

家蠶 核多角體病 바이러스 初期感染에 관한 電子顯微鏡的 觀察

柳 江 善·姜 錫 權*

農村振興廳 蠶業試驗場·*서울대학교 農科大學

Electron Microscopic Observations on the tissues infected with Nuclear Polyhedrosis Virus of *Bombyx mori* during early stage

Kang Sun Ryu and Seok Kwon Kang*

Sericultural Experiment Station, R.D.A., Suwon, Korea,

*College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea.

Summary

To investigate the pathway of Nuclear Polyhedrosis Virus(NPV) of *Bombyx mori* in early stage infection of 2nd instar larva, the larval tissues were observed under electron microscope at interval of 6, 12, 24, and 48 hours after virus inoculation.

The results are as follows.

1. The intact and enveloped nucleocapsids released from the polyhedra protein in the gut lumen apparently entered with the microvilli.
2. Virus progenies were observed in columnar cell nuclei 24 hours after inoculation, but polyhedra was not seen. The enveloped virus was observed in some of the intercellular spaces between mid-gut cells.
3. Many enveloped virus particles appeared in the basement membrane. These enveloped virus particles passed the basement membrane and gathered at blood cells in heomocoel.
4. The NPV multiplicates in nuclei of the blood cells and the tracheal cells normally.

序 言

核多角體病 바이러스(Nuclear Polyhedrosis Virus; NPV)는 血球, 脂肪細胞, 氣管皮膜細胞 및 진피세포 등의 핵내에서 增殖한다고 알려져 있고 주로 經口感染에 의해서 中腸의 皮막 세포층을 通過하여 體腔내의 感受性組織에 感染, 增殖을 하지만, 아직 확실한 感染 經路에 대해서는 추측의 영역을 벗어나지 못하고 있다.

北島(1936)는 증장피막세포에서 다각체형성을 관찰했고, 岩下·有賀(1957) 등은 中腸細胞核에서 NPV의 증식과정을 광학현미경 수준에서 보고하였으며, 重症蠶의 境遇 및 다른 바이러스와의 混合感染 등의 결과

로 中腸皮膜은 NPV에 대해 단지 감수성이 낮은 조직의 하나로 생각해왔으나 管家. 岩下(1968)는 稚蠶의 核多角體病 重症蠶의 境遇 증장의 圓筒細胞核내에서 增殖을 觀察하고, 이 增殖된 바이러스가 體腔내의 감수성 세포조직의 세포핵으로 이행된다고 하였다.

또한 岩下. 上野(1976), 및 岩下(1980)은 NPV의 經口感染의 境遇, 바이러스粒子는 最近에 中腸의 前部 및 後部の 特定 細胞核에서 增殖된 바이러스粒子는 中腸 基底膜에서 體腔으로 移行하는 經路和 中腸細胞의 核內에서는 增殖하지 않고 直接 細胞質 또는 細胞間隙을 通過하여 體腔中으로 移行하는 두 갈래의 經路가 있다고 報告하였다.

本 研究은 위의 여러가지 研究報告에 대한 感染經路

와 증식상을 보다 명확히 밝히기 위한 시도로, 多角體는 中腸內에서 消化液에 의해 溶解되고 바이러스 粒子가 遊離되어져, 中腸皮膜 圓筒細胞 核內에서 增殖한 卞基底膜을 通過하여 卞 增殖場所인 血球, 氣管皮膜細胞 등으로 移行하는 一連의 過程에 관한 結果를 얻어 이를 報告한다.

이 研究를 遂行함에 있어 시종 指導해 주신 東京大學 農學部 養蠶學 研究室 渡部 仁 先生, 小林 正彦 先生에게 깊은 感謝를 드립니다.

材料 및 方法

供試蠶品種은 鍾音を 利用하였으며, 接種多角體는 病蠶의 磨碎液을 가제로 濾過한 후 遠心分離法에 의해 精製한 高濃度의 多角體浮遊液을 使用하고, 接種은 多角體浮遊液의 一定量을 桑葉에 塗抹하여 2齡起蠶에 經口接種하고, 飼育溫度는 26°C로 하여 사-레에서 飼育하였다.

試料採取는 接種 6, 12, 24, 48時間後로 하여, 각각의 採取蠶을 1% paraformaldehyde와 3% glutaraldehyde가 含有된 0.1M sodium cacodylate 緩衝液內에서 解剖하여 얻은 試料는 3% glutaraldehyde로 固定하고, 0.5% sodium cacodylate 緩衝液으로 충분히 洗淨한 後 osmium tetroxide를 含有한 同 緩衝液에서 2次 固定하였다. 그後 50, 70, 90, 100%의 에탄올 및 100% 아세톤으로 脫水, EPON 樹脂(EPON 812)에 包

埋, LKB-Utrotome(MT-5000)으로 超薄切片을 作成하여 HU-12A型과 JEOL-1200EX型 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

結果 및 考察

1. 中腸腔內에서의 核多角體病 바이러스

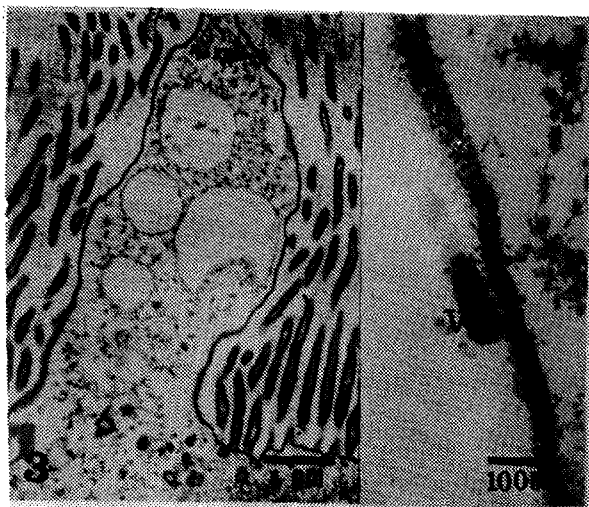
一般的으로 NPV는 多角體의 形態로 桑葉에 附着하여 蟲體內로 들어가 感染하게 된다. 桑葉과 같이 섭취된 多角體는 食道에서 中腸前部に 到達하는 사이에 消化液에 의해 溶解되어져 바이러스 粒子가 遊離되어 나오게 된다. 바이러스 粒子는 消化液中에서 安定된 形態로서 胃食膜을 通過하고 中腸圓筒細胞의 纖毛絨毛表面에서 부터 侵入을 開始한다.

細胞로의 侵入에 앞서 中腸의 腔內에서 alkali性 消化液에 의해 多角體가 溶解되어지고 있는 狀態에서 empty 바이러스를 觀察할 수 있었으나(Fig. 1), 圓筒細胞의 纖毛絨毛表面에 隣接한 바이러스 粒子들은 모두 envelope를 가진 바이러스 粒子 들이고 empty virus에서 遊離되어져 나온 노출된 바이러스 粒子들이 觀察되지 않은 것(Figs. 2, 3)은 多角體內에서 부터 存在한 것이 아닌가 생각되어진다.

溶解중에 있는 多角體가 圓筒細胞의 纖毛絨毛表面까지 進入하기에는 胃食膜이라는 장벽이 있음에도 이를 通過할 수 있었던 것은 接種時期가 2齡 起蠶으로 噴門部附近의 胃食膜이 매우 不完全한 狀態였기 때문이라 생



Fig. 1. Solubilized polyhedra in lumen of the midgut on 24 hours after virus inoculation.
V : virion P : polyhedra E : empty virus MV : microvilli



Figs. 2, 3. Virus particle attaching to the surface of microvilli on the 24 hours after virus inoculation.



Fig. 4. Intact polyhedra surrounded with microvilli on 24 hours after virus inoculation.

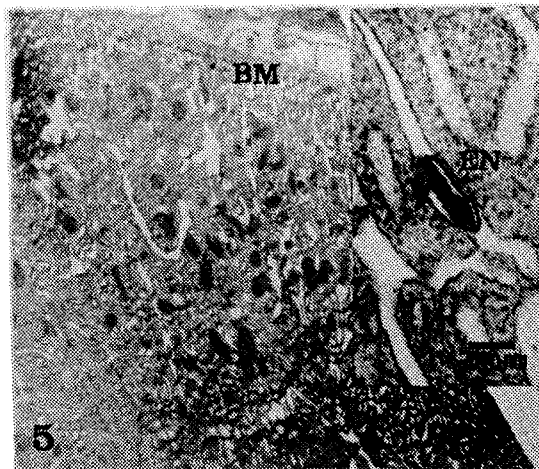


Fig. 5. The enveloped virus particle in intracellular of the midgut epithelium on 24 hours after virus inoculation. EN : envelope

각되어진다(Figs. 1, 4).

2. 中腸皮膜細胞內에서 바이러스의 增殖
多角體를 經口接種한 後 24時間에 이미 中腸圓筒細

胞核에서 顯著한 增殖이 일어나 核中央 染色質의 電子
密度가 낮아지면서 virogenic stroma의 形成이 觀察되
었다. virogenic stroma의 發達過程에 따라 染色質 및
仁은 核膜周邊으로 移動하는 것을 볼 수 있었으며,
virogenic stroma는 絲狀物과 微小顆粒이 集積되면서
擴大되었고 이에 따른 核質의 變性和 核의 肥大가 進
行된다. 그리고 virogenic stroma 內에는 많은 稜狀의
粒子들이 생겨나고 또 이들은 다발을 形成하기도 하고
單獨으로 de novo로 envelope을 形成하기도 하나 많은
바이러스粒子들은 核膜에 budding하여 envelope을 獲
得하고 있는 것을 觀察할 수 있었다(Fig.7).

바이러스粒子들은 成熟해질수록 電子密度가 높아지

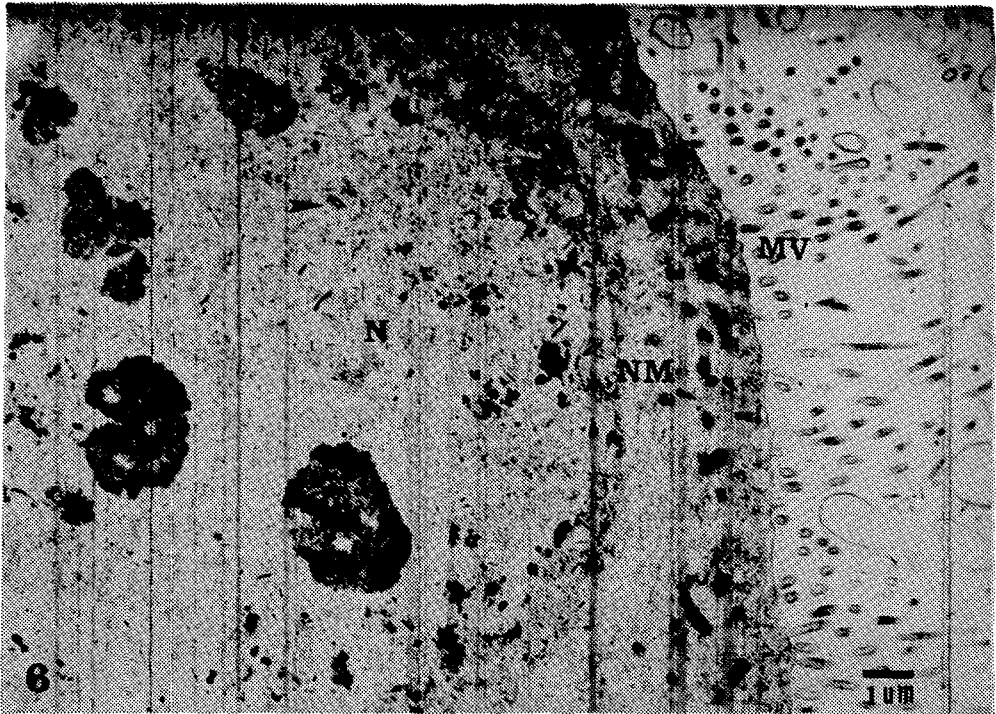


Fig. 6,7. A numerous virus particles in the nucleus of columnar cell, at 24 hours vvirus inoculation.
N : nucleus NM : nuclear membrane VS : virogenic stroma

고 同時에 ring zone部分에도 電子密度가 높은 小顆粒이 生産되면서 成熟된 바이러스粒子들이 電子密度가 높은 物質을 향해 서서히 모여드는 것으로 보아 小顆粒은 多角體蛋白質이 아닌가 생각된다(Figs. 6, 7).

中腸圓筒細胞 基底部の 細胞間隙에 envelope을 獲得한 바이러스 粒子가 移行되어지고 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5). 이 바이러스粒子는 envelope을 獲得한 狀態로 보아 圓筒細胞의 核에서 일단 增殖된 바이러스라 생각되어진다.

岩下, 上野(1976), 岩下(1980)는 1,2齡蠶의 中腸皮膜細胞는 4,5 齡蠶에 비해 NPV에 대한 感受성이 높은 傾向이 있다고 光學顯微鏡으로 觀察한 바를 報告한 바 있으며 蟻蠶에서 摘出한 中腸皮膜의 器管培養에서도 接種後 24時間에 前部の 圓筒細胞核에서 多角體形成이 觀察되었다고 報告하였다.

누에 이외에서는 Adams & Wilcox(1968)가 *Carda cautella*의 NPV에 있어 中腸皮膜前部細胞核에서 多角體形成을 報告하였으며, 또 Harrap & Robertson(1968), Harrap(1970)은 *Aglais urticae* NPV의 中腸皮膜內 多角體形成에 관해 多角體蛋白質은 形成되나 바이러스 粒子가 전혀 封入되지 않아 단지 多角體形成

의 可能性만 提示하였다.

이들의 보고와 같이 電子密度가 높은 小顆粒으로 바이러스粒子들이 모여드는 것을 보아 多角體의 形成이 可能하리라 여겨지며, 확실한 구명을 위해서는 免疫組織學的 技法 등에 의한 보다 精밀한 觀察이 要求되어진다.

3. 中腸基底膜 周邊에서의 바이러스

基底膜 가까이 있는 圓筒細胞의 細胞質에서 envelope을 獲得한 바이러스들이 多數觀察되었으며 envelope을 갖지 않는 바이러스라고 認定되어지는 것은 거의 觀察되지 않고, 하나의 envelope內에 2개의 바이러스粒子가 들어있는 경우도 볼 수 있었다(Fig. 8). 基底膜에서 體腔쪽으로 移行되어진 바이러스粒子들은 모두 envelope을 가지고 血球細胞의 一部分인 것으로 간주되는 organ에 集積되고 있는 것을 볼 수 있는데, 이는 血球細胞가 感受性組織이기 때문이라 생각되어진다(Fig. 10).

일단 纖毛絨毛로 부터 圓筒細胞로 移行되어진 바이러스는 de novo系 또는 核膜의 budding에 의해서 envelope을 獲得하여 細胞質로 遊離되어지지만 圓筒細胞核內에서 增殖되지 않고 中腸皮膜細胞를 移行하는

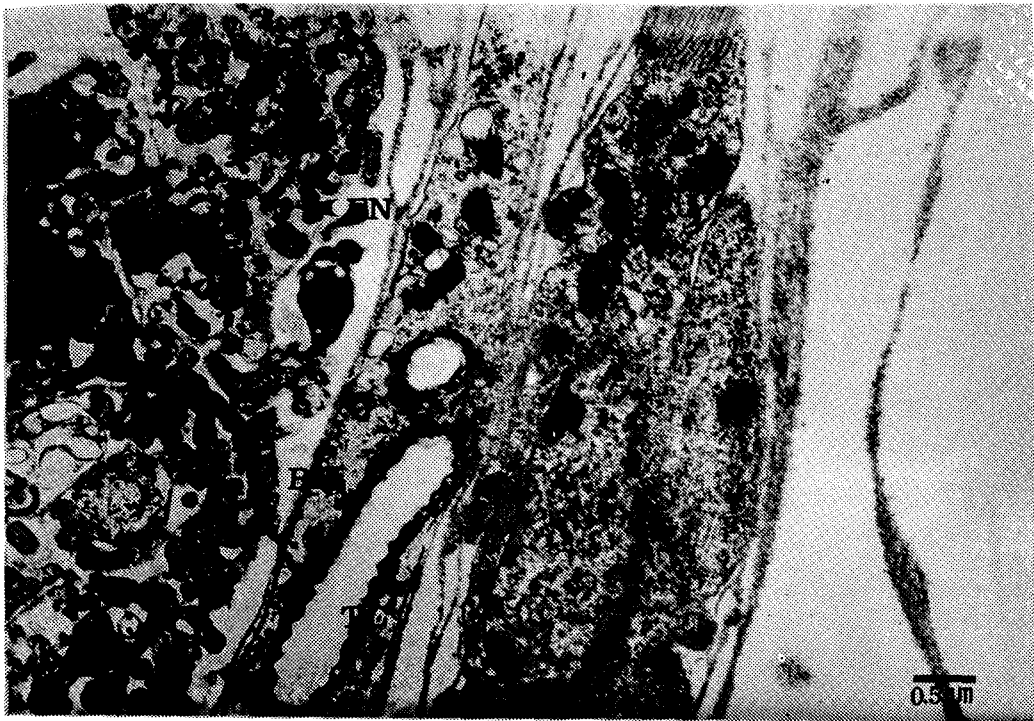


Fig. 8. Group of the virus particles shows under basal membrane of the midgut epithelium at 24 hours after virus inoculation.

BM : basal membrane M : muscle TC : tracheal cell

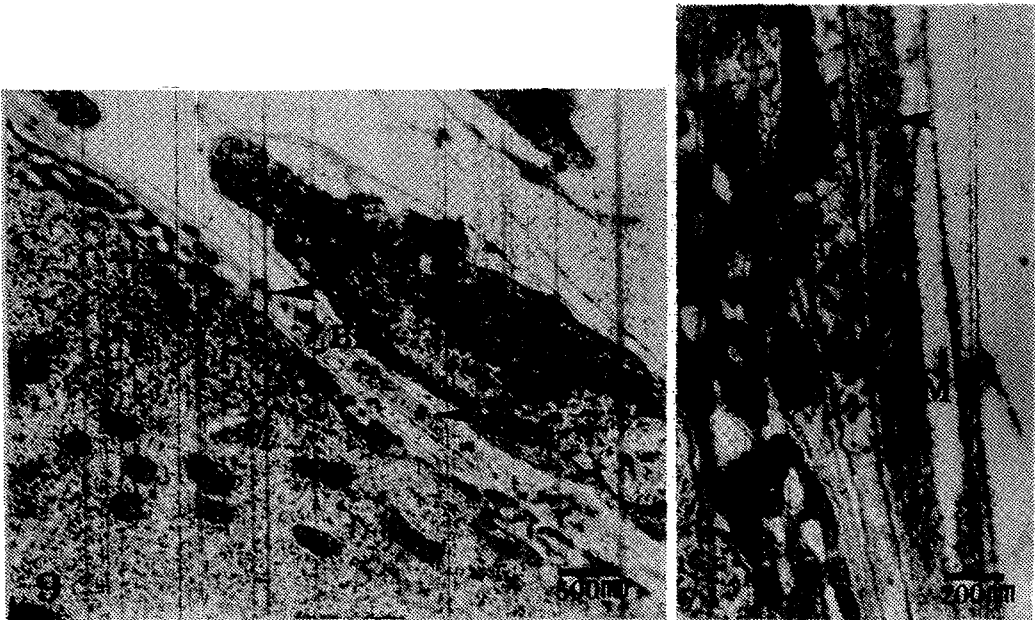


Fig. 9. Virus particles in the basal membrane of the midgut epithelium, at 12 hours after virus inoculation.

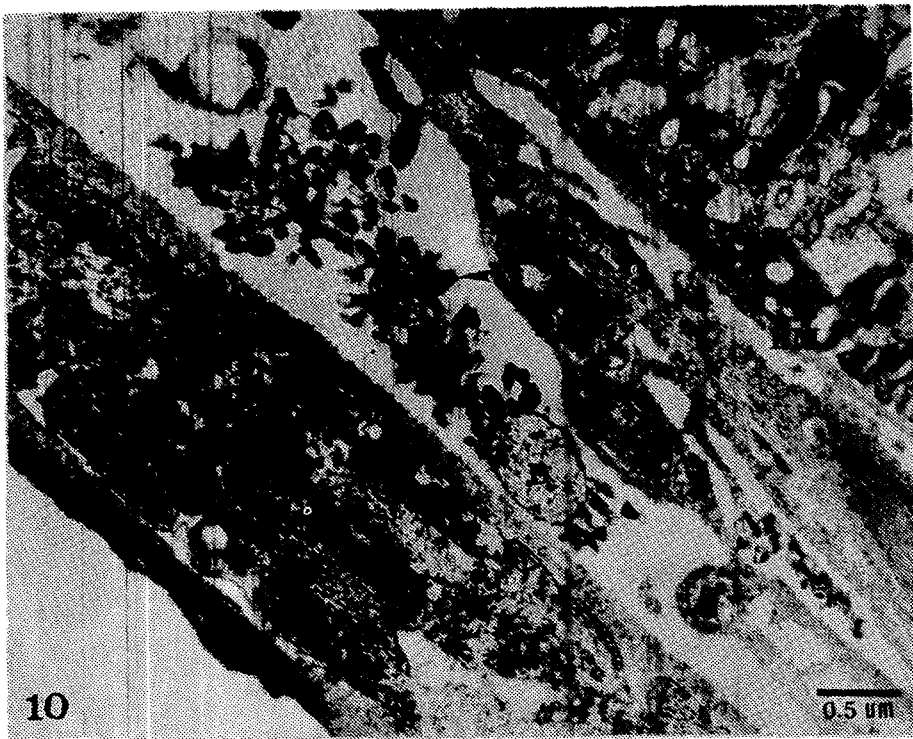


Fig. 10. Virus particles attached to the surface of blood cells in the hemolymph at 48 hours after virus inoculation.
B : blood cell.

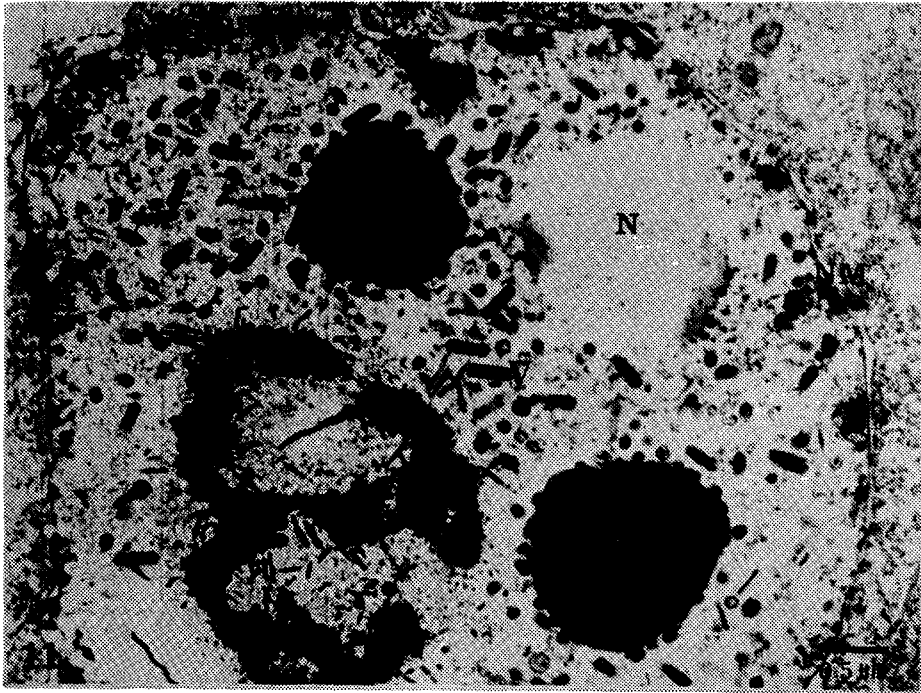


Fig. 11. Virus multiplication in the nucleus of the blood cell, at 48 hours after virus inoculation.

바이러스는 어디서 envelope를獲得하여細胞間隙으로遊離되는지에 대해서는 아직明確히 밝혀지지 않고 있다.

4. 感受性組織에서의 바이러스增殖

바이러스接種後 48시간에 中腸皮膜가 사이에 分布하고 있는 血球 및 氣管皮膜細胞의 核에서 NPV의 典型的인 增殖象을 觀察하였다(Figs. 11, 13).

電子密度가 높으면서 樹脂狀의 構造를 보이는 바이러스 製造工場이라는 virogenic stroma가 形成되어지고 수많은 바이러스 粒子들이 만들어져 de novo系에 의해 envelope를 獲得한 다음 多角體 蛋白質內로 埋入되어지고 있다(Fig. 11).

Bird(1959)는 나비目昆蟲의 幼蟲에서 NPV感染은 中腸皮膜을 에워싸고 있는 氣管皮膜細胞에서 開始되어지고, Mathad(1968)는 *Trichoplusia ni* 幼蟲의 경우도 最初로 感染을 보이는 組織은 中腸皮膜가 사이에 分布하고 있는 氣管皮膜細胞라고 報告하였다.

岩下(1976)는 中腸皮膜의 前端細胞核에 增殖이 認定되면 거의 同時 또는 조금 늦게 中腸皮膜가 사이에 分布하고 있는 氣管小枝의 皮膜細胞 및 血球核에서의 增殖을 報告하였으나, 本 研究에서는 中腸皮膜을 通過한 바이러스의 感受性組織感染은 氣管皮膜細胞보다는 血球가 우선하며, 感染時期 역시 血球核에서는 接種後

24時間부터 觀察되기 시작하므로 中腸皮膜의 細胞核과 거의 동시에 感染되어지는 것으로 생각된다.

中腸皮膜의 圓筒細胞核內에서 增殖된 바이러스 粒子들이 核膜쪽으로 많이 물리는 現象과는 달리 血球 등 感受性 細胞에서는 核膜周邊에는 그다지 바이러스 粒子들이 보여지지 않고 있으며, 또한 中腸의 圓筒細胞의 核에서 처럼 核膜의 굴곡이 심하지 않은 것으로 觀察되었다(Fig. 11, 12, 13).

이와같은 現象은 中腸 圓筒細胞核에서 增殖하는 바이러스는 주로 核膜의 budding에 의해 envelope를 獲得한 후 感受性 組織으로의 感染源 役割을 하는데 반해 感受性 組織의 核에서는 resting form으로 多角體를 形成하는 바이러스 增殖이 추가 되는데 起因하는 것으로 생각되어 진다.

摘 要

家蠶 多角體病 바이러스의 感染經路를 研究하기 위해서 2齡 起蠶에 바이러스를 接種하고 6, 12, 24, 48時間의 感染組織을 電子顯微鏡 觀察한 結果는 다음과 같다.

1. 多角體蛋白質이 中腸消化液에 의해 溶解되어져 바이러스 粒子가 遊離되고 纖毛絨毛表面에서 부터 흡착되는 것이 觀察되었다.

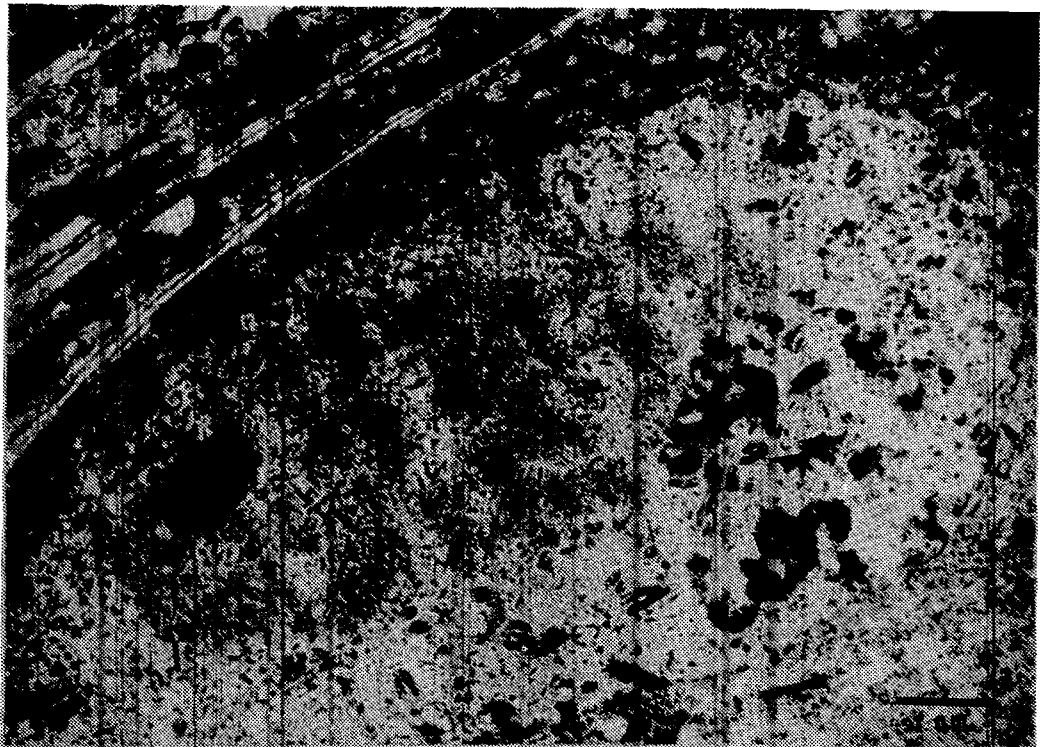
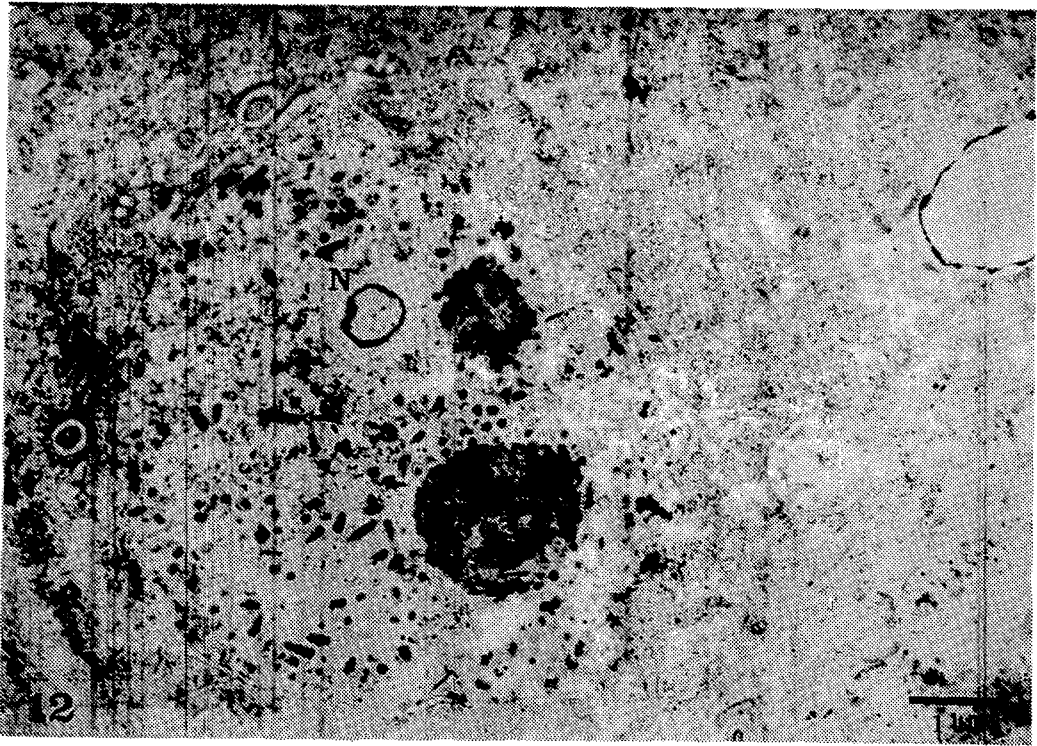


Fig. 12, 13. Virus multiplication in the nucleus of the tracheal epithelium cell, at 48 hours after virus inoculation.

2. 多角體 接種 後 24時間에 이미 中腸圓筒細胞核에 顯著한 增殖象을 보였으며 中腸皮膜細胞 間隙에서 envelope을 獲得한 바이러스粒子가 관찰되었다.

3. 基底膜 가까이 있는 圓筒細胞의 細胞質에서 envelope을 獲得한 바이러스粒子들이 다수 觀察되었으며, envelope을 가지고 있지 않은 바이러스는 관찰되지 않았다. 基底膜을 통과한 바이러스粒子는 體腔쪽으로 移行되어져 血球細胞에 集積되고 있다.

4. 接種後 48時間에 中腸皮膜 가까이에 분포하고 있는 血球細胞 및 氣管皮膜細胞核에서 NPV의 典型的인 增殖象이 觀察되었다.

參 考 文 獻

- 阿部 芳彦・鮎澤 千薫(1974) 카이코의 各種組織における 核多角體病感受性に 關すな研究, 1. 低溫處理蠶における中腸膜組織의感受性の變化. 日蠶雜 43(3): 200-205.
- Adams, J.R. and T.A. Wicox(1968) Histopathology of the Almond moth, *Cadar cautella*, infected with a nuclear polyhedrosis virus. J. invertebr. phatol. 12: 269-274.
- Adderson, E. and W. Harvey(1966) Active transport by the cecropia midgut. II. Fine structure of the midgut epithelium. J. cell. Biol. 31: 107-134.
- 岩下 光・上野 正樹(1976) 家蠶の稚齡期における核多角病ウイルス의增殖と感染經路. 宇都宮大學農學報 9(3):11-19.
- Harrap, K.A. and J.S. Robertson(1968) A possible infection pathway in the development of a nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol. 3: 221-225.
- Harrap, K.A. (1973) Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus. Virol. 42: 311-318.
- Harrap, K.A. (1973) Verus infection in invertebrates. Virus and Inverte. London: 217-299.
- Kawanish, C.Y. et al. (1972) Entry of an insect virus in vivo by fusion of viral envelope and microvillus membrane. J. Invertebr. Pathol. 20: 104-108.
- Kawamoto, F.T. Asayama and M. Kobayashi(1976) Acquisition of the envelope of nuclear polyhedrosis virus in the chinese oak silkworm, *Antherea Oerny* Guer Min, and the Japanese Giant silkworm, *Dictyoploca japonica* Butler. Appl. Ent. Zool. 11 (2):59-69.
- Kawamoto, F. et al. (1977) Envelopment of the nuclear polyhedrosis virus of the oriental Tussock Moth, *Euproscits subfiava*. Virol. 77: 867-871.
- Kawamoto, F.C. et al. (1977) Cytoplasmic budding of a mwnuclear polyhedrosis virus and comparative ultrastructural studies of envelope. Microbiol. Immunol. 21(5):255-265.
- 小林 正彦(1976) 核多角體病ウイルスを中心とした昆蟲ウイルス・細胞 (6):13-24.
- 小林 正彦 等(1976) 카이코의消化氣噴門部の微細構造. 日蠶雜 45(2):183-184.