

大日本蚕糸会

研究報告

第 56 号 平成 20 年 12 月 (2008)

目 次

報 文

1. α -トコフェロールエマルションの安定化とそのラジカル消去活性に及ぼすセリシンの影響
蚕糸科学研究所 栗岡 聰・山崎昌良…… 1
2. 日光による笹繭の色彩変化
蚕糸科学研究所 栗岡富士江・栗岡 聰…… 9

その他の報文

貞明皇后蚕糸記念科学技術研究助成報告
養蚕農家で発生した不結繭蚕の原因解明

宇都宮大学農学部昆虫機能利用学研究室 小川ひとみ・岩永将司・川崎秀樹
蚕業技術研究所 代田丈志…… 15

財団法人大日本蚕糸会
蚕糸科学研究所
蚕業技術研究所

Journal of DAINIPPON SILK FOUNDATION

No.56, December 2008

CONTENTS

Research Reports

1. KURIOKA, A. and YAMAZAKI, M.:
Effects of sericin on the stabilization of an α -tocopherol emulsion and
its radical scavenging activity 1
2. KURIOKA, F. and KURIOKA, A.:
Change in color of the yellow-green Sasamayu cocoon by exposure to sunlight ... 9

Other Reports

- OGAWA, H., SHIROTA, T., IWANAGA, M. and KAWASAKI, H.:
Study on the silkworm larvae that were incapable to spin cocoons
at the sericulture farmer 15

Published by

THE DAINIPPON SILK FOUNDATION
THE SILK SCIENCE RESEARCH INSTITUTE
INSTITUTE OF SERICULTURE

α -トコフェロールエマルションの安定化とそのラジカル消去活性に及ぼすセリシンの影響

栗岡 聰・山崎昌良

蚕糸科学研究所

AKIRA KURIOKA and MASAYOSHI YAMAZAKI: Effects of sericin on the stabilization of an α -tocopherol emulsion and its radical scavenging activity

緒 言

セリシン加水解分解物も含む繭層の熱水抽出物（以後「セリシン」という）は、比較的低成本で大量抽出が可能な資源であることから、著者らはセリシンのもつ乳化機能に着目し、食品加工分野をはじめとする様々な分野へのセリシン利用の可能性について検討してきた。その一例として、セリシンを乳化剤として α -トコフェロール（ビタミンE）を乳化させると、カゼインのような乳化性タンパク質から生成される乳化物（エマルション）よりも微小な油滴粒子が分散したエマルションが生成されることを明らかにした¹⁾。

一般的に、タンパク質であるセリシンと脂質を混合攪拌して得られるエマルションの分散安定性は、油水界面に吸着したタンパク質の安定性にも大きく依存しており、吸着タンパク質の分解はエマルションの分散安定性を大きく低下させる要因の一つと考えられる。ところで、セリシンは熱水による分解作用を受け易いことから²⁾、界面におけるセリシンの熱安定性に関する情報は、例えば、熱処理を多用する食品加工等への実用を考えるうえで重要な知見となる。

そこで、本報告ではセリシンによる脂質エマルションの安定化機構を解明するために、乳化処理によって油水界面に吸着したセリシンへの熱処理の影響について、カゼインやアルブミンなどの乳化性タンパク質との比較において調べた結果を報告する。また、抗酸化ビタミンとして知られる α -トコフェロールのエマルション化にともない、その抗酸化活性の変化についてもDPPHラジカル消去活性を指標にして調べた。

材料と方法

セリシン抽出法

オートクレーブ装置（MLS-3000型 三洋電気株）を用いて、115°C×30分の熱水抽出法で「錦秋×鐘和」の繭層からセリシンを抽出した。この抽出液に等量の8M尿素を加えてセリシン濃度を0.4%（w/v）に調整した水溶液を乳化試験に供試した。

α -トコフェロールエマルション調製法

0.4%（w/v）セリシン溶液2.5mLと2mMリン酸緩衝液（pH 7.3）7.5mLの混合液に33%（w/v） α -トコフェロール（ICN Biomedicals Inc.）200μLを添加した後、高速攪拌乳化装置（POLYTRON Model K, KINEMATICA）を用いて30,000 r.p.m., 2分間の攪拌処理を行い、 α -トコフェロールエマルション（SR-TocEM）を調製した。また、0.4%（w/v）カゼイン溶液（和光純薬工業）及び0.4%（w/v）牛血清アルブミン溶液（bovine fraction V, SIGMA）を用いて、同様の乳化法によりCS-TocEMとAL-TocEMをそれぞれ調製した。また、タンパク質を加えずに調製した対照区のエマルションをTocEMとした。

α -トコフェロールエマルションの乳化度測定法

乳化直後の各エマルション50 μL を0.1%ドデシル硫酸ナトリウムで50倍に希釈し、希釈液の乳化度について紫外可視分光光度計（Ubest-35、日本分光）を用いて波長500 nmで測定した。

光学顕微鏡によるエマルション粒子の観察

光学顕微鏡（BH-2, OLYMPUS）を用いて各エマルション液中のエマルション粒子の分散状態を倍率500倍で観察した。

α -トコフェロールエマルションの熱安定性試験

SR-TocEM, CS-TocEM 及び AL-TocEM の3試料について、85, 115, 121及び127°Cの4水準で加熱処理を行い、熱処理した各試料の分散安定性を乳化度の変化から判断した。85°C処理試験では試験液1 mL を85°C湯煎中で15～180分間加熱処理した。一方、115～127°C処理試験では、オートクレーブ装置（MLS-3000型、三洋電気株）を用いて、各試験液1 mL を試験管に採取し30分間の高温高圧処理を行った。

SR-TocEM と TocEM の2試料については、更に長時間の高温高圧処理を行うために、115°Cのオートクレーブ処理を90分と180分の2水準で行った。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）は、分離ゲル濃度14%，濃縮ゲル濃度5%の低ビス濃度 SDS-PAGE 法³⁾で行い、タンパク質はクマシ染色法で検出した。

α -トコフェロールエマルションのラジカル消去活性測定法

α -トコフェロールエマルションのラジカル消去活性についてはDPPH（1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl）分光測定法で測定した。エマルション液を0.1% SDSで50倍希釈した検体液30 μL に、70 μL の0.2 M 酢酸ナトリウム（pH 5.5）を加えて混合した後、エタノールと0.5 mM DPPHをそれぞれ100 μL 及び50 μL 加え室温で20分間反応させた。反応後、反応液200 μL の吸光度（550 nm）をマイクロプレートリーダー（Model 680 Bio-Rad）を用いて測定した。 α -トコフェロールエマルション液の α -トコフェロール含量と同量になるよう調製した α -トコフェロール溶液を対照区とし、そのDPPHラジカル消去活性を測定した。

結果と考察

α -トコフェロールの乳化に及ぼすセリシンの影響

SR-TocEM と TocEM の光学顕微鏡像（図1）では何れの試料にも粒径1～5 μm の油滴が観察され、SR-TocEM (b) では TocEM (a) に比べて粒径1～3 μm の細かな油滴が少なく、一定面積当たりの油滴数も SR-TocEM の方が少なかった。吸光度測定の結果は SR-TocEM の方が TocEM に比べて吸光度が約30%低く、光学顕微鏡像で確認した粒子径及び分散密度の違いを反映していた。以上の結果から、SR-TocEM ではセリシンの添加により乳化度が低下することが確認された。これは、一般的に高分子量で嵩高いタンパク質は界面上で相互に立体障害となり、低分子の界面活性剤のように緻密な吸着構造をとりにくることから⁴⁾、SR-TocEM の場合も界面吸着による立体障害が攪拌効率を低下させた可能性が高い。特に、供試セリシンには94kDa以上の高分子タンパク質（HS）も含まれているため（図6、レーン1），油水界面におけるセリシンの吸着が乳化度を低下させた一因と考えられた。

細胞膜やリポ蛋白質の脂質層に存在する α -トコフェロールは、膜内部に疎水性のフィチル側鎖を、一方、膜表面の水-脂質界面にはクロマン環フェノール性水酸基をそれぞれ配置している⁵⁾。このように α -トコフェロールは分子内に疎水性と親水性部分を持つことから、TocEM では乳化装置による攪拌処理だけでミセル様構造が形成されたものと推察された。しかし、7日間室温で保存した TocEM の乳化度は乳化時（0日）に比べて約30%低下したのに対して、SR-TocEM では若干の低下しか認められなかった。また、

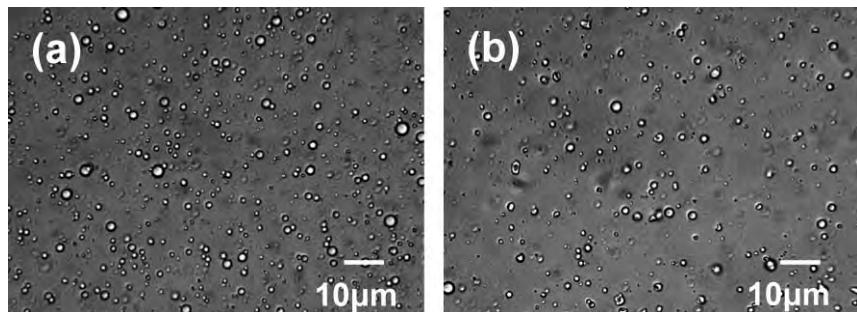


Fig. 1. Light micrograph images ($\times 500$) of emulsion drops. (a) TocEM, (b)SR-TocEM.

TocEM では SR-TocEM に比べ多量の油分が液面に認められたことから、 α -トコフェロールは乳化剤を添加しなくてもエマルションを生成することが可能ではあったが、TocEM は SR-TocEM よりも不安定なために油水分離（乳化破壊）の進行が速いことが明らかになった。一方、SR-TocEM が安定性を示したのは、界面吸着したセリシンによる立体障害及び電気的な斥力によって、油滴の凝集が抑制されたためと考えられた。

タンパク質の違いが乳化度に及ぼす影響

セリシンを用いて再現性よく α -トコフェロールエマルションを調製するための条件として、セリシンと α -トコフェロールの混合比は重量比で 1 : 5 であることが適切であり、 α -トコフェロールは攪拌振盪中に添加すること、そしてイオン強度の低い緩衝液中で乳化を行うことが望ましく、この調製方法に従ってセリシン以外にカゼインを用いた場合にも α -トコフェロールエマルションを再現性よく調製できることを既に確認している¹⁾。そこで、更に他の乳化性タンパク質について同法を適用した場合にも再現性よく乳化処理を行えるか調べた結果、アルブミンにおいても α -トコフェロールエマルションが再現性よく生成されることが確かめられた。

そこで、セリシン、カゼイン及びアルブミンの 3 種類のタンパク質からそれぞれ調製した α -トコフェロールエマルション、SR-TocEM、CS-TocEM 及び AL-TocEM の乳濁度を目視で比較した結果、SR-TocEM と AL-TocEM は濃い乳白色を呈したが、CS-TocEM は SR-TocEM と AL-TocEM に比べて乳濁度が低かった。各試料の吸光度を波長 500 nm で比較した結果（図 2）、SR-TocEM は AL-TocEM とほぼ同程度の吸光度を示した。一方、CS-TocEM の吸光度は最も低く、SR-TocEM の吸光度の 1 / 3 程度であった。以上、乳化度の比較からセリシンはアルブミンと同程度の α -トコフェロール乳化能をもつことが明らかになった。また、セリシンとアルブミンに比べてカゼインの α -トコフェロール乳化能は低いことも明らかとなった。

α -トコフェロールエマルションの熱安定性

SR-TocEM、CS-TocEM 及び AL-TocEM を 85°C 处理した結果、何れの試料においても吸光度の変動は認められなかった（図 3）。次に、オートクレーブ装置を用いて 115、121 及び 127°C 处理を 30 分間行い、高温高圧下におけるエマルション安定性を調べた。なお、115、121、127°C 处理における装置内圧力は、それぞれ 1 kg/cm³、1.3 kg/cm³、1.5 kg/cm³ であった。その結果、各試料の吸光度はオートクレーブ処理後も変化せず、127°C 処理後も処理前と同程度の吸光度を維持した（図 4）。以上の結果から、エマルションの分散安定性は油水界面に吸着したタンパク質により維持されているものと考えられた。

そこで、油水界面上に吸着したセリシンの安定性を詳しく調べるために、SR-TocEM について 115°C における加熱時間を更に長くした場合の分散安定性の結果を図 5 に示す。対照試験区の TocEM では 180 分処理後の乳化度は未処理区（0 分）の乳化度に比べて約 40% 減少した（図 5-A）。一方、SR-TocEM では

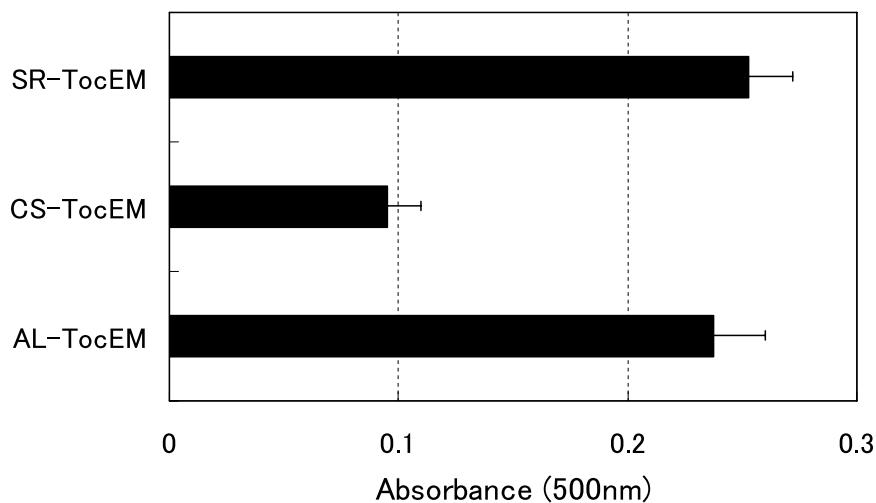


Fig. 2. Comparison of the emulsifying degree of three α -tocopherol emulsions. SR-TocEM, CS-TocEM, and AL-TocEM were emulsions prepared from sericin, casein, and albumin, respectively.

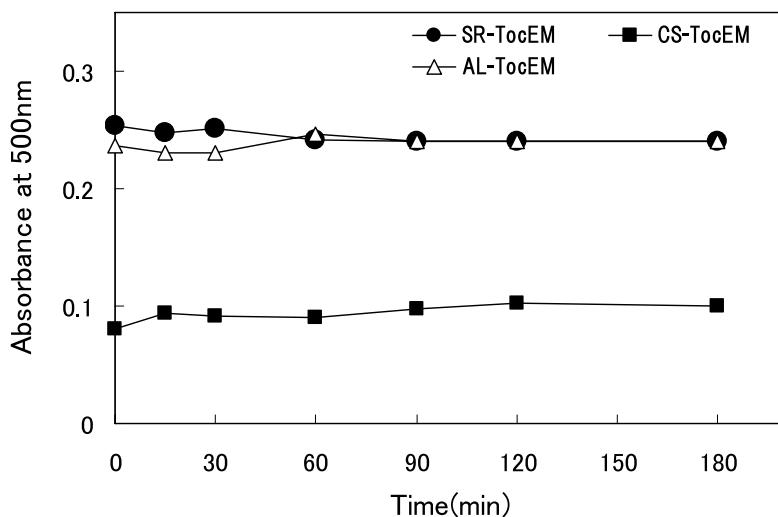


Fig. 3. Heat stability of SR-EM, CS-EM, and AL-EM. Time course of the absorbance at 500 nm for each emulsion treated at 85°C.

180分処理後も乳化度の減少は僅かであった（図5-B）。

加熱処理による溶液セリシンの分子量変化を SDS-PAGE で調べた結果（図6），加熱時間の増加に伴いセリシンの低分子化が顕著になった。特に，高分子セリシンのバンド（HS）は115°C処理を120分以上（レーン4～6）継続すると殆ど消失した。このようなセリシン溶液が低分子化する加熱条件では，界面上に吸着したセリシンには何らかの構造変化が起きることが予想された。しかし，SR-TocEM では115°C，180分処理後においても乳化破壊が抑制されたことから，セリシンは高温，長時間の加熱処理に対しても界面吸着を維持し，界面を安定化させていることが明らかとなった。

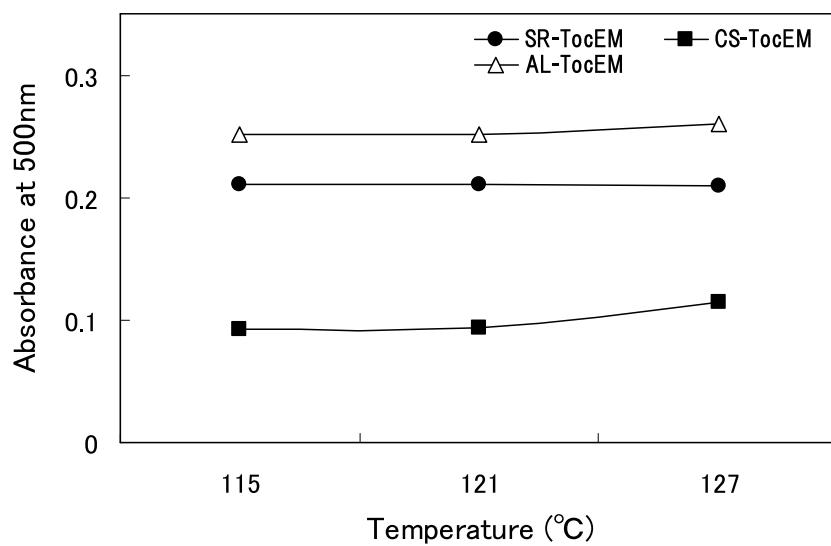


Fig. 4. Heat stability of SR-EM, CS-EM, and AL-EM. The absorbance of each emulsion autoclaved from 115 to 127°C for 0.5h was measured at 500 nm.

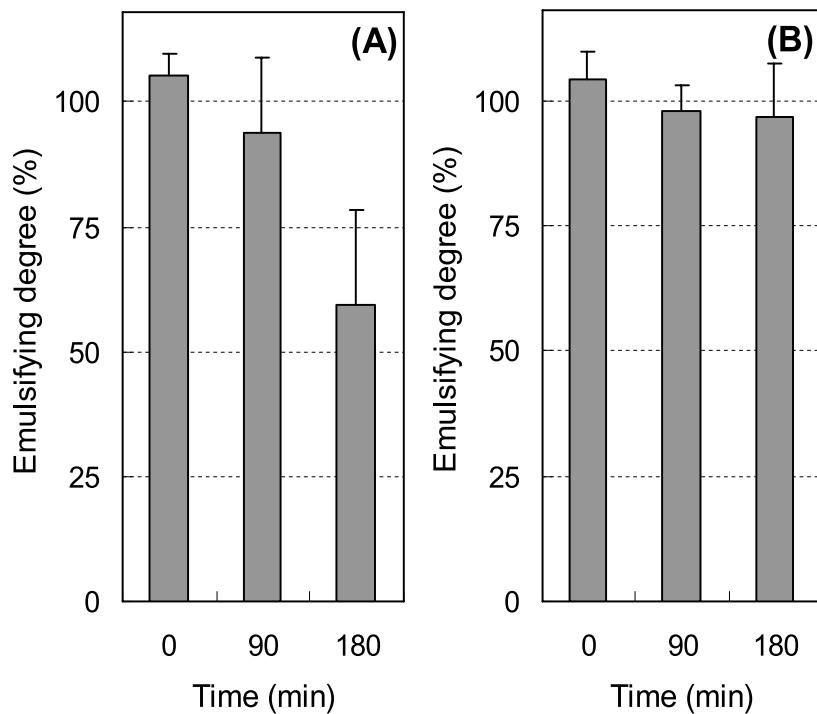


Fig. 5. Comparison of heat stability at 115°C between TocEM(A) and SR-TocEM(B).

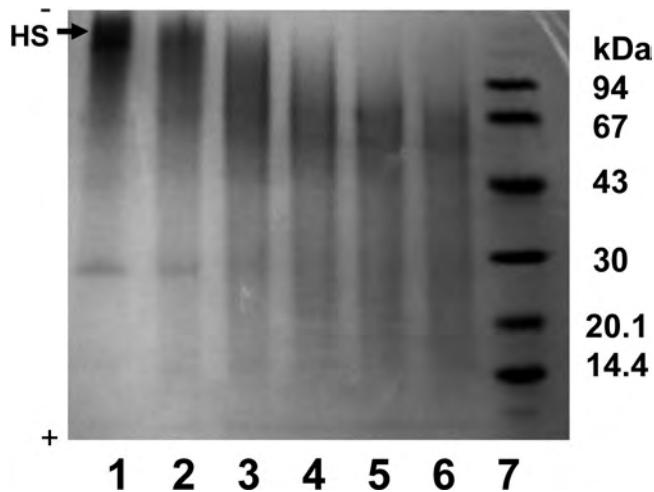


Fig. 6. SDS-PAGE profile of sericin after heating at 115°C. Lane 1, control (30 min); lanes 2~6 show samples treated at 60, 90, 120, 180 and 240 min, respectively; lane 7, marker proteins.

α -トコフェロールエマルションのラジカル消去活性

SR-TocEM, CS-TocEM 及び AL-TocEM のラジカル消去活性を比較した結果、何れの試料も α -トコフェロール溶液に比べてラジカル消去活性が低いことが明らかになった（図 7）。乳化用いたタンパク質の種類により α -トコフェロールエマルションのラジカル消去活性には差が認められ、AL-TocEM のラジカル消去率は 65.8% で最も高かった。一方、SR-TocEM と CS-TocEM のラジカル消去率は AL-TocEM のラジカル消去率の約 50% 程度であり、それぞれ 36.1% 及び 33.5% であった。

本実験で調製したエマルションは、タンパク質皮膜が α -トコフェロールを内包した水中油滴型エマルションを形成していると考えられる。供試した全てのエマルションは α -トコフェロール溶液に比べてラジカル消去活性が低かった。この原因是、 α -トコフェロールと DPPH ラジカル分子との接近が保護コロイド的役割を果たすタンパク質皮膜によって阻害されたためと考えられる。

SR-TocEM と AL-TocEM は同程度の乳化度を示したが、ラジカル消去活性は AL-TocEM の方が SR-

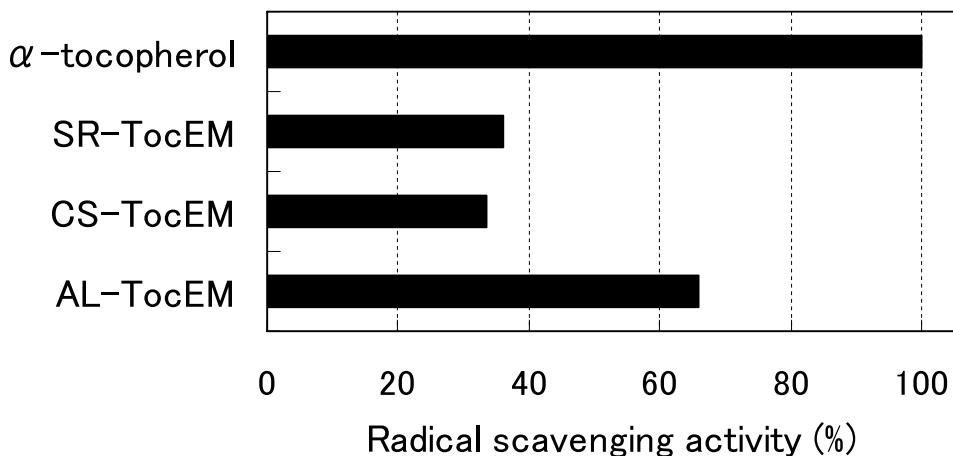


Fig. 7. Comparison of radical scavenging activity between vitamin E emulsions and vitamin E solution.

TocEM よりも約 2 倍高い値を示した。これとは対照的に、SR-TocEM と CS-TocEM との比較では、両者の乳化能は SR-TocEM の方が CS-TocEM に比べて約 3 倍高かったにもかかわらず、ラジカル消去活性は同程度であった。

本実験により、セリシンは油水界面に吸着して界面強度を高め、エマルションを安定化することが明らかとなった。また、セリシンと脂質との相互作用により、セリシン自体の熱抵抗性が向上した可能性も示唆された。このような特性は加熱加工用の食品乳化剤に必要な機能であり、さらに、セリシンの界面吸着力はレトルト殺菌時に行われる $121^{\circ}\text{C} \times 30$ 分間の処理に対しても安定性を示したことから、食品加工用乳化剤としての利用が期待できる。しかし、セリシンの界面安定化機構の詳細は未解明であり、界面吸着に関与するセリシンの疎水性構造について現在検討を進めている。また、抗酸化実験の結果から、乳化度が同じであっても乳化処理時に加えたタンパク質の種類が異なると、乳化度とラジカル消去活性には相関が認められないことが明らかとなり、抗酸化を優先機能とするエマルションを調製する場合には、乳化剤として用いるタンパク質の選択が重要であることもわかった。

摘要

家蚕 (*Bombyx mori*) の繭層から抽出したセリシンと α -トコフェロールを混合攪拌して調製した SR-TocEM と、カゼイン及びアルブミンからそれぞれ調製した CS-TocEM と AL-TocEM の 3 種類のエマルション試料の乳化度、熱安定性、ラジカル消去活性を比較した。吸光度法によりエマルションの乳化度を比較した結果、SR-TocEM と AL-TocEM は同程度の乳化度を示し、両者は CS-TocEM よりも乳化度が約 3 倍高かった。SR-TocEM はセリシンを加えずに乳化処理した TocEM に比べて、乳化度は低かったが、熱安定性が高かった。セリシンの低分子化を惹起する 115°C 、180 分処理によって TocEM の乳化度は約 40% 低下したが、SR-TocEM の乳化度は殆ど低下しなかった。以上の結果から、セリシンは油水界面上で脂質と強く相互作用し、界面の安定化に寄与していることが示唆された。ラジカル消去活性を比較した結果、エマルション化した α -トコフェロールは溶液状態の α -トコフェロールに比べてラジカル消去活性が低いことが明らかになった。また、SR-TocEM は AL-TocEM に比べてラジカル消去活性の低下が認められ、その原因是、保護コロイド様の作用をするセリシン皮膜が、 α -トコフェロールと DPPH ラジカルの遭遇を阻害したためと推察された。

Summary

The properties such as emulsifying degree, heat stability and radical scavenging activity of SR-TocEM, an α -tocopherol emulsion generated in the presence of sericin, were compared with those of CS-TocEM and AL-TocEM, α -tocopherol emulsions prepared from casein and bovine serum albumin, respectively. The degree of emulsifying for SR-TocEM was similar to that for AL-TocEM but three times higher than that for CS-EM.

SR-TocEM was lower in emulsification but higher in heat stability than TocEM, a control emulsion prepared in the absence of sericin. After heating at 115°C for 180 min, sericin in the liquid state was degraded whereas SR-TocEM remained in an emulsion state that showed the same emulsifying degree as non-heated SR-TocEM. The adsorption of sericin at an oil-water interface, which probably caused the lower degree of emulsification, was found to improve the heat stability of SR-TocEM. The radical scavenging activity of SR-TocEM and CS-TocEM was some 50% lower than that of AL-TocEM. Each emulsion showed lower radical scavenging activity than an α -tocopherol solution, suggesting that the interaction of α -tocopherol and a radical molecule may be interfered by a protective protein colloid.

引用文献

- 1) 栗岡聰・山崎昌良 (2007) セリシンを用いたビタミンEエマルションの調製法とその安定性について, 大日本蚕糸会研究報告, **55**, 65-69.
- 2) 蒲生卓磨 (1973) 薄層タンパク質のジスルフィド結合の開裂による抽出とゲル電気泳動による分別, 日蚕雑, **42**, 17-23.
- 3) H. Hirano (1989): Microsequence analysis of winged bean seed proteins electroblotted from two-dimensional gel, J. Protein Chem., **8**, 115-130.
- 4) 松村康生 (2003) 食品の高機能粉末・カプセル化技術, **121**, サイエンスフォーラム.
- 5) J. C. Gomes-Fernandez, J. Villalain, F. J. Aranda, A. Ortiz, V. Micol, A. Coutinho, M. N. Berberan-Santos, M. J. Prieto (1989) Localization of α -tocopherol in membranes, Ann. NY Acad. Sci., **570**, 109-120.

日光による笹繭の色彩変化

栗岡富士江・栗岡 聰

蚕糸科学研究所

FUJIE KURIOKA and AKIRA KURIOKA: Change in color of the yellow-green Sasamayu cocoon by exposure to sunlight

緒 言

色素を含有する色繭は、白繭にはない特有の色彩をもつ。しかし、色繭に含まれる色素は、紫外線や熱などの影響を受けやすいため¹⁾、繭の保管環境が悪ければ比較的短期間のうちに変退色してしまうこともある。そこで、繭の天然色素を活かすための処方として、例えば色素の溶解を抑制した精練法や糸の加工法が確立されている²⁻⁴⁾。

色繭の一種である笹繭は明るい緑黄色をしており、笹繭の主要色素であるフラボノールは、抗酸化作用や抗菌作用に関与していることが近年明らかにされ⁵⁻⁷⁾、化粧品材料としても利用されるようになった。しかし、繭色の変退色は笹繭の機能性に影響を及ぼす可能性が充分に考えられるため、フラボノール色素の変退色に影響を及ぼす因子を整理しておくことは、笹繭の用途に係わらず一定品質の笹繭を供給する視点からも重要である。

ところで、笹繭の変退色は色素の変化の他に、タンパク質の変質も関与している可能性も予想されるが、笹繭の変退色機構については詳しく調べられていない。そこで、笹繭の変退色に関与する可能性が最も高い日光の影響について検討するために、露光による笹繭の繭色の経時変化を調べた結果を報告する。

材料と方法

露光試験方法

笹繭は「いろいろ」の繭層を使用し、対照区として色素を含まない「錦秋×鐘和」の繭層を用いた。各繭層は熱による変退色を避けるために生繭繭層を用いた。繭層10粒を2片に切断後、手動式プレス機で繭層切片をシート状にプレスし、露光用試料を20枚作製した。各試料は、実験室の窓ガラス沿いに置き、ガラス越しに昼夜露光を5週間行った。また、笹繭に含まれるフラボノールの一種であるケンフェロール(Aldrich Chem. Com. Inc.)についても同様に露光試験を行った。ケンフェロール5gをシャーレに薄く広げ、日光が均等に照射されるように、1日1回粉末を攪拌した。

繭層は平成19年6月下旬から8月上旬、ケンフェロールは平成20年7月上旬から8月上旬に亘って露光試験を実施した。

測色方法

露光した繭層は、1週間毎に分光測色計(CM-508i, ミノルタ株)を使用して、波長400~700 nmの分光反射率を測定し、色彩パラメーター(L^* , a^* , b^* 値)を求めた。また、色彩パラメータをもとに、未露光試料を基準として各露光試料との色差を算出した。測定点は1試料につき任意の3箇所とした。ケンフェロールでは、1週間毎に露光試料を0.7 gずつサンプリングし、透明なポリエチレン袋に入れ、袋越しに任意の12測定点を測色した。

結果と考察

露光による反射率の変化

露光後の笹繭は、目視観察においても著しく変退色していることが観察され、露光1週間で明らかな色の変化が認められた。一方、白繭とケンフェロールでは5週間露光しても殆ど色が変わらなかった。

目視で観察されたこのような色彩変化を定量的に評価するため、各試料の反射スペクトルを比較した。その結果(Fig. 1.)、笹繭の場合(S)では、露光処理により470~700 nm の範囲で反射スペクトルの顕著な変動が認められ、特に、530~640 nm(緑~赤系)に対応する反射率の低下が認められた。一方、白繭(W)では5週間露光後も顕著な反射率の変動は認められなかった。露光前のケンフェロールの反射スペクトル(K)は笹繭のそれに比べて、長波長側ほど高い反射率を示し、露光処理後には550~660 nm(緑~赤系)間で反射率の低下が認められた。

笹繭とケンフェロールの反射率は、変則的な経時変化を示し、例えば、反射率の減少幅が最大であった波長で比較すると(Fig. 2)，笹繭(S)では、反射率は露光1週間後に最低値を示した後、2週間後には一時的に増加し、3週間後には再び減少した。ケンフェロール(K)でも笹繭同様に変則的な変動が認められ、露光3週間後にはそれ以前まで低下していた反射率は一過性の増加を示した。

露光による色彩変化

反射率の測定から、日光は笹繭とケンフェロールの緑~赤系の波長成分に影響を与えることがわかった。

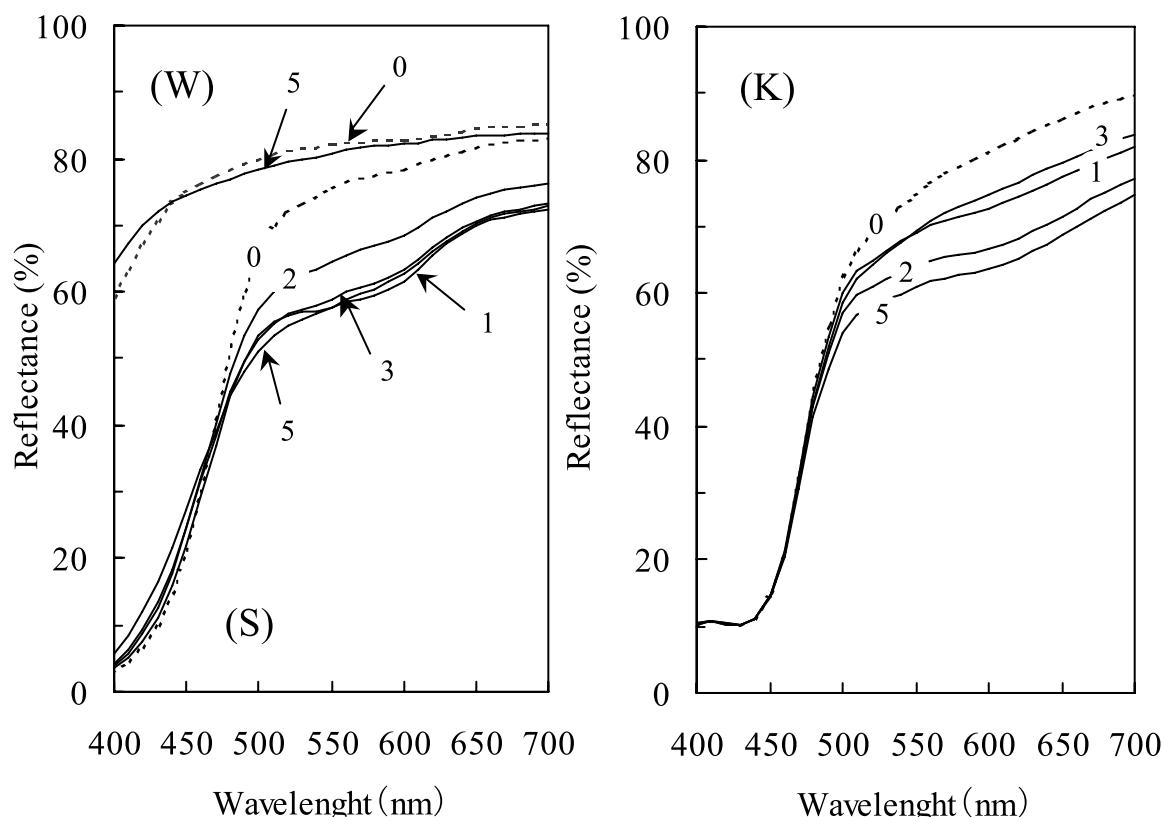


Fig. 1. Reflectance spectra of cocoon shells and kaempherol. (W), white cocoon; (S), Sasamayu cocoon; (K), kaempherol. Dotted lines show control samples without exposure to sunlight. Numbers 1 to 5 indicate 1 to 5-week exposure to sunlight, respectively.

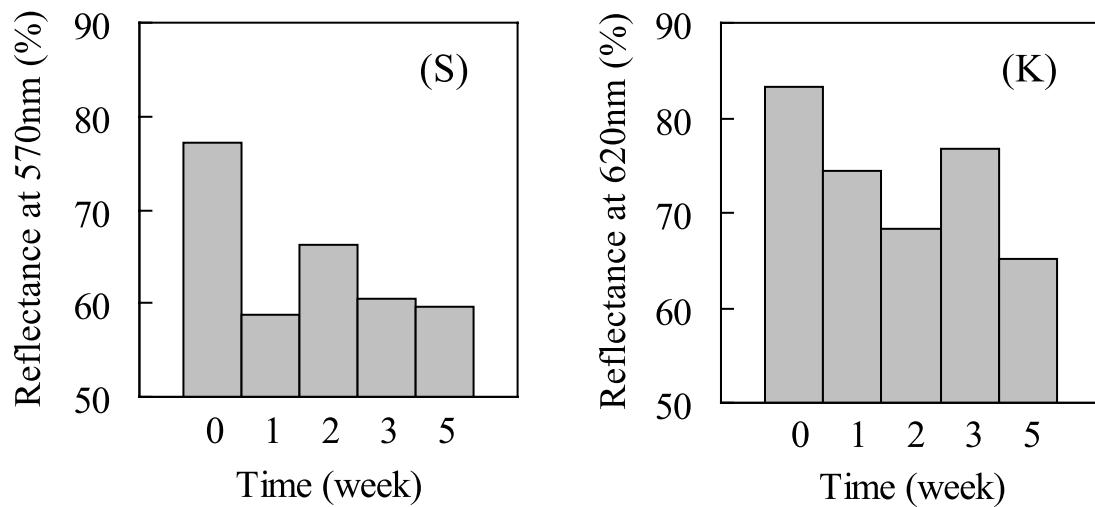


Fig. 2. Change of reflectance in Sasamayu (S, 570 nm) and kaempferol (K, 620 nm) as a function of time.

そこで、各試料の経時的な色彩変化について、色指標となる色彩パラメータで比較した結果をFig. 3に示す。色度は反射率から算出された a^* と b^* 値で決定され、 $-a^*$ と b^* はそれぞれ緑み及び黄みを表す。各値が大きくなるほど色は鮮明になり、0に近づくほど色がくすむことを示す。また、明度を示す L^* 値は100に近づくほど白く、0に近づくほど黒くなることを表す。

笹繭(S)の $-a^*$ 値、 b^* 値は露光時間に反比例して減少したが、2週間露光試料は例外的に1週間後よりも両値が増加傾向を示した。 L^* 値は1週間露光試料を除き、露光時間が長くなるほど減少傾向を示した。白繭(W)では、5週間露光後も色度及び L^* 値の変化が僅かであった。

露光前のケンフェロール(K-0)と笹繭(S-0)の色度を比較すると、ケンフェロールは笹繭よりも色度座標上の右斜め上方に位置していた。このことは、ケンフェロールが笹繭に比べて鮮明な黄緑色を呈していることを意味している。ケンフェロール(K)も露光後に色度が変化したが、その変化は笹繭とは異なる傾向を示した。ケンフェロールでは3週間露光試料を除き、露光時間が長いほど b^* 値が減少したが、 $-a^*$ 値の変動は僅かであった。また、 L^* 値においても、 b^* 値と同様の変動傾向が認められた。

各試料の未露光試料と露光試料との色差をFig. 4に示す。笹繭(S)は、露光1週間で未露光試料との色差が顕著に大きく、2週間露光試料を除いて、露光時間が長くなるほど未露光試料との色差はさらに増加する傾向が認められた。このような色差及び色度、 L^* 値にみられた色彩パラメータの変化は、日光露光によって笹繭が変退色したことを表している。これに対して白繭(W)は、5週間露光後も未露光試料との色差が小さく、色彩パラメータの変化も僅かであったことから、日光による変色は起こらなかったものと判断した。

一方、ケンフェロールの未露光試料と各露光試料との色差は、笹繭よりも総じて小さな値であった。しかし、ケンフェロールでは1週間露光後に未露光試料との著しい色差が認められ、5週間露光後には色差が顕著に増大したことから、5週間の日光露光によってケンフェロールが変色したことを示唆している。

以上の結果から、露光前には明るい黄緑色であった笹繭と、鮮明な黄緑色であったケンフェロールは5週間露光処理により両者ともにくすみが強くなることがわかった。また、目視において感知できなかったケンフェロールの変色を、色彩パラメータの変動から明らかにすることができた。

白繭に露光の影響がみられなかつたことは、タンパク質に変化がなかったと推察される。このため、本実験で認められた笹繭の変退色は、主にフラボノール色素の変化が関係しているものと推察される。また、笹繭とケンフェロールの変退色の経時変化が異なる理由は、露光時期が異なるために、露光量や露光強度に差が生じた可能性の他に、笹繭色素はケンフェロールだけでなく、複数のフラボノール配糖体から構成

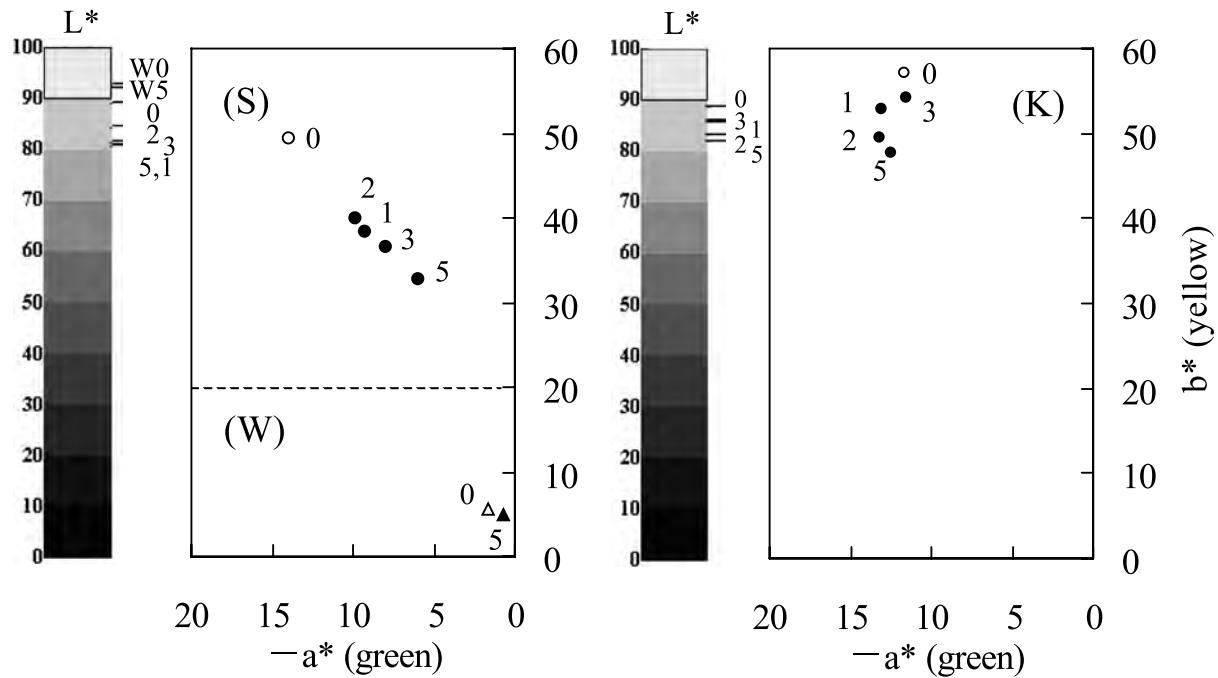


Fig. 3. Comparison of chromaticity and lightness between Sasamayu (S), white cocoon (W), and kaempherol (K). Solid circles with numbers 1 to 5 indicate 1 to 5-week exposure to sunlight, respectively. Open circles with number 0 are control samples without exposure to sunlight.

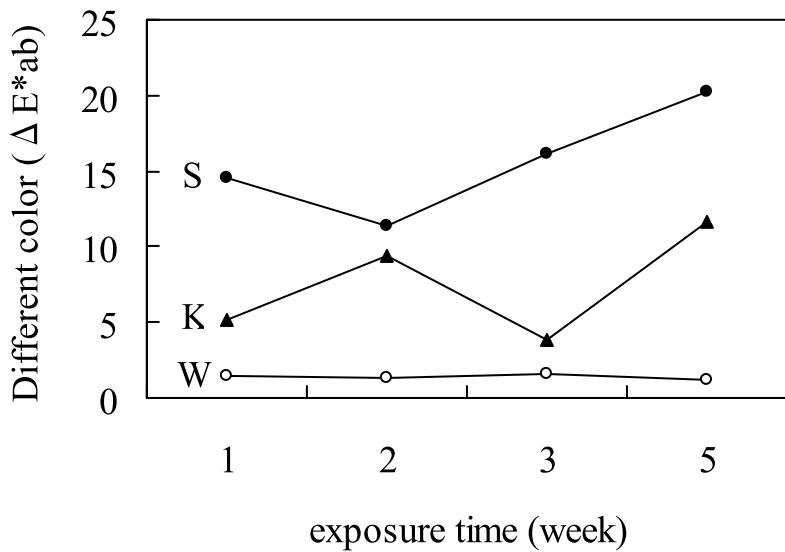


Fig. 4. Comparison of color difference between Sasamayu (S), white cocoon (W), and kaempherol (K) by exposure to sunlight.

される混合系であることも考えられる。この点については、露光量や露光時間の制御が可能なUV照射装置を用いて、詳細な検討を行う必要がある。また、筐繭のフラボノール色素の機能性を利用する場合には、紫外線遮蔽効果のある容器に保存するなどの対策が必要であり、変退色に伴う筐繭の機能性の変化についても現在検討を進めている。

摘要

筐繭の露光試験を行った結果、筐繭は日光露光1週間後には変退色し、5週間後には筐繭特有の明るい黄緑色がくすんだ黄緑色に変化した。5週間露光した白繭にはタンパク質の変色は認められず、筐繭の変退色はフラボノール色素の変化が関与していることがわかった。また、筐繭の反射率は露光時間の増加に伴い漸減するのではなく、一時的な増加時期が認められた。この現象はケンフェロールでも生じたので、筐繭の変退色の過程はフラボノールの特異的現象である可能性を示唆している。

Summary

The effects of exposure to sunlight on the color of Sasamayu yellow-green cocoons were studied using a spectroscope. The initial chromaticity of Sasamayu cocoons, which eventually turned darker after five weeks of exposure, showed discoloration during the first week of exposure. In white cocoons, however, no such discoloring was observed. The reflectance spectra of Sasamayu decreased with increased exposure time, in spite of showing a temporary increase during the first 2 weeks of exposure. The fluctuation patterns for the reflectance spectra of kaempferol were similar to those of Sasamayu, but showed a different period of temporary increase. These results suggest that the denaturing of flavonol is responsible for the color change in Sasamayu cocoons.

引用文献

- 1) 栗岡 聰・栗岡富士江・山崎昌良 (2005) 産業用オートクレーブ装置で調製した筐繭セリシン粉末の色相変化. 蚕糸会研報, **53**, 31-38.
- 2) 青木 昭・那須杜子明・齋島富士江 (1993) 限性黄繭糸によるニット製品の試作と性状. 蚕研彙報, **41**, 27-34.
- 3) 青木 昭・栗岡富士江 (1997) 限性品種「黄白」繭の生糸による織物の試作と性状. 糸絹研誌, **6**, 36-42.
- 4) 青木 昭 (1999) 色繭から得られる糸及び編織物の処理方法. 特許第2995475号.
- 5) 栗岡 聰・石坂弘子・山崎昌良・遠藤美代子 (1999) 繭の抗菌性試験. 糸絹研誌, **8**, 57-60.
- 6) 山崎昌良・中村直子・栗岡 聰・小松計一 (1999) 筐繭のアルコール抽出物の抗酸化作用. 日蚕雑, **68**, 167-169.
- 7) A. Kurioka and M. Yamazaki (2002) Purification and Identification of Flavonoids from the Yellow Green Cocoon Shell (Sasamayu) of the Silkworm, *Bombyx mor. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1396-1399.

養蚕農家で発生した不結繭蚕の原因解明

小川ひとみ¹・代田丈志²・岩永将司¹・川崎秀樹¹

¹宇都宮大学農学部昆虫機能利用学研究室

²蚕業技術研究所

HITOMI OGAWA, TAKESHI SHIROTA, MASASHI IWANAGA, and HIDEKI KAWASAKI: Study on the silkworm larvae that were incapable to spin cocoons at the sericulture farmer.

緒 言

カイコは変温動物であり長年屋内の管理された環境で飼育されてきたので、養蚕は気象変動や野外昆虫由来の病原体の侵襲、農薬汚染などの影響を受けやすい。明治以降の日本の養蚕においては、夏秋蚕期に生じる違作とその原因となっている軟化病や膿病および不結繭蚕の出現が大きな問題であった。

しかし近代の昆虫病理学の進展は、膿病が核多角体病ウイルスの感染に起因すること、伝染性軟化病ウイルスならびに濃核病ウイルスが軟化病の主因であることを明らかにし、ホルマリン消毒の奨励によって蚕作の安定化が図られてきた。

最近の養蚕における問題は、内部汚染繭の発生と希に不結繭蚕が出現することである。前者においては主に核多角体病ウイルスの感染によることが判明し¹⁾、消石灰上澄み液の散布による飼育環境改善によって病気の発生を減少させることに成功しているが、その一方で、これまでに稀にしか経験したことのない著しい気候の変動が頻繁に発生することによって蚕飼育場所や上ぞく室の温度が高くなり、それに起因すると考察される繭内部で斃死するカイコが出現してきている。後者の不結繭蚕の原因調査では、絹糸腺の異常に起因するものや細胞質多角体病ウイルスに起因するものが見いだされている。

そのような中で、平成18年に栃木県と茨城県の農家で上蔟時期に不結繭蚕が多発した。当該農家の聞き取り調査から、桑畠へ市販の鶏糞堆肥および畜産農家から譲渡された糞尿の自然発酵堆肥を施肥したことが明らかになった。畜産分野ではハエの駆除のために昆虫成育制御剤(IGR剤)²⁾が使用されており、JH類縁化合物のピリプロキシフェンをカイコの幼虫の各齢で添食させると5齢期間の延長、不吐糸、不結繭³⁾などの中毒症状が見られている。

このようなことから、堆肥中に存在すると想定されるIGR剤の影響に焦点を合わせて不結繭蚕の原因追跡を行った。それらの概要を報告する。なお、本研究は財団法人大日本蚕糸会の貞明皇后蚕糸記念科学技術研究助成によって実施されたものであり、ここに記して感謝申し上げる。

材料と方法

試供蚕品種は支124号×支124号を用いた。供試した堆肥は不結繭蚕の被害が発生した西那須野地域養蚕農家に残存していた堆肥を用い、堆肥との比較として用いたIGR剤は、市販のJH合成剤であるピリプロキシフェン(以後JHA剤と呼ぶ)(Sumitomo Chemical kk), キチン合成阻害剤のヨモベット(Bayer HealthCare kk), そして脱皮阻害剤のネポレックス(Novartis Animal Health kk)である。なお、供試頭数は10頭で行った。

経口投与試験には、蒸留水で溶解した堆肥またはIGR剤を塗布してから風乾した桑葉を用い、5齢起蚕から実験終了時まで桑葉を食下させた。なお、幼虫の経過は5齢起蚕から24時間ごとにV0～V20と表示した。

5齢期のカイコがJHA剤で発症する濃度と堆肥との関係を調査する試験において、JHA剤の0.02 ppm,



図1. 養蚕農家で発症した不結繭蚕
A: 初秋蚕期, B: 晩秋蚕期



図2. キチン合成阻害剤を塗布した桑葉を食下したカイコの症状



図3. JH剤および堆肥水溶液を塗布した桑葉を食下して発症した永続幼虫
A: ピリプロキシフェン2.0 ppm, B: 堆肥a

0.2 ppm, 1.0 ppm, 2.0 ppm 水溶液を調製した。西那須野地区の養蚕農家に残存していた堆肥 a, 小山地域の養蚕農家が保有していた堆肥（堆肥 b）および IGR 剤の散布を行っていない鶴糞堆肥（堆肥 f）の堆肥100 g に対して蒸留水400 g を加えた水溶液を調製した。また、JHA 剤2.0 ppm と堆肥 a で発症したカイコを5 齢期20日間飼育し、毎日の幼虫体重を測定した。

養蚕農家で発症した症状の再現実験は、無処理の対照、堆肥 a, 堆肥 b, 堆肥 f と JHA 剤1.0 ppm, 10.0 ppm, 100 ppm を添食して行った。聞き取り調査の結果から、一時的に堆肥に接触した桑葉が飼育されている一部のカイコに摂食されて被害が発生した可能性を想定して、JHA 剤および堆肥の水溶液を塗布した桑葉の食下は5 齢 V 0, V 1, V 2, V 3, V 4, V 5 の各1 日間だけとし、それ以外は対照区と同じ健全な桑葉を与えた。また、養蚕農家では上簇以降に桑葉を与えることは行なわないので、本実験では対照区が上簇した時点で給桑を停止し、養蚕農家で発症した症状と比較した。

結 果

1. 不結繭蚕が発生した養蚕農家の聞き取り調査

不結繭蚕（図1）が発生した栃木県の養蚕農家で聞き取り調査を行った結果、以下のことが明らかになった。不結繭蚕の症状が現れた養蚕農家は、桑園に堆肥および化学肥料を投入する際には表面散布をしていた。農家 a では、病蚕の発症少なく、農家 b では NPV の発症が認められた（表1）。摘桑作業時の条桑は表面散布された堆肥の上に一時的に置かれて結束作業が行われていた。そして、これらの桑は摘桑当日と翌日のカイコに給桑されていた。

2. 堆肥および IGR 剤の経口投与による5齢幼虫の症状

5 齢起蚕から実験終了時まで継続的に処理桑葉を食下させた結果を表2 に示す。これにみられるように、対照区は全て正常に化蛹した。JHA 剤および堆肥 a 処理区では100%の不結繭蚕が得られた。キチン合成阻害剤処理区では正常に結繭したが、体色の褐色化が見られ、90%のカイコが蛹化を阻害された（図2）。また、脱皮阻害剤を投与したカイコでは異常が認められず全て化蛹した。

表1. 不結繭蚕が発生した養蚕農家の状況

地域	農家	堆肥投入の有無	散布方法	堆肥の種類	化成肥料投入の有無	蚕作の状況	平成16年減蚕率	平成17年減蚕率	平成18年減蚕率
西那須野	a	有	表面に散布	発酵鶴糞	有	良			5.5
小山	b	有	表面に散布	発酵鶴糞	有	NPV発生	36.4	20.8	4.4

調査は2007年栃木県で行った。農家 a は平成 16, 17 年に NPV 発生が認められなかった。農家 b は平成 16, 17 年に NPV 発生した。

表2. IGR 剤と堆肥溶液を投与したカイコの蛹化状態

処理薬剤	不結繭蚕率(%)	異常蛹化率(%)	化蛹率(%)
対照	0	0	100
JH 剤	100	0	0
キチン合成阻害剤	0	90	10
脱皮阻害剤	0	0	100
堆肥 a	100	0	0

供試頭数 10 頭

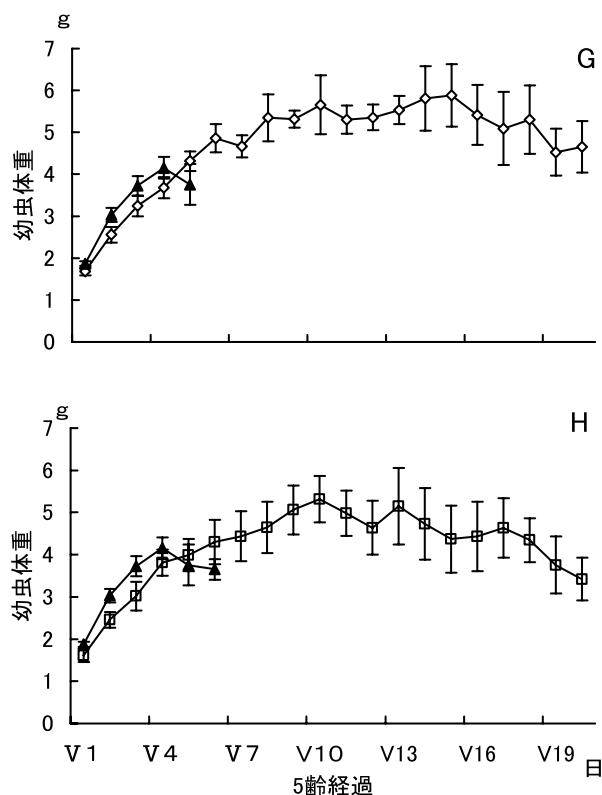


図4. 永続幼虫の幼虫体重の変動
5齢期幼虫にJHA剤2.0 ppmと堆肥aを添食して発症した永続幼虫カイコを20日間飼育した体重の変動. ▲, 対照; G△, JHA剤2.0 ppm; H□, 堆肥a.

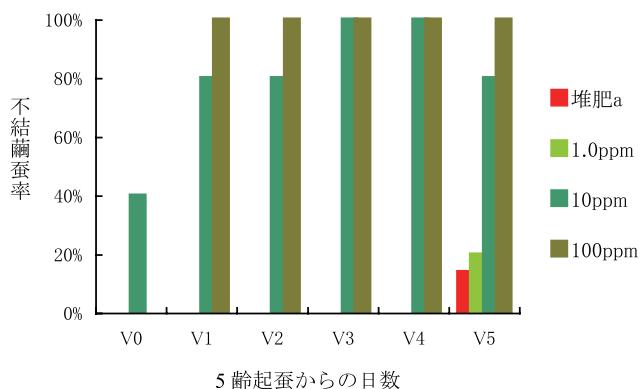


図5. 5齢期に堆肥およびJHA剤を投与して発症した不結繭蚕率
起蚕から24時間毎に1日間のみ処理桑葉を食下させた。それ以外は無処理の桑葉を給桑した。堆肥b及びfは発症しなかった。



図6. 養蚕農家で発症した不結繭蚕の再現
堆肥およびJHA剤を塗布した桑葉を5齢5日に1日間のみ食下したカイコを対照が上蔟した時点で給桑も停止した場合に観察された症状。

JHA 剤で発症する濃度と堆肥での発症を比較した結果を表 3 に示す。堆肥 f と JHA 剤 0.02 ppm, 0.2 ppm を塗布した桑葉を食下したカイコは発症しなかった。堆肥 a, 堆肥 b, JHA 剤 1.0 ppm および 2.0 ppm を塗布した桑葉を食下したカイコは、対照区が吐糸を開始した後も桑葉を食べ続け、幼虫の形態を維持した永続幼虫が 100% 出現した。

JHA 剤と堆肥の水溶液を添付した桑を食下させて得られた永続幼虫では、異なった体表面の変化が認められた（図 3）。すなわち、JHA 剤を添付した桑葉を食下したカイコは 17 日目から体表面の褐色化や脱腸がみられた（図 3 A）。一方、堆肥 a を食下したカイコは 10 日目頃から JHA 剤とは異なる体表面の色の変化が認められ（図 3 B），経過日数が伸びるに伴い 17 日頃には褐色化も確認できた。この異なる体表色の変化は堆肥水溶液が付着した桑葉を継続的に食下したカイコに、堆肥中の色素が影響して現われたと考えられる。

JHA 剤 2.0 ppm と堆肥 a を食下したカイコの幼虫体重の変動を図 4 に示した。前者の体重の変動は 5 歳 V10 に最大となり、V16 までこれに近い体重が維持された後に減少した。V10 の体重は対照区の最も重かった V4 の幼虫重 4.15 g の 1.38 倍となった（図 4 G）。また、堆肥 a を食下したカイコの体重は V13 で最も重くなり、対照区の 1.19 倍であった（図 4 H）。

3. 養蚕農家で発症したカイコの再現

被害養蚕農家で出現した不結繭蚕を実験的に得るために再現実験を行った結果を図 5 に示す。対照区と堆肥 f 区は 5 歳 6 日目で吐糸を開始した。堆肥 a 区では V5 に処理した桑葉を食下したカイコで不結繭蚕が 14.0% 出現し、他の時期では正常に上簇した。堆肥 b 区はどの時期に食下しても異常なカイコの発症が認められなかった。これに比べ、JHA 剤を食下した区では 1.0 ppm の V5 での処理で 20.0% 発症した。10.0 ppm では V0 から V5 での処理で発症し、V5 では 80.0% の発症率であった。100 ppm では V1 から V5 までの処理で 100% の不結繭蚕が発症した。このように、高濃度の JHA 剤が付着した桑葉を食下したカイコほど不結繭蚕の発症が多く認められた。

5 歳 5 日目の堆肥 a 区と JHA 剤を添付した桑葉を食下した区のカイコで共通に観察された点は、桑葉を摂食せず、吐糸せずに体長が縮まった幼虫形態を示すことであった（図 6）。

考 察

近年、環境にやさしい害虫防除方法として IGR 剤の開発が進められ、畜産現場におけるハエ防除にはこれら IGR 剤が使用されている。これまで、農家が使用した堆肥中にこれら IGR 剤が残存しているか否かは不明であった。

表 3. JHA 剤の発症濃度と堆肥の永続幼虫蚕発症の関係

処理薬剤	永続幼虫発症率
対 照	0
JH 剤 0.02ppm	0
〃 0.2ppm	0
〃 1ppm	100
〃 2ppm	100
堆肥 f	0
堆肥 a	100
堆肥 b	100

不結繭蚕が発生した養蚕農家で施用された堆肥を幼虫終齢期に継続的に投与した結果、IGR 剤の一種である JHA 剤を投与した結果と同じ症状を呈した。また IGR 剤非混入の堆肥については、無処理区と同様にカイコは正常に上蔟し異常はみられなかった。このことにより、堆肥 a および堆肥 b には JHA 剤または JH 類縁化合物の混入の可能性があると考えられた。

実際の発生状況や飼育環境を考慮にいれた再現実験では、JHA 剤の高濃度区で幼虫の形態を維持した永続幼虫が現れた。これは JH が体液中に多量にある状態と考えられる。また 5 齡 5 日目の堆肥 a 区、JHA 剤 1.0 ppm, 10.0 ppm 処理区で不結繭蚕が出現した。他の時期に堆肥 a を摂食させた区ではカイコに異常は確認できなかった。また堆肥 b 処理区では 5 齡幼虫期に継続的処理を行ったカイコから永続幼虫が出現したが、再現実験では全ての個体が上蔟した。この結果から、堆肥 b 区には堆肥 a 区よりも少量の JH 剤または JH 類縁化合物の混入が示唆された。

以上のことにより不結繭蚕が発生した養蚕農家が、養鶏農家から入手し桑園に施用した堆肥中には、IGR 剤である JHA 剤または JA 類縁化合物が微量に存在しており、それが摘桑時に桑葉に付着し、5 齡盛食期後期のカイコに摂食したため発症したと結論づけられる。また、聞き取り調査から明らかなように養蚕農家の減蚕率が低かったことから、堆肥と接触した桑葉はわずかであると考えられる。

本研究によって明らかのように、JH 類縁化合物の混入に起因する減蚕率は低く、これまで農家にとっては軽視されがちであった。しかし、多少とも原因不明の不結繭蚕が発生することは、将来的に優良繭の生産に大きく影響しかねない。ピリプロキシフェン剤は少量散布でも 120 日以上の残毒³⁾を示しており、IGR 剤の中では注意を要する薬剤であるとされているので、醸酵鶏糞堆肥を投入してしまった桑園での摘桑作業においては、地表面に施肥された堆肥に桑が接觸しないように注意することが、不結繭蚕の発生防に慣用である。

摘要

平成18年に茨城県及び栃木県の養蚕農家で原因不明の不結繭蚕が発生した。この出現原因の追跡を行い、発生経路を明らかにした。まず、不結繭蚕が発症した養蚕農家の共通点として、家畜の堆肥を桑園に施用していることが判明した。そこで、家畜舎ではハエなどの防除に昆虫成長制御(IGR)剤が用いられていることから該当養蚕農家の堆肥に IGR 剤が含まれているのではないかと仮説を立て追求した。

市販されている幼若ホルモン (JH) 剤・脱皮阻害剤・キチン合成阻害剤、該当養蚕農家に残存していた堆肥を桑葉に塗布し、カイコ最終齢幼虫に継続的に摂食させた。その結果、JH 剤と堆肥処理区から永続幼虫や不結繭蚕が出現した。一方でキチン合成阻害剤を処理したものでは正常に結繭を行なったが、幼虫期には体色の褐色化が見られ蛹化形成は阻害された。また、脱皮阻害剤で処理を行なったものでは異常は見られず結繭した。この結果を受けて検証を行なった結果、養蚕農家で生じた不結繭蚕は、最終齢幼虫の盛食後期に 1.0 ppm~10.0 ppm の JHA 剤または JH 類縁化合物を含有している堆肥が桑葉に付着し一部のカイコが摂食したことによるものと結論づけた。

英文摘要

Many domestic silkworms, *Bombyx mori*, which were incapable of cocoon formation, appeared at farmers of Ibaraki and Tochigi prefectures in 2006. We tried to clarify the above phenomenon reason by the following study. The farmers concerned used barnyard manures in the mulberry field. Insect growth regulators (IGR) has been used to prevent spreading of insect pests in the field of stock-breeding. From these we speculated whether barnyard manures contained IGR or not. Juvenile hormone analogue (JH), the molt inhibitor, inhibitor of the chitin synthesis and barnyard manures were dissolved with water. These solutions were applied to the fresh mulberry leaves, and fed larvae on them during 5th instars. The result, application of JHA and barnyard manures brought about eternal larvae and larvae that were prevented spinning. The larvae treated with inhibitor of chitin

synthesis grew normally, formed cocoons and pupated similarly to intact animals. The larvae treated with molt inhibitor spun cocoons normally, but their pupation was blocked. From these results, it is suggested that barnyard manures may include JHA of 1.0 ppm~10.0 ppm, and larvae that were prevented spinning fed JHA containing barnyard manures on late 5th instars.

参考文献

- 1) 高橋幸吉, 中村鶴松, 栗栖式彦, 酒井 智, 中岡保雄, (1957) 不結繭蚕に関する研究. 熊本県蚕業試験場報告, 1-60.
- 2) Hatakoshi, N., Kishida, H., Kawada, H., Ohuchi, H., Isobe, N., Ogino, T. (1997) Pyriproxyfen a new insect growth regulator, Sumitomo chemical., 1, 4-20
- 3) Koyama, C. (1994) The poisoning of Silkworm influence by Insect Growth Regulators (IGR). Gunma Sericultural Experiment Station, 1, 27-30.