2, 3 の化学的処理に対する家蚕細胞質多角体病ウイルスの安定性

宮 島 成 寿

愛知県農業総合試験場

(1977 年 9 月 8 日 受領)

Stability of Cytoplasmic-Polyhedrosis Virus of the Silkworm, *Bombyx mori* LINNAEUS, to Some Chemical Treatments. Shigetoshi MIYAJIMA (Aichi-ken Agricultural Research Center, Nagakute, Aichi 480—11) *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **22** : 22~25 (1978)

This paper reports on the stability of a cytoplasmic-polyhedrosis virus (CPV) of the silkworm to chemicals in order to obtain suitable chemicals and their concentrations for purification of CPV. A CPV readily lost its infectivity by chloroform and chloroform-n-butanol (1:1), but was not affected by treatment with 1×10^{-1} , 1×10^{-2} and 1×10^{-3} M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 5, 10, 20 and 40% carbon tetrachloride, and 1M magnesium chloride at 50°C for 60 minutes, respectively. No difference in the response to chemicals was observed between two strains of CPV, i.e., the hexagonal polyhedron and tetragonal types.

緒 言

既報 (宮島, 1976) に続いて, 家蚕細胞質多角体病ウイルス (CPV) の感染力におよぼす化学的処理について検討した。すなわち, ウイルスの精製, 濃縮のために用いられる適当な薬剤として, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 塩化マグネシウム, 四塩化炭素, クロロホルム および クロロホルム—*n*—ブチルアルコールを供試し, これらによる処理について実験を行なった。塩化マグネシウム処理およびクロロホルム処理については, ウイルスの分類基準の一つとしても調査した。

本文に入るに先立ち塩化マグネシウム処理について有益な御助言賜わった農林省家畜衛生試験場生物物理研究室長 小出英興博士に対し深謝の意を表する。

材料および方法

1. ウイルス

ウイルスは CPV の 4 角形と 6 角形の多角体を形成する系統 (それぞれ TC, HC と略記する) を供試した。ウイルスの精製は実験の性質上, フロロカーボンを用いない HUKUHARA and HASHIMOTO (1966) の方法によった。すなわち, 多角体をアルカリで溶離後, 低速と高速遠心を繰返してウイルスを精製し, 供試材料とした。ウイルスの溶媒は 0.01M 磷酸緩衝液 (PBS, pH 6.8) を用いた。なお, 供試ウイルスの原液濃度は実験の種類

により多少異なっている。

2. 供試蚕児

CPV をクロロホルム処理する実験では, (日 122 号×日 124 号)×(支 115 号×支 124 号) の 4 齢起蚕を, その他の実験では, 錦秋×鐘和の 4 齢起蚕を生物検定に用いた。ウイルスの注射部位は, 感受性の最も高い蚕児の第 8~9 環節間膜部 (MIYAJIMA and KAWASE, 1967 ; 宮島・川瀬, 1969) 背面右側に 0.005 ml 宛注射した。蚕児は注射後 $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ の恒温室で 5 日間飼育し, 解剖鏡検後多角体の有無によって病種を判定して, SPEARMAN-KÄRBER 法 (HARRIS, 1964) により $-\log \text{ED}_{50}$ 値を計算した。

3. 化学的処理

クロロホルムと塩化マグネシウム以外の処理は, イネ黒条萎縮病ウイルスの場合 (北川・四方, 1969) を一部改変した方法に準じた。すなわち, EDTA 処理はウイルス液 (対照としては蒸留水) に最終濃度がそれぞれ 0.1M, 0.01M, 0.001M になるよう EDTA を加え, よく攪拌し, Visking のチューブに入れて前記の PBS に対して 5°C で一夜透析して EDTA を除いた後, 蚕児に注射した。四塩化炭素処理は, ウイルス液 (対照としては蒸留水) に最終濃度がそれぞれ 5%, 10%, 20%, 40% になるよう四塩化炭素を加え, また, クロロホルム—*n*—ブチルアルコール処理は, ウイルス液 (対照としては蒸留水) に最終濃度で 10%, 20%, 40% になるよ

う溶媒 (1:1) を加え、それぞれ数分間攪拌後、3,000 rpm, 10 分間遠心分離した上清を更に PBS に対して 5°C で一夜透析した後注射用に供試した。クロロホルム処理は, FELDMAN and WANG (1961) の方法により、ウイルス液とクロロホルムとを 20:1 の割合に混合し、室温で 10 分間攪拌後 400rpm, 5 分間遠心分離した上清 (クロロホルムは下層に分離される) を蚕児の注射用に供試した。塩化マグネシウム処理はウイルス液 (対照として蒸留水) と蒸留水とを 1:10 に加え、これに等量の 2M の塩化マグネシウムを加え (最終濃度では 1M), 小試験管に分注し、50°C で 60 分間処理後蚕児に接種 (注射) して感染力価を測定した。

結果と考察

1. EDTA の影響

CPV を EDTA 処理して蚕児に接種した結果は第 1 表のとおりである。

この表の結果より、TC を用いた場合には、EDTA の濃度が 0.1M から 0.001M まで希釈されたもので処理しても、 $-\log ED_{50}$ 値はそれぞれ 4.2, 3.9, 4.2 で、無処理の TC の場合の 4.3 に比べて差は認められなかった。また、HC を用いた場合にも TC の場合と同じく、EDTA のウイルスにおよぼす影響は認められなかった。この結果から、EDTA は本実験で用いたいずれの濃度の場合でも、CPV の感染力には影響をおよぼさないと考えられる。

2. 塩化マグネシウムの影響

CPV(TC) を 1M の塩化マグネシウム中で 50°C, 60 分間処理後、蚕児に接種した結果は第 1 図に示すとおりである。

この図の結果より、塩化マグネシウム処理した CPV は、無処理の CPV と比較して感染力の差は認められなかった。このことから、CPV は一般ウイルスの分類

第 1 表 細胞質多角体病ウイルスに対する EDTA 処理の影響

処 理	濃度 (M)	$-\log ED_{50}$		
		TC ¹⁾	HC ²⁾	DW ³⁾
EDTA	1×10^{-1}	4.2	4.1	0
	1×10^{-2}	3.9	3.6	0
	1×10^{-3}	4.2	3.8	0
無処理	—	4.3	3.9	0

錦秋×鐘和の 4 令起蚕の背面第 8~9 環節間膜部右側にウイルスを 0.005 ml 注射。

1) 4 角形の細胞質多角体を形成するウイルス、2) 6 角形の細胞質多角体を形成するウイルス、3) 滅菌蒸留水。

第 1 図 細胞質多角体病ウイルスに対する塩化マグネシウム処理の影響。

錦秋×鐘和の 4 令起蚕の背面第 8~9 環節間膜部右側に 0.005ml 宛ウイルスを注射。H は 50°C, 60 分間処理、O は無処理。PBS: 0.01 MPBS (pH 6.8), $MgCl_2$: 1M 塩化マグネシウム処理。

第 2 表 細胞質多角体病ウイルスに対する四塩化炭素処理の影響

処 理	濃度 (%)	$-\log ED_{50}$		
		TC ¹⁾	HC ²⁾	DW ³⁾
四塩化炭素	5	3.8	4.4	0
	10	4.0	3.8	0
	20	3.5	3.9	0
	40	3.7	3.9	0
無 処 理	—	3.9	4.2	0

1), 2), 3) 実験条件は第 1 表に同じ。

(石田, 1972) で同じグループに属すると考えられるレオウイルスと同様に (小出, 1970; SPENDLOVE and SCHAEFFER, 1965), 塩化マグネシウム耐性と推定される。

3. 四塩化炭素の影響

CPV を四塩化炭素で処理して蚕児に接種した結果は第 2 表に示す。

第 2 表の結果より、四塩化炭素がそれぞれ 5%, 10%, 20%, 40% になるように CPV を処理した場合、いずれの濃度を用いても CPV の感染力には影響を与えなかった。また、この結果は TC, HC のいずれの CPV を供試した場合でも同じであり、従って TC, HC とともに四塩化炭素には耐性であると考えられる。

4. クロロホルム—n-ブチルアルコールの影響

前記の実験と同様に、CPV にクロロホルム—n-ブチルアルコールの混合液 (1:1) を最終濃度がそれぞれ 10%, 20%, 40% になるように混合し、その遠心上清、透析液を蚕児に接種した結果を第 3 表に示す。

第 3 表に示すように、クロロホルム—n-ブチルアルコ

第3表 細胞質多角体病ウイルスに対するクロロホルム—
n-ブチルアルコール処理の影響

処 理	濃 度 (%)	-log ED ₅₀		
		TC ¹⁾	HC ²⁾	DW ³⁾
クロロホルム— n-ブチルアルコール	10	1.9	1.4	0
	20	1.6	1.8	0
	40	1.5	1.3	0
無 処 理	—	4.1	3.7	0

〔1), 2), 3) 実験条件は第1表に同じ。

第2図 細胞質多角体病ウイルスに対するクロロホルム処理の影響。

供試蚕児は(日 122 号×日 124 号)×(支 115 号×支 124 号)の4 齢起蚕。CT:クロロホルム処理。NT:クロロホルム無処理。ウイルス接種は第1図に同じ。

ール混合液の処理による TC, HC の感染力は、無処理の場合の TC の -log ED₅₀ 値 4.1, HC の同 3.7 に比べていずれも低下するのが認められた。

5. クロロホルム処理

CPV をクロロホルム処理して蚕児に接種した結果を第2図に示す。

この結果より、CPV をクロロホルムで処理すると、TC および HC はともに感染力の低下するのが認められた。

上記の結果から、クロロホルムおよびクロロホルム—n-ブチルアルコール処理により CPV の感染力は低下する傾向が示された。しかしながら、CPV は TC, HC とともにエーテル耐性であること (宮島, 1976), ならびに *Malacosoma disstria* の細胞質多角体病ウイルスはエーテル、クロロホルムの両有機溶媒に対して耐性であり、lipid を持っていないらしいこと (RICHARD and HAYASHI, 1971), および本研究の結果とをあわせると、今後は CPV 粒子の essential lipid の問題を注目しなければならぬと考えられる。また、クロロホルムやクロロホルム—n-ブチルアルコールに感受性のウイルスは、植物ウイルスの lettuce necrotic yellow virus (CROWEY

et al., 1965) やムギ北地モザイク病ウイルス (慮ら, 1967) 等の bacilli form の大型ウイルスが多いが、前記のレオウイルスがクロロホルム耐性である (SPENDLOVE and SCHAFER, 1965) ことから、CPV についても今後更にこの問題について検討を行なう予定である。

摘 要

家蚕細胞質多角体病ウイルスの精製、濃縮のために用いる適当な薬剤を調べるため、化学的処理すなわち、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 塩化マグネシウム、四塩化炭素、クロロホルムおよびクロロホルム—n-ブチルアルコールによる各処理が家蚕細胞質多角体病ウイルス (CPV) の感染力におよぼす影響について検討した。

(1) EDTA 処理については、CPV 液に最終濃度でそれぞれ 0.1M, 0.01M, 0.001M になるよう EDTA を加えて蚕児に接種しても、無処理の CPV と比較して感染力の差は認められなかった。

(2) 塩化マグネシウム中の温度処理については、CPV 液に最終濃度で 1M の塩化マグネシウムを加え、50°C, 60 分間処理後蚕児に接種しても、無処理の CPV に比べて感染力の差は認められなかった。

(3) 最終濃度でそれぞれ 5%, 10%, 20%, 40% になるよう CPV 液に四塩化炭素を加えるか、または 10%, 20%, 40% になるようクロロホルム—n-ブチルアルコール (1:1) を加えて処理した後蚕児に接種すると、四塩化炭素処理では CVP の感染力は低下しなかったが、クロロホルム—n-ブチルアルコール処理では感染力の低下が認められた。

(4) クロロホルム処理では、CPV 液とクロロホルムとを 20:1 の比で混合し、その遠心上清を蚕児に接種すると、2log 以上の感染力の低下が示された。

(5) 以上のことから、CPV は EDTA, 塩化マグネシウム、四塩化炭素に対しては耐性であるが、クロロホルムおよびクロロホルム—n-ブチルアルコールに対しては感受性である結果が得られた。なお、これらの結果は、CPV の系統 (4 角形の多角体を形成する系統 TC, 6 角形の多角体を形成する系統 HC) による感受性の差は認められず、TC, HC はともに同じ傾向を示した。

引用文献

- CROWEY, N.C., B.D. HARRISON and R. I. B. FRANCKI (1965) Partial purification of lettuce necrotic yellow virus. *Virology* 26: 290~296.
- FELDMAN, H. A. and S. S. WANG (1961) Sensitivity of

- various viruses to chloroform. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **106** : 736~738.
- HARRIS, R.J.C. (1964) *The Techniques in Experimental Virology*, Academic Press, New York, 183 pp.
- HUKUHARA, T. and Y. HASHIMOTO (1966) Serological studies of the cytoplasmic- and nuclear-polyhedrosis viruses of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invert. Pathol. **8** : 234~239.
- 石田名香雄 (1972) ウイルスの分類と命名, 新ウイルス学 I, (東 昇・石田名香雄編), 朝倉書店, 東京: 3~6.
- 北川良親・四方英四郎 (1969) イネ黒条萎縮病ウイルスの諸性質. 北大農紀要 **6** : 439~445.
- 小出英興 (1970) レオウイルスの構造と増殖機構. 蛋白核酸酵素 **15** : 764~776.
- 盧 耀村・四方英四郎・村山大記 (1967) ムギ北地モザイク病ウイルスの分離. 北大農紀要 **6** : 1~5.
- 宮島成寿 (1976) 細胞質多角体病ウイルスの理化学的処理に対する安定性. 日蚕雑 **45** : 254~257.
- MIYAJIMA, S. and S. KAWASE (1967) Different infection response of silkworm larvae to the locality of cytoplasmic-polyhedrosis virus infection. J. Invert. Pathol. **9** : 441~442.
- 宮島成寿・川瀬茂実 (1969) 家蚕細胞質多角体病ウイルスの接種部位による発病率の差異について (I) 発育階梯による比較. 日蚕雑 **38** : 237~241.
- RICHARDS, W.C. and Y. HAYASHI (1971) Effect of some organic solvents on the cytoplasmic-polyhedrosis virus of the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*. J. Invert. Pathol. **17** : 42~47.
- SPENDLOVE, R.S. and F.L. SCHAFFER (1965) Enzymatic enhancement of infectivity of reovirus. J. Bacteriol. **89** : 597~602.