チャバネアオカメムシ, *Plautia stali* SCOTT (Hemiptera: Pentatomidae) から分離された鞭毛虫, *Blastocrithidia* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) について¹⁾

阿 部 芳 彦

農林水産省果樹試験場

On the Flagellate, *Blastocrithidia* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Isolated from the Brown-Winged Green Bug, *Plautia stali* SCOTT (Hemiptera: Pentatomidae). Yoshihiko ABE (Fruit Tree Research Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **37**: 169–174 (1993)

The morphology, morphogenesis and vertical transmission of a flagellate isolated from the brown-winged green bug are described. The flagellate is fusiform with an ellipsoidal central nucleus. A kinetoplast is located in front of the nucleus from where a flagellum arises. The flagellum emerges from the lateral part of the anterior cytoplasm to form an undulating membrane. This characteristic structure indicates an epimastigote, which is a typical developmental stage among trypanosomatid flagellates and suggests the genus *Blastocrithidia*. Epimastigotes attach to the lumen of the host intestine and multiply by binary fission. The multiplied epimastigotes accumulate as a rosette cluster and take a stumpy form with a large nucleus and kinetoplast suggesting fusions. Thereafter, the fused epimastigotes become bacilliform with a dense nucleus and kinetoplast showing “flagellar cysts.” Numerous cysts and epimastigotes are observed in feces of infected adults. Larvae originating from egg masses of infected adults were infected with the flagellate. The main flagellate infection route is the contamination of egg masses by cysts during oviposition.

Key words: flagellate, *Blastocrithidia*, brown-winged green bug, epimastigote fusion, cyst

緒 言

トリパノゾーマ科の鞭毛虫には *Leishmania* 属や *Trypanosoma* 属のように昆虫によって哺乳動物に媒介される病原体のほかに、直翅目、半翅目、鱗翅目、双翅目、ノミ目などの多くの昆虫の主として消化管内に感染しているものが多数知られている (WALLACE, 1966)。半翅目ではミズムシ科をはじめとする水棲昆虫およびメクラカメムシをはじめとする陸棲昆虫にも感染が認められる。カメムシ科の昆虫では *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Phytomonas* などの属の鞭毛虫の感染が知られている。こちらの中で *Phytomonas* 属の鞭毛虫は植物体内で増殖しカメムシ類によって媒介されることが知られている。他の鞭毛虫については植物体内における増殖は明らかでなかったが、CONCHON et al. (1989) は *Phytomonas* 属以外のトリパノゾーマ科の鞭毛虫が果実で増殖していることを

報告しており、カメムシ類関連のトリパノゾーマ科の鞭毛虫は植物をととして伝播される可能性もある。著者はカメムシ関連天敵微生物の探索を行っているが、1992年にチャバネアオカメムシから一種の鞭毛虫を見いだした。この鞭毛虫は形態学的特徴からトリパノゾーマ科の *Blastocrithidia* 属の鞭毛虫であることが判明した。そして本鞭毛虫の無菌培養系を確立し、チャバネアオカメムシに対する感染実験および経卵伝達実験を行い、その生活環を解明したので報告する。

材 料 と 方 法

供試昆虫: チャバネアオカメムシおよびクサギカメムシを野外より採集して供試した。いずれの種も果樹試験場 (つくば市藤本) 構内のサクラ、クワ、コウゾ、キリおよびモモなどの樹種に飛来してきた成虫、ならびにこれらの樹種上で生育中の幼虫を採集して調査した。調査

1) 果樹試験場業績番号: A-301
1993 年 3 月 16 日受領 (Received 16 March 1993)
1993 年 4 月 26 日登載決定 (Accepted 26 April 1993)

は一部を採集直後に調査し、一部は数日間人工飼育したのち調査した。飼育はラッカセイおよびダイズの種子を用いて行った。

鞭毛虫の検出方法：カメムシの幼虫および成虫を一頭ずつ小型の乳鉢に入れ少量の 0.85% 食塩水を加えて磨砕し、スライドグラスにその磨砕液を滴下して位相差顕微鏡で観察した。鞭毛虫の検出されたスライドグラスはカバーグラスをはずして熱風乾燥して塗抹乾燥標本とし、メタノール固定後 20 倍のギムザ液で染色し形態観察を行った。

鞭毛虫の分離培養法：鞭毛虫の検出された磨砕液を 2,000 rpm で 10 分遠心分離を行って沈殿させ、この沈殿物を 0.85% の滅菌食塩水に再浮遊させ再度遠心沈殿させ上清を捨てた。この処理を数回行って沈殿を洗浄した後ウシ胎児血清 5%, カイコ体液 5%, ペニシリン G カリウム 500 i. u. およびストレプトマイシン 500 μ g 添加した GRACE (1962) の培地 (ヘゼルトン社製の粉末培地から調製) に沈殿を浮遊させ、遠心沈殿させ上清を捨てた。この操作を数回繰り返して培地を交換した後に抗生物質を含んだ新鮮な培地の入ったプラスチック製の平底フラスコに接種して 24 時間培養した。次に培養物全体を滅菌試験管に移し 3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、20 分静置して鞭毛虫が上清に遊出移動するのを待ってから上清を抗生物質入りの新鮮な培地に接種して 48 時間培養した。鞭毛虫の増殖を確認すると共に他の微生物による汚染のないことを確認して抗生物質を含まない新鮮な培地に接種して培養を継続した。鞭毛虫の増殖を促進する (PENG and WALLACE, 1981) ために、GRACE (1962) の *Antheraea eucalypti* 卵巣由来細胞、あるいは QUOT (1982) のカイコ卵巣由来の S.P.C. Bm 36 細胞 (いずれも GRACE の培地で継代・維持) との混合培養も行った。培養物は経時的に採取して塗抹乾燥標本を作製し、メタノール固定後ギムザ液で染色し光学顕微鏡で形態観察を行い、生活環について検討した。また DAPI による核酸染色を行って蛍光顕微鏡で観察した。

カメムシへの接種試験：培養後 10 日以上経過した材料を 2,000 rpm 10 分の遠心分離を行って沈殿物を得、これを滅菌蒸留水に再浮遊させて鞭毛虫の形成した cyst の密度が 10⁸ cyst/ml になるように調製した。この cyst 浮遊液を脱脂綿を装着した培養用フラスコのキャップに注入しカメムシの幼虫および成虫に吸水させた。またこの浮遊液をカメムシの卵表面に塗布して乾燥させ、孵化後 7~10 日後に感染の有無を調査した。鞭毛虫の検出には前述の磨砕による方法のほかに成虫では排泄物を少量

Table 1. Infection by *Blastocrithidia* sp. of wild adults of the brown-winged green bug, *Plauta stali*

Samples	No. of adults observed	% infected
Normal adults	40	7.5
Dead or paralyzed adults	22	18.2
Total	62	11.3

の 0.85% 食塩水と共にスライドグラスに塗布して位相差顕微鏡で観察し有鞭毛世代および cyst の確認によって行った。幼虫についてはスライドグラス上でピンセットを用いて押しつぶし消化管内容物を観察した。また成虫については解剖し消化管を摘出して各部位における感染の有無を調査した。

経卵伝達試験：cyst を接種した孵化幼虫の一部を成虫まで飼育し、排泄物の調査により鞭毛虫の感染の確認された成虫を組み合わせて交尾・産卵させた。この卵を孵化させ 7~10 日飼育し押しつぶし標本の観察によって鞭毛虫感染の有無を調査した。

結 果

1. 鞭毛虫に感染したカメムシの検出率

チャバネアオカメムシ成虫および幼虫、ならびにクサギカメムシ成虫について鞭毛虫感染の有無を調査したところ、チャバネアオカメムシ成虫から鞭毛虫が検出され、その検出率は 11% を上回った (Table 1)。外観上健全とみなされる個体ではその検出率は 7.5% であったが、飼育中に死亡した個体ならびに麻痺症状を示した個体では検出率は 18.2% を示した。しかしながら鞭毛虫が血体腔へ侵入して増殖する鞭毛虫血症は認められなかった。麻痺症状を示した個体では通常消化管内に存在する細菌とは異なる細菌の増殖が認められた。チャバネアオカメムシ幼虫およびクサギカメムシ成虫の調査数はそれぞれ 3 頭および 11 頭と少なかったが、いずれも鞭毛虫は検出されなかった。

2. 鞭毛虫の形態

チャバネアオカメムシ成虫各個体から検出された鞭毛虫はいずれも同じ形態を示していた。細胞は前方にやや大きい膨らみを持った紡錘形を呈しており、ほぼ中央に楕円形の核を有し、核の前部近傍の細胞質にキネトプラストが位置した。鞭毛はキネトプラスト前部から正中線からずれて側方に伸長し細胞外に突出した。細胞質の一部が波動膜 (undulating membrane) として鞭毛に付着していた。この形態はトリパノゾーマ科の原虫の发育段階の基本的な形態の分類の中の epimastigote に一致し

Fig. 1. Developmental stages of *Blastocrithidia* sp. isolated from *Plautia stali*. A: Epimastigote, a typical developmental stage of the genus *Blastocrithidia* (f: flagellum, k: kinetoplast, n: nucleus, u: undulating membrane). B: Binary fission of epimastigote showing separation of nucleus, kinetoplast and undulating membrane and part of flagellum. C: Rosette cluster of epimastigotes. Note that fused epimastigotes (fe) have a double nucleus and kinetoplast, or a large nucleus and kinetoplast, but single epimastigotes (se) have small ones. D: Crumbling of rosette cluster following fusion of epimastigotes. Note the immature cysts (i) with dense nucleus and kinetoplast. E: Immature cysts (i) with dense nucleus and kinetoplast. Flagellar cysts (fc) are seen as immature cysts hanging on a flagellum without separating. F: Mature cysts (m).

ていた (Fig. 1A)。

epimastigote の多量に検出される材料では、これらの鞭毛に桿菌様の小体が数個付着しているものが観察されたが、この小体は個々に遊離して存在するもののほうが多かった。

3. 鞭毛虫の分離培養

チャバネアオカメムシ成虫磨砕液から多量の生存 epimastigote を含む材料を選び出し、滅菌食塩水を用いた遠心分離洗浄を繰り返し行った沈殿物を抗生物質添加培地で洗浄し培養したところ、細菌の汚染なく epimastigote の増殖が認められた。しかし糸状菌の増殖もわずかに認められたので培養物全体を滅菌試験管に移して遠心沈殿させ、epimastigote の遊出した上清を再度抗生物質含有の培地に接種して培養したところ、糸状菌の汚染のない epimastigote の培養系が得られ無菌化に成功した。増殖した epimastigote を抗生物質不含の培地に接種し継代培養を行った。epimastigote の増殖は緩慢で $10^8/\text{ml}$ の密度に到達するまでに 10 日以上を要した。そして継代を重ねるにしたがって鞭毛を体外に出す個体が減少し、ほとんどの個体が無鞭毛のまま増殖した。これらの個体を昆虫の培養細胞と混合して培養すると鞭毛を持つ個体が出現し、増殖も顕著に高まった。

4. 鞭毛虫の生活環

主として培養した材料の塗抹染色標本によって本鞭毛虫の生活環を観察した。epimastigote は 2 分裂で増殖した。分裂過程は鞭毛、キネトプラストならびに核においてほぼ同時に分離するように見られた (Fig. 1B)。増殖が進行するに従って epimastigote はロゼット状のクラスターを形成した。クラスター内の epimastigote は自由に遊泳している epimastigote と比較して太く、核およびキネトプラストも大きかった (Fig. 1C)。その後クラスター内の epimastigote は次第に小型化するとともに、細胞質の染色性も低下し、核およびキネトプラストが濃縮されたように強く染色される未熟の cyst が出現した (Fig. 1D, E)。そしてクラスターの崩壊と共に未熟の cyst や成熟 cyst が観察されるようになり、epimastigote の鞭毛に付着した flagellar cyst (VICKERMAN, 1962) も観察された。DNA の反応は核およびキネトプラストに限定されていた。

5. cyst のカメムシへの接種

培養によって得られた cyst を蒸留水により 10^8 cyst/ml の濃度の浮遊液に調製し、チャバネアオカメムシ飼育用の給水容器に浮遊液を入れて成虫および孵化幼虫に吸水させて接種し 10 日後に調査した。成虫では鞭毛虫の感

Table 2. Inoculation of *Blastocrithidia* sp. cyst in the brown-winged green bug, *Plautia stali*

Insect stage	Inoculation method	No. observed	% infected
Eggs	Smearred suspension on surface	24	45.8
Hatched larvae	Fed suspension	5	100
Adults	Fed suspension	14	7.1

Table 3. Vertical transmission of *Blastocrithidia* sp. via eggs laid by infected females

Experiments	No. of larvae observed ^a	% infected
1	9	100
2	7	57.1
3	9	33.3
4 ^b	18	100
5	10	90
6	8	12.5
7 ^b	18	100
8 ^b	18	38.9

^a Observed 7–10 days after hatching.

^b Two egg masses.

染率は約 7% と低かったが、孵化幼虫では 100% と高かった。そこで産下直後の卵塊に cyst 浮遊液を塗布し乾燥させて孵化を待ち孵化 10 日後に調査したところ、約 46% の感染率が得られ (Table 2), cyst による産下卵の汚染によっても感染することが明らかであった。cyst をクサギカメムシの孵化幼虫に対しても接種を行ったところ、10% と低率ではあったが、感染が確認された。

6. 感染成虫の産下した卵塊から孵化した幼虫の感染率

孵化幼虫に cyst 浮遊液を接種し羽化後排泄物中に cyst および epimastigote を含む成虫を得た。これらの成虫から雌雄 3 組を選び交尾・産卵させた。これらの卵から孵化した幼虫を 7–10 日飼育した後幼虫の鞭毛虫感染率を調査した。幼虫の鞭毛虫感染率は約 13% から 100% までと多様であった (Table 3)。孵化から調査時までの幼虫の生存率には著しい差異は認められなかった。供試した感染成虫は羽化後 2 か月以上生存し続け、この間に総計 24 回の産卵が観察された。感染成虫の排泄物への epimastigote および cyst の混在は常に認められたが、それらの量は一定ではなく、大量の cyst (推定 $10^9/\text{ml}$ 以上) と epimastigote が観察される場合と、ごく少量 (推定 $10^5/\text{ml}$ 以下) しか検出されない場合があった。消化管の各部位別に感染の有無を観察したところ、唾腺、食

道から以下全域にわたって epimastigote が検出され、消化管後部では cyst が多く検出された。

考 察

カメムシ類に感染するトリパノゾーマ科の鞭毛虫としては *Blastocrithidia* 属, *Crithidia* 属, *Leptomonas* 属および *Phytomonas* 属が知られているが、いずれの鞭毛虫もカメムシ類に対する病原性は明らかにされていない。このうち *Phytomonas* 属の鞭毛虫は *Leptomonas* 属と同一の形態をしており、カメムシなどの昆虫によって媒介される植物感染性の鞭毛虫である (WALLACE, 1966; LEE and HUTNER, 1985)。本研究で得られた鞭毛虫は epimastigote およびシストの 2 形態を持つことが示された。epimastigote は *Blastocrithidia* 属および *Trypanosoma* 属の鞭毛虫に共通して存在する形態であるが、*Trypanosoma* 属の鞭毛虫では epimastigote の他に trypomastigote の形態も存在することによって *Blastocrithidia* 属と区別されている (HOARE and WALLACE, 1966)。*Blastocrithidia* 属は感染性のある耐久性のシストを形成することが知られており、半翅目に感染性を示す種では epimastigote の鞭毛に付着した flagellar cyst (VICKERMAN, 1962; WALLACE, 1966) の存在も知られている。したがって本研究で得られた鞭毛虫はカメムシ類に見いだされている *Blastocrithidia* 属の原虫に近縁の鞭毛虫と考えられる。以下本鞭毛虫を *Blastocrithidia* sp. (株番号, Bc-Ps-FTRS-A9201) と称する。本鞭毛虫, *Blastocrithidia* sp. はロゼット状のクラスターを形成するが、クラスター内の epimastigote は分裂・増殖期の自由遊泳する epimastigote に比較して肥大していることが示され、核やキネトプラストも肥大しているように見られた。このような現象はカイコに病原性を示す鞭毛虫 *Leptomonas* sp. の promastigote においても認められる (阿部, 1978; ABE, 1980)。この場合に promastigote は融合して肥大し、肥大 promastigote の表面は厚い皮膜に覆われて cyst 化する (ABE, 1980; 阿部, 1987; 阿部・岩下, 1989)。本鞭毛虫 *Blastocrithidia* sp. のクラスター内の epimastigote の肥大状況および核ならびにキネトプラストの肥大状況からみて、クラスター内で epimastigote が融合すると考察される。そして融合後の核、キネトプラストおよび細胞質が濃縮されて桿菌状の耐久性のシストに変化するものと考えられる。epimastigote の鞭毛に付着した flagellar cyst は Fig. 1D および E に見られるように、鞭毛で付着し合った epimastigote が融合後 cyst 化する過程で解離する際に未熟な cyst が解離せずに cyst 化していない

Fig. 2. Life cycle of *Blastocrithidia* sp. in host (A to E) and outside host (F to G). The epimastigote (A) multiplies by binary fission (B). Thereafter, the epimastigotes accumulate as a rosette cluster (C) and fuse into stumpy form. Fused epimastigotes encyst showing a condensed form (D to E). Eggs laid by an infected female are surface contaminated by cysts (E to F). The cysts on the egg surface are ingested by hatched larvae (F to G) and metamorphose into the epimastigote (A).

epimastigote に付着している像を示すものと考えられる。以上のことから *Blastocrithidia* sp. の生活環は Fig. 2 のように要約された。すなわち、チャパネアオカメムシの幼虫の孵化時に卵表面の cyst は経口的に感染し消化管内で epimastigote に変態 (Fig. 2A) して 2 分裂によって増殖し (Fig. 2B)、増殖後ロゼット状のクラスターを形成しクラスター内で融合し (Fig. 2C)、融合 epimastigote の核およびキネトプラストが濃縮して小型化して cyst 化し (Fig. 2D, E)、シストが排泄物と共に排泄口を汚染し、卵表面が汚染され (Fig. 2F) て孵化幼虫に感染する (Fig. 2F, G, A)。

トリパノゾーマ科の鞭毛虫では細胞質に共生微生物を持つものが知られ、栄養要求性が低い (DE MENEZES and ROITMAN, 1991)。また共生微生物を持たない *Blastocrithidia triatomae* では培養が困難であるが、培養細胞との混合培養で増殖が高まる (PENG and WALLACE, 1981)。本研究の鞭毛虫は核およびキネトプラスト以外には DNA 反応がなかったことから共生微生物を持つてはいないと考察される。このために増殖性が低く、培養細胞との混合培養で高増殖性を示すものと考えられる。

摘 要

チャパネアオカメムシ成虫から鞭毛虫が分離された。

この鞭毛虫は紡錘形を呈し、核の前部のキネトプラストから波動膜を伴った鞭毛が伸びており、トリパノゾーマ科の鞭毛虫の epimastigote の形態を示すことから *Blastocrithidia* 属の鞭毛虫と同定された。本鞭毛虫は宿主消化管内で epimastigote 態で増殖した。epimastigote は 2 分裂によって増殖し、個体密度の上昇にしたがってロゼット状のクラスターを形成し、クラスター内で epimastigote は融合し cyst 化した。cyst は経口的に感染するが感染成虫の排泄物中に cyst が含まれており、感染成虫の産下する卵の表面の cyst による汚染が主要な感染経路と考えられた。

引用文献

- 阿部芳彦 (1978) カイコに病原性を示す *Leptomonas* sp. の生活史. 日蚕雑 47: 421—426.
- ABE, Y. (1980) On the encystment of *Leptomonas* sp. (Kinetoplastida; Trypanosomatidae), a parasite of the silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus. *J. Protozool.* 27: 372—374.
- 阿部芳彦 (1987) カイコに病原性を示す鞭毛虫, *Leptomonas* sp. の *in vitro* におけるシスト形成. 日蚕雑 56: 428—430.
- 阿部芳彦・岩下嘉光 (1989) カイコに病原性のある鞭毛虫 *Leptomonas* sp. LA-SES-AA7601 の微細構造について. 日蚕雑 58: 443—447.
- CONCHON, I., M. CAMPANER, C. SBRIVATE and E.P. CAMARGO (1989) Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultured from fruit. *J. Protozool.* 36: 412—414.
- DE MENEZES, M.C.N. and I. ROITMAN (1991) Nutritional requirement of *Blastocrithidia culicis*, a trypanosomatid with an endosymbiont. *J. Protozool.* 38: 122—123.
- GRACE, T.D.C. (1962) Establishment of two strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, 195: 788—789.
- HOARE, C.A. and F.G. WALLACE (1966) Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 212: 1385—1386.
- LEE, J.J. and S.H. HUTNER (1985) Order 11. Kinetoplastida Honigberg, 1963 emend Vickerman, 1976. In: *Illustrated guide to the Protozoa* (J.J. LEE, S.H. HUTNER and E.G. BOVEE eds.), Lawrence, Kansas, USA: Society of Protozoologists, pp. 144—146.
- PENG, P.L.-M. and F.G. WALLACE (1981) The cultivation of *Blastocrithidia triatomae* CERISOLA et al., 1971. *J. Protozool.* 28: 116—118.
- QUIOT, J.M. (1982) Establishment of a cell line (S.P.C. Bm 36) from the ovaries of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Sericologica*, 22: 25—31.
- VICKERMAN, K. (1962) Observation on the life cycle of *Phytomonas elmasiani* (MIGONE) in East Africa. *J. Protozool.* 9: 26—33.
- WALLACE, F.G. (1966) The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp. Parasitol.* 18: 124—193.