九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Chilo iridescent virusの感染病理に関する研究 : 3. CIVの野外昆虫およびカイコにおける増殖

大庭, 道夫
九州大学農学部生物的防除研究施設天敵微生物学部門

https://doi.org/10.15017/23201

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 30 (1/2), pp.71-81, 1975-08. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌 (Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.)
第30巻 第1・2号 71-81 (1975)

Chilo iridescent virus の感染病理に関する研究

3. CIV の野外昆虫およびカイコにおける増殖

大 庭 道 夫
九州大学農学部生物的防除研究施設
天敵微生物学部門
(1975年3月22日受理)

Studies on the Pathogenesis of *Chilo* Iridescent Virus

3. Multiplication of CIV in the Silkworm, *Bombyx mori* L. and Field Insects

MICHIO OHBA
Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

I. 緒 言

イリデッセントウイルス群に属するウイルスの特異な生物学的性状のひとつとして宿主域の広いことが知られているが，増殖についての定量的な検討は極めて不充分である．いままで調査された結果によると *Tipula* iridescent virus (TIV) は双翅目8種 (Xeros, 1954; Smith *et al.*, 1961)，鱗翅目12種 (Bird, 1961; Smith *et al.*, 1961) および鞘翅目3種 (Smith *et al.*, 1961) で増殖しうるし，また *Sericesthis* iridescent virus (SIV) は双翅目1種，鱗翅目6種および鞘翅目4種で増殖しうる (Steinhaus and Leutenegger, 1963; Day and Mercer, 1964; Day and Dudzinski, 1966)．一方 CIV に関しては Mitsuhashi (1967) が半翅目昆虫における CIV 感染を報告し，また浜 (1968) は鱗翅目および膜翅目の宿主を追加した．その後鞘翅目 (McLaughlin *et al.*, 1972) および双翅目 (Fukuda, 1971) にも経口または経皮接種で感染する昆虫が見いだされており，実験的宿主として知られる昆虫の種類は5目にわたつている．他のイリデッセントウイルスにおいては自然宿主以外の昆虫においての感染の解析はほとんどなされていない．

一般に昆虫ウイルスに限らず動物ウイルスにおいても宿主域は狭い場合が多いが，例外的に arbovirus のように節足動物門と脊椎動物門にまたがり，かつ脊椎動物のいくつかの綱に宿主が分布するウイルスも知られている．またイリデッセントウイルス群の一員と想定されている African swine fever virus はダニおよびブタの双方をともに宿主とする (Plowright *et al.*, 1969)．宿主域を決定する要因としての細胞性レセプターの解析はいくつかの動物ウイルスにおいてなされているが，昆虫ウイルスにおけるこの種の解析にとつてイリデッセントウイルスは前記の性質上特異な立場を占めるものと考えられる．本研究においては CIV の多種昆虫における増殖を定量的に調査し，あわせて本来の宿主とは異なる昆虫で継代した場合におけるウイルスの感染性の変化についても検討を行なつた．

本文にはいるに先立ち昆虫の同定の労をとられた九州大学農学部生物的防除研究施設・村上陽三助教授，同農学部昆虫学教室・矢野宏二助教授および同教養部生物学教室・嶌洪氏に感謝の意を表する．

II. 材料および方法

ウイルス CIV に感染したハチミツガ *Galleria mellonella* の幼虫，前蛹および蛹をプールして 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.2 中で磨砕し，3,000 rpm, 15分間の遠心を2回反復した上清を接種ウイルスとして使用した．場合によつてはそれをさらに 7,000

rpm, 10分間および12,000 rpm, 20分間の分別遠心を数回行なつて得た部分精製ウイルスを使用した.

供試昆虫 実験に使用した昆虫のほとんどは野外から採集した幼虫, 前蛹, 蛹および成虫であり, 卵は使用しなかつた. また幼虫の場合は令についてはしらべなかつた.

ウイルスの接種 接種方法は経口接種および体腔内接種を行なつた. 体腔内接種の場合にはウイルス浮遊液にペニシリン (約100単位/ml) およびストレプトマイシン (約100 μg/ml) を添加した. 経口接種に際してはウイルス浮遊液を食餌に塗抹して風乾後に添食させた. 原則として接種前に感染価を測定した. 接種後の昆虫は22〜30°Cで飼育または保護した.

感染の判定 CIV感染の判定は供試虫を解剖してイリデッセンスの発現の有無をしらべるとともに, その体液または一定量の0.05 Mリン酸緩衝液 pH 7.2中で虫体を磨砕した上清のCIV感染価の測定によつて行なつた. また血球細胞あるいは他の組織の塗抹標本を位相差顕微鏡で観察し, 細胞質封入体の形成の有無にもとづいて判定した場合もあつた. 通常の場合, 判定は接種7〜14日後に行なつたが, 場合によつてはそれ以前に, あるいは50日以上経過後に行なつた例もある.

感染価の測定 接種ウイルス液および供試昆虫の体液, 虫体磨砕液上清のウイルス感染価の測定には, それらを0.05 Mリン酸緩衝液 pH 7.2で10倍階段希釈し, ハチミツガ幼虫 (体重: 150〜200 mg) に注射 (0.005 ml/1頭) した. 注射後ハチミツガ幼虫は22〜23°Cに保護して約1週間後に感染の成立を判定し, Reed and Muench (1938) の方法によつて感染価 ($-\log ID_{50}$) を算定した.

Ⅲ. 実験結果

第1項 鱗翅目昆虫における増殖

1. 経口接種による感染

数種の鱗翅目昆虫にCIVを経口接種した結果はTable 1に示すとおりである. いずれの種においても高い感染価のウイルスを添食させたが, 感染の認められた昆虫はモンシロドクガ *Euproctis similis* 1種のみであり, 脂肪体に青紫色の明瞭なイリデッセンスが観察された. 他の昆虫においてはイリデッセンスの発現あるいは体液におけるウイルス感染価の増加は認められなかつた.

2. 体腔内接種による感染

体腔内にウイルスを注射して感染の認められた鱗翅目昆虫は以下に示す65種である.

スガ科: ツルマサキスガ *Yponomeuta mayumivorellus*

ヒロバスガ科: チシャノキオオヒロバスガ *Ethmia assamensis*

ホソガ科: クチナシホソガ *Parectopa geometropis*

キヌバコガ科: ヨツモンキヌバコガ *Scythris sinensis*

ヒロズコガ科: イガ *Tinea pellionella*

クチブサガ科: コナガ *Plutella xylostella*

キバガ科: イモキバガ *Brachmia macroscopa*

ノコメハマキガ科: モッコクハマキ *Eucosma ancyrota*, グミツマジロハマキ *Aphania geminata*

ハマキガ科: チャハマキ *Homona coffearia*

スカシバガ科: ヒメアトスカシバ *Paranthrene pernix*

メイガ科: ミサキクシヒゲシマメイガ *Sybrida misakiensis*, タケノメイガ *Algedonia coclesalis*,

Table 1. CIV-susceptibility of several lepidopterous larvae by *per os* inoculation.

Species	Inoculum[a)]	Days after inoculation	Iridescence	Inclusion in hemocyte	Infectivity titer of hemolymph[b)]
Zygaenidae					
Illiberis psychina	N. E.	15	—	—	
Lymantriidae					
Euproctis similis	N. E.	15	+	+	
Dasychira pseudabietis	N. E.	13	—	—	<0
Arctiidae					
Hyphantria cunea	6.0	13	—	—	
Spilosoma niveus	7.0	13	—	—	
Lycaenidae					
Lycaena phlaeas	7.38	12	—		<0

a) $-\log ID_{50}$/larva.
b) $-\log ID_{50}$/0.005 ml.
N. E.: Not estimated.

ワタヘリクロノメイガ *Diaphania indica*, クワノメイガ *Diaphania pyloalis*, ヘリグロキンノメイガ *Nagia balteata*, コヨツメノメイガ *Nagia inferior*, ワタノメイガ *Notarcha derogata*, コブノメイガ *Cnaphalocrocis medinalis*

マダラガ科：ミノウスバ *Pryeria sinica*, ウメスカシクロバ *Illiberis psychina*, タケノホソクロバ *Artona funeralis*, ホタルガ *Pidorus glaucopis atratus*

シャクガ科：ヒメシャクの1種 *Scopula* sp., ユウマダラエダシャク *Calospilos miranda*, フトスジエダシャク *Carecomotis repulsaria*, トンボエダシャク *Cystidia stratonice stratonice*, エグリヅマエダシャク *Gonodontis arida*, ウラベニエダシャク *Heterolocha aristonaria niphonica*

ヒトリガ科：アカハラゴマダラヒトリ *Spilosoma punctaria*, クワゴマダラヒトリ *Spilarctia imparilis*, アカヒトリ *Spilarctia flammeolus*

シャチホコガ科：ツマアカシャチホコ *Clostera anachoreta*

イラガ科：ムラサキイラガ *Apoda dentatus*, テングイラガ *Microleon longipalpis*

ドクガ科：リンゴドクガ *Dasychira pseudabietis*, ドクガ *Euproctis flava*, チャドクガ *Euproctis pseudoconspersa*, モンシロドクガ *Euproctis similis*

カレハガ科：カレハガ *Gastropacha quercifolia cerridifolia*

ヤガ科：オオケンモン *Apatele major*, オオバコヤガ *Diarsia canescens*, ヨトウガ *Mamestra brassicae*, ハスモンヨトウ *Spodoptera litura*, シンジュキノカワガ *Elygma narcissus*, ウリキンウワバ *Plusia peponis*, フクラスズメ *Arcte coerulea*, ソトウスモンアツバ *Hydrillodes morosa*

ヤママユガ科：ヤママユガ *Antheraea yamamai*, クスサン *Dictyoploca japonica*, シンジュサン *Philosamia cynthia pryeri*

スズメガ科：キイロスズメ *Theretra nessus*, セスジスズメ *Theretra oldenlandiae*, ホシホウジャク *Macroglossum pyrrhosticta*, オオスカシバ *Cephonodes hylas*, シモフリスズメ *Psilogramma increta*

セセリチョウ科：イチモンジセセリ *Parnata guttata*, キマダラセセリ *Potanthus flavum*

アゲハチョウ科：キアゲハ *Papilio machaon hippocrates*, アオスジアゲハ *Graphium sarpedon*

シロチョウ科：スジグロシロチョウ *Pieris melete*

シジミチョウ科：ベニシジミ *Lycaena phlaeas*

タテハチョウ科：ヒメアカタテハ *Vanessa cardui*, ゴマダラチョウ *Hestina japonica*, ツマグロヒョウモン *Argyreus hyperbius*.

このように鱗翅目における宿主域は経皮接種では26科の昆虫にわたることが示された．接種時の昆虫の発育段階は幼虫，前蛹および蛹であり，成虫は使用しなかつた．幼虫の場合には終令に接種した例が多く，接種後数日で蛹化したが半化蛹や奇型の個体の出現することは稀であつた．また蛹に接種した場合には感染しているにもかかわらず，外見上正常に羽化する個体が多かつたが，羽化できない例もあつた．

感染昆虫の体液または虫体磨砕液の上清はいずれも高いウイルス感染価を示した．これらの感染価の増加が認められた昆虫においては多くの場合イリデッセンスの発現が伴つた．一方感染価が上昇したにもかかわらず，イリデッセンスが観察されなかつた昆虫としてグミツマジロハマキ，ユウマダラエダシャク，アカハラゴマダラヒトリ，ハスモンヨトウ，ウリキンウワバ，クスサン，ホシホウジャクおよびゴマダラチョウがあげられる．

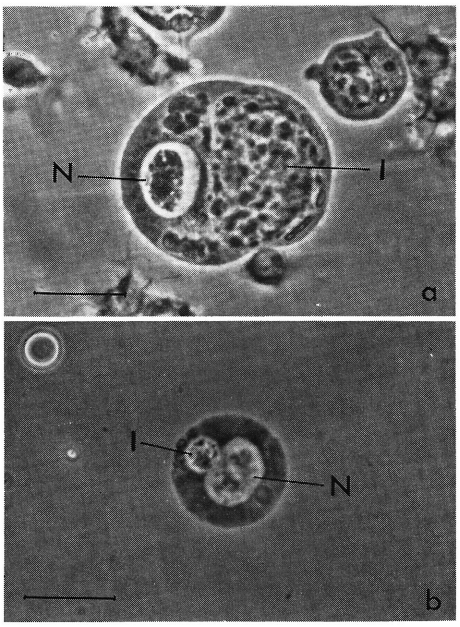

Fig. 1. Formation of cytoplasmic inclusions in the hemocytes of lepidopterous insects. Phase contrast. Scale marker is 20 μ. (a) CIV-infected hemocytes of *Pryeria sinica* larva. I : inclusion, N : nucleus. (b)CIV-infected hemocyte of *Euproctis pseudoconspersa* larva. I: inclusion, N: nucleus .

Table 2. CIV-susceptible lepidopterous insects by intrahemocoelic injection.

Species	Stage	Inoculum[a)]	Days after inoculation	Iridescence	Inclusion in hemocyte	Infectivity titer of hemolymph[b)]
Zygaenidae						
Artona funeralis	Larva	3.68	8	+		6.83
Geometridae						
Carecomotis repulsaria	Larva	3.68	9	+		8.38
Lymantriidae						
Euproctis flava	Larva	2.50	9	+	+	8.00
Papilionidae						
Graphium sarpedon	Pupa	4.50	10	+		8.38
Lycaenidae						
Lycaena phlaeas	Larva	3.68	8	+	+	8.68

a) $-\log ID_{50}$/insect.
b) $-\log ID_{50}$/0.005 ml.

イリデッセンスの発現部位は宿主によつて差異が見られたが通常は脂肪体における発現が多く，絹糸腺，消食管（前腸・中腸・結腸），皮膚，囲心細胞，筋肉，マルピギー管，翅芽，卵管などにも観察された．多くの昆虫においては上記の組織や器官の2つ以上においてイリデッセンスが出現し，全身病的な症状を示した．また絹糸腺やマルピギー管ではイリデッセンスを示す部位の隆起がしばしば観察された．感染体液を位相差顕微鏡で観察すると血球細胞に CIV 感染に特異的な細胞質封入体の形成された種も多かつた（Fig. 1 a および Fig. 1 b）．宿主昆虫は感染判定時以前に CIV によつて斃死することは稀であり，とくにクスサンは接種53日後，ミノウスバは30日後においても生存した．これらの CIV 感受性の昆虫の代表的な種を Table 2 に示す．この表における発育段階は接種時の段階を示している．

一方感染の認められなかつた昆虫も比較的多く，次にあげる種にはイリデッセンスの発現，体液または虫体磨砕液上清における感染価の増加あるいは細胞質封入体の形成のいずれも観察されなかつた．すなわちミノガ科：オオミノガ *Cryptothelea formosicola*；ヒトリガ科：シロヒトリ *Spilosoma niveus*，カクモンヒトリ *Spilarctia inaequalis*；シャチホコガ科：セグロシャチホコ *Clostera anastomosis tristis*，ナカグロモクメ *Harpyia lanigera*；ドクガ科：マメドクガ *Dasychira locuples confusa*；カレハガ科：タケカレハ *Philudoria albomaculata*；ヤガ科：ナシケンモン *Apatele rumicis oriens*，リンゴケンモン *Apatele incretata*，クサシロヨトウ *Leucania loreyi*，アカバキリガ *Orthosia carnipennis*，キバラモクメキリガ *Xylena formosa*；イボタガ科：イボタガ *Brahmaea wallichi japonica* の13種である．

3．ヨトウガにおける CIV の増殖

ヨトウガ *Mamestra brassicae* 幼虫2頭に比較的高い濃度のウイルス（$-\log ID_{50}$=3.50/1頭）を体腔内注射したのち9日後の1頭の体液をしらべたところ，その感染価（$-\log ID_{50}$/0.005 ml）は1.50以下であつて，ウイルスの増殖は認められず，またイリデッセンスの発現も観察されなかつた．他の1個体は正常に化蛹して羽化したが成虫の剖検においてもイリデッセンスは見られなかつた．

さらに高い濃度の CIV を注射した場合における感染を検討するために次の実験を行なつた．すなわち幼虫1頭（体重：250～280 mg）あたり $-\log ID_{50}$=4.50 のウイルスを注射したのち 22～23°C で飼育し，経時的に3頭の体液をプールして感染価の測定を行なつた．結果を Fig. 2 に示す．ウイルス感染価は接種後わずかに減少して5日後まで低い価（$-\log ID_{50}$=0.5～1.0/0.005 ml）が継続したが，感染性の消滅は見られなかつた．その後，前蛹期になつた7日後から感染価の上昇が観察され，最終的には12日後の蛹体液において高い感染価（$-\log ID_{50}$=5.17/0.005 ml）

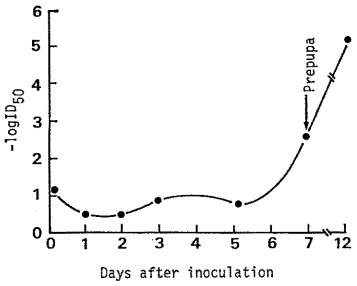

Fig. 2. ID_{50}-time curve of CIV in *Mamestra brassicae*.

に達した．イリデッセンスは12日後に3頭の蛹のうち1個体に明瞭に見られた以外は他のどの時点においても観察されなかつた．

4．カイコ幼虫および蛹における CIV 増殖の差異

カイコ *Bombyx mori* の幼虫に CIV を注射した場合に感染は成立するが接種量によつては感染しない場合もある．そこでウイルスの濃度をかえて注射した場合の体液における感染価の推移を比較し，また同様の実験を蛹を用いて行ない，幼虫および蛹における増殖の差異を検討した．

カイコ幼虫における CIV 増殖：4令幼虫（品種：日124×支124）に ID_{50}=2.17/1頭，5令幼虫（日124×支124）には ID_{50}＝3.50/1頭のウイルスを注射したのち，経時的に5頭の体液をプールしてその感染価を調査した．その結果両者ともに接種直後の体液は感染性を示したが，1日以上経過するともはや感染性は証明されず，また7～8日後においても感染価の回復および上昇は認められなかつた．つぎに高濃度のウイルス（ID_{50}=5.68/1頭）を4令幼虫（日124×支124）に注射した場合についても同様にしてしらべた．その結果は Fig. 3 に示すように接種24時間後に感染価は最低値を示したが，それ以後は漸増し最終的には ID_{50}=6.00/0.005 ml となり高い値を示した．またこの時点で剖検すると5頭中4頭にイリデッセンスが認められた．

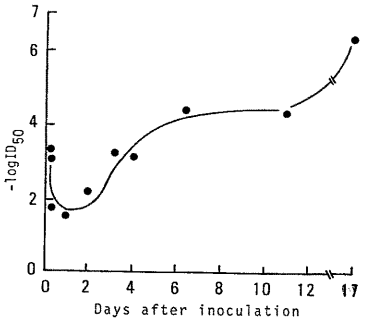

Fig. 3. Infectivity titer of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* during the course of CIV-infection.

カイコ蛹における増殖：蛹（支124×日124）に幼虫の場合と同じく ID_{50}=2.17/1頭および 3.68/1頭を注射した．両者ともにウイルスの増殖は良好であり，前者においては接種6日後に感染価（$-\log ID_{50}$/0.005 ml）は3.83，後者では同じく6日後に6.38となり高い値を示した．ID_{50}=3.68/1頭を日131×支131に注射した場合の増殖曲線には，Fig. 4 に示すように減少期，陰性期および上昇期が認められ定型的であつた．

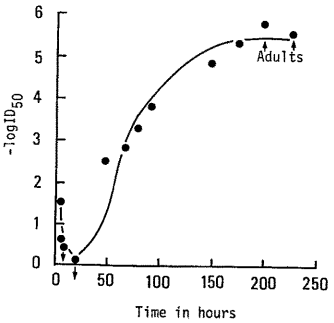

Fig. 4. Infectivity titer of pupal hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* infected with CIV.

5．CIV 感染カイコ蛾尿の感染性

カイコ蛹に CIV を接種するとカイコは外見上正常に羽化して交尾産卵する．羽化の際カイコは蛾尿を体外に放出するので CIV が蛾尿中に存在すれば重要な汚染源になることが考えられる．この点について検討した．

カイコ蛹（支124×日124）に1頭あたりの接種量を ID_{50}=2.17，3.68，4.68の3区にわけて CIV を注射し，対照には 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.2 を注射した．接種1時間後および5日後の3頭の体液をプールしてそれぞれの区の CIV 感染価を測定した．結果は Table 3 に示すようにウイルスの増殖は ID_{50}=3.68，4.68/1頭の両接種区において良好であつた．蛾は CIV 接種9日後から羽化を開始したので，3頭ずつ（場合によつては1頭）の体液および蛾尿をプールして CIV 感染価を測定した．蛾の腹部を軽く圧迫して試験管内に蛾尿を放出させたのちに同じ個体の体液を採集し，蛾尿は 3,000 rpm，10分間の遠心をした上清について調査した．実験結果は Table 4 に示

Table 3. Infectivity titer of hemolymph from CIV-injected silkworm pupae.

Inoculum ($-\log ID_{50}$/pupa)	Infectivity titer of hemolymph[a]	
	1 hr after inoculation	5 days after inoculation
Control[b]	<0	<0
2.17	<0	≦0.38
3.68	1.75	4.50
4.68	2.50	5.33

a) $-\log ID_{50}$/0.005 ml.
b) Injected with 0.05 M phosphate buffer pH 7.2.

Table 4. Infectivity of hemolymph and meconium from CIV-infected moths, *Bombyx mori*.

Inoculum[a]	Exptl. No.	Days after inoculation	No. of moths	Infectivity titer[b] hemolymph	Infectivity titer[b] meconium
Control[c]	1	12	3	<0	<0
	2	12	3	<0	<0
	3	12	3	<0	<0
2.17	1	12	3	1.83	<0
	2	12	3	≦1.17	<0
	3	13	3	5.17	≦0.56
	4	13	1	5.50	<0
3.68	1	10	1	5.46	3.50
	2	12	1	6.33	0.63
4.68	1	9	3	6.00	2.57
	2	10	3	6.00	3.20
	3	12	3	5.83	3.20

a) $-\log ID_{50}$/pupa.
b) $-\log ID_{50}$/0.005 ml.
c) Injected with 0.05 M phosphate buffer pH 7.2.

すとおりである．ID_{50}=2.17/1 頭を接種した場合には体液の感染価は高い場合もありまた低い場合もあつたが，蛾尿の感染性は認められないかまたは極めて低い感染価を示し，さらに剖検においてもイリデッセンスは観察されなかつた．これに対して ID_{50}=3.68/1 頭，あるいは 4.68/1 頭を接種した場合にはいずれも蛾の体液の感染価は高く，さらに蛾尿の感染価も比較的高かつた．しかし蛾尿中のウイルス量は体液中のそれの 1 %以下（0.005 ml あたり）であつた．またこれらの区においては卵管その他に明瞭なイリデッセンスが観察された．

6．シンジュサンおよびカイコにおける CIV の継代

昆虫ウイルスの異種宿主における継代とそれに伴う病原性や感染性の変化については知見が少なく，Aizawa (1962), Veber (1964) らの報告があるにすぎない．そこで本実験においては CIV を本来の宿主とは異なる昆虫で継代し，また継代したウイルスの感染性の変化をしらべた．

シンジュサン *Philosamia cynthia pryeri* の幼虫と蛹を使用して CIV を継代した経過を Table 5 に示す．すなわち感染個体の体液を採取して，適宜 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.2 で希釈したものを別個体に注射することにより，継代が可能であつた．また各代の感染個体には脂肪体にイリデッセンスが観察された．

つぎにカイコ幼虫を用いて CIV を継代したが，

Table 5. Serial passages of CIV through *Philosamia cynthia pryeri*.

No. of passages	Stage	Inoculum[a]	Days after inoculation	Infectivity titer of hemolymph[b]
1	Larva	6.68	8	≧7.00
2	Larva	≧7.00	7	6.63
3	Larva	6.68	9	6.50
4	Pupa	4.50	11	6.50

a) $-\log ID_{50}$/insect.
b) $-\log ID_{50}$/0.005 ml.

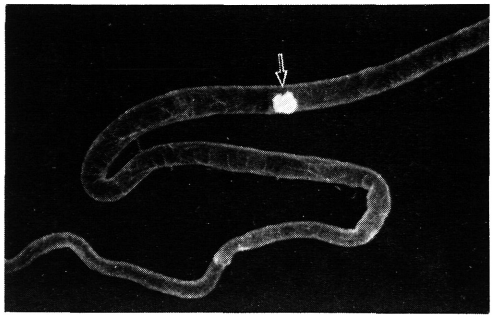

Fig. 5. Silkgland of the silkworm, *Bombyx mori* infected with CIV. Arrow indicates the appearance of iridescence.

CIV 感染シンジュサンの蛹体液を接種ウイルスとして使用した．カイコ幼虫は日 124×支 124 または支 124×日 124 の 4 令を用いたが，継代第 1 代の定量にのみ 4 令蚕〔(秋光×竜白)×(秋光×竜白)〕を使用した．CIV の継代に際し，感染体液の場合は 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.2 で適宜希釈し，組織（とくに絹糸腺）の場合はイリデッセンスを示す部位（Fig. 5）を摘出して，上記緩衝液中で磨砕した上清をできるだけ高い希釈において継代した．

4 代継代した CIV の感染価をハチミツガ幼虫とカイコ幼虫の両者で定量した結果を示すと Fig. 6 のよ

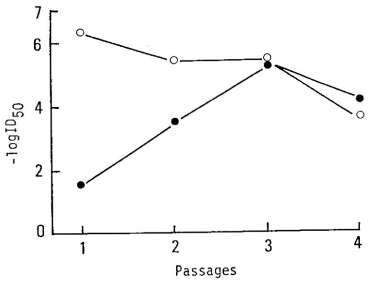

Fig. 6. Increase of infectivity of CIV against the silkworm, *Bombyx mori* by the successive passages through the silkworm. •—•: Infectivity titer against *Bombyx mori*, ○—○: Infectivity titer against *Galleria mellonella* larvae.

うになる．初代においては両者での定量値に約10万倍の差があつたが，継代にしたがつてその差が少なくなり3代ではほぼ同じ値を示し，4代においてはわずかではあるがカイコでの値がハチミツガのそれを上回つた．

第2項　鞘翅目昆虫における増殖

鞘翅目においては7科にわたる8種の昆虫すなわちクワガタムシ科：アカアシクワガタ *Macrodorcas rubrofemoratus*，コクワガタ *Macrodorcas rectus*；コガネムシ科：カブトムシ *Allomyrina dichotomus*；タマムシ科：クズノチビタマムシ *Trachys auricollis*；テントウムシ科：ナナホシテントウ *Coccinella septempunctata bruckii*；カミキリムシ科：アメイロカミキリ *Stenodryas clavigera*；ハムシ科：ヤナギハムシ *Chrysomela vigintipunctata*；ゾウムシ科：クリシギゾウムシ *Curculio dentipes* の各種で体腔内接種によつてウイルスの増殖が認められた．体液あるいは虫体磨砕液の上清はいずれも高い感染価を示し，またイリデッセンスも明瞭であつた．これらの昆虫のうちヤナギハムシの蛹は接種後4～6日で外見上正常に羽化したが，カブトムシおよびアメイロカミキリの蛹は羽化できなかつた．また鞘翅目昆虫での経口接種は行なわなかつた．

第3項　膜翅目昆虫における増殖

ハグロハバチ *Allantus luctifer*（ハバチ科）の幼虫に CIV を体腔内接種（ID_{50}=6.38/1頭）したが，接種5日後の剖検においてイリデッセンスは観察されなかつた．

一方ルリアリ *Iridomyrmex itoi*（アリ科）の蛹に経皮接種（CIV 浮遊液に浸漬した微針で穿刺）したところ，接種11日後において脂肪体に顕著なイリデッセンスが観察され，また蛹5頭を1ml の緩衝液中で磨砕した上清のウイルス感染価（$-\log ID_{50}$/0.005 ml）は6.38であつて高い値を示した．

またヒメバチの1種（ヘリグロキンノメイガ *Nagia balteata* の寄生蜂，ヒメバチ科）の蛹1頭に経皮接種（$-\log ID_{50}$=4.20）した場合，接種11日後の剖検において脂肪体にイリデッセンスの発現が見られ，さらに虫体を1ml の緩衝液中で磨砕した上清も高い感染価（$-\log ID_{50}$=7.68/0.005 ml）を示し CIV の増殖が認められた．

第4項　双翅目昆虫における増殖

クワゴヤドリバエ *Exorista sorbillans*（シンジュサン *Philosamia cynthia pryeri* の寄生バエ，ヤドリバエ科），およびハモグリバエの1種（食草：スイバ，ハモグリバエ科）の囲蛹に穿刺による体腔内接種を行なつたところ，前者では接種6日後において脂肪体に，後者では9日後に同じく脂肪体にイリデッセンスが観察された．またクワゴヤドリバエ囲蛹の3頭を0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.2 の2ml 中で磨砕した上清の感染価（$-\log ID_{50}$/0.005 ml）は7.83，ハモグリバエの1種の1頭磨砕液（緩衝液 0.5 ml）上清の感染価は6.63であり，両者ともにウイルスの増殖は良好であつた．

第5項　その他の昆虫における増殖

体腔内接種によつて次の数目にわたる昆虫における CIV 増殖を検討したが感染は認められなかつた．すなわちエンマコオロギ *Gryllus yemma*（直翅目，コオロギ科），チャバネゴキブリ *Blattella germanica*（ゴキブリ目，ゴキブリ科），オオハサミムシ *Labidura japonica*（革翅目，ハサミムシ科），ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus*（等翅目，ミゾガシラシロアリ科）の各成虫およびウスバカゲロウ *Hagenomyia micans*（脈翅目，ウスバカゲロウ科）の幼虫である．このうちチャバネゴキブリでは剖検において粘液腺にイリデッセンス様の色調が見られたが，これは正常な個体にも常に観察され，また虫体磨砕液上清の感染価の上昇も認められなかつたので CIV 感染によるものではない．

一方経口接種をオオトビサシガメ *Isyndus obscurus*（半翅目，サシガメ科）の成虫に行なつた．すなわち CIV 感染の進行したハチミツガ幼虫（1週間間隔で1頭ずつ合計3頭）を摂食させたのち20日後に剖検を行なつたが，イリデッセンスの発現は観察されなかつた．

以上の結果と異なり直翅目のオンブバッタ *Atractomorpha bedeli*（バッタ科）およびショウリョウバッタ *Acrida turrita*（バッタ科）においては CIV の感染が成立した．オンブバッタの場合雌成虫に CIV を体腔内注射（1頭あたり $-\log ID_{50}$=2.47）したところ，14日後にイリデッセンスは見られなかつたにもかかわらず3頭のプール体液の感染価（$-\log ID_{50}$/0.005 ml）は5.50であつた．つぎに同様に1頭あたり $-\log ID_{50}$=4.50 のウイルスを注射したのち，経時的に3頭の体液をプールして感染価を測定したが，感染価は漸増して接種14日後には $-\log ID_{50}$=7.46 に達しウイルスの増殖は良好であることが示された．

また接種14日後に体液をプールした3頭を解剖したところ，1頭の消食管および脂肪体の1部にイリデッセンスの発現が観察された．

ショウリョウバッタでは幼虫4頭に $-\log ID_{50}=6.30$/1頭を体腔内接種したところ，17日後の剖検においてすべての個体の脂肪体，筋肉にイリデッセンスが認められた．また血球細胞には細胞質封入体の形成が観察された．

Ⅳ. 論　　議

ウイルスの宿主域をしらべる際にはIgnoffo (1968) が指摘しているようにウイルスの形態および接種方法によつて宿主の感受性に差異のあることが考慮されなければならない．すなわちウイルスの形態としてはウイルスが多角体などの封入体に包含された状態，ビリオンの状態あるいは感染性核酸の段階などが考えられる．核酸の段階になると宿主域が拡大されることがいくつかの動物ウイルスや植物ウイルスにおいて知られている．昆虫ウイルスにおいてはカイコ核多角体病ウイルスの感染性核酸で処理されたヒト羊膜由来のFL細胞においてウイルスの増殖が認められた (Himeno *et al.*, 1967)．また同じ形態でも体腔内に接種するかまたは経口接種を行なうかで結果が異なり，体腔内接種の方が感受性の高い場合が多い．さらに宿主として個体を使用するかあるいは培養細胞を使用するかによつても結果が異なることが考えられる．細胞を *in vitro* で培養するとウイルスに対する感受性の増大することが知られているが，哺乳動物由来の培養細胞はSIVおよびCIVには非感受性であるという〔Kelly, 1972 (Kelly and Robertson, 1973 による)〕．一方densonucleosis virusのように本来はハチミツガの病原ウイルスであるにもかかわらず，ハツカネズミ由来のL細胞で増殖した例も報告されている (Kurstak *et al.*, 1969)．しかしウイルスの野外における生活環においては宿主個体とビリオン段階以上の組合せがウイルスを存続させうるものと考えられ，微生物的防除の立場からこのような調査は重要である．その意味において本研究ではすべて *in vivo* におけるCIV感受性を検討した．

宿主域をしらべる場合にさらに問題となる事項はウイルス感染の成立の判定である．昆虫のウイルス感染においてはいわゆる潜在感染を別とし厳密な定義にもとずく不顕性感染の例は知られておらず，またその証明も非常に困難と考えられる．しかし亜急性あるいは慢性的な感染様式を示すウイルスも知られており，このようなウイルスは低い水準で増殖し，病徴は明瞭でない場合や，ウイルス産生は顕著であつても病徴はなく宿主を斃死させない場合などが考えられる．Hurlbut and Thomas (1960) は動物ウイルスとして知られているarbovirus群に属する13種のウイルスに，本来の自然宿主を含めて6目にわたる8種の昆虫およびダニ1種が，体腔内接種により感染することを報告した．この場合ウイルスの増殖は著しいにもかかわらず宿主は外観上には何ら影響をうけなかつたので，その増殖はハツカネズミによるウイルス定量で判定された．これらのことからイリデッセントウイルスの感染の指標は詳細に検討されなければならない．イリデッセントウイルスの感染の判定は主にイリデッセンスの発現の有無によつてきた．しかし浜 (1968) も指摘するようにイリデッセンスの発現の不在が必ずしも昆虫の非感受性を表わすものとは考えられない．

本研究においては剖検によるイリデッセンスの観察と並行して供試昆虫の体液あるいは虫体磨砕液上清のCIV感染価の測定を行ない，指示昆虫としてハチミツガ幼虫を使用した．また場合によつては細胞質封入体の観察を位相差顕微鏡で行なつて感染を判定した．これらの指標をもとにしてCIV感染の認められた昆虫は鱗翅目の26科にわたる65種，鞘翅目7科8種，膜翅目2科2種，双翅目2科2種および直翅目1科2種であり総計5目の79種となつた．

昆虫の種または個体によつてはイリデッセンスが観察されないにもかかわらず，その体液または虫体磨砕液でのCIV感染価の増加が認められたので，感染の判定は最終的には感染価の測定による必要があると考えられる．

鱗翅目昆虫のクスサン，ヤママユガおよびヨトウガは浜 (1968) によればCIVに非感受性であるが，本実験においてはウイルス増殖が認められた．一方いずれの指標を用いてもCIVの増殖が認められない昆虫も比較的多く存在したが，これらについては接種時の発育段階あるいは接種ウイルス量などを考慮してさらに詳細な検討をする必要がある．CIVの鞘翅目，双翅目および膜翅目昆虫における感染はすでに報告されているが (浜, 1968; Fukuda, 1971; McLaughlin *et al.*, 1972)，それぞれの目においてさらに多くの昆虫が宿主として追加された．またCIV感染の成立したオンブバッタおよびショウリョウバッタはイリデッセントウイルスが直翅目昆虫で増殖したものとしては最初の例である．

このように従来の知見をあわせると6目にわたる

100種以上の昆虫が CIV の宿主となりうる．これはウイルスのレセプターおよび宿主特異性を考えるうえで CIV が特異な立場を占めることを示唆する．いくつかの動物ウイルスにおいては，ウイルス感染に対する初期の反応に細胞性レセプターの存在が重要な意義をもつことが知られており，その物質的な解析も進められている．またファージにおいても同様にレセプターの存在が感染の成立に必要である．このレセプターの概念がウイルス全般に適用できるものと仮定した場合，CIV に対する細胞性レセプターは宿主域が非常に広いこと，また多くの組織および器官が感染して全身病的な症状を呈することから考えて，昆虫の細胞膜または細胞内に普遍的に存在しかつ基本的な成分となつている物質と推定される．これはたとえば昆虫の中腸細胞でのみ増殖するが比較的宿主域の広い細胞質多角体病ウイルス（Tanaka, 1971），あるいはいろいろな器官や組織を侵すが宿主域が狭いといわれる核多角体病ウイルスなどと比較すると極めて興味のある現象である．CIV の宿主域を昆虫綱に限らず，節足動物を主とする無脊椎動物におよんで詳細に検討することは，CIV 感染に対する宿主要因としてのレセプターの分布について系統発生的な立場からの考察を可能にすると考えられる．

CIV に対する感受性はまた昆虫の発育段階によつても変化することが示唆された．すなわち CIV のカイコ幼虫および蛹における増殖を定量的にしらべると，両者の間に大きな差異が見られ，幼虫の感染が困難な比較的低濃度のウイルス接種で蛹は容易に感染する．鮎沢・荒武（1969）はマツカレハ *Dendrolimus spectabilis* の細胞質多角体病ウイルスに対するカイコ幼虫の感受性は令が進むにつれて低下することを報告した．また動物ウイルスとその宿主との間にも類似の現象が知られており，これらの現象は宿主の発育にともなつてウイルスに対する細胞性レセプターが mask されることを示唆している．一方 CIV とカイコの場合には幼虫から蛹に至る変態の過程で，mask されていたレセプターが発現されることも考えられる．同じような結果がヨトウガにおいても得られた．すなわち CIV を接種したヨトウガ幼虫の体液の感染価は接種後5日間は低い値を持続したが，前蛹以後にその値は上昇を開始した．変態にともなつてウイルスに対する感受性が変化することの解析にとつてもレセプターの物質的な解明が今後必要であると考えられる．

通常カイコ幼虫では増殖の困難である CIV を幼虫で継代した場合，継代第4代において著しい感染性の増強が認められウイルスの宿主適応が起つたことが示唆された．しかしながら感染性の増強と致死性との関連については知られておらず，この問題は今後さらに追求される必要がある．

V. 摘　　要

1．感染を判定する指標として今まで全く検討されなかつた細胞質封入体の形成および供試昆虫体液または虫体磨砕液の CIV 感染価の調査により，多種の昆虫における CIV の増殖が確かめられた．すなわち経口接種によつて鱗翅目1種が感染し，体腔内接種によつて鱗翅目の26科65種，鞘翅目7科8種，膜翅目2科2種，双翅目2科2種および直翅目1科2種が CIV に感染した．

2．直翅目のオンブバッタ *Atractomorpha bedeli*（バッタ科）において得られた ID_{50}-時間曲線は宿主における CIV の増殖を明瞭に示した．またショウリョウバッタ *Acrida turrita*（バッタ科）においては顕著なイリデッセンスの発現がみられ直翅目昆虫がイリデッセントウイルスの宿主となりうることが明らかとなつた．

3．感受性昆虫のいくつかの種においてはイリデッセンスの発現がみられないにもかかわらず感染価の増加が認められた．このことは CIV 感染の最終的な判定は感染価の測定によらねばならないことを示している．

4．カイコおよびヨトウガを使用してウイルスの定量実験を行なつたところ，変態によつて宿主の CIV 感受性の変化することが明らかにされた．すなわち蛹化にともなつて感受性の顕著な増大が見られた．

5．自然宿主ではないカイコおよびシンジュサンを用いて CIV の継代を試みたが，ウイルスの継代は良好であつた．

6．限界希釈法によつて CIV をカイコ幼虫で継代すると，第4代においてカイコに対する感染性が顕著に増強された．これは CIV の感染性を特定の害虫に対してのみ増強させうる可能性を示唆する．

7．CIV に感染したカイコ蛹は外見上正常に羽化して交尾および産卵を行なつたが，羽化の際に体外に放出される蛾尿中に比較的多量の CIV が存在することが明らかとなつた．したがつて卵面汚染による次代感染の可能性も考えられ，これは昆虫ウイルスの疫学において今まで知られていなかつた現象である．

8．CIV 感染の認められなかつた昆虫も比較的多

く，鱗翅目，直翅目，ゴキブリ目，等翅目，網翅目，半翅目，革翅目などにわたつたが，これらの昆虫においては感染の成立はウイルスの接種量，時期，方法を考慮する必要があると考えられる．

VI. 文　　献

Aizawa, K. 1962 Infection of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Linnaeus), with the nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus). *J. Insect Pathol.*, **4**: 122-127

鮎沢千尋・荒武義信 1969 マツカレハ細胞質多角体病ウイルスの蚕への影響に関する研究．蚕試報，**23**: 469—497

Bird, F. T. 1961 The development of *Tipula* iridescent virus in the crane fly, *Tipula paludosa* Meig., and the wax moth *Galleria mellonella* L. *Can. J. Microbiol.*, **7**: 827-830

Day, M. F. and M. L. Dudzinski 1966 The effect of temperature on the development of *Sericesthis* iridescent virus. *Aust. J. Biol. Sci.*, **19**: 481-493

Day, M. F. and E. H. Mercer 1964 Properties of an iridescent virus from the beetle, *Sericesthis pruinosa*. *Aust. J. Biol. Sci.*, **17**: 892-902

Fukuda, T. 1971 *Per os* transmission of *Chilo* iridescent virus to mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, **18**: 152-153

浜 弘司 1968 *Chilo* iridescent virus の交差感染に関する研究．応動昆，**12**: 34—39

Himeno, M., F. Sakai, K. Onodera, H. Nakai, T. Fukada and Y. Kawade 1967 Formation of nuclear polyhedral bodies and nuclear polyhedrosis virus in the silkworm in mammalian cells infected with viral DNA. *Virology*, **33**: 507-512

Hurlbut, H. S. and J. T. Thomas 1960 The experimental host range of the arthropod-borne animal viruses in arthropods. *Virology*, **12**: 391-407

Ignoffo, C. M. 1968 Specificity of insect viruses. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, **14**: 265-276

Kelly, D. C. and J. S. Robertson 1973 Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. gen. Virol.*, **20**: 17-41

Kurstak, E., J.-R. Côté, S. Belloncik, S. Garzon, M. Trudel and A. Chagnon 1969 Infection des cellules L de la souris par le virus de la densonucléose. *Rev. Can. Biol.*, **28**: 139-141

McLaughlin, R. E., H. A. Scott and M. R. Bell 1972 Infection of the boll weevil by *Chilo* iridescent virus. *J. Invertebr. Pathol.*, **19**: 285-290

Mitsuhashi, J. 1967 Infection of leafhopper and its tissues cultivated *in vitro* with *Chilo* iridescent virus. *J. Invertebr. Pathol.*, **9**: 432-434

Plowright, W., J. Parker and M. A. Peirce 1969 African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature*, **221**: 1071-1073

Reed, L. J. and H. A. Muench 1938 A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493-501

Smith, K. M., G. J. Hills and C. F. Rivers 1961 Studies on the cross-inoculation of the *Tipula* iridescent virus. *Virology*, **13**: 233-241

Steinhaus, E. A. and R. Leutenegger 1963 Icosahedral virus from a scarab (*Sericesthis*). *J. Insect Pathol.*, **5**: 266-270

Tanaka, S. 1971 Cross transmission of cytoplasmic polyhedrosis viruses. *In* "The Cytoplasmic-polyhedrosis Virus of the Silkworm," ed. by H. Aruga and Y. Tanada, University Tokyo Press, pp. 201-207

Veber, J. 1964 Virulence of an insect virus increased by repeated passages. *Entomophaga Mém. hors Sér. No. 2*, 403-405

Xeros, N. 1954 A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature*, **174**: 562-563

Summary

The multiplication of CIV was analysed by markers such as iridescence, cytoplasmic inclusion, and infectivity titer of the hemolymph or homogenate of insect.

1. Experimental hosts of CIV found by *per os* inoculation and intrahemocoelic injection were as follows:

Lepidoptera: 65 species (26 families); Coleoptera: 8 species (7 families); Hymenoptera: 2 species (2 families); Diptera: 2 species (2 families); Orthoptera: 2 species (1 family).

2. Apparent increase of the infectivity was shown in ID_{50}-time curve in the

hemolymph of *Atractomorpha bedeli* (Orthoptera: Acrididae). In *Acrida turrita* (Acrididae), iridescence was observed in CIV-injected nymph. These results are the first evidence of the multiplication of the iridescent virus in orthopteran insects.

3. In general, the appearance of iridescence was accompanied with the increase of CIV-infectivity. However, no iridescence could be observed in some cases, although the increase of infectivity in hemolymph or homogenates of whole bodies were observed. Accordingly, the infectivity titer should be considered to be the most important marker in CIV-infection.

4. The susceptibility of insects to CIV remarkably increased during metamorphosis from larvae to pupae in the quantitative experiments on the multiplication of CIV using lepidopterous insects such as *Bombyx mori* (Bombycidae) and *Mamestra brassicae* (Noctuidae).

5. Serial passages of CIV through *B. mori* and *Philosamia cynthia pryeri* (Saturniidae) were successfully done.

6. The infectivity of CIV to larvae of the silkworm, *B. mori* remarkably increased after serial passages through the larvae of the same host insect.

7. Adults of *B. mori* emerged from CIV-infected pupae copulated and oviposited normally, although their hemolymph showed high infectivity. CIV-infectivity of meconium from these newly emerged adults showed also relatively high level of titer.

8. Relatively many species from Lepidoptera, Orthoptera, Bllattaria, Isoptera, Neuroptera, Hemiptera, and Dermaptera were not susceptible to CIV, and defense mechanisms in these insects should be further analysed.