

短 報

イナズマヨコバイ 胚子の組織培養¹

山田堅一郎

北海道大学農学部植物学教室

徳 光 崇

北海道大学理学部動物学教室

四方英四郎

北海道大学農学部植物学教室

(1969年7月8日受領)

昆虫で伝搬される植物ウイルスのうち、その媒介昆虫体内で増殖することが知られているものがいくつかあるが、その増殖機構を解明するためには媒介昆虫の組織培養を用いることはきわめて有効であると考えられる。そのような観点から近年植物ウイルス媒介昆虫の組織培養が試みられており (HIRUMI and MARAMOROSCH, 1964; MITSUHASHI and MARAMOROSCH, 1964; MITSUHASHI, 1965a), さらに培養細胞を用いて植物ウイルスの研究も行なわれるに至った (MITSUHASHI, 1965b; CHIU ら, 1966; CHIU and BLACK, 1967; MITSUHASHI and NASU, 1967)。

本研究はイネ萎縮病ウイルスの媒介昆虫であるイナズマヨコバイ (*Inazuma dorsalis* MOTSCH.) の胚子の体外培養を試み、初代培養において増殖細胞を得ることに成功したのでここに報告する。

本文に入るに先だち、常々ご指導ご鞭撻を賜わっている北海道大学農学部植物学教室村山大記教授ならびに懇切なご教示および原稿のご校閲を賜わった農林省農業技術研究所技官三橋淳博士に深謝の意を表す。

材料および方法

イナズマヨコバイの受精雌虫をイネ苗に放飼して産卵させ実験材料に供した。昆虫飼育および産卵は25°C, 1日16時間のピタルックス (東芝製40W) 照明 (約700ルクス) の恒温室で行なった。この条件下で産卵後6日目に採卵して実験に供した。卵は70%エチルアルコールで30秒間表面殺菌し、滅菌蒸留水で洗浄後、RINALDINI's salt solution (RINALDINI, 1954) を入れた Maximow slide に移し、解剖刀と昆虫用微針を用いて胚子を摘出した。細片した胚子は0.1%トリプシン (Difco 製, 1:250) で処理後、sitting drop culture で培養した。培養方法の詳細は MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) の報告

した方法と同様である。培養は27°Cの恒温室において行なった。培養液は CHIU and BLACK (1967) が *Agallia constrieta* の培養に用いたものである。ただし抗生物質はストレプトマイシンを1 mg/ml だけ加えた。

結果および考察

イナズマヨコバイの胚子は、産卵後6日目の卵から得た。

培養開始後48時間以内に細胞の移住が認められた。まずはじめに、移植片のまわりに游走細胞が多数出現した。この細胞は空胞を多数含んでおり、しだいに巨大化して広がった。普通、培養細胞においてこのような空胞を含む細胞が出現することは、培養状態が良くないと考えられているが、本培養ではこの空胞を含む巨大游走細胞が早くから出現した。このような現象はツマグロヨコバイの培養では見られないものであり (MITSUHASHI, 1965a), きわめて特異的な現象と考えられる。この巨大空胞を含む游走細胞はおおよそ長さ125 μ , 幅75 μ で、核の直径は約25 μ であり (図1), MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) の A 型游走細胞と同じものと思われる。

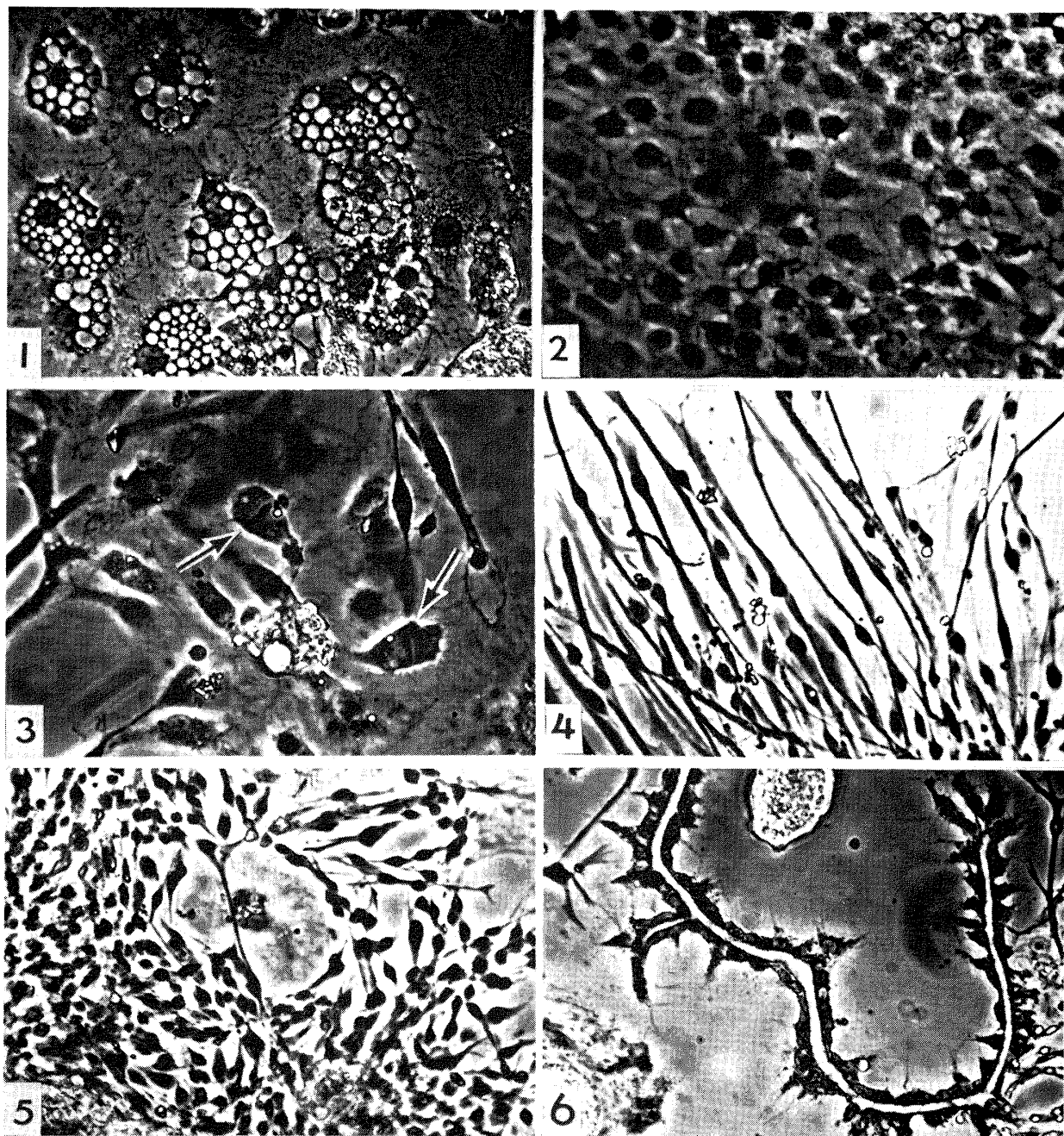
上皮性細胞としては2種類の細胞が移住した。培養開始後6日目頃からこれらの上皮性細胞で細胞分裂がよく見られるようになり、cell sheet を形成した。これらの上皮性細胞のうち、一つは細胞膜が明確に認められる細胞で長さ約30 μ , 幅25 μ , 核の直径は約10 μ のもので (図2), これは MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) の C 型上皮性細胞と同じものと思われる。他の一つは楕円形の細胞で長さ約50 μ , 幅40 μ , 核の直径15 μ であった (図3)。これは HIRUMI and MARAMOROSCH (1964) の large epithelial cell, MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) の B 型上皮性細胞にあたり、細胞分裂が観察しやすい細胞である。これらの上皮性細胞はいずれも活発に有糸分裂をくりかえし新生増殖細胞が現われた。培養開始後20日以上になると、緻密な cell sheet を形成し、初代培養細胞でのウイルスの実験に十分供し得るほどに達した。

繊維芽状細胞は培養開始後6日目頃から移住し始め、次第に network を形成する。この繊維芽状細胞には2種類の細胞型が現われた。その一つは長型で長さ約75 μ , 幅約5 μ , 核は長径10 μ , 短径5 μ であった (図4)。これは HIRUMI and MARAMOROSCH (1964) の繊維芽状細胞 I 型, MITSUHASHI (1965a) の繊維芽状細胞と同じようなものであった。他の一つは短型で長さ約25 μ , 幅約5 μ の長さで、核の直径は約5 μ であった (図5)。これは HIRUMI and MARAMOROSCH (1964) の繊維芽状細胞 II 型と同じものと思われる。

移植片の収縮運動も培養開始後6日目頃から観察され、その

1 Embryonic tissue culture of *Inazuma dorsalis* MOTSCHULSKY (Homoptera: Delphacidae). By Kenichiro YAMADA (Dept. Bot., Fac. Agr., Hokkaido Univ., Sapporo, Japan), Takashi TOKUMITSU (Zool. Inst., Fac. Sci., Hokkaido Univ., Sapporo, Japan) and Eishiro SHIKATA (Dept. Bot., Fac. Agr., Hokkaido Univ., Sapporo, Japan).

日本応用動物昆虫学会誌 (応動昆) 第13巻 第3号: 159~161 (1969)



イナズマヨコバイ胚子から得られた培養細胞および組織 (dark phase contrast)。図1. 空胞を含む巨大游走細胞 ($\times 200$)。図2. 細胞膜が明確に認められる上皮性細胞の cell sheet ($\times 200$)。図3. 楕円形の上皮性細胞。矢印は細胞分裂を起こしている細胞 ($\times 400$)。図4. 長型繊維芽状細胞 ($\times 200$)。図5. 短型繊維芽状細胞 ($\times 200$)。図6. 中空管状組織 ($\times 200$)。

後培養期間中常に認められた。

ツマグロヨコバイの体外培養で形成される中空組織については、イナズマヨコバイの培養においても観察された。すなわち単層のうすい細胞から形成された球形組織であるが、これを形成する細胞系は形態的に上皮性細胞と考えられ、活発に細胞分裂をくりかえしていることが観察された。そのほか、培養中、中空管状組織が見られた (図6)。これと似た組織は MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) も *Macrosteles fasci-*

frons 胚子細胞の体外培養で記載している。

培養期間中出现した細胞は游走細胞が1種類、上皮性細胞が2種類、繊維芽状細胞が2種類であった。これらの培養細胞は巨大空胞を含む游走細胞を除き、週1回培地を更新することにより、1か月以上増殖を続けた。

本実験には CHIU and BLACK (1967) が *A. constricta* の cell-strain を確立した培地を用いた。この培地には、100ml の培地に対し2.5ml の lobster haemolymph を添加した。体

液は添加する前に56°C, 30分加熱処理し, 2,000rpm, 10分間遠心して, その上清を用いた。その他に ツマグロヨコバイ組織培養用培地 (NCM-4A, 三橋, 私信) やヒメトビウンカの培養に用いた培地も試みた。増殖細胞はいずれの培地を用いても得られたが, あとの二つの培地では培養開始後20日目くらいで細胞の退化が見られた。すなわちイナズマヨコバイ胚子細胞の培養には CHIU and BLACK (1967) の培地がもっとも良好であった。

本実験に用いたイナズマヨコバイは ツマグロヨコバイ と共にイネ萎縮病ウイルスを媒介する。今回得られた増殖細胞を用いてウイルスの感染, 増殖の研究も可能ではあるが, 今後は増殖細胞の継代培養法とその細胞株の確立こそ急務と考えられる。

引用文献

CHIU, R. J., D. V. R. REDDY and L. M. BLACK (1966)

Virology 30 : 562~566.

CHIU, R. J. and L. M. BLACK (1967) Nature 215 : 1076~1078.

HIRUMI, H. and K. MARAMOROSCH (1964) Contr. Boyce Thompson Inst. 22 : 343~352.

MITSUHASHI, J. and K. MARAMOROSCH (1964) Contr. Boyce Thompson Int. 22 : 435~460.

MITSUHASHI, J. (1965a) Jap. J. appl. Ent. Zool. 9 : 107~114.

MITSUHASHI, J. (1965b) Jap. J. appl. Ent. Zool. 9 : 137~141.

MITSUHASHI, J. and S. NASU (1967) Appl. Ent. Zool. 2 : 113~114.

RINALDINI, L. M. (1954) Nature 173 : 1134~1135.

抄 録

シロイチモジヨトウの移動と気象条件

FRENCH, R. A. (1969) Migration of *Laphygma exigua* HÜBNER (Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles in relation to large-scale weather systems. J. Anim. Ecol. 38: 199-210.

シロイチモジヨトウは, ほとんど全世界に分布する多食性のヤガ科害虫であるが, 北緯44°より北のヨーロッパでは冬を越せない。イギリス本国の個体数は, フランス, スペイン, モロッコなど南の地方から移動してきた個体を基本にして形づくられる。国内の予察網の記録から, イギリス本国へは多かれ少なかれ, 毎年移動してきているものと考えられる。1月と12月を除くどの月にも誘殺の記録があるが, 年間誘殺数の特に多い年の特徴は, 5~6月に多くの個体が記録されることである。最近で

は, 1962年の総誘殺数が特に多かったが, この年には5月初旬に沢山の個体が誘殺された。そこで, 5月3~6日のヨーロッパの天気図を解析したところ, これらのガは, モロッコを出発点とし, 地球の回転によって地球表面近くに生じた風に乗って, ヨーロッパの沖を北東へ進んでブリテン島に達したとの結論がえられた。一般にこん虫が上空を長距離移動する場合, 高度を維持するためには, 翅を動かしていなければならない。したがって, 上昇気流によって高い空の上まき上げられても, そこでは気温が低すぎて飛ぶことができないので, かれらは地球の表面近くまで落ちてくる。そして, そこでの比較的暖い気流に乗って移動するのである。地球表面の天気図を解析して, シロイチモジヨトウの移動径路を論ずることの妥当性はここに求められる。(四国農試 大竹昭郎)

文献抄録・新刊紹介原稿募集

興味ある最新の外国文献の抄録, 内外で新しく刊行された応用動物・昆虫学関係の書籍に関する紹介原稿を広く募集致します。400字づめ原稿用紙(横書)1~2枚程度にまとめ, 当学会事務局あてお送り下さい。記述法については既刊本誌の同項記事をご参照下さい。紙面の都合で場合によっては掲載できないこともあります。採用の分には規定に基づき稿料を差し上げます。

(応動昆編集係)