

内部汚染菌の発生防止法試験(3)

誌名	栃木県蚕業センター研究要報 = Tochigi-ken Sangyō Sentā kenkyū yōhō
ISSN	09148396
著者	大金, 正美 高田, 孝夫 宇都木, ツル 山崎, 宏 中里, 茂
巻/号	31号
掲載ページ	p. 41-52
発行年月	1989年3月

内部汚染菌の発生防止法試験(第3報)

大金 正美・高田 孝夫・宇都木 ツル
山崎 宏・中里 茂

内部汚染菌の発生を防止するために、その発生要因及び防除法について検討した。

1 材料及び方法

(1) 発生要因調査

ア NPV接種時期別内部汚染菌発生状況調査

現地養蚕農家から採取した核多角体病(以下NPVとする)によりへい死した蚕を磨碎し、常法により多角体を精製し、供試病原とした。精製した多角体をトーマ血球計算盤により計算し、1 ml中の多角体濃度を 1.9×10^7 個/ml、 1.9×10^5 個/ml、 1.9×10^3 個/mlの3濃度にそれぞれ調整を行い、5令の経過日数毎に各濃度の多角体浮遊液を2 ml桑葉に塗布風乾後に処理桑を給与し、摂食6時間後残桑は取り除き、以降は普通桑に切り替えて飼育し、その後の発病時期、へい死蚕発生時期、菌中におけるへい死蚕の形態について調査を行った。

イ NPVり病蚕混入による発病状況調査

当所で継代しているNPVを供試し、予めNPVを接種し、接種6日目の蚕を5令起蚕、5令3日目、上簇時に50頭に対して2%及び10%の割合に混入、その後の発病及びへい死状況について調査を行った。なお、混入したNPVり病蚕についてはへい死した時点で取り除き、その他の材料蚕については普通桑により飼育上簇させ、NPVり病蚕混入による発病状況について調査を行った。

ウ 簇器からの感染に関する試験

所内で飼育した蚕を1区当たり200頭を供試し、消毒済みの簇にNPV多角体浮遊液(濃度 $10^{7.0}$ /ml)、20 mlをクロマト用スプレーで利根簇に散布し、病原処理区及び無処理区の簇に上簇させ、その後のへい死蚕の発生状況及びNPVによるへい死蚕割合について調査を行った。

エ 上簇法及び傷夷感染に関する試験

上簇法による内部汚染菌の発生状況については一頭拾い上簇法と条払い上簇法の2方法について検討した。供試病原としてはNPV多角体浮遊液(濃度 $10^{7.8}$ /ml)を各上簇法により収集した50頭の蚕に2 mlを滴下し、手で病原菌液を蚕体表面に塗りつけた状態にして上簇させ、簇中及び菌中における発病率について調査した。なお、条払い上簇の方法としては、1.5 mの高さから条を振るい、条桑から振るい落す手法で行った。また、傷夷感染に関する試験としては一頭拾いした蚕を#200のサンドペーパーで蚕体表面に傷をつけた蚕、蚕体表面に傷をつけ出血させた蚕を各50頭供試し、上簇法による感染に関する試験と同様にNPV多角体浮遊液(濃度 $10^{7.8}$ /ml)2 mlを蚕体に塗布し上簇させ、簇中及び菌中における発病率について調査した。

オ 飼育環境別の感染性に及ぼす影響に関する試験

5令期における飼育温度を標準飼育温度を対照とし高温飼育及び低温処理区を設定し、感染性への影響について検討を行った。供試病原はNPV多角体浮遊液(濃度 $10^{7.1}$ 個/ml) 2mlを桑葉に塗布、風乾後に5令3日目蚕に6時間摂食させて試験を行った。なお、5令中の飼育温度は、対照区 22°C 恒温飼育、高温飼育は 29°C 恒温飼育、低温処理区は通常は 22°C 恒温飼育とし、病原接種1日前(5令2日目)に 10°C の低温に24時間接触させたものを材料蚕として供試した。また、高温・低温に遭遇させて蚕にストレスを与えた場合に、蚕のNPVに対する感受性への影響について検討するために、5令3日目蚕にNPV多角体浮遊液(濃度 $10^{7.3}$ 個/ml) 2mlを桑葉に塗布風乾後6時間摂食させて行った。なお、高温及び低温遭遇処理については病原接種処理1日、当日の2回それぞれ 33°C 、 10°C に2時間、遭遇させて行った。

(2) 防止法試験

ア 蚕座内感染防止法試験

蚕座内における2次感染の防止法として、改良パフソール、消石灰を散布し防除効果について検討を行った。予めNPVを接種し発病させた蚕(接種6日目:節高症状)を5令起蚕、5令3日目及び上簇時に2%の割合で混入し、それぞれの資材を2回散布(5令起蚕、5令3日目)、3回散布(5令起蚕、5令3日目、上簇時)、毎日散布(5令中毎日1回)の3区を設定し、散布量としては $5\text{g}/0.1\text{m}^2$ とした。

イ 熟蚕消毒法試験

(ア) 熟蚕消毒時期の検討については、改良パフソール及びシルゾールの2薬剤を供試して行った。シルゾールの消毒効果試験については、膿病蚕体液をPBSで希釈(1:3)にしたものをクロマト用スプレーで供試頭数100頭に対し10mlを噴霧して接種したものを供試蚕とし、シルゾール15倍希釈5mlをウイルス接種30分前、30分後にそれぞれ散布処理を行った。

改良パフソールの消毒効果試験については、NPV多角体浮遊液2mlを滴下し、蚕体表面に塗りつけて接種した。改良パフソールは $5\text{g}/0.1\text{m}^2$ をウイルス接種1時間前、直後、30分後、1時間後に散布処理を行った。なお、消石灰についても改良パフソールの対照として供試した。

(イ) 薬剤別熟蚕消毒効果

熟蚕消毒について、数種類の薬剤を供試しウイルス接種30分後に散布処理を行い、効果判定を行った。供試病原は、NPV多角体浮遊液(濃度 $10^{7.3}$ 個/ml) 2mlを蚕体に噴霧して接種を行った。供試薬剤については、改良パフソールを薬剤別消毒効果の対照薬剤とし、テトライト粉体、テトライト200倍液、同400倍液、クロラムフェニコール200倍液、同400倍液、リン酸3ナトリウム200倍液、同400倍液をそれぞれ供試した。なお、散布量については、粉剤については $5\text{g}/0.1\text{m}^2$ 、液剤については $10\text{ml}/0.1\text{m}^2$ を散布した。

2. 結果の概要

(1) ア NPV接種時期別内部汚染菌発生状況調査

1.9×10^3 、 10^5 、 10^7 個/mlの濃度別に5令期間日別にウイルス接種を行い、内部汚染菌の

発生状況について調査を行った結果、 10^3 区における発病率は2.0%以下と低く推移し、5令起蚕、5令7日目に接種したものにおいては繭中へい死蚕として現れた。 10^5 、 10^7 区については、発病率の推移において一定の傾向は認められなかったものの、5令起蚕及び5令後半に接種したものに繭中へい死蚕が見られ、飼育経過が進み上簇期に近づくにつれて繭中におけるへい死蚕割合が増加し、内部汚染菌の発生が増加した。なお、繭中へい死蚕のへい死様態については幼虫態で軟化腐敗しているものが多かった。また、5令起蚕、5令3日目、上簇時期に限り行った試験においては、 10^3 区特に初秋蚕期において20%の発病率を示す場合も認められた(図-1)。

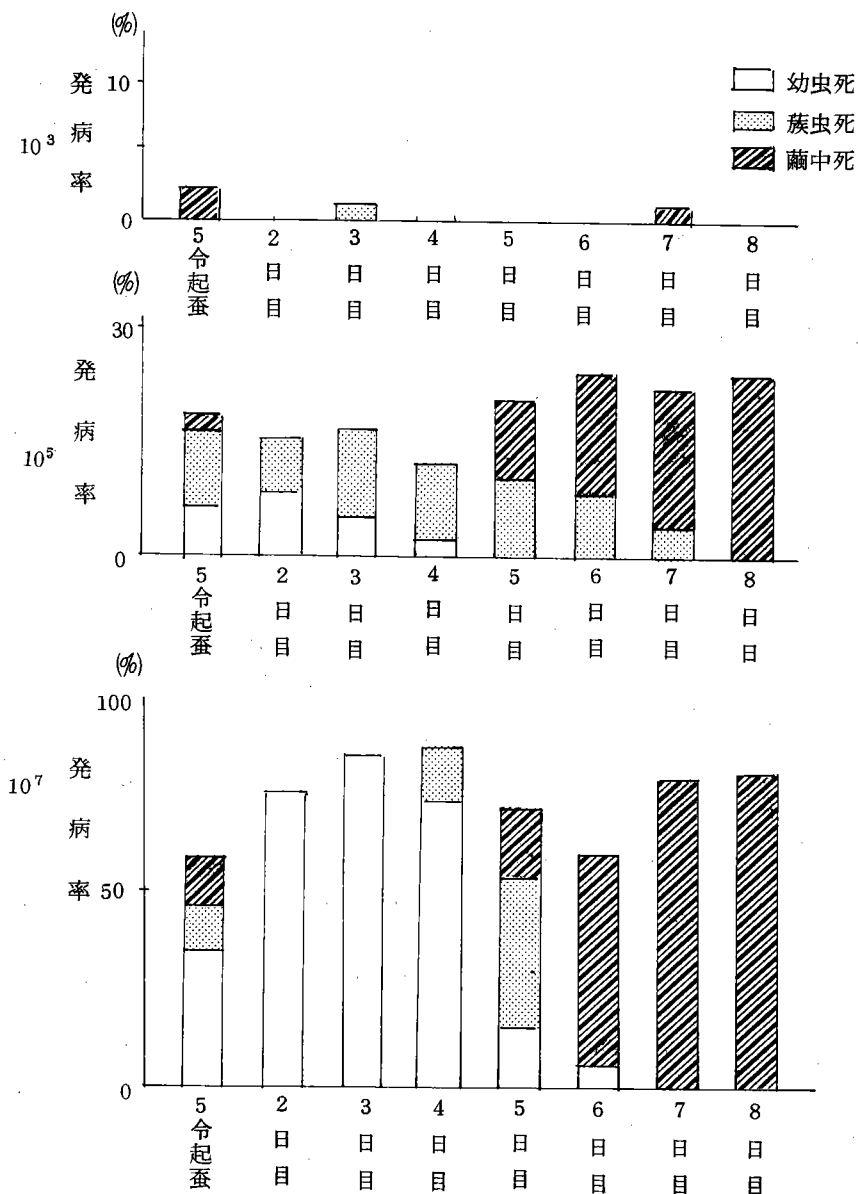


図-1 接種時期別内部汚染菌発生状況調査

(1) イ NPV病蚕混入による発病状況調査

予めNPVを接種しり病させた接種6日目の病蚕（節育症状）を3時期（5令起蚕、5令3日目、上簇時）に2%及び10%の割合に混入し、その後の発病状況について調査を行った結果、2%混入区については混入時期にかかわらず20%台の発病率を示し、10%混入区においては、5令起蚕、5令3日目に混入したものの発病率にはあまり差は認められなかったが、上簇時の混入では58%と他の混入時期に比して高くなった（図-2）。

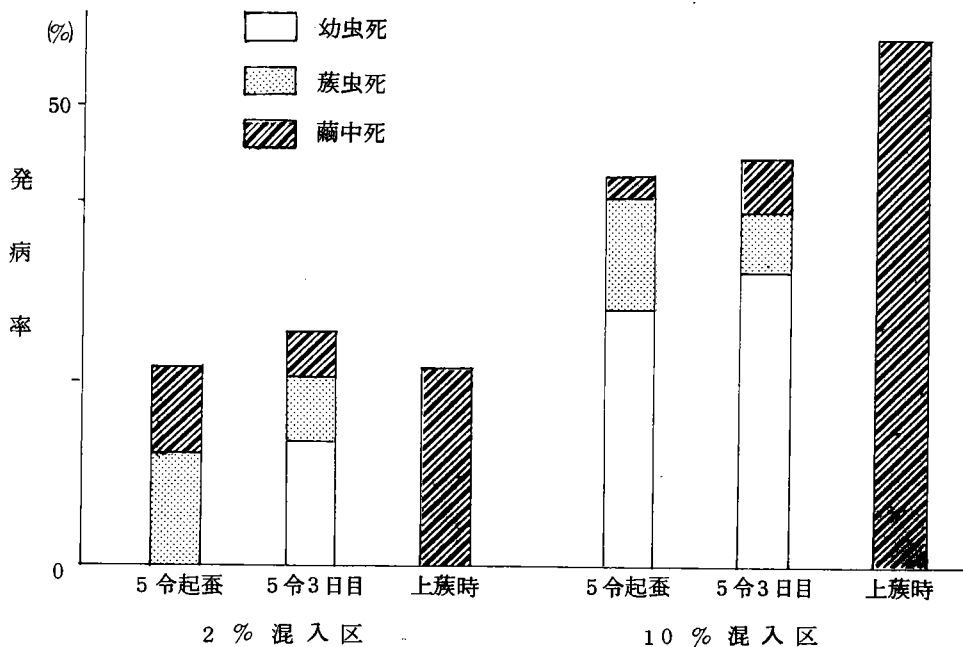


図-2 NPV病蚕混入による発病状況調査

(1) ウ 簇器からの感染に関する試験

所内で飼育した蚕を1区200頭供試し、消毒済みの利根簇にNPV病原接種区と未接種区を設け上簇させ、簇器からの感染の有無について検討した。

また、現地において飼育された蚕を簇器の消毒区と無消毒区の2区に上簇させ、任意に500g粒数を抽出し、繭中へい死蚕調査及びNPVの病原検索についても併せて調査した。この結果、現地農家においては、簇器消毒区が4.7%のへい死蚕割合に対し、無消毒区は9.0%とへい死蚕割合が増加した。なお、NPVによるへい死蚕割合は、無消毒区は消毒区に比し3倍以上増加したが、1.4%と割合は低かった。また、所内におけるNPV接種簇に上簇させた蚕と未接種の簇に上簇させた蚕については、へい死蚕割合では未接種の簇に上簇させた区のほうが14.0%と多かったが、NPVによるへい死蚕割合から見ると病原接種した簇に上簇させた区について4.5%

のへい死蚕が認められたことから、簇器からの感染率は僅かではあるが認められた(表-1)。

表-1 簇器からの感染状況調査

項目 場所	簇器 消毒	病原 (NPV) 接種	簇中死 (頭)	繭中死 (頭)	計 (頭)	減歩 蚕合 (%)	NPVによるへい死 蚕割合(%)	備 考
所 内	有	有	9	13	22	11.0	4.5	供試蚕：所内で飼育した蚕 供試頭数：1区 200頭 病原接種量：20 ml 接種濃度：10 ^{7.3} /ml
	有	無	7	21	28	14.0	0	
現 地	有	無	4	9	13	4.7	0.4	供試蚕：現地で飼育した蚕 調査点数：500g粒数 病原接種無消毒有 276粒 病原接種無消毒無 279粒
	無	無	7	18	25	9.0	1.4	

(1) エ 上簇法及び傷夷感染に関する試験

上簇法による感染性の差異について検討するため、条払い上簇法と1頭拾い上簇法の2方法で上簇させた蚕にNPVを接種し試験を行った結果、1頭拾い区が22.0%の発病率を示したのに比し、条払い上簇区は18.0%と発病率が低かった。また、傷夷感染の有無について検討するため

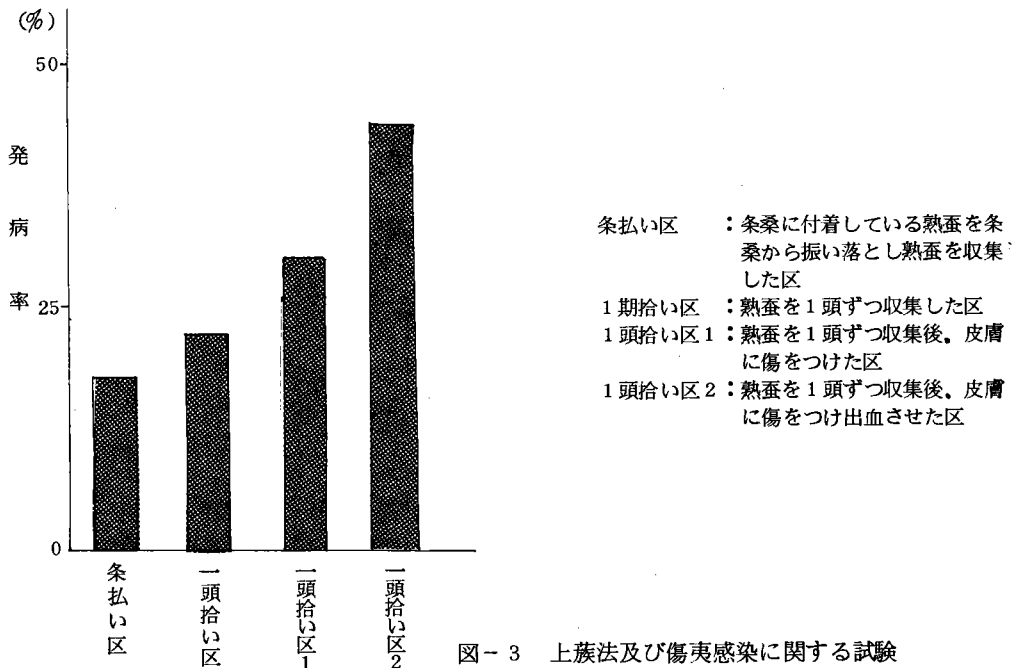


図-3 上簇法及び傷夷感染に関する試験

1頭拾いをした蚕に傷をつけた区と傷をつけ出血させた区を設定し、NPVによる発病率について調査を行った結果、1頭拾い区が22.0%の発病率に対し、傷をつけた区は30.0%、傷をつけ出血させた区は44.0%と発病率が顕著に高くなった（図-3）。

(1) オ 飼育環境別による感染性に及ぼす影響に関する試験

5令3日目蚕にNPVを接種し、標準表に基づき蚕を飼育（22℃恒温飼育）した場合の発病率が36.0%であったのに対して、29℃恒温育区が44.0%、5令2日目蚕を10℃24時間の低温処理区では60.0%を示した。また、へい死蚕の発生時期としては、低温処理した区において発病へい死する時期が標準育に比して早くなった（表-2）。また、高温遭遇及び低温遭遇させた場合のNPVに対する感受性への影響を調査するために、高温遭遇区（33℃2時間）、低温遭遇区（10℃2時間）を各々病原接種1日前及び接種後の2回遭遇させて行った結果、標準育のLD₅₀が6.81に対し、高温遭遇では有意差は認められなかったが、低温遭遇においてはLD₅₀が5.89と指数にして0.92低くなったことから、感受性が高くなったことが認められた。（表-3、4、5）

表-2 飼育環境別発病状況調査

区 \ 項目	幼虫死 (頭)	簇中死 (頭)	繭中死 (頭)	計 (頭)	減蚕歩合 (%)	平均 (%)
加温育	1	7	1	9	36.0	44.0
	3	8	2	13	52.0	
冷蔵処理	5	11	0	16	64.0	60.0
	2	10	2	14	56.0	
標準育	0	7	2	9	36.0	36.0
	1	5	3	9	36.0	

※ 標準育：22℃恒温飼育 冷蔵処理：5令2日目蚕を10℃、24時間処理
 加温育：29℃恒温飼育

表-3 濃度別発病状況調査

濃度	区	幼虫死	簇中死	繭中死	計 (頭)	減蚕歩合 (%)	平均	LD ₅₀
10 ⁷	1	3	3	0	6	60.0	60.0	6.81
	2	2	2	1	5	50.0		
	3	2	5	0	7	70.0		
10 ⁵	1	0	1	0	1	10.0	10.0	
	2	0	0	1	1	10.0		
	3	0	0	1	1	10.0		
10 ³	1	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0		

表 - 4 高温遭遇濃度別発病状況調査

濃度	区	幼虫死	簇中死	繭中死	計(頭)	減蚕歩合(%)	平均(%)	LD ₅₀
10 ⁷	1	3	4	0	7	70.0	75.0	6.54
	2	3	4	1	8	80.0		
10 ⁵	1	0	0	1	1	10.0	10.0	
	2	0	0	1	1	10.0		
10 ³	1	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0		

表 - 5 低温遭遇濃度別発病状況調査

濃度	区	幼虫死	簇中死	繭中死	計(頭)	減蚕歩合(%)	平均(%)	LD ₅₀
10 ⁷	1	3	2	3	8	80.0	80.0	5.89
	2	2	5	1	8	80.0		
10 ⁵	1	0	2	2	4	40.0	30.0	
	2	0	0	2	2	20.0		
10 ³	1	0	0	1	1	10.0	5.0	
	2	0	0	0	0	0		

(2) ア 蚕座内感染防止法試験

蚕座内における2次感染防止法を検討するために、予めNPVを接種した蚕を蚕座に供試頭数の2%の割合で5令起蚕、5令3日目、上簇時に蚕座に混入し、令中2回(5令起蚕、5令3日目)、令中3回(5令起蚕、5令3日目、上簇時)及び令中毎日改良パフソール、消石灰を散布し蚕座内感染防止効果について検討した。この結果、病原接種蚕を混入した場合、試剤無散布区ではNPVによる発病率が5令起蚕時の混入が24.0%、5令3日目の混入が18.0%、上簇時の混入が20.0%の発病率であったのに対し、試剤散布区は上簇時2回散布区を除き、いずれも発病率が低下し、2次感染防止効果が認められた。また、散布回数による防止効果については毎日散布>3回散布>2回散布の順で効果が高い傾向が認められた。

なお、改良パフソールと消石灰を比較すると、改良パフソールの方が防止効果が高い傾向が認められた(表-6)。

表 - 6 蚕座内感染防止法試験

混入時期	試 剤	散布回数	幼虫死頭	簇中死頭	繭中死頭	斃死蚕数計	NPV死 (%)	
5 令起蚕	改バ	2	1	1	3	5	10.0	
		3	0	2	2	4	8.0	
		毎日	0	0	3	3	6.0	
	消石	2	1	1	4	6	12.0	
		3	0	1	2	3	6.0	
		毎日	0	0	3	3	6.0	
	—	—	3	3	6	12	24.0	
	5 令3日	改バ	2	0	0	2	2	4.0
			3	0	0	4	4	8.0
毎日			0	1	3	4	8.0	
消石		2	0	1	4	5	10.0	
		3	0	2	1	3	6.0	
		毎日	0	2	3	5	10.0	
—		—	0	2	7	9	18.0	
上 簇 時		改バ	2	0	2	7	9	18.0
			3	0	0	5	5	10.0
	毎日		0	0	4	4	8.0	
	消石	2	0	2	7	9	18.0	
		3	0	1	6	7	14.0	
		毎日	0	0	6	6	12.0	
	—	—	0	0	10	10	20.0	
	対 照 区	—	—	0	2	1	3	0

(2) イ 防止法試験

(ア) 熟蚕消毒時期の検討

NPV病蚕体液をPBSで4倍に希釈し、クロマト用スプレーで蚕体表面が濡れる程度に100頭当り10mlを接種した。シルゾールの散布時期は、病原接種30分前及び30分後に5mlを散布し、熟蚕消毒効果について検討を行った。この結果、シルゾールによる熟蚕消毒効果については、シルゾール無散布が9.5~10.5%のNPV発病率に対し、シルゾールをウイルス接種後の散布において発病率が4.0%低下した(表-7)。

表-7 膿病防除のための熟蚕に対するシルゾール散布試験結果

シルゾール 散 布	ウイルス 接 種		病 蚕 数 (頭)						健 蛹 数 (頭)
			- 族 中		繭 中		計		
			N	その他	N	その他	N	その他	
す る	す る	前*	1	1	9.5	3	10.5	4	85.5
		後	1	0.5	3	4	4	4.5	91.5
	し ない		0	1	0	4	0	5	95.0
し ない	す る	前	1.5	0.5	9	5.5	10.5	6.0	83.5
		後	1	0.5	8.5	6	9.5	6.5	84.0
	し ない		0	1	0	5	0	6	94.0

* シルゾール散布の約30分前・後およびその相当時期

また、改良パフソールの熟蚕消毒時期についてもNPV多角体浮遊液2mlを接種して、所定時間経過後に改良パフソール5g/0.1m²を散布し調査を行った結果、薬剤無散布区の発病率が20.0%であるのに比し、ウイルス接種直後、30分後においては6.0%、8.0%と発病率が低下し熟蚕消毒効果が認められた(図-3)。

また、消石灰を改良パフソールの対照試材とした熟蚕消毒効果について検討した結果、改良パフソールが消石灰に比し消毒効果が高かった(表-8)。

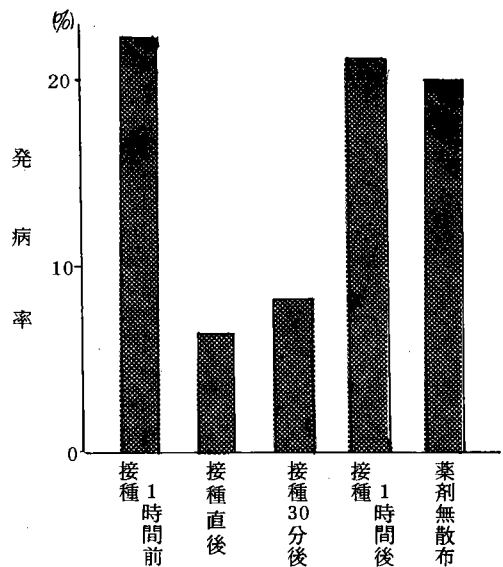


図-3 消毒薬剤の散布時期及び消毒効果に関する試験

表-8 熟蚕時の薬剤等の消毒効果

供試剤	簇中死(頭)	繭中死(頭)	へい死蚕数計(頭)	NPV死(%)
改良パフソール	0	5	5	10.0
消石灰	1	6	7	14.0
無散布区	0	10	10	20.0
対照区	2	1	3	0

(イ) 薬剤別熟蚕消毒効果

一般的な蚕体蚕座消毒剤及びそれ以外の薬剤数種による熟蚕消毒効果について検討するため、改良パフソールを対照薬剤として、テトライト粉体(5g/0.1m²)、テトライト200・400倍液、リン酸3ナトリウム(Na₃PO₄)200・400倍液、クロラムフェニコール200・400倍液(10ml/0.1m²)をNPV接種30分後に散布した結果、薬剤無散布区のNPVによる発病率が26.0%であるのに対し、消毒効果が最も高い薬剤は改良パフソールであった。なお、他の薬剤についてはテトライト200倍液において発病率が14.0%と熟蚕消毒効果が認められた。しかし、テトライト粉体を熟蚕に散布した場合、葉害によりすべてへい死したことから散布薬剤として適さないことを確認した(表-9)。

表-9 薬剤別熟蚕消毒効果試験

項目 薬剤名	散布濃度 (倍)	散布量 (ml, g/0.1m ²)	簇中死 (頭)	繭中死 (頭)	計 (頭)	NPVによる 死亡割合 (%)
改良パフソール	製剤	5g	0	2.5	2.5	10.0
テトライト	"	"	25.0	0	25.0	0
テトライト	200	10ml	1.0	2.5	3.5	14.0
テトライト	400	"	2.0	5.0	5.0	20.0
Na ₃ PO ₄	200	"	0	4.5	4.5	18.0
Na ₃ PO ₄	400	"	0.5	6.5	7.0	28.0
クロラムフェニコール	200	"	1.5	5.0	6.5	26.0
クロラムフェニコール	400	"	1.5	4.5	6.0	24.0
無散布区	-	-	1.0	5.5	6.5	26.0
対照区	-	-	1.0	0	1.0	0

3 考 察

本県における内部汚染菌の要因を外観症状別にみると軟化病症状蚕及びハナツキ菌の発生によるものが多く、軟化病症状蚕を病種判定した結果、その半数以上がNPVにより菌中においてへい死し、内部汚染菌となっているため、供試病原をNPVに限定し試験を実施した。まず、NPVによる内部汚染菌の発生要因について解析するために、接種時期別に調査した結果、内部汚染菌の発生は5令後半に感染したものに多くなり、また、簇中におけるNPVの潜伏期間は、外観上は健康な褐色蛹に見えるが、わずかな衝撃を受けると体形がくずれることから幼虫期に比し長いものと考えられる。NPV病蚕混入時期とNPV摂食試験における発病へい死の時期の差は、病蚕混入した場合の混入時期と蚕座内感染の時期において時間差が生じるためと考える。簇器からの感染については、本試験の結果から低い発病率ではあるが、簇器が病原に汚染されている場合、そこからの感染については否定はできず、現地調査の結果からも簇器は確実に汚染されていることは明らかである。このことから、簇器からの直接感染による内部汚染菌発生の寄与率は低いと考えられるが、簇器等の消毒が励行されていない現状から考えて、簇器からの再汚染を防止するため簇器消毒の必要性が再確認された。本県における上簇法の大部分が条払い上簇法であることから、条払い上簇法による内部汚染菌発生について検討したが、特に発病率が高くなることが認められないことから影響はないと考える。しかし、傷夷感染の有無について検討した結果、人為的に皮膚に傷をつけた場合、NPVの発病率が高まることから、なんらかの形で傷を負い、病蚕の混入により感染した時には、内部汚染菌の発生割合が増加する危険性があることが示唆された。飼育環境が適正飼育温度より高かったり、または低い温度で飼育された場合において発病率が高くなった。なお、本試験においては10℃という現実的には遭遇しえないと思われる温度に遭遇させ、NPVに対する感受性の変化について調査を行ったが、10℃2時間計2回の遭遇でかなり発病が助長されたことから、蚕がストレスを受けた場合、発病が助長されることは十分考えられる。

さらに、内部汚染菌発生防止法として薬剤を利用した熟蚕消毒効果を検討した結果、0.1㎡当たり5gの改良バフソールを散布した場合に消毒効果が高かった。また、熟蚕消毒の時期については熟蚕収集直後から30分以内において散布するのが有効であった。

4 摘 要

内部汚染菌発生防止法について、内部汚染菌の発生要因調査及び消毒薬剤等の散布による防除効果について検討を行った結果、次のとおりとなった。

- (1) 内部汚染菌の発生する病原感染時期については、5令後半に感染した場合に多く、発生割合も熟蚕に近づくほど高くなる傾向を示した。
- (2) 簇器からの病原感染については、低い発病率ではあるが認められた。
- (3) 条払い上簇法により振り落とされ、蚕体に傷がつき発病率が高くなると考えたが、一頭拾い上簇法

に比し、発病率は低く影響は認められなかった。

しかし、傷夷感染の有無を確認するため、人為的にサンドペーパーで傷をつけてNPVを接種した結果、顕著に発病率が高くなり、傷夷感染が確認された。

- (4) 飼育環境を変えて、温度によるストレスを与え病原に対する感受性について検討した結果、特に低温において感受性が高くなった。
- (5) 2次感染防止法として、改良パフソール、消石灰を散布した結果、毎日散布区は、3回散布区、2回散布区より防止効果が高い傾向が認められた。なお、試剤による効果については、改良パフソールにおいて防止効果が若干高い傾向を示した。
- (6) 熟蚕消毒効果については、改良パフソール(5g/0.1m²)の散布効果が最も高く、テトライト200倍液(10ml/0.1m²)の散布においても効果が認められた。なお、散布時期については、熟蚕収集後30分以内に散布することが有効であった。しかし、テトライト(5g/0.1m²)を散布した場合、葉害によりすべて簇中においてへい死したことから、テトライトの使用にあたっては、必ず水で希釈(200倍)して散布する必要があることが判った。