

# カイコの付着性培養細胞系の樹立とその特性

井上 元・谷合 幹代子・小林 淳

Hajime INOUE, Kiyoko TANIAI and Jun KOBAYASHI : Establishment and  
characterization of substrate-depending cell lines of *Bombyx mori*

蚕糸・昆虫農業技術研究所研究報告  
第 1 号 別刷

平成 2 年 3 月

Reprinted from  
Bulletin of the National Institute of  
Sericultural and Entomological Science  
No. 1, March, 1990

## カイコの附着性培養細胞系の樹立とその特性

井上 元<sup>1</sup>・谷合 幹代子<sup>2</sup>・小林 淳<sup>3</sup>

(1990年1月4日 受理)

Hajime INOUE, Kiyoko TANIAI and Jun KOBAYASHI : Establishment and characterization of substrate-depending cell lines of *Bombyx mori*

近年、昆虫核多角体病ウイルスを発現ベクターとして、培養細胞系あるいは幼虫体で外来遺伝子を発現させる研究が進展している (SMITH *et al.*, 1983 ; MAEDA *et al.*, 1985)。このような目的には、通常、外来遺伝子を挿入した組換えウイルスのプラーク形成法による選抜の過程を経ることが多いが、そのためには附着性でウイルス高感受性の培養細胞系を必要とする。

これまで、カイコの各種培養細胞系の中で BM-N 細胞株 (前田, 1984) と Bm 36 細胞株 (津田, 1985) がプラーク形成に利用されているが、前者は T.D.C. GRACE の未発表の細胞株といわれ、後者は DNA レベルと蛋白質レベルの調査からカイコの細胞株とするには疑問点が残されている (NINAKI *et al.*, 1985 ; 朝岡, 1987)。

また、カイコ培養細胞株において、浮遊細胞に比べて培養容器に附着している細胞の方が、細胞質多角体病ウイルスにより感染する現象が見いだされている (INOUE and BELLONCIK, 1989)。

このようなことから、今回、遺伝的に明確な既存のカイコ培養細胞株から附着性の良好な細胞系を選抜し、その増殖性やウイルスに対する感受性並びにプラーク形成能を調査した。それらの結果の概要を報告する。

本文に入るに先立ち、ウイルス DNA の抽出及び制限酵素解析に御協力いただいた蚕糸・昆虫農業技術研究所遺伝育種部原 和二郎博士に感謝の意を表す。なお、本研究の一部は科学技術庁振興調整費 (重点基礎研究) 並びに文部省科学研究費 (課題番号 01860008) によってなされた。

### 材料及び方法

#### 1. 附着性細胞の選抜

継代数 124 回目のカイコ培養細胞 SES-BoMo-15 A 株 (INOUE and MITSUHASHI, 1984, 1988) を供試し、この細胞株からの附着性細胞の選抜は、①全培地を交換し浮遊性細胞

1 企画連絡室企画科 (前遺伝育種部細胞工学研究室)

2 生体情報部生体防御研究室

3 遺伝育種部細胞工学研究室

を除去した残りの細胞を培養する、②全培地を交換後抗生物質 TC-AM-1 液（ストレプトマイシン 1g, ペニシリン G 10 万単位, カナマイシン 1g 力価, ノボビオチン 0.1g, 蒸留水 100 ml; 三橋 淳博士私信による）を多めに含む培地で連続的に培養する、の方法を行った。培養はすべて 25°C で行った。

## 2. 細胞のクローニング

一層のセルシート上に部分的に形成されたコロニーをピペティングで剥離し、遊離細胞を含めて 20 細胞・塊/ml に希釈し、96 穴プレート（ファルコン # 3072）へ約 50  $\mu$ l ずつ分注した。コロニーが入った区へ新鮮な培地を加えて 25°C で培養した。

## 3. 細胞の増殖率

Watanabe (1987) に準じて計測した。1~2 $\times 10^5$  個/ml の細胞液 1.5 ml を 35 $\times$ 10 mm の培養シャーレ（ラックス # 5217）へ播き、25°C で培養し、経時的に 2 $\times$ 2 mm または 1 $\times$ 1 mm のグリッド内の細胞数を計測した。使用したシャーレ数は 3~5 個で観察視野数はシャーレ当たり 3 グリッドである。

## 4. ウイルスの接種と観察

約 2 $\times 10^5$  個/ml の細胞を 50 ml 容量の培養容器に播種した 2 日後に、ウイルス液を培地 4 ml に対し 100  $\mu$ l 滴下し、以後 25°C で培養した。ウイルス液は、カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の場合は発病幼虫の体液の 3,500 rpm 20 min の遠沈上清の 50 倍希釈液を、*Euxoa scandens* 細胞質多角体病ウイルス (EsCPV) の場合は、罹病幼虫中腸磨碎標本の 10 倍希釈液 (INOUE and BELLONCIK, 1989) を、カイコ細胞質多角体病ウイルス A 系統 (BmCPV) の場合は、野口洋子博士 (埼玉県蚕試) より分譲されたウイルス液を幼虫に接種し、1 頭の感染幼虫の中腸を培地 1 ml を加えて磨碎し、3,500 rpm 10 min の遠沈上清を、それぞれ供試した。

細胞の BmNPV に対する感受性の検定は、24 穴プレート（ファルコン # 3047）の各穴に細胞液を 0.9 ml 入れた後に、10 倍階段希釈した BmNPV 液を 0.1 ml 加えた。培養 7 日後に多角体の形成を観察した。

また、EsCPV 及び BmCPV に対する感受性は観察細胞数あたりの多角体形成割合で求めた。

## 5. ブラーク形成

50 ml 容量のプラスチック培養容器に形成された一層のセルシートをパンクレアチン処理で剥離し、1,000 rpm 1 分間の遠沈細胞を 1 ml の培地に再浮遊し、培地 1 ml が入れている 6 穴プレート（ファルコン # 3046）の 1 穴に 0.5 ml ずつ播いた。1~2 日後にセルシートの形成を確認後、10 倍階段希釈した BmNPV 液各 0.25 ml を無菌的に加え、1 時間吸着処理を施した。その間、15 分毎に数回プレートを傾けた。ウイルス液を除去後、42°C 保温の 0.75% アガロース培地を 2.5 ml ずつ重層した。アガロースはシーケム ME (宝酒造社) 及びシグマ・タイプ 1 (シグマ社) を供試し、アガロース培地は 1.5% アガ

コース液と2倍濃度のMGM-448培地を等量混合して調合した。プレートに25°Cに静置し経時的に観察した。

#### 6. ウイルスの精製とDNAの抽出

プラークよりピペットで回収したウイルスを付着性細胞にて増殖後、その培地を人工飼料育5齢脱皮幼虫へ注射し、前報(谷合・井上, 1988)に従って発病した幼虫体液中の多角体をパーコール密度勾配遠心分離で精製し、さらに精製多角体よりウイルス粒子を蔗糖濃度勾配遠心分離にて精製した。多角体 $1 \times 10^9$ 個より得たウイルス粒子をTE緩衝液1 mlに再浮遊し、この0.5 mlを供試し、常法に従いフェノール抽出並びにエタノール沈澱によって、DNAの抽出と精製を行った。

#### 7. DNAの制限酵素切断

1.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 濃度のDNA液10  $\mu\text{l}$ を3  $\mu\text{l}$ のHind III (36 units)を加えて37°C 4時間消化した。その後0.7%アガロースで30 V 14時間または50 V 4時間泳動した。泳動後エチジウムブロマイドで染色しUV光で観察した。

## 結 果

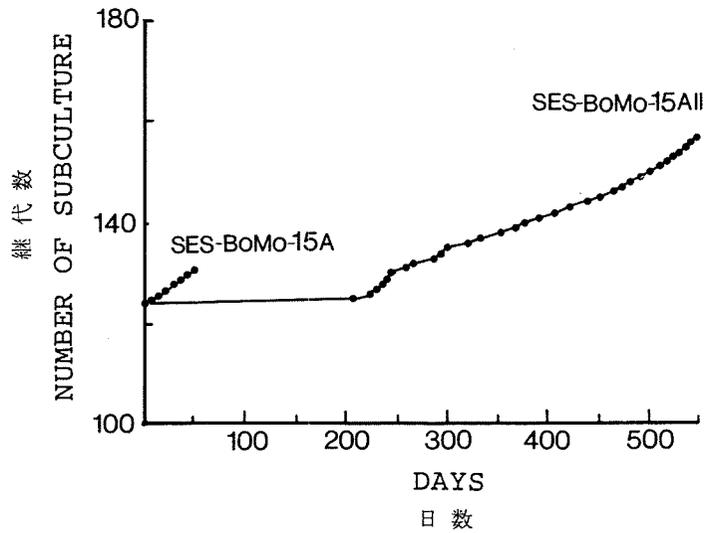
### 1. 付着性細胞の選抜

単に、全培地を交換し浮遊細胞を除去後残余の付着細胞を培養する方法では、その付着細胞も細胞密度が増すにつれ培地中に浮遊するようになり、この方法での付着性細胞の選抜は困難であった。

一方、抗生物質TC-AM-1液を100-200  $\mu\text{l}/\text{培地} 4 \text{ ml}$ の割合で加え、この培地にて毎日培地交換を行うなど、抗生物質を連続的に多投与した区では、多くの細胞は損傷を受け増殖を停止し、少なからずの細胞が死滅した。しかしながら、その後抗生物質を通常濃度含む培地で継続的に培養することによって、徐々に付着細胞数の増加がみられ、約7カ月後には植え継ぎが可能となった。その後も付着性細胞は順調に増殖し、継代28回目頃からは付着性を保持したまま、1週間毎の植え継ぎによって維持されるようになった(第1図)。

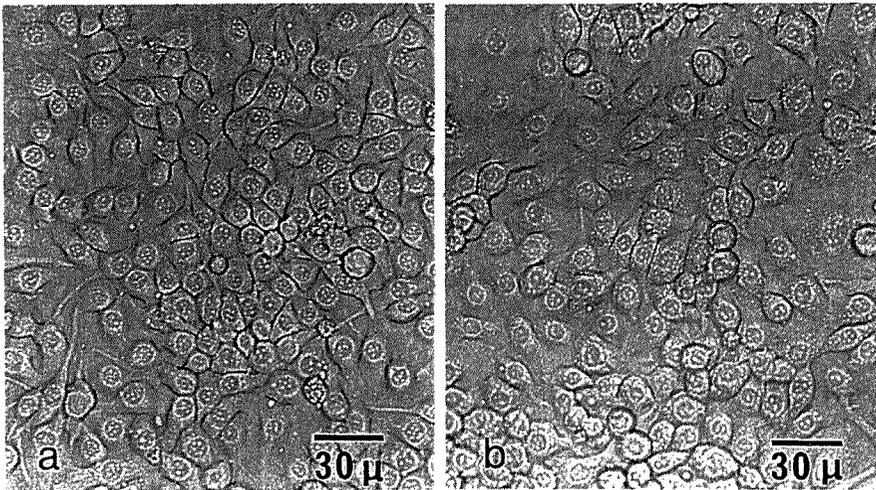
この細胞は培養容器底面への付着力が強く、継代にはパンクレアチン処理(Weiss *et al.*, 1982)を施した後にピペッティングして細胞を剥離する。この培養細胞系(第2図a)をSES-BoMo-15 AIIと命名した。

つぎに、この細胞からコロニー選抜によって細胞をクローニングした結果について述べる。遊離した細胞と細胞コロニーを含む液を播いた96穴プレートを観察すると、3穴に細胞コロニーが認められた。培養開始40日後に、最も均一な細胞形態を示す1穴を選び、パンクレアチン処理によって細胞を回収し、径3.5 mm培養シャーレに移した。一層のセルシートが形成された以後は1週間毎の定期的な継代が可能になった。このコロニアル・クローニングされた細胞系をNISES-BoMo-15 AIIc(第2図b)と名づけた。



第1図 カイコの附着性培養細胞系の選抜経過

Fig. 1. Selection time-course of a substrate-dependent cell line of *B. mori*



第2図 選抜されたカイコの附着性培養細胞系

a : SES-BoMo-15 AII cell line

b : NISES-BoMo-15 AIIc cell line

Fig. 2. Substrate-dependent cell lines of *B. mori*

a : SES-BoMo-15 AII cell line

b : NISES-BoMo-15 AIIc cell line selected by colonial cloning method

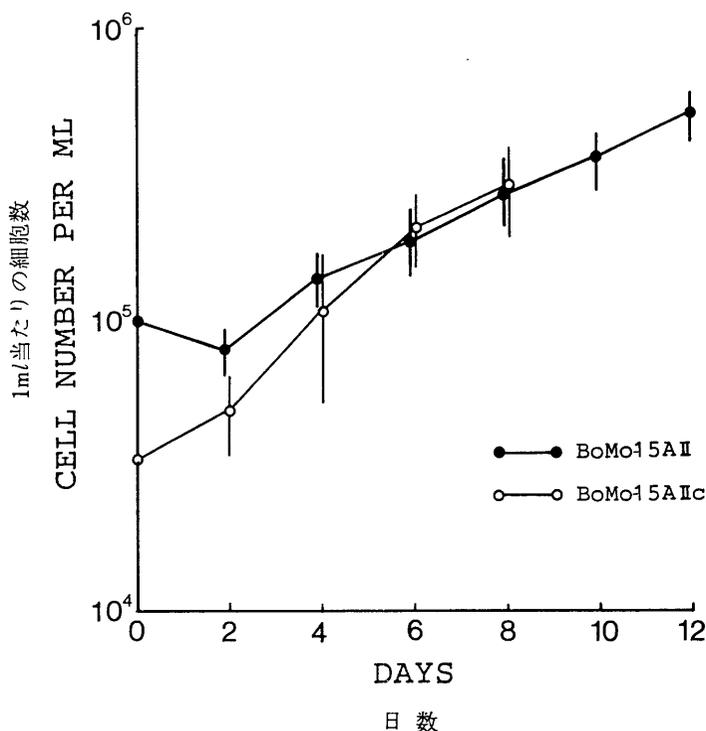
## 2. 付着性細胞系の特性

選抜された BoMo-15 AII 系の細胞数倍加時間は約 4 日と、その増殖速度は BoMo-15 A 細胞株と同程度であり、比較的緩慢な増殖速度であった（第 3 図）。BmNPV に対しては感受性が高く、多角体の形成も良好であり、もとの BoMo-15 A 細胞系よりも高い感受性を示した（第 4 図、第 1 表）。EsCPV に対しては、無作為に観察した細胞数 1,391 個のうち、多角体形細胞数が 295 個、すなわち 21.2%、BmCPV (A 系) に対しては、観察細胞数 393 個のうち多角体形成細胞数 48 個、すなわち 12.2% の感受率を示した（第 5 図、第 6 図）。また、BoMo-15 AIIc 株は BoMo-15 AII 株と類似の増殖率を示し（第 3 図）、BmNPV に対する感受性もほぼ同程度であった（第 1 表）。

BoMo-15 AII と BoMo-15 AIIc との形態はほぼ類似しているが、明視野観察において前者の細胞核が明瞭に識別出来るのに比較して、後者のそれはややうすく見える（第 2 図）。

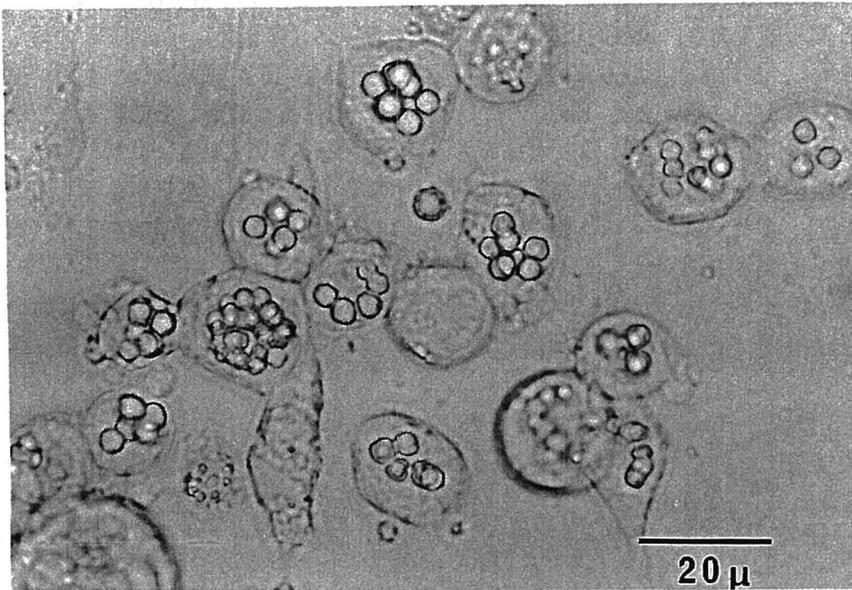
## 3. プラーク形成と BmNPV のクローニング

25°C での培養において、ウイルス接種後 5 日目には白い小さな斑点が肉眼で識別され、8 日目には直径 0.5~1.0 mm のプラークが明瞭に観察された（第 7 図）。ウイルス希釈  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  液におけるプラーク形成は、シーケム ME アガロースの場合 51, 3, 0,



第 3 図 カイコの付着性培養細胞系の増殖曲線

Fig. 3. Growth curves of substrate-dependent cell lines



第4図 BoMo-15 AII 細胞系における *B. mori* NPV の多角体形成  
 Fig. 4. Formation of polyhedra of *B. mori* NPV in the BoMo-15 AII cell line

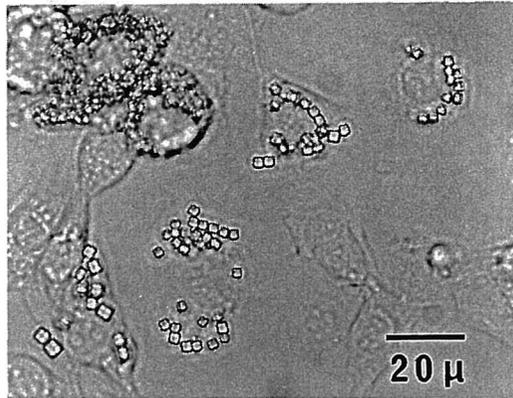
第1表 カイコ培養細胞系の核多角体病ウイルスに対する感受性

Table 1 Susceptibility of *B. mori* cells to *B. mori* nuclear polyhedrosis virus

培養細胞系 Cell Line	-logTCID <sub>50</sub>			平均 Mean
BoMo-15 A	5.50	5.63	5.63	5.59
BoMo-15 AII	7.25	6.63	7.13	7.00
BoMo-15 AII	7.17			
BoMo-15 AIIc	7.00			

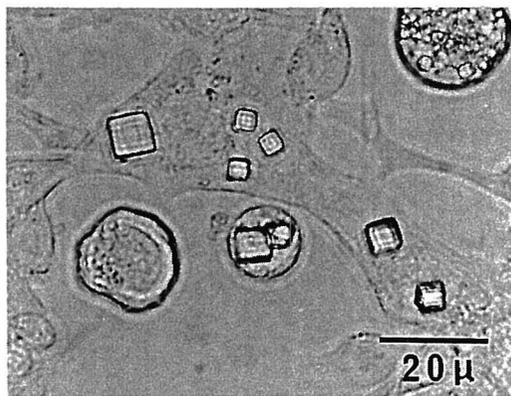
ウイルス接種7日目に調査

Observed on day 7 post virus inoculation



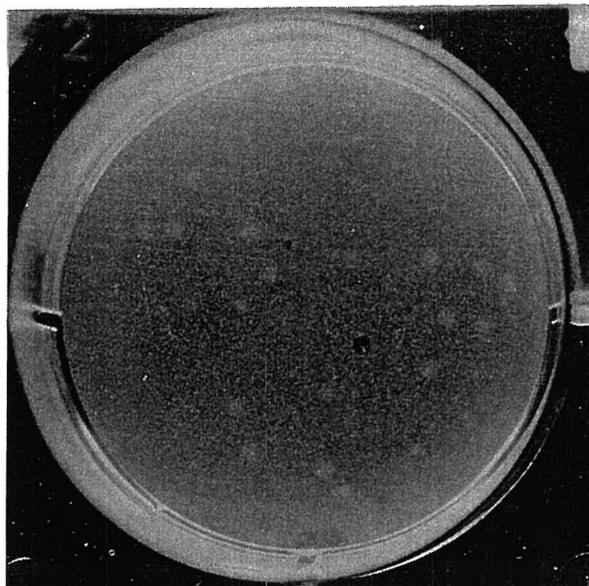
第5図 BoMo-15 AII細胞系におけるEsCPVの多角体形成

Fig. 5. Formation of polyhedra of *E. scandens* CPV in the BoMo-15 AII cell line



第6図 BoMo-15 AII細胞系におけるBmCPV(A系)の感染

Fig. 6. Infection of BoMo-15 AII cell line with a *B. mori* CPV (A strain)



第7図 BoMo-15 AII 細胞系における *B. mori* NPV のプラーク形成  
 Fig. 7. Plaque formation by *B. mori* NPV in the BoMo-15 AII cell line

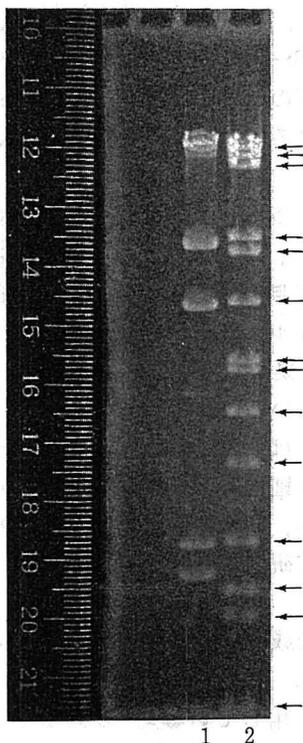
シグマ タイプ1 アガロースの場合 53, 5, 1 と、両者間で大きな差異はみられなかった。

シーケム ME アガロースにおけるプラークを倒立顕微鏡で鏡検し、外観六角形の多角体を多数形成しているプラークからパスツールピペットでウイルスを回収し、培地 1 ml に再浮遊しその  $10^{-3}$  までの希釈液を再度プラークアッセイし、この操作を合計 4 回繰り返した。その結果、最終のプラーク形成状況は  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  希釈液区で、それぞれ 193, 22, 1 とほぼ直線上にのった。この  $10^{-3}$  区のプラークのウイルスをカイコに接種し、増殖後得られた精製多角体に包埋されているウイルスの DNA の Hind III 切断パターンでは、24,500 bp 22,000 bp 19,920 bp 10,100 bp 9,400 bp 7,400 bp 5,600 bp 5,400 bp 4,400 bp 3,500 bp 2,450 bp 1,920 bp 1,720 bp 1,050 bp 780 bp の15本のバンドが出現した(第8図)。また、submolar なバンドは認められなかった。

## 考 察

一般に、抗生物質は細胞毒性を示すことが多い(MITSUHASHI, 1982)。このことを利用して、抗生物質を多投与することによって、活発に増殖している細胞に損傷を与える処理を施したところ、長期間を要したものの目的とする付着性の良好な培養細胞系が作出され、本方法は特定の細胞系の選抜に有効であることが判明した。

これまで、カイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)のプラーク形成に利用された培養細胞株は、ラバーポリスマンで剥離される(BM-N株)か、遠心力によって24穴プレート



第 8 図 BmNPV-P 4 E 株の DNA の Hind III 切断パターン

レーン 1: 分子量マーカー (ラムダファージ DNA の Hind III 切断)

レーン 2: BmNPV-P 4 E クローン株の DNA

Fig. 8. Hind III digestion of DNA extracted from *B. mori* NPV-P 4 E clone

lane 1: molecular marker (Hind III digestion of  $\lambda$ -phage DNA)

lane 2: BmNPV-P 4 E clone

へ付着させている (Bm 36 株) ように、その付着性は弱いものであるが、本研究によって作出された BoMo-15 AII 並びに BoMo-15 AIIc の細胞系は、いずれも培養容器への付着性が強いのが特徴であり、通常はパンクレアチン処理によって剥離される。このように、細胞の剥離に酵素処理を必要とするのは、プラークアッセイに簡便ではないが、本細胞系はプレートに播種後細胞が伸展した状態となるので、比較的少ない細胞数で一層のセルシートを形成することができる。

Bm 36 細胞株においては、プラーク内における多角体形成が極めて不良といわれているので (津田, 1985), Bm 36 細胞株を用いて多角体形成の有無による組換えウイルスの選抜は困難と考察される。この点において、BoMo-15 AII 及び BoMo-15 AIIc 細胞株は、プラークにおける多角体形成が良好であるという長所を有している。

また、BM-N 細胞株は BmNPV に高度に感染するという点で優れているが、BoMo-15 AII 及び BoMo-15 AIIc 細胞系は BmNPV 感染後容易に破裂する性質があり、ウイルスベクターに組み込まれた外来遺伝子が発現し、その産物が細胞内に集積している場合、培地中へ放出される可能性が高まることが期待できる。新たに作出されたこれらの細胞系のア

イソザイムパターンの分析において、蚕糸・昆虫農業技術研究所細胞工学研究室で継代されているヨトウ細胞株 (SES-MaBr-4)、シンジュサン脂肪体由来並びにサクサン胚子由来の培養細胞系 (井上, 未発表) 等の他の培養細胞とは異なることが確認されており (門野・井上, 1989), 選抜過程における他の昆虫培養細胞の混入はなかったことが実証されている。

KUBOTA and INOUE (1989) は, BoMo-15 AII 細胞系における BmNPV の増殖を, 酵素抗体法と間接 ELISA 法で追求し, ウイルス接種 12 時間後には培地中への遊離ウイルスの出現を認め, ウイルス接種 48 時間後には 90% 以上の細胞が感染し, 細胞崩壊が開始されるこの頃から, 培地中のウイルス抗原の量が顕著に増えることを認めている。このような知見と本研究で得られた結果から, 新たに作出された付着性の細胞が, BmNPV に対して比較的高い感受性を有していることが示された。

INOUE and BELLONCIK (1989) は, White cutworm, *Euxoa scandens* の CPV は BoMo-15 A 細胞株において, 浮遊細胞よりも付着細胞のほうがよりウイルスに感染することを報告している。このことから, 新たに作出された付着性細胞の EsCPV に対する感受性が高いことが期待されたが, 本研究結果に示されたようにそれほど高いものではなかった。

昆虫ウイルスにおけるプラーク形成は, 用いるアガロースの種類によって微妙に変化することが指摘されている (河原畑, 1984)。本細胞系を用いたプラーク形成では, 津田 (1985) 及び FRAISER (1982) の使用しているシーケム ME アガロース及びシグマタイプ 1 アガロースによって明瞭なプラークが形成され, BmNPV のクローニングが可能であることが判明した。なお, BM-N 細胞株並びに Bm 36 細胞株において, プラークはニュートラルレッドの後染色によって, より明瞭に識別されるが (前田, 1984; 津田, 1985), BoMo-15 AII 及び BoMo-15 AIIc 細胞系については, ニュートラルレッドによって細胞内顆粒が染色されることもあって, 後染色を施してもプラークがさらに明瞭になることはなかった。

本研究において 4 回目のプラークから得られた BmNPV は, DNA 断片の電気泳動において submolar なバンド (SMITH and SUMMERS, 1978) が認められないこと, プラーク数がウイルス希釈と比例し直線上に乗ることから, クローニングされたものと考えられ, このクローニング BmNPV は P 4 E 株と命名され, 外来遺伝子の発現ベクターの開発並びにモノクローナル抗体の調製に提供された。

## 摘 要

有用物質生産技術の開発に資する観点から, 昆虫ウイルスのクローニング等に使用出来る付着性のカイコ培養細胞系を作出し, それらの特性を調査した。

1. 浮遊細胞と付着細胞が混在している既存のカイコ培養細胞 SES-BoMo-15 A 株を供試し, 全培地交換によって浮遊細胞を除去した後, 抗生物質を多めに含む培地で連続的に培養したところ, 残余の付着細胞は損傷を受けたものの, その後の抗生物質を通常濃度含む培地での継続培養によって細胞は付着性を保持したまま活発な増殖性を回復し, 植え

継ぎが可能となった。この付着性細胞系は SES-BoMo-15 AII と命名された。

2. この付着性細胞系は培養容器底面への付着力が強く、通常はパンクレアチン処理によって剥離され、植え継がれている。細胞の増殖率は比較的緩慢であり、カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) に高い感受性を有し、また、カイコ細胞質多角体病ウイルス (A系) 及び *Euxoa scandens* 細胞質多角体病ウイルスに感染する。

3. SES-BoMo-15 AII 細胞系からコロニアル・クローニング法によって、NISES-BoMo-15 AIIc と命名された細胞系を選抜した。この付着性細胞系も BmNPV に対して高感受性を示した。

4. 新たに作出された付着性培養細胞系を用いたプラーク形成法によって、BmNPV のクローン P4E 株を選抜された。

## 引用文献

- 朝岡 潔 (1987) 電気泳動法によるカイコおよびその近縁昆虫類の培養細胞株の性格付け、日蚕雑, 56 : 411-417.
- FRASER, M.J. (1982) Simplified agarose overlay plaque assay for insect cell lines and insect nuclear polyhedrosis viruses. *J. Tissue Culture Methods*, 7 : 43-46.
- INOUE, H. and BELLONCIK, S. (1989) Infection of a *Bombyx* cell line with a cytoplasmic polyhedrosis virus of the white cutworm, *Euxoa scandens* (Lepidoptera : Noctuidae). *Appl. Ent. Zool.*, 24 : 318-320.
- INOUE, H. and MITSUHASHI, J. (1984) A *Bombyx mori* cell line susceptible to a nuclear polyhedrosis virus. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53 : 108-113.
- INOUE, H. and MITSUHASHI, J. (1988) Characterization of a new continuous cell line from silkworm (*Bombyx mori*) embryos. *Appl. Ent. Zool.*, 23 : 8-14.
- 門野敬子・井上 元, 1989. アイソザイムによるカイコおよび数種昆虫培養細胞株の同定。日蚕学会講要, (59) : 69.
- 河原畑 勇 (1984) 昆虫多角体病ウイルス—最近の研究から—。ウイルス, 34 : 73-88.
- KUBOTA, T. and INOUE, H. (1989) Nuclear polyhedrosis virus infection in a highly susceptible cell line of *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl. Ent. Zool.*, 24 : 480-482.
- 前田 進 (1984) カイコ核多角体病ウイルスのプラーク法による定量とウイルスのクローニング。日蚕雑, 53 : 547-548.
- MAEDA, S., KAWAI, T., OBINATA, M., FUJIWARA, H., HORIUCHI, T., SAEKI, Y., SATO, Y. and FURUSAWA, M. (1985) Production of human  $\alpha$ -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315 : 592-594.
- MITSUHASHI, J. (1982) Media for insect cell cultures. *In* "Advances in cell culture Vol. 2", p. 133-196, Academic Press.
- NINAKI, O., FUJIWARA, H., OGURA, T., MIYAJIMA, N., TAKADA, N. and MAEKAWA, H. (1985) Establishment and characterization of mulberry silkworm cell lines. Third international cell culture congress, p. 64. The Japanese Tissue Culture Association.
- SMITH, G.E. and SUMMERS, M.D. (1978) Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology*, 89 : 517-527.

- SMITH, G.E., SUMMERS, M.D. and FRASER, M.J. (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *J. Molec. Cell Biol.*, **3** : 2156-2165.
- 谷合幹代子・井上 元 (1988) ウェスタンブロッティングによるカイコ核多角体病ウイルス抗原の分析. *日蚕雑*, **57** : 265-269.
- 津田勝男 (1985) 昆虫培養細胞における核多角体病ウイルスの感染と増殖に関する研究. 九州大学学位論文.
- WATANABE, H. (1987) Effect of the concentration of fetal bovine serum in a culture medium on the susceptibility of *Bombyx mori* cells to a nuclear polyhedrosis virus. *Appl. Ent. Zool.*, **22** : 397-398.
- WEISS, S.A., PELOW, D., KALTER, S.S. and VAUGHN, J.L. (1982) Dissociation of insect cell cultures by pancreatin. *In Vitro*, **18** : 298.

## Summary

### Establishment and Characterization of Substrate-Depending Cell Lines of *Bombyx mori*

by

Hajime INOUE, Kiyoko TANIAI and Jun KOBAYASHI

A substrate-depending cell line of *Bombyx mori* and its cloned cell line were established and characterized for virus cloning by a plaque assay in order to develop a baculovirus-expression system.

The cell line designated as SES-BoMo-15 A, which is a mixture of floating and adherent cells, was cultured in a MGM-448 medium containing a high concentration of TC-AM-1 antibiotics (J. Mitsuhashi's personal communication). Although many cells were damaged and died, the remaining cells gradually recovered their growth activity when they were cultured in a medium containing a normal concentration of antibiotics, and about 7 months later adherent cells could be subcultured. This substrate-depending cell line was named SES-BoMo-15 AII.

The BoMo-15 AII cells were firmly attached to the base of the culture vessel, and were usually detached by treatment with pancreatin following pipetting. The population doubling time was about 4 days. The cell line was highly susceptible to *B. mori* nuclear polyhedrosis virus (NPV) and also to both *B. mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) (A strain) and *Euxoa scandens* CPV.

Furthermore a cell line, named NISES-BoMo-15 AIIc, which was cloned by a colonial cloning method from SES-BoMo-15 AII exhibited almost the same characteristics as the original cell line.

Using the newly established cell lines and Sea-Kem (ME) or Sigma type 1 agaroses, plaques of *B. mori* NPV were formed. After plaque purification was repeated 4 times, a clone of *B. mori* NPV, which showed a typical hexagonal shape and good yield of polyhedra, was eventually selected and named BmNPV-P 4 E.

(National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan)