



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	クロスジツマグロヨコバイ (Nephotettix nigropictus Stål)、トビイロウンカ (Nilaparvata lugens Stål) 胚子の組織培養について
Author(s)	仙北, 俊弘; SENBOKU, Toshihiro; 四方, 英四郎 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 12(2), 101-108
Issue Date	1980-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11943
Type	departmental bulletin paper
File Information	12(2)_p101-108.pdf



クロスジツマグロヨコバイ (*Nephotettix nigropictus*
Stål), トビイロウンカ (*Nilaparvata lugens* Stål)

胚子の組織培養について

仙北俊弘・四方英四郎

(北海道大学農学部植物学教室)

(昭和55年4月22日受理)

Embryonic tissue culture of *Nephotettix nigropictus*
Stål and *Nilaparvata lugens* Stål

Toshihiro SENBOKU and Eishiro SHIKATA

(Department of Botany, Faculty of Agriculture
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒 言

植物ウイルス媒介昆虫の組織培養の中には、*Agallia* 属の数種の培養細胞のように、既に継代培養に成功し cell line が確立されて、ウイルスの感染増殖の研究に利用されているものがある^{1,2,4,5,6,12,13}。本邦のイネウイルス媒介昆虫に関しては、イネ萎縮ウイルスの媒介昆虫ツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps* UHLER) の初代培養細胞にウイルスを感染させた報告、およびツマグロヨコバイの継代培養に成功した報告がある^{16,19}。

その他はいずれも初代培養に関する報告のみで、クロスジツマグロヨコバイ (*N. nigropictus* Stål)²⁰、ヒメトビウンカ (*Laodelphax striatellus* FALLEN)²³、イナズマヨコバイ (*Inazuma dorsalis* FALLEN)²² の胚子培養細胞が得られているのみである。

ヨコバイ類胚子培養の基本培地として、三橋の NCM4B¹⁷ が、初代培養細胞に関して大きく貢献したがその後の継代培養においては未だ問題が残されている。

本研究ではクロスジツマグロヨコバイの胚子培養について、その培地組成を種々検討し、さらにそれらのいくつかを用いてイネ grassy stunt ウイルスの媒介昆虫トビイロウンカ (*Nilaparvata lugens* Stål) の胚子培養を試みた。

本研究を行なうに際し、培養手技に関して御指導を戴いた農林水産省農業技術研究所三橋淳博士、厚生省予防衛生研究所山田堅一郎博士、また家蚕 (*Bombyx mori* L.)、シンジュ蚕 (*Phylosamia synthia* PRYER) を提供して

下さった本学農学部蚕学教室勝野貞哉助教授に対し深謝の意を表する。

実験材料及び方法

1) クロスジツマグロヨコバイ胚子組織培養

1. 材 料; クロスジツマグロヨコバイの羽化後10日から17日の受精雌虫を25°C 16時間の人工照明下で、ガラス飼育瓶内のイネ苗に毎日移しかえ産卵させた。培養には反転期の卵胚子⁸⁾を用いた。上記の飼育条件では産卵後4日目の卵がこの時期にあたる。供試卵数は培養容器(内径23mm)1個当たり約30個とした。

2. 培養方法; 胚子初代培養の培養方法は MITSUHASHI¹⁵⁾ および SHIKATA ら²⁰⁾ に従いガラスリングを用いた sitting drop 法によった。操作はすべて22°C

表—1 基本培地 (NCM4A)*

NaCl	560 mg	Glucose	400 mg
KCl	16	Sucrose	400
CaCl ₂ ·2H ₂ O	16	L-tryptophan	6.4
MgCl ₂ ·6H ₂ O	8	L-cystein	1.6
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	16	Lactoalbumin hydrolysate	640
NaHCO ₃	9.6	TC-Yeastlate	160
		Fetal bovine serum	10 ml
H ₂ O	to 100 ml	(pH 6.5)	

* 三橋私信

表-2 アミノ酸の分類とグループ名

Neutral Amino acids	
① Glycine, Serine, Alanine, Valine	① グリシングループ
② Leucine, Isoleucine, Threonine	② ロイシングループ
Aromatic Amino acids	
③ Phenylalanine, Tyrosine, Tryptophane	③ フェニールアラニングループ
Sulfer containing Amino acids	
④ Cysteine, Cystine, Methionine	④ システィングループ
Imino acids	
⑤ Proline	⑤ プロリン
Acidic Amino acids	
⑥ Aspartic acid, Asparagine	⑥ アスパラギン酸グループ
⑦ Glutamic acid, Glutamine	⑦ グルタミン酸グループ
Basic Amino acids	
⑧ Histidine, Arginine, Lysine	⑧ ヒスチジングループ

表-3 クロスジツマグロヨコバイ卵胚子初代培養検討培地

NAM 1	CHIU and BLACK (1967) の無機塩組成に置換
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O 8 mg 添加
3	Fructose 400 mg 添加
4	GRACE (1962) の有機酸組成を添加
5	基本培地から L-tryptophan, L-cysteine, lactoalbumin hydrolysate を除く
6	基本培地から L-tryptophan, L-cysteine を除き, lactoalbumin hydrolysate を遊離アミノ酸に置換
7	NAM 6 からグリシングループを除く
8	〃 ロイシングループを除く
9	〃 フェニールアラニングループを除く
10	〃 システィングループを除く
11	〃 プロリンを除く
12	〃 アスパラギン酸グループを除く
13	〃 グルタミン酸グループを除く
14	〃 ヒスチジングループを除く
15	NAM 10 にシスティンを 41.6 mg 添加 (NAM 6 の 2 倍量)
16	〃 システィンを 41.6 mg 添加 (〃)
17	〃 メチオニンを 21.2 mg 添加 (〃)
18	NAM 14 にヒスチジンを 12 mg 添加 (〃)
19	〃 アルギニンを 25.3 mg 添加 (〃)
20	〃 にリジンを 65.6 mg 添加 (〃)
21	NAM 10 にシスティングループをそれぞれ NAM 6 の 2 倍量添加
22	NAM 14 にヒスチジングループをそれぞれ NAM 6 の 2 倍量添加
23	基本培地の TC-Yeastlate を GRACE (1962) のビタミン組成に置換
24	クロスジツマグロヨコバイ幼虫磨砕体液 5 ml 添加
25	〃 〃 10 ml 添加

(基本培地との相違組成のみを記入し, 培地 100 ml に対しての添加量を示す)

の殺菌恒温室で行なった。培養は28°Cに保ち、週1回培地を更新した。予備実験で22°C, 0.1%トリプシン(DIFCO 1:250) 2~3分処理が組織片のガラス面への附着、その後の細胞の移住ならびに生育が良かったので、本実験ではすべてこの条件で処理した。

3. 培地; 三橋の NCM4A (私信) (NCM4B の牛胎児血清を半量にしたもの) を基本培地とした (表-1)。基本培地の組成のうち無機塩, 糖, 有機酸, アミノ酸, ビタミン, 昆虫体液などについて一部組成を変えて培地の適, 不適を比較検討した。アミノ酸の検討では表-2に示したアミノ酸グループをもとにした。用いた培地は基本培地の他 25 種 (NAM 1~25) である (表-3)。昆虫体液はクロスジツマグロヨコバイの 3~4 齢虫約 3g に 17 ml の蒸留水を加わえてフロンホモジナイザーを用いて磨砕し, 56°C, 30 分熱処理後 Seitz 濾過器で濾過した濾液を -30°C 凍結保存し用いた。

2) トビイロウンカ胚子初代培養

1. 材料; トビイロウンカ受精雌虫を 25°C, 16 時間人工照明下でガラス瓶内のイネ幼苗に毎日移しかえ産卵させた。産卵後 5 日目の卵が反転期にあたり, この期の胚子組織を供試し, 培養容器 1 個当り 30 個の卵を用いた。

2. 培養方法; 胚子初代培養の培養方法は, クロスジツマグロヨコバイで用いた方法に準じた。

3. 培地; 基本培地として NCM4A を用い, 他 6 種 (NLM 1~6) の培地について比較検討した (表-4)。昆虫体液として家蚕およびシンジュ蚕の幼虫体液を搾汁し 56°C, 30 分熱処理後, 3000 rpm, 15 分遠心分離し, その上清を凍結保存したものも用いた。また lobster heamolymph は GIBCO 製を凍結保存して用いた。

なおクロスジツマグロヨコバイおよびトビイロウンカの培養細胞の観察と写真撮影はニコン MD 型倒立位相

差顕微鏡で行なった。

結 果

1) クロスジツマグロヨコバイ胚子組織培養

1. 基本培地での培養

培養開始後 24 時間以内に繊維芽状細胞の移住がみられた (図-1)。ついで上皮性細胞が組織片のまわりに現われ, 1 週間後これら上皮性細胞の分裂が活発となり cell sheet を形成する (図-2)。上皮性細胞には細胞膜のはっきりした大型 (図-3), 小型 (図-4) 上皮性細胞と, cell sheet 周縁部にみられる不定形上皮性細胞 (図-5) が観察された。また空胞をもったアメーバ状の大型不定形上皮性細胞 (図-6), 小型遊走細胞 (図-7) も観察された。上皮性細胞により形成された中空の球状の構造もみられ, これは次第に大きさを増した (図-8)。培養開始後 3~4 週間を経過すると cell sheet の広がり鈍り, やがて細胞質内に小顆粒が目立ち始め (図-9), 2 カ月で殆んど細胞が退化し, cell sheet はガラス面より離脱した。

2. 各検討培地での培養

基本培地の他 25 種の培地について, 培養直後の組織片からの細胞移住, 細胞の種類, 分裂増殖の様子, cell sheet の広がり等培養経過を比較観察した。また基本培地を用いて 2 週間培養を続けた後, 検討培地に置き換えた場合の培養細胞の比較観察も試みた。

これらの結果を表-5に示す。無機塩を CHIU and BLACK¹⁾の組成に置き換えた NAM 1, またフラクトースを加わえた NAM 3, 基本培地中のラクトアルブミン水解物を遊離アミノ酸に置き換えた NAM 6, アミノ酸組成の検討培地のうち NAM 7~9, 11~13, 15~22 および昆虫体液添加培地である NAM 24, 25 を用いた場合, 基本培地での培養経過と殆んど差は認められなかった。一方, MgSO₄·7H₂O を加わえた NAM 2 を用いた場合, 細胞の分裂増殖が悪く, 培養開始後 1 カ月で殆んど細胞が退化した (図-10)。有機酸を加わえた NAM 4 では組織片からの細胞移住, その後の分裂が基本培地に比して良くなかった (図-11)。基本培地からラクトアルブミン水解物, L-トリプトファン, L-システインを除いた NAM 5 は細胞移住, 分裂増殖の状態が悪く, 基本培地からこの培地へ置き換えを試みた場合, 置換後 1~2 週間に殆んど細胞が退化した (図-12)。NAM 6 からシステイングループを除いた NAM 10, およびヒスチジングループを除いた NAM 14 を用いた場合, 組織片からの細胞移住が劣り, cell sheet 形成も遅れた。また繊維芽状細胞が目立ち, 健全細胞維持期間が短かっ

表-4 トビイロウンカ卵胚子初代培養検討培地

培地名	組	成
基本培地	NCM4A	と同じ
NLM 1	NAM 1	と同じ
〃 2	NAM 23	と同じ
〃 3	NAM 24	と同じ
〃 4	NCM4A	に 5% 家蚕体液添加
〃 5	〃	5% シンジュ蚕体液添加
〃 6	〃	5% lobster heamolymph 添加

表—5 クロスジツマグロヨコバイ 卵胚子培養液の検討

培養経過 培地	組織片からの細胞移住、 繊維芽状細胞及び遊離細胞出現	上皮性細胞の出現なら びに分裂増殖開始	Cell sheet 形 成	Cell sheet 拡 大 期	Cell sheet 周縁部の大 型上皮性細 胞内に顆粒 増加	Cell sheet の 広 が り 鈍 化	Cell sheet の 広 が り 停 止	細胞の退 化、細胞 質内に空 胞目立つ	Cell sheet のガラス 面からの 離脱
基本培地 NAM 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25	24 時間*	3~4 日	5~6 日	1~2 週間	3 週 間	3~4 週間	5~6 週間	6~7 週間	8~9 週間
NAM 23	24 時間	5~6 日	8~ 10 日	10日~ 2 週間	2~3 週間	3~4 週間	5~6 週間	6~7 週間	8 週間
NAM 2, 4, 5, 10, 14	24 時間	5~6 日	10 日	2 週間	2~3 週間	3 週間	3~4 週間	4~5 週間	5 週間
NAM 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25	**				3 週間*	3~4 週間	5~6 週間	6~7 週間	7~8 週間
NAM 23					2~3 週間	3~4 週間	4~5 週間	5~6 週間	6~7 週間
NAM 2, 4, 5, 10, 14					2~3 週間	3 週間	3~4 週間	4 週間	4~5 週間

* 培養開始から各現象観察までの時間

** 基本培地で2週間培養後各検討培地に置換

た(図-13)。また基本培地との置き換え実験でも、置換後7~10日で cell sheet の広がりが止まった(図-14)。ビタミンに関して、基本培地中の TC-Yeastlate (DIFCO) を GRACE⁷⁾ が用いたビタミン組成に置き換えた NAM 23 での培養では、細胞の退化が基本培地に比べてやや早まったが、他には殆んど差が認められなかった(図-15)。

2) トビロウナカ胚子初代培養

7種の培養液を用いて初代培養を試みた。これらの結果を表-6に示す。

基本培地 NCM4A において培養開始後24時間以内に組織片からの細胞移住がみられ(図-16)、4~5日目には繊維芽状細胞、不定形の大型上皮性細胞、小型の遊離細胞が観察された。これらの細胞は繊維芽状細胞で約30~100 μm 、核の直径が約10 μm であった。また不定形の大型上皮性細胞の大きさは30~50 μm 、その核の直

径は約15 μm であった。遊離細胞は約30×6 μm 、核の直径が約10×5 μm の紡錘形であった。不定形の大型上皮性細胞には空胞を含むものが多かった(図-17, 18)。1週間後に数は少ないが細胞壁の明瞭な大型(大きさ約30 μm 、核の直径は約10 μm)、小型(大きさ約20 μm 、核の直径約10 μm)の上皮性細胞を含む cell sheet の形成がみられたが、この広がりは遅く各細胞質の顆粒が目立ち始め、ほぼ2週間で細胞は退化した(図-19, 20)。他の6種の培地を用いた場合、得られる細胞の種類は同じであるが、cell sheet の広がりは遅く、細胞質内の顆粒が多く退化が早まった。クロスジツマグロヨコバイ、家蚕、シンジュ蚕体液を加わえた培地(NLM 3, 4, 5)、および lobster 体液添加培地(NLM 6)のいずれも良い結果を得るには至らず、細胞の退化は培養開始後10日~2週間で観察された。

表—6 トビイロウンカ卵胚子培養液の検討

培養経過 培地名	組織片からの細胞移住、繊維芽状細胞及び遊離細胞出現	上皮性細胞の出現ならびに分裂増殖開始	Cell sheet 形 成	Cell sheet 拡大期	Cell sheet 周縁部の大型上皮性細胞内に顆粒出現	Cell sheet の広がり鈍化	Cell sheet の広がり停止	細胞の退化、細胞質内に空つ胞目立つ	Cell sheet のガラス面からの離脱
基本培地	24時間*	4~5日	6~7日	7~9日	9~10日	10~12日	12日	12~13日	13~15日
NLM 1, 2, 3	24時間	5~6日	6~7日	6~7日	6~7日	7~8日	7~8日	7~8日	8~10日
NLM 4, 5, 6	24時間	4~5日	6~7日	7~8日	8~9日	8~9日	10日	10~12日	12~13日

* 培養開始から各現象観察までの時間

考 察

クロスジツマグロヨコバイの反転期卵胚子を用いて培養液の検討を試みた。HIRUMI and MARAMOROSCH⁹⁾は、*Macrostes fascifrons* の様々な発育段階の胚組織の培養を試み、反転期の胚子が最も適していると報告している。本実験では25°C恒温条件下で産卵後4~5日の卵が、この期に相当し活発な細胞の分裂増殖が認められた。組織片へのトリプシン処理は、トリプシンの濃度、処理温度と時間により、組織片のガラス面への付着および細胞の移住に大きな影響を与えるが、筆者らの予備試験の結果、0.1%トリプシン(DIFCO 1:250)で22°C、2分間処理が、組織片の付着、その後の細胞の移住に良い結果をもたらした。

培地組成の無機塩は緩衝効果と浸透圧を維持するために重要である。CHIU and BLACK¹⁾は *A. constricta* の培養でマグネシウム塩として、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ に代わり $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を用い好成績をあげている。本実験でのクロスジツマグロヨコバイの培養でも、CHIU and BLACK¹⁾の培地の無機塩組成をそのまま用いた場合、培養状態は基本培地を用いた場合と殆んど差はみられなかった。また GRACE⁷⁾は *Antherae eucalypti* の培養で2種の Mg^{2+} 塩 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ と $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) を併用し、好成績を得ているがクロスジツマグロヨコバイの培養では、これらの併用は細胞の増殖を悪くし、培養開始後1カ月で細胞は退化した。培地の無機塩組成は、かなり広い幅で適応性があるといわれているが、虫の種類または発育段階によって要求が異なるようであり、今後さらに検討を要する。

エネルギー源として糖は必須であり、グルコース、フラクトース、サッカロースが一般に用いられるが、MITSUHASHI and MARAMOROSCH¹⁸⁾はグルコース単

独でヨコバイの細胞生育が充分行なわれることを示した。本実験ではグルコース、サッカロース各400 mg/100 mlを含む基本培地と、この組成にフラクトース400 mg/100 mlを添加した培地について比較したが、培養経過に大きな差は認められなかった。この結果からフラクトースは、クロスジツマグロヨコバイの培地組成として必須のものではないと考えられる。

WYATT²¹⁾は鱗翅目昆虫細胞の体外培養で、各種有機酸を添加し好成績を得た。しかし筆者らは GRACE⁷⁾の培地組成をもとに検討したが、良い結果は得られなかった。

昆虫の体液中には多くの遊離アミノ酸が含まれておりその含量は種により、また発育段階により異なる²¹⁾。これまでペプトン、アルブミン水解物等がアミノ酸供給源としてヨコバイ、ウンカの組織培養に用いられているが^{1,8,9,10,15,18)}、筆者らは基本培地からラクトアルブミン水解物を除き、代わりに個々のアミノ酸をラクトアルブミン水解物の組成に基づいて添加した。その結果ラクトアルブミン水解物、L-システイン、L-トリプトファンを基本培地から除いた培地では、クロスジツマグロヨコバイの細胞の組織片からの移住および分裂増殖が悪く、cell sheet の十分な広がりはみられなかった。また基本培地組成のラクトアルブミン水解物を、これに含まれる個々のアミノ酸の添加により置き換えることができた。これらのアミノ酸の中でシステイン、シスチン、メチオニン、ヒスチジン、アルギニン、リジンが細胞の分裂、生長に大きな影響をもつと思われる。

基本培地中の主たるビタミン供給源は TC-Yeastlate であるが、GRACE⁷⁾の培地をもとに、各種合成純化ビタミンでこれを置き換えても、細胞の増殖に殆んど差は認められなかった。

昆虫体液を培養液に添加し、GRACE⁷⁾は昆虫の組織

培養細胞では初めて野生絹糸虫 *Antherae eucalypti* の cell line を確立し、我が国ではヒメトビウシカの胚子培養で山田ら²³⁾ がシンジュ蚕の体液を添加し好成績を得ている。筆者らはクロスジツマグロヨコバイの胚子培養およびトビウシカの胚子培養にクロスジツマグロヨコバイ体液を、またトビウシカの胚子培養では家蚕、シンジュ蚕の体液をも培地に添加し、培養を試みた。特に良い結果を得ることはできなかった。昆虫体液や脊椎動物血清の添加はアミノ酸、ペプチド蛋白、ビタミン、ホルモンその他未知の生長促進物質の補充の上で有効と思われるが、各培養細胞の栄養要求の特異性を充分考えねばならない複雑な問題を残している。

トビウシカ胚子初代培養で期待したほど十分な細胞の増殖が得られなかったことは、培地組成に適性を欠いたものと考えられる。しかしこの培養で得られた細胞の種類は、クロスジツマグロヨコバイの胚子培養で得られたものとほぼ同じものであった。

今後、ヨコバイ、ウシカの細胞培養には、より適当な培地、しかも調整の容易な合成培地の開発が望まれる。また分裂増殖の活発な高次倍数体細胞を得ることは cell line 確立の有効な手段ともいえる。この面から紫外線照射、各種薬剤処理といった物理的、化学的処理の検討もされねばならない。

虫媒性ウイルスに関する研究は、wound tumor ウイルス、potato yellow dwarf ウイルスの媒介昆虫である *Agallia* 属の cell line が確立されたことから¹⁾、飛躍的にその定量的研究が発展した^{2,3,4,5,6,11,12,13,14)}。しかし未だ他の多くの植物ウイルス媒介昆虫の cell line の確立とその応用的研究はなされていない。これを確立することによって今後寄主植物のプロプラスト培養細胞と媒介昆虫培養細胞を組み合わせ、ウイルス、昆虫、植物三者の相互関係、特に感染機作の問題解明が期待できる。

摘 要

1. クロスジツマグロヨコバイ胚子培養液の検討を、基本培地として NCM4A (三橋私信) を用いて行ない、組織片からの細胞移住の状況、得られる細胞の種類、細胞の分裂増殖と cell sheet の広がり方、健全細胞維持期間などについて比較検討した。

2. クロスジツマグロヨコバイ胚子培養液の無機塩組成の検討を試みた。その結果 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ と $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ の併用培地では細胞の分裂増殖が活発でなく細胞の退化も早かった。

3. クロスジツマグロヨコバイ胚子培養液の糖の検討で基本培地にフラクトースを添加したが、これは基本培地を用いた培養と大きな差異はみられなかった。

4. クロスジツマグロヨコバイ胚子培養で、有機酸添加培地を用いた場合の培養経過は分裂増殖が活発ではなく、細胞の退化も早かった。

5. クロスジツマグロヨコバイ胚子培養液の基本培地組成であるラクトアルブミン水解物を各種アミノ酸で置き換えることができた。またこれらアミノ酸を8グループにわけ、それぞれの培養細胞への影響を検討した結果システイングループ、ヒスチジングループを除いた培地を用いた場合、基本培地に比較して分裂増殖が悪く、細胞の退化も早まった。

6. クロスジツマグロヨコバイ胚子培養の基本培地の TC-Yeastlate を各種純化合成ビタミンで置き換えることができた。またクロスジツマグロヨコバイ幼虫磨砕体液を基本培地に添加したが、その効果は明らかではなかった。

7. トビウシカの胚子初代培養を試みた。クロスジツマグロヨコバイ胚子培養での基本培地を用いた場合得られた細胞は維繊芽状細胞と、3種の上皮性細胞と小型遊離細胞であるが、これら細胞の特に上皮性細胞の分裂、増殖はあまり活発でなく cell sheet の広がり遅い。殆んど細胞は培養開始後約2週間で退化した。他6種の培地を用いて培養を試みたが、細胞の分裂増殖を促進するには至らなかった。

引用文献

1. CHIU, R. J. and BLACK, L. M.: Monolayer cultures of insect cell lines and their inoculation with a plant virus, *Nature*, **215**: 1076-1078. 1967
2. CHIU, R. J. and BLACK, L. M.: Assay of wound tumor virus by the fluorescent cell counting technique, *Virology*, **37**: 667-677. 1969
3. CHIU, R. J. LIU, H. Y., MAC LEOD, R. and BLACK, L. M.: Potato yellow dwarf virus in leafhopper cell culture, *Virology*, **40**: 387-396. 1970
4. GAMEZ, R. and BLACK, L. M.: Application of particle-counting to a leafhopper-borne virus, *Nature*, **215**: 173-174. 1967
5. GAMEZ, R. and BLACK, L. M.: Particle counts of wound tumor virus during its peak concentration in leafhoppers, *Virology*, **34**: 444-451. 1968

6. GAMEZ, R. and CHIU, R. J.: The minimum concentration of a plant virus needed for infection of monolayers of vector cells, *Virology*, **34**: 356-357. 1968
7. GRACE, T. D. C.: Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*, *Nature*, **195**: 788-789. 1962
8. HIRUMI, H. and MARAMOROSCH, K.: Insect tissue culture; use of blastkinetic stage of leafhopper embryo, *Science*, **144**: 1465-1467. 1964
9. HIRUMI, H. and MARAMOROSCH, K.: The *in vitro* cultivation of embryonic leafhopper tissues, *Exptl. Cell Res.*, **36**: 625-631. 1964
10. HIRUMI, H. and MARAMOROSCH, K.: Insect tissue culture; further studies on the cultivation of embryonic leafhopper tissue *in vitro*, *Contr. Boyce Thompson*, **22**: 343-352. 1964
11. KIMURA, I. and BLACK, L. M.: Some factors affecting infectivity assays of wound-tumor virus on cell monolayers from an insect vector, *Virology*, **46**: 266-276. 1971
12. KIMURA, I. and BLACK, L. M.: Growth of wound tumor virus in vector cell monolayer, *Virology*, **48**: 852-854. 1971
13. LIU, H. Y. and BLACK, L. M.: Infectivity of varieties of potato yellow dwarf virus on vector and related nonvector cell monolayers, *Abstr. Phytopathology*, **59**: 1038. 1969
14. LIU, H. Y. KIMURA, I. and BLACK, L. M.: Specific infectivity of different wound tumor virus isolates, *Virology*, **51**: 320-326. 1973
15. MITSUHASHI, J.: *In vitro* cultivation of the embryonic tissues of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler (Hemiptera cicaderidae), *Japan J. Appl. Ent. Zool.*, **9**: 107-114. 1965
16. MITSUHASHI, J.: Subculturing of cells from the embryo of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* UHLER (Hemiptera, Deltocephalidae), *Annotationes Zoologicae Japonenses*, **48**: 139-147. 1975
17. MITSUHASHI, J.: In "Viruses, Vectors and Vegetation", 475-503. (MARAMOROSCH, K. ed.) Wiley (Interscience), New York, 1969
18. MITSUHASHI, J. and MARAMOROSCH, K.: Leafhopper tissue culture; Embryonic, nymphal and imaginal tissue from aseptic insects, *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **22**: 435-460. 1964
19. MITSUHASHI, J. and NASU, S.: An evidence for the multiplication of rice dwarf virus in the vector cell cultures inoculated *in vitro*, *Appl. Ent. Zool.*, **2**: 113-114. 1967
20. SHIKATA, E., YAMADA, K. and TOKUMITSU, T.: Embryonic tissue cultures of planthopper and leafhopper vectors of plant pathogenic viruses, *J. Facul. Agr. Hokkaido Univ.*, Sapporo, **56**: 292-302. 1970
21. WYATT, S. S.: Culture *in vitro* of tissue from the silkworm; *Bombyx mori* L., *J. Gen. Physiol.*, **39**: 841-852. 1956
22. 山田堅一郎・徳光崇・四方英四郎：イナズマヨコバイ胚子の組織培養，応動昆，**13**: 159-161. 1969
23. 山田堅一郎・徳光崇・四方英四郎：ヒメトビウンカ，*Laodelphax striatellus* FALLEN 胚子の組織培養，応動昆，**14**: 79-84. 1970

Summary

In the embryonic tissue culture of a leafhopper, *Nephotettix nigropictus* Stål, cell growth in several culture media modified from NCM-4A were examined. The cell growth was remarkably inhibited in the medium, NCM-4A+MgSO₄·7H₂O instead of MgCl₂·6H₂O. Addition of fructose to the basic medium caused little difference in active cell growth. The medium containing some organic acids added to NCM-4A resulted harmful effect on the cell growth as compared with the basic medium. When the medium was prepared by each of the amino acid contents instead of lactoalbumin hydrolysate, no difference of cell growth was observed. Twenty one kinds of amino acids were grouped into 8 according to their physico-chemical properties. Each group was removed from the basic medium or added to it, and then used to examine the conditions of cell growth. Two media lack of cysteine and histidine groups inhibited the cell division. As for the vitamins in the compositions of the culture media, TC-Yeastlate in the basic medium was substituted for some synthetic vitamins. The media supplemented with heamolymph of *N. nigropictus*, did not stimulate further cell growth.

An embryonic primary culture of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål was investigated. When the NCM-4A was used for the cultivation, five cell types were identified at the initial growth of the tissues. They were fibroblast cells, three

epithelial cells and free cells (the same kind of cell types as those of *N. nigropictus*). However, further cell growth did not actively develop, and the formation of cell sheets was very slow. Most

cells were degenerated within two weeks, and then they were detached from glass surface of the culture vessel. Other 6 kinds of the modified media examined, did not cause sufficient cell growth.

図 版 説 明

1. クロスジツマグロヨコバイ培養開始後24時間、組織片からの細胞移住の進展。(×180)
2. クロスジツマグロヨコバイ, cell sheet の形成。(×180)
3. クロスジツマグロヨコバイ, 大型上皮性細胞。(×420)
4. クロスジツマグロヨコバイ, 小型上皮性細胞。(×420)
5. クロスジツマグロヨコバイ, cell sheet 周縁部の不定形上皮性細胞。(×300)
6. クロスジツマグロヨコバイ, 空胞をもつ大型不定形上皮性細胞。(×360)
7. クロスジツマグロヨコバイ, 小型遊走細胞。(×420)
8. クロスジツマグロヨコバイ, cell sheet と中空の球状構造。(×240)
9. クロスジツマグロヨコバイ, cell sheet の細胞質内顆粒の出現, 培養開始後40日。(×240)
10. クロスジツマグロヨコバイ, NAM 2 を用いた場合の培養開始後4週間。(×200)
11. クロスジツマグロヨコバイ, NAM 4 を用いた場合の培養開始後3週間。(×240)
12. クロスジツマグロヨコバイ, 基本培地と NAM 5 の培地置換後2週間。(×360)
13. クロスジツマグロヨコバイ, NAM 10 を用いた場合の培養開始後3週間。(×360)
14. クロスジツマグロヨコバイ, 基本培地と NAM 10 の培地置換後10日。(×200)
15. クロスジツマグロヨコバイ, NAM 23 を用いた場合の培養開始後1カ月。(×420)
16. トビイロウンカ, 基本培地 (NCM4A) を用いた時の組織片からの細胞移住 (培養開始後24時間)。(×360)
17. トビイロウンカ, 基本培地を用いた時の不定形大型上皮性細胞, 培養開始後1週間。(×240)
18. トビイロウンカ, 基本培地を用いた時の小型遊走細胞, 培養開始後1週間。(×240)
19. トビイロウンカ, 基本培地を用いた時の培養開始後10日目の顆粒, 空胞を含む上皮性細胞。(×300)
20. トビイロウンカ, 基本培地を用いた時の培養開始後2週間での細胞の退化。(×240)



