Bacillus thuringiensis δ -内毒素の殺虫活性における芽胞の役割

浅野 昌司*・宮本 和久

独立行政法人農業生物資源研究所

Role of Spores in the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin. Shoji ASANO* and Kazuhisa MIYAMOTO National Institute of Agrobiological Sciences; Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305–8634, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 52: 183–192 (2008)

Abstract: Effect of spores on enhancing the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) delta-endotoxin (refer to toxin) has been reported to vary depending on the species of insect and variety of *Bt*, procedure of toxin preparation, bioassay methods and so on. Some studies have demonstrated a remarkable synergistic effect of spores on the insecticidal activity of toxin, but others have not. These discrepancies have raised the following questions: Are spores necessary for the insecticidal activity of *Bt* toxin? Why is there so much variation in synergistic action between spores and toxins? What problems are there with the bioassay method for judging synergism? To address these questions, we reviewed studies on the interaction between spores and toxins in the insecticidal action of *Bt* and outlined the problems which should be clarified further to elucidate the role of spores in the insecticidal activity of *Bt* toxin.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; delta-endotoxin; spore; synergistic action; insecticidal activity

はじめに

害虫防除に利用されている代表的な生物農薬のひとつ、いわゆる BT 剤は、ほとんどの場合、昆虫病原細菌 *Bacillus thuringiensis* (以下 *Bt* と略) の培養物を主成分として、これに展着剤や増量剤等を加えて製造販売されている。細胞が自己融解 (autolysis) した後に残る培養物は主に 2 種類の成分からなっている。一つは、副芽胞封入体 (parasporal inclusion, parasporal body) あるいはクリスタル (parasporal crystal, crystal) などと呼ばれる、多くの場合ピラミッドを二つ重ねたような形状を持つ、タンパク質の結晶体 (Insecticidal Crystal Protein, ICP, 以下単に結晶体と記載) で主成分は δ -内毒素 (δ -endotoxin) である。もう一つの成分は、環境が悪くなると細菌が作る芽胞 (spore) と呼ばれるものである。BT 剤の殺虫作用は δ -endotoxin (以下トキシンと略) が主体であるとされているが、芽胞の役割の重要性を指摘する報告も多い。

そこでここではトキシンの殺虫活性に及ぼす芽胞の役割と今後検討すべき課題について整理することを意図して、これまで報告された事例の総括を試みた。BT 剤の害虫防除への効果的な利用を図る上で、トキシンの殺虫活性に及ぼす芽胞の役割を考えることは重要であり、この総説がそ

のための参考になれば幸甚である。

引用した論文の中で、*Bt* の産生する結晶体 (通常は種類の異なる複数のトキシンを含む) を用いて行われた試験と遺伝子組み換え技術などにより単一トキシンとして調製されたものを用いて行われた試験があるが、両者をとくに区別しなくても良い場合は、単に「トキシン」とし、両者を区別する必要がある場合には、前者を「結晶体」とし、後者を「単一トキシン」とした。また、論点を簡明にするために、引用した論文の供試材料や方法は最小限の記載に留めた。

Bt の生活環と産生毒素

Bt はグラム陽性好気性芽胞形成細菌で、特殊な栄養要求性は認められず、土壤中に広く棲息している。土壤中では主として芽胞 (長径約 1 ミクロン程度の楕円体) の状態で存在している。芽胞は何らかの原因で昆虫の血体腔に入ると、そこで発芽して長さ 3~5 ミクロン、幅約 1~1.2 ミクロンの桿状の栄養型細胞となり、細胞の周囲に存在している沢山の鞭毛を用いて活発に運動し、分裂増殖する。そして、環境が悪化すると細胞内に芽胞を形成する。*Bt* は分類学的には、同じく土壌細菌である *Bacillus cereus* (*Bc*) に非常に近く、芽胞形成時に結晶体を形成する点で *Bc* と区分

*連絡者

2008 年 4 月 1 日受領 (Received 1 April 2008)

2008 年 7 月 22 日登載決定 (Accepted 22 July 2008)

DOI: 10.1303/jjaez.2008.183

されている。

Bt は昆虫に殺虫活性を示す複数の毒素を産生することが知られており、Heimpel (1967) は、それまで種々の名前で呼ばれていた毒素を整理し、 α -外毒素 (α -exotoxin)、 β -外毒素 (β -exotoxin)、 γ -外毒素 (γ -exotoxin) および δ -内毒素 (δ -endotoxin) の4つに統一することを提案した。 α -exotoxin はそれまで lecithinase C や phospholipase C と呼ばれていた酵素、 β -exotoxin は fly toxin や耐熱性因子と呼ばれていたアデニンヌクレオチドの類縁体、 γ -exotoxin は未同定の酵素、 δ -endotoxin は殺虫性結晶体と呼ばれていたものである。このうち、実際の害虫防除には、一部で β -exotoxin が利用されたが、それ以外はすべてこの総説でトキシンとして記述する δ -endotoxin が利用されてきた。近年、*Bt* 培養液中に結晶体を形成しない殺虫性タンパク質 (vegetative insecticidal protein) (Estruch et al., 1996) や *Bt* 培養上清中にトキシンの殺虫活性を増進する物質の存在 (Asano and Hori, 1995)、*Bt* の芽胞とトキシンの混合による殺虫活性の増進 (Miyasono et al., 1994) などが報告された。それ故、トキシンの殺虫活性には種々の要因が影響すると考えられている。これらのうち、芽胞がトキシンの殺虫活性に及ぼす影響については古くから研究が行われてきた。まず、Angus (1954) は結晶体および芽胞のカイコ *Bombyx mori* に対する殺虫活性の相違について調べ、芽胞は経口的に摂食させても殺虫活性など一切示さないが、血体腔へ注入すると敗血症を引き起こすこと、一方、可溶化した結晶体を経口的に摂食させると麻痺を起こすが、血体腔へ注入しても敗血症を引き起こさないことを見出し、結晶体と芽胞の作用は異なり、*Bt* の殺虫活性において結晶体と芽胞は別々の役割を持つと考察した。しかしその後報告された事例をみると、芽胞は *Bt* の示す殺虫活性に重要な役割を担うとするものや、そのような役割がないか、あるいは殺虫活性への寄与が少ないとするものがあり、統一した見解がない。さらに芽胞の存在により殺虫活性が増進する場合もその増進機構については不明な点が多い。

芽胞の役割を論ずる場合にまず留意すべき点は、それぞれの試験に用いられた *Bt* および生物検定に用いた昆虫種がまちまちである点である。幸い、Heimpel and Angus (1959) が *Bt* に感受性を示す鱗翅目害虫を分類しているので、まずそれについて紹介し、それを踏まえて芽胞の役割を論じることにする。

Bt 感受性チョウ目昆虫の分類

Heimpel and Angus (1959) は *Bt* に感受性を示すチョウ目昆虫をトキシンに対する反応の違いをもとにタイプ I, II および III のグループに分類した。タイプ I と II の昆虫はトキシンを摂取した後、数分以内に中腸の麻痺を起こすもの、そのうちタイプ I の昆虫 (代表例：カイコ) は摂取後 1~7

時間以内に体液 pH の上昇を伴い、体全体に麻痺を示して死に至るとした。体液 pH の上昇は損傷を受けた中腸上皮細胞の破壊によって中腸内のアルカリ性消化液が緩衝性の低い血体腔へ流入したために生じるものと考察した。また、タイプ II の昆虫 (代表例：モンシロチョウ *Pieris rapae*) は体液 pH の上昇や体全体の麻痺は示さず、摂取後 2~4 日以内に死に至るとした。タイプ III の昆虫 (代表例：スジコナマダラメイガ *Ephestia kuehniella*) は摂取後体全体の麻痺はなく、4 日以内に死に至るが、タイプ I や II と異なり、トキシン単独による殺虫性はなく、殺虫にはトキシンと芽胞の両方が必要であるとした。その後、スジコナマダラメイガ以外に、アワノメイガの一種 *Ostrinia nubilalis* (Sutter and Raun, 1966) やハチミツガ *Galleria mellonella* (Li et al., 1987) でも類似のことが報告された。しかし、トキシンと芽胞を混合することにより殺虫活性が増進する事例の多くは、タイプ II の昆虫で報告されているので、タイプ III に限らず、トキシン単独で殺されるタイプ I や II の昆虫種においても芽胞の影響があると考えられる。

芽胞の殺虫性

1. 芽胞自体の殺虫性

芽胞自体に殺虫性がないとする報告は多いが、芽胞単独で殺虫性を示すとする以下のような報告がある (第 1 表参照)。

Somerville et al. (1970) は経口投与法により芽胞単独でモンキチョウの一種 *Colias eurytheme* の 5 齢幼虫、イラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* の 5 齢幼虫およびヤガ科の一種 *Pseudaletia unipuncta* の 6 齢幼虫に対して殺虫性を示すとした。Burgess et al. (1976) は飼料混入法により芽胞単独でハチミツガの 7 日齢幼虫に対して殺虫性を示し、その活性は結晶体のそれより高く、 LC_{50} で 10,000 倍の差があったとした。Fast (1977) は経口投与法によりハマキガ科の一種 *Choristoneura fumiferana* の 6 齢幼虫に対して芽胞単独で殺虫性を有するが、その活性は結晶体のそれより低く、 LD_{50} で 1/200 に過ぎないと述べた。McGaughey (1978) も飼料混入法によりスジマダラメイガ *Cadra cautella* とノシメマダラメイガ *Plodia interpunctella* のふ化幼虫に対して芽胞単独で殺虫性を示すが、その活性は結晶体に比べると低く、 LC_{50} による比ではスジマダラメイガで 1/30、ノシメマダラメイガで 1/3 になるとした。Schesser and Bulla (1978) は芽胞を飼料表面に処理する方法でタバコスズメガ *Man-duca sexta* のふ化幼虫に対して、芽胞が濃度依存的に殺虫活性と発育阻害活性を示し、 LC_{50} は報告された結晶体のそれとほぼ等しいとした。Li et al. (1987) も飼料混入法でハチミツガの 8 日齢幼虫に対して芽胞単独で結晶体のそれに匹敵する殺虫性があるとしたが、葉片処理法ではオオモンシロチョウ *Pieris brassicae* の 5~6 日齢幼虫に対する芽胞単

第 1 表 *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin の殺虫活性に及ぼす芽胞の影響

検定昆虫				検定方法	芽胞単独 の殺虫性	トキシンの 混合効果	文 献
学 名	科	和 名	齢 ^a				
増進効果がある事例							
<i>C. cautella</i>	メイガ	スジマダラメイガ	1	飼料混合	有	増進	McGaughey (1978)
		スジマダラメイガ	4	飼料混合	有	増進	Nishiitsutsuji-Uwo & Endo (1980)
<i>E. kuhniella</i>	メイガ	スジコナマダラメイガ	4	飼料混合	無	増進	Heimpel & Angus (1959)
<i>P. interpunctella</i>	メイガ	ノシマダラメイガ	1	飼料混合	有	増進	Johnson & McGaughey (1996)
<i>G. mellonella</i>	メイガ	ハチミツガ	7d	飼料混合	有	増進	Burges et al. (1976)
		ハチミツガ	8d	飼料混合	有	増進	Li et al. (1987)
<i>P. rapae</i>	シロチョウ	モンシロチョウ	4	飼料処理	— ^b	増進	Nishiitsutsuji-Uwo & Endo (1980)
<i>P. brassicae</i>	シロチョウ	オオモンシロチョウ	5d, 6 d	葉片処理	有	— ^b	Li et al. (1987)
<i>C. eurytheme</i>	シロチョウ	コナガ	5	経口投与	有	増進	Somerville et al. (1970)
<i>P. xylostella</i>	スガ	コナガ	4	飼料混合	無	増進	Miyasono et al. (1994)
		コナガ	2	葉片処理	無	増進	Tang et al. (1996)
		コナガ	3	飼料混合	無	増進	Liu et al. (1998)
<i>S. exigua</i>	ヤガ	シロイチモジヨトウ	1	飼料混合	有	増進	Moar et al. (1989)
<i>T. ni</i>	ヤガ	イラクサギンウワバ	5	経口投与	有	増進	Somerville et al. (1970)
<i>P. unipuncta</i>	ヤガ		6	経口投与	有	増進	Somerville et al. (1970)
<i>O. nubilalis</i>	ツトガ		6d	飼料混合	無	増進	Sutter & Raun (1966)
			1d, 5 d	飼料混合	無	増進	M.-Shalleh & Lewis (1982)
<i>L. dispar</i>	ドクガ	マイマイガ	4	葉片処理	— ^b	増進	Nishiitsutsuji-Uwo & Endo (1980)
		マイマイガ	6	経口投与	— ^b	増進	Nishiitsutsuji-Uwo & Endo (1980)
		アメリカシロヒトリ	4	飼料混合	無	増進	宮本・鮎沢 (1982)
<i>H. cunea</i>	ヒトリガ	ノシマダラメイガ	1	飼料混合	有	無〜少	McGaughey (1978)
増進効果が無い・少ない事例			— ^b	飼料混合	— ^b	無	Nyauki et al. (1996)
<i>P. interpunctella</i>	メイガ	モンシロチョウ	4	飼料処理	— ^b	無〜少	Nishiitsutsuji-Uwo & Endo (1980)
<i>P. includens</i>	メイガ	コナガ	4	飼料混合	無	無	Asano et al. (2000)
<i>P. rapae</i>	シロチョウ	コナガ	4	葉片処理	無	無	Asano et al. (2000)
<i>P. xylostella</i>	スガ	コナガ	4	飼料混合	— ^b	無	Nyauki et al. (1996)
			— ^b	飼料表面	— ^b	— ^b	Schesser & Bulla (1978)
<i>S. frugiperda</i>	ヤガ	タバコスズメガ	1	経口投与	有	無〜少	Fast (1977)
<i>M. sexta</i>	スズメガ	カイコ	5	飼料混合	有	無	Nishiitsutsuji-Uwo & Endo (1980)
<i>C. fumiferana</i>	ハマキガ		3	飼料混合	有		
<i>B. mori</i>	カイコガ						

^a d は日齢, ^b 未記載.

独の殺虫性は結晶体より低く、 LC_{50} で1/30になるとし、昆虫の種類により異なることを示した。Moar et al. (1989)は飼料混入法でシロイチモジヨトウ *Spodoptera exigua* のふ化幼虫に対して芽胞単独で殺虫性があり、結晶体のそれに匹敵するとした。Tang et al. (1996)も葉片処理法でコナガ *Plutella xylostella* の2齢幼虫に対して結晶体と芽胞はともに単独で殺虫活性を示し、芽胞の活性は単一トキシン Cry1A のそれよりやや劣るが、Cry1C に匹敵するとした。しかし、Johnson and McGaughey (1996)は飼料処理法でノシメマダラメイガの2~3齢幼虫に対して芽胞と結晶体は、それぞれ単独で殺虫性はあるが、芽胞は結晶体より低く、 LD_{50} で1/6になるとした。また、Asano et al. (2000)はコナガ4齢幼虫を用いた飼料混入法による試験で、芽胞は *Bt* の垂種により異なり、単独で殺虫性がある場合とない場合を報告した。

ところで、*Bt* 培養液（結晶体と芽胞の混合物）から芽胞を精製する方法は研究者によって異なるが、二層分配法や密度勾配遠心法で精製した芽胞画分には結晶体が混入する。Fast (1977)は芽胞に混入する結晶体をプロテアーゼで可溶化して除去すると無処理の芽胞に比べ殺虫活性が低くなることを示した。宮園ら (1994)も混入する結晶体をアルカリで可溶化して除去した芽胞の殺虫性は 10^8 個/ml の高い濃度でも全くみられないとした。それ故、芽胞単独で殺虫性を示す場合には精製芽胞に混入する結晶体の影響を考慮する必要がある。

2. 芽胞殻に含まれる殺虫性タンパク質

Delafield et al. (1968)は *Bt* 芽胞の膜構成タンパク質の中に結晶体タンパク質と免疫学的に同じ性質を有するものがあるとした。Somerville and Pockett (1975)は *Bt* 芽胞のエキソスポリウム (exosporium) にはオオモンシロチョウに殺虫性を示すトキシンに類似したタンパク質が存在すること、このタンパク質はトキシンを可溶化する試薬で同様に可溶化できること、結晶体の抗血清により殺虫性がなくなることなどを示した。*Bc* 芽胞にも同様なタンパク質は存在し、ともにオオモンシロチョウの消化液で可溶化するが、*Bt* 芽胞に比べると殺虫活性が低いとした。Scherrer and Somerville (1977)は芽胞のエキソスポリウムおよび芽胞殻 (spore coat) から抽出したタンパク質がオオモンシロチョウに対して殺虫性を示し、 LC_{50} では結晶体のそれとほぼ同じであること、さらに、結晶体の抗血清によりその殺虫性がなくなるとした。Li et al. (1987)はハチミツガに対する殺虫活性をもとに、芽胞と結晶体に共通する、分子量138,000のタンパク質に注目し、これを持たない芽胞や、これを持つ結晶体でも同じこのタンパク質を持つ芽胞が存在しないと殺虫性がないとした。Li and Luo (1989)はハチミツガおよびオオモンシロチョウに対して殺虫性を示す3種類の *Bt* の芽胞殻には、トキシンと分子量が同じ138,000の

タンパク質があるが、結晶体非産生変異株の芽胞やこのタンパク質を持たない野生株の芽胞には殺虫性がないとした。Du and Nickerson (1996)は芽胞殻に存在する殺虫性ペプチドを持つ *Bt* の芽胞は単一トキシン Cry1Ac の特異抗体と反応するが、*Bc* の芽胞や結晶体非産生 *Bt* の芽胞はこの抗体と反応しないとした。さらに殺虫性ペプチドを持つ芽胞はタバコスズメガの中腸上皮細胞刷子縁膜小胞 (BBMV) 由来の *Bt* トキシンレセプターと結合することにより、発芽率が3倍高くなることを示した。

トキシンと芽胞の相互作用の事例

Bt の殺虫活性におけるトキシンと芽胞の相互作用について報告された事例は大別するとつぎの3つに分けられる(第1表参照)。

- 1) トキシン単独で殺虫性はないが、芽胞を混合すると殺虫性を示す事例
- 2) トキシン単独で殺虫性はあるが、芽胞を混合するとその殺虫活性が増進する事例 (芽胞単独で殺虫性のある場合とない場合も含む)
- 3) トキシン単独で殺虫性はあるが、芽胞を混合してもその殺虫活性が増進しない事例 (芽胞単独で殺虫性のある場合とない場合並びに殺虫増進効果はないが死亡時期が速まる場合を含む)

以下各グループの事例についてその概要を述べる。

1. トキシン単独で殺虫性はないが、芽胞を混合すると殺虫性を示す事例

Heimpel and Angus (1959)は飼料混入法でスジコナマダラメイガの4齢幼虫に対して結晶体と芽胞は、それぞれ単独での殺虫性はないが、両者を混合すると初めて顕著な殺虫性が現れることを示した。Sutter and Raun (1966)は飼料混入法で *O. nubilalis* の6日齢幼虫に対する殺虫活性の発現には結晶体と芽胞の両方が必要であるとした。

2. トキシン単独で殺虫性はあるが、芽胞を混合するとその殺虫活性が増進する事例 (芽胞単独で殺虫性のある場合とない場合も含む)

Somerville et al. (1970)は経口投与法で *C. eurytheme* の5齢幼虫、イラクサギンウワバの5齢幼虫および *P. unipuncta* の6齢幼虫に対して、結晶体と芽胞の混合は結晶体単独よりも殺虫活性が高くなることを示した。Burgess et al. (1976)は飼料混入法でハチミツガの7日齢幼虫に対して *Bt. var. galleriae* の結晶体と芽胞は共に単独で殺虫性を示すが、両者を混合すると殺虫活性は最高で芽胞単独の10倍、結晶体単独の10,000倍高くなるとした。また、*Bt. thuringiensis* の芽胞は、単独ではハチミツガに殺虫性を示さないが、*Bt. galleriae* の結晶体と混合すると、同じ *Bt. galleriae* の結晶体と芽胞との混合に比べてその度合は低いが、明らかに殺虫活性の増進があったとした。Fast (1977)は経口投与法で *C.*

fumiferana の6齢幼虫に対して芽胞と結晶体の混合物のLD₅₀は結晶体のそれとほぼ同じであること、ただし、混合物中のトキシン濃度で比較すると殺虫活性が結晶体単独に比べ2倍高くなるとした。McGaughey (1978) は飼料混入法でノシメダラメイガに対して結晶体と芽胞を1:1に混合すると、結晶体単独より殺虫活性がLC₅₀で2倍高くなるとした。宮本・鮎沢 (1982) は飼料混入法でアメリカシロヒトリ *Hyphantria cunea* の4齢幼虫に対して、結晶体と芽胞の混合物の殺虫性は結晶体単独に比べて死亡するまでの期間が2~3日早くなり、かつ、殺虫活性がLC₅₀で4倍高くなることを示した。Mohd-Salleh and Lewis (1982) は飼料混入法で、4種類の *Bt* 結晶体と芽胞を用いて、混合割合を変えて *O. nubilalis* のふ化幼虫および6日齢幼虫に与えると、芽胞単独での殺虫性はないが、結晶体と混合すると殺虫性が高くなるとした。Li et al. (1987) は飼料混入法でハチミツガの8日齢幼虫に対して結晶体と芽胞のそれぞれ単独の殺虫性はほぼゼロであったが、結晶体に少量の芽胞 (0.001%) を混合すると致死率が0%から36%に増加し、混合する芽胞数が多いほど致死率は高くなり、両者の混合が1:1の時に最も高くなるとした。Liu and Luo (1989) は飼料混入法でハチミツガの8日齢幼虫に対して3種類の *Bt* の結晶体と芽胞を用いて、混合割合を変えて調べ、いずれの種類でも1:1の混合比の時に致死率が最も高くなるとした。Moar et al. (1989) は飼料混入法でシロイチモジヨトウのふ化幼虫に対して結晶体と芽胞1:1の混合物の殺虫活性はそれぞれ単独の活性よりもLC₅₀で約10~38倍高くなることを示した。宮園ら (1994) は飼料混入法でコナガの4齢幼虫に対する結晶体と芽胞の混合による殺虫活性の増進効果をそれぞれ異なる *Bt* 亜種について調べ、増進効果は芽胞の由来する *Bt* の亜種間で異なり、2.9~116倍の幅があることを示した。また、投与後120hには死亡個体がほとんどみられない結晶体濃度でも、芽胞を混合すると死亡時期が早まり、投与後24~48hに死亡個体数が顕著になるとした。Tang et al. (1996) は葉片処理法を用い、コナガの2齢幼虫に対して単一トキシンと芽胞を1:1に混合した時、殺虫増進効果の度合はトキシンの種類によって異なるが、Cry1Aa, Cry1Ab および Cry1Ac では5.0~8.3倍、Cry1Cでは1.7倍、Cry2Aでは1.3倍活性が高くなるとした。Johnson and McGaughey (1996) は飼料処理法でノシメダラメイガの2~3齢幼虫に対して単一トキシンに芽胞を混合するとCry1Abで35倍、Cry1Cで50倍の殺虫増進があるとした。Liu et al. (1998) は葉片処理法で、結晶体に芽胞を混合するとコナガに対して殺虫活性が増進し、結晶体の種類によっても異なるが、LC₅₀で1.4~9.7倍高くなるとした。また、単一トキシンCry2AおよびCry1Cと芽胞の混合でも増進効果があることを示した。宮園ら (2003) は飼料混入法でコナガの4齢幼虫に対する結晶体および単一トキシ

ンCry1Aa, Cry1Ab, Cry1Acの殺虫活性が芽胞の混合で増進される効果を調べ、結晶体と芽胞の混合では163~212倍の高い増進があるのに比べ、単一トキシンと芽胞の混合では3.2~7.9倍増進に留まること、また、増進効果は用いるコナガの幼虫齢期によっても異なり、1~2齢幼虫で低く、3~4齢幼虫で高い傾向があることを示した。

3. 結晶体単独で殺虫性はあるが、芽胞を混合してもその殺虫活性が増進しない事例 (芽胞単独で殺虫性がある場合とない場合、並びに殺虫増進効果はないが死亡時期が速まる場合を含む)

McGaughey (1978) は飼料混入法でスジマダラメイガに対する結晶体と芽胞を1:1に混合しても殺虫活性の増進はみられないとした。Nishiitsutsuji-Uwo and Endo (1980) は飼料処理法でモンシロチョウに対する結晶体の殺虫性は、芽胞がある場合は、ない場合に比べ死亡の開始時期が1日以上早まるが、5~7日後のLC₅₀には両実験間に差がなく、増進効果はあっても、たかだか2倍程度に過ぎないとした。また、飼料混入法を用いて行ったカイコの3齢幼虫に対しては結晶体に芽胞を混合して与えても殺虫活性の増進がないとした。Li et al. (1987) も葉片処理法でオオモンシロチョウの5~6日齢幼虫に対して結晶体と芽胞の混合による殺虫活性の増進はないとした。

Nyoki et al. (1996) は飼料混入法で *Bt* 感受性の低いヤガ科の一種、*Spodoptera frugiperda* や *Bt* 感受性の高いヤガ科の一種 *Pseudoplusia includens* に対して結晶体と芽胞の混合による殺虫増進は明らかでないとした。Asano et al. (2000) は飼料混入法および葉片処理法でコナガに対する結晶体と芽胞を混合すると死亡までの時間は早まるが、最終的な殺虫活性は結晶体のそれと差がなく、両者の混合による殺虫活性の増進はないとした。

トキシンの殺虫活性における芽胞の役割

結晶体あるいは単一トキシンと芽胞の混合により殺虫活性が増進する事例には、芽胞単独での殺虫性がある場合とない場合の両方がある。今まで報告されたものを以下の項目に分けて述べる。

1. 芽胞に混入する結晶体あるいは結晶体に混入する芽胞による殺虫活性の増進

Fast (1977) は芽胞に混入している結晶体をプロテアーゼで可溶化して除去すると芽胞と結晶体の混合物による *C. fumiferana* 殺虫活性の増進効果が低くなることを示した。Li et al. (1987) もハチミツガで結晶体に混入する芽胞を除去すると殺虫性がほとんど消失することから、結晶体に混入している芽胞が殺虫活性に重要な役割を持つとした。また、精製した結晶体に含まれる芽胞の混入量 (0.001~0.01%) と同様に、精製された芽胞に含まれる結晶体の混入量 (0.02~0.05%) の影響もあるとした。しかし、結晶体と芽

胞の混合による殺虫活性の増進効果を議論する場合には、この混入の問題はそれほど重要になるとは考えない。なぜなら実験に用いた結晶体と芽胞にそれぞれ多少の混入があったとしても、混合による殺虫活性がそれぞれの単独による殺虫活性に比べて顕著に増進されていれば、両者の間には明らかに混合による相乗効果があると判断しても良いと考えられるからである。

2. 芽胞殻に存在するトキシン類似タンパク質による殺虫活性の増進

先に述べたので詳細は省くが、芽胞殻にトキシン類似タンパク質の存在が知られており、芽胞殻から抽出されたこのタンパク質に殺虫性のあることが示された (Scherrer and Somerville, 1977)。しかし、芽胞殻のトキシン類似タンパク質が殺虫性を示すにはなんらかの方法で芽胞殻からこのタンパク質が遊離されることが必要になる。さらに、芽胞と結晶体の混合による殺虫増進が芽胞殻に含まれるトキシン類似タンパク質によるとすると、殺虫増進効果は加算的效果になるが、いままで報告された増進効果はそれより高い相乗効果を示す場合が多く、単純なトキシン類似タンパク質の加算量だけでは説明できない。

3. 昆虫体内での芽胞の発芽と菌の増殖による殺虫活性の増進

昆虫体内での *Bt* 芽胞の発芽と菌の増殖について、Sutter and Raun (1966) は *Bt* 投与後に *O. nubilalis* の消化管内で *Bt* 芽胞の発芽と菌の増殖を観察した。Aly (1985) はネッタイシマカ *Aedes aegypti* およびその近縁種 *A. vexans* の4齢幼虫で、*Bt* 投与後 40~140 min に消化管内の *Bt* の芽胞数が最大となり、それ以後減少するが、消化管内で *Bt* 芽胞の発芽と増殖は明らかであるとした。Chiang et al. (1986) はメイガ科の *Corcyra cephalonica* で、*Bt* 投与後 40~120 min には中腸上皮細胞表面で *Bt* 芽胞の発芽と増殖がみられ、その後、致死までに中腸内に *Bt* 菌が充満すること、また、増殖した *Bt* の菌体内に結晶体と芽胞が形成されていると報告した。Wilson and Benoit (1990) は *Bt* の芽胞をタバコスズメガの4齢幼虫から採取した消化液と一緒にして5~10分培養すると *Bt* 芽胞が活性化され、発芽前段階の様相が示されたことから、中腸内の消化液は *Bt* 芽胞の活性化と発芽を誘導していると推論した。一方、結晶体と芽胞の発芽・菌の増殖との関係について、Heimpel and Angus (1959) はスジコナマダラメイガを用いて結晶体が芽胞の発芽や菌の増殖に必要であると述べている。Burges et al. (1976) はハチミツガに対する結晶体と芽胞の混合による相乗作用 (synergism) は、芽胞を UV 照射処理して発芽を抑えると低くなるとした。Nishiitsutsuji-Uwo and Endo (1980) はスジマダラメイガで抗生物質を入れた飼料を用いると、芽胞単独による殺虫活性もなくなり、結晶体と芽胞の混合による増進もみられなくなるとした。宮園ら (1994) はコナガ

の消化管内での芽胞の発芽と菌の増殖は結晶体を与えた時にのみ観察されると述べた。Du and Nickerson (1996) は結晶体産生 *Bt* の芽胞はアルカリ条件 (pH 10.3) で発芽が促進されるが、結晶体非産生 *Bt* や、*Bc* の芽胞は発芽が促進されないことを示した。Asano et al. (2000) は γ 線照射処理して発芽能力をなくした芽胞は無処理の芽胞にみられた死亡時間の短縮がなくなることから、結晶体の殺虫作用に関与する芽胞には発芽能力のあることが必要であるとした。

以上のように *Bt* 培養物 (結晶体と芽胞を含む) を昆虫に与えた場合、消化管内で *Bt* 芽胞が発芽し、菌が増殖し、その結果、消化管内で結晶体や芽胞を生産することになるので、最初に摂取されたもの以外に新たな結晶体と芽胞が追加されることになり、そのことにより殺虫活性の増進が予想される。この場合は発芽可能な芽胞を混合した場合のみ殺虫活性の増進があることになる。

Bt 以外の芽胞や他の微生物を与えた場合でも殺虫活性は増進される事例がある。Yamvrias and Angus (1970) は、*Bc* の芽胞単独による殺虫性はないが、*Bt* の結晶体と混合すると結晶体単独よりも死亡時期が早くなり、殺虫性が増進することを示した。Burges et al. (1976) は *Bt. thuringiensis* の芽胞単独ではハチミツガに殺虫性を示さないが、*Bt. galleria* の結晶体と混合すると、*galleria* の芽胞に比べるとその度合は低いが、殺虫性の増進があるとした。Nishiitsutsuji-Uwo and Endo (1980) はスジマダラメイガで *Bt* 芽胞および *B. subtilis* (*Bs*) 芽胞は投与 24 後に消化管内で発芽と増殖が同様にみられるが、*Bt* 結晶体と *Bs* 芽胞の混合物を与えた時は *Bt* 結晶体と *Bt* 芽胞の混合物の場合と異なり、殺虫増進効果がないことを示した。宮園ら (1994) は *Bt* 結晶体と *Bt* 芽胞の混合による殺虫増進効果と類似した現象が *Bt* 以外の *Bacillus* 属の *Bs* や *B. coagulans* の芽胞や乳酸菌 (*Lactobacillus*) の菌体、酵母 (*Saccharomyces* や *Zygosaccharomyces*) の芽胞を加えた時にも同様にみられることを示した。Dubois and Dean (1995) はマイマイガで大腸菌 *Escherichia coli* や植物寄生細菌の芽胞や菌体を単一トキシンと混合して与えると、程度の差はあれ、いずれも殺虫増進効果があること、*Bacillus* 属の *Bc*, *Bs* および *B. megaterium* の芽胞は *Bt* 芽胞と同程度の殺虫増進効果があるとした。

これらのことは結晶体の殺虫活性を増進するには混合する芽胞は発芽できることが必要であることを示唆する。しかし、Schesser and Bulla (1978) はタバコスズメガで芽胞をアジ化ナトリウム (NaN_3) で死滅させても芽胞単独による殺虫性が保存されるとした。その理由は芽胞の生死にかかわらず芽胞殻に存在するトキシン類似タンパク質が遊離されることにより殺虫性が発揮されるためとした。処理に用いた NaN_3 で芽胞が完全に死滅しているかどうかについては疑問であるが、この考え方は彼らの結果を解釈するには都合が良い。しかし、これまで報告された芽胞と結晶体

の混合による殺虫活性の増進効果のすべてを説明することはできない。なぜなら、結晶体と芽胞殻由来のトキシン成分の加算値以上の高い増進効果をこの考えでは説明できないからである。

トキシンと芽胞の混合による殺虫増進効果についての問題点

1. トキシンと芽胞の混合割合による殺虫増進効果の差異

Heimpel and Angus (1959) はスジコナマダラメイガの4齢幼虫に対して結晶体と芽胞の混合物の殺虫活性は、1:1の時にもっとも顕著であるとした。Burges et al. (1976) はハチミツガの7日齢幼虫に対して殺虫活性は、一定濃度の結晶体に対する芽胞数の割合が多いほど増進効果が高く、また、一定数の芽胞に対する結晶体の濃度が多いほど増進効果が高くなることを示した。McGaughey (1978) はスジマダラメイガとノシメマダラメイガに対して結晶体と芽胞の1:1混合物の殺虫活性はいずれも結晶体単独より高いとした。Mohd-Salleh and Lewis (1982) は *O. nubilalis* に対して4種類の *Bt* 結晶体と芽胞を用いて混合割合により殺虫活性が異なるとした。宮園ら (1994) はコナガで結晶体に対する芽胞の割合が高いほど増進効果が高いことを示した。

以上のように結晶体と芽胞の種類や混合割合によって殺虫増進効果に差異が生ずるのはなぜか。混合する芽胞が多い方が良いとする一面、混合割合が1:1の時に効果が最大になることが多いのはなぜか。結晶体と芽胞の混合物の殺虫増進効果が昆虫の種類によって異なるのはなぜかなどの疑問が残る。つまり、トキシン単独による中腸上皮細胞の損傷が引き金になって、その後の芽胞の発芽と菌の増殖が誘導される時、最初のトキシン濃度が上皮細胞の損傷速度とその後誘導される芽胞の発芽と菌の増殖に関係するのか、あるいは最初の芽胞濃度がその後の菌の増殖や、血体腔への進入速度と関係するのか、また、この過程は昆虫の種類によって異なるのか。さらに突きつめて *Bt* の殺虫作用においてトキシンと芽胞の両方が共に重要であるとしても、トキシンと芽胞のどちらが主体になるか。後者の芽胞が主体になるとすれば昆虫の消化管内で芽胞の発芽と菌の増殖が重要になり、芽胞の発芽誘導と菌の血体腔への流入に必要な最少のトキシン量があれば良いことになるし、また、前者のトキシンが主体になるとすればトキシンによる中腸上皮細胞の損傷が主因になり、これに伴って芽胞の発芽誘導と菌の増殖が起き、血体腔へ流入する、昆虫の死亡に必要な最少の菌量があれば良いことになる。この場合は *Bt* 以外に同時に流入する腸内細菌も同様な動きをすると考えられる。また、昆虫の種類による違いは用いる飼料の相違による影響も考えられる。人工飼料でほぼ無菌的に飼育された昆虫の腸内では摂取された *Bt* の増殖には好都合な条件

になるであろうし、逆に抗生物質や防腐剤を含む人工飼料では *Bt* の増殖が抑制されることになる。ところで、研究が多いチョウ目昆虫の内カイコの場合、摂食された飼料の消化管通過速度は3齢で約1h、5齢で3hとされる(伊藤, 1984)。このためトキシンがない場合、摂食された芽胞の多くは発芽する前に消化管から排泄されると考えられる。今後供試昆虫における消化管の通過速度などの要因も入れて、*Bt* の殺虫作用におけるトキシンと芽胞のそれぞれの役割の違いを明らかにする必要がある。

2. *Bt* 感受性および抵抗性個体間での芽胞による殺虫増進効果の差異

Johnson and McGaughey (1996) はノシメマダラメイガに対する単一トキシンと芽胞の混合物の殺虫活性は、*Bt* 感受性系統では Cry1Ab で35倍、Cry1C で50倍、*Bt* 抵抗性系統でも Cry1Ab で25倍、Cry1C で44倍と感受性とほぼ同程度の増進効果があるとした。一方、Tang et al. (1996) はコナガに対する単一トキシンと芽胞の混合物の殺虫活性は、*Bt* 感受性系統では Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac で5.0~8.3倍、Cry1C で1.7倍、Cry2A で1.3倍の増進効果があるとしたが、*Bt* 抵抗性系統ではいずれも増進効果がなかった。芽胞による増進効果はトキシンの種類やコナガの *Bt* 感受性の割合によっても異なることを示した。Liu et al. (1998) はコナガに対する結晶体と芽胞の混合物の殺虫活性は、*Bt* 感受性系統では9.7倍に留まるのに対し、*Bt* 抵抗性系統では450倍の増進効果があるとした。しかし、種類の異なる結晶体を用いた場合の芽胞との混合物の殺虫活性は感受性系統で1.4倍、抵抗性系統では1.5倍と差がなく、結晶体と芽胞の混合による増進効果は、供試する昆虫個体群の *Bt* 感受性レベルや、結晶体および芽胞の種類によっても異なることを示唆した。宮園ら (2003) は芽胞の殺虫活性増進効果を調べ、単一トキシン Cry1Aa, Cry1Ab および Cry1Ac と芽胞の混合物の場合は *Bt* 感受性系統では増進効果は3.2~7.9倍なのに対して、結晶体と芽胞の混合物では163~212倍の効果を得た。しかし、*Bt* 抵抗性系統の場合は単一トキシンと芽胞の混合物では948~2,439倍以上の増進に対して、結晶体と芽胞の混合物では215~8,844倍も上がり、感受性系統よりも抵抗性系統でより高い増進効果が得られた。

以上のように、トキシンと芽胞の混合による殺虫活性の増進は昆虫個体群の *Bt* 感受性レベルによっても異なり、とくに抵抗性昆虫で増進効果が大きくなるのはなぜか。また、トキシンと芽胞の混合による増進効果がトキシンの種類によって異なるのはなぜかなどの疑問が残る。*Bt* 抵抗性の昆虫はトキシンに対して抵抗性を示すが、芽胞に対しては感受性系統と同様に反応するのであろうか。そうであればトキシンによる殺虫活性が低下しても芽胞の混合によって殺虫活性が増進されることにより十分殺虫されることになる

のかもしれない。これらのことも今後の研究で *Bt* の殺虫作用におけるトキシンと芽胞のそれぞれの作用機構の相違から解き明かされる必要がある。

おわりに

トキシンの殺虫活性に及ぼす芽胞の役割については、今後さらに解明されなければならない多くの課題が残されているが、*Bt* の殺虫作用におけるトキシンと芽胞の関係について、いままで明らかになっている事実を踏まえて筆者らは上にあげた幾つかの文献の実験結果を解釈する統一的理解を推論してみた。

1) 殺虫性の主体はトキシンである。トキシンだけで殺虫性が顕著でない昆虫種でも殺虫以外の阻害活性（摂食阻害や発育阻害）があり、そこに芽胞が存在するとトキシンの活性が高められ、やがて死に至る。

2) 芽胞単独による殺虫性はほとんどなく、とくに発芽しない芽胞にはトキシンの殺虫活性を増進する効果がなく、そのまま排泄される。

3) 芽胞単独で殺虫性のある場合は芽胞に混入しているトキシン（あるいは芽胞殻に含まれるトキシン成分）による。

4) 芽胞は消化管内で通常発芽せずに消化管のぜん動運動により急速に排泄されるが、トキシンを同時に摂取するとトキシンの影響による消化管の運動低下などにより、排泄速度が低下し、消化管内での芽胞発芽が誘起され、菌が増殖する。

5) トキシンと芽胞の混合による殺虫活性の増進は、消化管内の芽胞発芽、それに続く菌の増殖に伴い、種々の生理活性物質が分泌されることにも関係する。

6) トキシン単独による中腸上皮細胞の損傷は、その損傷程度によっては回復が生じる場合がある（Retnakaran et al., 1983）。回復の度合はトキシンの濃度や昆虫の種類によっても差異はあるが、芽胞が存在するとその回復が前述の5)の理由で抑制される。

7) トキシンと芽胞の混合により死亡するまでの時間が短縮されるのは、トキシンによる中腸上皮細胞の損傷後、芽胞あるいは菌体が消化管内から血体腔に移入し、そこで菌が増殖し、敗血症が進むためである。

8) トキシンと芽胞の混合による増進効果に *Bt* 感受性の異なる昆虫の系統間で差が生ずるのは、供試昆虫の生理的要因（腸内菌の種類や過少などを含む）が関与する。

以上のような推論から、トキシンの殺虫作用における芽胞の役割は多様になると推測される。摂食により消化管に取り込まれ、消化液のアルカリ状態とプロテアーゼ消化により活性化されたトキシンが中腸上皮細胞になんらかの損傷をもたらす、アルカリ液と細胞由来の因子の消化管内への漏出を起こす一方、トキシンと一緒に取り込まれた芽胞

の発芽を誘導し、消化液中における菌の増殖と、その過程での新たなトキシンやその他の殺虫因子生産を予想させるが未解明である。芽胞の最終的な役割を結論づけるにはこれらの解明が必要と思われる。トキシンと芽胞の混合によって殺虫活性が増進するという室内試験結果を実際の害虫防除においてどのように有効に利用できるかを実証する必要がある。*Bt* の実際の害虫防除への利用場面を考えると、トキシン単独でも十分な防除ができる害虫であれば、芽胞の存在はそれほど重要な意味を持たなくなる。現にトキシンのみを有効成分とした *Bt* 製剤の開発（Asano et al., 1993）や、トキシン遺伝子を植物に導入して、植物体内にトキシンを生産させることにより耐虫性を付与した作物の育成が世界で広く行われている（Yamamoto, 2001）。一方、*Bt* を生物農薬として使用する場合、スジコナマダラメイガのような *Bt* 菌の殺虫作用に芽胞が不可欠な場合や、芽胞に数十～数百倍の殺虫増進効果がある場合は *Bt* 培養物中にトキシンとほぼ同数存在する芽胞の殺虫活性増進能を積極的に利用する方向での研究開発の推進も必要と考える。一方で、*Bt* 菌の示す殺虫活性における芽胞の役割の解明は、*Bt* 製剤を生物農薬として利用する際の特性の再認識と殺虫活性のさらなる増進以外に、例えば、適用害虫種の拡大、*Bt* 抵抗性発達の抑制、残効性の向上のための紫外線による活性低下の抑制などへの貢献も期待できるであろう。

引用文献

- Aly, C. (1985) Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores in the gut of *Aedes* larvae (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.* 45: 1-8.
- Angus, T. A. (1954) A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. *Nature* 4403: 545-546.
- Asano, S. and H. Hori (1995) Enhancing effects of supernatants from various cultures of *Bacillus thuringiensis* on larvicidal activity of δ -endotoxin against the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Appl. Entomol. Zool.* 30: 369-374.
- Asano, S., T. Maruyama, T. Iwasa, A. Seki and M. Takahashi and G. G. Soares, Jr. (1993) Evaluation of biological activity of *Bacillus thuringiensis* test samples using a diet incorporation method with diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera, Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* 28: 513-524.
- Asano, S., K. Ogiwara, M. Takahashi, L. S. Indrasith, M. Takahashi, N. Suzuki and H. Hori (2000) Synergism of the spore on insecticidal activity of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) is not observed at late stage in bioassay. *Appl. Entomol. Zool.* 35: 583-590.
- Burges, H. D., E. M. Thomson and R. A. Latchford (1976) Importance of spores and δ -endotoxin protein crystals of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 27: 87-94.
- Chiang, A. S., D. F. Yen and W. K. Peng (1986) Germination and proliferation of *Bacillus thuringiensis* in the gut of rice moth larva, *Corcyra cephalonica*. *J. Invertebr. Pathol.* 48: 96-99.

- Delafield, F. P., H. J. Somerville and S. C. Rittenberg (1968) Immunological homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 96: 713–720.
- Du, C. and K. W. Nickerson (1996) *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: Physiological and pathogenic consequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3722–3726.
- Dubois, N. R. and D. H. Dean (1995) Synergism between Cry1A insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae) larvae. *Environ. Entomol.* 24: 1741–1747.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig and M. G. Koziel (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5389–5394.
- Fast, P. G. (1977) *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: on the relative roles of spores and crystals in toxicity to spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 109: 1515–1518.
- Heimpel, A. M. (1967) A critical review of *Bacillus thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annu. Rev. Entomol.* 12: 287–322.
- Heimpel, A. M. and T. A. Angus (1959) The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *J. Insect Pathol.* 1: 152–170.
- 伊藤智夫 (1984) 家蚕生化学. 裳華房, 東京. 393 pp. [Ito, T. (1984) *Biochemistry of the Silkworm*. Shokabo Book Co., Tokyo. 393 pp.]
- Johnson, D. E. and W. H. McGaughey (1996) Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified cry proteins towards Indianmeal moth larvae. *Current Microbiol.* 33: 54–59.
- Li, R. S. and C. Luo (1989) Composition of proteins and polypeptides in crystals and spore coats of *Bacillus thuringiensis* and their toxicity to insects. *Acta Entomol. Sin.* 32: 149–157.
- Li, R. S., P. Jarrett and H. D. Burges (1987) Importance of spores, crystals, and δ -endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.* 50: 277–284.
- Liu, Y-B., B. E. Tabashnik, W. J. Moar and R. A. Smith (1998) Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Entomol. Microbiol.* 64: 1385–1389.
- McGaughey, W. H. (1978) Effects of larval ages on the susceptibility of almond moths and Indianmeal moths to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 71: 923–925.
- 宮本和久・鮎沢啓夫 (1982) *Bacillus thuringiensis* AF 101 株のアメリカシロヒトリに対する毒性における芽胞の役割. 九病虫研会報 28: 207–209. [Miyamoto, K. and K. Aizawa (1982) Effect of the existence of *Bacillus thuringiensis* AF101 spores (serotype 4a:4b) on toxicity toward the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Kyushu Pl. Proc. Res.* 28: 207–209.]
- Miyasono, M., S. Inagaki, M. Yamamoto, K. Ohba, T. Ishiguro, R. Takeda and Y. Hayashi (1994) Enhancement of delta-endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 111–112.
- 宮園 稔・山本牧子・稲垣秀一郎・大庭克明・石黒丈雄・林 幸之・武田禮二 (1994) 乳酸菌, 酵母菌, 枯草菌および *Bacillus thuringiensis* の混合による *Bacillus thuringiensis* HD-1 δ -endotoxin の殺虫活性増強について. 応動昆 38: 101–108. [Miyasono, M., M. Yamamoto, S. Inagaki, K. Ohba, T. Ishiguro, Y. Hayashi and R. Takeda (1994) Effects of several microorganisms on the insecticidal activity of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 38: 101–108.]
- 宮園 稔・稲垣秀一郎・田中玲璽・上山良人・武田禮二 (2003) 殺虫タンパク質抵抗性コナガに対する *Bacillus thuringiensis* の芽胞混合の殺虫活性増強効果. 応動昆 47: 61–66. [Miyasono, M., S. Inagaki, R. Tanaka, Y. Ueyama and R. Takeda (2003) Enhancement of insecticidal protein activity by spores of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*, developing resistance to insecticidal protein. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 47: 61–66.]
- Moar, W. J., J. T. Trumble and B. A. Federici (1989) Comparative toxicity of spores and crystals from NRD-12 and HD-1 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to neonate beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 1593–1603.
- Mohd-Salleh, M. B. and L. C. Lewis (1982) Toxic effects of spore/crystal ratios of *Bacillus thuringiensis* on European corn borer larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 290–297.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J. and Y. Endo (1980) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: Relative roles of spores and crystals in toxicity to *Pieris*, *Lymantria* and *Ephestia* larvae. *Appl. Entomol. Zool.* 15: 416–424.
- Nyounki, F. F. R., J. R. Fuxa and A. R. Richter (1996) Spore-toxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Entomol. Sci.* 31: 52–62.
- Retnakaran, A., H. Lauzon and P. Fast (1983) *Bacillus thuringiensis* induced anorexia in the budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Entomol. Exp. Appl.* 34: 233–239.
- Scherrer, P. S. and H. J. Somerville (1977) Membrane fractions from the outer layers of spores of *Bacillus thuringiensis* with toxicity to lepidopterous larvae. *Eur. J. Biochem.* 72: 479–490.
- Schesser, J. H. and L. A. Bulla Jr. (1978) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spores to the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 121–123.
- Somerville, H. J. and H. V. Pockett (1975) An insect toxin from spores of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *J. General Microbiol.* 87: 359–369.
- Somerville, H. J., Y. Tanada and E. M. Omi (1970) Lethal effect of purified spores and crystalline endotoxin preparations of *Bacillus thuringiensis* on several lepidopterous insects. *J. Invertebr. Pathol.* 16: 241–248.
- Sutter, G. R. and E. S. Raun (1966) The effect of *Bacillus thuringiensis* components on the development of the European corn borer. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 457–460.
- Tang, J. D., A. M. Shelton, J. van Rie, S. de Roeck, W. J. Moar, R. T. Roush and M. Peferoen (1996) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 564–569.

- Wilson, G. R. and T. G. Benoit (1990) Activation and germination of *Bacillus thuringiensis* spores in *Manduca sexta* larval gut fluid. *J. Invertebr. Pathol.* 56: 233–236.
- Yamamoto, T. (2001) One hundred years of *Bacillus thuringiensis* research and development: Discovery to transgenic crop. *J. Insect Biotech. Sericol.* 70: 1–23.
- Yamvrias, C. and T. A. Angus (1970) The comparative pathogenicity of some *Bacillus thuringiensis* varieties for larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferna*. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 92–99.
-