

人工飼料育蚕の糸状菌およびウイルス病

感染抵抗性に関する研究*

一 田 昌 利

STUDIES ON THE RESISTANCE AGAINST FUNGAL AND VIRAL INFECTION

IN THE SILKWORM LARVAE REARED ON ARTIFICIAL DIET

BY

MASATOSHI ICHIDA

緒 言

カイコ *Bombyx mori* の人工飼料育に関する研究は、カイコの摂食のしくみ (浜村, 1975), 栄養要求の解析と葉質の問題 (伊藤, 1983), あるいは、桑の代用開発と養蚕経営の合理化 (吉田ら, 1960) など、様々な角度から開始された。これらの成果に基づいて、1960年にカイコの全齢人工飼料育の方法が相次いで報告され (福田ら, 1960; 伊藤・田中, 1960; 吉田ら, 1960), 以来30年近い歳月が経過した。その間、人工飼料の組成、それに応じた飼育法、環境条件、桑葉育への移行後の飼育法、飼料条件等が改善され、現在のような稚蚕期における人工飼料育が実用化されるに至った。昭和63年度には全掃立量の約40%が稚蚕期人工飼料育に供されている。これは、近代養蚕技術発達史上特筆さるべき大変革であるといえよう。

このような稚蚕人工飼料育の普及と同時に、核多角体病をはじめとする蚕病の発生が増加したとされ、1981年の養蚕統計年報のデータ等からもその一端をうかがうことが出来る。一般に、人工飼料育蚕は桑葉育蚕に比べてウイルス病感染抵抗性が低いとされている (小林ら, 1967; 林屋ら, 1968; 松原・林屋, 1969; 石坂ら, 1977; 石井・中島, 1977; 国見・森

田, 1979; 関, 1980; 関・川口, 1981; 滝口・富田, 1980; 小森・清水, 1980; 宮島・鷺田, 1983)。これに関し、無菌育蚕を用いたウイルス病感染抵抗性について詳細な研究がある (松原, 1965, 1966, 1967a, 1967b, 1968, 1973)。また、人工飼料中のカゼイン量が細胞質多角体病に対する経口感染抵抗性に影響を及ぼすことも報告されている (蛸原, 1970)。細菌病抵抗性 (児玉・中筋, 1968, 1969; 中筋・児玉, 1969, 1970; 中筋ら, 1970; 飯塚・滝沢, 1969; 飯塚ら, 1971; 飯塚, 1972a, 1972b), および人工飼料育蚕の糸状菌病感染についても研究が行われた (河上・青木, 1968)。しかし、一方では人工飼料育蚕と桑葉育蚕のウイルス病感染抵抗性に差はほとんどないか、あっても小差であるとする報告もある (古田, 1983; 清水・川上, 1984)。また、最近の核多角体病の全国的流行の原因について渡部・清水 (1981) は、消毒の不徹底がその主な原因であるとしている。このように、多様な結果が多数報告されているにもかかわらず、稚蚕人工飼料育が導入された場合の蚕病防除指針となるべき体系的な研究は十分であるとはいえない。本研究は人工飼料育における蚕作安定技術を確認することを目的とし、人工飼料育蚕の糸状菌およびウイルス病感染抵抗性について検討した。

現在実用化されている人工飼料育体系では、1～2齢または1～3齢を人工飼料により共同飼育し、3齢または4齢から桑葉育に転換するものである。本研究では、この人工飼料育から桑葉育への転換と

*九州大学学位論文 (農博乙第1,100号)

いう急激な食性の変化が蚕児に及ぼす影響に着目し、特にウイルス病感染抵抗性については1～2齢人工飼料育と1～3齢人工飼料育蚕における試験結果を記載している。また、抗幼若ホルモン活性物質処理により誘発した3眠化蚕における糸状菌およびウイルス病感染抵抗性について検討した。

糸状菌としては、こうじかび病菌 (*Aspergillus flavus*) および黄きょう病菌 (*Beauveria bassiana*) を用い、蚕病原ウイルスには養蚕地域で特に問題となっている核多角体病ウイルス (以下NPV) を中心に、細胞質多角体病ウイルス (以下CPV)、および伝染性軟化病ウイルス (以下IFV) を供試した。

本研究により、人工飼料育における糸状菌の感染防除、病原ウイルス感受性の蚕児発育過程における推移および飼育条件による変化、感染時期と発病・死亡時期の対応などについて知見が得られた。

第I章

人工飼料育蚕の糸状菌病 感染抵抗性

I-1. 人工飼料育蚕のこうじかび病感染

稚蚕人工飼料育施設内では、飼育経過の進行につれ微生物量が増加し、汚染の原因となっている(酒井, 1978; 曾根ら, 1980; 松本ら, 1980)。稚蚕人工飼料育における微生物汚染の問題の一つに、人工飼料育蚕座への糸状菌による汚染がある。特に、こうじかび病菌 *Aspergillus flavus* は人工飼料劣化の原因となるばかりでなく蚕児に感染して被害を与えている。1～2齢人工飼料育期間中こうじかび病菌は、人工飼料中に含まれる防黴成分の作用で増殖が抑制されるが、人工飼料育蚕の糞や人工飼料残渣では繁殖する(縄田・鳥浜, 1979)。そこで、人工飼料育蚕と桑葉育蚕のこうじかび病菌感染抵抗性の差異、こうじかび病菌で汚染された蚕座で飼育した人工飼料育蚕の桑葉移行後のこうじかび病の発生、また、人工飼料育蚕の桑葉育への移行後におけるこうじかび病感染について検討した。

材料および方法

1) 蚕人工飼料および人工飼料育: 日本農産工機製粉体飼料(シルクメイト)を同社指定の方法で

蒸煮調製した。飼育規模は通常1回あたり蠶蚕量1.0gまたは0.5g掃とし、飼育管理は日本農産工機(株)の飼育標準表を基準とした。

- 2) 供試蚕品種: 芙・蓉×東・海(中母)を供試した。
- 3) 供試菌および培養: こうじかび病菌 *Aspergillus flavus* S85(ホルマリン抵抗性系統)は、農林水産省蚕糸試験場蚕病第1研究室長河上清博士および群馬県蚕業試験場 小野功一氏より分譲を受け、熊本県蚕業試験場で継代した菌株を用いた。こうじかび病菌分生子をCzapek寒天培地(しよ糖3%, NaNO₃0.2%, K₂HPO₄0.1%, MgSO₄7H₂O 0.05%, KCl 0.05%, FeSO₄7H₂O 0.001%, 寒天 1.5-2.0%, pH6.5)で30℃10日間静置培養し、分生子を形成させた。分生子を集菌してTween 40 0.02%添加した滅菌水に浮遊し分生子浮遊液を調製した。分生子数はトーマ血球計算盤で算定した。
- 4) こうじかび病菌分生子の蚕体侵入試験: 人工飼料育および桑葉育の3齢起蚕に、こうじかび病菌分生子浮遊液(2.7×10⁷分生子/ml)をプラスチックスプレー(Canyon HISSPRAYER)で直接噴霧し接種した。接種後所定時間ごとに各区50頭2連制でサリチル酸蚕体消毒剤(新々ダストII)による指定通りの処理を行った。蚕体表面消毒後の蚕児は15cmのペトリ皿に収容し、室温で桑葉育した。各試験区の感染率は接種7日後まで調査した。
- 5) こうじかび病菌感受性試験: 人工飼料育および桑葉育の3齢起蚕に、こうじかび病菌分生子浮遊液(4.4×10⁴~4.4×10⁷分生子/ml)をプラスチックスプレーで直接噴霧し接種した。接種後の蚕児は15cmのペトリ皿で室温で桑葉育した。感染率は接種7日後まで調査した。
- 6) 蚕体液のこうじかび病菌分生子の発芽抑制試験: 全齢人工飼料育および全齢桑葉育蚕からは5齢起蚕時および5齢3日蚕の血淋巴液を採取した。また、1～4齢人工飼料育・5齢桑葉育蚕からは5齢3日蚕の血淋巴液を採取した。血淋巴液の3,000rpm, 10分遠心上清を蚕体液として使用時まで-20℃に保存した。
スライドグラス上で蚕体液に直接こうじかび病菌分生子を混合し、30℃, 7時間後に分生子の発芽率を鏡検により調査した。発芽率は1検

体につき400個以上の分生子について調査し、3回反復して試験を行った。また、対照には Czapek液体培地を使用した。

- 7) 人工飼料育蚕座へのこうじかび病菌接種：人工飼料上に展開した蟻蚕0.5または1gに対し、7～8白金耳量のこうじかび病菌分生子を白金耳に振動を与えながら蚕座全面に散布した。接種後の蚕児は人工飼料育標準表〔日本農産工(株)〕に従って3齢起蚕または4齢起蚕時まで飼育管理を行い、以後桑葉育とした。

結 果

こうじかび病菌分生子の蚕体侵入試験：

人工飼料育および桑葉育の3齢起蚕に、こうじかび病菌分生子浮遊液を接種し、接種直後から24時間目まで3時間毎に蚕児を各区50頭2連制で、蚕体消毒後、15cmペトリ皿にて桑葉育した。感染率は蚕体消毒開始までの時間に対応して増加し、18時間以上ではほぼ一定の発病率となった(第1表)。

感染率を X^2 (カイ)検定法を用いて比較したところ、桑葉育蚕の場合は3時間区と6時間区の間には5%の危険率で有意差が認められた。また、人工飼料育蚕の場合は、0時間区と3時間区の間には5%の危険率で有意差があった。一方、桑葉育蚕と人工飼料育蚕の同一時間区では差がほとんど検出されず、

第1表 3齢起蚕に対するこうじかび病菌分生子の蚕体表面侵入と所要時間

蚕体消毒までの時間	感 染 率	
	桑葉育蚕	人工飼料育蚕
0hr	6%	5%
3	11	15
6	28	26
9	30	32
12	43	31
15	34	42
18	52	57
21	58	63
24	54	61
対照(無消毒)	55	76

6時間以上で感染率が増加し、18時間以上ではほぼ一定の発病率となった。

こうじかび病菌接種試験：

人工飼料育および桑葉育の3齢起蚕に、こうじかび病菌分生子浮遊液を接種後7日間の感染率を第2表に示す。人工飼料育蚕と桑葉育蚕の間には、 4.4×10^5 分生子/ml区および 4.4×10^6 分生子/ml区では差が認められなかったが、 4.4×10^7 分生子/ml区において有意差があり、高い接種濃度では人工飼料育蚕の感染率が高くなる傾向が見られた。

第2表 こうじかび病菌分生子接種量と感染率

区	感 染 率	
	桑葉育蚕	人工飼料育蚕
分生子/ml	%	%
4.4×10^5	5	13
4.4×10^6	53	52
4.4×10^7	89	97

蚕体液のこうじかび病菌分生子発芽抑制試験：

全齢人工飼料育蚕、全齢桑葉育の5齢起蚕と5齢3日蚕および1～4齢人工飼料育・5齢桑葉育の5齢3日蚕の体液がこうじかび病菌分生子の発芽率に及ぼす影響を検討した(第3表)。全齢人工飼料育蚕体液では5齢起蚕と5齢3日蚕の発芽抑制作用に差異は見られなかったが、全齢桑葉育では5齢起蚕から5齢3日までの期間に幼虫体液の発芽抑制作用が著しく低下した。

これらの結果から、各区の発芽率を総体有意法を用いて検定した結果、全齢人工飼料育と全齢桑葉育との間で、5齢起蚕時における蚕体液中でのこうじかび病菌分生子の発芽率に有意差は認められなかった。また、全齢人工飼料育の5齢起蚕と5齢3日蚕体液中の発芽率にも差は見られなかった。一方、全齢桑葉育の5齢起蚕と5齢3日目の発芽率および全齢人工飼料育の5齢3日蚕と全齢桑葉育の5齢3日蚕の発芽率に1%以下の危険率で有意差が認められた。さらに、全齢人工飼料育の5齢起蚕および5齢3日蚕と1～4齢人工飼料育・5齢桑葉育の5齢3日蚕の発芽率にも5%以下の危険率で有意差があった。このように、人工飼料育蚕体液にはこうじかび病菌分生子発芽抑制作用があった。

第3表 蚕幼虫体液のこうじかび病菌分生子発芽抑制試験

幼虫体液	分生子発芽率			
	試験1	試験2	試験3	平均
全齡桑葉育5齡起蚕	55.9%	41.5%	53.4%	49.2%
全齡人工飼料育5齡起蚕	65.6	53.1	56.3	58.0
全齡桑葉育5齡3日	88.2	84.9	71.6	80.6
全齡人工飼料育5齡3日	55.7	57.0	60.5	58.7
1-4齡人工飼料育・5齡桑葉育5齡3日	73.2	76.6	83.8	77.6

人工飼料育蚕座へのこうじかび病菌接種：

人工飼料蚕座上の蟻蚕にこうじかび病菌分生子を散布し、以後3齡起蚕まで飼育管理した。蚕座でのこうじかび病菌のコロニー形成は、分生子散布4日後に直径0.3cm程度のコロニーが4ヶ所に見られた。分生子散布5日後には直径約1cmのコロニー6個が認められたが、2齡飼食によって新しい飼料の下に埋没した。その後、新しい飼料の下でコロニーは生長を継続し、やがてコロニー部分が盛上ってその周囲の蚕児の密度が低くなった。しかし、コロニー表面には分生子形成は認められなかった。2眠拵座後コロニーはさらに生長し、最大直径約4cmとなり、コロニー表面に分生子が少量形成された。また、この間のこうじかび病蚕の発生は極くわずかであった(第4表)。

これらの蚕児を3齡起蚕時に各区2分し、一方をサリチル酸系新タダストIIで蚕体消毒した。そして、各試験区100頭ずつ木製の蚕箔に入れて桑葉育し、10日間普通育あるいは多湿育を行った。なお、多湿育区は補湿紙(2枚重ね)で蚕座周囲を囲み、上から防乾紙で覆って3齡期間を飼育した。その間のこうじかび病菌感染蚕の発生は対照(無消毒)区においても少なく、こうじかび病菌汚染蚕座で飼育されても、桑葉移行時の蚕体消毒により、1~2齡人工飼料育ではほぼ完全にこうじかび病菌感染蚕の発

第5表 1~2齡人工飼料育蚕の桑葉育移行後におけるこうじかび病菌感染(2連制平均)

実験区	湿度	汚染区	非汚染区
蚕体消毒	普通育	0.0%	0%
	多湿育	0.5	0
対照	普通育	2.0	0
	多湿育	4.5	0

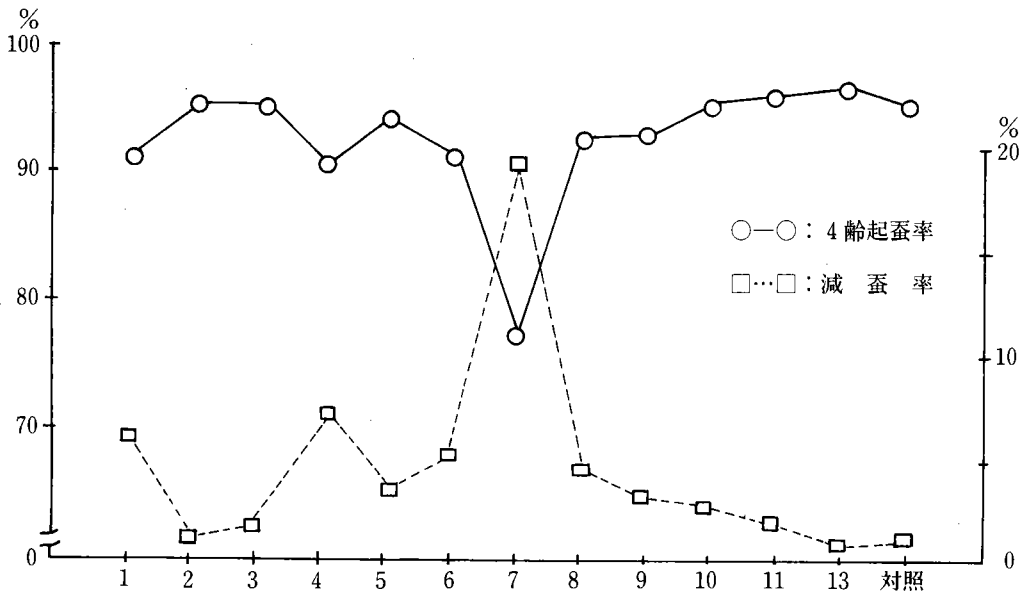
生を阻止することができた(第5表)。

蟻蚕量で0.5gを掃立た人工飼料蚕座に、掃立日から配蚕日(13日目)まで飼育日順に従ってこうじかび病菌分生子を散布し、蚕座でのこうじかび病菌の動向を追跡した。蚕座上のこうじかび病菌のコロニー形成は、掃立9日後以降の接種では、コロニーの形成が認められなかった。この条件下では、こうじかび病菌のコロニーは、菌接種4日後に直径0.3mm程度のコロニーが出現し、徐々に生長し、眠期の拵座によって急速に増大した。

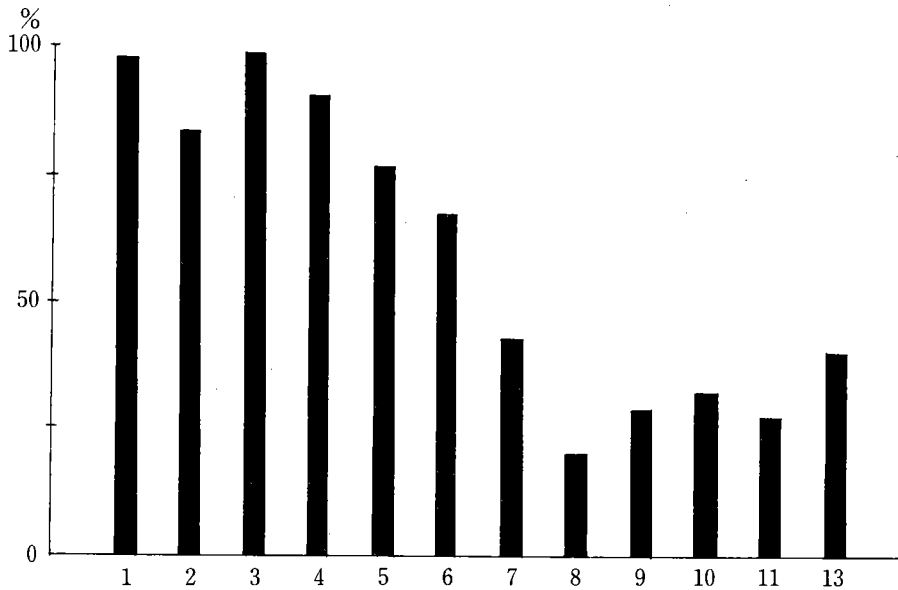
次に、こうじかび病菌汚染蚕座で飼育した蚕児の4齡起蚕率と減蚕率を調べた(第1図)。1区(掃立日接種)、4区(掃立4日後接種)、7区(掃立7日後接種)で減蚕率が高く、特に7区では減蚕率が19.2%に達した。

第4表 こうじかび病菌汚染蚕座における1~2齡人工飼料育蚕児の發育およびこうじかび病菌感染

区	供試蚕数	3齡起蚕数	2眠蚕数	遅れ蚕数	3齡起蚕率	1-2齡減蚕率
接種	2,445頭	2,111頭	30頭	100頭	86.3%	8.3%
無接種	2,445	2,147	36	120	87.8	5.8



第1図 1～3 齢人工飼料育中のこうじかび病菌汚染と4 齢起蚕率及び減蚕率



第2図 1～3 齢人工飼料育中のこうじかび病菌汚染時期と桑葉育移行後におけるこうじかび病発生との関係

同様に1～3齢人工飼料育した蚕児を各区50頭2連制で抽出し、桑葉育に移行した後のこうじかび病の発生を調査した結果(第2図)、発育初期の汚染がこうじかび病感染蚕の発生を促進することが明らかにされた。

考 察

こうじかび病菌の蟻蚕への侵入所要時間に関して、大場(1951)および西城ら(1972)は10-20時間、門平(1950)は10-24時間であることを報告しており、さらに、三国(1973)は10-15時間と推定している。また、2齢での侵入所要時間について三国(1973)は蟻蚕の場合より10時間程度長く、15-25時間と推定している。しかし、3齢起蚕に対するこうじかび病菌の侵入所要時間に関してはこれまで十分な知見が得られていなかった。本試験結果からこうじかび病菌は3齢起蚕に対し、桑葉育蚕、人工飼料育蚕ともに約6時間後頃から侵入を開始し、18時間後には感染がほぼ成立した状態になると考えられた。

人工飼料育蚕体液中でこうじかび病菌分生子の発芽が抑制されたが、その原因として、人工飼料中の抗菌剤が摂食によって蚕児の体液中に吸収移行したことが考えられる。また、1～4齢人工飼料育・5齢桑葉育蚕の5齢3日蚕体液におけるこうじかび病菌分生子の発芽率と全齢桑葉育蚕の5齢3日蚕体液中の発芽率にほとんど差異が見られないことから、蚕体内に吸収された防衛成分は、比較的速やかに蚕体外に排泄されるものと推察された。しかし、人工飼料に防衛剤として添加されているソルビン酸の蚕児体液中への移行については否定的見解が出されている(河上・青木, 1968)。人工飼料中の蚕児体液中へ移行可能な防衛成分の同定については更に検討する必要がある。

こうじかび病菌の濃厚感染状態では、人工飼料育蚕の発病率が桑葉育蚕より高くなったが、蚕体液の抗菌作用によって発病に差が生じるのではなく、人工飼料の摂食によって蚕児のこうじかび病菌に対する感受性の差異、例えば、こうじかび病菌の発芽侵入の難易に違いが生じるためと思われる。

人工飼料育中の蚕座でのこうじかび病菌のコロニーが眠期の拮座に伴って肥大した。縄田・鳥浜(1979)も同様の結果を発表している。この原因は、人工飼料中に含まれる防衛成分が、拮座乾燥によ

てその効果を十分に発揮できない状態になるためと考えられる。さらに、1～3齢人工飼料育では2眠時期の拮座乾燥によってコロニー表面及び底面に多量の分生子の着生が認められた。これは1～2齢人工飼料育の場合のコロニーの生育状態と異なる点である。

掃立日以降に蚕座を人為的に汚染させると、汚染の時期により4齢起蚕時の減蚕が増加し、特に7日汚染の場合は著しい減蚕極大値をもたらした。この原因として、4日および7日が蚕座の拮座乾燥時に当り、人工飼料中の防衛成分の効果が低下する。このため、こうじかび病菌に感染する可能性が高まり、減蚕を多くするものであろう。特に、2眠時期は7日17時から9日9時にかけての40時間にわたって乾燥状態に置かれるので、感染の可能性がより増大する。

掃立日に蚕座をこうじかび病菌で汚染後1～2齢人工飼料育し桑葉育移行後にこうじかび病の発生をみると、極めて少ない。一方、1～3齢人工飼料育中に蚕座がこうじかび病菌で汚染された場合には、桑葉育移行後(4齢)にかなり高い割合でこうじかび病が発生した。特に、人工飼料育初期に蚕座がこうじかび病菌で汚染されると、感染率が極めて高くなる。この場合、配蚕時点でこうじかび病菌コロニー表面に多量の分生子が着生しており、桑葉育移行時にこれらコロニーが感染源になると考えられる。また、コロニー形成が行われない9日後以降菌接種区でもこうじかび病が発生している。1～3齢人工飼料育においては、十分なこうじかび病菌対策を施さなければならない。

人工飼料育蚕座への蚕体消毒剤の利用について曾根ら(1980)は、餉食前の散布はこうじかび病に対してさほど効果がないとしているが、散布時期と散布量の組合わせについて検討した結果、拮座乾燥時に蚕体消毒剤を3g散布すると最も防除効果があり、次いで餉食前3g散布、餉食前1g散布、拮座乾燥時1g散布の順であった。しかし、拮座乾燥時3g散布の場合は眠蚕体重がかなり軽くなった。また、蚕体消毒剤の散布ではコロニーの発育を完全に阻止することはできない。蚕体消毒剤の中には人工飼料上での防衛効果が劣るものや、葉害の大きいものがある(上田ら, 1984)等、その使用に当たっては留意しなければならない点がある。そこで、防衛効果あるいは殺菌効果の期待できる若干の消毒剤剤によ

る蚕体蚕座消毒を試みた。その結果、70%エタノール散布が最も高い効果を有することを見出した(一田, 1986)。しかし、この場合に1眠時からの散布は薬害が大きいので、散布時期は2齡拵座乾燥時以降とすべきである。また、薬剤の散布は全面散布ではなく、こうじかび病菌コロニーへの噴霧によるスポット処理を行うことが望ましい。

I-2. 人工飼料育蚕の黄きょう病感染

人工飼料育蚕の硬化病感染に関して人工飼料中に含まれるソルビン酸の影響(河上・青木, 1968)および全齡人工飼料育蚕と桑葉育蚕の硬化病感染(河上・三国, 1984; 宮沢, 1983)について報告されている。しかし、現行の飼育体系に対応した、稚蚕人工飼料育蚕の人工飼料育期間および桑葉育移行後の硬化病感染については報告が少ない。そこで、人工飼料育蚕座に散布した硬化病菌の動向および蚕座内感染、桑葉育移行後の黄きょう病感染に対する人工飼料育蚕の抵抗性について検討した。

材料および方法

- 1) 蚕人工飼料及び人工飼料育: 人工飼料の調製、飼育規模および飼育管理はI-1と同様に行った。
- 2) 供試蚕品種: 芙・蓉×東・海(中母)を供試した。
- 3) 供試菌株および培養: 黄きょう病菌 *Beauveria bassiana* No.32は農林水産省蚕糸試験場蚕病第1研究室長河上 清博士から分与を受け、当場で継代した菌株を使用した。黄きょう病菌分生子をI-1と同様にCzapek寒天培地で25°C、14日間静置培養し、分生子を形成させた。分生子の集菌、分生子浮遊液の調製はI-1と同様に行った。
- 4) 黄きょう病菌分生子の蚕体侵入試験: 人工飼料育および桑葉育の3齡起蚕に、黄きょう病菌分生子浮遊液(10⁷分生子/ml)をプラスチックスプレー(Canyon HISPRA YER)で直接噴霧し接種した。接種後I-1と同様に所定時間ごとに各区50頭2連制でサリチル酸蚕体消毒剤による指定通りの処理を行った。蚕体表面消毒後の蚕児は15cmのペトリ皿に収容し、室温で桑葉育した。各試験区の感染率は5齡起蚕時ま

で調査した。

- 5) 黄きょう病菌感受性試験: 人工飼料育および桑葉育の3齡起蚕に、黄きょう病菌分生子浮遊液(10³~10⁷分生子/ml)をプラスチックスプレーで直接噴霧し接種した。接種後の蚕児は15cmのペトリ皿で室温で桑葉育し、5齡起蚕時まで感染率を調査した。
- 6) 蚕体液の黄きょう病菌分生子発芽抑制試験: I-1と同様に全齡人工飼料育および全齡桑葉育蚕からは4齡起蚕時および4齡3日蚕の血淋巴液を。また、1~3齡人工飼料育・4齡桑葉育蚕からは4齡3日蚕の血淋巴液を採取し、遠心沈清を使用した。スライドグラス上で蚕体液に直接黄きょう病菌分生子を混合し、28°C、6~15時間後まで分生子の発芽率を鏡検により調査した。発芽率は1検体につき400個以上の分生子について調査し、3回反復して試験を行った。また、対照にはCzapek培養液を使用した。
- 7) 人工飼料育蚕座への黄きょう病菌接種: 人工飼料上に展開した蟻蚕1gに対し、7~8白金耳量のこうじかび病菌分生子を白金耳に振動を与えながら蚕座全面に散布した。接種後の蚕児はI-1と同様に人工飼料育し、3齡起蚕からは桑葉育を行った。

結 果

黄きょう病菌分生子の蚕体侵入試験:

人工飼料育および桑葉育蚕の3齡起蚕に黄きょう病菌分生子浮遊液を接種し、接種直後から42時間目まで所定時間ごとに蚕児を各区50頭2連制で抽出し、蚕体消毒を行い、以後5齡起蚕まで桑葉育し、その間の黄きょう病感染蚕数を調査した(第6表)。桑葉育蚕における感染率は分生子接種後蚕体消毒までの経過時間に対応して高くなったが、接種30時間後以降は50%以上の感染率に達した。一方、人工飼料育蚕の場合はすでに接種6時間後には高い感染率がみられ、接種15時間後以降の感染率は50%以上となった。

第6表 3齢起蚕に対する黄きょう病菌分生子の蚕体表面侵入と所要時間

蚕体消毒までの時間	感 染 率	
	桑葉育蚕	人工飼料育蚕
0hr	3.0%	3.0%
6	10.5	28.0
15	18.0	58.6
18	21.4	50.6
21	33.3	49.1
24	37.4	64.7
30	50.0	74.0
42	90.0	100
無消毒	100	100

黄きょう病菌感染抵抗性比較試験：

人工飼料育および桑葉育の3齢起蚕に黄きょう病菌分生子を接種し、菌接種後各区50頭2連制で5齢起蚕まで桑葉育を行った。黄きょう病菌感染率は(第7表)人工飼料育蚕と桑葉育蚕ともに 10^7 分生子/ml接種区において100%であったが、 10^6 分生子/ml接種区では桑葉育蚕の感染率が35%であったのに対し、人工飼料育蚕の発病率は91%であった。また、 10^5 分生子/ml区では桑葉育蚕の発病率が5%に対し、人工飼料育蚕では14%とやや高かった(第7表)。このように、人工飼料育蚕が桑葉育蚕に比べ黄きょう病菌分生子に対し、感受性が高かった。また、黄きょう病菌による蚕体表面の病斑形成も人工飼料育蚕の方が桑葉育蚕に比較して明瞭であった。

第7表 黄きょう病菌分生子接種量と感染率

区	感 染 率	
	桑葉育蚕	人工飼料育蚕
分生子/ml	%	%
1×10^4	1	0
1×10^5	5	14
1×10^6	35	91
1×10^7	100	100

人工飼料育蚕体液の黄きょう病菌分生子発芽抑制試験：

全齡人工飼料育蚕及び全齡桑葉育の4齢起蚕および4齢3日蚕、1～3齡人工飼料育・4齡桑葉育の4齢3日蚕の体液中における黄きょう病菌分生子の発芽率を調査した(第8表)。各区の15時間後の発芽率を総体有意法で検定した結果、全齡人工飼料育蚕と全齡桑葉育蚕の4齢起蚕時体液中での黄きょう病菌分生子の発芽率に有意差は認められなかった。また、人工飼料育蚕の4齢起蚕と4齢3日蚕体液中での発芽率にも差は見られなかった。一方、桑葉育4齢起蚕と4齢3日体液には差異があり、また、全齡人工飼料育4齢起蚕及び4齢3日蚕と全齡桑葉育4齢3日蚕体液の発芽抑制作用にも1%以下の危険率で明らかに有意差があった。このほか、全齡人工飼料育および全齡桑葉育蚕の4齢起蚕体液と1～3齡人工飼料育・4齡桑葉育蚕4齢3日体液にも差異があった。また、全齡桑葉育4齢起蚕体液と1～4齡1日人工飼料育・4齡2日以降桑葉育蚕の4齢3日体液の発芽抑制作用にも差異が見られ、全齡人工飼料育4齢起蚕体液と1～4齡1日人工飼料育・4

第8表 蚕体液中における黄きょう病菌分生子の発芽率

蚕幼虫体液	分 生 子 発 芽 率			
	6 hr	9 hr	12hr	15hr
全齡桑葉育4齢起蚕	0%	1.9%	12.4%	27.6%
全齡人工飼料育4齢起蚕	0	2.3	6.4	24.8
全齡桑葉育4齢3日	0	7.5	24.6	52.1
1-3齡人工飼料育・4齡桑葉育4齢3日	0	5.1	25.0	44.3
1-4齡1日人工飼料育・4齡2日以降桑葉育4齢3日	0	6.3	28.6	37.4
全齡人工飼料育4齢3日	0	7.4	19.4	31.5

齢2日以降桑葉育蚕の4齢3日体液、全齢人工飼料育蚕4齢3日体液と1～3齢人工飼料育・4齢桑葉育蚕4齢3日体液間には5%以下の危険率で有意な差が認められた。

人工飼料育蚕座への黄きょう病菌接種と感染：

蟻蚕量1gを切削した人工飼料面上に掃立後、7～8白金耳量の黄きょう病菌分生子を蚕座全面に散布した。接種後3齢起蚕まで飼育管理し、蚕座での黄きょう病菌の動向および蚕児の感染状況を調査した。また、3齢起蚕からは、各試験区100頭ずつ蚕箔で桑葉育し、10日間飼育し黄きょう病の発生を観察した(第9表)。黄きょう病菌接種区の1～2齢減蚕率は比較的低く、無接種区との間に差異は見られなかった。また、この試験条件下では人工飼料育中の蚕座上においても、黄きょう病菌の菌糸の發育、コロニーの形成は認められなかった。

考 察

硬化病菌のうち白きょう病菌あるいは黄きょう病菌の蚕体侵入所要時間については、過去に数多くの研究結果が報告されている(三谷ら, 1923; 三谷ら, 1928; 久保田・斉藤, 1929; 勝又, 1930, 1931; 小宮山・高橋, 1955; 青木, 1957; 楠野・久保, 1962)。黄きょう病菌を2齢起蚕(桑葉育)に接種した場合は24～40時間で、4齢起蚕に接種した場合は24時間以上で経皮侵入を行うとしている(河上・三国, 1965)。本試験結果から、桑葉育蚕では30時間後の蚕体消毒で50%の発病率に達し、河上・三国の結果とほぼ一致する。一方、1～2齢人工飼料育蚕の場合は3齢起蚕15時間後の消毒で50%の感染率に達したことから、人工飼料育蚕では黄きょう病菌の蚕体侵入所要時間は桑葉育蚕に比べてかなり短いものと考えられる。

人工飼料育蚕体液中で黄きょう病菌分生子の発芽がこうじかび菌の場合と同様に抑制されていた。その原因は、I-1で述べたように、人工飼料中の

防黴成分が摂食によって蚕児の体液中に吸収移行したことによると考えられる。また、4齢3日蚕の蚕体液での黄きょう病菌分生子の発芽率は全齢人工飼料育 \leq 1～3齢人工飼料育・4齢桑葉育 \leq 1～4齢1日目人工飼料育・4齢2日目以降桑葉育 \leq 全齢桑葉育の順となる。このように、人工飼料育から桑葉育に切替えてからの期間が長くなる程、分生胞子の発芽率が高くなる傾向にあるが、これは蚕体内に吸収された防黴成分が、比較的速やかに蚕体外に排泄されたためと推察される。

また、蚕座を黄きょう病菌で汚染させても蚕児への感染は起こらなかった。人工飼料育の場合、黄きょう病はこうじかび病ほどには留意する必要がないものと結論される。

第II章

1～2齢人工飼料育蚕のウイルス病感染抵抗性

II-1. 人工飼料育中の早期停食および起蚕絶食が発病に及ぼす影響

ウイルスによる感染は、糸状菌の場合よりもさらに大きな影響を養蚕地域にもたらしている。稚蚕人工飼料育においても桑葉育移行後のウイルス感染とその防除は重要な問題である。

大規模に人工飼料育を行う場合、蚕児の發育を揃えるために行われる停食の時期は飼育施設の構造、気流等の影響を受け、停食最適時期に同一施設内においても相当の差が生じる。また、同一蚕座においても中心部より周辺部の飼料は乾燥化が早い。そこで、人工飼料育蚕の停食時期および早期停食状態が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響について検討した。

また、3齢起蚕の絶食によるウイルス病感染抵抗性への影響を調査した。起蚕絶食と蚕児のウイルス病感染抵抗性は、稚蚕人工飼料育蚕の配蚕後における飼育技術を確立する上で解決しておく必要のある

第9表 人工飼料育中の黄きょう病菌接種と蚕児の發育及び桑葉育移行後の黄きょう病発生

区	3 齢 起蚕数	2 眠 蚕 数	遅 れ 蚕 数	3 齢 起蚕率	1-2齢 減蚕率	3 齢期以降 の 感 染 率
接 種	2,141頭	49頭	71頭	93.3%	1.5%	0%
無接種	2,184	25	49	95.2	1.6	0

問題と考えられる。そこで、1～2 齢人工飼料育蚕の3 齢起蚕における絶食期間とウイルス病感染抵抗性の関係を検討した。

材料および方法

- 1) 蚕人工飼料および人工飼料育：人工飼料の調製、飼育規模および飼育管理は第 I 章と同様に行った。
- 2) 供試蚕品種：春蚕期は同栄×紅白，夏秋蚕期は美・蓉×東・海を供試した。
- 3) ウイルス：a) カイコ *B. mori* 核多角体病ウイルス（以下 NPV）は熊本市水前寺で分離した熊本県蚕業試験場保存株を使用した。NPV は精製多角体として 5～10℃ に使用時まで保存し、保存期間は 2 年以内とした。
b) カイコ *B. mori* 細胞質多角体病ウイルス（以下 CPV）は熊本県下の養蚕農家に発生した病蚕から分離された、熊本県蚕業試験場保存株を使用した。CPV は精製多角体として 5～10℃ に使用時まで保存し、保存期間は 2 年以内とした。
c) カイコ *B. mori* 伝染性軟化病ウイルス（以下 IFV）は農林省蚕糸試験場病理部 鮎沢千尋博士から分与を受け、当場で継代した熊本県蚕業試験場保存株を使用した。IFV は感染病死幼虫のまま -20℃ に使用時まで保存し、保存期間は 2 年以内とした。
- 4) 経口接種用ウイルス：a) NPV 病血に 1/1,000 量のペニシリン・ストレプトマイシン混液（GIBCO 社）を加え、5 齢起蚕にマイクロディスペンサー（ドラモンド社製）を用い、ガラス毛细管で経口接種した。病死直前の白濁した感染幼虫病血を採取し、3,000rpm, 10 分および 600rpm, 5 分の遠心分離を反復して、多角体を 1 M NaCl で遠心洗浄し部分精製した。最後に滅菌蒸溜水で 2 回洗浄し、経口接種用材料とした。多角体数はトーマ血球計算盤で算定した。
b) CPV 多角体の調製：CPV 多角体を 2 齢起蚕に経口接種し、病死直前に解剖して白化した消化管を採取した。消化管の 10% 磨砕液を 3,000rpm, 10 分および 600rpm, 5 分の遠心分離を反復して、多角体を 0.85% NaCl で遠心洗浄し部分精製した。最後に滅菌蒸溜水で 1 回洗

浄し、経口接種用材料とした。多角体数はトーマ血球計算盤で算定した。

- c) IFV 感染幼虫磨砕液：凍結保存した感染病死幼虫に 9 倍量の滅菌水を加えて磨砕した。磨砕液の 12,000rpm, 15 分遠心上清を 10^{-1} 液として経口接種用材料とした（古田, 1976）。
- 5) 感染価の算定：多角体または感染病死幼虫磨砕液上清を階段希釈し、各希釈の所定量を桑葉に塗布した。所定数の蚕幼虫に所定時間食下させ、桑葉を与えて所定期間観察した。飼育温度は室温とした。死亡虫は NPV および CPV の場合は鏡検して多角体の有無を調査し、50% 感染価（ LC_{50} ）を Reed and Muench (1938) 法で算定した。
- 6) 早期停食試験：1～2 齢人工飼料育蚕の 2 齢飼食を 0 時間として、これより 31, 43, 50, 55, 67 時間後に所定数の蚕を無作為に抽出して、15cm のペトリ皿に入れ、温度 29-30℃, 湿度 85-90% の部屋で停食就眠させ、2 齢飼食後 3 日 4 時間後に就眠調査を行った。そのうち、3 齢起蚕となったものにウイルスを経口接種した。
- 7) 3 齢起蚕における絶食試験：1～2 齢人工飼料育蚕で掃立 6 日 7 時間後～7 日 7 時間後までの 24 時間内に 3 齢起蚕となった個体、また掃立後 6 日 9 時間～6 日 21 時間後までの 12 時間内に 3 齢起蚕となった個体を蚕座上から 15cm のペトリ皿に入れ、掃立 6 日 21 時間または 7 日 7 時間後から 0～48 時間絶食させた。なお、絶食中の温度は 25℃ および 30℃ とした。所定時間絶食後、IFV, CPV 及び NPV を桑葉に塗布し 24 時間食下させた。以後、所定期間桑葉育を行った。

結 果

停食時期とウイルス病抵抗性：

停食時期が蚕児の就眠性及びウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響を第 10 表に示す。2 齢飼食 31 時間後に停食した場合は、大部分の蚕児が就眠できない状態になった。43 時間経過後からは就眠率がかなり向上し、50 時間以上ではほぼ一定の就眠率に達した。

IFV 感染抵抗性への影響については、2 齢 31 時間後に停食した場合が 50 時間後以降に停食した場合より抵抗性が低下する傾向にあり、その差異が有意な場合があった。

第10表 停食時期が蚕の就眠率およびウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響

蚕期	停食時期	3 齡起蚕	就 眠		就眠率	感染価		
			2 眠蚕	2 齡蚕				
晩	2 齡餉食後	3 1 時間	1 3 4 頭	1 頭	2 8 8 頭	31.9%	6. 9*	
		4 3	1 9 9	1	8 2	70.9	6. 3	
		5 0	2 2 4	5	2 8	89.1	5. 8	
	秋		5 5	2 2 7	5	2 8	89.2	6. 0
			6 7	2 0 0	1 1	2 5	89.4	6. 0
晩々	2 齡餉食後	3 1	1 8 8	9	3 2 8	37.5	6. 6	
		4 3	2 1 5	6	1 2 6	63.7	6. 2	
		5 0	2 4 8	6	3 3	88.5	6. 2	
	秋		5 5	2 3 8	1 4	3 1	89.0	6. 2
			6 7	2 1 5	2 5	3 1	88.6	5. 9
夏	2 齡餉食後	3 1	1 5 9	0	4 8 2	24.8	4. 5**	
		4 3	2 2 1	1	3 5	86.4	4. 0	
		5 0	2 5 7	2	2	99.2	4. 9	
		5 5	2 5 4	4	5	98.1	5. 2	
		6 7	2 5 7	0	1	99.6	5. 3	
晩	2 齡餉食後	3 1	2 3 5	0	3 7 0	38.8	≦ 4. 4	
		4 3	2 6 7	2	3 3	89.0	≦ 4. 6	
		5 0	2 9 7	1	6	98.0	≦ 4. 0	
	秋		5 5	2 9 1	7	5	98.3	4. 7
			6 7	2 6 2	4	5	98.2	5. 8
春	2 齡餉食後	3 1	7 1	5	4 2 4	15.2	6. 9***	
		4 3	1 5 2	1 9	8 1	67.9	≧ 7. 4	
		5 0	2 3 8	4	7	97.2	≧ 7. 0	
		5 5	2 3 8	7	2	99.2	6. 9	
		6 7	2 2 5	2 3	3	98.8	≧ 7. 1	
晩	2 齡餉食後	3 1	9 3	0	4 1 3	18.0	6. 1	
		4 3	1 7 0	0	7 7	68.8	6. 4	
		5 0	2 2 7	2	2 3	90.9	6. 4	
	秋		5 5	2 4 0	0	1 0	96.0	≧ 7. 2
			6 7	2 4 6	2	0	100	≧ 6. 9

* $-\log LC_{50}$ (IFV病虫希釈倍数)

** $\log LC_{50}$ (細胞質多角体数/ml)

*** $\log LC_{50}$ (核多角体数/ml)

CPV感染抵抗性は、夏蚕期に2齢飼食43時間後以内に停食した場合、2齢飼食55時間後以降に停食した場合より抵抗性が低かった。晩秋蚕期では2齢飼食55時間後以内に停食した蚕児のCPV感染抵抗性が低下し、特に2齢飼食50時間後以内に停食状態にした場合に顕著に見られた。

NPV感染抵抗性は、春蚕期では各区間に差異が見られず、晩秋蚕期では2齢飼食50時間後以内に停食させた場合にNPV感染抵抗性が低下する傾向があった。

3齢起蚕における絶食時間とウイルス病感染抵抗性：

絶食時間とウイルス病感染抵抗性との関係を第11表に示す。IFVに対する感染抵抗性は、25℃、24時間、30℃、15時間の絶食で抵抗性が低下した。さらに、30℃、36時間絶食させるとIFV感染抵抗性がさらに低下した。CPV感染抵抗性の場合、25℃、15時間の絶食で感染抵抗性が低下する傾向が認められ、24時間の絶食による感染抵抗性の低下はより顕著であった。また、30℃では15時間の絶食でも感染抵抗性が低下した。第2回試験では、25℃および30℃区共に15時間の絶食でCPV感染抵抗性が著しく低くなった。NPVに対する感染抵抗性は、25℃および30℃区共に40時間の絶食で感染抵抗性は低下した。第2回試験では、25℃で絶食させた場合、40時間の絶食までは感染抵抗性の低下が認められなかったが、30℃で絶食させた場合は、40時間の絶食でNPV感染抵抗性が低下した。

考 察

人工飼料育中における停食時期が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響は、NPVに対しては結果が明瞭ではなかった。しかし、晩秋蚕期の結果から、早期停食状態が蚕児のNPV抵抗性を低下させる一要因になっている可能性が示唆された。IFVに対しては2齢飼食後50時間以内に停食状態に置くと、抵抗性を低下させる要因になると推察される。さらに、CPVに対する感染抵抗性はNPVおよびIFV感染抵抗性に比較して早期停食による影響が顕著で、著しく抵抗性が低下する。したがって、1～2齢人工飼料育中の2齢期において、飼食後55時間以内に蚕児を停食状態に置くことは全般的にウイルス病感染抵抗性を低下させる要因になると判断される。

また、1～2齢人工飼料育蚕の3齢起蚕における絶食も蚕児のウイルス病感染抵抗性を低下させる要因になることが明らかとなった。特に、CPVおよびIFV感染抵抗性に及ぼす影響が大きかった。このことから、1～2齢人工飼料育蚕の3齢起蚕で不揃い状態を解消する目的で飼食時間を遅らせる場合は、桑付け予定時刻より10-15時間以上遅れるような状態にならないよう注意が必要である。絶食時間が長時間にわたる場合は、その後の蚕児の発育及び繭の計量形質にも悪影響を及ぼす(岩波, 1979, 1984)ので、発育経過によって早口遅口に分けるなどの対策が必要であると考えられる。

第11表 絶食時間がウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響

絶食時間	-log LC ₅₀ (IFV病虫希釈倍数)			log LC ₅₀ (細胞質多角体数/ml)				log LC ₅₀ (核多角体数/ml)			
	試験1		試験2	試験1		試験2		試験1		試験2	
	25℃	30℃	30℃	25℃	30℃	25℃	30℃	25℃	30℃	25℃	30℃
0	5.4	5.4	5.7	5.6	5.6	≥6.5	≥6.5	≥7.0	≥7.0	≥7.1	≥7.1
6	—	—	6.0	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	5.8	—	—	—	—	—	—	—	—
15	5.7	6.2	—	5.0	≤4.3	5.8	5.4	≥6.8	≥6.7	≥7.4	≥7.6
24	6.4	6.7	5.8	≤4.4	≤4.8	5.5	5.5	≥6.6	6.4	≥7.3	≥7.3
36	—	—	7.5	—	—	—	—	—	—	—	—
40	6.5	6.9	5.7	≤3.5	≤3.0	≤5.0	≤4.0	5.9	5.0	≥7.1	6.6
48	6.7	7.2	7.3	—	—	—	—	—	—	—	—

II-2. 1～2 齡人工飼料育蚕の桑葉育移行後におけるウイルス病感染抵抗性

稚蚕人工飼料育の普及に伴って違作の発生状況も従来とは異なる様相がみられるようになった。桑葉育移行直後の眠期からの核多角体病の発生、また死ごもり繭に占める核多角体病の割合の増加等である。これらは、人工飼料育導入に起因している可能性があるとして、人工飼料育蚕は桑葉育蚕よりウイルス病感染抵抗性が低いとする報告が多い。この問題点について十分な検討を加える目的で1～2 齡人工飼料育蚕の桑葉育移行後におけるウイルス病感染抵抗性を桑葉育蚕と比較した。

材料および方法

- 1) 蚕人工飼料の調製、飼育規模および飼育管理は第I章と同様に行った。
- 2) 供試蚕品種、供試ウイルス、経口接種用ウイルスおよび感染価の算出についてはII-1と同様に行った。
- 3) 3 齡起蚕におけるウイルス感受性：3 齡起蚕時点で経過が揃うように飼育した人工飼料育および桑葉育の3 齡起蚕にウイルスを接種した。
- 4) 1～2 齡人工飼料育蚕の桑葉育移行後におけるウイルス病感染抵抗性の経時的変化：桑葉育、1～2 齡人工飼料育・3 齡以降桑葉育、人工飼料育（ウイルス接種時まで人工飼料育した蚕

見)の3 齡起蚕時、3 齡飼食後6 時間および飼食後24時間経過後に病原ウイルスを接種した。

結 果

1～2 齡人工飼料育3 齡起蚕におけるウイルス病感染抵抗性：

人工飼料育蚕と桑葉育蚕のウイルス病感染抵抗性を比較した(第12表)。IFV感染抵抗性では、いずれの蚕期においても人工飼料育蚕と桑葉育蚕の間のIFV感染抵抗性に差異は認められなかった。IFV感染抵抗性は、人工飼料育蚕、桑葉育蚕ともに春蚕期が最も高く、初・晩秋蚕期にはやや低下する傾向があった。

CPV感染抵抗性は、春蚕期では人工飼料育蚕が桑葉育蚕よりCPV感染抵抗性が低く、その差異は有意であった。しかし、初・晩秋蚕期における桑葉育蚕と人工飼料育蚕のCPV感染抵抗性には差異が見られなかった。また、蚕期別のCPV感染抵抗性は人工飼料育蚕、桑葉育蚕ともに春蚕期が最も高く、初・晩秋蚕期では抵抗性が低下する傾向を示し、その変化は桑葉育蚕でより顕著であった。

NPV感染抵抗性についても、桑葉育蚕より人工飼料育蚕が低かった。また、NPV感染抵抗性は人工飼料育蚕、桑葉育蚕ともに春蚕期が最も高く、その他の蚕期では春蚕期より低くなる傾向が見られた。

1～2 齡人工飼料育蚕の桑葉育移行後におけるウイルス病感染抵抗性の経時的変化：

桑葉育蚕、1～2 齡人工飼料育・3 齡以降桑葉育

第12表 人工飼料育蚕及び桑葉育蚕の3 齡期におけるウイルス病感染抵抗性

蚕期	-log LC ₅₀ (IFV病虫希釈倍数)		log LC ₅₀ (細胞質多角体数/ml)		log LC ₅₀ (核多角体数/ml)	
	人工飼料育	桑葉育	人工飼料育	桑葉育	人工飼料育	桑葉育
春	3.7	3.6	6.1	7.3	≥7.1	≥7.8
春II	3.8	≤3.4	—	—	≥7.1	≥7.9
夏	5.5	5.4	—	—	6.9	≥7.3
初秋	5.8	5.6	5.3	5.6	6.6	7.1
初秋II	—	—	—	—	6.7	≥7.2
晩秋	6.0	5.4	5.8	6.1	6.8	7.2
晩秋II	—	—	—	—	6.7	≥7.6

蚕、人工飼料育蚕（ウイルス添食時まで人工飼料育した蚕児）の3齢起蚕時、3齢飼食後6時間および24時間経過後にウイルスを経口接種し、ウイルス病感染抵抗性の経時的变化を検討した（第3図）。桑葉育蚕、人工飼料育蚕、1～2齢人工飼料育・3齢桑葉育蚕とも春蚕期でのNPV感染抵抗性は発育に従って高くなった（第3図A）。また、それぞれの接種時期で飼料の違いによるNPV感染抵抗性の差は有意ではなかったが、常に人工飼料育蚕のNPV感染抵抗性が低くなる傾向があった。また3齢起蚕から桑葉育に切換えた場合のNPV感染抵抗性は人工飼料育蚕よりも高く、飼食後6時間で桑区とほぼ同レベルになった。初秋蚕期（第3図B）も春蚕期と同様、飼食後の発育経過時間に従いNPV感染抵抗性程抵抗性が高くなった。このように、1～2齢人工飼料育・3齢桑葉育区では齢経過時間に従って人工飼料育蚕よりもNPV抵抗性が高くなる傾向があり、24時間後には桑葉育区の値に近くなった。晩秋蚕期（第3図C）でも同様の傾向が確認され、特に、1～2齢人工飼料育・3齢桑葉育蚕では飼食後24時間後に桑葉育区と同様な $L C_{50}$ 値となった。

CPVを接種した場合、人工飼料育蚕は桑葉育蚕に比べ常に感染抵抗性が低く、春蚕期（第3図D）の6時間および24時間後、初秋蚕期（第3図E）の0時間および6時間後、晩秋蚕期（第3図F）の6時間後における差異は有意であった。これに対し、3齢起蚕から桑葉育に切換えた場合は飼食6時間後には人工飼料育蚕よりもCPV感染抵抗性が高くなり、24時間経過後は桑葉育蚕との差はほとんど認められなくなった。なお、3齢起蚕における飼食24時間後までのCPV感染抵抗性は、6時間目をピークとした山型に変化した。

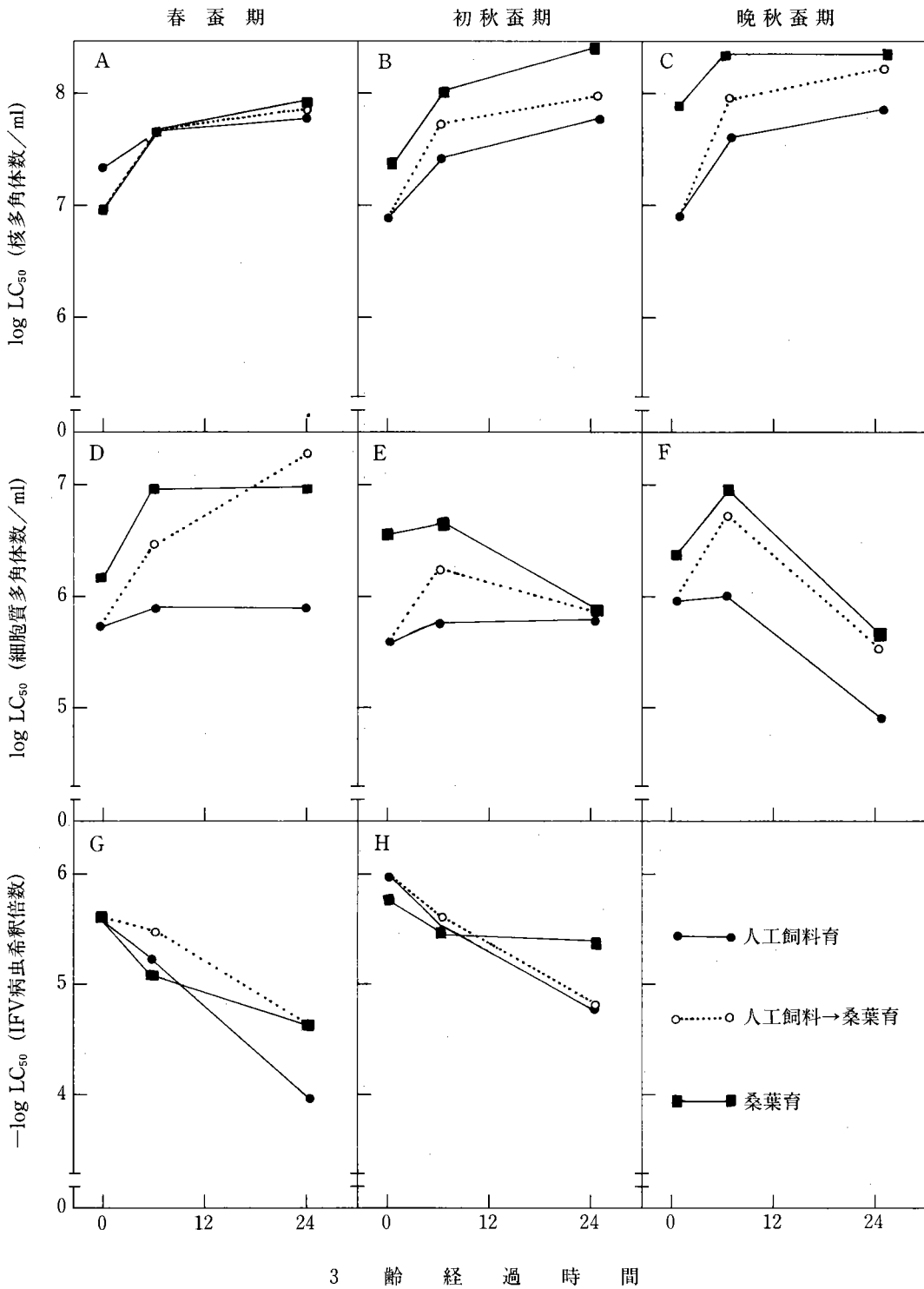
IFV感染抵抗性（第3図G, H）は、人工飼料育蚕、桑葉育蚕、1～2齢人工飼料育・3齢桑葉育蚕の間で経時的に特に目立った差異は認められなかった。しかし、齢経過に伴うIFV感染抵抗性の上昇はいずれの飼育区においても確認された。

考 察

1～2齢人工飼料育蚕の3齢起蚕時におけるCPV及びNPV感染抵抗性は、一般に各蚕期とも人工飼料育蚕が桑葉育蚕より低くなる傾向が見られた。しかし、全ての蚕期でその差は有意ではなかった。このことは、人工飼料育蚕と桑葉育蚕の多角体病抵抗性に差があるとする報告と、差が小さいかあるいは認められないとする報告にも反映されている。本研究の結果は、人工飼料育蚕のウイルス感染抵抗性が桑葉育蚕より低くなることを支持している。一方、IFV感染抵抗性の場合、人工飼料育蚕と桑葉育蚕の感染抵抗性に明らかな差異はないと判断された。また、人工飼料育蚕のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響はNPV>CPV>IFV感染抵抗性の順であるとしている宮島・鷲田（1983）の報告とも一致した。

稚蚕人工飼料育蚕の桑葉育移行後におけるウイルス病感染抵抗性の経時的变化についてもウイルスの種類による相違がみられた。NPV感染抵抗性は、桑葉育移行後の時間経過とともに上昇し、桑葉育蚕の感染抵抗性のレベルに近付いた。1～2齢人工飼料育蚕のNPV感染抵抗性が桑葉育蚕のNPV感染抵抗性と同レベルにまでなるには、3齢飼食後最低24時間程度の経過時間が必要と考えられた。この結果は、石井・中島（1978）の報告とも一致するものである。CPV感染抵抗性は、飼食6時間後に最大となった。人工飼料育蚕では桑葉育移行後の時間が経過するとともに桑葉育蚕の感染抵抗性のレベルに近付き、24時間経過後は全齢桑葉育蚕の感染抵抗性のレベルと同等となった。IFV感染抵抗性は、桑葉育移行後の時間経過とともに上昇し、その変化は全齢桑葉育蚕のウイルス感染抵抗性の経時的变化とほぼ同じパターンを示した。桑葉育移行後のウイルス感染抵抗性の経時的变化も、人工飼料育蚕と桑葉育蚕との間でほとんど差がなかった。

以上のことから、稚蚕人工飼料育蚕を3齢以降桑葉で飼育する場合、特に桑葉育移行（配蚕）直後のNPVおよびCPV感染を防止すること（初期感染の防止）が最も重要であると考えられる。



第3図 1~2 齢人工飼料育蚕の3 齢におけるウイルス病感染抵抗性の経時的変動

II-3. 1~2 齡人工飼料育蚕の桑葉育移行後における飼育条件とウイルス病感染抵抗性

稚蚕人工飼料育蚕の桑葉育移行後における飼育温度、特に中蚕期(3・4 齡)の飼育温度は、従来の桑葉育蚕の場合よりもやや高めにしたほうが、蚕児の發育や揃いあるいは作柄を良くするとされている(広瀬,1976a;真浦・横山,1978;林・荒井,1979)。一方、稚蚕人工飼料育蚕の桑葉育移行後における飼育温度が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響については不明な点が多い。そこで、桑葉育移行後における飼育温度が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響について検討した。

また、稚蚕人工飼料育蚕の桑葉育移行後における桑葉の質について検討した。葉質は蚕児の揃いに影響し、飼育成績にも影響を及ぼす(広瀬,1976b;村上ら,1979)。特に、稚蚕人工飼料育蚕の3・4 齡用桑は、従来の稚蚕桑葉育蚕の場合に比べてより軟らい桑葉を与える方が良いとされている。このように、桑葉育移行後の用桑について飼育法の面からは検討が加えられているが、病理学的側面からの研究は十分であるとはいえない(縄田・鳥浜,1979)。本研究では、桑葉育移行後の用桑別・葉位別給与および桑葉育移行後の飼育温度と用桑条件の組合わせがウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

- 1) 蚕人工飼料および人工飼料育：人工飼料の調製、飼育規模および飼育管理は第I章と同様に行った。
- 2) 供試蚕品種、供試ウイルス、経口接種用ウイルスおよび感染価の算出についてはII-1と同様に行った。
- 3) 飼育温度試験：1~2 齡人工飼料育蚕の3 齡起蚕に、IFV, CPVおよびNPVを接種した。以後、所定期間下記の設定温度で桑葉育を行った。春蚕期(一部晩々秋蚕期)では低温(17℃)に6時間、中・高温(25℃, 33℃)に18時間接触させるといふ変温飼育を、その他の蚕期では高温(30-33℃)、自然温度(室温：24-29℃)、中間温度(25℃)、および低温(22℃)の恒温度飼育を行った。また低温の影響をみるために、1~2 齡人工飼料育蚕と桑葉育蚕の3 齡起蚕にIFV, CPV及びNPVを接種した後、5℃に24時間接触させ、その後桑葉育したものを添食一冷蔵区、また、3 齡起蚕で5℃に24時間接触後、ウイルス接種したものを冷蔵一添食区とした。
- 4) 用桑別・葉位別給与試験：各蚕期の稚蚕用桑上位葉にウイルスを塗布して24時間食下させ、その後下記の桑で所定期間飼育した。
 - ア. 春蚕期
 - ア) 稚蚕専用桑(前年摘梢分枝, 初秋伐採)
 - 上位葉：全芽の最大光葉から下へ約30cm
 - 中位葉：古条部位の先端から下へ約30cm (主として出開葉)
 - 下位葉：株元から上へ約30cm (主として矮小枝)
 - イ) 壯蚕専用桑(前年夏刈, 晩秋中間伐採)
 - 上位葉：全芽の最大光葉から下へ約30cm
 - 中位葉：古条部位の先端から下へ約30cm (主として出開葉)
 - 下位葉：株元から上へ約30cm (主として矮小枝)
 - ウ. 初秋蚕期
 - ア) 稚蚕専用桑(春刈, 6月摘梢分枝)
 - 上位葉：分枝条の最大光葉から下へ約30cm
 - 中位葉：摘梢部位から下へ約30cm (非常に硬化)
 - 下位葉：株元から上へ約30cm (非常に硬化)
 - イ) 壯蚕専用桑(60cm残条夏刈)
 - 上位葉：新梢の最大光葉から下へ約30cm
 - 中位葉：上位葉から更に下へ約30cm。ただし、新梢着生葉に限る
 - 下位葉：株元から上へ約30cm (主として出開葉, 矮小枝)
 - ウ. 晩秋蚕期
 - ア) 稚蚕専用桑(夏刈, 7月摘梢分枝)
 - 上位葉：分枝条の最大光葉から下へ約30cm
 - 中位葉：上位葉から更に下へ約30cm。ただし、新梢着生葉に限る(少し硬化)
 - 下位葉：摘梢部位から下の着生葉(非常に

硬化)

イ) 壯蚕専用桑 (根刈・夏刈)

上位葉: 夏刈後伸長条 (約2.2-2.3m) の最大光葉から下へ約30cm

中位葉: 夏刈後伸長条 (約2.2-2.3m) の中間部位の約30cm (硬化)

下位葉: 株元から上へ約30cm (非常に硬化)

5) 用桑と温度の組合わせ試験: 3 齡起蚕にウイルス接種後, 下記の設定温度及び用桑条件で飼育した。試験区としては, 高温飼育・軟葉給与 (高温-軟葉), 高温飼育・硬葉給与 (高温-硬葉), 自然温度飼育・適葉給与 (自然-適葉), 中間温度飼育・適葉給与 (中温-適葉) 低温飼育・軟葉給与 (低温-軟葉), 低温飼育・硬葉給与 (低温-硬葉) の6区を設け, 春, 初秋及び晩秋の3蚕期に試験した。なお, 飼育温度条件として, 高温飼育は30-33°Cに, 中間温度飼育は25°Cに, 低温飼育は春17°C, 初・晩秋21°Cに設定した。用桑条件としては, 春蚕期の場合, 稚蚕用桑の全芽の最頂端から下へ約20cmを軟

葉とし, 同じ桑の樹高の中間部位約30cmを適葉, 株元から上へ約30cmを硬葉とした。初・晩秋蚕期では, 摘梢分枝した後の分枝条の最頂端から最大光葉までを軟葉とし, 最大光葉から下約30cmを適葉, 株元から上へ約30cmを硬葉とした。

結 果

桑葉移行後の飼育温度とウイルス病感染抵抗性: 桑葉移行後の飼育温度とウイルス病感染抵抗性の関係を調査した (第13表)。IFV感染抵抗性は春, 初秋および晩秋の各蚕期において, 各飼育温度間で大きな差が認められなかった。夏蚕期においては自然温度区が高温区及び低温区よりもIFV感染抵抗性が高かった。

CPV感染抵抗性については, 春蚕期では17~33°C区が25°C区および17~25°C区より明らかに感染抵抗性が大きであった。初秋蚕期では, 33°Cの恒温飼育区が他の区よりもCPV感染抵抗性が高かった。晩々秋蚕期においても, 17~33°C区が他区より高い

第13表 桑葉移行後の飼育温度がウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響

ウイルス	飼育温度	春蚕期	夏蚕期	初秋蚕期	晩秋蚕期	晩々秋蚕期
IFV	33°C	—	6.8*	6.7	—	6.8
	17-33°C	5.0	—	—	—	—
	自然温度(24-29°C)	—	6.1	6.7	—	6.7
	25°C	4.9	6.9	6.8	—	6.8
	22°C	—	6.4	—	—	—
	17-25°C	5.1	—	—	—	—
CPV	33°C	—	—	≥8.5**	—	—
	17-33°C	≥7.2	—	—	≥7.4	—
	自然温度(23-27°C)	—	—	6.4	—	—
	25°C	6.0	—	6.3	6.1	—
	22°C	—	—	6.5	—	—
	17-25°C	5.8	—	—	6.3	—
NPV	30-33°C	—	—	6.8***	—	—
	17-30°C	7.0	—	—	6.6	—
	自然温度(23-27°C)	—	—	6.9	—	—
	25°C	6.0	—	7.1	6.5	—
	20°C	—	—	6.9	—	—
	17-25°C	5.8	—	—	6.4	—

* —log LC₅₀ (IFV病虫希釈倍数) ** log LC₅₀ (細胞質多角体数/ml)

*** log LC₅₀ (核多角体数/ml)

感染抵抗性を示し、32°C以上の高温飼育では高温によるCPVの増殖阻止作用が見られた。一方、23~27°C程度の自然温度や、25°Cの中間温度あるいは17~22°C程度の低温はいずれもCPV感染抵抗性に及ぼす影響は小さかった。NPVに対しては、春、初秋及び晩秋の各蚕期において、各飼育温度間でNPV感染抵抗性に差は認められなかった。

次に、1~2齢人工飼料育および桑葉育の3齢起蚕時における低温(5°C)接触が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響について検討した(第14表)。IFVの場合は処理によってIFV感染抵抗性に変化が認められなかった。CPVについても、春蚕期の場合人工飼料育蚕では、添食-冷蔵区及び冷蔵-添食区とも添食-無処理区に比べてCPV感染抵抗性に差が認められなかった。桑葉育蚕では添食-冷蔵区及び冷蔵-添食区とも添食-無処理区に比べてCPV感染抵抗性が明らかに低く、特に冷蔵-添食区のCPV感染抵抗性の低下が大であった。初秋蚕期の場合人工飼料育蚕では、添食-冷蔵区及び冷蔵-添食区とも添食-無処理区より抵抗性が低下した。桑葉育蚕では添食-冷蔵と添食-無処理区との間でCPV感染抵抗性に差は認められなかったが、冷蔵-添食区は添食-無処理区よりCPV感染抵抗性が低下していた。

NPVについては、春蚕期の場合人工飼料育蚕及び桑葉育蚕ともに添食-無処理区より添食-冷蔵区のNPV感染抵抗性は大きく低下しなかった。しか

し、冷蔵-添食区のNPV感染抵抗性は有意に低下した。初秋蚕期では、添食-無処理区に比較して人工飼料育蚕の添食-冷蔵区及び桑葉育蚕の添食-冷蔵区、冷蔵-添食区のNPV感染抵抗性は大きく変化しなかった。一方、人工飼料育蚕の冷蔵-添食区のNPV感染抵抗性は明らかに低下した。晩秋蚕期では、添食-無処理区に比較して人工飼料育蚕および桑葉育蚕ともに冷蔵-添食区のNPV感染抵抗性が著しく低下した。

桑葉育移行後の用桑別・葉位別給与がウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響:

桑葉育移行後に用桑別・葉位別の給与を行ってウイルス病感染抵抗性を調査した(第15表)。IFVの場合は、春および初秋蚕期では用桑の種類(稚蚕専用桑, 壯蚕専用桑)あるいは採取部位別(上位葉, 中位葉, 下位葉)給与によってIFV感染抵抗性への影響は認められなかった。晩秋蚕期では壯蚕専用桑の採取部位によるIFV感染抵抗性への影響はなかったが、稚蚕専用桑では上位葉及び中位葉が下位葉に比べIFV感染抵抗性が(有意な差とはならないものの)高くなる傾向が見られた。また、各蚕期間で比較すると春蚕期が初秋および晩秋蚕期に比べ有意にIFV感染抵抗性が高く、初秋蚕期と晩秋蚕期では初秋蚕期にIFV感染抵抗性が低下していた。CPVおよびNPVの場合は、各蚕期とも用桑・葉位の違いによって、これらを給与した蚕のCPVおよびNPV感染抵抗性に差は認められなかった。

第14表 3齢起蚕での低温接触が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響

区	-log LC ₅₀ (IFV病虫希釈倍数)		log LC ₅₀ (細胞質多角体数/ml)			
	晩秋蚕期		春蚕期		初秋蚕期	
	桑葉育	人工飼料育	桑葉育	人工飼料育	桑葉育	人工飼料育
添食-冷蔵	5.9	5.4	5.3	5.7	5.5	5.5
冷蔵-添食	5.8	5.6	4.8	6.0	3.6	5.5
添食-無処理	6.0	5.8	6.1	5.9	5.7	6.3

区	log LC ₅₀ (核多角体数/ml)					
	春蚕期		初秋蚕期		晩秋蚕期	
	桑葉育	人工飼料育	桑葉育	人工飼料育	桑葉育	人工飼料育
添食-冷蔵	≥7.7	≥6.9	≥6.9	≥6.4	≥7.3	≥6.3
冷蔵-添食	≥6.8	≥6.2	≥6.8	5.7	5.9	5.7
添食-無処理	≥7.9	≥7.1	≥6.9	≥6.9	≥7.6	≥6.7

第15表 桑葉育移行後の用桑別・葉位別給与が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響

区	-log LC ₅₀ (IFV病虫希釈倍数)			log LC ₅₀ (細胞質多角体数/ml)			log LC ₅₀ (核多角体数/ml)		
	春蚕期	初秋蚕期	晩秋蚕期	春蚕期	初秋蚕期	晩々秋蚕期	春蚕期	初秋蚕期	晩秋蚕期
稚蚕専用桑									
上位葉	5.0	7.1	6.2	6.3	6.2	6.2	≥7.1	≥7.0	6.4
中位葉	4.7	7.3	6.1	6.1	6.1	6.0	≥6.7	6.8	6.7
下位葉	4.9	6.9	6.9	6.4	6.0	6.4	≥7.0	6.6	6.4
壯蚕専用桑									
上位葉	4.6	7.2	6.4	6.6	6.1	5.8	≥7.1	7.0	6.7
中位葉	4.5	6.9	6.6	6.3	6.3	6.2	≥7.1	6.9	6.3
下位葉	4.9	7.3	6.7	6.3	6.4	6.1	7.0	≥7.1	6.8

第16表 桑葉育移行後の飼育温度および用桑条件が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響

区	-log LC ₅₀ (IFV病虫希釈倍率)			log LC ₅₀ (細胞質多角体数/ml)			log LC ₅₀ (核多角体数/ml)		
	春蚕期	初秋蚕期	晩秋蚕期	春蚕期	初秋蚕期	晩秋蚕期	春蚕期	初秋蚕期	晩秋蚕期
高温-軟葉	5.7	6.5	6.3	≥6.4	5.3	≥6.9	6.7	6.0	6.5
高温-硬葉	5.1	6.1	5.6	≥6.0	5.7	≥6.4	6.7	5.9	6.5
自然-適葉	4.9	5.2	4.6	≥6.5	5.2	≥6.3	6.8	6.2	6.7
中温-適葉	4.7	4.9	4.7	≥6.4	5.5	≥5.9	6.6	5.9	6.6
低温-軟葉	—	5.0	4.7	—	5.0	≥6.4	7.1	6.3	6.7
低温-硬葉	—	5.8	4.6	—	5.2	≥6.4	6.9	6.3	6.7

桑葉育移行後の飼育温度および用桑がウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響：

人工飼料育蚕の桑葉育移行後の飼育温度および用桑条件の組合わせが蚕児のウイルス抵抗性に及ぼす影響について調査した(第16表)。IFV感染抵抗性は、飼育温度および用桑条件の違いによって抵抗性に影響を受け、春蚕期では高温-軟葉区、初秋蚕期では高温-軟葉区、高温-硬葉区および低温-硬葉区、晩秋蚕期では高温-軟葉区および高温-硬葉区のIFV感染抵抗性が劣った。CPV感染抵抗性は、春蚕期および初秋蚕期では、各区間に有意な差は認められなかった。晩秋蚕期では、高温区でCPV感染阻害による影響が強く、正確な判定が困難であった。NPV感染抵抗性は、春、初秋および晩秋の各蚕期とも各区間に有意差は見られなかった。

考 察

桑葉育移行後の飼育温度が蚕のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響は、本試験における飼育温度条件では、IFVおよびCPV感染抵抗性を低下しなかつ

た。また、NPV抵抗性への影響もほとんど認められず、温度要因単独で蚕児のウイルス病感染抵抗性が低下することはないと判断された。

無菌育蚕を5齡起蚕時に低温処理で発生するウイルス病は、低温処理前つまり4眠までに発病しない程度食下したウイルスの潜在感染に起因する(松原, 1965, 1967a, 1973; Himeno *et al.*, 1973)。また、低温処理直後から36時間以内に、通常発病しない程度の微量のウイルスを食下した結果感染する(松原, 1967b, 1968, 1973; 倉田, 1967)。本試験の結果、1~2齡人工飼料育蚕または桑葉育した3齡起蚕を低温接触させると、NPVおよびCPV抵抗性が低下することが明らかとなった。特に、餉食前の低温接触は影響が著しかった。倉田(1967)は無菌飼育した5齡起蚕では、ウイルス接種前の冷蔵処理の影響が大きいとしており、配蚕直後の低温接触には十分な注意が必要である。一方、本研究では、IFV感染抵抗性についてはほとんど低温接触は影響しないものと推察された。この原因については明らかではないが、ウイルス感染と宿主側の要因を解明する上で新たな問題を提起していると考えられることができる。

人工飼料育蚕の桑葉育移行後の用桑別・葉位別給与が蚕のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響については、IFV感染抵抗性の場合には一部蚕期において桑葉の着生部位によってIFV感染抵抗性に影響する可能性は否定できない。しかし、いずれの蚕期においても用桑別・葉位別給与がIFV感染抵抗性を大きく低下させる方向に作用することはなかった。一方、CPVおよびNPV感染抵抗性の場合も、用桑別・葉位別給与によって感染抵抗性は影響を受けず、通常に給与される桑の範囲内では、用桑条件単独でウイルス病感染抵抗性を低下させる要因にはなりえないと考えられた。これに関連して、桑葉育移行後を嫩葉を含む未熟葉の連続給与を行った場合にも、各蚕期とも蚕児のCPVおよびNPV感染抵抗性に対する影響は認められなかった。従来の桑葉育蚕では、未成熟な軟葉の連続給与が蚕児のCPV感染抵抗性を低下させるとされている(蛸原, 1966, 1970; 田中・清水, 1968)。しかし、本研究では人工飼料育蚕に対する軟葉の連続給与はCPVおよびNPV感染抵抗性に大きな影響を与えないと考えられた。

以上のように、1～2齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後の飼育温度条件または用桑条件はいずれも単独では蚕児のウイルス病感染抵抗性に強く影響を与える要因にならなかった。また、各種の飼育温度と用桑条件を組合せた場合にも同様にCPVおよびNPV感染抵抗性に及ぼす影響は小であった。一方、IFV感染抵抗性については影響が認められ、春蚕期では高温飼育と軟葉給与が重なった場合、また、夏秋蚕期では高温飼育と軟葉給与あるいは硬葉給与が重なった場合に影響が著しかった。これは、飼料と環境の複合条件がIFV感染抵抗性に影響を与える要因となり得ることを示すものである。

第III章

1～3齢人工飼料育蚕のウイルス病感染抵抗性

III-1. 1～3齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後における飼育条件と核多角体病発生との関係

第II章において、1～2齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後および3齢期以降の飼育条件が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響について検討し、低温

や起蚕絶食等いくつかの飼育条件がウイルス病の発生を助長する可能性を明らかにした。ここではさらに人工飼料育期間の長い1～3齢人工飼料育蚕について、4齢期における飼育条件がNPV感染抵抗性に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

- 1) 人工飼料の調製、飼育規模および飼育管理は第I章と同様である。なお、3齢期には2齢と同じ調製による人工飼料を用いて、1～3齢人工飼料育を行った。
- 2) 供試蚕品種については、II-1と同様の品種を用いた。
- 3) 供試ウイルスとしては、NPVを用い、NPV多角体の調製はII-1と同様に行った。
- 4) 感染価の算定：多角体を階段希釈し、各希釈を1頭当り10 μ lずつ所定数の蚕幼虫にマイクロディスペンサー(ドラモンド社製)を用い、ガラス毛细管で経口接種した。以後桑葉育とし、所定期間観察した。飼育温度は室温とした。死亡虫は鏡検して多角体の有無を確認し、50%感染価(LD₅₀)をReed and Muench (1938)法で算定した。
- 5) ウイルス接種後の飼育条件とNPV感染抵抗性試験：1～3齢人工飼料育の4齢起蚕に病原を接種し、以後の飼育条件として密閉飼育、多窒素桑給与、光線照射を考慮した。
- 6) ウイルス接種前の飼育条件とNPV感染抵抗性試験：1～3齢人工飼料育の4齢期の蚕幼虫に対して、密閉飼育、多湿育及び乾燥育、多窒素桑給与、高温育、光線照射を行い、5齢起蚕でNPVを接種した。
- 7) ウイルス接種前後の飼育条件とNPV感染抵抗性試験：1～3齢人工飼料育の4齢起蚕あるいは5齢起蚕へのNPV接種前後に低温処理(5℃, 24時間)を行った。

結 果

NPV接種後の飼育条件とNPV感染抵抗性：

密閉条件(ポリプロピレン製密閉容器；縦27cm×横20cm×高さ10cm)下で飼育した場合のNPV感染抵抗性への影響について検討した(第17表)。

開放育区 (対照) の炭酸ガス濃度0.05-0.15%に対し、密閉容器内では $\geq 1.75\%$ と極めて高くなったが、このような飼育条件下であってもNPV感染抵抗性には差が見られなかった。

多窒素桑給与の影響については、1/2,000 aポット仕立の桑を用い、窒素量が10 a 当り50kgの多窒素区、30kgの標準区と無肥料区を設定しNPV接種後の4齢期間に各区の桑葉を連続給与した場合のNPV感染抵抗性を比較した (第18表)。桑葉中の窒素量は多窒素区、標準区、無肥料区の間で明らかな差がみられ、多窒素区の桑葉給与蚕ではNPV感染抵抗性が低下した。

第17表 NPV接種後の密閉飼育がNPV感染抵抗性に及ぼす影響

蚕期	区	CO ₂ 濃度	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)
春	密閉	$\geq 1.75\%$	6.8
	開放	0.05-0.095	6.9
初秋	密閉	$\geq 2.6\%$	4.4
	開放	0.08-0.15	4.0
晩秋	密閉	—	4.0
	開放	—	3.8

第18表 NPV接種後の多窒素桑給与がNPV感染抵抗性に及ぼす影響

区	窒素量	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)
多窒素	3.8%	3.4
標準	3.2	4.3
無肥料	2.3	4.1

第19表 NPV接種後の光線照射がNPV感染抵抗性に及ぼす影響

区	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)
D	4.0
8 L・16D	4.0
L	4.1

飼育中の光線照射を変えてNPV感染抵抗性を調査した (第19表) が、全暗 (D)、8時間明・16時間暗区 (8 L・16D:明から開始) および全明区 (L) 間に差は認められなかった。

病原接種前の飼育条件とNPV感染抵抗性試験:

病原接種前の飼育湿度を多湿育区 (蚕座周囲を補湿紙で囲み、防乾紙で被覆)、半乾燥育区、乾燥育区 (無被覆) とした。本条件下で4齢期間を飼育し、5齢起蚕時にNPVを経口接種した。なお、給桑2時間後の蚕座上の湿度を測定したところ、蚕室内が25°C、63%RHの状態が多湿区は96%RH以上の飽和状態、半乾燥育区は93%RH、乾燥育区は83%RHであった。乾燥育区ではNPV感染抵抗性が低下する傾向が見られたが、有意差とはならなかった (第20表)。

第20表 NPV接種前 (4齢期) の飼育湿度がNPV感染抵抗性に及ぼす影響

区	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)	
	初秋	晩秋
乾燥育	5.2	5.6
半防乾紙育	5.6	5.9
多湿育	5.6	5.8

多窒素桑給与の影響を調査する目的で、春および初秋蚕期に、2年間の窒素施用量が10 a 当り50kgとした圃場の桑葉を用いた。しかし、葉中の窒素量は対照区3.80%、多窒素区3.75%で差は認められなかった。そこで、晩秋蚕期では桑葉に尿素2%溶液を給与開始20日前および10日前の2回散布して多窒素桑区とした。なお、その場合の窒素量は対照区3.19%に対し多窒素桑区3.91%であった。これらの桑を用いて4齢期間を飼育し、5齢起蚕でNPV感染抵抗性を調査した結果 (第21表)、葉中の窒素量に差のなかった春および初秋蚕期では、NPV感染抵抗性の差異も見られなかった。一方、尿素散布した多窒素桑給与区では晩秋蚕期にNPV感染抵抗性がわずかに低下する傾向がみられたが、有意な差にはならなかった。4齢期を密閉状態で飼育し、5齢起蚕にNPVを経口接種したところ、NPV接種後に密閉飼育した場合は異なり、密閉飼育によってNPV感染抵抗性が低下した (第22表)。

第21表 NPV接種前（4 齢期）の多窒素桑給与が 5 齢蚕のNPV感染抵抗性に及ぼす影響

区	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)		
	春蚕期	初秋蚕期	晩秋蚕
多窒素桑	6.4	≥6.6	5.4
対 照	6.6	≥6.6	≥5.8

第23表 NPV接種前（4 齢期）の光線照射が 5 齢蚕のNPV感染抵抗性に及ぼす影響

区	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)		
	春蚕期	初秋蚕期	晩秋蚕期
D	≥6.6	6.6	≥6.4
L	≥7.1	6.4	≥6.5

第22表 NPV接種前（4 齢期）の密閉飼育がNPV感染抵抗性に及ぼす影響

蚕 区 期	CO ₂ 濃度	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)	
		春 密 閉	開 放
春	2.6-5.8%	≤3.6	
	0.05-0.1	4.9	
初	1.8-4.8%	4.1	
	0.05-0.1	5.7	
晩	4.0-5.2%	5.3	
	0.15	6.0	

第24表 NPV接種前（4 齢期）における高温飼育が 5 齢起蚕のNPV感染抵抗性に及ぼす影響

区	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)	
	初秋蚕期	晩秋蚕期
27°C	5.5	≥6.2
33°C	5.3	≥6.3

4 齢期を予め全暗 (D) 及び全明 (L) 条件で飼育し、5 齢起蚕のNPV感染抵抗性を比較した結果 (第23表), 日長条件によるNPV感染抵抗性への影響は認められなかった。

4 齢期において高温飼育 (33°C) と27°C飼育を行うと、高温飼育によって4 齢期の発育経過が不良となったが、5 齢起蚕でのNPV感染抵抗性は影響を受けなかった (第24表)。

NPV接種前後の飼育条件とNPV感染抵抗性試験:

4 齢起蚕および5 齢起蚕をNPV接種前後に低温処理 (5°C, 24時間処理) した場合のNPV感染抵抗性を第25表に示す。低温処理を行うことによりNPV感染抵抗性が著しく低下した。特に、NPV接種前の低温処理の影響が大きかった。また、4 齢起蚕および5 齢起蚕での低温処理によるNPV感染抵抗性の低下は、II-3で行った3 齢起蚕での処理に比較して明らかに影響がより大きく、5 齢起蚕での低温処理が3~5 齢期間を通してNPV感染抵抗性に最も著しい影響をもたらした。

第25表 4 齢起蚕および5 齢起蚕での低温処理がNPV感染抵抗性に及ぼす影響

区	4 齢起蚕		5 齢起蚕	
	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)		log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)	
	春蚕期	晩秋蚕期	試験1	試験2
冷蔵—接種	≤0.9	≤1.0	≤1.0	≤1.5
接種—冷蔵	≤1.9	≤2.0	≤0.7	≤1.0
接種—無処理	3.5	4.3	5.9	6.0

考 察

広瀬・吉田 (1979) および塚田・栗原 (1980) は人工飼料育中の炭酸ガス濃度が蚕児のNPV感染抵抗性に影響のあることを報告している。従来から密閉多湿環境あるいは座蒸れ状態はNPVの発生を助長するとされていたが、今回の試験結果からNPV接種後の密閉飼育は蚕児のNPV感染抵抗性に影響しないものと判断される。しかし、NPV接種前の密閉飼育は蚕児のNPV感染抵抗性に影響があった。同じ飼育条件であってもNPV接種前後でその影響が異なる結果となる場合のあることが示唆された。

人工飼料育中の光線照射はNPV感染抵抗性に影響があるとする報告 (林屋ら, 1976; 鷺田・宮島, 1979; 渡部・高宮, 1976) と、ほとんどないとする報告 (石井・中島, 1978; 清水・川上, 1984) がある。今回の結果からは、桑葉移行後の日長条件はNPV感染抵抗性にほとんど影響しないか、あっても極めて小さいといえる。

また、NPV接種前後の多窒素桑給与は明らかにNPV感染抵抗性に影響を与えた。NPV予防対策の一つとして、多窒素桑の栽培および給与は避けるべきである。

以上のような飼育条件では、NPV感染抵抗性を低下させる場合と、さほど影響しない場合があった。一方、低温処理は常に蚕のNPV感染抵抗性に著しい影響を与えた。特に、NPV接種前の低温接触の影響は大きい (石森, 1951; 倉田, 1967)。本研究では、1~2 齢人工飼料育 3 齢起蚕および 1~3 齢人工飼料育 4 齢起蚕および 5 齢起蚕への低温処理がNPV感染抵抗性を低下させることが確認された。人工飼料育では桑葉移行後における温度に特に留意すべきであると考えられる。

III-2. 1~3 齢人工飼料育蚕に対するNPVの接種時期および接種回数と発病との関係

人工飼料育とウイルス病発生との関係をさらに明らかにするため、1~3 齢人工飼料育蚕を用いて、1) 発育時期別のウイルス接種時期と発病時期および感染抵抗性との関係、2) 雌雄別感染抵抗性の比較、3) ウイルス食下時間および接種回数と感染価との関係、4) 3 齢期におけるウイルス接種時期の組合わせ

と感染抵抗性との関係について追及した。

材料および方法

- 1) 人工飼料の調製, 飼育規模および飼育管理は第 I 章および III-1 と同様である。
- 2) 供試蚕品種については、II-1 と同様の品種を用いた。
- 3) 供試ウイルスとしては、NPV を用い、NPV 多角体の調製は II-1 と同様に行った。
- 4) 感染価の算定: 核多角体浮遊液を階段希釈し、各希釈液を人工飼料面上に 0.2ml (1 齢期) ~ 0.4ml (3 齢期) 滴下し、十分液がしみこんだ後所定時間食下させた (以下添食法)。また、III-1 と同様の方法 (直接経口接種法) で蚕幼虫に接種した。飼育温度は室温とした。死亡虫は鏡検して多角体の有無を確認し、50% 感染価 (LC_{50} および LD_{50}) を Reed and Muench (1938) 法で算定した。
- 5) 発育時期別の NPV 感染抵抗性の変動および死亡時期試験: 1~3 齢期では添食法で病原接種し、その後各区とも 4 齢起蚕まで人工飼料育、4 齢起蚕からは桑葉育とした。4・5 齢期は、直接経口接種法により核多角体を接種した。なお、5 齢期接種では上簇後 8 日目までの感染蚕を観察した。
また、核多角体接種時期と死亡時期との関係についても調査した。
さらに、1~5 齢の感染抵抗性の齢経過に伴う変動を明らかにするため、同一母集団から蚕を抽出して供試し、3 齢期に添食法および直接経口接種法を平行して試験を行った。
また、接種時期別の感染蚕数と死亡時期をみる目的で 1~3 人工飼料育蚕 5 齢起蚕の雌雄鑑別を行い、5 齢起蚕から 5 齢 4 日後までの期間に、この集団から任意に蚕児を抽出して供試した。核多角体の接種は、直接経口接種法により行った。NPV 接種後は 20 頭の混合育、あるいは直径 11cm、高さ 6cm のスチレン製容器で 1 頭育を行い、上簇 8 日後までの感染蚕数と斃死までの期間について 1 日 1 回観察した。
- 6) NPV 食下時間と感染価: 1~3 齢の蚕児を用い、各齢起から 1 濃度区 20 頭ずつ、24 時間単位で 1 日~3 日間添食法により核多角体接種を

行った。さらに、3齢期における添食時期の組み合わせが感染価に及ぼす影響について調べた。

- 7) NPV接種回数と感染価：1～3齢人工飼料育蚕の4齢起蚕、5齢起蚕および5齢4日後の蚕児に直接経口接種法により24時間間隔で1～4回核多角体を接種した。1頭当たり1回の接種量は $10\mu\ell$ とした。NPV接種後、4齢接種区では8日後まで、5齢接種区では上簇8日後まで感染蚕数を調査した。

結 果

発育時期別のNPV感染抵抗性の変動および死亡時期試験：

発育時期別NPV感染抵抗性の変動は1齢では、春蚕期（第4図A）、初秋蚕期（第4図B）ともに掃立日（1日）に比べ2日で著しくNPV感染抵抗性が高く、3日にやや低下するという山型変化をたどった。2齢では、春（第4図C）および晩秋蚕期（第4図E）は起蚕と2齢2日のみの調査であるが、いずれの蚕期も2日後にNPV感染抵抗性が高かった。初秋蚕期（第4図D）では1齢期と同様な山型を示した。1齢期に比べ2齢期のNPV感染抵抗性の上昇が明らかである。3齢期でも（第4図F、G、H）1・2齢期とほぼ同様に、2日後にNPV感染抵抗性が上昇し、3日後にやや低下した。4齢期の初秋（第5図B）・晩秋蚕期（第5図C）の結果は、1～3齢期の場合と良く一致していた。NPV感染抵抗性は齢起に低く、その後発育経過の進行に従ってNPV感染抵抗性が上昇し、齢の後半にやや低下するというパターンである。ただし、春蚕期（第5図A）では齢中でのNPV感染抵抗性の低下は認められなかった。5齢期の場合は1～4齢期に比べNPV感染抵抗性は著しく異なっていた。すなわち、春蚕期（第5図D）では2、5および7日後にNPV感染抵抗性が低下し3日から4日後にかけておよび6日後にNPV感染抵抗性が上昇した。初秋蚕期（第5図E）では2、5日および7日後にNPV感染抵抗性が低下し、3日と6日後にNPV感染抵抗性が上昇した。また、晩秋蚕期（第5図F）では、春・初秋蚕期とはやや傾向が異なり、5齢2日、7日後に低下し、5齢3日から4日後にかけてNPV感染抵抗性が上昇した。

本試験では1～3齢のNPV感染抵抗性を添食法

（ LC_{50} ）で、4～5齢を直接経口接種法（ LD_{50} ）での比較した。そこで、 LC_{50} 値と LD_{50} 値の対応を明らかにする目的で、同一母集団から材料蚕を抽出して供試し、3齢期に添食法と直接経口接種法によるNPV感染抵抗性の検定を行い、各齢の発育時期別NPV感染抵抗性を検討した（第6図）。これまでの結果と同様、1齢から4齢にかけては山型変化を繰返し（第6図A～D）、5齢（第6図E）では複雑な変化を示した。また、各齢眠前の値と翌齢起蚕の値がほぼ同様の値であった。3齢期における添食法および直接経口接種法によって齢中のNPV感染抵抗性の変動を検定した結果、添食法（ LC_{50} ）および直接経口接種法（ LD_{50} ）の対応関係は良好であった。

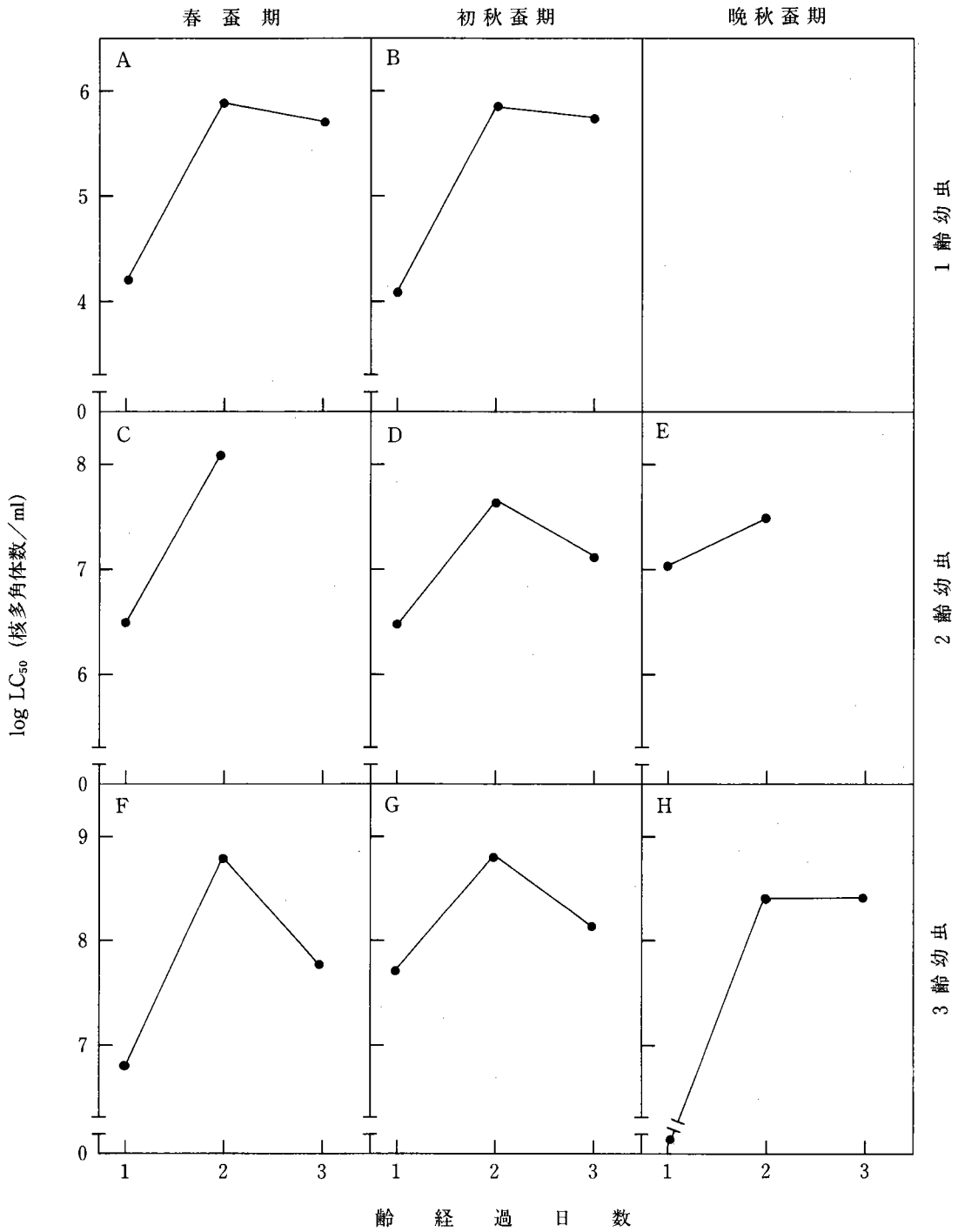
1～5齢発育時期別NPV感染抵抗性の変動と同時にNPV接種時期と死亡時期との関係について検討した（第26表）。1～3齢蚕では、齢の初めに感染した場合はその齢の眠中に死亡し、齢の中期以降に感染した場合には次齢の眠中に斃死するケースが多かった。4齢蚕についてはNPV接種は4日後で死亡し、5齢蚕期では5齢3日までに感染した場合は上簇前に死亡し、5齢4日以降の感染では上簇中に、5齢6日以降の感染では営繭後に死亡した。

次に、5齢前期のNPV接種の時期および濃度と死亡時期について検討した（第27表）。5齢蚕の雌雄間にNPV感染抵抗性の差は検出されず、接種時期が5齢後期になるほど死亡時期が短縮される傾向がみられた。

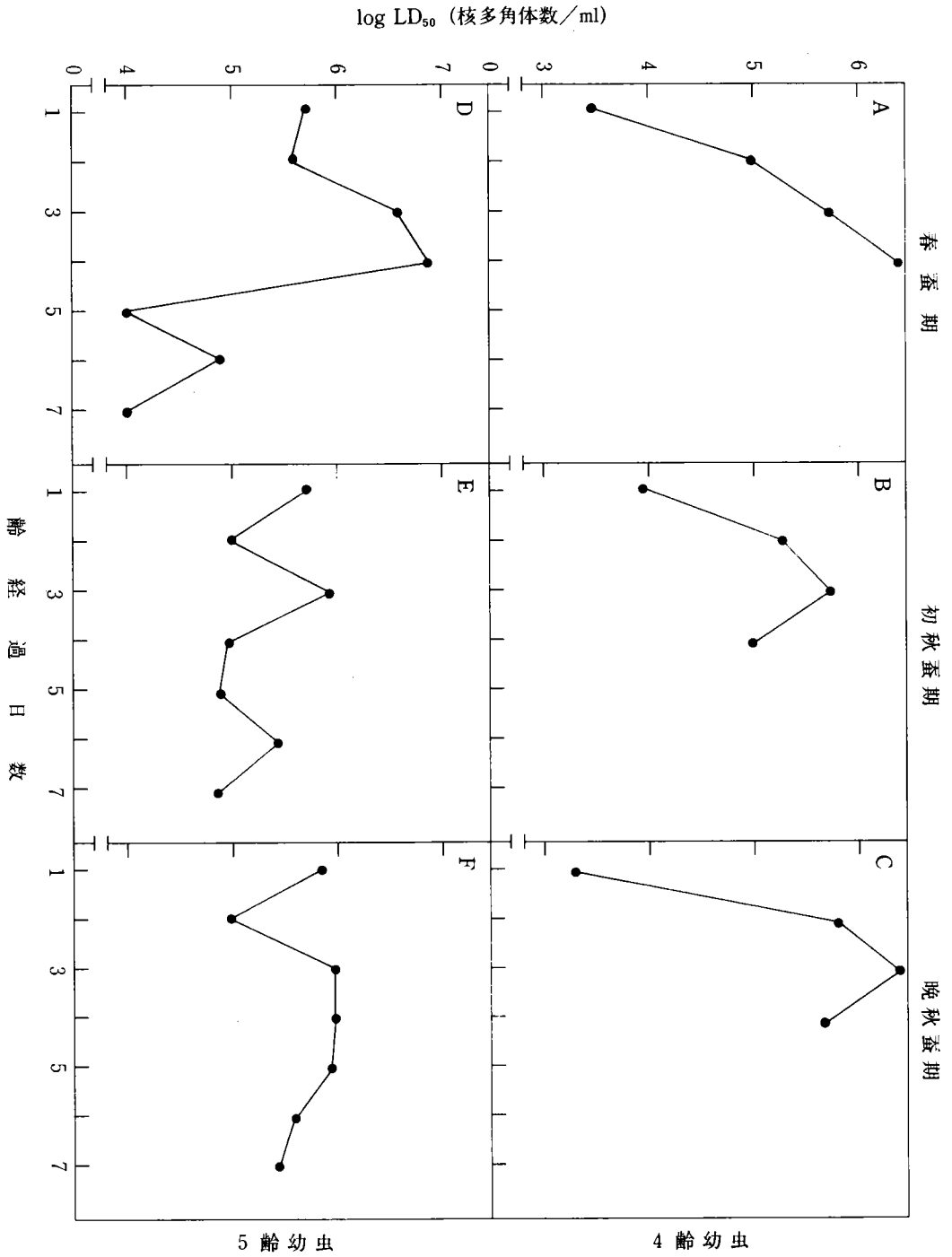
NPV食下時間と感染価：

1～3齢期における24時間単位のウイルス食下時間が感染価に及ぼす影響を調べた（第7図A～F）。1～3齢期のいずれの齢期においても24時間から72時間の範囲におけるウイルス食下時間の差は感染価に影響しなかった。

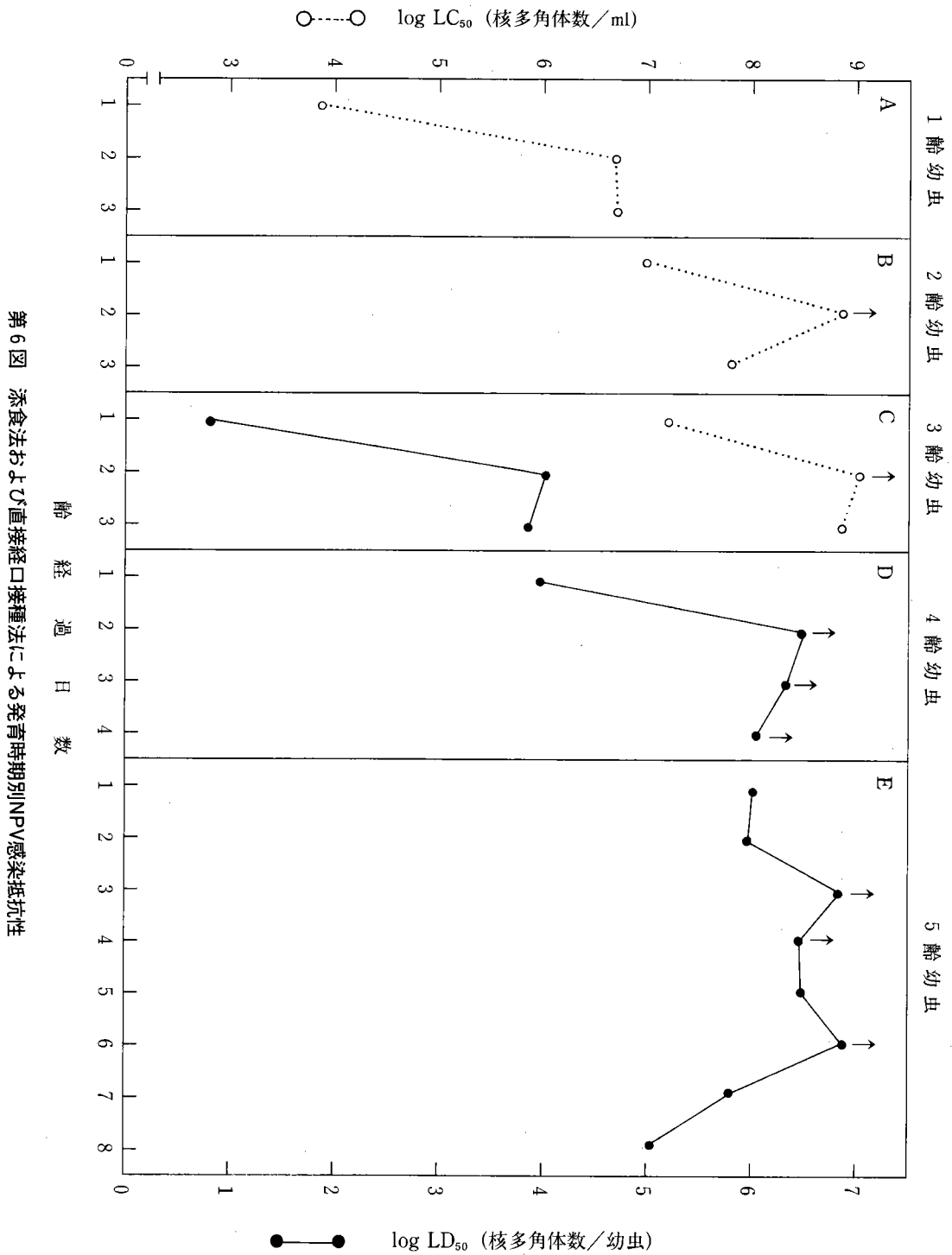
さらに、3齢期における添食時期の組み合わせと感染価の関係についても検討した（第28表）、3齢期に添食法で接種した場合、春蚕期ではd区とg区のNPV感染抵抗性が低下していた。晩秋蚕期でもd区とg区のNPV感染抵抗性の低下が見られた。



第4図 人工飼料育蚕の发育時期別NPV感染抵抗性の変動



第 5 図 1 ~ 3 齢人工飼料育蚕の発育時期別NPV感染抵抗性の変動



第6図 添食法および直接経口接種法による発育時期別NPV感染抵抗性

第26表 NPV接種時期と死亡時期の関係

齢	日	各齢起蚕からの日数									死亡時期	
		順	1	2	3	4	5	6	7	8		9以降
I	1		□			◎						1 齢及び 1 眠、2 齢
	2			□				◎				2 齢及び 2 眠、3 齢
	3				□				◎			2 齢及び 2 眠、3 齢
II	1		□				◎					2 齢及び 2 眠
	2			□					◎			3 齢及び 3 眠
	3				□				◎			3 齢及び 3 眠
III	1		□				◎					3 齢及び 3 眠
	2			□				◎				4 齢及び 4 眠
	3				□				◎			4 齢及び 4 眠
IV	1		□				◎					4 齢
	2			□				◎				4 齢及び 4 眠
	3				□				◎			4 齢及び 4 眠、5 齢
	4					□				◎	◎	5 齢
V	1		□					◎				5 齢
	2			□					◎			5 齢
	3				□					◎		5 齢、一部上簇中
	4					□					◎	上簇中
	5						□				◎	上簇中、一部営繭後幼虫態
	6							□			◎	営繭後幼虫態
	7								□		◎	営繭後幼虫態

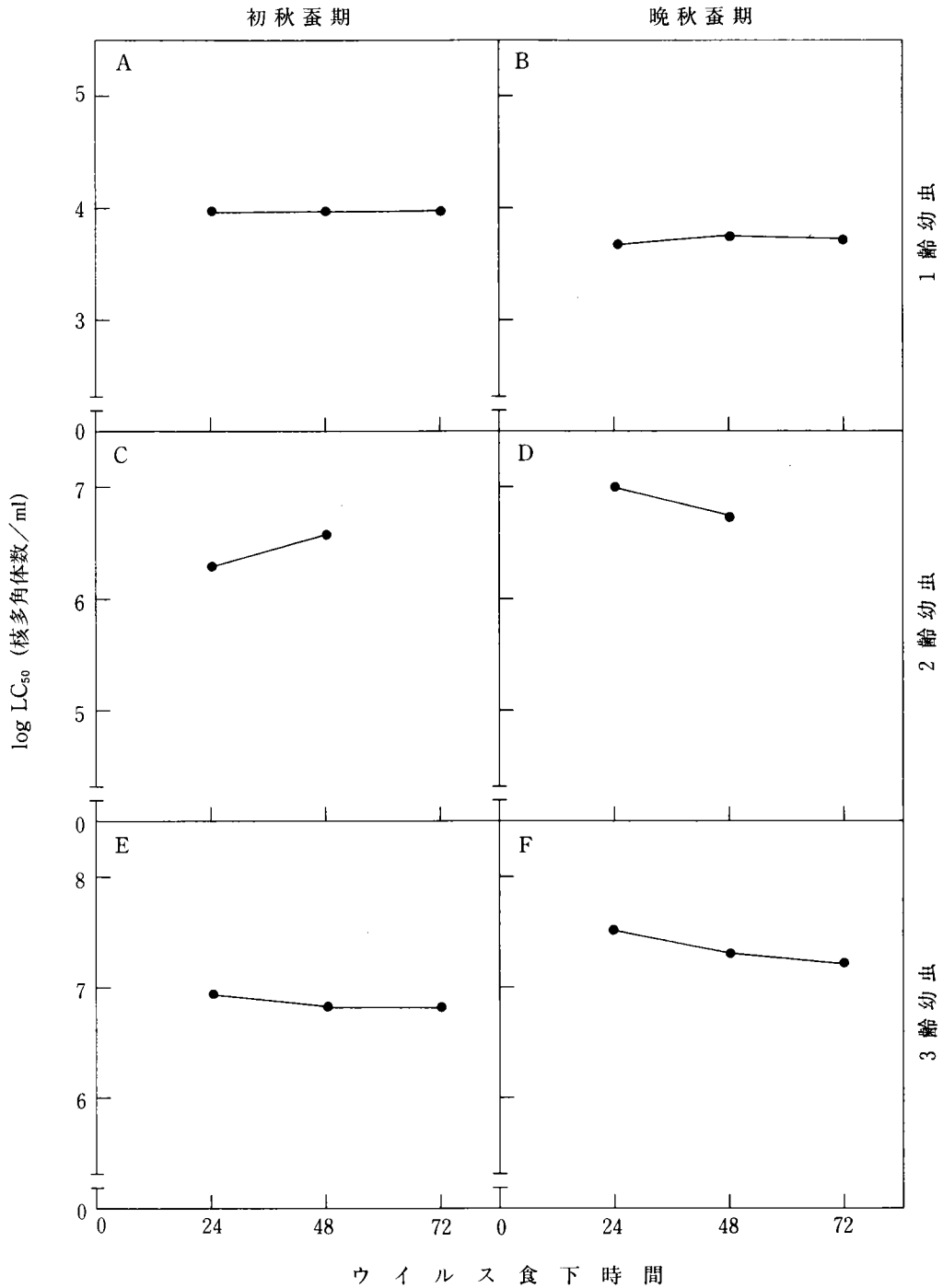
□：NPV接種時期

◎：死亡時期

第27表 5齡期前半におけるNPV接種の時期および死亡時期

接種時期	接種量*	病原接種後の死亡時期および死亡蚕数												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12日後
5 齡 1 日目 ♂	—10 ⁷								2	5	1			
	10 ⁶									6		2		
5 齡 1 日目 ♀	—10 ⁷								5	4	1			
	10 ⁶								1	4	2			
	10 ⁵									3				
	10 ⁴								1					
	10 ³										1			
5 齡 2 日目 ♂	—10 ⁷									4	4			
	10 ⁶								2	2	1			
	10 ⁵							1	1	2				
	10 ⁴								1	1				
5 齡 2 日目 ♀	—10 ⁷							1	1	7	1			
	10 ⁶							2	6		1			
	10 ⁵									2	1			
5 齡 3 日目 ♂	—10 ⁷								4	1	3			
	10 ⁶							1	1	3				
	10 ⁵							1	1					
	10 ⁴							1						
5 齡 3 日目 ♀	—10 ⁷							1	2	7				
	10 ⁶									7				
	10 ⁵										1			

* : 核多角体数 / 幼虫



第7図 1～3 齢期のウイルス食下時間が感染価に及ぼす影響

第28表 3 齢期における接種時期の組合せとNPV感染抵抗性

区	NPV接種時期			log LC ₅₀ (核多角体数/ml)		
	3 齢 1 日	3 齢 2 日	3 齢 3 日	春蚕期	初秋蚕期	晩秋蚕期
a	○			7.8	7.9	7.4
b		○		8.5	8.8	8.6
c			○	8.2	7.9	9.0
d	○	○		6.1	7.5	6.9
e	○		○	7.3	7.3	7.3
f		○	○	7.9	7.9	8.3
g	○	○	○	6.9	7.2	6.9

また、3 齢期の平均でみると、d 区と g 区の NPV 感染抵抗性がやや低い傾向にあり、添食回数の組合せによっては他の試験区との間に差が認められた。

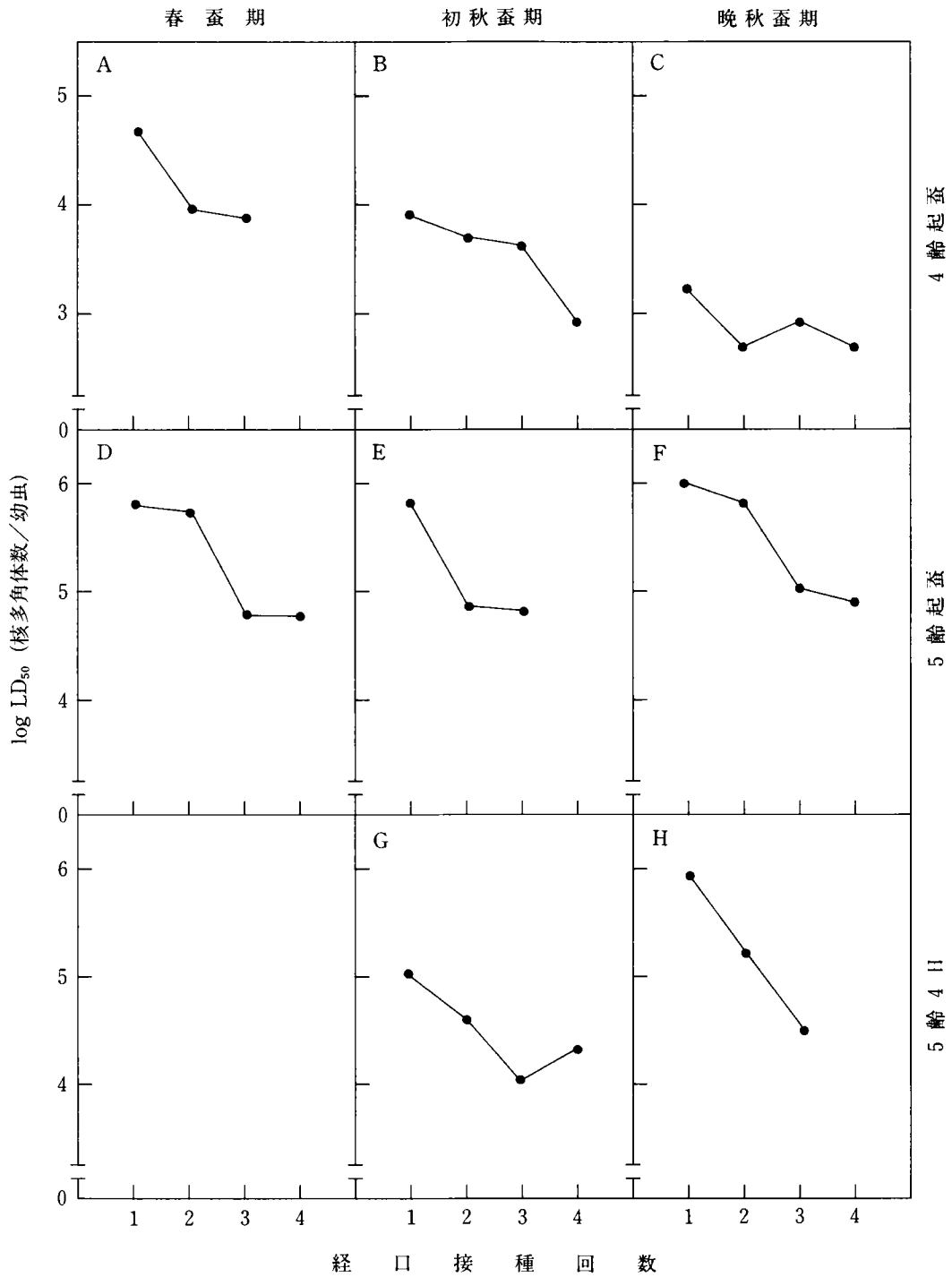
NPV 接種回数と感染価：

1～3 齢人工飼料育蚕の 4 齢起蚕、5 齢起蚕および 5 齢 4 日の蚕に、核多角体浮遊液を 1 頭当り 10 μ l ずつ 24 時間毎に計 1 回～4 回直接経口接種した場合（第 8 図）、接種回数の増加に対応して NPV 感染抵抗性の低下が見られた。この現象は春、初秋および晩秋蚕期を通じて観察された。

考 察

3 齢期に 2 種類の接種法を採用し、蚕の全幼虫期間における NPV 感染抵抗性の変動を比較した。一般に、蚕は若齢程ウイルスに対して感受性である（有賀，1973）。しかし、蚕座内に二次感染が起こらない個体育の場合には NPV 接種時期による感染価の変動がなく、蚕座内で二次感染が起り得る混合育や生葉育の場合には時期による変動が観察されている（古田，1983）。この結果は蚕の発育時期の相違による感受性の差を示すものではなく、NPV の接種時期が早い区の蚕座の汚染による二次感染の影響がより大きく現れたものと考えられる。本研究では、NPV 感染蚕はできるだけ血液漏洩する前に除去することを心掛けるとともに、NPV 接種後 8 日後（5 齢接種の場合は上簇後 8 日目）で試験を終了するよう設計した。従って、二次感染の影響についてはほとんど考慮する必要がなかった。一般に、蚕兎

の齢が進むにつれて NPV 感染抵抗性が上昇し、また起蚕は盛食蚕よりウイルス病感染抵抗性が低下している（鳥浜・浜田，1960）。本研究では 1～4 齢期の発育時期別 NPV 感染抵抗性については齢起で低く、齢の半ばで上昇し、眠前にやや低下するという山型変化を示した。このような変化パターンは小原ら（1967）が CPV を用いて行った桑葉育蚕の試験結果とはほぼ一致する。しかし、食桑すると抵抗性は高まり、その後一時低下するが、催眠期が近付くにつれて高まるとする報告（小林ら，1969）とは異なるものであった。4 齢期の NPV 感染抵抗性の変動パターンの相違は、接種方法の違いに起因していると考えられる。また、5 齢期の NPV 感染抵抗性の変動については、本研究の結果では 5 齢中にいくつかの小さなピークが出現したが、これは齢中で上昇・下降を繰返すとする桑葉育蚕の結果（小林ら，1969）と一致する。一方、宮沢（1982）は、5 齢期において起蚕の抵抗性が強く、熟蚕前に一時高くなるものの、再度低下し、経過が進むにつれて弱くなる傾向があるとしている。今回の結果からは、熟蚕の NPV 感染抵抗性は 5 齢起蚕に比べ低下すると考えられる。ただ、この点については、品種や接種方法および飼料等による影響も考慮に入れて今後さらに検討する必要がある。今後の問題点として齢中におけるウイルス病感染抵抗性の変動が何に起因するのかを物質的に明らかにしていく必要がある。アラタ体のエーテル可溶成分投与が発病率を増加させる効果があること（小林ら，1967）。また、除脳休眠した蚕蛹にボナステロン A を注射し、非休眠の方向に変化させた蛹のウイルス病感染抵抗性が弱く、ウイルスはより速い速度で増殖する（Watanabe and



第8図 NPV直接経口接種回数と感染価

Aruga, 1970) ので、内分泌器官が関与する可能性も考えられる。

また、齢と齢の間におけるウイルス病感染抵抗性の変動について、本研究の結果、眼前のNPV感染抵抗性と次齢起蚕のNPV感染抵抗性がほぼ同じレベルにあることから発育段階を追っての連続性があると考えられた。これは、4眠中と5齢起蚕におけるNPV感染抵抗性に差が認められず、体重当りのNPV感染抵抗性には誘発抵抗性でみられるような発育段階的消長はないものと考えられる(鮎沢, 1961)。

NPVの潜伏期間は一般的に4～8日程度であるが、接種時期と死亡時期の関係を検討した結果もこれと一致した。しかし、濃度による発病時期の差異、あるいは二次感染によらない間隔的な発病のピークの確認(小林ら, 1967)はできなかった。また、最近NPV感染による死ごもり繭の発生が問題となり、その原因については5齢5日以降の感染による(宮沢, 1982; 関, 1982; 平, 1983)としているが、本研究の結果も同様であった。しかしながら、本研究以外の試験結果は一回接種の結果であり、低濃度連続接種の影響や不顕性感染状態での誘発による発病の問題は取扱われていない。

蚕がNPVに感染し、発病に至るまでの日数は、ウイルス濃度(鮎沢, 1953; 小林ら, 1967; 古田, 1984)、接種時期(古田, 1983)、蚕品種(鮎沢, 1961)、飼育温度(鮎沢, 1953)などの各種要因によって異なっている。接種濃度については、高濃度接種により死亡時期が早くなる(鮎沢, 1953; 小林ら, 1967)が、その変動幅は他の蚕病原性ウイルスより小である(古田, 1983)ことが知られている。本研究では、明らかにNPV感染発症後体液が漏洩し、瀕死寸前の静止状態になる時点で調査したが、接種濃度と斃死時期に一定の傾向は認められなかった。また、雌雄間でもNPV感染抵抗性の差は認められなかった。一方、病原接種時期と死亡時期の関係については、若齢接種ほど潜伏期間が短い(古田, 1983)。また、NPV接種時期と平均発病日数との間には、個体育のみに正の相関関係が認められた(古田, 1984)等の報告がみられるが、本試験結果から、5齢期では起蚕接種より3日目接種で死亡時期が早くなる傾向がみられた。さらに、5齢3日の接種までは全て幼虫態で死亡していることから、蛹化までの期間が関係している可能性が考えられたが、この

点についてさらに今後研究する必要がある。

本研究において4～5齢では連続接種によりNPV感染抵抗性が顕著に低下した。ウイルス食下時間と感染価との関係について、古田・鮎沢(1972)は、NPVの場合10分間添食と5日間添食の場合の感染価にほとんど差がみられず、ウイルスを長時間食下させても体内で蓄積されないとしている。また、関(1982)も、1日間から7日間の添食で感染価に差はみられないとしている。本研究では1～3齢期での人工飼料を用いた経口接種の場合でも同様の結果となった。経皮接種の場合にはウイルス接種回数が多くなるに従って感染価も高くなり、感染価は累積接種量に対応している(古田・鮎沢, 1972)。この場合にはウイルスが体液中に追加されるため感染価が高くなると考えられたが、今回行ったような間接的な経口接種の場合にはそのたびごとに新たな感染が起り、累積効果により蚕のNPV感染抵抗性が低下しているものと推察された。

第四章

抗幼若ホルモン活性物質投与によって得られた3眠化蚕の糸状菌およびウイルス病感染抵抗性

抗幼若ホルモン活性物質(以下AJHと記す)投与により通常の4眠蚕から人為的3眠蚕が誘導される(村越, 1972; 村越・樺本, 1972; 村越ら, 1975; Kuwano *et al.*, 1983; Asano *et al.*, 1984; Akai *et al.*, 1984; 木内ら, 1985; Kuwano *et al.*, 1985; 関, 1985)。Akai *et al.* (1984)はAJHの3齢及び4齢投与によって100%の3眠化に成功し、繭重と繭糸繊度を大きく制御できることを明らかにした。また、AJH投与による3眠化蚕は、対照区の4眠蚕に比べて飼育経過が短縮する(木内ら, 1985)。特に、1～3齢人工飼料育とした場合農家での飼育期間は約1週間で、今後の蚕作安定に大きく寄与するものと考えられる。

ところで、従来から遺伝的3眠蚕においては、比較的蚕病発生の少ないことが知られているが(高瀬, 1936)、人為的に3眠化誘導可能なAJHの投与が蚕病発生に及ぼす影響についての報告は極めて少ない(松本ら, 1986)。本章では、AJHの投与によって得られた3眠化蚕の糸状菌およびウイルス病感染抵

抗性について検討した。

材料および方法

- 1) AJHを含有しない人工飼料の調製，飼育規模および飼育管理は第I章と同様に行った。
 - 2) 供試蚕品種についてはII-1と同様の品種を用いた。
 - 3) 供試AJHとしてイミダゾール系化合物，SSP-11 [1- [N-(4-chloro-2-tri-fluoro-methyl-phenyl)-propoxy-acetimidoyl] -imidazole] (Akai et al., 1984) を用いた。なお，糸状菌接種試験にはSSP-11W (SSP-11を水溶性にしたもの) を利用した。
 - 4) AJH含有人工飼料の調製：一田ら (1986) の方法に準拠した。人工飼料粉体と温湯を練合後，煮沸し，これにエタノールに溶解したAJHを混入・攪拌した。
なお，AJHは人工飼料湿体重当り120ppmとなるよう添加した。
 - 5) 3眠化蚕の作出：3齢起蚕あるいは4齢起蚕から48時間AJH含有人工飼料を給与し，誘導3眠化蚕を得た。
 - 6) 供試菌および培養：こうじかび病菌 *Aspergillus flavus* K-1およびK-3 (ホルマリン抵抗性系統) は農林水産省蚕糸試験場蚕病第1研究室長 河上 清博士より分譲を受け，熊本県蚕業試験場で継代した菌株を用いた。培養および分生子の調製はI-1と同様に行った。黄きょう病菌 *Beauveria bassiana* No.32についてはI-2と同様に行った。
 - 7) 糸状菌感受性試験：誘導3眠化蚕および4眠蚕の4齢起蚕にこうじかび病菌分生子浮遊液 ($10^4 \sim 10^8$ 分生子/ml) あるいは黄きょう病菌分生子浮遊液 ($10^4 \sim 10^7$ 分生子/ml) を毛筆を用いて蚕体背面に塗布接種した。以後の操作はI-1あるいはI-2と同様に行った。
 - 8) 糸状菌分生子の蚕体侵入試験：3眠化蚕および4眠蚕の4齢起蚕にこうじかび病菌分生子浮遊液 (10^8 分生子/ml) あるいは黄きょう病菌分生子浮遊液 (10^7 分生子/ml) を毛筆を用いて蚕体背面に塗布接種した。以後の操作はI-1あるいはI-2と同様に行った。
 - 9) 皮膚および体液中のプロテアーゼインヒビター
- 活性比較試験：スキムミルク寒天培地 (スキムミルク15%，アガーロース2%) を9cmペトリ皿に流し込み，平板培地を作成した。培地中に2本の溝 (2.5cm×0.3cm，溝と溝の間隔5mm) を切り，一方に粗酵素液，他方に皮膚磨砕液の上清あるいは体液を入れ，25℃に静置した。48時間後にclear zoneの広がりを観察した (江口・吉田，1986)。なお，対照として皮膚磨砕液の上清または滅菌再蒸留水を用いた。粗酵素液として蛹煮汁液体培地 (蛹浸出液1ℓに蔗糖1%添加) にこうじかび病菌 *Aspergillus flavus* K-3および黄きょう病菌 *Beauveria bassiana* No.32を25~27℃，11日間静置培養した培養液を用いた。
- 10) 供試ウイルス：NPV，CPV，IFV及び農林水産省九州農業試験場 荒武 義信博士より分与いただいた蚕B.mori濃核病1型ウイルス (以下DNVと記す) を用いた。
 - 11) 経口接種用ウイルスとしてはII-2と同様に調製した。なお，DNVはIFVと同様の調製を行った。
 - 12) 感染価の算定はIII-1と同様に行った。
 - 13) 3眠化蚕の4齢起蚕におけるウイルス抵抗性試験：3齢起蚕から48時間AJHを含有する人工飼料を給与し，誘導3眠化蚕の4齢起蚕およびAJH無投与の正常な4眠蚕の4齢起蚕にウイルスを接種した。
 - 14) 病原接種直後のAJH投与とウイルス病感染抵抗性：人工飼料育蚕の3齢，4齢及び5齢の各齢起蚕にNPV，CPVおよびIFVを接種し，直後から48時間AJHを投与し，AJH無投与蚕と比較した。
 - 15) AJH投与後のNPVおよびCPV感染抵抗性の経時的变化：人工飼料育蚕の3齢起蚕または4齢起蚕にAJH含有飼料を48時間添食した場合のNPVあるいはCPV感染抵抗性の経時的变化を調査し，AJH無投与蚕と比較した。

結 果

糸状菌分生子に対する感染抵抗性試験:

4眠蚕とAJH投与によって得られた3眠化蚕の4齢起蚕に黄きょう病菌を接種した場合(第29表), 3眠化蚕の4齢起蚕は4眠蚕の4齢起蚕より, 黄きょう病菌に対してやや感染抵抗性が低かった。一方, こうじかび病菌を接種した場合は黄きょう病菌接種の場合とは異なり, 誘導3眠化蚕の4齢起蚕は4眠蚕の4齢起蚕よりこうじかび病菌感染抵抗性が高かった。

糸状菌分生子の蚕体侵入試験:

黄きょう病菌分生子の蚕体内への侵入時間を調査した結果(第30表), 4眠蚕の4齢起蚕接種区では,

24時間後消毒まではほとんど発病せず, 30~39時間後消毒で20%が感染した。これに対し, 3齢起蚕へのAJH投与によって得られた3眠化蚕の4齢起蚕接種区では, 蚕体消毒までの時間が長くなるに従って感染率が高くなり, 30時間後消毒で87%が感染した。4眠蚕の4齢起蚕では蚕体への侵入時間が39時間以上であったのに対し, 誘導3眠化蚕の4齢起蚕では24~30時間程度であった。

一方, こうじかび病菌の蚕体侵入時間を調査した結果(第30表), 4眠蚕4齢起蚕では接種6時間後消毒区で感染率がかなり高く, 春蚕期では18時間後以降消毒区で, 晩秋蚕期では30時間後以降消毒区ではほぼ一定の感染率に達した。これに対し, 3眠化蚕4齢起蚕の場合, 春蚕期では42時間後, 晩秋蚕期で

第29表 AJH投与によって得られた誘導3眠化蚕の糸状菌分生子に対する感染抵抗性

区	log LC ₅₀ (黄きょう病菌分生子/ml)		log LC ₅₀ (こうじかび病菌分生子/ml)	
	夏蚕期	晩秋蚕期	春蚕期	晩秋蚕期
3眠化蚕4齢起蚕	2.9	2.8	4.3	3.7
4眠蚕4齢起蚕	3.5	≥3.5	3.2	1.9

1区30頭

第30表 誘導3眠化蚕4齢起蚕における糸状菌の蚕体侵入時間

	感 染 率					
	黄きょう病菌		こうじかび病菌			
	初 秋 蚕 期		春 蚕 期		晩 秋 蚕 期	
蚕体消毒 までの時間	3眠化蚕 4齢起蚕	4眠蚕 4齢起蚕	3眠化蚕 4齢起蚕	4眠蚕 4齢起蚕	3眠化蚕 4齢起蚕	4眠蚕 4齢起蚕
0hr	3.3%	3.3%	8%	20%	25%	17%
6	10	0	23	50	21	60
12	—	—	—	—	21	50
15	13	3.3	—	—	—	—
18	20	3.3	35	72	39	63
21	38	3.3	—	—	—	—
24	41	0	39	63	59	80
30	87	17	36	63	45	97
39	100	20	—	—	—	—
40	—	—	—	—	71	93
42	—	—	47	71	—	—
48	—	—	41	92	63	97
無散布	97	83	48	90	89	100

供試菌: *Beauveria bassiana* No.32 春蚕期……*Aspergillus flavus* k-3 供試蚕数: 春蚕期……1区50頭
 供試蚕数: 1区30頭 晩秋蚕期……*Aspergillus flavus* k-1 晩秋蚕期……1区30頭

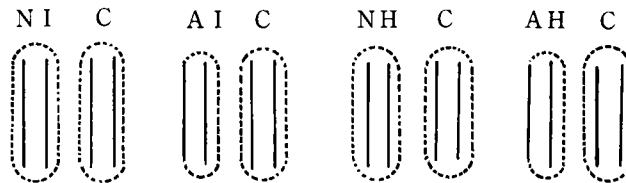
は40時間後以降の蚕体消毒区でほぼ一定の発病率になり、こうじかび病菌の蚕体侵入時間に差異がみられた。

皮膚および体液中のプロテアーゼインヒビター活性比較試験：

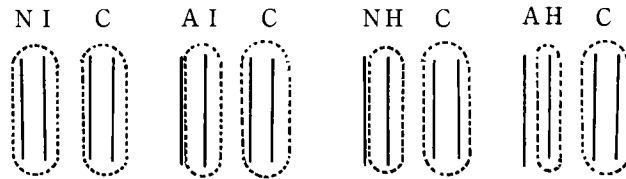
AJH投与によって得られた誘導3眠化蚕の4齢起蚕と4眠蚕の4齢起蚕の糸状菌病感染抵抗性について調査し、黄きょう病菌分生子とこうじかび病菌分生子に対する感染抵抗性とは異なる結果となった。そこで、誘導3眠化蚕の4齢起蚕と4眠蚕の4

齢起蚕の皮膚および体液に含まれるプロテアーゼインヒビター活性を、黄きょう病菌およびこうじかび病菌の産生するプロテアーゼに対して検定した。両酵素とも4眠蚕の4齢起蚕より誘導3眠化蚕の4齢起蚕の皮膚および体液の方がclear zoneの直径が小さかった。すなわち、両糸状菌のプロテアーゼに対して、ともに誘導3眠化蚕の4齢起蚕のプロテアーゼインヒビター活性が4眠蚕の4齢起蚕のインヒビター活性よりも高い結果が得られた(第9図)。

A : B. bassiana培養上清



B : A. flavus培養上清



- NI : 4眠蚕4齢起蚕皮膚磨砕液上清
- AI : AJH誘導3眠化蚕4齢起蚕皮膚磨砕液上清
- NH : 4眠蚕4齢起蚕体液
- AH : AJH誘導3眠化蚕4齢起蚕体液
- C : 対照 (再蒸留水)

第9図 蚕体液および皮膚のプロテアーゼインヒビターによる蚕病原性糸状菌培養上清中のプロテアーゼ活性阻害作用

AJH投与によって得られた誘導3眠化蚕の4齢起蚕におけるウイルス抵抗性:

3齢起蚕から48時間AJHを人工飼料とともに給与し、誘導3眠化蚕の4齢起蚕および対照区(AJH無投与)の4眠蚕の4齢起蚕にウイルスを接種し、ウイルス病感染抵抗性を検定した(第31表)、NPV接種の場合は誘導3眠化蚕の4齢起蚕および4眠蚕の4齢起蚕ともNPV接種5~6日後に死亡したが、NPV感染抵抗性は2回とも誘導3眠化蚕の4齢起蚕が対照区(AJH無投与)である4眠蚕の4齢起蚕に対し明らかに高く、その差は有意であった。

CPVに対する感染抵抗性は、第1回試験ではAJH無投与区の4齢起蚕接種区がCPV接種8~12日後に死亡したのに対し、誘導3眠化蚕の4齢起蚕接種区では上簇時(CPV接種7日後)までに死亡するものは見られなかった。また、上簇6日後に調査した時点で簇中斃蚕あるいは繭中斃蚕が高濃度接種区で少数発生しただけで、AJH投与区がAJH無投与区よりCPV感染抵抗性の高いことが認められた。第2回試験ではAJH無投与区の4齢起蚕接種区がCPV接種7~10日後に死亡したのに対し、誘導3眠化蚕の4齢起蚕の場合はCPV接種7~8日後に死亡する個体が見られた。しかし、8日後には残った蚕児は熟蚕となり上簇した。上簇6日後に調査した時点では高濃度接種区でわずかに簇中斃蚕がみられる程度で、第1回試験と同様AJH投与によって3眠化した蚕児の4齢起蚕におけるCPV感染抵抗性はAJH無投与区の4眠蚕の4齢起蚕に比べて明らかに高かった。

IFVの場合もCPVと同様の結果が得られ、2回行った試験ともAJH無投与区の4齢起蚕接種区がIFV接種9~12日後に死亡したのに対し、誘導3眠化蚕の4齢起蚕接種の場合は上簇時(病原接種7日

後)までに死亡するものは認められなかった。また、その後簇中あるいは繭中で少数が死亡したにすぎず、誘導3眠化蚕の4齢起蚕のCPV感染抵抗性とAJH無投与区の4眠蚕の4齢起蚕との間に明らかな差が生じた。

DNVについても同様に、AJH無投与区の4齢起蚕接種区がDNV接種9~12日後に死亡したのに対し、誘導3眠化蚕の4齢起蚕接種の場合は上簇時(病原接種7日後)までに死亡しなかった。そして、その後の死亡も認められなかったことから、誘導3眠化蚕の4齢起蚕とAJH無投与区である4眠蚕の4齢起蚕の間のDNV感染抵抗性に有意差があると判断された。

ウイルス接種直後のAJH投与とウイルス病感染抵抗性:

人工飼料育蚕の3齢、4齢および5齢の各齢起蚕にウイルスを接種し、接種直後から48時間AJHを投与した場合のウイルス病感染抵抗性を第32表に示す。なお、3齢起および4齢起処理の場合AJH投与区では3眠化が誘導され、3齢起AJH投与区ではウイルス接種から上簇までの期間が13日間、4齢起AJH投与区では8日間であった。

NPVを接種した場合、3齢起、4齢起および5齢起のいずれの処理区においてもAJH投与区と無投与区の間のNPV感染抵抗性に差は検出されなかった。CPVを接種した場合、3齢起および5齢起処理区ではAJH投与区と無投与区の間のCPV感染抵抗性に差はなかった。ただし、3齢起処理の場合AJH投与区は無投与区に比べ発病時期に変動が見られた。一方、4齢起処理ではAJH投与区のCPV感染抵抗性が無投与区より高くなった。IFVを接種した場合もCPVと同様、3齢起および5齢起処理区ではAJH投与区のIFV感染抵抗性は無投与区とほとんど同じであったが、4齢起処理では、

第31表 3齢起蚕へのAJH投与によって得られた誘導3眠化蚕の4齢起蚕におけるウイルス病感染抵抗性

区	log LD ₅₀		log LD ₅₀		-log LC ₅₀		-log LC ₅₀
	(核多角体数/幼虫)		(細胞質多角体数/幼虫)		(IFV病虫希釈倍数)		(DNV病虫希釈倍数)
	試験1	試験2	試験1	試験2	試験1	試験2	
3眠化蚕 4齢起蚕	5.2	5.5	≥6.1	≥4.4	≤3.1	≤2.9	≤2.5
4眠蚕 4齢起蚕	3.8	≤4.6	2.3	2.7	5.5	5.4	3.0
差	1.4	0.9	3.8	1.7	2.2	2.5	0.5

AJH投与区と無投与区のIFV感染抵抗性に差異が検出された。

AJH投与後のNPVおよびCPV感染抵抗性の経時的変動：

人工飼料育蚕の3齢起および4齢起にAJH含有飼料を48時間添食した場合、各々の投与齢期におけるNPV感染抵抗性の経時変化を追跡した(第10図A)。3齢起AJH投与区と無投与区は、3齢1～2日目では差が見られなかったが、その後無投与区では眠が近づき、NPV感染抵抗性は一定値となった。これに対し、AJH投与区ではNPV感染抵抗性はさらに高くなり、4日後にピークとなり、無投与区の最高値よりもかなり高くなった。5日目には催眠期となり、NPV感染抵抗性は低下した。4齢起

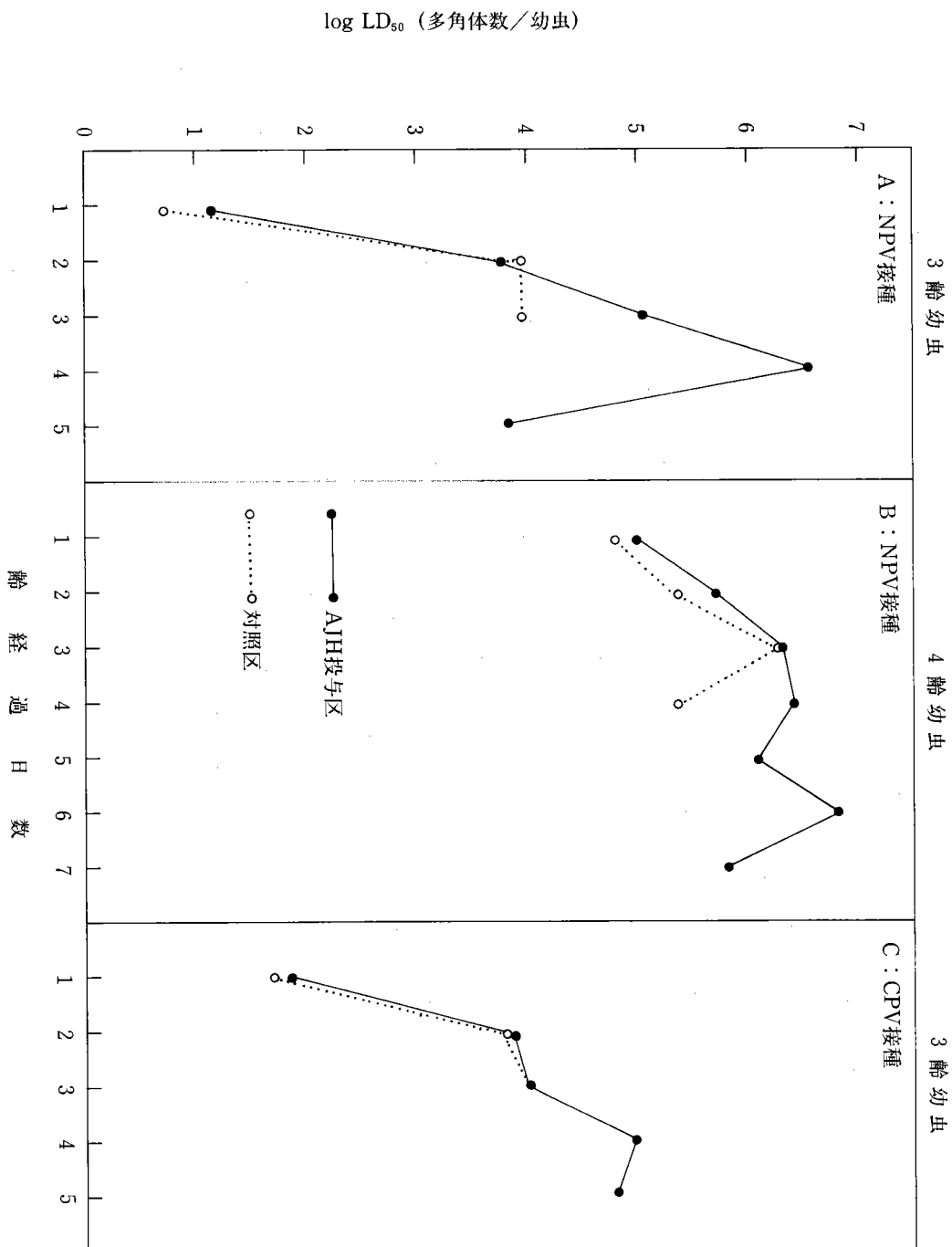
AJH投与の場合は、4齢1～3日目ではAJH投与区と無投与区との間に差は認められなかった(第10図B)。その後無投与区では催眠期となりNPV感染抵抗性は低下するという山型変化を示した。これに対しAJH投与区では4齢6日目にNPV感染抵抗性のピークがみられ、上簇前の4齢7日目に低下した。

人工飼料育蚕の3齢起にAJH含有飼料を48時間添食しCPV感染抵抗性の経時的変動を調査した場合(第10図C)、3齢起AJH投与区と無投与区とは3齢1～3日目ではその推移に差が認められなかった。その後、AJH投与区のCPV感染抵抗性はさらに上昇した。一方、無投与区では3齢4日目には眠となり、翌日4齢起蚕となった。

第32表 病原接種後のAJH投与とウイルス抵抗性

区	log LD ₅₀ (核多角体数/幼虫)			log LD ₅₀ (細胞質多角体数/幼虫)			-log LC ₅₀ (IFV病虫希釈倍数)					
	3齢起	4齢起	5齢起	3齢起	4齢起	5齢起	3齢起	4齢起	5齢起			
AJH投与区	≤0.7	4.7	4.7	5.0	≤0.3	2.5	3.4	4.4	≥9.0	6.0	4.7	≤1.7
対照	≤0.3	4.4	4.9	5.0	≤0.1	≤1.5	≤1.6	4.4	≥9.1	6.7	5.8	≤1.9
差	0.4	0.3	0.2	0	0.2	1.0	1.8	0	0.1	0.61	1.07	0.2

- 3齢起：3齢起蚕に病原接種後直ちにAJHを含有する人工飼料で48hr飼育または普通飼料で飼育，
4齢以降桑葉育
- 4齢起：4齢起蚕に病原接種後直ちにAJHを含有する人工飼料または普通飼料で48hr飼育，
その後は桑葉育
- 5齢起：5齢起蚕に病原接種後直ちにAJHを含有する人工飼料または普通飼料で48hr飼育，
その後は桑葉育



第10図 AJH投与後のウイルス病感染抵抗性の経時的変動

考 察

3 齢起蚕へのAJH投与によって得られた誘導3眠化蚕の4 齢起蚕の糸状菌病感染抵抗性について調べた結果、誘導3眠化蚕の4 齢起蚕は4 眠蚕の4 齢起蚕に比べ、黄きょう病菌に対する感染抵抗性が低く、蚕体への分生子の侵入時間も短かった。一方、こうじかび病菌に対しては感染抵抗性が高く、蚕体への侵入時間も長かった。これに関連して、誘導3眠化蚕の4 齢起蚕および4 眠蚕の4 齢起蚕の皮膚、および体液中に存在するプロテアーゼインヒター活性を測定し、誘導3眠化蚕の4 齢起蚕では皮膚、あるいは体液中に存在するプロテアーゼインヒター活性の高いことが判明した。しかし、こうじかび病菌および黄きょう病菌が産生するプロテアーゼとともに同様の結果となった。従って、両菌で異なる抵抗性を示すことを、インヒター活性の差によっては説明できない。むしろ、こうじかび病菌と黄きょう病菌で異なる結果となった原因の一つとして、これら糸状菌の発病感染機構の違いが影響している可能性が考えられる。黄きょう病菌では脱皮による治癒現象がみられるので、蚕体内への侵入の難易とともに感染後脱皮までの時間が短いほど感染率が低くなると考えられる。誘導3眠化蚕の4 齢期間は約7～8日で4 眠蚕の4 齢期間4～5日に比べ2～3日長く、黄きょう病菌に関しては、感染以後脱皮までの期間の違いが感染抵抗性の差となって現れたと考えられる。一方、こうじかび病菌では脱皮による治癒現象よりも、蚕体への侵入の難易が感染率に影響している可能性が強いと考えられる。

蚕児への生理活性物質あるいはその類似物質の投与がNPVの発生や病勢の進展に関与している可能性が指摘されている(小林ら, 1967; 渡部・有賀, 1971; 森田, 1981; 森田, 1982)。松本ら(1986)は、AJHは細菌のみを添食した蚕やIFVと細菌の混合感染蚕に対して顕著な抵抗性の上昇と蚕体内からの細菌の排除効果のあることを認め、AJHには眠性を制御する以外に、蚕の感染防御効果を高める作用が期待されるとしている。しかし、AJH投与と蚕ウイルス病感染抵抗性との関係については本研究によって初めて明らかになった。3 齢起蚕にAJHを投与して得られた3眠化蚕の4 齢起蚕におけるウイルス病感染抵抗性は、いずれもAJH無投

与蚕の4 齢起蚕よりも高くなった。一般に、ウイルスによる経口感染は齢が進行するに従ってウイルス病感染抵抗性は増大する。3 齢起蚕にAJHを投与して得られた3眠化蚕の4 齢起蚕の外部形態、特に斑紋は正常蚕の5 齢に類似し(木内ら, 1985)、頭幅、体長及び体重もAJH無投与蚕の4 齢起蚕と5 齢起蚕の間に位置する(一田, 未発表)ことから、ウイルス病感染抵抗性についても3 齢起蚕へのAJHを投与によって得られた誘導3眠化蚕の4 齢起蚕は、4 眠蚕の4 齢起蚕より生理的に5 齢起蚕に近いと推察される。ただし、CPV, IFVおよびDNV感染抵抗性の場合には、これらウイルスの増殖が中腸組織のみで行われ、潜伏期間がNPVに比べ長いことからAJHを投与によって得られた誘導3眠化蚕の4 齢起蚕では、中腸がこれらウイルスに感染しても発病に至らず、営繭・化蛹することが考えられ、CPV, IFVおよびDNVに対しては感染抵抗性が高まったというよりも感染後の組織更新に伴い抵抗性が高まったと考えることもできる。このことは、ウイルス接種直後からのAJH投与において、3 齢起処理ではウイルス病感染抵抗性に差は認められないが、4 齢起処理ではCPVおよびIFV感染抵抗性に幾分の差が生ずる事実によっても支持されている。

また、AJH投与蚕のNPVあるいはCPV感染抵抗性の経時的変動についても、AJH無投与蚕とは異なった変化を示した。特にNPV感染抵抗性の経時的変動は、3 齢起蚕へのAJH投与によって3 齢3日から4日にかけて急激な感染抵抗性の上昇がみられ、その値は4 眠蚕の4 齢期に近い値を示していること、4 齢起蚕へのAJH投与によって感染抵抗性の推移は単純な山型変化ではなく複雑なパターンを示したが、これは4 眠蚕の5 齢期における推移(第3図)に良く似ていること等から、AJHそのものに抗ウイルス作用があるのではなく、AJH投与によって起こる蚕体内での生理的変化が蚕児のウイルス病感染抵抗性に影響した結果であると考えられる。

総合考察

稚蚕期を人工飼料で飼育し、壯蚕期に桑葉育を行う稚蚕人工飼料育体系が初めて養蚕農家に導入されてから、15年が経過しようとしている。これまで、人工飼料育蚕の蚕病問題に関しては多数の研究がなされてきた。しかし、それにもかかわらず稚蚕人工飼料育を導入する地域での蚕病防除指針となるべき体系的な知識が蓄積されてきたとは言い難い。そこで、稚蚕人工飼料育における蚕病予防技術を確立する目的で研究を開始した。

なお、本研究を行うに当り詳細に人工飼料育の条件を検討し、光線照射、温度、湿度、人工飼料の保存に伴う飼料価値の低下等が蚕児の発育に強く影響するものの、ウイルス抵抗性に及ぼす影響は極めて小さい(縄田ら, 1980; 縄田・一田, 1981; 一田ら, 1982; 一田・中岡, 1983)ことを確かめた上で、感染実験に入った。ただし、低水分率飼料の給与がウイルス抵抗性を低下させることを発見し(一田ら, 1982; 一田・中岡, 1983)、その点に注意して実験を行った。

人工飼料が開発された初期の段階においては、飼料の腐敗をいかに防ぐかが最大の関心事であった。しかし、抗生物質を中心とした効率的な防腐剤の導入により、最近では開放育でも対応できるまでに人工飼料の改良が進んでいる。これに伴って、こうじかび病菌は人工飼料育においてさほど重要視されなくなってきたが、今回の研究において、1~3齢人工飼料育では蚕座汚染が桑葉育移行後におけるこうじかび病発生原因となることを明らかにした。特に、眠期の拈座乾燥は人工飼料中に含まれる防黴剤の働きを一時的であるにせよ低下させる状態に置くとともに、こうじかび病の二次発生源となる糞が増加するので、この時期を中心に防除を行うと効果的である。

人工飼料育蚕は桑葉育蚕に比べてこうじかび病菌および黄きょう病菌感染抵抗性がやや高いこと、また、黄きょう病菌の蚕体侵入時間が短いことが確かめられた。従って、桑葉育移行後の糸状菌対策として、配蚕直後からの蚕体消毒の励行、汚染源となりやすい人工飼料育蚕座の早期撤去が肝要である。

次に、ウイルス病感染抵抗性について、増殖組織や構成核酸種類等が下記のように異なる3種のウイ

ルスを取上げた。すなわち、現在繭生産上最も被害量が多く、防除が困難なNPV、昭和40年代においてウイルス病被害の中心であり、その後被害が下火になっていたが、近年増加傾向にあるCPV、過去において猛威を奮ったIFVである。

蚕病原性ウイルス			
	NPV	CPV	IFV
感染経路	経口	経口	経口
増殖組織	全身	中腸 円筒細胞	中腸 盂状細胞
増殖部位	核	細胞質	細胞質
核酸	複鎖DNA	複鎖RNA	単鎖RNA
多角体形成	有	有	無
主たる病徴	節高 体液白濁	軟化病症状 中腸白濁	軟化病症状
	体液漏洩		

これらウイルスに対する感染抵抗性の人工飼料育蚕と桑葉育蚕の比較、飼育条件による変化、発育における変動等を検討した。このような異なるウイルスの比較研究は、従来昆虫病理学研究の分野において詳細に行われたことはなかった。

人工飼料育蚕では桑葉育に比べて、経過が不揃いになり易いので、発育経過を揃えるため停食時期の遅速、飼食時間の延期等の操作をより徹底的に行う。そこでまず、これらの操作が蚕児のウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響を調べた。ウイルス別にみると、CPV感染抵抗性が早期停食の影響を最も強く受け、NPV感染抵抗性は比較的影響が少なかった。総合的にみて、2齢飼食後55時間以内に停食するとウイルス病感染抵抗性低下要因になることを初めて明らかにした。3齢起蚕での絶食ではCPVおよびIFV感染抵抗性が影響を強く受け、飼食時間を10~15時間以上延期することは、ウイルス病感染抵抗性を低下させる要因となる。

1~2齢人工飼料育蚕は桑葉育蚕よりもNPVおよびCPVに対して感染抵抗性が低かったが、桑葉育に転換した後24時間以上経過すると全齢桑葉育を行った蚕の感染抵抗性のレベルと同等になった。一方、IFVでは人工飼料育蚕と桑葉育蚕の間にウイルス病感染抵抗性の差が認められなかった。以上の結果から、人工飼料育蚕ではNPVおよびCPVに対に

して配蚕後の初期感染防止が桑葉育蚕の場合以上に重要と考えられる。

1～2 齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後の飼育条件における発病助長要因としてNPVおよびCPV感染抵抗性では低温処理（5℃）の影響が大きい。しかし、IFV感染抵抗性では低温は無関係であり、むしろ高温飼育と低品質桑給与の組合わせが影響することを見出した。

1～3 齢人工飼料育蚕についてはNPV抵抗性を詳細に追及した。まず、低温（5℃）接触によってNPV感染抵抗性が低下することを確認した。特に、病原接種前の低温接触は極めて著しい低下をもたらした。その他核多角体病発病助長要因となりうる飼育条件として病原接種前の密閉飼育、病原接種前後の多窒素桑給与を見出したが、同じ条件であっても、病原接種前であるか、後であるかによって影響の現れかたが異なっていた。このことは、今後のウイルス感染発病機構の解明において重要なポイントになるであろう。

1～3 齢人工飼料育蚕を用いて全幼虫期間におけるNPV感染抵抗性の変動および病原接種と発病時期の関係を詳細に研究した。従来、NPV感染について各齢間の差や齢中での値の解析例は多数あるが、今回のように連続的な変動を追跡したのは初めてである。その結果、1～4 齢の変動パターンと5 齢期のそれとが全く異なっていた。

次に、AJHの投与が糸状菌およびウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響を調べ、3眠化を促す本生理活性物質が蚕病の感染・発病を抑制することを明らかにした。AJHによる細織度菌生産体系においては、AJHがウイルス病防除に役立つ可能性を見出した。

以上の研究によって、5種の病原に関する感染の特徴と防除法について体系的な知見が得られた。

総 括

1. 人工飼料育蚕のこうじかび病感染抵抗性

- 1) 人工飼料育蚕および桑葉育蚕の3 齢起蚕に対するこうじかび病菌の蚕体侵入所要時間は、人工飼料育蚕、桑葉育蚕ともに分生子接種6時間後頃から蚕体に侵入が開始され、18時間後には感染がほぼ成立した状態になる。

- 2) こうじかび病菌分生子 4.4×10^7 分生子/mlといった濃厚感染状態で人工飼料育蚕の感染率が高くなった。
- 3) 桑葉育蚕では5 齢起蚕体液中でのこうじかび病菌分生子の発芽率が低く、5 齢3日蚕体液中での発芽率が高くなったのに対し、人工飼料育蚕体液中ではこうじかび病菌分生子の発芽がやや抑制されたが、5 齢起蚕と5 齢3日蚕体液の発芽抑制作用に差は認められなかった。
- 4) 人工飼料育中のこうじかび病の発生は一般に低率であり、桑葉育移行後の蚕体消毒によって、ほぼ完全に発生が阻止された。

2. 人工飼料育蚕の黄きょう病感染

- 1) 人工飼料育蚕及び桑葉育蚕の3 齢起蚕に対する黄きょう病菌の蚕体侵入時間を調査した結果、人工飼料育蚕は桑葉育蚕より黄きょう病菌分生子の蚕体侵入が短時間内に成立した。
- 2) 人工飼料育蚕は桑葉育蚕に比べ黄きょう病菌分生子接種に対する感染抵抗性がやや低く、黄きょう病菌感染によって生じる病斑も人工飼料育蚕では桑葉育蚕より明瞭で激しい病徴となった。
- 3) 桑葉育蚕では4 齢起蚕体液中での黄きょう病菌分生子の発芽率が低く、4 齢3日蚕体液中では発芽率が高くなった。一方、人工飼料育蚕体液中では黄きょう病菌分生子の発芽が桑葉育蚕体液中より抑制されたが、4 齢起蚕と4 齢3日蚕体液における黄きょう病菌分生子の発芽率に差は認められなかった。
- 4) 1～2 齢人工飼料育蚕では掃立時に蚕座に分生子を接種しても黄きょう病菌菌糸の発育、コロニーの形成は認められず、人工飼料育中の防衛成分によって発育が完全に抑制あるいは阻止された。

3. 人工飼料育中の早期停食とウイルス病感染抵抗性

- 1) 人工飼料育蚕の早期停食がNPV感染抵抗性に及ぼす影響は判然とはしなかったが、間接的にNPV感染抵抗性低下の要因の一つとなる可能性があった。
- 2) 2 齢飼食後50時間以内に停食状態に置くと、IFV感染抵抗性が低下した。
- 3) CPV感染抵抗性はNPV感染抵抗性およびIFV感染抵抗性以上に早期停食による影響が顕著で、

2 齢飼食後55時間以内に停食状態に置くと、CPV感染抵抗性が低下した。

4. 人工飼料育蚕の起蚕絶食とウイルス病感染抵抗性

1～2 齢人工飼料育蚕の3 齢起蚕における絶食はウイルス病感染抵抗性を低下させ、絶食中の保護温度が高い程影響が強く現れた。特に、CPVおよびIFV感染抵抗性に及ぼす影響が大であった。

5. 1～2 齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後におけるウイルス病感染抵抗性

1) 稚蚕人工飼料育蚕と桑葉育蚕との間にはIFV感染抵抗性に差は認められなかった。一方、稚蚕人工飼料育蚕、桑葉育蚕ともに蚕期間のIFV感染抵抗性の変動の幅が大であった。

2) CPV感染抵抗性では、桑葉育蚕より人工飼料育蚕の感染抵抗性がやや低かった。また、稚蚕人工飼料育蚕、桑葉育蚕ともに蚕期間のCPV感染抵抗性の変動幅が大であったが、桑葉育蚕でより顕著であった。

3) NPV感染抵抗性では、桑葉育蚕に比べ人工飼料育蚕の抵抗性が低くなる傾向が見られたが、IFVおよびCPV感染抵抗性に比べ蚕期間の変動幅が小であった。

4) 稚蚕人工飼料育蚕の桑葉育移行後におけるウイルス病感染抵抗性の経時変動についてはウイルスによる違いがみられた。

5) 稚蚕人工飼料育蚕のNPV感染抵抗性は、桑葉育移行後の時間が経過するとともに上昇し、桑葉育蚕のレベルに接近したが、桑葉育蚕と同レベルになったのは3 齢飼食24時間経過後であった。

6) CPV感染抵抗性は、桑葉育蚕の場合飼食6時間後をピークとした山型パターンを示した。稚蚕人工飼料育蚕では桑葉育移行後の時間が経過するとともにCPV感染抵抗性が上昇して全齢桑葉育蚕と同レベルに到達した。

7) IFV感染抵抗性は、3 齢飼食後の時間が経過するとともに上昇した。しかし、人工飼料育蚕と桑葉育蚕との間で桑葉育移行後のIFV感染抵抗性の経時変化に差異は見られなかった。

6. 1～2 齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後における飼育温度とウイルス病感染抵抗性

1) 桑葉育移行後における飼育温度が32℃を越える

場合には、高温抑制によりCPV感染抵抗性が一見高くなったが、17～30℃の範囲では温度要因が単独でウイルス病感染抵抗性を低下させる要因とはならなかった。

2) 1～2 齢人工飼料育蚕の3 齢起蚕における低温接触(5℃)は、NPVおよびCPV感染抵抗性を低下させる方向に作用した。そして、飼食前の低温接触の影響が特に大であったが、IFV感染抵抗性にはほとんど影響が見られなかった。

7. 1～2 齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後における用桑とウイルス病感染抵抗性

1) 1～2 齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後における用桑別・葉位別給与は、通常給与される範囲内では用桑条件単独でウイルス病感染抵抗性を低下させる要因にはならなかった。

2) 桑葉育移行後に嫩葉を含む未熟葉(軟葉)を連続給与しても、NPVおよびCPV感染抵抗性には大きく影響しなかった。

8. 1～2 齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後における飼育温度および用桑条件とウイルス病感染抵抗性

1) 各種飼育温度と用桑条件を組合わせて飼育した結果、NPVおよびCPV感染抵抗性に及ぼす影響は小さく、本研究の飼育条件の範囲内では多角体病感染抵抗性を低下させる要因とはならなかった。

2) 高温飼育と軟葉給与あるいは硬葉給与が重なった場合にIFV感染抵抗性については影響が認められ、感染抵抗性を低下させる原因となった。

9. 1～3 齢人工飼料育蚕の4 齢期における各種飼育条件と核多角体病発生との関係

1～3 齢人工飼料育蚕の桑葉育移行後におけるNPV感染抵抗性低下要因として低温の影響が最も大きく、NPV接種後の多室素桑給与及び病原接種前の密閉飼育も感染抵抗性を低下させる要因になると考えられた。さらに、病原接種前の多室素桑給与についても、明らかには影響しなかったが充分留意する必要がある。一方、NPV接種後の密閉飼育、NPV接種前後の光線照射及び病原接種前の高温飼育はほとんど影響しなかった。

10. 1～3 齢人工飼料育蚕に対するNPVの接種時期及び接種回数と感染価との関係

1) 発育時期別のNPV感染抵抗性の変動および死亡時期について調べた結果、1 齢から4 齢にか

けては齢初めのNPV感染抵抗性が低く、齢の半ばでやや感染抵抗性が上昇し、齢の終わりにやや低下するという山型変化のパターンを繰返し、5齢では複雑な変化パターンを示した。

- 2) 各齢眠前と翌齢起蚕のNPV感染抵抗性がほぼ同様のレベルを示し、発育段階を追って連続性が見られた。
- 3) 1～5齢期間のNPV感染抵抗性は、1齢<2齢≤3齢<4齢≤5齢という各齢間の順序であった。
- 4) NPV接種時期と死亡時期との関係は、1～3齢では齢初めに感染した場合はその齢の眠頃に死亡し、齢の半ば以降に感染した場合は次齢の眠頃に死亡した。4齢はNPV接種ほぼ4日後に死亡し、5齢期では5齢3日後までの感染では上簇前に死亡し、5齢4日後以降の感染で上簇中に、6日後以降の感染では営繭後に死亡した。
- 5) 5齢前期の雌雄別のNPV感染抵抗性を調査した結果、雌雄間のNPV感染抵抗性に差があると判断するには至らなかった。接種濃度と死亡時期は発育ステージで影響を受け、必ずしも一定しなかった。5齢では起蚕時接種より3日後接種蚕の方が死亡までの日数が短縮された。
- 6) 1～3齢期における最大72時間のウイルス食下時間は感染価に影響しなかった。一方、1～3齢人工飼料育蚕の4齢起蚕、5齢起蚕および5齢4日蚕に24時間毎に1～4回直接経口接種した結果、接種回数が増加するに従ってNPV感染抵抗性が低下した。
11. 抗幼若ホルモン活性物質投与によって得られた誘導3眠化蚕の糸状菌病感染抵抗性
 - 1) 誘導3眠化蚕の4齢起蚕は4眠蚕の4齢起蚕より、黄きょう病菌に対する感染抵抗性が低かった。
 - 2) こうじかび病菌に対しては、誘導3眠化蚕の4齢起蚕は、4眠蚕の4齢起蚕より感染抵抗性が高かった。
 - 3) 黄きょう病菌およびこうじかび病菌の蚕体侵入時間を比較した結果、4眠蚕の4齢起蚕ではこうじかび病菌の、3眠化蚕の4齢起蚕では黄きょう病菌の蚕体侵入時間が短いことが認められた。
12. 抗幼若ホルモン活性物質投与によって得られ

た誘導3眠化蚕のウイルス病感染抵抗性

- 1) 3齢起蚕へのAJH投与によって得られた誘導3眠化蚕の4齢起蚕におけるウイルス病感染抵抗性は、いずれのウイルスに対してもAJH無投与蚕の4齢起蚕より高くなった。
- 2) ウイルス接種直後のAJH投与がウイルス病感染抵抗性に及ぼす影響を調べた結果、NPV感染抵抗性の場合にはAJH投与の影響が認められなかった。CPV及びIFV感染抵抗性も、3齢起処理および5齢起処理ではAJH投与と無投与区の間で差が認められなかったが、4齢起処理ではAJH投与と無投与区の間で幾分の差が認められた。
- 3) AJH投与後のNPVおよびCPV感染抵抗性の経時的変動を調査した結果、AJH投与区と無投与区では異なった変動パターンを示し、AJH投与によって起こる蚕体内での生理的变化が蚕児のウイルス病感染抵抗性に関与するものと考えられた。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり懇篤なる御指導と御助言・御校閲を賜った九州大学農学部古賀克己教授、鮎沢啓夫教授、土井良宏教授、河原畑勇助教授並びに、本論文を取りまとめるきっかけを与えていただくとともに多くの御助言をいただいた京都工芸繊維大学繊維学部松原藤好教授に対し心から感謝申し上げる。

また、本研究を遂行するにあたり常に適切な御指導と御教示をいただいた熊本県蚕業試験場前場長鳥浜義巳氏、熊本県繭検定所業務課長縄田幸春氏、熊本県農業研究センター企画経営情報部長秋山文司氏、熊本県蚕業試験場前研究主幹中岡保男氏、熊本県農業研究センター農産園芸研究所蚕業部長井崎利行氏、熊本県蚕業試験場の研究員各位、貴重な御助言をいただいた前九州農業試験場養蚕研究室長荒武義信博士、蚕糸試験場蚕病第2研究室長(現蚕糸・昆虫農業技術研究所)鮎沢千尋博士、埼玉県蚕業試験場山口邦友博士、東京大学農学部渡部仁博士、貴重な御助言をいただくとともに抗幼若ホルモン活性物質を分与していただいた蚕糸試験場蚕生理第1研究室長(現蚕糸・昆虫農業技術研究所)赤井弘博士に

対し深謝する。蚕糸試験場蚕病第1研究室長(現蚕糸・昆虫農業技術研究所)河上 清博士, 東京都蚕糸指導所(現東京農工大学)国見裕久博士の各位からは貴重な病原を分譲していただいた。ここに感謝の意を表する。

さらに, 蚕の飼育を担当していただいた猪口タツ子さん, 吉田純子さん, 山崎圭介君, 実験のお手伝いをして頂いた長島律子さん, 畑山洋子さんに対し心から感謝する。

引用文献

- 鮎沢啓夫：膿病ウィールスの増殖様式 (I) 潜伏期間と $L D_{50}$ 一時間曲線との関係を中心とする家蚕膿病ウィールスの増殖様式について。蚕試報 14, 201-228, 1953.
- Akai. H., Kimura. K., Kiuchi. M. and Shibukawa. A. : Effect of antijuvenoid treatment on cocoon and cocoonfilaments in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 53, 545-546, 1984.
- 青木 清：蚕の硬化病防除に関する研究。蚕界 66, 3-10, 1957.
- 有賀久雄：昆虫病理凡論, 157-159, 養賢堂, 東京, 1973.
- Asano, S., Kuwano. E. and Eto. M. Anti-juvenile Hormone Activity of 1-citronelly-5-phenylimidazole in the 3rd instar silkworm, *Bombyx mori* L. Appl. Ent. Zool. 19, 212-220, 1984.
- 鮎沢千尋：家蚕の核型多角体病に対する感染抵抗性について。日蚕雑 30, 413-419, 1961.
- 蛭原富男：カイコの細胞質多角体病ウイルスに対する経口感染抵抗性と桑葉々質との関係。茨城蚕試要報 1, 61-63, 1966.
- 蛭原富男：カイコの細胞質多角体病ウイルスに対する経口感染抵抗力と人工飼料中の大豆カゼイン量との関係。茨城蚕試要報 4, 108-110, 1970.
- 江口正治・吉田 督：カイコの血液及び組織のインヒビターによる硬化病菌のプロテアーゼ阻害。日蚕雑55, 531-532, 1986.
- 福田紀文・須藤光正・樋口芳吉：人工飼料による蚕の飼育。日蚕雑 29, 1-3, 1960.
- 古田要二・鮎沢千尋：蚕におけるウイルス接種時間および回数と感染価。日蚕雑 41, 371-374, 1972.
- 古田要二：蚕の核多角体病ウイルスの二次感染。蚕糸研究 126, 57-64, 1983.
- 古田要二：人工飼料育蚕における各種ウイルスの潜伏期間。蚕試彙報 119, 71-79, 1984.
- 浜村保次：カイコの人工飼料への道。1-10, みすず書房, 東京, 1975.
- 林 英三郎・荒井良治：稚蚕人工飼料育後の中蚕期飼育温度試験。新潟蚕試要報 18, 57-59, 1979.
- 林屋慶三・西田 順・松原藤好：家蚕消化液におけるウイルスの不活化 I 飼料による不活化作用の強弱 応動昆 12, 189-193, 1968.
- Himeno. M., Matsubara. F. and Hayashiya. K. : The occult virus of nuclearpolyhedrosis of the silkworm larvae. J. Invertebr. Pathol. 22, 55-62, 1973.
- 平 繁人：核多角体病ウイルスの感染時期と死ごもり繭の発生について。九州蚕糸 14, 53, 1983.
- 広瀬興三：1-3 齢人工飼料育蚕の4 齢初期の温度に関する試験。京都農指蚕試研報 23, 40-45, 1976a.
- 広瀬興三：1-3 齢人工飼料育蚕の4 齢初期の桑葉々質に関する試験。京都農指蚕試研報 23, 45-47, 1976b.
- 広瀬興三・吉田一夫：1-3 齢期半密閉人工飼料育と4-5 齢の取り扱いに関する試験。京都蚕七研報2, 48-59, 1979.
- 一田昌利：1-3 齢人工飼料育中における麴菌汚染とその防除(第2報)。桑と蚕 27, 51-54, 1986.
- 一田昌利・縄田幸春・中岡保男：稚蚕人工飼料育・壮蚕桑葉育における蚕病予防技術組立てに関する試験(第4報)。桑と蚕 24, 37-62, 1982.
- 一田昌利・中岡保男：稚蚕人工飼料育・壮蚕桑葉育における蚕病予防技術組立てに関する試験(第5報)。桑と蚕 25, 43-66, 1983.
- 一田昌利・中西憲弘・山下信助・井崎利行：抗幼若ホルモン活性物質投与による3眠化蚕の大量飼育(予報)。桑と蚕 28, 76-85, 1986.
- 飯塚敏彦：蚕の腸内における好気性細菌フローラ

- (IV) 防腐剤添加飼料による無菌育幼虫に対する数種腸内細菌の消長. 日蚕雑 40, 86-90, 1971.
- 飯塚敏彦: *Streptococcus faecalis* AD-4に感染した人工飼料育蚕中腸皮膜の組織学的観察. 日蚕雑 41, 327-332, 1972a.
- 飯塚敏彦: *Streptococcus faecalis* AD-4による人工飼料育蚕の発病機作. 日蚕雑 41, 333-337, 1972b.
- 飯塚敏彦・滝沢義郎: 蚕の腸内における好気性細菌フローラ (II) 人工飼料による飼育蚕について. 日蚕雑 38, 95-102, 1969.
- 飯塚敏彦・堀江保宏・滝沢義郎: 蚕の腸内における好気性細菌フローラ (III) 人工飼料育蚕における腸内の細菌におよぼす防腐剤および数種抗生物質の影響. 日蚕雑 39, 253-260, 1971.
- 石井正市・中島栄一郎: 稚蚕人工飼料育蚕の桑葉移行後における核多角体病感受性の推移. 山形蚕試要報 14, 62-64, 1977.
- 石井正市・中島栄一郎: 稚蚕期の飼育光条件と多角体病ウイルス感受性. 山形蚕試要報 15, 99-102, 1977.
- 石森直人: 蚕の膿病発生と温度の限界及び伝染経路について (要旨). 日蚕雑 20 51-52, 1951.
- 石坂尊雄・田中茂男・関川利治: 稚蚕人工飼料育蚕の細胞質多角体病ウイルス感受性. 長野蚕試要報 13, 90, 1977.
- 伊藤智夫: 蚕の栄養と人工飼料. 9-14, 日本蚕糸新聞社, 東京, 1983.
- 伊藤智夫・田中元三: 人工飼料による蚕児の飼育及び5眠蚕の分離について. 日蚕雑 29, 191-196, 1960.
- 岩波 寿: 人工飼料育蚕の壯蚕期における絶食が発育および繭の計量形質に及ぼす影響. 蚕糸研究 112, 148-159, 1979.
- 岩波 寿: 人工飼料育蚕の絶食中における保護環境が発育に及ぼす影響. 蚕糸研究 128, 50-56, 1984.
- 勝又藤夫: 蠶ノ白彊病菌ノ防疫ニ關スル研究. 長野蚕試報 12, 86-132, 1930.
- 勝又藤夫: 蠶ノ白彊病菌ノ寄主體侵入ニ就イテ. 日蚕雑 3, 168-171, 1931.
- 門平潤一郎: 家蚕の麴黴病に対する防除試験. 埼玉蚕試報 30, 67-84, 1950.
- 河上 清・青木 清: 人工飼料育蚕の硬化病感染. 蚕糸研究 67, 81-96, 1968.
- 河上 清・三国辰男: 硬化病菌の蚕体への侵入時間について. 蚕糸研究 56, 35-41, 1965.
- 河上 清・三国辰男: 人工飼料育蚕の硬化病菌に対する感受性. 日蚕雑 53, 245-249, 1984.
- 木内 信・木村敬助・赤井 弘: 抗幼若ホルモン活性物質による3眠蚕の誘導とその計量形質. 日蚕雑 54, 77-81, 1985.
- 小林 勝・山口定次郎・吾妻 直: カイコにおける核多角体病の発病時期について. 日蚕雑 36, 395-399, 1967.
- 小林 勝・山口定次郎・横山好範: カイコの核多角体病ウイルスに対する感染抵抗性の発育時期による変化. 日蚕雑 38, 481-487, 1969.
- 児玉礼次郎・中筋祐五郎: 蚕から分離した細菌 (I) 無菌飼育蚕にたいする2種の分離株の病原効果. 日蚕雑 37, 477-482, 1968.
- 児玉礼次郎・中筋祐五郎: 蚕から分離した細菌 (II) 無菌飼育蚕に病原効果を示したE-5株およびE-15株の分類学的研究. 日蚕雑 38, 84-90, 1969.
- 小宮山英雄・高橋 章: 各種蚕体消毒剤の効果について (I). 岩手蚕試年報 2, 76-80, 1955.
- 小森三郎・清水孝夫: 稚蚕期人工飼料育蚕における核多角体病に関する研究 I 飼料組成の差異と感受性. 長野蚕試要報 16, 78-82, 1980.
- 久保田正樹・齋藤菊雄: 温湿度ト白彊病菌ノ病原性並ニ之ガ防除剤ニ就テ. 蠶絲242, 12-15, 1929.
- 国見裕久・森田芳昭: 稚蚕人工飼料育蚕の各種病原に対する感受性. 東京蚕指要報 13, 56-65, 1979.
- 倉田啓而: 無菌蚕の利用による蚕ウイルス病誘発の研究 (1) 低温処理の影響. 蚕試報 22, 91-110, 1967.
- 楠野正夫・久保正太郎: 東京都に発生したIsaria菌の性状について (2) 菌の培養上における性状. 東京蚕試年報 10, 151-165, 1962.
- Kuwano, E., Takeya, R. and Eto M.: Tenpenoidimidazoles: New anti-juvenile hormones. Agric. Biol. Chem. 47, 921-923, 1983.
- Kuwano, E., Takeya, R. and Eto, M.: Synthesis Anti-juvenile Hormone Activity of 1-Sub-

- stituted-5- [(E)-2,6-dimethyl-1,5-hepta-
dienyl] imidazoles. Agric. Biol. Chem. 49,
483-486, 1985.
- 松原藤好：無菌的飼育蚕における蚕病に関する研究
低温処理と多角体病誘発との関係。京工織大織
維学部学術報告 4, 291-297, 1965.
- 松原藤好：無菌的飼育蚕における蚕病に関する研究
(II) 核多角体病感染蛾の次代蚕における発病
について。京工織大織維学部学術報告 5, 1-
6, 1966.
- 松原藤好：無菌飼育における蚕病に関する研究
(III) 無菌飼育蚕を自然条件下に移して飼育し
た場合の発病。日蚕雑 36, 151-158, 1967a.
- 松原藤好：無菌飼育における蚕病に関する研究
(IV) 薬品添食が無菌飼育蚕に及ぼす影響。日
蚕雑 36, 159-164, 1967b.
- 松原藤好：無菌飼育における蚕病に関する研究
(V) 自然暴露後薬品添食した場合の核多角体
病誘発。日蚕雑 37, 137-143, 1968.
- 松原藤好：無菌蚕による家蚕のウイルス病誘発に関
する研究。京工織大織維学部学術報告 7, 34
-58, 1973.
- 松原藤好・林屋慶三：人工飼料育蚕の核多角体病ウ
イルスに対する感染抵抗性。日蚕雑 38, 43-
48, 1969.
- 松本継男・大西盛夫・林屋慶三・平川文男：稚蚕人
工飼料育の養蚕体系への導入 I 稚蚕人工飼
料室の微生物汚染。京工織大織維学部学術報告
9, 183-188, 1981.
- 松本継男・朱 亜峰・栗栖武彦・赤井 弘：伝染性
軟化病ウイルスと細菌との混合感染に及ぼす抗
幼若ホルモン活性物質の影響。日蚕雑 55, 1-
4, 1986.
- 真浦正徳・横山豊重：1-3 齢人工飼料育蚕の4 齢
飼育温度。山梨蚕試要報 17, 39-44, 1978.
- 三国辰男：麴かび病菌の1・2 齢への侵入時間。蚕
糸研究89, 99-103, 1973.
- 三谷賢三郎・河野 傳・中村眞一・岩木利男：蠶ノ
白彊病ニ關スル研究 (第一報) 白彊病豫防ノ為
メ行フ蠶体ニ「フオルマリン」水散布ニ就テ。
愛知蠶試報 1, 128-148, 1923.
- 三谷賢三郎・伊與田 茂・伊藤節之・梅村角一：蠶
ノ白彊病ニ就テノ研究 (第四報) 蠶体内ニ於ケル
白彊病菌ノ繁殖ニ就テノ病理解剖的所見。愛
知蠶試報 5, 115-136, 1928.
- 宮沢 潤：核多角体病の感染時期と感染抵抗性なら
びに発病時期について。宮崎総農試蚕成績 11,
39-40, 1982.
- 宮沢 潤：稚蚕人工飼料育蚕の桑葉移行後におけ
る蚕病感染での抵抗性の変動と発病時期。宮崎
総農試蚕成績 12, 25-27, 1983.
- 宮島成寿・鷺田純彦：人工飼料育蚕のウイルス感受
性に関する研究 (第1報) 飼料組成による感受
性の差異。愛知農総試研報 15, 334-337, 1983.
- 森田芳昭：ウイルス病感染蚕に対する合成幼若ホル
モン投与の影響。東京蚕指要報 15, 55-60,
1981.
- 森田芳昭：ウイルス病感染蚕に対する合成幼若ホル
モン投与の影響 (第2報) 東京蚕指要報 16,
36-42, 1982.
- 村上計広・田中 汎・木村由紀雄：稚蚕人工飼料育
後の壮蚕飼育技術に関する試験。鳥取蚕試報
29, 1-21, 1979.
- 村越重雄：こうじ酸の経口投与による4 眠交雑種か
らの3 眠蚕出現について。応動昆 16, 111-
113, 1972.
- 村越重雄・樺本五男：2-ヒドロキシメチル-5-ヒド
ロキシ-4-βピリドンの経口投与による4 眠交
雑種からの3 眠蚕出現について。応動昆 16,
159-161, 1972.
- 村越重雄・中田 忠・大場晏央・故田原昭・田村三
郎：カイコへのアピエチン酸誘導体の経口投与
による3 眠蚕出現について。応動昆 19, 267-
272, 1975.
- 中筋祐五郎・児玉礼次郎：蚕から分離した細菌
(V) グラム陰性桿菌の分類学的研究および無
菌飼育蚕にたいする病原効果。日蚕雑 38,
471-480, 1969.
- 中筋祐五郎・児玉礼次郎：蚕から分離した細菌 IV.
Micrococcus属およびStaphylococcus属細菌
の菌種と無菌飼育蚕に対する病原性との関係。
日蚕雑 39, 187-193, 1970.
- 中筋祐五郎・小林 明・児玉礼次郎：蚕から分離し
た細菌 VII. Streptococcus属分離株の病原性
発現経過に2つの型があることについて。日蚕
雑 39, 377-381, 1970.
- 縄田幸春・鳥浜義巳：稚蚕人工飼料育・壮蚕桑葉育
における蚕病予防技術組立てに関する試験 (第

- 1報). 桑と蚕 21, 35-44, 1979.
- 縄田幸春・一田昌利・鳥浜義巳: 稚蚕人工飼料育・壮蚕桑葉育における蚕病予防技術組立てに関する試験 (第2報). 桑と蚕 22, 32-60, 1980.
- 縄田幸春・一田昌利: 稚蚕人工飼料育・壮蚕桑葉育における蚕病予防技術組立てに関する試験 (第3報). 桑と蚕 23, 35-59, 1981.
- 小原隆三・有賀久雄・渡部 仁: 家蚕における細胞質多角体病ウイルスに対する感染抵抗力の発育時期による変動. 日蚕雑 36, 165-168, 1967.
- 大場治男: 麴かび菌の蚕体侵入から見た蟻蚕消毒の適期について. 日蚕雑 20, 186-187, 1967.
- Reed, L. and Muench, H. A. ; A simple method of estimating fifty percent end-points. Am. J. Hyg., 27, 493-497, 1938
- 西城澄雄・月田嘉文・柳田健郎: 農家および稚蚕共同飼育所より分離したこうじかび病菌について 第5報 蚕体消毒によるこうじかび病の防除に関する考察. 埼玉蚕試要報 44, 58-63, 1972.
- 酒井英郷: 人工飼料育飼育所内の麴かび病菌の検出実態. 新潟蚕試要報 17, 25-32, 1978.
- 関 宏夫: 人工飼料育蚕の各種病原に対する感受性 第1報 核多角体病に対する感受性. 山梨蚕試要報 19, 87-93, 1980.
- 関 宏夫・川口忠夫: 人工飼料育蚕の各種病原に対する感受性 第1報 核多角体病に対する感受性. 山梨蚕試要報20, 88-91, 1981.
- 関 宏夫: 核多角体病と繭中へい蚕の発生について (2) ウイルスの感染時期と重複感染. 山梨蚕試要報 21, 67-71, 1982.
- 関 宏夫: イミダゾール系殺菌剤の投与によるカイコの眠性変化. 応動昆 29, 247-250, 1985.
- 清水孝夫・川上圭司: 稚蚕期人工飼料育蚕における核多角体病防除法に関する試験. 長野蚕試要報 20, 58-70, 1984.
- 曾根正澄・栗原昌次・石井好一: 人工飼料育におけるこうじかび病の防除について. 埼玉蚕試研報 53, 30-37, 1980.
- 高瀬信孝: 三眠蠶ノ經濟的價値ニ就テ. 蚕界 45, 74-78.
- 滝口義夫・富田一郎: 稚蚕人工飼料育の実用化に関する試験 第4報 稚蚕人工飼料育の桑切換え時期とウイルス感受性について. 神奈川蚕セ研報 8, 23-25, 1980.
- 田中茂男・清水孝夫: 栄養条件が家蚕のウイルス病感染率に及ぼす影響. 長野蚕試要報 4, 148-154, 1968.
- 鳥浜義巳・浜田正昭: 多角体病伝染に関する研究, 主として実際上の感染について. 熊本蚕試報 36, 35-40, 1960.
- 塚田修一・栗原昌次: 網下平板給餌法における座蒸れ防止試験. 埼玉蚕試研報 53, 22-29, 1980.
- 上田 悟・河上 清・中島正雄: 人工飼料育における蚕体消毒の試み. 蚕糸彙報 121, 89-98, 1984.
- 鷲田純彦・宮島成寿: 人工飼料育の飼育環境と蚕児のウイルス感受性. 愛知農総試研報 11, 158-164, 1979.
- Watanabe, H., and Aruga, H. : Susceptibility of dauer-pupa of the silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), to a nuclear-polyhedrosis virus. Appl. Ent. Zool. 5, 118-120, 1970.
- 渡部 仁・有賀久雄: カイコの核多角体病における病勢の進展と眠との関連. 日蚕雑 40, 37-41, 1971.
- 渡部 仁・高宮邦夫: 家蚕の飼育光条件と多角体病ウイルスに対する感受性. 日蚕雑 45, 403-406, 1976.
- 渡部 仁・清水孝夫: 養蚕農家にみられる最近の核多角体病流行の要因について. 日蚕雑 50, 146-153, 1981.
- 吉田徳太郎・松岡道男・木村孝一: 乾燥桑葉粉末を基本とする人工飼料による家蚕の飼育について. 蚕試報 8, 35-42, 1960.

STUDIES ON THE RESISTANCE AGAINST FUNGAL AND VIRAL INFECTION IN THE SILKWORM LARVAE REARED ON ARTIFICIAL DIET BY

MASATOSHI ICHIDA

SUMMARY

Resistance against fungus infection

When the newly exuviated 3rd instar larvae were inoculated with conidia of *Aspergillus flavus*, invasion seemed to be completed until 18 hr. This held true either in the larvae reared on artificial diet or mulberry leaves during their 1st and 2nd instars. On the other hand, the time of invasion of *Beauveria bassiana* was shorter in the larvae reared on artificial diet than those reared on mulberry leaves.

The germination from the conidia of both fungi was inhibited in the haemolymph taken from the newly molted 5th instar larvae. The inhibition rate in the haemolymph from day-3 larvae was smaller if they were fed with mulberry leaves but remained unchanged if they were fed with artificial diet.

In the system of rearing with artificial diet at the 1st-3rd instars, inoculation with *A. flavus* at the early periods caused the production of a large number of colonies in the rearing beds and feces. This occurred during drying of the beds at the 2nd molting stage. From these colonies contamination would take place, since fungus infection prevailed in the 4th instar larvae. As to the system in which artificial diet was given during the 1st-2nd instars, early inoculation did not give colonies; in this case the inhibition by antifungal agents added in the diet seemed to be

effective.

Starvation of larvae and resistance to viruses

Shorter feeding with artificial diet at the 2nd instar was found to reduce the resistance of larvae against the viral disease infection. When fasting was started at 50 hr after the onset of the 2nd instar, larvae became significantly less resistant against IFV infection. The cessation of feeding within 55 hr decreased the resistance to CPV. The susceptibility to this virus received more marked effect than to NPV and IFV.

In the larvae fed on artificial diet until the 2nd instar, the elongated fasting, i.e. the retarded supply of mulberry leaves, purposely done to synchronize the following development, was found to cause a decrease in resistance toward the viruses. The results depended upon the temperature during the nonfeeding period. The influence to CPV and NPV infection was larger compared to IFV.

Changes in resistance to viruses at the 3rd instar

The 3rd instar larvae reared on artificial diet until the 2nd instar was less resistant to the virus infection compared to the larvae fed totally with mulberry leaves.

The larval resistance changed during development at the 3rd instar, although the pattern differed according to the virus. The NPV resistance increased and at 24 hr of the instar it

became close to that of the larvae which had been raised thoroughly on mulberry leaves. For CPV, the value gave a maximum at 6 hr. Again at 24 hr it was nearly the same as that of the larvae raised on mulberry leaves. The IFV resistance augmented as the time elapsed but there was no difference between the silkworms reared on artificial diet and mulberry leaves.

Resistance to viruses under different temperatures

At the 3rd instar following raising with artificial diet until the 2nd instar, rearing temperature was changed and the resistance to the viruses was investigated. When the temperature was beyond 32°C, the CPV resistance rose, probably due to the suppression of the viral replication. The NPV and CPV resistance was impaired when the larvae were exposed at 5°C in particular before feeding. On the other hand, the low temperature did not affect the IFV infection.

After rearing with artificial diet until the 3rd instar, the larvae were subjected to the test for NPV infection. Chilling of the newly molted 4th or 5th instar larvae at 5°C extensively lowered the resistance.

Changes in resistance to NPV during larval period

The resistance to NPV was investigated using the silkworms grown on the artificial diet until the 3rd instar and thereafter with mulberry leaves. The larval resistance increased as the instar proceeded. During each of the 1st to 4th instars the larval resistance showed a peak around the middle period. The pattern of the 5th instar was rather complicated and exhibiting a M-shaped pattern.

Fungal and viral infection to AJH-induced trimolter

Treatment with anti-juvenile hormone (AJH) induces an artificial tree-molter, which undergoes 3 ecdyses instead of 4 of the normal silkworm. At the 4th (final) instar the induced trimolter was more resistant to A. flavus but less resistant to Beauveria than the normal four-

molter silkworm. The invasion time of the conidia was longer in A. flavus but shorter in B. bassiana as compared to the normal larvae.

The viral-resistance was found to be higher in the AJH-induced trimolter than the normal with either of NPV, CPV or IFV. The changes in resistance during the 4th instar of the AJH-induced trimolter resembled the results of the 5th instar of the normal. This fact, together with other evidence, suggests that the physiological changes invoked by AJH affected the larval resistance against pathogens.