

環動昆

報文

- 大類幸夫・原田晴康：PCR-RFLP法による貯蔵害虫のマダ
ラメイガ類 (Lepidoptera: Pyralidae) 4種の識別 …………… 121
- 北原正彦・渡辺 牧：富士山北麓青木ヶ原樹海周辺における
チョウ類群集の多様性と植生種数の関係 …………… 131
- 寒川友貴・宇賀昭二：兵庫県千種川流域における *Metagonimus*
属吸虫の疫学調査…………… 147

解説

- 中谷憲一：日本産陸水生アメンボ科成虫の絵解き検索 …………… 155
- 印象記 …………… 163
- 会報 …………… 166
- 投稿規定 …………… 168

Vol. 12

3

2001

日本環境動物昆虫学会

PCR-RFLP法による貯蔵害虫のマダラメイガ類 (Lepidoptera: Pyralidae) 4種の識別

大類幸夫・原田晴康

日本たばこ産業株式会社 葉たばこ研究所

(受領：2001年1月18日；受理：2001年7月4日)

Discrimination of Four Stored Product Pest Species in Phycitinae (Lepidoptera: Pyralidae) by the PCR-RFLP Method. Yukio Orui and Hareyasu Harada (Leaf Tobacco Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., Oyama, Tochigi 323-0808, Japan). *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.* **12** : 121-129 (2001)

To identify four species (*Ephestia elutella*, *E. kuehniella*, *E. cautella*, and *Plodia interpunctella*) of stored product pests in Phycitinae, a portion of the 16S ribosomal RNA gene of the mitochondrial DNA was analyzed by the polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. The size of each amplified DNA product obtained from the four species ranged from 555bp to 559bp. Results of nucleotide sequencing of those amplified DNA products showed that the four species were discriminated from each other by *Vsp* I -digestion alone or a combination of *Dra* I - and *Xba* I -digestion of the PCR products. Developmental stage and sex did not affect the PCR-RFLP patterns of the four species. Each template DNA from both adult specimens dried for one month at room temperature and larvae dipped for 90 minuits in 100°C water was amplified by PCR.

Key words: Identification, *Ephestia elutella*, *Ephestia kuehniella*, *Ephestia cautella*, *Plodia interpunctella*, PCR-RFLP method

4種のマダラメイガ類（チャマダラメイガ，スジコナマダラメイガ，スジマダラメイガ，およびノシメマダラメイガ）について，ミトコンドリアDNAの16S rRNA 遺伝子一部領域を対象にPCR-RFLP法を用いて種の識別を試みた。これら4種の増幅されたPCR産物の大きさは，すべて555～559bpであった。これらPCR産物の塩基配列を決定し，あわせて種の識別に利用可能な制限酵素を推定した。この結果をもとに4種7系統のマダラメイガ類の増幅したPCR産物を制限酵素（*Vsp* I，

Dra I および *Xba* I) で実際に処理し、それぞれのRFLPパターンを調べた。その結果、塩基配列から推定したRFLPパターンと抽出DNAから増幅したPCR産物のRFLPパターンが発育ステージおよび性別に関係なく一致した。*Vsp* I 単独処理によるRFLPパターンを用いれば、4種の識別は可能であった。さらに、*Dra* I および *Xba* I の処理による2つのRFLPパターンの組合せからも4種のマダラメイガ類の識別が可能であった。また、沸騰水に90分間浸漬した幼虫、および室温で1か月間保存した乾燥成虫の一部から調製した鋳型DNAでもPCR増幅され、種の識別が可能であった。

はじめに

スジコナマダラメイガ (*Ephestia kuehniella* (Zeller)), スジマダラメイガ (*E. cautella* (Walker)), およびノシメマダラメイガ (*Plodia interpunctella* (Hübner)) の3種は、製粉工場や乾燥食品工場をはじめ一般家庭などで発見される鱗翅目害虫であり、なかでもノシメマダラメイガによる食品トラブルが最も多い(安富・梅谷, 1995)。また、チャマダラメイガ (*E. elutella* (Hübner)) は、葉たばこ耕作農家において貯蔵中の葉たばこを加害する重要害虫である(小泉ら, 1985)。

これら4種のマダラメイガ類は、メイガ科 (Pyralidae) のマダラメイガ亜科 (Phycitinae) に属している。これらの成虫の形態は、色彩や外形が似たものが多く、鱗粉が落ちると交尾器などの形態を観察しなければ、種の識別が困難である。それぞれの種の幼虫は、刺毛をとり囲む硬化したリングの特徴などで同定される(吉田, 1989)が、外部形態が酷似するため種の識別が難しく、成虫まで飼育してから識別することが多い。さらに乾燥成虫体は、各環節部分が壊れやすく、異物として商品に混入した場合、形態をとどめず、種の識別が難しくなる。このようなことから虫体の発育ステージや保存状態に関わらず虫体の一部からでも迅速かつ簡便に種を識別できる新しい技術は有益である。

近年、昆虫の種の識別や系統解析がDNAレベルで行われるようになってきた (Roehrdanz,

1994; Muraji *et al.*, 2000)。特にPCR (polymerase chain reaction) 法は、解析に用いるDNA試料がごく微量で精製純度が低い場合にも種の識別法として利用できることから、微小な昆虫や昆虫体の一部分などを用いた解析に適している。さらに、PCRを用いた方法のうちPCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) 法はDNA中における塩基配列の差異を増幅したPCR産物の制限酵素処理による断片の数および長さの変異として検出でき、操作が比較的簡便である。PCR-RFLPを用いた識別法は、オオタバコガとタバコガの識別(大類ら, 2000)、マメゾウムシ4種の識別 (Tuda *et al.*, 1995) など幅広い昆虫種で報告されている。

本研究では、貯蔵食品を加害する4種のマダラメイガ類(チャマダラメイガ、スジコナマダラメイガ、スジマダラメイガ、およびノシメマダラメイガ)についてミトコンドリアDNA (mt DNA) の16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子一部領域の塩基配列を決定し、PCR-RFLP法による種の識別に利用可能な制限酵素を推定した。次に、この推定した制限酵素を用いて増幅したPCR産物を実際に処理し、電気泳動法を用いてRFLPパターンを調べ、種間のパターンを比較した。さらに、発育ステージや雌雄の違いがRFLPパターンに及ぼす影響、および加熱処理や乾燥保存が供試虫のPCR増幅に及ぼす影響についても明らかにした。

材料および方法

実験には、チャマダラメイガ、スジコナマダラメイガ、スジマダラメイガ、およびノシメマダラメイガの4種7系統を供試した。これらのうちノシメマダラメイガ (Strain 2,3), チャマダラメイガ, スジコナマダラメイガ, スジマダラメイガは、成虫あるいは老熟幼虫を99.5%エタノールに浸漬した状態で分譲された供試虫である (Table 1)。ノシメマダラメイガ (Strain 1) は、コーン粉に乾燥酵母を1%加えた飼料を用いて室温で飼育した個体を実験に供試した。

これら供試虫の鋳型DNAの調製, PCR増幅, PCR産物の塩基配列の決定, およびPCR産物の制限酵素による消化は, 大類ら (2000) と同様の方法で行った。なお, 以下に大類ら (2000) の実験方法と異なる部分, 供試プライマー, 各実験の供試虫, および制限酵素の選定方法を示した。

4種7系統の鋳型DNAの調製には, 夾雑物の混入の恐れが最も少ない成虫の脚の一部あるいは老熟幼虫の尾端を試料として行った。鋳型DNAを次のようにして調製した。5 μ lのlysis buffer (大類ら, 2000) を入れた GeNunc Module No.2 (Nunc) のウェル中にこれらの試料を個体別に入れて磨砕し, この磨砕液に30 μ lのlysis bufferを加えて混合後, この溶液30 μ lを0.5mlの遠心チューブに移した。この溶液を55°Cで1時間処理後, さらに, 95°Cで10分間の熱処理をしたものを鋳型DNAとした。

供試したプライマーは Xiong and Kocher

(1991) が *Drosophila yakuba* の塩基配列に基づき設計した mt DNA の16S rRNA遺伝子の一部領域を増幅するセンスプライマー (16SAr) 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3', アンチセンスプライマー (16S Br) 5'-CTCCGGTTTG-AACTCAGATC-3'である。

PCR増幅には, プログラムサーマルサイクラー (PTC-100, MJ Research) を用い, 94°Cで1分, 48°Cで1分, 70°Cで2分の処理を1サイクルとし, 35回繰り返した後, 70°Cに5分間保つことにより実施した。

4種の塩基配列の決定には, チャマダラメイガ (Strain 1), スジコナマダラメイガ (Strain 1), スジマダラメイガ (Strain 1), およびノシメマダラメイガ (Strain 1) 各成虫1個体の脚の一部から調製した鋳型DNAを増幅したPCR産物を用いた。

決定された4種の塩基配列をもとに各種制限酵素の認識部位からバンドパターンを推定した。ただし, 種を識別するための制限酵素の選定基準は, 実際の電気泳動において種間差が明瞭に確認できるバンドパターンを示すものとした。

ところで, PCR-RFLP法を用いた種の識別では, 发育ステージや雌雄の違いがRFLPパターンに影響を及ぼさない方が操作性が高いと考えられる。そこで, ノシメマダラメイガ (Strain 1) の卵および1齢幼虫の全体, 老熟幼虫および蛹の尾端のみ, および雌雄成虫の脚の一部を用いて, 前述と同様の方法により发育ステージおよび雌雄の違いとRFLPパターンの差違について調べた。

Table 1 Strains and sources of four species in Phycitinae used in this study

Species	Strain No.	Source
<i>Ephestia elutella</i>	1	Fuji Flavor Co., Ltd.
<i>E. kuehniella</i>	1	Fuji Flavor Co., Ltd.
	2	National Food Research Institute
<i>E. cautella</i>	1	Fuji Flavor Co., Ltd.
<i>Plodia interpunctella</i>	1	Fuji Flavor Co., Ltd.
	2	National Food Research Institute
	3	Japan Environmental Sanitation Center

食品やその原材料に混入したマダラメイガ類は、それらの加工工程で加熱や乾燥される。そのため、熱処理や乾燥状態がPCR増幅に与える影響についても明らかにする必要がある。そこで、ノシメマダラメイガ (Strain 1) を供試し、虫体の高温処理や長期乾燥保存がPCR増幅に与える影響を調査した。水を入れた遠心チューブに10個体の1齢幼虫を生きたまま入れ、このチューブを沸騰水中に30分、60分、および90分間の一定時間浸漬処理、あるいは121°C、20分間のオートクレーブ処理をした。それぞれの浸漬処理後、チューブを回収し、ただちに水中で冷やした。その後、1個体ごとに鋳型DNAの調製をし、PCR増幅した。あわせて死亡した成虫を1か月間、室温に静置した後にその前脚の一部を採取し、同様の試験を行った。なお、目的とする遺伝子領域が増幅したPCR産物の長さは、約560bpを示すので、得られたPCR産物がアガロースゲル電気泳動法において約560bpを示したとき、PCR増幅が正常に行われ、このPCR産物のRFLPパターンにも影響を与えていないと判定した。

結 果

Fig. 1 に示したように *D. yakuba* の塩基配列に基づくプライマーを用いたPCRによってチャマダラメイガ、スジコナマダラメイガ、スジマダラメイガ、およびノシメマダラメイガから調製したDNAから16S rRNA遺伝子一部領域を増幅することが可能であった。各個体のPCR産物はアガロースゲル電気泳動において約560bpのほぼ同一サイズの1本のDNAバンドを示した。

チャマダラメイガ、スジコナマダラメイガ、スジマダラメイガ、およびノシメマダラメイガの増幅されたPCR産物の長さは、それぞれ556bp、559bp、555bpおよび557bpであった。PCR産物のプライマー部分を除く領域の塩基配列をFig. 2に示した。16S rRNA遺伝子一部領域におけるチャマダラメイガに対するスジマダラメイガ、スジコナマダラメイガ、およびノシメマダラメイガの塩基



Fig. 1 PCR product patterns of 16S rRNA gene from seven strains of the four species in Phycitinae on a 1.5% MetaPhor agarose gel. Species: elu, *E. elutella*; ku, *E. kuehniella*; ca, *E. cautella*; int, *P. interpunctella*. Numbers correspond to Strain No. in Table 1. The size marker on both edge lanes is BioMarker (BioVentures, Inc.).

配列の相同性は、それぞれ95.2%、93.1%、および91.7%であった。チャマダラメイガとスジマダラメイガの塩基配列の相同性が最も高かった。

本研究により得られた4種のマダラメイガ類の塩基配列をもとに各種の制限酵素の認識部位を推定した (Table 2)。さらに、4種7系統のPCR産物を *Vsp* I, *Dra* I, または *Xba* I で処理したときのRFLPパターンをFig. 3に示した。 *Vsp* I, *Dra* I, または *Xba* I のいずれの処理においてもバンドパターンは、塩基配列から推定した種特異的なRFLPパターンと一致していた。さらに、チャマダラメイガおよびノシメマダラメイガで各系統間のRFLPパターンを比較した結果、系統間に差異はなく、RFLPパターンは種特異的であることが明らかとなった。PCR産物の *Vsp* I 処理では、チャマダラメイガで268bp、173bpおよび105bpの明確な3本のバンド、スジコナマダラメイガで268bp、174bpおよび117bpの3本のバンド、スジマダラメイガで287bpおよび268bpの2本のバンド、ノシメマダラメイガで387bpおよび170bpの2

```

1
elu : GTCTTTTGA AGATAATTA AAGTCGAATC TGCCCACTGA T-AATAATTA AAGGGCTGCA
kue : ..T.....G G..........A..... .G.A.....
cau : .....-T............... .G.-.....
int : .....A.AG...........G..... -..T.....

61
GTATTTTGAC TGTACAAAGG TAGCATAATC ATTAGTCTCT TAATTGGTGA CTTGTATGAA
.....T.....A.....
.....A.....

121
TGATTTGATG AGATATAAGC TGCTCTAGA TTATAATAA AAATTAATTT TTTAATTAATA
.....A.....TT..........G.....T.....
.....A.....A.....T.....T.....
.....A.....A..........A.....T.....

181
AAGTTAAAAT AATTTTAAAA GACGAGAAGA CCCTATAGAG TTTTATAA-A TTAAATAATT
.....A..........A.....-.....
.....-.....G...GG..
.....A..........GT ..T...T...

241
AAAGTAATAT ATTTAAAGAA --AAATTGAA ATTAATTTAA TTTATTTTGT TGGGGTGATA
...A.G..T. ....TT... TTTT...A.G...............
...A..........--.AT...A...............
G..A.T... ..--.T... AAT.....G ....-T.AA......A.....G....

301
GAAAAATAAA AAAAACTTTT TT-TAAAATT ATTTACATAA ATAATTGAAT AAATGATCCA
.....T.......-.....-A...A.....T.T.....
.....G.......-.....AGAAA.....G.....A.....
A.....T......A.....AA.AAA.....T.....

361
GAATTTTGA TTATAAGAAA AAATTACCTT AGGGATAACA GCGTAA-TTT TTTTTTTTAG
A.....T.....
A..A.....
A.TA.....T.....

421
TTCAAATAAG AAAAAAAGTT TGCACCTCG ATGTTGGATT AAGATAAAAT TTAAATGCAA
C.....A.....
.....G.....

481
AAGTTTAAAA TTTTGATCTG TTCGATCATT AAAATCTTAC AT
.....
.....
.....

```

Fig. 2 Partial nucleotide sequences of 16S rRNA gene of *E. elutella* (elu), *E. kuehniella* (kue), *E. cautella* (cau), and *P. interpunctella* (int). Dots (•) indicate nucleotide identity with *E. elutella*. Dashes (–) are introduced to maintain optimal alignment. Wave underlines indicate recognition sites of *Vsp* I. Single and double underlines indicate recognition sites of *Dra* I and *Xba* I, respectively.

Table 2 Estimation of restriction fragment sizes (bp) of PCR products of 16S rRNA gene from the four species in Phycitinae

Endonuclease	Restriction fragment size (bp)			
	<i>E. elutella</i>	<i>E. kuehniella</i>	<i>E. cautella</i>	<i>P. interpunctella</i>
<i>Vsp</i> I	268, 173, 105 10	268, 174, 117	287, 268	387, 170
<i>Dra</i> I	176, 147, 67	177, 147, 126	176, 147, 67	195, 176, 77
	57, 56, 39, 14	56, 39, 14	57, 56, 38, 14	56, 39, 14
<i>Xba</i> I	392, 164	no digestion	no digestion	no digestion

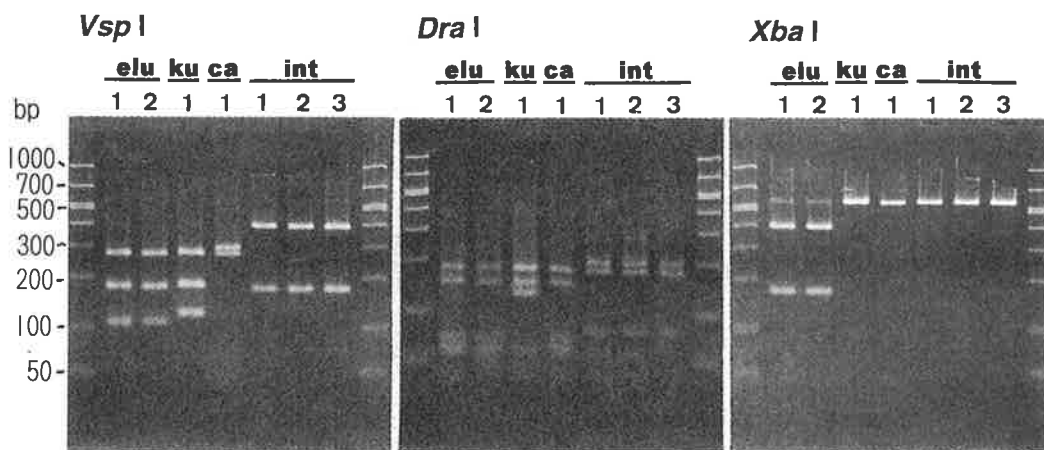


Fig. 3 Restriction fragment patterns of PCR-amplified 16S rRNA gene from seven strains of the four species in Phycitinae on a 2.0% MetaPhor agarose gel. Species: *elu*, *E. elutella*; *ku*, *E. kuehniella*; *ca*, *E. cautella*; *int*, *P. interpunctella*. Numbers correspond to Strain No. in Table 1. The size marker on both edge lanes is BioMarker (BioVentures, Inc.).

本のバンドが得られた。これらの結果は、*Vsp* I 処理によるRFLPのバンドパターンに明瞭な種間差があり、単独でも種の識別が可能であることを示している。PCR産物の*Dra* I処理では、スジコナマダラメイガは177bp, 147bp, および126bpの明確な3本のバンドを、ノシメマダラメイガで195bp, 176bp, および77bpの明確な3本のバンドとそれぞれ種特異的なバンドパターンを示した。一方、チャマダラメイガとスジマダラメイガは、176bp, および147bpの明確な2本の同一サイズのバンドパターンを示したため、これら2種の識別は不可能であった。*Xba* I処理では、この制限酵

素の認識部位がチャマダラメイガのPCR産物の塩基配列でのみあり、392bpおよび164bpの2本のバンドパターンを示した。これらの結果から*Dra* I処理のバンドパターンで識別できなかったチャマダラメイガとスジマダラメイガの識別は*Xba* I処理のバンドパターンの相違から可能となり、*Xba* Iと*Dra* I処理の2つのバンドパターンを組み合わせれば4種の識別が可能であることが示された。

ノシメマダラメイガの卵, 1齢幼虫, 老熟幼虫, 蛹, および雌雄成虫では、発育ステージおよび雌雄に関係なく、PCR法によって同一サイズの

PCR産物が増幅された。これらの結果からPCR産物は、*Vsp* I, *Dra* I, および*Xba* Iで処理したときも発育ステージおよび雌雄に影響されないことが示された (Fig. 4)。

ノシメマダラメイガの1齢幼虫の10個体を沸騰水中に30分, 60分, 90分間浸漬した場合, すべての供試虫の鋳型DNAから約560bpのPCR産物が得られた。さらに, 1齢幼虫10個体の供試虫を20分間オートクレーブ処理した場合, 調製した鋳型DNAから約560bpのPCR産物が得られたのは4個体であったが, アガロースゲル電気泳動後のこれらのバンドは, いずれもかなり薄かった。また, 本成虫を1か月間室温に静置した場合もすべての成虫で鋳型DNAから約560bpのPCR産物が得られた。

考 察

マダラメイガ4種においてmt DNAの16S rRNA遺伝子一部領域の塩基配列が明らかになった。そのため, この遺伝子領域をPCR増幅後, 塩基配列を決定し, 既知の塩基配列と比較した相同性の高さからでも種の識別が可能である。この塩基

配列の相同性から種を同定する方法は, 同定しようとしている昆虫を広い分類範囲にわたる多くの昆虫種から種を特定しようとする場合に有用である。PCR-RFLP法は, 同定しようとする昆虫の決定された塩基配列から種特異的なRFLPパターンを示す制限酵素が明らかになれば, この制限酵素でPCR産物を処理したRFLPパターンから種の識別が可能となり, 同定作業のたびに塩基配列を調べる必要がなくなる。そのため, PCR増幅後, 塩基配列を決定するまでに面倒な多くの操作や高価な試薬やDNAシーケンサーなどが必要でなく, 簡便な作業で多くの供試サンプルの解析が可能である。本研究では, 決定されたPCR産物の塩基配列に基づいてPCR産物を*Vsp* I処理したRFLPパターンでマダラメイガ類4種の識別が容易であることを明らかにした。その結果, PCR増幅後に比較的簡便な制限酵素処理および電気泳動で多くのマダラメイガ類の供試サンプルを同時に解析可能となった。

大類ら(2000)は, オオタバコガとタバコガでは同一種内であってもRFLPパターンが通常タイプとは異なる2タイプが低い頻度で検出されて

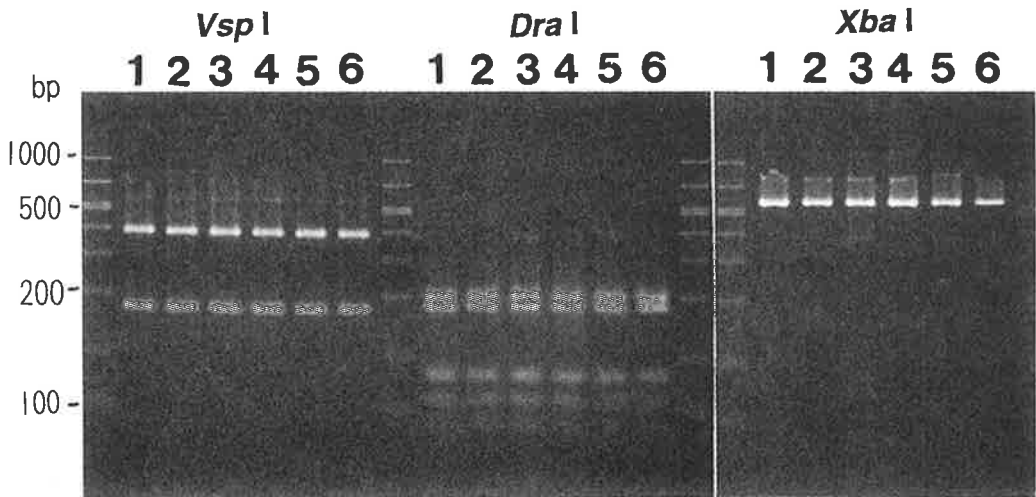


Fig. 4 *Vsp* I-, *Dra* I-, and *Xba* I-digested patterns of PCR-amplified 16S rRNA gene from a single individual in different developmental stages of *P. interpunctella* on a 2.0% MetaPhor agarose gel. Developmental stages: 1, egg; 2, first instar larva; 3, mature larva; 4, pupa; 5, adult male; 6, adult female. The size marker on both edge lanes is BioMarker (BioVentures, Inc.).

いることを示した。このことは、RFLPパターンを種の識別の基準として利用する場合、種内変異について考慮する必要があることを示している。したがって、本研究に用いた4種のマダラメイガ類についても V_{sp} I処理によるRFLPパターンの種内変異を考慮する必要がある。ところで、本研究で明らかにしたように複数のRFLPパターンを用いて種を識別することが可能であるが、この結果は種内変異を考慮すれば、1つのRFLPパターンで種を判定する場合に比べ、複数のRFLPパターンを用いることにより、種の誤判定の危険性は低くなることを示唆している。

チャマダラメイガとスジマダラメイガは近縁種で成虫の形態が酷似しており、両種の厳密な識別は、生殖器によるほかはないとされる(吉田ら, 1989)。このことは両種の塩基配列の相同性が、他の2種よりも高いことから裏づけられる。本研究から明らかになったようにPCR-RFLP法を用いれば近縁種でも識別できる。そのため、この研究で供試しなかった他のマダラメイガ類についても、mt DNAの16S rRNA遺伝子における一部領域を対象にしたPCR-RFLP法を簡易な同定法として広く活用できると考えられる。

昆虫が異物混入として発見された場合、昆虫の種名が明らかになれば、その昆虫の生態・習性・分布などの情報を集め、その昆虫の混入原因や侵入経路などを分析でき、対策を立てやすくなる。廣瀬ら(1994)によれば1969-1992年までの23年間に横浜市衛生研究所で検定された食品に混入した昆虫で最も多かったのが鱗翅目で全体の33.7%を占めた。そのうち、メイガ科昆虫が92.1%を占め、中でもノシメマダラメイガがその79.6%を占めた。このように食品への昆虫混入問題においてメイガ類の種同定の頻度が極めて高い。その一方で食品に混入した昆虫の形態は不完全であったり、形態からでは識別が難しい幼虫および蛹などで発見されることが多い。そのため発育ステージに関係なく虫体の一部からでも種が正確に同定できる方法が求められている。また、この研究所で

1988-1992の5年間に検査した昆虫のうち、食品工場では製造段階に混入した個体が最も多く、次いで材料段階であった(廣瀬ら, 1994)。一般に食品製造工程では、原料の加工や殺菌のために高熱処理や乾燥が行われ、このような段階で混入した昆虫は高温、乾燥条件下にさらされる。しかし、本研究で示したように虫体を高温、乾燥処理してもPCR増幅ができたことから、食品製造工程で混入したマダラメイガ類でもPCR-RFLP法による識別が可能であることを示唆している。

供試した日本国内のノシメマダラメイガ3系統、およびチャマダラメイガ2系統では、系統間のRFLPパターンに種内変異が認められなかった。しかし、ノシメマダラメイガをはじめとしたマダラメイガ類は、輸入穀類の検疫でもよく発見される(安富・梅谷, 1995)。世界各地の貯蔵害虫の系統間で被害の大小に関連する増殖や食性等の形質は大きく異なっており、これらの形質の種内変異の幅は、近縁種間の差に相当するほど大きいと吉田(1980)により指摘されている。これらのことから、世界各地のマダラメイガ類の系統間にRFLPパターンの種内変異がある可能性がある。今後は、海外に生息するマダラメイガ類も含めた多くの種および系統を供試して、それぞれの種のRFLPパターンおよびその種内変異を調査し、これらの情報を蓄積することによってPCR-RFLP法による同定法の精度をさらに高める必要がある。また、本研究では、虫体の高熱および乾燥処理条件とPCR増幅との関係を示したが、実際に食品の異物混入として持ち込まれるマダラメイガ類の試料は、虫体を処理した条件や虫体の状態が、さらにさまざまであることが予想される。今後は、実際に持ち込まれるさまざまな条件下にあるマダラメイガ類の試料に対して本法を適用し、種の同定技術としての有用性を確認してゆく必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、材料を提供していただ

いた富士フレーバー(株)の鈴木郁男氏, 食品総合研究所 宗田奈保子氏, および日本環境衛生センターの方々に感謝する。また, 実験にあたってご協力を頂いた大内裕美氏に厚くお礼申し上げる。

引用文献

- 廣瀬恵子・金山彰宏・小林伸好・鳥羽和憲・杉田和子 (1994) 横浜市における食品の混入異物—特に昆虫類を中心に—。日本ペストロロジー学会誌 9 : 76-79.
- 小泉成徳・菊川 一・下地朝秀 (1985) 九州産地における貯蔵たばこ害虫の発生と生態。鹿児島たばこ試報 26 : 75-86.
- Muraji, M., K. Kawasaki and T. Shimizu (2000) Phylogenetic utility of nucleotide sequences of mitochondrial 16S ribosomal RNA and cytochrome b genes in anthocorid bugs (Heteroptera: Anthocoridae). *Appl. Entomol. Zool.* 35 : 293-300.
- 人類幸夫・松沢春雄・小池芳昭・吉松慎一 (2000) オオタバコガ (*Helicoverpa armigera* (Hübner)) とタバコガ (*H. assulta* (Guenée)) のPCR-RFLP法による識別および日本のタバコ圃場におけるオオタバコガの発生調査への応用。応動昆 44 : 73-79.
- Roehrdanz, R. L. (1994) Simple method for monitoring dispersal of *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) backcross sterility genes. *J. Econ. Entomol.* 87 : 676-679.
- Tuda, M., T. Fukatsu and M. Shimada (1995) Species differentiation of bruchid beetles (Coleoptera: Bruchidae) analyzed by mitochondrial DNA polymorphism. *Appl. Entomol. Zool.* 30 : 377-380.
- Xiong, B. and T. D. Kocher (1991) Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morpho-species of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome* 34 : 306-311.
- 安富和男・梅谷猷二 (1995) 原色図鑑/改訂・衛生害虫と衣食住の害虫。全国農村教育協会, 東京。
- 吉田敏治 (1980) 植物検疫と害虫の種内変異—貯蔵害虫の系統について—。植物防疫 34 : 35-41.
- 吉田敏治・渡辺 直・尊田望之 (1989) 図説貯蔵食品の害虫—実用的識別法から防除法まで—。全国農村教育協会, 東京。

富士山北麓青木ヶ原樹海周辺におけるチョウ類群集 の多様性と植生種数の関係

北原正彦・渡辺 牧

山梨県環境科学研究所

(受領 : 2001年2月6日 ; 受理 : 2001年5月31日)

Relationships of Butterfly Community Diversity to Vegetational Species Richness in and around the Aokigahara Woodland at the Northern Foot of Mt. Fuji, Central Japan. Masahiko Kitahara and Maki Watanabe (Yamanashi Institute of Environmental Sciences, Kenmarubi, Fujiyoshida, Yamanashi 403-0005, Japan). *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.* **12** : 131-145 (2001)

To examine the relationships of community diversity of butterflies with vegetational species richness, we monitored and analyzed six butterfly communities in three types of habitats (forest interior, forest edge, the outside forest) in and around Aokigahara woodland at the northern foot of Mt. Fuji, central Japan, using transect counts, once or twice a month during the adult flight season (from April to November), in 1999. The total species richness and species diversity at each study site were closely and positively correlated with its number of species of plants (Phanerogamae). In addition, they were more closely correlated with the number of species of larval potential hostplants at each site. These suggest that vegetational species richness in a habitat greatly affects butterfly species richness and diversity, and in particular, the richness of diet resources available is the important determinant of butterfly community diversity. Furthermore, the total species richness and species diversity at each study site were more closely and positively correlated with its number of species of herbaceous plants than that of woody plants. Thus, at least in this area, the maintenance of herbaceous plant species richness is thought to be important for the maintenance of butterfly diversity. As suggested in past butterfly community studies, also in this area, there were butterfly diversity hotspots at the forest edge sites of the Aokigahara woodland, and 7 red-listed butterfly species were found mainly in the forest edge area. Thus, it is suggested that the conservation of forest edge areas is very important for the maintenance of butterfly diversity.

Key words : Butterfly community, Butterfly diversity, Diversity hotspots, Plant species richness, Vegetation, Woodland.

チョウ類群集の多様性と生息環境の植生種数の関係をみるために、富士山北西麓青木ヶ原樹海周辺の全6地区（同樹海林内地区（2カ所）、同樹海林縁地区（2カ所）、同樹海林外オープンランド地区（2カ所））で、1999年の成虫出現期にトランセクト・カウント法を用いて、チョウ類成虫の個体数モニタリング調査を実施し、得られた群集データと生息環境の植生種数との関係を解析した。チョウ類群集の種数や種多様性は、生息環境の種子植物の種数と密接な正の相関関係を持っており、またそれらはそこに見られた幼虫ホストの種数とより密接な相関関係が見られた。これらより、チョウ群集の種数や種多様性には、生息環境の植生多様性が大きく関与しており、とりわけチョウの利用できる餌資源の豊富さは、群集の多様性決定の重要要因であることが示唆された。一方、このチョウ類群集の種数や種多様性は、生息環境の木本よりも草本植物の種数と密接に関係しており、この点で、青木ヶ原樹海周辺では、草本植生環境の種数の維持がチョウ類群集の多様性維持のために極めて重要であると考えられた。既存の研究から示唆されたように、青木ヶ原周辺においても、チョウの種数や種多様性のホットスポットは、樹海の林縁部に見られ、さらに環境省（2000）の昆虫類レッドリスト登録の7種は、全て林縁部を中心に生息しており、この点で、チョウ類群集の多様性維持における林縁部保全の重要性を強調したい。

緒 言

国内外を問わず、近年、トランセクト法を使用したチョウ類群集のモニタリング調査が盛んに行われるようになった（Pollard, 1977；山本, 1988, 1998；石井, 1993；Pollard and Yates, 1993；矢田, 1996b；吉田, 2000）。これらの研究の多くは、通常、集積されたデータを基にしてチョウ類群集構造の解析を行っているが、そのほとんどは生息環境のタイプとそこに成立していたチョウ類群集の構造の関係を分析したものが多く、

このような、生息環境とそこに見られるチョウ類群集の関係の解明は、群集構造解析の中心テーマの一つであるが、従来は、景観構造や植物群落型の違いで生息環境をタイプ別けして、その各々に見られたチョウ類群集の構造の違いを解析した研究が主であった（例えば、森下, 1967；田中, 1988；山本, 1988, 1996；石井ら, 1991；桜谷・藤山, 1991；Kitahara and Fujii, 1994；今井, 1995；今井・夏原, 1996；石井, 1996；矢田, 1996a；服部ら, 1997；本田, 1997；田下・市村,

1997；吉田, 1997；夏原ら, 1998；関谷, 1998；北原, 1999；Kitahara *et al.*, 2000）。これらの場合、生息場所の植生環境の記載は定性的なことが多く、生物環境要因である植生種数を定量的に把握し、それと鱗翅類群集構造の関係を解析した研究は、国外には幾つか知られているが（Feber *et al.*, 1996；Steffan-Dewenter and Tschardtke, 1997；Usher and Keiller, 1998）、国内には見当たらない。チョウ類は一般に、幼虫期の食餌植物や成虫期の蜜源植物など、一生を通じてその餌資源を植物に依存しており、そのために生息環境の植生の多様性が、チョウ類の群集構造に大きな影響を及ぼしていることが予測される。

一方、種数が多く種多様度の高い群集がどのような環境に見られるのかということも、群集研究の最大の関心事の一つである。我が国の今までのチョウ類群集の調査では、農村近郊の里山の二次林周辺や景観構造で言うと森林とオープンランドが接する林縁の部分で、チョウの種数や種多様度が多くなったり、高まったりすることが知られている（木元・武田, 1989；石井ら, 1993, 1995；

石井, 1996; 矢田, 1996a; 田下・市村, 1997; 関谷, 1998). しかし, これについても, その要因については, そのような場所に幼虫の食餌植物や成虫の蜜源植物が質, 量ともに豊富に存在することが推測され, 指摘されているが(石井ら, 1995), 実際にこのことを定量的に解明した研究は, まだ知られていない.

本論文では, 調査地域の生物環境要因の一つである植生種数を定量的に捉え, これとチョウ類群集構造の関係について解析を試みる. また, 複数の調査地の中に森林の林縁部も含め, 実際に種数や種多様度が大きいのか, また, もしそうであるならば, それがその植生環境要因と関連性を持っているかどうかを定量的に解析する. さらに, 本研究より得られた結果を基にして, 地域チョウ類群集の保全について考察を試みる.

調査地および調査方法

1. 調査地の概要

調査は, 富士山の北西部山麓にあたる青木ヶ原樹海内とその周辺に位置する6調査地区(ルート)で実施した. これらの6地区は, それぞれ景観の明白に異なる樹海林内2地区(FI-1, FI-2), 樹海林縁2地区(FE-1, FE-2), 樹海林外オープンランド2地区(OL-1, OL-2)であり, 標高や地形などの物理的環境条件の違いがもたらすチョウ類群集への影響をなるべく減らすために, 共に標高約1000mの東西2.4km南北0.63kmの範囲内に設置された.

各調査地区(ルート)の概要についてはTable 1に示した. 結果で述べるべき内容(植生調査や照度測定(共に後述)の結果)についても, 便宜上Table 1に示してある. FI-1, FI-2は, 青木ヶ原樹海の中を通過している東海自然歩道に沿って設定した. ルートの長さは共に300mで, 樹林内の林床部にあたる. 青木ヶ原樹海は, 西暦864年に噴火した富士山北西部中腹の長尾山からの溶岩流の上に形成された原生林であると言われており, これまでの調査で高木の平均樹齢が約150年, 記

録された最高樹齢は優占種ツガ *Tsuga sieboldii* の356年, 同じくヒノキ *Chamaecyparis obtusa* の240年などがある(清藤, 1991). 樹海全体にヒノキ, ツガなどの常緑針葉樹が優占しているが(宮脇ら, 1971), FI-1とFI-2を比較した時に, FI-1の方がルート沿いにミズナラ *Quercus mongolica* var. *crispula*, コシアブラ *Acanthopanax sciadophylloides* などの落葉広葉樹が多く, 光環境が明るい. しかし, 林床部の草本類はFI-1にはほとんど見られず, FI-2の林縁に近い部分で僅かに確認されただけであった(Table 1).

FE-1とFE-2は共に青木ヶ原樹海東縁にあたる林とオープンランドの接する林縁の部分に設定された. ルートの長さは共に300mであり, 大部分が林のオープンランド側の縁の部分に沿って設定された. 従って, ルートの大部分は, 片側の景観要素が森林, もう一方の側が二次草原, 幼齢植林地, 耕作地, 休耕地などの景観であった. ルートの一部については, 両側景観要素が森林もしくは二次草原の部分も存在した. FE-1とFE-2共に, 景観要素や植生の大きな違いは存在しなかったが, 木本, 草本併せた種子植物 *Phanerogamae* の種数は, FE-2の方が30種ほど多かった(Table 1). オープンランドに見られた景観要素の多くでは人間の土地利用が見られ, 草刈り, 農薬散布, 施肥, 耕作, 整地などの人的行為が確認できた.

OL-1とOL-2は, 樹海の東側に開けたオープンランド内に設定された. 調査ルートは, 両者共に長さ300mであり, OL-1はリゾート施設に附設された陸上のトラックを有する運動場に沿って, OL-2は耕作地地域を通る農道に沿って設定され, 両者共に高木は認められなかった(Table 1). OL-1は管理の行き届いた芝生や競技用トラック, 園芸低木の植栽された植え込みなどが見られた. OL-2を設定した農道は未舗装で, 耕作地の多くはキャベツが栽培され, その他ジャガイモ, イチゴ, 生け花用のワレモコウ *Sanguisorba officinalis* などが栽培されていた. 両地区共にほとんどの部分が強い人的行為の影響を受けており, 草刈, 農

Table 1 Characteristics of six study sites

Study site	Altitude (open land)	Landscape and landscape element (open land)	Main plant (Phanerogumae) species		No. plant (Phanerogumae) species		Annual mean light intensity (lux)				
			Trees	Small trees and shrubs	Herb	Type		Total	Larval host		
FT-1	1030m	Woodland	<p>Quercus mongolica var. crispula Clethra barbinervis Acanthopanax scindaphnifoloides Acer sieboldianum Pinus densiflora Chamaecyparis obtusa</p>	<p>Ilex pedunculata Acer micranthum Sorbus americana ssp. japonica Rhus trichocarpa Erikanthus campanulatus Rhododendron dilatatum Stemodia japonica f. repens</p>	<p>ソヨゴ コミネカエデ ナナカマド ヤマウルシ ササキトリダン ミツバツツク ツルシキミ</p>	<p>Polygonum cuspidatum Maianthemum dilatatum</p>	<p>イタドリ マイヅルソウ</p>	<p>Trees 20 Shrubs 13 Perennials 2 Annuals 0 Others 2</p>	37	9	12011
FT-2	1020m	Woodland	<p>Tsuga sieboldii Chamaecyparis obtusa Clethra barbinervis Acer distylum Cornus controversa Quercus mongolica var. crispula Quercus serrata</p>	<p>Ilex pedunculata Gallicaea japonica Pinus inabata Lindera obtusiloba Euonymus macropterus Skimmia japonica f. repens</p>	<p>ツバキ ヒノキ リノウア ヒトツバクサエデ ミズキ ミズナラ コナラ</p>	<p>Oplismenus wadaiifolius Plantago asiatica Arenaria princeps Maianthemum dilatatum Erigeron annuus Corydalis incisa</p>	<p>チヂミソウ オオバコ ヨモギ マイヅルソウ ヒメジョオン ムラサキケマン</p>	<p>Trees 22 Shrubs 17 Perennials 17 Annuals 3 Others 5</p>	64	22	1799
FE-1	1025m	Woodland	<p>Quercus mongolica var. crispula Quercus serrata Castanea crenata Pinus densiflora Larix kaempferi Alnus hirsuta Magnolia obtusa Alnus firma</p>	<p>Prunus incisa Lonicera japonica Malus torii Rosa multiflora Deutzia crenata Hydrangea paniculata</p>	<p>ミズナラ コナラ クナギ アケマツ カサマツ ナカマツノキ モミノキ</p>	<p>Miscanthus sinensis Boehmeria triculis ssp. paraspicata Cirsium niponicum var. incomptum Lysimachia clethroides Agrimonia pilosa Sanguisorba officinalis Vicia cracca Pilea nipponica Pilea hirsutoides ssp. japonica Erigeron annuus</p>	<p>ススキ クサコノハコ タイサシ オカトラノオ キニミズキ ウレモコウ カンナツハキ コナリハ ヒメジョオン</p>	<p>Trees 16 Shrubs 15 Perennials 48 Annuals 18 Others 9</p>	106	37	97840
FE-2	1010m	Woodland	<p>Quercus serrata Pinus densiflora Larix kaempferi Alnus hirsuta Acer capillipes Zelkova serrata Pinus maximowiczii Clethra barbinervis</p>	<p>Acer crataegifolium Lindera obtusiloba Erikanthus campanulatus Rhododendron dilatatum Euonymus macropterus Spirea japonica Ligustrum obtusifolium</p>	<p>ウリカエデ ダンコウバイ ササキトリダン ミツバツツク ヒメジョオン シモツク イボトノキ</p>	<p>Miscanthus sinensis Oplismenus wadaiifolius Campanula punctata Cirsium niponicum var. incomptum Kallieria pinnatifida Lysimachia clethroides Polygonum cuspidatum Trifolium repens Asilabe microphylla Pilea hirsutoides ssp. japonica</p>	<p>ススキ チヂミソウ オカトラノオ タイサシ ユウゴサキ イタドリ シロツメクサ サダナツメ コウノリナ</p>	<p>Trees 31 Shrubs 20 Perennials 55 Annuals 20 Others 10</p>	136	47	99975
OL-1	990m	Open land abandoned arable land sparse forest	<p>Quercus serrata Pinus densiflora Larix kaempferi Alnus hirsuta Zelkova serrata Pinus maximowiczii Clethra barbinervis</p>	<p>Morus australis Pinus densiflora Cornus controversa Salix bebbii Pieris japonica Celastrus orbiculatus Rosa multiflora</p>	<p>ヤマブキ アケマツ ミズキ ハッコギナギ アケマツ ツルシキモミキ イボトノキ</p>	<p>Oxalis corniculata Ternstroemia lyonioides Geranium thumbergii Vicia cracca Trifolium repens Ceratium fontanum ssp. japonica Poa annua Ambrosia artemisiifolia var. elatior Kummerowia striata</p>	<p>カタバミ セイヨウタンポポ オウゴンソウ クサノソウ シロツメクサ ミミナツクサ スズメノカタビラ アザケ キハスソウ</p>	<p>Trees 0 Shrubs 1 Perennials 23 Annuals 27 Others 1</p>	52	21	108380
OL-2	1025m	Openland farmland consisting of cabbage, potato, and strawberry plots	<p>Morus australis Pinus densiflora Cornus controversa Salix bebbii Pieris japonica Celastrus orbiculatus Rosa multiflora</p>	<p>Morus indica Miscanthus sinensis Plantago asiatica Oxalis corniculata Tanacetum officinale Rumex crispus ssp. japonicus Agrimonia pilosa Clerodendron japonica Trifolium repens Pilea hirsutoides ssp. japonica Hemerocallis fulva var. Kwazoo</p>	<p>ヤマブキ アケマツ ミズキ ハッコギナギ アケマツ ツルシキモミキ イボトノキ</p>	<p>Rorippa indica Miscanthus sinensis Plantago asiatica Oxalis corniculata Tanacetum officinale Rumex crispus ssp. japonicus Agrimonia pilosa Clerodendron japonica Trifolium repens Pilea hirsutoides ssp. japonica Hemerocallis fulva var. Kwazoo</p>	<p>イボトノキ ススキ カタバミ オカトラノオ セイヨウタンポポ オウゴンソウ シロツメクサ ミミナツクサ スズメノカタビラ アザケ キハスソウ</p>	<p>Trees 6 Shrubs 9 Perennials 24 Annuals 18 Others 3</p>	60	28	100500

葉散布、施肥、耕作、整地、踏み込みといった様々なタイプの人為攪乱が見られた。

2. 調査方法

調査はチョウ類の成虫の主要出現期にあたる1999年の4月から11月まで、各地区月2回（4、10、11月は月1回）、トランセクト・カウント法（Pollard, 1977；山本, 1988, 1998；石井, 1993；Pollard and Yates, 1993）を用いて行い、出現したチョウ類全種の成虫を対象とする個体数モニタリングを実施した。調査日には原則として晴天・微風の日が選択され、10：00～15：00の間に調査ルート歩きながら、ルートの片側約5m（両側約10m幅）（場所によっては片側のみ約10m）に出現した全てのチョウ類成虫の種類と個体数を確認し記録した。後方から飛来した個体は記録に入れない等、できる限り重複カウントを防ぐための努力をした。

主として目視による種名確認を行ったが、目視で同定困難な個体については、その場で捕虫網で捕獲し、種名確認後にすぐにその地点に放逐した。ただし、スジグロシロチョウとエゾスジグロシロチョウについては、その場で即座に同定することが困難であったので、この調査では両種を1種として扱った。また、一部の個体については、遠くを飛翔していたりして捕獲できずに、種の確認ができなかったが、それらは不明のまま記録した（例、黒色系アゲハ類、大型ヒョウモンチョウ類など）。

調査時の物理的環境条件として、天候、照度を記録した。照度については各調査日、各地区ごとに記録した。各調査ルートの中で、その地区を最も代表する景観の部分を選択し（林内地区：両側が森林景観の地点、林縁地区：片側森林、片側オープンランドの地点、林外地区：両側オープンランドの地点）、そこに各地区1地点の固定の照度測定ポイントを設定した。照度測定には、TOPCONのIM-5 デジタル照度計を用いて、地上約1mの高さで調査時に測定した。

各地区の植生調査は、調査期間中に2回（1999

年6月12日および8月27日）実施した。調査にはベルト・トランセクト法を用いて、調査ルートに沿って約10m幅の中に見られた種子植物の種類をできる限り確認し記録した。

3. データの解析

調査時に種まで同定できなかった若干の個体（例えば、黒色系アゲハ類、大型ヒョウモンチョウ類）については、その調査日またはその前後の調査日に確認できた、その個体が該当すると考えられる全ての種の実際の出現比率に応じて、未同定個体（spp.）の個体数を比例配分する方法を採用した。

各種の平均密度を算出するにあたっては、先ず月個体数を4月から11月まで各地区ごとに算出した。月2回の調査の個体数の平均値をそれに充てたが、1回の調査しか行わなかった月については、1回の調査の値をそのまま月個体数に充てた。次に4月から11月までの月個体数を平均して、その値を月平均個体数とした。この際、個体が確認できなかった月の値（すなわち、0値）は計算から除外した。これは種間の化数の違いによる密度への影響を最小化するための処置である。最後に、月平均個体数を0.3km（各調査ルートの長さ）で割り、各種の調査地区ごとの平均密度（成虫個体数/月/km）を算出した。

各地区間の群集の解析には、総平均密度（確認された全種の平均密度の合計値）、総種数、多様性指数を用いた。このうち、多様性指数には Shannon-Wiener の情報量関数： $H' = -\sum_{i=1}^S (n_i/N) \cdot \log_e (n_i/N)$ （ただし、 N は総平均密度、 S は総種数、 n_i は*i*番目の種の平均密度）と Simpson (1949) の多様性指数 $1-\lambda$ （ただし、 $\lambda = \sum_{i=1}^S n_i(n_i-1)/N(N-1)$ 、 n_i と N は*i*番目の種の平均密度と総平均密度）を用いた。

各地区間の日照条件の比較には、年間平均照度を用いた。この値は、各調査日に地区ごとに測定された照度（単位lux）を年間を通して平均した値である（ただし、都合により測定できなかった日が数回ある）。また植生調査の結果から、各地

区ごとに全種子植物種数, この内の木本種数, 草本種数, 高木種数, 低木種数, 多年草種数, 一年草(越年草)種数を図鑑などを利用して割り出し, 解析に使用した. 各地区のホスト(幼虫の食餌植物)の種数については, 各地区で確認できた全種子植物種のうち, 今回の調査で確認できた全チョウ種のホストに該当する植物の種数を充てた. 各チョウ種の食餌植物は, 遠藤・仁平(1990)に記載されている種全てを充て, 各チョウ種間で重複して利用されている植物種については, 各地区1種として取り扱った.

結 果

1. 地区ごとの群集指数の変化

Appendixに今回の調査で確認できた全チョウ類の種名と各種の地区ごとの平均密度およびその平均値を示した.

各群集の総種数および総平均密度は, 樹海の林縁地区で多く(もしくは高く), オープンランドの2地区で中間の値を示し, 樹海の林内地区では種数, 密度共に極めて低い値を示した(Fig. 1a). 似たような結果は群集の種多様性についても見られ, H' および $1-\lambda$ 共に林縁地区で高い値を示し, オープンランド地区がこれに続き, 林内地区は,

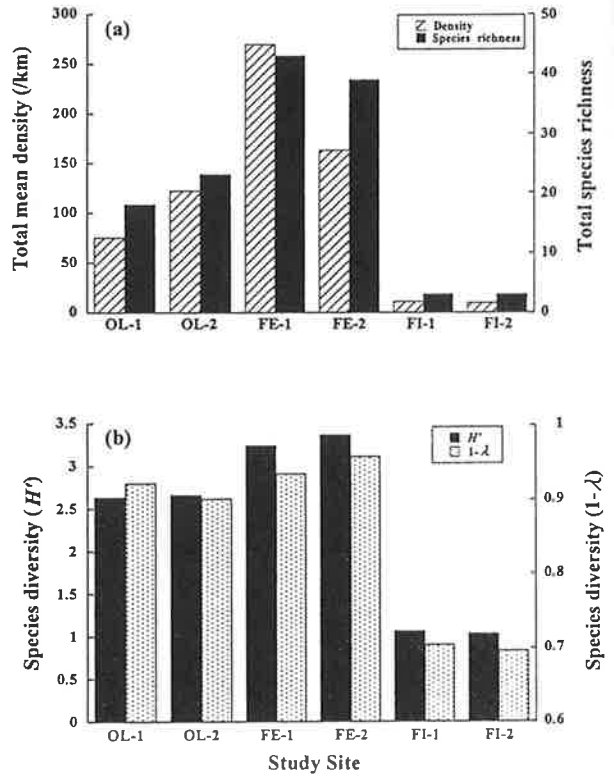


Fig. 1 The total mean density and total species richness (a), and the species diversities H' and $1-\lambda$ (b) of each butterfly community at each study site (OL-1, OL-2, FE-1, FE-2, FI-1, FI-2).

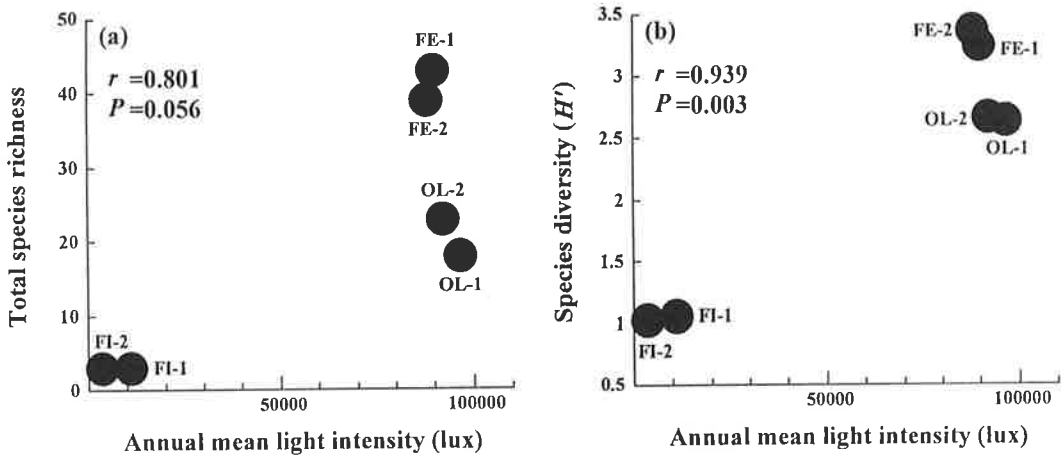


Fig. 2 Relationships of annual mean light intensity with butterfly total species richness (a), and with species diversity (H') (b).