

硬化病菌の生産する毒性物質に関する研究

第1報 *Aspergillus ochraceus* 及び *Sterigmatocystis japonica* の

生産する蚕児中毒性物質について

古平福紀*

Yoshinori KODAIRA: Studies on the Toxic Substances Produced by *Muscardine* fungi. I. On the Silkworm Poisonous Substances Produced by *Aspergillus ochraceus* and *Sterigmatocystis japonica*.
(1954年9月5日受理)

硬化病菌の蚕体に対する病原機作についての論文はまだ極めて少い。先に青木は⁽¹⁾*Aspergillus flavus* 及び *Botrytis bassiana* の1ヶ月培養濾液を蚕児に注射すると、共に毒性を示し、*A. flavus* の場合には特異的な症状を呈すると報告した。

筆者は9種14培養系の硬化病菌を用い、その培養液中に毒性物質が生産されているや否やについて検討中である。硬化病菌の侵入経路並びに蚕体内に於ける硬化病菌の初期の繁殖状態等から考えるならば、毒性の検索は血液内への注射による方法が妥当であると考えられるが、筆者は先ず経口的な方法による検索を行い、*A. ochraceus* 及び *S. japonica* の培養濾液に顕著な毒性を認めたので、両菌種の培養濾液より夫々毒性物質の抽出を行い、毒性の強い粗製物を得た。本報に於てはこれら毒性の検索と培養液からの毒性物質の抽出について報告する事とする。尙血液内注射法による毒性物質の検索は現在推進しつつある。

起稿に当り、御指導御援助賜わつた本学部佐藤利一教授並びに松尾卓見助教授 又実験に協力された小富山英雄及び土屋拓大の両氏に対し厚く謝意を表する。

I. 各種硬化病菌の蚕児に対する毒性

(1) 供試菌

Botrytis bassiana No.2, *Isaria farinosa* No.1, *Isaria fumosorosea* No.1, *Spicaria rubidopurpurea* No.1, *Oospora destructor* No.1, *Aspergillus ochraceus* No.1, *Sterigmatocystis japonica* No.1, *Aspergillus flavus* No.1~3, *Aspergillus oryzae* No.1~4

(Noは研究室保存培養系番号を示す)

(2) 培養液

次の組成の Czapek-Dox 改変培地を用いた。
 K_2HPO_4 0.5%, $MgSO_4$ 0.5%, KCl 0.5%, $NaNO_3$ 0.2%, $FeSO_4$ 0.001%, saccharose 3.5%, pepto-

ne 0.5% pH 6.8~7.0 (滅菌 1.5気圧20分間)

(3) 実験方法及び結果

上記の各種硬化病菌を Czapek-Dox 改変培地に23°Cで6日間培養した後、その濾液の反応をNaOH溶液でpH7.0に修正し、給桑時に桑葉に噴霧して蚕に与えた。蚕児は支113号の5令起蚕を用い、1日5回給桑の中2回を連続添食し他の3回は普通給桑として、6日間添食を続けた。

その結果は第1表に示す如くである。即ち *A. ochraceus* の培養濾液を与えた蚕児は全部が中毒症を起し、又 *S. japonica* の培養濾液を与えた蚕児は約1/3が中毒症を起したが、その他の菌の培養濾液を与えたものでは本実験の範囲内では全く中毒症を起さなかつた。

中毒蚕は第1回目の培養濾液を添食した後2~3時間にしてすでに相当数発生するが時間の経過と共に次第に恢方に向う。然し添食回数が重なるにつれて次第に重症となり遂には斃死するものである。その症状は前胸部が若干膨大し、軽微な痙攣を起し、苦悶の状を呈して食桑を停止する。又横転するものもある。

II. *A. ochraceus* 及び *S. japonica* 培養濾液中の毒性物質の耐熱性及び炭末吸着性

次に抽出を行うために *A. ochraceus* 及び *S. japonica* の培養濾液中の毒性物質の耐熱性及び炭末吸着性を調べた。耐熱性は培養濾液50ccをビーカーにとり50°C及び100°Cの湯中に入れ、内容液が夫々所定温度になつてから30分間保ち冷却後添食に用いた。又炭末吸着性は培養濾液100ccに対し1%の活性炭を加え時々振盪し30分後に吸引濾過してその濾液を添食に用いた。供試蚕児は支110号の5令起蚕を30頭用い、1日4回給桑の中2回添食し、2日間行つた。

その結果第2表に示す如く毒性物質は100°C 30分間加

*信州大学繊維学部蚕体病理学研究室

熱しても何等変化をうけず、且活性炭によく吸着される。

第1表 硬化病菌培養濾液の蚕児に対する毒性

供試菌	培養濾液のpH価(修正前)	供試蚕数	中毒蚕数	中毒蚕歩合	軟化病蚕数
<i>Bot. bassiana</i>	4.0	30頭	0頭	0%	1頭
<i>Isa. farinosa</i>	5.4	30	0	0	0
<i>Isa. fumosorosea</i>	4.0	30	0	0	2
<i>Oosp. destructor</i>	6.4	30	0	0	3
<i>Spic. rubidopurpurea</i>	5.6	30	0	0	2
<i>Asp. ochraceus</i> No.1	7.1	30	30	100	0
<i>Sterig. japonica</i>	6.4	30	11	37	0
<i>Asp. flavus</i> No.1	6.5	30	0	0	2
<i>Asp. flavus</i> No.2	6.2	30	0	0	0
<i>Asp. flavus</i> No.3	5.7	30	0	0	0
<i>Asp. oryzae</i> No.1	5.6	30	0	0	0
<i>Asp. oryzae</i> No.1	6.4	30	0	0	1
<i>Asp. oryzae</i> No.3	6.5	30	0	0	1
<i>Asp. oryzae</i> No.4	6.4	30	0	0	1
Czapek-Dox medium	6.8	30	0	0	0
Dist. water	7.0	30	0	0	0

備考 修正後の培養液のpH価は7.0

第2表 *A. ochraceus* 及び *S. japonica* 培養濾液中の毒性物質の耐熱性及び炭末吸着性

添食液	供試蚕数	健蚕数		中毒蚕数	中毒蚕歩合
		頭	頭		
<i>A. ochraceus</i> 培養濾液	50°C30分加熱	30	0	30	100
	100°C30分加熱	30	0	30	100
	炭末吸着濾液	30	30	0	0
	無処理(対照)	30	0	30	100
<i>S. japonica</i> 培養濾液	50°C30分加熱	30	18	12	40
	100°C80分加熱	30	18	12	40
	炭末吸着濾液	30	30	0	0
	無処理(対照)	30	18	12	40

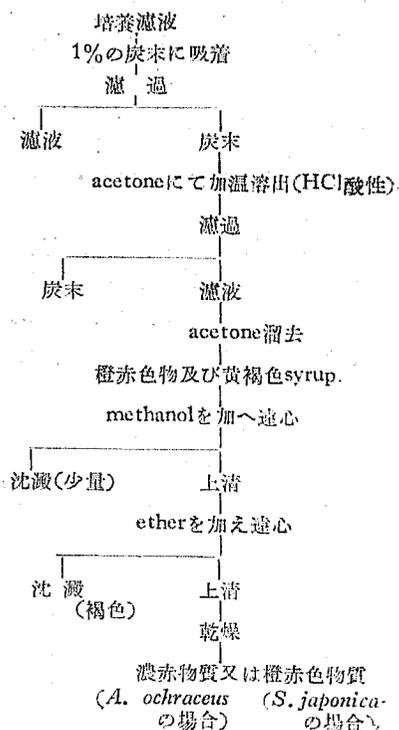
Ⅲ. *A. ochraceus* 及び *S. japonica* 培養濾液より毒性物質の抽出

抽出は両菌種別々に行つたが同一の方法で抽出する事が出来た。先づ培養濾液(反応は *A. ochraceus* はpH7.0前後、*S. japonica* はpH6.5前後)に1%の炭末を加え時々振盪、30分後に吸引濾過した。炭末からの毒性物質の溶出には ether, acetone, methanol 及び ethanol を用いたが acetone により良く溶出される事が判つた。

よつて炭末に acetone を加え塩酸々性(pH4.0)のもとに3~4回温浸し吸引濾過した。この濾液の acetone を50°~70°Cのもとに減圧で溜去すると橙赤色油状物及び黄褐色の syrup が得られた。この橙赤色の油状物は97%、黄褐色の syrup は87%の中毒蚕歩合の毒性を示した。次にこれらを methanol に溶解し遠心沈澱すると少量の methanol 不溶物が沈澱するがこのものには毒性は見られなかつた。又上清には更に ether を加えると多量の褐色沈澱を生ずるがこの沈澱も亦毒性を示さなかつた。よつて methanol-ether 混液から ether 及び methanol を蒸発すると *A. ochraceus* の場合には濃赤色の、*S. japonica* の場合には橙赤色の物質が夫々得られた(第3表参照)。これらは蚕児に対して極めて高度の毒性(95~100%)を示した。又これらの物質は ether, methanol 等には良くとけるが水には不溶性であつた。

尚抽出の各段階に於ける毒性検定供用蚕児は何れも3令蚕であり、検定物質が水に不溶性であつた場合は、蚕児に影響を及ぼさない程度の少量の methanol に溶解してから水を加えて用いた。

第3表 *A. ochraceus* 及び *S. japonica* 培養濾液より毒性物質の抽出法



以上の如く両菌種の生産する毒性物質は色調を多少異なるが同一方法で抽出する事が出来、又 *A. ochraceus* と *S. japonica* とは極めて近縁な関係にあると云われているので、これらの物質は同一物か或いは極めて近似の物質であると思われる。

又 Karow 等は *A. ochraceus* が抗菌性物質の1種である Penicillic acid を生産する事を報告している。Penicillic acid は毒性も亦強いので筆者の得た物質も或いは Penicillic acid ではなからうかと最初は疑念をもった。然し、同氏等は *A. ochraceus* を corn-steep liquor を3%加えた Czapek-Dox 培地に3日間培養する事により Penicillic acid の生産を認め、培養液からpH7.0で炭末吸着後 methanol 溶出を行う方法により Penicillic acid の粗製物を得ているが、筆者の得た物質はその抽出途上にあつて methanolでは溶出出来なかつたし又 Penicillic acid は水溶性であるのにこの物質は不溶性である等の事実よりして Penicillic acid とは異なるものであらうと思われる。

尙精製及び性状等については目下検討中である。

摘 要

- (1) 9種14培養系の硬化病菌を0.5%の peptone を加えた Czapek-Dox 培地に23°Cで6日間培養して培養濾液の蚕児に対する経口的な毒性を調べた結果、*A. ochraceus* 及び *S. japonica* の両菌種のものに毒性が有つた。
- (2) 上記の *A. ochraceus* 及び *S. japonica* の培養濾液は 100°C30分の加熱によつては全く毒性を失わない。
- (3) これら培養濾液より濃赤色及び橙赤色の物質を抽出し得た。これらの物質は蚕児に対して強い毒性を示した。

文 献

- (1) 青木襄児, 下平陸夫, 日蚕誌 21, 152 (講演要旨) (1952)
- (2) 門平潤一郎 埼玉蚕試報告 30, 14 (1950)
- (3) Karow, E. O., Woodruff, H. B., and Foster, J. W. Arch. Biochem. 5, 279. (1944)

Summary

This paper dealt with the studies on the silkworm poisonous substances produced by *Aspergillus och-*

raceus and *Sterigmatocystis japonica*.

(1) *Muscardine* fungi of 14 strains of 9 species were cultivated at 23°C for 6 days on Czapek-Dox media added 0.5% peptone. After examination of poisonous quality of every culture filtrate, the culture filtrates of *A. ochraceus* and *S. japonica* proved to be poisonous.

(2) Poisonous substances of *A. ochraceus* and *S. japonica* in culture filtrates do not change their poisonous quality at all by heating at 100°C for 3 minutes.

(3) Poisonous substances were extracted from these culture filtrates by the following process. The obtained substances were rich red (in case of *A. ochraceus*), or orange-red (in case of *S. japonica*), and proved to be very poisonous to the silkworm.

