

Chilo iridescent virusの感染病理に関する研究 : 2. CIVの持続感染

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/10.15017/23200>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 30 (1/2), pp.67-70, 1975-08. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



Chilo iridescent virus の感染病理に関する研究

2. CIV の 持 続 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

2. Persistent Infection of CIV *In Vitro*

MICHIO OHBA

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

I. 緒 言

動物ウイルスにおいては培養細胞における持続感染に関し多くの研究がなされている (Walker, 1964). しかし、これらの細胞系におけるウイルスの保持様式にはその成立過程および性状に多様性が見られ、それぞれの場合について詳細な検討がなされてきた。

一方、昆虫ウイルスにおいては Mitsuhashi (1967) によつて *Chilo iridescent virus* (CIV) に偶然に感染したニカメイガ *Chilo suppressalis* 由来の培養血球細胞から持続感染細胞株がはじめて確立された。昆虫培養細胞における持続感染としては動物の arbovirus である日本脳炎ウイルス および マレーバレー脳炎ウイルスに持続感染したネッタシマカ *Aedes aegypti* 由来の培養細胞株 (Řeháček, 1968) が報告されて以来、arbovirus (Banerjee and Singh, 1968; Peleg, 1969) や vesicular stomatitis virus (Artsoob and Spence, 1974) とカの培養細胞の系で持続感染が多く成立している。しかし、昆虫ウイルスとしては上記の CIV の例が唯一のものである。

CIV 持続感染細胞株の性状をしらべることは、ウイルスと宿主の相互関係、たとえば CIV 産生は急激であるにもかかわらず症状は亜急性もしくは慢性的に進行することなどの問題を解析するうえで、細胞レベルの考察を可能にするものと考えられる。

II. 材料および方法

細胞培養 CIV に持続感染したニカメイガの血球細胞株は三橋淳博士から分与を受けた。培養液 (CSM-2F) の組成は Mitsuhashi (1967) により、また培養温度は 25°C とした。継代は 1~2 週間の間隔で行ない、培養開始時の細胞数は $10^4 \sim 10^5$ /ml とした。細胞数の算定には Thoma 血球計算盤を使用した。

感染価の測定 感染価はハチミツガ幼虫 (150~200 mg) を使用して測定した。ウイルス浮遊液を 0.05M リン酸緩衝液 pH 7.2 で 10 倍階段希釈し、各階段ごとに 5 頭の幼虫に 0.005 ml/1 頭を体腔内注射した。感染の判定は接種後 1~2 週間目にイリデッセンス発現の有無をしらべ、また血球細胞における細胞質封入体の形成の鏡検を併用した。感染価 ($-\log ID_{50}$) の算定は Reed and Muench (1938) の方法によつた。

蛍光抗体法 抗 CIV 家兔免疫血清から川村 (1966) の方法によつて作製した蛍光抗体を使用した。蛍光色素は FITC を用いた。また、蛍光抗体の CIV 特異性は対照染色および吸収試験で確かめた。細胞は -20°C に冷却したアセトン中で固定したのち、室温または 37°C で 30 分~1 時間直接法で染色した。

III. 実 験 結 果

細胞を長期間培養したのちに培養液の CIV 感染価を測定した結果を Table 1 に示す。すなわち培養期

Table 1. Infectivity titer of CIV in whole culture.

Exptl. No.	Days of culture	$-\log ID_{50}/0.005\text{ml}$
1	30	2.67
2	30	2.83
3	21	2.38
4	15	3.17

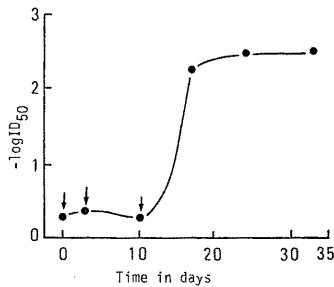


Fig. 1. Infectivity titer of liquid phase during the course of the culture of persistently infected cells.

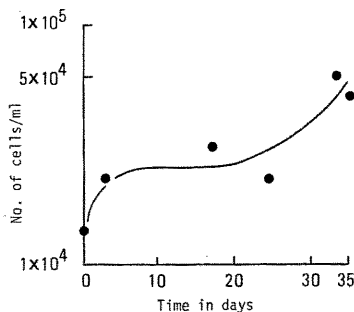


Fig. 2. Growth curve of cells in persistently infected cell culture.

間は15~30日間であり、感染価 ($-\log ID_{50}/0.005\text{ml}$) は2.5~3.5であつて比較的高い値を示し、ウイルスの存在が確かめられた。

細胞を数回新たな培養液で遠心洗滌 (1,000 rpm, 5分間) したのちに培養を開始し、経時的に培養上清の感染価をしらべた。洗滌に際しては洗液の感染価を測定して、遊離のウイルスが可及的に除去されていることを確かめた。ID₅₀-時間曲線は Fig. 1 に示すように、10日間以上の潜伏期を経たのちに上昇を開始し、最終的にはその値は2.5に達した。また、それに併行して細胞数を測定したところ、その数は漸増した (Fig. 2)。

つぎに細胞部分および培養上清の感染価をそれぞれ測定し、両者の比較を行なつた (Table 2)。細胞を培養液で数回遠心洗滌したが、その際洗滌液は毎回も

Table 2. Infectivity titers of cell-associated and free viruses.

Exptl. No.	No. of cells/ml	Phase	$-\log ID_{50}/5\mu\text{l}$
1	4.0×10^4	Liquid phase	1.83
		Washing medium (1st)	1.50
		Cells	2.38
2	1.0×10^4	Liquid phase	3.68
		Washing medium (5th)	1.83
		Cells	2.60

との培養液の量とした。洗滌した細胞はドライアイス・アセトンによつて数回凍結融解を行なつたのちに、培養液を加えて原量に復帰させ、CIV 感染価を測定した。最終洗液と細胞部分の感染価を比較すると、常に細胞部分のそれは洗液より高いという結果が得られ、細胞内にかなりの量のウイルスが存在した。

蛍光抗体法によつて培養細胞を調査すると大部分の細胞は弱い自家蛍光を示したが、500~700個の細胞をしらべたところ、約2~4%の割合で特異蛍光を示す細胞が観察された。これらの蛍光は自家蛍光とは明確に判別することができたものの、*in vivo* において観察された CIV 感染血球細胞の示す特異蛍光に比較すると弱かつた。また、大小の細胞が混在したが、比較的大型の細胞に特異蛍光が見られた。

IV. 論 議

昆虫ウイルスにおける持続感染の存在はこの細胞系によつてはじめて報告された。この培養細胞集団にはいくつかの膨化した細胞、あるいは凝集した細胞の細胞質に、イリデッセンスあるいはフォールゲン反応陽性の物質が観察される (Mitsuhashi, 1967)。蛍光抗体法による観察においては比較的大型の細胞に CIV 特異蛍光が見られたので、これらの大型細胞がウイルスを保持していると考えられる。Mitsuhashi (1967) は培養条件の悪化に伴つて細胞がウイルスに感染するようになるか、または潜在ウイルスがそれに伴つて活性化されると推定した。Grace (1958) は組成の異なる培養液に変換した場合におけるウイルスの誘発例を報告している。本実験の長期培養後における観察では CIV 特異蛍光を示した細胞は数%にすぎず、これがウイルスの誘発によるものとは現在のところ考えにくい。また、ハチミツガ幼虫における ID₅₀-時間曲線と比較した場合、培養上清のそれは明瞭に異なり、ウイルスの産生は著しくないことが明らかにされた。

この細胞株の CIV 保持様式は今後なお検討されなければならないし、またその成立過程を解明するため

には持続感染系の再確立がのぞまれる。この意味から *Antheraea eucalypti* 培養細胞においても CIV の持続感染が成立すること（大庭・鮎沢、未発表）は、この現象の今後の解析を容易にするものと考えられる。

いずれにしても CIV に持続感染したニカメイガ血球細胞株では、細胞は分裂増殖をしながら一部の細胞が CIV に感染しウイルスを放出していると考えられる。したがって、集団から CIV に感受性の細胞が出現し、それらがウイルスに感染すること、あるいは Sindbis virus に持続感染した *Aedes albopictus* の培養細胞（Enzmann, 1973）で報告されたように、感染細胞が何らかの感染阻止物質（たとえばインターフェロン）を産生して他の細胞を感染から防御している可能性などが考慮されてよいであろう。

また、Mitsunashi (1967) は持続感染細胞株においては分裂中の細胞にイリデッセンスが観察されないことを報告しているが、著者ら（大庭・鮎沢、未発表）の観察でも CIV に持続感染した *Antheraea eucalypti* 細胞株においては、分裂中の細胞には細胞質封入体の形成が見られず、一方、持続感染でない場合は分裂中の細胞にも高率に細胞質封入体の形成が観察されたので、これは持続感染に伴った特異な現象であることが示唆される。

V. 摘 要

CIV に持続感染したニカメイガ血球細胞株(Mitsunashi, 1967) の性状をしらべ、つぎの結果を得た。

1. 長期間培養した上清の CIV 感染価 ($-\log ID_{50}/0.005\text{ml}$) は 2.5~3.5 であり、細胞株の CIV 保持は明瞭であつた。

2. 培養開始後その上清の感染価を調査すると、10 日間以上の潜伏期を経て感染価は増加しはじめ、最終的には上記の値に達した。持続感染系における CIV の増殖様式は生体におけるそれとは明らかに異なり、ウイルスの産生は著しくなかつた。

3. 培養上清部分と細胞部分の CIV 感染価を測定

すると細胞部分にも比較的高い感染価が認められた。

4. 螢光抗体法により、集団の 2~4% の細胞に CIV 特異螢光が観察されたが、それらは比較的大型の細胞であつた。CIV の持続感染は少数の細胞がウイルスを保持し、他の細胞は何らかの機作で感染をまぬがれて増殖することによつて成立しているものと推定された。

VI. 文 献

- Artsob, H. and L. Spence 1974 Persistent infection of mosquito cell lines with vesicular stomatitis virus. *Acta virol.*, **18**: 331-340
- Banerjee, K. and K. R. P. Singh 1968 Establishment of carrier cultures of *Aedes albopictus* cell line infected with arboviruses. *Ind. Jour. Med. Res.*, **56**: 812-814
- Enzmann, P.-J. 1973 Induction of an interferon like substance in persistently infected *Aedes albopictus* cells. *Arch. ges. Virusforsch.*, **41**: 382-389
- Grace, T. D. C. 1958 Induction of polyhedral bodies in ovarian tissues of the tussock moth *in vitro*. *Science*, **128**: 249-250
- 川村明義 1966 螢光抗体法。蛋白質核酸酵素, **11**: 1621-1634
- Mitsunashi, J. 1967 Establishment of an insect cell strain persistently infected with an insect virus. *Nature*, **215**: 863-864
- Peleg, J. 1969 Inapparent persistent virus infection in continuously grown *Aedes aegypti* mosquito cells. *J. gen. Virol.*, **5**: 463-471
- Reed, L. J. and H. A. Muench 1938 A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493-501
- Řeháček, J. 1968 Persistent infection of mosquito cells grown *in vitro* with Murray Valley encephalitis and Japanese encephalitis viruses. *Acta virol.*, **12**: 340-346
- Walker, P. 1964 The viral carrier state in animal cell cultures. *Progr. Med. Virol.*, **6**: 111-148

Summary

The nature of cell line, which derived from hemocytes of *Chilo suppressalis* larvae and persistently infected with CIV (Mitsubishi, 1967), was investigated.

1. The whole culture incubated for a long period showed relatively high CIV-infectivity titer which revealed the persistence of the virus in this cell line.

2. The infectivity titer in the supernatant of culture began to increase after 10 days of lag phase and reached the maximum level (2.5-3.5 in $-\log ID_{50}/0.005$ ml).

3. The infectivity titer of the liquid phase (supernatant) was always high as well as the titer of the cellular fraction.

4. Since 2-4 % of cells showed CIV-specific immunofluorescence by fluorescent antibody technique, it was suggested that the virus multiplication occurred in some cells, but not in remaining cells by certain inhibitory mechanisms.