

カイコ核多角体病変異株ウイルスの増殖に関する病理組織学的観察

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者名	野口,洋子
発行元	日本蠶絲學會
巻/号	60巻4号
掲載ページ	p. 302-309
発行年月	1991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



カイコ核多角体病変異株ウイルスの増殖に関する 病理組織学的観察

野口 洋子

埼玉県熊谷市・埼玉県蚕業試験場 (〒360)
(1991年4月15日受領)

YOUKO NOGUCHI : Electron Microscopic Investigations on the Multiplication of the Variants of *Bombyx mori* Nuclear - Polyhedrosis Virus.

The multiplication of three variants of *Bombyx mori* nuclear - polyhedrosis virus (BmNPV), which were isolated from BmNPV - infected cells treated with a mutagen, 5 - bromo - 2' - deoxyuridine, was studied by transmission electron microscopy.

No.15 and 16 variants exhibited a defect in the *de novo* synthesis of the envelope, and they formed few polyhedra devoid of virions. Since the nucleocapsids derived from the nuclei formed buds through the plasma membrane into the reticular structure which extended remarkably in the cytoplasm, they protruded from the cytoplasm with the reticular structure.

No.24 variant in which no polyhedron formation was observed, produced progeny viruses normally. (Saitama - Ken Sericultural Experiment Station, Kumagaya, Saitama, 360, Japan)

カイコNPVの変異株No.15, 16, 24の増殖に関する病理組織学的観察を行った。

1. これらの変異株の経皮接種によるカイコへの病原性は多少の差がみられた。しかし、No.15, 16株の多角体を経口接種した場合には、ほとんど感染個体がみられなかった。
2. No.15, 16株に感染した脂肪細胞では、増殖した nucleocapsid はほとんど核外へ移行し、envelope の生成に異常がみられた。核外へ移行した大量の nucleocapsid は、細胞質で発達した膜構造からの budding によって envelope を獲得し、膜構造ごと細胞外へ移行して基底膜の内側に集積しているのが観察された。以上のような病理組織像については、No.15とNo.16株との間では差がなかった。
3. No.24株では、ウイルス粒子の増殖像には異常がみられず、envelope を獲得したウイルス粒子が核内に多数集積して観察された。また、核内に膜状構造物の形成が認められたが、多角体蛋白質の沈着像は観察されなかった。

Autographa californica をはじめとする野外昆虫の核多角体病ウイルス (以下NPVと記す) においては、多くの変異株が知られ (MILLER and DAWES, 1978 ; SMITH and SUMMERS, 1979) , また、人為的な突然変異株も作出されて (LEE and MILLER, 1979 ; BROWN *et al.*, 1979) , その性状

が検討されている。しかし、カイコでは変異株に関する報告はほとんどみられない。そこで、カイコNPVを感染させた培養細胞を5-bromo-2'-deoxyuridine添加培地で培養し、培養上清よりウイルスを回収して、特徴の異なる4種のNPV変異株を分離した (野口, 1990)。これらの変異株のう

ち、多角体の形成数が少なく、形状が不整形となるNo.15, 16株及び多角体非形成のNo.24株について、カイコに対する病原性の検討と、増殖様相の病理組織学的観察を行った。

本文に入るに先立ち、御指導を賜わった渡部 仁博士ならびに埼玉県蚕業試験場山口邦友博士に深く感謝の意を表す。

材料及び方法

1. 培養細胞とウイルス

培養細胞株は東京大学蚕養学研究室より分与されたカイコ由来のBM-N細胞株 (VOLKMAN and GOLDSMITH, 1982) をグレースの培養液に適応させたものを用いた。培養液としては15%牛胎児血清を加えたグレースの培養液を用いた。

第1表 変異株のカイコに対する病原性

ウイルス株	-logLC ₅₀
No.15	3.25
No.16	3.65
No.24	4.9
野生株	4.1

試供頭数：1区10頭

ウイルス接種：3齢起蚕に経皮接種

ウイルスは培養細胞に感染させた培養

上清を試供 (10⁸PFU/mlを原液とする)

ウイルスは、前報 (野口, 1990) の方法により分離したカイコNPVの変異株No.15, 16, 24を用いて、これらを培養細胞で増殖させ、培養液を3,000rpmで10分間遠心分離した上清を供試した。

2. カイコに対する病原性の検討

経皮接種には培養細胞で増殖させて得たウイルス液を用いた。濃度はプラーク法により調査し、10⁸プラーク形成単位 (PFU/ml) の濃度に調整したものを原液として10倍段階希釈し、1頭当たり3μlを接種した。また、経口接種に用いたウイルスは、5齢起蚕に経皮接種し、発病蚕の脂肪組織を採取して3,000rpm10分間の遠心を繰り返し、部分的に精製して得た多角体液を10倍段階希釈して得た。経皮接種は3齢起蚕に行い、5齢5日までの発病蚕を調査した。経口接種は3齢起蚕に行い、4齢末期までの発病蚕を調査した。

3. 電子顕微鏡観察試料の作成

ウイルスを5齢起蚕に経皮接種して発病した個体を解剖し、主として脂肪組織を摘出した。常法にしたがい2.5%グルタルアルデヒドと1%オスミウム酸で固定後エタノールで脱水し、スパー樹脂で包埋して薄切りした切片をJEM-2,000EX型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. 変異株の蚕に対する病原性

No.15, 16, 24株のウイルス液を3齢起蚕に経皮接

第2表 変異株より得た多角体のカイコに対する病原性

ウイルス株	多角体濃度と感染率 (%)								logLC ₅₀
	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	
No.15	40 ^a	5	0	0	0	0	0	0	≥10.1
No.16	25 ^b	10 ^c	0	0	0	0	0	0	≥10.2
野生株	100	100	95	85	60	15	5	0	5.9

試供頭数：1区10頭

多角体接種：3齢起蚕に経口接種

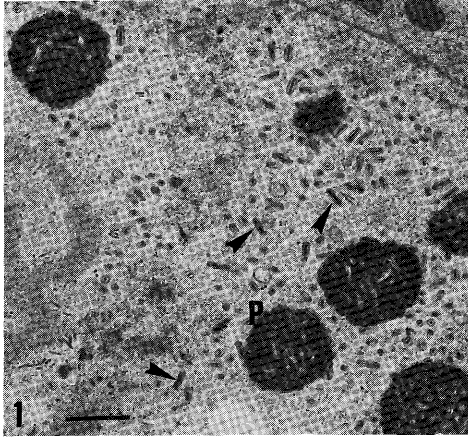
多角体は感染蚕より採取

a：致死時期が3齢脱皮期のもの5%，4齢1日のもの5%

b： " " " 10%

c： " 4齢1日のもの5%

他は3齢末期に致死

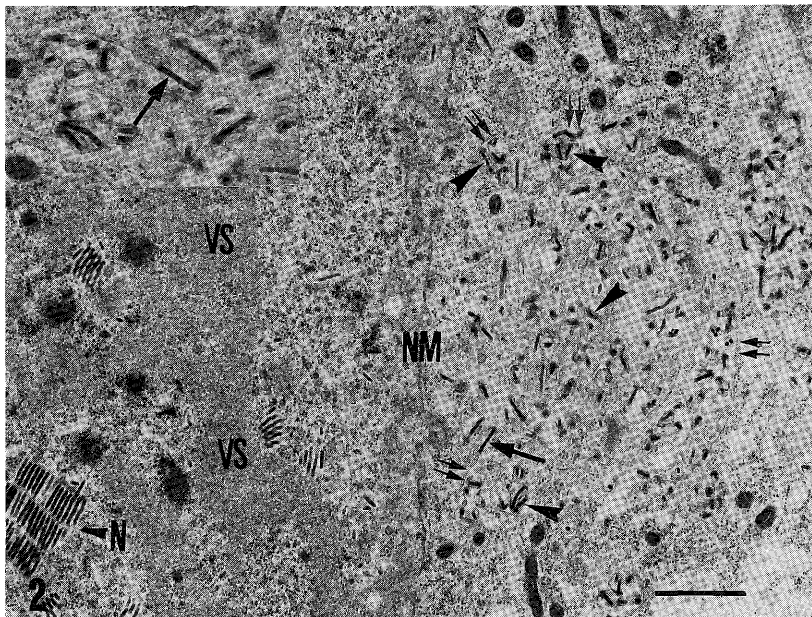


第1図 野生株の脂肪細胞における増殖像
 P : 多角体 ↓ : ウィルス粒子
 — : 1 μ m

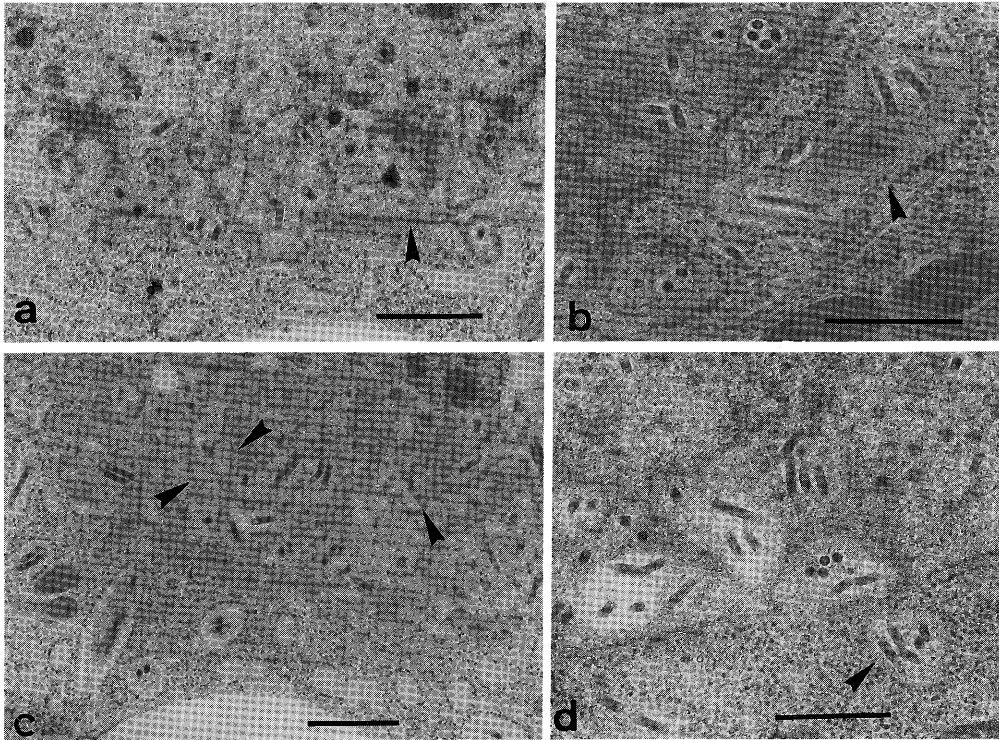
種して5齢5日まで25°Cで飼育し、カイコに対する病原性を調査した(第1表)。その結果、野性株に比べてNo.15, 16株がやや弱く、No.24株がやや強い傾向がみられ、病原性に多少の差がみられた。

No.15, 16株をカイコに経皮接種して得られた多角体を、3齢起蚕に経口接種した場合のカイコに対する病原性は、経口接種の場合と異なり、高濃度の多角体を接種しても、感染蚕の発生は低率であった(第2表)。

なお、No.15, 16株の感染蚕は接種方法によらず生存期間が1日程長くなる傾向がみられた。また、両変異株とも脂肪組織における多角体の産生量が非常に少なく、体液からはほとんど多角体が採取できなかった。



第2図 No.15株に感染した脂肪細胞
 VS : virogenic stroma NM : 核膜
 N : 整列した nucleocapsid
 ⇓ : 細胞質に発達した膜状構造
 ↑ : 同上から budding 途上の nucleocapsid
 ↓ : ルーズな envelope を獲得した nucleocapsid
 — : 1 μ m



第3図 nucleocapsidの細胞質への移行

- a : 複雑に入り組んだ核膜 (▲ : No.15株)
 b : 核膜から budding する nucleocapsid (▲ : No.15株)
 c : 核内周縁部にみられる膜構造 (▲ : No.15株)
 d : 核膜の間隙より移行する nucleocapsid (▲ : No.16株)
 — : 0.5 μm

2. 変異株の脂肪細胞における増殖様相

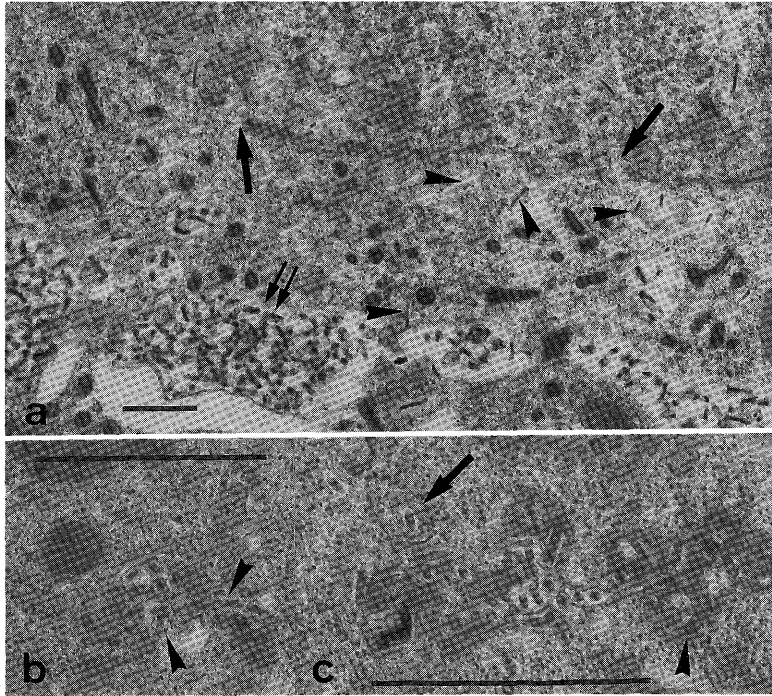
NPV野性株及び変異株に感染したカイコ5齢幼虫の、主として脂肪細胞におけるウイルス増殖様相を電子顕微鏡により比較観察した。

野性株に感染した脂肪細胞では、virogenicstromaで形成された nucleocapsid は、核質中へ移行後 envelope を獲得し、多角体に封入された(第1図)。これは、カイコNPVの一般的な増殖像(HIMENO *et al.*, 1968; RAGHOW and GRACE, 1974)と類似していた。

No.15及び16株に感染したカイコの脂肪組織においては、両者の増殖像は基本的に同じであったが、

いずれも野性株の増殖像とは著しく異なっていた。すなわち、virogenic stroma から突出した多数の nucleocapsid が整列して観察される時点で、細胞質においては膜構造が発達し、その中に多数のウイルス粒子が観察された(第2図)。しかし、核内においては envelope や、envelope を獲得しているウイルス粒子は観察されなかった(第2図)。

nucleocapsid が大量に細胞質へ移行する場合には、核膜が入り組んだ核内周縁部において、集積した多数の nucleocapsid を囲むように、膜様構造が複雑に発達した(第3、5図)。この膜様構造は、nucleocapsid の細胞質への移行に伴って生じたも



第4図 核から細胞質の膜構造への nucleocapsid の移行

- a : 核膜にみられる間隙 (↑: No.16株)
 ↓ : envelope をもたない nucleocapsid
 ↑↑ : 細胞間隙に集積したウイルス粒子
 b, c : 細胞質の膜構造から buddingg している nucleocapsid (↓: No.15株)
 ↑ : 核膜様構造
 - : 1 μm

のと考えられる。

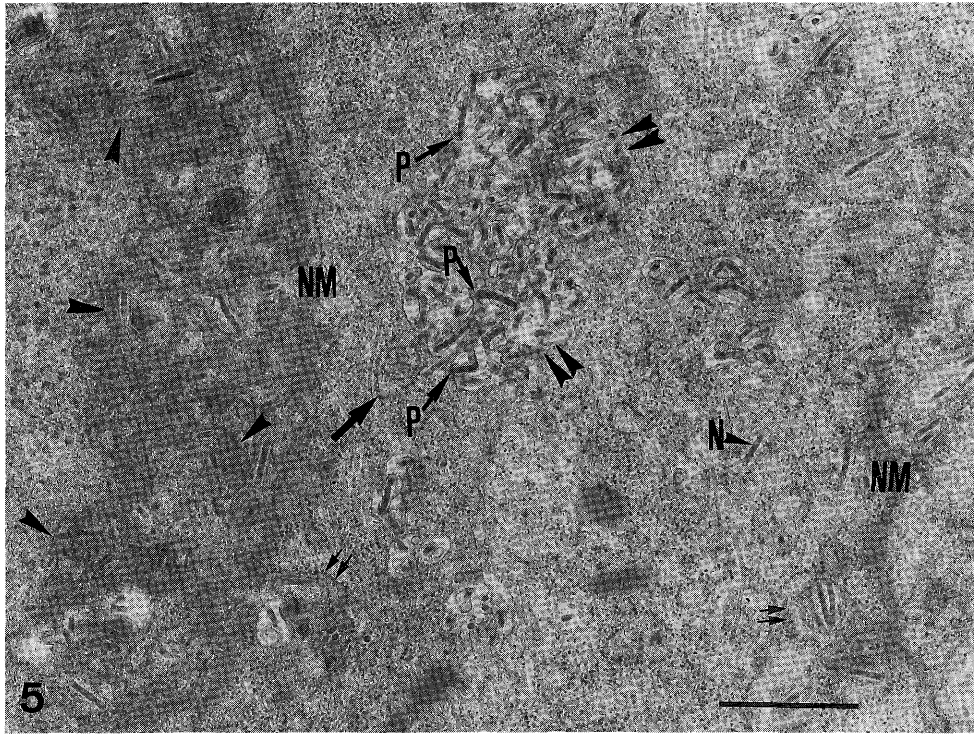
nucleocapsid が大量に細胞質へ移行中の核膜には小さな間隙 (第3-a, d, 図) のみならず, かなり大きなものも観察され (第4図), 近接した細胞質には被膜を持たない nucleocapsid が多数観察された (第4, 5図)。これらは, 前述の核内に発達した膜様構造から核膜の間隙を通過し, 直接細胞質へ移行したものと考えられる。

nucleocapsid が個々に, あるいは集塊となって核膜を嚢状に突出させ, その核膜に包まれたまま細胞質へと移行している像も観察された (第3, 5図)。この nucleocapsid を包み込んだ核膜は不鮮明であった (第3, 5図)。

細胞質に発達した膜状構造内に観察される nucle-

ocapsid は envelope にルーズに包まれており, Peplomer 構造 (ADAMS *et al.*, 1977; KAWAMOTO *et al.*, 1977; HESS and FALCON, 1977) が観察された (第5図)。膜状構造から budding 途上の nucleocapsid や (第2, 4図), 膜構造に接して核膜様の膜や核膜に包まれた nucleocapsid が観察された (第4, 5図)。核膜に包まれた nucleocapsid は細胞質へ移行後に核膜を失って, 細胞質の膜構造から budding する際に envelope を獲得するものと考えられた。

細胞質に移行したウイルス粒子は膜構造ごと細胞の周縁部に移行し, 膜構造全体が原形質膜の外側に押し出された (第6図)。これらのウイルス粒子は細胞の間隙や (第4, 5図), 基底膜の内側に (第



第5図 細胞間隙に集積したウイルス粒子 (No.15株)

- ↓ : 核内周縁部にみられる膜様構造
- P : peplomer 構造
- ⇓ : budding による核膜に包まれた nucleocapsid
- N : envelope をもたない nucleocapsid
- NM : 核膜
- ↑ : 核膜様構造
- : 1 μm

6図) 集積して観察された。大量のウイルス粒子が原形質膜外に排出された後の細胞質内には、膜構造の発達は見られず、細胞内小器官はほとんど消失していた (第6図)。

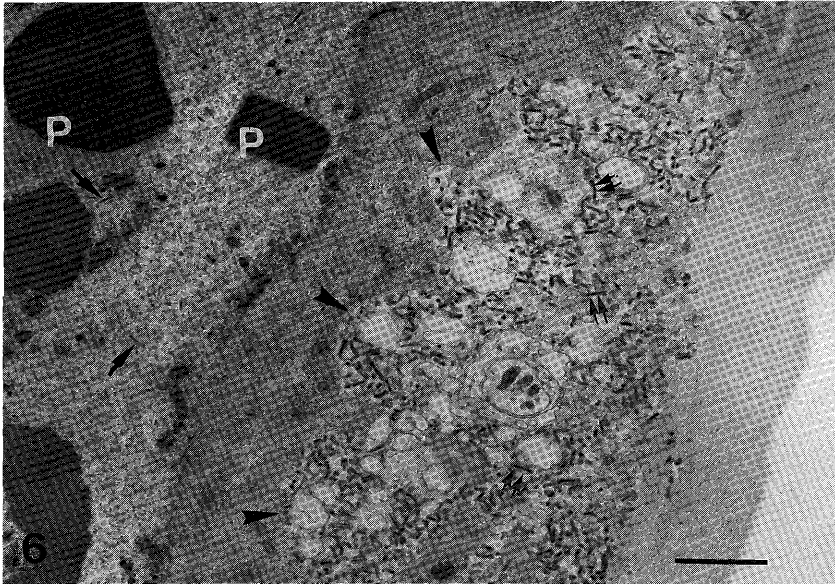
感染の進んだ脂肪細胞では、核内に観察される nucleocapsid の数は著しく少なく、核内で nucleocapsid が envelope を獲得している像はごくまれであった (第6図)。また、核内の周縁部に少数の不整形の多角体形成がみられたが、envelope を獲得したウイルス粒子が、多角体内に包埋されている像はごくまれであった (第6図)。

No.24株に感染した脂肪細胞においては、野生株と

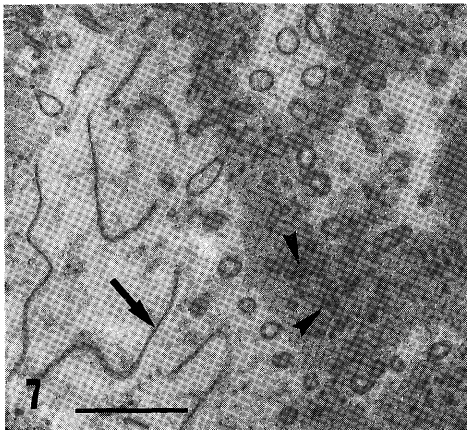
同様に核内において envelope を獲得した無数のウイルス粒子が観察された。一方、核内に特異的な膜構造物が出現したが、多角体蛋白の沈着像は観察されなかった (第7図)。このように、No.24株は封入体の生成機能を欠くと考えられるが、ウイルスの増殖様相には特に異常は観察されなかった。

考 察

以上の研究結果で明かなように、今回供試したカイコNPVの変異株No.15, 16株とNo.24株は、それぞれウイルスの増殖様相が異なった。*in vitro*でNPVを継代すると、多角体形成の少ないFP mutantが



第6図 細胞周縁へ膜構造ごと移行したウイルス粒子
 (↑↑: No.16株)
 ↓: 原形質膜
 P: 多角体
 ↑: envelope をもたない nucleocapsid
 —: 1 μm



第7図 No.24株の脂肪細胞における増殖像
 ↓: envelope を獲得したウイルス粒子
 ↑: 核内に形成された膜構造
 —: 1 μm

生じることが知られているが、この変異株は多角体の形成数が少なく、核内における envelope の生成に欠陥があり、occluded ウイルスの産生がほとんど見られない (MACKINNON *et al.*, 1974; POTTER *et al.*, 1976; FRESER and HINK, 1982)。No.15, 16株もこれに類似した性状を持つ変異株と考えられる。

nonoccluded ウイルスの核や細胞外への移行に関しては、PF mutant や中腸における NPV 増殖に関する多くの研究がみられ (MACKINNON *et al.*, 1974; ADAMS *et al.*, 1977; FRESER and HINK, 1982; 岩下, 1985), envelope や peplomer の獲得に関する議論が1つの焦点となっている。

No.15, 16株に感染した細胞においては、核膜孔や核膜に生じた間隙を通過したり、核膜からの budding により、細胞質に移行した無数の nucleocapsid は、細胞質で発達した膜構造からの budding により envelope や peplomer 構造を獲得していると考え

られる。また、核や細胞質に膜構造が発達し、細胞質へ発達した膜構造はウイルス粒子を包含したまま細胞外へと移行している。このような膜構造の形成は、あたかも細胞外にウイルスを放出するかのよう

に観察される。一方、No.24株は核内で envelope を獲得し、そのほとんどが核内にとどまっている。envelope に包まれない nucleocapsid は核外へ移行する性質を持っており、envelope を獲得するとそれが失われると考えられるが、その機構については明らかでない。

細胞質多角体病ウイルスに感染した細胞では、感染末期に産生された CPV がライソゾームに取り込まれている像が観察される場合がある(野口, 1984)が、No.15, 16株のウイルス粒子は大量に細胞質中に移行するにもかかわらず、ライソゾームに取り込まれ、異物として処理されている像は観察されていない。

引用文献

- ADAMS, J. R., GOODWIN, R. H. and WILCOX, T. A. (1977) : Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect baculovirus *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Cellulaire*, **28**, 261-268.
- BROWN, M., CRAWFORD, A. M. and FAULKNER, P. (1979) : Genetic analysis of a baculovirus, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. I. Isolation of temperaturesensitive mutants and assortment into complementation groups. *J. Virol.*, **31**, 190-198.
- FRASER, M. J. and HINK, W. F. (1982) : The isolation and characterization of the MP and FP plaque variants of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus. *Virol.*, **117**, 366-378.
- HIMENO, M., YASUDA, S., KOHSAKA, T. and ONODERA, K. (1968) : The fine structure of a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Invertebr. Pathol.*, **11**, 516-519.
- 岩下嘉光 (1985) : 核多角体病ウイルスの形態と感染経路に関する研究, 昭60科研費(一般研究B)研究成果報告書, pp. 26.
- KAWAMOTO, F., SUTO, C., KUMADA, N. and KOBAYASHI, M. (1977) : Cytolasmic budding of a nuclear polyhedrosis virus and comparative ultrastructural studies of envelopes. *Microbiol. Immunol.*, **21**, 255-265.
- LEE, H. H. and MILLER, L. K. (1979) : Isolation, complementation, and initial characterization of temperature - sensitive mutants of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **31**, 240-252.
- HESS R. T. and FALCOM L. A. (1977) : Observation on the interaction of baculoviruses. *J. Gen. Virol.*, **36**, 525-530.
- MACKINNON, E. A., HENDERSON, J. F., STOLTZ D. B. and FAULKNER, P. (1974) : Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage *in vitro*. *J. Ultrastructure Res.*, **49**, 419-435.
- MILLER, L. K. and DAWES, K. P. (1978) : Restriction endonuclease analysis to distinguish two closely related nuclear polyhedrosis viruses : *Autographa californica* MNPV and *Trichoplusia ni* MNPV. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35** : 1206-1210.
- 野口洋子 (1984) : アメリカシロヒトリの細胞質多角体病ウイルスに交差感染した昆虫の組織学的観察 応動昆, **28**, 57-62.
- POTTER, K. N., FAULKNER, P. P. and MACKINNON, E. A. (1976) : Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **18**, 1040-1050.
- RAGHOW, R. and GRACE, T. D. C. (1974) : Studies on a nuclear polyhedrosis virus in *Bombyx mori* cell *in vitro*. I. Multiplication kinetics and ultrastructural studies. *J. Ultrastruct. Res.*, **47**, 384-399.
- SMITH, G. E. and SUMMERS, M. D. (1979) : Restriction maps of five *Autographa californica* MNPV variants, *Trichoplusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases *Sma*, *I*, *Kpn* *I*, *Bam* *HI*, *Bac* *I*, *Xho* *I*, and *Eco* *RI*. *J. Virol.*, **30**, 828-838. VOLKMAN, L. E., and GOLDSMITH, P. A. (1982) : Generalized immunoassay for *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infectivity *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 227-233.