

## 蚕糞からの細胞質多角体病ウイルスの精製

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	福原, 敏彦 緑川, 真理 伊藤, 広
巻/号	50巻4号
掲載ページ	p. 301-305
発行年月	1981年8月

## 蚕糞からの細胞質多角体病ウイルスの精製

福原敏彦・緑川真理・伊藤 広

府中市幸町東京農工大農学部 (〒 183)

(1981年3月3日受理)

細胞質多角体病蚕は糞中にウイルスを排出するから、蚕座内の糞を集めてウイルスの有無を検定することにより、蚕座内の蚕児集団における病気の発生状況を推定できると考えられる。

ウイルスの検出や定量には、生物検定法がよく用いられるが、この方法では供試蚕児の生理状態や環境条件により感染力価が左右されるし、検出結果がわかるまでに時間がかかる。迅速で確実なウイルスの検出には血清学的手法を用いることが望ましい。最近開発されたラジオイムノアッセイや酵素結合抗体法 (ELISA) は検出感度の点でも生物検定法に比べて遜色がない。これらの血清学的手法を適用するには検定資料をある程度精製することが必要となる。

ウイルスの精製には超遠心分離法が普通用いられているが、操作が複雑な上、大型の設備を必要とするため、これを普及技術としてとり入れることは容易ではない。そこで HUKUHARA (1975, 1977) が土壌中の細胞質多角体の精製に用いた水性2層分配法を応用して、糞からのウイルスの精製を試みた。水性2層分配法は2種の水溶性ポリマーを混合した場合に上下2層に分離する現象を利用して、分離したい顆粒と夾雑物が異なる層に含まれるようにする分離精製法である (アルパートソン, 1972)。その顆粒と夾雑物が結合状態にある場合には、2層分配法を適用する前にこの結合を切る処理を行って、顆粒を遊離状態にすることが必要となる。このような方法を用いて糞中ウイルスの精製に成功したので、

\* 本研究は文部省科学研究費総合研究 (代表者 波部仁、課題番号436029) によって行なった。

その結果について報告する。

### 材料と方法

供試蚕品種は錦秋×鐘和と日140号×支140号で、伊藤ら (1968) の組成 (S5, NO 10) の人工飼料で飼育した。供試ウイルスは立方形の多角体を形成する細胞質多角体病ウイルスである。以下本文中ではウイルスと略記する。

糞は以下の方法で2つの蚕児集団から集めた。まず人工飼料に高濃度の多角体浮遊液を滴下して、これを約200頭の5齢起蚕に給与し、飼料をかえずに3日間 (1回目) あるいは2日間 (2回目) 飼育して、この間の排出糞を採集した。その後はウイルスを含まない飼料に切り替えて飼育を続け、毎日1回糞を採集した。5齢末期の発病率は1回目は80%で2回目は68%であった。採集した糞はウイルスの精製に用いるまで冷凍庫に保存した。

精製法は、脱着、分離、濃縮の3段階に分けられる。〔第1段階〕糞1gに脱着剤10mlを加え、乳鉢で磨砕したものを25ml用のメスシリンダーに移し、パラフィルムで密封してマイクロプレート専用振盪器 (三光純薬) で30分間振盪した。〔第2段階〕メスシリンダーに20% (w/w) デキストラン5mlと40% (w/w) ポリエチレングリコール6000 (純正化学) 2mlと蒸留水適当量を加えて総量を18.5mlとして良く振盪した後、冷蔵庫内で1晩静置した。この水性2層分配系は数時間で上下2層に分離した。下層は糞組成成分を多く含み、濃緑色を呈し、上層は褐色半透明であった。なお、供試したデキストランの製造元は名糖産業 (Lot No. VH-4965, 粘

度 0.694 dl/g) と BDH Chemicals (Grade A, 分子量 20-27.5 万), 和光純薬 (分子量 20-30 万) の 3 社であった。〔第 3 段階〕第 2 段階で得られた上層液にその 1/100 量の 20% (w/w) 硫酸デキストラン (Pharmacia, 分子量 50 万) と 1/10 量の 3 M NaCl を加えて良く振盪した後, 冷蔵庫中で 1 晩静置して 2 層に分離させた。上層はほぼ透明で, 下層は緑色を呈した。

精製分画に含まれるウイルスを以下の方法で生物検定した。すなわちシャーレ (9 cm 径) 内に短冊形に切った人工飼料 (2.5 cm × 4.0 cm × 0.1 cm) をおき, その表面に検定試料を 0.2 ml 滴下した。室温で数時間風乾させた後, 蠶蚕 20 頭を飼料上におき, 恒温条件下で 48 時間摂食させた。つぎに普通の人工飼料に切り替えて 2 ~ 3 日間飼育を行った後, すべての蚕を解剖し, 中腸を鏡検して診断を行った。飼育温度は 26 ~ 28°C とした。

## 結 果

細胞質多角体を添食した蚕児集団の糞を 3 種のナトリウム塩の水溶液中で磨砕し, それぞれの磨砕液をデキストランとポリエチレングリコールから成る 2 層分配系に加えて上下 2 層の分画を得た。各分画

の生物検定を行なったところ, 下層の感染性はいずれの処理区でも比較的高かった (第 1 表)。下層には糞粗成分の大部分が含まれるため, これに吸着したウイルスが検出された結果と考えられる。一方上層については, 蒸留水やフッ化ナトリウムを磨砕に用いた場合には, 感染性が検出されなかったが, ED TA ナトリウム塩を用いた場合には, わずかに感染性を示し, ピロリン酸ナトリウムを用いた場合にはかなりの感染性が認められた。多角体濃度もピロリン酸ナトリウムを用いた場合に高くなった。この結果から, ピロリン酸ナトリウムには糞粗成分からウイルスを脱着する作用があり, 遊離状態になったウイルスは上層に集まると考えられる。

つぎに 3 種のデキストランを用いて糞磨砕液の水溶性 2 層分配 (第 2 段階) を行ったところ, 上層に含まれる多角体数は  $4.3 \sim 4.9 \times 10^6$  個で, デキストランによる差はあまり認められなかった (第 2 表)。また上層を生物検定すると感染率は 42 ~ 75% となり, いずれのデキストランを用いた場合もウイルスが検出された。この上層に硫酸デキストランを加えた水溶性 2 層分配系 (第 3 段階) では, 下層 (約 1 ml) の感染性は非常に高く, 感染率はいずれの区でも 100% となった (第 2 表)。このことはウイルスが下層に

第 1 表 異なる脱着剤を用いて得た罹病蚕排出糞の水溶性 2 層分配 (第 2 段階) 分画の比較

脱着剤	上 層		下 層
	多角体濃度 (ml)	感染率 (%)	感 染 率 (%)
ピロリン酸ナトリウム	$1.9 \times 10^5$	30	50
EDTA ナトリウム塩	$5.3 \times 10^4$	5	60
フッ化ナトリウム	$2.7 \times 10^4$	0	46
蒸留水 (対 照)	$5.3 \times 10^4$	0	35

糞は 8 日後採集のもの。脱着剤の濃度は 0.05 M。デキストランは BDH 製。

第 2 表 異なるデキストランを用いて得た罹病蚕排出糞の水溶性 2 層分配分画の比較

デキストラン	第 2 段 階			第 3 段 階		
	上 層 多角体濃度 (ml)	液 量 (ml)	感 染 率 (%)	下 層 感 染 率 (%)	上 層 感 染 率 (%)	下 層 感 染 率 (%)
名 糖	$4.9 \times 10^5$	10.1	42	70	58	100
B D H	$4.2 \times 10^5$	11.2	75	45	32	100
和 光	$4.4 \times 10^5$	9.7	58	65	40	100

糞は 8 日後採集のもの。脱着剤は 0.05 M ピロリン酸ナトリウム

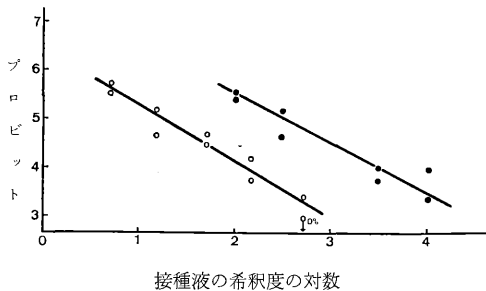
第3表 排出日の異なる糞を用いて得た水性2層分配分画の比較

糞	添食開始から糞排出までの日数	第 2 段 階			第 3 段 階		
		上層 多角体濃度 (/ml)	層 感染率 (%)	下層 感染率 (%)	上層 感染率 (%)	下層 多角体濃度 (/ml)	層 感染率 (%)
一回目採集試料	0-3	$1.2 \times 10^4$	5	26	0	—	62
	3-4	$1.0 \times 10^5$	0	3	0	—	15
	4-5	$1.6 \times 10^5$	25	38	10	—	73
	5-6	$3.2 \times 10^5$	5	18	0	—	35
	6-7	$1.8 \times 10^5$	35	48	0	—	73
	7-8	$4.6 \times 10^5$	52	88	13	—	93
二回目採集試料	0-2	$8.0 \times 10^4$	12	40	—	$4.8 \times 10^5$	75
	2-3	$4.0 \times 10^4$	0	0	—	$3.0 \times 10^4$	5
	3-4	$1.0 \times 10^4$	0	0	—	$3.0 \times 10^4$	5
	4-5	$2.5 \times 10^3$	0	0	—	$1.0 \times 10^4$	3
	5-6	$3.0 \times 10^4$	3	5	—	$1.0 \times 10^4$	8
	6-7	$1.6 \times 10^5$	33	50	—	$4.3 \times 10^5$	95

1 回目採集試料については2層分配を2回反復して得た値の平均値。  
 2 回目採集試料については各分画の生物検定を2回反復して得た値の平均値  
 脱着剤は0.05 M (1回目)と0.1 M (2回目)のピロリン酸ナトリウム。  
 デキストランは名糖製。

濃縮されたことを示している。

水性2層分配により糞中ウイルスがどの程度精製されるかを知るために、糞磨砕液と第3段階下層の10倍階段希釈液について生物検定を行い、感染率プロビット直線を得た(第1図)。プロビット5に相当



第1図 糞磨砕液(○—○)と第3段階下層(●—●)の感染性の比較。糞は7日後に採集したもの。脱着剤と希釈液は0.1 mMピロリン酸ナトリウム。デキストランは名糖製。

する希釈度対数は、糞磨砕液が1.3 (=18.4倍)第3段階下層は2.4 (=264倍)であった。糞磨砕液と第3段階下層原液の乾物量は1 ml 当りそれぞれ70.0mgと6.3 mgであったので、IC<sub>50</sub>は糞磨砕液

が3.8 mg/ml、第3段階下層が0.024 mg/mlとなる。すなわち、第3段階下層は糞磨砕液に比べて、乾物重が1/158でも同じ量の活性ウイルスを含んでいた。このことは、精製処理により不純物の大部分(157/158)が除かれたことを示している。

添食開始後の時間と糞中のウイルス量との関係を知るために、排出日の異なる糞から得た分画を比較したところ、いずれの分画も似たような感染性の変動を示した(第3表)。すなわち、ウイルス添食中は感染性が高く、正常餌に切り替えると低くなるが、添食開始4-5日以後から高くなりはじめ、その後やや低下する場合もあるが5齢最終日には最高値に達した。なお多角体濃度の高い分画は感染性も高いという傾向が認められた。

添食中の糞に検出されるウイルスは主として添食した多角体由来のものであろう。4-5日以後の糞の感染性が高まるのは、感染蚕の中腸粘膜細胞で増殖したウイルスが管腔内に放出されるためであろう。

考 察

土壌中の細胞質多角体は主としてクローン力によ

って土壌粒子に吸着しており、ピロリン酸ナトリウムはこの吸着を強く阻害する (HUKUHARA and WADA, 1972)。そのためこの薬品には土壌中の細胞質多角体を脱着する作用がある (HUKUHARA, 1975)。この薬品によって糞中のウイルスも遊離状態になることが本研究で明らかになった。

従来の報告によると、糞中に細胞質多角体が検出されるのは1齢では多角体添食3日後、2齢では4日後、5齢では5日後からで、その後は1—2峯型の変動を示しながら、多角体数が増加する (三谷ら, 1958; 石川ら, 1961; 佐藤, 1962)。罹病蚕の糞は感染性を示し (斎藤・山口, 1960)、それが糞磨砕液の低速遠心上清にも認められることから、多角体に包埋されていないウイルス粒子も糞中に排出されたと考えられている (石川ら, 1961; 渡部, 1968)。添食中の排糞もかなり感染性が高いが、多角体は検出されないので食下多角体が消化液によって溶解され、遊離状態のウイルス粒子が排泄されるためとされている (古田, 1963; 渡部, 1968)。

本研究では、添食中の排糞からも多角体が回収され、しかも精製分画中の多角体濃度と感染性の間には正の相関があった。従来の研究では糞磨砕液あるいはそのガーゼ濾過液の遠心沈澱をそのまま顕微鏡観察しているため、多角体の検出感度は低く、排出量の特により時期にしか検出できなかったものと思われる。精製分画の感染性が主として多角体によるのか遊離ウイルス粒子によるのかについては、さらに検討する必要がある。

### 摘 要

細胞質多角体を添食した5齢蚕児集団の糞を集めて脱着、分離、濃縮の3段階から成るウイルスの精製を試み、次のような結果を得た。

(1)ピロリン酸ナトリウム水溶液中で糞を磨砕すると、糞粗成分に吸着した細胞質多角体病ウイルスが脱着して遊離状態となった。

(2)デキストランとポリエチレングリコールから成る水性2層分配系に糞磨砕液を加えると、脱着ウイルスは上層に含まれ、糞粗成分の大部分とこれに吸着したウイルスは下層に含まれた。なお供試した3種のデキストランの間では分配に関して大きな差はなかった。

(3)ウイルスを含む上層液に硫酸デキストランを加えた水性2層分配系では、ウイルスは下層に濃縮された。

(4)このような精製処理により除かれた不純物の割合は乾物重にして157/158であった。

(5)糞磨砕液を水性2層分配して得た分画の感染性は添食中は高く、正常餌に切り替えると一旦低くなるが、添食開始4—5日後から高くなり始め、5令最終日には特に高かった。感染性と多角体濃度との間には正の相関があった。

### 文 献

- アルバートソン, P. Å. (1972): 水性2層分配法, 299pp, 東大出版会, 東京。
- 古田要二 (1963): 蚕糸研究, (48), 30-34。
- HUKUHARA, T. (1975): J. Invertebr. Pathol., 25, 337-342。
- HUKUHARA, T. (1977): J. Invertebr. Pathol., 30, 270-272。
- 福原敏彦・緑川真理 (1981): 日蚕雑, 50, 345-346。
- HUKUHARA, T. and H. WADA (1972): J. Invertebr. Pathol., 20, 309-316。
- 石川義文・浅山 哲・沖野英男 (1961): 蚕糸界報, 70 (821), 14-19。
- 伊藤智夫・堀江保宏・荒井成彦・渡辺喜二郎・篠原栄子 (1968): 蚕糸研究, (68), 39-46。
- 三谷賢三郎・北井三喜雄・曾田文清 (1958): 島根蚕試報, (36), 28-75。
- 斎藤忠一・山口孝根 (1960): 群馬蚕試報, (36), 1-79。
- 佐藤好祐 (1962): 福島蚕試要報, (1), 11-14。
- 渡部 仁 (1968): 日蚕雑, 37, 385-389。

**Summary****Purification of a cytoplasmic-polyhedrosis virus from silkworm feces.**

by

Tosihiko HUKUHARA, Mari MIDORIKAWA and Hiroshi ITO

Groups of fifth-instar larvae were administered an artificial diet which had been contaminated with polyhedra of a cytoplasmic-polyhedrosis virus. After feeding for two or three days on this diet, the larvae were transferred to uncontaminated diet and their feces were daily collected. The feces (1 g) were macerated in 10 ml of 0.05-0.1 M sodium pyrophosphate to detach the adsorbing virus and incorporated into an aqueous two-phase separation system consisting of 5 ml of 20% (w/w) dextran (MW 200,000-300,000) and 2 ml of 40% (w/w) polyethylene glycol 6000. The detached virus entered the upper phase, while the larger particles constituting the feces entered the lower phase. The upper phase was transferred to another vial and 1/100 volume of 20% (w/w) dextran sulfate 500 (MW 500,000) and 1/10 volume of 3 M NaCl were added. In this biphasic system the virus was concentrated in the lower dextran sulfate-rich phase. Serial dilutions of the macerated feces and the purified preparation were perorally administered to newly-hatched larvae in order to determine their  $IC_{50}$  as expressed by dry weight per unit volume. The  $IC_{50}$  of the starting material was 158 times as great as that of the purified preparation. This result indicated that most (157/158) of the non-viral fecal material was eliminated by the purification procedure. Feces collected on different days were compared in their infectivity by bioassays of the preparations purified from them. The feces defecated during the period when the larvae were fed virus-contaminated diet were highly infective and presumed to contain ingested polyhedra and virions liberated from them. The feces collected 1-2 days after the larvae were transferred to uncontaminated diet showed very low infectivity. However, the infectivity began to increase in 4 or 5 days following the peroral administration of polyhedra and reached a very high level on the last day of the fifth instar. These feces were presumed to contain the virus which had multiplied in the epithelial cells of the larval midgut.

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 〒183)