

寒天ゲル内拡散法による家蚕ウイルス性軟化病の診断

鈴木 繁 実*・及 川 英 雄*

1 ま え が き

従来、家蚕ウイルス性軟化病の診断には、生物検定法¹⁾、中和試験法⁶⁾および病理組織学的検査法⁵⁾が採用されてきたが、これらの方法は診断に時間と手間(飼育)を要すること、感染初期蚕の診断が困難であることなど発生予察的見地からの実用価値は少なかった。

幸い数年来、本ウイルス病の診断に蛍光抗体法⁴⁾ならびに寒天ゲル内拡散法⁷⁾などが開発されたので、これらの手法を用いて本病の早期診断の可能性を検討した。

本研究の実施に際していろいろ御教示を賜わった農林省蚕糸試験場ウイルス病研究室の鮎沢千尋博士、井上元技官、埼玉県蚕業試験場関島安隆博士および茨城県蚕業試験場蛸原富男病理部長に深謝する。

2 試 験 方 法

1. ウイルス株：軟化病ウイルス(以下FVと呼ぶ)は農林省蚕糸試験場ウイルス病研究室から分譲された坂城株を当場で継代保存したものを部分精製して用いた。

2. 抗血清：寒天ゲル内拡散法に用いた抗血清は埼玉県蚕業試験場病理部から分譲された抗FV(坂城株)抗血清であり、蛍光抗体法に用いた蛍光抗体は農林省蚕糸試験場ウイルス病研究室から分譲されたものである。

3. 寒天ゲル内拡散法の診断手順：関島⁷⁾の方法に準じてOuchterlony法によるスライドグラス法(Micro-Ouchterlony法)を行なった。以下その方法を列記する。

①精製寒天(Difco bacto agar)10g、窒化ソーダ1g、メチルオレンジ0.02gを1ℓのPBS(0.05 M・pH 7.0)に入れ、加熱溶解し、直ちに2,500~3,000rpm・10分間遠心分離し、上清を試験管に約10mlずつとり、栓をし適宜供試する。②溶解した寒天液を約2mlずつ清浄なスライドグラス(顕微鏡用・75×25mm)に流しこみ厚さ約1mmの寒天層をつくる。③寒天が凝固した後、外径2.5mmのガラス毛细管(アスピレーターに接

続し、寒天を吸引して孔をあける)で中央に1カ所、その周囲5mm離して4カ所に孔をあける。④中央の孔に抗血清を入れ、周囲の孔に検査蚕磨砕液の3,000rpm・10分間の遠心上清を入れ、37℃の湿室に15~20時間保存し、白色沈降バンドの有無を免疫観察箱で観察する。

4. 蛍光抗体法による診断手順：井上・鮎沢⁴⁾の方法に準じて行なった。以下その方法を列記する。①蚕児の中腸皮膜組織の前部をハサミで切りとりスライドグラスになすりつける。②室温下で風乾する。③アセトンで固定(10分間)。④風乾。⑤20倍に希釈した蛍光抗体液で染色(37℃、湿度100%下で60分間)。⑥PBSで洗浄(15分間)。⑦風乾。⑧エルパノールで封入しカバーグラスをかける。⑨蛍光顕微鏡(オリンパスFLM)による検査。⑩蛍光発生によりウイルスの存在を確認。

3 試 験 結 果

1. 感染初期蚕の早期診断

10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 濃度に調整したFV希釈液を桑葉に塗布し陰乾後、それぞれ蟻蚕、2齢起蚕および3齢起蚕に24時間経口接種し、以後普通桑にとりかえて飼育した。接種2日後から毎日10頭ずつ一緒にとり乳鉢で磨砕した後、3,000rpm・10分間遠心し、その上清中のFV病原を寒天ゲル内拡散法によって検出した。同時に蛍光抗体法による検出も実施した。

その結果、寒天ゲル内拡散法でFV病原を検出できる日数は、接種濃度により異なるが、接種蚕齢による差はほとんどなく、 10^{-2} では接種後5~6日、 10^{-4} では6日、 10^{-6} では7~9日であった(第1表)。

これは関島ら⁸⁾の結果とほぼ同程度かやや遅い検出感度であったが、山田ら¹⁰⁾の結果と比較すると3齢起蚕接種の場合、2日ほど検出感度が劣った。これは用いた抗血清の力価の差によるものと考えられる。

蛍光抗体法でFV病原を検出できる日数は、接種濃度および接種蚕齢により異なり、 10^{-2} (蟻蚕、2齢起蚕)では接種後2日、 10^{-2} (3齢起蚕)では4日、 10^{-4} では4~5日、 10^{-6} では5~6日であった(第2表)。

* Shigemi SUZUKI, Hideo OIKAWA (岩手県蚕業試験場)

第1表 寒天ゲル内拡散法による検出感度

| 接種時期 | F V 濃度 | 接種後日数 | | | | | |
|-------|------------------|-------|----|----|----|----|----|
| | | 4日 | 5日 | 6日 | 7日 | 8日 | 9日 |
| 蟻蚕 | 10 ⁻² | - | - | + | + | . | . |
| | 10 ⁻⁴ | . | - | + | + | . | . |
| | 10 ⁻⁶ | . | - | - | - | + | + |
| 2 齡起蚕 | 10 ⁻² | - | + | + | . | . | . |
| | 10 ⁻⁴ | - | - | + | + | . | . |
| | 10 ⁻⁶ | . | - | - | + | + | . |
| 3 齡起蚕 | 10 ⁻² | . | - | + | + | . | . |
| | 10 ⁻⁴ | . | - | + | + | . | . |
| | 10 ⁻⁶ | . | - | - | - | - | + |

注. +は白色沈降バンドの形成の認められたもの
-は " " 認められないもの

第2表 蛍光抗体法による検出感度

| 接種時期 | F V 濃度 | 接種後日数 | | | | | |
|-------|------------------|-------|----|----|----|----|----|
| | | 2日 | 3日 | 4日 | 5日 | 6日 | 7日 |
| 蟻蚕 | 10 ⁻² | + | + | + | . | . | . |
| | 10 ⁻⁴ | . | - | + | + | . | . |
| | 10 ⁻⁶ | . | - | - | + | + | . |
| 2 齡起蚕 | 10 ⁻² | + | + | + | . | . | . |
| | 10 ⁻⁴ | - | - | + | + | . | . |
| | 10 ⁻⁶ | . | - | - | + | + | . |
| 3 齡起蚕 | 10 ⁻² | - | - | + | + | . | . |
| | 10 ⁻⁴ | - | - | - | + | + | . |
| | 10 ⁻⁶ | . | - | - | ± | + | + |

注. +は特異蛍光の認められるもの。±は特異蛍光の認められるものと認められない標本があるもの。-は特異蛍光の認められないもの。

この結果は井上ら⁴⁾、蛭原ら²⁾の検出感度とほぼ同じであった。

2. 寒天ゲル内拡散法による集団検査法

蟻蚕に FV 10⁻²液を桑葉塗布添食法により経口接種し、10日経過蚕を感染蚕とし、同時に別々に飼育した無接種蚕を一応非感染蚕とし、これら感染蚕と非感染蚕を所定の割合で混合磨砕し、寒天ゲル内拡散法により検出感度を調べた。

その結果、第3表に示すように、感染蚕の混入割合が20%で白色沈降バンドの形成が認められた。古田ら³⁾は感染蚕の混入割合が約7%でも白色沈降バンドの形成が認められると報告しているが、これは抗原の精製

度すなわち抗体の力価の差に基づくものと考えられる。

第3表 寒天ゲル内拡散法による集団検査

| 区 | 検出結果 | | |
|---|------|------|---|
| | 感染蚕 | 非感染蚕 | |
| 1 | 1 頭 | 49 頭 | - |
| 2 | 5 | 45 | - |
| 3 | 10 | 40 | + |
| 4 | 20 | 30 | + |
| 5 | 25 | 25 | + |
| 6 | 30 | 20 | + |
| 7 | 40 | 10 | + |

注. FV 10⁻²蟻蚕接種し10日経過蚕を感染蚕とした。無接種蚕を非感染蚕とした。
+は白色沈降バンドの形成が認められたもの。
-は " " 認められないもの。

4 考 察

ウイルス性軟化病の診断法には種々の方法が考案され検討が加えられてきているが、正確であること、迅速であること、早期に診断できることなどから寒天ゲル内拡散法と蛍光抗体法はすぐれた方法であるといえる。特に蛍光抗体法は検出感度が極めてよく感染初期に検出が可能であることから発生予察の見地から非常にすぐれた方法である。しかしながら蛍光抗体法は本病の個体診断には適しているが、蚕という集団レベルを対象として考えると、操作が繁雑であり、技術的経験を要することなど集団検査には適当な方法であるとはいえない。

一方、寒天ゲル内拡散法は検出感度が蛍光抗体法より劣り、発生予察を前提とした早期診断には不十分ではあるが、操作が簡易であること、特別な装置、器具を必要としないこと、集団検査に適していることなどから実際に農家で発生した病蚕の中から、本病を正確にかつ迅速に診断して、その後の防疫体制を講ずる目的で利用すれば有利であると考えられる。

さらに寒天ゲル内拡散法は集団検査法に適した方法であることから、本法と蛍光抗体法を組み合わせたFG法²⁾および本法と電気泳動法を組み合わせた電気浸透法(ES法)⁹⁾の開発に伴い、ますますその利用活用場面が広がってくるものと考えられる。

5 摘 要

Micro-Ouchterlony法にもとづく寒天ゲル内拡散

法によって、ウイルス性軟化病の早期診断の可能性を蛍光抗体法と比較して実施し、次の結果を得た。

1. 寒天ゲル内散法でFV病原を検出できる日数は、 10^{-2} では接種後5～6日、 10^{-4} では6日、 10^{-6} では7～9日であった。
2. 蛍光抗体法でFV病原を検出できる日数は、 10^{-2} では2～4日、 10^{-4} では4～5日、 10^{-6} では5～6日であった。
3. 感染蚕と非感染蚕を種々の割合で混入した場合の検出感度を検討した。

6 文 献

- 1) 鮎沢啓夫・古田要二・倉田啓而・佐藤文子(1964). 蚕試報 19: 223-240.
- 2) 蛭原富雄他5名(1975). 茨城蚕試報告 30: 1-52.
- 3) 古田要二・滝口義夫・石井正市(1976). 日蚕講要 65.
- 4) 井上元・鮎沢千尋(1971). 蚕試報 25: 21-40.
- 5) 岩下嘉光・管家英治(1969). 日蚕雑 38: 64-70.
- 6) 関島安隆・小野恵子(1970). 埼玉蚕試研究要報 42: 103-107.
- 7) 関島安隆(1971). 日蚕雑 40: 49-55.
- 8) 関島安隆・大津暁(1973). 埼玉蚕試研究要報 45: 57-60.
- 9) 関島安隆・河野威雄・小野恵子(1974). 埼玉蚕試研究報告 46: 64-73.
- 10) 山田たけを・石坂尊雄(1976). 12: 117-125.