コナガ幼虫による *Bacillus thuringiensis* 製剤の力価検定

土 山 彬

住友化学工業株式会社農業事業部研究部

Bioassay of *Bacillus thuringiensis* Formulation Using Larvae of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L. Akira TSUCHIYAMA (Research Department, Pesticides Division, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Takarazuka, Hyogo 665). *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **22**: 234~237 (1978)

A bioassay of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* formulation to larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. using an artificial diet was performed. When the reference formulation was bioassayed, the variance of LC_{50} was nearly the same as that with the silkworm (*Bombyx mori* L.). The potency of the sample was calculated by the formula below to estimate BMU (*Bombyx mori* unit) and PXU (*Plutella xylostella* unit).

$$\text{Potency of sample} = \frac{LC_{50} \text{ reference formulation}}{LC_{50} \text{ sample}} \times 1,000 \text{ BMU/mg (or PXU/mg)}$$

A sufficiently high correlation coefficient between BMU and PXU ($r=0.997$) was obtained. BMU calculated from PXU was very close to the experimental results.

緒 言

Bacillus thuringiensis 製剤 (以下 BT 剤と略す) の効力に関する品質管理は、感受性昆虫による生物検定法によって行なわれる。わが国では、日本植物防疫協会 BT 剤研究会委員会が定めた生物検定法 (以下日植防法と略す) にもとづき、カイコ (*Bombyx mori* L.) に対する殺虫効力をもとに製剤の力価検定を行なうことになっている (AIZAWA *et al.*, 1975; TAKAKI, 1975; AIZAWA, 1976)。カイコは遺伝的にも生理的にも均一な材料が得られやすく、人工飼料による大量飼育が容易であるので検定用昆虫としての条件を満たしている。しかし、日植防法は BT 剤の表示力価の正当性の検定すなわち品質管理にとどまり、防除対象害虫に対する力価を判定するものではない。

BT 剤の力価検定には BURGERJON (1962) や DULMAGE *et al.* (1972) の検定法にみられるように、防除対象害虫を用いる必要があり、わが国でも害虫を用いる力価検定法の確立が望まれている。さらに、対象害虫に対する力価とカイコに対する力価の相関性に関する報告は少なく、検定によって得られた力価と野外での効力に関連づけて考える場合、この種の知見を蓄積する必要がある。

著者は人工飼料を用いて、重要な蔬菜害虫であるコナ

ガ (*Plutella xylostella* L.) 幼虫における BT 剤の力価検定法を確立し、さらにカイコを供試した場合の検定結果と比較したので報告する。

本文に入るに先だち、本稿をご校閲いただいた九州大学農学部 鮎沢啓夫教授に厚くお礼申し上げる。また、本稿の投稿を許可された住友化学工業株式会社に感謝する。

材料および方法

供試 BT 剤

標準品は住友化学 Dipol® (3.2% WP, 18,000IU/mg, 芽胞数; 3.0×10^{10} /g, 使用菌株; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) であり、3~5°C の冷暗所に保存した。検定 BT 剤として、製造ロットならびに保存状態 (期間ならびに温度) を異にする 5 種の Dipol® をあわせ供試した。

供試昆虫

住友化学工業 (株) 研究所恒温飼育室 (27±1°C, 18時間照明) で、白菜を給餌して累代飼育中のコナガ 4 令中期幼虫 (平均体重: 約 2.13mg) を用いた。

BT 剤浮遊液調製法

Dipol® 200mg を脱イオン水 100 ml に浮遊させ、ホモジナイザーによってホモジナイズ (10,000 rpm, 1 分間) した後、脱イオン水で 2 倍階段希釈を行ない、所定

第1表 コナガ人工飼料の組成

寒 天	15.0(g)	リン酸一カリウム	1.0(g)
馬鈴薯デンプン	10.0	クエン酸	0.5
蔗 糖	10.0	コレステロール	0.5
大豆ミール	40.0	L-アスコルビン酸	4.0
エビオス®粉末	15.0	ソルビン酸	0.21
セルロース	22.5	サリチル酸	0.21
大豆油	3.0	アクリル酸	0.24
キャベツ葉 ホモジネート	130.0	デヒドロ酢酸	0.01
Wesson's salt mixture	3.5	プロピオン酸ソーダ	0.09
Distilled water	200.0(ml)		

上記成分混合後高圧滅菌 (121℃, 20 分)

濃度の菌液を調製した。検定に供する濃度段階は 5～6 段階とした。

人工飼料

安居院ら (1975) による人工飼料組成を基本とする飼料を用いた (添加防腐剤の種類と量について改変した。第1表参照)。

検定法

日植防法に準じた。すなわち、人工飼料 4 g をポリカップ (容積: 約 120 ml) に秤量し、菌液 0.4 ml を滴下した。飼料と菌液を均一に混合した後、カップの内側にのばした。1 カップ当たりコナガ幼虫を 10 頭放ち、25℃ で 48 時間BT剤を含む飼料を摂食させた後、死虫数を調べ、アボットの補正式で補正殺虫率を求めた。LC₅₀ 値は直線性の検定で適合性が確認されたプロビット回帰式より算出した。なお、検定は 3 連制で行なった。

力 価

力価はカイコによる BMU (*Bombyx mori* unit) 測定法の場合と同様、次式により算出した。

検定品の力価
$$= \frac{\text{標準品の LC}_{50}}{\text{検定品の LC}_{50}} \times 1,000 \text{PXU/mg}$$

Dipol® 標準品のコナガ幼虫に対する力価を 1,000 PXU (*Plutella xylostella* unit) /mg とする。
供試した Dipol® 検定品の力価は 3 回の検定の平均値

第1図 Dipol®標準品のコナガ幼虫およびカイコに対する殺虫活性.

Dipol®: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 製剤 (住友化学).
●: コナガ 4 令中期.
○: カイコ 3 令 2 日 (品種: 春嶺×鐘月).

をもって表わした。

なお、カイコを用いる検定は日植防法に従い、検定品の BMU は PXU と同様、3 回の平均値で表わした。

結 果

コナガ幼虫—人工飼料系検定法の評価

Dipol® 標準品のコナガ幼虫およびカイコに対する殺虫活性の性状 (LC₅₀ 値, 回帰係数) ならびに対照区における生存率を第2表に示す。また、薬量—死亡率回帰直線を第1図に示す。コナガ幼虫を用いた場合の回帰直線式は $Y = 2.28X - 4.62$ ($\chi^2 = 2.53 < \chi^2(4, 0.05) = 9.49$) により、カイコを用いた場合は $Y = 4.48X - 7.59$ ($\chi^2 = 0.13 < \chi^2(2, 0.05) = 5.99$) により表わされた。第1図および第2表の結果から、コナガ幼虫とカイコのいずれ

第2表 コナガ幼虫およびカイコによる Dipol® 標準品の生物検定

供試昆虫	試験回数	回帰係数 Mean±S.E.	LC ₅₀ (μg/ml)		ふれの大きさ ^{a)}	対照区生存率(%) Mean±S.E.
			Mean±95%	Conf.L.(最高, 最低)		
コ ナ ガ	20	2.28±0.54	17.3±3.12	(9.5, 41.2)	4.35	91.2±5.10
	18 ^{b)}	2.30±0.58	16.4±1.68	(11.8, 22.9)	1.44	91.5±4.88
カ イ コ	20	4.79±1.05	109.8±9.64	(52.0, 142.8)	2.76	99.8±0.74
	18 ^{b)}	4.91±0.99	111.0±7.22	(88.4, 140.8)	1.59	99.8±0.78

Dipol®: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 製剤 (住友化学)

a) 最低 LC₅₀ 値/最高 LC₅₀ 値, b) 20 例中より最高, 最低 LC₅₀ 値を示した試験各 1 例を除いて計算。

第3表 BMU および PXU の実測値ならびに推定値

Dipol Lot No.	BMU ^{a)}		PXU ^{b)}	
	実測値 ^{c)}	推定値	実測値 ^{c)}	推定値
1	106.5	140.0	120.5	79.0
2	203.3	169.0	158.7	207.8
3	810.1	827.3	1038.9	1014.8
4	1103.3	1060.1	1350.1	1404.7
5	1209.2	1235.7	1584.8	1545.6

a) *Bombyx mori* unit, b) *Plutella xylostella* unit,
c) 3回平均.

が BT 剤に対して、より感受性であるかを判断することは、摂食量の違いなどから困難であった。コナガ幼虫の場合の回帰係数はカイコの場合に比べて小さく、BT 剤に対する薬量反応は、コナガ幼虫がカイコより鈍いという結果を得た。

検定ごとの LC_{50} 値のふれは、カイコを用いた場合に比べて大きかった。対照区の生存率はカイコがほぼ 100% を示すのに比べると劣ったものの、90% 以上を示しており、アボットの補正式の利用上、問題はないと考えられた。

PUX 値と BMU 値の相関および回帰

製造ロットおよび保存状態を異にする 5 種の Dipol® 検定品について、上記方法で検定して得た PXU およびカイコを用いて得た BMU を第 3 表に示した。PXU および BMU を同時に検定することができなかったのも、各ロットの検定品について 3 回の力価検定を行ない、その平均値をもって実測 PXU および実測 BMU とした。このようにして得た PXU と BMU の相関を調べたところ $r=0.997$ ($p<0.001$) を得たので、次に回帰式を求めた。

PXU, BMU の実測値をそれぞれ X , Y とするとき、BMU の推定値 $\hat{Y}$ は回帰式 (1) により、また、BMU, PXU の実測値を X , Y とするとき、PXU の推定値 $\hat{Y}$ は回帰式 (2) により求められる。

$$\hat{Y}=0.748X+50.4 \dots\dots\dots(1)$$

$$\hat{Y}=1.33X-62.6 \dots\dots\dots(2)$$

式 (1) および (2) に PXU, BMU の実測値 X を代入し、それぞれの推定値 $\hat{Y}$ を求め第 3 表に併記した。PXU, BMU と実測値と推定値は極めて近似した。

考 察

対象害虫による BT 剤の力価検定法を確立することが必要とされているので、コナガ幼虫-人工飼料系での力価検定法およびそれによって得られる力価 (PXU) と

BMU の相関について検討した。

著者はコナガ人工飼料として安居院ら (1975) の人工飼料を用いたが、開放系で行なう検定作業ではかびの発生がみられた。そこで、添加防腐剤について検討した結果、第 1 表に示す組成の人工飼料を用いると、検定期間中 (2~3 日間) はかびの発生を抑制することができた。

BT 剤添加飼料給餌期間を 48 時間とした理由は次のとおりである。1) 今回用いた人工飼料のかび発生抑制期間は 2~3 日である。2) 供試虫として 4 令中期幼虫を用いたため、処理 2 日後には蛹化が始まる。3) 3 日以上経過すると、対照区の未蛹化幼虫が死亡することがある。このような理由により、検定精度を高く維持するには 48 時間の給餌が限度と考えられた。本検定法によって得られた力価 PXU とカイコを用いて得られた力価 BMU の相関は十分高く、PXU から BMU を推定する検定法として実用的であると判断されたことから、BT 剤添加飼料の給餌期間を 48 時間とすることについて問題は無いといえよう。

今回の実験は人工飼料で飼育したコナガ幼虫を用い、BT 剤の力価検定法を確立させ、さらには PXU から BMU の推定を可能にした。しかし、本法は殺虫活性 (LC_{50} 値) のふれや対照区の生存率において、日植防法に比べやや劣った。殺虫活性のふれの原因としては、本法による検定期間は 2 日間であり、日植防法の 5 日間に比べて短いこと、コナガ幼虫の生育調整が困難で均一性が劣ることなどが指摘される。対照区の生存率が劣る原因としては、コナガ幼虫の飼育段階で飼料が変ること、虫体が弱小のため、放虫操作にともなう物理的損傷を受けやすいことなどが考えられる。BIEBER and BOLDT (1971) は BERGER (1963) の *Heliothis* 飼育用人工飼料を用いてコナガの累代飼育に成功している。コナガ幼虫を用いる BT 剤の力価検定においても、飼育から検定まで同一飼料を利用すれば、対照区の生存率も良好となり、本検定法の精度を日植防法に近い程度まで高めうることも可能となるであろう。

BT 剤の殺虫活性の測定においては、現状では化学的分析法によることは不可能である。また、芽胞数と殺虫効力の間に平行関係は常に成立するわけではない。このため、効力に関する品質管理は生物検定法によらねばならないことは周知のとおりである。外国では検定用昆虫に対象害虫が用いられているが、わが国においてもカイコのみならず対象害虫による生物検定法を確立しておくことは、野外で効果を関連づけて把握しうる長所をもち、実際面からも有意義であるのみならず必要である。

摘 要

1. わが国においては、BT 剤の力価検定はカイコを用いて行なわれているが、これはただちに害虫に対する力価を示すものではなく、防除対象害虫による力価検定法の確立が必要である。

2. 人工飼料で飼育したコナガ幼虫を用い、BT 剤の生物検定法について検討した結果、これによる力価検定が可能となり、PXU (*Plutella xylostella* unit) によって表示することができた。

3. PXU および BMU (*Bombyx mori* unit) の相関を調べた結果、高い相関 $r=0.997$ ($p<0.001$) が認められた。BMU の推定値は回帰式 $Y=0.748X+50.4$ (X ; PXU) から得られた。

4. 上記回帰式を用い、実測 PXU より推定される BMU は実測値と非常に近似した。

引 用 文 献

安居院宜昭・小倉信夫・大河原通高 (1975) 人工飼料によるヨトウムシ (*Mamestra brassicae* L.) および数種りん翅目昆虫の飼育. 応動昆 **19**: 91~96.
AIZAWA, K. (1976) Recent development in the production

and utilization of microbial insecticides in Japan. Proc. 1st Intern. Colloq. Invertebr. Pathol. 59~63.
AIZAWA, K., N. FUJIYOSHI., M. OHBA and N. YOSHIKAWA (1975) Selection and utilization of *Bacillus thuringiensis* strains for microbial control. Proc. 1st Intersec. Congr. IAMS. **2**: 597~606.
BERGER, R. S. (1963) Laboratory techniques for rearing *Heliothis* species on artificial medium. USDA ARS (Ser.). **33~84**. 4p.
BIEVER, K. D. and P. E. BOLDT (1971) Continuous laboratory rearing of the diamondback moth and related biological data. Ann. entomol. Soc. Amer. **64**: 651~665.
BURGERJON, A. (1962) Relation entre l'intoxication provoquée par *Bacillus thuringiensis* Berliner et la consommation chez *Pieris brassicae* L. Ann. Epiphyties. **13**: 59~72.
DULMAGE, H. T., O. P. BOENING., C. S. REHNBORG and G. D. HANSEN (1972) A proposed standardized bioassay for formulation of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. J. Invertebr. Pathol. **18**: 240~245.
TAKAKI, S. (1975) BT preparation in Japan. Jap. Pest. Inform. **25**: 23~26.