

カミキリムシ類防除のための天敵糸状菌  
*Beauveria brongniartii* 培養製剤  
『バイオリサ・カミキリ』の開発

1997年7月

樋口 俊男

## 目 次

緒 言	2
第 1 章 培養製剤の開発	8
第 2 章 培養製剤の特性	17
第 3 章 培養製剤の量産試作	25
第 4 章 防 除	35
第 1 節 柑橘園でのゴマダラカミキリ防除	35
第 2 節 桑園のキボシカミキリ防除	40
第 3 節 スギカミキリ防除の試み	42
第 4 節 街路樹でのゴマダラカミキリ防除の試み	50
第 5 章 <i>Beauveria brongniartii</i> 由来のキチナーゼとプロテアーゼ	54
総合考察	64
要 旨	67
謝 辞	68
引用文献	69
写真・図	1~42

## 緒 言

近年、環境汚染や地球の温暖化等の環境問題への関心が社会的に注目される中、身近な問題としては、食品の安全性に及ぼす食品添加物や残留農薬の影響について一般消費者の関心が高くなってきている。一方では、化学合成農薬の偏重による害虫自体の薬剤抵抗性の獲得のため、既存の農薬での防除が困難となってきている。そのような背景の中、害虫防除については、化学農薬だけでなく、天敵やフェロモンといった、いくつかの有効な防除手段を組合わせた総合的害虫管理 (Integrated Pests Management) が重視されるようになり、環境に対する負荷を少なくする低投入持続型農業 (Low Input Sustainable Agriculture) が提唱されている (Jullius, 1996、玉木, 1991、Mackenzie, 1991、Liebman, 1992、Bolinetc, 1996)。その中の一つの方法として、自然界に存在し、特定の害虫のみを罹病死させる天敵微生物の開発・利用が大きく期待されている (Hegedus・Khachatourians, 1995、Payne, 1989)。

わが国においては農薬の品質および安全性の確保は農薬取締法により図られ、その検査機関として農林水産省農薬検査所がある。内容は、「農作物等を害する菌、線虫、だに、昆虫、ねずみその他の動植物またはウィルス (病害虫) の防除に用いられる殺菌剤、殺虫剤、その他の薬剤及び農作物の生理機能の増進又は抑制に用いられる成長促進剤、発芽抑制剤その他の薬剤」とされており、同様の目的のために使用される天敵も農薬とみなされ、これらの登録申請の場合の認可に当たっても化学農薬の基準を参考にケースバイケースで安全性の試験項目が要求されている。一方、米国では、農薬の使用は、連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法 (F I F R A) により規制されており、米国環境保護庁 (E P A) が取り締まる。米国では、病害虫の防除に用いられる薬剤 (agent) を図 1 のように、化学農薬と生物作用に基づく農薬、さらに後者を、生化学農薬と微生物農薬 (細菌、糸状菌、ウィルス、原生動物を含む) に分類し、それぞれに対して異なる安全性評価法を定めている (三菱化成安全科学研究所, 1993、U. S. Environmental Laws, 1988、U. S. EPA, 1982)。すなわち、米国だけでなくカナダや E C の各国は、化学農薬の作用が毒性に基づいているのに対し、生物農薬

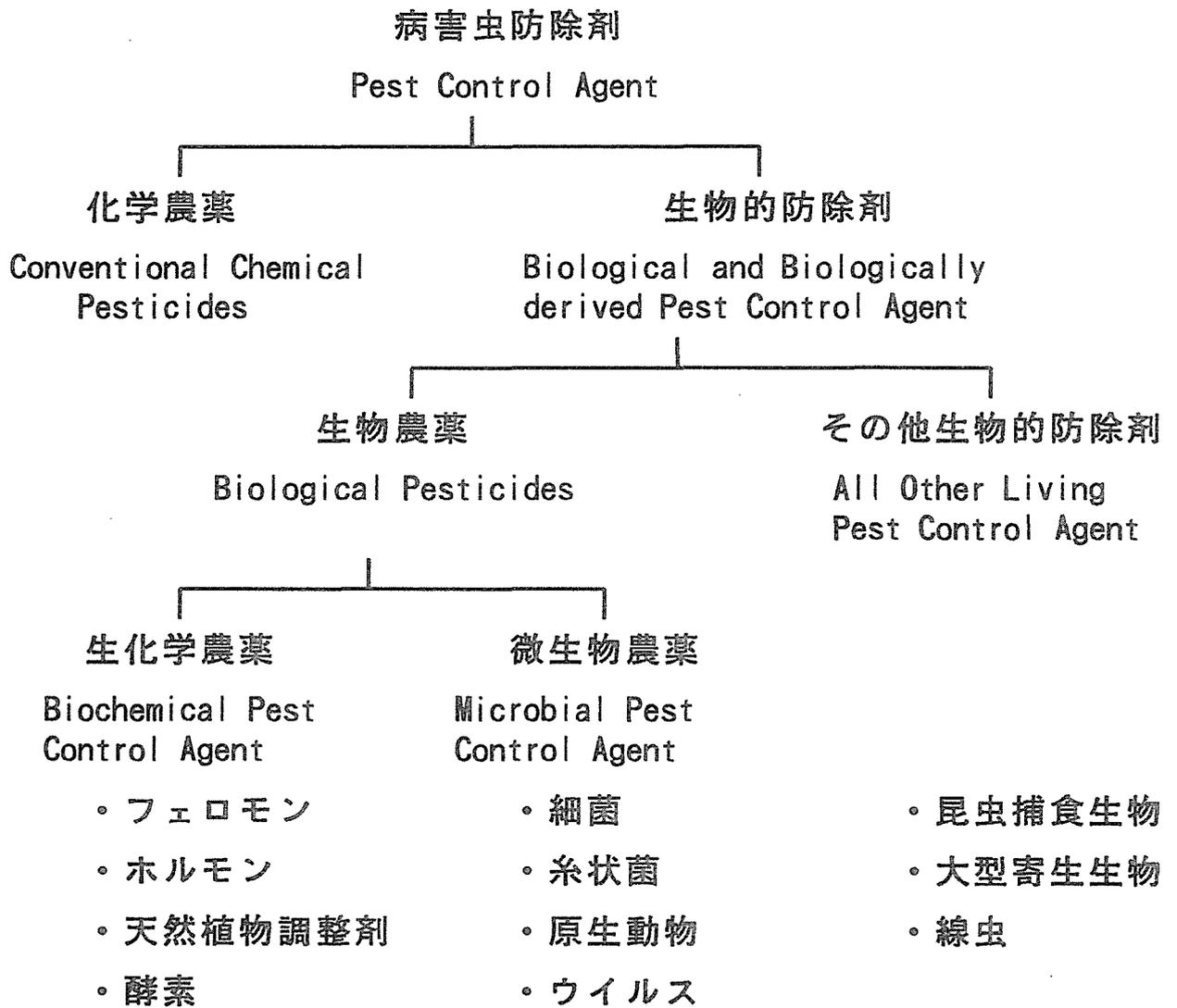


図 1 米国における農業の分類

は下記①～④の特徴から環境に対してより良いものと考えられ、農薬登録のためのデータは段階的試験法を採用し、安全性試験に加重な負担をかけないようにして農薬市場への参入を促進しようという意図がある。実際、これまでのEPAの経験では、微生物農薬の使用による人間および環境への有害影響は見られておらず、第二段階以上の試験が要求された例もないということである(Betz F.・M.Levin・M.Rogul, 1983)。

①作用機作が毒性によらないものが多い。

②使用量が少ないものが多い。

③標的生物に対する選択性が高い。

④生物農薬は自然界に既に存在しているものであり、環境に対する有害性が低いと見られる。

わが国においても、国・公の行政機関において、『有機農業』、『生態系活用型農業』、『持続的農業』の推進など、生態系の保全、安全性を重視した施策があげられ、この方面の研究や事業は近年著しく増加している。そして、微生物的病虫害防除資材の農薬登録のための『微生物農薬検査基準確立対策事業』が1992年から農水省農薬検査所において実施され、EPAのガイドラインなどを参考に、安全性試験に段階試験制度を採用するといった微生物農薬の新しい基準の導入が検討されている(岡田, 1994、岩花, 1994)。

微生物農薬に利用される病原微生物は、りん翅目昆虫の核多角体病に代表されるウィルス、同じくりん翅目昆虫を殺虫するB.T. (*Bacillus thuringiensis*) 剤に代表される細菌、節足動物の脂肪細胞で増殖するリケッチア、そして、糸状菌(カビ)や原生動物が上げられる。漢方薬で知られる冬虫夏草も、コウモリガ幼虫などの昆虫に寄生するキノコ、すなわち、病原糸状菌の一種である。これら病原微生物を殺虫剤として利用できるかは、その微生物の生態、特性が問題である。すなわち、殺虫剤は、伝播性(害虫集団の中での広がり)、残効性(害虫生息地での残存性)、安全性(人畜、魚類、益虫に影響がない)、病原性(害虫に対する殺虫力)、生産性(量産化)、貯蔵性(長期安定化)、簡便性(使い易さ)が必要である。そして、それらを考慮すると、すべてにおいて満足できる微生物農薬は少なく、世界的に広く普及している微生物農薬は、化学殺虫剤と同じ散布機が使用でき、殺虫力の強いB.T.剤のみである。しかし、微生物

の中には、伝播性、残効性、安全性において化学殺虫剤よりも優れたものがあり、生産性、貯蔵性、簡便性の開発が期待される（渡辺，1989）。

河上(1978)によってキボシカミキリ *Psacotha hilaris* Pascoe の病死体から分離された昆虫病原糸状菌 *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (*Beauveria tenella*) は、キボシカミキリ、ゴマダラカミキリ *Anoplophora malasiaca* Thomson の両種に高い病原性を示し（河上，1978、滝口，1981、柏尾・氏家，1988）、他にクワカミキリ *Apriona japonica* Thomson に対しても同様に高い感染力のあることが知られている（滝口，1981、柏尾・氏家，1988）。一方、*B. brongniartii* のマウスに対する経口投与、吸入試験、および、腹腔内注射試験でも全く異常はなく、カイコの幼虫に対しても実用上の安全性が示された（島根・河上，1993、島根・河上，1994、河上，1978）。

カミキリムシ類のうち、キボシカミキリはクワ、イチジクなどのクワ科植物、ゴマダラカミキリはカンキツ類などの主・枝幹に幼虫が穿孔し、その中で摂食・成長するため、化学合成農薬では幼虫まで到達し難く、農業上重要な難防除害虫である。更に、化学合成農薬はカイコや天敵昆虫など有用生物に対する影響が問題であるため、合理的な防除技術の導入が要望されている（柏尾・氏家，1988、伊庭，1993）。*B. brongniartii* によるキボシカミキリの防除は、当初フスマ培地による培養菌の桑園地表面への散布により試みられたが（河上，1978、河上，1986、河上・島根，1986、石々川，1986、米山，1987）、製剤化には至らなかった。*B. brongniartii* は、病原糸状菌としてその分生子が害虫に付着することより感染がはじまり、その分生子の伝播性や残効性、そして、安全性から、その普及が非常に期待されていた。そこで、カミキリムシ類防除に本菌を利用するにあたり、ゴマダラカミキリやキボシカミキリの生態を考慮し製剤化に至った。カミキリムシ類は、幼虫が樹幹内を穿孔・食害した後、蛹を経て成虫が樹幹の下部から羽化脱出する。脱出直後の成虫は摂食のため樹幹を移動して樹枝を上る。その後、交尾した雌成虫は、樹幹下部に産卵するため樹幹を移動する。*B. brongniartii* の病原性は遅効性（感染後、致死までに1週間必要）ではあるが、これらカミキリムシ成虫は羽化後1～2週間は産卵には未成熟である（橋元・柏尾・堤，1989、伊庭，1989）。したがって、成虫が羽化脱出直後や産卵時に樹幹を移動する習性を利用して、その樹幹に設置可能な *B. brongniartii* を培養したシー

ト状の製剤を考案し製剤化に至った。すなわち、本製剤を防除しようとする樹の主幹に巻き付けて固定するだけで、羽化直後に感染した雌成虫を産卵する前に致死させることが可能となった。こうした防除法は、世界でも初めての方法であり、簡便性に優れ、病原力の伝播性や残効性も優れていた。また、シート状製剤の培養担体としてパルプ不織布を用いることによって量産化が可能となり、貯蔵性においても低温(5℃)で1年以上保存可能な安定した製剤を生産することができた。そして、Low Input Sustainable Agriculture (LISA) から『リサ』を採って『バイオリサ・カミキリ』と名付けて商品化し、1995年に農薬登録され、1996年から販売を開始した。表1に示すように、害虫防除剤として登録されている糸状菌は10例前後で、日本でもセンチウに対する製剤はあったが、昆虫を対象とした殺虫剤として農薬登録された糸状菌製剤は『バイオリサ・カミキリ』が日本で初めてである。

表1 害虫防除用として登録されている糸状菌

糸状菌	標的害虫	商品名	使用国
<i>Hirsutella thompsonii</i>	ミカンサビダニ	Mycar	米国
<i>Verticillium lecanii</i>	アブラムシ	Vertalec	英国
<i>Verticillium lecanii</i>	オンシツコナジラミ	Mycotal	英国
<i>Arthrotrrys robusta antipolis</i>	マッシュルーム 食菌性線虫	Royal300	仏
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	センチウ	Biocon	フィリピン
<i>Monacrosporium phymatophagum</i>	サツマイモネコブ センチウ	ネマヒトン	日本
<i>Beauveria brongniartii</i>	ゴマダラカミキリ キボシカミキリ	バイオリサ ・カミキリ	日本
<i>Beauveria bassiana</i>	イナゴ、アブラムシ アザミウマ	Mycotrol	米国
<i>Beauveria bassiana</i>	コロラドハムシ	Boverin	旧ソ連
<i>Beauveria bassiana</i>	アワノメイガ		中国
<i>Metarhizium anisopliae</i>	アワフキムシ	Metaquino	ブラジル

本研究は、カミキリムシ類防除のための *B.brongniartii* 培養製剤『バイオリサ・カミキリ』の開発と普及を目的とし、製剤化と量産化を行い、圃場における防除効果を確認した (Higuchi・Saika・Senda・Mizobata・Kawata・Nagai,1997、Shibata・Higuchi,1988、Shibata・Yoneda・Higuchi・Ichinose・Yamada,1991、Shibata・Higuchi,1993、樋口・二宮・千田・雑賀・伊庭,1994)。さらに、カミキリムシに対する *B.brongniartii* の病原性向上を目指すべく、感染機構の最初の重要な役割をされると考えられる菌由来の酵素の働きを知る目的で、キチナーゼとプロテアーゼの精製を試み、検討を行った (Higuchi・Nagai・Kanamori・Mizobata・Kawata・Nagai,1996)。

本論文では、第1章で *B.brongniartii* の培養条件を中心に培養製剤の開発について、第2章では、製剤の保存および野外での使用を考慮した条件下での安定性など培養製剤の特性について、第3章では培養製剤の量産試作について、第4章では、実際に行われた多くの防除試験の中から、代表的なカンキツ園でのゴマダラカミキリや、クワ園でのキボシカミキリ防除の試験結果、ならびに、製剤開発当初に行い多くの知見が得られたスギカミキリ防除の試みと、今後さらに期待されている街路樹でのゴマダラカミキリ防除の試みについて述べ、第5章では、*B.brongniartii* の病原性向上に繋がると考え検討したプロテアーゼとキチナーゼに関する知見を述べる。

## 第1章 培養製剤の開発

昆虫病原糸状菌の中で *Beauveria* 属は、有性生殖が認められない不完全菌類 Deuteromycotina に分類され、その形態的特徴は、分生子形成細胞の先端がジグザグ状に伸長しながら交互に分生子が形成されることにある。その中で、*B.brongniartii* は、その分生子が単胞で無色、 $2.5\sim 4.5 \times 2\sim 2.5 \mu\text{m}$  の卵形で、分生子形成細胞は一般に細長く、それがブドウの房状に固まったクラスターが形成されることは少ない (De Hoog, 1972、青木, 1989)。

河上(1978)によってキボシカミキリ病死体から分離された *B.brongniartii* は、分生子の大きさが  $2.4\sim 6.8 \times 1.8\sim 3.5 \mu\text{m}$  で、様々な形のクラスターを形成する形態的な特徴がある。寄主範囲は、キボシカミキリ、ゴマダラカミキリの両種に高い病原性を示し、カイコ等に対する病原性がほとんどなく、カミキリムシに対して特異性の強い天敵糸状菌である (島根・河上, 1994)。そのため、本糸状菌によるカミキリムシ類の防除が、有用生物に対して影響を及ぼさない防除技術として検討されている。その施用方法としては、フスマ培地による大量培養が行われ、散布する方法が検討された (河上, 1986、石々川, 1986、米山, 1987)。

一方、カビ類の新しい培養法として、生物に親和性を持たせたウレタン発泡体を用いる方法が開発され、ペニシリン生産等の検討がされている (樋口・遠藤・長棟・井上・牛山, 1984、遠藤・長棟・井上, 1985)。

筆者らは、*B.brongniartii* を利用してカミキリムシ類を防除する方法として、キボシカミキリやゴマダラカミキリの成虫が羽化脱出直後や産卵時に樹幹を移動することから (橋元・柏尾・堤, 1989、伊庭, 1989)、その樹幹に設置可能なウレタン発泡体に *B.brongniartii* を培養したシート状の製剤を考案した (樋口・柴田, 1989)。さらに、実用化のために重要な課題であった保存性や野外施用時の殺虫力の持続性に優れた製剤の開発を行った (樋口・二宮・伊庭, 1993)。本章では、その製剤化における本菌液体培養、および、培養担体としてウレタン発泡体と経済的かつ生分解性に優れたパルプ不織布を使用した静置培養について検討した。

## 材料および方法

### 1. 使用菌株

糸状菌 *B.brongniartii* は、1985年に群馬県農業総合試験場蚕業分室から分与されたキボシカミキリ成虫の病死体から分離した。菌株の分離および保存には、蚕蛹煎汁2%加糖寒天培地（河上, 1978、片桐・島津, 1980）を使用した。病死体の菌を白金耳で掻き取り、寒天平板培地に画線法にて植菌して25℃で1週間培養後、さらに、生育したコロニーのうち最初白色の菌糸で生育し、分生子形成が進むにつれて黄色を帯びたコロニーを選択し、その単一コロニーから同様に白金耳で菌を掻き取って寒天平板培地に植菌、培養を繰り返し純粋分離を行った。純粋分離された菌株は、日東電工㈱にて年に1~2回スラント培地で継代し、その中から必要に応じて使用した。本菌は、その形態的特徴から、農水省蚕糸・昆虫農業技術研究所、河上清博士により *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (*Beauveria tenella*) と同定され（写真1-1）、保存菌株 NBL-851（樋口・柴田, 1989）と命名した。同時に、白色のコロニーを呈した糸状菌も分離し、河上清博士により *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas と同定された菌株を、比較実験に使用した。

### 2. 培養方法

*B.brongniartii* の培養は、当初、蚕蛹煎汁2%加糖培地（河上, 1978、片桐・島津, 1980）を使用した。蒸留水1ℓ当たり40gのさなぎ粉（丸九製つり餌）を加えて熱湯水中で10分間煮出し、その濾過液に20gのグルコースを加えて使用した(pH6)。寒天培地は、1.5%の普通寒天を加えて使用した。

製剤化における液体培養には、グルコースとコーンステープリカー（CSL）を組成とするCSL培地(pH4)を使用した。通常は、蒸留水1ℓ当たり、20gのグルコースと40gのCSL（いずれも、サンエイ糖化㈱製）を加えた。菌の液体培養は、保存菌株から1白金耳を滅菌したフラスコ培地に植菌し、25℃で7日間攪拌培養(100~400rpm)にて前培養を行った。これより、タンク培養の場合は培地量の2%、フラスコ培養の場合は0.2%を植菌し、3~6日間攪拌培養(100~400rpm)を行った。培養液中の溶存酸素濃度（DO値）は、ミツワ理化学工業㈱製デジタルDO指示計MD-2型により測定した。

ウレタン発泡体を用いた培養は、蚕蛹煎汁2%加糖液体培地を含浸させてオートクレーブ滅菌した厚さ5mmのウレタン発泡体に、同じ培地で7日間液体培養した培養液を0.1~0.2ml/g滴下してコンラージ棒で一面に引き伸ばし、25℃で7日間以上静置培養した。ウレタン発泡体は、ウレタンプレポリマー（東洋工業(株)製イソシアネート化合物）1000gに5%のゼラチン水溶液275gを加えて発泡成型した後、切断して使用した。

不織布を用いた培養は、CSL培地による前培養液とグルコース濃度を6%にして滅菌したCSL培地の混合液（通常1:4で混合）を、厚さ4mmのパルプ不織布（坪量306g/m<sup>2</sup>）に含浸させ、25℃、保湿条件下で5日間以上静置培養した。それを室温下で送風乾燥して得られた製剤を『バイオリサ・カミキリ』と命名した。製剤の培養湿度および培養温度の検討は、5cm×5cmに切断した10枚の不織布を、前培養液とCSL培地の混合液に含浸させた後、人工気象機（(株)日本医化器械製作所製LPH-200RDMP)内の網に設置し、種々の温度・湿度条件に設定して5日間培養した。

### 3. 菌数の測定

上記条件による液体培養では、本菌は短菌糸（hyphal bodies；写真1-2）で増殖し、静置培養では培地表面が菌糸で覆われ、それより繁殖器官として分生子（conidia；写真1-1）が形成される。そこで菌数の測定は、以下のように適宜調整した菌液により、短菌糸数、あるいは、分生子数を、検鏡数の測定（トーマ血球計算盤を用いた顕微鏡による測定）と生菌数の測定（ポテトデキストロース寒天培地（ニッスイ(株)製）を使用した寒天平板培養法による測定）により行った。すなわち、液体培養の場合は、培養液を滅菌水で10倍階段希釈により適宜調整して短菌糸数の測定を行い、製剤の場合は、一部を5×5cmに切取り、0.02% Tween 40水溶液（400ml）中で電気ミキサーにより粉碎し、それをナイロンメッシュ（100メッシュ）で濾過した後、蒸留水で洗浄し500mlに調整して検鏡数測定により分生子数の測定を行い、さらに、それを10倍階段希釈により調整して、同じ希釈液から5枚の平板培地にそれぞれ0.1mlを滴下後コンラージ棒で引き伸ばし、3日間25℃で培養後に出現したコロニー数を測定し、平均して生菌数とした。

#### 4. 培養固形物濃度の測定

単位容量サンプリングした培養液を、No.1 濾紙（アドバンテック東洋(株)製）を用いて吸引濾過し、濾紙上の固形物を105℃で十分乾燥させ、重量測定により求めた。

#### 5. 糖濃度の測定

液体培養液中の糖濃度は、0.45  $\mu$ mのフィルター（アドバンテック東洋(株)製）で濾過した培養濾液を、Brix計（ATAGO社製のHAND REFRACTOMETER N-10 Brix 0～10%）を用いて測定した。標準対照液には、蒸留水を用いた。

#### 6. 生物検定法

製剤のカミキリムシ類に対する生物検定は、原則として羽化脱出直後のキボシカミキリ成虫を用いた。成虫は5秒以上製剤表面を強制的に歩行させた後、25℃、75%相対湿度（RH）の実験室内で個体別に約30日間飼育し、この間に糸状菌病特有の体を硬直させて死亡、さらに本菌の叢生が認められたものを感染死虫とした（写真1-3）。キボシカミキリの確保および飼育は、伊庭(1993, 1988)、島根・河上(1991)の方法に準拠して行った。すなわち、桑園から確保した成虫や、人工的に交尾させ、桑枝に産卵させて孵化した幼虫を人工飼料（シルクメート；日本農業(株)製）で飼育し、蛹化・羽化させた成虫を使用した。成虫は桑枝や桑葉を与えて飼育した。

ウレタン発泡体を用いた培養物について、キボシカミキリに対する効果を調べた。羽化後4～7日後の成虫2頭を1分間、培養物表面を強制的に歩行させた後、25℃の実験室内で個体別に飼育し、生死日数を観察した。さらに死亡虫表皮を他の菌に汚染されないようエタノール消毒し、水で湿らせた濾紙を入れたシャーレ内で25℃で培養し、菌の叢生の有無を観察した。対照として、発泡体培養物に接触させない成虫1頭と、*B.brongniartii* に代えて、同時にキボシカミキリ成虫の病死体から分離された糸状菌 *Verticillium lecanii* を培養したウレタン発泡体に接触させた成虫2頭について同様に実験を行った。

## 実験結果

### 1. 液体培養

本菌の液体培養には、これまで4%蚕蛹煎汁 2%加糖培地が使用されていたことから、2%グルコースと4%コーンスチープリカーからなるCSL培地を用いて培養検討を行った。本菌の培養では、一般の糸状菌に見られるペレット状やパルピー状に生育するのではなく、写真1-2に示すように酵母状の短菌糸が均一に生育した。30Lタンクでの培養結果を、図1-1に示した。攪拌数400rpm、通気量1/2vvmとしたが、DO値の減少は少なく、酸素消費量は低かった。また、培養48h後には、ほぼ糖が消費され $10^9$ 個/mlの菌数に達した。また、4以下であったpHは36h以後に上昇し、48h後には6以上になった。図より求められた対数増殖期の倍加時間は、増殖期前期は2h以下、後期でも6hであった。

さらに、不織布での培養で植菌に用いるCSL培地の混合液の残液を、次のタンク培養の培地として再利用することを目的に、グルコース濃度6%の培地400mlにフラスコ培養液 100mlを加えて滅菌した培地を用い、培養した結果を図1-2に示した。ここでは菌数測定を生菌数でも測定した。培養初期には生菌数の減少が認められたが、24h以後は順調に生育し、増殖、糖消費、pHの変化については、図1-1と同様であった。したがって、不織布での植菌液の残液を次の生産のタンク培養の培地として再利用できることが確認できた。

### 2. 発泡体を用いた培養

5×50cmに切断し、滅菌したバット内で培養したウレタン発泡体は、培養7日目には *B.brongniartii* 菌で完全に表面が覆われた（写真1-4）。その表面上の分生子数は、 $10^7$ 個/cm<sup>2</sup>程度であった。

キボシカミキリに対する効果は、対照の *V.lecanii* に接触させた成虫が2カ月以上生存し続けたのに対し、*B.brongniartii* に接触させたものは、感染して10~11日後に死亡した（図1-3）。その4日後、表皮に *B.brongniartii* の生育が観察された。

表 1 - 1 不織布培養における培地混合比の検討

培地混合比 (培養液：培地)	分生子数 (検鏡数)	不織布への含浸量 <sup>a)</sup>
1：4	$3.4 \times 10^8$ 個/cm <sup>2</sup>	0.38 ml/cm <sup>2</sup>
1：9	$3.2 \times 10^8$	0.44
1：14	$2.0 \times 10^8$	0.44
1：19	$2.9 \times 10^8$	0.42
1：49	$1.5 \times 10^8$	0.42

バット内、25℃で 5日間培養

不織布への含浸量<sup>a)</sup>；含浸直後にバット内に残った液量を測定して算出

3. 不織布を用いた培養

不織布を用いた培養は、前培養液と滅菌した CSL 培地の混合液を厚さ 4 mm のパルプ不織布に含浸させ、静置培養で行った。はじめに、その植菌に用いる培養液と CSL 培地の混合比の検討を行った。CSL 培地のグルコース濃度を 6% に設定し、あらかじめ 3 日間フラスコ液体培養した本菌の培養液と CSL 培地の比率を、1：4～1：49 の範囲で検討した結果、保湿条件下 25℃ で培養 120h・乾燥 48h 後の検鏡数は、表 1 - 1 の通りであった。混合比 1：9 では、 $3.2 \times 10^8$  個/cm<sup>2</sup> であったが、それより混合比が大きくなると検鏡数は少なくなった。そこで、1：4～1：11 の範囲で再度検討した結果、1：11 では外観上も生育は不良で、その他については図 1 - 4 に示した様に、培養・乾燥後の菌濃度は 1：4、1：6 の時が高く、生菌数はほぼ  $10^8$  個/cm<sup>2</sup> であった。これらの対数増殖期の傾きは同じであり、図より求められた倍加時間は 16 h であった。

上記の混合比が生育に影響を及ぼすという結果は、菌濃度と糖濃度の 2 つの要因が考えられる。その後、大量生産を想定して CSL 培地中のグルコース濃度と CSL 濃度を変化させ、培地の混合比の高い条件（培養液：培地 = 1：99）で

表 1 - 2 不織布での培養における培地濃度の検討

グルコース (g/l)	C S L (g/l)	生菌数 ( $10^8$ 個/cm <sup>2</sup> )			
		培養 2 d	3 d	4 d	7 d
10	40	0.06	1.6	1.4	1.6
20	40	0.23	2.5	1.4	1.7
30	40	0.59	2.5	2.5	3.9
40	40	0.49	1.8	2.5	3.2
50	40	0.10	2.0	2.4	3.3
30	10	0.60	1.5	1.8	2.0
30	20	0.50	1.8	2.5	2.4
30	40	0.59	2.5	2.5	3.9
30	60	0.00	1.8	2.0	3.1

フラスコ培養した培養液( $3.5 \times 10^8$  個/ml)を1%上記組成の培地に接種し、不織布(5cm×5cm)に含浸させて、シャーレ内25℃で培養

検討した。その結果、培地の混合比が大きいかかわらず、グルコース濃度が5%の時も、培養3日目に生菌数 $10^8$  個/cm<sup>2</sup>が得られた(表1-2)。すなわち、菌濃度が低くても、生育は良好であった。

ただし、次に記載の実験は、培地のグルコース濃度は6%とし、培養液との混合比1:4の条件で検討したものである。

次に、5×5cmの培養不織布を人工気象器内に設置し、設定温度25℃にして、80~97%の範囲の設定湿度による生育に及ぼす影響について検討を行った。その結果、図1-5に示した様に、97%RHの場合は生菌数が培養96h目に $10^8$  個/cm<sup>2</sup>に達したが、95%RH以下の条件では、培養72h目までに試験片が乾燥し、菌数も $10^8$  個/cm<sup>2</sup>に達しなかった。

同様にして人工気象器の湿度を97%RHに設定し、22~30℃の範囲の設定温度による生育に及ぼす影響について検討を行った。その結果、図1-6に示した様に、22~28℃の設定では、いずれも培養96h目に生菌数は $10^8$  個/cm<sup>2</sup>に達した。しかし、29℃の場合は $0.9 \times 10^8$  個/cm<sup>2</sup>までで、30℃の場合は $0.5 \times 10^8$  個/cm<sup>2</sup>までしか達せず、外観も本来の白色ではなく、茶褐色を呈した。

さらに、同様の培養不織布をシャーレに入れ、35℃の条件で培養したが、9日間、全く外観の変化が見られず生育しなかった。その後、温度を下げると、外観上、十分な生育が得られた。

## 考 察

*B.brongniartii* 培養製剤『バイオリサ・カミキリ』は、クワおよびミカン等に大きな被害を及ぼすキボシカミキリやゴマダラカミキリが、羽化脱出直後や産卵時に樹幹を移動する習性を利用して、その樹幹に設置可能な形態を有する製剤として開発された。

生物に親和性を持たせた発泡体がカビ類の培養に適していることから（遠藤・長棟・井上，1985）、これをシート状にして *B.brongniartii* を培養した結果、ウレタン発泡体は菌で覆われ、キボシカミキリに対する致死効果も認められた。

その後、本製剤の実用的生産を考え、有効成分である分生子を均一に、しかも大量に形成させるため、培養担体としてウレタン発泡体より経済的で、かつ生分解性に優れたパルプ不織布を使用した。そして、培養原料として一般的なCSL培地を使用し、培養方法として、液体培養と不織布を用いた静置培養の2段階培養の検討を行った。

液体培養では、対数増殖期の倍加時間が6 h以下で、培養48 h後には2%の糖は消費され、ほぼ $10^9$  個/mlの菌数に達し、蚕蛹煎汁2%加糖培地の場合と同程度の良好な培養結果が得られた。本菌は、糸状菌培養としては短菌糸が均一に生育し、ペレットやパルピーの形状を呈しないことや、酸素消費量が低いことより、生産のためのタンク培養は、通気や攪拌等の消費電力の点で、効率が良いと考えられた。さらに、糖濃度が高いと、144 h培養を継続しても生菌数が維持された。これは培養後の取扱いに有利に働くものと考えられる。すなわち、液体培養で見られる短菌糸のうちで測定される生菌数は、液体培養、また、後の不織布による培養においても植菌後の誘導期には一旦減少し、培養初期の短菌糸はほとんど死滅すると考えられるので、液体培養で得られる生菌濃度は高いことが好ましい。

一方、不織布を用いた培養は、液体培養液とCSL培地の混合液をパルプ不織布に含浸させ、それを静置培養して行った。本培養は、グルコース濃度6%

の条件では、培養液とCSL培地の混合比1:4~6の時、生菌数 $10^8$ 個/cm<sup>3</sup>が得られ良好であったが、CSL培地の比率が高くなると生育に悪影響を及ぼした(図1-4)。混合比が生育に影響を及ぼすという結果は、その原因が菌濃度と糖濃度の2つの要因が考えられる。菌濃度による影響については必ずしも、最初に行った混合比1:4~49の結果(表1-1)と傾向では同じでも数値では再現性が得られなかったこと、そして、培地混合比1:99でもグルコース濃度5%の条件では生菌数 $10^8$ 個/cm<sup>3</sup>に達した(表1-2)ことから、液体培養の生育を抑制する原因として、菌濃度よりも糖濃度の影響が大きいものと考えられる。つまり、本製剤の残糖が野外での効果の持続性に影響すると考え、本培養の糖濃度を高くするためにCSL培地のグルコース濃度を6%に設定して混合比を検討したが、生育には混合直後のグルコース濃度は5%が限界と考えられる。

また、本静置培養における対数増殖期の倍加時間は16hであった。液体培養の3倍を要し、培養初期に一旦生菌数の減少も見られることから、培養時間として4日以上が必要である。

不織布を用いた培養において、人工気象器内での培養湿度の検討では、湿度が低いと菌数は $10^8$ 個/cm<sup>3</sup>に達しなかった。これは5×5cmに切断した不織布では、95%の湿度でも試験片が乾燥して生育が停止したもののようであった。すなわち、湿度が問題ではなく、培養物の水分が重要な要因と考えられ、仮に、95%以下の湿度条件で培養物が徐々に乾燥しても、培養96h目に少量の水分を含んでおれば、本培養に対する影響はほとんどないものと考えられる。また、培養温度の検討から、22~28℃の条件であれば、いずれも培養96h目に生菌数が $10^8$ 個/cm<sup>3</sup>に達し、その温度範囲では大きな差は見られなかった。しかし、29℃以上の場合には生育は抑制された。量産化においては、この温度・湿度の設定条件を見つけることが大きな課題となり、その諸条件を検討したことについては、第3章で詳述する。

## 第2章 培養製剤の特性

ゴマダラカミキリやキボシカミキリ等のカミキリムシ防除に*B.brongniartii*を利用するにあたり、ウレタン発泡体よりも経済的で、かつ生分解性に優れたパルプ不織布を用いて本菌を培養し、製剤『バイオリサ・カミキリ』が得られた。それは *B.brongniartii* を厚さ 4mmの不織布で静置培養した後、送風乾燥し、その表面が $10^8$  個/cm<sup>2</sup>以上の分生子で覆われたものである。本章では、製剤としての貯蔵性、効力の残効性を確認するために、種々温度条件における本製剤の保存性、殺虫力の持続性を調べるとともに、本製剤の自然環境に及ぼす影響として、土壌への影響とカンキツ類果実への影響について試験を行った結果（樋口・二宮・伊庭, 1993）について報告する。

### 材料および方法

#### 1. *B.brongniartii* の培養方法

*B.brongniartii* の培養は、第1章と同様、保存菌を滅菌したCSL培地に接種し、25℃で3～4日間攪拌培養（100rpm；フラスコ培養）により前培養した。得られた前培養液1に対し滅菌したCSL培地4を混合した液を、トレーに並べた厚さ4mm、幅5cm、長さ50cmのパルプ不織布に含浸させ、25℃、保湿条件下で6日間静置培養した。

以下に述べる本製剤『バイオリサ・カミキリ』は、培養した不織布を室温下で送風乾燥して得られた（写真2-1）。

#### 2. 生菌数の測定法

第1章と同様、製剤の生菌数を測定した。製剤の一部を5×5cmに切り取り、0.02% Tween 40の水溶液（400ml）中で電気ミキサにより粉碎した。それをナイロンメッシュ（100メッシュ）で濾過して、さらに蒸留水で洗浄して500mlに調整した後、1分間超音波処理して懸濁液を得た。その懸濁液を用い寒天平板培養法によって単位面積当りの生菌数を測定した。

### 3. 生物検定法

第1章と同様、生物検定は原則として羽化脱出直後のキボシカミキリ成虫を用いた。1製剤に1～2頭の成虫を5秒以上製剤表面を強制的に歩行させた後、25℃、75%RHの実験室内で個体別に約30日間飼育し、この間に糸状菌病特有の体を硬直させた死亡、さらに本菌の叢生が認められたものを感染死虫とした。

### 4. 保存方法

#### 4. 1 製剤の保存試験

本製剤を5×5cmに切断した後、SS滅菌バッグ（岡田紙業製）またはポリエチレンの袋に一枚ずつ入れてシール機で密閉し、-35℃、5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、37℃、39℃、41℃および43℃の各温度で保存した。その間生菌数の測定を行い、必要に応じて生物検定を行った。

#### 4. 2 給水した製剤の保存試験

25±3℃で40日間保存した本製剤に、5cm×50cm当り不織布含浸量の90%程度である100mlの培地または水道水を加え、25℃の保湿条件下に設置し、その後の生菌数を測定した。

また、鹿児島県における7月上旬の平均気温を参考にし、1日を周期として23～31℃の間で変動する温度条件（図2-7右）の人工気象器の中で、水道水を十分含ませた製剤を容器（直径105mm、深さ65mm）に入れて、一方は密閉し、他方は開放して保存した。後者については、更に3、14、21および30日後に給水した場合と全く給水しない場合について生菌数の経時変化を調べた。

### 5. *B.brongniartii* の土壌およびカンキツ果実への影響

#### 5. 1 土壌への本菌の接種と菌数の測定

ポテトデキストロース寒天培地（39g/l；ニッスイ（株）製）で*B.brongniartii*を20日間平板培養した表面をTween 40の2%水溶液でピペティング洗浄して分生子の懸濁液を作成した。本製剤の使用されていない京都市内の桑園から土壌を採集し、容量300mlのビーカーに100gずつ分取した。その中央に本菌の懸濁液を1mlずつ滴下して25℃の室内に8日間保存した後、本菌および混在する他のカビ類と細菌の菌数を測定した。菌数の測定法は、製剤の場合と同様、

100 g の土に対して 500mlの蒸留水で処理した濾液をサンプル液として希釈平板法により測定した。

本菌を含むカビ類の測定には、ローズベンガル (0.06mg/ml) やクロラムフェニコール (0.1mg/ml)、シクロヘキシミド (1 mg/ml) といった抗生物質を添加した培地を用いた (河上・仲, 1979)。希釈平板法によって25°Cで培養し、3日目に現れる約φ1mm以下の綿毛状の白いコロニーを *B.brongniartii* とし、それ以外のコロニーを他の菌としてカウントした。

## 5. 2 ミカンへの本菌の接種と表皮および果肉における菌数の測定

市販の温州ミカン10個を材料に用いた。これらはヘキサソで洗浄して表面のワックスを落とした後、果頂部に前述した *B.brongniartii* の分生子懸濁液 0.1 mlを接種した。そのうち5個を25°Cの室内に、他の5個を底一面に蒸留水を張り保湿条件としたバット内にミカンは浸らないようにして入れ、同室内に、8日間保存した。表皮の菌数は、滅菌水 500mlとミカン1個をミキサーに入れ、5分間ホモゲナイズして得られた液を供試し、前述の希釈平板法によって測定した。また、果肉については、それが汚染されないように剥皮し、上記と同じ方法で菌数を測定した。

## 実験結果

### 1. 製剤の保存性

本製剤を35~43°Cで保存した結果を図2-1および図2-2に示した。当初 $10^8$  個/cm<sup>3</sup>以上であった生菌数は経時的に減少し、その減少は温度が高い程、顕著であった。キボシカミキリに対する殺虫率は35°Cの場合は42日目、37~39°Cでは21日目、また、41°Cでも10日目まで80%以上保持され、その時の生菌数はいずれも $10^7$  個/cm<sup>3</sup>以上であった。その生菌数と感染死虫率との関係を図2-3に示した。本製剤の殺虫力は、生菌数 $10^7$  個/cm<sup>3</sup>を境にして急激に低下することが明らかとなった。

一方、本製剤を5~20°Cで420日間保存した場合の生菌数の変化を図2-4に示し、保存420日目におけるキボシカミキリに対する生物検定の結果を表2-1に示した。5°Cの場合、400日以後でも $10^8$  個/cm<sup>3</sup>以上の生菌数が保持された。10°Cおよび15°Cの場合、生菌数の経時的な減少傾向は示されたが、400

表 2 - 1 製剤の保存温度・包装形態が生菌数およびキボシカミキリの殺虫力に及ぼす影響（保存日数 420日）

保存温度	包装形態	生菌数 (個/cm <sup>2</sup> )	キボシカミキリ各2頭の致死日数 (d)
5℃	SS-滅菌バッグ	2.1 × 10 <sup>8</sup>	7 , 8
	ポリエチレン袋	1.5 × 10 <sup>8</sup>	7 , 7
10℃	SS-滅菌バッグ	1.4 × 10 <sup>8</sup>	9 , 12
	ポリエチレン袋	0.34 × 10 <sup>8</sup>	10 , 12
15℃	SS-滅菌バッグ	0.48 × 10 <sup>8</sup>	9 , 10
	ポリエチレン袋	0.76 × 10 <sup>8</sup>	9 , 10

日後でも10<sup>7</sup> 個/cm<sup>2</sup>以上の生菌数が保持された。そして、いずれもキボシカミキリに対する殺虫力が持続された。しかし、20℃では116日後の生菌数は4.1 × 10<sup>7</sup> 個/cm<sup>2</sup>、133日後には10<sup>7</sup> 個/cm<sup>2</sup>未満に減少した。なお、包装形態により、製剤の生菌数およびキボシカミキリに対する殺虫力には顕著な差は認められなかった。

また、本製剤を25℃と30℃で保存した結果を図 2 - 5 に示した。25℃で保存した場合は60日、30℃の場合もほぼ30日後でも生菌数が10<sup>8</sup> 個/cm<sup>2</sup>以上を維持した。-35℃で保存した試験では、688日後も1.1 × 10<sup>8</sup> 個/cm<sup>2</sup>の生菌数が維持された。

## 2. 給水による製剤の生菌数の変化

生菌数10<sup>8</sup> 個/cm<sup>2</sup>以上存在する本製剤を、25 ± 3℃で40日間保存したところ、生菌数は2.0 × 10<sup>7</sup> 個/cm<sup>2</sup>まで減少した。このサンプルに培地または水道水を加えて生菌数の変化を調べた。結果を図 2 - 6 に示した。2.0 × 10<sup>7</sup> 個/cm<sup>2</sup>まで減少した生菌数は3日後には、培地の場合10<sup>8</sup> 個/cm<sup>2</sup>以上に、水道水でも3倍以上に増加することが確認された。

一方、温度を周期的に変化させた人工気象器内での給水試験での生菌数の変化を図 2-7 に示した。含水した製剤を容器に入れて密閉した場合、製剤は雑菌に汚染され、3 日後には *B. brongniartii* の生菌が認められなくなった。これに対して含水した製剤を容器に入れ開放状態にした場合、製剤は数日で乾燥し、雑菌汚染は認められなかった。そのまま乾燥状態が続くと生菌数は対数的に減少したが、3、14、21 および 30 日後に給水した製剤は、その数日後生菌数が増え、40 日後も  $10^7$  個/cm<sup>2</sup> 以上の生菌数が維持された。

### 3. 土壌への本菌の接種と菌数の変化

100g の土壌に接種した *B. brongniartii* の生菌数は  $4 \times 10^7$  個であった。その土中における本菌および混在する他の菌の数を接種直後および 8 日後に測定し、その結果を表 2-2 に示した。本菌接種土壌では、混在する他のカビや細菌数にほとんど変化がなかったが、*B. brongniartii* の菌数は接種当日に比べて明らかに減少した。

表 2-2 *B. brongniartii* の土壌残留試験試験

菌接種	検知した菌	菌接種後、土壌 100 g 中に含まれる生菌数 (個)	
		接種後 0 日目	8 日目
<i>B. brongniartii</i>	<i>B. brongniartii</i>	$4 \times 10^5$	N. D.
	その他カビ	$3 \times 10^5$	$3 \times 10^5$
	全細菌	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
なし	<i>B. brongniartii</i>	N. D.	N. D.
	その他カビ	$2 \times 10^5$	$3 \times 10^5$
	全細菌	$1 \times 10^7$	$2 \times 10^7$

N. D. ; 検出されず ( $1 \times 10^3$  個以下/100 g の土壌)

表 2 - 3 ミカン表皮への *B.brongniartii* 接種試験

ミカン 部 位	検知した菌	菌接種後、ミカン 1 個当りに含まれる 生菌数 (個)		
		接種後	8 日目	
			0 日目	乾燥状態
表 皮	<i>B. brongniartii</i>	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	$5 \times 10^5$
	その他カビ	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$2 \times 10^5$
	全細菌	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$8 \times 10^4$
果 肉	<i>B. brongniartii</i>	N. D.	N. D.	N. D.
	その他カビ	N. D.	N. D.	$7 \times 10^3$
	全細菌	N. D.	N. D.	$2 \times 10^4$

N. D. ; 検出されず ( $1 \times 10^3$  個以下/ミカン 1 個当り)

#### 4. ミカンへの本菌の接種と表皮および果肉における菌数の変化

ミカンの果頂部に接種した *B.brongniartii* の生菌数は  $2 \times 10^6$  個であった。それらのミカン 10 個は接種 8 日目の時点で (その後 20 日目においても)、保湿処理の有無にかかわらず、外見上 *B.brongniartii* の生育は全く見られなかった。保湿条件においた 1 個は果頂部を含め、1 個は果頂部を除く一部が青カビによって汚染された。接種 8 日目に外見上青カビに汚染されていないミカンについて菌数を測定した。その結果を表 2 - 3 に示した。保湿条件では他のカビや細菌は、表皮だけでなく果肉でも増殖しているのが認められたが、これに対して *B.brongniartii* は表皮での菌数が接種当日に比べて減少し、果肉では全く検出されなかった。一方、室内に保存したミカンでは、表皮における菌数の変化はなかったが、保湿条件の場合と同様、果肉では菌が検出されなかった。

## 考 察

*B. brongniartii* 培養製剤『バイオリサ・カミキリ』の供給体制を考える上で、貯蔵性、すなわち保存性も大きな課題である。本製剤は、35℃では42日目まで、37～39℃でも21日目まで80%以上の殺虫力が保持された（図2-1）。更に、5℃では400日以上にわたって $10^8$  個/cm<sup>3</sup>以上の生菌数が保持され（図2-4）、殺虫力も十分であったことから（表2-1）、1年程度の保存は可能であると確認された。すなわち、温度条件、期間制限はあるものの、生物農薬として保存性に優れた製剤であると考えられる。本製剤は培養後乾燥され、一般に微生物は乾燥によって保存性が増すので、その乾燥が保存性に大きく影響したと考えられる。それに加え、乾燥によって製剤が軽量化され、かつ重ね合わせも可能であることから、輸送の点からも供給体制において好ましいと考えられた。

さらには、供給体制の中で、正確かつ迅速な製剤の評価が求められる。製剤の評価としては対象とするカミキリムシに対する殺虫力を調べるのが基本であるが、製剤の35℃～43℃の保存試験の結果から、生菌数 $10^7$  個/cm<sup>3</sup>を境に殺虫力に明らかな差のあることが判明し（図2-3）、生菌数によって製剤を評価することも十分可能と考えられた。

生物農薬として最も重要であるのが病原性と効果の残効性、すなわち、製剤施用時の殺虫力とその持続性が最も重要な課題である。本製剤は、一旦生菌数が減少しても給水によって生菌が再生されることが明らかとなり（図2-6）、鹿児島県における7月上旬の気温を指標にして温度設定した人工気象器内での実験でも、適度な給水によって製剤の生菌数が40日後も $10^7$  個/cm<sup>3</sup>以上を示したことから（図2-7）、圃場では降雨や蒸散により適度な水分が補給され、40日程度はカミキリムシに対する殺虫力が期待できることが示された。本製剤の実用試験については第4章で詳述するが、1989年以後日本植物協会委託試験を始め、多くの国公立試験機関による圃場試験等が実施され、野外における製剤の殺虫力とその持続性について高い評価を得、1995年に農薬登録することができた。

本製剤の農薬登録に当っては、効果とは別に安全性データが要求された。登録手続きを進める過程で、生菌である本製剤の環境や収獲物に対する安全性の基礎データが必要であった。*B. brongniartii* は天敵糸状菌の中でも寄主選

択性が強く、特定のカミキリムシ類にのみ感染する昆虫寄生菌であり（河上，1978、滝口，1981）、土壌での増殖や植物寄生菌または動物・ヒトの寄生菌として分離されたという報告は見当たらない。本製剤においても動物や魚介類に対する急性毒性試験による安全性はもとより、今回行った土壌残留試験やミカンへの接種試験でも、*B.brongniartii* の生育は全く認められず、むしろ、他のカビや細菌が混在する環境下ではこれが減少する現象が確認された。

以上、*B.brongniartii* 培養製剤『バイオリサ・カミキリ』の開発経緯および特性について述べてきた。本製剤は、商品化により、クワ・カンキツおよび関連農作物における難防除害虫であるカミキリムシ類の防除、ひいてはこれらによる被害の軽減に大いに寄与できるものと考えられる。

### 第3章 培養製剤の量産試作

微生物農薬の製剤化は、化学殺虫剤と同じく粉剤や散布剤にしたものがほとんどであり、細菌や糸状菌の場合、その量産は、人工の液体培地で大量培養を行い、遠心分離と洗浄濾過を繰り返して菌体や殺虫成分が分離され、界面活性剤や増量剤、展着剤が加えられる。イギリスではアブラムシを駆除するための糸状菌 *V.lecanii* 製剤は、タンク培養した菌体に増量剤と展着剤が加えられ、噴霧して使用されている。また、糸状菌の場合、その分生子が有効成分である場合には、固形培地で大量培養が行われ、分生子をペースト状にして乾燥した後、増量剤のシリカ粉末に混合される（渡辺, 1989、Hall, 1981）。保存安定性を増すために、アルギン酸ソーダやコーンスターチ、油剤添加による製剤化の検討も行われている（Pereira・Roberts, 1991）。一方、カビ類の固体培養については、小麦フスマや砂糖大根を培地とする棚段式のパイロットプラントが検討され（Rajagopalan・Modak, 1994、Xue・Liu・Zhang・Qi and Lei, 1992）、病原糸状菌 *B.bassiana* についても 1600Lの培養装置による生産方法が検討されている（Durand・Renaud・Almanza・Maratray・Diez・Desgranges, 1993）。また、不織布を担体とした気相生育法による菌体外酵素の固定化が行われている（徳田・佐藤・向高・高橋, 1991）。

製剤『バイオリサ・カミキリ』は、不織布を担体として固体培養したシート剤として開発したが、初期段階ではプラスチックトレイ上に滅菌不織布を乗せ、培養液を柄杓でかけて含浸させ培養後、それを乾燥棚に移して乾燥を行った。量産化に当たっては、これをできる限り省力化かつ汚染を少なくする必要があるため、不織布を多段に並べる多段式培養方法および装置を考案した（井上・樋口他, 1993）。すなわち、CSL培地 [グルコース20g/l、コーンステープリカー40g/l] で *B.brongniartii* をタンク培養し、この培養液と4倍量のCSL培地 [グルコース60g/l、コーンステープリカー40g/l] の混合液を、滅菌した不織布（坪量306g/m<sup>2</sup>、厚さ4mm）に含浸させて固体培養する際、その不織布の滅菌、植菌、培養を、60段の棚段に並べた鉄製角槽（図3-1）内で行なう方法であり、本方法を用いて量産化の検討を行った。本章では、その方法と装置による培養について詳述する。

## 材料および方法

### 1. *B.brongniartii* のタンク培養

培地は、CSL培地（グルコース 20g/ℓ、コーンステープリカー40g/ℓ）を使用し、消泡剤としてシリコンオイル3g/ℓを加えた。*B.brongniartii* は、培地 400mlを入れたひだ付 1 L容フラスコで継代培養を繰り返し、前々培養菌体とした。その培養液 1 mlを接種し、25℃の条件で、7日間攪拌培養(100rpm)した。前々培養と同じ条件で3日間培養した培養液 400mlを前培養液とし、培地 90Lを入れた 100Lタンクに植菌し、2～3日間タンク培養した（25℃、通気量 1 / 2 vvm、攪拌数180rpm；図 3 - 2）。

### 2. 不織布の滅菌と本菌の植菌

厚さ 4mmのパルプ不織布（坪量 306g/㎡、62cm×50cm；これを、製剤としては 5 cm×50cmのテープ状で使用するため、写真 2 - 1 のように 9本約 1 cm幅の打ち抜きを施したものを）、角槽培養タンク（図 3 - 1）の棚段に並べ、角槽内に設置して、全体をオートクレーブ滅菌した（図 3 - 2）。滅菌時間は60分間に設定し、角槽の底に水 1 Lを入れ、角槽内と外部が通気できるようバルブは開放にして、雑菌汚染の防止のため綿栓をする等の注意を要した。

滅菌後、上記の培養菌体を、あらかじめ 500 Lタンクで滅菌しておいた 4 倍量のグルコース濃度60g/ℓ のCSL培地に混合し、その混合液を、滅菌したシリコンホースを使って無菌的に角槽の下方バルブから送入し、最上段まで液を溜めた後、数分間後にドレーンバルブからポンプを使って過剰の培地混合液を抽出することで、不織布への植菌（含浸）を行った（図 3 - 2）。角槽を 2 機以上同時に培養する際は、あらかじめポンプラインを滅菌しておき、無菌的に、含浸液を次の角槽に送入する方法で植菌を行った。

植菌後、過剰の培地混合液のうち100 Lは、タンク培養用培地として100 Lタンクに戻し、消泡剤を加えて滅菌し、次のタンク培養に再利用した。さらに残りの培地混合液は、滅菌後、苛性ソーダーでpH調整をして廃水とした。角槽を 5 機以上同時に培養する場合には廃液を出さない設計となり、本考案は、実質的に無廃液の生産プロセスとなる。

### 3. 角槽による培養方法

角槽による培養は、当初、棚段に不織布を並べて植菌が済んだ角槽内にエアークリーナー（アドバンテック東洋㈱カートリッジフィルターTCF-020 S1FE）で無菌化した一定温度のエアークリーナーを角槽の下方バルブ2か所から送風し、上方バルブ2か所から排気する設計で行った（図3-1）。その後、加湿した無菌エアークリーナーを送入できるように、約80Lの水を入れてオートクレーブ滅菌した100L容ステンレスタンクを設け、そのドレーンにエアークリーナー送入口を、蓋にエアークリーナー出口を設けて角槽の入口バルブ2か所と連結できるようにした（図3-3）。そのタンク内の水にエアークリーナーを通す際、エアークリーナーは水中で細泡化するようにし、また、水の気化熱による温度低下を防ぐために、タンク内の水の温度調節機能を取り付けた。気化熱により減少する水量については、無菌フィルターを通して約10L/日の蒸留水を添加した（図3-3）。

恒温室内で、棚間隔18mmで60段全段不織布を並べた棚段設置の角槽を用い、その角槽内に棚段の枠外にはエアークリーナーが流れないように21~23℃の間の一定温度の無菌エアークリーナーを送風して、多段式の静置（固体）培養を行なった。その際、不織布の一定箇所に熱電対温度センサーを設置して、角槽内の温度測定を行った。培養は5日間（一部6日間）とし、培養後の生育状態を、任意の部分（図3-3）の検鏡数を測定することにより比較した。培養検討は6回行い、任意の部分の温度と生育の関係を調べた。

さらに、後半の検討では、角槽内部の放熱を促進させるため、角槽についているバルブを開放し、天井部を半密閉（蓋の片側を浮かせ10-20mm傾斜させる）にした培養、および、角槽に蓋をしないで開放し、温度設定25℃の恒温室内に置き、エアークリーナー送入は停止した。恒温室はオゾン殺菌灯設置と定期的なアルコール等の消毒で無菌化した。

### 4. サンプルの評価方法

サンプルの評価は、目視と単位面積当りの検鏡数、および、第2章で示した生菌数の測定と生物検定によって行った。

検鏡数の測定は、生菌数の測定同様、サンプルの一片（5×5cm）を切りとり、Tween 40の0.02%水溶液（400ml）中でミキサーにより2分間粉碎し、それ

を濾過、希釈した液の分生子および短菌糸の数をトーマの血球計算盤によって測定し、サンプルの単位面積当りの検鏡数に換算した。

## 実験結果

### 1. 角槽内の温度分布と生育分布の検討

角槽導入時の培養検討において、エア－供給量 2～700l/minの幅で検討した結果、200l/min以上の供給が必要であった。第1章に述べたように、培養温度は25℃が最適であるが、角槽内に入ったエア－温度は、培養初期には下がることが確認された（28℃送入→出口22℃）。その後、培養時間の経過とともに、菌の生育に伴う発熱により内部温度は上昇することも確認された（角槽壁面温度、入口22℃→出口26℃）。さらに、角槽下部のエア－送入側の不織布が早い時期に乾燥してしまい、菌の生育は抑制されることが観察された。

そこで、図3-3のように加湿装置を備え、送入エア－を乾燥エア－から水蒸気を含んだエア－に変えることで、培養物の乾燥と、不織布に含む水の気化熱による温度低下を抑制した培養検討を行った。角槽培養における培養中の温度分布と培養後の菌の生育分布の関係を調べ、角槽培養条件の最適化を図るため、24℃の恒温室内で、送入エア－の温度（滅菌水温度）を変化させて培養を検討した（表3-1）。

表3-1 多段式培養における培養条件

検討 No.	培養室 設定℃	エア－流量 l/min	滅菌水 °C	変更ポイント
1	24	450	21	滅菌水タンクにドライエア－流す
2	24	450	21	
3	24	450	22	
4	24	450	23	
5	24	450	23	エア－送入を上、出口を下方へ変更
6	24	450	23	パンチングパネル穴数変更*

\*エア－送入側のパンチングパネルの穴の数を減少

上 1段～20段目、50段目～60段までを 3/86に

(20段目～50段目は、そのまま全開86/86)

表 3 - 2 多段式培養における生育と温度分布の培養

検討 No.	滅菌水 設定℃	棚 段数	生育分布の結果			培養中の温度分布		
			b	e	h	b	e	h
1	21	1	1.4	0.4	0.6			
		15	0.8	0.8	1.0			(25-27)
		30		0.5				
		45		0.6				
		60		0.8				
2	21	1	0.6	1.5	1.6			
		15	0.6	1.8	1.8	(21-22)	(24-27)	(26-29)
		30	0.7	1.1	0.9			
		45	0.6	1.4	0.8			
		60	0.7	0.8	0.6			
3	22	1	1.1	1.2	1.2			
		15	0.9	1.0	1.4	(22)		(26-27)
		30	1.1	1.0	1.4			
		45	1.0	0.9	0.9	(23-26)		
		60	1.0	1.2	0.7			
4	23	1	1.5	1.8	1.4			
		15	1.6	1.4	×0.8	(23-24)		(28-30)
		30	0.9	1.1	1.3			
		45	1.0	1.2	1.4			
		60	1.3	0.6	0.7			
5	23	1	1.1	1.5	1.4			
		15	1.5	1.5	1.6	(23-25)		(26-27)
		30	1.7	×0.7	×1.2			
		45	1.8	1.8	×0.5		(25-29)	
		60	1.4	1.1	1.6			
6	23	1	×0.7	×1.0	×0.7			
		15	1.5	2.1	×1.7			(28-30)
		30	1.5	×0.7	×0.6			(27-30)
		45	1.5	2.2	1.4			
		60	1.4	0.8	0.8			(26-27)

b、e、h；棚の位置（図3-3）

条件： 培養室設定温度；24℃

エア-流量；450l/min

エア-を滅菌水タンクに通し、加湿して培養槽に流した

検討No. 5, 6；エア-送人を上方から、出口を下方へ変更

検討No. 6；エア-送入側のパンチングパネルの穴を減少

結果（生育）：菌数；検鏡数/×10<sup>8</sup> 個/cm<sup>2</sup>、×；培養物変色（茶褐色）

その結果を、表 3-2 に示す。送入エア-の温度（滅菌水温度）が 22℃ 以下の時（検討 1,2,3）、エア-送入側と角槽下部の菌の生育は、検鏡数が  $10^8$  個 /  $\text{cm}^3$  以下と低かった。その際、生育不良の部分の温度分布は 22℃ 前後であった。そこで、送入エア-の温度（滅菌水温度）を 23℃ にして培養したところ（検討 4）、エア-送入側の菌の生育状態は改良されたが、角槽 10~20 段目の出口側（g, h, i）の菌の生育は茶褐色をおび、検鏡数も  $10^8$  個 /  $\text{cm}^3$  以下であった。その際、生育不良部分の培養温度は 28~30℃ と高かった。また、角槽下部（60 段目）の菌の生育も、検鏡数が  $10^8$  個 /  $\text{cm}^3$  以下と依然悪かった。

さらに、エア-の送入口を上部に変更したところ（検討 5）、角槽下部の生育は改善されたが、出口側（g, h, i、ひどい段は d, e, f も）で茶褐色をおびた生育の悪い部分が存在した（20~50 段目）。

出口側の生育不良は、エア-流れの滞留による蓄熱が原因と考えられ、検討 5 で生育の悪かった 20~50 段目にエア-が流れやすいように、その他の段の部分のパンチングパネルの数を 3/86 に減少させて培養した（検討 6）。その結果、39 段目から下部の生育は改善されたが、予想に反し、38 段目より上部の出口側の菌の生育状態は、すべて茶褐色で、培養温度は、27~30℃ と高かった。

## 2. 天井部を半密閉にした角槽内の生育分布の検討

さらに、角槽内部の熱を放熱させる方法として、角槽についているバルブを開放し蓋を逆さに傾斜させ浮かせることにより、内部エア-を外気と入れ替えるようにし、培養を検討した。

その結果、依然、角槽内部の温度は高く（図 3-4）、棚上段から 45 段目までは表面が茶褐色を呈し、乾燥後、一部の菌数は  $10^8$  個 /  $\text{cm}^3$  以下であった。また、本方法では内部エア-を外気と入れ替える方法をとったが、 $10^6$  個 /  $\text{cm}^3$  程度の細菌による汚染はあるものの、カビによる汚染はなく、問題となる雑菌汚染はなかった（表 3-3）。

## 3. 蓋開放による角槽内の生育分布の検討

上記により、内部エア-を外気と入れ替えても問題になるほどの雑菌汚染はなかったので、角槽内部の熱を放熱させるために、角槽を開放して培養した。

表 3 - 3 半密閉型多段式培養による培養結果

棚位置 No. <sup>a)</sup>	培養6 日後		乾燥2 日後		培養物変色 (培養後)
	検鏡数 <sup>b)</sup>	生菌数 <sup>b)</sup>	検鏡数 <sup>b)</sup>	生菌数 <sup>b)</sup>	
1					
2	1.4	1.6	1.4	1.0	茶褐色
11	1.3		0.78		茶褐色
35	1.2		1.4	1.0	茶褐色
45	2.4		1.3		茶褐色
50	2.5	2.5	1.5	2.5	なし
60					

a) ; No. は、上から数えた棚段の位置 (全段60段)

b) ; 検鏡数、生菌数いずれも  $\times 10^8$  個/cm<sup>2</sup>

その結果、上2段は乾燥して生育が停止したが、3段目は培養5日目で、わずかに水分を含み、それ以下(下段)の生育は良好であった(表3-4)。培養時の角槽内部の温度変化は、室温が25℃で推移するのに対し、角槽内部の壁面も25℃と、全く蓄熱の様子は見られなかった(図3-5)。

### 考 察

角槽による培養を考案した時点では、一定温度(25℃)のエア-を少量流すだけで、培養は可能と考えた。さらに、400 l/min以上の乾燥エア-の供給により、角槽内で乾燥まででき、植菌から乾燥まで無菌的なクロ-ズドシステムで行えると考えた。

その考えのもと、角槽による培養条件を検討した結果、エア-送入付近の乾燥だけでなく、乾燥のため起こる気化熱による温度低下、逆に、培養が進むと菌の生育で発せられる熱による温度上昇のために角槽内に温度分布の差が生じ、それに応じて角槽内の位置により生育に差がでることが確認された。当初、培養・乾燥後に切断していた不織布を培養前に打ち抜いてスリットをあけ、培養時の通気の流れを良くすることによって若干の改善は得られたが、根本的な解決には至らなかった。

表 3 - 4 多段式培養による培養結果

棚 段数	培養(6d)後		乾燥(4d)後		培養物変色 (茶褐色)
	検鏡数	生菌数	検鏡数	生菌数 (個/cm <sup>2</sup> )	
1	1.7 × 10 <sup>9</sup>				なし
2	1.6		1.8 × 10 <sup>9</sup>	1.9 × 10 <sup>9</sup>	なし
3	1.8				なし
4	2.2				なし
5	2.3	3.4 × 10 <sup>9</sup>	2.2	2.3	なし
6	2.4				なし
7	2.2				なし
8	2.3				なし
9	2.8				なし
10	1.7				なし
12	2.3				なし
14	1.9				なし
16	2.0				なし
18	2.3				なし
20	2.5				なし
22	2.0				なし
24	2.2				なし
26	2.3				なし
28	2.3				なし
30	1.7	2.7	2.5	2.0	なし
35	1.8				なし
40	1.9		2.6		なし
45	2.2				なし
50	1.7		2.8	3.4	なし
55	1.8				なし
59	2.1		2.9		なし
60					

そこで、エア-送入付近の乾燥や気化熱による温度低下の問題については、滅菌水タンクを用いた加湿エア-の供給ができる培養システムにより、角槽内に一定温度の加湿されたエア-を送入した。その結果、生育は良くなったが、まだ均一な生育状態には至らなかった。角槽内に生じる菌生育による発熱のための温度分布の差は5℃であった(表3-2)。密閉された角槽内で、一定温度範囲(23~28℃)に維持して培養するためにはエア-の均一な流れ、温度上昇(生育に伴う発熱によるもの)の抑制、エア-送入付近の乾燥や気化熱による温度低下の防止といった化学工学的設計が必要であり、単純な設計では対処できないことが判明した。

植菌から乾燥まで無菌的に密閉系で行なうことに関しては、当初、①培養する不織布自身の雑菌汚染の防止、②作業する側の安全性という2つの目的があった。しかし、清酒工場の製麹工程では、原料の蒸米の滅菌は充分に行なわれるが、その後の工程は、雑菌汚染の対策として結露防止については注意するものの、比較的オープンな状態で培養が行われており、その後の本菌培養の検討でも、角槽と不織布の滅菌、植菌の無菌化が完全であれば、雑菌汚染の心配は少ないと考えられた。また、作業者に対しては、本菌の安全性が確認された(農薬検査所)現在において、必要最小限の安全対策(マスク、手袋等)をとれば、こだわる必要はないと考える。

そこで、培養における角槽内部の蓄熱は棚の上部で確認されていることから、その天井部(蓋)を開放して培養することを検討した。蓋を10-20mm浮かせる半密閉型培養方法では、なお蓄熱による内部温度上昇のために一部生育不良が認められた。本検討では、最終的には角槽を恒温室内に置き、強制的に送入していた無菌エア-は、バルブや蓋を開放することにより自然対流で外部からの空気を取り込んで、容積当りの培養物の負荷(水分)が高いので、内部湿度も100%に保てると仮定して停止させた。仮定通り、無菌エア-停止による培養への大きな影響はなかったものと考えられる。

そして、天井部(蓋)の開放により、蓄熱による内部温度上昇はなくなり、棚上段の一部乾燥による生育停止を除いて、ほぼ生育は良好となった。すなわち、菌の生育で発せられる熱は、角槽内の空気の自然対流で、開放された天井部から十分放熱されるものと考えられる。

さらに、生産性を追及し量産化のための製造装置としては、角槽中の棚のピッチを狭め、段数を多くすること（培養物高負荷条件）がポイントであり、今回、18mmピッチ60段の棚で培養が可能であることが確認できた。しかし、天井部（蓋）の開放で、上段の培養物が乾燥するために生育が停止し、その不良が3.3%（2/60）生じるのは量産方法としては改良の余地があった。そこで、最終的な製造装置は、培養物の高負荷条件を確保するために棚のピッチを狭め段数をより多くし、角槽部は培養室として1室にし、天井部を広げて温度・湿度調整が行えるようにした。それにより、本製剤の量産が可能となった。

## 第4章 防 除

### 第1節 柑橘園でのゴマダラカミキリ防除

ゴマダラカミキリ (*Anoplophara malasiaca* Thomson) は、カミキリムシ科 (Cerambycidae)、フトカミキリ亜科 (Laminae) に属する。小島・中村(1986)は、今まで記載された本種のすべての食樹についてまとめたが、それによれば本種は、フトカミキリ亜科のうちでも特異なほど広食性を示し、表4-1にみられるように、スギやモクマオウのような裸子植物からバラ科のような被子食物、イタドリのような草本に至るまで50種以上の植物に対して報告例がみられ、その中でも柑橘類への被害例数が最も多い。

ゴマダラカミキリは幼虫が地際部の樹幹内を食害する穿孔性害虫であり、時には樹を枯死させるため、柑橘園ではミカンハダニに次ぐ重要病害虫に挙げられている。本虫は、近年、放任園の増加や的確な防除法がないことが相まって、発生が増加傾向にある。次の世代の被害を抑制するために成虫防除をしているのが現状であるが、既存の有機リン剤や合成ピレスロイド剤は残効が2~3日と短く、天敵昆虫への影響が懸念される。柑橘園ではやはり重要害虫であるカイガラムシに対する寄生蜂(ヤノネツヤコバチ等)が導入され定着されつつあり、また、ミカンハダニに対してはハダニアザミウマ、カブリダニやハネカクシ類といった天敵昆虫がその防除に大きな役割を果たしており、ミカンハダニに対して化学農薬を多用するとリサージェンス(天敵昆虫が減ってしまっ、害虫が増え出す現象)を起こすといった問題もある。したがって、ゴマダラカミキリは捕獲によるところの防除が現状であり、地域によっては自治体が、1頭数十円で買い取っているところもある。加えて、消費者の果実に対する高級化、差別化指向が高まり、さらに、オレンジの輸入自由化にともなって、古くから生物的防除の取組みの進んでいるカリフォルニアや南米産の輸入オレンジに対抗するためにも、日本産カンキツ類の安全性をアピールできる防除体系を構築する必要があり、ゴマダラカミキリに対しても生物的防除の確立が急務とされている。

表4-1 ゴマダラカミキリの加害植物

種名	科名	記録例数
ミカン類	ミカン科	99
ヤナギ類	ヤナギ科	88
クワ	クワ科	79
センダン	センダン科	33
イチジク	クワ科	32
セイヨウリンゴ	バラ科	25
モミジバスズカケノキ	スズカケノキ科	25
キマメ	マメ科	17
ナシ	バラ科	12
バラ類	"	11
モクマオウ	マツ科	11
アカメガシワ	トウダイグサ科	8
カラタチ	ミカン科	7
スギ	スギ科	5
ポプラ類	ヤナギ科	5
シラカンバ	カバノキ科	5
クスギ	ブナ科	5
ヤシャブシ	カバノキ科	4
ニレ	ニレ科	4
イロハカエデ	カエデ科	4
ウラジロハコヤナギ	ヤナギ科	3
クリ	ブナ科	3
シイ類	"	3
タチバナモドキ	バラ科	3
オリーブ	モクセイ科	3
セイヨウハコヤナギ	ヤナギ科	2
シダレヤナギ	"	2
オノエヤナギ	"	2
イヌコリヤナギ	"	2
コリヤナギ	"	2
ネコヤナギ	"	2
クルミ類	クルミ科	2
ベカン	"	2
ヒメヤシャブシ	カバノキ科	2
ミヤマハンノキ	"	1
コバノヤマハンノキ	"	1
トキワギョリュウ	スギ科	1
アメリカヤマナラシ	ヤナギ科	1
ドロヤナギ	"	1
241号ポプラ	"	1
釜淵ポプラ	"	1
コゴメヤナギ	"	1
シロヤナギ	"	1
ミヤマハンノキ	カバノキ科	1
ハンノキの一種	"	1
ハンノキ類	"	1
ナラ類	ブナ科	1
クワ類	クワ科	1
モリシマアカシア	マメ科	1
イタドリ	タデ科	1
ウンシュウミカン	ミカン科	1
ハッサク	"	1
トネリコバノカエデ	カエデ科	1
キズタ	ウコギ科	1

小島・中村(1986)日本産カミキリムシ食樹総覧より作成.

柑橘園での『バイオリサ・カミキリ』によるゴマダラカミキリ防除は、国や各県の多くの試験場で検討されている。九州地区では1991～1993年に、九州地域重要新技術研究（1994）として重点研究が行われた。そして、1995年に農薬登録の認可を得てからは、各県の普及センターや農協が、普及のための試験を行っている。それらの中から代表例を紹介する。

### 材料と方法

本製剤の防除方法は、地際の主枝の分岐部に製剤を掛ける「枝かけ法」、あるいは、主枝および主幹部に製剤を巻き付けホッチキス止めする「バンド法」による処理が行われる（写真4-1）。その本数は、圃場内の全樹に製剤を1本ずつ施用する全量全樹処理、あるいは、半分に切断した製剤を全樹に施用する半量全樹処理、半分に切断した製剤を2樹に1本施用する半量半樹処理などが検討されている。

評価方法としては、製剤施用後数日置きに圃場からゴマダラカミキリ成虫を採集（捕獲）し、個体別飼育して感染死虫の割合（率）を調べた。

別の評価方法として、成虫が発生する前に調査する柑橘樹（約100本）を選び、6月に製剤を施用して、9月に、選んだ調査樹から前年の幼虫（被害）の数にあたる新しい成虫の脱出孔数と、新しく活動している幼虫の数（糞の跡）を測定し、その比（幼虫数／脱出孔数）を被害率として表した。

### 結果と考察

九州地区の試験では、施用圃場から採集したゴマダラカミキリ成虫の感染状況を表4-2（九州地域重要新技術研究，1994）に示した。全量全樹処理、半量全樹処理では、製剤を設置30日後までは、捕獲し個体飼育したゴマダラカミキリの感染率は56～100%と高かったが、40日後は減少した。半量半樹処理では、1例だけであるが、43～60%と低かった。

こうしたゴマダラカミキリ防除の防除効果は、ゴマダラカミキリ成虫が脱出した孔の数と、それら成虫によりその年に新しく産みつけられ成長している食入幼虫数との比で表すことができる。1頭のカミキリムシに対して幼虫数が1頭であれば防除効果が1であり、1より大きいとカミキリムシが増加し、小さ

表 4 - 2 菌製剤施用圃場から採集した成虫の感染状況

施用量	年次	場 所	処理月日	処理後 日 数	採集虫数	感 染 虫率(%)
	91	鹿 児 島 県 垂 水 市	5. 24	10	32	56. 3
				20	45	73. 3
				30	3	66. 7
				40	5	20. 0
全量全樹	92	熊 本 県 三 加 和 町	6. 6	10	13	69. 2
				20	15	80. 0
				40	10	60. 0
	93	熊 本 県 松 橋 町	6. 1	10	30	96. 7
				20	35	85. 7
				30	11	81. 8
				40	10	20. 0
半量全樹	92	福 岡 県 古 賀 町	6. 12	10	28	71. 4
				20	49	78. 0
				30	2	100. 0
				40	7	42. 9
半量半樹	92	福 岡 県 古 賀 町	6. 12	10	14	42. 9
				20	25	60. 0
				30	10	40. 0
				40	10	50. 0

いと減少すると考えられる。製剤施用による菌の感染率に対する防除効果をプロットした結果（図 4 - 1 ; 樋口・柏尾・橋元・堤・甲斐・行徳, 1990）、防除効果が 2 より大きいと被害が進み、0.5以下で防除効果が上がったとすると、感染率が60%を越えると薬剤散布などの慣行防除と比べても高い防除効果が示されたと考えられる。

さらに、施用面積を広げての試験が行われ、1994年に鹿児島県垂水市の試験では、3haの圃場に全量全樹処理し、中心部 2 か所と周辺部 3 か所について、200m離れた 1 か所と比較し、ゴマダラカミキリ成虫の採集区を設けて感染率を調べた結果は、施用後ほぼ 2 か月後の 7 月 26 日までを平均しても 66~89% の高い感染死虫率が得られた（表 4 - 3 ; 九州地域重要新技術研究, 1994）。施用圃場から 200m離れた比較区でも感染が確認された。これらは、施用圃場で感染した後比較区に侵入したか、あるいは、侵入した成虫に *B.brongnartii* を伝播された個体であり、従って、施用圃場だけでなく周辺の圃場に対しても本製剤の効果が波及していることが示唆された。

最近では、より低コストで使用するために、広い面積での半量全樹処理といった単位面積辺りの処理量を少なくする検討が行なわれている。

表4-3 鹿児島県菌製剤広域施用圃場(3ha)から採集した成虫の感染状況(1994)

調査圃場	採集日および病死虫数/採集虫数									病死虫率%
	6/2 7日目	6/7 12日目	6/14 16日目	6/21 23日目	6/28 30日目	7/5 37日目	7/12 44日目	7/19 51日目	7/26 58日目	
中央1	5/5	9/10	8/13	7/12	6/10	8/11	0/0	0/0	0/0	70.5(43/61)
中央2	0/0	0/0	20/26	10/12	13/13	0/0	0/0	1/1	0/0	84.6(44/52)
周辺1	0/0	0/0	6/20	3/4	7/9	6/6	8/8	3/3	2/3	66.0(35/53)
周辺2	0/0	1/1	5/7	1/1	7/8	2/2	7/7	1/1	0/0	88.9(24/27)
周辺3	0/0	0/0	14/19	6/10	5/6	4/4	1/1	0/1	0/0	73.2(30/41)
無施用	n. c.	n. c.	2/24	n. c.	11/21	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.	28.9(13/45)

n. c. ; 未調査

表4-4 和歌山県植物防疫技術確認圃試験(1996)

脱出孔調査

	調査樹数	脱出孔数	幼虫数	被害率 (幼虫数/脱出孔数)
処理区	100	90	5	0.06
無処理区	100	30	7	0.23

感染率調査

	処理後日数と捕獲数・感染虫数・感染率%								
	処理後11日目			24日目			31日目		
	捕獲数	感染虫数	感染率	捕獲数	感染虫数	感染率	捕獲数	感染虫数	感染率
無処理区	5	0	0	2	0	0	1	0	0
処理区	5	4	80	1	1	100	7	5	71
接触区	4	4	100	—	—	—	4	3	75

(和歌山県；平成8年度病害虫及び雑草防除技術確認圃調査成績書より)

1996年、和歌山県植物防疫協会に本製剤の技術確認圃試験を申し込み、和歌山地域普及センターの協力を得て、その地域の農家の圃場で試験を行った。

2 ha約1500本植えられた柑橘樹に半量（25mm幅）全樹処理して、その年の脱出孔数調査による被害を調べた結果、表4-4に示すように、無処理区においても、その年の被害は0.23と少なかったが、製剤処理区はさらに0.06と低く、本製剤による防除効果が示された。さらに、必要最小限の捕獲数（5頭程度）における感染率調査の結果でも、処理後31日目まで71%の感染率を示し、製剤に成虫を強制接触させて製剤の残効を調べる接触試験でも感染率75%と高かった。すなわち、経済性を考え、半量（25mm幅）全樹処理を行っても、約30日の残効があり、それが、実防除につながる実証された。各県・地域において、同様な実際の防除の検討がされている。

## 第2節 桑園でのキボシカミキリ防除

キボシカミキリ (*Psacotha hilaris* Pascoe) は、カミキリムシ科 (Cerambycidae)、フトカミキリ亜科 (Laminae) に属する昆虫で、現在約10亜種に区分されている。このうち、*Psacotha hilaris hilaris* が本州、隠岐、四国、九州、対馬など日本列島のほか台湾、朝鮮半島および中国など東アジア一帯に分布し、クワ、イチジク、アコウ、ビワなどの生木を寄主植物としている (伊庭, 1993)。しかし、桑園害虫発生状況調査成績 (農林省蚕糸園芸局, 1969) ならびに桑園害虫の発生予察に関する調査成績 (農林省農蚕園芸局, 1977) などから判断すると、かつては、クワカミキリ (*Apriona japonica*) およびトラフカミキリ (*Xylotrechus chinensis*) の両種が桑樹を加害する優先種であったが、1960年代後半からは、キボシカミキリが重要害虫とみなされるようになり、最近ではイチジク園などでも多発して、問題となっている (山下, 1980, 1981)。桑園においても化学殺虫剤の導入は、従事者の安全性はもとよりカイコに対する薬害が重視され、キボシカミキリの防除の場合にも、有効な耕種的、物理的手段の検索、成虫誘因 (横井・吉井, 1984, 1985)、および天敵利用による生物的防除手段を組み合わせた総合的防除体系の追究が行われてきた。その中で、糸状菌 *Beauveria tenella* (= *B. brongniartii*) を利用した防除法は、糸状菌発見以来、期待されてきた (河上, 1978、河上・島根, 1986)。

## 方法、結果と考察

桑園での『バイオリサ・カミキリ』によるキボシカミキリ防除も、国や各県の多くの試験場で検討されている（吉井, 1991、米山・渡辺, 1992）。

本製剤の桑園でのキボシカミキリに対する吉井（1991）の報告によると、約9 aの圃場で桑株の主幹上に2株に1枚の割合で本製剤を1/2（長さ25cm）に切断して処理し、その後採集されたキボシカミキリの感染状況については、処理後20日目まで67%以上の病死率が保持され、その後中間伐採により桑葉が刈られ直射日光の影響を受けやすくなった状況下でも、35日目まで40%前後の病死率を得た（表4-5）。25日以後の結果については採集0日目の死亡個体数を含めて換算すると、病死率は、30日目でも71%を示していると考えられる。

最近では、やはり、より低コストで使用するために、単位面積当りの処理量を少なくする検討が行なわれ、1/5以下に切断した製剤を用いた試験も行われている。

表4-5 クワ圃場における製剤によるキボシカミキリの感染状況（吉井(1991)による）

処理後 の日数	採集 虫数	死亡までの日数と死亡個体数											病死率 %		
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20		合計	
5	19			2	9	5	2							18	95
10	15		3	7		2								14	93
15	6		1		1	2								4	67
20	11		1	1		3	3							8	73
25	13	8				1	1	2				1		5	38
30	9	8	2	1			1							4	44
35	17	1	1	1			2	1	1			1		7	44
40	10													0	0
合計	100	17	8	12	10	13	9	5	1	0	2	0	60	60	

注) ・0日目の死虫は圃場内で病死していた個体。採集虫数には含まれない。

・20日と25日の間に晩晩秋蚕期の中間伐採が行われた。

### 第3節 スギカミキリ防除の試み

スギカミキリはスギやヒノキの生立木を加害する穿孔性害虫の中で、最も難防除で問題となる種類である (Kobayashi, 1985)。この害虫による被害は増加する傾向にあり、種々の防除法が提案されている (小林, 1986)。天敵糸状菌による本種の防除については、大長光 (1982) の *B.tenella* (= *B.brongniartii*) を使った実験があり、最近では上田ら (1993) が *B.bassiana* の丸太への散布による殺虫効果を調査している。

*B.brongniartii* は、キボシカミキリ、クワカミキリ、ゴマダラカミキリに対して有効であるが、シロスジカミキリの成虫に対しては病原性が認められないことが示されている (滝口, 1981)。そこで、本報では、*B.brongniartii* のスギカミキリ成虫に対する病原性を実験的に検討した。さらに、本種成虫が樹幹の暗いところに好んで潜むという習性を利用して開発されたバンド・トラップ法 (柴田, 1984) を応用して、スギ林内での製剤『バイオリサ・カミキリ』によるスギカミキリ防除を試みた。

#### 材料と方法

##### 1. *B.brongniartii* の病原性

奈良県室生村で採取したスギ被害木から、1987年4月4日に脱出した雄の成虫3頭と雌の成虫3頭、および4月7日に脱出した雄5頭と雌5頭の成虫を実験に供した。4月7日に直径12cm、高さ10cmのアイスクリームカップ内に、前記の *B.brongniartii* の製剤を5cmに切って入れた。そして、これらの成虫をそれぞれ1分間、このカップに入れて製剤と接触させた。その後、室温条件で同じ大きさのカップ内で個体別に飼育し、成虫の寿命と病死の有無を観察した。

##### 2. 交尾による感染

三重県、福井県および奈良県のスギ林で脱出した成虫を実験に供試し、交尾によって *B.brongniartii* が感染するかどうかを確かめた。まず4月7日に、雄10頭と雌10頭の成虫を上記と同様に製剤と接触させた。その後1週間個体飼育し、それまで飼育していたカップと異なるカップの中で、雌雄それぞれ製剤と

は接触させていない相手と約1時間交尾させた。同時に、製剤と接触させていない10対の雌雄も交尾させた。交尾後の成虫は、また別のカップ内で個別に飼育し、病死の有無を観察した。成虫の病死の有無は、死亡後の成虫を保湿して室温に保存し、糸状菌の叢生によって判定した。

### 3. 感染した成虫の産卵数

*B.brongniartii* に感染したスギカミキリ成虫の産卵数について調査した。1992年3月5日と6日に、奈良県吉野町でスギ被害木を割材し、雄20頭と雌20頭の越冬成虫を得た。成虫は実験に供するまで約5℃の冷蔵庫内に保存した。

3月31日に室温下で雌雄1対を1日間、直径9cm、高さ5cmのシャーレ内で交尾させた後、雌成虫を製剤と接触させた。その後、1頭ずつ飼育し、以後、死亡経過と産卵数を調査した。*B.brongniartii* に接触させない10頭の雌成虫も同じ方法で飼育した。

## 4. バンド・トラップ法の応用

### 4. 1. ケージ内試験

*B.brongniartii* 剤をスギ丸太に巻き付け、スギカミキリ成虫が樹幹上を歩いたり隙間へ潜り込んだりすることにより、成虫が本菌に感染するかどうかをケージ内試験で確かめた。1989年に三重県、福井県および奈良県のスギ林で脱出した成虫を実験に供試した。100cm×80cm×80cmのケージ内に、長さ50cm、直径約10cmの丸太を4本立てた。そのうちの2本の丸太の中央部に製剤を巻き付けた(図4-2)。他の2本には同じく中央部に幅5cmの遮光ネットを巻き付けた。4本の丸太とも巻き付け部分に隙間を作るために、細い木片を差し込んだ。

4月7日に各丸太の上部に雄2頭、雌2頭、計16頭の成虫を放した。24時間後に成虫を回収し、アイスクリームカップ内で個別に飼育して、病死の有無を観察した。4月8日から9日、9日から10日にかけても同じことを繰り返した。

### 4. 2. スギ林での適用

試験は1990年に奈良県明日香村にある隣接する二つのスギ林で行い、それぞれを処理区と無処理区にした。処理区のスギ林は面積490㎡、15年生で平均胸高直径は16.5cmであり、無処理区のスギ林は面積350㎡同じく15年生で平均胸高直

径は15.7cmであった。両スギ林は最も近いところで約8m離れていた。この両林は水田跡に成立しており、5,6年前にスギカミキリの被害が最も激しく、最近では成虫個体数も減少傾向にあった。

スギカミキリ成虫が脱出する前である1990年3月10日に試験を開始した。処理区のスギ林では、77本のスギの地際から1.3mの樹幹に *B.brongniartii* 製剤を巻き付けた。さらにそれより約15cm下の樹幹に遮光ネット（幅；約10cm、遮光率；70%）を巻き付けた（図4-3）。その後3月31日、4月10日、4月21日に両区の遮光ネット内や製剤に潜むスギカミキリ成虫を捕獲し、1頭ずつプラスチックケース（直径；3cm、高さ5cm）に収容し、奈良県林業試験場の飼育室に持ち帰った。捕獲の際に、無処理区の成虫に菌が人の手を介して感染しないように、必ず無処理区から行うように留意した。持ち帰った成虫は室温条件下で湿らせた濾紙を敷いたプラスチックケース（直径；10cm、高さ6cm）内で個体飼育し、毎日生死を確認した。

## 実験結果

### 1. *B.brongniartii* の病原性

本製剤と接触させたスギカミキリ成虫の寿命と病死の有無を観察した結果を表4-6に示す。接触処理した成虫は、すべて *B.brongniartii* に感染した。そして、寿命を雌雄別に比較すると、4月4日に脱出した成虫については、感染させた成虫の方が雄、雌ともに有意に寿命が短い傾向がみられた( $p < 0.05$ )。また7日に脱出した成虫についても、雄、雌ともに同様の傾向が見られた。このことから、キボシカミキリの病死体から分離した *B.brongniartii* は、スギカミキリ成虫に対しても病原性を持つことが明らかとなった。

### 2. 交尾による感染

*B.brongniartii* に接触させた成虫、および、それらと交尾させ直接菌と接触させていない成虫の病死の有無について、観察した結果を表4-7に示す。感染させた雄10頭と雌10頭の成虫は、雌の1頭を除き病死した。このような成虫に、菌と接触させていない雌雄成虫をそれぞれ交尾させたところ、相手となった成虫もすべて病死した。すなわち、*B.brongniartii* に感染した成虫は、交尾によって相手に感染させることが明らかになった。

表4-6 *B. brongniartii* で感染処理したスギカミキリ成虫の  
寿命と病死率

羽化脱出日	処 理	供試成虫数	平均寿命 (日)	病死率 <sup>1)</sup> (%)
4月 4日	処 理	♂ 3	21.3 <sup>a</sup> (19-23) <sup>2)</sup>	100
		♀ 3	24.3 <sup>b</sup> (22-26)	100
	無処理	♂ 3	32.7 <sup>a</sup> (32-36)	0
		♀ 3	34.7 <sup>b</sup> (30-40)	0
4月 7日	処 理	♂ 5	17.2 <sup>c</sup> (15-20)	100
		♀ 5	16.0 <sup>d</sup> (15-17)	100
	無処理	♂ 5	29.2 <sup>c</sup> (24-33)	0
		♀ 5	35.4 <sup>d</sup> (34-37)	0

注) <sup>1)</sup> : 死後菌叢生を確認した病死個体の割合

<sup>2)</sup> : (最小-最大)

<sup>a-d</sup> : 同一添字同士で有意差あり (t-検定、 $p < 0.05$ )

表4-7 製剤に感染させたスギカミキリ成虫との交尾による  
成虫の感染率

試験 番号	成虫の 組合せ	供試成虫数 (頭)	感染率 <sup>1)</sup> (%)
1	感染させた♀	10	90
	感染させない♂	10	100
2	感染させた♂	10	100
	感染させない♀	10	100
3	感染させない♀	10	0
	感染させない♂	10	0

注) <sup>1)</sup> : 死後菌叢生を確認した病死個体の割合

表4-8 *B.brongniartii* に感染させたスギカミキリ雌成虫の  
寿命と産卵数

処理	供試成虫数 (頭)	病死率 (%)	寿命 (日)	産卵数
処理	10	100	6.4 ± 1.3 <sup>1)</sup>	23.5 ± 23.2 <sup>1)</sup>
無処理	10	0	19.5 ± 7.6 <sup>1)</sup>	69.1 ± 33.8 <sup>1)</sup>

注) <sup>1)</sup> : 平均値 ± 標準偏差

### 3. 感染した成虫の産卵数

*B.brongniartii* に接触感染させたスギカミキリ雌成虫の病死率、寿命、および、産卵数の結果を表4-8に示す。処理した雌成虫の寿命は、無処理群のそれよりも有意に短い傾向がみられた( $p < 0.01$ )。

さらに処理雌と無処理雌の平均産卵数をみると、処理雌は  $23.5 \pm 23.2$  個 (平均 ± 標準偏差)、無処理で  $69.1 \pm 33.8$  個となり、処理群で有意に少ない傾向がみられた( $p < 0.05$ )。飼育成虫の生存曲線 ( $l_x$ ) と産卵曲線 ( $m_x$ ) をみると (図4-4)、無処理群では27日間に成虫がダラダラと死亡したのに対し、処理群では処理後7日以内にすべての成虫が死亡した。さらに無処理群では20日間にわたって成虫が産卵し続けたのに対し、処理群では5日間で産卵が終了したことが明らかとなった。このように、雌成虫に *B.brongniartii* を感染させることによって、次世代の卵数が少なくなることが明らかとなった。

## 4. バンド・トラップ法の応用

### 4. 1. ケージ内試験

製剤をスギ丸太に巻き付けたケージ内に放し、24時間後に回収した成虫の病死の有無の結果を表4-9に示す。回収した成虫を個体飼育したところ、3回の繰り返し実験ともすべての成虫が感染したことが明らかとなった。ケージ内に放された成虫は、*B.brongniartii* を繁殖させた製剤に接触したものと考えられる。

表4-9 製剤処理した丸太を入れたケージ内におけるスギカミキリ成虫の感染病死率

試験番号	放虫期間	放虫成虫数 (頭)	回収成虫数 (頭)	病死率 <sup>1)</sup> (%)
1	4月7-8日	♂ 8	8	100
		♀ 8	6	100
2	4月8-9日	♂ 8	4	100
		♀ 8	3	100
3	4月9-10日	♂ 8	4	100
		♀ 8	2	100

注) <sup>1)</sup> : 回収個体の中の死後菌叢生を確認した病死個体の割合

表4-10 *B. brongniartii* 製剤を処理したスギ林でのスギカミキリ成虫の採集個体数、採集後の寿命、病死率および産卵率

処理後の日数 (採集月日)	試験区	性	採集 個体数	寿命 <sup>1)</sup> (日)	病死率 <sup>2)</sup> (%)	産卵率 <sup>3)</sup> (%)
21日後 (3月31日)	処理区	♂	14	17.6 ± 5.9 <sup>a</sup>	71.4	—
		♀	10	17.6 ± 10.9	60.0	100
	無処理区	♂	7	34.1 ± 10.7 <sup>a</sup>	14.3	—
		♀	3	25.0 ± 6.2	33.3	100
31日後 (4月10日)	処理区	♂	6	11.7 ± 5.1	66.7	—
		♀	8	11.8 ± 4.4 <sup>b</sup>	75.0	100
	無処理区	♂	5	20.8 ± 3.6	0	—
		♀	11	31.3 ± 8.8 <sup>b</sup>	36.4	100
42日後 (4月21日)	処理区	♂	0	—	—	—
		♀	1	14	100	100
	無処理区	♂	0	—	—	—
		♀	1	15	100	100

注) <sup>1)</sup> : 平均値 ± 標準偏差

<sup>a, b</sup> : 同一添字同士で有意差あり (t-検定,  $p < 0.05$ )

<sup>2)</sup> : 採集個体の中の死後菌叢生を確認した病死個体の割合

<sup>3)</sup> : 採集♀雌個体の中の飼育中に産卵した個体の割合

#### 4. 2. スギ林での適用

スギ林において *B.brongniartii* 製剤の処理区、無処理区から採集したスギカミキリ成虫の個体数、採集後の寿命、採集個体数の中の感染率、ならびに雌成虫の産卵数を表4-10に示す。3月31日に採集した処理区の雄成虫14個体の平均寿命は17.6日に、また無処理区の雄成虫7個体の平均寿命は34.1日となり、両者の間には有意な差が認められた( $p < 0.05$ )。同日に採集した処理区の雌成虫10個体の平均寿命は17.6日に、また無処理区の雌成虫3個体の平均寿命は25.0日となり、処理区の方が短い傾向がみられたが、有意差は認められなかった( $p > 0.05$ )。4月10日に採集した処理区の8個体の雌成虫の平均寿命は11.8日になり、無処理区の11個体の雌成虫の平均寿命31.3日より有意に短い傾向が認められた( $p < 0.05$ )。同日に採集した雄成虫の平均寿命は、処理区の6個体で11.7日に、無処理区の5個体が20.8日で、処理区の方が短かったものの有意差は認められなかった( $p > 0.05$ )。4月21日に採集した処理区の雌成虫1個体の寿命は14日であり、また、無処理区の雌1個体の寿命は15日であった。

感染率は、3月31日に採集した処理区の雄成虫と雌成虫でそれぞれ71.4%と60.0%となり、無処理区のそれぞれの14.3%と33.3%より高い傾向が認められた。感染個体数と非感染個体数について処理区と非処理区で差があるかどうかを検定したところ、雄では有意差が認められた。4月10日に採集した成虫についても、処理区の感染率は雌雄それぞれ66.7%と75.0%であったのに対し、無処理区ではそれぞれ0%と36.4%になり、処理区の方が高い傾向が認められた。4月21日に採集した処理区と無処理区の雌成虫は、いずれも感染していた。

雌成虫の産卵数をみると、3月31日、4月10日および4月21日に採集した処理区、無処理区のすべての雌成虫はカップ内で産卵したことがわかった。

#### 考 察

室内での飼育実験により、*B.brongniartii* はスギカミキリ成虫に対して病原性を持っていることが示された。そして、*B.brongniartii* に感染することによってスギカミキリ成虫の寿命が短くなり、また、雌成虫の産卵数も少なくなるということが明らかになった。

今回のスギ林での野外試験では、実験的にケージ内で行った試験と同じよう

に、製剤処理区で成虫の感染率を高めることができ、成虫の寿命を短くすることができた。スギカミキリ成虫は夜間にスギやヒノキの樹幹上を歩くこと（杉山ら, 1987）、および樹幹の隙間などの暗いところに好んで潜む習性があることも知られている（柴田, 1984）したがって *B.brongniartii* を培養した製剤を樹幹に巻き付けた処理区では、スギカミキリ成虫が製剤の上を歩いた時や、製剤と樹幹の隙間に潜んだ時にこの菌に感染したものと考えられる。実際、調査時に製剤と樹幹の隙間に潜んでいる成虫も捕獲することができた。

さらに、今回の実験によって *B.brongniartii* は雌成虫から雄成虫へ、また、雄成虫から雌成虫に、交尾によって感染することが確かめられたので、交尾による感染も林内成虫の感染率を高める要因のひとつになったものと考えられる。今後、スギカミキリの密度を制御するためには、先に述べた樹幹への本菌の処理とともに、感染個体を林分に放して感染率を高くする方法の適用も考えられる。この場合、産卵しない感染雄成虫の放虫が有効であることはいうまでもない。

野外実験の処理区と無処理区で捕獲した雌成虫はすべて産卵した。Sibata (1987)が指摘したように、本種の雌は脱出後すぐに交尾して産卵することができる。しかし、飼育実験から、雌成虫は本菌に感染すると寿命が短くなり、産卵数も少ないことが明らかとなった。このことから、本法の適用によって次世代密度の出発点であるスギ林に産卵される卵数を少なくすることが期待される。

片桐・島津 (1980) は、*B.brongniartii* をマツノマダラカミキリ成虫防除に利用することを提案しているが、その方法は菌をマツノマダラカミキリ成虫の摂食時に樹幹に散布するなど、労力の面で薬剤散布と同じであり問題がある。また、キイロコクイムシに *B. bassiana* 菌を運ばせて枯れマツ樹皮下のマツノマダラカミキリ幼虫を防除する方法が試みられている（Fukuyamaら, 1989, 野淵, 1989）が、コクイムシの大量増殖が困難であるなどの問題点が多い。今回のスギカミキリの場合は、成虫の習性を利用して、*B.brongniartii* を培養した製剤を巻き付ける方法が可能であり、処理作業も大変簡単なため、効率的に成虫に感染させて、防除できるものと考えられる。実際、本成果を出発にして製剤『バイオリサ・カミキリ』が開発され、多くの試験場研究者により、果樹のゴマダラカミキリや桑のキボシカミキリの防除にも十分利用できる方法であることが明らかにされている。

#### 第4節 街路樹でのゴマダラカミキリ防除の試み

近年、都市の環境緑化に対する関心が高まり、道路緑地帯、都市公園、公共住宅団地などにおける公共緑化木の需要は著しい伸びを示している。緑化樹の生産は、主に、千葉、埼玉、東京、神奈川、栃木、群馬の6都県で全国生産額の72%を占め（堀江，1984）、各自治体も力を入れている。東京都では、1973年から緑化用苗木安定供給事業を実施し、農家への委託生産を行っており、その経費は5億円を越える。苗木の種類としては、最近ではサクラ、ハナミズキ、サザンカなどの花木類や、シラカシ、アラカシ、クスなどの常緑樹が著しい伸びを示しているが、特にカシ類やカエデ類でゴマダラカミキリの被害が問題になっている（阿久津，1990）。さらに、生木であるコナラ、エゴノキなどの人工雑木林や、プラタナスなどの街路樹でもゴマダラカミキリの被害が認められている。

特に、プラタナスなどの街路樹では殺虫剤の散布を好まない住民は多く、ゴマダラカミキリの被害を受けたプラタナスが強風のため、道路に横倒しにされることもある。そこで、それを管理する公園事務所などからも、本製剤が注目されており、本節では、『バイオリサ・カミキリ』による街路樹のゴマダラカミキリに対する防除について検討した結果について記述する。

#### 材料と方法

試験は、1993年に、茨木市内のプラタナスが道路の両端に約8m間隔で植え付けられた府道19号線（茨木寝屋川線）のうちの、府道138号線（三島江茨木線）から野々宮二丁目交差点までの1.2kmで行った。約200本（片側100本以上）植付けられたプラタナスの中で、府道138号線との交差点より200mの地点から約150mの地点までの平田団地前のプラタナス（樹齢；6～7年）、両サイド20本ずつ計40本を処理区とし、それらの両端から3本ずつ計12本の樹を隣接区、それ以外を無処理区とした（図4-5）。これらのプラタナスは処理区を中心にゴマダラカミキリの被害が多くみられ、脱出孔が多く枯死している樹も数本みられた。試験は、すでに成虫の発生が見られだした6月24日に、本製剤をプラタナスの株元に近い樹幹に巻き付け、ホッチキスで止めた（バンド法）。

株元に近い部分に巻き付けたのは脱出孔が根元に多かったためであるが、草が株元を覆い、日陰や目隠しになった。

調査は、施用後1週間おきに、2人が約2時間かけ、処理区、隣接区および無処理区のゴマダラカミキリの成虫を捕獲およびその死体を採取した。他の成虫への汚染を防ぐために捕獲した成虫は、その場で1頭ずつプラスチックケース（直径；10cm、高さ6cm）に収容し、次の捕獲の前には、アルコールで手を消毒した。捕獲した成虫は持ち帰り25℃で飼育し、その後の生死および菌糸の発生の有無について調べた。

施用35日後（7月29日）に一部の製剤を回収し、製剤を表裏2層に分け、それぞれのサンプルを評価した。その方法は、単位面積当りの検鏡数、生菌数、および、それら製剤に接触したキボシカミキリ（人工飼育）の致死期間を調べることにより行った。

#### 実験結果

製剤施用後に捕獲したゴマダラカミキリ成虫に対する *B.brongniartii* の感染状況は表4-11の通りであった。処理日6月24日が発生時期より遅かったためか、捕獲数が全期間を通じても処理区で9頭、隣接区で3頭、合計12頭と少なかったが、その場での死亡が3個体、残る9頭も100% *B.brongniartii* に感染死した。一方、無処理区で、21日目までに捕獲した4頭は感染が認められなかった。同じく28日目に発見された成虫1頭は感染死したが、これは処理区から信号を挟んで約100mの樹木の地ぎわで発見された成虫であった。

施用35日後に回収した製剤の菌数および接触したキボシカミキリへの影響については表4-12に示した。製剤の施用は表側が外部に向くように巻き付けられたが、サンプルAやCは内部である裏側の菌数が多く保持された。サンプルBやAとCの表側の菌数はやや低かったが、それでもほぼ $10^7$  個/cm<sup>2</sup>以上の生菌数が保持された。そして、キボシカミキリに対する致死効果については、1サンプル1頭で試験を行った結果、死亡しない個体もみられたが、6サンプル中4頭が6～8日目に感染死した。

表4-11 *B.brongniartii* の製剤を処理した街路樹から採集した  
ゴマダラカミキリ成虫の感染病死数

試験区	処理後 の日数	成虫の 捕獲数	感染病死数			感染病死 率 (%)
			捕獲前	捕獲後	合計	
処理区	7	4	0	4	4	
	12	1	0	1	1	
	21	3	2	1	3	
	28	1	1	0	1	100
隣接区	7	1	0	1	1	
	12	1	0	1	1	
	21	0	0	0	0	
	28	1	0	1	1	100
無処理区	7	1	0	0	0	
	12	2	0	0	0	
	21	1	0	0	0	
	28	1	0	1	1	20

表4-12 街路樹に施用後35日目に回収した製剤の評価

サンプル	検鏡数 個/cm <sup>2</sup>	生菌数 個/cm <sup>2</sup>	キボシカミキリ成虫の	
			致死日数	d
A-表	3.2 × 10 <sup>7</sup>	0.8 × 10 <sup>7</sup>		8
裏	8.4	5.9		8
B-表	2.4	1.6		6
裏	2.7	2.4		死亡せず
C-表	2.6	2.3		死亡せず
裏	7.1	6.5		7

## 考 察

ゴマダラカミキリは、ミカンやリンゴ等の果樹の他に緑化樹の害虫としての被害も報告されている（阿久津，1990）。最近では街路樹であるプラタナスでも問題とされ、その根元が幼虫により食害を受け、風雨で倒れたために、道路が渋滞したことが新聞等でも報道されている。今回試験した茨木市内のプラタナスの街路樹でも多くのカミキリムシ類の脱出孔が認められ、ゴマダラカミキリが生息するのを確認した。さらに、脱出孔が多く、枯死した樹木も数本見られた。

*B. brongniartii* 培養製剤による街路樹のゴマダラカミキリに対する防除について検討した試験では、処理後28日後まで処理区、隣接区において100%の感染死虫率が得られた。今回試験した道路は、周囲が田畑や学校といった環境で、街路樹のプラタナスの他はゴマダラカミキリの発生源となる樹木や区域は見当たらず、製剤処理区で本プラタナスから発生した成虫は、カンキツ園やクワ園と比較して主幹からの分岐が上方のために樹幹に巻き付けられた製剤の上を確実に歩行し、100%感染したものと考えられる。35日後の製剤の抜き取り検査でも、キボシカミキリに対しては6サンプル中4サンプルの致死結果で、製剤はほぼ $10^7$  個/cm<sup>2</sup>以上の生菌数を保持し、約1か月間に渡って感染力が持続することが認められた。施用試験年（1993年）は冷夏で気温がそれほど高くならず、雨が菌の再生条件として適していたこともあるが、施用した製剤の辺りは草が覆い、日陰や目隠しになったことが、1か月に渡って十分効果認められた要因と考えられる。

本試験は、捕獲虫数が少なかった。それは、施用時期が、その発生時期より遅れたためと考えられる。したがって、本製剤によるゴマダラカミキリ防除には、発生初期の6月上旬を目途に施用するのが好ましいと考えられた。そして、今回の結果により、本製剤による街路樹や公園木でのカミキリムシ防除の可能性が示された。最近では、バラ園での防除についても報告されおり（池上・小林・伏木，1996）、本製剤『バイオリサ・カミキリ』は、農薬登録を受けたカンキツやクワ以外の樹木においても、カミキリムシ防除が期待できる。

## 第5章 *B.brongniartii* 由来のキチナーゼとプロテアーゼ

昆虫病原糸状菌の研究は、19世紀末期から今日まで、1つはカイコやミツバチなどの益虫保護の面から、もう1つは害虫の生物的防除という目的に沿って発展してきた。その感染機構は、疫病菌 (Steinhaus, 1949) や、コメツキムシ幼虫に対する *Metarrhizium anisopliae* の侵入 (Zacharuk, 1970 a,b,c)、コロラドハムシへの *B.bassiana* の侵入 (Vey・Fargues, 1977) の電子顕微鏡による観察によって報告されている。そのサイクルは、①分生子の付着、②昆虫体表面での分生子の発芽、③侵入菌糸の昆虫表皮貫通により昆虫体腔内への侵入、④体腔内体液養分を利用して、短菌糸の発芽、分裂 (増殖)、⑤各組織、器官に侵入して栄養分の奪取、⑥寄主昆虫の致死、⑦体表へ菌糸が出現、⑧分生子形成、の過程を経る (図5-1; Steinhaus, 1949, 青木, 1977)。

糸状菌による昆虫の致死までの時間は、昆虫体内への侵入力と、侵入後の殺虫力に影響されるが、昆虫体内への侵入には、体表を構成するキチンタンパク質複合体からなるクチクルの酵素的加水分解が不可欠とされ (Jeuniaux, 1984)、糸状菌の侵入力は発芽管の先端から分泌されるキチナーゼとプロテアーゼの活性度に支配されると考えられている (Smith・Pekerul・Grula, 1981, Paris・Ferron・Fargues・Robertt, 1985)。 *B.bassiana* の感染致死力がキチン分解酵素の活性に影響されることが、明らかにされている (Gupta・Leathers・El-Sayed・Ignoff, 1994)。もし、これらキチナーゼ、プロテアーゼ活性等を増加させることができれば、昆虫に対する感染致死力の増加が期待できる。

本章では、その増加の可能性を研究するために、*B.brongniartii* のカミキリムシ成虫への感染に関係すると考えられる酵素、キチナーゼとプロテアーゼを分離し、それらの感染への影響を調べると共に、特に、キチナーゼについて分離精製を行った。

### 材料および方法

#### 1 *B.brongniartii* の培養方法

培地は、グルコース20g/l、塩化アンモニウム2g/l、リン酸一カリウム1g/l、硫酸マグネシウム0.5g/l、酵母エキス0.5g/l、および、ポリ

表5-1 *B.brongniartii* 培養液中のキチナーゼ活性

培地組成	キチナーゼ活性 ( $\mu\text{gGlcNAc/ml}\cdot\text{h}$ )	比活性 ( $\mu\text{gGlcNAc/mg}\cdot\text{h}$ )
基本培地…*	3.6	3.2
*+グルコース2%	3.6	2.6
*+グルコース2% +キチン0.5%	5.8	5.8
*+キチン0.5%	2.0	2.1
*+ " 1.0%	1.2	1.4
*+ " 2.0%	1.5	1.8
*+ " 3.0%	2.7	3.3
*+グルコース2% +キトサン0.5%	19.5	22.4
*+キトサン0.5%	2.5	2.6
*+ " 1.0%	4.4	4.9
*+ " 2.0%	2.2	2.3
*+ " 3.0%	2.7	2.9

基本培地…塩化アンモニウム 0.2%、リン酸一カリウム 0.1%

硫酸マグネシウム 0.05%、酵母エキス 0.05%

ポリペプトン 0.5%

25°C振盪培養、7days

ペプトン 5 g / l からなる合成培地 (pH5.5) を基本とした。 *B.brongniartii* の保存スラントから 500ml / 1 L 容フラスコ培地に植菌し、25°C で攪拌培養 (100rpm ; 培養) した後、それを新しい培地に 0.5~2 % 量接種し、フラスコ培養あるいはジャー培養を行った。酵素分泌を誘導するための培地添加実験では基本培地に各添加物を加えるか、それからグルコースを除いた培地を使用した (表 5-1)。基本培地にキトサン (フナコシ社製) 0.5% を添加したものをキトサン培地、グルコース 2% とコーンステープリカー 4% からなる培地を CSL 培地、蚕蛹煎汁加糖培地 (河上, 1978) をさなぎ粉培地とした。カミキリムシ添加培地のカミキリムシは、死虫体を 105°C で 60 分間乾燥した後播り潰して使用した。コガネムシ添加培地のコガネムシも、同様に乾燥、播り潰して使用した。培地添加実験の培養も 25°C でフラスコにて攪拌培養し、経時的に 6 ml ずつサンプリングして酵素活性等測定した。

菌の生育を知る目安として、サンプリング液中の短菌糸数を、検鏡数 (トー

マ血球計算盤を用いた顕微鏡による数)により測定した。pHは、pH試験紙により測定した。培地中の糖濃度は、メンブレンフィルターにて除菌後、Brix計(Brix 0～10%)による概数を測定した。培養濾液中のタンパク量は280nmの吸光度測定、あるいは、Lowry(1951)法、あるいは、バイオラッド社のタンパク測定システム(Bradford,1976)で定量した。標準タンパクとしては牛血清アルブミンを用いた。

## 2 酵素活性の測定法

### 2. 1. キチナーゼ活性の測定

キチナーゼ活性は、Morgan-Elson法(1934)により測定した。培養上清 0.2ml、25mMリン酸-酢酸緩衝液(pH5.5) 0.6ml、コロイダルキチン 0.2mlをマイクロチューブ(1.5ml容)に取り、よく降り混ぜ、30℃で3時間反応させた。反応後、10,000rpmで5分間遠心分離し、その上清 0.6mlを、100mlに4.95gのホウ酸を溶解し KOHでpH9.1とした0.8Mホウ酸塩溶液0.12mlの入った試験管に加え3分間沸騰水中で加熱後氷冷し、これに3.6mlのp-ジメチルアミノベンズアルデヒド試薬(10gのp-ジメチルアミノベンズアルデヒドを、10N塩酸12.5%含む氷酢酸100mlに溶かし、使用直前に氷酢酸で10倍に希釈して使用)を加えて混合し、37℃恒温水中で20分間反応した。反応後、室温まで冷却し、分光光度計により585nmの吸光度を測定した。キチン分解生成物量は、N-アセチルグルコサミンの標準定量曲線から求め、1分間に1  $\mu$ molのN-アセチルグルコサミンを1ユニットとした。吸光度測定は、日立分光光度計2000型を使用した。キチナーゼ活性測定用の基質として使用したコロイダルキチンは、1.0gの粉末キチン(フナコシ社製)を25mlの蒸留水に加えて4℃に冷却し、これに氷冷した硫酸(97%)32mlを10℃以上にならないよう徐々に加えた後、ガラスウールで濾過、その濾液を100mlの冷却蒸留水に加え析出したコロイダルキチンをpH6になるまで遠心分離による集積と洗浄を繰り返し作製した(Jeuniaux, 1958)。コロイダルキチンの濃度は3 mg/mlに調整した。通常冷蔵庫中に1か月は保存可能であった。

### 2. 2. プロテアーゼ活性の測定

培養上清中のプロテアーゼ活性は、天野製薬(株)製品プロテアーゼアマノAの

活性測定法に準じて定量した（アマノ法；平野ら，1991）。0.75%ミルクカゼイン（ディフコ社製）を基質として37°Cで反応させ、0.4モルのトリクロロ酢酸を反応液と等量添加し、濾紙で濾過し、濾液についてフォーリン試薬で発色させた。濾液 1 ml当り60分間に 100マイクログラムのチロシン相当量の発色量を 1 単位とした。

### 3. キボシカミキリ虫体の酵素処理と生物検定法（図 5 - 2）

*B. brongniartii* を、キトサン培地、CSL培地、さなぎ粉培地それぞれにて、25°C、7 日間フラスコ攪拌培養した培養液を入れたビーカーに、攪拌しながら、キボシカミキリ成虫を頭部だけだして30秒間浸漬することで、酵素処理と菌接触を同時に行い、その後、成虫を25°Cで個体飼育して、感染死するまでの致死期間を調べた。

さらに、キトサン培地にて本菌を11日間フラスコ攪拌培養した培養液を遠心分離（10,000rpm、15分）により除菌し、その上清を硫酸分画することにより、酵素画分を濃縮した。その酵素濃縮液、あるいは、コントロール液（水または別の画分の濃縮液）を 1 ml入れた直径 3 cmのシャーレにキボシカミキリ成虫を一昼夜封じ込めることによって酵素処理し、その後、製剤『バイオリサ・カミキリ』に接触させ、成虫を25°Cで個体飼育して、感染死するまでの致死期間を調べた。

### 4. キチナーゼの精製

キチナーゼは、カラムクロマトグラフィーによって精製を試みた。使用した PD-10脱塩カラム、Sephacryl S-400 HRクロマトグラフィーの樹脂は、フェルマシア製を使用した。CM-トヨパールカチオンイオン交換樹脂、DEAE-トヨパールアニオンイオン交換樹脂は、トウショウ製を使用した。

Sephacryl S-400HRクロマトグラフィーは、1 mMエチレンジアミンテトラ酢酸を含む10mMリン酸緩衝液（pH6.6）で行った。カラムサイズはφ2.2cm×55cmで、チログロブミン(669kDa)、フェリチン(440kDa)、カタラーゼ(232kDa)、アルドラーゼ(158kDa)を標準物（フェルマシア製）とし、カラムクロマトグラフィーによる分子量測定を行った。

## 実験結果

### 1. *B.brongniartii* の生育と培養上清中の酵素活性

基本培地と同じグルコース培地での *B.brongniartii* の生育は、図 5-3 に示すように、前培養液接種 2 日後から短菌糸濃度は増加し、4 日目以後は 10 日まで一定であった。この間培地の糖濃度は 5 日目まで減少し、培地 pH は 4 日目あたりから pH 3 程度まで減少し、8 日目には pH 6 にまで再び増加した。グルコース培地に 0.5% キトサン、4% コーンステープリカー、0.5% カミキリムシ粉末あるいは 0.5% コガネムシ粉末を添加した場合も、短菌糸の増加、グルコースの減少はグルコース培地と同様であったが、培養期間中の pH の減少は少なかった (図 5-3)。

この間の培地上清のキチナーゼ活性の変化を図 5-4、5 に、プロテアーゼ活性の変化を図 5-6、7 に示す。グルコース培地では、キチナーゼ活性は短菌糸濃度が一定となる 4 日目以降に培地中に認められた。これに対し、キトサン添加培地では、3 日目から出現し、7 日目にはグルコース培地の 5 倍以上の  $8 \mu\text{gN-アセチルグルコサミン}/\text{ml} \cdot \text{h}$  以上と高かった。コーンステープリカー添加の場合もグルコース培地よりも高いキチナーゼ活性が得られたが、カミキリムシ粉末やコガネムシ粉末添加では、有意な活性増加は見られなかった。プロテアーゼ活性は、グルコース培地の場合には 8 日目までは培養上清にほとんど見られず 9 日目に高い活性 ( $70 \mu\text{gTyr}/\text{ml} \cdot \text{m}$  以上) を示したが、キトサンを添加した培地では 6 日目から活性が見られ、その後  $55 \mu\text{gTyr}/\text{ml} \cdot \text{m}$  まで増加した。コーンステープリカー添加の場合にも 6 日目にも活性が見られたが、その後減少した。カミキリムシ粉末やコガネムシ粉末添加の場合には、5 日目以後、キトサン添加よりも培養上清に高い活性 ( $70 \mu\text{gTyr}/\text{ml} \cdot \text{min}$  以上) を示した。

25°C 7 日間、キチン、キトサンを種々添加した培地でフラスコで培養した別の実験での各種培地上清のキチナーゼ活性とプロテアーゼ活性を表 5-1、2 に示す。昆虫の表皮成分であるキチンを添加しても、キチナーゼ活性は 1.2~5.8  $\mu\text{gN-アセチルグルコサミン}/\text{ml} \cdot \text{h}$  と低かった。キトサン添加の場合、2% グルコースを含む培地では、 $19.5 \mu\text{gN-アセチルグルコサミン}/\text{ml} \cdot \text{h}$  と高かつ

表 5 - 2 *B.brongniartii* 培養液中のプロテアーゼ活性

培地組成	プロテアーゼ活性 ( $\mu\text{gTyr/ml}\cdot\text{min}$ )	比活性 ( $\mu\text{gTyr/mg}\cdot\text{min}$ )
基本培地…*	1. 3	1. 2
*+グルコース 2%	1. 4	1. 0
*+グルコース 2% +キチン 0. 5%	11. 1	11. 1
*+キチン 0. 5%	1. 1	1. 2
*+ " 1. 0%	1. 7	1. 9
*+ " 2. 0%	2. 0	2. 4
*+ " 3. 0%	0. 1	0. 1
*+グルコース 2% +キトサン 0. 5%	64. 8	74. 5
*+キトサン 0. 5%	—	—
*+ " 1. 0%	0. 3	0. 3
*+ " 2. 0%	—	—
*+ " 3. 0%	0. 1	0. 1

基本培地…塩化アンモニウム 0.2%、リン酸一カリウム 0.1%  
 硫酸マグネシウム 0.05%、酵母エキス 0.05%  
 ポリペプトン 0.5%  
 25°C振盪培養、7days

たが、糖無添加の培地の場合は活性増加は認められなかった（データは示していないが短菌糸濃度の増加は変わらない）。プロテアーゼ活性もグルコース培地にキトサンを添加することで活性が $64.8\mu\text{gTyr/ml}\cdot\text{min}$ と高くなった。また、キチンを添加した場合にも増加した。キチンを添加した場合、キチナーゼ活性は大きく増加しないがプロテアーゼ活性の増加が顕著であることは、カミキリムシ粉末やコガネムシ粉末添加の結果（図 5 - 6）と一致した。しかし、糖無添加の場合は、キトサン同様、キチンの場合もプロテアーゼ活性は低かった。

*B.brongniartii* を分離し、継代しているさなぎ粉培地の場合のキチナーゼ活性、プロテアーゼ活性は、いずれも低かった（図 5 - 8）。

## 2. キボシカミキリ虫体の酵素処理と生物検定

キトサン培地、CSL培地、さなぎ粉培地で *B.brongniartii* を培養した培養液中に浸漬して感染させたカミキリ成虫の致死までの日数は、キトサン培地の場合、5頭中3頭が6日間で、平均して6.2日で、これはCSL培地の7.1日、さなぎ粉培地の7.6日より短く、キトサン培地とさなぎ粉培地の間には、危険率5%で有意差があった（図 5 - 9）。

次に、キトサン培地で培養した培養上清を硫酸分画による酵素濃縮を行った。その結果を表5-3、4に示す。酵素液は、キチナーゼ、プロテアーゼいずれも60-90%の画分に集中し、キチナーゼは $175 \mu\text{gN-アセチルグルコサミン}/\text{ml}\cdot\text{h}$  (回収率33%)、プロテアーゼは $2196 \mu\text{gTyr}/\text{ml}\cdot\text{m}$  (回収率79%)と、それぞれ14倍、32倍に濃縮できた。この酵素濃縮液を使用し、0-30%の画分と水をコントロール液として、カミキリ成虫を酵素処理し、その後製剤と接触感染させた時の成虫の致死日数は、酵素処理の場合平均6.4日で、0-30%画分の7.3日、水の場合の7.0日と比較して短かく、前者との間には、危険率5%で有意差があった(図5-10)。

### 3. キチナーゼの部分精製

キチナーゼ活性が最も高く誘導されたキトサンとグルコースを含む培地を用いて、*B.brongniartii* を100L培養タンクで8日間培養し、遠心分離で除菌した後、上清に固体硫酸アンモニウムを90%飽和になるよう加えて一晩冷所に置き、沈殿したタンパク質を遠心分離して集め、90%飽和の硫酸アンモニウム溶液に懸濁した。この状態で4°Cで保存するとキチナーゼ活性は数か月間安定であった。この懸濁液の一部を透析して硫酸アンモニウムを除去し、キチナーゼ活性を種々の条件で検討した。硫酸アンモニウムは、キチナーゼ活性を直接阻害したり、酵素反応で生成するアセチルグルコサミンの発色を妨害した。また、プロテアーゼ活性もキトサンによって誘導されるので、精製時の50mMリン酸緩衝液(pH7.2)には1mMのEDTAが加えられ、精製する酵素は最初にセファデックスG-25のPD-10カラムで処理された。

Sephacryl S-400 HRカラムクロマトグラフィー( $\phi 2.2\text{cm}\times 55\text{cm}$ )によりゲル濾過した時のキチナーゼ活性の溶出パターンを、図5-11に示す。2つのキチナーゼ活性のピークが、主なタンパクピークの前に現れた。最初の活性ピークをキチナーゼI、2番目のピークをキチナーゼIIとした。これらを、分子量測定標準物により分析した結果、それぞれの分子量は、130kDaと67kDaであった(図5-12)。両ピークともキトサンを含まない培地で培養した場合にはほとんど見られなかった。さらに、精製を進める目的で、両溶出液をCM-トヨパールカチオンイオン交換樹脂やDEAE-トヨパールアニオンイオン交換樹脂で精

表 5 - 3 *B.brongniartii* 培養上清の硫酸分画によるキチナーゼ活性

	vol. (ml)	キチナーゼ活性 ( $\mu\text{gGlcNAc/ml}\cdot\text{h}$ )	回収率 (%)	濃縮率 (倍)
上清液*	410	13	100	1
0~30%画分	10	-	-	-
30~45% "	10	-	-	-
45~60% "	10	-	-	-
60~90% "	10	175	33	14
90%~ "	530	-	-	-

\*遠心分離により除菌した上清液

表 5 - 4 *B.brongniartii* 培養上清の硫酸分画によるプロテアーゼ活性

	vol. (ml)	プロテアーゼ活性 ( $\mu\text{gTyr/ml}\cdot\text{min}$ )	回収率 (%)	濃縮率 (倍)
上清液*	410	69	100	1
0~30%画分	10	30	1	0.4
30~45% "	10	48	2	0.7
45~60% "	10	12	0	0.2
60~90% "	10	2196	79	32
90%~ "	530	0.3	1	0

\*遠心分離により除菌した上清液

製を試みたが、いずれの場合も樹脂への吸着が弱く成功しなかった。また、*Rhizopus oligosprus* のキチナーゼ精製に使用されたキチンアフィニティカラム (Yanai・Takaya・Kojima・Horiuchi・Ohta・Takagi) を使用して同様にアフィニティカラムクロマトグラフィーを試みたが、やはり吸着が弱く、この操作も成功しなかった。そこで、2つのピーク部分をそれぞれ集めて濃縮し、再び同じゲル濾過を行った。その結果を図5-13に示す。キチナーゼ I は再び同じフラクションに活性のピークが見られた。一方、キチナーゼ II は、さらに2つのピークが現れ、ひとつは基のフラクションと同じ位置に溶出され、もうひとつは比較的分子量が小さく量的にはキチナーゼ I よりやや多かった。以上、完全な精製には至っていないが、*B.brongniartii* のキチナーゼは、少なくとも3種が存在することが確認された。

## 考 察

昆虫病原糸状菌の昆虫体内への侵入は、体表を構成するクチクルの酵素分解から始まる。キチナーゼはその過程で重要な働きをし、そのキチナーゼ活性の強さが糸状菌の感染力に影響を与えるものと考えられている (Paris・Ferron・Farues・Robert, 1985, Gupta・Leathers・El-Sayed・Ignoff, 1994)。ここでは、*B.brongniartii* がカミキリムシ成虫に侵入するために必要な酵素、キチナーゼとプロテアーゼを分泌していることを明らかにした。本菌のキチナーゼ活性は、キトサンとグルコースを含む培地で培養すると高い分泌が見られ、キトサンでは誘導されたが、同様にしてキチンを含む培地で培養した場合にはそれほど誘導されなかった。このことは、*Metarhizium anisopliae*、*B.bassiana*、そして、*Aspergillus flavus* がキチンを含む培地で誘導されたという結果 (St.Leger・Staples・Roberts, 1993、Havukkala・Mitamura・Hara・Hirayae・Nishizawa・Hiba, 1993) と異なるものであった。この違いは、菌種によるものか、培地成分の構成によるものと考えられる。

*B.brongniartii* の培養液上清のゲル濾過クロマトグラフィーを使った部分精製によって、本菌が分泌するキチナーゼは2種以上が存在することが示された。予備試験で、2つのキチナーゼ画分は至適PHや基質特異性において違いはな

く、それぞれの分子量が130kDaと 67kDaであることから、前者は後者の2量体とも考えられる。完全に精製されたアイソザイムではないが、昆虫病原糸状菌で同様の報告がある。St.Legerら(1991)は、*Metarhizium anisopliae* の3つのキチナーゼピークのクロマトグラフィーによる分子量が110~120kDa、66kDaと33kDaと報告している。これらは、同じ酵素の複合体と仮定された。これらの証明は、完全に精製された酵素での確認が必要である。

昆虫病原糸状菌において、*B.brongniartii* のように、その寄主がカミキリムシ成虫のみといった特異性の大きいことは興味深い。しかし、培地へキボシカミキリ粉末などを添加して培養する実験では、少なくともキチナーゼやプロテアーゼといった酵素がキボシカミキリの表皮細胞で特異的に誘導されることは認められなかった。むしろ、カイコにおいて、糸状菌が昆虫体内に入ると血球による捕食作用が認められており(河上, 1973)、また、カイコ体内にはプロテアーゼインヒビターが存在し、種々のプロテアーゼを防御するために働くが、糸状菌が侵入するために分泌されるプロテアーゼの中で、*B.bassiana* の分泌するプロテアーゼに対してはほとんど阻害しないと報告されていることから(江口, 1987)、おそらく、カミキリムシ類の場合にも、他の菌や異物に対して捕食作用のある血球や酵素インヒビターの活性が存在し、それら血球やインヒビターが*B.brongniartii*や、そのキチナーゼやプロテアーゼに対して働かないことが、感染の特異性に大きく影響しているものと考えられる。

しかし、培養液に浸漬して感染させたキボシカミキリや、その培養上清の濃縮液で処理して菌と接触させたキボシカミキリの致死日数が短くなったことから、キチナーゼやプロテアーゼはキボシカミキリ成虫の表皮貫通に大きな役割をはたしているものと考えられる。糸状菌の病原力は強いものでも速効性はない。*B.brongniartii* のカミキリ成虫に対する病原力についても致死までに1週間を要し、その病原性を上げ致死期間を短縮することは、今後、本製剤をより普及させる上で重要である。その短縮に効果があると考えられるキチナーゼやプロテアーゼの増加・安定、あるいは、そうした菌をスクリーニングするためにも、これら酵素の精製が必要である。

## 総合考察

米国 AGROW社の調べでは顕在化している生物農薬の市場は60億円、そのうち米国が30億円で、その内訳は90%以上がB.T.剤によるもので、ウィルス剤が2%、その他は把握すらされていない。しかし、国や県（州）の研究機関では、日本だけでなく、米国、ヨーロッパにおいても、B.T.剤の研究よりも、むしろ天敵昆虫やウィルス、糸状菌、線虫、その他バクテリアの研究に多くのエネルギーが費やされている（二口，1995）。今後生物防除資材が広く使用される条件として、資材の簡単に入手、品質の安定、効果、施用技術の指導力などが上げられる。また、生物農薬は保存期間が短い、極端に種特異的である、市場が小さい、特許の取得が困難というような点が、販売を難しくしており、生物農薬が化学農薬に完全に取って代わることは難しいと考えられる。すなわち、生物農薬、特に微生物農薬は、病原性、伝播性、安全性のほかに、生産性、残効性、貯蔵性、使用における簡便性が必要であり、残念ながら、現在これらを満たす生物農薬はB.T.剤しかないということである。しかし、微生物の中には、伝播性、残効性、安全性において化学殺虫剤よりも優れたものがあり、これまで以上に環境への安全性と持続性が社会的に要求され、また、総合的害虫防除（IPM）の下に推進されるこれからの農業において、生物農薬は有力な選択肢であり、IPMプログラムの中で大きく採用され得るものである。それにより、化学農薬においても、薬剤抵抗性の獲得を遅らせ、人々の農薬業界への理解も深めることから、農薬の息の長い使用につながるものと考えられる（J.C.van Lenteren, 1996）。

生物農薬として昆虫病原糸状菌の利用が研究・開発されたのは、1879年、メチニコフが *Metarhizium anisopliae* を使ってコガネムシの幼虫を防除したのが最初である。現在に至ってはヨーロッパやアメリカで種々の製剤化された糸状菌が販売・使用されている（河上，1988、岡田，1987、Hall, 1981、Latge, Papkierok 1988）。日本では、本製剤『バイオリサ・カミキリ』が最初の糸状菌殺虫剤として1995年に農薬登録された。昆虫病原糸状菌のほとんどがカイコに対しても病原性を示し、養蚕を国家事業としてきた日本では、むしろその病気を防ぐために昆虫病原糸状菌の研究が進められ、これらを生物農薬として導入

するのには慎重であった。本製剤が認可されたのは、カイコも含め動植物や環境に対してほとんど影響のない糸状菌 *B.brongniartii* が使用されたことによると考えられる。しかも、本製剤は、カミキリムシ類のみを感染死させる極端に種特異的な薬剤で、市場も柑橘園や桑園に限られ小さいものであるが、菌自身の病原性、伝播性、安全性に加え、カミキリムシ類の習性を考えてシート状の不織布に培養したことにより使用が簡便となり特許性が得られ、また、菌が地上に落下しないのでより残効性を増加させ、低温（5℃）で1年間の保存にも耐えられたこと（貯蔵性）により、製品化が可能となった。生産性についても、本製剤の製造は液体培養と固体培養（静置培養）の2段階培養が必要であり、特に不織布の静置培養が複雑でその方法と培養条件が課題であったが、角槽を用いたモデル実験により、不織布を棚段に並べて行う方法を考案し、加湿しながら温度を一定にする条件を見出だして、量産化の見通しを得た。本生産法における培養方法は確立できたが、化学農薬と比較すれば、まだまだ、製剤コストは高く、実用面で使用量を少なくして効果を高める試験が行われているが、製法の改良やキチナーゼ活性の増加など菌株の改良によって、さらに、生産性を上げる必要がある。

生物農薬の使用にあたっては、速効性がないことについて、化学農薬の場合の認識が改められる必要があり、その意識改革がない限り生物農薬の定着は難しく、社会的に要求される環境安全のためのIPMの農業の浸透はありえないと考える。カミキリムシ防除における既存の化学農薬は、「そこにムシがいるから散布する」といった発想で、カンキツのゴマダラカミキリの場合には成虫が多く見られる七月初旬に散布される。したがって、それ以後に産卵する成虫を防除することにはなるが、それ以前の産卵は防いでいない。また、化学農薬は有効期間が短いので、その期間を過ぎて出てきた成虫にも効果を示さない。化学農薬を使用する慣行防除園においてカミキリムシの発生が抑制できないのは、そのためと考えられる。一方、本製剤は、「そこから発生したムシを防除する」といった考えで、羽化脱出してきた成虫を、産卵するまでに防除することを狙ったものである。本製剤は、遅効性ではあるが、約1か月効果が持続し、さらに、温度と湿度条件が良ければ、感染死した病死個体にも菌糸が生えるので、それに接触することによる二次感染も期待できることから、カミキリムシ

成虫の発生初期から施用することで、その後の産卵を抑制することができるものと考えられる。多くの試験場の結果を見ても、50～60%程度の殺虫率でも、その圃場におけるカミキリムシの発生を年々減少させることが可能であると考えられる（図4-1）。

柑橘園のゴマダラカミキリは、近年、各地で発生量が増加し、ミカンハダニに次ぐ難防除害虫として位置付けられている。一方、ミカンハダニは、化学農薬によりリサージェンスを起こすといった問題があるため、IPMの考えの下、ハダニアザミウマ、カブリダニやハネカクシ類を導入する天敵昆虫による防除が推進されている。また、やはり重要害虫であるカイガラムシに対し寄生蜂（ヤノネツヤコバチなど）が導入されている。そして、ゴマダラカミキリに対しても微生物農薬である本製剤が利用されることが期待される。桑園におけるキボシカミキリの被害も年々増加し、被害面積は、桑の重要病害である萎縮病、胴枯病、および紋羽病の被害の合計よりも多いとも言われている。薬剤散布はカイコへの影響も懸念されることから、キボシカミキリに対しても本製剤が利用されることが大いに期待される。

生物農薬として利用可能な昆虫病原糸状菌は多数あり、今後も、本製剤の研究開発の経験をもとにして、総合的害虫管理体制の確立に役立つ製剤の開発に貢献していきたい。

## 要 旨

1987年に河上によりキボシカミキリ成虫の病死体から分離された *Beauveria brongniartii* は、類白色の不完全菌類に属する昆虫病原糸状菌で、カミキリムシ成虫に特異的に寄生する。カミキリムシ類は、農林業において難防除害虫であるため、本菌によるその防除方法が検討されてきた。著者は、それら成虫が樹幹を上下する習性に着目し、そこで接触感染するよう本糸状菌を用いて樹幹に設置可能なシート状の製剤を開発した。本製剤は、*B. brongniartii* を液体培養し、さらに、それを新しい培地で希釈し、4 mmのパルプ不織布に含浸させて静置培養した後、乾燥することにより完成させた。培地と培養条件の検討の結果、工業用グルコースおよびコーンステープリカからなるCSL培地で菌は十分生育し、培養日数は液体培養、静置培養とも3日以上必要で、生育温度は22～28℃で良好であったが、静置培養における湿度は97%以上が必要であることを明らかにした。また、静置培養を行うに当っては、不織布に含浸させる培養液に新鮮な培地を4倍量以上加えることで製剤1 cm<sup>2</sup>当り10<sup>8</sup>個以上の分生子を生産させることができた。

本製剤は、5℃で保存すると420日後でも10<sup>8</sup>個/cm<sup>2</sup>以上の生菌数が維持され、これに接触させたキボシカミキリは、ほとんどが7日後に感染死した。10℃以上の保存条件では生菌数は経時的に減少し、10<sup>7</sup>個/cm<sup>2</sup>以下になるとキボシカミキリに対する感染力が低下した。しかし、30℃でも30日は10<sup>7</sup>個/cm<sup>2</sup>以上を維持し、保存中に減少した生菌数は給水により再び増加・回復した。したがって、本製剤は、低温での保存性および施用時における感染力の長期持続性に優れていると判断された。

一方、多くの試験場で桑樹のキボシカミキリや果樹のゴマダラカミキリに対する本製剤を用いた防除体系が確立されたが、著者らは、*B. brongniartii* がスギカミキリに対しても感染することを明らかにし、スギ林におけるその防除の可能性を示した。その他にも、街路樹のゴマダラカミキリに対する防除についても可能性があることを示した。

*B. brongniartii* のカミキリムシ成虫の体皮貫通には、体皮成分を分解する酵素の働きが考えられ、その活性の強い菌株の育種により、感染力を増大させう

る可能性がある。そこで、本糸状菌を液体培養し、上清中のキチナーゼおよびプロテアーゼ活性を調べたところ、培地にグルコースとキトサンを加えることによって酵素活性の誘導がみられた。培養上清中のキチナーゼの精製を試みた結果、少なくとも2種以上のキチナーゼの存在が明らかとなった。

## 謝 辞

本論文の取り纏めに当たり懇篤な指導ならびに教示をいただくとともに激励を賜り校閲をいただいた鳥取大学工学部教授・永井純博士、安西晟博士、重政好弘博士、助教授・河田康志博士、梁瀬英司博士、助手・溝畑知宏博士、本研究のキチナーゼ精製に協力いただいた鳥取大学大学院工学研究科・永井宏樹氏、工学部生物応用工学科・金森久直氏に深甚の謝意を表します。

また、本研究を遂行するに当たり種々教示をいただくとともに激励を賜った農水省蚕糸・昆虫農業技術研究所元所長・河上清博士、元主任研究官・伊庭正樹博士、名古屋大学教授・柴田叡弍博士（元奈良県林業試験場主任研究員）に深甚の謝意を表します。さらに、本研究の実防除の検討では、多くの国公立試験場の方々にお世話になり、中でも、データを本論文に引用させていただいた、九州地域重要新技術研究成果NO.22 をまとめられた鹿児島県果樹試験場・坂口徳光先生をはじめとする先生方、および、千葉県蚕業センターの吉井幸子先生、さらには、和歌山県和歌山地域農業改良普及センターの土井雅人先生に厚くお礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行を許され、終始激励と有益な助言を賜った日東電工株式会社取締役メディカル事業部長・宗伊佐雄博士、メディカル事業部開発企画部長・岩間昭男博士、同事業部研究開発センター長・二宮保男博士、同センター主任研究員・撫佐義一氏、同センターバイオグループ長・日比野健博士、バイオグループ主任研究員・千田修治博士、副主任研究員・雑賀健氏、並びに、バイオグループの皆様と、本研究の酵素生産検討に協力いただいた医薬品グループ研究員・大久保勝之氏にお礼申し上げます。

## 引用文献

- 阿久津喜作 (1990) “緑化樹の害虫—ゴマダラカミキリの被害—” 植物防疫 **44**(4)  
196-200
- 青木襄児 (1977) “カビによる昆虫の病理” 防菌防黴 **5**(11)488-494
- 青木襄児 (1989) “昆虫病原菌の検索” 全国農村教育協会発行
- Betz, F. · M. Levin · M. Rogul (1983) “Safety aspects of genetically-engineered microbial pesticides.” *Recombinat DNA Tech. Bull.* **6** 135-141
- Bolin P.C., Hutchison W.D. and Davis D.W. (1996) “Resistant hybrids and *Bacillus thuringiensis* for management of European Corn Borer in sweet corn” *Journal of Economic Entomology* **89** (1) 82-91
- Bradford J. (1976) “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” *Anal. Biochem.* **72** 248-254
- Durand A. · Renaud R. · Almanza S. · Maratray J. · Diez M. · Desgranges C (1993) “Solid state fermentation reactors from lab scale to pilot plant” *Biotech. Adv.* **11** 591-597
- 江口正治 (1987) “カイコのプロテアーゼインヒビターの生理・遺伝・病理” *化学と生物* **25** (4) 262-267
- 遠藤勲, 長棟輝行, 井上一郎 (1985) “カビ類の新しい培養法” *化学工学* **49** (4)  
293-295
- Fukuyama K. · Nobuchi A. · Enda N. (1989) “Forest Insects Pests and Tree Diseases in the Northeast Asia Proceedings of the IUFRO Regional Workshop” **232-236**
- 二口欣也 (1995) “生物農薬の開発・利用に関する国際動向” *植物防疫* **49** (2)  
47-49
- Gupta S.C. · Leathers T.D. · El-Sayed G.N. · Ignoff C.M. (1994)  
“Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*” *J. Invertebr. Pathol.* **64** 13-17

- Hall R.A. (1981) "The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales" in Burges H.D.(editor) Microbial control of pests and diseases 1970-1980. Academic press, London , pp482-498
- Havukkala I. · Mitamura C. · Hara S. · Hirayae K. · Nishizawa Y. · Hiba T  
"Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes."  
J. Invertebr. Pathol. **61** 97-102
- 橋元祥一・柏尾具俊・堤隆文(1989) "昆虫病原糸状菌 *Beauveria brongniartii* によるゴマダラカミキリの生物的防除に関する研究 第2報" 九州病害虫研究会報 **35** 104-108
- Hegedus, D.D. · Khachatourians, G.G. (1995) "The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents" Biotechnology Advances **13** (3) 455-490
- 平野賢一・伊藤浩史・藤吉隆司・中村哲郎(1991) "ペプチド製造用酵素"  
特許公開公報平-3 123484
- 樋口俊男・遠藤勲・長棟輝行・井上一郎・牛山敬一(1984) "カビ類の新しい培養法"  
化学工学協会第18回秋季大会 SK210
- 樋口俊男・柏尾具俊・橋元祥一・堤隆文・甲斐一平・行徳裕(1990) "カミキリムシ類防除のための天敵微生物 *Beauveria brongniartii* の培養素材としての不織布培地について" 第34回応動昆大会講要 147p
- 樋口俊男・二宮保男・伊庭正樹(1993) "カミキリムシ類防除のための天敵糸状菌 *Beauveria brongniartii*(Sacc.)Petch 培養製剤バイオリサ・カミキリの開発"  
日東技報 **31** (2) 104-110
- 樋口俊男・二宮保男・千田修治・雑賀健・伊庭正樹(1994) "天敵微生物 *Beauveria brongniartii* 製剤(バイオリサ・カミキリ)の保存性および街路樹のゴマダラカミキリ防除の試み" 第38回応動昆大会講要 11p
- Higuchi T. · Nagai H. · Kanamori H. · Mizobata T. · Kawata Y. · Nagai J.(1996)  
"Chitinase and protease from *Beauveria brongniartii*" Reports of the Faculty Engineering Tottori University Japan **27** (1) 73-86
- Higuchi T. · Saika T. · Senda S. · Mizobata T. · Kawata Y. · Nagai J.(1997)  
"Development of biorational pest control formulation against Longicorn Beetles using a fungus, *Beauveria brongniartii*(Sacc.)Petch"  
Journal of Fermentation and Bioengineering **84** (3)issue
- 樋口俊男・柴田叡弼(1989) "カミキリムシ防除のための天敵微生物 *Beauveria brongniartii*(Sacc.)Petch の発泡体培養" 日東技報 **27** (1) 10-14

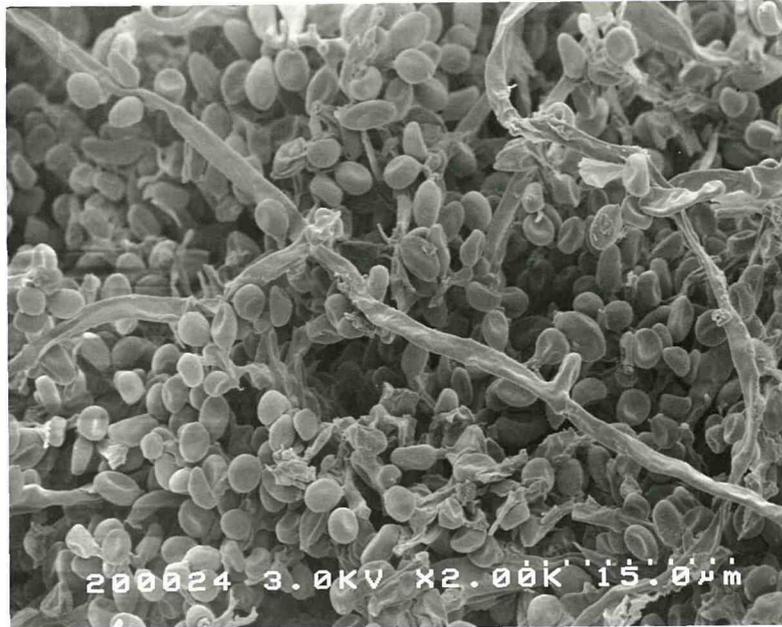
- Hoog G.S.De.(1972) “The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodonium* gen. nov.” *Studies in mycology* **NO.1** 41C.B.S.(Baarn)
- 伊庭正樹 (1988) “人工飼料によるキボシカミキリの飼育” *昆虫と自然* **23** 7-12
- 伊庭正樹 (1989) “*Beauveria tenella* 菌新製剤によるキボシカミキリ産卵前防除の試み 1. 羽化脱出後における成虫の行動と殺虫効果” *日本蚕糸学会関東支部第40回学術講演会講演要旨集* **19**
- 伊庭正樹 (1993) “桑園におけるキボシカミキリの生態ならびに防除に関する研究” *蚕糸・昆虫農業技術研究報告* **81** 119
- 池上隆文・小林則夫・伏木俊雄 (1996) “天敵糸状菌 *Beauveria brongniartii* を利用したバラ園におけるゴマダラカミキリの防除” *茨城農業総合センター蚕研 研究報告* **4** 26-32
- 井上昌三・日和隆之・樋口俊男・佐藤進 (1993) “多段式培養方法および装置” *公開特許公報 (特開)* 平 5-137564
- 石々川英樹 (1986) “キボシカミキリの天敵糸状菌 *Beauveria tenella* による防除” *愛媛蚕業試験場研究要報* **8** 1-7
- 岩花秀典 (1994) “生物農薬の安全性評価 (微生物農薬を中心に)” *生物農薬の開発・利用に関するシンポジウム講演要旨*; 社団法人日本植物防疫協会 **21-27**
- Julius J.Menn(1996) “Biopesticides; Has their time come?”  
*J. Environ. Sci. Health. B* **31** (3) 383-389
- Jeuniaux C. (1958) “Recherches sur les chitinases.”  
*Arch. Intern. Physiol. Biochim.* **66** 408-427
- Jeuniaux C. (1984) “Infection Process of Fungi(Roberts D.W.and Aist J.R.eds.)  
*Rockefeller Foundation* **201p** USA”
- 柏尾具俊・氏家武 (1988) “キボシカミキリ由来の天敵糸状菌 *Beauveria tenella* のゴマダラカミキリに対する病原性と殺虫効果” *九州病害虫研究会報* **34** 190-193
- 片桐一正・島津光明 (1980) “マツノマダラカミキリの天敵微生物” *森林防疫* **29** 28-33
- 河上清 (1973) “カイコの硬化病に関する研究、とくに菌の侵襲と宿主の病変について” *蚕糸試験場報告* **25** (5) 347-370
- 河上清 (1978) “キボシカミキリに寄生する *Beauveria tenella* (Delacroix) **Siemaszko** について” *蚕糸試験場報告* **27** (4) 445-467
- 河上清 (1986) “キボシカミキリの新防除法” *今月の農薬* **30** (2) 59-64

- 河上清 (1988) “微生物殺虫剤 (糸状菌)” *BIO INDUSTRY* **5** (1) 26-37
- 河上清・仲昭年 (1979) “黒きょう病菌 *Metarhizium anisopliae* の桑園土壌からの検出とそのカイコに対する病原性” *日蚕雑* **48** (1) 43-52
- 河上清・島根孝典 (1986) “昆虫病原糸状菌 *Beauveria tenella* を利用したキボシカミキリの微生物除法” *日蚕雑* **55** 227-234
- Kobayashi F.(1985) “Occurrence and control of woodinjuring insect damage in Japanese cedar and cypress plantations” *Z. Ang. Ent.* **99** 94-105
- 小林富士雄 (1986) “スギ・ヒノキの穿孔性害虫” 全国林業改良普及協会、東京 185p
- 小島圭三・中村慎吾 (1986) 日本産カミキリムシ食樹総覧、比婆科学振興会、広島 336p
- 九州地域重要新技術研究成果 No.22 (1993) “地域特産果樹のカミキリムシ類に対する昆虫病原糸状菌による生物的防除法の確立” 鹿児島県果樹試験場、福岡県農業総合試験場、大分県柑橘試験場、沖縄県農業試験場、熊本県農業研究センター
- Latge J.P.・Papkierok B. “Aphids Pathogens” in Minks A.K. and Harrewijn P.(editor) *Aphids* 2B. pp323-335
- Lenteren van J.C. (1996) “天敵の生物農薬的利用をめぐる国際情勢と将来展望” シンポジウム講演要旨 日本植物防疫協会
- Liebman M. (1992) “Research and extension efforts for improving agricultural sustainability in the north central and northern united states” *Agric. Ecosyst. Environ.* **39** (1-2) 101-122
- Lowry O.H.・Rosebrough N.J.・Randall R.J. *J. Biol. Chem.* (1951) 193 265
- Mackenzie D.R. (1991) “Progress in plant disease resistance research” *FAO Plant Prot Bull* **39** (4) 147-154
- (株)三菱化成安全科学研究所編 (1993) “微生物農薬の現状と安全性評価” ; 化学工業日報社発行
- Morgan W.T.J.・Elson L.A.(1934) *Biochem. J.* **28** 988  
cited in Jeuniaux C.:Chitinase.(1966) *Meth. Enzymeol.* **8** 644-650
- 野淵輝 (1989) *森林防疫* **38** 133-138

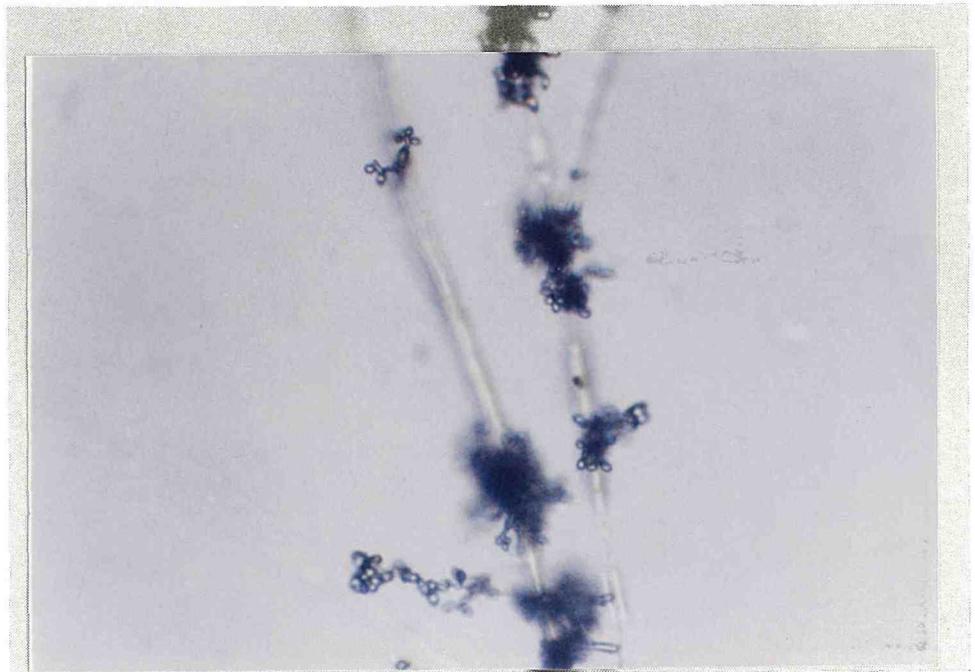
- 農林省蚕糸園芸局 (1969) 桑園害虫発生状況調査成績 技術飼料 **69** 1-73
- 農林省蚕糸園芸局 (1977) 桑園害虫の発生予察に関する調査成績 技術飼料  
**88** 1-24
- 岡田齊夫 (1987) “天敵微生物による害虫の防除” 農業技術 **42** 113-118
- 岡田齊夫 (1994) “生態系に調和した有害生物管理に向けて” 生物農薬の開発・  
利用に関するシンポジウム講演要旨；社団法人日本植物防疫協会 3-9
- 大長光純 (1982) “*Beauveria* 菌によるカミキリムシの殺虫試験” 日林九支研論集  
**35** 153-154
- Paris S. · Ferron P. · Farues J. · Robertt P. (1985) “Physiological characteristics  
and virulence of auxotrophic and morphological mutants of *Beauveria  
brongniartii*(Sacc.)Petch(*Beauveria tenella*) Mycopathologia **91** 109-116
- Payne C.C. (1989) “Microbial control of insect pests: current and potential  
uses” Chemistry and Industry **20** 182-186
- Rajagopalan S · ModakJM (1994) “Heat and mass transfer simulation  
studies for solid-state fermentation processes” Chemical Engineering Science  
**49** (13) 2187-2193
- Roberto M.Pereira · Donald W.Roberts (1991) “ Alginate and cornstarch  
mycelial formulations of entomopathogenic fungi,*Beauveria bassiana* and  
*Metarhizium anisopliae*” Journal of Economic Entomology **84** (6) 1657-1661
- 柴田叡弍(1984) 森林防疫 **33** 30-35
- Shibata E.(1987) Rest. Popul. Ecol. **29** 347-367
- Shibata E. · Higuchi T.(1988) “Application of an entomogenous fungus,  
*Beauveria brongniartii*(Sacc.)Petch for control of the adult Sugi Bark Bore,  
*Semanotus japonicus* Lacordaire” Appl. Ent. Zool. **23** (2) 199-201
- Shibata E. · Higuchi T.(1993) “Fecundity of the adult Sugi Bark Bore,  
*Semanotus japonicus* Lacordaire, infected with an entomogenous fungus,  
*Beauveria brongniartii*(Sacc.)Petch Appl. Ent. Zool. **28** (2) 249-250

- Shibata E. · Yoneda Y. · Higuchi T. · Ichinose H. · Yamada N.(1991)  
 “Control method of the adult Sugi Bark Bore, *Semanotus japonicus* Lacordaire, using the nonwoven fabric sheet with an entomogenous fungus, *Beauveria brongniartii*(Sacc.)Petch in Japanese Cedar, *Cryptomeria Japonica* D.Don stand” Appl. Ent. Zool. **26** (4) 587-590
- 島根孝典・河上清 (1991) “人工飼料によるキボシカミキリの大量類代飼育法”  
 蚕糸昆虫研報 2号 65-112
- 島根孝典・河上清 (1993) “昆虫病原糸状菌 *Beauveria brongniartii* の蚕および  
 マウスに対する安全性について” 日蚕雑 **62** (1) 30-37
- 島根孝典・河上清 (1994) “昆虫病原糸状菌 *Beauveria brongniartii* のキボシ  
 カミキリに対する病原性と菌学的特性” 蚕糸昆虫研報 10号 1-36
- Smith R.J. · Pekerul S. · Grula E.A.(1981) “Requirement for sequential  
 enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm  
 (*Heliothis zea*) J. Invertebr. Pathol. **38** 335-344
- Steinhaus E.A. (1949) “Principles of Insect Pathology McGraw-Hill, New York”
- St.Leger R.J. · Cooper R.M. · Charnley A.K.(1991) “Characterization of  
 chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus  
*Metarhizium anisopliae*” J. Invertebr. Pathol. **58** 415-426
- St.Leger R.J. · Staples R.C. · Roberts D.D.(1993) “Entomopathogenic isolates  
 of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus flavus*  
 produce multiple extra cellular chitinase isozymes.” J. Invertebr. Pathol.  
**61** 81-84
- 杉山隆史・浦野弘幸・永井進・岡本秀 (1987) 31 回応動昆大会講要 154p
- 滝口義夫 (1981) “4種のカミキリムシ成虫に対する *Beauveria tenella* (Delacroix)  
*Siemaszko* の病原性について” 日本応用動物昆虫学会誌 **25** (3) 194-195
- 玉木佳男 (1991) “性フェロモン剤の現状と展望” 農薬春秋 **63** 8-12
- 徳田宏晴・佐藤誠吾・向高祐邦・高橋穰二 (1991) “不織布を担体とした気相  
 生育法による菌体外酵素の固定化” 醸造協会誌 **86** (9) 689-694
- 上田明良・遠田暢男・三橋渡・島津光明・大河内勇・伊藤雅道・佐藤大樹 (1993)  
 第 104 回日林大会講要 230p
- U.S. Environmental Laws.(1988) “The Bureau of National Affairs, Inc.” ;Washington, D.C.

- U.S.EPA(1982) “Pesticide Assessment Guidelines: Subdivision M.” PB83-153965,  
NTIS, Springfield, VA.
- Vey A.・Fargues J. (1977) “Histological and ultrastructural of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* Larvae”  
J. Invertebr. Pathol. **30** 207
- 渡辺仁 (1989) “微生物で害虫を防ぐ” ポピュラーサイエンス 裳華房
- 和歌山県平成8年度病害虫及び技術確認ほ調査成績書 和歌山県植物防疫協会  
p149
- Xue Maojie・Liu Deming・Zhang Hongxun・Qi Hongyan・Lei Zhifang (1992)  
“A pilot process of solid state fermentation from sugar beet pulp for  
the production of microbial protein”  
Journal of Fermentation and Bioengineering **73** (3) 203-205
- 山下優勝 (1980) “イチジクのカミキリムシ類の発生と防除対策” 今月の農薬  
**24** 70-73
- 山下優勝 (1981) “イチジクの安定栽培技術を阻害する害虫とその対策”  
今月の農薬 **25** 315-317
- 横井直人・吉井太門 (1984) “キボシカミキリに対する伐採桑株およびその  
揮発物質の誘因性” 日蚕雑 **53** 363-364
- 横井直人・吉井太門 (1985) “キボシカミキリに対するパラコート処理した  
桑樹の誘因性” 日蚕雑 **54** 525-526
- 吉井幸子 (1991) “昆虫病原糸状菌 *Beauveria brongniartii* によるキボシカミキ  
リの防除” 千葉県蚕業センター研究要報 **10** 46-51
- 米山光郎 (1987) “天敵糸状菌 *Beauveria tenella* に対するキボシカミキリの  
感受性” 山梨県蚕業試験場研究要報 **26** 40-45
- 米山光郎・渡辺常富 (1992) “天敵糸状菌 *Beauveria brongniartii* シート剤の  
キボシカミキリへの防除効果” 山梨県蚕業試験場研究要報 **31** 30-34
- Zacharuk R.Y. (1970a,) “Fine structure of fungus *Metarhizium anisopliae*  
infecting three species of larval elateridae” J. Invertebr. Pathol. **15** 63-80
- Zacharuk R.Y. (1970b,) “Fine structure of fungus *Metarhizium anisopliae*  
infecting three species of larval elateridae” J. Invertebr. Pathol. **15** 81-91
- Zacharuk R.Y. (1970c) “Fine structure of fungus *Metarhizium anisopliae*  
infecting three species of larval elateridae” J. Invertebr. Pathol. **15** 372-396



a. 電子顕微鏡



b. 光学顕微鏡

写真 1 - 1 感染したキボシカミキリから分離した *B. brongniartii*

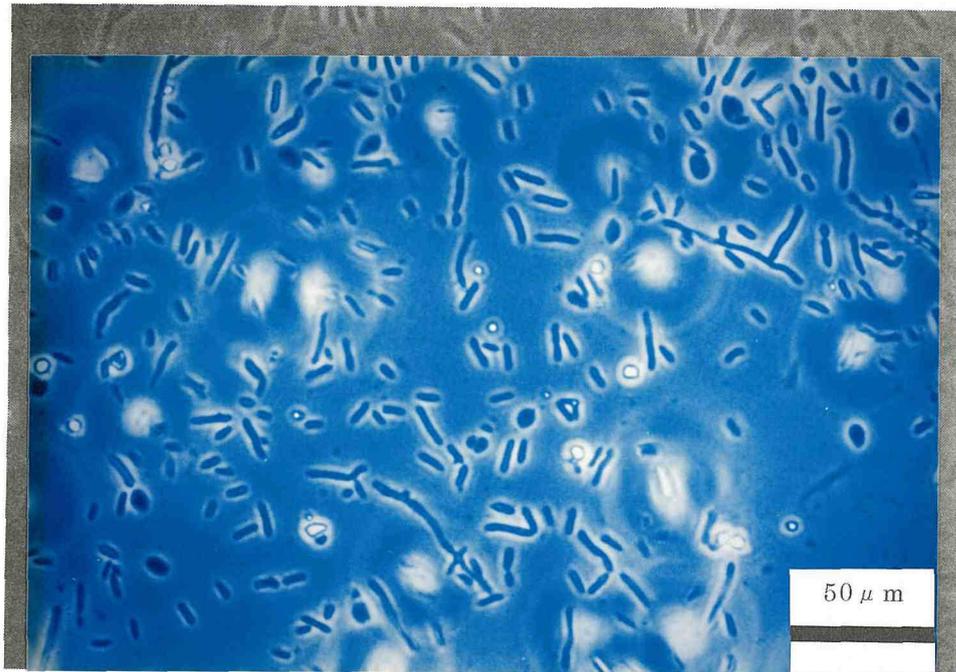


写真 1 - 2 液体培養中に短菌糸で増殖する *B. brongniartii*

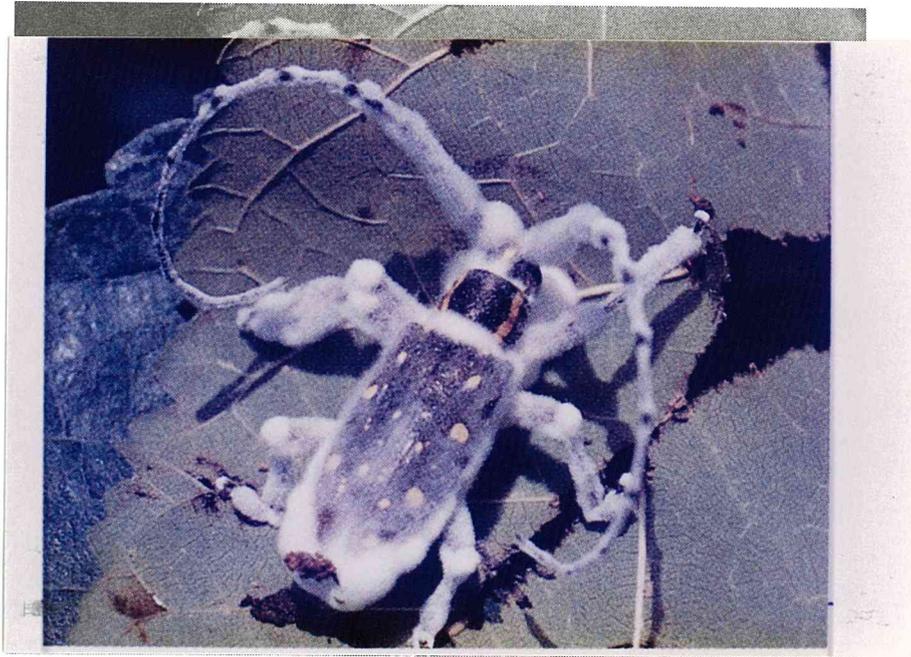


写真 1 - 3 *B. brongniartii* に感染死したキボシカミキリ



写真 1 - 4 *B. brongniartii* を培養したシート状のウレタン発泡体

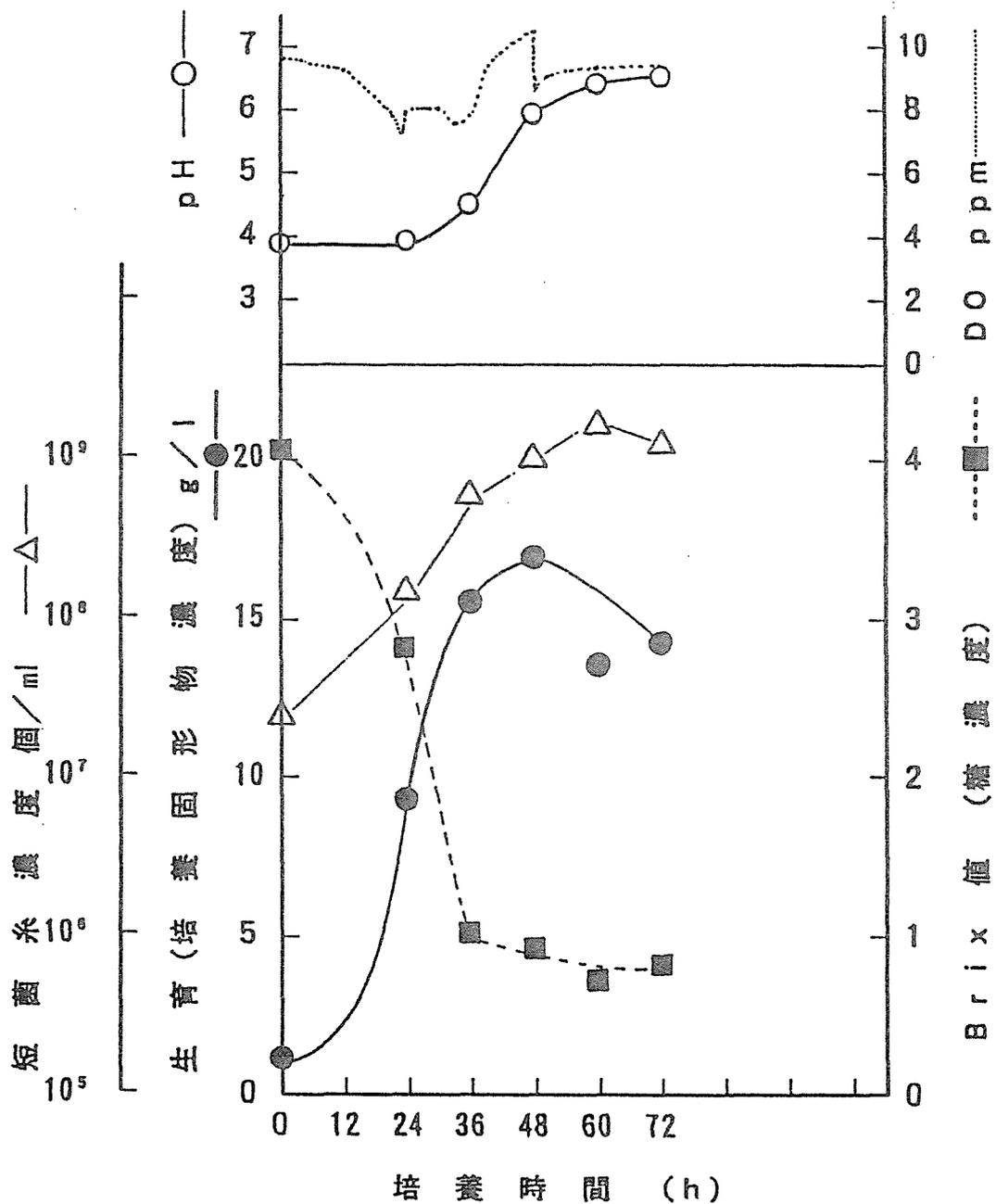


写真 2 - 1 製剤『バイオリサ・カミキリ』



写真4-1 柑橘園に枝かけ処理された  
製剤『バイオリサ・カミキリ』

樹幹中央に見える孔が  
ゴマダラカミキリ成虫の脱出孔



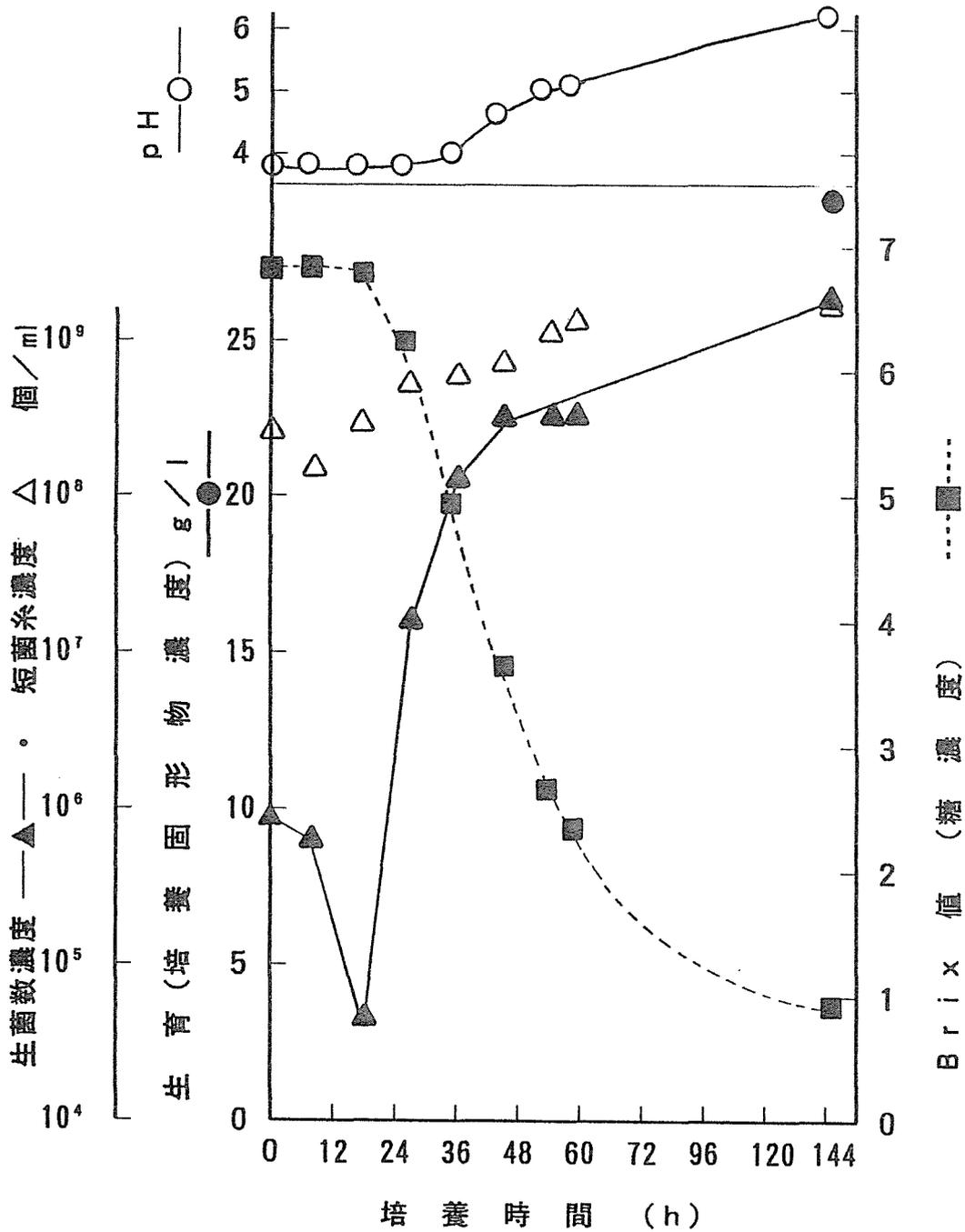
30L ジャー

培地；グルコース20g/l, コーンステープリカー40g/l

シリコンオイル、全量15 l

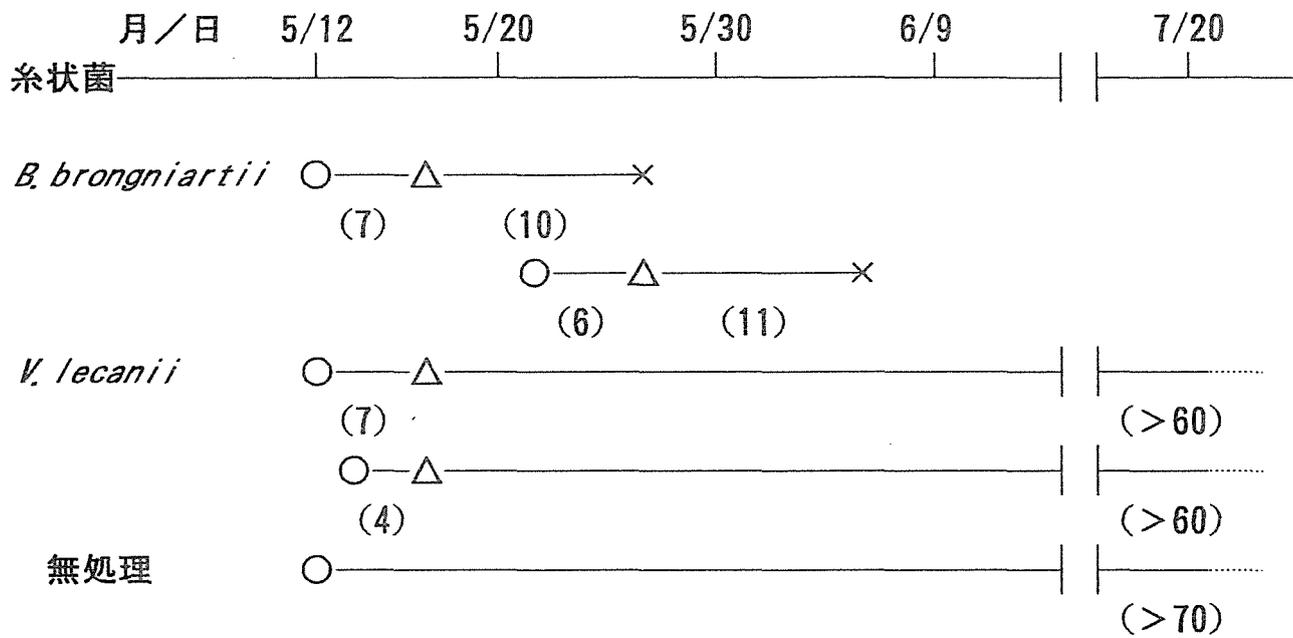
攪拌数；400rpm 通気量；1/2vvm 槽内圧；0.5kg/cm<sup>2</sup> 温度；25℃

図 1 - 1 *B. brongniartii* の培養



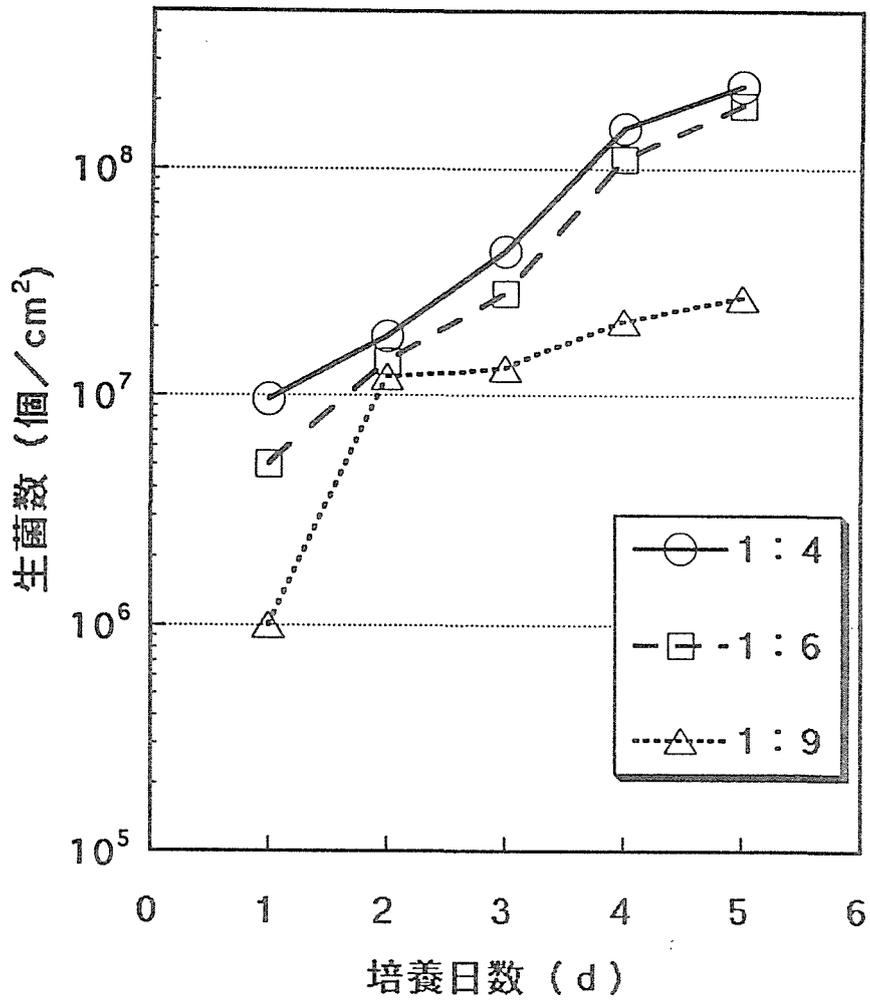
1 L ひだ付きフラスコ  
 培地：グルコース60g/l, コーンステープリカー40g/l  
 シリコンオイル3g/lの滅菌した培地 400mlに、*B. brongniartii*  
 の培養液 100mlを加え、更に、再滅菌した培地 全量 500ml  
 攪拌数：100rpm 温度：25℃

図 1 - 2 糖高濃度培地での *B. brongniartii* の培養



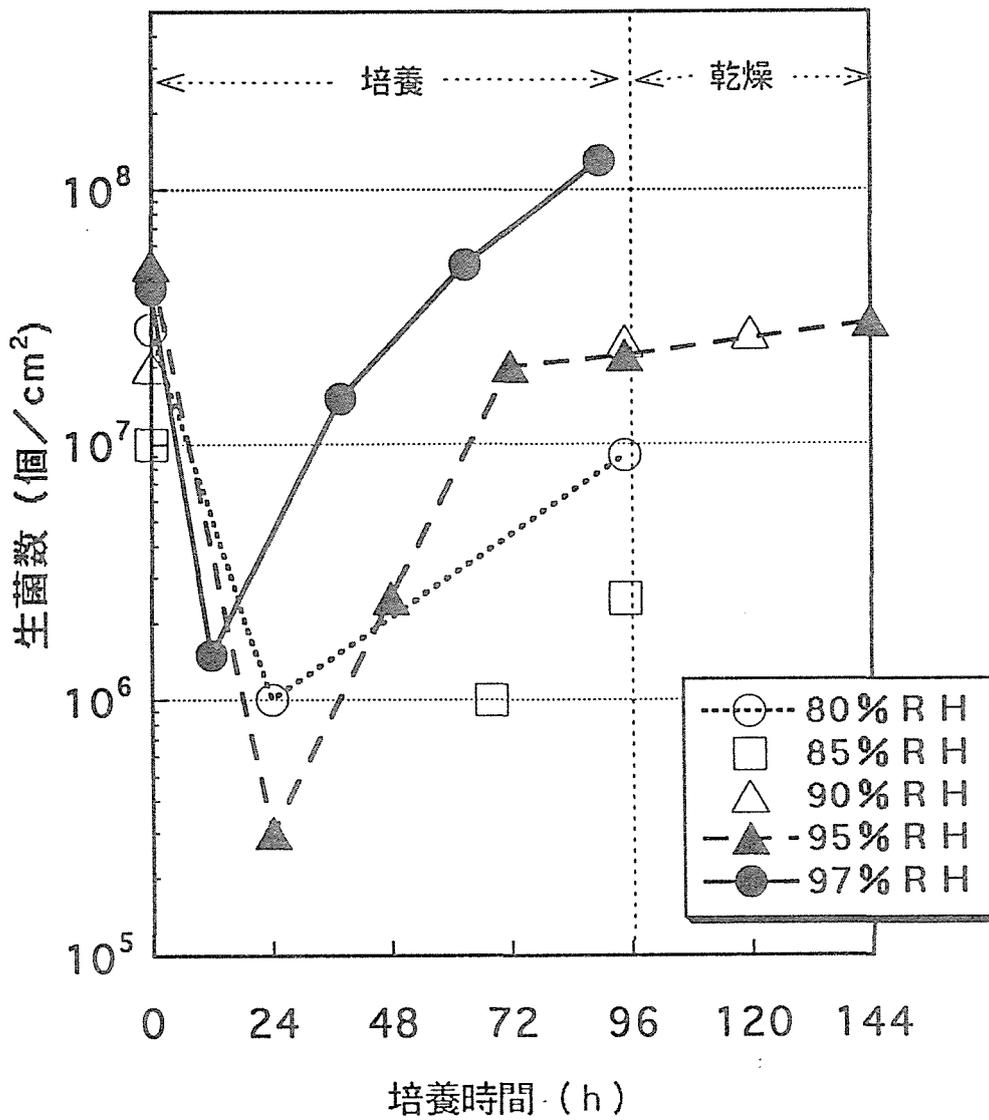
○ ; 羽化日    △ ; 発泡体との接触    × ; 死亡日  
 ( )内は、その区間の日数

図 1 - 3 キボシカミキリ成虫に対する *B. brongniartii* 培養発泡体の感染効果



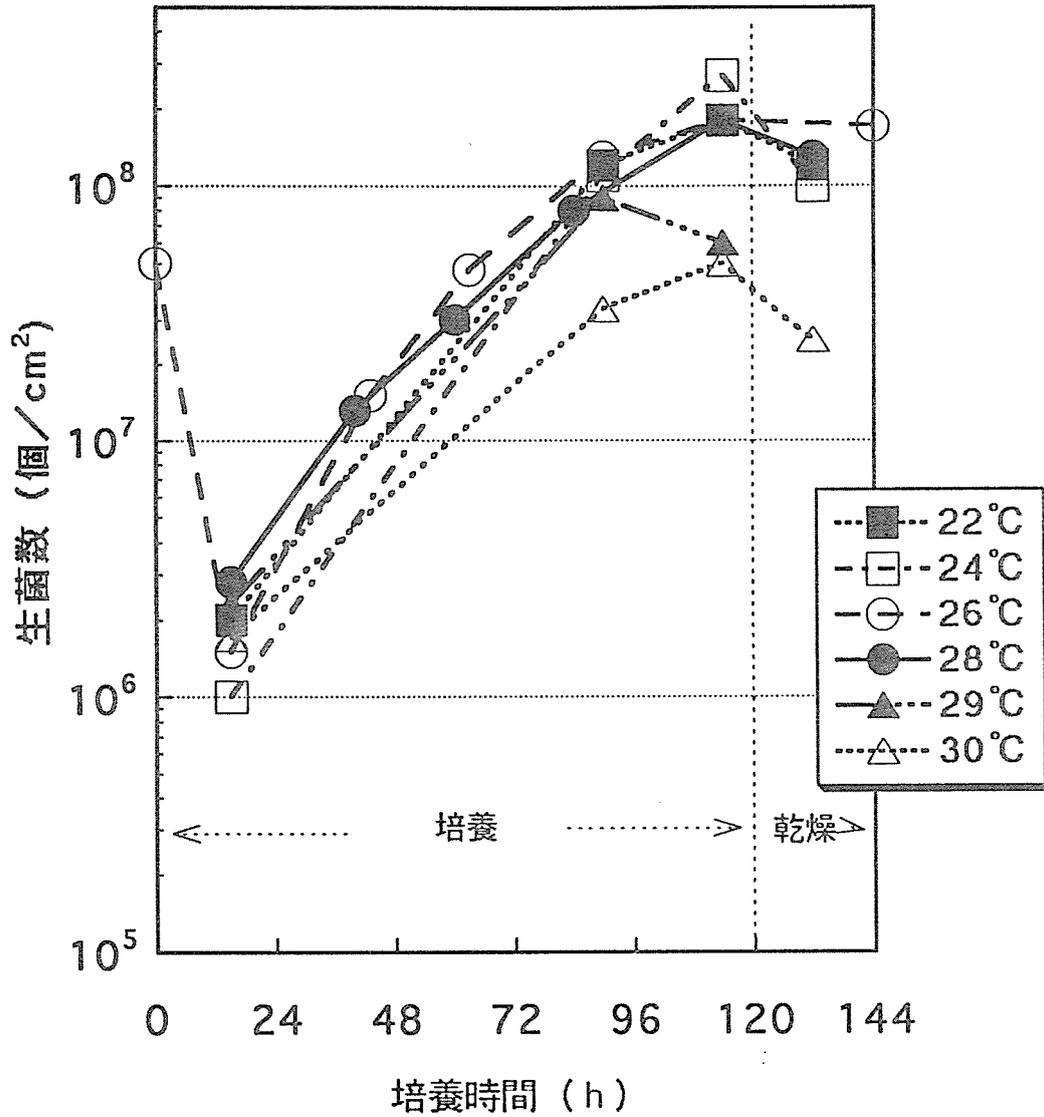
混合比 ; 前培養液 : CSL培地 [ Glu;60g/l+CSL;40g/l ]

図 1 - 4 不織布培養における培地混合比の検討



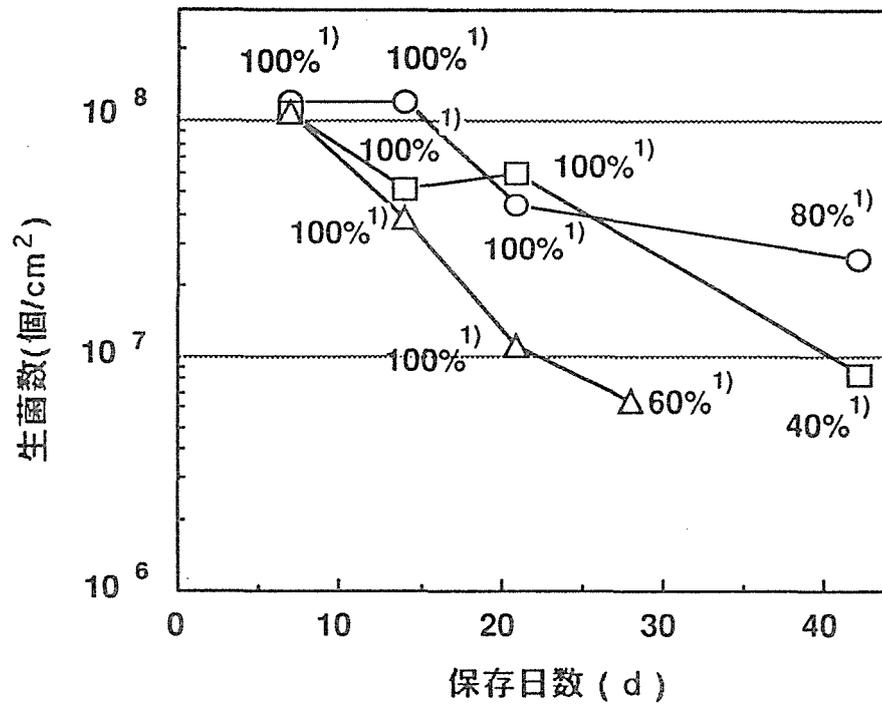
人工気象器内での培養 (25°C)

図 1 - 5 不織布培養における培養湿度の検討



人工気象器内での培養 (97~99% R H)

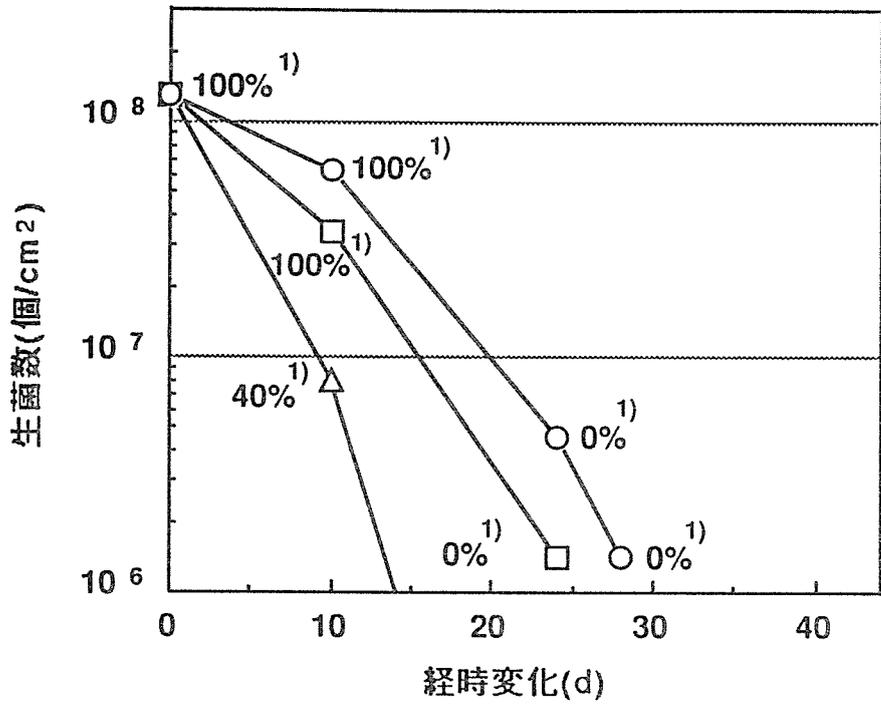
図 1 - 6 不織布培養における培養温度の検討



製剤の保存温度；○:35°C,□:37°C,△:39°C

1) 感染致死率 (n=5)

図 2 - 1 製剤保存における温度による生菌数の経時変化とキボシカミキリの殺虫力に及ぼす影響 (1)



製剤の保存温度○:39°C,□:41°C,△:43°C

1) 感染致死率(n=5)

図 2 - 2 製剤保存における温度による生菌数の経時変化とキボシカミキリの殺虫力に及ぼす影響 (2)

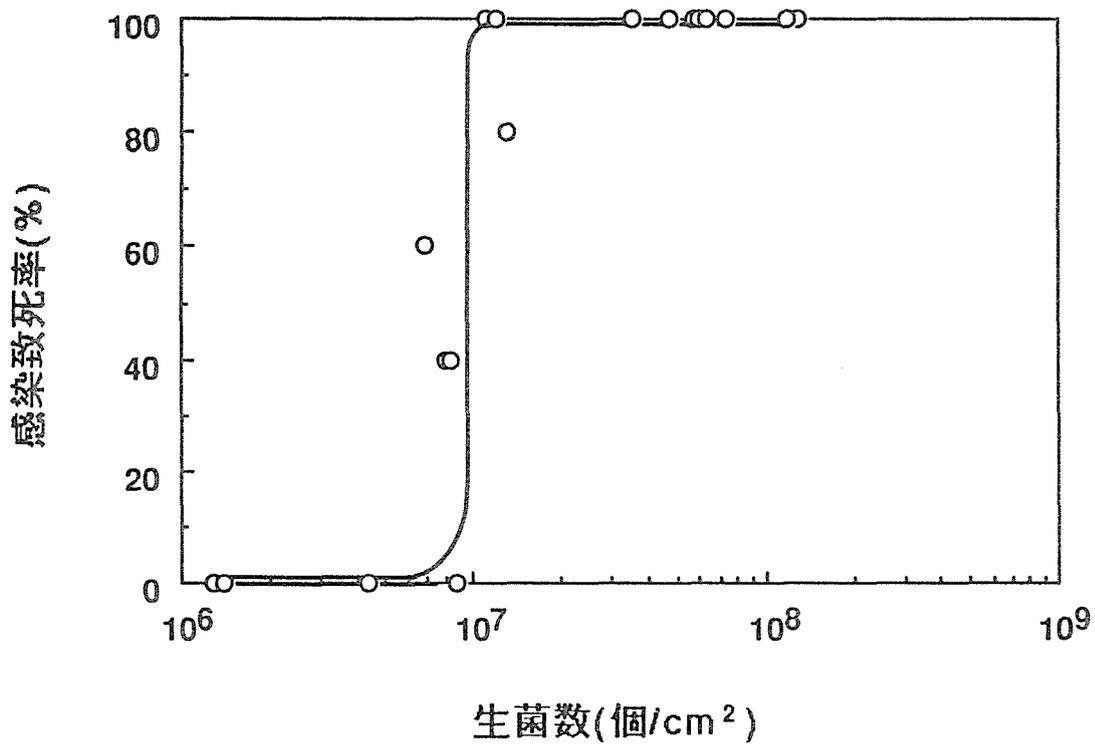
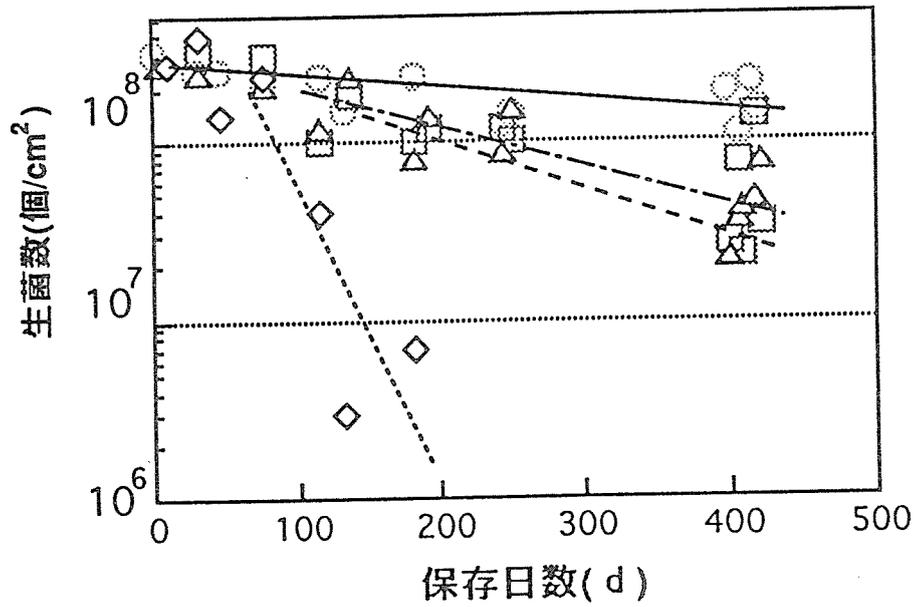


図 2 - 3 製剤における生菌数のキボシカミキリの感染致死率の関係



保存温度； ○ : 5°C   □ : 10°C   △ : 15°C   ◇ : 20°C

図 2 - 4 製剤の保存温度による生菌数の経時変化 (1)

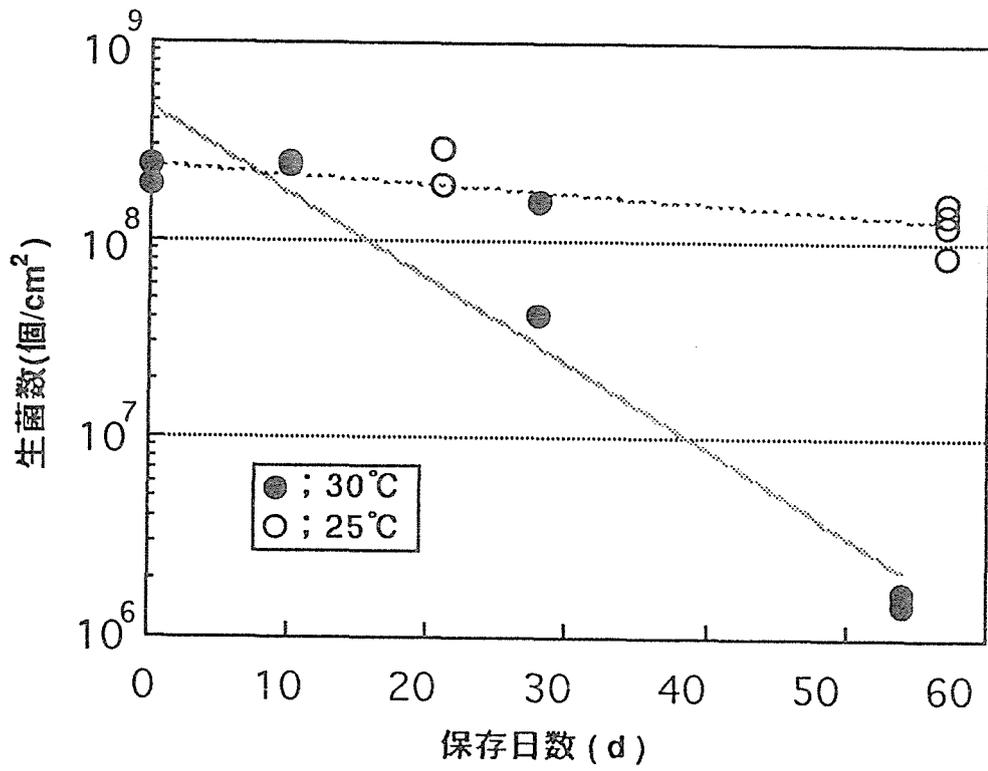
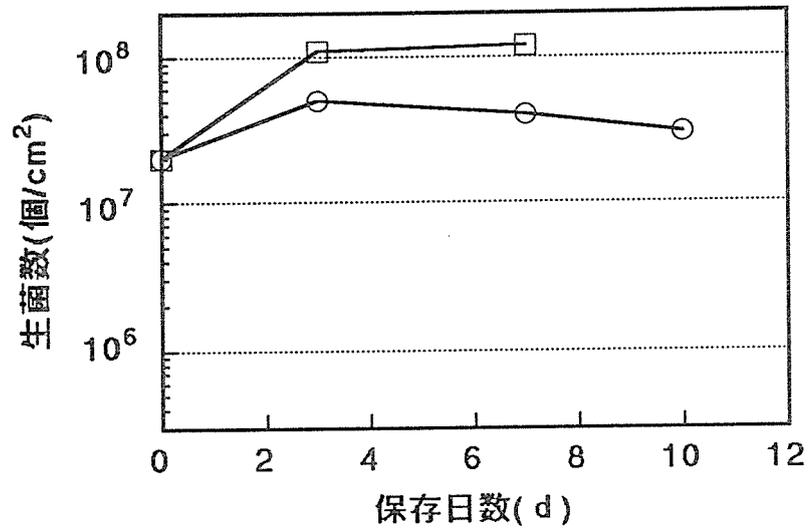


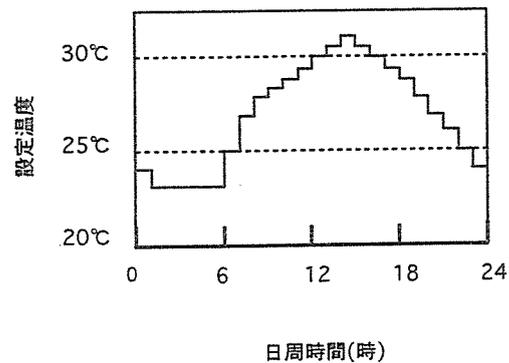
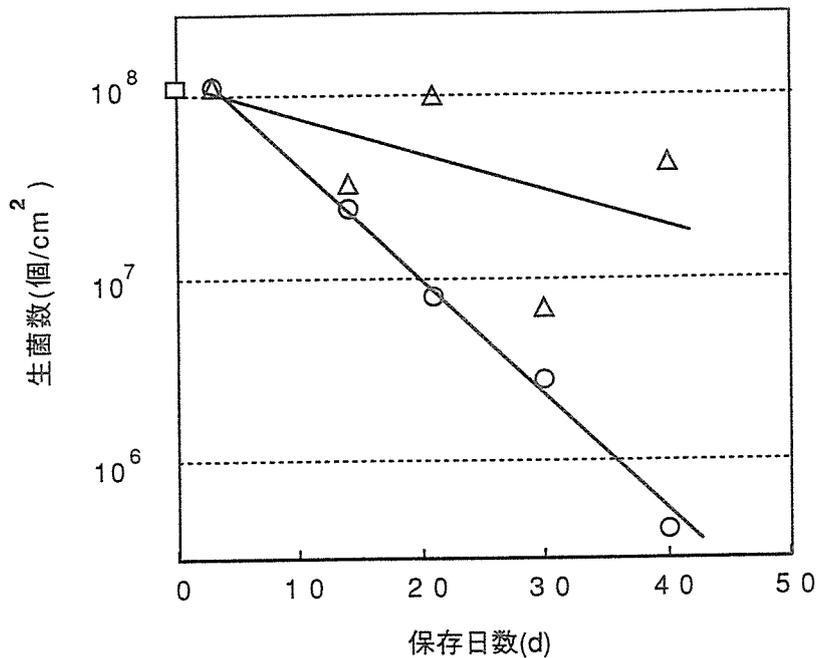
図 2 - 5 製剤の保存温度による生菌数の経時変化 (2)



吸水後の製剤を25°Cで保存

—○— ; 水道水    —□— ; 培地液

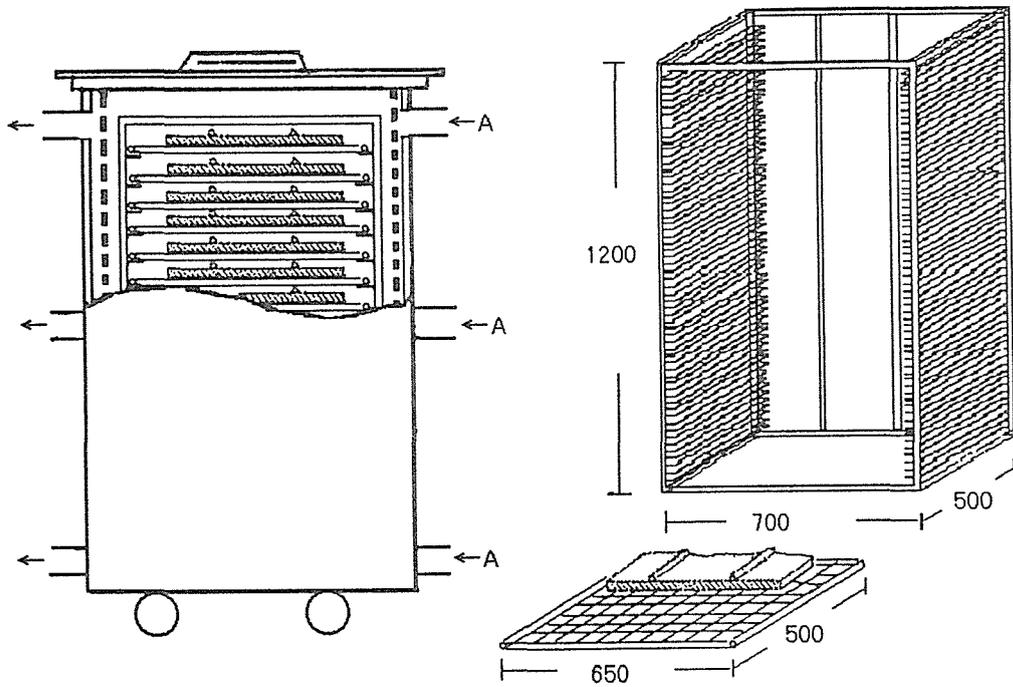
図 2 - 6 培地または水道水補給後の製剤の生菌数の変化



日周変化をさせた人工気象器の温度

- : 最初に水に浸した後は乾燥した製剤
- △: 最初と、その後3日目、14日目、21日目、30日目にも水に浸して、乾燥と湿潤の状態を繰り返した製剤
- : 最初に水に浸して容器に密閉し、湿潤状態のままの製剤  
保存3日目で生菌数は検出限界以下であった

図 2 - 7 温度変化する人工気象器内に保存した製剤の生菌数の経時変化



- 左図；棚段を入れて培養する角槽／無菌エア－は、両面の多孔隔壁（径 5mm 穴のあるパンチングパネル）を通過して槽内通過
- 右図上；網棚（60 段を入れる棚段）
- 右図下；不織布を乗せる網棚

図 3 - 1 多段式培養装置

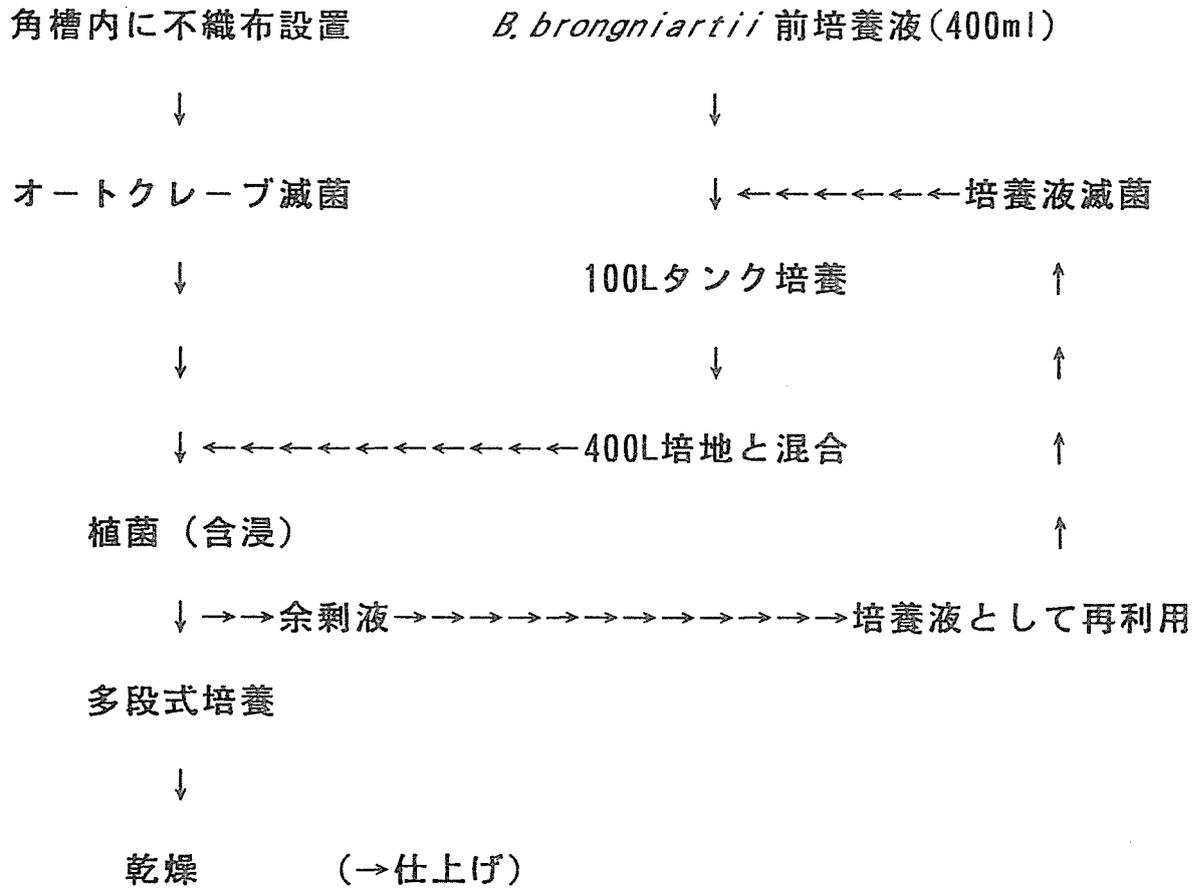
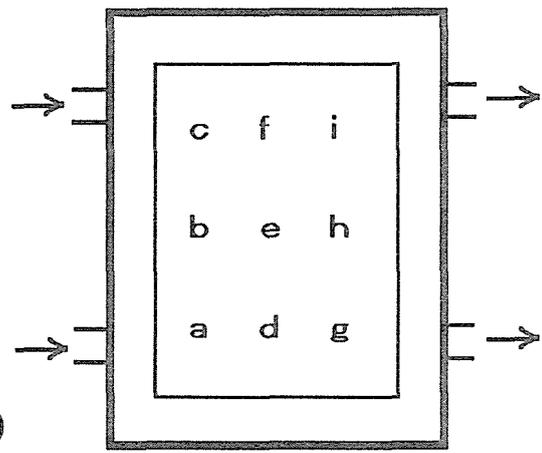
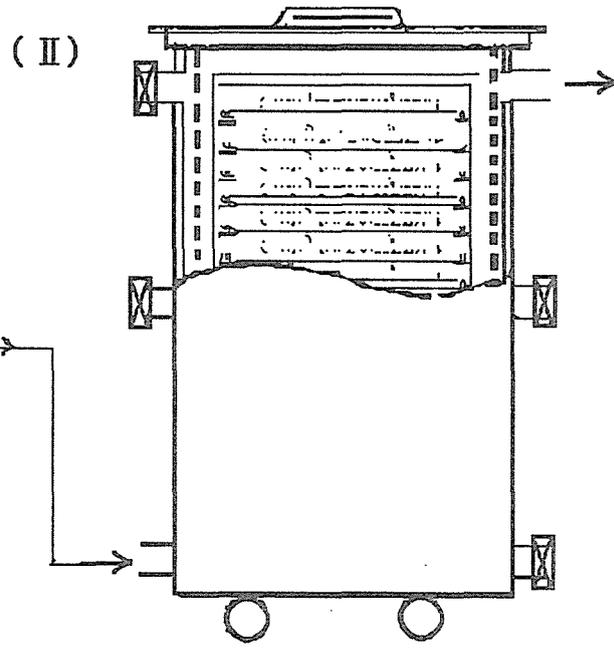


図 3 - 2 *B. brongniartii* 培養製剤の製造方法

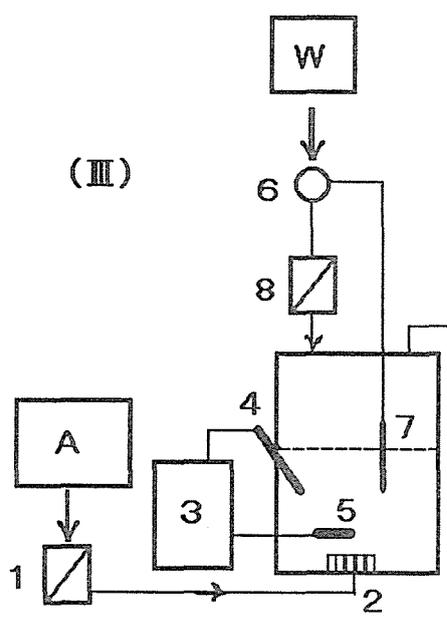
- A: エアコンプレッサー
- W: 水供給タンク
- 1: エアフィルター
- 2: スパージャー
- 3: 温度コントローラー
- 4: 温度計
- 5: ヒーター
- 6: 水供給弁
- 7: レベルセンサー
- 8: 超純水濾過膜(UF膜)



(I)



(II)



(III)

a~i; 不織布を上から見た時の位置の指定

図 3 - 3 無菌エアーの加湿装置を連結させた培養装置

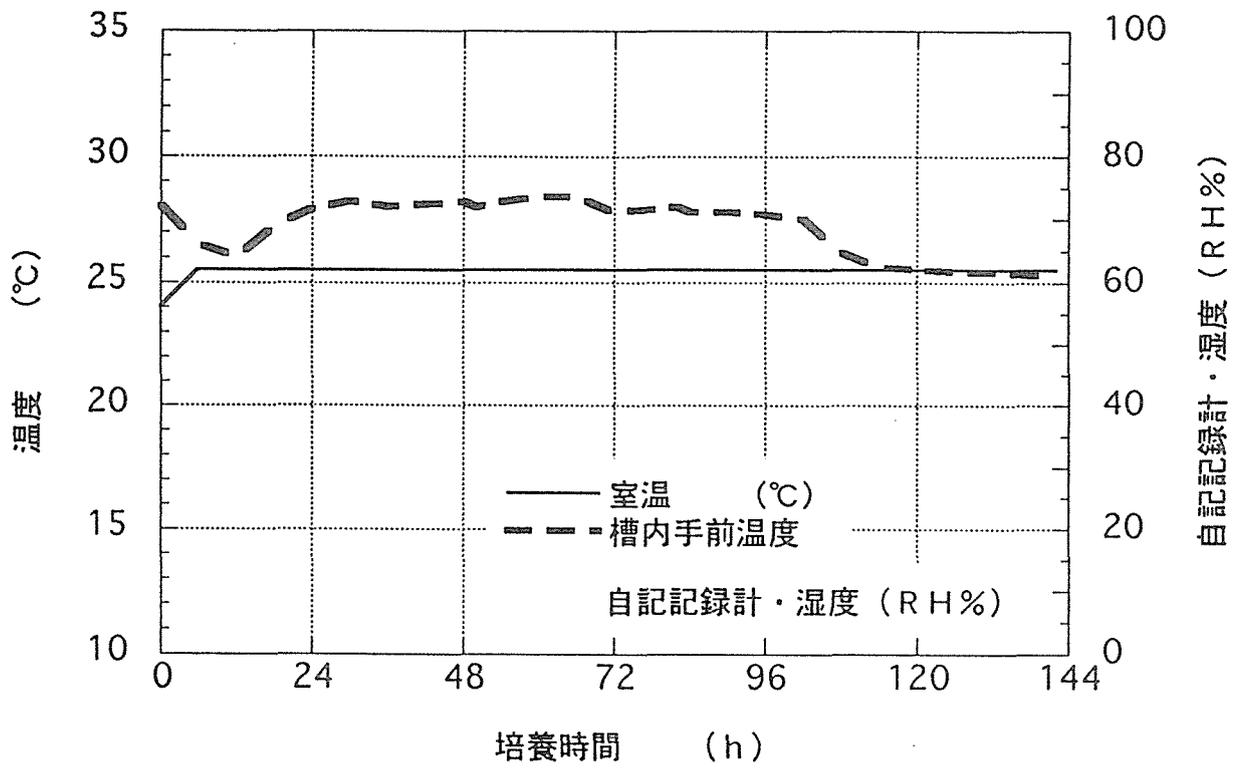


図 3 - 4 半密閉型多段式培養による温度変化

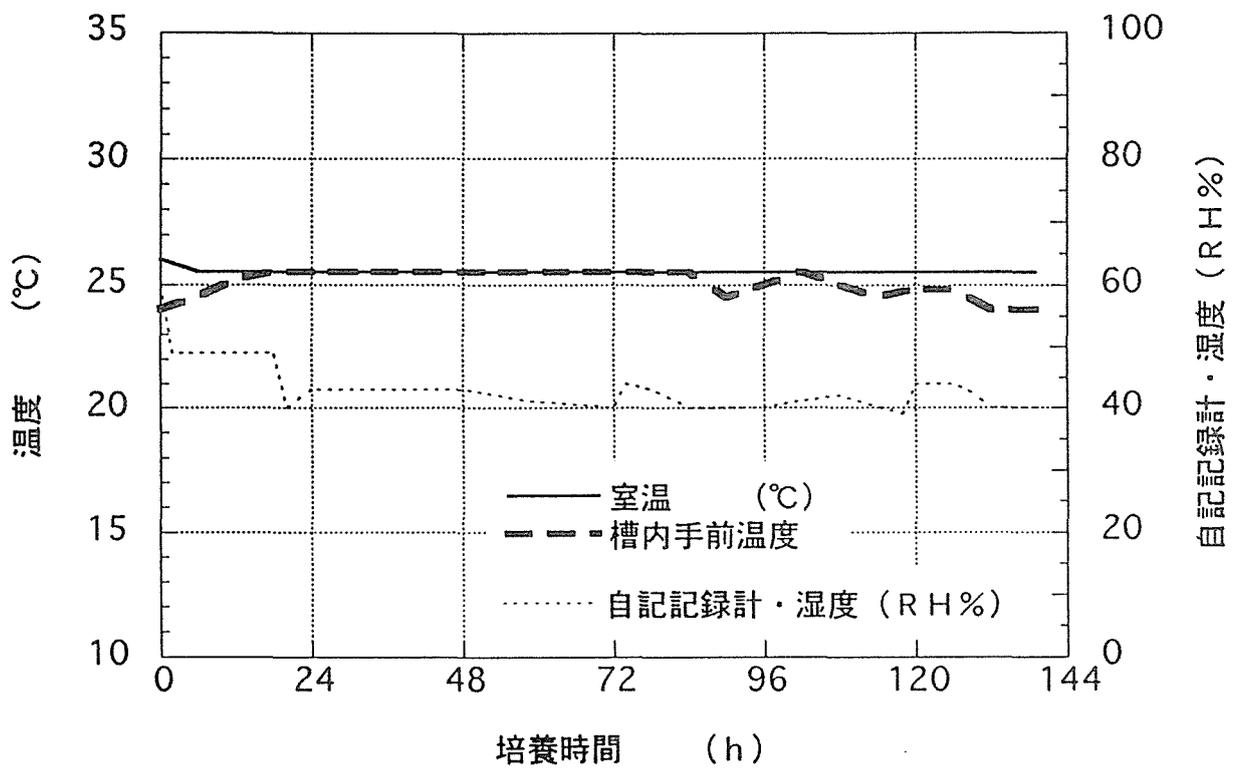


図 3 - 5 多段式培養装置による培養

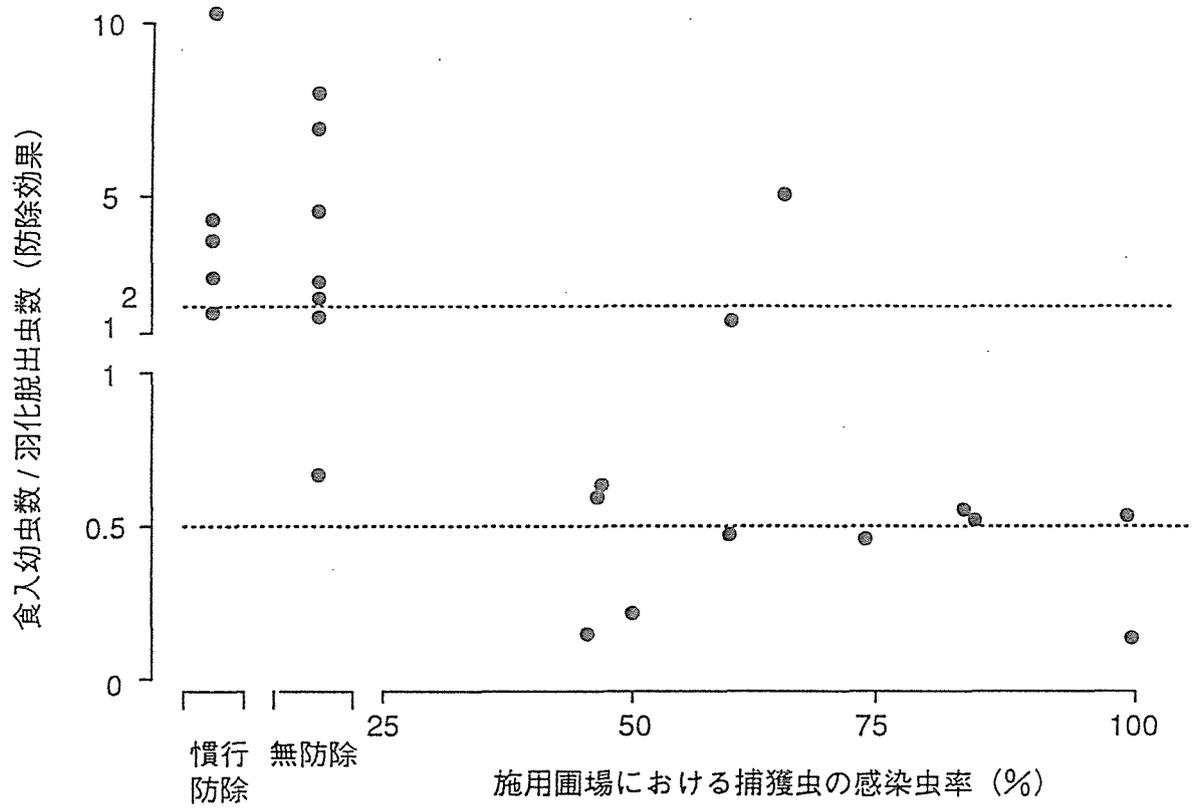
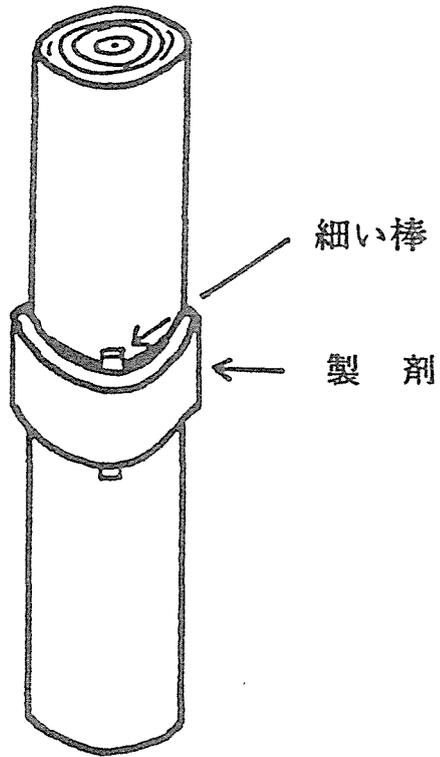


図 4 - 1 *B. brongniartii* 製剤施用圃場におけるコマダラカミキリ成虫の感染死虫率と防除効果



— 製剤と丸太の間に細い棒を 2本差込み隙間を作った —

図 4 - 2 丸太中央部に巻き付けた *B. brongniartii* 培養製剤

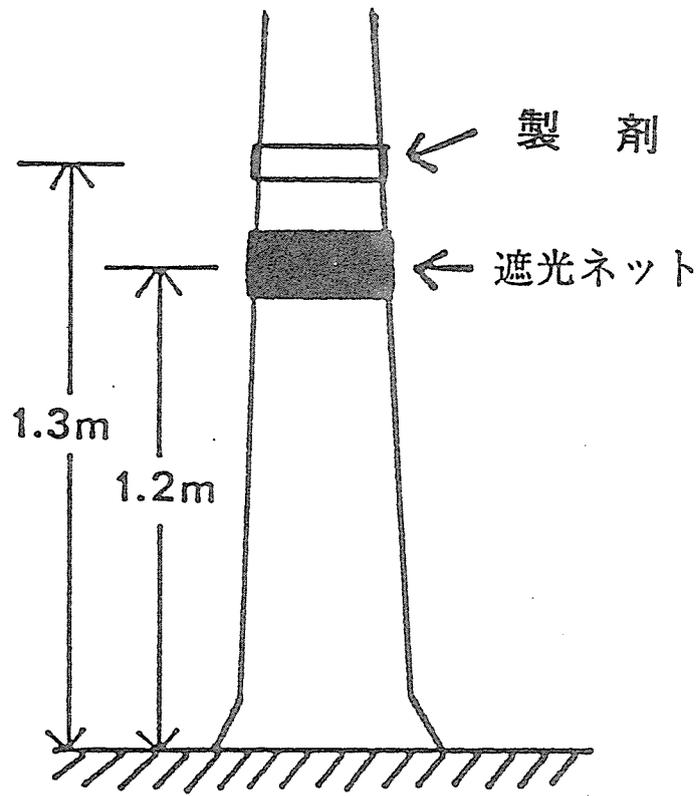


図 4 - 3 スギの樹幹に巻き付けた製剤と遮光ネット

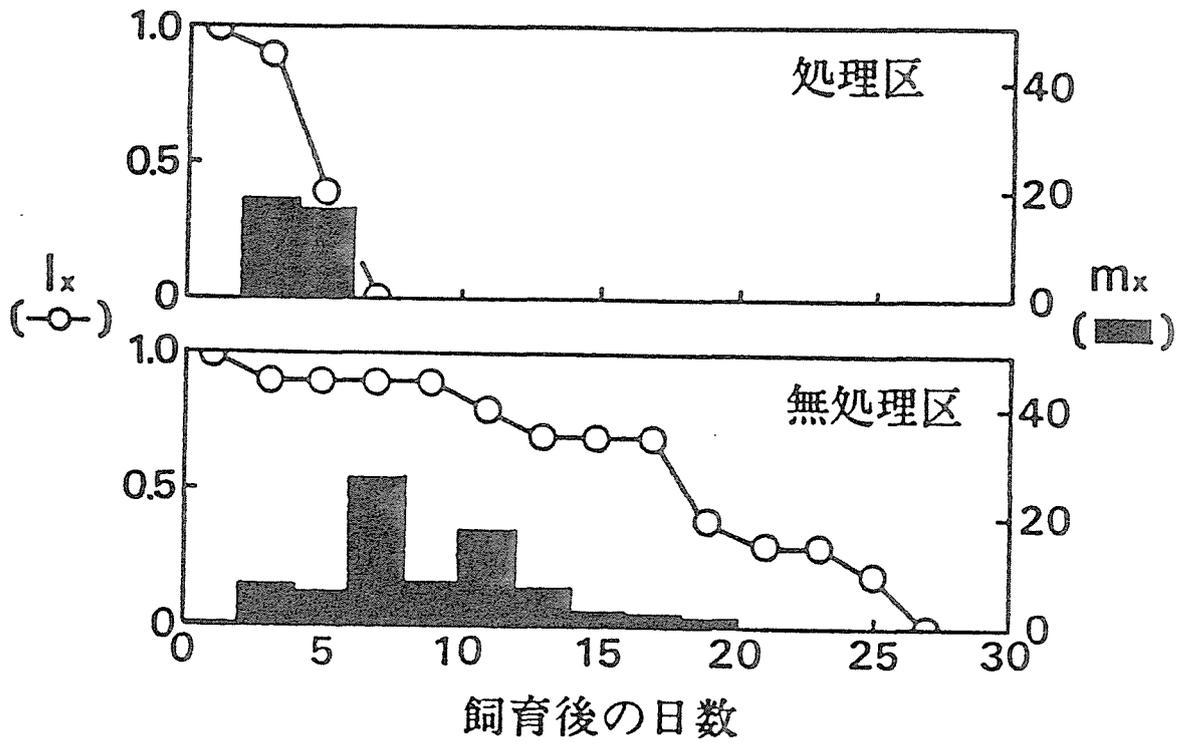
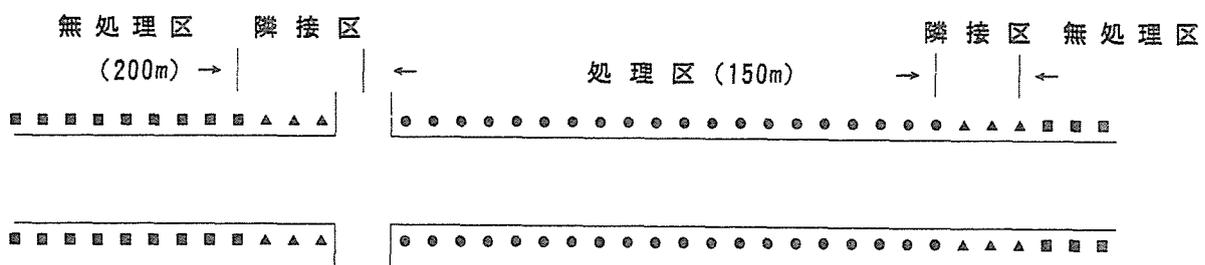


図 4 - 4 飼育成虫の生存曲線 ( $l_x$ ) と産卵曲線 ( $m_x$ )



大阪府道19号線（茨木－寝屋川線）  
 府道の沿道にプラタナスが並ぶ、シンボルは、それぞれの区の木立ち1本を示す

図4-5 街路樹（プラタナス）での *B. brongniartii* 製剤処理試験

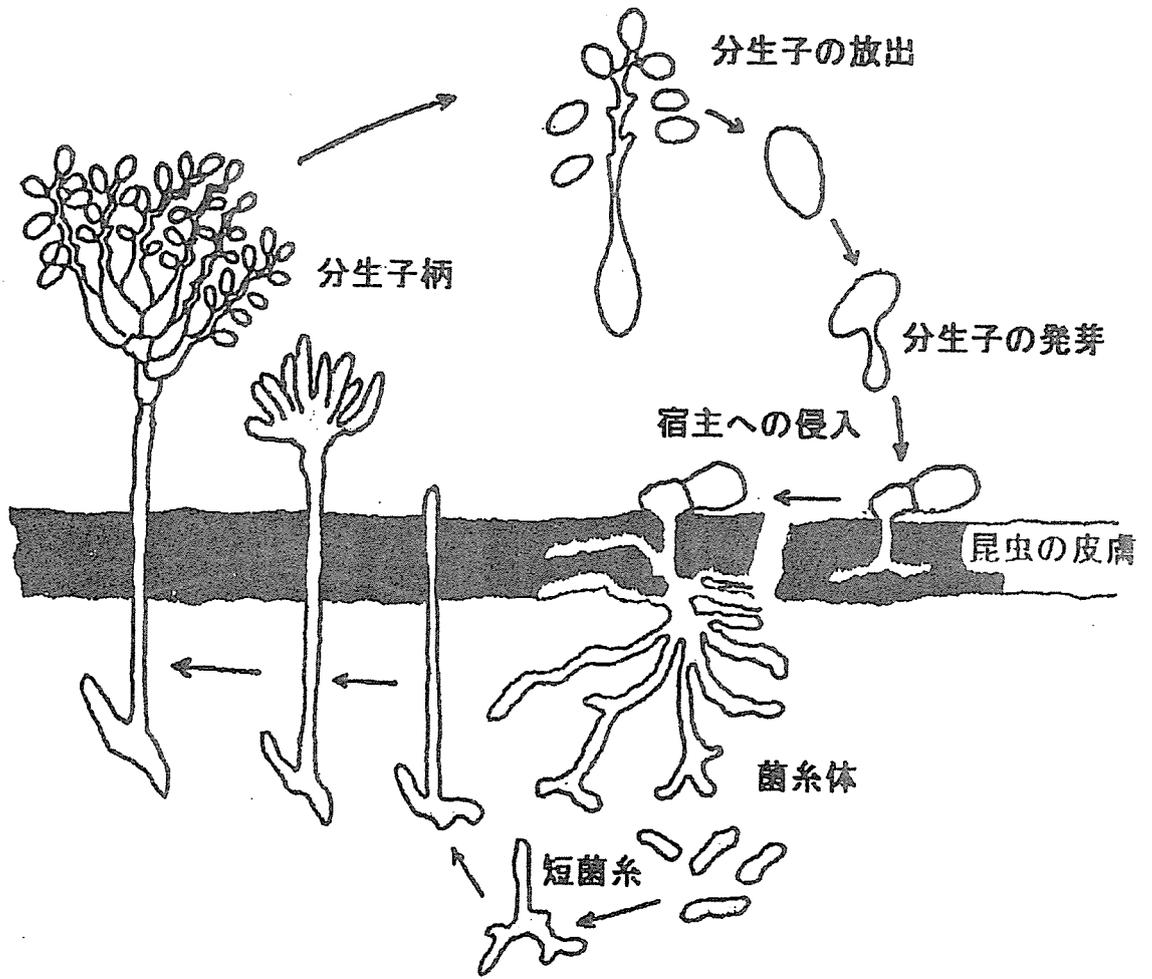


図 5 - 1 昆虫病原糸状菌の生活環（感染機構）

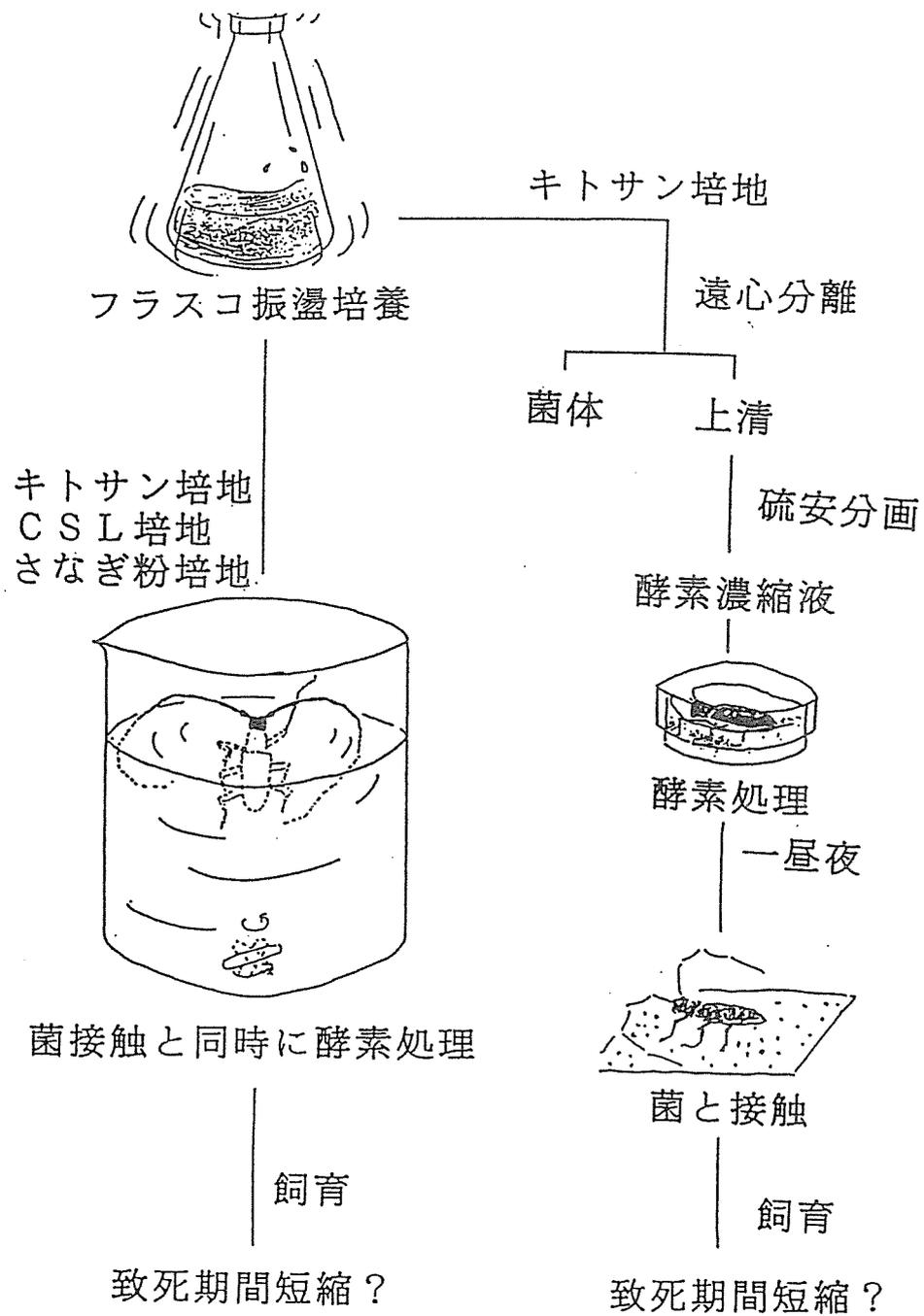
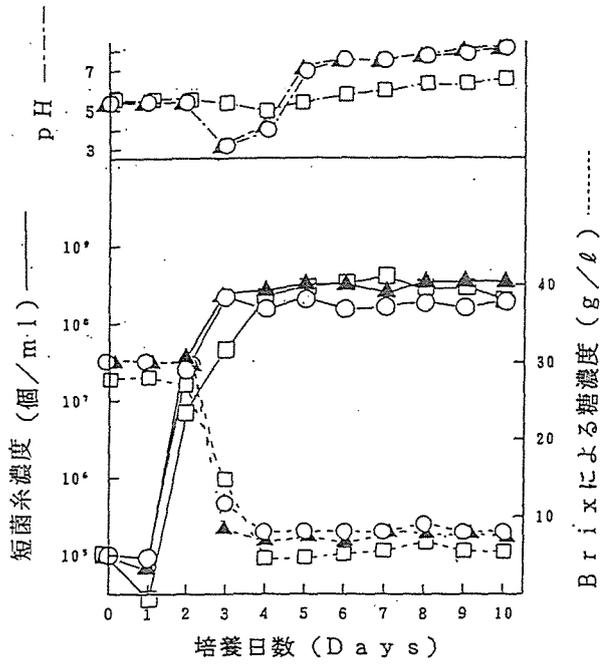
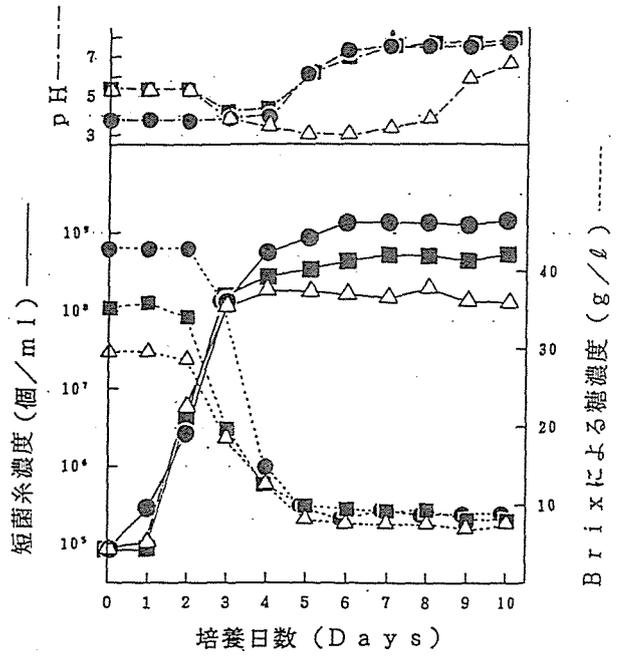


図 5 - 2 虫体酵素処理実験

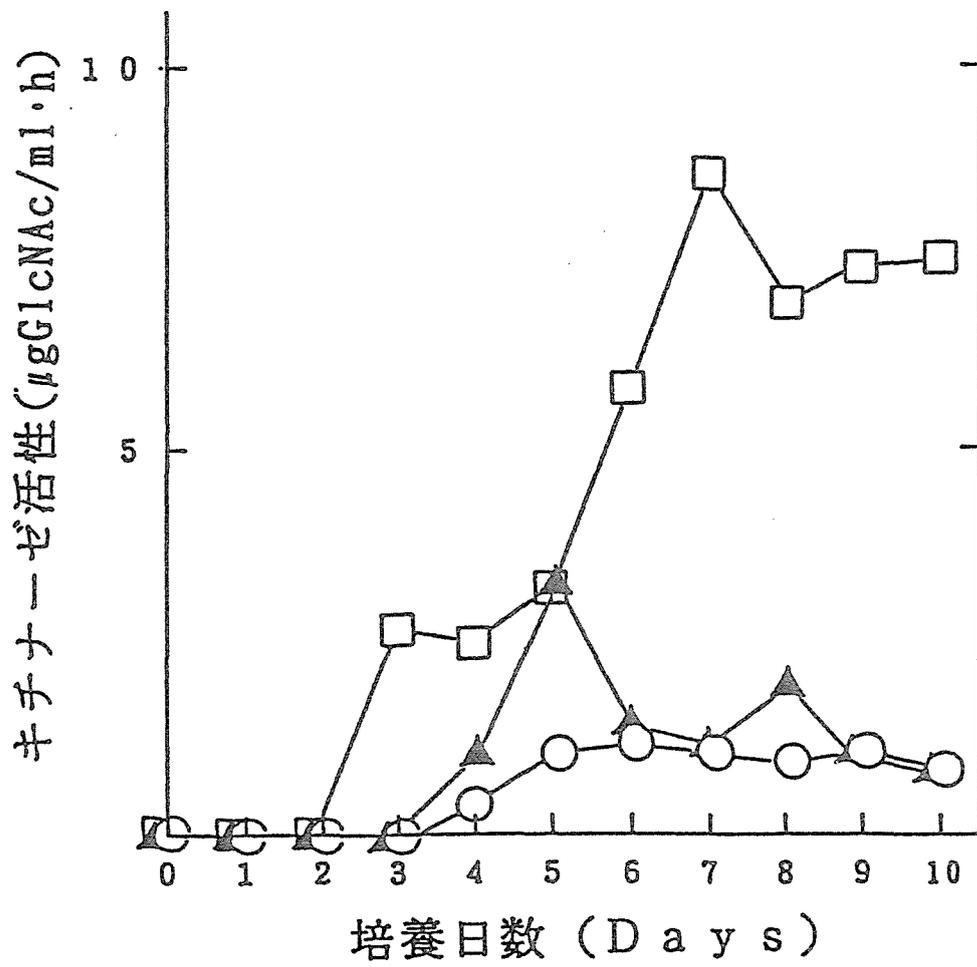


- : カミキリムシ培地
- ▲ : コガネムシ培地
- : キトサン培地



- : CSL培地
- : ペプトン培地
- △ : グルコース培地

図5-3 培地による *B. brongniartii* 生育に対する影響



- : カミキリムシ培地
- ▲ : コガネムシ培地
- : キトサン培地

図 5 - 4 *B. brongniartii* 培養液中のキチナーゼ活性に対する培地の影響 (1)

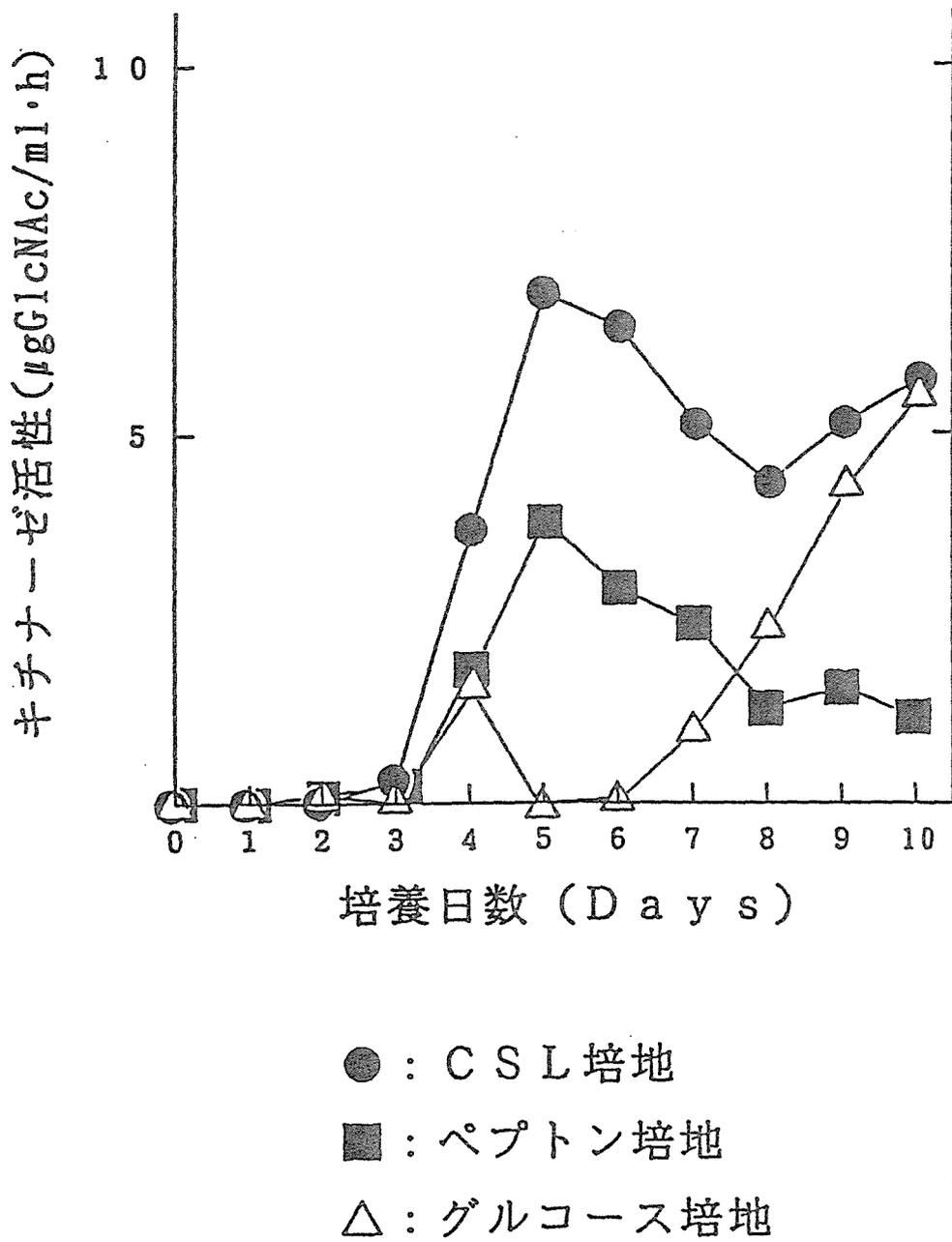
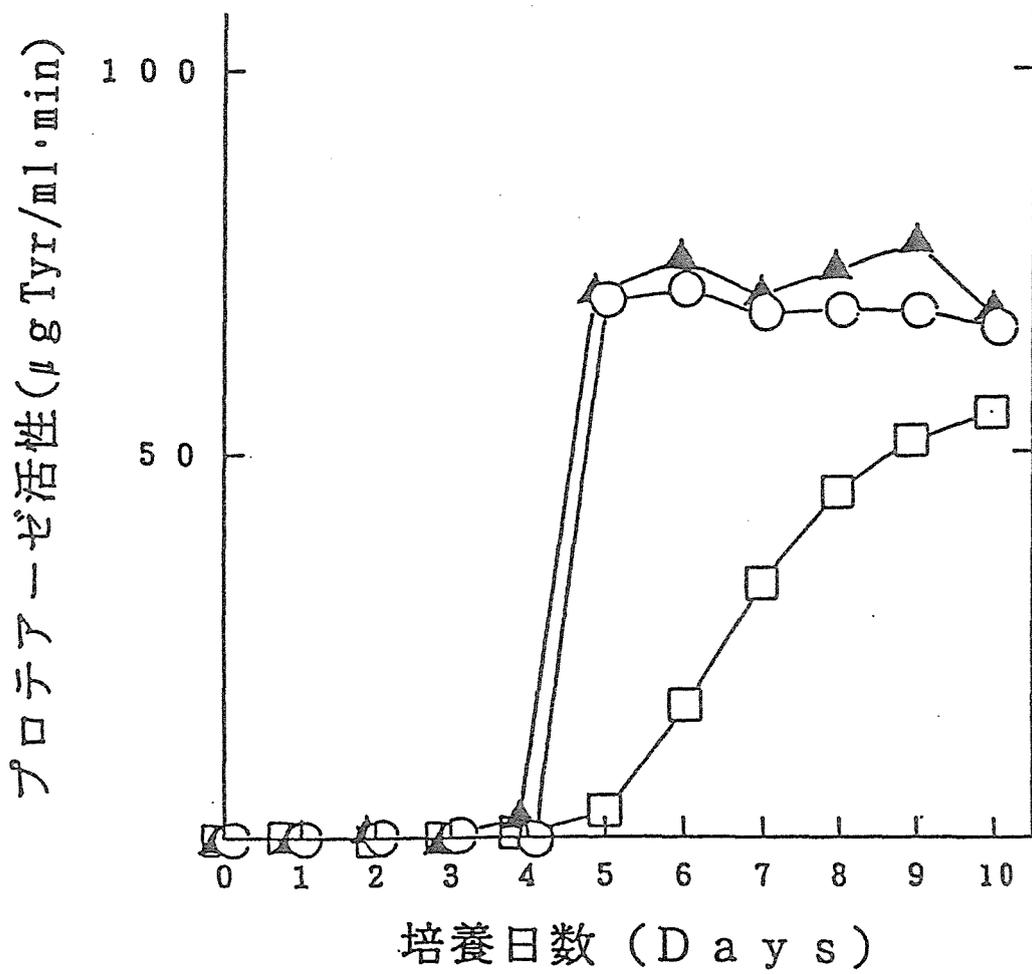


図 5 - 5 *B. brongniartii* 培養液中のキチナーゼ活性  
 に対する培地の影響 (2)



- : カミキリムシ培地
- ▲ : コガネムシ培地
- : キトサン培地

図 5 - 6 *B. brongniartii* 培養液中のプロテアーゼ活性に対する培地の影響 (1)

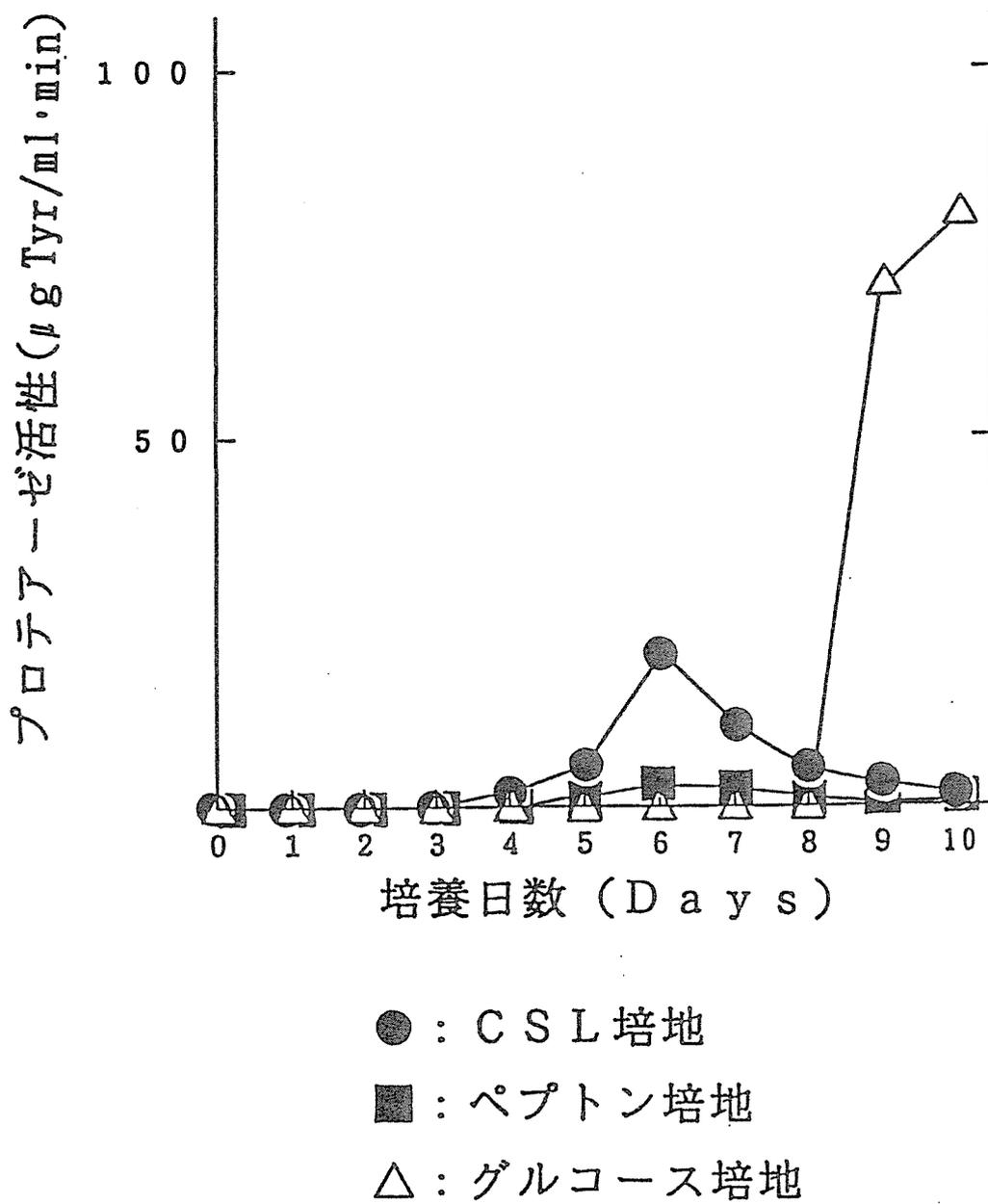
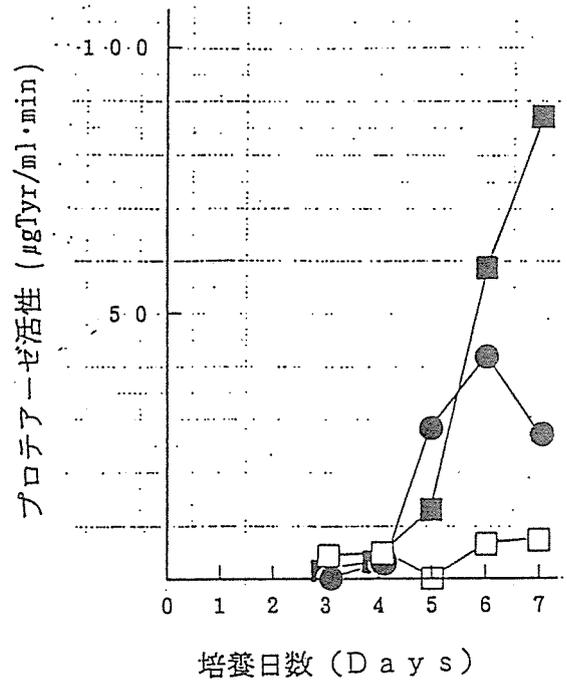
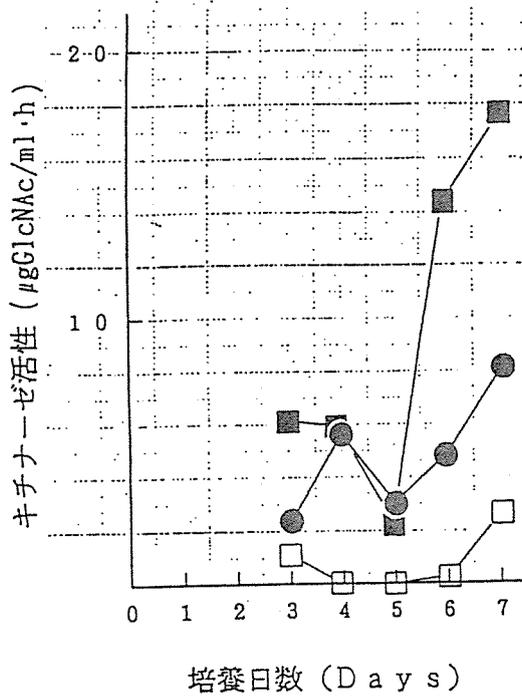
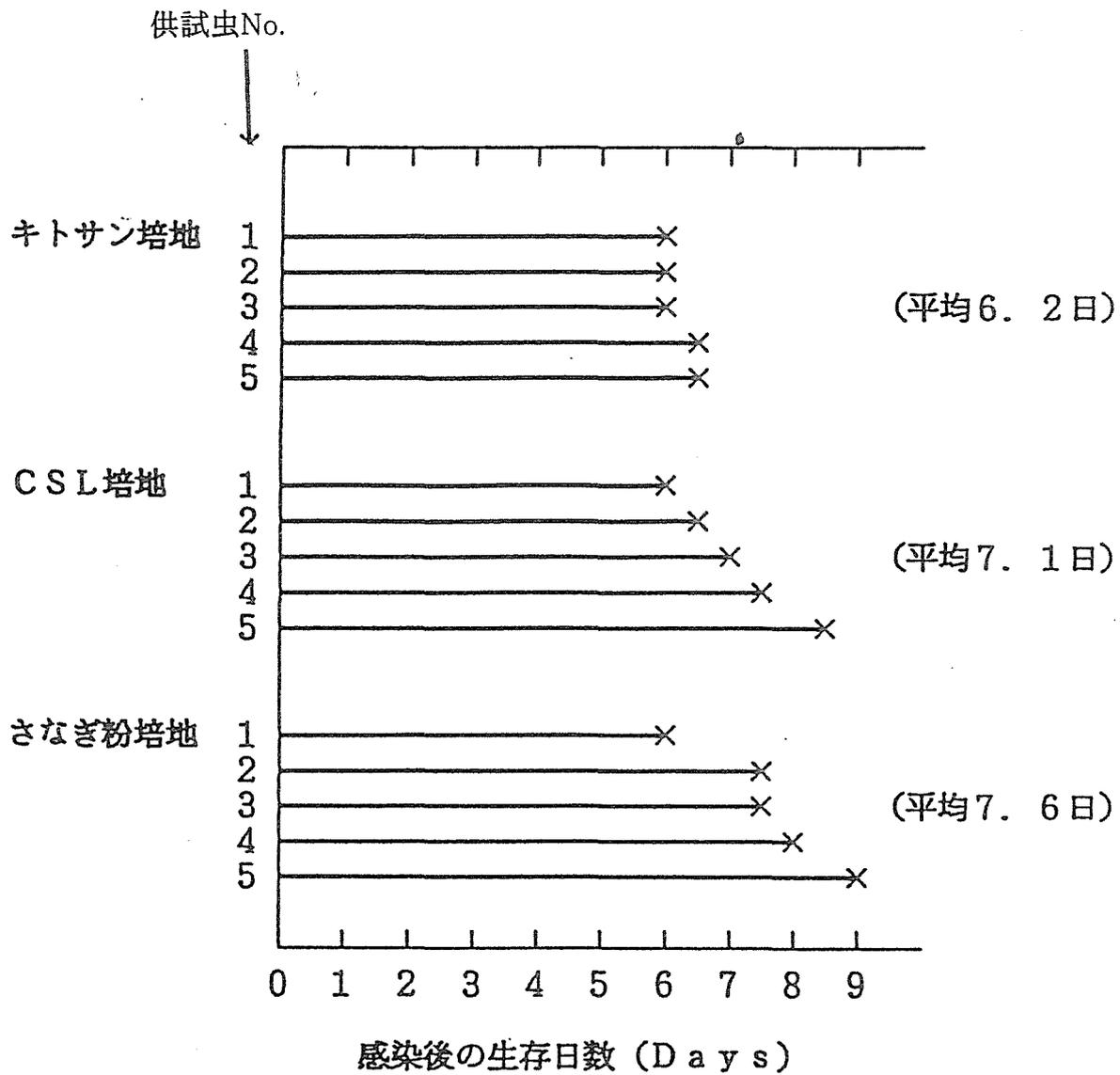


図 5 - 7 *B. brongniartii* 培養液中のプロテアーゼ活性  
 に対する培地の影響 (2)



- : キトサン培地
- : CSL培地 (新製剤用培地)
- : さなぎ粉培地 (旧製剤用培地)

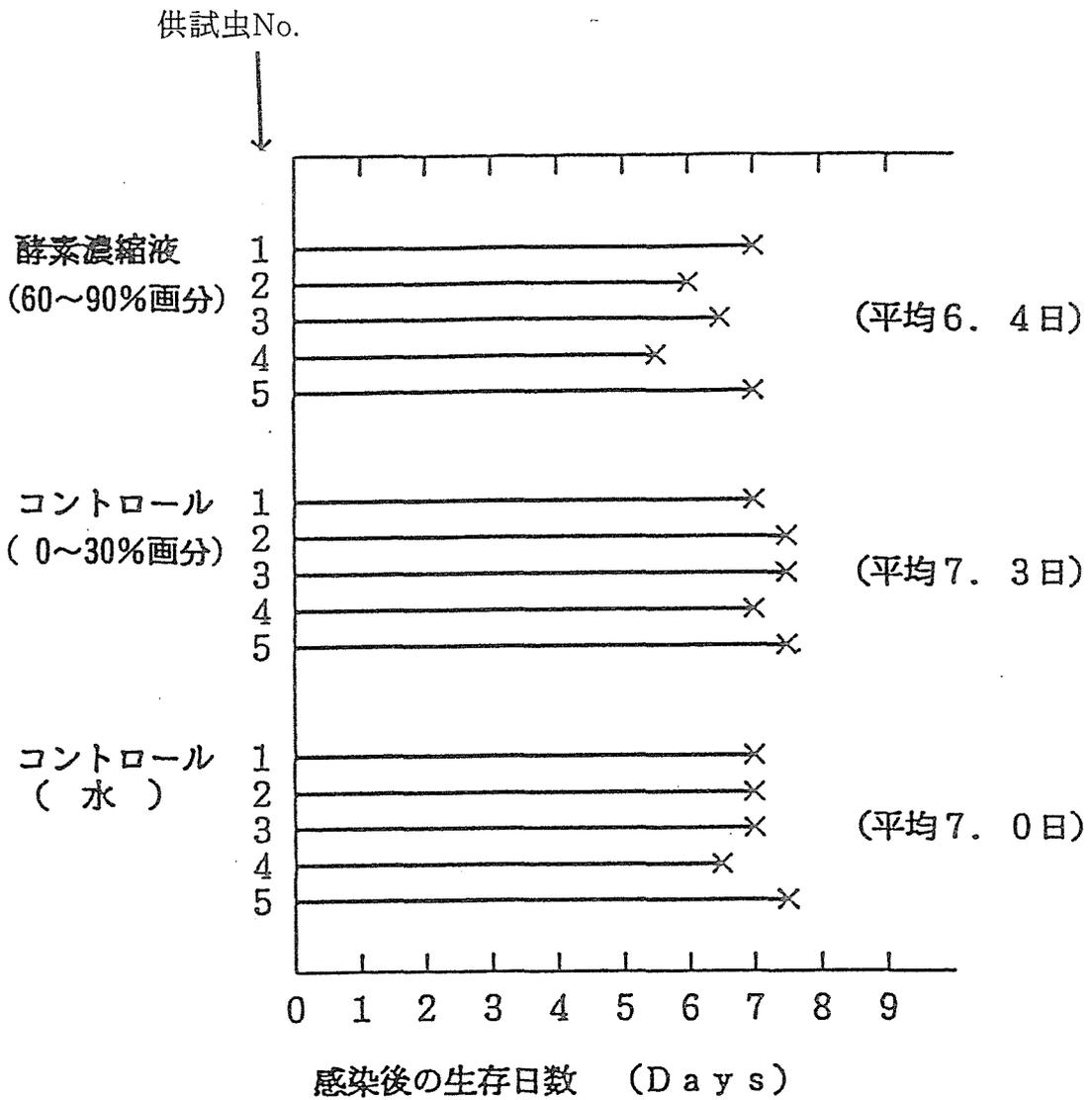
図5-8 培地による *B. brongniartii* 培養液中の酵素生産への影響



病死日...×

キトサン培地、さなぎ粉培地：危険率5%で有意差あり。

図5-9 *B. brongniartii* 培養液で処理したキボシカミキリ成虫の致死日数に対する培地の影響



病死日...×  
 酵素濃縮液、コントロール(0~30%画分) : 危険率5%で有意差あり。

図5-10 *B. brongniartii* 培養上清を硫酸濃縮した液で処理したキボシカミキリ成虫を製剤処理した時に致死日数

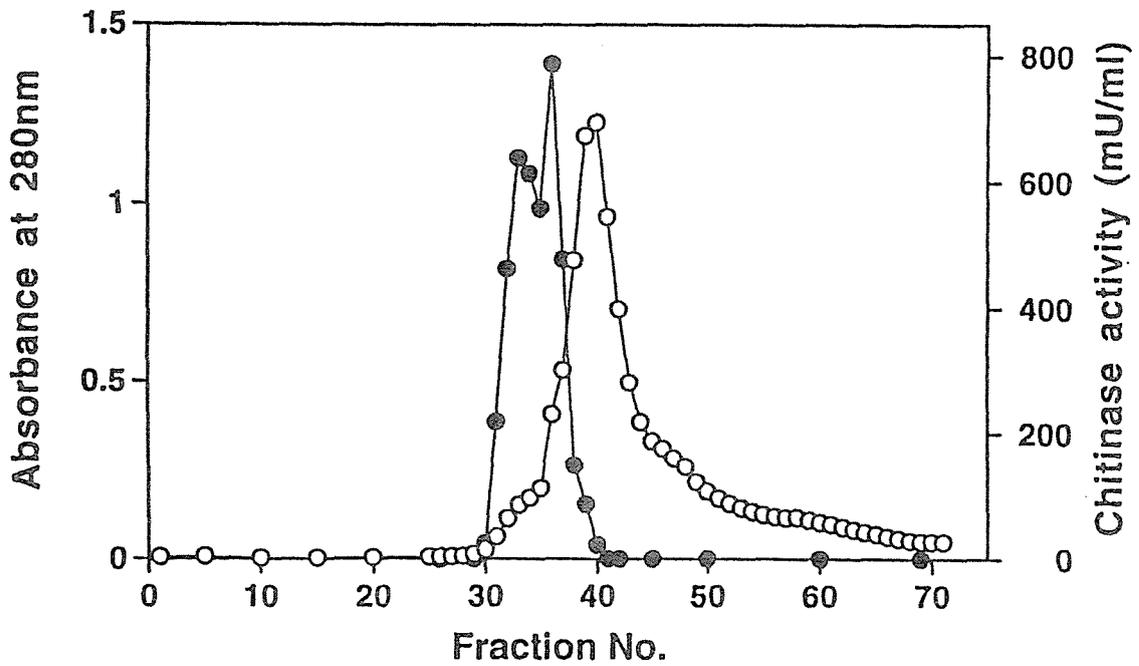


Fig. Elution profile of chitinase activity by gel filtration on Sephacryl S-400 HR. Samples (15 mg in 2 ml) were applied to the column ( $\phi 2.2 \times 55$  cm) at a flow rate of 42 ml/h. The buffer used was 20 mM potassium phosphate, pH 6.4, containing 1.0 mM EDTA. The absorbance at 280 nm was monitored to determine elution of protein (open circles), and chitinase activities were monitored by assays of activity according to the method described in the Materials and Methods section (closed circles).

図 5 - 11 Sephacryl S-400 ゲル濾過によるキチナーゼ活性の溶出

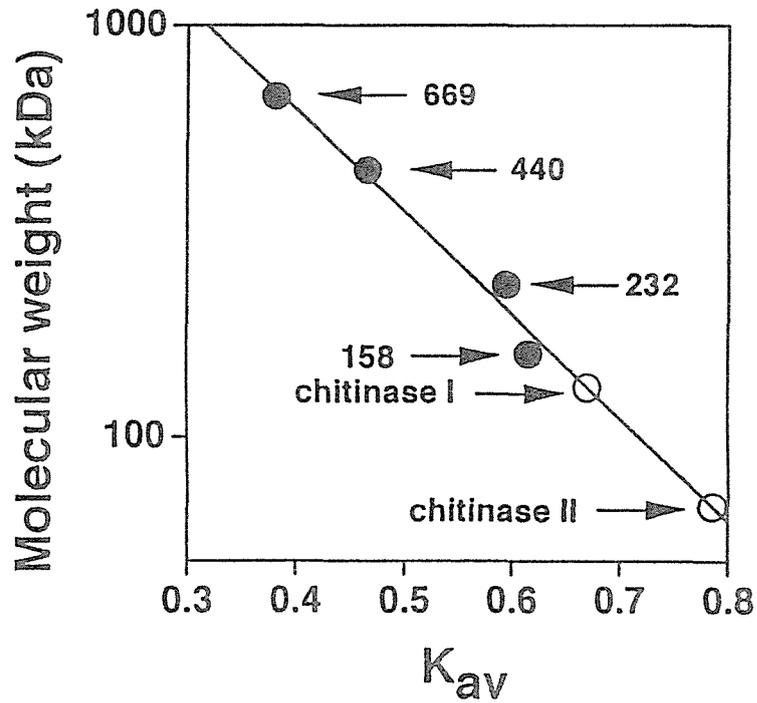


Fig. Estimation of the relative molecular weight of chitinase I and chitinase II by gel filtration on Sephacryl S-400 HR. Molecular weight standards were applied to the column in an identical manner to the initial protein sample. The standards used were: thyroglobulin; 669 kDa, ferritin; 440 kDa, catalase; 230 kDa, and aldolase; 158 kDa.

図 5 - 12 ゲル濾過で分離されたキチナーゼの分子量測定

41  
26号

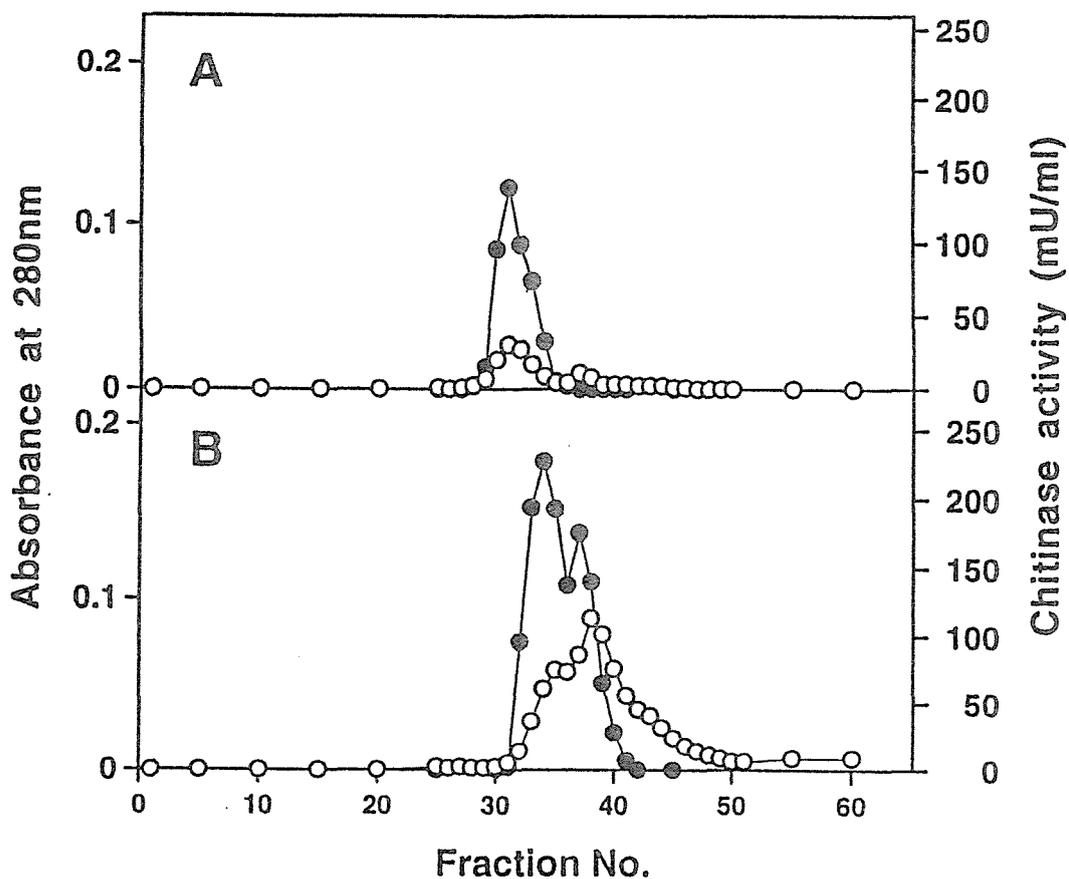


Fig. Elution profile of chitinase activities of chitinase I and chitinase II isolates from Sephacryl S-400 HR. Fractions 31 to 34 (chitinase I) and fractions 35 to 38 (chitinase II) of the profile shown in Fig. 11 were collected, concentrated, and re-applied to the gel filtration column and monitored for protein and activity. A; chitinase I, B; chitinase II. The symbols used are identical to those of Fig. 11

図 5 - 13 Sephacryl S-400 ゲル濾過によるキチナーゼ活性の再溶出

**END**