

蚕から分離した細菌(X)

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	児玉, 礼次郎 中筋, 砧五郎
巻/号	41巻1号
掲載ページ	p. 7-14
発行年月	1972年2月

蚕から分離した細菌 (X) Gnotobiotic silkworm における ウイルス性疾病の防除

児玉礼次郎・中筋祐五郎

財団法人 発酵研究所
大阪市東淀川区十三西の町 4-54
(1971年5月4日受理)

蚕のウイルス性疾病を化学薬剤の投与によって防除しようとする試みについてはいくつかの研究報告がある。このうち若干のあるいはかなりの発病阻止効果が認められたという報告は有賀ら¹⁾, Ueda *et al.*,¹⁷⁾ 内海ら¹⁸⁾, 宮島ら¹²⁻¹⁴⁾ 蛸原ら⁶⁾ および林屋ら⁸⁾ によってなされている。いうまでもなく、これらの諸研究では種々の病原体共存の可能性のある桑葉飼育蚕が供試されている。

ところで近年桑葉飼育蚕についてもまた人工飼料飼育蚕についてもウイルスと細菌とが共同して発病を刺激するという“synergism”が研究されつつあり、特に鮎沢ら²⁾ および蛸原ら⁵⁾の研究は gnotobiotic silkworm でなされたもので、これらの研究成果は蚕のウイルス性疾病の防除にも1つの有益な示唆を提供するものと考えられる。

ともあれそのような発病の場ではウイルスならびに細菌の両者の活動を同時に阻止するのではなければ、満足な防除効果を期しがたいと推論されるのであるが、しかし一般にウイルス性疾病を化学薬剤で防除することは容易ではなく、昆虫の分野においても今日なおそれが渴望されている実情である。

さて著者ら¹⁰⁾はさきに病原性細菌の経口接種による gnotobiotic silkworm の発病がそれらの細菌の増殖を抑制する抗生物質を含む人工飼料の給与によって阻止されることを確かめた。これに引き続いてさらにウイルス性疾病の発病を阻止する化学薬剤をも検索中、nalidixic acid (NA と略す) がウイルス性軟化病ウイルスまたは核多角体病ウイルスを経口接種した gnotobiotic silkworm の発病を顕著に阻止

する事実を発見したので、本報ではこれに関連した2, 3の実験結果について述べる。

材料と方法

I. 供試蚕 松原ら¹¹⁾の方法に準じた無菌飼育蚕(品種, 郡光×万里)

II. 病原体とその接種

(1) ウイルス ウイルス性軟化病ウイルス坂城株(FV)および細胞質多角体病ウイルス(CPV)はともに農林蚕試ウイルス研究室から、また核多角体病ウイルス(NPV)は京都工織大松原氏から分譲をうけたものである。接種は添食法により、FVの場合にはウイルス原液(ウイルス性軟化病蚕の10%乳液を10,000rpm, 10分間遠心分離した上清で、これを 10^{-1} 液とした)を蒸留水で適当に希釈したのち、ミリポア・フィルター(0.22 μ)で濾過して供試し、またCPVおよびNPVの場合には0.5%炭酸ナトリウム水溶液に多角体を 10^8 /mlの割合に懸濁、溶解したものを原液とし、これをミリポア・フィルターで濾過して供試したが、いずれの場合でもそれらのウイルス液を0.04ml/gの割合に滅菌人工飼料に添加し、これを3齢2日目の無菌飼育蚕に24時間給与した。供試ウイルス液が無細菌であることを確かめたうえ用いたことはいうまでもない。

(2) 細菌 *Streptococcus faecalis*-*Streptococcus faecium* intermediate G-27を供試し、その接種方法は前報⁹⁾に準じ、5齢2日目に4時間添食した。

III. Leucomycin, NA および fructosazine の投与 Leucomycin の投与方法は前報¹⁰⁾に準じたが、

NA および fructosazine を投与する場合には、それらの水溶液をミリポア・フィルターで濾過したのち、濾液を 0.04 ml/g の割合に滅菌人工飼料の表面に塗付して給与した。

結 果

I. NA によるウイルス性軟化病および核多角体病の発病阻止

FV を接種した gnotobiotic silkworm の発病は

NA の添食によって阻止された(表1)。この場合 1,000 $\mu\text{g/g}$ の割合に NA を加えた飼料で飼育すると、FV を接種しなくても、10頭中 3-4 頭の蚕の発育が遅滞し、かつ小薄皮繭が結ばれた事実から見て、NA のこの添加量では薬害が現われると判断された。また FV ならびに NPV の接種による発病は NA の添食によって阻止されたけれども、CPV の接種による発病は阻止されなかった(表2)。

II. FV の濃度と NA 添加量との関係

表 1. ウイルス性軟化病の NA による発病阻止

FV*	NA 添加量** ($\mu\text{g/g}$ 飼料)	供 試 頭 数	死 亡 蚕 発 生 数				致死率 (%)	備 考
			3 齢	4 齢	5 齢	繭中		
+	0	10	0	0	8	1	90	小薄皮繭 3
	1	10	0	0	3	1	40	
	10	10	0	0	1	1	20	
	100	10	0	0	0	0	0	
	500	10	0	0	0	0	0	
	1,000	10	0	0	0	0	0	
-	0	10	0	0	0	0	0	小薄皮繭 4
	1	10	0	0	0	0	0	
	10	10	0	0	0	0	0	
	100	10	0	0	0	0	0	
	500	10	0	0	0	0	0	
	1,000	10	0	0	0	0	0	

* 10^{-4} 液。+ 添加，- 無添加。

** ウイルス接種のための 24 時間(3 齢 2-3 日目)を除く 3-5 齢の全期間中飼料に添加した。

表 2. ウイルス性軟化病および核多角体病の NA による発病阻止

添加ウイルス液		NA 添加量* ($\mu\text{g/g}$ 飼料)	供 試 頭 数	死 亡 蚕 発 生 数				致 死 率 (%)
ウイルス	濃 度			3 齢	4 齢	5 齢	繭中	
FV	10^{-4}	0	10	0	0	4	3	70
		10	10	0	0	1	3	40
		100	10	0	0	0	0	0
NPV	多角体として $10^8/\text{ml}$	0	10	0	0	3	3	60
		10	10	0	0	1	2	30
		100	10	0	0	0	0	0
CPV	多角体として $10^8/\text{ml}$	0	10	0	0	2	3	50
		10	10	0	0	1	3	40
		100	10	0	0	1	4	50
無 添 加 (対 照)		0	10	0	0	0	0	0

* ウイルス接種のための 24 時間(3 齢 2-3 日目)を除く 3-5 齢の全期間中飼料に添加した。

表 3. 添加 FV 液の濃度と NA 添加量との関係

添加 FV 液 の濃度	NA 添加量* ($\mu\text{g/g}$ 飼料)	供 試 頭 数	死亡蚕発生数				致死率 (%)
			3 齢	4 齢	5 齢	繭中	
10^{-1}	0	10	0	0	10		100
	50	10	0	0	10		100
	100	10	0	0	10		100
	250	10	0	0	10		100
	500	10	0	0	10		100
10^{-2}	0	10	0	0	10		100
	50	10	0	0	9	0	90
	100	10	0	0	9	0	90
	250	10	0	0	4	4	80
	500	10	0	0	8	2	100
10^{-3}	0	10	0	0	9	0	90
	50	10	0	0	5	3	80
	100	10	0	0	6	1	70
	250	10	0	0	4	3	70
	500	10	0	0	4	0	40
10^{-4}	0	10	0	0	6	1	70
	10	10	0	0	3	1	40
	25	10	0	0	2	0	20
	50	10	0	0	0	1	10
	100	10	0	0	0	0	0
10^{-5}	0	10	0	0	2	2	40
	5	10	0	0	0	2	20
	10	10	0	0	0	1	10
	25	10	0	0	1	0	10
	50	10	0	0	0	0	0
無添加 (対照)	0	10	0	0	0	0	0

* ウイルス接種のための 24 時間 (3 齢 2-3 日目) を除く 3-5 齢の全期間中飼料に添加した。

次に飼料に添加した FV の濃度と NA 添加量との関係を追求して見た。その結果 (表 3), 10^{-4} 希釈以下の濃度の FV 液が飼料に添加されたときには, NA は明らかに発病阻止効果を現わし, FV の濃度の低下とともに発病阻止に必要な NA 量も減少した。しかし 10^{-3} 希釈以上の濃度の FV 液が添加されたときには, NA はほとんどあるいは全く発病阻止効果を現わさなかった。

Ⅲ. NA 類縁化合物の発病阻止効果

10^{-4} 希釈の濃度の FV 液を飼料に添加した場合について, NA の 1, 2 の類縁化合物の発病阻止効

果をしらべて見たが (表 4), 実験範囲内では NA だけに満足な成績が得られた。

Ⅳ. FV と *S. faecalis*-*S. faecium* intermediate G-27 との共同作用下における発病阻止

表 5 から見られるように, FV と G-27 株の間には致死率に関して相乗効果が認められるが, この相乗効果は大部分の *Streptococcus* 属菌株の増殖を抑制する macrolide 群抗生物質の 1 つ leucomycin の添食によってほぼ消滅する。しかし FV 単独接種の場合に近い致死率は残る。またこの共同作用下では NA だけを添食しても, 致死率をわずかに低下させ

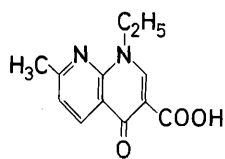
表 4. NA 類緑化合物の発病阻止効果

FV*	類緑化合物**		供試頭数	死亡蚕発生数				致死率(%)
	化合物	添加量(μg/g 飼料)		3 齡	4 齡	5 齡	繭中	
+	無添加		10	0	0	3	2	50
	NA†	100	10	0	0	0	0	0
	I†	100	10	0	0	2	1	30
	II†	100	10	0	0	5	1	60
-	無添加		10	0	0	0	0	0

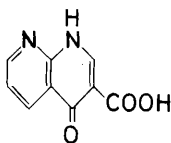
* 10⁻⁴ 液。+ 添加, - 無添加。

** ウイルス接種のための 24 時間 (3 齡 2-3 日目) を除く 3-5 齡の全期間中飼料に添加した。

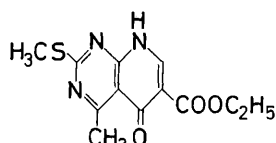
†



NA



I



II

るだけで, leucomycin だけを添食したときほど致死率の低下はいちじるしくなく, 両薬剤を併用してはじめて満足に発病を阻止することができた。

V. NA の投与時間および投与期間

次にこの研究でこれまで採ってきた実験条件, す

なわち 3 齡 2 日目に 24 時間 FV を経口接種するという 1 実験例における NA の発病阻止効果と投与時期および投与期間との関係について検討した。表 6 から明らかなように, FV 接種前および接種後のいずれか一方の時期だけ NA を投与しても, この化

表 5. FV と *S. faecalis*-*S. faecium* intermediate G-27 との共同作用下における発病阻止

FV*	病原体 <i>S. faecalis</i> - <i>S. faecium</i> intermediate G-27**	薬剤添加量 (μg/g 飼料)		供試頭数	死亡蚕発生数				致死率(%)
		NA	Leucomycin		3 齡	4 齡	5 齡	繭中	
+	-	0	0	10	0	0	1	0	10
-	+	0	0	10	0	0	2	0	20
+	+	0	0	10	0	0	6	2	80
+	+	100†	0	10	0	0	5	0	50
+	+	0	10††	10	0	0	1	1	20
+	+	100†	10††	10	0	0	0	0	0
-	-	0	0	10	0	0	0	0	0

* 10⁻⁶ 液。+ 添加, - 無添加。** 添加した生菌数 3.2×10²/g 飼料。

† ウイルス接種のための 24 時間 (3 齡 2-3 日目) および細菌接種のための 4 時間 (5 齡 2 日目) を除く 3-5 齡の全期間中飼料に添加した。

†† 細菌接種のための 4 時間 (5 齡 2 日目) を除く 5 齡の全期間中飼料に添加した。

表 6. NA の発病阻止効果と投与時間および投与期間との関係

2 齢	FV および NA の添加					供 試 頭 数	死 亡 蚕 発 生 数					致 死 率 (%)
	3 齢			4 齢	5 齢		2 齢	3 齢	4 齢	5 齢	繭中	
1 日目	2 日目	3 日目 以 降										
-	-	FV	-	-	-	10	0	0	0	6	0	60
+	+	FV	-	-	-	10	0	0	0	3	2	50
+	+	FV	+	-	-	10	0	0	0	1	0	10
+	+	FV	+	+	-	10	0	0	0	0	0	0
-	+	FV	+	-	-	10	0	0	0	3	1	40
-	+	FV	+	+	-	10	0	0	0	1	0	10
-	+	FV	+	+	+	10	0	0	0	0	0	0
-	-	FV	+	-	-	10	0	0	0	5	1	60
-	-	FV	+	+	-	10	0	0	0	2	1	30
-	-	FV	+	+	+	10	0	0	0	3	0	30
+	+	+	+	+	+	10	0	0	0	0	0	0
-	-	-	-	-	-	10	0	0	0	0	0	0

上表中 +, NA を 100 μ g/g の割合に飼料に添加, -, 無添加。
FV, 10⁻⁴ 液を飼料に添加。

表 7. Fructosazine による核多角体病およびウイルス性軟化病の発病阻止

ウイルス	添加ウイルス液 濃 度	Fructosazine 添 加 量* (mg/g 飼料)	供 試 頭 数	死 亡 蚕 発 生 数				致 死 率 (%)
				3 齢	4 齢	5 齢	繭中	
NPV	多角体として 10 ⁶ /ml	0	10	0	0	3	0	30
		2	10	0	0	1	0	10
		5	10	0	0	1	0	10
		10	10	0	0	1	0	10
	多角体として 10 ⁸ /ml	0	10	0	2	4	0	60
		2	10	0	0	3	1	40
		5	10	0	0	3	0	30
		10	10	0	0	4	0	40
FV	10 ⁻⁶	0	10	0	0	3	0	30
		2	10	0	0	1	0	10
		5	10	0	0	0	2	20
		10	10	0	0	1	0	10
	10 ⁻⁴	0	10	0	0	7	0	70
		2	10	0	0	4	1	50
		5	10	0	0	4	1	50
		10	10	0	0	3	0	30
無添加(対照)		0	10	0	0	0	0	0

* ウイルス接種のための 24 時間(3 齢 2-3 日目)を除く 3-5 齢の全期間中飼料に添加した。

表 8. Fructosazine 存在下における NA 必要量

FV*	薬 剤 添 加 量		供 試 頭 数	死 亡 蚕 発 生 数				致 死 率 (%)
	Fructosazine** (mg/g 飼料)	NA** (μ g/g 飼料)		3 齡	4 齡	5 齡	繭中	
+	0	0	10	0	0	5	2	70
	0	1	10	0	0	4	3	70
	0	10	10	0	0	0	3	30
	0	25	10	0	0	0	1	10
	0	50	10	0	0	0	1	10
	0	75	10	0	0	0	0	0
	0	100	10	0	0	0	0	0
	2	0	10	0	0	1	3	40
	2	1	10	0	0	0	4	40
	2	10	10	0	0	0	2	20
	2	25	10	0	0	0	0	0
	2	50	10	0	0	0	0	0
	2	75	10	0	0	0	0	0
	2	100	10	0	0	0	0	0
-	0	0	10	0	0	0	0	0

* 10^{-4} 液。+, 添加; -, 無添加。

** ウイルス接種のための 24 時間 (3 齡 2-3 日目) を除く 3-5 齡の全期間中飼料に添加した。

合物の発病阻止効果はあまり認められず, FV 接種の前後を通じて投与し続けたときはじめて顕著に認められた。また NA の発病阻止効果は投与期間が長いほど大きく, 十分な効果は 2-4 齡期間および 3-5 齡期間投与し続けたときに認められた。

VI. Fructosazine 存在下における NA 必要量

林屋ら⁸⁾によれば, fructosazine を添加した人工飼料は NPV による攻撃にたいして蚕に抵抗性を付与するという。著者らもそれを確認したが, 同時に fructosazine が FV にたいしても同様な効果を示す事実を認めた (表7)。この fructosazine の存在下では FV による発病を阻止するのに必要な NA 量は減少した (表8)。

考 察

NA⁴⁾ は主としてグラム陰性細菌の増殖を抑制する抗細菌性物質として注目されているが, しかしこの物質の抗ウイルス性についてはその記載が見当らない。上述のように, 著者らは蚕のウイルス性疾病を防除しうる化学薬剤を検索中, NA が FV または NPV を経口接種した gnotobiotic silkworm

の発病を顕著に阻止する反面, CPV にたいしては全く発病阻止効果を見出さぬ事実を見出した。細菌の増殖抑制における NA の作用機作として DNA 生合成の阻害⁷⁾ が推論されている点から見れば, NPV による発病が阻止される事実および CPV による発病が阻止されない事実は一応うなずけるところであるが, FV に関しては疑問がもたれる。すなわち, 須藤ら¹⁵⁾によれば FV の核酸は RNA だといわれているからである。

ところで最近 TEMIN ら¹⁶⁾ や BALTIMORE³⁾ をはじめとする数人の研究者によって, かなりの種類の RNA 腫瘍ウイルスに RNA 依存性 DNA ポリメラーゼが発見され, この種のウイルスの RNA 生合成の過程で DNA 生合成の行われる可能性が推論された。FV を RNA ウイルスだと前提して, いま仮に FV の増殖に RNA 依存性 DNA ポリメラーゼおよび DNA 依存性 DNA ポリメラーゼが関与すると考えて見ると, NA が FV による発病を阻止する事実をも一応肯定できるのであるが, これらについては今後の研究に俟たねばならないところである。

次に“1次性侵襲細菌”に含まれる1株 *S. faecalis-S. faecium intermediate* G-27 を用いた実験では、この細菌と FV との共同作用は抗生物質と NA との併用によって満足に阻止されるから、この事実は軟化病防除の実用面からも有意義なことと信じられ、またこの共同作用下で抗生物質だけの添食によって致死率が大きく低下するのに反して、NA だけを添食してもさして低下しない事実はウイルスと細菌との共同作用の仕組みを示唆するものとして興味深く感じられるところである。

要 約

人工飼料育の gnotobiotic silkworm を用いてウイルス性疾病の発病を阻止する化学薬剤を検索し、次の結果を得た。

(1) Nalidixic acid (NA) の経口投与によってウイルス性軟化病ウイルス (FV) および核多角体病ウイルスの経口接種による発病が阻止された。しかし細胞質多角体病ウイルスの経口接種による発病は阻止されなかった。

(2) FV を供試したとき

a) 飼料に添加したウイルス液の濃度の増大とともに発病阻止に必要な NA 添加量も増し、いちじるしく高濃度のウイルス液を添加したときには NA の発病阻止効果は現われなかった。

b) *Streptococcus* 属の1株 *S. faecalis-S. faecium intermediate* G-27 とこのウイルスとの共同作用下における発病は leucomycin と NA との併用によって満足に阻止された。この場合 leucomycin だけを経口投与しても、致死率はかなり低下したが、NA だけを経口投与しても、致死率はさして低下しなかった。

c) 数はきわめて少なかったが、供試した NA 類縁化合物のうちでは NA だけに満足な発病阻止効果が認められた。

d) NA の発病阻止効果はこの化合物をウイルス接種前および接種後を通じて投与し続けたときに顕著に現われ、かつ投与期間が長いほど大きかった。

e) 発病阻止に必要な NA 量は fructosazine の共存下では低減した。

文 献

1) 有賀久雄・吉武成美・大和田道子(1963): 日

蚕雑, **32**, 232-239.

- 2) 鮎沢千尋・古田要二・児玉礼次郎・中筋祐五郎(1968): 日蚕雑, **37**, 395-402.
- 3) BALTIMORE, D. (1970): Nature, **226**, 1209-1211.
- 4) DEITZ, W. H., J. H. BAILEY, and E. J. FROLICH (1963): Antimicrobial agents and chemotherapy 1963, p. 583-587.
- 5) 蛸原富男・福原好信(1968): 日蚕雑, **37**, 251-252 (講演要旨).
- 6) 蛸原富男・飯岡国雄(1970): 日本蚕糸学会関東支部第21回学術講演会(要旨).
- 7) Goss, W.A., W.H. DEITZ, and T.M. COOK (1965): J. Bacteriol., **89**, 1068-1074.
- 8) 林屋慶三・松原藤好・西田 順・柳田秀雄(1970): 日本蚕糸学会関西支部第36回研究発表会(要旨).
- 9) 児玉礼次郎・中筋祐五郎(1968): 日蚕雑, **37**, 477-482.
- 10) 児玉礼次郎・中筋祐五郎(1970): 日蚕雑, **39**, 425-428.
- 11) 松原藤好・加藤 勝・林屋慶三・児玉礼次郎・浜村保次(1967): 日蚕雑, **36**, 39-45.
- 12) 宮島成寿・川瀬茂美(1965): 日蚕雑, **34**, 359-365.
- 13) 宮島成寿・川瀬茂美(1966): 日蚕雑, **35**, 253-256, 257-261.
- 14) 宮島成寿・川瀬茂美(1971): 日蚕雑, **40**, 18-22.
- 15) 須藤千春・川瀬茂美(1970): 日本蚕糸学会第40回学術講演会(要旨).
- 16) TEMIN, H. M. and S. MIZUTANI (1970): Nature, **226**, 1211-1213.
- 17) UEDA, K., Y. OKIMOTO, H. SAKAI and K. ARIMA (1955): J. Antibiotics, Ser. A **8**, 91-95.
- 18) 内海 進・筑紫春生(1963): 日蚕雑, **32**, 232-239.

Summary**Bacteria isolated from silkworm larvae**
X. Inhibition of development of viral diseases
in gnotobiotic silkworm by nalidixic acid

By

Reijiro KODAMA and Yugoro NAKASUJI

Employing gnotobiotic silkworm larvae reared on an artificial diet, chemical agents protecting the larvae from viral diseases were researched. Following results were obtained.

(1) By the oral administration (by feeding) of nalidixic acid (NA) the development of infectious flacherie and nuclear polyhedrosis to be caused by the viral pathogens orally inoculated was inhibited, but that of cytoplasmic polyhedrosis was not inhibited.

(2) When the infectious flacherie virus was used as the test pathogen,

a) More NA was required for inhibiting the development of disease with increasing concentrations of viral suspension added to the diet. When very high concentrations of the viral suspension were adopted for the inoculation, the inhibition by NA was not achieved.

b) The development of disease under synergistic effect observed between the pathogenicity of the infectious flacherie virus and that of *S. faecalis*-*S. faecium* intermediate G-27, one strain of pathogenic streptococci, was inhibited by the combined administration of leucomycin and NA. In this experiment the lethality considerably lowered by the oral administration of leucomycin alone, but did not so particularly by that of NA alone.

c) Among NA and its related compounds tested, though they were small in number, only NA exhibited satisfactorily the inhibitory effect on the development of viral disease.

d) The good inhibition by NA was produced when this compound was administered both before and after the inoculation of the virus, and the inhibitory effect was greater with increasing period of time of the administration.

e) The amount of NA required for inhibiting the development of disease decreased by addition of fructosazine to the diet.

(Institute for Fermentation, Osaka)