昆虫培養細胞における核多角体病ウイルスの種特異性に関する研究

I. nonoccluded virus の細胞への吸着と感染の成立

津田勝男¹⁾・水城英一²⁾・河原畑勇・鮎沢啓夫

九州大学農学部

Infectivity of Nuclear Polyhedrosis Virus in Continuous Cell Cultures. I. Adsorption of Non-occluded Viruses to Permissive and Nonpermissive Cells. Katsuo TSUDA,³⁾ Eiichi MIZUKI,⁴⁾ Takeshi KAWARABATA and Keio ARIZAWA (Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **34**: 297—302 (1990)

Nonoccluded viruses (NOVs) of *Xestia c-nigrum* NPV and *Bombyx mori* NPV were mixed with three cell lines, *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AIEII), *Mamestra brassicae* (NIAS-Mb-32), and S. P. C. Bm36 (QUIOT, 1982). Nonoccluded viruses of *X. c-nigrum* NPV T-3 were rapidly adsorbed to permissive *S. frugiperda* and S. P. C. Bm36 cells. However, adsorption of NOVs with *M. brassicae* cells were not achieved. Nonoccluded viruses of *B. mori* NPV K-4 were also adsorbed to non-permissive *S. frugiperda* cells, however there was no evidence for viral replication.

緒 言

核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; 以下 NPV) は、バキュロウイルス科 (Baculoviridae), バキュロウイルス (*Baculovirus*) 属, サブグループ A に属し (MATTHEWS, 1982), 昆虫類および甲殻類を宿主とする無脊椎動物に特有なウイルスである (MARTIGNONI and IWAI, 1981)。

これまで 300 種以上の NPV が、主として鱗翅目昆虫から分離されている (MARTIGNONI and IWAI, 1981) が、その多くは、著名な農林害虫である。しかし、大部分の NPV の宿主特異性および宿主範囲に関しては、十分な知見が得られていない。NPV 名は、それが最初に分離された宿主昆虫の種名に NPV を付したものであり、これまでに記録された NPV の中には、同種ウイルスが交差感染により別種の昆虫から記録されている場合があると考えられる。また、同じ宿主昆虫から分離された NPV であっても発生場所や発生時期によって異種の NPV 感染である可能性があり、さらに複数の NPV の混合感染の可能性もある。また、一般に宿主昆虫から分離される

NPV の多くは、複数の遺伝子型を含み、遺伝学的に相同でないウイルス粒子の集団で構成されていると考えられている。したがって、NPV の種間差異、種の変異、感染と増殖、宿主範囲および病原性などの問題は、遺伝子型が相同な純系 (ウイルスクローン) の NPV 間で検討する必要がある。

昆虫培養細胞と NPV の *in vitro* 実験系では、宿主昆虫の生育段階や変態、個体差などの影響を排除できること、また、接種量、接種法、接種後の管理などの条件を比較的均一に調整できる利点がある。これまでに約 185 種の昆虫培養細胞株が樹立されているが、昆虫ウイルスの感染と増殖効率のよい昆虫培養細胞株は、現在もきわめて少数である (HINK, 1980)。

NPV は、感染細胞の核内に多角体を形成し、ウイルス感染による細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) の観察が容易である。また、NPV 許容性の昆虫培養細胞の confluent monolayer 上に NPV のブラック形成が可能な系では、NPV のブラック純化 (plaque purification) およびブラック検定によるウイルス定量に利用価値が高い。昆虫培養細胞におけるブラック形成は、HINK and

1) 現在 福岡県農業総合試験場生産環境研究所

2) 現在 福岡県工業技術センター材料開発研究所

3) Present address: Institute of Agro-Environmental Science, Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818, Japan.

4) Present address: Material Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center, Yame, Fukuoka 834, Japan.

1990 年 4 月 8 日受領 (Received April 8, 1990)

1990 年 7 月 13 日登載決定 (Accepted July 13, 1990)

VAIL (1973) が, *Autographa californica* NPV と *Trichoplusia ni* 細胞系 TN-368 細胞 (HINK, 1970) の組合せで初めて成功した。その後, 多くの研究者により NPV と細胞の組合せや重層培養液などの改良が試みられたが, ブラック形成が良好な NPV と昆虫培養細胞の組合せは, 依然としてごく少数に限られている。現在, もっとも多く利用されているのは, *A. californica* NPV と *T. ni* 細胞系 TN-368 細胞または, ツマジロクサヨトウ *Spodoptera frugiperda* 細胞系 IPLB-SF-21 細胞 (VAUGHN et al., 1977) の組合せで, これ以外の組合せでのブラック形成の成功例は, まだごく少数である (河原畑, 1984)。

また, NPV は, 感染増殖の過程で 2 種類の感染性粒子を産生する。occluded virus (以下 OV) は感染細胞核内で産生された後, 多角体に包埋され安定に維持されて, 次世代あるいは他個体への感染源となる。この多角体を食した昆虫の消化管内で遊離した OV が, 消化管の細胞核内で増殖後, 多角体に包埋されない nonoccluded virus (以下 NOV) が出芽により昆虫体腔内に放出される (KAWAMOTO et al., 1977)。in vivo では, 組織間における感染の伝播, in vitro では, 細胞から細胞への感染の伝播が, NOV により行われる。OV と NOV には, エンベロープメント (envelopment) の過程および場所, エンベロープの形態に明瞭な差異がある (浅山, 1982; KAWAMOTO et al., 1977)。また, 宿主昆虫や昆虫培養細胞への感染性などの生物学的性状や血清学的性状にも大きな差異が見られ, OV と NOV の諸性状の検討は, NPV の宿主特異性および感染増殖に関与している要因を解析するうえで重要である。

本研究では, わが国で分離された NPV の中からヨトウムシ類に広い宿主範囲と強い病原性を持ち, 農業害虫の有力な天敵微生物であるシロモンヤガ *Xestia c-nigrum* NPV と, 養蚕上重要なカイコ *Borbyx mori* NPV を対象に選んだ。そして, 昆虫培養細胞との系で, その感染性の差異を利用し, ウイルス感染の最初の段階である NOV の細胞への吸着と感染成立の関係を検討した。

なお, 本文に入るに先立ち, 貴重なウイルス試料を分譲していただき, 数々のご助言を賜った現北海道農業試験場・岡田齊夫博士に厚く御礼申し上げます。また, 昆虫培養細胞およびウイルスの取扱いについては現蚕糸・昆虫農業技術研究所・佐藤威博士に有益なご助言を賜った。紙面を借りて厚く御礼申し上げます。

材料および方法

1. 昆虫培養細胞

ツマジロクサヨトウ *S. frugiperda* 細胞系 IPLB-SF-21AE II 細胞は, アメリカ農務省 (USDA) の J. L. VAUGHN 博士より分与を受けた。また, カイコ *B. mori* 細胞系と称する S.P.C. Bm 36 細胞 (QUIOT, 1982) は, Station de Recherches de Pathologie Comparée の J. M. QUIOT 博士より分与を受け, Grace 培養液より IPL-41 培養液 (DOUGHERTY et al., 1981) に馴化させた。ヨトウガ *Mamestra brassicae* 細胞系 NIAS-Mb-32 細胞は, 農林水産省林業試験場の三橋淳博士より分与を受けた。

2. 細胞培養

昆虫培養細胞は, 熱処理 (56°C, 30 分) したウシ胎児血清 (Gibco) 10% を含む IPL-41 液で, 27°C で培養した。細胞培養用の容器は, 50 ml プラスチックフラスコ (Falcon, 3013) を用い, *S. frugiperda* 細胞および S. P. C. Bm 36 細胞は, 3~4 日, *M. brassicae* 細胞は, 4~5 日間隔で継代し, 継代時の昆虫細胞の初濃度は, いずれも 0.5×10^6 細胞/ml とした。また, 昆虫細胞を継代以外の目的で培養する場合は, 0.1% のペニシリン-ストレプトマイシン混液 (Gibco, Penicillin 10,000 U/ml-streptomycin 10,000 µg/ml) を添加した培養液を使用した。

3. ウイルス

シロモンヤガ *X. c-nigrum* NPV は, 農林水産省農業研究センターの岡田齊夫博士より感染幼虫病血の分与を受けた。当研究室において, *S. frugiperda* 細胞で, ブラック純化法でクローニングしたものを用いた。*X. c-nigrum* NPV T-3 株は, *S. frugiperda* 細胞の confluent monolayer に形成された *X. c-nigrum* NPV の小型のブラックから選抜したウイルスクローンである。*B. mori* NPV は, 当研究室で *B. mori* 幼虫で継代したウイルスに感染した幼虫の病血を S. P. C. Bm 36 細胞でブラック純化法でクローニングしたものを用いた。*B. mori* NPV K-4 株は, 比較的大型のブラックを選抜して得られたウイルスクローンである。

4. nonoccluded virus の増殖

X. c-nigrum NPV T-3 および *B. mori* NPV K-4 の感染細胞培養上清をそれぞれ *S. frugiperda* 細胞および S. P. C. Bm 36 細胞に接種し, 10 分間隔でゆるやかに攪拌しながら 1 時間吸着させた。細胞浮遊液を 600 rpm, 5 分低速遠心し, 上清を除いて新しい培養液に浮遊し, 50 ml プラスチックフラスコに移し, 27°C で培養した。接種 4 日後の感染細胞浮遊液を 3,000 rpm, 10 分遠心し

た感染培養上清を接種材料として、使用時まで -80°C に凍結保存した。

5. ブラックアッセイ

Wood (1977) および Tsuda et al. (1988) の方法を一部改変して行った。継代 3~4 日後の対数増殖期の昆虫培養細胞を IPL-41 液で 0.6×10^6 細胞/ml に希釈し、0.5 ml/穴ずつマルチウェルプレートに分注した。分注した細胞浮遊液 (0.3×10^6 細胞/穴) に直接、希釈した感染培養上清を 0.1 ml/穴ずつ加えて接種し、蓋をした後、マイクロテストプレート用水平回転ローター (佐久間製作所, HM-2) で、2,000 rpm, 27°C , 60 分遠心し、confluent monolayer の形成およびウイルスの吸着を同時に行った。遠心後、マルチウェルプレートの各穴からアスピレータで上清を除去し、アガロース重層液を *S. frugiperda* 細胞では 0.3 ml/穴ずつ、S. P. C. Bm 36 細胞では 0.4 ml/穴ずつ重層した。重層液は以下のように調製した。5% Seakem agarose ME (Marine Colloids Inc.) 水溶液をオートクレーブ滅菌後、 $80 \sim 90^{\circ}\text{C}$ に保温した。その 1 量に 9 量の 10% 熱処理ウシ胎児血清、0.1% ペニシリン-ストレプトマイシン混液を含む IPL-41 液を混合し、 42°C に保温した。さらに、 27°C で 5~6 日培養した後、0.03% ニュートラルレッドを含む二次アガロース重層を行った。二次重層液の調製法は以下のようなものである。オートクレーブ後、 $80 \sim 90^{\circ}\text{C}$ に保温した 4% アガロース水溶液 1 量に 0.03% ニュートラルレッドを含む IPL-41 液 9 量を混合後、 42°C に保温した。二次アガロース重層液は、0.15 ml/穴ずつ加えた。各希釈あたり 3 穴を利用し、二次重層の 1~2 日後に透過光でブラック数を測定した。

6. ウイルスの細胞への吸着効率

昆虫培養細胞浮遊液を 600 rpm, 5 分間遠心し、上清

を除去した後、沈澱に感染培養上清 (NOV 浮遊液) 1 ml を加えて浮遊し、 27°C でときどき攪拌しながら所定時間、NOV を細胞に吸着させた。所定時間後、浮遊液を 3,000 rpm, 10 分間遠心し、上清に残った NOV をブラック検定した。対照には、培養液と混合した感染培養上清を同じ温度条件下で所定時間処理し、両者の PFU の差より NOV の吸着効率を算定した。

結 果

X. c-nigrum NPV T-3 NOV の S. P. C. Bm 36 細胞、*S. frugiperda* 細胞および *M. brassicae* 細胞に対する吸着率を測定した結果を Table 1 に示した。*X. c-nigrum* NPV T-3 NOV は、許容性の S. P. C. Bm 36 細胞および *S. frugiperda* 細胞にそれぞれ 61% および 71% が吸着されたが、非許容性の *M. brassicae* 細胞には、まったく吸着されなかった。

一方、*B. mori* NPV K-4 NOV は、S. P. C. Bm 36 細胞にのみ感染し、接種した NOV の 77% が吸着された (Table 2)。しかし、非許容性の *M. brassicae* 細胞には、*B. mori* NPV K-4 NOV はまったく吸着されなかった。一方、*S. frugiperda* 細胞には、*B. mori* NPV K-4 NOV は感染しなかったが、接種した NOV の 71% が吸着された。

次に、吸着時間を 5 分または 60 分とした場合の *B. mori* NOV K-4 NOV の S. P. C. Bm 36 細胞および *S. frugiperda* 細胞に対する吸着率を測定した (Table 3)。*B. mori* NPV K-4 NOV はきわめて短時間内に S. P. C. Bm 36 細胞および *S. frugiperda* 細胞に吸着され、混合 5 分後には、60 分後までに吸着する NOV の 70% 以上が既に吸着されていた。

Table 1. Adsorption of *Xestia c-nigrum* NPV T-3 to three insect cell lines

Cell lines	Replication of <i>Xestia c-nigrum</i> NPV	Virus titer before adsorption ^a	Virus titer after adsorption ^b	Adsorption index ^c
S.P.C. Bm36 ^d	+	7.0×10^2	2.7×10^2	61
<i>Spodoptera frugiperda</i> (IPLB-SF-21AEII)	+	7.0×10^2	2.0×10^2	71
<i>Mamestra brassicae</i> (NIAS-Mb-32)	—	7.0×10^2	7.0×10^2	0
Control (IPL-41 medium)		7.0×10^2	7.0×10^2	

^a PFU/ml of infectious culture medium: *X.*

^b PFU/ml of supernatant after 60 min adsorption at 27°C : *Y.*

^c $\left(\frac{X-Y}{X} \right) \times 100$.

^d Number of cells: $1.0 \times 10^7/\text{ml}$.

Table 2. Adsorption of *Bombyx mori* NPV K-4 to three insect cell lines

Cell lines	Replication of <i>Bombyx mori</i> NPV	Virus titer before adsorption ^a	Virus titer after adsorption ^b	Adsorption index ^c
S.P.C. Bm36 ^d	+	1.0×10^3	2.3×10^2	77
<i>Spodoptera frugiperda</i> (IPLB-SF-21AE11)	—	1.0×10^3	2.9×10^2	71
<i>Mamestra brassicae</i> (NIAS-Mb-32)	—	1.0×10^3	1.0×10^3	0
Control (IPL-41 medium)		1.0×10^3	1.0×10^3	

^a PFU/ml of infectious culture medium: *X*.
^b PFU/ml of supernatant after 60 min adsorption at 27°C: *Y*.
^c $\left(\frac{X-Y}{X}\right) \times 100$.
^d Number of cells: 1.0×10^7 /ml.

Table 3. Titer of *Bombyx mori* NPV K-4 after adsorption to S.P.C. Bm36 and *Spodoptera frugiperda* cells^a

Adsorption period (min)	S.P.C. Bm36		<i>Spodoptera frugiperda</i> (SF-21AE11)	
	Virus titer ^b	Adsorption index ^c	Virus titer	Adsorption index
5	9.9×10^2	50	1.2×10^3	40
60	6.3×10^2	60	8.9×10^2	55

^a Initial titer of BmNPV was 2.0×10^3 PFU/ml: *X*.
^b PFU/ml of supernatant after adsorption at 27°C: *Y*.
^c $\left(\frac{X-Y}{X}\right) \times 100$.

考 察

ウイルス感染の第一の段階は、ウイルス粒子の宿主細胞への吸着であると考えられる。本研究では、*X. c-nigrum* NPV および *B. mori* NPV の NOV に昆虫培養細胞を混合し、その吸着率を測定したが、細胞密度が低い場合は、NOV の吸着がみられず、細胞密度が継代濃度程度でも十分ではなかった。細胞密度のほか、DOUGHERTY et al. (1981) は、吸着時の温度を 4°C にすると PFU 値が 60% 低下することを報告し、NOV の細胞への吸着がブラウン運動による影響も受けていることを指摘している。

また、NOV 吸着の第一ステップには、NOV と細胞間の静電的な引力が関与し、イオン環境によって、NOV 吸着の度合いが影響を受ける (DOUGHERTY et al., 1981) ことが指摘されているが、一般にウイルス粒子が細胞に吸着する過程には、細胞におけるレセプターの存在または、レセプターとウイルス粒子の間の親和性もとても重要であるとされる。本研究において、*X. c-nigrum* NPV および *B. mori* NPV の NOV は、*M. brassicae* 細胞にまったく吸着が見られなかった。*M. brassicae* 細胞は *X. c-nigrum* NPV および *B. mori* NPV に対して非

許容性であるが、これは、*M. brassicae* 細胞にこれらの NPV の NOV に対するレセプターが存在しないために吸着および感染が成立しないものと考えられた。

一方、*S. frugiperda* 細胞は、*B. mori* NPV に非許容性であるが、*B. mori* NPV の NOV は *S. frugiperda* 細胞に吸着されることが確認された。ウイルスが細胞に吸着しても感染しない例としては、発育鶏卵細胞における伝染性軟腐胚ウイルスが知られている (ROBINSON et al., 1969; DALES, 1973) が、NPV でも GRÖNER et al. (1984) は *A. californica* NPV NOV を非許容性のコドリングア *Carpocapsa pomonella* 細胞およびチャイニーズハムスター細胞に接種し、ウイルス粒子の吸着および細胞内取り込みを確認したが、感染が成立しなかったことを報告している。*B. mori* NPV の昆虫培養細胞への吸着速度について検討した結果、*B. mori* NPV の許容性 S. P. C. Bm 36 細胞および非許容性 *S. frugiperda* 細胞への吸着速度には、ほとんど差異がみられなかった。また、5 分以内に大部分の NOV が吸着されるので、この段階での反応は、ほぼ同一の経過と推定された。DOUGHERTY et al. (1981) は、*A. californica* NPV NOV は、*T. ni* 細胞で接種 40 秒ですでに 45% が吸着し、最初の 5 分間で NOV の大部分が吸着されることを報告した。このように昆虫

細胞に NOV がきわめて短時間に吸着されるのは、NOV とレセプターがその高い親和性のため最初の接触の機会です。瞬間的に反応し吸着されることによると考えられる。NOV の昆虫細胞への吸着が、拡散による偶然的接触の機会と静電的な引力により支配されているならば、吸着率は、吸着時間に比例し、ゆるやかに増加するはずであるが、吸着がきわめて短時間に成立していることから、他の要因の影響が大きいと考えられる。

S. frugiperda 細胞系 IPLB-SF-21 細胞 (VAUGHN et al., 1977) では、これまで *S. frugiperda* NPV (GOODWIN et al., 1970), *A. californica* NPV (VAUGHN, 1976), シロイチモジヨトウ *Spodoptera exigua* NPV, *Spodoptera exempta* NPV, *T. ni* NPV (KNUDSON, 1979), ハチミツガ *Galleria mellonella* NPV (FRASER and HINK, 1982; TSUDA et al., 1984), *Anticarsia gemmatilis* NPV (SIEBURTH and MARUNIAK, 1988) の増殖が報告されており、多くの NPV に許容性であり、多くの NPV の NOV にひろく反応するレセプターを持っている可能性が考えられる。*B. mori* NPV が、*S. frugiperda* 細胞では、NOV 吸着後のどのような段階で反応が停止し、感染が成立しないかについては、別の機会に検討したい。

摘 要

X. c-nigrum NPV および *B. mori* NPV の昆虫培養細胞に対する感染性の差異を利用し、NPV の昆虫培養細胞感染の最初の段階である nonoccluded virus (NOV) の細胞への吸着と感染成立の関係を検討した。

X. c-nigrum NPV T-3 NOV は、許容性細胞の *S. frugiperda* 細胞および S. P. C. Bm 36 細胞には吸着したが、非許容性細胞の *M. brassicae* 細胞には、吸着が認められなかった。一方、*B. mori* NPV K-4 NOV は、非許容性細胞の *M. brassicae* 細胞には、吸着は認められなかったが、もう一方の非許容性細胞の *S. frugiperda* 細胞に対しては、許容性の S. P. C. Bm 36 細胞と同程度に吸着された。したがって、*B. mori* NPV の NOV は、*S. frugiperda* 細胞に対しては、NOV の細胞吸着以降の過程で生じる原因により感染が成立しない可能性が示唆された。

引 用 文 献

- 浅山 哲 (1982) 鱗翅目昆虫 Baculovirus の感染ならびに形態形成に関する研究. 愛知農総試特報 No. 3: 1—85.
- DALES, S. (1973) Early events in cell-animal virus interactions. *Bacteriol. Rev.* **37**: 103—135.
- DOUGHERTY, E.M., R.M. WEINER, J. VAUGHN and C.F. REICHELDERFER (1981) Physical factors that affect *in vitro Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1166—1172.
- FRASER, M.J. and W.F. HINK (1982) Comparative sensitivity of several plaque assay techniques employing TN-368 and IPLB-SF-21AE insect cell lines for plaque variants of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* **40**: 89—97.
- GOODWIN, R.H., J.L. VAUGHN, J.R. ADAMS and S.J. LOULOUDIS (1970) Replication of a nuclear polyhedrosis virus in an established insect cell line. *J. Invertebr. Pathol.* **16**: 284—287.
- GRÖNER, A., R.R. GRANADOS and J.P. BURAND (1984) Interaction of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with two nonpermissive cell lines. *Intervirology* **21**: 203—209.
- HINK, W.F. (1970) Established insect cell line from the cabbage looper. *Trichoplusia ni*. *Nature* **226**: 466—467.
- HINK, W.F. (1980) The 1979 complication of invertebrate cell lines and culture media. In: *Invertebrate System in vitro*. (E. KURSTAK, K. MARAMOROSCH and A. DUBENDORFER eds.), Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 553—578.
- HINK, W.F. and P.V. VAIL (1973) A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper (TN-368) cell line. *J. Invertebr. Pathol.* **22**: 168—174.
- KAWAMOTO, F., C. SUTO, N. KUMADA and M. KOBAYASHI (1977) Cytoplasmic budding of a nuclear polyhedrosis virus and comparative ultrastructural studies of envelopes. *Microbiol. Immunol.* **21**: 255—265.
- 河原畑 勇 (1984) 昆虫核多核体病ウイルス—最近の研究から—。ウイルス **34**: 73—88.
- KNUDSON, D.L. (1979) Plaque assay of baculoviruses employing an agarose-nutrient overlay. *Intervirology* **11**: 40—46.
- MARTIGNONI, M.E. and P.J. IWAI (1981) A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970—1980*. (H.D. BURGESS ed.), London: Academic Press, pp. 897—911.
- MATTHEWS, R.E.F. (1982) Classification and nomenclature of viruses. Forth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **17**: 1—200.
- QUIOT, J.M. (1982) Establishment of a cell line (S.P.C. Bm36) from the ovaries of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Sericultura* **22**: 25—31.

- ROBINSON, H.J., P.H. PROSE, JR., A.E. FRIEDMAN-KIEN, S. NEISTEIN and L. VILCEK (1969) The Molluscum contagiosum virus in chick embryo cell cultures: An electron microscopic study. *J. Invest. Dermatol.* **52**: 51—56.
- SIEBURTH, P.J. and J.E. MARUNIAK (1988) Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.* **52**: 453—458.
- TSUDA, K., E. MIZUKI, T. KAWARABATA and K. AIZAWA (1984) Replication of *Xestia c-nigrum* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus in continuous cell cultures. *Appl. Ent. Zool.* **19**: 293—298.
- TSUDA, K., E. MIZUKI, T. KAWARABATA and K. AIZAWA (1988) Comparative neutralization of nuclear polyhedrosis viruses infections to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), in a cell line of *Spodoptera frugiperda*. *J. Invertebr. Pathol.* **52**: 248—252.
- VAUGHN, J.L. (1976) The production of nuclear polyhedrosis viruses in large volume cell cultures. *J. Invertebr. Pathol.* **28**: 233—237.
- VAUGHN, J.L., R.H. GOODWIN, G.J. TOMPKINS and P. McCRAWLEY (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro* **13**: 213—217.
- WOOD, H.A. (1977) An agar overlay plaque assay method for *Autographa californica* nuclear-polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* **29**: 304—307.
-