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 : 4. CIVと異種昆虫ウイルスとの重感染

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/10.15017/23202

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 30 (1/2), pp.83-86, 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 83-86 (1975)

Chilo iridescent virus の感染病理に関する研究

4. CIV と異種昆虫ウイルスとの重感染

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

4. Simultaneous Infection of CIV and a Nuclear Polyhedrosis Virus

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

I. 緒 言

宿主が2種の異なるウイルスに同時に感染した場合，現象的にはつぎの3つの場合が考えられる．すなわち，一方のウイルスが他方のウイルスの増殖を抑制する場合，逆に増強する場合，両者が共存的に増殖する場合である．一方のウイルス感染が他方のウイルス増殖を抑制する例としては，動物ウイルスのウイルス抑制因子またはインターフェロンによる干渉が知られている (Nagano and Kojima, 1954; Issacs and Lindenman, 1957). 昆虫ウイルスにおける重感染に関しては多くの報告があるが，これらのほとんどは核多角体病ウイルス (NPV)，細胞質多角体病ウイルス (CPV) およびグラニュローシスウイルス (GV) などの occluded virus に関するものであり，また定性的な実験にとどまっていることが多い．Tanada (1959) はアワヨトウの近縁種である *Pseudaletia unipuncta* における NPV と GV の synergism を報告した．これは GV の封入体蛋白に NPV の感染性を増強させる要因が存在することによるといわれる (Tanada and Hukuhara, 1971). また，Bird (1959) はトウヒノシントメハマキ *Choristoneura fumiferana* において GV を先に接種した場合，NPV の感染が阻止されることを報告した．一方，イラクサキンウワバ *Trichoplusia ni* においては，NPV と CPV との間に synergism や干渉効果は見られないことが定量的に明らかにされた (Lowe and Paschke, 1968).

これに対して nonoccluded virus についての研究は乏しいが，Garzon and Kurstak (1972) は2種の2本鎖 DNA ウイルスを用いた実験結果について報告した．すなわち，細胞質で増殖する nonoccluded virus である TIV，および核で増殖する NPV に重感染したハチミツガ幼虫においては，同一細胞内で両ウイルスの増殖が観察された．また，TIV および densonucleosis virus (核で増殖する1本鎖 DNA ウイルス) を用いた場合にも，同一細胞における両者の増殖が示された (Kurstak *et al.*, 1972) が，定量的な解析はなされていない．

本研究においてはカイコ NPV と CIV を使用してカイコ蛹およびハチミツガ幼虫における両ウイルスの重感染を定量的に解析することを目的とした．

II. 材料および方法

ウイルス NPV に感染したカイコ幼虫の体液の遠心上清 (7,000 rpm, 10分間) を接種ウイルスとして使用した．また，CIV は感染ハチミツガ幼虫および蛹を 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.2 中で磨砕し，7,000 rpm, 10分間および 12,000 rpm, 20分間の分別遠心を数回反復して得た部分精製ウイルスを使用した．

供試昆虫 カイコ蛹としては秋光×竜白を使用した．また，ハチミツガは体重 150～200 mg の幼虫を使用した．

ウイルスの接種および定量 両ウイルスともに体腔内接種を行ない，ウイルス接種量はカイコ蛹およびハチミツガ幼虫ともに 0.005 ml/1 頭とした．接種後に昆虫を 22～23°C で保護または飼育した．ウイルス感染価（NPV の場合には $-\log LD_{50}$/0.005 ml，CIV の場合には $-\log ID_{50}$/0.005 ml）は Reed and Muench (1938) の方法にしたがつて計算した．

抗血清の調製 抗 NPV 血清は感染カイコ幼虫体液の上清（7,000 rpm，10 分間）を家兎の静脈内に 10 回（約 13 ml/1 頭）注射して，最後の注射から 8 日後に全採血を行なつて調製した．抗 CIV 家兎免疫血清の調製は部分精製ウイルス（7,000 rpm，10 分間および 12,000 rpm，20 分間の分別遠心を数回反復；$-\log ID_{50}$=8.0/0.005 ml）の 3 ml を 6 回にわけて静脈内注射し最後の注射から 7 日後に全採血した．両血清ともに使用前に 56°C で 30 分間加熱して非働化を行なつた．

血球細胞の観察 ハチミツガ幼虫の血球細胞は体液をスライドガラスに塗抹したのち風乾し，メタノールで 5 分間の室温固定を行なつたのちにギムザ染色を施して鏡検した．

Ⅲ. 実験結果

第 1 項 カイコ蛹における NPV および CIV の重感染

カイコ蛹に NPV（$-\log LD_{50}$=3.0）および CIV（$-\log ID_{50}$=3.68）の等量混合液を体腔内に接種したのち，経時的に 5 頭の体液をプールして NPV および CIV を定量したが，方法は Fig. 1 に示すとおりである．すなわち，プール体液を 2 等分して一方を抗 CIV 免疫血清（CIV に対する中和指数：約 3.2）と等量混合し 27°C，1 時間処理してカイコ蛹で NPV の定量を行なつた．また．他方を同様に抗 NPV 免疫血清（NPV に対する中和指数：5.0 以上）で処理したのち，ハチミツガ幼虫を用いて CIV の定量を行なつた．対照には NPV および CIV のそれぞれを単独で接種し，上記と同様の血清処理を施して感染価を測

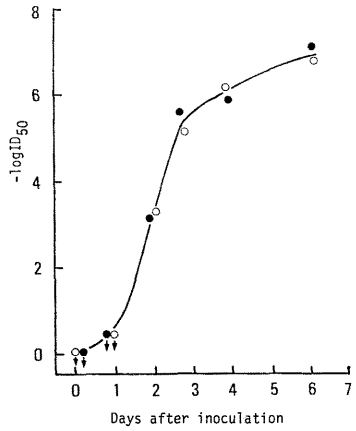

Fig. 2. LD_{50}-time curve of silkworm NPV in the silkworm pupae simultaneously infected with CIV and NPV. •—•: Titer of NPV in simultaneous infection, ○—○: Titer of NPV in single infection.

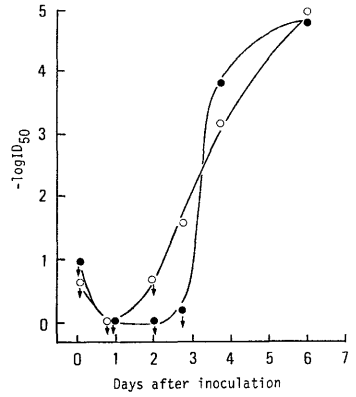

Fig. 3. ID_{50}-time curve of CIV in the silkworm pupae simultaneously infected with CIV and NPV. •—•: Titer of CIV in simultaneous infection, ○—○: Titer of CIV in single infection.

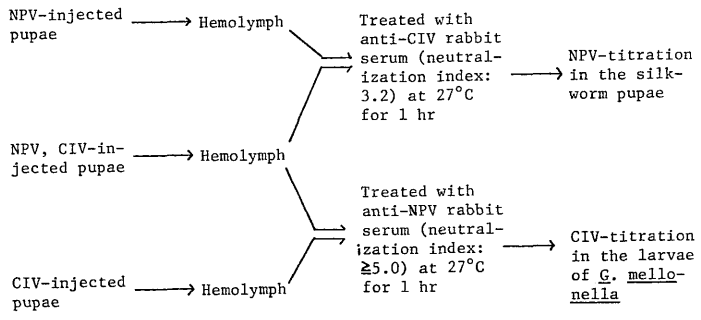

Fig. 1. Infectivity titration of CIV and NPV in the hemolymph from the silkworm pupae infected with both viruses simultaneously.

定した.

その結果を Fig. 2 および Fig. 3 に示す. NPV および CIV に重感染したカイコ蛹における NPV の LD_{50}-時間曲線と NPV 単独感染蛹におけるそれとの間に差異は見られなかつた. また, 重感染した蛹における CIV の ID_{50}-時間曲線と CIV 単独感染蛹におけるそれとの間にも差異は見られなかつた.

第2項 ハチミツガ幼虫血球細胞における NPV および CIV の重感染

ハチミツガ幼虫は CIV およびカイコ NPV (Aizawa, 1962) の両者に感受性であることが知られているので, その血球細胞を重感染の観察に使用した.

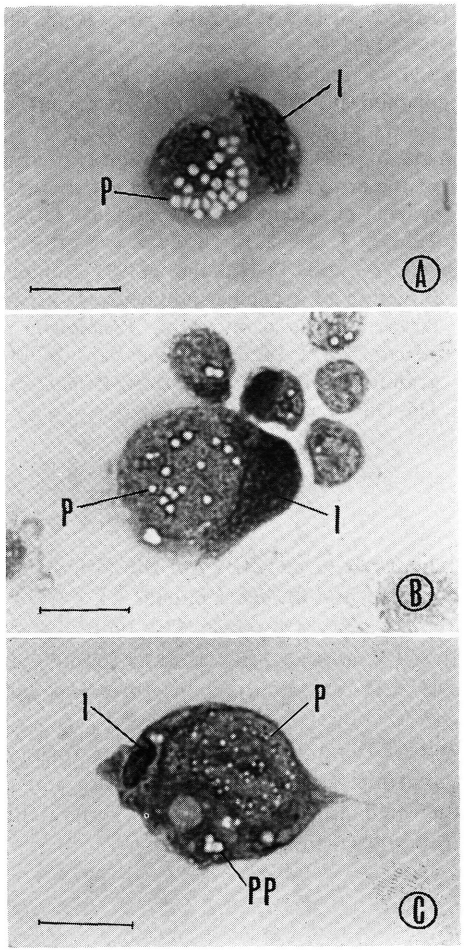

Fig. 4. Hemocytes of *Galleria mellonella* larvae simultaneously infected with CIV and silkworm NPV. Scale marker is 20 μ. Giemsa stain. (A) Polyhedra (P) are seen in the nucleus and the cytoplasmic inclusion (I) can be seen in the cytoplasm. (B) Double infection in hemocyte. P: polyhedra, I: cytoplasmic inclusion of CIV. (C) P: polyhedra, I: inclusion of CIV, PP: phagocytosed polyhedra in the cytoplasm.

カイコ蛹の場合と同じく NPV と CIV の混合浮遊液をハチミツガ幼虫に体腔内注射した. 接種後経時的に血球細胞を観察すると幼虫によつて, またウイルス接種量によつても異なつたが, 接種後約7日を経過すると次の4種の血球像が観察された. すなわち, 正常な血球細胞, 細胞核に多角体の形成された NPV 感染細胞, 細胞質に封入体の形成された CIV 感染細胞および核多角体と細胞質封入体が同時に形成された重感染細胞である. NPV および CIV に重感染した血球細胞を Fig. 4 に示すが, その出現の比率は少なかつた. また, 重感染をした細胞の種類は判別できなかつた.

IV. 論　　議

本研究においては個体レベルでの重感染を従来の死亡率などを使用した研究とは違つた観点からしらべたものであるが, ウイルスの産生量から検討した限りでは NPV および CIV は互いにその増殖を抑制せずまた増強も認められなかつた. このことから両ウイルスはカイコ蛹の個体段階では共存的に増殖することが明らかである. しかし, 細胞段階においてはそれぞれのウイルスの単独感染であることも考慮する必要がある. ハチミツガ幼虫の血球細胞においては頻度は高くなかつたが, 両ウイルスに重感染した場合も観察された. すなわち, NPV と TIV に重感染したハチミツガ幼虫の血球 (Garzon and Kurstak, 1972) と同様に, NPV と CIV の場合にも両ウイルスが増殖の場を異にするために重感染が成立しやすいとも考えられる. しかし, 上記の NPV および TIV, あるいは TIV と DNV (Kurstak *et al.*, 1972) の系では細胞学的観察がなされたのみであり, ウイルス産生の量的関係は明らかにされておらず, さらに検討が必要であろう. また, CIV と NPV 以外のウイルスとの重感染の解析あるいはウイルスの接種量を変えた場合, また両ウイルスの接種時の間隔を変えた場合などにおける調査はさらに追求されねばならない.

V. 摘　　要

1. カイコ蛹およびハチミツガ幼虫を用いて CIV およびカイコ核多角体病ウイルス (NPV) の重感染について検討した. すなわち, 両者を同時に体腔内接種したところ明瞭な重感染の成立が見られた.

2. 重感染したカイコ蛹の体液における NPV の

LD_{50}-時間曲線と対照（NPV 単独感染）のそれとを比較すると，両者に差異は認められなかつた．また，同様に重感染したカイコ蛹の体液における CIV の ID_{50}-時間曲線をしらべると，対照のそれと差異は見られず，カイコ蛹においては両ウイルスは相互に干渉または synergistic な効果をおよぼさないといえる．

3．ハチミツガ幼虫に両ウイルスを同時に接種すると，両ウイルスに同時感染した血球細胞が観察された．したがつて CIV と NPV は同一細胞内においても共存的に増殖しうることが明らかにされた．

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. Invertebr. Pathol.*, **4**: 122-127

Bird, F. T. 1959 Polyhedrosis and granulosis viruses causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens. *J. Insect Pathol.*, **1**: 406-430

Garzon, S. and E. Kurstak 1972 Infection double inhabituelle de cellules d'un arthropode par le virus de la polyédrie nucléaire (VPN) et le virus irisant de *Tipula* (TIV). *C. R. Acad. Sci.* D, **275**: 507-509

Issacs, A. and J. Lindenman 1957 Virus interference. I. The interferon. *Proc. Roy. Soc.* B, **147**: 258-267

Kurstak, E., S. Garzon and P. A. Onji 1972 Réplication simultanée de deux virus à DNA. Microscopie de fluorescence et electronique. *Arch. ges. Virusforsch.*, **36**: 324-334

Lowe, R. E. and J. D. Paschke 1968 Simultaneous infection with the nucleopolyhedrosis and granulosis viruses of *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, **12**: 86-92

Nagano, Y. and Y. Kojima 1954 Pouvoir immunisant du virus vaccinal inactivé par des rayons ultraviolets. *C. R. Soc. Biol.*, **148**: 1700-1702

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

Tanada, Y. 1959 Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). *J. Insect Pathol.*, **1**: 215-231

Tanada, Y. and T. Hukuhara 1971 Enhanced infection of a nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, by a factor in the capsule of a granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, **17**: 116-126

Summary

Simultaneous infection of CIV and nuclear polyhedrosis virus (NPV) of the silkworm, *Bombyx mori* occurred in both *Galleria mellonella* larvae and *B. mori* pupae.

LD_{50}-time curve of NPV in simultaneously infected silkworm pupae with both viruses was very similar to that in pupae infected with NPV alone. It was also found that there was no difference between multiplication of CIV in simultaneous infection and that in single infection of CIV.

In simultaneously injected *Galleria* larvae with CIV and NPV, hemocytes formed concurrently nuclear polyhedra in nuclei and cytoplasmic inclusions of CIV were sometimes observed. From these results, it was suggested that there were no synergistic effect or interference between CIV and NPV of the silkworm.