チャバネアオカメムシから分離されたウイルス様病原体の性状¹⁾

津田勝男*・中島信彦**・山中正博*²⁾・大平喜男*・河原畑勇***

* 福岡県農業総合試験場

** 蚕糸・昆虫農業技術研究所

*** 九州大学農学部

Virus-like Particles in Brown-Winged Green Bug, *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae). Katsuo TSUDA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818, Japan), Nobuhiko NAKASHIMA (National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan), Masahiro YAMANAKA,³⁾ Yoshio OHIRA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818, Japan) and Takeshi KAWARABATA (Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **41**: 39-44 (1997)

Virus-like particles were isolated from the Brown-Winged Green Bug, *Plautia stali*. Diseased nymphs revealed typical symptoms of virus infection. Re-infection of healthy nymphs with haemolymph of diseased nymphs resulted in typical disease symptoms. Infected nymphs died within several days with severe symptoms. The haemolymph maintained virulence for nymphs after filtration of 0.22- μ m pore size and after serial passage through nymphs. One opalescent band was seen after sucrose density-gradient centrifugation. The band had virulence to nymphs and contained spherical particles estimated about 30 nm in diameter by electron microscopy. These results indicated that the particles are a virus.

Key words: virus-like particles, brown-winged green bug, *Plautia stali*, virulence

緒 言

チャバネアオカメムシ *Plautia stali* は、カンキツやカキ、ナシ等多くの果樹類を害するが、果樹園外で繁殖して果樹園に飛来するため、被害を防止するには多数回の薬剤散布が必要となる。しかし、発生が多い場合には果樹園内の薬剤防除のみでは被害防止は困難である。このため、集合フェロモンや天敵微生物等、他の有効な防除素材の探索が行われている。著者らも、チャバネアオカメムシの生物的防除素材として、天敵微生物の探索を行い、その過程で室内飼育個体群よりウイルス病特有の病徴を呈する死亡個体を見出した。チャバネアオカメムシに対する天敵ウイルスはこれまでに報告はない。また、カメムシ類についても、これまで多くの研究者が探索したにもかかわらず、南アフリカ共和国においてミナミアオカメムシ *Nezara viridula* から分離された 2 種類のウイルス (WILLIAMSON and VON WECHMAR, 1992) が知られているだけである。

本研究では、チャバネアオカメムシから分離したウイルス様病原体について、これを生物的防除素材として利用する可能性を検討するために、病原性等の生物学的特性の解明を行った。

材料および方法

1. 病原体の分離

ウイルス様病原体は、福岡県農業総合試験場・果樹病害虫研究室で飼育していたチャバネアオカメムシの個体群において、ウイルス病様の症状を呈した個体から分離した。5 齢時に死亡した個体 (体重 40~50 mg) を選び、1 頭当たり滅菌水 1.0 ml を加えて乳鉢中で磨砕し、磨砕液を三重のゴース布でろ過して虫体残さを除去し、これを基準濃度液として試験に供試するまで 4°C に保存した。

2. 供試昆虫

当初は福岡県農業総合試験場・微生物利用研究室で累代飼育していたチャバネアオカメムシの健全個体群を供

1) 本報告の一部は日本昆虫学会第 55 回大会第 39 回日本応用動物昆虫学会合同大会 (1995 年 8 月, 北海道帯広市) で発表した。

2) 現在 農林水産省果樹試験場

3) Present address: National Institute of Fruit Tree Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 年 6 月 5 日受領 (Received 5 June 1996)

1996 年 9 月 11 日登載決定 (Accepted 11 September 1996)

試し、その後は野外成虫を採集して累代飼育を行い、異常のないことを確認した2世代目の個体群を供試した。これらの個体は、守屋ら (1985) に準じて直径 90 mm のプラスチックシャーレを用い、餌として生ラッカセイを与え、23°C、16 時間明、8 時間暗の長日条件で飼育した。

3. 病原性の確認

1) 接種方法

ウイルス様病原体は以下の方法で経口接種して病原性を確認した。まず、基準濃度の磨砕液を滅菌水で 10 倍および 100 倍、1,000 倍に希釈し、接種液とした。直径 90 mm×高さ 20 mm のプラスチックシャーレ中で、脱脂綿の小片を入れた容器 (直径 8 mm、高さ 8 mm) に接種液 1.0 ml を加え、あらかじめ半日程度絶食させた2 齢幼虫および 4 齢幼虫を 1 シャーレ当たり 10~15 頭ずつ放飼して、接種液を吸汁させた。接種 24 時間後からは、接種液を加えた容器を滅菌水を加えた容器に交換し、生ラッカセイを与えて飼育を継続した。対照は、滅菌水を与えて同様の操作を行った。これらの個体は、23°C で 30 日間飼育を行い、死亡するまでの行動および外観の変化等の病徴を毎日観察した。

2) フィルターによるろ過後の病原性

基準濃度の接種液を 0.22 μm および 0.45 μm のフィルター (ミリポア、マイレクス GV) でろ過し、上記と同

様に 5 齢幼虫へ接種して、病徴の発現等を毎日観察して病原性を確認した。

3) 継代による病原性の持続

接種後にウイルス病様の症状を呈して死亡した個体を磨砕し、上記と同様に 4 齢幼虫に再接種し、継代を反復した。継代を 5 回および 10 回反復した個体から得た基準濃度液およびその 10 倍および 100 倍、1,000 倍希釈液を、4 齢幼虫に吸汁させて病原性を確認した。

4) テトラサイクリンの病原性への影響

基準濃度の接種液にテトラサイクリン塩酸塩水溶液を 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加して、4 齢幼虫に接種し、テトラサイクリンが病原性に及ぼす影響を検討した。対照として、同濃度のテトラサイクリン塩酸塩水溶液および接種液のみを接種した。

4. ウイルス様病原体の精製

ウイルス様病原体を含む虫体磨砕液を、机上遠心機 (HITACHI, SCT5BA) で 1,300 g、15 分間遠心した。上清を採取し、超遠心機 (HITACHI, 55P-72) で、RPS40T ロータを用い、97,300 g、4°C、120 分間遠心を行い沈殿させた。沈殿を 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) に懸濁し、懸濁液をショ糖勾配に重層した。ショ糖勾配はショ糖を 60%、40%、30%、20% および 10% の濃度で 0.05 M Tris-HCl 緩衝液に溶解した溶液を 60% をクッションとして 13PET チューブに順次重層し、4°C

Table 1. Virulence of virus-like particles in diseased haemolymph to nymphs of *Plautia stali*

Treatment	Instar	Dosage	No. of nymphs	Mortality (%)	Longevity of infected nymphs (days) ^b
Inoculated	2	1 nymph/ml ^a	35	94	3.8±0.7
	2	$\times 10^{-1}$	40	98	3.9±0.7
Control	2	—	20	15	—
Inoculated	4	1 nymph/ml	14	93	5.5±1.6
	4	$\times 10^{-1}$	14	79	6.9±2.5
	4	$\times 10^{-2}$	14	79	5.9±2.6
	4	$\times 10^{-3}$	14	50	5.0±2.4
Control	4	—	14	14	—

^a One diseased 5th-instar nymph was homogenized in 1.0 ml of water.

^b All values are mean±S.D.

Table 2. Effect of filtration on virulence of virus-like particles in diseased haemolymph to nymphs of *Plautia stali*

Treatment	Pore size (μm)	Instar	No. of nymphs	Mortality (%)	Longevity of infected nymphs (days) ^a
Filtrated	0.45	5	42	100	5.4±1.0
	0.22	5	36	89	5.9±0.9
Non-filtrated	—	5	28	93	4.5±0.7
Control	—	5	28	14	—

^a All values are mean±S.D.

Fig. 1. Typical disease symptoms of infected 5th-instar nymphs of *Plautia stali*. (A) Healthy, (B) Infected. The surface of the abdomen is soft and the whole body is brown.

Fig. 2. Disease symptoms include apparent dehydration of an infected 4th-instar nymph of *Plautia stali*. The abdomen is shrunk and appears abnormally small compared to the thorax.

に一晩静置して調製した。懸濁液を重層したショ糖勾配は RPS40T ロータで、97,300 *g*、150 分間高速遠心し、ショ糖勾配に形成されたバンドの分画を採取した。採取した分画は蒸留水で希釈し、RPS40T ロータで、97,300 *g*、4°C、120 分間遠心を 2 回反復して遠心洗浄し、ショ糖を除去した。各バンドの精製物は、4°C または -80°C に保存し、電子顕微鏡観察および接種試験に供試した。

5. 電子顕微鏡による観察

ショ糖勾配から採取した各バンドの精製物は、0.3% 酢酸ウラン水溶液で染色した後、透過型電子顕微鏡 (HITACHI, H-7000) で検鏡し、ウイルス様粒子の有無を確認した。

6. 採取したバンドの病原性

ショ糖勾配から採取した各バンドの精製物は、前述 (3.1)) と同様の方法でチャバネアオカメムシ 4 齢幼虫に経口接種して、病原性を確認した。

結 果

1. ウイルス様病原体の病原性

ウイルス病の症状を示したチャバネアオカメムシ死亡個体の磨砕液は、チャバネアオカメムシの成虫および幼

Fig. 3. The bands formed after sucrose density-gradient centrifugation. Arrows a and b indicate the upper and lower band, respectively.

虫への経口接種により、同様の病徴を発現させ死亡させたことから、接種した磨砕液は病原性を有することが確認された (Table 1)。いずれの濃度でも 2 齢幼虫は 4 日以内に、4 齢幼虫は 7 日以内に大半が死亡した。罹病した個体の病徴は幼虫の場合に明瞭で、発育の遅延とともに行動が緩慢となり、体表の膨軟化および体色の褐変が認められた (Fig. 1)。また、死亡後数日を経過すると脱水症状により腹部が収縮する症状が認められた (Fig. 2) が、この症状は 2 齢から 4 齢時に死亡した場合に多く観察された。一方、成虫で死亡する場合には、死亡前の行動が不活発となり死亡時に体色の褐変が認められたが、やや不明瞭であった。

また、磨砕液は孔径 $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過しても病原性を有することから、病原体は $0.22 \mu\text{m}$ より小さいことが確認された (Table 2)。さらに、死亡個体の体液は、宿主による継代を 10 回経過しても病原性が維持されていた (Table 3)。また、接種液にテトラサイクリンを添加した場合、いずれの濃度においても接種液のみと同様に死亡し、テトラサイクリンが病原性に及ぼす影響は全く認められなかった (Table 4)。

2. ウイルス様病原体の精製

ウイルス病の症状を示したチャバネアオカメムシ死亡

Fig. 4. Electron micrograph of sucrose density-gradient purified particles stained with uranyl acetate. Bar represents 200 nm.

個体の体液をシヨ糖勾配遠心法により精製を行った結果、シヨ糖勾配には 2 本の明瞭なバンドが形成された (Fig. 3)。これらのバンドの精製物を電子顕微鏡により観察したところ、上部のバンドにのみ直径約 30 nm の球状の粒子が多数確認された (Fig. 4)。また、これらの精製物をチャバネアオカメムシ 4 齢虫に接種した結果、上部のバンドの精製物を接種した場合にのみウイルス病の症状を示して死亡する個体が認められた (Table 5)。

考 察

チャバネアオカメムシから分離したウイルス様病原体は、宿主であるチャバネアオカメムシに対して病原性を有し、病原体を含む虫体磨砕液を吸汁した個体の多くは 1 週間以内に死亡する。死亡前後の病徴は他の昆虫で認められるウイルス病の症状に類似しており、特に幼虫では特異的な病徴が認められる。また、病原体を含む体液を $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過しても病原性は失われ

Table 3. Virulence of virus-like particles in diseased haemolymph at 5th and 10th passages through nymphs of *Plautia stali*

No. of Passage	Dosage ^a	Instar	No. of nymphs	Mortality (%)	Longevity of infected nymphs (days) ^b
1	1 nymph/1 ml	4	14	93	5.5±1.6
	×10 ⁻¹	4	14	79	6.9±2.4
	×10 ⁻²	4	13	77	6.3±2.3
	×10 ⁻³	4	13	54	5.5±2.0
	Control	4	14	14	—
5	1 nymph/1 ml	4	21	100	5.5±1.6
	×10 ⁻¹	4	21	95	5.5±2.1
	×10 ⁻²	4	30	80	4.9±1.7
	×10 ⁻³	4	27	56	6.3±2.5
	Control	4	14	14	—
10	1 nymph/1 ml	4	11	100	5.2±1.9
	×10 ⁻¹	4	14	100	4.7±2.3
	×10 ⁻²	4	13	85	6.1±2.7
	×10 ⁻³	4	14	79	7.3±3.2
	Control	4	25	16	—

^a One diseased 5th-instar nymph was homogenized in 1.0 ml of water.^b All values are mean±S.D.Table 4. Effect of tetracycline addition on virulence of virus-like particles in diseased haemolymph to nymphs of *Plautia stali*

Treatment	Dose of tetracycline (μg/ml)	Instar	No. of nymphs	Mortality (%)
Haemolymph	16	4	20	90
+Tetracycline	32	4	20	85
Haemolymph only	—	4	20	85
Tetracycline only	16	4	21	5
	32	4	21	5
Control (water)	—	4	23	4

Table 5. Virulence of bands formed by sucrose density-gradient centrifugation to nymph of *Plautia stali*

Band	Age	No. of nymphs	No. of infected nymphs ^a	Longevity of infected nymphs (days) ^b
Upper band	4	40	3	4.8±0.9
Lower band	4	40	0	—
Control	4	20	0	—

^a Diseased nymphs showed typical symptoms of infection.^b All values are mean±S.D.

ないことから、病原体は 0.22 μm より小さいと考えられ、ウイルスである可能性が高い。

チャバネアオカメムシに病原性を有する病原体としては、ウイルス以外にも細菌、糸状菌、原生動物などが考えられるが、これらの病原体はいずれも 0.22 μm より大きく、孔径 0.22 μm のフィルターを通過することは

できない。また、マイコプラズマは 0.22 μm のフィルターを通過することができるが、病原性がテトラサイクリンの影響を受けないことから、病原体がマイコプラズマである可能性も低い。さらに、継代を反復しても病原性は維持されていることから、体液中の病原体はチャバネアオカメムシの体内で増殖していると考えられ、何らかの毒物質である可能性は低い。

また、電子顕微鏡により観察された直径約 30 nm の球状の粒子は、ショ糖勾配速心による精製では特定のバンドにのみ存在し、これを含む分画は病原性も認められたことから、ウイルス粒子である可能性が高いと考えられる。WILLIAMSON and VON WECHMAR (1992) は、ミナミアオカメムシから分離した 2 種類のウイルス、NVV-1 および NVV-2 の特性を検討し、前者は直径 29 nm でピコルナウイルス、後者は直径 41 nm でトチウイルスに属するかあるいは近縁のウイルスであると報じている。著者らが分離したウイルス様病原体は、形状については球状で両ウイルスと同様で、大きさについても NVV-1 に類似している。

本ウイルス様病原体が飼育個体群に持ち込まれた経緯は不明で、野外のチャバネアオカメムシ個体群における発生および伝染様式も不明である。伝染様式については、WILLIAMSON and VON WECHMAR (1992) は、NVV-1 および NVV-2 が経卵伝染することを報告している。本研究では経卵伝染の有無は確認していないが、健全個体が病死個体の体液を吸汁し、その個体が発病することを観

察している(津田, 未発表)。このことは、健全個体が病死個体の体液を吸汁することによって、ウイルス様病原体が健全個体へ伝染する可能性があることを示唆している。ただし、これは飼育条件下での観察である。

以上の試験を行ってウイルス様病原体の特性の解明を行ったが、これらの試験ではこの病原体をウイルスとは断言できない。ウイルスであることの確認およびミナミアオカメムシから分離された NVV-1, NVV-2 との関係を検討するためには、さらに核酸の同定やウイルスタンパク分子量の測定等の解析が必要である。また、ミナミアオカメムシ等の他のカメムシに対する病原性の検討も必要である。

摘 要

チャバネアオカメムシの室内飼育個体群よりウイルス病の病徴を呈する死亡個体を見出し、ウイルス様病原体を分離して、その特性を明らかにした。

1) 病原体は、チャバネアオカメムシに経口接種することにより病原性を有し、同様の病徴を発現させた。また、再接種による継代を反復しても病原性を維持した。

2) 病原体は、0.22 μm のフィルターを通過し、テトラサイクリンの影響を受けなかった。

3) ショ糖勾配遠心によりバンディングした精製物には、直径約 30 nm の球状粒子の存在が確認され、病原性を有することが確認された。

以上のことから、病原体はウイルスである可能性が高いと考えられた。

引 用 文 献

- 守屋成一・志賀正和・馬淵正人(1985) チャバネアオカメムシの累代飼育法. 果樹試報 **A 12**: 133-143.
- WILLIAMSON, C. and M.B. VON WECHMAR (1992) Two novel viruses associated with severe disease symptoms of the green stink-bug *Nezara viridula*. *J. Gen. Virol.* **73**: 2467-2471.