

# 「昆虫工場」プラント内のホルマリンを使用しない ウイルス不活化方法

西宮智美・中西 宏

## Virus Inactivation for the Maintenance of an Insect Factory without Formaldehyde Gas Treatment

Satomi H. NISHIMIYA and Hiroshi NAKANISHI

### Summary

We have studied the methods for inactivation of BmNPV budded particles which remained in the system for polypeptide production using insect hosts, called 'insect factory'. Ultra-violet (UV) exposure or heat treatment efficiently decreased viral infectivity on silkworms, *Bombyx mori* L. UV-C rays from a sterilization lamp (15w) set at a height of 273 cm inactivated thin layered BmNPV budded particles on a petri dish with 24-hour illumination. Therefore, it was thought that lethal UV dosage to BmNPV used here would be 410 mJ/cm<sup>2</sup> ca. On the other hands, humid high temperature ( $\geq 90^{\circ}\text{C}$ ) or hot steam appeared to have higher efficacy in a flash treatment. Moreover, no infectivity was detected in 10<sup>8</sup>/ml polyhedra, 5 minutes after mixing with hydrated lime solution acquiring a high pH value ( $\geq 12.3$ ). As proof of inactivated infectivity, it has been suggested that UV indicator labels would be useful to assess whether UV exposures were adequate or not, since their Chroma values well-expressed the colour deposition and highly correlated to the UV dosages. Furthermore, sensitive detection of infective virus particles has been performed by inoculation to cultured cells (Bm-N4), followed by PCR analysis of viral DNAs replicated in the cells.

キーワード：昆虫工場, NPV, 不活化, 紫外線, 消石灰, 熱処理, 感染性, 生物検定, 培養細胞, PCR

### I. 緒言

近年、バキュロウイルス感染系による物質生産技術の進歩はめざましく、経済性を見込める動物用医薬品の分野ではすでにネコインターフェロン製剤の商業的生産に及んでいる。今後さらに医薬品や機能性物質、農薬等の生産に向け、昆虫産業への期待が高まることが予想される。2002年の試算では、カイコによる物質生産系（昆虫工場）による組換え医薬品の市場規模は、10年後におよそ100億円に達することが示された(8)。

組み換え動植物や昆虫の生体を利用した物質生産のメリットは、微生物による生産系と比較して生成物中に生理活性が保持されることや、生産規模の調整が容

易な点にある。とりわけ昆虫工場では、蚕糸科学研究の蓄積と完成された養蚕技術により、完全な計画生産が可能である。さらに、ヒトへの感染が危惧される病原体の混入等も問題とされず、安全性の確保も容易と考えられる。

このうち組換えウイルスをカイコで増殖させる生産系では、生産終了後にウイルスを不活化し、外部環境への漏出や次期生産への持ち越しを防止する必要がある。小林(5)は昆虫工場生産施設内でのウイルス不活化方法として、養蚕施設ですでに実用化していた超微粒子ホルマリン散布が有効であることを示した。しかしながら、ホルマリンガスは人体に有害であり、環境ホルモンのひとつにも挙げられることから、ホルマリンに依らない消毒法への要望が強く、新たな消毒技術

体系の普及が待たれるところである。近年、園芸用消石灰を高濃度で水に溶解させた pH12.3 以上のアルカリ溶液（以下、消石灰上澄み液とする）の蚕病ウイルスに対する有効性が明らかにされ（7）、（財）大日本蚕糸会蚕業技術研究所が中心となって、蚕期中の消毒法として養蚕農家への普及が進められている。また、各種塩素系消毒資材によるウイルス不活化効果や、市販の漂白剤を用いた拭き取り作業がウイルスの汚染除去に効果があることも報告された（6）。

一方、機械制御による連続的な生産が想定される昆虫工場では、一般蚕室とは異なる消毒形態が必要と考えられる。著者らは、昆虫工場による生産スケジュールや大型飼育装置を用いた生産形態に適応可能な、ホルマリンを使用しないウイルス不活化技術、ならびに不活化効果の確認方法について検討し、若干の知見を得たのでここに報告する。

なお、本研究は 21 世紀グリーンフロンティア研究「植物・動物・昆虫を用いた有用物質生産系の確立」におけるプロジェクト研究の一部として、（独）農業生物資源研究所の委託を受けて実施したものである。

## II. 材料および方法

### 供試ウイルス

カイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）多角体懸濁液は、罹病蚕体液から遠沈回収した多角体を 0.04% Tween-40 中に  $10^8$  個/ml の濃度で懸濁させたものを用いた。また、BmNPV 非包埋粒子浮遊液（以下、多角体フリーウイルス液とする）は、罹病蚕体液から多角体を除去した上清画分を無菌ろ過（孔径  $0.45 \mu\text{m}$ ）したものをウイルス原液とし、滅菌 Dulbecco's PBS（DPBS）で適宜希釈調製した。

### 不活化効果の評価

カイコを用いた生物検定法により、不活化処理後のウイルス試料中の感染性を調査した。すなわち、多角体懸濁液については、1 区 20 頭 2 連制として 2 齢起蚕にウイルス試料を塗布した人工飼料を添食、また多角体フリーウイルス液については、1 区 10 頭 2 連制として 4 齢起蚕に 1 頭あたり  $6 \mu\text{l}$  を経皮接種し、いずれも発病の有無を調査した。

### PCR 法による BmNPV の検出

FTA カード（Whatman）に吸着保存したウイルス

試料を供試し、吸着ろ紙片（径 1mm）を FTA 精製試薬で調製後 PCR 混合液に加えた。PCR プライマーには BmNPV 感染初期蛋白遺伝子 *Ie-1* の配列を標的とした NPI1, NPI4（4）を用い、アニーリング温度を  $65^\circ\text{C}$  とした増幅反応を 35 サイクル行った後、1.5% アガロースゲル電気泳動により 844bp の反応生成物を検出した。

### 1. ホルマリンによらないウイルス不活化方法の検討 紫外線による不活化効果

分光特性の異なる紫外線、UV-A、-B および UV-C（ピーク波長：それぞれ 350, 310, 253.7nm）の不活化効果を検討するため、各直管光源の直下に BmNPV 多角体懸濁液 1ml を分注したプラスチックシャーレを置いて所定時間暴露した。この際、多角体を 10 倍量のカイコ体液中に混和して供試し、蚕体液成分の影響についても調査した。

また、昆虫工場プラント内に設置された殺菌灯（UV-C, 15W）による不活化条件を明らかにするため、UV メーター（UVC-254, カスタム）を用いて天井高（273cm）から UV-C を照射した場合の紫外線強度を測定した。さらに、多角体フリーウイルス液をシャーレ底面に薄膜状に塗布して暴露し、ウイルス不活化効果と紫外線積算照射量との関係を調査した。また、プラント内の壁面および床面の計 43 地点について、殺菌灯点灯時の紫外線強度を計測した。

### 湿熱処理による不活化効果

多角体フリーウイルス液を  $100 \mu\text{l}$  ずつ分注したサンプルチューブを 85, 90 および  $95^\circ\text{C}$  に保った温浴中に所定時間浸漬（以下、湿熱処理とする）した後、直ちに氷冷した  $900 \mu\text{l}$  DPBS と混和した。また、同ウイルス液をカバーガラスに塗布・風乾して沸騰水上の蒸気中に所定時間保持（以下、蒸気処理とする）した。なお、この固化ウイルス試料についてはスパーテルで掻き取り回収し、原液の 10 倍量の DPBS 中で十分に磨砕して再懸濁し、不活化効果の検定に供した。

### 消石灰上澄み液による不活化効果

消石灰上澄み液は、園芸用消石灰に 200 倍量（v/w）の蒸留水を加えて攪拌し、pH12.3 以上とした後、静置して回収した上清を用いた。この上澄み液に高濃度多角体懸濁液（ $10^9$  個/ml）を 1/10 容混和して、所定時間経過後の不活化効果の評価した。この際、混和処理

後のウイルス液を直ちに滅菌水で10倍に希釈し、消石灰濃度を低下させた場合の不活化効果に及ぼす影響についても調査した。

## 2. プラント内のウイルス不活化処理に伴う、不活化効果の確認方法の検討

### 紫外線照射量のモニタリング

紫外線照射量を推定し、ウイルス不活化要件の充足を確認することで、紫外線によるウイルス不活化効果の間接的検証を試みた。すなわち、UVインジケータラベル (UVラベル H, 日油技研工業) を殺菌灯 (UV-C光源) 下で所定時間暴露し、着色程度を色彩・色差計 (CR-200, MINOLTA) により測定した。これらの色彩値各要素 (彩度, 色度, 明度) と紫外線積算照射量との相関関係について検討し、ラベルの着色程度を基準とするウイルス不活化要件を推定した。

### 高精度生物検定法の検討

BmNPV多角体フリーウイルスを供試し、従来の4齢カイコを用いた経皮接種と、ポリオキシン投与後の経口接種 (3), ならびにカイコ培養細胞 (Bm-N4) への接種について、ウイルスの感染力価を比較検討した。ポリオキシンの投与は、0.5%ポリオキシンを添加した人工飼料を作成し、4齢起蚕に6時間食下させることにより行い、次いでウイルスを塗布した人工飼料を添食して発病の有無を調査した。また、培養細胞への接種は、24ウェルプレートの各穴に10%仔ウシ胎児血清 (FBS) 存在下で継代培養中の細胞  $500\mu\text{l}$  ( $10^5$  cells) を分注し、 $500\text{u/ml}$  ペニシリン- $500\mu\text{g/ml}$  硫酸ストレプトマイシン加用培地で希釈調製したウイルス

試料  $100\mu\text{l}$  を混和した。これらの上清と  $25^\circ\text{C}$ , 暗黒下で8日間培養後の上清, 各  $10\mu\text{l}$  をFTAカードに吸着保存してPCRに供試し、増殖ウイルスの有無を解析することで、試料中の感染性ウイルス粒子の検出を試みた。

### 検査ウイルス試料の調製方法の検討

多角体フリーウイルス液をDPBSで段階希釈してガラスシャーレ (直径90mm) 底面に塗布・風乾したのち、拭き取りキット (SWAB TEST pro. media ST-25, エルメックス) を用いて回収し、塗布試料に対して各々  $10^{-2}$  倍の濃度に相当する回収液を得た。これらを4齢カイコに経皮接種し、感染性を調査した。また、希釈ウイルス液を8%ポリエチレングリコール (PEG)-6000存在下で凝集・沈殿させ、PCRによる検出限界、ならびに生物検定における感染力価に及ぼす影響を調査した。

## Ⅲ. 結果

### 1. ホルマリンに依らないウイルス不活化方法

#### 紫外線による不活化

ピーク波長の異なる紫外線 UV-A, -B および -C (各10w, 3本) を至近距離 (16cm) から BmNPV 多角体に照射し、不活化作用を調査した結果、UV-B および -C では感染性が著しく低下し、不活化効果が認められたが、UV-A には不活化効果はほとんど認められなかった (図1)。また、UV-B と比較して UV-C の作用力が顕著に大きく、15秒間で  $10^8$  個多角体/ml のウイルス試料から感染性が失われた。

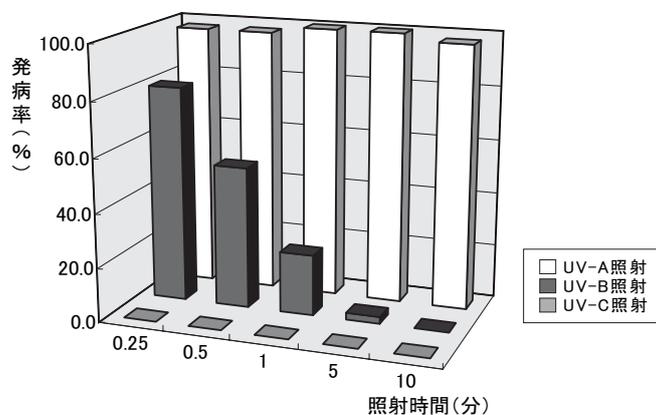


図1. 紫外線照射が BmNPV の感染性に及ぼす影響

フタを外したプラスチックシャーレ内に多角体懸濁液を入れ、シャーレ底面から高さ160mmの位置に蛍光管 (10W×3本) を設置して照射した。処理後の多角体は  $10^8$  個/ml の濃度で2齢起蚕に添食し、4日後に発病調査を行った。

一方、蚕体液中に懸濁した多角体に対しては不活化作用は及びにくいことが明らかとなった。この場合、体液層を薄膜状（液層1mm以下）に広げることで、UV-Cで10分、UV-Bでは30分の照射により同様に不活化効果が得られた（図2）。さらに、多角体懸濁液を入れたシャーレをプラスチック製のフタで覆い、底

面を反射あるいは非反射面上に静置して紫外線照射を行い、遮蔽や反射光の影響について比較検討した。その結果、供試したプラスチック製のフタは紫外線透過率が低く、ウイルス不活化作用を著しく阻害したが、UV-Bによる不活化効果はなおも認められ、底面からの反射光による増幅効果が明らかに認められた（図3）。

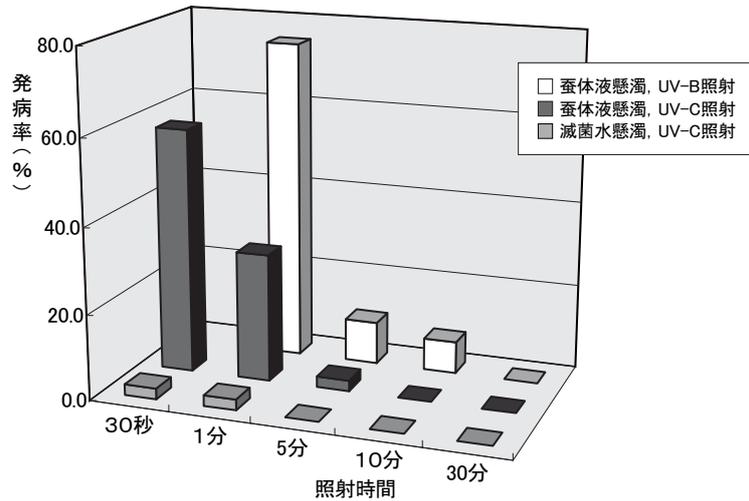


図2. 蚕体液成分が紫外線照射によるBmNPVの不活化に及ぼす影響

NPV多角体を蚕体液中に懸濁（ $10^9$ 個/ml）し、メンブレンフィルター上に滴下して薄膜状（厚さ約0.3mm）とし紫外線照射を行った。処理後メンブレンを9倍量のバッファーですすぎ、多角体を回収して2齢起蚕に添食した。

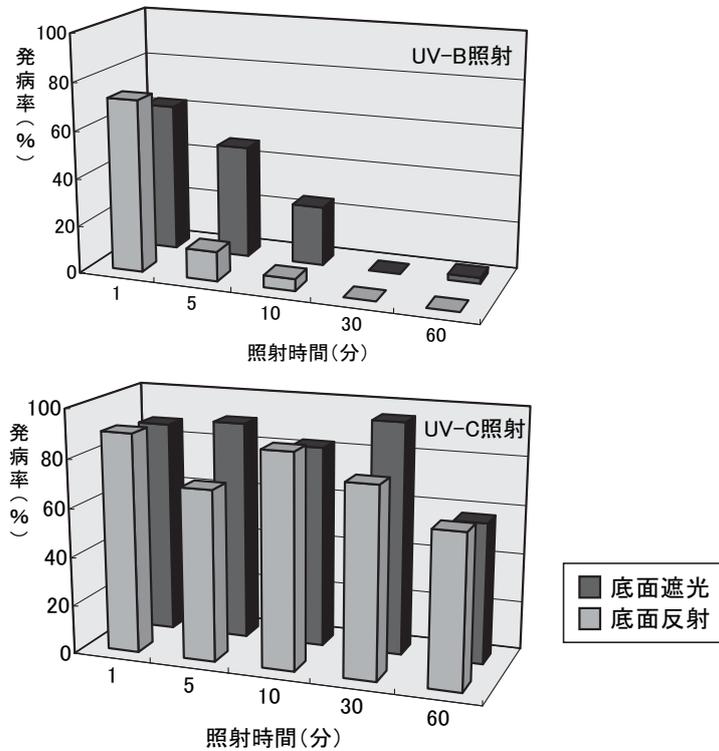


図3. 紫外線照射がNPVの感染性に及ぼす影響

フタ付きプラスチックシャーレ内に多角体懸濁液を入れ、シャーレ底面から高さ160mmの位置に光源（10W×3本）を設置して照射した。処理後の多角体は $10^7$ 個/mlの濃度で2齢起蚕に添食し、4日後に発病調査を行った。

次に、昆虫工場プラント内の残存ウイルスを想定し、多角体フリーウイルスに対する不活化効果を検討した。天井高から殺菌灯（UV-C, 15w）照射を行った場合は24時間以上で感染性が消失し、これに要した紫外線積算照射量は、およそ410mJ/cm<sup>2</sup>と推定された（図4）。これに基づいて、プラント内の紫外線強度の実測値からウイルス不活化条件を検討した結果、入射光の得られない物陰部分と光源から長手方向に外れた実験台中央部を除く計測地点では、24時間程度の連続照射に

よって残存ウイルスの不活化が可能と推察された。

#### 湿熱処理ならびに消石灰上澄み液による不活化

多角体フリーウイルスに対して2~30秒間の湿熱処理を行った場合、90℃以上の温度では10秒間の処理によってカイコに対する感染性の消失が認められ、蒸気処理では2秒間の暴露により同様にウイルスの不活化が確認された（図5）。

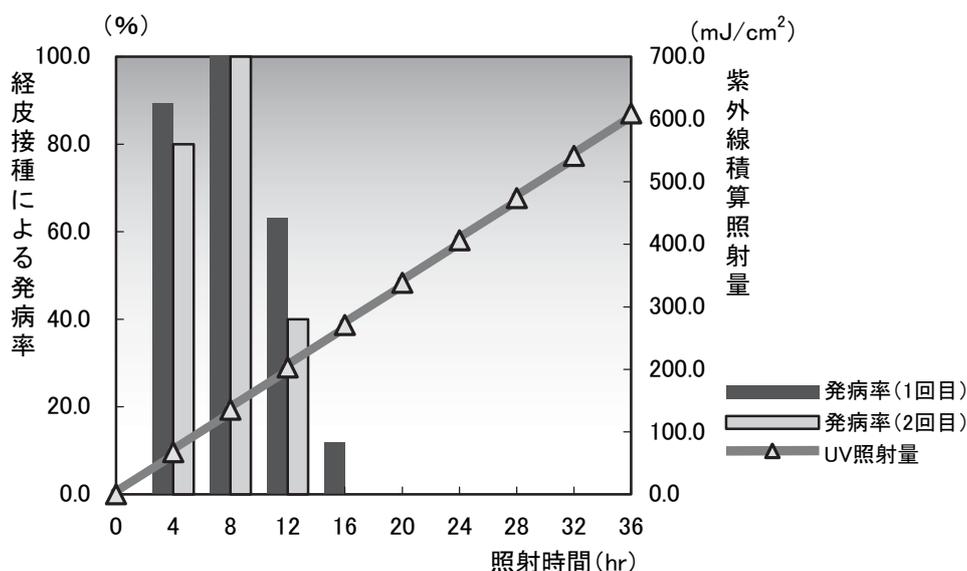


図4. 天井高からの紫外線照射がNPV多角体フリーウイルスの感染性に及ぼす影響

殺菌灯（15w）を高さ273cmに設置し、ガラスシャーレ底面に塗布・風乾したウイルス原液に所定時間照射後、拭き取り回収した試料を4齢起蚕に経皮接種（6μl/頭）した。

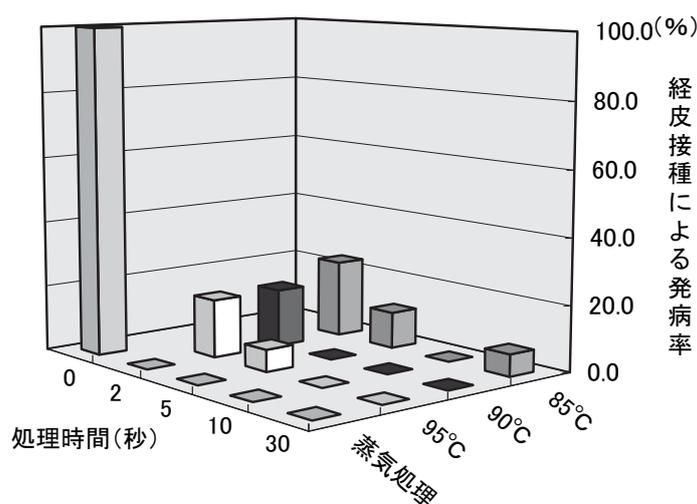


図5. 湿熱処理がNPV多角体フリーウイルスの感染性に及ぼす影響

湿熱処理は、ウイルス原液100μlをサンプルチューブに分注して温浴中で所定時間処理後、氷冷した10倍量のバッファーで速やかに希釈した。また、蒸気処理はカバーグラスにウイルス原液を塗布・風乾し、沸騰水上の水蒸気中に所定時間保持したのち拭き取り回収した。

表 1. 消石灰液処理による BmNPV 多角体の不活化, ならびに消石灰液の希釈が不活化ウイルスに及ぼす影響

処理時間 (分)	発病率 (%)*		
	消石灰希釈	希釈なし	無処理
5	0	0	—
10	0	0	—
20	0	0	—
40	0	0	—
60	0	0	87.5

\* 接種源濃度は  $10^7$  個/ml とし, 1 区 20 頭 2 連制で 2 齢起蚕に添食。

また, 高濃度の感染性ウイルス粒子の包埋体である BmNPV 多角体を供試し, 消石灰上澄み液と混和して 5~60 分間処理した場合, 5 分間でも  $10^7$  個/ml の多角体試料中から感染性が消失していた (表 1)。また, 処理後に消石灰濃度を有効濃度以下に低下させた場合も, 不活化効果が減退することはなかったことから, その効果の不可逆性が示唆された。

## 2. ウイルス不活化効果の検証

### UV インジケータラベルを用いた紫外線積算照射量の定量化

UV インジケータラベルの着色程度は, 殺菌灯照射下で時間の経過とともに明瞭に変化し, 紫外線照射量とラベルの各色彩要素値との間には高い相関が認められた (図 6)。なかでも, L. c. h 表色系における彩度 (c) 値の変化量が大きく, 紫外線照射量のモニタリングに有用と考えられた。前述のとおり, BmNPV 多角体フリーウイルスの不活化には  $410\text{mJ}/\text{cm}^2$  以上の

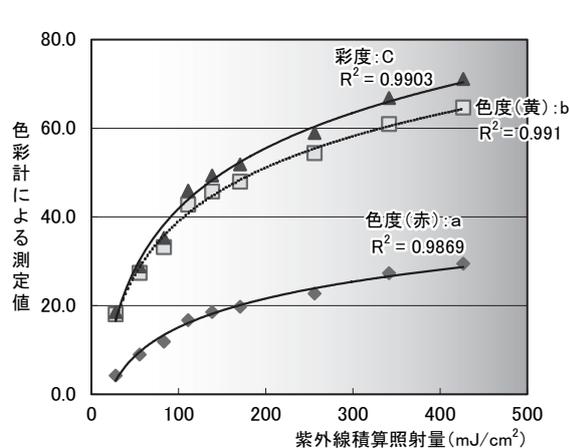


図 6. UV インジケータラベルの着色程度と紫外線照射量との関係

照射線量が必要とされることから, 彩度値と紫外線照射量の関係をもとにウイルス不活化要件を推定すると, ラベルの彩度値が 70 以上に達することが必要と考えられた (図 7)。

### 高精度生物検定法による感染性ウイルス粒子の検出

カイコを用いた生物検定では, ポリオキシンを用いた経口接種と比較して, 従来の経皮接種での発病率が高く (表 2), より高感度でウイルスの検出が可能であった。しかしながら, ふき取り検査キットにより回収した試料は高次希釈されることから, 低濃度のウイルスを検出するにあたっては, 回収試料の濃縮が必要と考えられた。そこで, ふき取り回収液から 8% PEG-6000 を用いてウイルス画分を 10 倍に濃縮し, PCR による検出限界希釈濃度を比較した結果, 試料の濃縮によって  $10^{-3}$  から  $10^{-5}$  となり, 検出感度が 100 倍に向上した (図 8 a)。

また, ウイルスの濃縮が培養細胞への感染性に及ぼ

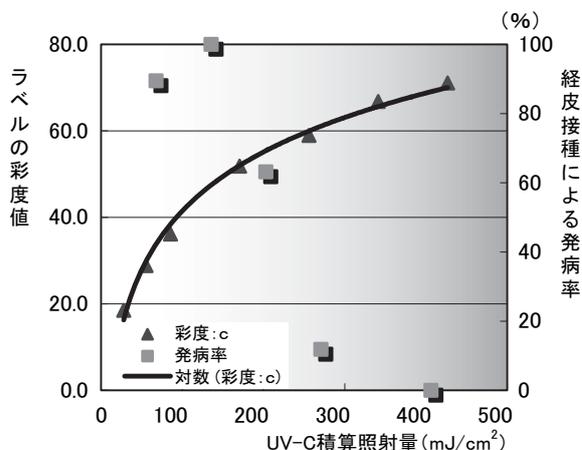


図 7. 紫外線照射量とインジケータラベルの着色程度, ならびに NPV 多角体フリーウイルスに対する不活化効果の関係

表 2. BmNPV 多角体フリーウイルスの経皮接種，ならびにポリオキシシンを用いた経口接種による感染性の比較

接種濃度 (ウイルス液の希釈度)	発病率 (%)*	
	経皮接種	経口接種
10 <sup>-10</sup>	70.0	0.0
10 <sup>-9</sup>	45.0	0.0
10 <sup>-8</sup>	80.0	0.0
10 <sup>-7</sup>	100.0	5.0
10 <sup>-6</sup>	100.0	10.0
10 <sup>-5</sup>	100.0	5.0
10 <sup>-4</sup>	95.0	20.0
10 <sup>-3</sup>	100.0	40.0
10 <sup>-2</sup>	100.0	65.0
10 <sup>-1</sup>	100.0	70.0

\* いずれも 1 区 10 頭 2 連制とし，4 齢起蚕に接種。

す影響を調査するため，培養細胞系で増殖した BmNPV 非包埋粒子を供試し，ウイルス原液とその 10 倍濃縮液の希釈系列を培養細胞に接種して，8 日後に培養上清を PCR に供し，増殖ウイルスの検出をおこなった。この場合，濃縮によって培養細胞への感染価が大幅に向上し，10<sup>-11</sup> 希釈レベルでもウイルスの増殖が認められた (図 8 b)。

さらに，多角体フリーウイルス液の希釈系列を 10 倍濃縮し，培養細胞に接種するとともに，4 齢起蚕に

経皮接種した。その結果，カイコの発病は 10<sup>-4</sup> 希釈までにとどまったのに対して，培養細胞においては培養前後の上清中のウイルスを PCR 解析することで，10<sup>-5</sup> 希釈試料においてもウイルスの感染増殖が確認された (図 9)。このことから，培養細胞に対する感染試験によって，カイコへの経皮接種と同等以上の精度で感染性ウイルス粒子を検出できることが明らかになった。

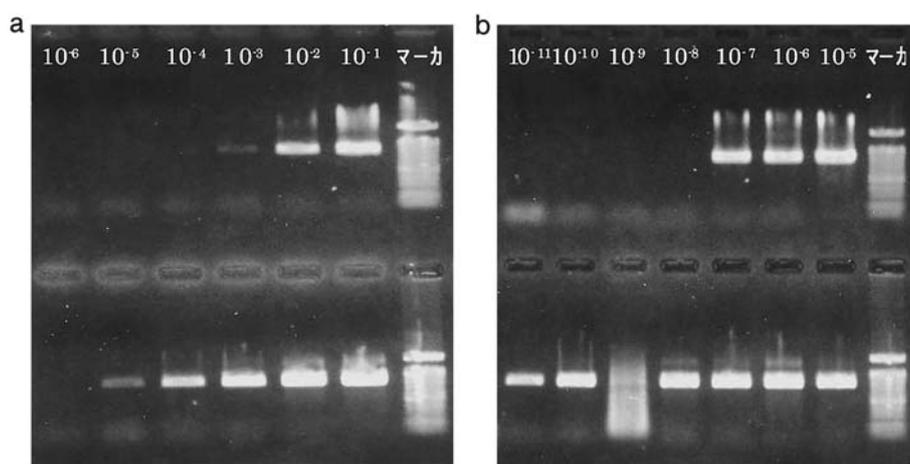


図 8. ポリエチレングリコール (PEG6,000) によるウイルス液の濃縮効果。

- 拭き取り回収液の濃縮が PCR 法による BmNPV *ie.1* の検出に及ぼす影響。  
上段：拭き取り原液，下段：同 10 倍濃縮液の希釈系列。
- 接種源ウイルスの濃縮が培養細胞への感染力価に及ぼす影響。  
上段：ウイルス原液 (培養細胞系で増殖)，下段：同 10 倍濃縮液の各希釈系列を接種源とし，それぞれ接種 8 日後の培養上清を PCR に供試して BmNPV *ie.1* の検出を行った。

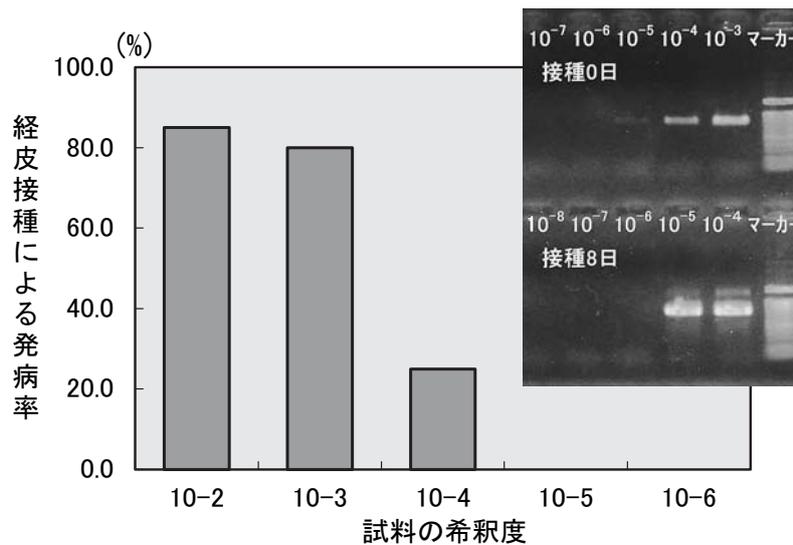


図9. ろ過ウイルス濃縮液中のカイコならびに培養細胞に対する感染性.

ろ過ウイルス試料を PEG により 10 倍に濃縮し、その希釈系列を 4 齢起蚕に経皮接種するとともに、カイコ培養細胞 (BmN4) に接種した。培養細胞に対する感染性は、接種直後および 8 日後の培養上清を PCR に供試し、BmNPV *ie.1* 断片の生成量を比較することで、複製ウイルスの有無を評価した (図中写真)。

#### IV. 考 察

試験に用いた 3 種の紫外線のうち UV-A はブラックライトに相当するもので、紫外線強度が低レベルでありウイルスに対する不活化作用は認められなかった。一方、UV-B (健康線：日焼け用) と UV-C (殺菌線) には強い不活化効果があり、後者の作用力は特に大きいことが示された。組換え動植物や昆虫を取り扱う管理区域内では、通常微生物汚染の拡大を防止する観点から殺菌灯が設置されており、それらの照射によってウイルス不活化効果が得られることは、実用上極めて好都合といえる。一方、ガラスと同様にプラスチックによっても紫外線の遮蔽が起こり、その材質や厚さで紫外線透過率が大きく異なることがわかった (データ未掲載)。本研究で供試したプラスチックシャーレの場合も UV-C はフタを透過せず、シャーレ内のウイルスには影響を及ぼさなかった。これに対して、UV-C よりもピーク波長の長い UV-B では透過光による不活化効果が認められ、底面を透過した反射光の有効性も確認された。このことは、紫外線による不活化処理の難点である‘陰’の問題を解消する手がかりになると考えられる。

昆虫工場プラント内に設置された殺菌灯を点灯した場合、一部の箇所を除き 24 時間で壁面や床に付着した組換えウイルスを不活化できると考えられる。一方、光量の不足する箇所は、殺菌灯の増設や反射光を利用

した補光等の措置を講ずることで、ウイルス不活化処理が可能であるが、現状では汚染箇所を想定した十分な洗浄作業等が必要である。この場合、熱湯による浸漬処理、ならびに蒸気処理は短時間で強力なウイルス不活化効果が期待できることから、使用後の飼育資材や機械・器具類の洗浄に有効と思われる。また、消石灰上澄み液は経済性と保存性に優れ、取り扱いが容易であることから汎用性が高いものと考えられる。

紫外線によるウイルス不活化効果の検証方法の一つとして、市販の UV インジケータラベルの利用が有効であり、ウイルス不活化要件をラベルの着色程度から推定できることが示された。また、ラベルの着色程度は紫外線照射量とともに明瞭に変化することから、基準色を作製することで遠観的判定も十分に可能であると考えられる。

一方、カイコにウイルスを接種してその感染性を評価する生物検定法は、これまで広く行われてきた手法であるが、用いるカイコの齢期や食餌の状況によって感受性が大きく変化する。したがって、定量的解析を目的として信頼性の高い検定結果を得るには熟練を要するうえ、検定の度に試験用カイコの供給が必要である。さらに、昆虫工場で増殖した非包埋ウイルス粒子は、経皮接種による感染に限られ、4 齢以上のカイコの使用が望まれるため飼育期間がより長期化するほか、作業効率も著しく低下する。近年、大量のカイコに効率的に非包埋ウイルスを感染させる方法として、蛍光

増白剤やフルフェノクスロンをはじめとした、昆虫成長調節物質の先行投与による経口感染法 (1, 2) が相次いで報告された。これらはいずれもカイコ中腸内壁の囲食膜構造の崩壊をもたらすことで、ウイルスに対する感受性を高めるものと考えられている。同様の機構で、糸状菌に対するキチン合成阻害剤であるポリオキシシンを用いた高感度バイオアッセイ法が開発され (3)、省力的で優れた手法として、「昆虫工場」における組換えウイルスの大量接種法への適用が検討されているが、本研究においては経皮接種と比較してカイコに対する感染率が劣った。このことから、不活化処理後の試料中に低濃度で存在する感染性ウイルスを検出する目的では、同法の適用は困難と思われる。

そこで、カイコを用いずにウイルスの感染性を評価するため、培養細胞にウイルス試料を接種して、増殖ウイルスの有無をモニタリングする方法について検討した。試験に用いた野生型 BmNPV は、感染後寄主細胞中で多核体を形成するため、巨視的に感染・増殖を確認することができるが、多角体をつくらぬ組換えウイルスでは、他の方法で感染の有無を判定する必要がある。著者らは、検出感度の高い PCR 法により細胞内外の増殖ウイルスを検知する方法を確立した。

また、プラント内から検査試料を回収するにあたって、キットを用いた拭き取り回収を行う場合、拭き取り操作 (拭き取り→懸濁) を 3 反復することで、十分な回収効率を確保することができた (データ未掲載)。一方、拭き取り試料は PBS に懸濁する際に希釈され、これを培養細胞に接種する場合には、ろ過滅菌処理の過程で更なるウイルス濃度の低下を余儀なくされる。これに対して、PEG によるウイルス画分の濃縮効果は極めて高く、培養細胞を用いた感染性ウイルス検出法の感度向上につながった。本検出法により陰性を示した検定試料においては、検出限界を下回る感染性ウイルスが含まれる場合も十分想定されるが、その濃度はカイコに感染する可能性がほとんどない水準にあるものと推察される。

このように、本研究では感染性のあるウイルスを、培養細胞と鋭敏な PCR 法を利用して検出する新たな手法を確立した。これまでに蚕病ウイルスの検出法として、PCR や ELISA 等が利用されてきたが、いずれもウイルスの感染性についての情報を得るものではなかった。本法は、生きたカイコを使用せずに感染性の評価が行える点で、大きなメリットがあるものと思われる。一方、供試する細胞の状態がウイルスの感染に

影響を及ぼすことなど、培養細胞を用いる場合も生物検定に共通する認識が重要であるほか、無菌ろ過の必要性等、培養細胞を使用することによるマイナス面も存在する。今後、検定試料を希釈せずに回収する方法や、ウイルスの損失を伴わない試料の無菌化法等について検討することによって、さらに検定精度を高めることが可能と思われる。

## V. 摘要

1. ホルマリンを使用しないウイルス不活化方法について検討し、紫外線照射、湿熱処理および消石灰上澄み液による混和処理に強い不活化作用が確認された。
2. BmNPV 多角体フリーウイルスの殺菌灯 (UV-C) による不活化には、 $410\text{mJ}/\text{cm}^2$  以上の紫外線積算照射量が必要であった。
3. 昆虫工場生産プラント内に設置された殺菌灯からは、床面や壁面に残存するウイルスを 24 時間程度で不活化できる紫外線強度が得られることが確認されたが、物陰等により不活化効果が得られない箇所も存在した。
4. 紫外線によるウイルス不活化効果の検証には、UV インジケーターラベルを利用した紫外線照射量のモニタリングが有効であり、ラベルの彩度 (c) 値が 70 以上に達することが不活化要件と推定された。
5. ウイルス不活化効果を検証する高精度な生物検定法として、培養細胞への感染・増殖の有無を PCR 解析により確認する方法を確立した。

**謝辞** 本研究の遂行にあたり、(独) 農業生物資源研究所 早坂昭二博士、ならびに茨城県農業総合センター生物工学研究所 池上隆文室長には逐次ご指導・ご助言を頂き、農業総合センター飯田豊技師、伏木俊雄副技師には接種試験において多大なるご協力を頂いた。また、臨時職員の方々には実験補助の労を多にした。ここに深く感謝の意を表する。

## 引用文献

1. 新川徹・古田要二・久保村安衛・加藤正雄・早坂昭二 (2002). カイコ多角体病非包埋ウイルス粒子を蛍光増白剤を用いて経口感染させる方法. 日蚕雑. 71 (2) : 101-105.

2. Arakawa, T., Furuta, Y., Miyazawa, M. and Kato, M. (2002). Flufenoxuron, an insect growth regulator, promotes peroral infection by nucleopolyhedrovirus (BmNPV) budded particles in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Virol. Meth.* 100 : 141-147.
3. 新川徹・野澤瑞佳 (2004). カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の高感度バイオアッセイの開発. 第48回日応動昆学会講要 (京都). pp. 76.
4. Huybrechts, R., Guarino, L., Van Brussel, M. and Vulsteke, V. (1992). Nucleotide sequence of a transactivating *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus immediate early gene. *Biochim. et biophys. Acta.* 1129 : 328-330.
5. 小林則夫 (2003). 超微粒子ホルマリンによる昆虫工場の消毒. 茨城農総七園研報. 11 : 37-44.
6. 埼玉県農業試験場ほか (2000). 平成9~10年度新技術地域実用化研究促進事業研究成果報告. 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. pp. 53.
7. 飼育環境管理技術研究会 (2002). 平成13年度貞明皇后蚕糸記念科学技術研究助成研究成果報告. 養蚕農家に対応した飼育環境管理技術の確立. pp. 7.
8. (社)農林水産先端技術産業振興センター (STAFF) (2003). 平成14年度 昆虫テクノロジー研究の産業利用への可能性と市場規模予測調査報告書. pp. 50.