

抵抗性ならびに感受性蚕品種における軟化病ウイルス増殖

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	井上, 元
巻/号	43巻4号
掲載ページ	p. 318-324
発行年月	1974年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



抵抗性ならびに感受性蚕品種における 軟化病ウイルスの増殖

井 上 元

東京都杉並区・蚕糸試験場
(1973年11月13日受理)

軟化病ウイルス (IFV) に対するカイコの抵抗力は蚕品種によって異なり、IFVを経口接種しても発病斃死し難い蚕品種の存在が報告されている(山崎ら, 1960; 宇治川・有賀, 1966; 船田, 1968; 田中, 1969; 市岡・丸山, 1970; 荒武, 1973)。同様の現象は既にカイコの細胞質多角体病ウイルス(CPV)について明らかにされており(WATANABE, 1964, 1966; ARUGA and WATANABE, 1964; 渡部, 1966), 経口感染に対する感受性の系統的差異は CPV の中腸管内侵入から宿主細胞侵入までの過程に働く種々の防禦機構の差異に基づくと考えられている(渡部, 1966)。

昆虫はウイルスの宿主細胞への感染と増殖に起因して発病するものであるから、カイコの IFV に対する抵抗性を論ずる場合、IFV の感染を阻止する経口感染抵抗性か、IFV が感染増殖しても発病斃死しない、いわゆる発病抵抗性かどうかをまず明らかにする必要がある。

一方、蛍光抗体法による観察結果から IFV のカイコ幼虫体内での主なる増殖組織は中腸皮膜組織の盃状細胞と断定され、さらに病蚕中腸皮膜組織の凍結切片標本に点在する“蛍光細胞”数の計測によって IFV 増殖の量的把握が可能となった(井上, 1972)。従って、本法を用いればカイコの IFV 抵抗性が経口感染抵抗性に基づくのか、あるいは発病抵抗性に基づくのかを明らかにすることができる。

著者はかかる目的で蛍光抗体法を用いて IFV 接種蚕 4 品種の中腸皮膜組織を病理組織学的に観察し、IFV 抵抗性について検討を加えたので、それらの結果の概要を報告する。

本文に入るに先だち、ご指導を賜った蚕糸試験

場病理部長小林勝利博士、同蚕ビールス病研究室長鮎沢千尋博士、保存蚕種の提供を賜った同育種部蚕品種保存研究室安村作郎室長に厚くお礼申し上げます。また、数々の有益なご助言を賜りかつ本稿のご校閲を賜った東京大学農学部助教授渡部 仁博士に感謝の意を表す。

材料と方法

ウイルス性軟化病蚕の 10%磨砕液を 12,000 rpm 15分間遠心分離し、その遠心上清のザイツフィルタ一濾過液を供試ウイルス液として使用した。

供試蚕としては、市岡・丸山(1970)の報告を参考に抵抗性蚕品種として黒子、大造を、感受性蚕品種として支7号、日124号を用いた。これら4品種のふ化幼虫にウイルス液を塗布した桑葉を5時間摂食させた。その後普通桑に移し1日2回給桑、25~27°Cの条件で飼育した。

4蚕品種における IFV 増殖様態の観察は凍結切片で行なった。すなわち、経時的に IFV 接種幼虫を常法に従って凍結し、約6 μ の縦断切片とし、フルオレッセンイソチオシアネート標識抗体で染色したときに中腸皮膜組織に点在する蛍光細胞の形態を観察しかつその数を計測した。なお、“封入体”は IFV 感染盃状細胞の退化物であるという報告(井上, 1972; 松井, 1973)に基づき、本研究では封入体(small light body)も1蛍光細胞として数えた。1頭の幼虫につきほぼ中央部で得た3枚の縦断切片にみられる蛍光細胞数の平均値を求め、IFV の感染増殖の程度を蛍光細胞数/6 μ 切片/幼虫として表示した。凍結切片の作成法および使用した蛍光抗体は前報(井上・鮎沢, 1971; 井上, 1972)と同様であ

るので記載は省略する。

結 果

1. IFV 接種幼虫の発育経過と累積死亡率

支7号, 日124号, 黒子および大造のふ化幼虫各25頭にウイルス液を5時間経口接種した場合, 各グループの幼虫の累積死亡率は第1図に示すとおりであった。IFV 接種幼虫は4蚕品種ともすべて2齢脱皮の時点までは IFV 非接種幼虫(対照区)と同じ発育経過を示した。

支7号は2齢2日目, すなわち IFV 接種後5日目に幼虫の発育不良および食桑停止が観察され, 6日目には60%が, 7日目には残り40%の幼虫がそれぞれ3齢に達することなく斃死した。日124号は6日目に幼虫の発育遅延が顕著であり12%の斃死蚕が出現した。7日目に残り88%の幼虫が斃死した。

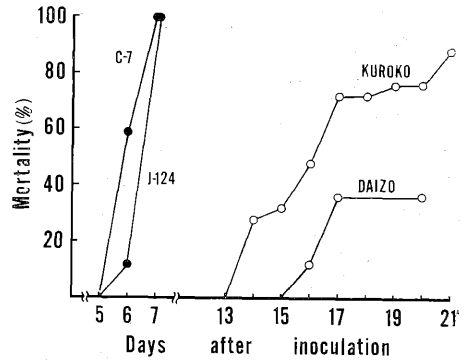


Fig. 1 Cumulative mortality curves of larvae infected with an infectious-flacherie virus (IFV). Each group of 25 larvae was inoculated for 5hr with IFV which was smeared on the mulberry leaves.

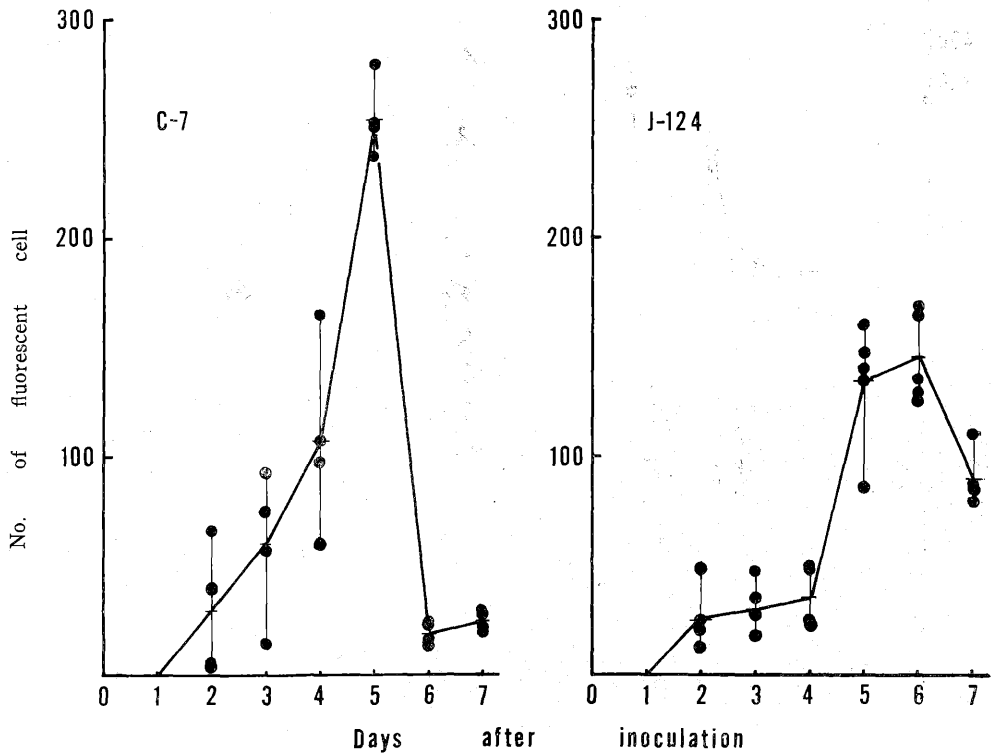


Fig. 2 Change in the number of fluorescent cells in the midgut of the larvae of susceptible strains. Number of "fluorescent cell" were counted as observed in the frozen sections of whole midgut (6 μ thick/larva) stained with fluorescen-isothiocyanate conjugated with anti-IFV γ -globulin.

黒子は接種後7日目には対照区に比較して蚕体が細く観察されたが發育遅延は認められなかった。14日目頃から幼虫の發育が不齊となり斃死幼虫も出現した。大造も黒子と類似の経過をたどった。黒子および大造の対照区では飼育開始後18日目(飼育開始当日を0日とする)に幼虫が管齎を開始したが、IFV接種区では1~3日遅れて一部の幼虫が管齎を開始し、最終的には黒子で12%、大造では64%の幼虫がそれぞれ管齎した。

2. 感受性蚕品種における螢光細胞数

感受性蚕品種における螢光細胞数を経時的に調査した結果を第2図に示した。

支7号の場合には接種後2日目に5~67個の明瞭な螢光細胞が観察され、その後はほぼ直線的に増加し外部病徴のあらわれた5日目には螢光細胞の総数は

238~281個に達した。しかし、実験区の60%が斃死した6日目および残り40%の幼虫が斃死した7日目では14~31個と螢光細胞はほとんど観察されなかった。発病した幼虫を解剖してみると中腸皮膜組織は軟化してピンセットでつまむと崩れやすい状態にあった。また、凍結切片標本にも部分的な中腸皮膜組織の崩壊像および細線縁が剥離している像が観察された。このようなことから発病末期の幼虫における螢光細胞数の減少は中腸皮膜組織の崩壊に伴う螢光細胞の脱落あるいは崩壊に主として基づくものと考えられた。螢光細胞は形態的に正常な盂状細胞と多少球状に変形した盂状細胞で構成され封入体は観察されなかった。

日124号の場合も支7号と同様に12~48個の明瞭な螢光細胞が接種後2日目に観察されたが、1齢期

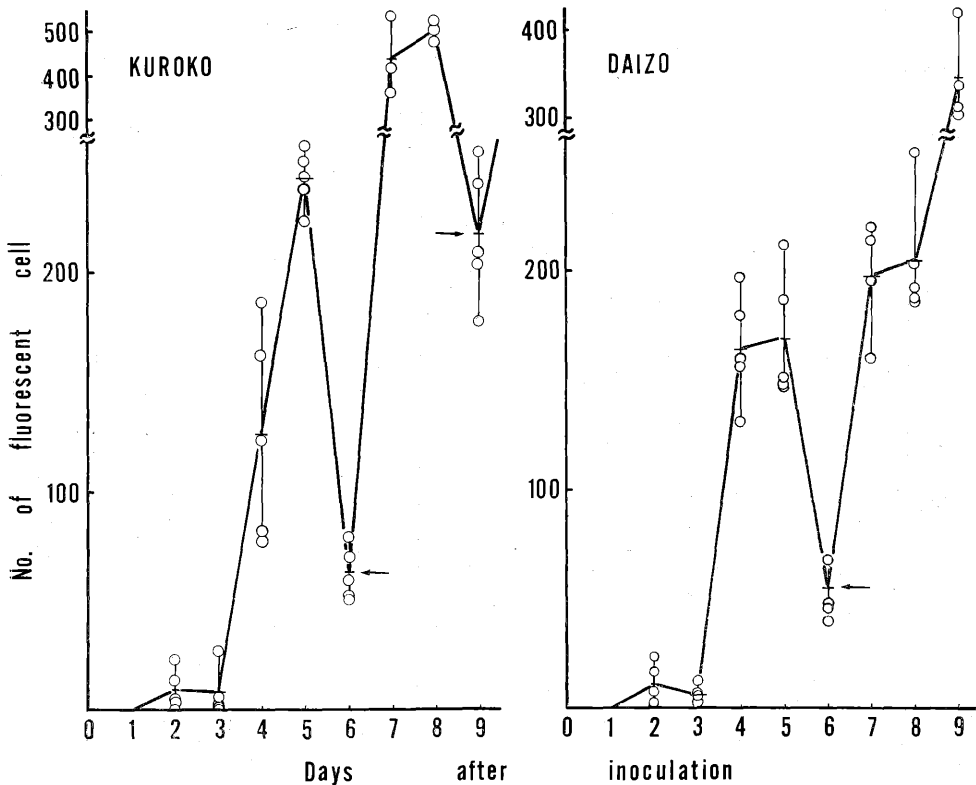


Fig. 3 Change in the number of fluorescent cells in the midgut of the larvae of resistant strains. In the 3rd and 4th instar larvae of Kuroko or the 3rd instar larvae of Daizo just after molting, the number of fluorescent cells was remarkably reduced (arrow), showing that the majority of them were small light bodies (see Fig. 4 b).

間中の蛍光細胞数の増加は著しくなく、顕著な増加は2齢脱皮以降にみられた。しかし、幼虫の発育遅延が観察される頃（接種後6日目）には蛍光細胞の増加は鈍り、斃死期の幼虫（接種後7日目）ではかえって蛍光細胞の総数は減少した。また、封入体は2齢脱皮幼虫で2~3個観察されるにすぎなかった。

3. 抵抗性蚕品種における蛍光細胞数

抵抗性蚕品種における蛍光細胞数を経時的に調査した結果を第3図に示した。

抵抗性蚕品種である黒子と大造では接種後2日目に1~24個の盃状細胞で明瞭な特異蛍光が観察された。その数は感受性蚕品種と比較した場合幾分少ないようにみうけられたが、特異蛍光の強さはほとんど同程度であり、また、蛍光細胞は中腸前部~中部で観察される頻度が高く感受性蚕品種の場合と同様であった。

黒子の場合には2齢脱皮期までは蛍光細胞数の増加はなかったが、2齢脱皮後は直線的に蛍光細胞数は増加し、接種後5日目には223~258個に達しその数は支7号のそれ（第2図）とほぼ同数であった。この場合観察される蛍光細胞はすべて形態的に正常な盃状細胞か多少球状に変形した盃状細胞であった（第4図a）。しかしながら、接種後6日目すなわち3齢脱皮後時間があまり経過していない幼虫（以下脱皮直後の幼虫と表現する）では51~79個の蛍光細胞数しか観察されなかった。しかも、この時点の蛍光細胞はその95~100%が封入体であった（第

4図b）。封入体は中腸皮膜組織に点散的に分布し細線縁の付近に位置するものが多く、細線縁中にも観察された。このように、接種後6日目にはほとんど封入体しか観察されず接種後5日目の感染像と様相を全く異にしていたが、接種後7日目になると再び蛍光細胞数は激増しその感染像は封入体が少数観察されることを別にすれば接種後5日目の様相に酷似していた。この3齢脱皮直後の幼虫（接種後6日目）にみられた蛍光細胞数の激減現象は再び4齢脱皮直後の幼虫（接種後9日目）において観察された。すなわち、接種後8日目には475~523個であった蛍光細胞数が接種後9日目には177~255個に減少し、しかもその97~100%は封入体で構成されていた。これは接種後6日目の様相と全く同じであった。3齢および4齢脱皮直後の幼虫の中腸皮膜組織は堅固で崩壊せず、さらに蛍光細胞の大多数は封入体である事実から、黒子でみられた蛍光細胞数の減少とは全く異質なものと考えられた。

大造の場合も2齢脱皮期までは蛍光細胞数は少なかった。2齢脱皮幼虫で封入体が数個観察された。2齢脱皮以降はIFVの増殖は顕著で2眠前（接種後5日目）には147~212個の蛍光細胞が観察された。しかしながら、3齢脱皮直後の幼虫（接種後6日目）では40~68個の蛍光細胞しか観察されず、しかもその95%以上は封入体であった。脱皮後1日を経た幼虫（接種後7日目）では蛍光細胞数は160~220個に激増し、その様相は2眠前の様相と類似し

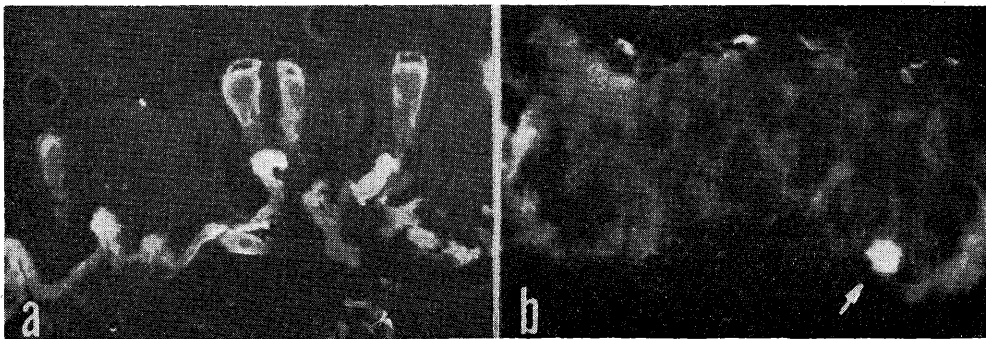


Fig. 4 Frozen sections of the larvae of Kuroko, a resistant strain, stained with fluorescen-isothiocyanate conjugated with anti-IFV γ -globulin.

a: A diseased midgut on day 5 after IFV inoculation. Some goblet cells showing specific fluorescence are recognized, but no small light body is observed. b: A diseased midgut on day 6 after IFV inoculation. Note small light body dotted in the midgut just after the 2nd molt.

螢光細胞の大多数は形態的に正常な盃状細胞であった。なお、4 齡脱皮直後の幼虫（接種後 8 日目）では螢光細胞数の減少はみられなかったが、増加も認められなかった。

4. 脱皮期における螢光細胞数

黒子および大造の脱皮幼虫における螢光細胞数の激減と多数の封入体の存在ならびに脱皮後 1 日を経過した幼虫での対照的な螢光細胞数の激増は、脱皮期を中心として感染幼虫の中腸皮膜組織で「IFV 感染盃状細胞の退化・縮小-脱落-新しい盃状細胞の形成-新しい盃状細胞での IFV の増殖」の過程が急速に進行していることを示唆している。そこで、脱皮期における螢光細胞数の推移を調査した。

まず、黒子のふ化幼虫にウイルス液を 5 時間経口接種し 3 眠直前、眠中および 4 齡脱皮直後の幼虫における螢光細胞数の調査を行なった。それらの結果を第 5 図に示した。催眠期（接種後 192 時間目）では約 500 個であった螢光細胞数が、頭部新外皮が識

別される眠中（接種後 204 時間目）では 195~323 個に減少した。この時点では中腸前部で封入体が多数観察された。4 齡脱皮直後の幼虫（接種後 216 時間目）では螢光細胞数はさらに減少するとともに封入体がほとんどであった。この結果から、脱皮期に感染盃状細胞の退化・縮小および脱落が急速に進行していることが明らかとなった。

つぎに、脱皮期における螢光細胞数の激減現象が感受性蚕品種で起るか否かを調査した。

支 7 号の 1 齡 3 日目の幼虫、すなわち体表が茶褐色を帯びた時期にウイルス液を 5 時間経口接種した。その後 3 齡脱皮直後まで観察し得られた結果を第 6 図に示した。螢光細胞数は接種後 72 時間目では 45~61 個、食桑行動を停止して 2 眠に入った直後（接種後 88 時間目）では 162~224 個であった。頭部新外皮の形成が認められる眠中（接種後 96 時間目）では 208~243 個の、3 齡脱皮直後の幼虫（接種後 108 時間目）では 146~212 個の螢光細胞が観察さ

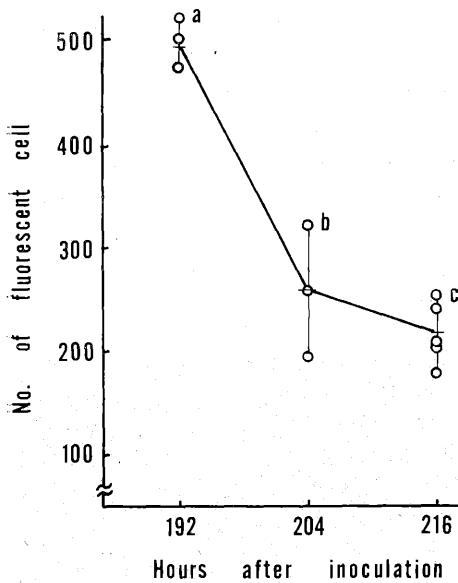


Fig. 5 Change in the number of fluorescent cells during the 3rd molting stage of the diseased larvae of Kuroko, a resistant strain.

IFV was inoculated perorally to the newly hatched larvae. a: Premolting stage, b: Midstage of the 3rd molt, C: The 4th instar just after the 3rd molt.

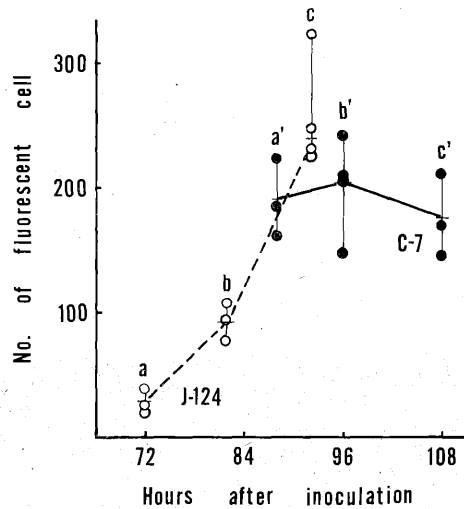


Fig. 6 Change in the number of fluorescent cells during the molting stages of the diseased larvae of susceptible strains.

IFV was inoculated perorally to the 3rd instar larvae just after molting of J-124 and to the 1st instar larvae of 3-day-old of C-7, a, a': Premolting stage, b: Midstage of the 3rd molt, b': Midstage of the 2nd molt, c: The 4th instar just after the 3rd molt, c': The 3rd instar just after the 2nd molt.

れ、脱皮期では螢光細胞の顕著な減少はみられなかった。眠中蚕および3齡脱皮直後の幼虫における封入体は、個体によって観察される場合と観察されない場合とがあり、前者の場合には中腸前部に多く存在した。

同様に、日124号の3齡脱皮幼虫にウイルス液を5時間接種したのち螢光細胞数の推移を調査し、その結果を第6図に示した。螢光細胞数は接種後72時間目では21~39個、眠中（接種後82時間目）では78~107個、4齡脱皮直後の幼虫（接種後91時間目）では225~324個であり、脱皮期に増加した。封入体は一部の眠中蚕ならびに4齡脱皮直後の幼虫で少数観察された。

考 察

本研究において、抵抗性蚕品種における螢光細胞数は感受性蚕品種と比較した場合、感染初期の段階では幾分少ない傾向がみられたが、2齡脱皮以降はほぼ同数でIFVの顕著な増殖が観察された。この結果は大造と日124号におけるIFVの増殖曲線は類似しているとする田中（1968）の報告に符合する。さらに、抵抗性と感受性の蚕品種における螢光細胞の出現時期とその螢光強度にも相異は認められず、カイコのIFVに対する感染防禦機構の系統的差異はそれほど大きいものとは思われない。このようなことから、一般にいわれるカイコのIFVに対する抵抗性はIFVが宿主細胞に感染し増殖しても宿主昆虫が発病斃死に至らない、いわゆる発病抵抗性を意味するものと考えられる。

抵抗性蚕品種黒子および大造における螢光細胞数は感受性蚕品種のそれとほぼ同数であったが、脱皮直後の幼虫で螢光細胞数が少なく、とくに黒子の3齡および4齡脱皮直後の幼虫、大造の3齡脱皮直後の幼虫では、ともに螢光細胞数の顕著な減少がみられた。しかもその時点で観察される螢光細胞の95~100%は封入体であった。また、脱皮後1日を経過した場合には再び螢光細胞数は激増し、その時点での螢光細胞は封入体は少なく形態的に正常な盃状細胞が大多数であることから、脱皮期を中心に中腸粘膜組織で「IFV感染盃状細胞の退化・縮小—脱落—新しい盃状細胞の形成—新しい盃状細胞でのIFVの増殖」が急速に進行していることが暗示された。幼虫の中腸粘膜組織における細胞の更新は、幼虫のい

ずれの時期でも行なわれているが、とくに脱皮期に旺盛であることが指摘されている（辻田，1943）ように、IFV感染盃状細胞の退化、脱落がこの時期に促進されている可能性も考えられる。

このような現象によって、一時的ではあるが感染幼虫組織内のIFVが排除され、また細胞の更新によって感染幼虫における盃状細胞の機能が一時的にもせよ補償されるならば、宿主幼虫に対するIFV感染の致死的影響を弱めることができるであろう。

本研究の範囲内では、抵抗性蚕品種で観察された螢光細胞数の激減現象は感受性蚕品種の支7号および日124号では観察されなかった。従って、IFV感染後における中腸細胞更新の難易がカイコのIFVに対する発病抵抗性の機構に密接な関連をもつものと考えられる。

摘 要

カイコの軟化病ウイルス(IFV)に対する抵抗性が経口感染抵抗性に基づくのか、あるいは発病抵抗性に基づくのかを明らかにする目的で、抵抗性蚕品種（黒子と大造）におけるIFV増殖を螢光抗体法によって調査し、感受性蚕品種（支7号と日124号）のそれと比較した。得られた知見はつぎのとおりである。

1. 抵抗性蚕品種における螢光細胞の出現時期と螢光の強さは感受性蚕品種と同様で、またIFV増殖も顕著であり、カイコのIFVに対する抵抗性は発病抵抗性に基づくと考えられた。
2. 抵抗性蚕品種では感受性蚕品種の場合と異なり、脱皮期を中心に螢光細胞数の激減激増がみられ、激減期の螢光細胞は95%以上が封入体で、激増期では大多数が形態的に正常な盃状細胞であった。このことは脱皮期を中心に「IFV感染盃状細胞の退化・縮小—脱落—新しい盃状細胞の形成—新しい盃状細胞でのIFVの増殖」の過程が進行していることを示唆し、この中腸細胞更新の難易が発病抵抗性の機構に密接な関連をもつものと思われた。

文 献

- 荒武義信(1973)：蚕系研究，**86**，48-57。
 ARUGA, H. and H. WATANABE (1964)：J. Insect Pathol., **6**，387-394。
 船田敏夫(1968)：日蚕雑，**37**，281-287。

- 市岡正道・丸山長治(1970) : 蚕糸研究, **74**, 37-43.
 井上元(1972) : 日蚕雑, **41**, 437-444.
 井上元・鮎沢千尋(1971) : 蚕試報, **25**, 21-40.
 松井正春(1973) : 日蚕雑, **42**, 11-16.
 田中茂男(1969) : 日蚕雑, **38**, 21-27.
 辻田光雄(1943) : 蚕試報, **11**, 211-293.
 宇治川喜平・有賀久雄(1966) : 日蚕雑, **35**, 23-26.
- WATANABE, H. (1964) : J. Sericult. Sci. Japan, **33**, 286-292.
 WATANABE, H. (1966) : Appl. Ent. Zool., **1**, 139-144.
 渡部仁(1966) : 日蚕雑, **35**, 411-417.
 山崎寿・酒井栄一・下平睦夫・山田たけを
 (1960) : 長野蚕試報, **61**, 1-28.

Summary

Multiplication of an infectious-flacherie virus in the resistant and susceptible strains of the silkworm, *Bombyx mori*

By

Hajime INOUE

The multiplication of an infectious-flacherie virus (IFV) in the susceptible and the resistant strains of the silkworm, *Bombyx mori*, was investigated by means of the fluorescent antibody method, which demonstrated the presence of IFV in the frozen sections of diseased midguts.

In the peroral inoculation test of IFV to newly hatched larvae, all the larvae of susceptible strains died by the 3rd instar, whereas most of the larvae of resistant strains were alive and pupated. However, the fluorescent antibody tests revealed that IFV multiplied well in the same degree both in larvae of the susceptible and resistant strains. In the susceptible larvae the number of cells with fluorescence increased just prior to death, while in the resistant larvae which were alive to pupate, the number of fluorescent cells also increased, but were much reduced temporarily just after every molting. The temporal reduction of the number of fluorescent cells during the IFV infection in the resistant larvae indicated that the infected goblet cells were discharged into the gut lumen at every molting and the regenerative cells located in *nidi* of the midgut developed into new goblet cells for the physiological repair. Therefore, the regenerative ability of the midgut cells might be mainly concerned with the resistance of the silkworm larvae to the lethal infection of IFV.

(The Sericultural Experiment Station, Wada, Suginamiku-ku, Tokyo)