コナガ顆粒病ウイルス感染に伴う細胞の変化と NUCLEOCAPSID の出現部位¹

浅 山 哲・稲 垣 育 雄

愛知県農業総合試験場

(1974 年 7 月 31 日受領)

Cell Alternations Caused by the Infection with the Granulosis Virus in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*, and the Site of Appearance of Nucleocapsid. Tetsu ASAYAMA and Ikuo INAGAKI (Aichi-Ken Agricultural Research Center, Nagakute, Aichi 480-11) *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **19**: 79~84 (1975)

Ultrastructural changes of the cell organellae in *Plutella xylostella* larva infected with the granulosis virus were observed by an electron microscope. Endoplasmic reticulum showed multilayered and whorl-shaped figures. Mitochondria changed into balloon-shaped structures with fragmented cristae. These abnormal structures disappeared into the cytoplasmic matrix at the advanced stage of the infection. During the conspicuous changes of cell organellae, 10 to 55 nucleocapsids protruded randomly in the cytoplasm of fat-body cells closely associated with rough endoplasmic reticulum, and regular stacking array of nucleocapsids were formed at the site of their appearance. Agglomerated glycogen granules and large clumps of lipid were seen in the infected cytoplasm.

緒 言

コナガ *Plutella xylostella* については、約 100 年前にイギリスで出版された成書にすでにアブラナ科野菜の重要害虫としての記載が見られる (CURTIS, 1883)。わが国では佐々木 (1899) が本種をウンダイノアオムシテフとして記載しているが最近になるまでほとんど注目されず、本種による野菜の被害が著しくなった約 10 年前からようやく研究の対象昆虫となっている (山下, 1963)。著者らも本種による被害増加に注目し、愛知県におけるその発生消長を調査したが (尾崎・浅山, 1970)、この時にコナガの顆粒病を発見した (ASAYAMA and OSAKI, 1970)。

顆粒病は 1926 年に PAILLOT によって *Pieris brassicae* から発見されたのが研究の始まりといわれている (STEINHAUS, 1949)。わが国では北島 (1938) が *Pieris rapae crucivora* の脂肪病について報告したのが最初のようなのである。このように比較的古くから知られているウイルス病の 1 種であるにもかかわらず、顆粒病ウイルス (granu-

losis virus, GV と略す) の増殖部位に関する知見など、多くのあいまいさがあると指摘されている (BIRD, 1959; HUGER, 1963)

著者らはコナガの顆粒病に関する研究の一環として、GV 感染幼虫脂肪体の電子顕微鏡観察を行い、感染宿主細胞の細胞学的変化ならびにウイルスの出現部位を明らかにしたので、その概要を報告する。なお、本文に用いたウイルスに関する術語は、GOODWIN (1968), HUGHES (1972) の提唱を参考にして、東 (1963) の定義に準拠した。

本研究に対して、数々のご助言を頂いた九州大学農学部教授鮎沢啓夫博士に深謝の意を表する。

材 料 と 方 法

供試顆粒病ウイルスはキャベツ畑に生息するコナガ幼虫から常法により得たものに由来する (ASAYAMA and OSAKI, 1970)。供試昆虫はコイトロンを用いて飼育したコナガ終令幼虫である。一部の幼虫にはあらかじめ微量のトリトン X-100 を添加した GV 顆粒の水浮遊液をキャベツ葉に塗布して与え、初期病徴を示す GV 感染幼

¹ コナガ顆粒病ウイルスに関する研究 第 1 報。

虫を準備した。別に対照観察用に健康幼虫も準備し、それぞれを電子顕微鏡観察標本の材料とした。

材料の固定包埋から超薄切片を得るまでの手技は次のとおりである。まず 0.1Ms-collidine 緩衝液と 3%オスミウム酸水溶液を準備し、別々に氷冷保存した。供試材料の解剖直前に両液の等量混合液を調製し、本液を幼虫に注ぎながら解剖を行い脂肪体を摘出した。摘出脂肪体の固定は本液にて 2 時間行い、次の脱水処理はエタノール・アセトン系列にて行った。この間に標本温度を徐々に室温と同じまでに上げた。包埋はエポン 812 を用い、超薄切片の作製には自家製ガラスナイフを装着した LKB 4800 型 ULTRATOME を用いた。切片の染色は佐藤 (1968) の方法に準じて鉛と酢酸ウラニルによる二重染色を行い、切片の観察には日本電子製 T7 型電子顕微鏡

を使用した。

結 果

細胞小器管の形態変化：コナガ幼虫の正常脂肪体細胞ではミトコンドリアと小胞体が非常に良く発達している。ミトコンドリアでは細長い形態を示す像が多く、内部に高密度のクリステ構造が認められる。またミトコンドリア周辺には粗面小胞体が豊富に存在し、全体に電子密度の高い像が得られた (第 1 図 a)。

GV 感染細胞では封入体形成部位 (第 1 図矢印) の細胞小器管がすでに消失しているために、正常細胞とは著しく異なり、透明な像が得られた (第 1 図 b, c)。ここに至るまでの細胞小器管の形態変化を観察すると、ミトコンドリアではまず輪郭が丸く膨潤状に変形し、また楕状

第 1 図 コナガ幼虫脂肪体細胞。a : 正常細胞。b, c : 顆粒病ウイルス感染細胞。
矢印は本文参照。・a : $\times 4,700$. b : $\times 2,800$. c : $\times 3,400$

第2図 ミトコンドリアの変化。(a : $\times 15,500$. b : $\times 31,000$)

第3図 小胞体の変化。(a : $\times 7,800$. b : $\times 15,500$. c : $\times 31,000$)

第4図 nucleocapsid の出現。(a : $\times 15,500$. b : $\times 27,900$. c : $\times 15,500$. d, e : $\times 33,500$)

を呈する正常のクリステ構造は見られなくなった。クリステは強度に変形欠損し、基質の一部に偏在する状況も呈したが、最終的にはミトコンドリア内外膜と共に細胞基質中に消失した(第1図c, 第2図)。粗面小胞体はその数層が束状となり大きく波打つように湾曲し、一部は渦巻き状に変化するのが観察された(第1図b, 第3図a)。次に膜構造の崩壊が始まり(第3図b矢印)、膜を構成していたと思われる好染性物質が雲絮状に拡散し、最終的にはミトコンドリアと同様に細胞基質中に消失した(第3図c矢印)。その結果、GV感染細胞では既存の細胞小器管像が著しく減少した。

NUCLEOCAPSID の出現 : nucleocapsid は残存する粗面小胞体膜に沿うようにして出現した。本像は初め小胞体膜の片側に1本ずつばらばらに突出するようにして形成され(第4図a)、本像の発達に伴い隣接する小胞体膜

構造はさらに崩壊した(第4図b)。このようにして出現した nucleocapsid は、次に10~55本程度集合し、その横断面では直線状積層配列を示す nucleocapsid の塊が形成された(第4図d, e)。前述の細胞小器管の消失時期と集塊状 nucleocapsid の形成時期とは一致した(第4図c)。また nucleocapsid はその芯部が中空状に見え(第4図d, e)、長さ200~400 nm、幅40~45 nmの長棒状形態を有するようであった。別に報告する被膜、封入体蛋白、管状構造体等のGVの成熟に関する各種の像は、これらの集塊状 nucleocapsid 付近の細胞基質より出現した。

グリコーゲン顆粒およびリピッド : 正常の脂肪体細胞におけるグリコーゲン顆粒およびリピッド像はわずかに散在的に認められる程度であるが、GV感染細胞ではこれらの巨大な凝集像がしばしば認められた(第5図)。

第5図 グリコーゲン顆粒およびリビッド。(a : $\times 3,200$ b : $\times 7,100$ c, d : $\times 2,800$)

またグリコーゲン顆粒ではGV封入体と共に細胞間隙中に流出している像も認められた(第5図b)。隣接する2個の細胞におけるリビッドの存在状況を観察すると、第5図c上半部の細胞には封入体とリビッドの両像が認められるが下半部の細胞にはいずれも認められない。第5図dでは2個の細胞ともリビッド像が認められるが、封入体形成の見られる細胞に多くのリビッド像が存在し、融合寸前と思われる像も認められた。

考 察

GV感染コナガにおける粗面小胞体は、多様な形態変化を示しながらも nucleocapsid の突出時にはまだ存在している。このことは nucleocapsid の形成に要する物質連絡が核その他の細胞小器官との間に行われているのを示唆しているようである。またGV感染 *Plodia inter-*

punctella では nucleocapsid が湾曲状小胞体膜に沿うようにして出現している像が観察されており(ARNOTT and SMITH, 1968), GV感染 *Cadra cautella* では nucleocapsid が cytomembrane に接し、整列状に形成されている(HUNTER and HOFFMANN, 1970)。著者らにはこの cytomembrane は小胞体膜のように見うけられるが、cytomembrane が小胞体膜に相当する器管であるとすれば、*Plodia interpunctella* および *Cadra cautella* のGVもコナガGVと同様に、nucleocapsid は宿主細胞の粗面小胞体膜に近接する部位に出現している可能性も考えられる。

ARNOTT and SMITH(1968)はGV感染 *Plodia interpunctella* において、無被膜 nucleocapsid 形成部位付近におけるミトコンドリアの蓄積像を観察し、渡部・今西(1972)はGV感染 *Adoxophyes fasciata* において、ミ

トコンドリア, リピッドおよびグリコーゲン顆粒の散在を観察している。GV 感染コナガではこれらの報告とは異なり, ミトコンドリアは消失し, グリコーゲン顆粒は凝集している。さらにリピッドは正常細胞に見られる場合よりはるかに巨大であり, GV 感染に伴う宿主細胞の異常代謝が想像される。

摘 要

電子顕微鏡を使用して, 顆粒病ウイルス感染コナガにおける細胞小器官微細構造の変化を観察した。

ウイルス感染脂肪体細胞の細胞小器官には著しい変化が認められた。粗面小胞体は多層渦巻き状に変形し, ミトコンドリアはクリステの損傷を伴い丸く膨潤した。感染が進行するとこれらの異常構造体は細胞基質中に消失した。無被膜 nucleocapsid は粗面小胞体に近接し, 細胞質に出現した。最初ばらばらに突出した各 nucleocapsid は出現部位にて 10~55 本程度集合し, 直線状積層配列を示す集塊を形成した。感染細胞質には凝集状グリコーゲン顆粒と巨大なリピッド塊が認められた。

引 用 文 献

- ARNOTT, H. J. and K. M. SMITH (1968) An ultrastructural study of the development of a granulosus virus in the cells of the moth *Plodia interpunctella* (Hbn). J. Ultrastruct. Res. **21**: 251~268.
- ASAYAMA, T. and N. OSAKI (1970) A granulosus of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Invert. Path. **15**: 284~286.
- BIRD, F. T. (1959) Polyhedrosis and granulosus viruses causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* CLEMENS. J. Insect Path. **1**: 406~430.
- CURTIS, J. (1883) *Farm Insect: Insects Injurious to the Field Crops*. John van voost., London, 528 pp.
- GOODWIN, R. H. (1968) Use of the term "virus inclusion body" and vernacular virus names. J. Invert. Path. **12**: 479~480.
- 東 昇 (1964) ウイルスの電子顕微鏡学的研究. 医学生物学用電子顕微鏡学 (東昇編), 文光堂, 東京: 352~400.
- HUGER, A. (1963) Granulosis of insects. In "Insect pathology" (E. A. STEINHAUS ed), Academic Press, New York: 531~575.
- HUGHES, K. M. (1972) Fine structure and development of two polyhedrosis viruses. J. Invert. Path. **19**: 198~207.
- HUNTER, D. K. and D. F. HOFFMANN (1970) A granulosus virus of the almond moth, *Cadra cautella*. J. Invert. Path. **16**: 400~407.
- 北島鉞雄 (1938) モンシロテフ (*Pieris rapae crucivora* BOISDUVAL) 幼虫の脂肪病に就て. 鹿児島高農学報 **13**: 111~116.
- 尾崎典光・浅山 哲 (1970) 愛知県におけるコナガの生活史. 関西病虫研会報 **12**: 30~34.
- 佐藤泰山 (1968) 超薄切片用鉛染色法の一改良法. 電顕学会誌 **17**: 158~159.
- STEINHAUS, E. A. (1949) *Principles of Insect Pathology*, McGraw-Hill., New York, 757 pp.
- 佐々木忠二郎 (1899) 日本農作物害虫篇, 敬業社, 東京, 439 pp.
- 山下善平 (1963) コナガの発生消長について. 今月の農薬 **7**(11): 50~54.
- 渡部 仁・今西健一 (1972) 顆粒病ウイルスに感染したチャノコカクモンハマキ脂肪体の電子顕微鏡観察. 応動昆 **16**: 193~201.