

細胞質多角体病ウイルス感染蚕の無菌条件下での発症

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
巻/号	401
掲載ページ	p. 32-36
発行年月	1971年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat



細胞質多角体病ウイルス感染蚕の 無菌条件下での発症

倉田 啓 而

東京都杉並区・蚕糸試験場

(1970年6月23日受理)

家蚕ウイルス病については多くの研究があるが、大多数のものが微生物の存在の下（無菌的でない条件）で行なわれたものであり、ウイルス単独疾患として扱われたものは数少ない。とくに細胞質多角体病およびウイルス性軟化病は多くの場合ウイルスと細菌による合併症としてあらわれているものと考えられるし、その場合ウイルス感染蚕は関与するとみられる細菌の種類や多少によってはその致死時期も変化してくることも考えられる。

そこで家蚕の細胞質多角体病をウイルス単独疾患として扱った場合どのような発症をするか、人工飼料による無菌飼育蚕について研究したところ、病徴にはとくに変わった点は見当たらなかったが、生存日数の延長、5眠蚕の出現、感染蚕が正常な子孫を維持することなど興味ある結果が得られたのでその概要を報告する。

本文に入るに先だち原稿のご校閲をたまわった養蚕部長針塚正樹博士、生理部長伊藤智夫博士、研究遂行にさいし多大の御便宜を与えられた当時の蚕糸試験場養蚕部飼育第1研究室長（現中部支場病理研究室長）高須敏夫技官に深く感謝の意を表す。

材料および方法

供試蚕には人工飼料による支124号×日124号の無菌飼育蚕を、細胞質多角体病ウイルス（CPVと略す）には蚕糸試験場病理部蚕ウイルス病研究室より分譲を受け当研究室で継代増殖した外観四角形の多角体を形成するものを用いた。人工飼料の組成、多角体表面の滅菌法、ウイルスの接種法および無菌飼育法は前報に記述したとおりである^{10,11)}。飼育温度は全齢を通じて27-28°Cであった。蚕はすべて試験管により営繭まで1頭飼育を行なった。

病蚕の判定にあたっては蚕の発育経過を毎日観察し、外観上あきらかに健康蚕でないと思われる個体もその死をまって解剖し鏡検して、中腸細胞内の多角体の有無により細胞質多角体病およびその他に分類した。また生存し結繭した個体については発蛾をまちその中腸を鏡検し多角体の有無により多角体保持蛾および健康蚕に分類した。以上各段階での検索における本病蚕および多角体保持蛾を合せて感染蚕数とした。

実験結果

各齢別にCPVを接種した蚕のその後の発症状況を観察し、CPV感染蚕の斃死までの日数、感染蚕数に対する5眠蚕の出現割合、同じく多角体保持蛾の割合を第1表に示した。

斃死までの日数：各齢別に接種されたCPV感染蚕の接種から死亡までの日数をみると、最初の斃死蚕のするまでの日数はどの齢に感染した場合も7~9日であるが、それ以後最後の蚕が斃死するまでの期間は非常に長くなり1齢に感染した蚕では53日、2齢に感染した場合は38日、3齢感染では39日、4齢感染では29日、5齢感染では14日とその致死時期は一致しなかった。斃死蚕が出はじめてから全個体が斃死するまでの様子を1齢接種蚕の場合を例にとりて示したのが第2表である。齢別の死亡蚕数をみると1齢1頭、2齢3頭、3齢4頭、4齢4頭、5齢26頭、6齢21頭であり、死亡蚕の76%が5齢および6齢になり死亡した。死亡した齢の中でも感染蚕は齢の初期から後期にわたり死亡しており、桑葉育に見られるような眠前または眠起きにとくに多く斃死する¹⁴⁾というような例は見られなかった。

5眠蚕および多角体保持蛾の出現：CPVに感染

第1表 細胞質多角体病ウイルス感染蚕の発症

接種蚕齢	供試蚕数	C* 感染率	死亡までの 日数	5眠蚕の 出現数	5眠蚕の 出現率**	多角体保 持蛾数	多角体保持 蛾出現率**
1	100	67%	8-53	29(8)***	43%	8	12%
2	40	30	7-38	3	25	1	8
	50	40		7(2)	35	10	50
3	40	23	7-39	0	0	6	67
	75	59		8	18	14	32
4	40	28	9-29	0	0	9	82
	40	38		0	0	13	87
	70	76		2(1)	4	34	64
5	50	48	7-14	0	0	21	88
	50	74		0	0	32	87
	50	98		0	0	37	76

* C：細胞質多角体病 CPV 接種時期：1 齢 2 日目，2～5 齢はそれぞれ各齢起，24 時間目。

** CPV 感染蛾を 100 とした場合の%

*** () は蛾になった数

第2表 前表における1齢接種の場合の同病による死亡の状況

死亡齢	死亡蚕数	死亡齢における経過日数	死亡までの日数
1	1	10	9
2	3	2-7	8-11
3	4	3-10	11-20
4	4	4-16	21-30
5	26	2-21	21-46
6	21	5-14	23-53

した個体のなかから5眠蚕が現われた。5眠蚕の出現率は1齢感染蚕42%，2齢感染蚕25，35%，3齢

感染蚕0，18%，4齢感染蚕0，0，4%，5齢感染蚕ではいずれの実験区からも5眠蚕は現われず感染蚕齢が若いほど多く現われた。5眠蚕の大部分は死亡したが一部の蚕は結繭し化蛾した。5眠蚕のすべての蛾は中腸に多角体を形成しており，4眠蚕の蛾のなかにも多角体を持っている個体があった。このような蛾はCPV感染齢が高くなるほど高率に現われ，4齢または5齢に感染した蚕の80%以上が多角体保持蛾となった。稚蚕期にCPVに感染し生存した個体の場合には裸蛹または薄皮繭であり，蛾の体は小さく1齢に感染した蚕の場合は産卵数は4蛾の平均が135個で健康蛾の1/4以下であったが，卵

第3表 1齢に細胞質多角体病ウイルスを接種した蚕の細胞質多角体病死蚕および多角体保持蛾の発育経過の状況

対照蚕の接種よりの経過日数	2 齢起	3 齢起	4 齢起	5 齢超	6 齢経過日数	營 繭
	3.5日	7日	11.5日	16日	—	23日
1 齢死亡蚕	—	—	—	—	—	—
2 齢死亡蚕	66%	—	—	—	—	—
3 齢死亡蚕	100	0%	—	—	—	—
4 齢死亡蚕	100	0	0%	—	—	—
5 齢死亡蚕	100	38.5	3.8	0%	—	—
6 齢死亡蚕	100	58.0	15.8	0	9-18日	—
多角体保持蛾*	100	62.5	0	0	9-10日	39-44日
健康蚕	100	93.7	90.6	93.7	—	93.7%

* 多角体保持蛾はすべて5眠蚕であった。CPV 接種時期：1 齢 2 日目

表中の数値 (%) は対照蚕の発育経過日数と同じ発育経過を辿った接種蚕の割合を示し，また日数は接種蚕の6 齢の死亡期日，6 齢経過日数および營繭までの日数である。

第4表 1齢に細胞質多角体病ウイルスを接種した蚕の各齢の感染歩合

	接種多角体濃度 個/ml	2 齢	3 齢	4 齢	5 齢	蛾
I	1.2×10^4	20%	22%	20%	20%	24%
II	6.0×10^4	74	66	76	78	78
III	1.2×10^5	90	92	94	92	92

CPV 接種時期: 1 齢 2 日目

供試蚕数: 1 区 50 頭

の大きさ、受精卵の割合は健康蛾のそれと変わりなかった。5 齢死亡蚕、5 眠蚕および多角体保持蛾等の発育経過を示したのが第3表である。表中の数値は対照蚕の発育経過日数と同じ発育経過を辿った接種蚕の割合を示す。また対照蚕の発育経過日数は各齢起蚕が90%以上を達した時点をもってそれとした。1 齢 2 日目に接種して2 齢で斃死した蚕の66%はその2 齢起までの経過は対照蚕と同じく接種してから3.5日であった。また3 齢、4 齢で斃死した蚕は2 齢起までは対照蚕と同じ経過を辿ったが3 齢起または4 齢起ではすべての蚕の経過が遅れた。5 齢、6 齢で斃死した蚕の一部は4 齢起まで対照蚕と発育経過において差はなかった。また五眠蚕の発育経過をみると、3、4、5 齢の経過日数が延長していることが判明した。多角体保持蛾では3 齢起で62.5%が対照蚕と同じ発育経過であったが4 齢以後発育は遅れ、6 齢経過日数は6~10日であった。

多角体形成時期: 250 頭の1 齢 2 日目の蚕に24時間 CPV を添食し、1 頭飼育をした蚕を無作為に5 等分し、2 齢解剖区、3 齢解剖区、4 齢解剖区、蛾解剖区の5 区を設けた。蚕は2 齢以後それぞれの齢の2 日目に解剖、鏡検した。蛾解剖区は6 齢死亡蚕も含めた。解剖の時期に到る前に死亡した個体はその時点で鏡検し感染蚕としてその該当区に含めた。実験は3 回行ない、接種ウイルス濃度は多角体数で約 1.2×10^4 個/ml、 6×10^4 個/ml、 1.2×10^5 個/ml のものを用いた。結果は第4表に示したとおり第1 実験では感染率は20~24%、第2 実験では66~78%、第3 実験では90~94%の範囲にあった。第2 実験の3 齢解剖区が66%と他の区より低い値を示したが、他の実験では各区間の差は±2%でありまた蚕の数が1 頭であることから各齢別の感染率に差はなく、2 齢初期にすでに多角体を形成していたものとみなされる。

ウイルスの経卵伝達: 上記の2 齢 2 日目から多角体を形成していたと考えられる蛾の交配によって得た次代蚕を無菌飼育し、5 齢起6 時間以内に5°C、24時間低温処理、または0.075-Nの NaF の添食を24時間行ない細胞質多角体病の誘発を試みたが、多角体病の発生は認められなかった(第5表)。

第5表 低温処理または弗化ソーダ添食による多角体病の誘発

	供試蚕数	健蛾数	半化蛹		多角体歩合
			C	F	
対 照 区	50	48	0	2	0
低温処理区	79	66	0	13	0
NaF添食区	67	45	0	21	0

低温処理: 5 齢起5°C、24時間

NaF: 0.075-N、5 齢起24時間添食

F: 鏡検により多角体が検出されなかった個体

考 察

CPV 感染蚕の発病状態は齋藤ら¹⁴⁾により研究されており、感染個体の多くが眠を中心にその前後に発病し健康蚕と異なる外見を示してくることを報告している。このような発病状態を示すのは細胞質多角体病のみでなく核多角体病⁹⁾、ウイルス性軟化病⁹⁾についても同様である。CPV 感染蚕を無菌条件下で飼育した場合の発病状態をみると、蚕の成長に変化の現われる時期も、個体の斃死する時期も特に眠を中心にその前後に多いということはなかったが、健康蚕が眠の状態にあるのに対し感染蚕は眠に入らず動き廻り、体形も小さいので健康蚕と病蚕の相異は明らかであった。1 齢期に CPV を接種した蚕の大部分は斃死したが、その感染蚕の43%が5 眠蚕となり、そのうち12%は5 眠蚕から化蛾し産卵した。

4 眠蚕から5 眠蚕の出現に関する最近の研究は加藤ら⁸⁾、住本ら¹⁵⁾、竹内ら¹⁶⁾、により報告されており、竹内らによると5 眠蚕の出現は栄養条件が悪くなると起こり、年齢別では1 齢、2 齢の栄養不良が大きく関係していると述べている。本実験においても1 齢または2 齢にウイルス感染した場合に5 眠蚕が多く現われることから、ウイルス感染のため中腸機能の低下が栄養不良を起こしホルモンに異常を来し、その結果5 眠蚕の発現となったものと考えられる。

CPV の増加はウイルス接種後短時間に最高値に達し¹²⁾、接種後3～5 日目の排糞は起病力を持っている¹⁸⁾ことが明らかになっている。死亡までの日数が非常に長かった個体および中腸に多角体を持った個体では、多角体形成時期を調べた実験結果がいずれの齢における多角体病蚕の割合も一定していることから、すでに2 齢初期から多角体を中腸組織内に持ち続けていたと考えられる。CPV 感染蚕がウイルスの増殖を許しながらも7～8 日間健康蚕と同様な発育経過をたどり、40 日以上も生命を維持し続け、産卵し子孫を残したことは非常に興味深いことである。CPV 感染蚕が長期間生存したことの原因としては細菌の影響を受けなかった事もあるであろうが、CPV に感染した中腸組織がその本来の機能を維持したことである。CPV に感染した細胞がウイルス増殖をしながらまたはその終了後に本来の機能を果たすのか、中腸組織の1 部の細胞または眠により新生された細胞がウイルス増殖を行わないで中腸細胞本来の機能を果たしているのか、さらに鮎沢¹⁾が膿病蚕で報告しているようなウイルス不活化物質が関与しているのかはこんごに残された問題である。

5 齢期に CPV に感染した個体は成虫になってもその中腸組織に多角体を持っていることがすでに明らかになっており⁶⁾、また5 齢に中腸核多角体病ウイルス¹⁷⁾、軟化病ウイルス¹³⁾に感染した蚕は正常な雌蛾になりその産卵性の変わらない個体のあることが知られている。今回の実験でも多角体を持った蛾の出現がみられ、感染齢が高くなるほどその割合は高くなり、対照蚕と変わらぬ繭を作り産卵した個体が多かったが稚蚕期に感染した場合の産卵数は健康蚕の1/4 以下となった。これらの蚕の発育経過日数は健康蚕の2 倍にも達したが、その蚕体は健康蚕の

3 齢盛食期程度の大きさであり発育不良によるものである。

CPV の次代蚕への伝達を示した報告があり^{2,3,4)}上記のような蛾から産下された卵を通して次代蚕へのウイルスの伝達の可能性はきわめて大きいと考えられる。しかしすでに実験結果に示したように CPV 感染蛾の次代蚕に誘発処理を行なったが多角体病蚕は発生せず、著者の前報^{10,11)}の結果を支持するものであった。

摘 要

(1) 1 齢に CPV に感染した蚕を無菌条件下で飼育すると、その死亡までの日数は延長し最も長かった個体では53 日であった。また死亡蚕の79.7% が5 齢および6 齢で死亡した。

(2) CPV に感染した蚕のなかに5 眠蚕が現われ、CPV に感染する齢が若いほど多かった。

(3) 1 齢に CPV に感染した蚕でも成虫になり産卵した。多角体保持蛾の出現率(感染蚕に対する多角体保持蛾の割合)は感染齢が高まるにしたがい高くなった。

(4) CPV 感染蚕のほとんどが CPV 接種後4 日目に多角体を形成していた。

(5) 稚蚕期より CPV に感染した蛾からの次代蚕への CPV 伝達の可能性は証明出来なかった。

文 献

- 1) 鮎沢啓夫 (1966): 科学, **36**(6), 298-303.
- 2) ARUGA, H., and E. NAGASHIMA (1962): J. Insect Pathol., **4**, 313-320.
- 3) 有賀久雄・長島栄一・武井隆三(1964): 日蚕雑, **32**, 460-463.
- 4) 福原敏彦 (1962): 日蚕雑, **31**, 97-100.
- 5) 細田茂和・東哲夫・山崎寿 (1966): 日蚕雑, **34**, 71-80.
- 6) 石川義文・浅山哲 (1959): 日蚕雑, **28**, 308-311.
- 7) 岩下嘉光・管家英治・高橋章夫(1968): 宇都宮大農学報, **7**(1), 1-10.
- 8) 加藤勝・住本憲一 (1968): 日蚕雑, **37**, 255 (要旨).
- 9) 小林勝・山口定次郎・吾妻直 (1967): 日蚕雑, **36**, 395-399.

- 10) 倉田啓而 (1967): 蚕試報, **22**, 91-110. 15) 住本憲一・加藤勝 (1968): 日蚕雑, **37**, 255 (要旨).
- 11) 倉田啓而 (1968): 蚕試報, **23**, 149-171.
- 12) MIYAJIMA, S., and S. KAWASE (1968): J. Invert. Pathol., **12**, 329-334. 16) 竹内好武・中島正雄・高宮邦夫(1968): 日蚕雑, **37**, 237 (要旨).
- 13) 大久保紀之 (1966): 日蚕雑, **35**, 81-84. 17) 田中茂男 (1967): 日蚕雑, **36**, 177-182.
- 14) 齋藤忠一・山口孝根 (1960): 群馬蚕試報, **36**, 22-48. 18) 渡部仁 (1968): 日蚕雑, **37**, 385-389.

Summary

On symptoms of silkworm, *Bombyx mori*, infected with a cytoplasmic-polyhedrosis virus under aseptic condition

By

Keiji KURATA

The silkworm larvae inoculated with a cytoplasmic-polyhedrosis virus (CPV) in each larval stage were studied to make clear the mode of symptoms of the polyhedrosis under aseptic condition. The condition was brought by rearing them on the artificial diet in a test tube individually at 27°-28°C.

The results were as follows;

(1) When larvae were inoculated with CPV in the first instar, the infected larvae died of the disease 7 to 53 days after the inoculation. About 80 per cent of them were dead in the fifth and sixth instars. Some of the larvae infected with CPV became imagos and oviposited. The amount of the eggs were about a quarter of those of normal imagos. In comparison with normal imagos, the infected ones were prolonged their larval stage more than 18 days.

(2) When older larvae inoculated, the number of imagos with polyhedra in their intestines increased.

(3) Pentamoulters appeared in the tetramoulting race, when they were inoculated with CPV. The younger the larvae were inoculated, the more the pentamoulters appeared.

(4) The infected larvae and imagos retained polyhedra in their midguts throughout the remainder of their life since 4 days after administration, even when they were inoculated on the second bay of the first instar.

(5) The first instar larvae were inoculated with CPV, and their progeny was examined to elucidate the virus transmission to following generations. As a result, no evidence of trans-ovum transmission of virus was observed, even when the progeny was treated with low temperature (5°C, 24 hr) or was fed sodium fluoride, on the first day of the fifth instar.

(Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo)