昆虫を用いる *Bacillus thuringiensis* 製剤の生物検定 —結果に影響する検定条件について—

浅野 昌司

牛久市中央 1-17-21

Bioassay with Insects for *Bacillus thuringiensis* Products—Factors Affecting the Results. Shoji ASANO 1-17-21 Chuo, Ushiku, Ibaraki 300-1234, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 48: 261-274 (2004)

Abstract: *Bacillus thuringiensis* has been used widely as one of representative microbial insecticides against variety of pest. Since the insecticidal principles produced by *B. thuringiensis* are complex with variety of toxins of different spectrum, spores and soluble substances affecting the biological activity of toxins, the bioassay with insects is requisite and important for comparing the activity among different formulations of *B. thuringiensis*. However there are several factors affecting the results in the bioassay. Author reviewed and discussed those factors affecting the results in the bioassay with insects using *B. thuringiensis* formulations at standpoints of species and stage of test insects, procedure for application, test temperatures, kinds of diet used, feeding periods and scoring time, methods for evaluating the biological activity and so on.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; bioassay; insects

はじめに

昆虫病原性細菌の一種である *Bacillus thuringiensis* (以下 *Bt* と略) が世界で最初に記載されたのはおよそ1世紀前の1901年で、わが国の石渡博士によってカイコ *Bombyx mori* の病死虫から分離された (Aizawa, 2001). 以来、膨大な数の *Bt* が昆虫以外からの場合も含め、世界中の様々な場所から分離されている (Ohba, 2001). *Bt* 研究の主目的はその培養物を微生物殺虫剤として害虫防除に利用することに置かれてきた. 近年、従来の化学農薬による害虫防除は薬剤抵抗性の発達、天敵類の排除、作物および環境中の農薬残留などの弊害が挙げられ、それらを解決するためには複数の防除手段を組み合わせた総合的害虫管理、いわゆる IPM の考えが広く推奨されるようになった. *B. thuringiensis* 製剤 (以下 *Bt* 剤と略) はヒトを含めた動物に対する安全性が高く、天敵昆虫や環境および生態系に悪影響の少ない特性から、IPM に適した生物農薬資材の代表として再評価されるようになった. 実際、諸外国では野菜、果樹、森林や衛生害虫の防除にすでに長年利用され、その使用面積および使用量で生物農薬の第一位の座を占めてきた. わが国でも現在多くの *Bt* 剤が市販され、種々の害虫の防除に広く利用されるようになった (Asano, 2001).

Bt の産生する殺虫成分は主に菌体内に産生される殺虫性

結晶タンパク質 (δ -エンドトキシン) であるが、他に菌体外に分泌される種々の殺虫成分 (α , β , γ -エクソトキシン) がある. *Bt* の芽胞 (胞子) は単独の殺虫活性はないが、エンドトキシンとの併用効果が報告されている (Heimpe, 1967).

微生物殺虫剤としての *Bt* 剤の開発研究には昆虫を用いる生物検定が常に必要である. *Bt* 剤を用いた生物検定に関する研究報告はいままで数多く出されているが、結果に影響する検定条件について総括的に議論された報告がない. 筆者は今回鱗翅目昆虫を用いた *Bt* 剤の生物検定についていままで報告された事例をもとに、結果に影響する検定条件について整理し、考察を試みた. この総説が昆虫を用いる *Bt* 剤の生物検定において結果を検討する際の参考となることを望む.

生物検定の条件

昆虫を用いる *Bt* 剤の生物検定においてもっとも重要なのは検定の目的である. 検定の目的に沿って以下の種々の検定条件が検討されなければならない.

1. 検定昆虫と齢期

検定昆虫は検定の目的に適した種を選ぶことが基本である. その際、検定昆虫は常に大量に提供できるように飼育方法の確立が必要である. 目的の昆虫種の飼育が難しい場

合には、飼育法がすでに確立している近縁の昆虫種から選ばれる。検定に用いる昆虫の齢期は *Bt* 感受性の最も高い幼虫期が望ましいが、感受性に大差のない場合は取り扱いに便利な齢期が選ばれる。

2. 検体の処理方法

検体の処理には種々の方法が考えられる。鱗翅目昆虫を用いる場合の代表的な方法としては次の3方法がある。(1) 葉片処理法：寄主植物の全葉、あるいは一部の葉片を所定濃度の検体液に浸漬、塗布または散布により処理し、風乾後昆虫に与える方法である。この場合、葉材料を常時供給するためにその植物を周年栽培することが必要となる。この方法は生葉を用いるので葉の乾燥度合により投与期間(1~7日)が制約されるが、処理が簡単な点で便利な方法である。また、殺虫活性以外に摂食阻害活性の評価にも適している。(2) 飼料混入法：人工飼料に所定濃度の検体液を処理する方法である。この方法は餌条件を常に等しくできることが利点である。飼料への処理は混合する以外に、飼料表面に一定量の検体液を滴下したり、あるいは飼料を検定液に浸漬するなどの方法がある。飼料混入法は比較的長期間(7~14日)の投与ができるので、遅効的な殺虫活性や発育阻害活性の評価に適している。しかし、人工飼料で飼育できる昆虫種に限られるので、検定昆虫に適した飼料をあらかじめ開発する必要がある。(3) 経口投与法：マイクロシリンジなどを用いて検定昆虫の口器から所定濃度の検体液の一定量を強制的に投与する方法である。この方法は経口投与の可能な大きさの中齢以上の幼虫に制限されるが、個体当たりの投与量がわかるので、 LC_{50} 以外に LD_{50} の算定のできる利点がある。経口投与の困難な若齢幼虫には所定濃度の検体液の小滴を容器内の平面に滴下して、それを幼虫に自由に飲下させる小滴飲下法がある。この方法は基本的に経口投与法と同じであるが、一度に多数の個体へ投与できることが利点である。

3. 検定温度

生物検定を行う環境温度は通常 25°C で行われることが多いが、検定昆虫の飼育温度と同じ条件にするために 25°C 以外に、 $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ の範囲から選ばれる場合もある。

4. 投与期間と調査時期

投与期間は投与方法とも関連する。経口投与法では原則1回の投与であるので、投与期間の問題はとくにない。葉片処理法では葉の乾燥度合により、投与期間が制約される。投与期間を延長する場合には処理葉の追加や交換を必要とする。飼料混入法は比較的長期の投与も可能であるが、容器内の餌の状態や虫糞量により試験期間中に餌や容器の交換を必要とする場合もある。投与後の調査時期は後述する活性の評価方法とも関連して決められるが、多くは生物反応が明確で、安定する時期を目安に決められる。

5. 活性の評価方法

生物検定における活性の評価は、致死数をもとにした殺虫活性による場合が多い。他には摂食量をもとにした摂食阻害活性や、生存幼虫の発育量をもとにした発育阻害活性なども利用される。それぞれの評価法には長所と短所があり、検定目的に適したものが採用される。殺虫活性は投与後の致死率に基づいて評価されるが、その際、生死の判定は物理的な刺激に対して反応しない個体を死とし、すこしでも反応がある個体は、たとえ瀕死の状態でも生として記録することが多い。摂食阻害活性は処理区と無処理区の摂食量の比較をもとに評価される。摂食量は残存葉の面積や重量から推定され、無処理区に対する摂食阻害率で評価されることが多いが、他に、糞重、糞粒数や体重増加量の比較や、あるいは摂食度合を指数化して評価される場合もある。発育阻害活性は処理区と無処理区の幼虫発育の比較をもとに評価される。短期的調査での幼虫発育は虫体重や幼虫齢期などが、長期的調査では幼虫期間、蛹化率や羽化率などをもとに評価される。

検定結果に影響する条件

Bt 剤の生物検定の結果に影響する条件について、1) 検定幼虫の齢期、2) 検定温度、3) 検定飼料、4) 投与期間、調査時期と評価活性および5) その他の項目に分けた。

1. 検定幼虫の齢期

Bt 感受性は若齢幼虫ほど高く、齢の進むに従い低くなる事例が多いが、これと異なる事例も報告されている。感受性と幼虫齢期の関係について以下に項目別および検定方法別に事例を示し、論議した。

1) 感受性が幼虫齢期に対応する事例

(葉片処理法) ヤガ科の *Alabama argillacea* の1齢、2~3齢および5~6齢幼虫で投与18~66h後の致死率は齢の進むに従い低下した (Ignoffo et al., 1964)。カイコの3齢と4齢幼虫の感受性は4齢の方が低く、 LC_{50} で約4倍の差があり (鮎沢・佐藤, 1961; 鮎沢ら, 1962)、同2齢と3齢幼虫の感受性は3齢の方が低く、 LC_{50} で約10倍の差があった (小野, 1966)。同1齢と4齢幼虫の感受性は4齢の方が低く、 LC_{50} で最大5倍の差があった (森田ら, 1974)。タマナヤガ *Agrotis ipsilon*、シロイチモジヨトウ *Spodoptera (Laphygma) exigua* およびハスモンヨトウの近縁種 *Spodoptera (Prodenia) littoralis* では1~13日齢幼虫の致死率はいずれも1~9日齢の間に差はないが、10日齢以降では低下した (Afify and Merdan, 1969)。*S. littoralis* の1~4齢幼虫の感受性は1齢が最も高く、齢の進むに従い低下し、1齢に対する2齢、3齢および4齢の感受性は LC_{50} でそれぞれ6.2、33および48倍の差があった (Altahtawy and Aballess, 1973)。マツカレハ *Dendrolimus spectabilis* の1、3および6齢幼虫の感受性は1齢が最も高く、齢の進むに従い低

下し, 1 齢と 3 齢および 1 齢と 6 齢との間に LC_{50} でそれぞれ 1.8 倍および 4.7 倍の差があった (Asano et al., 1976). タバコガの一種 *Hericoverpa zea* の 1 齢 (1 日齢), 2 齢 (3 日齢) および 3 齢 (5 日齢) での感受性は齢の進むに従い低下し, 1 齢と 2 齢の間には LC_{50} で 3.0 倍, 1 齢と 3 齢の間には 5.7 倍の差があった (Ali and Young, 1996).

(飼料混入法) マイマイガ *Porthetria dispar* の 1~4 齢幼虫の感受性は 1 齢が最も高く, ついで 2 齢と 3 齢で, 4 齢がもっとも低く, 1 齢と 4 齢の間には LC_{50} で約 7 倍の差が, マイマイガの一種 *Orgyria pseudotsugata* の 2~5 齢幼虫の感受性は 2~4 齢の間では同程度, 5 齢では低くなり, 5 齢と他の齢との間に LC_{50} で約 3 倍の差が, マイマイガの一種 *Heremrocampa leucostigmata* の 2~5 齢幼虫の感受性は 2 齢と 3 齢は同程度であり, 4 齢と 5 齢ではやや低く, 両群の間に LC_{50} で約 2 倍の差が, ヒメハマキガの一種 *Choristoneura fumiferana* の 3~6 齢幼虫の感受性は 3 齢が最も高く, 齢の進むに従い低下, 3 齢と 6 齢の間では LC_{50} で約 175 倍の差があった (Morris, 1973). ノシメダラメイガ *Prodia interpunctella* およびスジマダラメイガ *Cadra cautella* の老熟幼虫の感受性は 1 齢幼虫より約 4 倍低かった (Nwanze et al., 1975). イラクサギンウワバ *Trichoplusia ni*, *H. zea*, シロイチモジヨトウ, ウワバの一種 *Pseudoplusia includens*, ヤガ科の *Anticarsia gemmatilis* および *Plathypena scabra* の 1 齢 (1 日齢) と 2 齢 (4 日齢) 幼虫ではいずれも 1 齢の方が感受性は高いが, その度合は昆虫の種類によって異なり, LC_{50} でそれぞれ 20, 22, 22, 18, 183 および 1.2 倍の差であった (Ignoffo et al., 1977b). スジマダラメイガの 1~5 齢幼虫の感受性は 1 齢が最も高く, ついで 2 齢で, 3~5 齢の間では差がなかった. ノシメダラメイガの 1~4 齢幼虫の感受性は 1 齢と 2 齢が高く, ついで 3 齢で, 4 齢が最も低かった (McGaughey, 1978). ヨトウガの近縁種 *Mamestra configurata* の 1~5 齢幼虫での感受性は 1~4 齢間で差はないが, 5 齢で低下した (Morris et al., 1994). ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* の 1~6 齢幼虫の感受性は齢の進むに従い低下し, 1 齢と 2 齢の間では LC_{50} で約 3 倍, 1 齢と 3 齢の間には約 4 倍, 1 齢と 6 齢の間には 10 倍以上の差があったが, 3~5 齢の間には差がなかった (浅野・鈴木, 1995). ハマキガの一種 *Cochylis hospes* の 1~5 齢幼虫の感受性は 1~3 齢で高く, ついで 4 齢で, 5 齢が最も低く, 1 齢と 5 齢の間には LC_{50} で約 4 倍の差があった (Barker, 1998). コナガ *Plutella xylostella* の 1~4 齢幼虫の感受性は 1 齢が最も高く, 齢の進むに従い低下し, 1 齢と 2 齢の間には LC_{50} で 7~9 倍, 1 齢と 4 齢の間には 16~40 倍の差があった (宮園ら, 2003).

(経口投与法) 小滴飲下法で調べた *C. fumiferana* の 4~6 齢幼虫の感受性は 4 齢が最も高く, 齢の進むほど低下し, 4 齢と 5 齢の間には LD_{50} で約 2 倍, 4 齢と 6 齢の間には約

4 倍の差があった (van Frankenhuyzen et al., 1997).

2) 感受性が幼虫齢期に対応しない事例

(葉片処理法) ハマキガの一種 *Platynota idaeusalis* の 1 齢 (1 日齢), 3 齢 (9 日齢) および 5 齢 (14 日齢) 幼虫の感受性は 1 齢と 3 齢の間に差はないが, 5 齢では高く, LC_{50} で約 2 倍の差があった (Rock and Monroe, 1983). *M. configurata* の 3~6 齢幼虫の感受性が LC_{50} で比較され, 齢期と感受性の関係は温度 (20°C と 25°C) や *Bt* 剤の種類によっても異なり, 一定の傾向がなかった (Morris, 1986). しかし, 別の *Bt* 剤を用いて調べた *M. configurata* の 3~5 齢幼虫の感受性は 4 齢が最も高く, 3 齢と 5 齢は同程度で, 4 齢との間には LC_{50} で約 4 倍の差があった (Morris, 1988). ヒトリガ科の *Tyria jacobaeae* の 1~5 齢幼虫の感受性は 1 齢~3 齢より 4 齢~5 齢の方が高く, 両群の間には LC_{50} で約 20 倍の差があった (James et al., 1993). ヒメハマキガの一種 *Choristoneura rosaceana* の 1~6 齢幼虫の感受性は 4 齢が最も高く, 6 齢が最も低く, 他の齢では同程度で, 4 齢と 6 齢の間には LC_{50} で約 5 倍の差があった (Li et al., 1995).

(飼料混入法) イラクサギンウワバ, タバコガの一種 *Heliothis virescens* およびアワノメイガの近縁種 *Ostrinia nubilalis* の 1 日齢および 4 日齢幼虫での感受性は LC_{50} に差がなかった (Beegle et al., 1981). コナガの 1~4 齢幼虫の感受性は 1 齢が最も低く, 2~4 齢の間には差がなく, 1 齢と 2~4 齢の間には LC_{50} で約 2 倍の差があった (Asano et al., 1993). コナガの 1 齢と 3 齢幼虫の感受性は 1 齢の方が低く, 投与 2 日後の LC_{50} で 4.3 倍, 5 日後で 5.0 倍の差があった (Liu et al., 1995). *C. fumiferana* の 4~6 齢幼虫の感受性は LC_{50} および LT_{50} で差がなかった (Fast and Dimond, 1984). カイコの 1~5 齢幼虫の感受性は 1 齢が最も低く, 2~4 齢の間には差がなく, 1 齢と他の齢の間には LC_{50} で約 2 倍の差が, しかし, 5 齢は *Bt* 剤によって感受性が低下する場合と低下しない場合があった (浅野ら, 1997).

3) 論 議

Bt 感受性と幼虫齢期関係について報告された事例には, すべての齢期で検討されたものは少なく, 若齢期のみの比較や, 若齢と老齢期の比較, あるいは中齢~老齢期での比較など様々であり, 感受性の比較も LC_{50} ではなく, 単なる致死率で比較された事例も含んでいる. LC_{50} の比較でも統計的に差の検定がなされていない事例も少なくない. それ故, 報告された各事例に信頼性があるとしても, 検定昆虫や検定方法が異なる場合, 結果を単純に比較することには問題があると考えられる.

同じ研究者が同じ処理方法を用いて異なる昆虫種に対して調べた事例をみると, Ignoffo et al. (1977b) は人工飼料の表面に処理する方法で調べたイラクサギンウワバ, シロイチモジヨトウ, *P. includens*, *A. gemmatilis* および *P.*

scabra で、1日齢と4日齢(2齢)幼虫の感受性はいずれも1日齢の方が高かったと報告している。しかし、 LC_{50} の差は昆虫種により異なり、1.2~183倍の開きがあり、検定昆虫の種類によっても感受性と幼虫齢期の関係が大きく異なることを示している。

同じ昆虫種で、処理方法が違う事例をみると、Morris (1973) は人工飼料の表面に処理する方法で調べた *C. fumiferana* で、3~6 齢幼虫の感受性は3 齢が最も高く、齢の進むに従い低下し、3 齢と6 齢の間には LC_{50} で約175 倍の差があるとしたのに対して、Fast and Dimond (1984) は人工飼料に混合する方法で調べた同4~6 齢幼虫の感受性は LC_{50} および LT_{50} で差がないとした。van Frankenhuyzen et al. (1997) は小滴飲下法で調べた同4~6 齢幼虫の感受性は4 齢が最も高く、齢が進むに従い低下し、4 齢と6 齢の間には LD_{50} で約4 倍の差があるとしたが、同時に、幼虫体重当たりの LD_{50} では6 齢がもっとも感受性が高く、ついで5 齢、4 齢の順になったと述べている。チャハマキ *Homona magnanima* の齢期と感受性の関係について、飼料混入法では1 齢と2 齢の感受性がほぼ同じで、3~5 齢では齢の進むに従い低下し、1 齢と5 齢の間には LC_{50} で約17 倍の差があるとしたが、葉片浸漬法では1~5 齢の感受性に LC_{50} で差が認められなかった(浅野、未発表)。これらの結果を考えると、同じ昆虫種においても検定方法によって異なる場合があり、*Bt* 感受性と幼虫齢期の関係を議論する場合には昆虫種以外に検定方法の相違も考慮する必要がある。

同じ昆虫種で、同じ処理方法の事例をみると、Asano et al. (1993) は飼料混入法でコナガの感受性は1 齢が最も低く、2~4 齢では大差がないとした。Liu et al. (1995) も同様にコナガの1 齢と3 齢の感受性は1 齢の方が低いとしたが、宮園ら(2003) は1 齢幼虫の感受性が最も高く、齢が進むに従い低くなるとした。これらは検定に用いたコナガの系統や検定飼料が互いに異なっているので、*Bt* 感受性と幼虫齢期の関係は同じ昆虫種で、同じ処理方法でも検定に用いた昆虫の系統や検定飼料によっても異なることを示している。

Morris (1986) は葉片処理法で2 種 *Bt* 剤の *M. configurata* の3~6 齢幼虫に対する殺虫活性と齢期との関係を調べ、一定の傾向がないとしたが、その後、Morris (1988) は別の *Bt* 剤を用いて *M. configurata* の3~5 齢幼虫に対する殺虫活性を調べ、4 齢の感受性が最も高く、3 齢と4 齢はほぼ同じとした。浅野ら(1997) は飼料混入法でカイコ5 齢幼虫の感受性が2 種の *Bt* 剤間で大きく異なるとした。このように検定に用いる *Bt* 剤の種類によっても齢期と感受性の関係が異なることを示している。

Retnakaran (1983) は *C. fumiferana* の4, 5 および6 齢幼虫で24 時間後の飼料摂取量を比較し、4 齢の摂食量に比

べ、5 齢は3 倍、6 齢は20 倍多いが、幼虫体重 g 当たりの摂食量の比では差がないとした。このことから、飼料混入法や葉片浸漬法では異なる齢期の個体当たりの *Bt* 摂取量に相違があり、そのことが結果に影響していることも考えられる。浅野ら(1997) はカイコの2 齢および3 齢幼虫で脱皮後給餌前の幼虫と給餌2 時間後の幼虫では前者の方が LC_{50} で2~3 倍感受性が高いと報告したが、これは脱皮後の経過時間の問題ではなく、投与前の幼虫消化管の空腹度により投与開始直後の摂食量に差があるためと考察している。

この他、同じ昆虫種の齢期でも日齢によって感受性が異なる事例として、浅野ら(1997) は飼料混入法でカイコの2 齢および3 齢の感受性が同じ齢期でも脱皮当日の幼虫と1 日経過した幼虫では後者の方が2~3 倍低くなることを示した。また、宮園ら(2003) はコナガの感受性と齢期の関係は *Bt* の種類や胞子の存在によっても異なるとした。トキシンを単独で用いた試験では1 齢幼虫の感受性が最も高く、齢の進むに従い低下し、1 齢と2 齢の間では LC_{50} で約9 倍の差があったが、これに胞子が共存するとその差は約2 倍に減少し、さらに、1~4 齢間での感受性と齢期の関係に一定の傾向がみられなくなるとした。これからのことから、*Bt* 感受性と幼虫齢期の関係は個体当たりの摂取トキシン量以外に *Bt* 剤の種類や胞子の有無が結果に影響することも考えられる。

2. 検定温度

Bt 感受性に及ぼす温度の影響については温度が高いほど殺虫活性が高くなる事例が多い。しかし、幼虫の発育適温や発育零点は昆虫の種類によっても異なるので、温度による影響の度合は必ずしも同じでないと考えられる。事実、感受性に及ぼす温度の影響は昆虫の種類によって異なる事例が報告されている。以下に温度の影響について報告された事例を項目別および検定方法別に示し、論議した。

1) 温度によって感受性が変わる事例

(葉片処理法) オオモンシロチョウ *Pieris brassicae* の3 齢幼虫で投与後の致死率が17°C と23°C で比較され、23°Cの方が致死の発現が早く、致死率も高かった(Burgerjon, 1957)。イラクサギンウワバの3 齢幼虫の感受性に及ぼす温度(4, 10, 16, 21, 26 および32°C)の影響が調べられた。16°C 以下では致死がみられなかった。21°C と26°C では LC_{50} に差がないが、32°C では感受性が高く、 LC_{50} で8 倍の差があった(Chalfant, 1973)。 *M. configurata* の4 齢幼虫の5 種 *Bt* 剤に対する感受性が20°C と25°C で比較され、1 剤を除いて温度の高い方が感受性は高く、 LC_{50} で3.2~4.7 倍の差があった。同時に測定された体重増加量や糞重量も高温で少なかった(Morris, 1988)。

(飼料混入法) コナガの3 齢幼虫の感受性が25°C と28°C で比較され、28°C の感受性が25°C より高く、7 日後

の LC_{50} で約 2 倍の差があった (Robertson et al., 1996), ハスモンヨトウのふ化幼虫の感受性と温度 (15, 20, 25 および 30°C) では, 15°C で感受性が高いが, 20~30°C では差がなく, 15°C と他の温度の間には LC_{50} で約 3 倍の差があった (浅野・鈴木, 1995). ヨトウガ *Mamestra brassicae* のふ化幼虫の感受性と温度 (15, 20, 25 および 30°C) の関係では 30°C で感受性が最も高いが, 15~25°C では差がなく, 30°C と他の温度の間では LC_{50} で約 2 倍の差があった (浅野, 未発表).

(経口投与法) カイコの 5 齢幼虫の感受性が 15, 25 および 35°C で比較され, 温度が高いほど感受性が高くなり, 35°C と 15°C では LC_{50} で約 2 倍の差があった (石黒・宮園, 1979).

2) 温度によって感受性が変わらない事例

(葉片処理法) *C. fumiferana* の 4 齢幼虫の感受性と温度の関係では, 最終的な LC_{50} には温度間 (13, 19 および 25°C) で差はないが, LT_{50} は温度が高いほど小さくなった (van Frankenhuyzen, 1990).

(飼料混入法) *C. fumiferana* の 4 齢幼虫の感受性と温度の関係では, 最終的な LC_{50} に温度間 (16, 19, 22, 25 および 28°C) で差はないが, LT_{50} は温度が高いほど小さくなった (van Frankenhuyzen and Nystrom, 1987).

(経口投与法) 小滴飲下法を用いた *C. fumiferana* の 6 齢幼虫の感受性と温度 (16, 19, 22, 25 および 28°C) の関係では, 最終的な致死率に差はないが, 致死までの時間が短くなった (van Frankenhuyzen and Nystrom, 1987).

3) 論 議

一般に, 温度が高くなると個体当たりの摂食量が多くなるので, 葉片処理法や飼料混入法による検定では個体当たりに摂取するトキシン量も当然多くなると予想される. 実際に, Retnakaran (1983) は飼料混入法による *C. fumiferana* の 6 齢幼虫の摂食量に及ぼす温度の影響を調べ, 温度の高いほど摂食量が多くなり, 12°C と 27°C の間には 4.9 倍の差があったとした. van Frankenhuyzen and Nystrom (1987) は飼料混入法による *C. fumiferana* の 4 齢幼虫で温度の影響を調べ, 最終的な LC_{50} に差はないが, LT_{50} は温度が高いほど小さくなるとした. また, 同時に彼らは小滴飲下法による *C. fumiferana* の 4 齢幼虫で温度の影響を調べ, 同様に最終的な致死率に大差はないが, 温度が高くなるほど致死までの時間が短くなること, 投与後の生存個体の体重増加は温度が低いほど少なくなること, つまり, 温度が低いほど摂食阻害の回復が遅くなるとした. Morris (1988) は *M. configurata* の 4 齢幼虫で 20°C と 25°C での殺虫活性 (LC_{50}) を比較し, 25°C の方が 20°C より高いとしたが, その度合は *Bt* 剤の種類によって異なるとした. Ignoffo (1962) はキバガ科の *Pectinophora gossypiella* の 4 齢幼虫で血体腔注射後敗血症が観察されるまでの LT_{50} と温度の関係

について調べ, 40°C が最も短く, 12.8°C までは温度が低くなるほど大きくなるとした. 51.2°C と 8.6°C では敗血症は観察されなかったが, 敗血症は血体腔での *Bt* の増殖と関係があるとした. また, 血体腔での *Bt* の発芽適温は 51.2°C で, 増殖適温は 31.2°C とした. van Frankenhuyzen (1990) は葉片処理法で温度が高いほど投与後の致死発現の時期が早くなるとしたが, 投与 14 日間の累積致死率には差がなかったこと, 投与期間を 1 日に限定した時, 累積致死率は温度間で差のないことから, 最初の 1 日に摂取した *Bt* の致死量は温度間で差がないとした. van Frankenhuyzen (1994) は *C. fumiferana* の 6 齢幼虫で殺虫活性に及ぼす温度の影響は昆虫体液中における *Bt* の増殖速度の差によるとした. このように温度条件は投与時の時間当たりのトキシン摂取量, 最低致死量になるまでの時間および死亡に至るまでの時間に大きく影響すると思われる.

3. 検定飼料

Bt 剤の生物活性に影響する餌条件については飼料混入法における飼料中の抗菌物質などの影響は早くから報告されていたが, 最近, 葉片処理法における検定植物葉による影響が報告されている. それらの事例を検定方法別に示し, 論議した.

1) 生物活性に及ぼす検定飼料の事例

(葉片浸漬法) マイマイガの 2 齢および 4 齢幼虫で 3 種の寄主植物葉の影響が調べられ, ハコヤナギ属の葉で飼育した個体の致死率に比べ, コナラ属の 2 種の葉では 2~5 倍低かった (Appel and Schultz, 1994). ハスモンヨトウの 3 齢幼虫の致死率が検定植物葉の種類によって異なり, イチゴやシソでの致死率がトマトやキャベツに比べて低かった (長岡・井園, 1998). 同様に, ハスモンヨトウの 3 齢幼虫で, トマト, ピーマンおよびナスに比べ, イチゴやシソでの致死率が低かった (及川ら, 1999).

(飼料混入法) イラクサギンウワバの 3 齢 (4 日齢) 幼虫の感受性は飼料中に抗生物質 (クロルテトラサイクリン) がある場合は低下し, ない場合に比べ 3 日後の致死率で約 7 倍の差があった. しかし, 5 日ではその差が 1.5 倍に縮まり, 10 日後では差がなかった (Ignoffo et al., 1977a). イラクサギンウワバ, *H. virescens* および *O. nubilalis* の 4 日齢幼虫の感受性は飼料中に抗生物質 (オーレオマイシン) が存在すると濃度依存的に低下し, LC_{50} で 2.4~67.1 倍の差がみられた (Beegle et al., 1981). 棉に含まれる 2 種のフェノール (gallic acid と resorcinol) を添加した飼料ではオオタバコガ *Hericoverpa armigera* に対する生物活性 (LC_{50} , 摂食量の減少および幼虫体重の減少) が増大し, 24h 後の LC_{50} で約 3 倍の差が生じた (Sivamani et al., 1991). トマトから抽出・単離した 2 物質 (chlorogenic acid と polyphenol oxidase) を添加した飼料では *H. zea* の 3 齢幼虫に対する致死率が明らかに増大した (Ludlum et al., 1991). マイマイ

ガの3齢幼虫でモミ *Pseudotsuga menziessi* の葉粉末を入れた飼料を用いるとハンノキ *Alnus rhombifolia* の葉粉末を入れたものに比べ、48~96 h 後の致死率は約2倍高かったが、致死量以下の濃度における生存幼虫の幼虫期間では逆に後者の方が長くなった (Moldenke et al., 1994). シロイチモジヨトウのふ化幼虫に対する殺虫活性と寄主植物の関係が2品種のセロリー (嗜好性の良い品種と悪い品種) を用いて調べられ、投与1~4日後の LC_{50} では嗜好性の良い品種の方が悪い品種に比べ1.3~1.4倍高いが、6~7日後の LC_{50} では大差がなかった (Maedae and Hare, 1993).

(経口投与法) ヨトウガの一種 *Pseudaletia unipuncta* の6齢幼虫で経口投与後抗生物質 (オーレオマイシン) を含む人工飼料で飼育すると含まない飼料に比べて明らかに致死率が低下した (Somerville et al., 1970).

2) 論 議

Maedae and Hare (1993) はシロイチモジヨトウで嗜好性の良いセロリー品種は悪い品種に比べ、摂食量も多いことから *Bt* 摂取量も多くなると予想したが、殺虫活性は逆に前者で低くなったことから、飼料の影響は摂食量の多少以外に原因があるとした。Krischik et al. (1988) は飼料混入法でスズメガの一種 *Manduca sexta* の3齢幼虫に対する致死率が飼料にタバコやトマトに含まれる nicotin 類を添加すると濃度に対応して低下するとした。また、添加した培地では濃度に対応して *Bt* のコロニー数も減少するとした。Sivamani et al. (1991) は飼料混入法で棉の2種のフェノール成分 (gallic acid と resorcinol) がオオタバコガに対する *Bt* 活性を増大したのはそれぞれのフェノール単独の発育阻害作用が *Bt* との併用により高まるためとした。Morris et al. (1994) は飼料混入法で植物成分の caffeine や関連物質が *Bt* の殺虫活性 (LC_{50}) を最高3.5倍まで高める効果があるとした。Appel and Schultz (1994) は飼料混入法で植物中のタンニンにマイマイガの2齢および4齢幼虫に対する *Bt* の殺虫活性を阻害する作用があるとした。Kushner and Harvey (1962) は種々の植物葉の中に抗菌活性物質があり、それらは食植性昆虫の腸管内の病原菌に対する耐性に役立つとした。そのうち *Bacillus* 菌はとくに影響されやすいと述べている。Smirnoff and Hutchison (1965) は74種の植物葉の磨砕液や抽出液の *Bt* に対する抗菌活性を調べ、マツ科の植物に比較的強い抗菌活性があるとした。Maksymiuk (1970) は22種の植物葉に *Bt* に対する抗菌活性があるとした。Morris (1972) は種々の樹種の葉抽出液の *Bt* に対する抗菌活性を調べ、terpene 類にその作用が高いとした。これらの結果から植物中に含まれる抗菌活性を有する成分は *Bt* の殺虫作用に対し阻害的に働くと考えられた。これは飼料混入法に用いる飼料に含まれる抗菌活性を有する抗生物質 (Somerville et al., 1970; Ignoffo et al., 1977a; Beggle et al., 1981), 防腐剤 (松本, 1999) などが阻害的に働くことと

類似している。その他、飼料成分のダイズ粉末の種類 (松本, 2000) や水分含量 (浅野ら, 1997) が殺虫活性に影響することが示されている。このように検定飼料に含まれる抗菌物質や植物成分あるいは水分含量が *Bt* 剤の活性に影響することや、葉片処理法においては用いた検定植物の種類によって殺虫活性が異なることも考慮しなければならない。

4. 投与期間, 調査時期および評価活性

生物活性は致死率をもとにした殺虫活性で評価される事例が多いが、他に生存幼虫の発育や体重をもとにした発育阻害活性や摂食量をもとにした摂食阻害活性で評価される場合がある。経口投与法では検体の投与は原則1回であるので、投与期間の問題はとくにないが、葉片処理法や飼料混入法では投与期間によって結果が異なることが報告されている。葉片処理法では生葉を用いることもあり、投与期間が比較的短く、飼料混入法では逆に長くなる場合が多い。投与期間や調査時期は評価活性や検定方法によっても異なるが、いままでに報告された事例を評価活性をもとに検定方法別に示し、論議した。

1) 殺虫活性に基づく評価事例

(葉片処理法) オオモンシロチョウの3齢幼虫で処理葉を連続して12日間与えた時、致死率は投与2日後に急増し、その後の増加は緩やかになった (Burgerjon, 1957). *S. littoralis* の1齢と2齢幼虫で投与1日後に無処理葉と交換した48 h と168 h 後の LC_{50} は後者の方が2.5~3.4倍小さくなった (Altahtawy and Abaleess, 1973). コナガの3齢およびモンシロチョウの3~4齢幼虫で投与2~6日後の LC_{50} (対数値) は直線的に減少し、2日後と6日後の間には5~6倍の差が生じた。一方、ハスモンヨトウの2齢およびヨトウガの2齢幼虫では3日後まで LC_{50} は減少したが、それ以後の増大はほとんどなかった (浅野ら, 1973b). マイマイガの3~4齢幼虫で投与3~8日後の LC_{50} (対数値) は指数関数的に減少し、投与3日と8日後の間には約14倍の差があった (浅野ら, 1973a). マツカレハの1, 3および4齢幼虫で投与2~7日後の LC_{50} (対数値) はいずれも指数関数的に減少した (Asano et al., 1976). *C. fumiferana* の4齢幼虫に1, 2, 3, 5, 7, 9, および14日間与えた時の致死率は投与期間の長いほど増大した。この傾向は25, 19および13°Cで同様であった (van Frankenhuyzen, 1990). コナガの1齢および3齢幼虫で投与2日と5日後の LC_{50} は、後者の方が1.2~2.9倍小さくなったが、その度合はコナガの系統によっても異なった (Liu et al., 1995).

(飼料混入法) イラクサギンウワバの1日齢および4日齢幼虫で殺虫活性 (LC_{50}) が投与1~5日後まで比較され、 LC_{50} は投与後の日数に対していずれも指数関数的に減少し、1日後と5日後の LC_{50} は1日齢幼虫で14倍、4日齢幼虫で39倍の差があった (Ignoffo et al., 1968). *H.*

virescens のふ化幼虫で投与 7 日後の生存率, 3 齢への幼虫発育率, 蛹化率および羽化率が比較され, 7 日後の生存率 (LC_{50}) に比べ, 幼虫発育率, 蛹化率および羽化率は (各 EC_{50}) それぞれ 1/3, 1/6 および 1/15 になった (Dulmage and Martinez, 1973). *H. virescens* のふ化幼虫で投与 24, 48 および 72 h 後に無処理餌へ移した時の 7 日後および 14 日後の殺虫活性 (LC_{50}) が連続投与のそれと比較された. 投与期間に対応して LC_{50} は小さくなり, 24 h 投与の場合 7 日後の LC_{50} は 7 日間の連続投与に比べ約 89 倍の差であったが, 48 h および 72 h 投与の場合はその差がそれぞれ 3.5 および 1.4 倍に減少した (Dulmage et al., 1978). *S. littoralis* およびオオタバコガのふ化幼虫に 1, 2, 3, 5 または 7 日間投与し, その後無処理餌へ移して 7~22 日後に致死率が調査された. 投与期間の長いほど致死率が增大した (Slama et al., 1981). *C. fumiferana* の 5 齢幼虫では投与期間 (1~4 日) の長くなるほど殺虫活性が高くなり, 1 日投与と 6 日間連続投与では 10 日後の LC_{50} で約 500 倍の差があった. 投与 5~10 日後の殺虫活性 (LC_{50}) は指数関数的に減少したが, その後は変わらなかった (Fast and Régnière, 1984). *C. fumiferana* の 4 齢幼虫で投与 3~23 日後までの LC_{50} を温度 (16, 19, 22, 25 および 28°C) との関係で調査された. いずれの温度においても LC_{50} (対数値) は直線的に減少し, やがて一定になった. LC_{50} が一定になるまでの日数は 7~17 日で, 温度が高いほど短くなった (van Frankenhuyzen and Nystrom, 1987). タマナヤガのふ化幼虫に 1, 2, 3, 4, 5 および 6 日間与えた時の致死率は投与期間の長いほど高くなった (Salama and Sharaby, 1988). *H. virescens* の 3 齢幼虫で人工飼料に混合して与えて 3 日後に無処理葉へ移すと致死率は 12 日後まで増大し, 12 日後の LC_{50} は 2 日および 3 日後のその 1/3 および 1/2 であった (Gharib and Wyman, 1991). コナガの 3 齢幼虫で投与 2~7 日後の LC_{50} が 25°C と 28°C で比較された. いずれの温度も日数の経過とともに指数関数的に減少し, 2 日と 7 日後の LC_{50} の間に 6~21 倍の差があった (Robertson et al., 1996). カイコの 3 齢幼虫で投与後 7 日までの致死率は経過日数に伴い増加した. 1~5 齢幼虫の *Bt* 感受性が投与 7 日後の殺虫活性 (LC_{50}) で比較され, 齢期間に差のあることが示された (浅野ら, 1997).

(経口投与法) マイクロシリンジで経口投与したカイコの 5 齢幼虫で投与 24 時間後の致死率から LD_{50} が算定され, *Bt* 剤の効力評価に適した方法とされた (石黒・宮園, 1979). 小滴飲下法で調べた *C. fumiferana* の 4~6 齢幼虫で投与 5 日後の致死率から LD_{50} が算定され, 齢期間に差のあることが示された (van Frankenhuyzen et al., 1997).

2) 摂食阻害活性に基づく評価事例

(葉片処理法) オオモンシロチョウの 3~4 齢幼虫で投与 16~17 h 後の摂食面積をもとに評価され, これにより *Bt* 剤

の活性が比較できることが示された (Burgerjon, 1962). *A. argillacea* の 2~3 齢幼虫および 5~6 齢幼虫で投与 18~66 h 後の糞粒数をもとに評価された. また, 5~6 齢幼虫で投与 18 h 後に無処理葉へ移して 24 h 後の糞粒数から摂食阻害の回復が観察されたが, 投与 42 h 後に無処理葉へ移した場合は摂食阻害の回復はなかった (Ignoffo et al., 1964). マイマイガの 3~4 齢幼虫で投与 1~8 日後の乾燥糞重をもとに評価された. また, 3~4 齢幼虫で投与 2 日後に無処理葉へ移すと糞重が増大し, 摂食阻害の回復が示された (浅野ら, 1973a). マツカレハの 3 齢幼虫で投与後 7 日間の乾燥糞重をもとに評価された. また, 投与 2 日後に無処理葉へ移した時の糞重量の増大から摂食阻害の回復が示された (Asano et al., 1976). マイマイガの老齢幼虫で投与 24 h 後の摂食面積と, その後無処理葉に移した 24 h 後の摂食面積の比較から摂食阻害とその回復が示された (Nagasawa and Asano, 1976). ヨトウガの 2 および 3 齢幼虫で径 3 cm のキャベツ葉片を与え 36 h 後に乾燥重当りに換算した摂食量をもとに評価され, 40~47% の摂食阻害が示された (Espinel, 1981). *M. configurata* の 4 齢幼虫で投与 7 日後の乾燥糞重量をもとに評価され, *Bt* 剤の種類や温度による活性の差が示された (Morris, 1988). コナガの 4 齢幼虫で径 2.3 cm のキャベツ葉片を与えて 24 h 後の摂食面積をもとに評価された 6 種類の *Bt* 剤の摂食阻害活性 (EC_{50}) は 48 h 後の致死活性 (LC_{50}) の 1/1.8~1/3.7 であることが示された (浅野, 1999).

(飼料混入法) *C. fumiferana* の 6 齢幼虫で投与 24 h 後の摂食量とその後無処理餌へ移した 24 h 後の摂食量で摂食阻害と回復が示された (Retnakaran, 1983). *C. fumiferana* の 5 齢幼虫で投与 1~4 日後に無処理餌へ移した時の体重増加が調べられ, いずれの濃度においても摂食阻害の回復が示された (Fast and Régnière, 1984). ニカメイガ *Chilo suppressalis* の 3~4 齢幼虫で投与 48 h 後の摂食量をもとに評価された. また, 投与 36, 60 および 84 h 後に無処理餌へ移した時の摂食量を 180 h 連続投与のそれと比較して摂食の回復が示された (Rombach et al., 1989). *C. fumiferana* の 2 齢幼虫で投与 48 h 後に無処理餌と交換して 6 h 後の幼虫体重の推移から摂食の回復が示された (Ramachandran et al., 1993). *C. hospes* の 1 齢幼虫では 1 週間後に, 2~4 齢幼虫では 2 週間後に無処理葉へ移した時摂食の回復が示された (Barker, 1998).

3) 発育阻害活性に基づく評価事例

(葉片処理法) オオモンシロチョウの 3 齢幼虫で投与 6 日後の生存個体の幼虫発育 (齢期) は濃度に対応して遅延した (Burgerjon, 1957). *H. leucostigmata* の 2~5 齢幼虫, *O. pseudotsugata* 2~5 齢幼虫およびマイマイガ 1~4 齢幼虫で 5 日後の生存幼虫の体重増加量は濃度間で大差がなかった (Morris, 1973). マツカレハの 1 齢幼虫で 6 日後の幼虫

齢期および体重を、3 齢幼虫では 7 日後の体重は致死量以下で濃度に対応した発育阻害活性が示された (Asano et al., 1976). *M. configurata* の 3~6 齢幼虫で投与 7 日間の体重増加量、乾燥糞重および生存虫の羽化率をもとに阻害活性が評価され、5 種類の *Bt* 剤の間に差が示された (Morris, 1988). *C. rosaceana* の 1 齢および 5 齢幼虫で投与 6 日後に無処理葉へ移して蛹化および羽化が調べられた。1 齢幼虫では蛹化までの日数が長くなったが、蛹重、蛹期間および羽化率および性比には差がなく、5 齢幼虫では蛹重および羽化率は低下したが、性比には差がなかった (Li et al., 1995).

(飼料混入法) スジコナマダラメイガ *Anagasta* (*Ephesia*) *kuehniella* のふ化幼虫に致死量以下の濃度を与えた時の幼虫発育期間と成虫の産卵数をもとに評価され、発育の遅延と増殖の抑制が示された (Yamvrias, 1962). ノシメマダラメイガの 10~14 日齢幼虫で羽化率をもとに評価され、濃度に対応した阻害活性が示された (Kantack, 1959). スジコナマダラメイガで卵から羽化までの発育期間の遅延、羽化数、産卵数およびふ化率は減少したが、羽化成虫の性比は差がなかった (Afify and Matter, 1969). ノシメマダラメイガおよびスジマダラメイガの 1 齢幼虫で羽化率をもとに評価され、両種の *Bt* 感受性に差のないことが示された (Nwanze et al., 1975). ノシメマダラメイガの 1~4 齢およびスジマダラメイガの 1~5 齢幼虫で羽化までの期間が調査され、処理齢期が早いほど発育期間は長くなったが、羽化成虫の性比、産卵数、ふ化率は差がなかった (McGaughey, 1978). *O. nubilalis* の 6 日齢幼虫で投与 9 日と 12 日後の体重、羽化時期および羽化率をもとに評価され、発育遅延が示された (Sutter and Raun, 1966). イラクサギンウワバの 1 日齢と 4 日齢幼虫で 5 日後の体重および 15 日後の蛹化率で評価され、いずれも濃度に対応した発育遅延が示された (Ignoffo et al., 1968). *H. virescens* のふ化幼虫から連続投与した時、濃度に対応して幼虫期間の延長、蛹重の減少がみられた。蛹期間に差はなかったが、産卵数およびふ化率は低くなった (Dulmage and Martinez, 1973). *H. virescens* のふ化幼虫で連続投与した時、濃度に対応した幼虫発育の遅延があったが、幼虫発育の後期、蛹期間、蛹重、蛹化率および羽化率に差はなかった。また、投与 24, 48 および 72 h 後に無処理餌へ移した時、幼虫期間の遅延が投与期間と濃度に対応してみられたが、幼虫後期の発育期間、蛹期間、蛹重、蛹化率および羽化率には大差がなかった (Dulmage et al., 1978). *S. littoralis*, シロイチモジヨトウの 2 齢およびオオタバコガの 2 齢幼虫で致死以下の濃度を投与した時、濃度に対応して幼虫期間の延長、蛹重の減少、産卵数の減少が示された (Slama et al., 1981). ハスモンヨトウのふ化幼虫で投与 2 日後に無処理餌と交換した時、幼虫期間の延長、摂取餌量、糞重、消化餌量、蛹重および蛹化率の減少

がみられた (Sareen et al., 1983). タマナヤガのふ化幼虫に 1, 2, 3, 4, 5 および 6 日間与えた時、投与期間の長いほど幼虫期間の延長、蛹化率、羽化率および産卵数が減少した (Salama and Sharaby, 1988). *C. fumiferana* の 4~6 齢幼虫で投与 15 日間の虫体重をもとに評価され、濃度に対応した発育阻害が示された (Fast and Dimond, 1984). *C. fumiferana* の 4 齢幼虫で投与 7 日後に無処理餌へ移すと幼虫期間の減少はみられたが、蛹重、産卵数には差がなかった (Alford and Holmes, 1986). *C. fumiferana* の 2 齢幼虫で投与 48 h 後に無処理餌と交換した時、6 h 後の体重は連続投与に比べて大きかった。投与期間との関係では投与 1 または 2 日後に無処理餌へ移した時の 7 日後の体重には差がなかったが、投与 3 日後に無処理餌へ移した時は濃度に対応して体重が減少した。しかし、蛹体重では差がなかった。また、連続投与した投与 7 日後の幼虫体重は濃度に対応して減少し、致死量以下の濃度において幼虫発育の遅延と蛹重の減少がみられた (Ramachandran et al., 1993). *C. fumiferana* の 4~6 齢幼虫で投与 72 h 後に無処理餌と交換した時、幼虫期間の延長、蛹重および産卵数の減少がみられたが、ふ化率は差がなかった (Pedersen et al., 1997). コナガの 4 齢幼虫で 7 日後および 14 日後の蛹化率をもとに阻害活性 (EC_{50}) が評価され、両者に大差のないことが示された (Asano et al., 1993; Asano and Seki, 1994). *C. hospes* の 1~5 齢幼虫で蛹化までの期間をもとに評価されたが、濃度との関係は明確でなかった。また、1 齢幼虫は 1 週間後に、2~5 齢はそれぞれ 2 週間後に無処理餌へ移した時、幼虫発育が回復し、蛹化割合が増加した (Barker, 1998). カイコの 2 齢および 3 齢幼虫で投与 48 h 後の体重増加量をもとに評価された阻害活性 (EC_{50}) は 168 h 後の致死活性 (LC_{50}) の 1/8~1/10 であった (浅野, 2003).

(経口投与法) *C. fumiferana* の 6 齢幼虫で投与後の幼虫発育を温度 (13, 19, 22 および 28°C) 別に調べ、虫体重をもとに発育阻害とその回復が評価され、温度が低いほど回復が遅れることが示された (van Frankenhuyzen and Nystrom, 1987).

4) 論 議

一般に、投与期間が短いほど殺虫活性が低くなり、途中で無処理の餌と交換すると摂食阻害や発育阻害の回復がみられ、殺虫活性も対応して低くなる場合が多い。投与後の調査時期は投与終了時に多くなされるが、経口投与法の場合は投与後の致死が安定する時期が、葉片処理法や飼料混入法の場合は途中で無処理餌と交換してから調査がなされる場合があるので、投与期間と調査時期は一致しないことがある。*Bt* 剤の生物検定における投与期間と調査時期の条件は評価する活性によってそれぞれ検討されなければならない。

殺虫活性をもとに評価する場合について、Dulmage et al.

(1978) は *H. virescens* のふ化幼虫を用いて殺虫活性と投与期間の関係を調べ、投与期間が 48 h を過ぎると致死率に差が少なくなるとした。Slama et al. (1981) も *S. littoralis* およびオオタバコガのふ化幼虫で同様な結果を示した。しかし、Fast and Régnière (1984) は *C. fumifera* の 5 齢幼虫で投与期間が 96 h を過ぎても致死率に差があるとしている。浅野 (未発表) はコナガの 4 齢幼虫で同じ濃度で致死率に差のなくなる投与期間を検定温度 25, 20 および 15°C で調べ、それぞれ 2, 3 および 5 日であり、このことから個体当たり同じ致死量 (トキシン摂取量) に到達するまでの期間が温度によって異なるとしている。Fast and Dimond (1984) は飼料混入法で調べた *C. fumiferana* の 4, 5 および 6 齢幼虫で LT_{50} や 7 日後の LC_{50} に年齢の差はないが、 LT_{50} は投与濃度が高いほど小さくなるとした。Fast and Régnière (1984) も *C. fumiferana* の 5 齢幼虫で 6 日間連続投与した時の濃度別の LT_{50} は濃度が高いほど小さくなるとした。Robertson et al. (1996) もコナガの 3 齢幼虫に 7 日間連続投与した時の LT_{50} は濃度が高いほど小さくなるとした。van Frankenhuyzen and Nystrom (1987) は小滴飲下法を用いて調べた *C. fumiferana* の 4 齢幼虫で LT_{50} は濃度および温度が高いほど小さくなるとした。これらことから殺虫活性 (LC_{50}) が投与期間や調査時期により異なることを示しているので、多くの事例を比較する際には投与時期や調査時期の条件の違いを考慮しなければならない。

摂食阻害活性や発育阻害活性をもとに評価する場合は投与後に無処理餌へ移す時期による摂食阻害の回復や調査時期による発育阻害の相違を考慮しなければならない。摂食阻害の回復と投与期間の関係で Ignoffo et al. (1964) は *A. argillacea* の 5~6 齢幼虫で投与 42 h 後に無処理餌へ移した時は摂食阻害の回復はないとしたが、Rombach et al. (1989) はニカメイガの 3~4 齢幼虫で投与 84 h 後に無処理餌へ移しても摂食回復があるとした。Barker (1998) は *C. hospes* の 2~4 齢幼虫で 2 週間後に無処理餌へ移した時にも摂食の回復があることを示している。浅野 (未発表) はカイコ 3 齢幼虫に対する摂食阻害の回復性と投与期間の関係を調べ、回復度は *Bt* 剤によって異なり、胞子を含まない剤は含む剤に比べ、回復の遅いことを示した。van Frankenhuyzen and Gringorten (1991) は *C. fumiferana* の 6 齢幼虫で経口投与法を用いて調べ、摂食阻害や発育阻害は致死量より低い濃度で、かつ早い時期に観察され、濃度との対応が致死より敏感なので、*Bt* の生物活性の指標には致死よりも有効であると述べている。

Bt 処理葉に対する昆虫の摂食行動について、浅野ら (1973a) はマイマイガの 6 齢幼虫が処理葉と無処理葉を選択的に摂食することを示した。Yendol et al. (1975) も同様にマイマイガの 3 齢幼虫が処理葉と無処理葉を選択し、また、摂食選択性が処理濃度に依存することを示した。しか

し、浅野ら (1973a) はマイマイガが処理葉を摂食すると徘徊行動が活発になり、その行動中に偶然無処理葉と遭遇するとそこに留まり摂食を続ける割合の多いことから、*Bt* 剤処理葉に対する積極的な摂食忌避性ではなく、偶然に無処理葉へ移動したため結果的に処理葉の摂食が少なくなったに過ぎないと考察している。Farrar et al. (1995) はマイマイガの 2 齢幼虫で 1 日後の処理葉と無処理葉の間に摂食選択性があるとしたが、試験開始 7 日以後では幼虫の移動性が増大し、両葉の間の選択性が判然としなくなるとした。他方、Retnakaran (1983) は飼料混入法による *C. fumiferana* の 6 齢幼虫で処理餌と無処理餌の間に摂食選択性がないとした。また、摂食阻害の回復性についてはトキシンによる中腸上皮細胞の損傷後に修復が起きるが、その修復が不可能な程度に損傷を受けた場合は摂食の回復がなく、やがて敗血症を伴い死に至ると考察している。Gould et al. (1991) は飼料混入法を用いて *H. virescens* の摂食阻害 (発育阻害) と摂食選択性を調べた。ふ化幼虫は発育阻害の生じない濃度域で処理飼料の摂食を忌避したが、4 齢および 5 齢幼虫は発育阻害の生ずる濃度域で摂食忌避がみられた。この傾向は胞子を含まない精製トキシンでも同様にみられた。

Bt の生物検定において評価する活性の選定は重要であり、それぞれ長所と短所があるが、評価活性によって投与期間や調査時期を検討しなければならない。調査時期は殺虫活性の場合は投与 5~7 日後に、摂食阻害活性の場合はこれより短く投与 1~3 日後に、発育阻害活性の場合は両者の中間で投与 3~5 日後に多くなされている。しかし、蛹化率や羽化率などで評価する場合は調査時期が長くなる。貯穀害虫の場合、被害防止を防除効果の目安とするので、活性の評価は致死の代わりに摂食阻害 (被害防止) や発育阻害 (羽化防止)、あるいは次世代の幼虫密度でされることが多い。ノシメダラメイガやスジマダラメイガの場合では処理後の羽化率をもとに評価された (Kantack, 1959; Nwanze et al., 1975; McGaughey, 1976)。殺虫活性の評価で問題になるのは投与後の致死率の調査時期による差異と苦悶虫の判定である。通常、苦悶虫は正常個体と明らかに異なる場合でも生存個体として記録される場合が多い。浅野ら (1973b) は処理葉を連続して与えたモンシロチョウ 3~4 齢幼虫で致死率は投与 6 日後でもまだ増加がみられたが、同じ濃度において乾燥糞重をもとにした摂食阻害率では投与 2~6 日間の間で差がないとした。浅野ら (1973a) は同様な方法で調べたマイマイガ 3~4 齢幼虫の致死率は投与 8 日後でも増加がみられたが、8 日後に 90% 以上の致死率を示した濃度における摂食量は投与 2 日以後ほとんど増加しなかったと述べている。摂食阻害や発育阻害による活性の評価はそれらを数値化することが課題である。摂食阻害は摂食面積や糞量をもとにした評価が多いし、発育阻害は投

与後の幼虫齢期や体重増加量をもとにした評価が多い。浅野 (2000) はハスモンヨトウの1齢幼虫を用いた発育阻害活性の評価を7日後の生存幼虫に齢指数を乗じて合計したものを幼虫発育量 (バイオマス) として求め、それによる処理区と無処理区を比較する方法を示した。摂食阻害や発育阻害による生物活性の評価は致死量以下の濃度で評価できることや、殺虫活性よりも実際の *Bt* 剤による防除効果と関連性の高いことなどに利点がある。殺虫活性で苦悶虫を生存虫と判定すると効力を低く見積もることになり易い。生存していても摂食や発育が阻害されていれば *Bt* 剤の効力があると評価する方が实际的でもある。

5. その他の項目

Bt 剤の殺虫成分の主体は δ -エンドトキシン (以下トキシンと略) であるが、昆虫の種類によっては孢子が共存すると殺虫効果が高まる事例が、スジコナマダラメイガ (Heimpel and Angus, 1959), モンキチョウの近縁種 *Colias eurytheme*, イラクサギンウワバ, *P. unipuncta* (Somerville et al., 1970), ハチミツガ *Galleria mellonella* (Burgess et al., 1976), *C. fumiferana* (Fast, 1977), アメリカシロヒトリ *Hyphantria cunea* (宮本・鮎沢, 1982; Moar et al., 1989) およびシロイチモジヨトウ (Moar et al., 1989) で報告された。これらの昆虫では孢子単独の投与でも致死がみられた。*O. nubilalis* ではトキシンと孢子のそれぞれ単独でも体重増加を抑制する作用がみられるが、殺虫作用は両者の混合により顕著になるとされた (Sutter and Raun, 1966)。Miyasono et al. (1994) は飼料混入法を用いてコナガに対するトキシンと孢子の混合は最高 146 倍の協力効果があるとした。さらに、*Bt* 以外の *Bacillus* 属の孢子や乳酸菌 (*Lactobacillus*), 酵母 (*Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*) の孢子にも同様な協力効果があることが示された (宮園ら, 1994)。その後、トキシンと孢子の別の組み合わせで最高 212 倍の協力効果を示した (宮園ら, 2003)。Tang et al. (1996) は葉片処理法を用いてコナガに対して同様に協力効果を確認しているが、その度合は最高で 8.3 倍であった。Liu et al. (1995) は葉片処理法でコナガに対する孢子の混合効果を確認しているが最高 9.7 倍であった。Asano et al. (2000a) は飼料混入法および葉片処理法で検討し、コナガに対する孢子の混合はトキシンによる致死の発現時期を早める作用はあるが、殺虫活性 (LC_{50}) はトキシン単独のそれと大差がなく、殺虫活性における協力作用は特になくとしている。Nyouki et al. (1996) は飼料混入法で検討し、感受性の低いハスモンヨトウの一種、*Spodoptera frugiperda* や感受性の高いヤガ科の *Pseudoplusia includens* で孢子との混合効果は顕著でないとした。トキシンと孢子との協力効果はトキシンの種類によっても異なるし、コナガの系統 (*Bt* 感受性および抵抗性) でも異なっている (宮園ら, 2003)。その他、孢子の種類によっても異なっている (Liu et al., 1995) の

で、トキシンと孢子との協力作用は昆虫の種類やその系統、孢子の種類、トキシンの種類および組み合わせ、トキシンと孢子の混合比や製剤中の抗菌物質など存在により異なると考えられる。

Bt の培養上清中にトキシンの効力を増進する物質があり、ハスモンヨトウでトキシン単独の 32 倍の増進効果を示したが、コナガやチャノコカクモンハマキでは増進効果がみられなかった (Asano et al., 1995)。また、その物質の生産は培養条件によって異なることが示された (Asano and Hori, 1995)。その後、別の *Bt* の培養上清がハスモンヨトウ以外にヨトウガ、コナガおよびチャノコカクモンハマキに対して増進効果があり、最高でトキシン単独の 42 倍であった (Asano et al., 2000b)。

Bt の鱗翅目昆虫に対する殺虫作用は昆虫の種類によっても異なり、複雑である。Heimpel and Angus (1959) は *Bt* に感受性を示す昆虫を 3 グループに分類した。タイプ 1 の昆虫は投与後早い時期に全身のけいれん症状を示し、致死までの期間が比較的短いグループ (例: カイコ)。タイプ 2 の昆虫は全身のけいれんがなく、致死までに時間が比較的長いグループ (例: モンシロチョウ)。タイプ 3 の昆虫はトキシン単独では殺虫活性がなく、致死にはトキシンと孢子の両方を必要とするグループ (例: スジコナマダラメイガ) とした。タイプ 1 は致死が早く、中腸の直接的な重篤な障害を伴うが、タイプ 2 と 3 の昆虫は致死が遅く、トキシンの濃度に対応して摂食を中止し、*Bt* 孢子の発芽あるいは腸内微生物の増殖による遅効的な敗血症を伴う。敗血症は最終的に致死をもたらすが、摂食停止による飢餓や修復不可能に損傷した中腸細胞による影響もあり、殺虫作用は複雑である。生物検定においてはこれらの連続した殺虫作用機構を制御することはできないし、結果的に孢子の有無はトキシンの殺虫活性に影響することになる。また、カイコでは葉片処理法による LD_{50} に品種間で 10~50 倍の差が報告されている (鮎沢ら, 1962; 小野, 1966; 森田ら, 1974)。最近、カイコの原種間の感受性に最大 500,000 倍の差があることが示されている (宮本, 私信)。

お わ り に

昆虫を用いる *Bt* 製剤の生物検定結果に影響する種々の検定条件について事例を紹介し、論議を行ったが、影響の度合は検定昆虫や検定方法によっても異なるので、最終的には検定の目的に応じてそれに適した検定条件を選択することになる。その場合、得られた検定結果を過去の事例と比較する場合には両者の検定条件の差異についても十分考慮することが必要になる。ある昆虫で得られた結果が他の昆虫種へ同様に当てはまるとは限らないことや、検定方法によっても結果が異なることがある。種々の *Bt* 剤の生物検定における検定結果の相違は *Bt* 剤の昆虫に対する殺虫機

構の複雑さを改めて認識させられる。生物検定の目的が最終的に *Bt* 剤の害虫防除への利用にある場合は野外試験と相関性の高い試験結果を重視する必要がある。例えば、同じ害虫種に対する生物検定の結果が飼料混入法と葉片浸漬法で異なる場合には、野外条件と相関性の高い後者の葉片浸漬法の結果を、また、評価の方法も殺虫活性より摂食阻害活性を重視する方がより実際的と考えられる。一方、各種の *Bt* 剤の生物活性や殺虫スペクトルの比較では検定結果の高い再現性が要求されるので、その場合は葉片浸漬法より飼料混入法や個体当たりの投与量が推定できる経口投与方法の方が良い場合がある。検定結果を早く得たい場合には、検定温度を高くしたり、評価として致死率よりも摂食阻害率や発育阻害率を採用することも一つの選択肢である。実際の生物検定においては結果の再現性や信頼性以外に検定における簡便性もまた重要な要因である。*Bt* 剤の生物検定において結果に影響する種々の条件はあるが、検定目的に応じてそれに適した検定条件を個々に選定していくことが最も重要であると結論される。

引用文献

- Afify, A. M. and M. M. Matter (1969) Retarded effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the fecundity of *Anagasta kuehniella* (Zell). *Entomophaga* 14: 447–456.
- Afify, A. M. and A. I. Merdan (1969) On tracing the response Egyptian cotton worms in different larval ages to *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Z. Angew. Entomol.* 63: 263–267.
- Aizawa, K. (2001) Shigetane Ishiwata: His discovery of swotton-kin (*Bacillus thuringiensis*) in 1901 and subsequent investigation in Japan. *Proc. Centennial Sym. Commemorating Ishiwata's Discovery of B. thuringiensis*, 1–14.
- 鮎沢啓夫・佐藤文子 (1961) *Bacillus thuringiensis* Berliner の蚕に及ぼす影響。蚕糸研究 39: 38–44. [Aizawa, K. and F. Sato (1961) Effect of bacterial insecticides upon the silkworm, *Bombyx mori*. *Sanshi-Kenkyu (Acta Sericologica)* 39: 38–44.]
- 鮎沢啓夫・川原畑勇・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. Seric. Sci. Jpn.* 31: 253–257.]
- Alford, A. R. and J. A. Holmes (1986) Sublethal effects of carbaryl, aminocarb, fenitrothion, and *Bacillus thuringiensis* on the development and fecundity of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 79: 31–34.
- Ali, A. and S. Y. Young (1996) Activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against different ages and stages of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. *J. Entomol. Sci.* 31: 1–8.
- Altahtawy, M. M. and I. M. Abaleess (1973) Thuricide 90 TS flowable a recent approach to the biological control of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *Z. Angew. Entomol.* 72: 299–267.
- Appel, H. M. and J. C. Schultz (1994) Oak tannins reduce effectiveness of Thuricide (*Bacillus thuringiensis* in the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 1736–1742.
- 浅野昌司 (1999) 各種 *Bt* 剤のコナガに対する摂食阻害活性の比較。茨城病虫研報 38: 42–46. [Asano, S. (1999) Anti-feeding effects of *Bacillus thuringiensis* formulations on the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Ibaraki Byogaichu Res.* 38: 42–46.]
- 浅野昌司 (2000) *Bt* 剤のハスモンヨトウに対する発育阻害活性の評価について。茨城病虫研報 39: 35–41. [Asano, S. (2000) Evaluation of growth-inhibiting effects by *Bacillus thuringiensis* formulation on the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Ibaraki Byogaichu Res.* 39: 35–41.]
- 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 (2003) 飼料混入法による *Bacillus thuringiensis* 製剤のカイコ検定 2. 発育阻害活性に基づく評価。応動昆 47: 129–135. [Asano, S. (2003) Silkworm assay for *Bacillus thuringiensis* formulations using diet incorporation method: (2) Evaluation based on larval growth reduction. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 47: 129–135.]
- 浅野昌司 (2004) *Bacillus thuringiensis* 製剤のチャハマキに対する生物活性の評価について。茨城病虫研報 43: 38–42. [Asano, S. (2004) Bioassay of *Bacillus thuringiensis* formulation against the oriental tea tortrix, *Homona magnanima*. *Ibaraki Byogaichu Res.* 43: 38–42.]
- Asano, S. and H. Hori (1995) Enhancing effects of supernatants from various cultures of *Bacillus thuringiensis* on larvicidal activity of δ -endotoxin against the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Appl. Entomol. Zool.* 30: 369–374.
- Asano, S., L. S. Indrasith and H. Hori (1995) Synergism in larvicidal activity between supernatant and pellet from *Bacillus thuringiensis* culture. *Appl. Entomol. Zool.* 30: 153–158.
- 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 1. 殺虫活性に基づく評価。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 and 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・中村后代枝・松下洋子 (1973a) *Bacillus thuringiensis* 製剤のマイマイガに対する効果について。応動昆 17: 141–146. [Asano, S., K. Nakamura and Y. Matsusita (1973a) Some biological effects of a *Bacillus thuringiensis* product on the gypsy moth larvae. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 17: 141–146.]
- Asano, S., K. Ogiwara, M. Takahashi, L. S. Indrasith, M. Takahashi, N. Suzuki and H. Hori (2000a) Synergism of the spore on insecticidal activity of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) is not observed at late stage in bioassay. *Appl. Entomol. Zool.* 35: 583–590.
- Asano, S., K. Ogiwara, M. Takahashi and L. S. Indrasith (2000b) Culture medium of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* Buibui

- enhances the insecticidal activities of δ -endotoxins from *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* and *aizawai* against lepidopterous pest insects. *Appl. Entomol. Zool.* 35: 575–582.
- 浅野昌司・榊原啓高・北垣忠温・中村后代枝・松下洋子 (1973b) *Bacillus thuringiensis* 製剤 “Thuricide” をもちいたそ菜害虫の防除試験. 応動昆 17: 91–96. [Asano, S., H. Sakakibara, T. Kitagaki, K. Nakamura and Y. Matsusita (1973b) Laboratory and field evaluation of the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* products ‘Thuricide’ on some lepidopterous pests of crucifers. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 17: 91–96.]
- Asano, S., H. Sakakibara and K. Nakamura (1976) Susceptibility of the pine caterpillar, *Dendrolimus spectabilis* Butler (Lepidoptera, Lasiocampidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Kontyu* 44: 217–227.
- Asano, S. and A. Seki (1994) Comparative bioactivity of several formulations of *Bacillus thuringiensis* toxins against diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Yponomeutidae) using a diet incorporation method. *Appl. Entomol. Zool.* 29: 285–288.
- 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 incorporation method with common cutworm, *Spodoptera litura*. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 39: 135–141.]
- Barker, J. F. (1998) Effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* toxin on the mortality and development of the larval stages of the banded sunflower moth (Lepidoptera: Cochylidae). *J. Econ. Entomol.* 91: 1084–1088.
- Beegle, C. C., L. C. Lewis, R. E. Lynch and A. Martinez (1981) Interaction of larval age and antibiotic on the susceptibility of three insect species to *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 143–153.
- Burgerjón, A. (1957) L'utilisation des chenilles de *Pieris brassicae* L. comme insecte test de laboratoire dans un service de contrôle de préparations pathogènes insecticides. *Entomophaga* 2: 129–135.
- Burgerjón, A. (1962) Relation entre l'intoxication provoquée par *Bacillus thuringiensis* Berliner et la consommation chez *Pieris brassicae* L. *Ann. Epiphyties*. 13: 59–72.
- Burges, H. D., E. M. Thomson and R. A. Latchford (1976) Importance of spores and δ -endotoxin preprotein crystals of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 27: 87–94.
- Chalfant, R. B. (1973) Cabbage looper: Effect of temperature on toxicity of insecticides in the laboratory. *J. Econ. Entomol.* 66: 339–341.
- Dulmage, H. T., H. M. Graham and E. Martinez (1978) Interactions between the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, and the δ -endotoxin produced by the HD-1 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*: Relationship between length of exposure to the toxin and survival. *J. Invertebr. Pathol.* 32: 40–50.
- Dulmage, H. T. and E. Martinez (1973) The effects of continuous exposure to low concentrations of the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* on the development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* 22: 14–22.
- Espinell, P. R. (1981) Etude en laboratoire du comportement alimentaire de *Mamestra (Baratha) brassicae* L. en présence de feuillage traité avec *Bacillus thuringiensis* B. *Z. Angew. Entomol.* 91: 383–388.
- Farrar, R. R. Jr. and R. L. Ridgway (1995) Feeding behavior of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae on artificial diet containing *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.* 24: 755–761.
- Fast, P. G. (1977) *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: on the relative roles of spores and crystals in toxicity to spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 109: 1515–1518.
- Fast, P. G. and J. B. Dimond (1984) Susceptibility of larval instars of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), to *Bacillus thuringiensis*. *Can. Entomol.* 116: 131–137.
- Fast, P. G. and J. Régnière (1984) Effect of exposure time to *Bacillus thuringiensis* on mortality and recovery of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 116: 123–130.
- Gharib, A. H. and J. A. Wyman (1991) Food consumption and survival of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae following intoxication by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and thuringiensin. *J. Econ. Entomol.* 84: 436–439.
- Gould, F., A. Anderson, D. Landis and H. van Mellaert (1991) Feeding behavior and growth of *Heliothis virescens* larvae on diets containing *Bacillus thuringiensis* formulations or endotoxins. *Entomol. Exp. Appl.* 58: 199–210.
- Heimpel, A. M. (1967) A critical review of *Bacillus thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annu. Rev. Entomol.* 12: 287–322.
- Heimpel, A. M. and T. A. Angus (1959) The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *J. Insect Pathol.* 1: 152–170.
- Ignoffo, C. M. (1962) The effects of temperature and humidity on mortality of larvae of *Pedinophora gossypiella* (Saunders) injected with *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Insect Pathol.* 4: 63–71.
- Ignoffo, C. M., C. Garcia and T. L. Couch (1977a) Effect of antibiotics on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 30: 277–278.
- Ignoffo, C. M., C. Garcia and V. A. Gasparotto (1968) Sensitivity of larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, to *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 97–103.
- Ignoffo, C. M., D. L. Hostetter, R. E. Pinnell and G. Garcia (1977b) Relative susceptibility of six soybean caterpillars to a standard preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *J. Econ. Entomol.* 70: 60–63.
- Ignoffo, C. M., R. L. McGarr and D. F. Martin (1964) Control of *Alabama argillacea* (Hübner) with *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Insect Pathol.* 6: 411–416.
- 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.]
- James, R. R., J. C. Miller and B. Lighthart (1993) *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* affects a beneficial insect, the cinnabar moth (Lepidoptera: Arctiidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 334–339.
- Kantack, B. H. (1959) Laboratory studies with *Bacillus thuringiensis* Berliner and its possible use for control of *Plodia interpunctella* (Hbn.). *J. Econ. Entomol.* 52: 1226–1227.
- Krischik, V. A., P. Barbosa and C. F. Reichelderfer (1988) Three

- trophic level interactions: Allelochemicals, *Manduca sexta* (L.), and *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner. *Environ. Entomol.* 17: 476–482.
- Kushner, D. J. and G. T. Harvey (1962) Antibacterial substances in leaves: Their possible role in insect resistance to disease. *J. Insect Pathol.* 4: 155–184.
- Li, S. Y., S. M. Fitzpatrick and M. B. Isman (1995) Susceptibility of different instars of the obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *J. Econ. Entomol.* 88: 610–614.
- Liu, Y.-B., B. E. Tabashnik and M. W. Johnson (1995) Larval age affects resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 788–792.
- Ludlum, C. T., G. W. Felton and S. S. Duffey (1991) Plant defenses: Chlorogenic acid and polyphenol oxidase enhance toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to *Heliothis zea*. *J. Chem. Ecol.* 17: 217–237.
- Maedae T. and J. D. Hare (1993) Effects of differential host plant consumption by *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on *Bacillus thuringiensis* efficacy. *Environ. Entomol.* 22: 432–437.
- Maksymiuk, B. (1970) Occurrence and nature of antibacterial substances in plants affecting *Bacillus thuringiensis* and other entomogenous bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 356–371.
- 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. Seric. 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* formulations. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 44: 113–118.]
- McGaughey, W. H. (1976) *Bacillus thuringiensis* for controlling three species of moths in stored grain. *Can. Entomol.* 108: 105–112.
- McGaughey, W. H. (1978) Effects of larval ages on the susceptibility of almond moths and Indianmeal moths to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 71: 923–925.
- 宮本和久・鮎沢啓夫 (1982) *Bacillus thuringiensis* AF 101 株のアメリカシロヒトリに対する毒性における芽胞の役割. 九病虫研究会報 28: 207–209. [Miyamoto, K. and K. Aizawa (1982) Effect of the existence of *Bacillus thuringiensis* AF101 spores (serotype 4a:4b) on toxicity toward the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Kyushu Pl. Proc. Res.* 28: 207–209.]
- 宮園 稔・稲垣秀一郎・田中玲璽・上山良人・武田禮二 (2003) 殺虫タンパク質抵抗性コナガに対する *Bacillus thuringiensis* の孢子混合の殺虫活性増強効果. 応動昆 47: 61–66. [Miyasono, M., S. Inagaki, R. Tanaka, Y. Ueyama and R. Takeda (2003) Enhancement of insecticidal protein activity by spores of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*, developing resistance to insecticidal protein. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 47: 61–66.]
- 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.]
- Moar, W. J., J. T. Trumble and B. A. Federici (1989) Comparative toxicity of spores and crystals from NRD-12 and HD-1 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to neonate beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 1593–1603.
- Moldenke, A. F., R. E. Berry, J. C. Miller, J. G. Wernz and X.-H. Li (1994) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to gypsy moth, *Lymantria dispar*, fed with alder or Douglas-fir. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 143–145.
- 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. 東京蚕指試験要報 9: 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.]
- Morris, O. N. (1972) Inhibitory effects of foliage extracts of some forest trees on commercial *Bacillus thuringiensis*. *Can. Entomol.* 104: 1357–1361.
- Morris, O. N. (1973) Dosage-mortality studies with commercial *Bacillus thuringiensis* sprayed in a modified Potter's tower against some forest insects. *J. Invertebr. Pathol.* 22: 108–114.
- Morris, O. N. (1986) Susceptibility of the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae), to commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Can. Entomol.* 118: 473–478.
- Morris, O. N. (1988) Comparative toxicity of delta-endotoxin and thuringiensin of *Bacillus thuringiensis* and mixtures of the two for the bertha armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 81: 135–141.
- Morris, O. N., M. Trotter, N. B. McLaughlin and V. Converse (1994) Interaction of caffeine and related compounds with *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* in bertha armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 610–617.
- 長岡広行・井園佳文 (1998) イチゴにおける BT 剤のハスモンヨトウに対する殺虫効果. 九病虫研究会報 44: 76–78. [Nagaoka, H. and Y. Izono (1998) Effect of *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera litura* Fabricius larvae (Lepidoptera: Noctuidae) on strawberry. *Kyushu Pl. Prot. Res.* 44: 76–78.]
- Nagasawa, S. and S. Asano (1976) Feeding suppression and its disappearance in larvae of the gypsy moth, *Porthetria dispar* (L.) by *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Bull. Facul. Agri. Shimane Univ.* 10: 56–59.
- Nwanze, K. F., G. J. Partida and W. H. McGaughey (1975) Susceptibility of *Cardra cautella* and *Plodia interpunctella* to *Bacillus thuringiensis* on wheat. *J. Econ. Entomol.* 68: 751–752.
- Nyoui, F. F. R., J. R. Fuxa and A. R. Richter (1996) Spore-toxin inter-

- actions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Entomol. Sci.* 31: 52–62.
- Ohba, M. (2001) *Bacillus thuringiensis* in nature: ubiquity and diversity. *Proc. Centennial Sym. Commemorating Ishiwata's Discovery of B. thuringiensis*, 141–145.
- 及川雅彦・長岡宏行・森田和博・浅野昌司 (1999) BT 剤のハスモンヨトウに対する殺虫効果と寄主植物の関係. 関東東山病虫研報 46: 89–92. [Oikawa, M., H. Nagaoka, K. Morita and S. Asano (1999) Relationship between host plants and toxicity of *Bacillus thuringiensis* formulation against common cutworm, *Spodoptera litura*. *Ann. Rept. Kanto Pl. Prot. Soc.* 46: 89–92.]
- 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.]
- Pedersen, A., J. Dedes, D. Gauthier and K. van Frankenhuyzen (1997) Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Entomol. Exp. Appl.* 83: 253–262.
- Ramachandran, R., R. F. Raffa, M. J. Miller, D. D. Ellis and B. H. McCown (1993) Behavioral responses and sublethal effects of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) and fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) toxin in diet. *Environ. Entomol.* 22: 197–211.
- Retnakaran, A. (1983) Spectrophotometric determination of larval ingestion rates in the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 115: 31–40.
- Robertson, J. L., H. K. Preisler, S. S. Ng, L. A. Hickel, A. Berdeja and W. D. Gelernter (1996) Comparative effect of temperature and time on activity of Dipel 2X and MVP preparations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 1084–1087.
- Rock, G. C. and R. J. Monroe (1983) Interaction of larval age and dietary formaldehyde on the susceptibility of tufted apple budmoth (Lepidoptera: Tortricidae) to *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 42: 71–76.
- Rombach, M. C., R. M. Agura, L. Picard and D. W. Roberts (1989) Arrested feeding of the Asiatic rice borer (Lepidoptera: Pyralidae) by *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 82: 416–419.
- Salama, H. S. and A. F. Sharaby (1988) Effects of exposure to sublethal levels of *Bacillus thuringiensis* (Berl.) on the development of the greasy cutworm *Agrotis ypsilon* (Hufn.). *J. Appl. Entomol.* 106: 396–401.
- Sareen, V., Y. S. Rathore and A. K. Bhattachary (1983) Influence of *Bacillus thuringiensis* on the food utilization of *Spodoptera litura* (Fabricius). *Z. Angew. Entomol.* 95: 253–258.
- Sivamani, E., N. Rajendran, R. Senrayan, T. N. Ananthakrishnan and K. Jayaraman (1991) Influence of some plant phenolics on the activity of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* on *Heliothis armigera*. *Entomol. Exp. Appl.* 63: 243–248.
- Slama, H. S., M. S. Foda, A. El-Sharaby, M. Matter and M. Khalafallah (1981) Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endotoxins of *Bacillus thuringiensis* for different periods. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 220–229.
- Smirnoff, W. A. and P. M. Hutchison (1965) Bacteriostatic and bacteriocidal effects of extracts of foliage from various plant species on *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Invertebr. Pathol.* 7: 273–280.
- Somerville, H. J., Y. Tanada and E. M. Omi (1970) Lethal effect of purified spores and crystalline endotoxin preparations of *Bacillus thuringiensis* on several lepidopterous insects. *J. Invertebr. Pathol.* 16: 241–248.
- Sutter, G. R. and E. S. Raun (1966) The effect of *Bacillus thuringiensis* components on the development of the European corn borer. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 457–460.
- Tang, J. D., A. M. Shelton, J. van Rie, S. de Roeck, W. J. Moar, R. T. Roush and M. Peferoen (1996) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 564–569.
- van Frankenhuyzen, K. (1990) Effect of temperature and exposure time on toxicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner spray deposits to spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 122: 59–75.
- van Frankenhuyzen, K. (1994) Effect of temperature on the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* Berliner in larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clem. (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 126: 1061–1065.
- van Frankenhuyzen, K. and J. L. Gringorten (1991) Frass failure and pupation failure as quantal measurements of *Bacillus thuringiensis* toxicity to Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 58: 465–467.
- van Frankenhuyzen, K., J. L. Gringorten, J. Dedes and D. Gauthier (1997) Susceptibility of different instars of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* estimated with a droplet-feeding method. *J. Econ. Entomol.* 90: 560–565.
- van Frankenhuyzen, K. and C. W. Nystrom (1987) Effect of temperature on mortality and recovery of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) exposed to *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Can. Entomol.* 119: 941–954.
- Yamvrias, C. (1962) Contribution à l'étude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-a-vis de la teigne de la farine *Anagasta (Ephesia) kühniella* Zeller (Lépidoptère). *Entomophaga* 7: 101–159.
- Yendol, W. G., R. A. Hamlen and S. B. Rosario (1975) Feeding behavior of gypsy moth larvae on *Bacillus thuringiensis*-treated foliage. *J. Econ. Entomol.* 68: 25–27.