

BT製剤の殺虫活性に影響を及ぼす要因の解明と  
生物検定法に関する研究

一

2002

松 本 信 弘

BT製剤の殺虫活性に影響を及ぼす要因の解明と  
生物検定法に関する研究

Elucidation of the effective factors on bioassay method of  
*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) microbial insecticide

筑波大学大学院  
農学研究科  
農林学専攻  
Institute of Agricultural and Forestry,  
University of Tsukuba  
Ibaraki 305-8672

松本 信弘  
Nobuhiro Matsumoto

Email: nobu\_Matsumoto@mue.biglobe.ne.jp

## 目次

緒言	1
第1章 長期保存後のBT製剤の劣化と殺虫活性	9
1-1 長期保存によるBT製剤の劣化の有無	9
材料および方法	
結果および考察	
1-2 走査型電子顕微鏡による劣化製剤の観察	17
材料および方法	
結果および考察	
第2章 カイコの人工飼料成分の殺虫活性への影響	20
2-1 異なる人工飼料における活性の変化	21
材料および方法	
結果および考察	
2-2 ダイズ蛋白の違いによる殺虫活性の変化	26
材料および方法	
結果および考察	
2-3 ダイズ蛋白中の Bt-内毒素結合性蛋白	33
材料および方法	
結果および考察	
2-4 炭酸脱水素酵素の殺虫活性への影響	37
材料および方法	
結果および考察	
第3章 人工飼料中のプロピオン酸の殺虫活性への影響	41
3-1 プロピオン酸類の人工飼料への添加による殺虫活性の低下	42
材料および方法	
結果および考察	
3-2 プロピオン酸類が $\delta$ -内毒素前駆体蛋白に及ぼす影響	49
材料および方法	
結果および考察	

第4章 殺虫活性(力価)に影響するその他の要因	54
4-1 検定時の光条件の影響	55
材料および方法	
結果および考察	
4-2 検定に用いる検定希釈液の温度が殺虫活性に及ぼす影響	60
材料および方法	
結果および考察	
第5章 総合考察	64
要旨	69
謝辞	71
引用文献	72

## 緒 言

*Bacillus thuringiensis* (BT) 製剤は、作物や森林保護等のために世界中で最も広範に使用されている微生物殺虫剤である。その有効成分は、細菌 *B. thuringiensis* の産出する結晶性殺虫蛋白 (ICP) の1つである  $\delta$ -内毒素 ( $\delta$ -endotoxin) で、殺虫活性の種特異性が高く、かつ他生物への影響が少ないことを特徴とする。本菌の最初の発見は日本人の石渡 (1901) によるもので、軟化病により死亡したカイコ (*Bombyx mori*) 幼虫の中に見出され、卒倒菌 (*Bacillus sotto*) として報告された。その後、ドイツでスジコナマダラメイガ (*Ephestia kühniella*) から同様の菌が発見され、*B. thuringiensis* Beliner (1911) と命名され、これが正式名称となった。

*B. thuringiensis* 菌は好気条件下でよく生育し、栄養の欠乏や乾燥などの好ましくない環境下では芽胞をつくる。この芽胞形成時に多量の ICP が合成される。菌の細胞内でこの蛋白が凝集して結晶性封入体を形成し、外側の細胞膜が壊れ芽胞と ICP が放出される (Fig. 1)。

Hannay (1953) は *B. thuringiensis* が孢子の他に結晶を産出することを最初に発見し、Angus (1956) はこの結晶そのものが殺虫性に関与していること、さらに *B. thuringiensis* の *sotto* 株のカイコ幼虫に対する殺虫性を確認した。さらに、Heimpel and Angus (1959) は、鱗翅目昆虫に対する ICP の作用機作について報告し、Heimpel (1967) は *B. thuringiensis* の病理学的研究と ICP 生産菌の分類学的まとめを行った。孢子とともに菌体内に形成される結晶は、当初は封入体とよばれ、化学的にもその構成成分が調べられた。その結果、この封入体は蛋白質からなることがわかった (Hannay, 1956)。一方、Angus は殺虫活性本体であるこの  $\delta$ -内毒素を、bacterial insecticides (微生物殺虫剤) として位置づけるとともに実用化を進めた (Heimpel and Angus, 1959, 1960; Angus, 1968)。

Homes and Monto (1965) は、 $\delta$ -内毒素蛋白の分子量を 230kDa であるとし、Nagamatu et al. (1978) は *sotto* 株の  $\delta$ -内毒素が分子量 262kDa, 232kDa, 135kDa の3つの重成分からなることを示した。これまでに報告されていた *B. thuringiensis* の各菌株の  $\delta$ -内毒素蛋白の分子量が次々報告され、 $\delta$ -内毒素は 135kDa の前駆体蛋白として存在することが確認されている (Chestukhina et al., 1980; Nagamatsu et

al., 1984; Ogo et al., 1990; Masson et al., 1990)。

一方、分子生物学的な手法も進み ICPをコードする遺伝子を明らかにするために、その遺伝子のクローニングとその DNA の塩基配列の決定が試みられ、1981 年、ワシントン州立大学の Whiteley らのグループが、*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1 において最初に $\delta$ -内毒素遺伝子のクローニングに成功し (Schnepf and Whiteley, 1981), その後 Schnepf et al. (1985) により、HD-1 株, Shibano et al. (1985) により *B. thuringiensis* serovar *sotto* 株など、各 $\delta$ -内毒素遺伝子の塩基配列が明らかにされた。

Höfte et al. (1988) は $\delta$ -内毒素遺伝子の塩基配列中に5カ所の共通領域があることを明らかにし、Höfte and Whiteley (1989) は、特異的殺虫活性と塩基配列の共通性 (homology) に基づいて、 $\delta$ -内毒素を鱗翅目、双翅目、鞘翅目およびその他昆虫に特異的な活性を持つ CryI から CryIV のグループに分類した。その後新しいICPの報告が増加するにつれて、特異的殺虫活性のみに基づく分類では対応できなくなり、現在では Crickmore et al. (1995) が提案した ICP のアミノ酸相同性に基づく新しい分類法が採用されている。また特異的殺虫活性に基づく分類の表記は、従来のローマ数字 (I, II, III, ...) からアラビア数字 (1, 2, 3, ...) に変更され、1996 年現在、Cry1 から Cry23 までのグループに分類され、100種以上のICPの遺伝子が登録されている(飯塚, 1997)。

このように *B. thuringiensis* の産出する $\delta$ -内毒素の性質が明らかになると前後して、 $\delta$ -内毒素を主成分とする殺虫剤 (BT製剤) としての利用が世界中に広まり、1974 年には、我が国でも最初の商業用製剤が登録になり、主に鱗翅目やコガネムシ類などの害虫を対象に現在 11 製剤が微生物農薬として登録されている。

微生物殺虫剤といえども農薬である以上、その効力や品質面での信頼性を確保するために客観的生物活性 (力価) を備える必要がある。化学殺虫剤では化学分析で容易に力価を決定できるが、微生物殺虫剤では製造過程での有効成分の不活性化や病原性の変異の問題があり、そのため微生物殺虫剤の力価は生物検定で決めるのが最適の方法とされている (福原, 1979)。力価は含まれる $\delta$ -内毒素の量に依存し、定められた標準のBT製剤の致死活性との比較によって示される。このため鱗翅目に活性をもつBT製剤は、カイコを使った生物検定法によって力価が検査されている (Aizawa, 1976; 松本, 1999)。

生物検定法については、約 50 年前に最初の商業用製剤(以下、製品)が登場してから、多くの国で、製品の比較のために必要な手法がいろいろ考案されてきた。最初のプロトコールは孢子の計数に基づくものであったが、孢子数は本菌の ICP 含有量を反映せず、この方法は不正確であったのでかなり多くの製品で問題が生じた(Bonnefoi, 1958; Skovmand et al., 2000)。次に、フランスでBT製剤が商業用に開発された時に、製品と標準となるBT製剤(標準製剤)の半数致死活性(LC<sub>50</sub>)の比較に基づく力価法(生物検定法)が開発された(Bonnefoi, 1958; Burgerjon and Dulmage, 1977)。この方法により、毒素量に依存した力価を決められた標準製剤と致死活性を比較することで相対的な力価を示すことができるようになった(Skovmand et al., 2000)。同法は製品の信頼性を著しく高めたのみならず、工場における発酵や製剤開発のための基準となり、その後商品化され販売されるBT製剤の品質管理の基準法として定着した。

我が国では、25年前にBT製剤の農薬登録が検討された際に、農薬の適正な品質管理の目的で、この力価法に基づいたカイコに対する生物検定法が採用された(BT製剤研究会, 1973; Aizawa, 1976; 松本, 1999)。しかし、BT製剤の力価は、益虫のカイコではなく標的昆虫である他の鱗翅目害虫を用いるべきであるとの議論があったことから、コナガ(*Plutella xylostella*)、ハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*)、ドウガネブイブイ(*Anomala cuprea*)についても力価法が検討された(土山, 1978; de León et al., 1995; Asano et al., 1994; 浅野・鈴木, 1995; Suzuki et al., 1992; Inagaki et al., 1992)。さらに、これらの検討の中でBT製剤の投与方法として、飼料混入法(Aizawa, 1976; 浅野ら, 1997)、直接経口投与方法(石黒・宮園, 1979)、葉面施用法(de León and Ibbara, 1995)などの方法も検討された。

一方、このように力価法に他の鱗翅目害虫を用いる試みは、植物検疫上の問題から供試する昆虫種によっては国際間の移動が制約され製品の力価を国際的に比較しにくいこと、感受性が高く、かつ均質な集団の安定的な供給がむずかしいなどの問題が残った。したがって、Heimpel (1967) が指摘したように、標準的な供試昆虫としてカイコを用いる生物試験法が現在でも採用されている。

しかし、このように農薬の適正な品質管理の目的で保管されてきた各製品の力価の基準となる標準製剤の保管期間(全暗, 5℃下)が1996年の時点で20年を越えるものも出てきた。このような古い標準製剤の更新、さらに新剤の登録のための標準製剤

の設定において、標準製剤の測定力価がメーカーと登録検査機関である農薬検査所の間で一致しない事例が発生した (Table 1)。

この原因が生物検定に使われた人工飼料の違いや製剤成分の劣化、カイコ飼育条件等の違い等によるものと考えられた。これが本研究を実施することになった主な背景である。

BT製剤の適正な力価を評価するためには、活性成分である結晶性殺虫蛋白 (ICP), つまり $\delta$ -内毒素の作用機作を十分知る必要がある。Heimpel (1967)は、「感受性昆虫がICPを食下すると、昆虫の種類によって異なるが通常 pH10前後のアルカリ性消化液で溶解され毒素蛋白の前駆体(プロトキシン)となる。これがさらに消化液中のプロテアーゼによって分解され活性のある毒素蛋白(トキシン)となって中腸組織が破壊され最終的には敗血症を起こして死亡する」とした。それ以後も $\delta$ -内毒素の作用発現機作についての議論が続けられ、培養細胞を用いて $\delta$ -内毒素の影響を調べる手法なども試みられ、バリノマイシンが $\delta$ -内毒素の活性を阻害する性質 (Angus, 1956) をうまく利用して  $\text{Na}^+$ と  $\text{K}^+$ の存在が活性を発現させるために必須であること (Himeno, 1987, 1988) などの特性が明らかにされた (Honée and Visser, 1993)。

作用機作に関しより新しい研究を行ったのは、ケンブリッジ大学の Ellar らのグループであった (Knowles and Ellar, 1987)。彼らは、 $\delta$ -内毒素の役割は、中腸細胞に対するコロイド状浸透性崩壊 (Colloid-osmotic lysis) をもたらすもので、感受性昆虫の細胞膜に存在する受容体蛋白と $\delta$ -内毒素が種特異的に結合することによって細胞膜に小さな孔 (0.5~1.0 $\mu\text{m}$ ) を生じ、そこからの溶液の侵入が細胞崩壊をもたらすとした。この Ellar らのグループの説をさらに決定づけたのが Li et al. (1991) による $\delta$ -内毒素の構造決定である。彼女らは、甲虫類に活性を持つ $\delta$ -内毒素の1種の CryIII A (Cry3A) の ICP 結晶をX線解析し、 $\alpha$ -helix 部分と  $\beta$ -sheet 部分をもつ3つのドメインからなる内毒素 Cry3A の立体構造を明らかにした。さらに、Ge et al. (1989) がカイコに特異的殺虫活性を示す領域として、Block 3 の N-末端側直前のアミノ酸配列として332番目から450番目を指摘しているが、この部分はドメイン II に位置しており、このためドメイン II のどのアミノ酸が殺虫活性の決定に重要であるか多くの研究者による検討がはじまった (Gilmore and Blobel, 1985)。特に Wolfersberger et al. (1987) によって昆虫の中腸細胞に存在するBBMV (Brush border membrane vesicles) 分画を容易に調整することが可能となってからは受容体蛋白と ICP との結合のメカニズムの解明にも一層の関心が



持たれるようになった(Hofmann, 1988a, 1988b; Garczynski et al., 1991; Gill et al., 1995)。

しかし、受容体蛋白と $\delta$ -内毒素との結合のメカニズムや種特異性の発現機構については、まだ完全な解明に至っていない。Ellar らのグループ(Knowles et al., 1991)は、BT製剤の特徴である標的昆虫に対する $\delta$ -内毒素の種特異性の発現機構についてもコロイド状浸透性崩壊説で説明できるとしていた(Haider et al., 1986)。しかし、BBMVを用いたSDS-PAGEやウェスタンブロットによる実験の結果、各 $\delta$ -内毒素同士や受容体候補のアミノペプチダーゼ N (APN) だけでなく、蛋白分子量の試薬である $\beta$ -ガラクトシターゼ(Sanchis and Ellar, 1993)や、ビオチン化したウシ血清アルブミン(Du and Nickerson, 1996)などとも結合性があることが明らかになってきた。さらに、Satoらのグループは *B. thuringiensis* の受容体候補である APN と $\delta$ -内毒素の結合性を SDS-PAGE やウェスタンブロットで調べる過程で、偶然、蛋白の分子量の試薬であるミオグロビン、並びに遺伝子分析用の試薬であるリボヌクレアーゼ A、炭酸脱水素酵素、グルコース6リン酸脱水素酵素など12種の蛋白も $\delta$ -内毒素のいくつかと結合性を持つことを確認している(佐藤, 1998)。このことは、最初に Ellar らが考えたように、 $\delta$ -内毒素と感受性昆虫の受容体蛋白との結合は、厳密に種特異的に決定されたものではないことを示している。これに対し Ellar らのグループ(Knowles et al., 1991)は、既にN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)やN-アセチルグルコサミン(GluNAc)等の糖鎖の存在が、*B. thuringiensis* の殺虫活性に影響することを報告しており、感受性昆虫の受容体候補である APN にある複数個の N-型糖鎖サイトが、*B. thuringiensis* の殺虫活性や種特異性に影響するとの報告(Denolf et al., 1993; Knowles et al., 1994)を受けて、これらの糖鎖が中腸上皮細胞の浸透崩壊の引き金になるとの説(Carroll et al., 1997) が有力になってきている(Jenkins et al., 2000)。

このように、鱗翅目に活性をもつ $\delta$ -内毒素の中でも Cry1A グループについては、その受容体蛋白候補であるアミノペプチダーゼ N (APN) との結合能や結合部位のアミノ酸配列によりその種特異性や毒性が決定されるメカニズムが解明されはじめている。しかし、同じ鱗翅目に活性のある $\delta$ -内毒素の1種である Cry1C の作用機構の解明は遅れている。これは、その活性発現が Cry1A グループと共通する接続部位を持つだけでなく(Luo et al., 1996)、異なる独特な接合部位を持つとの説 (Sanchis, 1993;

Maagd et al., 1996, 1999, 2000; Park et al., 2000) が報告されていることから伺われる。

さらに, Cry1A グループのコナガ等に対する野外での抵抗性に関しては, 数万倍の程度に達した例も報告されているが, Cry1C に対する抵抗性の発達は, 2~4倍にとどまり, 交差抵抗性も見られない (Tabashnik et al., 1996)。実際の生物検定でも, *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 系統の製剤活性 ( $LC_{50}$ ) は従来の手順どおりの方法でも実施者間の差異が生じにくいのに対し, *B. thuringiensis* serovar *aizawai* 系統の製剤では, 実施者間における活性の差異が起りやすい。従って *aizawai* 系統由来の $\delta$ -内毒素である Cry1C を主成分とするBT製剤では, 生物検定実施にあたり, 実験時の温度, 照度等の条件に対しより厳密な操作手順を定める必要がある。また, もし $\delta$ -内毒素間で活性発現のメカニズムが異なれば, BT製剤の生物検定時の力価を適正に評価する上で障害となる条件が変化することが予想される。従って, このように力価の正確な評価にとって障害になると考えられる他の要因の解明についても, BT製剤 (特に *B. thuringiensis* serovar *aizawzi* 系統) の品質を適正に管理する上で重要である。以上の理由から, 本研究では主に *B. thuringiensis* serovar *aizawai* 系統の製剤を用いて生物検定を実施し, BT製剤のカイコに対する殺虫活性 (力価) に影響を与える緒要因について検討し, その結果をもとに今後の品質管理のあり方について論じた。

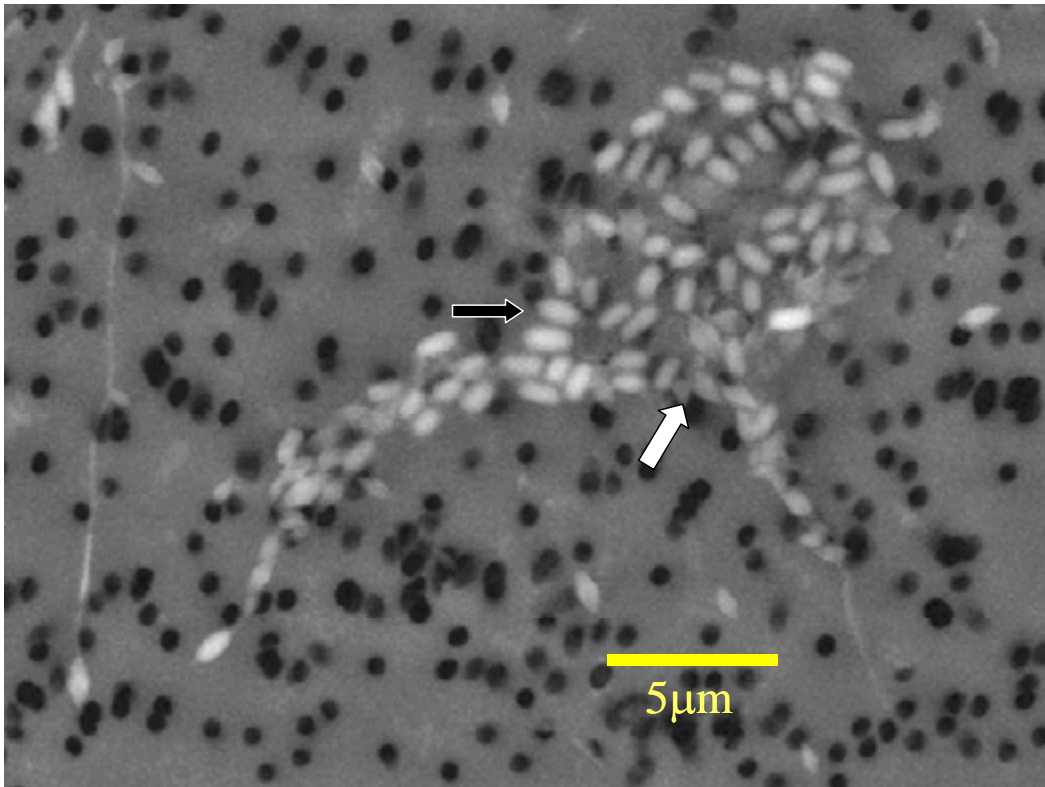


Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* spores and toxin crystals on culture medium. Specimen was applied by the low-vacuum SEM freeze-drying method (Suzuki et al., 1995). <: spore; ↑: toxin crystal.

Table 1. Estimated potency and appraisal of four BT formulation self-standard samples determined by the manufacturers and by Agricultural Chemicals Inspection Stations (ACIS) with a silkworm bioassay (Aizawa, 1973) in 1996.

	Manufacturer		ACIS		Appraisal <sup>c</sup>	Factors (Presumption)
	PV <sup>a</sup>	Slope <sup>b</sup>	PV <sup>a</sup>	Slope <sup>b</sup>		
1	1000	2.72	1700 (1,483–2,007)	3.67	B	Diet <sup>d</sup> , Dark
2	1000	5.29	925 ( 575–1,080)	5.10	A	Diet
3	1000	4.21	1,409 (1,276–1,603)	5.42	B	Diet <sup>d</sup>
4	1000	4.15	916 ( 815–1,022)	5.23	A	Diet

<sup>a</sup> Potency value:  $PV$  (*Bombyx mori* unit, BmU) = (ACIS's  $LC_{50}$ /Manufacturer's  $LC_{50}$ )  $\times 10^3$

<sup>b</sup> Regression line slopes

<sup>c</sup> A: Both intercepts and slopes of each regression line are not significantly different, B: Slopes are not significantly different in the likelihood ratio tests (Russell et al., 1977) at  $p \leq 0.05$ .

<sup>d</sup> Commercial artificial diet was used.

## 第1章 長期保存後のB T製剤の劣化と殺虫活性

### 1-1 長期保存によるB T製剤の劣化の有無

生物検定法で用いられるB T製剤の標準品は製剤の品質を管理する上で重要であり標準品は長期間品質が安定していることが前提となっている。

B T製剤の活性を低下させる要因としては、野外においては紫外線及び紫外線と乾燥の複合的影響が知られている (Ignoffo et. al, 1977; Morris, 1983; Choen, 1991; 宮園ら, 1998 ; de León et al., 1995)。このため紫外線による影響を考慮して、すべての標準品は全暗下での保存が義務づけられている。Heimpel(1967) 及び岩花(1987)は、B T製剤や*B. thuringiensis* 菌の殺虫活性の保存性が5-10年間にわたっても安定であったと記述している。しかしながら、5℃、全暗下(紫外線遮蔽)において10年以上もの長期保存された製剤の劣化の有無については、ほとんど報告例がない。

したがって、本章では17年~22年にわたって保存されていた標準製剤と新剤を生物検定法により比較し、規格実験法として同法の評価を行い、また、長期保存がB T製剤の活性低下の要因となり得るかどうかを検討した。また長期保存による影響が認められた場合にはその原因を特定し保存方法(設定温度等)も含めた評価法の改善に役立てることとした。

#### 材 料 お よ び 方 法

##### 1. 供試B T製剤

長期保存標品とはカイコ幼虫に対して保存開始時に1000相当の力価と濃度-致死回帰直線式が確認されている標準製剤である。このようにして長期保存された標品のうち、今回の試験に用いた3種4標品については、いずれも保存期間が15年を越えた長期保存標品である。また、本項の実験に用いた長期保存標品及び同新剤の製造所、商品名、保存条件および*B. thuringiensis* の系統は以下の通りである。なお、B0-79F, B0-75, S0-74, SN-96の各標品については劣化の有無の確認のために、SDS-PAGE泳動による分析に使用した。

- (1) 長期保存標品(製造後の保存期間が15年以上)

バシレックス水和剤 1 (塩野義製薬株式会社, serovar *kurstaki*及び  
*aizawai* 混合製剤) ( - 80°C, 全暗, 17年保存) : **B0-79F**

バシレックス水和剤 2 (塩野義製薬株式会社, serovar *kurstaki*及び  
*aizawai* 混合製剤) ( 5°C, 全暗, 21年保存) : **B0-75**

セレクトジン水和剤 (協和発酵株式会社, serovar *aizawai* 製剤) ( 5°C,  
全暗, 22年保存) : **S0-74**

ダイポール水和剤 (住友化学工業株式会社, serovar *kurstaki*製剤)  
(5°C, 全暗, 18年保存) : **D0-80**

( 2 ) 新剤 (製造後の保存期間が 2 年以内, 5°C 保存)

バシレックス水和剤 (塩野義製薬株式会社, serovar *kurstaki*及び  
*aizawai* 混合製剤) (新剤) : **BN-96**

セレクトジン水和剤 (協和発酵株式会社, serovar *aizawai* 製剤) (新剤)  
: **SN-96**

ダイポール水和剤 (住友化学工業株式会社, serovar *kurstaki*製剤) (新  
剤) : **DN-96**

## 2. 供試虫

鐘紡シルク (株) より購入のカイコ (春嶺×鐘月) の卵を, 湿度 90%,  
25°C, 16L-8Dの長日条件下でふ化させ, 透明アクリルケース ( 2 5 × 3 0 × 5  
c m ) の底に保湿のためのペーパータオルを敷き, 1 ケースあたりふ化幼虫が  
500 ~ 800 頭になるように入れて, 湿度 40% 程度の恒温器内で自家調整の人工  
飼料を与え 3 令まで飼育した。飼育に当たっては恒温器内の照度, 餌条件によ  
り幼虫の生育度合い (特に令期) や生体重に大きな差が生じないように細心の注  
意を払った。また供試の幼虫については大きさを出来る限りそろえるため平均  
的な体長のものを目視により選別して用いた。

## 3. 人工飼料

ここで使用する人工飼料は農薬検査所において力価検定に用いる標準飼料  
(以下 S T N 飼料) でその組成, 購入先および調合法は, 以下の通りである。

乾燥クワ葉粉末（片倉工業株式会社，東京）50g，乾燥ダイズ粉末（同左）25g，しょ糖（和光純薬工業株式会社，大阪）5g，L-アスコルビン酸（関東化学株式会社，東京）2g，クエン酸（同左）3g，セルロース粉末(Whatman international Ltd, USA) 10g，寒天粉末（関東化学工業株式会社，東京）5g，ソルビン酸（和光純薬工業株式会社，大阪）0.2g，サリチル酸（国産化学株式会社，東京）0.25g，アクリル酸（和光純薬工業株式会社，大阪）0.25g，および蒸留水 233ml（なお，クワ葉粉末，乾燥ダイズ粉末，蒸留水以外はすべて試薬特級品を使用した）。上記の成分を全て混合した後に電動攪拌機で1時間攪拌した後120℃で15分間オートクレーブを用いて滅菌加熱した。人工飼料は5℃の冷蔵室内で試験時まで保存した。調整済み飼料は，保存期間が長くなるとやや硬化しカイコの摂食量が減少する懸念があったので，（ふ化予定日にあわせて）出来るだけ実験直前に調整し，1ヶ月以内に使い切るよう心がけた。

#### 4. 検定手順及び結果の判定

検定の手順及び結果の判定は，鮎沢の方法(1978)をもとに設定された手法（BT剤研究会，1973）に準拠して実施した。希釈濃度は公定試験法に基づき7/10倍希釈で7段階制とし，希釈開始濃度は予備試験の結果によって中央致死濃度（ $LC_{50}$ ， $\mu\text{g/g diet}$ ）が第4希釈区に合致するように設定した。このようにして準備作成された希釈液を10gの公定餌に各0.5mlずつ滴下しステンレス製のスプーン等でよく攪拌した後，これを9cmのペトリ皿中に2～3mmの厚さに均一に塗り広げた。それぞれの濃度区毎に30頭（10頭×3皿）ずつ，3令2日目のカイコ幼虫を供試し，25℃，16L-8Dに設定された恒温器内で保存後3日目に幼虫の致死数を確認した。さらにBT希釈液が混入されていない新鮮な公定餌に入れ替え，さらに2日後（試験開始後5日目）に致死虫数を算定し，これらを足して総致死虫数を求めた。BT標品の殺虫活性については保存開始時の記録と濃度－致死回帰直線式を統計プログラムであるPolo-Pc (LeOra software, 1987)を用いて算出し比較した。

#### 5. SDS-PAGEによる $\delta$ -内毒素前駆体蛋白の検出

製剤試料 30 mg を採取し、蒸留水を加えて 300  $\mu$  l (10倍希釈) とし、倍量の調整済みサンプル・ミクスチャー液 (第一化学, 東京) を加えて混合し、沸騰水浴中で 5 分間加熱した。冷却後遠心して上清を分析に用いた。ミニゲルサイズのドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) によって、各レーンあたり 20  $\mu$  l ずつマウントし泳動した。泳動は市販の調整済み 4-20% グラジエント・ゲル (第一化学社製) を使用し、蛋白質の検出は coomassie brilliant blue を用いる色素結合法 (Bradford, 1976) で行い、泳動後のゲルを波長 600nm (CS-9300PC, 島津製作所) でスキャンした。

## 結果 および 考察

### 1. 長期保存された 4 標品のカイコに対する殺虫活性

長期保存標品とその新剤を生物検定によって活性を比較したところ、全暗、5  $^{\circ}$ C 条件下で 22 年間保存されていた *B. thuringiensis* serovar *aizawai* 系統単一製剤の長期保存 S0-74 製剤の  $LC_{50}$  値は、15.4  $\mu$ g/g diet で、新剤 SN-96 の  $LC_{50}$  値は 18.6  $\mu$ g/g diet でほぼ同じであった。

また、*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 系統単一製剤の長期保存 D0-80 製剤の  $LC_{50}$  値は 6.0  $\mu$ g/g diet であり、同新剤 DN-96 では 5.1  $\mu$ g/g diet であったことから、本標品についてもほぼ同等の殺虫活性が認められた (Table 2)。

一方、*B. thuringiensis* serovar *aizawai* と *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* の 2 系統混合剤の長期保存標品 B0-75 (5  $^{\circ}$ C 保存) の  $LC_{50}$  値は 52.0  $\mu$ g/g diet であり、同新剤 BN-96 の 19.8  $\mu$ g/g diet に比して活性は約 1/3 に低下していた。しかしながら、超低温下 (-80  $^{\circ}$ C) で 17 年間保存された長期保存標品 B0-79 F の  $LC_{50}$  値は 23.2  $\mu$ g/g diet であり、BN-96 の 19.8  $\mu$ g/g diet とほぼ同じ活性を保持していた (Table 2)。

### 2. SDS-PAGE による $\delta$ -内毒素の前駆体蛋白の比較

上述の生物試験の結果を確認するために、SDS-PAGE による  $\delta$ -内毒素の前駆体量の比較を行った (Fig. 2)。使用した B T 製剤 3 剤中に有効成分として含有さ



れている $\delta$ -内毒素として Cry1Aa , Cry1Ab , Cry1Ac , Cry1C , Cry1E などが考えられるが、これらの $\delta$ -内毒素のうちで、カイコに対し殺虫活性があるのは、Cry1Aa(前駆体の分子量= 130kDa) およびCry1C(同左= 135kDa) の2種類のみで、他のトキシンの活性は低く、カイコに対する殺虫性はこれらの2種の $\delta$ -内毒素によって起こる (Crickmore et al., 1998; Yaoi et al., 1997)。

泳動後、 $\delta$ -内毒素の前駆体蛋白 (130-135kDa) は5℃下での長期保存によっても劣化しなかった *B. thuringiensis* serovar *aizawai* 系統の単一標品の泳動結果は、新剤 SN-96 も長期保存後の S0-74 もほぼ同量の前駆体蛋白が確認された (Fig. 2 , Fig. 3)。

一方、5℃下の長期保存によって殺虫活性 ( $LC_{50}$ ) が低下した *B. thuringiensis* serovar *aizawai* と *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* の2系統混合剤 (B0-75) と超低温下の -80℃で保存された B0-79 F を比較すると、-80℃で保存された B0-79 F では、S0-74 やその新剤 (SN-96) と同等以上の十分な量の前駆体蛋白の存在が確認された (Fig. 2, Fig. 3)。しかしながら、 $LC_{50}$  の低下がみられた B0-75 製剤では $\delta$ -内毒素の前駆体蛋白はほとんど検出されず、前駆体蛋白の量が超低温下の -80℃で保存された B0-79F に比べて明らかに少ないことが示された (Fig. 2, Fig. 3)。

従って、この結果は5℃で保存された混合製剤のみ長期保存により劣化すると判断され、生物検定による  $LC_{50}$  値の低下と一致した。

以上から考察すると、単一系統の長期保存標品では、全暗下、5℃保存で20年以上の保存が可能であるが、2系統混合剤の場合には同じ5℃の保存では活性が劣化する原因になることから、BT製剤の生物検定に使用する標準品を保存する場合のように、長期保存による影響を避ける必要のある場合の保存には、-80℃での超低温条件下で凍結して保存する必要があると結論される。

そして、このような条件下で保存されたBT製剤は15年以上にわたって標準品として使用できることが判明し、BT製剤の生物検定による品質管理に特に問題なく利用できると思われる

Table 2. Insecticidal activity of BT formulations stored for different lengths of time.

BT samples	LC <sub>50</sub> (µg/g diet)	Regression lines <sup>1</sup>	Storage conditions and length (years)
<sup>2</sup> SO-74	<sup>3</sup> 15.4 (14.2–16.6)	Y=4.6X-0.4	5°C (22)
SN-96	18.6 (16.8–20.7)	Y=4.3X-0.4	5°C (<2)
BO-75	52.0 (46.1–59.5)	Y=2.2X+1.3	5°C (21)
BO-79F	23.2 (21.5–25.0)	Y=4.1X-0.5	-80°C (17)
BN-96	19.8 (18.3–21.4)	Y=3.3X+0.8	5°C (<2)
DO-80	6.0 ( 5.3– 6.7)	Y=3.9X+2.0	5°C (18)
DN-96	5.1 ( 4.8– 5.5)	Y=3.8X+2.3	5°C (<2)

<sup>1</sup> Y=aX + b. X: Log concentration (µg/g diet). Y: probit.

<sup>2</sup> SO-74: Selectzin® (a formulation of Cry1C) stored for 22 years at 5 °C, SN-96: Selectzin® stored for less than two years at 5 °C, BO-75: Bacilex® (a mixed formulation of Cry1C and Cry1Aa) stored for 21 years at 5 °C, BO-79F: Bacilex® stored for 17 years at -80 °C, BN-96: Bacilex® stored for less than two years at 5 °C, DO-80: Dipole® (a mixed formulation of Cry1Aa) stored for 18 years at 5 °C, DN-96: Dipole® stored for for less than two years at 5 °C.

<sup>3</sup> Values in parentheses are 95% confidence limits.

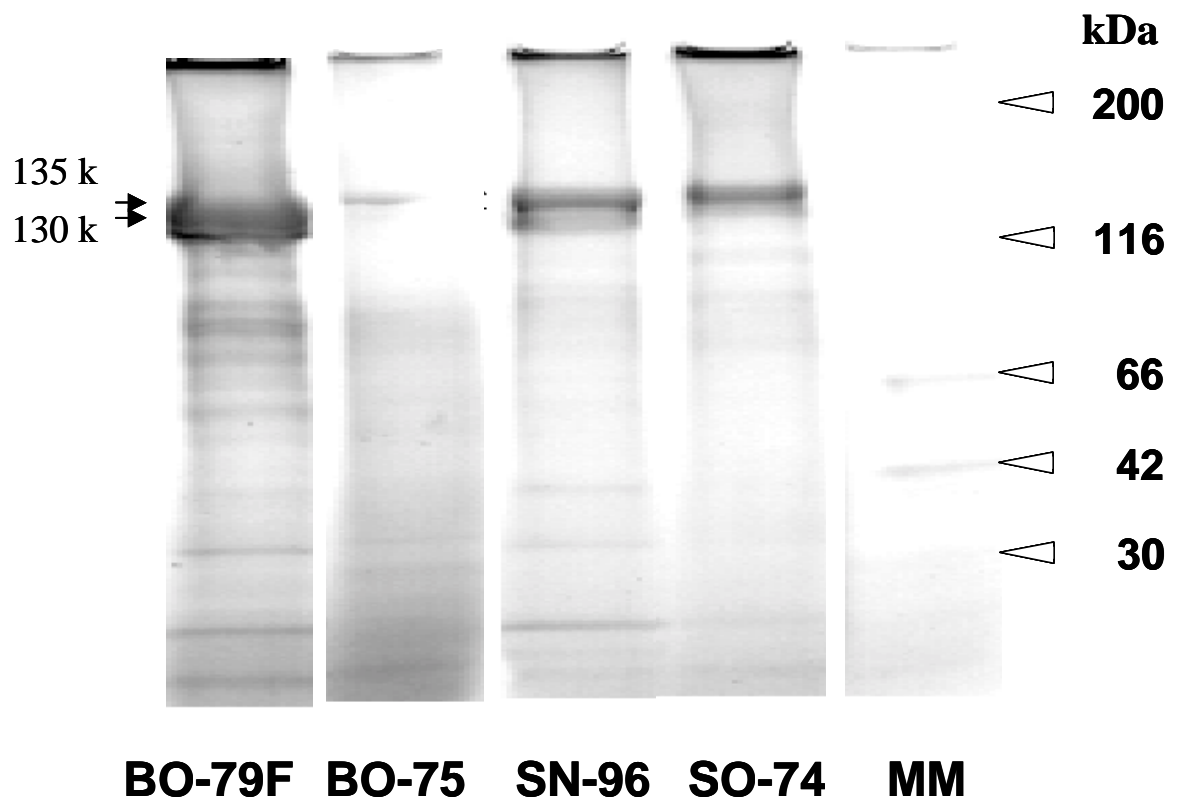


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of the toxin protein from BT formulations stored under various conditions. Gel was stained with commassie brilliant blue. BO-79F: Bacilex®(a mixed formulation of Cry1C and Cry1Aa) stored for 17 years at  $-80^{\circ}\text{C}$ , BO-75: Bacilex® stored for 21 years at  $5^{\circ}\text{C}$ , SN-96: Selectzin® (a formulation of Cry1C); stored for less than two years at  $5^{\circ}\text{C}$ , SO-74: Serectzin® stored for 22 years at  $5^{\circ}\text{C}$ . MM: molecular marker.

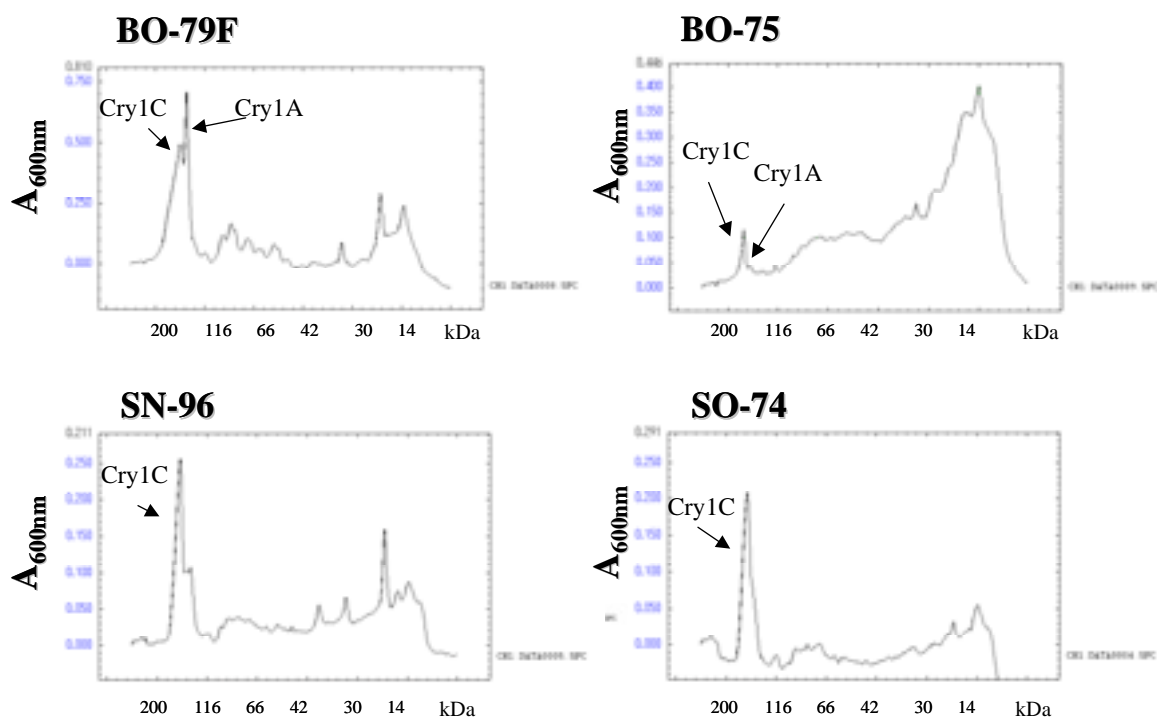


Fig. 3. Densitometric scanning charts of proteins in BT formulations on SDS-PAGE as shown in Fig 2.

## 1-2 走査型電子顕微鏡による劣化製剤の観察

前項の結果から、2系統混合剤を5℃で長期保管したB0-75製剤ではLC<sub>50</sub>が有意に低下することが明らかとなった。またSDS-PAGEによってδ-内毒素蛋白を検出した結果、δ-内毒素、特にCry1Aaの大幅な減少が認められた。しかし同じ剤種の製剤を超低温下(-80℃)で凍結保存したB0-79Fの場合には、このような顕著なLC<sub>50</sub>の低下やδ-内毒素の減少は起こらず、この製剤の活性の低下は5℃下で保存した場合のみ問題になることが示された。

もし製剤中で何らかの劣化現象が起きたとすれば、電子顕微鏡の観察(井上・永武, 1987; Anderson, 1951)によっても、製剤顆粒になんらかの形態的な変化があると考えられた。ICPの観察のために電子顕微鏡観察を行ったのはHannay and Fitz (1955)で、ほとんどの*B. thuringiensis* 亜種における透過型電子顕微鏡による結晶形態の観察も行われているが(Faust et al., 1982), *B. thuringiensis* のICPの結晶形態を明らかにするには走査型の方が明瞭であると言われる(飯塚, 1997)。また最近では低真空走査型電子顕微鏡(LV-SEM)が改良され使いやすくなっている上に、化学固定や脱水及び乾燥等の面倒な準備操作が不要な観察方法も報告されている(鈴木ら, 1995; 氏家ら, 1995)。従って、この方法をBT製剤の観察に利用することによって、製剤の表面構造や芽胞や結晶性毒素を傷つけず、しかも簡単に観察できる可能性が期待された(Matsumoto et al., *in press*)。

そこで、この簡便な方法を用いて劣化した標品と活性低下のない標品を比較し、生物検定による活性低下の形態的な証拠を探索した。

### 材料及び方法

#### 1. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察用標品の準備

1-1の実験で長期間の5℃下での保存によって殺虫活性が低下した製剤B0-75, 長期間保存されたにもかかわらず殺虫活性が低下しなかった超低温下(-80℃)保存のB0-79F, 並びにB0-79Fの1部を3ヶ月間5℃下で保存した製剤B0-79F+を観察用試料とした。標本の作製には、化学固定や脱水, 乾燥およびコーティング等の準備操作が不要な手法(鈴木ら, 1995)を一部改良して用い

た (Matsumoto et al., *in press*)。試料台上に貼り付けたカーボン製両面テープ上に製剤粉末 1mg を接着し液体窒素で急速凍結させ、LV-SEMの低真空設定下で製剤標本をマウントし、BT製剤顆粒表面の形状を観察した。反復として各標品の最低3カ所からサンプルを採取し観察に用いた。

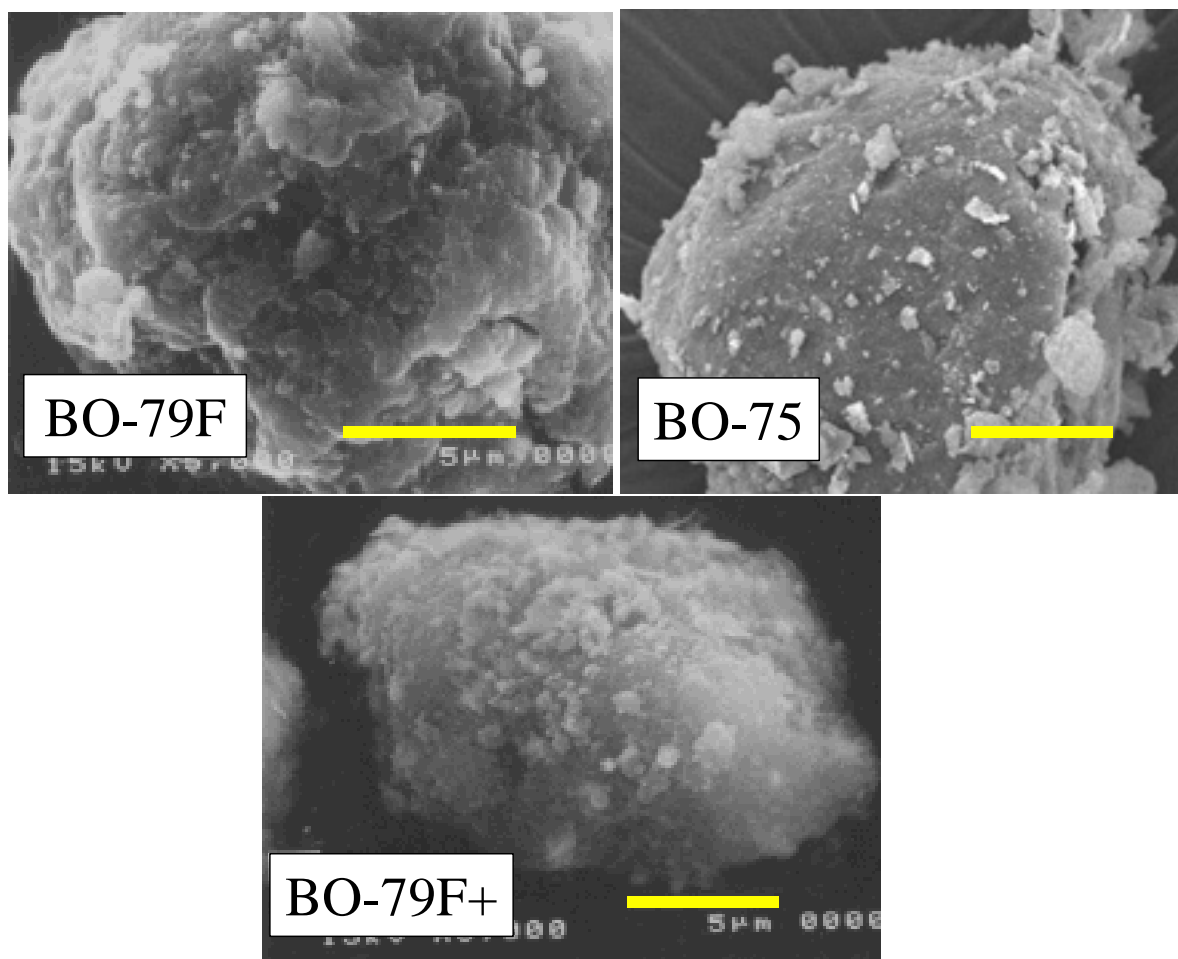
また、固定後の標本は必要に応じて高真空条件下(15kV)で高倍率(×5000～×15000倍)において観察した。観察には日本電子株式会社製のLV-SEM (JSM5300LV)を用いた。また、製剤表面の帯電状況から電子像に支障が生じた場合には適宜白金蒸着(40mA, 90sec.)を行った。

## 結果 および 考察

異なる条件下で保存されたBT製剤顆粒表面を走査型電子顕微鏡を用いて観察した結果をFig. 4に示した。

-80℃の凍結保存によって17年間活性低下なしに保存されてきたB0-79Fでは、観察したすべての製剤顆粒の表面には破損や崩壊等の劣化の徴候は認められなかった(Fig. 4)。一方、5℃下で21年間保存され $LC_{50}$ が低下していたB0-75では、顆粒表面層の大部分が崩壊し、剥離し脱落していた(Fig. 4)。また、前述のとおり-80℃で17年間保存されたB0-79Fの一部を、3ヶ月間5℃に移して保存したB0-79F+の観察では、B0-79FとB0-75の中間的な顆粒が多く観察され、両標品の中間的な形態を示していた(Fig. 4)。これは、同製剤を5℃下保存した場合には製剤顆粒の表面が速やかに破損し、その結果、 $LC_{50}$ が低下したと考えられた。

また、このLV-SEMを利用した簡易観察法を利用すれば、化学固定や脱水、乾燥等の面倒な準備操作が省略でき、しかもBT製剤の表面構造にほとんど悪影響を与えず観察出来ることから、BT製剤の剤種の確認や品質の確認のために非常に有力なツールとして役立つと考えられた。



**Fig. 4. Scanning electron micrographs of outer surface of BT granule stored under different conditions. Abbreviations are as shown in Fig. 2. BO-79F+: additional storage of BO-79F for 3 months at 5 °C. Scale bars = 5  $\mu$ m.**

## 第2章 カイコの人工飼料成分の殺虫活性への影響

前章ではBT製剤の品質管理のためにより安定で精度の高い生物検定法確立するために不可欠なBT製剤の自己標品の更新作業の中で長期保存性に関して、その影響と程度につき検討をおこなった。

本研究の発端となった標準製剤の測定力価が製造所と登録検査機関である農薬検査所間で一致しない事例があった(Table 1)が、ここで見られた差は生物検定法(BT剤研究会, 1973)に定められた実験条件下で起こったもので、差が認められた2製剤ではいずれも長期間の保存によつては劣化を示さなかった製剤であり、また保存期間も2年以内で短いこと、さらに長期保存が原因で殺虫活性が劣化した場合と異なり、農薬検査所における殺虫活性の方が製造所の値よりも高く測定されたことから、この原因は少なくとも保存条件の影響ではないと結論された。また本実験に先立って実験条件が公定法に定められたとおり実施されたことも確認してあることから、この差異の原因が、検定に使用する人工飼料によるものではないかと考えられた。そこで本章においては、飼料成分がBT製剤の殺虫活性に影響を及ぼすかという点に焦点をあてて検討した。

市販人工飼料中の成分は公表されておらず、また人工飼料の嗜好性や生育への影響については多くの報告があるものの人工飼料の差異が*B. thuringiensis* 菌の殺虫活性に及ぼす影響に関する報告はない(林屋, 1975; 浜村, 1975; 鮎沢, 1978)。このためカイコの飼育用として一般に販売されている人工飼料(SM2: 日本農産工業)、またハスモンヨトウなど他の鱗翅目幼虫飼育用に販売されている人工飼料(LF: 日本農産工業)及び殺虫活性に差が認められた2社がBT製剤検査用として購入・使用した公定飼料と全く同組成の人工飼料(M50: 日本農産工業)をもちいて活性を調べ、農薬検査所の自家調整による公定飼料(STN)を使った結果と比較した。



## 2-1 異なる人工飼料を用いた場合における活性の変化

生物検定法(Aizawa, 1976)に人工飼料は不可欠な資材である(Singh, 1977; 鮎沢, 1978)。しかし成分調整済みの人工飼料を用いて検定用のカイコを飼育した場合には殺虫活性(LC<sub>50</sub>)に差が認められる場合があり(Table 1), 嗜好性や生育の違い(伊藤, 1959), クワ葉育と人工飼料育の相違(林屋ら, 1968, 1971, 1976)やクワ葉粉末の大きさ(岡田ら, 1977)がBT製剤の殺虫活性に影響する例も知られることから, 飼料成分中の乾燥クワ葉, 乾燥ダイズ粉末などが*B. thuringiensis* 菌の殺虫活性に影響を及ぼし, BT製剤の適正評価の障害になる可能性がある。

そこで, 本項ではカイコの飼育用として一般に販売されている人工飼料(SM2), ハスモンヨトウなど他の鱗翅目幼虫の飼育用人工飼料(LF), 公定飼料と全く同一組成に調整済みの市販人工飼料(M50)の3種類の人工飼料と自家調整による人工飼料(STN)を用いて殺虫活性(LC<sub>50</sub>)を比較した。

### 材料及び方法

#### 1. 供試虫

鐘紡シルク(株)より購入したカイコ卵(春嶺×鐘月)を湿度90%, 25°C, 16L-8Dの長日条件下で, ふ化させ, 湿度40%程度の恒温器内で公定餌STN及びM50飼料を与えて3令まで飼育した。飼育に当たっては, 恒温器内の照度, 餌条件により両飼料育による幼虫の生育度合い(特に令期), 餌の違いによって生体重に大きい差が生じないように細心の注意を払った。

#### 2. 人工飼料

人工飼料は第1章の組成で混合調整した人工飼料を, 全暗, 5°Cの冷蔵庫に保存しておき, 随時飼育と試験に用いた。また比較のために用いた人工飼料は以下のとおりである。

##### (1) STN飼料

(クワ葉および乾燥ダイズ粉末については片倉工業(株)より購入)

##### (2) BT剤研究会指定調整済みM50飼料

(3) 2～3令用市販人工飼料シルクメイト2 (SM2)

(4) 一般鱗翅目等飼育用の市販人工飼料インセクタLF (LF)

なお、(3)および(4)の飼料の組成については公表されていないため、販売会社の公表資料および Ito and Inokuchi (1992) から推定した(Fig. 5)。

### 3. 供試製剤

市販のゼンターリ水和剤 (トーマン株式会社; *aizawa*株,  $\delta$ -内毒素 Cry1Cを主成分とする)を滅菌蒸留水で浮遊希釈して用いた。実験に用いた製剤の $LC_{50}$ および回帰直線式はあらかじめ生物試験によって確認してから用いた(回帰式: $Y=4.5X+3.4$ ,  $LC_{50}:2.5 \mu\text{g/g diet}$ )。

### 4. 検定手順及び効果の判定

1-1に同じ

### 結果 および 考察

$LC_{50}$ は、STN, M50, SM2, LFでそれぞれ, 2.47, 3.44, 3.27, 5.40  $\mu\text{g/g diet}$ となり, 活性は $STN > SM2 = M50 > LF$ の順番となった。中でもLF飼料を用いた場合には,  $LC_{50}$ がSTNの約2倍となり, この人工飼料にはBT製剤の殺虫活性を低下させる成分が含まれている可能性が示唆された (Fig. 6)。また, SM2およびM50飼料においても活性の抑制が認められたが, M50に関しては防腐剤や抗生物質は添加されておらず, STNと成分構成比も全く同じであり, SM2では防腐剤や抗生物質が添加されていることとクワ葉の量が少ないことがSTNとの違いである。これらの結果から, 少なくともM50に含まれる抑制成分はSTN飼料にも含まれている飼料成分であるクワ葉, ダイズ粉末に由来したものであろうと推察された。さらにM50とSM2ではクワ葉の量が2倍も異なるにもかかわらず, 殺虫活性はほぼ等しいことから, クワ葉の量が影響したのでもないと考えられた。以上から生物検定時の殺虫活性(力価)に影響を及ぼす原因が乾燥

脱脂ダイズ粉末である可能性が強く示唆された。しかし、使用されたカイコ用市販人工飼料(STN, M50)では、カイコの嗜好性や生産性が考慮されており、カイコの摂食や嗜好性がやや劣る公定の人工飼料(STN)とは摂食量に差が生じることも考えられ、毒素取り込み量とも関連するカイコの摂食量を併せて調査する必要があると考えられた。

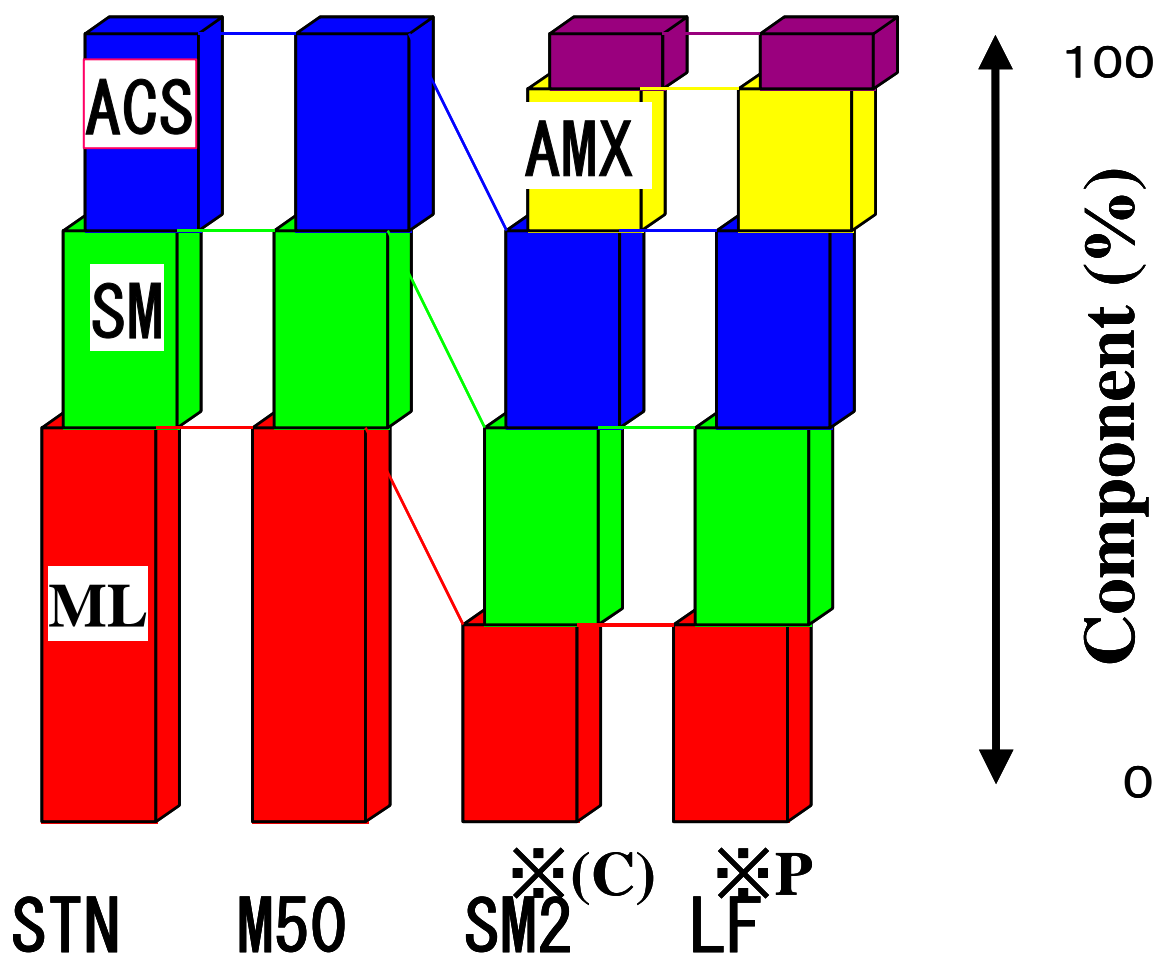


Fig. 5. Comparison of artificial diets used in the test.

ML: mulberry leaf powder, SM; defatted soybean meal. ACS; agar, cellulose and sucrose, AMX; amino acid mixture, CST; corn starch, \* contained antibiotics, antiseptics, and other additives (i.e. P = Propionate, C = Casein) [from Ito & Inokuchi (1992)].

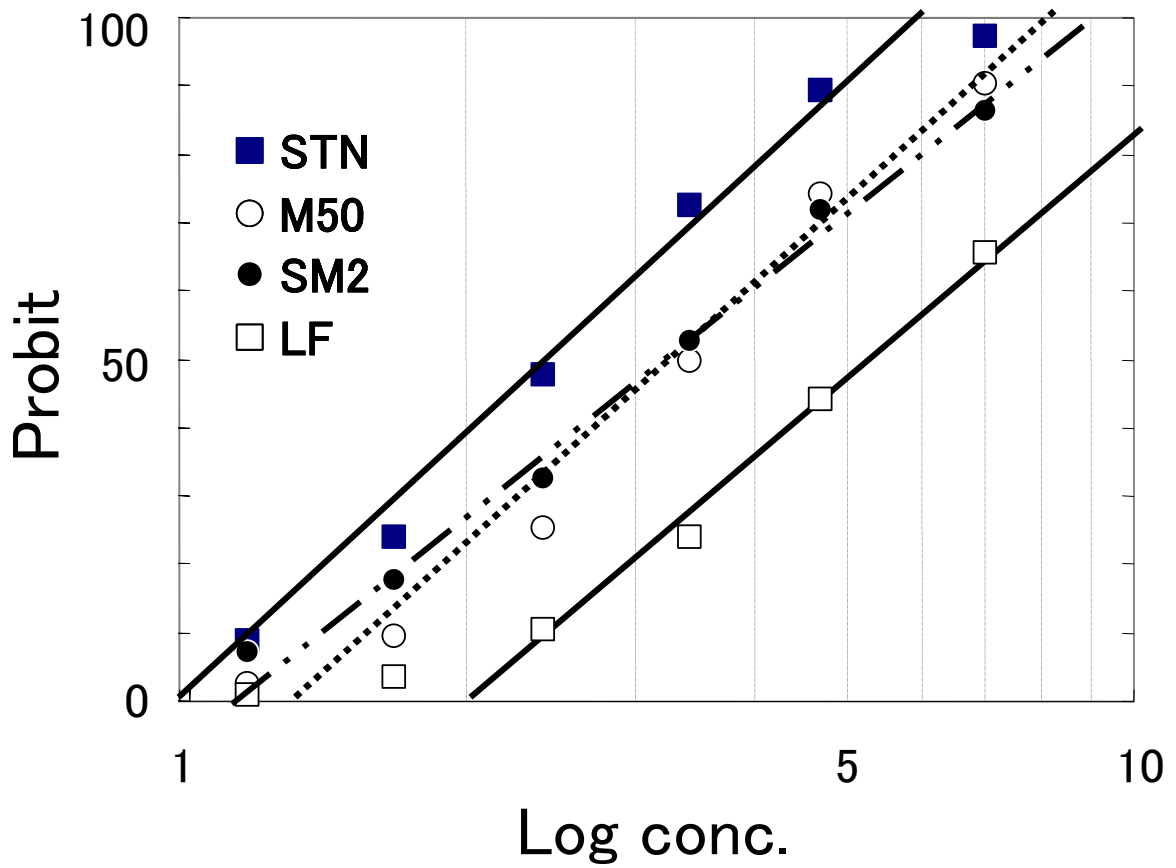


Fig. 6. Relationship between the toxicity and concentration of BT formulation applied with different artificial diets (STN, M50, SM2, LF).

## 2-2 ダイズ蛋白の違いによる殺虫活性の変化

公定人工飼料に用いられている成分は、水を除くと10種類程度で、その中のクワ葉粉末と乾燥脱脂ダイズ粉末以外はすべて試薬特級品が用いられている。クワ葉には赤色蛍光蛋白と呼ばれる抗菌性の蛋白が含まれることが報告されており（西田ら, 1973; 西田, 1974; Mukai et al., 1969), クワ葉の量がBT製剤の活性に影響する可能性も考えられた。しかし, STN餌とクワ葉の添加量が同量のM50餌と, 添加量が半分のSM2飼料を比較試験した結果(前項), この二者には有意な活性上の差異が認められず, 殺虫活性に対するクワ葉の影響は少ないと判断された。そこで, もう一つの成分である乾燥ダイズ粉末の殺虫活性への影響を本項では生物検定法で検討した。人工飼料によく使用される栄養成分の一つである乾燥脱脂ダイズ粉末は, 含有アミノ酸の種類と量の点でクワのそれとよく似ており良好な蛋白源であることが知られていること(伊藤, 1970; 新村, 1974), また乾燥重量比でも本人工飼料の約25%を占め(Fig. 5), その特性に大きな影響を与える可能性がある。本項では異なる製造所及び異なる製造法によった3種類の乾燥ダイズ粉末標品を用いて人工飼料をつくり, 成分の違いが実際にBT製剤の殺虫活性影響を与えるかを検証した。

## 材料および方法

### 1. 供試虫

1-1に同じ

### 2. 試製剤

前項と同様、市販のゼンターリ水和剤（トーマン株式会社; *B. thuringiensis* serovar *aizawai* 系統,  $\delta$ -内毒素 Cry1C を主成分とする)を使用した。

### 3. 人工飼料の調整

人工飼料の調製にあたっては、ダイズ以外の人工飼料の組成及び購入先は1-1の材料及び方法と同じであるが、人工飼料に混ぜる乾燥ダイズ粉末の種類のみを以下のとおりとした。なお、1)のSTN飼料は、1-1で混合調整したものをそのまま用いた。

- 1) STN: 従来から農薬検査所内で使用されている乾燥ダイズ粉末（片倉工業より購入した）で、搾油方法等は非公開で詳細は不明。（ダイズ種子に含まれるトリプシン・インヒビターがカイコの成長に悪影響を与えるのを防ぐ目的から、搾油時に蒸気加熱して製造された可能性がある）。
- 2) SP2: 日本農産工業（製造は日清コスモフーズ）製の、比較的低温度で搾油する方法により製造された飼料用に販売されるダイズ粉末。蛋白の変性度を示すNSI(窒素溶解性指数)は3)よりやや高く30%以上である。
- 3) SP600: SP2と同じ日清コスモフーズが製造した脱脂粉末で、搾油後さらに糖類が多く含まれるホエイ(whey)と呼ばれる溶解性成分を抽出し、蛋白をより濃縮した食用ダイズ粉末。蛋白の変性度を示すNSIは30%以下と最も低く抑えられている。

### 4. 生物活性試験

カイコに対する生物活性試験は、標準試験法（BT剤研究会, 1973; Aizawa, 1976）に準拠し実施した。また本実験では各個体の食餌量やBT製剤による生長抑制効果を明確にする必要があったためすべて滅菌済24穴マルチプレートを用いた個別供試法(松本, 1999, 2000)で行った。

まずBT製剤を秤量し、滅菌蒸留水によく攪拌して浮遊させた。希釈液はあらかじめ生物試験で確認した製剤の $LC_{10}$  (1.25  $\mu\text{g/g diet}$ ),  $LC_{50}$  (2.5  $\mu\text{g/g diet}$ ),  $LC_{90}$  (5.0  $\mu\text{g/g diet}$ )値となるよう3段階の濃度に調製した。透明ガラス製蒸発皿に10gの人工飼料を入れ、これに0.5 ml ずつ各製剤希釈液を入れスパーテルを用いて均一に混合した。対照区は同種の飼料に同量の滅菌蒸留水を加えて用意した。

上述処理を行った人工飼料の小片をマルチプレート1穴あたり約200 mg ずつ入れ、各1頭ずつ3令2日目のカイコ幼虫を入れた。実験は処理(濃度)ごとに10頭ずつ最低6反復(60頭)行った。同供試虫はマルチプレートに入れたまま、 $25\pm 1^\circ\text{C}$ の恒温器内(80-120 lx)で3日間飼育した後、幼虫の体重・残餌量を記録した後BT製剤を含まない餌に入れ替え、さらに2日間継続飼育し、幼虫の致死頭数を調査した。得られた致死頭数からプロビット法(Finney, 1971)を用いて $LC_{50}$ 値および濃度と致死率の回帰直線式を求めた、なお分析には統計プログラムであるPolo-PCを用いた。

## 結果および考察

乾燥ダイズ粉末のみ異なる3種の人工飼料を用いてそれぞれの殺虫活性を測定した結果、 $LC_{50}$ 値になるよう人工飼料中のBT製剤の含有量を、2.5  $\mu\text{g/g diet}$ に調製した希釈液を投与した場合の供試虫の致死率は、STN ( $50.3\pm 3.9\%$ ) > SP2 ( $30.7\pm 0.9\%$ ) > SP600 ( $13.1\pm 1.7\%$ ) となり、従来用いられてきた乾燥ダイズ粉末(STN)を使用した場合がもっとも高く、他の2種の乾燥ダイズ粉末(SP2およびSP600)を用いた場合には、致死率が低下した。また、最も活性が低くなったSP600を、STNに対し等量に混合・調製した人工飼料(STN+SP600, 1:1)では、致死率はSTNとSP600の中間の $28.3\pm 1.1\%$ であった(Table 3)。

異なるダイズ粉末を使用した人工飼料の $LC_{50}$ 値および直線回帰式を比較したところ、 $LC_{50}$ 値に関しては、STN (2.41  $\mu\text{g/g diet}$ ) > SP2 (3.02  $\mu\text{g/g diet}$ ) > SP600 (3.38  $\mu\text{g/g diet}$ ) で、STNとSP2, SP600間には有意な差が認められた。また回帰式の傾きがSTN ( $a=4.5$ ) < SP2 ( $a=7.4$ ) < SP600 ( $a=9.6$ ) と大きくなるにともない毒素活性が低下して、一見して阻害剤存在下の反応(西沢・志村, 1967; 泉ら, 1985)と類似していた(Table 4)。

一方で、供試虫の食餌量と体重増加量はBT製剤の濃度によっては、ダイ



ズ粉末の種類間で差が認められる場合もあったが、いずれも同濃度希釈液内の比較ではSP2やSP600の値が、STNと同等かより多い結果であったことから、SP2やSP600における殺虫活性の低下は少なくともカイコ幼虫の摂食量の低下による $\delta$ -内毒素の取り込み量の減少に起因するものではないと考えられた (Fig. 7)。

このように最も活性抑制が高いSP600は、糖類が多く含まれるホエー (whey) と呼ばれる溶解性成分を工業的に抽出除去し、蛋白質を濃縮処理したダイズ粉末 (表示68%) である。またSP2は、製造所はSP600と同じであるが、一般飼料向けの製品で飼料表示による蛋白含有率はSP600と比べてやや低く (表示53%)、脱脂ダイズの変性度を示すNSI (窒素溶解性指数) が30%以下の蒸気加熱処理が実施された比較的変性度の高いダイズ粉末であった。つまり、殺虫活性を抑制した2種のダイズ粉末は同じ製造所で製品化されたダイズ粉末であっても、製造時の蛋白質の抽出や蒸気加熱等の搾油時の処理法に違いがあった。

*B. thuringiensis* の $\delta$ -内毒素と鱗翅目幼虫の中腸上のレセプターとされるアミノペプチダーゼ N (APN) が特異的に結合する現象については、鱗翅目幼虫の中腸細胞の組織縁膜小胞 (BBMV) を用いた *in vitro* の実験による多くの報告があり (Van Rie et al., 1990; Knowles et al., 1991; Lee et al., 1992; Knight et al., 1994, 1995; Masson et al., 1995; Yaoi et al., 1997), *in vitro* で $\delta$ -内毒素とAPN間の結合をダイズ粉末中の蛋白が阻止し、その結果活性が低下した可能性も考えられる。

佐藤(1998) は、昆虫とは特に関係ない18種類の蛋白質と $\delta$ -内毒素との結合性について検討し、その結果から殺虫特異性の異なる3種の $\delta$ -内毒素 (Cry1Aa, Cry1Ac およびCry8c毒素) は、それぞれ10-12種の蛋白質に結合し、またこれらの蛋白のほとんどがアミノペプチダーゼ Nとも結合性を有することを報告している。以上のことを考慮すると本研究の結果は *in vivo* においても食餌中に含まれる植物由来の蛋白質と $\delta$ -内毒素が結合し、生体における $\delta$ -内毒素の活性を低下させる可能性があることを強く示唆する結果であった。

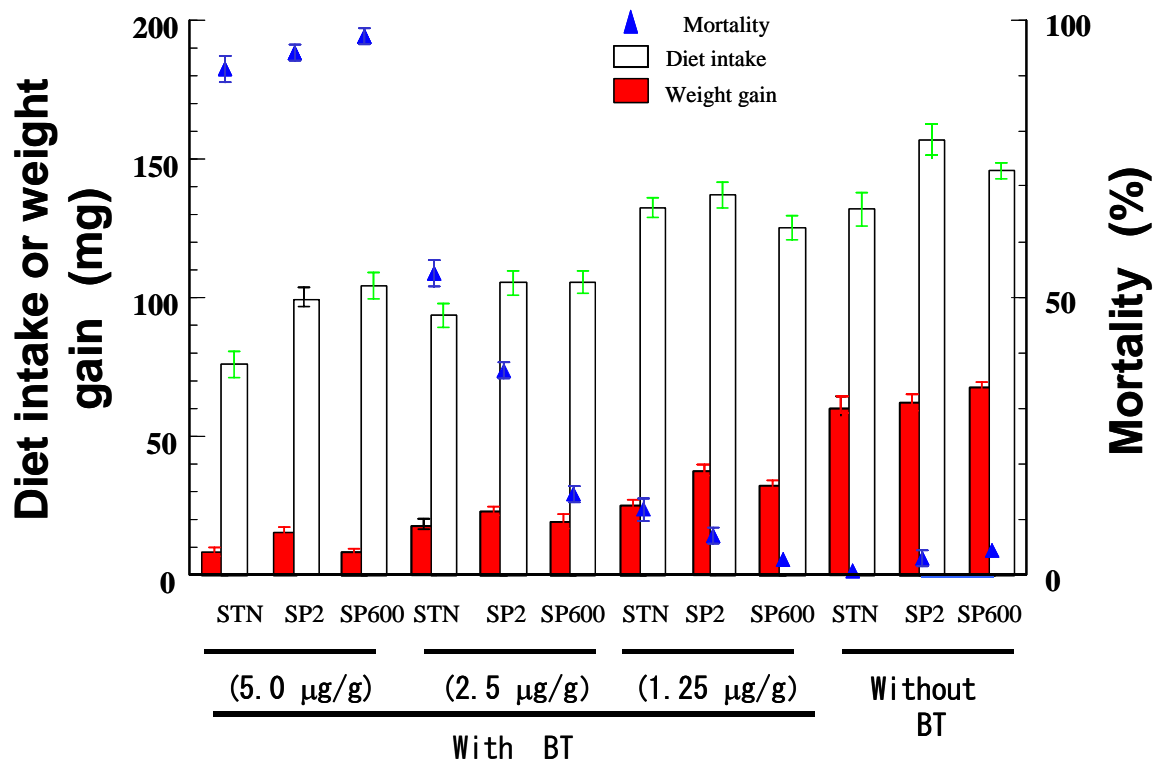


Fig. 7. Effect of different soybean meals in artificial diets on weight gain, diet intake (during 3 days) and mortality of BT-fed silkworms. STN indicates ACIS (Agricultural chemicals inspection station in Japan) ordinary defatted soybean meal (Katakura Kogyo Co. Tokyo). SP2 and SP600 indicate another manufacturer's diets (Nissin Cosmo Foods Co. Tokyo) in which the refinement processes were different (SP600 contained higher protein (68%) and less degeneration (NSI>30%) than SP2 (protein indicated 53%, NSI<30%). BT concentration in the diet was 2.5 µg/g diet. Vertical bars indicate standard errors.

Table 3. Effect of soybean meal in artificial diet with 2.5 µg/g diet BT formulation on mortality, weight gain and diet intake of the silkworm larvae.

Soybean meal <sup>1</sup>	Percent mortality <sup>2</sup> (mean ± SE)	Weight gain (mg) (mean ± SE)	Diet intake <sup>3</sup> (mg) (mean ± SE)
TN	50.3 ± 3.9 a	17.4 ± 1.9	93.6 ± 4.3 ns
P2	30.7 ± 0.9 b	23.4 ± 1.9	103.0 ± 3.9 ns
TN+SP600 (1:1)	28.3 ± 1.1 b	18.1 ± 2.2	97.3 ± 3.4 ns
P600	13.1 ± 1.7 c	21.2 ± 1.3	104.6 ± 3.8 ns

<sup>1</sup>Abbreviations are shown in Fig. 7.

<sup>2</sup>Means in each column with the same letter are not significantly different at 5% level by Tukey-Kramer method. Percentages of mortality were transformed to arcsine before analysis. 10 larvae per plot × 18 replications for each experimental plot.

<sup>3</sup>Values represent the amount of artificial diet consumed after a 3-day-feeding. Comparative analysis between different soybean meals was performed by the Duncan's multiple range test. "ns" indicates no significant difference (p > 0.05).

Table 4. Effect of soybean meal in artificial diet on the lethal activity of BT formulation against silkworm larvae

Soybean <sup>1</sup> meal	Regression lines <sup>2</sup>	LC <sub>50</sub> (µg/g diet) <sup>3</sup>
		4
STN	$Y = 4.5X + 3.4$	2.41 (2.2–2.6) a
SP2	$Y = 7.4X + 1.4$	3.02 (2.9–3.2) b
STN+SP600 (1:1)	$Y = 7.7X + 1.2$	3.09 (2.9–3.3) b
SP600	$Y = 9.6X - 0.1$	3.38 (3.2–3.6) c

<sup>1</sup>Same as shown in Fig. 7.

<sup>2</sup> $Y = aX + b$ . X: Log concentration (µg/g diet). Y: probit.

<sup>3</sup>Values in parentheses are 95% confidence limits.

<sup>4</sup> means in each column followed by the same alphabetic character are not significantly different ( $p > 0.05$ ) by the test of Russell et al. (1977).

### 2-3 ダイズ蛋白中の Bt-内毒素結合性蛋白

乾燥ダイズ粉末は、各種の蛋白質を豊富に含むことがよく知られている(山内・大久保, 1992)。2-2の実験結果から、製造所が違う乾燥ダイズ粉末を公定人工飼料中の栄養成分として混入した場合には、BT製剤の殺虫活性が影響をうけることが示された。このためこれら乾燥ダイズ粉末中に $\delta$ -内毒素と何らかの相互作用を持ち、BT製剤の活性を阻害する蛋白成分が含まれている可能性が示唆されたことから、あらかじめ SDS-PAGE で分離したダイズ粉末中の蛋白質をウェスタンブロットの手法でニトロセルロース膜に転写し、分離蛋白に $\delta$ -内毒素の1つである Cry1Aa 毒素(カイコに高活性(Yaoi et al., 1997))に反応させ、これをモノクローナル抗体で検出し、 $\delta$ -内毒素と結合可能な蛋白(BT-BP: Bt 内毒素結合性蛋白)が含まれるか調べた。

#### 材料および方法

##### 1, 乾燥ダイズ粉末中に含まれる Cry1Aa 毒素結合性蛋白の探索

結合性蛋白質の探索には、*B. thuringiensis* serovar *sotto* 系, T84A1 株 (Ogo et al., 1990) から二相分配法 (Goodman et al., 1967) で精製した Cry1Aa  $\delta$ -内毒素結晶 (東京農工大学 佐藤令一博士より提供) を用いた。結晶は、10mM dithiothreitol を含む 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.5) 中で、37°C, 2 時間静置して、5 mg/ml の蛋白濃度に溶解した。溶解後の毒素蛋白は Sugimura et al. (1997) の方法に基づき毒素を活性化するためにトリプシン処理を行い、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準に Bradford (1976) の色素結合法で毒素蛋白濃度を決定した。

カイコ中腸細胞の BBMV (brush border membrane vesicle)画分の調製は、Wolfersberger et al. (1987) に基づいて、人工飼料シルクメイト 2S(日本農産)を用いて 5 令まで飼育したカイコ(春嶺×鐘月)幼虫の中腸から採取した。最終的に調製した沈殿物は、リン酸緩衝液(pH 7.5) 中に再懸濁し、-80°Cで使用時まで保存した。

各乾燥ダイズ粉末 10 mg に蒸留水 100  $\mu$ l を加えてよく攪拌し浮遊させた。これに2倍濃度のサンプルバッファー (2% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% グリセロール, Laemmli, 1970) を等量加え、5 分間沸騰水中で加熱処理した後、10,000 g で 5 分間遠心して上清(蛋白溶解液)を得た。SDS-PAGE はゲルの

1 レーンあたり 25  $\mu$ l の蛋白溶解液を使用して行い、ゲル上で分離した蛋白質はセミドライ式ブロットング装置を用いてニトロセルロース膜上に転写した。転写したニトロセルロース膜は、2% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む TNT 溶液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20] 中で 90 分間振とう洗浄した。つぎに 1  $\mu$ M の  $\delta$ -内毒素を含む 2% BSA-TNT 中で室温、90 分間の振とうを行い  $\delta$ -内毒素と転写した蛋白質とを反応させた後、TNT で各 10 分間、計 3 回振とうして洗浄した。つぎに HRP (horseradish peroxidase) 標識抗 Cry1Aa モノクローナル抗体 2FQ (東京農工大学 佐藤令一博士より分与: *B. thuringiensis* serovar *sotto* 系統株より調製されたもの) を含む 2% BSA-TNT 中で、90 分間室温で振とうした。さらにこれを TNT で洗浄した後、ECL ウェスタンブロットング検出システム (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を用いて  $\delta$ -内毒素と結合した蛋白 (BT-BPs) を検出した。

## 結果 および 考 察

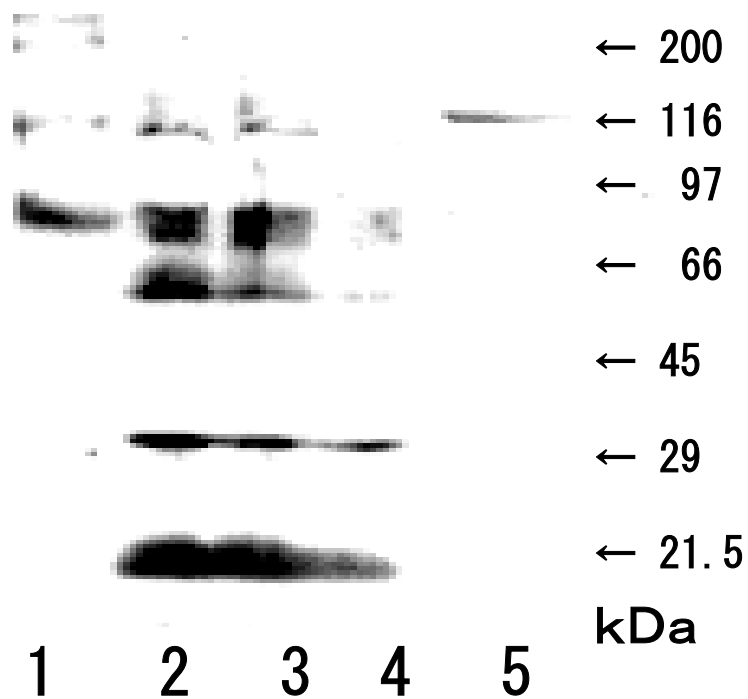
2-2 の実験において BT 製剤の殺虫活性に有意な差異が認められた 3 種類の乾燥ダイズ粉末 (STN, SP2, SP600) 中の蛋白について、リガンドブロットングの手法で  $\delta$ -内毒素 (Cry1Aa) と結合する蛋白の有無を探索した。その結果カイコに対し殺虫性が確認されている  $\delta$ -内毒素 (Cry1Aa) は、3 種類の乾燥ダイズ粉末中の一部の蛋白と結合し、それぞれ 5 本程度の複数のバンドが確認された (Fig. 8)。このことから、特定の構造にしか結合しないと考えられていた  $\delta$ -内毒素は、人工飼料中に含まれる乾燥ダイズ粉末中のある種の蛋白質と結合する性質があることが明らかとなった。しかも、先の実験で生物活性の抑制効果が見られた乾燥ダイズ粉末 SP2 や SP600 と、従来の STN 乾燥ダイズ粉末におけるそれぞれの結合性蛋白質濃度を比較すると、明らかに活性低下 (Table 4) が認められたダイズ粉末 (SP2, SP600) 由来の Cry1Aa 結合性蛋白のバンドは濃く、STN < SP2 < SP600 の順であった (Fig. 8)。特に 90-45kDa の間にある 3 本の結合バンドは STN (レーン 4) では非常に希薄であるのに対し、他の SP2 (レーン 3)、SP600 (レーン 2) ではともに明確に濃く現れている。これらの BT 親和性の蛋白が BT  $\delta$ -内毒素の中腸上のレセプター (膜上プロテアーゼであるアミノペプチダーゼ N (APN) (Knowles et al., 1991; Lee et al., 1992; Masson et al., 1995; Valaitis et al., 1995; Vadlamudi, 1995; Luo et al., 1996; Yaoi et al., 1997; Nagamatsu, 1998) への結合を競合的に抑制し生物活性に影響を与えたものと考察された。また、人工飼料

(SM2) によって飼育されたカイコ終令幼虫から採取したBBMV画分からも APN と思われる分子量約 120kDa のバンドと餌由来と思われる約 80kDa, 並びにもう一つの受容体候補と考えられているカドヘリン様タンパクの BT-R1(210kDa; Francis et al., 1997) と BTR-270 (270kDa; Luo et al., 1996) のそれぞれの分子量に酷似する約 210kDa と 270kDa の2本, 計4本のバンドがみとめられ, これらの BBMV 画分中の蛋白も $\delta$ -内毒素と結合していることが示された(レーン1)。

BT の毒素蛋白やその鱗翅目幼虫の中腸上のレセプターとされる APN に対して結合可能な蛋白については, いくつかの研究がなされている。佐藤(1998)は, カイコに対する殺虫性が異なる 3 種の内毒素(Cry1Aa, Cry1Ac および Cry3 (Buibui) 型毒素)が, それぞれ 10-12 種の蛋白に結合すること及びこれらのほとんどがレセプターである APN とも結合性を示すことを確認している。

また堀(1991)は, 活性化した $\delta$ -内毒素をアフィニティカラムに固定化し, 同カラムにカイコ中腸細胞の BBMV の溶解画分を流した場合には, 分子量 130, 155, 220kDa の 3 種の BBMV 蛋白が同カラムに結合して検出されたが, 活性化した $\delta$ -内毒素のかわりに同前駆体蛋白を流した場合には BBMV 蛋白は結合しなかったと報告している。

以上の結果から, 乾燥ダイズ粉末中には $\delta$ -内毒素と結合可能な複数の BT-BP 蛋白が含まれており, これら蛋白は, 受容体である APN と同様に活性化された $\delta$ -内毒素に対し結合性があり, これらの蛋白が中腸内で活性化された $\delta$ -内毒素と競合的に結合する結果, BT製剤の殺虫活性が抑制されると考えられた。



**Fig. 8.** Detection of Cry1Aa toxin binding proteins in defatted soybean meals and *B. mori* midgut BBMVs (brush border membrane vesicle). Gel proteins transferred to nitrocellulose paper, were incubated with Cry1Aa toxin and subsequently detected with monoclonal antibodies of Cry1Aa. Lane 1, BBMVs, lane 2 and 3, defatted soybean meal SP600 and SP2, respectively, lane 4, defatted soybean meal STN, lane 5, molecular markers.



## 2-4 炭酸脱水素酵素の殺虫活性への影響

*B. thuringiensis*  $\delta$ -内毒素結合性蛋白 (BT-BP)として、炭酸脱水素酵素(CA)や $\beta$ -ガラクターゼ、リボヌクレアーゼ A (RNase A), ミオグロビン, グルコース6リン酸脱水素酵素, グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素や $\alpha$ -グルコシダーゼなどの12種の蛋白がSDS-PAGEと活性化された $\delta$ -内毒素を用いたウェスタンブロッティングの実験時に偶然発見されている(佐藤, 1998)。さらに, 前項の実験からダイズ粉末中のいくつかの蛋白も同様に活性化された $\delta$ -内毒素と結合するBT-BPの1種であることが示唆された(松本, 2000)。

CA酵素は約30kDaの分子量をもつ蛋白で, ほとんどの動物中にも存在することが知られている(Pocker and Miao, 1987; Engstrand et al., 1995)。また, 前項2-3のBBMVを使ったSDS-PAGEと活性化された $\delta$ -内毒素を用いたウェスタンブロッティングの実験(Fig. 8のレーン2, 3 及び 4)からも, 分子量30kDa付近に $\delta$ -内毒素と結合する蛋白バンドが検出されており, このBT-BP蛋白がCA酵素であると推測された。CA蛋白を人工飼料に混ぜてカイコに与えると, 腸内におけるBT-BP濃度が高まり,  $\delta$ -内毒素の受容体であるAPNと活性化された $\delta$ -内毒素との結合を競合的に阻害し, その結果,  $\delta$ -内毒素の活性を抑制すると推定される。従って本項では, BT-BPの1種であるCA酵素を, 先の2-2の実験で最も活性阻害が少なかったSTN餌に添加して生物検定を行い, BT製剤の殺虫活性(致死率と  $LC_{50}$ )がどのように変化するか検討する。

### 1. 供試虫

1-1に同じ。

### 2. 人工飼料

2-2の3種類の人工飼料のうちSTN餌を用いた。

### 3. BT製剤

2-2と同じ市販のゼンターリ水和剤を用いた。

### 4. CA酵素

CA酵素 (EC 4.2.1.1, Boehringer Mannheim Biochemicals) を用いた。CA酵素 20 mg を正確に秤りとり、20 mlの蒸留水に溶解し、人工飼料 10g あたり 0.5 mlずつ滴下・混入した。コントロールには同量の蒸留水のみを添加した。CA酵素の $\delta$ -内毒素 (Cry1Aa)に対する解離定数  $K_m$  が216.9nMと試算されているのに対して(Kadotani et al., unpublished), 受容体であるAPNの解離定数は 7.6nM (Yaoi et al., 1997)であり、CA酵素の方が約1/30と親和性がかなり弱いことと、BT製剤の $LC_{50}$  (= 2.5  $\mu$ g/g diet) とを考慮して、CA:BT ( $\mu$ g/g diet) を (0 : 0), (50 : 5), (50 : 2.5), (50 : 1.25)の濃度区を設定し比較した。

### 結果および考察

結果は、Fig. 9及びTable 5のとおりで、重量比(1 : 20)に該当するCA酵素50  $\mu$ g/g dietとBT製剤(2.5  $\mu$ g/g diet)を人工飼料に滴下した場合の致死率は、BT製剤のみ(2.5  $\mu$ g/g diet)混合した場合のように、CA酵素を推定結合親和性換算でほぼ等量になるように加えた場合には致死率は約1/2に低下した (Fig. 9)。また、CA酵素を50 $\mu$ g/g diet ずつ添加した場合と添加しない場合の $LC_{50}$ 値は、2.43及び3.01  $\mu$ g/g dietで、50 $\mu$ g/g diet ずつ添加した場合には活性が有意に低下した (Table 5)。また、得られたデータを解析した結果、BT製剤のみの場合の回帰式の傾きは、4.5であったのに対し、CA酵素を添加した区では、8.3となり、前項のダイズ粉末中のBT-BPの影響と同様の結果を示した。また、それぞれの濃度比と致死率比を Scatchard法 (Scatchard, 1949) でプロットすると、 $Y = -2.29 X + 124.8$  ( $r^2 = 0.94$ )と相関が認められた。一方、CA酵素を添加した区ではカイコの摂食量がやや増加したが、致死率が低下する BT製剤濃度 2.5及び1.25  $\mu$ g/g dietにおける摂食量は、共にCA添加区の方が多く、少なくともCA酵素の添加によって供試虫の摂食低下が起き $\delta$ -内毒素の総取り込み量が減少したのではないと考えられた。

以上の結果から、ダイズ粉末などにも含まれるBT-BPの1種であるCA酵素を多量に人工飼料に加えると、 $\delta$ -内毒素のカイコに対する殺虫活性が*in vitro*での $\delta$ -内毒素との結合親和性にほぼ見合うだけの活性低下が起こることが明らかとなった (Matsumoto, 2002)。

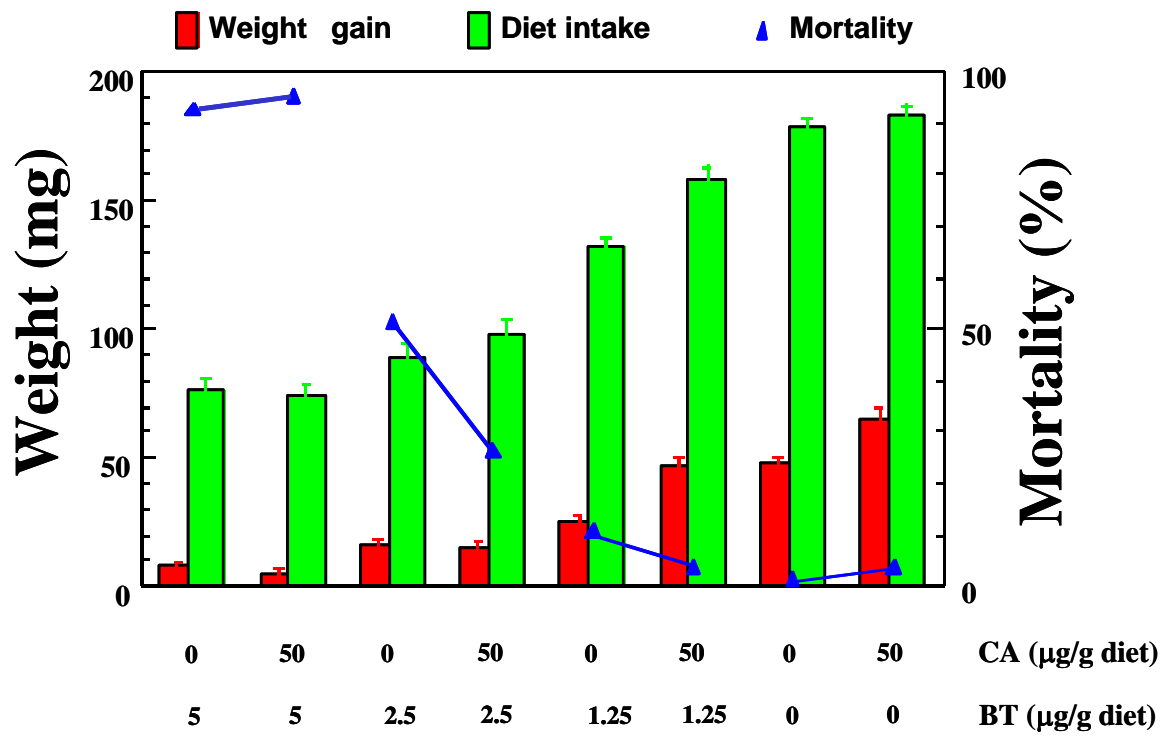


Fig. 9. Effect of carbonic anhydrase (CA) in diet on BT insecticidal activity. Vertical bars indicate standard errors.



Table 5. Effect of addition of carbonic anhydrase (CA) to artificial diet on BT lethal activity Against silkworm larvae.

Diet compound	LC <sub>50</sub> (μg/g diet)	Regression <sup>2</sup>
BT only (STN)	2.43 (2.3–2.6) <sup>1</sup>	Y = 4.5X + 3.3
BT+CA (50μg/g diet)	3.01 (2.9–3.1) *	Y = 8.3X + 1.0

Values in parentheses are 95% confidence limits.

Y= aX + b. X: Log concentration (μg/g diet). Y: probit

\* indicates significant difference (p>0.05) by the test of Russell et al. (1977).

### 第3章 プロピオン酸の殺虫活性への影響

本章では2-1の実験結果からBT製剤の殺虫活性を抑制する要因として示唆された人工飼料中に含まれている防腐剤，特に一般的に用いられることの多いプロピオン酸類(Propionate)の影響について検討した。

ソルビン酸は，公定法にも含まれておりBT製剤の活性に大きな影響を示さないが，市販の人工飼料中には防腐成分として，プロピオン酸類(プロピオン酸(PA)，プロピオン酸カルシウム(CaP)，プロピオン酸ナトリウム(NaP))も含まれている場合がある(Fig. 5)。これらの防腐剤がBT製剤の活性を阻害することにより生物検定の結果に影響することが想定された。PAでは摂食増加による生長促進効果(新村・桐村，1974)が報告されていることから，食餌量に影響を与えないとされるCaP(粉末)による結果を公定餌と比較したが，添加するプロピオン酸類の種類によって使用する人工飼料のpHが変化することから，他にプロピオン酸(液体)やプロピオン酸ナトリウム(粉末)についても同様の試験を行い，BT製剤の活性に対する影響について検討した。

また，3-2ではPAを添加した場合の $\delta$ -内毒素前駆体蛋白に及ぼす影響を，SDS-PAGE法により検討し，その結果を可視( $A_{600}$ )および近紫外部( $A_{280}$ )の透過吸光を用いて定量を試みた。

### 3-1 プロピオン酸類の人工飼料への添加による殺虫活性の低下

生物検定でBT製剤の力価を正確に測定するためには、カイコの生育を出来るだけ斉一にする必要があり、そのためには人工飼料による飼育が最適とされる。しかし、人工飼料による飼育では、クワ葉による飼育に比べ病害の発生が多くなるとの報告がある(林屋ら, 1968; 1971)。このため、市販の人工飼料には防腐剤が混合されることが多い。しかし、BT製剤は微生物由来の殺虫剤であることから、生物検定に使用する人工飼料には、ソルビン酸以外の防腐剤や抗生物質は添加されていない。

また市販の人工飼料と比較すると、生物検定に使用する人工飼料では無機塩やビタミン類が不足気味で、カイコの生育が遅く、供試虫として斉一に飼育するためにはかなり熟練が必要である。

プロピオン酸を人工飼料に添加すれば高い防腐効果があるとの報告(新村・桐村, 1974; 飯塚ら, 1970)に基づき、生物検定に使用する人工飼料に同酸を添加した場合の影響について検討した。

#### 材 料 と 方 法

##### 1. 供試虫

2-1に同じ。

##### 2. BT製剤

2-1に同じ。

##### 3. 人工飼料

人工飼料は、2-1の材料及び方法で示したSTN飼料を用いた。

調整したSTN飼料にプロピオン酸カルシウム(CaP, 和光純薬)(湿体重量2%, 0.2%, 0.02% (W/W)), プロピオン酸(PA, 和光純薬)(同2%, 0.2%, 0.02% (V/W)), およびプロピオン酸ナトリウム(NaP, 関東化学)(同0.2% (W/W))をBT製剤希釈液(BT液)混入時に添加した。これら溶液の添加は

マイクロピペットを用いて飼料上に滴下した後に BT 液も同様にマイクロピペットを用いて添加した。BT 液を含まない区においては滅菌蒸留水を同容量滴下した。

#### 4. 生物活性試験法

カイコに対する殺虫活性実験では、10 頭ずつ直径 9cm のシャーレに供試する公定試験法(Aizawa, 1976; BT 剤研究会, 1973)と、同法をカイコ1頭ごとの食餌量を確認するために1頭ずつ、マイクロプレートに供試する個別飼育法(松本, 1999)を併用し比較した。まずBT製剤を秤量し滅菌蒸留水によく攪拌して十分に溶かし、公定法の場合には 7/10 倍希釈で 7 段階の濃度希釈区で行うが、個別飼育法では1/2 希釈の3段階希釈とし(5.0, 2.5, 1.25  $\mu\text{g/g diet}$ )、公定試験法とのデータ比較ができるようにした。

給飼法については、公定(集団)試験法では、1-1と同じ方法で、また個別試験法では2-2と同じ方法で行った。個別試験法では処理された各人工飼料は、滅菌済 24 穴マイクロウェルプレート(Corning 社製)の各ウェルに投与した飼料重量を1個ずつ計測して供試した。各ウェルに3齢2日目のカイコ幼虫を1頭ずつ計 10 頭を供試した。実験は各処理毎に最低 6 反復した。供試された幼虫は  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  の恒温器内で、BT 液が添加された飼料で 3 日間飼育した後、幼虫の体重・残餌量を記録した後BT製剤を含まない餌に入れ替え、飼料に移し、さらに 2 日間飼育した。試験開始 5 日後に、生死を判別し記録した。

## 結 果

### 1. プロピオン酸類の影響

CaP 0.2%, PA 0.2%, NaP 0.2%を加えた STN 飼料を用いる方法で致死率の比較をおこなった(Table 6)。その結果、2.5  $\mu\text{g/g diet}$  のBT製剤における致死率は、CaP 0.2%で、 $25.4 \pm 1.4\%$ 、PA 0.2%= $25.6 \pm 1.1\%$ 、NaP 0.2%= $27.8 \pm 2.4\%$ で、プロピオン酸類が添加されていないSTNが  $50.5 \pm 3.0\%$ を示したのに比べて、3種のプロピオン酸類を添加したいずれの飼料でも致死率が 1/2 に低下した(Table 6)。



## 2. 飼料中へ CaP 濃度とBT製剤の濃度による影響

飼料中への CaP 濃度を湿体重量比で 0%から 2%まで変化させて、BT製剤の致死活性の低下を見ると、CaP の添加濃度が高くなるにつれて、致死率低下が観察された。CaP 2%の添加によって、濃度  $5.0\mu\text{g/g diet}$  (90%致死濃度)で致死率 32.1%に、 $LC_{50}$ 濃度条件下の致死率が 7.8%にまで低下した(Fig. 11)。

## 3. プロピオン酸類の添加がカイコの摂食量と体重増加に及ぼす影響

CaP (0.2%)を混和した場合のBT製剤添加区の3日間の摂食量は、 $103.5 \pm 5.1\text{mg}$  であり、STNだけの  $93.6 \pm 4.3\text{mg}$  と比べ有意な差異はなかった(Duncan's 多重解析)。また CaP 0.2%混合飼料での3日間の体重増加は、 $18.9 \pm 1.6\text{mg}$  で、無混和区 ( $17.4 \pm 1.9\text{mg}$ )と比べて有意な差異はなかった(Table 6 およびFig. 10)。

また、濃度-致死実験から CaP には濃度依存的に致死率を低下させることも示された(Fig.11)。

一方で CaP を混合した実験区の3日間の摂食量は、CaP の濃度(0.02-0.2%)間において差異はなく、またBT製剤の特性である生長抑制作用を体重増加量によって比較した結果でも CaP の混合は無混合時との有意な差異は認められなかった。つまりBT製剤の毒素蛋白は、どの濃度のCaP 混合人工飼料においても、同程度に生長抑制などのBT毒素による影響がみられた。また摂食量は高濃度のBT製剤を投与すればするほど、減少する傾向が認められ、カイコ幼虫の毒素蛋白の体内取り込み量は減少した。しかし、プロピオン酸類を一定以上の濃度で混和した飼料を用いるとBT製剤による致死率だけは、混合されていない餌を使用した場合に比較して明らかに減少した(Fig. 11)。

また、このBT製剤に対する致死活性の低下は CaP のみの現象ではなく、PA, NaP でもほぼ同程度の効果がみられた(Table 6)。

プロピオン酸類を通常のカイコ飼育のための人工飼料の防腐剤として利用することは飼料としての問題はないが、BT製剤の生物検定に使用する人

工飼料に添加する防腐剤としては、検定精度を低下させるため不適當であると判断された。

Table 6. Effect of propionates in artificial diet on mortality, weight gain and diet intake of the silkworm larvae.

Treatment <sup>1</sup>	Weight gain <sup>2</sup> (mg) (mean±SE )	Diet intake <sup>2</sup> (mg) (mean±SE)	Mortality (%) (mean±SE)	pH of diet
With BT (LC <sub>50</sub> ) only	17.4±1.9a	93.6±4.3a	50.5±0.9	4.9
+CaP (0.2%)	18.9±1.6a	103.5±5.1ab	25.4±0.6	5.8
+PA (0.2%)	23.2±2.0ab	104.4±4.4ab	25.6±0.5	4.3
+NaP (0.2%)	25.2±2.3b	117.1±5.2b	27.8±1.4	6.7
Without BT (LC <sub>50</sub> )	58.4±3.3c	143.5±5.4cd	1.1±0.2	5.2
+CaP (0.2%)	63.0±3.2cd	157.0±3.9d	1.7±0.4	6.0
+PA (0.2%)	57.5±2.2c	167.6±3.1de	2.2±0.7	4.3
+NaP (0.2%)	58.1±2.7c	177.9±4.8 e	0.6±0.3	6.8

46

<sup>1</sup> CaP, PA and Nap represent calcium propionate, propionic acid and sodium propionate, respectively.

Each chemical was added to the standard diet at a concentration of 0.2%.

<sup>2</sup> Values represent an increase in weight of larvae and amount of artificial diet consumed after a 3-day-feeding.

Comparative analysis between different propionates was performed by Duncan's multiple range test ( $p > 0.05$ ). BT concentration in the diet was 2.5 µg/g diet.

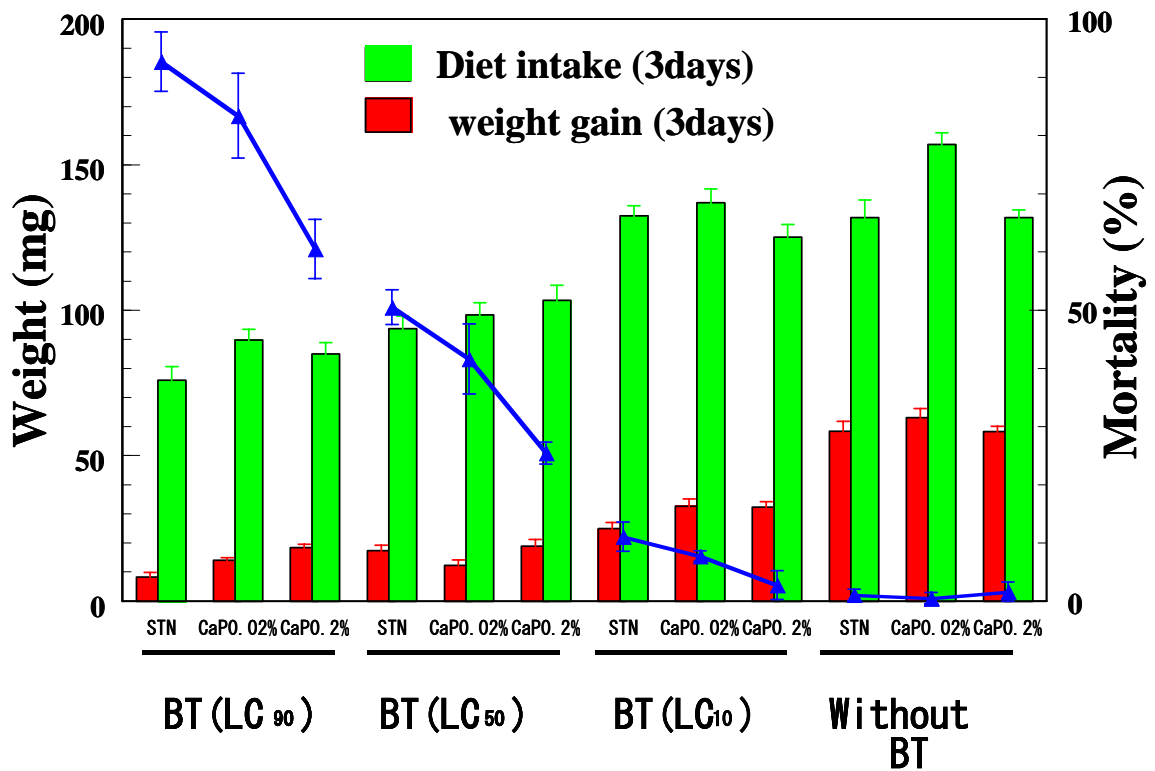


Fig. 10. Inhibitory effect of calcium propionate (0.02-2%) on BT lethal activity, larval weight gain and diet intake. Solid triangles: percent mortality. Vertical bars: standard errors.

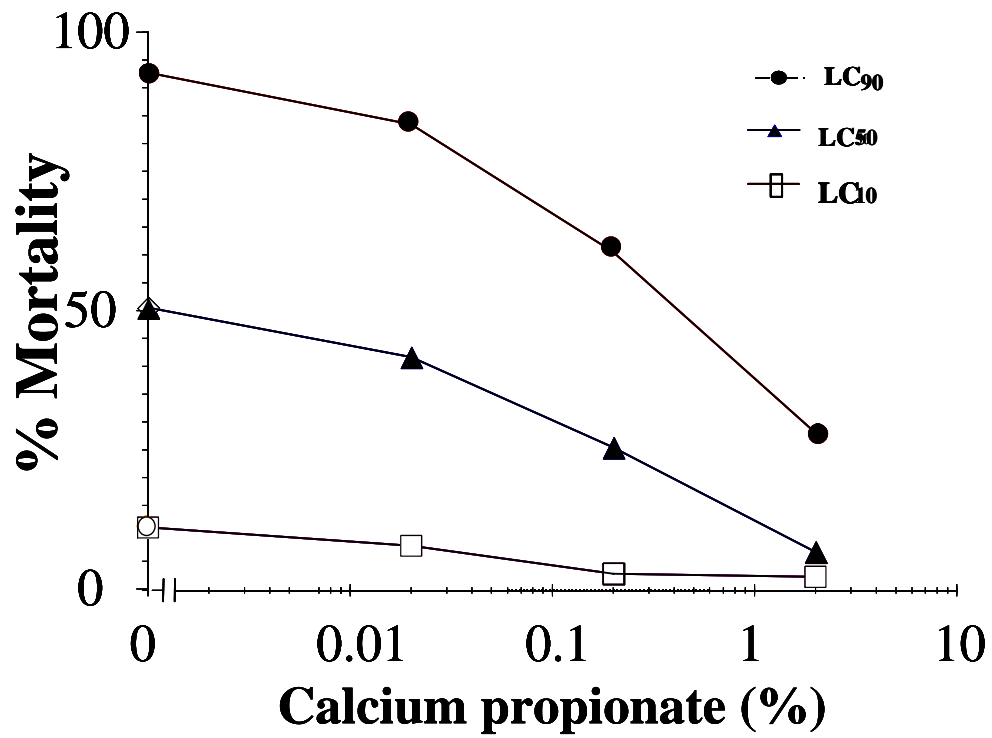


Fig. 11. Effect of calcium propionate concentration on the mortality of silkworm larvae.

### 3-2 プロピオン酸類が $\delta$ -内毒素前駆体蛋白に及ぼす影響

PA やそのカルシウム塩(CaP)は、各種の真菌類やグラム陰性菌による人工飼料の腐敗に対し安定した防腐効果が見られる(新村・桐村, 1974)。しかしながらグラム陽性菌である *B. thuringiensis* 菌の生物活性に対するこれらの脂肪酸類の影響はほとんど知られていない。また $\delta$ -内毒素のプロピオン酸類や他の飼料成分との生体内での相互作用、さらに毒素蛋白の虫体内での溶解性に関与する昆虫の消化酵素への影響なども全く知られていない。

3-1の結果から、人工飼料へのプロピオン酸類の添加によってBT製剤の殺虫活性が顕著に抑制されることが示された。

プロピオン酸類と殺虫活性低下との間には、濃度依存的関係が認められることから、プロピオン酸類が、 $\delta$ -内毒素蛋白分子と何らかの反応をして、活性を低下させる可能性が想定された。そこで、殺虫活性成分である $\delta$ -内毒素の前駆体蛋白を SDS-PAGE 法により測定し、同酸類の添加が影響を及ぼすか否か検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 供試製剤

2-1と同様、市販のゼンターリ水和剤を滅菌蒸留水で浮遊希釈して用いた。

##### 2. $\delta$ -内毒素前駆体蛋白の定量

製剤試料 10mg を採取し蒸留水を加えて 300 $\mu$ l (30 倍希釈)とし、BT製剤の成分が完全に溶解するまで良く攪拌した。同希釈液に添加するプロピオン酸の濃度を変えて BT 希釈液と等量ずつ混合し泳動のための試料とした。Laemmli 式サンプル・ミクスチャー(第一化学)を加えた後、沸騰水浴中で 5 分間加熱した。冷却後軽く遠心して上静を分析に用いた。SDS-PAGE 後 coomassie brilliant blue を用いる色素結合法 (Bradford, 1976)で行い、ゲル上に発現した $\delta$ -内毒素前駆体(130~140kDa)の蛋白バンドを比較検討した。また、紫外線フリーのゲルホルダー内に泳動・染色後のゲルを格納し、デンストメーター(CS-9300PC, 島津製作所)を用いてゲル上の各バンドの蛋白量を透過吸光(280, 600nm)により定量した。

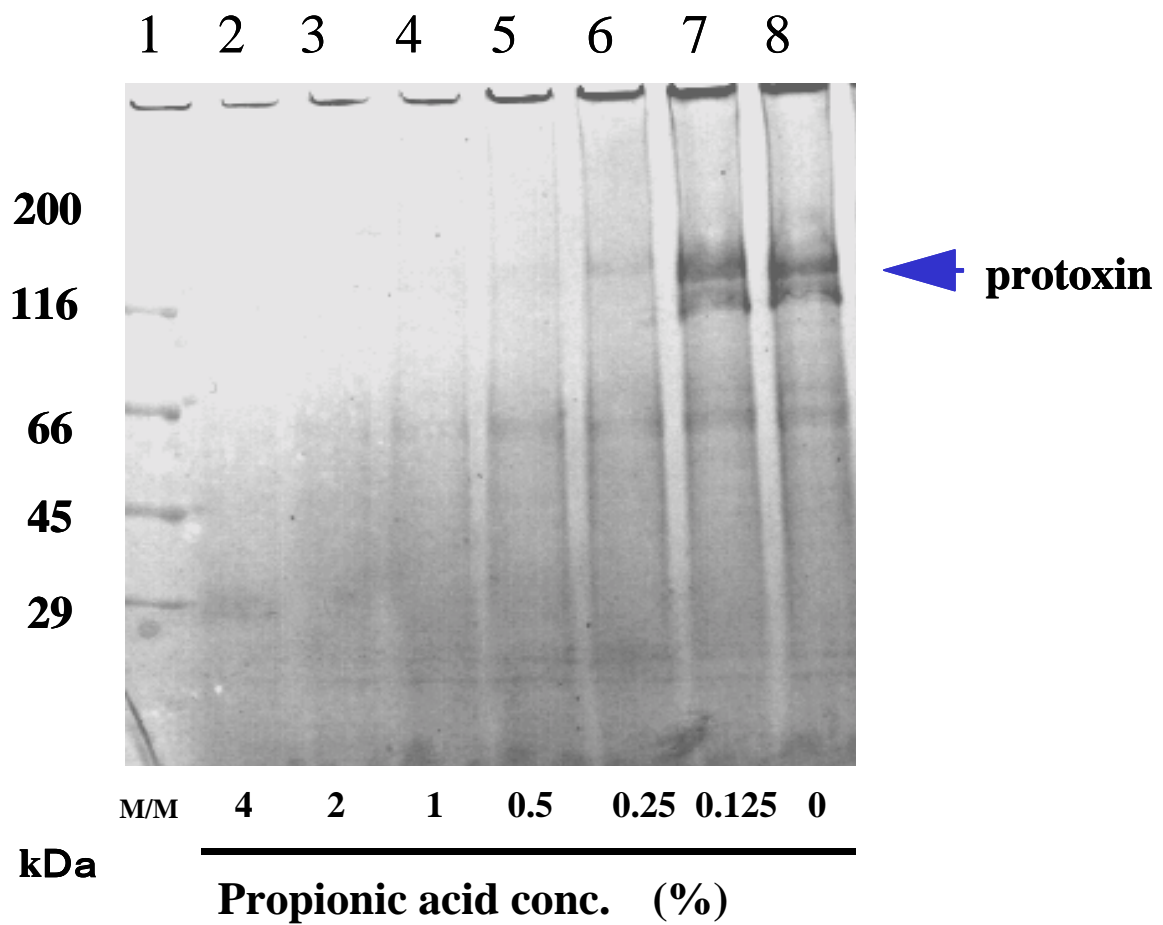
## 結果および考察

### 1. プロピオン酸類の $\delta$ -内毒素前駆体蛋白に及ぼす影響

プロピオン酸類をBT製剤の添加された人工飼料に混合して生物検定を行うと、なぜBT製剤の活性が低下するのか確認する目的から、検定希釈液にPAを加えてSDS-PAGEを行い、泳動された $\delta$ -内毒素前駆体蛋白量を比較した。その結果、0.2%以上の濃度のPAをBT製剤希釈液に等量ずつ混合すると、添加するPA濃度の増加とともに、本来ゲル上の130~135kDa付近に現れるはずの $\delta$ -内毒素前駆体蛋白のバンドが消失した(Fig.12)。また、ゲル上をデンストメーター(吸光度 $A_{280}$ )により探索すると130~135kDa付近の蛋白のみが急激に減少することが示された(Fig. 13)。しかも、添加されたプロピオン酸の濃度比(プロピオン酸/BT( $\mu\text{g/g diet}$ ))と吸光度( $A_{600}$ )の間には、 $Y = -0.0288 X + 0.0013$  ( $r^2=0.96$ ; Xは対数)と高い相関が認められ、プロピオン酸の濃度の増加にともなってゲル上の $\delta$ -内毒素前駆体蛋白が特異的に減少することが示された(Fig. 14)。

このように $\delta$ -内毒素前駆体蛋白が減少する原因として、1)プロピオン酸添加により、特異的にアグリゲーションが生じ $\delta$ -内毒素前駆体蛋白の溶解量が減少したか、 $\delta$ -内毒素前駆体蛋白(130~135kDa)が形成されず、より小さな蛋白分子となったかのいずれかと考えられるが、なぜ130-135kDa付近の蛋白だけがPAの添加によって減少するのか、その原因の特定には至らなかった(Fig. 13)。しかし、吸光度(600nm)の測定結果から、PAの添加量の増加と $\delta$ -内毒素前駆体蛋白量の減少との間には高い相関があることから、前章での殺虫活性低下の原因が、この $\delta$ -内毒素前駆体蛋白(130~135kDa)の減少により生じた可能性が高いと考えられた。

なお、参考までに本実験で用いた分子マーカー(第一化学)を、プロピオン酸を20%~0.02%の4希釈濃度で同様に泳動実験を試みたが、マーカーを構成している各蛋白のミオシン(200kDa)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(116kDa)、ウシ血清アルブミン(66kDa)、アルドラーゼ(42kDa)、カルボニックアンヒドラーゼ(30kDa)、ミオグロビン(17kDa)のいずれの標識蛋白においても、PAの添加によるBT  $\delta$ -内毒素のような泳動ゲル上の特定のバンドの消失は認められず、正常に泳動された。



**Fig. 12.** SDS-PAGE pattern of BT solution with propionic acid (PA). Lane 1, molecular marker 15  $\mu$ l. Lane 2, 3, 4, 5, 6 and 7, BT solution 15  $\mu$ l (BT formulation 10 mg + Distiled water (DW) 300  $\mu$ l) + sample buffer 15  $\mu$ l + propionic acid solutions 15  $\mu$ l (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 %, respectively). Lane 8, BT solution (15  $\mu$ l) + sample buffer (15  $\mu$ l) + DW (15  $\mu$ l). Gel was stained by coomasie brilliant blue.



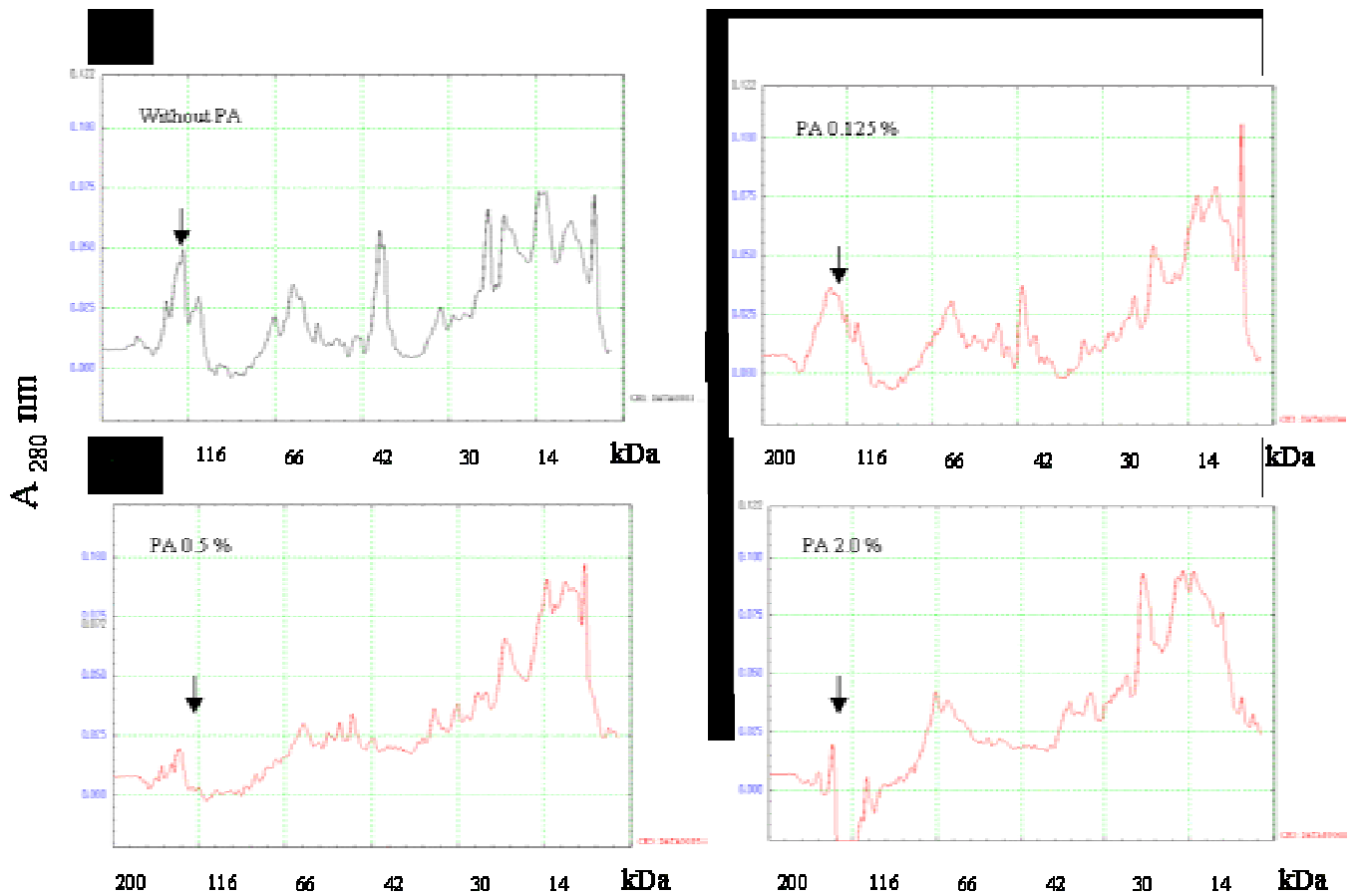


Fig. 13. Densitometric scanning chart of proteins (A<sub>280 nm</sub>) after SDS-PAGE as shown in Fig. 12. ↓ : 130-135 kDa.

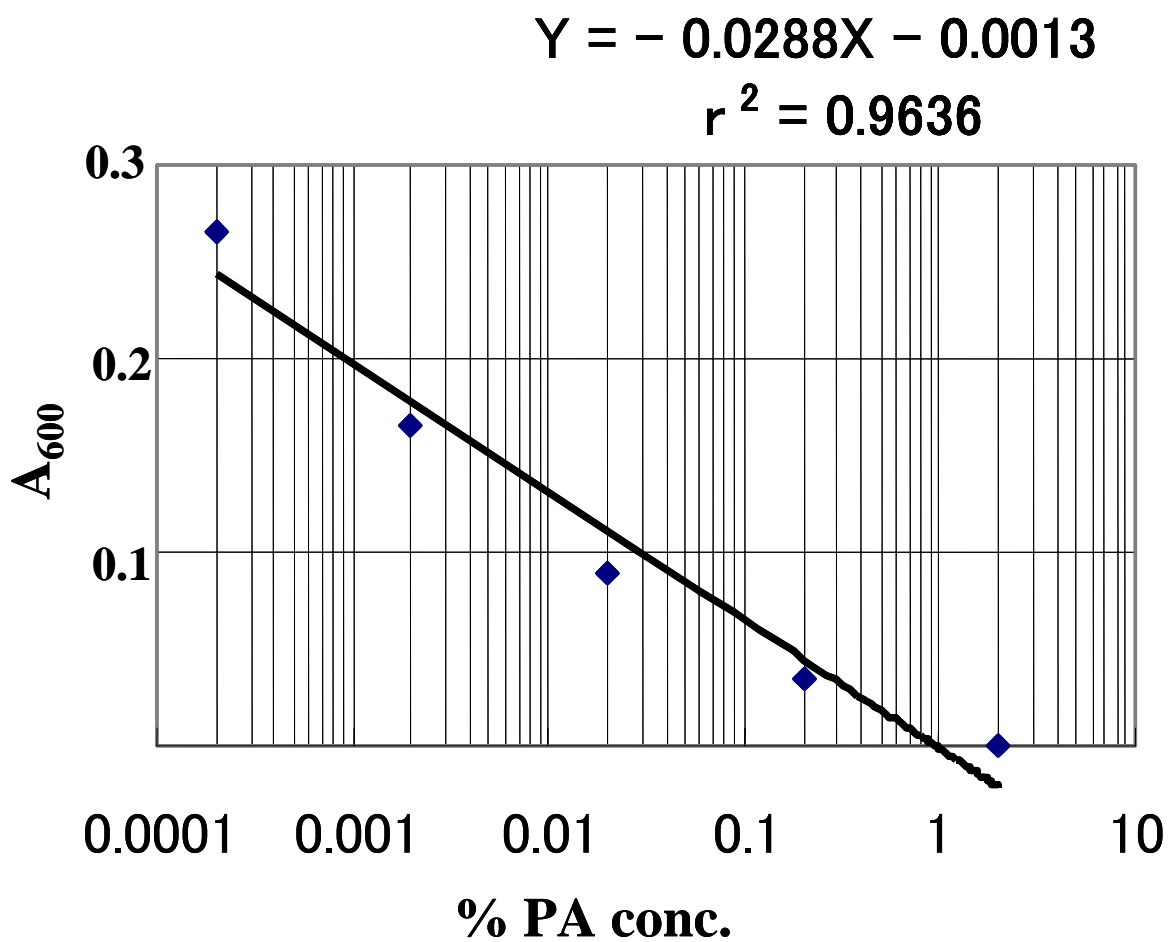


Fig. 14. Relationship between the intensity of absorbance at 600 nm ( $A_{600}$ ) and propionic acid (PA) concentration in SDS PAGE gel as measured with a densitometer (CS-9300PC, SHIMAZU). Y:  $A_{600}$ , X: Log PA concentration (%).

#### 第4章 殺虫活性(力価)に影響するその他の要因

現在の生物検定法(BT剤研究会, 1973)では, 検定試料を人工飼料に混入する際の手順など, 実際の検定作業のための条件については16L8D, 25°C下で実施する点以外のより詳細な規定はない。しかし, 薬物の昆虫に対する作用が環境温度によって影響をうけるという報告は多く(Hassan et al., 1970; Norment and Chamber, 1970; Harris, 1971; Chalfant, 1973), BT製剤の活性が生物検定時の温度によって影響を受けることも報告されている(於保・真下, 1973; 佐野, 1972; 石黒・宮園, 1979)。

これらはカイコ幼虫への薬物供試後の飼育温度に対するもので, 検定準備のための検体希釈液の温度に関するものではない。しかし, 飼育器内の温度を定められた25°Cに設定して行ったにも関わらず, 晩秋や初春の室内暖房が十分でない時期に生物検定すると, 活性が低下し, 力価が正確に測定できない事例もあった。また, 供飼カイコの飼育条件として実験時の照明の強さや光源の有無などのより詳細な光条件に関する規定はなく, カイコ幼虫の斉一化の目的から, 全暗下での飼育や実験を行うメーカーもあった。

このように, 当初には想定されなかった条件が, BT製剤の力価を正確に測定するための障害になる可能性が考えられた。このため, 本章では, 殺虫活性(力価)に影響を及ぼすその他の要因を明らかにするため, ①実験時の光条件, ②検体希釈液の水温が及ぼす影響について検討した。

#### 4-1 検定時の光条件の影響

生物検定に用いるカイコの幼虫(3令)は、生育を斉一にする必要がある。現行の生物検定法では供試虫の飼育条件についての規定はない。生育がそろったカイコ幼虫を生物検定に供するために、必要な約500頭の供試虫に対し5倍以上のカイコ幼虫を飼育し、その中から目視で選別した幼虫を試験に用いるなど、飼育や選別のための手間が掛かる方法を採用している。

カイコ幼虫の生育をそろえる飼育法に関する研究については養蚕指導の観点から多くの報告がある。一般に飼育時の光条件の関与が報告されており、斉一な飼育には孵化直後から全暗下で飼育する方法(全暗育)が有効とされている(Imanishi, 1980; Washida, 1983)。

現行の生物検定では、16L-8Dの照明条件下で行うことが定められており(BT剤研究会, 1973), 幼虫の斉一化のために全暗下で生物検定する方法も提案された。しかし、実験時の明暗条件がBT製剤の殺虫活性に影響を及ぼすかどうかは研究がなく、関連の資料も少ない。そこで 全暗条件と16L-8D照明下で検定を行った場合に、BT製剤の殺虫活性に相違があるか、また、生育の際に推奨されている照度80-120 lxとそれ以上の高い照度(1500-2000 lx)下で、生物検定結果に違いが生じるかを検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 供試虫

1-1に同じ。

##### 2. BT製剤

2-2と同じ市販のゼンターリ水和剤を用いた。

##### 3. 人工飼料

人工飼料は、1-1の材料及び方法と同じSTN飼料を用いた。

##### 4. 人工飼料の調整 (BT製剤の混入法)

1-1の材料及び方法に示した方法で調整して用いた。

## 5. 殺虫試験時の恒温飼育器内照度の調整

あらかじめ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、80-120 lx の恒温器内で飼育した供試虫(3令2日目幼虫)を、殺虫試験の間だけ、湿度50%に調整された恒温器3台を使用し、全暗(照度0 lx)、80-120 lx (16L8D)、1000-2000 lx (16L8D)の3区を設定して殺虫試験を行い、明暗及び照度の違いによって、殺虫活性に差違が生じるかどうかを比較した。明条件下における照度の設定のために、恒温器内の蛍光灯(40W、白色灯)に均一に白色の紙を巻き付け、その枚数を加減することにより調整した。

## 6. 殺虫活性試験

1-1に同じ。

### 結果 および 考察

全暗区および照明区(80-120 lxおよび1500-2000 lx, 16L8D)で殺虫活性を比較したところ、 $LC_{50}$ 値は全暗区と照明区(80-120 lxおよび1500-2000 lx)で、それぞれ3.69、2.45および2.41  $\mu\text{g/g}$  dietとなり全暗区と照明区において有意な差異が認められた。(Table 7)、それぞれの区における、実験時の摂食量や生長量においては、有意な差異がないか、活性の低い全暗育の方がやや多いことから、照度による活性の差異は摂食量の低下によって体内に取り込まれる $\delta$ -内毒素の量が減少したためではないと考えられた(Table 8)。

一般にBT製剤の殺虫成分は、散布後の太陽光、紫外線(UV)等により崩壊して活性が比較的速やかに失われることが知られている(Raun and Jackson, 1966; Morris, 1983; Choen, 1991; Inagaki et al., 1992; 宮園ら, 1998)。

しかし、今回の恒温器内での照度条件を変えた実験の結果では、照明をまったく実施しない全暗条件下におけるカイコの致死率の方が、照度を80-120 lx もしくは1500-2000 lxで照明(16L-8D)された条件における場合よりも、有意に低くなった。

しかし、カイコの摂食量やカイコの生長量は、照明区でやや減少するが、有意な差異は認められなかった。 $LC_{50}$ 濃度である2.5  $\mu\text{g/g}$  dietを供試した場合の致死率は、照明区では、共に50%程度であったのに対し、全暗区では約半分の21.3%と有意に致死率が低下した(Table 8)。

Iwao (1962)は、鱗翅目の罹病性は黒化型では低下すること。またKunimi et al. (1990)らは、ヨトウムシに対するNPVの罹病性が幼虫の体色の黒化とともに低下し、経口感染に対する幼虫の抵抗性は、主として中腸細胞内へのウイルスの侵入に対する腸内ルーメンの防御メカニズムによると報告している。これらをあわせて考察すると、BT製剤の鱗翅目幼虫体内でのBT製剤の活性発現機構に光の有無が関与する可能性があると結論される(Matsumoto, 2001)。

したがって、カイコ発育の斉一化のために養蚕の効率化のために推奨されてきた全暗育の技術が、卒倒病や軟化病といった*B. thuringiensis* 菌等によるカイコの感染症を防ぐ目的で優れた方法であることが改めて確認された。一方、BT製剤の生物検定を全暗下で行う際には活性が低く測定されることを念頭に置く必要があることが示された。

Effect of light conditions on the toxicity of BT formulations against *B. mori* larvae.

illumination intensity (lx)	LC <sub>50</sub> (µg/g diet) <sup>1</sup>	Regression lines <sup>2</sup>
	<sup>3</sup> 3.77(3.3–4.3) a	Y = 3.5X + 3.1
	2.57 (2.4–2.7) b	Y = 4.6X + 3.2
)	2.45 (2.3–2.6) b	Y = 4.3X + 3.3

parentheses are 95% confidence limits.

(<sup>1</sup>): Log concentration (µg/g diet).

each column followed by the same letter are not significantly different by the likelihood ratio test (Russell et al., 1977) at  $p \leq 0.05$ .

Table 8. Effect of light conditions on mortality, larval weight gain and diet intake.

Illmination intensity (lx)	Weight gain (mg) <sup>1</sup> (mean ± SE)	Diet intake (mg) (mean ± SE)	Percent mortality <sup>2</sup> (mean ± SE)
0	18.7 ± 1.9 ns	96.5 ± 4.5 ns	21.3 ± 4.1 a
80-120	18.1 ± 2.2 ns	94.3 ± 3.3 ns	50.3 ± 3.7 b
1500-2000	17.4 ± 1.6 ns	93.3 ± 2.9 ns	51.5 ± 3.0 b

<sup>1</sup>Values represent the increase in weight of larvae and amount of artificial diet consumed after a 3-day-feeding. Comparative analysis between different intensities of illumination was performed by Duncan's multiple range test. "ns" indicates no significant difference ( $p > 0.05$ ). BT concentration in the diet was 2.5  $\mu\text{g/g}$  diet.

<sup>2</sup>Means in each column followed by the same alphabetic character are not significantly different ( $p > 0.05$ ) by the Tukey-Kramer method. Mortality percentages were arcsine transformed before analysis. 10 larvae per plot  $\times$  6 replications for each experiment.



## 4-2 検定に用いる検定希釈液の温度が殺虫活性に及ぼす影響

野外におけるBT製剤の活性は早春や晩秋の低温期に低下することが知られ、力価試験では25℃の温度条件で行うこととなっている(BT剤研究会, 1973)。一般にBT製剤の殺虫性は、野外の試験において、早春や晩秋の低温期における殺虫活性の低下(佐野, 1972)や低温下での殺虫活性の低下が報告されている(石黒・宮園, 1979)。また、環境温度によって影響を受けるという報告は多い(Hassan et al., 1970; Harris, 1971)。

人工飼料や使用する滅菌蒸留水は実験直前まで冷蔵庫内で保存されるため、試験用BT水和剤の調整時に冷蔵庫から取り出した直後の人工飼料や冷水(滅菌蒸留水)を用いることが多い。夏季や暖房の十分に行われる真冬の室温はほぼ25℃に設定されており、速やかに25℃前後にまで水温は上昇するが、これらの境の季節である初春や晩秋には室温が低く十分に温度が上昇しないままに、人工飼料や希釈液を使用することが想定された。このため、低温下で調整された薬液や人工飼料の使用が、生物検定の結果に及ぼす影響について検討した。

### 材 料 お よ び 方 法

#### 1. 供試虫

1-1に同じ。

#### 2. BT製剤

2-2と同じ市販のゼンターリ水和剤を用いた。

#### 3. 人工飼料

人工飼料は、1-1の材料及び方法に示したSTN飼料を用いた。ただし、STN飼料は、冷蔵庫から取り出し、必要量を計りとった後にあらかじめ25℃の恒温器内に、1時間保存し温度が25℃になってから用いた。

#### 4. BT製剤の人工飼料への混入法

3.で調整した人工飼料にBT製剤希釈液(検体希釈液)を添加混合した。添加はマ

マイクロピペットを用いて飼料上に滴下しておこなった。**BT** 液を含まない区においては滅菌蒸留水を同容量滴下した。

BT製剤の生物活性試験時に添加する検体希釈液の温度(5~40℃)による影響を調査した。つまり、供試したBT製剤標品の $LC_{50}$ である $2.5 \mu\text{g} / \text{g diet}$  になるように希釈した検体希釈液を10 ml ずつ試験管にとり、それぞれ5分間ずつ5~40℃(5℃間隔)の各温度に調整した恒温槽につけ、その後25℃に保った水溶液中で保存した。これらの温度処理後の検体希釈液を人工飼料に混合してカイコに供試した。

## 5. 殺虫活性試験

カイコに対する殺虫活性試験は公定試験法(Aizawa, 1976; BT剤研究会, 1973)に準拠して実施した。ガラス製蒸発皿に**10g**の人工飼料を入れ、これに**0.5ml** ずつ上記により調製した**BT** 液をマイクロピペットを用いて人工飼料上に滴下した。その後、スパーテルを用いて十分に均一になるまで混合した。**BT** 液を添加しない対照飼料においては、それらと同容量の滅菌蒸留水を混合した。これらBT製剤の希釈・混合操作は、*B. thuringiensis* 菌活性の温度差による影響を避ける目的からすべて**25℃**下で実施した。そして保存温度が異なるBT製剤粉末、滅菌蒸留水および各人工飼料については実験前にあらかじめ恒温器内(**25℃**)で一定時間保存してから用いた。

処理された各人工飼料は、滅菌済プラスチック製のペトリ皿(直径**9cm**)に**10g** ずつ、厚さ**2~3mm** に均一に塗り広げ、カイコ3令幼虫を各**10** 頭ずつ供試した。実験は各処理毎に最低3反復(計30頭)した。供試された幼虫は**25±1℃**の恒温器内で**BT** 液が添加された飼料で**3** 日間飼育した後、**BT** 液を含まない飼料に移しさらに**2** 日間飼育した。処理開始**5** 日後に生死を判別し記録した。

## 結果 および 考察

**25℃**で調整された検定希釈液の入った試験管を、**5~40℃**に設定された恒温槽内で5分間水浴させ、その後は通常の手順でBT製剤の生物検定を実施したところ、**10** 及び **15℃**区におけるカイコの死虫率が、わずか5分間の温度処理によってその活性が変動した(**Table 9**)。

佐野(1972)は、8、15及び30℃でコナガのBT製剤の感受性と飼育温度の関係を調べているが、致死率から低温ほど感受性が低いと述べており、石黒・宮園(1979)も、

カイコ5令幼虫への経口投与方法を用いたBT製剤投与後の飼育温度の影響(15, 25, 35°C)を調査し、24時間後の15°Cと25°Cの **LC<sub>50</sub>** は、35°Cよりも高く、高温ほど活性が高くなると報告している。

一方、浅野・鈴木(1995)は、ハスモンヨトウ1令幼虫を用いて、15, 20, 25, 30°Cの4飼育温度での感受性を調査したところ、20~30°Cでは活性に変化がなく、上記とは全く逆に15°Cが最も活性が高いが、コナガやチャのコカクモンハマキでは全ての温度で活性に影響がなかったと報告している。この一連の浅野らの実験では、**60°C**前後の温度下で、寒天成分の含まれる人工飼料を溶かしてBT製剤を人工飼料に混入する手法(Asano **et al.**, 1993)が用いられており、このため他の実験と結果が異なったとも考えられる。

本結果では、BT製剤の活性は **10~20°C**まではほぼ直線的に上昇し、**10~15°C**の低温が活性を低下させる点で石黒・宮園(1979)や佐野(1972)の結果と一致した。しかし、**30~40°C**では、25°Cよりも活性がやや低下し大きな活性の変化は認められなかった。これは、本実験では **BT** 製剤希釈液をわずかに5分間だけ設定温度にした後、25°Cに戻し、その後は投与後も25°C下で飼育保管したためと考えられる。この点では、浅野・鈴木(1995)が行ったBT製剤の希釈時の温度は、寒天の溶ける約 **60°C**であり、その後飼育温度を**15°C~30°C**にして活性を測っている。

いずれにしても、本実験のきっかけとなった、**10~15°C**の低温下で検定希釈液を調整すると活性が低下し、飼育器内の温度を生物検定法に定められた **25°C**に設定したにも関わらず、晩秋や初春の室内暖房が十分でない時期に生物検定すると活性が低下して力価が正確に測定できない事例の要因が、低温下での検定希釈液の調整操作にあった可能性が強く示唆される結果であった。

従って、生物検定の正確な実施にあたってはカイコの飼育温度だけでなく、検体希釈時の蒸留水の温度にも十分留意する必要があると考察された。

**Table 9. Effect of temperature at the time of preparation of BT solution on the lethal activity.**

No.	Temperature (°C) and Mortality (%)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
I	50.0	20.0	30.0	53.3	53.3	40.0	33.3	36.7
II	50.0	26.7	36.7	53.3	50.0	36.7	30.0	43.3
III	53.3	20.0	30.0	53.3	43.3	40.0	46.7	43.3
IV	46.7	23.3	40.0	56.7	56.7	36.7	36.7	36.7
Mean (%)	50.0	22.5	34.2	54.2	50.8	38.3	36.7	40.0
SE (%)	1.6	1.8	2.9	1.0	3.3	1.1	4.2	2.2

## 第5章 総合考察

BT製剤は、昆虫に対して特異的に作用する毒素を生産する細菌、*Bacillus thuringiensis*、に由来する殺虫剤で、作物や森林保護等のために世界中で広範に使用されている。この殺虫剤は種特異性が高く、環境への影響が少ないことを特徴としている。我が国では、定められた標準製剤と製品の致死活性を比較する生物検定法が品質管理のために採用されている。

本研究では生物検定の実施にあたり問題となる、BT製剤の活性(力価)に影響を与える緒要因について検討してきた。本章ではその結果をもとにBT製剤の開発から流通までの流れに沿った剤力価の管理上の問題点とそれらの対策を含めた品質管理システムのあり方について検討する。

**Fig. 15**にはBT製剤の開発から流通までの流れを上段に、また下段に本研究結果や他研究者の研究結果から想定される力価管理上の問題点とその対策を示した。BT製剤の開発から流通までの流れの中で、BT製剤の力価管理のために生物検定が度々実施される。製品は、標準品との定期比較検査によって力価が確認されるため、生物検定で用いられる標準品は、品質管理をする上で非常に重要である。標準品は、開発時にメーカーにおいて設定され、登録時に農薬検査所で一定の力価を確認された基準となる製剤標品である。

標準品は、農薬登録時に製品開発時のデータと共に農薬検査所に提出され、農薬としての適格性が評価される。この段階で定められた標準品は、開発した製造所と検査機関である農薬検査所の双方で、冷暗所(5℃)で保存され、力価の評価や安全性評価のための生物検定に利用される。

この流れの中で、メーカーにおいては菌の増殖・培養時における工場での力価の調整(商品開発時を含む)、製品の出荷前品質検査等のために生物検定が実施される。また、検査機関である農薬検査所では、標準品の力価の確認(登録時)、販売されている製品や製造所内への立ち入り検査時の抜き取り品、並びに輸入品や無登録品の取り締まりなどの段階で生物検定が実施される。

我が国で最初のBT製剤が登録になってから、既に30年近くが経過しようとしている。本研究を開始した(1996年)時点で、既に20年を越えた標準品があり、これらの標準

品の更新作業が行われたが、その際に更新された新しい製剤でも、生物検定による力価が、製造所と農薬検査所で一致しないなどの問題が発生した。この問題は、現行の品質管理システムの手順に沿って行われた結果であり、BT製剤の品質管理上不可欠な生物検定法そのものの精度や信頼性に大きな疑問が生じた。しかし、BT製剤のように孢子数だけでは活性が推定できない微生物殺虫剤の品質管理上の問題に対する対応策としては、現行の品質管理システムの中で、生物検定法の精度を向上させることが、避けて通れない最初の課題である。

一般に、病原微生物に対する昆虫類の感染抵抗性は、病原微生物の特性、宿主昆虫の特性及び環境条件によって影響を受けやすいことが知られており、生物検定にあたっては、これらの3要素を同一にして行う必要がある。病原微生物の特徴としては、系統、分離後の増殖条件、保存期間、宿主昆虫の特性としては、系統、発育ステージ、餌条件、環境条件としては、温度、湿度、光条件などが特に重要とされている(福原, 1979; 国見, 1993)。このため本研究では、BT製剤の品質管理システムの運用上の観点から、病原微生物(製剤)の特性として、製剤の系統および標準品の保存、宿主昆虫の特性として、人工飼料及びカイコ飼育条件、検定環境条件として、検定希釈液の温度等の緒要因についてその影響を検討した。その結果、当初予想された以上に、製剤に含まれる $\delta$ -内毒素の種類や性質、補助剤の種類、使用する人工飼料やカイコの飼育時の光条件など多くの要因によって、製剤の殺虫活性が影響を受け、正當に力価を評価できない場合のあることが明らかになった(**Fig. 15**)。

我が国で今後もカイコを使った殺虫活性(LC<sub>50</sub>)による力価管理システムをBT製剤の品質管理の目的で運用してゆくためには、まず、本研究から明らかにされた殺虫活性に影響を及ぼす緒要因のすべてについて十分に検討し、またBT製剤の新しい品質管理システムとして従来のように生物検定だけで行うのではなく、現行で考えられる非生物学的手法を加えた、より包括的な力価管理システムとして運用することが最良の対策であると考えられた。

つまり、本研究の結果から解明された緒要因のうち、現行の実験手法に十分に規定されていない要因、例えば、1) 2系統混合剤の標準品の保存温度を、5°Cから、-80°Cの超低温での保存に換えること。2) 使用する蒸留水や人工飼料をあらかじめ30分から1時間程度、25°Cに設定された恒温器内で保存し、あらかじめ温度を斉一にしてから検定に用いること、3) 人工飼料に用いる乾燥大豆粉末については、BT剤研究会等

で申し合わせの上、出来る限り同一製造所の製品の使用を義務づけること。また、4) 乾燥大豆粉末の統一が出来ない場合には、大豆粉末の製造工程での劣化を推定するためにNSI(窒素溶解性指数)の明らかなものを選ぶこと、5) 使用するカイコの3令幼虫は、ふ化直後から25℃、16L-8D下で飼育したものを使用し、全暗下で飼育された幼虫を検定に使用せず、飼育時と同じ条件で検定を行うこと、6) プロピオン酸類などの防腐剤や抗生物質、またカゼインやミルク粉末等を栄養成分に含まない従来の公定人工飼料組成を忠実に遵守し自家調整するか、飼料工場等に依頼する場合にも合致するものを注文して使用すること、さらに7) 万一、製造所と農薬検査所で力価測定結果が一致しない場合には、お互いの考えられる全ての実験環境を交換して活性上の整合性を充分にはかること、などの規定を生物検定法の中に新たに加える必要がある。

また、これらの生物検定法による欠点を補うための対策として、非生物学的検定法である化学・物理学的手法や形態学的手法を併せて実施することを提案したい(**Fig. 15**)。非生物学的手法は、生物検定法のもつカイコの飼育等に非常に時間と手間が掛かる欠点を補う技術として期待でき、もし、非生物学的な手法により、生物検定結果と十分な相関がある代替可能な技術が確立すれば、このような生物検定時における手間が大幅に短縮できる利点がある。

各 $\delta$ -内毒素の含有量は、SDS-PAGE やHPLCによって検出できることが知られており(Yamamoto, 1983b; Yamamoto and Dean, 2000)、検定のために製剤標品の可溶液をまずSDS-PAGEで泳動した後、ゲル上で毒素部分の吸光度を正確に計量し得られた値を、例えば、 $\text{化学力価} = \text{標準品}(A_{600}) / \text{供試製品}(A_{600}) \times 1000$ のような計算式に代入して、生物力価の代わりに850~1250の範囲にあるかを検討するなどの手法を将来に向けて検討する必要がある。

SDS-PAGEによる泳動後のゲル上の前駆体蛋白測定結果は、非生物学的手法で力価を管理するための有効な方法となる可能性が高く、本研究でも、長期保管により活性が劣化した製剤のように、BT製剤の活性と $\delta$ -内毒素前駆体蛋白の間には相関性が認められる場合もある。しかし、各 $\delta$ -内毒素がそれぞれ異なる活性や種特異性を持つために、カイコに対する活性は必ずしもSDS-PAGE分析による $\delta$ -毒素量とは平行しないことも事実であり、 $\delta$ -内毒素の活性上の共同性や、干渉性に対する一層の研究が必要である。本研究以外にも、非生物学的手法の試みとしてエライザ法の利用が検

討されているが、カイコを用いた生物検定の結果とは一致していない(Hori et al., 1996, 2000; Yamamoto et al., 1983a)。また、BT製剤では単1系統でも異なる $\delta$ -内毒素をもつ場合が多く、さらに、 $\delta$ -内毒素間に競合や相乗効果が存在して活性に影響するため *in vivo* での結果の予想がつきにくい場合も考えられる。製剤の力価を正確に求めるためには個々の $\delta$ -内毒素量を測定するだけでは不十分で、生物検定による活性の評価と併行して、非生物学的な手法による測定データを蓄積してゆくことが不可欠である。従って、SDS-PAGE やエライザ法などにより、一挙に生物検定を非生物学的検定法に置き換える試みは、BT製剤の作用機作が完全に解明されていない現状から困難であるが、従前通り生物検定による力価管理の中で、このような化学測定法によるデータの蓄積を進めていくことが、将来の適正なBT製剤の品質管理技術として重要である。

また、もう1つ別の非生物学的検定法の方向性として、低真空走査型電子顕微鏡(LV-SEM)を使用して活性が低下した製剤を識別出来る可能性が本研究の結果から、示された。走査型電子顕微鏡については、従来から、ICP 結晶の観察のために利用されてきたが、観察の度に化学固定や脱水等の前処理に時間が掛かることや、操作時の熱線等による影響が懸念され、BT製剤の品質管理のためにはあまり注目されてこなかった。しかし、最近ではLV-SEMの利用により、面倒な前処理なしにBT製剤を観察できる手法(改良鈴木法)が開発され、非常に簡単にBT製剤の顆粒表面の観察が出来る。この方法を使って、既登録6種のBT製剤の顆粒表面を観察した結果、多くのBT製剤は、その製造時の培養液や補助成分の違いによって独特の顆粒構造をしていることも判ってきた。従って、顆粒表面の形状を走査型顕微鏡で観察することによって、登録されている製剤の剤種を簡単に特定できる可能性があり、今後の研究次第で輸入BT製剤や未登録農薬の取り締まりに活用できるかもしれない。

以上、現在使われている生物検定法は、まだ完全なものではなく、あくまでも鱗翅目活性のBT製剤の殺虫活性メカニズムが完全に解明されるまでの補完的なシステムであり、今後BT製剤一般に関するより高レベルの活性メカニズムが明らかになった場合には、それにあわせて条件や方法を改良し、より精度の高い、適正な品質管理システムとして完成されることが期待される。



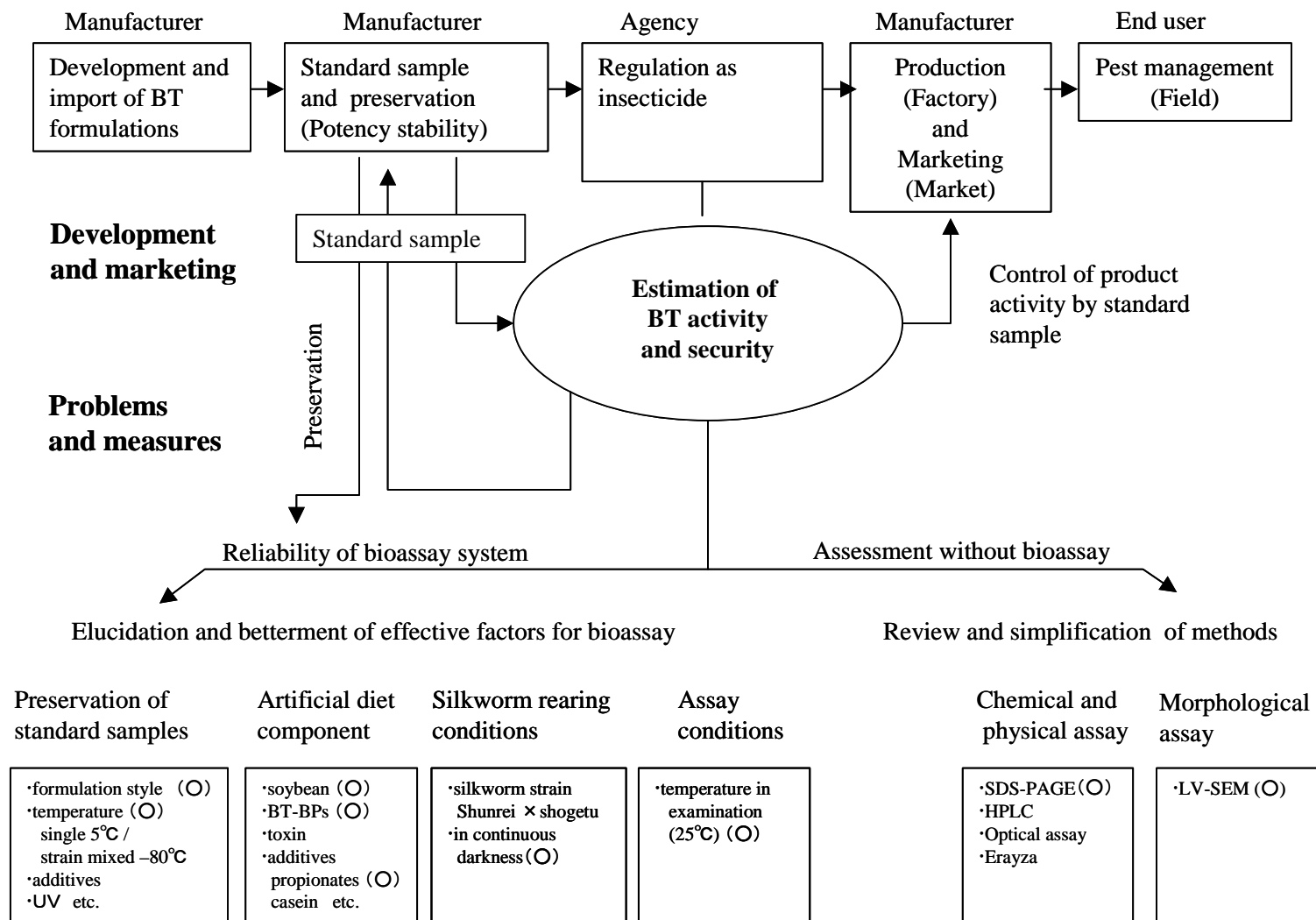


Fig. 15. Schematic illustration of problems and measures for BT formulation control based on flow between development and marketing. ○ indicates the effective factors for bioassay investigation in this study.

## (要旨)

BT製剤は、昆虫に対して特異的に作用する毒素を生産する細菌、*Bacillus thuringiensis*、に由来する殺虫剤で、作物や森林保護等のために世界中で広範に使用されている。この殺虫剤は種特異性が高く、環境への影響が少ないことを特徴としている。その力価は生物検定で決められており、決められた標準のBT製剤と製品の致死活性との比較によって示される。鱗翅目昆虫に活性をもつBT製品は、生物検定にカイコを用いている。本研究の材料である *B. thuringiensis*  $\delta$ -内毒素 Cry1C は *B. thuringiensis* serovar *aizawai* 系統に由来し、*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 系統由来の Cry1Aa と比べ、ハスモンヨトウに卓効を示し、抵抗性の発現頻度が低い利点を持つと言われるが、生物検定時の変動が大きいとも言われている。本研究では生物検定の実施にあたり問題となる、BT製剤の活性(力価)に影響を及ぼす緒要因について検討し、今後の品質管理のあり方について論じた。

1 系統からなるBT製剤は、全暗、5°C下における、10年以上の長期保存によっても、ほとんど活性が低下しないが、*B. thuringiensis* serovar *aizawa* と serovar *kurstaki* の2系統からなる混合剤においては有意な生物活性上の劣化が認められた。しかし、この混合剤における劣化は、全暗、-80°C下で保管した場合には発生しなかった。製剤サンプルをSDS-PAGEによって分析した結果、劣化した製剤では $\delta$ -内毒素前駆体量が有意に減少していた。また、劣化した製剤サンプルを、走査式電子顕微鏡で観察すると、その表面構造に物理的な劣化の兆候が認められた。

生物検定の際に用いられるカイコの人工飼料成分である乾燥ダイズ粉末の違いが、BT製剤の殺虫活性に影響を与えることが明らかになった。これはダイズ粉末中に含まれるタンパク質の中に、殺虫成分である $\delta$ -内毒素と結合能を有するものが存在するためである。また、同様に市販の人工飼料中に混合されることのあるプロピオン酸類もBT剤の殺虫活性を低下させることが明らかになった。

*B. thuringiensis*  $\delta$ -内毒素結合性蛋白の1種とされる炭酸脱水素酵素(CA)を人工飼料中に添加すると、BT製剤の $LC_{50}$ は有意に低下し、加えたCAの濃度(CA/BT)と活性低下には相関が認められた。このようにCAやダイズタンパク中の $\delta$ -内毒素結合性蛋白は、本来のBT受容体に比べると $\delta$ -内毒素に対する親和性は低いものであ

るが、 $\delta$ -毒素の受容体への結合を阻害し、活性に影響を及ぼすと考えられた。

カイコの飼育条件も生物検定結果に大きな影響を与える要因になることが明らかになった。発育の斉一化のために推奨される全暗飼育によって得られたカイコを検定に使用するとBT剤の活性(LC<sub>50</sub>)が約1/1.5に低下した。さらに、生物検定時に添加する検定希釈液の温度(5~40℃)によっても活性に影響を受けることが示された。

このように現行の生物検定手法は、製剤に含まれる $\delta$ -内毒素の種類や性質、補助剤の種類、使用する人工飼料やカイコの飼育条件など多くの要因によって、製剤の殺虫活性が影響を受け、正當に力価を評価できない欠点があることが明らかになった。

生物検定法の実施に伴う、このような欠点を補うために、化学・物理的手法や形態学的手法等の非生物学的な手法についても検討した。その結果、BT製剤の $\delta$ -内毒素の含有量は SDS-PAGE によって検出できたが、単1系統でも複数の $\delta$ -内毒素をもつ場合が多く、カイコに対する活性は SDS-PAGE による $\delta$ -内毒素量とは必ずしも一致せず、 $\delta$ -内毒素間の競合や相乗効果の影響が示唆された。

一方で、低真空走査型電子顕微鏡(LV-SEM)の利用によって、より簡便に劣化の有無や、剤種の識別が出来る可能性が示唆されたことから、力価検定に当たっては本研究で明らかになった緒要因について十分に留意し、SDS-PAGE や LV-SEM 等による非生物学的な手法を組み合わせたより精度の高い方法を採用することが重要であると結論された。

## 謝 辞

本研究の実施に際し有益な議論，ご指導を頂いた筑波大学の河野義明教授，正野俊夫元教授，本田 洋助教授，戒能洋一助教授，永田啓一元講師(現，理化学研究所)，並びに懇切な英文校閲を頂いた **D.Taylor** 博士に厚く御礼申し上げます。

また，論文審査において，それぞれのご専門の観点から貴重なご助言を頂いた筑波大学の臼井健二教授，柿島 眞教授に感謝申し上げます。

さらに，BT製剤の性質について，有用なご助言を頂いた東京農工大学の故岩花秀典元教授，国見祐久教授に感謝申し上げます。毒素蛋白抗体標品の提供と実験法に関し数々の有効な御助言を頂いた東京農工大学の佐藤令一助教授と同大学院生，矢野和彦氏，角谷友行氏，矢追克郎氏，中西和子氏，林 浩志氏に厚く感謝申し上げます。

電子顕微鏡操作にあたり貴重な助言を頂いた日本電子株式会社の鈴木武雄博士，高木憲治氏，人工飼料組成の実験に際し貴重な助言を頂いた日本農産工業株式会社，ダイズ粉末を提供して頂いた日清コスモフーズ株式会社，プロピオン酸の **SDS** 泳動に関し貴重な助言を頂いた第一化学薬品株式会社に御礼申し上げます。

また数々の貴重な自著を提供して頂いた大阪府立大学の姫野道夫元教授，北海道大学の飯塚俊彦元教授に感謝申し上げます。種々相談にのって頂いた元北海道農業試験場長の岡田利承博士，宇都宮大学の岩下嘉光元教授，上尾市在住小野恵子氏，農業環境技術研究所 濱 弘司 元科長，新潟大学堀秀隆教授，名古屋大学 小林迪弘教授，埼玉衛生短期大学 関島安隆教授，元クボタ株式会社 浅野昌司博士，北興化学株式会社 小池 勝博士，塩野義製薬株式会社 宮園 稔博士，エスディエスバイオテック株式会社 山中 聡博士および発表に際して協力頂いた農林水産省農薬検査所及び同横浜植物防疫所の各位，特に筑波大学大学院農学研究科社会人課程での本研究に理解と甚大な御配慮を頂いた農薬検査所 森田利夫 元所長(現，残留農薬研究所理事)，柿本靖信 元検査1部長(現，独立行政法人農薬検査所理事長)並びに農林水産省横浜植物防疫所 古茶武男 元所長(現，財団法人中央果実生産出荷安定基金協会)に深く感謝する。

## 引用文献

Aizawa, K. (1976) Recent development in the production and utilization of microbial insecticides in Japan. Proceedings of the first international colloquim on invertebrate pathology and IXth annual meeting, society for invertebrate pathology. Queen's university at Kingston, Canada, pp. 59-63.

鮎沢啓夫 (1978) カイコの病気とたたかう. 岩波科学, 東京, 84p.

Anderson, T. F. (1951) Technique for three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans. New York Acad. Sci. 2: 130-134.

Angus, T. A. (1956) Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. Can. J. Microbiol. 2: 122-131.

Angus, T. A. (1968) Similarity of effect of valinomycin and *Bacillus thuringiensis* parasporal protein in larvae of *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol. 11: 145-146.

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* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Appl. Entomol. Zool. 28: 513-524.

Asano, S., H. Hori and Y. Cui (1994) A unique insecticidal activity in *Bacillus thuringiensis* growth medium. Appl. Entomol. Zool. 29: 39-45.

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.

浅野昌司・岩佐智子・関昭広 (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.

Berliner, E. (1911) Über die Schlaflsucht der Mehlmottenraupe. Z. ges. Getreidew. 3: 63-70.

Bonnefoi, A., A. Burgerjon and P. Grison (1958) Titration biologique des préparations de spores de *Bacillus thuringiensis*. C. R. Acad. Sci. 27: 1418-1420.

Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

BT剤研究会 (1973) BT 剤に関する試験成績(昭和48年). 日本植物防疫協会, 東京, 445 pp.

Burgerjon, A and H. Dulmage (1977) Industrial and International standardization of microbial pesticides - I, *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga 22: 121-129.

Carroll, J., M.G. Wolfersberger and D. J. Ellar (1997) The *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-induced permeability change in *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles proceeds by more than one mechanism. J. Cell Sci. 110: 3099-3104.

Chalfant, R. B. (1973) Cabbage looper: Effect of temperature on toxicity of insecticides in the laboratory. J. Econ. Ent. 66: 339-341.

Chestukhina, G. G., I. A. Zalunin, L. I. Kostina, T. S. Kotova, S. P. Kattrukha and V. M. Stepanov (1980) The limited hydrolysis by endogeneous proteinnases as a cause of their apparent multiplicity. Biochem. J. 187: 457-465.

- Choma, C. T., W. K. Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynor and H. Kaplan (1990) Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis* structural implications. *Eur. J. Biochem.* 189: 523–527.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, B. Lambert, D. Leleclus, C. Gawron-Burke and D. H. Dean (1995) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* cry genes. Abstracts of SIP 28 th Annual Meeting, pp. 14.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D. H. Dean (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807–813.
- de León, T. and J. E. Ibarra (1995) Alternative bioassay technique to measure activity of cry III proteins of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 88: 1596–1601.
- Denolf, P., S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele and J. V. Rie (1993) Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1828–1837.
- Du, C. and K. W. Nickerson (1996) The *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin binds biotin-containing proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2932–2939.
- 道後充恵・豊田秀吉・松田一彦・備後美紀・直木優子・加藤靖也・松田克礼・反保宏行・大内成志(1997) 3-インドールプロピオン酸 (IPA) による水耕栽培トマトの青枯病防除とトマト組織における IPA の無毒化. *日植病報* 63: 406–408.
- Engstrand, C., B. Jonsson and S. Lindskog (1995) Catalytic and inhibitor-binding properties of some active-site mutants of human carbonic anhydrase I. *Eur. J. Biochem.* 229: 696–702.

Faust, R. M., J. R. Adams, K. Abe, T. Iizuka and L. A. Bulla Jr. (1982) Comparative morphology and size distribution of the parasporal crystals from various strains of *Bacillus thuringiensis*. J. Sericult. Sci. Jpn. 51: 316-324.

Finney, D. J. (1971) Probit analysis, Cambridge university press, Third edition, NY, 300p.

Francis, B. R. and L. A. Bulla (1997) Further characterization of BT-R1, the cadherin-like receptor for Cry1Ab toxin in Tobacco Hornworm (*Manduca sexta*) midguts. Insect Biochem. Molec. Biol. 27: 541-550.

福原敏彦(1979) 昆虫病理学. 学会出版センター, 東京, pp. 165-166.

Garczynski, S., F., J. W. Crim and M. J. Adang (1991) Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by protein blot analysis, Appl. Environ. Microbiol. 57: 2816-2820.

Gill, S. S., E. A. Cowles and V. Francis (1995) Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem. 270: 27277-27282.

Gilmore, R. and G. Blobel (1985) Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants. Cell 42: 497-505.

Goodman, N. S., R. J. Gottfried and M. H. Rogoff (1967) Biphasic system for separation of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 94: 485.

Haider, M. Z., B. H. Knowles and D. J. Ellar (1986) Specificity of *Bacillus*



*thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal  $\delta$ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. Eur. J. Biochem. 156: 531-540.

浜村保次(1975) カイコの人工飼料育への道. みすず書房, 東京, 311p.

Hannay, C. L. (1953) Crystalline inclusion in aerobic sporeforming bacteria. Nature 172: 318-340.

Hannay, C. L. and P. C. Fitz-James (1955) The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Can. J. Microbiol. 1: 694-710.

Hannay, C. L. (1956) Inclusion in bacteria. Symposium Soc. Gen. Microbiol. 6th, pp. 318-340.

Harris, C. R. (1971) Influence of temperature on the biological activity of insecticides. J. Econ. Ent. 64: 1044-1049.

Hassan, S. M., M. R. Abo-elghar, E. A. Albadry and G. I. Zohdy (1970) Studies on the chemical control of fruit tree false spider mite, *Cenopalpus pulcher*, in United Arab Republic. II. Relationships between temperature and toxicity of three acaricides. J. Econ. Ent. 63: 1-2.

林屋慶三・西田 順・松原藤好(1968) 家蚕消化液におけるウイルス不活性化 I. 飼料による不活性化作用の強弱. 応動昆 12: 189-193.

林屋慶三・松原藤好・西田 順・川本文彦 (1971) 人工飼料育蚕とクワ葉育蚕との比較. 京工織大繊維学報 6: 87-100.

林屋慶三 (1975) IV. 人工飼料育でえられるカイコの繭と生糸, カイコ人工飼料への

道(浜村保次編). みすず書房, 東京, pp. 259-277.

林屋慶三・西田 順・内田由子 (1976) カイコ消化液中の赤色蛍光蛋白質の生成機構—クロロフィリドの生成. 応動昆 20: 139-143

Heimpel, A. M. and T. A. Angus (1959) The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. Insect Pathol. 1: 152-170.

Heimpel, A. M. and T. A. Angus (1960) Bacterial insecticides. Bacteriol. Rev. 24: 266-288.

Heimpel, A. M. (1967) A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev. Entomol. 12: 287-322.

Himeno, M. (1987) Mechanism of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxin action on insect cells *in vitro*. In: K. Maramorsch (Ed.), Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture. Academic Press Inc., NY, pp. 29-43.

Himeno, M. (1988) Studies on receptor of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* on cultured insect cells. In: Y. Kuroda et al. (Eds.), Invertebrate and fish tissue culture. Japan Scientific societies press, Springer-verlag, Berlin, pp. 173-176.

Höfte, H., J. Van Rie, S. Jansens, A. Van Houtven, H. Vanderbruggen and M. Vaeck (1988) Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2010-2017.

Höfte, H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.

Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens and H. Van Mellaert (1988a) Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7844-7848.

Hofmann, C., P. Luthy, R. Hutter and V. Pliska (1988b) Binding of the  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur. J. Biochem. 173: 85-91.

Homes, K. C. and R. E. Monto (1965) Studies on the structure of parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. J. Mol. Biol. 14: 572-581.

Honée, G. and B. Visser (1993) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Entomol. Exp. Appl. 69: 145-155.

堀 秀隆 (1991) 微生物殺虫剤, BTトキシソ蛋白の研究の最近の進歩, 植物防疫 45: 493-497.

Hori, H., S. Asano and K. Ogiwara (1996) Fractionation and some features of synergistic compound which enhances the insecticidal activity of  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Entomol. Zool. 31: 29-35.

Hori, H., Y. Takahashi, M. Takahashi and Y. Wada (2000) Detection of the *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis strain Buibui protoxin with enzyme-linked immunosorbent assay and its application to detection of the protoxin in soil. Appl. Entomol. Zool. 35: 401-411.

Ignoffo, C. M., D. L. Hostetter, P. P. Sikorowski, G. Sutter and W. M. Brooks (1977) Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. Environ. Entomol. 6:

411-415.

飯塚俊彦・堀江保宏・瀧田義郎(1970) 蚕の腸内における好気性細菌フローラ(Ⅲ)人工飼料育における腸内細菌に及ぼす防腐剤および数種抗生物質の影響. 日蚕雑 39: 253-260.

飯塚敏彦 (1997) *Bacillus thuringiensis* の産出する殺虫性蛋白質とその病原機作: 現在までの歴史をたどって. 日蚕雑 66: 311-322.

石渡繁胤 (1901) 激烈なる一種の軟化病(卒倒病)に就いて. 大日本蚕糸会報 114: 1-5.

Inagaki, S., M. Miyasono, M. Yamamoto, K. Ohba, T. Ishiguro, R. Takeda and Y. Hayashi (1992) Induction of antibacterial activity against *Bacillus thuringiensis* in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptea; Noctuidae). Appl. Entomol. Zool. 27: 565 - 570.

Imanishi, S. (1980) Effect of light condition on the growth of young larvae of silkworm, *Bombyx mori* L. on an artificial diet. J. Sericult. Sci. Jpn. 49: 57-62.

井上貴央・長武 均(1987) 臨界点乾燥に代わる画期的な試料乾燥法. 医生物走査電顕 16: 67-69.

石黒丈雄・宮園 稔 (1979) カイコを用いた強制経口投与方法によるBT製剤の力価検定. 応動昆 23: 141-150.

伊藤智夫 (1959) 蚕児の食性について. 日蚕雑 28: 362-366.

伊藤智夫(1970) 栄養と人工飼料, カイコによる新生物実験(森 精 編). 三省堂, 東京, pp. 66-75.

Ito, T. and T. Inokuchi (1992) Nutritive effects of asparagine and glutamine on the silkworm, *Bombyx mori*. Appl. Entomol. Zool. 27: 575-586.

岩花秀典 (1987) 細菌の利用, バイオ農薬・生育調整剤開発利用マニュアル(岡田斉男ら編). エル・アイ・シー, 東京, pp. 17-29.

Iwao, S. (1962) Studies on the phase variation and related phenomena in some lepidopterous insects. Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ. 84: 1-80.

泉 美治・中川八郎・三輪谷俊夫 (1985) 生物化学実験の手引き, 2) タンパク質の分離・分析法. 化学同人社, 京都. 104p.

Jenkins, J. L., M. K. Lee, A. P. Valaitis, A. Curtiss and D. H. Dean (2000) Bivalent sequential binding model of *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. J. Biol. Chem. 275: 14423-14431.

Knight, P. J., N. Crickmore and D. J. Ellar (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol. Microbiol. 11: 429-436.

Knight, P. J., B. H. Knowles and D. J. Ellar (1995) Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. J. Biol. Chem. 270: 17765-17770.

Knowles, B. H. and D. J. Ellar (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. Biol. Chem. Acta. 924: 509-518.

Knowles, B. H., Knight, P. J. and D. J. Ellar (1991) N-Acetyl galactosamin is part of

the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*, Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 245: 31-35.

Knowles, B. H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. Adv. Insect. Physiol. 24: 275-308.

小林 浩(1996) 癌細胞の細胞外マトリックス破壊の機序とその制御による湿潤, 転移抑制. 日本産科婦人科学会雑誌 48: 623-632.

国見裕久(1993) 天敵微生物の力価検定法, 天敵微生物の研究手法 特別増刊号 2 (岡田齊夫ら編). 植物防疫, 東京, pp. 91-102.

Kunimi, Y. and E. Yamada (1990) Relationship of larval phase and susceptibility of the armyworm, *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctidae) to Nuclear polyhedrosis virus and Granulosis virus. Apple Entomol. Zool. 25: 289-297.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227: 680-685.

Lee, M., K. Milne, R. E. Ge., A. Ze and D. H. Dean (1992) Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. J. Biol. Chem. 267: 3115-3121.

LeOra software (1987) PoLo-PC use's guide, LeOra Software, Barkley, Col. USA, 23p.

Li, J., J. Carroll and D. J. Ellar (1991) Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature 353: 815-821.

Luo, K., Y. J. Lu and M. J. Adang (1996) A 106 kDa form of aminopeptidase is a

receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxin the brush border membrane of *Manduca sexta*. Insect Biochem. Molec. Biol. 26: 783-791.

Maagd, R. A., H. Van Der klei, P. L. Bakker, W. J. Stiekema and D. Bosch (1996) Different domains of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin can bind to insect midgut membran proteins on ligand blots. Appl. Environ. Microbial. 62: 2753-2757.

Maagd, R. A., P. Bakker, N. Statkov, S. Dukiandjiev, W. Stiekema and D. Bosch (1999) Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin cry1C domain III amino acid residues involved in insect specificity. Appl. Environ. Microbial. 65: 4369-4374.

Maagd, R. A., M. Weemen-Hendriks, W. Stiekema and D. Bosch (2000) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, cry1-cry1C Hybrids. Appl. Environ. Microbial. 66: 1559-1563.

Masson, L., G. Prefontain, L. Peloquin, P. C. Lau and R. Brousseau (1990) Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. Biochem. J. 269: 507-512.

Masson, L., Y. J. Lu, R. Brausseau and M. J. Adang (1995) The cry1A(c) receptor purified from *Manduca Sexta* displays multiple specifications. J. Biol. Chem. 270: 20309-20315.

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.

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. (2001) Effect of light condition on the insecticidal activity of BT (*Bacillus thuringiensis*) formulations to the silkworm, *Bombyx mori* (L.). Appl. Entomol. Zool. 36: 373-376.

Matsumoto, N. (2002) *In vivo* inhibitory effect of carbonic anhydrase on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*. J. Insect Biotechnol. Sericol. 71: 65-67.

Matsumoto, N., and T. Suzuki An efficient assay of *Bacillus thuringiensis* formulations by low vacuum SEM freeze drying. J. Pesticide Sci. *in press*.

宮園 稔・山本牧子・稲垣秀一郎・大羽克明・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  $\delta$ -内毒素の殺虫活性増強について. 応動昆 38: 101-108.

宮園 稔・鈴木 稔・山下ふじ子・熊谷千代子・上山良人・堤内正美 (1998) *Bacillus thuringiensis* UV 耐性株の数種鱗翅目昆虫に対する殺虫活性および持続性. 応動昆 42: 15-20.

Morris, O. N. (1983) Protection of *Bacillus thuringiensis* from inactivation by sunlight. Can. Entomol. 115: 1215-1227.

Mukai, J., A. Hara, A. Matsumoto and S. Akune (1969) A red fluorescent protein from silkworm. Agric. Biol. Chem. 33: 125-127.

Nagamatu, Y., R. Tsutsui, T. Ichimaru, M. Nagamatsu, K. Koga and K. Hayashi (1978) Subunit structure and toxic component of  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Invert. Pathol. 32: 103-109.

Nagamatsu, Y., Y. Itai, C. Hatanaka, G. Funatsu and K. Hayashi (1984) A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*, Agric. Biol.



Chem. 48: 611-619.

Nagamatsu, Y., S. Toda, T. Koike, Y. Miyoshi, S. Shigematsu and M. Kogure (1998) Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 727-734.

新村正純・桐村二郎(1974) カイコの人工飼料における防腐剤の開発, 日蚕雑 43: 163-170.

西田 順, 岡田裕伸・林屋慶三・和久義夫・住本憲一 (1973) 人工飼料育とクワ葉育蚕との比較 II 抗ウイルス性赤色けい光蛋白の *in vitro* における生合成と中腸組織内の局在性について. 京工織大繊維学報 7: 59-67.

西田 順 (1974) 家蚕消化液赤色蛍光蛋白の生成機構. 応動昆 18: 126-132.

西沢一俊・志村憲助 (1967) 入門酵素化学, 南江堂, 東京, 321p.

Nofer, JR., Tepel, M., Kehrel, B., Wierwille, S., Seedorf, U., Zidek, and W., Assmann, G. (1997) Circulation 95: 1370-1377.

Normant, B. R. and Chambers (1970) Temperature relationships in organophosphorus poisoning in boll weevils. J. Econ. Ent. 63: 502-504.

於保信彦・真下洋二 (1973) BT 剤のコカクモンハマキ(チャ型)に対する効果, BT 剤に関する基礎的研究成績(昭和 48 年). 日本植物防疫協会, 東京, pp. 91-94.

Ogo, M., Yamada, S., Kobayashi, Y., Shibata, J. and Nagamatsu, Y. (1990) Nucleotide sequence of the lepidoptera-toxic protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Dendrolimus* T84A1 J. Fac. Apple. Biol. Sci. Hiroshima Univ. 29: 95-107.

岡田利承・今村清昭・松谷茂伸・曾根一人 (1977) BT水和剤の力価検定に及ぼす人工飼料中のクワ葉粉末の大きさの影響. 農薬検査所報 17: 28-33.

Park, H.W., D. K. Kou and B. A. Federici (2000) Molecular genetic manipulation of truncated cry1C protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improve stability and yield. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4449-4455.

Pocker, Y. and C. Miao (1987) Molecular basis of ionic strength effects: interaction of enzyme and sulfate ion in CO<sub>2</sub> hydration and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dehydration reactions catalyzed by carbonic anhydrase II. Biochemistry 26: 8482-8486.

Raun, E. S. and R. D. Jackson (1966) Encapsulation as a technique for formulating microbial and chemical insecticides. J. Econ. Entomol. 59: 620-622.

Russell, R. M., N. E. Savin and J. L. Robertson. (1977) POLO: A new computer program for probit analysis, Bull. Entomol. Soc. Am. 23: 209-213.

Sanchis, V. and D. J. Ellar (1993) Identification and partial purification of a *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxin binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. FEBS Lett. 316: 264-268.

佐野利男 (1972) BT 剤の効果に関する基礎研究, BT 剤に関する基礎研究成績(昭和 47 年). 日本植物防疫協会, 東京, pp. 23-29.

佐藤令一 (1998) BT毒素蛋白質の蛋白質結合様式と認識モチーフの多様性の解析, 平成8, 9年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書, 14p.

Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672.

Schnepf, H. E. and H. R. Whiteley (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2893–2897.

Sibano, Y., A. Yamagata, N. Nakamura, T. Iizuka, H. Sugisaki and M. Takanami (1985) Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein. Gene 34: 243–251.

Singh, P. (1977) Artificial diets for insects, mites, and spiders. IFI/Plenum Data Company, NY, pp. 290–299.

Skovmand, O., I. Thiéry and G. Benzon (2000) Is *Bacillus thuringiensis* standardization still possible? Update and improvement of *Bt* titration over 20 years. In: J. -F Charles et al., (eds.), Entomopathogenic bacteria: From laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 275–295.

Sugimura, M., R. Sato and H. Iwahana (1997) Unusual proteolytic processing of a  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* strain *Buibui* by larval midgut-juice of *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae). Appl. Entomol. Zool. 32: 533–540.

Suzuki, N., H. Hori, K. Ogiwara, A. Asano, R. Sato, M. Ohoba and H. Iwahana (1992) Insecticidal spectrum of novel isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis*. Biol. Control. 2: 138–142.

鈴木武雄・柴田昌照・田中和明・土田恵子・戸田龍樹 (1995) 低真空走査型電子顕微鏡を利用したプランクトン観察のための凍結乾燥法とその応用. 日本プランクトン学会報 42: 53–56.

Tabashnik, B. E., T. Malvar, Y. Liu, N. Finson, D. Borthakur, B. Shin, S. Park, L.

Masson, R. A. Maagd and D. Bosch (1996) Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interaction with Domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2839-2844.

土山彬 (1978) コナガ幼虫による *Bacillus thuringiensis* 製剤の力価検定. 応動昆 22: 234-237.

氏家昌行・鈴木武雄・吉川翠(1995) 低真空走査型顕微鏡による室内塵性ダニ類観察のための簡易凍結乾燥手法. 家屋害虫 17: 18-110.

Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, H. Ji, and L. A. Bullar Jr. (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270: 5490-5494.

Valaitis, A. P., M. K. Lee, F. Rajamohan and D. H. Dean (1995) Brush border membrane aminopeptidase-N in midgut of gypsy moth serves as the receptor for the Cry1A(c)  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 1143-1151.

Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheel and H. Van Mellaert (1990) Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1378-1385.

Washida, S. (1983) Intensity threshold of illumination for the photoperiodic reaction of silkworm larvae reared on an artificial diet. *J. Sericult. Jpn.* 52: 151-156.

Wolfersberger, M., G. Lüthy, P. Mauer, A. Parenti, P. Sacchi, V. Giordana, B. and Hanozet, G. (1987) Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*), *Comp. Biochem. Physiol.* 86: 301-308.

Yamamoto, T., J. A. Garcia and H. T. Dulmage (1983a) Immunological properties of the entomocidal proteins of *Bacillus thuringiensis* and its insecticidal activity. J. Invertebr. Pathol. 41: 122-130.

Yamamoto, T. (1983b) Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. J. Gen. Microbiol. 129: 2595-2603.

Yamamoto, T. and D. H. Dean (2000) Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: J.-F. Charles et al. (Eds.) Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 81-100.

Yang, P. W, T. K. Kumar, G. Jayaraman and B. Yu. (1996) Effect of organic acids in the prevention of aggregation on rapid refolding of proteins. Biochem. Mol. Biol. Int. 38: 393-399.

Yaoi, K., T. Kadotani, H. Kuwahana, A. Sinkawa, T. Takahashi and R. Sato (1997) Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. Eur. J. Biochem. 246: 652-657.

山内文男・大久保一良 (1992) 大豆の科学. 朝倉書店, 東京, 199p.