

Chilo iridescent virusの感染病理に関する研究： 1. CIVの増殖様式

大庭, 道夫
九州大学農学部生物的防除研究施設天敵微生物学部門

<https://doi.org/10.15017/23199>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 30 (1/2), pp.51-65, 1975-08. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

Chilo iridescent virus の感染病理に関する研究

1. CIV の増殖様式

大庭道夫

九州大学農学部生物的防除研究施設

天敵微生物学部門

(1975年3月22日受理)

Studies on the Pathogenesis of *Chilo* Iridescent Virus

1. Mode of CIV-Multiplication *In Vivo*

MICHIO OHBA

Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

第1章 イリデッセントウイルス の研究史

双翅目昆虫であるガボンボ科の1種 *Tipula paludosa* から発見された特異なウイルス (Xeros, 1954) は *Tipula iridescent virus* (TIV) と命名され (Williams and Smith, 1957), その後の昆虫ウイルス学および一般ウイルス学にとって興味ある存在となり, また他の多くのイリデッセントウイルス (iridescent virus) の発見の端緒となつた。

TIV に感染した宿主細胞 および組織あるいはウイルスのペレットは青紫色のイリデッセンス (iridescence) を示すが, これはウイルス粒子の結晶状配列により可視光線が Bragg 型回折をうけるためといわれる (Klug *et al.*, 1959). その後同様の性状を示すウイルスが3目にわたる多くの昆虫からも分離された。すなわち *Sericesthis iridescent virus* (SIV) が鞘翅目昆虫のカブトムシの1種 *Sericesthis pruinosa* の幼虫から発見分離され (Steinhaus and Leutenegger, 1963), 同じく鞘翅目昆虫の *Costelytra zealandica* から類似のウイルスが分離されている (Kalmakoff *et al.*, 1972). 一方双翅目昆虫からは TIV 発見以後世界各地においてこの群に属すると考えられるウイルスが多数発見されたが, とくにシマカの1種である *Aedes taeniorhynchus* から発見されたウイルスはかから最初に分離されたものとして mosquito

iridescent virus (MIV) と命名された (Clark *et al.*, 1965). しかし TIV および MIV と他の双翅目昆虫たとえばシマカの1種 *Aedes annulipes* (Weiser, 1965), *Aedes cantans* (Weiser, 1965; Tinsley *et al.*, 1971; Buchatsky and Sheremet, 1974), *Aedes fulvus pallens* および *Aedes vexans* (Chapman *et al.*, 1966), *Aedes detritus* (Service, 1968; Vago *et al.*, 1969; Hasan *et al.*, 1970), *Aedes stimulans* (Anderson, 1970), *Corethrella brakeleyi* (Chapman *et al.*, 1971), スカカの1種 *Culicoides* sp. (Chapman *et al.*, 1968), *Psorophora ferox* (Chapman *et al.*, 1966) およびブユの1種 *Simulium ornatum* (Weiser, 1968) などから発見されたイリデッセントウイルスとの相互の関連についてはまだ解析がほとんどなされていない。またユスリカの1種 *Chironomus plumosus* から分離されたウイルスは, イリデッセンスの発現が必ずしもこのウイルス群に共通した属性ではないことを示唆した (Stoltz *et al.*, 1968).

わが国においては Fukaya and Nasu (1966) によつて鱗翅目のニカメイガ *Chilo suppressalis* の病死幼虫からイリデッセントウイルスが分離されて *Chilo iridescent virus* (CIV) と命名された。これはこの種のウイルスがアジアから発見された最初の例であり, また鱗翅目昆虫からの分離例としては世界で最初のものであつた。鱗翅目昆虫からはそのちにコ

ウモリガの1種 *Wiseana cervinata* およびメイガの1種 *Witlesia sabulosella* から発見されている (Fowler and Robertson, 1972). 以上のように数目的昆虫から分離されてきたウイルスは、相互に物理化学的および生物学的性状が類似するので、現在 *Tipula iridescent virus* をタイプとするイリドウイルス (Iridovirus) として分類されており、またこの群に脊椎動物から分離された African swine fever virus や amphibian cytoplasmic virus なども属する可能性が唆されている (Wildy, 1971). 昆虫から分離されたウイルスについては便宜的に TIV をイリデッセントウイルス・タイプ1として以下順次、番号で表示する方式が提唱されており (Tinsley and Kelly, 1970), 現在までタイプ 1~19 が示されている (Kelly and Robertson, 1973).

これらのウイルスに共通した性質のひとつとしてウイルス粒子 (ビリオン) が大型で齊一であることがあげられる。たとえば TIV の直径は $130\text{ m}\mu$ (Williams and Smith, 1957), SIV は $130\sim 170\text{ m}\mu$ (Steinhaus and Leutenegger, 1963; Mercer and Day, 1965), MIV は $180\sim 195\text{ m}\mu$ (Clark *et al.*, 1965; Stoltz, 1971), CIV は $160\text{ m}\mu$ (Fukaya and Nasu, 1966) といったようにそれらの直径はほぼ $130\sim 200\text{ m}\mu$ の範囲内にある。これらの値は既知の正20面体ウイルスとしては最大級のものであり、光学顕微鏡によるビリオンの観察が可能である (Stoltz, 1971).

ウイルスの沈降定数 ($S_{20,w}$) は TIV, SIV あるいは CIV についてはほぼ 2,200 である (Day and Mercer, 1964; Bellett and Inman, 1967; Glitz *et al.*, 1968; Kalmakoff and Tremaine, 1968). 一方 MIV の沈降定数は 4,450 で (Matta, 1970), これは MIV の粒子重 [$4.1\times 10^{-15}\text{ g}$ (Lowe *et al.*, 1970)] が他 [TIV: 約 $2\times 10^{-15}\text{ g}$ (Thomas, 1961), SIV: $2.7\times 10^{-15}\text{ g}$ (Day and Mercer, 1964)] より大きな値をもつことと一致する。

ビリオンの表面にはコート蛋白のサブユニットが配列しており、TIV については Smith and Hills (1962) はその総数を 812 とした。しかし Wrigley (1969, 1970) は詳細な電子顕微鏡の研究からサブユニットの新しい構築モデルを提唱し、SIV についてはその数が 1,562, TIV では 1,472 であると推定した。リン脂質がビリオンに含まれることが報告されているが (Thomas, 1961; Glitz *et al.*, 1968), 少量であり、また SIV (Day and Mercer, 1964) および CIV (大庭, 未発表) とともにエーテルに耐性であ

り、リン脂質は必須の成分とは考えられていない。

ビリオンの内部には電子密度の高いコア (core) が存在し、ここに核酸が位置する (Thomas and Williams, 1961; Mercer and Day, 1965). ウイルス核酸は2本鎖 DNA であり (Bellett and Inman, 1967), その塩基比 (G+C 含有率) は TIV では 31~32% (Thomas, 1961; Bellett and Inman, 1967), CIV および SIV ではそれぞれ 28~29%, 31% (Bellett and Inman, 1967) であつて互いに近似した値を示す。なお invertebrate poxvirus のビリオンにいくつかの酵素活性が見出されたが (Pogo *et al.*, 1971), SIV および CIV ビリオン中には RNA-polymerase の活性 (Kelly and Tinsley, 1973) および nucleotide triphosphatase 活性 [Kelly, 未発表 (Kelly and Robertson, 1973 による)] が存在するという。

イリデッセントウイルス相互間の物理化学的性状および生物学的性状は非常に類似しているの、その分類および同定には血清学的方法を用いることが必要と考えられる。ビリオン自身は寒天中を拡散することができないので、それをアルカリ処理して得られた抗原を使用して沈降反応が行なわれた。その結果 TIV と SIV は血清学的にも近縁であるが明らかに異なり (Day and Mercer, 1964), また CIV と TIV (Fukaya and Nasu, 1966) および CIV と SIV [Day, 未発表 (Fukaya and Nasu, 1966 による)] にも血清学的に差異のあることが報告された。一方補体結合反応においても TIV と SIV の近縁性は確かめられたが差異が存在し、また両者と MIV の間には関連は認められなかつた (Cunningham and Tinsley, 1968). これらのウイルスの抗原分析による統一的な分類はまだ試みられていない。またウイルス蛋白の違いは電気泳動像によつても確かめられている (Glitz *et al.*, 1968; Kelly and Tinsley, 1972).

イリデッセントウイルス (群) についてはビリオンの性状のほか病理学的研究による知見も蓄積されつつある。これらの結果によるといづれのウイルスもビリオンは細胞質にのみ存在している (Williams and Smith, 1957; Bird, 1961; Bellett and Mercer, 1964; Leutenegger, 1964; Xeros, 1964; Clark *et al.*, 1965; Fukaya and Nasu, 1966; Mitsushashi, 1966b; Stoltz *et al.*, 1968). 感染細胞の細胞質には光学顕微鏡的にはヘマトキシリンに好染しフォイルゲン反応陽性の塊状構造がみられ、また電子密度の高い物質の集積とその周辺部におけるビリオンの形態形

成が観察されている (Xeros, 1954; Bird, 1961; Leutenegger, 1964; Day, 1965; Weiser, 1965; Hukuhara and Hashimoto, 1966; Mitsuhashi, 1966b). ウイルス DNA の合成はこの塊状構造内部で進行することが SIV および TIV についてオートラジオグラフィで証明された (Bellett, 1965; Leutenegger, 1967; Youngusband and Lee, 1970). 一方 SIV および CIV 感染にともなうウイルス DNA あるいはウイルス特異 RNA の合成や宿主細胞自身の代謝などが生化学的にしらべられ (Kelly and Tinsley, 1974b), また CIV の複製へのアクチノマイシン D およびピューロマイシンの影響がしらべられている (Cunningham and Hayashi, 1970).

Chilo iridescent virus (CIV) は福岡県太宰府町近郊のニカメイガ *Chilo suppressalis* 越冬幼虫集団中の罹病虫より分離された (Fukaya and Nasu, 1966) が、福岡県以外での CIV の分布は知られておらず、稀なウイルス病と考えられ、またニカメイガ以外の自然宿主も知られていない。

CIV の諸性状については、当初ニカメイガの微生物的防除への CIV の利用の可能性を検討する目的で、次のような性状が調査されてきた。すなわち野外昆虫およびカイコ *Bombyx mori* に対する感染性 (Mitsuhashi, 1967b; 浜, 1968; Ono and Fukaya, 1969; Okada and Inoue, 1970; Fukuda, 1971; Jensen *et al.*, 1972; McLaughlin *et al.*, 1972; 小野ら, 1972), ウイルスの安定性 (三橋・小山, 1967), ウイルスの精製および物理化学的性状 (Tojo and Kodama, 1968), ウイルス核酸の性状および他種ウイルス核酸との比較 (Bellett and Inman, 1967; Bellett and Fenner, 1968; Kelly and Avery, 1974), 他のイリデッセントウイルスとの血清学的関連 [Fukaya and Nasu, 1966; Day, 未発表 (Fukaya and Nasu, 1966 による); Gibbs, 未発表 (Bellett, 1968 による); Kalmakoff *et al.*, 1972], ウイルス蛋白の SIV との比較 (Kelly and Tinsley, 1972) などについて研究された。

一方個体でのイリデッセンスの発現経過についての研究 (Mitsuhashi, 1966a), および *in vivo* と *in vitro* における細胞病理学的観察 (Mitsuhashi, 1966b, 1967a, b; Hukuhara and Hashimoto, 1967; Kelly and Tinsley, 1974a) が行なわれた。また生化学的調査としてはピリオンにおける酵素活性の存在 [Kelly and Tinsley, 1973; Kelly, 未発表 (Kelly and

Robertson, 1973 による)], 抗生物質のウイルス複製への影響 (Cunningham and Hayashi, 1970), 感染細胞における核酸合成 (Kelly and Tinsley, 1974b) などがある。

このように CIV に関する研究は多項目にわたっているが、その増殖様式についての知見は断片的であり、とくに感染の定量的な解析は皆無である。CIV 感染においては病勢の進行は他の昆虫ウイルス病と比較すると緩慢であること、*in vitro* において持続感染が成立すること (Mitsuhashi, 1967a) など特異な様相が示されるので、その感染病理の解明は昆虫ウイルス学において大きな意義をもつものと考えられる。

本研究を遂行するにあたり終始ご指導、ご鞭撻をいただいた九州大学農学部・鮎沢啓夫教授および安松京三名誉教授に、また日頃ご批判とご協力をいただいた河原畑勇助教授ならびに岩花秀典氏・舟越正子氏をはじめとする同農学部附属生物的防除研究施設天敵微生物学部門の教室員の方々に対して深く感謝の意を表す。東京教育大学農学部・故深谷昌次教授ならびに農林省農業技術研究所・三橋淳博士は貴重な実験材料を快く分与され、ここにお礼申し上げる。九州大学農学部・日高醇教授、筑紫春生教授、平嶋義宏教授からは常にご鞭撻をいただいたので感謝の意を表す。

第 2 章 CIV の増殖ならびに細胞病理

I. 緒言

CIV に関する知見はピリオンの物理化学的性状・血清学的性状あるいは宿主域などについては比較的多いが、感染病理に関する研究はイリデッセンスを指標とした調査ならびに電子顕微鏡による断片的な観察がなされているにすぎない。CIV は DNA ウイルスであるが宿主細胞の細胞質内で増殖し、poxvirus とならぶ特異なウイルスであり、その感染病理に関する研究は重要と考えられる。著者はまず CIV の *in vivo* における ID_{50} -時間曲線を解析し、ついで CIV 感染にともなう形成される細胞質封入体の性状とその意義をニカメイガと比較的近縁であるハチミツガ幼虫の血球細胞を使用して検討した。

II. 材料および方法

ウイルス モンシロチョウ *Pieris rapae curcivora* の幼虫を通過させた CIV をさらにハチミツガ

Galleria mellonella 幼虫で増殖させた。感染幼虫および蛹を 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.2 中で磨砕し低速(3,000 rpm, 10 分間)および高速(12,000 rpm, 20 分間)の分画遠心を数回反復してウイルスを精製した。使用前にはウイルス感染価($-\log ID_{50}$)を測定した。

供試昆虫 30°C で飼育したハチミツガ幼虫(体重: 約 150~200 mg)を使用した。

感染価の測定 ウイルス浮遊液を 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.2 (ペニシリン約 100 単位/ml およびストレプトマイシン約 100 μ g/ml を含む)で 10 倍階段希釈した。各希釈あたり 5 頭のハチミツガ幼虫に 0.005 ml/1 頭を体腔内接種して 22~23°C に保護し、接種後 7~10 日目に実体顕微鏡下で剖検した。位相差顕微鏡による血球細胞の観察を行なった。感染の判定はイリデッセンス発現の有無および血球細胞での細胞質封入体形成の有無により、感染価($-\log ID_{50}$)の算定は Reed and Muench (1938) の方法によった。

血球細胞の観察 CIV 感染ハチミツガ幼虫の腹脚を切断して流出した体液を血球細胞の観察に供試した。無処理の血球細胞は採血後ただちに位相差顕微鏡で観察した。染色に際しては体液をスライドガラスに塗抹して風乾させたのちに、メタノールで 5 分間室温固定を行ない、ギムザ染色、メチルグリーン・ピロニン染色、アクリジンオレンジ染色を常法にしたがって施した。

蛍光抗体法 精製ウイルス($-\log ID_{50}=8.0/0.005$ ml, 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.2 に浮遊)の総量 5 ml を 9 回にわけて、静脈内注射によつて家兎を免疫した。最後の注射から 7 日後に全採血を行なつて得た血清を蛍光抗体の作製に使用した。蛍光抗体の調製はほぼ川村(1966)にしたがつた。すなわち抗血清から 1/3 飽和硫酸塩析を 2 回反復して γ -グロブリンを分離した。これを生理食塩水に対して透析したのちに蛋白量を分光光度計で測定し、その 1/150 量のフルオレッセイン・イソチオシアネート (FITC, Difco 製) と反応させて色素標識を行なった。反応は pH 9.5 で行ない、4°C, 4 時間とした。反応終了液はセファデックス G-25 のカラム (0.005 M リン酸緩衝液 pH 7.0+0.1 M NaCl) を使用し同緩衝液で溶出させ、未結合色素を除去した。色素結合 γ -グロブリンはさらに DEAE セルロースカラムを通過させ、上記緩衝液で溶出してくる分画を実験に供した。染色に際しては体液をスライドガラスに塗抹して風乾後、冷却アセトン (-20°C) 中で 1 時間固定した。染色は直接

法にて行ない室温または 37°C で 30~60 分間施したのちに、生理食塩水で数回洗滌して蛍光顕微鏡で観察した。

オートラジオグラフィ DNA 前駆体として ^3H -チミジン(比活性, 11.5 Ci/mM)を使用した。CIV に感染したハチミツガ幼虫(体重: 約 200 mg)に 10 μ Ci/1 頭を体腔内注射した。所定時間後に体液をスライドガラスに塗抹して風乾したのちにメタノールで 5 分間の室温固定を施した。感光乳剤(Sakura, NRH-1)によるスライドガラスの被覆は dipping 法によつた。露出期間は 4°C で 4 日間とし、のち現像処理を行なつてギムザ染色を施した。

III. 実験結果

第 1 項 CIV の増殖 (ID_{50} -時間曲線)

CIV の一定量をハチミツガ幼虫に体腔内接種して 22~23°C に保護し、経時的に 5 頭(実験によつては 3 頭)の体液をプールしてウイルス感染価を測定した。数回の反復実験を行なったが、いずれにおいても同様の増殖曲線 (ID_{50} -時間曲線)が得られた。Fig. 1 に示すように体液のウイルス感染価は接種後下降したが、約 1 日後から急激に上昇しはじめ、4 日目以後にはほぼ一定の値を示すようになった。すなわち ID_{50} -時間曲線は減少期、上昇期および定常期の 3 相を明瞭に示した。

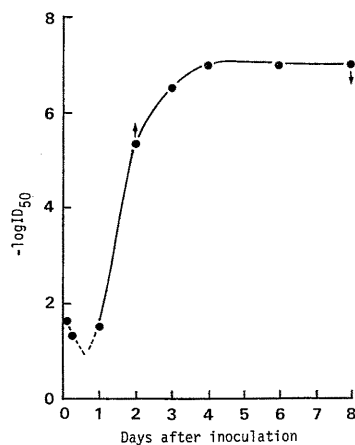


Fig. 1. ID_{50} -time curve of CIV in *Galleria mellonella* larvae.

つぎに CIV 接種後にハチミツガ幼虫を高温に保護した場合のウイルスの増殖をしらべた。30°C におけ

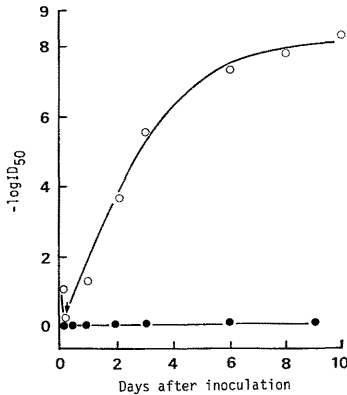


Fig. 2. ID₅₀-time curves of CIV at high temperatures. ○—○: 30°C, ●—●: 35°C.

る ID₅₀-時間曲線は 22~23°C におけるそれと同様であり、ウイルス産生も良好であったが、35°C に保護した場合にはウイルス感染価の上昇は認められず CIV は増殖しなかつた (Fig. 2).

第 2 項 CIV 感染にともなう宿主細胞の変化

1. 位相差顕微鏡による感染細胞の観察

ハチミツガ幼虫に CIV を体腔内接種したのちに、経時的にその体液を採取して血球細胞を観察すると、ウイルス接種量によつて出現時期は多少異なつたが、接種 1~3 日後において細胞質に特異な封入体が出現した。この時期においてはいずれの器官および組織もイリデッセンスを示さなかつた。また CIV を接種しない正常幼虫の血球細胞にはこのような細胞質封入体の出現は見られなかつた。

感染初期においては封入体は compact な円形を呈し (Fig. 3a), 出現部位は細胞質のなかでも細胞膜に近い部位であることが比較的多かつた。また 1 細胞に 1 個の封入体の形成された例が多かつたが、2 個以上の封入体形成が観察される細胞もあつた (Fig. 3b)。

ハチミツガ幼虫の血球細胞は形態および細胞化学的な相違により 5 種類に分類されている (Vercauteren and Aerts, 1958; Jones, 1962; Ashhurst and Richards, 1964) が、いずれの種類の細胞にも封入体の形成が見られた。

この細胞質封入体は感染の進行とともに発達して漸次その領域を拡大し (Fig. 3c および Fig. 3d), 核と同程度の大きさの時期をすぎると、一定の形状を失なつて感染末期には細胞質全体に拡散した (Fig. 3e および Fig. 3f)。

封入体内部は形成初期には無構造であつたが、感染

の進行に伴つて不規則な網状構造を示すようになった。さらに感染後期~末期には細胞質の縁辺部や拡散した封入体の内部に特徴のある不定形の塊状構造が出現した。1 細胞に 2 個以上の封入体が形成された場合には、それぞれ独立に発達したが末期には融合した。

核の形態的な変化は比較的小なかつたが、感染後期以後は封入体の拡散にともなつて変形した。また細胞自体の形状は末期には円形に膨化して細胞の種類を識別することが困難となつた。

2. ギムザ染色による感染細胞の観察

CIV を接種したハチミツガ幼虫の血球細胞にギムザ染色を施して観察すると接種 1~3 日後において細胞質内に封入体が出現したが、これは位相差顕微鏡による観察において認められた封入体に一致するものと考えられた。ギムザ染色を施すと細胞質封入体は核と同様に濃赤色または赤紫色に染まり、感染初期には円形または楕円形の compact な形状を呈した。

1 細胞について 1 個の封入体の形成された例 (Fig. 4a) がもつとも多かつたが、細胞によつては 2~4 個の封入体形成が観察され (Fig. 4b), また封入体の出現した部位は細胞質の縁辺部であることが比較的多かつた。この封入体は漸次発達して細胞質に拡大し (Fig. 4c および Fig. 4d), 一時核と同程度の大きさと形状になつたが、封入体内部は一樣に密に染まりクロマチン粒子の明瞭な核とは容易に判別できた。またハチミツガ幼虫の血球細胞には稀に 2 核を有するものが存在したが、それらの細胞質にも封入体が形成された。一方細胞分裂中の血球細胞もしばしば観察されたが、封入体の形成された例は非常に稀であつた (Fig. 4e)。

感染後期から末期にかけて封入体は細胞質全体に拡散したが、その内部あるいは縁辺部にギムザ染色によつては染まりにくい不定形の領域が出現し漸次拡大した (Fig. 4f)。

核は感染後期に至るまで形態的には大きな変化は観察されなかつたが、後期~末期には膨化して赤紫色の色調も低下した。

3. 蛍光抗体法による CIV 抗原発現の検討

調製した蛍光抗体の特異性は染色試験によつて確かめられた。すなわち TIV に典型的に感染したハチミツガ幼虫の血球細胞および正常幼虫の血球細胞は CIV に対する蛍光抗体では染色されず、CIV 感染幼虫の血球細胞のみが特異的に染色された。また CIV で吸収した蛍光抗体液によつて CIV 感染細胞は染色されなかつた。なお使用した抗 CIV 血清ならびに蝨

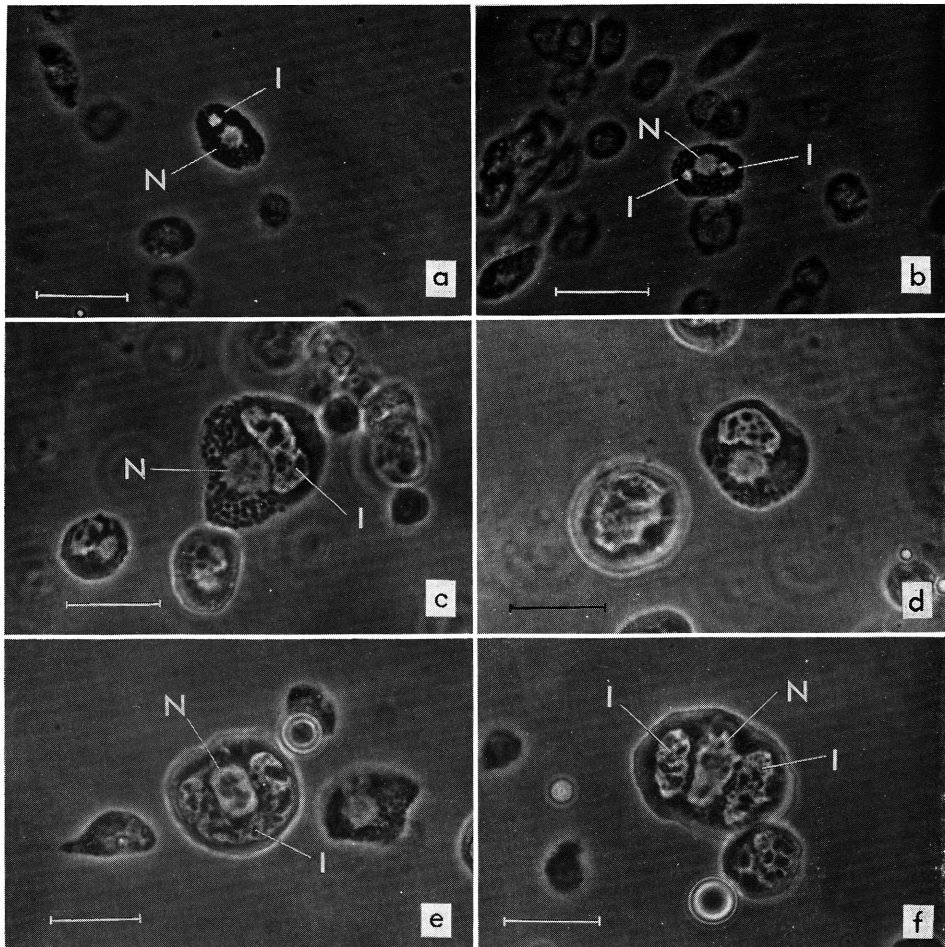


Fig. 3. Formation of cytoplasmic inclusions in the larval hemocytes of *Galleria mellonella* infected with CIV. Phase contrast. Scale marker is 20μ . Symbols: I, inclusion; N, nucleus. (a) Early stage of CIV-infection. Compact cytoplasmic inclusion can be seen. (b) Formation of two compact inclusions in one cell. (c) Middle stage of CIV-infection. Network is apparently shown in inclusion. (d) Two different stages of infection. Right cell: middle stage of infection. Left cell: last stage of infection. (e) Last stage of CIV-infection. Diffused cytoplasmic inclusion and malformed nucleus are seen in the hypertrophied cell. (f) Last stage of infection. Two developed inclusions and hypertrophied nucleus can be seen.

光抗体液の抗体価は抗体希釈法による沈降反応（重層法）で測定した結果、それぞれ1,280倍および80倍であった。予備的な染色試験を行なった結果にもとづき、蛍光抗体液は生理食塩水で4倍に希釈して用いた。

CIVを接種したハチミツガ幼虫の血球細胞を経時的に観察すると接種後1～3日目に細胞質内に限局した特異蛍光を示す部位が出現した（Fig. 5a）。この部位の輪郭は感染初期には円形あるいは長円形をなし、

1細胞に2カ所以上出現する場合もあった。感染中期から後期にかけて漸次発達した特異蛍光を示す領域（Fig. 5b）は一定の形状を失わない、感染末期には細胞質のほとんどの面積を占めるに至った（Fig. 5c）。

他方蛍光を示す細胞の割合は漸増し、感染末期にはほとんどすべての血球に特異蛍光の発現が見られた（Fig. 6およびFig. 7）。しかし細胞核には感染の全過程を通じて特異蛍光は観察されなかった。また感染後期から末期にかけて出現したゴムザ染色で染まりに

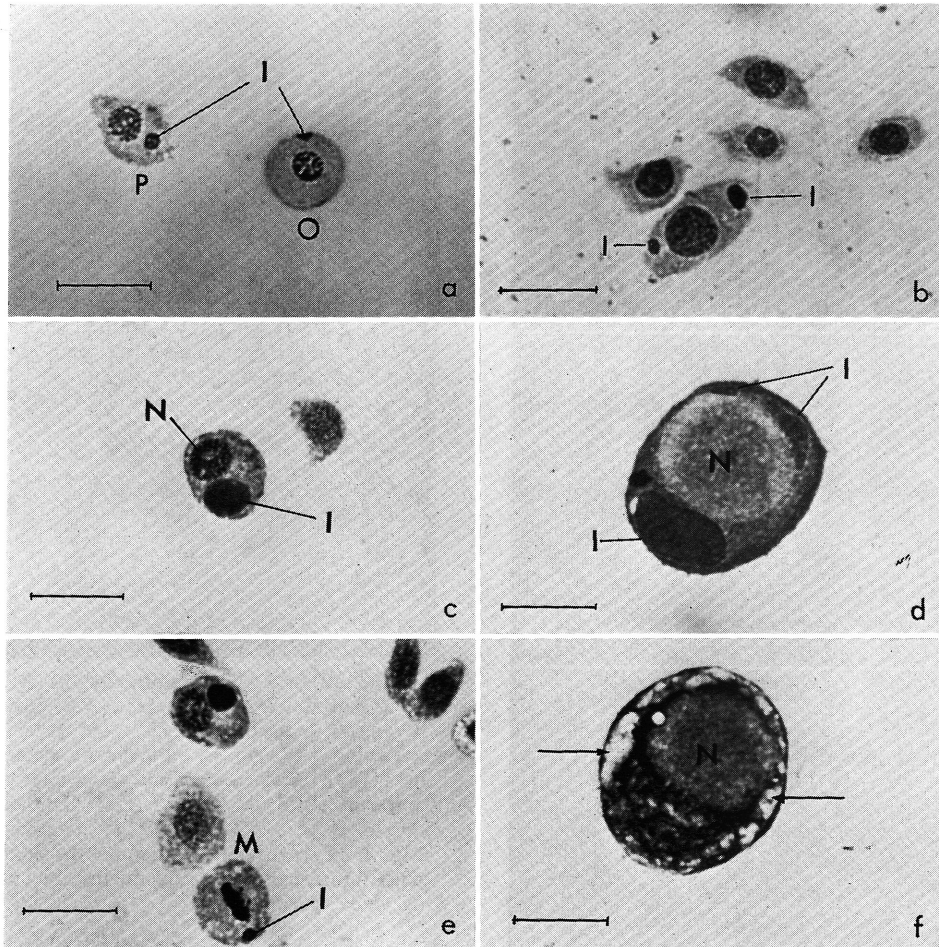


Fig. 4. Formation of cytoplasmic inclusions in the hemocytes of *Galleria mellonella* infected with CIV. Giemsa stain. Scale marker is 20 μ . Symbols: I, inclusion; N, nucleus. (a) Formation of compact inclusions in two types of hemocyte at early stage of infection. P: plasmatocyte, O: oenocytoid. (b) Formation of two compact inclusions in one cell. (c) Middle stage of CIV-infection. The inclusion is distinguishable from the nucleus by the absence of chromatin. (d) Middle stage of infection. Three inclusions and hypertrophied nucleus can be seen. (e) Inclusion formed in the cytoplasm of mitotic hemocyte (M). (f) Last stage of infection. The sites which cannot be stained with Giemsa solution are seen (arrows).

くい部位は蛍光抗体と反応して特異蛍光を示した。

4. 核酸の分別染色による感染細胞の観察

メチルグリーン・ピロニン染色を CIV 感染細胞に施すと細胞質封入体は青緑色に染まり、また核も青緑色を示したが他の細胞質部分は赤色を呈した (Fig. 8)。さらにアクリジンオレンジで感染細胞を染色して蛍光顕微鏡で観察すると、細胞質封入体および核は黄緑色の蛍光を示し、他の細胞質部分は炎紅色の蛍光を示した (Fig. 9a および Fig. 9b)。感染末期の細胞では黄緑色の蛍光を示す部分は細胞質全域に広がり、

その内部に炎紅色の蛍光が網目状に分布することが観察され、とくにそれは核の周辺部で強かった。

5. 感染細胞のオートラジオグラフィによる観察

ハチミツガ幼虫に CIV を体腔内接種し、24 時間後に DNA 前駆体として ^3H -チミジンを注射したのちに血球細胞をとり、オートラジオグラフィを行なった。 ^3H -チミジン注射 5 時間後および 24 時間後ともに感染段階のさまざまな細胞が見られ、封入体形成の観察されない非感染細胞から発達した封入体を有する細胞まで混在した。非感染細胞および CIV を接種し

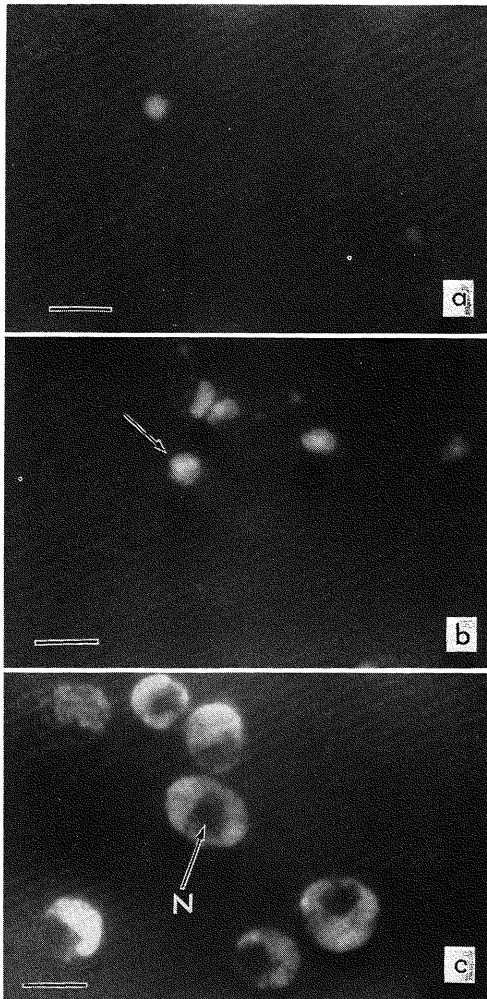


Fig. 5. Localization of CIV-antigens by immunofluorescence in the larval hemocytes of *Galleria mellonella*. Scale marker is $20\ \mu$. (a) CIV-infected hemocytes stained with fluorescent antibody 3 days after the virus inoculation. Immunofluorescence can be seen only in the cytoplasm, but not in the nucleus. (b) CIV-infected hemocytes 5 days after the virus inoculation. Arrow indicates the developed immunofluorescence in the cytoplasm. (c) CIV-infected hemocytes 7 days after the virus inoculation. Specific fluorescence covers whole cytoplasm, but not nucleus (N).

なかつた幼虫の血球細胞では銀粒子の集積は核部分にのみ見られ、細胞質には観察されなかつた。これに反して感染細胞では形成初期の compact な封入体あるいは発達した封入体に一致する細胞質部分に顕著な銀粒子の発現が見られた (Fig. 10a および Fig. 10b)。

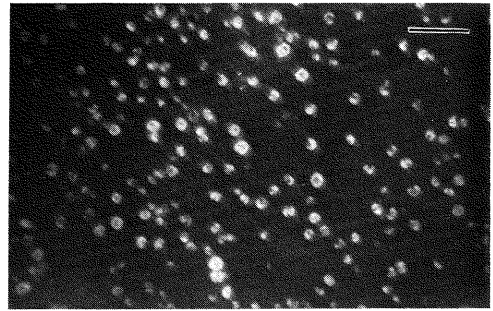


Fig. 6. Larval hemocytes stained with fluorescent antibody at the last stage of infection. Most cells show the specific immunofluorescence. Scale marker is $50\ \mu$.

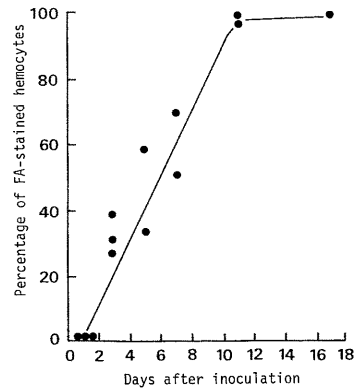


Fig. 7. Percentage of hemocytes stained with fluorescent antibody during the course of virus infection.

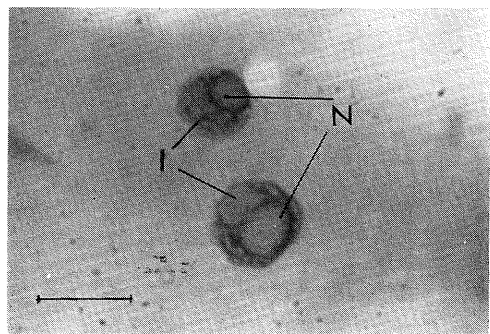


Fig. 8. CIV-infected hemocytes stained with methyl green-pyronine. I: inclusion, N: nucleus. Scale marker is $20\ \mu$.

また1細胞の細胞質内に2個以上の封入体が形成された場合には、それぞれの封入体上に銀粒子が集積した (Fig. 10c)。一方、細胞質封入体と核のいずれにも銀粒子の分布する細胞も比較的多く存在した (Fig. 11a および Fig. 11b)。

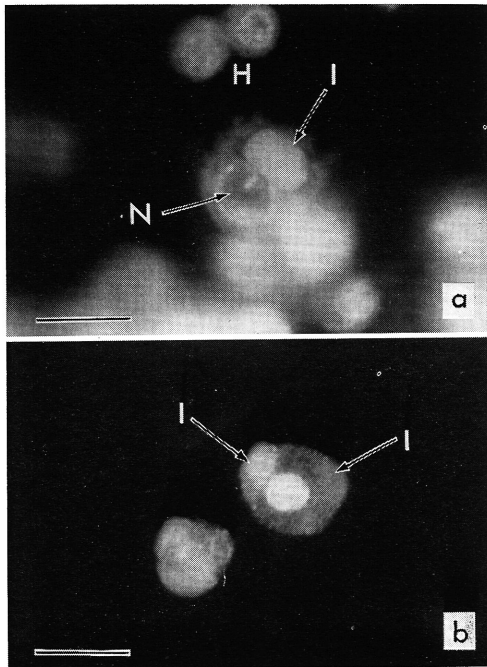


Fig. 9. Localization of DNA in the hemocytes of CIV-infected *Galleria* larvae. Scale marker is 20μ . (a) CIV-infected hemocyte stained with acridine orange. I: inclusion, N: nucleus, H: uninfected cells. (b) Two inclusions stained with acridine orange. I: inclusion.

IV. 論 議

昆虫ウイルスの増殖曲線は *in vivo* においてはショウジョウバエのシグマウイルス (Plus, 1955), カイコ核多角体病ウイルス (Aizawa, 1967), カイコ細胞質多角体病ウイルス (Miyajima and Kawase, 1968) およびカイコ軟化病ウイルス (Inoue and Ayuzawa, 1972) において報告されているが, *in vitro* ではカイコ核多角体病ウイルス (Vaughn and Falkner, 1963; Raghov and Grace, 1974) および *Sericesthis iridescent virus* (SIV) (Bellett, 1965) で知られるにすぎない。CIV の増殖曲線 (ID_{50} -時間曲線) は生体でしらべられた上記のいくつかのウイルスのそれと同じ様式を示し, 減少期, 上昇期および定常期の3相が明瞭であった。Bellett (1965) はヤマユガの1種 *Antheraea eucalypti* 由来の培養細胞における SIV の増殖を報告しており, 上昇期の開始は生体で見られた CIV の場合よりも遅延するようであるが, これは接種量の違いによることや感染価の

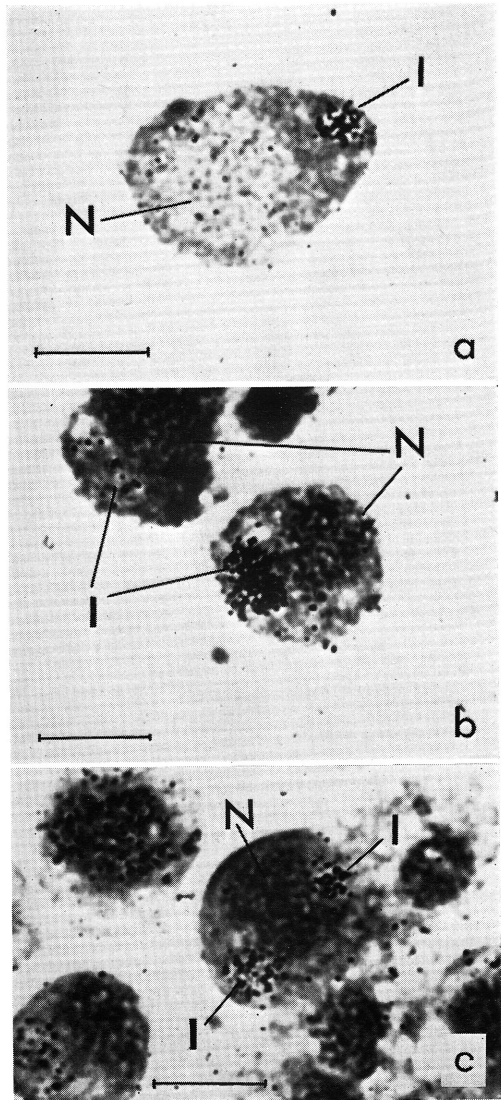


Fig. 10. DNA synthesis in CIV-infected hemocytes of *Galleria* larvae. Giemsa stain. Scale marker in Figs. 10 and 11 is 10μ . (a) Autoradiograph of hemocyte at early stage of CIV-infection. Silver grains are concentrated in compact cytoplasmic inclusion (I). Scattered silver grains are seen in the nucleus (N). (b) Autoradiograph of two CIV-infected hemocytes. Silver grains appear only in the cytoplasmic inclusions (I). N: nucleus. (c) Autoradiograph of CIV-infected hemocyte in which two inclusions (I) are formed. Silver grains can be seen in both inclusions. N: nucleus.

測定法の違いによるものかもしれない。

CIV の増殖曲線は宿主を急激に斃死させる核多角

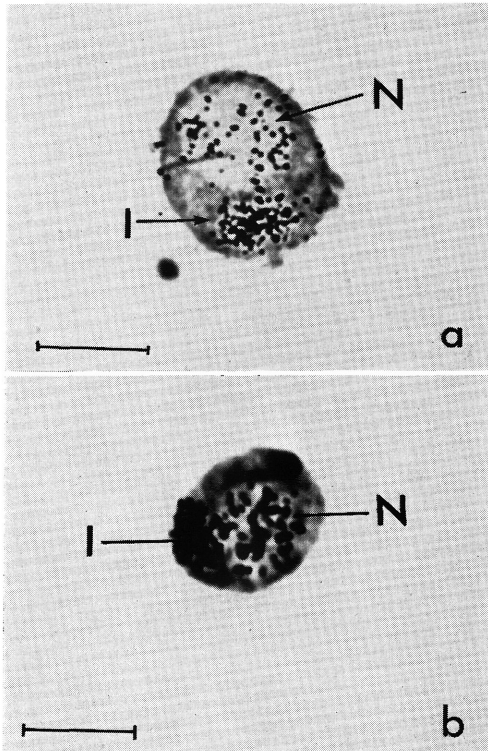


Fig. 11. Hemocytes in which silver grains are detected in both inclusion (I) and nucleus (N). Giemsa stain.

体病ウイルスと同じであり、感染性ウイルスの産生も急激であるにもかかわらず感染虫は長期にわたって生存する。Mitsubishi (1966a) はニカメイガ幼虫において感染後3カ月以上生存した例を報告しており、またミノウスバ *Pryeria sinica* 幼虫で接種後30日間生存した例もあつた(大庭, 未発表)。これらのことは後述するように、CIV と宿主の核酸合成をはじめとする代謝のかかわりあいの特性を反映するものと考えられる。

CIV に感染したハチミツガ幼虫の血球細胞には細胞質中に顕著な封入体が形成されて漸次発達した。この封入体はイリデッセンスの発現とともに細胞または個体の感染の指標となり、また感染の進行段階がそれによって判定されることが明らかにされた。Hukuhara and Hashimoto (1967) は CIV に感染した *Antheraea eucalypti* 培養細胞に出現する円形の封入体を報告したが、これは上記の封入体の発達の初期段階と考えられる。ハチミツガ幼虫の血球細胞は形態学および細胞化学的研究によつて5種類、すなわち prohemocyte, plasmatocyte, adipohemocyte,

spherule cell および oenocytoid に分類されており、それぞれ異なる機能をもつものと考えられている。それぞれの血球細胞に細胞質封入体が形成されるので CIV に対してはいずれも感受性であると考えられる。この結果は CIV に感染したニカメイガの血球細胞がすべてイリデッセンスを示す結果 (Mitsubishi, 1966a) や、また感染末期においてはハチミツガ幼虫のほとんどの血球細胞が CIV 特異蛍光を示したことからも裏付けられるであろう。一方感受性昆虫でも宿主の種類によっては血球は CIV に感染しないことが報告されている(浜, 1968)。

Vaccinia virus は細胞質で増殖する DNA ウィルスであるが、分裂期の細胞においても感染の成立することが、 ^3H -チミジンを使用したオートラジオグラフィによる観察で認められている (Kit *et al.*, 1963)。CIV 感染ハチミツガ幼虫においても分裂期の血球細胞の細胞質に CIV 封入体が稀に観察された。これはイリデッセントウィルスにおいては初めて認められた現象であるが、ウィルスの感染後に核の分裂が開始されたのか、または分裂の途中でウィルスに感染したものかは明らかにしえなかつた。これらの感染細胞の核分裂がどの段階まで進行するかは興味ある問題と考えられる。またしばしば観察される2核細胞にも封入体の形成が認められたが、2核細胞は正常幼虫の体液にも存在したのでこれは CIV 感染に伴う現象とは考えられない。

封入体の性状を検討した結果、これは次のような特異な性格をもつことが明らかにされた。すなわち核酸の分別染色で DNA の存在すること、またオートラジオグラフィでは ^3H -チミジンの封入体へのとり込みが見られることからウィルス核酸の合成の場であること、さらに蛍光抗体法により封入体は CIV 特異抗原の発現部位となつていることなどである。

加藤 (1963) はウィルス封入体をウィルス素材形成の場である1次封入体と、ウィルス産生には直接貢献しない2次封入体とに分類した。なかでも poxvirus 群に属するウィルスは1次封入体としてB型封入体を細胞質に形成し、ここでウィルス DNA の合成が進行し、かつウィルス特異抗原の発現が見られる (Kato *et al.*, 1959; Kato *et al.*, 1960; Kato *et al.*, 1964)。このことは DNA ウィルスでありながら細胞質で増殖するものとして poxvirus を特異な存在にしている。一方、CIV 感染にともなつて細胞質に形成される封入体は加藤 (1963) の分類にしたがえば1次封入体と考えられる。Poxvirus のA型封入体あるいは核

多角体病ウイルスの形成する核多角体のような2次封入体は CIV においては観察されなかつた。しかし感染後期～末期に細胞質に出現してギムザ染色では染まりにくい部位は CIV に対する蛍光抗体に反応するので、ウイルス蛋白あるいはビリオンそのものの集合と考えられる。この部位は領域的に他とは明瞭に判別できるので2次封入体とみなす可能性もある。以上の結果は基本的には Bellett and Mercer (1964) および Bellett (1965) の報告した SIV の形成する foci の性状に一致する。

^3H -チミジンのとり込みは封入体部分に見られたが、同時に核にもその見られた細胞が比較的多く存在した。この結果は Bellett (1965) および Leutenegger (1967) が SIV において報告しているように、ウイルスの感染が成立しても宿主自身の核酸合成はただちには停止しないことを示唆しており、B型封入体の形成にともなつて宿主細胞の核酸合成が急速に阻止される poxvirus の場合 (Kato *et al.*, 1964) とは対照的である。しかし SIV および CIV の感染にともなつて宿主自身の DNA 合成は急速に阻害されるという報告もあり (Kelly and Tinsley, 1974b), このことに関してはさらに検討を要すると考えられる。

イリデッセンスの発現、位相差顕微鏡およびギムザ染色などによる封入体の観察とともに蛍光抗体法による観察も CIV 感染の診断に有用であることが示された。すなわち蛍光抗体法はその特異性にもとづき他のイリデッセントウイルスによる感染症と明確に判別しようと考えられる。Ponsen (1967) は *Tipula iridescent virus* に感染したオオモンシロチョウ *Pieris brassicae* 幼虫の血球細胞を蛍光抗体法によつて観察し診断に有効であることを示し、また血球細胞がウイルス感染の最初の標的細胞であることを明らかにした。CIV においても血球における特異蛍光の発現は早く、接種後1日目において観察されたが、血球が最初の標的器官であるかどうかはいまのところ明言しえない。

V. 摘 要

Chilo iridescent virus (CIV) の *in vivo* における増殖様式を定量的ならびに細胞病理学的に検討し、つぎのような結果が得られた。

1. CIV をハチミツガ幼虫に体腔内接種して経時的に体液の感染価 ($-\log \text{ID}_{50}$) をしらべると ID_{50} -時間曲線は減少期、上昇期、定常期の3相を明瞭に示

した。

2. CIV を接種したハチミツガ幼虫を高温に保護した場合、 30°C における ID_{50} -時間曲線は定型的であつたが 35°C では感染価の増加はみられなかつた。

3. CIV を接種したハチミツガ幼虫の血球細胞には特異的に細胞質封入体が出現し、位相差顕微鏡およびギムザ染色によつて観察すると、感染初期には円形または楕円形を呈したが漸次発達して末期には細胞質全域に拡散した。

4. 血球細胞の種類による CIV 感受性の差異はみられず、すべての種類の血球細胞に細胞質封入体の形成が観察された。

5. 分裂期の血球細胞には稀に封入体が形成され、また2核細胞にも感染像が認められた。

6. メチルグリーン・ピロニン染色を施すと細胞質封入体は青緑色を呈し、アクリジンオレンジ染色によつては黄緑色の蛍光を示した。これらの結果は封入体における DNA の存在を示唆した。

7. ^3H -チミジンを使用して CIV 感染血球細胞のオートラジオグラフィを行なつたところ、感染初期の compact な封入体および発達した封入体部分に一致して銀粒子の集積が認められ、封入体における DNA 合成が示唆された。

8. 封入体に一致して銀粒子の発現がみられ、同時に核部分にもその観察される細胞が存在した。したがつてウイルス感染の成立後宿主 DNA の合成は必ずしも抑制されないものと考えられる。

9. 蛍光抗体直接法によつて CIV 感染血球細胞をしらべると CIV 特異蛍光は細胞質封入体に一致して観察され、核には感染の全過程を通じて特異蛍光は見られなかつた。

10. 特異蛍光を示す細胞の割合は漸増し、最終的にはほとんどすべての細胞に蛍光が認められた。

11. 感染後期～末期において封入体は細胞質全体に拡散し、その内部にはギムザ染色によつて染まりにくい部位が広く出現した。この部位は強い特異蛍光を示し、ウイルス粒子またはウイルス蛋白の集合したものであることが示唆された。

12. 以上の結果から CIV 感染によつて形成される細胞質封入体はウイルス産生に直接貢献し、ウイルス素材の合成の場として重要な意義をもつ1次封入体であることが明らかとなつた。またこの封入体の発達段階は個体および細胞の感染段階の指標として、またイリデッセンスの発現とともに CIV による病気の診断に重要な意義をもつことが明らかとなつた。

文 献

- Aizawa, K. 1967 Mode of multiplication of the nuclear-polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan*, **36**: 327-332
- Anderson, J. F. 1970 An iridescent virus infecting the mosquito *Aedes stimulans*. *J. Invertebr. Pathol.*, **15**: 219-224
- Ashhurst, D. E. and A. G. Richards 1964 Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L. *J. Morph.*, **114**: 247-254
- Bellett, A. J. D. 1965 The multiplication of *Sericesthis* iridescent virus in cell cultures from *Antheraea eucalypti* Scott. III. Quantitative experiments. *Virology*, **26**: 132-141
- Bellett, A. J. D. 1968 The iridescent virus group. *Advan. Virus Res.*, **13**: 225-246
- Bellett, A. J. D. and F. Fenner 1968 Studies of base-sequence homology among some cytoplasmic deoxyriboviruses of vertebrate and invertebrate animals. *J. Virol.*, **2**: 1374-1380
- Bellett, A. J. D. and R. B. Inman 1967 Some properties of deoxyribonucleic acid preparations from *Chilo*, *Sericesthis* and *Tipula* iridescent viruses. *J. Mol. Biol.*, **25**: 425-432
- Bellett, A. J. D. and E. H. Mercer 1964 The multiplication of *Sericesthis* iridescent virus in cell cultures from *Antheraea eucalypti* Scott. I. Qualitative experiments. *Virology*, **24**: 645-653
- Bird, F. T. 1961 The development of *Tipula* iridescent virus in the crane fly, *Tipula paludosa* Meig., and the wax moth, *Galleria mellonella* L. *Can. J. Microbiol.*, **7**: 827-830
- Buchatsky, L. P. and V. P. Sheremet 1974 Detection of mosquito iridescent virus in the Ukraine. *Probl. Virol.*, **1974**: 226-228 (in Russian)
- Chapman, H. C., T. B. Clark, D. W. Anthony and F. E. Glenn 1971 An iridescent virus from larvae of *Corethrella brakeleyi* (Diptera: Chaoboridae) in Louisiana. *J. Invertebr. Pathol.*, **18**: 284-286
- Chapman, H. C., T. B. Clark, D. B. Woodard and W. R. Kellen 1966 Additional mosquito hosts of the mosquito iridescent virus. *J. Invertebr. Pathol.*, **8**: 545-546
- Chapman, H. C., J. J. Petersen, D. B. Woodard and T. B. Clark 1968 New records of parasites of Ceratopogonidae. *Mosquito News*, **28**: 122-123
- Clark, T. B., W. R. Kellen and P. T. M. Lum 1965 A mosquito iridescent virus (MIV) from *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann). *J. Invertebr. Pathol.*, **7**: 519-521
- Cunningham, J. C. and Y. Hayashi 1970 Replication of *Chilo* iridescent virus in *Galleria mellonella*: purification of the virus and effect of actinomycin D and puromycin. *J. Invertebr. Pathol.*, **16**: 427-435
- Cunningham, J. C. and T. W. Tinsley 1968 A serological comparison of some iridescent non-occluded insect viruses. *J. gen. Virol.*, **3**: 1-8
- Day, M. F. 1965 *Sericesthis* iridescent virus infection of the adult *Galleria*. *J. Invertebr. Pathol.*, **7**: 102-105
- Day, M. F. and E. H. Mercer 1964 Properties of an iridescent virus from the beetle, *Sericesthis pruinosa*. *Aust. J. Biol. Sci.*, **17**: 892-902
- Fowler, M. and J. S. Robertson 1972 Iridescent virus infection in field populations of *Wiseana cervinata* (Lepidoptera: Hepialidae) and *Witlesia* sp. (Lepidoptera: Pyralidae) in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.*, **19**: 154-155
- Fukaya, M. and S. Nasu 1966 A *Chilo* iridescent virus (CIV) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Ent. Zool.*, **1**: 69-72
- Fukuda, T. 1971 *Per os* transmission of *Chilo* iridescent virus to mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, **18**: 152-153
- Glitz, D. G., G. J. Hills and C. F. Rivers 1968 A comparison of the *Tipula* and *Sericesthis* iridescent viruses. *J. gen. Virol.*, **3**: 209-220
- 浜弘 司 1968 *Chilo* iridescent virus の交差感染に関する研究. 応動昆, **12**: 34-39
- Hasan, S., G. Croizier, C. Vago and J.-L. Duthoit 1970 Infection à virus irisant dans une population naturelle d'*Aedes detritus* Haliday en France. *Ann. Zool. Ecol. Animales*, **2**: 295-299
- Hukuhara, T. and Y. Hashimoto 1966 Development of *Tipula* iridescent virus in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.*, **1**: 166-172
- Hukuhara, T. and Y. Hashimoto 1967 Multiplication of *Tipula* and *Chilo* iridescent viruses in cells of *Antheraea eucalypti*. *J. Invertebr. Pathol.*, **9**: 278-281
- Inoue, H. and C. Ayuzawa 1972 Fluorescent antibody study of an infectious flacherie of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, **19**: 227-230
- Jensen, D. D., T. Hukuhara and Y. Tanada 1972 Lethality of *Chilo* iridescent virus to *Colladonus montanus* leafhoppers. *J. Invertebr.*

- Pathol.*, **19**: 276-278
- Jones, J. C. 1962 Current concepts concerning insect hemocytes. *Am. Zoologist*, **2**: 209-246
- Kalmakoff, J., S. Moore and R. P. Pottinger 1972 An iridescent virus from the grass grub *Costelytra zealandica*: serological study. *J. Invertebr. Pathol.*, **20**: 70-76
- Kalmakoff, J. and J. H. Tremaine 1968 Physicochemical properties of *Tipula* iridescent virus. *J. Virol.*, **2**: 738-744
- 加藤四郎 1963 Virus 封入体. 核と細胞質, **5**: 23-28
- Kato, S., S. Kameyama and J. Kamahora 1960 Autoradiography of cells infected with variola and cowpox viruses with H^3 -thymidine. *Biken's J.*, **3**: 183-189
- Kato, S., M. Ogawa and H. Miyamoto 1964 Nucleocytoplasmic interaction in poxvirus-infected cells. I. Relationship between inclusion formation and DNA metabolism of the cells. *Biken J.*, **7**: 45-56
- Kato, S., M. Takahashi, S. Kameyama and J. Kamahora 1959 A study on the morphological and cyto-immunological relationship between the inclusions of variola, cowpox, rabbitpox, vaccinia (variola origin) and vaccinia IHD and a consideration of the term "Guarnieri". *Biken's J.*, **2**: 353-363
- 川村明義 1966 螢光抗体法. 蛋白質核酸酵素, **11**: 1621-1634
- Kelly, D. C. and R. J. Avery 1974 The DNA content of four small iridescent viruses: genom size, redundancy, and homology determined by renaturation kinetics. *Virology*, **57**: 425-435
- Kelly, D. C. and J. S. Robertson 1973 Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. gen. Virol.*, **20**: 17-41
- Kelly, D. C. and T. W. Tinsley 1972 The proteins of iridescent virus types 2 and 6. *J. Invertebr. Pathol.*, **19**: 273-275
- Kelly, D. C. and T. W. Tinsley 1973 Ribonucleic acid polymerase activity associated with particles of iridescent virus types 2 and 6. *J. Invertebr. Pathol.*, **22**: 199-202
- Kelly, D. C. and T. W. Tinsley 1974a Iridescent virus replication: a microscope study of *Aedes aegypti* and *Antheraea eucalypti* cells in culture infected with iridescent virus types 2 and 6. *Microbios*, **9**: 75-93
- Kelly, D. C. and T. W. Tinsley 1974b Iridescent virus replication: patterns of nucleic acid synthesis in insect cells infected with iridescent virus types 2 and 6. *J. Invertebr. Pathol.*, **24**: 169-178
- Klug, A., R. E. Franklin and S. P. F. Humphreys-Owen 1959 The crystal structure of *Tipula* iridescent virus as determined by Bragg reflection of visible light. *Biochim. Biophys. Acta*, **32**: 203-219
- Kit, S., D. R. Dubbs and T. C. Hsu 1963 Biochemistry of vaccinia-infected mouse fibroblasts (strain L-M). III. Radioautographic and biochemical studies of thymidine- H^3 uptake into DNA of L-M cells and rabbit cells in primary culture. *Virology*, **19**: 13-22
- Leutenegger, R. 1964 Development of an icosahedral virus in hemocytes of *Galleria mellonella* (L.). *Virology*, **24**: 200-204
- Leutenegger, R. 1967 Early events of *Sericesthis* iridescent virus infection in hemocytes of *Galleria mellonella* (L.). *Virology*, **32**: 109-116
- Lowe, R. E., D. W. Hall and J. F. Matta 1970 Comparison of the mosquito iridescent viruses (MIV) with other iridescent viruses. *Proc. IVth Intern. Colloq. Insect Pathol.*, 1970, 163-170
- Matta, J. F. 1970 The characterization of a mosquito iridescent virus. II. Physicochemical characterization. *J. Invertebr. Pathol.*, **16**: 157-164
- McLaughlin, R. E., H. A. Scott and M. R. Bell 1972 Infection of the boll weevil by *Chilo* iridescent virus. *J. Invertebr. Pathol.*, **19**: 285-290
- Mercer, E. H. and M. F. Day 1965 The structure of *Sericesthis* iridescent virus and of its crystals. *Biochim. Biophys. Acta*, **102**: 590-599
- Mitsuhashi, J. 1966a Appearance of iridescence in the tissues of the rice stem borer larvae, *Chilo suppressalis* Walker, infected with *Chilo* iridescent virus (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Ent. Zool.*, **1**: 130-137
- Mitsuhashi, J. 1966b Multiplication of *Chilo* iridescent virus in the *Chilo suppressalis* tissues cultivated *in vitro* (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Ent. Zool.*, **1**: 199-201
- Mitsuhashi, J. 1967a Establishment of an insect cell strain persistently infected with an insect virus. *Nature*, **215**: 863-864
- Mitsuhashi, J. 1967b Infection of leafhopper and its tissues cultivated *in vitro* with *Chilo* iridescent virus. *J. Invertebr. Pathol.*, **9**: 432-434
- 三橋 淳・小山健二 1967 *Chilo* iridescent virus の安定性. 応動昆, **11**: 177-181
- Miyajima, S. and S. Kawase 1968 Changes in virus-infectivity titer in the hemolymph and midgut during the course of a cytoplasmic polyhedrosis in the silkworm. *J. Invertebr. Pathol.*, **12**: 329-334

- Okada, T. and H. Inoue 1970 Virus diseases of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker, and their utilization for insect control. *IRC Working Party on Rice Production and Protection, Teheran, 1970*, 1-23 (mimeographed)
- Ono, M. and M. Fukaya 1969 The juvenile-hormone-like effect of *Chilo* iridescent virus (CIV) on the metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Appl. Ent. Zool.*, **4**: 211-212
- 小野正武・八木繁実・深谷昌次 1972 *Chilo* iridescent virus の蚕に対する感染性. 蚕試報, **25**: 77-102
- Plus, N. 1955 Étude de la sensibilité héréditaire au CO₂ chez la *Drosophile*. I. Multiplication du virus σ et passage à la descendance après inoculation ou transmission héréditaire. *Ann. Inst. Pasteur*, **88**: 1-17
- Pogo, B. G. T., S. Dales, M. Bergoin and D. W. Roberts 1971 Enzymes associated with an insect poxvirus. *Virology*, **43**: 306-309
- Ponsen, M. B. 1967 Development of virus antigen in tissues of *Pieris brassicae* inoculated with *Tipula* iridescent virus. *Proc. Intern. Colloq. Insect Pathol. & Microbial Control, Wageningen, 1966*, 86-89
- Raghow, R. and T. D. C. Grace 1974 Studies on a nuclear polyhedrosis virus in *Bombyx mori* cells *in vitro*. 1. Multiplication kinetics and ultrastructural studies. *J. Ultrastruct. Res.*, **47**: 384-399
- Reed, L. J. and H. A. Muench 1938 A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493-501
- Service, M. W. 1968 The ecology of the immature stages of *Aedes detritus* (Diptera: Culicidae). *J. appl. Ecol.*, **5**: 613-630
- Smith, K. M. and G. J. Hills 1962 Replication and ultrastructure of insect viruses. *Proc. 11th Intern. Congr. Entomol., Vienna, 1960*, **2**: 823-827
- Steinhaus, E. A. and R. Leutenegger 1963 Icosahedral virus from a scarab (*Sericesthis*). *J. Insect Pathol.*, **5**: 266-270
- Stoltz, D. B. 1971 The structure of icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. Ultrastruct. Res.*, **37**: 219-239
- Stoltz, D. B., W. L. Hilsenhoff and H. F. Stich 1968 A virus disease in *Chironomus plumosus*. *J. Invertebr. Pathol.*, **12**: 118-128
- Thomas, R. S. 1961 The chemical composition and particle weight of *Tipula* iridescent virus. *Virology*, **14**: 240-252
- Thomas, R. S. and R. C. Williams 1961 Localization of DNA and protein in *Tipula* iridescent virus (TIV) by enzymatic digestion and electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**: 15-29
- Tinsley, T. W. and D. C. Kelly 1970 An interim nomenclature system for the iridescent group of insect viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, **16**: 470-472
- Tinsley, T. W., J. S. Robertson, C. F. Rivers and M. W. Service 1971 An iridescent virus of *Aedes cantans* in Great Britain. *J. Invertebr. Pathol.*, **18**: 427-428
- Tojo, S. and T. Kodama 1968 Purification and some properties of *Chilo* iridescent virus. *J. Invertebr. Pathol.*, **12**: 66-72
- Vago, C., J.-A. Rioux, J.-L. Duthoit and J.-P. Dedet 1969 Infection spontanée à virus irisant dans une population d'*Aedes detritus* (Hal., 1933) des environs de Tunis. *Ann. Parasitol. Humaine et Comparée*, **44**: 667-676
- Vaughn, J. L. and P. Faulkner 1963 Susceptibility of an insect tissue culture to infection by virus preparations of the nuclear polyhedrosis of the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Virology*, **20**: 484-489
- Vercauteren, R. E. and F. Aerts 1958 On the cytochemistry of the hemocytes of *Galleria mellonella* with special reference of the polyphenoloxydase. *Enzymologia*, **20**: 167-172
- Weiser, J. 1965 A new virus infection of mosquito larvae. *Bull. World Health Organ.*, **33**: 586-588
- Weiser, J. 1968 Iridescent virus from the blackfly *Simulium ornatum* Meigen in Czechoslovakia. *J. Invertebr. Pathol.*, **12**: 36-39
- Wildy, P. 1971 Classification and nomenclature of viruses. *Monographs in Virology*, **5**: 1-81
- Williams, R. C. and K. M. Smith 1957 A crystallizable insect virus. *Nature*, **179**: 119-120
- Wrigley, N. G. 1969 An electron microscope study of the structure of *Sericesthis* iridescent virus. *J. gen. Virol.*, **5**: 123-134
- Wrigley, N. G. 1970 An electron microscope study of the structure of *Tipula* iridescent virus. *J. gen. Virol.*, **6**: 169-173
- Xeros, N. 1954 A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature*, **174**: 562-563
- Xeros, N. 1964 Development of the *Tipula* iridescent virus. *J. Insect Pathol.*, **6**: 261-283
- Younghusband, H. B. and P. E. Lee 1970 Cytochemistry and autoradiography of *Tipula* iridescent virus in *Galleria mellonella*. *Virology*, **40**: 757-760