

Identification of Serological Method of *Bacillus thuringiensis*. Takeo ISHIGURO, Katumi MIKAZUKI, Minoru MIYAZONO and Ken KATAGIRI (Aburahi Laboratories, Shionogi Co. Ltd., Koka-cho, Koka-gun, Shiga) Received Nov. 22, 1976. *Botyu-Kagaku*, 42, 75, 1977. (with English Summary 81)

9. *Bacillus thuringiensis* の血清学的分類に関する実験 石黒丈雄, 三日月勝見, 宮園 稔  
片桐謙 (塩野義製薬株式会社油日ラボラトリーズ) 51. 11. 22 受理

*Bacillus thuringiensis* を利用した微生物殺虫剤が開発されつつあり, その品質管理はカイコに対する生物検定法によって行なわれる。

われわれは殺虫スペクトラムの拡大を目的として *Bacillus thuringiensis* の 2 種菌株の混合製剤を試製したが, その力価や殺虫効果の外に, 供試した菌株の同定やその配合比率を明らかにする必要がある。そこで, Norris (1964) の方法を基礎として H 抗原を用いた抗原抗体反応により *B. t.* var. *aizawai* および var. *kurstaki* の型別を実施した。

吸血血清を用いたスライド凝集反応において両株ともに明瞭に反応するが, 使用する培地によって自家凝集性に差異が認められる。即ち, var. *aizawai* は普通寒天培地およびミュラーヒントン培地上で強い自家凝集を示すのに対して, var. *kurstaki* はミュラーヒントン培地では自家凝集は認めなかった。これにより, 2 種菌株の培養乾燥物の混合物や製剤から発育した混合集落においても両者の型別ができ, 製剤中の含有比率の算定が可能であることを見出した。

### 結 論

化学農薬の利用は害虫防除に秀れた役割を示す一方, その施用によって植物体や土壌への残留, 人畜に対する毒性, 殺虫剤抵抗性害虫の出現, 生態系の破壊による昆虫相の変化および害虫の異常繁殖などの問題を誘起している。そして, これらの問題点の一つの解決法として細菌, ウィルス, リックチャや糸状菌などを利用した一連の微生物殺虫剤が現在研究開発されつつあるが, その中心的な立場となるものとして *Bacillus thuringiensis* (以下 B T と略す) が産生する殺虫性毒素を主剤とした B T 製剤がある。一部の害虫類はこれを食下すると中毒を起して死亡するが, この毒素は人畜に無害と考えられ, また, 選択的殺虫性を有するので農業生態系の保全に有利である, などより微生物殺虫剤としての開発が進められ, 実用化に近づきつつある。

しかし, B T 剤の持つ問題点として製剤の力価検定と安全性がある。

品質管理上の製剤の力価検定には毒素蛋白の抗原抗体反応や酵素活性の阻害による方法の検討も行なわれているが, 現在では国際協力試験により生物検定によることと決められ, わが国では B T 剤研究委員会によりカイコに対する標準試験法が確立されつつある。

しかし, 製剤の品質管理には力価検定のみでなく, 用いられる菌株の同定, 芽胞数の測定や製剤中の B T の含有割合などが必要となるのは明白である。

わが国では B T 剤の開発のため種々の血清型が用いられ, しかも異なった血清型の混合製剤もあるため, 独自の品質管理法が必要であろう。

B T の分類は Voges-proskauer 反応, レシチナーゼの産生, サリシンからの酸産生, デンプンの加水分解能の測定など生化学的反應による分類, 抗生物質に対する感受性の差異による分類, 鞭毛抗原による凝集反応法やエステラーゼ型による分類などがある。

そこでわれわれは品質管理上, 混合製剤中の 2 種菌株を分別する目的で Norris<sup>1)</sup> の報告を基礎として 2 種菌株の発育集落を因子血清で型別する血清学的分類を試みた。

### 実験材料および方法

#### 1. H 抗原作成のための菌の選択法

H 抗原作成のため, *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Shionogi 株および Pasteur 株) と *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Shionogi 株) の 3 株について十分な運動性を有する菌の選択を実施した。即ち, 普通寒天上で 37°C, 1 夜斜面培養した各菌株を 10 倍段階希釈し, その 0.1 ml づつを普通寒天培地 (栄研製) へ滴下し, コンラーツ棒で広げ, 37°C, 24 時間培養した。その後, 発育した孤立集落を菌鈎し, 径 9 cm のペトリシャーレ中の 0.25% (W/V) 軟寒天培地の中央に接種した。なお, 供試した軟寒天培地の組成は Beef extract (Difco 社製) 10g, ポリペプトン (大五栄養化学製) 10g, 寒天末 (Difco 社製)

2.5g, NaCl 2g, 蒸留水 1000ml である。

培養は 30°C で 1 夜行ない、運動性による菌の拡散がシャーレ縁の数 mm までに達した時、最外部の発育部分を白金耳でかきとり、再び新しい軟寒天培地の中央に接種した。その後、30°C, 16時間培養し、先のペトリシャーレの表面を充分満たす発育をもって十分な運動性を有する菌株であると判断した。なお、運動性が不十分な場合は上記の操作により軟寒天培地上で数代の継代を実施して使用菌株の選択を行なった。

## 2. 抗原液の調製

前述の操作により十分な運動性を認めた菌株の 1 白金耳量を普通ブイオン培地 (Beef extract 10g, ポリペプトン 10g, NaCl 2g, 蒸留水 1000ml を加温溶解し、pH 7.2 に調整し、濾過後 50ml づつ振盪培養フラスコに分注し、121°C, 15分、高压滅菌したもの) に接種し、更に、30°C, 16 時間振盪培養した。培養液は 3000 r. p. m, 15分遠心分離し、その上清をすて、0.25%ホルマリン食塩水 (食塩濃度 0.85%) 50ml に再浮遊させ、更に 3000 r. p. m, 15分遠心分離して菌体の洗浄を行なった。

このようにして集菌したもの (50ml ブイオン培養液) を 0.25%ホルマリン食塩水 10ml に浮遊させてこれを抗原液とした。なお、抗原液は 4°C で保存したが、自家凝集を示すものについてはこれを除去した。なお、保存抗原液は調製後 4 週間以内に使用することとして、それ以後経過した場合は新しい抗原液を新たに作成して使用した。

## 3. 家兔免疫抗血清の調製

免疫原は *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* および var. *kurstaki* であり、各抗原について日本動物K.Kより購入した SPF ウサギ (ニュージーランドホワイト系) 3匹を用いて免疫を実施した。なお、これに用いた抗原は前記の方法で作成し、接種用抗原液の秤量法による測定濃度は湿菌重量で 110~140mg/ml である。

免疫は H 抗原液 (ホルマリン死菌) を初回 0.5ml, 以後 2日間隔で 1.0ml を耳静脈へ計 5 回接種した。なお、免疫を始める前に使用家兔より一部採血し、対照血清とした。最終の接種後 3 日目に一部採血し、予備的に試験管内凝集反応 (後述) を行ない、凝集価が 1:1000 以上のものを全採血した。採血は前日より絶食させた家兔の頸動脈より行ない、室温に 3 時間放置後 4°C の冷蔵庫に 1 夜保ち、その後、血清部分を遠心管にとり、1500r. p. m 20分遠心分離した。分離血清は滅菌した試験管に 5ml づつ分注し、-20°C の冷蔵庫に保存した。

## 4. 因子血清の調製

前記方法で得た *B. thuringiensis* var. *aizawai* の家兔免疫抗血清 5ml を *B. thuringiensis* var. *kurstaki* の抗原液 5ml で吸収して *B. thuringiensis* var. *aizawai* の因子血清を、また、*B. thuringiensis* var. *kurstaki* の抗血清を *B. thuringiensis* var. *aizawai* の抗原液で吸収し、*B. thuringiensis* var. *kurstaki* の因子血清を各々調製した。供試した吸収抗原量は両者共 550~700mg/5ml であった。なお、吸収に供した抗原液は 3000 r. p. m, 15分洗浄し、滅菌生理食塩水に再浮遊してホルマリンを取り除いた。吸収は恒温槽 (30°C) で 2 時間感作し、その後、室温に一夜放置した。なお、両因子血清ともに試験管内凝集反応 (後述) で充分吸収されたことを確認し、不十分な場合には同様な方法を繰返し行なった。

## 5. 試験管内凝集反応実験

先に調製した家兔免疫抗血清を用いて凝集反応を行なった。即ち、*B. thuringiensis* var. *aizawai* および *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Shionogi) の抗血清を生理食塩水で 2 段階階希釈し、各々 0.5ml を小試験管に分注した。そして、各々の血清希釈液に抗原液の 2 倍希釈 (McFarland No. 7-8 に相当) の 1 滴を滴下した。充分に振盪後、室温で 30 分間放置して中間判定し、再び 1 時間 30 分後に凝集素価の判定を行なった。判定は凝集の認められた最終の抗血清の希釈倍数を凝集素価とした。

## 6. スライド凝集反応実験

前記の操作で得た両菌株の因子血清を用いてスライド凝集反応を実施した。即ち、スライドガラスをガラス鉛筆で 3 等分し、その 1 区画に *B. t.* var. *aizawai* の抗原液を滴下し、他の 2 区画には *B. t.* var. *aizawai* および *B. t.* var. *kurstaki* の因子血清を別々に滴下し、抗原液を各々の因子血清と混合し、明瞭な凝集塊の出現を検査した。同様に、*B. t.* var. *kurstaki* の抗原液についても検討した。

次に、寒天培地上で発育した菌集落についてスライド凝集反応を試みた。即ち、平板培地として、121°C, 20分滅菌した普通寒天培地 (栄研製) および 115°C, 15分滅菌したミュラーヒントン培地 (培地 19g に蒸留水 500ml を加えたもの) の 2 種を準備し、これらに両菌株を接種後、37°C, 24時間培養し、発育した孤立集落を白金耳でかきとり、スライドガラス上で生理食塩水の 1 滴に均等に浮遊させ、この菌浮遊液を別々に滴下した *B. t.* var. *aizawai* および *B. t.* var. *kurstaki* の因子血清にそれぞれ別個に混合し、發光

灯下で凝集塊の出現を調べた。

7. スライド凝集反応を利用した *B. t. var. aizawai* および *B. t. var. kurstaki* の型別方法の検討

*B. t. var. aizawai* および *B. t. var. kurstaki* の菌浮遊液を調製し、これを原液として10倍段階希釈し、その0.1 mlをミュラーヒントン培地へ滴下し、コンラージ棒で塗抹後、37°C、16時間培養した。その後、100個程度の孤立集落が認められた平板を用いて因子血清によるスライド凝集反応を行なった。

また、両菌株の培養乾燥物を準備し、重量比で1:1の割合に含有する混合菌液を調製し、これを先と同様にミュラーヒントン培地に接種し、混合培養菌を發育させ、發育集落の個々のものについて因子血清によるスライド凝集反応を行なった。

8. *B. t. var. aizawai* および *B. t. var. kurstaki* の培養乾燥原末およびその混合物中の生菌数の測定と型別

両菌株の乾燥原末を各々10mg秤量し、10mlの滅菌生理食塩水に浮遊させたものを調製し、更に、ガラスホモゲナイザーを用いて氷冷しつつ充分磨砕均質化した。その後、生理食塩水で10<sup>8</sup>の溶液を調製し、これを更に2倍段階希釈し、各々の0.1mlをミュラーヒントン培地へ滴下し、コンラージ棒で塗抹した。なお、各希釈濃度について3枚の平板を使用した。使用培地はあらかじめフラン器でシャーレの蓋を開け、数時間培地表面の乾燥を行なった。培養は37°C、16時間行ない、その後、發育菌数の算定を行なった。また、同時に、両菌株の乾燥原末の等量混合液についても菌数の算定を同様の方法にて実施した。更に、等量混合液についてのみ平板培地に發育した孤立集落を用いて先記のスライド凝集反応を実施し、両株の型別の判定と含有される両株の割合を調べた。

9. 混合製剤中の型別

*B. t. var. aizawai* および *B. t. var. kurstaki* の乾

燥原末が等量に混合され、これに賦形剤などを含む製剤(水和剤、バシレックス®)2種とこれらに用いた各原末について前記のスライド凝集反応を用いて型別を行なった。

即ち、製剤1gを正確に秤量し、滅菌生理食塩水100mlを加え、ガラスホモゲナイザーを用いて磨砕均質化した。これを10倍段階希釈し、10<sup>6</sup>より2倍段階希釈した。各々の希釈液0.1mlをミュラーヒントン培地上に滴下し、コンラージ棒で塗抹し、その後、37°C、16時間培養した。50~150個の發育集落を持つ平板を選び、無作為に50個を選択し、これらについて、先と同様にスライド凝集反応によって型別を行なった。また、両乾燥原末についても個々に同様の操作を行なった。

実験結果

前記の操作により調製したH抗原液と家兔免疫抗血清を用いて試験管内凝集反応実験を実施し、その反応結果をTable 1に示した。

即ち、*B. t. var. aizawai* および *B. t. var. kurstaki* の両菌株が示す凝集素価には3管の差が認められ、*B. t. var. aizawai* の抗原は *B. t. var. aizawai* の抗血清に対して特異的な反応部分が大きく、*B. t. var. kurstaki* についても同様の結果を得た。

Table 1の結果より両菌株の共通抗原を認めたので、この共通抗原の吸収を試みた。その結果をTable 2に示した。即ち、*B. t. var. aizawai* の抗原は *B. t. var. kurstaki* の吸収血清に対して1:20であり、*B. t. var. kurstaki* の抗原を用いた場合の試験管内凝集反応において同様の結果を示した。また、吸収血清を用いたスライド凝集反応実験においては各々の菌株に対応する吸収血清でのみ明瞭な凝集塊が認められた。なお、この場合の反応時間は30秒~1分程度であった。

前記のとおり、このスライド凝集反応において両菌株共に各々の吸収血清に明瞭に反応するので、この方法が実際の寒天培地上に發育した集落に対して利用できるかを検討するため、2種培地を用いて検討し、そ

Table 1. Antibody titres by agglutination method of test tube.

Antiserum	Antigen		
	<i>B. t. aizawai</i> (Shionogi)	<i>B. t. kurstaki</i> (Shionogi)	<i>B. t. aizawai</i> (Pasteur)
<i>B. t. aizawai</i> (Shionogi)	3200	400	3200
<i>B. t. kurstaki</i> (Shionogi)	400	3200	400

の結果を Table 3 に示した。即ち、使用培地により自家凝集性に差があり、*B. t. var. aizawai* は普通寒天培地およびミュラーヒントン培地において強い自家凝集を示し、*B. t. var. kurstaki* では普通寒天培地で凝集を示すのに対して、ミュラーヒントン培地ではほとんどの株に自家凝集は示されなかった。以上の結果よりミュラーヒントン培地の利用による自家凝集で両者の区分ができる可能性を見出した。

そこで、この型別方法を確立するため、*B. t. var. aizawai* (Shionogi および Pasteur) および *B. t. var. kurstaki* (Shionogi および Pasteur) と両菌株の混合集落の型別を検討し、これを Table 4 に示した。即ち、*B. t. var. aizawai* のみを発育させた平板からの集落では93株中90株に自家凝集が認められ、他の3株には自家凝集は認められなかったが、*B. t. var. aizawai* および *B. t. var. kurstaki* の因子血清の両方にも凝集しなかった。しかし、これらの集落を軟寒天培地に移植し、30°C、20時間培養した菌を用いた場合にはすべて *B. t. var. aizawai* の因子血清に強く凝集した。*B. t. var. kurstaki* についても自家凝集が

認められた2株について軟寒天培地を用いることで型別が可能であった。また、自家凝集を認めなかった64株中62株のすべてが *B. t. var. kurstaki* の因子血清に凝集した。これらの両菌株間の自家凝集性の程度の差は Pasteur 由来の両株についても同様の結果であった。両菌株を混合した発育集落から型別を検討したが、自家凝集が認められた株は111株中57株であり、全株について軟寒天培地へ移植後因子血清で型別を行なったが、54株が *B. t. var. aizawai* であり、3株が *B. t. var. kurstaki* であった。一方、自家凝集の認められない株は54株であり、*B. t. var. kurstaki* の因子血清に強く凝集し、*var. kurstaki* と型別できるものは50株であった。他の4株は両因子血清に凝集を示さず、軟寒天培地へ移植後に *var. aizawai* と型別できた。以上のように型別された結果は *B. t. var. aizawai* 58株であり、*B. t. var. kurstaki* は53株であり、最初の調整菌液 (*B. t. var. aizawai* 1 : *B. t. var. kurstaki* 1) と同様に両菌株の占める率はほぼ1 : 1であった。本実験結果より以下の事柄が推論できる。即ち、自家凝集が認められないもので、*var. kurstaki* の因子血清に強く凝集したものを *B. t. var. kurstaki* と型別し、自家凝集が認められた株および自家凝集の認められない株で両因子血清で型別不能の株は軟寒天培地に移植後に凝集反応を行なうことで確実に両菌株を型別できる。更に、このミュラーヒントン培地を用いて両菌株の培養乾燥物およびその混合物中に含まれる生菌数の測定とスライド凝集反応による型別を実施した。予備試験により  $10^8$  希釈濃度において約1000個程度の生菌が認められることを確認し、 $10^8$  希釈から2倍希釈で個数を調べ、これらの結果を Table 5 に示した。得られた菌集落数より乾燥原末または混合乾燥原末 1mg 中の菌数に換算した。即ち、*B. t. var. aizawai* は  $0.7 \times 10^7$ /mg、*B. t. var. kurstaki* は  $1.2 \times 10^7$ /mg であり、混合物では  $0.9 \times 10^7$ /mg であった。また、型別方法を用いて混合物中の両株の含有される割合を調べ、これを Table 6 に示した。即ち、発育した集落より無作為に110個の集落について検討

Table 2. Antibody titres by test tube method and agglutination reaction by slide glass method

Antibody	Monospecific sera	
	<i>B. t. aizawai</i> (Shionogi)	<i>B. t. kurstaki</i> (Shionogi)
<i>B. t. aizawai</i> (Shionogi)	1820	20
<i>B. t. kurstaki</i> (Shionogi)	20	1820
<i>B. t. aizawai</i> (Shionogi)	+	-
<i>B. t. kurstaki</i> (Shionogi)	-	+

Table 3. Spontaneous agglutination capacity on the slide glass.

Variety	Medium	Spontaneous agglutination capacity	
		Positive	Negative
<i>B. t. aizawai</i> (Shionogi)	Nutrient agar	8	0
	Mueller-Hinton agar	5	0
<i>B. t. kurstaki</i> (Shionogi)	Nutrient agar	9	0
	Mueller-Hinton agar	1	7

した。10<sup>3</sup>希釈液の8倍希釈(0.1ml中)における平板上の平均出現集落数は *B. t. var. aizawai* で92.5個、*B. t. var. kurstaki* で151.8個であり、これらの出現集落数より割り出した理論個数は *B. t. var. aizawai* が110個中42個(37.9%)、*B. t. var. kurstaki* は110個中68個(62.1%)であるが実際に測定型別によると *B. t. var. aizawai* は40.9%、*B. t. var. kurstaki* は

59.1%であり、この値は理論値と一致した。次に、原末乾燥物以外に各種賦形剤を含む製剤(両原末を等量含有)について型別を実施し、Table 7に示した。即ち、培養した孤立集落からの50個について調べ、2種の同一製剤(製造年月日が異なる)間には両菌株の含有割合に差異は認められなかった。

Table 4. Identification on forming colonies of *B. t. aizawai*, *B. t. kurstaki* and mixed culture.

Variety	Spontaneous agglutination Capacity	No. of colony	Mueller-Hinton agar → Soft agar			
			B. t. aizawai	B. t. kurstaki	B. t. aizawai	B. t. kurstaki
<i>B. t. aizawai</i> (Shionogi)	Positive	90	—	—	90	0
	Negative	3	0	0	3	0
	Total	93	0	0	93	0
<i>B. t. aizawai</i> (Pasteur)	Positive	10	0	0	10	0
	Negative	0	—	—	—	—
	Total	10	0	0	10	0
<i>B. t. kurstaki</i> (Shionogi)	Positive	2	—	—	0	2
	Negative	62	0	62	—	—
	Total	64	0	62	0	2
<i>B. t. kurstaki</i> (Pasteur)	Positive	0	—	—	—	—
	Negative	10	0	10	—	—
	Total	10	0	10	0	0
<i>B. t. aizawai</i> plus <i>B. t. kurstaki</i> (Shionogi)	Positive	57	—	—	54	3
	Negative	50	0	50	—	—
<i>B. t. kurstaki</i> (Shionogi)	Negative	4	0	0	4	0
	Total	111	0	50	58	3

Table 5. Spore count on forming colonies of *B. t. aizawai*, *B. t. kurstaki* and mixed culture.

Replicates	<i>B. t. aizawai</i>		<i>B. t. kurstaki</i>		<i>B. t. aizawai</i> plus <i>B. t. kurstaki</i>	
	10 <sup>3</sup> ×1/4	10 <sup>3</sup> ×1/8	10 <sup>3</sup> ×1/4	10 <sup>3</sup> ×1/8	10 <sup>3</sup> ×1/4	10 <sup>3</sup> ×1/8
I	263.7	159.3	313.0	206.3	334.3	173.0
II	106.7	58.7	324.3	67.0	193.0	105.7
III	144.0	112.0	327.3	153.7	193.7	120.7
IV	140.7	40.0	272.3	180.0	187.0	82.7
Average	163.8	92.5	309.3	151.8	227.0	120.5
No. of spore per mg	0.7×10 <sup>7</sup> /mg		1.2×10 <sup>7</sup> /mg		0.9×10 <sup>7</sup> /mg	

Table 6. Contents ratio of *B. t. aizawai*, *B. t. kurstaki* on mixed forming colonies.

Variety	No. of spore in $10^3 \times 1/8$	→ per 110 viable cell				
		Variety	theoretical ratio	No. of theoretical viable cell	No. of practical viable cell	practical ratio
<i>B. t. aizawai</i>	92.5					
<i>B. t. kurstaki</i>	151.8					
<i>B. t. aizawai</i> plus <i>B. t. kurstaki</i>	120.5 →	<i>B. t. aizawai</i>	37.9%	42	45	40.9%
		<i>B. t. kurstaki</i>	62.1%	68	65	59.1%

Table 7. Identification of two variety in Bacilex® wettable powder.

Sample	No. of test colonies	1 st experiment		2 nd experiment	
		<i>B. t. aizawai</i>	<i>B. t. kurstaki</i>	<i>B. t. aizawai</i>	<i>B. t. kurstaki</i>
Bacilex A	50	21	29	23	27
Bacilex B	50	20	30	20	30
<i>B. t. aizawai</i> *	50	50	0	50	0
<i>B. t. kurstaki</i> *	50	0	50	0	50

\* Freezing dried powder

## 考 察

BT製剤の品質管理を行なう場合、現在まで化学的定量法は確立されておらず、従って、生物検定法によりその製剤の力価を検定している。更に、供試する菌株は安全性、均一性を保障できるように菌株登録番号、血清学的同定や生菌数の測定なども必要になりつつある。また、BT製剤の発展と共に2種以上の菌株、または化学物質の併用効果で殺虫スペクトラムの拡大や増強作用を期待する混合製剤の開発に進展する可能性もある。一方では、バクテリア、糸状菌、ウィルスなどの混合も考えられ、事実、種々の殺虫剤との混用による殺虫作用の増強やウィルスとの併用による相乗作用など多くの研究者達によって実験が進められている。以上の観点より、われわれは殺虫スペクトラムの拡大を目的として *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* と var. *kurstaki* の2種菌株の混合による製剤を試み、各種害虫類に対する効果を確認しつつあるが、混合製剤の場合は特に正確な性格づけが必要であることは効果は勿論、品質管理上からも重要であることは明白である。

*Bacillus thuringiensis* はこれまで鞭毛抗原反応により11の型に分類され、また、エステラーゼ型により16の variety に分類されている<sup>2,3)</sup>。土山<sup>4)</sup>は *B. t.* var. *thuringiensis*, var. *dendrolimus* および var. *aizawai* について抗原O, HおよびOHについて検討し、H抗原について特異的凝集反応の成立を報告し、

鮎沢<sup>5)</sup>は var. *thuringiensis*, var. *alesti*, var. *sotto*, var. *dendrolimus* および var. *aizawai* をのせガラス法において透析血清を用いて各々同定分別した。また、大庭・鮎沢<sup>6)</sup>は栄養型細胞で免疫を得て、それぞれに対応するO抗原で吸収し、H抗血清を更にヘテロで吸収透析して検査株を craigee tube 内で運動性の強い株を選択し、生菌で同定している。一方、関島・小野<sup>7)</sup>は耐熱性特異抗原を H<sub>3</sub> グループより確認しているし、福原<sup>8)</sup>らは *B. t.* var. *sotto* の同定に蛍光抗体を用い、土壌微生物学的研究に応用できる簡易定量法について述べている。

O抗原は凝集素価が低く、共通因子が高いので吸収操作が困難と考えられるのに対してH抗原は比較的凝集素価が高く、吸収操作も単純で容易に血清をうる事が可能であると考えられる。そこで Norris<sup>9)</sup>の方法を基盤として、*B. t.* var. *aizawai* および var. *kurstaki* の2種混合物および混合製剤(水和剤)中における両株の型別を行なう目的でH抗原を用いて抗原抗体反応を利用して実験を進めた。供試したH抗原においても自家凝集が認められるので運動性を有する菌株の選択を軟寒天培地で継代し、自家凝集を抑制すると共に鞭毛の豊富な菌株を用いて特異的鞭毛凝集反応を容易にした。また、供試する培地によっても自家凝集が認められる場合もある。即ち、普通寒天培地上では *B. t.* var. *aizawai* および var. *kurstaki* の両株が自家凝集をおこすのに対してミュラーヒントン培地では *B. t.* var. *kurstaki* に自家凝集を与えず、var.

*aizawai* においてのみ自家凝集が生じ易いことが明らかになった。

2種菌株の培地上における性質の差異より型別同定を実施した報告はこれまで全く認められず、ミュラーヒントン培地を用いると2種原末の混合物や混合製剤から接種、発育した集落においても容易に両者の型別が可能である。

これまでの結果より、単一菌株に供試し、同定し得た普通寒天培地や収寒天培地は混合菌株の分類、同定には適当ではなく型別不能であるのに対して、ミュラーヒントン培地の使用により容易にしかも正確な型別が可能であることを結論づけることができる。

#### 引用文献

- 1) Norris, J. R.: *J. Appl. Bacteriol.*, 27, 439 (1964).
- 2) Bonnefoi, A. and H. de Barjac: *Entomophaga*, 8, 223 (1963).
- 3) Norris, J. R. and H. D. Burges: *Entomophaga*, 10, 41 (1965).
- 4) 土山彬:九州蚕糸, No. 2, 69 (1971).
- 5) 鮎沢啓夫: B T剤に関する試験成績, 2 (1972).
- 6) 大庭道夫・鮎沢啓夫: 日本蚕糸学会第43回講要, 14 (1973).
- 7) 関島安隆・小野恵子: 日本蚕糸学会第43回講要, 14 (1973).
- 8) 福原敏彦・関島安隆: 日本蚕糸学会第43回講要, 15 (1973).

#### Summary

It has been well developed in Japan that *Bacillus thuringiensis* is used as a sources for microbial insecticides. The method of quality examination on the product have been discussed for recent few years and concluded that silkworm may be desirable as experimental animal representing biological activity unit.

Further with our product, Bacilex® was prepared with two variety of *Bacillus thuringiensis* getting wide insecticidal spectrum and it would also be expected to identify the variety used and to prove the contents ratio of the two variety for purpose of quality examination and standardized

method was established by modifying the experimental technique used by NORRIS (1964). The method discovered here was based on serological classification.

Each antigen of *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* and var. *kurstaki* were separately injected intravenously into rabbit and then both antiserum were prepared. The antibody titres were recorded by agglutination method on test tube and homologous titres on each antiserum were observed at high level. As cross-reacting antigen has been recognized, each monospecific sera was prepared with monospecific antibody and identification of both variety can be determined by agglutination method on slide glass.

On the otherhand, the colonies of these two variety showed the difference in spontaneous agglutinating capacity on slide glass. In *B. t. aizawai* spontaneous agglutination is observed on nutrient agar and Mueller-Hinton medium, and in *B. t. kurstaki* spontaneous agglutination is firmly observed on nutrient agar, but not easy to observed on Mueller-Hinton medium.

With the evidence described above, mixed culture of these variety on Mueller-Hinton medium is practicable for the identification on the colonies formed.

The colonies which are not observed spontaneous agglutination on Mueller-Hinton agar and have strong spontaneous agglutinating activity for monospecific sera of *B. t. kurstaki* can be classified as *B. t. kurstaki*

On the contrary, the colonies which is easy to have spontaneous agglutination on Mueller-Hinton medium are classified as *B. t. aizawai*. Furthermore, the colonies which shows non spontaneous agglutination and can not be classified by each monospecific sera were removed on soft nutrient agar containing 1% beef extract, and then the colonies can be classified as *B. t. aizawai* by the agglutination method on slide glass.