

ヒメトビウンカ, *Laodelphax striatellus* FALLÉN 胚子の組織培養

山田 堅一郎*・徳 光 崇†・四方英四郎*

*北海道大学農学部, †北海道大学理学部

(1969年10月28日受領)

Embryonic Tissue Culture of *Laodelphax striatellus* FALLÉN. Kenichiro YAMADA*, Takashi TOKUMITSU† and Eishiro SHIKATA* (*Department of Botany, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan; † Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.) *Jap. J. appl. Ent. Zool.* 14: 79—84 (1970)

Embryonic tissues of the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* FALLÉN were cultivated for over 100 days *in vitro*. When the basic medium (Mitsuhashi's NCM-4A) was supplemented with the haemolymph of *Philosamia cynthia* PRYER, active cell migration and mitoses were observed. Tissues either with or without trypsinization attached themselves well to the glass surface of culture vessels. In the trypsinized tissue cells migrated more actively than in the tissue without trypsinization. They continued growing to form epithelial cell sheets. Mitoses was observed in those cell sheets. There were many hollow spherical vesicles on the explant and the vesicles continued to swell up. In the embryonic tissue culture of *L. striatellus*, one type of fibroblast like cells, two types of wandering cells and three types of epithelial-like cells were observed. By the subculture of the original explants, including the growing tissues and the hollow spherical vesicles, similar vesicles were formed again on the explants, and active growing cells migrated from the original explants. However no cell growth was obtained from the separated cells.

緒 言

これまで植物ウイルスの媒介昆虫、とくに2, 3のヨコバイ類の体外培養が試みられ、その初代培養に成功したいくつかの例 (VAGO and FLANDERE, 1963; HIRUMI and MARAMOROSCH, 1964; MITSUHASHI and MARAMOROSCH, 1964; MITSUHASHI, 1965) があり, CHIU and BLACK (1967) は wound tumor virus の媒介昆虫である *Agallia constricta* (VAN DUZEE) の継代培養に成功し、ヨコバイ類の組織培養においてはじめて cell line を確立した。

わが国ではさきに三橋 (1965) によってイネ萎縮病ウイルスの媒介昆虫ツマグロヨコバイの初代培養が報告され、近年筆者らはイナズマヨコバイの初代培養に成功した (山田ら, 1969)。しかしながらイネ縞葉枯病, イネ黒

条萎縮病およびムギ北地モザイク病を伝搬するヒメトビウンカの体外培養についてはまだ成功した例がない。

本研究はヒメトビウンカの胚子組織より体外培養で増殖細胞を得、さらにその増殖細胞を長期間培養することができたので報告する。

本論に入るに先だち、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、同蚕学教室勝野貞哉助教授ならびにご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る。

材料および方法

1. 材 料

ヒメトビウンカ (*Laodelphax striatellus* FALLÉN) の受精雌虫をイネ苗を植えたガラス筒に24時間放飼して産卵さ

せ、採卵して実験材料に供した。産卵は25°C、1日16時間のビタルックス照明の恒温室のもとで行なわれた。この条件下で、産卵後4日目に採卵し、1回の実験に約100個の卵を用いた。

2. 培養方法

卵は遠心管の中で、70%エチルアルコールで約30秒間表面殺菌し、その後滅菌蒸留水で2~3回洗浄した。表面殺菌した卵は MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) が *Macrosteles fascifrons* STÅL の胚子組織を培養したときと同様の方法で処理した。培養容器は MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) と同じようにガラスリングの上下をカバーガラスで封じたものを使用し、sitting drop culture で培養した。培養は27°Cの恒温室において行なった。

3. 培養液

供試した培養液は MITSUHASHI (1965) がツマグロヨコバイの胚子の体外培養に用いた培地と、三橋のツマグロヨコバイ組織培養用培地 (NCM-4A) を基本培地とした。NCM-4A の組成は NCM-4B (MITSUHASHI, 1969) に含まれる牛胎児血清を半量にしたものである (三橋, 私信)。

本実験ではこれらの基本培地に シンジュ蚕 *Philosamia cynthia* PRYER の幼虫の体液およびアメリカザリガニ, *Procambarus clarkii* GIRARD の体液を基本培地 100 ml に対しそれぞれ 4% および 2% 添加したものを各培地での培養状態を比較検討した。本実験では MITSUHASHI (1965) の培地 (培地 I と記す) にシンジュ蚕の体液を添加した培地を培地 II, NCM-4A (培地 III とする) にシンジュ蚕の体液を添加したものを培地 IV, 培地 III にアメリカザリガニの体液を添加したものを培地 V と記す。

シンジュ蚕およびアメリカザリガニの体液は56°C、30分熱処理した後、2,000 rpm、10分の遠心操作をした。その上清をミリポアーフィルター (径0.45 μ) で濾過して、濾過液を培地に添加した。

4. 観 察

成長細胞の観察および写真撮影はニコン MD 型倒立位相差顕微鏡で行なった。培養細胞のあるものは BOUIN 氏液で固定して Delafield の haematoxylin で染色して保存した。

実 験 結 果

1. 培地の比較検討

培地 I ~ V を用いて、培養状態を観察してどの培地がヒメトビウンカの細胞培養に適しているかを検討した。

その結果を各培地ごとに記すと次のようであった。

i) 培地 I

細胞の移住はごくわずかしか起こらず、少し移住した細胞も培養開始後5~6日目で退化した。しかし移植片 (元の組織) の収縮運動は活発であった。

ii) 培地 II

細胞の移住はかなり活発で、培養開始後10日目ぐらまで続いたが、細胞分裂によって細胞が増殖するまでにはいたらなかった。移植片はよく収縮運動をくりかえした。

iii) 培地 III

細胞移住は少しみられたが、それ以上細胞増殖が認められず、培養開始後10日目頃から移住した細胞が退化しはじめた。移植片の収縮運動はみられなかった。

iv) 培地 IV

培養開始後24時間以内に細胞の移住が始まり、以後活発に移住を続けた。繊維芽状細胞の移住後、游走細胞、上皮性細胞の移住も起こり、上皮性細胞では細胞分裂による増殖がよく観察された。繊維芽状細胞は network を、上皮性細胞は cell sheet を形成した。しかし移植片の収縮運動はあまりみられなかった。

v) 培地 V

細胞移住は不活発で、移住した細胞も培養開始後5~6日目で退化した。移植片の収縮運動もみられなかった。

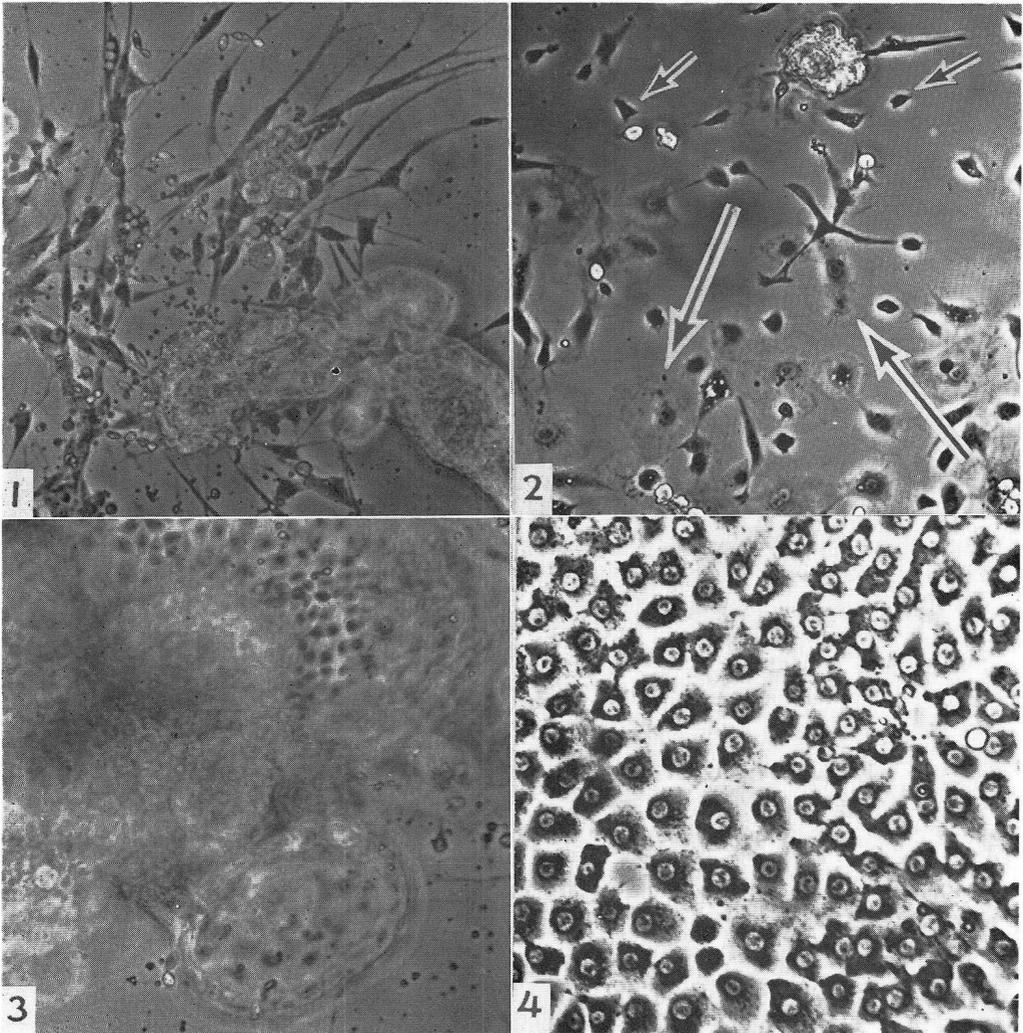
以上の5種の培地を用いた結果では、ヒメトビウンカの胚子の体外培養には培地 IV が最適であった。したがって以後の実験にはすべて培地 IV を用いた。

なおヨコバイ類の体外培養 (MITSUHASHI and MARAMOROSCH, 1964; MITSUHASHI, 1965) で観察された中空の球形組織がいずれの培地でも観察され、細胞が活発に増殖した培地ほど大きな中空球形組織に発達した。

2. 培養の経過

培養開始後24時間以内に繊維芽状の細胞の移住がみられた。この繊維芽状細胞は他の細胞に先だって移住しはじめ、培養開始後15日目ころになると network を形成した。この細胞は HIRUMI and MARAMOROSCH (1964) の繊維芽状細胞 I 型、MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) の A 型繊維芽状細胞と同じもので、双極性の細長い細胞質を伸ばして放射状に増殖した。細胞の大きさは長さ約150~200 μ、幅約10 μで、核は小楕円形で緻密であり、その大きさは約7.5 μである (第1図)。

繊維芽状細胞の移住後、游走細胞も移住しはじめ培養開始後15日目ころには移植片 (元の組織) のまわりに多数出現した。この游走細胞には2種類の細胞が出現し



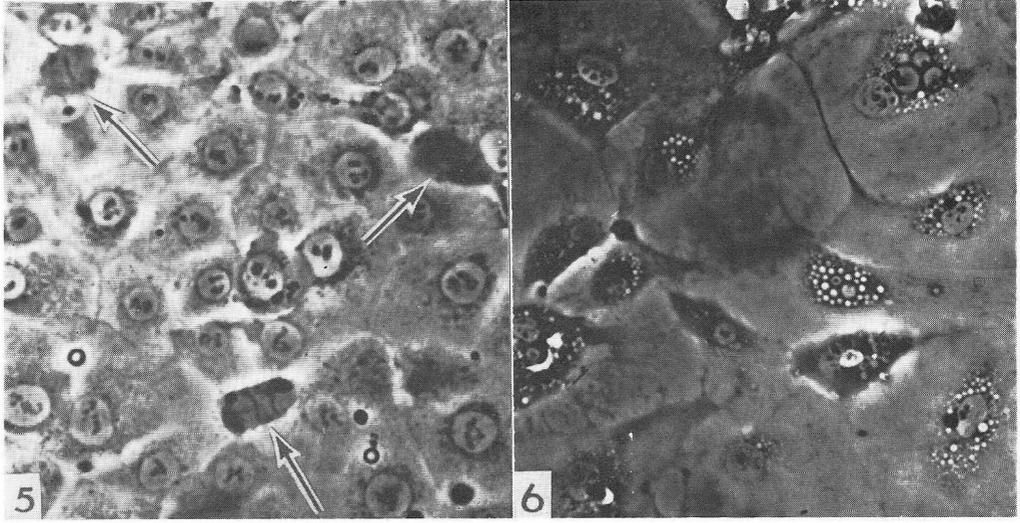
ヒメトビウツカ胚子から得られた培養細胞および組織 (dark phase contrast)。第1図 繊維芽状細胞($\times 600$)。第2図 小型游走細胞(短い矢印), および大型游走細胞(長い矢印)($\times 300$)。第3図 中空球形組織($\times 600$)。第4図 小型上皮性細胞の cell sheet ($\times 400$)。

た。一つは大きさが約 $20\sim 30\mu$ 、核の大きさが約 10μ で、MITSUHASHI (1965) の小型游走細胞によく似た細胞である。他は大きさが約 $100\sim 150\mu$ 、核の直径は約 20μ で細胞質が非常にうすく広がっており、MITSUHASHI (1965) の大型游走細胞に属するものと考えられる。これらの細胞は同じような時期に移植片のまわりに出現した(第2図)。

培養開始後6日目になると MITSUHASHI (1965) がツマグロヨコバイの体外培養で観察したものと同一ような中空球形組織が形成された(第3図)。これは一層の細胞層からなる中空の球形組織で、ほとんど上皮性細

胞を含んでおり、頻りに細胞分裂をくりかえし成長した。

上皮性細胞には3種類の細胞が出現した。その一つは MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) がA型上皮細胞、また MITSUHASHI (1965) が小型上皮細胞と述べているのによく似た細胞で、培養開始後6日目ころから移住し始めた。この細胞は急速に広がって培養開始後15日目ころになると cell sheet を形成した。細胞の大きさは長さ約 25μ 、幅約 20μ の多角形で細胞質は緻密であり、核は円形で直径約 7.5μ であった(第4図)。細胞分裂は cell sheet 中でしばしば観察された。つぎに出現した上



第5図 細胞膜が明確に認められる上皮性細胞、矢印は細胞分裂を起こしている細胞を示す(×900)。第6図 空胞を多く含む上皮性細胞(×600)。

皮性細胞は前述の上皮性細胞と同じように培養開始後6日目ころから移住を始め、15日目ころになると cell sheet を形成した。これは MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) の C 型上皮細胞と同じもので、細胞間の境界が明瞭な細胞である。細胞の大きさは約 25μ で、核は円形で直径約 10μ であった。細胞分裂は cell sheet 中で頻りに観察された(第5図)。これら2種の上皮性細胞はしばしば同一の移植片より混合して増殖してきた。培養開始後100日以上も増殖しつづけ、大きな cell sheet を形成した。

上皮性細胞は前述の2種類の他に、培養開始後26日目ころから空胞を多く含む上皮性細胞が出現し、cell sheet を形成するまでに広がった。この細胞の大きさは約 $50\sim 75\mu$ 、核の直径は約 12.5μ であり(第6図)、MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) の E 型上皮細胞によく似ている。

本培養において、1種の繊維芽状細胞、2種の游走細胞および3種の上皮性細胞が出現した。そのうち繊維芽状細胞と游走細胞は培養開始後30日ぐらいで退化するものが多かったが、上皮性細胞のうち小型の上皮性細胞(第4図)と細胞壁の明瞭な上皮性細胞(第5図)は100日以上培養をつづけても著しい退化は認められなかった。

3. トリプシン処理の効果

本実験では、胚子をトリプシン処理をして培養に供したが、トリプシン処理によって悪影響を受ける場合もあ

りうるので、同じ培養条件下で処理の効果を調べた。

その結果、MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) の *M. fascifrons* 胚子組織培養の場合と同様に、トリプシン処理しないものでもガラス面への付着は良好であったが、移住は処理したものの方が良好で、その後の細胞増殖も活発であった。

4. 継代培養の試み

培養開始後1か月目ころになると上皮性細胞は cell sheet を形成し、中空組織も大きく発達した。そのような移植片、中空組織および cell sheet をそれぞれ別々に継代培養を試みた。

移植片と中空組織は機械的にガラス面からはがし、初代培養の時と同じようにトリプシン処理して、別の容器に植えついで。この場合、中空組織を機械的にはがすと、中空の形態を失ったが、それを細胞間の結合がゆるむ程度にトリプシン処理をした。上皮性細胞の cell sheet は0.05%トリプシン液で10分間処理後、培地を加えて処理を止めて静置し、6時間後に新しい培地にとりかえて、同じ容器で培養を続けた。

その結果、中空組織は同じような中空組織を形成したにとどまった。上皮性細胞の cell sheet は週1回あて同じ操作をくりかえしたが、増殖細胞は得られず3週間目で退化した。ただ初代培養の移植片を植えついで場合だけ、伸びは遅かったが、初代培養と同じような増殖細胞が得られた。

考 察

HIRUMI and MARAMOROSCH (1964) はヨコバイの1種 *M. fascifrons* の体外培養を行なうにあたり、反転期の卵の胚子を用いるのが培養に最適であり、増殖細胞はこの時期の発育胚子のみから得られたと報告した。MITSUHASHI and MARAMOROSCH (1964) は *M. fascifrons* のその他の発育時期の胚子からも同様な細胞増殖が得られるが、上記の発育胚子は最も扱いやすいと述べている。したがって本実験においてもヒメトビウカと同じ発育時期の胚子を用いた。この時期の卵は胚子の摘出が容易であり、培養材料が多量にあつめられる利点があったが、それに比べ、これより早い時期のものは胚子が小さく、材料が多くとりにくい。またこれよりおそい時期の胚子を用いるとガラス面への付着が悪く培養に適さなかった。

鱗翅目昆虫の体外培養において、ある種の昆虫の体液を培養液に添加することによって、細胞の発育を促進し、cell line を確立できるほどの効果を示すいくつかの例が報告されている(鮎沢ら, 1961; GRACE, 1958, 1962)。また最近 *Agallia constricta* 胚子の体外培養においても, CHIU and BLACK (1967) は lobster の体液あるいは *Antherasa eucalypti* の体液を加えることによって sub-culture に成功した。

本研究において、数種の培地の検討を試みた結果、NCM-4A にシンジュ蚕幼虫の体液を添加した培地がヒメトビウカの培養に最適であり、体液を加えない培地では細胞移住も悪かったことを考えあわせると、シンジュ蚕幼虫の体液にはヒメトビウカの培養細胞の発育を促進するのに有効な成分が含まれているものと思われる。

培養中に中空球形組織が現われたが、これはゴキブリの組織培養(LARSEN, 1964; MARKS and REINECKE, 1964) やヨコバイ類の培養(MITSUHASHI and MARAMOROSCH, 1964; MITSUHASHI, 1965) で報告されたものと同じものである。本実験に現われた中空球形組織はほとんど上皮性細胞で形成されており、細胞増殖も活発だったので継代培養を試みたが、再び中空組織を形成するのみであった。この中空組織の形成機構はまだ明らかでない。

本実験において、ヒメトビウカの胚子初代培養から繊維芽状細胞1種、游走細胞2種および上皮性細胞3種の計6種類の細胞が出現した。これらの細胞中、最もよく増殖したのは上皮性の細胞であり、長く培養を続けると大きく広がる cell sheet が得られるので、この細胞を用いてヒメトビウカにより伝搬される植物ウイルスの

感染実験を行なうことも可能であろうと考えられる。しかし詳細なウイルス感染と増殖の研究には、これらの細胞の継代培養を行なって cell line を確立することが必要であろう。それによって植物ウイルスを定量的にあつかうこともできるようになり、媒介昆虫と植物ウイルスの相互関係を解明するのに有効な手段となりうるものと考えられる。

摘 要

1) ヒメトビウカの胚子組織より体外培養で増殖細胞を得、さらにその増殖細胞を100日以上培養することができた。

2) 基本培地 (NCM-4A) にシンジュ蚕幼虫の体液を添加することによって、増殖細胞が得られた。

3) 胚子をトリプシン処理したものと、しないものの培養状態をみると、処理しないものでもガラス面への付着は良好であったが、移住は処理したものの方が良好で、その後の細胞増殖も活発であった。

4) 継代培養の試みでは、初代培養の移植片を植えつけた場合だけ、伸びは遅いが、初代培養と同じような増殖細胞が得られた。

引用文献

- 鮎沢啓夫・佐藤文子・村上昭雄 (1961) 蚕の組織培養における体液の役割。日本蚕糸学雑誌 30: 445~450.
- CHIU, R. J. and L. M. BLACK (1967) Monolayer cultures of insect cell lines and their inoculation with a plant virus. *Nature* 215: 1076~1078.
- CHIU, R. J., D.V.R. REDDY and L. M. BLACK (1966) Inoculation and infection of leafhopper tissue culture with a plant virus. *Virology* 30: 562~566.
- GRACE, T. D. C. (1958) Effects of various substances on growth of silkworm tissues *in vitro*. *Australian J. Biol. Sci.* 11: 407~417.
- GRACE, T. D. C. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature* 195: 788~789.
- HIRUMI, H. and K. MARAMOROSCH (1964) Insect tissue culture: further studies on the cultivation of embryonic leafhopper tissue *in vitro*. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 22: 343~352.
- LARSEN, W. (1964) Cell proliferation in an insect tissue culture. *Life Sci.* 3: 103~106.
- MARKS, E. P. and J. P. REINECKE (1964) Regeneration of tissue from the cockroach leg: a system for studying

- in vitro*. Science 143: 961~963.
- MITSUHASHI, J. (1965) *In vitro* cultivation of the embryonic tissue of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* UHLER (Homoptera: Cicadellidae). Jap. J. appl. Ent. Zool. 9: 107~114.
- MITSUHASHI, J. (1969) Plant-pathogenic viruses in insect vector tissue culture. in Viruses, Vectors, and Vegetation (Ed. by K. MARAMOROSCH). 475~503, Interscience Publishers, New York.
- MITSUHASHI, J. and K. MARAMOROSCH (1964) Leafhopper tissue culture: embryonic, nymphal, and imaginal tissue from aseptic insects. Contrib. Boyce Thompson Inst. 22: 435~460.
- VAGO, C. and O. FLANDRE (1963) Culture prolongee de tissue d'insectes et de vecteurs de maladies en coagulum plasmatique. Ann. Epiphyties 14: 127~139.
- 山田堅一郎・徳光 崇・四方英四郎 (1969) イナズマヨコバイ 胚子の組織培養. 応動昆 13: 159~161.

抄 録

ヤガにおける脳の介在ニューロン：高振動音による特異的な抑制

ROEDER, K. D. (1969) Brain interneurons in noctuid moths: differential suppression by high sound intensities. J. Insect Physiol. 15: 1713—1718.

ヤガの鼓膜器官には二つの聴覚細胞があり、感受性の高い方 (A1) は約 20 dB の振動数領域を持ち、これ以上では飽和反応を示す。感受性の低い (A2) 感覚細胞は A1 に最大の興奮を起こさせる音の強さではじめてスパイク反応を起こす。脳の反応にスパイクを生じさせる単位は、20 dB ないしは最小可聴限界音 (0 dB) 以上の音の強さになると、部分的あるいは全面的に抑制され、また、小さなスパイクだけは 40 dB の振動数領域を越えてもその数を増加し続ける。供試刺激を毎秒 30 ミリ秒間持続の 40~45 Hz のパルスとし、効果傍受用の音の強さは +3~+5 dB に調整して実験を行なった。増大する音の強さによる前大脳の介在ニューロンの特異的な抑制の例が明示された。0 dB 区では大きなスパイクひとつが 16.5 ミリ秒の潜伏の後にあらわれ、超音波のパルスに 9 回生じた。中位のパルスは大きなパルスに先だつ形で 6 回繰り返され、一方、小さなスパイクは反応のはじめのころに数回生じた。+10 dB 区では最初の大きなスパイクと中位のスパイクは潜伏 12 ミリ秒で同時に生じ両者とも約 2.4 ミリ秒間隔で前者が 12 回、後者が 10 回あらわれ

た。+30 dB 区では第 2, 第 4, 第 5 および第 6 番目の大きなスパイクが止み、+40 dB 区では第 1 番目以外の大きなスパイクはすべてが止んだ。一方、中位のスパイクと小さなスパイクは刺激の強さが増すにつれて数を増し、+40 dB 区でも十分な後発を示した。したがって脳の介在ニューロンを伴う感覚細胞 A1 と A2 の相互作用を説明する仮説がたてられる。A1 は大・中・小の各スパイクを生じさせる脳の単位に対して興奮性のシナプス連結を、感受性の劣性な A2 は大きなスパイクを生じさせる単位に対する阻止性のシナプス連結と中および小のスパイクを生じさせる単位についての興奮性のシナプス連結とを有するというものである。蛾の回避行動の神経的相互関係はこれらのことから推察がなりたつ。すなわち飛翔中の蛾はコウモリの叫びに似せた超音波のパルスの連続に会うと二つの形式の回避行動を示す低振動音の音に遭遇した場合 (「遠くにいるコウモリ」に相当する) には向きを変え音源から逃げるような飛翔をする。高振動音の音 (「近距離のコウモリ」に相当する) は方向不定な降下、宙返り、きりもみ降下、地上への落下といった予測し難い反応のメドレーを引き起こす。音源から逃げる回避行動が起こるのは A1 に反応を起こさせるだけの音の強さがあった場合であり、方向不定の予測し難い反応のメドレーの回避行動は A1 を飽和させ、A2 に興奮を起こさせる音の強さで見られる。これらの研究から脳の介在ニューロンのはたらしによりこれら二つの行動形式がいかにして高・低振動音により中介されるかという仮説がなりたつ。(中外製薬 高橋啓暢)