

# 白蠶病蚕血液内の有機酸について\*

古 平 福 紀\*

Yoshinori KODAIRA : On the Organic Acids in the Blood of White Muscardine Silkworms.

(1956年10月1日受理)

白蠶病菌は硬化病菌の中特に酸生成力が強く硬化後の白蠶病蚕の体外に大きな結晶性の物質が析出する事は屢々見うけるが、この主成分は脛酸アンモニアである事はすでに報告<sup>5)</sup>した。

健常蚕の血液は微酸性を呈しており、これは主としてその中に含まれる有機酸に原因している事はすでに知られている。そしてこの微酸性である事は硬化病菌の発育上好適な条件となっているのであるが、白蠶病菌が蚕の血液内でその有機酸をどのように利用しているか未だ明らかにされていない。又白蠶病菌が酸を生成するのは白蠶病のどのような病勢の時期に最も多いかという事は白蠶病菌の病原作用を究明する上に重要な事であると考えられる。そこで筆者は白蠶病蚕を病勢により若干の時期に分け、病勢と血液内の酸度の消長との関係を調べると共に有機酸の種類をペーパークロマトグラフィーにより調べた。

尚ペーパークロマトグラフィーによる有機酸検出の応用は Lugg 等<sup>6)</sup>, Stark 等<sup>7)</sup>, 麻生等<sup>1)</sup>, 野村等<sup>7)</sup>及び竹本等<sup>10)</sup>により果実或は植物等の有機酸の分析に利用され、小幡等<sup>8)</sup>及び山本等<sup>11)</sup>は鯉節或は清酒の香気成分の分析に、北原等<sup>4)</sup>は菌核菌の生成する有機酸の分析に、又吉田等<sup>12)</sup>は蚕児血液の有機酸の分析にそれぞれ利用している。

## 実 験

### I. 血液中の総酸度

#### 1) 材料及び方法

5 齢 3 日目乃至 4 日目の蚕(交雑種)の血液内に白蠶病菌孢子浮遊液(濃度 1:20)を 0.01~0.02cc 宛注射し蚕の症状により次の各時期に分けた。

軽症期……孢子接種後 24 時間及び 48 時間経過した病蚕(但し晩秋蚕期の場合は 48 時間及び 72 時間経過したもの)、重症期……殆ど食桑を停止し挙動不発の病蚕、斃死期……斃死直前の病蚕と斃死直後の病蚕の 2 通りに分けた。前者は殆ど斃死状態にあるが指頭で触れると多少反応を示したもので、後者は斯かる状態のものを約 1

時間以内放置し完全に斃死した病蚕である。未硬化期……斃死直後の状態にある病蚕が更に約 2 時間経過し、まだ軟化病同様の軟みのあるもの、硬化期……蚕体が硬化しはじめ硬度が最大となつた病蚕(但し乾固の状態ではない)、菌糸発生期……病蚕体外に微かに菌糸が発生したもの。尚菌を接種した蚕は春蚕期及び夏蚕期の場合には接種後 50 時間前後で、又晩秋蚕期の場合には 75 時間前後で斃死した。

総酸度の測定は有機酸醱酵の総酸度測定法に従い血液 1~2 cc を採り水で 2~3 倍に稀釈後 1~2 分間加熱、濾過して蛋白質を除き N/10 NaOH でフェノールフタレインを指示薬として滴定した。

#### 2) 実験結果

実験は春、夏及び晩秋の 3 期に行い、各蚕期共夫々 3 回宛繰返し行つた結果の平均値を以て表わした。その結果は第 1 表及び第 2 表に示す如くである。尚第 3 表は晩秋蚕期に於ける軽症期及び斃死直前の状態の病蚕の血液内に於ける白蠶病菌分生胞子の発芽管長を測定した結果である。

第 1 表 白蠶病蚕血液中の総酸  
(血液 1cc 中の N/10 NaOH 量) 春・夏蚕期

症 状	軽 症 期		重 症 期	斃 死 期		未 硬 化 期	硬 化 期	* 菌 糸 発 生 期
	接 種 後 24 時 間	接 種 後 48 時 間	重 症 期	斃 死 前	斃 死 後	未 硬 化 期	硬 化 期	菌 糸 発 生 期
	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc
春 白蠶病蚕	0.31	0.32	0.29	0.23	0.18	0.37	0.69	0.50
健 常 蚕	0.30	0.31	0.31	0.31	0.31	—	—	—
夏 白蠶病蚕	0.27	0.29	0.17	0.14	0.05	0.12	0.65	0.48
健 常 蚕	0.27	0.29	0.30	0.31	0.31	—	—	—

(註) \* この場合は游離酸の酸度である。第 2 表も同様

第 2 表 白蠶病蚕血液中の総酸  
(血液 1cc 中 N/10 NaOH 量) 晩秋蚕期

症 状	軽 症 期		重 症 期	斃 死 期		未 硬 化 期	硬 化 期	糸 菌 発 生 期
	接 種 後 48 h	接 種 後 72 h	重 症 期	斃 死 前	斃 死 後	未 硬 化 期	硬 化 期	糸 菌 発 生 期
	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc
白きよよ蚕	0.25	0.29	0.27	0.22	0.11	0.48	0.81	0.38
健 常 蚕	0.27	0.30	0.32	0.32	0.32	—	—	—

\* 信州大学繊維学部 蚕体病理学研究室

\*\* 本研究の概要は昭和 31 年 3 月日本蚕糸学会にて発表

第3表 蚕の血液内に於ける白蠶病菌の菌糸長

菌糸長		平均( $\mu$ )	最長( $\mu$ )
軽症期	接種48時間後	8	27
	接種62時間後	21	52
斃死直前		45	92

即ち白蠶病蚕血液中の総酸度は軽症期には対照としての健常蚕と殆ど変りが無いが、重症期になると稍低下し、斃死期殊に斃死直後には著しく減少する。これは、この時期には菌糸が相當に伸長し白蠶病菌の生理作用が旺んとなり血液内の有機酸を栄養源として利用するためであろうと考えられる。しかして未硬化期には斃死期よりも逆に酸度は増加し、更に硬化期に至ると最大となり菌糸発生期には硬化期より多少低下する。尚菌糸発生期の病蚕血液を放置しておくとも白色沈澱が生ずるが、これは有機酸が不溶性塩となつたものと考えられる。従つて血液中の遊離の有機酸の酸度は低下したものと推定されるがこの不溶性塩については目下追究中である。

## II 血液中の有機酸の種類

### 1) 材料及び方法

総酸度測定の場合と同一の方法によつて得た病蚕を斃死期、硬化期及び菌糸発生期の3つの時期に大別し、対照として健常蚕を用いた。これらの血液を採り加熱により蛋白質を除いた後濾液を水蒸気蒸溜して揮発性酸部と不揮発性酸部に分けた。

ペーパークロマトグラフィーは東洋濾紙 No. 50 (3cm × 40cm) を用い、一端より 8 cm の処を原点とした。容器は内径 15cm、高さ 45cm のガラス円筒を用い内部に小型ガラス円筒をおき、その上端に展開剤を入れた径 7 cm の蒸発皿をおき、一次元下降法で実施した。尚展開温度は 28~30°C、展開時間は 7~8 時間とした。

### 2) 結果

#### a) 不揮発性酸部

不揮発性酸部は  $H_2SO_4$  で酸性として近藤の自動抽出器で約 70 時間エーテル抽出し、エーテル可溶部のエーテルを蒸発したものを試料とした。展開剤は n-butanol-acetic acid-water (4:1:1) 及び phenol-water-80% formic acid (3g:1cc:1%) の 2 種類を用い、発色剤には 95% ethanol 100cc に bromphenol blue 40 mg を溶かし NaOH で僅かにアルカリ性としたものを用いた。

第4表 血液内の有機酸の種類

有機酸	症 状			
	健常蚕	斃死期	硬化期	菌糸発生期
Succinic	+	+	+	+
Malonic	+	-	-	-
Malic	-	+	+	-
Citric	+	-	+	-
Oxalic	+	-	+(?)	-
Tartaric	-	+	+	-

第5表 Specimen の Rf 値

有機酸	展開剤	Phenol-H <sub>2</sub> O-80% formic acid (3g:1cc:1%)
	BuOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (4:1:1)	
Lactic	0.77~0.79	0.74~0.76
Succinic	0.76~0.78	0.73~0.75
Malonic	0.65~0.68	0.59~0.62
Malic	0.54~0.58	0.48~0.50
Citric	0.48~0.52	0.35~0.37
Oxalic	0.49~0.54	0.38~0.40
Tartaric	0.39~0.42	0.29~0.31

それらの結果は第4表に示す如く対照としての健常蚕血液に於ては Succinic, Malonic, Citric 及び Tartaric の 4 種類の有機酸を認めたが、白蠶病蚕の斃死期の血液では健常蚕に見られた 4 種類の酸の中 Malonic 及び Citric が検出されず、健常蚕に見られなかつた Malic が検出された。併し硬化期の病蚕血液では Malonic はやはり認められなかつたが Succinic, Malic 及び Tartaric の外 Citric が認められ、又不確実ではあるが Oxalic が認められた。尚菌糸発生期の血液では Succinic 1 種類しか認められなかつた。

#### b) 揮発性酸部

健常蚕の揮発性酸部は僅かに酸性を呈しており軽い一種の芳香をもつていたので小幡等<sup>(6)</sup>の方法に従い、5% KOH液で微アルカリ性として濃縮後 10%  $H_2SO_4$  で酸性として 50 時間エーテル抽出し、脱水後エーテルを蒸発して淡褐色油状物質を得た。このものを hydroxamic acid法<sup>(7)</sup>により hydroxamic acid 液を作り展開試料とした。即ち褐色油状物質 100mg にメタノール 10cc、濃硫酸 10滴を加え 80~85°C の湯煎中で還流冷却器を附して 30 分間加熱後 10% KOH メタノール液で中和し、これに 5% ヒドロキザミン メタノール液 3.5cc と 10% KOH メタノール液 3 cc を添加、10 分間 80~85°C の湯煎中で加熱し濾過後濾液を蒸発し、冷却後 alcohol HCl (2:1) を滴下して微酸性となし、これを試料として n-ブタノール水

飽和液を以て一次元下降法で展開し風乾後10%塩化第2鉄溶液を噴霧した。

この結果健康蚕血液に於ては Rf 0.42~0.43 及び Rf 0.30~0.32 の2箇所 purple の Spot 認められた。前者は Formic acid と推定されたが確認するには至らなかった。後者は比較的うすい purple を呈しており如何なるものか不明である。又白蠶病蚕血液についても同様操作を行つたが材料の関係上詳かにし得なかつた。これらは目下追究中である。

## 考 察

本実験に用いた白蠶病蚕の発生方法は分生孢子浮遊液を蚕の血液内に注入する方法を採つたが、自然発生の場合と条件が異なるのではないかという疑問が生ずる。併し自然発生の場合即ち分生孢子が蚕の体皮上に附着した場合は発芽管は体皮を貫通後菌糸となつて伸長し多数の円筒形孢子を形成し、これが発芽伸長する際に蚕は斃死に至るので本実験に用いた方法も蚕の血液内に於ける菌の生理作用については自然発生の場合に比べ余り考慮すべき差がないものと考えられる。

又白蠶病菌は強い酸生成力を有するが、本実験の結果血液内で酸を最も多く生成する時期は硬化期であり従つて酸生成能は白蠶病菌の病原作用には無関係であり、むしろ菌糸の伸長初期に於ける有機酸の摂取が蚕を斃死させる一誘因となつているものと推定される。しかして摂取する酸の種類は Malonic 及び Citric の2種類に限られないで斃死期の病蚕血液の酸度が相当に低い事から Succinic 及び Tartaric 等も相当程度利用されているものと考えられる。

## 摘 要

本実験に於ては蚕の血液内に於ける白蠶病菌の生理作用特に菌の發育と病原作用との関係を知るための一部として、種々の病状の病蚕血液の総酸度と有機酸の種類とを調べた。

その結果総酸度は孢子の未発芽及び発芽初期に当る軽症期にあつては健康蚕と殆ど変りなく、重症期には多少減少し、菌糸が相当に伸長しはじめた斃死期にあつては顯著に減少した。又斃死後2~3時間内の未だ硬化のはじまらない病蚕にあつては酸度が増加しはじめ、硬化の進んだ病蚕にあつては著しく増加した。

有機酸の種類は健康蚕では Succinic, Malonic, Citric 及び Tartaric を認めたが、斃死期の病蚕では Succinic,

Malic 及び Tartaric を、硬化期の病蚕では Succinic, Malic, Citric, Tartaric 及び Oxalic (不確定) を、又菌糸発生初期の病蚕にあつては Succinic のみを認めた。

## 文 献

- (1) 麻生清・柴崎一雄・松田和雄・山田文雄・森 健・関口茂雄：醸酵工学, 29, 167 (1951)
- (2) 井上吉之・野田万次郎：農化 24, 291 (1951)
- (3) 化学実験学・微生物及び酵素実験法：河出書房
- (4) 北原増雄・竹内良光：岐阜大農研報(2), 71(1953)
- (5) 古平福紀：日蚕誌, 24, 211(講要)(1955)
- (6) Lugg, J. W. H. and Overell, B. T., : Nature 160, 87 (1947)
- (7) 野村男次・高橋豊：醸酵工学 30, 29 (1952)
- (8) 小幡弥太郎・侯野景典：農化 26, 184 (1953)
- (9) SPARK, T. B. GOODBAN, A. E., and OWENS, H. S., : Anal. Chem, 23, 413 (1951)
- (10) 竹本常松・小池弘之：薬学 73, 100 (1953)
- (11) 山本銀三・嘉納成三・菅野誠之助：農化 27, 114 (1954)
- (12) 吉田徳太郎・松崎慶子：日蚕誌 24, 191 (講要)(1955)

## Summary

The author examined total acidity and kinds of organic acids on the blood of silkworms in various states of the white muscardine disease.

The followings are the results.

The acidity of the blood of the white muscardine silkworms decreased at a serious state and at a dying state, but began to increase two to three hours after their death and furthermore increased remarkably at a hardening state.

Regarding kinds of organic acids in the blood, the author could recognize to contain succinic, malonic, citric and tartaric acids in healthy silkworms; succinic, malic and tartaric acids at a dying state; succinic, malic, citric, tartaric and oxalic acids(uncertain) at a hardening state; only succinic acid at a state which mycelium is observed externally on the larval body.