

綜 説

Development of Microbial Insecticides in Japan, Keio Aizawa (Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka).

日本における微生物殺虫剤の開発 鮎沢啓夫 (九州大学農学部生物的防除研究施設)

昆虫微生物病学で扱われる主な対象は2つあり、カイコやミツバチのような有用昆虫の疾病の防圧と微生物利用による害虫防除(微生物的防除)である。日本では前者とくにカイコの疾病の研究が昆虫微生物病学の中心となってきたが、最近においては微生物的防除も現実に根ざした展開が強化されつつある。

カイコの伝染病の防除は蚕糸業における重要な課題としてとり上げられ、明治初期から行政および研究の機構の創設と拡充が着々と進行した。わが国のカイコの研究は国際的に他の追随を許さない水準を築いたが、同時にカイコの疾病の研究は蚕糸業という背景をかかえているだけに、昆虫微生物病学としても特色ある発展をみせたといえよう。

これに対し日本における微生物的防除の研究は大正末期になってようやくその胎動がみられる^{*}。1924年相沢¹²⁾は千島におけるマツカレハの防除に糸状菌の利用の可能性を指摘し、高木⁸²⁾(1925)は朝鮮におけるマツカレハの防除に白きょう病菌の利用の見込みについて触れている。

野外におけるマツカレハの防除に白きょう病菌をはじめて用いたのは日高²⁹⁾である。その後長谷川および小山^{25,26)}は森林害虫から病原性糸状菌、ウイルス、原虫などの検索を試み、コガネムシ、マツカレハ、ハラアカマイマイなどの微生物的防除の研究を行なった。スジコガネから分離された *Isaria kogane* はスジコガネ、オオスジコガネ、ヒメコガネ、サクラコガネ、ハナムグリ、マツノミドリハバチ、キハバチ、カラマツヒラタハバチなど、とくにネキリムシを中心とする害虫に対して強い病原性を示したので、その量産ならびに実用化の研究が行なわれた。わが国における微生物的防除は前記の日高(1933)ならびに長谷川・小山(1937, 1941)によって誕生をみたといえよう。

その後わが国における微生物的防除はどのように歩んできたかを眺め、さらに現在の微生物的防除はどの

ような問題に当面しながら研究が進められているかについてのべてみたい。

I. 1960年までのわが国における微生物的防除の研究

実験室内および野外実験を含めて1941~1960年の20年間にわたるわが国の微生物的防除の研究は森林害虫、農作物害虫、蚕糸害虫を対象にして行なわれた。

1. 森林害虫

長谷川・小山^{25,26)}の研究にもとずき農林省は長野県赤穂営林署、愛知県岡崎営林署管内に林業微生物培養所を設置し、1950年より1953年にわたって *Isariakogane* の量産と配布を実施したが、製剤としての総生産は185トンであった。この事業実施中にネキリムシに対してさらに病原性が強くかつ胞子形成の速い *Oospora* sp. が分離され⁶¹⁾、これは赤穂営林署管内の微生物培養所において、1953年より1956年までの間に88トンの製剤が生産され配布が行なわれた(浜^{27,28)})。糸状菌製剤によるネキリムシの防除は効果発現までに長期間を要し、その頃普及が盛んになった BHC の駆除効果の前にはたちうちできず、林業微生物培養所は閉鎖されるに至った。これに対しいろいろな論評がなされるであろうが、現在の日本の微生物的防除が当面している立場から考えるならば、そこには今後の発展の礎石となるいくつかの教訓がひそめられていることを付言しておきたい。

2. 農作物害虫

対象害虫と供試微生物をあける。クロカメムシに対し黒きょう病菌 (*Oospora destructor*=*Metarrhizium anisopliae*) (森本⁵³⁻⁵⁶⁾)、ジャガイモガに対し紫赤きょう病菌 (*Spicaria rubido-purpurea*) (大島⁷¹⁾)、モモシクイガに対し赤きょう病菌 (*Spicaria fumosorosea*) (関口^{78,79)})、ミカンネコナカイガラムシに対し黄きょう病菌 (*Spicaria farinosa*) (森本ら^{58,59,60)}) などが利用された。

3. 蚕糸害虫

カイコノウジバエに対し *Spicaria fumosorosea* が利用された(青木^{16,17)})。

以上のように1941~1960年の間に用いられた微生物は糸状菌であったことが特徴的である。

* 台湾においては1914年ハワイから黒きょう病菌 (*Metarrhizium anisopliae*) が輸入されコガネムシ類の防除を目的として1932年まで人工培養ならびに製剤の配布が台湾総督府によって行なわれた(高野⁸³⁾)。なお白きょう病菌 (*Beauveria bassiana*) によるマツカレハの防除も試みられた(水戸野⁵²⁾)。

II. 1961年以降のわが国における微生物的防除の研究

1960年をすぎると野外実験の規模も大きくなり、さらに微生物殺虫剤を目的とした製剤の開発まで手がけられるようになった。用いられた微生物はウイルス、細菌、糸状菌などである。

1. ウイルス

A) 森林害虫

小山および片桐ら^{37,38,40,43,44)}はマツカレハの防除に細胞質多角体病ウイルスを用いた。地上散布の場合は 5×10^8 /mlの多角体浮遊液をha当り200~300l、ヘリコプター散布の場合は 1.7×10^8 /mlの多角体浮遊液をha当り60l散布したが、多角体数にして $1 \sim 3 \times 10^{11}$ /ha (これはha当り約200頭の病虫に相当する)が散布されると有効性がみられた。

ハラアカマイマイの場合は核および細胞質多角体の混合液 (5×10^8 /ml, ha当り60l) が64haにわたって散布されたが、幼虫期においては59%が核多角体病に、25%が細胞質多角体病に感染し、蛹期まで到達した生存虫は0.02%にすぎなかった。さらに雌成虫の31%、雄成虫の14%は細胞質多角体病に感染していた⁴⁴⁾。

B) アメリカシロヒトリ

森井らはアメリカシロヒトリの防除に核多角体病ウイルスを利用した。このウイルスはカイコには全く病原性を示さないので直接桑園に散布しうる特色をもつ。 6×10^7 /mlの多角体浮遊液を25haの桑園にヘリコプターで1500l散布したところ、20日後に死亡率は90%に達した^{34,35,36)}。ウイルス散布実験は楠野および田村⁴⁵⁾によっても行なわれ有効性がみとめられた。

C) ドクガ

花房および幸田らはドクガの防除に核多角体浮遊液 (1×10^8 /ml) をha当り約100l散布し防除効果のみとめた⁴⁶⁾。

D) ヨトウおよびモンシロチョウ

阿久津はヨトウの防除にha当り $0.69 \sim 1.5 \times 10^{10}$ の、またはグラニューロシス・ウイルスを添加した 9.9×10^{10} の核多角体浮遊液を散布したところ死亡率は82.8~100%であった¹³⁾。またモンシロチョウの防除にグラニューロシス・ウイルス (40~120gの病虫磨砕液) を散布したが、その効果は化学農薬の場合にはほぼ匹敵した。さらに10アールに対し80頭の病虫磨砕液を散布したが6日後対照区は15.6%、散布区は79.5%の死亡率を示した^{13,14)}。

E) ハスモンヨトウおよびアワヨトウ

岡田 (齊夫) はハスモンヨトウおよびアワヨトウの各種昆虫ウイルスに対する感受性をしらべ、両者それ

ぞれの核多角体病ウイルスがその宿主害虫の防除に甚だ有効であることを明らかにした。ウイルスの量産、散布方法、次世代への影響、残効などについても調査が行なわれ、単位面積当りの散布多角体数を同じくするときは高濃度の多角体浮遊液を少量散布する方が防除にはより有効であった^{43,48)}。このウイルスは牧草に適用されるのみならず施設園芸においてもその防除効果が期待されている。

F) ニカメイチュウ

岡田 (忠虎) はニカメイチュウの防除にグラニューロシス・ウイルスの利用を試み、実験室的規模ではあったが有効性をみとめた⁴⁴⁾。

2. 糸状菌

森本ら⁴⁷⁾はコナカイガラムシおよびイセリアカイガラムシの防除に紫赤きょう病菌の野外散布を試み、また於保ら^{48,49)}はミカンコナジラミから *Aschersonia aleyrodis* を分離してその培養方法を検討し、野外散布実験を行なったが、いずれにおいても有効性がみとめられた。

III. わが国における微生物殺虫剤の進展

わが国における微生物的防除の研究は欧米の微生物的防除および微生物殺虫剤の進展によって刺激された*。しかし一面欧米で開発された微生物殺虫剤がわが国に輸入されたとき、それが養蚕にどのような影響をおよぼすであろうかということとはたえずつきまとう問題でもあった。わが国の蚕病研究ははじめにのべたように特色ある展開をみせたが、その技術は1つには微生物殺虫剤と養蚕との共存、1つには日本における微生物的防除の推進に対して寄与しうる力をもっていた。とくに後者について欧米の研究者から筆者は折にふれて激励と期待の言葉をうけたものである。

しかしわが国の微生物的防除の研究は実験室内の可能性にとどまる停滞がみられた。そこには実践にふみ出す意欲の不足や客観情勢が醸成されていなかったことも原因となっていた。けれどもこれはとくにわが国

* 外国で実用化されている製剤の主剤と製品名は次のとおりである。

- 1) *Bacillus popilliae* (および *Bacillus lentimorbus*) を主剤とする製剤: Doom (アメリカ)。
- 2) *Bacillus thuringiensis* を主剤とする製剤: Thuricide (アメリカ), Biotrol-BTB (アメリカ), Dipel (アメリカ), Bactospéine (フランス), Entobakterin (ソ連), Bathurin (チェコ)。
- 3) *Heliothis* 核多角体病ウイルスを主剤とする製剤: Viron/H (アメリカ), Biotrol-VHZ (アメリカ)。
- 4) *Beauveria bassiana* を主剤とする製剤: Beauverin (ソ連)。

に限ったことではなく、微生物殺虫剤を登場させた欧米においてさえその傾向は否めないところである。

最近のわが国における微生物的防除の性質は大きく変ぼうするに至った。もっとも大きく作用したのが化学農薬である。化学農薬は害虫駆除において甚大な役割を果たしている反面、その過剰散布は今日知られているようないくつかの難しい問題をも派生させた。わが国の農業は化学農薬の使用を不可欠の要因とする栽培体系を形成しているの、化学農薬によっておこった問題を解決することは容易ではない。こうした現実に対応する手段の1つが微生物的防除である。

微生物的防除は人畜・植物・魚類に対する危害がまずないこと（これに対する検討についてはあとで再びふれる）、目的害虫に選択的な微生物を利用しうるので生態系の保全に有利であること、害虫の微生物病に対する抵抗性の発達がおこりにくいことなどを特徴とし、また微生物の散布によって害虫に流行病をおこさせることもありうる。微生物的防除の実践には2つの方法がある。第1は微生物殺虫剤であり、これは作物と害虫が単純な系におかれている場合に効果をあげやすい。第2は生態系が複雑な場合、その実態を把握した上、害虫制御の手段として微生物を導入する場合である。

選択的感染が微生物的防除の特徴ともなっているの、微生物的防除とくに微生物殺虫剤は化学農薬のように万能性を発揮することができない。また糸状菌製剤を別として微生物殺虫剤の効力発現は経口感染によるので、そこには限界と制約がある。だが現在の微生物殺虫剤は化学農薬にとってかわるところはかわるといって目標をもってもよい段階に達した。たとえばアメリカではイラクサキンウバ (*Trichoplusia ni*) の防除の大部分は *Bacillus thuringiensis* 製剤によって可能であるというが、こうした例をわが国でもいくつかつくり出すことである。

過去10年間わが国の微生物的防除の研究者の念頭にはたえずこれが意識されてきた。このことはイエバエの防除を目的とする *Bacillus moritai* 製剤およびマツカレハの細胞質多角体病ウイルス製剤の開発、さらには殺虫性毒素産生細菌である *Bacillus thuringiensis* 製剤のわが国における利用という立場からの再開発などにつながる結果をもたらしたといえよう。以下基礎的知見にも触れながらそれらの展開について述べてみたい。

1. *Bacillus moritai* 製剤の開発

1960年農林省は永年作物協議会を組織したがこの中に病虫害分科会が設けられた。虫害については生物的防除の立場からの研究が行なわれた(1960~1964年

度)。筆者は微生物的防除の研究に従事したが、*Bacillus thuringiensis* 製剤の登場およびその輸入禁止の問題もあり、永年作物に限らず農作物や衛生害虫の微生物病とくに微生物病の診断、微生物の同定および分類をも研究対象とする了承をえた。当時 *Bacillus thuringiensis* のイエバエおよびカに対する影響が検討されはじめた頃であり、衛生害虫の微生物的防除はわが国としても考慮されなければならない課題であった。そこで筆者らはまずイエバエを対象とする有効微生物の検索にとりかかったのであるが、わが国の事情からカイコに病原性を示さない芽胞細菌のスクリーニングを目的とした。

イエバエ幼虫飼養基に芽胞浮遊液を添加して幼虫死亡、蛹化および羽化抑制を示す芽胞細菌のスクリーニングを重ねた結果遂に有効な1菌株が検出された。ハエ幼虫に対する効果は芽胞濃度に比例し、飼養基 1g 当り 6×10^6 個以上の芽胞を含んでいればハエ防除効果がみとめられた。ダイアジノン抵抗性のイエバエ幼虫に対しても同様の効果があった。この細菌は *Bacillus cereus* に形態的に類似していたが、澱粉水解一、レシチナーゼ産生一、硝酸塩還元一、クエン酸利用一、ウレアーゼ産生+などの点が異なるので *Bacillus moritai* Aizawa and Fujiyoshi (以下 BM と略す) と命名された⁷⁾。

殺虫作用の発現には芽胞がイエバエ幼虫に食下される必要があり、培養液の病原性はほとんど問題にならない。この殺虫機構についてはなお調査が行なわれなければならないが、*Bacillus thuringiensis* の場合とは全く異なる。また幼虫致死のほか羽化抑制効果があり、それにもとづく力価検定法も具体化されている。イエバエのみならずサシバエ、キンバエ、タネバエなどが BM に感受性であったが、ニクバエは感受性を示さなかった。

室内実験から野外実験に移り、有効芽胞濃度、羽化抑制効果などが調査されたが、室内実験と一致する結果がえられた。

一方 BM の人畜に対する安全性が検討されたが、まずマウス、モルモットを用いて急性および慢性毒性、腹腔内および皮下注射、吸入、アレルギーなどについて調査が行なわれた。さらにニワトリ、ブタ、ウシに対する影響が検討され、最終的には志願者による人体実験が行なわれた。いずれの場合にも悪影響はみとめられなかった。経口投与された BM のほとんどすべてが糞便に排泄された。高濃度投与の場合には少量ではあるが血液や臓器に BM が移行することもあったが、これは投与の中止によって消失した^{30,48,49,24a)}。

したがって動物飼料にあらかじめ BM 製剤を添加して糞に排泄させ、糞に産下された卵から発生するイエ

バエを防除することが可能であり、この防除効果は野外実験によって実証された。この製剤は1969年10月農林省に登録され製品名をラビルス M-10D, 同 M-20D, 同 M-200D というが、M-10D は散布用で製剤1g 中に 10^8 個の芽胞を含み 1m^2 当り 250g 散布する。M-20D は 1g 中に 2×10^8 個の芽胞を含み養豚、養鶏飼料に、M-200D は牛飼料用で 1g 中に 2×10^{10} 個の芽胞を含み、いずれも 1~2 % の割合に添加し給餌する。

2. *Bacillus thuringiensis* 製剤の開発と利用

Bacillus thuringiensis (以下BT と略す) 製剤* は微生物殺虫剤の代表的な役割を国際的にになってきたが、製剤の立場からの開発と利用はほぼ1950年以後の約20年間のことであり、アメリカでは1958年に残留毒性についての一時的免除がみとめられ、市場に登場してから今年 (1973) で15年になる。

BT は昆虫とくに鱗翅目に対する殺虫性毒素を産生するが、カイコもこの毒素に感受性である。1959年アメリカよりBT 製剤がわが国に輸入されたとき、外国産のBT およびその製剤は植物防疫法の「有害植物」の適用をうけ、輸入禁止品とされたため輸入には農林大臣の許可を必要とした。しかし、もともとBT は植物には有害ではなく、この事実がわが国でも理解されるようになり、1971年1月農林省植物防疫課の通達により禁止品から除外された。これを契機とし、とくに昨年 (1972) になってからBT 製剤の委託試験の申請が増加し、また一般の関心も高まりつつあったので、昨年3月日本植物防疫協会にBT 剤研究委員会が設置され、実用化にむかって広い角度からの検討が進められている。

1901年 (明治34年) 石渡繁胤博士³³⁾によって病蚕から発見された卒倒 (病) 菌が町田実上のBT の最初の分離となっている背景がわが国には存在するので、わが国の微生物的防除にたずさわる研究者の間にはBT に対する執着がひそめられていた。微生物殺虫剤の立場になつたBT がわが国で意識されてから10年以上を要して今日のような情勢をむかえるに至った。アメリカでは登録後15年間製剤の利用の拡大がはかられている間、わが国ではわが国としての道を歩まなければならなかった。BT は微生物殺虫剤の代表者の立場をになったとのべたが、そのうらづけとなる基礎的な知見にまず触れ、わが国における諸問題を概観したい。

A) BT の細菌学とその産生する殺虫性毒素

a) BT の細菌学的特性: BT は *Bacillus cereus* に極めてよく似た細菌で、芽胞のうに芽胞と結晶性毒素

を形成する。結晶性毒素はたんばくを主体とし、通常菱形または紡錘形で $0.6 \times 2\mu$ 程度の大きさであり、四角形を呈することもある。数日培養した集落をかきとり、染色鏡検すると多数の結晶性毒素と芽胞が遊離しているのが観察される。結晶性毒素が存在すれば *B. cereus* から区別されて *B. thuringiensis* と同定される。

BT 群の細菌は Voges-Proskauer 反応、レシチナーゼ産生、精および尿素分解などによって分類されていたが、鞭毛抗原によって11型に分けられ、さらにエステラーゼ型による分類も併用されている (第1表参照)。わが国においては serotype 4a, 4b (var. *sotto*, var. *dendrolimus*), serotype 7 (var. *aizawai*) が広く分布するが、鞭毛凝集反応によって serotype 1 (var. *thuringiensis*), serotype 3 (var. *alesti*) 抗原をもつBT も分布していることが明らかにされた。

BT の産生するおもな毒素には3種類があり、微生物殺虫剤の重要度からみると δ 内毒素 (易熱性の結晶性毒素)、 β 外毒素 (耐熱性の菌体外毒素でイエバエにも毒性を示すので fly toxin とよばれる)、 α 外毒素 (ホスホリパーゼC) の順となる。BT 毒素に対して鱗翅目、直翅目、鞘翅目、膜翅目、双翅目などの昆虫が感受性を示すが中心となるのは鱗翅目である。BT 芽胞のみを昆虫に注射すると敗血症をおこすことが多いが、経口投与の場合は病原性が示されない。

結晶性毒素による殺虫機序には3型がある。第1型はカイコ、第2型はモンシロチョウ、第3型はコナメダメイガがそれぞれの代表で、第3型の場合死亡をおこすには芽胞と結晶性毒素の両者を必要とする。

b) 結晶性毒素に存在する抗原と毒素たんばくの活性フラグメント: Pendleton^{74,75)} はゲル沈降法によって結晶性毒素中の抗原についてしらべ、a~k の11抗原が単独にまたは複数で存在することを明らかにした。エステラーゼ型が同じであっても菌株によって結晶性毒素中に存在する抗原のパターンは異なる。ただし抗原調製法にはまだ問題が残されているので今後なお詳細に検討される必要がある。

Lecadet^{46,47)} は var. *thuringiensis* の結晶性毒素から経口ならびに注射によって毒性を示すたんばくとペプチドを分別した。たんばくの約半量は分子量約 50,000 で、ペプチドの分子量は約 5,000 であった。後者はさらに4つの分画にわけられ、それぞれのC末端は i) アラニン、ii) ロイシン (N末端はアスパラギン酸)、iii) ロイシン (N末端はアスパラギン酸)、iv) アラニンであった。このうち i) は注射によってのみ毒性がみられたが ii)~iv) は経口および注射でも毒性が示された。

Pendleton⁷⁵⁾ は var. *thuringiensis* の結晶性毒素

* 詳しくは文献 3) 4) 19) 20) 22) 65) を参照されたい。

第1表 *Bacillus thuringiensis* の分類

血清型 (H抗原)	エステラーゼ型	亜 種	Fly toxin
H ₁	Berliner	var. <i>thuringiensis</i>	+
H ₂	Finitimus	var. <i>finitimus</i>	—
H ₃	3a	var. <i>alesti</i>	—
	3a, 3b	*	*
H ₄	4a, 4b	var. <i>sotto</i>	—
	4a, 4b	var. <i>dendrolimus</i>	—
	4a, 4c	var. <i>kenyae</i>	—
H ₅	5a, 5b	var. <i>galleriae</i>	—
	5a, 5c	*	—
H ₆	Entomocidus	var. <i>entomocidus</i>	—
		var. <i>subtoxicus</i>	—
H ₇	Galleriae	var. <i>aizawai</i>	—
H ₈	Morrison	var. <i>morrisoni</i>	+
H ₉	Tolworth	var. <i>tolworthi</i>	+
H ₁₀	*	var. <i>darmstadiensis</i>	+
H ₁₁	*	var. <i>thompsoni</i>	—

* 未決定

をモンシロチョウ消化液を加えたアルカリ緩衝液で処理し、分子量 200,000 の分画 1 と分子量 5,000~10,000 の分画 2 をえた。分画 1 には結晶性毒素をアルカリのみで処理したときと同様に a, d, i 抗原を含み、これは経口によって毒性が示されたが、注射では毒性が低かった。分画 2 は a, h, i 抗原を含み経口によっても注射によっても毒性が示された。抗 h 血清で処理した分画 2 は毒性を消失し、また抗 a + 抗 i 血清処理（抗原 h が残る）でも弱いながら毒性がみられた。さらに a + h, i + h は毒素たんぱく消化物 (a + h + i) と同様に強い毒性を示すので、抗原 h は活性フラグメントとして重要な役割を演じているものと考えられる。

結晶性毒素中の抗原と毒素消化物（とくに昆虫消化液を用いた場合）中の抗原とを比較してみると、前者の抗原は同じであっても消化物は異なった抗原パターンを示すことがある。またモンシロチョウに対する毒性は抗原 h が重要な役割をになっているとしても、それは他の昆虫に常にあてはまるものではないと考えられる。菌株と昆虫との組合せによって毒性には異なった様相が示される。事実供試昆虫を限定するとそれに対する菌株の毒性はかなり異なっていて^{1,15,73)}、ここに目的害虫に対して選択的な菌株を利用する可能性がでてくる。これについては微生物育種の項で再び触れたい。

結晶性毒素から毒素成分の抽出を試みる際、分子量 (5,000, 5,000~10,000, 10,000 および 40,000 などいくつかの報告がある) ならびに抗原性からみて異

なった成分がえられているが、これは供試菌株、処理方法、供試昆虫などの相違にもとずくところが多いと考えられる。

コナマダラメイガにおいては結晶性毒素のみを投与しても毒性が示されないが、モンシロチョウ消化液で処理した消化物は注射によっても毒性が示される。また酵素処理による毒素消化物はワモンゴキブリの神経節のシナプスの活動を阻害するが、酵素処理をしない毒素たんぱくにその作用はみられない。

c) β 外毒素: BT のある系統は耐熱性の菌体外毒素を培養液中に産生する (第 1 表参照)。培養液を昆虫に注射した場合に毒性の示されることが発見の端緒となったが、その後経口的にも毒性を発現することが明らかにされた。

この毒素の構造は Farkaš ら²⁴⁾ によって決定された。Kim ら³⁹⁾ も独立にややかれて報告したが方法もよく似ていて結果も同様である。Kim らは β 外毒素を Thuringiensin A および B と命名したが、後者は前者の γ ラクトンでありその毒性は前者の $\frac{1}{16}$ 程度である。 β 外毒素はマウス肝の RNA 合成を阻害するがたんぱくや DNA 合成を阻害しない。また *E. coli* の DNA 依存 RNA ポリメラーゼの活性を阻害するが ATP はその阻害に拮抗する。 β 外毒素は昆虫 (β 外毒素はイラクサキンウワバにおけるたんぱく、DNA, RNA の合成を阻害する) のみならずマウスに対しても毒性を示すが、脱りん酸した毒素は両者に対して毒性を示さない。

B) 外国産の BT 製剤

a) 製品：アメリカでは International Minerals and Chemical Corporation が Thuricide, Nutrilite Products, Inc. が Biotrol, Abbott Laboratories が Dipel という商品名で製剤を市販している。このほかフランスの Bactospéine, ソ連の Entobakterin, チェコの Bathurin などの製品名の製剤がある。粉剤、水和剤および液剤があり、園芸作物、タバコ、牧草、棉、バナナ、森林など多くの害虫を対象にしているが、それぞれ散布基準もきめられている。

b) 生物検定：製剤の力価検定は国際共通試験によって検討されたが、生物検定によることが勧告された。芽胞数の測定により製剤の力価を検定することは一般に限られた場合に適用される。現在国際単位標示が普遍化しているが、標準製剤 E-61 (パストゥール研究所による製剤) 1mg 当りの毒性を 1,000 単位としている。したがって製剤の力価を国際単位で示すには E-61 との比較にもとづかなければならない。

Biotrol BTB 183-25W は 1g 中 2.5×10^{10} 個の芽胞を含む。力価検定には標準として BT 048 株を用いてこの 1 毒性単位は芽胞数 1×10^9 個/g に相当する。当初の製剤 BTB 25-W の力価は 1g 当り 25 毒性単位をもっていたが、改良された BTB 183-25W は 80~100 毒性単位をもつ。このほか酵素活性をマーカーにする方法や免疫電気泳動による毒性の力価測定についても研究が行なわれている。

C) わが国における BT 製剤の開発と利用

a) BT および BT 製剤と養蚕との関係

欧米においては害虫防除に BT を容易に利用しているが、わが国では養蚕業との関係があり、いかに効果があっても即座に利用されない。これに対し外国では養蜂におよぼす BT の影響が検討されたが、このことはあとでものべるようにまず問題にならないのが実情である。石渡³³⁾によって BT はカイコの卒倒病の病原体として分離されたので、カイコに毒性を示すことは当然であるが、BT のカイコという昆虫に対する毒性の調査にとどまるだけでなく、BT 製剤散布の養蚕におよぼす影響が検討されなければならなかった。

i) わが国における BT の分布：1959 年アメリカより BT 製剤がわが国に輸入されたことが契機となり、微生物的防除の立場からわが国における BT の分布が 1960 年頃より調査された。各地の養蚕農家の塵埃（蚕室となっている居間の床上、鴨居、貯桑室や上簇室の天井、梁などの砂ぼこり）からカイコに対してもっとも強い毒性を示す BT が頻繁にかつ量的にも少なからず検出され¹¹⁾、その後の調査^{32,70)}によって、BT はわが国にしかも養蚕農家の塵埃に広く分布していることが明らかにされた。例数はわずかであったが

BT 検出率が非常に高い場合は違作の原因となっていた。しかし BT が少なからず検出されるにもかかわらず、それと違作との関係は必ずしも平行しないことも少なくなかった。

ii) BT の死滅と消毒：BT の芽胞は昇糸、ホルマリンなどの消毒薬によって死滅し、結晶性毒素はホルマリンによって容易に失活する^{8,10)}。現在養蚕農家においてはカイコの飼育前に蚕室、蚕具のホルマリン消毒を行なっているが、これは BT 芽胞の死滅、結晶性毒素の失活にとって極めて有効な処置である。BT による養蚕農家の被害はホルマリン消毒によって防ぐことができ、その実証は高須ら⁸⁴⁾の報告にみられるとおりである。

iii) 土壌における BT の蓄積と定着：BT 製剤の散布によって長い間には桑園土壌における BT の蓄積や土壌への定着の可能性があり、このことが再び養蚕に影響をおよぼすのではないかと懸念が生じる。BT は元来土壌細菌の 1 種とみなされるからこのことは当然であろう。つまり土壌における BT の増殖によって誘起される結晶性毒素と芽胞の再生産が問題になるからである。土壌中の BT の消長については Saleh ら⁷⁹⁾の報告があり、有機質が存在する土壌では酸性 (pH 5) の場合 BT は土壌微生物との競合により死滅するが、中性 (pH 6.3~7.2) においては増殖して芽胞を形成し、有機質の少ない土壌ではそのまま生存するという。滅菌土壌と無処理土壌における BT の生存が調査されたが、後者においては比較的長く生存することもあるが、一般に漸次減少する。これに対し滅菌土壌（とくに水田土壌）では増殖することがある⁸⁰⁾。なお河水、汚水などにおける BT の生存は比較的長いが増殖はみられなかった⁸¹⁾。このことは他の微生物との競合やその他の要因により BT は土壌に容易に定着するものではないことを示唆する。

iv) カイコ死体における BT の増殖：BT 製剤散布が養蚕において問題となる 1 つの理由はカイコ死体における BT の増殖（芽胞および結晶性毒素の再生産）の可能性であり、この点が BT 製剤を散布するとき化学農薬にはみられない問題をなげかけているのである。ここでいうカイコ死体は BT 毒素による中毒死のみならず、ウイルス病や生理疾患によって死亡するときたまたま芽胞を食下している場合が含まれる。BT 製剤を害虫防除に利用する場合、現状では直接桑園に散布するわけではないから、カイコ死体における BT の増殖の検討に際しては少量の芽胞摂取という条件をまず考慮する必要がある。4~5 令のカイコに数十~百数十個の芽胞を飲下させカイコを殺した場合死体における栄養型細胞の増殖はみられたが芽胞の形成はおきなかった^{6,10)}。これに対しかなり高濃度の芽胞を食下さ

せた場合増殖による芽胞—結晶性毒素の再生産はより容易である⁸⁷⁾。一般に *B. cereus* 群の細菌は昆虫の死体で芽胞を形成しにくいとされているが⁸⁸⁾、カイコ死体における BT 芽胞、結晶性毒素の再生産については菌株、摂取芽胞数、カイコの令などを考慮に入れて議論する必要がある。

あとで再び触れるように養蚕農家において BT が流行病となる可能性はほとんどないにしても、1戸内の BT によると考えられる不作の発生と BT の生態とはどう結びつくのだろうか。また野外で病死昆虫から BT が分離されることがあるが、その分離例や病死個体数は甚だ少ないにしてもそれは BT の生態とどのような関係にあるだろうか。これらの点については今後なお調査が重ねられる必要がある。

v) 抵抗性蚕品種：蚕品種によって BT 抵抗性に差があることも明らかにされた¹⁰⁾ (なお第2表参照)。現行品種では豊年×研白は共榮×新白および錦秋×鐘和の 2.5~3.8 倍の抵抗力を示した (藤吉ら、未発表)。

vi) 桑葉における BT の残留：BT 製剤を桑葉に直接散布しても日光や気象などの条件によるが2週間後にはカイコに製剤散布桑葉を食下させても毒性は示されない程度になるという結果がえられている。なお少量の連続摂取による影響⁸⁾、BT 付着桑葉を貯桑した場合の増殖⁶²⁾などについても調査が行なわれた。

vii) BT は流行病をおこすか：散布された微生物が他所へ伝播される要因として気象、動物などをあげることができる。たとえばスズメ、ムクドリなどの鳥類が昆虫病原微生物を食下した場合、消化管を通過して糞にそのまま排泄されるので微生物の伝播にあずかっていることが知られている⁸¹⁾。これが果して昆虫の流行病をおこしうるかについての調査は必ずしも十分ではないが、BT の場合、流行病となる可能性はまず期待されないと一般に考えられている (たとえば Tanada⁸⁶⁾)。野外において BT による流行病が発生したという報告はシベリアマツカレハの防除に BT が利用された場合 (Talalaev⁸⁹⁾) の1例にすぎない。アメリカではそ菜、果樹、棉など多くの害虫防除に BT 製剤が連続散布されているが、もし BT が土壌中で増殖して蓄積され、流行をおこすほどに定着するならばある時期以後は散布の必要はなくなるであろう。しかしいままでのところこうした現象はみられていない。

養蚕農家において BT による軟化病の発生はフランス (Vago⁸⁹⁾) でも日本 (佐野・市川⁷⁷⁾) でも報告された。Vago によればその軟化病はふるくからセブンス地方に存在する風土病で、隣接地域における発生は稀であり、またその被害は消毒によって防除できたという。Vago はその軟化病発生に対して風土病といい、

流行病とはいっていない。BT による軟化病の発生と流行とを区別して考える必要があり、わが国においても BT によるカイコの軟化病の発生は事実であるが、それを直ちに流行病とみなすことはできない。

b) BT 製剤の養蜂におよぼす影響

芽胞や結晶性毒素の投与によってミツバチは影響を受けないが、高濃度の β 外毒素の場合ミツバチは死亡する²¹⁾。ミツバチを死亡させる散布量は β 外毒素そのものとして 25~800kg/ha に相当するという。したがって結晶性毒素を主剤とする BT 製剤であるならば実用散布においてそのミツバチにおよぼす影響は全く問題にならないといえよう。3カ年にわたる試験により BT を養蜂地帯でも使用が可能なグループに所属させている報告もある。

c) BT の微生物育種：ワクチン製造や醗酵工業において微生物株の選抜と育成は重要な課題であり、微生物育種と表現されている。微生物的防除においても当然このことは目標としてかけられなければならないし、また認識されるに至った¹⁾。昆虫微生物病学においてはウイルス、細菌、糸状菌などが主な対象材料となっているが、そのうち細菌と糸状菌においては実用的な見地から具体的な研究が展開されつつある。

もともと BT はカイコに毒性を示すが、わが国のような養蚕国においては、もしカイコに対して弱毒性であり害虫に対しては強毒性の BT 菌株の選抜と育成がなされるならば BT 製剤の開発と利用に役立つところがあると考えられる。筆者は石倉秀次博士のセッションによってこの問題にとりくんできた。BT 生菌による流行病や芽胞および結晶性毒素の2次生産の危険性が過大視されることも理由となり、死菌—毒素製剤を利用する方法が検討されまた報告されている⁸⁸⁾。そこには現状では1つの価値が見出されるが、昆虫病原性の細菌、ウイルス、糸状菌など “naturally occurring” の微生物を主剤とする微生物殺虫剤 (および微生物的防除) は生菌を利用するのが本来の性格であり、BT もその例外ではない。筆者らのカイコに対する弱毒性 BT の選抜と育成ならびに実用化試験はこうした意識のもとに研究が行なわれ、その試みはいまや実用化にむかって進行中である。

筆者らは選抜、紫外線照射、溶原ファージの利用、培養方法の改変などによってカイコには弱毒性のいくつかの菌株を選出することができた^{13,7)}。例をあげるとカイコに対する毒性 (芽胞数/1匹で示すが結晶性毒素の形成は良好である) は $10^4 \sim 10^7$ であったが、モンシロチョウ、コナガおよびアメリカシロヒトリに対しては $10^4 \sim 10^6$ 程度であった。カイコに対する強毒性および弱毒性のそれぞれ1菌株の毒性とカイコ品種とを組合せた成績を第2表に示す。

第2表 *Bacillus thuringiensis* 強毒および弱毒株に対する蚕品種の感受性

菌 株	実 験 番 号	令 日	蚕 品 種 お よ び LD ₅₀ (芽胞数/g体重)						
			大 造	支115	大 草	支124	春 月	日124	
強 毒	1	IV ₄ -V ₄	3.7×10 ⁴	2.9×10 ⁴	—	5.2×10 ⁴	—	—	
	2	IV ₃ -IV ₄	3.9×10 ⁴	1.4×10 ⁴	4.2×10 ⁴	5.7×10 ⁴	2.6×10 ⁴	9.8×10 ³	
	3	IV ₂ -IV ₃	2.2×10 ⁴	6.7×10 ⁴	8.7×10 ⁴	2.8×10 ⁴	3.4×10 ⁴	—	
弱 毒	1	IV ₄ -V ₄	1.9×10 ⁷	2.9×10 ⁷	—	4.2×10 ⁶	—	—	
	2	IV ₃ -IV ₄	>3.9×10 ⁷	>2.0×10 ⁷	4.9×10 ⁷	8.6×10 ⁶	2.1×10 ⁶	2.1×10 ⁶	
	3	IV ₂ -IV ₃	>4.2×10 ⁷	>4.3×10 ⁷	5.1×10 ⁷	4.7×10 ⁶	4.4×10 ⁶	4.7×10 ⁶	

IV₄: 4令4日を示す。

またハスモンヨトウ中令以後の幼虫に対し通常のBT菌株は毒性を示さないが、筆者らはハスモンヨトウに毒性を示す菌株の選抜を行なったところ、いくつかの菌株がえられた。しかもこれらの菌株は鞭毛凝集反応によって大部分が var. *aizawai* (serotype 7) に所属することが明らかにされた⁴⁰⁾。さきにも触れたようにBT菌株と昆虫との組合せによって毒性には異なった様相が示され、目的害虫に対して選択的な、少なくとも特徴のあるBT菌株を選抜し利用する可能性が存在する。このことはひとりBTにとどまらず、糸状菌やウイルスにおいても発展がはかられる必要があり、とくに前者にはその大きな手がかりがすでにえられている。

d) わが国におけるBT製剤の利用試験

すでにのべたように日本植物防疫協会にBT剤研究委員会が設置されたが、基本問題、蚕、蜜蜂、効果試験、人畜毒性の5部会で構成され、BT製剤の実用化にむかって検討が重ねられている。

鱗翅目を中心とする各種の害虫がBTに感受性であり、欧米においてはそのリストも作製されている。わが国ではイネ、野菜、果樹、茶、樹木などの害虫に対する効果試験が進行中であるが、モンシロチョウ、コナガ、アメリカシロヒトリ、コカクモンハマキ、イネツトムシ、イチモンジセセリなどの防除に有効という成績が蓄積されつつある⁴²⁾。

3. マツカレハの細胞質多角体病ウイルス製剤の開発*

すでにのべたように小山および片桐を中心にマツカレハの細胞質多角体病ウイルスの利用についての基礎および応用研究が行なわれた。現在中外製薬とクミアイ化学が共同してマツケミンという製品名で登録申請を行なっている。

ウイルスの量産 (実際にはマツカレハ幼虫を大量に

飼育しウイルスに感染させて形成された多角体を採集することになる) は次のような手続による。葉のついたマツの枝約1kgに多角体浮遊液 (約10⁶個/ml) をうすくぬれる程度にかけ、これをカンレイシヤ袋 (折径50cm, 長さ90cm) で包み、7令幼虫100頭を入れ両端をくくり林内につり下げる。2週間ほど経過してから死虫、感染虫を集め、大型ホモジナイザーで磨砕し、この磨砕液を遠心して多角体を集める。多角体原液は0°Cに貯蔵する。このようなカンレイシヤ袋法のほかに人工飼料によって病虫を製造することも可能である。

使用形態には液剤、粉剤、水和剤などがある。液剤の場合は多角体原液を所定濃度に水で稀釈して中性展着剤を加える。粉剤は多角体原液をホワイトカーボンに吸着させ水分を除去してクレイを用いて増量する。水和剤は多角体原液に主としてホワイトカーボンとクレイを加えて調製した原末を粉砕し300メッシュで篩う。

マツカレハ細胞質多角体病ウイルスの哺乳動物、魚類、ミツバチ、カイコなどにおよぼす影響も調査されている。たとえばラットおよびマウスに対しては3.3×10¹⁰個の多角体を経口投与しても影響はなく、マウスの脳内注射 (多角体2.5×10⁸個)、ウサギの筋肉内注射 (多角体1.25×10⁸個)、ハムスターの腹腔内注射 (多角体9×10⁷個) などの場合にも異常はみとめられなかった。また多角体1.15×10¹¹個を含む水和剤の場合50ppmの濃度でコイやヒメダカに対して影響をおよぼさない。このウイルスはミツバチには病原性を示さないが、カイコの場合孵化幼虫では多角体数10⁴/mlで感染がみられるが、4令以後になると10⁷/mlでもほとんど感染をおこさない。

温度、光線、化学薬剤などによる製剤の活性保持についてもしらべられているが、5°Cに保存すれば少なくとも2年間は活性が十分に保持される。

* 小山・片桐⁴²⁾および中外製薬小山良之助博士よりの情報を参考にした。

IV. 微生物殺虫剤の安全性

微生物的防除は人体実験さえ行なうことに確信のあける微生物を材料にしているが、これらはもともと“naturally occurring”である。しかし使用量が増加した場合の人畜や生物環境におよぼす影響が問題になり、さらには昆虫に対する選択的病原性が漠然と普遍的病原性につながって、人々の拒否反応を生み、遂には方法論のわくをこえた絶対的な安全性まで要求されることがある。

微生物殺虫剤のうちでBT製剤について筆者は紹介⁴⁾を試みたので、ここではBTおよびBMについて調査の行なわれた項目のみをあげておく。

1. BT製剤の安全性

A) 供試動物：マウス、モルモット、ラット、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ウズラ、ニジマス、サケなど。

B) 動物試験における主要調査項目

- a) ラットに対する急性毒性
- b) モルモットに対する病原性
- c) マウス血中におけるBTの存続性
- d) マウスで継代した場合の病原性の増強
- e) 飼料添加の場合BTの血液・臓器への移行
- f) マウスに対する吸入毒性
- g) モルモットにおけるアレルギー

C) 人体実験

D) BTの哺乳動物に対する病原性株への変異

E) β 外毒素のマウスに対する毒性¹⁰⁾

2. BM製剤の安全性

A) マウスに対する病原性

- a) 経口急性毒性
- b) 傷口塗布
- c) 皮内注射
- d) 腹腔内注射
- e) 吸入毒性
- f) 7カ月慢性毒性

B) モルモットにおけるアレルギー

- a) 皮内注射によるアレルギー
- b) 経口投与および吸入によるアレルギー
- c) アナフィラキシー

C) ウサギに対する安全性 a) 3カ月給餌試験

D) ニワトリに対する安全性

- a) 強制飲下試験
- b) 4カ月給餌試験

E) ブタに対する安全性 a) 4カ月給餌試験

F) ウシに対する安全性 a) 3カ月給餌試験

G) 人体実験

微生物殺虫剤は人畜安全性、害虫に対する選択性、微生物病に対する抵抗性の発達の困難などを特徴とす

るものの、これらの問題は常に検討されなければならない。しかしある時期に至れば、微生物散布後の経過に対する注意深い観察を条件として、微生物殺虫剤の適用範囲においてはその活用にあみきる決断がなされないならば、物事は前向きに進まないであろう。

V. 微生物殺虫剤の開発を進めるにあたり

わが国は欧米とくにアメリカにおける微生物殺虫剤の開発の動向や利用状況をうかがって、微生物殺虫剤の将来に対応しようという風潮がみられないこともなかった。しかし筆者が痛感させられてきたことはアメリカの動向のみに依存することなく、“公害の実験場”とさえいわれているわが国こそ化学農薬の過剰散布が派生させた困難な問題に対処する一助として、微生物的防除の具体的な進展を独自にはかななければならないということである。筆者はこれを微生物的防除の日本の展開とよんでいる。

現状でまず筆者が強調したいことは日本のような環境条件において微生物殺虫剤をいかに導入するかその施用例の拡大をはかり、ここで指摘された諸問題の基礎的解明とその実用への還元である。いかなる形にせよ導入に際しては、導入技術のみならず微生物の製剤化の考慮なしには微生物を利用することはできない。

微生物殺虫剤として登場するからにはそこに登録問題がある。ここにはわが国において考慮され、かつ通過しなければならない関門といえる問題のほとんどの部分が包含されているといえよう。

微生物的防除ないし微生物殺虫剤にはいろいろな面で制約があり、また限界がある。したがって対象害虫の選定には十分な考慮が払われなければならない。筆者はそ業を中心とする園芸害虫、牧草害虫、森林害虫などに重点がおかれてよいと考える。衛生害虫については一般に基礎研究の展開が必要であり、稲作害虫の微生物的防除は技術的にも行政的にも問題をかかえているので、今後の研究にまっところが大い。

筆者がのべてきた日本における微生物的防除ないし微生物殺虫剤の展開の中には微生物的防除と養蚕との関係に必要な部分がさかれているかも知れない。カイコは家畜化された昆虫であるので、おのずと野外昆虫とは異なった取扱いがなされるはずである。しかしそれにとどまらずそこでの疫学は勿論 epizootiology であるが、むしろ “epidemiological” なアプローチが試みられてよいであろう。このように考えると微生物的防除の養蚕におよぼす影響は単にカイコだけの問題に限られず、微生物散布と生物相や環境との関係の解析に1つの役割をになっていると考えられる。なおこれに関連して付言したいことは“実験動物”と

しての昆虫のもつ役割である。従来実験動物は温血動物にたよってきたが、その多くは閉鎖環境におかれていた。疾病において昆虫が“実験動物”となる考えは先年惜しくも亡くなられた Steinhaus 教授²¹⁾によって提唱されているが、単に感染とその防衛機構(温血動物と根本的に異なる面がある)だけでなく、環境破壊が人類にどう波及するかが問題になっている現在、開放環境における一般昆虫とその疾病(伝染性および非伝染性疾病がある)は“実験動物”としての立場からも改めて見直される必要がある。

DeBach²³⁾によれば天敵昆虫による害虫防除の例はアメリカ(カリフォルニア、ハワイ、太平洋岸北西部の合計)においては効果からみて‘完全’が5例、‘完全に近い’が20例、‘部分的’が22例(計47例)であるのに対し、わが国では‘完全’が4例である。一方微生物的防除の場合その有効性の実証は1つには微生物殺虫剤の登場によるが、国際的にみて実用に供されている微生物はまだ4種にすぎない。わが国における微生物的防除ないし微生物殺虫剤は現実の要望にこたえるため、実践の立場からその試験に耐えぬものを1つ1つ出現させたいことを筆者は念願している。

文 献

- 1) Aizawa, K.: *In Microbial Control of Insects and Mites* (H. D. Burges and N. W. Hussey, eds.), Academic Press, 655 (1971).
- 2) Aizawa, K.: *In Entomological Essays to Commemorate the Retirement of Professor K. Yasumatsu* (S. Asahina *et al.*, eds.), Hokuryukan Publ. Co., 381 (1971).
- 3) 鮎沢啓夫: 化学の領域 26, 47 (1972).
- 4) 鮎沢啓夫: タンパク毒素(村田ほか編), 講談社サイエンティフィク, 335 (1972).
- 5) 鮎沢啓夫: 農および園 47, 1507 (1972).
- 6) 鮎沢啓夫・藤吉宜男: 日蚕雑 33, 399 (1964).
- 7) Aizawa, K. and N. Fujiyoshi: *Proc. U. S. - Japan Seminar on Microbial Control of Insect Pests*, 79 (1968).
- 8) 鮎沢啓夫・佐藤文子: 蚕糸研究 39, 38 (1961).
- 9) 鮎沢啓夫・藤吉宜男・浅川浩一: 農薬 19, 22 (1972).
- 10) 鮎沢啓夫・河原畑明・佐藤文子: 日蚕雑 31, 253 (1962).
- 11) 鮎沢啓夫・高須敏夫・倉田啓而: 日蚕雑 30, 451 (1961).
- 12) 相沢保: 林業試験報告(北海道庁) 10, 99 (1924).
- 13) Akutsu, K.: *Proc. U. S. - Japan Seminar on Microbial Control of Insect Pests*, 43 (1968).
- 14) 阿久津喜作: 応動昆 15, 56 (1971).
- 15) Angus, T. A.: *J. Inverteb. Pathol.*, 9, 256 (1967).
- 16) 青木清: 蚕糸科学 4, 5 (1947).
- 17) 青木清: 昆虫病理学, 技報堂, 493 pp. (1957).
- 18) Barjac, H. de. and J.-Y. Riou: *Rev. Pathol. Comparée et Méd. Exp.*, 69 année, 367 (1969).
- 19) Bond, R. P. M., C. B. C. Boyce, M. H. Rogoff and T. R. Shieh: *In Microbial Control of Insects and Mites* (H. D. Burges and N. W. Hussey, eds.), Academic Press, 275 (1971).
- 20) Burgerjon, A. and D. Martouret: *In Microbial Control of Insects and Mites* (H. D. Burges and N. W. Hussey, eds.), Academic Press, 305 (1971).
- 21) Cantwell, G. E., D. A. Knox, T. Lehnert and A. S. Michael: *J. Inverteb. Pathol.*, 8, 228 (1966).
- 22) Cooksey, K. E.: *In Microbial Control of Insects and Mites* (H. D. Burges and N. W. Hussey, eds.), Academic Press, 247 (1971).
- 23) DeBach, P.: *Proc. Hawaii. Ent. Soc.*, 18, 69 (1962).
- 24) Farkaš, J., K. Sebesta, K. Horská, Z. Samek, L. Dolejš and F. Šorm: *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 34, 1118 (1968).
- 24a) 藤吉宜男: 西武化学工業(株)研究所特別報告(1973), 印刷中.
- 25) 長谷川孝三・小山良之助: 林業試験報告 3 (3), 1 (1937).
- 26) 長谷川孝三・小山良之助: 林業試験報告 4 (1), 1 (1941).
- 27) 浜武人: コガネムシの幼虫防除に応用したオースボラ菌効果調査報告書, 長野営林局52 pp. (1958).
- 28) 浜武人: 長野林友 4月号, 1 (1959).
- 29) 日高義実: 林学会誌15, 1221 (1933).
- 30) 飯野雅夫・田家清一・持木清・米村寿男・元井霞子・勝尾茂夫・藤吉宜男・須藤喜八郎・吉村国彦: 埼玉養鶏試研報 5, 75 (1968).
- 31) 石川義文・神野英男: 日蚕雑 34, 371 (1965).
- 32) 石川義文・林田勉・井川晃: 日蚕雑 33, 480 (1964).
- 33) 石渡繁胤: 大日本蚕糸会報 114, 1 (1901).
- 34) 神奈川県: 昭和42年度アメリカシロヒトリ防除対策事業報告書, 78 (1968).
- 35) 神奈川県農政部: 昭和42年アメリカシロヒトリ防除対策試験成績, 13 (1968).
- 36) 神奈川県農政部: アメリカシロヒトリの防除に関

- する研究, 65 (1969).
- 37) Katagiri, K.: *Entomophaga*, 14, 203 (1969).
- 38) Katagiri, K.: *Rev. Plant Protect. Res.*, 2, 31 (1969).
- 39) Kim, Y. T. and H. T. Huang: *J. Inverteb. Pathol.*, 15, 100 (1970).
- 40) 小山良之助: 日林試 43, 91 (1961).
- 41) Koyama, R. and K. Katagiri: *Bull. Gov. Forest Exp. Sta.*, 207, 1 (1967).
- 42) 小山良之助・片桐一正: ウイルスによる森林害虫の防除, 林業科学技術振興所 46 pp. (1967).
- 43) Koyama, R. and K. Katagiri: *Proc. U. S. - Japan Seminar on Microbial Control of Insect Pests*, 63 (1968).
- 44) 小山良之助・木村重義・山家敏雄・佐藤平典・岩田善三・近藤秀明・神永翔六・片桐一正・串田保・井幡清生・松枝章・高根久男: 日林講要, 359 (1966).
- 45) 楠野正夫・田村孝一: 東京都蚕糸指導所要報2, 110 (1968).
- 46) Lecadet, M. M. and R. Dedonder: *J. Inverteb. Pathol.*, 9, 310 (1967).
- 47) Lecadet, M. M. and D. Martouret: *J. Inverteb. Pathol.*, 9, 322 (1967).
- 48) Maebashi, H.: *Japan. J. Hyg.*, 27, 267 (1972).
- 49) Maebashi, H. and N. Fujiyoshi: *Japan. J. Hyg.*, 27, 342 (1972).
- 50) 松本奎吾・鮎沢啓夫: 九州蚕糸 2, 68 (1971).
- 51) 松本奎吾・鮎沢啓夫: 九州蚕糸 3, 69 (1971).
- 52) 水戸野武夫: 台湾の山林 148, 98 (1938).
- 53) 森本徳右衛門: 高知大学術研報3 (6), 1 (1954).
- 54) 森本徳右衛門: 高知大学術研報 4 (5), 1 (1955).
- 55) 森本徳右衛門: 高知大学術研報 7 (2) 1 (1958).
- 56) 森本徳右衛門: 高知大農紀要 7, 1 (1959).
- 57) 森本徳右衛門・竹下正二・橋本博好: 高知大学術研報 10 (3), 17 (1961).
- 58) 森本徳右衛門・竹下正二・岩川孝・橋本博好: 高知大学術研報 8 (4), 1 (1959).
- 59) 森本徳右衛門・竹下正二・岩川孝・橋本博好: 高知大学術研報 8 (5), 1 (1959).
- 60) 森本徳右衛門・竹下正二・岩川孝・橋本博好: 高知大学術研報 9 (2), 13 (1960).
- 61) 長野営林局造林課・白田営林署・林業試験場木曽分場: 長野林友12月号, 1 (1958).
- 62) 日本植物防疫協会: 昭和47年度 BT 剤に関する試験成績, 315 pp. (1972).
- 63) 農林省中国農試虫害研究室: 昭和43年度虫害に関する試験成績, 37 (1969).
- 64) 農林省九州農試虫害第1研究室: 昭和41年度試験研究成績, 25 (1967).
- 65) Norris, J. R.: *In Microbial Control of Insects and Mites* (H. D. Burges and N. W. Hussey, eds.), Academic Press, 229 (1971).
- 66) Oho, N.: *Proc. U. S. - Japan Seminar on Microbial Control of Insect Pests*, 119 (1968).
- 67) 於保信彦・佐藤靖男: 園試報A (平塚) 5, 179 (1966).
- 68) 岡田齊夫: 農および園 45, 677 (1970).
- 69) 岡山県衛生部: 毒蛾の生物的防除技術研究 37pp. (1969).
- 70) 小野恵子: 埼玉蚕試研究要報 40, 125 (1968).
- 71) 大島俊市: 農学研究 47, 51 (1959).
- 72) Pendleton, I. R.: *J. Appl. Bact.*, 31, 208 (1968).
- 73) Pendleton, I. R.: *J. Inverteb. Pathol.*, 13, 423 (1969).
- 74) Pendleton, I. R. and R. B. Morrison: *J. Appl. Bact.*, 29, 519 (1966).
- 75) Pendleton, I. R. and R. B. Morrison: *J. Appl. Bact.*, 30, 402 (1967).
- 76) Saleh, S. M., R. F. Harris and O. N. Allen: *Can. J. Microbiol.*, 16, 677 (1970).
- 77) 佐野利男・市川辰也: 静岡蚕試報 8, 70 (1958).
- 78) 関口昭良: 東北農試研報 4, 152 (1955).
- 79) 関口昭良: 東北農試研報 16, 89 (1959).
- 80) Smirnoff, W. A. and A. M. Heimpel: *J. Inverteb. Pathol.*, 3, 403 (1961).
- 81) Steinhaus, E. A.: *Fed. Proc.*, 28, 1810 (1969).
- 82) 高木五六: 朝鮮林試報 2, 1 (1925).
- 83) 高野秀三: 日本学術協会報 15, 231 (1940).
- 84) 高須敏夫・高橋澄雄・倉田啓而: 蚕糸研究 41, 38 (1962).
- 85) Talalaev, E. V.: *Entomol. Rev. U. S. S. R.*, 37, 641 (1958).
- 86) Tanada, Y.: *In Insect Pathology An Advanced Treatise* (E. A. Steinhaus, ed.), Academic Press, 2, 423 (1963).
- 87) 内海 進: 京都工繊大繊維学報 4, 278 (1965).
- 88) 内海 進: 日蚕雑 40, 269 (1971).
- 89) Vago, C.: *Acad. Agr. France*, 37, 593 (1951).
- 90) 吉川直宏・鮎沢啓夫: 九州蚕糸 3, 70 (1972).