カイコ体液中に誘導された抗菌活性の品種間差異

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者名	岡田,英二 間瀬,啓介 長坂,幸吉 山本,俊雄
発行元	日本蠶絲學會
巻/号	66巻2号
掲載ページ	p. 116-122
発行年月	1997年4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

日蚕雑 66 (2), 116-122 (1997)
J. Seric. Sci. Jpn.

カイコ体液中に誘導された抗菌活性の品種間差異

岡田英二・間瀬啓介・長坂幸吉・山本俊雄

蚕糸・昆虫農業技術研究所

(1997年1月7日受理)

EIJI OKADA, KEISUKE MASE, KOUKICHI NAGASAKA and TOSHIO YAMAMOTO: Difference of inducible antibacterial activity in hemolymph among the silkworm, *Bombyx mori*, races.

To elucidate the relationship between the interracial variation in antibacterial resistance of silkworm and its defense mechanisms, the susceptibility of 10 silkworm races was tested against the insect pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*. The difference in susceptibility was from 40 to 180 fold among the silkworm races. Furthermore, the inducible antibacterial activity of hemolymph was tested by the diffusion method against 2 insect pathogenic bacteria, *P. aeruginosa* and *Serratia marcescens*, and 2 enterobacteria, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae*. In this assay, all races showed some antibacterial reaction to the enterobacteria and the activities differed among races. The race "Daizo" especially showed the highest activities in all test. However, these results of the activity tests did not always correspond with those of the susceptibility tests. The hemolymph induced antibacterial activity was examined by the method of polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE). As an antibacterial band in the gel was detected at the same mobility in all races, these differnces of the activity are likely to be caused by the quantity of antibacterial substances. *Research Team of Silkworm Breeding, National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-10-1 Agata, Matsumoto, Nagano 390.*

Key words: silkworm, inducible antibacterial activity, interracial difference, hemolymph

昆虫には細胞性と液性の生体防御機構が存在し，これらが共同して血体腔内に侵入した微生物から病気の感染を防ぐことが知られている（和合，1984；BOMAN and HULTMARK, 1987)。カイコにおける生体防御機構については，千賀崎（1930）が細菌に対する非特異的な免疫機構のあることを報告して以来，液性の防御機構について多くの研究が行われ，近年，抗菌タンパク質の誘導（KINOSHITA and INOUE, 1977)が確認され，そのタンパク質の分離・同定（MORISHIMA *et al.*, 1990）ならびに分子遺伝学的解析（TANIAI *et al.*, 1992；SUGIYAMA *et al.*, 1995）がなされている。一方，カイコの耐病性については核多角体病などウイルス病に対する抵抗性（有賀・渡部，1963；荒武，1973 a）や薬剤に対する感受性（山本・藤森，1986）について品種間差異が認められており，カイコ品種間の病理学・生理学的相違を比較することは，機能としての生体防御を明らかにしていく上で重要と考えられる。しかしながら，多数の蚕品種について細菌に対する抗菌活性の差異を調査した報告はみられていない。

本研究では，カイコの血体腔内へ細菌を注射接種した場合に体液中へ誘導される液性の抗菌作用に着目し，蚕品種間で数種の細菌に対する抗菌活性値を比較した。その結果，誘導された抗菌活性は品種間で顕著に異なることが認められたので，その概要を報告する。

本文に先立ち，細菌を分譲いただいた東京大学分子細胞生物学研究所細胞・機能高分子総合センターおよび蚕品種を分譲いただいた蚕糸・昆虫農業技術研究所遺伝素材研究室に深く感謝する。また，本研究に有益なるご助言をいただいた東京農工大学農学部助教授蜷木　理博士ならびに英文要約を御校閲い

〒390　長野県松本市県1-10-1

ただいた蚕糸・昆虫農業技術研究所低分子素材利用研究室長 LEAL, WALTER SOARES 博士，同室主任研究官宮澤光博博士およびジョン・ユーン・キム博士に厚く御礼申し上げる。

材料と方法

供試蚕品種としては，日本種の乞食，赤蚕および日137号，中国種の大造，黄波，黒縞および支146号，欧州種のローザおよびアスコリー黄繭，交雑種の日137号×支146号を供試した。実験には桑葉育で常法により飼育した5齢幼虫を用いた。

供試細菌は東京大学IAMカルチャーコレクションで保存している昆虫病原細菌 *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1514, *Serratia marcescens* IAM 12142 および腸内細菌 *Enterobacter cloacae* IAM 1528 ならびに蚕糸・昆虫農業技術研究所蚕育種研究チームで継代培養している *Escherichia coli* JM 101 を用いた。

細菌に対する蚕品種の感受性を検定するため，*P. aeruginosa* を検体としてその LD_{50} 値を求めて比較した。即ち，検体をLB液体培地で37°Cにて約12時間培養後，洗浄・集菌した。これを0.9%生理食塩水に懸濁し，約 10^8 cells/ml に調整したものを10倍階段希釈して5段階の系列を作成した。検定には1区当たり50頭を供試した。また，接種原を20 μl ずつ皮下注射接種し，接種量を計算した。そのうち1区は生理食塩水のみを接種して対照区とした。接種後25°Cで飼育し，5日目に死亡数を調べ，プロビット法を用いて LD_{50} 値を算出した。

接種用細菌懸濁液（ワクチン）は加熱殺菌とホルマリン殺菌による2種類を用いた。即ち *E. coli* JM 101 をLB液体培地に，37°Cで8時間以上振盪培養後，集菌・洗浄し，オートクレーブで121°C，15分間加熱殺菌した。また集菌・洗浄後に35%ホルマリン溶液を懸濁液の20%量になるように加え，室温で約12時間放置して殺菌した。これらは集菌して0.9%生理食塩水で洗浄後，再懸濁して 10^6 cells/ml に調整した。ワクチン接種は，供試幼虫を氷冷麻酔後，シリンジを用いて第1腹脚部に20 μl/頭（2×10^3 cells/頭）ずつ行った。ワクチン接種の対照実験としてワクチン作製に用いた生理食塩水のみを上述どおりに同量接種した実験区を設定した。また，この実験全体の対照区として接種処理を行わない実験区を設定した。採血は接種24時間後に行い，得られた体液から血球と脂肪体を除去するために遠心分離（1500 rpm×20分，4°C）し，さらに12000 rpm で5分間の遠心分離を行い固形成分を完全に除去した。この体液は実験に使用するまで−80°C にて凍結保存した。

抗菌活性の検定は拡散法および未変成ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（Native-PAGE）で行った。拡散法では直径9 cm のシャーレに1.5%LB寒天培地を12 ml ずつ撒き，その上に対数増殖期の各供試細菌（生菌）を約 10^4 cells/ml になるよう懸濁した0.7%LB寒天培地を4 ml ずつ重層した。次いで，その培地に内径5 mm の円筒を立て，その中に生理食塩水で2倍階段希釈した体液を40 μl ずつ注入し，37°Cで一晩培養した。円筒の周囲にできた透明な阻止円の直径を測定し，得られた数値を基に次式により，抗菌活性の相対値を求めた。なお，その値が最小値を示した品種を標準品種として，活性の基準値を1.00とした。

$$\log\theta = \{(U_H+U_L)-(S_H+S_L)\}/\{(U_H+S_H)-(U_L+S_L)\}\times\log A$$

θ ：検定体液の抗菌活性力と標準体液の抗菌活性力との比
U_H：検定体液により生じた阻止円の直径
U_L：A倍希釈した検定体液により生じた阻止円の直径
S_H：標準体液により生じた阻止円の直径
S_L：A倍希釈した標準体液により生じた阻止円の直径

Native-PAGE法では HULTMARK *et al.*（1980）の方法に従い，体液サンプルを15%ポリアクリルアミドゲル（pH 4）にて200 V で3時間泳動した。このゲルを0.2 M リン酸緩衝液（pH 7.4）を含むLB液体培地中に1時間浸漬して中性に平衡化した後，約 10^4 cells/ml で *E. coli* 生菌を含んだ0.7% LB寒天培地を厚さが1 mm になるよう重層し，これを37°Cで約12時間培養した。細菌の生育に伴い培地全体が不透明になるが，抗菌活性のあるバンドの部分では生育が阻止されるので透明なスポットになる。このスポットを抗菌活性の存在部位として判定した。

結　　果

昆虫病原細菌 *P. aeruginosa* に対する感受性

カイコ幼虫はすべての品種とも5齢2日目に細菌を注射接種した。いずれの品種も接種後1日目には死亡しないが，2日目からは死亡する個体が見られ

た。接種濃度の高い実験区ではすべての品種において5日目までにほぼ100%死亡することが認められた。死亡率をもとに LD_{50} 値を求めて比較した結果，品種間で供試細菌に対して有意な差が見られ，最も感受性を示した黄波と抵抗性を示した大造，アスコリー黄繭および日137号×支146号の間には顕著な差が見られた。また，日137号や支146号も比較的高い値を示した（Table 1）。

Table 1 Susceptibility among the sikworm races against *Pseudomonas aeruginosa* IAM1514

Type	Race	LD_{50}: log (cells/larva)
Japanese	Kojiki	2.10
	Akako	2.48
	N137	3.22
Chinese	Daizo	3.80
	Oha	1.62
	Kuroshima	2.91
	C146	3.24
Europian	Ascoli-koken	3.88
	Rosa	2.79
Hybrid	N137×C146	3.80

The bacteria were injected with a sylinge from abdominal leg
The values of LD_{50} were calculated from the mortalities for 5 days after inoculatiuon.

Table 2 Inducible antibacterial activities of silkworm races to 2 enterobacteria

Type	Race	*Escherichia coli* JM101				*Enterobacter cloacae* IAM1528			
		Injected with				Injected with			
		Non	Saline	H. T. V.	F. T. V.	Non	Saline	H. T. V.	F. T. V.
Japanese	Kojiki	–	–	5.07	3.88	–	–	5.31	5.22
	Akako	–	–	1.98	1.40	–	–	4.44	3.70
	N137	–	–	1.75	1.14	–	–	2.28	6.05
Chinese	Daizo	–	–	9.59	4.77	–	–	20.71	19.44
	Oha	–	–	3.57	1.00	–	–	2.91	1.76
	Kuroshima	–	–	6.15	2.40	–	–	7.80	2.92
	C146	–	–	3.27	1.91	–	–	2.68	1.36
European	Ascoli-koken	–	–	6.07	2.52	–	–	5.20	5.89
	Rosa	–	–	3.22	3.00	–	–	7.25	5.86
Hybrid	N137×C146	–	–	1.13	1.01	–	–	2.97	1.00

These numbers show the relative intensity of antibacterial activiy to each bacterium in contrast with the underlined number as a standard.
Non meens no treatment of injection and Saline was 0.9% of sterile sodium cloride solution.
Heat Treatment Vaccine (H. T. V.) made of *E. coli* JM101 sterilized by autoclaving and Formalin Treatment Vaccine (F. T. V.) by dipping formalin, and they were prepared to 10^6 cells/ml with the saline.
The 20μl of the material was injected to each larva at the 4th day in the 5th instar.
–: No detection of antibacterial activity

Table 3 Inducible antibacterial activities of silkworm races to 2 insect pathogenic bacteria

Type	Race	*Pseudomonas aeruginosa* IAM1514				*Serratia marsescens* IAM12142			
		Injected with				Injected with			
		Non	Saline	H. T. V.	F. T. V.	Non	Saline	H. T. V.	F. T. V.
Japanese	Kojiki	–	–	1.43	1.72	–	–	3.68	2.72
	Akako	–	–	1.00	–	–	–	2.37	1.71
	N137	–	–	–	–	–	–	–	–
Chinese	Daizo	–	–	9.59	4.77	–	–	5.92	3.79
	Oha	–	–	–	–	–	–	1.00	–
	Kuroshima	–	–	–	–	–	–	–	–
	C146	–	–	–	–	–	–	–	–
European	Ascoli-koken	–	–	1.22	±	–	–	1.60	±
	Rosa	–	–	3.85	2.28	–	–	3.44	2.05
Hybrid	N137×C146	–	–	–	–	–	–	–	–

These numbers show the relative intensity of antibacterial activiy to each bacterium in contrast with the underlined number as a standard.
Non meens no treatment of injection and Saline was 0.9% of sterile sodium cloride solution.
Heat Treatment Vaccine (H. T. V.) made of *E. coli* JM101 sterilized by autoclaving and Formalin Treatment Vaccine (F. T. V.) by dipping formalin, and they were prepared to 10^6 cells/ml with the saline.
The 20μl of the material was injected to each larva at the 4th day in the 5th instar.
–: No detection of antibacterial activity, ±: Detected antibacterial activity slightly but not calculated for the equation in the text.

供試細菌に対するカイコ体液の抗菌活性

昆虫病原細菌 *P. aeruginosa, S. marcescens* および腸内細菌 *E. cloacae, E. coli* の 4 菌種を検定菌として用い大腸菌死菌をワクチン接種してから 24 時間後の体液の抗菌活性を拡散法で調査した。その結果，*E. cloacae* および *E. coli* は顕著な抗菌作用を受けた(Table 2)。特に大造の活性作用は他の品種に比べて高く，活性の最低値を示す品種を基準とすると，*E. coli* に対して熱死菌ワクチン接種区が約 10 倍，*E. cloacae* に対しては両ワクチン接種区とも約 20 倍の活性値を示した。

一方，昆虫病原細菌に対しては抗菌作用が検出されない品種が認められた(Table 3)。しかしながら，大造はこれら実験でも高い活性値を示し，結局のところ，どの実験においても得られた活性の最高値は大造であった。また最低値を示す品種は特定できず，実験により異なったが，黄波，支 146 号，日 137 号および日 137 号×支 146 号はいずれの実験区でも比較的低い活性値を示すことがわかった。

次に，殺菌処理の異なるワクチン接種によって品種間に抗菌活性の差異が見られるか否かを調べたところ，大多数の品種において熱死菌ワクチンの方が活性値が高い傾向を示した。しかしながら，実験区および品種によっては，ホルマリン死菌の方が高い活性を示す場合も見られた。

これらいずれの実験および蚕品種においても対照区および生理食塩水を接種した実験区では抗菌活性の反応は全く見られなかった。

Native-PAGE 法による抗菌活性の比較

拡散法により，カイコ品種間に明瞭な抗菌活性の違いが見られたので，これらの差異が体液中の抗菌物質の成分構成の違いによるものであろうと推測された。また，ワクチン接種により誘導される抗菌活性は，その活性を担う抗菌タンパク質によることが知られている。そこで，抗菌タンパク質の変成を防ぎ，かつ分離を行うには Native-PAGE 法が最適であると考えて，この方法による検定を行った。供試した体液はどの品種も熱死菌ワクチンを接種したもので，サンプルウェルには 10 μl ずつの体液サンプルを乗せて行った。その結果，いずれの品種においても *E. coli* の成長を阻害するバンド領域が確認された(Fig. 1)。また，この成長阻害の見られたスポットは全品種に共通した同一のバンド領域のみが認められ，品種間でスポットの違うバンド領域は得られなかった。しかしながら，品種間での抗菌スポット

領域の面積は顕著に異なり，大造および黒縞では大きな抗菌スポットが見られたが，黄波，日137号，赤蚕および日137号×支146号ではわずかにしか反応しなかった。

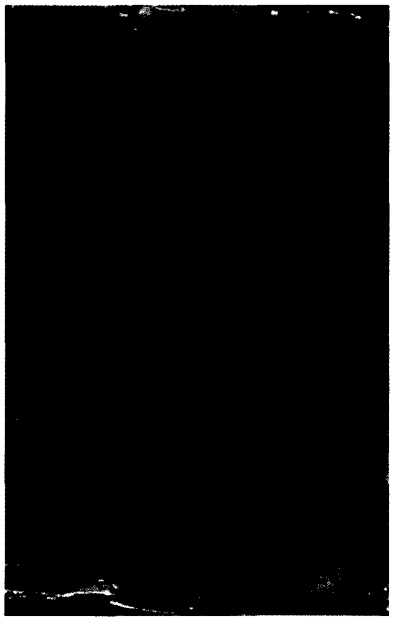

Fig. 1 Antibacterial activity assay of immunized hemolymph on polyacrylamide gel (by Native-PAGE).
It shows the growth inhibition of *E. coli* JM101 in soft agar overlaid on the gel. 10 μl of hemolymph was electrophored from right to left.

考　　察

カイコは，特にウイルス病を中心として蚕病感染における感受性の品種間差異が病理学的に詳しく調べられている（渡部，1966；荒武，1973 a，b；渡部ら，1974；川畑ら，1980；関，1985）。また，生理学的には，殺虫剤や殺菌剤などの化学薬品に対する感受性の品種間差異（山野井，1984；山本・藤森，1986）も報告されている。

本実験はカイコの病原細菌に対する感受性の品種間差異を生体防御機構の違いに基づくものと考えて行ったものである。河原畑（1970）は，カイコ蛹に対して *P. aeruginosa* が強い病原性を示すと共にワクチン接種効果によりこの菌株に対する殺菌作用が体液中に生ずることを報告している。本実験においては *P. aeruginosa* 生菌を用い，注射接種実験を行ったところ，細菌に対する LD_{50} 値が品種によって大きく異なることが確認された。今回用いた品種の中で最も感受性の高い黄波と比較して，大造，支146号，日137号およびアスコリー黄繭は40倍から180倍も LD_{50} 値が高かった。尚，この実験では接種後約24時間を経過した1日目の観察では *P. aeruginosa* の最大量を接種した実験区でも，死亡個体は認められなかった。その後，黄波や赤蚕は2日目に死亡し始め，他の品種では3日目より死亡が確認された。*P. aeruginosa* は潜勢病原細菌であり，好気性の体液中で増殖を開始するが，対数増殖までの遅滞期には貪食作用などの生体防御機構が働いて感染成立を阻止することはある（福原，1991）。細胞性防御機構は血体腔中の細菌密度が高いときは細菌と捕食血球との遭遇頻度が高くなり，密度の低いときは頻度が低くなることが予想されるので，遅滞期には液性防御機構の役割が相対的に高くなるのではないかと思われる。

病原細菌生菌を注射接種し，24時間後も生存していたことと，ワクチン接種後24時間を経過したカイコ体液に抗菌活性のピークがくる（SUMIDA *et al.*, 1992）ことより，体液の抗菌活性試験はワクチン接種24時間後に採取したもので行った。腸内細菌2種に対してはどの品種も阻止円が見られ抗菌活性が認められた。しかしながら，その阻止円の直径は品種によって顕著に異なり，抗菌活性値には差異が認められ，特に大造は他の品種に比べ高い値を示した。

病原細菌2種に対しては日137号，黒縞，支146号および日137号×支146号の4品種では全く阻止円が形成されず，活性の見られた品種であっても腸内細菌の実験区で形成された阻止円の直径よりも小さかったが，この実験でも大造は最大の活性値を示した。HULTMARK *et al.*（1982）は抗菌活性を測定するための簡便な方法として同じ阻止円形成による生物検定を行い，異なる細菌株では阻止円の直径対抗菌タンパク濃度の対数によって得られるデータから菌株間での直接的比較は不可能であると述べている。従って阻止円の大きさや形成の有無が各菌株に対する体液中の抗菌活性の評価を正確に反映していることにはならないが，同一菌株内においては，カイコ品種間で抗菌活性に違いが存在するために起きたものと判断してよいと思われる。

次に MORISHIMA *et al.*（1988）は，Native-PAGE法により2種類以上の抗菌スポットが現れたバンドを検出しているが，本研究では，いずれの品種も一つのバンド上にしか抗菌活性が見られず，タンパク質の質的な差を確認できなかった。しかしながら，抗菌活性のスポットの大きさに顕著な違いが認めら

れることから，その活性の差異は量的な違いによるものと考えられる。今後は物質の分離精度を上げたり，抗菌スポットの検出精度を高めるなどして，質的な違いがあるか否かを明確にする必要があろう。

以上のように，カイコ品種間には細菌に対する防御反応に差異のあることが認められた。しかしながら，病原細菌に対する感受性試験での品種間差異と体液の抗菌活性試験における品種間差異の結果では，日137号，支146号および日137号×支146号において逆転しており完全な相関関係が見られなかった。これは，ワクチン接種により誘導された液性の生体防御機構のほかに細胞性防御機構や非誘導による細菌排除機構など様々な要因が影響を及ぼしているためと考えられる。

体液中に誘導される抗菌活性は，細菌に対する抵抗性の防御機構に密接に関与すると思われる。今後はカイコ体液の抗菌活性物質を同定し，その役割や生成量などを詳細に追求し，さらに抵抗性の高低の見られる品種間での交配実験により遺伝様式を調べ，カイコ品種間における細菌耐性および生体防御機構の特異性を明らかにする予定である。

摘　　要

カイコの細菌抵抗性の品種間差異と生体防御機構の関係を解明することを目的として，昆虫病原細菌に対する蚕品種の感受性を調べるとともに，病原細菌2種および腸内細菌2種を用い，ワクチン接種により体液に誘導される抗菌活性を検討した。感受性試験では *P. aeruginosa* に対して品種間で40倍から180倍の差が見られ，大造，日137号×支146号，アスコリー黄繭で感受性は低かった。抗菌活性試験では腸内細菌に対してすべての蚕品種で顕著な抗菌作用が見られ，品種間差異も確認された。病原細菌では抗菌作用の現れない品種も存在し，品種間差異が顕著に認められた。なお，大造はすべての試験で最高値を示した。また，感受性試験と抗菌活性試験とでは品種間差異の現れ方が一致しない品種もあった。次いでNative-PAGE法を用いて抗菌活性を検定したところ，いずれの品種でも同じ位置に抗菌活性が認められたので，品種間差異は抗菌物質の量的な違いに起因するものと推察された。

文　　献

荒武義信（1973 a）：カイコの核多角体病における品種間差異，日蚕雑，**42**，230-238.

荒武義信（1973 b）：カイコのウイルス性軟化病に関する品種間差異，蚕糸研究，**86**，48-57.

有賀久雄・渡部　仁（1963）：家蚕中腸型多角体病ウイルスの経口接種における感染抵抗性の品種間差異．育種雑，**13**，53.

BOMAN, H.G. and STEINER, H. (1987): Cell-free immunity in insects. Ann. Rev. Microbiol., **41**, 103-126.

千賀崎義香（1930）：蚕児に於ける細菌免疫の非特異性に就て．日蚕雑.，**1**，235-245.

福原敏彦（1991）：昆虫病理学（増補版），p.69，学会出版センター，東京.

HULTMARK, D., STEINER, H., RASMUSON, T. and BOMAN, H. G. (1980): Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur. J. Biochem., **106**, 7-16.

HULTMARK, D., ENGSTRÖM, Å., BENNICHI, H., KAPUR, R. and BOMAN, H. G. (1982): Insect immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from Cecropia pupae. Eur. J. Biochem., **127**, 207-217.

川畑　勉・栢村鶴雄・荒武義信（1980）：核多角体病ウイルスに対する蚕品種間の抵抗性差異．九州蚕糸，**11**，52.

河原畑勇（1970）：カイコの微生物感染症における生体防衛に関する研究．九州大学学芸雑誌，**24**，231-254.

KINOSHITA, T. and INOUE, K. (1977): Bactericidal activity of the normal, cell-free hemolymph of silkworms (*Bombyx mori*). Infect. Immun., **16**, 32-36.

MORISHIMA, I., SUGINAKA, S., UENO, T. and HIRANO, H. (1990): Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides, from the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol., **95 B**, 551-554.

MORISHIMA, I., SUGINAKA, S., BOUGAKI, T., INOUE, M. and UENO, T. (1988): Induction and partial characterization of antibacterial proteins in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem., **52**, 929-934.

関　宏夫（1985）：カイコの濃核病ウイルス（山梨株）に対する感染抵抗性の品種間差異．日蚕雑，**54**，445-448.

SUGIYAMA, M., KUNIYOSHI, H., KOTANI, E., TANIAI, K., KADONO-OKUDA, K., KATO, Y., YAMAMOTO, M., SHIMABUKURO, M., CHOWDHURY, S., XU, J., CHOI, S.-K., KATAOKA, H., SUZUKI, A., and YAMAKAWA, M. (1995): Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel

member of the attacin family of insect antibacterial protein. Insect Biochem. Molec. Biol., **25**, 385-392.

SUMIDA, M., ICHIMORI, H., JOHCHI, S., TAKAOKA, A., YUHKI, T., MORI, H. and MATSUBARA, F. (1992): Antibacterial actibity inducible in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, by injection of formalin-treated *Escherichia coli* K-12 during the fifth larval instar and pharate adult development. Comp. Biochem. Physiol., **101 B**, 165-171.

TANIAI, K., KATO, Y., HIROCHIKA, H. and YAMAKAWA, M. (1992): Isolation and nucleotide sequence of cecropin B cDNA clones from the silkworm, *Bombyx mori*. Biochim. Biophys. Acta, **1132**, 203-206.

山野井文夫（1984）：カイコの殺虫剤 MMP に対する感受性の品種間差異．日蚕中部講要，**40**，30.

山本俊雄・藤森胡友（1986）：保存蚕品種における量的諸形質の品種特性(4)殺菌剤マンネブに対する感受性の品種間差異．蚕試彙報，**129**，35-42.

和合治久(1984)：昆虫の体液と生体防御．植物防疫，**38**，469-474.

渡部　仁(1966)：蚕の細胞質多角体病ウイルスに対する感受性の系統的差異．日蚕雑，**35**，411-417.

渡部　仁・田中茂夫・清水孝夫（1974）：ウイルス性軟化病および細胞質多角体病抵抗性の蚕品種間差異．日蚕雑，**43**，98-100.