

Streptococcus faecalis AD-4 による人工飼料育蚕の発病 機作

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	飯塚, 敏彦
巻/号	41巻5号
掲載ページ	p. 333-337
発行年月	1972年10月

Streptococcus faecalis AD-4 による人工 飼料育蚕の発病機作

飯塚 敏彦

札幌市・北海道大学農学部
(1972年2月21日受理)

前報¹⁾において、*S. faecalis* AD-4 に感染した人工飼料育ならびに無菌飼育家蚕幼虫の中腸皮膜組織における細胞・組織学的観察を行ない報告した。

本実験では、経口接種幼虫における体液中の細菌の消長、消化液と体液の pH の動きならびに AD-4 の毒素産生能の有無を明らかにすることによって、前報の組織病理学的な観察とともに AD-4 の発病機作を考察したので報告する。

材料および方法

供試蚕品種は日 131 号×支 131 号とし、人工飼料育は前報¹⁾に準じた。

供試細菌は *S. faecalis* AD-4 とし、細菌の接種方法は前報¹⁾に準じた。また、体液中の生菌数の計測方法は飯塚・滝沢²⁾に準じた。

AD-4 の毒素産生能検定試験は、生菌、死菌ならびに Seitz 濾過液について行なった。供試生菌は、Heart Infusion Agar-Difco 斜面培地に移植後 (30

°C, 24 時間)、一般乳酸菌用液体培地 (日水製薬 KK) に移植して 30°C, 48 時間培養しそのまま幼虫に接種した区ならびに培養液を遠心分離 (1,500 g, 15 分) して集菌し、3 回洗浄して所定の浮遊液とした区の 2 区とした。供試死菌は、2%ホルマリンにて 30 分殺菌後同じく 3 回洗浄して作成した。

消化液ならびに体液における pH の測定は、pH メーター (日立一堀場 E-5 型) によって行なった。

結果と考察

S. faecalis AD-4 に感染した幼虫の病徴は、下痢を伴った縮少症状を示すのが特徴である。AD-4 接種後死亡までの幼虫について、体重測定を行なったこの特徴を第 1 表に数値で示した。この結果、4 日目以後の体重増加が認められず、既に飯塚ら³⁾によって明らかにされている消化管内における生菌数の増加様式に一致した。

また、本実験では、消化管内の生菌数の消長と対

Table 1. Weight of the body in the 5th-instar larvae after inoculations of *Streptococcus faecalis* AD-4

Rearing group	Days after inoculations						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	♂ 0.94±0.02	1.41±0.07	1.85±0.10	2.20±0.13	2.65±0.11	2.98±0.08	3.18±0.05
	♀ 0.96±0.03	1.48±0.04	1.97±0.04	2.46±0.07	2.98±0.09	3.54±0.08	3.59±0.10
Peroral inoculation: 10 ⁴ cells	♂ 0.80±0.02	1.21±0.03	1.38±0.06	1.60±0.10	1.31±0.07	1.21±0.08	1.17±0.10
	♀ 0.80±0.02	1.26±0.03	1.45±0.06	1.46±0.06	1.34±0.10	1.26±0.05	1.25±0.09
Hypodermic inoculation: 10 ⁴ cells	♂ 0.73±0.02	1.06±0.03	1.08±0.04	0.75±0.05	—	—	—
	♀ 0.78±0.03	1.11±0.04	1.14±0.05	0.80±0.06	—	—	—

Number of larvae tested was five and each value was the mean ± S.E..

In each rearing group, weights of the body in 5th-instar larvae immediately after ecdysis were 0.54±0.01 in male and 0.58±0.01 in female.

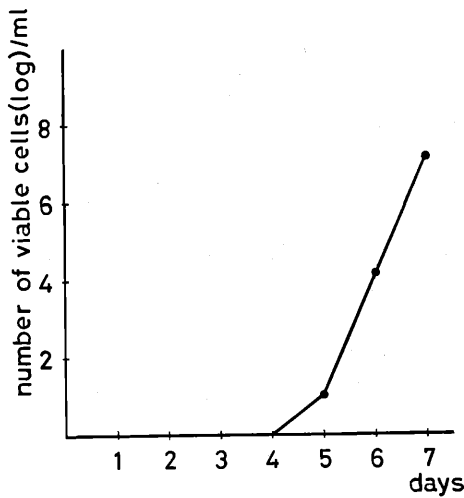


Fig. 1 Number of viable cells in hemolymph of the larvae after peroral inoculation of *S. faecalis* AD-4. Number of larvae tested was ten.

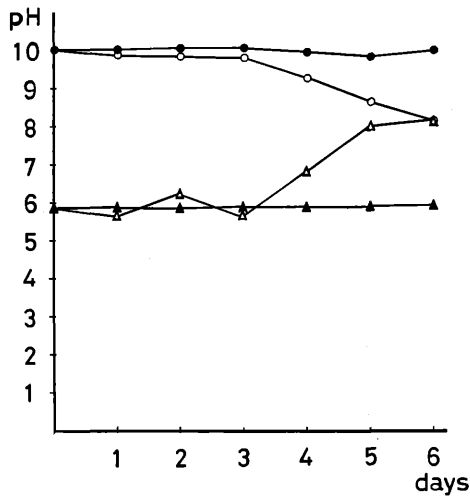


Fig. 2 pH value in hemolymph and digestive juice of the larvae after infection of *S. faecalis* AD-4. ●, pH in digestive juice of healthy larvae; ○, pH in digestive juice of larvae inoculated; ▲, pH in hemolymph of healthy larvae; △, pH in hemolymph of larvae inoculated.

比するため、飯塚ら³⁾と同じ条件下における感染幼虫体液の生菌数を計測し、その結果を Fig. 1 に示した。さらに感染幼虫の消化液ならびに体液中の pH 値を測定し Fig. 2 に示した。

Fig. 1 の結果、体液中における AD-4 は感染後 4 日目までは全く分離されず、5 日目になってはじめて分離された。この結果、児玉・中筋⁵⁾が *Streptococcus* E-5 ならびに *Serratia* E-15 の発病機作として論じた「消化管内で増殖した細菌が何らかの方法で中腸粘膜組織を通過し、体液中に侵入する」という結果に一致した。しかし、児玉・中筋⁴⁾による *Streptococcus* E-5 は、体液中での増殖能を有していないとされているため、本 AD-4 が中腸粘膜組織の損傷に伴なって機械的に体液中へ移行したのか、一部の菌体が組織を通過して体液中で増殖したのかは不明のままである。このため、AD-4 を幼虫に皮下接種して、体液中での増殖能の有無を調査した。その結果は Fig. 3 に示した。この結果、AD-4 は体液中で明らかに増殖し、幼虫が死亡する際には 10^7 /ml 水準の生菌数を示した。この死亡時の生菌数は、Fig. 1 の経口感染幼虫における体液中の生菌数ともよく一致した。また、Fig. 2 の結果、感染が

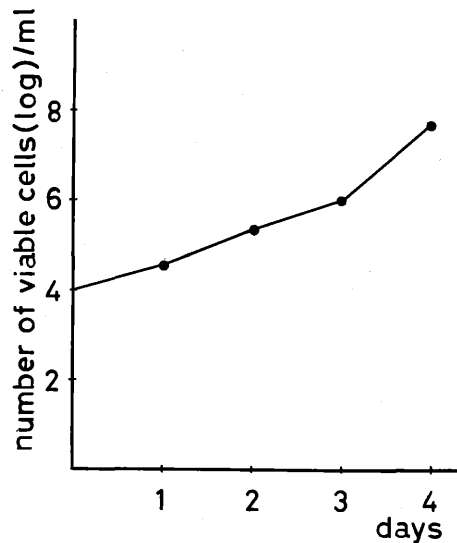


Fig. 3 Number of viable cells in hemolymph of the larvae after hypodermic inoculation of *S. faecalis* AD-4. Initial dose inoculated was 10^4 cells.

進むにつれて消化液の pH 値が次第に低下し、同時に体液の pH 値が上昇し、6日目には 8.2 の値で一致した。Fig. 1 ならびに Fig. 2 の結果は、いずれも消化管中の細菌ならびに消化液が中腸皮膜組織を通過して体液中に流入し、細菌は体液中で増殖することを示唆している。ところで、前報¹⁾における中腸皮膜組織の病理組織学的観察の結果は、盃状細胞ならびに円筒細胞の細胞質の空胞化が5日目をすぎると観察されはじめ、6日目には空胞化がさらに進行し、7日目になると盃状細胞の脱落、空胞化、円筒細胞の核、細胞質いずれにおいても著しい空胞化が観察されている。従って、7日目の中腸皮膜組織で観察される細胞の脱落、空胞化の状態においては、細菌ならびに消化液の体液中への流入は十分考えられる。しかし、5日目、6日目における盃状細胞の細胞質の空胞化を中心とした病理組織学的状態においても、一部の細菌ならびに消化液が体液中へ流入していると考えられるので、感染の進行と体液中への細菌流入の関係についてはさらに検討が必要と考えられる。

ついで、AD-4 が消化管内ならびに体液中で増殖する際、endotoxin ならびに exotoxin といった毒素を産生しているかどうかを明らかにするため、生菌、死菌ならびに Seitz 濾過液を家蚕幼虫に接種して発病の有無を観察し、その結果を第2表に示した。この結果、Seitz 濾過液ならびに死菌を接種した区では発病せず、生菌区にのみ死亡個体が出現した。このことは、AD-4 が毒素を産生していないこ

とを意味した。

以上の実験結果と、前報¹⁾の中腸皮膜組織の病理組織学的観察結果とをあわせて AD-4 の発病機作に関する考察を行なった。AD-4 が幼虫に経口接種されると、2日ないし3日の lag phase を経て消化管内で増殖をはじめめる。その際、中腸内の囲食膜では、膜に菌体が附着してその部位にとどまったまま増殖し、以後、生菌数は対数値的に増加する。感染後3日目をすぎた幼虫は、体重が全く増加しないことから細菌の増殖は幼虫の栄養吸収に著しい阻害作用を与えていると考えられる。また、AD-4 は、増殖に伴って代謝産物として乳酸を産生するため消化液の pH 値を低下させる。感染が進むにつれて、囲食膜は溶解して行くが、溶解の時期と中腸皮膜組織の盃状細胞ならびに円筒細胞の空胞化の進行とは一致した。時間的にはまだ検討の余地があるが、感染後6日目になると中腸皮膜組織の空胞化が著しく、一部の細菌ならびに消化液が体液中へ移行し、細菌は体液中で増殖する。この結果、幼虫は敗血症を起こし死亡する。

一方、AD-4 が皮下に接種されると、24時間で増殖がはじまり、幼虫の摂食活動が止まり成長も停止する。病理組織学的にも盃状細胞ならびに円筒細胞の空胞化がはじまり、3日目ないしは4日目に消化液が体液中に流入する。4日目には幼虫が敗血症で死亡する。

従来、児玉・中筋⁵⁾は *Streptococcus* E-5 と *Serratia* E-15 の発病機作として、細菌の消化管内増殖の結

Table 2. Number of the dead larvae in each hypodermic inoculations

Preparations	No. of larvae tested	Days after inoculations						
		1	2	3	4	5	6	7
Control*	20	0	0	0	0	0	0	0
Broth cultured (30°C, 48 hours): 10 ⁴ cells	20	0	0	6	12	2	—	—
Suspension of viable cells: 10 ⁴ cells	20	0	1	1	11	7	—	—
Suspension of dead cells**: 10 ⁴ cells	20	0	0	0	0	0	0	0
Culture broth filtered by Seitz's filter	20	0	0	0	0	0	0	0

*: Larvae were hypodermically inoculated only sterile broth medium.

** : Bacterial cells were killed by 2% formalin solution for 30 minutes and were cleaned three times by sterile distilled water.

果、何らかの原因によって中腸皮膜組織を通過した細菌が体液中に侵入して増殖した結果、幼虫は死亡すると考えていたが、前報¹⁾と本実験結果によって、AD-4 の場合には菌体が囲食膜に附着して増殖を続けることが囲食膜の溶解をもたらし、さらには中腸皮膜組織にも損傷を与える直接原因となると考えられる。この損傷は幼虫にとって回復し得ない傷害であり、幼虫死亡の素因となるものと思われる。最終的には、体液中における細菌増殖の結果、敗血症で死亡する。なお、消化管内の内側の膜が増殖部位であること、ならびに死亡直前に消化管を通過して体液中に細菌が侵入する事実は SUTTER and RAUN⁶⁾ による *Bacillus thuringiensis* に感染したアワノメイガの1種の報告と一致した。

摘 要

1. AD-4 に感染した幼虫において、感染が進むにつれて消化液の pH 値は下がりはじめ、同時に体液の pH 値は上がりはじめる。以後、6 日目に一致した。

2. 感染幼虫の体液では、5 日目まで生菌が分離されず、6 日目になって急に増加した。

3. AD-4 の死菌と培養液には起病性が認め

られず、生菌にのみ起病性が認められた。

4. 以上の結果、AD-4 の発病機作を考察した。経口的に消化管内に入った細菌は、2 日ないし3日の lag phase を経て増殖をはじめ。菌体は囲食膜の内側に附着して増殖する結果、幼虫の栄養吸収は阻害され、囲食膜は溶解し、中腸皮膜組織は感染後6日目に空胞化が著しい。この時期には消化液ならびに細菌が体液中に流入し、細菌が増殖し幼虫は敗血症にて死亡する。

文 献

- 1) 飯塚敏彦 (1972): 日蚕雑, **41**, 327-332.
- 2) 飯塚敏彦・滝沢義郎 (1966): 日蚕雑, **38**, 95-102.
- 3) 飯塚敏彦・堀江保宏・滝沢義郎 (1970): 日蚕雑, **39**, 253-260.
- 4) 児玉礼次郎・中筋祐五郎 (1968): 日蚕雑, **37**, 477-482.
- 5) 児玉礼次郎・中筋祐五郎 (1969): 日蚕雑, **38**, 406-412.
- 6) SUTTER, G.R. and E.S. RAUN (1967): J. Invertebrate Pathol., **9**, 90-103.

Summary

The pathogenic mechanism of the disease caused by *Streptococcus faecalis* AD-4 in silkworm larvae reared on the artificial diet

By

Toshihiko IZUKA

1. In the larvae after infection with *S. faecalis* AD-4, while pH value of digestive fluid decreased, pH value of hemolymph increased in four days after inoculation. Both solutions became the same pH value in six days after inoculation.

2. Viable cells were not isolated from hemolymph of the larvae before five days after inoculation, but in six days numbers of viable cells logarithmically increased.

3. Dead cells of *S. faecalis* AD-4 and the culture solutions filtrated by Seitz's filter were not pathogenic to silkworm larvae, but only viable cells were pathogenic.

4. The pathogenic mechanism of bacterial disease in silkworm larvae reared on the artificial diet was discussed by the results obtained in this paper and in the former paper by IZUKA(1972) and the pathogenic mechanism was postulated as follows:

In the larvae infected with *S. faecalis* AD-4, bacterial cells multiply to attach within peritrophic membrane after lag phase for two or three days, and then they gradually multiply as large colonies. By the results, peritrophic membrane are dissolved and goblet cells and cylindrical cells of midgut are vacuolyzed in six days after inoculation. The death in larvae seems to result from what digestive fluid passes through the vacuolyzed cells of midgut epithelium into hemolymph and septicemia is caused by the rapid growth of bacterial cells in the hemolymph.

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo)