

5-フロロウラシルによる伝染性軟化病発病の抑制効果(IV)

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者名	宮崎,成寿
発行元	日本蠶絲學會
巻/号	40巻1号
掲載ページ	p. 18-22
発行年月	1971年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



5-フロロウラシルによる伝染性軟化病発病の抑制効果 (IV) ウイルス濃度の相違および *in vitro* 処理による発病率

宮 島 成 寿

愛知県長久手村・愛知県農業総合試験場基礎研究部
(1970年6月11日受理)

著者および川瀬は先に家蚕ウイルス病の発病を抑制する目的で、主としてウイルス増殖阻害物質を用いた研究から5-フロロウラシル(以下FUと略)が伝染性軟化病の発病抑制効果を有し、核酸の塩基成分であるウラシルまたはチミンを加えることによりその抑制効果を消失することを報告した^{5,6)}。また、FUの有効濃度、投与時期および回数などについても検討してきた^{6,7)}が、今回は接種ウイルスの濃度の相違を中心にFUの投与時期について詳細な調査をおこなった。同時に*in vitro*におけるFUの伝染性軟化病ウイルスに及ぼす影響と、FUは昆虫に対して不妊効果を持つ報告⁴⁾があることから蚕に及ぼす不妊性についても検討したのでここにその大要を報告する。

本文に入るに先立ち、実験に際して適切なるご指導と本稿のご校閲を賜わった名古屋大学助教授川瀬茂実博士、不妊性の問題につき文献などでご援助いただいたクマイ化学研究所長沢純夫博士(現ブラジル国生物学研究所)ならびに実験を行なうに当りご便宜を与えられた当場基礎研究部石上孔一研究室長の各位に対し深謝の意を表す。なお、本実験において使用したFUを提供された米国 Hoffmann LaRoche Co. に対し謝意を表す。

材料および方法

本実験に供試した蚕品種は日124号(1966年春蚕期)、日126号×春月(1966年初秋蚕期)、日124号×支124号(1969年晩秋蚕期)で、不妊性の調査には錦秋×鐘和(1965年初秋蚕期)および支124号(1966年春蚕期)の各品種である。

伝染性軟化病ウイルス(以下ウイルスと略)の調製法は一部を除いて第1報⁵⁾に準じたのでここでは省略するが、*in vitro*の実験ではその目的から次のように行なった。すなわち、伝染性軟化病罹病蚕の中腸を磨砕し、ガーゼ濾過後3,000rpm、10分と10,000rpm、60分の上清を更に超遠心(Rev97,927g,60分)にかけた。この沈殿をテフロンホモジナイザーでほぐし、0.01Mリン酸緩衝液(pH6.8)を加えて同一の過程をもう一度くり返した。最後に前記の緩衝液に対して透析して100m μ のミリポアフィルターで濾過したものをウイルス浮遊液(OD₂₆₀=9.4)とした。

ウイルスの接種は蟻蚕に経口接種(桑葉添食法で4時間)で行ない、その後FU(5 \times 10⁻⁴M)附着桑あるいは普通桑を給与した。対照としては蒸留水を桑葉に塗布し、FU投与の場合と同様に半乾後蚕児に給与する区を設けた。

次に*in vitro*におけるFUの効果を調べるため、熱滅菌したFU(5 \times 10⁻⁴M)と前記の100m μ のミリポアフィルターで濾過したウイルス浮遊液の階段稀釈液とを無菌的に等量混合して、4 $^{\circ}$ C、24時間または37 $^{\circ}$ C、3時間静置してから蟻蚕に4時間添食し、軟化病発病率を調べた。

また、ウイルス濃度についての検討では、ウイルス浮遊液を10倍階段稀釈して別々に蟻蚕に添食し、その後FU(5 \times 10⁻⁴M)を連続投与して軟化病発病率を調べた。

なお、ウイルス接種後に発生した病蚕の調査と病種の表示方法は既法⁵⁾の通りである。

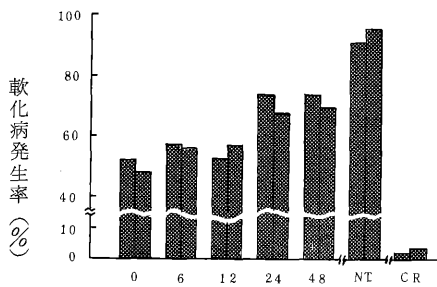
不妊性の調査は、蚕児全齢にFU(5 \times 10⁻⁴M)を

投与して、化蛾した個体から卵をとり、それらを浸酸（1965年初秋蚕期）または自然温度（1966年春蚕期）に放置して孵化したものの孵化歩合を調査した。

実験結果

1. FU の投与時期についての検討

FU の投与時期と回数についての検討は、前報⁷⁾に報告したとおりであるが、投与時期についてはウイルス接種0, 24, 48, 96時間後にFUを投与すると、48時間以内の投与ならば軟化病発生率を低下させる傾向が認められた。軟化病発生率は蚕児にウイルスを添食する時間の長さには影響されない¹⁾ことから、本実験では蟻蚕に添食する時間を前回より短かく4時間（添食時の温度は約25°C）とし、添食時間終了後にウイルス付着桑を除き、代ってFU付着桑を給与してこれを0時間とした。以下各區別別に6, 12, 24, 48時間および無投与区として9日間観察した。なお、ウイルスを4時間添食した直後にFUを投与する区を除き、他の区はFUを投与する



第1図 ウイルス接種後FU投与までの時間と軟化病発生率

備考：蚕品種，日124号；頭数，1区50（2連区）；供試齢，蟻蚕（ウイルスは4時間添食）；FU， 5×10^{-4} M；時期，1966年春蚕期（9日間）；NT，ウイルス接種FU無投与；CR，ウイルス無接種（対照）

第1表 ウイルス接種後のFU投与時期による発病抑制効果（有意性検定）

ウイルス接種後FU投与までの時間	0	6	12	24	48	対照 ^{a)}
χ^2	29.051***	21.531***	20.602***	8.432**	8.275**	($p=0.088$)

備考：*** $p(\chi^2 > 10.83) = 0.001$, ** $p(\chi^2 > 6.63) = 0.01$,

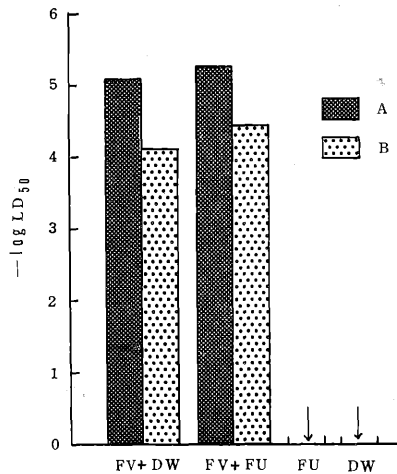
a) は Fisher の直接確率法による（以下同）

までの間普通桑を給与した。結果は次のとおりである（第1図）。

第1図より、得られた結果は前報⁷⁾と同様の傾向であり、ウイルス接種後FU投与までの時間が短い程（0-12時間）発病率は低く、24, 48時間後の投与でもFU無投与区より軟化病発生率の低下する傾向が見られることから、FUはウイルス接種後早い時期に投与すると発病抑制に有効な結果が得られている。

この結果の有意性をみると、ウイルス接種後48時間以内のFU投与では1%のレベルで有意であるが、12時間以内の投与では0.1%のレベルで非常に有意であることがわかる（第1表）。

なお、対照区には度数が5未満の数字があるの



第2図 ウイルスに対するFUのin vitroの効果

備考：蚕品種，日124号×支124号；供試齢，蟻蚕（ウイルスは4時間添食）；FU， 5×10^{-4} M；FV，ウイルス；DW，蒸留水；時期，1969年晩秋蚕期（12日間）；A，4°C，24時間処理，B，37°C，3時間処理；矢印は発病率0を示す；FV+DW，FV+FUの混合比は1：1（v/v）。

で、FISHER の直接確率法²⁾により計算すると有意でなく、従ってウイルス無接種の場合のFU投与区と無投与区との間には差は認められなかった。

2. ウイルスに対するFUの *in vitro* の効果

今までの報告^{5,6,7)}はいずれもFUの *in vivo* における効果を検討してきたので、本報告ではウイルスに対するFUの *in vitro* における効果を調査した(第2図)。

第2図に示すように、FUとウイルスとを等量混合した液を4°C、24時間あるいは37°C、3時間静置してから蠶蚕に接種した時の発病率(-log ED₅₀)と、蒸留水とウイルスとを同様に等量混合して処理後蠶蚕に接種した場合とを比較すると、発病率に差がなく、従って *in vitro* におけるFUのウイルスに対する効果はみられなかった。

3. ウイルス濃度の違いによる発病率の検討

10倍階段稀釈したウイルス浮遊液を別別の区の蠶蚕に4時間添食し、その後FU(5×10⁻⁴M)を連続

投与した場合の結果は第2表に示すとおりである。

この表より、縦に2列ずつ記した数字(2連区

第2表 接種ウイルスの濃度とFU投与による発病抑制効果

ウイルス濃度	軟化病発生率			
	FU投与		蒸留水投与	
原液	73.5%	74.4%	85.7%	93.6%
10 ⁻¹	62.5	58.1	84.1	90.9
10 ⁻²	36.0	25.0	64.0	75.0
10 ⁻³	29.8	20.5	29.8	46.0
対照(蒸留水)	6.3	.	8.3	.

備考: 蚕品種, 日126号×春月; 頭数, 1区50頭(2連区制); 供試齡, 蠶蚕(ウイルスは4時間添食); FU, 5×10⁻⁴M; 時期, 1966年初秋蚕期(9日間); 軟化病発生率, $\frac{\text{軟化病数}}{\text{供試頭数}-\text{遺失蚕数}} \times 100$

第3表 接種ウイルスの濃度とFU投与による発病抑制効果(有意性検定)

ウイルス濃度	原液	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	対照 ^{a)}
χ^2	7.548**	16.542***	30.261***	3.928*	($p=0.282$)

備考: * $p(\chi^2 > 3.84) = 0.05$

第4表 FU投与蚕産下卵の孵化歩合

処理(♀×♂)	FU×FU	FU×DW	DW×FU	DW×DW
I	$\frac{358}{378}$ (94.7%)	$\frac{273}{348}$ (78.4%)	$\frac{338}{421}$ (80.2%)	$\frac{370}{393}$ (94.1%)
	$\frac{349}{363}$ (96.1%)	$\frac{317}{358}$ (88.5%)	$\frac{300}{347}$ (86.4%)	$\frac{341}{358}$ (95.2%)
	$\frac{312}{329}$ (95.4%)	$\frac{325}{407}$ (79.8%)	$\frac{354}{367}$ (96.4%)	$\frac{386}{421}$ (87.4%)
II	$\frac{244}{262}$ (93.1%)	$\frac{202}{257}$ (78.5%)	$\frac{144}{198}$ (72.8%)	$\frac{220}{309}$ (71.1%)
	$\frac{204}{239}$ (85.3%)	$\frac{248}{281}$ (88.2%)	$\frac{250}{291}$ (85.9%)	$\frac{216}{243}$ (88.8%)

備考: 表中の数字, $\frac{\text{孵化数}}{\text{産卵数}}$, ()内は孵化歩合; 時期, I, 1965年9月2日産卵; II, 1966年6月26日産卵; 蚕品種, I, 錦秋×鐘和(浸酸する), II, 支124号(浸酸しない); FU, 5×10⁻⁴Mを蚕児の全齡に投与; DW, 蒸留水。

制)の結果から、ウイルス濃度がいずれの場合でもFU投与区は無投与区に比べて発病率が低くなる傾向が認められた。

この結果の有意性を検定したのが第3表であるが、これよりFUの発病抑制効果は5%あるいはそれ以下のレベルで有意であった。

4. FUの蚕に対する不妊性の検討

FUはKILGORE and PAINTER (1962)により昆虫に対して不妊性誘発効果を持つことが報告されている⁴⁾。従って蚕の幼虫期間中(全齢)にFU(5×10^{-4} M)を投与して、蛾の産卵数、孵化数、孵化歩合から不妊性を調べた結果が第4表である。

この表より、産卵数、孵化数、孵化歩合についてはいずれにも差は認められなかった。

考 察

第1図で明らかなように、ウイルス接種後早い時期とくに12時間までにFUを投与すると、24、48時間後に投与した場合よりも更に軟化病の発病抑制効果が認められた。このことは前報⁷⁾でも若干ふれたが、この種のウイルス増殖阻害物質の性質から、接種後からウイルスの増殖開始までの時間が問題になり、ウイルスの細胞内増殖が開始された後ではその効果が少なくなると考えられる。すなわち、この種の物質は感染成立後のある時期までに投与する場合のみ有効である(増殖阻止的に働く)と考えてもよいのではなからうか。

次に*in vitro*におけるFUのウイルスに対する作用は、第2図よりその効果は認められなかった。この種の物質は*in vitro*では有効でも生体内では無効なものがあり、逆に*in vivo*では有効なものでも試験管内のウイルスには作用しないことがあって³⁾、作用機作からも両者はかなり異なる場合があると思われる。FUの場合は、ウイルスに直接影響を及ぼすものではないのではなからうかと考えられる。

ウイルスの濃度をかえて蚕児に接種し、その後FUを投与した場合には、ウイルスの濃度がいずれの場合でも軟化病発病率がFU無投与区に比べて低下した。このことは、ウイルスのどの濃度の場合にもFUが有効であることが一応考えられるが、ウイルスをかなり希釈して接種し、FUを投与した場合でも軟化病発病率が0か0近くにない理由は明らかでない。しかしながら、ウイルス接種後蚕児が

体内で検出できない程度にFUの薬害を受け、その両者の作用により外観軟化病症状を呈するものがあるのではないかという考え方もできよう。

FUの蚕に対する不妊効果は少なくとも 5×10^{-4} Mでは現われなかったが、FUをこれ以上の濃度にするると影響の現われる可能性がないとはいえない。しかしながら、これ以上の濃度では稚蚕とくに1齢幼虫では薬害を示すので、不妊性を検討するには壮蚕にこれ以上の濃度を用いて実験を試みる必要があるように思われる。

いずれにしても、FUの伝染性軟化病の発病抑制に対する作用機作を解明することはウイルス増殖阻害のメカニズムをある程度明らかにすることにつながり、ひいてはどのような種類の物質を調べればよいかという手がかりにもなるであろう。これらのことが、今後この種のより有効な防除剤を開発する上で必要であろうと思われる。

摘 要

1. 軟化病ウイルス浮遊液(以下ウイルスと略)を蟻蚕に4時間添食した直後(0時間)、6、12、24および48時間後に5-フロウラジル(FUと略、 5×10^{-4} M)を連続投与して軟化病発病率を調査した。結果は48時間以内にFUを投与すると軟化病の発病を抑制する($P < 0.01$)が、12時間以内の投与では更に有効であった($P < 0.001$)。

2. FUの*in vitro*における効果を検討するため、ウイルスとFUとを無菌的に等量混合して(処理対照区はウイルスと蒸留水とを等量混合)4°C、24時間または37°C、3時間静置後、蟻蚕に4時間添食して発病率を調べたがその効果は否定的であった。

3. ウイルスを10倍階段希釈し(原液から 10^{-8} まで)、それらの液を別別に蟻蚕に4時間添食後FU(5×10^{-4} M)を蚕児に桑葉添食法で連続投与して軟化病発病率を検討した。この結果いずれのウイルス濃度の場合にもFUは軟化病の発病を抑制する傾向を示した。

4. FUは昆虫を不妊にする報告があるので、幼虫期間中(全齢)にFU(5×10^{-4} M)を連続投与して蛾の産卵数、卵の孵化数、孵化歩合を調査して不妊性を検討したが、この濃度(5×10^{-4} M)においては蚕に不妊の影響を与えることはなかった。

引用文献

- 1) 鮎沢千尋・古田要二 (1966): 日蚕雑, **35**, 234 (講演要旨).
- 2) FISHER, R.A. (1950): *Statistical Methods for Research Workers*, Hafner Publishing Co., New York.
- 3) 石田名香雄 (1966): 抗ウイルス物質の世界, 中外医学社, 東京.
- 4) KILGORE, W. W. and R. R. PAINTER (1962): *J. Econ. Entomol.* **55**, 710-712.
- 5) 宮島成寿・川瀬茂実 (1965): 日蚕雑, **34**, 359-365.
- 6) 宮島成寿・川瀬茂実 (1966 a): 同上, **35**, 253-256.
- 7) 宮島成寿・川瀬茂実 (1966 b): 同上, **35**, 257-261.

Summary

The inhibitory effect of 5-fluorouracil on the outbreak of infectious flacherie in the silkworm, *Bombyx mori*

(IV) On some administration method of 5-fluorouracil

By

Shigetoshi MIYAJIMA

1. In the inhibitory effect of 5-fluorouracil on the outbreak of infectious flacherie, the shorter the time after inoculation the less the incidence of infectious flacherie occurred, especially in case of administration within 12 hours after virus inoculation.

2. 5-fluorouracil has not virucidal activity *in vitro* during 24 hours at 4°C or 3 hours at 37°C in mixture.

3. In the physiological effect of 5-fluorouracil on egg production of female, hatchability of eggs oviposited by the treated silkworm was not different significantly among the treated series. Sterilizing effect of 5-fluorouracil on the silkworm was unable to be found under the concentration of $5 \times 10^{-4}M$ in each treatment.

(Basic Research Division, Aichi-ken Agricultural Research Center, Nagakute, Aichi-ken)