

第3号

纖維研究所研究報告

1998

財団法人衣笠会発行
THE KINUGASA-KAI FOUNDATION

Published
by
KINUGASA TEXTILE RESEARCH INSTITUTE
KYOTO, JAPAN

目 次

I. 人工飼料無菌周年蚕糸生産と高品質シルク	松原藤好・山崎 隆
1. 人工飼料による周年蚕糸生産について	3
2. 繭について	5
3. 絹フィブロインについて	13
おわりに	13
文 献	14
II. カイコバキュロウイルスを用いた遺伝子導入に関する研究	
カイコ蛹で生産されるニューカッスル病サブユニットワクチンについて	
森 肇・深野木信一・入谷好一・松原藤好・林 幸之	
材料と方法	21
結 果	22
考 察	23
引用文献	24

III. Gene Targeting in the silkworm by using a baculovirus

Hajime MORI, Yoshiyuki HAYASHI and

Fujiyoshi MATSUBARA23

Results and discussion31

Materials and Methodos.....36

References39

IV. 人工飼料無菌飼育法による17代にわたるカイコの継代……小村谷貴子・松原藤好

第1章 緒言.....51

第2章 カイコの選抜および継代.....52

第3章 各発育段階における起蚕調査.....54

第4章 異なる飼育条件下での発育調査.....56

第5章 総合考案.....60

文 献.....61

人工飼料無菌周年蚕糸生産と高品質シルク

松原藤好・山崎 隆*

A New Year-Round Germfree Sericulture System
and High Quality Silk

by

Fujiyoshi MATSUBARA and Takashi YAMAZAKI*

(平成10年3月)

現在 京都工芸繊維大学名誉教授
中国西南農業大学教授
中国浙江大学客座教授

*京都教育大学名誉教授

人工飼料無菌周年蚕糸生産と高品質シルク

松原藤好・山崎 隆

1. 人工飼料による周年蚕糸生産について

1.1 日本の蚕糸業

桑と蚕と人の係わりは京都工芸繊維大学の布日順郎名誉教授によれば、有史前（4700年前）から中国にあって、人間はシルクの製品によって大きな恩恵を受け絢爛とした文化を発展させてきた。

我が国の養蚕は日本の歴史が始まる以前からであると言われ、養蚕が近代的な形として発展したのは明治の初期であり、それまではシルク製品は中国より輸入していた。我が国の養蚕の発展に大きな係わりがあったのは、先進養蚕国であったフランス、イタリアである。当時両国の養蚕は、原因不明の病気によって滅亡した。この病気（微粒子病）はルイ・パスツール（1865年）によって解明され、防除法は確立されたが、両国はこの方法を利用しなかった。この研究の恩恵を受けたのは我が国であった。そして国策などもあって養蚕業は急速に発展し、1930年（昭和5年）にはシルク産業は日本の産業の花形となり、世界の繭生産の8割を我が国が占めるに至った。しかし、既に詳述したように¹⁾、近年桑育の稚蚕期の1週間、革新技术の人工飼料育を導入する方法を採用しているにも拘わらず、今では桑栽培から蚕の飼育と言った手間のかかる仕事が5月から10月までの間に集中するため、これを嫌い、養蚕業は消滅の危機にある。さらに1998年4月、蚕糸業法の全廃により、蚕糸行政関係者、研究者、指導者などが激減しこの現象はさらに進んでいる。

1.2 我が国の蚕糸生産技術

世界で最も高品質のシルクを生産する我が国の蚕糸生産技術を、その発展過程で見ると独創的な学問研究によって幾多の革新技术が開発され、その普及に努力したため、現在でも養蚕（蚕糸生産技術）は世界の追従を許さない水準にある。例えば、外山（1906年）の一代交雑種の利用、荒木・三浦（1916年）の人工孵化法の完成、1955年定繊度感知機の開発と自動繰糸機の開発、1959年桑葉

育の体系化と普及、1960年人工飼料の開発と全齢飼育、1964年無菌飼育法の確立とウイルス病発生機構の解明および防除法の確立、1965年人工飼料無菌飼育法の稚蚕期養蚕への利用、そして1989年工場周年無菌養蚕の実用化など人工飼料無菌飼育技術は季節養蚕から周年化へ転換した。よって、省エネルギー、労力の省力化、合理化、周年での作柄の安定、多収に大きく貢献することができる。

しかし我が国では人工飼料の全齢育は全く普及しておらず、現在では研究も殆どされていない。現在我が国での繭生産は桑育の稚蚕期における人工飼料清浄育（1日1回給餌）は50%普及しているが、残りは他国と同じ全齢桑育である。また、人工飼料は稚蚕期の1~2齢のみに導入され、5月から10月までの間3~4回の季節養蚕である。

1.3 京都工芸繊維大学（KIT）方式の蚕糸生産技術

京都工芸繊維大学の浜村保次名誉教授は1935年（昭和10年）から「カイコは何故桑しか食べないか」の命題に取り組み、1959年（昭和34年）に蚕の摂食機構つまり、誘引、かみつぎ、飲み込みの三つの食性の行動と、それらの化学物質を明らかにした²⁾。そして、桑に代わる人工飼料（合成）は1960年に創製した。桑と蚕と人間の何千年という関係の歴史が一変することになる。1962年蚕は人工飼料（合成）で飼育が可能となり、1963年には、無菌蚕という新しい生命を作出して、1964年には病理学者の長年の夢であった蚕の無菌飼育法を確立した³⁾。そして本法を養蚕（蚕糸生産）に応用した新しい我が国の周年蚕糸生産技術を開発し、また本法を用いた無毒蚕種生産によって、周年連続（365日）の繭生産が可能になった⁴⁾。1989年からは地方自治体や民間の協力によって、産官学での産業廃棄物オカラ50%含有低コスト人工飼料を用いて工場周年無菌蚕糸生産の実用化を推進している⁵⁾。この生産技術はエコロジーとエコノミーを両立させたものであり、これらは新しい産業として発展させたい。

1.4 KIT方式蚕糸生産技術の特徴とメリット

蚕の人工飼料は桑と違って、多くの物質を混合し、水を加え練合しなければならない。さらに桑と違って滅菌できるので、桑葉育では不可能であった無菌人工飼料を容易に作るができる。

蚕は、飼料を平面に作った上に掃き立てると等間隔に広がる性質がある。また

眠期には乾燥する所を好むので、飼料上に網を張って乾燥した場所を作っておけばよい。これは、人工飼料の特徴と蚕の特性を生かした方法と言えよう。

つぎに無菌飼育では蚕病発生が皆無であり、蚕病防除科学を守った生産方法であるので、無菌人工飼料と無菌蚕を用いることによって周年連続飼育でも安定し、超省力であり、そして低コストの蚕種と繭生産ができる。

以上のように、従来の作業（飼育技術）は蚕にさせることによって、周年での生繭生産ができるので、今後は乾繭や貯繭の必要がないことも大きな特徴とメリットである。

1.5 養蚕技術とシルクの品質

シルクは優雅な光沢と豊富な染色性、程良い弾性と強靱性、保温性、吸放出性など衣料繊維としても優れた特性を持っている。軽く、暖かく、そして美しいので、今でも繊維の女王にふさわしい素晴らしい天然の繊維である。

蚕は先にも述べたように、1960年まで桑を唯一の食べ物として幼虫期（約25日）のうちの5齢期に約1週間かかって体内で絹蛋白を合成し、絹糸腺に貯蔵し、成熟して糸を吐き繭を作る。その繭を数個集めて繰糸したものを生糸と言い、このようにしてシルクは作られる。したがって、シルクの品質は食べ物である桑葉や人工飼料が良質かどうか、また、蚕の品種がよくて健康に育つかどうかによって決まる。つまり養蚕（蚕糸生産）が最も重要であり、解舒のよい繭を如何に安く、多く生産するかという、原料繭の品質の良否によってシルクの品質は殆ど決定される。

2. 繭について

2.1 繭の形状と外観

本稿での人工飼料とは表1に示したオカラ含有人工飼料（オカラ飼料）であり、比較として従来用いてきた標準人工飼料および桑葉を用いた。

繭の形はいずれの飼料によってもそれほどの差は認められないが、やや小さく感じられる。特徴的なことは白度が高いことである。表2の5齢飼育および繭調査成績⁶⁾に示したように、5齢から上簇までの経過日数が約1日長いこと、全繭重が若干低いこと以外は大きな差は認められない。5齢期間をオカラ飼料で飼育

した結果、脱脂大豆粉末を主成分とした人工飼料（標準飼料）で飼育した場合と同様に、良好な飼育成績が得られた。

2.2 繰糸および生糸について

オカラ飼料と標準飼料で飼育した場合の繰糸成績を表3に示した。オカラ飼料の場合、標準飼料と比較して生糸歩合が優れていたが、逆に繭糸長が劣っていた。繭糸織度はともにやや太く、解舒率には両者の間で大差は見られなかった。

次に生糸検査の結果を表4に示した。また、参考までに神戸農林規格検査所における桑育の受検生糸の平均成績を併せて表示した。その結果、オカラ飼料で飼育した場合は、標準飼料で飼育した場合および受検生糸の場合に比べて織度偏差および練減率が少ないのが特徴であった。

さらに、オカラ飼料で生産した生糸では標準飼料のものと比較して、光沢があり、白度が高く、140℃1時間以上加熱した後の黄変度が小さい等オカラ飼料の特徴が認められた。

周年無菌飼育で生産された繭は従来のような乾繭工程を省略して、直ちに煮繭し、いわゆる生繭繰糸が可能である。この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、乾繭、貯繭による品質低下を防ぐことができる。生繭繰糸による生糸検査の結果を表5に示した。再繰切断は1回以下で、織度偏差は1.10～1.35の範囲であり、小節点は94.0～87.0、節点95.5～98.0と良好であった。強力は4.2g以上、伸度は約22%であり、品質の向上が認められた⁷⁾。以上は工場周年無菌養蚕で得られた繭を用いた時の成績である。

2.3 繭層セリシタンパク質について

図1はオカラ飼料繭と桑葉育繭の内層表面のSEM写真である。前者は后者よりも視覚的にもセリシン量が多いことがわかる。また、0.5%の炭酸ナトリウム溶液中で100℃、30分間セリシンを溶解したときの脱セリシン量はオカラ飼料繭では28.1%と桑葉育繭の24.2%よりも多かった。しかしながら、両者のセリシンのアミノ酸組成表は表6に示したように大差はなく、ほぼ一致している。

2.4 繭層セリシンの溶解特性

前述したように、生繭繰糸が可能であることなどからセリシンの溶解特性について検討した。図2に示したように、オカラ飼料育繭と桑葉育繭の熱水による溶

表1 人工飼料の組成

飼料素材	添加量 (%)	
	オカラ飼育	標準飼育
乾燥桑葉粉末	15	32
脱脂大豆粉末	24	47
乾燥オカラ粉末	50	—
澱粉	5	12
セルロース	—	3
塩化コリン	0.2	0.2
アスコルビン酸	1.5	1.5
クエン酸	2.0	2.0
クロトン酸	0.4	0.4
リケステロール	0.4	0.4
微量成分 (ビタミンB群を含む)	1.5	1.5
合計	100.0%	100.0%

表2 5 齢の飼育成績および繭調査成績¹⁾

調査項目	オカラ飼料	標準飼料
5 齢から上簇まで ²⁾ の経過日数	7日23時間	7日00時間
対5 齢起蚕結繭歩合	96.5%	97.1%
対5 齢起蚕健蛹歩合	94.8%	94.2%
全繭重 ♀ (g)	2.10	2.36
♂	1.72	1.77
平均	1.91	2.07
繭層重 ♀ (cg)	44.0	44.0
♂	39.1	39.2
平均	41.6	41.6
繭層歩合 ♀ (%)	20.9	18.6
♂	22.7	22.2
平均	21.8	20.1

1) 繭調査値は雌雄各20頭の平均値

2) 上簇までの経過日数は90%以上が熟蚕になった時点

表3 繰糸成績

調査項目	オカラ飼料	標準飼料
繰糸織度	2.73 d	2.65 d
解じょ率	80%	76%
生糸量歩合	17.06%	15.09%
繰糸長	985m	1,108m

表4 生糸検査成績

検査項目	オカラ飼料	標準飼料	参考区 ¹⁾
織度 (d)	20.40	21.50	20.37
織度偏差 (d)	0.95	1.25	1.06
糸むら二類 (個)	4	3	9.1
糸むら三類 (個)	0	0	0.1
節 (点)	95.00	97.50	97.39
小節 (点)	95.50	95.00	94.81
再繰切断 (回)	1	0	2.8
強力 (g)	4.01	4.04	4.00
伸度 (%)	21.3	19.4	20.4
繰減率 (%)	20.74	21.83	23.33
エクスポリエーション(点)	70.12	70.37	69.41
抱合(回)	114	113	138
水分率 (%)	9.02	9.24	9.81

1) は昭和59-63年日本神戸農林規格検査所における桑葉育による受検生糸の平均成績

表5 周年無菌養蚕における生繭繰糸の生糸検査

飼育時期 繭処理 調査項目	1994.9	1994.10	1995.5	
	生繭	生繭	生繭	乾繭
目的織度 (d)	27	27	27	27
再繰切断 (回)	0	0	1	1
織度偏差 (d)	1.10	1.10	1.35	1.75
小節 (点)	96.0	97.0	95.5	94.5
節 (点)	95.5	98.3	98.5	95.5
糸むら2類	1	1	2	2
糸むら3類	0	0	0	0
抱合	108	140	92	108
強力 (g)	4.20	4.24	4.28	4.15
伸度 (%)	21.6	22.4	22.3	21.8

表6 未分別セリシンのアミノ酸組成 (Mol%)

アミノ酸	オカラ飼料	桑葉飼料	文献値*	注
Gly	15.1	15.1	14.2	非極性
Ala	4.2	4.0	5.0	
Val	3.2	3.1	2.6	
Leu	0.8	1.1	0.7	
Ile	0.5	0.7	0.4	
Pro	0.6	0.3	0.4	
Phe	0.4	0.6	0.4	
Ser	31.7	31.4	34.3	水酸基
Thr	8.2	8.2	7.0	
Tyr	2.9	2.8	2.7	酸性
Asp	19.4	19.9	17.5	
Glu	5.5	5.0	6.8	
Arg	2.9	3.1	2.4	塩基性
His	1.1	1.3	0.9	
Lys	2.7	2.8	3.8	含硫黄
Met	0.1	0.0	0.1	
Cys	0.6	0.5	0.5	

*By Kirimura et al

解挙動にはかなり大きな差がある。両試料いずれも4つの直線部分は3つの屈曲点からなり、溶解特性の異なる4分画から構成されている。これは小松⁸⁾の報告した結果と一致している。オカラ、桑葉両飼料の各溶解直線の屈曲点間を溶解しやすい順でオカラ-I、II、III、IV、桑-I、II、III、IV、の4つの分画とした。オカラ飼料の3つの屈曲点の位置は桑葉飼料と比べて、いずれも短時間側にずれている。これは主としてオカラ飼料の第I分画の溶解速度の違いにより、その後の時間のずれをもたらしたものと考えられる。

表6に示した両者のアミノ酸組成にはそれほど差がないにも拘わらず4つの分画、特に第I分画における差を検討するために、両者の各分画セリシンのアミノ酸組成について検討した結果を表7、8に示した。オカラ-I分画では、桑葉Iと比較してセリンが多く、アスパラギン酸が少ない。また、この傾向は室温溶解の場合にも認められ、それぞれの第III分画と第IV分画でも差がある。オカラ飼料の第I分画のセリシンの高い溶解性はセリンやスレオニンのような水酸基を含むアミノ酸の量が、桑葉飼料と比較して多いことが関係しているものと考えられる⁹⁾。

2.5 紫外線照射による菌層の黄変

オカラ飼料、標準飼料および桑葉飼料によって得られた菌の紫外線照射による黄変については図3に示した。明らかにオカラ飼料育菌が黄変しにくいことがわかる。そこでオカラ飼料の黄変に対する特性を明らかにするために、前述のセリシンの熱水溶解特性と結びつけて検討した。表9は、オカラと桑葉飼料から得られた菌の紫外線照射前後の黄変度を黄変指数として示したものである。オカラ飼料菌の数値の変化に比べて、桑葉飼料菌と標準飼料菌の値は大きく変化した。このことからオカラ飼料菌は黄変しにくいことがわかる¹⁰⁾。

2.6 菌層セリシンの各分画抽出後の黄変

熱水溶解法により両飼料菌のセリシンの第I分画だけ、第Iから第II分画まで、第Iから第III分画まで、さらに第Iから第IV分画までをそれぞれ抽出した後、菌層を乾燥し、これらの菌層に紫外線を照射し、黄変指数を測定した結果を表10に示した。オカラ飼料の各分画区は桑葉飼料に比べてそれぞれ高い白度を示すとともに、両飼料菌はセリシンを抽出することによって黄変しにくくなる傾向が見

られた。特に第Ⅰ分画を抽出することによって繭層が黄変しにくくなることから、本来第Ⅰ分画は黄変しやすい性質を持つが、オカラ飼料には黄変が生じるのを防ぐ物質が含まれているのではないかと考えられる。

2.7 オカラ飼料育繭と桑葉育繭の紫外線吸収

オカラ、桑葉飼料育繭からのセリシンの各分画抽出液の紫外線吸収スペクトルを比較した結果、両飼料繭の第Ⅱ～Ⅳ分画では280nm付近に吸収極大を示すパターンのみで、両者の間に差は全く認められなかった。しかしながら、第Ⅰ分画だけは250nmと280nmの間で異なったパターンが見られた(図4)。桑葉飼料では260nm付近に最小吸収と、280nm付近に吸収極大を示すタンパク質の典型的なスペクトルパターンに対して、オカラ飼料では260nm付近に紫外線吸収を持つ物質が多く含まれ、核タンパク質特有のスペクトルパターンを示した。この260nm付近での紫外線吸収を持つ物質が黄変抑制に関与しているのではないかと推測した。

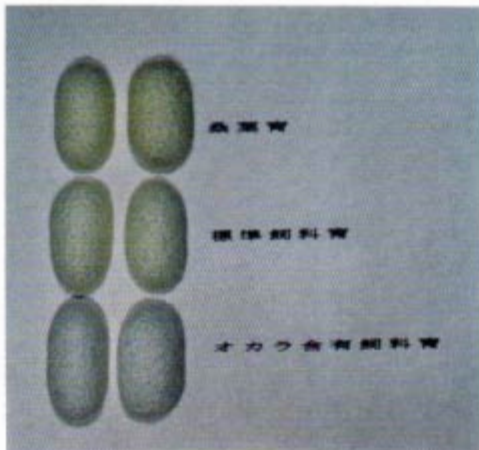
HPLCにより得られた両飼料育繭のヌクレオチドクロマトグラムを図5に示した。デオキシリボヌクレオチド標準品のピークの溶出時間と比較したところ、桑葉-Iの場合はピークが見られなかったのに対し、オカラ-Iの場合はデオキシチヂル酸(dCMP)にあたるピークが現れた。このことから桑葉飼料に比べ、オカラ飼料のセリシン第Ⅰ分画中にはdCMPがかなり多く含まれていることが判明した。しかしチヂル酸(CMP)もdCMPもほとんど同じ溶出時間にピークが現れるので、ピークの溶出時間のみでオカラ-I中に見られたピーク物質がdCMPかCMPか、それとも両者が共存するのかは区別できない。しかし、dCMP、CMPおよび対照として水でそれぞれ処理した桑葉育繭層紫外線を照射した後の黄変指数によれば(表11)、水処理区の黄変が最も大きく、dCMPとCMPで処理した繭層の黄変がいずれも水処理区より明らかに小さくなった。特にdCMP処理区は最も高い黄変防止効果を示した。これについては、桑葉育繭層中に吸着したdCMP(あるいはCMP)が紫外線を吸収し、その結果、チロシンやトリプトファンなどの酸化分解を防止し、繭糸の黄変を抑制するものと思われる¹¹⁾。

表7 オカラ飼料育菌からのセリン分別物のアミノ酸組成 (Mo1%)

アミノ酸	オカラ-I	オカラ-II	オカラ-III	オカラ-IV
Gly	13.7	15.8	15.7	16.6
Ala	3.9	5.0	4.3	4.7
Val	3.2	2.7	3.2	3.6
Leu	1.0	1.0	1.1	1.1
Ile	0.7	0.6	0.7	0.7
Pro	0.6	0.8	0.6	0.7
Phe	0.4	0.5	0.4	0.6
Ser	33.3	30.5	31.7	31.3
Thr	8.3	6.9	8.8	7.9
Tyr	2.9	2.3	2.9	1.9
Asp	18.4	19.0	19.2	19.0
Glu	5.5	6.5	4.3	4.1
Arg	3.3	3.1	3.0	3.2
His	1.4	1.1	1.2	1.4
Lys	3.0	3.3	2.4	2.3
Met	0.0	0.0	0.0	0.0
Cys	0.3	0.8	0.5	0.8

表8 桑葉飼料育菌からのセリン分別物のアミノ酸組成 (Mo1%)

アミノ酸	桑-I	桑-II	桑-III	桑-IV
Gly	14.1	16.0	15.4	13.5
Ala	3.6	4.9	3.8	4.2
Val	3.4	2.9	3.4	3.7
Leu	1.3	1.2	0.9	1.4
Ile	0.8	0.8	0.6	1.1
Pro	0.7	0.7	0.3	0.3
Phe	0.4	0.5	0.3	0.5
Ser	31.2	30.3	33.4	33.3
Thr	7.8	7.0	9.1	10.3
Tyr	1.7	2.0	2.0	2.9
Asp	22.0	19.4	20.0	18.0
Glu	5.5	6.4	4.0	3.4
Arg	2.9	3.0	3.0	3.1
His	1.1	1.1	1.2	1.3
Lys	2.9	3.2	2.1	2.1
Met	0.0	0.0	0.0	0.0
Cys	0.5	0.6	0.6	0.8



紫外線照射前後の繭層の黄変指数

	桑葉育繭層	標準飼料繭層	オカラ含有飼料繭層
未照射	16.7	15.1	16.2
照射後	41.8	37.2	16.4

- ①④は桑葉育繭層 ①②③は紫外線の照射前
 ②⑤は標準飼料繭層 ④⑤⑥は紫外線の照射後
 ③⑥はオカラ含有飼料繭層

図3 紫外線照射後の繭層

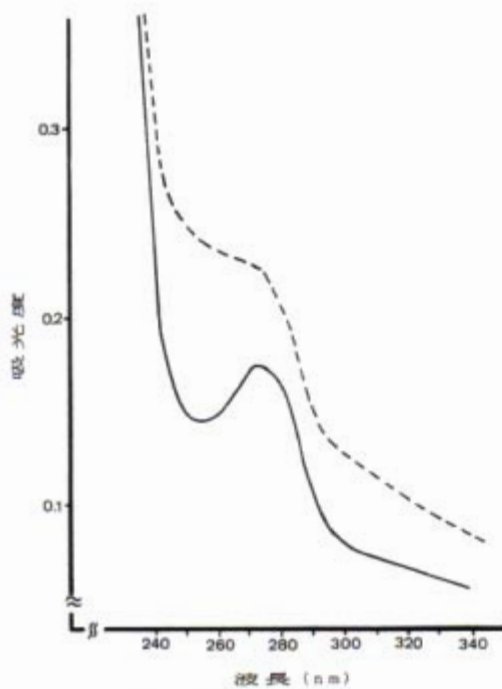


図4 紫外線吸収スペクトル
 実線：桑繭層セリシン第I分画
 点線：オカラ繭層セリシン第I分画

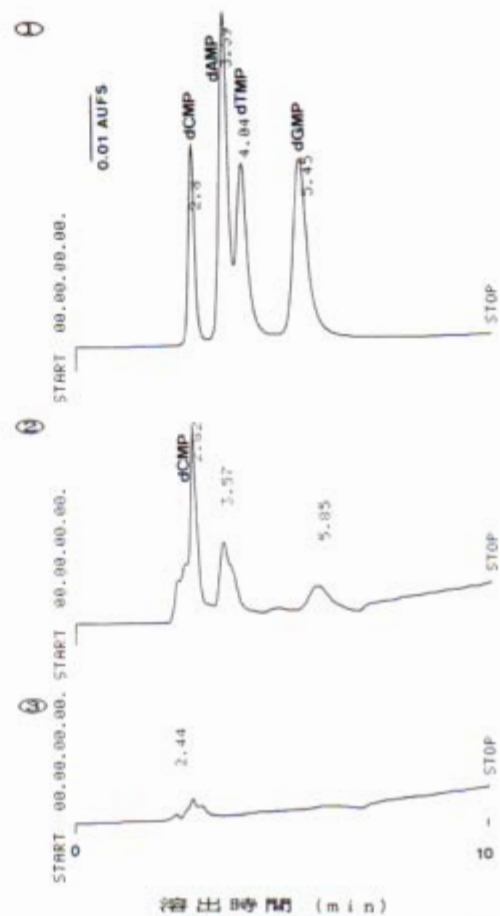


図5 繭層セリシン第I分画抽出後のクロマトグラム
 ①：デオキシリボヌクレオチド標準品
 ②：オカラ繭層
 ③：桑繭層

2.8 人工飼料中のオカラ含有量と繭糸の黄変との関係

オカラ添加量を異にした人工飼料育繭の紫外線による黄変指数を表12に示した。表12から明らかなように、オカラ添加量が増加するにつれて黄変しにくくなる^{11,12)}。その原因は人工飼料中のオカラ含有量が増加するにつれて、繭糸中に含まれるdCMP（あるいはCMP）の増加によるものと思われる。

蚕を人工飼料を用いて飼育した場合、尿素が絹糸腺を通してセリシンと共に排泄され、その尿素量は飼料組成や飼料調製法によって異なることが報告されている。また人工飼料育蚕に比べてグアニン+グアノシン、アデニン+アデノシンの量が著しく多いが、ウラシル+ウリジンの量は少なく、さらにウラシル+ウリジンとチミン+チミジンの量比が著しく低い、人工飼料組成の改良により人工飼料育蚕の血液中の遊離核酸塩基ならびにヌクレオシドの組成が桑葉育のそれに近づくことが知られている。今回オカラ飼料はセリシン第I分画中から検出されたdCMP（あるいはCMP）は、オカラが大量に含まれた人工飼料を用いて蚕を飼育することにより、幼虫体内に核酸やアミノ酸代謝、総括して窒素代謝系が桑葉育した場合と異なり、体内に蓄積された物質の一部が吐糸に伴って、排泄されたのではないかと考えられる。ここにも人工飼料周年無菌飼育蚕の特徴が見られる。

3. 絹フィブロインについて

セリシンのアミノ酸組成は全体としては大きな差はないが、量的には、今回用いたオカラを主成分とする人工飼料では桑葉育繭に比べて多かった。一方、絹フィブロインについて同様に分析したアミノ酸組成は表-13に示したように桑葉育フィブロインとほとんど同様であった。X線回折による結晶領域の構造にも変化は認められない（図6）。すなわち、オカラ飼料は絹フィブロインのアミノ酸組成と結晶構造には影響しないが、伊藤らによる結晶化度は桑葉育に比べて若干低下し、そのことが繊維の伸度を大きくしている¹³⁾。

おわりに

我々の養蚕（蚕糸生産）は桑葉に代わるオカラを主成分とした低コスト人工飼料の開発と無菌飼育法の確立によって、季節に支配された生産リズムから脱却して、鶏や豚や牛のような動物生産農業と同じように周年で蚕糸生産ができるよう

になり、今後の我が国の蚕糸生産のモデルになるものと考えている。1989年から地方自治体や民間企業などの協力によって、山間地、中山間地および都市工業団地など数カ所に、図7に示すように京都工芸繊維大学（KIT）方式の周年無菌蚕糸生産工場を建設して検証実験を進め、生産性、安定性、品質および経済性などについて明らかにした。収繭量、繭糸長や品質などの成績は、ほぼ満足する結果を示し、従来の桑葉育や人工飼料清浄育と全く違った新しい繭生産技術を明らかにした。

この方法で生産した生糸は色が白く、光沢があり、繊度が細く、強度もあり、その上、絹糸の最大の欠点といわれていた黄変を防ぐなど、優れた生糸特性を明らかにすることができた。オカラ飼料育の蚕糸は、従来の桑葉育蚕糸の延長にあるのではなく、新しい産業という考えに基づいて、新しい素材として各方面で活用されるものと思われる。このように、高品質シルクはノートバイオロジーを導入した新しい周年無菌蚕糸生産の技術によって安定して生産され、図8に示したようにエコロジーとエコノミーを両立させるものであり、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。

なお、1998年より蚕糸業法などが全て廃止されたので、我々が開発したKIT方式の新しい生産技術は自由に利用していただけるものと考えている。

本稿の内容については多くの方々のご協力によるものであり、深く感謝いたします。

文献

- 1) 松原藤好：繊維研究所研究報告、2、1-53。（1997）
- 2) Hamamura Y.: Nature. 183, 1746-1747. (1959)
- 3) 浜村保次編：みすず書房、東京、1-511。（1975）
- 4) 松原藤好：絹の50年、繊維機械学会誌、50、252-258。（1997）
- 5) 松原藤好：新版生物環境調節ハンドブック、養賢堂、484-494。（1995）
- 6) 森ら：日本蚕糸学会誌、60(6)、445-449。（1991）
- 7) 松原藤好ら：京都工芸繊維大学繊維学術報、20、27-36。（1996）
- 8) 小松計一：蚕糸報、26、135。（1975）
- 9) Ito H.: Tex. R. J. 755-757. (1995)

- 10) 松原藤好ら：日本蚕糸学会誌、62(2)、162-164. (1993)
- 11) 陳ら：繊維学会誌、49(8)、416-420. (1993)
- 12) 森ら：京都工芸繊維大学繊維学術報、18、85-95. (1996)
- 13) 伊藤ら：繊維学会 (要旨)、1315. (1997)

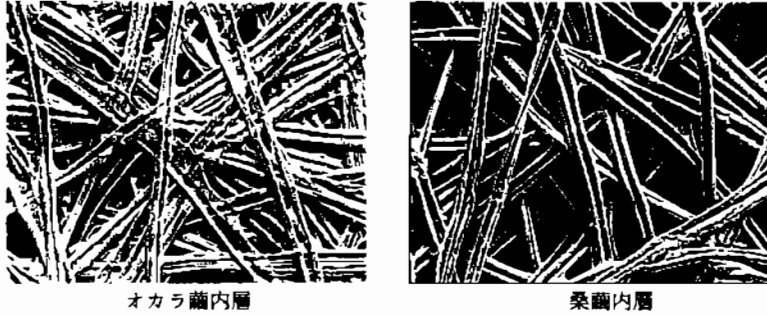


図1 繭内層のSEM写真(スケールは100 μ m)

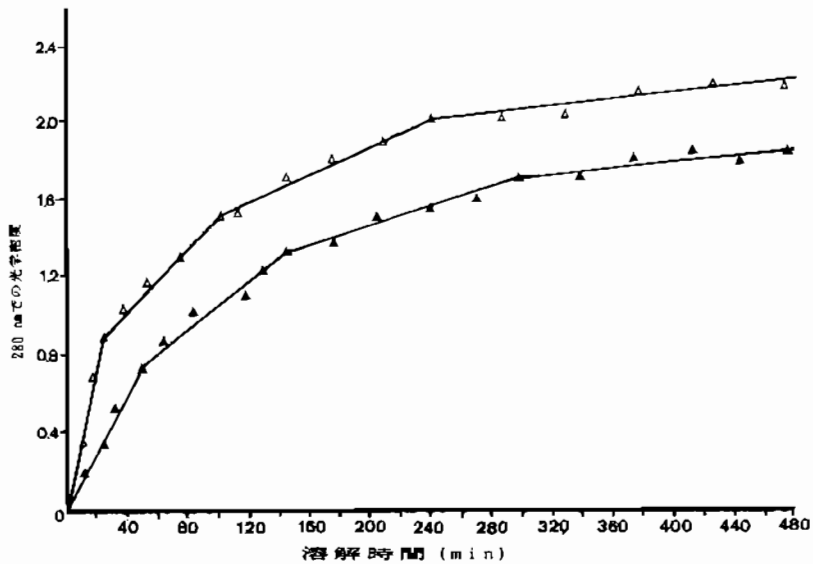


図2 熱水による繭層セリシンの溶解特性
 ▲：桑繭層 △：オカラ繭層

表9 紫外線照射前後の繭層の黄変指数

	桑葉育繭	標準飼育繭	オカラ含有飼料繭層
未照射	16.7	15.1	16.2
照射後	41.8	37.2	16.4

表10 セリシン分画と繭糸黄変との間の関係

抽出セリシン分画	桑葉飼料	オカラ飼料
I	24.46	18.93
I~II	21.33	19.35
I~III	21.58	19.61
I~IV	22.70	18.64

表11 dCMP および CMP で処理した桑葉育繭層の黄変指数

対照区	dCMP	CMP
38.1	26.8	29.8

黄変指数：5粒繭層の平均値

表12 オカラ含有量を異にした人工飼料育繭の黄変指数

紫外線照射	オカラ10繭糸	オカラ30繭糸	オカラ50繭糸
照射前	10.2	9.9	11.4
照射後	31.1	29.2	21.4

黄変指数：10粒繭層の平均値

表13 絹フィブロインのアミノ酸組成 (Mol%)

アミノ酸	オカラ飼料	桑葉飼料	文献値*
Gly	43.2	42.8	42.8
Ala	30.3	30.7	30.0
Val	2.5	2.6	2.5
Leu	0.6	0.5	0.6
Ile	0.7	0.6	0.6
Pro	—	—	0.5
Phe	0.7	0.6	0.7
Ser	1.8	1.7	1.9
Thr	1.3	1.2	1.4
Tyr	0.5	0.5	0.5
Asp	0.2	—	0.2
Glu	0.5	0.5	0.4
Arg	11.4	11.4	12.2
His	1.1	1.0	0.9
Lys	4.4	4.9	4.8
Met	—	—	0.1
Cys	0.7	0.9	0.1

*By Kirimura et al

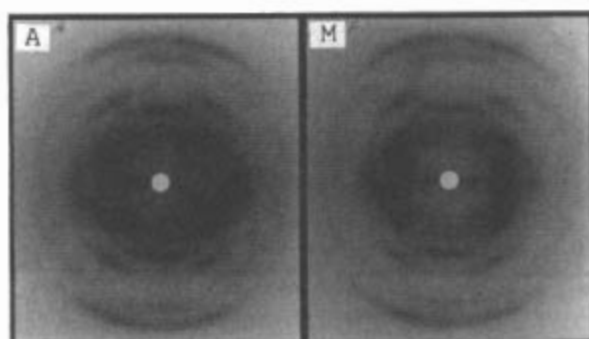


図6 絹フィブロインのX線回折写真

(A) artificial diet, (M) mulberry diet.

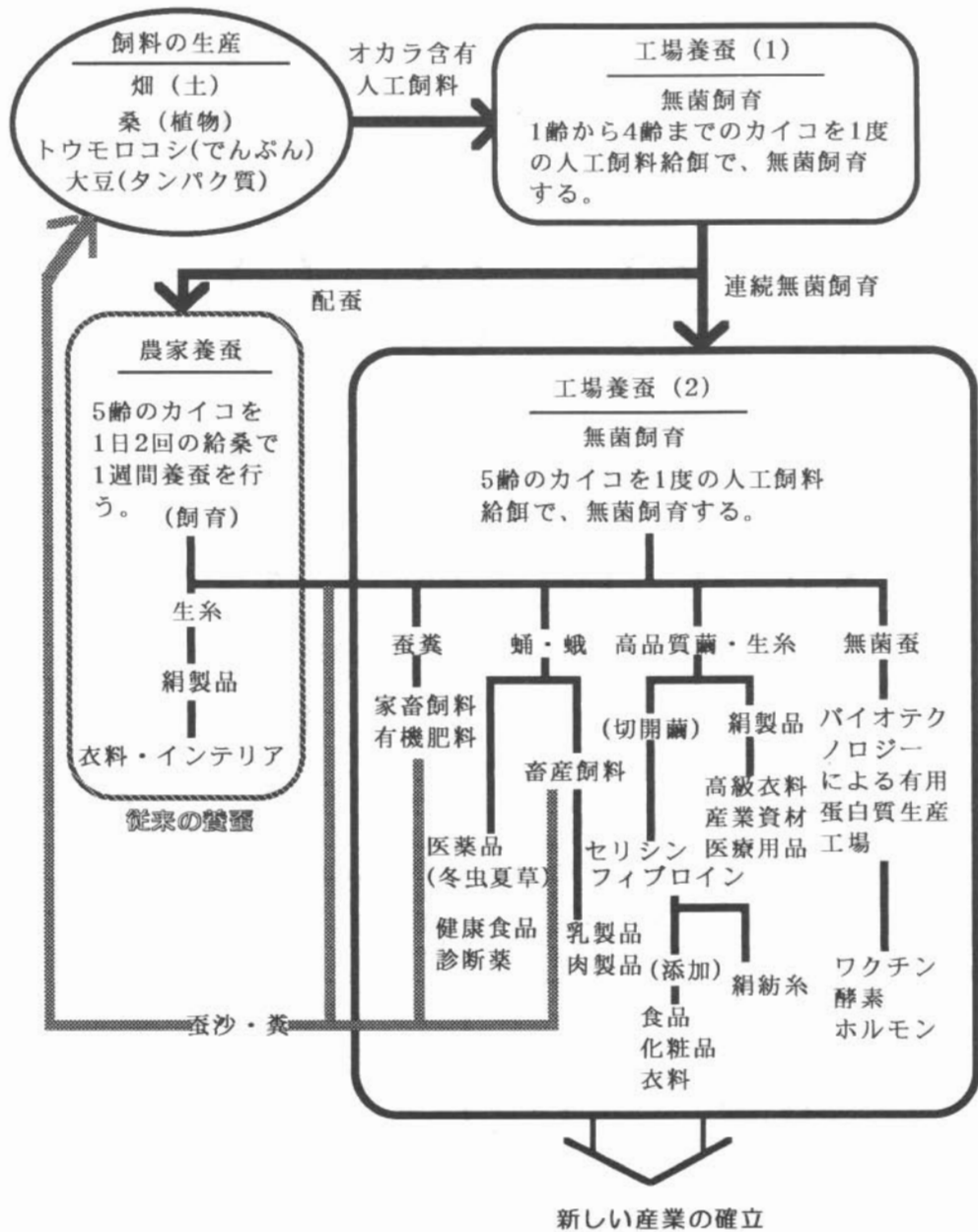


図8 エコロジーとエコノミーを両立させる周年産業

カイコ・バキュロウイルスを用いた遺伝子導入に
関する研究：カイコ蛹で生産される
ニューカッスル病サブユニットワクチンについて

森 肇・深野木 信一*・入谷 好一*・松原藤好**・林 幸之**

Baculovirus gene expression in the silkworm :
production of subunit vaccine for Newcastle disease

by

Hajime MORI, Shin-ichi FUKANOKI*, Yoshikazu IRITANI*,
Fujiyoshi MATSUBARA** and Yoshiyuki HAYASHI**

(平成10年3月)

現在 京都工芸繊維大学助教授

* シオノギ製薬油日ラボラトリーズ

** 財団法人衣笠会繊維研究所

カイコ・バキュロウイルスを用いた遺伝子導入に関する研究：
カイコ蛹で生産されるニューカッスル病サブユニットワクチンについて

森 肇・深野木 信一・入谷 好一・松原藤好・林 幸之

養鶏、養殖、養蚕など、これら全ての産業は常にウイルス、細菌、糸状菌などの病原体に起因する感染症を予防することが重要である。そこで、我々は病原体からの隔離、すなわち無菌飼育といった手法やワクチンを使用した受動免疫の利用などを試みてきた。このワクチンには弱毒微生物をそのまま利用する生ワクチンと、物理化学的処理を施した不活性化微生物にアジュバントを添加した不活化ワクチンの2種類がある。しかしながら、これらはいずれも病原体であるウイルス、細菌、糸状菌などの病原体を培養しなくてはならない。このような旧来型ワクチンに代わり、遺伝子組み換え技術によりサブユニットワクチン、コンポーネントワクチン、エピトープワクチンなどの次世代ワクチンが誕生するようになった。ニワトリのニューカッスル病は鳥類パラミクソウイルスに分類されるニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus, NDV) の感染によって発病する疾病であり、これに感染した場合、その致死率は極めて高い (Nagai *et al.*, 1988)。現在、その予防策として弱毒ウイルスを用いた生ワクチンと、発育鶏卵で増殖させたウイルスを不活化した後、濃縮し、さらにアジュバントを加えた不活化ワクチンなどの、いわゆる旧来型ワクチンが実用化されている。

そこで、本研究ではNDVのFタンパク質をバキュロウイルスベクター系で発現させ (Mori *et al.*, 1994; 入谷ら, 1995; 入谷, 1995)、この発現タンパク質をサブユニットワクチンとして利用する方法を検討した。

材料と方法

1. バキュロウイルスベクターへのFタンパク質cDNAクローニング

NDVのFタンパク質をコードするcDNA (Sato *et al.*, 1987) をトランスファーベクターpAcYM1 (Matsuura *et al.*, 1989) のポリヘドリンプロモーターの下流にクローニングし、組み換えトランスファーベクターpAcFを作製した。このpAcFを、カイコガおよびヨトウガ由来の培養細胞や、これらの昆虫で増殖できるように宿主範囲を拡大させたハイブリッドバキュロウイルス (Hybrid

nuclear polyhedrosis virus, HyNPV) (Mori *et al.*, 1992) のDNAとともに、ヨトウガ由来の培養細胞IPLB-SF21AE (Sf細胞) にトランスフェクションした。そして、NDVのFタンパク質を発現する組み換えバキュロウイルスHyNPV-Fをブランク法により純化した。

2. Fタンパク質のカイコ蛹での発現

カイコは1齢から5齢までの全齢期間を通して人工飼料を用いて、無菌飼育を行った (松原ら, 1988)。バキュロウイルスHyNPV-Fをカイコ蛹に感染させ、5日後にこの2倍量のリン酸緩衝液中で磨砕し、ガーゼ濾過した濾液にホルマリンと β -プロピオラク톤を加え、HyNPVを不活化した。適宜、これを5倍、10倍、25倍、50倍にリン酸緩衝液で希釈し、それぞれのワクチン原液とした。各原液10mlにリン酸緩衝液20ml、鉱物オイル70mlを加えた後、乳化しNDVのFタンパク質サブユニットワクチンを調製した。

3. ワクチネーション

7週齢のSPF鶏の大腿部筋肉内にワクチンを1mlずつ接種した。免疫後2週目に採血した後、強毒NDV佐藤株を $10^{4.0}$ EID₅₀/羽ずつ筋肉内に攻撃し、臨床症状を2週間観察した。

4. 血清反応

赤血球凝集抑制抗体価 (HI) は、非働化血清を2倍段階希釈し、マイクロプレート法により測定した (Iritani *et al.*, 1991)。中和抗体はブランク減少法により測定した (Beard and Hanson, 1984)。なお、中和価 (NI) は佐藤株の100 pfuを90%阻止する血清の最高希釈倍数で表示した。

結果

1. カイコ蛹で発現したFタンパク質の最小有効量

HyNPV-Fに感染したカイコ蛹に2倍量のリン酸緩衝液を加え、ガーゼ濾過した濾過液を0倍とし、さらにこの濾液をリン酸緩衝液で5倍、10倍、25倍、50倍に希釈した。これらウイルス原液10mlにリン酸緩衝液20ml、鉱物オイル70mlを加えた後、乳化しNDVのFタンパク質サブユニットワクチンを調整した。

得られたワクチン1mlを7週齢のSPF鶏の大腿部筋肉内に接種し、さらに2週間後に強毒NDVである佐藤株を筋肉内に攻撃し、臨床症状を2週間観察した。また、攻撃時の赤血球凝集抑制価および中和価を測定し、攻撃後においては赤血球凝集抑制価を測定し、ワクチン接種鶏の免疫力価を測定した。その結果、表1に示したように、強毒NDVの接種に対して25倍希釈まで100%の防御効果を示した。しかしながら、攻撃時の中和価は0倍、5倍、10倍希釈のそれぞれに対して低い値を示し、逆に攻撃後の赤血球凝集抑制価は25倍希釈以降で0倍、5倍、10倍希釈のそれぞれに対して高い値を示した。これは、25倍希釈を境界としてワクチンとしての効果が若干下がることを示すものである。

2. HyNPV-Fの継代による影響

一般に発現ベクター内に外来遺伝子を導入した場合、そのベクターの継代によって外来遺伝子が脱落し、それによってタンパク質の発現効率が低下することが知られている。今回、NDVのFタンパク質をコードするcDNAをバキュロウイルスベクターに導入し、ポリヘドリンプロモーターの制御下で同タンパク質の大量発現を試みたが、このような遺伝子の脱落という現象はワクチンの大量生産という点から見れば、今後大きな問題になると考えられる。そこで、HyNPV-FをSf細胞で5代連続継代し、得られた各継代時のウイルスをカイコ蛹に接種し、同様にワクチンとしての効果を調べた。その結果、表2に示したように、5代継代しても、強毒NDVの接種に対して100%の防御効果を示し、また攻撃2週間後の赤血球凝集抑制価にも変化が見られなかった。

考察

本来サブユニットワクチンは、旧来型の生ワクチンや不活化ワクチンとは違って、ある特定のタンパク質に対する液性および細胞性免疫を付与させておくことにより、病原体に対する防御効果を高めることができる。このため、今回のように作製したNDVに対するサブユニットワクチンを投与した鶏の赤血球凝集抑制価は、ワクチン非接種の鶏と同様に低値であるにも拘わらず、中和価はワクチン接種した鶏では高い値を示した。よって、養鶏場においてワクチン投与した鶏がNDVの自然感染を受けたかどうかの判定を行うことができると考える。通常は、自然感染が生じた場合、中和価と同時に赤血球凝集抑制価が上昇することになる。

しかしながら、今回ワクチンの抗原として使用した抗原がFタンパク質であり、このタンパク質は感染防御抗原の一つであるが、赤血球凝集能は持たない。ちなみに、このNDVの場合、赤血球凝集能はウイルスの膜タンパク質であるHNタンパク質が備えている。

カイコ蛹中で産生されたFタンパク質はNDVの攻撃に対して有効であることを示したが、これはNDV粒子中のFタンパク質と同様の抗原性を有するFタンパク質がカイコ蛹中で産生されたことを証明したものである。さらに、25倍希釈ワクチン液まで100%の感染防御効果を示したことは、カイコ蛹1頭あたり約2,500mlの不活化サブユニットワクチンの原料を調製できることを示した。これは、鶏胚培養から調製される不活化ワクチンと比較しても（山田ら，1994）、カイコ蛹の方が遥かに大量にFタンパク質が産生されていることが明らかになった。

したがって、本研究によりNDVの次世代ワクチンの抗原としてFタンパク質をバキュロウイルスベクターを用いてカイコ蛹で産生させることは、効率的でしかも廉価な手段であることが判明した。

引用文献

Beard, C. W. and Hanson, R. P. (1984) In "Disease of Poultry", 8th Ed. pp. 452-470

入谷好一 (1995) 鶏病研報31, 153-159

Iritani, Y., Aoyama, S., Takigami, S., Hayashi, Y., Ogawa, R., Yanagida, N., Saeki, S., and Kamogawa, K. (1991) Avian Dis. 35, 659-661

入谷好一、青山茂美、林 幸之、森 肇、俵 秀行、松原藤好、鴨川幸市 (1995) 家禽会誌32, 42-46

松原藤好、桑 前、杉森秀昭、石河正久、角田素行、松本継男 (1988) 日蚕雑57, 118-122

Matsuura, Y., Miyamoto, T., Sato, T., Morita, C., and Yasui, K. (1989) Virology. 173, 674-682

Mori, H., Nakazawa, H., Shirai, N., Shibata, N., Sumida, M., and

- Matsubara, F. (1992) J. Gen. Virol. 73, 1877-1880
- Sato, H., Oh-hira. M., Ishida, N., Imamura, Y., Hattori, S., and Kawakita, M. (1987) Virus Res. 7, 241-255
- Nagai, Y., Hamaguchi, M., and Toyoda, T. (1988) Prog. Vet. Microbiol. Immunol. 5, 16-64
- 山田進二、本田 隆、宮原徳治、酒井英史、種子野草 (1994) 畜産の研究 48, 25-31

表1. カイコ蛹から調製したNDV Fタンパク質サブユニットワクチンの最小有効量

ワクチンの希釈	攻撃時の抗体価		攻撃後の防御効果	
	HI	NI	耐過羽数 (%)	HI
0	< 1 : 2	1 : 50	5 / 5 (100)	1 : 3
1 : 5	< 1 : 2	1 : 50	5 / 5 (100)	1 : 3
1 : 10	< 1 : 2	1 : 30	5 / 5 (100)	1 : 4
1 : 25	< 1 : 2	1 : 5	5 / 5 (100)	1 : 15
1 : 50	< 1 : 2	1 : 3	2 / 5 (40)	1 : 79
HyNPV*	< 1 : 2	< 1 : 2	0 / 5 (0)	-
-**	< 1 : 2	< 1 : 2	0 / 5 (0)	-

*ハイブリッドバキュロウイルス接種カイコ蛹から調製した対照ワクチン

**無接種対照鶏

表2. HyNPV-Fを継代した場合のサブユニットワクチンの免疫力

継代歴	NDV攻撃試験によるワクチン力価	
	防御効果 (%)	攻撃後2週目のHI価
0	5 / 5 (100)	1 : 80
1	5 / 5 (100)	1 : 45
3	5 / 5 (100)	1 : 70
5	5 / 5 (100)	1 : 60
-*	0 / 5 (0)	-

*無接種対照鶏

Gene Targeting in the silkworm by using a baculovirus

by

Hajime MORI, Yoshiyuki HAYASHI *, and Fujiyoshi MATSUBARA *
(March, 1998)

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology,

*The Kinugasa-kai Foundation, Kinugasa Textile Research Institute

**Gene targeting in the silkworm
by using a baculovirus**

**Hajime Mori, Yoshiyuki Hayashi¹,
Fujiyoshi Matsubara¹**

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, ¹Foundation Kinugasakai, Textile
Research Institute, Kyoto 603-8326, Japan.

Bombyx mori fibroin light (L)-chain gene was cloned and a green fluorescent protein (GFP) gene was inserted into the exon 7 of the L-chain gene. The L-chain/GFP chimeric gene was used to replace with the polyhedrin gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV). This recombinant virus was used to target the L-chain/GFP gene to the L-chain region of the silkworm genome. Female moths were infected with the recombinant virus and then mated with normal male moths. Genomic DNAs from their progenies were screened for the desired targeting event. This analysis demonstrated that the chimeric gene had been integrated into the L-chain gene on the genome by homologous recombination and stably transmitted through generations. The chimeric gene was expressed in the posterior silk gland and the gene product was spun into the cocoon layer.

Received November 24, 1998; revised version accepted .

Lepidopteran insects and their cells are very useful as hosts for the production of heterologous proteins by baculovirus expression vectors (Luckow and Summers, 1988; Miller, 1988). However, gene expression is transient, because the infected cells ultimately die from virus infection and the polyhedrin promoter is expressed only during the very late phase of infection. For this reason, the IE1 promoter from NPV (Jarvis et al., 1990; Jarvis, 1993) or a densovirus promoter (Giraud et al., 1992) have been utilized for stable transformation of lepidopteran cells and constitutive expression of foreign genes. Attempts to develop similar transient expression systems in silkworms have failed, because plasmid DNAs injected into silkworm eggs were rapidly degraded (Nagaraju et al., 1996).

Although AcNPV can replicate in the silkworm, *B. mori*, the AcNPV-infected larvae survive and grow without any symptoms of

nuclear polyhedrosis (Mori et al., 1995). Previously, we reported that AcNPV could be utilized as a vector for the transovarian transmission of foreign genes in the silkworm (Mori et al., 1995). The luciferase gene was introduced into the AcNPV genome, female 5th instar larvae were inoculated with the recombinant virus, and luciferase activity was detected in the larvae of subsequent generations, indicating the luciferase gene had been vertically transmitted. Densoviruses are also considered to be candidate transfer vectors for transgenesis of lepidopteran insect cells and stable expression of foreign genes (Giraud et al., 1992). On the other hand, transgenesis of *Drosophila melanogaster* is routinely accomplished by using the P-element transposon and this has facilitated the analysis of developmental regulation of gene expression (Rubin and Spradling, 1982). Recently, germline transformation of dipteran insects has been established for the purpose of genetically controlling the Mediterranean fruit fly (Jasinskiene et al., 1998; Handler et al., 1998), and mosquitoes have been genetically transformed using the insect transposable elements *Hermes* and *Mariner* to control diseases such as yellow fever and malaria (Coates et al., 1998; Zwiebel et al., 1995).

In this report we examine the transgenesis by homologous recombination to carry out gene targeting and ferry transgene into the silkworm, *B. mori*.

Results and discussion

Since fibroin, which consists of heavy (H)- and light (L)-chains is one major protein of silk and the most abundant protein produced by the silkworm, the fibroin promoter would be a useful promoter for the production of large quantities of heterologous proteins. We constructed a vector for the purpose of gene targeting in the silkworm, *B. mori*. As shown in Fig. 1A, the 5 kbp-upstream (long arm) and 0.5 kbp-downstream (short arm) sequence of exon 7 of the L-chain gene (Kikuchi et al., 1992)

were cloned, and a GFP gene (Chalfie et al., 1994) was then inserted between the long- and short-arm sequence. The chimeric L-chain/GFP gene was transferred into the polyhedrin region of AcNPV and the recombinant virus was used as a targeting vector. Homologous recombination was expected to occur between the long- and short-arm sequences common to both the chimeric L-chain gene in the virus and the L-chain gene in the *B. mori* genome. The chimeric gene should then be expressed as an L-chain/GFP fusion protein under the control of the L-chain promoter. Open reading frame of the chimeric gene should be terminated by the stop codon (TAG) of the GFP gene (Fig. 1B). One day-old 5th instar female larvae (F0) were injected with 50 μ l containing 5×10^5 plaque forming unit (PFU) of the recombinant virus by percutaneous inoculation. Approximately 50 animals were inoculated in each experiment (Table I). Although normal larval-pupal ecdysis was observed, pupal-adult metamorphosis was arrested. Metamorphosis, however, resumed after administration of ecdysteroid hormone (Mori et al., 1995). The average duration of the larval and pupal stages in the uninfected animals were 10 and 15 days, respectively, but duration of the pupal stage of infected animals was a few days longer than in the uninfected animals. This phenomenon suggested that the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (EGT) gene of AcNPV was expressed and the secreted EGT altered growth of the infected animals (Shikata et al., 1998). After infection with the recombinant baculovirus, no progeny virus was detected in hemolymph at 5, 10, or 15 days postinoculation (p.i.), but 2.3×10^2 and 5.4×10^5 PFU/ml of progeny virus were detected in hemolymph at 20 and 25 days p.i., respectively. The progeny virus was propagated and the viral DNA was extracted. Restriction endonuclease analysis of the viral DNA indicated that the progeny virus was derived from the injected recombinant virus and not from the activation of a latent virus present in the silkworm (data not shown).

An outline of the screening method for gene targeting is shown in Fig. 2, and the frequency of gene targeting is summarized in Table 1. Virus-inoculated female moths were mated with a normal male moth (Fig. 2). The genomic DNA was extracted from 100 embryos and used as the template for a PCR using primers 5 and 6 which screens for the presence of the GFP gene. Approximately 3% of the inoculated F0 gave rise to F1 embryos that were positive by PCR and dot blot hybridization (Table 1). The larvae from the remaining PCR positive siblings were reared, while the PCR-negative sibs were discarded. About F1 100-150 individuals were collected, and hemocytes of each 5th instar larva were harvested from each individual separately. Genomic DNA was extracted from the hemocytes and screened by PCR analysis using primers 5 and 6. Overall, approximately 2.7% of all the F1 individuals tested were positive for the GFP gene (Table 1). Male and female moths containing this gene were mated with normal moths, and their progenies (F2) were reared. About 150 offspring were produced from each cross and hemocytes were harvested separately from each larvae in 5th instar. Genomic DNA from the hemocytes was assayed for gene targeting using a PCR screening method that specifically detects a novel DNA junction created by the targeting event. Only homologous recombination can juxtapose the two sequences that create this junction, one from the GFP gene in the targeting vector, and the other within the downstream sequence beyond the end of the targeting vector (Fig. 1A). As shown in Fig. 3A, the PCR reaction with a genomic DNA (lane 3) using primers 7 and 8 amplified a 0.9-kbp DNA fragment, and this showed that the targeting vector correctly recombined with the genomic DNA. The same results were obtained with the six other F2's. Nucleotide sequence analysis of the 0.9-kbp PCR product from all F2 animals indicated that one of homologous recombination occurred at the 3' end of the transgene in the targeting vector (Fig. 1B). After inoculating 252 animals of the 5th instar larvae (F0) with the recombinant AcNPV, the

chimeric protein consisting of L-chain (25 kDa) and GFP (27 kDa). Furthermore, the new protein band reacted with an antibody against GFP (Fig. 3E), indicating that the silk protein prepared from cocoons of targeted F2 animals was composed of chimeric L-chain and GFP gene. Cocoons produced by GFP gene-targeted silkworms did not appear any different from normal cocoons and green fluorescence was not observed under the irradiation of long-wavelength ultraviolet light. It is necessary to study the physicochemical properties of the cocoons and the raw silk. These findings indicated that the chimeric protein was synthesized under the control of the L-chain promoter in the posterior silk gland and secreted into the cocoon layer.

When male and female F2 animals were mated with normal animals and segregation of the GFP gene in the F3 generation was analyzed by dot blot hybridization, about half of the individuals contained this gene (Table 2). When the GFP gene-targeted F3 animals were crossed with normal animals and the GFP gene-targeted animals, about half and three fourth of individuals scored positive for GFP gene, respectively (Table 2). These indicate that the chimeric gene was all located on a single chromosome in the F2 generation of the silkworm and that a germline integration event had occurred at the F1 stage. Although the genomic DNA from the individuals of each generation was used as a template for a detection of AcNPV DNA, the viral DNA was detected in only F0 and F1 generation.

P-element transgenesis of *D. melanogaster* or of other insects using transposons is dependent on the random integration of a foreign gene (O'Brochta and Atkinson, 1996). Recombinant baculovirus-mediated transgenesis of the silkworm allowed specific alterations in a target sequence. Targeted disruption of an endogenous gene would permit analysis of gene function through the production of gene-knockouts in the silkworm. In addition, homologous recombination of a foreign gene downstream from a powerful promoter, such as the fibroin promoter, would

allow large-scale and constitutive production of a useful protein in the silkworm (Marshall, 1998). Thus, the genetic manipulations described in this study will be important in clarifying the regulation of gene expression and introducing new traits into beneficial insects.

Materials and methods

Construction of targeting vector and PCR amplification

The primers were synthesized for PCR amplification of the 5.0-kbp long-arm and the 0.5-kbp short-arm DNA fragments according to the published sequence data for the L-chain gene (Kikuchi et al., 1992). The genomic DNA of 5th instar larvae was extracted from hemocytes using a DNA extraction kit (STRATAGENE). The primers synthesized for PCR amplification of long-arm DNA fragment were : primer 1 as a forward primer (5'-AATTAGCTCTAGATGAGCTCCCGGCGTACC-3') and primer 2 as a backward primer (5'-CAACTAAGGGATCCGCGTCATTACCGTTGC-3'). In the backward primer, the AAGCCGGTCCG sequence included in the exon 7 of L-chain gene was converted into AAGGGATCCGCG, resulting in a creation of a *Bam*HI site. PCR amplification was carried out using the LA PCR kit ver.2 (TaKaRa) with 0.4 mM of each primer and 200 ng of the genomic DNA as template. After heating the reaction mixture (50 μ l) in MicroAmp reaction tubes (PE Applied biosystems) at 94°C for 1 min in a Gene AmpPCR System 2400 (PE Applied biosystems), amplification was carried out for 30 cycles of denaturation (20 sec at 98°C) and annealing-extension (15 min at 68°C). A final 10 min step at 72°C was performed at the completion of these cycles. The long arm was cut out with *Xba*I and *Bam*HI, and the fragment was inserted into baculovirus transfer vector pVL1392 (PharMingen) at the *Xba*I and *Bam*HI site to obtain pVLF1-5K. Primer 3 (5'-TACCCACTGTCCAATCCACCG-3') and primer 4 (5'-CCGGCTTAGTTGCTAATGCTC-3') were synthesized for amplification of the short-arm DNA fragment. Primer 5 (5'-

GGAGAAGAACTTTTCACTGGAG-3') and primer 6 (5'-ATCCATGCCATGTGTAATCCC-3') were used to screen for the GFP gene. Primer 7 (5'-ACTACAAGACACGTGCTG-3') in the GFP gene and primer 8 (5'-AGCATGACAACAGTACCG-3') in the intron of downstream sequence from exon 7 were synthesized for screening of the targeting event. These PCR amplifications were carried out in a reaction mixture (50 μ l) containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 200 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.4 mM of each primer, 2.5 units of rTaq DNA polymerase (TOYOBO), and 200 ng of the genomic DNA as template. MicroAmp reaction tubes were used with AmpliWax PCR Gems (PE Applied biosystems) for an auto-hot start. After heating the reaction mixture at 80°C for 5 min and cooling to 5°C for 30 sec in a Gene AmpPCR System 2400 (PE Applied biosystems), amplification was carried out for 35 cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 55°C) and extension (2 min at 72°C). A final 7 min step at 72°C was performed at the completion of these cycles. PCR products were cloned into pCRTM2.1 vector (Invitrogen). The short arm was cut out with *EcoRI* and inserted into pGFPCDNA vector (CLONTECH) at the dephosphorylated *EcoRI* site to construct pGFP-0.5K. *BamHI* and *StuI* fragments were separated from pGFP-0.5K and ligated with an *BamHI* adaptor at the *StuI* site. The resulting 1.2-kbp *BamHI* fragment composed of the GFP gene and short-arm DNA fragment was inserted into pVFL-5K at the dephosphorylated *BamHI* site, and the recombinant baculovirus transfer vector, pAcFLGFP, was constructed. *Spodoptera flugiperda* IPLB-SF21AE cells were transfected with 5 μ g of the recombinant transfer vector and 0.5 μ g of linearized AcNPV DNA, BaculogoldTM Baculovirus DNA (PharMingen). A recombinant AcNPV (targeting vector) rescued by the transfer vector was isolated and plaque purified.

Dot blot hybridization

Following PCR amplification, 10 μ l of the PCR sample was

immobilized on a nylon membrane (Amersham) using a vacuum manifold. GFP cDNA was cut out from pGFPCDNA vector and used as a probe for hybridization. Detection of PCR products was carried out with the ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham).

Analysis of nucleotide sequence

The nucleotide sequence of the intron-exon boundary of the L-chain gene was determined by the dideoxytermination method carried out with a 373A DNA Sequencing system (PE Applied biosystems).

Southern blot analysis and Western blot analysis

The GFP gene was cut out of the pGFPCDNA vector (CLONTECH) with *Bam*HI and *Eco*RI and used as a probe. A probe for the L-chain gene was prepared by PCR amplification. The primers were designed to amplify a part of L-chain gene (Fig. 3B). Primer 9 (5'-TTTTTAATTATCCACAGCTC-3') and primer 10 (5'-GTCTGTTTTTATATAGGTAG-3') was synthesized. The PCR amplification was carried out in a reaction mixture (50 μ l) containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 200 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.4 mM of each primer, 2.5 units of *rTag* DNA polymerase (TOYOBO), and 200 ng of the genomic DNA as template. MicroAmp reaction tubes were used with AmpliWax PCR Gems (PE Applied biosystems) for an auto-hot start. After heating the reaction mixture at 80°C for 5 min and cooling to 5°C for 30 sec in a Gene AmpPCR System 2400 (PE Applied biosystems), amplification was carried out for 35 cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 55°C) and extension (2 min at 72°C). A final 7 min step at 72°C was performed at the completion of these cycles. Southern blot analysis was performed on silkworm genomes after digestion with *Acc*I and *Sca*I (Fig. 1A). Electrophoresed genomic DNA was transferred to Hybond-N membranes (Amersham), and hybridization was performed with a commercially available digoxigenin DNA

labelling and detection kit (Boehringer mannheim), according to the supplier's instructions. Western blot analysis for chimeric protein expression was performed on silk proteins from the cocoon layer. To dissolve the silk protein, 150 ml of 70% LiSCN was added to 5 mg of the cocoon layer, and 40 ml of 62.5 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol was added to 10 ml of the dissolved silk protein. The silk protein (20 μ l) was then subjected to 12.5% SDS-PAGE, and the proteins were transferred to nitrocellulose. The nitrocellulose blot was placed in protein blocking solution (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl pH 7.5 (TBS) containing 3 % gelatin) for 1 hr, and the blots were treated overnight with rabbit anti-GFP antibody (CLONTECH). The blots were then treated with goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad) at 1:3000 dilution for 1 hr, and Konica Immunostaining HRP-1000 was used for signal detection.

Acknowledgments

We would like to thank Drs. L. Guarino and D. Jarvis for critically reviewing the manuscript and for helpful discussions. This work was supported by Enhancement of Center of Excellence, Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology, Science and Technology Agency, Japan. M. Y. was supported by the Research Fellowships of the Japan Society for the Promotion of Science for Young Scientists.

References

- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, and D.C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science **263**: 802-805.
- Coates, C. J., N. Jasinskiene, L. Miyashiro, and A.A. James. 1998. Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 3748-3751.

- Giraud, C., G. Devauchelle, and M. Bergoin. 1992. The Densovirus of *Junonia coenia* (JCDNV) as an insect cell expression vector. Virology **186**: 207-218.
- Handler, A.M., S.D. McCombs, M.J. Fraser, and S.H. Saul. 1998. The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 7520-7525.
- Jarvis, D.L. 1993. Effects of baculovirus infection on IE1-mediated foreign gene expression in stably transformed insect cells. J. Virol. **67**: 2583-2591.
- Jarvis, D.L., J.G.W. Fleming, G.R. Kovacs, M.D. Summers, and L.A. Guarino. 1990. Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. Bio/Technology **8**: 950-955.
- Jasinskiene, N., C.J. Coates, M.Q. Benedict, A.J. Cornel, C.S. Rafferty, A.A. James, and F.H. Collins. 1998. Stable transformation of yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 3743-3747.
- Kikuchi, Y., K. Mori, S. Suzuki, K. Yamaguchi, and S. Mizuno. 1992. Structure of the *Bombyx mori* fibroin light-chain-encoding gene: upstream sequence elements common to the light and heavy chain. Gene **110**: 151-158.
- Luckow, V.A., and M.D. Summers. 1988 Trends in the development of baculovirus expression vector. Bio/Technology **6**: 47-55.
- Marshall, A. 1998. The insects are coming. Nature Biotechnology **16**: 530-533.
- Miller, L.K. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. Ann. Rev. Microbiol. **42**: 177-199.
- Mori, H., M. Yamao, H. Nakazawa, Y. Sugahara, N. Shirai, F. Matsubara, M. Sumida, and T. Imamura. 1995. Transovarian transmission of a foreign gene in the silkworm, *Bombyx mori*, by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.

- Bio/Technology **13**: 1005-1007.
- Nagaraju, J., T. Kanda, K. Yukihiro, G. Chavancy, T. Tamura, and P. Couble. 1996. Attempt at transgenesis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) by egg-injection of foreign DNA. Appl. Entomol. Zool. **31**: 587-596.
- O'Brochta, D.A., and P.W. Atkinson. 1996. Transposable elements and gene transformation in non-drosophilid insects. Insect Biochem. Molec. Biol. **26**: 739-753.
- Rubin, G.M., and A.C. Spradling. 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. Science **218**: 348-353.
- Shikata, M., H. Shibata, M. Sakurai, Y. Sano, Y. Hashimoto, and T. Matsumoto. 1998. The ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus alters the moulting and metamorphosis of a non-target insect, the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). J. Gen. Virol. **79**: 1547-1551.
- Zwiebel, L.J., G. Saccone, A. Zacharopoulou, N.J. Besansky, G. Favia, F.H. Collins, C. Louis, and F.C.L. Kafatos. 1995. The white gene of *Ceratitis capitata*: a phenotypic marker for germline transformation. Science **270**: 2005-2008.

(Legends to figures)

Figure. 1. Homologous recombination between the targeting vector and endogenous DNA. (A) Targeting vector (top), intron and exon of L-chain gene (middle), and a product of the targeting event by homologous recombination (bottom). (B) Nucleotide sequence of the intron-exon boundary in the vicinity of exon 7. The 0.9-kbp product amplified by PCR with primers 7 and 8 was sequenced. The sequence of the GFP gene is shown in italics. The sequences of exon 7 and intron are shown by uppercase and lowercase letters, respectively. The downstream sequence beyond the end of targeting vector and the stop codon (TAG) in the chimeric gene are underlined and double-underlined.

Figure. 2. Scheme of the screening method for analysis of gene targeting.

Figure. 3. Screening for gene targeting. (A) Screening by PCR analysis. Primer 7 (5'-ACTACAAGACACGTGCTG-3') in the GFP gene and primer 8 (5'-AGCATGACAACAGTACCG-3') in the intron of downstream sequence from exon 7 were synthesized to screen the silkworm animals for homologous recombination events by PCR. As the normal L-chain gene contained no binding sites for primer 7 and the targeting vector contained no binding sites for primer 8, only the homologous recombinant allele could contain both priming sites. The targeting event was demonstrated by amplification of the 0.9-kbp PCR product. Lane 1, negative control containing water instead of template DNA; lane 2 and 3, genomic DNA from hemocytes of a control larva and a tested larva, respectively. The size (kbp) of the DNA markers is shown at the left. (B) Gene map of the periphery of exon 6 and 7. The AccI and ScaI sites are indicated in the L-chain gene (upper) and the chimeric gene (lower). The lengths of restriction enzyme fragments and each probe were also shown. (C) Southern blot

analysis of silkworm genomic DNAs. The genomic DNAs were digested with AccI and ScaI and analyzed by Southern blot hybridization with the probes for the GFP gene (left) or the L-chain (exon 7) gene (right). Lane 1, genomic DNA from a control larva; lanes 2-8, genomic DNA from larvae in which the 0.9-kbp PCR product was amplified. (D) Green fluorescence under the irradiation of long-wavelength ultraviolet light. Silk glands were dissected (left) and exposed to long-wavelength ultraviolet light (right). Silk glands from control animal and the GFP gene-targeted animal are shown as control and GFP, respectively. (E) SDS-PAGE (left) and Western blot analysis (right) of silk protein. Lane 1, normal cocoon layer; lane 2, cocoon layer from the GFP gene-inserted animal. Antibody used in the Western blot analysis was specific for GFP. The size (kDa) of protein markers is shown at the left.

Table 1. Frequency of gene targeting in the silkworm

Experiment	No. inoculated F0 larvae#	No. F0 larvae yielding GFP-positive embryos† (% positive)	No. F1 siblings containing GFP gene/No tested (% positive)‡	No. F2 larvae with targeted recombination Male	Females
1	51	3 (5.9%)	2/125 (1.6%) 4/141 (2.8%) 4/119 (3.4%)	0	0
2	47	1 (2.1%)	0/149	ND*	ND
3	46	1 (2.2%)	10/138 (7.2%)	2	1
4	53	2 (3.8%)	1/110 (0.9%) 4/108 (3.7%)	0	0
5	55	1 (1.8%)	4/156 (7.1%)	1	0
Total	252	8 (3.2%)	29/1046 (2.7%)	5	2

#Female 5th instar larvae were inoculated with recombinant AcNPV, and then mated with normal moths.
 †Genomic DNA pools were prepared from 100 embryos from each inoculated F0 larvae and tested for the presence of GFP by PCR with primers 5 and 6.

‡Approximately 100-150 siblings from each F0 that produced PCR-positive embryos were reared and individuals were tested for the presence of the GFP gene by PCR with primers 5 and 6.

§Genomic DNA from F2 larvae was analyzed by PCR using primers 7 and 8 which detect a novel DNA junction between GFP and chromosomal DNA.

*ND, not determined.

Table 2. Segregation patterns of the GFP gene in the F3 and F4 generation

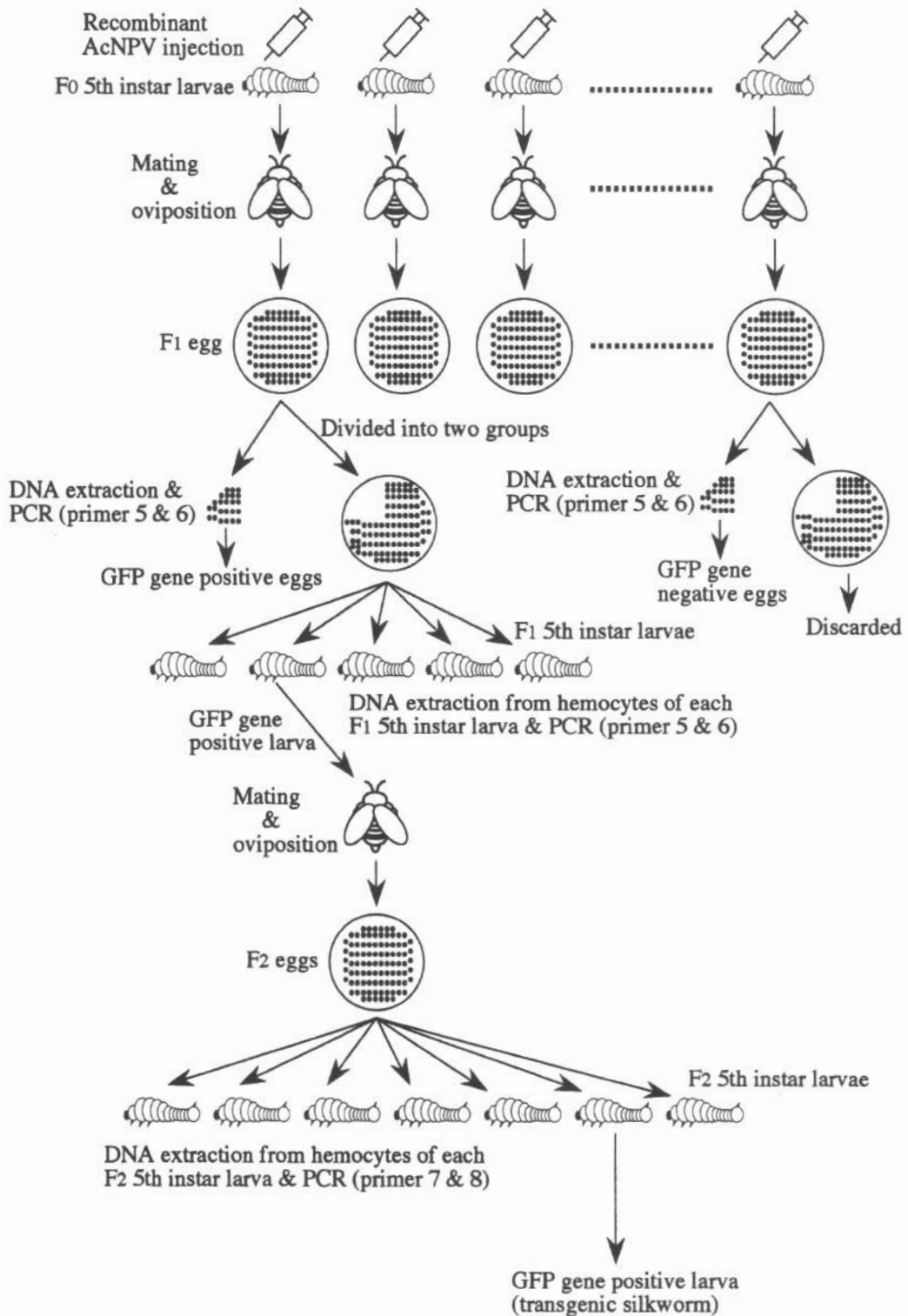
Mating	No.F3 or F4 animals tested#	No.GFP positive larvae (% tested)
F3		
control(♀) X F2(♂ from Exp. No.1)†	92	43 (46.7)
control(♀) X F2(♂ from Exp. No.5)	95	49 (51.6)
F2(♀ from Exp. No.3) X control(♂)	96	46 (47.9)
F2(♀ from Exp. No.4) X control(♂)	90	44 (48.9)
F4		
F3(♀)‡ X control(♂)	91	42 (46.2)
control(♀) X F3(♂)	98	50 (51.0)
F3(♀) X F3(♂)	96	70 (72.9)

#Genomic DNA from hemocytes of each 5th instar larva (F3) was extracted, and the GFP gene was analyzed by PCR amplification.

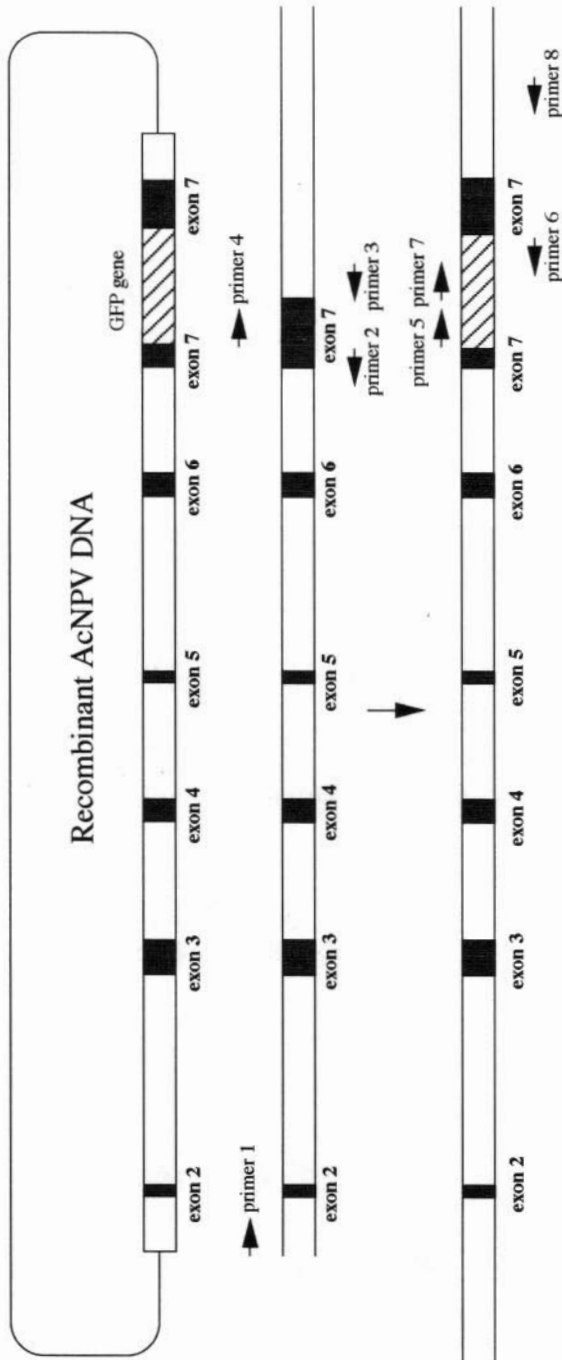
†F2 male and female animals were derived from each experiment (Table 1).

‡GFP gene-targeted F3 male and female animals were obtained by the cross of F2 generation.

Screening strategy

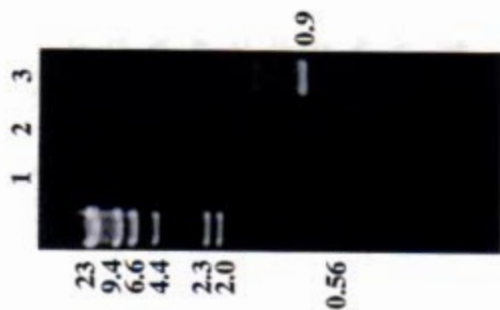
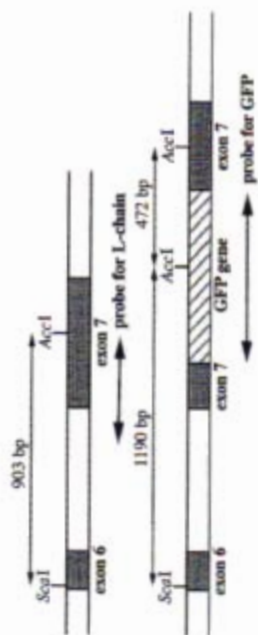
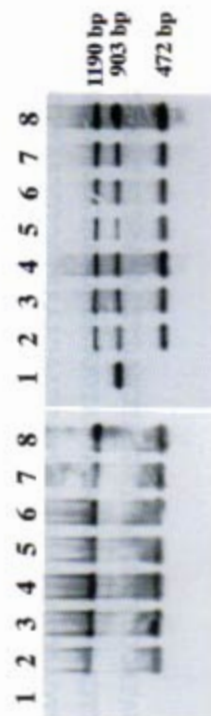
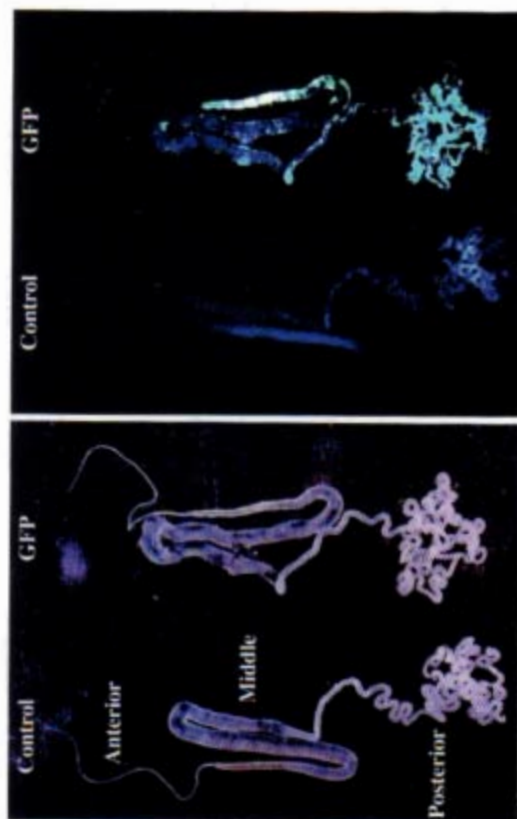
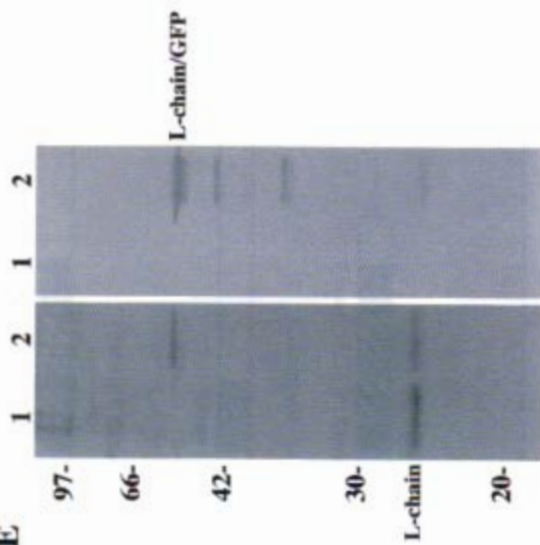


A



B

primer 7
 ACTACAAGACACCGTGTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAAATAGAAATCGAGTTAAAAAGGTTATTGATTTTAAAGAGATGGA
 AACATTTCTGGACACAAAATTGGAATACAACATAAATCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAACAAAAGAAATGGAATCAAAAGTTAA
 CTTCAAAAATTAGACACAAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCAATTATCAACAAAATCTCCAAATTGGCCGATGGCCCTGTCC
 TTTTACCAGACAAACCAATTACCTGTCCACACAACTGTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCCTTCTTTGAGTTT
 GTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAAATAGCAATTCGGTAGAAATTCGGCTTCCGGCTTAGTTGCTAAATGCTCA
 AAGATATATTGCACAAGCAGCCAGGTTACCGTCTAAATAAGAACTGTAAATAATGTATATATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA
 AACCATATACAAACATATATCAATTATAAGACAATCTACCATATAATAAAACAGACTAAAAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA
 TTAGGACATTTTATGCAAAATTGTGTTTGCCTTAGGATTTTTTTTGGAAAGTTTTTTAGATTAATTTATGAAATATAATAATAATAATAACGTT
 AATAATAATATAATATA
 AATAAAGATGTATCCAGTTTTCCAGATAaagaatttagttttagttttagttttagttttagttttagttttagttttagttttagttttagttttagttt
 tagtataatacccaaaagacggtgattggacagtggttacatggatttcggactgttgcacgct
 primer 8

A**B****C****D****E**

人工飼料無菌飼育法による17代にわたる
カイコの継代

小村谷貴子 - 松原藤好*

A Study on 17 Generations of Silkworm
in Aseptic Condition

by

Takako Komuratori and Fujiyoshi Matsubara*

(平成10年3月)

現在 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科
博士後期課程

*京都工芸繊維大学名誉教授
中国西南農業大学教授
中国浙江大学客座教授

人工飼料無菌飼育法による17代にわたるカイコの継代

第1章 結 論

人工飼料無菌飼育法においては、カイコの体表面および体液、消化液など体内のいかなるところにもウイルスを含めた一切の微生物を認めない^{1,2}。よって、人工飼料及びカイコの排泄物の腐敗などによる飼育環境の悪化や、微生物による蚕病発生がない^{3,4,5}。しかしながら、無菌飼育法は無停食であり除沙も行わないため、桑葉等において残沙と共に廃棄されるような「発育の遅れたカイコ」が最後まで飼育されることになる。

人工飼料無菌飼育法は、省資源、省エネルギー、超省力、低コストで、しかも安定多収及び高品質の蚕糸生産を目標として研究が進められてきた。その結果、下場での同年無菌養蚕では全齢2-3回の給餌回数でカイコを飼育することが可能になった^{6,7}。このような生産規模を拡大した無菌飼育においては、不揃いを防ぐ目的で「発育の遅れたカイコ」を飼料交換時に除去しているので、1齢から3齢までの減蚕が数%発生するが、死亡したカイコはごく稀かであり、ウイルスや細菌による病蚕ではないことが知られている⁶。発生割合が全体の1割に満たなくても、「発育の遅れ」はカイコの飼育規模が増大する程生産効率を低下させる要因となるので、今後「発育の遅れたカイコ」の出現をなくすることが急務である。

これまでに、H、支、欧などの11原種を人工飼料無菌飼育し、無菌環境で6代継代した場合の産卵数、卵下卵の休眠性などについて調査がなされ、用いた全ての原種の無菌飼育が可能であることが報告されている⁸。しかしながら、6代までの継代に成功した銀和での産卵数および孵化歩合は、世代を重ねるごとに減少傾向にあった。

そこで、産卵数に若目しつつも継代を行いつつ、1回目の飼料交換までの期間、すなわち1-3齢期間の発育速度が無菌環境に適しているカイコの形質の純化を試みた。

第2章 カイコの選抜および継代

全齡3回給餌法による原種の人工飼料無菌飼育が確立されている^{9,10}ことから、1-3齡期の発育速度を基に選抜したカイコにおいても系統の維持は可能であると考え、交雑種より選抜したカイコの継代を試みた。

1. 供試材料と飼料調製

供試蚕品種としては、春嶺1号×錦月1号を用いた。供試飼料としては、F₃までは壮蚕用人工飼料¹¹を用い、F₄からは(株)日光商事無菌養蚕システム研究所の全齡無菌飼料人工飼料を用いた。そして飼育容器であるプラスチックケース(22×16×4cm)1箱あたり人工飼料粉末50gを用いた。この粉末に対し2.3-2.5倍量の水を加えてよく練合し、ppフィルムで包んで平板に成型した後、この飼料をオートクレーブで117℃40分間滅菌処理した。プラスチックケースとポリプロピレン製網(網目12cm角)は高度さらし粉200倍溶液に30分間浸漬させた後、逆性石鹼Benzalkonium chloride 200倍溶液でさらし粉をふき取った。

2. 蚕卵消毒および掃立

蚕卵は25℃で暗催育をした。卵消毒は孵化前日にエタノール・ホルマリン常法^{1,12,13}で行った。まず、クリーンベンチ内で70%エタノールに5分間浸漬し前処理をした後、4%ホルマリンに15-20分間浸漬し本消毒とした。続いて70%エタノールに3分間の一次洗浄を行い、99%エタノールに1分間の二次洗浄を行った。そして直ちに滅菌濾紙を用いて卵表面を乾燥させた。消毒が完了した卵は滅菌シャーレに入れて再び暗催育を続けた。

掃立作業は全てクリーンベンチ内で無菌的に行った。消毒した飼育容器の中に滅菌飼料をいれ、飼料を包んでいたppフィルムの上部だけを切り取って除去し、その上に蚕卵を100-150頭掃き落とした。そして一から網を飼料に密着するように載せて飼育容器のふたをした。

3. 飼育および継代方法

光条件は24Lとし、飼育温度は1-3齡29℃、4-5齡25℃とした。湿度は特に

制御しなかったが、密閉育であるので常に90%RH以上に保たれていたと考えられる。給餌回数は全齢3回つまり1-3齢1回、4齢1回、5齢1回とした。1ケースあたり、4齢は40-50頭、5齢は10-11頭になるようにした。

4齢起蚕の出現割合は掃立後10日目に全体の16%、掃立後11-13日目に81.3%、そして掃立後14-17日目に2.7%となった。一番最初に4齢起蚕となった16%の一部を飼育し継代することとした。

上簇は改良簇を用い、熟蚕を一頭拾いする方法で行った。営繭中の蚕室内の温湿度は25-26℃、60-80%RHとし、扇風機による微風のある環境下に保護した。営繭後に取りだした蛹はプラスチックケースに入れて25℃に保ったが、雌雄の発育が揃わないときは眼着色後に29℃あるいは20℃に移して発育速度の調節を行った。

採取した蚕卵は5℃に保って人工休眠させた後、約40-60日後に出庫した。常法^{14,15}に従い、25℃に1時間保護してから、15℃における比重が1.1の塩酸を48℃に加温したものの中に6分間浸漬した。続いて25℃で暗催青を行い、掃立後は混合育し、11日目に集団選抜を行う方法をとった。全体の1/3に相当する発育の最も速い群を抽出し、次代を継代した。F₅以降は1蛾育によって近親交配を防ぎ、産卵数が約300粒以上ある個体のみを残した。またF₆以降は、中間に位置する発育速度を持った個体を40頭ずつ選抜して飼育した。

4. 結果と考察

継代は17代目まで成功した。掃立後11日目の4齢起蚕の割合を図1に示した。F₃までは65%程度であったが、掃立時の飼料を変更したF₄以降はほぼ100%に達した。この割合は17代目の現在も維持されている。このことから、4齢起蚕までの1-3齢期の発育が速くなるという形質が固定されたと言える。親の交雑種(春嶺1号×鐘月1号)が二元交雑種であったので、形質の純化が比較的早い段階で可能になったと考えられる。そして、春嶺及び鐘月の掃立11日後の発育成長の結果⁹より、固定された形質は春嶺由来である可能性が高い。

しかしながら、F₁からF₇の各世代において4齢起蚕までに20%程度の死亡率が認められた。選抜の初期に近親交配となったため、劣性の部分致死遺伝子が作用したものと思われる。

表1に示したように、平均産卵数は532粒であり、孵化歩合は79.2%であった。

24Dの光条件下で飼育された鐘和の産卵数が、F₅で約200粒であった⁸ので、300粒を選抜基準としたことに効果があったと言える。

4齢起蚕以降の飼育成績は表2に示した。4齢起蚕体重、5齢起蚕体重、熟蚕体重に個体間の有意な差異は認められなかった。また、表3において、春嶺及び鐘月の飼育成績⁹に比べて全繭重、繭層重および繭層歩合が低かったのは、発育速度を基に選抜を行ったためと考えられる。

以上のことから、選抜されたカイコの無菌飼育による蚕種生産は今後も可能であり、繭層重および繭層歩合を選抜条件に加えれば、蚕糸生産効率の向上に貢献できると考える。

第3章 各発育段階における起蚕調査

人工飼料無菌飼育法では、掃立後10-11日目の発育に関する調査はなされているが^{9,16}、1回目の飼料交換を4齢起蚕の際に行うため、2齢起蚕、3齢起蚕を調査したデータがない。そこで、掃立後5日目、8日目、さらに4齢起蚕抽出後5日目の発育調査を新たに行った。

1. 供試材料

供試蚕品種としては第2章で選抜したカイコのF₄、F₆、F₈、およびF₉を用いた。供試飼料としては、(株)日光商事無菌養蚕システム研究所の全齢無菌育用人工飼料を用いた。

2. 試験方法

発育調査までの飼育方法は、第2章に従った。毛振るいの調査時のみ、照明を点灯した。そして、掃立後5日目および8日目に各齢の割合を調査し、終了後は全て廃棄した。さらに、掃立後11日目に4齢起蚕を抽出して飼料を交換した後、24D・25℃の条件下で飼育し、抽出後5日目に各齢の割合を調査した。この際、光条件に関して4齢起蚕抽出作業時のみ照明を点灯した。また、この調査終了後の区は全て廃棄し継代は行わなかった。

表1 産卵成績

産卵数	孵化歩合 (%)
532 ± 34 (n=5)	79.2

孵化歩合は5蛾区の平均値

表2 飼育成績

4齡起蚕体重(g)	5齡起蚕体重(g)	熟蚕体重(g)
0.192 ± 0.023(n=15)	0.862 ± 0.115(n=15)	4.58 ± 0.737(n=8)

表3 繭調査成績

	♀	♂	平均
全繭重(g)	1.86 ± 0.146	1.52 ± 0.130	1.69 ± 0.219
繭層重(g)	0.357 ± 0.047	0.335 ± 0.039	0.346 ± 0.044
蛹体重(g)	1.50 ± 0.118	1.18 ± 0.105	1.34 ± 0.195
繭層歩合(%)	19.2 ± 1.85	22.1 ± 1.72	20.6 ± 2.28

各区♀、♂10頭の平均値

3. 結果と考察

掃立後5日目の各齢の割合を図2に示した。2齢蚕の割合は97.0%、1眠蚕は0.3%、そして1齢蚕は2.7%となり、2齢起蚕率はほぼ100%に達した。掃立後24時間目、48時間目の毛振るいの程度も調査したが、全て毛振るい期に入っていた。よって、掃立後5日目における1眠蚕および1齢蚕の発育のわずかな遅れは、飼料への食いつきに時間がかかって生じたものではなく、2日目以降の1齢期間中に起こったものと推察される。

掃立後8日目の各齢の割合を図3に示した。3齢蚕の割合は99.3%、2眠蚕は0.35%、そして2齢蚕は0.35%となり、3齢起蚕率もほぼ100%に達した。

さらに、図4に示したように、4齢起蚕を抽出し飼料を交換してから5日目の各齢の割合を調査した。5齢蚕の割合は92.1%に達し、4眠蚕と4齢蚕の割合はそれぞれ6.8%、1.1%であった。

以上のことから、継代されたカイコは掃立後11日目の発育状態で選抜されたにも関わらず、1-4齢期の発育速度が良く揃っていることが明らかとなった。

第4章 異なる飼育条件下での発育調査

清浄育における人工飼料育では、光条件がカイコに与える影響について報告¹⁷がなされている。すなわち、光はカイコに対する直接の影響がなく、人工飼料を変質させ、それを食下したカイコの発育を低下させるような間接的影響を与えることがわかっている¹⁸。また、変質したと思われる人工飼料でカイコを飼育しても、12L・12Dの飼育環境であれば、カイコの発育が促進されることが明らかになっている。そこで、本研究では12L・12Dの光条件下で、選抜されたカイコの無菌飼育を行った。

さらに、桑葉育での発育調査を実施し、これまでの人工飼料無菌飼育との比較を行った。

1. 供試材料

供試蚕品種としては第2章で選抜したカイコのF₈、およびF₁₂を用いた。供試飼料としては、(株)日光商事無菌養蚕システム研究所の全齢無菌育用人工飼料

を使用した。また、飼育用の桑葉は京都工芸繊維大学繊維学部付属農場の掃立用の桑葉を用いた。

2. 試験方法

① 12L・12Dおよび24Dの光条件下での無菌飼育

カイコの飼育温度は25℃とした。1蛾区の蚕卵を2分割してそれぞれ12L・12Dおよび24Dの光条件下で催育した。無菌蚕は第2章に従って作出および掃立し、12L・12Dおよび24Dの光条件下で飼育した。

予備実験の試験結果より人工飼料の給餌回数は18時間に1回とし、12L・12Dにおける光の強さは飼育ケース全てが20luxになるようにした。両条件とも、飼料交換作業時のみ照明を点灯した。そして、掃立後11日目に4齢起蚕の割合を調査し、終了後は全て廃棄した。

② 桑葉による飼育

カイコの飼育温度は29℃とした。飼育容器および蚕卵の消毒は第2章の方法に準じた。全暗の光条件下で通常の除沙、停食、各座の作業を行いながら飼育を行った。この際、作業時のみ照明を点灯した。

齢中1回、起蚕1回の割合でカピノランを散布して蚕体および蚕座を消毒した。そして、掃立後11日目に4齢起蚕の割合を調査した後は飼育を継続し、次代を再び第2章の方法で無菌飼育した。

3. 結果と考察

25℃の飼育条件下における掃立後11日目の4齢起蚕率は、図5に示したように、12L・12Dは100%、24Dでは81.1%となった。カイコは29℃・24Dで選抜されたものなので、飼育温度が下がったことで発育が遅くなったと考えられる。光による飼料の劣化はなかったと考えられるが、12L・12Dの光条件下の飼育では清浄育と同様に無菌育においてもカイコの発育の促進が見られたと言える。

しかしながら、図6に示したように、29℃の桑葉育では掃立後11日目の4齢起蚕率は52.9%にとどまった。除沙や停食など、本来カイコの発育を揃えるための作業を毎日行ったにも関わらず発育が遅れたのは、作業時の点灯によるものである可能性がある。桑葉育終了後、次代を再び無菌飼育したところ、掃立後11

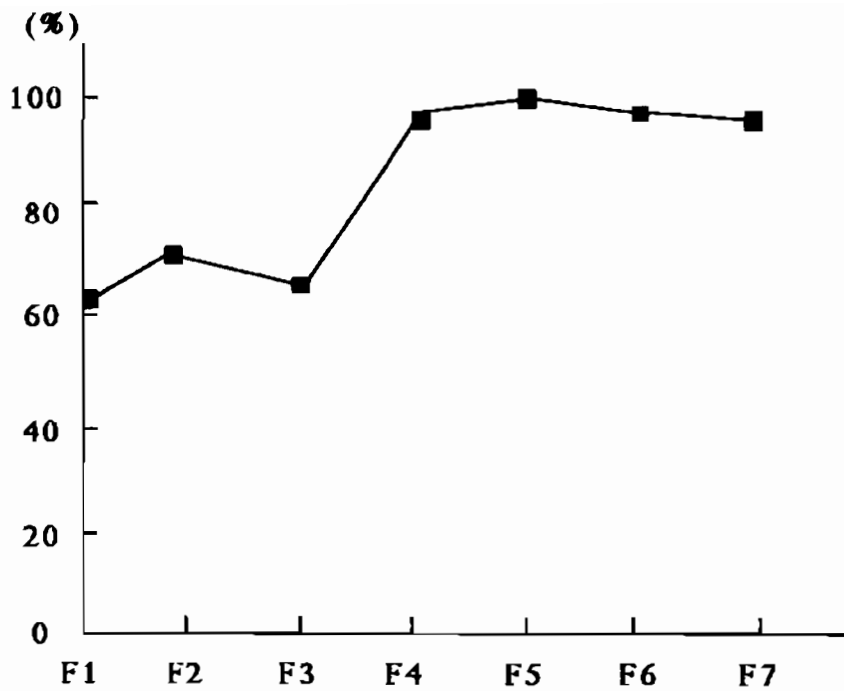


図1 掃立後11日目の4齢起蚕の割合

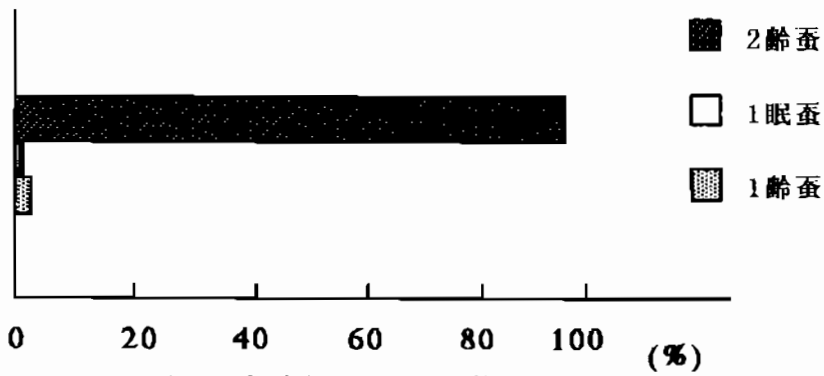


図2 掃立後5日目の各齢の割合

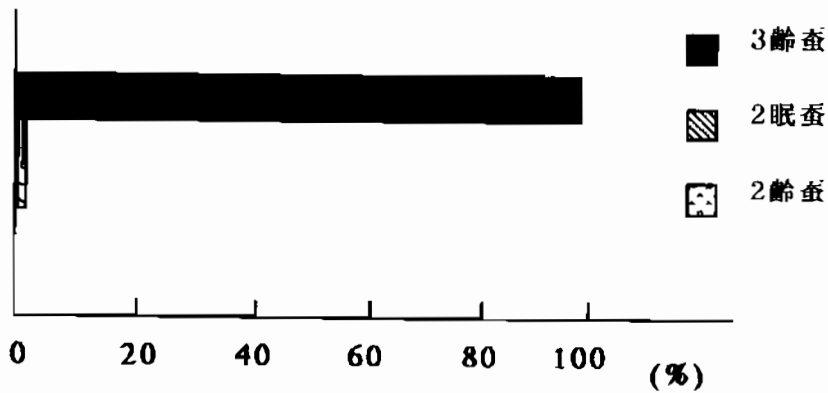


図3 掃立後8日目の各齢の割合

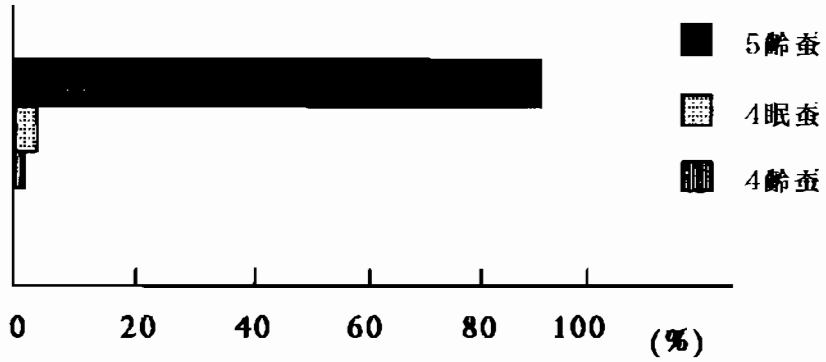


図4 4齡起蚕抽出後5日目の各齡の割合

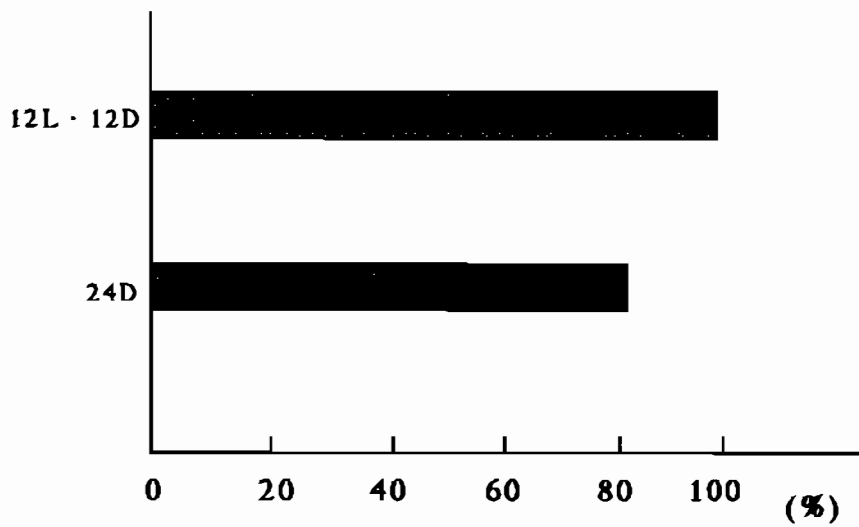


図5 掃立後11日目の4齡起蚕の割合 (25℃)

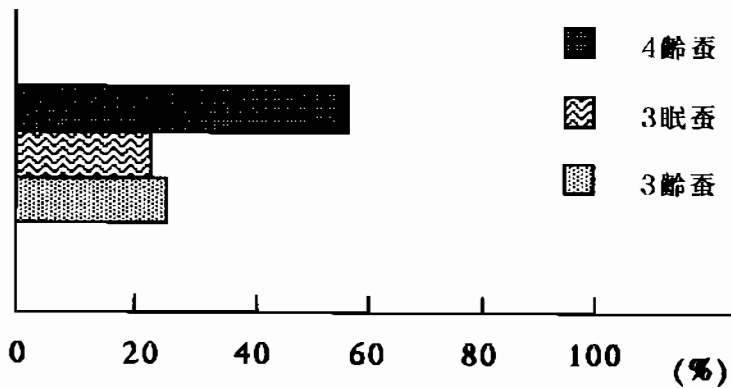


図6 掃立後11日目の各齡の割合 (桑葉育)

日目の4齡起蚕の割合は図1に示したF₇と同じであった。このことから、カイコの遺伝子が継代途中の環境の変化に影響されなかったと考えられる。

第5章 総合考察

1963年から始まったカイコの無菌飼育に関する研究は、簡便な無菌孵化法、無菌装置や施設、低コスト人工飼料の開発、および蚕種の低コスト周年生産と随時孵化法の確立を経て、1984年に人工飼料を用いたわが国の新しい工場周年無菌養蚕のシステム化を成功させた。

これまでの養蚕では、カイコはConventional rearing（普通育）によって生産されていた。つまり微生物的に制御されていない生物であるので、既成の諸学問の研究の材料として限界があると言える。自然界では、カイコは孵化と同時に卵殻に付着した微生物を体内に取り込み、汚染を受けながら死ぬまで共存することになる。寄生生物であるウイルス、糸状菌、そして原虫はカイコに対して病原的な役割を果たしている場合が多い。

そこで、エタノール・ホルマリン法およびエタノール・高度さらし粉法による浸漬消毒法により卵表面を消毒し、Germ free silkworm（無菌蚕）を作出することが必要となったのである。この無菌蚕は、これま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、そして生産学などの研究に役立てることができる。人工飼料無菌育を成り立たせる要素である無菌人工飼料および無菌装置・無菌室についての研究はほぼ完成している。しかしながら、カイコの飼育規模が増大する程生産効率が重要となってくるので、無菌飼育により適した品種を育成する研究は今後必要不可欠と考える。

そこで本研究では、これまで成功しているカイコの6代にわたる継代の記録を超える、17代の無菌飼育を試みた。4齡起蚕までの期間、すなわち1-3齡期間の発育速度が無菌環境に適しているカイコの形質の純化を行った結果、5齡起蚕までの発育速度および蚕体重の揃ったカイコを得ることができた。このカイコは継代の途中で飼育環境を変えても次代の性質に変化がなかったことから、新しい品種として確立されたと考えられる。

工場での周年無菌養蚕にこのカイコを利用するためには、繭層重および繭層歩

合に関する改良が必要であるが、産卵数が継代および育種に必要な量を満たしているので、生産効率の向上のための研究に継続して用いることが可能である。桑葉育に適應しない性質はあるものの、12L・12Dに光条件を変化させても4齡起蚕率が約100%を維持できる点などは、蚕糸生産への応用のみならず、基礎研究の材料として有用であることを示唆している。

今後、このカイコはこれまでの応用研究ならびに従来の生物学の分野にとられない、無菌昆虫独自の基礎研究に必要であると考えらる。

参考文献

1. 松原藤好：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。繊維研報告, 1-53, 1997.
2. 松原藤好・角田素行・森 肇：蚕糸生産の立場から。無菌生物, 25, 15-17, 1995.
3. 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, 39-45, 1967.
4. 今村利勝・角田素行・森 肇・松原藤好：人工飼料無菌飼育による周年養蚕。無菌生物, 24, 69-73, 1994.
5. 今村利勝・陳 瑞英・森 肇・角田素行・松原藤好：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, 1995.
6. 陳 瑞英・森 肇・角田素行・袁 錫麟・北丸 豊・松原藤好：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, 1992.
7. 今村利勝・角田素行・森 肇・松原藤好：人工飼料無菌飼育による周年養蚕。無菌生物, 24, 69-73, 1994.
8. 松原藤好・矢内須美：カイコの無菌継代。京工織大, 繊維学術報, 8, 33-42, 1977.
9. 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および蚕卵成績。日蚕雑, 64(1), 35-38, 1995.
10. 今村利勝・陳 瑞英・張 亜平・結城多門・森 肇・角田素行・松原藤好：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(2), 173-178, 1995.

発行 1999年5月10日

発行所 財団法人 衣笠会

〒603-8326

京都市北区北野下白梅町29

T E L 075-461-5949

F A X 075-463-6679

印刷所 爲國印刷株式会社

T E L 075-462-7889