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

3. 致死活性 (LC_{50}) と発育阻害活性 (EC_{50}) の比較

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: (3) Comparison between Lethal Activity (LC_{50}) and Growth Inhibitory Activity (EC_{50}). Shoji ASANO^{††} Advanced Technology Laboratory, Kubota Corporation; Rhugasaki, Ibaraki 301–0852, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 50: 43–49 (2006)

Abstract: Lethal activity and growth inhibitory activity of four commercial products of *Bacillus thuringiensis* (Dipol, Toarow CT, Bacilex and Thuricide) were investigated with the second instar of the silkworm, *Bombyx mori*, using a diet incorporation method. Six other experimental formulations of *B. thuringiensis* containing different amounts of the same single delta-endotoxin as the active ingredient were also investigated in a similar way. Lethal activity (LC_{50}) was evaluated based on mortality on day 7 and growth inhibitory activity (EC_{50}) based on weight gain for 2 d. The ratios of LC_{50}/EC_{50} ranged from 1.6–2.6 among the four products and 10.1–11.6 among the six experimental formulations. It was revealed that the ratio of LC_{50}/EC_{50} differed among products containing different toxins but not among formulations containing the same toxin. A linear correlation was observed between EC_{50} and protein content (%) of the formulations with the same toxin as observed between LC_{50} and protein content, indicating the possible utilization of EC_{50} instead of LC_{50} in silkworm assay for the quality control of *B. thuringiensis* formulations. Results also showed that an evaluation based on EC_{50} is 2–10 times more sensitive and time-saving than that based on LC_{50} .

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *Bombyx mori*; silkworm; LC_{50} ; EC_{50}

緒 言

昆虫病原細菌の 1 種 *Bacillus thuringiensis* の産生する殺虫性蛋白毒素 (δ -エンドトキシン, 以下トキシンと略) を有効成分とする微生物殺虫剤は, わが国では BT 剤と総称されている (鮎沢, 1978). 世界で BT 剤が商品化された当初, 製品の品質管理が製剤 g 当たりの芽胞 (胞子) 数をもとになされていた経緯はあるが, BT 剤の殺虫活性成分はトキシンであることが解明された後は, 昆虫を用いる生物検定が必要であると提言された (Burgess, 1964). 近年, トキシンには種類が多く, それぞれに殺虫活性や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た (Höfte and Whiteley, 1989). それ故, BT 剤は製造に用いた菌株の種類や培養条件により, 産生されるトキシンの種類や構成が異なり, その結果, 製剤の殺虫活性に違いが生じることになる. したがって, BT 剤の品質管理には最終的に昆虫を用いる生物検定が必要にな

る. 1966 年オランダで開かれた国際シンポジウムで BT 剤の品質管理を目的とした力価検定と標準品について議論された (Burgess et al., 1967). それ以後, BT 剤の品質管理に昆虫を用いる力価検定が各国で採用されるようになったが, 検定昆虫の種類, 検体の処理方法や標準品は国によって異なった (浅野・宮本, 2004). わが国における BT 剤の力価検定は, 検定昆虫にカイコを, 検体処理は飼料に混合する方法, 標準品は企業ごとに用意する自己標準品を用いることが 1973 年に提案された (Aizawa, 1976; 鮎沢, 1978). 以来, わが国では BT 剤の品質管理にこの方法が長年採用されてきた. しかし, このカイコ幼虫を用いる標準的な力価検定法にはなお改善すべき課題も指摘されている (浅野・宮本, 2004). その中には検定に用いる飼料調製の簡略化や検定期間の短縮がある. 飼料調製について浅野ら (1997) は, 粉末飼料に所定濃度の検定液を加えた後に予め保温しておいた寒天液の所定量を混合して飼料調製する方法を示した. この方法を用いると検定作業の省力ができ, かつ,

[†] 現在 牛久市中央 1–17–21

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

2005 年 9 月 15 日受領 (Received 15 September 2005)

2005 年 11 月 3 日登載決定 (Accepted 3 November 2005)

DOI: 10.1303/jjaez.2006.43

飼料中の検体の均一性も向上するとした。検定期間の短縮について浅野（2003）は、評価活性を従来の投与5日後の致死活性（ LC_{50} ）に代えて投与2日後の体重増加量をもとにした発育阻害活性（ EC_{50} ）を用いることにより、検定期間を5日から2日に短縮できることを示した。 EC_{50} による評価が一般のBT剤の活性評価にどの程度適用できるかを検討するために、今回、有効成分の異なる市販のBT剤4種類と単一の同じトキシシンを有効成分として、その含有量が異なる試験用BT剤6種類を用いてカイコ2齢幼虫に対する7日後の LC_{50} と2日後の EC_{50} の比較を行った。その結果を報告する。

材料および方法

1. 供試昆虫

カイコ *Bombyx mori*（品種：春嶺×鐘月）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。生物検定には2齢脱皮後24h以内の幼虫を用いた。

2. 供試薬剤

市販BT剤の4種類（ダイポール水和剤、トアロー水和剤CT、バシレックス水和剤およびチューリサイド水和剤）と試験用BT剤6種類（米国Mycogen社製）を用いた。試験用BT剤は *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 由来の δ -エンドトキシシン（Cry1Ac）の遺伝子を *Pseudomonas fluorescens* に導入した株を用いて製造された同一ロットの培養原体（トキシシン蛋白量は12.3%）を用いて調製された、トキシシン含有量の異なる5種類の製剤A、B、C、DおよびE（トキシシン蛋白含量がそれぞれ8、9、10、11および12%になるように調製）を供試した。その他、同様な方法で製造され、自己標準品として用いられた製剤S（力価はカイコ単位で1,000 BMU/mg、トキシシン蛋白含量は不明）を比較に用いた。

3. 検定方法

生物検定に用いた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%寒天液を準備し、55°Cの温浴槽に保温し、つぎに、100ml容量のガラスビーカーに粉末飼料5gを入れ、これに蒸留水で所定濃度に希釈した検体液2mlを入れた後、55°Cの温浴槽内でビーカーを外部から暖めながら、上記の2%寒天液13mlを加えてよく混合した。無処理区は上記の検体液の代わりに蒸留水を用いて同様に調製した。飼料は調製後ただちに5°Cにおき、飼料の固化を早めた。

生物検定は径6cmのプラスチックシャーレに検定飼料の適当量（5～10g）を入れ、2齢カイコ幼虫を容器当たり10頭ずつ接種した。試験容器は25°C、60% RHにおいて、

致死活性は投与7日後の生死数をもとに、発育阻害活性は投与2日後の生存虫の体重増加量を無処理区のそれと比較することにより評価した。虫体重の測定はシャーレごとにとまとめて行った。各試験は1濃度に3～6シャーレ（幼虫数で30～60頭）を用いた。

致死活性（ LC_{50} ）、発育阻害活性（ EC_{50} ）およびそれらの95%信頼限界（95% CL）の算定はエス・ピー・エス・エス社（東京）の統計ソフト（11.0J）を用いてプロビット法（Finney, 1952）により行った。力価の計算は下式から求めた。

$$\text{力価} = \frac{\text{標準品の } LC_{50} \text{ (または } EC_{50})}{\text{検定品の } LC_{50} \text{ (または } EC_{50})} \times \text{標準品の力価 (1,000 BMU/mg)}$$

上式でBMUはカイコ単位を示す。

結 果

1. 市販BT剤の LC_{50} と EC_{50} の比較

4種類の市販BT剤（ダイポール、トアローCT、バシレックスおよびチューリサイド）のカイコ幼虫に対す致死活性（ LC_{50} ）を比較する目的で、製剤濃度でそれぞれ1.25、2.5、5、10、20および40 ppm添加した飼料を調製し、同2齢幼虫に7日間与えたときの致死率を調査した（Table 1）。表の数値は日を変えて行った5反復試験の平均値と標準誤差（SE）を示した。濃度と平均致死率の関係をプロビット法に従って解析した結果、直線回帰が認められたのは検定した4検体のうちチューリサイドの1剤にすぎなかった。4検体の濃度－致死率回帰直線の傾きは4.300～7.598の範囲にあり、今回実施した濃度希釈比（1/2）では濃度幅が広すぎたため0～100%間に致死率の点数が十分とれていないことがその要因と考えられた。Table 1の結果から算定した4検体の LC_{50} は8.7～18.5 ppmの範囲にあり、製剤間の LC_{50} には最大で約2倍の差があった。

つぎに、同じ4種類のBT剤の同2齢幼虫に対する発育阻害活性（ EC_{50} ）を比較する目的で、製剤濃度でそれぞれ1.25、2.5、5、10、20および40 ppm添加した飼料を調製し、2齢幼虫に2日間与えたときの発育阻害率を調査した（Table 2）。表の数値は日を変えて行った3反復試験の平均値とSEを示した。濃度と平均阻害率の関係を同様にプロビット法に従って解析した結果、いずれの検体にも直線回帰が認められた。また、4検体の濃度－致死率回帰直線の傾きは2.145～2.816の範囲にあり、互いに平行性が認められ、共通勾配としては2.392（ $\chi^2=3.701$, $df=3$, $p=0.381$ ）が算定された。

Table 1に示した LC_{50} とTable 2に示した EC_{50} の比を求めるとダイポール、トアローCT、バシレックスおよびチューリサイドはそれぞれ1.6、2.2、1.8および2.6で、製剤

Table 1. Lethal activity of four products of *B. thuringiensis* containing different delta-endotoxins against the second instar of the silkworm, *B. mori*

Conc. (ppm) ^a	% Mortality (%) ^b							
	Dipol WP		Toarow CT WP		Bacilex WP		Thuricide WP	
	<i>n</i> ^c	Mean±SE	<i>n</i> ^c	Mean±SE	<i>n</i> ^c	Mean±SE	<i>n</i> ^c	Mean±SE
40	—	—	—	—	120	98.0±2.0	—	—
20	170	96.0±2.1	170	96.0±2.2	220	51.0±10.0	110	100±0.0
10	220	45.2±5.7	250	21.6±4.7	190	12.6±3.7	220	66.6±8.9
5	170	14.2±2.0	170	1.2±0.7	170	0.4±0.4	200	3.6±3.6
2.5	170	1.2±0.7	170	0.0±0.0	170	0.0±0.0	170	0.0±0.0
1.25	140	0.8±0.8	140	0.0±0.0	—	—	140	0.0±0.0
LC ₅₀ (95% CL)	9.6 (6.1–16.4)		12.8		18.5 (14.2–25.8)		8.7 (8.3–9.1)	
Coefficient	4.300		7.598		4.739		7.558	
df	2		1		2		1	
χ ² (<i>p</i>)	12.433 (0.002)		14.587 (0.000)		6.647 (0.036)		0.431 (0.512)	

^a The concentrations were based on formulation weight (μg)/g diet.^b Average mortality of five replicated tests on day 7.^c Total number of test larvae.Table 2. Growth inhibitory activity of four products of *B. thuringiensis* containing different delta-endotoxins against the second instar of the silkworm, *B. mori*

Conc. (ppm) ^a	% Growth inhibition (%) ^b							
	Dipol WP		Toarow CT WP		Bacilex WP		Thuricide WP	
	<i>n</i> ^c	Mean±SE	<i>n</i> ^c	Mean±SE	<i>n</i> ^c	Mean±SE	<i>n</i> ^c	Mean±SE
40	—	—	—	—	30	98.0±0.0	—	—
20	80	87.5±0.5	80	89.5±0.5	110	74.7±0.9	80	94.5±1.5
10	110	70.3±0.3	110	75.7±1.9	110	50.0±2.1	110	88.0±0.6
5	110	40.3±1.5	110	44.7±1.8	110	25.3±0.3	110	71.7±1.5
2.5	110	19.3±2.9	110	15.7±1.2	110	4.0±2.0	110	38.7±2.2
1.25	110	9.0±4.5	110	0.7±0.3	—	—	110	12.3±0.9
EC ₅₀ (95% CL)	6.0 (5.2–6.9)		5.9 (5.3–6.6)		10.4 (9.2–11.8)		3.3 (2.9–3.8)	
Coefficient	2.145		2.816		2.451		2.443	
df	3		3		3		3	
χ ² (<i>p</i>)	1.300 (0.729)		4.181 (0.243)		2.306 (0.511)		3.909 (0.271)	

^a The concentrations were based on formulation weight (μg)/g diet.^b Average growth inhibition by comparison of weight gain for 2 d between treatment and control.^c Total number of test larvae.

間で多少異なるが、いずれも近似した値が得られたので、市販 BT 剤 4 種類の LC₅₀ と EC₅₀ の比は製剤間の殺虫活性の差には関係なく近似した値が得られることが窺えた。

2. 試験用 BT 製剤の LC₅₀ と EC₅₀ の比較

製剤に含まれるトキシンの単一で同じではあるが、含有量が 8, 9, 10, 11, 12% の 5 種類の BT 製剤 (A, B, C, D および E) と標準品 (S) のカイコ幼虫に対する LC₅₀ を比較す

る目的で、製剤濃度でそれぞれ 125, 250, 500 および 1,000 ppm 添加した飼料を調製し、同 2 齢幼虫に 7 日間与えたときの致死率を調査した (Table 3)。表の数値は日を変えて行った 4 反復試験の平均値と SE を示した。濃度と平均致死率の関係を同様にプロビット法に従って解析した結果、いずれの検体にも直線回帰が認められた。また、6 検体の傾きは 1.886~2.330 の範囲で、互いに平行性が認められ、

Table 3. Lethal activity of six formulations of *B. thuringiensis* containing the same delta-endotoxins against the second instar of the silkworm, *B. mori*

Conc. (ppm) ^a	% Mortality ^b											
	Formulation A ^c		Formulation B ^c		Formulation C ^c		Formulation D ^c		Formulation E ^c		Formulation S ^c	
	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE
1,000	260	71.0±5.6	260	76.8±6.3	260	77.2±5.5	260	80.8±5.0	260	77.0±6.9	260	56.8±8.1
500	260	53.2±4.3	260	53.0±8.1	260	59.4±3.8	260	62.6±3.3	260	60.6±5.3	260	30.6±4.0
250	260	22.6±6.1	260	28.4±5.6	260	34.0±7.6	260	28.2±6.2	260	42.0±5.4	260	11.8±4.2
125	260	10.2±3.0	260	10.4±2.4	260	17.0±4.5	260	15.2±4.1	260	15.2±4.1	260	2.4±0.8
LC ₅₀ (95% CL)	514 (468–570)		461 (421–506)		397 (360–440)		391 (269–591)		372 (252–559)		830 (746–944)	
Coefficient	2.100		2.199		1.922		2.164		1.886		2.330	
df	2		2		2		2		2		2	
χ^2 (<i>p</i>)	3.287 (0.193)		0.052 (0.974)		0.489 (0.783)		6.248 (0.044)		5.102 (0.078)		0.380 (0.827)	

^a The concentrations were based on formulation weight (μ g)/g diet.^b Average mortality on day 7.^c Formulations A, B, C, D and E contain Cry1Ac toxin at 8, 9, 10, 11 and 12%, respectively. Formulation S is a standard with 1,000 BMU/mg.Table 4. Growth inhibitory activity of six formulations of *B. thuringiensis* containing the same delta-endotoxins against the second instar of the silkworm, *B. mori*

Conc. (ppm) ^a	% Growth inhibition ^b											
	Formulation A ^c		Formulation B ^c		Formulation C ^c		Formulation D ^c		Formulation E ^c		Formulation S ^c	
	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE	<i>n</i>	Mean±SE
125	170	77.8±3.8	170	84.3±5.2	170	78.3±4.3	170	77.7±5.5	110	86.5±1.5	170	61.7±3.3
62.5	170	55.0±5.6	170	61.3±6.3	170	63.3±5.4	170	64.0±4.2	110	68.0±4.0	170	47.7±5.8
31.3	170	36.7±6.8	170	42.0±6.0	170	44.0±8.0	170	43.7±6.8	170	43.7±4.8	170	26.3±6.2
15.6	170	20.3±7.1	170	23.0±7.6	170	25.3±6.9	170	31.7±9.4	170	29.0±6.1	170	13.7±6.6
EC ₅₀ (95% CL)	48.7 (42.5–56.1)		39.9 (34.7–45.8)		39.5 (34.4–45.4)		36.3 (30.4–42.7)		34.2 (29.4–39.8)		74.1 (64.3–85.8)	
Coefficient	1.733		1.882		1.606		1.406		1.826		1.579	
df	2		2		2		2		2		2	
χ^2 (<i>p</i>)	0.675 (0.714)		1.103 (0.576)		0.165 (0.921)		0.827 (0.661)		1.525 (0.466)		0.851 (0.653)	

^a The concentrations were based on formulation weight (μ g)/g diet.^b Average growth inhibition by comparison of weight gain for 2 d between treatment and control.^c Formulations A, B, C, D and E contain Cry1Ac toxin at 8, 9, 10, 11 and 12%, respectively. Formulation S is a standard with 1,000 BMU/mg.

共通勾配としては 2.085 ($\chi^2=7.212$, $df=5$, $p=0.205$) が算定された。

つぎに、同じ 6 種類の試験用 BT 製剤のカイコ幼虫に対する EC₅₀ を比較する目的で、製剤濃度で 15.6, 31.3, 62.5 および 125 ppm 添加した飼料を調製し、同 2 齢幼虫に 2 日間与えたときの発育阻害率を調査した (Table 4)。表の値は日を変えて行った 3 反復試験の平均値と SE を示した。同様に濃度と平均発育阻害率の関係をプロビット法に従って解析した結果、いずれの検体にも直線回帰が認められた。

6 検体の傾きは 1.406~1.882 の範囲で、互いに平行性が認められ、共通勾配としては 1.669 ($\chi^2=5.773$, $df=5$, $p=0.329$) が算定された。

Table 3 に示した LC₅₀ と Table 4 に示した EC₅₀ の比を求めると試験用 BT 製剤 A, B, C, D, E および S は、それぞれ 10.6, 11.6, 10.1, 10.8, 10.9 および 11.2 で、製剤間に多少差はあるものの近似した値が得られたので、試験用 BT 剤 6 種類の LC₅₀ と EC₅₀ の比は製剤の殺虫活性やトキシン濃度に関係なく、ほぼ同じ値を示すことが窺えた。

考察

本報で算定した市販 BT 剤 4 種類の LC₅₀ 値はやや信頼性に欠けたが、LC₅₀/EC₅₀ の比は 1.6~2.6 と推定された。一方、試験用 BT 剤 6 種類の比は 10.1~11.6 であり、前者との間には最大で 7 倍の差があった。浅野 (2003) は本報で用いた試験用 BT 剤と同じ性質の BT 剤を用いてカイコ 2 齢および 3 齢幼虫に対する LC₅₀ と EC₅₀ を報告した。その結果から LC₅₀/EC₅₀ 比を求めると 7.9 および 9.5 になった。このように LC₅₀/EC₅₀ の比は用いた BT 剤の種類他に検定昆虫の齢期によっても異なった。また、本報での濃度 - 致死率回帰直線と濃度 - 発育阻害率回帰直線の傾きは後者の方が前者より小さい傾向にあるが、その度合は製剤によっても異なった。これは各 BT 剤に含まれるトキシンの種類や生芽胞 (孢子) の有無によっても相違があると思われる。

本報の結果から BT 剤のカイコに対する LC₅₀/EC₅₀ の比は一定ではなく、BT 剤の種類によって異なるが、製剤中に含まれるトキシンが単一で同じ場合は含有量が違っても LC₅₀/EC₅₀ の比はほぼ同じ値になることが示された。

わが国では前述したように BT 剤の品質管理を目的としたカイコを用いる力価検定において、標準品は検定品と平行して試験すること、検定品と標準品の LC₅₀ の比較から検定品の力価を算定すること、用いた標準品の力価を 1,000 BMU/mg として検定品の力価を算出することなどが定められている (Aizawa 1976; 鮎沢, 1978)。いま、Table 3 の LC₅₀ の値をもとに標準製剤 S (1,000 BMU/mg) に対する製剤 A, B, C, D および E の力価を算定すると、それぞれ 1,615, 1,800, 2,091, 2,123 および 2,231 BMU/mg が得られた。これらの力価と製剤中に含まれるトキシンの蛋白量 (%) の関係を求めると (Fig. 1), 力価 (y) とトキシン蛋白量 (x) の関係は $y=1.69.0x+413.8$ で示された。両者の間には高い相関が認められ、相関係数は $R=0.950$ であった。同様に Table 4 の EC₅₀ の値をもとに標準製剤 S に対する製剤 A, B, C, D および E の力価を算定すると、それぞれ 1,522, 1,857, 1,876, 2,025 および 2,167 BMU/mg となった。これらの力価と製剤中に含まれるトキシンの蛋白含量 (%) の関係を同様に求めると (Fig. 2), 力価 (y) とトキシン含量 (x) の関係は $y=147.4x+418.6$ で示された。両者の間には高い相関が認められ、相関係数は $R=0.954$ であった。

Fig. 1 および Fig. 2 は製剤中のトキシン蛋白含量 (%) と BT 製剤の力価の関係を示す 1 種の標準曲線であり、LC₅₀ あるいは EC₅₀ のどちらをもとに算定しても製剤の力価やトキシン蛋白含量が算定できることを示している。しかしながら、同じ製剤でも LC₅₀ から算定した力価と EC₅₀ をもとに算定した力価は、近似していても必ずしも一致しなかった。それは力価 (y) とトキシン蛋白量 (%) の関係式の

Fig. 1. Relationships between potency relative to the standard and contents of toxin protein among five formulations (A-E) of *B. thuringiensis* based on the lethal activity (LC₅₀) against the second instar of the silkworm, *B. mori*.

Fig. 2. Relationships between potency relative to the standard and contents of toxin among five formulations (A-E) of *B. thuringiensis* based on growth inhibitory activity (EC₅₀) against the second instar of the silkworm, *B. mori*.

傾き (b) が互いに異なり、LC₅₀ をもとにした場合の $b=169.0$ に対して EC₅₀ をもとにした場合は $b=147.4$ とわずかながら差のあることによる。本報で標準製剤として用いた製剤 S の蛋白含量を LC₅₀ (Fig. 1) および EC₅₀ (Fig. 2) から推定すると、それぞれ 3.5 および 3.9% となった。このように LC₅₀ あるいは EC₅₀ をもとに算定した力価やトキシン蛋白含量は必ずしも一致しない場合もあると思われる。この理由は発育阻害活性 (EC₅₀) が生存個体の体重増加量をもとにしているのに対して、連続した数値をとるのに対して、致死活性 (LC₅₀) は生か死の二者択一の調査記録であり、不連続な数値をもとにしていることの違いもある。例えば、投与区では正常な個体に比べると明らかにトキシンによる中毒反応が見られて、苦悶や瀕死の状態が観察されても刺激に反応があれば生存個体として記録される場合が多く、計算上は正常な生存個体と同じ扱いがなされる。これに比べ、発育阻害活性 (EC₅₀) は正常個体に比べて発育が阻害され、体重増加量に変化がでれば活性が評価されるし、濃度に対して連続した反応量を記録できる点などがあ

Fig. 3. Relationships between LC_{50} and EC_{50} against the second instar of the silkworm, *B. mori*, among six formulations (A-E and S) of *B. thuringiensis* containing the same toxin.

る。

Table 3 および Table 4 に示した同じトキシンを含有する 6 種類の製剤 (A~E および S) の LC_{50} と EC_{50} の関係を示したのが Fig. 3 である。 LC_{50} (y) と EC_{50} (x) の関係は $y = 0.0855x + 3.1901$ で示された。両者の間には高い相関が認められ、相関係数は $R = 0.993$ であった。この結果から投与 7 日後の致死活性 (LC_{50}) と投与 2 日後の発育阻害活性 (EC_{50}) は調査時期や調査項目に違いはあるものの、両者の間に高い相関が認められたことから、両者はお互いに関連性があること、おそらくトキシンの同じ作用機構によるものと推察された。

一般に、BT 剤の品質管理を目的とした昆虫を用いる BT 剤の力価検定においては種々の検定成立条件がつけられている。Dulmage et al. (1971) は飼料混入法によるイラクサギンウバ *Trichoplusia ni* の 4 日齢幼虫を用いる BT 剤の力価検定において、検定品と標準品の濃度-致死率回帰直線が平行であること、検定品の相対力価の変動係数 (CV) が 30% 以内にあることとした。その後、さらに、 LC_{50} の 95% 信頼限界比 (最大値/最小値) が 2 以内にある条件が追加された (Beegle et al., 1991)。

それ故、検定品と標準品の性質 (菌株、製造方法、製剤方法など) はできるだけ同じくすることが望ましく、日本における製品ごとに企業が別々の自己標準品を設定する考え方は、その目的に合致すると思われる。検定品と標準品の性質が同じ場合には力価検定を LC_{50} に代えて EC_{50} で評価しても問題は少ないと考えられる。また、 LC_{50} に代えて EC_{50} で評価する利点としては検定時間の短縮、検定の感度や信頼性の高まることなどが上げられる。Table 1 の LC_{50} と Table 2 の EC_{50} の比較では検定感度が約 2 倍、Table 3 の LC_{50} と Table 4 の EC_{50} の比較では検定感度が約 10 倍上がることが示された。さらに、それら値の 95% 信頼限界比 (最大値/最小値) でも LC_{50} では 2 を越える場合があるのに対して、 EC_{50} ではすべて 2 以下になっていることから、

後者の方が評価結果においてより信頼性が高いと考えられた。

以上、カイコを用いる BT 剤の力価検定の活性評価において致死活性 (LC_{50}) に代えて発育阻害活性 (EC_{50}) を用いる利点について述べたが、後者の欠点としては前者の致死調査に比べて、体重増加量の測定に時間と労力をより多く要する点がある。とくに検定濃度数や濃度当たりの供試数が多い場合や、一度に検定する検体数が多い場合にはこの点が問題になる。それ故、今後は発育阻害活性 (EC_{50}) を算定する場合の適正な検定濃度数や濃度当たりの供試数についても検討する必要がある。

摘 要

有効成分 (δ -エンドトキシン) の異なる市販 BT 剤 4 種類と有効成分が単一の同じトキシンを有し、含有量の異なる試験用 BT 剤 6 種類のカイコ 2 齢幼虫に対する致死活性 (LC_{50}) と発育阻害活性 (EC_{50}) を飼料混入方法で比較した。その結果、4 種類の市販 BT 剤の LC_{50}/EC_{50} 比は 1.6~2.6 の範囲にあったが、試験用 BT 剤のそれは 10.1~11.6 の範囲にあった。このように LC_{50}/EC_{50} 比は BT 剤の種類によって異なったが、同じ有効成分であれば、含量が異なってもほぼ同じ値をとることが示された。また、 LC_{50} あるいは EC_{50} をもとに算定した標準製剤に対する相対力価は、いずれも製剤中の有効成分含量 (トキシン蛋白量) との間に同様な 1 次直線回帰を示した。この結果、 EC_{50} は LC_{50} と同様に BT 剤の品質管理に利用できること、さらに、 EC_{50} は LC_{50} に比べ検定感度が 2~10 倍高いこと、検定期間を 7 日から 2 日に短縮できることの利点が示された。

引 用 文 献

- Aizawa, K. (1976) Recent development in the production and utilization of microbial insecticides in Japan. *Proc. 1st Int. Coloq. Inver-*

tebr. Pathol. pp. 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.]
- 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・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. 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.]
- 浅野昌司・宮本和久 (2004) *Bacillus thuringiensis* 製剤の品質管理のためのカイコを用いた生物検定—現行法とその修正. 応動昆 48: 13–21. [Asano, S. and K. Miyamoto (2004) Bioassay method with silkworm, *Bombyx mori* for quality control of *Bacillus thuringiensis* formulations—Current method and its modification. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 48: 13–21.]
- Beegle, C. C., R. I. Rose and Y. Ziniu (1991) Mass production of *Bacillus thuringiensis* and *B. sphaericus* for microbial control of insect pest. In *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors* (K. Maramorosch ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 195–216.
- Burges, H. D. (1964) International symposium on the identification and assay of viruses and *Bacillus thuringiensis* Berliner used for insect control. *J. Insect Pathol.* 6: 544–547.
- Burges, H. D. and Contributors (1967) The standardization of *Bacillus thuringiensis*: tests on three candidate reference materials. In *Insect Pathology and Microbial Control* (P. A. van der Laan ed.). North-Holland Publ. Co., Amsterdam, pp. 314–338.
- Dulmage, H. T., O. P. Boening, C. S. Rehnberg and G. D. Hansen (1971) A proposed standardized bioassay for fomulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 240–245.
- Finney, D. J. (1952) *Probit Analysis*. Cambridge Univ. Press, London, 318 pp.
- Höfte, H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Mirobiol. Rev.* 53: 242–255.