

養蚕地域におけるカイコ核多角体病ウイルスの疫学調査とその防除に関する研究

2015. 9

野 澤 瑞 佳

目 次

緒 言	1
第 1 章 核多角体病による内部汚染菌の発生	7
第 1 節 養蚕地域における内部汚染菌の発生傾向と核多角体病の影響	7
材料および方法	7
結 果	11
考 察	13
第 2 節 核多角体病による内部汚染菌の発生と収菌量への影響	19
材料および方法	19
結 果	19
考 察	23
摘 要	26
第 2 章 核多角体病ウイルスによる汚染の実態	27
第 1 節 養蚕関連施設のウイルス汚染状況	28
材料および方法	28
結 果	29
考 察	32
第 2 節 PCR 法による立体構造物からのウイルス検出法の考案	35
材料および方法	35
結 果	40
考 察	40
第 3 節 常習違作農家におけるウイルスの汚染状況とその特徴および 消石灰水の導入による防疫効果の検証	47
材料および方法	47
結 果	50
考 察	61
摘 要	65
第 3 章 次亜塩素酸ナトリウムを含有する核多角体病ウイルス不活化剤の開発	66
第 1 節 次亜塩素酸ナトリウムと炭酸ナトリウムの相乗効果を利用した カイコ核多角体病ウイルス不活化促進法の考案	68

材料および方法	68
結果	70
考察	76
第2節 ポリリン酸ナトリウムによる防錆効果の増強	80
材料および方法	81
結果および考察	83
摘要	89
第4章 養蚕用除菌洗浄剤の実用化	91
第1節 食品添加物の利用と水質の影響	92
材料および方法	92
結果	93
考察	97
第2節 主要病原に対する消毒効果の検証	99
材料および方法	99
結果	105
考察	112
第3節 鉄、銅および真鍮に対する防錆効果の検証	115
材料および方法	115
結果	115
考察	118
第4節 実用化に伴う諸問題の検討	120
材料および方法	120
結果	121
考察	124
摘要	126
総合考察	128
総括	135
引用文献	139
Summary	151
謝辞	156

緒 言

繭の作柄と品質に影響を及ぼす要因の一つに蚕病がある。各種病原体が引き起こす蚕病としては、ウイルス病（川瀬, 1989, 1990ab; 川瀬・宮島, 1989）、糸状菌病（河上, 1972; Riba et al., 1982; 河上・三国, 1984）、細菌病（河北ら, 1967; 児玉・中筋, 1968, 1969abc; 関島, 1969ab; 飯塚, 1972ab; 永江, 1974, 1977ab; 永江・鈴木 1976, 1982; 岩波ら, 1985）、および微孢子虫由来の微粒子病（石原, 1985; Kawarabata, 2003）があげられる。これらの蚕病のうち、今なお養蚕現場で違作を引き起こす病原体は、カイコ核多角体病ウイルス（*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV）である。BmNPV は、本論文でも取り上げるように、繭の品質に影響を及ぼす内部汚染繭の発生原因として全国的に知られており（山形県: 石井ら, 1975; 山梨県: 関, 1981; 長野県: 清水・小森, 1981a; 埼玉県: 野口・小林, 1982; 徳島県: 須見ら, 1982; 新潟県: 吉原ら, 1982; 愛知県: 倉島ら, 1983; 茨城県: 蛭原ら, 1984）、養蚕現場では、第一に防除対象とされるウイルスである。内部汚染繭の発生は、繭の生産量と品質に影響を及ぼすだけでなく、その後の繰糸工程において煮繭用水を汚すため、生糸の品質にも影響を及ぼすことが知られている（小林, 1982）。このため、核多角体病による内部汚染繭の発生を防ぐことは、蚕糸業における重要な課題である。

内部汚染繭の発生原因として知られる BmNPV は、バキュロウイルス科アルファバキュロウイルス属のグループ 1 クレード 1a に分類されるウイルスで（Jehle et al., 2006; Harrison and Hoover, 2012）、そのゲノムは他の NPV と同様に環状 2 本鎖 DNA から構成されている（Onodera et al., 1965; Kok et al., 1972; Summers and Anderson, 1973）。BmNPV の標準株であ

る BmNPV T3 系統のゲノムは 128,413 塩基対で、60 アミノ酸鎖長以上の開放読み取り枠 (open reading frame: ORF) は 136 個あると推定されている (Gomi et al., 1999). BmNPV を含むバキュロウイルスは、感染過程において、二つのタイプのウイルス粒子を形成する (Summers and Volkman, 1976). 一つは、感染細胞から宿主の体腔に移行し、次の細胞へ感染する出芽ウイルス (budded virus: BV) である. もう一つは、宿主の細胞核内で形成される多角体に包埋された包埋体由来ウイルス (occluded virus: ODV) である. ODV の宿主への感染は、経口感染により行われ、宿主の中腸内で多角体が溶解すると、遊離したウイルス粒子のエンベロープと宿主の円筒細胞膜が融合し、ウイルスの本体であるヌクレオキャプシドが宿主の細胞核内へ侵入して増殖を開始する. 養蚕現場で問題となるのは、経口感染の主体となる後者の ODV である. ODV を包埋する多角体は、ポリヘドリンとよばれるタンパク質から構成されており (Iatrou et al., 1985; Rohrman, 1992), 環境からウイルスを保護する役目を果たしている (England et al., 1998). このため養蚕現場では、BmNPV の多角体中の ODV が長期にわたり活性を保つため (清水・小森, 1981b), 消毒不十分な養蚕現場では、核多角体病が慢性的に発生する環境が形成されやすいと考えられている (渡部・清水, 1981).

養蚕現場では、このような特性をもつ BmNPV を不活化するために、強力なタンパク質固定剤であるホルムアルデヒドが長年使用されてきた経緯がある. しかし、ウイルスの不活化には、3%程度のホルムアルデヒド水溶液に多角体を 10 分以上浸漬する必要がある (清水, 1983; 国見ら, 1985; 鈴木, 1991; 伊藤, 2001), 多角体非形成ウイルスであるカイコの伝染性軟化病ウイルスや濃核病ウイルスに比べ、BmNPV はホルムアルデヒドに耐性が

あり、養蚕現場では十分な消毒効果が得られにくいと考えられている（清水，1983）。さらに、消毒剤として長年使用されてきたホルムアルデヒドは、世界保健機関（WHO）の下部研究組織である国際がん研究機関（IARC）によって、ヒトに対する発ガンリスクがグループ1（発がん性あり）に認定されたことにより（IARC, 2006）、我が国でも同剤の使用規制が強化され、作業環境中の残留ホルムアルデヒド濃度は0.1 ppm以下とすることが法律で義務付けられた（松岡，2009）。このため、既存の養蚕現場では、ホルムアルデヒドを用いた従来型の消毒作業を行うことは極めて厳しい状況にあり、国内養蚕業を継続するためには、ホルムアルデヒドに替わる新たな蚕病防除の手段が求められている。本論文では、新たな蚕病防除剤の開発に関する研究成果を記すため、日本の蚕病防除の歴史を消毒剤の開発と利用の側面から概説しておきたい。

養蚕分野では、古くから蚕病防除のための消毒剤として、ホルムアルデヒド、昇汞水（塩化第二水銀）、クライト（次亜塩素酸カルシウム）などが用いられ、繭の生産に貢献してきたが、長年ホルムアルデヒドを多用した結果、稚蚕共同飼育所から検出されるコウジカビに薬剤抵抗性の発達を示唆された（門平，1950ab）。河上・三国（1969）による詳細な広域調査の結果から、稚蚕共同飼育所に分布するコウジカビの多くはホルムアルデヒドに抵抗性があり、強い抵抗性を示す菌株ほどカイコに強い病原性を示すことが判明した。さらにこの問題が指摘される9年前、すなわち1960年には山崎ら（1960）によって、当時猛威を振るっていた軟化病（伝染性軟化病）の原因がウイルス性であることが判明し、稚蚕期におけるカイコのウイルス感染が集団違作につながることを判明した。また、当時の養蚕現場では、核多角体病よりも細胞質多角体病の被害が目立っていたようである（齊藤・山口，

1960). これらの問題を解決するために、コウジカビに効果のある殺菌剤とウイルスに消毒効果を示すホルムアルデヒドを混用する方法が盛んに研究され、最近まで利用されてきた塩化ベンザルコニウムを主成分とする「アリバンド」とホルムアルデヒドの混用液は、1970年代始めに考案された(山口・小野, 1972; 月田, 1973). 1970年代の中頃には、蚕室消毒用ホルマリン製剤である「サンマークⅢ」が開発され、各種蚕病病原に消毒効果を示すことが確認された(山口, 1974). 1970年代後半から1980年代前半にかけて、ジクロール酢酸とその近縁化合物を主成分とする V-118(池上・蛭原, 1977) から「Vサン」が開発され、各種蚕病病原に対する消毒効果が得られたが(村上, 1981; 小野・山口, 1981), 同剤は各種金属(鉄, 銅, アルミ, ステンレス等)に対して著しい腐食作用を示す消毒剤であった. ほぼ同時期に、4種類の界面活性剤(塩化ベンザルコニウム, アルキルジアミノエチルグリシン, ポリオキシエチレンラウリルエーテル, 臭化アルキルイソキノリウム)とグルタルアルデヒドの混合剤である「養蚕用ピオチノンエース」が開発され(森田・国見, 1979, 1980), 同剤とホルムアルデヒドの混用により各種蚕病病原に対する消毒効果が確認された(森田・国見, 1980; 池上・蛭原, 1980). その後、グルタルアルデヒドと塩化ベンザルコニウムを主成分とする GBV - 10 剤が開発され、消石灰水との混用により各種蚕病病原に対して消毒効果が認められた(森田・国見, 1983; 国見ら, 1985). その後、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムによる各種蚕病病原に対する消毒効果も報告されたが、同剤も先のジクロール酢酸と同様に金属への腐食作用が極めて強い消毒剤であった(鈴木, 1991). 一方、液剤散布による消毒が困難なボール蔴などの一部の蚕具については、パラホルムアルデヒドを主成分とする燻蒸消毒剤「ネオ PPS」が1960年代頃から利用され、1980

年代以降にはエチレンオキサイドガスを用いた消毒剤（池上・蛭原，1982；池上，1990）も実用化された。また，蚕体消毒剤については，パラホルムアルデヒドを主成分とする「改良パフソール」などが製品化され，コウジカビ病と硬化病の防除に最近まで使用されてきた。このように1970年代以降に様々な消毒剤が考案され一部は製品化されるに至ったが，その後登場した稚蚕人工飼料育の普及に伴い，これまで稚蚕桑育で問題とされてきたコウジカビや伝染性軟化病ウイルスによる違作の問題が克服された時期から養蚕農家の減少に直面し，製品化された各種消毒剤の製造が中止された。この状況を受けて，消毒作業の負担軽減を目的としたホルムアルデヒドの超微粒子噴霧による消毒技術が考案され（柳田，1984ab, 1985ab；伊藤，1999；鈴木，2002），人工飼料育を行う稚蚕共同飼育所や一部の大規模養蚕農家でその技術が採用された。2000年代の養蚕現場では，「アリバンド」と2%ホルムアルデヒドの混用液で消毒作業が行われていたが，「アリバンド」の製造中止後は，2~3%ホルムアルデヒド水溶液と消石灰を用いる方法で養蚕現場の消毒が行われた。ホルムアルデヒドの使用規制後は，多くの養蚕農家が消石灰の水溶液しか散布できない危機的状況に直面した。以上，過去半世紀における国内養蚕業の消毒の歴史を概説したが，国内養蚕業における消毒剤の歴史を振り返ると，ホルムアルデヒドが使用できない現状はまさに国内養蚕業の危機的状況といえるだろう。

本研究は，内部汚染菌の発生原因となる BmNPV の防除を念頭に置き，養蚕現場における BmNPV の疫学的調査を行うとともに，ホルムアルデヒドに替わる新たな蚕病防除技術を開発し，養蚕現場へ導入するまでの一連の研究成果をとりまとめたものである。本論文は次の4章から構成されている。

第1章は、近年の蚕病問題として、BmNPVによる内部汚染繭の発生問題を取り上げた。

BmNPVによる内部汚染繭の発生が養蚕地域でどのように変遷し、繭の作柄に影響を及ぼすのかを解析した。本章から、BmNPVが要防除対象ウイルスであること示す。

第2章では、内部汚染繭の発生原因となるBmNPVが養蚕現場のどのような場所に拡散するのか調査した。さらに、核多角体病と細胞質多角体病の併発により壊滅的な違作をした養蚕農家の事例もとりあげ、養蚕現場におけるBmNPVの汚染実態とこのウイルスを防除するうえでの要点を考察する。

第3章では、次亜塩素酸ナトリウムを蚕病防除に使用するための課題と解決策を提案し、応用的側面から研究を行い、食品添加物から構成される「養蚕用除菌洗剤」の基本組成を開発した経緯を記述する。

第4章は、3章で開発した養蚕用除菌洗剤の実用化に関する内容である。実用化に必要な各種試験を行い、同剤の実用性を評価した。

総合考察では、以上の研究成果をふまえて、ホルムアルデヒドが使用できない現状下における蚕病防除の在り方として、BmNPVの防除を中心に考察する。

第1章 核多角体病による内部汚染繭の発生

内部汚染繭の発生は、繭の品質と歩留りに影響する深刻な問題であり、以前からその原因究明と防除に関する研究が行われてきた（石井ら，1975；関，1981；清水・小森，1981a；野口・小林，1982；須見ら，1982；吉原ら，1982；倉島ら，1983；蛭原ら，1984）。特に，カイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）による内部汚染繭の発生は、地域や年代を超えて発生する、養蚕業上極めて重要な蚕病問題であり、ホルムアルデヒドを消毒剤として利用しにくい現況下では、その防除対策の確立は今後もさらに重要性を増すと考えられる。本章では、茨城県内の養蚕地域を対象に、(1) BmNPV による内部汚染繭の発生傾向と (2) 収繭量に及ぼす影響を解析した結果を記述する。

第1節 養蚕地域における内部汚染繭の発生傾向と核多角体病の影響

材料および方法

養蚕農家

茨城県旧霞ヶ浦町（9戸）、旧千代田町（4戸）、旧八郷町（1戸）および旧石岡市（5戸）に位置する全養蚕農家を対象に、内部汚染繭の発生状況を調査した。調査が行われた2002年の飼育蚕品種は、春蚕期（5月上旬～6月中旬）が“春嶺×鐘月”，夏（6月下旬～7月中旬）、初秋（8月上旬～下旬）および晩秋蚕期（9月上旬～下旬）が“錦秋×鐘和”であり、いずれの品種も稚蚕共同飼育所で2齢または3齢の眠期まで飼育されたのち、養蚕農家へ

配蚕された。

繭の採集と内部汚染繭の選別

2002年の春、夏、初秋および晩秋蚕期に調査用の繭を採集した。出荷の前日に、すなわち上簇日から数えて9~10日目に、各養蚕農家の繭を無作為に500粒ずつ採集し、翌日に繭を一粒ずつ振りながら繭の内部でへい死したカイコ（以後、繭中へい蚕）に起因する内部汚染繭（図1）を選別し、その発生率を求めた。次に、選別した内部汚染繭をカッターナイフで個別に切開後、繭に滅菌蒸留水2mlを加えてチップの先端でよく磨り潰した。得られた磨砕液を1ml採取して1.5mlの滅菌チューブに入れ、-20℃で凍結保存した。この凍結試料を順次解凍し、以下に述べる染色法でBmNPVの多角体を検出した。

核多角体の検出と識別

腐敗の進んだ繭中へい蚕からBmNPVの多角体を検出するために、Buffalo Black染色（Evans and Shapiro, 1997）を行った。内部汚染繭から得られた凍結試料を解凍し、滅菌蒸留水で2倍に希釈した。その一滴をスライドグラスに薄く塗抹して軽く風乾後、40℃に保温したNaphthol Blue Black（Acid Black 1, シグマ アルドリッチ ジャパン社製）染色液に5分間浸漬後、流水で約10秒間洗浄し、核多角体の有無を光学顕微鏡下（15×40倍）で確認した。この方法により各養蚕農家から集めた繭500粒に対する核多角体病率を求めた。なお本染色法は、カイコ細胞質多角体病ウイルス（*Bombyx mori* cyovirus, BmCPV）の多角体を染色せず、BmNPVの多角体を特異的に染色することが知られている（図2）。

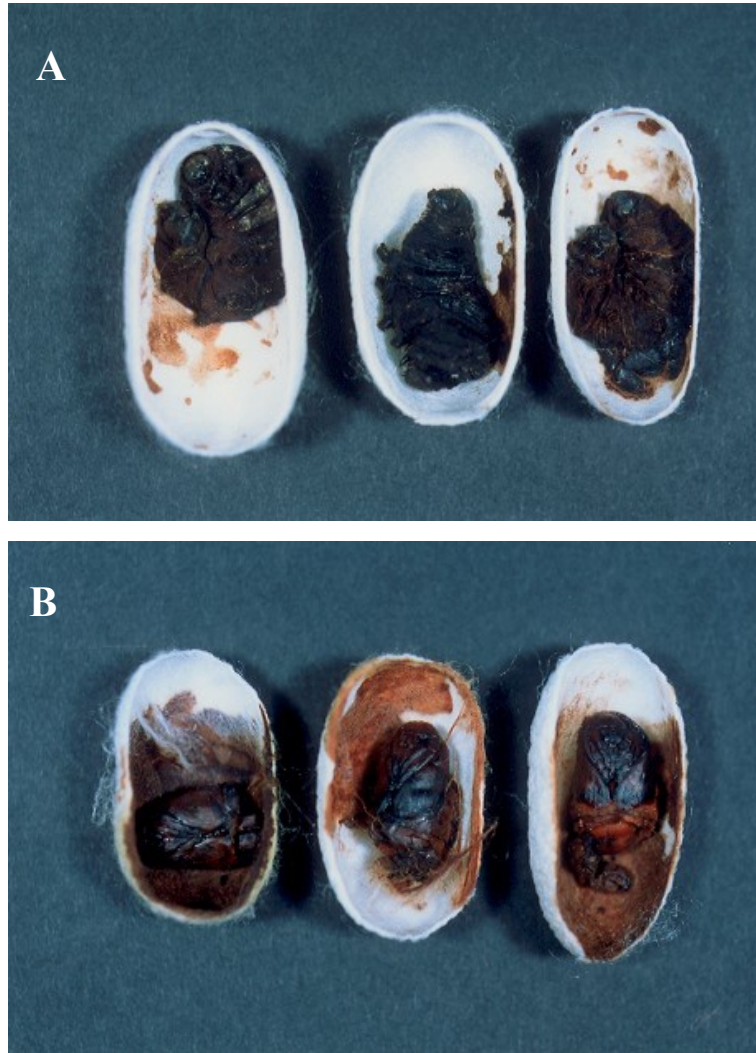


図1. 養蚕現場で発生した内部汚染繭.

(A: 化蛹前. B: 化蛹後).

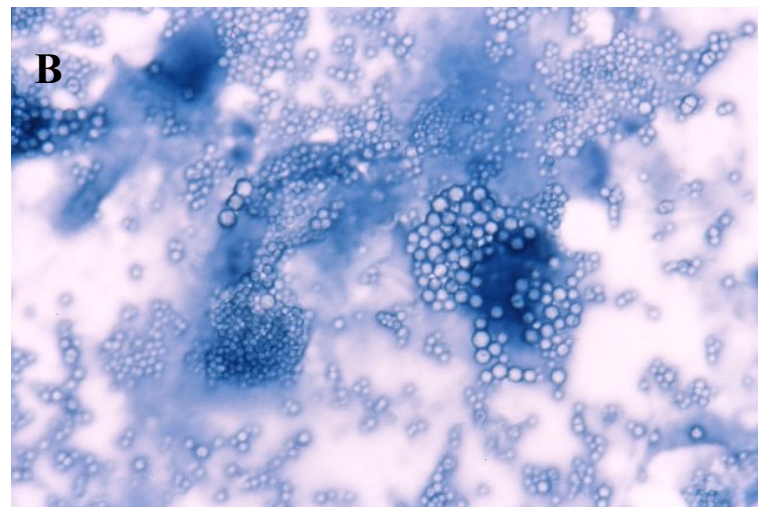
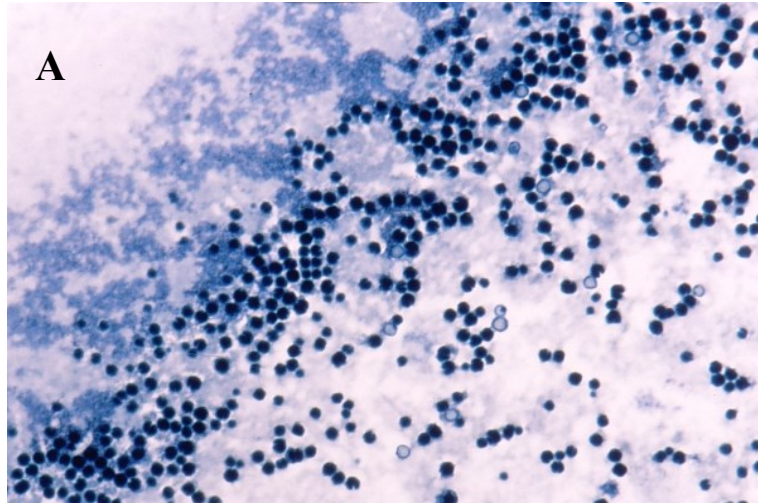


図2. Buffalo Black 染色による多角体の染め分け.

(A: BmNPV の多角体, B: BmCPV の多角体).

統計解析

各蚕期に発生する内部汚染繭と核多角体病の関係をj知るために、両者の相関を調べた。さらに各蚕期の相関係数を Tukey 型の多重範囲検定 (Zar, 1999) で比較した。また、各蚕期の内部汚染繭率と核多角体病発生率の間で線形回帰を行い、回帰式と決定係数 (R^2) を求めた。

結 果

茨城県内の養蚕地域における内部汚染繭の発生率とその核多角体病率を表 1 に示した。養蚕地域では、すべての蚕期 (春～晩秋) に核多角体病による内部汚染繭 (以後、ウイルス性の内部汚染繭) が発生した。春にウイルス性の内部汚染繭が発生した養蚕農家 (D, G, H, I, J, L, M, O, P および R) では、J と M を除き、その後の蚕期もウイルス性の内部汚染繭が発生した。また、春にウイルス性の内部汚染繭が発生していなかった養蚕農家のうち、A, B, F および Q の養蚕農家でも夏蚕期以降にウイルス性の内部汚染繭が発生した。例外的に N の養蚕農家では、すべての蚕期でウイルス性の内部汚染繭が発生していなかった (なお、この養蚕農家は第 2 章でとりあげる壊滅的な違作をした養蚕農家であることを付記する)。さらに、年に一度の飼育に限られていた E, K および S の養蚕農家では、ウイルス性の内部汚染繭が発生していなかった。この養蚕地域でみられたウイルス性の内部汚染繭率を各蚕期で比較した結果、その平均発生率は、春、初秋、夏および晩秋蚕期の順に高くなり、養蚕現場間の差も大きくなる傾向にあった。また、各蚕期の平均内部汚染繭率も同様の傾向であった。

表1. 茨城県下の養蚕地域における各蚕期の内部汚染繭率と核多角体病発生率

		2002年							
地域	農家	春		夏		初秋		晩秋	
		内部汚染繭 (%) ^a	核多角体病 (%) ^b	内部汚染繭 (%)	核多角体病 (%)	内部汚染繭 (%)	核多角体病 (%)	内部汚染繭 (%)	核多角体病 (%)
旧霞ヶ浦町	A	5.8	0.0	14.0	0.2	— ^c		1.2	0.6
	B	2.4	0.0	1.4	0.0	0.6	0.0	2.6	1.6
	C	—	—	1.2	0.6	4.2	1.0	—	—
	D	0.8	0.2	9.8	8.0	8.2	4.8	6.6	4.2
	E	—	—	3.4	0.0	—	—	—	—
	F	1.8	0.0	6.6	2.0	4.0	1.2	6.0	4.6
	G	0.8	0.4	3.0	0.2	4.6	0.0	4.0	0.6
	H	2.4	1.4	14.8	11.4	11.8	10.0	11.4	8.8
	I	5.4	4.6	11.4	9.8	—	—	18.6	17.4
旧千代田町	J	0.8	0.2	0.6	0.0	0.4	0.0	1.2	0.0
	K	3.2	0.0	—	—	—	—	—	—
	L	0.6	0.4	22.6	18.0	—	—	12.4	10.8
	M	2.2	0.4	1.6	0.0	—	—	1.0	0.0
旧八郷町	N	0.6	0.0	1.8	0.0	5.6	0.0	0.4	0.0
旧石岡市	O	5.8	4.4	1.8	0.4	—	—	10.8	7.6
	P	2.0	0.4	—	—	4.2	2.4	8.2	8.0
	Q	1.6	0.0	—	—	—	—	15.0	13.6
	R	1.2	0.2	5.8	4.8	—	—	8.0	6.6
	S	1.0	0.0	—	—	—	—	—	—
	平均	2.3	0.7	6.7	3.7	4.8	2.2	7.2	5.6
	SD	± 1.79	± 1.46	± 6.54	± 5.59	± 3.53	± 3.34	± 5.61	± 5.44
	N ^d	17		15		9		15	

^a 養蚕農家から採集した繭500粒に対する内部汚染繭の割合。

^b 内部汚染繭から検出された繭500粒に対する核多角体病の割合。核多角体病の判定は、Buffalo Black染色法 (Evans and Shapiro, 1997) に基づいた。

^c カイコを飼育しなかった。

^d 調査農家戸数。

次に、各蚕期の養蚕農家から得られた内部汚染繭率とその核多角体病発生率との相関を調べた結果、いずれの蚕期も有意な正の相関を示した。相関係数（ r ）は、春と晩秋蚕期間に有意な差が認められた（表 2）。さらに、両者の間で回帰分析を行った結果、養蚕地域では春から晩秋蚕期に向かうほど決定係数（ R^2 ）は 1 に近づいた（図 3）。

考 察

養蚕農家で発生する内部汚染繭を調べると、化蛹前の幼虫が腐敗しているものや、蛹が溶解しているものが多い（図 1）。このような繭中へい蚕から客観的な手法で核多角体を識別するために、本研究では Buffalo Black 染色法（Evans and Shapiro, 1997）を採用した。内部汚染繭から核多角体を識別する場合、40°C に保温した染色液に 5 分間浸漬するだけでよく、大量の塗抹試料から核多角体を容易に識別することが可能であった（図 2）。染色法による核多角体の識別は経験差に関係なく、客観的な判断が可能であるため、疫学的な調査に有用な手法である。本研究の他に染色法を採用した事例には、アメリカシロヒトリ *Hyphantria cunea* NPV の多角体を染色した福原（1982）の例や、クワゴマダラヒトリ *Thanatarctia imparilis* (*Spilosoma imparilis*) NPV の多角体を染色した国見（1986）の例などが報告されている。本染色法は、Bromophenol blue（阿部, 1973; 国見・有賀, 1974; Fuxa et al., 1999）で染色可能な CPV の多角体を染めないため（図 2）、本研究で得られた多角体の識別結果は、内部汚染繭で発生した核多角体病の影響を正確に反映しているものと考えられる。

表2. 各蚕期の内部汚染率と核多角体病発生率の関係

蚕期(2002年)	N ^a	<i>r</i> ^b	SE ^c	<i>t</i> ^d
春	17	0.674 a	0.191	3.53 *
夏	15	0.866 ab	0.139	6.23 **
初秋	9	0.874 ab	0.184	4.75 *
晩秋	15	0.985 b	0.048	20.52 **

^a 調査農家戸数.

^b 相関係数*r*. 異なる文字間には, Tukey型多重範囲検定(Zar, 1999)により, 相関係数の間に有意差が認められる($P < 0.05$).

^c *r*の標準誤差.

^d r/SE により算出(Zar, 1999). * $P < 0.005$; ** $P < 0.001$.

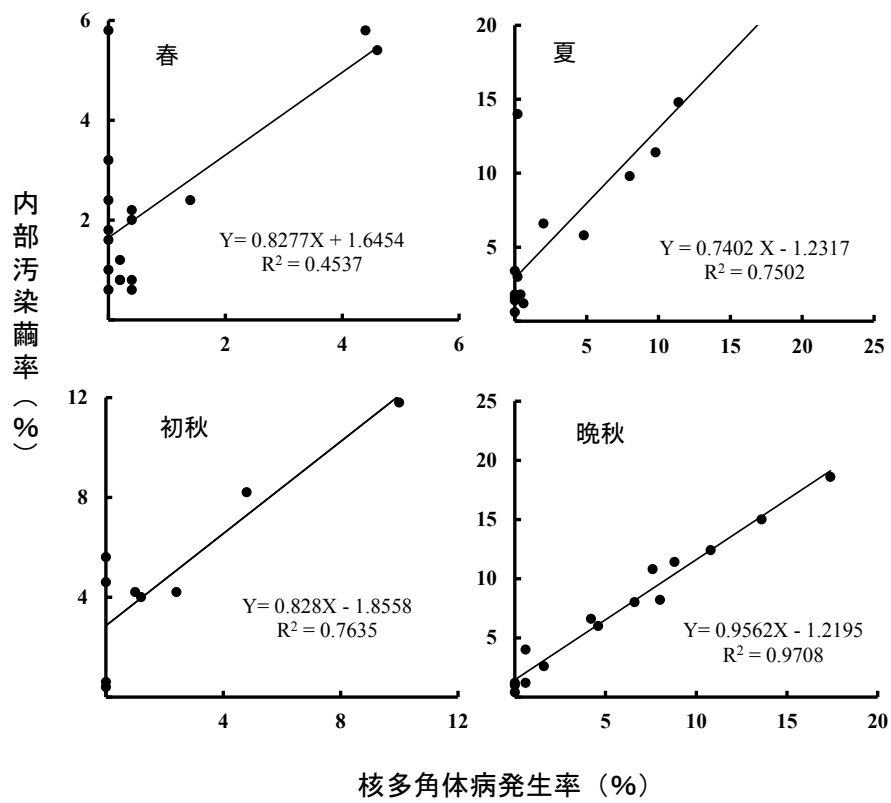


図3. 各蚕期の内部汚染繭率 (%) と核多角体病発生率 (%) の線形回帰.

調査を行った養蚕農家では、春蚕期の内部汚染菌からすでに核多角体が検出されており、このような農家では夏蚕期以降にもウイルス性の内部汚染菌が発生する傾向にあった（表 1）。また、春蚕期にウイルス性の内部汚染菌が発生していなかった養蚕農家でも、夏蚕期以降にウイルス性の内部汚染菌が発生した（表 1）。これらの事実から、養蚕農家では飼育関連施設に BmNPV が残留または蓄積し、戸別の養蚕農家の飼育環境下で越冬後（秋葉・小野，1979；秋葉，1980），翌年の春蚕期以降に再びカイコへ感染し、蚕期を通して感染と増殖を繰り返すという、一連のサイクルを想定する必要がある。この点については第 2 節で述べる。渡部・清水（1981）は、当時みられた核多角体病の流行様式を、戸別の養蚕農家における蚕期～蚕期への垂直的な伝播様式であると考察しているが、本研究で認められた核多角体病による内部汚染菌の発生も渡部・清水（1981）が報告した広義な意味での垂直的な伝播様式と同一のものと考えられる。この戸別の養蚕農家における BmNPV の垂直的な伝播を、春～晩秋蚕期の間と、晩秋～翌年春蚕期までの間の二つに大別すると、垂直的な伝播に要する期間は、前者が短く、後者は長い。特に晩秋蚕期の終了から翌年の春蚕期までの期間は約 6 か月あり、この期間における養蚕農家に共通した BmNPV の動態（養蚕施設におけるウイルスの拡散範囲、蓄積量および越冬箇所）を解明することは、春蚕期から始まる BmNPV の「戸別の養蚕農家における垂直的伝播サイクル」を遮断するための重要な示唆を与えてくれるだろう。

養蚕地域にみられる内部汚染菌の発生傾向と核多角体病の影響（表 1）を、各蚕期の変動係数（標準偏差/平均値）で比較すると、内部汚染菌の発生については初秋蚕期（変動係数 0.74）＜春蚕期（0.78）＝晩秋蚕期（0.78）＜夏蚕期（0.98）という順になり、農家間の

差は、夏の蚕期が大きく、春と晩秋蚕期は同程度であった。同様に、ウイルス性の内部汚染繭について比較してみると、晩秋蚕期 (0.97) < 夏蚕期 (1.51) < 初秋蚕期 (1.52) < 春蚕期 (2.09) の順となり、春蚕期は最も農家間の差が大きく、晩秋蚕期はその差が小さいという結果になった。つまり、春蚕期にはウイルス性の内部汚染繭が発生しやすい農家としにくい農家にわかれやすく、夏蚕期にはウイルス病に関係なく内部汚染繭が発生しやすい農家としにくい農家に分かれやすいことがわかる。その反対に、初秋蚕期は内部汚染繭の発生率に農家間差が小さく、晩秋蚕期はウイルス性の内部汚染繭率に農家間差が小さい。すなわち、養蚕農家では初秋蚕期から晩秋蚕期に内部汚染繭が発生する傾向にあり、ウイルス病の影響が顕著に現れるのは晩秋蚕期であると推察される。そこで、養蚕地域で発生する内部汚染繭と核多角体病の相関を調べた結果、春～晩秋蚕期は、いずれの蚕期も内部汚染繭の発生率と核多角体病の発生率との間に正の相関が認められ、春と晩秋蚕期の相関係数 (r) に有意な差が認められた (表 2)。この結果から、養蚕地域では春～晩秋蚕期に向かうほど両者の相関が強くなり、核多角体病による内部汚染繭が発生しやすくなると推察される。 r は、その特性上、比較の対象となるグループ間で相関の強さを比較できないため、核多角体病による内部汚染繭の発生のしやすさを各蚕期で比較するための尺度とならない。そこで次の方法を試みた。核多角体病による内部汚染繭の発生については従属関係が明白なので、核多角体病発生率を独立変数とし、内部汚染繭の発生率を従属変数として線形回帰分析を行い、図 3 に示す決定係数 (R^2) を求めた。回帰式の信頼性を表すこの尺度に基づくと、晩秋蚕期は、初秋蚕期の 1.27 倍、夏蚕期の 1.29 倍、春蚕期の 2.14 倍、他の蚕期に比べて核多角体病による内部汚染繭が発生しやすいと考えられる。

調査対象とした養蚕地域では，以上のように，春～晩秋蚕期に向かって内部汚染繭の発生要因が核多角体病へと変遷する．特に晩秋蚕期は核多角体病による内部汚染繭が他の蚕期に比べて発生しやすいことを本節で明らかにした．次節では，さらに調査を進め，核多角体病による内部汚染繭の発生が，養蚕地域で生産される繭の生産量（収繭量）にどのような影響を及ぼすのか解析した．

第2節 核多角体病による内部汚染繭の発生と収繭量への影響

材料および方法

第1節の養蚕地域を対象に、2002年の春～晩秋蚕期の内部汚染繭率と収繭量の関係を調べ、各蚕期の相関係数をTukey型の多重範囲検定(Zar, 1999)で比較した。養蚕地域の収繭量に関する資料は、土浦地域農業改良普及センターより入手した。調査当時の茨城県内の配蚕頭数は、1箱あたり約27,000頭であった。

内部汚染繭率と収繭量の間を負の相関が認められた2002年晩秋蚕期のデータに基づいて、収繭量から内部汚染繭率を推定するため、線形、累乗および指数回帰を行った。これらの回帰式のうち、決定係数(R^2)が最も高かった指数回帰の式に基づいて、2003年晩秋蚕期の収繭量から内部汚染繭率を推定し、実測値と比較した。

結 果

内部汚染繭の発生率と収繭量の関係を各蚕期で比較した結果、春～初秋蚕期の間は相関がなく、晩秋蚕期にのみ有意な負の相関が認められた(表3)。ウイルス性の内部汚染繭が発生しやすい晩秋蚕期には、内部汚染繭の発生が収繭量に影響することが判明した。

2002年晩秋蚕期のデータに基づいて、収繭量から内部汚染繭率を推定するための回帰式を検討した結果、指数回帰が適合した($Y=107.92e^{-0.0938X}$, $R^2=0.685$)(図4)。この回帰式に基づいて2003年晩秋蚕期の収繭量から内部汚染繭率を推定した結果、収繭量が多いほど、実測値をよく反映した(表4)。

表3. 各蚕期の内部汚染率と収繭量 (kg) の関係

蚕期(2002年)	N ^a	r ^b	SE ^c	t ^d
春	17	0.229 b	0.251	0.912 ns
夏	15	-0.248 b	0.269	-0.922 ns
初秋	9	-0.136 b	0.375	-0.363 ns
晩秋	15	-0.749 a	0.184	-4.071 *

^a 調査農家戸数.

^b 相関係数 r . 異なる文字間には, Tukey型多重範囲検定(Zar, 1999)により, 相関係数の間に有意差が認められる($P < 0.05$).

^c r の標準誤差.

^d r/SE (Zar, 1999). *: r の値は有意である($P < 0.05$). ns: r の値に意味がない($P > 0.05$).

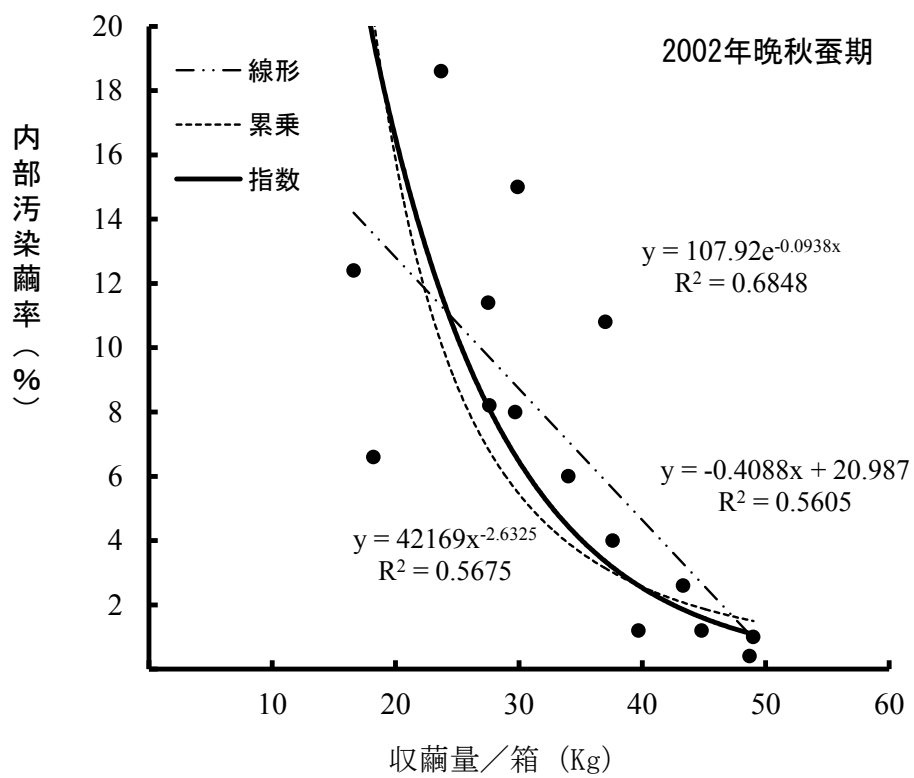


図4. 内部汚染繭の発生率と箱あたり収繭量の関係.

表4. 内部汚染繭率の実測値と推定値の比較

地域	養蚕現場	2003年晩秋蚕期			
		収繭量/箱 (kg)	内部汚染繭率 (%)		
			実測値 ^a	推定値 ^b	差 ^c
旧霞ヶ浦町	A	40.6	1.0	2.4	1.4
	B	*	*	*	*
	C	*	*	*	*
	D	*	*	*	*
	E	*	*	*	*
	F	28.2	2.6	7.7	5.1
	G	38.2	1.4	2.9	1.5
	H	41.5	1.4	2.2	0.8
	I	41.6	2.0	2.2	0.2
旧千代田町	J	42.8	0.8	1.9	1.1
	K	37.8	1.4	3.1	1.7
	L	42.4	2.0	2.0	0
	M	47.6	0.6	1.2	0.6
旧八郷町	N	44.2	0.0	1.7	1.7
旧石岡市	O	42.3	1.8	2.0	0.2
	P	35.2	2.6	4.0	1.4
	Q	43.3	2.6	1.9	-0.7
	R	*	*	*	*

^a 繭500粒の振出調査による値.

^b 推定内部汚染繭率 (%) は $y=107.92e^{-0.0938x}$ より算出した. xは収繭量/箱 (kg) .

^c 推定値-実測値.

* カイコを飼育しなかった.

考 察

内部汚染繭の発生率と収繭量の間で相関を調べた結果、春～初秋蚕期は有意な相関がなく、晩秋蚕期にのみ有意な負の相関が認められた(表3)。この解析結果から、晩秋蚕期は、内部汚染繭の発生率が収繭量にも反映されるが、他の蚕期では、内部汚染繭の発生率が収繭量を反映しないことが判明した。調査を行った養蚕地域では、夏と初秋蚕期にも、核多角体病による内部汚染繭は発生していたが(表1)、この時期に発生する内部汚染繭は、収繭量との間に有意な相関が無い(表3)、養蚕農家では選除が困難な繭中へい蚕繭(みかけの上繭)が発生しやすいと考えられる。実際に、今回の調査で内部汚染繭を除いた残りの上繭のうち、200粒を採集して繭中の様子を調べた結果、夏と初秋蚕期には、繭中へい蚕が多発する傾向にあり、このような繭が製糸の段階で内部汚染繭を生じる可能性(山口, 1981)がある。夏と初秋蚕期は、収繭量から内部汚染繭の発生率を推定できないが、晩秋蚕期には収繭量と内部汚染繭の発生率の間に負の相関が成立するため、収繭量からおおよその内部汚染繭率は推定可能と考えられる。

この点を検証するために、2002年の晩秋蚕期に、養蚕地域で得られた内部汚染繭率と収繭量の間で、線形、累乗および指数回帰式を求め、これらの決定係数(R^2)を比較したところ、両者の関係は指数回帰によく適合した(図4)。調査を行った養蚕地域にみられる晩秋蚕期の単繭重は、2002年の調査で 1.89 ± 0.16 g、2003年の調査で 1.86 ± 0.16 gであり(表5)、一箱約27,000頭のカイコが全て繭を形成した場合、箱あたりで50.2～51.0 kgの繭が生産されることになる。先の回帰式に基づくと、配蚕されたカイコが全て繭を形成した場

表5. 晩秋蚕期の単繭重

地域	養蚕現場	単繭重(g) ^a	
		2002年	2003年
旧霞ヶ浦町	A	1.98	1.83
	B	2.20	*
	C	*	*
	D	1.77	*
	E	*	*
	F	1.70	1.51
	G	1.93	1.82
	H	2.03	1.85
	I	1.74	1.87
旧千代田町	J	1.76	1.82
	K	*	2.14
	L	1.78	1.79
	M	2.10	2.15
旧八郷町	N	2.09	1.78
旧石岡市	O	1.73	1.86
	P	1.70	1.84
	Q	1.94	1.93
	R	1.92	*
	平均	1.89	1.86
	標準偏差	±0.16	±0.16
	調査数	15	13

^a 繭500粒から推定した平均値.

* カイコを飼育しなかった.

合、内部汚染繭が 0.90～0.97%の範囲で発生してしまう誤差を生じるが、これを踏まえたうえで、2003 年の晩秋蚕期に同一の養蚕地域で得られた収繭量に基づいて先の回帰式の適合性を検証すると表 4 のとおりとなる。養蚕現場 Q の一例を除くと、回帰式から推定された内部汚染繭率は、実測値よりもわずかに高い値を示し、収繭量が多くなるほど内部汚染繭率の推定値は実測値に近づいた（表 4）。すでに第 1 節で述べたように、晩秋蚕期は、核多角体病による内部汚染繭が多発しやすい時期であり、この時期の内部汚染繭は他の蚕期に比べて上繭を汚染する危険性が極めて高い。そのため、晩秋蚕期の繭については、出荷の段階で繭の品質を評価し、生産現場の段階で差別化を図ることが望ましい。本研究の結果から、晩秋蚕期の繭は、収繭量が内部汚染繭の発生率を反映するため、当蚕期の繭品質を維持するためには、各農家の収繭量に格付けを行い、箱あたりで同程度の収量にある農家の繭を一つのロットにすると良いだろう。

以上本節で述べたとおり、晩秋蚕期は、核多角体病による内部汚染繭が多発するだけでなく、養蚕地域の収繭量にも多大な影響を及ぼすようになる。養蚕現場で BmNPV の防除が極めて重要となるのはこのためである。次章では、戸別の養蚕現場における BmNPV の汚染実態を解明し、防除に必要な視点を明らかにする。

摘 要

核多角体病による内部汚染繭の発生が、複数の養蚕農家から構成される養蚕地域においてどのような季節的変遷を遂げながら繭の作柄に影響するのか解析した。2002年の春、夏、初秋および晩秋蚕期に、茨城県内の養蚕農家（9～17戸）から繭を500粒ずつ採集して内部汚染繭を選別し、Buffalo Black染色法により核多角体を染色することでウイルス性の内部汚染繭率を調査した。地域の内部汚染繭率とウイルス性の内部汚染繭率との間で相関関係を調べ、さらに回帰分析により両者の関係の強さを解析した。また、内部汚染繭の発生率と収繭量との間で相関関係を調べた。その結果、春～晩秋蚕期に向かうほど、ウイルス性の内部汚染繭が発生する傾向にあり、その影響が収繭量に反映されるのは主に晩秋蚕期であると推定された。

本章では、内部汚染繭の発生原因となるBmNPVの防除が重要である背景を記述した。

第2章 核多角体病ウイルスによる汚染の実態

第1章第1節で示したとおり、養蚕現場では、春蚕期の内部汚染繭からカイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）が検出される（表1）。春蚕期の内部汚染繭から BmNPV が検出される農家では、その後の蚕期も核多角体病による内部汚染繭が発生する傾向にある（表1）。そのため、春蚕期開始直前の養蚕関連施設における BmNPV の汚染実態とその後蚕期におけるウイルスの拡散状況を解明することは、養蚕現場の防疫体系を構築するうえで有益であると考えられる。本章では、第1章でとりあげた茨城県南地域の養蚕現場を対象に、養蚕関連施設における BmNPV の汚染実態を調査した。第1節では、春蚕期の開始直前から晩秋蚕期の収繭直後にかけて養蚕関連施設のどのような場所に BmNPV が拡散するか調査し、上簇室が BmNPV の主たる汚染箇所であることを明らかにする。第2節では、PCR法を導入し、上簇室内に置かれている立体構造物の蚕具から、BmNPV を検出する手法を考案し、収繭毛羽取機のウイルス汚染を示したうえで、上簇室に置かれている常時未消毒の蚕具等が BmNPV の温存場所となりえる可能性を指摘する。第3節では、核多角体病と細胞質多角体病の併発により壊滅的な違作が生じた養蚕現場の事例を取り上げる。2種ウイルスの分布傾向に則した防疫対策の導入と消石灰水の利用により作柄が改善し、核多角体病による内部汚染繭の発生も皆無となった事例を記述する。本章を通して明らかにしようとしている点は、養蚕現場における BmNPV の分布傾向とその不偏性である。現場間に共通した BmNPV の汚染箇所が存在するならば、その場所が防疫対策上、重要な場所になるからである。

第 1 節 養蚕関連施設のウイルス汚染状況

材料および方法

塵埃採集

茨城県南地域の養蚕現場を対象に、2003 年の春蚕期開始前および春、夏、初秋および晩秋蚕期の各収繭直後に塵埃を採集した。各蚕期の塵埃採集は、春蚕期開始前の 4 月 23 日、春蚕期収繭直後の 6 月 13 日～15 日、夏蚕期収繭直後の 7 月 20 日～23 日、初秋蚕期収繭直後の 8 月 31 日～9 月 3 日および晩秋蚕期収繭直後の 10 月 7 日に行った。塵埃採集箇所は、養蚕農家の母屋の玄関前、貯桑場、蚕室および上蔭室の 4 か所とした。これらの採集箇所のうち、貯桑場、蚕室および上蔭室については、部屋の四隅と中央からほぼ等量の塵埃を採集した。塵埃採集には、採集箇所ごとに、消毒可能な採集用具を利用した。採集した塵埃は、個別にビニール袋へ入れておき、生物検定に供試するまで -20°C で保存した。春蚕期開始前および春～晩秋蚕期の収繭直後に採集した塵埃は、いずれも 3 か月以内に生物検定に供試した。

生物検定による BmNPV の検出

BmNPV の検出は、塵埃添食試験法により行った。塵埃試料 1 g に、0.05 M に調製したピロりん酸ナトリウム水溶液を 9 g 加えてよく攪拌し、10% (w/w) 塵埃浮遊液を作り、24 時間 5°C で静置した。この上清を人工飼料の小片 (2 cm \times 4 cm, 厚さ 0.5 cm, 1～3 齢原種用, 日本農産工業社製) の全面によく塗布し、2 齢起蚕 20 頭 (蚕品種: 朝・日 \times 東・海) に 24 時間摂食させた。その後、清浄な人工飼料に移し換え、 25°C , 16L8D の環境下で飼

育した。添食開始から 6 日間の総発病頭数を求めた。BmNPV 感染の有無は、供試蚕の組織の塗沫標本を作成し、多角体の有無によって判定した。なお、塗沫標本の多角体は Buffalo Black 液 (1.5%) で染色した (Evans and Shapiro, 1997)。生物検定は、各塵埃試料について 3 回行った。

結 果

春蚕期開始前のウイルス分布

BmNPV は、13 か所の養蚕現場のうち 10 か所から検出され、施設別では、上蔭室 (8 か所)、貯桑場 (7 か所)、蚕室 (6 か所) および母屋の玄関前 (5 か所) の順に検出件数が多かった (表 6)。また、BmNPV が検出された養蚕現場では、上蔭室から採集した塵埃において、発病頭数が最も多い傾向がみられた。

収穫直後のウイルス分布

春蚕期の調査では、14 か所の養蚕現場のうち 11 か所から BmNPV が検出され、施設別では、上蔭室 (10 か所)、母屋の玄関前 (5 か所)、貯桑場ならびに蚕室 (各 4 か所) の順に検出件数が多かった (表 7)。また、BmNPV が検出された養蚕現場では、H の一例を除いて、すべての上蔭室からウイルスが検出された。

夏蚕期の調査では、13 か所の養蚕現場のうち 11 か所から BmNPV が検出され、施設別では、上蔭室 (9 か所)、貯桑場 (6 か所)、母屋の玄関前 (4 か所) および蚕室 (3 か所) の順に検出件数が多かった (表 7)。また、BmNPV が検出された養蚕現場では、A と B を除いた上蔭室からウイルスが検出された。

表6. 春蚕期開始直前の未消毒状態におけるカイコ核多角体病ウイルスの分布状況(2003年)

地域 ^a	養蚕 ^b 現場	N ^c	核多角体病の罹病頭数												
			母屋の玄関前			貯桑場			蚕室			上蔭室			
			反復	1	2	3	反復	1	2	3	反復	1	2	3	反復
旧霞ヶ浦町	A	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	B	20	0	0	0	*			1	3	0	2	6	0	
	D	20	2	1	0	2	0	0	0	0	0	5	5	1	
	F	20	0	1	0	0	0	0	2	1	0	4	5	1	
	G	20	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	H	20	0	0	0	1	2	0	2	0	0	0	1	0	
	I	20	3	0	0	0	0	0	0	6	0	3	3	2	
旧千代田町	J	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	L	20	0	0	0	2	0	2	4	2	1	3	7	1	
	M	20	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
旧八郷町	N	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
旧石岡市	O	20	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	2	0	
	P	20	3	1	1	2	3	0	2	3	1	6	9	2	

^a 茨城県南地域. 2005年に千代田町と八郷町は, それぞれ霞ヶ浦町と石岡市に合併された.

^b 塵埃採集日: 4月23日. 養蚕現場 C, E, K, QおよびRでは, 塵埃採集の許可が得られなかった.

^c 生物検定1回あたりの供試頭数. 蚕品種“朝・日×東・海”の2齢幼虫(0日目)を用いて, 各試料につき試験を3回行った.

* 塵埃が得られなかった.

表7. 各蚕期の収繭直後におけるカイコ核多角体病ウイルスの分布状況(2003年)

地域 ^a	養蚕現場 ^b	N ^c	核多角体病の罹病頭数 ^d															
			母屋の玄関前				貯桑場				蚕室				上蔭室			
			春	夏	初秋	晩秋	春	夏	初秋	晩秋	春	夏	初秋	晩秋	春	夏	初秋	晩秋
旧霞ヶ浦町	A	20	0	0	—	0	0	3	—	0	0	0	—	0	0	0	—	0
	B	20	—	1	0	0	—	2	*	*	—	5	0	3	—	0	0	1
	D	20	0	0	1	—	2	2	0	—	0	0	0	—	2	12	0	—
	F	20	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	7	5	1	4
	G	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	0	0
	H	20	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	3	0	3
	I	20	1	0	0	1	0	0	2	2	0	4	0	2	3	3	2	7
旧千代田町	J	20	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	4	0	8
	K	20	—	0	—	—	—	0	—	—	—	0	—	—	—	0	—	—
	L	20	0	0	—	2	0	1	—	1	0	0	—	0	2	5	—	5
	M	20	0	0	—	0	0	0	—	0	0	0	—	0	0	1	—	0
旧八郷町	N	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
旧石岡市	O	20	1	0	0	0	2	5	0	0	1	0	0	0	5	1	0	3
	P	20	6	—	0	0	1	—	0	3	5	—	2	7	10	—	6	7
	Q	20	0	—	—	0	0	—	—	0	1	—	—	0	3	—	—	2
	R	20	3	—	—	—	2	—	—	—	0	—	—	—	8	—	—	—

^a 茨城県南地域. 2005年に千代田町と八郷町は, それぞれ霞ヶ浦町と石岡市に合併された.

^b 養蚕現場 CおよびEでは, 塵埃採集の許可が得られなかった.

^c 生物検定1回あたりの供試頭数. 蚕品種“朝・日×東・海”の2齢幼虫(0日目)を用いて, 各試料につき試験を3回行った.

^d 3回の塵埃添食試験で認められた罹病頭数の総数.

塵埃採集日: 春蚕期 6月13日~15日; 夏蚕期 7月20日~23日; 初秋蚕期 8月31日~9月3日; 晩秋蚕期 10月7日.

— カイコを飼育しなかった. * 塵埃が得られなかった.

初秋蚕期の調査では、10 か所の養蚕現場のうち4 か所から BmNPV が検出され、施設別では、上蔭室（3 か所）、母屋の玄関前、貯桑場ならびに蚕室（各 1 か所）の順に検出された（表 7）。他の蚕期の収繭直後に比べると、BmNPV が検出される養蚕現場は少数であった。

晩秋蚕期の調査では、13 か所の養蚕現場のうち9 か所から BmNPV が検出され、施設別では、上蔭室（9 か所）、蚕室ならびに貯桑場（各 4 か所）および母屋の玄関前（3 か所）の順に検出件数が多かった（表 7）。晩秋蚕期の収繭直後に BmNPV が検出された養蚕現場では、すべての上蔭室から BmNPV が検出された。

考 察

茨城県南地域の養蚕現場を対象に、BmNPV による施設の汚染状況を調べた結果、上蔭室が最も BmNPV に汚染されやすいことが判明した。この汚染傾向は、春蚕期の開始直前から晩秋蚕期の終了直後まで一貫しているため（表 6, 7）、養蚕現場では、上蔭室が BmNPV の主要な汚染箇所であると考えられる。

塵埃添食試験法により養蚕現場のウイルス分布を調べた過去の事例としては、秋葉・小野（1979）および秋葉（1980）の報告などがあり、当時の調査においても上蔭室内から BmNPV が検出された。しかし、BmNPV が検出された養蚕現場の数が 2～3 か所と少ないため、上蔭室内が BmNPV の主要な汚染箇所であると推定するには至らなかった。本研究では、調査対象とする養蚕現場の数を拡大し、春蚕期開始直前に 13 か所、各蚕期の収繭直後に 10～14 か所の養蚕現場を調べているため、養蚕現場における BmNPV の分布特性が明

確に示されたと考える。

今回調査した養蚕現場においても、秋葉（1980）の調査結果と同様に、春蚕期の開始前から BmNPV が育蚕関連施設とその周辺に広く拡散していた（表 6）。一般に、多角体に包埋された NPV は自然環境に耐性があり（England et al., 1998）、アメリカシロヒトリ *Hyphantria cunea* の NPV では、土壌中で約 8 か月間病原性を維持した報告例がある（Hukuhara and Namura, 1972）。カイコに感染する BmNPV の場合では、相対湿度 0%、全暗条件の室内環境下で約 5 か月間病原性を維持しており（清水・小森, 1981b）、土壌に混入した BmNPV も日陰の室内で 100 日以上病原性を保つと報告されている（渡部・清水, 1981）。過去の知見を踏まえると、春蚕期開始前の養蚕現場から検出された BmNPV は、前年の晩秋蚕期に増えた包埋型のウイルスに由来する可能性があり、乾燥しやすい養蚕現場の上蔭室内が BmNPV の温存場所となることで、作業者の移動に伴って育蚕関連施設やその周辺にウイルスが拡散されるものと考えられる。本調査においても母屋の玄関前から BmNPV がたびたび検出されたため（表 6, 7）、ウイルスの拡散は主に作業者の移動に伴って生じているものと推察される。

本研究では、核多角体病が慢性的に発生している養蚕現場において、収繭直後の上蔭室内が BmNPV で汚染される可能性が高いことを明らかにした。核多角体病による内部汚染繭が多発しやすい既存の養蚕現場では、この点を考慮した防疫体制を構築する必要がある。例えば、配蚕前に回転蔭の準備を済ませておき、配蚕後は上蔭室への入室を控えるなど、作業手順の見直しを図ることは、養蚕現場において養蚕従事者が即座に実行できる有効な防疫手段である。また、その年の蚕期終了後は、BmNPV の拡散を防ぐため、上蔭室を中

心とした養蚕関連施設の早期の消毒・洗浄作業は不可欠であるが、これまで蚕室蚕具類の消毒に用いられてきた2~3%ホルムアルデヒド水溶液による消毒作業は、すでに緒言で詳述したとおり、近年、作業者への安全配慮から実施が困難な状況にある。そのため、同薬剤に替わる新たな消毒技術の開発と現場への応用は、国内養蚕業を継続するためにも重要な課題である。この点については、第3章および第4章で詳しく詳述する。本研究では、主に養蚕関連施設の塵埃から BmNPV を検出したため、上蔭室内に置かれている回転蔭や収繭毛羽取機等の立体構造をとる蚕具類の汚染実態は不明である。

次節では、立体構造をとる蚕具から BmNPV を検出する手法を考案し、特に汚染が懸念され、未消毒のまま放置されている収繭毛羽取機のウイルス汚染を調査した。

第2節 PCR法による立体構造物からのウイルス検出法の考案

材料および方法

プライマーの設計

BmNPV を構成する主要キャプシドタンパク p39 遺伝子 (Bp39 遺伝子: Lu and Iatrou, 1996) の塩基配列情報を利用して, Bp39 遺伝子に特異的なプライマーペア (Bp39-1F, Bp39-2R) を設計した (表 8). このプライマーペアの特徴は, アミノ酸レベルで他の核多角体病ウイルスの p39 遺伝子とは異なる塩基配列を持つことである (図 5). プライマーペアの T_m 値は, Bp39-1F で 57°C , Bp39-2R で 63°C と算出されたので, PCR のアニーリング温度は 57°C に設定した.

プライマーの検出感度と PCR の再現性

BmNPV の多角体 (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 および 10^7 多角体/ml) を 100 倍量のアルカリ溶液 ($0.2\text{ M Na}_2\text{CO}_3$, 0.2 M NaCl , 20 mM EDTA , pH 10.8) で溶解した. 次に, 各濃度のウイルス懸濁液 1 ml をチューブ (1.5 ml) に移し換え, $2,100\times\text{g}$ で 10 分間遠心後, 上清 0.1 ml を採取し, 核酸抽出試薬 (ISOGEN, ニッポンジーン社製) でウイルス DNA を抽出・精製した (野口ら, 1998). 常法の PCR 反応液に DNA Taq ポリメラーゼ (TaKaRa EX Taq polymerase, タカラバイオ社製) とプライマーペア (Bp39-1F および Bp39-2R, Invitrogen 社製) を加え, サーマルサイクラー (SP, タカラバイオ社製) を使用して PCR を行った. PCR の設定は, 94°C 1 分間, 57°C 1 分間および 72°C 1 分間で 60 サイクルとした. PCR

表8. カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) を検出するためのプライマーペア

段階	プライマー	塩基配列 ^a	GC (%)	Tm (°C)	DNA 断片長 (bp)
PCR	Bp39-1F	5'-GTATGGCGCCGCGAAAAATG-3'	55	57	1,014
	Bp39-2R	5'-CACTTCCACTTGCTTCGCCGAGAAC-3'	56	63	
Nested-PCR	Bp39-3F	5'-GAGAGTTAACCGCTGCATTTTCGCG-3'	52	61	815
	Bp39-4R	5'-TAAGCGTTCTGTCCAGCTCACGTGT-3'	52	61	

^a BmNPV Bp39遺伝子 (Lu and Iatrou, 1996) の塩基配列から設計した.

		Bp39-1F	
BmNPV	MALMPVGMAP	RKMRVNR CIF ASI VSF DACI TYKSPCSPDA YHDDGWFICN SHL IKRFKMS KMLVLP IFDED DNQFKMTIAR HLVGNKERGI	90
AcNPV	-----V--Q-----	-----N-----	90
OpNPV	---VSP-VSS-R*ST-H---GA-EP-S-V-R---S-SV-----D Y-KL-----Y---Y-R-----H---V		89
BmNPV	KRILIPSATN YQEVFNLSM MQAEQLIFHL IYNNEAAVNV ICDNLKYTEG FTSGKQRVIH SVYATTRSIL DTTNPNTFCS RVS RDEL RFF		180
AcNPV	-----D-----	-----N-----N-----K-----	180
OpNPV	---V-TRA--MT---PG--L-----D-RLE-R--AS--NN-N-IDNTYS-VS---SA--N--SL-D-QAY--AN-DV---		179
BmNPV	DVTNARTR*R GGVDQLFNN YSGFLQNL I* RAVAPEYLQI DTEELRFRNS ATCIIDETGL VASVPDGPEL YNPIRSSDIM KSQLPRLQIR		268
AcNPV	-----AL*--A-----R-----C-----R-----		269
OpNPV	-ANVVDNRRQ A-N-TV---MP---R---R-----T---S-D-L-C-N-V-NN---T-TN*T---V---I-TR-----		268
		Bp39-2R	
BmNPV	NVLKFECDTR ELDRTL RGYE EYPTYVPLFL GYQIINSENN FLRND FISRA NPNATLGGGA LAGPAPGVVL GEASGSVAA		347
AcNPV	-----S-----	-----P-----V-----A*--G-GI-V	347
OpNPV	-----A-E--GR--M-----LV-LG-D I--ANNFLP- PFGVPQAVNN -EAQ--AAPA PA-PAPA-A PVV		351

Lu and Iatrou (1996)

図 5. カイコ核多角体病ウイルス Bp39 遺伝子領域のアミノ酸配列とプライマーの位置.

の増幅産物は、2%アガロースゲル (Agarose S, ニッポンジーン社製) で電気泳動後, UV 照射で確認した. PCR の検出感度の安定性を確認するため, 反復試験 (n=4) を行った.

Nested-PCR の検討

PCR の増幅産物 (1,014 bp) から, さらに 815 bp の塩基配列が増幅されるように, もう一組みのプライマーペア (Bp39-3F, Bp39-4R) を設計した (表 8). このプライマーペアの T_m 値に基づいて, nested-PCR のアニーリング温度を 61°C に設定した. Nested-PCR の設定は, 94°C 1 分間, 61°C 1 分間および 72°C 1 分間で 20 サイクルとした. Nested-PCR の増幅産物は, 先で行った PCR と同一手順で検出した. Nested-PCR の検出感度の安定性を確認するため反復試験 (n=4) を行った. 鑄型には, 先の PCR で得られた各供試濃度の多角体に由来する DNA 増幅産物を用いた.

試料の採取と BmNPV の検出

本章第 1 節でとりあげた養蚕地域から, 2002 年の晩秋蚕期に核多角体病により内部汚染繭が発生した養蚕現場の 6 か所 (D, F, I, H, O および P) から, 試料を採取した. 2003 年の春蚕期消毒前 (4 月下旬) に, 滅菌蒸留水で湿らせた滅菌ガーゼ (8cm 四方の四つ折り) を使用して, 上族室内に設置されている収繭毛羽取機の本体表面同一箇所 (本体上段) を拭き取ることで埃を採取した (図 6). 埃が付着したガーゼを滅菌チューブ (50 ml) へ回収し, -20°C で保存した. ガーゼに付着した埃から BmNPV の DNA を回収するために, ガーゼの入った滅菌チューブにアルカリ水溶液 (0.2 M Na_2CO_3 , 0.2 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 10.8) を 20 ml 加え, 試験管ミキサーで 3 分間かく拌後, 25°C で 5 分間静置した. この

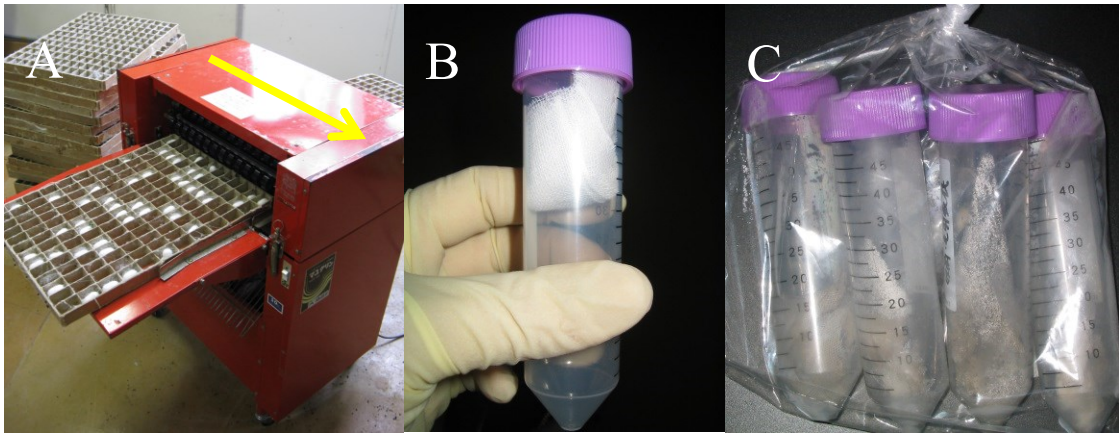


図 6. 収繭毛羽取機からの試料採取法.

A: 収繭毛羽取機. B: 滅菌ガーゼを入れた試料採取用チューブ. C: 採取された試料.

写真 A の黄色い矢印の方向に従って滅菌ガーゼにより試料を採取した.

チューブを $2,100\times g$ で 10 分間遠心後、上清 0.1 ml を採取して核酸抽出試薬 (ISOGEN, ニッポンジーン社製) でウイルス DNA を抽出・精製した。得られた DNA を鋳型として PCR を行い、その増幅産物を用いて nested-PCR を行った。

結 果

プライマーの検出感度と PCR の再現性

BmNPV Bp39 遺伝子の塩基配列から設計された PCR プライマーの検出感度を表 9 に示した。検出感度は、 10^5 多角体/ml が再現のある検出限界であり、それ以下の多角体数では再現性が低かった (表 9, 図 7-A)。次に、nested-PCR プライマーで PCR の増幅産物を増幅した結果、多角体 1 個/ml から、標的塩基配列の増幅が可能となり、再現性も認められた (表 9, 図 7-B)。

PCR 法による収繭毛羽取機からの BmNPV の検出

収繭毛羽取機のウイルス汚染を調べた結果、PCR で BmNPV が検出された養蚕現場は F のみであった (図 8-A)。次に nested-PCR でさらに BmNPV の検出を試した結果、養蚕現場 D, H および O からウイルスが検出され、I でもやや薄いバンドが認められた。養蚕現場 P では、nested-PCR を用いても BmNPV は検出されなかった (図 8-B)。

考 察

本研究では、BmNPV の Bp39 遺伝子領域 (Lu and Iatrou, 1996) の塩基配列に基づいて、PCR と nested-PCR に用いるプライマーペアを設計し、滅菌ガーゼで採取した収繭毛羽取機の埃

表9. カイコ核多角体病ウイルス(BmNPV) Bp39遺伝子領域から設計したプライマーペアの検出感度と再現性

段階	プライマー	N ^a	BmNPV 多角体/ml ^b					サイクル回数	アニーリング温度(°C)	
			1	10	10 ²	10 ³	10 ⁴			10 ⁵
PCR	Bp39-1F Bp39-2R	4	±----	±----	±----	±----	±----	++++	60	57
Nested-PCR	Bp39-3F Bp39-4R	4	++++	++-+	++++	++++	++++-	++++	20	61

^a反復数.

^bアルカリ水溶液(pH 10.8)による100倍希釈後の多角体濃度. アルカリで溶解した多角体溶液0.1 mlからウイルスDNAを抽出し, DNA 溶液1µlに基づいてPCRを行った.

バンドのシグナル強度: 鮮明(+), 不鮮明(±), 不明(-).

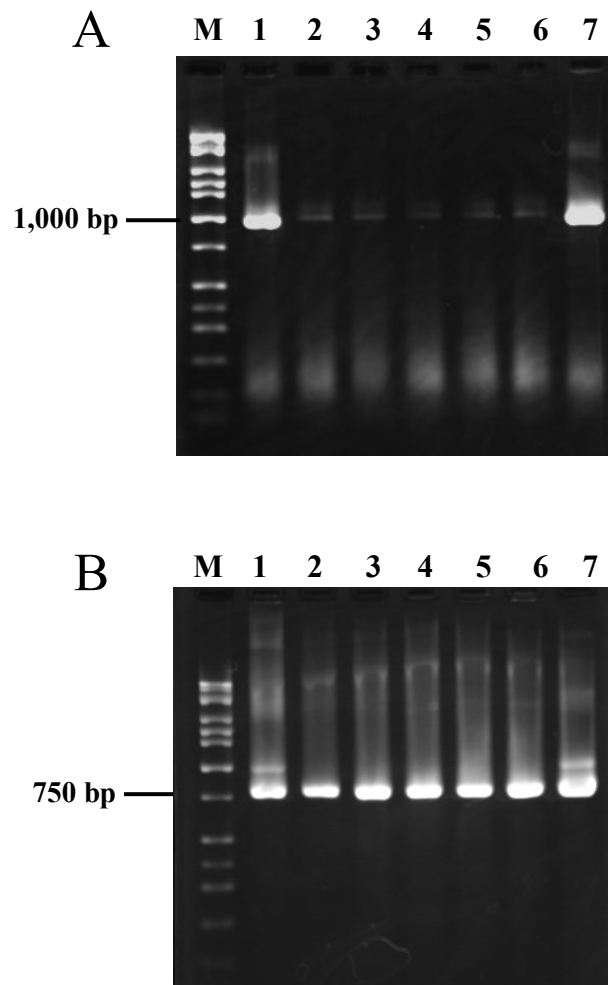


図 7. PCR (A) および nested-PCR (B) によるカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の検出.

M: マーカー, 1: BmNPV ゲノム DNA, 2: 1 多角体/ml, 3: 10 多角体/ml, 4: 10^2 多角体/ml, 5: 10^3 多角体/ml, 6: 10^4 多角体/ml, 7: 10^5 多角体/ml.

PCR プライマー: Bp39-1F, Bp39-2F, Nested-PCR プライマー: Bp39-3F, Bp39-4R.

PCR 反応条件: 94°C 1 分間, 57°C 1 分間, 72°C 1 分間, 60 サイクル.

Nested-PCR 反応条件: 94°C 1 分間, 61°C 1 分間, 72°C 1 分間, 20 サイクル.

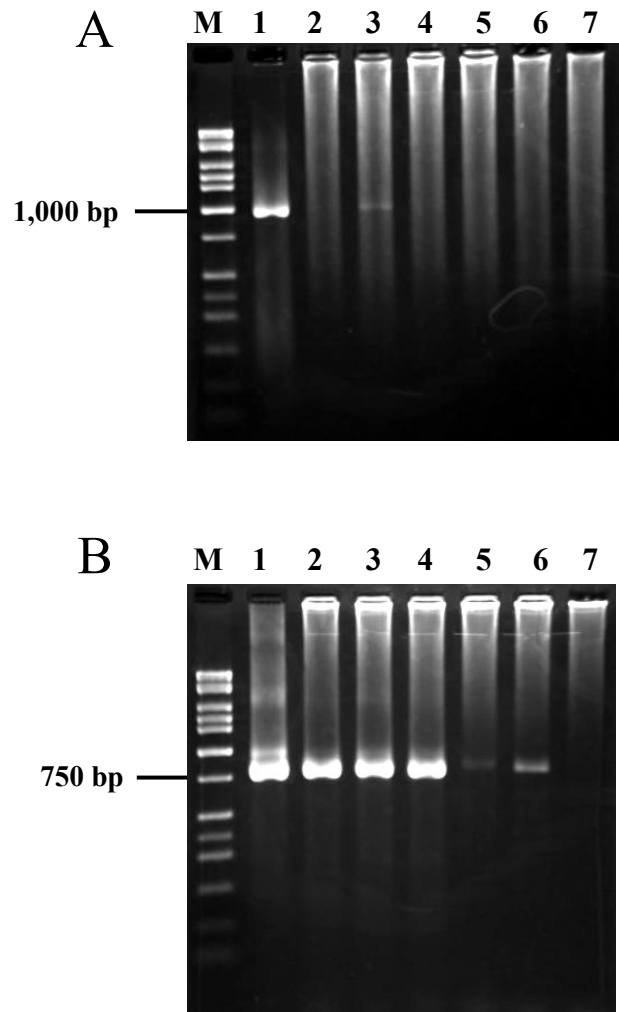


図 8. PCR (A) および nested-PCR (B) による収繭毛羽取機からのカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の検出.

M: マーカー, 1: BmNPV ゲノム DNA, 2: 養蚕現場 D, 3: 養蚕現場 F, 4: 養蚕現場 H, 5: 養蚕現場 I, 6: 養蚕現場 O, 7: 養蚕現場 P.

PCR プライマー: Bp39-1F, Bp39-2F. Nested-PCR プライマー: Bp39-3F, Bp39-4R.

PCR 反応条件: 94°C 1 分間, 57°C 1 分間, 72°C 1 分間, 60 サイクル.

Nested-PCR 反応条件: 94°C 1 分間, 61°C 1 分間, 72°C 1 分間, 20 サイクル.

から BmNPV が検出可能であることを確認した。今回得られた知見から、上蔭室内に置かれている蚕具のうち、洗浄消毒が極めて難しい収繭毛羽取機が BmNPV に汚染されており、ホルムアルデヒドによるガス消毒が実施しにくい現状下において、収繭毛羽取機は BmNPV の温床になりやすい蚕具の一つと考えられる。また、すでに第 1 章で述べたとおり、BmNPV による内部汚染繭が多発しやすい養蚕現場の現状と、本章第 1 節で述べた上蔭室内が最も BmNPV に汚染される可能性が高いという背景から考えると、上蔭室内の消毒作業終了後は、収繭毛羽取機の取り扱いに十分気をつける必要がある。特に配蚕後、養蚕従事者は収繭毛羽取機に接触しない方がよいと考えられる。

PCR 法は、極微量の試料から標的とする塩基配列を数百万倍に増幅する技術である。PCR 法によるカイコ病原性ウイルスの検出は、すでに BmNPV (野口ら, 1994, 1995; 景安ら, 1997)、細胞質多角体病ウイルス (景安ら, 1997)、濃核病ウイルス 1 型および同 2 型 (阿部ら, 1993; 景安ら, 1997) および伝染性軟化病ウイルス (景安ら, 1997) で報告されており、実験室レベルではこれらのウイルスが検出可能である。BmNPV で明らかにされた遺伝子のうち、これまでプライマーの設計に利用された遺伝子は、野口ら (1994) のポリヘドリン遺伝子 (Iatrou et al., 1985) と景安ら (1997) の IE1 遺伝子 (Huybrechts et al., 1992) がある。両遺伝子の塩基配列は、ヨトウガの一種 (*Autographa californica*) の核多角体病ウイルス (AcNPV) の両遺伝子の塩基配列と極めて相同性が高いため、野口・嶋田 (1996) は、プライマーのアニーリング温度を 55°C、PCR の反復回数を 30 回に設定し、この問題の回避を図った。また、景安ら (1997) の設計した BmNPV IE1 遺伝子を検出するために設計したプライマー (NP-1, NP-4) の塩基配列は、AcNPV の同塩基配列部位と 1 塩基の

違いであるため、特異性について改善の余地が残されていた。本研究では、BmNPV に対する特異性を高めるために、BmNPV の主要キャプシドタンパクをコードする Bp39 遺伝子 (Lu and Iatrou, 1996) の塩基配列を用いた。この遺伝子がコードするアミノ酸配列には、AcNPV とドクガ一種 (*Orgyia pseudotsugata*) の NPV (OpMNPV) の同配列部位とは一致しない箇所が多数存在するため (図 5)、この部分に注目することで、BmNPV に対して特異性の高いプライマーが設計できると考えた (表 8)。この部位に基づいて本研究で設計されたプライマーのウイルス検出限界は、多角体数として 10^5 個/ml であり、これ以下では検出不可能であった (表 9)。養蚕現場から集めた試料中に存在する多角体数は未知のため、期待される検出感度の目標を多角体 1 個/ml として、nested-PCR のプライマーを設計した (表 8)。このプライマーペアを用いて PCR の増幅産物を nested-PCR で処理した結果、多角体 1 個に由来する BmNPV から標的塩基配列の増幅が可能となった (表 9, 図 7-B)。この手法を用いて、養蚕現場の上族室内に設置されている収繭毛羽取機から BmNPV の検出を行った結果、PCR 単独の場合では、養蚕現場 F の試料で薄いバンドが検出された他は、検出が困難であった (図 8-A)。そこで nested-PCR を行い、BmNPV の検出を試みた結果、養蚕現場 D, H および O でバンドが検出され、養蚕現場 I で薄いバンドが検出された (図 8-B)。養蚕現場 P では、nested-PCR を用いても BmNPV の標的塩基配列が増幅されていなかったため (図 8-B)、収繭毛羽取機から採取した試料には、多角体が 1 個も付着していなかったと考えられる。これらの結果から、養蚕現場 F の収繭毛羽取機は最も BmNPV に汚染されており、養蚕現場 D, H および O は同程度、養蚕現場 I はやや汚染されていたと推定される。また、BmNPV による収繭毛羽取機の汚染は、回転簇の汚染を間接的に示して

いるため、収繭毛羽取機から BmNPV が検出される場合には、回転簇もウイルスに汚染されていると判断し、防疫対策を検討する必要がある。

本節では、PCR 法による BmNPV の検出法を考案し、養蚕現場の上蔭室内に設置されている収繭毛羽取機のウイルス汚染を明らかにした。養蚕現場では、前節で示したように、上蔭室内の床が BmNPV で汚染されているだけでなく、収繭毛羽取機等の消毒しにくい蚕具類もウイルスに汚染されている。養蚕現場では、これらの未消毒蚕具に BmNPV が温存される可能性があるため、上蔭室内での各種作業（回転簇の組立てや収繭毛羽取機の清掃等）は配蚕前に終了させ、養蚕従事者による蚕室と上蔭室間の往来を遮断する必要があると判断された。さらに年間多回育の慣習で行われてきた上蔭作業終了直後の配蚕も、一定の消毒期間をもうけた配蚕体系に見直す必要がある。

次節では、核多角体病と細胞質多角体病の併発により壊滅的な違作をした養蚕現場をとりあげる。防疫対策導入前後の 2 種ウイルスの分布状況と、各種防疫対策導入後の作柄改善経過を示すことにより、ウイルス病による常習違作を克服した事例を記述する。

第3節 常習違作農家におけるウイルスの汚染状況とその特徴

および消石灰水の導入による防疫効果の検証

材料および方法

養蚕農家

核多角体病と細胞質多角体病の併発により、1999年の初秋～晩々秋蚕期にかけて深刻な違作を経験した常習違作農家を調査対象とした（表12参照）。1999年の年間掃き立て箱数は32箱であった。当時の労働構成は、50代の男女が各1名、70代の女性が1名、および上簇期に女性労働者を1～2名雇う構成であった。この養蚕現場では、消毒剤として、アリバンドを添加した2%ホルムアルデヒド水溶液が使用されていた。消毒剤の散布箇所は、2～3齢用の中蚕室、4～5齢用の壮蚕室（屋外含む）、貯桑場および上簇室であり（図10参照）、施設周辺土壌には散布されていなかった。また、飼育中の防疫対策として、消石灰の粉末が壮蚕室の床に軽く撒かれていた。当時の飼育蚕品種は、春蚕期が“春嶺×鐘月”，夏，初秋，晩秋および晩々秋蚕期が“錦秋×鐘和”であった。いずれの品種も稚蚕共同飼育所で2～3齢の眠期まで飼育されたのち、農家へ配蚕されていた。

消石灰の希釈濃度とpHの関係および経時的安定性の評価

消石灰（水酸化カルシウム）水溶液のpHとその経時的安定性を確認するために、消石灰水溶液（アルカリ成分70%消石灰，エクセル・パル社製）を5段階濃度（0.05%，0.1%，0.5%，1.0%および5.0%（w/v））で調製し、各濃度のpH値を10分，30分，60分および

24 時間後に測定した。各時間に測定した消石灰水の pH 値を Steel-Dwass の多重範囲検定法 ($\alpha=0.05$) で比較した。さらに、pH 値の安定性を調べるため、水溶液の調製から 10 分後および 24 時間後に測定した pH 値を Wilcoxon の符号付き順位和検定法 ($\alpha=0.05$) で比較した。

消石灰水の BmNPV 不活化効果の検証

先の試験と同様に 5 段階濃度 (0.05%, 0.1%, 0.5%, 1.0% および 5.0% (w/v)) で調製した消石灰水溶液を 25°C で 1 時間置いた後、BmNPV の多角体を終濃度が 10^7 個/ml となるように混合し、25°C で 15 分、30 分および 60 分間の浸漬処理を行った。この処理溶液を人工飼料 (シルクメイト 1~3 齢原種用, 日本農産工業社製) 1 g に対して 1 ml の割合で混入し、カイコの孵化幼虫に 24 時間摂食後、清浄な人工飼料に切替えて飼育した。供試蚕品種は、人工飼料育に適した“ひたち×にしき”とし、各区 10 頭の 2 連制で試験を行った。消毒効果の判定は、試験開始から 7 日目までの総発病頭数に基づいた。

2 種多角体病ウイルスの分布調査

防疫対策を検討するために、2000 年の夏~晩々秋蚕期にかけて、常習違作農家の養蚕現場で 2 種多角体病ウイルス (BmNPV および BmCPV) の分布状況を調査した。蚕期の開始前、蚕期の間および収繭直後に、図 10 に示した 20 か所の地点から、採集用具を用いて塵埃 (または表面土壌) を採集し、常法の塵埃添食試験法 (本章第 1 節参照) で、2 種ウイルスの検出を行った。この調査では、試験開始から 7 日目までに致死した個体および発病して苦悶していた個体の組織の塗抹標本を作成し、検鏡により多角体が認められた個体を

核多角体病感染蚕と判定した。試験開始後9日目に生存していた幼虫の中腸組織の塗沫標本を作成し、検鏡により、多角体が認められた個体を細胞質多角体病感染蚕と判定した。

この調査によって、塵埃（または表面土壌）に、BmNPVの存在が確認された場合、もしくは細胞質多角体病で幼虫が1頭でも死亡した場合には“2”を与えた。生物検定から9日目まで核多角体病を発症することなく全ての幼虫が生存し、中腸被膜組織に細胞質多角体が確認された場合には、“1”を与えた。9日間の観察で2種ウイルスが全く検出されなかった場合には、“0”とした。この点数化によって、年間を通してウイルスに汚染されやすい場所を特定し、最も汚染されていた場所に基づいて相対汚染率で表した。また、2001年に同様の方法で、0.5%消石灰水溶液導入後の2種ウイルスの分布状況を調べた。調査を行った蚕期は、春、夏、初秋、晩秋および晩々秋蚕期であった。

防疫対策の実施

2000年に行った2種多角体病ウイルスの分布状況に関する調査の結果に基づいて、2001年に防疫対策を実施した。2000年の調査から、BmNPVは、上蔭室内に分布する傾向が認められたため、回転蔭の組立て作業は、全ての蚕期において配蚕前に済ませるようにした。

また、調査農家では、壮蚕室の2階に上蔭室があるため、収繭直後の清掃作業はBmNPVが階下の蚕室へ拡散する一因と判断し、簡単に済ませるように助言を与え、徹底した清掃作業は、消毒作業終了後に行うように指導した。BmCPVは、2000年に行った調査の結果から、養蚕施設の広い範囲に拡散していることが判明したため、BmCPVにも消毒効果が認められている消石灰水を各蚕期の配蚕前にウイルスが検出された場所へ散布した。調査

農家では、除沙網の消毒が全く行われていなかったため、除沙網を使用した後は、0.5%消石灰水溶液で浸漬消毒するように改めた。従来から行われていた各蚕期のホルマリン消毒は、従来どおり2%ホルムアルデヒド水溶液で行った。

防疫対策導入後の養蚕成績と内部汚染繭の発生調査

防疫対策導入後の作柄改善経過を調査した。収繭量の資料は、土浦地域農業改良普及センターから入手した。一箱あたりの配蚕頭数を2万頭に換算して、各蚕期の収繭量を補正した。各蚕期の単繭重は、繭500粒から推定した1粒重で表した。調査農家で生産された繭の品質を確認するために、大日本蚕糸会蚕糸科学研究所において、各蚕期の繭糸長、繭糸量、繭糸繊度、解じょ率、生糸量歩合および歩掛を調査した。

防疫対策導入後の核多角体病による内部汚染繭の発生状況を確認するために、2002年の春蚕期から2003年の晩秋蚕期にかけて各蚕期の繭を500粒採集し、内部汚染繭の発生率と内部汚染繭の核多角体病発生率を調査した。調査は、第1章第1節で記した方法で行った。

結 果

消石灰の希釈濃度と pH の関係およびそれらの継時的安定性

常習違作の状態にある養蚕現場の防疫対策として消石灰水溶液を導入する前に、消石灰の希釈濃度と pH の関係およびそれらの継時的安定性を評価した。消石灰粉末（アルカリ成分70%）を用いて5段階の濃度の水溶液（0.05%、0.1%、0.5%、1.0%および5.0%（w/v））を調製し、調製から10分、30分、60分および24時間経過後の pH 値を測定した結果、各

濃度区の pH 値は、0.05%、0.1%および0.5%の濃度区間において、いずれの経過時間においても有意な差が認められたが（Steel-Dwass の多重範囲検定、 $p < 0.05$ ）、0.5%以上の濃度区間では、pH 値に有意差が認められなかった（図 9）。次に、各濃度に調製した消石灰水溶液の pH 安定性を確認するために、調製から 10 分および 24 時間経過後の pH 値を比較した結果、いずれの供試濃度においても両時間経過後に有意な差は認められなかった（Wilcoxon の符号付き順位和検定、 $p > 0.05$ ）（表 10）。

消石灰水の BmNPV 不活化効果の検証

BmNPV が完全に不活化される消石灰水溶液の濃度は 0.5%（w/v）以上であり、本試験で供試した 0.1%の濃度では 60 分経過後もウイルスを完全に不活化しなかった（表 11）。この結果に基づいて、養蚕現場に導入する消石灰水溶液の濃度を 0.5%に設定した。

2 種多角体病ウイルスの分布

調査の結果に基づいて、養蚕現場における 2 種多角体病ウイルスの分布状況と相対汚染率を図 10 に示した。2000 年の調査において 2 種ウイルスで最も汚染されていた場所は No. 17 であり、この地点は上蔭室であった。この年のウイルス分布をみると、BmNPV は上蔭室（No. 12～17）、屋外壮蚕室（No.11）および通路の一角（No. 19）から検出された。一方、BmCPV は、養蚕関連施設全域と母屋の玄関前から検出され、BmNPV に比べて拡散範囲が広がった。0.5%消石灰水溶液の導入を開始した 2001 年の調査において 2 種ウイルスで最も汚染されていた場所は、No. 15 であり、この場所は前年と同様に上蔭室であった。この年のウイルス分布をみると、BmNPV は前年同様、上蔭室から検出されており、BmCPV

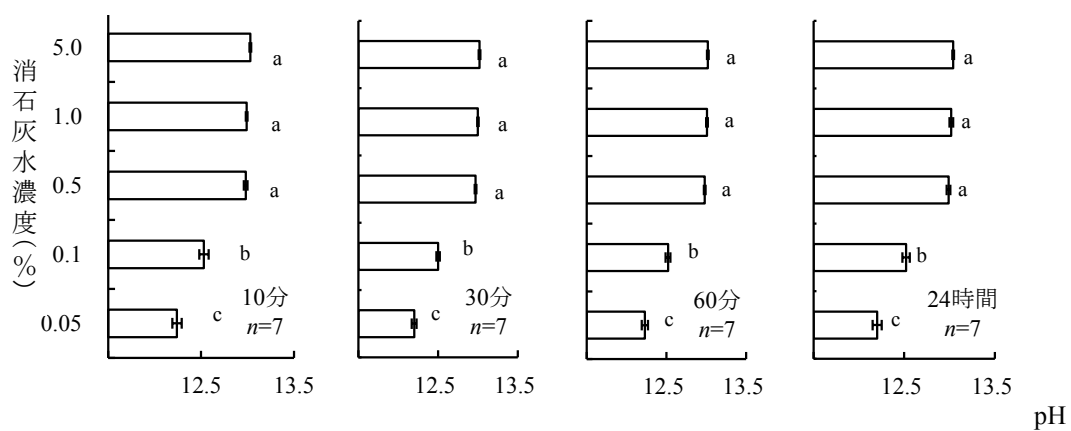


図9. 消石灰水溶液の濃度と pH との関係.

図中の時間は消石灰水溶液調製後の経過時間. n は溶液調製の反復回数を示す. 各図の棒グラフ

に付随した異なる文字間には有意差が認められる (Steel-Dwass の多重範囲検定, $p < 0.05$).

表10. 消石灰水溶液調製後のpH値に及ぼす経過時間の影響

水溶液調製後の 経過時間	各濃度の水溶液のpH ^{a, b}				
	0.05%	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%
10分	12.24 ± 0.05 a	12.53 ± 0.05 a	12.98 ± 0.02 a	12.99 ± 0.01 a	13.03 ± 0.01 a
24時間	12.20 ± 0.05 a	12.52 ± 0.04 a	12.99 ± 0.02 a	13.02 ± 0.02 a	13.04 ± 0.01 a

^a 平均 ± SE ($n=7$).

^b 消石灰水溶液の調製から10分経過後および24時間経過後のpH値には、有意差が認められない(Wilcoxonの符号付き順位和検定, $p>0.05$).

表11. 核多角体病ウイルス(BmNPV)の不活化に及ぼす消石灰水濃度と処理時間の関係

ウイルス ^a	処理時間	n ^b	反復	各消石灰水濃度における発病頭数					
				0%	0.05%	0.1%	0.5%	1.0%	5.0%
BmNPV	15分	10	1	10	9	1	0	0	0
			2	10	6	4	0	0	0
	30分	10	1	10	3	0	0	0	0
			2	10	4	2	0	0	0
	60分	10	1	10	7	0	0	0	0
			2	10	6	2	0	0	0

^a 消石灰水処理後の多角体終濃度: 10^7 多角体/ml.

^b 供試頭数. 蚕品種“ひたち×にしき”の孵化幼虫を用いた.

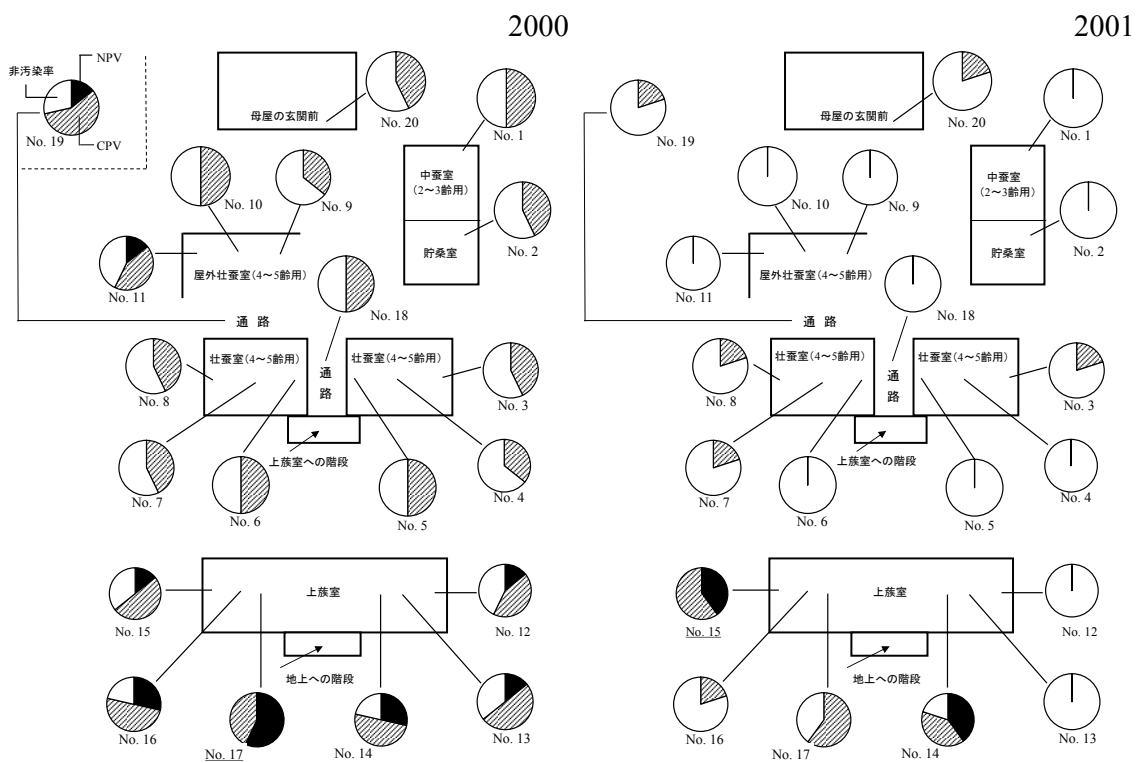


図 10. 1999 年に違作をした養蚕現場における核多角体病ウイルス (BmNPV) および細胞質多角体病ウイルス (BmCPV) の分布状況と相対汚染率.

は上蔭室 (No. 14, 15, 16, 17), 室内壯蚕室 (No. 3, 7, 8), 通路の一か所 (No. 19) および母屋の玄関前 (No. 20) から検出された。前年同様, BmCPV は拡散範囲が広がった。また, 相対的な汚染状況を両年で比較すると, 0.5%消石灰水溶液を導入した 2001 年は, 養蚕関連施設の汚染度が低下した。

防疫対策導入後の養蚕成績と内部汚染繭の発生状況

防疫対策導入後, 常習違作農家の作柄は次第に改善し, 導入から 3 年目の 2003 年度には, 年間 5 蚕期の養蚕が行えるまでに回復した (表 12)。年間あたりの配蚕箱数と総収繭量は, 防疫対策導入 1 年目の 2001 年時点では 635.8 kg/20 箱, 2 年目の 2002 年には 734.4 kg/24 箱, 3 年目の 2003 年には 926.3 kg/28 箱となり, 年間総収繭量は増加した。

第 1 章で行った BmNPV による内部汚染繭の発生調査と並行して, 2002 年の春蚕期から 2003 年の晩秋蚕期にかけて各蚕期の繭を 500 粒採集し, 単繭重と BmNPV による内部汚染繭の発生状況を調査した。単繭重は 2002 年の初秋蚕期 (1.54 g) を除き 1.8~2.2 g の範囲であった (表 13)。また, 各蚕期の内部汚染繭率は, 両年とも初秋蚕期が 5%台の発生率で他の蚕期に比べて高い傾向が認められたが, BmNPV による内部汚染繭の発生は, 2 年間にわたる調査期間中, 全く認められなかった (表 14)。

作柄が改善した養蚕現場の繭品質を確認するために, 2002 年および 2003 年の各蚕期に繰糸検定を行った。その結果を表 15 に示した。蚕品種“春嶺×鐘月”を飼育した春蚕期の検定成績と, 蚕品種“錦秋×鐘和”を飼育した夏~晩秋蚕期の検定成績は, 両年とも養蚕農家で生産される繭の性状としては良好もしくは許容できる値であり, 繭の品質も回復した。

表12. 常習違作農家の作柄改善経過

年度	各蚕期の箱あたり収繭量 (kg) ^{a, b}				
	春	夏	初秋	晩秋	晩々秋
1999	32.6 (8)	26.4 (6)	16.0 (5)	4.9 (8)	0.6 (5)
2000	— ^c	32.6 (5)	29.6 (5)	—	25.2 (6)
2001	40.2 (3)	33.7 (6)	27.2 (5)	—	29.5 (6)
2002	35.2 (7)	24.9 (6)	24.4 (5)	36.1 (6)	—
2003	34.6 (7)	30.2 (6)	33.9 (5)	32.7 (6)	34.3 (4)

^a 飼育蚕品種: 春蚕期 “春嶺×鐘月”, 夏～晩々秋蚕期 “錦秋×鐘和”.

^b カッコ内の数字は配蚕箱数.

^c カイコを飼育しなかった.

表13. 防疫対策導入後の単繭重(g)^a

年度	蚕 期 ^b			
	春	夏	初秋	晩秋
2002	2.18	1.83	1.54	2.09
2003	2.02	2.04	1.84	1.78

^a 繭500粒に基づく推定値.

^b 春: 春嶺×鐘月, 夏～晩秋: 錦秋×鐘和.

表14. 防疫対策導入後の内部汚染菌発生率(%)

年度	各蚕期の内部汚染菌発生率(%) ^{a, b}			
	春	夏	初秋	晩秋
2002	0.6 (0.0)	1.8 (0.0)	5.6 (0.0)	0.4 (0.0)
2003	1.6 (0.0)	0.6 (0.0)	5.0 (0.0)	0.0 (0.0)

^a 菌500粒に基づく割合.

^b カッコ内の数字は内部汚染菌に占める核多角体病の割合(%) .

表15. 繰糸検定による繭の品質評価

蚕 期 ^a	繭糸長 (m)	繭糸量 (cg)	繭糸繊度 (デニール)	解じょ率 (%)	生糸量歩合 (%)	歩掛 (%)
2002年						
春	1,312	42.9	2.95	89.8	20.06	80.9
夏	1,327	35.8	2.43	71.3	19.05	78.1
初秋	1,320	30.8	2.10	68.9	19.34	81.6
晩秋	1,292	39.5	2.75	84.0	18.81	80.0
2003年						
春	1,291	38.8	2.71	86.0	19.13	79.7
夏	1,366	41.8	2.76	88.6	20.47	82.2
初秋	1,407	38.6	2.47	78.2	20.62	83.5
晩秋	1,108	33.1	2.69	89.2	18.56	78.6

^a 春: 春嶺×鐘月, 夏～晩秋: 錦秋×鐘和.

考 察

1999年に、茨城県旧八郷町の養蚕農家で壊滅的な違作が発生した。被害が発生した養蚕現場では、その年の初秋蚕期から核多角体病と細胞質多角体病が併発し、蚕期を重ねるごとに収繭量が減少した結果、晩々秋蚕期には5箱の飼育で収繭量は3kgという深刻な状況に陥った(表12)。表12は、一箱あたりの配蚕頭数を2万頭に換算した場合の収繭量を示しているが、作柄が良好な場合には、最終歩留りを80%、繭1粒を2gとして試算すると、一箱あたりの繭生産量は32kgとなり、5箱の飼育では160kg程度の繭生産量が見込まれる。すなわち、被害が発生した養蚕農家では、本来期待されていた繭生産量のうち、約98%がウイルス病の被害で消失したことになる。カイコのウイルス病の恐ろしさを如実に示した違作事例である。この養蚕現場では、1999年の晩秋蚕期終了後、2%ホルムアルデヒド水溶液で養蚕施設全体(図10)を消毒し、2000年には、年5回行われていた飼育回数を3回に減らして作柄の回復を図った(表12)。しかし、その年の晩々秋蚕期には、調査のため採集した繭500粒のうち44粒(8.8%)からBmNPVが検出され、ウイルス病の被害が沈静する兆しは認められなかった。

2001年度から、消石灰水溶液を用いたウイルス防除の実証試験を行うため、2種多角体病ウイルスの分布傾向に基づいた防疫手段を検討した。2000年の夏蚕期から開始した、養蚕関連施設全域に及ぶ2種ウイルスの分布状況に関する調査の結果から、BmNPVは上蔭室を中心に分布しており、屋外壮蚕室まで拡散する傾向が認められた。この養蚕農家では上蔭期に、屋外壮蚕室(図10, No. 9~11)に熟蚕分離装置を設置して熟蚕収集作業を行う

ため、BmNPV が検出される場所は、上簇作業に関連した場所である可能性が高い(図 10)。

上簇室から BmNPV が検出される明確な理由は本調査からは不明であるが、上簇室内の塵埃から BmNPV が検出される背景としては、上簇室内でカイコが発病しやすい、あるいは、上簇室内の消毒が不十分であるという二つの可能性が考えられる。一方、BmCPV は養蚕関連施設全域に拡散しており、主要な汚染箇所を推定することは困難であった(図 10)。

BmCPV の場合では、活性のあるウイルスが蚕糞とともに排泄されるため(古田, 1963; 渡部 1968)、多量の糞が含まれる蚕沙の処分作業は、BmCPV を施設一帯に拡散する可能性が高いと考えられる。また、BmCPV は、BmNPV に比べてホルムアルデヒドに耐性があり、5%以上のホルムアルデヒド水溶液で完全不活化が達成される(清水, 1983)。そのため、この養蚕現場で用いられてきた 2%ホルムアルデヒド水溶液による消毒作業は、BmCPV に対して消毒効果が不十分であった可能性が高い。

以上の知見に基づいて、2001 年から次の防疫対策を導入した。BmNPV への防疫対策は、上簇室を中心に強化した。すなわち、回転簇の組立ては、配蚕前に済ませておき、カイコの飼育中には上簇室への入室を禁止した。養蚕農家も上簇室内に専用履物を用意して、BmNPV の拡散防止に努めた。また、収繭直後における上簇室内の清掃作業は、階下の壮蚕室にウイルスを拡散する原因となるため、徹底した清掃作業は上簇室内の消毒作業終了後に行った。BmCPV への防疫対策は、蚕糞が含まれる蚕沙の処分に重点を置いた。すなわち、従来から壮蚕室の裏で行われていた蚕沙の焼却処分を、壮蚕室から離れた場所で行うように変更した。さらに、この養蚕農家では、焼却不十分な蚕沙を桑園に投入する習慣があったため、蚕沙の桑園投入を禁じて BmCPV による桑の汚染を防止した。また、この

養蚕現場では、屋内壯蚕室の洗浄ができない構造であったため、壯蚕室の周囲に排水溝（U字溝）を設け、0.5%消石灰水溶液で洗浄後、排水できるように改善した。上記のとおり両ウイルスへの防疫対策を導入した上で、室内試験により BmNPV に対して不活化効果が認められた 0.5%消石灰水溶液（表 11）による消毒を 2001 年から導入した。春蚕期の開始直前および各蚕期の終了直後に、養蚕関連施設と作業動線上へ 0.5%消石灰水溶液を散布した結果、2001 年には、養蚕関連施設と作業動線上のウイルス汚染は改善される傾向が認められた（図 10）。このように各種の防疫対策を導入した場合でも BmNPV は上蔭室内から検出されるため（図 10）、本章第 1 節および第 2 節でも指摘したように、BmNPV の防疫対策は、上蔭室内の防疫管理を主体とすべきであり、上蔭室内で BmNPV を効果的に消毒しながら室外へウイルスを拡散させない措置をとることが重要であると考えられる。

2002 年および 2003 年も、2001 年と同様に防疫管理を継続した結果、内部汚染繭に占める核多角体病の割合は、各蚕期に採集した繭 500 粒の調査において 0%になり（表 14）、収繭量（表 12）、単繭重（表 13）および各種繰糸成績（表 15）は、優良な繭を生産する養蚕農家とほぼ同一のレベルにまで回復した。第 1 章 第 1 節の表 1 に示した旧八郷町の養蚕現場 N は、本節でとりあげた養蚕現場であり、核多角体病による内部汚染繭が最も多発する晩秋蚕期に、核多角体病による内部汚染繭の割合が 0%であったことは、この養蚕現場に導入した防疫対策が核多角体病の防除に寄与したことを示している（第 1 章 第 1 節, 表 1）。

以上、本章 第 3 節では、核多角体病と細胞質多角体病の併発により、壊滅的な被害が発生した養蚕現場の作柄改善事例を示した。深刻な違作が発生した場合でも、ウイルスの種類と分布傾向に則した適切な防疫対策を導入することにより繭の作柄と品質は改善され、

核多角体病による内部汚染菌の発生も防げることを明らかにした。

本章 第 3 節で防疫対策を実施した 2001 年当時は、蚕病を防ぐ手段として 2%ホルムアルデヒド水溶液の大量散布は容認されていた。しかし、現在は、法律による規制のため、ホルムアルデヒド水溶液を大量に調達して用いることは極めて困難である。そこで次章では、ホルムアルデヒド水溶液に代わる新たな消毒技術として、次亜塩素酸ナトリウムを用いる方法を検討し、実用化に必要な剤の組成を決定した経緯を記述する。

摘 要

第1章で核多角体病による内部汚染繭の発生調査を行った茨城県南地域の養蚕現場13～16か所を対象に、養蚕関連施設のBmNPV分布状況を調査した。春蚕期の消毒作業が始まる直前と、春、夏、初秋および晩秋蚕期の収繭直後に、蚕室、上蔭室、貯桑場および母屋の玄関前から塵埃を採取し、添食試験法によりウイルスの検出を行った。その結果、春蚕期の開始直前から晩秋蚕期の収繭直後まで上蔭室からBmNPVが検出される養蚕現場が多かった。この結果から、上蔭室はBmNPVに最も汚染されやすい場所であると推定した。

上蔭室内に置かれている蚕具の中で、未消毒のまま放置されている収繭毛羽取機の汚染状況を確認するために、BmNPVのp39遺伝子から特異性の高いプライマーを設計し、採取した埃の試料から抽出したDNAを鋳型としてPCRおよびnested-PCRを行った。その結果、収繭毛羽取機もBmNPVに汚染されていることが判明した。養蚕現場では1台の収繭毛羽取機で繭を集めるため、収繭毛羽取機のウイルス汚染対策も必要であると判断した。

核多角体病と細胞質多角体病の併発により壊滅的な違作をした養蚕現場において、2種ウイルスの分布状況を防疫対策導入前後に調べた結果、BmNPVは主に上蔭室から検出されており、本章第1節の調査結果と一致した。一方、BmCPVは、養蚕関連施設全域から検出され、BmNPVに比べて汚染の範囲が広がった。この養蚕現場の作柄を改善するために、上蔭室を中心とした各種防疫対策の導入と、BmNPVに消毒効果が認められた0.5% (w/v) 消石灰水溶液の利用を勧めた結果、違作を克服し、繭の作柄と品質が回復した。この養蚕現場は、第1章第1節の表1に示した養蚕現場Nであり、核多角体病による内部汚染繭の発生も治まった。

第3章 次亜塩素酸ナトリウムを含有する核多角体病ウイルス不活化剤の開発

第1章で明らかにしたとおり、カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) は養蚕現場の繭生産に深刻な被害を及ぼすため、第2章で推定した養蚕現場における BmNPV の汚染箇所を適切な手段で消毒する必要がある。第2章第3節で使用した消石灰水溶液は、BmNPV およびカイコに病原性を示す各種ウイルスに対して優れた消毒効果を示すが (山崎ら, 1966; 柏村・荒武, 1977; 森田・国見, 1979, 1983; 岩下・周, 1988; 周ら, 1999), その一方でカイコに感染する各種糸状菌や芽胞を形成する卒倒菌 (*Bacillus thuringiensis*) には消毒効果を示さない (柏村・荒武, 1977; 森田・国見, 1979, 1983)。そのため、消石灰水溶液のみに依存した蚕病防除は好ましい防疫管理体制とはいえない。これに対して、ホルムアルデヒド水溶液 (ホルマリン) は各種蚕病病原に対して優れた消毒効果を示すため、養蚕現場の消毒薬として長年使用されてきた。一方、2006年にはいり、世界保健機関の下部研究組織である国際がん研究機関 (IARC) がホルムアルデヒドのヒトに対する発がんリスクを従来のグループ 2A (発がん性の疑いあり) からグループ 1 (発がん性あり) に修正したことにより (IARC, 2006), 日本国内ではホルムアルデヒドが特定化学物質第2類の特定管理物質に指定された。このため、我が国では、ホルムアルデヒドに代わる代替剤への切り替えが進められており、養蚕分野においても早急にホルムアルデヒドに代わる消毒薬を開発する必要がある。

本章で扱う次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) は、ホルムアルデヒドのように消毒可能な対象病原の範囲が広く (金子, 1966), 殺菌作用と洗浄作用を併せ持つ塩素系の薬剤として

知られているが (Urano and Fukuzaki, 2005; Fukuzaki, 2006), NaClO 水溶液を養蚕分野で消毒薬として使用するためには, 解決すべき課題がいくつか残されている. 第一に, 多角体に包埋された BmNPV が不活化されにくいことである (古田, 1994). 生成されたばかりの新鮮な NaClO 溶液には溶存する水酸化ナトリウムが少ないため, 多角体を溶解するために必要な pH に到達せず, BmNPV が不活化されにくい. 第二に, 弱酸性を示す人工飼料のような有機物と反応して NaClO 水溶液の pH が容易に下がるため, さらに多角体の溶解を困難にすることである. 第三に, 鉄を腐食する作用が極めて強く, NaClO 水溶液の濃度が高いほど腐食の影響が顕著に表れることである. NaClO には, 養蚕分野で使用するうえでこれらの致命的な欠点があり, これらの欠点を克服しなければ, 養蚕分野で実用化することは困難であるといつてよい.

本章では, NaClO の実用化を可能とした研究成果を記述する. 第 1 節では, 炭酸ナトリウム (Na_2CO_3) を用いて NaClO による BmNPV の不活化を可能とした経緯を詳述する. 第 2 節では, テトラポリリン酸ナトリウム ($\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$) による防錆効果が NaClO と Na_2CO_3 の共存下で発揮される知見を詳述する. とくにこの節には, 3 種薬剤混合液へ鉄の刃片を浸漬したことにより偶然発見した新知見が含まれており, この発見がなければ, 第 4 章に続く「養蚕用除菌洗浄剤の実用化」は不可能であったといえる.

第1節 次亜塩素酸ナトリウムと炭酸ナトリウムの相乗効果を利用した

カイコ核多角体病ウイルス不活化促進法の考案

材料および方法

カイコとウイルス

生物検定には、広食性蚕品種“ひたち×にしき”の孵化幼虫を用いた。供試ウイルスは、茨城県旧八郷町の違作農家（第2章 第3節参照）から分離した BmNPV（IS-Y 株）を利用した。試験に使用する前に、ウイルス懸濁液を 1.05×10^8 多角体/ml の濃度に調製し、Spearman-Kärber 法（Evans and Shapiro, 1997）によりウイルスの感染力価を調べた。その結果、カイコ孵化幼虫の半数致死濃度（ LC_{50} ）は、 7.1×10^3 多角体/ml と推定された。この感染力価のウイルス懸濁液を下記の試験に用いた。なお本節で表記する BmNPV は全て多角体包埋型のウイルス粒子のことである。

供試薬剤と遊離塩素濃度の測定

炭酸ナトリウム（ Na_2CO_3 、試薬特級、和光純薬社製）と次亜塩素酸ナトリウム溶液（NaClO、有効遊離塩素濃度 5%以上、和光純薬社製）を使用した。NaClO 溶液については、下記の試験を始める前に、残留塩素濃度計（PC compact, Aqualytic 社製）を用いて原液中の有効遊離塩素（Free available chlorine, FAC）濃度を測定し、FAC 濃度が 50,200 ppm であることを確認したうえで目的濃度に希釈した。

生物検定による不活化促進作用の検証

濃度の異なる Na_2CO_3 水溶液で NaClO 溶液を希釈することにより、BmNPV の不活化がどの程度まで促進されるのか調査した。滅菌した脱イオン蒸留水（以後、滅菌蒸留水）で調製した各濃度の Na_2CO_3 水溶液（0.05%、0.1%、0.2% および 0.3% (w/v)）を用いて、 NaClO を目的とする FAC 濃度（100 ppm、250 ppm および 500 ppm）に希釈した。調製した供試薬液 0.9 ml と BmNPV 懸濁液（ 1.05×10^8 多角体/ml）0.1 ml を 1.5 ml のチューブに入れて室温下で 5 分間処理した後、ウイルスと薬液の混合液を滅菌蒸留水で 10 倍に希釈した。その液 0.1 ml を人工飼料の小片（2 cm×2 cm、厚さ 0.1 cm、シルクメイト 1~3 齢原種用、日本農産工業社製）上に等しく滴下して 10 分間置いた後、20 mg に秤量したカイコ孵化幼虫に摂食させた。24 時間後、飼料を摂食した供試幼虫から 30 頭を採取して清浄飼料に移した。生物検定の開始から 7 日間におけるカイコの発病頭数を調査した。全ての生物検定は 3 連制で 3 回調査した。飼育環境は 25°C、16L8D とした。

BmNPV に対する不活化力

0.3% Na_2CO_3 水溶液で調製した、FAC を 100 ppm 含有する NaClO 水溶液を用いてカイコ孵化幼虫の LC_{50} を調査した。BmNPV の多角体懸濁液（ 1.02×10^9 多角体/ml）1 ml を供試薬液 9 ml と 5 分間作用させ、滅菌蒸留水で 10 倍に階段希釈した各濃度のウイルス液（ $1.02 \times 10^8 \sim 1.02 \times 10^0$ 多角体/ml）0.1 ml を用いて前記と同様の生物検定を行った。各処理区の発病頭数を確認後、Spearman-Kärber 法（Evans and Shapiro, 1997）で LC_{50} を算出し、この値の対数値を BmNPV に対する不活化力の指標とした。対照薬剤には 2.5%ホルムアルデヒド水溶液を用いた。

薬液の pH 緩衝作用と BmNPV の不活化に及ぼす人工飼料の影響

弱酸性物質を含む人工飼料の粉末が蚕室内に散在している場合を想定し、その条件下において Na_2CO_3 水溶液で希釈した NaClO に pH 緩衝作用と BmNPV への不活化作用が見られるか調査した。100 ppm の遊離塩素を含む NaClO 水溶液と、0.3% Na_2CO_3 水溶液で調製した同水溶液を各 1 L 調製し、湿体人工飼料の乾燥粉末（以後、人工飼料粉末）を 1 g および 5 g 混合した後の pH の経時的変化を測定した。pH の測定は、試験開始直後から 5 分、10 分、15 分、30 分および 60 分後に行った。

0.3% Na_2CO_3 水溶液を用いて FAC 濃度の異なる 3 つの NaClO 水溶液（100 ppm, 250 ppm および 500 ppm）を調製し、人工飼料粉末を 1 g/L および 5 g/L の割合で混合し、5 分後に各上澄み液を採取して BmNPV の不活化状況を先の生物検定法で確認した。

なお本試験では、薬液 1 L に対して人工飼料粉末を 1 g および 5 g 加えているが、これは実用現場におけるホルマリンの散布量が従来から蚕室面積 1 m^2 あたり 1 L を基準としており、その単位面積に人工飼料の微小粉末が 1~5 g の範囲で散在する場面を想定したことによる。

結 果

生物検定による不活化促進作用の検証

2 種薬剤による BmNPV の不活化促進作用について調査した結果を表 16 に示した。BmNPV は、 NaClO の希釈に用いた Na_2CO_3 水溶液の濃度が高くなるほど、低濃度の FAC で不活化された。すなわち、0.3% Na_2CO_3 水溶液で NaClO を 500 倍に希釈した場合、FAC

表16. NaClOとNa₂CO₃の混合液によるBmNPV不活化促進作用の検討

NaClOに含まれる 遊離塩素濃度 ^a (ppm)	n ^b	実験	核多角体病によるカイコ1齢幼虫の死亡頭数 ^c				
			Na ₂ CO ₃ (%) (w/v)				
			0	0.05	0.1	0.2	0.3
			反復 1, 2, 3	反復 1, 2, 3	反復 1, 2, 3	反復 1, 2, 3	反復 1, 2, 3
500	30	1	30 30 30	30 27 27	0 0 0	0 0 0	0 0 0
		2	30 30 30	30 30 30	0 0 0	0 0 0	0 0 0
		3	30 30 30	30 30 30	0 0 0	0 0 0	0 0 0
250	30	1	30 30 30	30 30 30	28 30 28	0 0 0	0 0 0
		2	30 30 30	30 30 30	30 29 30	2 5 7	0 0 0
		3	30 30 30	30 30 30	28 29 30	0 0 2	0 0 0
100	30	1	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30 30 30	0 0 0
		2	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30 30 30	0 0 0
		3	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30 30 30	0 0 0
0	30	1	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30 30 30
		2	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30 30 30
		3	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30 30 30

^a各濃度のNa₂CO₃水溶液で調製した.

^bカイコ孵化幼虫の供試頭数. 品種は“ひたち×にしき”.

^c人工飼料を用いた生物検定法による試験開始から7日間の死亡頭数. 試験環境は, 25°C, 16L-8Dとした.

100 ppm で BmNPV が不活化されていた。一方、100~500 ppm の FAC を含有する NaClO 水溶液と、0.05~0.3% の Na₂CO₃ 水溶液をそれぞれ単独で用いて BmNPV を処理した場合、ウイルスは全く不活化されていなかった。

BmNPV に対する不活合力

0.3% Na₂CO₃ 水溶液で調製した FAC 100 ppm を含有する NaClO 水溶液で多角体懸濁液を 5 分間処理した場合、カイコ孵化幼虫の LC₅₀ 値は 2.0×10^8 多角体/ml 以上となり、その値は 2.5%ホルムアルデヒド水溶液で多角体を処理した値 (1.7×10^4 多角体/ml) の約 1 万倍に相当した (表 17)。

薬液の pH 緩衝作用と BmNPV の不活化に及ぼす人工飼料の影響

薬液の pH 安定性に関する試験の結果を図 11 に示した。FAC 100 ppm を含有する NaClO 水溶液に人工飼料粉末を 1 g/L の割合で加えた場合、試験直後に pH 10.6 を示したのち、時間の経過とともに pH は緩やかに低下して 60 分経過後に pH 9.8 を示した。FAC 100 ppm の NaClO 水溶液に人工飼料粉末を 5 g/L の割合で加えた場合には、5 分後に溶液の pH は 7.9 まで急減し、60 分経過後に pH 6.8 を示した。一方、0.3%Na₂CO₃ 水溶液で調製した同塩素濃度の NaClO 水溶液では、人工飼料粉末を 5 g/L の割合で加えた場合でも、60 分経過後の水溶液は pH 10.9 を示しており、pH の急激な低下は認められなかった。

BmNPV の不活化促進作用とその安定性に及ぼす人工飼料の影響を表 18 に示した。0.3% Na₂CO₃ 水溶液を用いて FAC 濃度の異なる 3 つの NaClO 水溶液 (100 ppm, 250 ppm および 500 ppm) を調製し、人工飼料粉末を 1 g/L および 5 g/L の割合で 5 分間混合したのちに、

表17. BmNPVに対する不活化力の比較

供試薬剤 ^a	Log LC ₅₀ (多角体/ml) ^b
NaClO 100 ppm + 0.3% (w/v) Na ₂ CO ₃	> 8.30
2.5%ホルムアルデヒド	4.23
滅菌蒸留水	4.21

^a 多角体懸濁液 (1.02×10⁹ 多角体/ml) 0.1 mlを各供試薬剤0.9 mlで5分間処理した.

^b Spearman-Kärber 法で推定されたカイコ1齢幼虫の半数致死濃度.

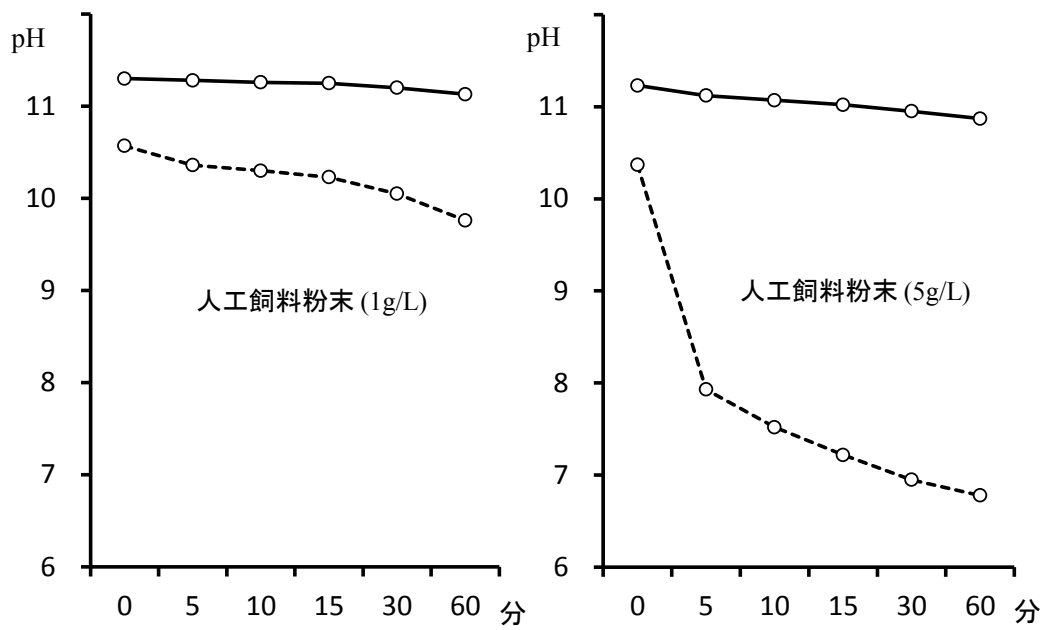


図 11. 有機物存在条件下における NaClO と Na₂CO₃ 混合液の pH 安定性.

— : NaClO 水溶液(遊離塩素濃度 100 ppm) + 0.3% (w/v) Na₂CO₃.

--- : NaClO 水溶液(遊離塩素濃度 100 ppm).

表18. 有機物存在条件下におけるNaClOとNa₂CO₃混合液のBmNPV不活化状況

NaClOに含まれる 遊離塩素濃度 ^a (ppm)	n ^b	核多角体病によるカイコ1齢幼虫の死亡頭数 ^c					
		1 g/L ^d			5 g/L ^d		
		反復 1, 2, 3			反復 1, 2, 3		
500	30	0	0	0	0	0	0
250	30	1	0	0	1	3	3
100	30	1	0	0	2	6	8
0	30	30	30	30	30	30	30

^a 0.3% (w/v) Na₂CO₃水溶液で調製した.

^b カイコ孵化幼虫の供試頭数. 品種は“ひたち×にしき”.

^c 人工飼料を用いた生物検定法による試験開始から7日間の死亡頭数. 試験環境は, 25°C, 16L-8D.

^d 2種薬剤混合液に加えた人工飼料乾燥粉末の添加量.

各上澄み液を採取して BmNPV に対する不活化作用を先と同一の生物検定法で調べた結果、人工飼料粉末を 1 g/L の割合で混合した場合には、FAC 500 ppm の試験区では BmNPV の完全不活化が認められ、FAC 100 ppm および同 250 ppm 処理の場合でもウイルスはほぼ不活化された。一方、人工飼料粉末を 5 倍の量 (5 g/L) に増やした場合には、FAC 500 ppm の試験区では BmNPV が完全に不活化されたが、FAC 100 ppm および同 250 ppm 処理では、人工飼料粉末を 1 g/L 加えた場合に比べてウイルスの不活化促進作用が低下した。

考 察

NaClO を 0.1% 以上の Na₂CO₃ 水溶液で希釈すると、加えた濃度に比例して BmNPV に対する不活化作用が促進され、0.3% Na₂CO₃ 水溶液による希釈では、100 ppm の FAC でも BmNPV が不活化されるようになり (表 16)、その不活化作用は 2.5% ホルムアルデヒドよりも迅速で強力であった (表 17)。この 2 種薬剤混合液は、人工飼料のような弱酸性の有機物が存在する条件下でも pH を安定化させ (図 11)、BmNPV を不活化することが可能であった (表 18)。

NaClO は、消毒可能な対象病原の範囲が広い (金子, 1996)、一般的にどのような病原体にも効果があると理解されている。しかし、多角体を形成する BmNPV は例外であり、FAC 500 ppm を含有する NaClO 水溶液では BmNPV を不活化できなかった (表 16)。このことは NaClO 水溶液が多角体を溶解しにくいことに起因すると考えられる。古田 (1994) は、多角体の溶解性に及ぼす NaClO 濃度の影響を調べたところ、2.5% NaClO 水溶液 (体積百分率) は多角体を全く溶解せず、5% 以上の水溶液で多角体の一部溶解または

変形が認められるようになり, 25%水溶液で多角体は溶解したと報告している. 古田(1994)の研究では, BmNPV の多角体が溶解するために NaClO 原液の 4 倍希釈液が必要であった. また, イラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* の NPV を用いて多角体の溶解性と NaClO 濃度の関係を詳細に調べた Ignoffo and Dutky (1963) の研究によると, 多角体が完全に溶解するためには, 5,000 ppm の水溶液で 2 分, 1,000 ppm の水溶液で 12 分, 500 ppm の水溶液で 22 分必要とすることが示されている. さらに Ignoffo and Dutky (1963) は生物検定により NaClO による NPV の不活化状況も調べているが, 5,000 ppm の水溶液で多角体を 5 分間処理した場合でも, ウイルス粒子を完全に不活化しなかった. これらの報告は, 純粋な NaClO 溶液が一般的に NPV の多角体を溶解しにくい薬剤であり, ウイルス粒子を不活化するためには, 高濃度の NaClO 水溶液が必要であることを示している. 本章第 1 節で明らかにした重要な知見とは, すなわち NaClO 溶液に Na_2CO_3 水溶液を加えることにより, 低濃度の FAC で BmNPV の不活化を可能とした点である. この手法により, BmNPV の不活化に必要な FAC 濃度を大幅に低減できるため, 本章第 2 節で記述する鉄の腐食を抑制するための諸条件を検討することも可能となった. この点については次節で詳述する.

蚕病防除でこれまで使用されてきたホルムアルデヒドの散布濃度は 2~3% の範囲が通例であり, その濃度の範囲において高濃度の BmNPV 多角体を完全に不活化する作用時間は 30 分であり (清水, 1983; 国見ら, 1985; 鈴木, 1991), 5 分ではほとんど不活化せず 10 分で完全に不活化するという報告事例もある (伊藤, 2001). 本研究においても BmNPV は 2.5%ホルムアルデヒドの 5 分間処理では全く不活化せず, 伊藤 (2001) の報告を支持する結果となった (表 17). 一方, 0.3% Na_2CO_3 で調製した FAC 100 ppm を含有する NaClO

水溶液は、多角体に包埋された BmNPV をわずか 5 分で不活化し、2.5%ホルムアルデヒド水溶液に比べて、BmNPV に対する不活化力は迅速で強力であった(表 17)。この結果から、NaClO と Na₂CO₃ の混合液は、BmNPV に対してホルムアルデヒドと同等以上の消毒効果が期待できると考えられる。

養蚕現場の蚕病防除で NaClO と Na₂CO₃ の混合液を用いる場合、この薬液の特性は Na₂CO₃ の添加によって補われたアルカリ作用によって BmNPV の多角体を溶解し、包埋体由来のウイルス粒子を NaClO で不活化する点にある。そのため、飼育環境中に存在する残沙や塵埃等が pH の低下要因となり BmNPV の不活化を阻害する可能性がないか検討する必要があった。特に注意を要する残沙は、弱酸性物質を含む人工飼料である。本研究では、蚕室内に人工飼料の微量粉末が散在する場合を想定して薬液の pH 安定性(図 11)と BmNPV への不活化効果(表 18)を確認した。その結果、0.3%Na₂CO₃ で調製した FAC 100 ppm を含有する NaClO 水溶液は、人工飼料粉末と接触してから 60 分経過後も pH は安定しており(図 11)、蚕室 1 平方メートル当たり 1~5 g の範囲で人工飼料の粉末が存在した場合でも薬液の pH はアルカリ側に保たれると考えられる。また、BmNPV に対する不活化促進作用は、人工飼料の粉末量が 1g/L の場合には室内試験の結果(表 16)をよく反映していたが、5 倍の量の人工飼料粉末を加えた場合には薬液の BmNPV 不活化促進作用がやや阻害されたため(表 18)、本研究手法で調製される薬液の効果を引き出す散布場所は、ある程度の清浄環境を保てる蚕室、例えば稚蚕室や有用物質を生産するカイコの蚕室などが理想的な場所と考えられる。

NaClO によるウイルスの不活化は、NPV の他にも広く認められている。例えば、BmNPV

と同じ科に属しているエビのバキュロウイルスの一種 (Chang et al., 1998) や、ヒトに感染する B 型肝炎ウイルス (Payan et al., 2001), エイズウイルス (Spire et al., 1984; Aranda-Anzaldo et al., 1992) およびサーズコロナウイルス (Wang et al., 2005) なども NaClO で不活化される。また, Sanekata et al. (2010) の報告によれば, ネコカリシウイルス, ヒトインフルエンザウイルス, イヌジステンパーウイルス, ヒトヘルペスウイルス, ヒトアデノウイルス, イヌアデノウイルスおよびイヌパルボウイルスも NaClO で不活化される。このように NaClO は, ウイルスの種類を問わずに不活化効果を示すため, ウイルス全般に効果を示す優れた不活化剤であると考えられる。

NaClO は, これまで負の側面として, 多角体に包埋された BmNPV が不活化されにくいという点や, 鉄を腐食する点などが強調され続け, 養蚕現場でこの剤を使用することはむしろ禁忌とされてきた。このため, 養蚕分野では, NaClO を消毒剤として使用するための組成の検討は十分に行われていなかったといつてよい。次節では, 本章第 1 節で明らかにした手法を更に発展させ, NaClO を含有するにも関わらず鉄の腐食が抑制可能となる剤の組成を明らかにした経緯を記述する。

第2節 ポリリン酸ナトリウムによる防錆効果の増強

防錆効果の発見経緯

本章第1節で明らかにした2種薬剤（次亜塩素酸ナトリウム NaClO および炭酸ナトリウム Na_2CO_3 ）の相乗効果により、低濃度の NaClO で BmNPV の不活化が達成された。この方法により鉄の腐食に影響する有効遊離塩素（FAC）濃度を下げることができるため、防錆効果を補う薬剤を添加することにより鉄の腐食を抑制することが可能になるのではないかと考えた。その候補となりえる薬剤を検索したところ、ポリリン酸ナトリウムの一種であるテトラポリリン酸ナトリウム（ $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ ）が銅および鉄に対して防錆効果を示すことが判明し（Desai et al., 1971）、この薬剤を NaClO と Na_2CO_3 の混合液に加えれば多少なりとも防錆効果が得られるのではないかと考えた。そこで試験的に 0.3%（w/v） Na_2CO_3 で調製した NaClO 水溶液（FAC 250 ppm）に 0.5%（w/v） $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ を加えて3種薬剤混合液を調製し、実験室に放置されていたカッターナイフの刃を同水溶液に一晩浸漬したところ、刃片の腐食が全く認められないことに気がついた。再度この現象を確認するために、同水溶液を調製し、対照区に NaClO 水溶液（FAC 250 ppm）を用意して再試験を行った結果、3種薬剤混合液に浸漬したカッターナイフの刃片は全く腐食せず、 NaClO 水溶液に浸漬した同刃片は著しく腐食することが判明した。この現象を応用すれば、金属に対して極めて腐食作用が強い NaClO を蚕病防除に使用できる可能性があるかと判断し、本節では $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ の防錆特性と3種薬剤混合液に加える至適濃度等を調査した。

材料および方法

供試薬剤

防錆効果の検証試験には、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO, FAC 5%以上, 和光純薬社製), 炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 , 試薬特級, 和光純薬社製) およびテトラポリリン酸ナトリウム ($\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$, 食品添加物用, 燐化学工業社製) を使用した。試験に用いた NaClO 水溶液は、蚕病防除で実用化を想定している FAC 濃度 (240 ppm) よりもわずかに高い濃度 (337.2 ppm) で調製した。薬液は全て脱イオン水で調製した。カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) に対する不活化効果の検証試験では、実用化を想定し、食品添加物に指定されている NaClO (アサヒラック, 食品添加物用, FAC 12%以上, 高杉製薬社製) の 500 倍希釈液 (FAC 286 ppm) と Na_2CO_3 (食品添加物用, 純度 99.5%, 高杉製薬社製) を用いて試験を行った。本研究では、重量/体積百分率 (%) で Na_2CO_3 と $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ を調製した。

簡易検定法の考案による防錆効果の検証

防錆効果の検証のために、市販のカッターナイフの刃 (鉄 97%, 炭素 1.3%, その他 1.7%, オルファー社私信) を用いる簡易検定法を考案した (図 12)。この方法は、カッターナイフの刃の表面に塗布されている油性の防錆剤を 99.5% エタノールに浸漬して除去したのち、蓋付きの 1.5 ml チューブに刃の断片 (以後、金属片) 1 枚と供試薬液 1ml を加えて、25°C の保温器に 24 時間静置した後に供試金属片の腐食の有無を確認する簡易な検定法である。この検定法により供試金属片に黄褐色の腐食が全く認められなかった場合には、供試薬液に防錆効果があると判定し (図 12), 次の試験を行った。

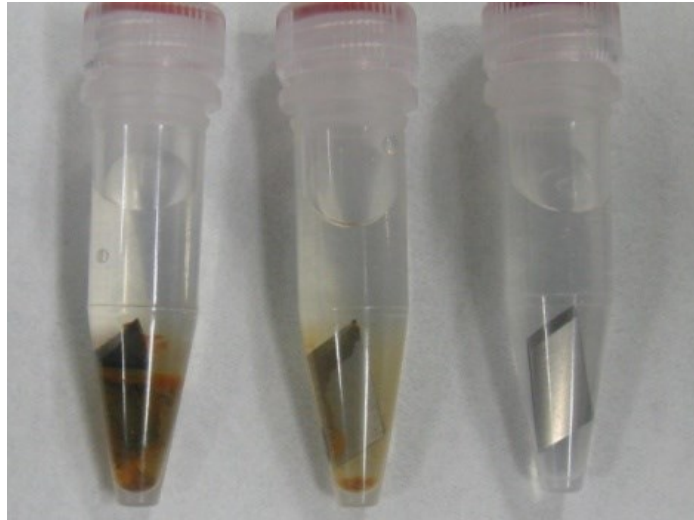


図 12. 防錆効果を検証するための簡易検定法.

1) $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ の防錆特性

NaClO 水溶液中で、鉄の腐食を抑制するために必要な $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ 濃度を調べた。調査濃度は 0.3~1.2% の範囲とし、対照区は脱イオン水処理とした。

2) Na_2CO_3 と $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ の添加による防錆効果の増強作用

各種濃度の Na_2CO_3 (0.1~0.4%) と $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ (0.05~0.2%) を加えた NaClO 水溶液で、鉄に対する防錆効果を調べた。その結果に基づいて、防錆効果の増強作用が認められる両薬剤の至適濃度を求めた。

BmNPV への不活化効果

本章第 1 節に記した生物検定法を用いて、3 種薬剤混合液 (FAC 286 ppm, 0.3% Na_2CO_3 および 0.2% $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$) による BmNPV の不活化効果を検証した。試験に用いた BmNPV の多角体濃度は 1.03×10^9 多角体/ml とし、薬液処理時間は、5 分、10 分および 15 分とした。生物検定には、広食性蚕品種“ひたち×にしき”の孵化幼虫と人工飼料のシルクメイト (1~3 齢原種用、日本農産工業社製) を用いた。

結果および考察

本節ではまず、防錆効果の簡易検定法 (図 12) を考案し、 $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ の防錆特性を調査した。その結果、対照区として脱イオン水に各種濃度の $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ を溶解した試験液では、1.2% $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ を加えた場合でも 24 時間の浸漬中にすべての金属片が腐食した。これに対して試験液に NaClO が共存する場合には、 $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ の添加濃度が高くなるにしたがい、錆

の発生が抑制された（表 19）。水溶液中における金属表面の防錆現象は、一般的に被膜の形成が深く関与すると考えられている。例えば、 OH^- は、鉄の表面上に不動態被膜を形成し、 NaClO 水溶液中で鉄の腐食を抑制する作用がある。また、ケイ酸塩は、金属表面にコロイド被膜を形成し、防錆効果を発揮することが知られている。これらの知見から、 NaClO が $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ に何かしらの作用を及ぼして金属表面に被膜の形成を促進し、防錆効果を発揮している可能性があり、例えば、リン酸塩が被膜の形成に関与している可能性も考えられる。この点については、今後の検証が必要である。

表 19 の試験結果から、 NaClO による錆の発生を抑制するために、高濃度の $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ が必要であることを示しており、300 ppm 程度の遊離塩素を含む NaClO 水溶液へ 1.2% の $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ を加えることはコストの面でも実用的ではないと考えられる。この問題を解決するために、 $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ を添加した NaClO 水溶液に Na_2CO_3 を加えてその効果を調査した。その試験結果を表 20 に示した。表に示した各種濃度の組み合わせで Na_2CO_3 と $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ を NaClO 水溶液へ加えたところ、鉄に対する防錆効果を示す至適な濃度の組み合わせは、使用する薬剤のコストも考慮すると、0.2% Na_2CO_3 と 0.2% $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ であることが判明した。また、この試験結果から、供試した遊離塩素濃度（337.2 ppm）に対して、0.4% Na_2CO_3 も鉄への防錆効果を示すことが判明したので（表 20）、 NaClO 水溶液へ 0.4%以上の Na_2CO_3 と 0.2% $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ の 2 種薬剤を加えることで、 Na_2CO_3 と $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ の二重の防錆効果を期待できる可能性がある。今回の試験では、 NaClO 水溶液中に鉄の金属片を浸漬することにより防錆効果を判定しているが、24 時間浸漬した金属片を取り出して濾紙上に放置しても、その後、目立った錆の発生は認められなかった。唯一、錆の発生が認められた試験条件は、

表19. NaClO水溶液に添加したNa₆P₄O₁₃の防錆特性

Na ₆ P ₄ O ₁₃ (%) (w/v)	n ^a	腐食した金属片の数 ^b					
		NaClO ^c			脱イオン水		
		I	II	III	I	II	III
1.2	10	0	0	0	10	10	10
1.1	10	0	1	1	10	10	10
1.0	10	0	1	1	10	10	10
0.8	10	5	4	5	10	10	10
0.6	10	10	9	8	10	10	10
0.4	10	9	10	10	10	10	10
0.3	10	10	10	10	10	10	10
0	10	10	10	10	10	10	10

^a カッターナイフの刃(鉄 97%, 炭素 1.3%, その他 1.7%, オルファー社私信)の供試枚数.

^b 簡易検定法(図12)により, 25°Cの条件下で24時間浸漬した.

^c 遊離塩素濃度:337.2 ppm.

I~III:反復数.

表20. NaClO水溶液中中で防錆効果を得るためのNa₂CO₃とNa₆P₄O₁₃の至適濃度の検討

NaClO (337.2 ppm) +			腐食した金属片の数 ^b		
Na ₂ CO ₃ (%) (w/v)	Na ₆ P ₄ O ₁₃ (%) (w/v)	n ^a	I	II	III
0	0	10	10	10	10
0.1	0	10	10	10	10
0.1	0.2	10	10	10	10
0.1	0.3	10	3	4	5
0.1	0.4	10	1	0	0
0.1	0.5	10	0	0	0
0.2	0	10	3	6	6
0.2	0.05	10	4	6	4
0.2	0.1	10	1	2	3
0.2	0.2	10	0	0	0
0.3	0	10	7	6	8
0.3	0.05	10	2	7	6
0.3	0.1	10	0	2	1
0.3	0.2	10	0	0	0
0.4	0	10	1	0	1
0.4	0.05	10	0	0	0

^a カッターナイフの刃(鉄 97%, 炭素 1.3%, その他 1.7%, オルファー社私信)の供試枚数.

^b 簡易検定法(図12)により, 25°Cの条件下で24時間浸漬した.

I~III: 反復数.

金属片の表面中心に、防錆効果の認められた薬液を少量滴下して放置した場合である。滴下した部分は薬液乾燥後も錆の発生が認められず、滴下したところの外縁部にその後、放射状の淡い錆の発生が認められた。このため、防錆効果のある薬液組成でも揮発する塩素の影響を受けて錆が生じる場合があるため、3種薬剤混合液を散布する際には、散布ムラが生じないように注意する必要がある。

3種薬剤混合液（NaClO水溶液（286 ppm）に0.2%（W/V）の Na_2CO_3 および $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ を添加）の実用化を検討するために、用いる試薬を全て食品添加物のグレードに変更し、BmNPVに対する不活化効果を検証した結果、BmNPVは5分で不活化されず、10~15分後に不活化された（表21）。不活化に要する時間を5分に短縮するためには、 Na_2CO_3 濃度の微調整が必要であると考えられる。この点については第4章第1節で詳しく検討する。

本節では、NaClO水溶液の防錆効果を増強する2種薬剤（ Na_2CO_3 および $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ ）の至適濃度を解明し、3種薬剤混合液でBmNPVが不活化されることを確認した。本章で明らかにした3種薬剤混合液の組成を「養蚕用除菌洗浄剤」と命名し、次章において、実用化に向けた各種試験の結果を記述する。

表21. NaClO, Na₂CO₃およびNa₆P₄O₁₃から構成される3種薬剤混合液のBmNPVに対する不活化作用

水溶液の組成	n ^a	実験	核多角体病によるカイコ1齢幼虫の死亡頭数											
			多角体浸漬時間 ^b									対照区		
			5分			10分			15分					
反復 1, 2, 3			反復 1, 2, 3			反復 1, 2, 3			反復 1, 2, 3					
NaClO (286 ppm) + 0.3% (w/v) Na ₂ CO ₃ + 0.2 % (w/v) Na ₆ P ₄ O ₁₃	30	1	25	16	6	0	0	0	0	0	0	30	30	30
		2	25	29	28	1	0	0	0	0	0	30	30	30

^a カイコ孵化幼虫の供試頭数. 品種は“ひたち×にしき”.

^b 多角体懸濁液 (1.03×10⁹ 多角体/ml) 0.1 ml を3種薬剤混合液 0.9 ml で所定の時間浸漬後, 人工飼料を用いた生物検定に供試した.

摘 要

ホルムアルデヒドに替わる BmNPV 不活化剤を開発するために、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) を活用する手法を検討した。各濃度の遊離塩素 (FAC) を含有する NaClO 水溶液を各濃度の炭酸ナトリウム (Na_2CO_3) 水溶液で調製し、多角体に包埋された BmNPV に対する不活化状況を調べた結果、0.3% (w/v) Na_2CO_3 を添加した NaClO 水溶液 (FAC 100 ppm) では、多角体の 5 分間浸漬処理で BmNPV は完全に不活化された。一方、NaClO 水溶液 (FAC 500 ppm) あるいは 0.3% (w/v) Na_2CO_3 水溶液を単独で用いた場合には、BmNPV は全く不活化されなかった。この結果から、NaClO および Na_2CO_3 の 2 種薬剤を併用することにより相乗効果が認められ、低濃度の FAC で BmNPV が不活化されることが判明した。

2 種薬剤混合液の BmNPV に対する不活化力を調べた結果、NaClO (FAC 100 ppm) + 0.3% (w/v) Na_2CO_3 水溶液の半数致死濃度は、カイコ孵化幼虫に対して 2.0×10^8 多角体/ml 以上であり、2.5%ホルムアルデヒド水溶液の同値に比べて約 1 万倍の差が認められた。この結果から、NaClO と Na_2CO_3 より構成される 2 種薬剤混合液は、多角体に包埋された BmNPV に対して優れた不活化作用を示すと判断された。

この 2 種薬剤混合液へテトラポリリン酸ナトリウム ($\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$) を添加したところ、鉄の金属片に対して防錆効果が得られる現象を発見した。この作用を検証し、添加に必要な至適濃度を検討した結果、NaClO (FAC 337.2 ppm) と 0.3% (w/v) Na_2CO_3 水溶液の組合せにおいて、添加に必要な $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ は、0.2% (w/v) であることが判明した。この研究から $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ には特異な防錆作用があることを見出した。すなわち、 $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ は、NaClO と

共存する条件下で防錆効果を示し、NaClO の FAC が 337.2 ppm の条件下では、1.2% (w/v) の濃度で鉄の腐食を抑制した。一方、NaClO を含有しない 1.2% (w/v) $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ 水溶液では、鉄の腐食は抑制されなかった。これらの知見から、NaClO、 Na_2CO_3 および $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ の 3 薬剤が相互に影響し合い、相乗効果を発揮することで、鉄に対して強力な防錆効果を示すことが判明した。

この 3 種薬剤混合液を用いて、多角体に包埋された BmNPV に対する不活化作用を調べた結果、10 分間以上の多角体浸漬処理で十分な不活化効果が認められた。

第4章 養蚕用除菌洗浄剤の実用化

第3章では、ホルムアルデヒドに替わるカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) 不活化剤として、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO)、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3) およびテトラポリリン酸ナトリウム ($\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$) を用いる手法を考案した。このように新規に開発した防除手段を養蚕現場へ導入する場合、消毒可能な対象病原の範囲を確認し、用いる薬剤の安全性とコストを明確にする必要がある。特にヒトへの安全性については、ホルムアルデヒドの場合と同様に、揮発が懸念される塩素ガスの発生量を確認し、ヒトへの暴露限界値を超えないか確認する必要がある。本章では、これらの点を確認するために、第3章で確立した3種薬剤混合液を「養蚕用除菌洗浄剤」と命名し、実用化に必要な各種試験を行った。

まず第1節では、「養蚕用除菌洗浄剤」に用いる薬剤をすべて市販の食品添加物グレードの薬剤に変更し、用いる溶媒を蒸留水から地下水に変更した場合の BmNPV 不活化効果を検証した。本節で「養蚕用除菌洗浄剤」に加える Na_2CO_3 濃度を 0.5%へ変更する意義とその効果を記述する。次の第2節では、第1節で確定した「養蚕用除菌洗浄剤」の組成を用いて各種蚕病病原に対する消毒効果を調査した結果を記述する。第3節では、食品添加物グレードの薬剤で調製した「養蚕用除菌洗浄剤」を用いて鉄、銅および真鍮に対する防錆効果を調査した結果を記述する。最後の第4節では、実用化に伴う諸問題の検討として、「養蚕用除菌洗浄剤」から揮発する塩素ガスの発生量とヒトへの安全性について調査した結果を記述する。さらに本節では、「養蚕用除菌洗浄剤」のコストについて試算した結果を記述する。

第1節 食品添加物の利用と水質の影響

第3章で効果を明らかにした3種薬剤（NaClO、Na₂CO₃およびNa₆P₄O₁₃）を食品添加物のグレードに変更し、利用の可否を検討したうえで、薬液調製に用いる水質の影響を調査した。この調査の結果に基づいて「養蚕用除菌洗浄剤」の実用濃度を検討した。

材料および方法

供試薬剤

薬剤には、NaClO（次亜塩素酸ナトリウム製剤「アサヒラック」、塩素濃度12%以上、食品添加物用、高杉製薬社製）、Na₂CO₃（無水炭酸ナトリウム、食品添加物用、高杉製薬社製）およびNa₆P₄O₁₃（テトラポリリン酸ナトリウム、食品添加物用、燐化学工業社製）を用いた。NaClOについては、使用前に、残留塩素濃度計（PC compact, Aqualytic社製）で有効遊離塩素（Free available chlorine, FAC）濃度を測定した。Na₂CO₃とNa₆P₄O₁₃については、重量/体積百分率（%）で濃度を調製した。

BmNPVに対する不活化促進作用の確認とNaClO濃度の検討

滅菌した脱イオン蒸留水（以後、滅菌水）を用いて、0.3%Na₂CO₃を含有する各濃度のNaClO水溶液（50倍、100倍、500倍および1,000倍希釈液）を調製し、各希釈液のpHを測定後、第3章第1節に記した手順により生物検定を行った。供試蚕品種、ウイルスおよび人工飼料は、第3章第1節と同様に、広食性蚕品種“ひたち×にしき”の孵化幼虫、BmNPV IS-Y株（ 1.14×10^8 多角体/ml）およびシルクメイト（1~3齢原種用、日本農産工業社製）

を用いた。試験中の飼育環境条件は、25℃、16L8D とし、全ての試験は3連制で2回調査した。

Na₂CO₃ 水溶液の pH に及ぼす水質の影響

養蚕用除菌洗浄剤に加える Na₂CO₃ 濃度を検討するために、Na₂CO₃ 水溶液の pH に及ぼす水質の影響を調査した。試験に用いた水は、蒸留水および蚕業技術研究所の蚕室洗浄作業に用いる地下水（以後、地下水）とした。これらの溶媒で各濃度の Na₂CO₃ 水溶液（0.1%、0.3%、0.5%および0.8%）を調製し、調製から1時間経過後に水溶液の pH を測定した。

結 果

BmNPV に対する不活化促進作用の確認と NaClO 濃度の検討

0.3%Na₂CO₃ を添加した NaClO 水溶液は、調査した希釈率の範囲（50～1,000 倍）において BmNPV を完全に不活化した（表 22）。一方、蒸留水で調製した NaClO 水溶液は、原液の 50 倍希釈液を用いても BmNPV を全く不活化しなかった（表 22）。この調査に用いた各水溶液の pH は、NaClO 水溶液に 0.3%Na₂CO₃ を添加した場合には、pH 11.12～11.20 の範囲であり、NaClO 水溶液のみの場合には、pH 9.22～10.55 の範囲であった（表 23）。

Na₂CO₃ 水溶液の pH に及ぼす水質の影響

用いる溶媒を蒸留水から地下水へ変更した場合、Na₂CO₃ 水溶液の pH は低下する傾向が認められた（図 13）。地下水を用いて pH 11 の Na₂CO₃ 水溶液を調製するためには、0.5%以上の濃度が必要であった。

表22. 食品添加物グレードのNaClOとNa₂CO₃を用いた場合のBmNPVに対する不活化作用

NaClOに含まれる 有効遊離塩素濃度 ^a (ppm) (希釈倍数)	n ^b	実験	核多角体病によるカイコ1齢幼虫の 死亡頭数					
			Na ₂ CO ₃ ^c (%) (w/v)					
			0			0.3		
			反復	1, 2, 3	反復	1, 2, 3	反復	1, 2, 3
2,860 (50)	30	1	30	30	30	0	0	0
		2	30	30	30	0	0	0
1,430 (100)	30	1	30	30	30	0	0	0
		2	30	30	30	0	0	0
286 (500)	30	1	30	30	30	0	0	0
		2	30	30	30	0	0	0
143 (1,000)	30	1	30	30	30	0	0	0
		2	30	30	30	0	0	0
0	30	1	30	30	30	30	30	30
		2	30	30	30	30	30	30

^a 「アサヒラック」(食品添加物用, 有効遊離塩素濃度12%, 高杉製薬社製).

^b カイコ孵化幼虫の供試頭数. 品種は“ひたち×にしき”を用いた.

^c 無水炭酸ナトリウム(食品添加物用, 純度 99.5%, 高杉製薬社製).

表23. 食品添加物グレードのNaClOとNa₂CO₃で調製した水溶液のpH

NaClOに含まれる 有効遊離塩素濃度 ^a (ppm) (希釈倍数)	反復	pH	
		Na ₂ CO ₃ ^b (%) (w/v)	
		0	0.3
2,860 (50)	1	10.55	11.14
	2	10.54	11.20
1,430 (100)	1	10.11	11.12
	2	10.22	11.14
286 (500)	1	9.51	11.12
	2	9.55	11.13
143 (1,000)	1	9.22	11.13
	2	9.23	11.13

^a 「アサヒラック」(食品添加物用, 有効遊離塩素濃度12%, 高杉製薬社製).

^b 無水炭酸ナトリウム(食品添加物用, 純度 99.5%, 高杉製薬社製).

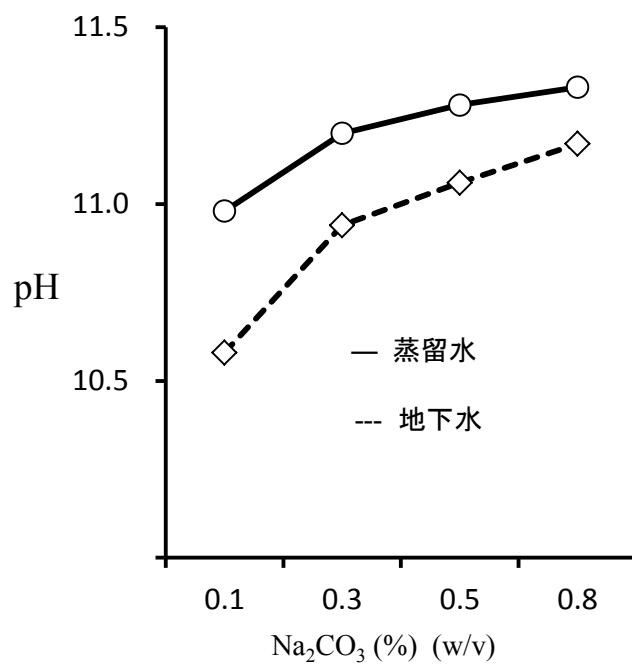


図 13. Na₂CO₃ 水溶液の pH に及ぼす水質の影響.

考 察

第3章で明らかにした「養蚕用除菌洗浄剤」の実用化を図るため、用いる薬剤を全て食品添加物のグレードに変更し、第3章1節の知見を再検証した。さらに、 Na_2CO_3 に及ぼす水質の影響を調べ、養蚕用除菌洗浄剤の組成に用いる Na_2CO_3 濃度を決定した。まず NaClO 製剤の「アサヒラック」と食品添加物用途の Na_2CO_3 を用いてBmNPVの不活化促進作用を検証した結果、0.3% Na_2CO_3 で調製したアサヒラックの希釈液は、1000倍希釈液(FAC 143 ppm)においてもBmNPVを完全に不活化した(表22)。この結果から、本研究に用いた食品添加物用途の両薬剤は、養蚕用除菌洗浄剤の調製に使用可能であると判断した。

次に、薬液調製に用いる水質の影響を調査した。養蚕用除菌洗浄剤に用いる Na_2CO_3 は、水の硬度に関係する Ca^{2+} や Mg^{2+} の影響を受け、薬液のpHを下げる可能性がある。この可能性を検証するために、薬液調製に用いる水を蒸留水から地下水へ変更して調べた結果、 Na_2CO_3 水溶液のpHはいずれの濃度においても低下した(図13)。この調査の結果から、表22に示した試験の結果と同等のpH11(表23)を得るためには、 Na_2CO_3 濃度を0.3%から0.5%へ調整する必要があると判断された。

養蚕用除菌洗浄剤を構成する $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ は、重合リン酸塩の一種であり、 Ca^{2+} や Mg^{2+} などの二価イオンの封鎖力に優れており、硬水を軟水化する作用がある(辻, 1984)。このため、養蚕用除菌洗浄剤を調製する手順としては、最初に希釈に用いる水へ $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ を溶解し、水中の金属イオンを封鎖しておき、散布直前に Na_2CO_3 と NaClO を加えて剤の効果を引き出す方が良いと考えられる。この調製手順により、硬水傾向にある養蚕地域でも利用

できる可能性があるため、今後の研究でこのことを確認する必要があると考えられる。

以上、本節で得られた結果から、養蚕用除菌洗浄剤に用いる薬剤を全て食品添加物グレードの薬剤に変更することが可能であると判断された。次節では、食品添加物グレードの薬剤と地下水で調製した実用レベルの養蚕用除菌洗浄剤を用いて、主要な蚕病病原に対する消毒効果を明らかにする。

第2節 主要病原に対する消毒効果の検証

材料および方法

供試薬剤

本章第1節で用いた薬剤を供試した。また、「養蚕用除菌洗浄剤」に用いる NaClO は、第3章第2節において、鉄の刃片に対する防錆効果が認められた有効遊離塩素濃度（FAC 337.2 ppm）を超えず、さらに弱酸性の有機物が存在する条件下でも BmNPV への消毒効果が認められた FAC 濃度（第3章第1節の表18）を基準として、NaClO 製剤「アサヒラック」の500倍希釈液（FAC 256～286 ppm）とした。

蚕病病原に対する消毒効果の検証

3種薬剤混合液（NaClO（FAC 256～286 ppm）+0.5%Na₂CO₃+0.2%Na₆P₄O₁₃）（以後この組成を単に「実用養蚕用除菌洗浄剤」と記述する）を蚕業技術研究所の地下水で調製し、各種蚕病病原に対する消毒効果を検証した。

核多角体病ウイルス

実用養蚕用除菌洗浄剤 0.9 ml と BmNPV 多角体懸濁液（IS-Y 株, 1.03×10^9 多角体/ml）0.1 ml を 1.5 ml のチューブに加え、室温下で所定の時間（5分、10分および15分）反応させた後、処理した液を滅菌蒸留水で10倍に希釈した。対照区の処理には、滅菌した地下水を用いた。滅菌シャーレ（直径9 cm）の底にろ紙を敷き、その上に人工飼料の小片（2 cm × 2 cm, 厚さ 0.1 cm, 1～3 齢原種用, 日本農産工業社製）を一つ置き、人工飼料の表面上

に前述の 10 倍希釈液 0.1 ml を均一に滴下して 10 分間放置した後，広食性蚕品種“ひたち×にしき”の孵化幼虫 20 mg を入れた．24 時間後，飼料を摂食した供試幼虫から 30 頭をランダムに採取し，清浄な人工飼料の入った 9 cm シャーレに移した．生物検定の開始から 7 日間，核多角体病による感染致死頭数を調査した．全ての生物検定は 3 連制で 2 回行い，飼育環境は 25℃，16L8D とした．この試験の結果，供試幼虫が核多角体病を発症しなかった場合には，BmNPV が実用養蚕用除菌洗浄剤で不活化されたと判定した．

細胞質多角体病ウイルス

茨城県旧八郷町の違作農家（第 2 章 第 3 節）から分離した細胞質多角体病ウイルス（BmCPV）を供試した．実用養蚕用除菌洗浄剤 0.9 ml と BmCPV 多角体懸濁液（ 1.19×10^9 多角体/ml）0.1 ml を 1.5 ml のチューブに加え，室温下で所定の時間（5 分および 10 分）反応させた後，処理した液を滅菌蒸留水で 10 倍に希釈した．対照区の処理には滅菌した地下水を用いた．滅菌シャーレ（直径 9 cm）の底にろ紙を敷き，その上に人工飼料の小片（2 cm×2 cm，厚さ 0.1 cm，1～3 齢原種用，日本農産工業社製）を一つ置き，人工飼料の表面上に前述の 10 倍希釈液 0.1 ml を均一に滴下して 10 分間放置した後，広食性蚕品種“ひたち×にしき”の孵化幼虫 20 mg を入れた．24 時間後，清浄な人工飼料の小片を加えた滅菌シャーレ（直径 3 cm）に 1 齢幼虫を個別に移し替え（図 14），10 日目に供試幼虫の中腸組織を光学顕微鏡下（15×40 倍）で観察した．検鏡により，供試幼虫の中腸組織に多角体の形成が認められなかった場合には，BmCPV が実用養蚕用除菌洗浄剤で不活化されたと判定した．

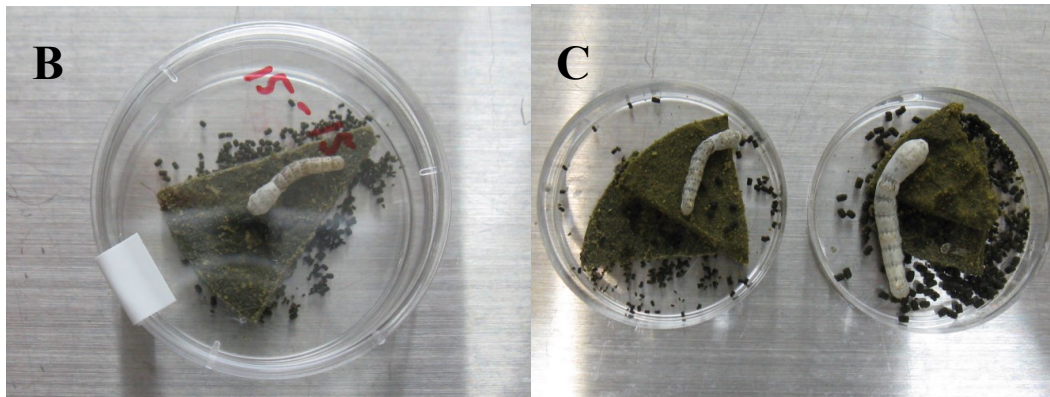


図 14. 細胞質多角体病ウイルスおよび *Nosema bombycis* を対象とした個体飼育による生物検定.

A : 生物検定中の飼育風景. B : 個体飼育の状況. C : 生物検定終了直後の状況. 「実用養蚕用除菌洗浄剤」処理区のカイコ (右) と同剤未処理区 (対照区) のカイコ (左).

コウジカビ

旧埼玉県蚕業試験場で保存されていたコウジカビ (*Aspergillus flavus* S-85) を供試した。*A. flavus* 分生子を蚕蛹エキス寒天斜面培地 (口径 1.8 cm×全長 16.5 cm) に接種し、30℃で7日間培養した。ここに高圧滅菌処理した 0.02%Tween 40 水溶液を入れ、分生子が浮遊した水溶液を新しい試験管に回収し、試験管ミキサーでよく攪拌後、遠心分離 (1,500×g, 3分) を行った。沈殿物に滅菌済みの 0.02%Tween 40 水溶液を加えて、供試分生子懸濁液とした。分生子懸濁液の分生子濃度は、トーマの血球計算盤で測定した。調製した *A. flavus* 分生子懸濁液 (1.12×10^8 分生子/ml) 5 μ l を、高圧滅菌処理した円形ろ紙 (直径 8 mm, 抗生物質検定用, 東洋濾紙社製) の中心に滴下し、室温下で1時間乾燥後、供試した。滅菌したガラス試験管に円形ろ紙6枚と実用養蚕用除菌洗浄剤 3.0 ml を加えて所定の時間 (5分, 10分および15分) 処理した。その後、円形ろ紙を取り出して滅菌蒸留水で3回洗浄後、ツアペックドックス平板培地 (直径 9 cm シャーレ) に円形ろ紙6枚を置床し、30℃で72時間培養後、菌糸の生育状況を調査した。対照区の処理には滅菌した地下水を用いた。この試験の結果、円形ろ紙の周縁部に菌糸の生育が認められなかった場合には、実用養蚕用除菌洗浄剤で *A. flavus* の分生子が殺菌されたと判定した。

硬化病菌

国立研究開発法人農業生物資源研究所ジーンバンクに登録されている白きょう病菌 *Beauveria bassiana* (MAFF 450032), 緑きょう病菌 *Nomuraea rileyi* (MAFF 830016) および黒きょう病菌 *Metarhizium anisopliae* (MAFF 830006) を供試した。いずれの分生子も蛹用

エキス寒天斜面培地に接種し、25℃、2週間培養後、コウジカビと同様の方法で分生子懸濁液 (*B. bassiana*: 1.18×10^8 分生子/ml, *N. rileyi*: 1.01×10^8 分生子/ml, *M. anisopliae*: 1.06×10^8 分生子/ml) を調製した。実用養蚕用除菌洗浄剤の殺菌効果判定試験は、コウジカビと同様の方法で行った。なお、*B. bassiana* の試験では SDY 平板培地、*N. rileyi* の試験では蚕蛹エキス寒天平板培地、*M. anisopliae* の試験では PDA 平板培地を用いた。これら3種の菌の培養条件は25℃、全暗とした。試験開始から7日後に菌糸の生育状況を観察し、円形ろ紙の周縁部に菌糸の生育が認められなかった場合には、実用養蚕用除菌洗浄剤で硬化病菌の分生子が殺菌されたと判定した。

セラチア

独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門 (NBRC) に登録されている *Serratia marcescens* Bizio (NBRC 3046) を供試した。PY 液体培地 40 ml が入った三角フラスコ (50 ml) に *S. marcescens* 1 白金耳量を植菌し 30℃で 24 時間静置培養した。得られた培養液中の生菌数を平板塗抹法 (鎌田, 2009) により測定し、生菌数を 1.1×10^9 個/ml に調製後、供試した。実用養蚕用除菌洗浄剤の効果判定試験は次のとおり行った。滅菌処理したマイクロチューブ (1.5 ml) に薬液 0.9 ml と *S. marcescens* 懸濁液 0.1 ml を加え、所定の時間 (5 分, 10 分および 15 分) 処理した後、処理した液から 1 白金耳量を採取して、滅菌済みの PY 液体培地を 1 ml 入れた 1.5 ml の滅菌チューブに加え、30℃で 24 時間培養した。得られた培養液から 1 白金耳を採取し、PY 平板培地 (直径 9 cm シャーレ) に塗布して、白金耳でよく塗り広げ、30℃で 24 時間培養後、コロニー形成の有無を調査した。対照

区の処理には、高圧滅菌処理した 0.8%塩化ナトリウム水溶液を用いた。*S. marcescens* と培地を扱う作業は全てクリーンベンチ内で行った。この試験により平板培地にコロニー形成が認められなかった場合には、実用養蚕用除菌洗浄剤で *S. marcescens* は殺菌されたと判定した。

微粒子病原虫

国立研究開発法人農業生物資源研究所から分与された *Nosema bombycis* を供試した。*N. bombycis* 孢子懸濁液の孢子濃度は、トーマの血球計算盤で測定した。滅菌処理したマイクロチューブ (1.5 ml) に実用養蚕用除菌洗浄剤 0.9 ml と孢子懸濁液 (8.80×10^8 孢子/ml) 0.1 ml を加え、所定の時間 (5 分, 10 分および 15 分) 処理した後、滅菌蒸留水で 10 倍に希釈した。滅菌シャーレ (9 cm) に敷いたろ紙上に人工飼料の小片 (2 cm×2 cm, 厚さ 0.1 cm, 1~3 齢原種用, 日本農産工業社製) を置き、飼料の表面に前述の 10 倍希釈液 0.1 ml を均一に滴下して 10 分間放置した後に、蚕品種 “ひたち×にしき” の孵化幼虫 20 mg を入れた。24 時間後、清浄な人工飼料の小片を加えた滅菌シャーレ (直径 3 cm) に供試幼虫を個別に移し替え (図 14), 生物検定開始から 10 日目に供試幼虫の中腸組織を光学顕微鏡下 (15×40 倍) で観察した。検鏡により、供試幼虫の中腸組織に孢子が認められなかった場合には、*N. bombycis* は実用養蚕用除菌洗浄剤で殺菌されたと判定した。

結 果

蚕病病原に対する消毒効果の検証

核多角体病ウイルス

養蚕用除菌洗浄剤の組成に 0.5%Na₂CO₃ を用いた場合、BmNPV の不活化所要時間は 10 分から 5 分に短縮され、15 分で完全に不活化された (表 24)。対照区のカイコは全て発病・致死した。

細胞質多角体病ウイルス

BmCPV は、実用養蚕用除菌洗浄剤の 5 分の処理により一部不活化され、15 分後に完全に不活化された (表 25)。対照区のカイコは全て中腸組織に多角体の形成が認められた。

コウジカビおよび硬化病菌

糸状菌 4 種 (*A. flavus*, *B. bassiana*, *N. rileyi* および *M. anisopliae*) に対する実用養蚕用除菌洗浄剤の殺菌効果について調査した結果を表 26 および図 15 に示した。*A. flavus* と *N. rileyi* の分生子は、実用養蚕用除菌洗浄剤の 5 分の処理で完全に殺菌された。*B. bassiana* と *M. anisopliae* の分生子は、実用養蚕用除菌洗浄剤の 5 分の処理で一部殺菌され、10 分の処理で完全殺菌された。対照区の処理では、全てのろ紙において菌糸の生育が認められた。

セラチア

S. marcescens は、実用養蚕用除菌洗浄剤の 5 分の処理により完全に殺菌された (表 27, 図 16)。対照区では、*S. marcescens* のコロニー形成が全て認められた (表 27, 図 16)。

表24. 「実用養蚕用除菌洗浄剤」によるカイコ核多角体病ウイルスの不活化と多角体浸漬時間の関係

水溶液の組成 ^a	n ^b 実験	核多角体病によるカイコ1齢幼虫の死亡頭数 ^c											
		多角体浸漬時間						対照区					
		5分			10分			15分			反復1, 2, 3		
		反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3		
A ^d : NaClO ^e + 0.3% (w/v) Na ₂ CO ₃ + 0.2% (w/v) Na ₆ P ₄ O ₁₃	1	25	16	6	0	0	0	0	0	0	30	30	30
	2	25	29	28	1	0	0	0	0	0	30	30	30
B ^f : NaClO ^e + 0.5% (w/v) Na ₂ CO ₃ + 0.2% (w/v) Na ₆ P ₄ O ₁₃	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	30	30
	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	30	30	30

^a 食品添加物グレードの薬剤を用いて地下水により調製した。

^b カイコ孵化幼虫の供試頭数。品種は“ひたち×にしき”を用いた。

^c 多角体懸濁液 (1.03×10^9 多角体/ml) 0.1 mlを薬液0.9 mlで所定の時間反応させ、人工飼料を用いた生物検定法で調査した。

^d 表21より引用。

^e 有効遊離塩素濃度286 ppm。

^f 本研究。

表25. 「実用養蚕用除菌洗浄剤」によるカイコ細胞質多角体病ウイルス(BmCPV)の不活化と多角体浸漬時間の関係

水溶液の組成 ^a	n ^b	実験	BmCPV感染頭数 ^c			
			多角体浸漬時間			対照区
			5分	10分	15分	
			反復 1, 2, 3	反復 1, 2, 3	反復 1, 2, 3	反復 1, 2, 3
		1	0 3 3	0 0 1	0 0 0	10 10 10
NaClO ^d + 0.5% (w/v) Na ₂ CO ₃ + 0.2% (w/v) Na ₆ P ₄ O ₁₃	10	2	0 0 2	1 2 1	0 0 0	10 10 10
		3	1 0 4	0 0 0	0 0 0	10 10 10

^a 食品添加物グレードの薬剤を用いて地下水で調製した.

^b カイコ孵化幼虫の供試頭数. 品種は“ひたち×にしき”を用いた.

^c 多角体懸濁液 (1.19 × 10⁹ 多角体/ml) 0.1 mlを薬液0.9 mlで所定の時間反応させ, 人工飼料を用いた生物検定法で調査した.

^d 有効遊離塩素濃度 286 ppm.

表26. 「実用養蚕用除菌洗浄剤」によるカイコ病原性糸状菌の殺菌と分生子浸漬時間の関係

水溶液の組成 ^a	糸状菌 ^b	n ^c	℃ ^d	D ^e	実験	菌糸の生育が認められたろ紙ディスクの枚数 ^f				
						分生子浸漬時間			対照区	
						5分	10分	15分		
反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3							
NaClO ^g + 0.5% (w/v) Na ₂ CO ₃ + 0.2% (w/v) Na ₆ P ₄ O ₁₃	<i>Aspergillus flavus</i> S-85				1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6	
		6	30	3	2	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6	
					3	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6	
	<i>Beauveria bassiana</i> (MAFF 450032)					1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6
		6	25	7	2	0 0 5	0 0 0	0 0 0	6 6 6	
					3	0 0 1	0 0 0	0 0 0	6 6 6	
	<i>Nomuraea rileyi</i> (MAFF 830016)					1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6
		6	25	7	2	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6	
					3	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6	
<i>Metarhizium anisopliae</i> (MAFF 830006)					1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6	
	6	25	7	2	4 1 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6		
				3	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6 6 6		

^a 食品添加物グレードの薬剤を用いて地下水で調製した。

^b 分生子濃度: *A. flavus* S-85: 1.12×10^8 /ml; *B. bassiana*: 1.18×10^8 /ml; *N. rileyi*: 1.01×10^8 /ml; *M. anisopliae*: 1.06×10^8 /ml. 円形ろ紙ディスク(直径 8 mm)の中心に分生子懸濁液を0.5 µl滴下して, 室温下で1時間乾燥後, 試験に用いた。

^c 円形ろ紙ディスクの供試枚数。

^d 培養温度。

^e 培養日数。

^f 培地の種類: *A. flavus* S-85: ツアベック・ドックス寒天培地; *B. bassiana*: SDY寒天培地; *N. rileyi*: 蚕蛹エキス寒天培地; *M. anisopliae*: PDA寒天培地。

^g 有効遊離塩素濃度 254 ppm。

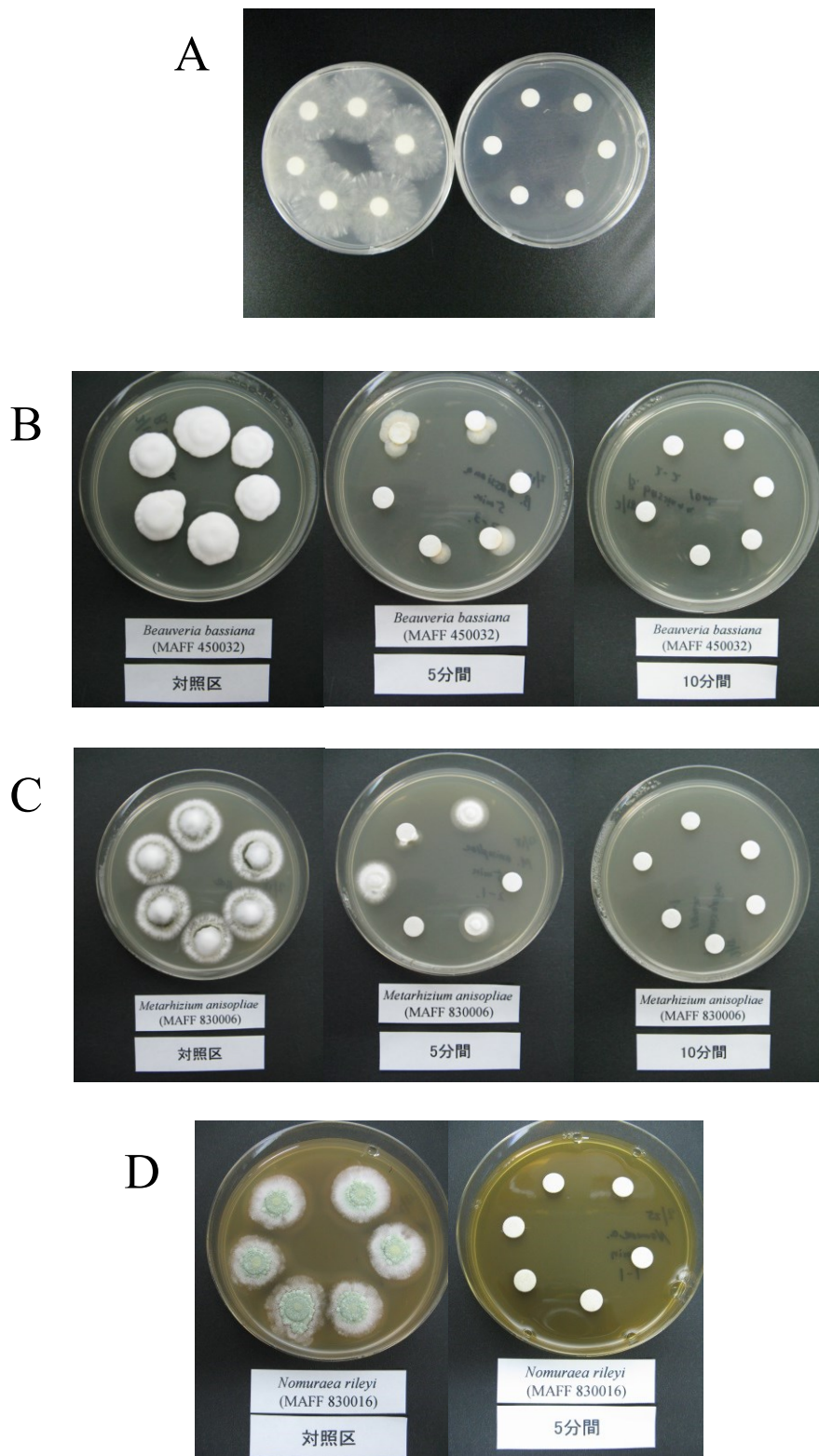


図 15. 「実用養蚕用除菌洗剤」によるカイコ病原性糸状菌の殺菌状況。

A: *A. flavus* S-85 (左: 对照区, 右: 5分間処理), B: *B. bassiana*, C: *M. anisopliae*, D: *N. rileyi*.

表27. 「実用養蚕用除菌洗浄剤」による*Serratia marcescens* の殺菌と浸漬時間の関係

水溶液の組成 ^a	実験	コロニー形成の有無 ^b			対照区
		浸漬時間			
		5分 反復1, 2, 3	10分 反復1, 2, 3	15分 反復1, 2, 3	
	1	---	---	---	+++
NaClO ^c + 0.5% (w/v) Na ₂ CO ₃ + 0.2% (w/v) Na ₆ P ₄ O ₁₃	2	---	---	---	+++
	3	---	---	---	+++

^a 食品添加物グレードの薬剤を用いて地下水で調製した.

^b *S. marcescens* 生菌濃度: 1.10×10^9 CFU/ml. +: 形成, -: 非形成.

^c 有効遊離塩素濃度 254 ppm.

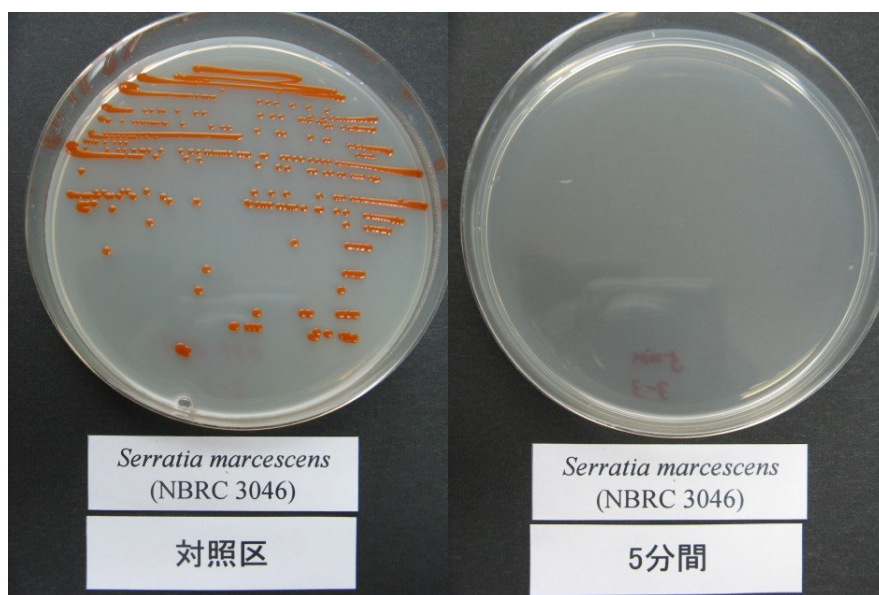


図 16. 「実用養蚕用除菌洗淨剤」による *S. marcescens* の殺菌状況.

(試験開始から 48 時間後に撮影)

微粒子病原虫

N. bombycis の胞子は、実用養蚕用除菌洗浄剤の 5 分の処理により一部殺菌、10 分の処理で完全に殺菌された (表 28)。対照区のカイコでは、全個体の中腸組織に *N. bombycis* の胞子形成が認められた。

考 察

食品添加物から調製した実用養蚕用除菌洗浄剤は、主要な蚕病病原 (BmNPV, BmCPV, *A. flavus*, *B. bassiana*, *N. rileyi*, *M. anisopliae*, *S. marcescens* および *N. bombycis*) に対して消毒効果を示した。BmNPV と BmCPV は、実用養蚕用除菌洗浄剤の 5~10 分間の処理で一部が不活化され、15 分間の処理で完全に不活化された (表 24, 25)。糸状菌 4 種に対する消毒効果はウイルスよりも明瞭であり、*A. flavus* と *N. rileyi* は 5 分間、*B. bassiana* と *M. anisopliae* は 10 分間の処理で完全に殺菌された (表 26)。これらの糸状菌は、実用養蚕用除菌洗浄剤により 10 分程度で分生子が殺菌されるため、多角体形成ウイルスよりも消毒効果が得られやすいと考えられる。また、カイコに日和見感染する *S. marcescens* や経卵巣伝達する *N. bombycis* は、実用養蚕用除菌洗浄剤に感受性が高く、5 分間の処理で完全に殺菌された (表 27, 28)。

このように、実用養蚕用除菌洗浄剤は主要な蚕病病原に対して優れた消毒効果を示したことから、ホルムアルデヒドに替わる蚕病防除剤として利用できると考えられる。これまでホルムアルデヒドに代わる蚕病防除剤の研究事例としては、消石灰水と殺菌剤の混合液を用いる方法 (国見ら, 1985) や、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムを用いる方法 (鈴

表28. 「実用養蚕用除菌洗浄剤」による*Nosema bombycis*の殺菌と孢子浸漬時間の関係

水溶液の組成 ^a	n ^b	実験	<i>N. bombycis</i> に感染したカイコの頭数 ^c			
			孢子浸漬時間			対照区
			5分	10分	15分	
反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3	反復1, 2, 3			
		1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	10 10 10
NaClO ^d + 0.5% (w/v) Na ₂ CO ₃ + 0.2% (w/v) Na ₆ P ₄ O ₁₃	10	2	0 0 0	0 0 0	0 0 0	10 10 10
		3	1 0 0	0 0 0	0 0 0	10 10 10

^a 食品添加物グレードの薬剤を用いて地下水で調製した。

^b カイコ孵化幼虫の供試頭数. 品種は“ひたち×にしき”。

^c *N. bombycis* 孢子懸濁液 (8.80 × 10⁸ 孢子/ml) 0.1 mlを薬液0.9 mlで所定の時間反応させ、人工飼料を用いた生物検定法により調査した。

^d 有効遊離塩素濃度 254 ppm.

木, 2002) などが知られているが, 食品添加物に認定された剤の組み合わせで蚕病防除剤を開発した事例は本研究が初めてのことである. 食品添加物に認定された薬剤を数種類組み合わせで洗浄剤を開発する事例は, ヒトに対する高い安全性が求められる食品分野で見られるため (辻, 1984), 食品添加物の組成で調製される「実用養蚕用除菌洗浄剤」は, 養蚕の分野において, 使用者の理解と同意が得られやすいと考えられる.

本節では, 第 1 節で確定した実用養蚕用除菌洗浄剤を用いて主要な蚕病病原に対する消毒効果を確認した. 次節では, 同剤を用いて, 鉄, 銅および真鍮に対する防錆効果を明らかにする.

第3節 鉄，銅および真鍮に対する防錆効果の検証

材料および方法

供試薬剤

本章第1節に準じた。

供試金属

鉄，銅および真鍮を用いた。鉄については，カッターナイフの刃（オルファー社製，鉄97%，炭素1.3%，その他1.7%，オルファー社私信），銅および真鍮はクギ（長さ2 cm）を用いた。

防錆効果の検証

地下水を用いて実用養蚕用除菌洗浄剤（NaClO（FAC 272～286 ppm）+0.5%Na₂CO₃+0.2%Na₆P₄O₁₃）を調製し，第3章第2節で考案した簡易検定法により，鉄，銅および真鍮への防錆効果を検証した。対照区には，NaClO水溶液（鉄：FAC 286 ppm，銅および真鍮：FAC 272 ppm）を用いた。

結 果

防錆効果の検証

第3章第2節で考案した防錆効果の簡易検定法により，実用養蚕用除菌洗浄剤の防錆効果を検証した。その結果を表29に，供試金属の状態を図17に示した。実用養蚕用除菌洗浄剤は，鉄，銅および真鍮の腐食を抑制したが，対照区に用いたNaClO水溶液の処理では，供試金属は全て腐食した。

表29. 鉄、銅および真鍮に対する「実用養蚕用除菌洗浄剤」の防錆効果の検証

金属の種類	n ^a	腐食した供試金属の数					
		養蚕用除菌洗浄剤 ^b			NaClO水溶液 ^c		
		反復1	反復2	反復3	反復1	反復2	反復3
鉄	10	0	0	0	10	10	10
銅	10	0	0	0	10	10	10
真鍮	10	0	0	0	10	10	10

^a 供試金属の数.

^b NaClO (FAC 272~286 ppm) + 0.5% (w/v) Na₂CO₃ + 0.2% (w/v) Na₆P₄O₁₃.

^c 鉄の試験:FAC 286 ppm, 銅および真鍮の試験:FAC 272 ppm.

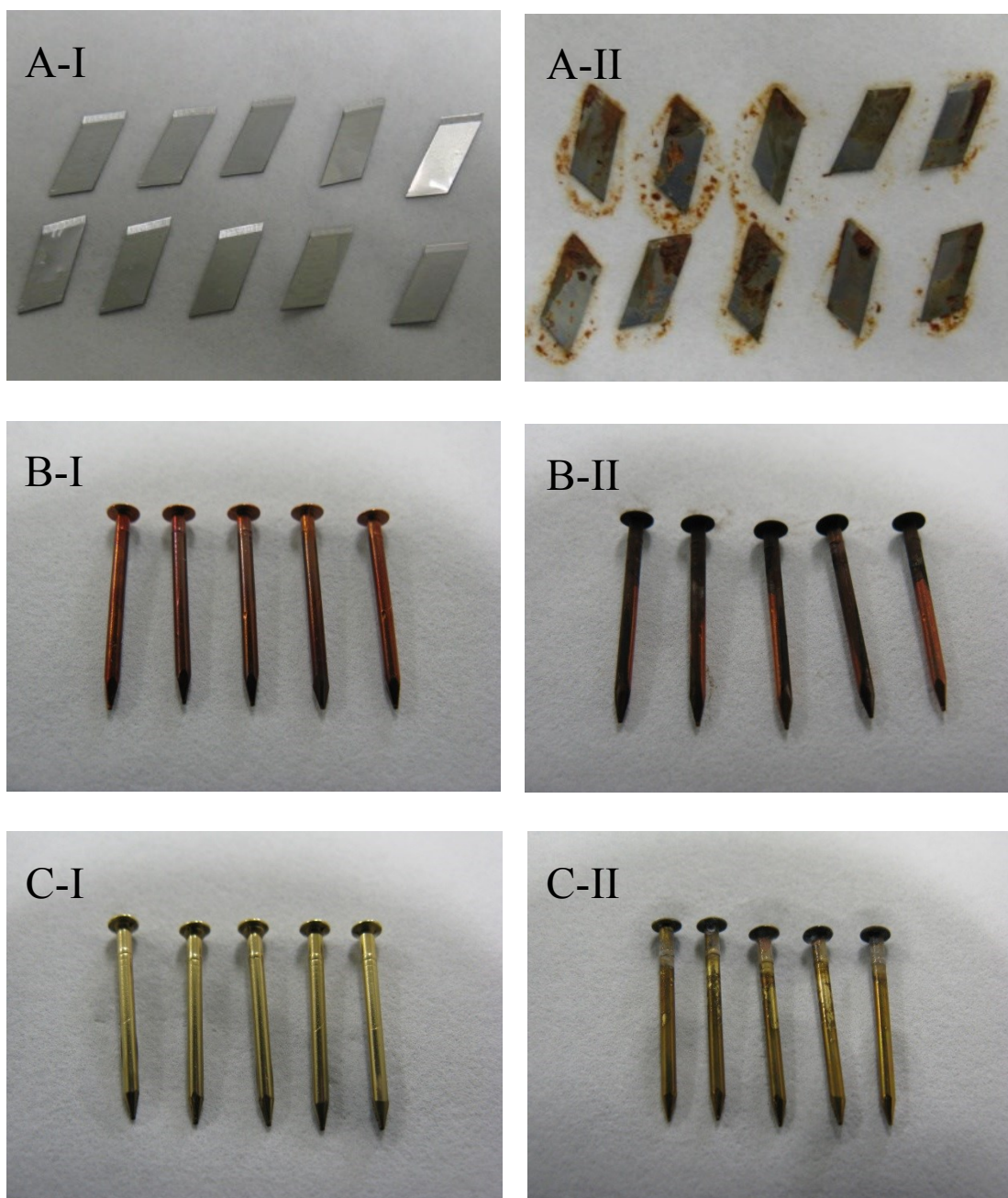


図 17. 鉄 (A), 銅 (B) および真鍮 (C) に対する「実用養蚕用除菌洗浄剤」の防錆効果.

I: 「実用養蚕用除菌洗浄剤」24 時間浸漬処理. II: 次亜塩素酸ナトリウム 24 時間浸漬処理.

各水溶液に含まれる有効遊離塩素濃度: 286 ppm (A), 272 ppm (B および C).

考 察

すでに第3章第2節において、3種薬剤（ NaClO 、 Na_2CO_3 および $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ ）の相乗効果により、鉄の腐食が抑制されることを記述した。本章第3節では、この現象が食品添加物の組成で調製された「実用養蚕用除菌洗浄剤」でも再現されるのか、鉄、銅および真鍮を用いて確認試験を行った。その結果、供試した各種金属は、実用養蚕用除菌洗浄剤に24時間浸漬しても全く腐食せず、強い防錆効果が認められた（表29、図17）。この結果から、食品添加物に認定された市販薬剤と地下水を用いて実用レベルの「実用養蚕用除菌洗浄剤」を調製しても、鉄、銅および真鍮に対しては十分な防錆効果が得られると考えられる。本研究では、24時間の浸漬処理で金属の腐食状況を判定しているが、実用養蚕用除菌洗浄剤に浸漬した鉄、銅および真鍮は、その後1年経過しても腐食が抑制されたので、腐食の進行が遅延しているのではなく、腐食が完全に抑制されていると考えられる。

このように、アルカリ条件下において NaClO が各種金属に対して腐食作用を示さない類似の現象としては、 OH^- による強アルカリ条件下での腐食抑制作用（不動体被膜の形成作用）や、ケイ酸塩にみられる非鉄金属へのコロイド吸着と防食被膜の形成作用などが知られている（福崎，2012a）。実用養蚕用除菌洗浄剤にみられる強力な腐食抑制作用は、被膜形成作用の一種が関与していると考えられるが、詳しい仕組みは不明である。この点は今後の研究で明らかにする必要がある。また、本研究で開発した実用養蚕用除菌洗浄剤はpH 11のアルカリ性であり、各種非鉄金属の腐食限界値（辻，1984）に基づくと、スズ（限界値 pH 11）、黄銅（限界値 pH 11.5）、ケイ素鉄（限界値 pH 13）に対しても腐食抑制作用を

示す可能性がある。この点については必要性に応じて確認する必要がある。

本節では、食品添加物の組成で調製した「実用養蚕用除菌洗浄剤」が鉄、銅および真鍮に対して腐食抑制作用を示すことを明らかにした。これまで、稚蚕人工飼料育の施設を含む養蚕現場では、銅に対しても腐食作用があるホルムアルデヒドが長年、蚕病防除に使用されてきた経緯がある。このため本研究で、鉄、銅および真鍮に対して腐食抑制作用が認められた「実用養蚕用除菌洗浄剤」は、ホルムアルデヒドに替わる蚕病防除剤として実用化が可能であると考えられる。

そこで次節では、「実用養蚕用除菌洗浄剤」の実用化に伴う諸問題の検討として、散布に伴う塩素ガスの発生状況とヒトへの安全性および薬剤調製コストについて明らかにする。

第4節 実用化に伴う諸問題の検討

材料および方法

「実用養蚕用除菌洗浄剤」散布後の塩素ガス濃度の測定

本章第1節に準じて「実用養蚕用除菌洗浄剤」を100 L調製後、水溶液に含まれる有効塩素濃度（FAC）を残留塩素濃度計（PC compact, Aqualytic 社製）で3回測定し、その平均値を求めた（FAC 268.7 ppm）。自走式キャリー動噴（VSC 3511-130, 給水量 22 L/分, 共立社製）を使用して、蚕業技術研究所の病理棟に併設された人工飼料育専用蚕室（4.18 m×2.90 m, 高さ 2.45 m, 空間容積 29.7 m³, 総面積 58.9 m²）へ「実用養蚕用除菌洗浄剤」を散布した。薬剤散布量は、従来から行われてきた2%ホルムアルデヒド水溶液の散布量（野口ら, 1998）に従い、1 m²あたり 1 Lを基準として 59 Lとした。蚕室内の温度は 30°Cに設定し、サーキュレーターを設置して室内温度を均一に保った。実用養蚕用除菌洗浄剤散布直後から、ガス検知管 2 台（GV-100, ガステック社製）と気体検知管（塩素用, No.8LL, ガステック社製）を用いて、床からの高さ 0.5 m および 2 m の位置で気体を採取し、塩素ガス濃度を測定した。ガス濃度の測定は、実用養蚕用除菌洗浄剤散布直後から、30 分後、1 時間後、3 時間後、6 時間後および 24 時間後に行った。ガス測定時には、水銀温度計を用いて蚕室内の温度も測定した。

「実用養蚕用除菌洗浄剤」の調製費用

「実用養蚕用除菌洗浄剤」の調製に用いる各種薬剤を蚕業技術研究所で購入し、100 L

あたりの薬液調製費用をホルムアルデヒド水溶液の調製費用と比較した。「実用養蚕用除菌洗浄剤」の調製費用の試算に用いた薬剤は、次亜塩素酸ナトリウム製剤アサヒラック（食品添加物用 5 kg, 3 本入り, 高杉製薬社製）、無水炭酸ナトリウム（食品添加物用, 25 kg/袋, 高杉製薬社製）およびテトラポリリン酸ナトリウム（食品添加物用, 25 kg/袋, 燐化学工業社製）であった。ホルムアルデヒド水溶液の調製費用の試算に用いた薬剤は、蚕業技術研究所で購入したホルムアルデヒド原液（メタノール 8%含有, 日本化成社製）とした。

結 果

「実用養蚕用除菌洗浄剤」散布後の塩素ガス濃度

「実用養蚕用除菌洗浄剤」を 30℃に加温した人工飼料育専用蚕室内に散布して、散布直後からの塩素ガス発生量を経時的に調べた結果、塩素ガスの発生量は、散布直後から 24 時間経過後も、測定した高さに関係なく、0.025 ppm 以下であった（表 30）。

「実用養蚕用除菌洗浄剤」の調製費用

「実用養蚕用除菌洗浄剤」の調製費用をホルムアルデヒド水溶液の調製費用と比較した結果、実用養蚕用除菌洗浄剤の調製費用は総額で 473 円となり、この金額は、2%ホルムアルデヒド水溶液調製費用（1,081 円）の 1/2 以下、3%同水溶液調製費用（1,622 円）の 1/3 以下であった（表 31）。

表30. 「実用養蚕用除菌洗浄剤」散布後の塩素ガス発生状況

床からの高さ (m)	塩素ガス濃度(ppm)および室内温度					
	散布直後	30分後	1時間後	3時間後	6時間後	24時間後
0.5	<0.025	<0.025	<0.025	<0.025	<0.025	<0.025
2	<0.025	<0.025	<0.025	<0.025	<0.025	<0.025
	25℃	26℃	27℃	31℃	31℃	30℃

表31. 調製費用の比較

薬剤の種類	数量 /100L	単価 (円) /100L
「実用養蚕用除菌洗浄剤」水溶液		
NaClO (食品添加物用, 有効遊離塩素12%)	200 ml	73
Na ₂ CO ₃ (食品添加物用, 純度99.5%)	500 g	234
Na ₆ P ₄ O ₁₃ (食品添加物用, 純度99%)	200 g	166
ホルムアルデヒド水溶液 2%	5.4 kg	1,081
3%	8.1 kg	1,622

考 察

気密性の高い人工飼料育専用蚕室を 30℃に加温して「実用養蚕用除菌洗浄剤」を 1m²あたり 1L の割合で 59L 散布した場合、塩素ガスの発生量は 0.025 ppm 以下であった（表 30）。日本国内における塩素ガスの管理濃度および同許容濃度は 0.5 ppm 以下と定められており、本試験結果から得られた塩素ガスの発生量（<0.025 ppm）は、これらの基準値の 20 分の 1 以下であることが判明した。この結果から「実用養蚕用除菌洗浄剤」は、ヒトへの安全性が極めて高い水溶液であると考えられる。

「実用養蚕用除菌洗浄剤」から塩素の揮発が抑制される理由としては、次亜塩素酸ナトリウム（NaClO）に由来する次亜塩素酸（HOCl）の解離特性が深く関係している。すなわち、福崎（2012b）によれば、HOCl の解離定数（*pKa*）は 25℃で約 7.5 であり、pH 7.5 の条件下において、水溶液中における HOCl と OCl⁻の存在比率は 1 : 1 となる。HOCl の場合では、水溶液の pH がアルカリ側に傾くと HOCl の解離度が大きくなり、OCl⁻の存在割合が増加する。この特性のため、pH 10 を超えたあたりから、水溶液中に溶存する HOCl の存在比率は極めて小さくなることが知られている（福崎，2012b）。このため、pH 11 を示す「養蚕用除菌洗浄剤」では、水溶液中に溶存する HOCl がすべて解離した OCl⁻となっており、塩素ガスの揮発が強く抑制された状態であると推察される。なお、「養蚕用除菌洗浄剤」から塩素ガスが発生するためには、弱酸性領域（pH 4~6）で OCl⁻がプロトン化して非解離型になった後、さらに塩酸などの添加により強酸性領域に移行しなければ HOCl の一部が溶存塩素（Cl₂）にならない（福崎，2012b）。このことから、アルカリ性でかつ緩衝作用のある Na₂CO₃ が添加されている「養蚕用除菌洗浄剤」では、塩素ガスが発生する

可能性は極めて低いと考えられる。

次に、「実用養蚕用除菌洗浄剤」の調製費用をホルムアルデヒド水溶液の調製費用と比較した。その結果、「実用養蚕用除菌洗浄剤」の調製費用は100Lあたり473円であり、ホルムアルデヒド水溶液調製費用の半分以下であった（表31）。この試算から、「実用養蚕用除菌洗浄剤」は、従来から使用されてきた2%もしくは3%ホルムアルデヒド水溶液に比べて、調製費用は安価であると判断される。

現在、多くの養蚕現場では、ホルムアルデヒドを調達して利用することができない状況にあり、農家で生産される繭の単価も1粒あたり約3~4円程度と試算される。このため、消毒に用いる資材は、ホルムアルデヒドよりも安全で調達しやすく、可能な限り安価な方が良い。「実用養蚕用除菌洗浄剤」は、食品添加物から構成される安全性の高い薬剤であり、塩素ガスの発生も管理濃度以下であり（表30）、従来用いられてきたホルムアルデヒド水溶液に比べて調製費用も安いという長所がある（表31）。本章における一連の研究成果を踏まえると、「実用養蚕用除菌洗浄剤」は養蚕現場での実用評価試験に移行できる段階にあると考えられる。

摘 要

3種薬剤混合液を「養蚕用除菌洗浄剤」と命名し、用いる薬剤を全て食品添加物のグレードに変更して既往の知見を再検証した結果、水質の影響を考慮する必要性が判明した。この点を配慮して「実用養蚕用除菌洗浄剤」の組成は、NaClO (FAC 240 ppm) + 0.5% (w/v) Na_2CO_3 + 0.2% (w/v) $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ とした。

蚕業技術研究所の蚕室洗浄作業で用いる地下水を使用して、先の「実用養蚕用除菌洗浄剤」を調製し、主要蚕病病原に対する消毒効果を検証した。その結果、BmNPV および BmCPV は、除菌洗浄剤処理から5分で顕著な不活化が認められ、15分で完全に不活化された。コウジカビ病菌 (*A. flavus* S-85) および緑きょう病菌 (*N. rileyi*) の分生子は、除菌洗浄剤により5分で殺菌され、白きょう病菌 (*B. bassiana*) および黒きょう病菌 (*M. anisopliae*) の分生子は10分後に殺菌された。セラチア (*S. marcescens*) および微粒子病原虫 (*N. bombycis*) は、除菌洗浄剤処理によりいずれも5分で殺菌された。

「実用養蚕用除菌洗浄剤」の鉄、銅および真鍮に対する防錆効果を、第3章で考案した簡易検定法により検証した結果、「実用養蚕用除菌洗浄剤」では鉄、銅および真鍮は腐食が抑制された。対照区の処理ではこれらの金属は全て腐食した。

30°Cに加温した、気密性の高い人工飼料育専用蚕室内へ「実用養蚕用除菌洗浄剤」を散布 (59L, 1L/m²) して、その後の塩素ガスの発生量を経時的に調べた結果、測定した高さ (0.5 m および 2 m) に関係なく、散布直後から24時間経過後も塩素ガスの発生量は0.025 ppm 以下であった。この測定結果は、国の定める管理濃度 (0.5 ppm) の基準値以下であった。

「実用養蚕用除菌洗淨剤」の調製費用を2%および3%ホルムアルデヒド水溶液の調製費用と比較した結果、除菌洗淨剤100Lあたりの調製費用は473円であり、ホルムアルデヒド水溶液調製費用の約1/2~1/3の費用で収まった。

以上、本章における一連の研究成果から「実用養蚕用除菌洗淨剤」は、養蚕現場における実用評価試験に移行できると考えられた。

総合考察

緒言で述べたように、本研究の目的は、内部汚染菌の発生原因となるカイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）の効果的な防除を行うため、茨城県南地域の養蚕現場で発生する内部汚染菌の発生傾向と収繭量に及ぼす影響を解析し、養蚕現場における BmNPV の拡散範囲と主要な汚染箇所を特定したうえで、ホルムアルデヒドに替わる新たな蚕病防除剤を開発し、実用化を目指すことにあった。以下、一連の研究結果に基づいて、疫学的な立場から養蚕現場における BmNPV の防疫対策を考察する。

核多角体病による内部汚染菌の発生傾向からみた防疫対策

核多角体病による内部汚染菌の発生は、1970年代頃から報告されるようになり（石井ら、1975）、その後1980年代に行われた調査から、内部汚染菌の発生原因は主に BmNPV であることが判明した。数多くの調査が行われた1980年代から20年以上が経過した現在でも、養蚕現場では内部汚染菌が多発する傾向にあり、その防除対策の確立が強く望まれてきた。第1章では、茨城県南地域の養蚕現場で発生する内部汚染菌と核多角体病の関係を詳しく分析し、BmNPV で内部汚染菌が多発する晩秋蚕期には収繭量も有意に減少するため、この時期の防疫対策が重要であることを指摘した。また、養蚕現場における戸別の調査の結果から、BmNPV による内部汚染菌が発生する養蚕現場では、その後の蚕期も同ウイルスによる内部汚染菌が多発する傾向にあり、そのような養蚕現場では、晩秋蚕期になると核多角体病による内部汚染菌が多発する傾向にあった。一方、春蚕期に BmNPV による内部汚染菌が検出されていなかった養蚕現場では、一部で例外は存在するものの、概してその

後の蚕期も核多角体病による内部汚染繭の発生は低い傾向にあった。すなわち、晩秋蚕期にみられる内部汚染繭の多発を防ぐためには、春蚕期のカイコに BmNPV を感染させないことが重要であり、養蚕地域で春蚕期の消毒を徹底することが地域全体の繭品質向上につながるものと考えられた。

BmNPV による汚染の実態と防疫対策

核多角体病の防除における消毒作業の重要性については、渡部・清水（1981）が、その当時にみられた核多角体病の流行要因は消毒の不徹底にあると考察し、核多角体病の防除には蚕室の構造に対応した消毒法の再検討が必要であることを指摘した。また、秋葉（1980）は、養蚕現場における BmNPV の拡散状況に関する調査から、春蚕期の開始前に活性のあるウイルスが育蚕関連施設の一带に拡散していることを指摘した。もし、秋葉（1980）の結果が養蚕現場にみられる一般的な傾向であるならば、調査を行う養蚕現場の数を増やして BmNPV の拡散状況を調べることにより、養蚕現場における BmNPV の分布傾向について新たな知見が得られ、これまで消毒不徹底で片づけられていた BmNPV の防除における問題を、新たな視点から再検討できると考えられた。このような視点から、第 2 章第 1 節では、第 1 章でとりあげた養蚕現場を対象に、BmNPV の拡散状況に関する調査を行った。その結果、核多角体病による内部汚染繭の発生が認められた多くの養蚕現場では、春蚕期の消毒作業を行う直前（4 月下旬ごろ）に、BmNPV は上蔭室、蚕室、貯桑場および母屋の玄関前まで広く拡散し、BmNPV が検出された養蚕現場では、1 か所の例外（G）を除き、BmNPV の検出箇所には必ず上蔭室が含まれていることが判明した。さらに、各蚕期の収繭直後にも同様の調査を行った結果、上蔭室から BmNPV が検出される養蚕現場が多かつ

た。これらの結果から、既存の養蚕現場では、上蔭室内に活性のある BmNPV が存在しており、作業者の移動に伴って上蔭室から BmNPV が拡散する可能性が高いため、上蔭室内は防疫管理上、最も重要な場所であると考えられた。

第 2 章第 2 節では、塵埃添食試験法において確認できない立体構造をとる蚕具のウイルス汚染状況を PCR で確認する手法を考案した。上蔭室内に置かれている蚕具のうち、BmNPV による汚染が最も危惧されるのは、1 台の装置で全ての蔭から繭を回収する収繭毛羽取機であり、茨城県南地域の養蚕現場では、収繭毛羽取機が未消毒のまま上蔭室内に放置されてきた。そこで BmNPV による収繭毛羽取機の汚染を確認するために、滅菌ガーゼを用いて収繭毛羽取機の表面から微量の埃を採取し、PCR で BmNPV の検出を試みた結果、nested-PCR の併用でウイルスが検出された。この結果から、上蔭室内に置かれている収繭毛羽取機は BmNPV で汚染されているため、核多角体病で内部汚染繭が発生する養蚕現場では、収繭毛羽取機の取り扱いにも十分注意する必要があると考えられた。

第 2 章第 3 節では、核多角体病と細胞質多角体病の併発により壊滅的な違作を経験した養蚕現場の作柄改善経過をとりあげた。この養蚕現場において、BmNPV および細胞質多角体病ウイルス (BmCPV) の分布パターンを 0.5% (w/v) 消石灰水溶液の散布前 (2000 年) および散布後 (2001 年) に調べた結果、消毒の前後に関わらず、BmNPV は主に上蔭室から検出され、BmCPV は育蚕関連施設とその周辺から広範囲にわたって検出される傾向が認められた。防疫対応終了後も消石灰水溶液の散布を継続した結果、2002 年における内部汚染繭の発生調査時には、内部汚染繭に占める核多角体病の割合は蚕期を通してゼロとなり (第 1 章, 表 1 の農家 N), その後 2003 年に行った BmNPV の拡散範囲に関する調

査においても、飼育環境からウイルスは検出されてこなかった。収繭量は、2003年に正常なレベルに回復し、優良な繭を生産する養蚕現場に復帰した。この結果は、ウイルス病で常習違作を繰り返す養蚕現場において、適切な防疫対策を導入することにより、病気の被害を克服した良い例である。本養蚕現場を対象とした塵埃添食試験において BmNPV が上蔭室内から検出されやすい傾向にあったことは、本養蚕現場の防疫対策を検討するうえで重要な知見となっていた。すなわち、上蔭室から BmNPV が検出されやすい本養蚕現場の特徴に基づいて、配蚕作業が始まる前に上蔭室を消毒して回転蔭の準備を済ませておき、さらに上蔭室内に専用の履物を用意して BmNPV の拡散を抑制し、カイコの飼育中には上蔭室への入室は控えるようにした。本養蚕現場の蚕室は、1階に4～5齢を飼育する壮蚕室があり、2階に上蔭室が位置していた。このため、上蔭室内に存在するウイルスが階下の蚕室に侵入してカイコに感染し上蔭室で発病する、「感染」と「発病」の悪循環を繰り返していた可能性があり、防疫対策として上蔭室の隔離を図ったことが、この悪循環の遮断に貢献したものと考えられる。また、上蔭室内には、収繭毛羽取機のように消毒せずに放置されている蚕具があるため、上蔭室内の完全消毒による BmNPV の不活化は困難を極める可能性が高い。しかし、この養蚕現場で行われた取り組みのように上蔭室を可能な限り隔離することで一定の防疫効果も期待できるため、核多角体病が多発しやすい既存の養蚕現場では、BmNPV の防疫対策として、「上蔭室を中心とした消毒作業の徹底」と「上蔭室の隔離化」を図ることが重要であると考えられる。

「養蚕用除菌洗剤」の開発とその利用性

疫学的な視点からどのような考察を加えても、最終的にはBmNPVの垂直伝播を防ぎ、そ

の後の水平伝播による蚕座内感染を防ぐことが蚕病防除を行う上で重要となる。このことから、上蔭室のようにBmNPVで汚染されやすい場所のウイルス防除を徹底するためには、消毒効果のある薬剤で消毒と洗浄を徹底し、ウイルスの垂直伝播によるカイコへの感染を可能な限り防止するしかない。すでに緒言でも述べたとおり、養蚕分野における消毒技術の歴史を振り返ると、ホルムアルデヒドに抵抗性を発達させたコウジカビの消毒問題から端を発して、稚蚕共同飼育所で用いる消毒剤の探索と実用化が進められ、その後、人工飼料による稚蚕飼育の普及に伴って、これまで問題とされてきたコウジカビ病や伝染性軟化病の問題が解決し、これまで製品化されてきた各種消毒剤の製造が中止されるようになると、最終的に消毒作業の効率化を優先したホルムアルデヒドによるガス消毒が稚蚕共同飼育所や大規模養蚕農家で行われるようになった。現在は、ホルムアルデヒドの使用条件が厳しく規制されており、糸繭生産を行う多くの養蚕現場では、消毒剤として消石灰しか使用できない厳しい状況にある。人工飼料育を行う稚蚕共同飼育所では、ホルムアルデヒドによるガス消毒が定着しているため、消毒剤の変更は困難を伴うことが予想される。このような状況下で、高品質の繭を生産するためには、稚蚕共同飼育所でも使用可能な薬剤組成で、なおかつ養蚕現場の消毒にも使用できる新たな防除剤の開発が求められていた。この問題を解決するために、第3章第1節において次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) と炭酸ナトリウム (Na_2CO_3) を併用する新たな手法を考案し、低濃度の NaClO でBmNPVの不活化を達成した。その後、第3章第2節において NaClO と Na_2CO_3 の混合液にテトラポリリン酸ナトリウム ($\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$) を添加することにより鉄への防錆効果が得られることを発見し、「養蚕用除菌洗剤」の基本組成を提案した。第4章では、「養蚕用除菌洗剤」の実用化に関わる各

種試験を行い、主要な蚕病病原に対する消毒効果の検証を行い、さらに鉄の他に銅および真鍮に対する防錆効果も確認した。また、実用化に伴う諸問題の検討として、薬剤散布後の塩素ガスの発生量と調製費用を検証し、本研究で提案した「養蚕用除菌洗剤」は低コストで安全であることを確認した。本研究で開発した「養蚕用除菌洗剤」は、日本国内で食品添加物に指定された薬剤で構成されており、ホルムアルデヒドに比べて安全性は高い。また、食品工場で使用される除菌洗剤には食品添加物から構成されているものもあり(辻, 1984)、本研究で提案した組成は、ホルムアルデヒドの代替剤として社会からも受け入れられやすいと考えられる。特に、一部の養蚕現場では、その年の蚕期終了後、上蔭室を農産物の加工場所として利用する場合があるため、このような養蚕現場における「養蚕用除菌洗剤」の利用は、消費者への安全性にも配慮が可能と考えられる。また、最近では、遺伝子組み換えバキュロウイルスとカイコを用いた有用物質の生産が進展しており(宇佐美, 2014)、遺伝子組換えカイコの大量飼育の実用化も進められている(桑原ら, 2014; 伊藤ら, 2015)。将来、食品工場並みの安全性が求められる環境でこれらのカイコを飼育する場合、本研究で開発した「養蚕用除菌洗剤」の組成が適用できる可能性があり、汎用性も高いと考えられる。

今後の防疫対策における課題

BmNPV の防除対策として今のところ現実的な取り組みは、上蔭室を中心とした育蚕関連施設の消毒と洗浄作業に加え、BmNPV が存在する上蔭室を隔離するくらいしか手段がない。現在、多くの養蚕現場では、ホルムアルデヒドが使用できない状況にあり、回転蔭室等の消毒もできない状況にある。もし将来可能であるならば、上蔭室で使用する蚕具類は、

耐水性で消毒・洗浄可能なものに更新することが望まれる。また、カイコの品種利用の面では、BmNPV に対するカイコの感受性は現行品種間で大差はないとされているが（渡部・清水，1981），その一方で，遺伝資源として保存されているカイコには，BmNPV に抵抗性を示すものも存在すると報告されている（古田，1995）。このことから，これらのカイコ系統を利用して新たな品種を育成し，利用することが重要である。なぜならば，病気の流行をもたらす要因として，「病原体の存在状態と病原力」，「宿主の病原体に対する感受性」および「伝播様式」とそれらに影響する環境要因の存在が知られており（Fuxa and Tanada, 1987），宿主であるカイコのウイルスに対する感受性はウイルス病が流行するための重要な要因となるからである。これらのことから，養蚕現場で核多角体病の発生を防ぐためには，本研究で明らかにした養蚕現場における BmNPV の動態に関する知見と新規の消毒剤に依存するだけでなく，核多角体病に強いカイコの育成を進めることも内部汚染菌の発生を減らすうえで重要な課題になると考えられる。

総 括

核多角体病ウイルス（BmNPV）は、内部汚染繭の発生原因となるウイルスで、養蚕現場で多発して繭の作柄に深刻な被害を及ぼしている。本研究は、茨城県南地域の養蚕現場で発生している核多角体病を原因とした内部汚染繭の発生傾向と収繭量に及ぼす影響を解析し、その防除に役立つ知見を得るために、養蚕現場における BmNPV の拡散範囲と主要な汚染箇所を特定したうえで、ホルムアルデヒドに替わる蚕病防除剤を新規に開発し、実用化を検討したものである。結果の概要は次のとおりである。

1. 核多角体病による内部汚染繭の発生

2002 年の春、夏、初秋および晩秋蚕期に、茨城県南地域の養蚕現場（9～17 か所）を対象に、繭を 500 粒ずつ採集して内部汚染繭を選別し、染色法で核多角体病による内部汚染繭の発生率を調べ、内部汚染繭に占める核多角体病の割合を各蚕期で解析した結果、春から晩秋蚕期に向かうほど BmNPV による内部汚染繭が多発しやすいことが判明した。

調査対象地域における内部汚染繭の発生率と収繭量の関係を解析した結果、内部汚染繭の発生率と収繭量の間を負の相関が成立するのは晩秋蚕期だけであった。このことから、晩秋蚕期に収繭量の少ない養蚕現場では、核多角体病による内部汚染繭が多発していると考えられた。

2. 核多角体病ウイルスによる汚染の実態

内部汚染繭の発生調査を行った茨城県南地域の養蚕現場（13～16 か所）を対象に、養蚕関連施設の BmNPV 分布状況を塵埃添食試験法で 1 年間調べた結果、春蚕期の開始直前から晩秋蚕期の収繭直後まで上蔭室から BmNPV が検出される養蚕現場が多かった。この結

果から、上蔭室は BmNPV に最も汚染されやすい場所であると推定した。

上蔭室内に置かれている蚕具の中で、未消毒のまま放置されている収繭毛羽取機の汚染状況を確認するために、BmNPV の p39 遺伝子の塩基配列に基づいて同ウイルスに特異性の高いプライマーを設計し、収繭毛羽取機から採取した埃から DNA を抽出して PCR および nested-PCR を行った結果、収繭毛羽取機も BmNPV に汚染されていることが判明した。

核多角体病と細胞質多角体病の併発により壊滅的な違作をした養蚕現場において、BmNPV と細胞質多角体病ウイルス (BmCPV) の分布状況を調べた結果、BmNPV は主に上蔭室から検出されており、前述の塵埃添食試験の結果と一致した。一方、BmCPV は、養蚕関連施設全域から検出されたため、BmNPV に比べて汚染の範囲が広がった。この養蚕現場の作柄を改善するために、上蔭室を中心とした各種防疫対策の導入と、BmNPV に消毒効果が認められた 0.5% (w/v) 消石灰水の利用を進めた結果、違作を克服し、繭の作柄と品質が回復し、核多角体病による内部汚染繭の発生も見られなくなった。

3. 次亜塩素酸ナトリウムを含有する核多角体病ウイルス不活化剤の開発

ホルムアルデヒドに代わる BmNPV 不活化剤を開発するために、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の活用を検討した結果、BmNPV 多角体は、0.3% (w/v) Na_2CO_3 水溶液で調製した NaClO 水溶液 (有効遊離塩素, FAC 100 ppm) の 5 分間の浸漬により不活化された。一方、NaClO 水溶液 (FAC 500 ppm) あるいは 0.3% (w/v) Na_2CO_3 水溶液で BmNPV の多角体を処理した場合、BmNPV は不活化されなかった。この結果から、2 種薬剤の併用により不活化作用に相乗効果が認められ、低濃度の FAC で BmNPV が不活化されることが判明した。NaClO (FAC 100 ppm) + 0.3% (w/v) Na_2CO_3 水溶液の BmNPV に対する不活化作用

は 2.5%ホルムアルデヒド水溶液と比べて迅速で強力であった。この結果から、NaClO と Na₂CO₃ より構成される 2 種薬剤混合液は、多角体に包埋された BmNPV に対して優れた不活化作用を示すと判断された。

この 2 種薬剤混合液にテトラポリリン酸ナトリウム (Na₆P₄O₁₃) を添加したところ、鉄の金属片に対して防錆効果が得られる現象を発見した。この作用を検証し、添加に必要な至適濃度を検討した結果、NaClO (FAC 337.2 ppm) と 0.3% (w/v) Na₂CO₃ 水溶液の組合せにおいて、添加に必要な Na₆P₄O₁₃ は、0.2% (w/v) であることが判明した。この研究から Na₆P₄O₁₃ に特異な防錆作用が確認された。すなわち、Na₆P₄O₁₃ は、NaClO と共存する条件下で防錆効果を発揮し、NaClO の FAC が 337.2 ppm の条件下では、1.2% (w/v) Na₆P₄O₁₃ の薬剤濃度で鉄の腐食が抑制された。一方、NaClO を含有しない 1.2% (w/v) Na₆P₄O₁₃ 水溶液では、鉄の腐食抑制作用は認められなかった。これらの結果から、NaClO、Na₂CO₃ および Na₆P₄O₁₃ の 3 薬剤が相互に影響し合い相乗効果を発揮することで、鉄に対して強力な防錆効果を発揮することが判明した。また、この 3 種薬剤混合液を用いて多角体に包埋された BmNPV の不活化状況を調べた結果、10 分以上の浸漬処理で不活化が認められた。

4. 「養蚕用除菌洗浄剤」の実用化

3 種薬剤混合液を「養蚕用除菌洗浄剤」と命名し、用いる薬剤を全て食品添加物のグレードに変更して既往の知見を再検証した結果、水質の影響を考慮する必要性が判明した。この点を配慮して「実用養蚕用除菌洗浄剤」の組成は、NaClO (FAC 240 ppm) + 0.5% (w/v) Na₂CO₃ + 0.2% (w/v) Na₆P₄O₁₃ とした。

蚕業技術研究所の蚕室洗浄作業で用いる地下水を使用して、先の「実用養蚕用除菌洗浄

剤」を調製し、主要な蚕病病原に対する消毒効果を検証した。その結果、BmNPV および BmCPV は、除菌洗浄剤処理から 5 分で顕著な不活化が認められ、15 分で完全に不活化された。コウジカビ病菌 (*Aspergillus flavus* S-85) および緑きょう病菌 (*Nomuraea rileyi*) の分生子は、除菌洗浄剤により 5 分で殺菌され、白きょう病菌 (*Beauveria bassiana*) および黒きょう病菌 (*Metarhizium anisopliae*) の分生子は 10 分後に殺菌された。セラチア (*Serratia marcescens*) および微粒子病原虫 (*Nosema bombycis*) は、除菌洗浄剤処理によりいずれも 5 分で殺菌された。

「実用養蚕用除菌洗浄剤」の鉄、銅および真鍮に対する防錆効果を簡易検定法により検証した結果、鉄、銅および真鍮では腐食が抑制された。「実用養蚕用除菌洗浄剤」に含まれる同濃度の NaClO 水溶液に 24 時間浸漬した対照区の金属は全て腐食した。

「実用養蚕用除菌洗浄剤」を、30℃に加熱した人工飼料育専用蚕室内へ散布 (59L, 1L/m²) して、その後の塩素ガスの発生量を経時的に調べた結果、塩素ガスの発生量は、測定した高さ (0.5 m および 2 m) に関係なく、散布直後から 24 時間後まで 0.025 ppm 以下であった。この測定値は、国の定める塩素ガスの管理濃度の基準値 (0.5 ppm) を下回っていた。

「実用養蚕用除菌洗浄剤」の調製費用を 2% および 3% ホルムアルデヒド水溶液の調製費用と比較した結果、除菌洗浄剤 100 L あたりの調製費用は 473 円であり、ホルムアルデヒド水溶液調製費用の約 1/2~1/3 の費用で収まった。

実用化に関する以上の研究成果から「実用養蚕用除菌洗浄剤」は、養蚕現場における実用評価試験に移行できると判断された。

引用文献

- 阿部広明・嶋田 透・小林香織・前田 進・横山 岳・黄色俊一・小林正彦 (1993) ポリ
メラーゼ連鎖反応による蚕糞中からの濃核病ウイルスの検出. 日蚕雑 62: 376-381.
- 阿部芳彦 (1973) カイコの核多角体および細胞質多角体の染色性. 蚕糸研究 89: 104-109.
- 秋葉芳男 (1980) 違作農家における蚕病病原の拡散と残存期間について (II). 埼玉蚕試研
報 52: 31-34.
- 秋葉芳男・小野恵子 (1979) 違作農家における蚕病病原の拡散と残存期間について. 埼玉
蚕試研報 51: 57-59.
- Aranda-Anzaldo, A., D. Viza and R. G. Busnel (1992) Chemical inactivation of human
immunodeficiency virus in vitro. *J. Virol. Methods* 37: 71-82.
- Chang, P.-S., L.-J. Chen and Y.-C. Wang (1998) The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH,
ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome
baculovirus. *Aquaculture* 166: 1-17.
- 周 垂欽・中垣雅雄・滝沢和也・津田英利・梶浦善太・武井隆三・岩下嘉光 (1999) 消石
灰液によるカイコ核多角体病ウイルス (NPV) の不活化について. 日蚕雑 68: 201-207.
- Desai, M. N., D. S. S. Rana and M. H. Gandhi (1971) Corrosion inhibitors for copper. *Anti-Corros.
Methods Mater.* 18 (2): 19-23.
- 蛭原富男・富田健夫・池上隆文 (1984) 内部汚染菌の発生要因解明と防除に関する試験.
茨城蚕試報 38: 1-34.

- England, L. S., S. B. Holmes and J. T. Trevors (1998) Persistence of viruses and DNA in soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 163-169.
- Evans, H. and M. Shapiro (1997) Viruses. In *Manual of techniques in insect pathology* (L. A. Lacey, ed.). Academic Press, Inc., San Diego. pp. 17-53.
- Fukuzaki, S. (2006) Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection process. *Biocontrol Science* 11: 147-157.
- 福崎智司 (2012a) 次亜塩素酸ナトリウムの洗浄特性と有効利用. 防菌防黴 40: 787-795.
- 福崎智司 (2012b) 次亜塩素酸の科学. 米田出版, 千葉. 166 pp.
- 古田要二 (1963) 細胞質多角体病蚕の排泄した糞によるウイルス感染. 蚕糸研究 48: 30-34.
- 古田要二 (1994) 洗剤によるカイコ核多角体病ウイルスの不活化. 蚕糸昆虫研究 8: 11-18.
- 古田要二 (1995) 蚕遺伝資源, 456 品種の核多角体病ウイルス及び濃核病ウイルスに対する感受性. 蚕糸昆虫研究報 15: 119-145.
- Fuxa, J. R. and Y. Tanada (1987) *Epizootiology of insect disease*. John Wiley&Sons, Inc., New York. 555 pp.
- Fuxa, J. R., J.-Z. Sun, E. H. Weidner and L. R. LaMotte (1999) Stressors and rearing diseases of *Trichoplusia ni*: evidence of vertical transmission of NPV and CPV. *J. Invertebr. Pathol.* 74: 149-155.
- Gomi, S., K. Majima and S. Maeda (1999) Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* 80: 1323-1337.
- Harrison, R. and K. Hoover (2012) Baculoviruses and other occluded insect viruses. In *Insect*

- pathology* 2nd ed. (F. E. Vega and H. K. Kaya eds.), Academic Press, San Diego. pp. 73-131.
- 福原敏彦 (1982) 土壤中の核多角体病ウイルス. 多角体の精製と同定. 応動昆 26: 183-187.
- Hukuhara, T. and H. Namura (1972) Distribution of a nuclear-polyhedrosis virus of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, in soil. *J. Invertebr. Pathol.* 19: 308-316.
- Huybrechts, R., L. Guarino, M. Van Brussel and V. Vulsteke (1992) Nucleotide sequence of a transactivating *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus immediate early gene. *Biochim. Biophys. Acta.* 1129: 328-330.
- IARC (2006) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 88, Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-*tert*-Butoxypropan-2-ol., pp. 39-325.
- Iatrou, K., K. Ito and H. Witkiewicz (1985) Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 54: 436-445.
- Ignoffo, C. M. and S. R. Dutky (1963) The effect of sodium hypochlorite on the viability and infectivity of *Bacillus* and *Beauveria* spores and cabbage looper nuclear-polyhedrosis virus. *J. Insect Pathol.* 5: 422-426.
- 飯塚敏彦 (1972a) *Streptococcus faecalis* AD-4 に感染した人工飼料育蚕中腸被膜の組織学的観察. 日蚕雑 41: 327-332.
- 飯塚敏彦 (1972b) *Streptococcus faecalis* AD-4 による人工飼料育蚕の発病機作. 日蚕雑 41: 333-337.
- 池上隆文 (1990) 新エチレンオキサイド剤「エポソニーミニ 50[®]」の蚕具類の消毒について.

茨城蚕試報 44: 8-14.

池上隆文・蛭原富男（1977）蚕室蚕具消毒剤（V-118）の効果. 茨城蚕試報 31: 28-31.

池上隆文・蛭原富男（1980）病原糸状菌と蚕ウイルス対するピオチノンエースの殺菌・不
活化効果および蚕への影響. 茨城蚕試報 34: 12-22.

池上隆文・蛭原富男（1982）蚕病病原に対するエチレンオキサイドのガス消毒について.
茨城蚕試報 36: 19-25.

石原 廉（1985）微粒子病研究この20年. 日蚕雑 54: 347-353.

石井正市・深瀬悦男・池田 登・松田礼治郎・山川隆平（1975）不結繭蚕・繭中へい蚕の
防除技術確立に関する試験. 山形蚕試要報 12: 69-93.

伊藤 寛（1999）ホルマリンガスによる効率的蚕病防除技術. 群馬蚕試研報 5: 37-42.

伊藤 寛（2001）ビルコンS剤による核多角体病ウイルス消毒効果. 群馬蚕試研報 7: 23-28.

伊藤 寛・桑原伸夫・池田真琴・清水健二・下田みさと・岡野俊彦（2015）養蚕農家によ
る遺伝子組換えカイコ飼育. 生物工学 93: 334-336.

岩波節夫・榎本末男・富田健夫（1985）細菌による繭中死亡蚕と繭中の細菌汚染. 日蚕雑
54: 278-283.

岩下嘉光・周 垂欽（1988）消石灰液による核多角体の溶解とウイルス粒子の不活化. 日
蚕雑 57: 511-518.

Jehle, J. A., M. Lange, H. Wang, Z. Hu, Y. Wang and R. Hauschild (2006) Molecular identification
and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology* 346: 180-193.

門平潤一郎（1950a）家蚕の麴黴病に関する研究. 埼玉蚕試報 30: 1-66.

- 門平潤一郎 (1950b) 家蚕の麴黴病に対する防除試験. 埼玉蚕試報 30: 67-84.
- 景安聖士・早川 徹・伊澤晴彦・浅野真一郎・佐原 健・飯塚敏彦・伴戸久徳 (1997) PCR
法を用いたカイコ病原ウイルス遺伝子の検出. 日蚕雑 66: 477-483.
- 鎌田 寛 (2009) 液体培養と生菌数測定. 獣医微生物学実験マニュアル (原澤 亮・本多
英一 監修). チクサン出版社, 東京, pp. 36-55.
- 金子光美 (1996) 水質衛生学. 技報堂出版, 東京, pp. 282-311.
- 河上 清 (1972) 硬化病蚕の病斑と菌の体内増殖について. 日蚕雑 41: 144-149.
- 河上 清・三国辰男 (1969) 蚕の麴かび病菌に関する研究 (I) 稚蚕共同飼育所に分布す
る麴かび病菌の病原性とホルマリン抵抗力. 蚕試報 23: 323-370.
- 河上 清・三国辰男 (1984) 人工飼料育蚕の硬化病菌に対する感受性. 日蚕雑 53: 245-249.
- 河北俊彦・渡辺卓也・林 金雄 (1967) 養蚕地帯における腸球菌の分布について. 日蚕雑
36: 31-38.
- Kawarabata, T. (2003) Biology of microsporidians infecting the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan.
J. Insect Biotech. Sericol. 72: 1-32.
- 川瀬茂実 (1989) カイコの濃核病ウイルス. 日蚕雑 58: 295-301.
- 川瀬茂実 (1990a) カイコの細胞質多角体病ウイルス. 日蚕雑 59: 1-13.
- 川瀬茂実 (1990b) カイコの核多角体病ウイルス. 日蚕雑 59: 387-401.
- 川瀬茂実・宮島成寿 (1989) カイコの伝染性軟化病ウイルス. 日蚕雑 58: 363-373.
- 柏村鶴雄・荒武義信 (1977) 消石灰乳の蚕病病原に対する不活化効果について. 蚕糸研究
102: 45-53.

- 小林公幸（1982）死ごもり繭の煮繭中における繭層染汚．埼玉蚕試研報 55: 63-64.
- 児玉礼次郎・中筋祐五郎（1968）蚕から分離した細菌．（Ⅰ）無菌飼育蚕にたいする2種の分離菌株の病原効果．日蚕雑 37: 477-482.
- 児玉礼次郎・中筋祐五郎（1969a）蚕から分離した細菌．（Ⅱ）無菌飼育蚕に病原効果を示したE-5株およびE-15株の分類学的研究．日蚕雑 38: 84-90.
- 児玉礼次郎・中筋祐五郎（1969b）蚕から分離した細菌．（Ⅲ）無菌飼育蚕にたいする *Streptococcus* 属乳酸菌および *Serratia piscatorum* の病原性．日蚕雑 38: 103-109.
- 児玉礼次郎・中筋祐五郎（1969c）蚕から分離した細菌．（Ⅳ）蚕の細菌性疾病の発病機構に関する1考察．日蚕雑 38: 406-412.
- Kok, I. P., A. V. Chistuakova-Ryndich and A. P. Gudz-Goban (1972) Macromolecular structure of the DNA of the *Bombyx* nuclear polyhedrosis virus. *J. Mol. Biol.* 6: 255-262.
- 国見裕久（1986）クワゴマダラヒトリ核多角体病の病理生態学的研究．東京蚕指研報 2: 1-93.
- 国見裕久・有賀久雄（1974）飼料条件を異にしたアメリカシロヒトリ幼虫のウイルス感染抵抗性．応動昆 18: 1-4.
- 国見裕久・森田芳昭・本林 隆（1985）消石灰水および殺菌剤混用液の蚕病病原に対する消毒効果．東京蚕指要報 19: 39-50.
- 倉島秀雄・加藤郁夫・斉藤惣治・中山忠三・宮島成寿（1983）愛知県における内部汚染繭の実態．愛知農総試研報 15: 327-333.
- 桑原信夫・池田真琴・清水健二・鹿沼敦子・伊藤 寛（2014）遺伝子組換えカイコの拡散

- 防止技術措置を執った大量飼育技術の開発. 生物試料分析 37: 207-212.
- Lu, M. and K. Iatrou (1996) The genes encoding the P39 and CG30 proteins of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 77: 3135-3143.
- 松岡 宏 (2009) 特化物の法改正に伴うホルムアルデヒド (ガス燻蒸含め) の取り扱いに関する法の概要および解釈. アニテックス 21 (4): 5-10.
- 森田芳昭・国見裕久 (1979) 無刺戟性殺菌剤の開発に関する研究, 第1報, Glutaraldehyde の蚕病病原に対する失活効果ならびに Benzalkonium chloride, 石灰水との混用効果. 東京蚕指要報 13: 41-55.
- 森田芳昭・国見裕久 (1980) 無刺戟性殺菌剤の開発に関する研究. 第2報, 養蚕用「ピオチノンエース」の蚕室蚕具用殺菌剤としての効果. 東京蚕指要報 14: 37-46.
- 森田芳昭・国見裕久 (1983) 消石灰乳および GBV 剤混用液の蚕病病原に対する不活化効果. 東京蚕指要報 17: 30-35.
- 村上計広 (1981) 蚕室・蚕具消毒剤「V-サン液」の蚕病病原体に対する消毒効果に関する試験. 鳥取蚕試報 31: 1-8.
- 永江敏規 (1974) 人工飼料育蚕から分離した乳酸菌の起病性. I. 人工飼料育蚕と桑葉育蚕とに対する起病性の差異. 日蚕雑 43: 471-477.
- 永江敏規 (1977a) 人工飼料育蚕から分離した乳酸菌の起病性. III. 分離菌株の抗生物質耐性. 日蚕雑 46: 25-31.
- 永江敏規 (1977b) 人工飼料育蚕から分離した乳酸菌の起病性. IV. *Streptococcus faecalis* の起病性に及ぼす人工飼料組成の影響. 日蚕雑 46: 384-390.

- 永江敏規・鈴木直雄 (1976) 人工飼料育蚕から分離した乳酸菌の起病性. II. 分離乳酸菌の菌学的性状. 日蚕雑 45: 41-47.
- 永江敏規・鈴木直雄 (1982) 人工飼料育蚕から分離した乳酸菌の起病性. V. *Streptococcus faecalis* の起病性に及ぼすビタミン B 群の影響. 日蚕雑 51: 40-45.
- 野口洋子・小林公幸 (1982) 農家における死ごもり繭の実態調査. 埼玉蚕試研報 55: 110-112.
- 野口洋子・嶋田 透 (1996) ポリメラーゼ連鎖反応によるカイコ核多角体病ウイルスと野外昆虫の識別. 埼玉蚕試研報 68: 19-24.
- 野口洋子・小林正彦・嶋田 透 (1994) ポリメラーゼ連鎖反応による飼育残渣を含めた大量試料からの核多角体病蚕の検出. 日蚕雑 63: 399-406.
- 野口洋子・小林正彦・嶋田 透 (1995) ポリメラーゼ連鎖反応によるカイコ核多角体病ウイルス検出技術の簡易化. 日蚕雑 63: 399-406.
- 野口洋子・平野泰志・根岸 進 (1998) 蚕病診断の手引き. 埼玉県蚕業試験場・埼玉県植物防疫協会. 62 pp.
- 小野恵子・山口邦友 (1981) V サンの蚕病病原不活化試験. 埼玉蚕試研報 54: 72-74.
- Onodera, K., T. Komano, M. Himeno and F. Sakai (1964) The nucleic acid of nuclear-polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Mol. Biol.* 13: 532-539.
- Payan, C., J. Cottin, C. Lemarie and C. Ramont (2001) Inactivation of hepatitis B virus in plasma by hospital in-use chemical disinfectants assessed by a modified HepG2 cell culture. *J. Hosp. Infect.* 47: 282-287.
- Riba, G., K. Katagiri and K. Kawakami (1982) Preliminary studies on the susceptibility of the

silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), to some entomogenous hyphomycetes.

Appl. Entomol. Zool. 17: 238-243.

Rohrman, G. F. (1992) Baculovirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 73: 749-761.

齊藤忠一・山口孝根 (1960) 家蚕の軟化病に関する研究. 第1報, 主として中腸型多角体病に関する研究. 群馬蚕試報 36: 1-79.

Sanekata, T., T. Fukuda, T. Miura, H. Morino, C. Lee, K. Maeda, K. Araki, T. Otake, T. Kawahata and T. Shibata (2010) Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. *Biocontrol Science* 15: 45-49.

関 宏夫 (1981) 核多角体病と繭中へい蚕の発生 (1) 内部汚染繭および揚り繭における病原検索. 山梨蚕試要報 20: 82-87.

関島安隆 (1969a) 蚕における軟化病と細菌. 1. *Serratia* 菌類似菌の稚蚕に対する病原性. 埼玉蚕試要報 41: 150-156.

関島安隆 (1969b) 蚕における軟化病と細菌. 2. 農家の病蚕から分離した *Serratia* 菌類似菌の二, 三の性状について. 埼玉蚕試要報 41: 157-163.

清水孝夫 (1983) 家蚕の各種ウイルス病発生に関する疫学的研究. 長野蚕試報 72: 1-122.

清水孝夫・小森三郎 (1981a) 内部汚染繭からの蚕病病原検索と病原の耐熱性について. 日蚕雑 50: 355-358.

清水孝夫・小森三郎 (1981b) 蚕ウイルスの自然不活化に及ぼす環境湿度の影響. 長野蚕試

要報 17: 125-130.

Spire, B., L. Montagnier, F. Barré-Sinoussi and J. C. Chermann (1984) Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet* 324: 899-901.

須見典昭・遠藤 弘・北島和子 (1982) 上族後に多発する蔟中死蚕及び繭中死蚕の原因究明調査研究 (昭和 56 年). 徳島蚕試要報 3: 52-61.

Summers, M. D. and D. L. Anderson (1973) Characterization of nuclear polyhedrosis virus DNAs. *J. Virol.* 12: 1336-1346.

Summers, M. D. and L. Y. Volkman (1976) Comparison of biophysical and morphological properties of occluded and extracellular nonoccluded baculovirus from in vivo and in vitro host systems. *J. Virol.* 17: 962-972.

鈴木繁実 (1991) 蚕室蚕具消毒剤としてのジクロロイソシアヌル酸ナトリウムの効果ならびに蚕に及ぼす影響. 岩手蚕試要報 14: 78-85.

鈴木繁実 (2002) 小型常温煙霧機を利用した蚕飼育施設・蚕具類の無人消毒法. 日蚕雑 71: 33-39.

辻 薦 (1984) 食品工場における洗浄と殺菌. 建帛社, 東京, pp. 51-166.

辻 薦 (1992) 洗浄と洗剤. 地人書館, 東京, 270 pp.

月田嘉辰 (1973) 蚕室蚕具の消毒剤に関する試験. アリバンドならびにホルマリン混合液による蚕病々原の不活化効果. 埼玉蚕試要報 45: 74-79.

Urano, H. and S. Fukuzaki (2005) The mode of action of sodium hypochlorite in the cleaning process. *Biocontrol Science* 10: 21-29.

- 宇佐美昭宏 (2014) カイコ/バキュロウイルス系によるタンパク質生産と産業利用. 生物試料分析 37: 197-206.
- Wang, X.-W., J.-S. Li, M. Jin, B. Zhen, Q.-X. Kong, N. Song, W.-J. Xiao, J. Yin, W. Wei, G.-J. Wang, B.-Y. Si, B.-Z. Guo, C. Liu, G.-R. Ou, M.-N. Wang, T.-Y. Fang, F.-H. Chao and J.-W. Li (2005) Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J. Virol. Methods* 126: 171-177.
- 渡部 仁 (1968) 細胞質多角体を食下した蚕における糞の起病性. 日蚕雑 37: 385-389.
- 渡部 仁・清水孝夫 (1981) 養蚕農家にみられる最近の核多角体病流行の要因について. 日蚕雑 50: 146-153.
- 山口邦友 (1981) 製糸過程で除去された内部汚染菌調査. 埼玉蚕試研報 54: 46-48.
- 山口孝根 (1974) 蚕室蚕具消毒剤としての「サンマークⅢ」の開発と実用化. 群馬蚕試報 47: 41-50.
- 山口孝根・小野功一 (1972) 動物用消毒剤「アリバンド」の蚕室蚕具消毒への導入に関する試験. 群馬蚕試報 45: 39-48.
- 柳田健郎 (1984a) 超微粒子ホルマリンによる消毒試験. I. 移動式噴霧器による消毒試験. 埼玉蚕試研報 57: 36-41.
- 柳田健郎 (1984b) 超微粒子ホルマリンによる消毒試験. II. 固定式噴霧装置による消毒試験. 埼玉蚕試研報 57: 42-45.
- 柳田健郎 (1985a) 超微粒子ホルマリンによる消毒試験. III. 各種病原に対する消毒試験. 埼玉蚕試研報 58: 47-51.

柳田健郎 (1985b) 超微粒子ホルマリンによる消毒試験. IV. 超微粒子噴霧機の実用化. 埼玉蚕試研報 58: 52-57.

山崎 寿・酒井栄一・下平睦夫・山田たけを (1960) 伝染性のある軟化病 (F) に関する研究. 長野蚕試報 61: 1-28.

山崎 寿・山田たけを・小林あつ子 (1966) 石灰乳による蚕の伝染性軟化病 (F) ウイルスの不活化. 日蚕雑 35: 158-160.

吉原常男・酒井英卿・宮川正通 (1982) 新潟県における内部汚染繭の発生実態. 新潟蚕試要報 21: 35-38.

Zar, J. H. (1999) *Biostatistical analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey, pp. 324-412.

**Epizootiological Survey of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus (BmNPV) in Sericultural Farms
and Development of New Control Methods for the BmNPV**

Mitsuyoshi NOZAWA

Summary

Over the past few decades, the silkworm cocoon production in Japan's sericulture has been suffered from several viral diseases including infectious flacherie, denonucleosis, cytopolyhedrosis and nucleopolyhedrosis mentioned here. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV), a causal agent of the silkworm inside-stained cocoon (ISC) problem, has nowadays become a serious pathogen that lowered cocoon qualities after the harvest. In the present study, the author aimed to consider and establish the adequate disinfection method against BmNPV in farms where the formalin disinfection was hard to conduct. The present thesis is consisted from four chapters containing following results.

Chapter I: Seasonal Occurrence of nucleopolyhedrosis ISCs in sericultural area

In spring, summer, early-and late autumn season of 2002, each of 500 cocoon samples were randomly collected from 9 to 17 sericultural farms located in southern area of Ibaraki Japan, and the nucleopolyhedrosis ISCs were classified with Buffalo black staining. Correlation analyses between % ISCs and % nucleopolyhedrosis ISCs in each season revealed that the r -value, indicator for the correlation coefficient between the two, was higher in order of late autumn ($r=0.985$, $n=15$), early autumn ($r=0.874$, $n=9$), summer ($r=0.866$, $n=15$), and spring season ($r=0.674$, $n=17$), and there were significantly difference in the r -value between the spring and late autumn season by Tukey-type multiple comparison test ($p<0.05$). In addition, correlation analyses between % ISCs and cocoon yields

(kg) in each season showed that the negative correlation was only found in late autumn season ($r = -0.749$, $n=15$), and there were significantly difference in r -value of late autumn season in comparison to the other sericultural seasons by Tukey-type multiple comparison test ($p < 0.05$). These results suggested that the nucleopolyhedrosis was a main factor causing the ISCs and loss of cocoon yields especially in late autumn season of southern area of Ibaraki Japan in that days. This is the reason why the BmNPV should be intensively disinfected and controlled in sericultural farms to keep the cocoon quality high over the season.

Chapter II: BmNPV contamination status in sericultural farms

Using a dust-feeding bioassay, BmNPV dispersal traits and main accumulation points were epizootiologically surveyed in sericultural farms immediately before the spring season in May and soon after the cocoon harvest each season. In 2003, after the first survey in chapter I, dust samples from rearing rooms, mounting rooms, mulberry stock rooms, and entrance of the farmer's houses were collected from 13 to 16 sericultural farms that were investigated previously in chapter I, and were tested in the dust-feeding bioassay to detect the BmNPV. A series of the bioassay revealed that the BmNPV was dispersed around farming area immediately before the spring season and almost all the mounting rooms were contaminated with the BmNPV if the virus was detected from the dust sampling points after the cocoon harvest. These results suggested that the mounting room would be the most important places for the BmNPV control strategy in the sericultural farms.

PCR and nested-PCR techniques were applied to confirm the BmNPV contamination status on structural objects in the mounting rooms. Based on the BmNPV major capsid Bp39 gene region already

reported by Lu and Iatrou (1997), PCR and nested-PCR primers were constructed to check the sensitivity and reproducibility to the DNA amplification from the target sequence of the BmNPV genomic DNA. Using the both techniques, BmNPV contamination status on semi-automatic cocoon harvesters with floss remover were clearly demonstrated. In many cases, the cocoon harvesters located in the mounting rooms are hard to disinfect owing to its machinery structure despite all the rotary cocooning frames are treated with the machine. This result indicates that we should pay much attention to the BmNPV contamination on sericulture-related structural objects like the cocoon harvester to avoid vertical transmission of the BmNPV to the next rearing season.

To consider adequate disinfection points of view, distributional characteristics of the BmNPV and *Bombyx mori* cypovirus, BmCPV, were investigated in a sericultural farm where cocoon yield was heavily damaged by both viruses. Applying dust-feeding bioassays used previously in this chapter, author revealed that the BmNPV was mainly detected from the mounting room and the BmCPV was dispersed widely around the farming area. As to mention of the BmNPV distributional characteristic in this farm, the mounting room seemed to be the most important place for the nucleopolyhedrosis control. To overcome the chronic loss of the cocoon yield in the investigated farm, alternation of working manners in the mounting room and practical application of 0.5% (w/v) slaked lime solution were introduced, and then, cocoon yields in this farm were successfully recovered at the ordinary level without any viral diseases afterward.

Chapter III: Development of a new disinfectant with BmNPV inactivation and anti-corrosion performance

To develop a new disinfectant effective to the BmNPV without using formaldehyde, usability of sodium hypochlorite (NaClO) with sodium carbonate (Na_2CO_3) was studied firstly. The BmNPV in occlusion bodies (OBs) was inactivated synergistically at 5-min treatment with a combined solution of 0.3% (w/v) Na_2CO_3 and NaClO containing 100 ppm of free available chlorine (FAC). On the contrary, 0.3% (w/v) Na_2CO_3 or NaClO (FAC 500 ppm) single solution had no effect to the BmNPV inactivation. This result made it clear that the combination of NaClO and Na_2CO_3 could help the inactivation of the BmNPV at low concentration of FAC and disinfect the virus rapidly.

Secondary, as to the anti-corrosion performance, an interesting and useful phenomenon was observed when sodium tetrapolyphosphate ($\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$) was added in the combined solution of NaClO and Na_2CO_3 . Steel corrosion was strongly suppressed when steel blades were dipped in a combined solution of NaClO (FAC 337.2 ppm), 0.3% (w/v) Na_2CO_3 and 0.2% (w/v) $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$. Concerning the anti-corrosion background of $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$, existence of NaClO was needed to exert the anti-corrosion performance. That is, steel blades in a single solution of 1.2% (w/v) $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ were corroded within 24 h while no steel corrosion was observed when steel blades were dipped in NaClO (FAC 337.2 ppm) solution adding 1.2% (w/v) $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$. Combining three chemicals, NaClO, Na_2CO_3 and $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$, synergistic effect to the rust prevention was also expected in the practical application.

Finally, the BmNPV inactivation was checked using the combined solution of NaClO (FAC 286 ppm), 0.3% (w/v) Na_2CO_3 and 0.2% (w/v) $\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ and it was confirmed that the BmNPV was disinfected completely with immersion treatment of the OBs for 10-15 min in a conventional bioassay used over this chapter.

Chapter IV: Estimation for the practical availabilities of the combined solution of NaClO, Na₂CO₃ and Na₆P₄O₁₃

To avoid the pH decrease owing to the water quality, final concentration of Na₂CO₃ was slightly modified in 0.5% (w/v). A finally decided solution was a mixture of NaClO (FAC 240 ppm), 0.5% (w/v) Na₂CO₃ and 0.2 % (w/v) Na₆P₄O₁₃. This mix solution was named as “Disinfectant Cleaner for Sericulture (DCS)”. Using the food additive grade of the three chemicals, the DCS solution was prepared with the ground water used in the cleansing work of the rearing rooms in the Institute of Sericulture, Dainippon Silk Foundation. Firstly, effects of the DCS solution were checked against the silkworm pathogens including BmNPV (1.03×10⁹ OBs/ml), BmCPV (1.19×10⁹ OBs/ml), *Aspergillus flavus* S-85 (1.12×10⁸ conidia/ml), *Beauveria bassiana* (1.18×10⁸ conidia/ml), *Nomuraea rileyi* (1.01×10⁸ conidia/ml), *Metarhizium anisopliae* (1.06×10⁸ conidia/ml), *Serratia marcescens* (1.10×10⁹ CFU/ml), and *Nosema bombycis* (8.80×10⁸ spores/ml), and these pathogens were disinfected completely within 5-15 min with the DCS treatment. Secondary, an anti-corrosion performance of the DCS solution against steel, copper and brass was evaluated by an immersion method, and it was confirmed that these metals were remained its form without rusting. Thirdly, after the massive spraying of the DCS solution in a rearing room heated at 30°C, the volatility of chlorine gas was checked using gas detection tubes. And it was confirmed that the concentration of chlorine gas after 24hours was less than 0.025 ppm. Lastly, preparing cost of the DCS solution was compared with that of 2-3% formaldehyde, and it was shown that the preparing cost was about a half or third of that of the formaldehyde solutions.

謝 辞

本論文を取りまとめるにあたり，東京農工大学大学院農学研究院 国見裕久教授には，懇切なるご指導とご助言を賜りました．心からお礼申し上げます．

茨城大学農学部 後藤哲雄 教授，宇都宮大学農学部 岩永将司准教授，東京農工大学大学院農学研究院 仲井まどか准教授，同 横山 岳准教授には，本論文の御校閲を賜りました．厚くお礼申し上げます．

大日本蚕糸会 蚕業技術研究所の新保 博 所長には，一連の研究成果を取りまとめるにあたり終始激励とご助言を賜りました．同研究所の井上 元 前所長と村上 毅 元所長には，本研究を開始する契機を賜りました．また，同研究所の田中幸夫 前副所長と阿相敏雄 前技師長には，試験用の蚕品種を分譲して頂きました．また，著者が所属する蚕業技術研究所養蚕チームの代田丈志 上席研究員と浅野栄子 技師には，一連の研究において多大なるご支援とご協力を頂きました．茨城県南地域の養蚕農家の皆様には，2 年間にわたる現地調査と研究材料の採集を快諾して頂きました．茨城県土浦地域農業改良普及センターの高橋和男氏には，茨城県南地域の養蚕農家を戸別に紹介して頂きました．茨城県農業総合センターの池上隆文 首席研究員（当時）と小林則夫 主任研究員（当時）には，共同研究を通して現地調査の手法とウイルス病診断技術をご教示頂きました．群馬県蚕糸技術センターの小林初美 所長（当時），伊藤 寛 独立研究員，国立研究開発法人農業生物資源研究所の宮本和久 上級研究員，新川 徹 上級研究員，和田早苗 主任研究員，同研究所元所長の河上清 博士，元研究室長の古田要二 博士ならびに早坂昭二 博士には，共同研究を通して各種病

理研究の基礎をご教示頂きました。大日本蚕糸会 蚕糸科学研究所の清水重人所長，黒川トシミ主任技師（当時），岡島正章研究員，井上アヤ技師補（当時）ならびに天方美帆技師には，養蚕農家から集めた繭の繰糸検定を実施して頂きました。このように多くの方からご支援頂きましたこと，深く感謝申し上げます。

最後に，一連の研究を行う機会を与えて頂いた一般財団法人 大日本蚕糸会に感謝と敬意を表します。