

## 培養細胞におけるカイコ核多角体病ウイルスの増殖

今 西 重 雄・井 上 元・小 林 淳  
門 野 敬 子・河 本 秀 夫・Serge BELLONCIK  
桑 原 伸 夫・坂 元 秀 彦・富 田 秀 一 郎

Shigeo IMANISHI<sup>2</sup>, Hajime INOUE<sup>3</sup>, Jun KOBAYASHI<sup>2</sup>, Keiko OKUDA-KADONO<sup>4</sup>, Hideo KAWAMOTO<sup>4</sup>, Serge BELLONCIK<sup>4</sup>, Nobuo KUWABARA<sup>5</sup>, Hidehiko SAKAMOTO<sup>6</sup> and Shuichiro TOMITA<sup>2</sup>: *In vitro* multiplication of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus

蚕糸・昆虫農業技術研究所研究報告  
第 7 号 別刷

平成 5 年 2 月

Reprinted from  
Bulletin of the National Institute of  
Sericultural and Entomological Science  
No. 7, February, 1993

## 培養細胞におけるカイコ核多角体病ウイルスの増殖<sup>1</sup>

今西重雄<sup>2</sup>・井上元<sup>3</sup>・小林淳<sup>2</sup>  
門野敬子<sup>4</sup>・河本秀夫<sup>4</sup>・Serge BELLONCIK<sup>4</sup>  
桑原伸夫<sup>5</sup>・坂元秀彦<sup>6</sup>・富田秀一郎<sup>2</sup>

(1992年 8月6日 受理)

Shigeo IMANISHI<sup>2</sup>, Hajime INOUE<sup>3</sup>, Jun KOBAYASHI<sup>2</sup>, Keiko OKUDA-KADONO<sup>4</sup>, Hideo KAWAMOTO<sup>4</sup>, Serge BELLONCIK<sup>4</sup>, Nobuo KUWABARA<sup>5</sup>, Hidehiko SAKAMOTO<sup>6</sup> and Shuichiro TOMITA<sup>2</sup>: *In vitro* multiplication of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus

昆虫の培養細胞株および幼虫体内で、有用物質の生産に関与する各種の外来遺伝子を効率よく発現させる技術開発が進められている (SMITH et al., 1983; MAEDA et al., 1985)。このためには、まず昆虫核多角体病ウイルス (NPV) から構築される発現効率が高いベクター (組換えウイルス) およびウイルス高感受性の培養細胞株が必要であるとともに、培養細胞株における組換えウイルスの感染・増殖を促進させる条件の解明が必要である。

このような観点から、本研究では遺伝的特性が明らかな既存の培養細胞株を用いて、ウイルス高感受性培養細胞の選抜とウイルスのクローニングを行い、また培養細胞の特性解明のためのアイソザイム分析による細胞同定法の検討を行った。さらに、ウイルスの感染・増殖を良好に維持・促進する培養条件の検討を行った。それらの結果の概要を報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試培養細胞株

カイコ由来の培養細胞株として、SES-BoMo-15A (以下 BoMo-15A ; INOUE and MITSUHASHI : 1984, 1988), SES-BoMo-15A II (以下 BoMo-15A II ; 井上ら, 1990), NISES-BoMo-15A II c (以下 BoMo-15A II c ; 井上ら, 1990), NISES-BoMo-Caml (以下 BoMo-Caml ; 小林・井上, 1989), SES-BoMo-J125 および SES-BoMo-C129 (以下 BoMo-J125 および BoMo-C129 ; IMANISHI and OHTSUKI, 1988 ; IMANISHI et al., 1988), BmN-4 (MAEDA, 1989) の7種類の細胞株を供試した。カイコ以外の昆虫由来培養細胞株

- 
- 1 この研究は所内特別研究「培養細胞系における昆虫ウイルスの感染・増殖機構の解明」(1988～1990)の一部として行われた。
  - 2 遺伝育種部細胞工学研究室
  - 3 企画連絡室 (前遺伝育種部細胞工学研究室)
  - 4 科学技術振興調整費重点基礎研究による参画
  - 5 群馬県蚕業試験場
  - 6 長野県蚕業試験場

としては、シンジュサン脂肪体由来の NISES-SaCy-12 (以下 SaCy-12; 未発表), クワゴマダラヒトリ脂肪体由来の FRI-SpIm-1229 (MITSUHASHI and INOUE, 1988), *Euxoa scandens* の培養細胞株 IAFES-1 (BELLONCIK *et al.*, 1985), ヨトウ脂肪体由来の SES-MaBr-4 (以下 MaBr-4; INOUE and MITSUHASHI, 1985), サクサン胚子由来の NISES-AnPe-426 (以下 AnPe-426; 未発表) を用いた。

## 2. 培地

培地は牛胎児血清 (FBS) を10%含む MGM-448培地 (MGM-448) と FBS を10%含む MGM-443培地 (MGM-443; MITSUHASHI, 1984), FBS を3%含む MM培地 (MM (3% FBS); MITSUHASHI and MARAMOROSCH, 1964), FBS を10%もしくは20%含む TC-10培地 (GARDINER and STOCKDALE, 1975) および Grace培地 (GRACE, 1962) を用いた。

## 3. 昆虫体液の調製

桑葉育および人工飼料育したカイコ (品種: 日02号×中02号) の5齢6日目の幼虫からそれぞれ体液を採取し, 60°C 60分もしくは65°C 30分の加熱処理により, 体液のメラニゼーションの防止と滅菌処理を行い, それぞれの3,000rpm-15分間の遠心上清を-20°Cに凍結保存し, 適宜, 融解して実験に用いた。また, カイコ体液と同様に, テンサン (クヌギ葉飼育) の終齢幼虫からも体液を採取し, カイコ体液と同様に処理して, 実験に用いた。

なお, 実験には主に桑葉育蚕の体液を用いた。

## 4. ウイルス液の調製

カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の発病幼虫の体液を3,500rpm, 20分間遠沈し, 孔径450nm ミリポアフィルターで濾過した濾液をカールソン液で30倍もしくは50倍 (ウイルス力価:  $1 \times 10^6$  PFU/ml) の希釈液とした。これを原液として-20°Cに凍結保存し, 適宜, 融解・希釈して用いた。

## 5. ウイルス接種と感染の確認

細胞浮遊液を1,500rpm, 2分間の遠心にかけて, 沈澱した細胞を昆虫体液添加培地および無添加培地に  $2 \times 10^5$  細胞/ml になるように計測して, 50ml 容量の培養容器に植え継ぎ, その直後または2日後にウイルス液を培地4ml に対し80 $\mu$ l を加え, 以後25°Cで培養した。マイクロテストプレートを用いたウイルス接種試験では, 細胞浮遊液を96穴のそれぞれに150 $\mu$ l/well になるように分注した。ウイルス液は1穴当たり, 25 $\mu$ l を1希釈段階ごとに8穴ずつ分注した。以後, 25~28°Cで培養し, TCID<sub>50</sub> (tissue culture infectious dose) を求めた。ウイルス感染の確認はウイルス接種後経時的に倒立顕微鏡下で観察し, 細胞核内における多角体形成の有無で判定した。また, 培養細胞に顆粒が多く多角体との識別が困難な場合には, 適宜細胞の塗抹標本作製し, カルノア液で固定後1Nの塩酸60°C5分間処理を施した後, 1%プロモフェノールブルー (BPB) を用いて5分間染色し, 染色された多角体の有無で判定した。さらに, 抗ウイルス蛍光抗体40倍希釈液 (INOUE and KIMURA, 1985) と抗多角体タンパク蛍光抗体20倍希釈液 (渡辺ら, 1988) で細胞を染色し, 特異蛍光の有

無で感染を調査した。

#### 6. 免疫学的手法によるウイルス増殖様態の観察

カイコの付着性培養細胞(BoMo-15A)におけるウイルスの増殖を間接 ELISA 法 (Enzyme-linked immuno solvent assay) および酵素抗体法で検討した。方法は以下のとおりである。

標本の調製：

$2.4 \times 10^5$ 細胞/ml の細胞液を 1 個の 50ml 容量プラスチック培養容器 (ファルコン#3013) に播き、 $25^{\circ}\text{C}$  48時間培養してセルシートを形成させた。その後、培地を除去し、0.5ml の 10倍段階希釈のウイルス液をそれぞれの培養容器に加え、1時間室温に放置した。その間、容器を15分間毎に数回動かしウイルスの細胞膜への吸着を促進した。ウイルス液を除去し、カールソン液で細胞表面を洗浄してから、5 ml の新鮮 MGM-448 培地を加え $25^{\circ}\text{C}$ で培養した。経時的に 1 個の培養容器の培地を全部回収し、3,500rpm15分間の遠心上清を採取し、間接 ELISA 法でウイルス量を測定した。残りの細胞をパンクレアチン処理で剝離しカールソン液で 3 回遠心洗浄 (1,000rpm 1 分間) 後、スライドに塗抹し、酵素抗体法による細胞染色を行った。

間接 ELISA 法：

抗ウサギ IgG のパーオキシデース標識ヤギ IgG はバイオラッド社製を使用し、0.02% Tween20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBST) で3,000倍に希釈して使用した。検査は96穴平底プレート (Nunc イムノプレート I) を用いて行った。各穴にウイルス感染培地もしくは非ウイルス接種対照区の培地を $100\mu\text{l}$  入れ、室温に 1 時間、さらに  $4^{\circ}\text{C}$  に一晩静置した。各穴を PBST で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、2% アルブミン液を加え 1 時間反応させた後に、液を吸引除去し、10,000倍希釈の抗 B mNPV 血清 $100\mu\text{l}$  を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間反応させた。この血清を除去し、PBST で 3 回洗浄後3,000倍希釈のパーオキシデース標識抗ウサギ IgG-ヤギ抗体を $37^{\circ}\text{C}$  2 時間反応させた。その後、二次抗体を除去し PBST で 3 回洗浄後、2, 2-azino-di- [3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] を $100\mu\text{l}$  加えて20分間発色処理し、2% シュウ酸液 $100\mu\text{l}$  で反応を停止後414nm の吸光度を EIA リーダで測定した。

酵素抗体細胞染色：

塗抹細胞をアセトンで10分間固定後、2% アルブミン液を室温30分処理し、液を除去後1,000倍希釈の抗 BmNPV 血清を $37^{\circ}\text{C}$ 45分間、次いで1,000倍希釈二次抗体を PBS で洗浄後45分間反応させた。反応後、PBS で洗浄、0.04% 四塩酸ジアミノベンジジンを、引き続き0.03% 過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を10分間反応させ、PBS で洗浄後カバーガラスをかけて鏡検した。

#### 7. 特性を解明するための培養細胞のアイソザイムパターンの検出

供試する培養細胞の密度を約 $10^6$ 個/ml に調整した。これらの標本についてオーセンティキット (コーニング社) を用いて分析用酵素試料の抽出、アガロース電気泳動、酵素基質液による活性バンドの検出を行った。調査した酵素はイソクエン酸脱水酵素 (ICD)、リンゴ酸酵素 (ME)、グルコース磷酸イソメラーゼ (PGI)、グルコース磷酸ムターゼ (PGM)、

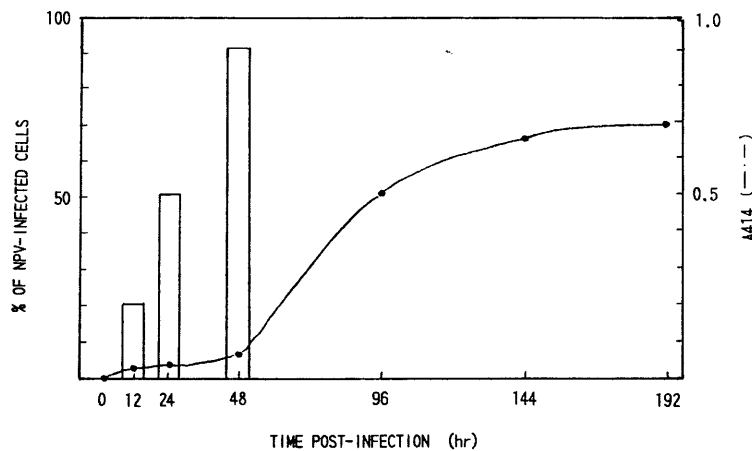
グルコース—6—磷酸脱水素酵素 (G6PD) および乳酸脱水素酵素 (LD) の6種類である。

## 結 果

### 1. カイコの新付着性培養細胞株 BoMo-15A II の選抜とウイルス感受性

カイコ培養細胞株 BoMo-15A からクローニングした付着性の培養細胞株 BoMo-15A II c の特性と核多角体病ウイルス感受性については既に蚕糸・昆虫研報告, 1, 13—25(1990) に報告したので, ここでは, 新たに選抜した付着性細胞株 BoMo-15A II におけるカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の増殖様相を, 培地に遊離してくるウイルス量並びに感染細胞数によって把握した結果について記述する。

継代数が99代目の培養細胞株 BoMo-15A II に, BmNPV を接種すると12時間後には培地中にウイルス抗原が確認され, ウイルス量は接種48時間後までゆるやかに増加した。しかし, 接種48時間以後は顕著に増加した(第1図)。この間の培養細胞の塗抹標本を酵素抗体染色によって調査すると, 接種12時間後には20.8%の細胞が染色され, 接種後24時間後にはその割合が50.8%に高まるとともに小型の多角体が核内に識別された。また, 接種48時間後になると91.3%の細胞感染率となり, 多角体もほぼ成熟した形態を示し, ウイルス感染に伴う細胞破裂も認められた。このような結果から, 培地中のウイルス抗原量の増大は, 細胞から出芽したウイルスによるものであり, それ以降は出芽ウイルスの他に細胞破裂によって遊離したウイルスに基づくものとみなされた。



第1図 BoMo-15A II細胞株における BmNPV 増殖の ELISA 法による調査

Fig. 1 Detection of virus antigen by the ELISA method in the BoMo-15A II cell line. Non-specific control data were deducted from these absorbances. Histogram represents the percentage of infected cells.

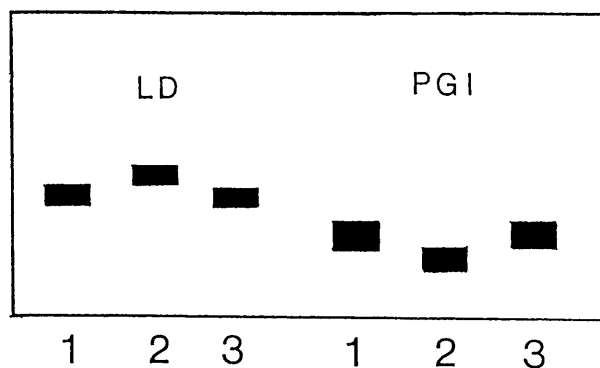
## 2. カイコおよび他の昆虫の培養細胞株のアイソザイムパターンによる同定

付着性培養細胞株の特性を解明するために、細胞工学研究室で作出された既存の各種昆虫細胞株 (BoMo-15A, BoMo-Caml, BoMo-C129, SaCy, AnPe-426, MaBr-4) と新たに選抜された BoMo-15A II についてアイソザイムパターンを比較検討した。

1) カイコ組織間差異：ICD, ME, PGM および G6PD の各酵素については、供試したカイコ胚子由来の培養細胞株ではいずれも同じバンドパターンを示した。一方、PGI および LD についてはカンボージュ (熱帯種) 卵巣由来の BoMo-Caml は多少異なる移動度のバンドを示した (第2図) が、黒子 (日本種) の胚子由来の BoMo-15A と支129号 (中国種) 胚子由来の BoMo-C129 とは全く同じパターンであった。

2) 系統間差異：BoMo-15A から選抜された付着性の系統 BoMo-15A II は調査した ICD, PGI, PGM, G6PD, LD のすべての酵素について BoMo-15A と同じバンドパターンを示した (第3図)。しかし、タンパク質量当たりのバンドの染色強度には大きな差があり、付着性の系統である BoMo-15A II では PGI を除いて常に弱い染色バンドしか得られなかった。これは培養容器に付着している細胞の採取方法をラバーポリスマンによる機械的剝離方法からパンクレアチンを用いた酵素による剝離処理に変えても同じであった。このことは、BoMo-15A 細胞集団中の細胞種により酵素活性に差のあることを示している。いずれにしても、今回供試した6種の酵素についてはバンドパターンからカイコの系統間差異を導くことはできなかった。

3) 種間差異：6種類の酵素を用いてそれぞれの昆虫に特有なアイソザイムパターンが得られた。ICD では BoMo-15A は2本, AnPe-426 では3本, MaBr-4 は2本のバンドを

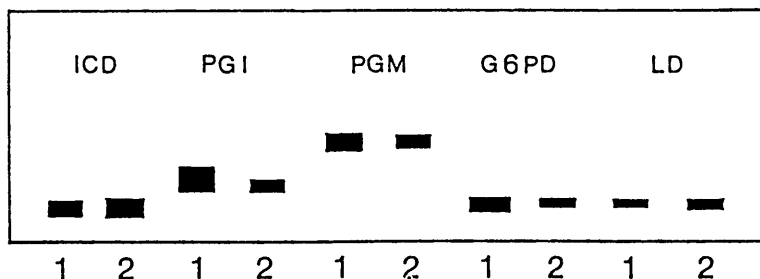


第2図 カイコ培養細胞のアイソザイムパターン

1 : SES-BoMo-15A,      2 : SES-BoMo-Caml  
3 : SES-BoMo-C129

Fig. 2 Isozyme pattern of *Bombyx mori* cell lines.

1 : SES-BoMo-15A,      2 : SES-BoMo-Caml  
3 : SES-BoMo-C129



第3図 カイコ培養細胞の SES-BoMo-15A 細胞株と SES-BoMo-15A II細胞株のアイソザイムパターン  
1 : SES-BoMo-15A, 2 : SES-BoMo-15A II

Fig. 3 Identification by isozyme analysis of SES-BoMo-15A and SES-BoMo-15A II cell line of *Bombyx mori*  
1 : SES-BoMo-15A, 2 : SES-BoMo-15A II

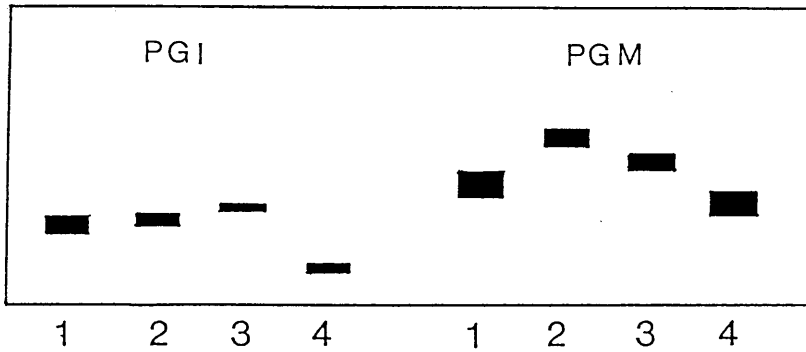
示した。ME では BoMo-15A は 2 本のバンドを示した。G6PD では、カイコ以外の 3 種の培養細胞には明瞭なバンドがみられなかった。すなわち、活性を示すバンドは試料添加位置からほとんど移動せず、しかも AnPe-426 ではマイナス側に、また SaCy-12 と MaBr-4 ではプラス側に認められた。PGI および LD ではどの種においてもバンドが 1 本ずつみられた。バンドの活性染色の強さおよびパターンからみて PGI がアイソザイムによる種間差異の確認に明瞭な指標になるものと判断された。なお、ここでは PGI と PGM の両酵素を用いたパターン図を記載したが、カイコ、サクサン、シンジュサン、ヨトウのいずれの細胞株でも明瞭な種間差異がみられた (第 4 図)。

### 3. 培養細胞系における核多角体病ウイルスの増殖様態

MGM-448 培地で継代されているカイコ培養細胞株 BoMo-15A を MGM-443 培地と MM (3% FBS) 培地へ順化させたところ、前者には容易に順化し、細胞は以後順調に増殖したが、後者への順化には時間を要した。これら 3 種の培地で細胞が安定して増殖するようになった後、BmNPV を接種し、多角体形成細胞率を比較した。その結果、MGM-448 培地区および MGM-443 培地区の細胞には多数の多角体が認められたが、MM (3% FBS) 培地区の細胞には多角体がほとんど形成されなかった (第 1 表)。抗ウイルス並びに抗多角体タンパク蛍光抗体によってウイルスの感染度合いを調査してみたところ、MGM-443 培地の培養細胞はウイルスの感染度が極めて高く (99.2%)、また多角体形成度も高い (81.8%) が、MM 培地ではそれぞれ 21.2% および 6.1% と低い数値が得られた (第 2 表, 第 3 表)。これらの結果から、MM 培地では多角体形成の面で栄養的に不足するものがあると考えられた。

### 4. 培地への昆虫体液および金属塩の添加とウイルス増殖

MM 培地 (3% FBS) における多角体の形成率を高めるためにカイコおよびテンサンの体液並びに金属塩を培地へ添加し、それらの多角体形成に及ぼす影響を検討した。



第4図 数種鱗翅目昆虫培養細胞のアイソザイムパターン

1：カイコ (BoMo-15A), 2：サクサン (AnPe-426)  
 3：シンジュサン (SaCy-12), 4：ヨトウ (MaBr-4)

Fig. 4 Isozyme pattern of insect cell lines

1 : *Bombyx mori* (BoMo-15A), 2 : *Antheraea pernyi* (AnPe-426)  
 3 : *Samia cynthia pryeri* (SaCy-12),  
 4 : *Mamestra brassicae* (MaBr-4)

第1表 異なる培地へ順化されたカイコ培養細胞のカイコ核多角体病ウイルス感受性

Table 1 Susceptibility of *B. mori* cells with BmNPV in the different media

培地 Media	調査細胞数 No. of cells examined	多角体形成 細胞数 No. of cells formed polyhedra	割合 percentage (%)
MGM-448 (10% FBS)	1224	168	13.7
MGM-443 (10% FBS)	1379	203	14.7
MM (3% FBS)	1609	0	0.0

BmNPV 接種後 5 日目に調査, 供試培養細胞株: SES-BoMo-15A 株

Virus inoculation : 2 days post cell subcultivation

Observation : 5 days post virus inoculation

Cell line used : SES-BoMo-15A



**第2表** 抗ウイルス蛍光抗体による核多角体病ウイルス感染細胞の染色**Table 2** Staining of NPV-infected cells by fluorescent antibody against virus rod

培地 Media	調査細胞数 No. of cells examined	蛍光細胞数 No. of cells fluorescent	割合 percentage (%)
MGM-443(10% FBS)	124	123	99.2
MM(3% FBS)	335	71	21.2

SES-BoMo-15A 細胞株にウイルスを接種し、7日後に調査

Observation at 7 days post inoculation

Cell line used : SES-BoMo-15A

**第3表** 抗多角体蛋白蛍光抗体による核多角体病ウイルス感染細胞の染色**Table 3** Staining of NPV-infected cells by fluorescent antibody against polyhedron protein

培地 Media	調査細胞数 No. of cells examined	蛍光細胞数 No. of cells fluorescent	割合 percentage (%)
MGM-448(10% FBS)	77	63	81.8
MM(3% FBS)	361	22	6.1

SES-BoMo-15A 細胞株にウイルスを接種し、7日後に調査

Observation at 7 days post inoculation

Cell line used : SES-BoMo-15A

まず、体液の添加効果を調査した結果は、MM(3% FBS) 培地で培養されたカイコ培養細胞株 BoMo-15A では、BmNPV による多角体形成が全く認められないが、カイコ幼虫から採血した60°C 1時間の加熱処理体液を MM 培地(3% FBS)に10%加えると、多角体形成が促進された。この場合、FBS を含まない MM 培地を用いても結果は同じであった(第4表, 第5図)。また、このような条件下で形成された多角体には、ウイルス粒子が包埋されていることが、電子顕微鏡により確認された。なお、多角体形成の促進効果については体液の60°C 1時間および65°C 30分間の処理には特に差異は認められなかった(第5表)。

次に、テンサンの終齢幼虫から採取した体液をカイコ体液と同様に65°C 30分間加熱処理し、その遠心上清を MM(3% FBS) 培地に添加して、カイコ培養細胞株 BoMo-15A における BmNPV の感染度をみたところ、若干の効果が認められたが、カイコ体液の場合のような顕著な多角体形成促進効果は認められなかった(第6表)。

## 第4表 多角体の形成に及ぼすカイコ体液の効果

Table 4 Effect of silkworm hemolymph on the formation of polyhedra

培地 Media	実験区 No. of experiment	調査細胞数 No. of cells examined	多角体形成 細胞数 No. of cells formed polyhedra	割合 percentage (%)
MM(3% FBS)	I	1701	0	0.0
	II	1670	0	0.0
MM(3% FBS+10% hemolymph)	I	1647	379	23.0
	II	1633	461	28.2
MM(10% hemolymph)	I	1590	397	25.0
	II	1681	555	33.0

BmNPV 接種後 4 日目 (I) 及び 5 日目 (II) に調査

カイコ体液：60°C 1 時間処理，供試培養細胞株：SES-BoMo-15A 株

I means the observation at 4 days post virus inoculation

II means the observation at 5 days post virus inoculation

Silkworm hemolymph was heat-treated with 60°C for 1 hr

Cell line used : SES-BoMo-15A

## 第5表 カイコ体液添加培地における培養細胞の多角体形成

Table 5 Formation of the polyhedra of BmNPV in *B. mori* cell cultured in the medium containing silkworm hemolymph

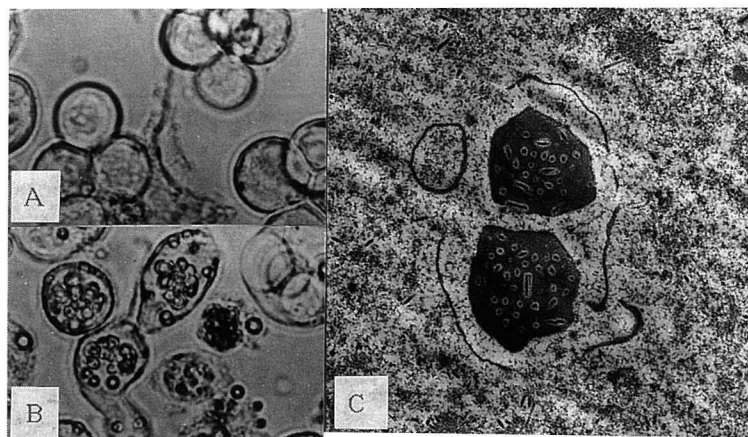
培地 Media	調査細胞数 No. of cells examined	多角体形成 細胞数 No. of cells formed polyhedra	割合 percentage (%)
MM(3% FBS)	1008	0	0.0
MM(3% FBS+10% hemolymph) (60°C・1 hr.)	1263	278	22.0
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65°C・30min.)	1353	380	28.1
MGM-443(10% FBS)	1127	82	7.3

細胞内の多角体数の計測は，ウイルス接種後 4 日目に実施

供試培養細胞株：SES-BoMo-15A 株

Observation at 4 days post virus inoculation

Cell line used : SES-BoMo-15A



第5図 カイコ体液を添加したMM培地で培養されたカイコ培養細胞と細胞内に形成された多角体

- A) 体液無添加培地の細胞には多角体がみられない  
 B) 10%体液添加培地での細胞には多角体が形成される  
 C) 多角体中にはウイルス粒子が包埋されている

Fig. 5 Formation of the polyhedra of *B. mori* NPV in the cells cultured in MM medium containing silkworm hemolymph.

- a) Polyhedra are not recognized in the cells cultured in the MM medium  
 b) Polyhedra are recognized in the cells cultured in the medium containing 10% silkworm hemolymph  
 c) Virions are occluded in the polyhedra

さらに、培地へ添加すると昆虫ウイルスの増殖を促進するといわれている金属塩(Weiss *et al.*, 1982)の塩化アルミニウム( $\text{AlCl}_3$ )と硫酸亜鉛( $\text{ZnSO}_4$ )をMM(3% FBS)培地へ添加し、その効果を調べた。しかし、両金属塩ともカイコ培養細胞における多角体形成には明瞭な促進効果を示さなかった(第7表)。

#### 5. カイコ体液のウイルス増殖促進効果

カイコの体液が培養系におけるBmNPVの多角体形成を顕著に増進することが明らかになったので、体液の添加効果を体液濃度、処理温度、培養細胞株の種類とウイルスとの関係から調べた結果について記述する。

まず、MM(3% FBS)培地に添加するカイコの幼虫体液の割合を0, 1, 3, 5および10%と変化させたところ、BmNPVの多角体形成への促進効果は、体液の添加量に比例して高まることが判明した(第8表)。

次に、65°C30分間処理した体液をさらに70°C, 80°Cおよび90°Cでそれぞれ30分間処理し、

第6表 加熱処理の異なるテンサン体液添加培地における培養細胞の多角体形成

Table 6 Formation of the polyhedra of Bm NPV in *B. mori* cells cultured in the medium containing *Antheraea yamamai*

培地 Media	実験区 No. of experiment	接種後の日数 Days post inoculation	
		4日間 4 days	6日間 6 days
		MM(3% FBS)	I
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65°C・30min.)	I	1.6	9.5
	II	1.6	6.1
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65°C・30min.+70°C・30min.)	I	1.2	9.1
	II	1.3	6.1
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65°C・30min.+80°C・30min.)	I	1.1	4.4
	II	1.0	5.1
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65°C・30min.+90°C・30min.)	I	0.4	1.9
	II	0.7	2.3

観察細胞数は1,300個程度，供試培養細胞株：SES-BoMo-15A株

About 1,300 cells were observed

Cell line used : SES-BoMo-15A

The hemolymph was treated at 65°C for 30 min, and followed with the treatment of different temperature

多角体形成への影響を調査した。その結果、65°C処理の体液では顕著な効果を示すが、70°Cで処理した体液ではその効果が大きく減じることが示された。しかしながら、ウイルス接種6日目頃には70°C処理区で多角体形成細胞数が多く出現してきており、80°C処理区および90°C処理区でも多少多角体の形成が認められた(第9表)。一方、人工飼料育蚕から採取した体液(65°C30分間処理済み)を培地へ添加したところ、10% FBSを含む Grace 培地と *Euxoa scandens* 培養細胞株において、また、10% FBSを含む MGM-448 培地とカイコ培養細胞株 BoMo-15A において、それぞれ細胞毒性が認められ、体液添加での細胞増殖の不良および一部の細胞の死滅が認められた(第6図)。しかし、このような条件下においても、カイコ培養細胞株 BoMo-15A では BmNPV の多角体形成細胞数は明らかに体液無添加区に比べて多かった(第7図)。

カイコ体液添加による BmNPV の多角体形成促進効果は BoMo-15A 以外の培養細胞株では BoMo-15A II c, BoMo-J125 および BoMo-J125K2 でも顕著にみられた。また、BoMo-15A II c でも体液添加の効果がみられた。BoMo-Caml および BmN-4 では体液無添加の培地でも多角体形成が認められるが、体液添加による多角体形成促進効果の点では、他の細胞株にみられるような顕著な効果は認められなかった(第10表)。なお、両者のうち BmN-4 細胞株は BmNPV に対する感受性が極めて高かった。

第7表 金属塩添加培地における培養細胞の多角体形成度合

Table 7 Formation of the polyhedra of BmNPV in *B. mori* cells cultured in the medium containing metallic salts

培地 Media	実験区 No. of experiment	接種後の日数 Days post inoculation	
		4日間 4 days	6日間 6 days
MM(3% FBS)	I	0.3%	0.3%
	II	0.2	0.4
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65°C・30min.)	I	45.1	54.4
MM(3% FBS+16 $\mu$ M・AlCl <sub>3</sub> )	I	0.4	0.5
	II	0.2	0.6
MM (3% FBS+0.24 $\mu$ M・ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O)	I	0.7	0.8
	II	0.2	0.5

観察細胞数は1,200~1,500個程度, 供試培養細胞株: SES-BoMo-15A 株

Cells of 1,200~1,500 were observed.

Cell line used: SES-BoMo-15A

第8表 多角体の形成に及ぼすカイコ体液添加割合の影響

Table 8 Effect of the additive rate of silkworm hemolymph on the formation of polyhedra

添加割合 rate of hemolymph added	調査 細胞数 No. of cells examined	多角体 形成細胞数 No. of cells formed polyhedra	割合 percentage
10%	1870	592	31.7%
5	1861	320	17.2
3	1954	189	9.7
1	1971	69	3.5
0	1790	0	0.0

SES-BoMo-15A 株にウイルスを接種し, 6日後に調査

供試培地: MM(3% FBS)培地

Observation at 6 days post virus inoculation

Cell line used: SES-BoMo-15A

Medium used: MM(3% FBS)

第9表 加熱処理の異なるカイコ体液添加培地における培養細胞の多角体形成

Table 9 Formation of the polyhedra of BmNPV in *B. mori* cells cultured in the medium containing silkworm hemolymph

培地 Media	実験区 No. of experiment	接種後の日数 Days post inoculation		
		4日間 4 days	5日間 5 days	6日間 6 days
		MM(3% FBS)	I	0.0%
	II	0.1		0.2
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65°C・30min.)	I	31.0	50.5	
	II	31.2	45.8	
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65°C・30min.+70°C・30min.)	I	1.1		22.5
	II	2.3		20.7
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65%・30min.+80°C・30min.)	I	1.0		9.7
	II	1.4		7.1
MM(3% FBS+10% hemolymph) (65°C・30min.+90°C・30min.)	I	0.5		4.4
	II	1.0		4.2

観察細胞数は1,300個程度，供試培養細胞株：SES-BoMo-15A株

About 1,300 cells were observed

Cell line used : SES-BoMo-15A

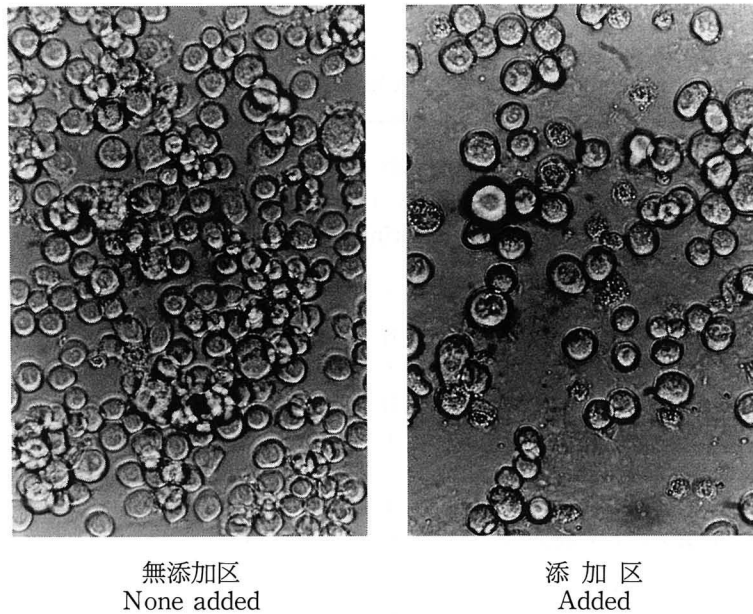
The hemolymph was treated at 65°C for 30 min, and followed with the treatment of different temperature

次に、シンジュサン培養細胞株 SaCy-12，クワゴマダラヒトリ培養細胞株 Splm-1229 および *Euxoa scandens* 培養細胞株を供試して、カイコ以外の鱗翅目昆虫由来の培養細胞株におけるサクサン NPV，クワゴマダラヒトリ NPV 並びに *Euxoa scandens* CPV の多角体形成状況を調査した。その結果，体液無添加区で明らかなウイルス感受性が認められたが，体液添加区と無添加区との間には大きな差異はなかった（第11表）。

上記の結果から，カイコ体液の多角体形成促進効果はカイコ培養細胞系に特徴的な現象であることが示唆された。

## 考 察

前報（井上ら，1990）に示したように，ウイルス高感受性のカイコ付着性培養細胞株が新たに作出され，この培養細胞株を用いたブランク形成法の確立並びに BmNPV のクローニングが行われた。この付着性細胞株並びに細胞工学研究室で作出されているシンジュサン，サクサン，ヨトウ，クワゴマダラヒトリの培養細胞株の特性を明らかにする目的からアイソザイム分析による細胞同定を試みた。今回，我々は市販の Authentikit (Corning 社) を用いた。その結果から明らかなように，PGI と PGM を用いると昆虫種間の差異が明瞭

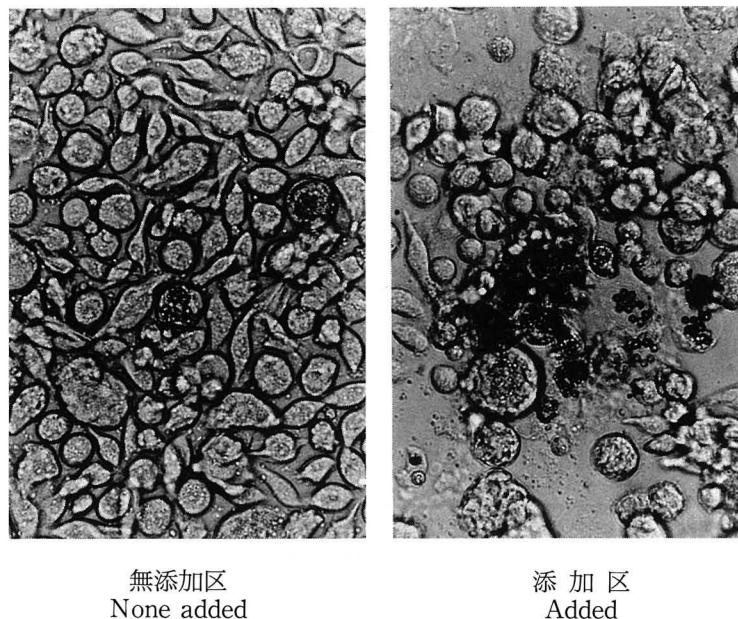


第6図 カイコ体液を添加した時にみられた細胞増殖の不良現象

Fig. 6 Damage of cells by the addition of silkworm hemolymph

に示された。しかし、カイコの付着性培養細胞株 BoMo-15A II は浮遊性細胞を主体とする選抜の母集団である BoMo-15A 培養細胞株とは6種類の酵素間でパターンが全く同じであり、同一母集団から得た付着性と浮遊性細胞株の系統間の違いはアイソザイム分析では同定が困難とみられた。カンボーージュの卵巣由来の培養細胞株は LD と PGI を用いた場合、黒子および支129号の胚子由来の培養細胞株とは多小異なるパターンが得られており、組織間の差異を明らかにする手がかりが得られた。

*In vitro* 系における昆虫ウイルスの感染は培地の条件に影響されることが報告されている。WATANABE (1987) はカイコ培養細胞の核多角体病ウイルスの感受性に及ぼす培地中の FBS の影響について、10% の FBS 添加が細胞と BmNPV の増殖に適していると述べている。本研究において、FBS を 3% 含む MM 培地を用いて、カイコ培養細胞の核多角体病ウイルスに対する感受性を検討した結果、ウイルスの感染があってもこの培地での多角体の形成量は極めて不良であるが、加熱処理したカイコ体液を培地に加えると、多角体の形成量が顕著に増大することが明らかになった。昆虫の細胞培養技術の開発初期においてはカイコ体液は細胞増殖因子として培地に添加されていたが、漸次 FBS に代替されてきた (GARDINER and STOCKDALE, 1975)。しかし、本研究結果に示されたように、カイコ体液はカイコの培養細胞系でカイコの核多角体病ウイルスの増殖を顕著に促進する。この効果は、人工飼料(市販)育蚕体液を用いた場合でも、カイコの培養細胞株 BmN-4 と BmNPV および BmCPV の間で認められている(岩橋ら, 1989; 森ら, 1990)。また、岩橋ら (1990)



第7図 カイコ体液を添加した時に細胞増殖が不良になった試験区における核多角体形成  
添加区で添加体液の細胞毒性が認められるが、多角体形成は促進された

**Fig. 7** Polyhedra formation in the test that showed the adverse effect on the cell multiplication by the silkworm hemolymph addition.  
Polyhedra formation was marked in the test in which hemolymph was added, though the cell condition was not good

はウイルス感染細胞の培地中でのウイルス量は感染後30時間までは体液5%添加培地はFBS10%添加培地と大きな差は認められないが、15%体液を添加すると細胞増殖の抑制がみられたと報告している。

今回の著者らの実験においても、人工飼料育蚕から採取した体液を1~2%添加した培地を用いて培養したところ、細胞増殖が不良になり、細胞毒性の影響と思われる現象が現れた。しかし、このような条件下においても体液添加によるBmNPVの増殖促進効果が顕著にみられたことから、ウイルス増殖促進因子は培地の栄養条件が高められて、培養細胞の増殖が促進され、その結果、ウイルスの増殖が促進されたというよりは、ウイルスの増殖過程に直接、作用したものと考えられる。

カイコ体液に存在するウイルス増殖因子は、本研究の範囲内において、カイコ以外の昆虫由来の培養細胞株とウイルスの場合には明かな効果は示さず、種特異的な効果を示して



第10表 カイコ培養細胞系におけるカイコ体液の多角体形成促進効果

Table 10 Effect of silkworm hemolymph on the formation of polyhedra of BmNPV in *B. mori* cells

組 胞 株 Cell line	TCID <sub>50</sub>		由来組織 tissue derived
	体液無添加 None added hemolymph	体液添加 added hemolymph	
BoMo-15A	10 <sup>-4.35</sup>	10 <sup>-5.54</sup>	embryo
BoMo-15AIIc	10 <sup>-3.57</sup>	10 <sup>-4.31</sup>	embryo
BoMo-J125	10 <sup>-2.63</sup>	10 <sup>-4.25</sup>	embryo
BoMo-J125K2	10 <sup>-2.63</sup>	10 <sup>-4.26</sup>	embryo
BoMo-Cam 1	10 <sup>-3.63</sup>	10 <sup>-3.86</sup>	ovary
BmN-4	≥10 <sup>-8.85</sup>	≥10 <sup>-8.85</sup>	ovary

培地：BmN-4は TC-10(10% FBS), 他の細胞株は MGM-448(10% FBS) TCID<sub>50</sub>は BmNPV 感染細胞培養上清を10<sup>-1</sup>液とし, BEHRENS-KARBER で算出  
 体液添加：65°C30分間処理のカイコ体液を培地に10%添加

Media : TC-10 (10 % FBS) for BmN-4 cell line and MGM-448 (10 %-FBS) for another cells. Heat-treated hemolymph with 65°C for 30 min. was added to the medium at 10 % final concentration.

いる。また、カイコの各種培養細胞株において、卵巣由来の BmN-4 細胞株は BmNPV 感受性が極めて高いために体液添加効果を判定するのは多少困難であるとしても、他の卵巣由来の BoMo-Cam1 細胞株において BmNPV の増殖促進がみられなかったのは胚子由来の培養細胞系における明白な増殖促進と対比して組織特異的な面で興味をもたれる。カイコの体液に存在するウイルス増殖因子は、70~90°Cの加熱処理によって大きく増殖効果が低下することから、タンパク様物質と推定され、また、培地への添加量によってその効果に差がみられることから、この現象はある程度タンパク様物質の量に依存すると推察される。さらに、テンサン体液には BmNPV 増殖促進効果が認められないことから、テンサン体液中には存在しないものと思われる。

カイコ体液中にあるカイコ培養細胞における多角体形成促進因子の成分を明らかにするため、SDS-PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動法) により、体液の成分分析を行った。その結果、分子量10~100kDa の分画に BmNPV の増殖を促進する効果が認められた。また、10kDa 以下の分画ではそれ以外の分画と比べて低かった(今西ら, 1991)。このことから、カイコ体液中に存在する多角体形成促進因子は高分子のタンパク様物質であることが示唆された。

## 第11表 鱗翅目昆虫由来培養細胞株における多角体形成へのカイコ体液の影響

Table 11 Effect of silkworm hemolymph on the formation of polyhedra in Lepidoptera cell lines

細胞株 Cell line	昆虫 ウイルス Insect virus	培地 Media	TCID <sub>50</sub> /ml	
			体液無添加 None added hemolymph	体液添加 Added hemolymph
SaCy-12	AyNPV	MGM-448(10% FBS)	10 <sup>-3.43</sup>	10 <sup>-3.00</sup>
Splm-1229	SiNPV	MM(3% FBS)	10 <sup>-3.63</sup>	10 <sup>-2.77</sup>
Es	EsCPV	Grace(20% FBS)	10 <sup>-4.10</sup>	10 <sup>-4.10</sup>
		Grace(10% FBS)	≤10 <sup>-2.35</sup>	10 <sup>-3.60</sup>

TCID<sub>50</sub>の算出に当たっては BmNPV 感染細胞培養上清を10°液とし, EsCPV は TCID<sub>50</sub>が10<sup>6.5</sup>の中腸磨砕液を用いて, BEHRENS-KARBER 法で算出

添加体液: 65°C30分処理のカイコ体液を10%添加

AyNPV: サクサン核多角体病ウイルス, SiNPV: クワゴマダラヒトリ核多角体病ウイルス, EsCPV: *Euxoa scandens* 細胞質多角体病ウイルス

TCID<sub>50</sub> was calculated by the method of BEHRENS-KARBER

The supernatant fluid of culture medium of infected cells with BmNPV was regarded as 10° of TCID<sub>50</sub>

Heat-treated hemolymph with 65°C for 30min. was added to the medium at the 10% final concentration

AyNPV : *Antheraea pernyi* nuclear polyhedrosis virus

SiNPV : *Samia cynthia pryeri* nuclear polyhedrosis virus

EsCPV : *Euxoa scandens* cytoplasmic polyhedrosis virus

## 摘 要

昆虫の培養細胞系における昆虫ウイルスの増殖を良好に維持・促進する培養条件の検討を行った。

1. 細胞工学研究室で継代されているカイコ, 野蚕およびヨトウの培養細胞株についてアイソザイム分析を行い, これらのアイソザイムによって細胞の同定できることが明らかになった。

2. MGM-448 培地で継代されているカイコ培養細胞株 (SES-BoMo-15A) を MGM-443培地と MM 培地に順化させ, これらへ BmNPV を接種し, 多角体形成細胞率をみると, MGM-448 培地区および MGM-443 培地区の細胞に多数の多角体形成が認められたが, MM (3% FBS) 培地区の細胞では多角体はほとんど形成されなかった。

3. MM (3% FBS) 培地に60°C 1時間加熱処理されたカイコ体液を10%添加すると, 多角体形成が顕著に促進され, 多角体内にウイルス粒子が包埋されていることが確認された。

4. MM (3% FBS) 培地に添加するカイコ体液の割合を0~10%と変化させたところ、多角体の形成促進効果は体液の添加量に比例して高まることが明らかになった。

5. 培地に添加するカイコ体液の加熱温度を60~90°Cの範囲で30分間の処理を行ったところ、温度が高くなるに従い、多角体の形成率が低下した。

6. テンサン幼虫体液を培地に添加した場合には、BmNPV の多角体の形成促進効果は認められなかった。

7. ヨトウ細胞におけるウワバNPV の多角体形成を促進する効果のある金属塩  $AlCl_3$  および  $ZnSO_4$  はいずれもカイコ培養細胞における多角体の形成促進には明かな効果を示さなかった。

8. カイコの体液によるカイコ核多角体病ウイルスの増殖促進はカイコ培養細胞で顕著であり、シンジュサン培養細胞とサクサンNPV および *Euxoa scandens* 培養細胞と *Euxoa scandens* CPV の組み合わせでは促進効果は認められなかった。

9. カイコ体液中に存在する多角体形成促進因子は分子量が10kDa~100kDa の画分に含まれていることが分かった。このことから多角体形成促進因子はタンパク様物質と推定した。

## 引用文献

- BELLONCIK, S., QUIOT, J. M., ARELLA, M., and LÉCONTE, J. (1985) Etablissement d'une nouvelle lignée cellulaire (IAFEs-1) à partir d'ovarioles d'*Euxoa scandens* [Lep : noctuidae] Entomophaga, **30** : 51~54.
- GARDINER, G. R., and STOCKDALE, H. (1975) Two tissue culture media for production of Lepidopteran cells and nuclear polyhedrosis viruses. J. Invertebr. Pathol., **25** : 363~370.
- GRACE, T. D. C. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. Nature, **195** : 788~789.
- IMANISHI, S. and OHTSUKI, Y. (1988) Characterization of cell lines established from embryonic tissues of several races of the silkworm, *Bombyx mori*, cultured *in vitro*. J. Seric. Sci. Jpn., **57**(3) : 184~188.
- IMANISHI, S., SATO, S. and MORI, T. (1988) Characteristics of cell lines derived from embryos in the silkworm, *Bombyx mori*. Invertebrate and fish tissue culture, pp. 255~258.
- 今西重雄・門野敬子・小林 淳 (1991) 低血清培地における多角体形成：カイコ体液中の促進因子および培地による差異. 日蚕講要, (61) : 77
- INOUE, H., and MITSUHASHI, J. (1984) A *Bombyx mori* cell line susceptible to a nuclear polyhedrosis virus. J. Seric. Sci. Jpn., **53** : 108~113.
- INOUE, H. and KIMURA, S. (1985) Fluorescent antibody study of chitobiase in uninfected and nuclear polyhedrosis virus infected larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) Appl. Ent. Zool., **20**(2) : 131~136.

- INOUE, H. and MITSUHASHI, J. (1985) Further establishment of continuous cell lines from larval fat bodies of the Cabbage Armyworm, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera : Noctuidae) Appl. Ent. Zool., 20 (4) : 496~498.
- INOUE, H. and MITSUHASHI, J. (1988) Characterization of a new continuous cell line from silkworm (*Bombyx mori*) embryos. Appl. Ent. Zool., 23 : 8~14.
- 井上 元・谷合幹代子・小林 淳 (1990) カイコの付着性培養細胞系の樹立とその特性. 蚕糸昆虫研報, 1 : 13~25.
- 岩橋隆之・寺崎朝子・下郡洋一郎・小林 弘 (1988) カイコ核多角体病ウイルスの培養細胞における増殖におよぼすカイコ体液の影響. 日蚕東海講要, (37)14.
- 岩橋隆之・寺崎朝子・下郡洋一郎・小林 弘 (1990) カイコ体液添加によるカイコ核多角体病ウイルスの BM-N 細胞における増殖促進. 日蚕講要, (60) : 77.
- 小林 淳・井上 元 (1989) カンボージュ卵巣から樹立された培養細胞系とそのウイルス感受性. 日蚕講要, (59) : 60.
- MAEDA, KAWAI, T., OBINATA, M., FUJIWARA, H., HORIUCHI, T., SAEKI, Y., SATO, Y. and FURUSAWA, M. (1985) Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature, 315 : 592~594.
- MAEDA, S. (1989) In "Invertebrate cell system and applications", Vol. I., (J. MITSUHASHI ed.), pp. 167~182, CRC press.
- MITSUHASHI, J. and MARAMOROSCH, K. (1964) Leafhopper tissue culture : embryonic, nymphal, and imaginal tissues from aseptic insects. Contrib. Boyce Thompson Inst., 22 : 435~460.
- MITSUHASHI, H. (1984) Isolation of continuous cell line from larval fat bodies of an arctiid moth, *Spilarctia seriatopunctata*, (Insecta, Lepidoptera, Arctiidae). Zool. Sci., 1 : 415~419.
- MITSUHASHI, H. and INOUE, J. (1988) Obtainment of a continuous cell line from the larval fat bodies of the Mulberry Tiger Moth, *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera : Arctiidae). Appl. Ent. Zool., 23 (4) : 488~490.
- 森 肇・岩本慎一・小谷英治・松原藤好・寺崎朝子・下郡洋一郎 (1990) 粉末カイコ体液添加によるカイコ CPV の培養細胞での増殖促進. 昆虫病理談話会会報, 第57号(7).
- SMITH, G. E., SUMMERS, M. D. and FRASER, M. J. (1978) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. J. Molec. Cell Biol., 3 : 2156~2165.
- WATANABE, H. (1987) Effect of the concentration of fetal bovine serum in a culture medium on the susceptibility of *Bombyx mori* cells to a nuclear polyhedrosis virus. Appl. Ent. Zool., 22 : 397~398.
- 渡辺泰光・吉原常男・井上 元 (1988) 異なる培地に順化されたカイコ培養細胞の核多角体病ウイルス感受性. 日蚕雑, 57 : 227~231.
- WEISS, S. A., PEPLow, D., KALTER, S. S. and VAUGHN, J. L. (1982) Dissociation of insect cell cultures by pancreatin. *in Vitro*, 18 : 298.

## Summary

### *In vitro* Multiplication of *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus

by

Shigeo IMANISHI, Hajime INOUE, Jun KOBAYASHI, Keiko OKUDA-KADONO, Hideo KAWAMOTO, Serge BELLONCIK, Nobuo KUWABARA, Hidehiko SAKAMOTO and Shuichiro TOMITA

Factors affecting the multiplication of insect viruses in cell culture were studied. The results are summarized as follows.

1. Three cell lines derived from *Bombyx mori*, *Antheraea pernyi*, *Samia cynthia pryeri* and *Mamestra brassicae*, which were subcultured in the CELL ENGINEERING LABORATORY were characterized by isozyme analysis.

2. After adaptation of the SES-BoMo-15A cell line cultured in the MGM-448 medium (FBS 10 %), MGM-443 medium (FBS 10 %) or MM medium (FBS 3 %), *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) was inoculated to the adapted cells. Formation of BmNPV polyhedra in the cells cultured in these MM media was scarce.

3. In the MM medium containing 10 % volume of silkworm hemolymph, that was heated at 60°C for 1hr., the cells infected with BmNPV formed a large amount of polyhedra, in which occluded virions were observed.

4. The formation of the polyhedra of BmNPV was promoted by the addition of silkworm hemolymph until 10 % volume in the medium, suggesting that the silkworm hemolymph may promote the formation of polyhedra.

5. The higher, the temperature used to the hemolymph (within the range of 60 to 90°C), the lower, the level of formation of polyhedra.

6. The addition of hemolymph in the medium was also effective in the formation of polyhedra of *Antheraea pernyi* in the *Samia cynthia pryeri* cells, as well as *Euxoa scandens* NPV in the *Euxoa scandens* cells.

The addition of *Antheraea yamai* hemolymph in the medium was not effective in the formation of polyhedra of BmNPV in the *Bombyx mori* cells.

7. The addition of aluminum chloride and zinc sulfate to the MM medium did not promote the formation of polyhedra of BmNPV.

8. The BmNPV polyhedra formation-promoting factor, which is contained in

the silkworm hemolymph, was estimated to have a molecular weight ranging from 10kDa to 100kDa, suggesting that the factor seems to be a protein.

*(National Institute of Sericultural and Entmological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan)*

**Key words** : *Bombyx mori*, insect culture cell line, nuclear polyhedrosis virus, silkworm haemolymph, multiplication