

第2号

# 纖維研究所研究報告

1997

財団法人衣笠会発行  
THE KINUGASA-KAI FOUNDATION

Published  
by  
KINUGASA TEXTILE RESEARCH INSTITUTE  
KYOTO, JAPAN

人工飼料無菌飼育法をベースにした  
わが国の新しい周年養蚕

松原 藤好

A New Year-Round Sericulture System Incorporating Aseptic Rearing  
Technique of Silkworms on an Artificial Diet

By

Fujiyoshi MATSUBARA

(平成9年3月)

---

現在 京都工芸繊維大学名誉教授  
西南農業大学教授 (中国)

# 目 次

I. 我が国の新しい周年無菌養蚕に関する研究-----	松原藤好
はじめに-----	1
1. 人工飼料無菌飼育法をベースにした我が国の新しい周年養蚕	
1. 1 無菌生命と無菌生物学-----	1
1. 2 無菌生物とその分類-----	2
1. 3 無菌蚕と無菌飼育の意義および無菌蚕の特性	
1. 3. 1 無菌蚕 (Germ free silkworm) -----	4
1. 3. 2 無菌蚕を飼育する意義-----	4
1. 3. 3 自然蚕および無菌蚕の特性-----	6
1. 3. 4 無菌飼育蚕と清浄育の相違点-----	6
2. バイテク・教材・実験動物として無菌 (germ free) 蚕を用いる場合の周年人工飼料無菌飼育システム	
2. 1 バイテク・教材・実験無菌蚕の生産システムにおける基本操作手順-----	7
2. 2 簡易飼育容器 (試験管、シャーレ、プラスチックケース) によるgerm free蚕の周年生産システム	
2. 2. 1 試験管によるgerm free 蚕の飼育-----	12
2. 2. 2 シャーレによるgerm free 蚕の飼育-----	13
2. 2. 3 プラスチックケースによるgerm free 蚕の飼育-----	14
2. 2. 4 無菌装置によるgerm free 蚕の飼育-----	16
2. 3 無菌飼育法の確立によって生まれた新しい技術	
2. 3. 1 年間の飼育回数-----	18
2. 3. 2 給餌法および給餌回数-----	18
3. 人工飼料無菌飼育法を導入した養蚕法とそのプロセスとシステム	
3. 1 周年養蚕と工場周年無菌養蚕-----	23
3. 2 人工飼料を導入した養蚕法の分類	
3. 2. 1 全齢人工飼料育-----	24
3. 2. 2 稚蚕期人工飼料無菌・壮蚕人工飼料普通育 (KIT方式) ---	25
3. 2. 3 稚蚕期人工飼料無菌・壮蚕期条桑育 (KIT方式) ---	25
3. 2. 4 稚蚕人工飼料清浄・壮蚕期条桑育 (農林水産省方式) ---	26
3. 2. 5 1~4 齢条桑育・5 齢人工飼料育-----	26
3. 2. 6 全齢条桑育-----	26

3. 3	周年無菌養蚕のプロセスとシステム	
3. 3. 1	無菌人工飼料の開発 (プロセス1)	27
3. 3. 2	無菌人工飼料の調整 (プロセス2)	30
3. 3. 3	蚕卵の催青と無菌蚕の作出 (プロセス3)	31
3. 3. 4	幼虫の周年無菌飼育 (プロセス4)	31
3. 3. 5	KIT方式の周年種繭生産と蚕種製造 (プロセス5)	35
3. 3. 6	繭以降から製糸工程 (プロセス6)	37

#### 4. KIT方式周年無菌養蚕の特徴と繭糸質

4. 1	KIT方式周年養蚕の特徴とメリット	38
4. 2	KIT方式で生産された繭や生糸、絹の特徴	39

おわりに		41
------	--	----

参考文献		43
------	--	----

## II. 重金属の無菌蚕に対する毒性に関する研究 増井博之

1. 緒論		57
-------	--	----

### 2. 重金属類を無菌蚕に単独投与した場合の毒性に関する研究

2. 1	カドミウムを無菌蚕に投与した場合の毒性	58
2. 2	亜鉛を無菌蚕に投与した場合の毒性	63
2. 3	鉛を無菌蚕に投与した場合の毒性	68
2. 4	ニッケルを無菌蚕に投与した場合の毒性	72
2. 5	コバルトを無菌蚕に投与した場合の毒性	76

### 3. 重金属類を無菌蚕に共存投与した場合の毒性に関する研究

3. 1	カドミウムに亜鉛を共存投与した場合の毒性	81
3. 2	カドミウムに鉛を共存投与した場合の毒性	85

摘要		90
----	--	----

Summary		91
---------	--	----

引用文献		93
------	--	----

# 人工飼料無菌飼育法をベースにした我が国の新しい周年養蚕

松原 藤好

はじめに

我が国の蚕糸業を生産技術の発展過程でみると、独創的な学問研究にもとづいて幾多の革新技術が開発され、しかもその技術の普及に努力が注がれてきたため、現在でも世界の追従を許さない蚕糸生産の技術が生み出され続けており、1960年代の桑に変わる人工飼料や無菌飼育技術の開発もその一つである。

1963年から蚕病防除科学に立脚した無菌飼育による養蚕に関する研究を推進し、生産規模に応じた容易な無菌孵化法、無菌装置や施設、また普通蚕室を無菌室として利用する方法及び産業廃棄物オカラを含有した低コスト人工飼料の開発、蚕種の低コスト周年安定生産と随時孵化法の確立など蚕糸生産に関する基礎から応用に亘る研究へと発展し、養蚕法の終局の目標であった幼虫期25日1回給餌法は1984年に明らかにした。そして我が国の新しい人工飼料を用いた工場周年無菌養蚕のシステム化に成功した。

この生産システムによって、周年での繭生産は勿論、周年生産の無菌蚕はバイオテクノロジーとそれら関連部門の新しい生産方式の産業の開発や自然界で解明できなかった諸問題を解決するための実験動物として利用し、更には教育材料として年間を通して利用できる。そこで今回は従来と全く異なる人工飼料による蚕の全齢期間（幼虫期）1～3回の給餌法による周年無菌飼育法について、無菌用語説明を含め報告するとともに人工飼料の開発によって変わった養蚕法を分類し、特に人工飼料による周年無菌養蚕のプロセスとシステムについても簡単に報告することにした。

## 1. 無菌生物学的手法による蚕の無菌飼育

### 1.1 無菌生命と無菌生物学

我々の周年養蚕法は無菌生物学的手法を導入しているので、先ず無菌の生命や

無菌生物学についてふれてみる。無菌生物学 (gnotobiology) は無菌の生命 (germ free life) という特異的な生命のからくり (仕組み) を究明し、無菌の無生物 (germ free inanimate substance) つまり無菌の土、水および空気との関連面から無菌の生態系統 (ecology system) の研究まで拡大しようというものである。また無菌の生命を自然界の既成の諸学科の研究の道具に利用する学問も含んでいる。これが無菌生物学と定義されている。日本無菌生物ノートバイオロジー学会では無菌生物は無菌動物、無菌植物、無菌昆虫が研究の柱となって基礎から応用まで研究がなされている。

無菌生物 (germ free life) は体表、体内の如何なるところにも現行の検索法で微生物 (microorganism) を認めない上位の生物 (高等動物) で、germ というのはウイルスを含めたあらゆる微生物を指している。検索の対象は細菌が中心となっているので無菌という言葉が使用されている。しかし現行のウイルス検索法を実施し、ウイルスが存在しない事を確かめておくことも重要である。もしウイルスが存在した場合、このウイルスを排除するか、この種の動物は廃棄する必要がある。また検索上確認できないmaskedあるいはlatentのウイルスも種々の処理によって顕性化させ、その排除方策をはかる必要があることは当然である。

蚕においては1963年までは自然蚕ではmaskedあるいはlatentなウイルスが存在すること、またウイルスの経卵伝達なども考えられていた。しかし正常蛾の産卵した卵内はウイルスを含んでおらず無菌である。もし潜在ウイルス (latent, masked virus) が存在したとしても誘発処理法 (5℃ 24時間処理その他) をすれば、体内に1~3000個のウイルスが存在 (潜在) した場合でも増殖させ蚕を発病させるウイルス検索法を確立しているので問題はない。しかし蚕では微粒子原虫の経卵伝達がある。これについては今から約120年前にルイ・パスツールによって微粒子原虫の排除法が確立されているので問題はない。従って我々が無菌で蚕糸生産を実施できるのは、上記のようにウイルスを含めた全ての微生物と蚕との関係が明確にされているからに他ならない。もし、微粒子以外に経卵伝染する蚕病が存在すれば無菌飼育法を養蚕法に採用することはできない。

## 1. 2 無菌生物とその分類

無菌とか無菌飼育といえはウイルスや細菌を含めた全ての微生物が存在しないものとして解釈され、一般にはその言葉を出しただけで飼育は難しく、大変で、施設などが高くてつくという考え方が一般的である。そこで無菌 (germ free) はあまりにもダイレクトすぎるので、もう少しゆとりのある言葉が必要となり、Reyniers (1949) によって gnotobiotite という言葉が提案され、無菌生物は微生物の制御の程度によって次のように分けられている (図1-1)。なお国際実験動物委員会 (ICLA) での用語説明もなされている。

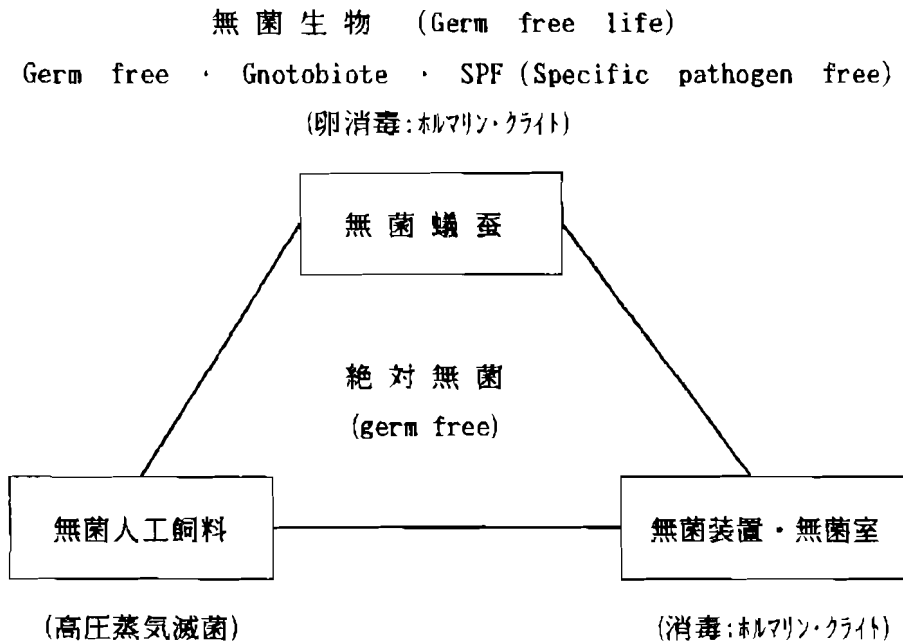


図1-1 蚕の無菌人工飼料育の概念

### 1. Germ free life (絶対無菌)

生体のどこにもvirusを含めた微生物を全く認めない上位の生物のことで、従来無菌と言えは全てこれを指していた。

### 2. Gnotobiotite (ノートバイオート)

自分だけの生命であってもよいし、自分の生命以外に他の一種の生命を含んでもよい。つまり生命内容が明確であればよいことになっている。

### 3. Specific pathogen free (SPF)

特に指定された微生物のいない動物。これは無菌豚の生産が有名である。

### 4. Conventional rearing (普通育)

微生物的に制御されない生物。

Germ freeとGnotobiotは微生物的に制御された生物であり、これは我々が人工的に作りだした生命である。SPFは微生物的に制御されているわけではないが、厳重な閉鎖環境で生産維持されている。現在では動物だけに用いられている。

## 1. 3 無菌蚕と無菌飼育の意義および無菌蚕の特性

### 1.3.1 無菌蚕 (Germ free silkworm)

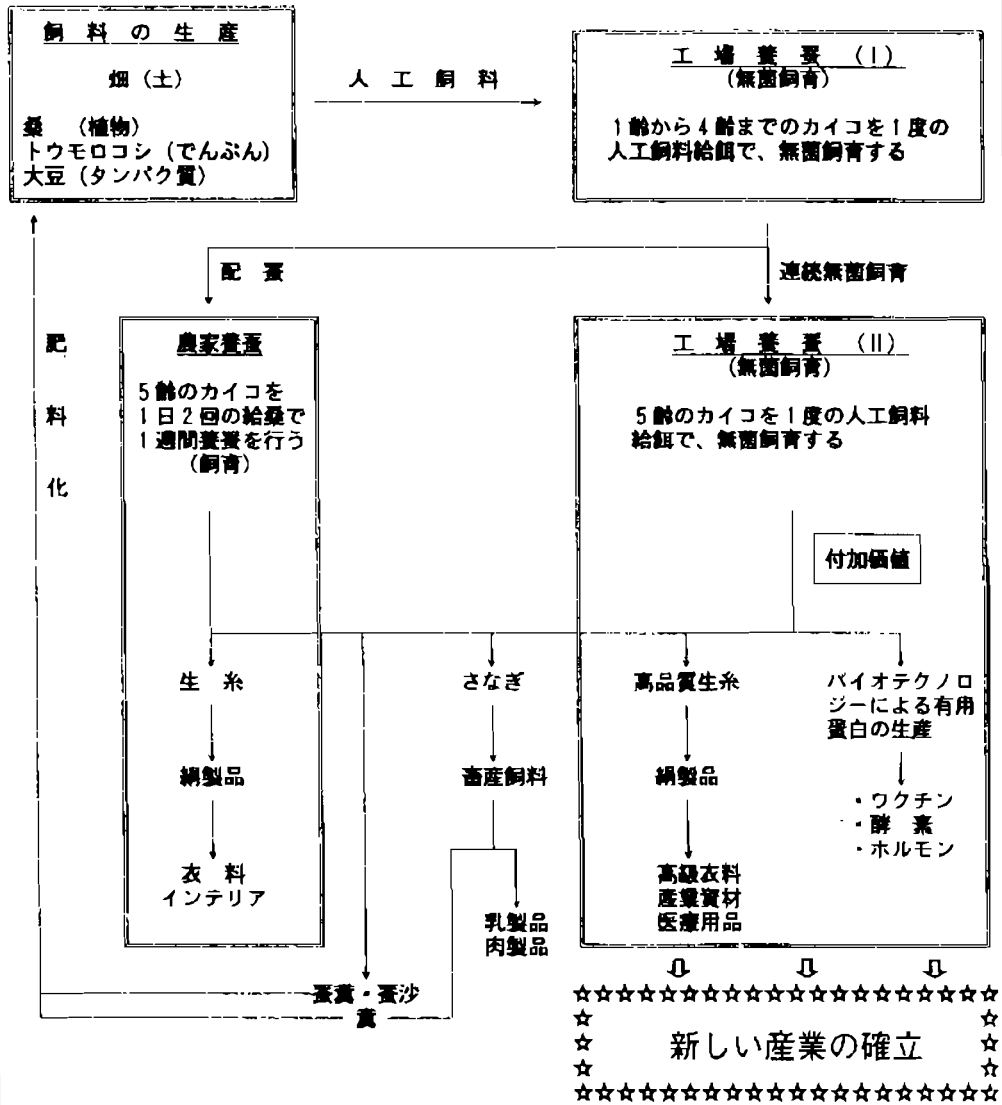
蚕の体表面および体液、消化液など体内のいかなる場所にもウイルスを含めた一切の微生物を認めない蚕を無菌蚕ということにする。しかし自然界では蚕は生まれる(孵化)と同時に微生物の汚染を受けながら微生物と共存している。しかし一般動物の場合と異なって、蚕の場合は特に細菌を含めたウイルス、糸状菌、原虫などは寄生生物として存在する。これらは蚕に対して病原的役割をはたしている場合が多い。したがって普通育でも蚕を飼育する前後は蚕室を完全に消毒して無菌室とし、しかも清浄を保ちながら蚕は飼育しなければならない理由にもなっており、無菌度の維持が蚕作の安定と古くから関係してきた。

### 1.3.2 無菌蚕を飼育する意義

無菌蚕を得るという科学的な興味の外に、これらを材料や手法として用いることによって自然界で究明できなかった諸問題、例えば蚕病の誘発や発生機構の解明、栄養生理、生化学、遺伝学などの研究、教材、バイオテクノロジーおよび生産学などの研究に役立てることができる。しかも蚕の場合は無菌飼育そのものが蚕糸生産という産業につながっており、図1-2に示すように、無菌飼育をベースにした周年養蚕は、エコロジーとエコノミーを包括した先端的革新的生産技術として我が国養蚕業の活性化と将来の発展に期待されるわけである。



『エコロジーとエコノミーを両立させる新しい産業』



『工場での人工飼料無菌養蚕の特色』

- ①省資源 (オカラ等産業廃棄物の再活用・自然のリサイクル)
- ②省力 (工業的生産方法の導入)
- ③省エネルギー (工場排熱・清掃工場・発電所・温泉地・コージェネレーション等の活用)
- ④高品質化 (風合いの良い生糸ができる)
- ⑤低コスト化、伝統産業の活性化、地域の活性化、若者の参入定住化
- ⑥周年生産、原料の安定確保

図1-2 ノートバイオロジーを導入した周年養蚕

### 1.3.3 自然蚕および無菌蚕の特性

- 1 卵は年中市販されており入手できる。また自分で容易に製造できる。
- 2 品種や系統がはっきりしている。
- 3 120年前より卵内微生物は排除されウイルスを含め無菌である。
- 4 卵消毒によって無菌蚕の作出ができ、一度に大量の無菌孵化も容易である。
- 5 体は適当に小さく、飼育期間が短い。
- 6 無菌蚕は比較的小規模の施設で大量育ができる。
- 7 蚕は飼料を平面や波形に作れば、幼虫は飼料上で等間隔に散らばる。
- 8 各齢の眠期は乾燥した場所を好み悪条件で糸を吐く性質がある。
- 9 飼料水分率が60%以下に低下すれば優秀な飼料でも食下しにくい。
- 10 排泄物は糞のみで尿としてはない。また糞は一定の硬度をもっている。
- 11 無菌蚕の排泄物は無菌であり、腐敗がなく、発酵しないので清潔である。
- 12 無菌蚕は30年飼育を継続したが蚕病発生は全くない。
- 13 蚕は一度病気に感染すれば全て死亡する。また治療法はない。

### 1.3.4 無菌育と清浄育の相違点

表1-1 に示した点が大きな差異である。

表1-1 無菌育と清浄育

	無 菌 育	清 浄 育
卵の処理	消毒する	消毒しない
飼料の滅菌	完全に滅菌する	不完全のため防腐、防黴剤を使用している
飼料の形態及び給餌法	平板または波形 下方給餌	切削及び棒状 従来の上方給餌
作業	掃立、4,5齢の飼料交換と発育検査(5齢3日目)	各齢の餉食給餌、拡座、整座
飼育環境	作業が少ないので微生物汚染の機会が少ない	防沙、分箔、停食、眠起の処理 汚染の機会が多い
作柄	周年安定している	不明

## 2 バイテク・教材・実験動物として無菌（germ free）蚕を用いる場合の周年人工飼料無菌飼育システム

我々は、京都工芸繊維大学繊維学部において30年以上に亘りgerm free蚕を用いて周年養蚕の基礎的、応用的研究を進めてきた。このシステムを利用すれば、バイテク・教材・実験動物としてgerm free蚕の各発育段階の幼虫、蛹、成虫および卵などを年間を通じて誰でも、何時でも、必要な数だけ、簡単に生産することが出来る。

### 2. 1 バイテク・教材・実験無菌蚕の生産システムにおける基本操作手順

バイテク・教材・実験動物として無菌蚕を生産する際の蚕の無菌人工飼料育システムの基本操作手順は繭生産を目的とする場合と何等変わるところはないが、繭生産に比すればgerm free蚕の生産は小規模であるから目的によって給餌操作を省略することができる。一般的な手順は以下の通りである。

蚕の幼虫が卵から孵化する1日前に卵表面を薬液で消毒する。消毒した卵は孵化するまで滅菌シャーレに入れて保護する。蚕の1齢幼虫が孵化した当日に、クリーンベンチ内には予め消毒したプラスチック製の飼育箱、蒸気滅菌した調整済みの蚕の人工飼料、飼料上に乗せる蒸気滅菌したポリプロピレン製の1cm角の網目のある網、滅菌剃刀、滅菌ピンセットなどを入れ、クリーンベンチ内で飼育箱の中に滅菌した人工飼料を入れる。人工飼料の上面のポリプロピレンシートを滅菌剃刀を用いて切りとる。この人工飼料の上に滅菌ピンセットを用いて前記の網をのせる。その上に無菌的に孵化した蚕の1齢幼虫を白金耳等で移した（掃立）後飼育箱の蓋をして、これを積み重ね、恒温器または普通飼育室内に移して、25℃の室温に保護する。蚕の数に対して適正量の人工飼料を準備して蚕幼虫に与えることによって、掃立後全幼虫期間の25日を飼料交換すること無く蚕幼虫を飼育し、蚕が繭を作る時点まで飼育は継続する。いわゆる全齢期間1回給餌つまり装置を用いない無人育も可能である。重要な点は、蚕の1齢幼虫が孵化する前の適期に予め卵表面の消毒を行い、消毒済みの卵は無菌容器に保護しておくことである。孵化した1齢幼虫は無菌幼虫（蟻蚕）であるから蚕の発育成長可能

な温度のもとで無菌人工飼料の入った無菌容器中に蚕を入れ約25日間保護すればよい。このように全ての操作を無菌条件で実施することである。

なお生産規模の大小にかかわらず全齢25日3回以上の給餌の必要はない。

### 1 蚕品種

糸繭生産用の交雑種の蚕の卵を蚕種販売業者より購入して使用するが、目的によっては原々種および交雑原種なども入手し使用することが出来る。その年間蚕種生産システムについては周年養蚕システムの項で詳述したのでここでは省略する。なお日本には、約460系統の品種が保存されているので、今後この遺伝子源を利用する事も必要である。

### 2 卵の催青

卵を冷蔵庫から取り出し、必要数を秤量して計り取り、清浄なガラスシャーレに入れ蓋をする。実験目的によって異なるが我々の研究室での一般的な例を示すと、1回の飼育には約1グラムの卵を用いているが、それは約1600頭の蚕に相当する量である。卵を入れたガラスシャーレを箱に入れ、25℃のインキュベーター内で保護する。この操作を催青といい、箱に入れ、暗所で保護するので、これを暗催青という。催青は自分が実験する回数と日時を決定し、それから逆算して催青の日時、回数などを決定すればよい。なお25℃で催青すれば10日前後で孵化するので、それらを考慮し3日に1回催青すれば年間を通して何時でも好きな蚕の材料を得ることができる。

### 3 卵消毒

卵が青み始める孵化1、2日前に、卵消毒用のスチロール容器に卵を移し、蓋をした後、クリーンベンチ内に入れる。卵消毒用のスチロール容器は市販されていないが自分で造ることができる。その方法について述べると、5グラム程度の試薬瓶が入っていた容器を流用すればよい。この容器に蚕の卵の直径よりも小さい穴を多数あけておく。容器がない場合はガーゼを用いてもよい。卵を入れた卵消毒用容器または卵を入れたガーゼをしばって、順次以下の500ミリリットル容器の広口瓶に入れた溶液に浸漬することによって卵表面を消毒する。その消毒順序は図2-1に示した。

- |   |          |      |
|---|----------|------|
| 1 | 70%エタノール | 1分間  |
| 2 | 3%ホルマリン  | 15分間 |

### 3 純エタノール

### 洗滌

卵消毒用容器は大ピンセットを用いて滅菌用溶液の入った瓶の間を移送する。最後に大ピンセットを用いて、卵消毒用容器の蓋を開け、卵消毒用容器をさかさにして、予めガラスシャーレに数枚の円形濾紙を入れ、蓋をして、アルミホイルで包んだものを、160℃で1時間乾熱滅菌しておいた濾紙上に卵を移し更に1枚の濾紙を卵の上にかぶせ、こすりながら、すみやかに卵表面の水分を除き、卵表面を乾燥させる。乾燥しにくい場合は滅菌濾紙を取り替えればよい。卵表面が乾燥したら、滅菌試験管または市販の滅菌プラスチックシャーレに入れ、蓋をした後、クリーンベンチから取り出す。これを卵催青用の箱に入れ、卵が孵化するまで25℃のインキュベーター内で保護する。(写真2-1)

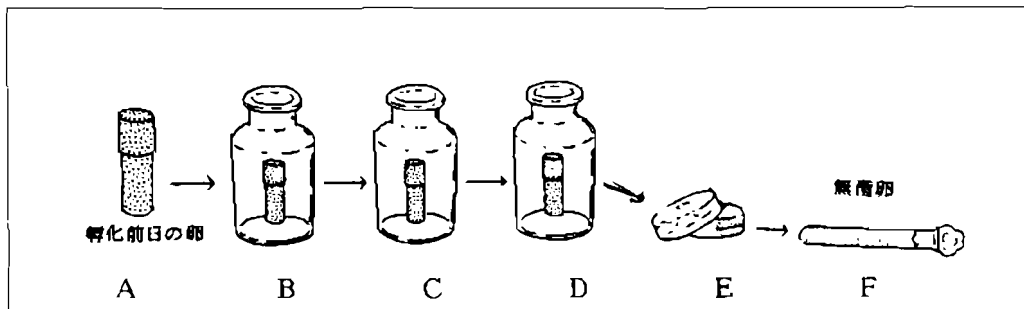


図 2-1 消毒処理順序 (クリーンベンチ中)

- A 孵化前日の卵をスチロール容器に入れる
- B 70%エタノール 1分
- C 3%ホルマリン 15分
- D 純アルコール 洗滌
- E 滅菌シャーレ(滅菌濾紙の入った)水分除去
- F 滅菌試験管

### 4 人工飼料と飼料調製

飼料は清浄育用と無菌育用で異なるので、全齢期間3回以下の給餌の無菌育では1～3齢幼虫期の稚蚕期と4・5齢幼虫期の壮蚕期に使用する人工飼料はいずれも著者らと(株)日光商事で開発したものでKIT-32飼料を用いる。なお自分で人工飼料を作る場合は松原ら(1976)の方法を用いればよい。1回の調製に使用する量は飼育容器や掃立量によって異なるが、飼育容器64×38×9cm

を例にすれば粉体300グラムを秤量し稚蚕期用にはこれに2.4倍量の水道水を、壮蚕期用には2.3倍量の水道水を加えてプラスチック製または金属製のボールの中で木しゃもじまたはスパーテルを用いてよく練り、これをポリプロピレンシート(75×50cm)の上に置く。飼料の上にもう1枚同じ大きさのポリプロピレンシートを置き、飼料をはさんで均一な厚さになるようにガラス棒または木製の丸棒で伸ばしながら、64×38cmになるように成形する。ポリプロピレンシートの端を折り返し、セロハンテープを用いて固定する。この場合飼育用具の大きさに合わせて予めポリプロピレンシートで袋を作ってその中に目的量の飼料を入れた後、入り口を閉じてガラス棒などで平面飼料に成形調製するとよい。成形した飼料をステンレス製の網にのせ、網ごと飼料を蒸し器に入れて、96℃になってから1時間蒸気滅菌する。または高圧蒸気滅菌機を使用する場合は117℃、40分滅菌する。

#### 5 飼育用具の消毒・滅菌

飼育箱としては色々あるがここではプラスチックコンテナ(64×38×9cm)を使用する場合について述べる。プラスチックコンテナとポリプロピレン製の網目1cm角の飼育用網は、消毒剤を入れたプラスチック製の桶の中に30分間浸漬する方法によって消毒する。消毒剤として300倍に希釈したクライト溶液を用いる。30分後にプラスチックコンテナと網を引き上げ、クライト溶液に浸漬した布を固くしぼったものでクライト溶液を拭き取る。プラスチックコンテナと網をクリーンベンチ内に持ち込む。ピンセット類は、200倍に希釈したオスバン液(塩化ベンザルコニウム溶液)に5分間浸漬して消毒する。

#### 6 一般的な無菌飼育

インキュベーター内の箱に入れたプラスチックシャーレ中の卵が1~2頭孵化しはじめたら、プラスチックシャーレを箱から取り出し、インキュベーター内の明所に置く。こうすることによって孵化が促進される。ほぼ100%の蚕が孵化したら、クリーンベンチ内で蚕を無菌飼料上に移し、網をかけ蓋をして恒温器または飼育室に移して蚕の飼育を開始する。

研究材料として無菌蚕を使用する場合、通常掃立時1~3齢1回、4齢1回、5齢1回合計3回新しく作った人工飼料を与える。この操作はクリーンベンチ中で行う。

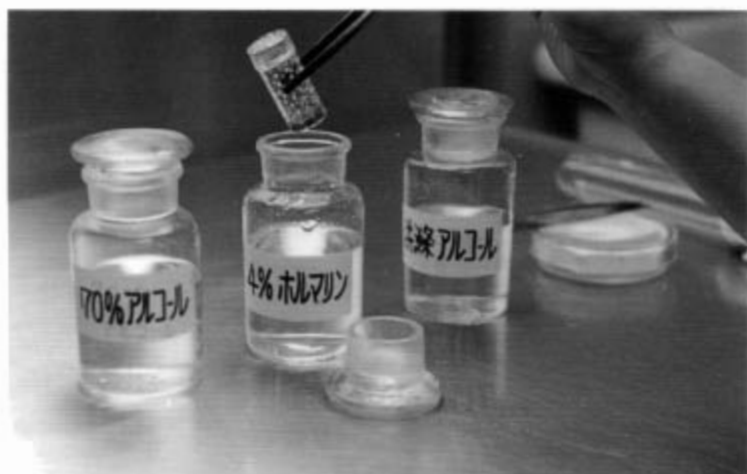


写真2-1 卵面消毒による germ free 蚕の作出



写真2-2 試験管育における無菌飼料の調製



クリーンベンチを用いて無菌掃立や4齢および5齢に飼料を交換した後の無菌飼育容器を置く飼育室は予め清掃し、4%ホルマリンを噴霧して消毒しておく。飼育室は稚蚕用と壮蚕用の2室を準備し室温は稚蚕室は27~29℃、4齢以降の壮蚕室は25~26℃とする。1回の飼育頭数は卵重にして1グラムとし、約1600頭の蚕を飼育する。プラスチックコンテナ(64×38×9cm)1箱当たり、1~3齢は800頭とする。したがって1~3齢は2箱が必要となる。4齢は1箱当たり400頭、5齢は100頭飼育できる。したがった卵重1g当たり4齢では4箱、5齢では16箱のプラスチックコンテナが必要である。通常1齢幼虫に人工飼料を与えた後12日目に4齢幼虫になる。4齢起蚕で初めて飼料を交換し(分箔もかねる)、更に4、5日経過して5齢起蚕時に飼料を交換すれば全齢約25日で営繭する。その具体的な方法については、飼育装置や給餌回数や飼育頭数や実験目的によって異なるので飼育装置や給餌法ごとに詳述する。

#### 7 発育管理

無停食にもかかわらずgerm free蚕はよく揃い発育成長するので、3齢起蚕や4齢起蚕から実験する場合は全く問題はないが、5齢起蚕からの場合は特に眠中が長いので5齢幼虫期の発育開始の時点は以下のようにして決定する。4齢幼虫が4齢眠期に入ってから蚕の発育を飼育箱の外側から頻繁に監視する。5齢幼虫に脱皮してから24時間以内の幼虫を飼料の入っていない滅菌飼育容器にクリーンベンチ中で集める。実験の目的によって5齢幼虫に脱皮してから3時間以内とか5時間以内というように幼虫の発育の斉一度の適切なものを選択する。これらの蚕に人工飼料を与えた時点を5齢0日として5齢期からの実験材料に供するとよい。蚕の発育段階の判定は、各齢の眠、起および蚕の5齢幼虫が糸を吐き始めた時点、蚕が蛹化脱皮した時点、蚕の蛹の眼が着色し始めた時点、蚕の蛹の眼が黒くなった時点、化蛾した時点および産卵した時点などをとらえればよい。

### 2. 2 簡易飼育容器(試験管、シャーレ、プラスチックケース)による germ free蚕の周年生産システム

蚕の無菌人工飼料育システムを利用して簡単で安価でしかも完全無菌環境下で飼育したい場合がある。本法は1963年から京都工芸繊維大学の我々の研究室

で実施しているものであり、その場合は、以下のように試験管やシャーレやプラスチックケースなどを無菌飼育容器として用いる。なおこれら無菌飼育容器はクリーンベンチ中での無菌操作後は恒温器または普通の飼育室に移して飼育している。

## 2. 2. 1 試験管によるgerm free蚕の飼育

試験管そのものが無菌装置になっているので、試験管の中に飼料を入れて滅菌した後に蚕を無菌飼育する。したがって掃立とか飼料交換等の操作はクリーンベンチ中で行えばよい。

1～3齢用と4齢用には直径4.0cm×長さ19.5cmがよく、5齢用には直径5.2cm×長さ17.0cmを用いている。蚕品種、卵の催青および卵の消毒などは前述に準じ、実験目的によって蚕品種は異なる場合もある。

### 1 人工飼料の調製

無菌飼育用に開発された市販の日光商事製の全齢飼育用人工飼料やKITで開発した組成を用いる。特に人工飼料の開発の研究では自分で人工飼料を調製して使用する。

1～4齢幼虫期の人工飼料は乾燥重量1に対して2.3倍量の水道水を加えてよく練る(写真2-2)。

5齢幼虫期の人工飼料は乾燥重量1に対して2.2倍量の水道水を加えてよく練る。1～4齢幼虫期は薬包紙を3分の1に切ったもので、大きさが4×17cmのものに、厚さが0.2cmになるように人工飼料を載せる。

5齢幼虫期は薬包紙を3分の1に切ったもので、大きさが5.4×17cmのものに、厚さが0.2cmになるように練り合わせた人工飼料(乾物20g)を1枚の薬包紙に載せる。この飼料は1～3齢用と4齢用および5齢用のそれぞれを試験管に入れ、試験管の口にシリコン栓をする。この試験管を3～4本ずつハトロン紙を二重にしたもので包む。これをオートクレーブを用いて117℃、40分間の高圧蒸気滅菌を行う。このように試験管自身が無菌装置になっている。

### 2 蚕の飼育

試験管育では全齢1回育は困難で1～3齢、4齢および5齢の3回給餌法も確立しているがここでは1963年無菌飼育に最初に成功した4回給餌法や現在の



写真2-3 試験管による全齢3回育掃立  
飼料交換及び普通蚕室での飼育

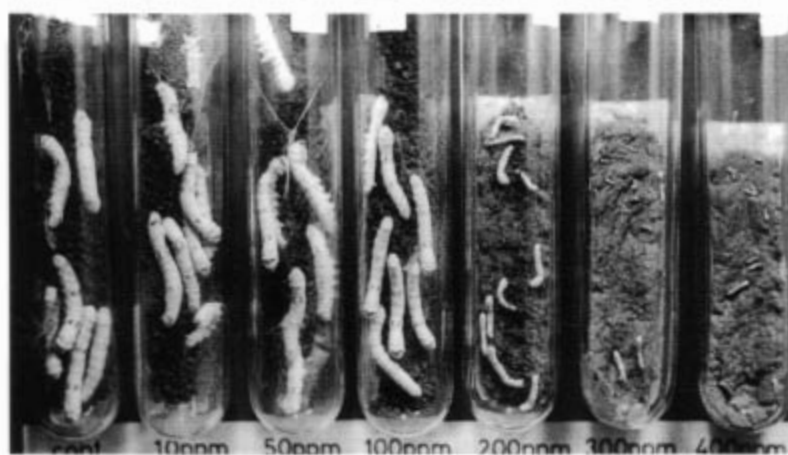
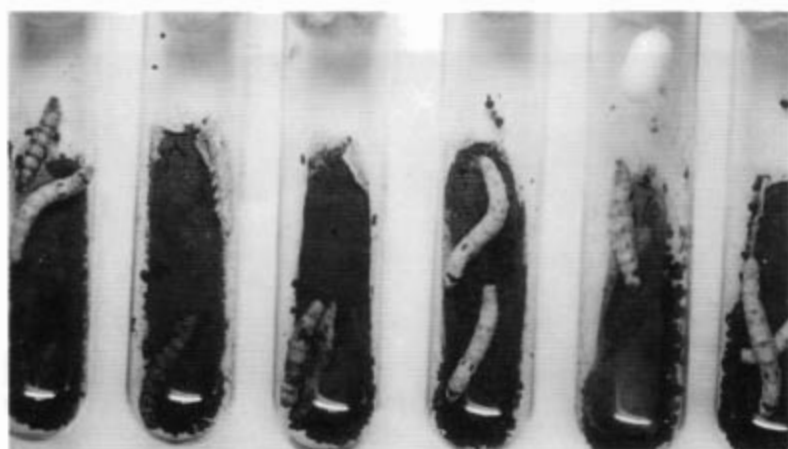


写真2-4 試験管でのウイルス感染実験（上）  
及び重金属（コバルト・ニッケル）毒性検定

3回給餌法について述べる。

クリーンベンチ内に滅菌した試験管を持ち込む。試験管を包んでいたハترون紙を取り除く。試験管の口のシリコン栓を取り、試験管中の滅菌された人工飼料の表面に蚕を白金耳で無菌容器で孵化した蟻蚕を打ち落とすこれが掃立である。

蚕の飼育頭数は給餌回数によって異なり、4回育の場合は1本の試験管当たり1～2齢期間は80頭を目標飼育頭数とする。3齢期間は50頭、4齢期間は20頭、5齢期間は1～2頭とする。つまり全幼虫期間に掃立後3回飼料を交換する。3回育の場合は1～3齢は40～50頭、4齢は15～20頭、5齢期間は1～2頭である（写真2-3）。

試験管を保存する部屋は写真2-3に示したように普通の飼育室または恒温器中でその温度は、1～3齢期間は27～29℃、4、5齢期間は25℃を目標としている。

飼料を与える時点の目安としては、4回育では孵化時に1齢の滅菌飼料を与えた後、8日に3齢の滅菌飼料の入った新しい滅菌試験管3本にピンセットで蚕を移す方法で飼料の交換をする。12日に4齢の滅菌飼料を、17日に5齢の滅菌飼料を同様の方法で交換する。いずれもクリーンベンチ内で新しい滅菌飼料の入った試験管に蚕を目的頭数白金耳または滅菌ピンセットを用いて移す（写真2-3）。試験管育のgerm free蚕は絶対無菌の材料が必要な場合に小規模研究に適している。一般に微生物の感染実験、農薬や重金属および食品添加物の毒性検定や人工飼料の開発などによく用いている（写真2-4）。

## 2. 2. 2 シャーレによるgerm free蚕の飼育

シャーレは蓋が深く、空気が僅かに流入し滅菌し易いので、無菌飼育容器としては適している。全齢3回給餌法については1964年頃から実施しているが、全齢1回給餌は1984年に成功し、掃立したものの殆どは上蔭、営繭、化蛹、化蛾し、更に交尾し約500粒の卵を生むことも明かとなっている。

シャーレの大きさは色々あるが、小さいもの(9×3.5cm)は飼料の良否検定に用いているが、実験研究用としては18×4.5cmのシャーレを用いる場合が多い。掃立前の卵消毒などのプロセスは前述の通りである。

### 1 人工飼料の調製と滅菌

人工飼料は市販のKIT1215無菌飼育用飼料を用いシャーレ1個当たり1～3齢は乾物25g、4齢は40gおよび5齢は60gに水を2.3倍加え、よく練り合わせて葉包紙上に平にし、シャーレに入れ蓋をした後ハترون紙に包んで高圧蒸気滅菌機を用い117℃40分間滅菌する。これが無菌飼料の入った無菌容器つまり簡単な無菌装置となる。試験管の場合は滅菌シリコン栓または綿栓で空気の濾過はできるが、シャーレの場合は濾過装置はない。しかし深いシャーレの蓋によってシャーレ中に僅かに空気が流入するが、シャーレ内の微生物汚染は全くみられない。もし汚染が心配であれば殺菌灯のついた無菌箱で保護すれば安心である。5齢期はシャーレ中では空気が不足するので、蓋を少しずらして空気を入れる必要がある。この場合は無菌箱または無菌室が必要である。

## 2 蚕の飼育

滅菌が終わった飼料の入ったシャーレはハترون紙をめくってクリーンベンチ内に無菌的に移し、シャーレの蓋を開け、予め準備した無菌の蟻蚕を白金耳で約180頭掃立した後予め滅菌した網をその上にかける蓋をして、恒温器または飼育室に移し目的温度で飼育する。掃立後11日目になるとシャーレ中の蚕は網上で3齢眠に入る。その時点で新しく4齢用の飼料をシャーレ中で練り合わせ3個準備し、12日目4齢起蚕を60頭ずつ3個のシャーレに移し、網をかけ蓋をして給餌が終了する。

これらの操作は全てクリーンベンチを用い無菌的に操作する。なお掃立は白金耳を用いるが蚕の移し替えは大型のピンセットを滅菌して用いている。移し替えが終わったシャーレは前記飼育室に移し飼育を継続し、掃立18日目になると網上で4齢眠に入るのので、また新しい人工飼料の入った滅菌シャーレを4齢起蚕の入ったシャーレ1個当たり3個（全体で9個）準備し、4齢の場合と同様の方法でシャーレ1個当たり20頭ずつ大ピンセットで蚕を移し替え飼育室に移して飼育を継続すればよい。掃立後約25日で殆どよく揃って熟蚕となり営繭する。

蟻蚕、3齢起蚕、4齢起蚕および5齢起蚕など発育段階別に何時でも必要量のgerm freeを生産できる。この蚕は人工飼料組成の検討、飼料の良否の判定などの実験に利用している（写真2-5、2-6）。

### 2. 2. 3 プラスチックケースによるgerm free蚕の飼育

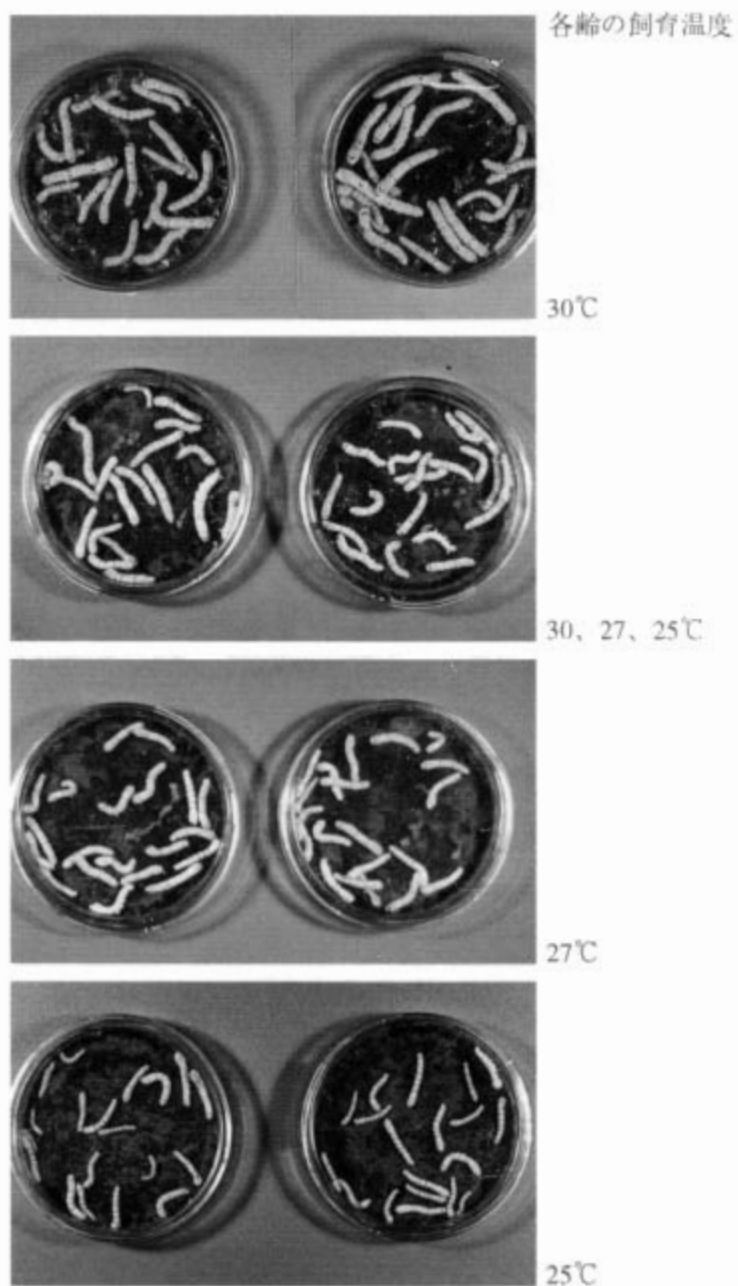


写真2-5 シャーレ(9×3cm)による1-3齢1回育の germ free 蚕  
飼育温度と発育成長の関係 (掃立後12日目)



写真2-6 各種シャーレによる全齢3回育及び1回育(中)  
の5齢4日目の germ free 蚕



1967年頃から用いた無菌装置で大きさは16×22×4cm、および22×29×6cmをよく用いている。これらは試験管やシャーレと異なって素材は高圧蒸気滅菌や乾燥滅菌ができないので、薬物消毒滅菌しなければならない。したがって人工飼料を装置（プラスチックケース）に入れて同時に高圧蒸気滅菌ができないので、人工飼料は予め高圧蒸気滅菌法で作っておく。プラスチックケースは300倍のクライト溶液に浸漬して滅菌する。滅菌した後クリーンベンチ中に入れ、プラスチックケース中に無菌飼料と飼育用網を移し掃立の準備をすることによって無菌蚕の飼育ができる。

表2-1 全齢人工飼料無菌飼育における飼育容器 給餌量および飼育頭数

飼育期間	給餌回数	飼育容器	粉体飼料量 (g)	飼育頭数 (頭)
1-3 齢	1 回	シャーレ	25	120
		プラスチックケース	40	160
		アルミトレイ	500	3000
4 齢	1 回	シャーレ	40	60
		プラスチックケース	70	80
		アルミトレイ	1000	1500
5 齢	1 回	シャーレ	60	15
		プラスチックケース	100	25
		アルミトレイ	2000	500
全 齢	1 回	シャーレ	80	15
		プラスチックケース	120	20
		アルミトレイ	2000	400

備考 シャーレ(18×4.5cm) プラスチックケース(16×22×4cm) アルミトレイ(56×92×3cm)

### 1 人工飼料の調製と滅菌

KIT1215飼料および市販の無菌飼料をプラスチックケースとして16×22×4cmを用いる場合は、全齢25日3回給餌法では1ケース当たり、1～3齢は乾物40g、4齢70gおよび5齢100gを秤量した後、水2.3倍を加えてよく練合し、PPフィルムの袋は15×22cmを作り、この中に練り合わせた飼料を袋に入れて入り口をセロテープで止め、ガラス棒で平面に成形した後、高

圧蒸気滅菌機で117℃40分滅菌する方法で無菌飼料を製造する。

飼料の量は飼育容器の大きさと飼育頭数、同一飼料を食べさせる日数によって表2-1に示すように決定している。

## 2 蚕の飼育

プラスチックケースは300倍の高度晒粉溶液で消毒滅菌した後クリーンベンチに移す。PPフィルム中の滅菌飼料も表面をオスバン溶液でふいてクリーンベンチ中に入れる。

プラスチックケースの蓋を取ってPPフィルム毎に飼料をケースの中に入れPPフィルムの上部を滅菌剃刀で四方を切ると無菌飼料が現れる。その上に予め準備した無菌の蠶蚕をプラスチックケース16×22×4cmの場合は1～3齢1回給餌では160頭を掃立した後、滅菌網をかけ蓋をして普通の飼育室に移して飼育する。掃立後11日目に3齢眠に入るので、4齢用プラスチックケース（無菌飼料の入った）にクリーンベンチ中で1個当たり80頭の蚕を滅菌ピンセットで移す方法で3個に増やす。5齢起蚕では同じように新しい無菌飼料の入ったプラスチックケース1個に25頭ずつ3個に増やす。このように分箔も兼ねて飼料交換を行う。

プラスチックケースが大きく飼育頭数が増加すると4齢起蚕および5齢起蚕時のピンセットでの飼料交換に手間がかかるので、その場合は繭の大量生産の方法を採用して、網を利用して飼料交換を兼ねた分箔の方法を採用すればよい。なおこの場合の飼育ケース、は高压蒸気滅菌にも耐えられる素材を利用しているので、PPフィルム中に調製した飼料は飼育トレイと一緒に蒸気滅菌が可能である。給餌回数、飼育容器別の飼料の必要量とそれに応じた飼育頭数に関しては先に示した。

なお本法はgerm free蚕を最もよく簡単に飼育でき、繭生産の基礎研究に利用している。また各種の実験研究や展示用に国内外で約15日間は持ち運んでも微生物汚染は全くなく、よく揃って成長する（写真2-7, 2-8, 2-9）。

### 2.2.4 無菌装置によるgerm free蚕の飼育

蚕は体が小さく、飼育期間が短いので図2-2に示した簡単な器具を装置として利用できるが、飼育環境（微生物、温度、湿度、風量、空気組成、光、飼料など）

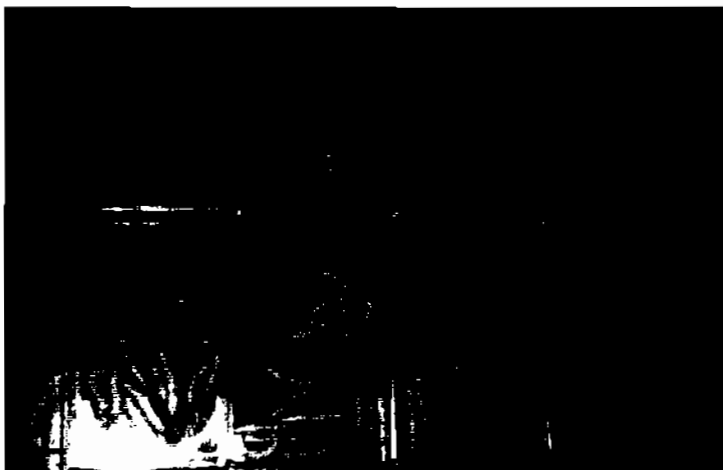
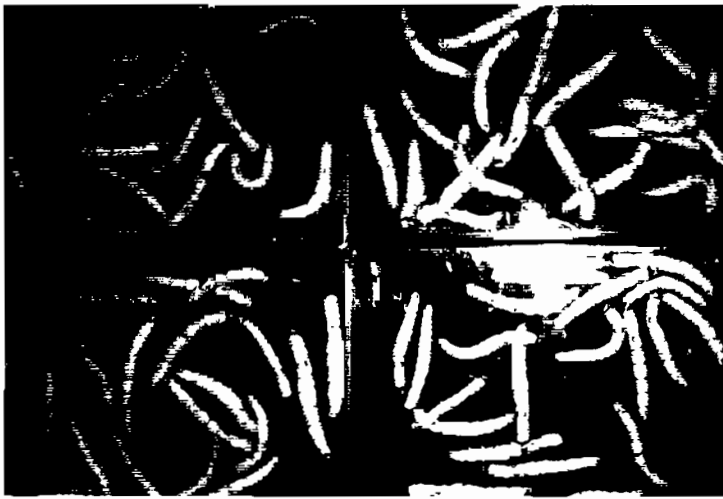
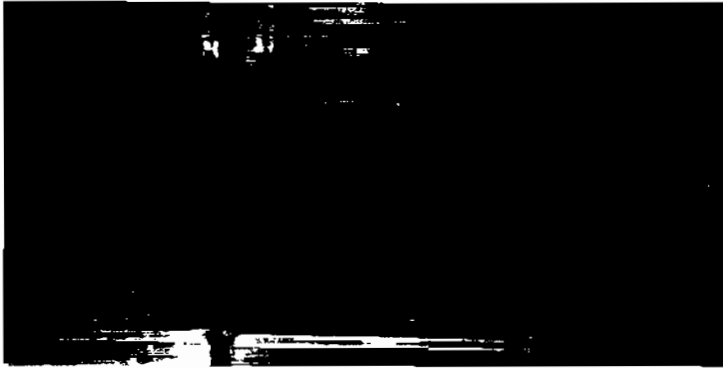


写真2-7 プラスチックケース(16×22×4.5cm)による  
全齢2回育(中)、3回育(下)と地震前の異常行動(上)

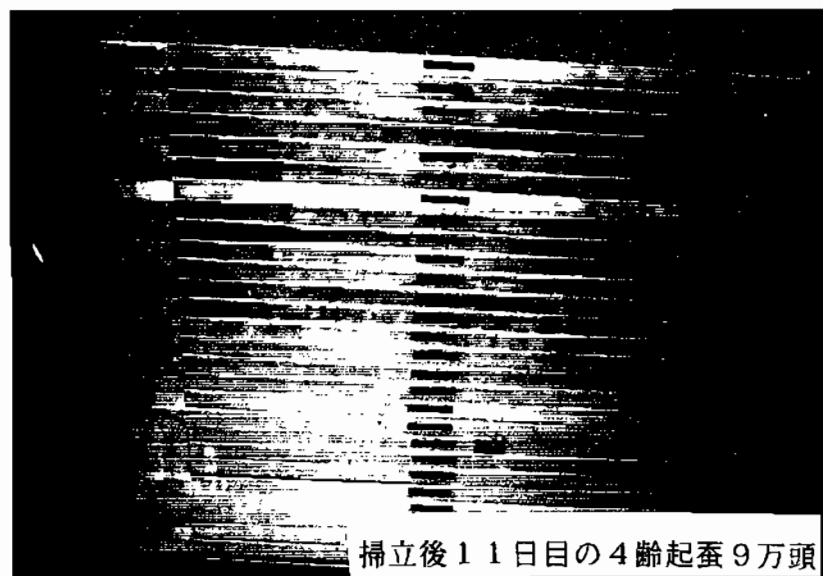
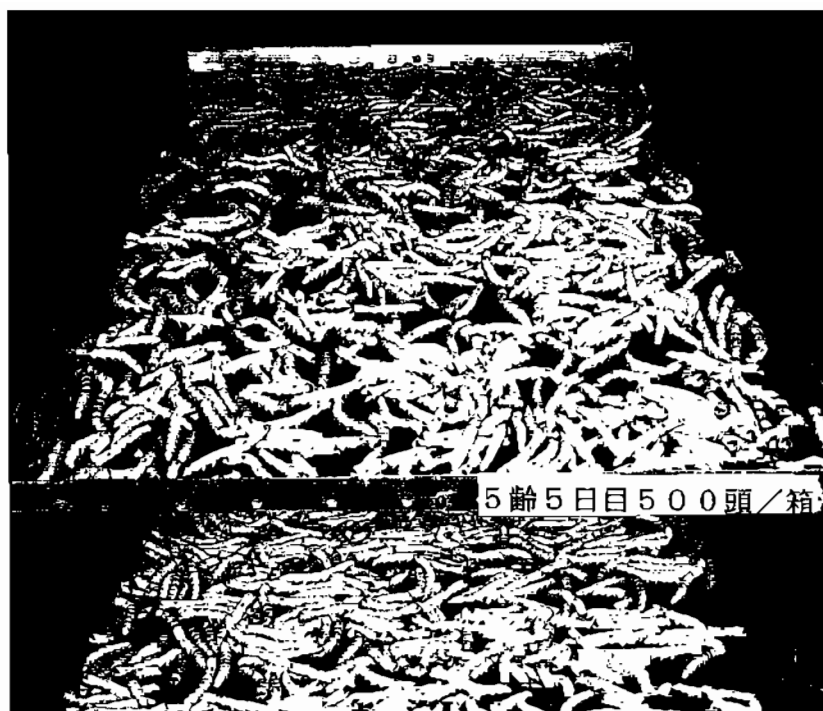
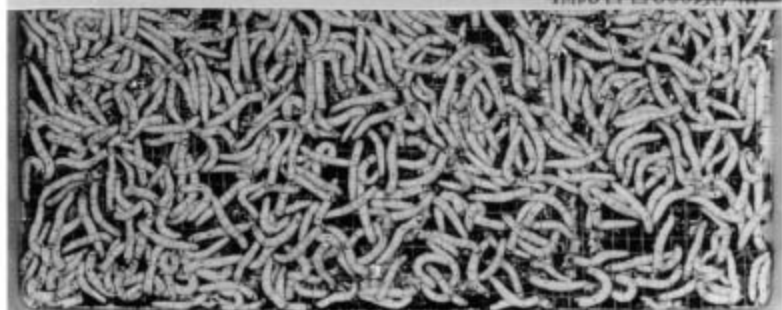
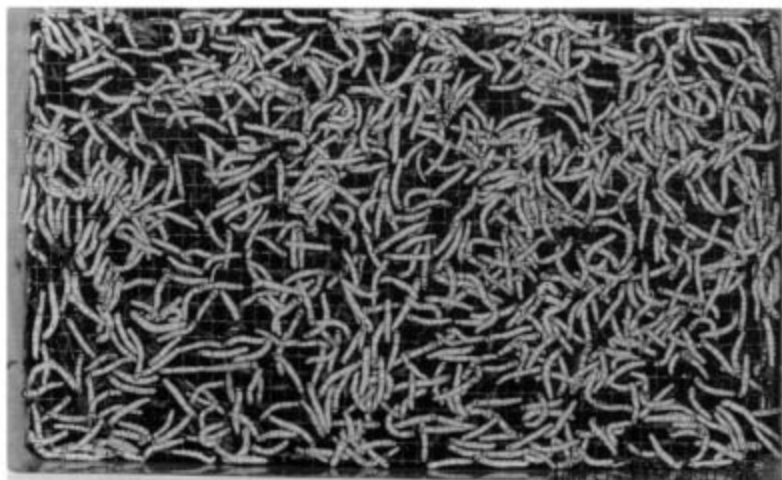
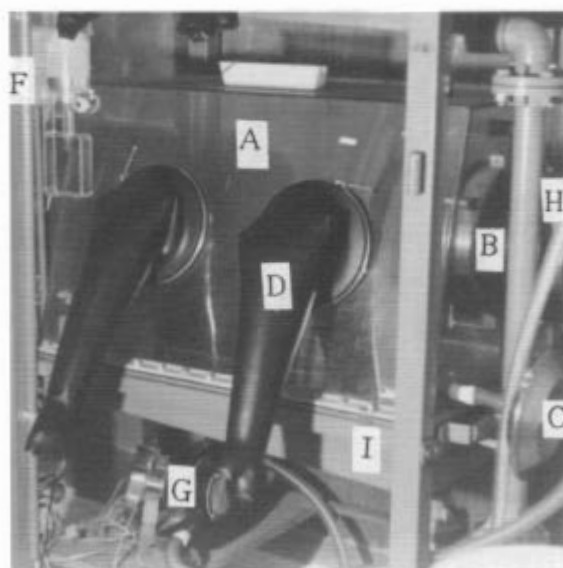
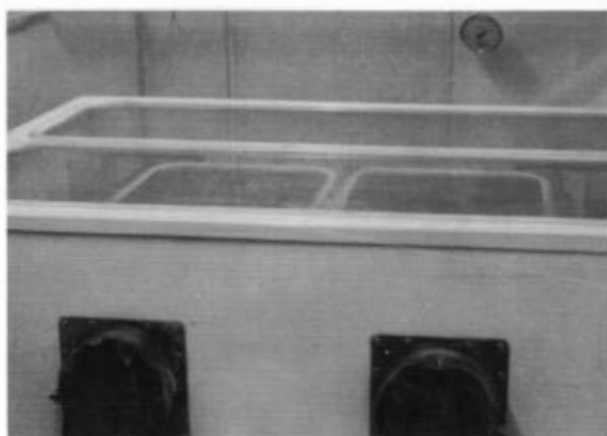


写真2-8 アルミトレイ(92×56×3cm)による全齡3回育の germ free 蚕



帰立後11日目の  
4齢起蚕2万頭

写真2-9 プラスチックコンテナ(64×38×9cm)による  
全齢2回育の germ free 蚕



A：チャンバー　B：ステリルロック　C：エアフィルター  
 D：ゴム手袋　E：ジャーミサイドルトラップ　F：排気トラップ  
 G：ブローア　H：薬液噴霧口　I：台車

写真2-10 昆虫無菌飼育装置第1号機（E）と  
 プラスチックアイソレーターとその構造

と蚕の発育成長との関係の究明は出来ない。そこでそれらを究明できる装置が必要となる。著者らは写真2-10 に示したように1967年に無菌装置1号を開発し、続いて改良型2号を開発した。その後無菌動物用プラスチックアイソレーターや、小糸工業の蚕用のNH型ノートバイオトロンを用いて germ free蚕を生産すると同時に本装置を用いて生産学の基礎から応用に関する研究を推進してきた。

### 1 本学のノートバイオトロン (gnotobiotron) の構造と部品および組立

写真2-10, 2-11 に示したように(A)チャンバー (B)ステリルロック (C)フィルター(D)ゴム手袋 (E)ジャーミサイドトラップ (F)排気トラップ (G)フロア(H)薬液噴霧口 (I)台車 などの部品からなっているので、ステリルロック、排気トラップ、フィルターフレーム、フロア、ゴム手袋などをキャビネットまたはチャンバー空気漏れのないように装着する。

### 2 装置内の消毒滅菌

チャンバーやアイソレーターは薬液消毒滅菌しかできないので10%ホルマリン水または2%の過酢酸を調製してガスマスクと手袋を着用して、ステリルロックの小穴からコンプレッサーに接続したスプレーガンを用いてチャンバー内やアイソレーター内に薬液を噴霧する。そして装置は全て密閉する。過酢酸の場合は消毒後2時間、ホルマリンは24時間を過ぎてから新鮮な空気をフィルターを通して流入させる方法でガス抜きをする。なお消毒前に装置内にはステリルロックやジャーミサイドトラップを利用して、飼育箱、飼育用網、白金耳、ピンセットなど飼育に必要な用具は全て搬入しておく。

人工飼料は水を加え練合、成形、滅菌した後、掃立前にチャンバー内にステリルロックかジャーミサイドトラップを通し搬入する。消毒済みの蚕卵も同様にゴム手袋によって搬入しておく。

### 3 装置内でのgerm free蚕の飼育

装置内のシャーレやプラスチックケースつまり人工飼料の入った飼育容器は、ゴム手袋によって蓋を開けて無菌蟻蚕を打ち落とした後、蓋をして25日間装置内に放置すれば1回育で繭を作ることが出来る。4齢起蚕に1回または5齢起蚕に1回新しい飼料の入った容器にピンセットでゴム手袋によって蚕を移し替え、蓋をして飼育を続ければ全齢2回育で繭を作らせることができる。更に4齢および5齢起蚕に1回ずつ新しい飼料に蚕を移し替えれば3回育で繭が作れる。無菌蚕

の1頭当たり人工飼料の食下量は1～3齢は約0.2g、4齢は約0.4g、5齢は4.5gつまり全齢25日で乾物で約5gの飼料を食下するので、その1～2割増やして用いればよい。したがって飼育容器の大小によって全齢の給餌回数を決し、飼育頭数が判明すればそれぞれの給餌量がわかる。なお前にも述べたように全齢無菌飼育では3回以上給餌する必要はない。またこのことが全齢1回育でgerm free蚕（写真2-12）が容易に作れる理由にもなっている。

## 2. 3 無菌飼育法の確立によって生まれた新しい技術

我々が開発した無菌飼育による周年養蚕は我が国では全く普及していないが、自然の桑や人工飼料普通育でできない次に示すような革新技術を開発することができた。

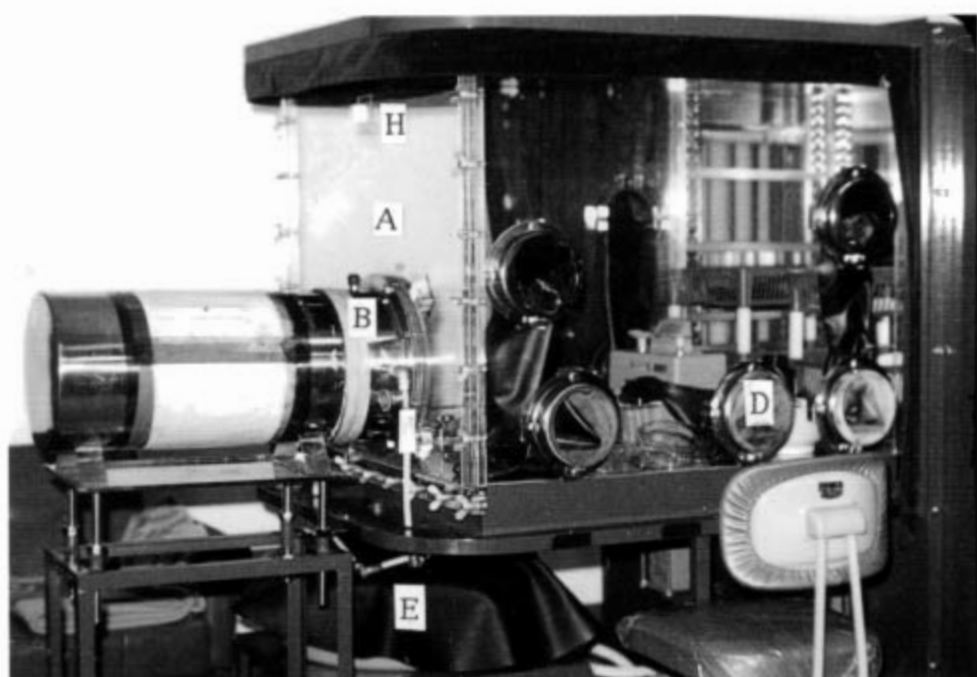
### 2. 3. 1 年間の飼育回数

我が国の養蚕は現在1年の間に5月から10月まで桑のある期間に3回が標準であり4回以上を多回育と言う。最も多くは6回であるが、この場合蚕病の防除科学を十分に利用しなければ失敗する。著者らは1989年から月2回、年間24回（1回1箱または2箱）の繭生産を無菌飼育法で実施している。研究材料は1963年から月5回、年60回以上の無菌飼育を30数年実施している。この間研究材料蚕に蚕病など異常が生じたことは全く無い。3日に1回掃立を実施すれば1年中連続で発育の同じ材料の無菌蚕や繭が365日生産できる。このような周年連続生産が出来るのは以下のように給餌回数を25日3回以下に省力化したことにより、従来のきめ細かい飼育技術を必要としなくなったことによる。

### 2. 3. 2 給餌法および給餌回数

人工飼料では給餌形態によって給餌回数などが決定できる。従来のように切削しない平面に調製した飼料であれば全齢25日に3回以上給餌する必要はない。しかし人工飼料を用いた清浄育では1日に1回または2日に1回を常法として行われており、桑葉育では1日に3～4回が常法である。なお全齢2回および3回育の飼育成績は桑葉育と殆ど変わらない。





A：チャンバー B：ステリルロック C：エアフィルター  
D：ゴム手袋 E：ジャーミサイドトラップ H：菜液噴霧口



装置内の5齢の germ free 蚕

写真2-11 NH型ノートバイオトロン（上）と装置内の全齢1回育の germ free 蚕（下）

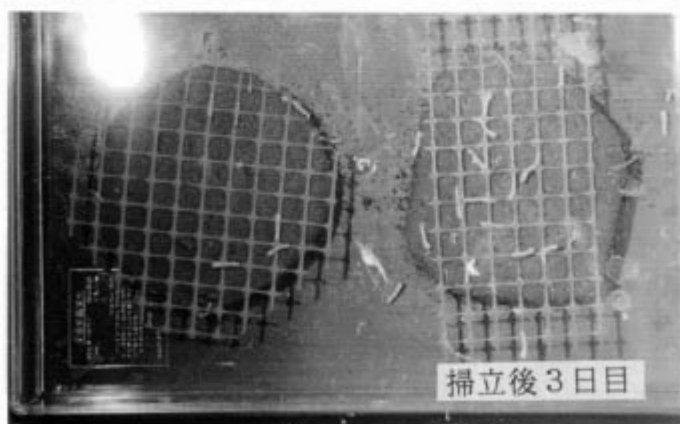
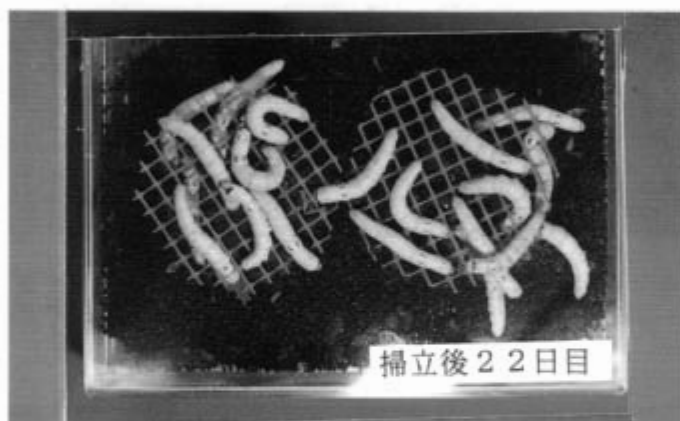
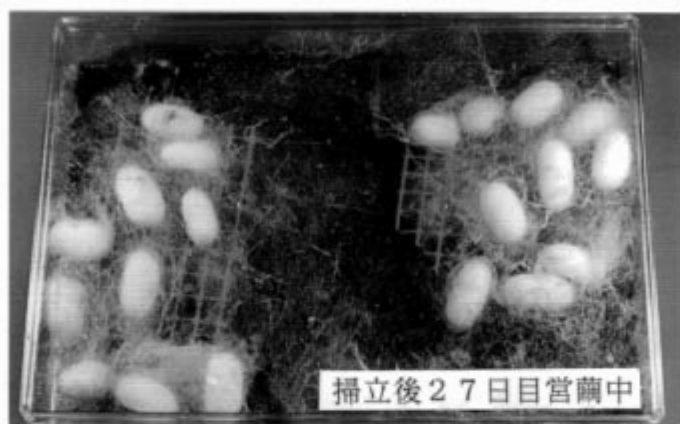


写真2-12 NH型ノートバイオトロンによる全齢1回育の germ free 蚤

表 2-2 全齡1回育の發育経過日数

飼育密度	1-4 齡	5 齡	全齡
18(頭)	18(日)5(時)	9(日)1(時)	27(日)6(時)
15	17 23	9 6	27 5
20	23	9 6	27 5
25	1	9 4	27 5

備考 飼料給餌：掃立時1回

飼育温度：25℃

飼育容器：プラスチックケース(22×16×4cm)

表2-3 全齡1回育の蚕体重 (g)

發育齡	飼育密度(頭)			
	10	15	20	25
蟻蚕	$3.44 \times 10^{-4}$	$3.44 \times 10^{-4}$	$3.44 \times 10^{-4}$	$3.44 \times 10^{-4}$
2齡眠	0.039	0.036	0.038	0.038
3齡眠	0.186	0.185	0.188	0.186
4齡眠	0.889	0.887	0.916	0.883
5齡8日目	5.134	5.121	4.940	4.821
熟蚕	4.575	4.408	4.445	4.056

備考 各区10頭の平均値

## 1 全齡1回給餌法

本飼育法はシャーレ、プラスチックケース、プラスチックコンテナおよびプラスチックトレイなどの飼育容器を用いれば可能である。

その例を示せばプラスチックケース(22×16×4cm)を消毒滅菌し、人工飼料粉体120gに水2.5倍を加え練合し、2枚のPPフィルム間に20×12cmの飼料を平に作り、これを高圧滅菌した後両者ともクリーンベンチに入れ、飼料はプラスチックケース中に入れ、PPフィルムの上部1枚を剃刀で切り取って、この上に予め消毒して生まれた無菌蟻蚕を20頭掃立した後、網目1cm角の飼育網を飼料上かけ蓋をして25℃の恒温室で保護すれば、25日で殆ど飼料を食

べつくし糞だけとなり全部が熟蚕になり、網と蓋の間に繭を作る。(写真2-13)  
なお飼育容器が大きくなれば、飼料を多くして掃立量を増やせばよい。なお全齢  
1回育の発育経過および蚕体重は表2-2,3に示した

## 2 全齢2回育

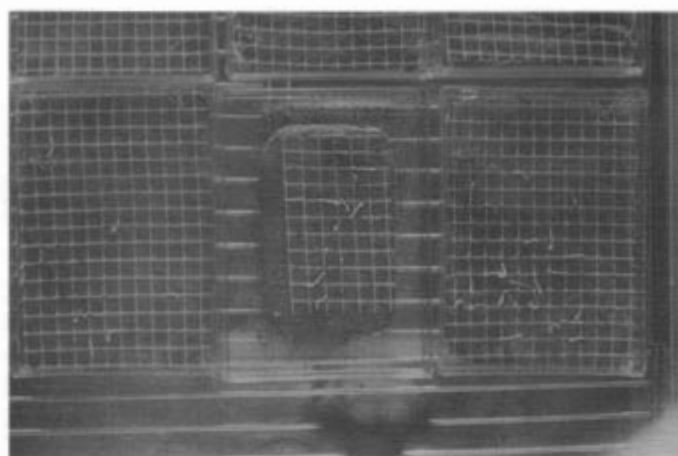
1987年から京都工芸繊維大学、日光商事無菌養蚕システム研究所において、  
更に1990年からは日原町の無菌蚕生産センターで周年で繭生産を実施した方  
法で全齢25日に掃立時1回の他に4齢起蚕または5齢起蚕1回飼料を交換する  
方法である。大量生産では後述することとし、小規模について述べると掃立まで  
は1回育と同じようにプラスチックケース(22×16×4cm)に飼料(乾物)  
40gを練合滅菌してプラスチックケースに入れ、60頭の無菌蟻蚕を掃立て、  
掃立後12日目に同滅菌ケースに170gの人工飼料(乾物)を練合滅菌したも  
のを3個作り、それぞれ20頭ずつ入れ恒温器に移して上蔭営繭させる。また1  
～4齢1回、5齢1回の計2回育の場合、掃立後17日に同様にして新しいケー  
スに同じ人工飼料を3個作り、5齢起蚕を1個当たり20頭ずつ入れ網をかけ蓋  
をした後恒温室に保護すればよい。なお飼育容器の大きいものを使えば1個で6  
0頭や100頭の5齢期の飼育は可能である。

## 3 全齢3回育

人工飼料を用いた周年での蚕種および繭生産は本法を採用している。また研究  
等の材料蚕の飼育も殆どこの3回育であり、小規模の例を示せば、プラスチック  
ケース(22×16×4cm)を用いる場合、人工飼料は乾物1～3齢で40g、  
4齢で200g、5齢で300gを準備し水を加え練り合わせたものをPPフィ  
ルムの上に20×15cmの大きさに平面に作り、これを滅菌してそれぞれケー  
スの中に入れ、クリーンベンチの中で蓋を取って無菌蟻蚕を180頭掃立てる。

12日後に新しい飼料の入ったケースに60頭ずつ3個のケースにピンセットで  
移し、更に5齢起蚕時に20頭ずつ9個の飼料の入ったプラスチックケースに蚕  
を移す方法で飼料交換した後25℃の恒温器で保護すればよい。

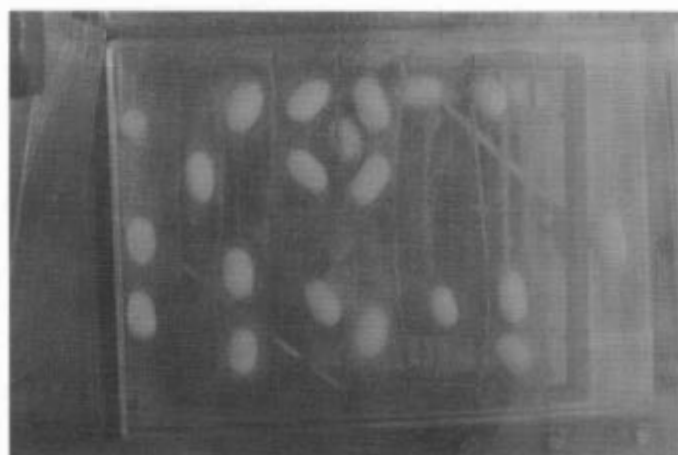
以上のように掃立と4齢および5齢の飼料の調製と飼料の交換のみで、その他各  
齢での飼食、給餌、括座、分箔、除沙、停食および眠期の取扱いなどのきめ細か  
い飼育技術を必要としない。なお全齢2回育および3回育の飼育成績および繭糸  
質および飼育標準などについては表2-4,5,6,7,8に示した。



2齢  
(掃立後5日目)



5齢5日目  
(掃立後22日目)



上簇営繕  
(掃立後27日目)

写真2-13 プラスチックアイソレーターによる全齢1回育



写真2-14 普通蚕室において各種無菌容器を用いた germ free 蚕

表2-4 全齡2回育および3回育の飼育成績

飼育法	飼育容器	供試蚕数	全齡減蚕数		結繭蚕数	掃立蚕に対する結繭率
			簇中			
全齡2回育 I	A	450	6	5	439	97.9
	B	3000	129	47	2815	93.8
全齡2回育 II	A	450	15	4	431	95.8
	B	3000	163	56	2761	92.0
全齡3回育	A	450	7	6	437	97.1
	B	3000	156	38	2798	93.3

A: プラスチックケース B: 1-3 齡7ルミトレイ, 4-5齡 プラスチックトレイ

表2-5 全齡2回育および3回育の繭調査成績

飼育法		全繭重 (g)	繭層重 (g)	繭層歩合 (%)
全齡2回育 I	雌	2.11	0.45	21.6
	雄	1.70	0.42	24.3
全齡2回育 II	雌	2.01	0.42	20.6
	雄	1.68	0.40	23.5
全齡3回育	雌	2.09	0.44	20.9
	雄	1.73	0.41	23.3

表2-6 全齡2回育および3回育繭鑑定の結果

飼育法	生糸量歩合 (%)	解じょ率 (%)	繭糸繊度 (d)	繭糸長 (m)
全齡2回育 I	19.06	66	2.51	1499
全齡2回育 II	18.31	68	2.43	1351
全齡3回育	19.06	66	2.50	1486

表2-7 生糸検査成績

飼育法	節点	小節点	強度	伸度 (%)	抱合 (回)	E X 点
全齡2回育 I	95.00	95.50	4.07	22.2	82	67.00
全齡2回育 II	95.00	96.50	4.07	22.6	82	67.00
全齡3回育	94.00	96.50	4.01	22.8	82	69.37

表2-8 人工飼料無菌養蚕飼育標準表(作業内容,給餌量)(対掃立2万頭)

蚕齡	日順	作業項目	全齡無菌育				清浄育	
			2回給餌法		3回給餌法		農水省方式	
			作業の有無	飼料量	作業の有無	飼料量	作業の有無	飼料量
卵	-6	蚕室消毒	○		○		○	
	-1	卵消毒	○		○		×	
1 齡	1	掃立	○	12.6kg	○	12.6kg	○	0.5kg
	2	給餌	×		×		○	0.4
	3	扨座	×		×		○	
	4	除湿	×		×		○	
2 齡	5	飼食	×		×		○	1.2
	6	給餌	×		×		○	2.3
	7	扨座・除沙・除室	×		×		○○○	
3 齡	8	飼食	×		×		○	3.0
	9	給餌	×		×		○	8.0
	10	分箔・扨座・除沙	×		×		○○○	
	11	除湿	×		×		○	
4 齡	12	網入・分箔・飼食	○○○	297.5	○○○	50.4	○×○	11.0
	13	除沙・分箔	×		×		○○	
	14	給餌	×		×		○	36.0
	15	補給餌	×		×		○	12.0
	16	除沙・除湿	×		×		○○	
5 齡	17	飼食	×		○	259.0	○	63.0
	18	除沙・分箔	×		×		○○	
	19	除沙・給餌・扨座	×		×		○○○	108
	20	除沙・扨座	×		×		○○	
	21	除沙・給餌・扨座	×		×		○○○	126
	22	除沙	×		×		○	
	23	給餌	×		×		○	36.0
	24	上蔭	○		○		○	
飼料合計 (kg)				310.1		322.0		470.4

無菌育：京都工芸繊維大学(KIT)方式，常法3回給餌法，清浄育：農水省方式  
 作業の有○無× 飼料：湿体，KIT飼料は乾物1に対し水2.5倍量

なお、表 2-2,3,4,5,6,7に示したものは1988年に日本蚕糸学雑誌に発表したもので、当時の飼料には乾燥オカラは含まれていない無菌飼料を用いた成績である。



### 3 人工飼料無菌飼育法を導入した養蚕法とそのプロセスとシステム

#### 3. 1 周年養蚕と工場周年無菌養蚕

現在動物生産農業の中で飼料植物の生育期間を生産期間としている動物はカイコとミツバチ、つまり養蚕業と養蜂業だけである。しかし蚕は1960年に人工飼料の開発によって鶏、豚や牛のように他の農業動物生産に仲間入りすることができたわけである。しかし人工飼料が開発されて30数年が経過したにも係わらず、1963年から周年無菌養蚕を実施しているのは我々だけである。

我が国の周年養蚕は従来と全く異なった、無菌生物学的手法を導入した新しい生産法を採用しなければならない。つまり桑葉がある5月～10月までは桑葉育の1～4齢期に人工飼料無菌飼育法を導入した養蚕、その他の時期はその施設を利用した全齢人工飼料無菌飼育による養蚕である。つまりこのような山間地や中山間地域における周年養蚕によって飼育施設や設備を効率的に利用して生産性の飛躍的な向上を計ることである。これを我々は農家型周年養蚕と呼ぶことにしている。一方都市や都市工業団地などで排熱や産業廃棄物を再利用しながら工学的的手法を導入して省力化と安定化を計るいわゆる工場周年無菌養蚕である。これを先進工業国型養蚕と呼んでいる。そのためには周年工場無菌養蚕だけで経営が成り立つことが必要である。

以上のように蚕の人工飼料による無菌飼育法は新しい蚕病の防除理論の確立と蚕糸生産（育蚕）理論の見直しによって1年を通して誰でも、何時でも、何処でも養蚕が出来るようになったので、この養蚕法とそのシステムは我が国の蚕糸業の発展に大きく貢献するものと考えている。なお新しい周年養蚕で重要なことは冬季のエネルギーの問題があり、我々はこれも考慮して色々な提案をしている。

#### 3. 2 人工飼料を導入した養蚕法の分類

我が国においては1960年に人工飼料が開発され、人工飼料で全齢飼育が可能になった。更に1964年無菌飼育法を確立し蚕の飼育法つまり養蚕法は以下のように分類することができる(表3-1)。

表3-1 人工飼料開発後の我が国養蚕法の分類

飼料
桑葉育 (5-10月の季節養蚕)
人工飼料育 (清浄と無菌の周年養蚕)
飼育環境
無菌飼育: (1963年より) 全齡3回, 2回, 1回給餌法
清浄育: 卵消毒なし, 1日1回, 2日1回給餌法
工場周年無菌養蚕 (全齡3回給餌法) 1989年
桑葉育への人工飼料清浄育の導入 (農林水産省方式)
1-2齡人工飼料, 3-5齡桑葉育 (普及率45%)
1-3齡人工飼料, 4-5齡桑葉育 (普及率 3%)
1-4齡人工飼料, 5齡桑葉育 (先進国型養蚕、農水省研究中)
桑葉育への無菌人工飼料育の導入 (KIT方式)
1-3齡1回無菌, 4-5齡桑葉育 1967年～
1-4齡1回無菌, 5齡桑葉育 1988年～
1-4齡桑葉育・5齡人工飼料育 (人工飼料開発当時)
KIT (京都工芸繊維大学または松原) 方式

### 3. 2. 1 全齡人工飼料育

人工飼料の開発当初から三つの方法に分けることができる。

#### 1 全齡人工飼料無菌飼育 (KIT方式)

本法は1964年から京都工芸繊維大学で実施しているもので、1年を通して原蚕および糸繭用の蚕は全齡期間1回給餌法、2回給餌法および3回給餌法などがある。なお全齡幼虫期間の約25日に3回以上人工飼料は給餌しないことを原則としている。本法を京都工芸繊維大学 (KIT) 方式養蚕法と呼び、1989年からは本学を中心に地方自治体 (写真3-1)、および民間 (写真3-2) などで全齡3回給餌法による周年工場無菌養蚕が進められているが、まだ我が国では農家に全く普及していない。

#### 2 全齡人工飼料清浄育 (農水省方式)



日原町無菌養蜂生産センター（産・官・学の共同開発施設）（1992年竣工）



京都府加悦町無菌養蜂飼育所  
写真3-1 中山間地周年無菌養蜂工場



石川県白峰村 西山産業特殊生糸周年無菌生産研究所



京都市伏見区久世工業団地 京ヤ(株) 無菌養蚕システム研究所  
写真3-2 山間地および工業団地の周年工場無菌養蚕(1989年竣工)

人工飼料が開発された当初は全て本法であり、1日1回または2日に1回の給餌法である。現在農林水産省を中心として研究が進められており、糸繭生産では一般にはまだ普及していない。無菌育と清浄育の比較は表2-2に示した。

### 3. 2. 2 稚蚕期人工飼料無菌・壮蚕人工飼料普通育 (KIT方式)

この方式は1965年人工飼料無菌蚕の自然暴露法と蚕病発生の関係にもとづく研究成果から利用できるようになったもので、特に4～5齢期の施設費が軽減できる。それには次の二つの方法がある。

1 1～3齢期人工飼料無菌・4～5齢人工飼料清浄育

2 1～4齢期人工飼料無菌・5齢人工飼料清浄育

1～3齢および1～4齢期の人工飼料は掃立時1回給餌法を原則としている。

### 3. 2. 3 稚蚕期人工飼料無菌・壮蚕期条桑育 (KIT方式)

この方式は桑のある5月から10月までしかできない方法である。

無菌飼育期間の違いによって2通りあるが、次の方式によって繭生産を実施し、なお人工飼料無菌飼育期間の給餌回数は1回である。

1 1～3齢人工飼料無菌・4～5齢条桑育

1965年に我々が提案し、提案当時は1～3齢1回給餌法であったが、1967年から齢中1回育となり、1969年にはまた1～3齢1回給餌法を確立して低コスト、超省力化、高品質および安定化を計っている。

2 1～4齢人工飼料無菌・5齢条桑育

1985年に我々が提案した方法で、最初は1～4齢期2回給餌法であったが、1989年からは1～4齢期1回給餌法により実用化を計っている。まだ農家には普及していない。本飼育法は無菌飼育の期間が最も長いので、超省力化と蚕病感染機会が最も少ない。更に得られた繭は全齡桑葉育と品質や生産性は殆ど変わらない。従って人工飼料を桑葉育に導入した最も理想的な方法である。

以上の飼育法は特に稚蚕期に給餌しないので、飼育用の機械や装置を出来る限り使用しないのが特徴であり、従来の飼育作業は殆ど行わず、蚕の機能を有効に利用しようとする考えのもとに開発した方法である。但し人工飼料の調製は全て自動化している。

### 3. 2. 4 稚蚕人工飼料清浄育・壮蚕期条桑育（農林水産省方式）

農林水産省が全国に普及させる事に努力しているもので、給餌回数は1日1回または2日に1回であり、従来の桑葉育の方法が採用されている。飼育規模が大きい場合は機械化により省力化され、従って人工飼料を切る切削機や飼料を各齢で与える給餌機が開発されている。本法は次の三つに分けることが出来る。

#### 1 1～2齢人工飼料清浄育・3～5齢条桑育

1～2齢の7日間を人工飼料を用い清浄育し、3齢起蚕から条桑育に切り替えて飼育する方法で、稚蚕共同飼育所で利用されており、現在我が国の農家に45%普及している。

#### 2 1～3齢人工飼料清浄育・4～5齢条桑育

人工飼料を用い1日に1回または2日に1回の給餌法で3齢まで飼育し、4齢起蚕から桑葉育に切り替える方法である。我が国での普及率は3%であり、本法が普及しない理由は3齢期の人工飼料代が高い事によると言われている。

#### 3 1～4齢人工飼料清浄育・5齢条桑育

1～4齢を人工飼料で1日1回または2日に1回の給餌法で清浄育し、5齢起蚕から桑葉を用いる方法である。これを農林水産省では先進国型養蚕と呼び、本法では飼料素材の中で最も高価な桑葉粉末の添加をしない人工飼料を開発し、それに適合した蚕品種の選抜と育成と合わせ、研究開発が進められている。まだ研究中で農家には普及していない。

### 3. 2. 5 1～4齢条桑育・5齢人工飼料育

本法は1960年頃人工飼料の摂食の研究に桑育の5齢起蚕が用いられ、人工飼料の研究が進められてきた方法である。本法は現在のところ飼育の安定は望めない。しかし干ばつ、台風および凍霜害などによって桑葉が不足した場合の方法としては重要と思われるので今後研究しておくことも大切である。

### 3. 2. 6 全齢桑葉育

蚕の幼虫期を桑葉で飼育する従来の方法で我が国では52%がまだ桑葉育である。外国では全て桑葉育養蚕である。著者らは1963年から人工飼料無菌飼育を実施して以来、全齢桑葉育養蚕は全く行っていない。

### 3. 3 周年無菌養蚕のプロセスとシステム

我が国は緯度的にみて北半球に位置するので冬季に桑の葉が落葉するため養蚕業は5月から10月までの季節に支配されたため、システム化することはできなかった。しかし低コスト人工飼料の開発と無菌飼育法の確立によって図3-1に示すようにKIT方式の周年無菌養蚕のシステム化に成功し、1989年からは地方自治体や民間の協力によって年間を通して連続的に安定した無菌養蚕を実施している。我々が意図した生産システムは、季節に支配された生産リズムから脱却して、しかも先に示したエコロジーとエコノミーを両立させる新しい生産技術を開発することであった。実際にこのシステムを普及させるためには、過去にとらわれない新しい生産様式を模索する必要がある。我々が開発したシステムは6項目のプロセスからなっている。そこでKIT方式の周年無菌養蚕のプロセスとシステムについて述べ、本法での生産様式、繭糸質および経営試算などについて簡単に報告する。

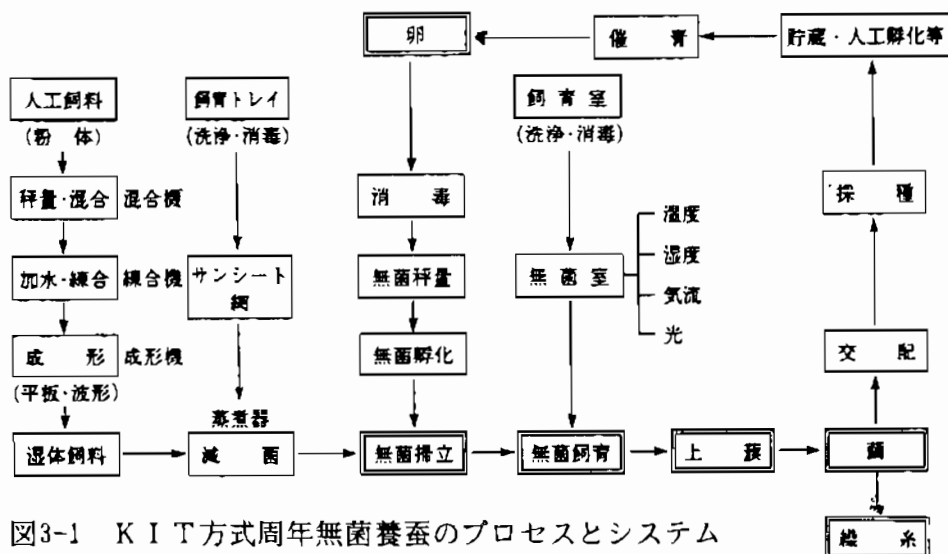


図3-1 KIT方式周年無菌養蚕のプロセスとシステム

#### 3. 3. 1 無菌人工飼料の開発 (プロセス1)

周年無菌人工飼料養蚕で最も重要な課題は、如何に良質で低コストの人工飼料を年間安定して調製し供給できるかにある。

蚕の人工飼料は、タンパク質、炭水化物、脂質、ビタミン類および無機成分な

ど5大栄養素をバランスよく含むことが大切で、蚕は栄養の他に特別に水を要求しないので飼料中の水分率も重要である。

実際に低コスト人工飼料を開発するには、5大栄養素を含む主要素材を決定し、飼料全体のコストの中で、各素材のコストの占める割合を計算し、高価な素材は同じ効果を持つ他の安い素材に代替える事も重要である。著者らが開発してきた無菌人工飼料の主要素材で最も大切にしたのは桑葉粉末である。現在は他の素材に比べ高価ではあるが、わが国では全地域で生産が可能なことや、桑葉は蚕の発生以来から唯一の食物であること、図3-2 に示すように天日乾燥によって桑葉粉末を安く生産できるようになったこと、また多くの既知や未知の物質も代替えできることなどから、将来にわたって素材から抜くことは考えていない。脱脂大豆粉末は蚕の蛋白源として古くから用いられており、蚕の摂食、発育成長や絹蛋白の合成とかかわりが大きく、蚕に適した素材である。オカラ乾燥粉末は脱脂大豆粉末と同じ大豆が原料であり、現在は産業廃棄物として取り扱われているので、資源の再利用によって飼料コストを安くするためには大切な素材である。またセルロースの代替えや澱粉を少なくすることにも役立っている。澱粉は炭水化物源の他に飼料の成型剤として用いている。切削して使用する飼料では成型剤として高価な寒天が加えられているが、無菌用人工飼料は開発当時から平面に作り切削しないので添加の必要はない。

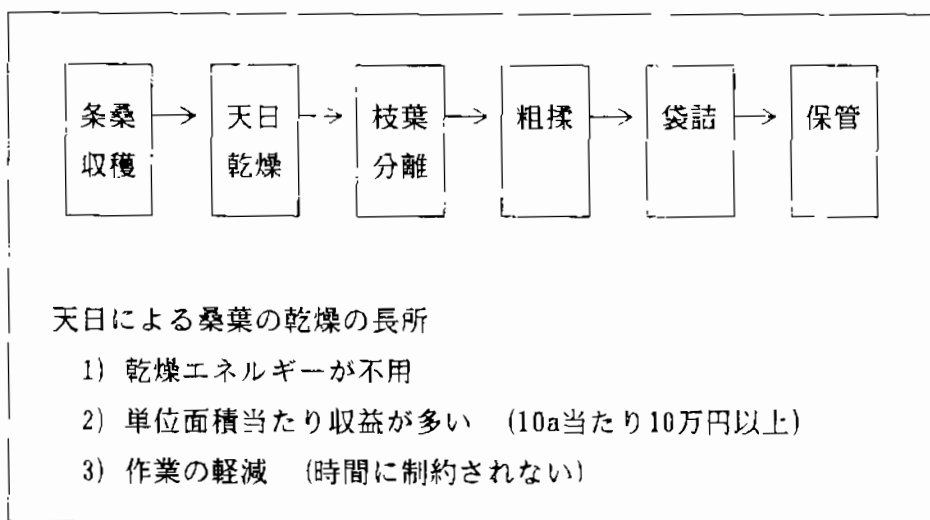


図3-2 天日による桑の乾燥工程と長所



その他微量物質としてのビタミン類、無機塩類および摂食促進物質などは、開発当時の飼料組成を参考にしながら必要でない高価なものは除いている。なお、清浄用飼料に用いられる防腐、防黴剤は不吐糸蚕の発生の危険があるので、全齢3回給餌の無菌飼育では原則として用いないようにしている。

### 1 稚蚕用低コスト人工飼料

人工飼料無菌飼育では表3-3 に示したように稚蚕期（1～3 齢）の食下量は全食下量の僅か3 %である。したがって稚蚕期には多少高価な素材でも摂食成長のよい素材を用いることに重点を置くことが望ましい。また飼料水分率は壮蚕期よりもやや多いめにするようにした。特に蒸気滅菌で破壊され易いビタミンCは、破壊分を見込んで増量することになっている。著者らは現行糸繭用品種や交雑原種を用い、安藤・田坂（1986）の直交計画法（直交配列表を用いる多因子計画法）によって主要素材とその配合量を決定している。

表3-3 全齢3回育における給餌量・食下量・消化量(対1頭)

給餌期間 と回数	給餌量 (乾物) (g)	食下量 (乾物) (g)	食下率 (%)	消化量 (乾物) (g)	消化率 (%)	全食下量に 対する割合 (%)
1-3齢1回	0.284	0.15	52.8	0.09	56.3	3.1
4齢1回	0.697	0.38	54.7	0.15	40.4	7.8
5齢1回	5.616	4.33	77.1	1.47	34.0	89.1
合計	6.597	4.86	73.7	1.72	35.3	100

飼育温度：25℃， 飼育室：無菌室

### 2 壮蚕用低コスト人工飼料

全食下量に対する壮蚕期の食下量の割合は4 齢では7.8 %、5 齢は89 %である。したがって壮蚕期は如何に低コストの飼料を用いるかが、人工飼料による周年養蚕においては重要である。また稚蚕期に比べ壮蚕期は食性の幅も広がっているため、同じ素材でも安いものに代替える事も可能である。

主要素材は最も安価な産業廃棄物のオカラ粉末は悪影響のない最上限とし、高価な桑葉粉末量は必要最少限とした。脱脂大豆粉末は、稚蚕用の素材より安価な

ものを用いた。

以上のように飼料は給餌回数や生産目的なども考慮しながら、稚蚕用と壮蚕用に分けて開発しており、稚蚕用と壮蚕用の飼料組成とその価格は表3-4 に示した。

人工飼料の価格は、現在我々が工場養蚕に供している稚蚕用および壮蚕用は大学の研究室で個々に素材を購入すると、乾物kg当たり壮蚕用は約200円であり、稚蚕用は僅かに高い。なお参考までに現在市販されている飼料は乾物kg当たり800～1500円となっている。

表3-4 人工飼料組成と価格

飼料素材	単価 円/kg	稚蚕用 (1-3齢)		壮蚕用 (4-5齢)		標準飼料	
		添加量	コスト	添加量	コスト	添加量	コスト
	(円)	(g)	(円)	(g)	(円)	(g)	(円)
桑葉粉末	200	25	50.5	10	20.0	32	64.0
脱脂大豆粉末	180	40	72.0	19	34.2	(32) 47	(211.2) 84.6
オカラ粉末	20	15	20.0	50	10.0	-	-
澱粉	80	11	8.8	12	9.6	12	9.6
セルロース	370	0	-	-	-	3	11.1
微量成分混合物	1900	6	114.0	6	114.0	6	114.0
無機塩混合物	450	3	13.5	3	13.3	-	-
合計		100	278.3	100	201.3	100	283.3
						100	(430.5)

備考( ): 機械乾燥桑葉粉末単価600円/kg 市販飼料(乾物):800円-1500円/kg

### 3. 3. 2 無菌人工飼料の調製 (プロセス2)

周年無菌養蚕工場での無菌人工飼料の調製のプロセスについては粉体を秤量した後、混合機で混合し2.2倍の水を加え練合機で練合し、成型機で平板または波型に成型し洗浄消毒したサンシートを敷いた飼育トレイに入れ蒸煮滅菌するプロセスで無菌飼料は調製している。

このプロセスは写真3-3,3-4 に示すように練合、成型圧延、滅菌機による自動



混合・加水練合・移送・圧延成型滅菌の各プロセス・システム



飼料練合・移送・圧延成型機  
写真3-3 日原町無菌人工飼料調整装置((株)ヤナギヤ製作)



高压蒸気滅菌機



練合・圧延・成型・滅菌  
写真3-4 京ヤ(株)(旧日光商事)無菌人工飼料調整装置(1989年竣工)

化により省力化されており、何時でも必要な時に養蚕工場内で稼働させることができる。なお小規模生産の飼料調製は先に述べた方法で全て手動で行っている。

### 3. 3. 3 蚕卵の催青と無菌蚕の作出（プロセス3）

一般動物は帝王切開術によって無菌動物を作出するが、健康な蚕が生んだ卵内は無菌であるから、卵表面の消毒によって簡単に無菌蚕を作出することができる。蚕卵の消毒は用いる薬物の種類、濃度および作用時間によって孵化率や消毒効果は異なる。また卵の催青日順つまり卵の発育の時期によっても孵化率は異なるので、著者ら（1965）はホルマリン水2.0～4.0%および高度晒粉溶液200および300倍液を用いて催青日順別に最も孵化率の高い消毒条件を明らかにした。周年生産用においては図2-1に示した方法を応用して、催青末期つまり孵化前日に300倍の高度晒粉溶液に15分間の侵漬消毒を行っている。なお消毒前後は純エタノールに浸漬することによって消毒効果と孵化率はよくなる。消毒後の卵は秤量した後無菌容器に入れ暗催青を続け（写真3-5）る。桑育や人工飼料清浄育ではこのようなプロセスはない。

### 3. 3. 4 幼虫の周年無菌飼育（プロセス4）

幼虫の無菌飼育方法には、給餌回数や飼育容器や装置などによって色々の形式がある。周年生産で最も重要なプロセスであり、従来の方法と異なる点が多い。

#### 1 掃立

掃立は無菌室中に設置したクリーンベンチまたはクリーンブース内で行う。掃立前に手指等は消毒用アルコールまたはオスバン溶液で充分消毒しておくことが重要である。滅菌機より無菌室に移動させた飼育トレイ中の平板飼料は、上面のPPフィルムを水滴が飼料上にこぼれないように注意しながらめくる。シャーレ中の無菌蠶蚕を滅菌済の羽箒または白金耳の柄で、シャーレをひっくり返すと同時にその底面をたたき、飼料上に蠶蚕を打ち落とす方法によって掃立を行う。その後直ちに滅菌済の飼育用網を3枚重ならないように上からかぶせる。

順次掃立が終了したもののから飼育トレイを飼育台車の上に積み重ね、最上部は同じ飼育トレイで蓋をして全飼育トレイを密閉する（写真3-6, 3-7）。

#### 2 飼育作業と飼育環境

表3-9全齡人工飼料無菌原蚕飼育用標準表(全齡3回育給餌法,対掃立2万頭)

蚕齡	原 蚕 種						交 雑 種				
	4 眠 蚕			3 眠 蚕			日順	作業項目	給餌量		
	日順	作業項目	給餌量	日順	作業項目	給餌量					
卵	-6 -1	蚕室消毒 卵消毒		-6 -1	蚕室消毒 卵消毒		-6 -1	蚕室消毒 卵消毒			
1 齡	1	掃立	2.10		掃立	1.90		掃立	3.60		
	2										
	3										
	4										
2 齡	5	なし		5	なし		5	なし			
	6										
	7										
	8										
3 齡	9			11	飼食	5.10	8	なし			
	10										
	11										
	12										
4 齡	13	網入分箔飼食	9.20	19			12	網入分箔飼食	14.4		
	14										
	15										
	16										
5 齡	17	網入分箔飼食	68.30				17	網入分箔飼食	74.0		
	18										
	19										
	20										
	21	上 簇					21	上 簇			
22											
23											
24											
飼料合計 (kg)			79.60	飼料合計 (kg)			46.70	飼料合計 (kg)			92.00

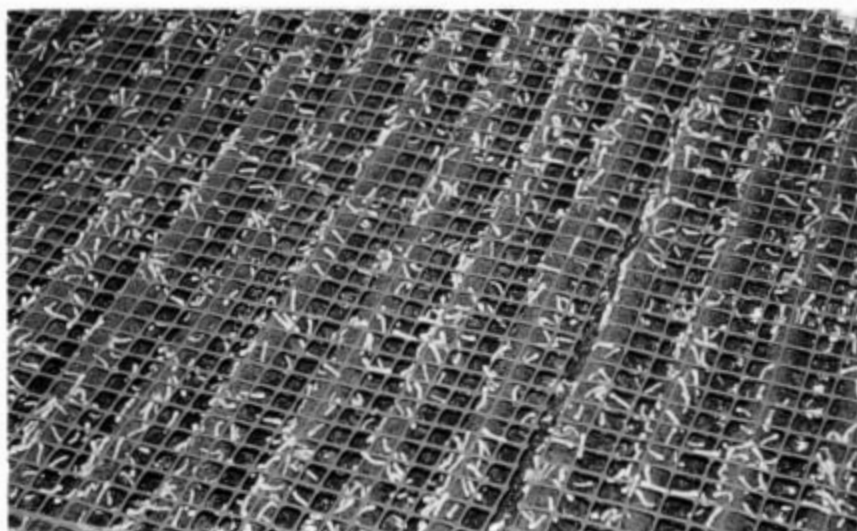
4眠蚕は朝日、東海、雪花の平均値、3眠蚕は旭光の値である。給餌量は乾量で表示した。



写真3-5 無菌蚕の作出法と消毒卵の保護と掃立



クリーンブースでの掃立

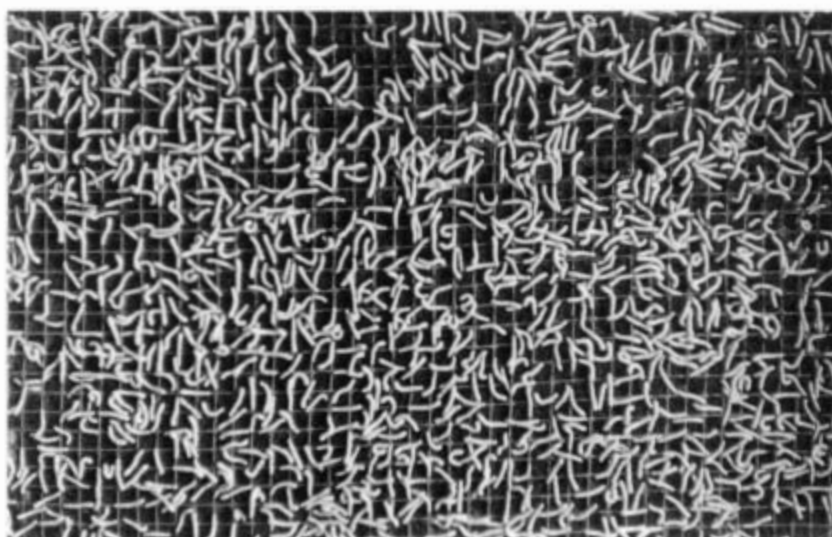


波形成型飼料上の掃立後5日目の蚕  
写真3-6 掃立と波形成飼料上の無菌蚕（日光商事）





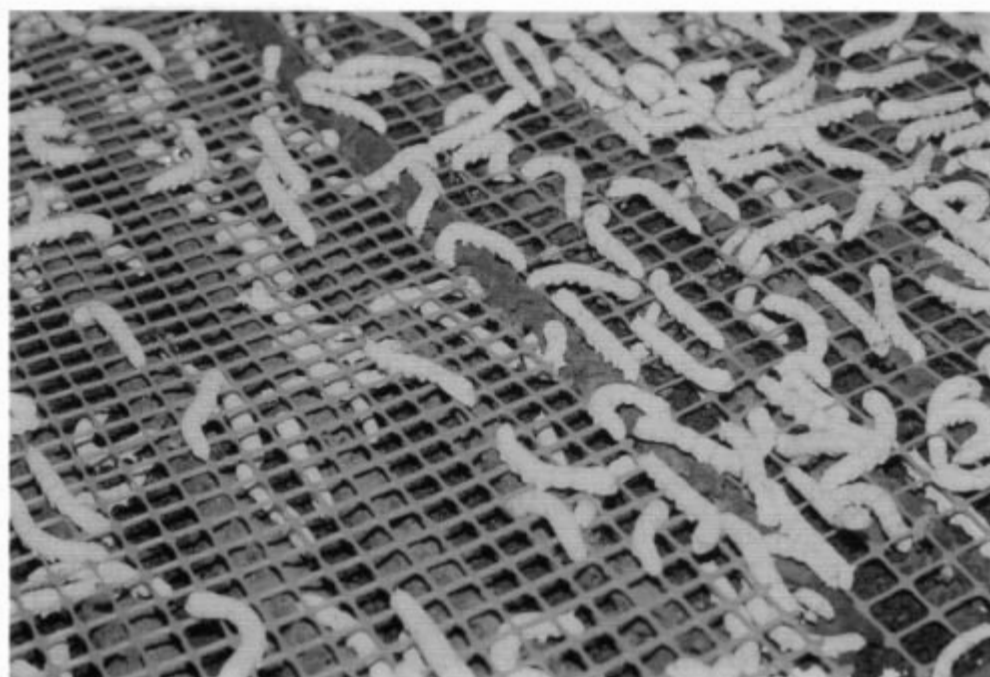
無菌飼室での掃立



掃立後11日目の発育成長  
写真3-7 全齢3回給餌法における無菌掃立と蚕の発育（日原町）



飼料交換室で3分の1に分けて新しい飼料に移す



波形飼料で成長した無菌蚕（掃立後16日目）  
写真3-8 掃立後第1回目の飼料交換（掃立後12日目）

蚕は平面に作った飼料では掃立終了後数分間に均等に散らばる性質がある。従って、蚕のこの性質を利用して、平面飼料では人為的に拈座や整座をする必要がないので掃立後直ちに、飼育トレイは積み重ね11日間放置してトレイ内をのぞく必要はない。

次に飼料上に網があると掃立後、数日経過して催眠期に入ると乾燥した網上に昇って足を固定して眠に入る。眠中も飼料上は多湿であるが網上は乾燥しているので、網上で脱皮し2齢の起蚕になると網から飼料上に降りて食下する。同じ様なことを繰り返して3齢起蚕となり、更に4齢起蚕となる。この間蚕が排泄した糞は無菌であり、一定の硬さを持ち、蚕は尿を排泄しない。また蚕は糞を絶対に食べない。飼育容器は密閉されており飼料水分率65%以上で、どこをとっても殆ど一定である。

このように蚕の特性と、無菌人工飼料の特徴を十分に生かすことによって、表3-5に示す飼育標準は従来のように人為的な各齢での拈座、整座、停食、給餌、除沙などのきめ細かいこれまでの飼育作業つまり技術を省略することができる

無菌を維持するには飼育作業をできるだけしないことが重要であり、また蚕病に対する感染機会が少なくなる。

飼育環境としては光線を必要としない。これは飼料の変質防止にもなっている。飼育温度および湿度の標準は1齢29℃ 75%、2齢は28℃、70%、3齢は27℃、65%、4齢26℃、65%、および5齢25℃、60%とし、眠中飼料を乾燥させる必要がないので給食中も眠中もともに温湿度は変化させない。

### 3 飼料交換と蚕の発育検査

掃立後、無菌室で保護した蚕は表3-6に示すように飼育標準に従って12日目に4齢起蚕になるので第1回の飼料交換を行うことになる。飼料交換前日(掃立11日)に新しく滅菌した飼育用網を飼育中の蚕(3齢の催眠期の蚕)の上に3枚全面をおおうようにかぶせておく。翌日(掃立12日目)蚕は殆ど3枚の網上に均等に昇って脱皮し、4齢起蚕になっている。そこで新しい滅菌飼料の入った飼育トレイを滅菌機から予備室の飼料交換室に移送し、滅菌飼料の上面のPPフィルムを取り除く。新しいトレイ中の飼料の中心部に蚕が載った網を1枚移し、その両側に1枚ずつ新しい滅菌網を置く。こうすれば蚕は中心から外側に自然に移動しながら均等に飼料を食下する。これが分箔を兼ねた拈座である(写真3-8)。

表3-6 人工飼料全齢3回給餌法による飼育トレイ別飼料量、容器数、および掃立蚕数の飼育標準

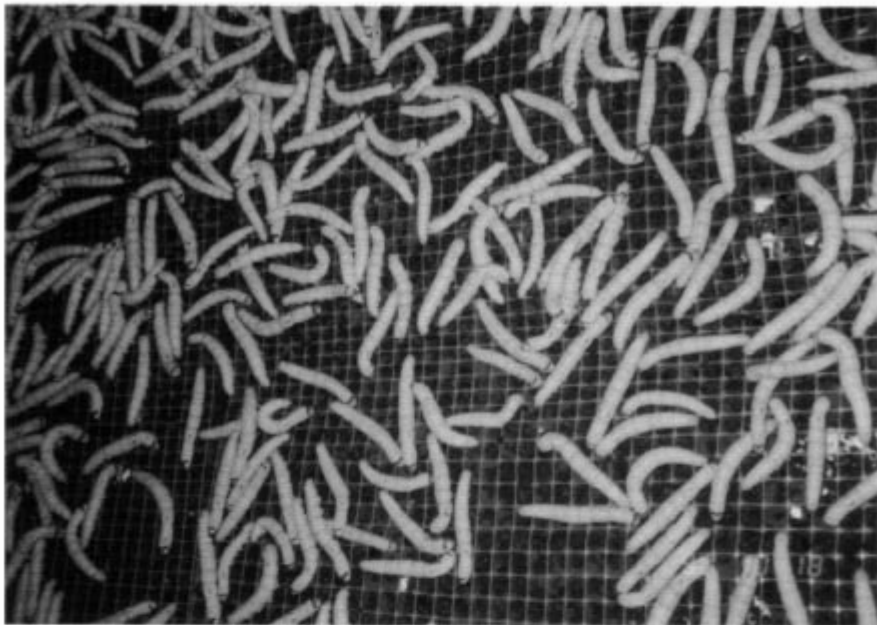
給餌回数	使用容器寸法		プラスチックコンテナ 38×64×9 cm	プラスチックトレイ① 55×116×4 cm	プラスチックトレイ② 82×174×4.5cm	頭数
1〜3 齢	1箱 当り	飼料乾物	4kg	同 左	同 左	20000頭
		水	10kg	同 左	同 左	
		容器数	20枚	6枚	3枚	
1回	1容 器当 り	頭数	1,000頭	3,300頭	6,700頭	
		飼料乾物	200 g	660 g	1,340 g	
		水	500 g	1,650 g	3,350 g	
4 齢	1箱 当り	飼料乾物	12kg	同 左	同 左	20000頭
		水	30kg	同 左	同 左	
		容器数	40枚	18枚	8枚	
1回	1容 器当 り	頭数	500頭	1,100頭	2,500頭	
		飼料乾物	300 g	660 g	1,500 g	
		水	750 g	1,650 g	3,750 g	
5 齢	1箱 当り	飼料乾物	84kg	同 左	同 左	20000頭
		水	210kg	同 左	同 左	
		容器数	120枚	54枚	24枚	
1回	1容 器当 り	頭数	167頭	367頭	833頭	
		飼料乾物	700 g	1,560 g	3,500 g	
		水	1,750 g	3,900 g	8,750 g	

4齢以降になると蚕自体の水分蒸散量が多くなり、飼育トレイの中は過湿になり易い。したがって滅菌したスペーサー（1.5mm×20mm×30mmのアルミ製角パイプ）で飼育トレイと飼育トレイの間隙を空けて過湿を防止することが重要である（写真3-9.3-10）。

掃立12日目に飼料を交換した飼育トレイ中の蚕は、台車にて4齢用無菌室に移送して保護する。

4齢用無菌室で保護された蚕は5日目（掃立後18日目）に5齢起蚕になる。従って、4齢起蚕時と同じように前日の4日目の催眠期に3枚の網をかけ、そのうちの1枚を新しい飼料上に移し、その両側にそれぞれ1枚の網を置き、分箔を兼ねた拵座を4齢期と同じように行う。こうすることによって第2回目の飼料交換が終了する。過湿防止のスペーサーも4齢と同じものを用いる。

5齢4日目頃、各トレイ中の蚕の発育検査を行い、発育が極端に早い蚕と遅い蚕を選別する。選別された発育が遅い蚕は、新しい飼料中に移し別に飼育する。



5齢4日目



写真3-10 西山産業および加悦町の無菌周年繭生産の状況



5齢4日目、日光商事月2回の掃立（1回蚕種2-3箱）



4-5齢からスパーサーをトレイの間に入れる（日原町）  
写真3-9 飼育トレイの積み重ねによる無菌全齢3回給餌法



5齡4日目



写真3-10 西山産業および加悦町の無菌周年菌生産の状況

この選別を行うことによって、無停食給餌法であっても一斉上簇が可能となる。また発育が遅れた蚕も全部良い繭を作らせることができる。

#### 4 上簇

上簇は写真3-11 に示したように網上の塾蚕を払い落とす方法で一斉に上簇させている。上簇中の保護は温度25℃、湿度65%および気流50cm/秒が最も理想的な条件である。この条件で人工飼料無菌育でも92%以上の解じょ率が得られる(写真3-12)。このように上簇から収繭までのプロセスは従来と殆ど同じである。以上のように幼虫の飼育のプロセスが最も省力化したところであり、従来に比べ卵消毒が加わったにもかかわらず作業時間の短縮を計ることができた(表3-7)。また掃立と2回の給餌を機械化すれば無人育が可能である。

表3-7 全齡3給餌法における作業項目と時間と全対に対する割合

作業項目	作業時間	
	(1箱当規模/回)	(10箱規模/回)
1. 蚕具・飼育室洗浄消毒	4.0(19.5%)	33.0(21.1%)
2. 卵消毒	0.6(2.9)	1.3(0.8)
3. 飼料調製	4.7(22.9)	19.6(12.5)
4. 飼育	2.2(10.7)	13.7(8.7)
5. 上簇	2.0(9.8)	20.0(12.8)
6. 収繭	4.0(19.6)	40.0(25.6)
7.その他(後片付・蚕沙蚕糞処理等)	3.0(14.6)	29.0(18.5)
計	20.5時間	156.6時間

### 3.3.5 KIT方式の周年種繭生産と蚕種製造(プロセス5)

人工飼料無菌飼育は糸繭生産を目的とする普通の蚕(交雑種)以外に種繭生産を目的とする原蚕飼育でのメリットは大である。我々は糸繭用の生産法が原蚕用に応用できるかを検討し、無毒蚕種の超省力による周年安定生産法を明らかにした。なお具体的な蚕の無菌飼育法は交雑用の飼育と殆ど同じであるが、交雑用の人工飼料は使えないので新しく原蚕種および原々蚕種用に開発している(表3-8)。

工場周年無菌養蚕という新しい養蚕体系に対応するには何時でも孵化(随時孵



表3-8 原々蚕種用およびその他一般原蚕種用の無菌人工飼料

飼料素材	組 成		
	KIT-C	KIT	KIT-N
桑葉粉末	32.0	32.0	25.0
脱脂大豆粉末	35.0	47.0	40.0
オカラ粉末	-	-	15.0
セルロース	12.0	3.0	-
澱粉	12.0	12.0	11.0
クエン酸	2.0	2.0	2.0
クロトン酸	0.4	0.4	0.4
塩化コリン	0.2	0.2	0.2
β-システロール	0.4	0.4	0.4
アスコルビン酸	1.5	1.5	1.5
ビタミンB群混合物	1.5	1.5	1.5
無機塩混合物(C)	3.0	-	3.0
合 計	100.0	100.0	100.0

KIT:標準飼料 KIT-C:一般中国種用飼料 KIN:交雑原蚕種飼料

化)し、常時供給できる蚕種を製造する必要がある。また一方原蚕の飼育に当たっては糸繭用蚕種の生産量に応じて飼育労力の均一化と飼育施設の効率的な利用および作柄の安定などを考慮しながら生産計画を立てなければならない。

糸繭用蚕種の周年生産法については、年4回の原蚕種の無菌飼育を行う方式を提案した。図3-3に示すように1年のうち4月に原蚕種を飼育し交雑原蚕を製造すれば7月から9月までの糸繭生産ができる。つまり7月から9月までの蚕種が供用できる。同様に7月に原蚕を飼育し採種したものは10月から12月の糸繭生産に供用し、10月に原蚕を飼育し、採種したものは翌年の1月～3月期の糸繭生産用原種として供用する。更に1月に原蚕を飼育し、採種したものは4～6月の糸繭生産用蚕種として随時供用している。このように表3-9に示す飼育標準表に従って全齢人工飼料無菌3回給餌による原蚕の飼育によって、糸繭用交雑種の年間随時供給計画のもとに蚕種製造する方法を明らかにした(写真3-13)。



払い落とし法による一斉上族



雪の中、払い落した熟蚕を上族室に移送  
写真3-11 全齢3回育の周年無菌養蚕の一斉上族



回転族による営菌（日原町）



万年族による営菌（日光商事）  
写真3-12 周年無菌養蚕の上族営菌室

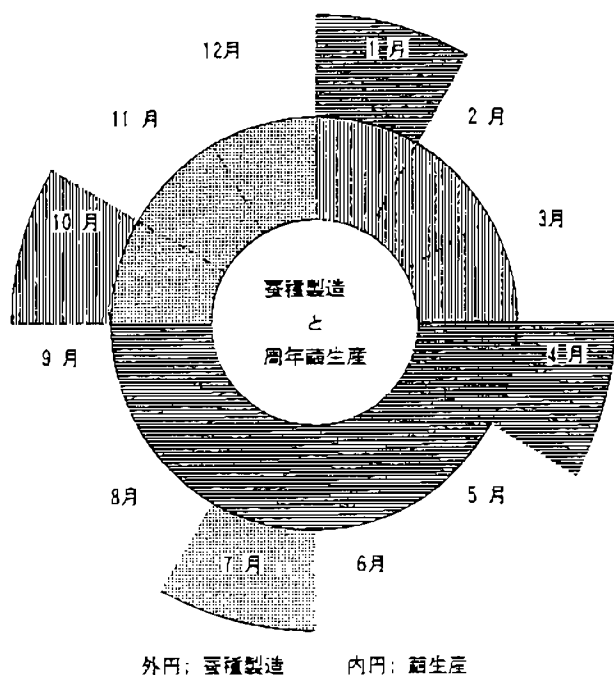


図 3-3 周年無菌蚕種生産と蚕種製造

伝染する微粒子原虫が排除されるので、有毒蛾の廃棄分を増やして蚕種製造する必要はない。第三は今後消費者の要求に合った製品の高級化、個性化に応じた多品種少量生産が可能な蚕種製造を容易にすることができる。一方図3-4 に示すように糸繭100トン生産に必要な蚕種製造法や生産費などを明らかにし、KIT方式の蚕種生産で蚕種を製造すれば、蚕種1箱当たりの生産原価は462円となっている。現在市販されているものは1箱4000円から冬期は8000円である。

### 3. 3. 6 繭以降から製糸工程（プロセス6）

人工飼料の開発と無菌飼育法の確立によって繭生産様式が季節に支配されることなく、毎日目的量の生繭が生産されてくると、繭を出発点としたプロセスも従来の方法とプロセスの省略が可能となり省力化低コスト化されることになる。

#### 1 乾繭、貯繭工程の省略

我々は年間300トンの繭を処理できる製糸工場、都市工業団地や山間地にお

以上のように人工飼料無菌3回給餌法の確立によって、従来の蚕種製造はどのように改善できるかについてみると、先ず第一に5～10月までの季節生産から周年生産を行うことによって従来の年2回の生産に比べ、超省力で蚕病の心配が排除され、周年での蚕種の使用量に合わせて労力や施設の利用効率を高くすることができる。第二は無菌飼育を採用しているので、蚕病では唯一の経卵

原々蚕	原蚕	普通蚕	繭	
芙 — 0.085 箱	芙・蓉 17箱	(芙蓉×東海)	100ton	
蓉 — 0.085 箱				1.700 箱
東 — 0.085 箱	東・海 17箱	(東海×芙蓉)		1.700 箱
海 — 0.085 箱				1.700 箱
計 0.34箱 (6,800頭)	34箱	3,400箱		

図3-4 生繭100トに必要な蚕種製造量

いて、月に2～3回の掃立によって年間を通して連続的にKIT方式の無菌産蚕系生産を実施している。将来は年330日稼働を目標にしてお、生産された繭は直ちに煮繭しいわゆる生繭繰糸をしている。従って乾燥機による乾繭や長期に亘る貯繭の工程が省略できる。しかし上簇後の繭は収繭後2週間すると化蛾するので万一その間に繰糸できない場合は生繭を密閉や薬物などによって殺蛹し、1～2ヶ月間生繭の状態で保存する方法も開発している。なお生繭繰糸は従来のプロセスの省略による省力化と同時に低コストで高品質の生糸が生産できることも明らかとなっている。

## 2 空気繰りの繭

人工飼料に適合した品種の育成によって乾燥、貯繭更には煮繭のプロセスを省略した、空気中で繰糸できる“空気繰り”ができる品種も最近開発されている。

以上のように全く新しいプロセスが人工飼料から蚕種、繭、生糸まで開発されたことによって、従来のように年3回の生産リズムからKIT方式の周年無菌養蚕システムによって365日毎日無人の繭生産による生糸生産も夢ではない。

## 4 KIT方式周年無菌養蚕の特徴と繭糸質

### 4.1 KIT方式周年養蚕の特徴とメリット



写真3-13 原蚕種の普通飼育室における各種無菌容器での全齢3回給餌の無菌飼育

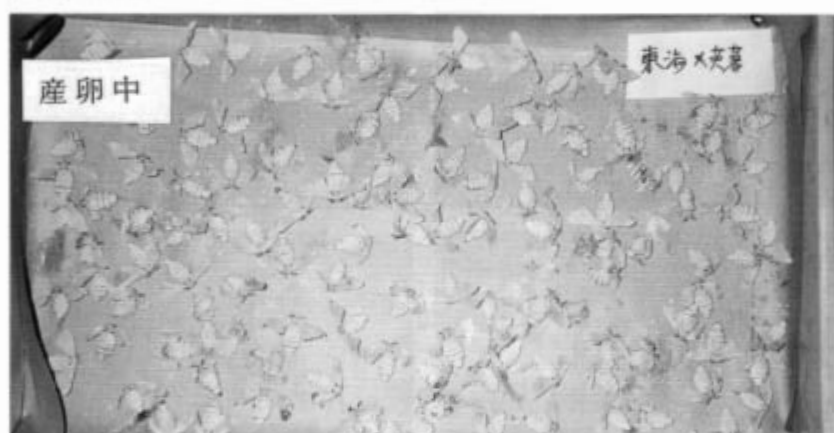
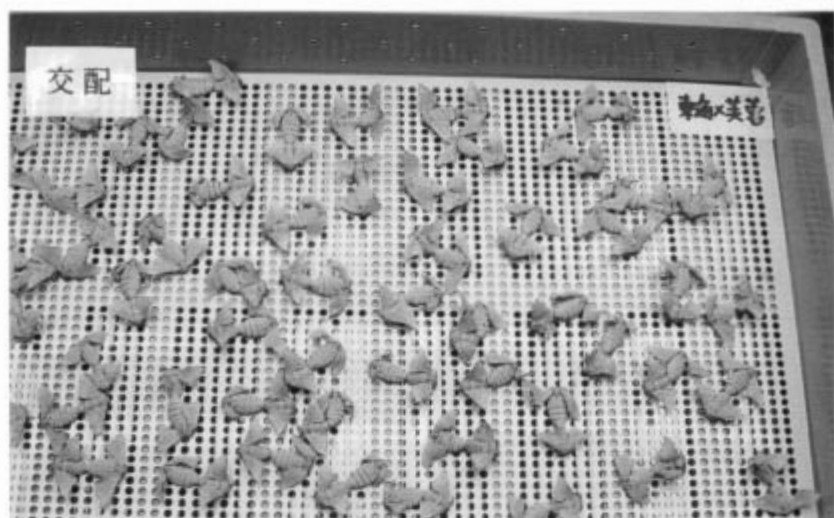


写真3-14 人工飼料全齢3回育による無菌周年蚕種生産

- 1 人工飼料の特徴と蚕の特性を生かしたものである。
- 2 蚕病防除科学を守った方法。
- 3 周年連続安定、超省力、低コストの蚕種と繭を生産することができる。
- 4 従来の飼育作業（生産技術）は蚕にさせる。
- 5 周年での生繭生産ができるので乾繭や貯繭の必要がなく生繭繰糸ができる。
- 6 飼育中採桑や人工飼料製造と飼育作業を分離することができるので、集中した養蚕の重労働から開放されることなどそのメリットは大きい。

表3-10 工場周年無菌養蚕実験プラントにおける飼育成績

掃立年月日	品 種	経過日数	収 繭 量 (1箱)	解 じ ゃ 率	生 糸 量 歩 合	繭 糸 長	繭 糸 繊 度
		日	kg	%	%	m	d
93/ 9.10	東海×芙蓉	24	32.2	69	15.2	978	2.41
.24	錦秋×鐘和	24	34.5	65	16.0	1,125	2.29
10. 8	芙蓉×東海	25	34.5	70	15.2	1,085	2.45
.22	芙蓉×東海	25	33.8	75	16.1	1,108	2.45
11. 5	東海×芙蓉	24	32.2	68	14.8	1,025	2.17
.19	芙蓉×東海	25	33.0	59	15.2	1,151	2.13
12. 3	芙蓉×東海	25	33.5	82	14.4	1,085	2.47
.24	東海×芙蓉	25	35.0	85	15.6	1,107	2.46
94/ 1. 7	東海×芙蓉	25	32.5	75	15.7	1,029	2.35
.21	東海×芙蓉	25	33.7	79	16.4	1,125	2.47
2. 4	芙蓉×東海	25	33.8	74	16.8	1,038	2.52
.18	芙蓉×東海	24	32.4	80	15.7	1,057	2.43
3. 4	芙蓉×東海	24	34.4	68	17.1	1,061	2.41
.18	東海×芙蓉	25	33.8	73	16.9	1,008	2.28
4. 2	芙蓉×東海	24	32.5	64	15.8	1,117	2.25
.15	芙蓉×東海	24	34.6	78	14.3	1,109	2.47
5.13	東海×芙蓉	24	32.4	73	15.2	1,122	2.31
.27	東海×芙蓉	24	33.8	71	16.0	1,113	2.48
6.10	芙蓉×東海	24	34.6	68	16.4	1,025	2.56
.24	芙蓉×東海	24	34.1	64	15.3	1,007	2.46
7. 8	東海×芙蓉	24	33.6	70	15.8	1,120	2.35
.22	東海×芙蓉	24	32.1	75	16.2	1,057	2.31
8.12	東海×芙蓉	24	32.5	61	16.0	1,115	2.40
.26	錦秋×鐘和	24	32.7	65	16.4	1,100	2.35

#### 4. 2 K I T方式で生産された繭や生糸、絹の特徴

- 1 オカラ含有飼料によって黄変がない。
- 2 色が白く光沢があり繊度が細い。



3 練り減りが少なく、毛羽立がしない。

4 年間の生繭繰糸ができるので染色性がよいなどである。

以上述べてきたように、蚕は人工飼料の開発と無菌飼育法の確立によって、鶏や豚や牛のような農業動物と同じようにK I T方式を用いれば周年で繭生産ができるようになった。ここで重要なことは蚕の場合は他の一般動物と異なり病気に對する治療法がないので、周年で蚕種や繭を生産する場合は予防的生産法つまり無菌蚕糸生産法を採用することが重要である。この方法は省資源、省エネルギー、超省力、低コストで従来の高度な多くの生産技術を用いなくて、しかも高品質、安定多収の養蚕であり、年間の飼育成績は表3-10に示したように、開発当初、目標とした蚕種1箱当たり30kg以上の収繭量、繭糸長1000m以上、他の項目も殆ど満足する成績を示し、また 経営試算の収支については表3-11に示したように人工飼料育で初めて公開することができた。一日も早く本システムを利用して我が国の蚕糸業の発展に役立てて戴ければ幸いである。

表3-11 繭100トンの生産プラントの経営試算

収支	科 目	金 額	備 考
収 入	生 繭 代	199,800 (千円)	99.9t × 2 千円/kg 蛹・蚕糞、蚕沙、その他
	副 産 物 代 計	— 199,800	
支	蚕 種 費	3,330	3330箱 × @ 1 千円/箱
	人 工 飼 料 費	66,600	@ 18.4
	人 件 費	42,624	@ 12.8
	水 道 光 熱 費	24,000	@ 7.2
	消 耗 品 費	10,000	@ 0.3
	小 計	146,554	
出	建 物 償 却 費	20,000	20年
	機 械 償 却 費	20,000	10年
	小 計	40,000	
	計	186,554	
収 支		13,246 (千円)	

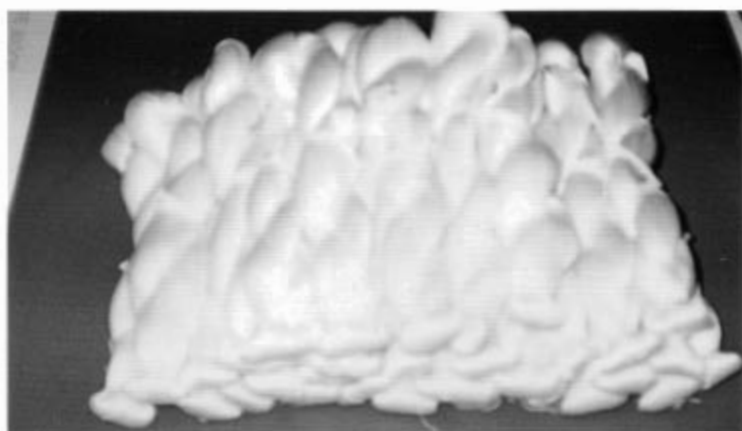
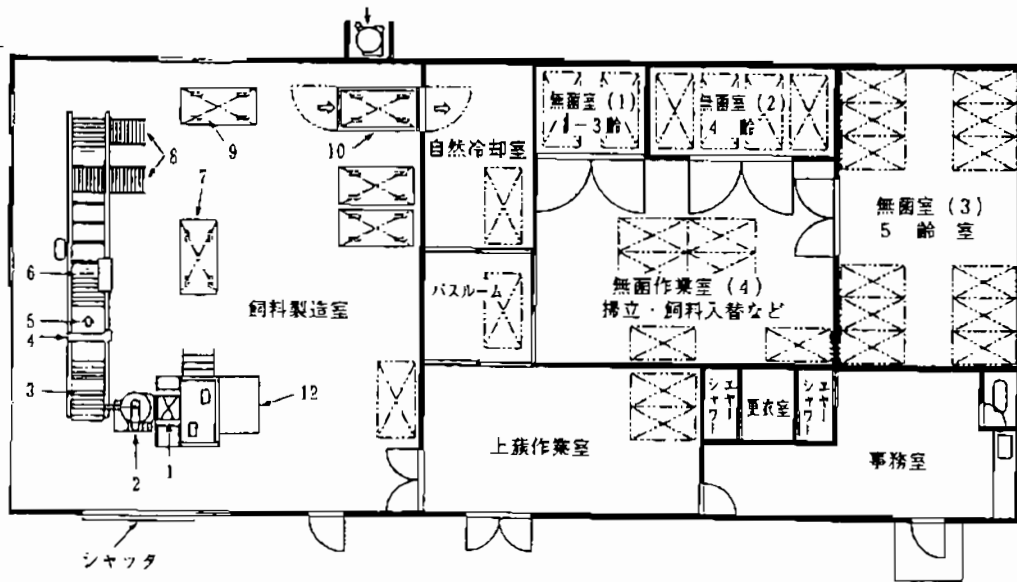


写真3-15 工場周年無菌飼育室と生産された真白な菌と生菌操系の生糸



写真3-16 人工飼料周年無菌養蚕システムで生産された製品  
染色家上村氏によるあかね染(上) 一晒穂(株)による織物(下)

以上述べてきたように周年養蚕において作柄や製品が安定している理由は幼虫期に無菌飼育を導入したこと以外にはない。そして普通蚕室から図3-5に示したような新しい施設設備のもとにおける周年養蚕について述べてきたが、無菌室を新設する場合は写真3-14に示した1-3齢用、4齢用、5齢用および飼料交換等作業用の3-4室を1セットとして生産規模を拡大する場合はこれを高く積み重ねるか又は横に拡げて行くかにすれば人工飼料の調製施設が有効に利用することが出来る。無菌飼育では飼育作業が殆どないので、機械力を用いないのが特徴であり、また繭や生糸および製品については写真3-15、3-16に示した従来見られなかった優れた特徴がみられ、大量生産が期待されている。



- 1: 粉体混合練合機(自動給水装置付) 2: 圧送ポンプ 3: □金 4: 飼料カッター  
 5: 飼料搬送コンベヤ 6: シャトルコンベヤ 7: 空トレー台車 8: トレー受けローラコンベヤ 9: 実トレー台車 10: 蒸器 11: ppシート巻出装置 12: テーブルリフト 13: ボイラ

図3-5 産官学(住友商事・一迺穂綸・日原町・京都工芸繊維大学)の共同研究. 周年無菌養蚕の施設・設備図(1992年竣工)

## おわりに

かつて我が国の蚕糸業は中山間地域における基幹的な作目として農業経営上重要な地位を占めてきた。また蚕種製造や製糸業などの関連のもとに地域経済の発展に多大の貢献をしてきた。しかし近年では急速な工業化による農家の農業離れ、従業者の高齢化、後継者不足、更には繭価の低迷による収益に悪化などで最近では大規模養蚕農家ほど養蚕経営は厳しさを増しており、養蚕農家は減少し、このままの状態では我が国の養蚕業は消滅するおそれさえある。

そこで、これを解決するには養蚕のもつ歴史的な季節に支配された生産リズムから脱却して周年生産のシステム化を計らなければならない。そのためには何と云っても、幼虫飼育プロセスにおける桑に変わる低コスト人工飼料の開発と飼料の調製装置の開発によって、年間を通して桑より安い飼料の製造が重要であると同時に人工飼料飼料に適合した生産法を確立する事である。

我々は30数年に亘って周年生産のシステム化を意図してノートバイオロジーを導入した新しい養蚕法に関する研究を進め、最近の10年は地方自治体や民間企業の協力によって山間地、中山間地および都市工業団地に周年無菌養蚕工場を建設して実用化研究を進め、新しい養蚕のプロセスとシステムを確立し、そしてこのシステムで我が国において実現させるためには過去にとらわれない生産様式を模索する必要がある。先に述べたように我々が意図した省資源、超省力低コスト、高品質で年間安定多収の周年養蚕のシステムはエコロジーとエコノミーをも包括したものであり、従来の農業生産でもなく工業生産といわれるものでもない、全く新しい生産様式の産業と考えている。必ずや我が国の蚕糸業の発展やまた国づくりに貢献できるものと考えている。

なおこの周年養蚕のシステム化の研究には、京都工芸繊維大学蚕糸生産学教室の角田先生、森先生、大学院、学部学生、苦しい時期に御理解と御支援を賜った元学長福井謙一先生、前学長巽友正先生および周年養蚕の実用化研究に御協力戴きました住友商事の越山国男次長他各位、一迺穂光男社長、中田弥之輔常務、京都原糸商協同組合の各位、また日光商事無菌養蚕システム研究所田中友治社長、今村利勝所長、西山産業の西山昭康社長、織田鉄吾開発本部長、日原町木村治町長、加悦町西原重一町長の各位には新しい周年無菌養蚕の工場を各地に建設して、永年、周年無菌蚕糸生産の実現にご協力を賜った。ここに厚く御礼申し上げる。

参考文献 1. (著者及び著者らの蚕の無菌飼育及び無菌蚕の応用研究)

- 松原藤好, 1965: 無菌飼育における蚕病に関する研究(I) 低温処理と多角体病誘発との関係, 京工織大繊維学術報, 4, 291-297.
- 松原藤好, 1966: 無菌飼育における蚕病に関する研究(II) 核多角体病感染蛾の次代蚕における発病について, 京工織大繊維学術報, 5, 1-6.
- 松原藤好・加藤 勝・林屋慶三・児玉礼次郎・浜村保次, 1967: 人工飼料による家蚕の無菌飼育, 日蚕雑, 38, 39-44.
- 松原藤好, 1967: 無菌飼育における蚕病に関する研究(III) 無菌飼育蚕を自然条件下に移して飼育した場合の発病, 日蚕雑, 36, 39-44.
- 松原藤好, 1967: 無菌飼育における蚕病に関する研究(IV) 薬品添食が無菌蚕に及ぼす影響, 日蚕雑, 36, 159-160.
- 林屋慶三・松原藤好・西田 順, 1967: 無菌飼育法の養蚕への応用, 生物環境調節, 5, 1-4.
- 松原藤好, 1968: 無菌飼育における蚕病に関する研究(V) 自然暴露後薬品添食した場合の核多角体病誘発, 日蚕雑, 37, 137-143.
- 林屋慶三・西田 順・松原藤好, 1968: 家蚕消化液におけるウイルス不活化 I 飼料による不活化作用の強弱, 応用動物昆虫学雑誌, 12, 189-196.
- 松原藤好・大槻良樹・林屋慶三, 1968: 昇汞水およびホルマリンによる蚕卵処理が孵化歩合と人工飼料による無菌飼育の成績に及ぼす影響, 京工織大繊維学術報, 5, 146-154.
- 松原藤好・林屋慶三, 1969: 人工飼料育蚕の核多角体病ウイルスに対する感染抵抗性, 日蚕雑, 38, 43-48.
- K. Hayasiya, J. Nisida, F. Matsubara, 1969: The production of anti-viral substance, a red fluorescent protein, in the digestive juice of the silkworm larvae. Applied Entomology and Zoology, 4(3), 154-155.
- 林屋慶三・松原藤好・西田 順・川本文彦, 1971: 人工飼料育蚕と桑葉育蚕との比較 I 消化液の抗ウイルス作用の比較, 京工織大繊維学術報, 6, 87-100.
- 松原藤好, 1973: 無菌蚕による家蚕ウイルス病の誘発に関する研究, 京工織大繊維学術報, 7, 34-58.
- M. Himeno, F. Matsubara, K. Hayasiya, 1973: The occult virus of nuclear polyhedrosis of the silkworm larvae. Journal invertebrate pathology, 22, 292-295.
- 松原藤好・山口長造・林屋慶三, 1974: 人工飼料無菌飼育法の養蚕への応用, 京工織大繊維学術報, 7, 206-212.
- 松原藤好・木村由起夫, 1974: 数種重金属とそれら化合物が無菌蚕に及ぼす影響, 京工織大繊維学術報, 7, 213-234.

- 松原藤好・山口長造・林屋慶三・鎌田政喜,1974: 稚蚕期人工飼料無菌・壮蚕期桑育による養蚕法, 農業及び園芸, 49, 323-324.
- 松原藤好・山口長造・林屋慶三,1974: 稚蚕人工飼料無菌・壮蚕桑育した蚕の核多角体病に対する感染抵抗性, 農業及び園芸, 49, 1403-1404.
- 浜村保次・林屋慶三・加藤 勝・松原藤好・児玉礼次郎,1975: カイコの人工飼料育への道, みすず書房, 135-165, 220-258.
- 山口長造・大西盛夫・松原藤好,1976: 人工飼料無菌飼育法の養蚕への応用 蚕の揃, 飼料効率飼育労働力について, 農業及び園芸, 51, 79-80, 養賢堂.
- 松原藤好・増井博之・桑原秀樹,1977: 重金属が無菌蚕におよぼす影響II カドミウム毒性におよぼす亜鉛, 鉛の影響, 京工織大繊維学術報, 6, 25-32.
- 松原藤好・矢内須美,1977: カイコの無菌時代, 京工織大繊維学術報, 8, 33-42.
- 大西盛夫・松原藤好・林屋慶三,1978: 幼若ホルモンアナログ利用による繭生産の向上, 京工織大繊維学術報, 8, 25-32.
- 松原藤好・増井博之・吉田一夫,1978: 重金属が無菌蚕におよぼす影響III カイコへのカドミウム取り込みにおよぼす亜鉛, 鉛の影響, 京工織大繊維学術報, 8, 46-53.
- 松原藤好,1978: 蚕繭の解舒に関する研究 人工飼料による養蚕と解舒について, 昭和51, 52年度文部省科学研究総合(A)研究成果報告, 5-7.
- 松原藤好・服部静明・中西憲明,1979: 無菌蚕を用いてウイルス性軟化病ウイルスの経卵伝染の可否に関する研究, 京工織大繊維学術報, 9, 31-41.
- 松原藤好・大西盛夫・松本継男・林屋慶三,1981: 人工飼料無菌飼育の育蚕体系への導入に関する研究II 多回育と蚕のウイルスに対する感染抵抗力, 日蚕雑, 59, 266-270.
- 松本継男・松原藤好・大西盛夫・林屋慶三,1981: 人工飼料無菌飼育の育蚕体系への導入に関する研究III 配蚕時における蚕の微生物検索, 日蚕雑, 50, 359-365.
- 松原藤好・中山康博,1981: 重金属が無菌蚕におよぼす影響IV Cd およびEDTA の毒性, 生物環境調節, 19, 115-120.
- 中山康博・松原藤好,1981: 重金属が無菌蚕におよぼす影響V EDTA のCd 毒性抑制効果, 生物環境調節, 19, 121-127.
- 松原藤好・松本継男,1981: 水棲生物のGnotobiotron Cabinet の試作, 京工織大繊維学術報, 9, 385-391.
- 松原藤好・中山康博・増井博之,1982: 重金属が無菌蚕におよぼす影響VI Cd単独, Cd・Zn及びCd・EDTAを混合投与した場合の生体内各組織器官別 cd 蓄積量, 生物環境調節, 20, 35-38.
- 松原藤好・呉 友良・森 肇・大頭 肇,1983: 無菌蚕の発育時期別の核多角体病に対する経口感染抵抗性, 日蚕雑, 52, 419-425.

- 増井博之・松原藤好,1983: コバルト及びニッケルが無菌蚕に及ぼす影響, 日蚕雑, 52, 425-431.
- 松原藤好,1983:人工飼料育蚕の細繊維生糸を使った絹織物の風合に関する研究 7パル科学センター報, 2, 16-17.
- 松原藤好・呉 友良・森 肇・大頭 肇,1984: 無菌蚕の低温処理による核多角体病ウイルス感受性の齢別差異, 日蚕雑, 53, 205-209.
- 増井博之・松原藤好,1984: 無菌蚕に添食したコバルトの体内分布と消長, 日蚕雑, 53, 222-225
- 増井博之・松原藤好,1984: ニッケルの蚕体内各組織・器官別分布量, 排出量及び蛹中の量, 日蚕雑, 53, 331-334.
- 松原藤好・呉 友良・森 肇・大頭 肇, 1984: 無菌蚕の低温処理及び低温処理による核多角体病ウイルスに対する感染抵抗力, 日蚕雑, 53, 588-542.
- K.Suzuki, Y.Aoki, M.Nisikawa, H. masui, F.matsubara, 1984: Effect of Cadmium-feeding on tissue concentration of elements in germ-free silkworm (*Bombyx mori*) larvae and distribution of Cadmium in the alimentary canal. *Comp. Biochem Physiol Comp. Biochem. physiol.* 79, 249-253.
- 松原藤好・呉 友良・川口万左志・森 肇,1984: 幼虫期1回給餌による蚕の無菌飼育,京工織大繊維学術報,10, 359-363.
- 松本継男・大西盛夫・松原藤好・河野 清,1984: 稚蚕期を人工飼料で無菌飼育されたカイコの配蚕時における微生物検査成績(1979-1982), 京工織大繊維学術報,10, 365-371.
- 松原藤好,1984: 細繊維繭糸を使った絹織物の風合に関する研究, 7パル科学研究センター報, 3, 1-2.
- K.Suzuki, M.Yamamura, N.Hatakeyama, Y.Aoki, H.Masui, F.Matsubara, K.Sumi, T.Suzuki, 1985: Difference in tolerance mechanism to Cadmium among three insect larvae (midge, fleshfly and silkworm) *Jurnal Pharrmacobio-Dyn.* 8, 5-25.
- 松原藤好・西居孝次,1985: 特殊生糸を使った絹織物の風合に関する研究, 7パル科学研究センター報, 4, 1-5.
- 松原藤好,1985: 稚蚕期人工飼料・壮蚕期桑葉育蚕のウイルス病に関する研究, 聯58, 59年度科学研究一般(c)研究成果報告, 1-14.
- 松原藤好・増井博之・鈴木和男,1986: 人工飼料による無菌飼育蚕の生体内各組織器官別無機元素の分布量, 日蚕雑, 55, 5-9.
- 増井博之・鈴木和男・松原藤好,1986: 無菌蚕に EDTA を投与した場合の蚕体内各組織器官別無機元素の分布量, 日蚕雑, 55, 23-27.
- 松原藤好・松本継男・大西盛夫・河野 清, 1987:人工飼料無菌飼育の育蚕体系への導入に



- 関する研究Ⅳ 稚蚕期(1-3齡)1回給餌法, 京工織大繊維学術報, 11(3), 271-283.
- 松本継男・松原藤好・大西盛夫・河野 清・高柳広喜・真柴 稔, 1987: 人工飼料無菌飼育の微生物検定用キットの試作, 京工織大繊維学術報, 11(3), 297-301.
- 東 政明・松原藤好, 1987: 用途別生糸開発のための特定品種の検索とその通年繭生産に関する研究, *7パレル科学研究センター報*, 6, 15-21.
- 松原藤好, 共著, 1988: 蚕糸生産学実験実習書, (財)衣笠会, 150-233
- 松本継男・前野正博・浜崎 実・大西盛夫・松原藤好・新田勝通, 1988: バイオクリーンルーム内の汚染微生物の流れ, *日蚕雑*, 57(1), 77-78.
- 松原藤好・桑 前・杉森秀昭・石河正久・角田素行・松本継男, 1988: 全齡2回給餌法による人工飼料育蚕の飼料利用効率, *日蚕雑*, 57(1), 83-84.
- 松原藤好・松本継男・石河正久・浜崎 実・角田素行, 1988: ノートバイオトロンによるカイコの無菌飼育Ⅰ 光条件とカイコの発育成長及び飼料利用効率, 京工織大繊維学術報, 12(1), 1-9.
- 松原藤好・松本継男・石河正久・浜崎 実・林 幸之, 1988: 無菌装置による家蚕の全齡1回給餌育, *日蚕雑*, 57(2), 100-105.
- 松原藤好・桑 前・松本継男・杉森秀昭・石河正久・角田素行・松本継男, 1988: 全齡2回人工飼料給餌によるカイコの飼育, *日蚕雑*, 57(2) 118-122.
- 角田素行・石河正久・森 肇・松原藤好, 1988: 無菌人工飼育による蚕繭紙に適した蚕品種の育成, *7パレル科学研究センター報*, 7, 118-122.
- 松原藤好・松本継男・大西盛夫・石河正久・杉森秀昭・森 肇, 1989: 人工飼料による稚蚕期(1-3)1回給餌育蚕のウイルス病抵抗力, *応動昆*, 33(1), 9-11
- 森 肇・大西盛夫・角田素行・浜崎 実・松原藤好, 1989: 人工飼料と桑葉育期間中の発育成長との関係, *日蚕雑*, 58, 524-526.
- 松原藤好・角田素行・森 肇, 1989: 人工飼料による育蚕法及び人工飼料育蚕のウイルス感染抵抗性, 聯61.62.63年度文部省科学研究総合(A)研究成果報告書, 9-19.
- 松原藤好・角田素行・森 肇・大西盛夫・浜崎 実, 1989: 稚蚕期人工飼料1回給餌による各蚕期別の飼育成績, *日蚕雑*, 58, 463-467.
- H. Mori, M. Ohyane, S. Iwamoto, M. Ito, T. Mtumoto, M. Sumida, F. Matsubara, 1989: Induction of a hemagglutinating activity in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate pathology*, 54, 112-116
- 森 肇・角田素行・松原藤好, 1990: 無菌生物学的手法を導入した昆虫の生体防御機構の解明, *無菌生物*, 20, 112-115.
- M. Sumida, X. L. Yuan, Y. L. Mah, H. Mori, F. Matsubara, 1990: Changes in Kinetic param-

- eters and total activity of midgut sucrase in the silkworm *Bombyx mori* during larval-pupal-adult development. *Comparative Biochemistry and physiology*, 96(B), 605-611.
- X.L.Yuan, H.Mori, F.Matsubara, M.Sumida, 1990: Isolation of three species of soluble sucrase from larval midgut of the silkworm, *Bombyx mori* and some kinetic properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 97B(1), 373-379.
- M.Sumida, Y.Yamada, Y.Tanaka, J.simabukuro, M.Ohnishi, H.mori, F.Matsubara, 1990: Changes in urea in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* in the fourth and the fifth larval instars and effect of starvation in the fifth instar on the level of urea in the pharate adults. *Comp.Biochem.Physiol.* 97A(3), 373-379
- 松原藤好・山田 隆・森 肇・角田素行・一田昌利, 1991: 人工飼料無菌飼育の育蚕体系への導入に関する研究 V 1-4 齢期間 1 回給餌. *京工織大繊維学術報*, 15, 110.
- 森 肇・陳 瑞英・俵 秀行・一田昌利・今村利勝・土山 彬・吉田まち子・大西盛夫・角田素行・松原藤好, 1991: オカラを主成分とした人工飼料によるカイコ 5 齢期の無菌飼育. *日蚕雑*, 60 (6), 445-449.
- M.Sumida, H.Itimori, S.Johchi, A.Takaoka, T.Yuhki, H.Mori, F.Matsubara, 1992: Antibacterial activity inducible in the haemolymph of the silkworm *Bombyx mori* by injection of formalin-treated *Escherichia coli* K-12 during the fifth larval instar and pharate adult development. *Comp.Biochem.Physiol.* 101B(1/2), 165-171.
- M.Sumida, H.Ichimori, T.Yuhki, H.Mori, F.Matsubara, 1992: Induction of antibacterial activity in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* by injection of formalin-treated *Escherichia coli* K-12 in the anterior and posterior body part of the ligated larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 101(1/2), 173-178.
- H.Ichimori, T.Yuhki, H.Mori, F.Matsubara, M.Sumida, 1992: Oral immunization with *Escherichia coli* K-12 of the fifth instar larvae of the silkworm *Bombyx mori* reared on an artificial diet under complete aseptic conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 101(1/2), 179-183.
- H.Mori, S.Iwamoto, E.Kotani, M.Sumida, T.Matsumoto, F.Matsubara, 1992: Isolation of cDNA clones coding for humoral lectin of the silkworm, *Bombyx mori* larvae. *J.Invertebr. Pathol.* 59, 40-45.
- 松原藤好, 1992: 人工飼料無菌飼育法をベースにしたわが国の新しい周年養蚕. *京工織大繊維学術報*, 16, 1-18.
- 一田昌利・島袋順二・大西盛夫・森 肇・角田素行・松原藤好, 1992: 稚蚕期の人工飼料が壮蚕期桑葉育中の成長並びに繭質に及ぼす影響. *日蚕雑*, 61(2), 101-104.

- 陳 瑞英・森 肇・角田素行・袁 錫麟・北丸 豊・松原藤好,1992: 人工飼料無菌飼育による年間36回の繭生産, 日蚕雑, 61(2), 172-179.
- 松原藤好・陳 瑞英・角田素行・森 肇・一田昌利・袁 錫麟, 稚蚕期人工飼料育の低コストに関する研究, アパル科学研究センター報, 10, 1-5.
- H.Mori, H.Nakazawa, N.Shirai, N.Shibata, M.Sumida, F.Matsubara, 1992: Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range. *Journal of General Virology*, 73, 1877-1880.
- 陳 瑞英・張 伝溪・一田昌利・森 肇・角田素行・北野 実・松原藤好,1992: 稚蚕1回給餌法における人工飼料の pH が桑葉育移行後の成長に及ぼす影響, 日蚕雑, 61(5), 455-459.
- 松原藤好・陳 瑞英・森 肇・角田素行・山崎 隆・伊藤 啓,1993:全齡人工飼料育蚕および桑葉育蚕の繭糸の黄変度について, 日蚕雑, 62(2), 162-164.
- Y.Sirai, Y.Aizono, T.Iwasaki, A.Yanagida, H.Mori, M.Sumida, F.Matubara, 1993: Prothoracicotropic Hormone is Released Five Times in the 5th-larval Instar the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 39, 83-88
- H.Mori, R.Ito, H.Nakazaa, M.Sumida, F.Matsubara, Y.Minobe, 1993: Expression of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin in insect cells using a baculovirus expression vector, and its assembly into polyhedra. *Journal of General Virology*, 74, 99-102.
- 松原藤好,1993: 蚕の無菌飼育, 蚕糸技術, 145, 25-29.
- 陳 瑞英・森 肇・角田素行・松原藤好・山崎 隆・伊藤 啓,1993: オカラ含有人工飼料育の黄変について, 日本繊維学会誌, 49(8), 416-420.
- M.Sumida, S.takimoto, M.Ukai, F.Matsubara, 1993: Occurrence of fibroinase in degenerating silk gland in the pharate adult of the silkworm *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B, 239-245.
- M.Sumida, S.Takimoto, F.Matsubara, 1993: Fibroinase from silk gland in the fourth molt stage in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B, 247-251.
- M.Sumida, K.Haga, Y.Tanaka, J.Shimabukuro, M.Ichida, F.Matsubara, 1993: Developmental changes in urea in the haemolymph (determined by a urease-indophenol method) in hybrid strains of the silkworm, *Bombyx mori* and the effect of starvation in the fifth instar larvae, fed an artificial diet, on urea in subsequent development. *Comp. Biochem. Physiol.* 105A, 563-570.
- Y.Aizono, K.Hirooka, T.Yamada, Y.Shirai, M.Takeda, F.Matsubara, 1993: Control of prothoracicotropic hormone Release with Biogenic monoamines in the silkworm,

- Bombyx mori. Second International symposium on Molecular Insect Science Flagstaff Arizona, USA, July 17-22.
- 松原藤好・角田素行・森 肇・陳 瑞英・今村利勝, 1993: 人工飼料無菌飼育法をベースにしたわが国の新しい周年養蚕に関する研究 I. 低コスト人工飼料の開発, 京工織大繊維学術報, 18, 49-69.
- H. Mori, H. Tawara, H. Nakazawa, M. Sumida, F. Matsubara, S. Aoyama, Y. Hayashi, K. Kamogawa, 1994: Expression the Newcastle Disease Virus (NDV) Fusion Glycoprotein and Vaccination against NDV Challenge with a Recombinant Baculovirus. Avian Diseases, 38, 772-777.
- 松原藤好, 1994: ノートバイオロジーを導入した世界で初めての周年養蚕, 真気技術, (株) シオクト, 2, 12-21.
- Y. Shirai, T. Iwasaki, F. Matsubara, Y. Aizono, 1994: The Carbachol-induced Release of prothoracicotropic Hormone from Brain-Corpus Cardiaeum-Corpus Allatum Complex of the Silkworm, Bombyx mori. J. Insect Physiol. 40(6), 469-473.
- 角田素行・森 肇・松原藤好, 1994: 無菌人工飼料育蚕の消化・吸収特に中腸組織の蔗糖分解酵素を中心にして, 京工織大繊維学術報, 18, 79-84
- 森 肇・陳 瑞英・角田素行・今村利勝・松原藤好, 1994: 人工飼料育蚕の繭糸の黄変について, 京工織大繊維学術報, 18, 65-95
- M. Sumida, X.L. Yuan, F. Matubara, 1994: Purification and some properties of soluble  $\beta$ -fructofuranosidase from larval midgut of the silkworm Bombyx mori. Comp. Biochem. physiol. 107A, 273-284
- M. Sumida, X.L. Yuan, F. Matsubara, 1994: Sucrase activity and its kinetic properties in peritrophic membrane, and in membrane-bound and soluble fractions of midgut in the silkworm, Bombyx mori. Comp. Biochem. physiol. 108A, 255-264
- 今村利勝・角田素行・森 肇・松原藤好, 1994: 人工飼料無菌飼育による周年養蚕, 無菌生物, 24, 69-73
- 松原藤好・角田素行・森 肇・今村利勝, 1994: 1-4 齢人工飼料無菌・5 齢条桑育による養蚕法に関する研究, 無菌生物, 24, 74-77.
- 森 肇・小谷英治・角田素行・松原藤好・今村利勝, 1994: 昆虫に存在するフォンビルブラント因子ホモログの無菌条件下での機能解析, 無菌生物, 24, 78-80.
- 松原藤好, 1995: 無菌生物学特集, 無菌生物, 「蚕糸生産」 アニテックス, 179-183.
- 松原藤好, 1995: 生物環境調節ハンドブック, 「養蚕施設」 養賢堂, 東京, 484-492.
- 松原藤好, 1995: 生物実験の手引き: 実験動物としての無菌蚕, 京都府生物教育会編, 17-19
- E. Kotani, M. Yamakawa, S. Iwamoto, M. Tashiro, H. Mori, M. Sumida, F. Matsubara,

- K.Taniai, K.Kadono-Okuda, Y.Kato, 1995: Cloning expression of the gene of homocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von willebrand factor. *Biochemica Acta*, 1260, 245-258.
- Y.Shirai, K.Shimasaki, T.Iwasaki, F.Matsubara, Y.Aizono, 1995: The in vitro release of prothoracicotropic hormone (PTTH) from the brain-corpus cardiacum-corpus allatum complex of silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem Physiol.* 110(2), 143-148.
- 松原藤好・角田素行・森 肇・今村利勝・板垣敬司, 1995: 人工飼料無菌飼育法をベースにした我が国の新しい周年養蚕に関する研究Ⅱ周年無菌養蚕の施設及び設備, *京工織大繊維学術報*, 19, 25-36.
- 松原藤好・角田素行・森 肇, 1995: 無菌生物, 25, 15-17.
- 今村利勝・陳 瑞英・森 肇・角田素行・松原藤好, 1995: 無菌周年養蚕用蚕種の人工飼料無菌飼育による周年生産, *無菌生物*, 25, 40-42.
- 今村利勝・森 肇・角田素行・松原藤好, 1995: 無菌飼育法を導入した周年養蚕-真気空調装置による飼育-, *無菌生物*, 25, 46-49.
- 今村利勝・森 肇・角田素行・松原藤好, 1995: 無菌飼育法を導入した周年養蚕-特に工業的生産方法を導入する場合の無菌飼育施設及び設備-, *無菌生物*, 25, 46-49.
- 森 肇・中沢 裕・山本真美・角田素行・松原藤好・今村利勝, 1995: 無菌カイコを宿主としたバキュロウイルスベクターによる外来遺伝子発現, *無菌生物*, 25, 50-52.
- 角田素行・結城多門・陳 瑞英・森 肇・今村利勝・松原藤好, 全齡3回給餌法による原蚕の飼育成績及び産卵成績, *日蚕雑*, 64, 35-38.
- 今村利勝・陳 瑞英・張 亜平・結城多門・森 肇・角田素行・松原藤好, 1995: 全齡3回給餌法による原蚕の飼料利用効率及び飼育標準, *日蚕雑*, 64, 175-178.
- H.Mori, M.Yamao, H.Nakazawa, Y.Sugahara, N.Shirai, F.Matsubara, M.Sumida, T.Imamura, 1995: Transovarian Transmission of a Foreign Gene in the silkworm, *Bombyx mori*, by *Autographa carifornica* Nucleat Polyhedrosis Virus. *Biotechnology*, 13, 1005-1007.
- H.Ito, Y.Muraoka, T.Yamazaki, H.Mori, M.Ichida, M.Sumida, F.Matsubara, 1995: Structure and Chemical Composition of Silk Proteins in Relation to Silkworm Diet. *Textile Research*, 65(12).
- 松原藤好・角田素行・森 肇・今村利勝, 1996: 人工飼料無菌飼育法をベースにした我が国の新しい周年養蚕に関する研究Ⅲ 周年工場養蚕とその経営試算, *京工織大繊維学術報*, 20, 27-36.
- 森 肇・中沢 裕・角田素行・松原藤好・今村利勝・榎澤郁夫, 1996: カイコの人工飼料

- に添え加するビタミン、防腐・防黴剤、抗酸化剤に関する試験, 京工織大繊維学術報, 20, 37-41
- H.Nakazawa, F.Kendirgi, S.Belloncik, R.Ito, S.Takagi, Y.Minobe, K.Higo, M.Sumida, F.Matsubara, H.Mori. 1996: Effect of mutations on the intracellular localization of Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin. J.General Virology, 77, 147-153
- 松原藤好, 1996: 無菌蚕, 無菌生物, 26, 10-13.
- 増井博之・一田昌利・松原藤好, 1996: 最小有害濃度以下の重金属投与と核多角体病ウイルス感染抵抗性との関係, 無菌生物, 26, 101-102
- 中沢 裕・森 肇・角田素行・松原藤好, 1996: 低温処理を施した無菌蚕へのコンビナントバキュロウイルスの経口接種について, 無菌生物, 26, 103-106
- 小村谷貴子・森 肇・角田素行・松原藤好, 1-3齡期の發育速度の異なる無菌蚕の分離, 無菌生物, 26, 107-109.
- 松原藤好・角田素行・森 肇・張 亜平・山崎 敬・植村振作, 1996: 空中散布農薬 (NAC) を無菌蚕に投与した場合の毒性, 無菌生物, 26, 110-112.
- 松原藤好・角田素行・森 肇・張 亜平・中沢 裕・今村利勝, 1996: 人工飼料による工場周年無菌養蚕の収益性, 無菌生物, 26, 113-116
- 加古 武・角田素行・森 肇・松原藤好, 1996: オカラ含有人工飼料育蚕生糸・絹糸の吸湿性・染着性, 日蚕雑, 65, 275-277.
- 松原藤好, 1996: 人工飼料を導入した我が国における周年養蚕に関する研究, 平成5-7年度度文部省科学研究(総合研究A) 成果報告書, 1-135.
- 松原藤好, 1996: 低コスト人工飼料の開発と周年無菌養蚕に関する基礎的研究, 平成6-7年度(一般研究B) 成果報告書, 1-60
- M.Sumida, F.Matsubara, 1996: All the year round cocoon production using germ free techniques of silkworm larvae aseptically on an artificial diet: A proposal of new industry in the 21st century. X<sup>th</sup> International Symposium on Gnotobiology (Honolulu June 23-28), 5-52.
- M.Sumida T.Mori, F.Matsubara, Germfree sericulture as new industry in the 21st century. International Symposium on Sericultural Science Zhejiang China oct. 6-11.
- 松原藤好・張 亜平・森 肇・角田素行, 1997: 人工飼料による工場周年無菌養蚕に関する研究, 無菌生物, 印刷中。

参考文献 2. (著者以外の蚕の無菌飼育及び無菌蚕の応用研究)

- 阿久根 了・渡辺忠雄・木村午郎, 1969: 無菌飼育家蚕の栄養及び病理学的研究 (第 1 報) 家蚕の無菌飼育人工飼料. 栄養と食料, 21, 189-192.
- 平坂忠雄・殿村吉夫・小山長雄, 1968: カイコの無菌飼育環境に関する研究. 日蚕雑, 37, 403-407.
- 堀江保宏・渡辺喜二郎・伊藤智夫, 1965: 家蚕の人工飼料における無菌飼育の応用. 蚕糸研究, 55, 41-44.
- 飯塚敏彦, 1971: 蚕の腸内における好気性細菌フローラ (IV) 防腐剤添加飼料による無菌育幼虫に対する数種腸内細菌の消長, 日蚕雑, 40, 86-90.
- 伊藤智夫・田中元三, 1962: 無菌的方法による蚕の飼育. 日蚕雑, 31, 7-10.
- 伊藤智夫・堀江保宏・渡辺喜二郎, 1967: ピニールアイソレーターによる家蚕の無菌飼育. 日蚕雑, 36, 409-412.
- 児玉礼次郎・中筋五郎, 1968: 桑から分離した細菌 (I) 無菌飼育蚕に対する 2 種の分離株の病原効果, 日蚕雑, 37, 477-482.
- 児玉礼次郎・中筋五郎, 1969: 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 株及び E-15 株の分類学的研究. 日蚕雑, 38, 84-90.
- 児玉礼次郎・中筋五郎, 1969: 蚕から分離した細菌 (III) 無菌蚕に対する *Streptococcus* 属乳酸菌及び *Serratia Piscatorum* 病原性, 日蚕雑, 38, 103-109.
- 児玉礼次郎・中筋五郎, 1969: IV 蚕の細菌性病関する I 考察, 日蚕雑, 38, 406-412.
- Kodama, R., Nakasuji, Y. 1969: Pathogenicity of bacteria for silkworm larvae reared aseptically on an artificial diet. Ann. Rep. Inst. fermentation Osaka 4, 3-11.
- 児玉礼次郎・中筋裕五郎・西尾昌晃, 1971: 蚕から分離した細菌 (VII) 無菌飼育蚕の細菌性疾病を抗生物質で防除する試み, 日蚕雑, 29, 425-428.
- 児玉礼次郎・中筋裕五郎, 1971: 蚕から分離した細菌 (IX) 人工飼料に添加した抗生物質の動き, 日蚕雑, 40, 8-12.
- Kodama, R., Nakasuji, Y. 1971: Further studies on the pathogenic mechanism of bacterial diseases in gnotobiotic silkworm larvae IFO, Res. Comm. 5, 1-9.
- 児玉礼次郎・中筋裕五郎, 1972: 蚕から分離した細菌 (X) Gnotobiotic silkworm におけるウイルス性疾病の防除, 日蚕雑, 41, 7-14.
- 倉田啓而, 1967: 無菌蚕の利用による蚕ウイルス病誘発の研究 (1) 低温処理の影響, 蚕糸報, 22, 91-110.
- 倉田啓而, 1968: 無菌蚕の利用による蚕ウイルス病誘発の研究 (2) ヒドロキシルアミン EDTA, 靑酸化合物, ホルマリンの添食及びガンマ線照射の影響, 蚕糸報, 23, 149-171

- 倉田啓而,1971: 細胞質多角体病ウイルス感染蚕の無菌条件下での発症,日蚕雑,40, 32-36
- 松田基一・松浦雄二,1967: Flexible plastic Isolator niyoru 家蚕の無菌飼育,日蚕雑, 40, 403-408.
- 中筋裕五郎・児玉礼次郎,1969: 蚕から分離した細菌 (V) グラム陰性桿菌分類学的研究及び 無菌飼育蚕に対する病原効果, 日蚕雑,38, 471-480.
- 中筋裕五郎・児玉礼次郎,1970: 蚕から分離した細菌IV Micrococcus属及びStaphylococcus 属の菌種と無菌飼育蚕に対する病原性とその関係, 日蚕雑,39, 187-193.
- 中筋裕五郎・小林 明・児玉礼次郎,1970: 蚕から分離した細菌 VII Streptococcus 属分離 細菌株の病原性発見経過に2つの型があることについて,日蚕雑,39, 377-381.
- 岡本征二・谷 桂爾,1972: 人工飼料用蚕種の消毒試験, 徳島蚕試年報,45.
- 鳥浜義巳,1965: ウイルス病の誘発機構に関する研究 (1) 無菌飼育における斃死蚕児の病原 分類並びに伝染性について,熊本蚕試報,39, 44-47.
- 内海 進・栗栖式彦,1971:  $\beta$ -プロピオラクトン添加による家蚕無菌飼料の調製について, 日蚕雑,40, 343-349.



# 重金属の無菌蚕に対する毒性に関する研究

増井博之

A Study on Toxicity of Heavy Metals in Germfree Silkworms

By

Hiroyuki Masui

(平成9年3月)

---

現在 京都市立銅駝美術工芸高等学校

# 重金属の無菌蚕に対する毒性に関する研究

## 第1章 緒 論

現在77種類の金属元素が知られ、これらのうち52種類が人間にとって必要であると考えられている。工業化が進めば当然これらの金属は自然界に放出あるいは廃棄される。その結果、種々生物に害作用を及ぼす。仮に有害といえない金属でも自然の自浄作用を越える濃度の蓄積は生物に影響を及ぼすと考えられる。一般に重金属を生体に対する働きの上で分類すると、公害病を起こす汚染金属群 (Cd, Pb, Hg, As, Be, Bi, Sn), 生命維持のために必要な必須金属群 (Zn, Co, Mo, Fe, Cu, Mn, Cr) また生理的に必要もなく、有害作用もないとされる随伴金属群 (Ni, Al, V, Sr, Ti) に大別できる。

従来、種々環境汚染物質や重金属類が蚕や桑に及ぼす影響について調べられている (藤井, 1972, 1973; 今井ら, 1975, 1976; 栗林, 1977 a, 1977 b; 三好ら, 1971, 1978 a, 1978 b, 1978 c; 松原・木村, 1974, 松原ら, 1976)。しかし、いずれの場合も桑葉添食法あるいは人工飼料による普通育であり飼育条件の変化、また環境の微生物汚染、更に飼料交換等の人為的な蚕への影響のため正確な毒性検定ができない嫌いがあった。本研究ではこれらの金属中Cd, Pb, Zn, CoおよびNiの5種類を取り上げ、松原 (1967, 1975) が開発した人工飼料による無菌飼育蚕を用い毒性検定 (Doull, 1977; 松原ら, 1974, 1977, 1981; 中山・松原, 1981) を行なった。本方法では飼料組成, 飼料作成方法, 飼料量, 給餌時間, 飼育温度, 湿度および光条件などを常に同一にすることができ、また飼育環境の微生物汚染による重金属投与蚕への感染抵抗力への影響などの心配なしに純粹に重金属の無菌蚕に及ぼす毒性を検討することができた。

なお、この論文は学位論文 (1993) の一部である。第4章 無菌蚕に重金属類を単独投与した場合の重金属の生体内分布量および消長に関する研究 第5章 重金属類を共存投与した場合の生体内分布量および消長に関する研究 第6章 無菌蚕に投与した重金属類の次代への移行残留に関する研究 第7章 EDTAによるカドミウム毒性の軽減効果に関する研究 第8章 無菌蚕におけるカドミウム毒性の作用機構に関する研究 第9章 無菌蚕の生体内無機成分に関する研究 の詳細は追って報告します。

## 第2章 重金属類を無菌蚕に単独投与した場合の毒性に関する研究

本実験では、汚染金属群に属する Cd, Pb, 必須金属群に属する Zn, Co および随伴金属群に属する Ni の 5 種類の重金属を選び、段階的濃度のこれら重金属を無菌蚕の 1 齢, 3 齢および 5 齢の幼虫に投与した場合の最小有害濃度, LD<sub>50</sub> 値および 100% 致死濃度を調べた。

### 第1節 カドミウムを無菌蚕に投与した場合の毒性

環境汚染物質の一つである Cd は微量で生物に対して強い毒性を示すことが知られ、種々動植物についてその毒性が調べられている。蚕に及ぼす影響としては Cd が消化液のタンパク分解酵素の阻害（浜野・向山, 1970）についてや化性への影響が報じられている（長谷川, 1943；吉武, 1954）。毒性については三好ら（1971, 1978）が飼料中に添加した Cd の発育段階別の最小有害濃度および致死濃度について、また Cd の化合形態と毒性との関係について報告している。松原・木村（1974）は無菌蚕を用いて細菌やウイルスなど微生物が全く関与しない条件下でカドミウムおよびその化合物（CdSO<sub>4</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CdO, CdCO<sub>3</sub>）の毒性を調べ電離度が大きい物質即ち CdSO<sub>4</sub> や CdCl<sub>2</sub> の毒性が電離度の小さい物質である CdCO<sub>3</sub> および CdO に比べ毒性が高く Cd イオンが毒性に関与することを報告している。本実験では電離度の大きい CdCl<sub>2</sub> を取りあげ人工飼料による無菌飼育蚕を用いて発育段階別の最小有害濃度, LD<sub>50</sub> および致死濃度を調べた。

#### 1) 供試材料および実験方法

供試蚕品種は群光×万里を用いた。供試薬品は CdCl<sub>2</sub> を用い、投与濃度 0, 10, 20, 40, 80, 120, 160 および 200 ppm とした。材料蚕の飼育は人工飼育による無菌飼育を行なった。人工飼料の組成は第 1 表に示した。飼料の滅菌, 卵消毒および無菌飼育の方法は松原ら（松原ら, 1967；松原, 1975）の方法にしたがった。

#### カドミウムの投与方法および毒性調査方法

##### ① 蠶蚕からの投与

人工飼料 10g に前述の CdCl<sub>2</sub> の段階的濃度の溶液 24ml を加えてよく練り合わ

せたものを短冊形に切った硫酸紙上に0.1~0.3 mmの厚さにぬりつけ、飼育用大型試験管(内径3 cm×長さ20 cm)に投入し、綿栓を行ない、その後オートクレイブで117°C、35分滅菌した。前日消毒した卵から孵化した蠶蚕をクリーンベンチの中でこの滅菌したCdを含む飼料の入った試験管に1本当たり40~50頭ずつ白金耳で移した。そして飼育温度は26°Cで湿度は約90%、光環境は全明で10日間飼料交換を行わず無菌飼育を行なった。毒性調査は試験開始後10日目の発育経過および死亡率を齢別で調べた。

Table 1. Diet composition

Dried mulberry leaf powder	3.0 g
Cellulose powder	1.5
Defatted soybean	2.5
Sucrose	1.0
Starch	1.5
Inorganic salt mixture (Wesson's salt)	0.15
Vitamin mixture *	0.04
$\beta$ -Sitosterol	0.05
Vitamin C	0.05
Inositol	0.05
$K_2HPO_4$	0.05
Acetylcholine	0.01
$H_2O$	16 ml

\* Vitamin mixture; biotin (0.02 mg), calcium pantothenate (0.2mg), folic acid (0.02 mg), nicotinic acid amide (0.2 mg), vitamin  $B_6$ -HCl (0.1 mg), vitamin  $B_2$  (0.1 mg), vitamin  $B_1$ -HCl (0.1 mg), vitamin  $B_{12}$  (0.1 mg), vitamin C (39.16 mg).

## ② 3 齢起蚕からの投与

2 齢までCdの入らない人工飼料で無菌飼育し3 齢起蚕より段階的濃度のCdを含む無菌飼料で試験管1本当たり20頭入れ、26°Cの恒温室において10日間無菌

③ 5 齡起蚕からの投与

蟻蚕より 4 齡まで Cd を含まない普通の人工飼料で無菌飼育した蚕児の 5 齡起蚕を前述のように目的濃度の Cd を含む飼料の入った試験管内で 1 本当たり 2 頭ずつ 26°C の恒温室で飼育し、10 日目の発育経過および死亡率を求めた。なお何れの齡の投与の場合も死亡蚕については中毒死か病死かについて鏡検を行なって調査した。

2) 試験成績

① 蟻蚕からの投与の場合

蟻蚕から CdCl<sub>2</sub> を含んだ人工飼料で無菌飼育し、10 日目における Cd 濃度と蚕の発育経過および死亡率の関係は第 2 表に示した。対照としての無投与区では 95% が 3 齡に達しており、2 齡蚕は僅か 5% であった。10 ppm 投与区でも無投与区と殆ど同じ傾向であった。20 ppm 投与区では発育の遅れが認められ、3 齡蚕は 21.1% で他は全て 2 齡蚕であった。40 ppm 投与区では障害が出はじめ 3 齡に達するものではなく、37.8% が 2 齡蚕で 40.6% が 1 齡であった。80 ppm 以上になると

Table 2 Effect of graded doses of cadmium in diet on development and survival of the silkworm larvae (1st instar larvae)

Concentration of cadmium (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			1st instar	2nd instar	3rd instar
0	40	0	0	5.0	95.0
10	40	0	0	7.5	92.5
20	38	0	0	78.9	21.1
40	37	21.6	40.6	37.8	0
80	39	74.4	25.6	0	0
120	37	91.9	8.1	0	0
160	38	100	0	0	0
200	36	100	0	0	0

The larvae were reared on an artificial diet under aseptic condition.

障害は急激に重くなり、1齢で発育は停止した。120～200 ppmにおいては各区とも1齢で発育は停止し、2齢に達する蚕は全くみられなかった。

死亡率についてみると20 ppm投与区までは対照の無投与区と同様に死亡蚕は全く認められなかった。40 ppmでは2齢で僅かながら死亡蚕が認められ、1齢では16.2%が死亡した。80 ppmでは1齢中に74.4%の死亡率を示した。120 ppmでは91.9%が1齢中に死亡し、更に時間が経過すると100%死亡した。160 ppm以上では10日目までに100%死亡した。LD<sub>50</sub>は40～80 ppmの間であった。

## ② 3齢起蚕からの投与

1齢から2齢まではCdを含まない人工飼料で無菌飼育し、3齢起蚕から0～200 ppmのCdを含む人工飼料で無菌飼育した場合の10日目の蚕の発育経過および死亡率は第3表に示した。対照の無投与区では全て5齢で10 ppmにおいても100%5齢に達していた。20 ppmでは僅かに発育の遅れが認められ5齢は65%で他は全て4齢であった。40 ppmにおいては発育が著しく遅れ90%が4齢蚕で5齢は僅か10%であった。80 ppm以上になると10日間経過しても5齢に達する蚕は1頭もみられなかった。死亡蚕は対照の無投与と同様に10、20および40 ppmの各

Table 3 Effect of graded doses of cadmium in diet on development and survival of the silkworm larvae (3rd instar larvae)

Concentration of cadmium (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			3rd instar	4th instar	5th instar
0	20	0	0	0	100
10	20	0	0	0	100
20	20	0	0	35	65
40	20	0	0	90	10
80	20	40	50	10	0
120	20	85	15	0	0
160	20	100	0	0	0
200	20	100	0	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

区においても全く認めなかった。80 ppm以上になると急激に死亡率は高くなり、120 ppm以上になると生存することができなかった。そしてLD<sub>50</sub>は80 ppmであった。

### ③ 5 齢起蚕からの投与

1 齢から4 齢までCdを投与しない普通の人工飼料で無菌飼育し、5 齢起蚕から0～200 ppmを含む人工飼料でそれぞれ無菌飼育した場合の発育経過及び死亡率は第4表に示した。対照としての無投与区は5 齢起蚕から10 日目で100%の化蛹率を示した。10, 20および40 ppm においては各区とも対照と殆ど同じ傾向を示し、障害は認めなかった。80 ppmでは化蛹歩合が60%と低下し、120 ppm以上になると発育が急激に遅れ更に化蛹歩合が低下した。160 ppm以上になると投与から10 日目で全く化蛹しなかった。

死亡率についてみると、対照の無投与区では死亡蚕は全く認めなかった。また40 ppm以下の死亡率も0%であった。80 ppm投与区では僅かに死亡蚕が認められ、高濃度になるにしたがい更に死亡率は高まり、160 ppm以上になると5 齢中に全部死亡した。LD<sub>50</sub>は80～100 ppmの間であると考えられる。なお斃死蚕

Table 4 Effect of graded doses of cadmium in diet on development and survival of the silkworm larvae (5th instar larvae)

Concentration of cadmium (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days	
			5th instar	pupa
0	10	0	0	100
10	10	0	0	100
20	10	0	10	90
40	10	0	0	100
80	10	10	30	60
120	10	50	30	20
160	10	90	10	0
200	10	100	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

は全ての区において病徴および検鏡で調べた結果 Cd 食下による慢性中毒蚕であり、細菌およびウイルス病は全く認めなかった。

### 3) 結果と考察

Cd 毒性について無菌蚕の発育時期別にすなわち 1 齢, 3 齢および 5 齢起蚕から 10 日間 0 ~ 200 ppm の濃度範囲で投与した場合について調べた。まず 1 齢からの投与区では 10 ppm では対照区とはほぼ同じ傾向で 3 齢率 92.5% を示した。20 ppm 投与区では発育の遅れが認められ 3 齢率が低下した。従って最小有害濃度は 10 ppm 以下である。100% 死亡する濃度は 160 ppm 以上であった。しかし 80 ppm 以上になると蟻蚕投与では 10 日間経過しても 2 齢に達することができず日数が経過すると全て死亡するので実際の 100% 死亡する濃度は 80 ppm 以上とみなすことができる。3 齢起蚕から投与した場合の影響についてみると、10 ppm までは蟻蚕投与の場合と殆ど同じ傾向を示す。20 ppm 投与区では発育が遅れ 40 ppm では更に成長が遅れ、飼育を継続すると僅かに死亡蚕が認められる。従って非致死濃度は 20 ppm 附近であるといえる。100% 死亡濃度は 120 ppm 以上である。次に 5 齢起蚕から投与した場合 40 ppm 以下が非致死濃度で、100% 死亡する濃度は 160 ppm 以上であった。以上のことから Cd 投与による毒性を蚕の発育時期別にみると齢が進むにつれて、僅かではあるが最小有害濃度および致死濃度は高くなる傾向が認められた。そこで全齢を通じてみると許容限界濃度は 10 ppm 以下であり、致死濃度は 80 ppm 以上であるといえる。三好ら (1971) は最大許容量を 5 ppm 以下で致死濃度は 50 ppm 以上と報告しているが、著者はこの結果よりかなり高い値であり、松原・木村 (1974) のそれとはほぼ等しかった。このことは人工飼料による無菌飼育であり環境の病原微生物の影響を受けず Cd 食下による慢性中毒のみの影響のためだと思われる。

また Cd による慢性中毒の症状の特徴は摂食行動が鈍くなり、吐液はなく、日数経過に伴い摂食動作は更に緩慢になり、眠に入ることができず投与齢で長く生存する。

## 第 2 節 亜鉛を無菌蚕に投与した場合の毒性

Zn は動植物にとって必須微量元素であり、飼料中にも一定量含まれているが、



本実験では更に定量的に人工飼料に投与し摂取量と無菌蚕の発育状況の関係を調べた。そして最小有害濃度，LD<sub>50</sub>および致死濃度を求めたが，Cdと比較して無菌蚕に対して比較的毒性は低いことが判明した。

### 1) 供試材料および実験方法

供試蚕品種はCd投与の場合と同様に群光×万里を用いた。供試薬品はZnCl<sub>2</sub>を用い，投与濃度は0, 250, 500, 1,000, 1,500, 3,000, 4,000, 6,000および8,000 ppmとした。材料蚕の飼育に使用した人工飼料の組成，Znの投与方法，無菌飼育法，飼育条件および毒性調査方法は前述の通りである。

### 2) 試験成績

#### ① 蟻蚕からの投与

蟻蚕から10日間0~8,000 ppmのZnCl<sub>2</sub>を含む人工飼料で無菌飼育した場合の蚕の発育経過および死亡率を各齢別に調べた結果は第5表に示した。発育経過を

Table 5 Effect of graded doses of zinc in diet on development and survival of the silkworm larvae (1st instar larvae)

Concentration of zinc (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			1st instar	2nd instar	3rd instar
0	37	0	0	5.4	94.6
50	43	0	0	4.7	95.3
250	39	0	0	7.7	92.3
500	40	0	0	10.0	90.0
1,000	37	0	0	40.5	59.5
1,500	40	67.5	12.2	20.0	0
3,000	39	46.2	56.5	10.3	0
4,000	40	87.2	12.5	0	0
6,000	37	89.2	10.8	0	0
8,000	39	100	0	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

齡別に見ると対照の無投与区は殆どが3齡であった。50～500 ppmの範囲では障害は殆ど認められず、3齡率は90～95%と無投与区と変わらないか、逆に高い傾向がみられた。1,000 ppmでは3齡に達するものは59.5%であった。1,500 ppmでは障害が強く20%の2齡率を示しその他は1齡で成長が停止した。3,000 ppm以上では2齡は僅か10.3%で4,000 ppm以上では1齡で成長が止まった。死亡率は0～1,000 ppmでは全く認められなかった。1,500 ppmにおいてはかなり障害が認められ2齡中に67.5%の死亡率がみられた。3,000 ppmでは投与から10日目までに1齡中の死亡率は46.2%を示した。従ってLD<sub>50</sub>は1,500～3,000 ppmの間であると考えられる。そして4,000 ppm以上では1齡で成長は停止しているが、まだ生存蚕が認められる。しかし2齡以上に達することができず飼育を更に続けると15～20日で全て1齡中に死亡した。

② 3齡起蚕からの投与

2齡まで普通の人工飼料で飼育した無菌蚕の3齡起蚕から0～8,000 ppmのZnCl<sub>2</sub>を投与した場合の10日目における蚕の発育経過および死亡率を調べた結果は第6

Table 6 Effect of graded doses of zinc in diet on development and survival of the silkworm larvae (3rd instar larvae)

Concentration of zinc (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			3rd instar	4th instar	5th instar
0	20	0	0	5	95
50	20	0	0	10	90
250	20	0	0	15	85
500	20	0	0	10	90
1,000	20	0	0	40	60
1,500	20	0	0	40	60
3,000	20	15	0	85	0
4,000	20	65	25	10	0
6,000	20	100	0	0	0
8,000	20	100	0	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

表に示した。先ず 0~500 ppm の範囲では 85~95% が 5 齢に達した。1,000~1,500 ppm では発育の遅延が認められ、5 齢に達するものは 60% で他は 4 齢蚕であった。3,000 ppm では障害が現われ始め 3 齢に達するものは認められず 2 齢であった。4,000 ppm 以上では投与した 3 齢で成長は全て停止した。死亡率は無投与および 1,500 ppm では 0% であるが、3,000 ppm 以上では濃度の高さに比例して死亡率が高くなるという一定の傾向がみられ、6,000 ppm 以上では 10 日目に全て死亡した。この場合も 1 齢投与の場合と同様に 4,000 ppm 以上では 3 齢で生存した蚕も 15~20 日間継続して飼育すると全部死亡した。そして LD<sub>50</sub> は 4,000~6,000 ppm の濃度範囲であった。

### ③ 5 齢起蚕からの投与

1 齢から 4 齢まで普通飼料で無菌飼育し、5 齢起蚕から各区 10 頭宛 Zn を 0~8,000 ppm の範囲で投与した場合の投与濃度と発育経過および死亡率の関係は第 7 表に示した。投与後 10 日目では対照としての無投与区と 500 ppm の範囲内では化蛹歩合に差異がみられなかった。1,000~1,500 ppm では発育は遅れるが化蛹

Table 7 Effect of graded doses of zinc in diet on development and survival of the silkworm larvae (5th instar larvae)

Concentration of zinc (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days	
			5th instar	pupa
0	10	0	10	90
50	10	0	10	90
250	10	0	0	100
500	10	0	10	90
1,000	10	0	60	40
1,500	10	0	70	30
3,000	10	0	100	0
4,000	10	50	50	0
6,000	10	50	50	0
8,000	10	100	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

した。しかし3,000 ppmでは化蛹したものは全くなかった。死亡率は1,500 ppmまでは全くみられないが4,000~6,000 ppmでは投与後10日目で50%の死亡率がみられ8,000 ppm以上になるとことごとく死亡した。この場合も4,000 ppm以上で正存した蚕は15日以上経過すると化蛹できず5齢中に死亡した。LD<sub>50</sub>は4,000 ppmであった。

### 3) 結果と考察

動植物にとって必須微量元素であるZnが無菌蚕に有毒な作用を示す濃度すなわち最小有害濃度および致死濃度を発育段階別に調べた結果、その濃度はCdと比較して高いことがわかった。Zn投与による影響を1齢、3齢および5齢起蚕投与で調べた結果、500 ppm以下では蚕の発育経過は非常によく、この濃度範囲ではCdでみられたように投与齢中で発育が停止するという現象は認められず、また死亡率も高濃度になるにしたがって高くなるという一定の傾向は全くみられなかった。1,000 ppmでは対照の無投与と比較すると僅かに発育の遅れがみられるが死亡蚕は全く認められなかった。従って最小有害濃度は500 ppmとみなすことができる。死亡率については1,500 ppm以上で認められ、その後は濃度に比例して高くなり8,000 ppm以上では投与から10日目までに全て死亡した。従って100%死亡する濃度は8,000 ppm以上となる。しかし4,000 ppm以上では発育は投与齢で停止した。そこで僅かに生残った蚕を更に15~20日間飼育すると全て死亡するので、実際の致死濃度は4,000 ppm以上とみなせる。3齢起蚕から投与した場合についてみると、蟻蚕投与の場合と全く同じ傾向を示し、500 ppmまでは発育に影響はないが、1,000 ppmからは経過が遅延することから、最小有害濃度は蟻蚕投与の場合と同様に500 ppm以下とみなすことができ、100%死亡濃度は6,000 ppm以上である。5齢からの投与の場合も1齢および3齢投与の場合と同様に最小有害濃度は500 ppmで、致死濃度は8,000 ppmであった。以上のことから全齢を通じて考えると、Znの無菌蚕に対する最小有害濃度は500 ppm以下で、致死濃度は4,000 ppm以上であることがわかる。三好ら(1971)は最小有害濃度は100 ppm以下で200 ppm以上で障害が現われたと報告している。松原・木村(1974)は400 ppm以下では死亡蚕がみられず、1,000 ppmで僅かに死亡蚕がみられ、そして3,000 ppm以上で100%死亡すると報告している。その理由はCdの項で述べた

通りである。また Zn を無菌蚕に投与した場合の発育に及ぼす影響の特徴としては、先ず低濃度の 100 ppm 以内の投与では対照の無投与区より発育が良好であることがあげられる。1,000~3,000 ppm の濃度範囲では成長が抑制され、発育経過は延長する。それ以上の高濃度では行動が緩慢で Cd の場合より更に長く生存するが最後に縮小状で死亡する。

Sridhara and Bhat(1966)は桑葉を用いて蚕の 4 齢から 5 齢まで成長期間に Zn を与えた場合、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下では成長を促進するが、それ以上では毒作用を発現することを報告しており、著者らの結果と類似しているが、濃度に差がみられるのは桑葉と人工飼料という飼料のちがいによるものと考えられる。

### 第 3 節 鉛を無菌蚕に投与した場合の毒性

Cd と同様に環境汚染金属である Pb の無菌蚕に及ぼす影響について発育段階別に最小有害濃度、LD<sub>50</sub> および致死濃度について調べた結果、その毒性は先に調べた Cd より低く、Zn とほぼ等しい値を得た。これは溶解度の小さい PbCl<sub>2</sub> を用いたためであり、電離度の高い物質を使用すれば更に毒性は高くなると考えられる。

#### 1) 供試材料および実験方法

供試蚕品種は Cd および Zn の場合と同じ郡光×万里を用いた。供試薬品は PbCl<sub>2</sub> を用い、投与濃度は 0, 50, 250, 500, 1,000, 2,000, 4,000, 6,000 および 8,000 ppm とした。また供試薬品は溶解度が小さいためできるだけ均一に攪拌し飼料に混入した。材料蚕の飼育方法、薬品の投与方法、飼育条件および毒性の調査方法は Cd および Zn の場合に準じた。

#### 2) 試験成績

##### ① 蟻蚕からの投与

0~8,000 ppm の PbCl<sub>2</sub> を含んだ人工飼料で無菌飼育した場合の投与濃度と 10 日目の蚕の発育経過および死亡率については第 8 表に示した。対照としての無投与区は 92.3% の 3 齢率であった。50~500 ppm では各区とも障害が認められず、3 齢率も約 90~95% と対照と同じ傾向であった。1,000 ppm では 3 齢率は 32.4% と低下し発育経過が遅れる傾向が認められた。2,000~8,000 ppm の濃度では濃度に

Table 8 Effect of graded doses of lead in diet on development and survival of the silkworm larvae (1st instar larvae)

Concentration of lead (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			1st instar	2nd instar	3rd instar
0	39	0	0	7.7	92.3
50	43	0	0	4.7	95.3
250	40	0	0	7.5	92.5
500	39	0	0	10.3	89.7
1,000	37	0	8.1	59.5	32.4
2,000	40	22.5	70.0	7.5	0
4,000	39	61.5	38.5	0	0
6,000	40	93.3	6.7	0	0
8,000	37	100	0	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

比例して障害が強くなり、4,000ppm以上では1齢で成長が停止し、2齢に達する蚕は全く認められなかった。死亡率は1,000ppmまでは対照区と同様に全くみられないが、2,000ppmでは1齢で22.5%、4,000ppmでは61.5%と高濃度になるにつれて死亡率は高まり、6,000ppm以上では10日間で殆ど死亡した。4,000ppm以上の場合生存した蚕を更に飼育し続けると全て1齢中に死亡した。この場合LD<sub>50</sub>は2,000~4,000ppmの間であると考えられる。

## ② 3齢起蚕からの投与

無菌蚕の3齢起蚕から10日間PbCl<sub>2</sub>を0~8,000ppmの範囲内でそれぞれ投与した場合の発育経過および死亡率は第9表に示す通りであって、0~500ppmの範囲では各区とも発育経過は良好で殆どが5齢蚕で差異は認めなかった。1,000ppm投与区では僅かに5齢率が低下した。2,000ppm以上では発育が遅れ、5齢率は0%であった。4,000ppm以上になると発育経過は更に遅れ、僅かに10~20%が4齢に達することができ他は全て3齢で発育が停止した。死亡率は対照区では全く認められず、5,000ppm投与区までは各区とも対照の無投与と同様であり、この濃度範囲内では障害が認められなかった。2,000ppmでは4齢中に15%、4,000

ppm 以上になると投与齡中の死亡率は高まり, 8,000ppm では投与後 10 日目までに 100% 死亡した。なお 4,000ppm 以上では生存した蚕は最後まで 5 齡に達することなく全て死亡した。

Table 9 Effect of graded doses of lead in diet on development and survival of the silkworm larvae (3rd instar larvae)

Concentration of lead (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			3rd instar	4th instar	5th instar
0	20	0	0	10	90
50	20	0	0	15	85
250	20	0	0	10	90
500	20	0	0	15	85
1,000	20	0	0	40	60
2,000	20	15	0	85	0
4,000	20	25	55	20	0
6,000	20	30	60	10	0
8,000	20	100	0	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

Table 10 Effect of graded doses of lead in diet on development and survival of the silkworm larvae (5th instar larvae)

Concentration of lead (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days	
			5th instar	pupa
0	10	0	10	90
50	10	0	20	80
250	10	0	10	90
500	10	0	20	80
1,000	10	0	10	90
2,000	10	0	100	0
4,000	10	50	50	0
6,000	10	70	30	0
8,000	10	100	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

### ③ 5 齡起蚕からの投与

1 齡から 4 齡まで普通の人工飼料で無菌飼育した蚕の 5 齡起蚕から 0~8,000 ppm の  $PbCl_2$  を混入した飼料で無菌飼育した。その場合の发育経過及び死亡率を 10 日目に調べた結果は第 10 表に示した。0~1,000 ppm では 80~90% の化蛹歩合であった。2,000 ppm 以上になると、やや経過は遅れ殆ど化蛹しなかった。死亡率は 2,000 ppm 以下では全く認められなかったが、4,000~6,000 ppm では 5 齡中に 50~70% 死亡し、更に 8,000 ppm 以上では 100% 死亡した。そして  $LD_{50}$  は 4,000 ppm であった。

### 3) 結果と考察

Pb の無菌蚕に対する毒性について  $PbCl_2$  を用いて发育時期別にすなわち 1 齡・3 齡および 5 齡起蚕から 10 日間 0~8,000 ppm の濃度範囲で投与し調べた。

先ず 1 齡からの投与についてみてみると、0~500 ppm の範囲内では发育経過は対照区と同じ傾向を示し、死亡蚕も認めなかった。1,000 ppm 投与では僅かに发育の遅れが認められた。従って最小有害濃度は 500 ppm 以下とみなすことができる。そして Pb も Zn の場合と同様に 8,000 ppm 以上になると、その投与齡中で 10 日目までに 100% 死亡した。従って 100% 死亡する濃度は 8,000 ppm 以上となるが、4,000 ppm 以上の投与では 10 日目までに生存蚕は多く見られるが、これらは 1 齡で成長が停止し 2 齡にならず 15~20 日後に全て死亡するので実際の 100% 死亡濃度は 4,000 ppm 以上となる。3 齡起蚕から投与した場合は 1 齡投与の場合と殆ど同じ傾向を示し、最小有害濃度は 500 ppm 以下とみなせる。死亡率については 6,000 ppm 投与区では 10 日目に投与齡中に 30% の死亡率を示した。更に時間を経ると死亡率が増加することから  $LD_{50}$  は 6,000 ppm 附近であろう。そして致死濃度は 8,000 ppm 以上である。次に 5 齡起蚕から投与した場合は最小有害濃度は 1,000 ppm 以下で、1 齡および 3 齡投与の場合より 500 ppm も高くなることより、つまり耐性が増大したことになる。100% 致死濃度も 8,000 ppm 以上であり、致死濃度も最小有害濃度と同様に齡が進むにつれて高くなった。以上より全齡を通じて Pb の無菌蚕に対する最小有害濃度は 500 ppm 以下であり、致死濃度は 4,000 ppm 以上で Zn の場合と同じ値を得た。松原ら (1976) も種々化合物で最小有害濃度および致死濃度を求めているが、本実験結果と殆ど同じ



値である。三好ら(1978)はPbの最小有害濃度を100 ppm以下としているが、これは電離度の大きい酢酸鉛を使用したため値が低くなったと考えられる。またPb食下による中毒症状はCdの場合と類似性を示した。

#### 第4節 ニッケルを無菌蚕に投与した場合の毒性

Cd, ZnおよびPbを単独投与した場合の毒性を調べ致死量, LD<sub>50</sub>および許容限界量について明らかにした。

本実験では自然界に広く遍在し随伴金属群のNiを無菌蚕に投与した場合の投与濃度と蚕児の発育経過および死亡率との関係について発育段階別に調べた結果、最小有害濃度および致死濃度とともにCdより高くZn・Pbより低かった。

##### 1) 供試材料および実験方法

供試蚕品種としては芙蓉×東海を用いた。供試薬品はNiCl<sub>2</sub>を用いた。投与濃度は1齢および3齢起蚕から投与する場合は0, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1,000, 2,000および3,000 ppmとし、5齢起蚕からの投与の場合は更に6,000~8,000 ppmとした。材料蚕は人工飼料による無菌飼育蚕を用いた。飼料へのNi投与方法, 飼育条件および毒性調査方法は前述の方法に準じた。

##### 2) 実験結果

###### ① 蟻蚕からの投与

蟻蚕からNiを投与した場合の発育経過および死亡率については第11表に示した。対照としての無投与区では投与後10日目ですべて3齢に達しているのに対し、Ni 10 ppmでは95.2%, 50 ppmで100%となり100および200 ppmでは83.3%の3齢率を示し対照と大きな差異はみられなかった。300 ppmになると31.6%, 400 ppmで11.1%と3齢率は低下し、500 ppmでは僅かに7.1%であった。そして1,000 ppmでは3齢に達する蚕はみられず、殆ど2齢であった。また2,000 ppmでは6.5%の2齢率を示し、殆どは1齢で発育は停止した。また3,000 ppmでは2齢に達する蚕はみられなかった。死亡率については500 ppmまでは全く認められず、1,000 ppmでは僅かに認められた。2,000 ppm以上では10日経過しても殆どが2齢に達することはできず発育は停止し、更に飼育を継続すると約10日後

に全て死亡した。そこでLD<sub>50</sub>についてみると蠶蚕投与では1,000から2,000 ppmの間であった。

Table 11 Effect of graded doses of nickel in diet on development and survival of the silkworm larvae (1st instar larvae)

Concentration of nickel (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			1st instar	2nd instar	3rd instar
0	30	0	0	0	100
10	21	0	0	4.8	95.2
50	19	0	0	0	100
100	24	0	0	16.7	83.3
200	18	0	0	16.7	83.3
300	19	0	0	68.4	31.6
400	18	0	0	88.9	11.1
500	28	0	0	92.9	7.1
1,000	27	11.1	7.4	81.5	0
2,000	31	93.5	0	6.5	0
3,000	24	100	0	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

② 3 齡起蚕からの投与

3 齡起蚕からの各濃度のNiを投与した場合の発育経過および死亡率については第12表に示したように、300 ppm までは対照と殆ど変わらず5 齡に達するが400 ppmおよび500 ppmでは発育が遅れ、1,000 ppm以上では5 齡に達する蚕児は認められなかった。死亡率については500 ppmまでは全く認められず、1,000 ppmで11.8%、2,000 および3,000 ppmでは投与齡で41.2%が死亡したが、実際には3,000 ppm以上では10日以上飼育を継続すると全て死亡した。LD<sub>50</sub>は2,000 ~3,000 ppmの間にあった。

Table 12 Effect of graded doses of nickel in diet on development and survival of the silkworm larvae (3rd instar larvae)

Concentration of nickel (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			3rd instar	4th instar	5th instar
0	10	0	0	10.0	90.0
10	10	0	0	10.0	90.0
50	10	0	0	20.0	80.0
100	10	0	0	10.0	90.0
200	10	0	0	20.0	80.0
300	10	0	0	20.0	80.0
400	10	0	0	90.0	10.0
500	17	0	0	94.1	5.9
1,000	17	11.8	0	88.2	0
2,000	17	41.2	0	58.5	0
3,000	17	100	0	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

### ③ 5 齡起蚕からの投与

4 齡まで Ni を含まない人工飼料で無菌飼育し 5 齡起蚕から Ni を投与した場合の投与濃度と発育経過および死亡率については第 13 表に示したように、8,000 ppm までは対照の無投与と同様に発育は良好で全て上簇営繭した。しかし 1,000 ppm 以上では投与後 10 日以内に殆ど死亡した。LD<sub>50</sub>についてみると 8,000 ~ 10,000 ppm の間にあった。

Ni を投与した場合に高濃度で死亡した個体の死因を調べた結果は全て Ni による中毒死であり病原微生物による斃死蚕は全くなかった。また Ni の高濃度における中毒症状では食慾が不振となり殆ど動かず Cd での状況と似かよっているが、徴候が見えてから死亡するまでの期間は Cd 毒性よりも長期間を要した。

Table 13 Effect of graded doses of nickel in diet on development and survival of the silkworm larvae (5th instar larvae)

Concentration of nickel (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days	
			5th instar	pupa
0	8	0	0	100
10	8	0	0	100
500	8	0	0	100
1,000	8	0	0	100
2,000	8	0	0	100
3,000	8	0	0	100
6,000	8	0	0	100
8,000	8	0	0	100
10,000	8	100	0	0
12,000	8	100	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

### 3) 考察

Niは広く野菜や果物および穀物などに自然状態でかなり多量に含まれていること(Schroeder et al., 1961)などから、この元素の哺乳動物に対する報告は多くある(Phatak et al., 1950; Tedeschi, 1957; Weber, 1967, 1969)。しかし無菌蚕への影響についての報告は全くない。本実験では無菌蚕を用いてNiの毒性を調べその致死濃度、発育に影響のない濃度およびLD<sub>50</sub>を蚕の発育段階別に明らかにした。

Niの毒性については発育に殆ど影響のない濃度は1齢では200 ppm以下であり、3齢起蚕では300 ppmで5齢起蚕では8,000 ppmであった。100%死亡する濃度は1齢で2,000 ppm以上、3齢では3,000 ppm以上であり、5齢では10,000 ppm以上であった。

以上のように本実験においてNiの毒性を明らかにすることができたが、松原ら(1974, 1977)によるとCdのように一般的に汚染金属と呼ばれるものは比較的低濃度すなわち10 ppm以下が蟻蚕での最小有害濃度であるのに対し、常時天然の植物

中に含有し、蚕が摂取しているNiにおいて200ppmと最小有害濃度は高くなっている。また100%致死濃度をみるとZnおよびPb(塩化化合物)と同様に2,000ppm以上の高い濃度であった。

#### 第5節 コバルトを無菌蚕に投与した場合の毒性

Coは植物に普遍的に存在し、ビタミンB<sub>12</sub>の成分として知られ、Zn同様動物の必須微量元素であり、哺乳動物に対する毒性については報告がある(Becker and Smith, 1951)。蚕に対する影響についてはSridharaら(1966)がCo投与が蚕に対するベンジミダゾール基の毒性を軽減すること、またCo投与が蚕の成長に及ぼす影響が調べられている(Sridhara, 1966)。しかし発育段階別の毒性についての報告は全くない。本実験ではCoの無菌蚕に対する毒性を発育段階別で調べた。

##### 1) 供試材料および実験方法

供試蚕品種は芙蓉×東海を用いた。投与薬品はCoCl<sub>2</sub>を用いた。投与濃度は1齢および3齢起蚕からの投与においては0, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1,000, 2,000および3,000ppmとしたが、5齢起蚕からの投与の場合は更に4,000~10,000ppmとした。材料蚕の飼育に要した人工飼料の組成、無菌飼育法、Coの投与方法、飼育条件および毒性の調査方法は前述の通りである。

##### 2) 実験結果

###### ① 蠶蚕からの投与

蠶蚕からCoを含む人工飼料で無菌飼育し、10日目の蚕児の発育経過および死亡率については第14表に示す通りである。無投与の対照区においては、すべて3齢に達しており、斃死蚕は全くみられなかった。Co 10ppmでは対照と同様100%の3齢率を示し、50ppmでは85%となり、100ppmでは50%と3齢率はやや低下し、200ppmでは4.3%が3齢に達し、それ以上の濃度では10日間経過しても3齢に達するものは認められなかった。そして400ppmからはすべて1齢で発育は停止し、2齢に達するものはなかった。死亡率については100ppmまでは死亡蚕は全く認められなかったが、200ppm以上で認められ、200ppm

では 8.6%, 300 ppm では 35%, 400 ppm では 54.5% となり, 500 ppm では 90% と殆ど死亡し, 1,000 ppm ではすべて死亡した。400 ppm 以上の生存蚕は 1 齢で全て発育は停止し, 更に飼育を継続すると 1 齢のままで全て死亡した。そして LD<sub>50</sub> は 300~400 ppm の間にあった。

Table 14 Effect of graded doses of cobalt in diet on development and survival of the silkworm larvae (1st instar larvae)

Concentration of cobalt (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			1st instar	2nd instar	3rd instar
0	16	0	0	0	100
10	20	0	0	0	100
50	20	0	0	15.0	85.0
100	20	0	0	50.0	50.0
200	18	8.6	0	87.1	4.3
300	20	35.0	50.0	15.0	0
400	22	54.5	45.5	0	0
500	20	90.0	10.0	0	0
1,000	20	100	0	0	0
2,000	20	100	0	0	0
3,000	20	100	0	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

## ② 3 齢起蚕からの投与

1 齢および 2 齢期間中は Co を含まない普通の人工飼料で無菌飼育し, 3 齢起蚕から Co を含んだ人工飼料で同様に飼育し, 10 日目における蚕児の発育経過および死亡率は第 15 表に示した。発育経過を齢別にみると, 対照の無投与区では 93.8% が 5 齢に達し, 6.2% は 4 齢であった。Co 10 および 50 ppm では 88.2% の 5 齢率を示し, 100 ppm では 94.1% となり対照区と殆ど変らない発育を示した。200 ppm では 47.1%, 300 ppm で 23.5%, 400 ppm では 6.5% と Co の濃度が高くなるにつれて 5 齢率は低下し, 500 ppm 以上では 5 齢蚕は全く認められな

った。死亡率については 10, 50 および 100 ppm においては無投与区と同様死亡蚕は全く認められないが, 200 ppm では 23.5%, 300 ppm では 29.4% となり 400 ppm では 37.5%, 500 ppm では 40% であった。1,000 ppm 以上では発育成長せず投与齢中に 40% 以上死亡した。従って実際の 100% 致死濃度は 1,000 ppm 以上であり, LD<sub>50</sub> は 500 から 1,000 ppm の間にあった。

Table 15 Effect of graded doses of cobalt in diet on development and survival of the silkworm larvae (3rd instar larvae)

Concentration of cobalt (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
			3rd instar	4th instar	5th instar
0	16	0	0	6.2	93.8
10	17	0	0	11.8	88.2
50	17	0	0	11.8	88.2
100	17	0	0	5.9	94.1
200	17	23.5	0	29.4	47.1
300	17	29.4	0	47.1	23.5
400	16	37.5	0	56.2	6.3
500	10	40.0	0	60.0	0
1,000	10	100	0	0	0
2,000	10	100	0	0	0
3,000	10	100	0	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

③ 5 齢起蚕から投与した場合

4 齢までは Co を含まない普通の人工飼料で無菌飼育し, 5 齢起蚕から Co を含む人工飼料で同様に飼育し投与後 10 日目における発育経過および死亡率を第 16 表に示した。Co 10 から 400 ppm の各区では対照の無投与区と同様すべて吐糸営繭し死亡する個体は全くみられなかった。6,000 ppm では 25% の死亡率であり, 8,000 ppm 以上では投与後 10 日目で 100% の死亡率を示した。そして LD<sub>50</sub> は 6,000 から 8,000 ppm の間であった。

Table 16 Effect of graded doses of cobalt in diet on development and survival of the silkworm larvae (5th instar larvae)

Concentration of cobalt (ppm)	NO. of larvae tested	mortality (%)	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days	
			5th instar	pupa
0	8	0	0	100
10	8	0	0	100
500	8	0	0	100
1,000	8	0	0	100
2,000	8	0	0	100
3,000	8	0	0	100
4,000	8	0	0	100
6,000	8	25	75	0
8,000	8	100	0	0
10,000	8	100	0	0

The larvae were reared as shown in Table 2.

### 3) 考察

無菌蚕を用いてCoの致死濃度、発育に影響のない濃度およびLD<sub>50</sub>を蚕の発育段階別に明らかにした。濃度設定については予備実験を繰返した結果定めたが、本実験範囲内で致死濃度および非致死濃度が得られたので、濃度設定は適切であったと考えられる。

Coの無菌蚕に対する毒性についてみると、1齢、3齢および5齢起蚕から10日間連続投与した場合は発育齢によって差異がみられ、1齢では50 ppm以下、3齢では100 ppm以下、5齢起蚕では4000 ppm以下の濃度は発育に影響のない濃度といえよう。100%死亡する濃度については10日間の調査では明瞭でなかったが、投与齢で発育が停止しているものは、いずれ全て死亡するのでこの濃度を100%死亡する濃度と仮定すれば1齢では400 ppm以上、3齢では1000 ppm以上、5齢では6000 ppm以上といえよう。以上より全齢を通じてみると許容限界濃度は50 ppm以下であり、致死濃度は400 ppm以上であるといえる。な



お桑葉を用いて蚕の4齢から5齢までの成長期間にCoを与えた場合の影響は、低濃度では成長に好結果を及ぼすが、1,000 µg/ml以上では毒作用を現わすという報告がある(Sridhara and Bhat, 1966)。しかし各齢別の毒性については報告がない。また同じ必須微量元素のZnとその毒性を比較すると、Znの場合の許容限界濃度は500 ppm以下で致死濃度は4,000 ppm以上であることからCoはZnの10倍の毒性を示すことになる。一方蚕のCo食下による中毒症状は先のCd, Zn, PbおよびNiの項で述べたように重金属共通の類似性を示した。

### 第3章 重金属類を無菌蚕に共存投与した場合の毒性に関する研究

著者は無菌蚕を用いて Cd, Zn, Pb (松原・木村, 1974, 三好ら, 1971, 1978) Ni および Co の (増井・松原, 1983) 毒性検定を行なった。そしてそれら重金属の許容限界濃度, LD<sub>50</sub> および致死濃度を明らかにした。

一般に重金属汚染はそれぞれの元素が単独によるよりも数種のものの複合によるいわゆる複合汚染の形式で起る場合が普通のものである。従って重金属の共存下での影響を多くの動物で検討する必要がある。そこで本実験では2種の元素が飼料中に共存した場合, それを摂食した動物はどのように影響を受けるかを知るため, ウィルスや細菌など微生物汚染を全く受けていない無菌蚕を用い, それぞれの元素が単独に飼料中に存在し, それを食下した場合には 1000 ppm という高濃度においても殆ど毒性を示さない Zn と Pb を用い, これらに Cd の一定量を共存させ投与した場合の毒性の強弱について調べた (松原ら, 1978)。

#### 第1節 カドミウムに亜鉛を共存投与した場合の毒性

Cd は同族の Zn が常に付随して存在することが知られている (館川, 1973)。汚染金属群の Cd は低濃度で強い毒性を示すが, 必須微量元素である Zn の毒性は Cd と比較して弱い (松原・木村, 1974; 三好ら, 1971)。本実験では Cd に種々の濃度の Zn を共存させ無菌蚕に投与した場合, Cd 毒性が Zn 共存によって軽減されること, 更に致死濃度である 80 ppm および 160 ppm の高濃度の Cd の毒性を最も軽減させる Zn 量を明らかにした。

##### 1) 供試材料および実験方法

供試蚕品種は郡光×万里を用いた。供試薬品は CdSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> を用いた。投与濃度は Cd 濃度 80 ppm とし, Zn 濃度を 0, 10, 50, 125, 250, 500 および 1000 ppm とした。重金属の投与方法は単独および共存投与とも蠶蚕から 10 日間および 3 齢起蚕から 10 日間無菌的に飼料に混合し, 滅菌して投与した。材料蚕の飼育は, 人工飼料による無菌飼育を行なった。飼料組成, 飼料の調製, 滅菌, 卵の

消毒および無菌飼育の方法は松原ら（1967, 1975）の方法に準じた。

毒性調査は、1 齢および3 齢投与とも、26°C の恒温室で光条件は全明で10 日間飼料を食下させ、10 日目に試験管を開放し、各齢別に頭数を調べ、更に斃死蚕についても齢別に調べた。なお斃死蚕については、中毒死か病死かを病徴で調べ、判別困難な場合は鏡検によった。

## 2) 実験結果

Cd 80 ppm および 160 ppm に対し Zn を、0, 10, 50, 125, 250, 500 および

Table 17 Influence of lead on cadmium toxicity of germ-free silkworm larvae(1st instar)

concentration		No. of larvae tested	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
Cd	Zn		1st instar	2nd instar	3rd instar
ppm	ppm		%	%	%
0	0	40	0	25.0	75.0
80	0	40	45.0 ( 55.0)	0	0
80	10	30	50.0 ( 50.0)	0	0
80	50	30	57.7 ( 43.3)	0	0
80	125	30	96.7 ( 3.3)	0	0
80	250	40	30.0	50.0	20.0
80	500	30	33.3	40.0	26.7
80	1,000	30	16.7	50.0	33.3
160	0	52	0 (100)	0	0
160	10	58	0 (100)	0	0
160	50	36	0 (100)	0	0
160	125	45	16.6 ( 83.4)	0	0
160	250	40	47.5 ( 40.0)	12.5	0
160	500	30	30.0 ( 26.7)	43.3	0
160	1,000	30	46.7	53.3	0

( ) : mortality

1,000 ppmの7段階とし、それらを共存させ無菌の蠶蚕から10日間投与した場合の蚕児の発育経過および死亡率については第17表に示す通りであって、先ず発育経過についてはCd 80 ppmの単独投与では1齢ですべて成長が停止し、10日間経過しても2齢に達するものはみられない。Cd 80 ppmにZnが、10、50および125 ppmと共存投与してもCd単独投与と同じ傾向がみられる。しかしZnが250 ppm～1,000 ppmの共存投与では発育は良好となり、2齢や3齢蚕が出現し、本実験の範囲内ではZnの濃度が高くなるにしたがって発育はよくなる傾向がみられた。死亡率についてはCd 80 ppm単独投与では55%であるがZnが125 ppmの共存投与では3.3%と低下し、Zn 250 ppm以上1,000 ppmまでは斃死蚕は全く認められなかった。Cd 160 ppmの場合の発育経過は対照のZnが0 ppmの場合は1齢で成長は停止するが、Zn 125 ppm以下の共存投与ではCd 160 ppm単独投与と同じ傾向がみられる。Cd 160 ppmにZnが250 ppm共存した場合は2齢蚕が僅かに出現する。Znが500 ppm共存すると更に発育経過は良くなり、Znが1,000 ppm共存すると53%の2齢率を示した。このようにCd 160 ppmにおいてもZn 250 ppm以上ではZnの濃度が高くなるにつれて発育経過は良好になる傾向が認められた。死亡率は対照のCd 160 ppm単独投与では投与齢の1齢で100%の死亡率を示し、Znを10および50 ppmの共存投与でも同様である。Znを125 ppm共存投与すると83%となり、250 ppmでは40%、500 ppmの共存投与では26.7%と共存するZnの濃度に反比例して死亡率は低下し、Zn 1,000 ppmの共存投与では死亡蚕は全く認められなかった。以上のようにCd 80 ppmおよび160 ppmでZnは250 ppm以上1,000 ppmまでの共存投与によって発育経過はよくなり、共存するZnの濃度が高くなるにつれ死亡率は低下する。このように蚕児の発育経過および死亡率の上からCdにZnを共存させた場合毒性の軽減効果が明らかに認められた。

つぎにCd 80 ppmおよびCd 160 ppmにZnを0～1,000 ppmの範囲で3齢から共存投与した場合の蚕児の発育経過および死亡率は第18表に示した。Cd 80 ppmを3齢起蚕に投与した場合の発育経過は投与後10日目で30%の4齢率を示し、5齢蚕の出現はみられない。そこでZnを50 ppm Cdに共存投与すると5齢蚕が10%出現した。更にZn濃度が125 ppm以上1,000 ppmになると5齢率は30～50%と増加し、発育はよくなった。死亡率についてはCd 80 ppmの単独投与で

は 40 % であるが Zn 10 ppm 共存投与で 30 %, Zn 50 ppm の共存投与で 10 % と低下し, Zn 125 ppm 以上 1,000 ppm までの共存投与では死亡蚕は全く認めなかった。Cd 160 ppm においては発育経過をみると対照の単独投与で発育は停止するが, Cd 160 ppm に Zn を 500 ppm 共存させ投与すると 40 %, Zn 1,000 ppm の共存投与で 50 % の 5 齢蚕が出現し発育は良好となった。死亡率は Cd 160 ppm の単独および Cd 160 ppm に Zn 10 ppm の共存投与では 100% であり, Cd 160 ppm に Zn 50, 125 ppm の共存投与で 90% となり, Zn 250 ppm の共存投与で 60% と低下する。更に Zn 500, 1,000 ppm の共存投与では斃死蚕は全くみられず, Cd 毒性が Zn によって強く軽減されることが判明した。

Table 18 Influence of zinc on cadmium toxicity of germ-free silkworm larvae (3rd instar)

Concentration		No. of larvae tested	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
Cd	Zn		3rd instar	4th instar	5th instar
ppm	ppm		%	%	%
80	0	10	50 ( 20)	10 ( 20)	0
80	10	10	50 ( 10)	20 ( 20)	0
80	50	10	0	80 ( 10)	10
80	125	10	0	70	30
80	250	10	0	60	40
80	500	10	0	50	50
80	1,000	10	0	50	50
160	0	10	0 (100)	0	0
160	10	10	0 (100)	0	0
160	50	10	0 ( 90)	10	0
160	125	10	0 ( 80)	10 ( 10)	0
160	250	10	10 ( 60)	30	0
160	500	10	0	60	40
160	1,000	10	0	50	50

( ) : mortality

### 3) 考 察

松原ら(1974)はCdの毒性はZnの共存によって軽減されることを報告している。著者はCd濃度が高い場合にはそれらの共存効果は殆どみられなかったが、共存するZnを増量すればその効果が判明するのではないかと考えた。そこで本実験ではZnが単独では毒性を示さない最も高い濃度範囲で実験を行なったところ、高濃度のCdにおいてもZnの共存によって毒性軽減が判明し、その効果が最も大きいZnの量も明らかにすることができた。そこでCdとZnの共存によって毒性が強くと軽減される場合の両者の濃度と組合せについてみると、Cd濃度は致死濃度の80 ppmおよび更に高濃度の160 ppmを用いた。またZnについても先に述べたように非致死濃度の1,000 ppm以内とし、CdとZnを組合わせたところ、Cdが80 ppmや160 ppmの高い濃度でもZnが250 ppm以上1,000 ppm以下の共存投与によって毒性は強く軽減されるが、Cdが320 ppmになるとZnの量が1,000 ppmや、それ以上共存しても軽減効果は認められないので、CdとZnの共存によってCd毒性が軽減される場合のCd量は160 ppm以下であり、Znは1,000 ppm以下とみなされる。そしてCd 80 ppmで最も毒性を強く軽減させることのできるZnの濃度は250～1,000 ppmで、Cd 160 ppmでは500～1,000 ppmと言える。松原ら(1974)はCd 40 ppm以下の低濃度ではZnが250 ppm以下で充分効果があることを報告しているが、本実験でもこれを確認することができた。

以上は細菌やウィルスなど病原微生物が全く存在しない無菌条件下で検討しているので高濃度のCdとZnの共存による毒性の軽減効果を明確にすることができたが、現実に自然界ではこのように高濃度では毒性の軽減効果はみられないかも知れない。その理由としては松原ら(1974)が報告しているようにCdを投与した蚕はウィルス病に感染し易いからである。つまり自然界ではCd、Znなど単独投与での最小許容限界量は非常に低い。三好ら(1971)によればCdで1 ppm、Znで200 ppmという。従って自然環境下での重金属の共存効果を究明する場合には著者らの場合よりも更に低濃度での組合せが必要で、またその効果も環境の病原微生物の汚染の程度によって異なることも考えられる。

### 第2節 カドミウムに鉛を共存投与した場合の毒性

無菌蚕を用い、Pbを単独に飼料中に混合して投与し、それを食下しても殆

ど毒性を示さない1,000 ppmの濃度を用い、これにCdの一定量を共存させ投与した場合の毒性の強弱について調べた。そしてCdにPbが共存することによって、その毒性が増強されること。更にCd毒性を強くする濃度に応じたPb量を明らかにした。

#### 1) 供試材料および実験方法

供試蚕品種は郡光×万里を用いた。供試薬品はCdSO<sub>4</sub>およびPbSO<sub>4</sub>を用いた。投与濃度はCd濃度を40 ppmおよび80 ppmとし、Pb濃度を、0、10、50、125、250、500および1,000 ppmとした。材料蚕の飼育法、飼料組成、CdおよびPbの投与方法、飼育条件および毒性調査方法は前項の方法（松原ら、1967、1975）に準じた。

#### 2) 実験結果

Cd濃度を40 ppmおよび80 ppmと一定にとり、Pb濃度を0、10、50、125、250、500および1,000 ppmと7段階にして、CdとPbをそれぞれ共存させ1齢に投与した場合の蚕児の発育経過および死亡率から毒性を調べた結果は第19表に示す通りである。発育経過をみると、対照のCd 40 ppm単独投与では投与後10日目で1齢蚕が30%、2齢蚕が70%出現するのに対し、Pb 125 ppmを共存投与すると1齢で成長が停止する蚕児が70%認められた。更にPb 250 ppm以上の共存投与では2齢に達することはできない。しかしPb単独では前項に示したようにPb 1,000 ppmの単独投与では90%以上が2齢以上に達する。死亡率については対照としてCd 40 ppmの単独投与およびCd 40 ppm、Pb 50 ppm以下の共存投与では全く認められないが、Pb 125 ppm以上の共存投与で死亡蚕が出現し、共存するPbの濃度に比例して死亡率は高くなり、Pb 1,000 ppmの共存投与で87.5%と高率の死亡率を示した。つぎに蠶蚕からCd 80 ppmを単独投与した場合の発育経過は1齢で成長が全て停止し、Pbが10～1,000 ppmの共存投与によってもPb濃度に関係なく同様の結果を示す。死亡率はPb 125 ppmの共存投与までは70～90%であり、250 ppm以上のPbの共存投与で100%となり、死亡蚕は全て1齢であった。Cd 160 ppm以上ではCd単独で全て発育は停止し死亡率も

Table 19 Influence of lead on cadmium toxicity of germ-free silkworm larvae(1st instar)

Concentration		No. of larvae tested	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
Cd	Pb		1rd instar	2th instar	3th instar
ppm	ppm		%	%	%
40	0	40	30.0	70.0	0
40	10	40	32.5	67.5	0
40	50	30	33.3	66.7	0
40	125	30	63.3( 6.7)	30.0	0
40	250	38	73.7( 26.3)	0	0
40	500	40	37.5( 62.5)	0	0
40	1,000	40	12.5( 87.5)	0	0
80	0	30	30.0( 70.0)	0	0
80	10	40	30.0( 70.0)	0	0
80	50	40	20.0( 80.0)	0	0
80	125	40	10.0( 90.0)	0	0
80	250	45	0 (100 )	0	0
80	500	46	0 (100 )	0	0
80	1,000	45	0 (100 )	0	0

( ) : mortality

100%であり、Pbを共存させても同様な結果を示すので表に示さなかった。

つぎに3齢起蚕からCdとPbを共存投与した場合の毒性を調べた結果は第20表に示す通りであって、Cd 40 ppmでは全て4齢蚕であり、CdにPbが10～1,000 ppm共存しても同様であり発育経過の差異は認められなかった。死亡率ではPb 125 ppm以下の共存投与までは0%であるが、Pb 250 ppmで10%、500 ppmの共存投与で20%、Pb 1,000 ppmの共存投与で40%とCdに共存するPbの濃度が高くなるにつれて死亡率は高くなる傾向がみられた。Cd 80 ppmにPbを共存投与した場合の発育経過は、対照のCd単独投与では90%の4齢率を示すが、Pb 250 ppmの共存投与で20%と低下し、Pb 500 ppmおよび1,000 ppmの共存投与では投与齢の3齢で成長は全て停止した。死亡率についてみると、Cd 80 ppmに



Table 20 Influence of lead on cadmium toxicity of germ-free silkworm larvae(3rd instar)

Concentration		No. of larvae tested	Percentage of larvae reaching through various instars in 10 days		
Cd	Pb		3rd instar	4th instar	5th instar
ppm	ppm		%	%	%
40	0	10	0	100	0
40	10	10	0	100	0
40	50	10	0	100	0
40	125	10	0	100	0
40	250	10	0	90(10)	0
40	500	10	0	80(20)	0
40	1,000	10	0	60(40)	0
80	0	10	0(10)	60(30)	0
80	10	10	0(20)	70(10)	0
80	50	10	0(20)	60(20)	0
80	125	10	0(40)	50(10)	0
80	250	10	0(80)	20	0
80	500	10	0(100)	0	0
80	1,000	10	0(100)	0	0

( ) : mortality

Pbが125 ppm以下共存した場合は30～50%と殆ど変わらないが、Cd 80 ppmにPd 250 ppmの共存投与で80%と高くなり、Pb 500 ppm, 1,000 ppmの共存投与では100%死亡した。なおCd・Pbを共存投与して斃死した蚕児は全て中毒死であり伝染性蚕病による斃死蚕は認めなかった。

### 3) 考 察

細菌やウィルスなど病原微生物が全く存在しない無菌条件下で無菌蚕にCdおよび非致死濃度範囲のPbを共存投与した場合の毒性について調べた。

CdにPbを共存させ無菌蚕に投与した場合、その毒性はPbによって増強されるが、松原・木村(1974)が報告した結果と殆んど一致した。本実験

でCdとPbの濃度のとり方としてCdを一定にし、Pbの濃度を変化させることによって、Pb単独では全く毒性を示さない非致死濃度範囲内であっても、Pbの濃度が高くなれば共存するCdの毒性はPbの濃度に応じて増強されることが判明した。ここでCd濃度を40ppmおよび80ppmと、Cd・Znの共存投与の場合よりも低い濃度にしたのは、Cd単独投与で死亡率100%を示す濃度ではPbの共存による毒性増大の効果はみられないからである。そこでCd単独投与でLD<sub>50</sub>を示す濃度にPbを共存させ100%死亡させるPbの量を求めたが、明確になったので本実験の結果からその濃度のとり方と組合せはよかったように思われる。この場合もPbの単独投与では無菌蚕に悪影響のない1,000ppm以内であるが、先に述べたように単独投与でZnとPbの毒性は殆ど同じであり、ZnとPbの濃度を一定にして用いたことはCdとの共存下で両者の性質を調べる上に有効であったと思われる。

以上のようにCd毒性はPbの共存によって増強されることは判明したが、Cd・Znの場合ほど明確ではない。

## 摘 要

人工飼料を用いて無菌飼育を行ない、1 齢、3 齢および5 齢起蚕から種々の濃度のカドミウム (Cd)、亜鉛 (Zn)、鉛 (Pb)、ニッケル (Ni) およびコバルト (Co) を10日間投与した直後の幼虫の発育経過および死亡率を調べ、許容濃度(発育に影響のない濃度)および100%致死濃度を明らかにした。

- (1) 先ず Cd については、許容濃度は1 齢で10ppm 以下、3 齢では20ppm 以下、5 齢では40ppm 以下であった。100%致死濃度は1 齢で80ppm 以上、3 齢では120ppm 以上となり、5 齢では160ppm 以上であった。
- (2) Zn については、許容濃度は1 齢、3 齢および5 齢のいずれの場合も500ppm 以下であった。100%致死濃度は1 齢で4,000ppm 以上、3 齢では6,000ppm 以上となり、5 齢では8,000ppm 以上であった。
- (3) Pb については許容濃度は1 齢および3 齢では Zn と同様に500ppm 以下であり、5 齢では1,000ppm 以下であった。100%致死濃度は1 齢で4,000ppm 以上、3 齢および5 齢では8,000ppm 以上であった。
- (4) Ni については、許容濃度は1 齢で200ppm 以下、3 齢では3,000ppm 以下となり、5 齢では8,000ppm 以下であった。100%致死濃度は1 齢で2,000ppm 以上、3 齢では3,000ppm 以上、5 齢では10,000ppm 以上であった。
- (5) Co については、許容濃度は1 齢で50ppm 以下、3 齢では100ppm 以下、5 齢では4,000ppm 以下であった。100%致死濃度は1 齢で400ppm 以上、3 齢では1,000ppm 以上となり、5 齢では6,000ppm 以上であった。
- (6) 重金属を投与して死亡した蚕児はすべて中毒死であり、ウイルス病の発生(誘発)は全くみられなかった。

人工飼料に Cd を単独および Cd・Zn、Cd・Pb を共存させ無菌蚕に投与すると Cd 毒性は Cd・Zn の共存投与では強く軽減され、Cd・Pb の共存投与で毒性は強くなる。そして Cd 毒性を最も軽減させる Zn の濃度は Cd 80ppm では Zn 250～1,000ppm、Cd 160ppm では Zn 500～1,000ppm であった。

でCdとPbの濃度のとり方としてCdを一定にし、Pbの濃度を変化させることによって、Pb単独では全く毒性を示さない非致死濃度範囲内であっても、Pbの濃度が高くなれば共存するCdの毒性はPbの濃度に応じて増強されることが判明した。ここでCd濃度を40ppmおよび80ppmと、Cd・Znの共存投与の場合よりも低い濃度にしたのは、Cd単独投与で死亡率100%を示す濃度ではPbの共存による毒性増大の効果はみられないからである。そこでCd単独投与でLD<sub>50</sub>を示す濃度にPbを共存させ100%死亡させるPbの量を求めたが、明確になったので本実験の結果からその濃度のとり方と組合せはよかったように思われる。この場合もPbの単独投与では無菌蚕に悪影響のない1,000ppm以内であるが、先に述べたように単独投与でZnとPbの毒性は殆ど同じであり、ZnとPbの濃度を一定にして用いたことはCdとの共存下で両者の性質を調べる上に有効であったと思われる。

以上のようにCd毒性はPbの共存によって増強されることは判明したが、Cd・Znの場合ほど明確ではない。

## SUMMARY

The larvae of the silkworm of the 1st, 3rd, or 5th instar were allowed to be fed aseptically with artificial diets containing various doses of cadmium (Cd), zinc(Zn), lead(Pb), nickel(Ni), or cobalt(Co) for 10 days, and the permissive concentration (without any growth inhibition) and 100% lethal concentration of these metals were determined.

(1) The permissive concentration of Cd was below 10 ppm in the 1st instar, below 20 ppm in the 3rd instar, and below 40 ppm in the 5th instar. The 100% lethal concentration of Cd was over 80 ppm in the 1st instar, over 120 ppm in the 3rd instar, and over 160 ppm in the 5th instar.

(2) The permissive concentration of Zn was below 500 ppm in the 1st, 3rd and 5th instar. The 100% lethal concentration of Zn was over 4,000 ppm in the 1st instar, over 6,000 ppm in the 3rd instar, and 8,000 ppm in the 5th instar.

(3) The permissive concentration of Pb was below 500 ppm in the 1st and 3rd, and below 1,000 ppm in the 5th instar. The 100% lethal concentration of Zn was over 4,000 ppm in the 1st instar, over 8,000 ppm in the 3rd and 5th instar.

(4) The permissive concentration of Ni was below 200 ppm in the 1st instar, below 300 ppm in the 3rd instar, and below 8,000 ppm in the 5th instar. The 100% lethal concentration of Ni was over 2,000 ppm in the 1st instar, over 3,000 ppm in the 3rd instar and over 10,000 ppm in the 5th instar.

(5) The permissive concentration of Co was below 50 ppm in the 1st instar, below 100 ppm in the 3rd instar, and below 4,000 ppm in the 5th instar. The 100% lethal concentration of Co was over 400 ppm in the 1st instar, over 1,000 ppm in the 3rd instar and over 6,000 ppm in the 5th instar.

(6) The death cause of the killed silkworms by the administration of metals was diagnosed as poisoning death, while no possibilities indicating the viral infections or induction of viral disease by metals were observed.

The effect of Zn and Pb was investigated in order to decrease the Cd toxicity in a germfree silkworm development by means of an artificial diet containing Cd•Zn and Cd•Pb. With the diets, prepared with Cd•Zn and Cd•Pb, the Cd toxicity at the stages of the 1st and 3rd instar larvae was sharply decreased in the Cd•Zn, while with the Cd•Pb diet the toxicity was enhanced. The maximum concentration of Zn which decreases the Cd toxicity was 250~1,000 ppm at 80 ppm Cd and, while at 160 ppm of Cd, the Zn concentrations ranged between 500 and 1,000 ppm.

## 引用文献

1. Akao, A. : Beitrage zum Wachstumsphänomen des Seidenspinners. Die verschiedenen aufbauenden und katalytischen Element und deren biologische Bedeutung während des Wachstums. J. Biochem., 30, 303~349, 1939.
2. Aoki Y., and Suzuki K. T. and Kubota K. : Accumulation of cadmium and induction of its binding protein in the digestive tract of fleshfly ( *Sarcophaga peregrina* ) larvae. Comp. Biochem. Physiol., 77C, 279~282, 1984.
3. 有賀久雄・福原敏彦 : 化学薬品の添食による家蚕多核体病の誘発. 日蚕雑., 29, 44~49, 1960.
4. 安藤正典・佐谷戸安好・外村正活 : 有害金属の衛生化学的研究 ( 第 4 報 ) カドミウムの生体内への吸収機構について. 衛生化学, 22, 24~30, 1976.
5. Becker, D. E. & Smith, S. E. : The level of cobalt tolerance in young sheep. J. Anim. Sci., 10, 266~271, 1951.
6. Bert L, Wallee and David D. Ulmer : Biochemical effect of Mercury, Cadmium and Lead. Annual Review of Biochem., 92, 1972.
7. Cecil Smith & Betty Hackley : Distribution and excretion of nickel-63 administered intravenously to rats. J. Nutr., 95, 541~546, 1968.
8. Clubb R. W., Lords J. L. and Gaufin A. R. : Isolation and characterization of a glycoprotein from the stonefly, *Pteronarcys californica*, which binds cadmium. J. Insect Physiol., 21, 53~60, 1975.
9. Comenge, G. M., Guelbenze, M. D. : Metabolism of trace element in an herbivorous larva (silkworm) Chem. Abstr., 44, 6973f, 1950.
10. Comer. C. L. & Davis, G. K. : Cobalt metabolism studies IV. Tissue distribution of radio active cobalt administered to rabbits, swine, and young calves. J. Biol. Chem., 17, 379~389, 1947.
11. Doull, J. : 白須泰彦・吐豊秋 ( 訳 ) “新毒性学の基礎と応用” ( Lonis,

- J. C., and Doull, J. 編) 143~156, 日本メディカルセンター, 東京, 1977.
12. Engström, B., Norin, H., Jawaid, M., Ingman, F. : Influence of different Cd-EDTA complexes on distribution and toxicity of cadmium in mice after oral or parenteral administration. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 46, 219~234, 1980.
  13. Eyll, V., Sykora, J., and Mertl, F. : Wirkung von Ca-ADTA und Ca-DTPA bei der Kadmiumvergiftung. *Acta Biol. Med. Ger.*, 17, 178~185, 1966.
  14. EYBL, V., SYKORA, J. and MERTL, F. : Vliv Kalciových Komplexu Aminopolykarbonových Kyselin Na Experimentální akutní Otravu Kadmiem. *Prac. Lek.*, 15, 234~238, 1963.
  15. Forman, H., Trujirro, T. T., and Alamos, L. : The metabolism of  $C^{14}$  labeled ethylenediaminetetraacetic acid in human being. *J. Lab. Clin. Med.*, 43, 566~71, 1954.
  16. 藤井実・林 宏 : タイル工場周辺の蚕桑中に検出されたフッ素化合物, 日蚕雑, 41 (2), 150~153, 1972.
  17. 藤井実 : 蚕桑に付着したフッ素化合物の蚕に対する毒性, 日蚕雑, 42 (5), 375~379, 1973.
  18. 福田紀文・松田基一 : 家蚕幼虫の器官および組織の無機成分について, 日蚕雑, 22 (6), 243~247, 1953.
  19. 福原敏彦 : EDTAによる家蚕中腸型多核体病の誘発, 日蚕雑, 30, 351~353, 1961.
  20. 蒲生卓磨・広部達道 : カイコの遺伝形質に及ぼす農薬の累代投与の影響, 応動昆, 21, 47~49, 1977.
  21. 浜野国勝・向山文雄 : 家蚕幼虫における消化液蛋白分解酵素の二, 三の性状および数種蛋白質の分解度とその栄養価との関連, 日蚕雑, 39, 371~376, 1970.
  22. 原久寿雄 : 埼玉蚕試要報, (36), 74~78, 1964.
  23. 長谷川金作 : 無機塩類の注射に因る家蚕の化性変化に就いて, 日蚕雑, 14,



24~32, 1943a.

24. 早津彦哉 編：“生体濃縮，微量有害物質の生体内運命” 48，講談社サイエ  
ィフィック，東京，1976.
25. 堀江保宏・渡辺喜二郎・伊藤智夫：家蚕の栄養に関する研究 XⅩⅦ. カリウ  
ム，燐，マグネシウムおよび亜鉛の量的要求について. 蚕試報，22(2)，  
181~193, 1967.
26. 今井暹・鎌田好二・佐藤幸子：千葉県茂原地区に発生したヨウ素中毒蚕につ  
いて. 日蚕雑，44(4)，274~280, 1975a.
27. 今井暹・吉井幸子：ヨウ素中毒蚕の発現とヨウ素濃度との関係. 日蚕雑，  
44(6)，472~475, 1975b.
28. 今井暹・吉井幸子：ヨウ素とヨウ化カリウムまたはモリブデン化合物との混  
合物の蚕に対する毒性. 日蚕雑，45(4)，291~294, 1976.
29. 伊藤智夫・新村正純：家蚕の栄養に関する研究. Ⅶ. 無機物の栄養効果につ  
いて. 蚕試報，20, 361~374, 1966.
30. 岩成義才：家蚕の銅に関する研究. (Ⅰ) 家蚕の5齡期における血液中の銅  
含有量について. 日蚕雑，24, 359~363, 1955.
31. 岩成義才：飼料中のリンおよびナトリウム含量の多少が蚕の成長に及ぼす影  
響. 日蚕雑，47(4)，333~337, 1955.
32. Jones, M. M., and Pratt, T. H. : Therapeutic chelating agents. J. Chem.  
Educ., 53, 342~347, 1976.
33. Kent, N. L. & McCance, R. A. : The absorption and excretion of  
Minor Elements by man cobalt, nickel, tin and manganese. Biochem.,  
35, 877~883, 1941.
34. 小林 純・藤井ふじ・村本茂樹・中島 進：キレート剤による汚染土壌から  
重金属除去実験(第1報)日衛誌，27, 225, 1972.
35. Kosai, M. F., and Boyle, A. G. : Ethylenediaminetetraacetic acid in man-  
gane poisoning of rats. Ind. Med. Surg., 25, 1~3, 1956.
36. 児島昭次・浄任 護・松本幸江・山本美登・中村千鶴子・新保和子：有害金  
属に関する研究(第3報)ラットにおける塩化カドミウムの消化管吸収，  
分布および排泄に及ぼすキレート剤の影響. 衛生化学，23, 43~47, 1977.

37. 倉田啓而：無菌蚕の利用による蚕ウイルス病誘発の研究(2)ヒドロキシルアミン, EDTA青酸化合物, フッ化物, ホルマリンの添食およびガンマ線照射の影響. 蚕試報, 23, 149~171, 1968.
38. 栗林茂治：二酸化イオウによる大気汚染のクワおよびカイコに及ぼす影響. 日蚕雑, 46(6), 528~535, 1977a.
39. 栗原茂治：フッ化水素による大気汚染のクワおよびカイコに及ぼす影響. 日蚕雑, 46(6), 536~544, 1977b.
40. Leber, A. P., and Miya, T. S. : A mechanism for cadmium and zinc-induced tolerance to cadmium toxicity: Involvement of metallothionein. Toxicol. Appl. Pharmacol., 37, 403~414, 1976.
41. Lee, C. C. & Wolterink, L. F. : Blood and partition of cobalt 60 in dogs. Amer. J. Physiol., 183, 173~177, 1955.
42. Martoja R., Bouquegneau J. M. and Verthe C. : Toxicological effects and storage of cadmium and mercury in an insect *Locusta migratoria* (Orthoptera). J. Invertebrate Pathol., 42, 17~32, 1983.
43. 増井博之・松原藤好：コバルトおよびニッケルが無菌蚕に及ぼす影響. 日蚕雑, 52(5), 425~431, 1983.
44. 増井博之・松原藤好：無菌蚕に添食したコバルトの体内分布と消長. 日蚕雑, 53(3), 222~225, 1984a.
45. 増井博之・松原藤好：ニッケルの蚕体内各組織・器官別分布量, 排泄量および蛹中の量. 日蚕雑, 53(4), 331~334, 1984b.
46. 増井博之・松原藤好：重金属が無菌蚕に及ぼす影響 X. 重金属を投与した場合の脱皮殻, 蛾尿, 卵殻および次代の重金属量. 日蚕学会関西講要, 50, 1, 1984.
47. 増井博之・鈴木和夫・松原藤好：無菌蚕に EDTA を投与した場合の蚕体内各組織・器官別無機元素の分布量. 日蚕雑, 55(1), 23~27, 1986.
48. 増井博之：無菌カイコの重金属類に対する耐性について. 日本生物教育学会講要, 45, 17, 1988.
49. 松原藤好・加藤勝・林屋慶三・児玉礼次郎・浜村保次：人工飼料による家蚕の無菌飼育. 日蚕雑, 36, 39~44, 1967.

50. 松原藤好：無菌飼育における蚕病に関する研究（Ⅳ）薬品添食が無菌蚕に及ぼす影響。日蚕雑，36，159～164，1967.
51. 松原藤好：無菌飼育における蚕病に関する研究（Ⅴ）自然暴露後薬品添食した場合の核多角体病誘発。日蚕雑，37，137～143，1968.
52. 松原藤好・木村由紀雄：数種重金属およびそれら化合物が無菌蚕に及ぼす影響。京工織大，繊維学術報，7，213～234，1974.
53. 松原藤好：“カイコの人工飼料への道”（浜村保次編）135～165，みすず書房東京，1975.
54. 松原藤好・増井博之・桑原秀樹：重金属が無菌蚕に及ぼす影響（Ⅱ）カドミウム毒性に及ぼす亜鉛，鉛の影響。京工織大，繊維学術報，8，25～32，1975.
55. 松原藤好・増井博之・吉田一夫：重金属が無菌蚕に及ぼす影響（Ⅲ）無菌カイコへのカドミウム取り込みに及ぼす亜鉛，鉛の影響。京工織大，繊維学術報，8，46～53，1978.
56. 松原藤好・一田昌利・増井博之：無菌カイコを用いてのカドミウム汚染抑制に関する研究（Ⅳ）重金属（Cd・Zn・Pb）の次代への移行。生物環境調節講要集，1，1976.
57. 松原藤好・中山康博：重金属が無菌蚕に及ぼす影響（Ⅳ）CdおよびEDTAの毒性。生物環境調節，19（4），115～120，1981.
58. 松原藤好・中山康博・増井博之：重金属が無菌蚕に及ぼす影響（Ⅴ）Cd単独，Cd・ZnおよびCd・EDTAを混合投与した場合の生体内各組織・器官別Cd蓄積量。生物環境調節，20（1），34～38，1982.
59. 松原藤好・増井博之・鈴木和夫：人工飼料による無菌飼育蚕の生体内各組織・器官別無機元素の分布量。日蚕雑，55（1），5～9，1986.
60. 三好健勝・宮沢福寿・清水 治：重金属類の蚕桑に及ぼす影響Ⅰ。飼料中のカドミウムおよび亜鉛が家蚕に及ぼす発育段階別影響。日蚕雑，40（4），323～329，1971.
61. 三好健勝・宮沢福寿・清水 治・町田順一：重金属類の蚕桑に及ぼす影響Ⅱ。飼料中の鉛，銅およびヒ素の飼育成績に及ぼす影響。日蚕雑，47（1），70～76，1978.

62. 三好健勝・宮沢福寿・清水 治・町田順一：重金属類の蚕桑に及ぼす影響 III. 飼料に複合的に共存する重金属類等の飼育成績に及ぼす影響. 日蚕雑, 47 (1), 77~84, 1978a.
63. 三好健勝・宮沢福寿・清水 治：重金属類の蚕桑に及ぼす影響 IV. 重金属類の化合形態と毒性との関係および蚕による重金属の吸収. 日蚕雑, 47 (2), 101~107, 1978b.
64. Nakamura, M., Horie, Y. : Ingestion, absorption and utilization of phosphorus by the silkworm, *Bombix mori* (Lepidoptera : Bombycidae) Appl. Ent. Zool., 17 (4), 543~549, 1982.
65. 中山康博・松原藤好：重金属が無菌蚕に及ぼす影響 (V) EDTAのCd毒性抑制効果. 生物環境調節, 19 (4), 121~127, 1981.
66. 新村生純・伊藤智夫：家蚕の人工飼料へ添加した無機物の栄養効果について. 日農化, 37, 757~760, 1963.
67. Perry, H. M. Jr. and Schroeder, H. A. : Lesions resembling vitamin B complex deficiency and urinary loss of zinc produced by ethylenediamine tetraacetate. Amer. J. Med., 22, 168~172, 1957.
68. Phatak, S. S. & Patwardhan, V. N. : Toxicity of nickel. J. Sci. Industr. Res., V. 9B, 70~76, 1950.
69. Phatak, S. S. & Patwardhan, V. N. : Toxicity of nickel—accumulation of nickel in rats fed on nickel-containing diets and its elimination. J. Sci. Industr. Res., Vol. 11B, 173~176, 1952.
70. Rubin, M. : “ Pharmacology, Physiology, Biochemistry and Toxicity of Versenes.” Bersworth chemical Co., Framingham, Massachusetts, U. S. A. 1~34, 1952.
71. Rubin, M., Gignac, S., Bessman, S. P., and Belknap, E. L. : Enhancement ethylenediaminetetraacetate. Science, 117. 659~660, 1953.
72. Rothery, P., Bell, J. M. & Spinks, J. W. T. : Cobalt and vitamine B<sub>12</sub> in sheep I. Distribution of radio cobalt in tissue and ingesta. J. Nutr., 49, 173~181, 1953.
73. Schroeder, H. A., Balassa, J. J., Tipton, I. H. : Abnormal trace elements

- in man-nickel. *J. Chron. Dis.*, 15, 51~65, 1961.
74. Sridhara, S. & Bhat, J. V. : Trace element nutrition of the silkworm *Bombyx mori* L. I. Effect of trace elements. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 63, 9~16, 1966.
  75. Sridhara, S. & Bhat, J. V. : ditto. II. Relationship between cobalt, vitamin B<sub>12</sub>, benzimidazole and purines. *ibid.*, 63, 17~25, 1966.
  76. Suzuki K. T. : Direct connection of high speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis : metallothionein. *Analyt. Biochem.*, 102, 31~34, 1980.
  77. Suzuki K. T. and Yamamura M. : Isolation and characterization of metallothionein dimers. *Biochem. Pharmac.*, 29, 689~692, 1980.
  78. 鈴木和夫 : 医学のあゆみ - 最近の研究動向からみたメタロチオンイン. 116 (7), 611~620, 1981.
  79. 鈴木和夫 : 有機合成化学. 重金属とメタロチオンイン. 39, 1073~1082, 1981.
  80. Suzuki, K. T., Aoki, Y., Nishikawa, M., Masui, H. and Matsubara, F. : Effect of cadmium-feeding on tissue concentrations of elements in germ-free silkworm larvae and distribution of cadmium in the alimentary canal. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 79C, No. 2, 249~253, 1984.
  81. Suzuki, K. T., Yamamura, M., Hatakeyama, Y., Aoki, Y., Masui, H., Matsubara, F., Sumi, Y. and Suzuki, T. : Difference in tolerance mechanism to cadmium among three insect larvae (Midge, Fleshfly and Silkworm). *J. Pharmacobio-Dyn.*, 8, s~25, 1985.
  82. 館川 洋 : “近代農業における土壌肥料の研究” 養賢堂, 東京, 79, 1973.
  83. Tedeschi, R. E. & Sundrman, F. W. : Nickel poisoning. *A. M. A. Arch. Ind. Health*, 16, 486~488, 1957.
  84. Weber, C. W. & Reid, B. L. : Nickel toxicity in growing chicks. *J. Nutr.*, 95, 612~616, 1967.
  85. Weder, C. W. & Reid, B. L. : Nickel toxicity in young growing mice. *J.*

Anim. Sci., 28, 620~623, 1969.

86. Yamamura M., Suzuki K. T., Hatakeyama S. and Kubota K. : Tolerance to cadmium and cadmium-binding proteins induced in the midge larva, *Chironomus yoshimatsui* (Diptera Chironomidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C, 21~24, 1983.
87. 山根靖弘・高島英悟・内山充 編：環境汚染物質と毒性無機物質篇. 化学の領域, 南江堂, 東京, 34~75, 1980.
88. 山野井文夫：カイコに対する殺虫剤の投与が後代に及ぼす影響 Ⅲ. 産下卵の孵化に影響を及ぼす有機リン殺虫剤の投与時期並びに薬量. 日蚕雑, 50(4), 282~287, 1981.
89. 山野井文夫：カイコに対する農薬投与が投与世代並びに後代の実用形質に及ぼす影響. 日蚕雑, 53(4), 292~298, 1984.
90. 吉武成美：鱗翅目昆虫の化性に関する研究 (Ⅲ) 無機塩類並びにその他数種の物質の注射による化性変化について. 日蚕雑, 23, 349~355, 1954.

発行 1997年5月10日

発行所 財団法人 衣笠会

〒603 京都市北区北野下白梅町29

TEL 075-461-5949

FAX 075-463-6679

印刷所 為國印刷株式会社

TEL 075-462-7889