

家蠶에서 分離된 새로운 微孢子蟲 K79의 病理學的 研究

I. 微孢子蟲 孢子的 精製 및 識別

尹 在 洙·林 鍾 聲*

尙州農業專門大學·*慶北大學校 農科大學

Pathological Studies on the New Microsporidia K79 Isolated from the Silkworm, *Bombyx mori* L.

I. Purification and Serological Discrimination of Microsporidian Spores.

Jae Su Yun, and Jong Sung Lim*

Sang Ju National Agriculture Junior college

*College of Agriculture, Kyungpook National University

Summary

The present study was made to establish the purification method of mature microsporidian spores by iso-density equilibrium technique using percoll and the serological discrimination by an indirect fluorescent antibody technique.

The purification of new microsporidian spores took effect in the three steps purification method (precentrifugation-percoll iso-density equilibrium centrifugation-rising).

There were clear differences in the size of spores between the new microsporidia and *N. bombycis*. The spores of *N. bombycis* is short elliptical of 2.07 in a ratio of length to width in diameter while that of new microsporidia is characterized with long elliptical shape which shows a ratio of 2.76 in length to width in diameter.

The specific antigens of new microsporidia K79 spores was showed in the spores wall by the indirect fluorescent antibody reaction, and it was affected by the antibody against *N. bombycis* which antiserum was diluted in 1:20. It means that the new microsporidia K79 is serologically not identical to *N. bombycis*.

緒 論

微孢子蟲類는 動物寄生性인 單細胞 孢子로 極絲을 갖고 있으며 Mitochondria가 없는 것이 特徵이다(Bulla et al., 1976. 猪木, 1981. 瀧澤, 1977) 그 生活環은 營養生殖期, 孢子形成期 및 孢子期로 나눌 수 있으며 極絲와 極帽로 이루어진 突出器官을 利用하여 發芽한다. 發芽한 孢子는 細胞內 寄生性이고 그 宿主域은 原生動物 부터 哺乳類에 이르기 까지 廣範하다. 特히 産業動物로서 重要한 昆蟲類, 甲殼類, 魚類의 病原體로

서 알려져 있는 것이 많다(猪木, 1981. Jones, 1981). 이 중 昆蟲 寄生性 微孢子蟲은 230여 種으로서 微孢子蟲類의 約 40%나 점유하며 病原性이 높아서 昆蟲에 致命的인 影響을 주는 境遇가 많다(石原, 1975. 福原, 1979).

昆蟲疾病의 病原體로서 微孢子蟲類에 對한 研究은 1849年 Guerimeneville가 누에의 病蠶 體液中에 活動性인 小粒子의 存在를 確認한 報告가 始初이다(三谷 1934. 岩淵, 1913). 그 후 Osima(1857)가 蠶卵內에서 橢圓小體를 發見했고 Naegeli(1857)는 이들 微孢子蟲에 依한 疾病을 微粒子病이라고 하였으며 그 學名을

Nosema bombycis Naegeli(이하 *N. bombycis*로 略함)라고 命名하였다. Pasteur(1870)는 微粒子病 罹病蛾가 産卵한 蠶卵에서 微粒子를 多數 發見하고 微粒子病 豫防을 爲한 袋採種法을 案出했다. 한편 Balbiani(1884)는 微粒子病의 病原體가 原生動物임을 밝히고 그후 이 病原蟲의 形態, 生態, 感染經路, 누에 및 野外昆蟲과의 關係를 追究하여 이들의 宿主域과 누에에 寄生하는 微孢子蟲이 밝혀지게 되었다.

微孢子蟲의 分離精製는 生物學的 性狀 微生物學的 防除, 血清學的 및 生化學的 研究等에 기초가 되고 있으며 이에 對한 研究는 Cole(1970)의 反復遠心에 依한 大量 分離法인 triangulation 法을 始初로 Undeed & Alger (1971)의 colloid狀 silica ludox 平衡密度遠心法 Kelly & Knell(1979)의 變形 colloid狀 silica ludox 平衡密度遠心法, Gochner & Magetts(1980)의 連續流動法, 河原畑·荒武(1979)의 picoll과 percoll로서 部分 精製後 平衡密度遠心法 應用, 佐藤·渡部(1980)의 sucrose와 percoll에 依한 平衡密度遠心法, Jouvenaz(1981)의 percoll 使用法, Hostounsky(1981)의 自然沈澱法과 Brown 運動의 應用法, Avery & Undeed(1983)의 連續流動 密度遠心法等이 있다.

微孢子蟲 胞子の 血清學的 反應에 依한 識別을 爲하여 螢光抗體法이 病蠶의 檢査에 利用된 것은 藤原等(1966), 林(1966), 林·李(1971)가 *N. bombycis* 胞子 抗原에 對한 免疫血清을 利用한 螢光抗體法을 成功시킨 後 부터 現在까지 많은 研究가 이루어져 왔다. Weiser(1976)는 微孢子蟲의 胞子는 그 表面에 種 特異的인 抗原을 갖는다고 報告하였으며 佐藤等(1981)은 螢光抗體法의 應用으로 多數의 微孢子蟲 胞子 表面의 血清學的 性狀을 比較하여 類緣關係를 調査함으로써 胞子를 識別하였다.

本 研究는 1979年度 慶北地方에서 發見된 새로운 微孢子蟲 K79 胞子(이하 K79로 略함)의 分離精製, 螢光色素에 對한 染色性을 究明하기 爲하여 실시하고 몇가지 結果를 얻어 報告한다.

이 研究를 遂行함에 있어서 指導를 하여 주신 慶北大學校 蠶絲學科 諸教授님, 日本 東京大學 農學部 養蠶學 研究室 教授 吉武成美博士, 助教授 渡部 仁博士, 그리고 佐藤分一博士等 諸氏에게 衷心으로 感謝 드립니다.

材料 및 方法

1. 微孢子蟲 胞子の 分離精製

胞子の 精製에 供試된 微孢子蟲은 慶北大學校 農科

大學 蠶絲學科에서 發見 保存하고 있는 K79와 日本 東京大學 農學部 養蠶學 研究室에서 保存하고 있는 微粒子 *N. bombycis*였다. 이들 胞子の 10^6 spores/ml 浮遊液을 만들어서 1頭當 0.03ml가 되도록 人工飼料에 塗布後 2齡 起蠶에 24時間 食下 시켜(林·韓, 1981. 林·趙, 1982) 人工飼料育을 實施하면서 發生된 病蠶을 生理的 食鹽水를 加하여(岩野·石原, 1984) mortar grinder로 磨碎하고 이 液을 3겹의 gauze로 여과 한 다음 30分間 靜置後 上清液을 3,000rpm으로 10分間 遠心分離하고 다시 증류수로 2회 반복 세척한 다음(Pilley et al., 1978) 沈澱物을 IN-HCl로 中和시킨 percoll을 使用하여(佐藤·渡部, 1980) 42,500g, 15分(Beckman's Sw27.1 rotar)間 平衡密度勾配 超遠心 分離한 後 微孢子蟲 胞子帶에서 胞子를 採取 하였다. 이 採取物을 증류수로 희석하여 2,000rpm, 10分間 遠心 分離하고 沈澱物을 Dulbecco PBS로 희석하여 2,000 rpm, 10分間 遠心分離한 것을 最終 精製胞子로 하였다 또한 精製時 使用된 percoll과 기타 藥劑가 胞子에 미치는 影響을 알기 爲하여 3% H_2O_2 로 28°C에서 1時間 處理하여 精製胞子の 極絲抽出率을 調査 하였다(岩野·石原, 1979).

2. 螢光抗體에 依한 微孢子蟲 胞子の 識別

分離精製한 *N. bombycis* 胞子和 K79 胞子를 0.85% 食鹽水에 浮遊시킨 3.8×10^8 spores/ml 浮遊液 0.25ml와 Freund's complete adjuvant 0.25ml를 混合하여 흰 쥐에 皮下注射하고(吉武, 1980. 佐藤等, 1981) 그후 1週 간격으로 3회에 걸쳐 3.8×10^8 spores/ml 胞子 浮遊液을 0.5ml씩 皮下 5~6 個所에 分割注射 하였다. 最初接種 後 5週째 採血하여 螢光抗體 間接法(IFA)으로 抗體價를 測定한 後 全採血하여 얻은 抗血清은 0.1%量(w/v)의 NaN_3 를 하여 螢光抗體 間接法에 一次血清으로 하였다. 2次 血清으로는 fluorescent isothiocyanate (FITC) 標識 一抗體 IgG— 토끼 血清을 使用 하였다.

精製胞子는 slide 위에 塗抹, 風乾하고 acetone으로 固定한 다음 1次 血清을 加하여 37°C에서 1시간 反應 시키고 PBS(phosphate buffered saline, NaCl 8.0g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.15g, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.29g/l, pH 7.4)로 3회 洗淨 하였다. 그 다음 2次 血清을 加하여 37°C에서 1時間 反應시킨 後 PBS로 3회 洗淨 하였다. 染色胞子는 螢光顯微鏡(Olympus BHF, BG12勵起 filter, 0515吸收 filter)으로 觀察 하였다.

結 果

1. 微孢子蟲 胞子の 分離 精製

後胞子蟲에 感染되어 發病한 누에를 골라 磨碎하여 豫備遠心→percoll 平衡密度遠心→洗滌의 3段階의 過程으로 胞子を 分離精製하면 精製前에는 胞子 浮遊液內에 누에의 組織片, 桑葉片, bacteria等 不純物이 混在되어 있었으나(Fig. 1-2) 精製後에는 不純物이 除去되고 胞子만이 純粹하게 精製 되었다(Fig. 3-4). K79胞子の 形態 (Fig. 4)는 長橢圓形으로 기존 微粒子病原體인 卵圓形의 *N. bombycis* 보다 크고 長短徑比가 커서 細長圓筒狀으로 보인다(Fig. 3-4).

Table 1. Extrusion rate of polarofilament of microsporidia spores after treatment with percoll neutralized by HCl

Block	Before treatment		After treatment	
	NB(%)	K79(%)	NB(%)	K79(%)
1	36.84	30.27	37.71	31.03
2	40.31	34.89	38.72	32.76
3	32.78	35.71	34.27	33.28
\bar{X}	36.64	33.62	36.90	32.35

$t(\text{NB})=0.41$, $t(\text{K79})=1.25$

NB: *Nosema bombycis*, K79: New microsporidia K79 isolated from silkworm larvae, in Kyungpook area.

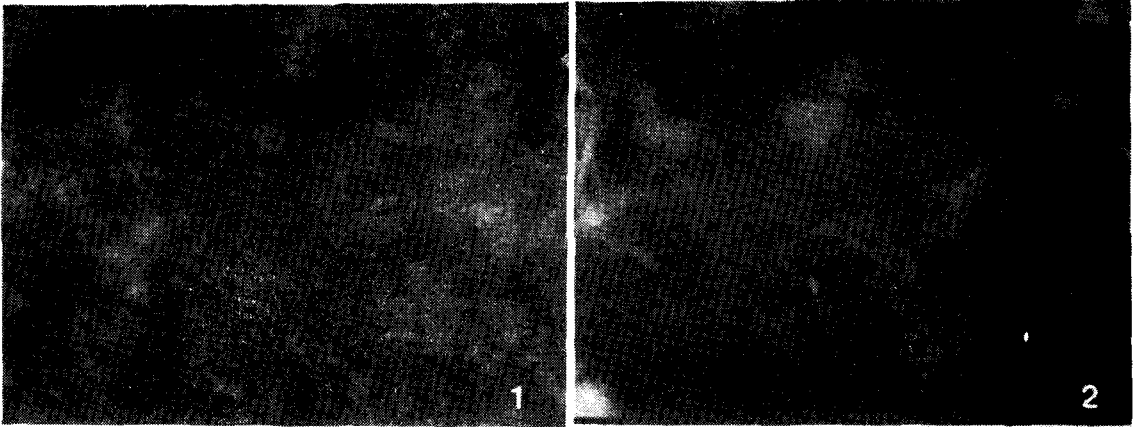


Fig. 1-2. Suspension of homogenized silkworm body infected with microsporidia. Observed spores, tissue debris of silkworm, cell debris of mulberry leaves and bacteria. Fig. 1; *Nosema bombycis*, Fig. 2; New microsporidia K79.

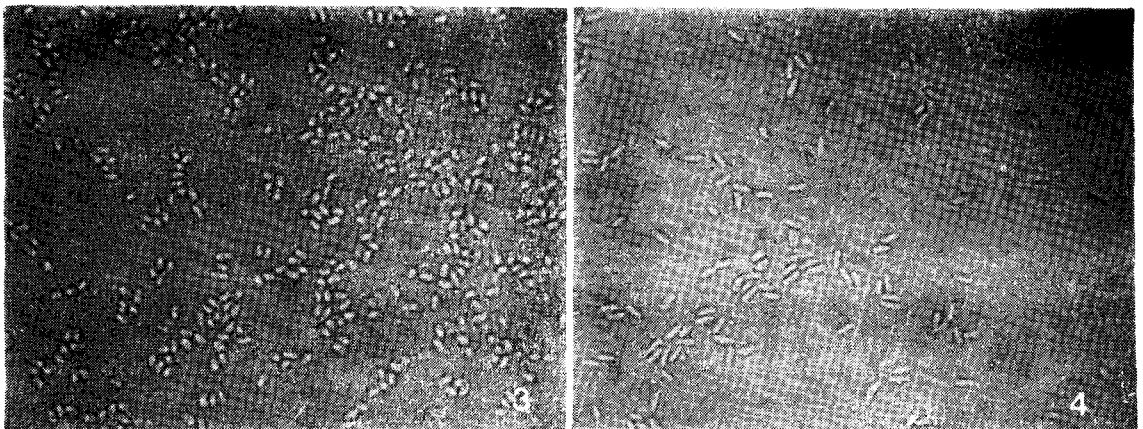


Fig. 3-4. Suspension of microsporidian spores after purification by 3 steps: precentrifugation-percoll isodensity equilibrium centrifugation-rising. Fig. 3; *Nosema bombycis* spores, Fig. 4; New microsporidia K79 spores.

Table 2. Fluorescent antibody reactivity on microsporidia spores

Serum dilution	1 : 10		1 : 20		1 : 40		1 : 80	
	NB	K79	NB	K79	NB	K79	NB	K79
Anti-NB serum	+	±	+	-	+	-	+	-
Anti-K79 serum	+	+	±	+	±	±	±	±
Normal serum	-	±	-	-	-	-	-	-

NB: *Nosema bombycis*, K79: New microsporidia K79 isolated from silkworm larvae, in Kyungpook area.

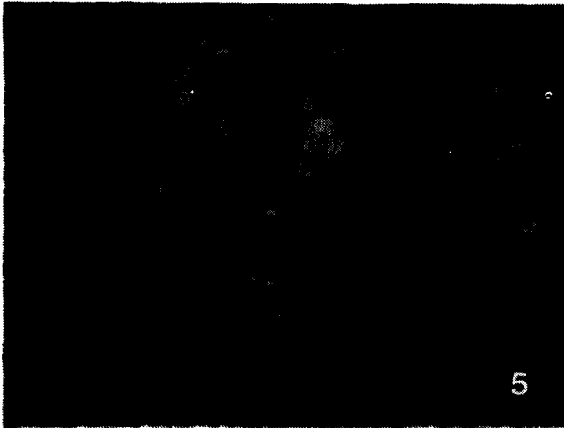


Fig. 5. *Nosema bombycis* spores reacted with antiserum *N. bombycis* spores in the indirect fluorescent antibody method.

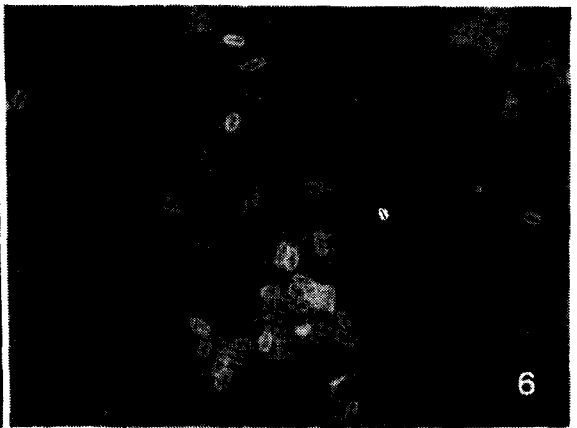


Fig. 6. New microsporidia K79 spores showed specificity by the indirect fluorescent antibody method.

또한 分離精製에 使用된 percoll이 胞子の 極絲抽出에 미치는 影響을 알기 爲하여 微孢子蟲 胞子の 極絲抽出率을 調査한 結果는 table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 percoll을 使用하지 않은 對照區의 胞子 極絲抽出率은 *N. bombycis* 胞子が 平均 36.90%였고 K79 胞子は 32.35%이었다. 한편 percoll 處理한 試驗區의 胞子 孵化比率은 *N. bombycis* 가 36.90%, K79 胞子が 32.35%이었다.

2. 螢光抗體에 依한 微孢子蟲 胞子の 識別

微孢子蟲 胞子を 圈鏡에 注射하여 얻은 抗微孢子蟲 血清을 使用하여 胞子の 螢光抗體反應을 調査했다 (Table 2).

Table 2에서 알수 있는 바와 같이 抗 *N. bombycis* (20倍以上 稀釋) 血清으로 *N. bombycis* 胞子和 K79 胞子에 處理한 結果는 *N. bombycis* 胞子에는 強한 FITC의 螢光이 發現 되었지만(Fig. 5) K79 胞子에는 發現 되지 않았다. 抗 79 胞子 血清으로 處理한 境遇는 10 倍稀釋區에서 兩胞子에 強한 螢光反應을 보였으나 (Fig. 6) 20倍 稀釋區에서는 K79 胞子の 特異 螢光反應이 인정 되었다.

考 察

1. 微孢子蟲 胞子の 分離精製

微孢子蟲 胞子の 精製에 使用된 percoll은 修飾 colloid 狀 silica(a colloidal suspension of silica coated with polyvinyl pyrrolidone)이고 그 自體는 거의 浸透壓을 갖고 있지 않고 生體膜을 通過하지 않으며 또 pH5~10에서 安定性이 있으므로 pH를 中性으로 調整하면 胞子에 影響이 거의 없다(佐藤·渡部, 1980)고 하였고 이 試驗의 結果에서도 胞子の 極絲抽出에 影響이 없었을 뿐만 아니라 percoll은 遠心力場에서 自動적으로 密度 勾配를 일으키므로 密度 勾配 作成裝置를 使用 할 必要가 없었다. 이 試驗에 使用된 微孢子蟲 胞子の 精製法은 Cole (1970)의 triangulation法의 長點인 洗淨過程을 應用하고 Undeed & Alger, (1971)가 使用한 Ludox 代身에 percoll을 使用하였고 佐藤·渡部 (1980)의 方法中 速度만을 73,000g에서 42,500g로 낮추어 利用하였다. 以上の 여러 試驗方法을 修正 利用한 이유는 triangulation法은 胞子の 分離時間과 勞力이 많이 들 뿐만 아니라 蠶體 微細組織, 桑葉細胞片, 細菌, 未熟

胞子等を 완전히 除去하기 어렵고 流失胞자가 많은 缺點을 보완하고 또한 Ludox가 pH4~7.5 사이에서 不安定하고 微胞子蟲 胞자에 나쁜 影響을 주며 胞子の 精製量에 制限을 받기 때문에 이러한 缺點을 보완하기 위하여 Ludox 代身에 percoll을 使用 하였다. 또한 超高速 (73,000g)遠心에서는 遠心張力의 影響을 받아 管底에 胞子が 沈澱附着하는 缺點을 보완하기 위하여 42,000g로 낮추어서 遠心하였다. 이 試驗에서 使用한 微胞子蟲 胞子の 精製는 豫備遠心 (3,000rpm, 10min, with D.W) 3回—percoll 平衡密度遠心(42,500, 15 min, with neutralized percoll)—洗滌의 方法으로 遂行 하였던 바 上記의 諸方法 보다 더욱 純粹한 胞子를 얻을 수 있었다.

한편 胞子精製量과 時間을 살펴 보면 Undeed & Avery (1983)는 5×10^{10} spores의 精製에 所要된 時間은 2時間이었고, Hostounsky (1981)는 $2 \sim 4 \times 10^7$ spores의 精製에 2日間이 所要되었으며, Cole(1970)는 8×10^9 spores의 精製에 120분이 所要되었다. 佐藤·渡部(1980)의 方法으로는 10^{10} spores의 精製에 38분의 짧은 時間이 所要되고 있으나 이 試驗에서는 3.8×10^{10} spores의 精製에 75분이 所要되어 佐藤·渡部(1980)의 方法보다 다소의 所要時間을 要하나 胞子が 管底에 附着하지 않았으며 percoll colloid粒子的 沈澱 및 胞子の 傷害現象도 없었다.

胞子精製中에 使用된 中和 percoll의 影響을 알기 위하여 中和 percoll 處理 前後의 極絲抽出率을 比較 試驗한 結果는 *N. bombycis* 胞자와 K79胞子 모두 極絲抽出率에 有意差가 없었으므로 percoll에 依한 影響이 없는 것으로 思料된다. 또한 이 方法에 의하여 精製된 胞子の 形態는 *N. bombycis* 胞자가 短橢圓形($3.61 \times 2.07 \mu\text{m}$)이었고 K79 胞子は 長橢圓形($4.73 \times 1.74 \mu\text{m}$)으로 서로 다른 形態의 胞子임을 確認할 수 있었으나 M12 胞子(藤原, 1980) $5.12 \times 2.1 \mu\text{m}$ 로 長橢圓形이어서 形態의 類似 하지만 크기가 K79 胞子 보다 크다.

2. 螢光抗體에 의한 微胞子蟲 胞子の 識別

微胞子蟲 胞子를 흰쥐에 주사하여 얻어진 抗微胞子蟲 胞子 血清을 使用하여 螢光抗體 間接法으로 胞子の 螢光性을 調査 하였다.

抗 *N. bombycis* 胞子 血清 (20~40倍 稀釋)으로 K79 胞자와 *N. bombycis* 胞子를 處理 했을 때에는 *N. bombycis* 胞子에는 강한 螢光이 보였지만 K79 胞子에는 螢光이 나타나지 않았다. 그러나 抗 K79 胞子 血清으로 處理하면 10倍 稀釋血清에서는 兩胞子 모두 강한 螢光이 發現 되었으나 20倍 稀釋血清에서는 K79에

特異螢光이 認定 되었다(Fig. 5-6), 따라서 *N. bombycis* 와 K79는 別種의 微胞子蟲이라고 생각되며 螢光抗體 間接法에 依한 兩胞子の 識別을 爲하여는 一次 血清의 稀釋을 20倍로 하는 것이 적당하다고 생각된다. 이들 兩胞子の 螢光抗體에 對한 反應部位가 胞子の 被設이며 胞子 原形質에는 螢光色素가 認定되지 않았으므로 微胞子蟲의 識別을 爲하여는 胞子の 表面 特異抗原을 證明함이 根幹이라고 思料된다.

摘 要

微胞子蟲 胞子の 精製法을 개발하고 胞子表面의 血清學的 反應을 究明하기 爲하여 遂行한 試驗結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 微胞子蟲 胞子の 分離精製는 豫備遠心—percoll 平衡密度遠心—洗滌의 3段階法이 優秀하였고, 分離精製된 胞子는 極絲抽出에 나쁜 영향도 받지 않았다.

2. 胞子の 形態는 K79 胞자가 長橢圓形(長短徑比 2.76)이고 *N. bombycis*는 短橢圓形(長短徑比 2.07)으로 兩胞자가 相異하였다.

3. 螢光抗體 間接法에 依하여 抗 *N. bombycis* 胞子 血清에 對하여는 *N. bombycis* 胞子만이 강한 螢光을 發現하였으나 抗 K79 胞子の 血清에 對하여는 10倍稀釋區에서는 兩胞子 모두 강하게, 20倍以上 稀釋區에서는 약하게 螢光을 발현하였고 K79 胞子の 特異抗體가 胞子外殼에 認定되었다.

引 用 文 獻

- Balbani, G. (1884) Lecons sur les sporozoaires. (O. Doin, ed.) Paris, 184.
- Bulla, L.A. Jr. and Cheng, T.C. (1976) Comparative pathobiology Vol. 1. pleum press, 1-162.
- Cole, R.J. (1970). The application of the "Triangulation" method to the purification of Nosema spores from insect tissue. J. Invertebr. Pathol., 15, 193-195.
- 藤原 公 (1980) カイユから分離された3種の微胞子蟲について. 日蠶雜 49(3), 229-236.
- 藤原 公·扇元敬司·須藤恒二·上田金時 (1966) 家蠶微粒子病原體 *Nosema bombycis* NÄGELI의 免疫螢光染色について. 蠶絲研究 58, 14-18.
- 河原畑勇·荒武義信 (1970) picoll と percoll で部分精製後平衡密度遠心法. 九州蠶絲 10, 56-57.
- Gochnauer, T.A. and Magett, V.J. (1980). A rapid

- method for concentrating *Nosema apis* spores. J. Invertebr. Pathol. 36, 279-280.
- Hostounsky, Z. (1981) The utilization and brownian movement in a concentration and separation of microsporidian spores from insect tissue. J. Invertebr. Pathol. 38, 431-433.
- 福原敏彦 (1979), 昆蟲病理學, 學會出版センター, 105-122.
- 猪木正三 (1981), 原生動物圖鑑. 講談社, 582-589.
- 石原 廉 (1975), 原蟲の研究史と展望. 昆蟲病理談話會報, 27, 3-4.
- 岩淵平介・三谷賢三郎 (1913), 微粒子の胚種傳染に關する研究. 東京蠶業講習所試驗成績, 48, 1-65.
- 岩野秀俊・石原 廉 (1979) *Nosema bombycis* 胞子の孵化刺激處理液の效力と液温との關係. 日蠶雜, 48, 142-146.
- 岩野秀俊・石原 廉 (1984) スジキリヨトウから分離された微胞子蟲 *pleistophora sp.* について. 日大學術研究報告, 41, 25-33.
- Jones, J.B. (1981) A new microsporidium from the oyster *Ostrea lutaria* in New Zealand. J. Invertebr. Pathol. 38, 67-70.
- Jouvenaz, D.P. (1981) An effective medium for cleaning microsporidian spores. J. Invertebr. Pathol. 37, 319.
- Kelly, J.F. and Knell, J.D. (1979) A Simple method of cleaning microsporidian spores. J. Invertebr. Pathol. 33, 252.
- 林鍾聲 (1966) 柞蠶膿病 virus의 免疫血清學的反應. 蠶試研報, 1, 42-48.
- 林鍾聲・趙世衍 (1982) 누에로부터分離된 새로운 Microsporidia (S80)의 特性, 慶北大 大學院論文, 1-37.
- 林鍾聲・韓明世 (1981) 家蠶에 寄生하는 Nuclear-polyhedrosis virus와 새로운 微胞子蟲 *Nosema sp.* (M12)間の 相互作用. 慶北大 大學院論文 1-53.
- 林鍾聲・李永根 (1971) 微粒子病原體의 鑑別을 위한 免疫螢光染色法에 關한 試驗. 蠶試研報 1, 212-219.
- 三谷賢三郎 (1934) 最近蠶病學. 明文堂, 480.
- Naegeli (1857) Ueber die neue krankheit der seidenraupe und verwandte organismen. Bot. Ztg., 15, 760-761.
- Pasteur (1870) Etudes sur la maladie des vers a soie T.I., Paris, 317.
- Pilley, B.M., Canning, E.U. and Hammond, J.C. (1978) The Use of a microinjection procedure for large-scale production of the microsporidian *Nosema eurytremae* in *Pieris brassicae*. Jr Invertebr. Pathol. 32, 355-358.
- 佐藤令一・小林正彦・渡部 仁 (1981) 家蠶から分離された微胞子蟲胞子の性状比較. 昆蟲病理談話會會報 39, 2-3.
- 佐藤令一・小林正彦・渡部 仁・藤原公 (1981) カイユから分離された微胞子蟲類胞子の螢光抗體法による識別日蠶雜, 50, 180-184.
- 佐藤令一・渡部 仁 (1980) 平衡密度遠心法による *Nosema bombycis* を含む數種微胞子蟲胞子の精製. 日蠶雜, 49, 512-516.
- 瀧澤寛三 (1977) カイユの微胞子病原蟲の増殖に關する研究. 蠶絲試驗場報告, 27, 297-352.
- Undeed, A.H. and Alger, N.E. (1971) A density gradient method for fractionating microsporidian spores. J. Invertebr. Pathol. 18, 419-420.
- Undeed, A.H. and Avery, S.W. (1983) Continuous flow-density gradient centrifugation for purification of microsporidian spores. J. Invertebr. Pathol. 42, 405-406.
- Weister, J. (1976) Microsporidia in invertebrates; Host-parasite relations at the organismal level. Comparative Pathobiology Vol. 1, 182-183.
- 吉武成美 (1980) 昆蟲實驗法, 學會出版センター, 159-164.