

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3030430号
(P3030430)

(45)発行日 平成12年4月10日(2000.4.10)

(24)登録日 平成12年2月10日(2000.2.10)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 7/00

// C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/00

B

(C 1 2 N 7/00

C 1 2 R 1:92)

請求項の数2(全 3 頁)

(21)出願番号 特願平9-327647

(22)出願日 平成9年11月28日(1997.11.28)

(65)公開番号 特開平11-155563

(43)公開日 平成11年6月15日(1999.6.15)

審査請求日 平成9年11月28日(1997.11.28)

(73)特許権者 391030284
農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長
茨城県つくば市大わし1-2

(72)発明者 佐藤 守
茨城県牛久市栄町1-56-68

(72)発明者 三橋 渡
茨城県つくば市吾妻1-1-1-603-223

(72)発明者 古田 要二
茨城県つくば市花室1463-12

(72)発明者 早坂 昭二
茨城県つくば市松代4-408-401

(74)代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔 (外1名)

審査官 新見 浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウイルス感染方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 遊離核多角体病ウイルスと昆虫ボックスウイルスの紡錘体とを昆虫に経口接種させることを特徴とする、ウイルス感染方法。

【請求項2】 前記遊離核多角体病ウイルスが遊離カイク核多角体病ウイルスであることを特徴とする、請求項1記載のウイルス感染方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ウイルス感染方法に関する。

【0002】

【従来の技術】インターフェロン等の有用物質をカイコ等の昆虫で大量生産する場合、有用物質の遺伝子を導入した組換えウイルスを大量の昆虫に接種し増殖させる必

要がある。核多角体病ウイルスは、昆虫に特異的に感染するので、組換えウイルスによる有用物質の生産においては、核多角体病ウイルスが一般的に用いられている。核多角体病ウイルス由来の組換えウイルスを作製する場合、通常、封入体を形成するタンパク質をコードしている遺伝子部分に有用遺伝子を挿入するので、作製される組換えウイルスは封入体を形成することができない遊離ウイルスの形態である。

【0003】遊離ウイルスを昆虫に接種する場合、現在、主として経皮接種による方法が用いられている。しかし、経皮接種には、接種液料が少なく確実に感染させられる利点はあるものの、接種に時間を要するという欠点があり、このような欠点は有用物質を大量生産する場合に特に問題となる。一方、経口接種によれば短時間で接種することができるが、感染率が極めて低い。経口

接種におけるウイルス感染率を高める方法として、例えば、5 齢脱皮直後のカイコを 5 で24時間低温処理し、カイコのウイルスに対する感受性を増加させた上で、ウイルス液を人工飼料に吸着又は桑葉に塗抹してカイコに食下させる方法などがあるが、この方法によっても十分な遊離ウイルスの感染率を得ることはできない。そこで、経口接種により遊離ウイルスを効率よく感染させることができる方法の開発が望まれている。

【0004】このような状況の下、アワヨトウ昆虫ボックスウイルス封入体（楕円体又は紡錘体）と核多角体病ウイルスの封入体である多角体とを混合してアワヨトウ5 齢幼虫に経口投与すると、核多角体病ウイルスの感染力が増進し、核多角体病が高率で発生することが報告されている（福原及び早川, B10 R&D 13: 35 - 41 (1996)）。しかし、核多角体病ウイルスの封入体である多角体とは、数百のウイルス粒子が結晶性タンパク質（多角体タンパク質）の中に包埋されたものであり、この方法を遊離ウイルスに適用できるか否かについては未だ報告されていない。

【0005】

【発明の解決しようとする課題】本発明は、経口接種により遊離ウイルスを効率よく感染させる方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意研究した結果、遊離ウイルスと昆虫ボックスウイルス紡錘体とを昆虫に経口接種することにより、遊離ウイルスの昆虫への感染力が増進し、昆虫に遊離ウイルスを効率よく感染させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、遊離ウイルスと昆虫ボックスウイルスの紡錘体とを昆虫に経口接種させることを特徴とする、ウイルス感染方法である。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のウイルス感染方法は、遊離ウイルスと昆虫ボックスウイルスの紡錘体とを昆虫に経口接種させることを特徴とする。本発明のウイルス感染方法は、例えば、以下のようにして行なうことができる。すなわち、遊離ウイルス液に昆虫ボックスウイルスの紡錘体を添加し、これを飼料に吸着するか又は桑葉に塗抹して昆虫に食下させることにより行なうことができる。

【0008】ここで、本発明で用いる遊離ウイルスとしては、昆虫に感染することができる限り特に限定されず、いかなる遊離ウイルスであってもよいが、特に遊離核多角体病ウイルスが好ましい。遊離核多角体病ウイルスとしては、例えば、遊離カイコ核多角体病ウイルス、遊離アワヨトウ核多角体病ウイルス、遊離クワゴマダラヒトリ核多角体病ウイルス、遊離アメリカヒロヒトリ核多角体病ウイルス、遊離マイマイガ核多角体病ウイルス、

遊離ツガカレハ核多角体病ウイルス等を用いることができるが、特に遊離カイコ核多角体病ウイルスを用いることが好ましい。遊離ウイルスは常法に従って得ることができる。例えば、遊離ウイルスとして遊離核多角体病ウイルスを用いる場合には、核多角体病ウイルスに感染した昆虫の体液（膿液）を採取し、これを3000rpmで15分間及び7000rpmで15分間遠心分離することによって、その遠心上清中に遊離核多角体病ウイルスを得ることができる。

【0009】本発明で用いる昆虫は、感染させる遊離ウイルスの種類により適宜選択することができる。例えば、遊離ウイルスとして遊離カイコ核多角体病ウイルスを用いる場合には、昆虫としてカイコを用いることができる。本発明で用いる昆虫ボックスウイルスの紡錘体は特に限定されず、いかなる昆虫ボックスウイルス由来の紡錘体であってもよいが、特にドウガネブイブイ昆虫ボックスウイルスの紡錘体が好ましい。昆虫ボックスウイルスの紡錘体は常法に従って得ることができる。例えば、昆虫ボックスウイルスに感染した昆虫を磨碎し、これを61～75%蔗糖密度勾配遠心法を用いて遠心分離することにより、その沈殿物として昆虫ボックスウイルスの紡錘体を得ることができる。

【0010】本発明で行なう経口接種は、常法に従って行なうことができる。本発明において、昆虫に経口接種させる遊離ウイルスの量は、昆虫の種類、昆虫齢期などに応じて適宜選択することができる。例えば、核多角体病ウイルスに感染したカイコの体液を遠心分離して得られる遠心上清を遊離ウイルス液として用いる場合、上記遠心上清の濃度を 10^0 として、遊離ウイルス量を 10^{-1} ～ 10^{-5} の範囲から適宜選択することができる。また、遊離ウイルスとともに経口接種させる昆虫ボックスウイルス紡錘体の量は、経口接種させる遊離ウイルスの量、昆虫の種類、昆虫齢期などに応じて、 10^6 ～ 10^7 個/頭の範囲から適宜選択することができる。例えば、カイコ5 齢幼虫に上記 10^{-3} 量の遊離ウイルスを経口接種させる場合、遊離ウイルスとともに経口接種させる昆虫ボックスウイルス紡錘体の量は、 10^6 ～ 10^7 個/頭、好ましくは 10^7 個/頭とすることができる。

【0011】

【実施例】以下、本発明をさらに具体的に説明する。核多角体病ウイルス（NPV）に感染したカイコの体液を3000rpmで15分間遠心分離して得られた遠心上清を、さらに7000rpmで15分間遠心分離した。得られた遠心上清には、多角体は含まれておらず、遊離NPVのみが含まれていた。この遠心上清を原液とし、その濃度を 10^0 として、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、及び 10^{-5} の濃度のNPV接種液を調製した。カイコ1 頭あたり 10^6 ～ 10^7 個のドウガネブイブイ昆虫ボックスウイルスの紡錘体を摂取できるように、各濃度のNPV接種液1 mlあたり紡錘体 10^7 ～ 10^8 個を添加し、各々10頭のカイコ5 齢幼虫（供試蚕

品種：はばたき)に経口接種させた。経口接種は、各接種液を人工飼料に吸着させ、5齢脱皮直後のカイコに完全食下させることにより行なった。一方、対照例として、遠心上清のみをカイコ5齢幼虫に上記と同様にして経口接種させた。

【0012】また、比較例として、5齢脱皮直後のカイコを5で24時間処理した後、NPVを経口接種させた。なお、この5齢起蚕の低温処理は、カイコのNPVに対する感受性を増加させる方法として従来から用いら

れている。さらに、参考例として、核多角体病蚕体液の遠心沈殿(多角体)についても上記と同様に経口接種させた。経口接種後、カイコ核多角体病の発病蚕数を調べた。核多角体病に感染したカイコは、ウイルス接種5～6日後に環節間膜が肥大し、いわゆる節高症状となるので、これを目印として核多角体病に感染したカイコを容易に見分けることができる。結果を以下の表1に示す。

【0013】

【表1】

NPV 形態	5齢起蚕処理	NPV接種濃度と発病蚕数							LD ₅₀ (-log)	感受性 対数
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0		
NV	紡錘体 10 ⁶ 個	10	10	8	4	0	0	0	2.70	>2.70
	紡錘体 10 ⁷ 個		10	10	9	4	2	0	4.00	>4.00
	無処理	3	0	0	0			0	<0.00	
	低温処理		10	8	8	0	0	0	3.10	>3.10
NP	紡錘体 10 ⁶ 個	10	10	7	5	0	0	0	2.70	1.30
	紡錘体 10 ⁷ 個		10	10	10	8	1	0	4.40	3.00
	無処理	10	8	0	0			0	1.40	
	低温処理		10	10	9	8	0	0	4.20	2.80

【0014】表1中、「NV」は核多角体病蚕体液の遠心上清、すなわち遊離NPVを表し、「NP」は核多角体病蚕体液の遠心沈殿、すなわち多角体を表す。表1に示されるように、遠心上清(遊離NPV)にドウガネブイブイ昆虫ボックスウイルスの紡錘体を添加して経口接種すると、遠心上清(遊離NPV)のみを経口接種した場合と比較して著しく遊離NPVの感染力が増加した。特に遠心上清(遊離NPV)にカイコ1頭あたり紡錘体10⁷個を添加して経口接種した場合には、遠心上清(遊

離NPV)のみを経口接種させた場合よりも1万倍以上も感染力が増加した。また、表1に示されるように、5齢起蚕の低温処理と比較しても、感染力が増加した。

【0015】

【発明の効果】本発明のウイルス感染方法によれば、経口接種における遊離ウイルスの昆虫への感染力が増進し、遊離ウイルスを昆虫に効率よく感染させることができる。

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)

C12N 7/00

C12N 5/00

B I O S I S (D I A L O G)