

原種 및 交雜種에 對한 微粒子の 病原性에 관한 研究

*金 鍾 洙 · *金 文 浹 · **蔡 洙 君 · **林 鍾 聲

(*서울대학교 農科大學, **農村振興廳蠶業試驗場)

Studies on Pathogenicity of *Nosema bombycis* Naegeli to Parents and Hybrid in the Silkworm (*Bombyx mori* L.)

*J.S. Kim, *M.H. Kim, **S.K. Chae, **J.S. Lim

(*College of Agri., Seoul National Univ., **Sericultural Experiment Station)

Summary

Studies on Pathogenicity of *Nosema bombycis* Naegeli are summarized as follows:

1. The mortality of the parents, Jam 103 and Jam 104, is remarkably higher than that of the hybrid, Jam 103×Jam 104, whereas there is no difference in the mortality between the parents.
2. In the mortality of the pathogen-concentration, it is increased in order of the following concentrations inoculated, 10^8 , 10^7 , 10^6 and 10^5 /ml.
3. In the mortality of each instar, it is high in order of 5th, 4th, 3rd, and 2nd instar.
4. In the interaction between the mortalities of the varieties and the concentrations,
 - 1) The mortality shows no differences between the parents and the hybrid in the high concentration of 10^8 /ml.
 - 2) The mortality of the hybrid is lower than that of the parents in the low concentration of 10^5 /ml, whereas no difference is found between the parents.
 - 3) The interaction appears at the same level in the middle concentration of 10^6 /ml to the parents and of 10^7 /ml to the hybrid.
5. It was pointed out that active immunity depends upon the volume of antigen injection, immunizing period, and injection intervals. In this experiment, it is noticed that the optimum volume of injection is above 20ml and D is the best one of the four treatment (A.B.C.D.).
6. The immune sera indicate such a 12,800 high titer in the indirect method can be obtained from the D immunizing method. Silkworm tissues and *N. bombycis* spores show self-fluorescence, but it is able to distinguish it from the F.I.T.C. by using the U.V. filter.
7. The midgut epithelium is examined to be the first site of the tissues which are penetrated into and multiplied by the inoculation of the pathogen per os.

I. 緒 言

누에 미립자병(*Nosema bombycis* Naegeli)의 寄主는 Lepidoptera(鱗翅目)외에도 13종류목(目)에 기생하는 기주범위가 넓은 병이며, 특히 누에의 경우에는 누에치는 시기를 통하여 언제 어디서나 그 발생이 가능하여 때로는 큰 피해를 초래하는 무서운 병이다. 한 예를 들면 19세기 중엽에 유럽의 유명한 잠업국인 프랑스(France)에서 이병의 발생으로 인하여 잠업이 거의 파멸상태 까지 이르게 되었고 병이 없는 누에알을 얻기 위하여 외국에서 대량으로 수입하지 않으면 안될 정도로 그 피해가 극심 하였다.

누에 미립자병에 관해서는 Pasteur(1870)가 미립자의 전염경로 및 모체전염을 구명하였고 三谷(1926)은 누

에 품종별 미립자 원충에 의한 胚種傳染의 수량적 관찰에서 계통별 잠복종의 미립자병에 대한 感受性의 강약은 그 폐잠수에서 일본종 < 중국종 < 구주종 順으로 많았고 령기별로는 치잠기가 장잠기보다 폐잠수가 높았다고 밝혔다. 大島(1937)은 미립자 포자에 대한 가잠 소화액의 殺菌力에 있어 누에의 소화액은 미립자 포자를 죽이는 힘이 있으며 령기적으로 볼 때 누에가 발육함에 따라 점차적으로 소화액의 살균력이 증가한다고 밝혔다.

三谷(1913)은 경구전염된 미립자 병잠의 芽胞 배설물 조사에 있어서 령기별, 日數別로 배분립을 채취 鏡檢하였는데 각각 일수별, 령기별로 배설물의 芽胞數가 다르게 나타난다고 보고 하였으며 배분립은 蠶座感染의 근원이 된다고 보고 하였다.

岩淵・三谷(1913)은 미립자는 卵에 대한 遺傳性, 전염순서 및 배자전과 順序등을 病理解剖學的으로 자세히 연구한 발표에서 미립자전염 1일후에는 소화관내에 Planont의 多數가 보였고 소화관 세포내에는 Meront 형태가 조금 보였으며 2일후, 3일후에는 그 수가 매우 증가하였고, 4일후에는 소화관 피막조직에 Meront의 번식개체와 소화관 圍繞筋肉, 縱走筋肉, 體腔內筋肉에서도 Meront 형태의 증식을, 5일 경과되면 脂肪組織에, 6일째는 말피기씨관, 氣管膜, 網絲腺, 생식기 및 혈구등에서도 Meront 형태를 인정, 7일째는 소화관, 피막조직, 圍繞筋肉 및 체강내조직에 Meront와 成熟한 芽胞體를 형성한다고 하였다.

미립자 병원체의 감별진단 방법으로는 岩淵(1909)이 母蛾의 過乾에 의하여 변형된 미립자포자의 약물처리에 의한 형태부활을 연구발표 했고, 宮崎・兵頭(1923)은 미립자포자와 유사한 진분립 식별법의 규명에 있어서 염산처리가 미립자포자에 미치는 형태상의 변화에 대하여 관찰, 유사물과의 판별법을 규명하였다.

Gram stain을 하면 미립자포자는 다른 병원체와는 달리 동일개체내에 음성과 양성으로 염색이되어 기타 유사한 병원체와 감별이 용이하다고 하였다.

大島(1937)은 *Nosema bombycis*의 포자 生死 鑑別의 新法에서 포자를 포자 추출용액(H_2O_2 6%+KOH2%)에 넣어 인위적으로 극사를 추출 極絲의 有無로 포자의 생사를 판정하였다.

藤原(1966)의 3人, 林鍾聲(1971)은 가잠 미립자 병원체 *Nosema bombycis* Naegeli의 免疫螢光染色에 관하여 미립자 포자 및 잠체조직은 自家螢光을 볼 수 있었으며 U.V. filter로 관찰하게 되면은 FITC의 형광색을 명확히 식별할 수 있었다고 보고 하였다.

해방이후 우리나라에서는 이 미립자 대한 연구는 거의 보고 된바 없었으며 따라서 이번 연구목적은 미립자 병원성의 제일차적인 연구로서 경구전염에 대한 原種과 交雜種사이의 병원성을 비교하였고, 누에 배설물에 대한 조사와 催靑死卵을 검사하여 經卵傳染을 구명하였다.

II. 研 究 史

누에 미립자(*Nosema bombycis* Naegeli)병원성에 대해서는 여러가지 면에서 연구가 이루어 졌다.

Pasteur(1870)가 미립자의 전염경로 및 모체전염을 구명하였고 특히 본병의 예방 방법으로 袋探製種法을 발견하였다. 三谷(1926)은 누에 품종별 미립자 원충에 의한 胚種傳染의 수량적 관찰에서 계통별 잠복종의 미립자병에 대한 感受性의 강약에서 그 폐잠수는 구주종, 중국종, 일본종 순으로 많았고 령기별로는 치잠기는 장잠기 보다 斃蠶數가 높았다고 밝혔다.

大島(1932)는 미립자 포자에 대한 가잠 소화액의 살균력에 있어 령기적 변화에 대해서는 누에의 소화액은 미립자 포자를 죽이는 힘이 있으며 령기적으로 볼 때 누에가 발육함에 따라 점차적으로 소화액의 살균력이 증가 한다고 밝혔다.

藤原(1965)은 미립자병의 누에에 대한 최소 감염량에 대해서 누에 한마리당 최소 감염량의 포자수는 령기별로 2령 < 3령 < 4령 < 5령 순으로 포자의 감염량이 증가 한다고 하였다.

三谷(1937)은 경구전염된 미립자 병잠의 아포 배설물 조사에 있어서 령기별, 日數별로 배분립을 채취 鏡檢하였는데 각각 일수별, 령기별로 배설물의 아포수가 다르게 나타난다고 보고 하였으며, 배분립은 蠶座感染의 근원이 된다고 보고 하였다.

미립자의 구조와 증식과정에 대한 연구로서는 Stempel(1910)의 미립자 원충의 형태 및 생태에 대한 연구에서 포자의 형상은 대개 타원형 또는 새알모양이며 被殼은 두텁고 極囊이 존재하며 극사는 극낭내에 규칙 정연하게 旋回되어 있다고 하였고 芽胞는 그의 寄生體 내에서 발아한다고 말하였으며 Planont시기에는 二分裂法에 의해서 증식되고, Meront시기에는 이분열과 出芽分裂法으로 증식한다고 밝혔다.

大森(1914)은 미립자 원충아포의 極絲에 관한 연구에서 극사는 一端의 空所內에 존재하며 Meront시기의 증식관계에 있어서는 多數分裂法으로 분열한다고 보고 하였다.

工藤(1915)은 미립자 원충의 구조 및 發育圈에 관한 새로운 사실을 발표 하였는데, 芽胞에 있어서 被殼은 Stempell이 측정 한 것 보다 얇으며 극사의 旋回 상태에 대하여 異議를 제기 하였고 아포는 그의 寄主 消化液에서 發芽 生成한다고 하였고, Planont 시기를 인정할 수 없었으며, Meront 시기의 증식 단계는 二分裂法으로 한다고 주장하였다.

大島(1937), Kramer(1960), Lom, Vavra (1963)는 Planont 시기를 인정하지 않았으며 이 시기는 想像的인 實體라고 주장했다.

石原(1969)은 누에의 조직배양에서 나타난 미립자의 생활사에서 Planont 시기를 거의 볼 수가 없었다고 발표했다. 조직학적인 관찰에서 岩淵, 三谷(1913)은 미립자의 卵에 대한 遺傳性 전염순서 및 배자전과 順序등을 病理解剖學的으로 자세히 연구한 발표에서 미립자 전염 1일 후에는 소화관내에 Planont의 多數가 보였고 소화관 세포내에는 Meront 형태가 조금 보였으며 2일후, 3일후에는 그 수가 매우 증가 하였고, 4일후에는 소화관 皮막조직에 Meront의 개체와 소화관 圍繞筋肉, 縱走筋肉, 體腔內筋肉에서도 Meront 형태의 증식을 볼 수 있고, 5일 경과되면 脂肪組織에 근소하게 Meront의 번식을 인정하며 6일에는 말피기 氏管, 氣管膜, 絹絲腺, 생식기 및 血球 등에서도 Meront 형태를 인정하였고, 7일째는 소화관 皮막조직, 匏繞筋肉, 巨縱走筋, 체강내조직에 Meront와 成熟한 芽胞體를 형성한다고 하였다.

미립자 經卵傳染(Transovarial Transmission)은 암나방에 감염된 미립자가 처음에 卵原細胞를 침해하고, 다음에 난원세포가 알세포와 영양세포로 분화하게 되면 이들에게도 기생하게 된다. 기생은 받은 알세포는 병이 중한 경우에는 죽게 되지만, 경한 것은 발달하여 경반이를 하여 알을 낳게 되고, 또 알세포의 영양구멍을 통하여 영양세포에서 양분이 흘러 들어갈 때에 미립자도 함께 흘러 들어가게 되어 미립자는 씨눈이 자라는 동안에는 일반적으로 그 성장을 침해하지 않고 완전히 자라도록 한뒤 기주몸의 성장을 완전히 하여 자기몸을 영구히 보존할 수 있도록 하는 것은 일반 기생체의 공통된 사실이다. 알안에 있는 미립자는 포자가 되는 것은 적으며, Meront로 일정한 休眠期를 지난뒤에 씨눈의 성장과 함께 그안에 들어가게 되는 것이다.

미립자 병원체의 감별진단방법으로는 염색법(staining), 염산(HCl)에 의한 아포의 변형 및 消失 현상, 인위적인 극사 추출법 및 면역 형광 염색법등이 있다.

염색방법으로는 KOH(가성가리) 4% 용액과 Safranin(6mg)+Alcohol(100cc)을 같은 量으로 섞어서 염색하게 되면 미립자포자의 核은 濃赤色, 原形質은 赤色 또는 淡赤色으로 着色된다고 하였고 Gram staining에 의하면 미립자포자는 다른 병원체와는 달리 동일 개체내에 陰性과 陽性으로 염색이 되어 기타 유사 병원체와 감별이 용이하다고 했으며, 염산처리에 있어서 그 용해정도에 의하여 미립자포자의 판별이 가능한데, 즉 25~35% 염산에 희석하여 30°C에 30분간 보온하면 미립자포자는 완전 용해 되는데 반해서 경화균은 부분 용해, 세균은 원래의 모양을 유지한다고 하였다.

大島(1939)은 *Nosema bombycis*의 포자 生死 鑑別의 新法에서 포자를 포자 추출용액(H₂O₂ 6%+KOH 2%)에 넣어 인위적으로 극사를 추출 극사의 有無로 포자의 生死를 판정하였다.

石原(1967)은 *Glugea famiferanae* 포자의 극사를 抽出시키는 자극물에 관한 연구에서 극사추출 하는데에는 pH 10.8, 온도는 30°C 때가 가장 많이 추출되었다고 발표했다.

가잠 미립자 병원체 *Nosema bombycis* Naegeli의 免疫螢光染色에 관하여 미립자 포자 및 잠체조직은 자가 형광을 볼 수 있었으며 U.V. filter로 관찰하게 되면은 FITC의 형광색을 명확히 식별할 수 있었다고 보고 하였다. <藤原公, 扇元敬司, 須藤恒二, 上田金時 (1966), 林鍾聲(1971)>.

Ⅲ. 試驗材料 및 方法

품종별 병원성을 구명하기 위하여 공시 잠품종은 현재 우리나라에서 보급되고 있는 장려품종의 하나인 교잡종 잠103×잠104와 원잠종, 잠 103, 잠 104를 택하였다. 병원체 *Nosema bombycis* Naegeli(포자를 분양하여 준 일본 잠업시험장 병리부에 감사를 드리며)포자를 사용 하였으며 처리방법은 난괴법 3반복 각구 20두씩 공시하여 사육하였고 접종농도는 Haemocytometer에 의해서 10⁸ spores/ml 되게 희석한후 단계적으로 10⁷ spores/ml, 10⁶ spores/ml 및 10⁵ spores/ml 되게 희석한 각농도를 얻었다. 접종방법은 미립자를 뿔잎에 도말 陰乾 후

품종별, 령기별(2령~5령) 起蠶에 1회 침식시켰다. 排糞粒 조사에 있어서는 령기별(3령~5령)로 잠 103× 잠 104의 기잠에 병원액(10^8 spores/ml)을 침식시켜 12시간씩 간격을 두고 매 령기별로 잠분을 채취하여 현미경으로 鏡檢해서 포자수를 계산하였다. 5령 기잠때 10^6 spores/ml, 10^8 spores/ml, 10^7 spores/ml의 농도별로 침식하여 살아남은 나방이로부터 얻은 알을 증침한후 경란전염의 여부를 알기 위하여 최청사란 및 난각을 검사하여 조사 하였다. 그리고 LD₅₀를 구하는 공식은 Reed와 Munch씨 방법에 의하여 산출하였다. 조직학적 관찰은 다음과 같은 과정으로 실행하였다. 절종시킨 병잠은 Bowin's 고정액에 고정시킨후 Alcohol(60%~100%)에 다 1일간씩 8일간 단계적으로 탈수하여 Methyl Benzoate 및 Benzene에 6일간 씻고, 그 다음 6일간 Wax에 침투시켜서 Embedding 하였다.

2~3 μ 두께로 잘라서 60°C 액온에서 절편을 편후 24 시간 Xylene에 넣었다가 여러 단계의 Alcohol(100%~20%)에다 5분씩 경과후 염색하였다.

염색방법의 순서는 절편된 조직을 A 용액에서 1~5분, B 용액에서 20~60분, 그리고 95% Alcohol에 3~4번 잠간동안 담근후 곧 100% Alcohol에 2~3번 담가서 완전 脫水시킨후 Xylene을 통과시켜 mounting(Canada Turpentine)하여 관찰하였다.

위의 과정을 자세히 요약하면 아래와 같다.

Bowin's fixative → 60% Alco. → 70% Alco. → 80% Alco. → 90% Alco. →
 (1일) (1일) (1일)

탈 수 과 정

% Alco. → 95% Alco. → 100% Alco. → 100% Alco. → 100% Alco. →
 (1일) (1일) (1일) (1일) (1일)

|-----Clearing-----| |-----Wax impregnation-----|

Methyl Benzoate → Benzene → Benzene Wax → Wax 한 후 Embedding하여 microtome으로 2~3 μ 크기로 잘라서
 (3일) (3일) (3일) (3일)

|-----탈 수 과 정-----|

→ Xylene → 100% Alco. → 100% Alco. → 95% Alco. → 90% Alco.
 (1일) (5분) (5분) (5분) (5분)

탈 수 과 정 -----|

→ 80% Alco → 60% Alco → 40% Alco → 20% Alco → Distilled
 (5분) (5분) (5분) (5분) (5분)

Water에서 고집어낸후 염색을 Mallory's Aniline Blue Stain으로 행하였다.

※ Bowin's fixative { Picric acid 1.4% 수용액 ... 150ml }
 { Formalin ... 50ml }
 { Glacial acetic acid ... 10ml }

※ Mallory's Aniline Blue stain

Acid fuchsin solution A 용액

{ Acid fuchsin, 0.5 Gm }
 { Distilled water, 100ml }

Aniline Blue and Orange G solution B 용액

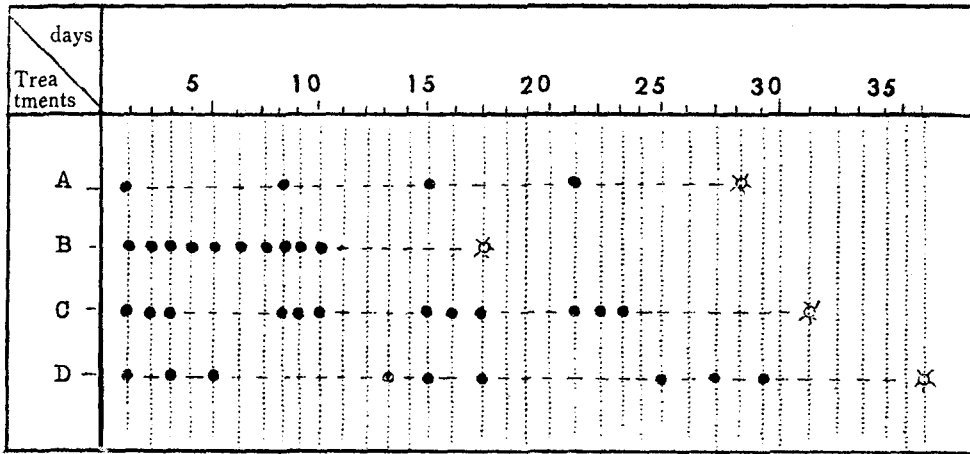
{ Aniline blue, water soluble 0.5Gm }
 { Orange G 2 Gm }
 { 1% Aqueous Phosphotungstic acid ... 100ml }

면역형광 염색법은 미립자에 감염된 유충에서 추출한 *N. bombycis*의 생존포자를 순수분리하여 0.85% 식염수에 부유액을 만들어 미립자 포자수를 10^8 spores/ml 되게 희석한 포자액을 항원으로 사용했다. 면역 주사법은 <표 1>과 같이 절종량 및 주사간격을 각각 달리해서 토끼(약 2.5Kg)의 정맥에 주사를 하고 採血은 면역 종료후 1일전에 행하여 제1차 혈청을 얻었다. 면역혈청은 냉동기 -40°C로 보존하면서 시험을 실시하였다.

Table 1. Immunization and inoculum of antigen *N. bombycis* spores

Treatments	Concentration of Antigen	Inoculum per an injection	Times of injection	Total Inoculum of Antigen
A	10 ⁸ spores/ml	2.5ml	4Times	10ml
B	"	2.5ml	10 "	25ml
C	"	2.0ml	12 "	24ml
D	"	2.0ml	9 "	18ml

※ Antigen: Spores of *N. bombycis*



● : injection ⊗ : bleeding

면역형광 염색의 직접법에 사용한 형광색소 標識抗體 및 염색방법은 藤原 外 3人(1966), 林鍾聲(1971)의 방법에 따라 시행하였다.

극사 추출법은 포자를 극사추출 용액(H₂O₂ 6% 2cc+KOH 2% 0.08cc)에 넣은 후 추출용액 액온을 28°C, 10~30분간 방치후 용액을 적어서 슬라이드에 놓고 암시야 조명에 의하여 극사를 관찰했다.

IV. 試 驗 結 果

1. 포자의 크기

Table 2. The size of *N. bombycis* spores

Unit : μ

	Rep-1		Rep-2		Rep-3		Rep-4		Overall means	
	Range	Average	Range	Average	Range	Average	Range	Average	Range	Average
Length	2.3~4.8	3.85	2.0~7.0	3.78	3.0~5.3	3.56	2.0~4.1	3.15	2.0~7.0	3.59
Width	2.0~3.0	2.55	1.2~3.5	2.59	2.0~3.5	2.61	1.2~3.3	2.6	1.2~3.5	2.59

포자와 크기는 <표-2>에서 나타난것과 같이 평균3.59(長)~2.59(短)μ였다.

<표-3>에서 나타난것 같이 품종간의 령별 LD₅₀=1.8×10⁸ 4령에서 LD₅₀=3.2×10⁶이며, 원종인 잠 103에서는 5령에 LD₅₀=4.0×10⁷ 4령에 LD₅₀=2.5×10⁸, 잠 104에서는 5령에 LD₅₀=5.1×10⁷ 4령의 LD₅₀=2.9×10⁶으로 나타났다. 교잡종의 LD₅₀는 4령과 5령에서 원종 잠 103과 잠 104와 비교할때 LD₅₀치가 원종보다 높았다 농도와 폐잠수 사이에는 회귀관계가 있었으며 <표-4>과 같이 품종별, 령별 회귀직선을 구하였다.

2. LD₅₀와 Probit

〈Table-3〉 LD₅₀ and probit of the varieties, the instars and the concentrations

Varieties Instars Mortality & Probit Concentrations	(Jam 103×Jam 104)								Jam 103			
	2		3		4		5		2		3	
	A.M	P	A.M	P	A.M	P	A.M	P	A.M	P	A.M	P
5.8×10 ⁸ /ml(8.77)Log	100	8.7190	100	8.7190	100	8.7190	94.46	5.893	100	8.7190	100	8.7190
							LD ₅₀ =1.8×10 ⁸					
5.8×10 ⁷ /ml(7.77)	100	8.7190	100	8.7190	93.63	6.5301	37.03	4.6681	100	8.7190	100	8.7190
5.8×10 ⁶ /ml(6.77)	99.04	7.3416	94.79	6.6258	77.01	5.7388	13.91	3.9152	100	8.7190	96.07	6.7624
					LD ₅₀ =3.2×10 ⁶							
5.8×10 ⁵ /ml(5.77)	77.14	5.7421	56.05	5.1535	23.78	4.2872	2.52	3.04	88.33	6.1901	65.65	5.4043

Varieties Instars Mortality & Probit Concentrations	Jam 103				Jam 104							
	4		5		2		3		4		5	
	A.M	P	A.M	P	A.M	P	A.M	P	A.M	P	A.M	P
5.8×10 ⁸ /ml(8.77)Log	100	8.7190	95.81	6.7279	100	8.7190	100	8.7190	100	8.7190	95.41	6.6849
5.8×10 ⁷ /ml(7.77)	95.48	6.6954	60.82	5.2741	100	8.7190	100	8.7190	94.54	6.5982	53.80	5.0954
			LD ₅₀ =4.0×10 ⁷						LD ₅₀ =5.1×10 ⁷			
5.8×10 ⁶ /ml(6.77)	85.08	6.0407	29.90	4.4727	100	8.7190	95.03	6.6449	79.25	5.8169	23.38	4.2743
	LD ₅₀ =2.5×10 ⁶								LD ₅₀ =2.9×10 ⁶			
5.8×10 ⁵ /ml(5.77)	28.94	4.4437	6.63	3.4937	86.66	6.1123	63.12	5.3345	25.76	4.3505	6.22	3.4618

※ A.M=Average Mortality. P=Probit

〈Table-4〉 The regression line of the varieties and the instars.

Varieties Instars	Jam 103×Jam 104	Jam 104	Jam 103
2nd instar	Y=0.9063+0.9518X t=2.6098*	Y=2.3987+0.7801X t=2.4671*	Y=2.585+0.7571X t=2.4565*
3rd instar	Y=-1.9825+1.2782X t=3.0047**	Y=-1.5092+1.2202X t=3.0039**	Y=-1.2316+1.1882X t=2.9989
4th instar	Y=-3.9279+1.4095X t=3.0978**	Y=-3.7547+1.3929X t=3.0912**	Y=-2.8980+1.2910X t=2.9616**
5th instar	Y=-3.6786+1.1338X t=3.0413**	Y=-2.8256+1.0598X t=3.0979**	Y=-2.5491+1.0395X t=3.1197**

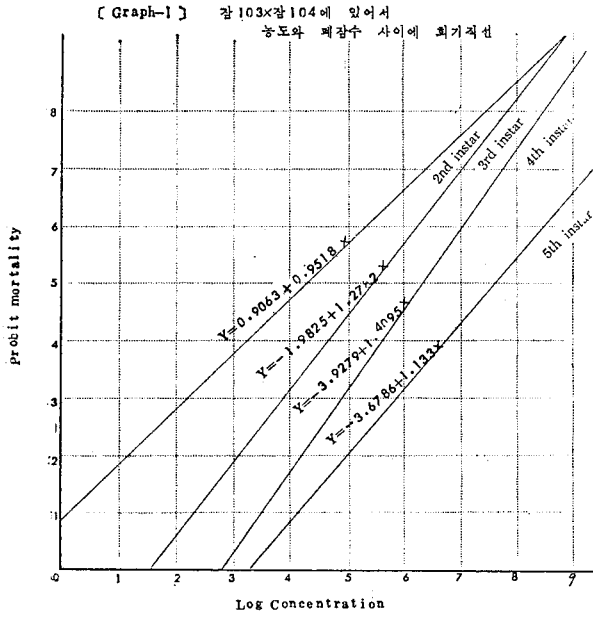
〈표-4〉에서 나타난것 같이 장잠기에 있어서 병원체 농도와 폐잠비를 관계는(t-value에 있어서) 고도의 회귀관계가 있었으며 치잠기에는 회귀관계가 성립되는 것을 보여주고 있다.

이것을 품종별, 령별로 Graph을 표시하면 다음과 같다.

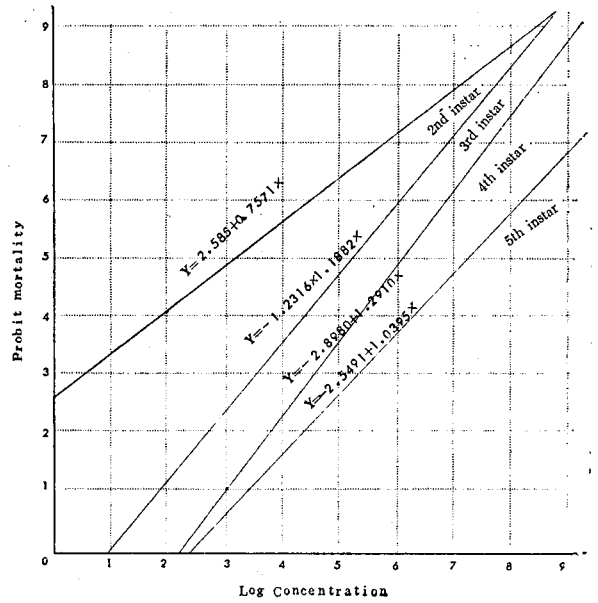
Graph 1~Graph 3에서 보는 것 같이 각 품종간에 있어서 공히 폐잠수는 5령<4령<3령<2령 순으로 폐잠수가 높은 경향을 나타냈다. Graph 1~Graph 3을 종합해서 Graph을 그려 놓은 것이 Graph-4이다.

〈표-5〉에서 나타난것 같이 반복간에는 유의차가 나타나지 않았으며, 폐잠수와 령 사이에 있어서는 5령<4령<3령<2령 순으로 폐잠수가 많았으며 폐잠수와 농도 간에 관계에서 10⁵<10⁶<10⁷<10⁸ 순으로 폐잠수가 많았다. 품종과 농도사이의 교호작용에 있어서는 고농도(10⁸/ml)에서는 원종과 교잡종간에는 차이가 없었으며 저농도(10⁵/ml)에서는 교잡종은 원종 보다 낮았으나 원종간에는 차이가 없었다. 중간농도(10⁷/ml, 10⁶/ml)에서는 交互作用이 엇갈려 원종의 10⁶/ml과 교잡종의 10⁷/ml에서 교호작용이 같았다.

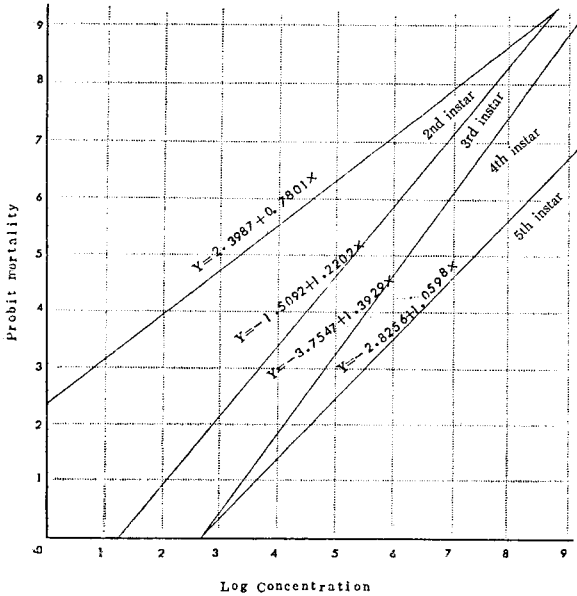
[Graph 1] Dosage-Mortality responses in each instar of Jam 103×Jam 104 following use of *N. bombycis* spores-suspension with mulberry leaves.



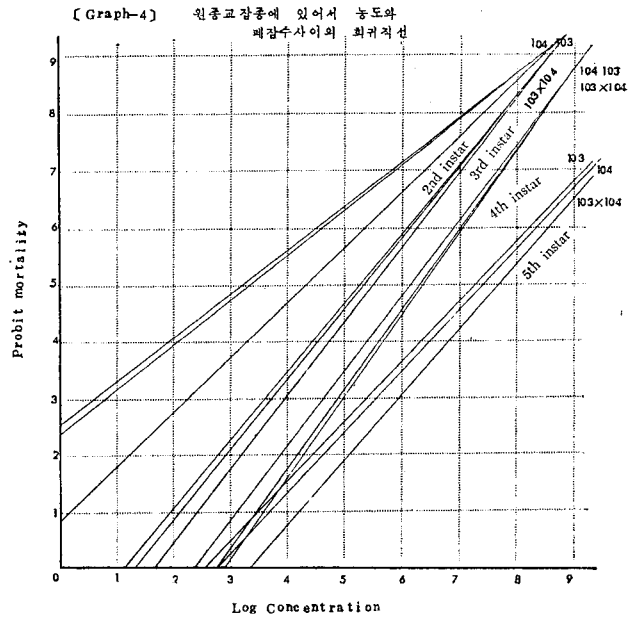
[Graph 2] Dosage-Mortality responses in each instar of Jam 103 following use of *N. bombycis* spores-suspension with mulberry leaves.



[Graph-3] Dosage-Mortality responses in each instar of Jam 104 following use of *N. bombycis* spores-suspension with mulberry leaves.



[Graph-4] Dosage-Mortality responses in each instar of parents and hybrid following use of *N. bombycis* spores-suspension with mulberry leaves.



<Table-5>

Analysis of variance

Factor	D.F	S.S.	M.S.	F	L.S.D	
Main: Rep	3-1=2	0.0139	0.0069	0.1419<	0.848	Jam 103=Jam 104>Hybrid
Race	3-1=2	28.8472	14.4236	296.7818**		
Error	2×2=4	0.1945	0.0486			
Split: Instar	4-1=3	2496.6667	832.2222	1002.9190**	0.980	5th<4th<3rd<2nd
RI	2×3=6	15.3750	2.5625	3.0880*		
Error	3×4=12	9.9583	0.8298			
Split split:						
Concentration	4-1=3	1764.1667	588.0555	1998.8290**	0.255	10 ⁵ <10 ⁶ <10 ⁷ <10 ⁸
RD	2×3=6	11.5417	1.9236	6.5384*	0.541	◇◇◇
ID	2×3=6	789.2777	131.5462	447.1318**		
RID	2×3×3=18	14.6806	0.8155	2.7719**		
Error	81	23.8333	0.2942			
Total	143	4106.556				

◇◇◇ H10⁸=104. 10⁸=103. 10⁸>103. 10⁷=104. 10⁷=103. 10⁶=H 10⁷=104. 10⁶>H10⁶>103. 10⁵=104. 10⁵>H 10⁵

3. 잠분속의 미립자

<Table-6> Detection of the pathogen(*N. bombycis*) from the feces laid by the larvae inoculated per os at each instar.

Variety: Jam 103×Jam 104. Conc.: 10⁸/ml

Collecting hours after inoculation	Instar	3rd instar			4th instar			5th instar		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
12hr	Rep.	1	1	3	6	5	8			
24		—	—	—	—	—	—	8	6	20
36		—	—	—	—	—	—	—	—	—
48		—	—	—	—	—	—	—	—	—
60		—	—	—	5	10	12	—	—	—
72		16	12	20	—	—	—	—	—	—
84		25	30	40	6	—	—	—	—	—
96		40	40	41	—	—	—	—	—	—
108		—	—	—				—	—	—
120								8	—	—
132					3	—	—	3	—	—
144					30	20	30	—	—	—
156					50	70	50	4	—	2
168										
180										

※ The figure in the table (1) means that a spore was detected from 10 visual fields by microscope.

시간별로 채취한 누에 배분립을 0.02g씩 저울에 달은 후 1cc KOH 용액을 넣어 유발에나 같은 후 경검하였다.

<표-6>에서 나타난 것 같이 3령, 4령에서 0~12시간사이, 5령에서 12~24시간 사이에 1차적으로 검출되었다. 다가 3령에서 72~96시간만에 4령에서는 144~156시간에 2차적으로 많이(1차보다는)검출되었다.

4. 미립자에 결란전염된 사란

〈Table-7〉 Detection of the pathogen (*N. bombycis*) from the dead eggs infected by transovarial transmission.
Variety: Jam 103×Jam 104

Concentration	Replication										Average
10 ⁵ /ml	31	27	24	13	28	15	18	19	29	36	23.9
10 ⁶ /ml	27	33	33	38	32	36	38	31	30	35	34.3
10 ⁷ /ml	97	48	61	69	93	48	86	47	33	29	62.1

※ The figures in the table means that a spore was detected from 10 visual fields by microscope.

잠란을 최청한 후 잠란의 사란을 채취하여 유발에 넣은후 2% KOH 용액을 0.1cc씩 첨가, 마쇄후 현미경하에 경검하였으며 1시야당 나타나는 포자수를 숫자로 표시했다. 〈표-7〉에서 보는것 같이 현미경하에 있어서 포자가 나타나는 정도는 10⁵<10⁶<10⁷ 처리순으로 포자수가 많이 나타났다.

6. 경란전염된 잠란의 부화후 난각

최청한후 농도별로 부화한 잠란의 난각을 채취하여 현미경하에 조사하였던 바 〈표-8〉을 얻었다.

〈Table-8〉 Detection of the pathogen (*N. bombycis*) from the chorion infected by transovarial transmission
Variety: Jam 103×Jam104

Concentrations	Replication										Average
10 ⁵ /ml	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0.2
10 ⁶ /ml	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0.2
10 ⁷ /ml	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0.3

조사방법은 〈표-7〉에서 행한 방법으로 시행 하였음. 〈표-8〉에서 나타난것 같이 포자의 출현수는 농도별로 차이가 없는 것을 보여주고 있 .

6. 조직학적 관찰

누에가 미립자포자의 경구전염을 받았을 때 잠체내에 있어서 미립자포자의 번식과 조직학적 변화를 관찰한 결과 아래와 같다.

〈Table-9〉 Mode of multiplication of the pathogens in the silkworm larvae

Days	Tissues	The midgut epithelium	The midgut muscle	The midgut longitudinales	Fat body	Blood corpuscle
1		+	-	-	-	-
2		+	-	-	-	-
3		+	-	-	-	-
4		+	+	+	-	-
5		+	+	+	+	-
6		+	+	+	+	+

+: means the multiplication of *N. bombycis*

-: means the non-multiplication of *N. bombycis*

미립자 포자 농도를 10⁸ spores/ml되게 희석한후 누에에 침식시킨 결과 집중 1일에서는 중장(中腸)피막조직에 기생하였고 4일째는 중장근육, 중장중주근육에서 5일째는 지방조직 6일째는 血球에서 포자가 기생한 것을 발견 할 수 있었다.

※ 미립자포자는 Mallory's stain에서는 yellow나 orange색으로 부분 염색되었다.

7. 면역혈광 염색법

면역방법 A.B.C.D.구의 방법에 의해서 면역혈청으로 항원 항체 반응을 행한 결과 *N. bombycis*의 포자는 면역원이 될 수 있음이 명백하였다. 그러나 면역방법에 따라서 면역혈청의 항체가 달라서 D구는 1 : 12,800 C구는 1 : 1,600의 항체를 보였으나 B 및 A구는 각각 1 : 800 및 1 : 200이었다.

〈Table-10〉 Immunization and titer of *N. bombycis*

Treatments	Dilution of the first sera										
	50	100	200	400	800	1,600	3,200	6,400	12,800	25,600	0.85% NaCl
A 1	++	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-
A 2	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
B 1	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
B 2	++	++	+	+	+	±	±	-	-	-	-
C 1	++	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-
C 2	++	++	++	++	++	+	±	±	-	-	-
D 1	++	++	++	++	++	+	+	+	±	-	-
D 2	++	++	++	++	++	++	+	+	+	±	-

(Positive: + + +, Negative: ± -)

간접 염색 결과에 있어서는 〈표-11〉과 같이 1차 혈청의 희석배수(1:20에서 4배 단계 희석)와 비특이적 염색의 관계에 대해서 보면 *N. bombycis*의 포자는 1차 혈청희석 1:5, 120에서도 염색이 잘 되어 녹색의 강한 형광이 보이며 포자의 형태도 분명하였다. 그러나 1차 혈청희석 1:20 및 1:80에서는 비특이적인 염색이 보여서 시야전체가 녹색의 형광이 비쳐서 포자의 염색상은 오히려 불분명 하였다. 따라서 미립자포자의 관별을 위한 단역형광 염색의 경우에는 혈청의 희석배수를 낮추는 것이 이상적이다.

〈Table-11〉 Indirect staining method for diagnosis

	The dilution times of first sera							
	20	80	320	1,280	5,120	20,480	81,920	0.85% NaCl
<i>N. bombycis</i> F fluorescence	++	++	++	+	+	±	-	-
Self fluorescence	±	±	±	-	-	-	-	-
Tissues of larvae F fluorescence	+	±	-	-	-	-	-	-
Self-fluorescence	+	+	+	+	+	+	+	+

Titer of first sera: D treatment

Titer of second sera: 1:100

잠체조직은 1차 혈청 희석배수 1:20 및 1:80과 같이 높은 농도에서는 비특이적 염색이외는 전혀 보이지 않았으며 自家螢光은 모든 농도에서는 물론 대조에 있어서도 나타났다. 그러나 自家螢光은 BV filter로 관찰하면 황색으로 보여 FITC의 녹색의 형광과 그 식별이 곤란하나 UV filter로 관찰하면 백색내지는 청백색으로 보여 FITC의 형광과 쉽게 식별이 가능하다. 그리고 포자의 自家螢光은 잠체조직의 그것보다 약하여 형광색의 강도에 있어서 변이가 있기 때문에 또한 식별이 가능하다.

8. 극사 추출법

포자를 극사추출 용액에 넣고 극사를 추출한 결과 짧은것은 50~55 μ , 길은 것은 95~100 μ 크기의 극사를 볼 수 있었다.

V. 考 察

*Nosema bombycis*의 누에에 대한 병원성에 있어서 폐잠수는 일본종<중국종<구주종의 順이라 하였으나 본 시험에서는 원종의 품종간에 차이가 나타나지 않았는데 그 이유는 그 당시의 품종과 현 공시 품종간에 갖고 있는 미립자병에 대한 저항성의 차이에서 오는 것이라고 사료된다. 령기별로는 치잠기는 장잠기 보다 폐잠수가 높았다고 밝혔으며(三谷 1926) 미립자 포자에 대한 가잠 소화액의 살균력에 대한 령기별 변화에 대하여는 누에가 발육함에 따라 점차적으로 소화액의 살균력이 증가한다고 밝혔다.(大島 1932) 교잡종은 확실히 어느 원종들 보다는 강한 것으로 나타났다.

품종과 농도 사이의 감감비율에 대한 교호작용에서 흥미로운 점은 중간농도($10^7/ml$, $10^6/ml$)에서는 원종의 $10^6/ml$ 과 교잡종의 $10^7/ml$ 에서 교호작용이 엇갈렸다. 이는 미립자 포자침식에 의한 감감비율로서 품종간의 강건성을 비교한다면 원종은 $10^6/ml$, 교잡종은 $10^7/ml$ 의 농도로 침식시험을 하여야 그의 강건성을 비교할 수 있다는 사실을 말해 준다고 하겠다.

三谷(1937)의 미립자병감의 배설물 중 령기별 아포수는 시간과 함에 따라 다르게 나타난다고 보고한 바 있으나 이번 시험결과 3령에서 0~12시간사이, 4령에서 0~12시간, 5령에서는 12~24시간 사이에 1차적으로 포자가 검출되었다가 다시 3령에서 72~96시간만에, 4령에서는 144~156시간에 2차적으로 검출되었으니 그 포자수는 1차보다 2차에서 많이 검출되었다. 1차의 포자수는 누에가 포자를 먹고 난후 기생하지 못한것이 잠분과 같이 체외로 나온 것이라고 생각되며 2차에 많이 검출된것은 미립자포자가 들어가 증식단계를 거쳐서 조직이 파괴되므로 유출되어 밖으로 나온 것이라고 생각된다. 이것은 이번 조직학적 관찰에서도 나타났듯이 누에를 경구전염시켜서 그 조직부위별로 관찰한 결과 1~3일 경과된 병감을 절편하여 관찰한 결과 누에 미립자는 증장피막 조직에만 기생하여 있는것을 알 수 있었으며 4일째된 병감을 관찰한 결과 여기에서는 증장피막조직, 증장근육, 증장중주근육에 현저히 많이 기생한것을 볼 수 있었다. 이것은 우리가 누에를 치는 데에 있어서 배분법에 의한 蠶座感染을 방지하기 위하여, 1일, 3일, 6일째 약제를 처리해야만 豫防 효과가 있다고 하겠다. 미립자에 경관 전염된 잠란의 난각 조사에 있어서 死卵과 부화하여 나온 난각을 현미경에서 경검 하였던 바 전자는 후자에 비하여 검출된 미립자 포자수가 훨씬 많았다. 이것은 우량잠종 생산을 위한 무독잠종을 만들기 위하여 행하여지는 補正檢査의 과정에 있어서 최청하여 개미 누에나 난각을 검사하는 것보다는 死卵을 채취하여 조사하는 것이 더 효과적이라고 생각된다.

참고적으로 경관전염된 모아가 낳은 알은 특히 산란수가 떨어졌으며, 불수정란, 사란 및 重積卵이 많은 경향을 보였다. 면역형광 염색법에서 항원주사량 관계에서 보면 면역시간이 거의 같고 항원주사량이 다른 A구(면역기간 29일 항원량 10ml)와 C구(면역기간 31일, 항원량 24ml)는 항원주사량이 많은 C구가 그 항체가가는 높은 것으로 보아 주사량이 항체가에 미치는 영향이 큰 것을 알 수 있다. 그러나 B구는 여러가지의 면역방법 중 가장 많은 항원 주사량에도 불구하고 항체가는 C 및 D구보다 낮은 1:800이었다. 이와같은 결과는 항체 생산에 있어서 항원 주사량은 중요한 요인이나 이것이 항체가에 비례하지 않고 면역기간 및 주사간격도 중요한 요인에 속하는 것으로 생각된다. 이상의 결과를 종합하면 면역에 있어서 *N. bombycis* 포자의 면역방법은 항원주사량, 면역기간 및 주사간격이 중요하며 특히 항원 주사량은 20ml(10^8 spores/ml) 이상이 필요한 것으로 생각된다.

극사추출법에 있어서 石原(1967)은 온도와 pH가 극사 추출에 있어서 크게 작용한다고 하였는데 실상 극사 추출 용액을 만들고 포자를 넣은후 27~28°C, pH 10.7~10.8에서 제일 많이 추출되는 경향을 보였고 온도나 pH가 이것보다 낮거나 높을 때는 조금 나타나거나 거의 나타나지 않은 경향을 보였다.

VI. 摘 要

미립자 병원체의 병원성에 대한 연구로서 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 품종별 감감비율에 있어서 원종은 교잡종보다 훨씬 높았으나 원종간에는 차이가 없었다.
2. 침식농도별, $10^5/ml < 10^6/ml < 10^7/ml < 10^8/ml$ 순으로 감감비율이 높았다.
3. 영별로는 5령 < 4령 < 3령 < 2령 순으로 감감비율이 높았다.
4. 품종과 농도 사이의 감감비율에 대한 교호작용에 있어서
 - 1) 고농도($10^8/ml$)에서는 원종과 교잡종간에는 차이가 없었으며
 - 2) 저농도($10^5/ml$)에서는 교잡종은 원종보다 낮았으나 원종간에는 차이가 없었다.
 - 3) 중간농도($10^7/ml$, $10^6/ml$)에서는 교호작용이 엇갈려 원종의 $10^6/ml$ 과 교잡종의 $10^7/ml$ 에서 교호작용이 같았다.
5. 면역에 있어서 *N. bombycis* 포자의 면역방법은 항원 주사량, 면역기간 및 주사간격이 중요하며 특히 항원 주사량은 20ml(10^8 spores/ml) 이상이 필요한 것으로 생각되며 4처리구(A.B.C.D)중에서 D구가 제일 좋았다.
6. *N. bombycis*의 생존포자를 면역원으로 해서 토기에 면역시키면 간접법 염색에 의한 항체가에서 1:12, 800의 항체가 *N. bombycis* 면역혈청을 얻었으며, 잠체조직 및 *N. bombycis*의 포자는 자기 형광을 볼 수 있었으나 U.V. filter로 관찰하게 되면 FITC의 형광색을 명확히 식별할 수 있었다.

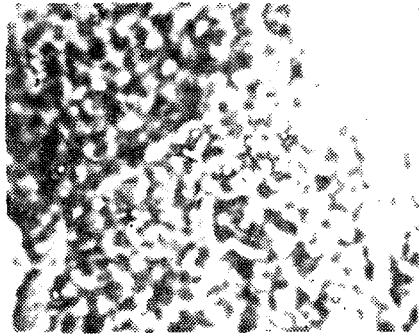
7. 미립자 병감의 조직학적 관찰에서 미립자 포자는 누에 조직 중에서도 제일 먼저 中胃被膜組織에 기생하는 것을 알 수 있었다.

参 考 文 献

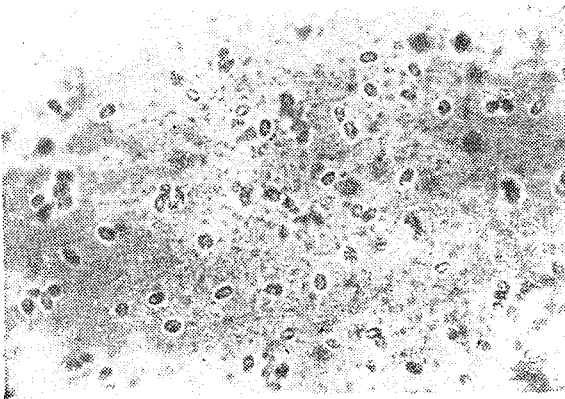
1. 藤原公, 扇元敬司, 須藤恒二(1966), *Nosema bombycis* Naegeli의 免疫螢光染色について 螢蠶絲研 58. 14-19.
2. Frobisher(1962): Microbiology 199-200
3. 石原廉(1969): 小孢子 蟲類(Microsporidia)に關する 最近の知見 日蠶雜 38(2), 176-183.
4. Ishihara(1967): Stimuli causing extrusion of polar filament of *Glugea fumiferanae* spores
5. Ishihara(1969): The life cycle of *Nosema bombycis* as revealed in tissue culture cells of *bombyx mori*. Journal of Invertebrate Pathology, 14, 314-320
6. 石原廉, 藤原公, 澤田紀一(1965): 微粒子病による 家蠶の斃蠶數と 保毒蛾數 日蠶雜 34. 121-124.
7. 金洛禎(1970): 잠체해부 생리 140-145.
8. 林鍾聲(1971): 微粒子 病原體의 鑑別을 위한 면역형광 염색법에 관한 시험·잠업 시험연구 보고서 212-219.
9. 三谷賢三郎(1937): 最近 蠶病學(中卷) 2-27, 39-63, 87-171.
10. Mcmanus mowry(1964): Staining methods Histological and Histochemical 8-47, 232-233, 215.
11. 大島格(1931): 柞蠶に寄生する小孢子蟲類 *Nosema* sp. に就て 日蠶雜 2. 435-436.
12. 大島格(1932): *Nosema bombycis* の孢子に對する 家蠶消化液の滅殺力の齡期的 變化に就て. 日蠶雜 3. 42-53.
13. 大島格(1935): *Nosema bombycis* の孢子の生死鑑別の一新法に就て 日本學術會報告 14(2) 307-313
14. Philip L. Carpenter(1969): Immunology and Serology 193-211
15. Steinhaus (1947): Insect Microbiology 511-514, 522, 588
16. Steinhaus (1963): Insect Pathology Vol. (I) 344-359, 361-367
17. Steinhaus (1963): Insect Pathology Vol. (II) 292, 324, 326, 458.
18. Steinhaus (1950): Principle of Insect Pathology 465, 581-589
19. 山崎輝男: 深谷昌次 石井象二郎(1968): 昆蟲實驗法 824~826, 178~190

Explantion of Figures:

- <Fig-1> Spores of *Nosema bombycis* Naegeli
- <Fig-2> Midgut epithelium is attacked by *N. bombycis* Naegeli
- <Fig-3> Muscle is attacked by *N. bombycis* Naegeli.
- <Fig-4> Midgut Muscle is at attacked by *N. bombycis* Naegeli
- <Fig-5> *N. bombycis* spores are to be extruded from organs
- <Fig-6> *N. bombycis* spores stained with Immuno fluorescence dye(FITC)
- <Fig-7> The polar filaments of spores



①



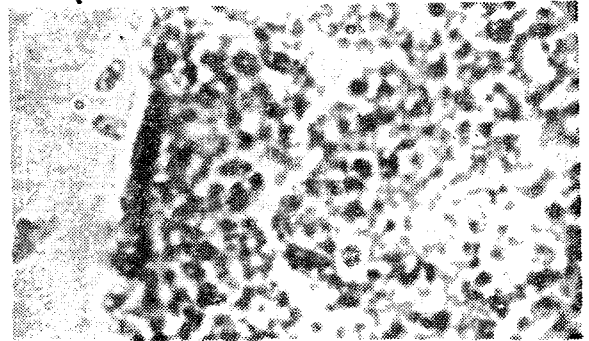
2



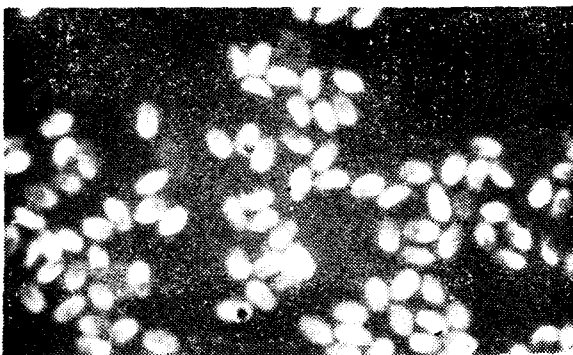
3



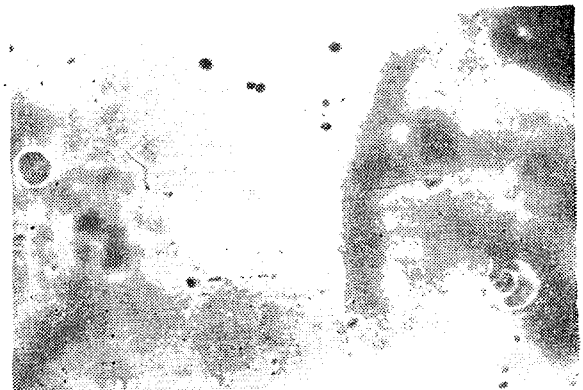
4



5



6



⑦