

# 学位論文

森林生物起源サナギタケのカイコ蛹を  
用いた大量生産法の確立

阿部 伸一

## 目次

序論.....	1
謝辞.....	5
第一章 サナギタケ感染率向上のための寄主昆虫蛹の羽化抑制	
Ⅰ．研究目的.....	6
Ⅱ．材料及び方法.....	9
1. 炭酸ガス麻酔を使用したカイコ蛹発育実験.....	9
2. 炭酸ガス麻酔を使用したサナギタケ感染実験.....	10
3. 炭酸ガス麻酔と冷蔵麻酔の実験スケジュール.....	11
4. 大量処理に向けた炭酸ガス麻酔装置.....	12
5. 統計分析.....	12
Ⅲ．結果.....	18
1. 炭酸ガス処理がカイコ蛹発育に及ぼす影響.....	18
2. 炭酸ガス麻酔がサナギタケ感染に及ぼす影響.....	18
3. 冷蔵麻酔がサナギタケ感染率に及ぼす影響.....	19
Ⅳ．考察.....	23
Ⅴ．摘要.....	26
第二章 サナギタケ感染率向上のための寄主昆虫蛹の腐敗抑制	
Ⅰ．研究目的.....	28
Ⅱ．材料及び方法.....	30
1. 7戸の養蚕農家からの収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の調査.....	30
2. 12戸の養蚕農家からの収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の調査.....	31

3. クリティカルポイント設定のための検証実験.....	32
<b>Ⅲ. 結果.....</b>	<b>33</b>
1. 7 及び 12 戸の養蚕農家から収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の関連性.....	33
2. 18 戸の養蚕農家から収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の関連性.....	34
<b>Ⅳ. 考察.....</b>	<b>40</b>
<b>Ⅴ. 摘要.....</b>	<b>43</b>
総合考察.....	45
引用文献.....	54

## 序 論

狭義の冬虫夏草（主に、*Ophiocordyceps* 属、*Cordyceps* 属、*Isaria* 属 spp.）は、科学的根拠が乏しいながらも、癌や糖尿病、心血管疾患、神経性障害などの代謝病の治療として伝統的に利用されている虫生菌類である（Paterson, 2008; Zhou *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2010; Tsushima *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2012; Patel and Ingalhalli, 2013).

広義の冬虫夏草の多くは、森林生物群集の構成メンバーとして昆虫に寄生しながら生態系の維持に貢献している。冬虫夏草の自然界における生長は遅く、特定地域に制限されるので採取量は極めて少ない。中国とその近隣国の高山帯でコウモリガ類に寄生するシネンシストウチュウカソウ *Ophiocordyceps sinensis* (= *Cordyceps sinensis*) (付表 1 参照) の採取による自然破壊は、すでに社会問題となっている。*O. sinensis* は、2003 年に世界的に話題となり価値が一気に高騰したことから、乱獲による環境破壊が深刻化している。チベット自治区は、2006 年 4 月に生態環境保護措置を行い、指定地区以外での採取を禁止し、採取許可書発行によって採取者制限を行っているが不正採取が絶えない。2007 年 7 月には四川省の村で冬虫夏草の採取をめぐり、チベット族同士の大規模な衝突が起き、死亡者 6 名、負傷者 100 名以上の大惨事を引き起こしている。中国科学院西双版納熱帯植物園が組織した調査隊が、チベット、青海、雲南等の産地において 2007 年 6 月から 7 月に行った調査では、生産量が 25 年前の 1 割にも満たず、絶滅寸前だと伝えている。

一方で、*O. sinensis* では液体培養による子座 (Stromata) 及び子実体 (Fruting bodies) の形成に成功していないために、伝統中国医学漢方薬の代替冬

虫夏草としてサナギタケ (*C. militaris*) (付表 1 参照) が期待されてきた (Shrestha et al., 2012).

特にサナギタケの場合は、最適な液体培養条件から培地中に生産される各種の生理活性物質まで解析され、今日では薬理冬虫夏草の代表格として位置付けられている (Shih et al., 2007). またサナギタケでは、1 % のカイコ蛹磨砕液を含有した液体培養と宿主カイコを培地とした培養との遺伝子産物が解析され、両者が異なることが報告されている (Xiong et al., 2010). そこで液体培養に依存することなく、宿主として大量飼育も可能なカイコを利用したサナギタケの子座を含む子実体形成が研究されてきた (Chen and Ichida, 2002; Sato Shimazu, 2002).

以上のことから、グローバルに進行する地球上の高山帯の環境破壊に歯止めをかけるとともに、森林生物資源の多様性の維持と保全のため、森林生物資源起源となるサナギタケの新しい社会的な役割に着目した。すなわち、わが国においてもサナギタケは通常山地で採取され、しかもわが国では 20 世紀の前半には総輸出額の 50 % 以上が生糸であり、養蚕業に関する科学技術も蓄積されている。本研究では、森林生物資源起源のサナギタケと養蚕業のカイコを融合し、その生産物がヒトの健康寿命延長と国民医療費削減に貢献することを最終的な出口としている。

そこで以上のような大きな出口を目指しながら、第 1 段として、サナギタケの宿主昆虫カイコのカイコ蛹ステージにおける感染率の課題に取り組んだ。カイコは大量飼育技術が確立されており、幼虫期よりも蛹期がサナギタケの感染率が高いこと、また感染方法として分生子の散布や浸漬よりも注射接種が優れていることが報告されている (Chen and Ichida, 2002; Sato and Shimazu, 2002). しかしながら、生存中のカイコ蛹にサナギタケ分生子を接種するステージは限ら

れており、蛹発育中期の眼点期を経ると成虫発育が進行し羽化が激増するため、眼点期からの限られた時期までに接種を行わなければならない、サナギタケの大量生産における大きな障壁となる。

さらに第2段として、サナギタケの大量生産を行う上では、現在各地で行われている養蚕によるカイコ飼育を前提とするため、ウイルス・細菌類を保有するカイコ蛹を避けることはできず、サナギタケが感染することなくカイコ蛹が死んで腐敗してしまう問題に取り組んだ。腐敗蛹は強烈な腐敗臭が発生するため、作業者に与える苦痛は大きい。さらに、数十時間で内部が液状化し潰れやすい腐敗蛹は、量産工程では隔離することができないため、周辺の正常感染蛹にも影響を与えてしまう。従って、有効な腐敗抑制方法を見出す必要がある。

本研究の第一章では、サナギタケが、カイコ蛹を寄主とした場合の接種の制限要因となる感染蛹期に着目し、サナギタケの接種期間の延長に対する炭酸ガス麻酔の有効性について明らかにし、第二章では、カイコ蛹に対して、有効な腐敗抑制方法を見出し、サナギタケの感染率を向上させるクリティカルポイント設定による対処法を見出した。そして、最終的に、この両者を組み合わせることで、カイコ蛹を寄主とした場合のサナギタケの大量生産のフローを提案した。

さて本研究では、森林生物資源としてのサナギタケと宿主カイコの融合分野を目指す必然性が重要と考えた。わが国のブナ林で大発生する害虫ブナアオシヤチホコ (*Suntypistis punctatella*) に寄生するサナギタケは、周期的に変動するブナアオシヤチホコの大発生に密接に関連している。すなわち、ブナアオシヤチホコが大発生した際には、9割の蛹にサナギタケが寄生し、これが要因となり翌年のサナギタケの密度は抑制されると考えられている(鎌田, 2006)。

一方で、林業関連者は、このブナアオシャチホコが大発生した際のサナギタケを滋養強壮剤として活用している（座談会ブナ植樹を検証するより，2004）．すなわち，わが国におけるブナ林を巡る周期的な大発生とそれを制御する寄生糸状菌のサナギタケの密度変動の関連性以外に，森林における貴重な薬用生物資源の存在を提示するものである．カイコを宿主としたサナギタケの大量生産の実現を通じて，わが国における森林資源の多面的な営みに対する理解が深まることを期待したい．

付表 1. 本論文で取り上げている冬虫夏草の和名、学名、及び宿主

和 名	種 名	宿 主
シネンシストウチュウカソウ	<i>Ophiocordyceps sinensis</i> (Berk.) G.H.Sung, J.M.Sung, Hywel-Jones & Spatafora.	コウモリガ類, <i>Thitarodes</i> 属の幼虫
サナギタケ	<i>Cordyceps militaris</i> (L.) Fr.	ガの蛹, 幼虫
ハナサナギタケ	<i>Isaria japonica</i> Yasuda	ガの蛹, 幼虫

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり，終始懇切なるご指導やご鞭撻を賜った岩手大学連合農学研究生物資源科学専攻・生物資源利用学連合講座の主導教員である小藤田久義博士に深甚なる感謝の意を表します．

また，何かと親身にご相談に乗って頂き，ご指導を賜った，岩手大学研究推進機構副機構長教授の対馬正秋博士，旧農学部学術研究員（現西澤国際特許事務所）の山本圭一郎博士には心よりお礼申し上げます．

さらに，実験を進める上で，多大なるご協力を頂いた株式会社にはらは総合研究所 佐伯潤代表取締役，板垣敬司取締役，草田真吉元社員，三家本利之社員に心よりお礼申し上げます．

最後に，暖かく励まして頂いた応用昆虫学研究室諸氏，本課程への社会人入学をするにあたりわがままを受け入れてくれたBS国際特許事務所所員，そして家族に深く感謝いたします．



## 第一章 サナギタケ感染率向上のための寄主昆虫蛹の羽化抑制

### I. 研究目的

サナギタケ (*Cordyceps militaris*) の生産の多くは、昆虫原料を一部添加するのみで穀類素材を主成分とした人工培地で子実体を形成しているが、寄主昆虫を使用して子実体を形成する場合もある。しかしながら、子実体の遺伝子解析では、両タイプは異なることが報告されている (Xiong *et al.*, 2010).

サナギタケの培地として寄主昆虫を用いる場合には、大量飼育の技術が確立しているカイコが適しているが、幼虫期よりも蛹期の方が感染率が高いこと、また感染方法としては、散布や浸漬に対して注射による方法が極めて優れていることが報告されている (Chen and Ichida, 2002). 感染方法として、噴霧方法では十分な感染率を得ることができず、注入接種が極めて有効であることは、韓国においても報告されている (Hong *et al.*, 2010). しかし、カイコ蛹の体内に分生子を注入接種する方法は、散布や浸漬と比較して作業時間を要する。

一方カイコ蛹は、上族後 7 日まで、蛹の体表面は柔らかく傷つきやすく、早期収穫は鼻つき繭の発生要因となるため、収穫作業を行うべきではないとされている (図解養蚕, 1995). そのため、収穫作業は、上族後 8 日に行われるが、冬虫夏草の生産作業においても上族後 8 日より早く作業を行うとカイコは傷つき致死するため培地として用いることができない。

羽化は、上族後 15 日であるが、上族後 7 日から中腸プロテアーゼが上昇しはじめ、また卵巣ビテロジェニン量が急激に増加するなど、上族後 8 日からは、蛹体内では大きな変態が生じることが報告されている (Yamashita and

Hasegawa, 1974). すなわち、冬虫夏草の生産を行う上で、カイコ蛹の体内に分生子を注入できる期間は、極めて限られてしまう。従って、発育が進んだカイコ蛹の羽化を抑制し、接種可能な期間を延ばすことが、サナギタケの量産において極めて重要である。

昆虫に対する麻酔方法として、冷蔵麻酔とともに炭酸ガス麻酔を用いることが知られている (Sillans and Biston, 1979; Branscome and Koehler, 2005)。冷蔵麻酔の場合は、体内の細胞・血液・組織・器官まで低温処理による影響を及ぼすが、炭酸ガス麻酔の場合は、一時的な発育停止と考えられている。

Martin *et al.* (1961) は、ニクバエ及びアズキゾウムシに対して 10 分~180 分間炭酸ガス麻酔を行い、アズキゾウムシは 180 分でも影響が生じないが、ニクバエは 180 分で死亡することを報告している。チャバネゴキブリにおいて、70 % 濃度の炭酸ガスを 3 分間ずつ複数回 (6~14 回) 麻酔を行い、幼虫期の麻酔では齢数の増加と幼虫期間の延長が報告されている (田中, 1982)。ヨツモンマメゾウムシの成虫に対して、100 % 濃度炭酸ガスで 30~32 分間麻酔処理したところ、産卵数が明らかに減少することが確認されている (Dawson, 1995)。また、幼虫のショウジョウバエにおいて 100 % 濃度の炭酸ガスで 10 分間処理したところ、中枢神経系に作用し心臓停止が誘導された (Bardre *et al.*, 2005)。

昆虫における炭酸ガス処理は、一種の殺虫手段としても使用されている。クリの害虫クリシギゾウムシでは、炭酸ガスとともに、加圧法 (3 MPa) を併用した殺虫方法が報告されている (宮ノ下, 2007)。またコナナガシנקイに対して、30~60 % 濃度の炭酸ガスで 1~3 日間燻蒸処理することで高い殺虫効果があり (木村, 1991)、ショウガ根茎に被害を及ぼすショウガクロキノコバエに対しては、20~60 % 濃度で 24 時間の燻蒸で 100 % の殺虫効果が確認されている (小山,

2007). 以上のように、昆虫体に対する炭酸ガスは、短時間で一時的な動作停止を伴う麻酔作用のみならず、長時間処理では殺虫作用も誘導する。

サナギタケの大量生産を目指して、寄主昆虫のカイコに対する炭酸ガス処理はまったく見当たらない。本研究では、サナギタケの注射による感染効率の高い時期がカイコ蛹発育の前半に集中しているために (Chen and Ichida, 2002; Sato and Shimazu, 2002)、大量生産の障害となるこの限定的な感染時期を克服することを目的とした。カイコの発育と呼吸量の関連性については、幼虫期の眠中には低下し、さらに老熟幼虫が吐糸して営繭する時期以後（上族後）から漸次呼吸量は低下し、蛹化の前期から中期にかけて最低になることが知られている (森, 1970)。

そこで本研究は、サナギタケの接種時期と呼吸量の低下がオーバーラップしていることに着目して、この接種時期に炭酸ガス処理を導入することで接種時期の延長を試みることにした。

## II. 材料及び方法

### 1. 炭酸ガス麻酔を使用したカイコ蛹発育実験

#### 1.1 供試昆虫カイコ

普通カイコ品種のぐんま 200 は，群馬県蚕糸技術センターにおいて全齢人工飼料育されたものを購入した．

#### 1.2 炭酸ガスによる麻酔処理

炭酸ガスは，実験用二酸化炭素（炭酸ガス）（Net, 580 mL; Gas, 48 × 104 個/mL (1 atm); Purity, 95 % 以上）（日酸 TANAKA 株式会社）を使用した．

容器内空間が 550 cc の容器を用い，容器内に蛹 30 頭を入れた．容器には 2 箇所の孔を空け，一方から炭酸ガスを注入し，他方から容器内空気を排出し，排出空気の炭酸ガス濃度が 85 % 以上となったところで容器の孔を封止した．容器は，密封後 2 日と 3 日経過後に開封し，生存数を確認し眼点形成までの日数を調査した．開封後は，対照区と同様に通常環境下で保存した．また生存の確認は，蛹の動きを観察することで行った．

対照区として，炭酸ガス麻酔の実験区と同様の容器を使用し，通常の開放状態で蛹 30 頭を保存した．

#### 1.3 冷蔵による麻酔処理

多くの研究室では、昆虫の麻酔処理として、炭酸ガス以外に、冷蔵、エーテル、窒素ガスを使用している (Sillans and Biston, 1979; Branscome and Koehler, 2005). そこで本研究では、炭酸ガス麻酔処理との比較のために、5 °C による冷蔵処理も行った. 上記同様の容器 (550 cc) に 30 頭の蛹を入れて 5 °C で保存した. 容器は、5 °C 設置 2 日と 3 日経過後に 25 °C に移動し、生存数を確認し眼点形成までの日数を調査した. 移動後は、対照区と同様に 25 °C で保存した. また生存の確認は、蛹の動きを観察することで行った.

## 2. 炭酸ガス麻酔を使用したサナギタケ感染実験

### 2.1 供試昆虫カイコ

実用品種の 1 種 (春嶺×鐘月) は、愛媛蚕種株式会社 (愛媛県八幡浜市) で人工飼料 (日本農産工業株式会社) を用いて 4 齢まで飼育し、5 齢期は桑葉を使用し株式会社にはら総合研究所 (島根県津和野町) で飼育された.

### 2.2 サナギタケの培養と接種実験

サナギタケ (*C. militaris*, NBRC No. 100741) の培地は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (千葉県木更津市) から購入した. カイコ乾燥蛹 50 g を 400 mL の蒸留水で 60 分間煮沸し、この煮沸液 200 mL と 20 g の寒天を混合し、10 mL 混合物を試験管に分注し、121 °C で 40 分間高圧滅菌処理した. 各試験管にサナギタケ培地を植菌し、25 °C で 35 日間培養し、ここから分生子及び短菌糸を得て、蒸留水で接種濃度を  $8 \times 10^4/\text{mL}$  に調

整した．Sato and Shimizu (2002) または Chen and Ichida (2002) の方法に従って，各ステージの蛹の環節間膜を通じて接種懸濁液 50  $\mu$ L を注射した．

### 2.3 炭酸ガス発生装置

商業用，食品用，または工業用の炭酸ガスが，炭酸ガス麻酔に用いられている (Newton, 1993; Branscome and Koehler, 2005)．便宜的で効果的な方法を参考にして (上村ら, 1972; 早川ら, 1986), 4 台の麻酔装置 (1 台の装置容量は 114 L: 440 mm  $\times$  740 mm  $\times$  350 mm) に 4 本のチューブで接続した炭酸ガス発生装置 (11 L, 250 mm  $\times$  300 mm  $\times$  150 mm) を設置した．この炭酸ガス発生装置に，固体の炭酸ガス (ドライアイス, 株式会社大陸) を設置した (第 1 図)．ドライアイスから発生する炭酸ガス (3 kg/ 日) を麻酔装置に連続供給し，高濃度ガス検知器 (XP - 3140, 株式会社レックス) で濃度を測定した．また，麻酔装置の上方 80cm に炭酸ガス発生装置を設置し，85 % 以上の濃度で一定のガスが供給できるように工夫した．さらに，流動する炭酸ガスが室温になるようにチューブを長くし，炭酸ガスが高濃度を維持したまま通気するように麻酔装置の蓋に小孔を確保した．

### 2.4 冷蔵麻酔処理

上記のように，炭酸ガス麻酔と同じように冷蔵麻酔が使用されていることから，比較実験のために 5  $^{\circ}$ C での麻酔実験を独立に設定した．

## 3. 炭酸ガス麻酔と冷蔵麻酔の実験スケジュール

炭酸ガス麻酔のために、上族後 8 日の蛹を繭から取り出し、眼点期に達しているステージのものを使用した。各実験区で、200 頭のカイコを無作為に抽出し、1~5 日後に接種するように 5 つのグループに分けた ( $n = 40$ , 第 2 図)。対照区として、25 °C で通常環境下で保存したものを使用した。第 2 図に示したように、炭酸ガス麻酔を 2 日間処理した後は、対照区と同様に通常環境下に移動した。なお、羽化については 25 日間記録し、各実験は 6 回繰り返した。

一方、比較実験に使用した 5 °C による冷蔵麻酔は炭酸ガス麻酔同様に行い、対照区も 25 °C で継続し、羽化についても 25 日間観察した (第 3 図)。なお、各実験は 3 回繰り返した。

#### 4. 大量処理に向けた炭酸ガス麻酔装置

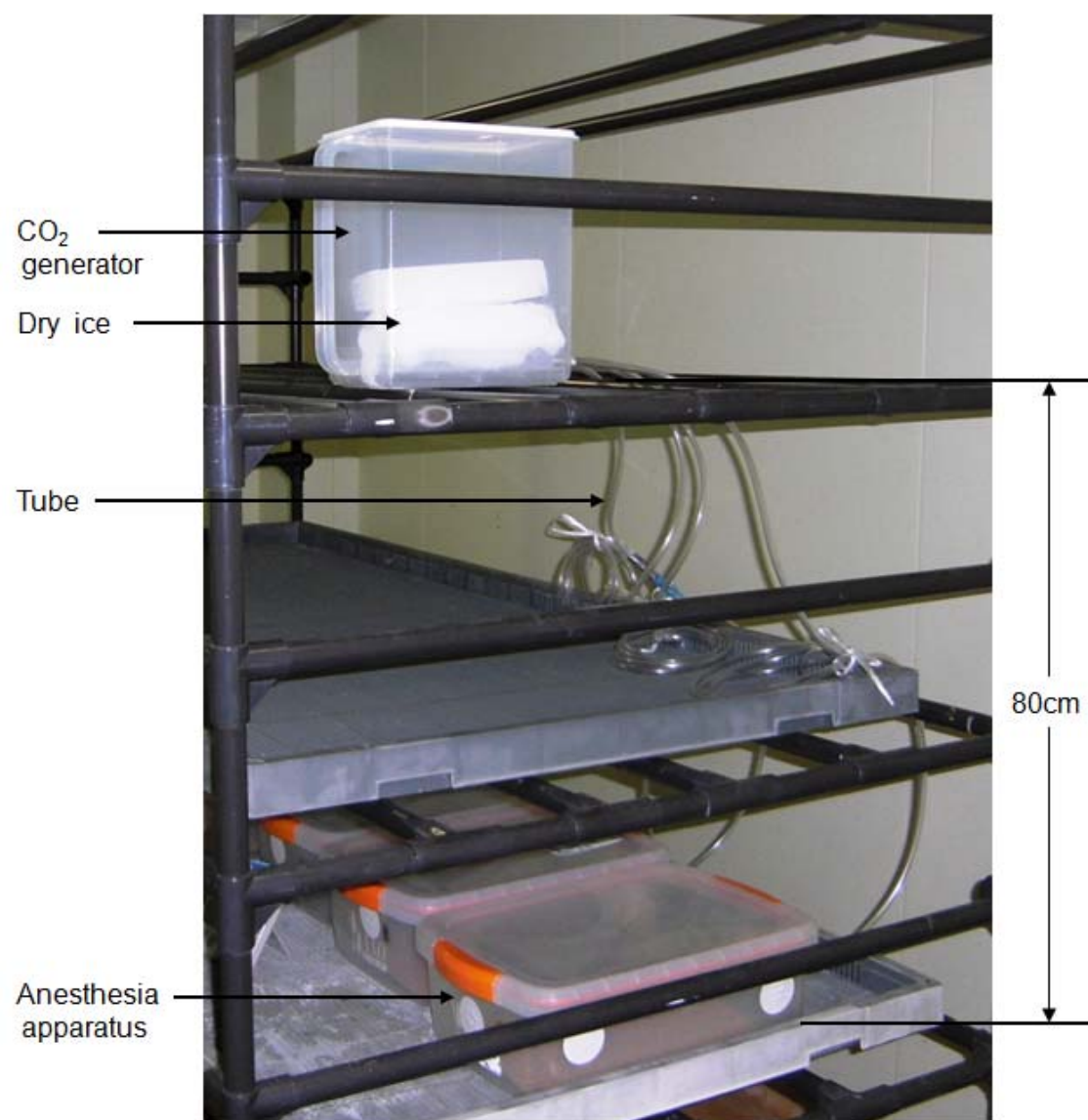
第 4 図には、炭酸ガスポンプを用いた量産型装置の概略構成を示した。30 kg の炭酸ガスをレギュレータから 2 分岐し、それぞれに直列に麻酔容器を併設した。最下流側の麻酔容器には、排出用孔（エアー抜き孔）を設けた。炭酸ガス流出を 1 L/min とすることで、4 連結の最下流の麻酔容器で濃度 65 % を維持し、連続運転で 54 時間炭酸ガスを供給することができる。

#### 5. 統計解析

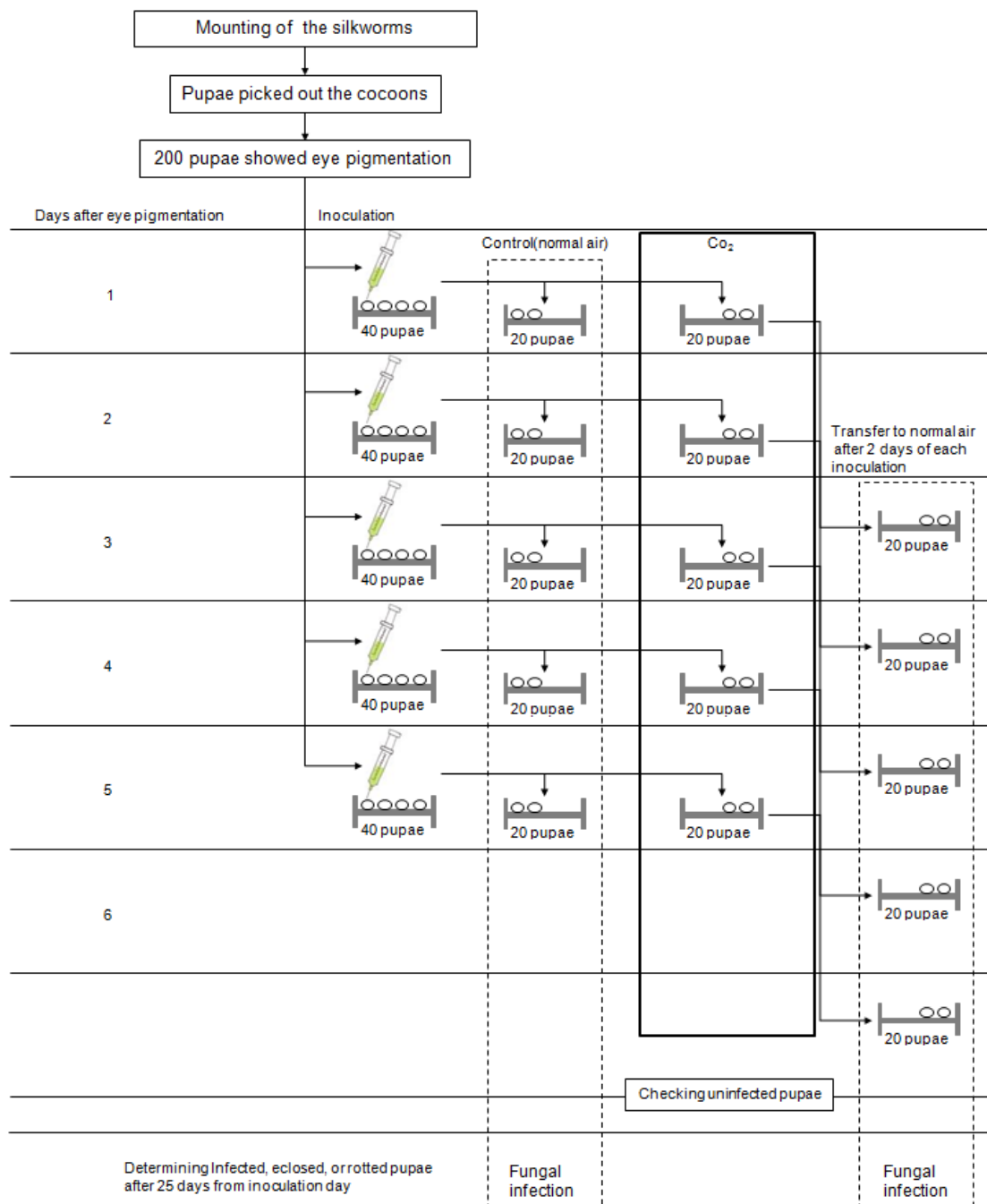
炭酸ガス麻酔におけるデータは Dunnett test に従った ANOVA により分析した。冷蔵麻酔におけるデータは Student t 検定により分析した。羽化につい

てのデータは Kaplan - Meier 法（故障率プロット）により分析した．  $P < 0.05$  の場合，有意差があったとした．

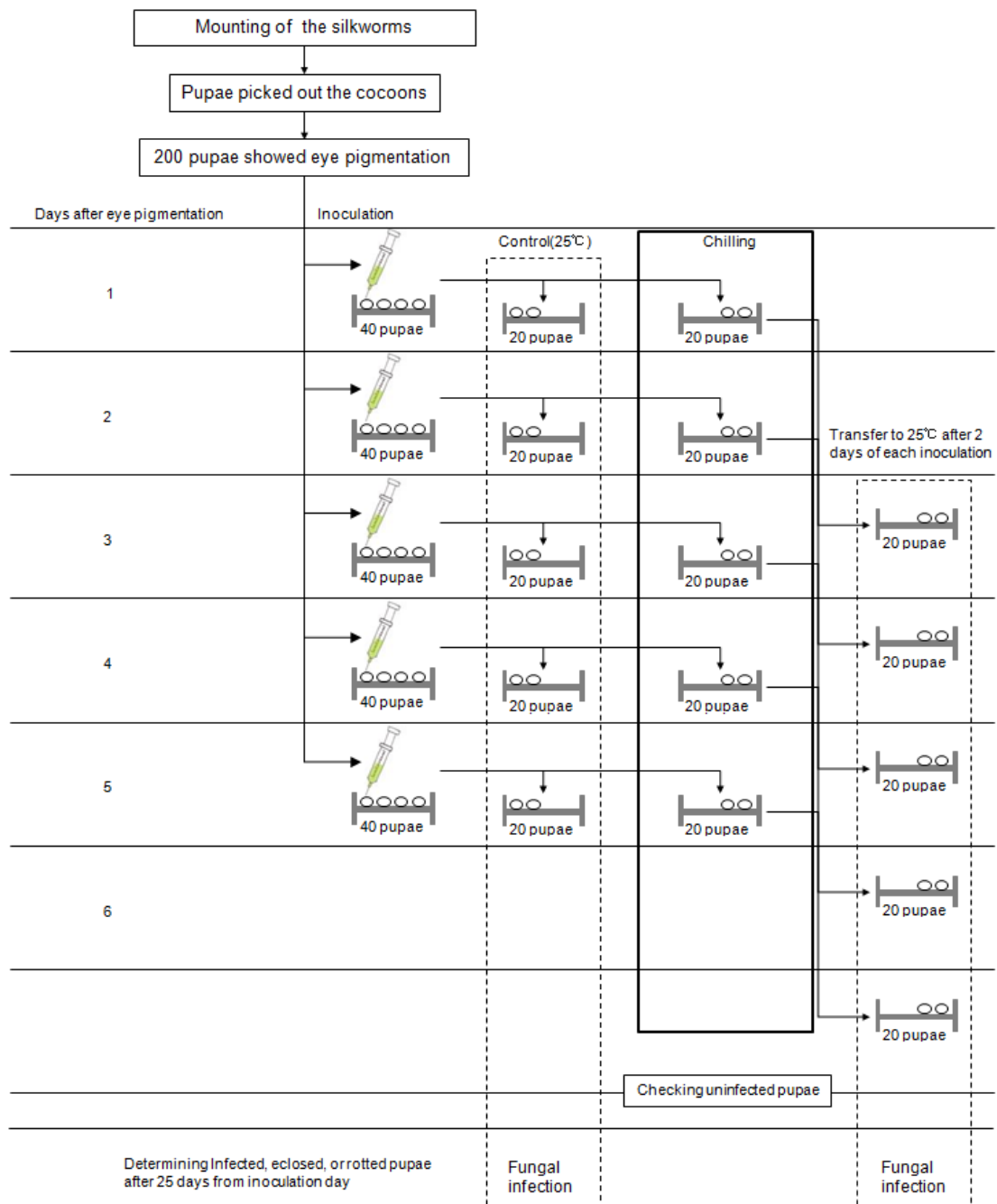




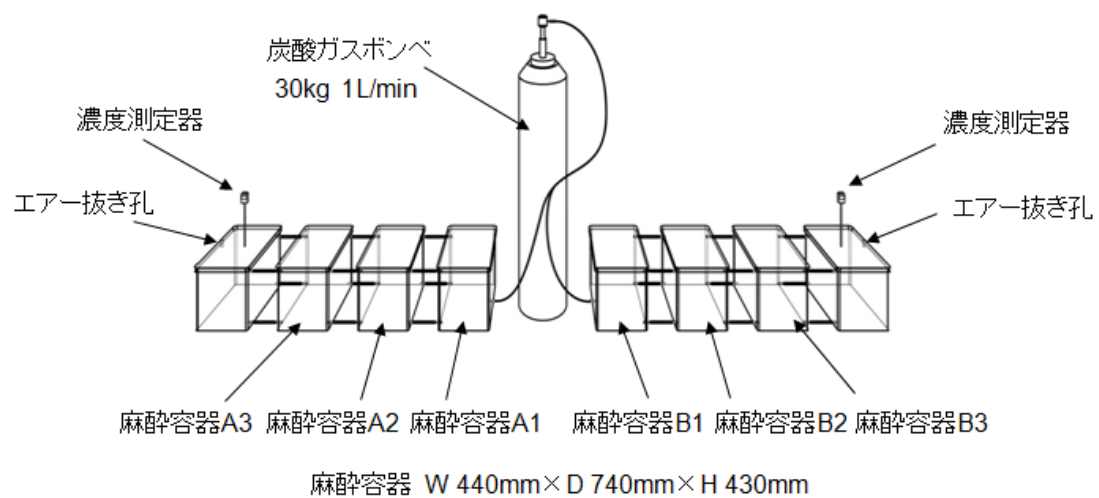
第 1 図 炭酸ガス発生装置と麻酔装置. 詳細は材料と方法を参照.



第2図 炭酸ガス麻酔処理の実験スケジュール（各200頭の蛹を用いて6回の実験）



第3図 冷蔵麻醉処理の実験スケジュール（各200頭の蛹を用いて3回の実験）



A, 概略図



B, 炭酸ガスボンベ

第4図 炭酸ガスポンベを用いた量産型装置の概略

### III. 結果

#### 1. 炭酸ガス処理がカイコ蛹発育に及ぼす影響

最初に、上族後 8 日の蛹における 2 日間の炭酸ガス処理がカイコ蛹発育に及ぼす影響を検討した。比較のために、冷蔵麻酔を使用した。その結果、第 5 図に示したように、対照区に比較して、何れの処理でも眼点形成までの日数は延長した。なお、死亡する個体は確認されなかった。

次に、同様の方法で 3 日間の処理を施したところ、第 6 図に示したように、炭酸ガスと冷蔵の両処理ともに、2 日間の処理と同様の傾向を示した。またこの場合でも、死亡する個体は確認されなかったことにより、2~3 日間の炭酸ガスと冷蔵による麻酔方法は、次のサナギタケ感染実験において問題がないと判断された。

#### 2. 炭酸ガス麻酔がサナギタケ感染に及ぼす影響

炭酸ガス麻酔により、蛹発育が遅延するだけで死亡する個体は認められなかったことから、感染実験においては 2 日間炭酸ガスに暴露することで検討した。

その結果、眼点形成後に対照区として通常環境下で蛹を保存した場合（対照区）は、蛹発育が進むとともに感染率は減少した（第 7 図）。対照的に、炭酸ガス麻酔させたほとんど全ての蛹は眼点形成日からの経過日数にかかわらず感染し、感染率は高いレベルをキープした。特に、眼点形成後 4 日と 5 日に接種した場合には、それぞれの感染率は対照区に比較して著しく高かった（4 日で\*\*\*  $P < 0.001$ , 5 日で\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ）。

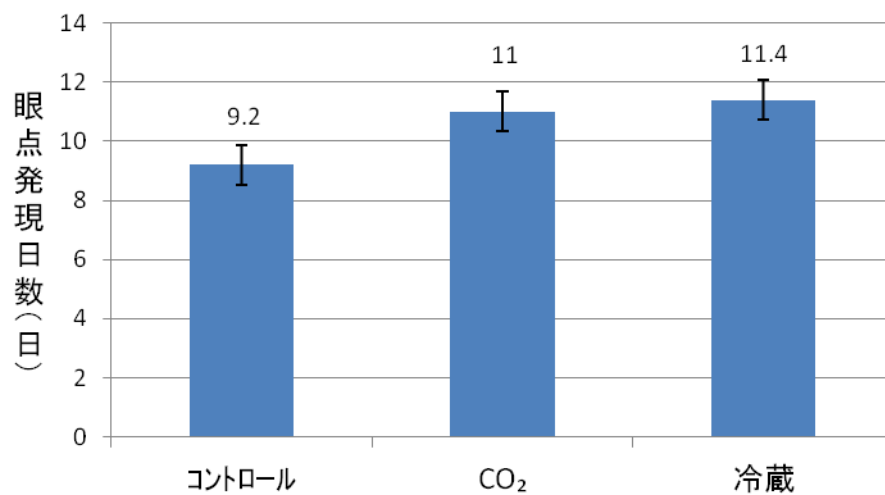
対照区の 600 頭の蛹の内、47.4 % は羽化し、12 % は腐敗し、残りの 40.6 % はサナギタケに感染していた。一方、炭酸ガス麻酔処理した 600 頭の蛹では、1.7 % だけが羽化し、腐敗は 2.5 % であり、感染率は 95.8 % の高いレベルを示した。また、感染したすべての個体からサナギタケの子実体を含む子座（ストローマ）が形成され、対照区で形成された子座と形態上違いは確認されなかった（データ省略）。

以上の結果から、蛹の眼点形成日後に接種しても炭酸ガス麻酔処理を行うことで、高い感染率を維持することが明らかになった。

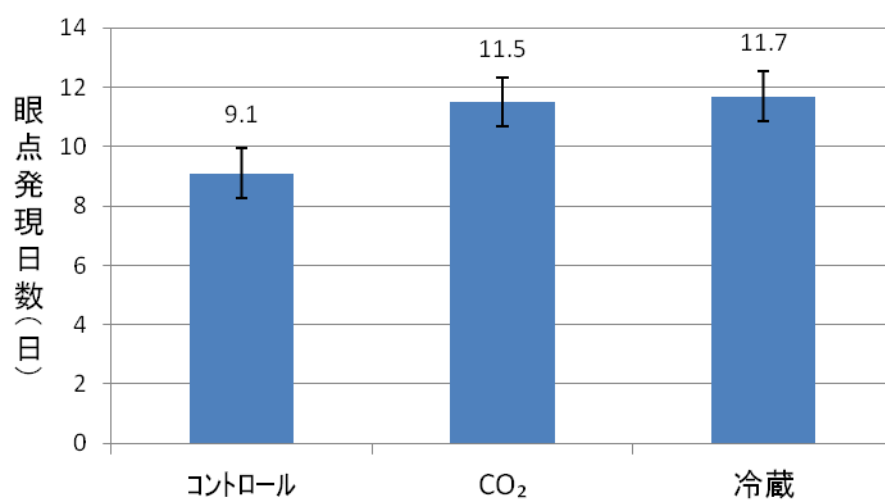
### 3. 冷蔵麻酔がサナギタケ感染率に及ぼす影響

上記の炭酸ガス麻酔と同様に、2 日間 5 °C で冷蔵麻酔処理を行い、眼点形成後 5 日間接種を試みたが、対照区の感染率とほとんど同じ傾向であった。すなわち、第 8 図に示したように、蛹発育が進むとともに両方で感染率の減少が認められた。300 頭の冷蔵麻酔では、47.3 % が羽化し、7.0 % が腐敗し、45.7 % が感染していた。

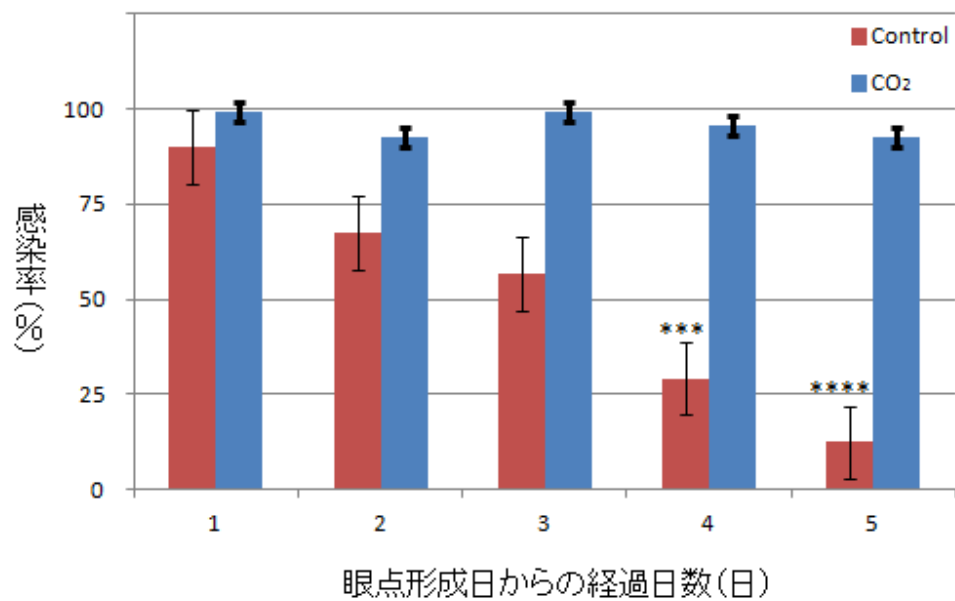
以上の結果から、冷蔵麻酔の場合、カイコ蛹発育は炭酸ガス麻酔と同様に 2 日間遅延するが、サナギタケ感染においては効果的でないことが明らかになった。



第5図 2日間の炭酸ガス麻酔及び冷蔵麻酔が蛹発育に及ぼす影響  
各実験で30頭使用した。



第6図 3日間の炭酸ガス麻酔及び冷蔵麻酔が蛹発育に及ぼす影響  
各実験で30頭使用した。



A



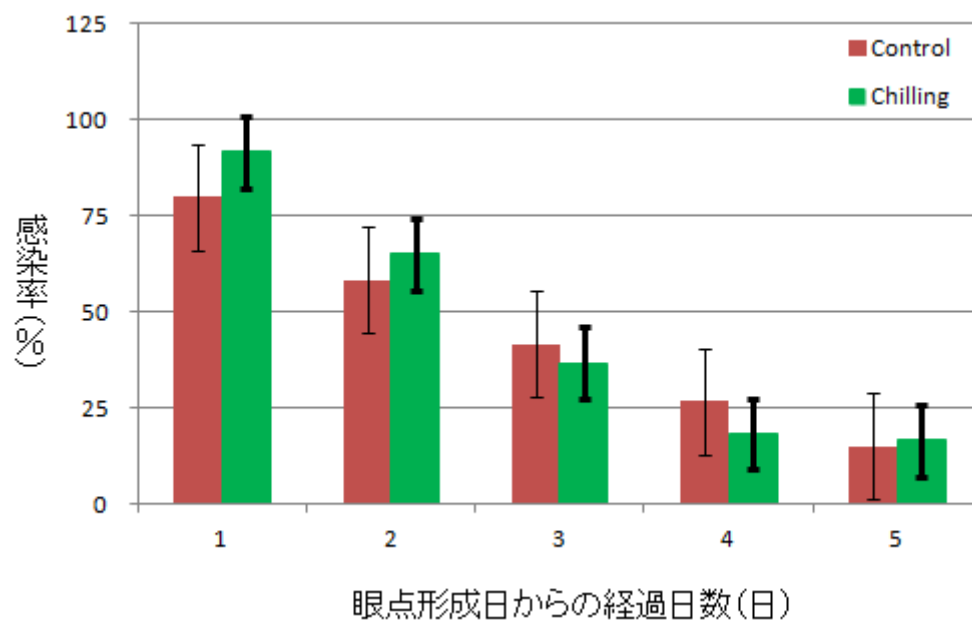
B

#### 第7図 炭酸ガス麻酔がサナギタケ感染率に及ぼす影響

A, 第2図に示した方法で接種実験を行った. 接種後25日に評価した. 平均値  $\pm$  標準誤差 ( $n = 200$ ) (6回の実験の繰り返し). \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

B, 炭酸ガス麻酔処理した接種後31日に観察されたサナギタケの子実体の一部の写真 (スケールバー = 1 cm)





第8図 冷蔵麻醉がサナギタケ感染率に及ぼす影響

第3図に示した方法で接種実験を行った．接種後25日に評価した．平均値  $\pm$  標準誤差 (n = 200) (3回の実験の繰り返し)．

## IV. 考 察

本研究で使用した炭酸ガスは、使用上規制強化されている臭化メチル燻蒸剤に変わる代替防除剤として、害虫やダニに対する殺虫効果を目的として使用されている (Newton, 1993). 例えばアザミウマ類 (Seki and Murai, 2012), ヨツモンマメゾウムシ (Cheng *et al.*, 2012), モモシンクイガ・ナシシンクイガ・ナミハダニ (土田ら, 2011) に対する高濃度炭酸ガス燻蒸効果が評価されている. 一方では, 炭酸ガスによる麻酔効果を利用して, ショウジョウバエやチャバネゴキブリの昆虫体を速やかにノックダウンし, 通常の空気圧下での回復, 行動, 摂食, 死亡率などへの影響が解析されている (Bardre *et al.*, 2005; Branscome *et al.*, 2005).

しかし本研究ではこの炭酸ガスを利用して, 寄主昆虫であるカイコ生存中の蛹にサナギタケを接種する場合, これまでの蛹発育の限定期間を眼点形成期から 5 日間延長することに成功した. この延長はサナギタケの感染効率を高く維持しながら接種の作業工程の軽減化をもたらすことであり, 大量生産の道を切り開く重要な意味を持つものである. しかしながら, 実験的に炭酸ガスと同じように使用される冷蔵麻酔では, 2 日間の暴露ではまったくサナギタケの感染効率の維持に作用せず, 無処理の対照区と同様にサナギの成虫化とともに感染率は減少するのみであった.

それでは, 寄主であるカイコ蛹の発育⇒サナギタケ分生子接種⇒炭酸ガス麻酔⇒高感染率の維持のメカニズムは, どのように考えられるだろうか. 例えば, ショウジョウバエの幼虫における炭酸ガス麻酔は, 背脈管の拍動停止, そして運動神経末端部から放出される神経伝達物質のグルタミン酸への神経筋接合部における感受性低下によって引き起こされていると考えられている (Bardre *et*

*al.*, 2005).

すなわち、これらの急速な反応は中枢神経系の介在よりも、翼状筋における直接的な運動神経末端部の介在である。また、コドリング (*Cydia pomonella*) の幼虫では、低濃度の酸素分圧が ATP 合成を阻害し、高濃度の炭酸ガス分圧は ATP 利用を抑制することが明らかにされている (Neven and Hansen, 2010)。さらにチャバネゴキブリ成虫では、短時間 (5 分) 炭酸ガス麻酔すると、回復に 48 時間経過した成虫では、24 時間で回復したタイプに比較して、摂食量も多く寿命も短縮した (Branscome *et al.*, 2005)。このように昆虫種及びステージの違いにより、行動から生理学的な反応まで異なるものと推定される。

チョウ目のカイコに関する古典的な研究では、炭酸ガスは幼虫に対して背脈管拍動の減少と行動の停止を誘導し (Sillans and Biston, 1979)、幼虫と蛹において外皮を浸透することが明らかにされている (Ito, 1953)。また多くのチョウ目の蛹のように、蛹発育 - 成虫化発育期にかけて一旦呼吸量が低下し、その後上昇する典型的な U 字カーブを示すことが知られている (森, 1970)。

以上のこれまでの知見から、本研究で着目した蛹の眼点期における生理学的なバックブランドについては、呼吸量は低レベルで ATP 生産は減少し、ATP 利用も抑制されており、背脈管の拍動も極端に低いと考えられる。本研究では、この低代謝レベルを標的として炭酸ガス麻酔を施したことに特徴が認められる。しかも、5 分～数時間のような生理学的な研究上の炭酸ガス麻酔に比較して、2 日間は長期間であり、むしろ昆虫体にとって殺虫性が危惧される。従って、本研究で着目したカイコ蛹の眼点期に炭酸ガス麻酔を施したことは、長期間に渡り低代謝レベルを維持することに成功したことを意味する。

一方、寄生者であるサナギタケの侵入感染の成立のメカニズムからすれば、

1) サナギタケの子嚢菌の菌糸がカイコの外皮から侵入する経路がある。しかし、

本研究の場合は、体腔内への注射接種であることから、この外的免疫機構は成立しないことになる（和田・佐藤, 2013）。次に、2) 内的免疫機構が介在する。すなわち、本研究では、注射接種による感染であることから、寄主側の液性免疫反応と細胞性免疫反応を突破することで最終的に感染を達成することができた。昆虫外皮を経ることなく、糸状菌の子嚢菌が直接体腔内に侵入し多くの分子レベルのカスケードの引き金を引きながら一連の生体防御反応を回避して、宿主側では体腔内に短菌糸が蔓延する前に致死すると考えられている（和田・佐藤, 2013）。

これまで多くの昆虫病原糸状菌は、糸状菌と宿主害虫の相互作用から微生物殺虫剤までを出口として研究開発されてきた（Hajek and Leger, 1994）。一方では、中国・韓国・ネパールなどが中心となり、サナギタケを健康薬理素材として、宿主範囲・培養条件・遺伝子に関する多くの研究が蓄積されている（Shrestha *et al.*, 2012）。そこで昆虫糸状菌を巡る世界的な二つの流れの中で、本研究成果としては、後者の方向性でサナギタケの大量生産を目指してカイコ蛹における効率的な感染法を提案することができた。もう 1 つのベクトルとして、炭酸ガス麻酔下でのサナギタケの感染メカニズムという新しい課題も提案している。すなわち、昆虫蛹において成虫化が進めば、注射接種においても宿主の内的免疫機構を突破することができないが、宿主を炭酸ガス麻酔下でその発育を停止すればこの内的免疫機構を回避することができる。本研究で提案できる宿主の炭酸ガス麻酔下における糸状菌の感染効率化は、感染メカニズムを解析するための新しい実験ツールになるかもしれない。

## V. 摘 要

わが国における森林生物資源の 1 種であるサナギタケ (*C. militaris*) は、生態系におけるバイオマスとしての役割を果たしているだけではなく、中国・インドなど採取される希少種のコウモリガ類に寄生するシネンシストウチュウカソウ (*Ophiocordyceps sinensis*) の代替薬理素材として、多くの研究蓄積がある。特に社会的なニーズに応えるために大量生産が試みられており、カイコを宿主昆虫としたサナギタケ接種による試験研究が報告されている。しかし、その高い感染率は蛹発育の初期に限定されており、成虫化が進むと感染率が減少するために大量生産のための接種作業に困難をきたしていた。そこで、これを克服するために、蛹発育を停止する炭酸ガス麻酔処理に着目して、カイコ蛹発育とサナギタケ感染効率の関連性について解析した。

1. 簡易型炭酸ガス発生装置を製作し、85 % 以上の炭酸ガス濃度下で一度に 200 頭のカイコ蛹を炭酸ガス麻酔処理できるように設置し、この装置で繰り返し麻酔実験を行った。また、この簡易型実験装置から数千頭単位で麻酔処理できる大型炭酸ガス麻酔装置も考案した。
2. カイコ蛹を眼点形成期で揃えて、5 日間に渡りサナギタケの分生子及び短菌糸懸濁液 (50  $\mu$ L) を環節間膜から注射し、その注射接種ごとに炭酸ガス麻酔を 2 日間処理した。この麻酔処理後、通常環境下に戻してその後の感染化を調査した。その結果、5 日間の何れの時期に接種しても感染率は高く維持されほとんどのカイコ蛹は完全に感染することができた。
3. 冷蔵麻酔は炭酸ガス麻酔と同じように使用されていることから、比較検討するために、炭酸ガス麻酔と同様に 2 日間 5  $^{\circ}$ C 処理して、その後の感染率を

調査した。その結果、冷蔵麻醉処理した場合でも連続して通常環境下で保存した対照区と同じように、蛹の眼点形成以後の成虫化が進むとともにサナギタケ感染率は急速に減少した。

以上の結果から、カイコ蛹をサナギタケの宿主として使用し子実体の大量生産を目的とした場合、注射接種期間の延長は宿主昆虫の炭酸ガス麻醉で達成することができた。

## 第二章 サナギタケ感染率向上のための寄主昆虫蛹の腐敗抑制

### I. 研究目的

サナギタケ (*C. militaris*) による体腔内への侵入とカイコ蛹の内的免疫機構による生体防御の攻防期間 (約 3 日) 中に、サナギタケに対して十分な内的免疫機構が勝った場合にはカイコ蛹は羽化し、この逆の場合には、感染が成立する (和田・佐藤, 2013).

ところが、カイコを使用したサナギタケ培養の現場では、この攻防期間中にカイコ蛹が蚕病で死亡すると、寄生者側のカイコサナギタケは感染することなく、最終的には蛹は腐敗してしまう。カイコ蛹の腐敗率は 80 % を越えることもあり、サナギタケの生産に与える比率は大きい。また、腐敗蛹は強烈な腐敗臭が発生するため、作業者に与える苦痛は大きい。さらに、腐敗蛹は数十時間で内部が液状となり潰れやすく、量産工程ではそれぞれのカイコ蛹を個体別に隔離することができないため、早期に除去しなければ、周辺の正常感染蛹にも影響を与えてしまう。従って、サナギタケの正常感染の確定までの期間 (接種から約 1 週間)、腐敗蛹を除去するための作業が必要となる。さらに、前章で明らかにしたように、炭酸ガス麻酔を導入したとしても、サナギタケの接種は羽化までの期間内に行わなければならない、この間に腐敗除去作業が発生することは、接種工程において極めて深刻な事態となる。そこで、カイコ蛹の腐敗の抑制は、サナギタケの量産においても 1 つの大きな課題である。

寄主昆虫を使用して子実体を形成するサナギタケは、昆虫原料を一部添加するのみで穀類素材を主成分とした人工培地で子実体を形成するものと、子実体

の遺伝子産物の解析では異なることが報告されている (Xiong *et al.*, 2010). そして、カイコ蛹に対する感染方法としては、散布や浸漬と比較して、注入接種が極めて感染率が高いことが国内だけでなく韓国においても報告されている (Chen and Ichida 2002 ; Hong *et al.*, 2010).

しかし、注入接種方法では注射針を使用するために、蚕病の代表的な原因となる核多角病ウイルスが感染しやすい状況にある (大日本蚕糸会, 2010).

また、核多角体病ウイルスだけではなく、その他のカイコウイルス (伝染性軟化病、濃核病)、細菌 (細菌性消化器病、卒倒病、敗血症)、糸状菌 (白きょう病、黄きょう病、緑きょう病、こうじかび病)、そして原虫 (微粒子病) による被害の確認も必要になる.

しかしながら、これらの蚕病に関しては、適切な治療剤がないことと、能率的な点で予防が中心となっている (大日本蚕糸会, 2010). そこで予備実験として、接種前のカイコ蛹の体表汚染、接種によるカイコ蛹へのダメージ、及び接種後の環境汚染について検討したが、これらが原因となる相関関係は認められなかった.

すでに新川ら (2004) は、養蚕農家から採取したチリの核多角病ウイルスの検出率と内部汚染繭の発生率には、大まかな相関が認められたことを報告している. 養蚕農家からの搬入繭が予定数より少ない場合には、腐敗が多いという傾向がある. そこで、本章では内部汚染繭の発生率 (不良率) と感染せずに腐敗に至る腐敗率の関連性に着目して解析することにした.



## II. 材料及び方法

### 1. 7 戸の養蚕農家から収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の調査

#### 1. 1 供試昆虫カイコ

普通カイコ品種のぐんま 200 は、群馬県の養蚕農家において桑葉で全齢飼育したものを使用した。

#### 1. 2 サナギタケの培養と接種実験

第一章と同じように、サナギタケ (*C. militaris*, NBRC No. 100741) の培地は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（千葉県木更津市）から購入した。カイコ乾燥蛹 50 g を 400 mL の蒸留水で 60 分間煮沸し、この煮沸液 200 mL と 20 g の寒天を混合し、10 mL 混合物を試験管に分注し、121 °C で 40 分間高圧滅菌処理した。各試験管にサナギタケ培地を植菌し、25 °C で 35 日間培養し、ここから分生子及び短菌糸を得て、蒸留水で接種濃度を  $8 \times 10^4/\text{mL}$  に調整した。Sato and Shimizu (2002) または Chen and Ichida (2002) の方法に従って、蛹の環節間膜を通じて接種懸濁液 50  $\mu\text{L}$  を注射した。

#### 1. 3 不良率（内部汚染）の算出方法

養蚕農家からの繭搬出の際に、2 kg の繭を取り出し、繭数を計測するとともに、内部汚染繭を不良として繭数をカウントした。2 kg 中の内部汚染繭の数と、2 kg の全繭数から、内部汚染繭を不良率として算出した。

## 2. 12 戸の養蚕農家から収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の調査

### 2. 1 供試昆虫カイコ

普通カイコ品種のぐんま 200 は、群馬県の養蚕農家において桑葉で全齢飼育したものを使用した。実用品種の 1 種（春嶺×鐘月）は、島根県及び山口県の養蚕農家において桑葉で全齢飼育したものを使用した。12 戸の養蚕農家から搬入されたカイコ総数は 502,548 頭であり、普通カイコ品種のぐんま 200 は 446,198 頭、実用品種の 1 種（春嶺×鐘月）は 56,350 頭であった。

### 2. 2 サナギタケの培養と接種実験

上記と同じ方法に従った。

### 2. 3 不良率（内部汚染繭，未蛹化個体，軟化病）の算出方法

養蚕農家から繭を搬入した後に、蛹を繭から取り出す作業を行う。この作業時に、内部汚染繭だけでなく、未蛹化個体、軟化病である蛹を、不良蛹として選別し、繭からの取り出し作業での対象数（注射接種可能蛹数＋不良蛹数）を元に不良率を算出した。

### 3. クリティカルポイント設定のための検証実験

#### 3.1 供試昆虫カイコ

普通カイコ品種のぐんま 200 は、群馬県の養蚕農家において桑葉で全齢飼育したものを使用した。18 戸の養蚕農家から搬入されたカイコ総数は 562,499 頭である。

#### 3.2 サナギタケの培養と接種実験

上記と同じ方法に従った。

#### 3.3 クリティカルポイントの設定方法

検証は、全数を対象とした検証の他に、サンプリング検証を行った。全数を対象とする場合には、蛹を繭から取り出す作業日が 1 週間程度ずれる可能性があり、搬入日からの経過日数の影響が考えられる。従って、この経過日数の影響を除くために、同日処理を行えるサンプリング検証を合わせて行った。サンプリング検証では、繭状態で 2 kg を抽出し、この 2 kg について、不良蛹と健康蛹の数をカウントした。不良蛹には、繭中で体液が出ている内部汚染繭の他に軟化病、未蛹化個体を含んでいる。

### III. 結 果

本研究をスタートする前に、予備実験の結果次の点を明らかにしている. 1) 接種懸濁液の濃度による影響を検討したが、カイコ蛹の腐敗に対して濃度の違いによる明らかな違いは認められず、同じ濃度でも腐敗のばらつきは発生していた. 2) 接種懸濁液の注射液量による腐敗発生の違いは認められなかった. 3) 注射接種部位について、頭部から尾部までの各環節間膜を通じて検討した結果、腐敗発生に違いは認められなかった. 4) 注射接種後の環境要因に付いて、特に保存トレイの汚染影響を調査したが、この点にいても腐敗発生原因ではなかった. 5) さらに、注射接種前の蛹の体表における蚕病汚染を考慮して、UV照射とアルコール消毒（70 % エチルアルコール）を実施したが、両処理とも汚染発生の減少には至らなかった.

以上の予備実験から、蚕病による腐敗の原因は搬入されるカイコ蛹がすでに保有している蚕病の可能性が考えられることから、以下の実験を行った.

#### 1. 7 及び 12 戸の養蚕農家から収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の関連性

上記の予備実験から、注射接種後の培養室の環境要因や宿主カイコ蛹の体表汚染によって腐敗が発生していないということが明らかになった. そこで、そもそもカイコ蛹の中にすでにウイルス・細菌・糸状菌などに感染しており、注射接種という工程において、蚕病の拡大が発生していると考えられる.

ここでは養蚕農家別に、接種後の腐敗率を算出し、蛹の不良率と接種後の腐敗率との関係をグラフ上でプロットした. 第 9 図は、横軸を不良率、縦軸を腐敗率として 7 戸の養蚕農家別の不良率と接種後の腐敗率とをグラフ化したもの

である。なお、第 9 図に示すデータは、抜き取り 7244 個サンプル検証であり、内部汚染繭だけに着目し未蛹化個体と軟化病とは不良としてカウントしていない。不良率と腐敗率とは、比例関係ではなく、不良率が 6.0 % を境として、6.0 % 以下では 30 % 程度の腐敗率、6.0 % 以上では 70 % を越える腐敗率となっている。

すなわち、クリティカルポイントが存在し、このクリティカルポイントを下回ると低い腐敗率であるが、クリティカルポイントを越えると高い腐敗率となっている可能性があることが示唆された。

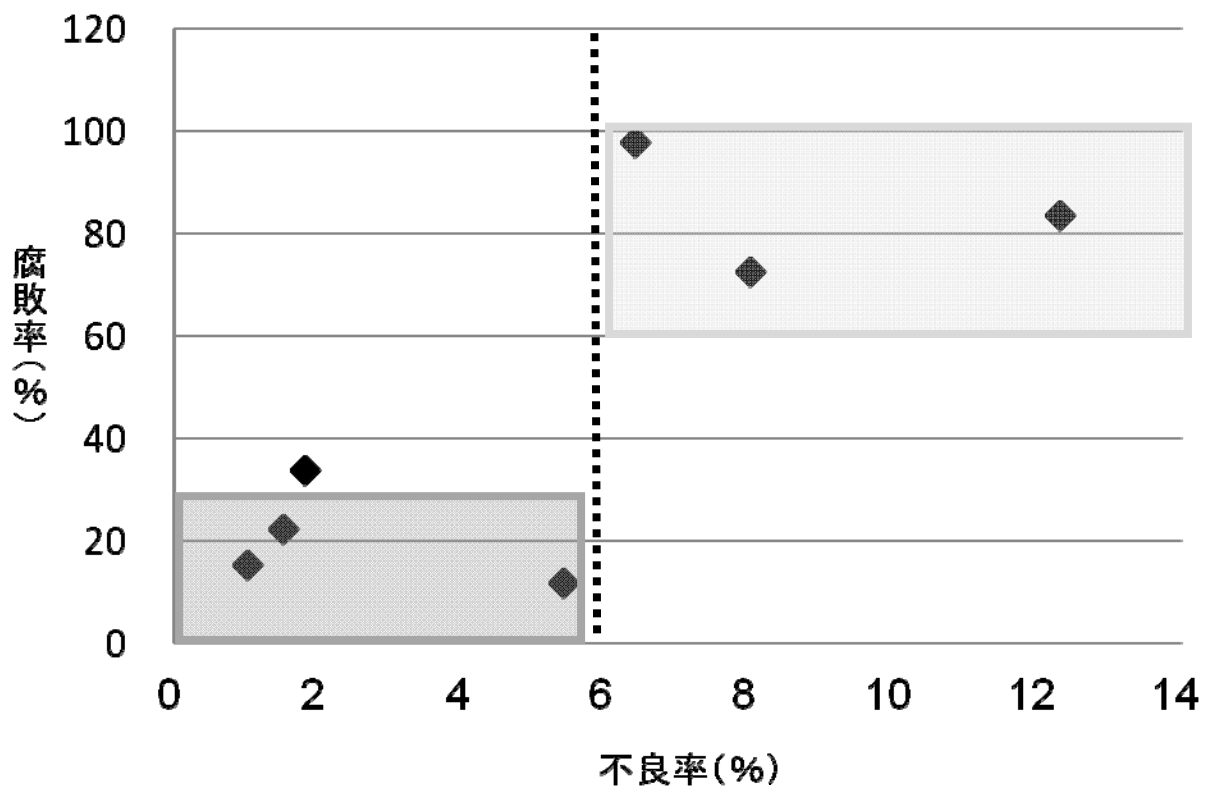
そこで、抜き取りサンプリングではなく 12 戸の養蚕農家からの 502,548 個の全収繭数を検証しながら、不良蛹に関しては内部汚染繭に未蛹化個体と伝染性軟化病（接種までの間に個体が崩れる現象で確認）を加えることにした。その結果第 10 図に示したように、不良率と腐敗率において相関関連は認められず、不良率が 13 % を境界として、13 % 以下では 30 % 程度の腐敗率が発生し、13 % 以上では 70 % を超える腐敗率があると考えられる。

## 2. 18 戸の養蚕農家から収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の関連性

ここではさらに、18 戸の養蚕農家の各農家から 2 kg ずつ収繭し、蛹頭数では 24,161 であり、合計 562,499 頭の蛹数を使用して調査した。その結果第 11 図に示したように、最初に 24,161 頭のサンプリング検証においては、不良率と腐敗率に間に明瞭なクリティカルポイントを見出すことができた。

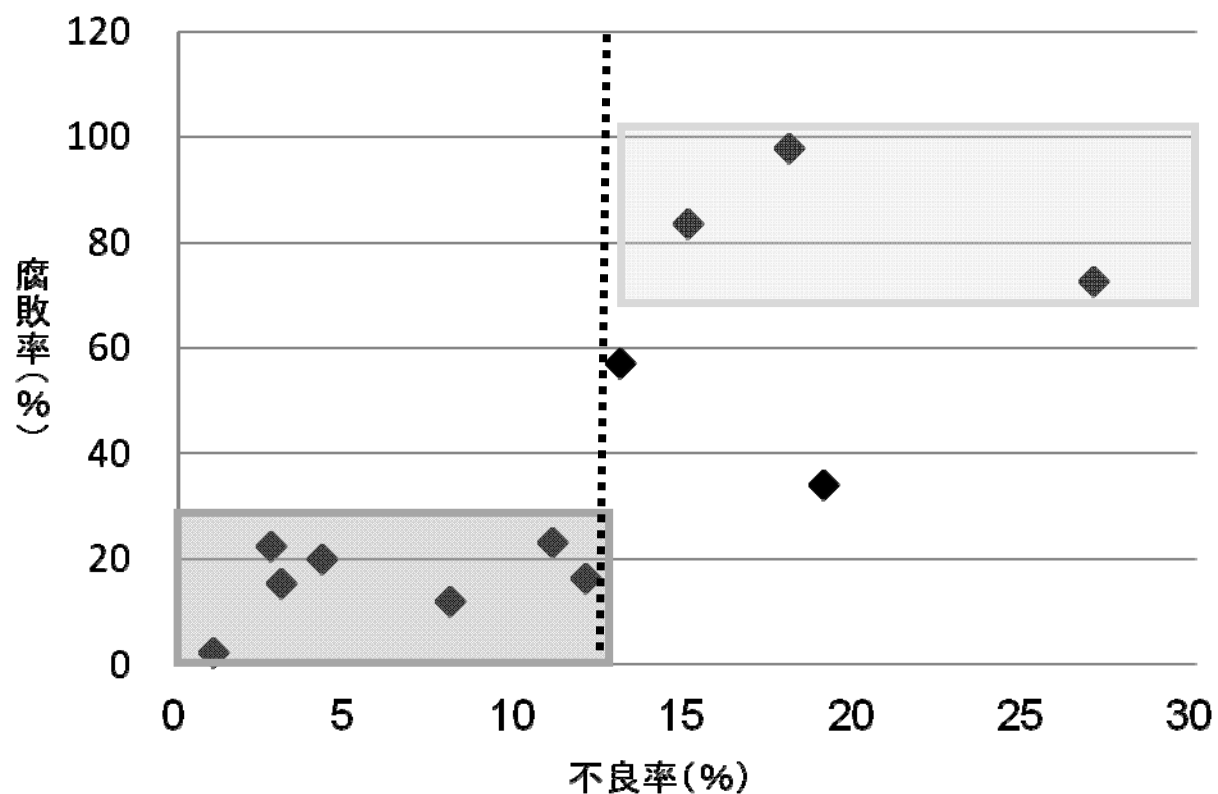
18 戸の養蚕農家から収繭した全ての繭から 562,499 頭の蛹を取り出して、同様に調査した。その結果、第 12 図に示したように、クリティカルポイントが 13 %

付近で認められるが、全蛹を対象とした方で明らかにクリティカルポイントを超えた不良率が、腐敗率の転換に結び付くことを示唆した。



第9図 7戸の養蚕農家における蛹の不良率と接種後の腐敗率の関連性

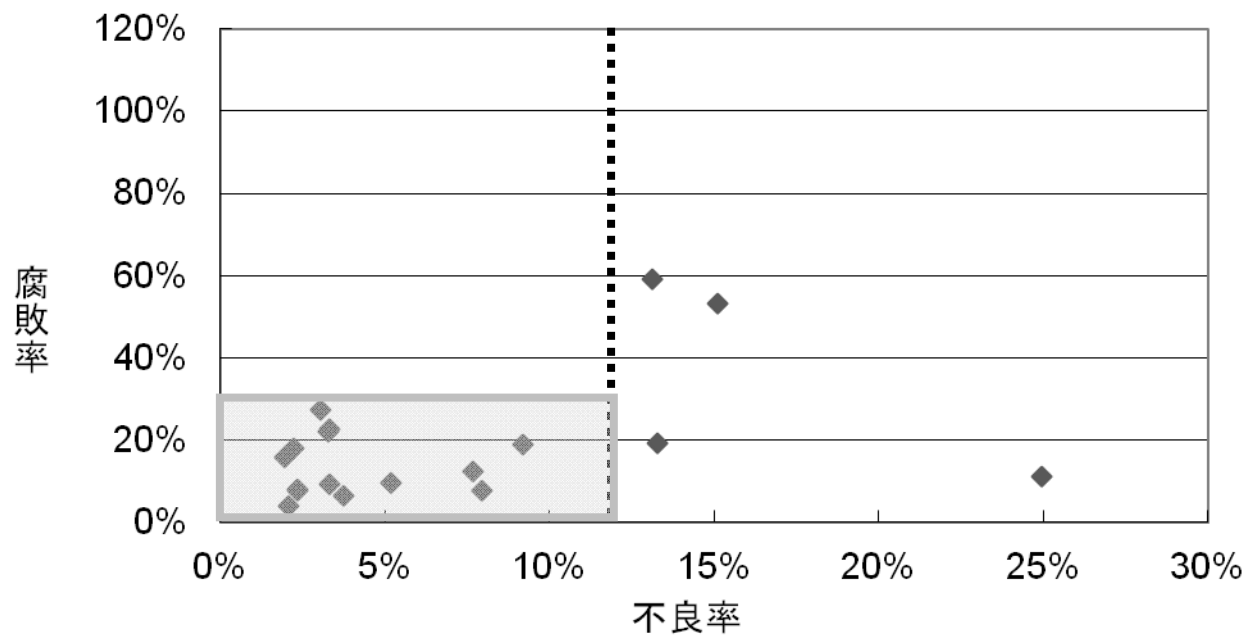
7戸の養蚕農家から抜き取りサンプリングとして各2 kg の繭を収繭し，内部汚染繭を不良蛹数として調査するとともに，合計413,999頭の全体蛹における接種後の腐敗個体数も調査した．横軸は不良率，縦軸は蛹の腐敗率を示している．◆，各養蚕農家からの調査数．



第10図 12戸の養蚕農家における蛹の不良率と接種後の腐敗率の関連性

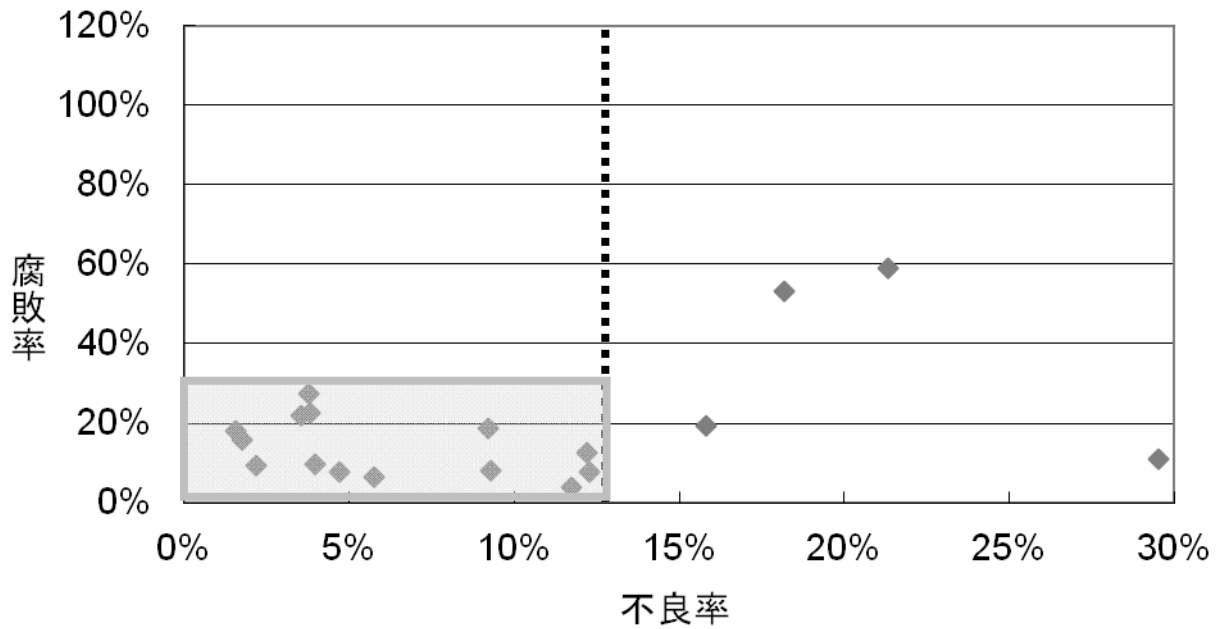
12戸の養蚕農家から全繭を収繭し，内部汚染繭と未蛹化個体と軟化病を不良蛹数として調査するとともに，合計502,548頭の全体蛹における接種後の腐敗個体数も調査した．横軸は不良率，縦軸は蛹の腐敗率を示している．◆，各養蚕農家からの調査数．





第11図 18戸の養蚕農家からサンプリング収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の関連性

18戸の養蚕農家から抜き取りサンプリングとして各2 kg の繭を収繭し，内部汚染繭と未蛹化個体と軟化病を不良蛹数として調査するとともに，合計562,499頭の全体蛹における接種後の腐敗個体数も調査した．横軸は不良率，縦軸は蛹の腐敗率を示している．◆，各養蚕農家からの調査数．



第12図 18戸の養蚕農家から全収繭した蛹の不良率と接種後の腐敗率の関連性  
 18戸の養蚕農家から全繭を収繭し、内部汚染繭と未蛹化個体と軟化病を不良蛹数として調査するとともに、合計562,499頭の全体蛹における接種後の腐敗個体数も調査した。横軸は不良率、縦軸は蛹の腐敗率を示している。◆、各養蚕農家からの調査数。

## IV. 考 察

蚕病として知られている種類には、ウイルス病・細菌病・糸状菌病原虫病などに加えて、ダニ類や化学物質による中毒症がある（大日本蚕糸会編，2010）。第一章の羽化抑制実験においても主たるウイルス病・細菌病による発生の危険性を低くするために、全齢または4齢までを人工飼料を用いて育てた。カイコ蛹に対するサナギタケ感染では、サナギタケに対して十分な内的免疫機構が働いたカイコ蛹は羽化し、逆にサナギタケの侵入感染機構が勝った場合には感染が成立する。

しかし、サナギタケの大量生産を行う上では、現在各地で行われている養蚕によるカイコ飼育を前提としなければならず、ウイルス・細菌類を保有するカイコ蛹を避けることはできないため、カイコ蛹とサナギタケとの間での感染メカニズムの解明だけではサナギタケの大量生産を実現することはできない。

特に、病蚕が死亡した個体が軟化して腐敗する病気を総称して軟化病と呼ばれているが、これには細胞質多角体病・伝染性軟化病・核多角体病のようなウイルス病や、各種細菌病（細菌性消化器病、卒倒病、敗血病）及び糸状菌病（白きょう病、黄きょう病、緑きょう病、こうじかび病）などが含まれている（大日本蚕糸会編，2010）。これらの蚕病に対しては、治療剤による対処法よりも、経営的に予防法が講じられ、蚕室・蚕具・カイコ体の消毒、飼育技術、そして耐病性育種の対策が確立されてきた。本研究の特徴としては、わが国の養蚕農家戸数が最盛期の2,216,602戸から、2004年では1,850戸に減少し（総務省統計局 2004）その後も減少の一途をたどっている中で、現場の7戸、12戸、そして18戸の養蚕農家から収穫した蛹の不良率と接種後の腐敗率を解析した意義は極めて大きいと考えられる。本研究ではこれまでまったく報告された知見がな

く (Shrestha et al., 2012), サナギタケ感染率向上を目的とした宿主カイコ蛹の腐敗防止法を見出すことに成功した。それは、養蚕農家から収繭した抜き取りサンプリングケースならびに全体の蛹の不良率と接種後の腐敗率の解析であり、サナギタケの大量生産において不作の原因となる腐敗蛹発生の抑制策に向けたクリティカルポイント設定を見出すことができた。

従来報告されているサナギタケの分生子の注射接種が効率的と報告されてきたが (Chen and Ichida, 2002; Sato and Shimazu, 2002), しかし、この注射接種ステージは蛹発育の初期に限定されている。これはサナギタケ感染が実験室レベルなら問題ないが、サナギタケの大量生産を前提とした場合、大きな障害となっている。第一章では、注射接種後に宿主カイコ蛹を炭酸ガス麻酔処理すれば、眼点形成後でも 5 日間延長することができ、接種作業の大幅な軽減が期待できることになった。一方で、大きな課題が残されている。それは、注射接種作業を終えた後に発生する腐敗蛹はハードルの高い新たな障害となっている。

生存状態でカイコ蛹をサナギタケの宿主として使用する大量生産システムであって、完全な工業化にまだ遠い現代におけるサナギタケの大量生産においては、養蚕農家から収繭した蛹を使用するという研究は、本研究がはじめてのことである。本研究では、蛹の不良率と接種後の腐敗率の関連性において、明らかにクリティカルポイントの存在が明らかになった。クリティカルポイントの設定で、収繭作業⇒繭切開⇒分生子注射接種⇒炭酸ガス麻酔⇒サナギタケ生産の一連の作業工程における腐敗蛹発生の軽減化の見極めが可能となった。

カイコの飼育だけでなく通常のキノコ培養においても、飼育または培養環境の清浄度を高めることが常識であり、一般には腐敗対策として培養環境の清浄度を問題とするが、清浄度を高めてクリーン環境を維持するには、初期設備投資だけでなく維持管理にも相当の努力を要する。従って、分生子接種後の環境

汚染がカイコ蛹の腐敗拡大に影響せず，培養室の清浄度を必要以上に高める必要が無いとの知見は，サナギタケの大量培養において極めて有益である．クリティカルポイントの見極めについては，腐敗の要因が，核多核体病，細胞質多核体病，伝染性軟化病，細菌病などと多岐にわたり，さらには新たな病原が発生する可能性もあることから限界がある．そこで，これらのカイコの病気に左右されないために，今後は人工飼料育によるカイコ飼育の併用についても検討すべきであろう．カイコの人工飼料育を行うことで，冬期の生産体制を確立し年間を通じた安定生産を実現でき，また人工飼料育をプレハブタイプの簡易な施設で実現できれば，激減する養蚕農家に対する新しい経営システムの提案になると期待できる．

わが国の森林生物起源であるサナギタケを活用したカイコ蛹による大量生産の方向性は薬理産業の構築であり (Patel and Ingalthalli, 2013)，養蚕農家にとっては，生糸産業に加えて薬理昆虫産業としての新しい役割を見出すことが可能となる．本研究成果が，その糸口になることを期待したい．－

## V. 摘 要

カイコを宿主昆虫としたサナギタケ接種による試験研究が報告されているが、注入接種の方法では、核多核体病や細胞質多核体病が極めて感染しやすい状況にある。サナギタケの大量生産を行う上では、現在各地で行われている養蚕によるカイコ飼育を前提としなければならず、ウイルス・細菌類を保有するカイコ蛹を避けることはできないため、接種工程におけるカイコ蛹の腐敗の抑制は、サナギタケの量産において極めて重要である。そこでこれを克服するために、以下の結果を得ることができた。

1. 空気感染やカイコ蛹の体表接触によって腐敗が拡大するものではなく、ウイルス・細菌類に既に汚染されているカイコ蛹はサナギタケに感染することなく腐敗し、健全なカイコ蛹についても、注射接種時にウイルス・細菌類が同時に注入されて汚染され、サナギタケに感染することなく腐敗することを見出した。
2. サナギタケの大量生産を目指す上では、健全なカイコの飼育が重要な鍵となり。今後は、サナギタケの大量生産のためのカイコ蛹の健全性を前提としたカイコ飼育を目指す必要がある。
3. 器材交換は作業効率を低下させ、植菌時期が遅れることで羽化や腐敗に影響を及ぼす危険性をもたらすが、クリティカルポイントを下回る場合には器材交換の必要はなく、クリティカルポイント近傍では感染を抑制でき、クリティカルポイントを大きく上回る場合には腐敗回避困難なため、クリティカルポイントによって作業を変更することで、量産に適した作業を実現できる。

以上の結果から、クリティカルポイントによるサナギタケの生産体制の構築によって腐敗抑制を実現できるとともに、腐敗率が低い安定生産を確立すべく、カイコ蛹の健全性を前提としたカイコ飼育に取り組む必要性がある。

## 総合考察

「森の宝」と称される冬虫夏草は、そもそも中国の高山地帯でコウモリガ類 (*Thitarodes* 属) に、糸状菌 *Ophiocordyceps sinensis* (= *Cordyceps sinensis*) が寄生し子実体を形成するものが、古来より冬虫夏草と呼ばれてきた。しかし今日、広範な宿主の昆虫種に寄生し、きのこ状の形態をするものから形成しないものまで含まれるようになり、広義に冬虫夏草と呼ばれている (日本冬虫夏草の会, 2014)。チベット及びヒマラヤの高山地では乱獲も 1 つの要因として希少種となり、しかも、人工培養による子座 (Stromata) の形成には成功していない。一方、*O. sinensis* の代替品になると位置付けられているサナギタケ *C. militaris* の培養液から、抗がん作用のある Cordycepin (3'-deoxyadenosine) がはじめて発見されて以来 (Cunningham *et al.*, 1950)、多くの生理活性物質が同定されている。

サナギタケは、人工培養による子座及び子実体 (Fruiting bodies) の形成にも成功しており、今日では、希少種 *O. sinensis* の重要な代替品として薬理作用が期待され、大量生産の道が切り拓かれている (Shrestha *et al.*, 2012)。

特に、わが国、韓国、中国においては、大量飼育の技術が確立されている寄主昆虫であるカイコを使用し、サナギタケの分生子を散布、または接種することで人工培養生産の研究開発とともに、その製品が市販されるまでに至っている。わが国では、幼虫期よりもカイコ蛹に分生子を注射接種することで、感染率が高く、成熟した子実体の形成が報告されている (Chen and Ichida, 2002; Sato and Shimazu, 2002)。

しかしながら、生存中のカイコ蛹にサナギタケ分生子を接種するステージは限られており、蛹発育中期の眼点期を経ると極端に感染率が減少することが、



大きな障害となっていた。特に、農家から収穫し切繭後に蛹を取り出して、接種の時期は蛹化後 2~3 日の蛹 (Sato and Shimazu, 2002), または上族後 7~8 日の蛹に限定されている (Hong *et al.*, 2010)。何れにしても、蛹化後の眼点期までに接種工程が集中することになり、カイコサナギタケの大量生産を目的とした場合には、この集中する時期を克服しなければならなかった。

そこで本研究の第一章では、冬虫夏草の 1 種サナギタケ (*C. militaris*) が、カイコ蛹を寄主とした場合の増殖の制限要因となる感染蛹期に着目し、炭酸ガス麻酔がサナギタケの接種期間の延長に有効であることを明らかにした。また第二章では、カイコ生蛹を利用した際のサナギタケ接種でウイルス性腐敗が障害となっていたが、腐敗抑制のためのクリティカルポイント設定で対処法を見出すことに成功した。この両者を組み合わせることで、カイコ蛹を寄主とした場合のサナギタケの大量生産を提案することができる。

すなわち従来の培養フローについては、第 13 図に示すように、搬入されたすべての繭からカイコ蛹を取り出し、カイコ蛹に対して植菌を行っている。従来の培養フローによれば、羽化や腐敗の可能性の高いカイコ蛹に対しても植菌作業や感染確認作業が発生するだけでなく、感染確認工程において、羽化したカイコ及び腐敗したカイコ蛹の処理を行わなければならない。この従来の培養フローの工程における欠点を乗り越えるために、本研究の成果を導入して、第 14 図に示すような新培養フローを提案することができる。新培養フローによれば、無駄になる可能性の高い作業を無くすことができるとともに、羽化による蛾尿処理や腐敗処理という作業者に苦痛を与える作業を極力少なくでき、さらには羽化や腐敗の可能性の高いカイコ蛹を、他の方法による培養（培地培養）として活用することができる。この新培養フロー提案が、いかなる発展に通じるかについては、以下のように考えられる。

世界における冬虫夏草の人工培養と薬理学的な研究開発が、主にサナギタケに集中する中で、単離同定されている生理活性物質としては、Cordycepin 以外に、Cordycepic acid, Ergosterol, Polysaccharides, Neucleosides, Peptides などの構造を有したものがある(付表 2 参照). またその薬理機能として、抗炎症・抗酸化・抗がん・抗血糖上昇・抗アポトーシス・免疫賦活・腎機能保護・肝機能保護などが期待されている (Yue *et al.*, 2012).

一方で、天然のサナギタケは世界中に分布し、海拔 0 m から 2,000 m まで採集されるが、わが国においては里山付近の雑木林がその適地と言われている. すなわち、わが国における天然のサナギタケの生息は雑木林における薬用の生物資源としても位置付けられることを意味する. また雑木林だけではなく、スギ植林地に比較的多く発生するヒグラシの幼虫を寄主とするツブノセミタケもあり、ツクツクボウシなどのセミに寄生するツクツクボウシタケ (*Isaria cicadae*) は森林に発生するが、公園のような場所でも採取され日本各地で発生する (冬虫夏草生態図鑑, 2014).

特に、ツクツクボウシタケに関しては、世界ではじめて医薬品が開発されている. 京都大学の藤田哲朗名誉教授が、1994 年にツクツクボウシタケの培養液から免疫抑制物質マイオリシンを同定し、その毒性を弱めながら FTY720 (フィンゴリモド) を合成し、現在は多発性硬化症 (Multiple sclerosis) の治療薬として国内外で使用されている (谷田, 2010). 伝統的に中国漢方薬として古代から使用されてきた *O. sinensis*, そして現代では、その代替品薬用冬虫夏草として多くの研究蓄積があるサナギタケも含めて、健康食品のみならず医薬品を目指して研究開発途中である. しかし、わが国の森林に発生している冬虫夏草の一種のツクツクボウシタケを起源とした医薬品創薬は、森林資源ならびに里山雑木林を新たな生物資源の活用という視点からも重要な指針になる.

序論で既述したように，わが国のブナ林で周期的に大発生した際のブナアオシヤチホコ (*Syntypistis punctatella*) の自然界における密度調整の1つとして，寄生菌サナギタケが重要な制御因子となっている (鎌田, 2006). このサナギタケは，希少資源の中国伝統漢方薬冬虫夏草 *O. sinensis* の代替品となり，中国・インドの国境付近の環境破壊を防ぐ切り札になると期待されている．さらに，わが国の雑木林で発生している *Isaria* 属のハナサナギタケ (*Isaria jaoinica* = *Paecilomyces tenuipes*, *Isaria tenuipes*) (付表 1 参照) の場合は，熱水抽出物を老化マウスに経口投与することで，脳の海馬における神経膠症 (グリオーシス) の消失が報告され，脳機能改善薬の可能性が提案されている (Tsushima *et al.*, 2010). また，この不完全菌類 (アナモルフ菌類) のハナサナギタケをカイコに接種感染し，無性的に分生子を生じる分生子柄束 (Synnemata) の大量生産が報告されている (Kang *et al.*, 2010).

以上のように，わが国の森林生物として通常に発生しているサナギタケ，ツクツクボウシタケ，ハナサナギタケは正に薬理資源であり，世界中で発見されている冬虫夏草は約 500 種で，わが国ではその内約 400 種が発見されるような豊富な冬虫夏草国土である (冬虫夏草生態図鑑, 2014). 特に，サナギタケの場合は，カイコ蛹磨砕液 1% を含有した米原料培養液とカイコ蛹で培養した 2 つのタイプの子実体における遺伝子発現解析では，異なることが報告されている (Xiong *et al.*, 2010). 従って，遺伝子発現産物のみならず，二次代謝産物における 1) 完全天然物由来の子実体，2) カイコのような寄主昆虫由来の子実体，そして 3) ほとんど昆虫が介在しない人工培地由来の子実体の違いについては，将来薬理的な機能を有する生理活性物質の存在と濃度差を考慮する必要がある．

本研究成果であるカイコ蛹を炭酸ガスで処理することでサナギタケの感染率を向上させ，薬理資源として大量生産法を提案することができた．従って，わ

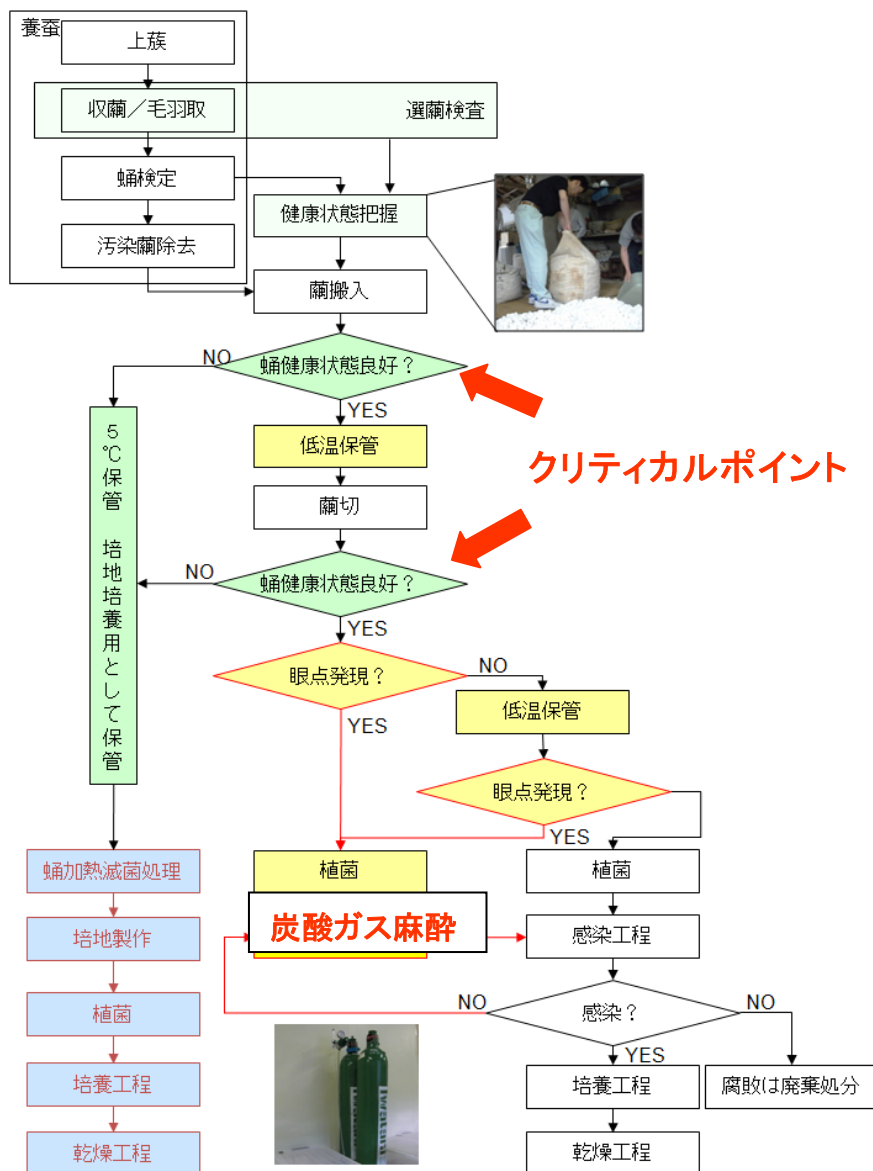
が国における森林で発生する冬虫夏草については、森林生物資源 ⇔ 寄主昆虫となる大量生産のための昆虫テクノロジー ⇔ 薬理分野の学術に関する異分野融合の研究開発こそが、ヒトの **QOL** 向上に貢献できる新しい分野の創生に発展すると期待できる。

付表 2. サナギタケから同定された生理活性分子 (Yue *et al.*, 2012) から抜粋

Compounds		Characteristic signals or IUPAC Name	Sources
Nucleotide/nucleotides derivatives	Cordycepin (3'-deoxyadenosine)	(2R,3R,5S)-2-(6-Aminopurin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxolan-3-ol	Cultured <i>C. militaris</i>
	Inosine(C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> )		Mycelia of <i>C. militaris</i>
	3'-Amino-3'-deoxyadenosine	(2R,3R,4S,5S)-4-Amino-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol	Mycelia of <i>C. militaris</i>
	Homocitrullyl aminoadenosine	A nucleoside isolated from <i>C. militaris</i>	Mycelia of <i>C. militaris</i>
Polysaccharides	P70-1	P70-1 has a backbone of 1,6-linked $\beta$ -D-mannopyranosyl residues with branching points at O-3 composed of 1,4-linked $\beta$ -D-glucopyranosyl and 1,6-linked $\beta$ -D-galactopyranosyl residues, and terminated with $\beta$ -D-galactopyranosyl residues and $\alpha$ -D-glucopyranosyl residues	Fruiting bodies of cultured <i>C. militaris</i>
	CPS-1	Composed of nannose bonded by (1,2) linkage, xylose bonded by (1,4) linkage and rhamnose bonded with galactose by (1,2) or (1,3) linkage	Cultured <i>C. militaris</i>
	CPS-2	CPS-2 was found to be mostly of $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-d-glucose and $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-mannose, branched with $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4,6)-d-glucose every twelve residues on average	Cultured <i>C. militaris</i>
	CMB	CMB possesses 1,6-linked mannosyl residues, 1,4-linked galactosyl residues, and even 1,6-linked or 1,4-linked glucosyl residues with branches of 1,4-linked and a few 1,6-linked glucosyl residues substituting at the C-3 of 1,4-linked glucosyl residues with terminal galactosyl or glucosyl residues, mainly connected by $\beta$ -glycoside linkage	Mycelia of <i>C. militaris</i>
	CM-1	CM-1 possessed a backborn of 1,2-linked $\beta$ -mannosyl residues with branches of 1,6-linked $\beta$ -galactofuranosyl residues at the C-4 and C-6 of galactosyl residues in the main chain	Cultured liquid of <i>C. militaris</i>
	Exopolysaccharide fraction (EPSF)		Cultured <i>C. militaris</i>
	CPSN Fr I		The liuid culture broth of <i>C. militaris</i>
	CBP-1	CBP-1 has a backbone of (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -d-mannose residues which occasionally branches at O-3. The branches were mainly composed of (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -d-glucose residues and (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -d-galactose residues, and terminated with $\beta$ -d-galactose residues	Cultured <i>C. militaris</i>
Sterols and fatty acids	Ergosterol	(3S,9S,10R,13R, 14R,17R)-17-[(E,2R,5R)-5,6-Dimethylhept-3-en-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,9,11,12,14,15,16,17-Decahydro-1H-cyclopenta[a] phenanthren-3-ol	<i>Cordyceps</i> spp.
other compounds	Cordycepic acid		<i>C. militaris</i>
	Dipicolinic acid	Pyridine-2,6-dicarboxylic acid	<i>C. militaris</i>
	A lectin	The lectin was designated CML	Furiting body of <i>C. militaris</i>

Biological activity	Assay	In-vivo	In-vitro
Immunomodulatory	Mouse	Extractable fruiting body glucan and the extracellular glucan of the mycelium showed relatively high growth-inhibition activity against sarcoma 180 solid tumour in mice.	
Anti-inflammatory	Mouse	CPS-1 50-200 mg/kg significantly suppressed ( $P<0.01$ ) the mouse ear oedema induced by croton oil in a dose-dependent manner. At doses of 50 and 100 mg/kg, CPS-1 exerted a significant ( $P<0.01$ ) inhibitory effect on the increased vascular permeability induced by acetic acid in mice.	
	Human		Potent growth inhibition on NO, TNF- $\alpha$ and IL-12 production with an IC <sub>50</sub> value of 7.5, 6.3, and 7.6 $\mu\text{g/ml}$ was displayed, respectively. An inhibitory trend on these inflammatory mediators was observed for compounds with an IC <sub>50</sub> value ranging from 10.8 to 17.2 $\mu\text{g/ml}$ .
Antitumour/anticancer	Mouse and Human		A dose of 100 or 200 mg/kg body weight per day inhibited the tumour volume by 43.81% and 48.89%, respectively. Tumour weight was reduced also by 31.21% and 39.48%, respectively.
Nephroprotective	Human		When <i>C. militaris</i> 100, 200, 300 or 400 $\mu\text{g/ml}$ plus LDL 10 $\mu\text{g/ml}$ , [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation was respectively $192 \pm 75$ kBq, $168 \pm 66$ kBq, $145 \pm 53$ kBq and $72 \pm 16$ kBq, $P<0.01$ compared with controls.
Hepatoprotective	Mouse	The content of liver glycogen tended to be lower after treatment with <i>C. militaris</i> .	
Neuroprotective	Mouse		Pretreatment with <i>C. militaris</i> (5-20 $\mu\text{g/ml}$ ) for one hour was sufficient to stimulate primary neurite sprouting and extension of Neuro2A cells after 24-h cultivation in a dose-dependent manner.
Antifibrotic	Mouse	Extracellular biopolymers (30 mg/kg per day for four weeks, p.o.) had an antifibrotic effect on fibrotic rats induced by BDL/S.	
Hypoglycaemic	Mouse	A daily 0.5 g dose of <i>C. militaris</i> water extract to rats ameliorated insulin resistance by enhancing glucose utilization in skeletal muscles.	
Anti-HIV	Human		Treatment of HIV-1 infected H9 cells with 1 $\mu\text{M}$ of the cordycepin core timer and its 5'-monophosphate derivative resulted in an almost 100% inhibition of virus production.





第14図 今後の培養フロー



## 引用文献：

新川 徹・野澤瑞佳 カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の好感度バイオアッセイの開発日本応用動物昆虫学会大会講演要旨, 48, 76, 2004-03-01.

Bardre, N.H., Martin, M.E. and Cooper, R.L. (2005) The physiological and behavioral effects of carbon dioxide on *Drosophila melanogaster* larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **A140**, 363-376.

Branscome, D.D. and Koehler, F.M.O. (2005) Influence of carbon dioxide gas on Derman cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) knockdown, recovery, movement and feeding. *Physiol. Entomol.* **30**, 144-150.

Chen, R. and Ichida, M. (2002) Infection of the Silkworm, *Bombyx mori*, with *Cordyceps militaris*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology.* **71**, 61-63.

Cheng, W., Lei, J., Ahn, J.-E., Liu, T.-X. and Zhu-Salzman, K. (2012) Effects of decreased O<sub>2</sub> and elevated CO<sub>2</sub> on survival, development, and gene expression in cowpea bruchids. *J. Insect Physiol.* **58**, 792-800.

Conningham, K. G., Manson, W., Spring, F. S. and Hutchinson, S. A. (1950) Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (L.), *Link, Nature.* **166**, 949-954.

大日本蚕糸会編 (2010) 第 8 章蚕病とその防除法, 133-153, 大日本蚕糸会出版.

Das, S.K., Masuda, M., Sakurai, A. and Sakakibara, M. (2010) Medical uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia* **81**, 961-968.

Dawson, C. (1995) The Effect of Carbon Dioxide Induced Anaesthesia on Fecundity of *Callosobruchus maculatus*. *J Stored Prod Res.* **31-1**, 49-54.

Hajek, A. E. and Leger, R. J. S t. (1994) Interactions between fungal pathogens and hosts. *Ann. Rev. Entomol.* **39**, 293-322.

早川博文・松村 雄・長谷川勉・稲岡 徹・長島義介 (1986) 北海道日高地方の馬産地におけるアブ類の生態に関する研究, 衛生動物, Vo1. 37, No. 4, 305-309.

姫野道夫 (1976) 家蚕ウイルスの構造と増殖, 農化, 第 50 卷, 第 9 号, p.R 193-R199.

Hong, I.-P., Kang, P.-D., Kim, K.-Y., Nam, S.-H., Lee, M.-Y., Choi, Y.-S., Kim, N.-S., Kim, H.-K. Lee, K.-G., and Humber, R.A. (2010) Fruit Body Formation on Silkworm by *Cordyceps militaris*. *Mycobiology.* **38**, 128-132.

Ito, T. (1953) Studies on the integument of the silkworm, *Bombyx mori*. VII.

The permeability of the integument to oxygen and carbon dioxide in vivo.

*Biol. Bull.* **105**, 308-315.

鎌田直人 (2006) ブナの葉食性昆虫ブナアオシヤチホコの密度変動, 日本生態学会誌,

56, 106-119

上村 清・渡辺 護・井上民二 (1972) イヨシロオビアブの季節消長と個体数推

定および発生源について, 衛生動物, Vo1, 23, No. 1, 1-9.

Kang, P.-D., Sung, G.-B., Kim, K.-Y., Kim, M.-J., Hong, I.-P. and Ha, N.-G.

(2010) Breeding of a silkworm variety for synnemata production of

*Isaria tenuipes*, *Mycobiology*. **38**, 180-183.

木村 広・井上市郎・鶴田 理 (1991) 貯穀害虫に対する炭酸ガスの殺虫効果,

環動昆, 第3巻, 第3号, 136-139.

小山昌志 (2009) ショウガクロバネキノコバエに対する二酸化炭素くん蒸の殺

虫効果, 関西病虫研報 (51), 79-80.

Martin, S and Hayakawa, M. (1961) Carbon Dioxide as an Anesthetizing

Agent for the Flesh Fly, *Sarcophaga peregrine* Robineau-Desvoidy, and

the Adzuki-bean Weevil, *Callosobruchus chinensis* L. *Japanese Society*

*of Applied Entomology and Zoology*. **5-2**, 151-153.

三国辰男・河上 清 (1975) カイコの脱皮・変態におよぼす緑きょう病菌 (Spicaria prasina) 生産物質の影響, 日本応用動物昆虫学会誌, 第 19 卷, 第 3 号, 203-207.

宮ノ下明大 (2007) 新しく農薬登録された高圧炭酸ガスを用いたクリシギゾウムシ殺虫技術, 食総研ニュース, No.19, 4-6.

森 精 (1970) カイコによる新生物実験, 三省堂, p 476.

Neven, L.G. and Hansen, L.D. (2010) Effects of temperature and controlled atmospheres on codling moth metabolism. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **103**, 418-423.

Newton, J. (1993) Carbon dioxide as fumigant to replace methyl bromide in the control of insects and mites damaging stored products and artifacts. In: Wildey, K.B. and Robinson, W.H. (eds), *Proc. 1st Int. Conf. on Urban Pests*. pp. 329-338.

日本冬虫夏草の会 (2014) 冬虫夏草生態図鑑, 誠文堂新光社, p303.

Patel, K.J. and Ingalthalli, R.S. (2013) *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link – An important medicinal mushroom. *J. Pharmacol. Phytochem.* **2**, 315-319.

- Paterson, R.R.M. (2008) *Cordyceps* – A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory?. *Phytochemistry*. **69**, 1469–1495.
- Sato, H. and Shimazu, M. (2002) Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. *Appl. Entomol. Zool.* **37**, 85-92.
- Seki, M. and Murai, T. (2012) Response of five adult thrips species (Thysanoptera; Thripidae) to high-carbon dioxide atmospheres at different temperatures. *Appl. Entomol. Zool.* **47**, 125-128.
- Shih, I.-L., Tsai, K.-L. and Hsieh, C. (2007) Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochem. Eng. J.*, **33**, 193-201.
- Shrestha, B., Zhang W., Zhang Y. and Xingzhong Liu (2012) The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. *Mycol Progress*. **11**, 599-614.
- Sillans, D. and Biston, J. (1979) Studies on the anesthetic mechanism of carbon dioxide by using *Bombyx mori* larvac. *Biochimic*. **61-2**, 153-156.
- 田中 彰 (1982) チャバネゴキブリの令数, 幼虫期間, 成虫サイズに及ぼす炭酸ガス麻酔の影響. *Journal of Insect Physiology*., **28**, 813-821.

谷田清一 (2010) 冬虫夏草で新薬が生まれようとして, リード探索で産と学が連携した日本発の創薬事例, 産学官連携ジャーナル, **6**, 46-49.

土田 聡・中村ゆり・羽山裕子・村井 保・中田 健・望月雅俊 (2011) 高温・高濃度炭酸ガスくん蒸の殺虫効果とリンゴ・ナシ果実品質への影響, 果樹研報, **12**, 15-26.

Tsushima, M., Yamamoto K., Goryo, M., Suzuki, F. and Suzuki, K (2010) Hot-water extract of *Paecilomyces tenuipes* from the silkworm pupae improves D-galactose-induced brain aging in mice. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*. **79-2**, 45-51.

和田早苗・佐藤大樹 (2013) 昆虫の病原糸状菌抵抗性機構と昆虫病原糸状菌の昆虫への感染機構, 蚕糸・昆虫バイオテック, **82**, 161-168.

渡部 仁・前田 進 (1979) 高温飼育下のカイコにおける濃核病ウイルスの増殖, 日本応用動物昆虫学会誌, 第 23 巻, 第 3 号, 151-155.

Xiong, C., Xia, Y., Zheng, P., Shi, S. and Wang, C. (2010) Developmental stage-specific gene expression profiling for a medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Mycology*. **1**, 25-66.

Yue, K., Ye, M., Zhou, Z., Sun, W. and Lin, X. (2012) The genus *Cordyceps*: a

chemical and pharmacological review. *J. Pharm. Pharmacol.*, **65**, 474-493.

養蚕及び生糸生産量（明治 7 年～平成 16 年）. 2, 7-16 Sericulture and Production of Raw Silk (1874--2004). 総務省統計局

座談会 ブナ植樹を検証する！2004-10-23. 青森の自然環境を考える会のホームページ ([http://thinkaomori.sakura.ne.jp/zadankai/zadankai\\_1.html](http://thinkaomori.sakura.ne.jp/zadankai/zadankai_1.html))

全国養蚕農業協同組合連合会指導生産部蚕糸の光，図解養蚕，1995-9，101.