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¹⁾

浅野昌司・岩佐智子・関 昭広

株式会社クボタ事業開発室 BB-PT (基盤技術研究所)

Silkworm Assay for *Bacillus thuringiensis* Formulations using Diet Incorporation Method: (1) Evaluation Based on Larval Mortality. Shoji ASANO, Tomoko IWASA and Akihiro SEKI (Advanced Technology Laboratory, Kubota Corporation, Ryugasaki, Ibaraki 301, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **41**: 187-194 (1997)

In bioassays for quality control of *Bacillus thuringiensis* (BT) formulations, the diet-incorporation method using silkworm (*Bombyx mori*) has been generally used since 1973. To make the silkworm assay simpler, we attempted a new procedure for preparing the incorporated diet; a powdery diet, BT solution and 2% agar solution were mixed in liquid form at 55°C and then allowed to solidify. The present study showed that the diet water content affected the larval development and BT susceptibility. An appropriate water content with no adverse effects was about 75%. Larval susceptibility to BT formulations differed between instars, and was high in the 2nd, 3rd and 4th instars, and low in the 1st and 5th instars. It decreased with days after ecdysis in the same instar. Larval mortality occurred after 2 days and then increased, but differed with exposure period and types of BT formulations.

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

緒 言

Bacillus thuringiensis の生産する殺虫性蛋白毒素 (δ -endotoxin) を有効成分とする製剤 (以下 BT 剤と略) は、諸外国ではおよそ 40 年前に鱗翅目害虫の防除を目的に商業化された。その後、双翅目および甲虫目の害虫にも有効な菌株が発見され、BT 剤の害虫防除への利用が一層広がった (BEEGLE and YAMAMOTO, 1992; 安田, 1991)。わが国では 1981 年に初めて BT 剤が農業登録されて以来、主に野菜、果樹および街路樹などの鱗翅目害虫の防除に利用されてきた (NOGUCHI, 1993)。商品化された BT 剤の品質管理は、一般に昆虫を用いる生物検定で行われている。供試昆虫には通常適用害虫で室内飼育法が確立されている種類から選ばれることが多い。また、BT 剤の力価は同時に検定した標準品に対する相対活性に基づいて定めることが基本とされている (BONNEFOI et al., 1958; BURGESS, 1967; BEEGLE, 1990)。検定に用いられる昆虫の種類は国によっても異なり、わが国では鱗翅目害虫を目的とした BT 剤の検定昆虫にカイコガ *Bombyx mori* 幼虫 (カイコ) が利用されてきた (AIZAWA et al., 1975;

AIZAWA, 1976; 鮎沢, 1978)。カイコは害虫ではないが、養蚕国であるわが国では卵や人工飼料が長年にわたり商業化されているので、生物検定用の資材が容易に入手できること、遺伝的に均一な品種が利用できること、飼育や扱いが容易であることなどの検定昆虫としての有利な性質を持つ。

カイコを用いる BT 剤の生物検定法としては、1973 年に日本植物防疫協会から提示された飼料混入法 (鮎沢, 1978) が基本的に現在も利用されているが、BT 剤と飼料を混合するのに多大の労力を必要とする。石黒・宮園 (1979) は飼料混入法に比べ、カイコ個体に強制経口投与する方がより精度の高いことを述べているが、生物検定に供する検体数が多くなる場合には、経口投与法は必ずしも実用的なものとはいえない。一方、カイコ以外にコナガ *Plutella xylostella* を用いる BT 剤の生物検定法 (土山, 1978; ASANO et al., 1993) も提案されたが、コナガの系統や人工飼料などに問題が残されている。

筆者らは、鮎沢 (1978) によって提案された、カイコを用いた品質管理のための BT 剤の力価検定に採用されている飼料混入法 (従来法とする) とは別の、検体と飼料を

1) この論文の一部は日本昆虫学会第 55 回大会・日本応用動物昆虫学会第 39 回大会・合同大会 (帯広畜産大) で発表した。
1996 年 7 月 5 日受領 (Received 5 July 1996)
1997 年 7 月 7 日登載決定 (Accepted 7 July 1997)

より容易に混合する方法 (改良法) を考案した。従来法はあらかじめ寒天を加えて調製した固形の飼料に一定量の検体液を滴下して混合する方法であるが、改良法として粉末飼料に一定量の検体液を滴下し、その後に可溶した寒天液を加えて成形する方法を考えた。考案した方法を用い、飼料中の水分含量の幼虫発育および毒性への影響、BT 剤の投与日数と幼虫死亡率の関係および幼虫の発育段階と BT 剤感受性の関係について調べた。ここにそれらの調査結果を報告する。

材料および方法

1. 供試昆虫

カイコガ *B. mori* は (品種名「春嶺×鐘月」, カネボウシルクエレガンス株式会社) の 1~5 齢の幼虫を用いた。幼虫は市販の調製された人工飼料シルクメイト® 1S (日本農産工業株式会社) を与えて、25°C, 60% R.H., 16L: 8D の条件で飼育した。2 齢および 3 齢幼虫の BT 剤感受性を調べた試験以外はふ化または脱皮後 24 時間以内の幼虫を用い、供試するまでは餌を与えなかった。

Table 1. Components of artificial diet M-50

Water	233 ml
Powder of mulberry leaves	50 g
Soybean flour	25 g
Sugar	5 g
Vitamin C	2 g
Citric acid	3 g
Pulp flock	10 g
Agar	5 g
Sorbic acid	0.2 g
Salicylic acid	0.2 g
Acrylic acid	0.25 g

2. 供試製剤

B. thuringiensis serovar *kurstaki* の 1 菌株の産生した δ -endotoxin と生胞子を含む BT 剤 (KM301 水和剤) ならびにこれとは異なる *B. t.* serovar *kurstaki* 菌株の δ -endotoxin の遺伝子を *Pseudomonas fluorescens* で発現させて得られた、胞子を含まない BT 製剤 (KM202 水和剤, ガードジェット® 水和剤) を用いた。

3. 検定用飼料および調製法

本試験には主に実験用粉末飼料 M-50 (Table 1) を用いたが、その他に供試虫の飼育用に用いたシルクメイト® 1S と同じ製造会社から販売されている粉末飼料シルクメイト® 1M を比較に用いた。飼料調製はまず 2% 寒天液を用意し、55°C の恒温槽に保温しておき、ガラスビーカーに秤量した上記粉末飼料に適当量の寒天液を加えて、55°C に保温しながらよく混合した。その後、5°C の低温に 1 時間以上置いて飼料の固化を早めた。水分含量の異なる飼料の調製は、粉末飼料と 2% 寒天液の混合割合を変えることで行った。飼料中の水分含量を 75, 80, 83 および 87% に調製する場合の飼料粉末 (g) と寒天液 (ml) を混合する割合はそれぞれ、7.5 : 22.5, 6 : 24, 5 : 25 および 4 : 26 で行った。試験の都度調製した飼料の一部は 5°C に保存し、試験期間中に容器内の飼料が乾燥したり、雑菌の繁殖がみられた場合は適宜飼料を交換した。

4. 試験方法

試験はいずれも上記の方法で調製した飼料を一定の容器に移し、所定の齢期の幼虫を接種する方法で行った。容器は幼虫の齢期によって後述するように種々のものを使用した。供試幼虫は特に明記しない限りふ化後または脱皮後 24 時間以内のものを用いた。供試虫数、反復数

Table 2. Effect of diet water content on larval development of 2nd- and 3rd-instar silkworm (*B. mori*) larvae

Diet	Water content (%)	Average body wt. (mg) ^a		Larval development (days) ^b	
		2nd instar	3rd instar	2nd instar	3rd instar
M-50	75	37.4 ± 2.9 A	210.2 ± 36.6 AB	4.0 ± 0.20 A	5.0 ± 0.18 A
	80	34.5 ± 2.6 B	NT ^c	4.1 ± 0.40 A	NT
	83	32.7 ± 6.0 B	204.6 ± 11.9 AB	4.8 ± 0.79 B	5.0 ± 0.31 A
	87	29.2 ± 1.9 C	181.2 ± 28.2 C	5.4 ± 0.76 C	5.7 ± 0.60 B
Silkmate®-1M	75	38.5 ± 4.0 A	232.0 ± 13.9 A	4.0 ± 0.20 A	4.9 ± 0.35 A
	83	NT	199.7 ± 60.3 B	NT	6.0 ± 0.98 B
	87	NT	158.1 ± 47.3 C	NT	(>7.0) ^d

Mean ± SD (Values with the same letters are not significantly different at $p=0.05$ by FISHER's LSD test.)

^a Average of 25-30 larvae on day 3.

^b Average of 25-30 larvae during 2nd and 3rd instars.

^c Not tested.

^d Larvae died after 7 days.

Table 3. Effect of diet water content on susceptibility of 2nd-instar silkworm (*B. mori*) larvae to *B. thuringiensis* formulation (KM202 WP)

Diet	Water content (%)	Mortality on day 7 (%) ^a			
		at concentration (ppm)			
		0	30	100	300
M-50	75	0.0 (50)	0.0 (50)	4.0 (50)	17.3 (75)
	80	0.0 (50)	0.0 (50)	10.2 (49)	26.7 (75)
	83	0.0 (50)	4.0 (50)	26.5 (49)	32.0 (75)
	87	0.0 (50)	14.0 (50)	32.7 (49)	64.0 (75)
Silkmate®-1M	75	0.0 (50)	0.0 (50)	6.0 (50)	9.3 (75)

^a Sample size in parentheses. Fig. 1. Day-mortality curves of 3rd-instar silkworm (*B. mori*) larvae fed *B. thuringiensis* formulations (KM202 WP and KM301 WP) in diet.

や調査項目は各試験で異なるが、幼虫接種後の容器はいずれも 25°C, 60% R.H. に置いて、所定日数後に調査した。

(1) 飼料中の水分含量が幼虫発育に及ぼす影響を調べた試験では粉末飼料の M-50 またはシルクメイト® 1M に 2% 寒天液を加えて、所定の水分含量 (重量比で 75, 80, 83 および 87%) の飼料を前述の割合で混合して調製した。これを 2 齢または 3 齢幼虫に 3 日間与え、その後、供試幼虫の飼育に用いたシルクメイト® 1S に移して、次の脱皮をする時期まで飼育した。2 齢幼虫ではプラスチックシャーレ (直径 6 cm) 当たり 5 頭を接種し、1 区に 5 シャーレを用いた。3 齢幼虫では同シャー

レ (直径 9 cm) 当たり 5 頭を接種し、1 区に 6 シャーレを用いた。いずれも投与 3 日後に幼虫体重をシャーレごとにとりまとめて測定した。また、投与後の脱皮幼虫時期を記録した。

(2) 飼料中の水分含量が BT 剤の毒性に及ぼす影響を調べた試験では M-50 またはシルクメイト® 1M と水で希釈した BT 剤の懸濁液を軽く混合した後、所定量の 2% 寒天液とよく混合した。飼料調製の混合割合について水分含量 75% の飼料 30 g を調製する場合を例にとると、100 ml ガラスビーカーに粉末飼料 7.5 g を秤量し、これに BT 検体液 3 ml を軽く混合した後、2% 寒天液の 19.5 ml を加え 55°C の恒温槽内において寒天が固まらないようにして液状態でよく混合した。飼料中の水分含量を変える場合は BT 検体液量を同じにして粉末飼料と 2% 寒天液の量を適宜変えることによって調製した。飼料中の BT 検体量は KM202 水和剤の製剤濃度で 30, 100 および 300 ppm になるようにした。この飼料に 2 齢幼虫をシャーレ当たり 5 頭ずつ接種し、1 区に 5 シャーレを用いた。試験は 2~3 反復行った。調査は接種 7 日後の生死虫数を記録した。

(3) BT 剤の投与日数と致死率の関係を調べた試験では水分含量 75% にした M-50 に所定濃度の BT 検体液を混合した。飼料中の BT 検体量は KM202 水和剤の製剤濃度で 2,000 ppm を、KM301 水和剤は 10 ppm で行った。この飼料を 2 齢または 3 齢幼虫に所定の日数与えた後、BT 検体を含まない飼料に換えて通算で 7 日間飼育した。調査は投与後の生死虫数を毎日記録した。試験はシャーレ当たり 5 頭、1 区に 10 シャーレを用いた。

(4) 幼虫の発育段階と BT 剤感受性の関係を調べた試験では M-50 飼料 15 g に所定濃度の BT 懸濁液の 6 ml を混合し、水分含量が 75% になるように 2% 寒天液 39 ml を加えてよく混合した。飼料中の BT 検体量は KM202 水和剤の製剤濃度で 31, 63, 125, 250, 500 および 1,000 ppm, KM301 水和剤は 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5 および 10 ppm となるようにした。これらの飼料を所定の容器に入れて、1~5 齢幼虫を接種した。1 齢幼虫には 30 ml 容量のプラスチックカップを、2 齢幼虫には径 6 cm の同シャーレを、3 齢幼虫には径 9 cm の同シャーレを、4~5 齢幼虫には 250 ml 容量の同丸型カップをそれぞれ用いた。1 齢幼虫の試験はカップ当たり 10 頭で、1 区に 5 カップを、2 齢および 3 齢幼虫はシャーレ当たり 5 頭で 1 区に 5 シャーレを、4 齢および 5 齢幼虫はカップ当たり 5 頭で 1 区に 5 カップを用いた。

試験は 2〜4 反復行い、調査はいずれも幼虫接種 5 日後に生死虫数を記録した。2 齢および 3 齢幼虫の発育時期と BT 剤感受性の関係を調べた試験では、接種幼虫を眠期の幼虫、脱皮後 24 時間以内で供試するまで全く餌を与えなかった幼虫、2 時間および 24 時間餌を与えた幼虫をそれぞれ用いた。飼料中の BT 検体量は KM202 水和剤の製剤濃度で 250, 500, 1,000 および 2,000 ppm になるようにした。試験はシャーレ当たり幼虫 10 頭を接種し、1 区に 5 シャーレを用いた。試験は 2〜3 反復行い、調査はいずれも接種 7 日後の生死虫数を記録した。

結 果

1. 飼料中の水分含量が幼虫発育に及ぼす影響

飼料中の水分含量を 75, 80, 83 および 87% に調製した M-50 およびシルクメイト® 1M 飼料を 2 齢および 3 齢幼虫にそれぞれ 3 日間与えた時の幼虫発育の結果を Table 2 に示した。投与 3 日後ではいずれの試験区でも死亡個体は全くみられなかったが、幼虫の体重や発育には差がみられた。シルクメイト® 1M の 87% 区では投与 6 日後に死亡個体が現れ、7 日以後さらに増加したが、他の区ではいずれも全く死亡個体はみられなかった。飼料中の水分含量が多くなるほど幼虫体重が減少し、齢期間が延長した。とくに水分含量が 87% になるその度合が顕著になった。この傾向は飼料 M-50 およびシルクメイト® 1M のいずれの場合も同様で、飼料の種類やそれまでの飼育に用いた飼料の種類との関連性はみられなかった。

2. 飼料中の水分含量が BT 剤の毒性に及ぼす影響

飼料中の水分含量は前述のように幼虫発育に影響することが明らかになったので、次に飼料中の水分含量が幼虫の BT 剤感受性に影響するかどうかをみた。Table 3 に示したように投与 7 日後の死亡率は飼料中の水分含量が多くなるに従い増大する傾向がみられ、とくに水分含量が 87% になると顕著に高くなった。

本試験では飼料中の水分含量が 75% の時幼虫死亡率が最も低かったが、福田 (1987) もカイコ用人工飼料の水分含量は 75% 前後が良いとしている。そこで 以後の生物試験では飼料中の水分含量を 75% とした。

3. BT 剤の投与日数と死亡率の関係

KM202 水和剤の 250, 500, 1,000 および 2,000 ppm ならびに KM301 水和剤の 2.2, 3.6, 6.0 および 10 ppm を含む飼料を 3 齢幼虫に連続して 7 日与えた時の累積死亡曲線を Fig. 1 に示した。図の累積死亡曲線で示すように投与後の死亡率は BT 剤の種類や検定濃度によっても異なった。投与後 2 日間までの死亡率はいずれも低かったが、投与 3〜4 日後になると死亡率は顕著に増大した。KM202 区では投与 4〜5 日後までに死亡率はほぼ平衡に達したが、KM301 区では投与 7 日後でもわずかではあるがまだ死亡率の増大がみられた。このような 2 種類の BT 剤の死亡曲線の相違は、データを示していないが 2 齢幼虫を用いた場合でもほぼ同様な傾向であった。

次に、KM202 水和剤の 2,000 ppm および KM301 水和剤の 10 ppm を含む飼料を 2 齢および 3 齢幼虫に所定の日数与えた後無処理の飼料に換えて 7 日間飼育した時の死亡率を Table 4 に示した。KM202 水和剤の場合、投与日数が 1〜4 日の間でも死亡率には大差がなかったが、KM301 水和剤の場合は投与日数が短いほど死亡率は低く、とくに投与が 1 日の場合の死亡率は 2 日以上の投与区に比べ著しく低かった。

4. カイコ幼虫の発育段階と BT 剤感受性の関係

KM202 水和剤の 31, 63, 125, 250, 500 および 1,000 ppm ならびに KM301 水和剤の 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 および 10 ppm を含む飼料を 1〜5 齢幼虫に連続して 5 日間与えた時の BT 剤感受性を Table 5 に示した。表には投与 5 日後の死亡率をもとにプロビット法で算定した LC₅₀, 95% 信頼限界 (95%CL), 回帰直線の傾き *b*, *χ*² の値ならびに無処理区の幼虫発育度合と差のない最大実験濃度を NEL (最大無作用濃度) として示した。回帰

Table 4. Relationship between feeding days and toxicity of *B. thuringiensis* formulations (KM202 and KM301 WP) in the 2nd- and 3rd-instar silkworm (*B. mori*) larvae

Instar	BT samples	Conc. (ppm)	Mortality after feeding days ^a				
			0	1	2	3	4
2nd	KM202	2000	0.0 (50)	42.0 (50)	56.0 (50)	42.9 (49)	62.0 (50)
	KM301	10	0.0 (50)	4.0 (50)	30.5 (59)	86.3 (61)	100 (50)
3rd	KM202	2000	0.0 (50)	56.9 (51)	40.0 (50)	62.0 (50)	54.0 (50)
	KM301	10	0.0 (50)	2.0 (50)	22.0 (50)	58.0 (50)	88.0 (50)

^a Sample size in parentheses, mortality scored on day 7.

Table 5. Comparative susceptibility of different instars of silkworm (*B. mori*) larvae to *B. thuringiensis* formulations (KM202 WP and KM301 WP)

BT samples	Term ^a	1st	2nd	3rd	4th	5th
KM202 WP	LC ₅₀	>1000	542	393	385	>1000
	(95%CL)	—	(498–591)	(315–467)	(269–494)	—
	<i>b</i>	—	4.710	2.246	1.873	—
	χ^2	—	0.002	2.167	1.331	—
	NEL	125	31.3	31.3	31.3	125
KM301 WP	LC ₅₀	6.81	2.72	2.68	2.23	2.65
	(95%CL)	(6.16–7.56)	(2.39–2.86)	(2.51–2.92)	(1.00–1.36)	(2.52–3.03)
	<i>b</i>	6.987	4.192	5.755	4.019	4.260
	χ^2	1.192	0.061	1.244	1.902	1.803
	NEL	0.625	0.313	0.313	0.313	0.625

^a The LC₅₀ (ppm), 95% confidence limits (95%CL), regression coefficient (*b*) and Chi-square (χ^2) were calculated by probit analysis based on the mortality at day 5. The non-effect level (NEL) is the test concentrations (ppm) having no detrimental effects on larval development.

Table 6. Comparative susceptibility of different developmental stages within 2nd and 3rd instars of silkworm (*B. mori*) larvae to *B. thuringiensis* formulation (KM202 WP)

Instar	Term ^a	Developmental stage of larvae			
		Before ecdysis ^b	Feeding hours after ecdysis		
			0	2	24
2nd	LC ₅₀	827	386	1153	2260 ^c
	(95%CL)	(608–1090)	(334–441)	(975–1420)	—
	<i>b</i>	1.247	2.401	1.919	1.867
	χ^2	0.853	4.385	2.222	0.442
3rd	LC ₅₀	860	383	579	1960
	(95%CL)	(486–1759)	(356–413)	(509–641)	(1530–3090)
	<i>b</i>	1.867	2.112	2.347	1.431
	χ^2	0.442	3.153	1.800	0.021

^a The LC₅₀ (ppm), 95% confidence limits (95%CL), regression coefficient (*b*) and Chi-square (χ^2) were calculated by probit analysis based on the mortality at day 7.

^b Molting stage.

^c Values estimated by extrapolation.

直線の傾きは供試した 2 種の BT 剤間で異なり、KM202 水和剤は 2 齢幼虫の場合を除くといずれも KM301 より緩やかであった。幼虫齢期と LC₅₀ および NEL の関係をみると 2 種の BT 剤間で多少異なるが、全体的に 1 齢幼虫の感受性が最も低く、ついで 5 齢幼虫で、2–4 齢幼虫の感受性はほぼ同程度であった。

次に 2 齢および 3 齢幼虫において同じ齢期内の発育時期と BT 剤感受性の関係を KM202 水和剤を含む飼料を用いて調べた。Table 6 には投与 7 日後の死亡率をもとにプロビット法で算定した LC₅₀, 95%CL, *b* および χ^2 の値を示した。脱皮前幼虫としたのは眠中の幼虫で、脱皮後で供試するまで全く餌を与えなかったものを給餌 0 時間幼虫とし、無処理の餌を与えて 24 時間処理したものをそれぞれ給餌 2 および 24 時間幼虫とした。同じ幼虫齢期内の発育時期の違いと KM202 水和剤に対する

感受性を比較すると、2 齢および 3 齢幼虫のいずれでも脱皮後 24 時間以内で供試するまで全く給餌しない幼虫が最も高く、ついで、脱皮前幼虫と脱皮後 2 時間給餌した幼虫がほぼ同程度で、24 時間給餌した幼虫が最も感受性が低く、2 時間給餌のそれに比べると感受性は約 1/2 であった。

2 齢および 3 齢脱皮後 24 時間以内の幼虫に無処理の飼料を与えた場合の給餌開始直前の体重を基準とした体重増加割合を調べた結果を Fig. 2 に示した。体重は給餌開始後 2, 4, 6 および 8 時間後に個体別に測定した。給餌開始後の最初の 2 時間における体重増加は急激であったが、その後の増加は緩やかでほぼ一定の割合であった。この傾向は 2 齢および 3 齢幼虫でもほぼ同様であった。

Fig. 2. Time-growth curves in early feeding hours of 2nd- and 3rd-instar silkworm (*B. mori*) larvae.

考 察

BT 剤の品質管理を目的にした生物検定に用いられる昆虫の種類は国によって異なり、欧州ではオオモンシロチョウ *Pieris brassicae* (BONNEFOI et al., 1958) が、米国ではイラクサキンウワバ *Trichoplusia ni* (DULMAGE et al., 1971) が、日本では害虫の代わりに有用昆虫のカイコが用いられてきた (AIZAWA et al., 1975)。

わが国でのカイコを用いる BT 剤の生物検定法は、1973 年に日本植物防疫協会の BT 研究会から提案された飼料混入方法が基本になっている (鮎沢, 1978)。この従来法はあらかじめ定められた組成の人工飼料をオートクレーブにかけて調製しておき、その 10 g を径 9 cm シャーレに入れ、これに BT 検体の懸濁液 0.5 ml を滴下し、ステンレススプーンを使ってよく混和する。そして 3 齢 2 日目幼虫をシャーレ当たり 10 頭を接種し、25°C で 3 日間飼育する。その後生存虫は検体の入らない無処理の餌に移してさらに 2 日間飼育してから致死率を最終的に記録する。試験は各濃度に 3 シャーレ (幼虫 30 頭) を用いる。この方法の難点は飼料と検体との混合に多大の時間と労力を要することである。また、飼料と検体の混ざり具合により検体の殺虫活性が大きく左右されるので、できるだけ均一に混合するように細心の注意と熟練を要する。これを簡便にするには混合する飼料をできるだけ柔らかい状態にすれば、飼料と検体との混合が容易になり、飼料中の検体の均一性も向上すると考えられた。しかし、飼料中の水分含量が多すぎると幼虫の発育に悪影響を及ぼし、BT 剤感受性にも影響するので、これらの点を考慮すると飼料の水分含量は従来法と同様に 75% 前後が良いと思われた。

検体と飼料の混合を従来法より容易にするために本報では粉末飼料を用いて、これに検体希釈液を軽く混合

し、その後、2% 寒天液を加えてよく混合することによる新しい飼料調製の方法を考案した。飼料混合の際、加えた寒天液がすぐに固まらないように 55°C の恒温槽で行うと液状態で混合できるので作業が容易であった。また、反復数が多い場合でも飼料、検体液および寒天液量を同じ割合で相対的に増やすことで、混合操作を 1 回で済ませることができる点でも、従来法のシャーレごとに混合する方法に比べるとかなり作業時間を短縮できた。

供試昆虫の BT 剤に対する感受性は、多くの昆虫種で若齢期ほど感受性が高く、齢期が進むほど低下するといわれてきた。鱗翅目ではハスモンヨトウ *Spodoptera litura* (佐野, 1974; 浅野・鈴木, 1995), *S. exigua*, *Pseudoplusia includens*, *Anticarsia gemmatilis*, および *Plathypena scabra* (IGNOFFO et al., 1977), マツカレハ *Dendrolimus spectabilis* (ASANO et al., 1976), スジマダラメイガ *Ephestia cautella* (MCGAUGHEY, 1978), チャノココクモンハマキ *Adoxophyes* sp. (岩佐ら, 未発表), ヨトウムシ *Mamestra brassicae* (遠藤ら, 未発表) などの例がある。しかし、コナガの場合には今回のカイコと同様に 1 齢幼虫の感受性が最も低いことが報告されている (ASANO et al., 1993)。幼虫の齢期と BT 剤に対する感受性の関係は昆虫の種類によっても異なる。それゆえ、BT 剤の生物検定に当たっては、供試する昆虫の種類ごとに齢期と感受性の関係をあらかじめ確認しておく必要があると思われるが、実際の生物試験では扱いやすさで幼虫の齢期を決める場合も多い。

一方、同じ齢期内の幼虫の発育時期と BT 剤感受性は、一般に発育経過が進むほど低くなると考えられる (BEEGLE et al., 1981)。本試験でカイコ 2 齢および 3 齢幼虫を用いて調べた結果、脱皮後飼育経過時間が長くなるほど BT 剤感受性が同様に低下する傾向がみられた。しかし、脱皮後 24 時間以内で供試するまで餌を与えない幼虫を用いた場合の感受性が高かった原因には、本質的なもの以外に脱皮から供試するまでの空腹が影響しているとも考えられる。空腹の幼虫は給餌直後しばらくはそれまでの空腹を早急にいやすかのように摂食活動が旺盛になることに加え、摂食を開始してから腸管内が餌で充满して排糞が始まるまでにタイムラグがあるので、飽食の幼虫に比べると個体当たりの初期の餌摂取量が多くなり、それに伴い個体当たりに取り込む BT 剤の量が多くなると予想される。この空腹による影響を除くためには、供試前に無処理の餌を約 2 時間与えて腸管内を無処理の餌で満たしてから検定飼料を与えることにより解決できると思われた。

Heliothis virescens では BT 剤の投与期間が長いほど死亡

率が高いと報告されている (DULMAGE and MARTINEZ, 1973) が, これは同時に投与期間が短いと毒作用の回復のあることを示唆している。本報の結果 (Table 4) で BT 剤の種類によって回復度合の異なることが示されたが, 他に, 昆虫の種類や試験温度によっても異なることが明らかにされている (浅野ら, 未発表)。BT 剤の種類による相違を考えるとカイコ検定における投与日数や調査日数は 4~7 日が良いと思われた。

BT 剤の昆虫に対する殺虫作用は経口的に摂取されたトキシンが中腸内のプロテアーゼで活性化されてはじめて発揮されるので, 飼料に混入する BT 剤はできるだけ均一になるように心掛けなければならない。今回検定に用いた BT 剤のひとつの KM202 水和剤は他の市販の BT 剤に比べるとカイコに対する毒性が低いこともあり, 従来法でカイコ 3 齢幼虫に対する毒性を検定すると LC_{50} は 4,000 ppm 以上となり, 正確な値が求められなかった (未発表)。しかし今回の改良法で検定すると LC_{50} は同じ 3 齢期幼虫に対して約 400 ppm と算定された。これはおそらく飼料中の検体の均一性の違いによると思われる。このように同じ検体でも方法を変えるとカイコに対する毒性の評価が異なることは試験方法の検討の重要性を示している。それゆえ, BT 剤の品質管理のためのカイコ検定にはそれぞれの製剤に適した試験方法を設定することも重要と思われた。

摘 要

Bacillus thuringiensis (BT) 製剤の品質管理を目的としたカイコ検定は 1973 年に発表された飼料混入法が現在も利用されている。この従来法に比べ, 検体と飼料をより容易に混合する方法として, 本報では粉末飼料, 検体および 2% 寒天液を一定の割合で液状態で混合する方法を考案した。この新しい飼料調製方法を用いて飼料の水分含量の影響, 幼虫の齢期や発育時期と BT 剤感受性の関係, 投与日数と致死活性の関係などについて調べた。その結果, 飼料中の水分が多すぎると幼虫発育が抑制され, BT 剤感受性にも影響すること, 影響の少ない飼料水分含量は 75% であること, 幼虫の BT 剤感受性は齢期によって異なり, 2~4 齢で高く, 1 齢および 5 齢で低く, また, 同じ齢期内では発育経過 (給餌時間) に伴って感受性が低下すること, 投与後の致死の発現は 2 日後からみられたが, 致死率は投与日数や BT 剤の種類によっても異なることが示された。

引 用 文 献

- AIZAWA, K. (1976) Recent development in the production and utilization of microbial insecticides in Japan. *Proc. 1st Int. Colloq. 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. *醸酵工学* **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 Intersectional Congress of LAMS* **2**: 597-606.
- 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., H. SAKAKIBARA and K. NAKAMURA (1976) Susceptibility of the pinecaterpillar, *Dendrolimus spectabilis* BUTLER (Lepidoptera, Lasiocampidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Konchu* **44**: 217-227.
- ASANO, S., T. MARUYAMA, T. IWASA, A. SEKI and M. TAKAHASHI (1993) Evaluation of biological activity of *Bacillus thuringiensis* test samples using a diet incorporation method with diamond-back moth, *Plutella xylostella* (LINNAEUS) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* **28**: 513-524.
- BEEGLE, C.C. (1990) Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. In: *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*. (S.H. LESLIE and L.F. WILLIAM eds.), ACS Symposium Series, No. 432, Washington, DC, American Chemical Society, pp. 14-21.
- BEEGLE, C.C. and T. YAMAMOTO (1992) History of *Bacillus thuringiensis* BERLINER research and development. *Can. Entomol.* **124**: 587-616.
- BEEGLE, C.C., L.C. LEWIS, R.E. LYNCH and A.J. MARTINEZ (1981) Interaction of larval age and antibiotic on the susceptibility of three insect species to *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **37**: 143-153.
- BONNEFOI, A., A. BURGERJON and P. GRISON (1958) Titration biologique des préparations de spores de *Bacillus thuringiensis*. *C. R. Acad. Sci.* **247**: 1418-1420.
- BURGES, H.D. (1967) The standardization of products based on *Bacillus thuringiensis*. In: *Insect Pathology and Microbial Control*. (P.A. van der LAAN ed.), Amsterdam, North-Holland Publ. Co., pp. 306-314.
- DULMAGE, H.T. and D. 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.
- DULMAGE, H.T., O.P. BOENING, C.S. REHNBERG and G.D. HANSEN (1971) A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international units. *J. Invertebr. Pathol.* **18**: 240-245.

- 福田紀文 (1987) 家蚕および野蚕の人工飼料育. 東京: 日本蚕糸新聞社, 134 p.
- IGNOFFO, C.M., D.L. HOSTETTER, R.E. PINNELL and C. GARCIA (1977) Relative susceptibility of six soybean caterpillars to a standard preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *J. Econ. Entomol.* **70**: 60-63.
- 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.
- McGAUGHEY, W.H. (1978) Effects of larval ages on the susceptibility of almond moth and Indian meal moths to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **71**: 923-925.
- NOGUCHI, H. (1993) The development of *Bacillus thuringiensis* in Japan. In: *Advanced Engineered Pesticides*. (L. KIM ed.), New York, Marcel Dekker, Inc., pp. 283-291.
- 佐野利男 (1974) 害虫防除剤としての病原性細菌・糸状菌の利用. 植物防疫 **28**: 195-201.
- 土山 杉 (1978) コナガ幼虫による *Bacillus thuringiensis* 製剤の力価検定. 応動昆 **22**: 234-237.
- 安田 誠 (1991) BT 剤の現状と問題点. 植物防疫 **45**: 498-501.
-