

2017 年度

博士学位論文

クロゴキブリに寄生する線虫  
*Leidynema appendiculatum* の  
寄生進化学的研究

中部大学大学院

応用生物学研究科 応用生物学専攻

小澤 壮太

# 目次

## 第1章 諸言

1-1. ゴキブリ目昆虫	4
1-2. 線虫門 (Nematoda)	6
1-3. Oxyurida 目線虫を含めた寄生性の線虫	7
1-4. ゴキブリに寄生する Thelastomatidae 科線虫	8
1-5. 宿主と寄生性線虫の寄生・共生関係のメカニズムについての課題	9

## 第2章 外来種クロゴキブリに寄生する Thelastomatidae 科線虫についての調査

2-1. 背景	12
2-2. 材料と方法	13
2-3. 結果	17
2-4. 考察	22
2-5. 表 (Table 2. 1~Table 2. 6)	28
2-6. 図 (Fig. 2. 1~Fig. 2. 6)	34

## 第3章 外来種ワモンゴキブリに寄生する Thelastomatidae 科線虫についての調査

3-1. 背景	40
3-2. 材料と方法	41
3-3. 結果	44
3-4. 考察	51
3-5. 表 (Table 3. 1~Table 3. 6)	57
3-6. 図 (Fig. 3. 1~Fig. 3. 11)	65

第4章 クロゴキブリに寄生する線虫 <i>Leidynema appendiculatum</i> の宿主特異性の低さについて	
4-1. 背景	76
4-2. 材料と方法	77
4-3. 結果	80
4-4. 考察	83
4-5. 表 (Table 4.1 ~Table 4.4)	89
4-6. 図 (Fig. 4.1 ~Fig. 4.5)	94
第5章. 結言	102
引用文献	103
謝辞	121

## 第1章 諸言

### 1-1. ゴキブリ目昆虫

昆虫（昆虫綱）は、節足動物門の中でも多様な種を擁する綱の1つであり、近年、平均で550万種以上（260万～780万の範囲で）が世界中で生息していると推定されている（Stork et al. 2015）。これら昆虫は様々な環境に生息しており、植物の花粉を媒介する昆虫や、捕食の対象となり生態系ピラミッドを担う昆虫、分解者として栄養分をリサイクルする昆虫と自然界の大小様々なバランスを保つ上で欠かせない生物となっている（Gordon 1996）。

ゴキブリ目（Blattodea）も他の昆虫同様、昆虫綱に属しており、俗にゴキブリと呼ばれるものとともにシロアリも含まれる。ゴキブリは世界中の様々な場所に生息しており、例えば熱帯や温暖の森林、荒野、草原地帯、湿地、そして砂漠などにも生息している（Bell et al. 2007）。ゴキブリはこれら環境の中で、洞穴、鉱山、木や樹皮の隙間や、落ち葉、朽木、また別の社会性昆虫の巣などを生活の住処としたり、さらには住居、船舶、航空機などヒトによって作られた人工構造物に侵入したりもする（Roth and Willis 1960）。

ゴキブリの外部構造は、一般的な昆虫の中でも中型もしくは大型であり、頭部から腹部にかけて扁平で楕円形の形状であり、頭部を覆う前胸部を有し、感覚器官として長い触角も持っているところが特徴的である。これら外部構造に加えて、ゴキブリ種ごとに多様な形態を有しており、例えば、成虫の雌雄の前後の翅に極端な長短を有すもの（トルキスタンゴキブリ *Blatta lateralis* やヤマトゴキブリ *Periplaneta japonica* など）、また雌雄ゴキブリ間で体長や体幅を含めて、外部構造に明らかな相違を有すものと、顕著な性的二形性を持つものも存在する。さらに、多様な色彩や模様を有すものや甲虫類に擬態しているものなどもあり、実に様々である（Bell et al. 2007）。

また、ゴキブリの繁殖様式に関しては、基本的には卵生であり、硬く黒い外皮に卵が包まれた（卵鞘）状態で地上に産下される（クロゴキブリなども含まれる *Periplaneta* 属や *Eurycotis* 属など）。また卵生であるが、卵鞘自体の外皮が薄い種もあり、それらは卵を腹端で保持し、胚発生が進む間雌ゴキブリから水分の供給を受けている。これはチャバネゴキブリ科（Blattellidae）の複数の種で報告されている（チャバネゴキブリなどが含まれる *Blattella* 属や *Lophoblatta* 属

など)。また卵生以外の繁殖様式も確認されており、卵を形成した後、一旦体外へ排出した卵を体内の保育嚢に収容し、胚発生が進んで幼虫が孵化し脱出するまでの間、成虫から水分の供給を受ける卵胎生という繁殖様式もある。これは主にオオゴキブリ科 (*Blaberidae*) のゴキブリで報告されている (*Blaberus* 属など)。そして卵胎生の繁殖様式の中でも一旦体外へ卵を排出せず、直接保育嚢内で卵を生育させるものも有り、一部のオオゴキブリ科がこれに該当する (*Macropanesthia* 属など)。さらに胎生の繁殖様式のゴキブリも、1 種のみではあるが存在しており (*Diploptera punctata*)、不完全な薄膜に卵が包まれ、保育嚢内で水やたんぱく質の分泌物などが供給されて生育し、幼虫は孵化後に体外へ脱出する。以上のようにゴキブリ目昆虫は様々な繁殖様式を有して進化している (Bell et al. 2007)。加えて種数自体も 4,500 種以上が確認されていることから、ゴキブリ目昆虫は非常に繁栄している昆虫綱の 1 つであるといえる (Rentz 2014)。

ゴキブリの祖先種は石炭紀 (ca. 3 億 5 千万年前) から既に地球上に生息していたとする化石記録があり、以後、現在のように卵鞘などを用いた繁殖システムではなく産卵管を有していた点を除き、現在に至るまで形態的な変化もほとんどないまま、生存競争や厳しい気候変動にうまく対応しながら生き残ることができた。またゴキブリは 2 億 5 千万年前から 2 億年前にカマキリのグループと系統的に分岐していると考えられており (Misof et al. 2015)、生きた化石と言われている。このことから、ゴキブリは最も成功した昆虫群の 1 つであると考えられている (Grimaldi and Engel 2005)。

現在日本では、52 種 7 亜目のゴキブリが確認されている (Asahina 1991)。それぞれ、ゴキブリ科 (*Blattidae*)、チャバネゴキブリ科、ムカシゴキブリ科 (*Polyphagidae*)、オオゴキブリ科に分けられており、種数こそ多くはないが、複数の科のゴキブリが日本で生息している。これらゴキブリ種の内、7 種以外はすべて日本在来種であり、そして半分以上が本島以南に生息している。日本産ゴキブリ種の記載は大抵整理されてきたが (Asahina 1991)、現在でもゴキブリの生態や地理分布に関して不明な点が多く、現在でも新たな報告が重ねられている (Komatsu et al. 2013; Komatsu et al. 2014; Fujita and Machida 2014)。

世界中に 4,500 種以上が生息しているゴキブリであるが、様々な環境下に適応し、その地域に限定して生息している種がほとんどである。ところがそのうち

の僅か数種類のみが世界中に拡散しており、主にクロゴキブリ (*Periplaneta fuliginosa*)、ワモンゴキブリ (*P. americana*) とチャバネゴキブリ (*Blattella germanica*) が挙げられる (緒方ら 1975; Lee and Lee 2000; Miller and Meek 2004)。これらゴキブリは環境適応性が極めて高く、人間の経済活動の活発化に伴い、世界中に拡散・定着してしまい、そして衛生害虫として問題になっている (Appel and Smith 2002; Bell et al. 2007)。

これらの衛生害虫ゴキブリ種は、ヒトの居住環境に侵入し、食品や汚物を摂食し、自分の排泄物によって環境を汚染し、細菌やウイルス、カビなどの病原性微生物を媒介して問題を引き起こしている (Roth and Willus 1960; Guthrie and Tindall 1968)。また、マンソン裂頭条虫がオガサワラゴキブリを中間宿主とする報告や (Roth and Willus 1960; Schwabe 1951; Francisco et al. 2014)、ヒト蟯虫である *Enterobius vermicularis* の寄生性線虫の卵が複数のゴキブリ種から分離される報告例もあり (Roth and Willus 1960)、ヒトの病原体ベクターとしても問題を引き起こしている (Salehzadeh et al. 2007)。

## 1-2. 線虫門 (Nematoda)

線虫とは線形動物門 (Nematoda) に属する動物の総称である (石橋 2003)。線虫は、現在既知種が 2 万種以上と報告されているが、地球上には 1 億種生息しているのではないとも言われている程まだまだ未知種も多い (石橋 2003)。これら線虫の生育環境も多様であり、自分で自由に生活できる自活性線虫についても、細菌食性、糸状菌食性、捕食性、雑食性と様々な食性を持っている。土壌や海洋・干潟の環境変化に応じて、そこに生息する自活性線虫の種構成が変わることからも、線虫を環境指標に利用する研究も行なわれている (石橋 2003)。また自活性線虫の中でも *Caenorhabditis elegans* という種は、細菌を餌に室温で容易に培養でき、1 世代の生育時間が 3 日と非常に短く扱いやすいこと、さらに雌雄同体と雄の性があるため遺伝学的解析が容易なことから、モデル生物として普及している。医療分野などでも応用が期待されており、最近だとヒトの尿を用いた安価で簡便な癌診断法が開発されている (Hirotzu et al. 2015)。

また、自活性以外の生態を持つものとして、様々な生物を宿主として寄生する線虫があり、例えば植物を宿主として生活する植物寄生性線虫は、植物の細胞に口針を突き刺して養分を吸う。代表的な例として、カミキリをベクターとして利

用しながらマツを枯らす、マツ材線虫病の病原体マツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* が挙げられる。また昆虫に寄生し、昆虫を殺してしまう昆虫病原性線虫 (Entomo Pathogenic Nematode) もおり、殺虫活性を有する毒素生産細菌と共生関係を確立しているため、昆虫を積極的に殺してそれを自分の餌の養分としている。さらに、動物寄生性線虫も多く知られており、例えば、ヒトが海産魚介類を生食した際、本来の宿主ではないために幼虫移行症を引き起こしてしまうアニサキス *Anisakis simplex* や、飲み水を通してヒトに感染し、線虫が成長した際に、生息部位に水疱の腫瘍が形成されてしまうギニアワーム (*Dracunculus medinensis*: Guinea worm) などがある (石橋 2003)。これらは絶対寄生性の線虫であるとともに、中間宿主を介して終宿主内で性成熟する、複雑なライフサイクルを持つ。また、動物寄生性のなかでも Oxyurida 目の線虫は絶対寄生性線虫でありながら中間宿主を介さず、1 種類の宿主のみを利用するシンプルなライフサイクルである。

### 1-3. Oxyurida 目線虫を含めた寄生性線虫

Oxyurida 目線虫は、ヒト蟯虫 *Enterobius vermicularis* を含め様々な脊椎動物・無脊椎動物に寄生している「蟯虫」と呼ばれている線虫である。この Oxyurida 目線虫は、中間宿主を介さず、生活史のほとんどを宿主の腸内に寄生する絶対寄生性である。

Oxyurida 目の線虫はシンプルな感染サイクルであるといわれており (Adamson 1994)、まず宿主後腸内で成虫が産卵する。卵は宿主の糞とともに宿主体外へ排出され、胚発生が進んだのち宿主の摂食により感染する。摂食された卵は腸内で孵化し、幼虫から成熟して成虫となる。ヒト蟯虫 *E. vermicularis* はかつて、日本人に対して非常に高い感染率であったものの、現在、衛生面の改善などから感染率がほぼ 0% となっている (東京都予防医学協会年報 2017 年版 第 46 号より)。この線虫はヒトの後腸および直腸に寄生し、宿主特異性が高く、本来の宿主であるヒトに対して影響がほとんどないと言われている。しかし、別の宿主であるチンパンジー *Pan troglodytes* に感染した場合、本来の宿主ではないことから重大な影響を与えるという報告がある (Murata et al. 2002)。ただ、宿主に対する影響の詳細の大部分は未知な点が多い。

動物に広く寄生する Oxyurida 目線虫は、脊椎動物に寄生する Oxyuridea 上

科と無脊椎動物に寄生 *Thelastomatidea* 上科とに分けられる (Anderson 1990)。 *Oxyuridea* 上科の線虫は、硬骨魚類 *Teleostei*、両生類 *Amphibia*、有鱗目 *Squamata*、陸ガメ科 *Testudinidae*、有袋類 *Marsupiali*、皮翼類 *Dermoptera*、霊長類 *Primata*、げっ歯目 *Rodentia*、有蹄類 *Ungulata*、ウサギ目 *Lagomorpha*、鳥類 *Aves* など哺乳類を含めて、広く脊椎動物に寄生していることが報告されている (Anderson 1990)。また *Thelastomatidea* 上科の線虫も、倍脚類 *Diplopoda*、ゴキブリ目 *Blattodea*、直翅目 *Orthoptera*、甲虫目 *Coleoptera*、クロツヤムシ科 *Passalidae*、ガムシ科 *Hydrophilidae*、コガネムシ科 *Scarabaeidae* など、昆虫を含めた様々な無脊椎動物に寄生している。 *Thelastomatidea* 上科線虫の中でも、特にゴキブリ目とクロツヤムシ科、倍脚類（主にヤスデ）などに寄生する線虫種の多様性が高い (Anderson 1990)。

#### 1-4. ゴキブリに寄生する *Thelastomatidae* 科線虫

ゴキブリには、*Oxyurida* 目 *Thelastomatidea* 上科の *Thelastomatidae* 科線虫が寄生している。これら線虫は古くから記載・報告されており、*Oxyurida* 目線虫として節足動物から分離した最初の報告は 19 世紀初頭である。顕微鏡を用いて微小生物を観察することが最先端科学であった当時、先駆者である Joseph Leidy や Hammerschmidt K.E. などらによってこれら節足動物の寄生性線虫の記載報告などが行なわれ、動物の胚発生や細胞分裂の実験モデルとして利用されながら、感染サイクルなどが明らかにされてきた (Dobrovolny and Ackert 1934; Todd 1944; Adamson and Cleas 1989)。種の記載に関してはシノニムが少なからず存在していたため、Adamson と van Waerebeke らによって 5 科に整理されたものが現在広く支持されている (Adamson and van Waerebeke, 1992a; 1992b; 1992c)。しかし分類体系は十分整理されているとはいえ、種のデータも不十分でないものも多い中、新種が記載され続けていること、さらに既知あるいは未知であると判別がつかぬまま、未発表宿主からの既知線虫分離といった報告も続いており (最近では例えば Rehana et al., 2016; Carreno, 2017 など)、既知線虫種の再定義を含めて本線虫グループの整理が必要ではないかと考えられる。

*Thelastomatidae* 科線虫も、*Oxyurida* 目線虫全体に共通したシンプルな感染サイクルであり、線虫の卵が雌線虫から産み落とされた後、宿主の糞とともに卵



が排泄され、新しい宿主が卵の摂食をすることで感染が成立する (Adamson 1994; Ozawa et al. 2016)。また、Thelastomatidae 科線虫の生殖様式は、受精した卵が雌になり、未受精の卵が雄になる性決定システム haplodiploidy であると言われているが (Ainsworth 1991)、これを明確に示した研究報告はまだ無い。

これまで、Oxyurida 目の中でも Thelastomatidae 科線虫は数多くの線虫種が記載報告されており、属レベルで見ても Adamson と van Waerebeke 1992 からさらに 8 属が増えており、計 46 属となっている。走査型電子顕微鏡を用いた微細構造観察も、主に線虫の分類をおこなう上で重要な指標である (例えば Hunt, 1981; Yu and Crites, 1986; Jex et al., 2005; Carreno, 2007; Carreno and Tuhela, 2011; Morffe and García, 2013)。古くに記述・記載された線虫に関しては微細構造の形態情報が欠如しているため、再定義していく必要があると考えられている (Carreno 2014)。Thelastomatidae 科線虫の形態を観察する際に問題となるのは、種を定義する際に雌雄線虫ともに微細構造や形態観察をする必要があるが、体長が数 mm の雌線虫に対して雄線虫の大きさは 1mm 以下と小さいことや、1 頭のゴキブリ宿主から線虫種が複数種同時に分離される場合も多く、どの雌と雄が本当のペアであるのか判断する必要があるなど、困難な問題が挙げられる。この問題を解決するために、核ゲノムの 18S rRNA 遺伝子や 28S rRNA 遺伝子の領域を用いた種同定や線虫の分子系統解析も行なわれており (Spiridonov and Guzeeva 2009)、これは雄線虫の種判別やこれまで記載された線虫種の再定義や新種記載を行なう上で利便である。

## 1-5. 宿主と寄生性線虫の寄生・共生関係のメカニズムについての課題

Oxyurida 目線虫のうち、脊椎動物に寄生する Oxyuridea 上科線虫の宿主特異性が高く、また宿主との共進化が進んでいることが報告されているが (Hugo 1999)、無脊椎動物に寄生する Thelastomatidea 上科線虫のうち、特にゴキブリを宿主とする Thelastomatidae 科線虫では宿主と寄生性線虫の共進化が見られないと報告されている (Adamson and van Waerebeke 1992a; Jex et al. 2006a; Jex et al. 2006b; Jex et al. 2007)。ゴキブリ目は先ほど述べたように生きていた化石と言われているほど昆虫として歴史が長く、Oxyurida 目線虫と長くから

寄生関係を築いてきたと考えられる。このゴキブリとその寄生性線虫について調査することで、一般的な寄生・共生関係のメカニズムや進化について理解することが出来るのではないかと考えている。**Oxyurida** 目の線虫は絶対寄生性であり、線虫単独での培養は不可能であるため宿主とともに培養する必要がある。**Oxyuridea** 上科の線虫は脊椎動物に寄生するため、宿主を培養するには無脊椎動物よりも大規模になってしまい、実験を行なう上でも扱いが難しく、寄生・共生関係のメカニズムを調査する上で扱いづらい。**Thelastomatidea** 上科線虫は、昆虫や倍脚類に寄生する種が多く、扱いが容易なように見えるが、甲虫は完全変態の昆虫なので、培養は可能であるが手間がかかる。ゴキブリは不完全変態の昆虫であることから、頭数が増え始めたらある程度安定して維持・培養が可能であり、実験する上で非常に扱いやすい。さらにクロゴキブリなどの衛生害虫ゴキブリ種として知られている種については、より培養しやすく、ワモンゴキブリはこれまで生理学、神経学のモデルとして使用されているため、培養方法に関する知識や技術の蓄積もある (Bell and Adiyodi 1981)。

一方で、これまで述べてきた通り、ゴキブリに寄生する線虫 **Thelastomatidae** 科線虫は多くの情報が不足しており、分子情報もまだわずかの種で一部の遺伝子しか登録されていない (NCBI, National Centre of Biotechnology and Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。古くに記載されて以来、あまり研究がされていないため、分類学的情報のみならず線虫の感染サイクルに関しても改めて調べる必要があった。そこで、まず第 2 章では、環境適応性が高く、世界中に拡散しており、日本でも全国的に生息している衛生害虫ゴキブリ種の 1 つであり、日本で最も良く見かける衛生害虫であるクロゴキブリ (The Japanese Society of Pestology 2015) を選び、そこに寄生する **Thelastomatidae** 科線虫について調査した。第 3 章では、同じく衛生害虫ゴキブリ種として世界中に拡散しており、日本でも九州・南西諸島を中心に生息する外来種ワモンゴキブリに寄生する線虫について調査した。そして、最後に第 4 章として、このクロゴキブリに寄生する線虫 *Leidynema appendiculatum* を用いた人工感染実験法を確立し、このゴキブリ寄生性線虫の宿主範囲およびゴキブリ腸内の線虫の個体群構造について調査し、宿主と寄生性線虫の共進化について考察した。

以上の実験から、この寄生性線虫を用いて宿主と寄生虫間の相利共生関係の進化やメカニズムの理解をするためのモデルとなりうる基盤を得ることができ

た。今後、ヒトをはじめとした動物と寄生性線虫間で見られる相利共生関係の理解に繋がられるのではないかと考えている。

## 第2章 外来種クロゴキブリに寄生する *Thelastomatidae* 科線虫についての調査

### 2-1. 背景

ゴキブリは世界中で 4,000 種以上の種類が確認されており、種数も豊富であり (Bell et al., 2007)、日本でも 52 種のゴキブリ種の生息が確認されている (Asahina 1991)。このように非常に多くの種が地球上に存在するが、衛生害虫として問題となっているものはそのうちのわずか数種のみであり、主にクロゴキブリ (*Periplaneta fuliginosa*)、ワモンゴキブリ (*P. americana*) とチャバネゴキブリ (*Blattella germanica*) が挙げられる (緒方ら 1975; Lee and Lee 2000; Miller and Meek 2004)。衛生害虫であるこれらゴキブリは環境適応性が極めて高く、人間の経済活動の活発化に伴い、世界中に拡散・定着している (Appel and Smith 2002; Bell et al. 2007)。さらに、感覚や習性の異なる個体を出現させ、毒餌を拒絶して生き残ることができるようになるといった、高い適応能力も持ちあわせている (Wada-Katsumata et al. 2013)。

クロゴキブリは中国南方が原産地であると考えられており、現在、アジア、ヨーロッパ、オーストラリア、そして北米と南米で外来種として分布している。しかし、残っている古い文献を見ても本種の明らかな誤同定があったりするため、原産地の真偽や拡散・分布の歴史は未だ謎である (Appel and Smith 2002)。またこのゴキブリは、現在日本において最も身近な害虫の1種であり、日本在来種のゴキブリであるヤマトゴキブリ (*P. japonica*) はかつて屋内害虫の主流であったものの、現在クロゴキブリと取って替わり、屋外に追いやられている。

Oxyurida目のグループである *Thelastomatidae* 科に属する寄生性線虫は、現在まで多数のゴキブリ種から分離報告されている (Adamson and van Waerebeke 1992a)。これら線虫はゴキブリにとって古くからの寄生相手であり、宿主の後腸内で普遍的に生息しており、一般にhaplodiploidyという繁殖様式であると言われている (Ainsworth 1991; Adamson 1994)。寄生性線虫の雌成虫から産み落とされた卵は、宿主の糞とともに宿主体外へと排出され、そして新しい宿主個体が糞を経口摂食することで感染が成立する絶対寄生性である。またときにはゴキブリ1個体に寄生性線虫が同時に複数種感染していることもあり、

例を挙げると、各国の実験培養株のワモンゴキブリからは *Thelastoma bulhoesi*、*T. periplaneticola*、*Hammerschmidtella diesingi*、*Leidynema appendiculatum* といった4種の線虫が分離されている (Chitwood 1932; Dobrovolny and Ackert 1934; Adamson and Noble 1993; Connor and Adamson 1998; Shah 2007; Blanco et al. 2012; Ozawa et al. 2016; Rina et al. 2016)。したがって、これら世界に拡散・定着するゴキブリたちは、寄生性線虫とともに移動しているのではないかと考えられる。

日本全国的に存在しており、また衛生害虫として問題となっているクロゴキブリに寄生する線虫の報告例は未だないことから、私はクロゴキブリに寄生する線虫の調査をおこなうために、日本国内に定着するクロゴキブリを調査した。また、本線虫種の種同定に必要な特徴を明らかにするために、走査型電子顕微鏡を用いた線虫の微細構造の観察、線虫の遺伝子情報を取得し、分子系統解析も行った。さらに、宿主と寄生性線虫の寄生共生関係の進化やそのメカニズムについての研究基盤とするために、クロゴキブリ宿主に寄生する線虫の個体群構成 (後腸内における線虫性比および個体数)、さらに生活史のなかでゴキブリ宿主から唯一離れる時期である卵の初期胚発生についても同様に調査した。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. クロゴキブリ株およびその培養法

クロゴキブリ培養株4株 (それぞれ CU: 愛知県春日井市産、IK: 千葉県千葉市産、FE: 静岡県静岡市産、EE: 兵庫県赤穂市産) を本実験に使用した。IK (イカリ消毒)、FE (富士環境サービス)、EE (アース環境サービス) はそれぞれの企業から提供していただいた株である。これらの株は独立に採集され、実験用株として培養されていたものであるが、詳細な採集情報などは不明であった。CU株に関しては、2012年9月~11月の間、中部大学の春日井キャンパス内において捕獲した3頭の雌成虫ゴキブリを培養し、CU株として確立した。

これらゴキブリは逃走防止用に炭酸カルシウムを壁面に塗ったプラスチックの容器 (30 × 44 × 32 cm) に段ボールなどで棲み処を作り、霊長類用の餌 (東京、オリエンタル酵母 CO. LTD、PS-A: 主原料は小麦粉、トウモロコシ、脱脂大豆、魚粉、ピーナッツ粉、米粉) と飲み水を十分与え、室温 (約 25℃) で

培養した。

### 2-2-2. 寄生性線虫の分離および光学顕微鏡による観察

次に線虫の分離・観察をおこなうために、宿主ゴキブリの後腸を摘出した。ゴキブリの基節と腿節の間にある転節及び前翅、後翅を除去し、シラキウス時計皿の上に置いた。次に、ゴキブリの外部構造は頭部、胸部、腹部の三つの部位にわかれているので、頭部と胸部を解剖用ハサミで切り取り、腹部をゴキブリ生理食塩水（1,000 ml 当たり NaCl 9.32 g、KCl 0.77 g、NaHCO<sub>3</sub> 0.18 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01 g、CaCl<sub>2</sub> 0.5 g を蒸留水で溶かして調整。Bell et al. 1981）の入った新しいシラキウス時計皿へ移した。そして腹部を切り開いて後腸を摘出した後、後腸を縦にピンセットで切り開き、線虫を分離した。線虫はマウスピペットや線虫用のピッカーを用いて採取し、予めスライドガラス上にて作成した 5%アガーパッドに移した後（Shaham 2006）、シリコングリースをカバーガラス側面に塗って封入し、ノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察をおこなった。

この方法によって、高い解像度で線虫を観察することができたが、カバーガラスによる圧迫によって線虫の体の厚みが若干変わってしまうため、線虫の形態計測をおこなうために別の方法を開発した。厚さ約 250 μm のアガーパッドを作成し、中央に穴をあけ（ホールアガーパッド）、その穴の中にゴキブリ生理食塩水を入れ、生きた線虫を移した。アルコールランプでこのホールアガーパッドに移した線虫を熱殺したのち、カバーガラスをかけ顕微鏡観察及びマイクロメーターによる測定をおこなった（Fig. 2. 1）。

### 2-2-3. 寄生性線虫の初期胚発生観察

寄生性線虫が 1 細胞期から L2 ステージになるまでの胚発生を観察するために、以下の 3 つの方法によって 1 細胞期胚を採集した。

(1) **ゴキブリ糞からの採集**：複数頭のクロゴキブリ（EE 株）をそれぞれ別々の容器に移し、1 時間糞を排泄させた後、糞を採集しゴキブリ生理食塩水を入れたシラキウス時計皿の中に移動させた。実体顕微鏡で糞をほぐしながら、1 細胞期胚をマウスピペットで採集し、5%アガーパッドへ移した。全部で 8 個の 1 細胞期胚を採集し、ノマルスキー微分干渉顕微鏡で室温（25℃）条件下で連続

観察を行なった。1細胞期から4細胞期まで1時間ごとに写真撮影を行ない、4細胞期以降は、L2期まで24時間ごとに観察し、写真撮影を行なった。

(2) **子宮からの採集**：クロゴキブリ (EE株) を解剖して雌線虫を取り出し、別のシラキューズ時計皿に移した後、線虫の陰門から産み落とされた1細胞期胚を観察に用いた。産み落とされた1細胞期胚はマウスピペットで採集し、5%アガーパッドへ移した。全部で10個の1細胞期胚を採集し、同様にノマルスキー微分干渉顕微鏡で室温 (25°C) 条件下で観察しながら、4細胞期まで1時間ごとに写真撮影を行なった。4細胞期以降は、L2期まで24時間ごとに観察し、写真撮影を行なった。

(3) **子宮内の卵の観察**：線虫雌成虫の子宮の中には、卵殻がすでに形成された卵を多数保持している。そこで、クロゴキブリ (EE株) を解剖して取り出した雌線虫を5%アガーパッドへ移し、そのまま子宮内の卵をL2期まで24時間ごとに (1日ごとに) 室温 (25°C) 条件下で観察し、写真撮影した。雌成虫は間もなくして死んでしまうが、子宮内の卵は発生を続けた。3個体のゴキブリを解剖し、それぞれから1頭ずつの雌線虫を分離し、胚発生観察をおこなった。

#### 2-2-4. 統計解析

SPSS software と STATISTICA version 7.0 を用いて統計処理を行なった。ゴキブリ発達ステージ (1齢~5齢、終齢、雄雌成虫) の間に見られる、寄生する幼虫線虫と雌雄成虫線虫の数の関係性を判定するために、Tukey's test を行なった。95%有意水準で有意差検定し、集団間の有意差検定を行なった。

#### 2-2-5. 走査型電子顕微鏡を用いた寄生性線虫の形態観察

寄生性線虫の体は透明であるため、アガーパッドを用いたノマルスキー微分干渉顕微鏡観察によって、線虫の内部構造を鮮明に観察することが可能である。しかしこの方法では、形態観察による線虫種同定を行なう上で重要な口器形状や陰門の形状、また雄線虫の交接刺や乳頭の形状などといった表面微細構造を観察するのが難しい。そこで走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope、SEM) を用いて観察を行なった。

初めに、クロゴキブリを解剖して分離した線虫20頭以上をゴキブリ生理食塩

水の入ったガラス試験管に入れ、65°Cで線虫を熱殺した。次にリン酸緩衝液（NaCl; 16 g、KCl; 0.4 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2.88 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.48 g を蒸留水で溶かし、10 倍希釈し使用）で調整した 4%ホルムアルデヒドを別のガラス試験管に入れ線虫を移し、30 分間 4°Cで前固定した後、0.1 M リン酸バッファー（KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>（無水） 54.1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>（無水） 17.8 g を蒸留水に溶かした。pH 6.0）で調整した 2%グルタルアルデヒド溶液を加え、12 時間 4°Cで固定した。固定処理後、0.1 M リン酸バッファーで洗浄し、2%オスミウム酸溶液に線虫を移し、1 時間 4°Cで後固定した。それら線虫を金属性の容器に移し、エタノール溶液 30%、50%、70%、90%、95%、それぞれ 1 回ずつ、100%を 2 回ずつ、30 分間浸し、脱水処理を行ない、最後に t-ブタノールと 100%エタノール 1:1 の混合溶液に 30 分間、t-ブタノール溶液に 30 分間 2 回浸し、t-ブタノールに置換した。凍結真空乾燥装置（日立製作所製 ES-2030）を使用して凍結乾燥したのち、線虫をアルミ製粘着テープが敷かれたステージ上に移した。マグネトロンスパッタコーター（日立製作所製 E-1030）を用いて、非導電性の線虫試料を Pt-Pd で被覆し導電性を付与した。走査型電子顕微鏡（日本電子製 JSM-6510LA）を用い、Spot size 30、加速電圧 15 kV の条件で観察をおこなった。

### 2-2-6. 寄生性線虫の分子系統解析

線虫ゲノミック DNA は、Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit（Qiagen, USA）を用いてそれぞれ 1 頭ずつの雌線虫から抽出を行なった。リボソーマル RNA の大サブユニット（60S サブユニット）の 28S ユニット D2/D3 領域は、線虫用ユニバーサルプライマー、D2a: 5'-ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3' と D3b: 5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3'（Nunn 1992）を用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は、Wizard SV Gel and PCR clean-up system（Promega, USA）もしくは FastGene Gel/PCR Extraction Kit を用いて精製し、ABI3130xl sequencer（ABI, USA）によって塩基配列を解読した。

分子系統解析に用いた寄生性線虫は、クロゴキブリ CU 株、EE 株から分離したものを使用した。それら取得した塩基配列は、配列をアライメントし GenBank（NCBI、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）に登録してアクセッション番号を得た。系統解析を行なうために、すでに登録がなされていた Thelastomatidae 科線虫の配列を選択した。選択した配列は *Leidynema appendiculatum*



JQ343844、*L. appendiculatum* EU365630、*L. portentosae* GQ401114、*Cranifera cranifera* EU365632、*Hammerschmidtella cristata* EU365629、*H. diesingi* JQ343843、*H. diesingi* EU365628、*Thelastoma* sp. JQ343845、*Thelastoma* sp. GQ368468 であり、アウトグループとして *Ascaris lumbricoides* AY210806 の配列を使用して系統解析を行なった。

ClustalW multiple alignment は BioEdit version 7.1.9 (Hall 1999) を用いて作成した。系統樹は最尤法を用いて進化距離から作製し、MEGA 6.0 software (Tamura et al. 2013) を用いて、キムラ 2 パラメーターモデル (Kimura 1980) +G で構成し、系統樹の信頼性はブートストラップ検定 1000 反復 (Felsenstein 1985) を行なって評価した。各配列の組み合わせ比較をしたときにみられる配列鎖の割合%は、MEGA 6.0 software を使って、ペアワイズ比較によって求めた (Chilton et al. 1995)。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 形態観察によるクロゴキブリ寄生性線虫の種同定

日本産クロゴキブリ 4 株から、雄雌成虫及び各齢の幼虫計 120 頭を解剖したところ (Table 2.1)、寄生性線虫の存在を確認することができた。すべてのクロゴキブリ個体から、寄生性線虫 1 種のみが 100%分離することができた。分離した寄生性線虫の形態観察及び計測をした特徴を以下に述べる。

寄生性線虫の雌線虫は全体に特徴的なひだ (annuli) があり、頭部先端のやや後方から翼状構造が顕著に見られ、それが後部食道球付近で小さくなり、肛門付近まで伸びていた (Figs. 2. 2 A、B、C)。この線虫は、*Hammerschmidtella* 属線虫のような丸い形の中部食道球 (Metacarpus) はなく、前部食道球から中部食道球にかけて細長い、*Thelastoma* 属ほど長くはない形状であった (Figs. 2. 2 A、B、Fig. 2. 5 A)。中部食道球と後部食道球 (Terminal bulb) との間の境界である峡部 (Isthmus) は短く、神経環 (Nerve ring) は中部食道球のほぼ中心に位置していた (Figs. 2. 2 A、B、Fig. 2. 5 A)。口腔 (Buccal cavity) には、鋸歯構造が観察できた (Fig. 2. 5 A の白矢印)。後部食道球に続いて腸管が有り、腸管は *Leidynema* 属特有の二股形状をしていた (Pal et al. 2014)。総排泄腔 (Excretory pore) は後部食道球の後ろ、腸管の二股の分岐より少し後方付近に

あった (Figs. 2. 2 A)。陰門はほぼ中心に位置しているが、やや頭部に近かった。卵巣は体のそれぞれの端から絡み合いながら伸びて両方が子宮まで届いていた。成虫になってからでも線虫の体が大きくなり、それにしたがって子宮の大きさも大きくなり、子宮内の保有卵数も格段に増えていった。卵は楕円形で、*Hammerschmidtella* 属線虫のものと形が似ていた。雌成虫個体の全長、各器官・部位の計測結果については、Table 2.2 に示した。

雄線虫も同様に全体に特徴的なひだがあり、頭部先端からやや後方より翼状構造がみられ、交接刺の少し前まで伸びていた (Figs. 2.2 E、F)。腸管は雌で見られるような二股となっておらず、尻尾はとても短く小さかった (Figs. 2. 2 F、G)。雄も雌と同様、丸い中部食道球ではなく、神経環は中部食道球の中心より後ろで峡部に近い位置にあり、排泄腔は体の中心より前方に位置していた (Fig. 2.2 E、Fig. 2.5 B)。雄の尾端にある尾乳頭 (Caudal papillae) は全部で 5 対あり、1 対の大きな乳頭は亜腹側の肛門前方、3 対の乳頭が交接刺 (Spicule) のすぐ後ろ、1 対の乳頭が背側の尻尾後ろに確認できた (Fig. 2. 4 C)。雌成虫個体の全長、各器官・部位の計測結果については、Table 2. 3 に示した。

形態測定の結果、本線虫はワモンゴキブリ *P. americana* より分離報告例のある既知種 *L. appendiculatum* であると同定した (Dobrovolny and Ackert 1934; Adamson and van Waerebeke 1992a; Shah 2007; Nedelchev et al. 2013)。

### 2-3-2. *L. appendiculatum* の胚発生

クロゴキブリに寄生する線虫 *L. appendiculatum* の胚発生についてのデータを得るために、1 細胞期の胚を集め、ノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いて生きたまま胚発生観察を行なうことができた。

クロゴキブリ (EE 株) から分離された雌線虫の子宮内には、卵殻が形成された多数の卵が確認できた (Fig. 2. 3 a)。子宮内の卵のほとんどは 1 細胞期であり (Fig. 2. 3 b)、ゴキブリの新鮮な糞のなかには発生のある程度進んだ卵から発生の進んでいない 1 細胞期の卵まで、様々なステージの卵が含まれていた。まずは、胚発生パターンを観察するために、クロゴキブリの新鮮な糞より採集した 1 細胞期胚をアガーパットに移し、連続観察をおこなった。

1 細胞期の胚は、卵殻内全体に細胞質が広がっており、前核がひとつ見られるものや、2 つみられるものが混在していた (Figs. 2. 3 b、c)。その後、細胞質が

徐々に凝縮されていき、前核が消失した (Fig. 2. 3 d)。このとき、原形質流動や前核融合、偽卵割といった、モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* や植物寄生性線虫 *Bursaphelenchus xylophilus* で確認されるような現象がはっきり観察できなかつた。しばらくすると大小の細胞へと不等割し、2 細胞期になった (Fig. 2. 3 e)。その後大きい細胞が先に等分割し、続いて小さい細胞も等分割し、菱形状の 4 細胞期になった (Fig. 2. 3 f)。そして分裂を繰り返しながら細胞数を増やし、多細胞期となった (Fig. 2. 3 g)。徐々に線虫の形が形成されるに従い、胚の運動が確認できるようになった。形態形成や器官形成が活発に行なわれており、線虫の形態および食道の咽頭筋が明確に確認できたものを L1 期とした (Fig. 2. 3 h)。L1 期の線虫はしばらく卵殻内で活発に動いていたが、その後脱皮をした後、倒卵形に似た形状の L2 期になり、以後運動及び成長や脱皮は見られなかつた (Fig. 2. 3 i)。観察したすべての卵の胚は、L2 期に達したことを確認できた。

Table 2. 4 は、3 つの方法によって採集した *L. appendiculatum* 胚 (1. ゴキブリ糞からの採集、2. 子宮からの採集、3. 子宮内の卵の観察) における胚発生時間を示した。糞から採集した卵について、1 細胞期から 2 細胞期までの胚発生にかかる時間は  $4.6 \pm 1.7$  時間、子宮から採取した胚は  $2.5 \pm 1.4$  時間であった。また、4 細胞期までに要する時間は、糞から採集した卵は  $8.0 \pm 2.0$  時間、子宮から採集した卵は  $6.4 \pm 6.4$  時間であった。L1 幼虫期までに要する時間は、糞から採集した卵は  $2.9 \pm 0.8$  日、子宮から採集した卵は  $6.9 \pm 2.7$  日であった。L2 幼虫期までに要する時間は、糞から採集した卵は  $5.6 \pm 1.1$  日、子宮から採集した卵は  $9.5 \pm 3.3$  日であった (Table 2. 4)。糞から採集した卵 (N=8) および子宮から採集した卵 (N=10) は、すべて L2 期まで発生した。

一方、3 頭の雌成虫の子宮内でそのまま、計 238 個の卵の発生を観察したところ、84 個のみが L2 期まで発生が進み、他の 154 個の卵は L2 期になる前に細胞が分解されて死亡した。L2 期まで正常に発生の進んだ 84 個の卵のみをデータに示すと、1 細胞期から 2 細胞期までに要した時間は  $5.0 \pm 11$  日、4 細胞期までは  $29.7 \pm 7.42$  日、L1 幼虫期までは  $35.1 \pm 5.91$  日であった (Table 2. 4)。

### 2-3-3. クロゴキブリ宿主内における *L. appendiculatum* の個体群

#### 構成

解剖した日本産クロゴキブリ株計 120 個体には、1 種の線虫種 *L. appendiculatum* が 100% の確率で寄生していることがわかった。つぎに、これらクロゴキブリに寄生する *L. appendiculatum* の個体群構成を調べるために、解剖した 120 頭の宿主個体ごとに、寄生する線虫の性、ステージおよびその頭数を調べた。なお、クロゴキブリおよび寄生性線虫は、幼虫時期にその雌雄判別ができない。

様々なステージのクロゴキブリを計 120 頭解剖し、感染する寄生性線虫 *L. appendiculatum* の個体群構成を Table 2.5 に示した。クロゴキブリ 1 頭当たりに寄生する線虫の雄成虫の平均頭数は、全体で  $1.0 \pm 1.1$  頭、線虫の雌成虫は  $3.5 \pm 6.3$  頭、線虫の幼虫は  $4.8 \pm 7.0$  頭であった。孵化して間もないクロゴキブリ 1 齢幼虫であっても、すでに *L. appendiculatum* の感染が確認でき、1 齢のクロゴキブリ 1 頭当たりに寄生する線虫の雄成虫の平均頭数は  $0.6 \pm 0.5$  頭、雌成虫は  $0.7 \pm 0.5$  頭、幼虫は  $1.1 \pm 1.1$  頭であった。幼虫が成長してゆくに従い、寄生する線虫の平均頭数は微増し、クロゴキブリ雄成虫 1 頭当たりに寄生する線虫の雄成虫の平均頭数は  $0.9 \pm 0.3$  頭、雌成虫は  $3.2 \pm 2.2$  頭、幼虫は  $3.9 \pm 6.0$  頭であった。またクロゴキブリ雌成虫 1 頭当たりに寄生する線虫の雄成虫の平均頭数は  $1.7 \pm 2.8$  頭、雌成虫は  $11.7 \pm 13.2$  頭、幼虫は  $11.9 \pm 10.5$  頭であった。

クロゴキブリ各齢に寄生する雄線虫、雌成虫、幼虫それぞれの個体数に見られる差の有意性について、Tukey's test により検定した。どのクロゴキブリステージにおいても、寄生する線虫雄個体の数に差がなかった。また、線虫雌個体の数については、クロゴキブリ雌成虫に寄生する場合を除き、すべてのクロゴキブリステージにおいて寄生する線虫個体数に差がないことがわかった。したがって、クロゴキブリ 1 頭に寄生する線虫の雄の個体数は常に 1 個体に制御されており、また雌線虫の場合は、クロゴキブリ雌成虫以外は 3 頭前後に制御されていることがわかった。幼虫は雄雌線虫と比較して個体数が多いことから、恒常的に寄生性線虫卵が宿主体内に供給されて孵化幼虫があらわれるが、既に占有する雌雄成虫個体によって、幼虫が成虫になる前に排除されているのではないかと考えられた。

#### 2-3-4. SEM を用いた寄生性線虫の微小構造の形態観察

日本各地のクロゴキブリ株には、すべて同一線虫種 *L. appendiculatum* が寄生していることを発見した。つぎに、日本産のクロゴキブリに寄生する *L. appendiculatum* 雌線虫と雄線虫の微細構造の観察を行なうために、SEM による観察をおこなった。

雌線虫は SEM での観察で口器の形状を観察し、この線虫には 8 つの乳頭 (papillae) が観察でき、双器 (amphids) は 1 対観察できた (Fig. 2. 4)。雄線虫は、DIC で観察できた乳頭 (全部で 5 対) をより明瞭に観察できた (Fig. 2. 4)。またそれだけではなく、翼状構造や体全体の形状も観察できた。個体によっては雌雄とも体に細菌のようなものが付着していた (Fig. 2. 4 A、Fig. 2. 4 D)。

#### 2-3-5. *L. appendiculatum* 系統間でみられる rRNA 遺伝子配列の

##### 比較

今回分子系統解析に用いた寄生性線虫は、クロゴキブリ CU 株および EE 株から分離したものであり、遺伝子配列データからも 2 つの株由来の線虫は *L. appendiculatum* であると判断できた。

また、*L. appendiculatum* 4 株の配列間に見られる差異 (%) をペアワイズ法によりもとめた (Table 2. 6)。日本産クロゴキブリ 2 株から分離した寄生性線虫 *L. appendiculatum* は、配列の相同性は 100% であった (EE 対 CU)。また、海外産 2 株 *L. appendiculatum* (アルゼンチン産：アクセッション番号 JQ343844、ロシア産：アクセッション番号 EU365630) の配列間の相同性が 100% であったが、これらと日本産株との間には 1.6% の違いが確認された。また、*L. appendiculatum* と同じ属の線虫である *L. portentosae* (アクセッション番号: GQ401114) と比較したところ、日本産 *L. appendiculatum* とは 9.7%、外国産 *L. appendiculatum* とは 10.2% の相違があった。

系統樹を作成しても、日本産 *L. appendiculatum* (CU 株、EE 株) と外国産 *L. appendiculatum* (アルゼンチン JQ343844、ロシア EU365630) と 2 つにクレードが分かれる結果となった (Fig. 2. 6)。

## 2-4. 考察

### 2-4-1. クロゴキブリに寄生する線虫 *L. appendiculatum* について

日本産クロゴキブリ 4 株を解剖したところ、すべての個体において *Leidynema appendiculatum* という 1 種類の寄生性線虫が 100 % の確率で寄生していることを発見した。クロゴキブリに寄生する線虫に関する報告は今までになく、本報が世界初である。しかし、*L. appendiculatum* は既知種であり、ワモンゴキブリ *P. americana* やコワモンゴキブリ *P. australasiae*、トウヨウゴキブリ *Blatta orientalis* などといった、クロゴキブリと同じように世界的な衛生害虫として広く知られているゴキブリ目宿主からも分離されているコスモポリタン種である (Todd 1944; Poinar 1975)。加えて、フロリダキゴキブリ *Eurycotis floridana*、マダガスカルオオゴキブリ *Gromphadorhina portentosa*、ブラベラスオオゴキブリ *Blaberus atropos*、*Hormetica scrobiculata*、*Blaptica* sp. などといった、ペットの爬虫類の餌として流通しているゴキブリ、もしくはペットとして流通しているゴキブリからも、*L. appendiculatum* が分離されたといった報告例もある (Poinar 1975; Blanco et al. 2012; Ozawa and Hasegawa 2018)。またこの線虫はゴキブリ以外の昆虫 (カミキリの 1 種 *Oncideres* sp. の幼虫) (Stock, 1988) からまた分離されている。但し、こういった報告の多くが古い文献であり、宿主より分離した線虫の遺伝子情報はおろか、形態情報さえ残っていないため、本当に *L. appendiculatum* であったのかどうかの信頼性は低いため、再調査が必要であるといえる。

これらゴキブリ (*E. floridana*、*B. atropos*、*H. scrobiculata*、*Blaptica* sp.) の自然生息地は中南米とされているが、世界中を移動する衛生害虫ゴキブリ (*P. fuliginosa*、*P. americana*、*P. australasiae*、*B. orientalis*) の拡散経路や原産地は正確にはわからない。同じ環境に生息している節足動物は、Thelastomatidae 科線虫を共有している場合が報告されている (Jex et al. 2005; Jex et al. 2006a、2006b)。したがって、これらゴキブリが共通して *L. appendiculatum* を持っているということであれば、これらの原産地が共通であるか、もしくは *L. appendiculatum* の宿主特異性が低いかを示しているのではないかと考える。

ワモンゴキブリ (*P. americana*) 培養株に *H. diesingi* と *L. appendiculatum*

の 2 種類の寄生性線虫が共感染していたが、宿主ゴキブリが脱皮した際に、*L. appendiculatum* は脱落してしまったという報告がある (Hominick and Davey 1972)。ワモンゴキブリが実験室で高密度に培養されていれば、*L. appendiculatum* は宿主への再感染チャンスが非常に高く、よってこのようにワモンゴキブリが脱皮する度に寄生性線虫が宿主から脱落しようとも、寄生性線虫の感染率が高く維持され得ると考えられる。また、本研究室で培養している脱皮直後のクロゴキブリを解剖してみたが、宿主ゴキブリから *L. appendiculatum* が脱落してしまうような現象を観察することはなく、定着・維持されているようであった (データ未記載)。この結果は、*L. appendiculatum* にとって、クロゴキブリのほうがワモンゴキブリより適切な宿主であることを示しているのではないかと考えられる。さらに、次の 3 章以降で説明するが、本研究室で培養しているワモンゴキブリ 1 株計 97 個体、沖縄県石垣市で捕獲したワモンゴキブリ計 6 個体を解剖したところ、*Thelastoma bulhoesi* および *Hammerschmidtella diesingi* の 2 種が同時に高確率で寄生していることがわかったが、*L. appendiculatum* が寄生している個体は確認できなかった。このことも、*L. appendiculatum* 本来の宿主がクロゴキブリではないかという仮説を支持する結果であると考えられる。

ワモンゴキブリの後腸内では、最大 4 種の寄生性線虫 *T. bulhoesi*、*T. periplaneticola*、*H. diesingi*、*L. appendiculatum* が同時に寄生していたという報告がある (Connor and Adamson 1998; Adamson and Noble 1993; Hominick and Davey 1972)。宿主 1 個体に対し複数の線虫種が感染している報告例はいくつかあり (Jex et al. 2005; Jex et al. 2006a, 2006b; Carreno and Tuhela 2011)、私もこれまで日本で捕獲したオオゴキブリ *Panesthia angustipennis spadica* から、14 種類の未記載線虫種を分離しており、現在順次新種記載に向けた準備を進めている (Ozawa and Hasegawa, 未報告データ)。クロゴキブリの本来の生息地は東アジア (中国) ではないかと言われており、したがって日本においては外来種であると考えられている。しかし、その詳細は未知であり、もし原産地の近くに生息するクロゴキブリの寄生性線虫を調べた場合、複数の線虫種が感染しているのではないかと考えられる。そして、世界中に拡散する間に、*L. appendiculatum* 以外の寄生性線虫が脱落してしまったのではないかと考えられる。これは寄生性線虫の種の多様性を 1 つの指標として、クロゴキブリ

の原産地を予測することも可能ではないかとする新たな提唱である。

### 2-4-2. *L. appendiculatum* の形態的特徴

線虫種を決定するうえで、生態的特徴と同時に形態的特徴の詳細を明確に観察する必要があり、体長や体幅の計測、陰門や神経環といった各器官の配置からその種の特徴を捉える Morphometrics (線虫形態計測) が基本となる。また、口器形状、頭部感覚器官 (アンフィド amphid など) の形状や位置、陰門形状、雄の感覚突起である尾乳頭 (caudal papillae) の数や位置等も、種ごとにそれぞれ特徴を持っている。クロゴキブリに寄生している線虫 *L. appendiculatum* は、これまでワモンゴキブリから分離報告されていた既知種ではあるものの、SEM による微細構造の詳細観察は今まで報告されていなかった。光学顕微鏡による観察には微細構造の観察には限界があり、*L. appendiculatum* 雄の感覚突起が 3 対 6 個であるとした不鮮明な報告を基にして本種を同定した論文や (Dobrovolny and Ackert 1934; Adamson and van Waerebeke 1992a; Shah 2007)、*Leidynema* 属線虫の新種記載をしている論文 (Singh et al. 2014) もある。また、5 対 10 個あるとしている報告もある (Nedelchev et al. 2013)。今回、SEM によって 5 対 10 個であることを確認することができ (Fig. 2. 4 C)、またリボソーム RNA 遺伝子の部分配列を付加して本種を定義することができた (Fig. 2. 5)。今後ゴキブリ寄生性線虫の種同定を行なっていく際には、遺伝子配列と電子顕微鏡による観察の両方が必須であると考えられる。

### 2-4-3. *L. appendiculatum* の初期胚発生

線虫受精卵の第一分裂の不等割によって生じる 2 つの割球のうち、大きい細胞が将来の前方部 (頭部)、小さい細胞が将来の後方部 (尾部) となり、ここで前後軸がはじめて明らかとなる (Hasegawa et al. 2004; Yoshida et al. 2009)。モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* の場合、前後軸決定において精子の侵入点が重要となっている。すなわち、精子が卵内に持ち込んだ中心体から展開する微小管、およびアクチンといった細胞骨格が、原形質および卵膜付近に存在するタンパク質の再配置をおこない、前後軸極性をつくりだす (Galli and van den Heuvel 2008)。ゴキブリ寄生性線虫の性決定様式は、未受精卵が雄に



なり受精卵が雌になるという haplodiploidy (半倍数性) であるといわれているが (Adamson et al. 1989; Adamson 1994)、これを決定するような報告は知られていない。私は、*L. appendiculatum* の細胞分裂が始まる前の初期胚を観察した際に、2つの前核が見られる場合と1つの前核しか見られないものと、2種類のパターンを観察できた。しかし、前核の出現は見られるものの、その後の前核の動きや、2細胞期以降の核膜形成も本線虫種では明確には観察できなかった。ワモンゴキブリ *P. americana* に寄生する線虫 *H. diesingi* および *T. bulhoesi*、さらにオオゴキブリ *Panesthia angustipennis spadica* に寄生する未記載線虫種数種の初期胚発生を観察しても、核膜構造は明確に観察できなかった (データ未記載)。この結果から、Thelastomatidae 科線虫の多くの線虫胚に見られる特徴なのではないかと考えられる。また、第一分裂が始まる前の1細胞期の胚において、細胞質の流動、偽分割、鮮明な前核の様子などは観察できなかった。したがって、*L. appendiculatum* 初期胚発生における前後軸決定の仕組みは、*C. elegans* とは全く違った仕組みではないかと予測できる。

また、卵殻形成された卵が子宮内に留まっていた場合、産卵されて子宮外に排出された胚と比較して、胚発生時間がとても長い時間を要した (Table 2. 4)。有性生殖をおこなう2倍体生物の卵母細胞は、減数分裂第一分裂前期ディアキネシス期で静止しており、受精後に減数分裂が再開し、そして精子由来の前核と融合して2倍体となる (Hasegawa et al. 2006)。*L. appendiculatum* は haplodiploidy であるといわれており、ある程度の割合の卵母細胞は受精を待たずして細胞分裂が始まるということであると考えられる。つまり、子宮内で卵の発生を止めるための何らかの仕組みが備わっているのか、あるいは産卵後に発生を開始するような機構があるのではないかと考えられる。卵母細胞の中で、受精するものと受精しないものはどのように決められているのか、受精しなかった卵子は、どのようにして倍数性を維持しているのか、性決定機構の分子メカニズムはどのようになっているのか、このようなメカニズムを獲得してきた進化の原動力は何なのか、今後本線虫種の初期胚を用いた分子生物学的手法により、明らかにできるのではないかと考えている。

#### 2-4-4. *L. appendiculatum* の個体群構成

クロゴキブリ後腸内に寄生する *L. appendiculatum* 雄線虫の平均頭数は、1頭

に固定されており、雌線虫の頭数は2~3頭に固定されていた。また、幼虫線虫は常に宿主ゴキブリ内に存在していることから、線虫卵の供給と排出が連続的に生じることで、この寄生性線虫の特徴的な個体群が維持されているのかもしれない。他の *Thelastomatidae* 科線虫種においても、このような個体群維持の現象が報告されており、雄1頭に対して雌複数頭である (Hominick and Davey 1973; Zervos 1987; Zervos 1988abc; Adamson and Noble 1993)。 *L. appendiculatum* はまた、ワモンゴキブリ成虫内においても同様にその個体群構成が維持されている報告がある (Hominick and Davey 1972)。集団内における性比のコントロールとして、幾つかユニークな生物の例をあげると、カニクサと呼ばれるシダ植物の1種は前葉体発達過程の後期に植物ホルモンに似た構造のアンセリジオーゲンを前葉体外に分泌する。それを発達初期の前葉体に取り込み、最終的にジベレリンを合成する。このジベレリンによって、造精器の形成が誘導されるとともに造卵器の形成が阻害され、発達初期の前葉体が雄へと分化し、雄の数が增加することで、集団内の性のバランスを調節し、自殖の必要性をなくすことで、遺伝的多様性が維持されているといった報告がある (Tanaka et al., 2014)。クマノミ類の魚は、雄性成熟の性転換をおこなうことで、社会構造をコントロールすることは古くからよく知られている (Moyer and Nakazono 1978)。また、ゴキブリ寄生性線虫の生殖様式であるといわれる haplodiploidy は、社会性昆虫の間でよく進化した性決定様式である。

このように生物の性決定様式や仕組みは、多くの生物を用いて研究されている。寄生性線虫の性比のコントロールに関する研究は、現象を捉えた報告のみであり、そのメカニズムや種の存続における有意性についてのクリティカルな報告は全くなく、チャレンジングなテーマである。ゴキブリはプラスチックケースで容易に飼育することができ、寄生性線虫も同時に培養することができる。このことから、絶対寄生性の線虫のなかでは扱いやすい生物であると考えられ、寄生性線虫の研究モデルとしても有用であるといえる。

#### 2-4-5. *L. appendiculatum* の系統関係

顕微鏡が発明された初期の頃よりゴキブリ寄生性 *Thelastomatidae* 科線虫の存在は知られており、この頃から多数の種が記載され始めた (例えば Leidy 1850; Hammerschmidt 1838; Walton 1927)。生物種の記載・分類をするうえで、最近

では生態および形態情報に加えて分子情報が充実してきている中、本線虫およびその近縁種の情報は極めて乏しい。リボソーマル RNA 遺伝子の 60S サブユニット (60S サブユニット) の 28S ユニット D2/D3 領域が、Thelastomatidae 科線虫の系統関係を調べる上で有用であり、この領域を得るための汎用プライマーも存在する (Nunn 1992)。

ロシア産およびアルゼンチン産の *L. appendiculatum* を加えて、クロゴキブリ各系統に寄生する *L. appendiculatum* のこの領域の配列を比較すると、日本産と外国産とで異なるクレードを形成した (Table 2. 6、Fig. 2.5)。クロゴキブリが様々な地域に拡散・定着するとともに、本線虫種も各地に拡散し、そして在来種ゴキブリに寄生性線虫が感染しているかもしれない。もしくはこれらは形態的に区別ができない隠蔽種 (cryptic species) であるかもしれない。

今回は遺伝子同定のために 28S ユニット D2/D3 領域を PCR で増幅させて遺伝子同定したが、ミトコンドリアの CO1 遺伝子を用いて霊長類の寄生性線虫についての系統関係が報告されている (Foitová et al. 2014)。*L. appendiculatum* のミトコンドリア遺伝子配列については、未だ報告がなく、種内変異を調べるうえで有益な情報となるかもしれない。クロゴキブリと *L. appendiculatum* 両方にとって有効な遺伝子配列情報を用いれば、クロゴキブリの原産地や拡散経路の推定などもできるかもしれないと考える。

## 2-5. 表 (Table 2. 1~Table 2. 6)

Table 2. 1 解剖したクロゴキブリ株の性、齢およびその頭数

	Total	M	F	Last	5 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>	3 <sup>rd</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>
Total	156	25	39	13	13	14	15	23	14
CU	61	1	3	4	7	5	11	21	9
EE	40	4	10	1	6	9	3	2	5
FE	12	2	3	6	-	-	1	-	-
IK	7	3	2	2	-	-	-	-	-

クロゴキブリ培養株 4 株、CU：愛知県春日井市産、IK：千葉県千葉市産、FE：静岡県静岡市産、EE：兵庫県赤穂市産。M、雄成虫；F、雌成虫；Last、終齢（6<sup>th</sup>）齢；5<sup>th</sup> から 1<sup>st</sup>、5<sup>th</sup> から 1<sup>st</sup> 齢の幼虫。幼虫のうち、形態からの雄雌判断ができない。すべての個体に 1 種類の寄生性線虫 *L. appendiculatum* が寄生していた。

Table 2. 2 日本産クロゴキブリに寄生する *L. appendiculatum* 雌成虫の形態測定

Character	female (N=20)
L (Body Length)	2575.0 ± 314.6 μm (1983.4–3225.0)
a (body length/maximum body width)	10.7 ± 1.2 μm (9.0–13.1)
b (body length /oesophagus length)	6.2 ± 0.9 μm (4.7–8.2)
c (body length/tail length)	4.3 ± 1.3 μm (3.2–7.9)
Maximum body width	242.4 ± 37.3 μm (190.0–325.0)
Buccal cavity length	19.6 ± 4.1 μm (12.5–28.2)
Buccal cavity width	0.9 ± 2.0 μm (5.7–13.3)
Oesophagus length	415.7 ± 19.9 μm (360.0–451.4)
Corpus length	267.6 ± 22.3 μm (210.0–314.3)
Isthmus length	24.7 ± 5.7 μm (12.9–38.6)
Posterior bulb length	106.7 ± 8.1 μm (88.6–124.5)
Posterior bulb width	118.0 ± 11.4 μm (101.4–147.7)
Nerve ring-anterior end	163.6 ± 22.2 μm (122.9–240.0)
Excretory pore-anterior end	609.3 ± 170.2 μm (450.0–1216.5)
Vulva-anterior end	1026.8 ± 254.8 μm (600.0–1471.4)
Tail length	619.0 ± 114.5 μm (374.3–797.1)
Egg length (N = 30)	114.8 ± 6.5 μm (102.9–125.7)
Egg width (N = 30)	43.0 ± 2.0 μm (40.0–47.1)

雌成虫 (N 頭数 = 20 頭) の各器官の測定結果を示しており、左側が線虫の各器官、右側が測定結果を示している。測定結果は、平均値 ± 標準偏差 μm (最小値—最大値) を示している。

**Table 2. 3** 日本産クロゴキブリに寄生していた *L. appendiculatum* 雄成虫の形態測定

Character	male (N=14)
L (body length)	704.1 ± 262.2 μm (351.4–1230.0)
a (body length/maximum body width)	12.4 ± 2.4 μm (9.0–16.4)
b (body length /oesophagus length)	3.5 ± 1.2 μm (1.9–5.9)
c (body length/tail length)	87.6 ± 48.5 μm (53.6–239.5)
Maximum body width	55.9 ± 14.6 μm (31.4– 76.5)
Buccal cavity length	14.6 ± 2.1 μm (10.8–17.4)
Buccal cavity width	6.3 ± 0.9 μm (4.3–7.5)
Oesophagus length	199.9 ± 26.2 μm (161.4–234.3)
Corpus length	122.1 ± 22.7 μm (81.0–151.1)
Isthmus length	22.5 ± 5.5 μm (11.6–34.0)
Posterior bulb length	45.9 ± 6.7 μm (34.0–54.8)
Posterior bulb width	42.0 ± 5.3 μm (32.4–49.0)
Nerve ring-anterior end	122.4 ± 31.0 μm (59.8–159.3)
Excretory pore-anterior end	284.2 ± 71.3 μm (175.1–430.0)
Spicule length	40.0 ± 3.1 μm (34.0–44.0)
Tail length	8.7 ± 2.7 μm (4.2–12.9)

雄成虫 (N 頭数 = 14 頭) の各器官の測定結果を示しており、左側が線虫の各器官、右側が測定結果を示している。測定結果は、平均値±標準偏差 μm (最小値—最大値) を示している。

**Table 2. 4** 各条件で採集した卵について、1細胞期から4細胞期、第1期幼虫（L1）および第2期幼虫（L2）までに要する時間

	N	2-cell	4-cell	L1	L2
糞から採集 <sup>1</sup>	8	4.6 ± 1.7 h	8.0 ± 2.0 h	2.9 ± 0.8 d	5.6 ± 1.1 d
子宮から採集 <sup>1</sup>	10	2.5 ± 1.4 h	6.4 ± 6.4 h	6.9 ± 2.7 d	9.5 ± 3.3 d
子宮内 <sup>1</sup>	84	5.0 ± 11 d	29.7 ± 7.42 d	35.1 ± 5.91d	40.7 ± 5.94 d

時間スケールは、hが時間、dは日数（材料と方法を参照）。

<sup>1</sup>観察した卵はすべて、第2期幼虫（L2）期まで正常に発生した。

Table 2. 5 日本産クロゴキブリの各齢期に寄生する *L. appendiculatum* の個体群構造

	N	Adult male	Adult female	Juvenile <sup>2</sup>
Total	120	1.0 ± 1.1	3.5 ± 6.3	4.8 ± 7.0
Adult Male	10	0.9 ± 0.3a	3.19 ± 2.2b	3.9 ± 6.0bc
Adult Female	18	1.7 ± 2.8a	11.7 ± 13.2a	11.9 ± 10.5a
Last instar <sup>1</sup>	13	1.0 ± 0.0a	3.3 ± 2.1b	4.2 ± 6.7bc
5th instar <sup>1</sup>	13	1.1 ± 0.3a	3.6 ± 2.3b	10.2 ± 7.3ab
4th instar <sup>1</sup>	14	1.0 ± 0.0a	2.5 ± 1.6b	5.4 ± 5.4abc
3rd instar <sup>1</sup>	15	0.7 ± 0.5a	1.5 ± 0.9b	2.4 ± 2.3c
2nd instar <sup>1</sup>	23	0.8 ± 0.4a	1.1 ± 1.5b	0.9 ± 1.1c
1st instar <sup>1</sup>	14	0.6 ± 0.5a	0.7 ± 0.5b	1.1 ± 1.1c

<sup>1</sup>クロゴキブリは、幼虫の段階で形態的に雄雌の判断ができない。

<sup>2</sup>*L. appendiculatum* は、孵化直後の幼虫の段階で形態的に雄雌の判断ができない。

値は平均±標準偏差を示し、同一の列の間で統計的に有意な差がなければ同じアルファベットを付けてある (Tukey's test, p<0.05)。



Table 2. 6 ペアワイズ比較により算出された *L. appendiculatum* 各株の D2/D3 配列の違い (%)

	<i>L.a.EE</i>	<i>L.a.CU</i>	<i>L.a.JQ</i>	<i>L.a.EU</i>	<i>L.p.GQ</i>	<i>C.c.EU</i>	<i>H.d.EU</i>	<i>H.d.JQ</i>	<i>H.c.EU</i>	<i>T.s.GQ</i>	<i>T.s.JQ</i>	<i>A.l.AY</i>
<i>L. appendiculatum</i> EE ( <i>L.a.EE</i> )	-											
<i>L. appendiculatum</i> CU ( <i>L.a.CU</i> )	0	-										
<i>L. appendiculatum</i> JQ343844 ( <i>L.a.JQ</i> )	1.4	1.4	-									
<i>L. appendiculatum</i> EU365630 ( <i>L.a.EU</i> )	1.4	1.4	0	-								
<i>L. portentosae</i> _GQ401114 ( <i>L.p.GQ</i> )	8.5	8.5	8.6	8.6	-							
<i>C. cranifera</i> EU365632 ( <i>C.c.EU</i> )	15.7	15.7	15.9	15.9	15.1	-						
<i>H. diesingi</i> EU365628 ( <i>H.d.EU</i> )	20.1	20.1	19.9	19.9	18.1	15.5	-					
<i>H. diesingi</i> JQ343843 ( <i>H.d.JQ</i> )	19.8	19.8	19.9	19.9	17.7	15.2	0.6	-				
<i>H. cristata</i> EU365629 ( <i>H.c.EU</i> )	17.9	17.9	17.6	17.6	16.8	14.9	9.6	9.6	-			
<i>Thelastoma</i> sp. GQ368468 ( <i>T.s.GQ</i> )	17.0	17.0	17.1	17.1	17.3	17.1	19.2	19.2	20.7	-		
<i>Thelastoma</i> sp. JQ343845 ( <i>T.s.JQ</i> )	17.0	17.0	17.1	17.1	17.1	15.7	19.2	19.2	19.3	5.7	-	
<i>A. lumbricoides</i> AY210806 ( <i>A.s.AY</i> )	28.7	28.7	29.2	29.2	27.2	26.4	27.9	27.9	29.4	25.6	25.4	-

欠失やギャップを含んだすべての配列 (637 塩基) を基にして、MEGA6 ソフトで解析した (Tamura et al., 2013)。計 12 線虫種間の配列の差異を比較し、*L. appendiculatum* のそれぞれ分離された株を比較した際に相同性が完全に一致したものを赤色、配列間で差異が確認できたものを青色で示した。

2-6. 図 (Fig. 2. 1~Fig. 2. 6)

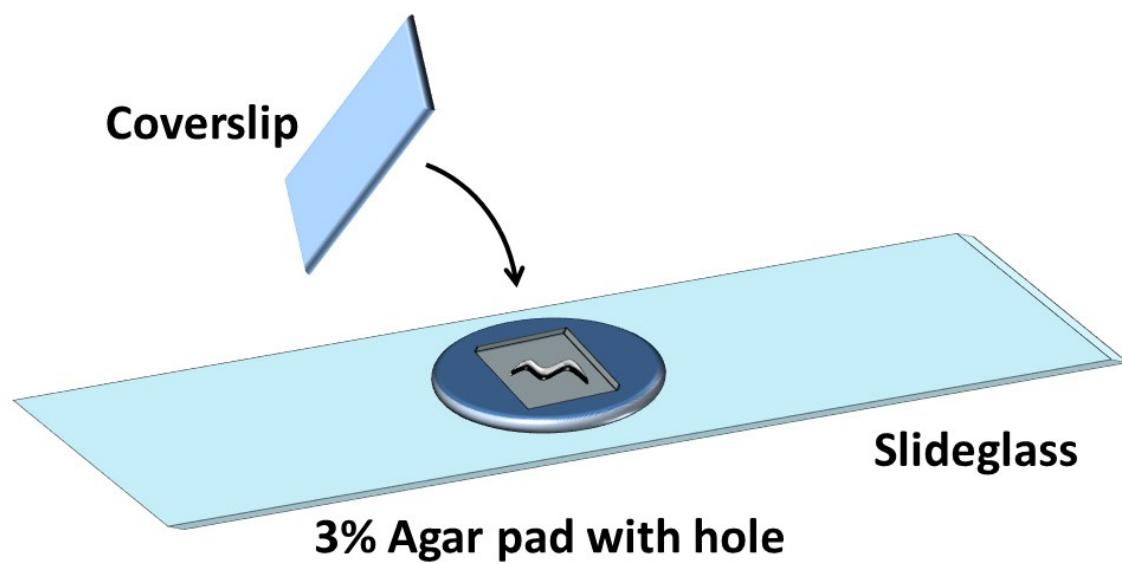
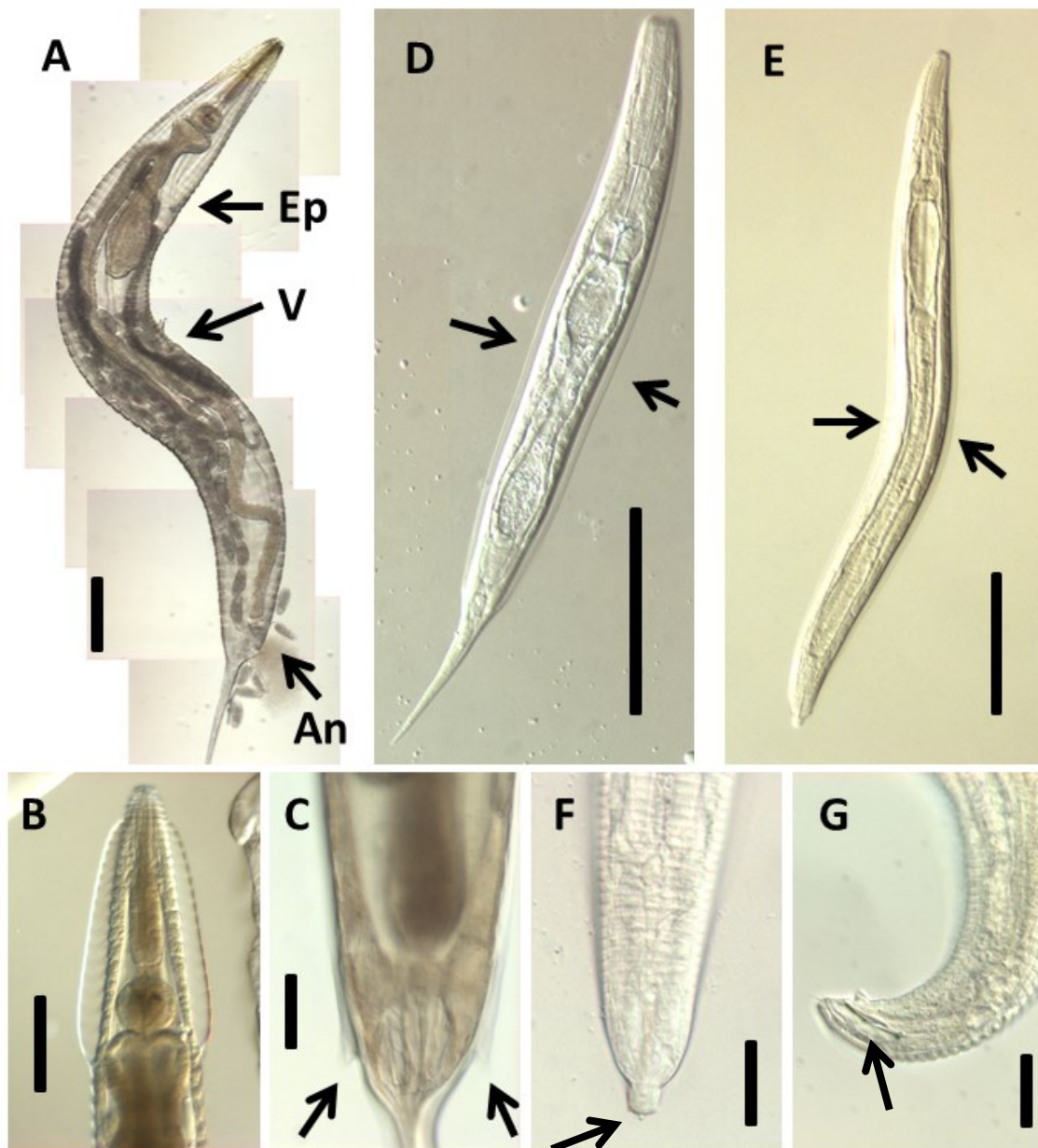


Fig. 2. 1 寄生性線虫の形態測定用アガーパッド

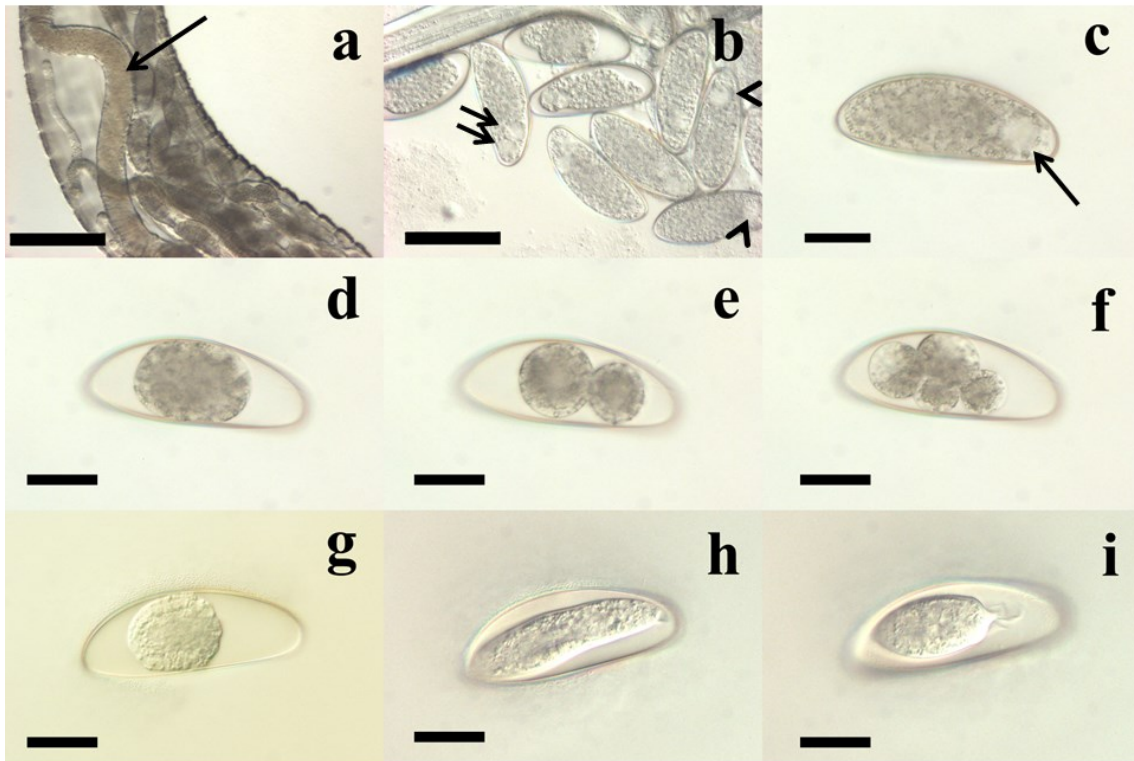


**Fig. 2. 2 *L. appendiculatum* のノマルスキー微分干渉顕微鏡写真**

(A) 雌成虫の全体像。陰門 (V) は線虫の中心から少し頭部よりに位置している。Ep, Excretory pore (総排出腔) ; V, vulva (陰門) ; An, anus (肛門)

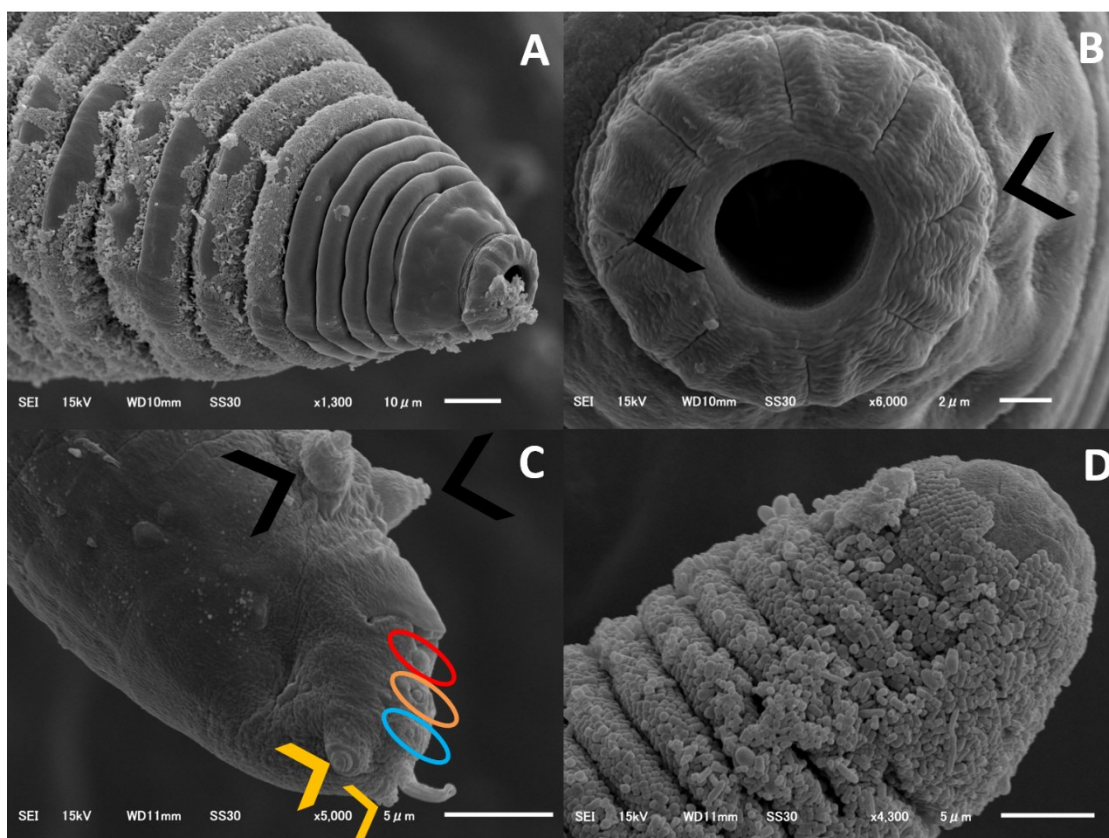
(B) 雌線虫頭部の写真。(C) 雌線虫尾部の写真。矢印は側翼を示す。

(D) 幼虫線虫の写真。矢印は側翼をあらわしており、側翼は頭部から尾部まで確認できる。(E) 雄線虫の写真。矢印は側翼を示す。(F) 雄線虫尾部の写真。末端には小乳頭突起 (矢印) が確認できる。(G) 雄線虫尾部の写真。(F) を線虫の腹側とする際に、腹右側から尾部を撮影した。生殖器官の交接刺 (矢印) が確認できる。スケールバーは、(A) 200  $\mu\text{m}$  ; (B) と (E) 100  $\mu\text{m}$  ; (C) と (D) 50  $\mu\text{m}$  ; (F) と (G) 20  $\mu\text{m}$ 。



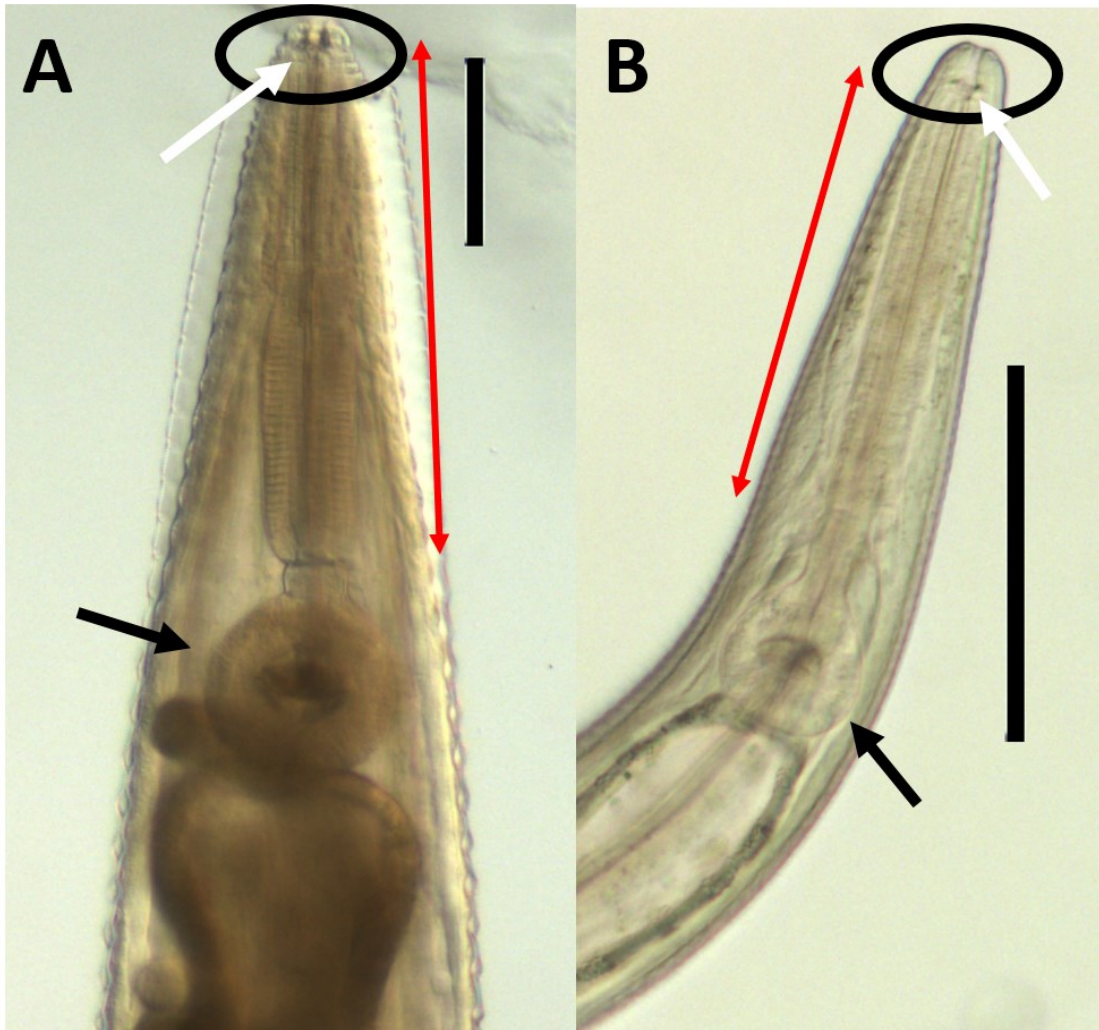
**Fig. 2. 3** *L. appendiculatum* の初期胚発生で、ノマルスキー微分干渉顕微鏡 (DIC) による写真

(a) 抱卵雌線虫の子宮内にある多数の卵。矢印で示したものは腸管。(b) 陰門から排出された卵。複数個の卵の胚は 2 つの前核を持っていたが (矢印で示したもの)、他のものは 1 つの前核のみであった (矢頭)。(c) 1 つの前核 (矢印) をもった 1 細胞期胚。細胞質は卵殻内全体に確認できる。(d) 1 細胞期胚。前核は消失し、細胞質は凝縮している。(e) 2 細胞期胚。(f) 4 細胞期胚。(g) 多細胞期で、細胞が凝集している。(h) 第 1 期幼虫 (L1)。(i) 第 2 期幼虫 (L2)。スケールバーは、(a) 200 $\mu$ m ; (b) 100  $\mu$ m ; (c-h) 40  $\mu$ m。



**Fig. 2. 4 *Leidyneema appendiculatum* の雌線虫、雄線虫の頭部と口器形状、SEM による写真**

- (A) 日本産クロゴキブリの雌線虫の頭部前部分の写真 頭部の特徴的なひだ (annuli) には細菌のようなものが付着している。
- (B) 日本産クロゴキブリの雌線虫の頭部口器の写真 黒矢印で示したものは amphids (双器) を示している。
- (C) 日本産クロゴキブリの雄線虫の後部の写真 黒矢印やオレンジ色矢印、赤色、オレンジ色、水色で囲った形態は雄線虫の小乳突起を示している。
- (D) 日本産クロゴキブリの雄線虫の頭部前部分の写真 頭部の特徴的なひだ (annuli) には細菌のようなものが付着している。
- スケールバーは、(A) ; 10  $\mu\text{m}$ 、(B) ; 2  $\mu\text{m}$ 、(C) ; 5  $\mu\text{m}$ 、(D) ; 5  $\mu\text{m}$



**Fig. 2. 5** ノマルスキー微分干渉顕微鏡により観察した、*Leidyneema appendiculatum* の雌線虫、雄線虫頭部の拡大写真

(A) 雌線虫の頭部の写真、黒色で囲った部位は口腔 (Buccal cavity) を示す。黒矢印は後部食道球、白矢印は鋸歯構造、赤双方向矢印は前部食道球から中部食道球を示す。

(B) 雄線虫の頭部の写真、黒色で囲った部位は口腔 (Buccal cavity) を示す。黒矢印は後部食道球、白矢印は鋸歯構造、赤双方向矢印は前部食道球から中部食道球を示す。

スケールバーは、100  $\mu\text{m}$

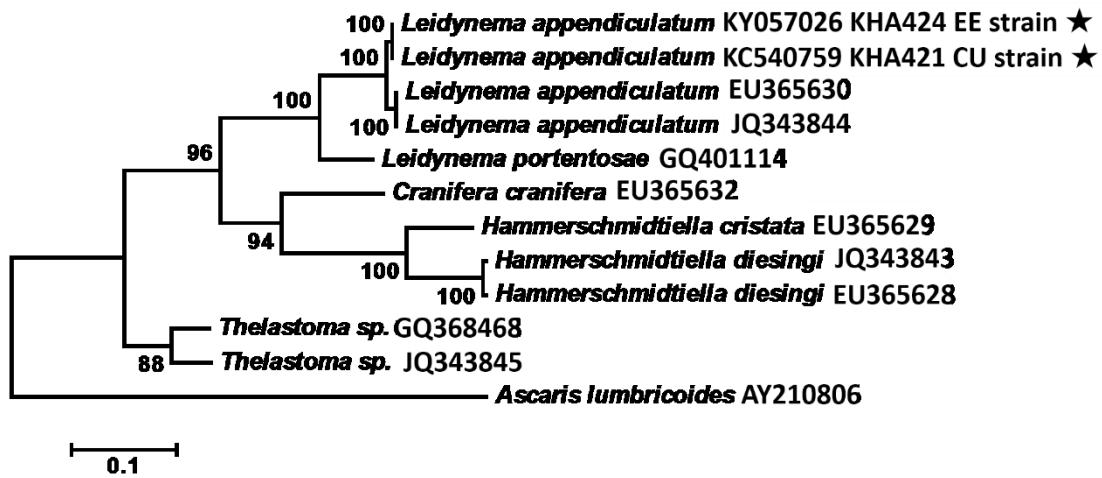


Fig. 2. 6 日本産 2 株のクロゴキブリから分離した *Leidyneema appendiculatum* の分子系統関係

rRNA 遺伝子領域より最尤法を用いて系統樹を作製し、12 種の線虫の配列（11 種の Thelastomatidae と 1 種の outgroup として *Ascaris lumbricoides*）から MEGA 6.0 software（Tamura et al. 2013）を用いて、キムラ 2 パラメーターモデル（Kimura 1980）+G で推定し、系統樹の信頼性はブートストラップ検定を 1000 反復（Felsenstein 1985）行なった。この系統樹は作成した際、高い数値（-3330.4155）を表している。系統樹の数値は各 Bootstrap 値を示しており、80 以上の高い信頼性を示す系統樹を作製できた。なお、ガンマ推定（+G）は 3 categories（+G, parameter = 0.6170）で推定した。

★で示した線虫は日本産 2 株（CU、EE 株）を示している。

## 第3章 外来種ワモンゴキブリに寄生する *Thelastomatidae* 科線虫 についての調査

### 3-1. 背景

本章では、クロゴキブリと同様に重要な衛生害虫である、ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) の寄生性線虫について調査した。日本において、ワモンゴキブリは主に沖縄諸島などで生息しているが、九州・四国・本州・そして北海道でも発見されている (The Japanese Society of Pestology 2015)。日本に生息するワモンゴキブリに寄生する線虫についての報告は未だ無く、外国での分離報告例として、カナダやアメリカ合衆国のワモンゴキブリから *Thelastoma bulhoesi* (de Magalhães 1900) や *T. periplaneticola* (Leibersperger 1960) や *Hammerschmidtella diesingi* (Hammerschmidt 1838)、そして *Leidynema appendiculatum* (Leidy 1850) が報告されている (Chitwood 1932; Dobrovolny and Ackert 1934; Hominick and Davey 1972; McCallister 1988; Adamson and Noble 1993; Connor and Adamson 1998)。以上の線虫種の報告例は、共通して研究室で培養されたワモンゴキブリからである。

また、それ以外の例として、*Hammerschmidtella* 属を中心に実に多くの線虫種が報告されており、インドで捕獲されたワモンゴキブリからは、*H. diesingi*, *H. aspiculus* の2種が Biswas と Chakravarty らによって、また *H. bisiri* が Singh と Kaur らによって、*H. indicus* 線虫が Singh と Malti らによって、そして *L. appendiculatum* が Shah によって、それぞれ分離・記載されている (Biswas and Chakravarty 1963; Singh and Kaur 1988; Shah 2007; Chaudhary et al. 2014)。また、南米のアルゼンチンで捕獲されたワモンゴキブリから *H. diesingi* と *H. laplatae* の2種が Blanco らや Camino らによって報告されている (Blanco et al. 2012; Camino et al. 2013)。そしてブルガリアでは *H. diesingi* 及び *L. appendiculatum* の2種が分離報告されている (Nedelchev et al. 2013)。このようにワモンゴキブリに寄生する線虫種は、一見すると様々な場所で多種の線虫が寄生しているようにも見えるが、最も頻繁に報告されている線虫種は、*H. diesingi* と *L. appendiculatum* であり、これらはコスモポリタン種であると言える。

ワモンゴキブリから分離されている線虫種の中で、*T. bulhoesi* は特に研究されている線虫種の1つである。ブラジルで捕獲されたワモンゴキブリが最初の分離記載 (de Magalhães 1900) であり、この種はアメリカのワモンゴキブリからも報告されている (Chitwood 1932)。またこの種は実験室培養株のワモンゴ



キブリから広く共通して報告されている寄生性線虫であり (Adamson and van Waerebeke 1992a)、この線虫種の感染サイクルや胚発生に関する研究も報告されている (McCallister and Schmidt 1981; McCallister and Schmidt 1983; McCallister and Schmidt 1984; McCallister 1988; McCallister 1993; Adamson and Cleese 1989)。また、*T. bulhoesi* は、衛生害虫ゴキブリ種の 1 つであるトウヨウゴキブリ (*Blatta orientalis* Linnaeus 1758) からや、ブラジルの *Gymnostreptus* sp. と *Neptunobolus hoguei* の 2 種のヤスデからも報告されている (Dollfus 1952; Ruiz and Coelho 1955)。しかしながら、*T. bulhoesi* についても古くから研究されているにもかかわらず、種を判別する上で基本となる形態および分子情報が欠けていた。

そこで、日本に生息するワモンゴキブリから分離された線虫 *T. bulhoesi* について、種同定の基本である形態学情報および分子情報を得ることで、種の再定義を行なった。また、発生生物学的なデータを得ることで、本線虫種の感染サイクルの詳細も調査した。さらに、日本産ワモンゴキブリに対して、*T. bulhoesi* と同時に寄生する *H. diesingi* についても同様に、形態学情報及び分子情報を得ることで、ゴキブリと寄生性線虫の寄生共生関係を研究するための基礎的な土台を構築した。

## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. ワモンゴキブリ株およびその培養法

実験で使用したワモンゴキブリ培養株は、日産化学工業株式会社 (以下 NC 株) から分譲いただいた株であり、中部大学の長谷川研究室で 3 年間継代培養した株を使用した。研究室培養株のゴキブリは第 2 章 2-2-1 と同様の方法で培養した。また、線虫の後胚発生を観察するために、線虫非感染状態のゴキブリを以下の方法で確立した。①ワモンゴキブリ NC 株から複数個の卵鞘を集めた。②卵鞘の表面をエタノールで洗浄した後、幼虫が孵化するまで小型プラスチックケース内にて室温で培養した。③孵化した幼虫は、培養用プラスチック容器に移動して引き続き室温で培養した。④このようにして確立した線虫非感染株は、複数頭を適時解剖し、寄生性線虫の非感染を確認した。

加えて、日本沖縄県石垣島で採集したワモンゴキブリも実験に使用した。2013 年に沖縄県石垣市名蔵バナナ岳展望台付近で (1 頭の成虫)、また沖縄県石垣市大川町公設市場付近で (1 頭の♂成虫、1 頭の♀成虫、2 頭の幼虫)、2014 年に沖縄県石垣市大川町公設市場付近で (1 頭の幼虫) の計 6 個体のワモンゴキブリを捕獲した。すべてのゴキブリは生存した状態で解剖し、後腸から寄生性線虫を

分離した。

### 3-2-2. 線虫の観察

計 97 頭のワモンゴキブリ NC 株を解剖し、寄生性線虫の存在を調査した。解剖方法やゴキブリ生理食塩水の調整に関しては、第 2 章の 2-2-2. と同様の方法で行なった。また、解剖後、分離した線虫は、線虫種の判断、性比、ステージを判別し、第 2 章の 2-2-2. の方法同様に、5%アガーパッドにマウントし (Shaham 2006)、ノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察をおこなった。

線虫の形態計測に関しては、第 2 章の 2-2-2. の方法同様にホールアガーパッドを作成し、そこに生きたまま線虫を移した。アルコールランプで軽くあぶって線虫を熱殺したのち、カバーガラスをかけ顕微鏡観察及びマイクロメーターによる測定をおこなった。線虫の計測に関しては、線虫で一般的に計測されている a、b、c などの比率や V% なども計測した。また線虫の写真は、IS capture というアプリケーションを用いた CCD カメラ: VTCH1.4ICE (Visualix, 日本) を接続したノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いて撮影した。

また、線虫の永久標本の作成は、まず線虫を TAF 固定液 (2% トリエタノールアミンと 7.5% のホルマリンで調整) で固定し、ゆっくりと脱水させる方法で脱水し、永久標本用のスライドガラスを作成した (Morffe and García 2010)。この研究で使用した線虫標本は中部大学長谷川研究室 (NCHL: the Nematological Collection of Hasegawa Laboratory) とキューバのハバナの Instituto de Ecología y Sistemática (CZACC: Collection of the Zoological Collections) に登録・保管した。

SEM での観察は、第 2 章の 2-2-5. 走査型電子顕微鏡を用いた寄生性線虫の形態観察の方法に従って観察した。

### 3-2-3. ワモンゴキブリの寄生性線虫の分子系統解析

線虫のゲノミック DNA の抽出方法、及び PCR によって増幅した領域やプライマー、塩基配列の解析は、第 2 章の 2-2-6. 寄生性線虫の分子系統解析と同様の方法で行なった。

線虫の系統解析に関しては、すでに報告されている *Thelastoma* 属、*Hammerschmidtella* 属、*Leidynema* 属の D2/D3 領域の配列を使用し、*Ascaris lumbricoides* AY210806 をアウトグループにして解析した。配列のアライメント方法及び、系統樹の作製方法や系統間に見られる配列間の差異の比較は、第 2 章の 2-2-6. 寄生性線虫の分子系統解析と同様の方法で行なった。

### 3-2-4. ワモンゴキブリの寄生性線虫 *Thelastoma bulhoesi* の初期

#### 胚発生観察

*T. bulhoesi* の初期胚発生を観察するうえで、ワモンゴキブリ NC 株を解剖して取り出した雌線虫をゴキブリ生理食塩水の入った別のシラキユース時計皿に移し、陰門から産み落とされた複数個の 1 細胞期胚の卵を採集し、これらを用いた。マウスピペットで線虫卵を回収し、アガーパッドの上に置いた。全部で 8 個の 1 細胞期胚を採集し、ノマルスキー微分干渉顕微鏡で室温 (25°C) 条件で観察しながら、4 細胞期まで 1 時間ごとに観察及び写真撮影した。4 細胞期以降は、L2 期まで 24 時間ごとに観察及び写真撮影した。1 細胞期から 4 細胞期まで要した平均時間、それ以降の L1 期や L2 期まで要した平均日数を算出した (平均 ± S.D.)。

### 3-2-5. ワモンゴキブリの寄生性線虫 *Thelastoma bulhoesi* の後胚

#### 発生観察

*T. bulhoesi* の L2 感染態ステージ卵をワモンゴキブリに感染した後、孵化してから成熟するまでの後胚発生を観察するために、確立した線虫非感染ゴキブリ株を使用し、線虫を人工感染させた。線虫卵はワモンゴキブリを解剖し、*T. bulhoesi* の抱卵した雌線虫を集めた後、シラキユース時計皿内のゴキブリ生理食塩水内で 14 日間、25°C でインキュベートし、L2 感染態ステージになるまで培養した。

体長約 19-20mm の線虫非感染ゴキブリを 10 頭集め、プラスチックゲージ(直径 13 cm × 高さ 22.5 cm) に移し、人工感染実験前に 3 日間絶食させた。その後、0.4g の餌 (第 2 章の 2-2-1. 参照) に約 500 個の L2 感染態ステージ卵を混ぜてゴキブリに摂食させた。これを 3 セット準備し、感染実験用餌がすべて食べつくされた後は、通常の餌で培養しながら、1、3、7、14、21、31、41 日後にゴキブリを解剖して、線虫の感染頭数および後胚発生を観察した。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. 形態観察によるワモンゴキブリ寄生性線虫の種同定

研究室培養株計 97 頭（雄成虫 16 頭、雌成虫 23 頭、幼虫 58 頭）のワモンゴキブリを解剖した結果、高確率で *Thelastoma bulhoesi* と *Hammerschmidtella diesingi* が感染していた。それぞれ感染率は、*T. bulhoesi* の雄成虫で 80%、雌成虫で 91%、幼虫で 93%、*H. diesingi* の雄成虫で 73%、雌成虫で 91%、幼虫で 76%であった。また野外で採集した 6 頭（雄成虫 2 頭、雌成虫 1 頭、幼虫 3 頭）のワモンゴキブリに関しては、*T. bulhoesi* が 100%感染し、*H. diesingi* はゴキブリ幼虫 1 頭を除き、全てに感染していた。

次に、これら 2 種の線虫の形態的な位置づけや定義について説明する。

#### *Thelastoma bulhoesi* の分類学的な位置付け

科：Thelastomatidae 科 Travassos, 1929

属：*Thelastoma* 属 Leidy, 1849

種名：*Thelastoma bulhoesi* (de Magalhães, 1900)

Figs. 3. 1 A-H、3. 2 A-E、3. 4、3. 5 を参照

#### *T. bulhoesi* の標本の情報

標本：2 頭の雌線虫、ワモンゴキブリ研究室培養 NC 株から分離 (*Periplaneta americana*)、分離場所：愛知県春日井市中部大学長谷川浩一研究室、分離年月日：2015 年 5 月 29 日、採集者：小澤壮太

保管場所：中部大学長谷川浩一研究室の NCHL: the Nematological Collection of Hasegawa Laboratory、サンプルナンバー：A1、A2.

標本：2 頭の雄線虫、ワモンゴキブリ研究室培養 NC 株から分離 (*Periplaneta americana*)、分離場所：愛知県春日井市中部大学長谷川浩一研究室、分離年月日：2015 年 5 月 29 日、採集者：小澤壮太

保管場所：中部大学長谷川浩一研究室の NCHL: the Nematological Collection of Hasegawa Laboratory、サンプルナンバー：A3、A4.

標本：1頭の雌線虫、ワモンゴキブリ研究室培養 NC 株から分離 (*Periplaneta americana*)、分離場所：愛知県春日井市中部大学長谷川浩一研究室、分離年月日：2015年5月29日、採集者：小澤壮太

保管場所：キューバのハバナにある Instituto de Ecología y Sistemática の CZACC: Collection of the Zoological Collections、サンプルナンバー：11.5100.

標本：1頭の雄線虫、ワモンゴキブリ研究室培養 NC 株から分離 (*Periplaneta americana*)、分離場所：愛知県春日井市中部大学長谷川浩一研究室、分離年月日：2015年5月29日、採集者：小澤壮太

保管場所：キューバのハバナにある Instituto de Ecología y Sistemática の CZACC: Collection of the Zoological Collections、サンプルナンバー：11.5101.

永久標本はそれぞれの場所で保管し、それ以外のホールアガーパッド法による形態計測用の雌線虫 10 頭と雄線虫 8 頭は標本としては含めなかった。

### *T. bulhoesi* の形態計測

ホールアガーパッド法で 10 頭の雌線虫と 8 頭の雄線虫を、また永久標本の 3 頭の雌線虫と 3 頭の雄線虫を使用して各器官、各部位を計測し、平均値をそれぞれ算出した (Table 3. 1、Table 3. 2)。

### *T. bulhoesi* の形態的な再定義

ワモンゴキブリに寄生する線虫 2 種のうち 1 種は、*Thelastoma* 属線虫である。この雌線虫は、クロゴキブリの寄生性線虫 *Leidynema appendiculatum* と比較して、より顕著なひだ (annuli) が体表面にあり、唇部にある 8 対の突起もおよび双器 (Amphid) も確認できた。体には *L. appendiculatum* と違い、翼状構造は見られず、尻尾は長く末端は先細くなっていた (Fig. 3. 1 A、B、E)。口腔 (Buccal cavity) には、*L. appendiculatum* 同様に鋸歯構造が観察できた (Fig. 3. 6 A)。 *Hammerschmidtella* 属線虫で見られる丸い形の中道食道球 (Metacarpus) (Basir 1956) を持たず、前部食道球から後部食道球までが長く伸び、前部食道球と後部食道球との間の境である峡部 (Isthmus) が *Leidynema*

属線虫と比べると長かった (Fig. 3. 6 A)。また神経環 (Nerve ring) は前部食道球と後部食道球の間のほぼ中心に位置していた (Fig. 3. 6 A)。総排泄腔 (Excretory pore) は後部食道球の中央付近に位置しており、後部食道球の下にある腸管は二股の腸管を持つ *Leidyenema* 属と違い (Pal et al. 2014)、一本である。陰門は体のほぼ中心に位置しているが、やや後部に近かった。卵巣は体の前後端から伸びて、体の中心にある子宮までその 2 本が繋がっていた。*Hammerschmidtella* 属線虫や *Leidyenema* 属線虫と違い、卵は正球に近い形状で、これら 2 属と比べて雌成虫の卵の保有卵数はやや少なかった。これら雌成虫個体の全長、各器官・部位の大きさおよび位置については、Table 3. 1 に示した。

雄線虫にも、雌線虫と同様にひだ (annuli) が頭部の端から雄の生殖器付近まで確認できたが、体の側面には翼上構造がみられなかった (Fig. 3. 2 A、B)。また、前部食道球から後部食道球までが雌線虫同様に長く、峡部 (Isthmus) にかけて食道の幅が狭くなっていた (Fig. 3. 6 B)。神経環 (Nerve ring) は中部食道球の中央よりやや下方 (約 75%) に位置していた (Fig. 3. 6 B)。総排泄腔 (Excretory pore) は後部食道球の中心付近に位置しており、腸管は雌線虫同様一本である。雄の尾端にある尾乳頭 (copulatory papillae) は計 4 対あり、交接刺 (Spicule) 付近に大きな尾乳頭が 2 対、小さいのが 1 対、その下に線虫の尾の肛門側に 1 対確認された (Fig. 3. 2 D)。これら雄成虫個体の全長、各器官・部位の大きさおよび位置については、Table 3. 2 に示した。

### *Hammerschmidtella diesingi* の分類学的な位置付け

科 : Thelastomatidae 科 Travassos, 1929

属 : *Hammerschmidtella* 属 Chitwood, 1932

種名 : *Hammerschmidtella diesingi* (Hammerschmidt, 1838)

Fig. 3. 6、Fig. 3. 7 A-H、Fig. 3. 8 A-D を参照

### *H. diesingi* の標本の情報

標本 : 2 頭の雌線虫、ワモンゴキブリ研究室培養 NC 株から分離 (*Periplaneta americana*)、分離場所 : 愛知県春日井市中部大学長谷川浩一研究室、分離年

月日：2015年5月29日、採集者：小澤壮太  
保管場所：中部大学長谷川浩一研究室の NCHL: the Nematological Collection of Hasegawa Laboratory、サンプルナンバー：A5、A6  
標本：2頭の雄線虫、ワモンゴキブリ研究室培養 NC 株から分離 (*Periplaneta americana*)、分離場所：愛知県春日井市中部大学長谷川浩一研究室、分離年月日：2015年5月29日、採集者：小澤壮太  
保管場所：中部大学長谷川浩一研究室の NCHL: the Nematological Collection of Hasegawa Laboratory、サンプルナンバー：A7、A8

標本：1頭の雌線虫、ワモンゴキブリ研究室培養 NC 株から分離 (*Periplaneta americana*)、分離場所：愛知県春日井市中部大学長谷川浩一研究室、分離年月日：2015年5月29日、採集者：小澤壮太  
保管場所：キューバのハバナにある Instituto de Ecología y Sistemática の CZACC: Collection of the Zoological Collections、サンプルナンバー：11.5102.  
標本：1頭の雄線虫、ワモンゴキブリ研究室培養 NC 株から分離 (*Periplaneta americana*)、分離場所：愛知県春日井市中部大学長谷川浩一研究室、分離年月日：2015年5月29日、採集者：小澤壮太  
保管場所：キューバのハバナにある Instituto de Ecología y Sistemática の CZACC: Collection of the Zoological Collections、サンプルナンバー：11.5103.

グリセリンで固定した永久標本はそれぞれの場所で保管し、それ以外のホールアガーパッドによるサンプル雌線虫 13 頭と雄線虫 10 頭は標本としては含めなかった。

### ***H. diesingi* の形態計測**

ホールアガーパッドによる方法で 13 頭の雌線虫と 10 頭の雄線虫を、グリセリンで固定した標本の 3 頭の雌線虫と 3 頭の雄線虫を計測したものを平均して各部位の値を算出した (Table 3. 4、Table 3. 5)

### ***H. diesingi* の形態的な定義**

寄生性線虫の雌線虫は、体が紡錘状で、全体に特徴的なひだ (annuli) があり、食道後部から翼状構造が見られ、肛門付近まで確認できた (Fig. 3.9 G、H)。感覚器官である、唇部に備わる 8 つの突起と、頭部の双器 (Amphid) も確認できた (Fig. 3.9 C)。口腔 (Buccal cavity) には鋸歯構造がみられ、食道は中部食道球を含めて、口腔下の食道から峡部 (Isthmus) の始まりまでと、峡部 (Isthmus) の始まりより後ろの後部食道球の 2 つの部位に分けることができる (Fig. 3.8 A)。腸管は二股に分かれる *Leidynema* 属とは違い、一本の構造であった。神経環 (Nerve ring) は中部食道球付近で確認でき、総排泄腔 (Excretory pore) は腸管の始まり付近で確認できた。陰門の位置は、頭から尾の先までを 100%としたとき、頭部から 20%付近であった。生殖巣の形態は、二子宮の前子宮型 (didelphic-prodelphic) で、卵巣は体のそれぞれの端から伸びて両方が 2 つの子宮につながっていた (Fig. 3.7)。成虫になってからも線虫の体が大きくなり、それにしたがって子宮の大きさも大きくなり、子宮内の保有卵数も格段に増えていった。卵は *Leidynema* 属と同様に楕円形に近い形状であった (Fig. 3.7)。雌成虫個体の全長、各器官・部位の大きさおよび位置については、Table 3.4 に示した。

雄成虫は、雌線虫より明らかに体長が小さく、ひだ (annuli) は頭部の端から肛門付近まで確認できたが、線虫の側面には翼状構造は見られなかった (Fig. 3.7 A、Fig. 3.10)。雌線虫と違い、中部食道球は見られず、そのかわりに食道と峡部 (Isthmus) がかなり長い (Fig. 3.8 B)。腸管は一本の形状であり、神経環 (Nerve ring) は峡部 (Isthmus) の中央で確認できた。総排泄腔 (Excretory pore) は腸管の前部で確認できた。交接刺付近に副交接刺 (Gubernaculum) という線虫の特殊な構造が確認できた。尾端には計 4 対の尾乳頭があり、線虫の腹側と側面に 1 対ずつと、肛門付近に乳頭が 2 対あり、特に、尾の肛門近くの腹側付近に duplex papilla という特徴的乳頭も確認できた (Fig. 3.10 C、D)。これら雄成虫個体の全長、各器官・部位の大きさおよび位置については、Table 3.5 に示した

### 3-3-3. 系統解析によるワモンゴキブリ寄生性線虫の同定

実験室培養株および野外で採集したワモンゴキブリから、それぞれ寄生性線虫を分離し、リボソーマル RNA 大サブユニット (60S サブユニット) の 28S ユ



ニット D2/D3 領域の配列を取得した (約 700bp)。 *T. bulhoesi* と *H. diesingi* の配列に関しては、BLAST (NCBI, National Centre of Biotechnology and Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録し、GenBank のアクセッション番号を得た。 *T. bulhoesi* のうち実験室培養 NC 株から分離したものは、 *T. bulhoesi* NC KHA441 としてアクセッション番号 KP172224 を、石垣島で採集したものは *T. bulhoesi* Ishigaki KHA442 としてアクセッション番号 KP172225 を得た。 *H. diesingi* のうち、実験室培養 NC 株から分離したものは、 *H. diesingi* NC KHA443 としてアクセッション番号 KP172226 を、石垣島で採集したものは *H. diesingi* Ishigaki KHA444 としてアクセッション番号 KP172227 を得た。

*T. bulhoesi* に関しては、NCBI に登録されていた未同定 *Thelastoma* 属線虫 2 種 (ロシア GQ368468 とアルゼンチン JQ343845 のワモンゴキブリ) と同一クレードに含まれ、特にロシア GQ368468 の配列は日本で分離した *T. bulhoesi* とより近縁なクレードに含まれた。ロシア GQ368468 と日本産 *T. bulhoesi* 2 株の間で見られる配列差異をペアワイズの配列比較によって調べたところ、 *T. bulhoesi* NC 株とは 0.2%、 *T. bulhoesi* 石垣島採集サンプルとで 0.5%であった (Table 3. 3)。

アルゼンチンで分離したワモンゴキブリに寄生していた線虫の配列 (JQ343843) や、ロシアで分離したトウヨウゴキブリ *Blatta orientalis* に寄生していた線虫の配列 (EU365628) とペアワイズ比較をした結果、本研究によって分離した *H. diesingi* の配列と 99 以上%一致した (Table 3. 6)。

これら線虫 2 種を含めて最尤法で系統樹を作製したところ、 *T. bulhoesi* は *Thelastoma* 属、 *H. diesingi* は *Hammerschmidtella* 属のクレード内に位置した (Fig. 3. 9)。

### 3-3-4. ワモンゴキブリ寄生性線虫 *T. bulhoesi* の初期胚発生

*T. bulhoesi* の正球形卵は抱卵した雌線虫子宮内で確認でき、すべて 1 細胞期であった (Fig. 3. 3 A)。1 細胞期の間、前核や核融合は確認できなかったが (Fig. 3. 3 A)、その後、胚は大きい細胞と小さい細胞からなる 2 細胞期に不等分割した (Fig. 3. 3B)。次に、小さい細胞の等分割に続き大きい細胞も等分割し、割球が菱形状の 4 細胞期となった (Fig. 3. 3 C)。核膜を明確に確認できなかったが、2 細胞期と 4 細胞期の胚の分割球内には核のようなものが確認できた。その後、

割球は細胞分割を繰り返して増加した (Fig. 3. 3 D)。線虫の咽頭や食道球が明瞭に観察できるようになり、その段階を第 1 期幼虫 (L1 期) の始まりとした (Fig. 3. 3 E)。次に卵内で活発に体を動かしていた蠕虫状の L1 期は脱皮し、倒卵形に似た感染態 L2 期となった (Fig. 3. 3 F)。観察したすべての胚は L2 期まで発生が進行し、発生時間は 1 細胞期から 2 細胞期まで  $6.1 \pm 3.6$  時間、4 細胞期までは  $9.6 \pm 2.9$  時間、L1 期までは  $2.5 \pm 0.8$  日、L2 期までは  $6.1 \pm 1.7$  日であった。

### 3-3-5. ワモンゴキブリ寄生性線虫 *T. bulhoesi* の後胚発生

これまでに報告されている Thelastomatidae 科線虫と同様に、*T. bulhoesi* は卵内で L1 期が一度脱皮し、感染態 L2 期となり感染を待つ (Todd 1944; McCallister and Schmidt 1984)。感染態 L2 期の *T. bulhoesi* を準備し、線虫非感染ゴキブリ株に人工感染させ、経時的に宿主を解剖して線虫の後胚発生を観察した。

感染後 1 日目から 3 日目には複数頭の孵化した幼虫が宿主後腸内で確認できた。これら幼虫の生殖細胞は明らかに未発達であり、尾部から頭部にかけて左右側面に翼状構造を持つことが確認できた (Fig. 3. 4 A)。この段階では、性的二型が明確でないため雌雄の判別ができなかった。またこの時期、孵化直後の L2 感染態幼虫が宿主中腸内で複数頭確認できたことから (データ未記載)、宿主体内に感染後、線虫卵はこの部位で孵化すると考えられた。次に感染 7 日後、脱皮している幼虫複数頭確認できた。7 日目に見られる脱皮後、雌雄の性的二型が確認できるようになった。雄幼虫の場合、交尾器官である交接刺が備わり、尻尾は雄成虫のものと似た形状となった (Fig. 3. 5 A)。7 日目の解剖では、ゴキブリ宿主内に複数頭の雄を確認することができた。

感染後 14 日目は、性的二型がより顕著となり、雌幼虫の場合、雄より体長が大きく、尾が長く線状であり、生殖細胞に関しては陰門の形成が始まっていた。さらに、総排泄腔や咽頭筋の発達が明確に観察できた (Fig. 3. 4 B)。雄幼虫は、生殖細胞がより発達し、総排泄腔も確認できた (Fig. 3. 5 B)。この時、1 頭のゴキブリ宿主に対して約 3 頭の雌幼虫が観察できたが、雄幼虫は 1 頭のみであった。

感染後 21 日目、雌幼虫は未発達の子宮や形成途中の陰門が確認でき、それらの生殖細胞は発達途中であった (Fig. 3. 4 C)。雄幼虫も生殖細胞の発達がより

進行していたが、精子形成はまだ確認できなかった (Fig. 3. 5 C)。

感染後 31 日目、41 日目になると、雌雄共に成虫となっていた。若い雌成虫は、2 本の生殖巣が子宮を中心に前方と後方に展開しており、複数個の正球型卵が子宮内で確認できた (Fig. 3. 4 D)。線虫は成熟後も、生殖器官の発達とともに体長の伸長がみられ (Fig. 3. 4 E)、雌成虫に備わる 2 つの貯精嚢に多くの精子が満たされていた (Fig. 3. 4 F)。以上から、雌は成熟したと判断できた。また、雄成虫の体長は雌よりはるかに小さかったが (Fig. 3. 5 D)、精子形成が確認できたことから (Fig. 3. 5 E)、雄も成熟したことが判断できた。

### 3-4. 考察

#### 3-4-1. ワモンゴキブリ寄生性線虫 *T. bulhoesi* の形態

日本産ワモンゴキブリから *Thelastomatidae* 科寄生性線虫 *T. bulhoesi* を分離したが、ワモンゴキブリからこの種以外で *Thelastoma* 属線虫が 6 種分離されており、それぞれ *T. aligharica* Basir, 1940、*T. aurangabadense* Farooqui, 1970、*T. basiri* Farooqui, 1970、*T. malaysiense* Khairal & Paran, 1977、*T. periplaneticola* Leibersperger, 1960、*T. thapari* Singh & Singh, 1955 である (Adamson and van Waerebeke 1992a; Basir 1956; Leibersperger 1960)。しかしながら、これらワモンゴキブリから報告されている線虫種は、詳細が不明なものや、雄成虫についての情報が無いものなど、比較するための形態情報が不足していた。これら線虫種については改めて再確認する必要があると考えており、この問題を明確にするためには、分子生物学的手法や SEM などを用いた形態観察など現在の手法による同定が必要であると考えられた。1 種のゴキブリ宿主に対して、こうも多様性の高い *Thelastomatidae* 科寄生性線虫種が寄生しているという事実は、第 4 章の実験および第 5 章の考察で述べるように、本線虫種の寄生性進化を紐解く重要な情報になるはずであり、今後これら以外の線虫種に関しても種の再確認及び種の再整理を行なう必要があると考えられた。

#### 3-4-2. ワモンゴキブリ寄生性線虫 *T. bulhoesi* の系統解析

今回実験で使用したユニバーサルプライマー (Nunn 1992) は、幅広くゴキブ

リ寄生性線虫に有効であり、これを用いて増幅することが可能な rRNA の 28S ユニットは *Thelastomatidae* 科線虫の系統関係を確認するために有用な領域であるといえる (Ozawa et al. 2014; Blanco et al. 2012; Spiridonov and Guzeeva 2009; Jex et al. 2006)。 *Thelastoma* 属の未同定種 2 種について、この遺伝子領域情報が GenBank に登録されていた (1 つ目はアルゼンチン産 JQ343845 : Blanco et al. 2012 で、2 つ目はロシア産 GQ368468)。今回作製した系統樹では、日本産ワモンゴキブリから分離した *T. bulhoesi* とロシア由来 *Thelastoma* sp. とが同じクレードに含まれ、高い相同性を示した。この結果はこれらの種が同一種ではないかということが示唆される。一方で、アルゼンチン由来の *Thelastoma* sp. は *T. bulhoesi* のクレードの外側に位置したことから、 *Thelastoma* 属の別種であると考えられる。この結果で示した本線虫グループの分子情報は、 *Thelastoma* 属を含めた寄生性線虫の系統関係を理解するための大切な基盤である。

### 3-4-3. ワモンゴキブリ寄生性線虫 *T. bulhoesi* の発生観察

絶対寄生性の生活史を有する *Thelastomatidae* 科寄生性線虫にとって、胚発生がおこなわれる時期は宿主ゴキブリから離れる唯一の段階である。クロゴキブリの寄生性線虫 *L. appendiculatum* で明らかとなった、胚発生のステージや発生時間と照らし合わせながら各線虫種をを観察することができる (Ozawa et al. 2014、第 2 章 2-3-2. 参照)。 *T. bulhoesi* の胚は、温度が 35 度以上や 15 度以下では発生が進まず、25 度下では 128 時間後 (約 5.3 日後) にほとんどの卵が感染態 L2 期まで発生が進むことが報告されている (McCallister and Schmidt 1984)。今回の結果では、 *T. bulhoesi* の卵内の胚発生時間は 1 細胞期から感染態の L2 期まで約 25 度で  $6.1 \pm 1.7$  日であった。

*T. bulhoesi* の 1 細胞期の前核の動態はノマルスキー微分干渉顕微鏡下で明確に観察できなかったが (Fig. 3. 6)、 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner 1934) を含めた他の線虫や *B. okinawaensis* (Kanzaki, Maehara, Aikawa and Togashi 2008)、 *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900)、 *Aphelenchoides besseyi* (Christie 1942) や *L. appendiculatum* と異なっていた (Ozawa et al. 2014; Shinya et al. 2014; Yoshida et al. 2009; Hasegawa et al. 2006)。Oxyurida 線虫は、haplodiploidy の生殖様式であり (Ainsworth 1991)、

性決定システムや繁殖様式は、今回の結果では未知のままである。

*T. bulhoesi* の初期胚は、胚発生観察用アガーパッド上で L2 感染態幼虫まで発生が進むものの、幼虫が孵化することはなかった。人工感染させた際、感染 1 日後に孵化し、倒卵形に似た形態の線虫が蠕虫状の形態に変化した (Fig. 3. 4 A)。*L. appendiculatum* や *H. diesingi* の感染態 L2 期胚は、タンパク希釈液で処理した際、卵殻内で線虫が伸長し、2 回目の脱皮をすると報告されている (Todd 1944)。McCallister and Schmidt (1981, 1983, 1984) の報告でも、感染態 L2 期の卵はゴキブリ後腸で孵化し、すぐに L3 期に脱皮すると言われているが、これを決定付けるデータは示されていない。線虫感染 1~3 日後にゴキブリを解剖し、分離した *T. bulhoesi* を観察すると、尾部から頭部にかけて側面に翼状構造を持っており (Fig. 3. 4 A)、この形態に関しては顕著に観察できた。線虫はこの段階ですでに摂食活動をしており、腸管内に摂食したものを観察することができた。本来線虫は、脱皮前後で摂食活動を止めることが知られており、したがって今回の観察から、感染・孵化した直後に倒卵型幼虫が脱皮して蠕虫型幼虫となったわけではなく、伸長して形態が変わっただけではないかと考えた。次に感染 7 日後、線虫は脱皮し、この後、雌雄の間で性的二型が明確に観察できた (Fig. 3. 5 A)。この時期の雄の生殖細胞は未成熟であるものの (Fig. 3. 5 A)、交接刺がすでに備わっていることは、Thelastomatidae 科寄生性線虫に広く共通している特徴ではないかと考えられる (Zervos 1983)。

感染 7 日後、宿主ゴキブリ 1 頭につき雌雄幼虫が複数頭観察できたが、感染 14 日後では、雄のみが 1 頭に減少していた。雄の個体数が 1 頭に固定していることは、*Drymaplaneta variegata* に寄生する線虫 *Protrellus dixoni* や (Zervos 1988a)、クロゴキブリ (Ozawa et al. 2014) やワモンゴキブリ (Hominick and Davey 1972) に寄生する線虫 *L. appendiculatum* でも観察されている。この時期以降、*T. bulhoesi* の雌雄間で見られる性的二型がさらに明確となり、同時に何らかの因子によって雄個体数を調整し 1 頭に調節されているのかもしれない。

#### 3-4-4. ワモンゴキブリ寄生性線虫 *H. diesingi* の形態について

日本のワモンゴキブリからの *H. diesingi* 分離も初報告となる。この線虫種は、ドイツ (Leibersperger 1960)、ブルガリア (Nedelchev et al. 2013)、インド (Shah 2007)、マレーシア (Khairul and Paran 1977)、コスタリカ (Carreno

and Tuhela 2011)、アルゼンチン (Blanco et al. 2012)、ブラジル (de Magalhães 1900; Kloss 1966) やアメリカ (Dobrovolny and Ackert 1934) と、非常に多くの国で報告されており、宿主はワモンゴキブリが主ではあるが、ゴキブリ科であるトウヨウゴキブリ *B. orientalis* (例として Hammerschmidt 1838; Chitwood 1932) やオオゴキブリ科の *Archimandrita tessellata* Rehn, 1903 (Carreno and Tuhela 2011) など他のゴキブリ種からも報告されている。しかしながら、これらは遺伝子配列情報の登録が無く、形態による種同定がおこなわれたのみであることから、遺伝情報加味した再確認が必要であろう。

これまでの報告のなかで、*Hammerschmidtella* 属雌線虫の生殖形態に関する整理がなされていなかった (Maggenti 1981)。*Hammerschmidtella* 属は当初、対子宮型 (amphidelphic) であると定義されたが (Chitwood 1932)、後の報告で Adamson と van Waerebeke 1992、Shah 2007、Blanco ら 2012 などによって、*H. diesingi* の生殖システムが二子宮の前子宮型 (didelphic-prodelphic) であると定義している。これら報告を参考にして、*H. diesingi* の生殖システムが、二子宮の前子宮型 (didelphic-prodelphic) であることを本研究で再確認できた。また、Shah (2007) がインドの Manipur で分離できた *H. diesingi* の雌成虫に、尾端に帽子形状を有していると報告している。これに関してはこれまでも複数の報告 (Lee 1958; Leibersperger 1960; Kloss 1966; Gupta 1997; Blanco et al. 2012) で示されているが、今回の結果ではこの形状を確認できず (Figs 3. 7 A)、尾の先は尖がった形状であることを SEM で明確に観察できた。

Thelastomatidae 科線虫種の同定の際によく使われる、雄成虫尾部の小乳頭についての報告を整理したところ、Shah (2007) や Blanco ら (2012) は、*H. diesingi* の小乳頭の対が 4 対で構成されていると定義している。今回の結果では Shah (2007) や Blanco ら (2012) が定義した突起対と同じ数であることを SEM やノマルスキー微分干渉顕微鏡で再確認できた。4 対の詳細な小乳頭の形態のうち、特に尾部に有る小さい 1 対の二重小乳頭 (duplex papilla) (Fig. 3. 8 D) に関して、これまでの報告を修正することができた。Lee (1958) や Rao (1958) はこの尾部の乳頭について、光学顕微鏡下で大きい 1 対の小乳頭突起 (single papilla) が見られると主張していた。Nedelchev ら (2013) は光学顕微鏡下で 1 対の小乳頭突起 (single papilla) が見られると主張していた。Yu

と Crites (1986) は、SEM で 1 対の小乳頭突起 (single papilla) であることを報告している。以上のような報告例があったが、今回の SEM による観察結果から、小さい 1 対の二重小乳頭突起 (duplex papilla) であることを明瞭に示すことができた (Fig. 3. 8 C、D)。

また、交接刺に隣接して観察できる構造体、副交接刺 (Gubernaculum) について、本線虫種でこの存在を確認できなかつたと報告されていたが (例えば、Gupta 1997; Shah 2007)、今回ノマルスキー微分干渉顕微鏡や SEM でより鮮明に観察できた (Fig. 3. 8 C)。この結果は Blanco ら (2012) のアルゼンチンで分離した *H. diesingi* に、副交接刺が確認された報告とも一致する。Adamson と Nasher (1987) は、同属の別線虫種 *H. andersoni* でこの形態を観察している (Adamson and Nasher 1987)。この形態は高倍率のノマルスキー微分干渉顕微鏡や SEM を使用しないと観察が容易ではない。

感覚器官のひとつである幻器 (Phasmid) は、肛門近くの左右側翼側付近にペアで存在し、光学顕微鏡での観察は容易でない (Lee 1958; Kloss 1966; Gupta 1997; Shah 2007)。これまでの観察報告は 2 例だけであり、雌線虫の尻尾付近に有ると報告されている (Blanco et al. 2012; Yu and Crites 1986)。本研究で、雌線虫にはこれまでの報告と同じ位置にこの形態を確認できた (Fig. 3.10 F)。しかし、雄成虫では幻器を観察することができなかつた。

*H. diesingi* の形態計測値は、これまで報告された結果 (Leibersperger 1960; Shah 2007; Blanco et al. 2012) とほぼ同様の値であったが、日本産の b 値がわずかに大きい値であった (Blanco et al. 2012 の結果を参照、b 値 = 本研究結果 : 6.8–10.2、Blanco et al. 2012 の結果 : 9.5–16.0)。また卵の全長に関して、これまでの報告よりやや短い結果となった (本研究結果 : 54.3–59.8 × 23.6–25.8、Blanco et al. 2012 の結果 : 61.0–85.0 × 25.0–35.0、Shah 2007 の結果 : 72.9–80.2 × 29.2–34.0) (Blanco et al. 2012; Shah 2007)。本研究では、形態計測にアプリケーション Image J を使用して値を算出したが、Blanco ら (2012) や Shah (2007) の論文内では計測の仕方や手法について明記されていない。形態計測に使用するアプリケーションや顕微鏡の違いによって値が変わることはないはずであり、したがって同種異株間で見られる差であると考えられる。

### 3-4-5. ワモンゴキブリ寄生性線虫 *H. diesingi* の系統解析

これまで登録されている *Hammerschmidtella* 属線虫種のリボソーマル RNA の 28S ユニットの D2/D3 領域の配列データは、*H. diesingi* (EU365628 と JQ343843)、と *H. cristata* (EU365629) の 2 種のみである。本研究で取得した *H. diesingi* の NC 株 KHA443 と 石垣島サンプル KHA444 の配列データは、アルゼンチンやロシアから分離された *H. diesingi* と同一のクレードに含まれたことから、同種であると判断できる。この結果は、リボソーマル RNA の 28S ユニットの領域がゴキブリ寄生性線虫を属や種レベルで同定するために十分に有用な領域であると考えられ、今後、線虫の形態情報と合わせて配列データも充実させていく必要があると考えられる。

以上のように *H. diesingi* はこれまで既に論文として報告されている既知種であり、多数の報告例がある線虫だが、ノマルスキー微分干渉顕微鏡や SEM での詳細な形態観察や遺伝子情報を用いた系統解析は、既知種の分子系統学的関係や種の再定義、また新種記載を行なう際の種同定に有益な方法であるという確認ができた。*T. bulhoesi* のデータを含め、これら寄生性線虫について理解するために大切な基盤データとなると考えている。



### 3-5. 表 (Table 3. 1~Table 3. 6)

Table 3. 1 日本産ワモンゴキブリに寄生する *T. bulhoesi* 雌成虫の形態測定

Character	female (N=13)
a (body length/maximum body width)	13.7 ± 2.5 μm (9.7–16.5)
b (body length /oesophagus length)	6.1 ± 0.5 μm (5.4–7.0)
c (body length/tail length)	4.5 ± 0.8 μm (3.6–6.5)
V %	50.2 ± 6.0 (40.7–64.7)
Body Length	2715.5 ± 290.0 μm (2084.5–3251.2)
Body width	204.1 ± 42.9 μm (131.2–270.6)
Oesophagus length	442.9 ± 35.8 μm (388.1–511.7)
Excretory pore-anterior end	412.2 ± 54.1 μm (317.6–523.5)
Nerve ring-anterior end	199.7 ± 19.4 μm (176.2–235.8)
Tail length	611.8 ± 85.7 μm (448.8–731.1)
Vulva-anterior end	1363.3 ± 213.1 μm (1042.3–1742.3)
Buccal cavity length	16.3 ± 2.5 μm (11.9–20.9)
Buccal cavity width	11.8 ± 1.6 μm (10.5–14.9)
Corpus length	310.6 ± 28.3 μm (262.7–367.2)
Isthmus length	30.2 ± 2.0 μm (26.9–32.8)
Basal bulb length	87.1 ± 7.6 μm (68.7–98.5)
Basal bulb width	92.4 ± 8.3 μm (74.6–104.5)
Egg length (N = 30)	85.2 ± 1.7 μm (83.4–89.0)
Egg width (N = 30)	65.7 ± 1.7 μm (62.6–69.5)

雌成虫（N 頭数 = 13 頭）の各器官の測定結果を示しており、左側が線虫の各器官、右側が測定結果を示している。測定結果は、平均値±標準偏差  $\mu\text{m}$ （最小値—最大値）を示している。

**Table 3. 2** 日本産ワモンゴキブリに寄生していた *T. bulhoesi* 雄成虫の形態測定

Character	male (N=11)
a (body length/maximum body width)	14.1 ± 0.9 μm (13.0–15.8)
b (body length /oesophagus length)	4.9 ± 0.3 μm (4.1–5.2)
c (body length/tail length)	18.0 ± 4.0 μm (11.7–23.3)
Body length	869.9 ± 62.1 μm (733.3–938.1)
Body width	61.7 ± 4.8 μm (53.7– 68.7)
Oesophagus length	179.2 ± 7.5 μm (164.2–191.0)
Excretory pore-anterior end	241.1 ± 32.2 μm (182.1–286.6)
Nerve ring-anterior end	115.1 ± 10.9 μm (104.5–138.8)
Tail length	50.4 ± 11.0 μm (37.3–70.0)
Buccal cavity length	6.1 ± 2.1 μm (3.0–10.5)
Buccal cavity width	5.5 ± 1.0 μm (4.2–7.5)
Corpus length	127.3 ± 7.7 μm (112.0–141.8)
Isthmus length	10.7 ± 3.5 μm (6.0–16.4)
Basal bulb length	36.8 ± 3.5 μm (31.4–40.3)
Basal bulb width	33.4 ± 2.4 μm (29.9–37.3)
Spicule length	35.1 ± 2.3 μm (31.4–38.8)

雄成虫 (N 頭数 = 11 頭) の各器官の測定結果を示しており、左側が線虫の各器官、右側が測定結果を示している。測定結果は、平均値±標準偏差 μm (最小値—最大値) を示している。

Table 3.3 ペアワイズ比較により算出された *T. bulhoesi* の D2/D3 配列の違い (%)

	<i>T.b.NC</i>	<i>T.b.Ishi</i>	<i>T.sp.GQ</i>	<i>T.sp.JQ</i>	<i>H.d.EU</i>	<i>H.d.JQ</i>	<i>H.c.EU</i>
<i>T. bulhoesi</i> KP172224 ( <i>T.b. NC</i> )	-						
<i>T. bulhoesi</i> KP172225 ( <i>T.b. Ishi</i> )	0.4	-					
<i>Thelastoma sp.</i> GQ368468 ( <i>T.s.GQ</i> )	0.2	0.5	-				
<i>Thelastoma sp.</i> JQ343845 ( <i>T.s.JQ</i> )	5.3	5.3	5.5	-			
<i>H. diesingi</i> EU365628 ( <i>H.d. EU</i> )	29.0	29.0	28.5	28.6	-		
<i>H. diesingi</i> JQ343843 ( <i>H.d. JQ</i> )	29.6	29.6	29.0	29.1	0.5	-	
<i>H. cristata</i> EU365629 ( <i>H.c. EU</i> )	33.5	33.5	32.9	30.9	14.2	14.5	-

欠失やギャップを含んだすべての配列 (589 塩基) を基にして、MEGA6 ソフトで解析した (Tamura et al., 2013)。計 7 線虫種の間での配列の差異を比較し、*T.bulhoesi* の配列を比較した際、1%以下の配列の差異のものを赤色で示した。

Table 3. 4 日本産ワモンゴキブリに寄生する *H. diesingi* 雌成虫の形態測定

Character	female (N=16)
a (body length/maximum body width)	13.0 ± 1.9 μm (8.5–16.5)
b (body length /oesophagus length)	8.6 ± 0.7 μm (6.8–10.2)
c (body length/tail length)	3.2 ± 0.3 μm (2.7–3.9)
V %	23.5 ± 2.6 (17.3–26.5)
Body Length	2851.7 ± 335.6 μm (2271.9–3459.5)
Body width	224.8 ± 50.1 μm (163.9–361.7)
Buccal cavity length	10.7 ± 1.6 μm (8.6–14.2)
Buccal cavity width	10.1 ± 1.2 μm (8.2–13.0)
Procorpus length	207.6 ± 11.6 μm (190.3–228.1)
Maximum width of procorpus	66.6 ± 5.6 μm (59.4–78.6)
Isthmus length	45.5 ± 4.9 μm (38.9–56.7)
Basal bulb length	72.7 ± 4.5 μm (64.6–80.8)
Basal bulb width	80.6 ± 9.0 μm (67.1–98.9)
Oesophagus length	330.3 ± 18.3 μm (304.4–364.9)
Nerve ring-anterior end	123.4 ± 10.5 μm (103.5–139.2)
Excretory pore-anterior end	422.3 ± 32.1 μm (364.5–489.7)
Vulva-anterior end	668.0 ± 90.6 μm (506.2–805.6)
Tail length	882.3 ± 81.5 μm (679.6–1055.7)
Egg length (N = 16)	58.0 ± 1.6 μm (54.3–59.8)
Egg width (N = 16)	24.7 ± 0.6 μm (23.6–25.8)

雌成虫（N 頭数 = 16 頭）の各器官の測定結果を示しており、左側が線虫の各器官、右側が測定結果を示している。測定結果は、平均値±標準偏差  $\mu\text{m}$ （最小値—最大値）を示している。

Table 3.5 日本産ワモンゴキブリに寄生していた *H. diesingi* 雄成虫の形態測定

Character	male (N=11)
a (body length/maximum body width)	14.5 ± 2.9 μm (10.4–18.6)
b (body length /oesophagus length)	4.8 ± 0.7 μm (3.7–5.8)
c (body length/tail length)	7.1 ± 1.0 μm (5.8–8.7)
Body length	704.8 ± 130.2 μm (455.8–851.7)
Body width	51.2 ± 15.5 μm (28.1– 75.8)
Buccal cavity length	4.4 ± 0.6 μm (3.1–5.1)
Buccal cavity width	5.5 ± 0.8 μm (4.2–6.7)
Procorpus length	77.5 ± 7.0 μm (64.4–87.7)
Isthmus length	39.7 ± 4.4 μm (32.6–45.9)
Basal bulb length	28.4 ± 4.5 μm (20.0–35.9)
Basal bulb width	21.8 ± 2.9 μm (15.0–25.8)
Oesophagus length	147.2 ± 14.1 μm (121.5–166.3)
Nerve ring-anterior end	94.9 ± 8.0 μm (74.4–104.1)
Excretory pore-anterior end	171.2 ± 19.2 μm (133.3–196.4)
Tail length	99.3 ± 14.6 μm (68.4–117.7)
Spicule length	29.9 ± 2.2 μm (26.5–33.9)
Gubernaculum length	14.9 ± 1.4 μm (12.0–16.5)

雄成虫 (N 頭数 = 11 頭) の各器官の測定結果を示しており、左側が線虫の各器官、右側が測定結果を示している。測定結果は、平均値 ± 標準偏差 μm (最小値—最大値) を示している。

Table 3. 6 *H. diesingi* の D2/D3 配列の違い (%) をペアワイズ比較により算出した

	<i>H.d</i> .NC	<i>H.d</i> .Ishi	<i>H.d</i> .JQ	<i>H.d</i> .EU	<i>H.c</i> .EU	<i>T.b</i> .NC	<i>T.b</i> .Ishi	<i>T.sp</i> .GQ	<i>T.sp</i> .JQ
<i>H. diesingi</i> KP172226 ( <i>H.d</i> . NC)	-								
<i>H. diesingi</i> KP172227 ( <i>H.d</i> . Ishi)	0.15	-							
<i>H. diesingi</i> JQ343843 ( <i>H.d</i> . JQ)	0.15	0.31	-						
<i>H. diesingi</i> EU365628 ( <i>H.d</i> . EU)	0.31	0.31	0.46	-					
<i>H. cristata</i> EU365629 ( <i>H.c</i> . EU)	11.1	11.2	11.3	11.4	-				
<i>T. bulhoesi</i> KP172224 ( <i>T.b</i> . NC)	18.1	18.2	18.3	18.4	19.8	-			
<i>T. bulhoesi</i> KP172225 ( <i>T.b</i> . Ishi)	17.8	17.9	18.0	18.1	19.7	0.33	-		
<i>Thelastoma sp.</i> GQ368468 ( <i>T.s</i> .GQ)	17.9	18.1	18.1	18.2	19.6	0.48	0.82	-	
<i>Thelastoma sp.</i> JQ343845 ( <i>T.s</i> .JQ)	18.6	18.7	18.8	18.9	18.9	6.00	5.58	6.44	-

欠失やギャップを含んだすべての配列 (589 塩基) を基にして、MEGA6 ソフトで解析した (Tamura et al., 2013)。計 9 線虫種の間配列の差異を比較し、各 *H. diesingi* の配列を比較した際、1%以下の配列の差異のものを赤色で示した。



3-6. 図 (Fig. 3. 1~Fig. 3. 11)

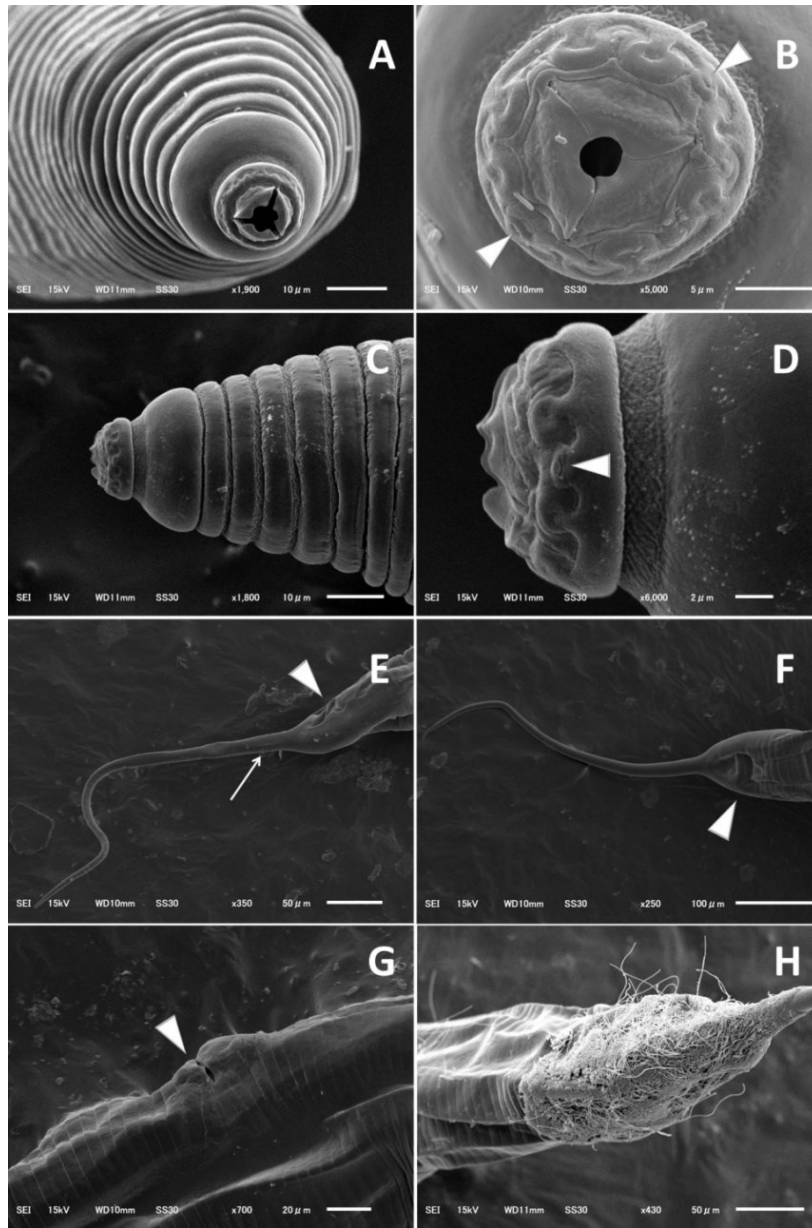
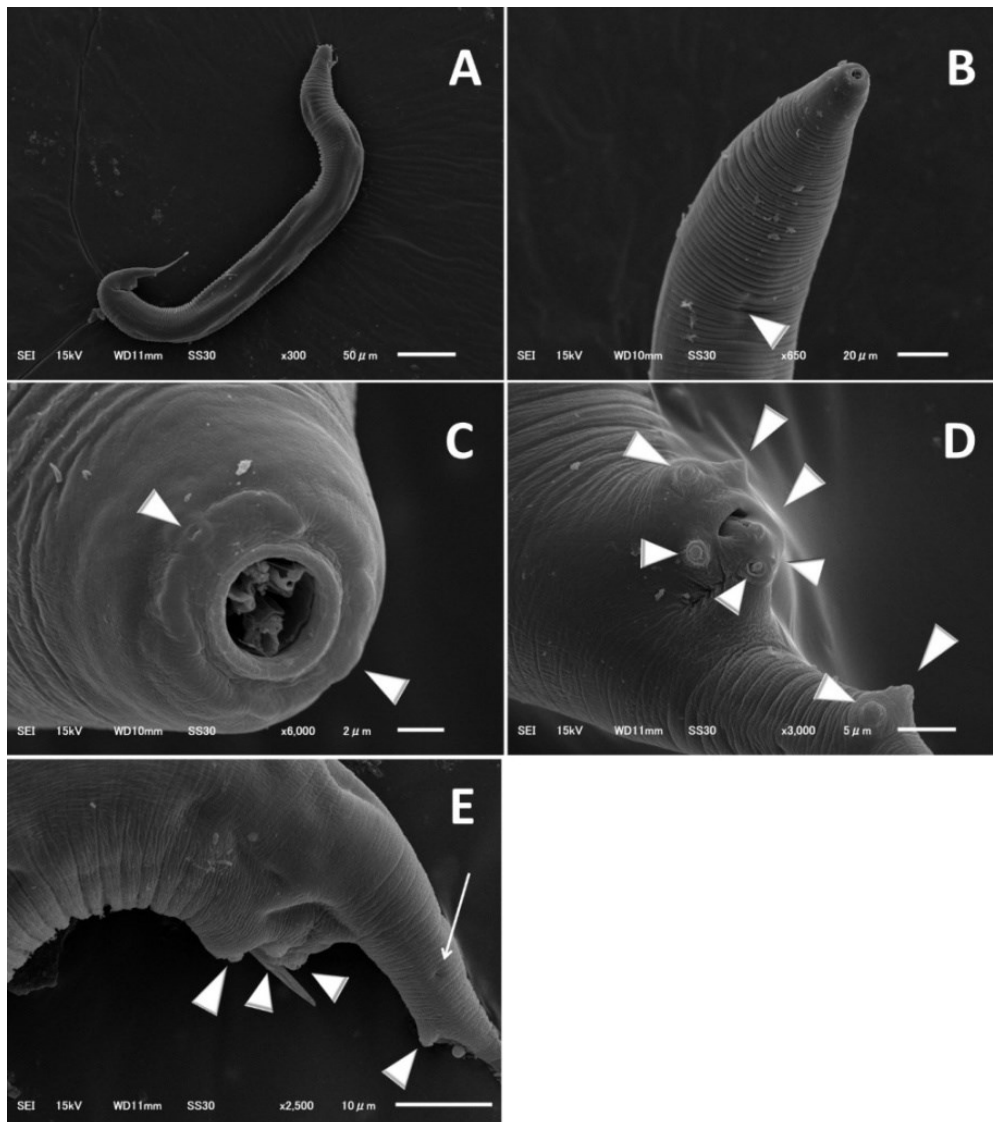


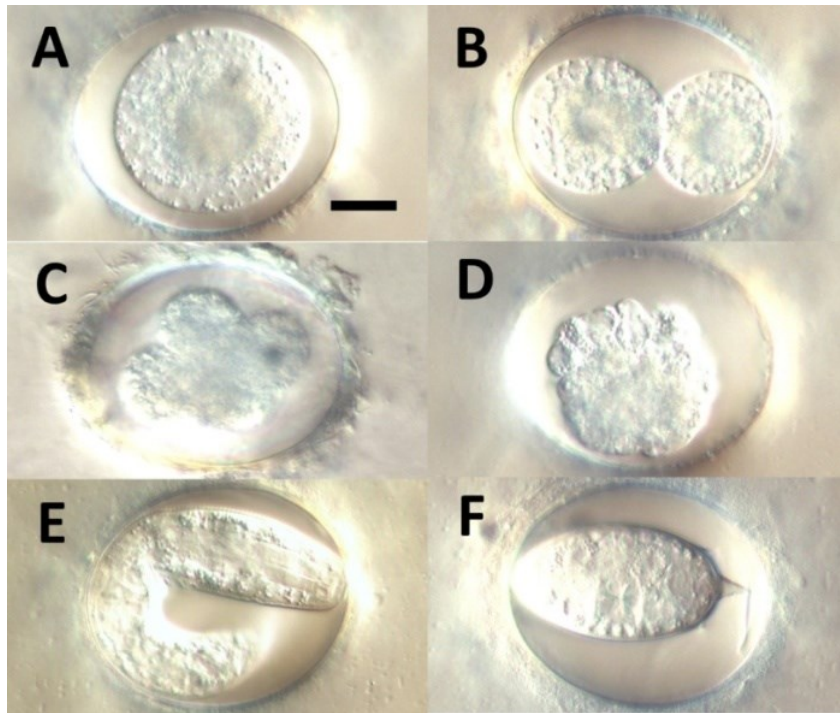
Fig. 3. 1 *Thelastoma bulhoesi* (de Magalhães 1900)の電子顕微鏡 (SEM) で観察した雌線虫の写真

A. 線虫の頭部の写真、B. 線虫の口器の詳細な写真 (白矢尻：感覚器官の双器 Amphid について示す)、C. 線虫前部の写真、D. 線虫口器の写真 (白矢尻：感覚器官の双器 Amphid について示す)、E. 線虫の尾部の写真 (白矢尻：肛門、白矢印：感覚器官の幻器 phasmid について示す)、F. 線虫の尾部の写真 (白矢尻：肛門)、G. 線虫の陰門の写真 (白矢尻：陰門)、H. 線虫尾部の写真で、細菌が表面に付着している。



**Fig. 3.2** *Thelastoma bulhoesi* (de Magalhães 1900)の電子顕微鏡 (SEM) で観察した雄線虫の写真

A. 線虫の全体写真、B. 線虫の頭部の写真 (白矢尻：総排泄腔について示している) C. 線虫の口器の詳細な写真 (白矢尻：感覚器官の双器 Amphid について示す)、D. 線虫の尾部の写真 (白矢尻：それぞれの尾部小乳頭について示す)、E. 線虫の尾部の写真 (白矢尻：それぞれの尾部小乳頭、白矢印：感覚器官の幻器 phasmid について示す)。



**Fig. 3.3** *Thelastoma bulhoesi* (de Magalhães 1900)の卵の初期胚発生ステージについてノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察した写真

A. 1細胞期、B. 2細胞期、C. 4細胞期、D. 多細胞期、E. 第1期 L1 幼虫期、F. 第2期 L2 幼虫期。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

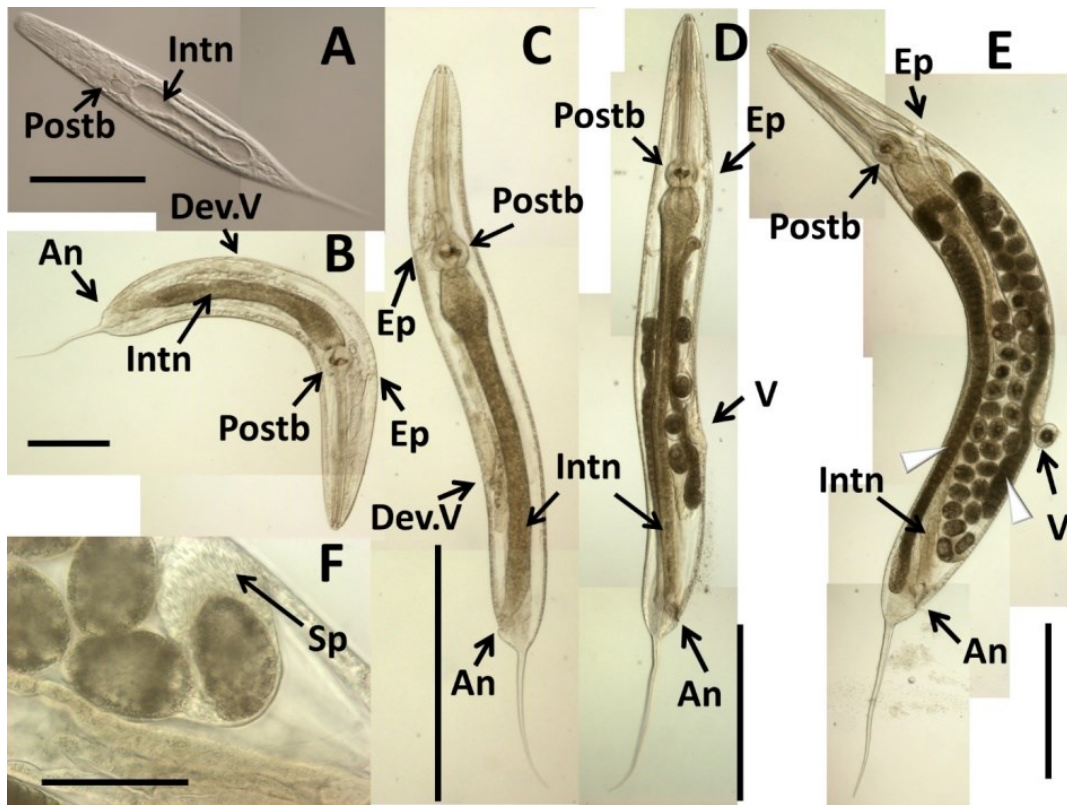
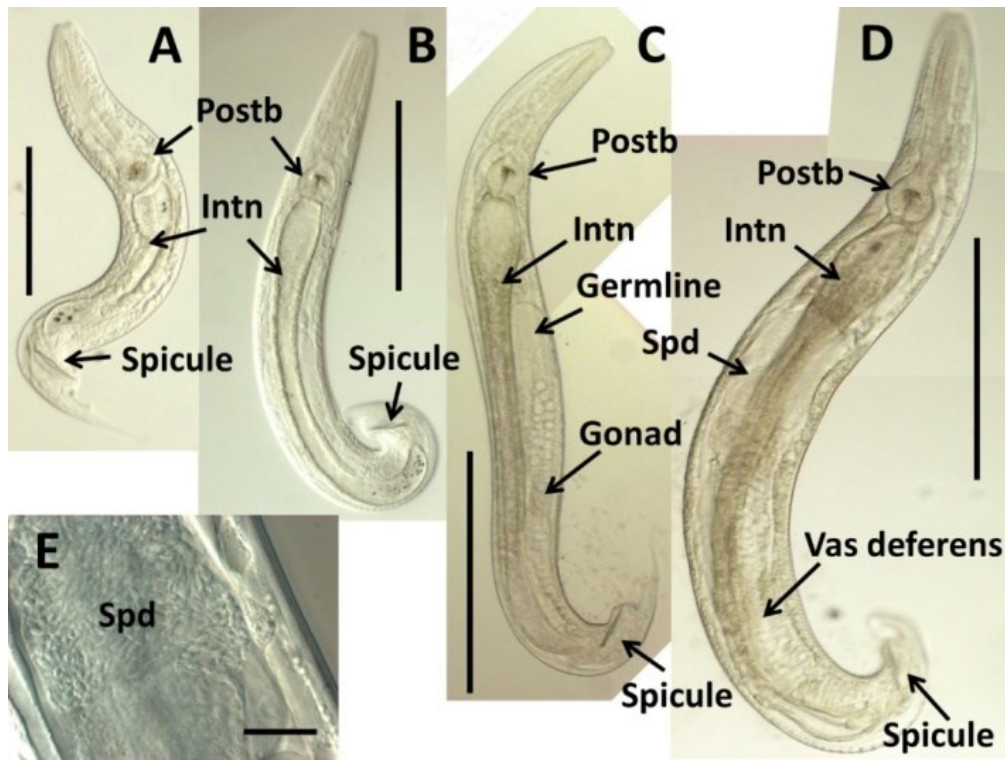


Fig. 3. 4 *Thelastoma bulhoesi* (de Magalhães 1900)の雌線虫の後胚発生ステージについてノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察した写真

A. 感染 1 日後の幼虫、B. 感染後 14 日後の幼虫、C. 感染後 21 日後の幼虫、D. 感染後 31 日後の若雌線虫、E. 感染後 31 日後の抱卵雌線虫（白矢尻：線虫内の卵母細胞）、F. 感染後 31 日後の雌線虫内で見られた貯精囊と子宮の中にあつた卵、貯精囊は精子で満たされていた。

スケールバー：A, F 100  $\mu\text{m}$ 、B 200  $\mu\text{m}$ 、C, D, E 500  $\mu\text{m}$ 。

省略した単語について：Postb, posterior bulb 咽頭筋；Intn, intestine 腸管；Dev.V., developing vulva 発生が進んでいる段階の陰門；V, vulva 陰門；Ep, excretory pore 総排泄腔；An, anus 肛門；Sp, sperm in the spermatheca 貯精囊内の精子。

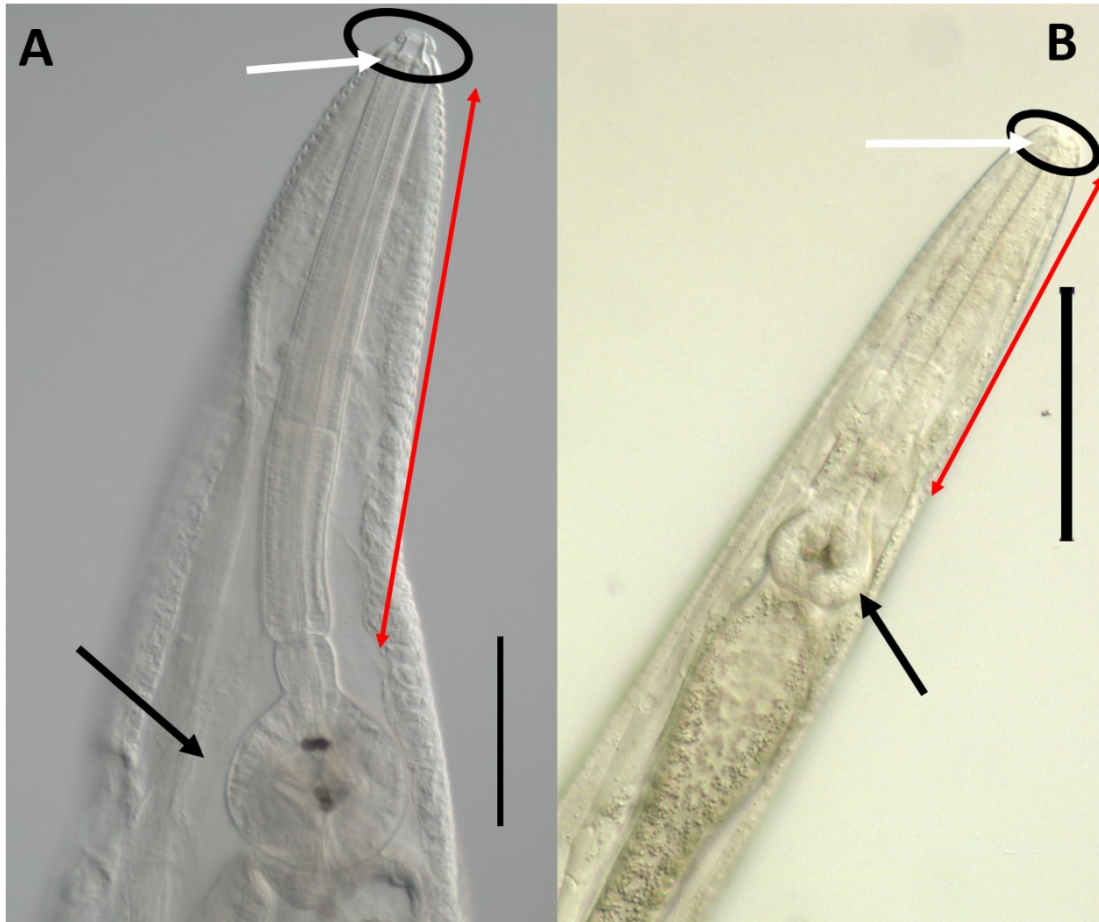


**Fig. 3.5** *Thelastoma bulhoesi* (de Magalhães 1900)の雄線虫の後胚発生ステージについてノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察した写真

A. 感染7日後の幼虫、B. 感染後14日後の幼虫、C. 感染後21日後の幼虫、D. 感染後31日後の雄線虫 E. 感染後31日後の精母細胞の様子。

スケールバー：A 100  $\mu\text{m}$ 、B, C, D 200  $\mu\text{m}$ 、E 20  $\mu\text{m}$ 。

省略した単語について：Postb：Posterior bulb 咽頭筋；Intn：Intestine 腸管；Spicule 交接刺；Germline 生殖細胞；Gonad：生殖巣；Vas deferens：輸精管；Spd：spermatid 精細胞。



**Fig. 3. 6** ノマルスキー微分干渉顕微鏡により観察した、*Thelastoma bulhoesi* の雌線虫、雄線虫頭部の拡大写真

(A) 雌線虫の頭部の写真、黒色で囲った部位は口腔 (Buccal cavity) を示す。黒矢印は後部食道球、白矢印は鋸歯構造、赤双方向矢印は前部食道球から中部食道球を示す。

(B) 雄線虫の頭部の写真、黒色で囲った部位は口腔 (Buccal cavity) を示す。黒矢印は後部食道球、白矢印は鋸歯構造、赤双方向矢印は前部食道球から中部食道球を示す。

スケールバーは、100  $\mu\text{m}$ 。

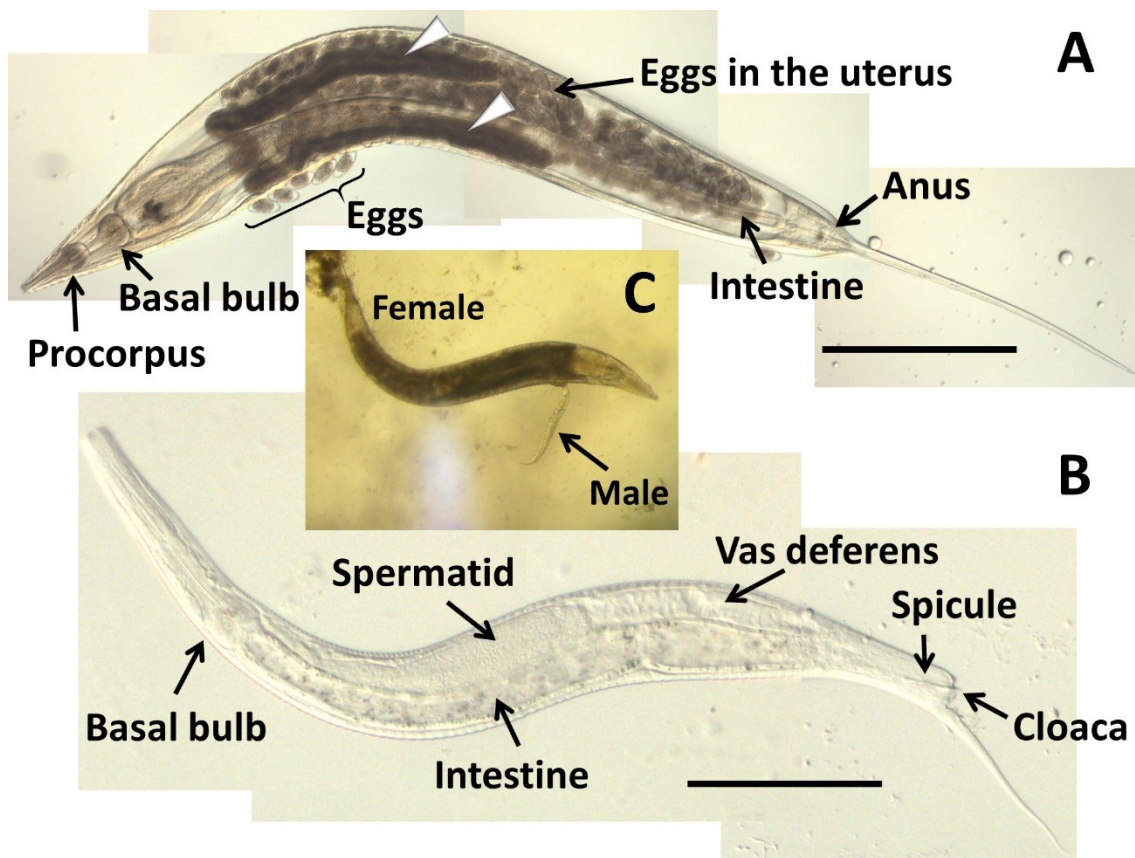


Fig. 3. 7 *Hammerschmidtella diesingi* のノマルスキー微分干渉顕微鏡で撮影した写真

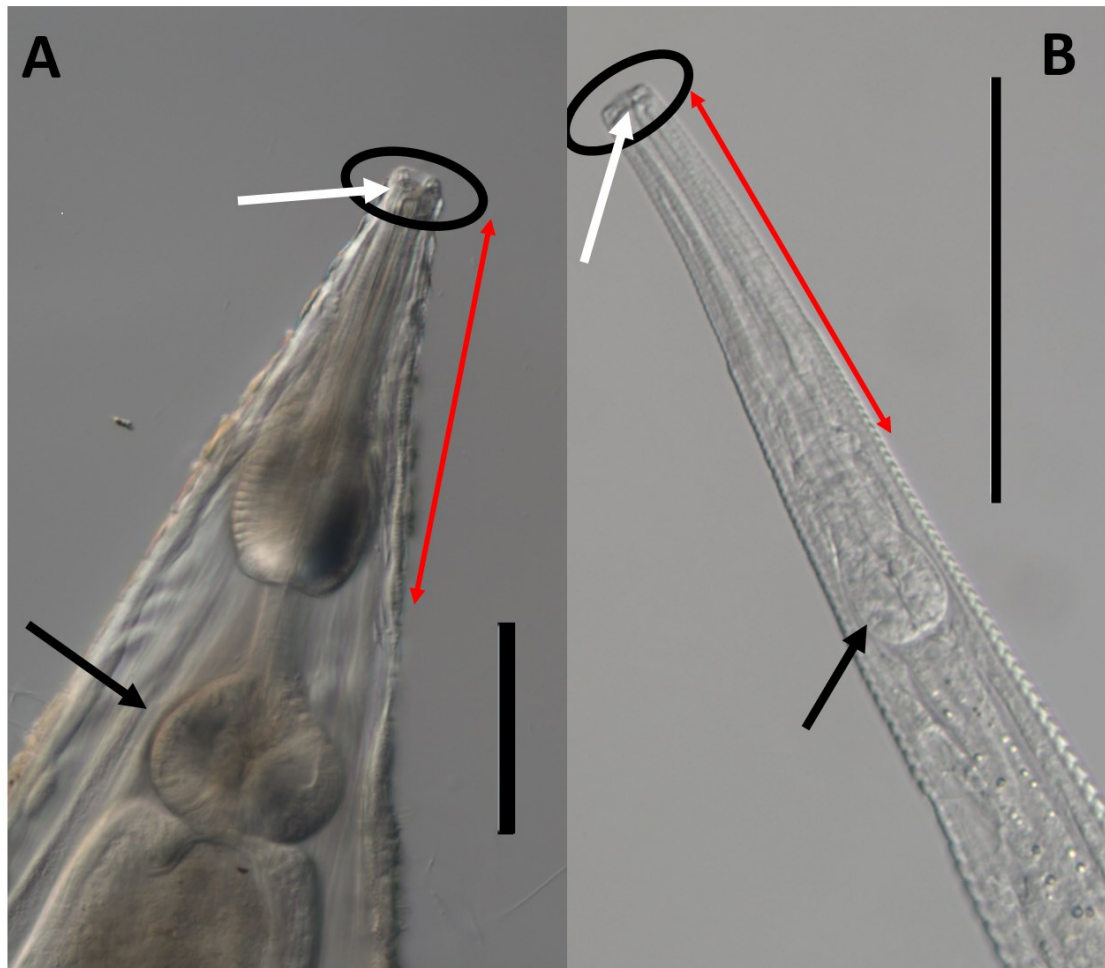
A. 雌線虫の写真、白矢尻は卵母細胞を示す。5 個の卵が陰門から産卵されているのが分かる。B. 雄線虫の写真、たくさんの精子細胞 (Spermatid) が貯精嚢で確認できる。C. 雌雄線虫が交尾している様子、矢印の小さい線虫が雄。  
スケールバー: A 500  $\mu\text{m}$ 、B 100  $\mu\text{m}$ 。

図に示した単語

雌線虫 A の写真に関して: Procorpus 中部食道球; Basal bulb 後部食道球; Eggs: 産卵された卵; Eggs in the uterus: 子宮内の卵; Intestine: 腸管; Anus: 肛門。

雌線虫 B の写真に関して:

Basal bulb 後部食道球; Intestine: 腸管; Spermatid 精細胞; Vas deferens: 輸精管; Spicule 交接刺; Cloaca: 排泄腔。



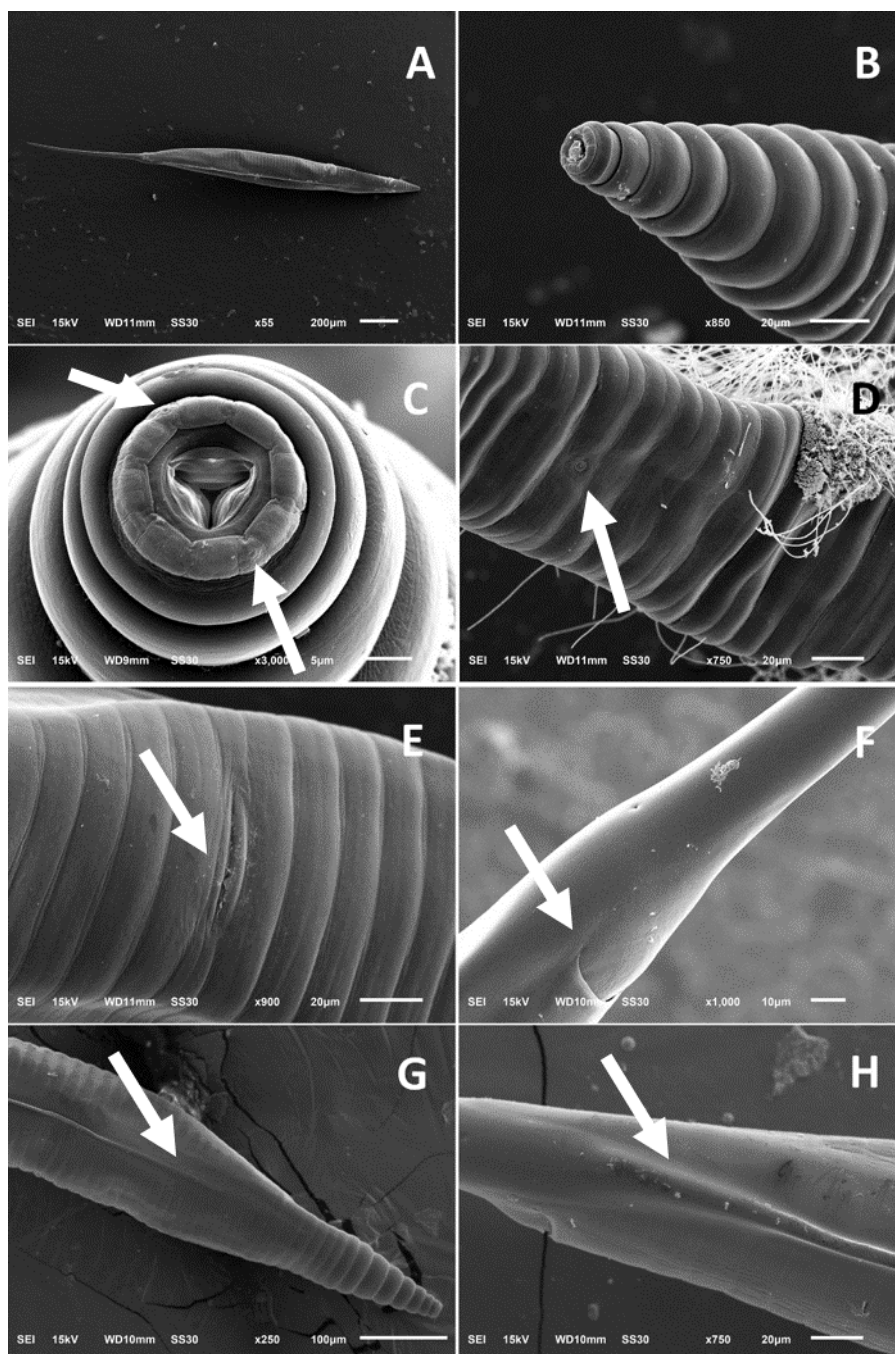
**Fig. 3. 8** ノマルスキー微分干渉顕微鏡により観察した、*Hammerschmidtella diesingi* の雌線虫、雄線虫頭部の拡大写真

(A) 雌線虫の頭部の写真、黒色で囲った部位は口腔 (Buccal cavity) を示す。黒矢印は後部食道球、白矢印は鋸歯構造、赤双方向矢印は前部食道球から中部食道球を示す。

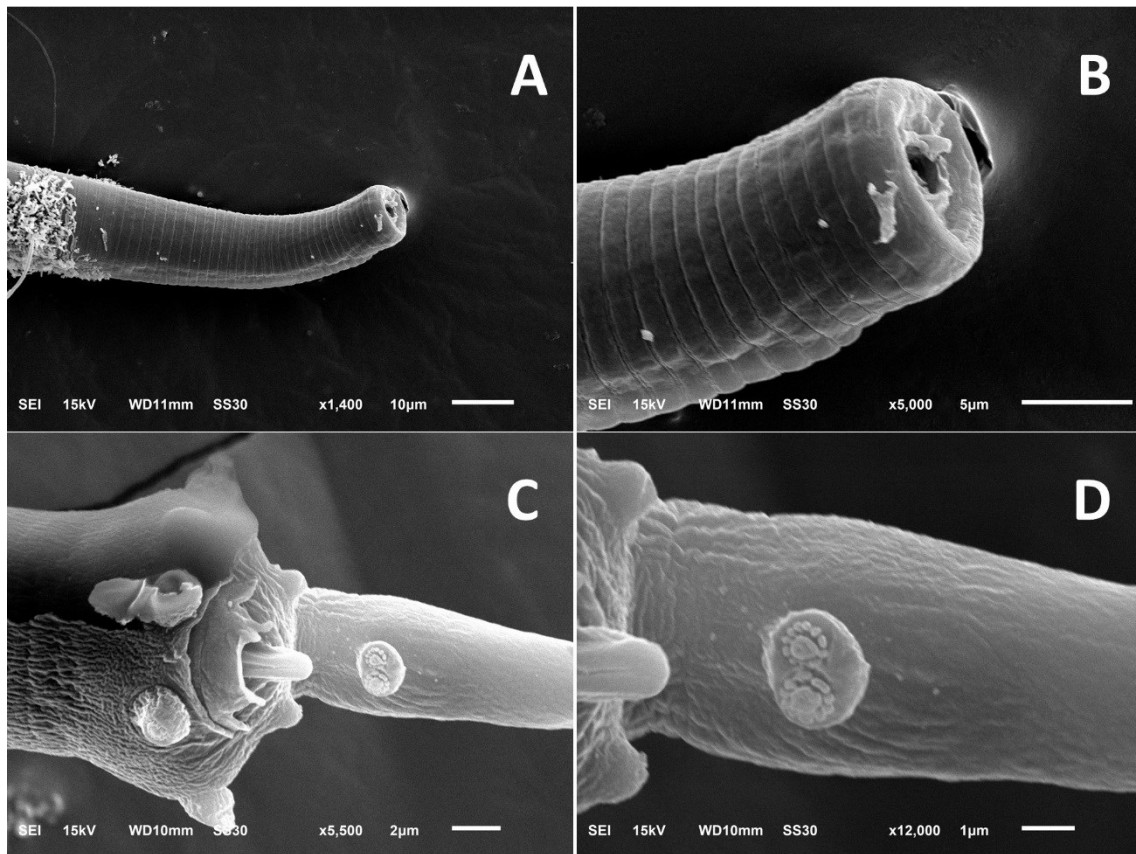
(B) 雄線虫の頭部の写真、黒色で囲った部位は口腔 (Buccal cavity) を示す。黒矢印は後部食道球、白矢印は鋸歯構造、赤双方向矢印は前部食道球から中部食道球を示す。

スケールバーは、100  $\mu\text{m}$ 。





**Fig. 3.9** *Hammerschmidtella diesingi* の SEM で観察した雌線虫の写真  
 A. 線虫の全体写真、B. 線虫の頭部の写真、C. 線虫の口器の詳細な写真（白矢印は双器 Amphid を示す）、D. 高倍率で観察した総排泄腔（白矢印）の写真、E. 線虫の陰門（白矢印）の写真、F. 肛門（白矢印）付近の写真、G. 側翼の始まり（白矢印）を示した線虫前部の写真、H. 側翼の終わり（白矢印）を示した尾部の写真。



**Fig. 3. 10** *Hammerschmidtella diesingi* の SEM で観察した雄線虫の写真  
 A. 線虫の頭部写真、B. 線虫の口器の写真、C. 線虫の尾部の写真、D. 線虫尾部の二重小乳頭 duplex papillae についての写真。

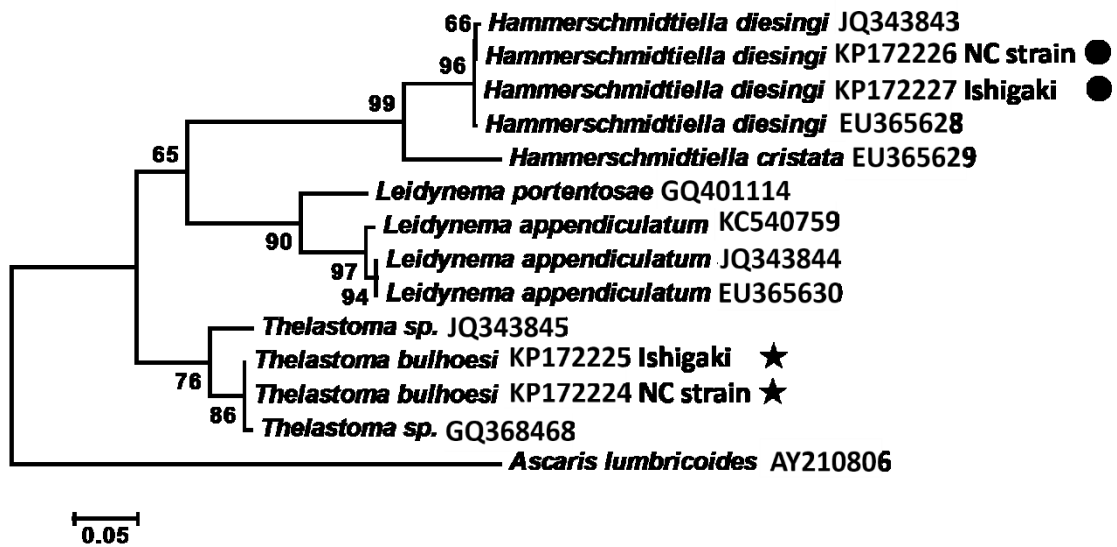


Fig. 3. 11 日本産ワモンゴキブリから分離した寄生性線虫の分子系統関係  
 rRNA 遺伝子領域より最尤法を用いて系統樹を作製し、14 種の線虫の配列（13 種の Thelastomatidae と 1 種の outgroup として *Ascaris lumbricoides*）から MEGA 6.0 software（Tamura et al. 2013）を用いて、キムラ 2 パラメーターモデル（Kimura 1980）+G で推定し、系統樹の信頼性はブートストラップ検定を 1000 反復（Felsenstein 1985）行なった。系統樹の数値は各 Bootstrap 値を示しており 65 以上の高い信頼性を示す系統樹を作製できた。なお、ガンマ推定（+G）は 2 categories（+G, parameter = 0.7839）で推定した。  
 ★で示した線虫は日本産 *T. bulhoesi* 2 株（NC 株、Ishigaki : 石垣採集個体）を示している。●で示した線虫は日本産 *H. diesingi* 2 株（NC 株、Ishigaki : 石垣採集個体）を示している。

## 第4章 クロゴキブリに寄生する線虫 *Leidynema appendiculatum*

### の宿主特異性の低さについて

#### 4-1. 背景

寄生性線虫に備わる宿主特異性は、寄生性進化戦略の理解とともに、寄生性線虫あるいは宿主が新しい環境に移動した際、その地域における感染症拡大等のリスクや生態系への影響を予測するための重要な基礎情報と言える。動物に広く寄生する Oxyurida 目線虫は、脊椎動物を宿主とする Oxyuroidea 上科と無脊椎動物を宿主とする Thelastomatidea 上科に分けられる (Nadler et al. 2007; Carreno 2014)。ヒトに寄生する Oxyuroidea 上科の *Enterobius vermicularis* は、大腸炎や肛門周囲の膿瘍などの病気をヒトに対して引き起こすと報告されているものの (St Georgiev 2005; Ariyarathenam et al. 2010)、一般の健常者には大したインパクトを与えないし、鉤虫症や象皮病、回旋糸状虫症を含めた消化管寄生性線虫によって引き起こされる感染症と比較して、それほど重大なものでないといえる (Bungiro and Cappello 2004; Pilotte et al. 2017)。無脊椎動物を宿主とする Thelastomatidea 上科寄生性線虫も、宿主に対してほとんど害を及ぼさないように見えるが (Adamson 1994; Ozawa et al. 2014)、実際の影響に関しては未知である。さらに、脊椎動物を宿主とする Oxyuroidea 上科線虫の系統関係と、その宿主動物の系統関係との間に相関があり、共種分化を示す例が報告されている (Hugo 1999; Murata et al. 2002; Falk & Perkins 2013)。一方、無脊椎動物を宿主とする Thelastomatoidea 上科線虫を見ると、1種類の宿主から最大 15種類以上の寄生性線虫が分離されることから、種多様性が非常に高いことが分かっており (Adamson and van Waerebeke 1992a; Jex et al. 2006a; Jex et al. 2007; Ozawa, Morffe, Hasegawa, unpublished data)、また宿主と寄生性線虫との系統関係の相関がないことから、Thelastomatoidea 上科と Oxyuroidea 上科の間では寄生戦略の進化の仕方が全く違うのではないかと考えられる。

Thelastomatoidea 上科 Thelastomatidae 科線虫は、ゴキブリ目を主に宿主とするグループであり (Adamson and van Waerebeke 1992a; Ozawa et al. 2014; Ozawa et al. 2016; Sriwati et al. 2016)、日本に生息するクロゴキブリ

*Periplaneta fuliginosa* には、線虫 *Leidyneema appendiculatum* の 1 種のみが高確率で寄生していた (Ozawa et al. 2014、本論文中第 2 章より)。しかし過去の報告からも、*L. appendiculatum* はコスモポリタン種であるとも言われ、複数のゴキブリ宿主 (ワモンゴキブリ *P. americana*、コワモンゴキブリ *P. australasiae*、トウヨウゴキブリ *Blatta orientalis*) から分離されている (Adamson and Noble 1993; Connor and Adamson 1998; Shah 2007; Blanco et al. 2012)。ただ、*L. appendiculatum* は様々な宿主からの分離報告があるものの、クロゴキブリを宿主としたときと同様の感染率や個体群構造であるかは調べられてない。

4 章では、14 種のゴキブリを解剖して寄生する線虫種を調べることで、クロゴキブリ以外からも *L. appendiculatum* が分離されるかどうか確認した。さらに、*L. appendiculatum* の人工感染実験法を確立し、クロゴキブリ以外の宿主にも感染するかどうか調べた。

## 4-2. 材料と方法

### 4-2-1. ゴキブリ株およびその培養法

実験で使用したゴキブリは、中部大学環境生物科学科長谷川浩一研究室で培養されている研究室培養株であり、次の 7 つの株を使用した。(1) クロゴキブリ *Periplaneta fuliginosa* EE 株、(2) クロゴキブリ *P. fuliginosa* UF 株、(3) ヤマトゴキブリ *P. japonica* みよし株、(4) オガサワラゴキブリ *Pycnoscelus surinamensis* ペット株、(5) オガサワラゴキブリ *P. surinamensis* 八重岳株、(6) モリチャバネゴキブリ *Blattella nipponica* CU 株、(7) トルキスタンゴキブリ *Blatta lateralis* KX 株。クロゴキブリ EE 株は、兵庫県赤穂市産でアース環境サービスから 2012 年に分譲いただいたものであり、クロゴキブリ UF 株はフロリダ大学 Philip G. Koehler 研究室で 60 年以上培養していた株を 2013 年に分譲頂いたものである。ヤマトゴキブリみよし株は 2012 年 6 月に愛知県みよし市で雌雄 10 頭ずつ捕獲したものから株を確立した。オガサワラゴキブリ *P. surinamensis* ペット株は、爬虫類の餌用として売られていたものを購入し培養した (詳細は不明である)。オガサワラゴキブリ *P. surinamensis* 八重岳株は、2013 年 3 月に沖縄県本島の八重岳 (沖縄県国頭郡本部町大嘉陽) で 3 匹の成虫

を捕獲し、それらを基に株として確立した。モリチャバネゴキブリ *B. nipponica* CU 株は、愛知県春日井市の中部大学キャンパス内の林で 2014 年と 2017 年に、4 月から 9 月の間に採集したものを使用した。モリチャバネゴキブリは継代培養することが不可能であったため、すべての個体は実験前に捕獲し、一時的に培養したものを使用した。トルキスタンゴキブリ *B. lateralis* KX 株は、2013 年 7 月にアメリカ合衆国テネシー州のノックスビルで採集した 3 頭の成虫から株を確立した。

線虫非感染ゴキブリ株の確立方法は、第 3 章 3-2-1. ワモンゴキブリ株およびその培養法と同様の方法で説明したとおりである。ヤマトゴキブリ *P. japonica* みよし株、モリチャバネゴキブリ *B. nipponica* CU 株、オガサワラゴキブリ *P. surinamensis* 八重岳株は、もともと線虫非感染であった。確立した線虫非感染ゴキブリ株は、定期的に数頭ランダムに捕獲・解剖して寄生性線虫が感染していないこと確認し続けた。

#### 4-2-2. ゴキブリの解剖および寄生性線虫の観察

ゴキブリの解剖やノマルスキー微分干渉顕微鏡による観察は、第 2 章の 2-2-2. で説明された方法に従って実施した。

4 つの研究室培養株であるクロゴキブリ *P. fuliginosa* EE 株、クロゴキブリ *P. fuliginosa* UF 株、オガサワラゴキブリ *P. surinamensis* ペット株、トルキスタンゴキブリ *B. lateralis* KX 株、には、もともと線虫 *L. appendiculatum* が感染しており、寄生する線虫を幼虫、雄成虫、雌成虫に区別し、Quantitative Parasitology 3.0 (Rózsa et al. 2000) を用いて線虫個体群構造を解析した。

上記 4 種の培養株に加え、3 か所の地域（東京都心、中部、九州）で捕獲したクロゴキブリ野生株を解剖し、寄生する線虫の個体群構造を解析した。

#### 4-2-3. 寄生性線虫の分子同定及び系統解析

線虫のゲノミック DNA の抽出、リボソーマル RNA の大サブユニット（60S サブユニット）28S ユニット D2/D3 領域の配列解析は、第 2 章の 2-2-6. と同様の方法で実施した。新たに 18S ユニットの部分領域を解析するために、線虫全般に使用されるユニバーサルプライマー、nSSU\_F\_07: 5' -AAAGAT TAA GCC

ATG CAT G-3' と nSSU\_R\_26: 5' -CAT TCT TGG CAAATG CTT TCG -3' (Blaxter et al. 1998) を使用した。

分離した線虫の系統関係は、Table 4.2 に示した配列を用いて解析した。第 2 章の 2-2-6. 寄生性線虫の分子系統解析と同様の方法で、各配列のアライメントを行ない、trimAI のデフォルト設定で配列を調整した (Capella-Gutiérrez et al. 2009)。系統樹の作製方法や系統間に見られる配列間の差異の比較は、第 2 章の 2-2-6. 寄生性線虫の分子系統解析と同様の方法で行ない、28S ユニット D2/D3 領域は Hasegawa-Kishino-Yano モデル (Hasegawa et al. 1985)、18S ユニットの部分領域は Jukes-Cantor モデル (Jukes and Cantor 1969) を使用して、それぞれ系統樹を作成した。

#### 4-2-4. 寄生性線虫の人工感染実験テスト

線虫の人工感染実験は、4 つの線虫非感染ゴキブリ株に対して実施した。それぞれ、クロゴキブリ *P. fuliginosa* EE 株、ヤマトゴキブリ *P. japonica* みよし株、オガサワラゴキブリ *P. surinamensis* 八重岳株、モリチャバネゴキブリ *B. nipponica* CU 株を使用した。

*L. appendiculatum* 感染態 L2 期の卵を集めるために、まずはクロゴキブリ *P. fuliginosa* EE 株の線虫感染株を解剖し、*L. appendiculatum* の抱卵雌線虫を集めた。ゴキブリ生理食塩水を入れたシラキユース時計皿に、*L. appendiculatum* の抱卵雌線虫を複数頭移し、解剖用のメス刃で線虫の体の中心を切り割き、子宮内の卵 (1 頭当たり 50~150 個ぐらい) を取り出した。子宮から取り出した卵を 25°C で 14 日間、生理食塩水内で静置させると、全ての卵が感染態 L2 期にまで発生が進んだ。終令ゴキブリ (線虫非感染) 10 頭を 1 グループとしてプラスチックケース (直径 13 cm × 高さ 22.5 cm) に移し、人工感染実験前に予め 3 日間絶食させた。絶食後、500 個の線虫感染態 L2 期卵と 0.4g のゴキブリ餌を混合したものを与え摂食させた。線虫卵を混合した餌がすべて摂食された後は、線虫卵を混合しない通常の餌と滅菌水を与えて培養した。これをゴキブリ株ごとに ~8 グループ作成し、クロゴキブリに関しては人工感染後 1、3、7、14、21、28、35 日後に各グループから 1 頭ないし 2 頭のゴキブリを捕獲・解剖し、線虫の感染率 (すべてのゴキブリを対象に線虫感染率を % で算出) および個体群構造 (宿主 1 頭あたりに寄生する線虫の個体数で、雄、雌、幼虫を区別) を調べた。

ヤマトゴキブリやモリチャバネゴキブリ、オガサワラゴキブリに関しては、人工感染後 1 週間ごとに（7 日目から 35 日目まで）、各グループから 1 頭ないし 2 頭のゴキブリを解剖し、線虫の感染率及び個体群構造を調べた。この実験において分離したすべての線虫は、発生ステージと性の判別を行なうために、5%アガーパッド（Shaham 2006）の上に乗せてカバーガラスで封入し、ノマルスキー微分干渉顕微鏡下で写真撮影した。

さらにヤマトゴキブリに関しては、35 日目の解剖後に余った個体をすべて集め、何世代か継代培養した。人工感染後に継代培養したヤマトゴキブリを解剖し、線虫の感染率及び個体群構造を調べた。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. 線虫 *L. appendiculatum* が寄生していたクロゴキブリ以外の宿主

第 2 章で調べた研究室培養株（Ozawa et al. 2014）に加え、新たに 2 種類のクロゴキブリ培養株、EE 株（日本）と UF 株（アメリカ）を調べたところ、やはり線虫 *L. appendiculatum* の 1 種のみが 100%感染していた（Table 4. 1）。2 つのクロゴキブリ株はそれぞれ独立で培養・確立し、長い間培養されていた株であることから、寄生性線虫 *L. appendiculatum* とクロゴキブリとの関係が非常に安定していることも明らかである。3 地域の野外で採集したクロゴキブリ野生株にも線虫 *L. appendiculatum* の 1 種のみが寄生しており、比較的高い感染率であった（Table 4. 5）。線虫 *L. appendiculatum* は、基本的にクロゴキブリのみから分離できたが、2 つの例外の宿主が見られた。オガサワラゴキブリ *P. surinamensis* のペット株とトルキスタンゴキブリ *B. lateralis* の KX 株に、*L. appendiculatum* が 100%の確率で感染していた（Table 4. 5）。

#### 4-3-2. 線虫 *L. appendiculatum* の分子系統解析

クロゴキブリ EE 株、クロゴキブリ UF 株、オガサワラゴキブリペット株、トルキスタンゴキブリ KX 株、クロゴキブリ CU 株（Ozawa et al. 2014）を含め、



ゴキブリ株から分離した線虫 *L. appendiculatum* の 28S ユニットの D2/D3 領域および 18S ユニットの部分領域の DNA 配列データを取得した。さらに、2014 年に東京都港区で採集したクロゴキブリから分離できた *L. appendiculatum* に関してもサンプル名 Tokyo20140825SB として配列データを取得した (Table 4. 5)。これら配列データは BLAST (NCBI, National Centre of Biotechnology and Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録し、GenBank のアクセッション番号を得た (アクセッション番号に関しては、Table 4. 2 を参照)。これまで報告されていた *Leidyneema* 属の線虫の配列データを含めて系統解析を実施したところ、*L. appendiculatum* すべての 18S ユニット部分配列は 100% 一致し (Fig. 4. 1A)、28S ユニットの D2/D3 領域の配列は 2 つのクレードに分かれた (Fig. 4. 1B)。2 つに分かれたうちの 1 つのグループは日本産の宿主ゴキブリから分離した *L. appendiculatum* からなり、もう一方は、アルゼンチンやロシア、アメリカで分離された *L. appendiculatum* からなる (Fig. 4. 1B)。日本産 *L. appendiculatum* の宿主は、クロゴキブリ EE 株、クロゴキブリ CU 株、クロゴキブリ Tokyo140825SB サンプル、オガサワラゴキブリペット株である。また日本以外の国の宿主は、クロゴキブリ UF 株 (アメリカ)、トルキスタンゴキブリ KX 株 (アメリカ)、ワモンゴキブリ (ロシア)、ワモンゴキブリ (アルゼンチン) である (Table 4. 2)。2 つのクレード間で見られる配列の差異は 1.5% であり、クレード内のもの同士は完全一致であった (Table 4. 3)。

### 4-3-3. 様々なゴキブリ株での線虫 *L. appendiculatum* の個体群構

#### 造について

研究室培養ゴキブリ 4 株における、*L. appendiculatum* の感染率および個体群構造を調べた。4 つの株はそれぞれ、クロゴキブリ EE 株、クロゴキブリ UF 株、オガサワラゴキブリペット株、トルキスタンゴキブリ KX 株である。これらすべてのゴキブリ株には *L. appendiculatum* が 100% 感染していた。宿主 1 個体に寄生する線虫の個体群構造を調べたところ、(1) 雌成虫と幼虫の個体数は正の非対称分布 (Mean > Median) を示し、(2) 雄成虫の個体数は基本的に 1 頭か 0 頭であり、(3) 雌ゴキブリに寄生する線虫個体数は雄ゴキブリに寄生する線虫個体数よりも多かった。さらに (4) ゴキブリ宿主の雌雄間で線虫感染率の

差が無かった (Table 4.1)。

#### 4-3-4. クロゴキブリに対する *L. appendiculatum* の人工感染実験

*L. appendiculatum* 感染態 L2 期の卵をクロゴキブリに人工感染させ、線虫の感染率や L2 期から成虫になるまでの後胚発生タイミングを調査した。感染 1 日後、既にたまごから孵化した体長 300  $\mu\text{m}$  ほどの幼虫が平均 3 頭、宿主後腸内で観察できた (Fig. 4. 2 A)。感染 3 日後には平均 6 頭の幼虫が見られたが、雌雄間の形態の違いはこの段階ではまだ明らかでなかった。感染 7 日後に観察した線虫のうち、数頭が脱皮を開始しており、この時期から雌雄間で形態に差異が観察でき、雄幼虫には交接刺が備わり、雄成虫のものと似た特徴的な形態の尻尾となった (Fig. 4. 2 E)。雌幼虫の場合は、尻尾は長くて細い線状であった (Fig. 4. 2 B)。感染 14 日後にはほとんどの線虫が脱皮し (Figs. 4. 5 A-D)、未成熟であるものの性的二形性がより顕著に観察できた (Figs. 4. 2 C、F)。感染 21 日後、生殖細胞が成熟しきった雄も中には見られ、また陰門形成が始まっている雌も見られた (Figs. 4. 5 E-H)。感染 28 日後、雌雄の線虫はともに成虫まで成長し、雌の子宮内では複数の卵が見られた (Figs. 2 D、G)。感染 35 日後、おそらく線虫が再感染したようで、ゴキブリ後腸内で次世代の幼虫を複数頭観察できた。宿主 1 頭当たりに寄生する雄線虫の平均頭数は、感染 7 日後に 2 頭であったが、感染 21 日以降後に 1 頭を超えることがなかった (Fig. 4. 3 A)。クロゴキブリに対する線虫感染率の平均は、本実験条件下で 78%であった (N 頭数=76 頭)。

#### 4-3-5. 他のゴキブリ種に対する *L. appendiculatum* の人工感染実験

##### 験

*L. appendiculatum* 感染態 L2 期の卵を、ヤマトゴキブリ、モリチャバネゴキブリ、オガサワラゴキブリに人工感染させ、線虫の感染率や L2 期から成虫になるまでの後胚発生タイミングを調査した。線虫の感染率は、クロゴキブリの結果 (感染率: 78%, N 頭数=76 頭) と比較すると、それぞれヤマトゴキブリ (感染率: 65%, N 頭数=40 頭)、モリチャバネゴキブリ (感染率: 53%, N 頭数=66

頭)、オガサワラゴキブリ (感染率 : 51 %、N 頭数=51 頭) となり、3 種のゴキブリ全てに感染することがわかった。さらに、各宿主体内における後胚発生パターンを調べた結果、クロゴキブリを宿主としたときと同様であった (Figs. 4. 2 B、C、D)。ゴキブリ宿主 1 頭当たりの個体群構造を見たところ、すべての宿主において同じ傾向であると言えるが、モリチャバネゴキブリを宿主とした場合、感染 28 日後と 35 日後に幼虫の再感染が観察できなかった (Fig. 4. 3 C)。

この人工感染実験後に余ったヤマトゴキブリを、引き続き何世代かに渡って継代培養したのち、ヤマトゴキブリ宿主の雌雄成虫における *L. appendiculatum* の線虫の感染率および線虫個体群構造を調べた。感染率は非常に高く、雄成虫では 91 % (N 頭数=22 頭)、雌成虫では 90 % (N 頭数=20 頭) であった。宿主 1 頭あたりに寄生する線虫個体群構造は、クロゴキブリ、オガサワラゴキブリ、トルキスタンゴキブリで見られた構造を示した (Table 4. 1)。

#### 4-4. 考察

##### 4-4-1. 宿主ゴキブリ種と寄生性線虫種との対応

私はこれまで、クロゴキブリ *P. fuliginosa*、ヤマトゴキブリ *P. japonica*、ワモンゴキブリ *P. americana*、コワモンゴキブリ *P. australasiae*、チャバネゴキブリ *Blattella germanica*、モリチャバネゴキブリ *B. nipponica*、ヒメチャバネゴキブリ *B. lituricollis*、トルキスタンゴキブリ *Blatta lateralis*、オガサワラゴキブリ *Pycnoscelus surinamensis*、オガサワラゴキブリ (Indicus) *P. indicus*、ウスヒラタゴキブリ *Onychostylus pallidiolus*、フタテンコバネゴキブリ *Lobopterella dimidiatipes*、オオゴキブリ *Panesthia angustipennis spadica*、サツマゴキブリ *Opisthopteria orientalis* の計 14 種のゴキブリを解剖し、その寄生性線虫を調べた (データ未記載)。これらの種/株は研究室で培養したものや野外で採集した野生個体も含まれている。すべての寄生性線虫の記載及び同定を完成させるためには更なる調査が必要であるが、宿主と寄生性線虫の種の組み合わせは、2 つの例外を除いて固定されていたことから、この線虫グループの宿主特異性は高いように見られた。第 2 章及び第 3 章で示したように、クロゴキブリには *L. appendiculatum* の 1 種が、ワモンゴキブリには *T. bulhoesi* および *H. diesingi* の 2 種が同時に、それぞれ高確率で寄生していた。加えて、ヤ

マトゴキブリには *Protrellus* 属線虫の新種が、オガサワラゴキブリには *Suifunema* 属線虫の新種が高い割合で寄生しており、さらにオオゴキブリには新属を含む 14 種もの新種が寄生していることを確認している（未発表）。*L. appendiculatum* はオガサワラゴキブリ *P. surinamensis* ペット株やトルキスタンゴキブリ *B. lateralis* の KX 株を除いて、他のゴキブリからは分離されなかった（Table 4. 1）。トルキスタンゴキブリは、採集したのち他種ゴキブリと完全に隔離して培養しているため、*L. appendiculatum* が元々感染していたはずである。トルキスタンゴキブリ本来の寄生性線虫が本線虫種であるかどうかは、より多くの野生個体を確保して寄生性線虫種の確認する必要があるが、今回の結果により、トルキスタンゴキブリも幅広い宿主範囲をもつ寄生性線虫 *L. appendiculatum* の宿主となり得ることができるとい証拠となった。

トルキスタンゴキブリの例に関しては、今回の実験で 1 株のみしか確認できていないが、オガサワラゴキブリに関しては、Pet 株以外の研究室培養株や野外で採集した野生個体でも寄生性線虫を確認しており、本来の寄生性線虫は新種 *Suifunema* sp. であると判断した（記載準備中、データ未記載）。オガサワラゴキブリの生殖様式は単為生殖であり、ゴキブリの成長や繁殖は早いため簡単に培養できる。それゆえ日本では、オガサワラゴキブリは爬虫類の餌として飼育されているのが一般的である。クロゴキブリは、日本全国的に幅広く生息しているゴキブリである。したがって、これらオガサワラゴキブリがペットショップや一般家庭などで培養されていたとすれば、クロゴキブリの寄生性線虫 *L. appendiculatum* によるコンタミが生じる可能性も十分あり得る。

#### 4-4-2. *L. appendiculatum* の宿主範囲の広さ

本実験にて、クロゴキブリの寄生性線虫 *L. appendiculatum* がヤマトゴキブリ、モリチャバネゴキブリ、オガサワラゴキブリの 3 種に感染する能力があることを示した。この結果を含めて、*L. appendiculatum* は 2 亜目 3 科 5 種のゴキブリに感染することができることから、非常に幅広い宿主範囲を持つといえる（Fig. 4. 4）。ヤマトゴキブリは日本在来種のゴキブリであり、主に日本北部に生息し、屋内と屋外の間を行き来している（Tanaka & Uemura 1996; Tanaka & Tanaka 1997）。オガサワラゴキブリはインド・マレー半島が原産であると推定されており、現在、世界中の熱帯・亜熱帯に幅広く分布している（Kramer and

Brenner 2009)。これまでの調査から、ヤマトゴキブリとオガサワラゴキブリにはそれぞれ高い確率で *Protrellus* sp. と *Suifunema* sp. という線虫種が感染していたのを確認している（データ未記載）。また、モリチャバネゴキブリは日本在来種であり、形態的には世界的な衛生害虫であるチャバネゴキブリと似ているが、生育環境に明らかな違いがある。モリチャバネゴキブリは主に日本の南東の草地や森林の落ち葉の下などで生息しているゴキブリであり、屋内に侵入することはほぼない（Tsuji 1985; Asahina 1991）。モリチャバネゴキブリの野生個体を解剖してみたが、寄生性線虫が感染していないと結論づけている（データ未記載）。

モリチャバネゴキブリに *L. appendiculatum* を人工感染させたとき、線虫はゴキブリ後腸内に定着・成熟し、卵を産卵することができたが、再感染することはなかった。これはモリチャバネゴキブリが糞を摂食していないことが理由ではないかと考えられ、寄生性線虫が感染するためのサイクルが確立できなかったからであると解釈した。この結果は、モリチャバネゴキブリ野生個体には寄生性線虫が感染していなかったデータとも一致し、*L. appendiculatum* がモリチャバネゴキブリの本来の寄生性線虫種ではないことも明らかである。クロゴキブリの寄生性線虫 *L. appendiculatum* は、本来の宿主と異なる分類および生態を有する宿主に対しても感染できることを示すことができた。

#### 4-4-3. 各種ゴキブリ宿主に対する、線虫 *L. appendiculatum* の感染について

Thelastomatidae 科寄生性線虫の性的二形性は、幼虫の初期段階で明瞭に観察が可能となる（Zervos 1983; Ozawa et al. 2016）。今回の人工感染実験から、*L. appendiculatum* の性的二形性は、感染 7 日後から 14 日後の間に起こる脱皮以降で明らかになることがわかった（Figs. 4. 2、Fig. 4. 3、Fig. 4.5）。こういった特徴は、第 3 章で示したようにワモンゴキブリにおける *T. bulhoesi* をはじめとする Oxyurida 目線虫に共通したものであり、本線虫がクロゴキブリ体内で正常に後胚発生が進んでいることを意味し、本線虫種が他種を宿主とした場合の後胚発生タイミングの重要な指標となる。

Thelastomatidae 科線虫の個体群構造に関して、宿主ゴキブリ 1 頭あたりに

寄生する雄線虫個体数は1もしくは0であると報告されている (Zervos 1988a; Ozawa et al. 2014)。クロゴキブリを宿主とした今回の人工感染実験で、感染7日後から14日後の段階で *L. appendiculatum* の雄が平均2頭確認された。しかし感染14日後以降、ゴキブリ宿主1頭に対し、雄線虫1頭を超えることは一度もなかった (Fig. 4. 3 A)。また今回使用した3種の他のゴキブリ種は、雄線虫の個体群構造が1頭を超える例は発見されなかった (Fig. 4. 3 B-D, Table 4. 1)。この実験から、先に成熟した雄1頭以外の雄個体の成熟が抑制されたのか、あるいは余分な雄が体外へ排出されたかなどの原因はわからなかった。性比や線虫個体群構造を制御するためのメカニズムは、生物種の繁栄や競争において重要な要素であると考えられる。

さらに、今回実験に使用したゴキブリ3種に対する *L. appendiculatum* 感染率はクロゴキブリよりも低いものの、すべて50%を超えており、線虫の成熟や発生過程もクロゴキブリで観察されたものと同様であった (Fig. 4. 3)。このことから、*L. appendiculatum* がクロゴキブリを本来の宿主として進化してきたのであり、そして他種への感染能力も同時に備わっていると言える。

本線虫種が広くゴキブリ宿主に感染する能力を備えているということが、今回の大きな発見であり、一方、野生環境においてみられる、決まった宿主に特定の線虫種が寄生しているという事実からも、宿主ゴキブリの生態が寄生性線虫の宿主範囲を決める大きな要因であるといえる。この線虫が Blattodea 目のゴキブリ種に広く宿主間を移動する能力を維持している点こそ、この線虫グループの種分化を促す要因ではないかと考えられる。

#### 4-4-4. 線虫 *L. appendiculatum* に見られる宿主範囲の広さの意味

*L. appendiculatum* の特徴として、(1) 宿主範囲が広いこと (2) クロゴキブリから高い割合で分離されることである。このことは、ゴキブリとともに寄生性線虫も世界中に拡散・定着しうることを意味する。クロゴキブリは主に西日本や中部地域を中心に生息しており、全ての都道府県に定着が報告されている (The Japanese Pestology Society 2015; Nakano 2013; Tsuji 1975)。これまでに採集して解剖したゴキブリは全て生態が異なるため、各宿主の寄生性線虫が他宿主に対して感染能力があったとしても、自然界で寄生性線虫の交換が行なわれる機会はほとんどないだろうと考えられた。しかし、野外ではゴキブリ寄生性線虫

の宿主が共有されている例も存在する (Jex et al. 2006a; Jex et al. 2006b; Jex et al. 2007)。ゴキブリ寄生性線虫の生息場所は、完全に宿主の後腸内に制限されていること、ほとんどのゴキブリ宿主に高確率で線虫が寄生分離していることから、宿主と寄生性線虫の関係性は長い時間をかけて関係性が成り立っていることが予測できる。Thelastomatidae 科線虫の感染メカニズムは単純であることから、線虫種間の宿主交換は自然界でより頻繁に行われてきているのかもしれない、これが線虫の宿主範囲の広さを維持させているのだろうとも考える。また、線虫非感染のヤマトゴキブリと、*L. appendiculatum* に感染しているクロゴキブリと共に培養すると、*L. appendiculatum* がヤマトゴキブリに感染してしまうことを予備的に確認しており (データ未記載)、ゴキブリ種間での寄生性線虫の交換は、他のゴキブリ宿主の糞を摂食すること等で容易に起こりうるだろうと考えている。近年、ガラパゴス諸島における在来種と外来種ゴキブリに寄生する線虫について調査した報告があった。ガラパゴス諸島では外来種であるワモンゴキブリ、コワモンゴキブリ *P. australasiae*、オガサワラゴキブリから、低い感染率 (それぞれの割合は、14%、31%、6%) ではあるが *L. appendiculatum* が分離されている (Sinnott et al. 2015)。さらに、チャバネゴキブリから分離報告例のある線虫 *Cephalobellus ovumglutinosus* (van Waerebeke 1978) は、ガラパゴス在来種のゴキブリからも分離されている (Sinnott et al. 2015)。ガラパゴス諸島で行われたこの調査では、クロゴキブリの生息は確認されておらず、したがってクロゴキブリ以外の種が *L. appendiculatum* を拡散させるベクターになっているのかもしれない。

Adamson によると、動物界に広く寄生する Oxyurida 目線虫の共通祖先は、脊椎動物の前に無脊椎動物を宿主とし、とりわけ倍脚類かゴキブリ目昆虫を宿主とするグループで種の多様性が促進されたと考えられている (Adamson 1984; Adamson 1989)。脊椎動物の宿主に見られる系統関係と、それら寄生性線虫の系統関係は相関が高く (Hugo 1999)、宿主特異性も極めて高いことから両方で共進化が起こっているといえる。ヒトの蟯虫 *Enterobius vermicularis* は本来の宿主であるヒトに対して、肛門付近にかゆみなどを引き起こすのみであるが、チンパンジー *Pan troglodytes* に対して感染した場合、宿主が深刻にやせ衰え複数の臓器に炎症や腫瘍などを引き起こすといった重大な影響を与えることが報告されている (Murata et al. 2002)。また、寄生性線虫の存在は、ゴキ

ブリ腸内細菌叢の多様性にも貢献しており、宿主と寄生性線虫の間で直接・間接的な相互作用があるのは明らかである (Vicente et al. 2016)。寄生性線虫と宿主間で見られる相利共生関係メカニズムやその進化を理解するうえで、ゴキブリとその寄生性線虫は格好のモデルであろうと考えている。



4-5. 表 (Table 4.1 ~Table 4.4)

Table 4. 1 5つのゴキブリ株のそれぞれの宿主の *L. appendiculatum* の個体群構成

宿主ゴキブリ			<i>Leidynema appendiculatum</i> の個体群データ				
株及び性 <sup>1</sup>	N	Body size <sup>2</sup>	線虫	Prevalence (CI) <sup>3</sup>	Mean Intensity (CI) <sup>4</sup>	Median Intensity (CI) <sup>5</sup>	V/M Ratio <sup>6</sup>
<i>P.f.</i> EE Male	10	25.7 ± 1.4	♂	50.0 (22.3-77.8)	1.00 (uncertain)	1.0 (1-1)	0.56
			♀	70.0 (38.1-91.3)	2.43 (1.43-4.57)	2.0 (1-7)	2.62
			J	100 (70.9-100)	7.60 (3.40-15.30)	4.0 (1-20)	11.73
<i>P.f.</i> EE Female	15	26.6 ± 1.8	♂	86.7 (60.3-97.6)	1.15 (1.00-1.46)	1.0 (1-1)	0.43
			♀	100 (77.8-100)	9.20 (5.6-19.00)	8.0 (3-12)	14.57
			J	93.3 (69.8-99.7)	15.43 (10.71-19.79)	15.0 (8-24)	5.94
<i>P.f.</i> UF Male	20	27.2 ± 1.7	♂	70.0 (47.5-86.0)	1.14 (1.00-1.43)	1.0 (1-1)	0.61
			♀	70.0 (47.5-86.0)	2.14 (1.43-2.93)	1.5 (1-3)	1.72
			J	50.0 (29.3-70.7)	2.70 (1.90-3.80)	2.0 (2-5)	2.28
<i>P.f.</i> UF Female	22	29.4 ± 1.9	♂	81.8 (61.1-93.5)	1.06 (1.00-1.17)	1.0 (1-1)	0.25
			♀	90.9 (70.9-98.3)	4.45 (3.65-5.25)	4.0 (3-5)	1.24
			J	45.5 (20.8-71.8)	3.60 (2.20-5.10)	3.0 (1-6)	3.06
<i>P.s.</i> Pet Female	10	18.5 ± 2.5	♂	90.0 (55.4-99.5)	1.00 (uncertain)	1.0 (1-1)	0.11
			♀	100 (70.9-100)	3.50 (2.70-4.30)	3.0 (2-5)	0.59
			J	100 (70.9-100)	18.90 (12.40-28.80)	13.5 (7-39)	10.05
<i>B.l.</i> KX Male	18	21.8 ± 1.4	♂	88.9 (67.0-98.0)	1.00 (uncertain)	1.0 (1-1)	0.12
			♀	94.4 (72.9-99.7)	2.65 (2.06-3.12)	3.0 (2-3)	0.67
			J	55.6 (33.0-76.4)	3.70 (2.30-5.60)	2.0 (2-8)	3.86
<i>B.l.</i> KX Female	19	24.3 ± 1.5	♂	78.9 (55.4-92.5)	1.00 (uncertain)	1.0 (1-1)	0.22
			♀	100 (82.5-100)	4.47 (3.37-5.74)	4.0 (3-5)	1.75
			J	94.7 (67.2-99.9)	11.39 (7.83-16.22)	9.0 (3-13)	8.24
<i>P.j.</i> AI Male	22	24.9 ± 2.1	♂	45.5 (26.1-66.2)	1.00 (uncertain)	1.0 (1-1)	0.57
			♀	59.1 (38.3-77.8)	2.23 (1.62-2.92)	2.0 (1-3)	1.62
			J	72.7 (50.0-87.4)	4.19 (2.69-5.94)	3.5 (1-5)	3.86

<i>P.j.</i> AI Female 20	24.8 ± 2.9	♂	40.0 (20.1-62.8)	1.00 (uncertain)	1.0 (1-1)	0.63
		♀	65.0 (42.4-83.3)	2.15 (1.46-2.85)	1.0 (1-4)	1.68
		J	75.0 (52.6-89.6)	8.27 (5.27-11.47)	6.0 (3-14)	7.14

<sup>1</sup> *P.f.* EE : クロゴキブリ *P. fuliginosa* EE 株、*P.f.* UF : クロゴキブリ *P. fuliginosa* UF 株、*P.s.* Pet : オガサワラゴキブリ *P. surinamensis* ペット株、*B.l.* KX : トルキスタンゴキブリ *B. lateralis* KX 株、*P.j.* AI : ヤマトゴキブリ *P. japonica* 人工感染実験株。すべてのゴキブリ個体は 100%線虫が感染している状態である (ヤマトゴキブリ AI の雌ゴキブリ 91%を除いて)。

<sup>2</sup> 宿主ゴキブリの体長の平均と標準偏差 SD (mm)

<sup>3</sup> Sternre's exact 法 : 線虫個体群割合の信頼区間における存在率 (95% 信頼区間)

<sup>4</sup> 頑強性法 (BCa) : 線虫の平均個体群の信頼区間の頭数で (95% 信頼区間)、*P.f.* EE の雄から分離した雄線虫を除いた値である (93.8% 信頼値)

<sup>5</sup> 線虫個体群の中央値の信頼区間の頭数 (95%信頼区間)

<sup>6</sup> 中央値の分散は非感染ゴキブリを含めて算出した。

\* “線虫” は線虫の雌雄、幼虫のステージを表している。

**Table 4. 2** 分子系統解析で使した *Leidynama* 属線虫の株やこれまで報告されていた配列についての情報

寄生性線虫種	宿主ゴキブリ	分離した国	D2/D3 受託番号	SSU 受託番号	引用元
<i>L. appendiculatum</i> EE	<i>Periplaneta fuliginosa</i> EE	Japan	KY057026	KY057032	This study
<i>L. appendiculatum</i> UF	<i>P. fuliginosa</i> UF	USA	KY057030	KY057034	This study
<i>L. appendiculatum</i> Pet	<i>Pycnoscelus surinamensis</i> pet	Japan	KY057029	KY057033	This study
<i>L. appendiculatum</i> KX	<i>Blatta lateralis</i> KX	USA	KY057027	KY057031	This study
<i>L. appendiculatum</i> Tokyo	<i>P. fuliginosa</i> Tokyo	Japan	KY057028	KY057036	This study
<i>L. appendiculatum</i> CU	<i>P. fuliginosa</i> CU	Japan	KC540759	KY057035	Ozawa et al. 2014
<i>L. appendiculatum</i>	<i>P. americana</i>	Argentina	JQ343844	-	Blanco et al. 2012
<i>L. appendiculatum</i>	<i>P. americana</i>	Russia	EU365630	-	Spiridonov, direct submission
<i>L. portentosa</i>	<i>Gromphadorhina portentosa</i>	-	GQ401114	EF180073	Nadler et al. 2007 Spiridonov et al. 2009

Table 4. 3 分子系統解析で使した *Leidynama* 属線虫の 9 つのサンプルでの LSU rDNA D2/D3 領域の配列の相違比較

	<i>L.a.</i> CU	<i>L.a.</i> EE	<i>L.a.</i> Pet	<i>L.a.</i> Tokyo	<i>L.a.</i> UF	<i>L.a.</i> KX	<i>L.a.</i> EU	<i>L.a.</i> JQ	<i>L.p.</i> GQ
<i>L. appendiculatum</i> CU (Japan) KC540759	-								
<i>L. appendiculatum</i> EE (Japan) KY057026	0.0	-							
<i>L. appendiculatum</i> ペット (Japan) KY057029	0.0	0.0	-						
<i>L. appendiculatum</i> Tokyo (Japan) KY057028	0.0	0.0	0.0	-					
<i>L. appendiculatum</i> UF (USA) KY057030	1.5	1.5	1.5	1.5	-				
<i>L. appendiculatum</i> KX (USA) KY057027	1.5	1.5	1.5	1.5	0.0	-			
<i>L. appendiculatum</i> (Russia) EU365630	1.5	1.5	1.5	1.5	0.0	0.0	-		
<i>L. appendiculatum</i> (Argentina) JQ343844	1.5	1.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	-	
<i>L. portentosae</i> GQ401114	9.1	9.1	9.1	9.1	9.4	9.4	9.4	9.4	-

Table 4. 4 野外で採集したクロゴキブリの *L. appendiculatum* の個体群構造

Host cockroach			<i>Leidynema appendiculatum</i> infection data			
Stage and Sex <sup>1</sup>	N	Body size <sup>2</sup>	Male <sup>3</sup>	Female <sup>3</sup>	Juvenile <sup>3</sup>	Prevalence (%) <sup>4</sup>
Tokyo Total	29	15.8 ± 8.5	1	2.5	3.5	55.2
Adult Male	4	28.5 ± 1.0	1	1.7	4.0	100
Adult Female	2	30.5 ± 2.1	1	7.0	8.0	50
Nymph	23	12.3 ± 5.5	1	2.6	1.0	48
Chubu Total	37	19.4 ± 7.0	1	3.8	5.1	32.4
Adult Male	2	24.0 ± 0.0	1	4.0	5.5	100
Adult Female	6	27.7 ± 0.8	1	3.5	5.7	67
Nymph	29	17.3 ± 6.4	1	0.0	4.3	21
Kyusyu Total	16	25.6 ± 5.9	1	5.4	9.0	81.3
Adult Male	3	30.7 ± 2.1	1	3.0	1.5	100
Adult Female	4	30.8 ± 1.0	1	10.3	15.5	100
Nymph	9	21.7 ± 4.7	1	4.2	5.3	66.7

<sup>1</sup> ゴキブリは東京 (N 頭数=29 頭)、中部 (N 頭数=37 頭)、九州 (N 頭数=16 頭) のそれぞれの地方で採集した。

<sup>2</sup> 宿主ゴキブリの体長の平均と標準偏差 SD (mm)

<sup>3</sup> 非感染のゴキブリの頭数 0 を除いた、感染していたゴキブリの中での線虫の平均頭数。

<sup>4</sup> 実験したすべてのゴキブリの中での感染していたゴキブリの割合%。

4-6. 図 (Fig. 4.1 ~Fig. 4.5)

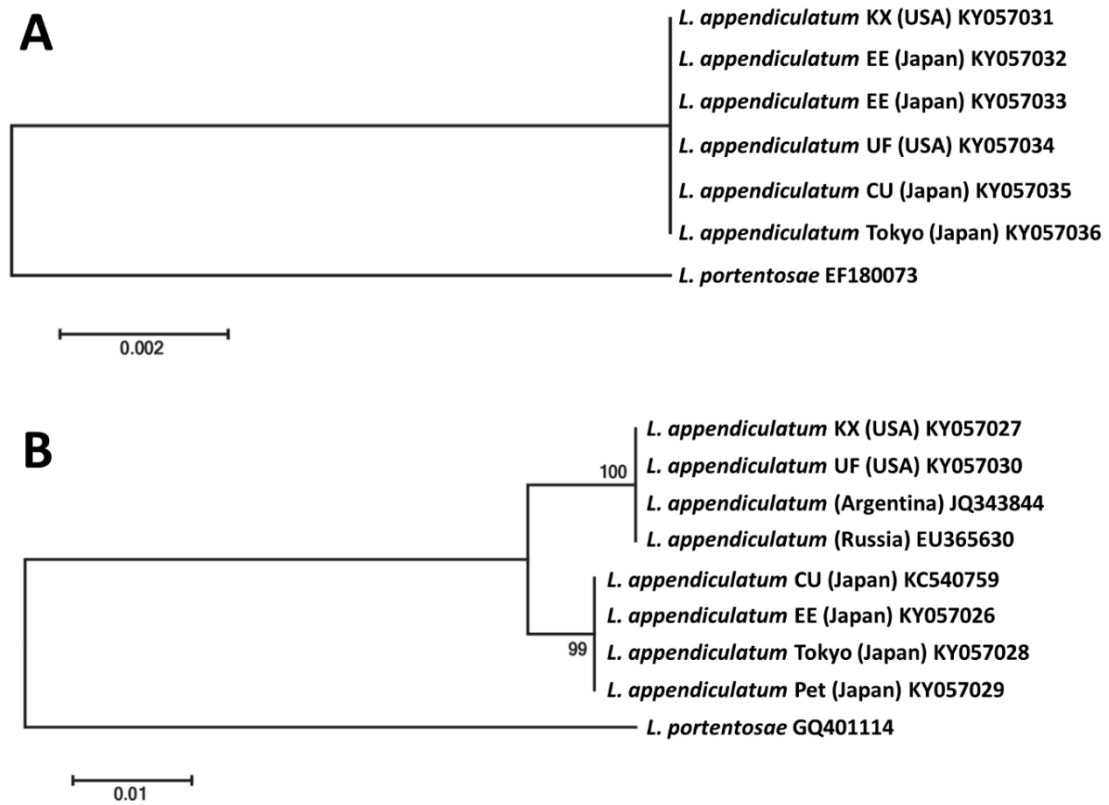
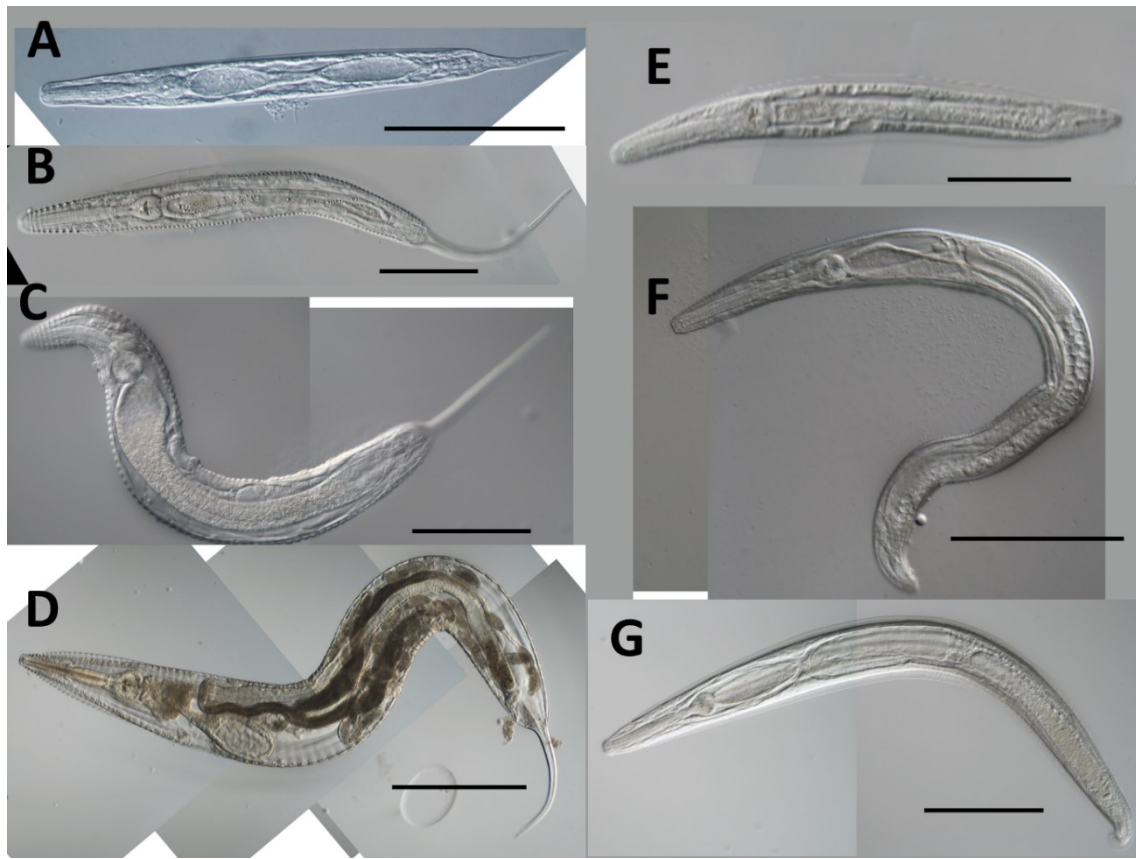


Fig. 4.1 複数の宿主ゴキブリ株から分離された *Leidyneema appendiculatum* を使用して作製した系統樹

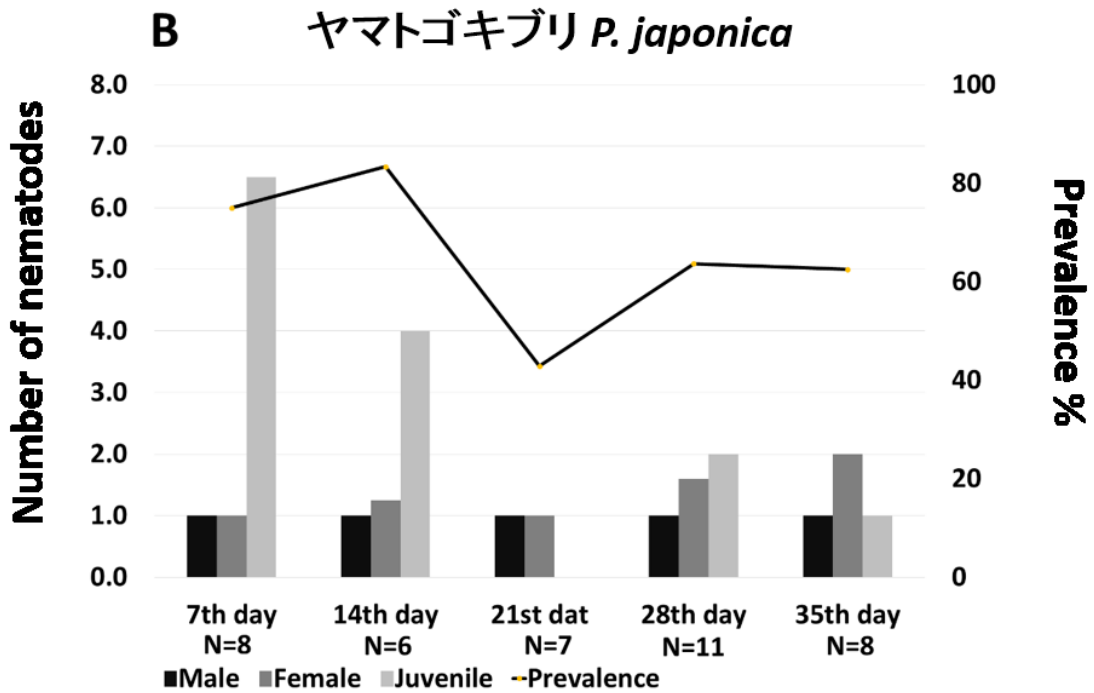
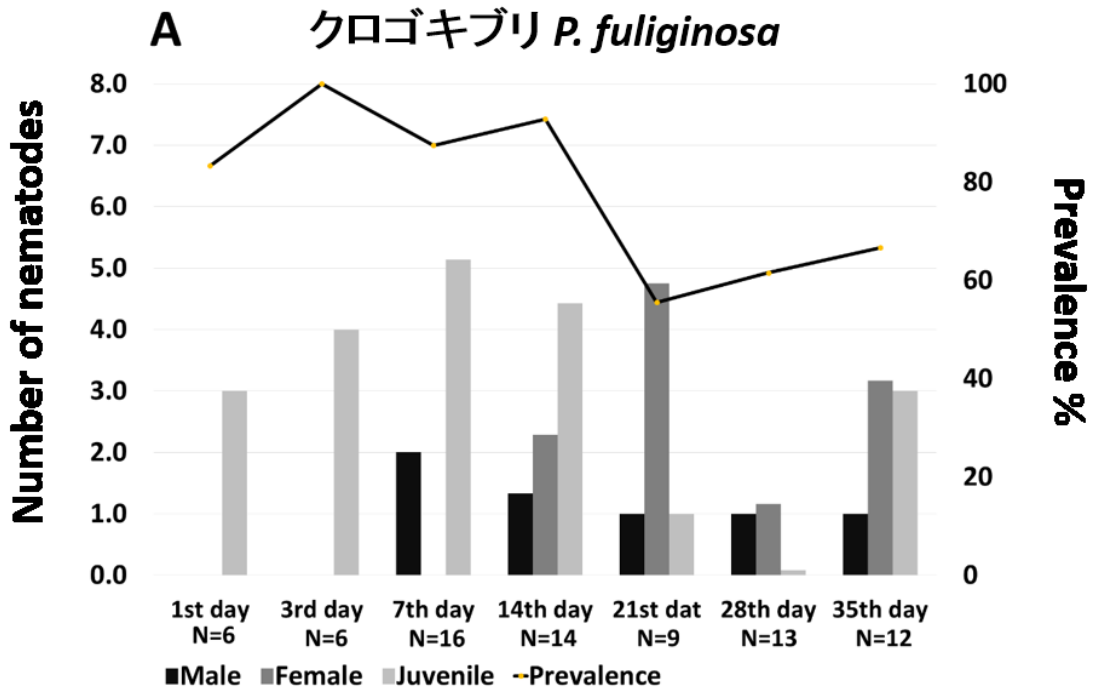
(A) 18S rDNA 部分領域と (B) 28S rDNA D2D3 領域の系統樹。Outgroup は *Leidyneema portentosa*、系統樹の数値は各 Bootstrap 値を示しており、系統樹の信頼性を示している。



**Fig. 4.2** *L. appendiculatum* の発生ステージ

- (A) : 感染 1 日後の幼虫
- (B) : 感染 14 日後の雌幼虫
- (C) : 感染 21 日後の雌幼虫
- (D) : 感染 28 日後の抱卵雌線虫
- (E) : 感染 14 日後の雄幼虫
- (F) : 感染 21 日後の雄幼虫
- (G) : 感染 28 日後の成熟雄線虫

スケールバー (A)、(E) : 100  $\mu\text{m}$ 、(B)、(C)、(F)、(G) : 200  $\mu\text{m}$ 、(D) : 500  $\mu\text{m}$





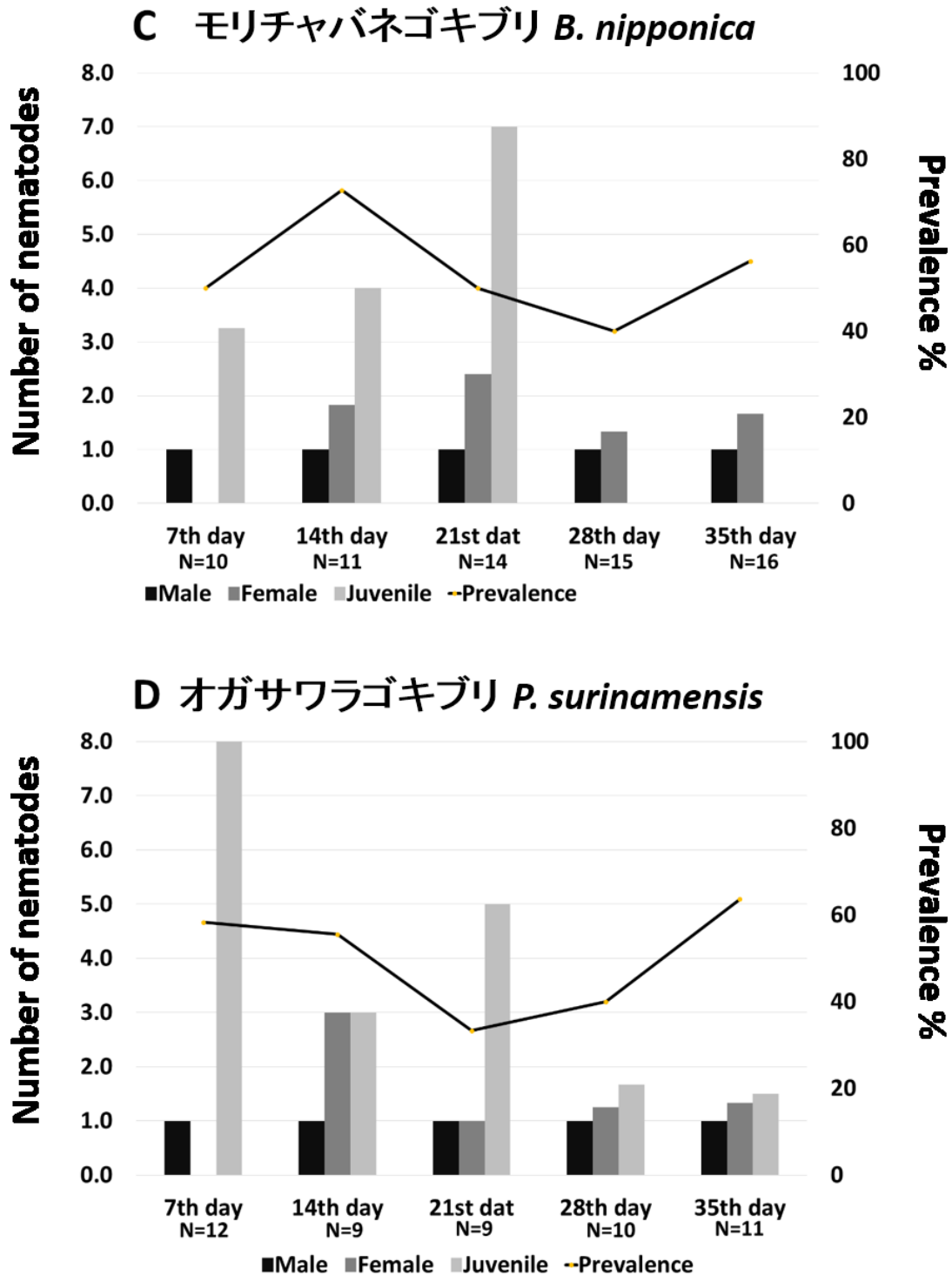


Fig. 4. 3 それぞれのゴキブリ宿主の感染率 Prevalence% (グラフの Y 軸右側) と線虫の頭数 Number of nematodes (グラフの Y 軸左側) を示したグラフ (A) クロゴキブリ *P. fuliginosa*、(B) ヤマトゴキブリ *P. japonica*、(C) モリチャバネゴキブリ *B. nipponica*、(D) オガサワラゴキブリ *P. surinamensis*。

折れ線グラフがそれぞれのゴキブリの *L. appendiculatum* の感染割合%を示しており、A の棒グラフがクロゴキブリの感染 1 日後から感染 35 日後のゴキブリ後腸内の雌雄成虫と幼虫線虫の頭数の平均（非感染のゴキブリの線虫 0 頭を除いて、感染したゴキブリの線虫の頭数）を算出しており、線虫に性的二形性が見られた際（感染 7 日後の時かそれより後）は雌雄とカウントし、二形が明らかではないとき（感染 7 日後より前）は幼虫と分けた。（A）クロゴキブリの線虫の感染率の平均は（感染 1 日後から感染 35 日後で）、78%であった（N 頭数=76 頭）。

また、それ以外のゴキブリ宿主に関しては、感染 7 日後から感染 35 日後のゴキブリ後腸内での *L. appendiculatum* の感染割合%、雌雄成虫、幼虫線虫の平均頭数（非感染ゴキブリの 0 頭を除いた）を示している。それぞれの線虫の感染率の平均は、それぞれヤマトゴキブリ（感染率：65%、N 頭数=40 頭）、モリチャバネゴキブリ（感染率：53%、N 頭数=66 頭）、オガサワラゴキブリ（感染率：51%、N 頭数=51 頭）であった。

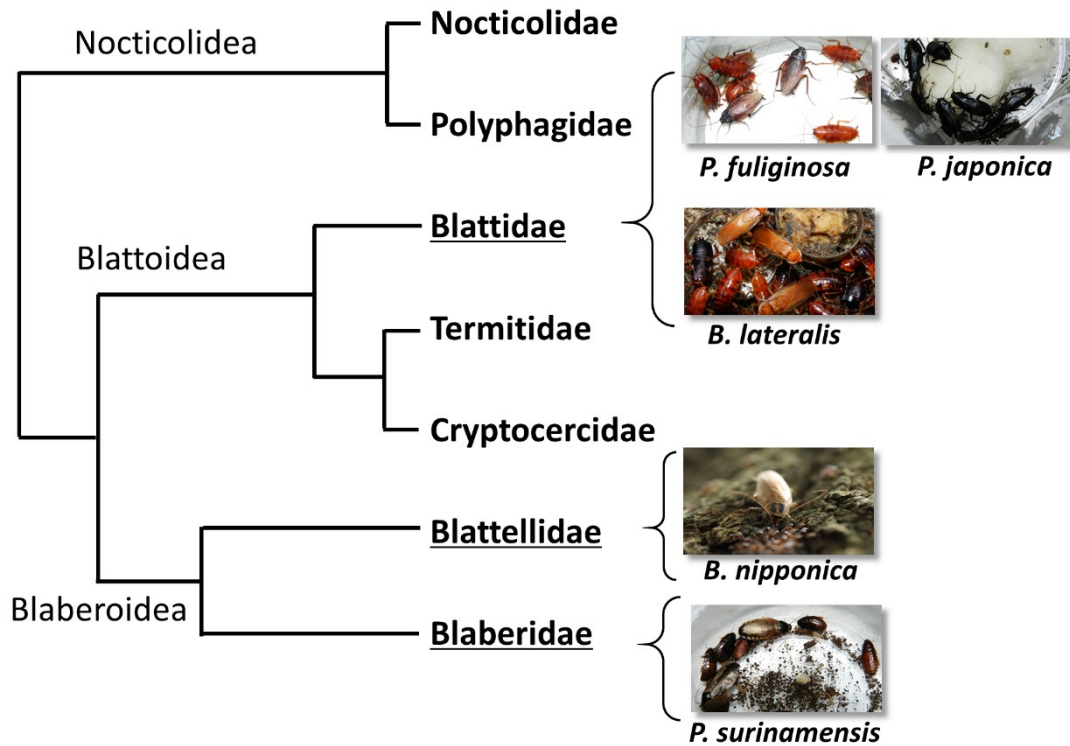
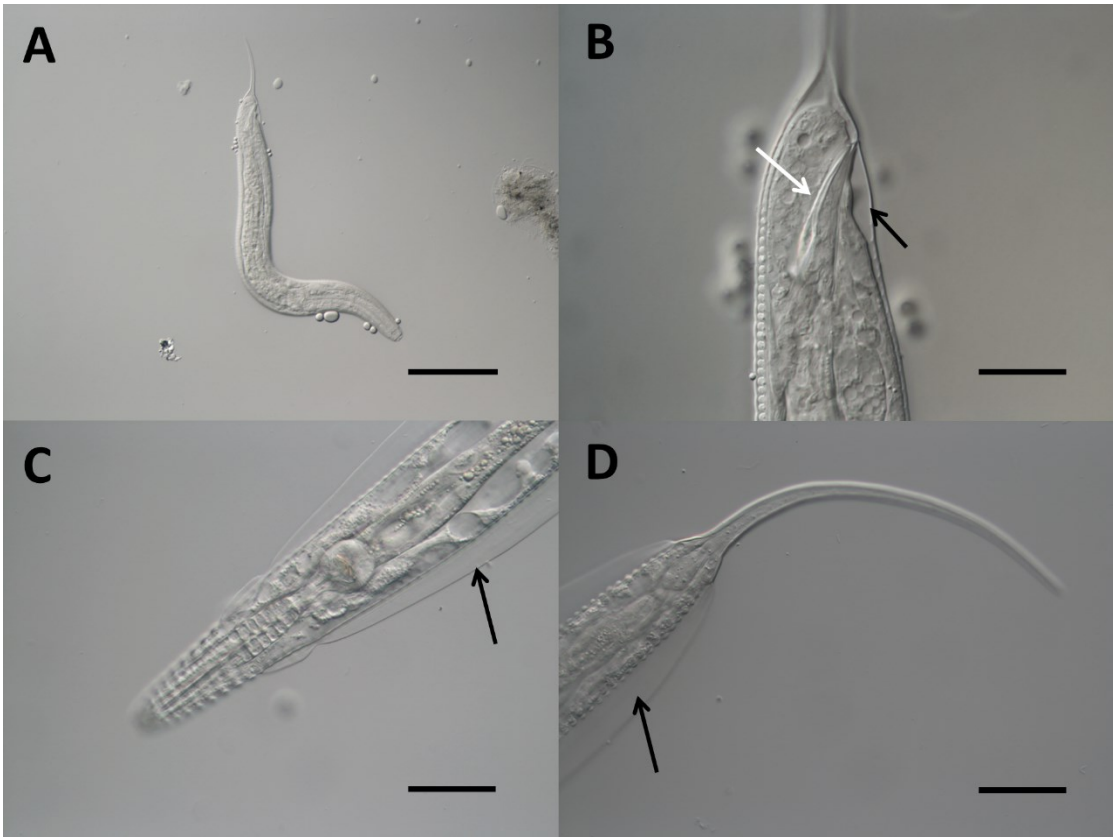


Fig. 4. 4 Inward et al. 2007 を基にして、今回の実験に使用した 5 種のゴキブリの系統関係について示した図

これらの種は 2 亜目 (Blattoidea、Blaberoidea) 3 科 (Blattidae、Blattellidae、Blaberidae) に属している。





**Fig. 4.5** *L. appendiculatum* の後胚発生の中で観察された性的二型の様子

(A) : 感染 14 日後の脱皮途中の雄幼虫 (右下側が線虫の頭部で左上側が線虫の尾部を示す)、

(B) : (A) の尾部を高倍率で観察した図 (黒矢印が古い脱皮殻で白矢印が交接刺を示す)、

(C) : 感染 14 日後の雌幼虫の頭部の図 (黒矢印が古い脱皮殻を示す)、

(D) : 感染 14 日後の雌幼虫の尾部の図 (黒矢印が古い脱皮殻を示す)、

(E) : 感染 21 日後の雄成虫の発達した生殖細胞の図 (黒矢印が総排泄腔を示す)、

(F) : 感染 21 日後の雄成虫の尾部の図、

(G) : 感染 21 日後の雌の陰門付近の高倍率写真 (黒矢印が総排泄腔を示し、白矢印が発達途中の陰門を示す)

(H) : 感染 21 日後の雌の尾部の図。

スケールバー (A)、(H) 100  $\mu\text{m}$ 、(B) 20  $\mu\text{m}$ 、(C-G) 50  $\mu\text{m}$ 。

## 第5章 結論

本研究では、長い進化の歴史を持つゴキブリとそこに寄生する Oxyurida 目線虫を用いて、寄生・共生関係の解明や進化について理解することを目指して研究をおこなった。

これまで述べた実験結果から、クロゴキブリの寄生性線虫 *L. appendiculatum* は宿主特異性を低く保ちながら、ゴキブリ宿主間を移動する能力を維持していることが示唆された。ヒトの物理的移動が活発化した近代という短い期間で見た場合、クロゴキブリのような環境適応性の高いゴキブリとともに、本寄生性線虫も世界中を移動し、そして各地の在来種ゴキブリ宿主に寄生してその生息域を拡大しているのではないかと推測できる。

これら宿主と寄生性線虫の寄生共生の相利関係を解明するための基盤となる線虫の基本的な生態情報を取得でき、またクロゴキブリに寄生する線虫 *L. appendiculatum* を用いて Thelastomatidae 科線虫の宿主特異性について提言することができた。今後クロゴキブリに寄生する線虫 *L. appendiculatum* とクロゴキブリの両方から、この関係性を解明していくことが可能であると考えており、例えば、線虫非感染株を使用して、線虫感染/非感染でそれぞれゴキブリ腸内での遺伝子発現を解析するなどといった応用が考えられる。

ゴキブリ寄生性線虫の宿主特異性が低く、容易に宿主間移行するという発見は、相互関係メカニズムを解明していく上で、新規的な考察と事象である。また、外来種ゴキブリが拡散・定着することによる寄生性線虫の置き換わりの可能性は、外来種昆虫の拡散の過程で寄生性線虫も考慮に入れる必要があると提言することも出来るのではないかと考えている。

## 引用文献

Adamson, M.L. 1989. Evolutionary biology of the Oxyurida (Nematoda): Biofacies of a haplodiploid taxon. *Advances in Parasitology* 28: 175-228.

Adamson, M.L. 1994. Evolutionary patterns in life histories of Oxyurida. *International Journal for Parasitology*, 24, 1167-1177.

Adamson, M. L., and Clease, D.F. 1989. Morphological changes during in ovo development in the Thelastomatoidea: description and functional considerations. *Journal of Parasitology*, 75, 728-734.

Adamson, M.L., and Noble, S.J. 1993. Interspecific and intraspecific competition among pinworms in the hindgut of *Periplaneta americana*. *Journal of Parasitology*, 79, 50-56.

Adamson, M.L., and van Waerebeke, D. 1992a. Revision of the Thelastomatidea, Oxyurida of invertebrate hosts I. Thelastomatidae. *Systematic Parasitology*, 21, 21-63.

Adamson, M.L., and van Waerebeke, D. 1992b. Revision of the Thelastomatoidea, Oxyurida of invertebrate hosts II. Travassosinematidae, Protrelloididae and Pseudonymidae. *Systematic Parasitology* 21: 169-188.

Adamson, M.L., and van Waerebeke, D. 1992c. Revision of the Thelastomatoidea, Oxyurida of invertebrate hosts. III. Hystriagnathidae. *Systematic Parasitology* 22: 111-130.

Ainsworth, R. 1991. Cytogenetic evidence of haplodiploidy in two species of nematode (Pharyngodonidae: Oxyurida) from New Zealand lizards. *Journal of Parasitology*, 77, 92-98.

Appel, A.G., and Smith, L.M.II. 2002. Biology and management of the smokybrown cockroach. *Annual Reviews of Entomology*, 47, 33-55. DOI: 10.1146/annurev.ento.47.091201.145106.

Ariyathenam, A.V., Nachimuthu, S., Tang, T.Y., Courtney, E.D., Harris, S.A., Harris, A.M. 2010. *Enterobius vermicularis* infestation of the appendix and management at the time of laparoscopic appendicectomy: Case series and literature review. *International Journal of Surgery* 8: 466-469. DOI: 10.1016/j.ijssu.2010.06.007.

Asahina, S. (Ed.) 1991. Blattaria of Japan. Nakayama Shoten, Tokyo, Japan, 253 pp.

Basir, M.A. 1956. Oxyuroid parasites of Arthropoda. 1. Thelastomatidae. 2. Oxyuridae. *Zoologica* 38: 1-79. (Original-Abhandlungen aus dem Gesamtgebiet der Zoologie).

Bell, W.J. (Ed.) 1981. The Laboratory Cockroach – Experiments in Cockroach Anatomy, Physiology and Behavior. Chapman & Hall, London, UK, 161 pp.

Bell, W.J., Roth, L.M., Nalepa, C.A. (Eds.) 2007. Cockroaches: ecology, behavior, and natural history. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA, 230 pp.

Bell, W.J., Adiyodi, K.G. 1981. The American Cockroach. Chapman and Hall, London, 529 pp.



Biswas, P.K., and Chakravarty, G.K 1963. The systematic studies of the zoo-parasitic oxyuroid nematodes. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 23, 411-428.

Blanco, M.V., Lax, P., Dueñas, J.C.R., Gardenal, C.N., Doucet, M.E. 2012. Morphological and molecular characterization of the entomoparasitic nematode *Hammerschmidtiella diesingi* (Nematoda, Oxyurida, Thelastomatidae). *Acta Parasitologica*, 57, 302-310.

Blaxter, M.L., Ley, P.D., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71-75. DOI:10.1038/32160.

Bungiro, R., and Cappello, M. 2004. Hookworm infection: new developments and prospects for control. *Current Opinion in Infectious Disease* 17: 421-426.

Camino, N.B., Ricuzzi, M., Costa, L.L. 2013. A new Thelastomatidae, *Hammerschmidtiella laplate* n. sp. (Nematoda) parasite of the cockroach *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea, Blattidae) from Argentina. *Neotropical Helminthology*, 7, 96-103.

Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M., Gabaldón, T. 2009. trimAI: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analysis. *Bioinformatics* 25: 1972-1973.

Carreno, R.A. 2014. The Systematics and Evolution of Pinworms (Nematoda: Oxyurida: Thelastomatoidea) from Invertebrates. *Journal of Parasitology* 100(5):553-560. <https://doi.org/10.1645/14-529.1>

Carreno, R.A. 2017. New species of *Hammerschmidtella* Chitwood, 1932, and *Blattophila* Cobb, 1920, and new geographical records for *Severianoia annamensis* Van Luc & Spiridonov, 1993 (Nematoda: Oxyurida: Thelastomatoidea) from Cockroaches (Insecta: Blattaria) in Ohio and Florida, U.S.A. *Zootaxa* 4226 (3): 429-441. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4226.3.6>

Carreno, R.A., and Tuhela, L. 2011. Thelastomatid Nematodes (Oxyurida: Thelastomatoidea) from the Peppered Cockroach, *Archimandrita tessellata* (Insecta: Blattaria) in Costa Rica. *Comparative Parasitology*, 78(1), 39-55.

Chaudhary, A., Kansal, G., Singh, N., Singh, H. S. 2014. New molecular data for parasite *Hammerschmidtella indicus* and *Thelandros scleratus* (Nematoda: Oxyurida) to infer phylogenetic position. *Turkish Journal of Zoology*, 38, 1-5. DOI:10.3906/zoo-1311-18

Chilton, N.B., Gasser, R.B., Beveridge, I. 1995. Differences in a Ribosomal DNA Sequence of Morphologically Indistinguishable Species within the *Hypodontus macropi* Complex (Nematoda: Strongyloidea). *International Journal for Parasitology*, 25(5), 647-651.

Chitwood, B. 1932. A synopsis of the nematodes parasitic in insects of the family Blattidae. *Parasitology Research*, 5, 14-50.

Connor, S., and Adamson, M. 1998. Niche overlap among three species of pinworm parasitic in the hindgut of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Parasitology*, 84, 245-247.

de Magalhães, P.S. 1900. Notes d'Helminthologie Brésilienne. *Archives de Parasitologie*, 3, 34-69. (In French)

Dobrovolny, C.G., and Ackert, J.E. 1934. The life history of *Leidynema appendiculata* (Leidy), a nematode parasite of cockroaches. *Parasitology*, 26, 468-480.

Dollfus, R.P. 1952. Quelques Oxyuroidea de Myriapodes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 27, 143-236. (In French)

Falk, B.G. and Perkins, S.L. 2013. Host specificity shapes population structure of pinworm parasite in Caribbean reptiles. *Molecular Ecology* 22: 4576-4590.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

Foitová, I., Civiánová, K., Baruš, V., Nurcahyo, W. 2014. Phylogenetic relationships between pinworms (Nematoda: Enterobiinae) parasitising the critically endangered orang-utan, according to the characterisation of molecular genomic and mitochondrial markers. *Parasitology Research*, 113(7), 2455-2466.

Francisco, A., Rosendo, R., Juan, J. and Xóchitl. 2014. Identificación de *Oxyspirura mansoni* (Spirurida: Thelaziidae) en una gallina de traspatio (*Gallus gallus domesticus*) y de su huésped intermediario, la cucaracha de Surinam (*Pycnoscelus surinamensis*), en Monterrey, Nuevo León, México. *Acta Zoológica Mexicana* 30(1): 106-113.

Fujita, M. and Machida, R. 2014. Reproductive biology and postembryonic development of a polyphagid cockroach *Eucorydia yasumatsui* Asahina

(Blattodea: Polyphagidae). *Arthropod systematics & phylogeny* 72(2), 193-211.

Galli, M. and van der Heuvel, S. 2008 Determination of the cleavage plane in early *C. elegans* embryos. *Annual Review of Genetics*, 42, 389-411.

Gordon, D. 1996. The Compleat Cockroach: A Comprehensive Guide to the Most Despised (And Least Understood) Creature on Earth. Ten Speed Press; 1st edition, 178 pp.

Grimaldi, D., and Engel, M.S. (Eds.). 2005. Evolution of the insects. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 772 pp.

Guthrie, D. M. and Tindall, A.R. 1968. The Biology of the Cockroach. New York : St. Martin's Press, 408 pp.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hammerschmidt, K.E. 1838. Helminthologische Beiträge. *Isis von Oken*, 5, 351-358.

Hasegawa, M., Kishino, H., and Yano, T. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-174. DOI:10.1007/BF02101694.

Hasegawa, K., Futai, K., Miwa, S., Miwa, J. 2004. Early embryogenesis of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Development Growth and Differentiation*, 46, 153-161.

Hasegawa, K., Mota, M.M., Futai, K., Miwa, J. 2006. Chromosome structure and behavior in *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae) germ cells and early embryo. *Nematology*, 8, 425-434. DOI: 10.1163/156854106778493475

Hirotsu, T., Sonoda, H., Uozumi, T., Shinden, Y., Mimori, K., Maehara, Y., Ueda, N., Hamakawa, M. 2015. A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection. *PLoS ONE*, 10(3): e0118699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118699>.

Hominick, W.M., and Davey, K.G. 1972. The influence of host stage and sex upon the size and composition of the population of two species of thelastomatids parasitic in the hindgut of *Periplaneta americana*. *Canadian Journal of Zoology*, 50, 947-954.

Hominick, W.M., and Davey, K.G. 1973. Food and the spatial distribution of adult female pinworms parasitic in the hindgut of *Periplaneta americana* L. *International Journal for Parasitology*, 3, 759-771.

Hugo, J. P. 1999. Primates and their pinworm parasites: the Cameron hypothesis revisited. *Systematic Biology*, 48: 523-546.

Hunt, D. J. 1981. On *Artigasia horridospina* n. sp., *Longior semialata* n. sp., *Mentecle magnifica* n. sp., *Paraxyo ensicrinatus* n. sp. (Oxyurida: Hystrignathidae) and *Pulchrocephala ? pulchrocephala* Travassos, 1925 (Oxyurida: Pulchrocephalidae). *Systematic Parasitology*, 3: 33-52.

Inward, D., Beccaloni, G., Eggleton, P. 2007. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology Letters*, 3: 331-335. doi:10.1098/rsbl.2007.0102

石橋 信義（編集）. 2003. 線虫の生物学. 東京大学出版会, 東京, 日本, 290 pp.

Jex, A.R., Schneider, M.A., Rose, H.A., Cribb, T.H. 2005. The Thelastomatoidea (Nematoda: Oxyurida) of two sympatric Panesthiinae (Insecta: Blattodea) from southeastern Queensland, Australia: taxonomy, species richness and host specificity. *Nematology*, 7, 543-575.

Jex, A.R., Hu, M., Rose, H.A., Schneider, T. H., Cribb, T. H., and Gasser, R. B. 2006a. Molecular characterization of Thelastomatoidea (Nematoda: Oxyurida) from cockroaches in Australia. *Parasitology*, 133: 123-129. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182006009978>.

Jex, A.R., Schneider, T.H., and Cribb, T.H. 2006b. The importance of host ecology in thelastomatid (Nematoda: Oxyurida) host specificity. *Parasitology International*, 55: 169-174. DOI: 10.1016/j.parint.2006.03.001.

Jex, A.R., Schneider, T.H., Rose, H.A., and Cribb, T. H. 2007. A comprehensive analysis of the biogeography of the thelastomatid pinworms from Australian burrowing cockroaches (Blaberidae: Geoscapheinae, panesthiinae): no evidence of coevolution. *Parasitology*, 134: 1387-1399. doi: 10.1017/S0031182007002843.

Jukes, T.H., and Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.

Khairul, A.A., and Paran, T.P. 1977. Parasites of *Periplaneta americana* Linn., in Penang, Malaysia I. *Thelastoma malaysiense*, new species, with notes on *Hammerschmidtella diesingi* and *Leidynema appendiculata*. *Malayan Nature Journal*, 30, 69-77.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120. DOI: 10.1007/BF01731581

Komatsu, N., Kishimoto, T., Uchida, A., and Ooi, H.K. 2013. Cockroach fauna in the Ogasawara Chain Islands of Japan and analysis of their habitats. *Tropical Biomedicine*, 30(1): 141-151.

Komatsu, N., Kawakami, Y., Banzai, A., Ooi, H.K., and Uchida, A. 2015. Species clarification of Ogasawara cockroaches which inhabit Japan. *Tropical Biomedicine*, 32(1): 98-108.

Kramer, R.D., and Brenner, R.J. 2009. Cockroaches (Blattaria). In Mullen, G.R., L.A. Durden. (Eds), *Medical and Veterinary Entomology*, 2nd edition. Elsevier, Burlington, MA. pp. 43-57.

Lee, C.Y., and Lee, L.C. 2000. Influence of sanitary conditions on the field performance of chlorpyrifos-based baits against American cockroaches, *Periplaneta americana* (L.) (Dictyoptera: Blattidae). *Journal of Vector Ecology*, 25, 218-221.

Leibersperger, E. 1960. Die Oxyuroidea der europäischen Arthropoden. VEB G. Fischer 150 pp.

Leidy, J. 1850. Description of some nematoid Entozoa infesting insects. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences, Philadelphia*, 5, 100-102.

McCallister, G.L. 1988. The Effect of *Thelastoma bulhoesi* and *Hammerschmidtella diesingi* (Nematoda: Oxyurata) on Host Size and Physiology in *Periplaneta americana* (Arthropoda: Blattidae). *Proceedings of*

*the Helminthological Society of Washington*, 55, 12-14.

McCallister, G.L. 1993. The Effect of Temperature, pH, Sodium Chloride, and Glucose on the Survival of Female *Thelastoma bulhoesi* (Nematoda: Oxyurata). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 60, 170-173.

McCallister, G.L., and Schmidt, G.D. 1981. Diurnal Migration of the Female of *Thelastoma bulhoesi* (Oxyurata: Thelastomida) in the American Cockroach, *Periplaneta americana*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 48, 127-129.

McCallister, G. and Schmidt, G.D. 1983. Development of *Thelastoma bulhoesi* (Oxyurata: Thelastomatida) and the effect of Thiabendazole on the unembryonated egg. *Journal of Nematology*, 15, 296-301.

McCallister, G., and Schmidt, G.D. 1984. Effect of temperature on the development of *Thelastoma bulhoesi* (Oxyurata, Thelastomatida) and other nematodes. *Journal of Nematology*, 16, 355-360.

Miller, D.M., Meek, F. 2004. Cost and efficacy comparison of integrated pest management strategies with monthly spray insecticide applications for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control in public housing. *Journal of Economic Entomology*, 97, 559-569.

Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, RS., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, PB., Ware, J., Flouri, T., Beutel, RG., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, AJ., Aspöck, U., Aspöck, H., Bartel, D., Blanke, A., Berger, S., Böhm, A., Buckley, T., Calcott, B., Chen, J., Friedrich, F., Fukui, M., Fujita, M., Greve, C., Grobe, P., Gu, S., Huang, Y., Jermin, LS., Kawahara, AY., Krogmann, L., Kubiak, M., Lanfear, R., Letsch,



H., Li, Y., Li, Z., Li, J., Lu, H., Machida, R., Mashimo, Y., Kapli, P., McKenna, DD., Meng, G., Nakagaki, Y., Navarrete-Heredia, JL., Ott, M., Ou, Y., Pass, G., Podsiadlowski, L., Pohl, H., von Reumont, BM., Schütte, K., Sekiya, K., Shimizu, S., Slipinski, A., Stamatakis, A., Song, W., Su, X., Szucsich, NU., Tan, M., Tan, X., Tang, M., Tang, J., Timelthaler, G., Tomizuka, S., Trautwein, M., Tong, X., Uchifune, T., Walzl, MG., Wiegmann, BM., Wilbrandt, J., Wipfler, B., Wong, TK., Wu, Q., Wu, G., Xie, Y., Yang, S., Yang, Q., Yeates, DK., Yoshizawa, K., Zhang, Q., Zhang, R., Zhang, W., Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, C., Zhou, L., Ziesmann, T., Zou, S., Li, Y., Xu, X., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Kjer, KM., Zhou, X. 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, Vol. 346, Issue 6210, 763-767.

DOI: 10.1126/science.1257570

Morffe, J., and García, N. 2010. *Hystrignathus dearmasi* sp. n. (Oxyurida, Hystrignathidae), first record of a nematode parasitizing a Panamanian Passalidae (Insecta, Coleoptera). *Zookeys*, 57, 1-8. DOI: /10.3897/zookeys.57.477

Morffe, J., and García, N. 2013. Two new genera of nematode (Oxyurida, Hystrignathidae) parasites of Passalidae (Coleoptera) from the Democratic Republic of Congo. *Zookey*, (257):1-15. doi: 10.3897/zookeys.257.3666.

Moyer, J.T., and Nakazono, A. 1978. Protandrous Hermaphroditism in Six Species of the Anemonefish Genus *Amphiprion* in Japan. *Japanese Journal of Ichthyology*, 25(2), 101-106.

Murata, K., Hasegawa, H., Nakano, T., Noda, A., Yanai, T. 2002. Fatal infection with human pinworm, *Enterobius vermicularis*, in a captive chimpanzee. *Journal of Medical Primatology*, 31, 104-108. DOI: 10.1034/j.1600-0684.2002.01017.x.

Nadler, S.A., Carreno, R.A., Mejía-Madrid, H., Ullberg, J., Pagan, C., Houston, R., Hugot, J.P. 2007. Molecular phylogeny of clade III nematode reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology*, 134, 1421-1442. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182007002880>

Nakano, K. 2013. Investigation of habitat for cockroaches in an outdoor urban environment XI Cockroaches captured in open spaces close to high-rise buildings and tree hollows in an urban park in Tokyo. *Pestology*, 28: 101-106.

Nedelchev, S., Pilarska, D., Takov, D., Golemansky Vassil. 2013. Protozoan and Nematode Parasites of the American Coakroach *Periplaneta americana* (L.) from Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 65 (3), 403-408.

Nei, M., and Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 333 pp.

Nunn, G.B. 1992. Nematode molecular evolution. An investigation of evolutionary patterns among nematodes based upon DNA sequences. Ph. D. dissertation. University of Nottingham, UK. pp. 187.

Ozawa, S., Vicente, C.S.L., Sato, K., Yoshiga, T., Kanzaki, N., Hasegawa, K. 2014. First report of the nematode *Leidynema appendiculata* from *Periplaneta fuliginosa*. *Acta Parasitologica*, 59, 219-228.

Ozawa, S., Morffe, J., Vicente, C. S. L., Ikeda, K., Shinya, R., and Hasegawa, K. 2016. Morphological, molecular and developmental characterization of the thelastomatid nematode *Thelastoma bulhoesi* (de Magalhães, 1900) (Oxyuridomorpha: Thelastomatidae) parasite of *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattodea: Blattidae) in Japan. *Acta Parasitologica*, 61: 241-254. DOI: 10.1515/ap-2016-0034

緒方一喜, 田申生男, 小川智儀. 1975. ゴキブリのすみつき要因に関する研究  
第1報 家住性ゴキブリのすみわけ実態調査成績. 衛生動物, 26(4), 241-245.

Pilotte, N., Unnasch, T.R., Williams, S.A. 2017. The current status of  
molecular xenomonitoring for Lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Trends  
in parasitology*, in press. DOI: 10.1016/j.pt.2017.06.008

Poinar, G.O. (Ed.) 1975. Entomogenous nematodes: a manual and host list of  
insect-nematode associations. Brill, Leiden, Netherland, 317 pp.

Rehana, R., Bhagat, R.C., Rukhsana, A.F., and Sofi. T.A. 2016. New Record of  
*Leidynema appendiculata* (Leidy, 1850) Chitwood, 1932. (Oxyuroidea:  
Thelastomatidae) from the Cockroaches *Blatta orientalis* (Dictyopetra:  
Blattidae) from Kashmir. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 7:403.  
doi: 10.4172/2157-7579.1000403

Rentz, D. (Ed). 2014. A guide to the cockroaches of Australia. CSIRO  
Publishing, Australia, 318 pp.

Roth, L.M., and Willis, E.R. 1960. The biotic associations of cockroaches. The  
Smithsonian Institution, Washington, D. C., 470 pp.

Rózsa, L., Reiczigel, J., Majoros, G. 2000. Quantifying parasites in samples of  
hosts. *Journal of Parasitology*, 86: 228-232. DOI:10.1645/0022-  
3395(2000)086[0228:QPISOH]2.0.CO;2

Ruiz, J.M., and Coelho, E. 1955. Nematóides (Oxyuroidea) parasitos de  
Diplópodos da Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil. *Memorias do  
Instituto Butantan*, 27, 51-66. (In Portuguese)

Salehzadeh, A., Tavacol, P., and Mahjub, H. 2007. Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospital of Hamadan, Iran. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44(2):105-110.

Schwabe, C.W. 1951. Studies on *Oxyspirura mansoni*, the Tropical Eyeworm of Poultry. II . Life History. *Pacific Science*, 5(1): 18-35.

Shah, M.M. 2007. Some studies on insect parasitic nematodes (Oxyurida, Thelastomatoidea, Thelastomatidae) from Manipur, North-East India. *Acta Parasitologica*, 52, 346-362.

Shaham, S. 2006. Methods in Cell Biology. In: The *C. elegans* Research Community (Ed.). WormBook, <http://www.wormbook.org>.

Shinya, R., Hasegawa, K., Chen, A., Kanzaki, N., Sternberg, P. 2014. Evidence of hermaphroditism and sex ratio distortion in the fungal feeding nematode *Bursaphelenchus okinawaensis*. *G3 Genes Genomes Genetics*, 4, 1907-1917. DOI: 10.1534/g3.114.012385

Singh, H.S., Kaur, H. 1988. On a new nematode, *Hammerschmidtella bisiri* n. sp. from *Periplaneta americana* Linn. *Indian Journal of Parasitology*, 12, 187-189.

Singh, P.K., Rastogi, P., Singh, H.S. 2014. Description of a new species of insect parasitic nematode, *Leidynema* (Schwenck, in Travassos 1929) (Thelastomatidae) from host *Periplaneta americana* of Meerut region – India. *Journal of Entomology and Nematology*, 6(2), 32-41.

Sinnott, D., and Carreno, R.A., Herrera, H. 2015. Distribution of thelastomatid nematode (Nematode: Oxyurida) in endemic and introduced

cockroaches on the Galápagos island Archipelago, Ecuador. *Journal of Parasitology*, 101: 445-457. DOI: 10.1645/15-721.1

Sriwati, R., Ozawa, S., Morffe, J., Hasegawa, K. 2016. First record of *Hammerschmidtella diesingi* (Hammerschmidt, 1838) (Oxyuridomorpha: Thelastomatidae) parasite of *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattodea: Blattidae) in Japan, morphological and molecular characterization. *Acta Parasitologica*, 61: 720-728. DOI: 10.1515/ap-2016-0101

St Georgiev, V. 2005. Chemotherapy of enterobiasis (oxyuriasis). *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2: 267-275. DOI: 10.1517/14656566.2.2.267

Stock, S.P. 1988. *Leidynema* (L.) *appendiculata* (Nematoda: Thelastomatidae) en larvas de *Oncideres* sp. (Coleoptera: Cerambycidae) en la Argentina. *Revista Peruana de Entomología*, 31, 151-153.

Stork, N.E., McBroom, J., Gely, C., and Hamilton, A.J. 2015. New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (24): 7519-7523. doi:10.1073/pnas.1502408112.

Spiridonov, S.E., and Guzeeva, E.A. 2009. Phylogeny of nematodes of the superfamily Thelastomatoidea (Oxyurida) inferred from LSU rDNA sequence. *Russian Journal of Nematology*, 17, 127-134.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.

Tanaka, J., Yano, K., Aya, K., Hirano, K., Takehara, S., Koketsu, E., Ordonio,

R. L., Park, S.H., Nakajima, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M. 2014. Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally split gibberellin synthesis pathway. *Science*, 346, 469-473.

Tanaka, S., and Uemura, Y. 1996. Flexible Life Cycle of a Cockroach *Periplaneta japonica* with Nymphal Diapause. *Journal of Orthoptera Research*, 5: 213-219.

Tanaka, K. and Tanaka, S. 1997. Winter survival and freeze tolerance in a northern cockroach, *Periplaneta japonica* (Blattidae: Dictyoptera). *Zoological Science*, 14: 849-853.

The Japanese Society of Pestology. 2015. Survey of pest distribution 2015. *Pestology*, 30: 77-80.

Todd, A.C. 1944. On the development and hatching of the eggs of *Hammerschmidtella diesingi* and *Leidynema appendiculatum*, nematodes of roaches. *Transactions of the American Microscopical Society*, 63, 54-67.

東京都予防医学協会検診検査部 2017. 寄生虫検査（学校保健分野）の実施成績. 東京都予防医学協会年報: 2017年版 第46号 57-62.

Tsuji, H. 1975. Development of the smokybrown cockroach, *Periplaneta fuliginosa*, in relation to resistance cold. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 26: 1-6.

Tsuji, H. 1985. The Life Cycle of *Blattella nipponica* ASAHINA in Kyoto. *Konchu*, 53: 42-48.

Vicente, C.S.L., Ozawa, S., Hasegawa, K. 2016. Composition of the cockroach gut microbiome in the presence of parasitic nematodes. *Microbes and*

*Environments*, 31, 314-320. DOI:10.1264/jsme2.ME16088

Wada-Katsumata, A., Silverman, J., Schal, C. 2013. Changes in taste neurons support the emergence of an adaptive behavior in cockroaches. *Science*, 340, 972-975.

Walton, C. 1927. A Revision of the Nematodes of the Leidy Collections. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 79, 49-163.

Yoshida, K., Hasegawa, K., Mochiji, N., Miwa, J. 2009. Early embryogenesis and anterior-posterior axis formation in the white-tip nematode *Aphelenchoides besseyi*. *Journal Nematology*, 41, 17-22.

Yu, X., Crites, J.L. 1986. Scanning electron microscope studies on *Hammerschmidtella diesingi* (Nematoda: Oxyuroidea). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 53, 117-120.

Zervos, S. 1983. *Blatticola monandros* n. sp. (Nematoda: Thelastomatidae) from the blattellid cockroach *Parellipsidon pachycercum*. *New Zealand Journal of Zoology*, 10, 329-334.

Zervos, S. 1987. *Protrellus dalei* n. sp., *Blatticola barryi* n. sp., and *Suifunema mackenziei* n. sp., thelastomatid nematodes from New Zealand cockroaches. *New Zealand Journal of Zoology*, 14, 240-250.

Zervos, S. 1988a. Population regulation in parasitic nematodes (Thelastomatidae) of Cockroaches. *New Zealand Journal of Zoology*, 15, 333-338. DOI: 10.1080/03014223.1988.10422622.

Zervos, S. 1988b. Population dynamics of a thelastomatid nematode of cockroaches. *Parasitology*, 96, 353-368.

Zervos, S. 1988c. Evidence for population self-regulation, reproductive competition and arrhenotoky in a thelastomatid nematode of cockroaches. *Parasitology*, 96, 369-379. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000058352>



## 謝辞

本論文執筆に当たって、主査であります中部大学応用生物学研究科の長谷川浩一准教授、副査であります大塚健三教授及び南基泰教授には多大なるご指導ご鞭撻をいただきました。また、東京都や九州でのゴキブリの野外サンプリングに関しては、東京都港区の中野敬一様や熊本大学教育学部理科の田邊力教授の全面的なご協力があったおかげで、このような結果を出すことができました。

ポルトガルの Évora 大学の線虫学研究室の特別研究員 Cláudia SL Vicente 博士には、データの解析など様々なアドバイスやご指導を頂きました。明治大学農学部農学科の新屋良治専任講師には、博士論文に関してや、研究進捗に対する相談や方向性に対する貴重な助言を頂くことができました。理化学研究所植物免疫研究グループの特別研究員佐藤一輝博士には、研究に対する心構えなど多くの助言を頂きました。応用生物学部研究員の幾代以子さんには、研究を進めてゆくうえでの多くの助言およびサポートを頂きました。長谷川研究室の大学院生の後輩達を含め、研究室メンバーとの切磋琢磨や日々の討論が、私にとって研究者を志すための成長また人間としての成長を促していただきました。

フロリダ大学昆虫線虫学部の Philip G. Koehler 博士には、フロリダ産クロゴキブリの分与と、ゴキブリに関する貴重なご助言を頂きました。佐賀大学農学部の吉賀豊司先生には、ゴキブリ寄生性線虫の研究を始める初期の段階で、大変重要なきっかけを頂きましたこと、また様々なゴキブリを分与頂くためのご手配をして頂きました。森林総合研究所の神崎菜摘博士には、右も左もわからなかった線虫分類の基礎を教えていただきました。森林総合研究所東北支所の相川拓也博士には、本研究を含めて私のゴキブリ研究全体を後押しして導いて頂きました。愛知ペストコントロール協会会長の川瀬充様には、ペストコントロール分野での活動及び日本ペストロジー学会において大変お世話になりました。

クロゴキブリは、アース環境サービス（兵庫県阿古市）、イカリ消毒（千葉県千葉市）、富士環境サービス（静岡県静岡市）から送っていただいたものであり、これらの株を提供していただいた方々に感謝致します。

またこれまでの研究は日本学術振興会特別研究員 DC1 のサポートを受けて研究を遂行することができましたことを感謝致します（科研番号：15J09961）。

最後に、私自身の生活・研究全てにおいて支えてくださった家族に感謝致します。