バキュロウイルス性中腸腺壊死症ウイルス (BMNV) の エーテル, 食塩濃度および pH に対する抵抗性

桃 山 和 夫*

(1989 年 6 月 5 日受付)

Tolerance of Baculoviral Mid-gut Gland Necrosis Virus (BMNV) to Ether, NaCl Concentration and pH

Kazuo MOMOYAMA

Yamaguchi Prefectural Naikai Fisheries Experimental Station, Yamaguchi 754, Japan

(Received June 5, 1989)

Tolerance of BMNV to ether, NaCl concentration and pH was investigated by means of the infection method of the author using larval and post-larval kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. Test shrimp sampled on day 4 after water-borne inoculation were examined for nuclear hypertrophy of the mid-gut gland epithelial cells in fresh squash preparations under the dark field microscope. The results obtained are summarized as follows;

Ether: BMNV did not tolerate to 18 hr treatment with ethyl ether at 4°C.

NaCl concentration: BMNV was inactivated in 25% NaCl solution within 10 hours and in 12.5% NaCl solution within 24 hours. But it tolerated to 24 hr treatment with NaCl solutions of 0-6.0%.

pH: BMNV had low tolerance to low pH, and was inactivated in sea water adjusted to pH value of 1.0 within 10 minutes, 1.5 and 2.0 within 30 minutes, 2.5 within 60 minutes, and 3.0 and 4.0 within 180 minutes. Whereas the virus had high tolerance to high pH, and was not inactivated by 180 minute exposure in sea water adjusted to pH values of 10.0-13.0.

筆者はこれまでに、バキュロウイルス性中腸腺壊死症ウイルス (BMNV) に対する消毒剤の不活化効果 (桃山, 1989a), 紫外線や熱等の物理・化学的不活化 (桃山, 1989b) について報告した。

今回、本ウイルスの性状をより明らかにすることを目的として、エーテル、食塩濃度および pH に対する抵抗性を、前報と同様にクルマエビ稚仔を用いた感染実験 (MOMOYAMA and SANO, 1988) により調べたので報告する。

材料および方法

1. 供試クルマエビ

山口県内海栽培漁業センターで種苗生産されたミシスから P-4 (4 日令のポストラーバ) までのいずれかの発育期にある健康な稚仔を用いた。これらの稚仔は、BMNV

に対して高い感受性をもつことが (MOMOYAMA and SANO, 1989) により明らかにされている。

2. 供試 BMNV 液

サンプルビンに小分けされ、-80°C で 3~4 年間凍結保存されていた同一群由来の BMNV の自然発病エビ 1 g (約 400 尾, 平均体重 2.5 mg) に滅菌海水 10 ml を加えた後、MOMOYAMA and SANO (1988) に従って調整されたホモジネート濾液 (450 nm) をウイルス液として用いた。

なお、本ウイルス液のクルマエビ稚仔に対する浸漬接種による感染力価は、クルマエビの発育期によって多少異なるが、 10^{-5} から 10^{-7} の範囲にあった。

3. BMNV 処理方法

以下の手順に従った。

エーテル

石井 (1973) にほぼ準じた。すなわち、ウイルス液 2 ml

* 山口県内海水産試験場

に滅菌海水 6 ml を加えて混合後、4 ml ずつ 2 本の試験管に分注する。1 本に特級エチルエーテル 1 ml を加え、密栓して時々振とうしながら 4°C の冷蔵庫に保存する。他の 1 本は対照としてエーテルを加えずに以下同様の操作をする。18 時間後、室温にもどして空気のパブリングによってエーテルを除く。

食塩濃度

予め 25°C の恒温水槽にセットしておいた 0~25% (Table 2) の食塩水 50 ml に、ウイルス液 0.5 ml (25% 食塩水についてはウイルス液 1.0 ml) を加えて混合後、再び恒温水槽にもどして所定時間静置する。

pH

滅菌海水 50 ml を入れた試験管に N/100 または N/10 の塩酸または水酸化ナトリウム溶液を加えて所定 (Table 3) の pH に調整した後、25°C の恒温水槽にセットしておく。ウイルス液 0.5 ml を加えて混合後再び恒温水槽にもどして静置する。所定時間後、直ちに予め求めておいた中和するのに必要な量の上記規定濃度の水酸化ナトリウム溶液または塩酸を加えて中和し、作用を停止する。

4. 接種方法

処理後 500 ml (食塩濃度 25% 液で処理したものは 1 l) の海水で希釈されたウイルス液に 30 尾の供試エビを 2 時間浸漬して行った。

5. BMNV の抵抗性の有無の判定方法

接種された供試エビを水温 25.5~30.2°C で 4 日間飼育後、無作為に採取した 10 尾の生鮮中腸腺について、暗視野観察法 (桃山, 1983) により感染の有無を調べて抵抗性の有無を判定した。

なお、供試エビの発育期には多少のバラツキが認められたが、各実験毎の主な発育期は、エーテル抵抗性試験に対しては P-3、食塩濃度抵抗性試験に対してはミシス III 期と P-1、pH 抵抗性試験に対してはミシス II 期、III 期および P-4 がそれぞれ用いられた。

結果および考察

エーテル

エンベロープを有するウイルスは一般にリピド溶剤感受性であると言われている (石井, 1973)。BMNV は他のバキュロウイルス (川瀬, 1976) と同様エンベロープを持つことが確かめられており (Sano *et al.*, 1981)、エーテル感受性についても陽性を示した (Table 1)。

食塩濃度

BMNV は食塩水 25% 液では 10 時間以内に、12.5%

Table 1. Tolerance of BMNV to ethyl ether.

Ether treatment	Incidence of infection (No. of shrimp infected/ no. examined)
Yes	0/10
No	10/10

Table 2. Tolerance of BMNV to various NaCl concentrations.

NaCl concentration (%)	Exposure time (hour) at 25°C			
	1	3	10	24
25	10/10	10/10	0/10	0/10
12.5	10/10	10/10	10/10	0/10
6.0	10/10	10/10	10/10	10/10
3.0	10/10	10/10	10/10	10/10
0.3	10/10	10/10	10/10	10/10
0	10/10	10/10	10/10	10/10

液では 24 時間以内にそれぞれ不活化された (Table 2)。しかし、それ以下の濃度では食塩濃度 0% (実際には添加したウイルス液中の塩類により、約 0.03% の塩分濃度と計算される) においても 24 時間活性を保持しており、低塩分に対しては抵抗性を示した。

筆者は前報 (桃山, 1989b) において、海水に懸濁され濾紙上に滴下された本ウイルスの乾燥過程における速やかな不活化には、ウイルスをとりまいている環境水の塩分濃度の上昇が大きく関与しているのではないかと述べた。今回の実験では、飽和に近い 25% の食塩濃度 (食塩の 25°C における溶解度は 26.43) では 3 時間以上、また、海水の約 4 倍の濃度の 12.5% 食塩水では 10 時間以上活性が保持されていた。本ウイルスの食塩濃度に対する抵抗性は食塩の飽和点付近で急激に低下するように思われる。

pH

核多角体病やグラニューロシスなど陸上昆虫由来のバキュロウイルスはアルカリに対しては比較的抵抗性で、ウイルスの精製には薄いアルカリ溶液で封入体を溶解する方法が通常用いられている (川瀬, 1976)。封入体非形成の BMNV も高い pH に対しては抵抗性が大きく、pH 13.0 に暴露されても 180 分間活性を保持していた (Table 3)。

しかし、本ウイルスは低い pH に対しては抵抗性は小さく、pH 1.0 では 10 分以内、1.5 と 2.0 では 30 分以内、2.5 では 60 分以内、3.0 と 4.0 では 180 分以内に

Table 3. Tolerance of BMNV to various pH.

pH	Exposure time (minute) at 25°C			
	10	30	60	180
No. of shrimp infected/no. examined				
1.0	0/10	0/10		
1.5	4/10	0/10	0/10	
2.0	10/10	0/10	0/10	
2.5	10/10	10/10	0/10	0/10
3.0	10/10	10/10	9/10	0/10
4.0	10/10	10/10	10/10	0/10
5.0	10/10		10/10	10/10
8.0	10/10		10/10	10/10
10.0	10/10		10/10	10/10
11.0	10/10		10/10	10/10
12.0	10/10		10/10	10/10
13.0	10/10		10/10	10/10

それぞれ不活化された。MOMOYAMA and SANO (1989) は, クルマエビ稚仔の BMNV に対する感受性は発育とともに低下し, ゴエアから P-4 までは高い感受性を示すのに対して, P-8 ないし P-10 では著しく抵抗性となっていること, および本ウイルスは経口的に稚仔の体内にとり込まれる可能性が強いことを指摘した。また, クルマエビ稚仔の生理・生態的特性は P-10 前後 (体長 7~10 mm) を境として大きく変化することが知られている (倉田, 1972; 石岡, 1973)。クルマエビ稚仔の発育に伴う BMNV に対する抵抗性の増大に胃液の pH がどの程度関与しているかは, 消化液中の不活化物質 (川瀬, 1976) の探索とともに今後の検討課題であろう。

謝 辞

本研究を進めるにあたり貴重な御助言と本報告の御校閲を賜った東京水産大学・佐野徳夫教授に厚くお礼申し

上げます。

なお, 本研究費の一部は水産庁・魚病対策技術開発研究委託費によったことを付記して感謝する。

引用文献

- 石井慶蔵 (1973): ウイルス粒子の性状の検索法と群別。ウイルス実験学総論, 国立予防衛生研究所学友会編, 丸善, 東京, 472-478.
- 石岡宏子 (1973): クルマエビ人工種苗の生理生態に関する研究。南西水研研報, 6, 59-84.
- 川瀬茂実 (1976): ウイルスと昆虫。化学の領域選書 12, 南江堂, 東京, 312 pp.
- 倉田 博 (1972): クルマエビ栽培における種苗とその播殖に関する諸原理について。南西水研研報, 5, 33-75.
- 桃山和夫 (1983): クルマエビのバキュロウイルス性中腸腺壊死症に関する研究—III, 仮診断法。魚病研究, 17, 263-268.
- 桃山和夫 (1989a): 消毒剤によるバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) ウイルスの不活化効果。魚病研究, 24, 47-49.
- 桃山和夫 (1989b): 紫外線, 日光, 熱および乾燥によるバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) ウイルスの不活化。魚病研究, 24, 141-146.
- MOMOYAMA, K. and T. SANO. (1988): A method of experimental infection of kuruma shrimp larvae, *Penaeus japonicus* Bate, with baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) virus. *J. Fish Diseases*, 11, 105-111.
- MOMOYAMA, K. and T. SANO. (1989): Developmental stages of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* Bate, highly susceptible to baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) virus. *J. Fish Diseases* (in print).
- SANO, T., T. NISHIMURA, K. OGUMA, K. MOMOYAMA and N. TAKENO (1981): Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathology*, 15, 185-191.