

滋賀県のコナガから分離された核多角体病ウイルスの性状

近藤 篤*・山本 雅則

Properties of Nuclear Polyhedrosis Viruses Isolated from the Diamondback Moth,
Plutella xylostella (Lepidoptera: Yponomeutidae), Collected in Shiga

Atsushi KONDO and Masanori YAMAMOTO

キーワード：核多角体病ウイルス，コナガ，制限酵素分析

滋賀県彦根市松原町のは場におけるコナガの病原性ウイルスによる感染率を調査したところ、核多角体病ウイルスは2月にのみ4.3%、顆粒病ウイルスは2月、3月および9～10月に0.4～0.7%の発生が認められた。

これら野外から分離されたコナガ核多角体病ウイルス5株の遺伝子の構造を制限酵素 EcoR I と Hind III を用いて分析したところ、既知のシロイチモジヨトウ核多角体病ウイルス SeNPV # 5 株と同一の泳動パターンが得られたことから、同一あるいはほぼ同一のウイルスであると判断した。また、SeNPV # 5 株はすでに *Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcNPV) の変異株であることが示されていることから、本報で取り扱ったコナガから分離されたコナガ核多角体病ウイルスも AcNPV の変異株であると考えられた。

1. 緒 言

コナガはアブラナ科作物の難防除害虫である。コナガの薬剤防除対策として従来から薬剤による防除が行われてきたが、本種は薬剤抵抗性が発達しやすく、滋賀県においても有機リン剤や合成ピレスロイド剤などの多くの薬剤に対して感受性が低下している²⁾。このため、本種は本県の特産物ヒノカブなどのアブラナ科作物の栽培上、特に施設の周年栽培において、薬剤防除が困難な状態となっており、栽培地において有効な防除対策が望まれてきた。また、薬剤以外のコナガに対する防除方法として、合成性フェロモン剤や被覆資材を利用した方法の導入が検討されている⁶⁾。さらに、天敵寄生蜂の調査²⁾や天敵微生物²⁾などを利用した防除方法についても検討されている。

天敵などの生物的防除法を検討する上で、害虫の野外における発生抑制要因（死亡要因）を解明すること

は極めて重要である。コナガにおいても数多くの調査が行われており、本種の生命表もすでに作成されているが⁹⁾、生命表中での病原性ウイルスについての調査は十分とは言えない。コナガ病原性ウイルスに関する報告は、顆粒病ウイルス、核多角体病ウイルスおよび虹色ウイルスに関するものがあるが^{1, 2, 17, 20)}、これらウイルスの野外における発生実態や詳しい性状についての日本における報告はほとんどない。また、これらウイルスによるコナガの防除は、顆粒病ウイルスについては、は場での防除効果まで確認されているが²⁾、ウイルスの大量増殖法が未だ確立されておらず、生きたコナガ幼虫へのウイルス接種により、増殖を行うという原始的な方法をとっているのが現状である。また、核多角体病ウイルスについては、生きた昆虫を利用するという点において同様であるが、コナガより大型であるハスモンヨトウを用いた代替宿主による効率のよい増殖法が報告されている¹⁹⁾。筆者らは、本県彦根市

* 滋賀県病害虫防除所

で分離されたシロイチモジヨトウ核多角体病ウイルスが2つのグループに大別でき、その1グループがコナガにも病原性を有していることを報告した¹⁰⁾。

本報では、コナガのウイルスによる防除法確立のため、野外におけるコナガのウイルス病、特に核多角体病ウイルスの発生状況と分離されたウイルスの性状について検討した。

2. 材料と方法

2. 1 コナガの野外における天敵微生物による死亡要因の調査

1991年に滋賀県彦根市松原町で露地栽培されているアブラナ科作物（ブロッコリー、キャベツ）からコナガの幼虫を採集し、個体別に室内で飼育した。飼育にはガラス温室内で隔離栽培したキャベツ生葉を用いた。死亡した幼虫は個体別に回収し、光学顕微鏡を用いてコナガの細胞を検鏡して死亡要因を調査した。このうち、細胞の核内に多角体と考えられる顆粒が形成されていた場合には、この顆粒を再び健全なコナガ幼虫に経口接種し、発病の有無により病原性を確認した。また、本調査中、コナガ幼虫が天敵寄生蜂により死亡した場合についても記録した。

2. 2 ウイルスの分離

2. 1の死亡要因調査で得られたウイルスに加えて、同市長曾根町においてコナガ幼虫を採集し、死亡要因の調査と同様の方法で核多角体病ウイルスを分離した。分離後、病原性を確認したウイルス株は5℃で保存した。

2. 3 ウイルスの増殖

分離したウイルスはシロイチモジヨトウに病原性を示したため、ウイルスの増殖には体サイズの大きいシロイチモジヨトウを用いた。シロイチモジヨトウの飼育には人工飼料（インセクタ LF[®]、日本農産工業^株）を用いた。ウイルスの接種は経口で行った。シロイチモジヨトウ3齢幼虫に 1×10^6 個の多角体を混入した少量の人工飼料を与え、24時間摂食させた後、通常の人飼料を与え、5日間27℃で飼育して、幼虫個体内でウイルスを増殖させた。

2. 4 多角体の精製

ウイルスの接種により死亡した幼虫を蒸留水中に回収し、多角体の精製まで5℃で保存した。精製方法は次のとおりとした。死亡した幼虫をろ過後、遠心分離

を行い、沈殿物を回収した。さらに、その沈殿物を蒸留水で3回洗浄した後、少量の蒸留水に懸濁し、45-55%の不連続シ₂糖密度勾配遠心法によって多角体を精製した¹⁰⁾。

2. 5 ウイルス粒子の精製

ウイルス粒子の精製は、先に得られた多角体をアルカリ条件下に置き、ウイルス粒子を放出させた¹⁰⁾。さらに、ウイルス粒子を多数含むこの溶液を10-60%の連続シ₂糖密度勾配遠心法によって分離、精製した。バンドとして得られたウイルス粒子に蒸留水を加え、再び遠心分離を行い沈殿させた。沈殿物は少量の10mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTAに溶解し、供試するまで-80℃に保存した。

2. 6 ウイルス遺伝子の精製と制限酵素による分析

ウイルス遺伝子は多角体から得られたウイルス粒子より精製した。10mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTAに溶解したウイルス粒子に、1/20量のproteinase K(20mg/ml)と1/10量の10%SDSを加え、37℃で1時間反応させた。反応後、フェノール抽出3回、フェノール：クロロホルム=1：1抽出1回、クロロホルム抽出3回を行い、ウイルス遺伝子を精製した。精製されたウイルス遺伝子は制限酵素 Hind IIIもしくはEcoR Iによって消化し、0.7%のアガロースゲルで電気泳動し、遺伝子の構造を調べた。なお、対照として、シロイチモジヨトウ核多角体病ウイルス *S. exigua* NPV(SeNPV) #1株とSeNPV #5株の2株を用いた¹⁰⁾。

3. 結果および考察

3. 1 野外ほ場でのコナガの死亡要因

彦根市松原町の野外ほ場より採集したコナガの死亡要因を調査した結果、ウイルス（核多角体病ウイルスと顆粒病ウイルス）や糸状菌による感染死、数種の寄生蜂による寄生死が認められた。糸状菌を除く、核多角体病ウイルスと顆粒病ウイルスの感染率および寄生蜂の寄生率を表1に示した。

核多角体病ウイルスは、2月に4.3%の感染が認められたが、この時期以外の感染は認められなかった。顆粒病ウイルスは2月、3月、9-10月で0.4-0.7%の感染が認められたが、5月と6月では認められなかった。寄生蜂の寄生率は、3月ではわずか0.4であったが、5月で3.4%、6月には42.9%と最も高くなり、

表1 コナガの死亡要因推移

採集月日	採集虫数(頭)	NPVの感染率(%)	GVの感染率(%)	寄生蜂の寄生率(%)
2月21日	140	4.3	0.7	0
3月27日	231	0	0.4	0.4
5月2日	117	0	0	3.4
6月12日	56	0	0	42.9
9月24日~10月4日	177	0	0.6	0.6

注) NPV:核多角体病ウイルス GV:顆粒病ウイルス

9~10月では0.6%と再び低下した。核多角体病ウイルスが冬期のみ発生を認められた理由は明らかではないが、冬期には感染の機会が増加したこと、コナガの幼虫自体のウイルスに対する抵抗性が変化した可能性が考えられる。すなわち、感染の機会の増加としては、冬期間はコナガの幼虫の成育期間が長く、寄主植物の生育も緩慢であることから、寄主植物が降雨などでウイルスなどを含んだ土壌などによって汚染する可能性が高くなるのではないかと考えられる。ウイルスに対する抵抗性の低下については、カイコなどの他の昆虫では幼虫の抵抗性が低温処理などのストレスなどにより低下することが一般的に知られており^{7,8)}、コナガでもこのようなことが何らかの影響を与えているのではかと考えられた。本報では発病を感染として扱っているが、厳密には異なる可能性も考えられる。東京都で作成されたコナガの生命表⁹⁾ではコナガの死亡要因として病気として扱われているが、病気の種類までは詳細に記述されていない。今回、核多角体病ウイルス、顆粒病ウイルスの季節的な感染の変動が認められたことはコナガの防除を考える上で重要である。

一方、寄生蜂は、3月および9~10月では1%以下の低い寄生率であったが、5月では3.4%とやや上昇し、6月では42.9%と最も高い寄生率を示した。また、2月での寄生は認められなかった。伊賀⁹⁾によると5月中旬~7月までのコナガの主な死亡要因は卵寄生蜂による寄生死としているが、3~4(終)齢の幼虫の死亡要因は明らかでなく、スズメによるものと推測している。しかし、山田²⁰⁾らは6月期の幼虫後期で14.3%、蛹で71.7%の高い寄生蜂の寄生率を報告している。今回の調査で得られた寄生率の値は山田らの結果と矛盾しなかった。

3. 2 分離されたウイルスの性状

野外のコナガ幼虫から個別別に7株の核多角体病ウ

イルス野外分離株が得られた。この分離した核多角体病ウイルス野外分離株にそれぞれ PxNPV # 1~7の番号を与えた。これらのウイルスをシロイチモジヨトウの幼虫に接種したところ、すべての株が典型的な核多角体病ウイルスの病徴を示した。死亡したシロイチモジヨトウの組織を光学顕微鏡によって観察したところ、立方体の多角体が観察された。

分離されたウイルスをシロイチモジヨトウ幼虫で増殖し、この死亡した幼虫から多角体、さらに多角体からウイルス粒子を精製した。コナガ核多角体病ウイルス7株のうち5株(PxNPV # 1, 3, 4, 6および7株)と対照として用いたシロイチモジヨトウ核多角体病ウイルス2株(SeNPV # 1 および5株)の7株の遺伝子構造を制限酵素を用いたアガロースゲル電気泳動法によって分析した結果を写真1に示した。PxNPVの5株では、制限酵素 EcoR I と Hind III の消化によって得られた遺伝子は同様な泳動パターンを示した。また、泳動によって得られた遺伝子のバンド

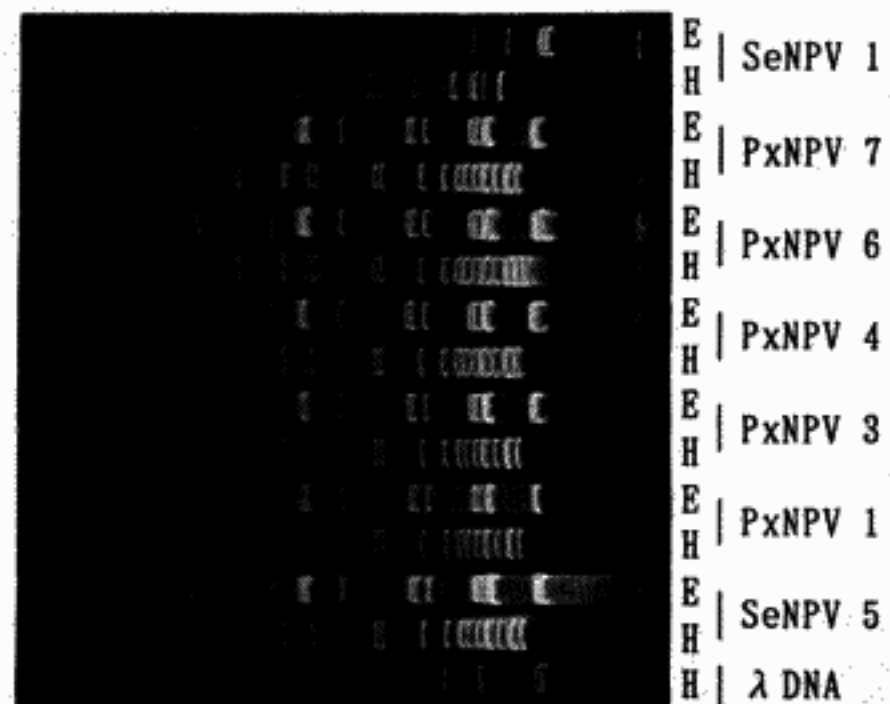


写真1 ウイルスゲノムDNAの泳動パターン
E:制限酵素EcoR I H:制限酵素Hind III
入DNA:分子量マーカー

のそれぞれは明瞭であり、薄いバンドは認められなかった。これらのことから、5株のコナガ核多角体病ウイルスはそれぞれ遺伝的に均一なウイルス集団であり、株間でも、同一もしくはほぼ同一のウイルスであることが確認できた。また、PxNPV株とSeNPV株を比べてみると、PxNPV株はSeNPV#1株とは明らかに異なるパターンを示したが、SeNPV#5株とは同一かほぼ同一のパターンを示した。このことから分離された5株のPxNPVはすでにシロイチモジヨトウから分離されているSeNPV#5株と同一グループであると考えられた。しかし、このシロイチモジヨトウ核多角体病ウイルスグループSeNPV#5株は、すでに小笠原から分離され、性状が報告されているハスモンヨトウ核多角体病ウイルス(SINPV)OT2株と同一のウイルスグループであることが明らかとなっている^{13, 16)}。また、SINPVOT2株は*Autographa californica*核多角体病ウイルス(AcNPV)の1つの変異株であると考えられている。したがって、今回の調査でコナガから分離されたこれら5株のウイルスもAcNPVの1つの変異株ということになる。すなわち、このAcNPVの変異株は、鱗翅目に属するハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウ(ヤガ科)、コナガ(スガ科)と異なる宿主から分離され、滋賀県と小笠原のように離れた地域から分離されていることから野外に広く分布していることが推察できる。

AcNPVは、1970年代に、ヤガ科*Autographa californica*から分離され、病原性や遺伝子の構造が明らかとなっており、ウイルスの接種試験によってコナガに対しても病原性を有することが知られている¹⁵⁾。また、海外では野外からコナガに病原性を有する核多角体病ウイルスが分離され²⁰⁾、遺伝子の構造が調査されている¹⁾。今回分離されたPxNPVの分析結果と比べると非常によく似た泳動パターンを示していることから、近縁か同一のウイルスであると考えられる。今回、本県において、AcNPVが野外のコナガから分離されたことから、本県ではAcNPVがハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウの他、コナガも宿主として利用していることが明らかとなった。

すでに分離されているAcNPVの変異株であるSeNPV#5株は、シロイチモジヨトウを用いて大量に増殖することが比較的容易であり、筆者らによって現地ほ場においてコナガの防除試験を実施した。その結果、コナガに対する防除効果は認められたが、実用的

には十分ではなく、被覆資材などとの併用が必要であった^{11, 12)}。また、高温期の防除試験ではウイルスの防除効果低下する傾向がうかがえた(未発表)。このような、ウイルスによる防除を考える場合、防除対象とする害虫種に自然発生しているウイルスを分離、増殖して防除に用いることは、より生態系に与える影響も低いと推察されることから、今回の調査で野外のコナガからAcNPVの変異株であるPxNPV株が分離されたことは大変有意義であると考えられる。また、高温期に防除効果が低下するのは、今回の調査結果で核多角体病の発生が冬期に集中していたことと何らかの関係がある可能性も考えられた。

核多角体病ウイルスは、従来、分離された宿主の種類によって命名と分類が行われてきたが、近年、制限酵素による遺伝子構造の研究が盛んに行われるようになり、遺伝子構造の比較による同定法が確立された。*Spodoptera littoralis*核多角体病ウイルスでは、この方法によって地理的な変異が詳しく調べられており⁴⁾、また、数種の昆虫から分離された核多角体病ウイルス間の比較検討も行われている^{3, 18)}。しかしながら、本報のような一地域の異なる宿主の核多角体病ウイルスの遺伝子構造の比較検討は行われていない。

今回分離されたPxNPVは、アブラナ科植物に寄生するキンウワバ亜科(ヤガ科)の一種に対する病原性も確認している(未発表)。以上のことから、*Autographa californica*から分離されたAcNPVは、ハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウ、コナガ、ウワバ類等のアブラナ科作物を加害する鱗翅目害虫に広く病原性を有している可能性がある。核多角体病ウイルスは、遺伝子の構造や発現のメカニズムなどが詳細に調べられており、外来遺伝子の発現ベクターとしての利用が進み、さらに、昆虫に特異的に作用する遺伝子を組み込むことで防除素材としての改良がなされている⁵⁾。このような状況の下、AcNPVは宿主域が広く、害虫防除を考える上で利用価値が高いと考えられる。さらに、AcNPVは宿主域に関する知見も蓄積されており、カイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)との掛け合わせによって、AcNPVの宿主に加えてカイコでも増殖するようになることが知られている¹⁴⁾。このことは、ウイルス増殖にシロイチモジヨトウではなくカイコを利用できることを示しており、防除用ウイルス製剤生産の問題点である大量増殖に大きな解決策を与えることと考えられる。宿主域が広がれ

ば、同時に多種の害虫防除が可能となり、鱗翅目害虫に関しては他剤を補完的に使用するだけで栽培できる可能性があり、省農薬栽培が可能となるものと考えられる。しかし、一方では、カイコに病原性を有することにもなり、このようなウイルスの利用には十分な注意を払う必要があると考えられる。

引用文献

- 1) ABDUL KADIR, H. B. and C. C. PAYNE: Relation ship of a *Plutella xylostella* nuclear polyhedrosis virus(NPV) to NPV of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **53**:113-115,1989.
- 2) 浅山哲: コナガの顆粒病ウイルス. 植物防疫 **39** (3):113-116,1985.
- 3) BROWN, S. E., J. E. MARUNIAK and D. K. KNUDSON: Baculovirus (MNPV) genomic variants: Characterization of *Spodoptera exempta* MNPV DNA and comparison with other *Autographa californica* MNPV DNAs. *J. gen. Virol.* **66**:2431-2441,1985.
- 4) CHERRY, C. L. and M. D. SUMMERS: Genotypic variation among wild isolates of two nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.* **46**:289-295, 1985.
- 5) HAMMOCK, B. D., B. C. BONNING, R. D. POSSEE, T. N. HANZLIK and S. MAEDA: Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature* **344**:458-461,1990.
- 6) 平井康博・川村清隆・川田和・山本雅則・小嶋俊彦: 合成性フェロモン剤によるコナガの防除(第1報) 露地キャベツにおける交信攪乱の効果について. 滋賀農試研報**32**:32-41,1992.
- 7) 松原藤好・呉友良・森肇・大頭肇: 無菌蚕の低温および高温処理による核多角体病ウイルスに対する感染抵抗力. 日蚕雑**53**(6):538-542,1984.
- 8) 福原敏彦: ウイルス病. 昆虫病理学. pp.123-148. 学会出版センター, 東京, 1979.
- 9) 伊賀幹夫: コナガの発生消長と生命表. 応動昆 **29**:119-125,1985.
- 10) KAWARABATA, T. and K. MATSUMOTO: Isolation and structure of the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Ent. Zool.* **8**:227-233,1973.
- 11) 近藤篤・中田毅・平井周一: シロイチモジヨトウ核多角体病ウイルスによる現地ほ場でのコナガの防除効果. 関西病虫研報**39**:13-14,1997.
- 12) 近藤篤・中田毅・平井周一: 滋賀県草津市における昆虫ウイルスを組合せたコナガの防除効果. 関西病虫研報**40**:147-148,1998.
- 13) KONDO, A., M. YAMAMOTO, S. TAKASHI and S. MAEDA: Isolation and characterization of nuclear polyhedrosis viruses from the Beet armyworm, *Spodoptera exigua* found in Shiga, Japan. *Appl. Ent. Zool.* **29**:105-111,1994.
- 14) KONDO, A. and S. MAEDA: Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **65**:3625-3632,1991.
- 15) LEWIS, L. C, R. E. LYNCH and J. J. JACKSON: Pathology of a baculovirus of the alfalfa looper, *Autographa californica*, in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Environ. Entomol.* **6**:535-538, 1977.
- 16) MAEDA, S., Y. MUKOHARA and A. KONDO: Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera litura*. *J. Gen. Virol.* **71**:2631-2639,1990.
- 17) MARTIGNONI, M. E. and P. J. IWAI: Microbial control of pests and plant diseases. (H. D. Burges ed.) .pp.897-911. Academic Press, New York, 1970~1980.
- 18) SMITH, G. E. and M. D. SUMMERS: Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* **89**:517-527,1978.
- 19) 津田勝男・三井寿一・庄籠徹也: コナガに対する天敵ウイルスの利用技術 第1報コナガ核多角体病ウイルスの代替宿主による増殖 福岡農総試研報 **B-11**:43-46, 1991.
- 20) VAIL, P. V., G. SUTTER, D. L. JAY, and D. GOUGH: Nuclear polyhedrosis of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* **20**:216-217,1972.
- 21) 山田偉雄・山口泰治: コナガの寄生性および捕食

性天敵. 応動昆29:170-173,1985.
22) 山本雅則・小嶋俊彦・平井康博: 滋賀県における

コナガの感受性検定と薬剤による防除. 滋賀農試研
報32:42-52,1991.

Summary

The diamondback moth, *Plutella xylostella*, is a major pest causing damage to cruciferous crops. The prevalence of viruses entomopathogenic to *Plutella xylostella* in fields at Matsubara-cho in Hikone City, Shiga Prefecture, was investigated. The prevalence of infection with nuclear polyhedrosis virus showed seasonal variation. Five viral genomic DNAs of several isolated strains of diamondback moth nuclear polyhedrosisvirus (PxNPV) were compared with two previously isolated strains of beet armyworm nuclear polyhedrosis virus (SeNPV #1 and #5), by restriction endonuclease analysis.

The electrophoretic patterns of five isolates of PxNPV differed markedly from the pattern of SeNPV #1, while being identical or nearly identical to the pattern of SeNPV #5. This suggests that the five PxNPVs isolated from diamondback moths in the present study represent a variant of *Autographa californica* NPV.