飼料混入法による *Bacillus thuringiensis* 製剤のカイコ検定

2. 発育阻害活性にもとづく評価

浅野 昌司[†]

株式会社クボタ技術開発本部 BB-PT（基盤技術研究所）

Silkworm Assay for *Bacillus thuringiensis* Formulations Using the Diet Incorporation Method: (2) Evaluation Based on Larval Growth Reduction. Shoji ASANO^{††} (Advanced Technology Laboratory, Kubota Corporation; Rhugasaki, Ibaraki 301-0852, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 47: 129-135 (2003)

Abstract: In bioassays for quality control of *Bacillus thuringiensis* formulations, the silkworm, *Bombyx mori*, has been generally used as a test insect in Japan. The median lethal concentration (LC_{50}) of a test sample to the 3rd instar silkworm is usually calculated based on mortality at 5 days after treatment and is compared with that of a standard sample. In the present study, the total weight of 2nd or 3rd instar silkworm survivors at 48 h after treatment was measured instead of mortality and per cent growth reduction was obtained by comparison of larval weight gains in treatments against those of controls. Relationships between logalistic concentrations of test sample and per cent growth reduction by probit showed a straight line and the median growth reductive concentrations (EC_{50}) were calculated by probit analysis. EC_{50} values of test samples between the 2nd and 3rd instar silkworms at 25°C were similar of about 10 times lower than the LC_{50} values. EC_{50} 's in the 2nd instar silkworms at 20 and 25°C were similar. The present study demonstrated that the bioassay based on growth reduction in the 2nd instar silkworm was more sensitive and speedy than one based on mortality for the quality control of *B. thuringiensis* formulations, reducing the test period from 5 to 2 days at 25°C.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; silkworm; *Bombyx mori*; bioassay; diet incorporation

緒 言

Bacillus thuringiensis の産生する結晶性蛋白毒素 δ -エンドトキシン（以下トキシンと略す）を有効成分とするいわゆる BT 剤は、わが国で初めて農薬として登録された 1981 年以来、現在までに 20 種に及ぶ製剤が登録され、種々の害虫防除に利用されている。適用害虫のほとんどは鱗翅目昆虫に限られていたが、最近では甲虫目に有効な BT 製剤も登録されている（Asano, 2001）。諸外国での BT 剤は鱗翅目や甲虫目の他に双翅目の害虫防除にも利用されている（Glare and O'Callaghan, 2000）。

BT 剤の殺虫成分は上述した *B. thuringiensis* の産生するトキシンであるが、殺虫活性を示すトキシンの種類が多いこと、トキシンの種類により殺虫スペクトルが異なること、複数のトキシンを産生する菌株の多いことなどが明らかにされている（Höfte and Whiteley, 1989）。そのため、商品化される BT 剤の殺虫活性は製造に用いられた *B. thuringiensis* 菌株の種類によって製品中のトキシン成分やその構成比が異なるので、製品中の有効成分（トキシン）の化学分析

は複雑になる。また、経口的に摂取されたトキシンは昆虫の消化管内で溶解され、蛋白分解酵素によって代謝されて初めて殺虫活性を有する物質に転換される（Bulla et al., 1979）。したがって、製品中に含まれるトキシンそれ自体は殺虫活性のないトキシンの前駆体に過ぎないこと、製品中にトキシンと一緒に含有される *B. thuringiensis* の胞子は単独では殺虫活性を示さないが、トキシンと同時に昆虫に摂取されるとトキシンの殺虫活性を高める効果のあること（Miyasono et al., 1994; 宮園ら, 1994）、太陽光線、とくに紫外線の照射によりトキシンの生物活性が迅速に消失すること（Ignoffo et al., 1977）などから、トキシンの化学分析と殺虫活性が一致しない場合のあることが予想される。諸外国での BT 剤の品質管理は当初製品中の胞子数で行われたこともあったが、製剤の殺虫活性との関連性に疑問がもたれ、昆虫を用いる生物検定が推奨された経緯もある（Bonnefoi et al., 1958; Dulmage et al., 1971）。

BT 剤の生物検定に用いられる昆虫種は国によっても異なり、鱗翅目害虫を防除対象にした製剤の検定のため欧州ではオオモンシロチョウ *Pieris brassicae*（Bonnefoi et al.,

[†] 現在 牛久市中央 1-17-21

^{††} Present address: 1-17-21 Chuoh, Ushiku, Ibaraki 300-1234, Japan

2002 年 11 月 19 日受領 (Received 19 November 2002)

2003 年 8 月 8 日登載決定 (Accepted 8 August 2003)

1958) が、米国ではイラクサキンウバ *Trichoplusia ni* (Dulmage et al., 1971) が用いられた。これらの昆虫種はいずれも BT 剤の適用害虫であるが、わが国では有用昆虫であるカイコ *Bombyx mori* が検定昆虫として採用され、1973 年に日本植物防疫協会から検定法(飼料混入法)が提案された(Aizawa et al., 1975; Aizawa, 1976; 鮎沢, 1978)。養蚕国であるわが国においてカイコが検定昆虫として採用された理由は、カイコの遺伝育種学および生理学に関して豊富な研究蓄積のあること、飼育が容易かつ扱い易い昆虫であること、遺伝的に管理された品種の卵(蚕種)の入手が容易なこと、人工飼料が市販されていることなど、検定昆虫としてカイコを利用する利点が考慮されたことによるものと思われる。石黒・宮園(1979)は、提案された飼料混入法に比べ、経口投与方法の方が BT 剤の検定により精度の高いことを報告したが、検体数が多い場合に彼らの方法は必ずしも実用的でないと考えられる。カイコ以外の昆虫を用いる検定方法として BT 剤の適用害虫の一種、コナガ *Plutella xylostella* を用いる飼料混入法が提案された(土山, 1978; Asano et al., 1993) が、コナガを検定昆虫として広く一般に利用するにはその飼育方法や供試系統の選定などに問題があると考えられる。

以来、わが国では鱗翅目害虫を対象とした BT 剤を適切に品質管理するための生物検定は、カイコ幼虫を用いた飼料混入法によって行われてきた。この検定方法は提案された 1973 年以来、基本的になんら変更されることなく行われてきた。この方法(以下標準法とする)の課題としては、検定に先立ってその都度飼料を調製する必要のあること、検定の際、試験容器毎に一定量の飼料を秤量し、これに一定量の検定液を滴下し、かつ十分に混合しなければならないこと、それには多大な労力と時間を要することなどがあげられる。筆者らは市販のカイコ用粉末飼料を利用することで飼料調製にかかる時間を省き、かつ、粉末飼料と検定液を混合した後に寒天液を加えて飼料を調製することにより、混合作業が簡略になることを報告した(浅野ら, 1997)。

一方、標準法における別の課題として、検定に要する時間が依然として長いことが問題として残っていた。そこで今回、筆者らは検定に要する期間を短縮する目的で、標準法では生物活性の指標とした投与 5 日後の致死率に代え、2 日後の体重増加をもとに发育阻害率を算定し、このデータを用いて評価する方法を検討した。その結果、この方法は検定期間が 25°C 条件下で 5 日から 2 日に短縮できることが明らかになったので、具体的な検討結果を報告する。

材料および方法

1. 供試昆虫

カイコ *Bombyx mori* (品種：春嶺 × 鐘月) の催青卵をカ

ネボウシルクエレガンス株式会社から入手し、ふ化後市販のカイコ用人工飼料シルクメイト 1S (日本農産工業株式会社製) を与えて 25°C, 60%RH, 16L:8D の条件で飼育した。検定には 2 齢および 3 齢脱皮直後の幼虫を用いた。

2. 供試薬剤

B. thuringiensis serovar *kurstaki* のトキシンの遺伝子を *Pseudomonas fluorescens* に発現させて製造された BT 製剤、KM202 水和剤(ガードジェット® 水和剤)を用いた。

3. 検定方法

検定用の人工飼料は上述の飼料シルクメイト 1S と同じ会社から販売されている粉末飼料シルクメイト 1M を用いた。まず、2% 寒天液をあらかじめ準備し、55°C の温浴槽に保温した。つぎに、100 ml 容量のガラスビーカーに上記粉末飼料の 5 g を入れ、蒸留水で所定濃度に希釈した検定液 2 ml を加えた。これに上記の 2% 寒天液 13 ml を加えて 55°C の温浴槽内でビーカーを外部から温めながら飼料をよく混合した。無処理区の飼料は上記の検定液の代わりに蒸留水を用いて同様に調製した。飼料は調製後直ちに 5°C の低温下に 1 時間ほどおき、固化を早めた。

生物検定は 2 齢幼虫試験には径 6 cm, 3 齢幼虫試験には径 9 cm のプラスチックシャーレに検定飼料の適当量(5~10 g)を入れ、それぞれに 2 齢と 3 齢脱皮直後のカイコ幼虫を容器当たり 10 頭ずつ移した。試験容器は 20°C または 25°C において所定時間後に生死数を記録し、同時に生存虫の体重をシャーレ毎にまとめて秤量した。各試験には 1 濃度当たり 3~9 シャーレ(幼虫数: 30~90 頭)を用いた。

結 果

1. KM202 水和剤のカイコ 2 齢幼虫に対する体重増加抑制と温度の関係

KM202 水和剤を製剤濃度で 15.6~500 ppm 含む飼料を 25°C 条件におき、カイコ 2 齢幼虫に連続給餌した時の体重増加を 24 h 毎に 72 h まで調べた結果を Fig. 1 に示した。図の縦軸は個体当たりの平均体重 (mg) で示した。無処理

Fig. 1. Growth curves of the 2nd instar silkworms after feeding on a diet with different concentrations of KM202 WP at 25°C.

区の幼虫体重は投与開始時の 6.6 mg から 48 h 後の 35.1 mg までほぼ直線的に増加したが、72 h 後では 34.8 mg とやや低下した。これは 2 齢幼虫が 48 h を経過すると 3 齢脱皮前の眠期に近くなるため、摂食が減少または停止し、体重増加が一次的に停止するためである。一方、KM202 水和剤の 62.5~500 ppm 区では無処理区に比べ、濃度に依存的に体重増加が抑制された。その傾向は 72 h 後も継続した。31.3 ppm 区の 48 h 後の体重は 28.8 mg と無処理区に比べやや少なかったが、72 h 後では眠期に入った個体もみられ、体重も 27.5 mg まで低下した。15.6 ppm 区は無処理区とほぼ同様な体重増加曲線を示し、体重増加の抑制はとくにみられなかった。これらの結果から、25°C 下においては 15.6 ppm 以下の KM202 水和剤はカイコ 2 齢幼虫の發育にほとんど影響を及ぼさないと考えられた。

つぎに、20°C 条件において同様に KM202 水和剤のカイコ 2 齢幼虫の体重増加に及ぼす影響を調べた。その結果は Fig. 2 の様になる。図の縦軸は Fig. 1 と同じく個体当たりの平均体重 (mg) で示した。無処理区の体重増加は上述の 25°C と異なり、投与開始時の体重 6.3 mg から 72 h 後の 25.7 mg までほぼ直線的に増加した。これに比べ KM202 水和剤の 62.5~500 ppm 区では濃度上昇に対応して体重増加が抑制されたが、これ以下の 15.6~31.3 ppm 区では無処理区と同程度の体重増加曲線を示した。これらの結果から、20°C 下における 31.3 ppm 以下の KM202 水和剤はカイコ 2 齢幼虫の發育にほとんど影響がないと考えられる。

さらに、KM202 水和剤の処理濃度と体重増加の抑制割合との関係を明らかにするため、25°C における投与 24 h および 48 h 後の体重増加量 (投与後の体重 - 投与前の体重) を対数濃度に対して示したのが Fig. 3 である。無処理区における 24 h および 48 h 後の体重増加量はそれぞれ平均で 12.0 および 28.5 mg であった。これに比べ、処理区の濃度と体重増加量の関係は 24 h と 48 h 後で明らかに異なった。24 h 後の 62.5 ppm (対数値: 1.8) 区以下では無処理区と大差ないが、48 h 後では 31.3 ppm (対数値: 1.5) 区でも明らかな差が生じた。また、濃度と体重増加抑制との直線関係は 24 h 後では 62.5~250 ppm (対数値: 1.8~2.4) の範囲でみられたのに比較して 48 h 後ではさらに低濃度域を広げ 15.6~250 ppm (対数値: 1.2~2.4) の範囲でみられた。これらの結果から、KM202 水和剤の 2 齢幼虫に対する發育阻害活性を評価する場合は、投与 48 h 後の体重増加量に基づく方が、24 h 後よりも対応する濃度範囲が広く、かつ抑制割合の大きいことが示唆された。

同様に、20°C における KM202 水和剤の濃度と体重増加抑制との関係をみるために、対数濃度に対する投与後 24 h、48 h、72 h の平均体重増加量 (mg) を示したのが Fig. 4 である。無処理区における各時間経過後の体重増加量は、それぞれ平均で 5.4、11.7、19.4 mg であった。これに対して処理

Fig. 2. Growth curves of the 2nd instar silkworms after feeding on a diet with different concentrations of KM202 WP at 20°C.

Fig. 3. Relationship between KM202 WP concentrations and weight gain in 2nd instar silkworms 24 and 48 h after feeding at 25°C.

Fig. 4. Relationship between KM202 WP concentrations and weight gain in 2nd instar silkworms 24, 48, and 72 h after feeding at 20°C.

区の濃度と体重の増加抑制との関係をみると、24 h 後ではいずれも無処理区と有意な差が認められなかったが、48 h および 72 h 後では 31.3~500 ppm (対数値: 1.5~2.7) 区で濃度に対応した体重増加抑制がみられた。両者の間では 72 h 後調査の方が 48 h 後より抑制割合が大きいことが示された。これらの結果から 20°C における KM202 水和剤のカイコ 2 齢幼虫に対する發育阻害活性を評価する場合は、投与 48 h 後の体重増加量よりも 72 h 後の方が適していると考えられた。

Table 1. Relationship between KM202 WP concentrations weight gain of 2nd instar silkworms after 48 h at 25°C and 72 h at 20°C

Conc. (ppm)	Average weight gain (mg)±SD (n) ^a					
	48 h at 25°C			72 h at 20°C		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
500	18±2 (22)	20±6 (22)	24±8 (21)	27±3 (24)	33±13 (29)	31±8 (25)
250	22±2 (27)	44±7 (28)	43±1 (29)	53±3 (28)	55±20 (30)	53±8 (30)
125	52±39 (26)	93±7 (30)	97±70 (30)	83±16 (30)	94±5 (30)	89±8 (30)
62.5	160±19 (29)	156±22 (29)	155±22 (30)	150±9 (30)	133±2 (30)	117±10 (30)
31.3	225±39 (30)	208±35 (30)	236±4 (30)	191±23 (30)	175±1 (30)	174±12 (30)
15.6	297±2 (30)	271±11 (30)	270±9 (29)	197±16 (30)	179±21 (29)	186±5 (30)
0.0	310±8 (30)	272±10 (30)	275±40 (30)	206±10 (30)	190±3 (30)	178±9 (30)
EC ₅₀ (ppm) (95% CL)	62.5 (48.8–79.4)	83.5 (64.9–107.4)	88.7 (69.6–113.5)	118.2 (92.0–154.9)	132.5 (106.9–178.9)	136.6 (104.1–181.4)
Coefficient	2.338	2.149	2.234	2.092	1.821	2.011

^a Average weight gain (mg) per 10 larvae with 3 replicates, n=no. of larvae used.

2. KM202 水和剤のカイコ 2 齢幼虫に対する発育阻害活性の評価

前項で KM202 水和剤のカイコ 2 齢幼虫に対する発育阻害活性について体重増加量をもとに評価する場合、投与後の調査時期を 25°C では 48 h 後に、20°C では 72 h 後に行うことが適当と考えられたので、この条件で 25°C および 20°C における KM202 水和剤のカイコ 2 齢幼虫に対する発育阻害活性を求めた。その結果を Table 1 に示す。表中の数値は 25°C (No. 1~No. 3) および 20°C (No. 4~No. 6) 試験における 10 頭当たりの体重増加量の平均値と標準偏差を示した (表中の括弧内の数値は調査幼虫数)。各濃度はシャーレ当たり 10 頭の 3 反復で行ったが、高濃度区では若干死亡個体がみられた。他の濃度区と比較する基準を等しくするため、平均体重増加量およびその標準偏差 (SD) は 10 頭当たりに換算した値で示した。発育阻害率は処理区における体重増加量の無処理区に対する割合から求めた。25°C および 20°C における検定濃度と発育阻害率の関係に基づきプロビット法を用いて半数発育阻害濃度 EC₅₀ (ppm) を求めた。Table 1 で 25°C の No. 1~3 および 20°C の No. 4~6 における濃度-発育阻害率の関係は $p=0.05$ でいずれも直線回帰が有意であった。Table 1 の下欄にはそれぞれの EC₅₀ とその 95% 信頼限界 (95%CL) および回帰直線の傾きを示した。25°C での EC₅₀ の範囲は 62.5~88.7 ppm (平均 78.2), 20°C では 118.2~136.6 ppm (平均 129.1) であり、平均値では 1.7 倍の差があるが、No. 1~3 と No. 4~6 における EC₅₀ の 95% 信頼限界は、No. 1 を除いて 25°C と 20°C の EC₅₀ の信頼限界はすべて重なり、相互に有意差のないことが示された。一方、No. 1~6 の回帰直線の傾きは 1.821~2.338, $p=0.05$ で平行性が認められた。これらの結果から、体重増加抑制をもとに求めた KM202 水和剤の力

イコ 2 齢幼虫に対する発育阻害活性 EC₅₀ は 25°C と 20°C との間で大きな差は認められず、この範囲の温度条件は発育阻害活性にとくに影響しないことが示された。

3. KM202 水和剤の 2 齢および 3 齢カイコ幼虫に対する致死活性と発育阻害活性の関係

KM202 水和剤の 15.6~2,000 ppm を含む飼料を 25°C 条件において、カイコ 2 齢および 3 齢幼虫に連続給餌した時の、致死率と発育阻害率の関係を調べた結果を Table 2 に示した。Table 2 の致死率は 4 回の反復試験における投与 7 日後の生存個体数をもとに、発育阻害率は投与 2 日後の体重増加量をもとに算出した。濃度-致死率および濃度-発育阻害率の関係はいずれも $p=0.05$ で直線回帰が有意であった。KM202 水和剤の 2 齢および 3 齢幼虫に対する致死活性は LC₅₀ でそれぞれ 587.5 および 703.5 ppm, 発育阻害活性は EC₅₀ でそれぞれ 69.2 および 73.8 ppm となった。LC₅₀ および EC₅₀ は 2 齢および 3 齢幼虫の間でいずれも有意な差はみられなかった。それぞれの回帰直線の傾きは 1.537~2.257 の範囲でいずれも近似していたが、平行性は $p=0.05$ で認められなかった。Table 2 の結果をもとに求めた LC₅₀/EC₅₀ の比は 2 齢および 3 齢幼虫でそれぞれ 8.5 および 9.5 でほぼ同程度であり、EC₅₀ は LC₅₀ の約 1/9~1/10 倍に相当した。

考 察

トキシンを摂取したカイコが致死に先立ち摂食を停止する現象は古くから観察され、また、カイコ以外の昆虫種でも同様な現象が報告されている (Angus and Heimpel, 1956, 1959)。摂食阻害活性をもとに BT 剤の品質管理を行う標準試験方法として、欧州ではオオモンシロチョウを用いる検定法が提案された (Bonnefoi et al., 1958)。米国ではこの

Table 2. Lethal activity and growth inhibitory activity of KM202 WP against 2nd and 3rd instar silkworms

Conc. (ppm)	2nd instar			3rd instar		
	No. of larvae used	% Mortality ^a	% Growth inhibition ^b	No. of larvae used	% Mortality ^a	% Growth inhibition ^b
2,000	100	92	—	150	87	—
1,000	102	62	—	149	60	—
500	100	44	94	210	36	89
250	127	30	87	240	17	80
125	126	9	70	240	5	66
62.5	125	3	52	180	1	44
31.3	125	0	22	180	0	28
15.6	126	0	9	151	0	15
0.0	125	0	0	210	0	0
LC ₅₀ or EC ₅₀ (95% CL)	—	549.1 (422.7–743.6)	69.3 (61.0–78.4)	—	703.5 (637.3–783.1)	73.9 (65.2–83.3)
Coefficient	—	1.988	1.994	—	2.257	1.538

^a 168 h, ^b 48 h.

昆虫が利用できないこともあり、代わって致死活性をもとにイラクサキンウバを用いる標準試験方法が提案された (Dulmage et al., 1971)。近年、オオモンシロチョウは北日本で普通にみられるようになったものの、わが国ではこれらの昆虫がいずれも普遍的に利用できず、代わって致死活性をもとにカイコを用いる検定法が提案された (Aizawa et al., 1975)。このように、BT 剤の品質管理を目的にした生物検定における供試昆虫の種類とその検定方法は国によって異なるものの、力価の定められた標準品に対する EC₅₀ あるいは LC₅₀ の比から検定品の力価を算定するという基本的考えは同じである。これまで、トキシンの昆虫に対する発育阻害活性をもとにした BT 剤の標準検定法がいずれの国においても採用されなかったのは、発育阻害を評価するのに適当な昆虫種や方法がなかったこともその理由に起因すると思われる。その点、検定昆虫としてのカイコは遺伝的に管理された品種が利用でき、幼虫発育が斉一で、供試齢期が揃えやすい上、発育が早く体重測定が容易であるので、発育阻害活性（体重増加量）を基にした BT 剤の検定に適していると考えられる。

わが国で BT 剤の品質管理を目的として、致死活性に基づいたカイコ検定法（標準法）が 1973 年に提案されてからすでに 30 年が経過した。この間、人工飼料中の防腐剤（松本, 1999）や大豆蛋白の種類による影響（松本, 2000）や飼料の調製方法やカイコ幼虫の齢期別感受性（浅野ら, 1997）などが報告されたが、検定方法自体は提案された当時と基本的に変更のないまま現在まで続いている。しかし、この標準法を用いて実際に BT 剤の品質管理を実施するにあたり、いくつかの検討課題がある。まず、検体と飼料を混合する作業をシャーレ毎に行うので、検体数の多い場

合や反復シャーレ数を増加する場合には多大の労力と時間を要すること； 検定に要する期間が 5 日間と長いこと；

検定開始 3 日後の生存虫を無処理餌と交換してさらに 2 日間飼育する面倒さ； 供試虫の幼虫齢期が 3 齢 2 日目に制限されているので、供試前の飼育に長期間を要することなどである。

このうち、とについては、カイコ用の市販粉末飼料を用い、あらかじめ検体液と粉末飼料を混合した後に 2% 寒天液を加えて飼料調製することによって混合作業が簡略化でき、飼料交換も必要のないことが明らかにされた（浅野ら, 1997）。の幼虫齢期については、本報で示したように 2 齢幼虫と 3 齢幼虫の LC₅₀ に差がなかったことから、標準法の 3 齢幼虫に代えて 2 齢幼虫の利用が可能であり、それにより検定前の供試昆虫の飼育期間を 5 日ほど短縮できることが示された。BT 剤に対する幼虫の感受性は、多くの昆虫で若齢ほど高く、齢期が進むほど低下すると言われている（浅野・鈴木, 1995）。しかし、カイコでは 1 齢幼虫がもっとも感受性が低く、ついで 5 齢幼虫の順になり、2 齢～4 齢幼虫の感受性は同程度であると報告されている（浅野ら, 1997）。については致死率が安定するまでの日数が必要になるので、致死の発現や安定を早めるための投与方法や検定温度などの検討が考えられるが、本報で示した様に致死活性（LC₅₀）に代え、48 h 後の体重増加量をもとにした発育阻害活性（EC₅₀）からの結果に基づくかぎり、検定期間が 5 日から 2 日に短縮できる。ただ、この場合には生存個体の体重測定をする作業が新たに必要となり、その測定に労力と時間を要することが難点となるが、体重測定は容器当たりの生存幼虫をまとめて秤量することにより測定時間の短縮が可能であるし、体重測定に多少の時間が

かかって検定が2日間で終了できる利点がある。また、標準法による力価検定の途中であっても2日後の発育阻害活性を調査することで、結果を予見する補完的な利用も可能であると考えられる。

今後BT剤の品質管理のためのカイコ検定において、2日後の体重増加量をもとにした発育阻害活性(EC_{50})による評価が従来の致死活性(LC_{50})に代えて利用されるには、この方法による検定精度および致死活性(LC_{50})との相関性について多くのBT剤について確認する必要がある。実際に、市販の4種のBT剤について同様な方法を用いて検討した結果、カイコ2齢幼虫に対する2日後の発育阻害活性(EC_{50})は3.3~10 ppmで、7日後の致死活性(LC_{50})は8.4~17 ppmの範囲にあったが、 LC_{50}/EC_{50} の比は1.7~2.5でいずれも大差がなかった(浅野, 未発表)。しかし、本報で供試したBT剤の LC_{50}/EC_{50} 比は8.5と大きく異なっているため、BT剤の種類によってこの比は変動すると思われる。標準法における自己標準品は、検定品と同じ菌株および製造方法を用いて調製された製剤を基本としているので、検定品と標準品との相対力価を LC_{50} あるいは EC_{50} のどちらで評価しても結果は変わらないと考えられるが、それを実際に確認する必要がある。また、検定に用いるカイコの品種についてのさらなるスクリーニングも不可欠である。

BT剤のカイコに対する毒性は品種によって異なり、交雑品種間に LD_{50} で10~50倍もの差が報告されている(鮎沢ら, 1962; 小野, 1966; 森田ら, 1974)。最近、宮本(2001)はトキシシンCry1Abを用いて、カイコ毒性を地理的品種114種と交雑品種1種について調べ、地理的品種間に LC_{50} で最大25,000倍、交雑品種との比較では最大500,000倍の差を報告している。発育阻害活性(EC_{50})で比較しても品種間で同様な変動があると予想される。BT剤の生物検定には感受性の高いカイコ品種を供試することが望ましいが、標準法で採用されている交雑品種「春嶺×鐘月」はBT剤に感受性の比較的高いグループに属することが示されている(森田ら, 1974)。自己標準品は前述のように検定品と同一菌株および同一製造方法で調製されたものであるため、たとえ検定に用いたカイコ品種や評価方法が異なっても、検定品と標準品との相対力価はほぼ同じになると考えられる。

摘 要

わが国ではBT剤の品質管理を目的とした生物検定における検定昆虫としてカイコが利用されてきた。検定は3齢カイコ幼虫を用いて投与5日後の致死率をもとに検体と標準品の半数致死濃度(LC_{50})が比較され、製剤の力価が算定されてきた。本報ではBT剤としてKM202水和剤を用い、飼料混入法によるカイコ2齢および3齢幼虫試験で投

与48時間の生存個体の体重増加量を測定し、投与区と無投与区の比較から発育阻害率を求めた。濃度と発育阻害率の関係をプロビット法で解析した結果、両者は直線回帰を示し、半数発育阻害濃度(EC_{50})を算定することができた。2齢および3齢幼虫に対する EC_{50} には差がなく、 LC_{50} と比較すると約1/10であった。また、20°Cと25°Cの条件における2齢幼虫に対する EC_{50} は差がなかった。これらの結果から、BT剤の品質管理におけるカイコ検定は25°Cで2齢幼虫に連続給餌した48h後の体重増加抑制量をもとにした発育阻害活性(EC_{50})で評価が可能であること、従来の致死活性(LC_{50})評価より検定期間が25°Cで5日から2日に短縮できることが示された。

引 用 文 献

- Aizawa, K. (1976) Recent development in the production and utilization of microbial insecticides in Japan. *Proc. 1st Inst. Coloq. Invertebr. Pathol.* 59-63.
- 鮎沢啓夫 (1978) わが国における *Bacillus thuringiensis* 製剤の開発と利用. 醗酵工学 56: 676-683. [Aizawa, K. (1978) Development in the production and utilization of *Bacillus thuringiensis* preparations in Japan—A review—. *Hakkokogaku* 56: 676-683.]
- Aizawa, K., N. Fujiyoshi, M. Ohba and N. Yoshikawa (1975) Selection and utilization of *Bacillus thuringiensis* strains for microbial control. *Proc. 1st Intersect. Congr. IAMS* 2: 597-606.
- 鮎沢啓夫・河原畑勇・佐藤文子 (1962) *Bacillus thuringiensis* Berliner の蚕に及ぼす影響. 日蚕雑 31: 253-257. [Aizawa, K., T. Kawarabata and F. Sato (1962) Response of the silkworm, *Bombyx mori*, to *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Sericult. Sci. Jpn.* 31: 253-257.]
- Angus, T. A. and A. M. Heimpel (1956) An effect of *Bacillus sotto* on the larvae of *Bombyx mori*. *Can. Entomol.* 88: 138-139.
- Angus, T. A. and A. M. Heimpel (1959) Inhibition of feeding, and blood pH changes, in lepidopterous larvae infected with crystal-forming bacteria. *Can. Entomol.* 91: 352-358.
- Asano, S. (2001) Development and utilization of *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide in Japan. *Proc. Centennial Sym. Commemorating Ishiwata's Discovery of B. thuringiensis* 21-32.
- 浅野昌司・岩佐智子・関 昭宏 (1997) 飼料混入法による *Bacillus thuringiensis* 製剤のカイコ検定 I. 致死活性に基づく評価. 応動昆 41: 187-194. [Asano, S., T. Iwasa and A. Seki (1997) Silkworm assay for *Bacillus thuringiensis* formulations using diet incorporation method: (1) Evaluation based on larval mortality. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 41: 187-194.]
- Asano, S., T. Maruyama, T. Iwasa, A. Seki, M. Takahashi and G. G. Soares, Jr. (1993) Evaluation of biological activity of *Bacillus thuringiensis* test samples using a diet incorporation method with diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* 28: 513-524.
- 浅野昌司・鈴木伸和 (1995) 飼料混入法を用いる *Bacillus thuringiensis* 製剤のハスモンヨトウに対する生物検定法について. 応動昆 39: 135-141. [Asano, S. and N. Suzuki (1995) Bioassays of *Bacillus thuringiensis* formulation using diet incorpo-

- ration method with common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 39: 135–141.]
- Bonnefoi, A., A. Burgerjon and P. Grison (1958) Titration biologique des préparations de spores de *Bacillus thuringiensis*. *C. R. Acad. Sci.* 247: 1418–1420.
- Bulla, L. A. Jr., L. I. Davidson, K. J. Kramer and B. L. Jones (1979) Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1123–1130.
- Dulmage, H. T., O. P. Boening, C. S. Rehnberg and G. D. Hansenn (1971) A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international units. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 240–245.
- Glare, R. T. and M. O'Callaghan (2000) *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. John Wiley & Sons, Ltd., NY. 350 pp.
- Höfte, H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242–255.
- Ignoffo, C. L., D. L. Hostetter, P. P. Sikorowski, G. Sutter and W. M. Brooks (1977) Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. *Environ. Entomol.* 6: 411–415.
- 石黒丈雄・宮園 稔 (1979) カイコを用いた強制経口投与法による BT 剤の力価検定・応動昆 23: 141–150. [Ishiguro, T. and M. Miyasono (1979) A bioassay for toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticide using the force-feeding method applied to the silkworm, *Bombyx mori*. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 23: 141–150.]
- 松本信弘 (1999) プロピオン酸類の BT (*Bacillus thuringiensis*) 剤に対する殺虫活性阻害効果について・日蚕雑 68: 333–338. [Matsumoto, N. (1999) Inhibition effect of propionates on the insecticidal activity of BT (*Bacillus thuringiensis*) formulations. *J. Sericult. Sci. Jpn.* 68: 333–338.]
- 松本信弘 (2000) 人工飼料に用いるダイズ粉末標品の違いが *Bacillus thuringiensis* 製剤の殺虫活性に与える影響・応動昆 44: 113–118. [Matsumoto, N. (2000) Effect of three defatted soybean meals on insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* formulation. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 44: 113–118.]
- 宮本和久 (2001) バチルス菌の産生する殺虫性毒素の特異性評価・農林水産技術会議研究成果 364: 141–146. [Miyamoto, K. (2001) Evaluation on the specificity of insecticidal toxins from *Bacillus*. *Min. Agri. Forest Fish Conf. Res. Rept.* 364: 141–146.]
- Miyasono, M., S. Inagaki, M. Yamamoto, K. Ohba, T. Ishiguro, R. Takeda and Y. Hayashi (1994) Enhancement of delta-endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 111–112.
- 宮園 稔・山本牧子・稲垣秀一郎・大庭克明・石黒丈雄・林 幸之・武田禮二 (1994) 乳酸菌、酵母菌、枯草菌および *Bacillus thuringiensis* の混合による *Bacillus thuringiensis* HD-1 δ -endotoxin の殺虫活性増強について・応動昆 38: 101–108. [Miyasono, M., M. Yamamoto, S. Inagaki, K. Ohba, T. Ishiguro, Y. Hayashi and R. Takeda (1994) Effects of several microorganisms on the insecticidal activity of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 38: 101–108.]
- 森田芳昭・楠野正夫・坂川あき子 (1974) 蚕品種における *Bacillus thuringiensis* 抵抗性に関する研究・東京蚕指報 8: 35–37. [Morita, Y., M. Kusuno and A. Sakagawa (1974) Tolerance to *Bacillus thuringiensis* among species of silkworm. *Tokyo Metrop. Seric. Cetr.* 8: 35–37.]
- 小野恵子 (1966) 蚕品種による *Bacillus thuringiensis* に対する感受性の変異について・埼玉蚕試報 38: 61–63. [Ono, K. (1966) Variation among the races of silkworms in susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *Bull. Saitama Seric. Exp. Stn.* 38: 61–63.]
- 土山 彬 (1978) コナガ幼虫による *Bacillus thuringiensis* 製剤の力価検定・応動昆 22: 234–237. [Tsuchiyama, A. (1978) Bioassay of *Bacillus thuringiensis* formulation using larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 22: 234–237.]