

卵黄抗体による蚕ウイルス病の発病抑制

池上隆文・小林則夫

キーワード: ランオウコウタイ, NPV, CPV, カイコ, ハツビョウヨクセイ, ヨウサン

Effect of Egg Yolk Antibodies on the Incidence of Nuclear Polyhedrosis and Cytoplasmic Polyhedrosis in the Silkworm, *Bombyx mori*.

Takafumi IKEGAMI and Norio KOBAYASHI

Summary

The effect of egg yolk antibodies on the incidence of nuclear polyhedrosis and cytoplasmic polyhedrosis in the silkworm, *Bombyx mori* were examined. In this study, the egg yolk antibodies were derived from eggs of laying hens which were immune to the nuclear polyhedrosis virus and cytoplasmic polyhedrosis virus, and was purified with centrifugation method using chloroform.

1. In the case of rearing the silkworm larvae on the mulberry leaves smeared the egg yolk antibodies diluted fifty times and one hundred times in volume, or on an artificial diet, the rates of incidence of the disease were lowered. However, when antibodies were diluted two hundred times or more and administered to the silkworm larvae, no inhibitory effect was obtained.
2. The inhibitory effect of egg yolk antibodies appeared when it was administered in the silkworm larvae period of the virus inoculation.

I. 緒 言

蚕ウイルス病は養蚕に大きな被害をもたらしており、最近では特に多角体病ウイルスがその原因になっている。これは、蚕児を高密度で飼育するため、蚕座にウイルス感染蚕が少数でも混在すると、繭生産までにはウイルスの伝播により多数の蚕児が感染して発病すると、本ウイルスが他の蚕病ウイルスに比べて蚕病防除消毒剤のホルマリンに抵抗性が高いためである。そこで、蚕ウイルス病防除は飼育前の徹底した蚕室蚕具消毒が重要であるが、飼育中に持ち込まれたウイルスに対しては有効な予防手段がない。このようなことから、蚕座における蚕ウイルス病の伝染を防止する目的で、蚕児に化学物質を投与して発病を抑制しようとする試みが数回行われており、幾つかの物質にその作用があることが報告されている(1,2,6,8,9,11)。しかし、これらは伝染防止効果が小さいことなどから農家での

利用には至っていない。

一方、最近では佐藤らにより、蚕児に抗血清を投与することでウイルス感染率を下げる事が検討され始めている(10)。また、この抗血清を蚕児に投与する技術ではウイルスとの反応力の高い抗体が多量に必要となることから、著者らはニワトリを用いて蚕ウイルスに対する卵黄抗体を調製するとともに、その保存法を明らかにした(3)。

そこで、今回は調製した卵黄抗体を蚕児に投与した場合の、多角体病に対する発病抑制効果について検討したので、その概要を報告する。

なお、この課題は平成9-11年度新技術地域実用化研究促進事業「大規模超多回育に対応した健全蚕の生産環境管理技術の確立」の一部として実施したものである。

II. 材料および方法

供試した卵黄抗体は、池上ら(3)がニワトリで免疫してクロロホルムで調製した蚕核多角体病ウイルス(以下NPV)と蚕細胞質多角体病ウイルス(以下CPV)に対するものを用いた。すなわち、免疫卵黄の調製は、シヨ糖密度勾配で精製したNPVとCPVのタンパク量3mgを3回に分けて完全アジュバントと等量混合後、20週齢のニワトリに1週間間隔で注射し、得られた卵から卵黄を分離した。この卵黄に4倍量のPBSおよび全容量と等量のクロロホルムを加えて攪拌後3,000rpm、30minの遠心分離をして、免疫グロブリン(IgY)を含む水層を採取した。加温による非働化とクロロホルム除去処理をし、この調整液を4倍希釈卵黄抗体として各試験に用いた。

蚕児に接種するNPVおよびCPVは、当研究所で冷凍保存中のウイルスを蚕児で増殖してから用いた。NPVの増殖方法は、多角体をアルカリで溶解後に5齢起蚕に

注射し、ウイルスが増殖した5齢5日目の蚕児から体液を採取、3,500rpm 15minの遠心を繰り返して多角体を分離した。CPVは、同様にアルカリ溶解後に4齢起蚕に注射し、5齢5日目に中腸を採取、乳鉢で磨碎してから遠心分離を繰り返して多角体を分離した。精製した多角体を滅菌水で希釈し、血球計算盤で多角体数を調整して所定濃度のウイルス液とした。

1. 卵黄抗体の投与量と発病抑制

蚕児への卵黄抗体の投与量と多角体病の発病抑制効果については、卵黄抗体を3齢期間中連続で投与し、ウイルスを3齢起8時間目から12時間経口接種して検討した。この時のウイルス接種蚕の発病状況については、NPV接種蚕は4齢起蚕時までの発症で、CPV接種蚕では5齢3日目蚕を解剖して中腸細胞の多角体の有無で調べた(図1)。なお、調査は桑葉育と人工飼料育について実施し、ウイルス濃度毎に発病状況を調べ、卵黄抗体を投与しない場合と比較して発病抑制効果を検討した。

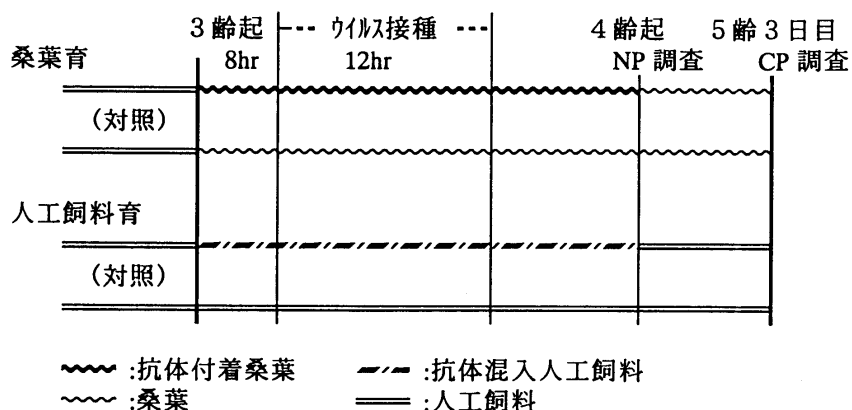


図1 卵黄抗体の投与量と病蚕発生調査

桑葉育による試験では、2齢まで市販の人工飼料「モーラス」で飼育し、3齢起蚕から桑葉で飼育した。

抗NPV卵黄抗体は、蒸留水で50倍、100倍、200倍および500倍に希釈し、これに浸漬、風乾した桑葉を卵黄抗体付着桑として3齢期間中の蚕児に給与した。この間、3齢起8時間目から12時間、卵黄抗体付着桑に多角体数で $10^8/ml$ から10倍階段希釈したNPV液を塗布して蚕児に経口接種した。1区20頭2連制で4齢起蚕時まで飼育して、各ウイルス濃度の発病率と LD_{50} 値で発病状況を比較した。なお、対照としては卵黄抗体無投与、すなわち蒸留水に浸漬、風乾した桑葉にNPVを塗布接種して経口接種した区を設

けた。

抗CPV卵黄抗体は50倍、100倍希釈液を用い、これをNPV試験と同様に蚕児に投与しながら、桑葉に塗布したCPVを経口接種して発病状況を調査した。

人工飼料育による試験では、2齢まで市販の人工飼料で飼育し、3齢起蚕から粉体人工飼料を湿体に調整して与えた。抗NPV卵黄抗体100倍希釈液で湯練り人工飼料と水練り人工飼料を調整し、これを抗体混入人工飼料として3齢期間中の蚕児に給与した。この間、3齢起8時間目から12時間、抗体混入人工飼料に多角体数 $10^8/ml$ から10倍階段希釈したNPV液を滴下して経口接種し、桑葉育試験と同様に発病状

況を調査した。抗CPV卵黄抗体は50倍または100倍希釈液を用い、NPV試験と同様に人工飼料を調整して蚕児に投与しながら、これにCPVを滴下して経口接種し、発病状況を調査した。

2. 卵黄抗体の投与時期と発病抑制

3齢期間中をウイルス接種前、接種中、接種後の3つの時期に分け、それぞれの時期に卵黄抗体付着桑を給与して卵黄抗体の投与時期と発病抑制との関連

について調べた。卵黄抗体付着桑は、抗体50倍または100倍希釈液に浸漬、風乾した桑葉を冷蔵保存しながら供試し、ウイルス接種は3齢起8時間目から12時間、卵黄抗体付着桑に多角体数 $10^8/ml$ から10倍階段希釈したウイルス液を塗布して経口接種した。この蚕児を4齢起蚕時まで飼育して、各ウイルス濃度の発病率とprobit分析による LD_{50} 値で発病状況を比較した(図2)。

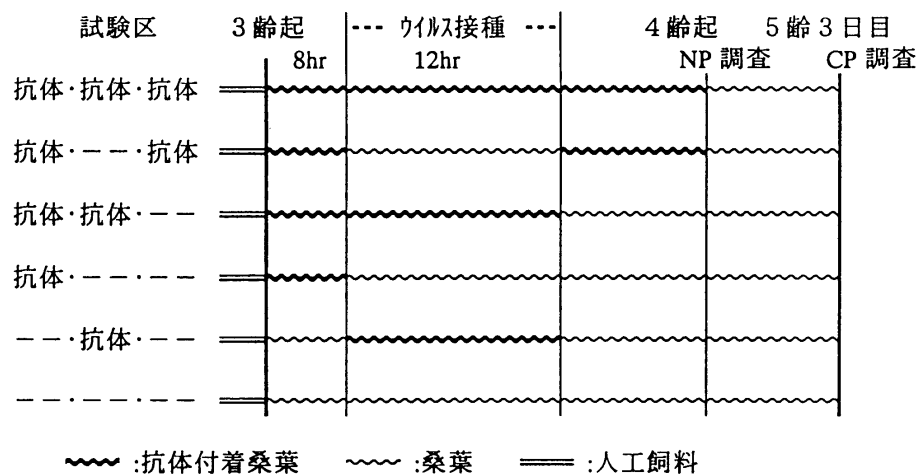


図2 卵黄抗体の投与時期と病蚕発生調査

調査は、核多角体病と細胞質多角体病について実施し、ウイルス濃度毎に1区20頭の2連制飼育で、どの時期にも卵黄抗体を投与しない場合と比較した。

III. 結 果

1. 卵黄抗体の投与量と発病抑制

桑葉育における卵黄抗体の核多角体病に対する発病抑制を調査した結果、対照区に比較して50倍希釈抗体の投与では $NPV10^8/ml$ 、 $10^7/ml$ および $10^6/ml$ 接種区で発病率が低く、また、100倍希釈抗体の投与でも $NPV10^8/ml$ と $10^7/ml$ 接種区で発病率が低かった。10倍階段希釈のウイルス接種区の発病状況からprobit分析で LD_{50} 値を算出すると、50倍希釈抗体の投与では対照区に比較して対数で0.96差、100倍希釈抗体の投与では0.54の差が認められ、発病が抑えられる傾向が認められた(図3)。また、春蚕期に実施した同試験においても、 LD_{50} 値の差は小さいものの、同様の傾向が認められた。

人工飼料育での核多角体病に対する発病抑制を調

査した結果、試験全体の発病割合が低く、卵黄抗体を投与しない場合の $NPV10^8/ml$ 接種区でも、水練り人工飼料で17.5%、湯練り人工飼料で35%の発病率であった。これに対して、100倍希釈抗体を投与した場合には、水練り、湯練り人工飼料給与蚕とも5%の発病率に低下した。この場合probit分析が不可能なため、BEHRENS-KARBER法で LD_{50} 値を算出すると、水練り人工飼料で0.25、湯練り人工飼料で0.30の対数差であり、ともに発病が抑制されている傾向が認められた。なお、水練りと湯練りの飼料差は認められなかった(図4)。

桑葉育における卵黄抗体の細胞質多角体病に対する発病抑制を調査した結果、対照区に比較して50倍希釈抗体の投与では $CPV10^8/ml$ から $10^5/ml$ の接種区で発病率が低かった。また、100倍希釈抗体の投与でも $CPV10^8/ml$ と $10^5/ml$ 接種区で発病率が若干低かったが、 $10^7/ml$ 接種では逆に高かった。この発病率から LD_{50} 値を算出すると、50倍希釈抗体の投与では対照区に比べて1.25の対数差で発病が抑制されたが、100倍希釈抗体の投与では差が認められな

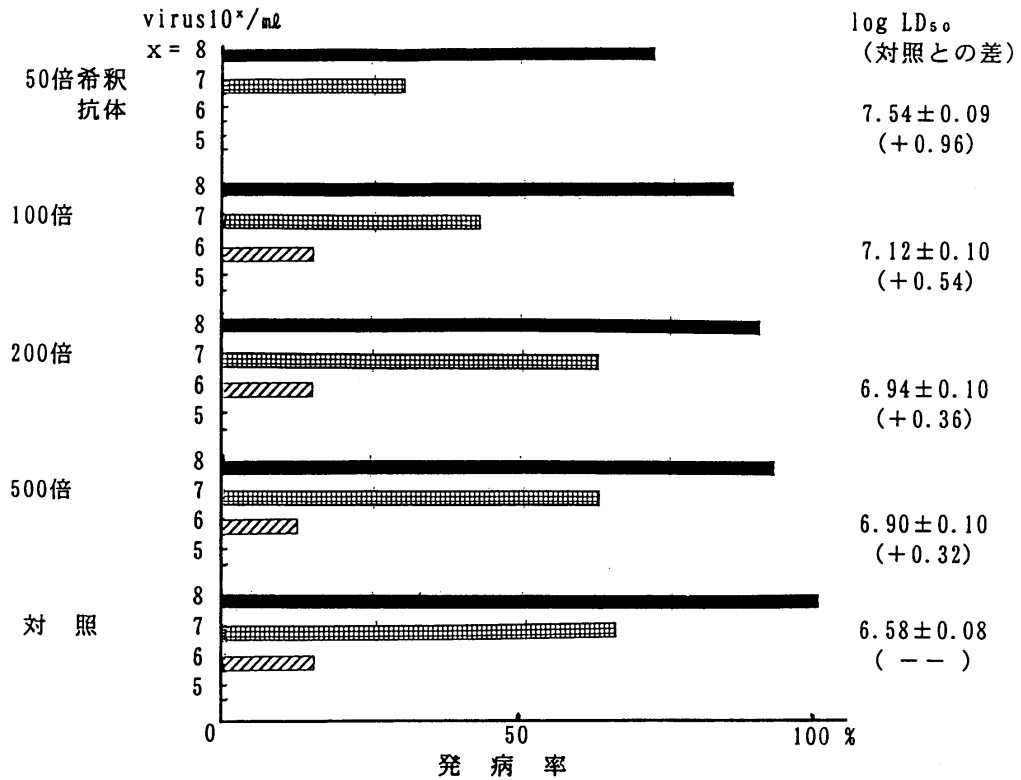


図3 卵黄抗体の投与濃度とNP病蚕の発病状況(桑葉育, 晩秋蚕期)

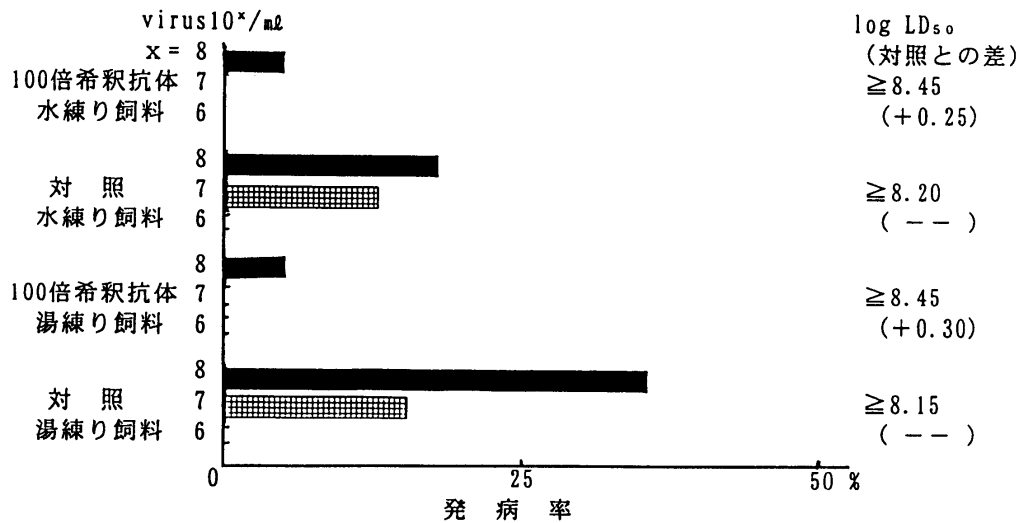


図4 卵黄抗体の投与とNP病蚕の発病状況(人工飼料育, 晩々秋蚕期)

った(図5)。春蚕期に実施した同試験においては、50倍希釈抗体の投与では対照区に比較したLD₅₀値で

0.30の差があったが、100倍希釈抗体の投与では差がほとんど認められなかった。

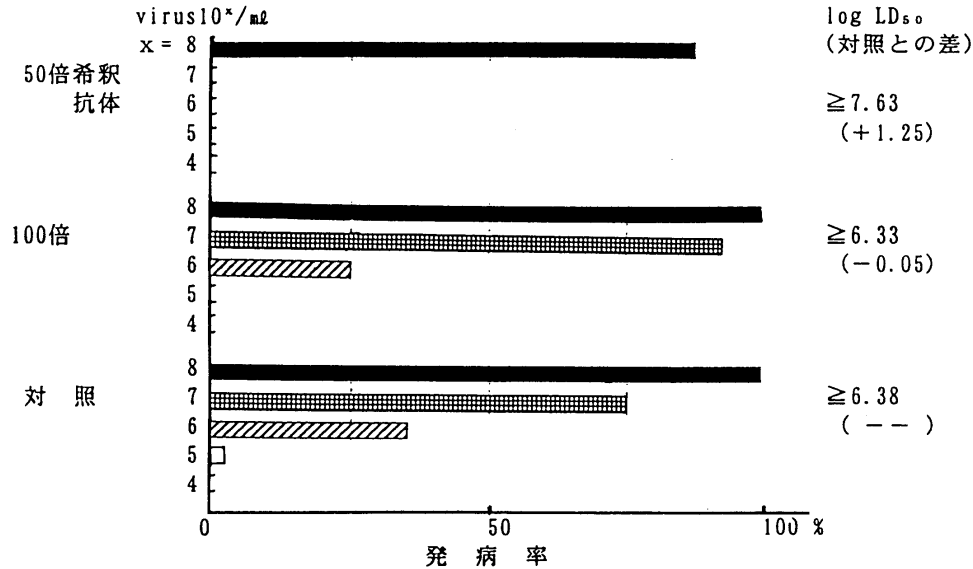


図5 卵黄抗体の投与濃度とCP病蚕の発病状況(桑葉育, 初秋蚕期)

人工飼料育での細胞質多角体病に対する発病抑制を調査した結果、対照区に比較して、50倍および100倍希釈抗体の投与ともCPV10⁸/mlから10⁶/ml接種区で発病率が低く、probit分析のLD₅₀値では50倍希釈抗体投与の場合0.58の対数差、100倍希釈抗

体投与でも0.45の対数差で発病抑制効果が得られた。また、初秋蚕期に実施した同試験でも同様の傾向が認められ、50倍希釈抗体投与で0.71の対数差、100倍希釈抗体投与で0.47の対数差が認められた(図6)。

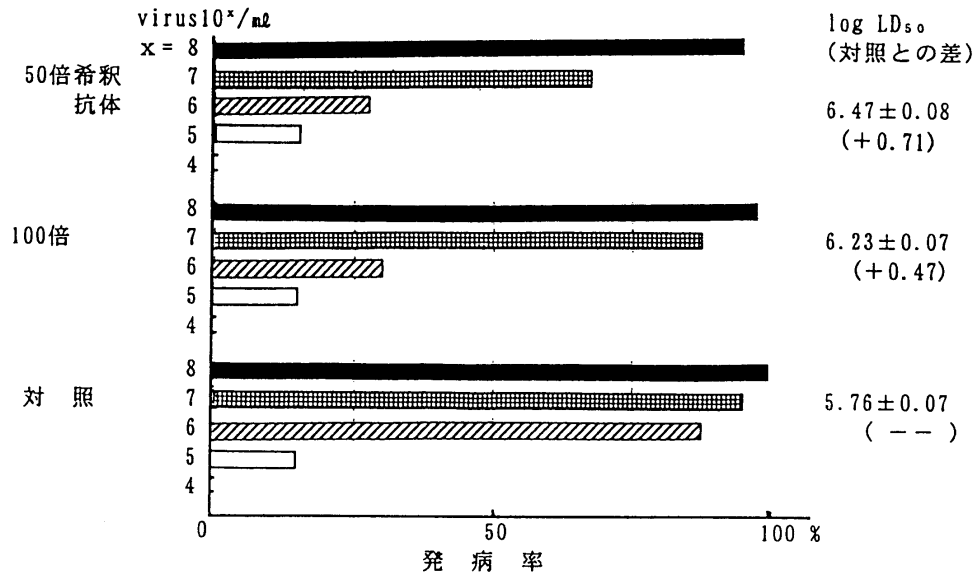


図6 卵黄抗体の投与濃度とCP病蚕の発病状況(人工飼料育, 初秋蚕期)

2. 卵黄抗体の投与時期と発病抑制

核多角体病に対する卵黄抗体の発病抑制について、100倍希釈抗体をウイルス接種前、接種中、接種後の

投与時期の組み合わせで試験を実施した結果、3齢全期、ウイルス接種前と接種中、あるいはウイルス接種中のみに抗体を投与した場合、発病率が低くなっ

た(表1)。そこで、3齢全期、ウイルス接種前と接種中の抗体投与の調査を再度実施した結果、対照区に比較してLD₅₀値で0.7前後の差が見られ、発病が抑制された(表2)。また、3齢全期、またはウイルス接種前と接種中に50倍希釈抗体を投与した場合は、抗体投与量と発病抑制試験の結果と同様に100倍希釈抗体の投与より発病率が若干低下した。なお、卵黄抗体だけを投与した場合の蚕児への影響は認められなかった。

表1 抗体付着桑葉投与時期とNP病蚕の発病状況 (春蚕期)

試験区	logLD ₅₀ (probit)	対数の差
抗体・抗体・抗体	7.57 ± 0.13	+0.45
抗体・---・抗体	7.13 ± 0.10	+0.01
抗体・抗体・---	7.55 ± 0.09	+0.43
抗体・---・---	7.22 ± 0.08	+0.10
---・抗体・---	7.66 ± 0.09	+0.54
---・---・---	7.12 ± 0.08	--

注) 1区2連制の平均値 蚕品種:春月×宝鐘

表2 抗体付着桑葉投与時期とNP病蚕の発病状況 (晩秋蚕期)

試験区	logLD ₅₀ (probit)	対数の差
抗体・抗体・抗体	7.07 ± 0.10	+0.71
抗体・抗体・---	7.04 ± 0.09	+0.68
---・---・---	6.36 ± 0.10	--

注) 1区2連制の平均値 蚕品種:錦秋×鐘和

細胞質多角体病に対する発病抑制について調べた結果、NPV接種試験と同様に卵黄抗体を3齢全期、ウイルス接種前と接種中またはウイルス接種中に投与した場合において発病率が低くなった(表3)。

表3 抗体付着桑葉投与時期とCP病蚕の発病状況 (晩秋蚕期)

試験区	logLD ₅₀ (probit)	対数の差
抗体・抗体・抗体	7.06 ± 0.09	+0.34
抗体・---・抗体	6.74 ± 0.08	+0.02
抗体・抗体・---	7.03 ± 0.10	+0.31
抗体・---・---	6.99 ± 0.06	+0.27
---・抗体・---	7.24 ± 0.07	+0.52
---・---・---	6.72 ± 0.08	--

注) 1区2連制の平均値 蚕品種:錦秋×鐘和

従って、核多角体病と細胞質多角体病に対しては、ウイルス接種時に卵黄抗体を投与した場合に発病が抑制された。

IV. 考 察

ウイルス病防除には、ウイルスの核酸やタンパクの合成を阻害する薬剤、あるいはウイルスの増殖における諸機能を阻害する薬剤の投与、すなわち化学療法による発病抑制が知られている(4)。蚕ウイルス病防除についても、多角体病防除では石川(6)、内海ら(11)、蛭原(1)等における報告があり、また、伝染性軟化病防除では宮島ら(9)、川瀬ら(8)、池上ら(2)等の報告がある。しかし、これらに報告されている物質の投与は、発病抑制に有効性ではあるものの実用面での使用には至っていない。また、最近になって抗血清を蚕児に投与する蚕ウイルス病防除技術が検討され始めた(10)。

抗血清を蚕児に投与する場合、ウイルスに対する反応力が高い抗体を多量に必要とするため、動物を用いた抗体調製法では、免疫や抗体調製等に労力がかかり、その対応が困難である。そこで、著者らはニワトリを用いて蚕病ウイルスに対する卵黄抗体を調製した(3)。この方法では、動物を犠牲にせずに抗血清の採取が容易で、採取量が多く、しかも抗体の精製が簡単な点、更には多数飼育、多数免疫に適している等の実用面での利点が多い(7)。鶏卵卵黄では、タンパク質が20%で、そのうち15%がIgY、すなわち卵黄中の3%はIgYになる。また、鳥類の免疫グロブリンは高等動物と違ってほとんどがIgYであり、ほ乳動物のIgGに生物活性が非常に類似しているが、物理化学的性状は異なる(5)。

佐藤ら(10)は、カラギーナンで分離後DEAEカラムで精製した卵黄抗体を5齢蚕児に投与することで、核多角体病の発病抑制効果を見いだしている。著者らは、卵黄抗体の調製を簡易にするためにクロロホルムによる精製を試み(3)、今回はこの抗体を用いて多角体病の発病抑制効果について、抗体の投与量および投与時期の面から検討した。その結果、核多角体病と細胞質多角体病の両蚕病に対しては同様の傾向がみられ、100倍希釈までの卵黄抗体をウイルス接種前と接種中に投与した場合、発病が抑制された。しかし、その抑制効果が、抗体をウイルス接種時に同時に投与した場合にみられていることから、蚕児に食下される前に抗原抗体反応が起こっていることも考えられる。従って、卵黄抗体を蚕病ウイルス防除に利用するためには、発病

抑制機構についてさらに調査する必要がある。

また、佐藤ら(10)は人工飼料に卵黄抗体を混入する場合、蚕児用飼料に必要とされるプロピオン酸が入っていると発病抑制効果がなくなることを明らかにしている。そのため、今回の試験ではプロピオン酸を混入しない人工飼料を調整して蚕児に給与したが、実用面では抗体を人工飼料へ混入する方法についての検討も重要になる。

いずれにしても、今回の卵黄抗体投与による発病抑制調査では、養蚕現場で直ぐに利用できるほどの効果が得られておらず、蚕座における蚕ウイルスの伝染防止技術については更に研究が必要と思われる。また、今回用いた卵黄抗体は、蚕病診断においてELISAには使用が可能であり(著者ら、未発表)、蚕病診断技術への利用にも有効と考えられる。

V. 摘 要

ニワトリで免疫してクロロホルム精製によって得られたNPVとCPVに対する卵黄抗体を用いて、蚕児への抗体の投与量および投与時期と発病抑制効果について検討した。

1. 卵黄抗体は、50倍希釈または100倍希釈濃度を蚕児へ投与した場合、核多角体病および細胞質多角体病の発病を抑制する傾向が認められた。
2. その発病抑制効果は、NPVあるいはCPVを接種すると同時に蚕児に投与した場合に認められた。

謝 辞 本研究の遂行にあたり、卵黄抗体の調製方法についてご指導をいただいた農林水産省果樹試験場天敵機能研究室の佐藤威室長に厚く感謝の意を表す。

引 用 文 献

1. 蛭原富男(1968)カイコ細胞質多角体病に対する抵抗性賦与剤に関する研究 茨城蚕試要報 3:106-110
2. 池上隆文・蛭原富男(1983)Sodium Fumarate または Acridin Orange の投与による伝染性軟化病の発病抑制について 茨城蚕試報 37:41-45
3. 池上隆文・小林則夫(1998)蚕ウイルスに対する卵黄抗体の調製法と保存法 茨城農総セ蚕研研報 6:6-10
4. 石田名香雄(1964)ウイルス病の化学療法 ウイルス学 朝倉書店 東京 217-225
5. 石井栄治(1989)エンザイムイムノアッセイ 生化学実験法 11:78-79
6. 石川義文(1954)抗生剤 Aureo mycin の膿病軟化病に対する防除効果について 愛知蚕試概要 172-175
7. 金光 修(1994)ニワトリ抗体 抗体工学入門 他人書館 112-113
8. 川瀬茂実・宮島成寿(1982)伝染性軟化病に対するグアニジンの発病抑制効果について 日蚕雑 51:341-345
9. 宮島成寿・川瀬茂実(1965)5-フロロウラシルによる伝染性軟化病の抑制効果 日蚕雑 34:359-365
10. 佐藤 威・木村真之(1994)抗カイコ核多角体病ウイルス卵黄抗体の添食によるウイルス感染阻止効果 日蚕学会関東支部講要 45:42
11. 内海 進・筑紫春生(1963)家蚕における多角体病の抑制に関する研究 (1)タウリン、シスチン添食の効果 日蚕雑 32.(4):232-239