HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner による家蚕疾病の病原機作 : 第２報　家蚕生体内における B.thuringiensis 芽胞の増殖ならびに毒性について
Author(s)	滝沢, 義郎; 松本, 継男
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 7(4), 486-490
Issue Date	1970-12-28
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11812
Type	bulletin (article)
File Information	7(4)_p486-490.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Bacillus thuringiensis var. *thuringiensis* BERLINER による家蚕疾病の病原機作

第2報　家蚕生体内における *B. thuringiensis* 芽胞の増殖ならびに毒性について

滝沢義郎・松本継男
(北海道大学農学部蚕学教室)

Infection mechanism of the disease of the silkworm, *Bombyx mori* L., caused by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BERLINER

II. Multiplication mode of the intestinal spores and toxicity of *B. thuringiensis* in the silkworm

Yoshiro TAKIZAWA and Tsuguo MATSUMOTO
(Laboratory of Sericulture, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received June 30, 1970

緒　言

家蚕における結晶性毒素形成細菌の病原作用については，*Bacillus thuringiensis* var. *sotto* ISHIWATA が発見[10]されて以来，蚕児の卒倒病として多くの研究がある[16]。その症状も感染後急性的に麻痺を起し，致死する中毒症とされている[8]が，芽胞，結晶体や栄養型細胞等の混在した培養物による発病機構の考察には，不明な点が少くない。

一般に *B. cereus* 群は昆虫体内では，芽胞形成が起りがたく従って結晶性毒素も産生されず[14]，鮎沢ら[2]も *B. thuringiensis* 製剤で同様の結果を得ている。しかし後に鮎沢・藤吉[3]は，芽胞形成および毒素産生が容易に家蚕死体内で起りうる *B. thuringiensis* 株の存在を示唆している。

筆者らは家蚕幼虫に微量の *B. thuringiensis* の完熟芽胞を蒸下させることにより，家蚕生体内での芽胞の増殖様相を検討し，芽胞化および毒素形成の過程を観察するとともに家蚕疾病の病徴出現に注目した。その結果完熟芽胞は家蚕体内で容易に outgrowth し結晶体も容易に観察されたが，従来の症状とやや異なった病徴がみられたのでここにその大要を報告する。

本実験を行なうにあたり，無菌蚕飼育に御懇切な御指導をいただいた京都工芸繊維大学蚕桑化学研究室林屋慶三博士ならびに松原藤好博士に厚く謝意を表する。

実験材料および方法

1. 供試菌芽胞　先報にて[12]分離採取した *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* BERLINER 芽胞を用いた。

2. 供試家蚕品種　大造（原種；春蚕期，夏蚕期，秋蚕期），麗玉×陽光（交雑種；夏蚕期），郡光×万里（交雑種；無菌飼育蚕）をそれぞれ40個体用いた。無菌蚕は松原ら[11]の方法で飼育した。

3. 摂食芽胞液および摂食法　マイクロシリンジにて2 $\mu\ell$（芽胞数約3,000），4 $\mu\ell$（芽胞数6,000）をそれぞれ4齢起蚕幼虫の口腔内へ直接投与した。

4. 増殖様相の観察　芽胞を完全に蒸下した蚕児は，新蚕座に移し以後の芽胞摂食は停止し，普通育（桑葉）を行なった。その後中毒症状を呈した蚕児は，直ちに除き除沙を操返して外見的健康蚕についてのみ飼育を続けた。24時間毎に1頭宛の蚕児をとり出し，電気ショック或いは麻酔法などで吐液させ，消化液中の *B. thuringiensis* の増殖様相を観察した。

一方，中毒症による死亡個体は，体表面部を0.1%昇汞水で消毒後，小型の滅菌シャーレに入れ30°Cに保護し十分に細胞の増殖を促した。その蚕体組織片の塗抹標

Table 1. Mortality by flacherie for feeding 2 $\mu\ell$ of *B. thuringiensis* of spores Control larvae were fed of distilled water. Rearing tempertaure was at 37°C and humidity on 75%

silk worm strain	Daizo (cont.)	spring	Daizo summer	autumn	Reigyoku × Yoko	Gunko × Banri (asepsis)
tested	40	40	40	40	40	10
4th instar-1	0	0	0	0	0	0
-2	0	4	0	4	0	1
-3	0	5	3	0	1	1
-4	0	0	0	0	2	1
-5	0	5	0	4	0	0
-6	—	—	—	—	3	1
5th instar-1	0	0	0	2	0	0
-2	1	5	1	0	4	1
-3	0	5	0	6	0	0
-4	0	0	2	5	0	2
-5	0	0	2	3	0	1
-6	0	0	0	4	4	2
-7	—	—	—	—	0	
cocoon bed	39	16	32	10	26	0
mortality (%)	0*	60	20	75*	35	100

* Abbott's correction

Table 2. Mortality by flacherie for feeding 4 $\mu\ell$ of the spores of *B. thuringiensis* Control larvae were fed of distilled water. Rearing temperature; 30°C, Humidity; 75%

silk worm strain	Daizo (cont.)	spring	Daizo summer	autumn	Reigyoku × Yoko	Gunko × Banri (asepsis)
tested	40	40	40	40	40	10
4th instar-1	0	9	10	10	6	6
-2	0	18	6	13	8	0
-3	0	4	13	7	2	2
-4	0	2	0	6	0	0
-5	0	0	0	0	0	0
-6	0	—	—	—	3	1
5th instar-1	0	0	0	1	0	0
-2	0	0	1	1	5	0
-3	1	1	0	2	3	0
-4	0	1	0		0	1
-5	0	0	2		0	
-6	1	0	1		2	
-7	0	—	—		0	
cocoon bed	38	5	7	0	11	0
mortality (%)	0*	87.5	82.5	0	75	100

* Abbott's correction

本で *B. thuringiensis* の増殖様相を観察すると同時に，平板法による分離培養によりその存在を確認した。

又，春蚕期に2 μℓ 食下直後の4齢起蚕の腹部第9環節(中腸と後腸の境界部)を結紮し，*B. thuringiensis* の増殖部位を検討した。その結果に基づいて夏蚕期に食下後の結紮処理時間と病状および *B. thuringiensis* の増殖状態とを顕微鏡下で観察した。

5. 経皮接種による毒性　2 μℓ, 4 μℓ の芽胞液を腹部第5環節部より経皮接種した。

実験結果

B. thuringiensis 芽胞の摂食による家蚕の死亡数を Table 1 および Table 2 に掲げた。食下量2 μℓ の蚕児は食下当日，翌日に中毒症を起して死亡する個体はほとんど認められず，やや軽微な苦悶を呈しながらも外観的には健康蚕(対照)と変らぬ生活を維持した。5齢2日目以降から麻痺が出現し，空頭蚕や吐液蚕の死亡個体が多くなったが，上蔟まで *B. thuringiensis* が観察されたにもかかわらず営繭するものも認められた。

4 μℓ 食下蚕は少なくとも約40%の個体が，48時間迄に中毒症を発現し死亡した。

又，春蚕期に比し秋蚕期に多発し，交雑種に較べ原種の方が感受性が高かった。

人工飼料による無菌的飼育蚕は，たびたび飼料の均一化を計ったが2 μℓ 食下蚕は8日目までに死亡し，4 μℓ 食下蚕は食下当日に約50%が死亡し営繭までに至らなかった。

死亡個体による塗沫標本の観察結果で，遊離した結晶体及び芽胞のう内に結晶体を含有する栄養型細胞等が観察された。

Table 1, Table 2 に基づいて作成した生存曲線を Fig. 1, Fig. 2 に示した。

芽胞食下後の外見的健康蚕および死亡蚕中において，*B. thuringiensis* の増殖様相が容易に観察されたが，先に筆者らが認めた増殖時間[12]と比較するといずれも24時間の遅延が認められた。2 μℓ 食下蚕に於いて，4 μℓ 食下蚕に比較して，*B. thuringiensis* と共存する黄褐色，黄色，灰白色の小球菌，小桿菌が平板法で多く分離された。

春蚕期の結紮処理蚕で，蚕児の腸内部位と *B. thuringiensis* の生存状態を調べた結果が Table 3 である。この結果営繭まで *B. thuringiensis* が観察され，且つ分離されたが，出現頻度は後腸や糞中より中腸部に高く，増殖様相も進んでいた。更に芽胞食下後の結紮時間が経過するほど後腸部組織の病状変化が著しく乏しく，増殖様相も中腸と比して劣り，他菌の寄生繁殖も多かった。反面不結紮の外見的健康蚕に比べて，*B. thuringiensis* の増殖は早かった。対照の滅菌水食下蚕および食下後の結紮処理蚕には，*B. thuringiensis* は分離もされず，又疾

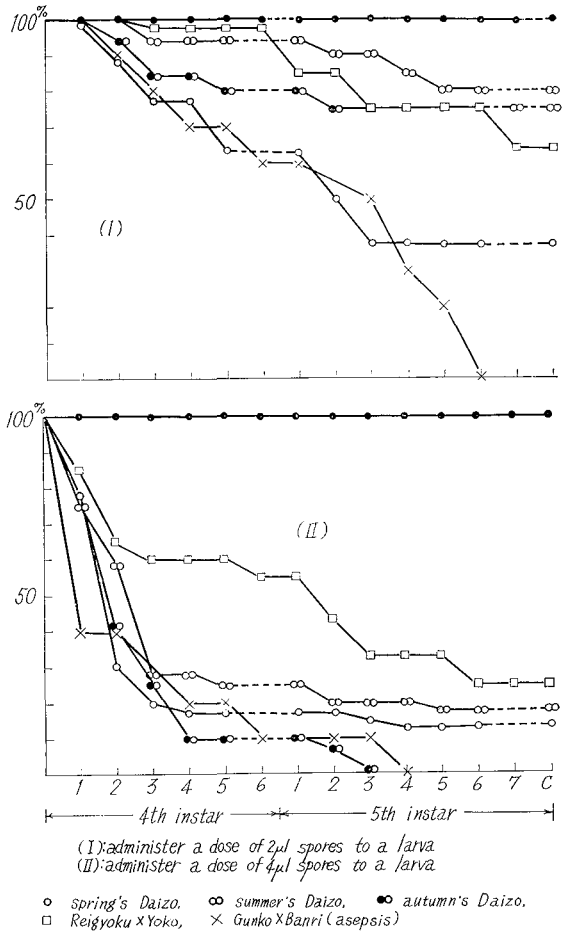

Fig. 1 and 2 Survival curve for the different dose of the spores of *B. thuringiensis*

Table 3. Appearance of *B. thuringiensis* in intestinal parts of silkworm

		4th instar					5th instar					
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6
Gut	mid	++	++	++	++	+++	++	+++	+++	++	+++	++
	behind	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Feces		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

The larvae were ligatured with threads at the 9th of abdominal segments. Silkworm strain: Daizo, expt. in spring

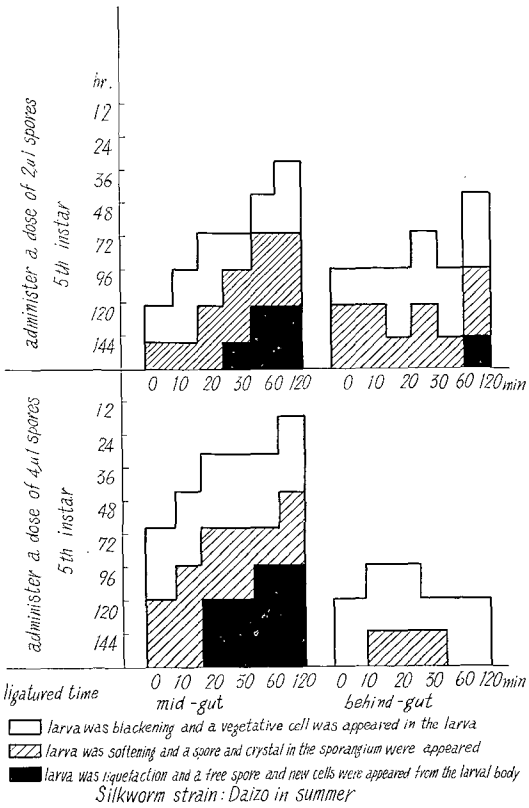

Fig. 3 Relationship between the multiplication of *B. thuringiensis* and the patient in silkworm after ligatured them

病も認められなかった (Fig. 3)。

接種蚕は顕著な中毒症は認められなかったが，食下蚕に比し蚕体は著るしく黒変し敗血症が出現した。しかし芽胞化，毒素形成などは死亡個体中でのみ検出された。

考察および論議

家蚕に急性的中毒症をもたらす *B. thuringiensis* においても，食下が休止芽胞型で微量である場合には典型的な中毒症状を発現せず，健康蚕に比して食慾，運動にやや緩慢的症状を呈する程度で，長期間家蚕腸内に保有されることが明らかになった。このことは *B. thuringiensis* の希釈菌体で内海[17]も同様の結果を得ている上に，青木・本多[4]，千賀崎[5]が認めた *Serratia marcescens* BIZIO の家蚕腸内に長期間繋留保菌される現象と同一と考えられる。

秋蚕期に中毒症外発の傾向は，春，夏蚕期に比べ栄養および環境などの生理条件の劣化（降霜による硬桑葉の食下等）で蚕児が虚弱に育ち，藤井[6]の指適した腸内の抗菌力の減退が関与するものと考えられ，且つ保菌蚕でも結紮処理蚕の方が，*B. thuringiensis* の増殖様相が早いことからも推察され得る。

生体および中毒死蚕体内の *B. thuringiensis* の増殖形態が，先の筆者らの報告[12]とかなり遅延していることは給与桑に由来する腸内および死体中の種々の細菌が *B. thuringiensis* の増殖に拮抗に働いたものと考えられる。このことは平板法にて多くの共存細菌が分離された結果からも，逆に無菌蚕が顕著なる感受性を示したことからも考察されるが，STEINHAUS[15]が *S. marcescens* と *B. thuringiensis* を共存培養した結果，*B. thuringiensis* の発育が抑制される観察結果を得ていることなどからも推測されうる。しかし試験管中での増殖形態より遅延していても，家蚕体内で容易に芽胞化形成，結晶性毒素産生が観察されたことは，一般に *B. cereus* 群は昆虫死体内で毒素形成がなされない[14]という従来の考えと異なっているが，このことは *B. thuringiensis* の菌力に差があること[16]や培養条件により芽胞形成および毒素産生能が弱小なる株の存在が報告されている[3,13]ので，これら緒条件の相違と考えられる。

結紮処理蚕における病勢から *B. thuringiensis* の増殖寄生部位は中腸後部と推察されるが，病理組織標本作成の上，更に報告する予定である。

B. thuringiensis は寄生範囲が広く，家蚕飼育場所の塵芥にも分布[1]し家畜や小鳥などにより伝搬される[9]事実もある。*B. thuringiensis* は一般に抵抗力ある芽胞型で生存するので，本実験により *B. thuringiensis* 芽胞は，経皮接種では明らかに敗血症を呈するが，経口感染した場合，家蚕生体内で長時間保菌され outgrowth し，飼育条件の悪化で中毒症が多発するものと思う。しかしその間，家蚕は苦悶・吐液を伴う慢性的な病徴を呈する現象より，結晶性毒素以外に家蚕に対して作用する病原因子の存在[7]が考えられる。

摘　　要

4齢起蚕幼虫に微量の *B. thuringiensis* 芽胞を蒸下させ，家蚕生体内における芽胞の増殖様相と毒性を観察し，次のような結果をえた。

1) 微量の芽胞食下では家蚕は典型的な中毒症を呈することなく，一方食下された芽胞は家蚕体内で生育し，芽胞化及び結晶性毒素形成等が行なわれた。

2) *B. thuringiensis* は長期間家蚕体内に保菌され，その間家蚕は慢性的な病徴を示して遂には死亡するもの

もある。又，経皮接種により家蚕は敗血症を容易に呈する。

3) 中・後腸境界部の結紮により，後腸部に比して中腸部に病勢の顕著な変化が見られ，同時に *B. thuringiensis* の増殖も旺盛であった。

引用文献

1) 鮎沢啓夫・高須敏夫・倉田啓而 1961. 日本蚕糸学雑誌 30: 451.
2) ———・河原畑勇・佐藤文子 1962. 日本蚕糸学雑誌 31: 253.
3) ———・藤吉宜男 1964. 日本蚕糸学雑誌 33: 399.
4) 青木 薫・本田実芳 1919. 蚕糸報告 4: 117.
5) 干賀崎義香 1921. 蚕糸報告 5: 305.
6) 藤井音松 1940. 兵庫県蚕業試験場報告第6号.
7) HEIMPEL, A. M. 1955. Can. J. Zool. 33: 111.
8) HEIMPEL, A. M. and T. A. ANGUS 1959. J. insect Pathol. 1: 152.
9) 石川義文・沖野英男 1965. 日本蚕糸学雑誌 34: 371.
10) 石渡繁胤 1901. 大日本蚕糸会報 114: 1.
11) 松原藤好 1965. 京都工芸繊維大学繊維学報 4: 291.
12) 滝沢義郎・松本継男 1970. 北海道大学農学部邦文紀要 7: 482
13) SMIRNOFF, W. A. 1963. J. insect Pathol. 5: 242.
14) SMIRNOFF, W. A. and A. M. HEIMPEL 1961. J. insect Pathol. 3: 403.
15) STEINHAUS, E. A. 1949. Principle of Insect Pathology II. 21, Acad. Press. N.Y.
16) TANADA, Y. and C. REINER 1962. J. insect Pathol. 4: 139.
17) 内海 進 1965. 京都工芸繊維大学繊維学報 4: 278.

Summary

Investigation was made on the multiplication mode of intestinal spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BERLINER in the healthy silkworm larvae in 4th instar, which were directly fed into a mouth. The results obtained were:

1) Feeding the attanuated dose of 2 $\mu\ell$ (3,000) spores larva seldom developed typical symptoms of paralysis. The spores proceeded to vegetative cells on outgrowth and the crystals had been formated in larval body. Injected larva of spores caused the septicemia.

2) The bacteria remained in the larval body at least a week and a chronic symptom was investigated during they carried.

3) When the larvae were ligatured at the 9th abdominal segment, the bacteria were easily multiplied in the mid-gut.