

## 蛹を用いたハスモンヨトウ核多角体病ウイルスの大量増殖

津田勝男<sup>†</sup>・東 理香<sup>\*</sup>・佐藤史子・坂巻祥孝・櫛下町鉦敏

(害虫学研究室)

平成17年8月10日 受理

### 要 約

ハスモンヨトウ核多角体病ウイルスをより効率的に増殖するために、蛹へのウイルス接種による多角体の大量増殖を検討した。また、蛹の時期に死亡することを想定して6齢幼虫に多角体を経口接種して蛹期で回収する方法を検討した。感染幼虫の体液から採取したBudded virusを接種源とし、マイクロシリンジによりハスモンヨトウの蛹に経皮接種した。接種量は5 $\mu$ lと10 $\mu$ l, 20 $\mu$ lでウイルスの生成量に差は認められなかった。接種時期は蛹化後1日目から3日目では差が認められなかった。接種部位を胸部、生殖器および腹部として蛹に経皮接種した結果、1頭あたりの多角体数は $10^8$ 個程度であった。また、ウイルス接種後の蛹内での多角体数は接種4日目に1頭あたり $10^8$ 個に達したが、以後の増加は認められなかった。6齢幼虫および前蛹にBudded virusを経皮接種して蛹期に多角体を回収することが可能であったが、1頭あたりの多角体数は $10^8$ 個程度であった。6齢幼虫後期に多角体を経口接種した場合は蛹で死亡することが認められた。このことから6齢幼虫に経口接種し蛹でウイルスを回収することが可能であると考えられたが、回収された多角体数は、1頭あたり $10^8$ 個程度であった。以上のことから、蛹におけるNPV多角体の増殖については、蛹化3日目までの蛹の腹部にbudded virusを5 $\mu$ lずつ経皮接種する方法がもっとも効率的であると考えられた。

キーワード：ハスモンヨトウ, ハスモンヨトウ核多角体病ウイルス, ウイルスの大量増殖, 蛹

### 緒 言

核多角体病ウイルス (nucleopolyhedrovirus; 以下NPV) は、宿主特異性およびヒトおよび標的外生物に対する安全性が高いことから、総合的害虫管理の一素材として利用するための研究が以前より行われている [6]。ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) NPVは、岡田[6]により大量増殖法が確立されているが、この増殖法ではハスモンヨトウ幼虫に多角体の混入した人工飼料を摂食させ、幼虫体内でウイルスを増殖させて死亡虫から多角体を回収している。しかし、この方法では罹病幼虫が共食いをするため、幼虫の個体飼育が必要である。また、ウイルスに感染して死亡した幼虫は、皮膚組織が崩壊して体液が流出してしまうために回収に多くの労力を必要とす

る。このため、生産コストの大部分は人件費である。小池[3]は生産コストの削減を図るために昆虫培養細胞を用いた多角体の大量生産を検討した。しかし、培養細胞を用いて生産された多角体は、幼虫で生産された多角体より病原性が低下していたと報告している。また、生産設備に要する費用は、規模にかかわらず高く高額であるとも報告している。そこで、これらの労力を省き低コストで効率良くウイルスを回収する方法を検討する必要がある。その方法として、蛹を利用する方法が考えられる。蛹の時期でのウイルス回収が可能であれば、幼虫の個体飼育を行う必要がなく、またウイルスは蛹の殻に包まれたウイルスペレットとして取り扱いや流通が容易になることが期待される。

本研究では蛹へのウイルス接種による多角体の大

<sup>†</sup> : 連絡責任者：津田勝男 (鹿児島大学農学部害虫学研究室)

Tel/Fax (099) 285-8685, E-mail: tsuda@agri.kagoshima-u.ac.jp

<sup>\*</sup> 現在 株式会社フジ環境サービス

Present address: Fuji Environmental Service INC., Hirono, Shizuoka 421-0121, Japan

量増殖を検討した。また、蛹の時期に死亡することを想定して6齢幼虫に多角体を経口接種して蛹期で回収する方法を検討した。

### 材料および方法

#### 1) 供試昆虫

ハスモンヨトウは鹿児島大学農学部害虫学研究室の累代飼育系統を使用した。25℃内外、16L8Dに設定した昆虫飼育室内で、人工飼料を用いて飼育した。人工飼料は、川崎ら[2]が報告した組成を一部改変したものを用いた。

#### 2) 供試ウイルス

ハスモンヨトウNPVは、鹿児島大学農学部害虫学研究室に保存されていた鹿児島株を供試した。本ウイルス株は、1997年10月に鹿児島市郡元の鹿児島大学構内で採集したハスモンヨトウの罹病幼虫から分離した。多角体をハスモンヨトウ幼虫に経口接種し、感染虫の体液を3000rpm、20分間の遠心洗浄を反復して多角体を粗精製した。粗精製した多角体は蒸留水に懸濁した後、使用するまで4℃で保存した。

#### 3) Budded virusの採取と経皮接種

多角体懸濁液を蒸留水で希釈し、 $1 \times 10^8$ 個/mlの濃度に調製し接種液とした。5mm×5mm×5mmに裁断した人工飼料片に接種液を1片あたり10μlずつ滴下した。この人工飼料を1片ずつハスモンヨトウ3齢幼虫に摂食させた。約24時間後にハスモンヨトウ幼虫がウイルスを滴下した人工飼料を全て摂食したことを確認して、ウイルスを滴下していない人工飼料を加えて飼育を継続した。接種4日後に、死亡していない幼虫の脚をハサミで切り体液を採取した。採取した体液を遠心分離器(コクサン、H-26F)で3000rpm、20分間遠心し、多角体を沈殿させた。上清を0.45μmのフィルター(Millipore, Millex HA)でろ過し、これを基準液として-18℃の冷凍庫に保存した。

経皮接種は、外径0.26mmの針(HAMILTON: 90031)を装着したマイクロシリンジ(HAMILTON: 80920)を用いて所定量の接種液を注射した。

#### 3) Budded virusの蛹への接種濃度

幼虫の体液から採取したBudded virus粒子は光学顕微鏡では観察できない。そのため、罹病虫から採取した体液を基準液とし、蛹が感染する希釈濃度を特定した。希釈液として滅菌水およびGrace培地(Grace, 1962: Gibco社製)を用いた。Grace培地は

昆虫の細胞培養のために開発された培地である[1]。昆虫細胞培養液によって昆虫の細胞の増殖が盛んになるのではないかと考えられたことから、本培養液を用いた。蛹化後48時間以内の蛹を供試し、基準液をそれぞれの希釈液で10倍、100倍および1000倍に希釈したものを1頭あたり5μlずつ腹部に経皮接種した。ウイルスを接種した蛹は25℃、14L10Dの条件下で飼育を継続し、死亡を確認後に体液を採取し、多角体の有無により感染を確認し、多角体数を測定した。多角体数は、生存個体または死亡個体をすり潰して蒸留水で懸濁し、ガーゼでろ過して残渣を取り除いた後、トーマ型血球計算盤により測定した。

#### 4) Budded virusの蛹への接種時期および接種量

蛹化後1日目、1～2日目および2～3日目の蛹を供試して、それぞれ20頭に5μlずつ基準液を腹部に経皮接種した。また、蛹化後48時間以内の蛹を供試し、基準液を1頭当たり5μl、10μlおよび20μlずつ、それぞれ20頭の腹部に経皮接種した。ウイルスを接種した蛹は25℃、14L10Dの条件下で飼育し、蛹の死亡を確認後に多角体数を測定した。

#### 5) Budded virusの蛹への接種部位

蛹への接種部位を特定するために、蛹を解剖して各組織を観察した。蛹化1日目、3日目、5日目の蛹の胸部にメスで切れ込みを入れ、固定液に浸漬した。固定液として成分比が水：無水エチルアルコール：ホルマリン：酢酸=57：28：11：4のKahle氏液[8]を用いた。1週間後、蛹をメスで切断し、乾燥しないように生理食塩水を滴下しながら断面を顕微鏡で観察し、飛翔筋と生殖器の位置を確認した。

蛹化後48時間以内の蛹の胸部、腹部第4節と5節の間および生殖器がある腹部第7節にBudded virusの基準液を5μlずつ経皮接種し、25℃、14L10Dの条件下で飼育した。接種頭数はそれぞれ20頭ずつである。蛹の死亡を確認後、多角体数を測定した。

#### 6) 蛹における生成多角体数の変化

蛹化1～3日目の蛹にBudded virusの基準液を5μlずつ経皮接種し、接種した蛹から毎日10頭をランダムに取りだして生死の確認および多角体数の測定を行った。

#### 7) Budded virusの6齢幼虫および前蛹への経皮接種

6齢の1～4日目幼虫および前蛹のそれぞれ20頭にBudded virusをそれぞれ10μlずつ経皮接種した。25℃、14L10Dの条件下で飼育し、死亡時期を確認した後、多角体数を測定した。

Table 1. Infectivity of budded virus of *Spodoptera litura* NPV injected into pupal haemolymphs of *Spodoptera litura* at different concentrations, volumes and times

Concentration	Dilution <sup>b</sup>	Volume (μl)	Time (day)	No. of pupae	% infectivity
SS <sup>a</sup>	-	5	0-2	16	100
SS x 10 <sup>-1</sup>	DW	5	0-2	17	59
SS x 10 <sup>-2</sup>	DW	5	0-2	14	43
SS x 10 <sup>-3</sup>	DW	5	0-2	18	6
0	DW	5	0-2	15	0
SS x 10 <sup>-1</sup>	IM	5	0-2	13	31
SS x 10 <sup>-2</sup>	IM	5	0-2	17	30
SS x 10 <sup>-3</sup>	IM	5	0-2	16	5
0	IM	5	0-2	20	0
SS	-	10	0-2	20	100
SS	-	20	0-2	20	100
SS	-	5	0-1	15	100
SS	-	5	1-2	15	100
SS	-	5	2-3	15	100
Control <sup>c</sup>	-	0	0-2	20	0

<sup>a</sup> Standard solutions derived from the haemolymph of infected *Spodoptera litura* larvae.

<sup>b</sup> Standard solutions were diluted using distilled water (DW) or Grace's insect medium (IM).

<sup>c</sup> Insertion only using a 31-gauge needle of a HAMILTON microsyringe

### 8) 多角体の6齢幼虫への経口接種

6齢幼虫への経口接種による感受性および死亡時期を確認した。多角体数を3×10<sup>9</sup>個/mlに調製したウイルス接種液を5mm×5mm×5mmに裁断した人工飼料に10μlずつ添加して6齢1日目および2日目、3日目の幼虫のそれぞれ20頭に経口接種した。接種した幼虫は内径60mm×高さ15mmのシャーレで25℃、14L10Dの条件下で個体飼育した。死亡時期を確認した後、多角体数を測定した。

## 結 果

### 1 Budded virusの蛹への接種条件

蛹にBudded virusの基準液および希釈液を接種した場合の感染率をTable 1に示した。100%の感染率が得られたのは基準液を接種した場合のみで、基準液を希釈した場合には、滅菌水および培養液のいずれを用いても100%の感染率は得られなかった。蛹への経皮接種によって確実に蛹が感染するのは基準液のみであったので、以後蛹への経皮接種には基準液を用いた。なお、培養液および滅菌水のみを接種した場合とマイクロシリンジ針による穿孔のみの場合はどちらも死亡することなく全個体が羽化し、マイクロシリンジによる注射はハスモンヨトウの生育に影響は認められなかった。

Table 2. PIB production in a pupa after haemocoelic injection of budded virus of *Spodoptera litura* NPV into pupa of *Spodoptera litura* at different volumes

Volume of inoculum (μl)	n	No. of PIB (Mean ± SD x 10 <sup>8</sup> PIB/pupa) <sup>a</sup>
5	20	2.8 ± 1.2 a
10	20	3.0 ± 1.3 a
20	20	2.1 ± 1.0 a

<sup>a</sup> Data followed by same letters are not significantly different (ANOVA, p>0.05).

### 2 Budded virusの蛹への接種時期

蛹化後1日目、1～2日目および2～3日目の蛹にBudded virusを経皮接種した結果、いずれの場合も感染率は100%で差が認められなかった (Table 1)。

### 3 Budded virusの蛹への接種量

Budded virusの蛹への接種量を1頭当たり5μl、10μlおよび20μlとした場合の感染率をTable 1に示した。いずれの場合も感染率は100%で差が認められなかった。また、生成された多角体数はいずれも10<sup>8</sup>個/頭のレベルであった (Table 2)。

### 4 Budded virusの蛹への接種部位

蛹の異なる部位にBudded virusを経皮接種した結果をTable 3に示した。生成された多角体数は、雄の腹部に接種した試験区と雌の生殖器に接種した試

Table 3. PIB production in a pupa after haemocoelic injection of budded virus of *Spodoptera litura* NPV into pupa of *Spodoptera litura* at different sites

Sex of pupa	Injected site and No. of PIB (Mean $\pm$ SD $\times 10^8$ PIB/pupa) <sup>a</sup>		
	Reproductive organs	Abdomen	Thorax
Male	4.3 $\pm$ 1.2 ab (8) <sup>b</sup>	4.6 $\pm$ 1.2 a (15)	4.1 $\pm$ 1.5 ab (18)
Female	3.1 $\pm$ 1.0 b (10)	3.4 $\pm$ 1.1 ab (16)	3.1 $\pm$ 1.0 ab (17)

<sup>a</sup> Data followed by different letters are significantly different (Scheffé's multiple range test,  $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Number of specimens.

Table 4. Daily PIB production in a pupa after haemocoelic injection of budded virus of *Spodoptera litura* NPV

Days after Inoculation	No. of PIB in a pupa <sup>a</sup>	
	Alive	Dead
1	0	n.a. <sup>b</sup>
2	0	n.a.
3	5.6 $\times 10^7$ a	n.a.
4	9.5 $\times 10^7$ b	n.a.
5	1.7 $\times 10^8$ c	n.a.
6	1.7 $\times 10^8$ c	n.a.
7	1.2 $\times 10^8$ bc	1.4 $\times 10^8$ c
8	9.2 $\times 10^7$ b	1.0 $\times 10^8$ b

<sup>a</sup> Data followed by different letters are significantly different (Scheffé's multiple range test,  $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Data not available

験区との間に有意差が認められた。しかし、この2つの試験区以外では有意差は認められず、生成された多角体数はいずれも $10^8$ 個/頭のレベルであった。蛹への経皮接種においては接種が容易にできる腹部への接種が最も効率的であった。

#### 5 蛹体内における生成多角体数の変化

蛹にBudded virusを接種した後の多角体数の変化を経時的に測定した。生存個体中の多角体は、接種後1日目と2日目までは確認されず、接種後3日目から確認された。接種5日後で1頭当たりの多角体数は $10^8$ 個/頭のレベルに達し、以後の増加は認められなかった。死亡個体は接種7日後から認められたが、1頭当たりの多角体数は $10^8$ 個/頭のレベルであった (Table 4)。

#### 6 Budded virusの6齢幼虫および前蛹への経皮接種

6齢幼虫および前蛹にBudded virusを経皮接種した結果をTable 5に示した。生成された多角体数は、6齢1日目に接種して幼虫の時期に死亡した個体が6齢2日目および3日目に接種して蛹で死亡した個体に比べて有意に多かった。6齢1日目幼虫に接種した場合、幼虫および前蛹で死亡する個体が多かつ

た。また、6齢2日目および3日目の幼虫に接種した場合、蛹で死亡する個体と、前蛹で死亡する個体が認められた。6齢4日目幼虫および前蛹に接種した場合には、死亡個体はすべて蛹であった。しかし、蛹で死亡した個体から回収された多角体数はいずれも $10^8$ 個/頭のレベルで、蛹に接種したものと同程度であった。一方、6齢1日目幼虫に経皮接種して幼虫期または前蛹期に多角体を回収した場合では、生成多角体数が $10^9$ 個/頭のレベルとなった。

#### 7 多角体の6齢幼虫への経口接種

多角体を6齢幼虫に経口接種した結果をTable 6に示した。生成された多角体数は、6齢1日目および2日目に多角体を接種し幼虫期で死亡した個体と6齢3日目に接種し蛹期で死亡した個体で有意差が認められた。しかし、6齢のいずれの時期に接種した場合も生成される多角体数は $10^8$ 個/頭のレベルであった。6齢1日目の幼虫に接種した場合、幼虫および前蛹で全ての個体が死亡した。一方、6齢2日目の幼虫に接種した場合、幼虫、前蛹および蛹でそれぞれ5頭、5頭および4頭の個体が死亡したが、6頭は感染せずに羽化した。6齢3日目の幼虫に接種した場合、幼虫および前蛹で死亡する個体はなく、死亡個体はすべて蛹であった。しかし、ウイルスに感染した個体は4頭のみで、16頭は感染が認められなかった。

## 考 察

NPVの感染様式は経口感染である。感染はハスモンヨトウ幼虫が多角体の付着した餌を摂食することで始まる。多角体は消化管内に入り、消化液によって多角体タンパクが溶解され、多角体に封入されていたウイルス粒子が遊離して中腸細胞に感染する。細胞内に侵入したウイルスは核内で増殖する。増殖したウイルスは、多角体に封入されて他個体に感染する多角体粒子および同一個体内の他細胞に侵入し

Table 5. PIB production and stage of death after haemocoelic injection of budded virus of *Spodoptera litura* NPV into 6th-instar larvae and prepupa of *Spodoptera litura*

Age of larvae	n	Stage of death and No. of PIB (Mean±SD × 10 <sup>8</sup> PIB/pupa) <sup>a</sup>			No. of not infected
		Larva	Prepupa	Pupa	
1 day old	20	12.0±4.0 a (9) <sup>b</sup>	9.2±2.2 ab (7)	2.9±1.3 ab (2)	2
2 days old	20	n.a. <sup>b</sup> (0)	6.3±4.9 ab (9)	2.9±1.2 b (4)	7
3 days old	20	n.a. (0)	5.7±4.7 ab (3)	3.9±1.5 b (11)	6
4 days old	20	n.a. (0)	n.a. (0)	5.1±1.6 ab (20)	0
prepupa (5 days old)	20	n.a. (0)	n.a. (0)	5.1±2.0 ab (20)	0

<sup>a</sup> Data followed by different letters are significantly different (Scheffé's multiple range test,  $p<0.05$ ).

<sup>b</sup> Number of deaths.

Table 6. PIB production and stage of death after oral injection of PIB of *Spodoptera litura* NPV into 6th-instar larvae of *Spodoptera litura*

Age of larvae	n	Stage of death and No. of PIB (Mean±SD × 10 <sup>8</sup> PIB/pupa) <sup>a</sup>			No. of not infected
		Larva	Prepupa	Pupa	
1 day old	20	3.0±0.9 a (15) <sup>b</sup>	2.9±1.2 ab (5)	n.a. (0)	0
2 days old	20	3.9±1.8 a (5)	2.4±1.5 ab (5)	2.8±1.0 ab (4)	6
3 days old	20	n.a. (0)	n.a. (0)	1.1±0.7 b (4)	16

<sup>a</sup> Data followed by different letters are significantly different (Scheffé's multiple range test,  $p<0.05$ ).

<sup>b</sup> Number of deaths.

で感染するBudded virusという機能が異なる2つのウイルス粒子となる。このため、ウイルスを経口感染させる場合には多角体粒子を、経皮感染させる場合にはBudded virusを必要とする。Budded virusを蛹に経皮接種した結果、蛹での多角体の回収が可能であることが確認できた。本研究では、基準液を希釈した場合には100%の感染率が得られなかった。一方、Monobrullah and Nagata [4]は、ハスモンヨトウ老熟幼虫の体腔内にBudded virusを経皮接種した場合は1000倍に希釈しても100%の感染率が得られたと報告している。このことから、蛹は幼虫に比べて感染しにくいと考えられる。NPVは細胞増殖が盛んな組織でよく増殖すると考えられている。ハスモンヨトウなどの鱗翅目昆虫では幼虫と成虫で体内の構造が大きく異なる。そのため蛹期間では細胞の増殖が盛んであると考えられる。その中でも特に飛翔筋と生殖器ができる部分での細胞の増殖が盛んであると考えられ、生成される多角体数が増加することが期待された。本研究の接種方法では飛翔筋あるいは生殖器の部位で感染が起っていたかは不明であるが、いずれの部位にBudded virusを接種しても生成される多角体の数に差が認められなかった。多角体を大量増殖するための接種部位としては、

容易に注射ができる腹部が適当であると考えられる。また、Monobrullah and Nagata [4]は、ハスモンヨトウの老熟幼虫の体腔内にBudded virusを経皮接種した場合は高い感受性を持つと報告している。このことから6齢幼虫および前蛹への経皮接種により蛹期でのウイルス回収が可能であると予測された。本研究の結果、6齢幼虫および前蛹に経皮接種をしても蛹から多角体を回収することが可能であることが確認された。さらに蛹から回収される多角体の数は、蛹に経皮接種した場合との間に差はなかった。6齢1日目の幼虫に経皮接種し、幼虫期または前蛹期に多角体を回収した場合では、生成多角体数が10<sup>9</sup>個/頭のレベルとなり、他の時期と比較して多くの多角体を回収できると考えられた。しかし、幼虫期のウイルス回収は前述したとおり、皮膚の崩壊や細菌類の繁殖などの問題がある。また、前蛹での回収については、確実に前蛹で死亡する時期が特定できない。さらに、前蛹で死亡した場合、前蛹は皮膚が堅いため、体液の回収が困難であった。このことから、幼虫期の経皮接種による蛹での多角体の回収は、効率的でないと考えられた。

本研究では、6齢2日目および6齢3日目の幼虫に多角体を経口接種することで蛹期に多角体を回収

することが可能であることが確認された。Monobrullah and Nagata [4]はハスモンヨトウの6齢幼虫はウイルスの経口接種に対して感受性ではないと報告している。また、Murray et. al. [5]は、マイマイガ (*Lymantria dispar*) の終齢幼虫にマイマイガNPVを経口接種して感染した個体は多角体の産生は無いかわずかであろうと述べている。しかし、岡田[6]は、ハスモンヨトウNPVに感染したハスモンヨトウ幼虫が蛹期に死亡した場合、蛹1頭あたり  $4 \times 10^9$  個の多角体を産生すると報告している。岡田[6]の報告では詳細な接種時期が記載されていないが、接種濃度は  $LC_{100}$  である。一般に  $LC_{100}$  の濃度は  $LC_{50}$  の100倍に相当すると言われている。本研究では6齢幼虫に  $LC_{50}$  の100倍量に相当する  $3 \times 10^9$  個/mlの濃度で10 $\mu$ lずつの多角体を接種したが、生成多角体数はいずれの死亡時期でも岡田[6]より少なかった。また、6齢3日目に接種した場合は、非感染の個体が多かった。このことから、6齢3日目幼虫に対しては  $3 \times 10^9$  /mlの接種濃度は  $LC_{50}$  の100倍相当になっていなかったことが考えられる。いずれにしても、6齢3日目幼虫はウイルスに対する感受性が低下したと考えられることから、感染させるためにはさらに高濃度での接種が必要であるとされる。終齢幼虫でウイルス感受性が低下する原因として、蛹内での生理的変化が感染を防ぐこと、あるいはウイルスが増殖して昆虫を死亡させるのに十分な時間が不足したことが考えられる。Monobrullah and Nagata [4]は、蛹化に関する何らかの生理的変化が発育段階後期の感染を妨げることおよび昆虫が死亡に至るまでに十分な時間がないと感染できないと述べている。さらにオオタバコガ (*Heliothis armigera*) の老熟幼虫においては、ウイルスの複製が血リンパ中では起こらないことも報告されている[7]。

蛹への経皮接種および6齢幼虫への経口接種のいずれも蛹で回収された多角体は  $10^8$  個/頭のレベルであった。実際の防除に必要な多角体数は10 aあたり  $1 \sim 3 \times 10^{11}$  個である[6]。岡田[6]が報告した増殖

法であれば、幼虫1頭あたり  $4.0 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^{10}$  個の多角体を回収することができるため、防除に必要な罹病幼虫数は13~39頭である[6]。一方、蛹による増殖法で得られる多角体数を基に試算すると、約150頭の蛹が必要である。このように罹病虫数だけを比較すると、蛹での増殖は効率的ではない。しかし、幼虫での増殖は前述したように多大な労働力が必要である。また、罹病虫の体液には細菌が繁殖しやすく、悪臭がひどく精神的苦痛も大きい。これに対し、蛹での増殖は、ウイルスの接種および回収は簡単であり、臭いの発生は認められない。さらに、ウイルスは蛹の殻に包まれたウイルスペレットとして取り扱いや流通が容易になることが期待される。

## 引用文献

- [1] Grace, T. D. C.: Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature*, 195, 788-789 (1962)
- [2] 川崎健次郎・池内まき子・日高輝展: 飼料交換を要しないミツモンキンウワバの室内飼育法. *応動昆*, 31, 78 - 80 (1987)
- [3] 小池 勝: 昆虫の大量細胞培養による天敵ウイルスの生産. *植物防疫*, 45, 161-164 (1991)
- [4] Monobrullah, M. D. and Nagata, M.: Effect of larval age on susceptibility of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Spodoptera litura* multiple nuclear polyhedrosis virus. *The Canadian Entomologist*, 132, 337-340 (2000)
- [5] Murray, K. D., Shields, K. S., Burand, J. P. and Elkinton, J. S.: The effect of gypsy moth metamorphosis on the development of nuclear polyhedrosis virus infection. *J. Invertebr. Pathol.*, 57, 352-361 (1991)
- [6] 岡田齊夫: 核多角体病ウイルスによるハスモンヨトウの防除に関する研究. *中国農業試験報告*, E12, 1-66 (1977)
- [7] Teakle, R. E., Jensen, J. M. and Giles, J. E.: Age-related susceptibility of *Heliothis punctigera* to a commercial formulation of nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 36, 281-282 (1986)
- [8] Wiggins, G. B.: Larvae of the north american caddisfly genera (Trichoptera). University of Toronto Press, Toronto 401pp. (1977)

---

**Mass Production of *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus using *Spodoptera litura* Pupae.**Katsuo TSUDA<sup>†</sup>, Rika HIGASHI\*, Fumiko SATO, Yositaka SAKAMAKI and Kanetosi KUSIGEMATI*(Laboratory of Entomology)***Summary**

In order to achieve a more effective mass production of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (NPV), the collecting method using pupae was investigated. Pupae were infected by a haemocoelic injection of budded viruses and the number of polyhedral inclusion bodies (PIBs) produced in the pupal tissues was counted. The number of PIB produced in a pupa was about  $10^8$  when injected under several conditions. When the last instar larvae were infected by per oral injection of PIB, some of them died in the pupal stage. The number of PIB in a pupa was about  $10^8$ .

**Key words :** *Spodoptera litura* NPV, pupae, mass production

<sup>†</sup>: Corresponding to: Katsuo TSUDA (Laboratory of Entomology)