

伝染性軟化病ウイルスと細菌との混合感染に及ぼす抗幼若ホルモン活性物質の影響

| | |
|-------|------------------------------------|
| 誌名 | 日本蠶絲學雜誌 |
| ISSN | 00372455 |
| 著者 | 松本, 継男 朱, 亜峰 栗栖, 弍彦 赤井, 弘 |
| 巻/号 | 55巻1号 |
| 掲載ページ | p. 1-4 |
| 発行年月 | 1986年2月 |

伝染性軟化病ウイルスと細菌との 混合感染に及ぼす抗幼若ホルモン活性物質の影響

松本継男¹⁾・朱 亜峰¹⁾・栗栖弐彦¹⁾・赤井 弘²⁾

1) 京都市左京区・京都工芸繊維大学繊維学部 (〒 606)

2) 茨城県谷田部町・農林水産省蚕糸試験場 (〒 305)

(1985年6月7日 受理)

TSUGUO MATSUMOTO¹⁾, YA FENG ZHU¹⁾, KAZUHIKO KURISU¹⁾ and HIROMU AKAI²⁾: Effects of anti-juvenile hormone on mixed infection of infectious flacherie virus and bacteria in silkworm larvae

Trimolter larvae were induced from aseptically reared larvae fed on an artificial diet by the administration of anti-juvenoid (AJH) in the 3rd instar larval stage. The susceptibility of trimolters to mixed infection of flacherie virus (IFV) and bacteria was determined. When a mixture of IFV (10^{-2} - 10^{-5}) and *Streptococcus faecalis* (10^6) or *Serratia marcescens* (10^6) was given to the 4th instar larvae, the mortality of trimolters which had received AJH was about 17-35% compared with that of larvae which had not received AJH. The administration of AJH to the infected larvae prevented death from occurring and the presence of *S. faecalis* or *S. marcescens* in the intestine of the larvae could not be detected. However bacteria accumulated in the intestine of larvae, which AJH had been administered at the 3rd instar and which had been infected with IFV in the presence of *S. faecalis* at the 4th instar. However the bacteria were not observed in larvae infected with IFV associated with *S. marcescens*. (¹⁾ Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, 606 ; ²⁾ Sericultural Experimental Station, Yatabe, Ibarahi 305)

無菌の3齢起蚕に抗幼若ホルモン活性物質(AJH)を投与し、3眠蚕を誘導した。この3眠蚕を用いて、伝染性軟化病ウイルス(IFV)と細菌との混合感染を試みた。3齢起蚕にIFV(10^{-2} ~ 10^{-5})と*S. faecalis*(10^6)または*S. marcescens*(10^6)の混液を添食させた。その結果、AJH無処理蚕は100%致死したが、AJH処理蚕は約17-35%の死亡率だった。また感染後にAJHを投与すると、死亡蚕は認められずまた蚕体内に細菌はほとんど残留しなかった。しかし3齢起蚕にAJH処理され4齢起蚕に感染を受けた個体は、*S. faecalis*関与した感染では感染4日後の蚕体内に多量の細菌を係留していたが、*S. marcescens*が関与した感染ではほとんど係留していなかった。

伝染性軟化病ウイルス(IFV)に感染した蚕は、多様な症状を呈する(山崎ら, 1960; 1968)。この症状の多様性は、腸内に生存する細菌の種類や菌数に起因すると考えられている(栗栖ら, 1966)。IFVと細菌との共同作用で、潜伏期の短縮や急激な致死が招来する(石川・宮島, 1968; 鮎沢ら, 1968)が、IFVの初期感染の病理はまだ十分に解析されてい

い。

われわれは、脱皮や中腸皮膜組織の更新や排泄機能を、蚕がもつ生体防衛反応の一つと位置づけ、IFVの感染病理をかかえる方面から解析している。さきに無菌蚕を用いてIFVと細菌との混合感染を試み、IFVの感染致死に細菌が大きく関与すること、また眠蚕の腸内には細菌が多量に係留することを報

告した(松本ら, 1985)。そして, この眠中に残存する細菌が, 次の齢期に感染を容易に許容せしめる易感染宿主としての素因を形成するとともに, さらにIFVの感染を増強する要因をなすものと推定した。

今回は抗幼若ホルモン活性物質(AJH)を用いて眠性を制御するとともに, それに伴う腸内の細菌の動態からIFVの感染性を検討した。

材料と方法

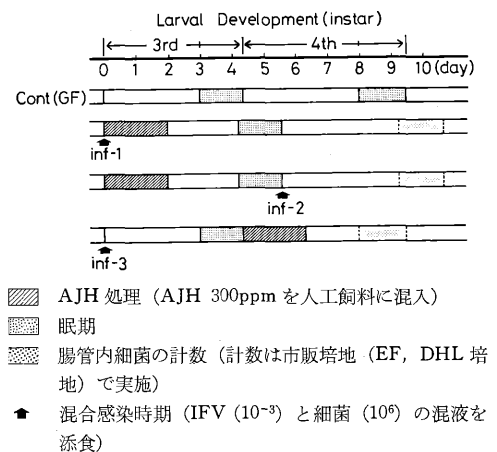
AJH(イミダゾール系化合物)による4眠蚕の3眠化は, Akai *et al.*(1984)に従った。すなわち300ppmのAJHを人工飼料に混合し, 3齢まで無菌飼育された幼虫(芙蓉×東海)に, 餉食より48時間摂食させた。その後はAJHを含まない人工飼料に移し, 無菌飼育を継続した。

IFVや供試菌(*Streptococcus faecalis*, *Serratia marcescens*)および感染方法, また腸内に生存する細菌数の計数方法などは, すべて前報(松本ら, 1985)に準じた。菌数計数は4齢起蚕から4日目に行なった。この時期はAJH無処理蚕では4眠にあたるが, AJH処理蚕には4眠が認められないので, 4眠に相当する時期として設定した。

結果

感染実験に先立ち, AJHによる4眠蚕の3眠化を検討した。その結果3齢起蚕への投与では95%の幼虫が3眠蚕となり, 4齢起蚕への投与では90%の

幼虫が3眠蚕となった。そこで感染実験は, 3眠蚕の誘導率が高い前者を用いて行なった。一定の菌量(10^6)とIFV濃度を 10^{-2} ~ 10^{-5} に調製した混液を, AJH処理された蚕の4齢起蚕に24時間添食した。その結果を第1表に示した。AJH無処理蚕は, 10^{-2} ~ 10^{-3} のIFV濃度の添食で吐液を伴ってすべてが急激に致死したが, AJH処理蚕では*S. faecalis*との混合感染で17.4-35%, *S. marcescens*との混合感染で22%の死亡率であった。しかし 10^{-4} ~ 10^{-5} のIFV濃度の感染では, AJH無処理蚕とAJH処理蚕の死亡率に大差は認められなかった。これらの混



第1図 AJH処理と混合感染時期

第1表 IFVと細菌との混合感染に対するAJHの効果¹⁾²⁾

| IFV濃度 | 細菌 (10^6) | AJH処理蚕 | | AJH無処理蚕 | |
|-----------|----------------------|---------|--------|------------------|--------|
| | | 死亡数/供試数 | 死亡率(%) | 死亡数/供試数 | 死亡率(%) |
| 10^{-2} | <i>S. faecalis</i> | 4 / 23 | 17.4 | 20 / 20 | 100 |
| | <i>S. marcescens</i> | 5 / 23 | 21.7 | 20 / 20 | 100 |
| 10^{-3} | <i>S. faecalis</i> | 8 / 23 | 34.8 | 20 / 20 | 100 |
| | <i>S. marcescens</i> | 5 / 23 | 21.7 | 20 / 20 | 100 |
| 10^{-4} | <i>S. faecalis</i> | 5 / 23 | 21.7 | 6 / 20 | 30 |
| | <i>S. marcescens</i> | 4 / 23 | 17.4 | 5 / 20 | 25 |
| 10^{-5} | <i>S. faecalis</i> | 1 / 23 | 4.3 | 2 / 20 | 10 |
| | <i>S. marcescens</i> | 0 / 23 | 0 | ND ³⁾ | ND |

- 1) AJHは3齢起蚕に48時間添食(添食量300ppm)
- 2) 接種は4齢起蚕に実施
- 3) not-done

第2表 AJH 処理による眠期中の腸管腔内細菌数の変化¹⁾

| 感 染 方 法 | 無 処 理 | | AJH 処 理 | | | | |
|-------------------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|---------------------|--|
| | | | 3 齢 | | 4 齢 | | |
| | 単 一 | 混 合 ²⁾ | 単 一 | 混 合 | 単 一 | 混 合 | |
| <i>S. faecalis</i> | | | | | | | |
| 3 齢 初発接種菌量 (I) | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | |
| 眠期の菌量 (E) | 2.1×10 ³ | 3.6×10 ⁵ | 0 | 8.8×10 | 1.0×10 ² | 2.4×10 ² | |
| log (E/I) ³⁾ | -3 | -1 | -6 | -5 | -4 | -4 | |
| 4 齢 初発接種菌量 (I) | ND ⁴⁾ | ND | 10 ⁶ | 10 ⁶ | ND | ND | |
| 眠期の菌量 (E) | ND | ND | ∞ ⁵⁾ | ∞ | ND | ND | |
| log (E/I) | — ⁶⁾ | — | ↗ ⁷⁾ | ↗ | — | — | |
| <i>S. marcescens</i> | | | | | | | |
| 3 齢 初発接種菌量 (I) | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | |
| 眠期の菌量 (E) | 0 | 4.9×10 ⁴ > ⁸⁾ | 6.0×10 | 1.0×10< ⁹⁾ | 1.0×10 | 0 | |
| log (E/I) | -6 | -1 | -5 | -6 | -5 | -6 | |
| 4 齢 初発接種菌量 (I) | ND | ND | 10 ⁶ | 10 ⁶ | ND | ND | |
| 眠期の菌量 (E) | ND | ND | 0 | 3.4×10 ² > | ND | ND | |
| log (E/I) | — | — | -6 | -4< | — | — | |

1) 各感染区における細菌計数は、10頭の平均で示した

2) 混合感染：IFV (10⁻³) + 細菌 (10⁶) の混液にて感染させた

3) 腸管内の細菌の減少指数

4) 実施せず

5) 計数できず

6) 測定なし

7) 増殖

8) 以上

9) 以下

合感染では、*S. marcescens* より *S. faecalis* が関与した感染に若干高い死亡率が認められた。致死しなかった個体は、その後順調な発育経過をたどり、無菌蚕 (対照) より 3 日早く登簇した。

つぎに菌量 (10⁶) と IFV の濃度 (10⁻³) を一定にして混合感染を行ない、この感染蚕に AJH を投与して 4 齢起蚕から 4 日目に蚕体内に存在する菌量を計数した。感染期と AJH 投与期のスケジュールを第 1 図に示し、それらの結果を第 2 表にまとめた。まず AJH 無処理蚕では、3 齢起蚕に細菌のみを添食した個体は、4 眠中の蚕体内に *S. faecalis* を 10³ 保留していた。しかし *S. marcescens* はまったく残存していなかった。また細菌と IFV との混合感染を受けた蚕は、*S. faecalis*、*S. marcescens* とともに 10⁴ 以上の菌量が保留していた。一方 3 齢起蚕に、細菌だけ添食された個体や IFV と細菌との混合感染を受けた個体に AJH を投与すると、蚕体内に若干の *S. faecalis* や *S. marcescens* の存在を認めるのみであった。この AJH 投与による排菌の効果は、4 齢起蚕での投与より 3 齢での投与、すなわち感染後早

期に投与する方が有効であり、また *S. faecalis* より *S. marcescens* に対して著しい効果が認められた。しかし 3 齢起蚕に AJH を投与して 4 齢起蚕に感染を試みた場合には、前述の感染後投与のような顕著な排菌効果は認められなかった。すなわち *S. faecalis* の関与した感染では計数不能の菌量が、感染後 4 日目の蚕体内に残留していた。しかし *S. marcescens* が関与した感染では、顕著な菌の減数が認められ、感染期と AJH 投与期とは無関係であった。

考 察

さきにわれわれは、無菌蚕を用いて IFV と細菌との混合感染を試み、健康蚕の腸内で優勢を示す *S. faecalis* が、病原性の *S. marcescens* より IFV 感染に強い致死作用を示すことや、眠期に多量の細菌が蚕体内に残留することなどを報告した (松本ら, 1985)。そして IFV の感染で中腸皮膜細胞の補填更新機能の低下 (栗栖・松本, 1974) や、幼虫脱皮に伴う排泄機能などの減弱が、眠期に細菌を腸内に残存せしめ、この残存菌が IFV に対する易感染宿主

としての素因を形成し、さらには死物寄生的な増殖により遂に急激な致死を誘起するとの、IFV感染の相貌を推論した。

今回は AJH を用いて眠性を制御することにより、蚕体内の細菌の動向から、IFV感染に対する易感染宿主の素因の形成を検討した。AJHは、Akai *et al.* (1984)、木内ら (1985) の指摘のように、今回無菌の3齢起蚕に投与して95%の蚕を3眠化することができた。そしてまた AJH は細菌のみを添食した蚕や IFV と細菌との混合感染蚕に対して、顕著な感受性の緩和と蚕体内からの細菌の排除効果を示した。この効果は先の感染実験 (松本ら, 1985) に用いた抗生物質の挙動と類似している。そこで数種の細菌を用いて AJH の抗菌性を検討したが、現在までのところ AJH には直接的な抗菌力は認められていない。いずれにしても AJH は眠性を制御する以外に、蚕の感染防御効果として作用する一面が期待されるので、今後の多面的な検討が必要と考えられる。

蚕のウイルス性軟化病の感染致死に細菌が関与することは、Paillot (1934) が指摘し *Streptococcus* や *Bacillus* に注目した。栗栖ら (1966) も多彩な症状の発現のなかで、*Enterobacteriaceae* や *Streptococcus* を指摘し、石川・宮島 (1968) も *S. faecalis* が発病の助長や潜伏期の短縮に関与することを示し、渡部 (1976) も相乗的な助長菌として腸球菌に注目している。しかしこれら細菌がどのような機序で IFV

感染に関与しているかは、不明な点が少なくない。先の実験 (松本ら, 1985) や今回の実験を通じて、眠期に細菌が係留すること、その係留する細菌の種類や菌量などが、IFVの感染性に関与することは十分に考えられる。この眠期での細菌の係留性については、中腸皮膜組織や消化液などの生理機能や AJH による内分泌変化などと合せて今後検討する必要がある。

文 献

- AKAI, H., KIMURA, K., KIUCHI, M., and SHIBUKAWA, A. (1984): J. Seric. Sci. Jpn., 52, 545-546.
- 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.
- 石川義文・宮島成寿 (1968): 日蚕雑, 37, 471-476.
- 木内 信・木村敬助・赤井 弘 (1985): 日蚕雑, 54, 71-81.
- 栗栖式彦・松本継男 (1974): 日蚕雑, 43, 283-289.
- 栗栖式彦・内海 進・市川吉夫 (1966): 京工織大学報, 5, 7-13.
- 松本継男・朱 亜峰・栗栖式彦 (1985): 日蚕雑, 54, 453-458.
- PAILLOT, A. (1934): Ann. Inst. Pasteur, 52, 290-310.
- 山崎 寿・酒井栄一・下平睦夫・山田たけを (1960): 長野蚕試報, (61) 1-28.
- 山崎 寿・山田たけを・小林あつ子 (1968): 日蚕雑, 37, 155-156.
- 渡部 仁 (1976): 日蚕雑, 45, 95-106.