

# 超微粒子ホルマリンによる昆虫工場の消毒

小林則夫

キーワード：コンチュウコウジョウ、シヨウドク、チョウビリュウシホルマリン、ウイルス、カクタカクタイビョウ、PCR、ケンシュツ、カイコ、ヨウサン

The Disinfection of the Insect Factory by the Super-minute Particle Formalin .

Norio KOBAYASHI

## Summary

1. Infection disappeared when it was exposed to the formalin gas of 100 ppm for two hours, a slight though infection was remained though the NPV refined from the polyhedra was exposed to the formalin gas at 500 ppm for one hour.
2. The recombinant NPV infection stayed at the virus in the formalin gas of 150 or 300 ppm for 1 hour exposure, and at 20 to 150 ppm disappeared for 2 hours by the management as for the infection of the virus.
3. When detection by PCR was done with a combination of primer NPI7-8, in the wild type NPV, a band appeared in 544 bp with a combination of NP3a-4a in 808 bp. Two bands appeared when four kinds of primer were mixed. But, one band appeared only in 808 bp with the recombinant virus.
4. As for the wild type NPV, exposure was detected even with 200 ppm for six hours though it stopped when it was exposed to the formalin gas 400 ppm for six hours, being detected with PCR. Even at 300 ppm for four hours exposed to the formalin gas, the recombinant NPV was detected with PCR, and disinfection could not be confirmed.

## I. 緒言

遺伝子組換え生物を用いた有用物質の生産は、近年の遺伝子組換え技術の進歩に伴い、植物、動物、昆虫等の高等生物を物質生産に用いることが可能になってきている。昆虫による物質生産はオートグラフア核多角体病ウイルス (AcNPV) や、カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の強力なポリヘドリンプロモーターを有用物質生産に利用した、組換えバキュロウイルス発現ベクターが確立されている (7)。BmNPV を用いれば高度に家畜化されたカイコに組換えウイルスの感染増殖させ、医・農薬等の有用物質生産を行うことができることから、効率的な生産プラントの開発が待たれている (6)。このためには有用物質生産に適した蚕

品種の評価選定、生産性の高いウイルスベクターの開発、効率的なウイルス感染手法、蚕児飼育の完全自動化、有用物質の回収等の新しい技術の開発が必要であり、農業生物資源研究所が中心となって、昆虫を用いた有用物質生産施設「昆虫工場」の基盤技術開発を行っている。このような施設では組換えウイルスに感染したカイコを大量に飼育することから、施設内の残存ウイルスが施設外へ持ち出されることを防止するとともに、次期飼育に備えて清浄環境を整える技術が必要である。

一方、密閉度の高い養蚕施設では、少量無人散布機を用いた超微粒子ホルマリンによる消毒がこうじかび病菌や NPV 等の蚕病病原に対して効果が高く、金属への影響が少ないことから、稚蚕共同飼育所の消毒法

として実用化されている(3,10)。また、蚕病ウイルス病原の検出法としてPCRによる検出法が確立されており、蚕糞蚕沙などから微量な病原を検出することが可能となっている(8)。このような蚕病防除技術や検出技術は、昆虫工場施設での組換えNPVの封じ込め技術に適用できると思われた。

今回、著者は組換えウイルスを使用した昆虫工場施設における消毒技術の開発に取り組み、残存ウイルスの超微粒子ホルマリンによる不活化法と、PCRによるウイルス検出法において、若干の知見を得たので報告する。

なお、この課題は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」の一部として、独立行政法人・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

### 1. 野生型ウイルスの不活化効果

超微粒子ホルマリン消毒法は、多角体に封入されている野生型ウイルスや糸状菌病原を対象にガス濃度や消毒時間が決められているので、多角体を形成しない組換えウイルスでは消毒条件を変える必要があると思われる。当研究所施設では組換えウイルスは取り扱えないので、多角体を溶かして精製した野生型ウイルスを用いて消毒効果を調べた。

供試ウイルスは、養蚕農家に発生した核多角体病蚕から採取して、当研究所で継代したウイルスである。多角体濃度で $1.22 \times 10^9$ 個/mlの多角体液1mlにアルカリ液(炭酸ナトリウム0.025M, 塩化ナトリウム0.025M)9mlを加えて溶解し、等量の滅菌蒸留水を加えて希釈した。2,000gで10分間遠心した上清を、25,000gで60分間遠心して沈殿を1mlの滅菌蒸留水に浮遊させ、これを $10^9$ 個/ml濃度の野生型ウイルス浮遊液(タンパク量で5.25mg/ml)とした。この液をそのまま、または希釈して0.1mlを3cmガラスミニシャーレの底面に広げて乾燥させたものをウイルス試料とし、真空デシケーター中でホルマリンガスに曝露させた。

ホルマリンガスの調整は、ジェービークラールス社のジェットパーフェクターを用いた。当研究所内の密閉した蚕室内で超微粒子ホルマリン噴霧を行い、噴霧30分後に室内のホルマリンガス濃度が安定してから、予めウイルス試料を入れたデシケーターにエアポンプ

で吸引した。ホルマリン濃度はガス検知管で所定濃度であることを確認し、一定時間曝露後、開放して0.5mlの滅菌蒸留水をミニシャーレに入れてよく攪拌し、ウイルスを回収した。この試料液5 $\mu$ Lを微量注射器で4齢起蚕に注射し、発病状況を調査してウイルスの不活化を生物検定した。

### 2. 組換えウイルスに対する不活化効果

組換えウイルスでの消毒効果については、野生型ウイルスでの試験結果に基づきホルマリンガス濃度や消毒時間を予め設定し、独立行政法人農業生物資源研究所の施設を使って実施した。

供試ウイルスは、ポリヘドリンプロモーターにヒト血清アルブミン(HSA)遺伝子を組み入れたrHSA発現BmNPVベクター(5)を用いた。ウイルスは昆虫培養細胞で増殖したもので、力価が $10^7$ PFU/ml以上のものを用いた。ホルマリンガスは実験室内にビニール蚊帳を吊り、その中にジェットパーフェクターを置いてホルマリン原液を噴霧し、エアポンプでデシケーターへ吸引した。以後、野生型ウイルスでの方法と同様にウイルスのホルマリンガスへの曝露を行い、カイコに注射して不活化効果を検定した。

### 3. 昆虫工場の設備に対する影響

超微粒子ホルマリン消毒は金属への影響が少ないことが明らかになっている(1)。しかし、昆虫工場内には様々な自動制御装置が設置されており、電子機器に対する影響についても考慮しなければならない。この消毒法が昆虫工場に適用できるか確認するため、パソコンを置いた室内でジェットパーフェクターによるホルマリン原液の噴霧を繰り返して実施して、パソコンに故障などが起きないかを調べた。

### 4. PCRによる不活化効果判定法

PCRによる組換えNPVの検出方法、および野生型NPVとの識別方法について検討した。ウイルス試料に超微粒子ホルマリン消毒処理を行い、生物検定によって確認された不活化程度と、PCRによる検出結果が一致するかについて調べた。

野生型NPV試料からDNA抽出を行い、PCRで消毒処理によるウイルス不活化が確認できるかを検討した。DNAの抽出はISOGEN(ニッポンジーン)を用いた。温度制御はミニサイクラー(フナコシ)を、TaqポリメラーゼはGenTaq(ニッポンジーン)を使

用した。PCRは野口らの方法(8)に準じて行い、プライマーにはNP1, NP4を用いた。温度条件は94℃1分間→55℃1分間→72℃1分間、反復回数35回とし、PCR産物を1.5%アガロースで電気泳動してエチジウムブロマイドで染色して確認した。

野生型NPV検出に用いたプライマーは、一部がポリヘドリン遺伝子の塩基配列に基づいているため、この配列を欠損させた組換えNPVは検出できないことが考えられた。そこで、ポリヘドリン遺伝子をはさんだ前後の塩基配列を参考に作製したプライマーと、組換え部位から離れたie-1遺伝子塩基配列から作製したプライマー(4)を用意し組換えNPVの検出を試みた。ウイルス試料からのDNA抽出等は野生型NPVと同様に行い、組換えNPVを検出できるプライマーセット、温度条件、反復回数を検討した。

組換えNPVの検出法が確立された後、野生型NPVと組換えNPVを同時に検出できるPCR条件の検討や、消毒処理で不活化した組換えウイルス試料がPCRで不活化を確認できるかについて調査した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 野生型ウイルスに対する不活化効果

多角体から精製した $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ 個/mlの

ウイルス液0.1mlをミニシャーレで乾燥させ、ホルマリンガスには接触させずに0.5mlの滅菌蒸留水で回収し、4齢起蚕に注射したところ、 $10^9$ 個/mlで全部、 $10^8$ 個/mlで約半数のカイコが発病したが、 $10^7$ ,  $10^6$ 個/mlでは発病しなかった。ウイルス試料をホルマリンガス500ppmに1時間曝露してからカイコに注射したところ、 $10^9$ 個/mlでは1個体が発病したが、 $10^8$ ~ $10^6$ 個/mlのウイルス濃度では発病したものはなかった。次に、ウイルス試料 $10^9$ 個/mlをホルマリンガス濃度100, 200, 400ppmで2, 4, 6時間曝露した。カイコに注射してウイルスが不活化されているか生物検定したところ、いずれの区でも発病蚕はなく、100ppm2時間でも不活化されていた(表1)。

以上のことから、多角体に包埋されていないウイルスは、多角体に包埋された野生型ウイルスを不活化するのに要するホルマリンガス濃度及び処理時間より、低濃度短時間の処理で不活化されることが示された。

#### 2. 組換えNPVに対する不活化効果

組換えNPVを150ppm, または300ppmのホルマリンガスに1~6時間曝露して4齢蚕に注射して生物検定を行ったところ、1時間では病蚕が発生し、2時間では300ppm, 150ppmとも病蚕は発生せず、ウイルスは不活化されていた。さらに薄いホルマリンガス

表1 野生型ウイルスに対する不活化効果

ガス濃度	ウイルス量 多角体相当	ホルマリン消毒時間と死亡虫数				
		消毒なし	1時間	2時間	4時間	6時間
500 ppm	$10^9$ 個/ml	20 頭	1 頭	—	—	—
〃	$10^8$	9	0	—	—	—
〃	$10^7$	0	0	—	—	—
400	$10^9$	20	17	0	0	0
200	$10^9$	20	19	0	0	0
100	$10^9$	20	20	0	0	0

1区20頭, ウイルス濃度は精製時の多角体個/ml

表2 組み換えウイルスに対する不活化効果

ガス濃度	ウイルス濃度	ホルマリン消毒時間と死亡虫数				
		消毒なし	1時間	2時間	4時間	6時間
300 ppm	$10^7$ PFU/ml	20 頭	18 頭	0 頭	0 頭	0 頭
150	$10^7$	20	20	0	0	0
100	$10^7$	20	—	0	0	0
50	$10^7$	20	—	0	0	0
20	$10^7$	20	—	0	0	0

1区20頭, ウイルス濃度はPFU/ml

濃度でウイルスの不活化を検討し、20ppm、50ppm、100ppmに2～6時間曝露して生物検定を行ったところ、全ての試験区で病蚕が発生はなく、もっとも低濃度である20ppm2時間処理でもこのウイルスを不活化できることが確認できた(表2)。

### 3. 昆虫工場の設備に対する影響

密閉した蚕室内(28m<sup>3</sup>)にパソコンを置き、ジェットパーフェクターでホルマリン原液を120ml噴霧して4時間後にホルマリンガス濃度が200ppm以上あることを確認した。翌日、蚕室入り口を開放してガス

抜きをし、パソコンをタイマーで1日1回フロッピーで起動して2時間稼働させ、その後再度ホルマリン噴霧を行った。これを半年間の間に40回繰り返し、パソコンに対する影響を調べた。調査期間中は正常に動作して故障はせず、試験後、分解して配線や基盤等に異状がないか調べたが、金属部分に腐食は見つからなかった。しかし、ジェットパーフェクターの吸引口に付けてあるフィルタースポンジにはホルマリン重合物が付着しており(図1)、噴霧操作のたびごとに交換が必要だった。この付着物は水に浸しておけば取り除けるので、フィルターを再利用することはできた。

図1 吸引口フィルターの付着物



右：使用前 左：使用后、吸引口の位置にホルマリンの重合物が付着している

### 4. PCRによる不活化効果判定法

野生型NPVの $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 個/ml濃度の試料からDNAを抽出した。プライマーにNP1とNP4を用い、35サイクルでPCRによる検出を行ったところ、 $10^9$ 、 $10^8$ 濃度ではバンドが現れて検出できたが、 $10^7$ 、 $10^6$ 濃度では検出できなかった。このことから、 $10^9$ 個/ml濃度の野生型NPVを、ホルマリンガス濃度100ppm、200ppm、400ppmに、2時間、4時間、または6時間消毒して不活化させた後、PCRで検出を行った。これを3回反復して行ったところ、400ppm6時間で検出されなくなった。しかし、生物検定で不活化を確認した100ppmや200ppmの消毒済み試料では、6時間処理しても検出され、ウイルスの不活化をPCRで確認することはできなかった(表3)。

組換えNPVを検出するために、ポリヘドリン遺伝子とその前後の塩基配列、およびie-1遺伝子の塩基配列を参考にしてプライマーを作製した(表4)。また、HSA遺伝子の塩基配列に基づいていくつかのプライマーを作製した。 $10^7$ PFU/ml濃度のウイルスからDNAを抽出し、それぞれのプライマーの組み合わせで検討した。この結果、ポリヘドリン周辺の塩基配列を基にしたプライマーやHSA遺伝子から作製したプライマーでは組換えNPVは検出できなかったが、ie-1遺伝子に基づくプライマーNP11-4、またはNP17-8の組み合わせで、PCR条件を94℃1分→58℃1分→72℃2分、45回反復とすることで検出できた。

ポリヘドリン遺伝子のプライマーは野生型ウイルス

のみを検出でき、ie-1 遺伝子のプライマーは野生型、組換え型両方のウイルスを検出できることから、この両方のプライマーを混合して PCR を行うことで、野生型と組換え型の同時検出を試みた。その結果、NPI7-8 のと NP3a-4a のセットの組み合わせがもっとも良好で、野生型 NPV を鋳型 DNA とした場合では 808bp と 544bp に 2 本のバンドがほぼ同じ強さで現れた。組換えウイルスでは 808bp のみに 1 本のバンドが現れ、野生型と区別して検出することができた (図 2)。

このように組換えウイルスを検出できるプライマーと PCR 条件が確定したので、ホルマリンガスに曝露して感染力がなくなった組換えウイルスが、PCR で不活化を確認できるかについて調べた。ホルマリンガス 150ppm、または 300ppm に 1, 2, 4 時間曝露した組換えウイルス試料から DNA を抽出して PCR を行って電気泳動で確認したところ、全ての処理区でバンドが現れ、PCR ではウイルスの不活化を確認することはできなかった (図 3)。

表 3 ホルマリンガス曝露後のウイルスの PCR による検出

ガス濃度 ppm	ウイルス 濃度	ホルマリン曝露時間と PCR				
		0 時間	1 時間	2 時間	4 時間	6 時間
400	10 <sup>9</sup>	+++	+	+	-	-
400	10 <sup>9</sup>	+++	++	+	+-	-
400	10 <sup>9</sup>	+++	++	+	+-	-
200	10 <sup>9</sup>	+++	++	++	++	+
200	10 <sup>9</sup>	+++	++	++	++	+
200	10 <sup>9</sup>	+++	++	++	+	+
100	10 <sup>9</sup>	++	++	++	++	++
100	10 <sup>8</sup>	+	+	+	+	+
100	10 <sup>9</sup>	+++	++	++	++	++

表 4 組換えウイルス検出のために作成したプライマー

名称	塩基配列	参照領域 (* )		方向
NP1	CGGTATGTACAGGAAGAGGT	-391 ~	-372	Fwd
NPS1a	CGACTCCAAGTGTGTGGGTGAAGTC	-281 ~	-257	Fwd
NPS1	CCAAGTGTGTGGGTGAAGTC	-276 ~	-257	Fwd
NPS2	ACTGTCGACAAGCTCTGTCC	-195 ~	-176	Fwd
NPS2a	ACTGTCGACAAGCTCTGTCCGTTTG	-195 ~	-171	Fwd
NP3b	CGGGCGTACTTACGTGTACGACAAT	30 ~	54	Fwd
NP3a	GCGTACTTACGTGTACGACAATAA	32 ~	56	Fwd
NP3	CGTACTTACGTGTACGACAA	34 ~	53	Fwd
NP4a	TCGAACGAGTTGGTGTACTCGCTGT	551 ~	575	Rev
NP4	TCGAACGAGTTGGTGTACTC	556 ~	575	Rev
NPS4a	ATCAACAACGCACAGAATCTAACGC	767 ~	791	Rev
NPS4	CAACGCACAGAATCTAACGC	772 ~	791	Rev
NPS3	TCGCTCTAACATACCACCCT	848 ~	867	Rev
NPS3a	TCGCTCTAACATACCACCCTAAAGA	848 ~	872	Rev
NPI1	GAGCGTCGTTTCGACAACGGCTATTC	117046 ~	117070	Fwd
NPI8	TTTTGTGATAAACAACAGCCCAACG	117075 ~	117099	Fwd
NPI7	CGTTGCACACATCTTGAGAATGAGG	117858 ~	117882	Rev
NPI4	GTCTCGTCTGCACACATCTTGAG	117865 ~	117889	Rev

\* ) Polyhedrin 遺伝子の翻訳開始点を +1 とする

図2 組換えウイルスと野生型ウイルスの検出

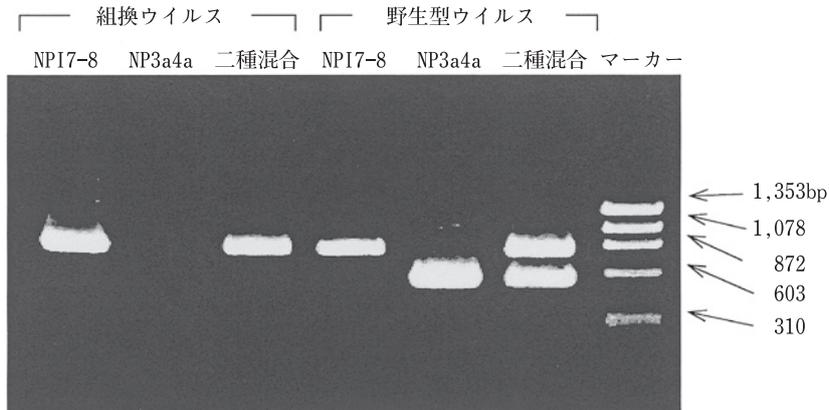
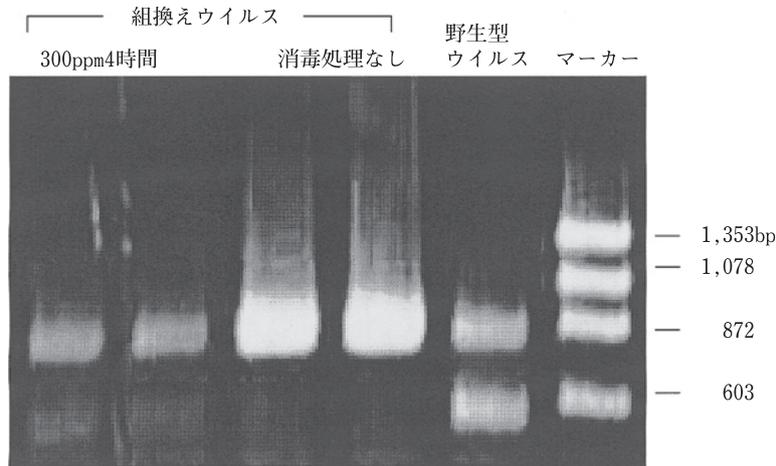


図3 PCRによるウイルス不活化検定



#### IV. 考 察

昆虫工場では1週間サイクルの生産工程が想定されていることから、残存ウイルスの消毒方法は短時間に完了でき、しかも電子機器類に影響が少ないことが望ましい。超微粒子ホルマリン消毒は消毒時間が短時間で済み、機械類へのダメージも少ないことから、昆虫工場への適用を検討した。蚕病防除での超微粒子ホルマリン消毒では、200ppm4時間処理を行うのが通常の消毒手順となっているが、多角体を溶かして精製したウイルスは100ppm2時間で不活化でき、多角体形成能力のない組換えNPVは、低濃度短時間の消毒処理で不活化されることが示唆された。組換えウイルス(rHSA発現BmNPV)を用いて不活化効果について

検討した場合、300ppm1時間では感染力は残り、20ppm2時間では不活化されていた。このことから多角体を形成しない組換えNPVはホルマリンガス濃度は20ppmあれば十分であるが、消毒時間はより重要で、2時間以上ホルマリンガスに曝露させる必要がある。今回の試験では、組換えウイルスに培養細胞で増殖させたものを使用した。昆虫工場ではカイコ体液に含まれるウイルスが残留することが予想されるので、消毒対象としてウイルス感染蚕の体液を使って不活化程度を調べることも必要と思われる。

超微粒子ホルマリン消毒はトタン、アルミニウム、ステンレス、鉄に対しては影響がなく、銅に対してはわずかに影響がある(1)と報告されている。パソコンでは影響がなかったことから、昆虫工場に設置された

電子機器類に影響はないであろう。しかし、噴霧機のフィルターにホルマリン重合物が付着してしたことから、噴霧中やガス濃度の高い状態で空調機を稼働させるとエアフィルターが目詰まりするおそれがあると思われた。ホルマリンのガス化は温度が高いほど促進されて消毒効果が高いので、空調を稼働させて温度を高めておくと効果が上がるが、消毒直前には空調機を止めておくことでトラブルを未然に防ぐことができると思う。

野生型ウイルス検出に用いたプライマーは、NP1が多角体蛋白翻訳開始点から-391~-372なので使用可能であったが、NP2,3,4は開始点+1~+730の間で組換え部分なので組換えウイルスの検出には使えなかった。ポリヘドリン遺伝子前後の塩基配列を参考に作製したプライマーなら、組換え領域をはさんで増幅することを予想したが、結果は検出できなかった。また、HSA遺伝子導入に用いたプラスミドのプライマーを用いたが、ウイルスは検出できなかった。結局、組換え領域から離れた遺伝子のプライマーを用いることで組換えウイルスを検出でき、野生型ウイルスしか検出できないポリヘドリン遺伝子のプライマーも同時に用いてマルチプライマーPCRを行うことで、組換型と野生型を区別して検出することができた。

ウイルスの不活化とPCRでの検出結果は、ホルマリンガス消毒の効果でウイルスが感染力をなくしても、DNAの一部が残ってPCRでは検出され、不活化を確認することはできなかった。高い濃度で長時間処理を行えば検出されなくなるが、過度の噴霧はホルマリン原液に含まれる水分で過湿状態になり、機械類へのダメージも心配されるので実用的ではない。ウイルスは20ppm2時間処理で不活化できるのであるから、ガス濃度測定装置で記録して消毒処理が完了したことを証明するなど、PCR以外の方法でウイルス不活化を確認する方法を検討したい。

蚕病病原の消毒法としては塩素系薬剤やエチレンオキシドガス(2)による消毒法もあるが、塩素系薬剤は金属腐食の影響が大きく、塩素ガス発生危険もある。エチレンオキシドガスは殺虫殺菌効果は高いが、無臭で残留に気づきにくいので、安全に使用するためには、きちんとした排気設備や残留ガスの確認が必須である。ホルマリンは刺激臭が強いことで敬遠されるが、気密性の高い昆虫工場施設では自然排気は期待できないので、刺激臭で残留ガスを確認できることは、かえって安全であろう。それでもホルマリンは人体に

有害であるから、今後はホルマリン以外によるウイルス不活化方法も検討して、昆虫工場でのウイルス封じ込め体系を確立したい。

## V. 摘要

1. 多角体から精製したNPVは500ppmのホルマリンガスに1時間暴露しても若干感染性が残ったが、100ppmのホルマリンガスに2時間暴露すると感染性はなくなった。
2. 組換えNPVは150、または300ppmのホルマリンガスに1時間暴露では感染性が残り、20~150ppm2時間処理ではウイルスの感染性はなくなった。
3. 野生型NPVはプライマーNPI7-8の組み合わせでは808bpに、NP3a-4aの組み合わせでは544bpにバンドが現れた。4種のプライマーを混合してPCRを行うと、野生型では808bpと544bpに2本のバンドが現れ、組換え型では808bpのみに1本のバンドが現れた。
4. 野生型NPVはホルマリンガス400ppmに6時間曝露するとPCRで検出されなくなったが、200ppmでは6時間曝露でも検出された。組換えウイルスはホルマリンガスに300ppm4時間曝露してもPCRで検出され、不活化は確認できなかった。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、高妻和哉氏に随時rHSA-BmNPVを提供して頂いた。ここに厚く感謝の意を表す。

## 引用文献

1. 古郡義夫・小林敬爾(1983)超微粒子自動噴霧方式による稚蚕人工飼料育施設の消毒法 神奈川蚕七報 11:1-15
2. 池上隆文・蛭原富男(1982)蚕病病原に対するエチレンオキシドのガス消毒について 茨城蚕試報 36:19-25
3. 池上隆文・蛭原富男(1985)超微粒子ホルマリンによる蚕室消毒 I. フォートコンベンションシステムによる消毒 茨城蚕試報 39:29-33
4. 景安聖士・早川徹・伊澤晴彦・浅野真一郎・佐原健・

- 飯塚敏彦・伴戸久徳 (1997)PCR 法を用いたカイコ病原ウイルス遺伝子の検出 日蚕雑 66:447-483
5. Kazuya K., Masao K., and Kunikastu H. (2001) Human serum albumin production in silkworm *Bombyx mori* fourth instar larvae. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 70:183-188
  6. 木村滋 (2000) 昆虫バイオ工場 工業調査会 110-127
  7. 前田進 (1993) 昆虫ウイルスとバイオテクノロジーサイエンスハウス 53-109
  8. 野口洋子・小林正彦・嶋田透 (1994) ポリメラーゼ連鎖反応による飼育残沙を含めた大量試料からの核多角体病の検出 日蚕雑 63:399-406
  9. 埼玉県農業試験場他 (2000) 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 平成9～11年度新技術地域実用化研究促進事業研究成果報告 49-50
  10. 柳田健郎 (1984) 超微粒子ホルマリンによる消毒試験 I. 移動式噴霧器による消毒試験 埼玉蚕試研報 57:36-41