

【短報】

一般住宅で捕獲されたノシメマダラメイガから分離された微孢子虫

小田 尚幸^{1)*}, 橋本 一浩¹⁾, 福富 友馬²⁾, 川上 裕司¹⁾¹⁾株式会社エフシージー総合研究所 環境科学研究室²⁾国立病院機構相模原病院 臨床研究センターIsolation of microsporidia from infected *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) captured from residential houses.Hisayuki ODA^{1)*}, Kazuhiro HASHIMOTO¹⁾, Yuma FUKUTOMI²⁾ and Yuji KAWAKAMI¹⁾¹⁾Laboratory of Environmental Science, FCG Research Institute, Inc.; 1-1-20-6F Aomi, koto-ku, Tokyo, 135-0064, Japan.²⁾Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, Sagami National Hospital; 18-1 Sakuradai, Minami-ku, Sagami, Kanagawa, 252-0392, Japan.

摘 要

ノシメマダラメイガは一般住宅の室内で普通に見られ、本種への微孢子虫の感染が海外で報告されている。しかしながら、本邦におけるノシメマダラメイガの微孢子虫感染状況は報告されていない。そこで、東京近郊の住宅5軒でノシメマダラメイガ用フェロモントラップを用いてトラップ毎の捕獲虫の微孢子虫感染状況を約3か月間調査した。その結果、5,358匹の捕獲ノシメマダラメイガから計16群の微孢子虫が単離された。そのうち6群の孢子サイズを計測した結果、同様のサイズ及び形状であった。10群のsmall subunit rDNA配列を解析した結果、同一配列であり *Nosema* / *Vairimorpha* クラスターに分類された。

Abstract

The Indian meal moth (*Plodia interpunctella*) is normally observed indoors in human residences; the infection of this species by microsporidia has been reported overseas. However, the infection status of *P. interpunctella* by microsporidia has so far not been reported in Japan.

We therefore investigated, over about three months, the microsporidia infection status of *P. interpunctella* captured in pheromone traps in five houses in suburban housing in Tokyo city, Japan. We isolated 16 strains of microsporidia from 5,358 captured *P. interpunctella* individuals. The results of 10 strains of small subunit rDNA sequence analyses suggest that these microsporidians are classified in the same array as the *Nosema* / *Vairimorpha* genus cluster.

Key words: ノシメマダラメイガ (Indian-meal moth), 微孢子虫 (microsporidia), 系統解析 (phylogenetic analysis)

はじめに

ノシメマダラメイガ (Indian-meal moth; *Plodia interpunctella*, Hübner) の幼虫は貯穀類や乾燥果実をはじめ、ナッツ入りチョコレートなどの二次加工食品に至るまで広く食品を加害し、化学薬剤や物理的な防除が困難であることから食品への混入事故の重要種として位置づけられている⁴⁾。また、一般住宅周辺に極めて普通に生息しており、家屋害虫としての一面も知られている^{5,13)}。近年、成虫の翅に高いマイコトキシン産生能を有する真菌胞子を付着させていることが報告されており、食品衛生学およ

び医真菌学の観点からも有害性が指摘されている^{5,13)}。また、成虫の鱗粉や死骸の乾燥微粒子片が吸入性アレルゲン物質となることも指摘されている¹⁶⁾。

ノシメマダラメイガに微孢子虫が感染する事例は、海外では報告されている^{9,11)}。微孢子虫 (Microsporidia) は細胞内偏性寄生性の単細胞真核生物の一群で、宿主細胞外では1~10 μmほどの卵形、長球形、球形の微粒子状をしている。カイコ (*Bombyx mori*, Linnaeus) の微粒子病 (pebrine) の病原体としてルイ・パスツールによって初めて発見されて以来、昆虫病原性微生物として多くの種類の昆虫から見つかるようになった。昆虫

* Corresponding author: oda@fcg-r.co.jp
 受付: 2016年3月29日 (Received: 29 March, 2016)
 受理: 2016年10月11日 (Accepted: 11 October, 2016)

類だけでなく、甲殻類や魚類を宿主とする種や人を含む哺乳類に感染する種も見つかっている^{8,17)}。発見以来、核を持つ前の原始的な真核生物（アーケゾア）として考えられ、原生動物門孢子虫綱、あるいは極嚢胞子虫綱に入れられたが、分子系統学的な分類体系から、現在では極めて特殊化した菌類だと考えられ、独立な分類群（菌類界・微胞子虫門）と考えられている^{8,10)}。 *Nosema apis* は養蜂業にとっては厄介な病原体として著名である一方、 *Antonospora (Nosema) locustae*¹⁴⁾ はバッタ類の天敵防除（生物農薬）として利用されている¹⁰⁾。養蚕業の危機管理やチョウ目農業害虫に対する天敵微生物検索を目的として、本邦における野外のチョウ目昆虫の調査が行われ、微胞子虫の感染事例が報告されている^{1,3,6,7)}。一方、本邦における家屋害虫や食品害虫に対する微胞子虫感染事例の報告はなく、ノシメマダラメイガの微胞子虫感染の実態については不明である。ノシメマダラメイガに病原性を有する微胞子虫が明らかになれば、本種に対する生物的防除の可能性が開かれるかもしれない。このような背景から筆者らは、ノシメマダラメイガ用フェロモントラップを東京都および近県所在の一般住宅のリビングルーム、ベランダ、屋外に設置して、捕獲虫における微胞子虫感染実態について調査を行った。分離された微胞子虫について、胞子の形状観察およびサイズの測定という形態学的同定検査に加えて、small subunit rDNA 配列の比較による分子生物学的同定を試みた。この結果、新たな知見を得たので報告する。

材料および方法

1. ノシメマダラメイガの捕獲

ノシメマダラメイガの捕獲は2013年7月初旬から9月下旬に、東京都内3軒、神奈川県3軒、埼玉県2軒、千葉県2軒の計10軒の一般住宅を対象として行った（Table 1）。戸建住宅は5軒、集合住宅は5軒であった。ノシメマダラメイガ誘因用フェロモントラップ「ガチョン」（Fuji Flavor Co. Ltd.）を各住宅のリビングルームと、屋外2か所（ひさしのある住宅と隣接したベランダと、ひさしのある玄関や庭）の計3カ所に7日間設置し、計6回実施（10軒×3カ所×6回=180トラップ）、さらに東京都小平市と埼玉県小敷谷の2住宅の屋外のみ7回も実施（2軒×1カ所=2トラップ）、合計182個のトラップを使用した。

2. 微胞子虫の単離と胞子サイズの計測

捕獲したノシメマダラメイガは粘着シートから剥がし、トラップごとに翅以外の部位を捕獲数50頭あたり1mlの滅菌生理食塩水とともに乳鉢で磨砕した。磨砕液中の微胞子虫の感染状況は、位相差顕微鏡を用いて確認した。微胞子虫様の胞子が見つかった磨砕液は、ろ紙（No. 2, φ=90 mm；アドバンテック東洋株式会社）で濾過した後、遠心分離機H-103N（株式会社コクサン）を用いて約300×Gの遠心分離にてろ液を精製し、上清を滅菌チューブ中で滅菌生理食塩水で懸濁して4℃で保存し、これを1群として以降の試験で扱った。精製後の微胞子虫は位相差顕微鏡のデジタルメーターで20胞子の

Table 1 A list of the location of traps and isolated microsporidian strains

District	House form (Captured floor)	Captured <i>P. interpunctella</i> (L / V / O*)	No. positive traps	date	Detection of microsporidia				
					Positive location	Length and width (μm)		Acc No.	Strain No.
Tokyo	Haneki Setagaya-ku Apartment (3, 4F)	6 / 426 / 224	3	2013/7/29	V	3.3±0.23	ND** × 1.63±0.15	LC033874	FCG-1458
				2013/7/29	O				
				2013/9/9	V				
Tokyo	Takaido Suginami-ku Apartment (5F)	0 / 137 / 101	0	2013/7/29	V	3.37±0.53	ND × 1.58±0.14	LC033875	FCG-1460
				2013/8/26	V				
				2013/9/9	V				
Tokyo	Kodaira-shi Detached (1, 2F)	13 / 362 / 127	3	2013/7/13	V	3.11±0.22	ND × 1.65±0.13	LC033881	FCG-1469
				2013/8/26	O				
				2013/9/9	V				
Kanagawa	Aoba-ku Yokohama-shi Detached (1, 2F)	31 / 371 / 251	2	2013/7/13	V	3.49±0.21	ND × 1.72±0.12	LC033879	FCG-1465
				2013/8/26	O				
				2013/9/9	V				
Kanagawa	Kameino Hujisawa-shi Apartment (1F)	0 / 99 / 210	0	2013/8/26	O	3.51±0.47	ND × 1.72±0.19	LC033876	FCG-1461
				2013/9/24	V				
				2013/9/24	V				
Kanagawa	Izawa Minamiashigara-shi Detached (1, 2F)	1 / 336 / 91	0	2013/7/29	O	3.49±0.21	ND × 1.72±0.12	LC033883	FCG-1471
				2013/8/26	O				
				2013/9/9	V				
Saitama	Koshikiya Ageo-shi Detached (1, 2F)	41 / 696 / 82	2	2013/8/8	O	3.51±0.47	ND × 1.72±0.19	LC033876	FCG-1461
				2013/8/26	V				
				2013/8/26	V				
Saitama	Midorigaoka Ageo-shi Detached / Rice shop (1, 2F)	147 / 613 / 485	3	2013/7/18	V	3.32±0.25	ND × 1.59±0.2	LC033877	FCG-1462
				2013/8/1	O				
				2013/8/26	O				
Chiba	Akehara Kashiwa-shi Apartment (6F)	0 / 142 / 124	2	2013/9/10	V	3.49±0.21	ND × 1.72±0.12	LC033882	FCG-1470
				2013/9/24	V				
				2013/9/24	V				
Chiba	Hanamigawa-ku Chiba-shi Detached (1, 2F)	1 / 81 / 160	1	2013/7/29	O	3.51±0.47	ND × 1.72±0.19	LC033876	FCG-1461
				2013/7/29	O				

*L: Living room, V: Veranda, O: Outside house. **ND: No data.

短径と長径を計測した。それぞれの胞子サイズは、一元配置の分散分析（有意水準 $p = 0.05$ ）を用いて平均値に差があるかを解析した。

3. DNA 抽出と SSU rDNA 配列の解析

微胞子虫様胞子の DNA 抽出はガラスビーズ法¹⁾を用いた。抽出した DNA に、VN001F (5'-CTG CAG GTA CCA CCA CCA GGT TGA TTG CCT GAC-3') と VN001R (5'-GAG CTC GCA TGC GGT TTA CCT TGT TAC GAC TT-3')¹⁾ プライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物は Illustra ExoProStar (GE Healthcare UK Ltd.) によって精製し、Hokkaido System Science Co., Ltd. にダイレクトシーケンスを依頼した。得られた配列データは DDBJ に登録した (Acc. No LC033874 - LC033883)。DDBJ/EMBL/Genbank から引用した他の微胞子虫種および大腸菌の SSU rRNA 遺伝子配列とともに MEGA version 5.2.2¹⁵⁾ を用いて近似配列のデータベース検索および系統解析を行った。最尤法を用い、ブートストラップを 1,000 回試行として系統樹を作成した。

結果および考察

ノシメマダラメイガ捕獲調査の結果、182 個のトラップに計 5,358 匹が捕獲された。杉並区高井戸、藤沢市亀井野、柏市明原以外の住宅のリビングルームに設置したトラップにおいても、ノシメマダラメイガが捕獲された。7 軒の住宅のリビングでノシメマダラメイガが捕獲されたが、緑が丘の住宅以外の捕獲数はトラップあたり最大約 3 頭と少なかった。これは室外から誘引されたものであり、室内で繁殖していないと推察される。緑が丘の住宅は捕獲数が多く、室内で繁殖している可能性がある。

磨砕液を観察した結果、16 個のトラップ捕獲虫から長球形の微胞子虫様胞子が 16 群分離され、それぞれ FCG-1456 から FCG-1471 とした (Table 1)。トラップあたりの感染率は 13.9%であった。微胞子虫様胞子が確認されたトラップはすべて屋外に設置したものであった。また、屋内でノシメマダラメイガが発生していると示唆される緑が丘の住宅屋内から微胞子虫は分離されなかった。微胞子虫様胞子感染群は調査期間である 7 月上旬から 9 月上旬まで確認された。ノシメマダラメイガの捕獲数が少数でも感染が見られた一方で、平均程度の捕獲数でも分離されない場合があり、捕獲数が多ければ分離頻度が

上がるというわけではなかった。

分離した微胞子虫様胞子の内、FCG-1459, 1461, 1462, 1464, 1470, 1471 の計 6 群の胞子サイズは平均 $3.35 \mu\text{m} \times 1.64 \mu\text{m}$ であった。これ以外の 10 群は胞子サイズ計測のための胞子数が基準となる 20 個に満たなかったため計測していない (Table 1)。6 群の胞子サイズを分散分析した結果、短径は p 値: 0.30, 長径は p 値: 0.17 となり、短径・長径ともに大きさに有意な差は見られなかった。ノシメマダラメイガに感染性が報告されている微胞子虫である *V. necatrix* の平均胞子サイズは二核性胞子で $4.65 \times 2.11 \mu\text{m}$, 単核胞子で $2.84 \times 1.67 \mu\text{m}$ である¹⁾。また、ノシメマダラメイガ由来微胞子虫である *Nosema heterosporum* と *Thelohania nana* は $5.46 \times 1.99 \mu\text{m}$, $2.07 \times 1.86 \mu\text{m}$ である⁹⁾。本調査で分離された胞子は、いずれとも異なるサイズを示した。既知のチョウ目昆虫由来微胞子虫と比較したところ、*Thelohania* sp. M32 の $3.50 \times 1.70 \mu\text{m}$ ⁶⁾ と近いサイズを示した。

分離群を PCR した結果、胞子サイズを計測した 6 群に加えて 4 群の SSU rDNA 配列が増幅できた。配列解析の結果、解析した 10 群はすべて同一の配列を有しており、チョウ目昆虫由来の微胞子虫である *Nosema* sp. Mrp や *Nosema* sp. MIS-M11, *N. carpocapsae* と高い相同性を示した。作成した系統樹 (Fig.1) から、単離株の DNA 配列は *V. necatrix* や *Vairimorpha* sp. NIS M-11 を含む *Nosema/Vairimorpha* 複合グループに属することが明らかとなった。

Vairimorpha 属微胞子虫は発育における温度条件によって、*Nosema* 属様と *Thelohania* 属様の異なる 2 つの胞子形成様式が存在することが知られている¹²⁾。したがって、本調査の微胞子虫群における胞子形状と SSU rRNA 遺伝子配列解析の結果から、捕獲されたノシメマダラメイガから分離した微胞子虫株は *Thelohania* 属様の胞子形状をとっている *Vairimorpha* sp. である可能性が高い。そこで、本調査における単離株を同定するため、胞子形成様式の観察が必要である。また、SSU rRNA 遺伝子配列では、*Nosema/Vairimorpha* 複合グループの微胞子虫を分類することが困難である²⁾ ため、さらなる遺伝子配列の解析も望まれる。

チョウ目昆虫における微胞子虫伝搬は幼虫時の経口感染と、一部の種類では経卵感染によって起こる⁶⁾ ことから、ノシメマダラメイガ発生源に微胞子

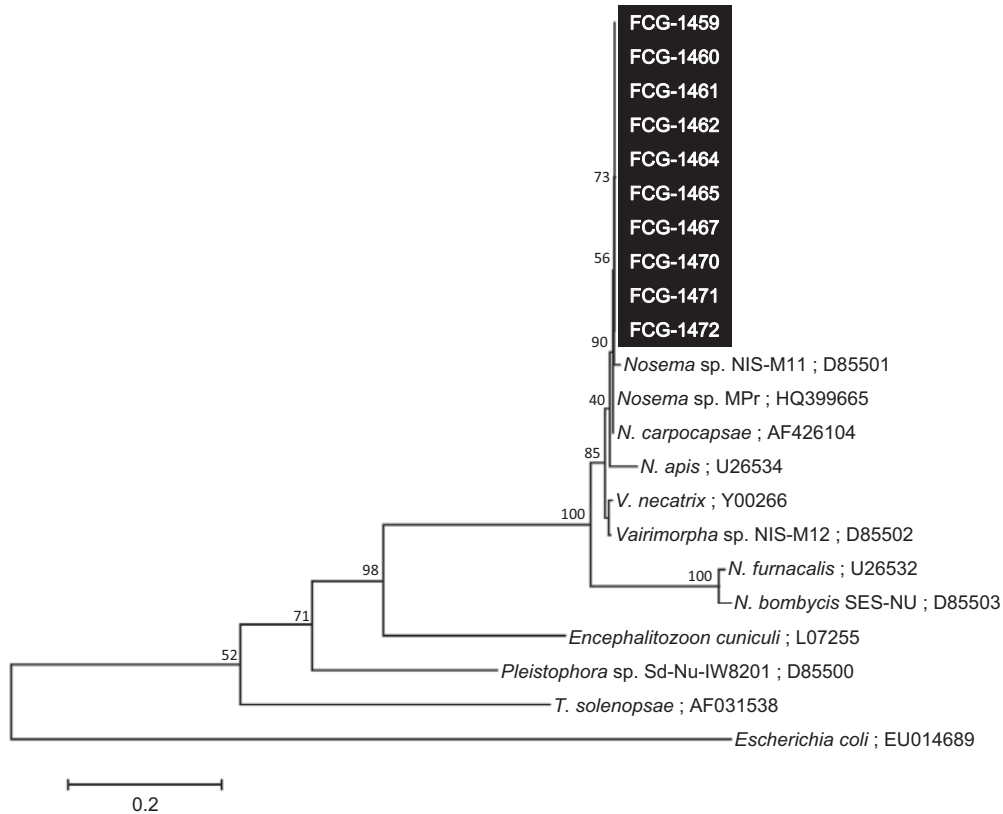


Fig. 1 A phylogenetic tree of microsporidian strains isolated from *Plodia interpunctella* constructed using SSU rRNA sequences.

Comparison was made between the microsporidian strains isolated from *P. interpunctella* (black box) and other strains. *N* : *Nosema*, *P* : *Pleistophora*, *T* : *Thelohania*, *V* : *Vairimorpha*

虫が存在していて、餌の摂食に伴って感染が成立したと示唆される。ノシメマダラメイガの発生源には不明な点が多いが、住宅周辺に何らかの発生源があることが指摘されている¹³⁾。屋内ノシメマダラメイガから微胞子虫が分離されなかったことから、微胞子虫は屋外にあるノシメマダラメイガ発生源で生活サイクルをとっていることが推察される。なお、本調査で分離された微胞子虫の経卵感染性については不明である。

国内における屋外ノシメマダラメイガにおける微胞子虫の分離事例は本邦初である。ノシメマダラメイガに対して高い殺虫性を有する微胞子虫株が発見される可能性があるため、同様の分離調査を今後も継続する予定である。

謝 辞

本調査におけるノシメマダラメイガの捕獲を快く協力していただくとともに、微胞子虫についてのご助言を賜りました。日本大学生物資源科学部植物資源科学科応用昆虫学研究室岩野秀俊教授、博士後期

課程志賀野倫明氏、博士後期課程山本裕一氏にこの場を借りてお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Hatakeyama, Y., Kawakami, Y., Iwano, H., Inoue, T. and Ishihara, R. (1997) Analyses and taxonomic inferences of small subunit ribosomal RNA sequences of five microsporidia pathogenic to the silkworm. *J. Seric. Sci. Jpn.* 66: 242–252.
- 2) Hatakeyama Y., Oda H., Tsunoda R., Imura Y., Maeda T., Xuan T. T., Hai T. V. and Iwano H (2011) Genome profiling implies high genetic diversity in microsporidia isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), in Vietnam. *Appl Entomol Zool* 46: 293–299.
- 3) 岩野秀俊 (1987) スジキリヨトウ個体群における微胞子虫感染率の季節変動 応動昆 31: 321–327.

- 4) 川上裕司 (2007) 室内環境中に見られるダニ類と小昆虫類. 室内環境 10: 45–67.
- 5) 川上裕司・高橋治男 (2007) *Aspergillus ochraceus* の carrier としての衛生害虫. マイコトキシン 57: 47–56.
- 6) Kawarabata Y. (2003) Biology of microsporidians infecting the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan. *J. Seric. Sci.* 72: 1–32.
- 7) 川原畑勇・早坂昭二・一田昌利・瀬川裕美・寺峰孜・植松秀雄・安田慶次 (1990) 桑園周辺で採集したモンシロチョウ成虫から検出された微孢子虫類 日蚕雑 59: 288–92.
- 8) Keeling P. (2009) Five Questions about Microsporidia. *Pathogens*. 5: e1000489.
- 9) Kellen, W. R. and Lindegren, J. E. (1968) Biology of *Nosema plodiue* sp. n., a Microsporidian Pathogen of the Indian-Meal Moth, *Plodia interpunctella* (Hübner), (Lepidoptera: Phycitidae) *J. Invertebr. Pathol.* 11: 104–111.
- 10) Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. and Stalpers, J. A. (2008) Ainsworth & bisby's dictionary of the fungi. 10th edition ed. CABI Publishing. 427p.
- 11) Malonei, L. A. (1984) A comparison of the development of *Vairimorpha plodiae* and *Vairimorpha necatrix* in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *J. Invertebr. Parhol.* 43: 140–148.
- 12) Mitchell, M. J. and Call, A. (1993) Ultrastructural study of the development of *Vairimorpha necatrix* (Kramer 1965) (Protozoa, Microsporida) in larvae of the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera, Noctuidae) with emphasis on sporogony *J. Eukar. Microbiol.* 40: 701–710.
- 13) 宮ノ下明大・今村太郎・古井聡 (2013) マンション周辺における性フェロモントラップで捕獲されたノシメマダラメイガ *Plodia interpunctella* の個体数と分布. 都市有害生物管理 3: 1–6.
- 14) Slamovits C. H., Williams B. A. P. and Keeling P. J. (2004) Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonospora locustae* n. comb. based on molecular and ultrastructural data. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51: 207–213.
- 15) Tamura K. Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 28: 2731–2739.
- 16) 谷口正実・福富友馬 編 (2014) 吸入性アレルギーの同定と対策. 株式会社メディカルレビュー社, 東京. pp. 38-39.
- 17) Weiss L. M. (2001) Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Tropica* 78: 89–102.