蚕の伝染性軟化病ウイルスに関する研究

1. 経口接種法による力価検定法

田 波 洋 ・ 船 田 敏 夫
松 尾 直

STUDIES ON THE FLACHERIE VIRUS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*, L.

1. Quantitative interaction between Flacherie virus and larvae of the silkworm.

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Shinshu University

Yoh TANAMI

Sericultural Experiment Station, Katakura Industrial Co., Ltd. (Matsumoto)

Toshio FUNADA, and Tadashi MATSUO

〔受付：4月11日，1969年〕

総 括

蚕幼虫への経口接種法による蚕の伝染性軟化病ウイルス (Flacherie virus) の感染力価検定法についてのべた。試験区間のウイルス・コンタミネーションに注意すれば、高い精度で一定の LD_{50} が得られ、かつ接種ウイルス量 ($M.O.I. = m$) と接種幼虫群の死亡率 (P) との間には Poisson 分布式に基づき次の関係が成立することが認められた。

$$P = 1 - e^{-m}$$

このことは唯1個のウイルス粒子が、幼虫の target tissue 内に侵入することによって幼虫が発病・致死することを意味している。

上の P と m の相互関係を Weibull の確率紙上に目盛つてみると直線関係が成立する。従つて、実測値に基づいて LD_{50} (または LD_{95}) をグラフ的に求めるときには Weibull 確率紙の利用が便利だと思われる。

序 文

昔から養蚕業界に大きな被害を与えて来た蚕の軟化

病のうち、ウイルスによるものがあることは早くから Paillot (1929) によつて指摘されていた。しかし、この病原ウイルスに関する研究は長い間放置されており、実際にこの“病原体”が実験室内で研究の対称となつたのは山崎寿ら (1960, 1962) 以後のことである。山崎ら (1960) が長野県坂城 (さかき) 町で分離した“病原株”がウイルスであることは鮎沢 (啓) ら (1962, 1964) によつてはじめて確認され、その virion は直径約 $30m\mu$ の立方対称型であることが明らかになつた。この坂城 (さかき) 株は歴史的標準株として重要な意味をもつものと私たちは考える。

私たちは、蚕の伝染性軟化病ウイルスに抵抗性をもつ

脚注1) 軟化病という言葉は、蚕体が軟化ないし軟腐して死亡する疾病の総称で、蚕の核多角体病 (膿病)、細胞質多角体病 (以上2つはウイルス病)、糸状菌病、原虫病とは症状上区別できる。ウイルス性の軟化病は山崎寿ら (1960) 以来“蚕の伝染性軟化病”と呼ばれているので本稿でもこの病名を用いた。接種蚕幼虫の発病に際して他の細菌類の協同作用が最近問題になっている (鮎沢 (千) 他, 1968; 石川・宮島, 1968)。

農林省の統計によると昭和42年度における軟化病 (総称) による繭の減収量は約3400トンに及ぶという (青木, 1968)。繭1kgの市価を800円とすれば約27億円の被害に相当する。

蚕の品種選出という仕事をすすめるため、このウイルスを手がけることになり(船田, 1968), まずウイルス力価の検定法を確立するため、以下のべる実験を行った。

材料と方法

1. 試験ウイルス株 1965年9月, 兵庫県和田山町における伝染性軟化病蚕から分離したウイルス株(以下和田山株とよぶ)を用いた。ウイルス株の純化とストックのつくり方は次のとおりである。

病蚕の乳剤の3000r.p.m 30分間遠心上清をザイツ EK フィルターで濾過後, 10段階稀釈し家蚕2令期幼虫(以下すべて日本種純系 H4 を用いた)に経口接種し, 最高に稀釈したウイルス液の接種により死亡した幼虫を出発材料として, ウイルスの限界稀釈法による純化を3回くりかえし行い, 最後に数百頭の2令期幼虫に経口接種し, 1~2週間までに病死した材料からウイルス・ストックをつくり, 実験に供した。

病死幼虫(−20°C で凍結保存したもの)にガラス粉末を加え, 乳鉢で磨細後生理食塩水で10%乳剤とし, 2回凍結融解する。この乳剤を 3,000r.p.m で30分間遠心(平均 1,200g)した上清を更に15,000r.p.m(平均18,000g)で1時間遠心した上清を小アンプルに分注し, −20°C で保存した。−20°C において, このウイルスの力価は1年以上ほぼ一定に保たれる。

ウイルス純度の問題 以下のべるように, このウイルスの認識手段は, 接種した蚕幼虫の病変と, その致死率の統計的処理にのみ基いている。従つて, 延3回の限界稀釈法によつてウイルスの“純化”を行つたといつても最終的に得られたウイルス・ストックが(単一ブラックから得られたウイルス液のような)高純度のものかどうか疑えば問題は残るだろう。

また, ウイルス・ストックの出発材料(乳剤)中に, 多数の中腸常在細菌が含まれていたことはいうまでもない。しかし, 蚕中腸内に常在する細菌類やマイコプラズマは, 平均18.000g の遠心処理によつて大部分除かれる。最終的なウイルス液中の細菌数は $10^3 \sim 10^4/\text{ml}$ (但し普通寒天平板上のコロニー数より換算)で, グラム陽性の双球菌, グラム陰性の桿菌が主であつた。最近, 一部の細菌の共存が, 軟化病ウイルスの中腸感染率を促進させるという報告がある(鮎沢(千)ら, 1968; 石川・宮島, 1968)が, ここで用いたウイルス・ストックの中腸常在菌の(10^{-8} 稀釈以下で行う)ウイルス力価検定に及ぼす影響は全く無視しうるものと考えられる(後出の式(1)参照)。

次報でのべるように, 和田山株は, 軟化病ウイルス標準株としての坂城株と血清学的に近縁であり, 感染蚕幼

虫の症状や, 病理検査における多角体(封入体)形成が陰性である点(岩下, 1965)などから考えて, これが伝染性軟化病ウイルスの一員であることは疑いない。

Table 1. Filtration experiment with Flacherie virus of the silkworm, strain Wadayama.

Pore diameter of the milipor filter	LD ₅₀ of the filtrate	Percentage of Control LD ₅₀
10m μ	10 ^{-0.63}	0.00135%
50m μ	10 ^{-3.04}	0.35
Control (Unfiltered)	10 ^{-5.50}	100

表1に示すミリポアフィルターによる濾過実験成績によれば, 和田山株ウイルスの粒子径は10~50m μ の範囲と推量され, 坂城株についての鮎沢(啓)ら(1964)の成績(32m μ)や塩崎株についての鮎沢(千)ら(1966, 1968)の成績(25m μ)と, 大まかにいつて, ほぼ同一のオーダーであることが認められた。

以上の諸点から, 以下の実験で用いた接種病原が軟化病ウイルスであることは疑がないが, 今後はより精製したウイルス材料を用いて実験を進めたいと考えている。

2. 試験動物 原則として同一品種(日本種 H4)を用いた。本品種は和田山株に対して強い感受性をもち, しかも各幼虫間のウイルス感受性が均質である(後出)。

3. ウイルス価検定法の手順 山崎ら(1960, 1962)や鮎沢(啓)ら(1964)と同様, ウイルス液を滅菌蒸留水で10段階稀釈し, 各稀釈液に若桑葉を浸し, 風乾後幼虫に添食させて, 発病・致死率を求め, LD₅₀ または LD₆₃ を計算した。

追試の便のために, その手順をやや詳しくのべてみる。

(a) 各ウイルス稀釈液(50~100ml)を小ビーカーに入れ, 1g 前後の若い桑葉を浸し, 水滴が滴下しないまでに水を切つたのち, 空中に吊して風乾させる。この条件で桑葉の表裏両面に附着する水分量は, 桑葉自体の重さの63%前後であつた。この附着水分比は, あとでウイルス感染単位数の計算のとき必要になる。

(b) これらの桑葉を夫々1個あての, 滅菌シャーレ(径15cm)に裏面を上にして入れ, 20~50頭の孵化直後の幼虫(蟻蚕)をつけ25°C で12時間添食させる。蟻蚕は桑葉の表面まで食下するので, 桑葉の両面についてウイルスを桑葉とともに食べることになる。

多数の蟻蚕について, 上の条件下で1頭あたりどの位の桑葉を食べるのか, 測定した結果を表2に示した。これをまとめてみると: 孵化直後の蟻蚕1頭の重さは約0.36mg, 12時間添食後の重さは約0.80mg, 12時間内に

Table 2. The amount of mulberry leaves ingested by new born larvae of the silkworm during the first 12 hours.

	Race of silkworm	The weight of a new born larva before feeding.	The weight of a larva after feeding for 12 hours.	The amount of mulberry leaves ingested by a larva during 12 hours.
Exp. I -11	H ₄ ×H ₄	0.41mg*	0.76mg*	0.75mg
Exp. II -12	H ₄ ×H ₄	0.33mg*	0.84mg*	1.11mg

* Average values of 200 larvae.

Table 3. A protocol of the contamination experiment: The occurrence of secondary infection among the newly hatched larvae of the silkworm which were fed with mulberry leaves contaminated with the feces of sicked larvae.

Exp. I-1. (5-20/66)

Days after virus inoculation	Virus inoculated group:* Virus dilution				Contamination experiment group** : Newly hatched larvae were fed with mulberry leaves contaminated by the feces of the sicked larvae of the virus inoculated group.	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8	2					
9	12	14	7			
10	6	5	6	1		
11		1	6	10		
12				7		
13				1	5	4
14						1
15					1	
16				1	1	2
17					4	2
18						1
19					1	
20					1	
21					5	7
22					11	9
23					5	7
24					2	3
25					1	2
26					1	
27						
28					1	1
29						
30						
Mortality ratio	$\frac{20}{20}$	$\frac{20}{20}$	$\frac{19}{19}$	$\frac{20}{20}$	$\frac{39}{39}$	$\frac{39}{39}$

* Flacherie virus was inoculated *per os* to the new born larvae.

** The newly hatched larvae (born on the same day as the virus inoculated group) were fed with the mulberry leaves which had been contaminated with the feces of the virus inoculated larvae group daily.

食下した桑葉の重さは1頭あたり約0.93mgであつた。

とおおよそ次の値になる。

従つて、上の条件下で経口接種されるウイルス量(V)

$$V = 0.93 \times 0.63 \div 6 \times 10^{-4} \text{ (ml)} \dots\dots\dots (1)$$

を、桑葉を浸したウイルス稀釈液の ml で表わしてみる

上の値は桑葉の質や蚕(mg) 品種によつて多少ちがう

だろうが、一応の目安にはなると思われる。

(c) LD_{50} , LD_{63} の計算法 接種幼虫群は毎日観察し、病死幼虫数を算えた。死蚕は発見のつど試験区から除き、二次感染の機会を最少限にするよう努めた。病死幼虫の一部について病理検査を行い、とくに多角体の形成が陰性であることを確かめた。また一部の病死蚕についてはひきつづき感染実験を行い、軟化病ウイルスによる病死であることを確認した。なお後で触れるが、ウイルスを接種しない対照試験区では病蚕発生がおこらぬことはつねに確認している。

DD_{50} 値の計算はいわゆる Behrens & Kaerber (Kaerber, 1931) 法が合理的だが、 LD_{63} 値の計算のときは Reed & Muench (1938) 法の方が便利のため主として後者によった。いずれにしても大きなちがいはない(表5)。感染力価のあらわし方としては習慣に従つて、 LD_{50} (または LD_{63}) は接種動物群の50% (または63%) 致死率を示すウイルス液の稀釈度であらわすことにした。50% lethal dose という言葉の意味からいうと、真の50% lethal dose とは上の LD_{50} に動物あたりの接種量 (ここでは (1) 式に示すように約 6×10^{-4} ml) を乗じた値にすべきだが、論議の混乱をさけるためここでは

論じない。なお、本論文では病死幼虫の10%乳剤上清をウイルス原液(undiluted)と呼ぶことにする。

(d) 感染単位数 実験の経過中、接種動物群の致死率は Poisson 分布式に基づく single particle 式で表現されることがわかった(後出、(3)式)。この事実に基づいてウイルス原液 1 ml 中の感染単位数(N)は、 LD_{63} の逆数として次のように与えられる。

$$N = 1.7 \times 10^3 \times \frac{1}{LD_{63}} \dots \dots \dots (2)$$

新鮮なウイルス原液(病死蚕の10%乳剤上清)の LD_{63} は $10^{-6.5}$ 前後(表5)だからウイルス原液 1 ml 中の感染単位数はおおよそ 10^{10} 程度である。

実験成績

(1) 飼育ケージ内での二次感染 軟化病ウイルスを接種した幼虫群の間で、一次感染病蚕(の糞を媒介して)二次感染がおこり易いが、正しい LD_{50} 値を得るためにはケージ内二次感染による病死蚕を一次感染によるものから区別する必要がある。この点を明らかにするため、同時に孵化させた幼虫群を2群に分け、一方にはウイルスを経口接種し、他群には、ウイルス接種幼虫に与え、たべのこしの桑葉(感染幼虫の糞で汚染されている)を与えて

Table 4. Daily distributions of the number of died larvae among the Flacherie virus inoculated larvae of the silkworm.

Days after virus inoculation	Dilution of virus stock							Control (Uninfected group)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
1								
2								
3								
4								
5								
6	13	27						
7	17		4					
8		3	4	3		1		
9			21	14	2			
10				3	7			
11				5	3			
12								
13					1			
14								
15					14			
16				4	2	6		
17						3		
18					1	2		
19						2		
20								
Mortality ratio by the 12th day.	$\frac{30}{30}$	$\frac{30}{30}$	$\frac{29}{29}$	$\frac{25}{29}$	$\frac{12}{30}$	$\frac{1}{30}$	$\frac{0}{30}$	$\frac{0}{30}$

Note: The LD_{50} calculated from the above results based on the mortality ratio by the 12th days after inoculation is $10^{-4.77}$ (by the Behrens & Kaerber's method).

Table 5. Reproducible results of the infectivity titrations of a Flacherie virus (strain Wadayama) of the silkworm by means *per os* inoculation.

Virus* dilution	Mortality ratio by the 12th days after inoculation			
	Date of Experiment: May 20/'66		July 28/'66	Aug. 29/'66
	Ser. I	Ser. II		
10 ⁻³	10/10	10/10	20/20	20/20
10 ⁻⁴	10/10	10/10	20/20	20/20
10 ⁻⁵	10/10	9/9	20/20	20/20
10 ⁻⁶	10/10	8/10	18/20	15/20
10 ⁻⁷	2/10	2/10	4/20	5/20
10 ⁻⁸	2/10	0/10	1/20	2/20
10 ⁻⁹	0/10	0/10	1/20	0/20
Uninfected control	0/20	0/20	0/40	0/40
Log ₁₀ (LD ₅₀) B-K**	-6.90	-6.50	-6.70	-6.60
	R-M	-6.75	-6.63	-6.57
Log ₁₀ (LD ₅₀) R-M	-6.55	-6.30	-6.43	-6.34

* The virus stock used was made on May 20, 1966.

** B-K: by the Behren & Kaerber's method.

R-M: by the Reed & Muench's method.

飼育した場合の病蚕発生経過を観察した。その結果(表3)一次的にウイルスを接種した幼虫群は接種後11日目までに殆んど病死しているのに対し、病蚕の排糞接種区では13日以降においてはじめて病蚕が発生することが認められた。従つて、ウイルス接種後12日目までの致死率を基にして LD₅₀ を計算すれば(ケージ内二次感染の影響を避けた)ほぼ正しい感染力価を得ることが出来よう。

鮎沢(啓)ら(1964)が、坂城株ウイルスの力価計算において、同じく12日目までの致死率に基いているのも同様の理由によるものと推量される。

和田山株の力価検査の実例を表4に示した。この表において接種後13日目以降の病死蚕はケージ内コンタミネーションによるものと考えて致死率の計算からは除外した。

(2) LD₅₀ の実測値——検定力価の再現性 -20°C で保存した和田山株ウイルス・ストックの LD₅₀ を前後数ヶ月に亘つてくりかえし測定した成績を表5に示した。ここにみられるように、上の技法が再現性のある信頼できるものであり、またこのウイルスの感染力価が-20°C では数ヶ月にわたり非常に安定に保たれることが理解される。

(3) 接種ウイルス量と発病・致死率の関係 接種動物の致死率(mortality ratio)に基づいてウイルスの感染力価をきめようという検定法では、接種動物の反応(発病・致死)率がウイルス希釈度の対数に対して近似的に

正規分布をなす(その積分値がシグモイド曲線を示す)ことが条件になつている。そこで私どもの生物系がこの条件を満たすかどうか検定したところ、以下のべるような興味深い結果がえられた。

(理論)

(i) **Single particle theory:** 軟化病ウイルスに対する蚕幼虫の感受性が互いに均一であつて、しかも幼虫の発病・致死のためには少くとも1個の感染力をもつウイルス粒子(感染単位)が target tissue²⁾内に侵入しさえすればよいと仮定すると、幼虫あたりの感染単位数(すなわち multiplicity of infection; M.O.I.=m)と、接種された幼虫群の発病・致死率Pの間には Poisson 分布式に基づく次の関係が成立する。

$$P = 1 - e^{-m}, \dots \dots \dots (3)$$

(ii) **Two particle theory:** もし target tissue あたり(幼虫あたりといつてもよい)少くとも2個の感染単位の侵入がおこななければ幼虫が発病・致死しないときはm(=M.O.I.)とPとの間の関係は次のように与えられる。

$$P = 1 - e^{-m} (1 + m), \dots \dots \dots (4)$$

(iii) **Three particle theory:** もし、幼虫の発病・致

脚注2) ウイルスと宿主との間の最初の変渉がおこる標的組織を指す。岩下(1965)によれば軟化病ウイルス感染蚕幼虫での最初の病理学的変化は、中腸皮膜組織の蓋状細胞に認められるという。従つてこのウイルス感染系における target tissue は中腸皮膜組織だと考えてよいだろう。

Fig. 1 Relation between mortality ratios of the virus inoculated larvae of the silkworm and the dilutions of the virus stock. The solid lines are derived on the assumption that one, two or three virus particles initiate infection, respectively. The dots are experimentally determined points; different symbols indicate different experiments. It is noted that the experimentally determined points distribute near the first curve which is derived on the assumption that a single virus particle is adequate to initiate infection.

Fig. 2 Relation between mortality ratios and multiplicity of infection (M.O.I.) of the Flacherie virus in the Weibull's probability paper. Three theoretical curves derived from the Poisson's formula are shown, each of which has been calculated based on the assumption that one, two, or three virus particles are required to initiate infection, respectively. The dots are experimentally determined points. It is seen that the experimental results bear a close resemblance to the theoretical curve which is derived on the assumption that a single virus particle is adequate to initiate infection. A second theoretical curve, derived on the assumption that two particles are required for initiate infection has a greater slope, and therefore deviates more widely from the experimental results.

死のために target tissue に少くとも 3 個の感染力をもつ粒子の侵入が必要である場合は、 P と m との関係は次式で与えられる。

$$P = 1 - e^{-m} \left(1 + m + \frac{m^2}{2} \right) \dots \dots \dots (5)$$

さて、縦軸に致死率 P を目盛り、横軸に m を対数的

に目盛ると(3),(4),(5)式で夫々表わされる曲線は、図1に示すような、夫々傾斜のちがう3本のシグモイド曲線になる。またこれらの関係を Weibull の確率紙⁹⁾ (Plait, 1962, 真壁, 1963) 上に目盛ると(3)式は直線として、(4),(5)式は近似的に直線として、互いに傾斜の異なる直線群がえられる(図2)。

これらに実測値をはめこんでみると、夫々図1, 2に示すように single particle theory に基づく理論曲線にほぼ一致して実測値が分布することが認められた。

(4) 理論曲線と実測値の比較 M.O.I. = 1 の場合の致死率は(3)式から $1 - e^{-1} \approx 0.63$ と期待されるのでまず LD_{63} に相当するウイルス稀釈度を求める。実際には(1)式でのべたように $0.0006 \times LD_{63}$ が真の LD_{63} の値を示すのであるが、理論曲線に対する実測値の適合度を検定するだけの目的のときは、相対的なウイルス稀釈度を単位として分析をすすめて差支えない。さて LD_{63} の計算には Behrens & Kaerber (Kaerber, 1931) より Reed & Muench (1938) 法の方が計算がらくなので主として

脚注3) Weibull 分布 (Plait, 1962; 真壁, 1963) は真空管の寿命や金属の弾性限界などの分布によくあてはまる分布として工場設備保全の問題の分析によく使われ、次のような一般式であらわされる。 $P = F(x) = 1 - e^{-\phi x^n}$ 。この式はもともと n 個の環 (ring) よりなる鎖を x なる力で引っ張ったとき、鎖の切れる確率 (P) はいくらか、という問題の解として与えられた。 n 個のうち唯1個の環が切れば鎖全体の機能は失われるわけだから、この式は一部の故障がその機械全体の不能を意味するような問題にあてはまる。従つて、この式が target tissue の一部が virulent なウイルスの感染を受けた場合の生体の致死率を求める問題にあてはまることは決して偶然ではない。上の式で $\phi x = m$, $m = \text{M.O.I.}$ とおけば(3)式と同型になる。

この方法によつた、 $\text{M.O.I.} = 1$ に相当する LD_{63} が得られれば、任意のウイルス稀釈度における $m = \text{M.O.I.}$ は次のようにして得られる。

$$m = \frac{\text{ある与えられたウイルス稀釈度}}{LD_{63}} \dots (6)$$

M.O.I. 値の計算実例と、各 M.O.I. における致死率の期待値と実験値の比較を夫々表6, 7, 8に示した。ここに single particle theory から導かれた理論的致死率と実験値の近似関係がよみとれよう。

考 察

蚕の伝染性軟化病ウイルスの経口接種法による力価検定に際して試験区間のウイルス・コンタミネーションがおこらぬように注意すれば高い精度で感染力価の測定が可能であることが認められた。

ただし正しい値を得るためには、このウイルスに限つたことではないが、次の一般的注意が厳守されねばならない。

(1) 軟化病ウイルスの伝染力は非常に強いので同一実験室内での試験区相互間で、ウイルス・コンタミネーションが容易におこりうる。これを防じためには各ケージの蓋を完全にし、桑葉の交換時の注意を徹底する必要がある。

(2) 2種以上のウイルス株を同一実験室内で取扱うことは危険である。少くとも標準ウイルス株の継代は、互いに隔離された別室で行わねばならない。実験室は使用に先立つてフォルマリンガスか高度晒粉水溶液による消毒を実施する(渡辺, 他, 1968)。

(3) 試験区間のウイルス・コンタミネーションと用いた桑葉が別種のウイルスで汚染されていない事を監視す

Table 6. Comparison between theoretical and obtained mortality ratios of the Flacherie virusinfected larvae of the silkworm.

Virus dilution	M.O.I. (m)* $m = \frac{\text{A given virus dilution}}{LD_{63}}$	Mortality ratio (P)	
		Expected $P = 1 - e^{-m}$	Obtained $P = \frac{\text{No. died larvae}}{\text{No. inoculated larvae}}$
10^{-3}	30.2	>0.9999	1.00 (30/30)
10^{-4}	3.02	0.88	0.83 (25/30)
10^{-5}	0.302	0.26	0.40 (12/30)
10^{-6}	0.0302	0.030	0.033 (1/30)
10^{-7}	0.00302	0.0030	0.00 (0/30)

$LD_{50} = 10^{-4.73}$ (obtained by the Reed & Muench's method)

$LD_{63} = 10^{-4.48}$ (obtained by the Reed & Muench's method)

* The multiplicity of infection (M.O.I.), m , was calculated as follows:

$$\text{M.O.I. at the virus dilution of } 10^{-4} \text{ is } \frac{10^{-4.0}}{10^{-4.48}} = 10^{-0.48} \approx 3.02$$

Table 7. Comparison between theoretical and obtained mortality ratios of some groups of the silkworm larvae, each of which was inoculated with serially diluted Flacherie virus stock, respectively.

Virus dilution	M.O.I. (m) $m = \frac{\text{A given virus dilution}}{\text{LD}_{50}}$	Mortality ratio (P)	
		Expected $P = 1 - e^{-m}$	Obtained $P = \frac{\text{No. died larvae}}{\text{No. inoculated larvae}}$
10^{-3}	20	>0.9999	1.00
5×10^{-4}	10	0.9995	1.00
2×10^{-4}	5	0.933	1.00
10^{-4}	2.5	0.918	0.90
5×10^{-5}	1.25	0.713	0.60
2×10^{-5}	0.50	0.393	0.45
10^{-5}	0.25	0.221	0.25
5×10^{-6}	0.125	0.118	0.15
2×10^{-6}	0.050	0.049	0.10
10^{-6}	0.025	0.025	0.00
5×10^{-7}	0.0125	0.0125	0.00
2×10^{-7}	0.0050	0.0050	0.00
10^{-7}	0.0025	0.0025	0.00

$$\text{LD}_{50} = 2.8 \times 10^{-5} \quad \text{LD}_{95} = 4.0 \times 10^{-5}$$

Table 8. Infectivity titration of a Flacherie virus of the silkworm, strain Wadayama. Calculation of goodness of fit of experimental with theoretical curves.

Logarithm of virus dilution	Results of Exp. II-10		If 1 particle initiate infection		If 2 particles initiate infection	
	No. of inoculated larvae	No. died larvae ($\bar{x}$)	Expected No. of died larvae	$\frac{(\bar{x} - \bar{x})^2}{\bar{x}}$	Expected No. of died larvae	$\frac{(\bar{x} - \bar{x})^2}{\bar{x}}$
-3.3	20	20	19.99	0.000005	19.999	0.000
-3.7	20	20	18.66	0.0965	19.99	0.00
-4.0	20	18	18.36	0.0071	19.6	0.13
-4.3	20	12	14.26	0.358	16.4	1.18
-4.7	20	9	7.86	0.165	6.6	0.87
-5.0	20	5	4.42	7.81 0.615	2.4	3.34 13.28
-5.3	20	3	2.36		0.74	
-5.7	20	2	0.98		0.17	
-6.0	20	0	0.05		0.03	

$$\chi^2 = 1.2416$$

$$P \approx 0.87$$

$$\chi^2 = 15.46$$

$$P \approx 0.0038$$

るために、非接種幼虫群を対照区として同一実験室内に必ず置く。

(4) 力価検定のさい病死蚕が軟化病ウイルスによる感染死によるものか否か確認するために、死蚕の一部については病理検査を行い、少くとも多角体(封入体)が陰性であることを確認する。最近、須藤・川瀬(1969)は軟化病ウイルスがマウス赤血球を凝集させる事実を報告したが、病死蚕の乳剤中に軟化病ウイルスの存否の、簡

便な認知法として有用だと思われるので今後試みたいと考えている。

次に、接種ウイルス量と幼虫群の致死率の相関々係の分析の結果、蚕幼虫に対する和田山株ウイルスの感染様式が、唯1個の感染力をもつ粒子が target tissue 内に侵入すれば、その幼虫は発病・致死するという様式であることが認められた。予備実験では軟化病ウイルス島根株と埼玉株でも同様の成績がえられている(これらのウ

イルス株の起源については次報で触れる)。

このようなウイルス感染様式は培養細胞に対するウイルス感染実験では一般にみられるし、poxvirus 群の家兎皮内接種実験 (Parker, 1938, 1940; Parker *et al.*, 1941) でも証明されているが、昆虫への経口接種でも見出されることは面白い。このことは軟化病ウイルス virion の感染力が非常に強いことを示すとともに、宿主として用いた蚕幼虫 (日本種 H4 系) の対ウイルス感受性が互いに均一であることを意味している。

謝 辞

本論文を纏めるにさいして、九州大学農学部、鮎沢啓夫教授の御校閲と御教示を頂きました。またウイルスと宿主幼虫との間の dose-response 関係の統計学的処理については、東京大学医科研、松本稔教授ならびに信州大学医学部、広沢毅一講師の御教示を頂きました。記して厚く謝意を表します。

Summary

A method for titrating the infectivity of a Flacherie virus of the silkworm has been described, with special interest to determine the minimum number of virus particles required to cause infection in a larva of the silkworm. Partially purified virus particles were serially diluted and inoculated *per os* to newly hatched larvae of the silkworm (of a Japanese race H4×H4). Most larvae inoculated died between 6 and 12 days after the virus inoculation. Contamination experiment showed that sick larvae due to contamination with feces of the inoculated larvae died always later than the 13th day after the inoculation. Therefore, virus titer (LD₅₀) has been calculated based on the mortality ratios determined by the 12th day after the inoculation. The obtained mortality ratios of the virus-infected larvae groups bore a close resemblance to the theoretical curve (derived from Poisson's formula) on the assumption that a single virus particle is sufficient to initiate infection in a larva.

文 献

- 1) 鮎沢千尋・増尾英子 (1966) 蚕の軟化病ウイルス精製に関する 2, 3 の知見。日蚕学会第36回講演会要旨。pp. 386-387.
- 2) 鮎沢千尋・井上元・河野威雄 (1968) 家蚕ウイルス性軟化病のウイルス株に関する 2, 3 の調査。日蚕雑。37, 253.
- 3) 鮎沢千尋・古田要二・児玉礼二郎・中筋祐五郎 (1968) 家蚕の軟化病発生におけるウイルスと細菌との共同作用。ibid. 37, 395-402.
- 4) Aizawa, K. and Furuta, Y. (1962). Sur un virus de la Flacherie chez le ver à soie, *Bombyx mori*. Coll. Int. Path. Insectes, Paris, pp. 373-376.
- 5) 鮎沢啓夫・古田要二・倉田啓而・佐藤文子 (1964) 蚕の伝染性軟化病ウイルスに関する研究。蚕試験報。19, 223-239.
- 6) 青木清 (1968). 蚕病防除。蚕糸科学と技術。7, 19-23.
- 7) 石川義文・宮島成寿 (1968) 家蚕における軟化病ウイルスと細菌との相互作用。日蚕雑。37, 471-476.
- 8) 岩下嘉光 (1965). ウイルス性軟化病蚕の中腸粘膜組織における組織・細胞病理学的観察。ibid. 34, 263-273.
- 9) 船田敏夫 (1968). 家蚕のウイルス性軟化病に対する抵抗性の遺伝様式。ibid. 37, 281-287.
- 10) Kaerber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. Exp. Path. Pharm. 162, 480.
- 11) 川瀬茂実・須藤千春・山崎寿 (1966) 伝染性軟化病ウイルスの精製について。日蚕学会第36回講演会要旨 pp. 388-389.
- 12) 須藤千春・川瀬茂実 (1969) 蚕の伝染性軟化病に関する研究、特に赤血球凝集反応について。日蚕学会第39回講演会要旨 pp. 44.
- 13) 真壁肇 (1963) ワイブル分布とワイブル確率紙の使い方。標準化。16, 47-56.
- 14) Paillet, A. (1929). La gattine et la flacherie vraie ou flacherie de Pasteur, maladies infectieuses mixtes à ultra-microbe et bactéries. Compt. rend. acid. sci., 189, 308-310.
- 15) Parker, R. F. (1938). Statistical studies of the nature of the infectious unit of vaccine virus. J. Exp. Med. 67, 725-738: (1940). Studies of the infectious unit of myxoma. ibid., 71, 439-444.
- 16) Parker, R. F., Bronson, L. H. and Green, R. H. (1941). Further studies of the infectious unit of vaccinia. ibid., 74, 263-281.
- 17) Plait, A. (1962). The Weibull distribution. Industrial Quality Control. (November), 17-26.
- 18) Reed, L. J. and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent end-points. Am. J. Hyg., 27, 493-497.
- 19) ウイルス実験学総論 (1964) ウイルス学に必要な数値の扱い方の項のうち pp. 356-362. 国立予研学会編(丸善).
- 20) 山崎寿・酒井栄一・下平睦夫・山田たけを (1960). 伝染性のある軟化病 (F) に関する研究。長野県蚕試験報。61, 1-28.
- 21) 山崎寿・山田たけを (1962). 伝染性のある蚕の軟化病 (F) に関する研究(続報1). ibid. 65, 1-73.
- 22) 渡辺正男・船田敏夫・窪田厚・川上武治・有沢邦二・北征三・松尾直 (1968). 各種消毒剤の家蚕伝染性軟化病ウイルスに対する不活化効果。日蚕雑。37, 213-218.