

of discharges despite continuous stimulation. Geraniol had no effect on the cells. It should be noted here that the cells did not respond equally to the every odor stimulation tested.

Figure 2 shows the summary of the reactions of the units tested in both sexes to an arbitrarily chosen set of odorants. The spectra of the units overlap considerably, but there is still some spectral variability from cell to cell. For example, unit numbers 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12 are very similar to each other, but not exactly the same. From these results, it is obvious that the cells in the antenna possess some degree of specific sensitivity to odor stimuli. In the olfactory lobe of the cockroach, excitation (impulse frequency increase during stimulation) and inhibition (impulse frequency decrease) are known to be components of the odor response pattern<sup>2)</sup>. However, the inhibitory responses has not been recorded from the efferent cells of this insects. Of the highest interest to the present discussion is the indications of the activities of the presumed efferent cells: (1) The responses to odor stimuli

disappeared when the antenna was amputated from its base, although both different and indifferent electrode were placed on the same place of the antenna as before amputating antenna; (2) A burst of discharge could also be produced by the light illumination. (3) Even when odor stimuli were applied to distant regions of antenna from the places of recording electrodes, we can usually record big responses.

Though these experiments are still preliminary, the above-mentioned results strongly indicate that the electrophysiological responses to odor and light stimuli could be derived from efferent neurons.

**Acknowledgment:** The author expresses appreciation to Dr. T. Tamura for his encouragement and valuable advices, and to Mrs. K. Koga for her assistance.

#### References

- 1) Yamada, M.: *J. Physiol.*, 214, 127 (1971).
- 2) Yamada, M.: *Nature*, 217, 778 (1968).

---

**Effect of Alkaline and Acid Solutions on Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis*.**  
Junko Nishiitsutsuji-Uwo and Ayako OHSAWA (Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd., Fukushima-ku, Osaka 553) Received April 8, 1975. *Botyu-Kagaku*, 40, 96, 1975. (with English Summary 102)

#### 18. *Bacillus thuringiensis* の殺虫毒性におよぼす酸、アルカリの影響 宇尾淳子, 大沢文子 (塩野義製薬研究所) 50. 4. 8 受理

*Bacillus thuringiensis* の殺虫毒性を検定する場合、アルカリ性溶液を用いると毒性が著しく低下する事実、われわれは度々遭遇した。BT がりん翅目昆虫に特異的に毒性を発揮するのは、腸管内の pH がアルカリ性であることが必須条件の一つとされており、かつ、この毒素を可溶化しうる溶液の代表の一つは強アルカリ性溶液であるとされている。それにもかかわらず、アルカリ性溶液で殺虫活性が低下、時に消失するのは、大きな矛盾のように思われた。そこで、BT var. *aizawai* を対象に、NaOH および KOH と酢酸をアルカリと酸の代表としてえらび、濃度・処理時間・pH 等を種々に組合わせて、BT 殺虫活性におよぼす影響をしらべた。その結果以下のことが判明した。

- ① 酢酸は殺虫活性に影響を与えない。
- ② NaOH や KOH は濃度が高い程、また処理時間が長い程活性の低下または消失をきたす。0.01 M の低濃度でさえ、長時間処理すると活性は低下する。
- ③ NaOH で低下または消失した活性は中和、または透析によっても回復しない。
- ④ NaOH による活性の低下は NaOH の濃度よりも、むしろ溶液の pH に依存するものであり、活性を低下させる臨界 pH は 11-12 である。

*Bacillus thuringiensis* (以下 BT と略す) は芽胞細菌であり、菌体内に  $\delta$ -toxin と呼ばれるタンパク性の毒素結晶体を生成する。この結晶体を食下した場合、りん翅目こん虫のみが特異的に死ぬのは、腸管内の

pH がアルカリ性 (>pH 8.9) であることが大きな要因であるとされている。事実、この毒素は水、酸および有機溶媒に不溶であり、一般にアルカリ、もしくはアルカリと SH 試薬による可溶化が試みられている<sup>1,2,3)</sup>。

ところが、BTの殺虫毒性を検定する場合、それが培養収獲物であれ、また結晶体であれ、毒素の精製物であれ、アルカリ溶液を用いると毒性が著しく低下する事実がわれわれはたびたび遭遇した。渡辺ら<sup>1)</sup>も、結晶性毒素は0.5M-NaOHによって殺虫活性が失活することを簡単に報告しているが、一方では、腸管内のpHがアルカリ性であることが殺虫性の必須条件とされながら、他方、その毒素が可溶化されるアルカリ溶液によって殺虫活性が低下、または消失するという事実は、一見大きな矛盾に思われた。

この矛盾を追求するために、筆者らはまずカイコに対して摂食忌避や毒性のないNaOHおよびKOHと酢酸(以下AcOHと略す)とを、代表的なアルカリおよび酸としてえらび、濃度・pH・処理時間等を種々に組み合わせて、BTの殺虫活性におよぼす影響について詳細に検討した。その結果をここに報告する。

実験材料および方法

菌株は、BT var. *aizawai* を使用した。培養液は、パレイショデンプン3%、大豆かす5%、カゼイン1%、リン酸アンモニウム0.2%、pH 7.0で、30°Cで2日間振とう培養を行なったものである。培養後遠心して沈殿物を集め、水洗、乾燥して微粉末にしたものを使用した。全実験は同一lotを用いて行なわれたが、使用されたlotの細胞体由来の乾燥重量(Net wt.)は、全乾燥重量(gross wt.)の約1/2と推定された。

毒性試験は、生桑葉飼育のカイコ(秋宝×神鈴)の2-3令起蚕を対象動物とした。BTを水、または0.025% Tween-80中でホモジナイズし、この懸濁液中に桑葉を浸してカイコに与え、24時間後に食べ残した桑葉を捨てて新しい生桑葉を与え、連日観察して3日間の致死率を調べた。各区20-30頭を供試し、太い葉脈を除いて細かくきざんだ桑葉1gにつき約0.2mlのサンプル溶液を使用した(3令起蚕10頭では、約20時間で1gの桑葉を食下する)。LD<sub>50</sub>はプロビット法で表わし、この溶液1mlにおけるBT量(gross wt.)で算出した。

実験結果

1) BT 殺虫活性のアルカリによる影響

BTの結晶毒素抽出のためにしばしば用いられているNaOHについて、まず次の実験を行なった。

1, 0.5, 0.1Mの3つの異なるNaOH溶液に、BTを加え、それぞれ異なる時間(0-49時間)8°Cに保存したのち、BTの最終濃度が1mg/ml、NaOHは0.1Mになるように調整して各区2令起蚕20頭を用いて生物検定を行なった。

Table 1から明らかなように、1M-NaOHの場合、

Table 1. Change of insecticidal activity by NaOH Mortality (%) over 3 days. 20 *Bombyx* larvae (1st day of 2nd instar) were employed for each experimental lot. BT: 1mg/ml(final), NaOH: 0.1M(final)

Hours in NaOH			Mortality %
1M	0.5M	0.1M	
—	—	—	100
0 <sup>1)</sup>	—	—	100
0.5	—	—	100
1	—	—	74
3	—	—	0
5 <sup>2)</sup>	—	—	0
—	1	—	100
—	3	—	70
—	5	—	15
—	—	1	100
—	—	5	100
—	—	24	100
—	—	49	100
Control NaOH { 0.1M 1/38			3
{ 0.5M 0/19			0

- 1) BT was soaked in 1M NaOH for less than 1 min.
- 2) After the treatment of 5-hour in 1M NaOH, BT activity was never recovered by neutralization or dialysis.

30分以内の処理であれば100%の致死率を保っていたが、1時間では殺虫活性は低下し、3時間以上処理すると活性は完全に消失していた。また、1M-NaOHに5時間接触した後、それをAcOHでpH 7に調整し、更に0.1Mに希釈して1時間後と24時間後に生物検定を行なったが活性は回復せず、また同じく1M-NaOHに5時間接触後、水で1-2日間透析を行なった場合も同様で、NaOHにより不可逆的にBTの殺虫活性は失活したものと考えられた。

0.5M-NaOHの場合は、上記1M-NaOHの場合よりも殺虫活性は多少長く保たれているように思われた。すなわち、0.5Mの3時間区の殺虫活性は、1M、1時間区とはほぼ同じで、0.5Mでは5時間区でもまだわずかに活性が残っていた。しかしながら、1M、0.5M-NaOHのような強アルカリに接した場合、BTの殺虫活性はすみやかに消失してゆくことが判明した。これに反し、0.1Mの場合では49時間区でも、このBT濃度(1mg/ml)においては、100%の殺虫活性を保持していた。

2) BT 殺虫活性の酸による影響

酸の代表としてAcOHをえらび、BTを1Mと0.1MのAcOH溶液中で、それぞれ異なる時間(0-49時間)、8°Cに保存した。NaOHの場合と同様、生物検定はすべて、BT濃度は1mg/ml、AcOHは0.1Mに一定し、各区2令起蚕20頭を用いた。Table 2から明らかなように、1M-AcOHに2日間接しても、このBT濃度(1mg/ml)では活性の低下は全く見られなかった。1M-AcOHに5時間接した後1M-NaOHで中和し、0.1Mまで希釈して1時間後および24時間後に生物検定を行なったが、いずれの場合も致死率は100%保たれていた。

Table 2. Change of insecticidal activity by acetic acid  
Mortality (%) over 3 days. 20 *Bombyx* larvae (1st day of 2nd instar) were employed for each experimental lot.  
BT: 1mg/ml (final), acetic acid: 0.1M (final)

Hours in AcOH		Mortality %
1M	0.1M	
—	—	100
0 <sup>1)</sup>	—	100
5 <sup>2)</sup>	—	100
24	—	100
49	—	100
—	1	100
—	5	100
—	24	100
Control. 0.1M AcOH		(0/40) 0

- 1) BT was soaked in 1M AcOH for less than 1 min.
- 2) BT activity was retained after neutralization with 1M NaOH following the treatment of 5-hour in 1M acetic acid.

3) アルカリ、酸による殺虫活性度の変化

これまで示した実験は、BTの最終濃度を1mg/mlに一定して行なわれたので、殺虫活性がどの程度変化しているのかを判定することが困難であった。そこで1)と2)からそれぞれ0.1M・49時間区を選びだし、希釈試験を行なった。無処理区として、BTを水に49時間浸したのを用いた。水、0.1M-NaOH、0.1M-AcOHの3溶液中に49時間浸漬したBT溶液を水で5段階に希釈し、2令起蚕各20頭を用いて生物検定を行なった (Fig. 1)。

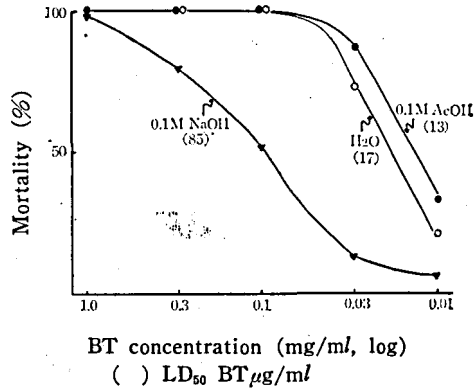


Fig. 1. Change of insecticidal activity by NaOH or acetic acid.

Mortality (%) over 3 days. 20 *Bombyx* larvae (1st day of 2nd instar) were employed for each experimental lot. BT was soaked for 49 hours in each solution.

BT 1 mg/ml の濃度で検定した場合、0.1M-NaOH と 0.1M-AcOH の両液とも 49 時間区では 3 日間の致死率は 100% であり (Table 1, 2), 殺虫活性は一見同じと思えた。ところが希釈実験をみると (Fig. 1), 0.1M-NaOH の LD<sub>50</sub> は水の場合と比べて 5 倍であった。すなわち、活性は約 1/5 に低下していたことになる。これに反して、0.1M-AcOH の場合、殺虫活性は水のそれに比して同じか、または少し高いように思われた。これらの結果から、BT の殺虫活性は 0.1M-NaOH 中で 2 日間処理すると相当低下するが、0.1M-AcOH 中では安全に保たれていることが推定された。

4) NaOH および KOH の濃度と BT 殺虫活性との関係

上述したごとく、BT の毒素の活性は AcOH 中では完全に保持されたが、NaOH 中では低下または消失した。そこで、NaOH 単独の溶液に浸漬する場合、どの濃度ならば活性を安全に保持できるかを調べるために次の実験を行なった。

NaOH を 0.4M から 0.01M まで 11 段階に分けて溶液をつくり、これらに BT を加え 8°C に 3 日間保存した後希釈を行ない、カイコ 2 令起蚕各 25 頭中の 3 日間の致死率を調べた。0.03 mg/ml の希釈区ではほとんど全区が 0% であったのでこれをふき、0.3 mg/ml と 0.1 mg/ml の両区の結果を Fig. 2 に示した。

この図から明らかなように、NaOH を単独に用いた場合、0.01M のような低い濃度の溶液中でも BT を 3 日間保存すると、その毒素活性は対照区の水 (O) に比してずっと低下しており、NaOH が 0.02M 以上の濃度になると活性は急激に低下または消失すること

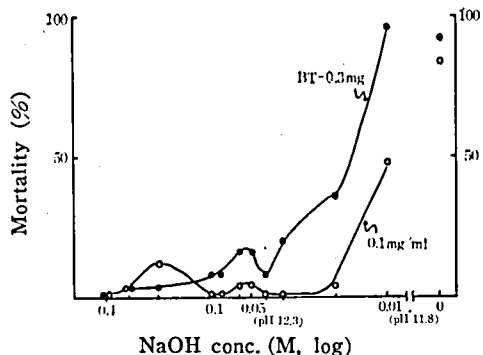


Fig. 2. Relationship between the concentration of NaOH and insecticidal effect Mortality (%) over 3 days. 25 *Bombyx* larvae (1st day of 2nd instar) were employed for each experimental lot. BT was soaked for 3 days in each concentration of solution.

がわかった。

NaOHと同様の実験をKOHを用いて異なる時期に行なった結果を示したのがTable 3である。KOHを0.5Mから0.01Mまで7段階に分けて、これらにBTを加え6°Cに3日間保存したのを希釈して、カイコ2令起蚕各30頭中の3日間の致死率をしらべた。この場合、NaOHの0.1M区と0.01M区とを再度対

照として検査した。

この表から明らかなように、KOHも単独に用いた場合、NaOHと全く同様の結果を示すことがわかった。しかしながら、用いた溶液の20°CでのpHの実測値が、活性を保持していた0.01M NaOHでは11.8、0.005M KOHでは11.5であったが、活性の低下した0.05M NaOHと0.02M KOHでは12.3であったので、活性の低下や消失が、NaOHまたはKOHの濃度でなく、pHに依存していると推定された。

5) BT 殺虫活性の pH による影響—Na<sup>+</sup>イオン強度一定1—

BTの殺虫活性がpHに依存しているという推定を証明するために次の実験を試みた。すなわち、0.2MのGlycine-NaCl-NaOH bufferでpH 6から12.9までの16段階の溶液をつくり、このbufferと等量の0.6 mg BT/ml (H<sub>2</sub>O)を加えて最終濃度を0.3 mg BT/0.1M-Na<sup>+</sup>sol.に一定し、3日間8°Cに放置した後に生物検定を行なった。希釈区(0.1, 0.03, 0.01 mg/ml)は、原液を4日間8°Cに放置した後水で希釈して生物検定した。対象こん虫はカイコ3令起蚕で、25頭を一区とした。その結果の一部をTable 3に示した。この場合のpHは20°Cにおける測定値であり、3—4日間処理した8°Cでの実際の値はこの測定値より0.2—0.3程度高いものと思われる。

このTable 4が示すように、0.3 mg/ml区では

Table 3. Change of insecticidal activity by KOH Mortality (%) over 3 days. 30 *Bombyx* (1st day of 2nd instar) were employed for each experimental lot.

Solutions	pH <sup>2)</sup>	BT concentration <sup>1)</sup> (mg/ml)			LD <sub>50</sub> (mg/ml)
		0.3	0.1	0.03	
0.5M-KOH	13.5	0	0	3	
0.2	13.3	0	0	0	
0.1	13.1	17	0	3	
0.05	12.8	50	13	0	
0.03	12.55	73	39	3	165
0.02	12.35	97	45	3	100
0.005	11.5	100	90	10	55
H <sub>2</sub> O	—	100	73	23	60
0.1M-NaOH	13.0	10	0	3	
0.01	11.9	100	90	26	43
non-treated		0 (out of 45)			
H <sub>2</sub> O		1 (out of 55)			
KOH (0.5-0.005M)		0 (out of 90)			

1) BT was soaked for 2 days (0.3 mg/ml) at 6°C, then assayed.

2) pH was read at 20°C.

Table 4. Effect of pH on the insecticidal activity (constant Na<sup>+</sup>ion --0.1M by NaCl+NaOH).Mortality (%) over 3 days. 24-27 *Bombyx* larvae (1st day of 3rd instar) were employed for each experimental lot.

Constitution of solution			BT concentration <sup>1)</sup> (mg/ml)				LD <sub>50</sub> μg/ml
NaOH(M)	glycine(M)	pH <sup>2)</sup>	0.3	0.1	0.03	0.01	
—	0.1M	5.8	100%	83%	52%	0%	42
—	0.1M	6.0	100	—	—	—	
0.005M	0.095	8.5	100	76	44	0	45
0.02	0.08	9.3	100	88	36	4	39
0.04	0.06	10.4	100	100	9	0	43
0.05	0.05	11.0	100	58	9	0	84
0.055	0.045	12.0	100	64	0	0	87
0.06	0.04	12.3	96	0	0	—	
0.07	0.03	12.6	59	0	0	—	
0.09	0.01	12.8	12	—	—	—	
0.1	—	12.9	4	—	—	—	
Control 0.1M NaCl non-treated				2/75	3%		
				1/50	2%		

1) BT was soaked in each solution for 3 days (0.3mg/ml) or 4 days (0.1-0.01 mg/ml) at 8°C, then assayed.

2) pH was read at 20°C.

pH 12.6, 0.1 mg/ml 区では pH 12.0, 0.03 mg/ml 区では pH 9.3 以上になると活性は急激に低下した。用いた BT 溶液の3日間の LD<sub>50</sub> 値をみると, pH 5.8—10.4 がほぼ一定で, pH 11—12 で約2倍, pH 12 以上になると急激に高くなっている。そして pH 12.8 に3日間接すると活性はほとんど消失するものと思われた。この実験では Na<sup>+</sup> のイオン強度は一定であるが, NaOH 濃度は一定ではない。溶液中の NaOH 濃度が高くなるに従って pH は上がり, かつ活性は低下した。しかしながら, 活性の低下, 消失が NaOH 濃度によるよりも pH によるものであることは先の実験 (Fig. 2, Table 3) から推論づけられた。

#### 6) BT 殺虫活性の pH による影響—Na<sup>+</sup> イオン強度一定 2—

上記の結果をさらに確かめるために次の実験を行った。このたびは, NaCl を加えずに Na<sup>+</sup> イオンを NaOH のみで一定とし, これに glycine を加えて pH を調整して最終の Na<sup>+</sup> イオン強度を 0.1M とした。これらの液に BT を3日間 8°C で浸漬したのち, カイコ 2 令起蚕 25 頭を一区として検定を行なった。無毒素対照区としては, 0.41M, 0.2M, 0.05M の glycine 溶液を用いたが, いずれの濃度の液を与えても3日間で死亡する個体は一頭もなく, 無処理区よりも発育はむしろ良好であった。

Fig. 3 から明らかのように, BT を各溶液に3日間処理した場合, pH 11—12 の間が殺虫活性保存の臨界 pH になっていることが判明した。Probit 法で 50% 致死濃度を求めてみると, pH 6.2—11.2 の間が 27—56 μg/ml であり, pH 10.1 のところが一応もっとも低い値を示し, pH 12 付近では約 1/50 に活性がおちていた。

pH 10 付近が殺虫活性の保存に最適であると, ここで結論づけることは困難である。たとえば, 対照区として水または glycine 中に BT を浸漬した場合でさえ, Fig. 1 では 17 μg/ml (2 令), Table 3 では 60 μg/ml (2 令), Table 4 では 42 μg/ml (3 令), Fig. 3 では 39 μg/ml (2 令) となっており, 同じような検定を異なる時期に行なった場合, 同一品種のカイコを用いてさえ, このような誤差が生じているためである。人工飼料育で一定の方法により検定を行なった場合には, 経験上この誤差は相当縮められるように思われた。いずれにしても, この種の検定法には, 今後多くの改良が加えられるべきであると考えられる。

## 論 議

BT の産生する菱形の毒素結晶は, 水や有機溶媒には不溶であるが, pH 11 以上の強アルカリ溶液や還元剤, 変性剤に可溶である。この性質を利用して毒素の抽出・精製が試みられてきた<sup>5-13)</sup>。δ-toxin のアミ

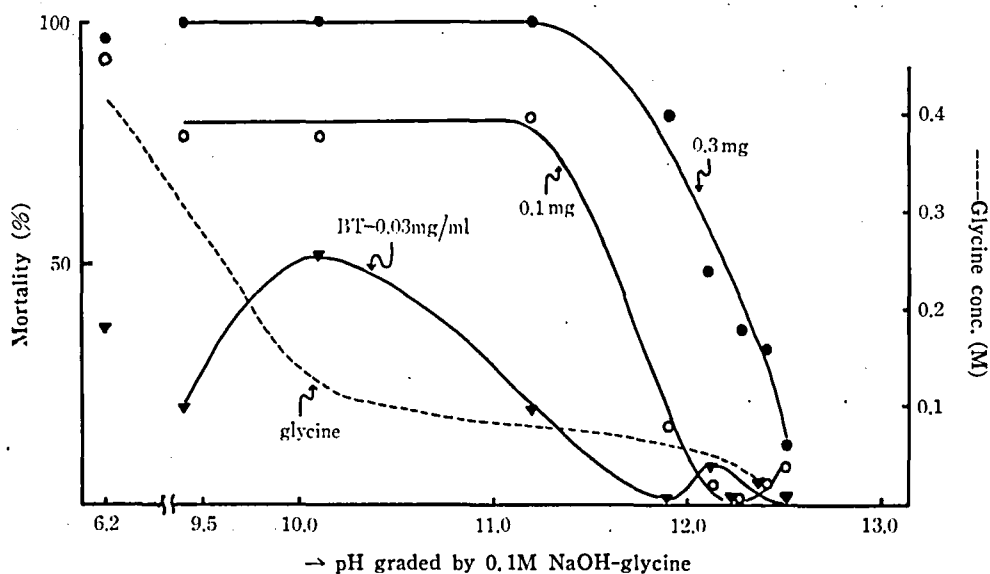


Fig. 3. Effect of pH on the insecticidal activity (constant Na<sup>+</sup> ion--0.1M by NaOH). Mortality (%) over 3 days. 25 *Bombyx* larvae (1st day of 2nd instar) were employed for each experimental lot. BT was soaked in each solution for 3 days. pH was read at 20°C.

ノ酸組成は、菌株による著しい違いがない<sup>14,15)</sup>にもかかわらず、抽出・精製された毒素の component の数およびその分子量、または subunit の大きさ等は報告者によって非常に異なる値が示されている。これは各人の用いた BT の系統・培養法・出発材料の精製の程度・毒素可溶化の方法・分離方法などが、それぞれ異なっていることに起因していると思われるが、このうち特に問題となるのは、毒素の可溶化の方法であろう。どのような溶液を用いて、どれほどの時間処理し抽出したかが、活性物質の回収や変性の度合に大きな影響を与えたように思われる。

今回の実験は、BT の系統としては *aizawai* のみであり、かつ結晶体そのものでなく培養収穫物全体（菌体由来物はその $\frac{1}{2}$ 、結晶体はさらにその $\frac{1}{2}$ ぐらい）を用いており、かつ NaOH を中心にその比活性を調べたものであるが、このような実験からも次の重要な二点が指摘される。すなわち、① NaOH のような強アルカリの溶液に接すると、BT の  $\delta$ -toxin はすみやかにその毒性を失なう。たとえ 0.01M のうすい NaOH 溶液でさえも、長時間接すると、殺虫活性は低下してゆく。② この活性の低下は pH に依存しており、臨界 pH は 20°C で、11—12 である。

BT の毒素精製を試みたく多くの研究者の報告をみると、一般にその活性物質の回収率についての考慮がはられていない。これは材料入手の容易さが原因と

なっていたのか、またはその生物検定法に問題が多すぎたためかは不明である。いずれにしても結晶体を孢子その他のものから厳密に分離精製した後、毒素活性の回収を基準において、種々の溶液を用いての比較抽出を試みるならば、 $\delta$ -toxin の精製・単離の研究はもっと容易に進められるものと思われる。

結晶体毒素は、ほ乳動物の消化管のように、酸性でタンパク分解酵素が作用する条件下では有毒化されず、りん翅目昆虫のように腸管内の pH が、アルカリ性であるものに特異的に毒性を発揮すると言われている。今回の実験によると、毒素活性の低下は pH に依存しており、臨界 pH がりん翅目昆虫の腸管内の pH よりも、わずかに高いところに存在していることが判明した。この事実を考慮して  $\delta$ -toxin の生体内における作用機作について、今いちど新しい解明が病理学的レベルのみでなく、腸上皮細胞のレベルでもなされるべきであると思われる。

#### 引用文献

- 1) 鮎沢啓夫：化学の領域, 26, 47 (1972).
- 2) Somerville, H. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 217, 93 (1973).
- 3) 宮本純之：化学, 28, 120 (1973).
- 4) 渡辺忠雄, 筒井亮毅, 岩花秀典：日蚕雑, 35, 418 (1966).

- 5) Holmes, K. C. and R. E. Monro: *J. Mol. Biol.*, 14, 572 (1965).
- 6) Lecadet, M. M.: *Compt. Rend.*, 262, 195 (1966).
- 7) Lecadet, M. M. and R. Dedonder: *J. Invert. Pathol.*, 9, 310 (1967).
- 8) Pendleton, I. R.: *J. Appl. Bacteriol.*, 31, 208 (1968).
- 9) Glatron, M. F., M. M. Lecadet and R. Dedonder: *Comp. Rend.*, 269, 1338 (1969).
- 10) Fast, P. G. and T. A. Angus: *J. Invert. Pathol.*, 16, 465 (1970).
- 11) Sayles, V. B. Jr., J. N. Aronson and A. Rosenthal: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 1126 (1970).
- 12) Akune, S., T. Watanabe, J. Mukai, R. Tsutsui and K. Abe: *Jap. J. Med. Sci.*, 24, 57 (1971).
- 13) Herbert, B. N., H. J. Gould and E. B. Chain: *Eur. J. Biochem.*, 24, 366 (1971).
- 14) Lecadet, M. M.: *Compt. Rend.*, 261, 5693 (1965).
- 15) Angus, T. A.: *Can. J. Microbiol.*, 2, 416 (1956).

### Summary

In our experience, the insecticidal activity of the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* is remarkably decreased when suspended in or dissolved with alkaline solutions. Nonetheless, it is widely believed that the alkaline conditions

present in the midgut of lepidopterous larvae are indispensable for activity of the crystalline endotoxin. Moreover, strong alkaline solutions are often employed for the solubilization and extraction of this toxin. Such beliefs and procedures appear contradictory to the observed loss of activity in alkaline solutions. Sodium hydroxide, potassium hydroxide, and acetic acid were chosen as representative alkali and acid respectively, and the effect of these solutions on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* was measured, using larvae of *Bombyx mori* as test animals. Concentration of solutions, duration of treatment, and pH were combined in various ways. The following points were demonstrated:

1. Insecticidal activity was unaffected by exposure to acetic acid.
2. NaOH and KOH decreased insecticidal activity in a manner dependent on dose and duration of exposure. A decrease in toxicity could be demonstrated following long exposure to as low a concentration as 0.01M NaOH.
3. The loss of toxicity could not be reversed by subsequent neutralization or dialysis.
4. The loss of toxicity was dependent on pH rather than NaOH concentration. The critical pH was found to be pH 11-12.

---

**Effects of Some Juvenile Hormone Analogues on the Last Instar Larvae of *Cephonodes hylas* L. (Lepidoptera)** Hajime IKEMOTO (Tokyo Prefectural Isotope Research Station, Fukasawa, Setagaya, Tokyo) Received April 16, 1975. *Botyu-Kagaku*, 40, 102 1975.

19. オオスカシバの終令幼虫におよぼす幼若ホルモン類縁体の影響 池本 始 (東京都立アイトーブ総合研究所, 東京都世田谷区) 50. 4. 16 受理

ZR 512 (ethyl-3, 7, 11-trimethyl-2, 4-dodecadienoate) はオオスカシバ幼虫の終令末期にみられる暗赤色化, 造繭および蛹化を阻害した。ZR 512 の影響は施用時期によって異なる。終令脱皮後4日目に施用したときがもっともいちぢるしい効果 (過剰脱皮) をもたらした。効果は施用量によってもことなる。なお, 合成 *Cecropia* JH および 1-(3, 4-methylenedioxyphenyl)-7-epoxy-4, 8-dimethyl-nona-1, 3-diene (CT 5) の発生などにおよぼす影響を ZR 512 のそれと比較検討した。

Effects of synthetic juvenile hormone (JH) or its analogues on the growth and metamorphosis have hitherto been studied in many insect species. These effects vary with the age of larvae treated and the amount of substances applied<sup>1, 2</sup>.

Green color of larvae of the larger pellucid

hawk moth, *Cephonodes hylas*, turns to heavy dark red prior to cocoon formation. After a short time they become into pale green prepupae, red pigments being disappeared gradually. Such depigmentation is induced by a considerable high titer of the molting hormone and inhibited by