

硬化病菌の生産する毒性物質に関する研究

(第3報) 各種硬化病蚕血液内における 毒性物質の存在について

古 平 福 紀*

Yoshinori KODAIRA: Studies on the Toxic Substances produced by Muscardine Fungi. III. Existence of the Toxic Substances in the Blood of Silkworms Attacked by Various Muscardine Fungi.

(1960年9月1日受理)

硬化病菌はいずれの菌も培養液内で培養条件が好適である場合は蚕に対する毒性物質を生産することを前報¹⁾において報告した。するととはたして蚕が硬化病となつた場合にその血液内に硬化病菌が毒性物質を生産し、かつこれが蚕をへい死させる一要因となつているのであるうか。

本報においてはこの点を明らかにするため、硬化病菌を接種した病蚕のへい死期における血液をとり、この中に毒性物質が存在しているか否かを調べた結果について報告する。

実 験 の 部

第1表 硬化病蚕の病間日数および血液の色調

接 種 硬 化 病 菌	供 試 蚕 数	接 種 時 期	病 間 日 数	血 液 の 色 調
白きよう菌 <i>Beauveria Bassiana</i> 4号菌	400 匹	5令第4日	3 日	黄 色
緑きよう病菌 <i>Spicaria pracina</i>	400	5令第3日	7.5	黄 色
黄きよう病菌 <i>Isaria farinosa</i> 1号菌	400	5令第4日	2.5	黄 色
赤きよう病菌 <i>Isaria fumoso-rosea</i>	400	5令第5日	2	黄 色
黒きよう病菌 <i>Oospora destructor</i> 2号菌	150	5令第3日	3	黄褐色
こうじかび病菌 <i>Asp. oryzae</i> 2号菌	250	5令第4日	2.5	黒褐色
こうじかび病菌 <i>Asp. oryzae</i> 30号菌	250	5令第4日	2	濃黄色
こうじかび病菌 <i>Asp. flavus</i> 1号菌	200	5令第3日	3	褐 色
こうじかび病菌 <i>Asp. flavus</i> 2号菌	250	5令第4日	3	黒褐色
こうじかび病菌 <i>Asp. ochraceus</i> 1号菌	150	5令第6日	3	黄褐色
こうじかび病菌 <i>Sterigmatocystis japonica</i>	250	5令第5日	3	黄 色

備考 飼育期：春蚕期，飼育温度：22°~25°C

* 信州大学繊維学部蚕体病理学研究室

I 硬化病蚕血液の採取法

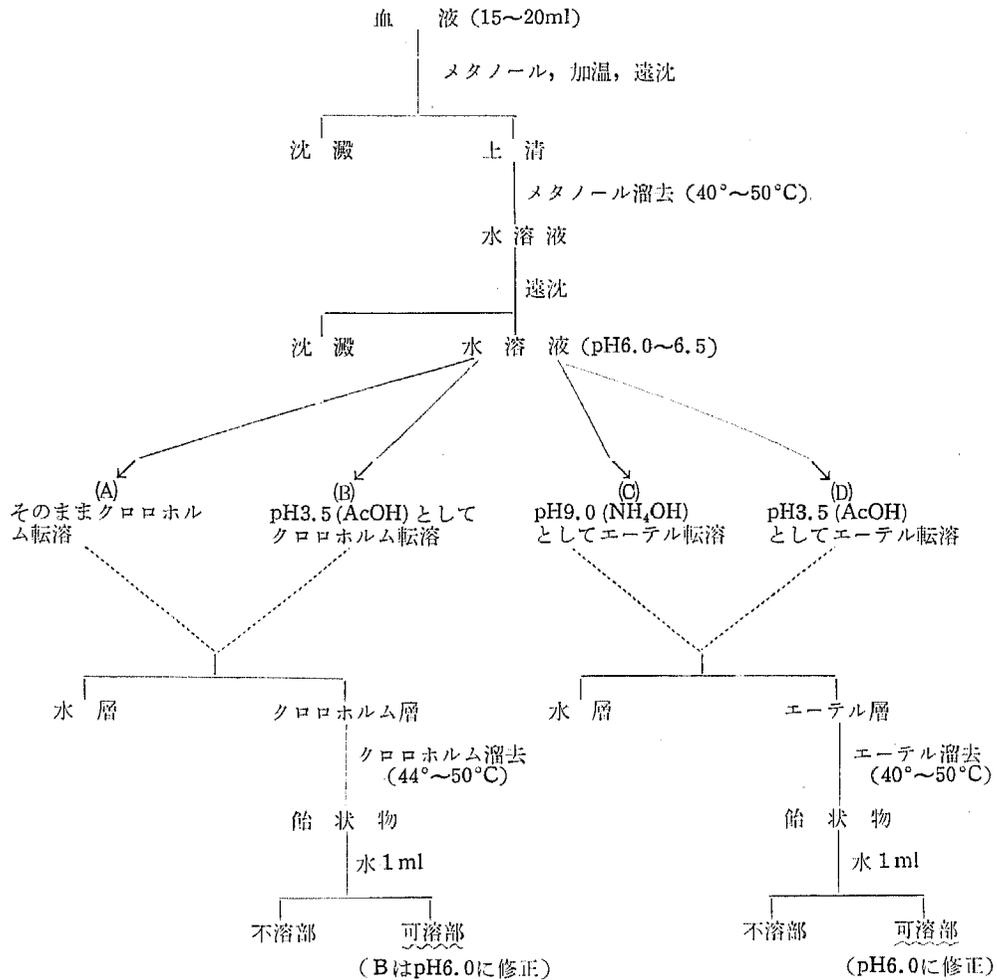
硬化病菌は第1表に示すような8種類11株の菌を用い、これらの菌の孢子浮遊液を5令蚕の血液内に環節間膜をとおして接種して普通飼育のもとに発病させ、頻死期ないしへい死直後の病蚕のみを採り、直ちに脚部を切断して血液を採取した。この際における菌の接種時期、菌を接種してより硬化病蚕がへい死するまでの日数および採取した血液の色調等は第1表の通りである。

なお、白きよう病蚕、緑きよう病蚕、黄きよう病蚕および赤きよう病蚕等は病蚕のへい死期における採血は相当に困難であるので供試頭数を多くした。

II 採取血液の処理法

採取した血液はそのまま他の健康蚕の血液内に注射すると蚕児はショック病状を呈し、直ち

第1図 血液の処理法



に硬直して仮死状態となる。この現象は健康蚕の血液の方がやや著しく現われるが、このような仮死状態におちいつた蚕児は注射量が少ない時には2~3時間後に、注射量がやや多い時には数時間後にほぼ恢復する。しかし、前報において述べたように硬化病菌の生産する毒性物質による中毒症状も大部分が注射後短時間内に現われ、かつ、症状が比較的類似しているので、血液自体がショック症状を表わす場合には両者を区別することが困難である。そこで筆者は血液内のショック症状を起す原因を除去する必要を感じ、健康蚕血液について第1図に示す方法で処理を行つた。すなわち、血液20mlを採り、除蛋白のためメタノールを加え更に軽く湯湯中で加温して遠沈後上清をとつた。この場合除蛋白にメタノールを用いたのは病蚕血液の場合その中に含まれていると考えられる毒性物質が蛋白と共に沈澱するのをなるべく防ぐためである。この上清のメタノールを40°~50°Cで減圧溜去し、更に直空デシケーター中で十分にメタノールを除き、これを蚕に注射するとなお強いショック症状を起させた。そこで硬化病蚕血液の場合、その中に含まれていると考えられる菌の生産した毒性物質を有機溶媒に転溶させようと考えたが、その際転溶物がなおショック症状を起すか否かを知るため健康蚕血液の除蛋白液を更にA, B, C, Dの4つの方法に分けてクロロホルムあるいはエーテルで振り出し、溶媒層の溶媒を溜去して得た餡状物に水を加え、その水溶液を蚕児に注射するとどの転溶法の場合でもショック症状を起させないことを知つた。

以上の方法によつて血液自体によるショック症状を除去することが出来たので、各種の硬化病蚕の血液15~20mlについて除蛋白を行つた後これら4つの転溶法の中いづれかの方法を用いて有機溶媒による転溶を行い、転溶物の水溶液を毒性の有無を調べる試料とした。

III 血液を処理して得た水溶液の毒性

毒性を調べるためには血液を処理して得た水溶液をpH 6.0に修正して5~10匹の蚕児の血液内に注射した。蚕児は主として4令蚕を用いたが、飼育の都合上3令蚕を用いなければならぬ時もあった。このような時には蚕体の大きさを考えて注射量を少なくした。

血液の処理方法は第1図に示したようにA, B, CおよびDの4つの転溶法を用いたが、黒きよう病蚕および*Asp. ochraceus*によるこうじかび病蚕の場合は、その病原菌の培養液から毒性物質を抽出する際中性状態においてクロロホルムによく転溶することがわかっているのでA法だけを用いたが、それらの処理液は共に強い毒性を示した。その他の硬化病蚕は血液を多量に採取し得ない関係から、多くは血液を除蛋白して得た水溶液を酸性として溶媒に転溶させる方法をとつたが、どの病蚕の血液も毒性を示した。

中毒症状は白きよう病蚕血液のように注射後約15分位経つてから前胞部が他の病蚕血液の場合に反して縮小し、また緑きよう病蚕血液のように或る時間を経過してから著しい痙攣症状を呈することがあるが、一般的症状としては注射後間もなく胸部の膨大および全身の硬直を起し、かつ毒性が余り強くない時には体の中央部から屈曲反転する特徴があつた。

中毒症状とショック症状との関係については、すでに述べたように健康蚕血液の除蛋白液をクロロホルム或はエーテルで振ると転溶物はショック症状を起さず、かつ中毒症状は胸部の膨大および全身の硬直の外に体を屈曲反転させる傾向があるので明らかに両者を区別しうる。

また病蚕の種類によつては中毒症状が比較的短時間で恢復するものがあるが、これはそれら病原菌の生産する毒性物質の有機溶媒への転溶が良好でないためであろうと考えられる。

以上の結果から、この実験に用いた硬化病菌は蚕児の血液内で発育をはじめて病蚕がへい死する時期になると血液内に毒性物質を生産することがわかつた。

第2表 硬化病蚕血液を処理して得た水溶液の蚕児に対する毒性

硬化病蚕名	注射時の蚕令 および注射量 (ml)	有機溶媒転溶法 と毒性の有無				中毒症状
		A	B	C	D	
白きよう病蚕	4令第5日 0.05~0.08	+	+			全身硬直卒倒, 約15分後前胸部縮小す 約24時間後へい死
緑きよう病蚕	4令第6日 0.05~0.08	+	+			胸部膨大, 全身硬直卒倒, 約10分後硬 直は恢復するか胸部を起立して著しく けいれんす。数時間この状態を持續す る。
黄きよう病蚕	4令第5日 0.05~0.08				+	胸部膨大, 全身硬直卒倒, 体中央部よ り屈曲, 約20分後次第に恢復に向う。
赤きよう病蚕	3令第3日 0.02	+	-	-		注射直後ただちに横倒, 体伸長す。数 分後胸部膨大, 全身硬直。約15分後恢 復に向う。
黒きよう病蚕	4令第5日 0.05	+				全身硬直, 吐液多量, 間もなくへい死 す。
こうじかび病蚕 (<i>A. oryzae</i> 2号菌)	4令第5日 0.05~0.08	+	-		+	胸部膨大, 全身硬直, 体中央より屈曲 す。約20分後恢復に向う。
こうじかび病蚕 (<i>A. oryzae</i> 30号菌)	4令第5日 0.05~0.08	+	-		+	同上
こうじかび病蚕 (<i>A. flavus</i> 1号菌)	4令第2日 0.05~0.08	+	-		+	同上。約2時間後恢復に向うが, 多少 けいれんあり。
こうじかび病蚕 (<i>A. flavus</i> 2号菌)	4令第2日 0.08			-	+	前胸部縮小, 腹部やや膨大, そのまま 24時間後へい死
こうじかび病蚕 (<i>A. ochraceus</i>)	4令第2日 0.05~0.08	+				胸部膨大, 全身硬直, そのままへい死
こうじかび病蚕 (<i>Sterig. japonica</i>)	3令第2日 0.02	-	+	-	-	胸部膨大, 全身硬直。約30分後恢復に 向う。
健康蚕 (対照)	4令第5日 0.10	-	-	-	-	異常なし

備考 (1) A, B, C, D. の記号は第1図に示した有機溶媒転溶法である。

(2) (-)は中毒症状が全く現われない状態, (+)は中毒症状が1時間以内に恢復する状態を,
(++)は症状が1時間以上にわたる状態を, (+++)は注射後間もなく中毒死する状態を示す。

摘 要

硬化病蚕がへい死する際にその血液内に硬化病菌の生産する毒性物質が存在しているか否かを知るため, 9種11株の硬化病菌を接種した病蚕のへい死期における血液を除蛋白してクロロホルム或はエーテルで振り出した飴状物の水溶液について蚕児に対する毒性の有無を調べた結果, いずれの硬化病蚕の血液も蚕児に中毒症状を起させた。従つて, 病蚕の血液中には硬化病菌の生産する毒性物質が存在しており, これが硬化病蚕をへい死させる一原因となつていものと考える。

終りに, 有益な御助言と御鞭撻を賜つた当学部生物学教室の小山長雄博士ならびに本研究に終始熱心に協力された東川静夫氏に厚く感謝の意を表する。

また本研究は日本ワックスマン財団の研究奨励金によつて行つた研究の一部である。記して感謝の意を表する。

文 献

- (1) 古平福紀：信大織報 (9) 79~82 (1959)
 (2) ————：日蚕誌 28 (3) 179 (1959)

Summary

The existence of the toxic substances in the blood of silkworms attacked by the following muscardine fungi are dealt with in this paper.

Beauveria Bassiana (BALS.) VUILL.

Spicaria pracina (MAUBL.) AOKI

Isaria farinosa (DIKS.) FR.

I. fumoso-rosea WIZE

Oospora destructor (METSCH.) DELAC.

Aspergillus oryzae WEHMER.....Two strains

Asp. flavus LINK.....Two strains

Asp. ochraceus WILM.

Sterigmatocystis japonica AOKI.

The injected syrups into the blood were obtained from the blood of silkworms in state of death caused by muscardine diseases, extracting with chloroform or ether after expelling proteins, then they were used for the injection being added 1 ml. water.

The silkworms showed poisonous symptoms by these water solutions in every case.

The results prove that the toxic substances to the silkworms are produced in the blood of diseased silkworm caused by the muscardine fungi.