

## 濃核病ウイルス(山梨株)の不活化について

誌名	山梨県蚕業試験場研究要報
ISSN	0388953X
著者	関, 宏夫
巻/号	26号
掲載ページ	p. 35-39
発行年月	1987年3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



## 濃核病ウイルス（山梨株）の不活化について

関 宏 夫

数種の理化学的処理による濃核病ウイルス（山梨株）〔Y-DNV〕の不活化については既に報告した（SEKI、1986）<sup>7)</sup>が、今回、消化液、凍結融解による処理、および自然不活化について検討したのでその結果を報告する。

### 材 料 お よ び 方 法

#### 1、消化液による処理

桑葉育をした5齢5日目のカイコ（30～50頭）を1日絶食し、電気ショックにより氷冷試験管に吐液させて採取した消化液を2,500 rpm、20分間遠心し、その上清を使用した。

一方、凍結保存したY-DNV罹病蚕の20%磨砕液の遠心上清（12,000 rpm、30分）をウイルス液とし、消化液と等量混合して室温で1時間処理した。処理液を10倍段階希釈（ $10^{-4}$ ～ $10^{-7}$ ）して人工飼料片（約直径4 cm×厚さ2 mm）に滴下し、風乾後、2齢起蚕（人工飼料育）に24時間摂食させた。その後、普通飼料で6日間飼育して個別別に寒天ゲル拡散法により感染の有無を調査し、更にBehrens-Kärber法により感染価（ $-\log IC_{50}$ ）を求め比較検討した。

なお、消化液を採取したカイコの品種は、錦秋×鐘和、芙・蓉×東・海、秋光×竜白、郡秋×秀月、日137号×支146号、日124号および支124号である。

#### 2、凍結融解処理

前述と同様に調製したウイルス液を小試験管に1 mlあて分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに入れ凍結した（約16時間）が、融解は室温（ $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）に約8時間、放置することにより行った。

このような凍結融解を2～20回行い、処理したウイルス液を10倍段階希釈して前述同様生物検定して感染価を求めた。

#### 3、自然不活化

供試ウイルスは、1)罹病蚕の10%磨砕液を遠心（12,000 rpm、30分）した上清および 2)罹病蚕の排出糞を用いた。1)については、その1 mlを小型シャーレ（径9 cm）に分注、風乾した。2)については、3 gの糞をそのままシャーレに入れて用いた。

試料の設置条件は、実験室内（北側）および鉄骨蚕舎（側壁なし、土間）とし、1985年6月～1986年5月まで放置して適時サンプリングした。一方、直射日光による不活化効果をみるため試料1)について、直射日光下で10～180分暴露した。このようにして得た試料1)については9 mlの滅菌水で再懸濁して、2)については10%乳剤の遠心（3,000 rpm、20分）上清をそれぞれ10倍段階希釈して前述同様生物検定を行い、感染価を求めた。

## 結 果 お よ び 考 察

## 1、消化液による不活化

消化液には各種の消化酵素を含むことは当然であるが、抗菌作用（内海・西村、1982<sup>10)</sup>、<sup>4)</sup> 1977）や抗ウイルス作用（林屋ら、1971<sup>3)</sup>）などのあることが知られている。特に、核多角体病ウイルス（NPV）に対しては、かなり強い抗ウイルス作用が認められているが、品種により作用の強弱のあること（荒武・上野、1973<sup>1)</sup>）が知られている。

Y-DNV に対する消化液の影響を第 1 表に示した。

対照区の感染価が 5.80 に対して 5 種の交雑種および 2 種の原種の消化液処理は、いずれも 5.80～6.10 の範囲にあり殆んど差がみられず不活化効果はないものと推察された。清水・原(1977)<sup>8)</sup>は、濃核病ウイルス（伊那株）について同様の試験を行い、不活化作用のないことを報告していることから、消化液は濃核病ウイルスの活性に影響しないものと思われる。

ところで、日 124 号は Y-DNV に対してきわめて高い抵抗性を示すことが明らかになっている（関、1985<sup>6)</sup>）が、その発現機構に消化液の関与のないことが前述の結果から示唆される。

第 1 表 Y-DNV に対する消化液の影響

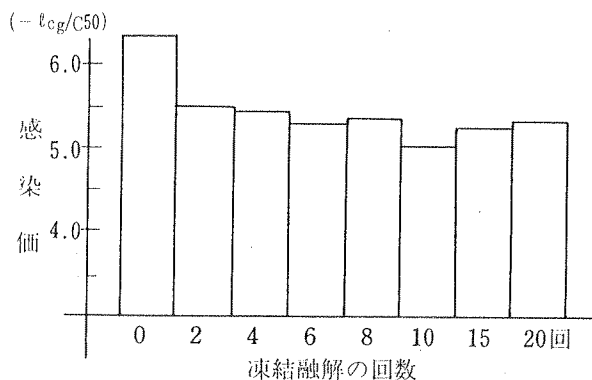
供試蚕品種	感染価 (-log IC 50)
錦 秋×鐘 和	6.10
芙 蓉×東 海	5.80
秋 光×竜 白	6.10
郡 秋×秀 月	6.50
日 137 号×支 146 号	5.90
日 124 号	6.00
支 124 号	5.80
対 照 (蒸留水)	5.80

## 2、凍結融解による不活化

各種病原菌の保存法のひとつとして凍結保存が広く行われているが、菌種によっては不適当な場合もあり、活性の低下する例も知られている。

第 1 図は、凍結融解の回数による Y-DNV 活性への影響を示したものであるが、対照の感染価 (-log IC50) が 6.25 に対して凍結融解 2 回以上では 5.50～5.00 の範囲にあり回数による差はみられていない。しかし、若干の低下 (0.75～1.25) がみられているが、これは凍結融解処理の際に観察される試料の凝集が原因と考えられ、直接ウイルス活性へ影響したものではないものと推察される。

従って、凍結融解によるウイルス活性への影響はほとんどないものと思われる。



第 1 図 Y-DNV における凍結融解の影響

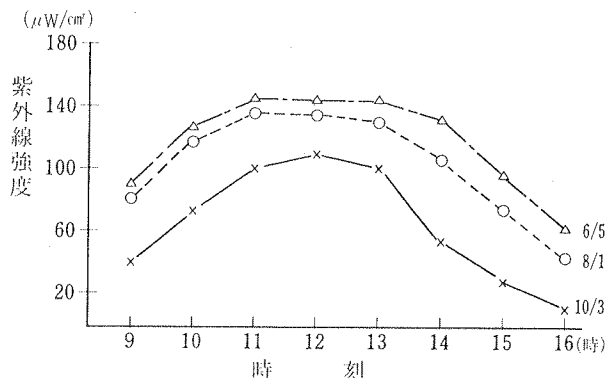
### 3、自然不活化

自然条件下でのウイルス活性の推移を明らかにしておくことは、効果的な防疫管理を行う上で大切であることから各種の蚕ウイルスについて多くの研究がある（荒武ら、1972<sup>2)</sup>、清水・小森、1981<sup>9)</sup>、など）。それによれば、多角体を形成する NPV、細胞質多角体病ウイルス（CPV）は長期間活性を維持しているが、多角体を形成しない伝染性軟化病ウイルス（IFV）および濃核病ウイルス（伊那株）〔I-DNV〕は比較的短期間に活性が低下する。しかし、IFVでも条件によってはかなり長い間、活性を維持することが明らかになっている（佐藤、1967<sup>5)</sup>）。このように、ウイルス活性はウイルスの種類によって本質的な差のあることはもちろんであるが、自然条件下ではウイルスの置かれている条件によってかなり左右されるものと思われる。

ところで、自然条件下でウイルスに影響を与えるものとして温度、湿度および日光（主として紫外線）などがあるが、影響の大きい日光について検討した。

まず、屋外における紫外線強度を測定（紫外線強度計 UVR-254、測定中心波長 250 nm、東京光学機械 K.K 製）したところ第 2、

3 図のような結果が得られた。第 2 図は一日の紫外線強度変化であるが、ゆるやかな山型を示し、1 日では午前 11 時～午後 1 時頃まではもっとも強く、100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ （10 月 3 日）～140 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ （6 月 5 日）とほぼ一定の値を示したが午前 11 時前および午後 1 時以降はゆるやかに低下した。



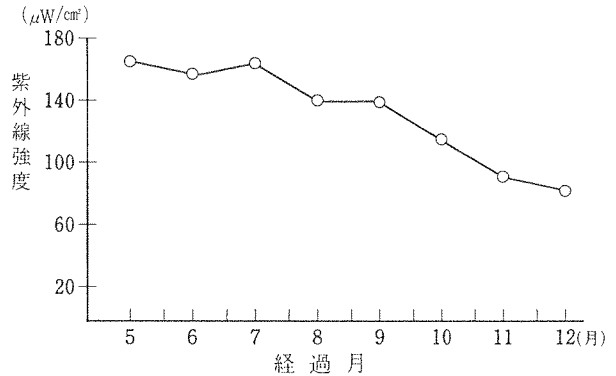
第 2 図 日中の紫外線強度 (1985)

また、紫外線強度（最大値）は、季節によって変化し、5～12月についてみると、5月が $160\mu\text{W}/\text{cm}^2$ で最も高い値を示すが次第に減少し12月が最も低く（ $80\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）なった。なお、殺菌燈（15W、東芝製）の紫外線強度は30cm直下で約 $360\mu\text{W}/\text{cm}^2$ あったことから、直射日光下で最も強い時は殺菌燈のほぼ半分程度の強度があることになる。

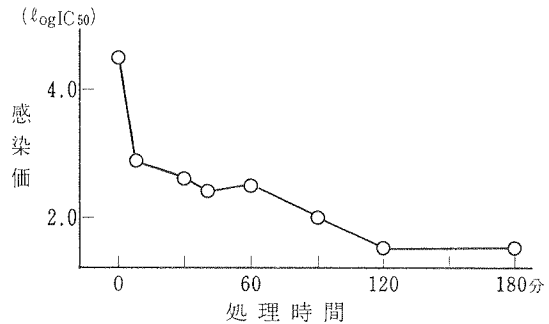
次に、粗製ウイルスの直射日光下における不活化をみたのが第4図である。これで明らかなように、かなりの不活化力があり10～40分暴露で急激にウイルス活性が低下し、その後漸減して120分程でほぼ完全に不活化された。この結果と殺菌燈による不活化傾向（SEKI、1986<sup>7)</sup>を比較すると、直射日光では不活化するまで殺菌燈の約2倍の時間を要していることになるが日光の紫外線強度が殺菌燈の半分程度であることから妥当な結果が得られているものと考えられる。

第5、6図は、日光が直接影響しない鉄骨蚕舎および実験室内でのウイルスの不活化傾向をみたものである。粗精ウイルスの場合（第5図）、設置場所による相異はみられずほぼ同様の不活化傾向を示し、設置後2ヶ月まで急速に活性を失い、6ヶ月程度でほぼ不活化された。一方、蚕糞（ウイルスを含む）の場合には（第6図）、粗精ウイルスよりも不活化傾向がゆるやかで、2ヶ月までは比較的速やかに活性が低下したが、その後、ゆるやかとなり鉄骨蚕舎では6ヶ月で活性を失ったが、実験室内では12ヶ月後においても活性が若干残っていた。

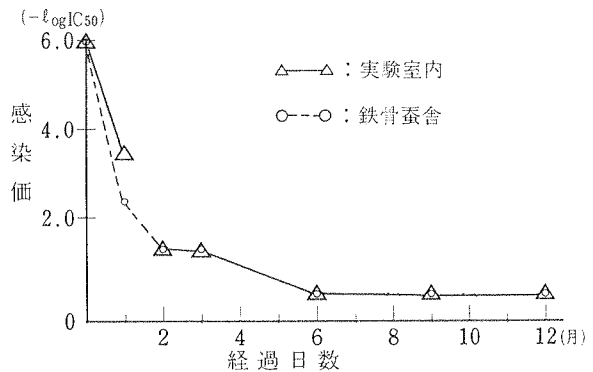
以上のように、ウイルスの存在状態（遊離のウイルスあるいは病死体、糞中のウイルスなど）および存在場所な



第3図 月別紫外線強度(1985)

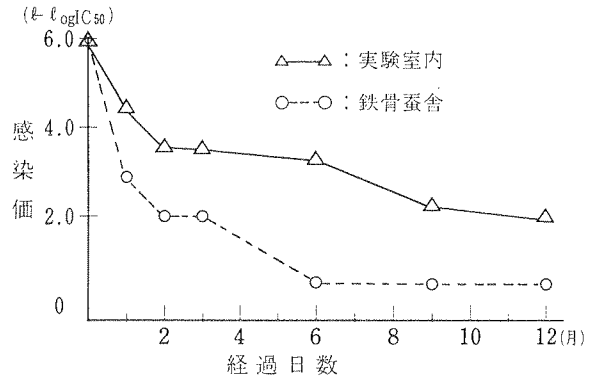


第4図 日光によるDNVの不活化



第5図 精製DNVの自然不活化

どによってウイルス活性の持続期間はかなり異なることが明らかとなった。このことは、本病の発生農家において産生されたウイルスが適当な条件下に残存すれば十分に翌年まで活性を持続することが可能であり翌年の感染源となり得ることを示しているものと考えられる。



第6図 DNVの自然不活化(蚕糞)

### 摘 要

- 1、7種の蚕品種の消化液について、Y-DNVに対する影響を検討したがウイルス活性への影響はみられなかった。
- 2、Y-DNVの活性は凍結融解の反復(最高20回)によっても影響されなかった。
- 3、Y-DNVは直射日光により比較的速やか(120分)に不活化された。なお、直射日光の紫外線強度は一日の時間帯、季節によって変化するが、一日では午前11時～午後1時、年間では5月頃が最も強くなった。

一方、実験室内および鉄骨蚕舎に自然放置したY-DNVは、その存在状態(遊離ウイルスか蚕糞中か)によって活性程度が異なり遊離ウイルスで2ヶ月で活性を失ったが、糞中のものは1年後においても活性が残っていた。

以上のことから、ウイルスが適当な条件下で残存すれば十分に翌年の感染源になりうるものと推察した。

### 文 献

- 1) 荒武義信・上野 博(1973)：日蚕雑、42、279 - 284
- 2) 荒武義信・柏村鶴雄・上野 博(1972)：蚕糸研究、85、141 - 151
- 3) 林屋慶三・松原藤好・西田 順・川本文彦(1971)：京工維大維報、6、87 - 100
- 4) 飯塚敏彦(1977)：東北蚕糸(2) 28
- 5) 佐藤敏夫(1967)：蚕糸研究、64、47 - 51
- 6) 関 宏夫(1985)：日蚕雑、54、445 - 448
- 7) SEKI, H. (1986)：Appl. Ent. Zool. 21, 515 - 518
- 8) 清水孝夫・原真佐夫(1977)：長野蚕試要報、13、73 - 77
- 9) 清水孝夫・小森三郎(1981)：長野蚕試要報、17、125 - 130
- 10) 内海 進・西村利典(1982)：日蚕雑、51、84 - 92