

熱・紫外線および日光によるカイコウイルスの不活化について

誌名	蠶絲研究
ISSN	00364495
著者	荒武, 義信 栢村, 鶴雄 上野, 博
巻/号	85号
掲載ページ	p. 141-152
発行年月	1972年12月

熱，紫外線および日光によるカイコウイルスの 不活化について

荒武 義信・栢村 鶴雄・上野 博

カイコウイルスの熱による不活化については酒井 (1934), 鮎沢(啓) (1953 a, 1960) および三谷ら (1960) の報告があり, 紫外線による不活化については北島 (1930), 酒井 (1934), 鮎沢 (干) (1964) および服部ら (1968) の研究がみられる. また, 日光による不活化については酒井 (1934), 三谷 (1960) および山崎ら (1963) を始めとして数多くの報告がある. これらの研究はカイコウイルス病の防除や, カイコウイルスの性状の解明など種々の目的で行なわれているが, 特定の条件におけるいわゆる断片的調査であり, 異なる条件の場合にその知見を適用して不活化の程度を推察することは困難である. さらに後述の3種のカイコウイルスについて全く同じ処理条件で不活化曲線を比較した知見は見当らない. したがって, これらの点を明らかにすることはカイコウイルス病の防除に関連して重要な事項と考えられる. 著者らはこのような観点から, 3種のカイコウイルスを熱, 紫外線または日光照射などで不活化し, 処理条件と不活化程度との関係に重点をおいて調査, 比較したので, 以下その結果を報告する. 本文に入るに先立ち, 本稿のご校閲をいただいた九州大学農学部教授鮎沢啓夫博士および東京大学農学部助教渡部仁博士に深謝する.

実験材料および方法

供試したカイコウイルスは精製核多角体 (NPV と略す), 精製細胞質多角体 (CPV と略す) およびウイルス性軟化病蚕中腸の10% 乳剤 (FV と略す) である. FV は10% 乳剤をガーゼで濾過し, 3,500 rpm. 15分間遠心し, その上清をさらに 15,000 rpm, 30分間冷却遠心して得られた上清を原液 (10^{-1} 希釈液) とした.

熱によるウイルスの不活化方法は滅菌蒸溜水 1.8 ml を小試験管に分注し, 恒温水槽中で目的温度 ($100^{\circ}\text{C}\sim 38^{\circ}\text{C}$) として, これにウイルス原液 (NPV, CPV は $10^7/\text{ml}$) を 0.2 ml 加え所定時間 (5秒~30時間) 加熱した. 処理終了後は直ちに氷水中で冷却し, 実験時まで -20°C で保存した. 一方, 桑葉上におけるウイルスの不活化方法はウ

ウイルス液を10倍階段稀釈して桑葉に塗布し、風乾後シャーレに入れて定温器内(45°C, 38°C)で5~30時間加熱した。この場合、シャーレには桑葉の乾燥を防ぐため脱脂綿を水に浸して入れ蓋をした。

紫外線によるウイルスの不活化処理はウイルス原液 3.0 ml を直径 6 cm のシャーレに分注し、殺菌灯(三菱, 15 w)の直下 30 cm の位置で所定時間(5秒~10時間)処理した。

日光によるウイルス不活化方法は紫外線処理の場合と同様にシャーレに分注したウイルス液を晴天無風時に屋外で所定時間(5分~11時間)日光に曝射した。日光曝射が長時間に亘る場合は翌日に引続いて行なった。実験中は両処理ともシャーレの蓋は外しておき、処理によってウイルス液量の減少した場合は処理終了後もとの液量になるよう滅菌蒸溜水を補充した。なお、曝射時の気温、照度、およびウイルス液の水温の測定を1時間ごとに行なった。

処理したウイルスの不活化の程度はすべて蚕への経口接種によって判定した。すなわち、各処理液を10倍階段稀釈して桑葉に塗布し、風乾後蚕に24時間添食し、そのごは普通桑を給与してNPVの場合は2齢起蚕時まで、CPVおよびFVでは4齢起蚕時まで飼育し発病状況を調査した。

発病状況は発病蚕数からBEHRENS-KÄRBERの方法によってLD₅₀(NPV, CPVの場合はlog, FVの場合は-log)を求め比較するとともに、対照区の示すLD₅₀値から処理区のそれを減じて、これを不活化対数として不活化の程度を判定した。したがって、ウイルスが完全に不活化された場合の不活化対数値はウイルスの種類、処理時期などによって異なってくる。また、ウイルスが完全に不活化されたということは、ここでは処理したウイルス原液を蟻蚕に添食しても発病しなかったことを意味する。

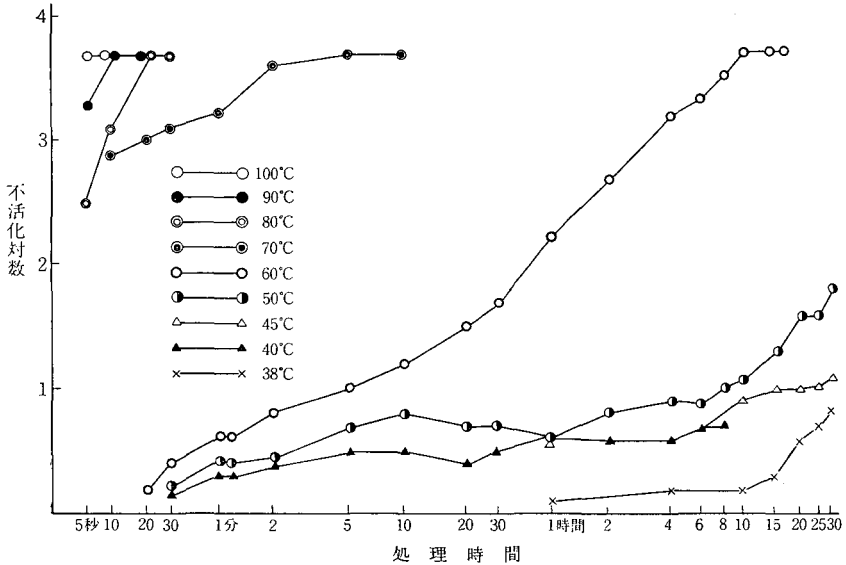
供試蚕品種は日124号×支124号で、実験は1969年と1970年に行なわれた。

実験結果および考察

1. 熱によるウイルスの不活化

NPV, CPV および FV をそれぞれ 38~100°C の恒温水槽中で5秒~30時間処理し、これらウイルスを蟻蚕に添食して不活化対数を算出した。

NPV における結果を第1図に示す。NPV は 100°C, 5秒間で完全に不活化され、90°C では5秒間で大部分不活化されたが、完全な不活化には10秒を要した。80°C では5~10秒間処理でも、いくぶん不活化されたが、完全に不活化されたのは20秒間の処理区であった。70°C では5分間で完全に不活化されたが、10秒~2分間処理によっても多少の不活化はみとめられた。60°C 処理では短時間処理でも幾分不活化は進行したが完全不活化には10時間を要した。50°C, 45°C, 40°C および 38°C では本実験の範囲、すなわち、30時間処理してもウイルスの完全な不活化はみとめられなかった。しかし、これらの温度でも長時間処理すると、ウイルスはある程度不活化されることが明



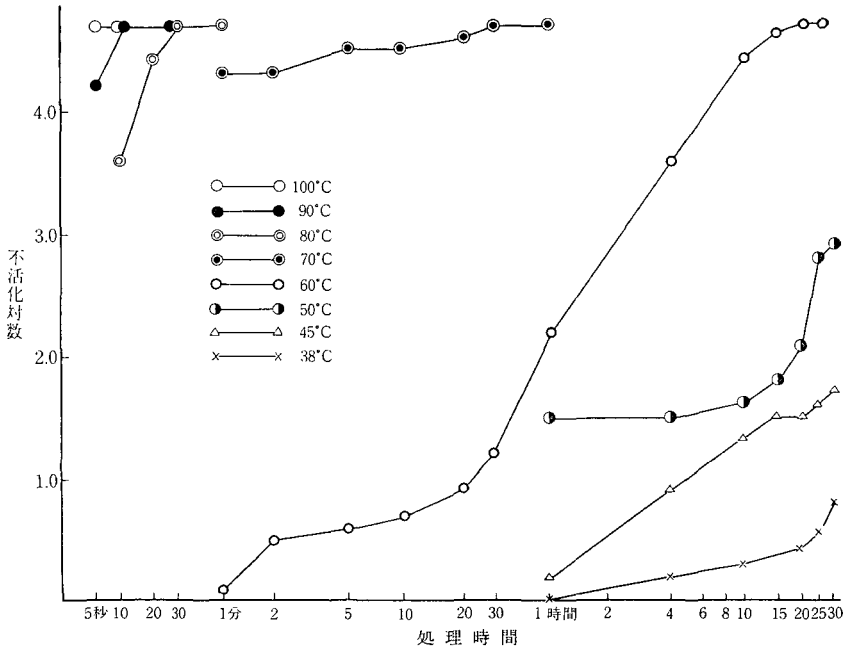
第1図 NPV の熱による不活化 (対数)

ちかになった。

つぎに CPV における結果を第2図に示す。CPV の熱による不活化状況は NPV のそれと類似の傾向が得られた。すなわち、ウイルスが完全に不活化されたのは 100°C 処理で 5 秒間、90°C で 10 秒、80°C では 30 秒、70°C では 30 分間、60°C では 20 時間処理区であった。50°C、45°C および 38°C の処理によつては 30 時間処理してもウイルスの完全な不活化はみとめられず、長時間処理区にいくぶんの不活化がみとめられたにすぎなかった。

FV における結果を第3図に示す。FV の不活化状況は NPV、CPV のそれとやや異なり、ウイルスが完全に不活化されるに要する処理時間がいくぶん長い傾向がみられた。すなわち、FV が完全に不活化されたのは 100°C で 20 秒間処理区、90°C では 30 秒、80°C では 30 分、70°C では 1 時間、60°C では 10 時間であった。50°C あるいは 40°C では NPV、CPV の場合と同様に 30 時間処理しても完全なウイルスの不活化はみられなかった。

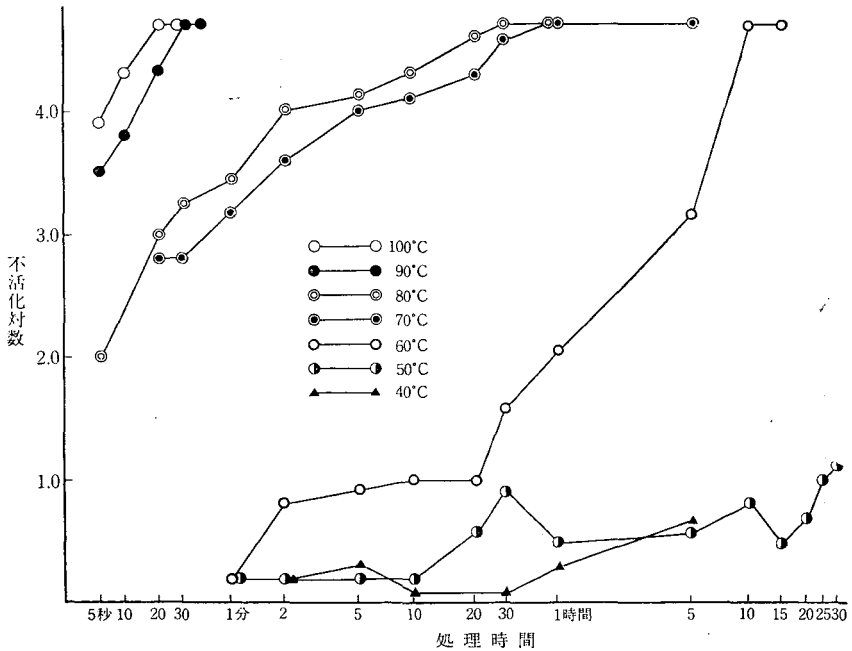
以上、第1図～第3図に示した結果はそれぞれ異なる時期に実験したものである。したがって加熱による3種のウイルスの不活化状況を直接比較することは必ずしも適当ではない。そこで、1970年春蚕期に同一条件、同一方法で3種のウイルスを加熱処理して不活化状況を比較した(第1表)。各ウイルスの不活化状況はこの場合も前述の第1～第



第2図 CPV の熱による不活化 (対数)

3図の結果と似た傾向が得られた。また、3種のウイルスの不活化状況を対比しても同様のことがうかがえた。ただFVの完全不活化に要する処理時間が、NPV、CPVより長く、それはとくに高温処理区において顕著であった。しかし、各ウイルスとも60°Cでは8~10時間で完全に不活化され、50°Cでは10時間でも完全不活化はみとめられなかった。

熱によるウイルスの不活化試験で考慮されなければならないことは、ウイルスが目的の温度に上昇するまで、あるいは処理終了後、処理液が常温に戻るまでの間に不活化が進行するのではないかということである。本実験ではそれらの点を十分考慮して行なったが、完全にこの問題を排除することは出来なかった。しかし、このような条件下においても3種のウイルスはいずれも高温によってきわめて短時間に不活化が進行した。鮎沢(啓)(1953 a)はNウイルス(濃汁の遠心上清)について同様のことを報告しており、さらに50°C~60°Cで20~30分処理においても病原性の低下をみとめている。石森(1935)はNPVを熱処理した後アルカリで溶解し、皮下注射法で不活化程度を調べ、100°Cでは1分間、90°C~60°Cでは15分間の加熱によってウイルスは完全に不活化されたとしている。一方、宮島ら(1968)は、Cウイルスは比較的耐熱性であると述べて



第3図 FV の熱による不活化 (対数)

いるが、三谷 (1960) は 100°C 7 分間の処理で完全に不活化されるとし、鮎沢 (啓) ら (1960) は 100°C では 5 分間、60°C では 30 分間で不活化をみとめている。FV については鮎沢 (啓) ら (1964) が 100°C で 10 分間の加熱処理を行なってウイルスの完全不活化をみとめている。これらの研究はいずれも必要最小時間を求めたものでなく、かつ処理前後の扱い方を異にするので直接これらの結果と著者らの結果を比較することは困難である。しかし、3種のウイルスは高温度の湿熱による処理の場合、秒単位で不活化されることは明らかであり、処理温度が 100°C~70°C と 60°C 以下におけるウイルス不活化状況の差異などと併せ考え興味ある点であろう。

一方、桑葉に塗布されたウイルスが 45°C または 38°C の乾熱状態で不活化されるか否かについて調査した (第2表)。表示したように3種のウイルスとも 38°C、45°C で 30 時間処理の範囲では各区の LD₅₀ に対照区のそれと差異はみられず不活化されないことが示された。一般に昆虫のウイルス病は高温によって発病が抑制されるといわれ、この抑制現象は種種の面から論議されているが、桑葉に塗布されたウイルスは上記のように 38°C または 45°C で 30 時間処理しても不活化されず、有間ら (1969) とは異なる

第1表 蚕ウイルスの熱による不活化状態の比較

ウイルス 温度 処理時間	N P V						C P V						F V					
	100°C	90	80	70	60	50	100°C	90	80	70	60	50	100°C	90	80	70	60	50
	5秒	6.50	6.40	6.00	5.10			6.50	6.30	5.10	5.00			0.70	0.80	0.70		
10	6.50	6.40	6.10	5.65			6.50	6.40	6.20	5.30			0.71	0.90	0.80	0.20	2.80	
20	6.50	6.50	6.00	6.10			6.50	6.30	6.30	5.60			0.61	0.60	0.70	0.20	2.50	
30	6.50	6.50	6.30	6.00			6.50	6.50	6.20	5.50			0.60	0.80	0.60	0.90	2.02	
60	6.50	6.50	6.50	6.30			6.50	6.50	6.40	5.60			0.60	0.70	0.70	0.70	1.93	3.38
2分	6.50	6.50	6.50	6.40			6.50	6.50	6.40	5.60			0.50	0.70	0.80	0.60	1.80	2.70
5		6.50	6.50	6.50				6.50	6.50	6.00			0.50	0.50	0.90	0.90	1.90	2.30
10			6.50	6.50	5.20	4.30			6.50	6.20	5.00	4.00	0.50	0.50	0.70	0.90	1.60	2.90
20			6.50	6.50	5.40	4.20			6.50	6.50	5.00	4.00	0.50	0.80	0.70	1.70	3.00	
30			6.50	6.50	5.72	4.16			6.50	6.50	5.10	4.10	0.50	0.50	0.70	1.70	2.35	
1時間					6.06	4.40					5.20	4.30		0.50	0.50	1.40	2.75	
2					6.37	4.30					5.30	4.50		0.50	0.50	1.20	2.53	
4					6.39	4.80					5.40	4.70				0.90	2.46	
6					6.30	4.60					6.10	4.60				0.80	2.50	
8					6.39	5.17					6.20	4.80				0.50	2.60	
10					6.50	5.65					6.50	4.30				0.50	2.40	

NPV, CPV は $\log LD_{50}$ で 10^7 で死亡しなかった区は 6.50 で示した.

FV は $-\log LD_{50}$ で 10^{-7} で死亡しなかった区は 0.50 で示した.

黒線は死亡蚕のみられない処理区

第2表 桑葉に塗布したウイルスの熱処理による不活化

ウイルス 温度	NPV		CPV		FV	
	38°C	45°C	38°C	45°C	38°C	45°C
処理時間						
5 時間	6.50	6.70	5.20	4.70	5.00	5.20
10 //	6.70	6.60	4.50	4.90	5.00	5.40
15 //	6.30	6.50	4.70	4.40	5.10	4.90
20 //	5.80	6.80	5.30	4.20	4.90	5.20
25 //	6.00	6.70	4.10	4.60	5.10	5.50
30 //	6.50	7.00	4.50	4.40	5.00	5.00
対 照	6.60		4.40		5.00	

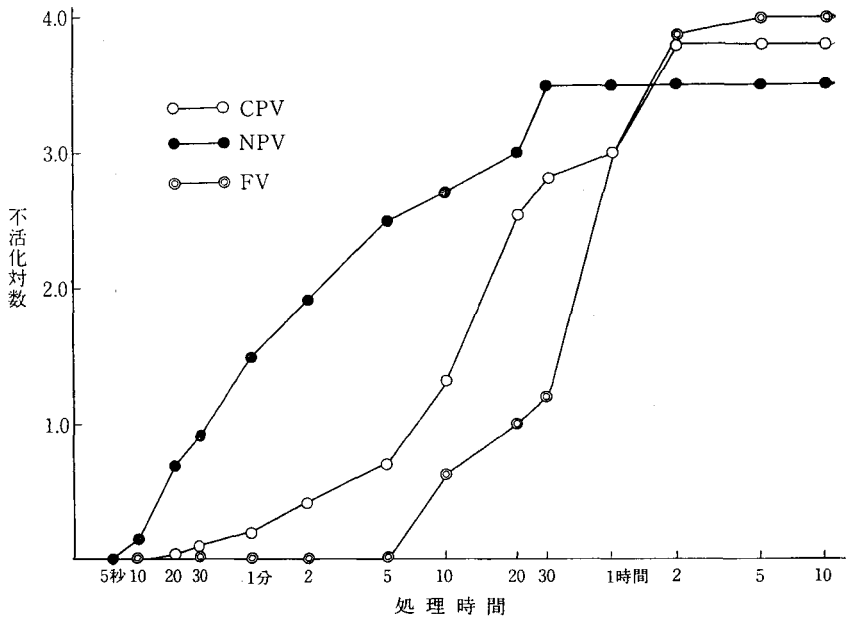
NPV, CPV は $\log LD_{50}$ FV は $-\log LD_{50}$

結果が得られた。この原因は明らかでないが、第1図～第3図で示されたように湿熱状態でも生体外のウイルスは60°C以上の加熱を行なわないと短時間での不活化は困難であることから、昆虫体内にあるウイルスより体外にとり出されたウイルスの方が高温により不活化され易く、したがって昆虫ウイルスの高温による発病抑制効果においてはこのような現象が関与しているものと考えられる。

2. 紫外線によるウイルスの不活化

3種のウイルスを紫外線照射し、不活化状況を調べた。1969年初秋期および晩秋蚕期に行なったが、いずれも似た傾向が示されたのでここには初秋蚕期の結果のみ図示する(第4図)。NPVがもっとも早く不活化され、CPVがこれにつぎ、FVがもっともおそかった。すなわち、NPVは1分間の照射によっても不活化対数1.5を示し、30分間の照射でほぼ完全に不活化された。CPVは10分間照射で約1.3の不活化対数を示し、2時間の照射によって完全に不活化された。FVは5秒～5分間の照射ではほとんど不活化されず、30分間で約1.2の不活化対数を示し、10時間の照射でほぼ完全に不活化された。

紫外線によるウイルスの不活化については紫外線の線量がもっとも重要と考えられ、また処理中に発生する熱も考慮されなければならない。現在までにNPVの紫外線による不活化については酒井(1934)は膿汁に2時間照射して病原性の低下はみとめられなとし、鮎沢(啓)(1953b)は照射時間と LD_{50} との間に直線的関係が存在することを報告している。CPVについて服部(1968)は紫外線による蚕座内における発病抑制効果をみとめている。また、小木曾ら(1968)は殺菌灯から1mおよび2mの下で照射した場合、およそ6時間で不活化されるとしている。FVについては鮎沢(干)ら(1954)



第4図 紫外線による蚕ウイルスの不活化(対数)

がおよそ8時間で、小木曾(1968)は6時間以上の照射で不活化されたとしている。これらの実験結果にみられるように、紫外線によるウイルスの不活化には供試ウイルスの性状、形態などのほか、紫外線の照射量、照射装置、照射距離など数多くの要因が関与するものとみられる。したがって著者らの結果と直接比較検討することは困難であるがNPVの不活化については鮎沢(啓)(1953 b)の、CPVについては小木曾ら(1968)の、FVについては鮎沢(千)(1964)および小木曾ら(1968)の成績と著者らの結果は大差のないものといえる。

3. 日光によるウイルス不活化

日光でウイルスを不活化する場合、処理時の気象条件が重要であると考えられる。そこで本実験では処理中の水温(シャレ中の水温)、平均気温、照度およびカロリーなどを測定した(第3表)。水温、気温は初秋期が高く、照度、カロリーは春蚕期が多かった。なお、春蚕期の処理5時間後における各測定値が低下しているのは処理を2日間に亘って行なったためである。このような条件下で曝射を行なった場合には、あとで述べるように蚕期別のウイルス不活化程度に大差はみとめられなかった。

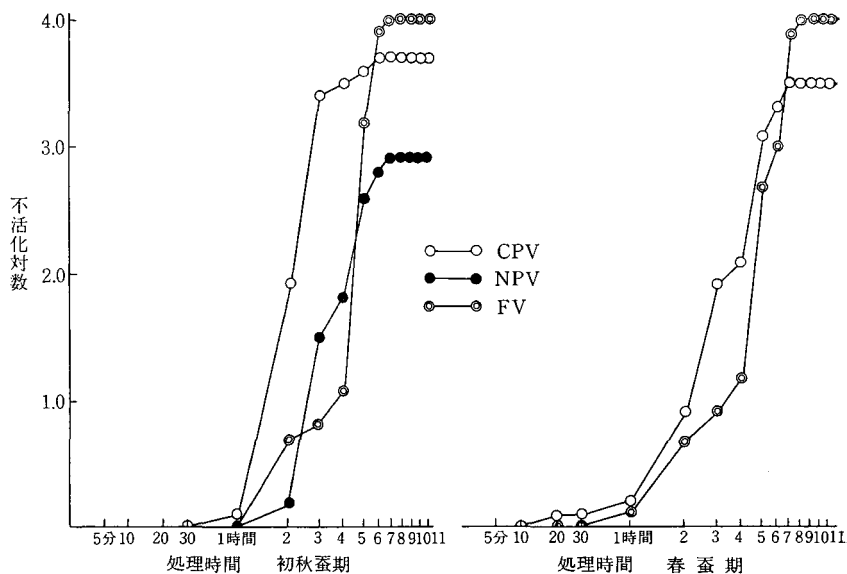
第5図に日光曝射によるウイルスの不活化状況を示す。図には春蚕期と初秋期の結果のみを示したが、各ウイルスとも5分~1時間ではほとんど不活化されなかった。しか

第3表 日光によるウイルス不活化時の気象条件

調査時期	項目 時間	水温℃		気温℃		照度 Lux		Cal/cm ²	
		最低	最高	最低	最高	最低	最高	最低	最高
春 蚕 期 5月10日～ 5月12日	1時間	18.0	37.0	26.0	29.0	100,000	107,000	44.0	44.8
	2	37.0	37.5	27.0	29.0	96,000	100,000	44.0	44.2
	3	33.0	35.0	26.0	27.0	66,000	80,000	42.0	43.5
	4	28.0	30.0	26.0	26.0	39,500	58,000	36.9	39.6
	5	17.0	26.0	21.0	26.0	27,000	52,500	32.9	35.8
	6	28.5	30.0	21.5	22.0	69,500	80,000	39.7	42.8
	7	30.0	32.0	23.5	25.0	97,000	106,000	43.7	44.3
	8	32.5	33.5	27.5	28.0	108,000	108,000	45.2	45.2
	9	33.0	34.0	28.0	28.5	82,000	90,000	43.7	44.1
	10	33.5	34.0	28.0	28.5	59,000	70,000	39.5	42.1
	11	29.0	31.0	27.0	27.0	31,500	46,000	34.1	36.8
初 秋 蚕 期 7月18日	1時間	22.0	42.0	31.5	34.0	44,000	78,000	33.1	36.2
	2	42.0	42.5	34.0	34.0	82,000	90,000	37.5	39.0
	3	41.5	42.5	34.0	36.0	96,000	128,000	40.1	40.6
	4	41.0	41.0	35.5	35.5	90,000	96,000	39.3	40.5
	5	39.5	40.0	35.0	35.5	70,000	76,000	36.2	37.6
	6	36.5	39.0	33.0	34.0	39,000	52,000	30.1	33.8
晩 秋 蚕 期 9月8日	1時間	19.5	28.0	27.5	29.0	70,000	82,000	36.2	38.2
	2	29.0	29.5	30.0	31.5	84,000	86,000	39.8	39.9
	3	31.0	31.5	31.0	33.0	78,000	80,000	36.5	37.9
	4	27.0	31.0	31.0	32.5	44,000	59,000	30.3	33.9
	5	26.0	26.5	29.0	29.5	24,000	31,000	27.4	28.7

し、2時間の曝射によってはいくぶん不活化が進行し、各ウイルスが完全に不活化されるには6～7時間の曝射を要するものとみられた。

日光による NPV の不活化について酒井 (1934) は 16～22 時間の曝射によって完全に不活化されるとしている。C ウイルスについては三谷 (1960) が約 10 時間、久保ら (1963) は日照が十分な場合には 8 時間、不十分な場合には 16 時間で不活化されるとしている。FV については山崎ら (1961) が約 7 時間で不活化されるとしている。このように日光によるウイルスの不活化に要する曝射時間はウイルスの種類、曝射方法などによって差異がみられる。しかし、これらの結果と著者らの成績を併せて考えると、日照が十分な場合に 3 種のウイルスは通常 7～8 時間で大部分不活化されるものとみられ



第5図 日光による蚕ウイルスの不活化(対数)

る。

摘 要

蚕の核および細胞質多角体病およびウイルス性軟化病の各ウイルスの熱、紫外線および日光による不活化を秒単位から長時間に亘って調査した。

1. 熱による不活化は温度および時間に左右され、70°C~100°C では短時間(秒単位)で不活化されたが、60°C では長時間を要した。50°C~38°C では30時間処理しても完全な不活化はみられなかった。多角体病ウイルスに比しウイルス性軟化病ウイルスは、やや不活化され難い傾向を示した。

2. 紫外線による不活化は核多角体病の多角体がもっとも早く不活化され、細胞質多角体病ウイルスがこれにつぎ、ウイルス性軟化病のウイルスがもっともおそかった。

3. 3種のウイルスは日光によってほぼ同様に不活化された。

引用文献

1. 鮎沢啓夫(1953 a) 家蚕膿病ウイルスの不活化について. 応動 17: 181~190.
2. 鮎沢啓夫(1953 b) 紫外線による膿病ウイルスの不活化性. 日蚕雑 24: 388~389.

3. 鮎沢啓夫・長楽勇 (1960) 細胞質多角体病の特異性の 2, 3 について. 日蚕雑 29: 363~369.
4. 鮎沢啓夫・古田要二・倉田啓而・佐藤文子 (1964) 蚕の伝染性軟化病ウイルスに関する研究. 蚕試報 19: 223~240.
5. 有間正三 (1969) 飼育中の高温処理による蚕病の予防に関する研究. 昭和 43 年度 農林水産業特別研究費補助金による研究報告
6. 鮎沢千尋・佐藤敏夫 (1964), 紫外線による家蚕軟化病ウイルスの不活化について 蚕糸研究. 49: 96~97.
7. 服部保 上島啓介 (1968) 紫外線の蚕体照射による中腸型多角体病の発病抑制 日蚕雑 37: 244.
8. 石森直人 (1935) 家蚕多角体病の病毒に関する研究. 植物および動物 7: 9~18.
9. 北島鍼雄 (1930) 膿病毒に対する紫外線照射試験. 中央蚕糸報 173: 1623~1924.
10. 小木曾正敏・岡稔・沖野英男 (1968) 殺菌灯照射が蚕児及び蚕病病原体に及ぼす影響. 日蚕東海支部講要 16: 26~27.
11. 久保正太郎・楠野正夫 (1963) 日光による家蚕中腸型多角体病ウイルスの不活化 日蚕関東支部講要. 14: 57~58.
12. 三谷賢三郎 (1960) 中腸型多角体病病原ウイルスの消毒に就て——家蚕の中腸型多角体病についての研究. 第 10 報——蚕糸界報 69: 814.
13. 宮島成寿・川瀬茂実 (1968) 細胞質多角体病ウイルスの耐熱性. 日蚕東海支部講要 6: 29
14. 酒井績 (1934) 家蚕膿病の抵抗力について (予報). 蚕糸学報 16: 32~41.
15. 渡辺静夫 (1936) 家蚕膿病毒の温熱冷却に対する抵抗試験. 蚕糸学報 18: 153~161.
16. 山崎寿・山田たけを (1963) おそろしい蚕の軟化病 (F) のふせぎ方. 長野蚕試 昭和 38 年 2 月 26~29.

Summary

Inactivation of the silkworm viruses by heat, UV, and sunlight

By

Yoshinobu ARATAKE, Tsuruo KAYAMURA and Hiroshi UENO

This paper dealt with an inactivation of the silkworm viruses treated with heat, UV, and sunlight. Nuclear and cytoplasmic-polyhedrosis viruses were used as a suspension of each polyhedron and infectious flacherie virus was used as a supernatant of homogenate of midgut in *Bombyx*-larva infected with the

virus. The results obtained summarized as follows:

1. Heat treatment: The virus wae inactivated rapidly at about 70°C and the inactivation was made in several seconds at 100°C. Nuclear polyhedra were more sensitive to heat than cytoplasmis polyhedra, while infectious flacherie virus was more resistant than polyhedral viruses.

2. UV-radiation: Although all of three kinds of viruses were inactivated by UV-radiation (Toshiba GR-15, 30 cm in distance) for 30 hours, infectious flacherie virus was more resistant to UV-radiation than polyhedral viruses.

3. Exposure to sunlight: The response of virus to inactivation by sunlight was almost similar in every virus used in the experiment.

(Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo)