

入生田におけるアシマダラブユ幼虫腸内寄生菌の通年観察

陶山 舞・佐藤 大樹・折原 貴道

Mai Suyama, Hiroki Sato and Takamichi Orihara:
Observation of gut-living fungi in larvae of *Simulium japonicum*
through a year in Iryuda, Odawara, Kanagawa

Abstract. Blackfly larvae are known as hosts of fungi classified in Harpellales (Kickxellomycotina). To investigate the ecological aspects of these fungi, we collected larvae of *Simulium* (*Simulium*) *japonicum* monthly from a small stream in Iryuda, Odawara City, Japan from April 2016 to March 2017. We dissected the collected larvae and examined the harpellalean fungi inhabiting the larval midguts and hindguts. *Harpella melusinae* was observed in the midgut of every larva. *Simuliomyces microsporus* was collected from hindguts in the spring and autumn–winter seasons, whereas *Pennella angustispora* was collected from hindguts in the summer and winter seasons. A specimen *Smittium* sp. inhabiting the hindgut of the Simuliidae larvae was obtained. This genus is new to Kanagawa Prefecture, however, additional isolates need to be obtained for species-level identification. In addition, simultaneous infection of three species, (i. e., *Harpella melusinae* in midgut, and *P. angustispora* and *Si. microsporus* in hindgut), was observed in some individuals in February and November.

はじめに

ハルペラ目は、トリモチカビ門キクセラ亜門に属し、多くが水生昆虫の幼虫の消化管内に生息している。寄主として主に、カワゲラ目、カゲロウ目、ハエ目が知られ、なかでもハエ目の幼虫に感染する種が著しく多い。特にハエ目ブユ科の幼虫からは2科9属が報告されている (Lichtwardt *et al.*, 2001)。これらのうち国内からは、*Harpella melusinae* L. Léger & Duboscq (産地：神奈川県・栃木県・茨城県)、*Pennella angustispora* Lichtwardt (神奈川県・茨城県)、*Smittium simulii* Lichtwardt (栃木県・茨城県)、*Simuliomyces microsporus* Lichtwardt (北海道・神奈川県) の4属4種が報告されているが (Lichtwardt *et al.*, 1987, Sato, 2013b, 佐藤, 2013a, 佐藤・出川, 2003, 佐藤・折原, 2013, 陶山ほか, 2017), これらハルペラ目菌の感染率の季節的変動については日本では調査されていない。神奈川県小田原市入生田では、同一の調査地点において、過去に *Harpella melusinae* (調査月: 4, 11 月), *Pennella angustispora* (4, 11 月), *Simuliomyces microsporus* (4 月) の3属3種が報告されている (佐藤・出川, 2003, 佐藤・折原, 2013, 陶山ほか, 2017)。

今回、調査時期が限られている従来の報告を補い、各菌種の感染頻度やその頻度の季節変動など生態的側面を明らかにすることを目的として、通年の感染状況をブユ科幼虫において調査した。その結果、未記録の時期における菌の検出、後腸への菌の二重感染例の確認、ブユ寄生性の *Smittium* sp. の発見など、神奈川県内でのブユ寄生菌に関する新知見が得られたので報告する。



図1. 調査地. 丸印はブユ生息場所.

寄主のブユ科幼虫は、神奈川県小田原市入生田、宮沢川上流で採集した（図 1）。この採集地は佐藤・出川（2003）、佐藤・折原（2013）、陶山ほか（2017）で調査が行われた場所と同じ地点である。採集は 2016 年 4 月より 2017 年 3 月まで 9、12 月を除き毎月実施した。採集した幼虫は速やかに実験室に持ち帰り、佐藤（2013b）に従い解剖を行い、毎月 10–15 匹のブユの消化管を水封入により観察した。その後、ラクトフェノールに置換しプレパラート標本を作成した。これらのプレパラート標本は、生命の星・地球博物館（KPM）に保管されている（KPM-NC 24848, KPM-NC 24849, KPM-NC 25735–25763）。寄主の同定のため、採集したブユの一部を 70 %エタノールで固定し保管した。また、今回の調査では得られたブユ幼虫の齢については考慮しなかった。なお、同博物館における菌類の標本番号は、電子台帳上はゼロが付加された 7 桁の数字が使われているが、ここでは標本番号として本質的な有効数字で表した。

寄主昆虫は、上本（2005）に基づき全てアシマダラブユ（*Simulium japonicum* Matsumura）と同定された。調査期間に採集されたブユ幼虫を解剖した結果、4 属 4 種（*Harpella melusinae*, *Pennella angustispora*, *Simuliomyces microsporus*, *Smittium* sp.）のハルペラ目菌が検出された。つまり 1 地点に生息する 1 種のブユに対し、少なくとも 4 種の菌類が寄生していることが判明した。これら 4 種の寄生は中腸あるいは後腸に認められた。

中腸では、年間を通して解剖した全ての寄主個体に *Harpella melusinae* の付着が見られた。トリコスポア（離脱性の孢子嚢で内部に 1 個孢子を含み、無性孢子役割をしている構造）を形成している菌体も年間を通して多く確認された。接合孢子は観察されなかったが、接合孢子形成の前段階と考えられる、2 菌体の接合は 4, 8, 11 月に観察された（図 2A）。

後腸には、感染が確認できた個体では 1 頭当たり 1–2 種が感染しており、全体で 3 属 3 種（*Pennella angustispora*, *Simuliomyces microsporus*, *Smittium* sp.）の付着が確認された（図 3）。*Pennella*

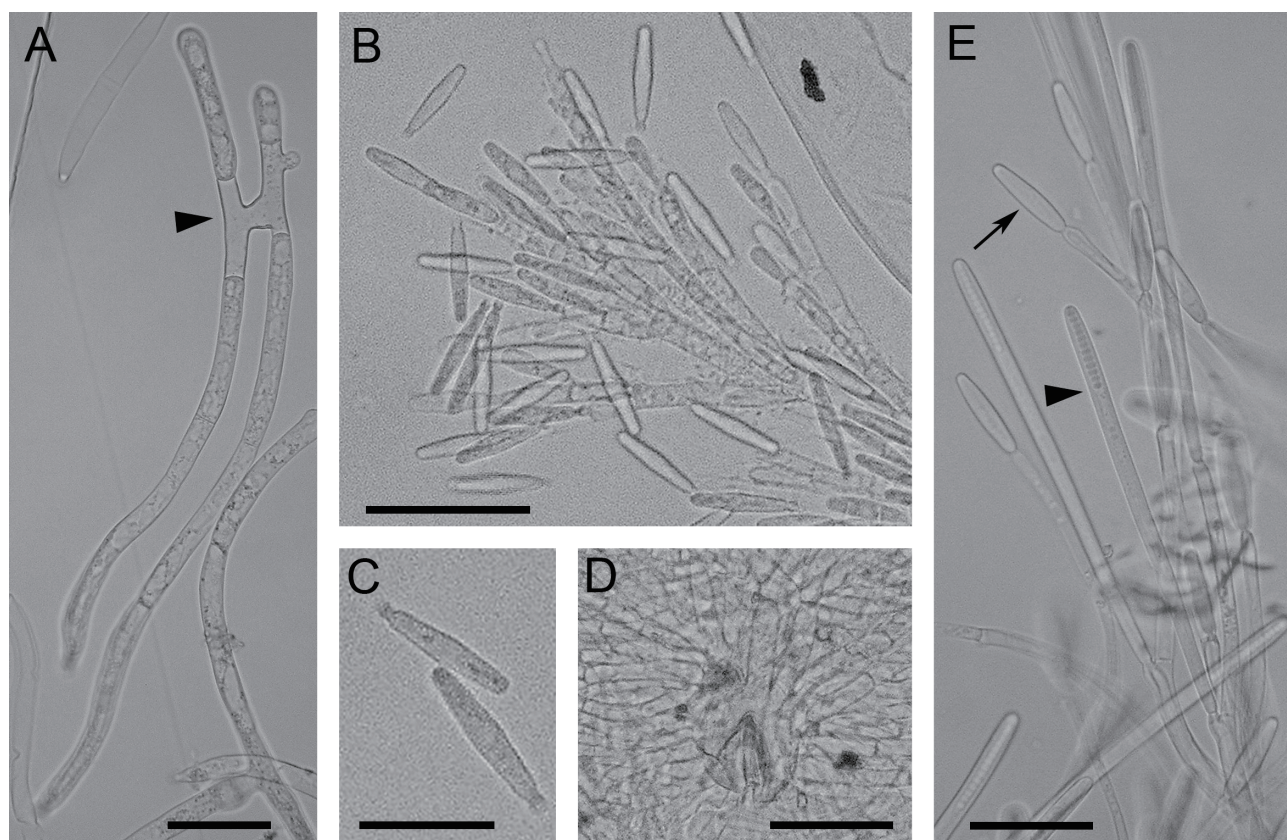


図 2A–E. A. *Harpella melusinae* の接合。くさび印：接合部。B. トリコスポアを形成する *Smittium* sp. C. *Smittium* sp. のトリコスポア。D. *Smittium* sp. の付着器。E. *Pennella angustispora*, *Simuliomyces microsporus* の二重感染。くさび印：*P. angustispora* のトリコスポア，矢印：*Si. microsporus* のトリコスポア。図 A, B, D, E: スケール 30 μ m。図 C: スケール 15 μ m。図 A: KPM-NC 25754。図 B–D: KPM-NC 25743。図 E: KPM-NC 25761。図 A–E: 水封入。

angustispora は5月から8月、11月から2月まで観察され、4、10、3月には見られなかった。本種が最も多く検出された月は、大きく成長したブユ幼虫が多く確認された8月であった。なお、本種のトリコスポアは100 μm をこえる大型のもので、今回の調査でも観察されたが、接合胞子は観察されなかった。*Simuliomyces microsporus* は4月から6月、10月から3月まで観察され、7、8月には見られなかった。本種ではトリコスポア、接合胞子ともに観察された。また、本種は同所的に生育する原生生物 *Paramoebidium* sp. の細胞に付着する様子が認められたが、他のハルペラ目菌の菌体への付着は見られなかった。*Paramoebidium* 属は節足動物の腸内に生息し糸状の細胞を形成することから旧来は菌類とみなされていたが、分子系統解析等の研究に基づき動物に近縁なメソミケトゾアの一類ということが判明し、現在は菌界からはずされている。*Smittium* sp. は8月に解剖したブユ1個体からのみ検出された。トリコスポアの形成は見られたが、接合胞子は観察されなかった。2月および11月には、ブユ1個体の後腸に *P. angustispora* と *Si. microsporus* が同時に感染していた例(図2E)も見られた。これらの中腸には *Harpella melusinae* が付着し、3重の感染が確認された。また、5月と10月には、未熟のため同定のできない菌体(図3では「未熟」と記述)が多かった。後腸については、年間を通して菌の感染が見られない個体が一定数認められた。

Smittium 属菌はブユ科にも寄生することが知られる

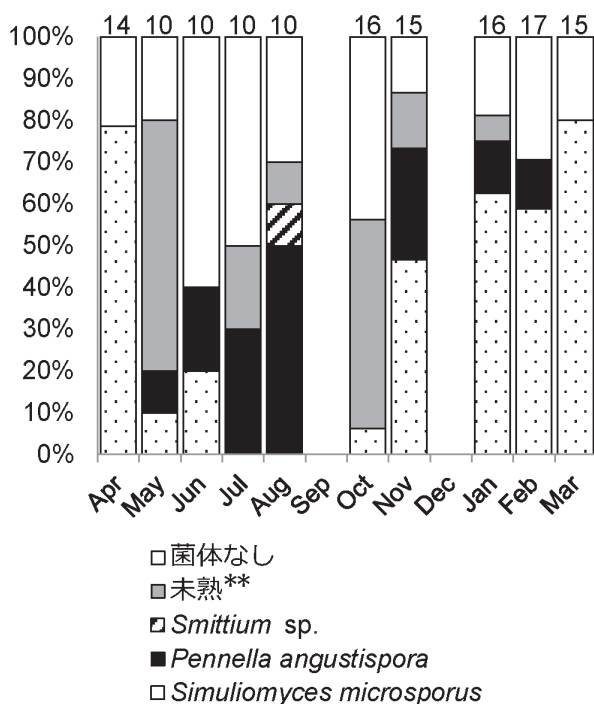


図3. 後腸寄生性の菌類各種の感染率。* グラフの上の数値は調査個体数。同一個体から得られた別種の菌類はそれぞれ別に感染率を示した。** 未熟：保持菌体が未熟のため同定のできなかった割合。

が(Lichtwardt *et al.*, 2001), 神奈川県では採集例がなく、これが初記録である。本調査で得られた菌の形態的特徴を下記に記す。

Smittium sp. (図2B-D)

菌体は馬蹄形の基部細胞から叢生した複数の分枝した菌糸から成り、ブユ幼虫の後腸壁に付着する。トリコスポアは、中央がやや膨らんだ円筒形、15.0–22.5 $\times$ 3.8 μm (平均: 18.4 $\times$ 3.8 μm , N = 25), 長さ 1.3–2.5 μm (平均: 2.3 μm , N = 25) のカラーを有し、アペンデージは観察されなかった。接合胞子は観察されなかった。

観察試料: KPM-NC 25743

本菌はブユに寄生する点、トリコスポアがカラーを有する点、馬蹄形の基部細胞をもつ点から *Smittium simulii* に酷似するが、アペンデージを持たないという点で異なる。一方、ブユに寄生する点、トリコスポアのサイズおよびアペンデージを有しない点から *Smittium imitatum* に酷似するが、馬蹄形の基部細胞をもつ点で異なる。今回はその検出数が少なく、もっと多くの資料を検討する必要がある、同定のためには今後も調査をつづける必要がある。

考 察

日本におけるハルペラ目菌類相の最初の調査は Lichtwardt *et al.* (1987) であり、ハエ目を寄主として探索された。その結果、北海道アシリベツの滝で、4種が検出されているが、これが同一地域で採集されたハルペラ目菌の最大種数であった: *Harpella melusinae* (寄主: ブユ科), *Harpellomyces eccentricus* (ユスリカバエ科) *Stachylinea penetralis* および *Smittium elongatum* (ともにユスリカ科)。近年、ハルペラ目の調査が集中的に行われている筑波山でも4種が同定され、2種が未同定で記録されている(Sato, 2013a, b): *Bojamyces repens* (トビイロカゲロウ科), *H. melusinae*, *Pennella angustispora* および *Smittium simulii* (ブユ科, 3種)。上述の2つの調査地の結果は、複数の地点の調査の結果を合わせたものである。一方、今回、同一河川の1地点の継続的調査により、寄主をブユ科の1種に限定しても4種の腸内寄生菌を記録することができた。このことは、ブユを寄主とするハルペラ目菌にとって宮沢川には良好な環境が備わっていることを示唆している。同時に同一地点での継続調査の重要性も示していると考えられる。

Lichtwardt *et al.* (1987) の報告には複数種の感染に関する記述はないが、Lichtwardt (1972) には、*Simuliomyces microsporus* と *Genistellospora homothallica* の同時感染、さらに同所的に存在する原生生物 *Paramoebidium* sp. の細胞表面への付着が記述されている。日本では、ブユにおける三重感染の例として、同一のブユ幼虫個体の中腸に *Harpella melusinae*,

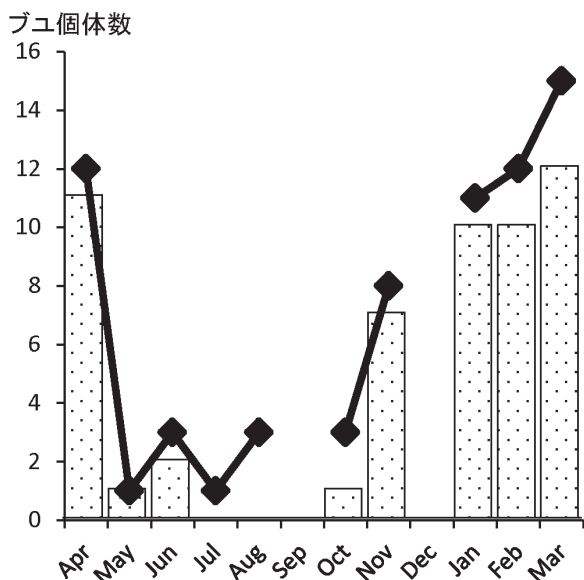


図4. *Simuliomyces microsporus*と*Paramoebidium* sp.の感染率. 棒グラフは*S. microsporus*の出現した調査個体数, 折れ線グラフは*Paramoebidium* sp.の出現した調査個体数を示した。*Paramoebidium* sp.の感染の有無は, 毎月のハルペラ目の感染調査と同時に行った。従って各月の寄主の調査頭数は図3と同じである。

後腸に *Pennella angustispora* と *Smittium simulii* とが同時に感染した例が記録されており (Sato, 2013b), 同一の後腸内で *Sm. simulii* が上流部に, *P. angustispora* が下流部に生息する図が掲載されている。今回, 後腸に *P. angustispora* と *Si. microsporus* の感染 (図2E) に加え, *Smittium* sp. も検出された。これら3種が後腸内に同時感染したとき, それぞれの種には付着部位の特異性があるのか, また付着部位を巡る競争が存在するのかという点に着目して今後, さらに研究を進めたい。

Simuliomyces microsporus は, 寄主の後腸壁に付着するのみならず, 同所的に生息する *S. microsporus* の別個体, 別種の別個体のハルペラ目菌類の菌体上, そしてハルペラ目と同様に後腸壁に付着生活する原生生物の *Paramoebidium* spp. の細胞表面にも付着することが知られている (Lichtwardt, 1972)。本調査では *S. microsporus* が他のハルペラ目菌類の菌体に付着する例は観察されなかったが, *S. microsporus* を検出した月には必ず *Paramoebidium* sp. が確認された (図4)。このことから, *S. microsporus* の感染と *Paramoebidium* sp. の感染との間には何らかの関連があると考えられる。これらの動態について, この菌の付着基質の選好性も含めて詳しく検討する必要がある。また, 他のハルペラ目の菌体表面に付着できるという性質は, 付着の機会を増やす意味で, 複数種の後腸内同時感染時には有利な特徴だと考えられる。

Pennella angustispora は大型のトリコスポアを形成するが, 本種が多く検出された月のブユ幼虫は大型であっ

たことから, 本種の発生長は, ブユ幼虫の個体サイズ, 成長段階と関連していると考えられる。また, 今回の調査で10月に検出された菌体は未熟のものが多く, 同定できなかったが (図3では「未熟」と記述), 一部の菌体は基部の細胞の先端が細くなる形態を示したことから, 本種である可能性がある。過去の調査では本種は4月に4個体のブユから検出されているが (佐藤・折原, 2013), 本研究では, 4月調査時に感染は認められなかった。今後は, 幼虫のサイズや齢にも着目して, 寄主と寄生菌との対応関係の解明についても調査を進めていきたい。

謝 辞

接合菌類の観察について手ほどきしていただいた, 筑波大学の出川洋介博士に深謝する。

引用文献

- Lichtwardt, R. W., 1972. Undescribed genera and species of Harpellales (Trichomycetes) from the guts of aquatic insects. *Mycologia*, 64(1): 167–197.
- Lichtwardt, R. W., M. J. Cafaro & M. M. White, 2001. The Trichomycetes, Fungal associates of Arthropods, revised edition. <http://www.nhm.ku.edu/~fungi/> (accessed on 2017-August-20).
- Lichtwardt, R. W., Y. Kobayasi & H. Indoh, 1987. Trichomycetes of Japan. *Transactions of Mycological Society of Japan*, (28): 359–412.
- Sato, H., 2013a. *Bojamyces repens* (Harpellales) from exuviae of mayfly, a new record from Japan. *Mycoscience*, 54: 217–220.
- Sato, H., 2013b. Gut-living fungi of aquatic insects: Preliminary collection record of Harpellales (Kickxellomycotina) in Tsukuba, Japan. *Biology of inland waters*, Supplement, 2: 109–114.
- 佐藤大樹, 2013a. ブユ幼虫の腸内寄生菌 *Simuliomyces microsporus* (ハルペラ目) の日本初記録とその解剖用昆虫試料の冷凍保存法の検討. 日本菌学会会報, (54): 54–59.
- 佐藤大樹, 2013b. ブユ幼虫を用いたハルペラ目の観察方法. 日本菌学会会報, (54): 70–78.
- 佐藤大樹・出川洋介, 2003. 神奈川県産昆虫腸内寄生菌の一種 *Harpella melusinae* (トリコミケス綱: ハルペラ目) の記録. 神奈川県自然誌資料, (24): 85–87.
- 佐藤大樹・折原貴道, 2013. ブユ幼虫の腸内寄生菌 *Pennella angustispora* (ハルペラ目) の神奈川県初記録. 神奈川県自然誌資料, (34): 21–23.
- 陶山 舞・高木 望・佐藤大樹・折原貴道, 2017. 本州初記録となるブユ幼虫の腸内糸状菌 *Simuliomyces microsporus* (ハルペラ目) の神奈川県からの発見. 神奈川自然誌資料, (38): 1–4.
- 上本麒一, 2005. ブユ科. 川合禎次・谷田一三編, 日本産水生昆虫一科・属・種への検索, pp. 1007–1033. 東海大学出版会, 秦野.

陶山 舞: 神奈川県立生命の星・地球博物館外来研究員
佐藤 大樹: (国研) 森林研究・整備機構 森林総合研究所
折原 貴道: 神奈川県立生命の星・地球博物館