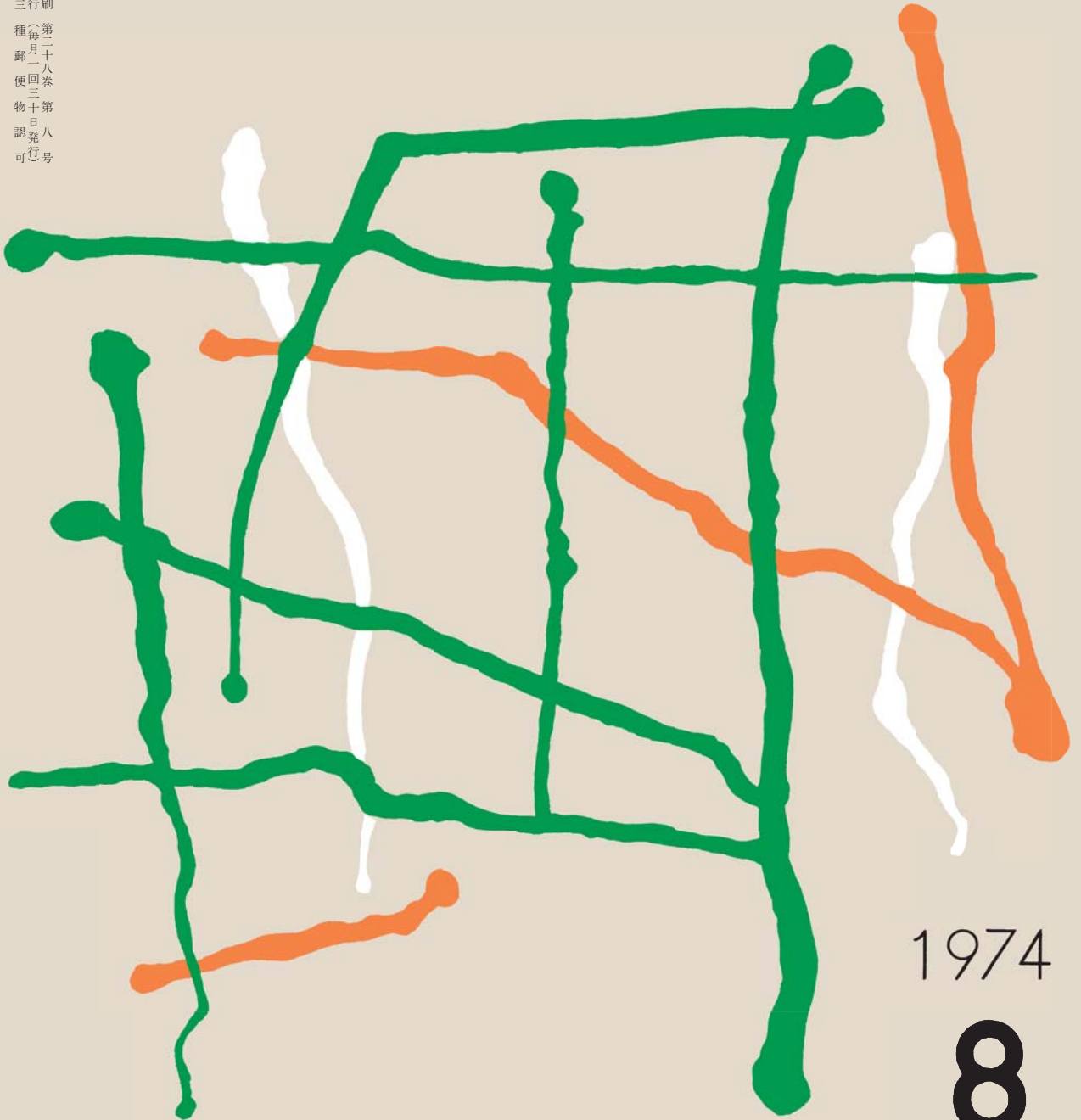


植物防疫

昭和四十九年
八月二十九日
第三十八卷
第八号
（每月）
（每回）
（十日）
（發行）
（認可）
種郵便物



1974

8

特集 生体外培養

VOL 28

NOC

果樹農薬

■有機硫黄水和剤

モノックス

りんご………うどんこ病・黒点病・斑点落葉病の同時防除に

■有機硫黄・DPC水和剤

モノックス-K

■ピナパクリル

有機硫黄水和剤

アプルサン 水和剤

大内新興化学工業株式会社

〔〒103〕 東京都中央区日本橋小船町1の3の7

DM-9は小形の大農機 共立背負動力散布機DM-9

うまい米づくりの近道はDMによる適期・
適確な本田管理です。

DM-9は、

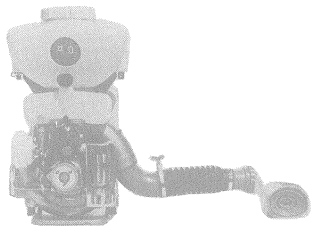
防除はもちろんおまかせください。

防除用マスクがついています。

除草剤が散布できます。

施肥——粒状肥料が散布できます。

散布作業がラクラクできるDM-9は、その他
驚くほど幅広く効率的に利用できる安心と信
頼の散布機です。



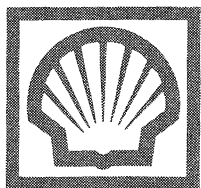
株式
会社

共 立



共立エコー物産株式会社

〒160 東京都新宿区西新宿1-11-3(新宿Kビル) TEL 03-343-3231(代表)



前進する
シェルの農薬

今年の稲作害虫防除には
人畜無害・安心して使用できる

メイチュウ・コブノメイガに

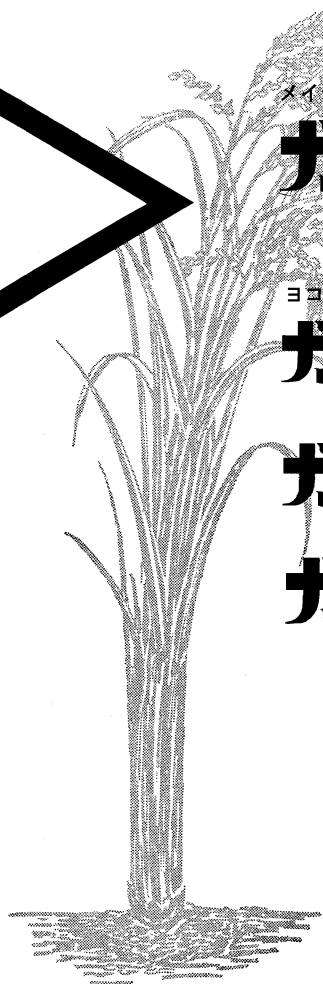
ガードサイド粉剤

ヨコバイ・ウンカ・メイチュウ同時防除に

ガードサイド・バッサ粉剤

ガードサイド・ナック粉剤

ガードツマサイド粉剤



シェル化学株式会社

東京都千代田区霞が関3-2-5(霞が関ビル)

札幌・名古屋・大阪・福岡

農業開発センター(静岡県掛川市)

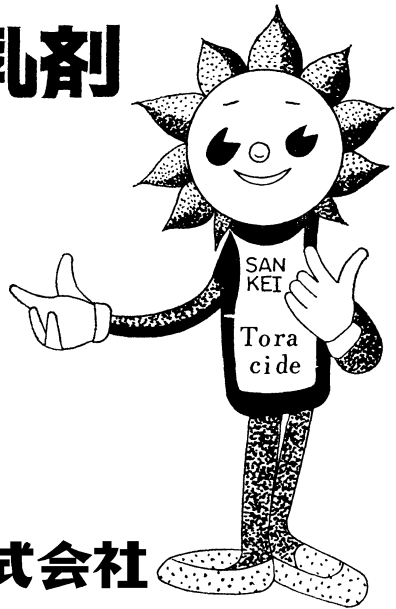
農家のマスコットサンケイ農薬

お宅のブドウ園、あなたの桑園は私がガッチリ守ります。

私の名前は **トラサイド乳剤**
御存知

私の特長は

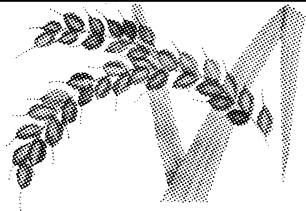
- 穿孔性害虫に卓効があります。
- 滲透力が強く燻蒸作用もあります。
- 残留毒性の心配がありません。
- 低毒性で安心して使用できます。



サンケイ化学株式会社

本社 〒890 鹿児島市郡元町 8 8 0 (0992)54-1161(代)
東京事業所 〒101 東京都千代田区神田司町 2-1 神田中央ビル (03)294-6981(代)
大阪営業所 〒555 大阪市西淀区柏里 2 丁目 4-33 中島ビル (06)473-2010
福岡出張所 〒810 福岡市中央区西中洲 2-20 (092)771-8988(代)

種子から収穫まで護るホクコー農薬



水銀に代る新しい種もみ消毒剤

★ばかなえ病・いもち病・ごまはがれ病に卓効
デュポン

ベンレート[®]水和剤20

新発売

★アブラムシからヨトウムシまで、これ一発でOK
安全・卓効・省力《新型浸透性殺虫剤》
ホクコー

オルトラン 粒剤
水和剤



いもち病に

カスラサイド[®] 粉剤・水和剤

果樹・野菜の各種病害に

トップジンM[®] 水和剤

《新発売》キャベツ・さつまいも畑の除草に

プラナビアン[®] 水和剤

MOとの体系除草に(ウリカワにも)

グラキール 粒剤 1.5/2.5

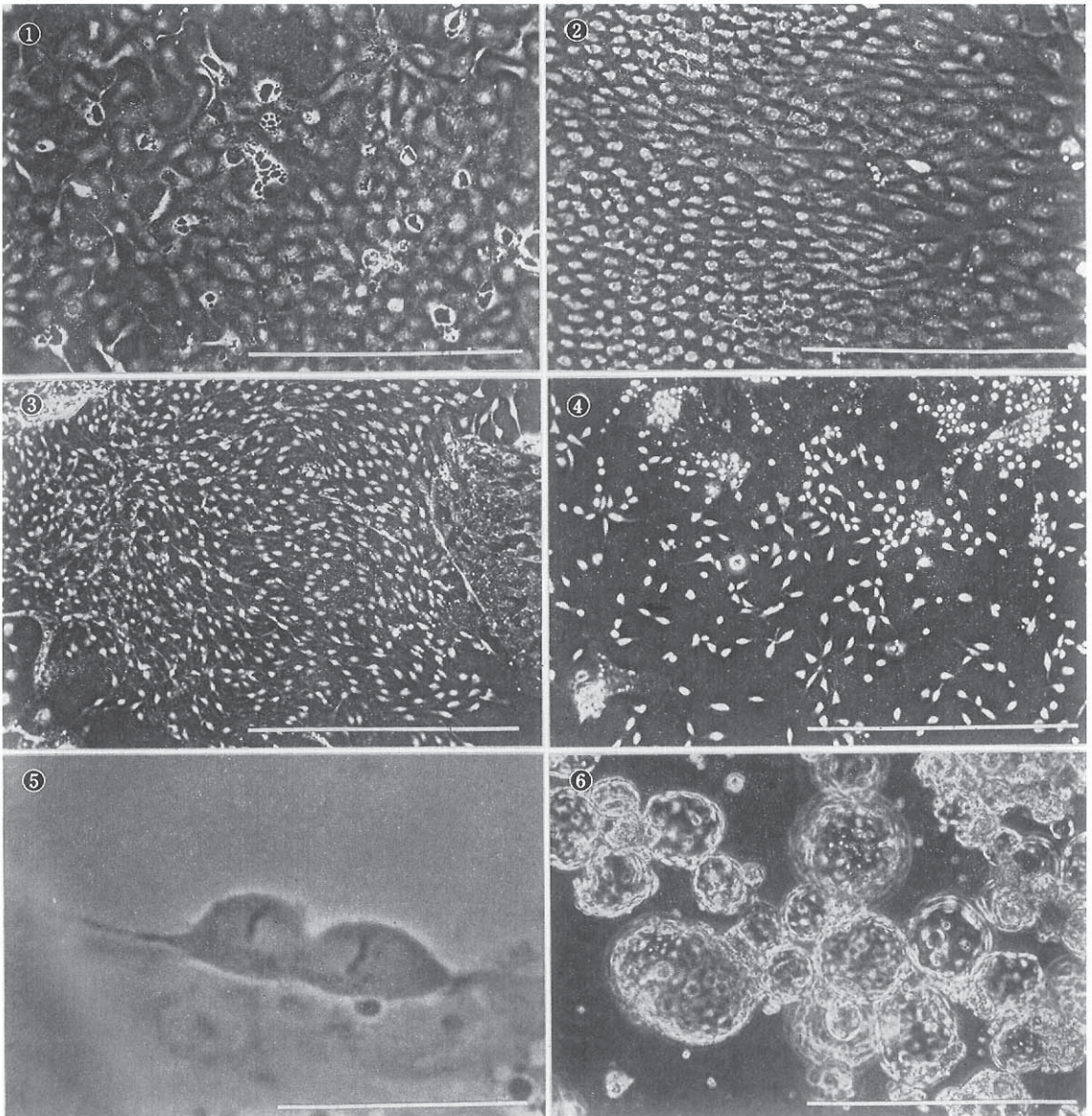


北興化学工業株式会社
東京都中央区日本橋本石町4-2 ☎103
支店: 札幌・東京・名古屋・大阪・福岡

昆虫の細胞培養と細胞株の確立

農林省農業技術研究所 三 橋

淳 (原図)

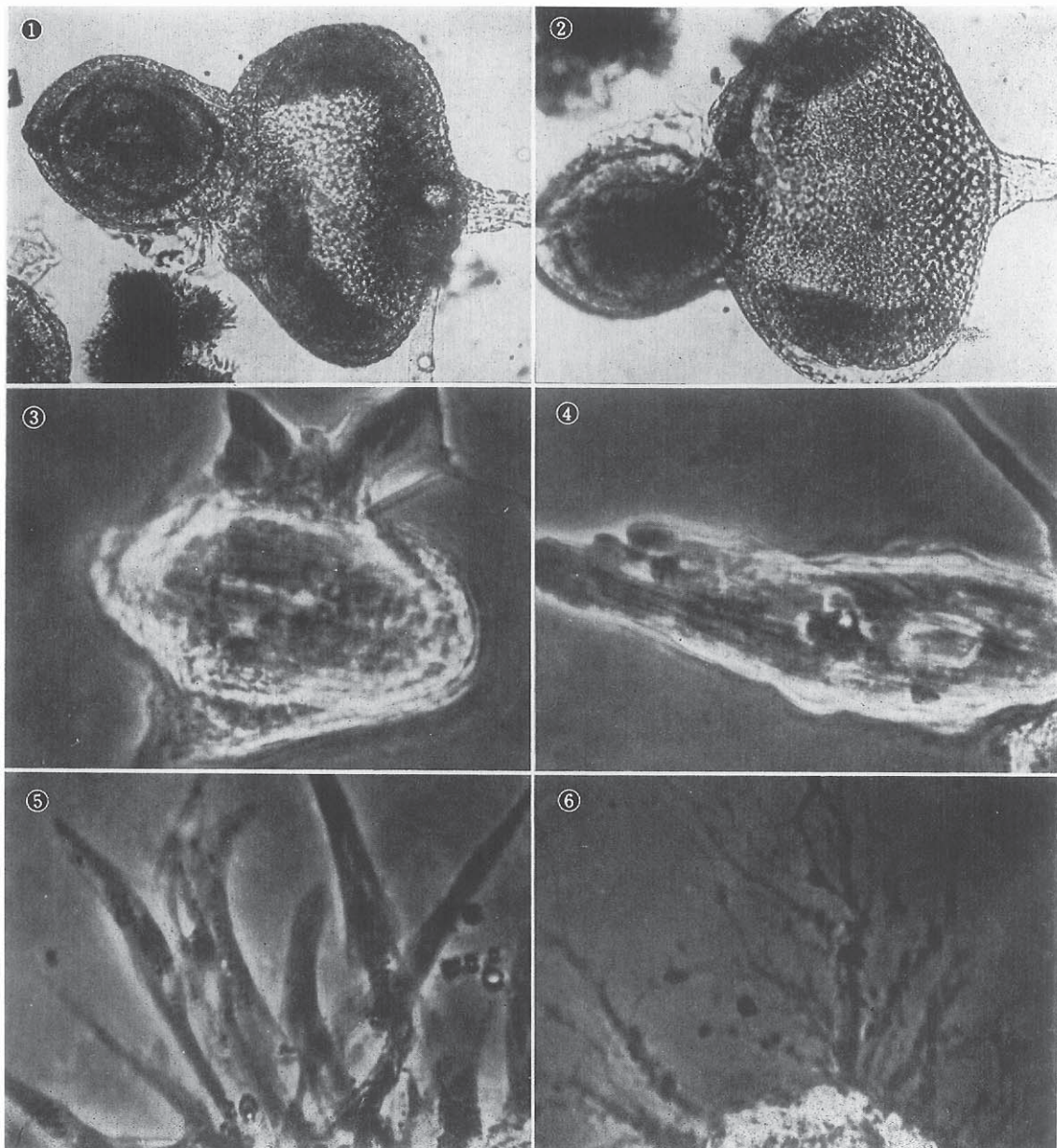


<写真説明>

- ① ニカメイガ幼虫血球の初代培養 (細胞の単層が形成されている)
 - ②～⑥ ツマグロヨコバイ胚子細胞の初代培養
 - ② 上皮状細胞の cell sheet, ③ 繊維芽状細胞の network, ④ 遊走細胞, ⑤ 有糸分裂後期,
 - ⑥ 細胞の単層からできている中空の球状構造 (表面を構成する上皮状細胞がみえている)
- 白線は ①～④, ⑥ は 300 μm , ⑤ は 40 μm を示す。

ショウジョウバエの組織培養

国立遺伝学研究所 黒田行昭(原図)

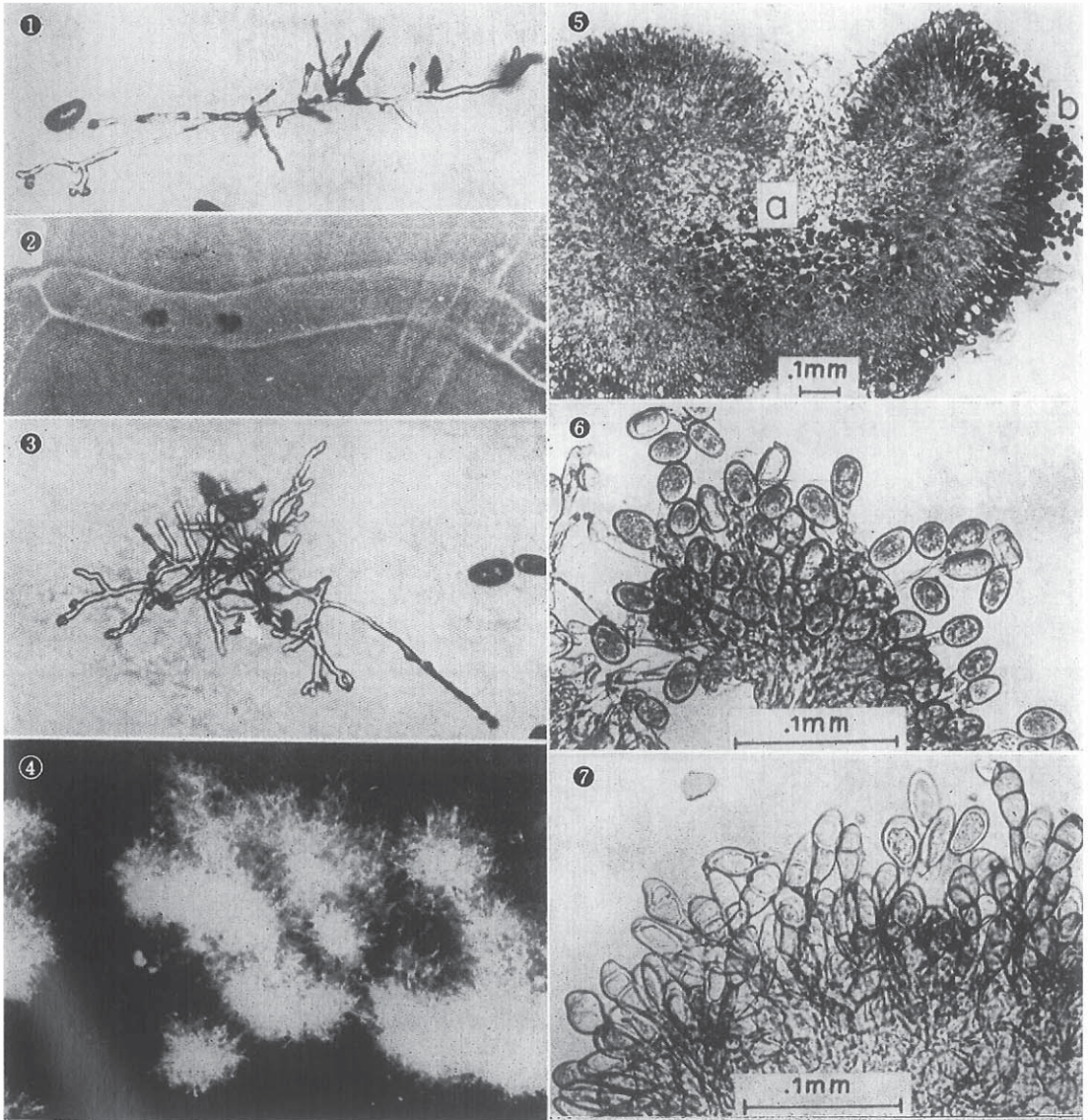


<写真説明>

- ① キイロショウジョウバエ 3 令成熟幼虫の眼触角原基 (培養直後) × 220
- ② ①をエクジソン活性物質存在下で 24 時間培養したもの。× 220
- ③ キイロショウジョウバエの蛹化 48 時間後の精巣組織 (培養直後) × 600
- ④ ③を 24 時間培養したもの。× 600
- ⑤ キイロショウジョウバエ胚の筋肉細胞 (培養 10 日後) × 600
- ⑥ キイロショウジョウバエ胚の神経細胞 (培養 8 日後) × 600

絶対寄生菌の人工培養

愛媛大学農学部 浅田 泰次



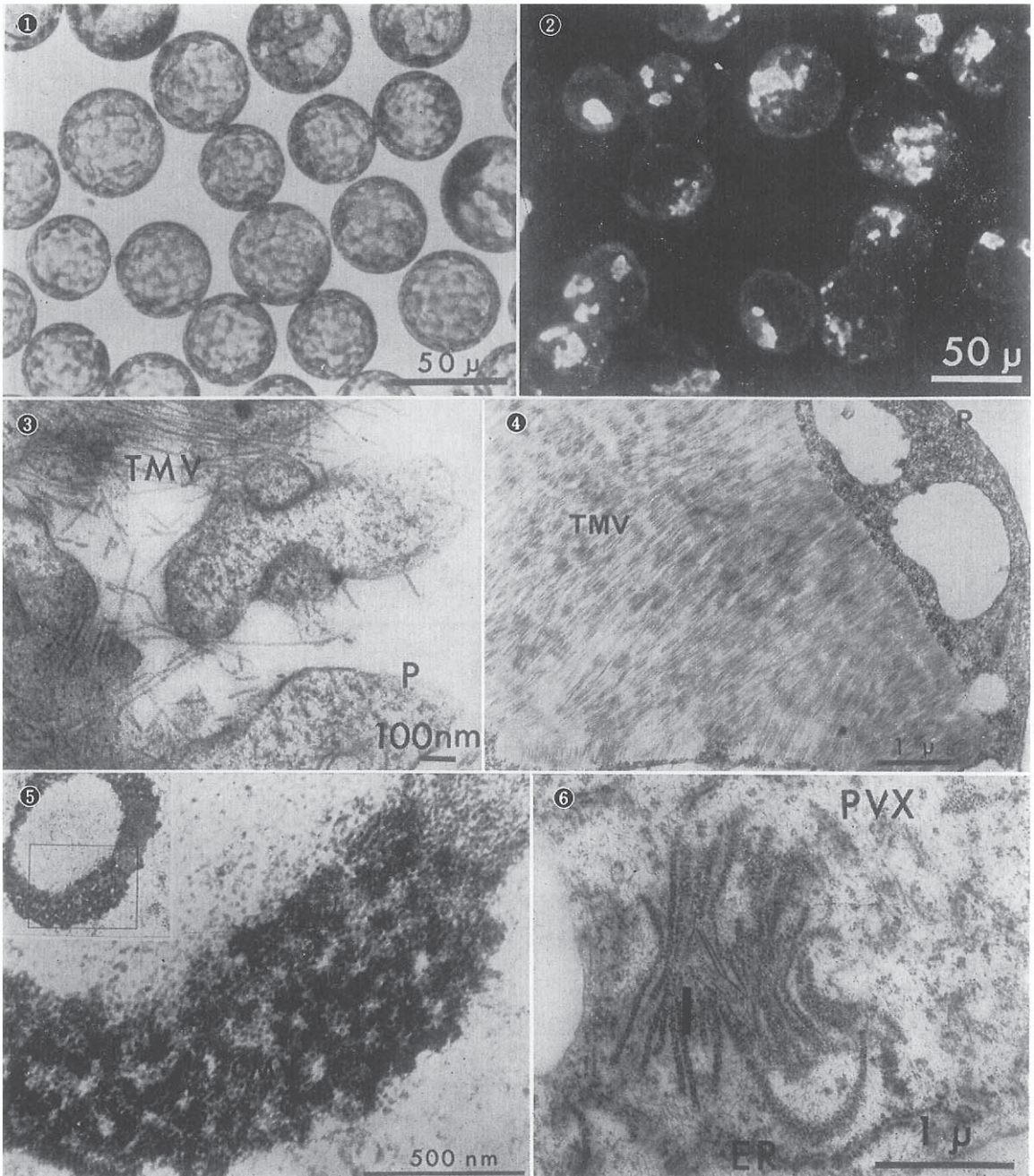
<写真説明>

- ① くろさび菌夏孢子からの枝分かれした発芽管 ② 2核性隔膜菌糸（フォイルゲン染色）
 ③ 枝分かれした菌糸 ④ 菌糸体
 ⑤ 培地上に形成された夏孢子堆の断面（クリスタル紫染色） a：接種源，b：夏孢子形成層
 ⑥ 形成夏孢子 ⑦ 形成冬孢子 [WILLIAMS ら^{40,41}原図]

—本文 18 ページ参照—

タバコ・プロトプラストのウイルス感染

農林省植物ウイルス研究所 大 槻 義 昭 (原図)



<写真説明>

- ① キサンチタバコ葉の柵状組織から得たプロトプラスト
- ② TMV 感染プロトプラストの蛍光抗体染色 (接種後 24 時間) (すべての細胞中に TMV 抗原の塊がある)
- ③ プロトプラストによる TMV の取りこみ (接種直後) (P: 原形質膜が波打っている。接種時以外は平坦である)
- ④ プロトプラスト内に集積した TMV (接種後 24 時間) (P: 原形質膜)
- ⑤ 核内の仁に集積した CMV (左上のわく内を拡大したもの) (接種後 24 時間)
- ⑥ PVX 感染により細胞質内に現われた封入体 (接種後 24 時間) (I: 封入体, ER: 小胞体)

特集：生体外培養

昆虫の細胞培養と細胞株の確立.....	三橋 淳.....	1	
昆虫の器官培養による内分泌学的研究.....	安居院宣昭.....	8	
昆虫の培養組織における分化.....	黒田 行昭.....	13	
絶対寄生菌の人工培養.....	浅田 泰次.....	18	
植物プロトプラストによるウイルス感染実験系の確立.....	大槻 義昭.....	23	
植物寄生性マイコプラズマ分離培養の問題点.....	奈須 壮兆.....	29	
組織培養によるウイルスフリー植物の育成.....	浜屋 悦次.....	34	
中央だより.....	40	協会だより.....	41
学界だより.....	39	人事消息.....	17, 22

豊かな稔りにバイエル農薬



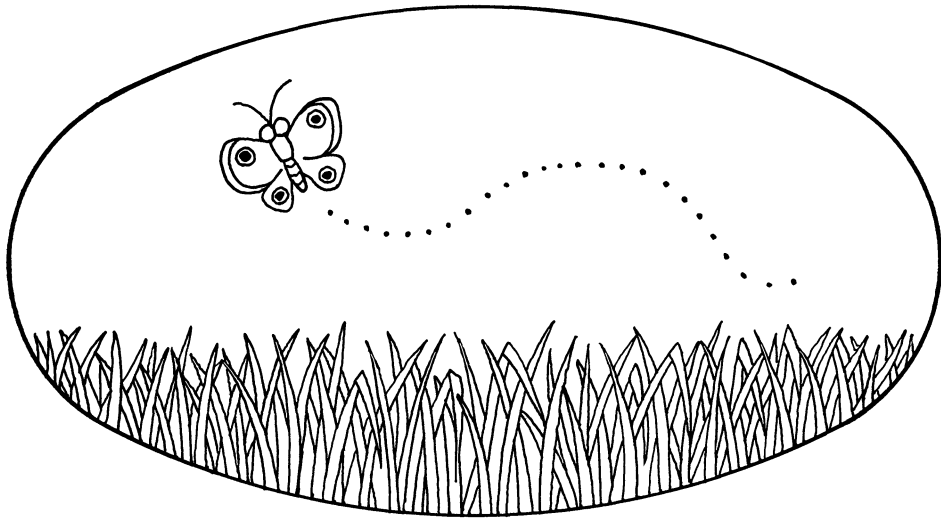
説明書進呈



日本特殊農薬製造株式会社
東京都中央区日本橋室町 2-8 ☎ 103



自然環境を守り、
もんがれ病を防ぐ安全農薬！



バリダシン[®] 粉剤 液剤

- もんがれ病菌の病原性をなくさせる
- 稲に葉害がなく増収効果が高い
- 稔実障害・減収・穂発芽助長など悪影響はありません
- 人・畜・蚕・魚・天敵に極めて安全
- 米にも土にも残らない

●いもち病・もんがれ病の同時防除剤

ラブサイドバリダシン[®] 粉剤

●水田害虫の総合防除に

パダン[®] 粒剤 4 **パダン[®] ミフシン 粒剤** **武田パダン[®] バツサ[®] 粒剤**

●そ菜の害虫に

パダン[®] 水溶剤 **武田 オルトラン[®] 水和剤 粒剤**

●園芸作物の基幹防除に

武田 ダコニール[®]

●そ菜・果樹病害に

デュボン ベンレート[®] 水和剤

●あらゆる雑草を速かに枯す

武田 グラモキソ[®]

●畑の雑草防除に

トリアリサイド[®] 乳剤

昆虫の細胞培養と細胞株の確立

農林省農業技術研究所 ^{みつ}三 ^{はし}橋 ^{じゆん}淳

はじめに

いわゆる組織培養法 (Tissue culture method) は更に三つの技法に分けることができる。第1は器官培養法 (Organ culture method) で組織や器官をそのままの形で体外で維持し、本来の機能を保たせるように配慮された培養法である。したがって異常な細胞の増殖や移動はできるだけ起こらないことが望ましい。第2は本来の組織培養法 (Tissue culture method) で、体外に取り出した組織の小片から、細胞の移住 (migration) や増殖 (proliferation) を促すものである。第3の方法は細胞培養法 (cell culture method) で、組織を構成する細胞を遊離して、ばらばらの状態で培養して増殖させ、無限に増え続ける細胞株 (cell line) を作ろうとするものである。

昆虫では GOLDSCHMIDT が 1915 年にセクロピア蚕の精子細胞の培養を行ったのが、組織培養法を用いた最初の研究といわれている。しかし、この研究は短期間の培養で精子細胞の分化を観察するのが目的で行われたものであり、昆虫の細胞を体外で増殖させて、細胞株を得ることは意図されていなかった。そして GOLDSCHMIDT の業績に続く数年間に行われた昆虫組織培養における初期の研究はすべて同様に短期間の培養に終始していた。昆虫組織に狭義の組織培養法を適用して、後の昆虫細胞培養発展の足がかりを作ったのは TRAGER (1935) である。彼は家蚕の卵巣組織を小さくきざんで移植片 (explant) とし、無機塩、糖、卵アルブミン、昆虫血液からなる培地で培養し、移植片からの細胞移住と、移住した細胞の有糸分裂 (mitosis) を得ている。そしてこのような増殖は約3週間保たれた。

彼の用いた培養法はその後 WYATT, GRACE らに受けつがれ、更に最近でも多くの研究者が同様の方法を用いて幾つもの細胞株を確立している。TRAGER は細胞の増殖を得はしたが、それを植えつぐ (subculture) までには至らなかった。

これを達成したのは GRACE (1958) である。彼は WYATT (1956) が開発した昆虫組織培養用の合成培地を更に改良し、野蚕の1種 *Callosamia promethea* の卵巣小片を培養し、細胞増殖を186日間保たせ、その間に6回の植えつぎを行うことができた。そして引き続いて GR-

ACE (1962) はついに昆虫で初めての細胞株を野蚕の1種 *Antheraea eucalypti* の卵巣小片培養から確立することに成功した。この細胞株は現在に至るも盛んに増殖を続け、世界各地の研究室に分与され、昆虫生理学、ウイルス学などの研究に用いられている。昆虫の細胞株を確立することは脊椎動物を材料とした場合より困難といわれているが、GRACE が昆虫細胞株を確立して以来は、着々と昆虫細胞株が確立されて来ている。しかし、脊椎動物に比べるとまだまだ確立された細胞株の種類も数も少なく、また、細胞株自体の性質も十分明らかにされていないので、気軽に実験材料として使うという状態には至っていないのが現状である。

I 培養法

脊椎動物組織培養では生体から取り出した組織を機械的または化学的処理によって、いきなりばらばらの細胞にまで遊離して培養することがよく行われている。しかし、昆虫の組織をこのように処理した場合は、培養後細胞が死滅することが多い。化学的に昆虫組織を遊離するためにはトリプシン、ヒアルロニダーゼ、プロナーゼ、EDTAなどが用いられるが、これらの処理が昆虫には有害だという報告もある (AIZAWA and VAGO, 1959)。そのため初代培養のために普通行われている方法は組織片培養 (explant culture) である。これは組織を小塊として植えこんで培養する方法で、この初代培養において、細胞が良く移住し、増殖したならば、それを植えついでいて、最終的に細胞株を確立しようとするものである。次にその方法を述べる。

まず材料とする昆虫の表面殺菌をする。卵を材料とする場合は表面殺菌だけで容易に無菌組織を得ることができが、幼虫、蛹、成虫などを材料とする場合は表面殺菌だけでは無菌組織を得難い場合があるので、できれば無菌飼育した昆虫を材料とすることが望ましい。表面殺菌には70% アルコール、0.1% 昇コウ水がよく用いられるが、そのほかリゾール、ハイアミン、マーゾニン、過マンガン酸カリ、過酸化水素なども用いられるし、殺菌燈の紫外線を利用することもできる。

次に材料を解体して目的の組織または器官を取り出す。材料が小さい時には滅菌した解剖皿に滅菌した塩類溶液を満し、その中で解体するとやりやすい。昆虫は小

さいので1個体から得た組織または器官だけで一つの培養をつくり上げることはまず不可能で、多くの場合何個体もから集めた同じ組織あるいは器官をいっしょにして培養する。そのため、取り出した組織または器官は十分な量に達するまで、滅菌塩類溶液中にためておく。塩類溶液としては CARLSON(1946) によって改良された RINGER-TYRODE 氏が良く使われている。これは元々はバッタの神経芽細胞のために作られたものであるが、多くの昆虫組織に利用しうる。その組成を第1表に示す。双翅目昆虫の卵などのように、非常に小さくてしかも多量のもを一時に扱うには、培養液中に卵を浸し、ホモゲナイザーで軽く卵をつぶして、ステンレスメッシュでこし、卵殻を除いて細胞の小塊をうる方法がとられる。

第1表 RINGER-TYRODE 氏液の組成

NaCl	0.7 g	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 g	NaHCO ₃	0.012 g
NaH ₂ PO ₄	0.02 g	グルコース	0.8 g
KCl	0.02 g	H ₂ O	100 ml

NaHCO₃ とそれ以外のものは別々に 10 倍濃度の stock solution を作っておき、使用前に混合すると良い。

取り出した組織は次に 1 mm³ 内外に細切され、そのまま培養に移されるか、あるいは培養びんのガラスに対する付着性を良くするために軽くトリプシンなどで処理した後、培養に移される。この場合のトリプシン処理は細胞をばらばらにするためのものではないので、組織表面がべたつき始めたら止める。この処理により組織表面の細胞間結合がゆるめられるためか、培養に移した後、細胞移住が促進されることがある。血球のようにもともと遊離している細胞を培養する場合は、初めから単層培養 (mono layer culture) を行うことになる。昆虫血液はチロシナーゼを含んでいるので、血液ごと培養にもちこむとじきにメラニンが形成され、血球細胞が死滅してしまう。そこで血球を培養する場合はチロシナーゼ阻害剤を加えたり、遠心などによって血球をよく洗ったりしてから培養に移す。血球は培養容器の底に付着伸展して単層を形成する (口絵写真 ①)。

培養容器には特に制限はないが、扱う組織の量によっておのずから大きさが決ってくる。ホロースライドを使った懸滴培養 (hanging drop culture) は少量の組織で培養を始めるのに適した容器であるが、細胞培養が長期間培養を目指すものであり、したがって初代培養において何回も培地の交換を行わなければならないことを考えると、あまり適当な容器とはいえない。材料がある程度得られるならば、カレルフラスコ、TD 型培養びん、角

型培養びん、シャーレなどのできるだけ小さいものを使ったほうがやりやすい。市販されている培養容器にはガラス製のものプラスチック製のものがあるが、どちらも使用できる。

培地は組織培養を行う際の最も重要な要因であることはいうまでもない。培地の性状としてはその化学的組成が重要であるばかりでなく、その物理的性状も問題となる。初期のころの昆虫組織培養においては、培地として昆虫血液そのもの、あるいは簡単な塩類溶液に組織抽出物を加えたものなどが主として用いられた。その後脊椎動物組織培養で使われる培地に手を加えたりして試行錯誤的にいろいろな培地が作られて来た。昆虫組織培養用の合成培地を作ったのは S.S. WYATT (1956) が最初で、彼女は夫君の G. R. WYATT 氏ら (1956) が分析した数種昆虫の血液の化学的組成を元にして、独特のアミノ酸組成をもつ昆虫組織培養用の培地を作り上げたのだった。その後、WYATT 培地を元にして、あるいはまた独自に種々の合成培地が発表され、現在は合成培地の時代となっている。合成培地は大きく分けて無機塩、糖、アミノ酸、有機酸、ビタミンから成り、それに最終的に昆虫血液、または脊椎動物血清などを添加して使用するのが普通である。無機塩としては RINGER 氏液のように NaCl を主体とするものと、NaCl を用いず MgSO₄、MgCl₂、KCl などを主体とするものがあるが、材料とする昆虫により、どちらでもよいもの、無機塩組成特に Na/K 比に敏感なものがあるようである。糖としては、グルコースだけあれば十分のようである。一般にはそのほか果糖、ショ糖が良く用いられる。昆虫の血糖の主体をなすトレハロースはほとんど効果がないようである。アミノ酸は 20 数種が用いられている。その組成は WYATT 培地のそれに基づいているものが多い。昆虫の血液はヒトの血液のおよそ 70 倍のアミノ酸含有率を含んでいることから、脊椎動物用培地に比べ多量のアミノ酸が用いられている。個々のアミノ酸を用いる代わりにアルブミンの加水分解物などを用いることも行われている。WYATT (1956) はコハク酸、フマル酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸を組織発育を増進させるものとして培地に加えたが、その後もこれらの四つの有機酸がしばしば用いられている。そのほかクエン酸、乳酸、脂肪酸などを加えた例もあるが、効果は不明である。ビタミンとしては主として B 群の 10 種のビタミンが用いられている。WYATT の培地にはビタミンが純粋の形で加えられておらず、ビタミン添加は GRACE (1958) 以来行われるようになった。B 群以外のビタミンを加えた例もあるが効果は不明である。個々のビタミンを加える代わりに酵母抽出

物を用いることもしばしば行われている。以上の合成培地に昆虫血液を添加する場合、血液をそのまま加えるとチロシナーゼの作用でメラニンが形成され、それが培養にとって有害となるので、一般に集められた昆虫血液を60°Cで5分間熱処理してチロシナーゼを失活させる方法がとられている。脊椎動物の血清としてはコウシ血清、ウシ胎児血清が良く使われている。後者のほうが効果があるように思われる。培地に抗生物質を加える場合は、細菌類に対してはペニシリン、ストレプトマイシン、真菌類に対してはマイコスタチン、アンフォテリシンBなどが用いられている。培地のpHは通常6.0~7.0の範囲に決められる。昆虫の細胞は脊椎動物細胞のようにpHの変動に対してあまり敏感でないようである。培地の物理的性状としては液の粘度、浸透圧が重要な要因である。培地の粘度が低いと細胞がガラス面に付着しにくいといわれている。培地の粘度を上げるためには、ホリビニールピロリドン、メチルセルロースなど生理的に不活性な物質が用いられている。培地の浸透圧は材料とする昆虫の血液の浸透圧と等しいことが望ましい。浸透圧はショ糖の濃度を加減することにより調節することができる。第2表に昆虫組織培養用培地の数例を示す。

培養は通常25~30°Cの範囲で行われる。光は直射日光を避ければ、特に制御する必要はない。培養びんの中の気体は通常の空気ですべて、特に酸素を補強する必要はないようである。密閉された培養びんでも、特にガス交換を行う必要はない。培養中培地は週1回くらいの割合で更新する。その場合培地の全量を更新せずに半量くらいを更新するほうが細胞に良い影響を与える。

初代培養で細胞が十分増殖したら、それを更に大きい培養びんに移すか、二つ以上の培養びんに分割しなければならない。そのために植えつきを行う必要が生じる。

植えつき法には細胞が増殖する様式により次の2種類がある。まずガラスに付着せず培地中に懸濁した形で増殖する細胞の培養では、培養びんを振ると白く濁った均一な細胞浮遊液が得られるので、それをピペットで移し、新しい培地を加えるだけでよい。しかし、ガラスに密着して増殖する細胞の培養の場合は手技はやや面倒になる。ガラス面に軽く付着しているだけの細胞はピペットで培地を吹きつけるとはがれてくるが、しっかりとくっついている細胞に対しては、まず培地をすてて細胞をCa⁺⁺、Mg⁺⁺を含まない塩類溶液で洗ってから、トリプシン、トリプシンとEDTAの混合液などで処理する。室温で15分くらい処理すると細胞はガラスからはがれやすくなって、位相差顕微鏡でみると、扁平であった細胞が球状を呈してくるので、この時期にトリプシン液と

等量の培地を加えてトリプシンの作用を止め、ピペットで培地を細胞表面に吹きつけると簡単にはがれて白濁した細胞浮遊液となる。この方法でもガラスからはがれない細胞には、ゴムの小片でガラス面をこすって細胞をこすり取る方法もある。得られた細胞浮遊液は遠心機にかけて上清をすて細胞を新しい培地に懸濁して、新しい培養びんに移す。植えつきの際注意しなければならないのは、植えつきにより極端に細胞の密度を下げると細胞が死滅することで、したがって大きな培養びんに移す時は、いろいろな大きさのびんを用意し、徐々に大きなびんに移して行くようにすると良いし、また、分割する際は細胞数を考えて一定密度を下回らないように分割しなければならない。

II 初代培養における細胞の増殖

移植片培養により初代培養を始めるとまず見られることは移植片からの細胞の移住である。これは移植片の組織を構成していた細胞が培地中に遊出してくるもので、移植片の周囲に見られる細胞数が増加するので、一見細胞が増えたように見えるが、真の増殖ではない。移植片から出てくる細胞には通常上皮状細胞 (Epithelial-like cell)、繊維芽状細胞 (Fibroblastic cell) 及び遊走細胞 (Wandering cell) の三つの型が区別される。上皮状細胞はタイルを敷きつめたような単層の細胞層 (cell sheet) を形成する (口絵写真②)。繊維芽状細胞は通常紡錘形でその両端でのみ他の細胞と接触し、網目状構造を形成する (口絵写真③)。遊走細胞は細胞どおし接触せず、ばらばらに分散し、微速度映画撮映をすると、他の型の細胞より活発にアメーバ状運動をして動き回ることが分かる (口絵写真④)。これらの異なった型の細胞は、同時に一つの移植片から出てくるので、移植片の周囲のある部分には上皮状細胞の cell sheet、他の部分には繊維芽状細胞の net work 更にそれらの外側、あるいはそれらの上に遊走細胞が分散してみられることがある。

細胞移住に続いて細胞分裂が起こる。細胞分裂が観察されて初めて真の増殖が確認されるわけである。細胞分裂は通常有糸核分裂によるものであり、顕微鏡下では核内に染色体が形成されるころから識別され、中期で染色体が赤道板上に並ぶところは真横から観察されるので一つの短い直線として認められる。この短い線はやがて2本に別れ細胞の両端にひかれ、その間にくびれが入って細胞が2分される (口絵写真⑤)。ガラスに付着して扁平になっていた細胞も、分裂の時は厚みを増し球形に近い形をとるので、一見細胞が小さくなったように見える。

通常大部分の細胞はガラスに付着して増殖するし、ガ

第2表 昆虫組織培養用培地の組成 (mg/100 ml)

報告者	GRACE	FLANDER et al.	SCHNEIDER *	MITSUHA- SHI	KITAMURA	MARKS *	MITSUHA- SHI
年号	1962	1962	1964	1967	1970		1972
培地名	G. M. A.	Bm-22		CSM-2F	M41	M-18	MGM431
適用昆虫名	一般	カイコ	シヨウジ ヨウバエ	鱗翅目昆虫	カ	ゴキブリ	鱗翅目昆虫
NaCl			210		520	100	
NaH ₂ PO ₃						40	
NaH ₂ PO ₄	144 ^b	120	70	50 ^a		20 ^a	95.8 ^b
NaHCO ₃	35		40		8	30	29.2
Na ₂ SO ₄						30	
KCl	224	300	160	120	40	40	187.5
KH ₂ PO ₄					8		
K ₂ HPO ₄			45				
CaCl ₂	100	100 ^b	60	40 ^b	8 ^b	45 ^b	83.3
MgCl ₂	228 ^c	300 ^c		120 ^c		40 ^c	191.7 ^c
MgSO ₄	278 ^d	400 ^d	370 ^d	160 ^d			233.3 ^d
グルコース	70	150	200	80	160	2,000	333.3
フルクトース	40			80			41.7
スクロース	2,668					1,000	2,208
トレハロース			200			300	
リンゴ酸	67		10			50	55.8
α-ケトグルタル酸	37		20			30	30.8
コハク酸	6		10			30	5.0
フマル酸	5.5		10			10	4.6
クエン酸						10	
α-アラニン	L 22.5					L 1.0	L 26.3
β-アラニン	20		50			20	16.7
アルギニン	L 70		L 40			L 100 ^e	L 58.3 ^e
アスパラギン酸	L 35		L 40			L 40	L 29.3
アスパラギン	L 35					L 30	L 29.3
システイン			L 6				
シスチン	L 2.5		L 10			L 11.3 ^e	L 2.1
グルタミン酸	L 60		L 80			L 100	L 50.0
グルタミン	L 60		L 180			L 100	L 50.0
グリシン	65		25			60	54.2
ヒスチジン	L 250		L 40			L 66.1 ^{a,e}	L 208.3
イソロイシン	L 5		L 15			L 10	L 4.2
ロイシン	L 7.5		L 15			L 20	L 6.3
リジン	L 62.5		L 165 ^e			L 20 ^e	L 52.1
メチオニン	L 5		L 80			L 30	L 4.2
フェニールアラニン	L 15		L 15			L 10	L 12.5
プロリン	L 35		L 170			L 50	L 29.2
セリン	DL 110		L 25			L 20	DL 91.7
トレオニン	L 17.5		L 35			L 10	L 14.6
トリプトファン	L 10		L 10				L 8.3
チロシン	L 5		L 50			L 16.6	L 4.2
バリン	L 10		L 30			L 30	L 8.3
チアミン塩酸塩	0.002					0.002	0.016
リボフラビン	0.002					0.002	0.016
ピリドキシン塩酸塩	0.002					0.002	0.016
ニアシン	0.002					0.002	0.016
パントテン酸カルシウム	0.002					0.002	0.016
ビオチン	0.001					0.001	0.008
葉酸	0.002					0.002	0.016
イソイノシトール	0.002					0.002	0.016
パラアミノ安息香酸	0.002					0.002	0.016
塩化コリン	0.02			40		0.02	0.16
カルニチン塩酸塩						0.001	

が生体内にあった時と同じ状態ではないということを心にとめておく必要がある。

確立された細胞株は安定した増殖を示すのが普通である。増殖の速さは通常細胞数が2倍になるのに要する時間 (population doubling time) を以て表わされる。昆虫の細胞では10数時間から数日間である。昆虫細胞株は決った温度条件で培養する必要はないので、培養の温度条件により増殖速度は当然変わってくる。前ページの図に数種の昆虫細胞株の増殖曲線を示した。

昆虫細胞株は1962年にGRACEによって初めて確立されて以来、特に近年は続々と確立され、40数種に及んでいる。その一覧表を第3表に示す。カ由来の細胞株が多いのはカによって媒介されるアルボウイルスの研究のために医学関係の研究者が多勢力の細胞培養にとりくんだ結果である。また、鱗翅目昆虫の卵巣由来の細胞株が多いのはTRAGER(1935)以来、卵巣組織は培養しやすい

組織として多くの研究者により培養された結果である。

分離された1個の細胞を元にして、それを増殖させてつくり上げられた細胞系はクローン (clone) と呼ばれている。昆虫細胞からも幾つかのクローンが分離されている。植えつぎの所で述べたとおり、一般に細胞は密度を極端に下げると増殖しなくなるから、分離された単一細胞を増殖させるにはいろいろな方法が工夫されている。例えば密度を下げると増殖が悪くなるのは細胞が細胞自体の増殖を促進するような物質を培地中に分泌していて、密度を下げることによりその物質が極端に希釈されるためとも考えられるので、単一細胞を培地の微小滴やキャピラリーの中にとじこめたり、また、多数の細胞を放射線処理して増殖を止めてその上に単一細胞を植えたり、多数の細胞を一定期間培養し、細胞の代謝物を豊富に含んでいる conditioned medium を用いたりする。細胞株は何種類もの型の細胞を含んでいる場合が多いが、

第3表 昆虫細胞株一覧表

株名	起 源			染色体数	報告者 (年号)
	種 名	発育ステージ	組織		
A.e.	<i>Antheraea eucalypti</i>	休眠蛹	卵巣	約100(4n)	GRACE(62)
	<i>Aedes aegypti</i>	終令幼虫	全体	48または96	GRACE(66)
	<i>Drosophila melanogaster</i>	胚 子	全体	8(2n)	HORIKAWA et al.(66)
	<i>Bombyx mori</i>	成熟幼虫	卵巣	>100	GRACE(67)
Cs-16-CIV	<i>Chilo suppressalis</i>	休眠幼虫	血球		MITSUHASHI(67)
A.c.	<i>Agallia constricta</i>	胚 子	全体		CHIU & BLACK(67)
ATC-10	<i>Aedes aegypti</i>	1令幼虫	全体	6(2n)	SINGH(67)
ATC-15	<i>Aedes albopictus</i>	1令幼虫	全体	6	SINGH(67)
CED	<i>Drosophila melanogaster</i>	胚 子	全体	>100	ECHALIER & OHANESSIAN(68)
EPa	<i>Periplaneta americana</i>	胚 子	全体	(poly-n)	LANDUREAU(68)
As-1	<i>Aceratagallia sanguinolenta</i>	胚 子	全体		CHIU & BLACK(69)
	<i>Anopheles stephensi</i>	1令幼虫	全体	6	SCHNEIDER(69)
KC	<i>Drosophila melanogaster</i>	胚 子	全体	8	ECHALIER & OHANESSIAN(69)
Mos 20, 20A, 29	<i>Aedes aegypti</i>	1令幼虫	全体	6	VARMA & PUDNEY(69)
67j25D, 67j25A	<i>Drosophila melanogaster</i>	胚 子	全体	8, 8±α	KAKPAKOV et al.(69)
59 & 364	<i>Aedes aegypti</i>	胚 子	全体	7	PELEG(69)
CP-1268, CP-169	<i>Carpocapsa pomonella</i>	胚 子	全体	52~57	HINK & ELLIS(70)
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	成 虫	卵巣	6	Hsu et al.(70)
IMC-HZ-1	<i>Heliothis zea</i>	成 虫	卵巣		HINK & IGNOFFO(70)
TN 368	<i>Trichoplusia ni</i>	成 虫	卵巣	82~95	HINK(70)
ATC 121	<i>Culex molestus</i>	成 虫	卵巣	6	KITAMURA(70)
	<i>Aedes vittatus</i>	幼 虫			BHAT & SINGH(70)
	<i>Samia cynthia</i>	休眠蛹	血球		CHAO & BALL(71)
	<i>Culista inornata</i>			(poly-n)	McHALE & SWEET(71)
	<i>Aedes vexans</i>			190	McHALE & SWEET(71)
Mos 43	<i>Anopheles stephensi</i>	1令幼虫	全体	6	PUDNEY & VARMA(71)
	<i>Colladonus montanus</i>	胚 子	全体		RICHARDSON & JENSEN(71)
	<i>Malacosoma disstria</i>	幼 虫	血球		SOHI(71)
	<i>Culex tritaeniorhynchus summorosus</i>	成 虫	卵巣	6	Hsu et al.(72)
	<i>Drosophila melanogaster</i>	胚 子	全体		SCHNEIDER(72)
GM, GM ₂ , GM ₃	<i>Drosophila melanogaster</i>	胚 子	全体	8	MOSNA & DOLFINI(72)
Mos 55	<i>Anopheles gambiae</i>	1令幼虫	全体	6	MARHOUL & PUDNEY(72)
	<i>Culex pipiens</i>	胚 子	全体	6	CHAO & BALL(73)
Px58, Px64	<i>Papilio xuthus</i>	蛹	卵巣		MITSUHASHI(73)
ATC 89, 91	<i>Anopheles albopictus</i>	幼 虫	全体	6	BHAT(73)

クローンはそれに比べるとはるかに斉一な細胞集団ということができる。しかし、クローンも長い間培養するうちには変異した細胞が現われて来て、細胞集団は heterogeneous となる。したがって細胞株を実験に用いるに先立ってクローン化し材料の均一化を計ることが行われている。昆虫細胞のクローンとしては GRACE の *Anthe-raea eucalypti*, *Aedes aegypti* 株細胞のクローン、LANDUREAU のワモンゴキブリ株細胞のクローン、ECHALIER のショウジョウバエ株細胞のクローンなどがある。

確立された細胞株やクローンを微生物の混入から守りながら常時植えついで維持していくことは容易なことではない。そこで使用しない細胞を増殖させずに生かしたまま保存させる方法が考えられている。いずれも低温による保存であるが、数か月の保存ならば昆虫の細胞はそのまま 5°C の冷蔵庫に入れておくだけで保存できる。ただし、この場合保存期間が長くなると、後に培養に戻したとき細胞が元の増殖率を回復するのに時間がかかる。更に長期間保存する場合は凍結して超低温に保存する。この場合は培地に 10% のグリセリンまたはジメチルスルフォキシドを入れ氷の形成による機械的障害から細胞を保護する。凍結した細胞は一般に -80°C 以下で保存される。この方法によると数年間保存が可能である。培養再開のときはできるだけ急速に融解することが重要であるといわれている。

おわりに

現在最も頻々に実験材料として用いられている昆虫細胞株は SINGH のヒトスジシマカの細胞株である。これはいうまでもなくアルボウイルスの研究のために用いられているものである。この細胞株に限らず、虫媒性動物ウイルス、虫媒性植物ウイルス、昆虫ウイルスなどウイルス学の研究に昆虫細胞株を利用している例は多い。ウイルスばかりでなく、その他の病原性微生物あるいは共生微生物などの研究にも利用された例がある。遺伝的によく調べられているショウジョウバエの細胞株は細胞遺伝学にとって恰好な材料である。双翅目昆虫は染色体数が少ないので、その培養細胞の核型も良く調べられており、脊椎動物細胞との交雑も試みられている。一方、細胞株そのものの生理的特性などもいろいろ調べられている。しかし、まだ昆虫細胞が確立されてから年限が浅いのと、それぞれの株についてその特性が十分明らかにされていないので、まだ思うように望む細胞株を利用できる態勢にはなっていない。すでに 40 数種の株が確立されているとはいえ、まだまだもっと多くのいろいろな種類の昆虫細胞株が確立される必要が痛感される。

引用文献

- AIZAWA, K. et al. (1959) : C. R. Acad. Sci. 249 : 928.
 BHAT, U. K. M. (1973) : Curr. Sci. 42 : 66.
 ——— et al. (1970) : ibid. 39 : 388.
 CARLSON, J. G. (1946) : Biol. Bull. 90 : 109.
 CHAO, J. et al. (1971) : Curr. Top. Microbiol. 55 : 28.
 ——— et al. (1973) : In vitro 8 : 406.
 CHIU, R. J. et al. (1967) : Nature 215 : 1076.
 ——— et al. (1969) : Virology 37 : 667.
 ECHALIER, G. et al. (1968) : 2nd Intern. Colloq. Invert. T. C. : 174.
 ——— et al. (1969) : C. R. Acad. Sci. D-268 : 1771.
 FLANDRE, O. et al. (1962) : ibid. 255 : 1654.
 GOLDSCHMIDT, R. (1915) : Proc. Nat. Acad. Sci. 1 : 220.
 GRACE, T. D. C. (1958) : J. Gen. Physiol. 41 : 1027.
 ——— (1962) : Nature 195 : 788.
 ——— (1966) : ibid. 211 : 366.
 ——— (1967) : ibid. 216 : 613.
 HINK, W. H. (1970) : ibid. 226 : 466.
 ——— et al. (1971) : In Vitro 6 : 230.
 ——— et al. (1970) : Exp. Cell Res. 60 : 307.
 HORIKAWA, M. et al. (1966) : Nature 210 : 183.
 HSU, S. H. et al. (1972) : J. Med. Ent. 9 : 86.
 ——— et al. (1970) : ibid. 7 : 703.
 KAKPAKOV, V. T. et al. (1969) : Genetika 5 : 67.
 KITAMURA, S. (1970) : Kobe J. Med. Sci. 16 : 41.
 LANDUREAU, J. C. (1968) : Exp. Cell Res. 50 : 323.
 MARHOUL, Z. et al. (1972) : Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 66 : 183.
 McHALE, J. S. et al. (1971) : Curr. Top. Microbiol. 55 : 42.
 MITSUHASHI, J. (1967) : Nature 215 : 863.
 ——— (1972) : Appl. Ent. Zool. 7 : 39.
 ——— (1973) : ibid. 8 : 64.
 ——— et al. (1970) : Ent. Exp. Appl. 13 : 327.
 MOSNA, G. et al. (1972) : Chromosoma 38 : 1.
 PELEG, J. (1969) : Nature 221 : 193.
 PUDNEY, M. et al. (1971) : Exp. Parasitol. 29 : 7.
 RICHARDSON, J. et al. (1971) : Ann. Ent. Soc. Am. 64 : 722.
 SCHNEIDER, I. (1969) : J. Cell Biol. 2 : 603.
 ——— (1972) : J. Embryol. exp. Morphol. 27 : 353.
 SINGH, K. R. P. (1967) : Curr. Sci. 36 : 506.
 SOHI, S. S. (1971) : In vitro 6 : 389.
 TRAGER, W. (1935) : J. exp. Med. 61 : 501.
 VARMA, M. G. R. et al. (1969) : J. Med. Ent. 6 : 432.
 WYATT, G. R. et al. (1956) : J. Gen. Physiol. 39 : 853.
 WYATT, S. S. (1956) : ibid. 39 : 841.

昆虫の器官培養による内分泌学的研究

東京教育大学農学部 ^あ ^ぐ ^い ^の ^り ^あ
 安居院 宣 昭

はじめに

昆虫の器官培養は 1915 年 GOLDSCHMIDT がセクロピア蚕精細胞を血液中で培養し、その精子形成の過程を観察したことに端を発している。このように昆虫の諸器官を生体外に取り出して培養する器官培養法は、個体レベルでは解析の難しい複雑な昆虫の発育や分化に関係した生理現象を、より単純な環境でとらえることができるという特徴を持っている。特に脱皮や変態に伴う複雑な生理現象を支配しているホルモンの作用を調べるにあたってはそれが果たす役割は大きい。さて、器官培養法によって昆虫内分泌学の研究を進めるとき大切なことは次に述べる二つの問題をいかに解決していくかということであろう。すなわち一つはホルモンの標的器官を生体外に取り出して培養した場合いかにして長期間生体内と同じ状態で維持させるかということであり、もう一つはホルモン分泌器官を生体外でいかにして分泌する状態で維持させるかということである。これら二つの問題が克服されれば生体外でいろいろな標的器官とホルモン分泌器官とをいっしょに培養したり、あるいは近年の昆虫内分泌学の発展に伴って合成されるようになった脱皮ホルモンや幼若ホルモンを生体外で直接標的器官に作用させたりすることも可能となってくる。では以下、器官培養法を用いて明らかにされてきた昆虫の内分泌に関する研究を標的器官の側からとホルモン分泌器官の側の両面から筆者の研究室でなされてきた仕事をおりまぜて紹介していきたい。

I 標的器官の培養

1 成虫原基

成虫原基は昆虫が変態していく過程で著しく分化、発育する器官である。したがってこの器官は分化、発育を支配しているホルモンの働きを明らかにする上でかかる材料とされた。古くは KURODA & YAMAGUCHI (1956)らの研究で、最終令幼虫のキイロシヨウジウバエから取り出された複眼一触角原基は Cephalic complex (脳、神経球、環状腺などの頭部器官の複合体) とともに培養されると分化、発育が著しく促進されるという報告がある。このようなハエ類の成虫原基を用いた器官培養はその後も多くの研究者によってなされている。さて、

最近では培養した成虫原基に直接ホルモンを作用させその影響を調べた研究が多い。MANDARON (1973) は同じキイロシヨウジウバエの肢原基に数種の ecdysone 及びその類似化合物を作用させたところ、 α -ecdysone と inokosterone では肢原基が蛹の肢から成虫の肢にまで分化していくことを認めた。しかし、 β -ecdysone を処理した場合、不完全な分化にとどまるのみか、いったん α -ecdysone によって分化するように条件付けられた原基の分化も抑制されてしまうことを明らかにした。このことから彼はシヨウジウバエの生体内で本来ホルモンとして働くのは α -ecdysone であろうと考察している。しかし、 α -ecdysone は生体内においてはすぐに β -ecdysone に変換されてしまうことや、同じシヨウジウバエの実験で β 型が直接標的器官に働くことと主張する論文もみうけられるので標的器官に直接作用するホルモンが α か β かという問題については今後更に論議の必要がある。

幼若ホルモン (JH) が原基にいかん作用するかということも最近 CHIHARA & FRISTOROM (1973) によって調べられている。彼らはやはりキイロシヨウジウバエの肢原基を材料として実験を進めた。すなわち β -ecdysone の作用で原基は著しく分化するが、その分化は C_{18} セクロピア JH により抑制されてしまう。また、 β -ecdysone によって高められた RNA 合成も JH によって抑制されることを明らかにした。しかし、JH によるこれら抑制作用は可逆的なものであったとも述べている。

さて、鱗翅目昆虫の原基の培養については、OBERLANDER がハチミツガ幼虫の翅原基を用い、その分化にホルモンがいかん作用するかを調べている。すなわち GRACE の培地を用いて α -ecdysone、 β -ecdysone、inokosterone のいずれを作用させても原基の分化は促進されるが、 α -ecdysone のときのみ原基の DNA 合成は維持されたという。ところがこの合成は他の β などのホルモンによって停止されてしまうという。このことから彼は、生体内においては α -ecdysone がまず変態のための DNA 合成を促進し、次にこの α が β 型へとすぐに変換して DNA 合成を停止させ、その上で形態形成に働きかけるのでであろうと推論している (OBERLANDER, 1972)。一方、筆者ら (1969b) の実験からニカメイチュウ幼虫の翅原基に β -ecdysone を CSM-2F 培地中で作用させて

も分化の促進がみられた。この場合培養に用いる原基の発育ステージが重要で、終令中期の個体より取り出した原基が最も感受性が高く、これより若い終令1日目のものではホルモンの影響はほとんど認められなかった。また、中期以後の原基ではホルモンのない培地中でも分化が自動的に進んでしまうことが判明した。

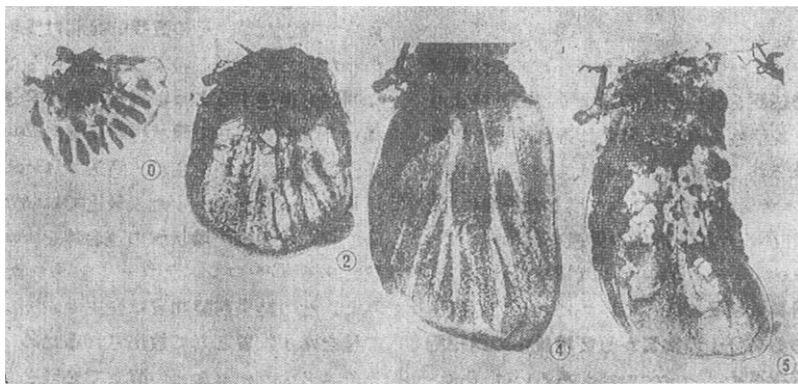
次に筆者らはヨトウムシの翅原基についてもホルモンの作用を調べたところ、同様にステージの違いによってホルモン感受性が著しく異なっていることが明らかとなった。また、処理する β -ecdysone の濃度が高いほど（高濃度は $30\mu\text{g/ml}$ 、一般には $0.3\mu\text{g/ml}$ くらいの濃度が適当な濃度であった）分化が起こり始めるまでに要する時間が短縮され、また、退化も早くおこり、ホルモン濃度が低いと分化もゆっくりとしかも生体内で起こる分化によく似た状態で進行することが分かった。更に β -ecdysone の代わりに前胸腺と翅原基をともに培養しても、また、一定期間前胸腺を培養した培地で原基を培養しても著しい分化が見られた。しかも前胸腺の数を多くした場合は高濃度の β -ecdysone で処理した場合と同じ分化の様子を示し、数個の前胸腺と原基をともに培養した場合には生体内に近い状態で分化していくのが観察された (AGUI & FUKAYA, 1973)。

以上紹介した幾つかの結果から一般に成虫原基の分化、発育には脱皮ホルモンが必要であることが実証されたが、種の違い、原基の種類の違い、更に発育ステージの違いなどによってホルモンの要求性もずいぶん違うことも明らかとなった。特に原基の分化に必要な本当のホルモンの α 型か β 型か、あるいは全然別のものかなどの問題については幾つかの矛盾した結果も報告されており、今後ますます論議されなければならない問題と思われる。

2 皮膚

皮膚の脱皮は脱皮ホルモンの働きで起こる現象であるが、そのときの幼若ホルモンとのバランスいかんで脱皮のパターンが決定されることは個体レベルの実験からよく知られている。したがって皮膚の器官培養を通してホルモンの作用を調べることは昆虫内分泌学の分野で特に興味ある事柄の一つである。

培養した皮膚が皮を脱いだという事柄については1967年にイタリアの MICIARELLI らによってバッタの皮膚片を使った実験で初めて報告されている。このときは生体外で直接脱皮ホルモンを作用させたというわけではなく、脱皮期に入った皮膚の脱皮完了までの過程を生体外の培地中で経過させたにすぎなかった。筆者らはカイコを初めてとして種々の鱗翅目昆虫の皮膚の培養を試み、まずニカメイチュウ幼虫の皮膚片にホルモンを直接作用させて脱皮を起こさせることに初めて成功した (AGUI et al., 1969 a) (後にヨトウムシ、アワノメイガなどでも成功している)。このときの方法は、ニカメイチュウ終令幼虫の腹部背側から関節ごとに皮膚を切り取り生理食塩水でよく洗った後に脱皮ホルモン (ED_{50} β -ecdysone $0.04\mu\text{g/ml}$) の溶かされた培地に移す。すると非休眠幼虫より切り取った皮膚片では感受性が高くほぼ 24 時間後には脱皮する。一方、休眠の深い幼虫から取った皮膚では 48 時間後には脱皮を完了することが明らかとなった。培地としては三橋 (1968) の CSM-2F、GRACE の培地などが極めて皮膚の維持には好適であったが、脱皮の誘起に関するかぎり RINGER-TYRODE 液中でも必要濃度のホルモンが溶かされていれば脱皮することが認められた。このようにホルモンを生体外で作用させて脱皮を起こさせた皮膚の形態を調べたところ、ホルモン処理後短時間に真皮細胞は容積を増し、endocuticle が溶解し、新しい



第1図 β -ecdysone ($0.3\mu\text{g/ml}$) を含んだ GRACE の培地中で培養したヨトウムシ翅原基の分化
0~5 は培養日数を示す。4 日後には分化はピークに達し、5 日後では退化が始まる。

epicuticle と endocuticle の形成が観察された。更に休眠幼虫の皮膚片が生体外で脱皮するときの核酸、タンパクの合成などをアイソトープで調べた結果、RNA 合成はホルモン処理後 48 時間でピークとなり、DNA 合成は数日間の培養期間を通してほぼ一定の値を示し、タンパク合成にいたっては RNA 合成の高いときにはその値は低く RNA 合成が下がると逆に高くなるという、生体内でみられる知見とよく一致した。そこでこのような脱皮をみちびくためにはどれくらいの時間ホルモンの作用があればよいかを調べてみた。その結果 5~6 時間ホルモン作用を受ければ皮膚は脱皮することが明らかとなった。しかも初めに 3 時間ホルモンを作用させ 4 日後に再度 3 時間作用させても 24 時間後には脱皮が誘起された。このことは脱皮に対するホルモンの作用が単なる引き金のものでないことを示唆する結果と思われる。一方、一度脱皮させた皮膚をホルモンの含まれていない培地で 4 日間放置した後に古い Cuticle をピンセットで取り去り、再びホルモンの含まれた培地に移してみた。驚いたことに新しく形成された皮膚がまた脱皮をした。なんと生体外で 2 度の脱皮をさせることが可能となったのである(安居院, 未発表)。また、このようにニカメイチュウの皮膚片が使用培地のいかに問わず脱皮ホルモンが一定濃度以上存在すれば必ず脱皮することが確実となったので、このような系を応用して脱皮ホルモンの定量的な検定法も確立することができた。すなわち活性未知のホルモンが溶けている培地とホルモン濃度があらかじめ分かっている培地に同一個体より切り取った皮膚片をおのおの培養し、一定時間後に互いに脱皮率を比較する方法である (AGUI, 1973 a)。このような検定法によってヨトウムシの終令幼虫から蛹に至るまでの各ステージの前胸腺の活性も生体外で β -ecdysone 相当量として調べることが可能となった (AGUI & YAGI, 1973)。

3 生殖器官

SCHMIDT & WILLIAMS (1953) はセクロビア蚕休眠蛹より取り出した精細胞を成虫分化の始まっている蛹より取った脱皮ホルモン活性の高いと思われる血液中で培養すると精子が形成されると報告している。一方、YAGI ら (1969) はニカメイチュウ幼虫より取り出した精巢に β -ecdysone を直接作用させ精子形成の促進を認めている。ところが KAMBYSELLIS & WILLIAMS (1971) はシンジュ蚕の休眠蛹の精巢の培養によって培地にまぜた血液中に含まれているある高分子の物質が直接精巢中の精細胞に働いて精子形成を進め、 α -ecdysone あるいは β -ecdysone などは精巢被膜に作用して高分子の物質の通りをよくするために働くことを報告している。しかし、筆者の研

究室の福島ら(未発表)の実験によると、ヨトウムシ及びハスモンヨトウの精巢に血液の混っていない化学組成のはっきりしている GRACE の培地中で α -ecdysone (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を作用させると精子形成は進み、 β -ecdysone (0.5~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ではその効果は認められないことを確認している。このことは α -ecdysone のみが直接精巢被膜と精細胞に作用して精子形成を促進させる点、また、高分子物質がなくても精子形成が起こりうる点で、大変興味深い結果である。更に八木ら(未発表)は、カイコの精細胞を血液をまぜた GRACE の培地で培養すると分化は進行するが、この培地中で 5 令 0 日目のカイコのアラタ体を一定期間培養した後に精細胞を培養したり、直接 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の C_{18} セクロピア JH をまぜたりするとその分化は完全にとまってしまうことを明らかにした。

さて卵巣を器官培養してホルモンの作用を調べた実験報告も少なくない。例えばチャイロコメゴミムシグマシ (LAVERDURE, 1969)、ハチミツガ (SHIBUYA & YAGI, 1972) などの卵子形成に対する脱皮ホルモンの作用を調べた報告がある。この場合特に卵巣の発育がある程度進行していないとホルモンの効果がないということである。一方、JH は生体内で卵黄タンパクの合成、蓄積に関係すると一般に認められているが、このことについて ADAMS & EIDE (1972) はイエバエの卵巣を器官培養しそこに JH 類似化合物を作用させ直接証明している。しかし、この場合 200~1800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という高濃度の JH 類似化合物を必要としている。したがって今後不溶性の JH をいかに培地に溶解させ、かつ標的器官にとりこませるかということを検討する必要がある。

II ホルモン分泌器官の培養

1 環状腺、前胸腺、アラタ体

環状腺、前胸腺はともに脱皮ホルモンの分泌器官と考えられてきたが、その直接的証明は長い間なされていなかった。ところがこのような昆虫内分泌学にとって重要な問題も後述するように器官培養の発達によって解決されたのである。さて環状腺の培養については先に述べたように原基の分化をさぐる意図で Cephalic complex を培養した研究が多かった。最近では WILLIG ら (1971) がクロバエの脳-環状腺の連合体を ecdysone の前駆物質である C_{14} -コレステロールを入れた培地で培養を試みた。その結果前駆物質は脱皮ホルモンのグルコサイドの型を示す物質として放出されるため α -グルコシターゼやエステラーゼなどの酵素で処理をしないとほとんどホルモン活性が高まらなると報告している。この報告では環状腺以外に脳などもともに培養しており、更に化学

分析が不十分な点などもあって分泌物の化学構造についてなら結論することはできない。そこで脳—環状腺などの複合器官でない独立した脱皮ホルモン分泌器官だけを取り扱うことが必要である。鱗翅目昆虫の前胸腺はその点では独立した分泌器官である。KAMBYSELLIS & WILLIAMS は前述のようにシンジュ蚕の終令吐糸 1 日目の個体より取り出した前胸腺を血液の入った培地で精巢とともに培養すると前胸腺から放出されたホルモンが精巢の膜の透過性をよくするように働くと述べている。更に筆者らによるとヨトウムシの終令 6 日目の個体より取り出した前胸腺を GRACE の培地、CSM-2F 培地、RINGER-TYRODE 液中で 48 時間培養し、その後培地のみを回収して、回収した培地中にニカメイチュウの皮膚片を入れホルモン活性を検定すると 2 日後にはほとんどの皮膚片が脱皮することを確認している (AGUI et al., 1972)。このことは前胸腺が 48 時間の培養で脱皮に必要な量のホルモンを放出したことを示しており、特に未知物質を多く含む血液をまぜない無機塩のみの RINGER-TYRODE 液を培養液としても十分なホルモンが放出されることが明らかとなっている。このことは前胸腺が脱皮ホルモンを分泌する器官そのものであることを示す結果と考えられる。さて、それでは前胸腺から放出される脱皮ホルモンは化学的にどんな構造を持つ物質なのであろうか。ごく最近、時を同じくして日本とアメリカの研究グループが前胸腺の器官培養によって集めた培地を化学分析して α -ecdysone と同定した。CHINO ら (1974) はカイコの吐糸 1 日目の前胸腺の培養から、一方、KING ら (1974) は tobacco hornworm の前胸初期の前胸腺からそれぞれ α -ecdysone を同定したのである。

幼若ホルモンの分泌器官であるアラタ体の培養については、RÖLLER & DAHM (1970) がハチミツガの終令幼

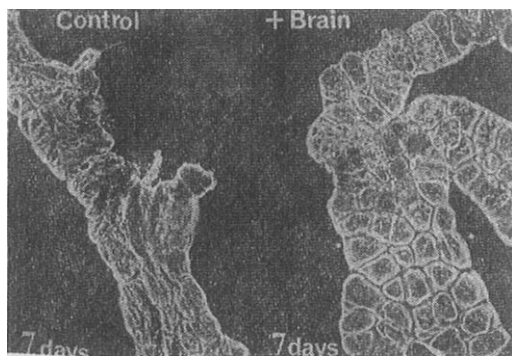
虫のアラタ体を器官培養し、培地中にセクロピア蚕の雄成虫の腹部で発見された C_{18} セクロピア JH と同一のホルモンを同定している。更に最近、アイソトープでラベルした数種類の JH 前駆物質がどのように JH へと生合成されるかを tobacco hornworm のアラタ体の器官培養を利用して調べた実験も報告されている (SCHOOLEY et al., 1973)。

2 脳

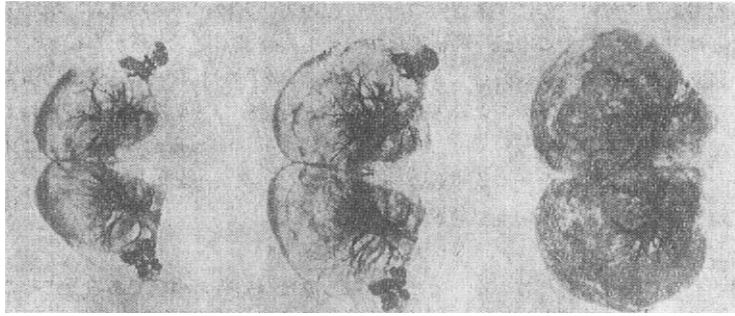
脳は神経系の中樞である上にそこに存在する数多くの神経分泌細胞群からいろいろの機能を持つ生理活性物質を分泌している。これら分泌細胞については多くの形態学的観察がなされているが、機能面について未知の事柄が多く、したがって脳の器官培養にかかる期待も大きい。

脳を器官培養するとその脳間部神経分泌細胞群に染色性の分泌顆粒が蓄積するということがクロバエの脳で LELOUP & GIANFELICI (1966) が初めて観察している。その後同様に培養した脳に分泌顆粒がよく蓄積するという幾つかの報告がなされている。最近ではオガサワラゴキブリの一種の脳を培養したところ脳間部の神経分泌細胞及び軸索中にビクトリアブルー好染性の顆粒が多く蓄積し、この顆粒は β -ecdysone を作用させると流出するという MARKS (1972, 1973) の報告がある。一方、KAMBYSELLIS & WILLIAMS (1971) はシンジュ蚕の休眠蛹より取った活性のない前胸腺と非休眠蛹より取った活性脳をともに培養すると前胸腺は活性化され、ともに培養した精巢を发育させると報告している。筆者 (1973b) もヨトウムシを用い、いろいろなステージの休眠と非休眠蛹の脳と前胸腺を組み合わせで培養し、前胸腺の生体外での活性化現象を形態的に、更に前述のニカメイチュウの皮膚片による検定で機能的に調べてみた。その結果蛹化後 40 日くらいまでの比較の日数を経過していない前胸腺ほど活性脳によって活性化されやすいことが分かり、このような傾向は非休眠蛹から蛹化後にすぐ脳をとってしまった永続蛹の前胸腺を培養した場合も同様にみられた。興味深いことは蛹化直後、更には蛹化後 20 日以上経過した休眠蛹より取った脳においても活性のない休眠前胸腺を活性化することが分かった。

ところでこの前胸腺活性化ホルモンが脳間部の神経分泌細胞群から放出されているらしいことは WIGGLESWORTH (1940) のオオサシガメの脳を用いた部分的切除の実験からある程度明らかとなっているが、数種類存在する神経分泌細胞群のどの細胞でつくられているかについての直接的証明はない。この問題を明らかにするには脳の器官培養技術をより発展させることと、最終的には、脳の神経分泌細胞そのものを機能を保持させたまま長期



第2図 活性脳とともに培養して活性化されたヨトウムシ休眠蛹の前胸腺 (右) と対照区として CSM-2F 培地で 7 日間培養された休眠蛹の前胸腺 (左)



第3図 培養されたヨトウムシ非休眠蛹の脳
左から培養直後, 3日後, 14日後.

にわたって培養できるようにすることが必要であろう。

あ と が き

以上標的器官と分泌器官について幾つかの問題点を述べて来た。このほか神経球やエノサイトの培養, 再生組織に対するホルモンの作用, 唾腺の Puff 形成に対する ecdysone と JH の拮抗作用などの興味深い問題もあるが, 紙面の都合でここに紹介できなかったのが心残りである。いずれにしても今後, 器官培養法が昆虫内分泌学の分野においてますます大きな役割を果たしていくであろうことが紙面を通じてうかがわれたことと思う。

引用文献

- ADAMS, T. S. et al. (1972) : Gen. Comp. Endocrinol. 18 : 12~21.
- AGUI, N. et al. (1973) : Appl. Ent. Zool. 8 : 73~82.
- et al. (1973) : *ibid.* 8 : 240~241.
- (1973 a) : *ibid.* 8 : 236~239.
- (1973 b) : 昭和48年度応動昆虫大会講演.
- et al. (1972) : Appl. Ent. Zool. 7 : 71~78.
- et al. (1969 a) : *ibid.* 4 : 156~157.
- et al. (1969 b) : *ibid.* 4 : 158~159.
- CHIHARA, C. J. et al. (1973) : Dev. Biol. 35 : 36~46.
- CHINO, H. et al. (1974) : Science 183 : 529~530.
- GOLDSCHMIDT, R. (1915) : Proc. Nat. Acad. Sci. 1 : 220~222.
- KAMBYSELLIS, M. P. et al. (1971) : Biol. Bull. 141 : 541~552.
- KING, D. S. et al. (1974) : Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71 : 793~796.
- KURODA et al. (1956) : Jap. J. Gen. 31 : 98~103.
- LAVERDURE, A. M. (1969) : C. R. Acad. Sci. Paris D 269 : 82~85.
- LELOUP, A. M. et al. (1966) : Ann. Endocr. 17 : 506~508.
- MANDARON, P. (1973) : Dev. Biol. 31 : 101~113.
- MARKS, E. P. et al. (1973) : J. Insect Physiol. 19 : 471~477.
- et al. (1972) : *ibid.* 18 : 847~850.
- MICIARELLI, A. et al. (1967) : Experientia 23 : 64~66.
- MITSUHASHI, J. (1968) : Appl. Ent. Zool. 3 : 1~4.
- OBERLANDER, H. (1972) : J. Insect Physiol. 18 : 223~228.
- RÖLER, H. et al. (1970) : Naturwissenschaften 57 : 31~32.
- SCHMIDT, E. L. et al. (1953) : Biol. Bull. 105 : 174~187.
- SCHOOLEY, D. A. et al. (1973) : Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 : 2921~2925.
- SHIBUYA, I. et al. (1969) : Appl. Ent. Zool. 7 : 97~98.
- YAGI, S. et al. (1969) : *ibid.* 4 : 70~78.
- WILLIG, A. et al. (1971) : J. Insect Physiol. 17 : 2317~2326.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1940) : J. Exp. Biol. 17 : 201~222.

昆虫の培養組織における分化

国立遺伝学研究所形質遺伝部 黒 田 行 昭

まえがき

昆虫の組織、器官を用いた体外培養による分化の研究は、今世紀初頭 GOLDSCHMIDT (1915, 1916, 1917) がシジミ蚕の1種 *Samia cecropia* の蛹の精巢を昆虫体液中で培養し、精子形成の過程を観察して以来、多くの研究者が、鞘翅類、双翅類、半翅類、鱗翅類、蜻蛉類、直翅類などの昆虫を用いて、脳、複眼原基、触角原基、翅原基、心臓、血管、消化管、唾腺、精巢、卵巣などを培養し、種々の組織や器官の構造や機能が、体外培養条件下で分化、発現し、保持されることが報告されている。

とりわけ、膜翅類、鱗翅類、双翅類などの完全変態を行う昆虫においては、幼虫期から蛹期を経て成虫期にいたる期間に形態的にも生化学的にも著しい変化がみられ、比較的短期間に組織や器官の分化を研究するには好個の材料となっている。更にまた、幼若ホルモン、エクジソンなどの昆虫特有のホルモンが、これら組織、器官の分化や増殖に関与することが知られており、これらホルモンによる細胞分化の調節機構を研究するにも優れた材料を提供している。

ここでは、筆者が、これまで扱ってきたキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を材料とした眼触角原基や翅原基、精巢などの体外培養による細胞分化の研究を中心として、更に最近進めている胚細胞の培養条件下での分化形質の発現などについて述べてみたい。

I 眼触角原基の分化

キイロショウジョウバエの眼触角原基 (eye-antennal disc) は、卵の初期発生の胞胚期にすでに 20 個余りの細胞として決定を受けていることが知られているが (POSTLETHWAIT と SCHNEIDERMAN, 1971)、幼虫の期間を通じて細胞分裂による増殖を行い、3 令成熟幼虫では、数千個の細胞集団として、幼虫体内の他の組織とは独立して、脳の背前部に左右一対存在し、これから成虫の複眼、触角、頭部表皮のほか外部眼神経節などが分化形成される。

筆者らは、採取した受精卵を 70% エタノールで滅菌後、無菌的に発育させた 3 令成熟幼虫 (ふ化後約 96 時間) から眼触角原基を取り出し、無機塩、グルコース、アミノ酸、ビタミンなどを含む合成培養液 K-6 中で体外培

養し、エクジソン分泌器官である環状腺 (ring gland) を脳、腹部神経節を含む脳神経節複合体とともに培養液中加入すると、複眼の小眼形成細胞の著しい分化がみられることが分かった (KURODA と YAMAGUCHI, 1956)。

この際、正常系の眼触角原基を棒眼 (*Bar*) 突然変異系の脳神経節複合体とともに培養した場合には、棒眼系の脳神経節複合体の影響によって、正常系の眼触角原基が棒眼型の眼の発育を示し、一方、棒眼系の眼触角原基を正常系の脳神経節複合体とともに培養した場合には、正常型の眼の発育分化を示した。これらの事実から、3 令成熟幼虫の眼触角原基の発育分化は、棒眼系と正常系の脳神経節複合体によって、それぞれ特有の方向を与えられ、複眼の形態形成に関与する遺伝子の作用が、これらの脳神経節複合体を通して、眼触角原基に働く可能性を示唆している。

HORIKAWA (1959, 1960) は、種々の眼色突然変異の眼触角原基を 3 令成熟幼虫から取り出して、これを前記合成培養液中で培養し、そのトリプトファン系色素の代謝を調べた。この結果によれば、トリプトファンを含む培養液では、正常系の眼触角原基は培養約 72 時間で、褐色色素が形成され、キヌレニンを含む培養液では、正常系及び鮮紅色眼 (*vermilion*) の眼触角原基は培養後約 30 時間で褐色色素が形成され、3-ヒドロキシキヌレニンを含む培養液では、正常系、鮮紅色眼、朱色眼 (*cinnabar*) の眼触角原基は培養約 5 時間で、色素が形成された。この場合にも、脳神経節複合体は、褐色色素の形成を促進する作用をする。これらの研究は、トリプトファン系褐色色素形成過程の各段階を支配する遺伝子と酵素との結びつきを、体外培養条件下で直接顕微鏡下に捉えることができた例と考えることができる。

FUJIO (1960, 1962) は、この培養液に、乳酸アンモニウムやアセトアミド、尿素などを加えると、眼触角原基の成長と分化が促進されることを見だし、また、脳神経節複合体より分泌されるホルモンの量的な関係を知るために、1 ml の培養液に、10~60 個の脳神経節複合体をあらかじめ培養した条件づけられた培養液 (conditioned medium) で眼触角原基を培養した結果、1 ml の培養液に 20 個以上の脳神経節複合体を含む培養液が有効であり、正常系と棒眼系の脳神経節複合体を用いた場合、その間に量的及び質的な差違がみられた。

以上はいずれも、キイロシヨウジヨウバエの3令成熟幼虫から取り出した眼触角原基が、体外培養条件下で、エクジソン分泌器官を含む脳神経節複合体からのホルモン作用により、複眼の形態分化や色素形成が、それぞれの系統に対応した方向性をもって促進されることを示すものである。同様に眼触角原基に脳神経節複合体を結合させたままの状態でも体外培養すると、眼色素、角膜、個眼、水晶体などの形成されることが報告されている(SCHNEIDER, 1964, 1966)。

KURODA (1969) は、これまでホルモン物質の供給源として培養に使用してきた脳神経節複合体の代わりに、最近植物体より分離抽出された種々のエクジソン活性物質を用いて、これらが実際に眼触角原基の分化に有効であることを確証した。培養液はこれまで使用してきた合成培養液を改良し、ビタミンの組成を少し変えたもの(培養液 K-6') で、その組成は第1表に示した。

第1表 キイロシヨウジヨウバエの合成培養液 K-6' の組成 (mg/100 ml) (KURODA, 1970)

NaCl	700	チアミン(塩酸塩)	0.002
KCl	20	リボフラビン	0.002
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2	ビリドキシン(塩酸塩)	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10		0.002
NaHCO ₃	5	ナイアシン	0.002
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	20	パントテン酸カルシウム	
ブドウ糖	80		0.002
カゼイン加水分解物	5,000	ビオチン	0.001
L-トリプトファン	100	葉酸	0.002
L-システイン	100	コリン(塩酸塩)	0.02
L-シスチン	26	イノシン	0.002
		p-アミノ安息香酸	0.002

この培養液に、各濃度のエクジステロン、イノコステロン、ポナステロンC、ルブロステロン(東北大学中西香爾・竹本常松両博士の御好意による)を加えて、3令成熟幼虫より取り出した眼触角原基を培養し、複眼分化に対するこれら物質の効果を調べた結果は第2表のようになった。

エクジステロン、イノコステロンは、いずれも 10⁴μg/ml の濃度で、培養眼触角原基のかなりのものに分化を起こさせる作用があり、ポナステロンCは、これよりやや作用が弱く、逆にルブロステロンは作用が最も強く、非常に低い濃度でも有効で、10⁻⁵μg/ml でも、22% の培養原基の分化をひき起こすことができた。このようなエクジソン活性物質の存在下で培養した眼触角原基は、原基全体の大きさの増大や、ひだの肥厚とともに、複眼形成部域中央の均一に分布していた細胞が、6~10個ずつ集って細胞集団を形成し、この細胞集団が、複眼形成部域中央に規則正しい配列を示すようになる(口絵写真参照)。

第2表 キイロシヨウジヨウバエの眼触角原基の分化に対するエクジソン活性物質の作用 (KURODA, 1969)

物質	濃度 (μg/ml)	培養原基数	複眼分化のみられた原基数	複眼分化の割合 (%)
対照(非添加)	0	16	0	0
エクジステロン	10 ⁴	16	15	94
	10 ³	8	7	88
	10 ²	6	2	33
	10 ¹	7	2	27
イノコステロン	10 ³	3	3	100
	10 ²	9	4	44
	10 ¹	8	3	38
ポナステロンC	10 ³	8	5	63
	10 ²	8	2	25
ルブロステロン	10 ⁴	8	6	75
	10 ³	20	14	70
	10 ²	12	11	92
	10 ¹	11	10	91
	10 ⁰	12	11	92
	10 ⁻¹	13	12	92
	10 ⁻²	11	10	91
	10 ⁻³	12	6	50
10 ⁻⁴	12	5	42	
10 ⁻⁵	9	2	22	

このような眼触角原基を構成している個々の細胞の性質や動きについて、更に詳しく知るために、3令成熟幼虫より取り出した眼触角原基をトリプシン処理により単一遊離細胞にしたものを、10⁵個を0.3 mlの培養液に浮遊させて、これを密閉式のマイクロビーカーに入れて、100 rpmの速度で巡回培養すると、24時間後には、ほとんどの細胞は、ビーカーの中央に集まって、平均0.6 mmの再構成組織を形成した(KURODA, 1969, 1970)。

この再構成組織の切片標本を作成して内部構造を調べると、約5~20個のヘマトキシリンで濃染される円型の細胞が集積して細胞集団を形成し、それが再構成組織のあちこちに存在し、その周辺にあるヘマトキシリンには染まりにくい繊維芽状の細胞集団とは明確に区別された。このヘマトキシリンで濃染される円型細胞は、その形態や染色性から、エクジソン活性物質存在下で眼触角原基の複眼形成域に構成された細胞集団と同一の細胞と考えられ、この細胞が単一細胞に遊離されたとき、他の細胞集団の中から自己と同一種類の細胞を識別し、相互に接着して一つの細胞集団を形成する能力をもっていることが示された。

エクジソン活性物質の存在下で培養した眼触角原基にみられる細胞集団の形成が、どのような機構によって起こるのかは興味のある問題であるが、この複眼形成の過程に、RNAやタンパク合成の阻害剤を作用させても、

第3表 キイロシヨウジヨウバエの眼触角原基の分化に対する高分子物質合成阻害剤の影響 (KURODA, 1970)

阻 害 剤	培養原基数	複眼分化のみ られた原基数	複眼分化の割合 (%)
対照 (非添加)	12	11	92
BUdR (10 ⁻⁵ M)	7	6	86
アクチノマイシン D (1 μ g/ml)	14	11	79
ビュロマイシン (10 μ g/ml)	10	7	70

ほぼ正常に複眼分化は行われる (KURODA, 1970)。すなわち、1 μ g/ml のルプロステロンを加えた培養液に、10⁻⁵M BUdR、1 μ g/ml アクチノマイシン D、10 μ g/ml ビュロマイシンなどを添加して 24 時間培養した場合の結果は、第3表のようになり、いずれの場合にも、エクジソン活性物質によって引き起こされた複眼形成細胞の分化には、3 令成熟幼虫から取り出した眼触角原基の細胞内にすでに存在していた物質が、エクジソン活性物質の作用により活性化され、この活性化の過程には、新たな RNA 合成やタンパク合成を必要としないことが示唆された。

この眼触角原基内での複眼分化は、種々の線量の X 線照射によって阻害のされ方が異なり、1,000R の X 線照射ではほとんど阻害を受けないが、1,500R の照射では、複眼形成域の最後端部のみ細胞集団の形成がみられ、2,000R の照射では、複眼形成域全部にわたって、ほぼ完全に細胞集団の形成の阻害がみられた (KURODA, 1970)。このことは、複眼の分化が、複眼形成域の最後端部より開始され、次第に前方部に進行することを示している。

II 翅原基の分化

キイロシヨウジヨウバエには、種々の翅の形態の突然変異があり、その形質発現は、飼育温度によって影響を受けるが、これらの翅原基を 3 令成熟幼虫より取り出し、25°C と 31°C の温度で体外培養すると、痕跡翅 (*vestigial*) の種々の対立遺伝子をもつ系統で、その翅原基の成長と分化が、温度によって異なった反応性を示すことが見いだされた (KURODA, 1959)。

これらの翅原基は、体外培養すると、翅形成域の同心円状の褶壁が次第に肥厚し、中心部が内部に陥入して翅嚢を形成し、これが後方に伸展して将来の翅に発育する。その翅嚢の大きさは、25°C で培養した場合には、正常系 >*vg^{nb}* (*vestigial-nipped*) >*vg^{no}* (*vestigial-notched*) >*vg* の順であるが、これらを 31°C で培養した場合には、正常系 >*vg^{no}* >*vg* >*vg^{nb}* となっており、*vg^{no}* や *vg* は、高温に

よって正常系の翅の形態に近づくのに対して、*vg^{nb}* は高温によって痕跡翅の形態により著しく近づくことが分かった。

翅原基の分化にも、眼触角原基の場合と同様に、エクジソン活性物質が効果をもつことが、OBERLANDER と FULCO (1967)、OBERLANDER (1969 a, b) などによって、ハチミツガ *Galleria mellonella* の翅原基の培養で確かめられているが、AGUI と FUKAYA (1973) が、キャベツのヨトウムシ *Mamestra brassicae* の翅原基の培養で、種々のエクジソン活性物質の作用を比較したところでは、ポナステロン A ≒ シアステロン ≒ エクジステロン > エクジソン > ルプロステロンの順であった。

また、ゼンチクバエ *Sarcophaga peregrina* の翅原基の培養では、OHMORI と OHTAKI (1973) が、エクジステロン、ポナステロン A、シアステロンが翅の分化や、DNA、RNA、タンパク合成などを促進する作用をもつことを報告している。

III 唾腺組織、消化管の培養

双翅類昆虫の唾腺、腸管、マルピギー氏管などは、巨大な細胞からできていて、その核中には、体の他の組織の細胞に比べて、100 倍以上もの大きな染色体がある。この巨大染色体には、幼虫や蛹の一定の発生時期によって、きまった位置にパフというふくらみができて、このふくらみは、染色体の DNA から mRNA の形成を示すと考えられ、遺伝子作用を直接顕微鏡下にとらえることのできる材料と考えられている。

CIANNON (1964) は、*Sciara coprophila* の幼虫にある 1 対の唾腺組織の一方は、幼虫から取り出してそのまますぐに固定し、他方は合成培養液で 24 時間体外培養した後固定し、両方の唾腺細胞のパフの型を比較したところ、パフの形成には、脳や環状腺のホルモン作用はあまり影響を与えないが、これらのホルモン分泌器官を除いて培養すると、ある染色体にパフを起こさないことが分かった。

PLANTEVIN ら (1968) は、ハチミツガ *Galleria mellonella* の 5 令幼虫の中腸を 4 種類の培養液を用いて培養し、ある培養液では、28 日間培養組織は生存し、培養中に腸管の変態の過程が進行したことを報告している。

IV 生殖巣の分化

生殖巣の体外培養については、冒頭に述べた GOLDSCHMIDT (1915, 1916, 1917) による精巣の培養のほか、数多くの研究がなされているが、これは大きく二つに分けられ、生殖巣そのものの分化に関する研究と、生殖巣

中の生殖細胞の分化に関する研究とがある。

生殖巣そのものの分化については、STERN (1940) が、シヨウジョウバエの精巣を体外培養し、その成長とらせん構造形成に対する精管の影響について調べている。精巣と精管とがまだ結合していない若い幼虫から取り出した精巣は、培養してもなんら変化を示さないのに対して、精管と結合した精巣を培養すると、著しい成長とらせん構造の形成を示した。

生殖細胞の分化については、SCHMIDT と WILLIAMS (1949, 1953) によって、シンジュ蚕の1種 *Platysamia cecropia* 及び *Samia walkeri* の休眠蛹から取り出した精巣の培養が行われている。これらの精巣を幼虫、前蛹、蛹、成虫など種々の発育時期の異なった個体から取り出した体液中で体外培養すると、5令のまゆをつむいでいない幼虫の体液は精細胞の発育を著しく促進し、蛹の後期休眠のものの体液は、その成長促進作用が低下し、成虫体液になると、再び成長促進作用が上昇した。この研究は、体液中のホルモンが精細胞の分化を促進させる作用をもつことを示すものであるが、WILLIAMS と KAMBYSELLIS (1969) は、*Samia walkeri* の精巣から取り出した精母細胞を、体液中の高分子因子を加えた培養液中で培養すると精子にまで発育分化するが、完全な精巣のままに器官培養した場合には、内部の精母細胞に分化がみられないこと、また、完全な精巣をエクジソンの存在下で1時間だけ培養した後、体液高分子因子を含む培養液中で培養すると、精子形成がみられることを見いだしている。

このことは、エクジソンによって精巣壁の透過性が変化し、このため体液高分子因子が精巣内に入って、精子形成を起こさせることを示している。この昆虫体液高分子因子は熱に不安定性で、透析ができないことが知られており、ウシ胎児血清中にも同様の活性をもつ因子が存在することが見いだされている (KAMBYSELLIS と WILLIAMS, 1971)。

筆者は、キイロシヨウジョウバエの蛹化後 48 時間の蛹から取り出した精巣を、数個の組織片に切断したものを、15% ウシ胎児血清を加えた合成培養液中で培養したところ、精原細胞、精母細胞などはエクジソンの存在しないこの条件下ではほとんど分化が見られないが、精細胞は、この条件下でも精子束の伸長など精子形成の過程が著しく進行することが分かり (口絵写真参照)、精子形成の初期過程にはエクジソンが必要であるが、後期の過程には、エクジソンを必要としないことを見いだした (KURODA, 1974)。

以上のような精巣の体外培養による研究のほか、卵巣

の体外培養についても研究が行われているが、細胞増殖や株細胞の確立などの卵巣組織を用いた研究の著しい成果に比して、卵巣や卵細胞の分化については、大きな成果は得られていない。

V 胚細胞の分化

胚の組織や細胞の分化に関する体外培養の研究としては、カイコの休眠卵の発育阻止の原因を調べるため、TAKAMI (1958) によって胚子培養が行われている。

休眠卵及び非休眠卵の胚を、卵の細胞質、卵黄など、卵の抽出物を加えた培養液で培養した結果、休眠卵の卵細胞質や卵黄に、胚の発育を阻止する原因が存在し、また、胚自身にもこの原因があることが分かった。卵の細胞質や卵黄に、酵母エキスやラクトアルブミン加水分解物、トリプトファンなどを加えて培養すると、胚が発育し、休眠卵抽出物には胚の発育に必要な物質が欠けていることが分かった。

休眠卵の胚自身に存在する発育阻止要因は、非休眠卵の胚を同じ培養液中に並べて培養することによって消失し、休眠胚もかなりよく発育した (TAKAMI, 1959)。また、神経細胞や前胸腺の分化してくる前の胚の頭部を除去したものを体外培養しても、外皮の脱離が行われ、培養胚の脱皮には前胸腺や脳のような神経または、ホルモン支配が必ずしも必要でないことを示している (TAKAMI, 1963)。

KURODA (1974) は、キイロシヨウジョウバエの産卵 10 時間後の頭部内転期の胚細胞を、ウシ血清及びフェツインを含む合成培養液中で培養し、培養初期には、上皮性細胞、筋肉細胞、神経細胞、小型細胞 (成虫原基細胞と考えられる) などが、それぞれ特徴のある形質を発現し、培養条件下に相当長期間にわたってその形質を保持することを見いだした。

上皮細胞は、培養過程に成熟分化し、中腸または、咽頭部由来と思われる筋肉細胞は、1~60 回/分の種々の速度で搏動を行い、体外培養条件下で約 6 週間以上にわたって搏動が持続した。また、神経細胞は、多数の糸状の細い神経繊維を出し、分枝繊維の伸展や、神経繊維どうしの接触、結合による神経網の形成がみられた。このほか、小型細胞は、培養条件下に規則的な細胞配列による構造の形成を示した (口絵写真参照)。

む す び

以上、昆虫の培養組織における分化の研究を、キイロシヨウジョウバエの眼触角原基、翅原基などの成虫原基や、唾腺、生殖巣、胚組織などを用いた筆者の研究の中

心に概略述べた。

昆虫組織の体外培養は最初にも述べたように、種々の昆虫特有のホルモン作用によって、組織や細胞の増殖や分化が著しい影響を受け、高等動物細胞の増殖や分化の調節機構の研究にも、今後更に大きく寄与するものと考えられる。これらのホルモンの一部が、すでにこれまでの植物の防虫剤や農薬に代わる新しい害虫駆除の方法として実用化のきざしが見えてきた今日、体外培養を用いたこれらホルモンの生物学的な作用機序の研究が、更に強力に押し進められることを期待してやまない。

引用文献

- AGUI, N. et al. (1973) : Appl. Entomol. Zool. 8 : 73~82.
- CANNON, G. B. (1965) : Science 146 : 1063.
- FUJIO, Y. (1960) : Japan. J. Genet. 35 : 361~370.
- (1962) : ibid. 37 : 110~117.
- GOLDSCHMIDT, R. (1915) : Proc. Nat. Acad. Sci. 1 : 220~222.
- (1916) : Biol. Zentralbl. 36 : 160~167.
- (1917) : Arch. Zellforsch. 14 : 421~450.
- HORIKAWA, M. (1959) : Cytologia. 23 : 468~477.
- (1960) : Japan. J. Genet. 35 : 76~83.
- KAMBYSELLIS, M. P. et al. (1971) : Biol. Bull. 141 : 527~540.
- KURODA, Y. (1959) : Med. J. Osaka Univ. 10 : 1~16.
- (1969) : Japan. J. Genet. 44, Suppl. 1 : 42~50.
- (1970) : Exp. Cell Res. 59 : 429~439.
- (1974) : J. Insect Physiol. 20 : 637~640.
- (1974) : Development Growth Differentiation 16 : 55~66.
- et al. (1956) : Japan. J. Genet. 31 : 98~103.
- OBERLANDER, H. (1969a) : J. Insect Physiol. 15 : 297~304.
- (1969b) : ibid. 15 : 1803~1806.
- et al. (1967) : Nature 216 : 1140~1141.
- OHMORI, K. et al. (1973) : J. Insect Physiol. 19 : 1199~1210.
- PLANTEVIN, G. et al. (1968) : Proc. Internat. Colloq. Invertebr. Tissue Cult. 2nd, 1967 : 81~100.
- POSTLETHWAIT, J. H. et al. (1971) : Develop. Biol. 24 : 477~519.
- SCHMIDT, E. L. et al. (1949) : Anat. Rec. 105 : 487.
- et al. (1953) : Biol. Bull. 105 : 174~187.
- SCHNEIDER, I. (1964) : J. Exp. Zool. 156 : 91~104.
- (1966) : J. Embryol. Exp. Morphol. 15 : 271~279.
- STERN, C. (1940) : Growth 40 : 377~382.
- TAKAMI, Y. (1958) : J. Exp. Biol. 35 : 286~296.
- (1959) : Science 130 : 98~99.
- (1963) : J. Exp. Biol. 40 : 735~739.
- WILLIAMS, C. M. et al. (1969) : Proc. Nat. Acad. Sci. 63 : 231.

人事消息

福島武雄氏（東海農政局次長）は大臣官房付に
 児島司忠氏（農蚕園芸局植物防疫課課長補佐（検疫第2班担当））は農蚕園芸局植物防疫課課長補佐（検疫第1班担当）に
 小畑琢志氏（名古屋植物防疫所国内課長）は同上課課長補佐（検疫第2班担当）に
 前田耕一氏（農蚕園芸局肥料機械課長）は同上局普及部

長に
 田中基雄氏（農蚕園芸局普及部長）は退職
 玉川寛治氏（同上局植物防疫課農業航空班技術係）は農蚕園芸局普及部生活改善課企画組織係長に
 坂野雅敏氏（同上班技術係長）は構造改善局計画部資源課水質保全班水質調査係長に
 山崎 昭氏（名古屋植物防疫所調整指導官）は名古屋植物防疫所国内課長に

8月号をお届けします。この機会にご製本下さい。

「植物防疫」専用合本ファイル

本誌名金文字入・美麗装幀

本誌B5判12冊1年分が簡単にご自分で製本できる。

- ①貴方の書棚を飾る美しい外観。 ②穴もあけず糊も使わず合本ができる。
 ③冊誌を傷めず保存できる。 ④中のいづれでも取外しが簡単にできる。
 ⑤製本費がはぶける。

頒価改訂 1部 400円 送料 本会負担

ご希望の方は現金・振替・小為替で直接本会へお申込み下さい



絶対寄生菌の人工培養

愛媛大学農学部 ^あ浅 ^だ田 ^や泰 ^し次

はじめに

菌類は葉緑体を持たないので、外界から有機態炭素源を吸収しなければならないが、ショ糖やデンプンを与えても生長しない一群の菌類を絶対寄生菌 (obligate parasite) あるいは純寄生菌 (pure parasite) と呼んでおり、それらは生きた宿主細胞から直接養分を吸収しているとされている。したがってそれらは人工培養のできる菌類にはみられない、吸器 (haustorium) と呼ばれる菌糸の分化した特殊な養分吸収器官を持っている。このような絶対寄生菌の中で農業上特に重要な種類に、べと菌 (downy mildew fungus), うどんこ菌 (powdery mildew fungus), さび菌 (rust fungus) の3種類があって、分類学上それぞれ菌類の3綱 (class) にあたる藻菌類 (phycomycetes), 子のう菌類 (ascomycetes), 担子菌類 (basidiomycetes) に属している。筆者に課せられた課題は、表題のように絶対寄生菌の人工培養について、その史的展望と将来の可能性を論ずることにあるが、人工培養に成功したものは前記3種類の中ではさび菌の数種のみであって、べと菌やうどんこ菌ではまだ1例の報告も出ていない。したがって記述はほとんどさび菌に限定されるが、べと菌ではなぜ人工培養が困難なのかについても、筆者の考えを述べることにする。

I 人工培養への歩み

絶対寄生菌をなぜ人工培養しなければならないのかについて、SCOTT and MACLEAN²⁹⁾ はさび菌について次の3点をあげている。

- (1) 人工培養自体が生物学上興味深い。
- (2) さび菌の栄養生理、代謝などを詳細に知るため。
- (3) 宿主-寄生菌相互関係の真の理解には病原菌のみの培養知見がいる。

実際、抵抗性品種や農薬の検定には病原菌がいつでも使用できるのが望ましいので、こうした点からも人工培養のメリットがでてくる。この目的のために、人工培養でなくても病原菌を任意に使用できるように、組織培養したものに絶対寄生菌を接種して継代培養しようと試みられたのは自然の経緯であった。MOREL²⁴⁾ はブドウの若い茎組織を培養してカルスを作らせ、これに病原菌 (*Plasmopara viticola*) を接種したところ、菌糸はよくその表

面に広がり、更にこの菌糸が新しい培養組織に継代されることを見出した。ブドウのような落葉果樹の病原菌では、冬期でもこの方法によって病原菌を使用できるので、少し手のかかる組織培養でもやむをえないが、ムギ類のくろさび菌 (*Puccinia graminis*) やうどんこ菌 (*Erysiphe graminis*) では播種によっていつでも子葉を作りうるので、あえて培養組織に継代しなくても任意に病原菌が入手される。したがって病原菌の保存あるいは継代というだけでは、組織培養法の利用はそれほど価値あるものではないが、MORELの仕事はHOTSON and CUTTER¹⁶⁾の研究によってその価値が明らかになった。すなわち、彼らはエンピツビャクシン上のリンゴ赤星病菌 (*Gymnosporangium juniperi-virginianae*) 冬孢子堆を宿主組織とともに培養して冬孢子を作らせたが、培養後4か月目のカルスから培地への菌糸の発育を認めた。この菌糸を種々の培地に移植したところ、さび孢子状のものが形成され、これが感受体の一種である *Crataegus* に感染することを見いだした。次いでCUTTER¹⁷⁾ は同じ材料で詳細な報告を行った。この報告は45ページにも及ぶ膨大なものであって、54地方から8,840個の試料を集め、13,504個の感染組織の培養を行った。それらの中でも雑菌汚染などなしに最後まで培養できた組織は358個であり、更にその中の7個のみに培地への病原菌の発育を認めた。したがって人工培養率は約2,000分の1になる。CUTTER¹²⁾ は更に同様な方法で *Uromyces ari-triphylli* の人工培養にも成功したが、この場合は培養率約330分の1であった。その他、組織培養法利用による絶対寄生菌の人工培養については8年前に小論を書いたので²⁾ それを参考にしたい。

もっともオーソドックスな人工培養の試みは、誰もが試みたように孢子発芽管の生長条件を検討して行くことである。HURD-KARRER and RODENHISER¹⁸⁾ は *Puccinia graminis* の夏孢子が Zn 添加によって *in vitro* で付着器のみでなく気孔下のう (substomatal vesicle) を作ることを見だし、人工培養の可能性を示唆した。その後のこの種の研究は極めて多く、それらはYARWOOD⁴²⁾ やSCOTT and MACLEAN²⁹⁾ の抄録に書かれている。次いで1966年、雑誌 *Phytopathology* に出た WILLIAMS らの報告⁴⁰⁾ は世界中の植物病理学者や菌学者を驚かせた。すなわち彼らは *P. graminis* f. sp. *tritici* race ANZ 126

第1表 WILLIAMS らのくろさび菌用合成培地

成分	量 (g/L)
ツァベック培地	
NaNO ₃	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
ショ糖	30
酵母エキス (Difco)	1
寒天	10
pH	6.4

17°C, 暗黒下培養.

-6 の夏胞子を用いて、第1表に示した合成培地上でこの病原菌を生育させることに成功し(口絵写真①, ②, ③, ④), 翌年更に培地上での夏胞子及び冬胞子形成, 培養夏胞子及び菌糸体の接種, 再分離, 培地上での継代培養を報告した(口絵写真⑤, ⑥, ⑦)。これは BUSHNELL⁵⁾ と BOSE and SHAW⁴⁾ の追試によって確認されたが、オーストラリア菌 (race ANZ 126-6) 以外の分離系では人工培養できないことが明らかになった。BUSHNELL and STEWART⁷⁾ はその後 *P. graminis* f. sp. *tritici* の 25 種アメリカ系夏胞子を用いて培養実験を行ったところ、その中の 20 種が培地上で白色菌そうを形成し、11 種は 1 日当たり 6~41 μ の生長速度であったが、その後毎月 1 回の継代培養によって生長速度は徐々に遅くなった。しかし、6 か月の継代でも 1 日 42~64 μ の生長速度のものが 2 種類あったと報告した。そしてこのことは菌系によっては培地での生育能力が著しく異なることを示しており、今日の技術水準ではすべての菌系を人工培養することは難しいと述べている。また、WILLIAMS³⁹⁾ は 2 核性菌糸のみが夏胞子を作り、単核菌糸は分化能力を喪失した発芽管から生ずること、発芽管からの感染構造物 (infection structure) の形成は栄養分、熱処理、接種源の採取時期、採取量及び遺伝的要素が影響するとし、さび菌の人工培養についての理論と実際について論じている。この種の培養実験では接種源の量が大切であって、接種源の多量には必要微量元素の培地への持ち込みをまねく心配があり、筆者⁷⁾ はイネごま葉枯病菌の培養でこのことを体験している。PAJENDREN²⁸⁾ も同じオーストラリア菌を用いて培養菌体の核学的研究を行い、人工培地上での本菌は核物質を新しく合成する能力がなく、核は菌糸の隔膜孔を通じたり、隣接菌糸との融合によって移行するとしている。

II 培養条件の検討

WILLIAMS ら⁴⁰⁾ の用いた培地 (第1表) は、菌類の培

養に広く用いられているツァベック培地に酵母エキスを加えただけの簡単な組成であったから、さび菌が何を特殊な栄養分としているのかを知ろうとして、培地組成の再検討がなされた。BUSHNELL⁵⁾ は WILLIAMS らの培地のショ糖をブドウ糖にかえ、培地の滅菌時間も 121°C, 30 分としたが (WILLIAMS らは 121°C, 15 分), WILLIAMS ら^{39, 41)} はその後彼らの創製した培地の改良を試み、ペプトンの添加がよいこと、更に酵母エキスとペプトンはアスパラギン酸と含硫アミノ酸のシステインで、ショ糖はブドウ糖、果糖、マンノース、マンニトールでそれぞれおきかえうるが、十分信頼のできる代替合成培地はなく、また、接種源量が少ないときはその後の生育も悪く、さび菌夏胞子は相互に生長を助け合っているのではないかとした。HOWES and SCOTT¹⁷⁾ は窒素源としてはアンモニウム塩、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、アラニン、セリン、グリシンのいずれでもよいが、硝酸塩と亜硝酸塩は無効であり、基準培地に加えたシステインはホモシステインあるいはメチオニンで代替できるが、無機態硫黄は無効とした。FOUDIN and WYNN¹⁴⁾ はカゼイン水解物の添加がオーストラリア菌の生育を促進することから、その構成アミノ酸をカゼイン水解物と同じ比率で混合したものを培地に加えて生長条件を検討している。

くろさび菌での WILLIAMS らの成功は TUREL³⁴⁾ によってアマさび菌 (*Melampsora lini*) に応用された。すなわち本菌レース 3 がショ糖、無機塩、キレート鉄、酵母エキスからなる培地で生育するのを認め、それは 5 か月間、8 代にわたって継代できたが、その間に冬胞子が気中菌糸上に形成されること、ブドウ糖よりも 4% ショ糖がよいこと、K₂HPO₄ の 0.05% 付加添加がよいこと、酵母エキスの 0.2% 添加が胞子形成を促進することなどを見いだした。TUREL³⁵⁾ は更に培養温度は 17~17.5°C よりも 16°C がよく、24°C で 30~40 分間おくことと生長がとまるとした。COFFEY ら⁹⁾ は更に本菌の培地組成を検討し、ペプトンと酵母エキスは単独でもあるいは両者を合わせたものでも生長に好結果を与えるが、ココナツミルクは無効であって、夏胞子堆及び冬胞子状のものを培養菌体中に見いだした。QUICK and CROSS²⁷⁾ は寒天培地上にミリポアフィルターを静置することによって、本菌の均一かつ旺盛なコロニー生育がみられると述べている。TUREL³⁶⁾ は培地上で 1 か半年継代した本菌菌糸体を付傷接種によってアマ子葉に感染させ、更に 1 日 8~16 時間蛍光照明して 16°C に保った培地上の菌糸体に 30~70 日後夏胞子が形成されたが、これらの夏胞子は接種でき、判別品種への接種結果から、すべてレース 3 菌であ

第2表 TUREL のアマさび菌用合成培地

成分	量 (g/L)
クノッ液*	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	2
KNO ₃	0.25
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
KH ₂ PO ₄	0.25
NH ₄ NO ₃	0.02
K ₂ HPO ₄	0.75
寒天	15
シヨ糖	50
微量元素**	(mg/80 ml)
Fe(NO ₃) ₂ · 9H ₂ O	139
EDTA-2Na	134
MnSO ₄	894
KI	20
L-アミノ酸及びペプチド***	(mg/100 ml)

* 2倍濃度のものを氷冷保存。

** 添加量 10 ml/L.

*** Asp 300, 1/2 Cys 28, Cys 39.6, Ala 14.7, Met 24.6, glutathione 50.7 (以上 1.65mM).

ることを確認した。これらの罹病材料を用いて、TUREL³⁷⁾は感染組織内の吸器、夏孢子堆形成過程、菌糸の核数などを形態学的に観察している。同女史は更に本菌の培地成分の再検討を行い、第2表に示した合成培地でレース3菌がよく発育することを報告した³⁸⁾。COFFEY and SHAW¹⁰⁾も同様の検討を行い、本菌はシヨ糖、ブドウ糖、果糖、マンノース、マンニトール、トレハロース、ラフィノース、リビトール、麦芽糖を利用するが、ガラクトースは利用できず、アラニンとメチオニンの添加が有効としている。

Puccinia graminis 及び *Melampsora lini* 以外の絶対寄生菌の人工培養については、HOLLIS ら¹⁵⁾はマツ紡錘形さび菌 (*Cronartium fusiforme*)、BARNETT³⁾は吸器を形成するケカビ目菌、*Tiaghemiomyces parasiticus*、*Dimargaris verticillata*、*D. bacillispora*、*Dispira simplex*、*D. cornuta*、新崎ら²⁵⁾はアマノリ壺状菌 (*Olpidiopsis* sp.)で成功している。しかし、農業上重要なべと菌とうどんこ菌についてはまだ1例の人工培養の報告もない。さび菌の場合でも数種のレースで成功しているのみであって、すべてのさび菌が培養できるわけではないが、ある種の突破口が開かれたことは確かであって、近い将来その他のさび菌についても人工培養ができるのではないかと考えられる。

以上を取りまとめると、次のように要約できる。

(1) さび病罹病組織の培養から、培地への病原菌の生長をみた。その結果、変異菌かもしれないが、人工培

養の可能性がでてきた。

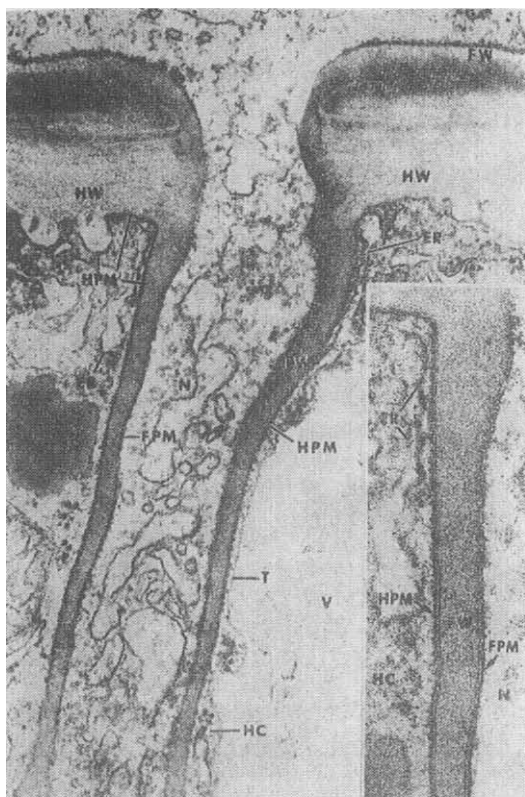
(2) 他方、夏孢子発芽管の *in vitro* での生長実験で、感染構造物の形成を認めた。

(3) オーストラリア菌で完全合成培地での人工培養が発見され、また、アメリカ菌にも培養できる分離系があることが分かった。

(4) これらの結果は、その他のさび菌にも応用され、アマさび菌の人工培養が完成し、合成培地の組成検討がなされた。

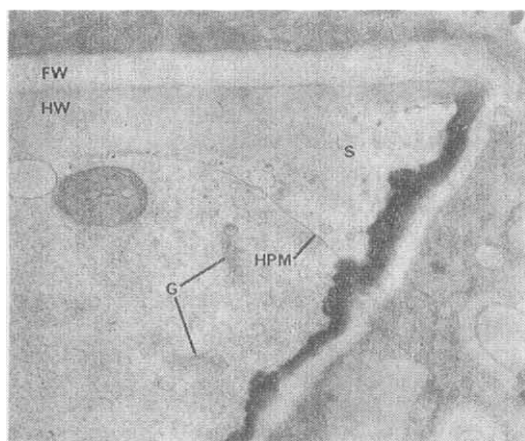
III さび菌とべと菌の比較

絶対寄生菌がなぜ人工培養できないのかを考える場合、誰しも気づくことは吸器と宿主原形質との接触場面を観察することである。LITTLEFIELD and BRACKER²³⁾は *Melampsora lini* の吸器周辺の微細構造を観察し、宿主原形質膜が吸器の周囲に存在し(第1図)、吸器は宿主原形質膜を介して養分を吸収しているとした。PEYTON and BOWEN²⁶⁾もダイズべと菌 (*Peronospora manshurica*) の吸器について観察し、宿主原形質膜の連続性を報告している。しかし、筆者らが用いているあぶらな科べと菌 (*Peronospora parasitica*) の場合は、宿主原形質膜は吸器によって貫通され、吸器は直接宿主原形質に接している^{30,31)}(第2図)。こうした感染宿主細胞でも原形質分離を起こすので、吸器の侵入した宿主細胞は生きており、その場合吸器で穴をあけられた宿主原形質膜は吸器と密着しているので原形質分離がみられるものと思われる。したがって本菌吸器は宿主原形質膜を介せず、生きた原形質から直接養分を摂取していることになる。事実、吸器の周辺には宿主細胞のミトコンドリアや粗面小胞体の変形したものなどが存在し、吸器にはロマソーム状の構造がみられるので、本菌吸器はこうした細胞内小器官を食細胞状に摂取するのではないかと想像される。SINGER and NICOLSON³²⁾によると原形質膜は固体とみるよりはむしろ一種の液体と解すべきだとしているので、吸器と宿主原形質間での原形質膜の介在が、必ずしも吸器の養分摂取に障害となっているとはいきれないが、摂取細胞内小器官はかなり大きいので、原形質膜の存在はかなりの障害になるのではないかと推定される。すなわち、べと菌の場合はさび菌での宿主原形質膜を介する養分摂取に比べて、比較的大型の物質を摂取しているのではないかと考えられ、これがさび菌が人工培養できた大きな原因の一つではないかと推定される。うどんこ菌の場合は宿主原形質膜に連続性があるようであり、KUNOH²¹⁾は宿主原形質膜を介する宿主ミトコンドリアなどの吸器への取りこみを報告している。梶原¹⁹⁾はキュウリべと菌



第1図 アマさび菌吸器と宿主原形質膜の連続性

HW: 宿主細胞壁, HPM: 宿主原形質膜,
 HC: 宿主細胞質, FW: 菌糸細胞壁,
 FPM: 菌糸原形質膜, ER: 小胞体, N:
 核, T: 液胞膜, V: 液胞
 (LITTLEFIELD and BRACHER²³⁾による)



第2図 ダイコンべと菌吸器と宿主原形質膜の不連続性

S: シース, G: ゴルジ体
 (白石ら³⁰⁾による)

(*Pseudoperonospora cubensis*) の場合は、宿主原形質膜が吸器発育の一時期に溶失し、吸器成熟後はその修復が起こるとしている。したがって、筆者らの材料でも吸器発育の各ステージにおける宿主原形質膜の存否を、より詳細に観察しなければならないが、筆者らの観察範囲内では、吸器はすべて宿主原形質膜を貫通していた。こうした点を考え合わせると、べと菌はさび菌よりも、より一層人工培養が困難な種類ではないかと推定される。黒田²²⁾は *Peronospora parasitica* 分生胞子の発芽栄養生理を検討し、ダイコン根搾汁液、同搾汁液遠沈分画 (30,000 g, 100,000 g)、ココナツミルク、ウシ血清、各種有機リン酸、ゼラチン、酵母エキス、肝臓エキス、ペプトン、麦芽、レシチンなどを添加して発芽管の生長促進効果を検討したが、付着器形成以降の生長は認められなかった。このような結果は鈴木³³⁾の言葉をかりると“寄生菌だけではなしえないことを宿主がなしとげてくれることに、絶対寄生しかなしえない理由があるのかもしれない”ということになって、ある種の飛躍したアイデアなしに、単にいろいろな有機物を添加してみる試みは行きづまりのように思える。吸器の機能についての BUSHNELL⁶⁾ の総説はあるいは新しいアイデアを生む基礎になるかもしれない。なお、さび菌やうどんこ菌ではレースの存在が明らかになっているが、べと菌では筆者の知るかぎり DUNLEAVY¹³⁾ の報告ただ一つであって、これも解決を要する課題であろう。

おわりに

錬金術や永久運動は自然科学がどれだけ進歩しても絶対に不可能なことが証明されている。しかし、絶対寄生菌の人工培養は近い将来必ず誰かが完成すると考えられる。本稿がそれに少しでも役立てば幸いである。なお、筆者はこの問題の専門家ではないので、見落とした文献もあることと思うが、紙数も尽きたので稿を終える。

引用文献

- 1) 浅田泰次 (1962): 愛媛大紀要第6部 8: 1~103.
- 2) ——— (1966): 農および園 41: 427~431.
- 3) BARNETT, H. L. (1970): Mycologia 62: 750~760.
- 4) BOSE, A. et al. (1971): Can. J. Bot. 49: 1961~1964.
- 5) BUSHNELL, W. R. (1968): Phytopathology 58: 526~527.
- 6) ——— (1972): Annu. Rev. Phytopathol. 10: 151~176.
- 7) ——— et al. (1971): Phytopathology 61: 376~379.
- 8) COFFEY, M. D. et al. (1969): Can. J. Bot.

- 47 : 1291~1293.
 9) ——— et al. (1970) : *ibid.* 48 : 773~776.
 10) ——— et al. (1972) : *Physiol. Plant Path.* 2 : 37~46.
 11) CUTTER, V. M. Jr. (1959) : *Mycologia* 51 : 248~293.
 12) ——— (1960) : *ibid.* 52 : 726~742.
 13) DUNLEAVY, J. M. (1971) : *Amer. J. Bot.* 58 : 209~211.
 14) FOUIND, A. S. et al. (1972) : *Phytopathology* 62 : 1032~1040.
 15) HOLLIS, C. A. et al. (1972) : *ibid.* 62 : 1417~1419.
 16) HOTSON, H. H. et al. (1951) : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 37 : 400~403.
 17) HOWES, N. K. et al. (1972) : *Can. J. Bot.* 50 : 1165~1170.
 18) HURD-KARRER, A. et al. (1947) : *Amer. J. Bot.* 34 : 377~384.
 19) 梶原敏宏 (1969) : 農技研報 C 23 : 63~91.
 20) KUHL, J. L. et al. (1970) : *Can. J. Bot.* 49 : 201~209.
 21) KUNOH, H. (1972) : *Bull. Fac. Agr. Mie Univ.* 44 : 141~224.
 22) 黒田憲三 (未発表) : 愛媛大農学研究科修士論文 1~29.
 23) LITTLEFIELD, L. J. et al. (1970) : *Mycologia* 62 : 609~614.
 24) MOREL, G. (1944) : *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 218 : 50.
 25) 新崎盛敏ら (1967) : 文部省科研費報告書, 農学編 (Ⅲ) 186.
 26) PEYTON, G. A. et al. (1963) : *Amer. J. Bot.* 50 : 787~797.
 27) QUICK, W. A. et al. (1971) : *Can. J. Bot.* 49 : 187~188.
 28) RAJENDREN, R. B. (1972) : *Mycologia* 64 : 591~598.
 29) SCOTT, K. et al. (1969) : *Annu. Rev. Phytopathol.* 7 : 123~146.
 30) 白石雅也ら (1973) : 愛媛大農紀要 18 : 157~178.
 31) ———ら (1974) : 同上 19 (印刷中).
 32) SINGER, S. J. et al. (1972) : *Science* 175 : 720~731.
 33) 鈴木直治 (1966) : 植物の病気 (伊勢村他編 : 現代の生物学 8, 病気の生物学, 岩波, 東京) 169~194.
 34) TUREL, F. L. M. (1969) : *Can. J. Bot.* 47 : 821~823.
 35) ——— (1969) : *ibid.* 47 : 1637~1638.
 36) ——— (1971) : *ibid.* 49 : 1993~1997.
 37) ——— (1972) : *ibid.* 50 : 227~230.
 38) ——— (1973) : *ibid.* 51 : 131~134.
 39) WILLIAMS, P. G. (1971) : *Phytopathology* 61 : 994~1002.
 40) ——— et al. (1966) : *ibid.* 56 : 1418~1419.
 41) ——— et al. (1967) : *ibid.* 57 : 326~327.
 42) YARWOOD, C. E. (1956) : *Annu. Rev. Plant Physiol.* 7 : 115~142.

人事消息

平松甲子雄氏 (林野庁林政部長) は関東農政局長に
 田中慶二氏 (関東農政局長) は退職
 須賀 博氏 (官房兼農蚕園芸局審議官) は東海農政局次長に
 結城庄吉氏 (官房地方課長) は中国四国農政局次長に
 野崎博之氏 (林野庁職員部長) は九州農政局長に
 山下一郎氏 (九州農政局長) は退職
 植草治郎氏 (中国四国農政局次長) は前橋営林局長に
 於保信彦氏 (果樹試験場保護部虫害研究室長) は果樹試験場保護部天敵微生物研究室長に

梅谷献二氏 (果樹試験場保護部虫害研究室主任研究官) は果樹試験場保護部虫害研究室長に
 高野光之丞氏 (埼玉県農試病虫害部長) は埼玉県肥飼料検査所長に
 安 正純氏 (同上試次長) は財団法人公園緑地管理財團武蔵管理センター所長 [埼玉県] 及び飛鳥管理センター所長 [奈良県] に

内田登一氏 (北海道大学名誉教授) は8月17日心不全で逝去されました。御冥福をお祈りします。

次号予告

次9月号は下記原稿を掲載する予定です。
 イネわい性症状と媒介昆虫 西 泰道
 最近におけるドウガネブイブイの多発 深沢永光・山内寅好
Cristulariella 属菌の分類学的研究 横山 竜夫
Cristulariella 属菌によるブドウの新病害 堀本 求・藤井新太郎
 褐色葉枯病

クワゴマダラヒトリの多発生による果樹の

被害 関 道生
 農薬製剤の物理性と付着 坂本 彬
 植物防疫基礎講座
 不完全菌類の見分け方 (3) 椿 啓介

定期購読者以外の申込みは至急前金で本会へ

頒価改訂 1部 260円 送料 16円

植物プロトプラストによるウイルス感染実験系の確立

農林省植物ウイルス研究所 おお つき よし あき
大 槻 義 昭

バクテリオファージ研究におけるバクテリア、あるいは動物ウイルス研究における動物培養細胞は懸濁培養が可能であって、一つ一つの細胞は培養液の中で同一条件下におかれるため細胞の間でのばらつきが少なく、また、ピペットによって定量的に扱える利点をもっている。こういった実験系を有するゆえに上記ウイルスは、植物ウイルスに比べて発見の歴史が浅いにもかかわらず、ウイルスの感染・増殖の機構に関しては植物ウイルスよりはるかに良く調べられている。

植物ウイルス研究の分野でも、遊離細胞の懸濁培養を目指してカルスをを用いて数多くの試みがなされてきたが、植物細胞は固い細胞壁に囲まれているためにウイルスが容易に侵入することができず、したがって感染の効率が非常に低くて満足な結果を得ることができなかった。それでは邪魔な細胞壁を酵素によって溶かしてしまえば、ウイルスは容易に細胞内に侵入できるだろうという考えから、細胞壁を除いた細胞—プロトプラスト—の使用が着目されたのは約8年前である。その後、いろいろな植物から酵素的にプロトプラストを調製する試み、そうして得られたプロトプラストにいろいろなウイルスを感染させる試みがなされてきた。そして今では、植物プロトプラストは植物ウイルス研究の新しい実験系としてほぼ確立された感がある。

そこで、プロトプラストのウイルス感染について今までに得られた知見をまとめて紹介しようというのがこの小文の目的である。プロトプラスト実験系の意義については筆者の研究室の建部室長によって既に本誌上に詳細に論じられているので、参照していただきたい。また、タバコ葉肉組織からのプロトプラストの調製方法についても、同じ論文中に記述されている方法と、現在筆者らの用いている方法との間に大きな差はないので、ここでは省略する。

I 実験系としての必要条件

プロトプラストが植物ウイルスの実験系として確立されるためには、次のような条件を満足させなければならない。第1に、大多数の細胞が同時に感染する必要がある。言いかえれば、感染率が高くなければならない。もし、非感染細胞が過半数を占めているような場合には、感染したウイルスのその後の挙動を追っていくに当た

り、非感染細胞が邪魔になってくる。第2は、多数の細胞に同時に侵入したウイルスは、その後の増殖の全過程が同調的でなければならない。感染後のある時間では、どの細胞でも同じことが行われているならば、ウイルス増殖を経時的に解明していくことが容易になる。葉組織でみられるようにウイルスが一つの細胞でまず増殖し、その細胞から次の細胞へ、そしてまた次へ移るという2次感染が起こるような状態では、ウイルス増殖の1サイクル……1段増殖と呼ばれているが……を経時的に正確に捉えることが不可能に近くなる。だから、プロトプラストでも2次感染が起こるのは望ましくない。第3に、ある程度量的に扱うことができるような細胞数が必要である。すなわち、細胞の中で起こっている現象を1個の細胞について調べるのは容易なことでない。もし、第1、第2の条件が満たされているなら、どの細胞も同じ状態にあるはずであるから、集団的に扱うことが可能なわけである。

このほかにプロトプラストの調製が容易であることとかの2、3の条件があるが、最低上記3条件を満たしていれば実験系として使用可能であると考えられる。これらの条件を満たしている系として筆者らの研究室で開発したタバコ・プロトプラスト—タバコ・モザイクウイルス (TMV)、キュウリ・モザイク・ウイルス (CMV) そしてジャガイモ・ウイルス・X (PVX) の系がある。ここではタバコ・プロトプラスト—TMV 系を中心として、接種の方法、ウイルスの侵入過程、ウイルスの増殖過程と生産量などについて述べてみよう。

II タバコ・プロトプラスト—TMV 系

タバコ・プロトプラスト (口絵写真①) は通常栽培品種キサンチの葉の柵状組織から酵素的に調製したものをを用いている。成熟した1枚のタバコ葉から1,000万個前後のプロトプラストが得られる。これに純化したTMVを一定の濃度に混ぜて接種を行う。TMVの核酸を接種してもプロトプラストが感染することは確かめられている²⁾が、ここではTMV粒子の接種による場合について書くことにする。

1 種接及び培養の方法^{3), 4), 5)}

純化TMVとポリオルニチン(分子量約13万)とをそれぞれ2 µg/mlとなるよう、0.02 Mのクエン酸緩

衡液で pH を 5.2 とした 0.7M マンニトール中に溶かして、25°C に 10 分間おく。次に、0.7M のマンニトールでよく洗ったプロトプラストを $0.5 \sim 1 \times 10^6 / \text{ml}$ の細胞濃度となるように同液に懸濁し、容積比が 1:1 の割合でウイルス液とプロトプラスト液とを混合する。これを 25°C で 10 分間置くと、その間にウイルスがプロトプラストに吸着・侵入し感染がおこる。低速遠心でプロトプラストを集め、無菌的に 3~4 回マンニトール液で洗ってから、下表の培養液に移して培養する。この培地は数種の無機塩と植物ホルモンとして 2,4-D、それに細菌及びかびの増殖を抑えるために抗生物質であるセファロリジンとリモシジンを加えただけの簡単な組成である。プロトプラスト液は通常 50 または 100 ml の三角フラスコに入れ、28°C の恒温器の中で蛍光灯により約 2,000 ルックスの連続照明を当てて培養する。

タバコ・プロトプラスト用培養液

KH ₂ PO ₄	0.2mM
KNO ₃	1mM
MgSO ₄	1mM
CaCl ₂	10mM
KI	1 μM
CuSO ₄	0.01 μM
2,4-D	1 μg/ml
セファロリジン	300 μg/ml
リモシジン	10 μg/ml
マンニトール	0.7 M
pH	5.4

2 感染率

プロトプラスト総数のうち何 % に TMV が感染していたかを表わす感染率は、培養したプロトプラストを TMV 蛍光抗体で染色して、蛍光顕微鏡下で蛍光を示す細胞数と全細胞数とを数え、その比を計算すれば出すことができる⁶⁾。

卵白アルブミンを薄く塗ったスライドグラスにはりつけたプロトプラストを 95% のエタノールに約 10 分間浸して固定する。これを 0.01M リン酸緩衝液-0.85% 食塩液 (PBS) で約 10 分間洗って固定液を除く。次に、スライドグラス上の試料に蛍光色素フルオレセイン・イソチオシアネートを結合させた TMV 抗体 (TMV 蛍光抗体) 液を 1 滴のせ、37°C に 1 時間置いて染色する。この間に蛍光抗体は固定された細胞内に入りウイルス抗原と固く結合する。染色後再び PBS で洗って未結合の蛍光抗体を除き去る。

このようにして染色した標本を蛍光顕微鏡で観察すると、多くのプロトプラストの中に黄緑色に光る塊が数多くあるのが見える (口絵写真②)。これは増殖した TMV が集団をなしていて、この塊に特異的に結合した蛍光抗

体が黄緑色の蛍光を発するからである。

この方法により、通常 500~1,000 個の細胞を観察して感染率を求めている。筆者らの行っている TMV の接種方法では、平均して 90% 前後のプロトプラストが感染していることが明らかになった。すなわち前章に述べた必要条件の第 1 がまず満たされたことが分かる。

次に、このようにして接種した TMV が、その後どのような経過をたどって増殖していくかについて順を追って説明してみよう。

3 ウイルスの吸着と侵入

プロトプラストの場合、固い細胞壁が取り除かれていて原形質膜が露出している状態にあるので、細胞に傷をつけなくても、ウイルスはプロトプラスト内に侵入できるものと予想された。しかし、ただ両者を混ぜただけでは感染はほとんどおこらない。なぜ、そうなのか。それはプロトプラストが TMV を取りこもうとしないからである。ウイルスを効率よく取りこませるためにはポリオルニチンの存在が必要である。ポリオルニチンは塩基性アミノ酸オルニチンの重合したものであるが、このようなポリカチオンが動物細胞でタンパク分子の取りこみ⁷⁾ やウイルス核酸による感染を促進する⁸⁾ ということが報告されている。これは多分ポリカチオンが原形質膜に作用して pinocytosis をおこさせるためであると考えられる。これらと同様の現象がタバコ・プロトプラストでもおこるために TMV 感染が効率良くおこると考えられる。

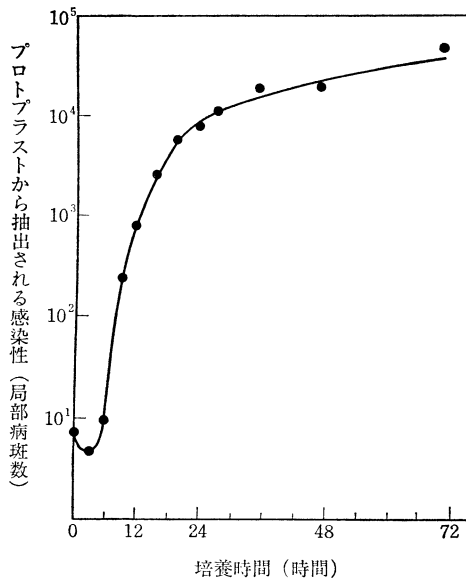
ポリオルニチン存在下で TMV と混合したプロトプラストを固定し、その超薄切片を電子顕微鏡でみると、TMV の吸着、侵入過程を詳しく追跡することができる⁹⁾。それによると、まず TMV はその一端で原形質膜に吸着する。するとその部分の原形質膜は徐々に陥没していき (口絵写真③)、ウイルスを包みこみながら最終的には小さな袋となって細胞表面から離れ、原形質内に入る。すなわち TMV は動物細胞でよく見られる pinocytosis と似た機構でプロトプラスト内に取りこまれる。ポリオルニチンを加えない場合には、前述のような取りこみ像を見いだすことは非常にまれで、原形質膜は平静を保っている。また、TMV を加えずにポリオルニチンだけで処理した場合も同様であった。このことは、プロトプラストが pinocytosis 様の現象を示すには、TMV のような粒子とポリオルニチンの両方の存在が必要であるということを示唆している。

4 ウイルスの増殖

プロトプラストの pinocytosis 様の作用によって取りこまれた TMV は、接種後数時間の間、細胞内に見い

だすことができない。この間に TMV 核酸は coat タンパクを脱ぎ捨て、子孫の TMV の生産にとりかかっているはずである。そして、6 時間培養後には、細胞質内に TMV の粒子が点々と散在しているのを見ることができる。これら新生 TMV の数は、培養時間の経過とともに急激にその数を増し、24 時間後では TMV 粒子の大集団が細胞内のあちこちにでき上がる（口絵写真④）。このような TMV がよく増えた細胞でも、細胞質内の諸器官、核、葉緑体、ミトコンドリアには特に異常は見当たらないし、TMV 粒子以外には感染に伴う構造物も現われない。電子顕微鏡で見た TMV 増殖は以上のような経過をたどるが、各時点で観察される多数のプロトプラスト内でのウイルスの増殖状態はよく似ており、感染が同調的に進行していることを示している。

一方、ウイルス増殖の時間的経過を数量的に表わすと第 1 図のようになる⁹⁾。これは培養後の多くの時点でプロトプラストを取り、その抽出液中に含まれる TMV の感染力を局部病斑法により定量したものである。培養開始時に少し感染力がみられるが、これはプロトプラストに吸着あるいは侵入した親ウイルスによるものである。最初にプロトプラストに吸着する TMV 数は、計算によって 1 細胞当たり 10^3 個前後と推定される。この感染性はその後減少し、次に 6 時間目ころから増え始め 20 時間ころまで急速に増え続ける。24 時間ころから後は速度が鈍るが増殖は 72~96 時間まで継続する。この曲線は、プロトプラストの超薄切片に現われる TMV 粒



第 1 図 タバコ葉肉プロトプラストにおける TMV の増殖曲線

子数から、細胞全体に含まれる粒子数を算定しグラフにして得られた曲線⁹⁾とよく一致している。

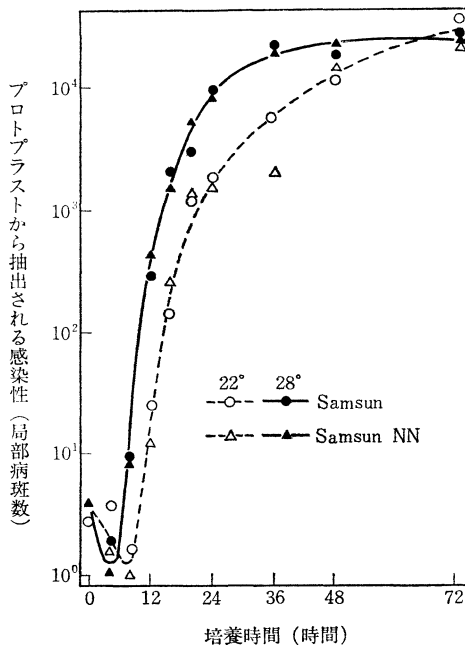
細胞中に生産される TMV 量は 72 時間で大体 10^6 個になる。この量は、葉における細胞当たりの TMV 量にはほぼ匹敵する。このことは、懸濁培養されているプロトプラストが、葉の中の細胞にほぼ匹敵するウイルス生産能力をもっていることを示している。次に、培養中に 2 次感染がおこるかどうかの問題についてであるが、プロトプラスト内で増えたウイルス粒子はプロトプラストが破壊されない限り、ほとんど培養液中に放出されない。仮に培養の途中にこわれた少数の細胞から TMV が出たとしても、その TMV は未感染細胞を感染させることはできない。というのは、培養液中にはポリオルニチンが入っていないから、これの存在なしでは感染はおこらないはずである。事実、蛍光抗体法による観察で、培養 12 時間後で 90% の感染率があったものは更に培養を続けて 48 時間後になっても感染率はもはや増加しない。上記電子顕微鏡観察と 2 次感染のないことから、プロトプラストにおける TMV 増殖は、一段増殖であると考えてよいであろう。

以上のことから、タバコ・プロトプラスト-TMV の系が、前述の諸条件を満足させるものであることが理解されたと思う。従来用いられてきた組織レベルの系は、こういった特性をもっていなかったため、ウイルスの感染・増殖の経過を追っていくのは、はなはだ困難であった。プロトプラストの系の確立は、そういう研究の遂行を容易にした。例えば、前述の電子顕微鏡によるウイルス感染過程の追跡であるが、感染後ある時間の細胞は、どれをとってもウイルス増殖のほぼ同じ時期にあるわけで、その時間の前後の細胞での観察と比較するとき、増殖の進み方を容易に判断できるわけである。次に、この系を用いて行われた実験を少し紹介しよう。

5 局部病斑宿主のプロトプラストにおける TMV 感染¹⁰⁾

普通のタバコ品種の場合、TMV は全身感染しモザイク症状などの病徴を表わすが、*Nicotiana glutinosa* やそれに由来する N 遺伝子をもつタバコ品種では、ウイルスに感染した細胞が壊死を起こすので TMV は全身には拡大しない。このように TMV 感染に対し壊死反応を示すようなタバコ品種からプロトプラストをとり、TMV を感染させると細胞は死ぬであろうか。TMV の局部病斑宿主であり、assay plant として用いられる Xanthi nc や Samsun NN のプロトプラストに TMV を接種し、22 または 28°C で培養すると、TMV の増殖曲線は N 遺伝子をもたない全身感染宿主 Xanthi や Samsun プ

プロトプラストでの TMV 増殖曲線と、それぞれの温度でほぼ一致する(第2図)。このことは、細胞当たりの TMV 生産能力は局部病斑宿主と全身感染宿主との間に差がないことを示している。植物体の TMV 感染による壊死現象は温度に左右され、高温、例えば 28°C の場合には、N 遺伝子をもつ宿主でも壊死は起こらず TMV は全身に感染するが、28°C で管理していた植物を 22°C に移したり、または最初から 22°C におくと壊死が起こる。これに反し、プロトプラストにすると、28 から 22°C に移しても、あるいは最初から 22°C で培養しても TMV 感染に起因する細胞の死は全く認められなかった。



第2図 局部病斑宿主(Samsun NN)と全身感染宿主(Samsun)のプロトプラストにおける TMV の増殖曲線

これらのことは、N 遺伝子に起因する細胞の壊死は細胞レベルでの現象ではなく、組織レベルで起きる。すなわち感染細胞とその周りの細胞との相互作用によって起きると考えられる。N 遺伝子による細胞壊死は、それによってウイルスが局在化され感染の拡大が防がれるのでウイルス病防除にも寄与しうる重要な現象であるが、その機構についてはほとんど知られていないと言ってよい。プロトプラストを用いた実験によって、これが細胞間の相互作用によると示されたことは、今後、この問題の研究に良い手がかりを与えるものであろう。

6 タバコ以外の植物を用いた実験

今まで書いてきた研究は全部タバコ葉肉プロトプラストを用いて行われたが、タバコ以外の植物のプロトプラストを用いても TMV 感染が試みられている。イギリスの COCKING は、トマト果実の組織からペクチナーゼだけでプロトプラストを調製し、これに TMV を接種して電子顕微鏡で観察している¹¹⁾。また、東大の日比らはペチュニア葉肉組織からペクチナーゼとセルラーゼの同時処理で良好なプロトプラストを調製して TMV 感染実験に用いている¹²⁾。いずれもナス科植物である。タバコは葉が大きいため大量のプロトプラストが容易に得られるが、植物の育成管理が比較的難しい。ペチュニアは植物管理はやさしく、かなり安定してプロトプラストがとれるようである。

III タバコ・プロトプラスト-TMV 以外のウイルス

今までに述べてきたようにプロトプラストのウイルス感染の研究は、諸性質がよく調べられていて扱いが容易である TMV を用いて始められた。TMV は 300×15 nm の桿状粒子であるが、植物ウイルスの多くは球状とかひも状の形態をもっている。また、TMV 粒子は他の植物ウイルスに比べると極立って安定であり、植物内での増殖量も非常に多い。いわば、数多くの植物ウイルスの中で特異な存在であると言えるかもしれない。プロトプラストの系でウイルス研究をやるうとする場合、TMV 感染で得られた結果は、ある点では他のウイルスにも当てはまる現象であるだろうが、反面、TMV 特有の現象も含まれているに違いない。したがってタバコに感染する TMV 以外のウイルスについてもプロトプラスト実験系ができることが望ましい。

1 キュウリ・モザイク・ウイルス (CMV)^{13), 14)}

CMV は径 25 nm の球形ウイルスであり、寄生範囲が非常に広く、汁液伝染のほか、アブラムシによっても伝播される。また、粒子としてはかなり不安定で汁液の中で 1~2 週間で感染性を失う。この CMV は TMV とほぼ同じ接種方法によって約 80~90% のプロトプラストに感染させることができる。感染には TMV と同様ホリオルニチンが必要であり、プロトプラストへの吸着・侵入像も TMV と全く同一であって、細胞の pinocytosis 様作用によって取りこまれる。増殖曲線は感染性定量が困難なため描かれていないが、蛍光抗体染色の観察から TMV と類似の増殖が予想されている。TMV と異なるのは CMV 粒子が核内にも存在していることである(口絵写真 ⑤)。細胞内におけるウイルスの核酸合成、タン

パク合成及びウイルス粒子形成の場所についてはまだ明確にされていない。CMV 感染プロトプラストを経時的に電子顕微鏡で詳しく観察することにより、核と細胞質のどちらに早く CMV 粒子が現われてくるかが分かれば、これらの問題についてより確かな知見が得られるであろう。

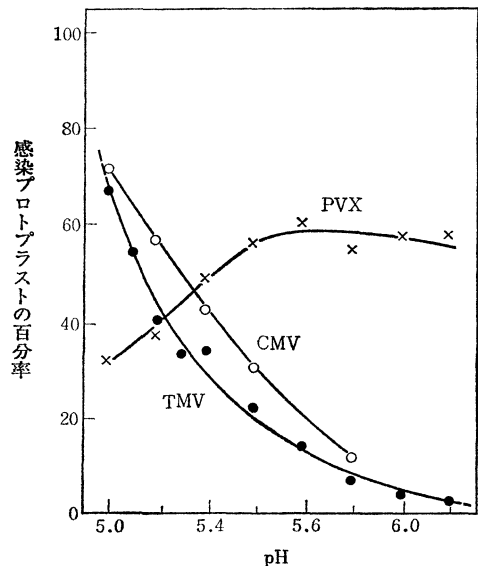
2 ジャガイモ・ウイルス・X (PVX)¹⁵⁾

ひも状の形態をもつこのウイルスは TMV や CMV ほどではないが、それでも 60~70% のプロトプラストに感染する。PVX による感染実験で特に目立つのは、感染細胞中に特徴的な封入体が現われることである。これは薄い膜の両面にリボソームよりわずかに小型の球体が一面に並んだような構造物である(口絵写真 ⑥)。この構造物は PVX に感染した植物細胞中で既にみつけられており¹⁶⁾、その機能について興味をもたれているものであった。というのはその特異な構造と、この構造物の間に PVX 粒子が束になってはさまっている像や、PVX 粒子があたかもそこから出て来つつあるような像がしばしば見られること、それに感染の後期では消失してしまうことなどから、PVX 合成との関連が問われていた。プロトプラストでの実験結果は、この構造物は少なくともウイルス合成の場ではないことを示している。それはウイルス増殖を経時的に追った場合、この構造物が現われる以前に子孫の PVX 粒子が細胞質内に現われること、プロトプラストの生理状態によっては PVX がよく増えている細胞でも封入体はほとんど見当たらないことがある。という二つの理由による。

プロトプラストの PVX 接種の条件は前述の 2 種のウイルスでの場合と多少異なる。おおざっぱな説明をすると、まず感染率がウイルス液の pH によって受ける影響は TMV や CMV と全く異なったパターンを示す(第 3 図)。pH の影響というのは、プロトプラスト及びウイルスの表面電荷、それにポリオルニチンの+電荷の 3 者の関係で、ウイルスがプロトプラストに吸着しやすく、あるいは吸着しにくくする作用であろうと考えられるが、PVX が他の二つと全く異なった挙動を示すことについては、まだ試験中である。pH のほかに、より高い感染率を得るためには PVX 濃度とポリオルニチン濃度を少し高くしなければならない。

3 その他のウイルス

植物ウイルスの中には、TMV や PVX のように 1 種類の粒子から成るもののほかに、例えば前述の CMV は粒子は 1 種であるがその核酸は 3 成分に分かれる。また、タバコ・ラトル・ウイルス (TRV) は長短 2 種類の桿状粒子から成る。更に CCMV, BMV などの球形ウ



第 3 図 プロトプラストへのウイルス感染に対するウイルス液 pH の影響

イルスはシロ糖密度勾配遠心で数本のバンドに分かれる。これらのウイルスでは、その幾つかに分かれる成分がそれぞれの働きを持つと考えられていて、どのような機能がどの成分に持たされているか興味深いところである。中にはこの問題がある程度解明されているウイルスもある。例えば TRV ではウイルスの核酸合成のための情報は長粒子に、coat タンパク合成の情報は短粒子に持たされていることが明らかになっている。しかし、ほとんどのウイルス、特に球形の多成分ウイルスではこれらが明確にされていない。

これら多成分ウイルスのプロトプラストへの感染が最近試みられて良い結果を得ている。植物ウイルス研究所の本吉がイギリスの Jone Innes 研究所で行った仕事であるが、多成分ウイルスの一つ、cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) は粒子でも核酸でも、筆者らの行っているのとほぼ同じ接種方法でよくタバコ・プロトプラストに感染することが分かった¹⁷⁾。CCMV は、従来タバコを寄主範囲に含まないとされていたが、プロトプラストに感染することから、この点が再検討され、植物体で CCMV が増えるかどうかを試験した。その結果高濃度のウイルス液を接種すると、ほとんど無病徴であるが CCMV は増殖し、接種葉からも接種した上葉からもウイルスが回収され、全身感染していることが分かった。本吉らはタバコ・プロトプラストに CCMV のほか、pea enation mosaic virus (PEMV)¹⁸⁾ や bromegrass mosaic virus (BMV)¹⁹⁾ の一系統が高率に感染すること

を見いだしている。

IV 今後の展望

上述のようにタバコ・プロトプラストについては既に TMV, CMV, PVX など各種の形態をもつ植物ウイルス, CCMV などの多成分系ウイルスによって、十分に高い頻度で感染させることが可能である。したがって、これらのウイルスについての実験系はほぼ確立されたものと考えてよく、これから、この実験系を使って多方面の研究が展開されるであろう。植物ウイルスの感染実験系としてのプロトプラストの特徴を要約すると、①感染が多くの細胞に一斉におきること。②感染が同調的に進行して2次感染がないためウイルス増殖の1サイクルを観察できること。③懸濁液として扱えるので精度の高い定量的実験が行えることなどであろう。これら従来の組織レベルの実験系には見られない特徴は、ウイルス増殖機構の生化学的究明には特に有利な特徴であって、既に TMV を用いて細胞内におけるウイルス核酸合成の研究²⁰⁾やウイルス特異タンパク合成の研究²¹⁾などに利用され、見るべき成果をあげている。これらの研究は建部の総説によっても既に紹介されている²²⁾。多成分系ウイルスについては、従来の実験系では多成分の核酸が細胞内でどのように複製されているかを見ることはほとんど不可能であったから、プロトプラストの利用によって新しい知見が産み出されるものと期待される。

植物ウイルス増殖の細胞学的研究も今までの材料では各細胞で感染の段階が揃っていないため、多くの困難があり、その成果は、主として感染後期に現われる変化の研究に限られていた。上述のプロトプラスト系の特徴から、この系を使うことにより感染・増殖初期の問題、例えば脱外被、核酸複製、タンパク合成あるいは粒子形成についても、より確実な細胞学的な観察ができるようになると思われる。

最近筆者らはタバコ・プロトプラストに TMV, CMV, PVX などを混合して接種したり、あるいは連続して接種すると2種あるいは3種のウイルスによる重複感染を高い頻度で起こしうることを見いだした²³⁾。この結果はプロトプラストが2種以上のウイルス粒子を同時に取りこみ、入ったウイルスは同じ細胞内で平行して増殖することを示している。したがってプロトプラストは、一つの細胞内におけるウイルスの相互作用の研究に有効な材料となることが予想される。例えば多成分ウイルスの各成分間の相互作用や、近縁のウイルス間に見られる干渉現象の研究がプロトプラスト系の利用によって新しい展開をみせるかもしれない。

植物ウイルスの寄主範囲は接種植物における病徴の発現あるいはウイルスの回収によって決められてきたが、従来承認されていた寄主範囲が必ずしも厳密なものでないことは、上述のタバコ-CCMV の例からも想像される。プロトプラスト系は感染効率が高いため、ある植物におけるウイルスの感染・増殖を極めて鋭敏に検出できるから、この材料を使うことにより寄主範囲の決定がより厳密に行いうるものと思われる。また、抵抗性品種と感受性品種のプロトプラストにおける感染により、宿主の抵抗性を決定する機構の研究の一つの手がかりが得られるのではないかと期待される。

今までウイルス感染の試みられたプロトプラストはタバコを主として、ペチュニア、トマトなどナス科の植物に限られている。しかし、プロトプラストはムギなどの単子葉植物を含む多くの植物からも分離されており、これらの植物のプロトプラストについても将来ウイルスの感染が試みられ、多くのウイルスと植物の組み合わせでプロトプラストの実験系が確立されて行くものと予想される。

引用文献

- 1) 建部 到 (1968) : 植物防疫 22 : 375.
- 2) S. AOKI et al. (1969) : Virology 39 : 439.
- 3) I. TAKEBE et al. (1969) : Proc. Nat. Acad. Sci. 64 : 843.
- 4) ——— et al. (1971) : Les Cultures de Tissus de Plantes, p. 503. Centre National de Recherche Scientifique, Paris.
- 5) Y. OTSUKI et al. (1972) : Virology 49 : 188.
- 6) ——— et al. (1969) : ibid. 38 : 497.
- 7) H. J. P. RYSER (1968) : Science 159 : 390.
- 8) G. KOCH, et al. (1966) : Biochem. Biophys. Res. Comm. 24 : 304.
- 9) T. HIBI et al. (1972) : Ann. Phytopathol. Soc. Japan 38 : 350.
- 10) Y. OTSUKI et al. (1972) : Virology 50 : 45.
- 11) E. C. COCKING (1966) : Planta 68 : 206.
- 12) 日比忠明ら (1968) : 日植病報 34 : 375.
- 13) Y. OTSUKI et al. (1973) : Virology 52 : 433.
- 14) Y. HONDA et al. (1974) : Phytopathology 64 : 30.
- 15) Y. OTSUKI et al. (1974) : J. gen. Virol. 22 : 375.
- 16) T. A. SHALLA et al. (1972) : Virology 49 : 654.
- 17) F. MOTYOYOSHI et al. (1973) : J. gen. Virol. 20 : 177.
- 18) ——— and R. HULL (1974) : ibid. in Press.
- 19) ———, J. B. BANGROFT and J. W. WATTS (1974) : ibid. in Press.
- 20) 青木茂治ら (1971) : 第44回日本生化学会大会.
- 21) F. SAKAI et al. (1972) : Mol. Gen. Genet. 118 : 93.
- 22) 建部 到 (1972) : ウイルス 22 : 1.
- 23) 大槻義昭ら (1973) : 日植病報 39 : 224.

植物寄生性マイコプラズマ分離培養の問題点

農林省農業技術研究所 な す そう ちよう
奈 須 壮 兆

1967年、我が国でクワ萎縮病などから発見された植物寄生性マイコプラズマ様微生物(植物マイコプラズマ)は、yellows diseasesの研究に新しい分野を開いた(土居ら、1967)。現在、世界各国から50種を越すこの種の病植物から植物マイコプラズマが検出され、これが病原体であろうということに疑問を持つ人はいない。

植物から分離したマイコプラズマの培養について最初に報告されたのはアメリカで、Alfalfa mosaic virusに感染したエンドウからであった(HAMPTONら、1969)。しかし、この培養した微生物がいわゆる植物マイコプラズマの範疇に入るものかどうか疑わしく、その実体は明らかでない。続いて同じアメリカで、Rio Grande系 corn stuntに感染したトウモロコシから植物マイコプラズマが分離され、培地中で43日後もその病原性を維持していた(CHENら、1970)。同じころイタリアでClover dwarfをネナシカヅラで接種したニチニチクワからも、植物マイコプラズマが分離された(LOMBARDOら、1970)、また、台湾でwhite leafに感染したサトウキビからも分離培養に成功したことが報告された(LINら、1970)。これらは病原性検定の結果が明確でないが、ともあれ植物マイコプラズマの培養に曙光が見られてきた。

1970年から71年にかけてフランスにおいて clover phyllody と stubborn から植物マイコプラズマが分離培養され、大きな反響をよんだ(COUSINら、1970; FAIVRE-AMIOTら、1970; GIANNOTTIら、1971 a, b; SAGLIOら、1971)。用いた培地はすべて PPLO broth とウマ血清及びイーストエキストラクトを主体とするマイコプラズマ用培地に2~3の成分を加味したものであるが、clover phyllody では培養後にヨコバイに注射し、病原性が確認され“コッホの原則”に則った実験に成功した。一方の stubborn については媒介昆虫が不明であるため、病原性の確認がなされていないが、これとは全く別にアメリカでも stubborn の分離培養に成功している(FUDL-ALLAHら、1972)、培養された植物マイコプラズマが stubborn から特異的に分離される微生物であることは確かである。また、同じような培地を用いてインドで citrus greening からの分離培養に成功し(GHOSHら、1971)、我が国からもキリてんぐ巢、リンドウてんぐ巢、ペチュニア aster yellows、ミツバてんぐ巢より分離培養に成功したと報告された(寺中ら、1973)。しかし、これ

らはすべて、培養後の病原性について報告されていない。

スタンフォード大学のマイコプラズマ研究グループが、マイコプラズマ用培地17種を用いて aster yellows からの分離培養を試みた結果、すべて失敗に帰している(HAYFLICKら、1973)。HAYFLICKは著名なマイコプラズマ研究者であるが、植物マイコプラズマの培養にも早くから関心を持ち、1968年筆者がカリホルニア大学滞在中培養のための材料供給を依頼され、共同研究を申し込まれたことがあった。そのHAYFLICKと協同研究者の新井らは aster yellows mycoplasma-like organism をあえて今も yellows disease agents(YDAA)とよび、動物のマイコプラズマとはかなり異質の微生物と考えている。しかし、一方ではフランスの stubborn, clover phyllody のように2~3の成分を加味したマイコプラズマ培地で比較的容易に培養ができ、stubborn の培養株はすでに新属新種 *Spiroplasma citri* と記載されている。この *S. citri* は前述のように病原性がまだ確認されていないが、最近イギリスで citrus little leaf から分離培養した *spiroplasma* をヨコバイ *E. plebejus* に注射し、クローバーで検定して病原性を確認した(DANIELSら、1973)。*S. citri* の病原性もいずれは確かめられるであろう。

さて、植物マイコプラズマ培養の研究は aster yellows とその類似のグループなど、大部分のものでは進展せず、わずかに stubborn, greening, little leaf グループと clover phyllody などで急速に進展している。このように植物マイコプラズマ培養には難易の差があり、現在の時点で培養の全貌を論ずることは困難である。今後、新しい手法でこの植物マイコプラズマの栄養要求を明らかにし、有効な培地が得られたならば、微生物としての植物マイコプラズマの特徴が明らかになり、*Spiroplasma* 以外にも幾つかの属が設定されるであろう。最近 *S. citri* には培養中に bacteriophage の感染が認められ(COLEら、1973)、これの研究にまた新しい一石が投じられた。

I 分離の問題点

まだ有効な培地がなく、なお培地探索の時期にある植物マイコプラズマの大部分の種類では、培養に入る前段階として、病組織から感染性高かつそれを長時間維持する inoculum を作製することが先決である。

1 病植物からの分離

病組織を細切し低温で緩衝液か培養液とともに磨砕する方法が最も普通に行われている。しかし、この磨砕液の感染率(磨砕液注射虫の媒介虫率)は不安定である。例えば corn stunt の病植物磨砕液は 4.14~10% の感染率を示すが、これが 25°C では 4 時間で消滅する (CHEN ら, 1970)。また、クワ萎縮病ではマイコプラズマ培地で磨砕した液が 10.5% の感染率を示し、これに 0.02M 亜硫酸ソーダを加えると感染率が 45.2% に上昇する(蚕糸試, 1972)、しかし、これも室温では数時間で消失するようである。Western X 病ではセルリーの病組織を 1.2M シュークロース加用 AcTC 培地で磨砕すると、その磨砕直後の液は感染性を示さないが、室温 (28°C) で 1 日保存後に 1.7%、2 日保存後に 35% の感染率となる、しかし、3 日後にはこの感染性は消滅する (NASU ら, 1974)。

病植物磨砕液の感染性は上記のように不安定であるが、微量の亜硫酸ソーダを加えることにより感染性がたかまり、また、室温に放置することによっても同様にたかまる。これは磨砕液に感染阻害物質が存在することを示唆している。病植物磨砕液ではこの阻害物質の産生と活性を抑圧し、感染性を長時間維持する磨砕法を検討すべきであろう。

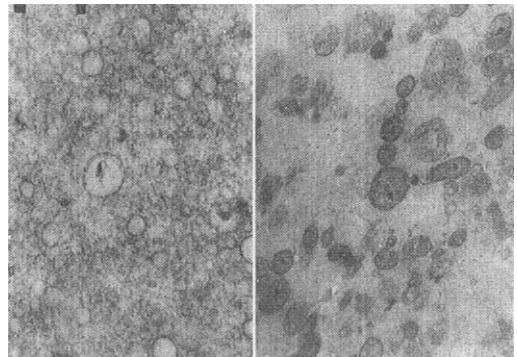
病植物はグラム単位の量を磨砕するが、これを後述のミリグラム単位で磨砕する保毒虫の場合と比較すると、磨砕した病植物の中の植物マイコプラズマの絶対量は非常に多いはずである。しかし、病植物磨砕液の感染率は前記のように 35~45% である。この感染率を Western X 病の場合に当てはめて考えてみると、保毒虫 10 頭を緩衝液 0.5 ml で磨砕し、その 10^{-4} 希釈液の感染率に相当する (WHITCOMB ら, 1966)、また、電顕的に調べても病植物磨砕液中の植物マイコプラズマの量は非常に少ない。これらのことから病植物からの分離に際して、その収量を上げる方法をも併せて検討しなければならない。

2 保毒虫からの分離

磨砕液は、保毒虫を緩衝液か培養液とともに低温室で

磨りつぶし、低速遠心した上清液を 0.45μ フィルターでろ過して作製する。この液の感染率すなわち磨砕液注射虫の媒介虫率は第 1 表のようである。これによると感染性零のイネ黄萎病のような場合から、100% の感染率となる Western X 病の場合まで、その反応は様々である。保毒虫磨砕液でも感染性が低い場合も多いが、これは磨砕した組織に由来する阻害物質によるものではないらしく、ミツバてんぐ栗病では磨砕液に特定のアミノ酸を加えると感染率が変化する(杉浦ら, 1974)。保毒虫磨砕液では用いる液の組成の影響があるようである。

クワ萎縮病のように、媒介虫率が低率から高率まで振れるのは、液の物理性が関係しているようである。例えば Western X では、その細胞培養液で保毒虫を磨砕し室温に置くと、数時間で感染性を失う。この感染性喪失の原因を調べるために、まず磨砕液中の植物マイコプラズマの状態を電顕で観察した(第 1 図)。これによると細胞培養液 (AcTC 培地, Cmu ら, 1967) で磨砕した液中に植物マイコプラズマがほとんど検出できず、わずかに検出できてもその微細構造は失われている。これに対して培養液に 0.9M シュークロースを加えた高張液中では正常な状態で検出される。この微細構造は細胞中で検



第 1 図 Western X 病保毒虫磨砕液中のマイコプラズマ様微生物 (NASU ら, 1974)

保毒虫を AcTC 培地で磨砕したもの (左)、
AcTC 高張培地で磨砕したもの (右)。

第 1 表 保毒虫磨砕液の感染性

保 毒 虫	磨 砕 に 用 い た 液	媒 介 虫 率*	発 表 者
イネ黄萎病保毒ツマグロヨコバイ	AcTC 高張培地	0 %	奈須ら, 1974 b
ミツバてんぐ栗病保毒ヒメフタテヨコバイ	AcTC 高張培地	4.8~ 34.6	杉浦ら, 1974
クローバー Phyllody 保毒 <i>E. plebejus</i>	M II 培地	7.5~ 72.3	GIANNOTTI ら, 1969
クワ萎縮病保毒ヒシモンヨコバイ	グリシンーリン酸緩衝液	4.5~ 93.8	蚕糸試, 1974
エゾギク萎黄病保毒 <i>M. fascifrons</i>	生理食塩水	60.0~ 92.0	SINHA ら, 1967
モモ Western X 病保毒 <i>C. montanus</i>	AcTC 高張培地	95.0~100.0	NASU ら, 1974

* 保毒虫磨砕液を健全幼虫に注射し、一定期間後に個体検定して得た媒介虫率。

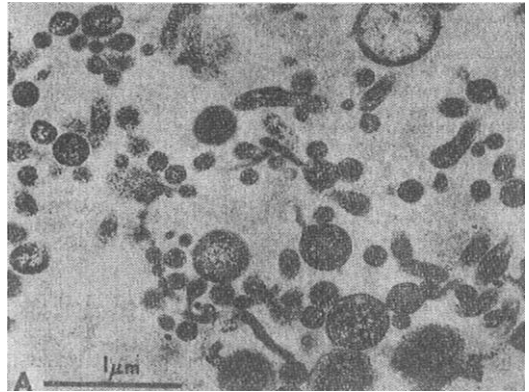
出される状態とほとんど変わらず、磨砕によって大きな衝撃を受けることなく液中に取り出されている。

生体内の増殖部位における植物マイコプラズマの浸透圧はまだ明らかでないが、しかし、上記のような高張条件が存在するとは考えにくい。にもかかわらず植物マイコプラズマを生体から分離する場合、それが生活している環境より低張液に遭遇させると短時間で破壊される。これを防ぐには大部分の植物マイコプラズマでは予想以上の高張液を必要とするようである。この浸透圧に対する適応の範囲は植物マイコプラズマの種類によって異なるようで、例えば GIANNOTTI ら (1968, 1969) は、0.35M シュエクロースを磨砕液に加えて分離に成功し、前述の Stubborn 及び Clover phyllody 及びワタ畑から採集した病植物、昆虫からは、特別な操作をすることなく培地中に植物マイコプラズマが分離されている (GIANNOTTI ら, 1963)。これらのことから、培地の優劣もさることながら生体からの分離の難易がその後の培養の難易と併行しているようにも考えられる。

II 培養の現状

1 マイコプラズマ培地による培養

CHEN ら (1970) は Rio Grande 系 Corn stunt から植物マイコプラズマを分離培養するために数種の培地を用いたところ、マイコプラズマ培地に3種の組織培養用培地 10% を加用したものが有効であった (第2表)。すなわちこの培地に病植物組織で接種して 25°C で培養し、更にそれをヨコバイ *D. elimatus* に注射して媒介虫率を調べた結果、培養5日目に 20%、8日目に 85.7%、14日目に 78.6% となり、更に継代培養43日目でも 10% の媒介虫率を示した。この培地を電顕で調べたところ第2図のように明らかに植物マイコプラズマが認められている。CHEN らはこの結果を *in vitro* での corn stunt mycoplasma-like organism の maintenance として報告しているが、1週間後に培地中の感染性がたかまること、



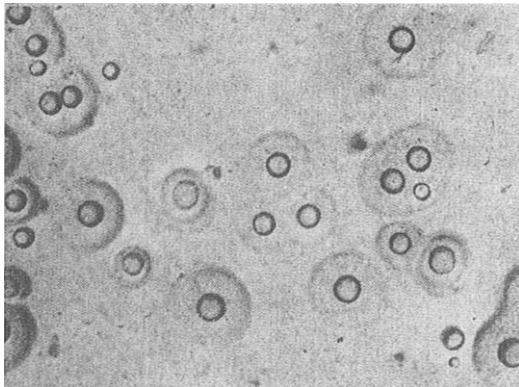
第2図 継代培養した corn stunt mycoplasma-like organism (CHEN ら, 1970)

及び継代培養後の電顕写真などから判断すると、この培地で植物マイコプラズマはわずかではあるが増殖していたものと考えられる。この実験はその後、追試されていないが、植物マイコプラズマ用の培地探索に一つの刺激を与えた。しかし、CHEN らは現在、昆虫組織培養の手法を応用して植物マイコプラズマを培養しようという研究の方向に進んでいる (McBEATH ら, 1973)。

GIANNOTTI ら (1971 a, b, 1972) 及び SAGLIO ら (1971) は、第2表に示す培地を用いて stubborn 及び clover phyllody などから植物マイコプラズマを分離し培養した。SAGLIO らの培地はマイコプラズマ培地に糖類を加え、ソルビトールで浸透圧を調整した培地である。GIANNOTTI らの培地は初期には昆虫体液や植物汁液を加えていたが、次第に改変されて第2表のようにマイコプラズマ培地に糖類を加えたものになり、これを MII-71 といっている。更にこれを固形培地とするには PPLO broth にかえて PPLO Agar 3.7g を加えている。GIANNOTTI らはこの MII-71 より更に簡単な MII-70 (マイコプラズマ培地にグルコース 1g、シュエクロース 0.5g 加用) を用いて Clover phyllody から植物マイコ

第2表 主要な植物マイコプラズマ用培地

Corn stunt 用 CHEN ら, 1970	Stubborn 用 SAGLIO ら, 1971	Clover phyllody 用 GIANNOTTI ら, 1972
PPLO broth1.5 g	PPLO broth2.1 g	PPLO broth2.4 g
イーストレート0.1 g	イーストエキストラクト1.0 g	イーストエキストラクト10.0 ml
シュエクロース8.5 g	シュエクロース1.0 g	シュエクロース0.5 g
TC-199 medium.....5.0 ml	フラクトース0.1 g	グルコース1.0 g
Schneider's	グルコース0.1 g	フラクトース0.1 g
drosophila medium2.5 ml	トリプトン1.0 g	マラトース0.1 g
GMRL-1066 medium2.5 ml	ソルビトール7.0 g	ラクトース0.1 g
ウマ血清20.0 ml	ウマ血清20.0 ml	ガラクトース0.1 g
蒸留水69.0 ml	蒸留水80.0 ml	ウマ血清20.0 ml
pH6.8		蒸留水70.0 ml
		pH7.5



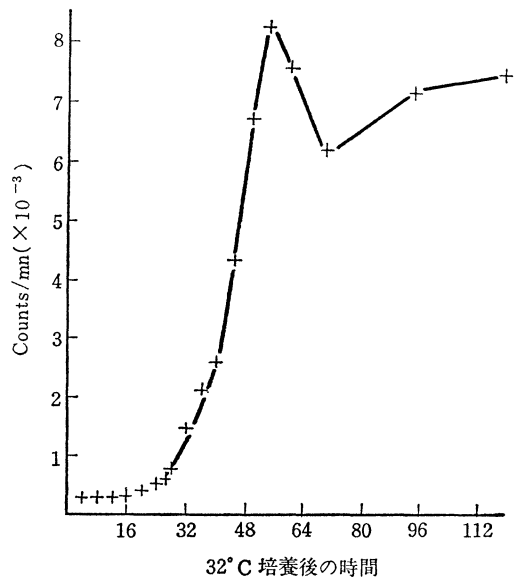
第3図 Clover phyllody mycoplasma-like organism のコロニー (GIANNOTTI ら, 1971 b)

プラズマを分離培養した。これによると 31°C で 6~10 日培養後に液が黄色になり、固形培地では径 0.2~1 mm のコロニーが生じた (第3図)。この培養した植物マイコプラズマをリンゲル液に於いてヨコバイ *E. plebejus* に注射したところ、その 35~86% が Clover phyllody を媒介した。更に 4 回継代培養したものをヨコバイに注射した結果でも 25~33% の媒介虫率が得られた。これらの結果から、MI-70 培地で培養したこの植物マイコプラズマは、確かに Clover phyllody の病原体であることを確認し、培地中では 31~37°C の間で 2~3 日で増殖すると結論した。しかし、24°C 培養ではコロニーは形成するが病原性は失われていたという。

SAGLIO ら (1973) は第2表の培地を用いて stubborn から *S. citri* を分離培養し、培地での増殖の状態を明らかにした (第4図)。これによると培養3日目に ³²P の取りこみが多く、この時期に最も盛んな増殖に入ったことを示している。この増殖速度は上記の Clover phyllody の場合とほぼ一致する。増殖の温度も stubborn では 27~33°C の範囲にあって適温は 30°C である (FUDL-ALLAH ら, 1972)。この点もほぼ一致する。

2 組織培養培地による培養

ヨコバイ *Agallia constricta* 細胞培養培地 (AcTC 培地, CHIU ら, 1967) にシュクロースを加えた高張液で、Western X 病保毒虫から植物マイコプラズマを分離培養した (NASU ら, 1974)。この AcTC 培地は Western X 病を媒介するヨコバイ *Colladonus montanus* の細胞培養にも用いられる (RICHARDSON ら, 1971)。培養の結果は第3表のとおりで、接種1週間後に感染性が失われるが、2週間後には上昇した。中でも 0.9M シュクロース加用 AcTC 高張培地での媒介虫率が最も高く、0.2M シュクロースと *C. montanus* 培養細胞を加



第4図 液体培地での stubborn mycoplasma-like organism, California isolate 189 の増殖 —³²P-labelled inorganic phosphate の取りこみ— (SAGLIO ら, 1973)

第3表 ヨコバイの細胞培養培地で培養した Western X mycoplasma-like organism の感染性 (奈須ら, 1974 a)

培地	接種直後	1週間後	2週間後
AcTC+0.9M シュクロース	—	0 %	62.5%
AcTC+0.2M シュクロース + <i>C. montanus</i> 培養細胞	—	5.0%	32.5%
AcTC+0.2M シュクロース	67.5%	0 %	22.5%

えた AcTC 培地がこれに次ぐ媒介虫率を示した。培地に培養細胞を加えたのは、細胞から植物マイコプラズマの増殖に有効な物質が供給されることを期待した。しかし、その効果は期待したほどではなかった。また、植物マイコプラズマが培養細胞へ感染することも期待したが、感染は起きなかった。また、AcTC 高張培地をミツバてんぐ巢病で用いた結果は、培養3週間まで 0~1.3% の感染率であった (塩見ら, 1974)。

植物組織培養用の Murashige-Skoog 基本培地に 2,4-D を加え、これでクワ萎縮病株の新梢を培養すると、節部の植物マイコプラズマは培養前と変わらないが、培地に形成されたカルス細胞では植物マイコプラズマが増殖する像が見られた。しかし、このカルスを継代するとその増殖は減少するようである (蚕糸試, 1974)。これは

病植物の組織からカルス細胞とともに植物マイコプラズマを分離して培養しようとする試みである。

結 語

植物マイコプラズマはその限界膜を寄主の細胞質中に露出している。この細胞内存在様式が他の微生物と大きく異なる点であるが、この限界膜がER膜としての働きを持つものと考えられる。植物マイコプラズマではこの膜の持つ比重は大きく、これ以外の微細構造は膜の内側にわずかに存在するライボゾームと、核に相当する slender strand のみである。限界膜は植物マイコプラズマが生存に適しない条件下ではその外側に surface projection を形成して保護の機能を果たし、好適条件下では寄主の細胞質中に潮濕状に広がる。この好適条件下では膜が物質選択と輸送の場となり、わずかに存在すると考えられる酵素系はこの膜構造でその機能を果たしているであろう。したがって膜の栄養要求と代謝の問題は、培地の組成を考える上にまず第一にとりあげなければならない。この膜がコレステロールを持ち膜そのものの必要な栄養としてステロールを要求することは、この種の微生物の特徴として知られている。植物マイコプラズマでも同様でしかもコレステロール合成の機能はないと考え、これを培地から取りこませて膜の代謝基質や終末産物の搬体としての機能を果たさせようとしている。コレステロールは培地に血清の形で加えるが、植物マイコプラズマでは血清の種類によってはこれが致死的な働きをする場合が多い。これはマイコプラズマ培地に加えるウマ血清でも同様である。大部分の植物マイコプラズマの培養が壁に当たっている最初の原因にまずこの血清の問題があるように考えられる。この問題ひいてはステロール要求を根本的に考えなおす必要があろう。我々は植物マイコプラズマの栄養要求を根本的に検討するために考案した手法を用いて、血清の問題はもちろん無機塩の影響、アミノ酸・ビタミン類の問題、炭水化物要求などについて、段階的に追及している途中である。

フランスで培養に成功した植物マイコプラズマの培地は、普通のマイコプラズマ培地にわずかの成分を加えたものである。世界各国でこの培地を用いて他の多くの植物マイコプラズマの培養が試みられたが、ほとんど失敗し培地改良の手掛りさえ得られないのが現状である。この壁を破るためには新しい培地探索の方法を開発し、植物マイコプラズマの栄養要求を根本的に調べる必要があろう。

引用文献

CHEN T. A. et al. (1970) : Science 167 : 1633~1636.

- CHIU R. J. et al. (1967) : Nature 215 : 1076~1078.
 COLE R. M. et al. (1973) : J. Bacteriol. 115 : 367~386.
 COUSIN M. T. et al. (1970) : Ann. phytopathol. 2 : 245~250.
 DANIELS M. J. et al. (1973) : Nature 244 : 523~524.
 土居養二ら (1967) : 日植病報 33 : 259~266.
 FAIVRE-AMIOT A. et al. (1970) : Ann. Phytopathol. 2 : 251~258.
 FUDL-ALLAH ABD EL-SHAFFY A. et al. (1972) : Phytopathology 63 : 256~259.
 GHOSH S. K. et al. (1971) : Curr. Sci. 40 : 299~300.
 GIANNOTTI J. et al. (1968) : Revue de Zoologie Agricole 4~6, 69~72.
 ——— et al. (1969) : C. R. Acad. Sci. Paris t. 268 : 845~847.
 ——— et al. (1971 a) : ibid. 272 : 1776~1778.
 ——— et al. (1971 b) : Physiol. Vég. 9 : 541~553.
 ——— et al. (1972) : Parasitica 28 : 78~88.
 ——— et al. (1973) : UNE NOUVELLE APPROCHE DE L'ÉTUDE ÉPIDÉMIOLGIQUE D'UNE PHYLLODIE, LA VIRESCENCE FLORALE DU COTONNIER 1~7.
 HAYFLICK L. et al. (1973) : Abstracts for Conference on Mycoplasma and Mycoplasma-like Agents of Human, Animal and Plant Diseases. Abstract No. 43, The New York Academy of Sciences.
 HAMPTON R. O. et al. (1969) : Plant Dis. Rep. 53 : 499~503.
 LIN S. C. et al. (1970) : Phytopathology 60 : 795~797.
 LOMBARDO G. et al. (1970) : Ann. Micr. 20 : 84~89.
 McBEATH J. H. et al. (1973) : Abstracts of Papers, Abstract No. 0278, 2nd ICPP.
 NASU S. et al. (1974) : Appl. Ent. Zool. 9 : 53~57.
 奈須壮兆ら (1974 a) : 日植病大会講要 E5.
 奈須壮兆・杉浦己代治 (1974 b) : 未発表 (応動昆虫投稿中)
 RICHARDSON J. et al. (1971) : Ann. Entomol. Soc. Am. 64 : 722~729.
 蚕糸試験場桑病研究室 (1972) : 病害虫関係専門別総括検討会議資料, 資料 No. I-1 (病理)
 ——— (1974) : 特研〔植物マイコプラズマ〕推進会議資料, 農林省技術会議 : 4~9.
 SAGLIO P. et al. (1971) : C. R. Acad. Sc. Paris 272 : 1387~1390.
 ——— et al. (1973) : Pathogenic Mycoplasmas, A Ciba Foundation Symposium : 187~198.
 SINHA R. C. et al. (1967) : Virology 33 : 702~708.
 杉浦己代治ら (1974) : 日植病大会講要 E3.
 寺中理一ら (1973) : 宇都宮大農学部「学術報告」 8(3) : 11~19.
 WHITCOMB R. F. et al. (1966) : Virology 28 : 448~453.

組織培養によるウイルスフリー植物の育成

農林省農事試験場 ^{はま} 濱 ^や 屋 ^{えつ} 悦 ^し 次

はじめに

ウイルス病罹病植物からウイルスフリー (virus free 無ウイルス) の健全植物を得る方法として、組織培養の応用は現在のところ最も有力な手段である。生長点組織の培養による無ウイルス植物の育成法は、既に実用的な技術として多くの無ウイルス植物の作出に成功しているのは周知のところであり、その技術の概略については本誌の第24巻第9号に小文を載せた。今回は主として、組織培養によって無ウイルス植物の得られる機作、あるいは最近注目されてきた、カルス (callus) を経由させて一度に多数の無ウイルス植物を得ようとする方法について若干の解説を試みたい。

なお、ここでいう組織培養とは、細胞・組織・器官培養を総称する広い意味での「組織培養」であることをおことわりしておく。

I 生長点培養法

1 無ウイルス植物の得られる生長点組織の大きさ

無ウイルス植物育成を目的とする場合の生長点組織は一般に茎の生長点組織を指す。この生長点といわれる部分の範囲はかなり莫然としているが、ここでは茎端から数個の葉原基を含む範囲の部分であるとする。いわゆる「茎頂 (shoot tip)」も同じような範囲であると考えられる。

生長点組織を培養して無ウイルス植物を得る方法は、多くのウイルスと寄主植物との組み合わせについての成功例が報告されており、筆者らの経験によっても¹²⁾、サツマイモ、ジャガイモ、ユリ、イチゴ、カーネーション、ペチュニア、ダリア、サトウキビ、アイリス、ニンニク、

キク、ワサビダイコンなど、生長点組織を培養して独立個体に育成できた寄主とウイルスの組み合わせでは、すべて無ウイルス植物が得られている。しかし、培養して無ウイルス植物の得られる生長点組織の大きさは、各ウイルスと寄主の組み合わせによって異なり、0.2 mm 以下のごく小さな生長点組織を培養しなければ無ウイルス植物の得られない tobacco mosaic virus (TMV) とペチュニアの組み合わせや 0.5 mm 以下でなければならぬ potato virus X (PVX) とジャガイモの組み合わせのようなものから、数 mm の大きさの生長点組織を培養しても無ウイルス植物の得られた sugarcane mosaic virus とサトウキビの組み合わせのようなものまであった。

2 無ウイルス植物の得られる機作

生長点培養法は、生長点の先端にウイルスの存在しない部分があるという考えに基づいて、MOREL ら (1952, 1955) によって始められ、事実多くの無ウイルス植物が得られているのであるが、生物検定、蛍光抗体法あるいは超薄切片の電子顕微鏡観察によって直接生長点の無ウイルスの範囲を調べた結果と、培養によって無ウイルス植物の得られる生長点組織の大きさは、必ずしも一致しない。例えば、森ら (1973)¹⁴⁾ が生物検定及び蛍光抗体法で調べたところによると、cucumber mosaic virus (CMV) に感染しているタバコ、ペチュニアなどの生長点の無ウイルス部分は先端から約 0.2 mm 以内であるが、筆者らの培養試験によると、CMV は 1 mm 以上の大きさの生長点組織の培養によっても無ウイルス植物が得られている。また、HOLLINGS と STONE (1964)⁶⁾ によれば、carnation mottle virus (CaMV) にかかっているカーネーションの生長点の無ウイルス部分はごく先端

第1表 大きさ別カーネーション茎頂の CaMV 濃度 (HOLLINGS ら, 1964)

茎頂の数	茎頂の大きさ (mm)	検定植物における lesion 数			ウイルスのなかった茎頂	
		総 lesion 数	接種葉数	1葉あたり lesion 数	数	%
3	0.1	3	13	0.2	2	66
20	0.25	137	61	2.2	8	40
30	0.5	1198	70	17.1	4	13
9	0.75	429	12	35.3	1	11
4	1.0	432	11	39.2	0	0
5	1.0 以上	1972	20	98.6	0	0

注 検定植物は *Chenopodium amaranticolor*.

近辺のみに限られているが(第1表), STONE (1963)²³⁾の行った培養試験の結果によると, それよりも大きな生長点組織を培養しても高率に無ウイルス植物が得られている(第2表)。すなわち, 完全に無ウイルスの生長点部分でなくても, 培養によって無ウイルス植物の得られる場合があると考えられるのである。

第2表 カーネーションの茎頂培養結果と無ウイルス株率 (STONE, 1963)

材 料	培 養 数	生育株数	無ウイルス株率 %
頂 芽	184	37	57 (21/ 37)
側 芽	831	109	64 (70/109)

注 1 mm 以下 (多くは約 0.5 mm) の生長点組織の培養結果。

HOLLINGS らはこれについて, 生長点部分にはウイルスを不活化する機構 (inactivation system) があって, この作用は生長点が成熟部分と切り離されることにより助長されるものと考察している⁶⁾。ウイルスを含む生長点組織を培養しても無ウイルス植物の得られる理由としては, HOLLINGS らの考えたような生長点自体の作用のほかに, 培地中の特異物質の有無とは関係なく, 培養という特殊な条件が, 組織中のウイルスの不活性化しは増殖阻害をすることも推察される。

しかし, 生長点先端のごく小部分の培養によってのみ無ウイルス植物の得られるウイルスと寄主の組み合わせもあるものであって, これはおそらく培養当初から無ウイルスの組織を培養する必要のある場合であろう。森ら (1971, 1973)^{7, 14)}の観察した TMV, PVX の生長点部分における分布と培養試験の結果はおおよそ一致している。比較的大きな生長点組織の培養によってでも無ウイルス植物の得られる組み合わせには, 培養中にウイルスの消失する場合がかなり含まれている可能性が高い。

組織のウイルスを不活化する積極的な方法として, 井上ら (1971)⁸⁾は, シンビジウムの生長点組織を *odontoglossum ringspot virus* 抗血清で処理してから培養し, 育成植物の無ウイルス化率を高めている。培養中の高温処理, 抗ウイルス剤の培地添加は, 組織のウイルスの消失を促す意味で効果のある補助的手段であろうが, むしろ組織の分離前の元株に対して処理の行われることが多い。また, 植物ウイルスの増殖阻害作用があるとされる植物ホルモン類の培地添加は, 培養組織がカルス化する場合が多く, その場合は後述のカルスを経由する培養法にあてはまる。通常の生長点培養は, 原則的に組織をカルス化しないのが一般である。

3 生長点部分のウイルス分布についての考察

生長点になぜ無ウイルス部分が存在するのか, あるいはなぜ無ウイルス部分の範囲がウイルスと寄主の組み合わせによって異なるのかなどは, 培養組織中のウイルスの消長とも関連があるのであろうが, 生長点部分における, ウイルスの細胞間移行, 細胞のウイルスに対する感受性あるいはウイルス不活化作用などの特異性が想像されるものの, 確かなことは依然として明らかにされていない。しかし, ウイルスと寄主の組み合わせの特異性について, 土崎ら (1971)²⁶⁾ は興味のある報告をしている。すなわち, 生長点部分の超薄切片の電顕観察によると, ササゲ・モザイク・ウイルス (2系統), アズキ・モザイク・ウイルス (1系統) とササゲ (3品種) あるいはアズキ (1品種) の組み合わせで, 種子伝染率の傾向と生長点におけるウイルス分布状態とはよく一致し, 種子伝染をする組み合わせの生長点の無ウイルス部分は先端から 0.1~0.2 mm 以下であり, 種子伝染をしないアズキとササゲ・モザイク・ウイルスの1系統との組み合わせでは無ウイルス部分は 0.3 mm 以上あった。このことは, 生長点部分のウイルス分布状態が配偶子感染とも関係のあることを示している。また, 抗ウイルス剤 (テオウラシルなど) や高温処理 (多くは 36~40°C, 1週間~2か月間) によって, ウイルス病罹病植物の生長点の無ウイルス域が拡大する現象も, 問題解明の糸口になる可能性がある。高温処理の応用例その他については, 下村ら (1967)²²⁾ の総説を参考にされたい。

一方, 生長点に無ウイルス部分が存在しないとする報告も以前からかなりあり, 近年にも WALKER ら (1968, 1970)^{27, 28)} の cherry leaf roll virus など NEPO ウイルスや CMV とタバコ, キュウリの組み合わせの報告, APPIANO ら (1972)²⁾ の PVX とジャガイモの組み合わせの報告などがある。彼らは, 生長点組織の培養によって無ウイルス植物の得られるのは培養中にウイルスが消失するためである, と考えるのである。しかし, 生長点部分をつぎ木やさし木することによって無ウイルス植物を得た例もあり, 生長点にはやはり元来無ウイルス部分があって, その範囲が条件によって大幅に (場合によってはほとんどゼロに) 変異するのではなかろうか。

II カルス培養による無ウイルス植物の育成法

I これまでの報告例

植物体の各組織・器官は, 個体中である一定の規制を受け, 方向性を持ち, また, 分化した組織・器官としてそれぞれの特徴ある形態を有している。これらの分化してしまつた, あるいはしつづつある組織・器官の分化の

方向性を失わせ、無定形に増殖する「カルス」とよばれる細胞群を人為的に誘導することができる。このカルスをウイルス病罹病植物の組織から誘導し、それから無ウイルス植物を育成する方法が近年注目を集めている。まず、その実例を幾つかあげてみる。

SVOBODOVÁ (1966)²⁴⁾ は PVX, Y, S とジャガイモの組み合わせの生長点組織及び PVY とタバコの組み合わせの茎の組織から、kinetin (K) を含む MURASHIGE-SKOOG の培地 (MS 培地, 1962-RM...revised medium ともいう) でカルスを誘導、カルスに生じた shoot (莖葉を含む芽条) を切り取って移植し、無ウイルス植物を得たと報告している。

HANSEN と HILDEBRANDT (1966)²⁵⁾ は、TMV に感染したタバコの茎の pith から、coconut milk (CM) 及び 2,4-D を含む培地でカルスを誘導、5 回以上継代し、1.5(mg/l, 以下同じ) IAA+5.0K+MS 培地で shoot を形成、その shoot が 1~2cm になったとき基部で切断して WHITE の培地に移植発根させ、38 株のウイルス感染株と 4 株の健全株 (この株は TMV に抵抗性を示さなかった) を得た。森ら (1973, 1974)^{15,26)} も、TMV に感染したタバコの葉から、2.0IAA+0.2K+MS 培地でカルスを誘導、1~5 回継代、2.0IAA+2.0K+MS 培地に移して shoot を形成させ、shoot の長さが約 1cm のとき基部から切り取って 2.0IAA+0.02K+MS 培地に移植して発根、0~50% の無ウイルス株を得ている。

PILLAI と HILDEBRANDT (1969)²⁰⁾ は、ゼラニウムの茎頂部や節間の pith から、無機塩+糖+CM あるいはそれに 2,4-D を加えた培地でカルスを誘導、0.1 NAA

+10.0K+MS 培地と明暗交代条件で shoot を形成、10.0IAA+0.04K+MS 培地で発根させ、この shoot を WHITE 培地、次いでろ紙片で培養体を支持する液体培地 (filter paper bridge) に移して幼植物を育成した。約 300 株の育成株を得たが、そのうち 1 株を除いて全株がウイルス症状を示さなかった。また、ABO EL-NIL と HILDEBRANDT (1971)¹⁾ は、1 核期の花粉を含むゼラニウムの葯から、CM (150 ml/l)+2~2.5NAA+2.5K+WHITE 培地でカルスを誘導、0.5NAA+2.5K+MS 培地と明暗交代条件で shoot を形成、前の場合と同様にして幼植物を育成、育成株はすべてウイルス病症状を示さなかった。

WALKEY ら (1969)²⁸⁾ は、cherry leaf roll virus (CLRV) あるいは arabis mosaic virus にかかっている *Nicotiana rustica* の約 0.6 mm の生長点組織 (100% ウイルスが検出された) を、8.0 IAA+2.56 K+LINSMAIER-SKOOG 培地 (LS 培地, 1964-RM ともいう) で培養、無ウイルス株を得たが、培養期間と無 CLRV 株率の関係について、培養期間 (16~108 日間) が長いほど無ウイルス株率 (50~100%) が高くなるとしている。

大沢ら (1973, 1974)^{17,19)} のイチゴに関する成績は、現在のところ実用的に最も意義のある成功例であろう。彼らは、strawberry mottle virus, mild yellow edge virus 及び crinkle virus に感染しているイチゴから、ランナーの生長点組織を 0.1~0.5 mm の大きさに切り取って 10⁻⁵ モル benzyl adenin (BA)+LS 培地に置床、もしくは 2~3 mm のつぼみの 1 核期の花粉を含む葯を採取し 10⁻⁵ モル BA+10⁻⁶ モル NAA+LS 培地に置床

第3表 MURASHIGE-SKOOG の培地の組成

Mineral salts (mg/l)

Major elements		Minor elements	
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6.2
KNO ₃	1900	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	KI	0.83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Na ₂ -EDTA	37.3*	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8*	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Organic constituents			
ショ糖	30 g/l	寒天	10 g/l
Edamin (optional)**	1 g/l	myo-Inositol	100mg/l
グリシン	20mg/l	ニコチン酸**	(0)0.5mg/l
Indoleacetic acid***	1~30mg/l	ピリドキシン塩酸塩**	(0)0.5mg/l
Kinetin***	0.04~10mg/l	チアミン塩酸塩**	(0.4)0.1mg/l

* 1 l 当たり FeSO₄·7H₂O 5.57 g 及び Na₂-EDTA 7.45 g 含む原液を 5 ml/l 加える。

** LINSMAIER-SKOOG の培地は () 内の量とする。それ以外の組成は同じ。

*** これらを除いたものを基礎培地とする。

してカルスを誘導、カルスの増殖及び shoot の形成は 10^{-5} モル BA+LS 培地で行い、shoot を LS 基礎培地に移植して幼植物にまで生育させた。培養は 12 時間照明、 25°C の条件で行っている。こうして得た培養育成株は、薬培養の場合も半数体ではなかったが、すべて元株のもっていたウイルスが検出されなかった。特筆すべきことは、一つの培養系統 (clone) から多数の育成株 (50 株以上) の得られたこと、及びウイルスを含んでいた可能性の高い薬組織由来の育成株からも全くウイルスが検出されなかったことであろう。

2 本法の基本過程

本法の過程を整理すると次のようになる。

(1) カルスの誘導

ウイルス病罹病元株の茎頂部、薬、茎の pith、葉肉あるいは根など、あらゆる部分を材料にしてカルスを誘導することが可能である。これはいいかえれば脱分化の過程である。カルスの誘導には、IAA, NAA, 2,4-D などの auxin の比較的高濃度 (一般に $1\sim 2\text{ppm}$ 以上) の培地添加が条件 (ときに K, BA など cytokinin だけでよい場合もある) であり、cytokinin, GM の併用はカルス化を促進する (あるいはこれらの併用を必須とすることもある)。

(2) カルスの増殖

カルスを増殖させることによって、得られる育成植物の数を増加させることができ、また、それと同時に、カルス増殖期間中にウイルスの消失あるいは偏在 (局在) 化が期待される。しかし、カルスの継代が多くなり、あるいは培養期間が長くなると、shoot の形成は悪くなる傾向にある。カルスの維持、増殖には、一般に auxin (及び cytokinin) の培地添加が必要である。

(3) shoot 及び根の形成

再分化の過程である。カルスにおける shoot 形成の条件を、山田 (1970)³⁰⁾ は次のように要約している。

- ① 培地内の auxin 濃度を下げるか、除く。
- ② 培地内の cytokinin の濃度を高める。
- ③ 培地内の有機態窒素含量を増加する。

根の形成の条件は、shoot 形成の条件とおおよそ逆の傾向にある。

(4) 幼植物の培養育成

以上のようにして得られた shoot を、植物ホルモン類のない基礎培地で、土壤 (水耕、砂耕その他を含む) に移植できる幼植物にまで育成する。

(5) ウイルスの検定

ウイルスの有無の検定は、育成された植物について行う場合もあるし、培養中のカルスについて行う場合も考

えられる。

以上本法についての一般的な基本過程を述べたが、このうち特に重要な問題は、培養カルス中でのウイルスの消失あるいは偏在と、カルスからの shoot の再分化である。

3 培養カルス中のウイルスの消長及びカルスからの shoot の再分化

(1) カルス中のウイルスの消長

ウイルスに全身的に感染している植物体の組織からカルスを誘導した場合、そのカルスにおけるウイルスの消長は、ウイルスと寄主の組み合わせによって、二つの型に分けることができる。第1は、比較的短期間の培養、少回数の継代によって、カルス全体からウイルスが消失してしまう型であり、第2は、ウイルスの偏在 (局在) は起こるが、全体的なウイルス濃度は比較的安定している型である。

第1の消失型は、先に述べたイチゴやゼラニウムの例がこれにあてはまる。ともにカルス誘導後間もなくから shoot の分化を行わせ、しかもゼラニウムの場合の1株を除き育成株の全株でウイルスが認められなかった。近藤 (1967, 1968)^{10,11)}によると、CaMV とカーネーションの組み合わせのカルスでは、ウイルスの偏在がまず起こり、数回 (約半年) の継代でウイルスはほとんどなくなったが、カルスが緑色を保つような条件 (培地の糖を減少) にすると 10 回 (約1年) の継代によってもウイルスが消失しなかった。このことは、脱分化の程度とウイルスの消長とが関係していることを示している。

第2の偏在 (局在) 型は、TMV とタバコの組み合わせが典型的である。TMV に感染したタバコから誘導したカルスについての HILDEBRANDT ら (1958, 1966)^{5,3)} KASSANIS (1967)⁹⁾、森ら (1971)¹³⁾、日高ら (1973, 1974)^{4,18)}の報告を総合すると、カルス中の TMV の消長、分布は、おおよそ次のようになる。カルス誘導後数回の継代によって、TMV の濃度は感染タバコ葉の $1/20\sim 1/30$ に低下するが、それ以後の濃度低下は少なく、カルス全体としての TMV 濃度はかなり長期にわたって安定となる。この状態における TMV 感染細胞率は少なくとも $30\sim 40\%$ あり、この値はタバコ葉における感染細胞の割合に近いので、個々の細胞のウイルス量が少ないものと考えられる。また、蛍光抗体法によって、TMV 感染細胞の分布を調べると、pith など通常の組織では感染細胞が組織全体に一樣に分布しているのに対し、カルスでは感染細胞が集団となって点在し、強い局在の傾向がみられる。この型のカルスから shoot を分化させれば、健病双方の育成株を生ずるであろう。

以上、二つの型について述べたが、この区別は絶対的なものではなく、ウイルスと寄主の組み合わせによって中間的な型もあり、また、同じ組み合わせでも、継代のしかた、培地の組成、その他の培養条件、あるいは clone などによっても差があると思われる。REINERT (1966)²¹⁾ は、CMV, tobacco ringspot virus (TRSV), tomato ringspot virus (ToRSV) あるいは tobacco etch virus (TEV) にそれぞれ感染したタバコから、0.2K+0.1 NAA+MS 培地でカルスを誘導、2週間おきもしくは4週間おきに継代、6か月間培養したところ、一般に4週間おき継代のほうがウイルス濃度が低く、CMV は継代とともに連続的に濃度が低下、ToRSV は4週おき5回目の継代の終わりには検出されなくなり、TRSV と TEV は比較的安定であったと報告している。

いずれにしても、カルスと脱分化していない培養組織との間には、ウイルスの消長に明確な差が認められる。筆者らの行った試験でも、PVX 保毒のジャガイモの1~3mmの生長点組織からカルスを誘導し、6か月ないし1か年間隔で継代したところ、clone のウイルス検出率は次第に低下し、5年後には全 clone でウイルスが検出されなくなったのに対し、同様の生長点組織を WHITE などの普通培地に培養した場合には、5年後でも全培養体から PVX が検出された。Svobodová (1966)²⁴⁾ は先に述べた報告において、K を加えた培地 (auxin については記載がない) でのみ無ウイルス植物が得られたのは、K 添加培地のカルスの生長が速いのでウイルスの移行が間に合わなかったと考えているが、カルス化の程度にも関係していたのではないかと推察される。

カルスのウイルスの消失あるいは偏在には、生長点のウイルスの分布や培養中の消失と同じく、細胞のウイルスに対する感受性、細胞間のウイルスの移行、なんらかのウイルス不活化作用などの問題が考えられるが、カルスも生長点組織も細胞が脱分化あるいは未分化の状態であり、これと無関係ではないであろう。今後の重要な研究課題である。

(2) カルスからの shoot の再分化

当然のことであるが、ウイルスの消失あるいは偏在したカルスから、shoot を再分化させ、幼植物にまで育成しなければならない。カルスからの shoot 形成の一般的な条件は、先に示したとおりであるが、植物の種類、カルスの clone、培養の履歴などによって、auxin や cytokinin の種類、濃度、濃度比、光周期その他の培養条件の要求はそれぞれ異なり、また、植物によっては再分化の極めて困難なものもあるので、最適条件の検索が肝要である。各種の植物のカルスの再分化について新関ら

(1970)¹⁶⁾ の文献調査がある。

III 今後の展望

MOREL らによって始められた生長点培養法は、それまで救いようのなかった多くのウイルス病罹病植物を無ウイルス化する途をひらき、そしてそれはいまやカルス培養と結びつき、一挙に大量の無ウイルス植物をうる方法にまで発展しようとしている。

生長点培養法では、これまでの経験によると、生長点組織を培養して独立個体が育成されさえすれば、無ウイルス植物の得られる可能性があるが、原則として1個の生長点から1株の育成植物が得られるのみであり、また、場合によっては極めて小さな生長点組織を分離・培養しなければならぬため、高度の熟練を要し、培養能率も高いとはいえない。

カルスを経由する方法でも同様に、独立個体が育成されさえすれば、無ウイルス植物の得られることはほぼ確実と思われる。しかも、ウイルスの除去、得られる育成植物の数、あるいはその他の技術的な面において、生長点培養法よりもはるかに有利な点をもっている。しかし、そこには、培養カルス中のウイルスの消長や確実なウイルス検定方法など植物病理学的な研究と、カルスからの再分化の問題などの組織培養そのものの技術的な進歩の裏づけがなければ、せつかくの方法もいたずらに应用範囲のせまいものになってしまうであろう。また、カルスを経由することにより、遺伝的な形質の変化の可能性もありうることである。これらの諸問題が解決されるならば、大量液体タンク培養による pathogen-free の健全苗を種子なみに生産することもあながち夢ではないかもしれない。

おわりに

組織培養による無ウイルス植物の育成について、最近の考え方とそれに関連した研究報告をかいつままで述べたが、培養細胞の植物生理学的な特異性あるいは植物ウイルス学の基礎的な問題など未解決の点の余りにも多いのが痛感される。近年、組織培養による無ウイルス植物の育成は、病害関係の研究者ばかりではなく、育種や園芸関係の人たちの間にも関心が高まっているので、情報の交換など一層連絡を密にして研究を進めたい。

引用文献

- 1) ABO EL-NIL, M. M. and A. C. HILDEBRANDT (1971): Plant Dis. Repr. 55: 1017~1020.
- 2) APPIANO, A. et al. (1972): J. gen. Virol. 14: 273~276.

- 3) HANSEN, A. J. and A. C. HILDEBRANDT (1966) : *Virology* 28 : 15~21.
- 4) 日高 醇ら (1973) : 日植病報 39 (3) : 227 (講要).
- 5) HILDEBRANDT, A. C. et al. (1958) : *Federation Proceedings* 17 : 986~993.
- 6) HOLLINGS, M. et al. (1964) : *Ann. appl. Biol.* 53 : 103~118.
- 7) 細川大二郎ら (1971) : 関東東山病虫研年報 18 : 76.
- 8) 井上成信ら (1971) : 日植病報 37 (3) : 198 (講要).
- 9) KASSANIS, B. (1967) : *Methods in Virology Vol. I* : 537~566.
- 10) 近藤 章 (1967) : 日植病報 33(2) : 102(講要).
- 11) ——— (1968) : 同上 34(3) : 196 (講要).
- 12) 森 寛一ら (1969) : 農事報告 13 : 45~110.
- 13) ———ら (1971) : 日植病報 37 (3) : 203 (講要).
- 14) ———ら (1973) : 関東東山病虫研年報 20 : 74~75.
- 15) ———ら (1973) : 同上 20 : 76.
- 16) 新関宏夫ら (1970) : 育種学最近の進歩 第11集 : 69~81.
- 17) 西 貞夫ら (1974) : 農耕と園芸 29(2) : 83~85.
- 18) 大村敏博ら (1974) : 日植病会講要集 : C 28 (講要).
- 19) 大沢勝次 (1973) : 農林水産研究情報 27 : 29~30.
- 20) PILLAI, S. K. et al. (1969) : *Amer. J. Bot.* 56(1) : 52~58.
- 21) REINERT, R. A. (1966) : *Phytopath.* 56 : 731~733.
- 22) 下村 徹ら (1967) : ウイルス (1, 2) : 1~14.
- 23) STONE, O. M. (1963) : *Ann. appl. Biol.* 52 : 199~209.
- 24) SVOBODOVÁ, J. (1966) : *Viruses of Plants, North-Holland Publishing Co.* : 48~53.
- 25) 谷口達雄ら (1974) : 日植病会講要集 : C 30 (講要).
- 26) 土崎常男ら (1971) : 日植病報 37(1) : 17~21.
- 27) WALKEY, D. A. G. et al. (1968) : *J. gen. Virol.* 3 : 311~313.
- 28) ——— et al. (1969) : *ibid.* 5 : 237~241.
- 29) ——— et al. (1970) : *ibid.* 7 : 159~166.
- 30) 山田康之 (1970) : 育種学最近の進歩 第11集 : 39~44.



○第7回農薬科学シンポジウム開催のお知らせ

共催：日本学術会議植物保護・農薬研究連絡委員会，
日本農芸化学会，日本植物病理学会，日本応用
動物昆虫学会，日本雑草防除研究会，植物化学
調節研究会

期日：49年10月6日(日)午前10時~午後4時30分

会場：東北大学農学部第1講義室
(仙台市堤通雨宮町1の1，
電話 0222 (72) 4321 番)

内容：

- 1 農薬の土壌微生物に対する影響と土壌中の微生物分解 岩手大学農学部 渡辺 巖氏
- 2 化学物質の突然変異性
国立遺伝学研究所 賀田恒夫氏
- 3 弱毒ウイルス利用によるトマトモザイク病の防除 農林省植物ウイルス研究所 大島信行氏
- 4 農薬用抗生物質の開発と問題点
理化学研究所 見里朝正氏

5 安全農薬の技術開発

海洋科学技術センター 石倉秀次氏
科学技術庁 安尾 俊氏

参加費：500円(当日講演要旨代を含む)

連絡先：仙台市堤通雨宮町1の1(〒980)

東北大学農学部農薬化学教室 山下恭平氏
(電話 0222 (72) 4321 番)

宿泊申込：仙台市中央2の8の12(〒980)

こけし旅館内 仙台中央旅館組合
(電話 0222 (22) 4639 番)

A 3,500円, B 3,000円, C 2,400円

(いずれも朝食のみ, 税・サービス料込)

予約 2,000円, 9月15日までに

○農薬の安全性に関するシンポジウム開催のお知らせ

主催：日本学術会議植物保護・農薬研究連絡委員会

期日：49年10月29日(火)

会場：日本学術会議講堂

(東京都港区六本木7の22の34)

内容：

- 1 農薬の安全性と問題点
東京大学医学部 斎藤 守氏
- 2 農薬安全使用と問題点
農薬残留研究所 後藤真康氏
- 3 討論(補足発言者6名)

中央だより

— 農 林 省 —

○病害虫発生予報第3号発表さる

農林省は昭和49年6月29日付け49農蚕第3946号をもって昭和49年度病害虫発生予報第3号を発表した。

○病害虫発生予報第4号発表さる

農林省は昭和49年7月20日付け49農蚕第4563号昭和49年度病害虫発生予報第4号でもって、主な病害虫の向こう約1か月間の発生動向の予想を発表した。その概要は、①発生時期は概して並。②イネいもち病の発生がやや多ないし多くなる。③ジャガイモ疫病、リンゴ斑点落葉病、モモ灰星病、ブドウ晩腐病の発生がやや多くなるといったものであった。なお、今回の予報にとりあげられた病害虫は下記のとおりである。

〔イネ〕いもち病、紋枯病、白葉枯病、ヒメトビウンカと縞葉枯病、ツマグロヨコバイ、ニカメイチュウ、セジロウンカ及びトビイロウンカ、〔ジャガイモ〕疫病、〔カンキツ〕そうか病、黒点病、かいよう病、ヤノネカイガラムシ、ミカンハダニ、〔リンゴ〕斑点落葉病、黒星病、モモヒメシンクイガ、コカクモンハマキ、キンモンホソガ、ハダニ類、クワコナカイガラムシ、〔ナシ〕黒斑病、黒星病、シンクイムシ類、コカクモンハマキ、ハダニ類、クワコナカイガラムシ、〔モモ〕せん孔細菌病、灰星病、コスカシバ、モモハモグリガ、ハダニ類、クワシロカイガラムシ、〔ブドウ〕晩腐病、うどんこ病、フタテンヒメヨコバイ、〔カキ〕炭そ病、うどんこ病、カキミガ、フジコナカイガラムシ、〔チャ〕炭そ病、コカクモンハマキ、チャハマキ、チャノサンカクハマキ、チャノミドリヒメヨコバイ、カンザワハダニ。

○病害虫発生予報第5号発表さる

農林省は昭和49年8月10日付け49農蚕第4955号昭和49年度病害虫発生予報第5号でもって、主な病害虫の向こう約1か月間の発生動向の予想を発表した。その概要は、①発生時期は概して並。②イネいもち病の発生が多くなる。③リンゴ斑点落葉病、モモハモグリガの発生がやや多くなるといったものであった。なお、今回の予報にとりあげられた病害虫は下記のとおりである。〔イネ〕いもち病、紋枯病、白葉枯病、ニカメイチュウ、セジロウンカ及びトビイロウンカ、ツマグロヨコバイ、コブノメイガ、カメムシ類、〔カンキツ〕黒点病、かいよう病、ヤノネカイガラムシ、ミカンハダニ、〔リンゴ〕斑点落葉病、黒星病、モモヒメシンクイガ、コカクモン

ハマキ、キンモンホソガ、ハダニ類、〔ナシ〕黒斑病、シンクイムシ類、コカクモンハマキ、ハダニ類、〔モモ〕灰星病、コスカシバ、モモハモグリガ、ハダニ類、クワシロカイガラムシ、〔ブドウ〕晩腐病、さび病、フタテンヒメヨコバイ、〔カキ〕炭そ病、うどんこ病、カキミガ、フジコナカイガラムシ、〔チャ〕炭そ病、ハマキムシ類、チャノミドリヒメヨコバイ、カンザワハダニ。

○種馬鈴しょ検疫規程一部改正さる

種馬鈴しょ検疫規程(昭和26年農林省告示第59号)の一部を改正する告示が7月24日付農林省告示第690号をもって公布され、昭和50年産の種馬鈴しょの検査から適用されることとなった。

今回の改正の要点は、①昭和47年北海道において新発生したジャガイモシストセンチュウを検疫対象有害動物に指定し、種馬鈴しょ植え付け予定ほ場の土壌検診、ほ場検査時の植物検診などの検査を実施し、本線虫発生ほ場産のジャガイモが種馬鈴しょとして流通しないよう改正されたこと。②ジャガイモの発生地域における生産物検査時のジャガイモに関する合格の条件の一つであった消毒の条件が削られたこと。③検査事務の簡素化などを図るため検査申請書の様式が改正されたこと。

なお、規程改正のための公聴会が7月3日開催され、学識経験者及び利害関係者全員から賛成の公述がなされた。

○植物防疫所に4出張所新設さる

7月24日付けで植物防疫法施行規則の一部改正などが行われ、8月1日から次の4か所の出張所が新たに開設され、業務を開始した。この4か所の出張所の開設により植物防疫所の数は、4本所、1事務所、12支所、78出張所となった。

名古屋植物防疫所清水支所御前崎出張所

所在地：静岡県榛原郡御前崎町御前崎 3416 の 40
(〒 421—06)

電 話：御前崎 (054863) 3562

所 長：高野忠雄

神戸植物防疫所ポートアイランド出張所

所在地：神戸市生田区港島4丁目地先
日本運輸(株)L-2事務所内(〒 650)

電 話：神戸 (078) 331-4201

所 長：下良房夫

神戸植物防疫所坂出支所須崎出張所

所在地：高知県須崎市港町 須崎木材団地会館内

(〒 785)

電話：須崎 (08894) 2-6738

所長：井上 茂

門司植物防疫所菊田出張所

所在地：福岡県京都郡菊田町港町 I 番地

(〒 800-03)

電話：菊田 (093) 44-1711

所長：竹森俊彦

協会だより

一本 会一

○各種研究会発足す

☆種子消毒特別研究会

作物の種子消毒については、万能的薬剤として、専ら有機水銀剤に頼ってきたが、最近我が国では、これが使用をとり止め、また、諸外国でも可及的速かにこれをとりに止めようとしている。

種子消毒の重要性については、世界のいずれの国においても同じであるが、ムギ、雑穀、野菜、その他の畑作物を主とする国においては特に重要で、水銀剤の使用廃止は深刻な打撃を与えている。したがって新しい消毒剤の開発は世界的な緊急事であり、外国でも我が国の農業技術に大きな期待をよせている。

国においてもこの重要性にかんがみ、昭和 49 年度に非水銀系種子消毒剤検索事業を本会に委託した。

したがって、この事業と密接な連携のもとに本会内に種子消毒特別研究会を設け、種子消毒剤に関する基礎的問題の解決をはじめ、委託試験、講演会、現地検討会、シンポジウムなどを実施するとともに新消毒剤の開発に貢献する。

委員 (アイウエオ順、敬称略)

委員長 水上 武幸 (農林省農業技術研究所)

委員 飯田 格 (千葉大学園芸学部)

上杉 康彦 (農林省農業技術研究所)

江塚 昭典 (農林省野菜試験場)

岸 国平 (同 上)

高坂 滄爾 (東京農工大学農学部)

後藤 和夫 (日本植物防疫協会研究所)

白浜 賢一

竹内昭士郎 (農林省農事試験場)

富永 時任 (農林省農業技術研究所)

能勢 和夫 (同 上)

藤井 溥 (同 上)

古田 力 (農林省農事試験場)

山口 富夫 (農林省農業技術研究所)

☆薬剤耐性菌対策研究会

イネ、野菜、果樹、花卉などの病害防除において、近時、各地において薬剤耐性菌のは場発現による防除効果

の低下が問題になっており、特に作物によっては特産地において交差耐性の問題も懸念され、その様相も複雑で由々しき事態に立ちいたっている所もあり、現地においてはその対策に苦慮しており、関係者より緊急に対策を必要とするとの要望も出ている。

薬剤の耐性化については、抗生物質については従来より問題となっていたが、糸状菌についても実験室内の耐性獲得現象などのことから、薬剤耐性出現のことは以前より指摘されており、研究の面においても各方面において検討されているが、今後益々研究が促進されるであろう。

このほ場における薬剤耐性菌出現問題は植物防疫上の重要問題で緊急に対策を要すると思う。また、一方今後益々盛んになる農薬の海外輸出の上からも解決を要することと考える。

これらの諸事情から本会内に薬剤耐性菌対策研究会を設け、耐薬性機作、検定法の確立、回避法の検討、耐性獲得後の対策、耐性の種類の判別などの究明と今後の対策を確立し、農薬の適正円滑な使用に貢献するとともに必要に応じ委託研究の実施、研究会、シンポジウム、現地検討会などを開催し、その解決に努力する。

委員 (アイウエオ順、敬称略)

委員長 水上 武幸 (農林省農業技術研究所)

顧問 明日山秀文 (日本植物防疫協会研究所)

委員 飯田 格 (千葉大学園芸学部)

上杉 康彦 (農林省農業技術研究所)

岸 国平 (農林省野菜試験場)

北島 博 (農林省果樹試験場)

後藤 和夫 (日本植物防疫協会研究所)

桜井 寿 (農林省農薬検査所)

富永 時任 (農林省農業技術研究所)

見里 朝正 (理化学研究所)

山口 富夫 (農林省農業技術研究所)

☆殺虫剤抵抗性研究会

現在普及している優秀な殺虫剤の中には、対象害虫に対する防除効果が低下する事例があり、その原因が害虫の抵抗性増大によると考えられる場合が少なくない。このことは生物が持つ変異性、適応力によって必然的に起

この現象であるが、殺虫剤の生産、使用が続く限り避けられない問題であり、防除を実施する上で、また、殺虫剤を開発し、普及するにあたって、誠に大きな障害となることはいうまでもない。

本会では、ニカメイチュウのエチルパラチオン抵抗性問題を契機に、昭和37年4月に殺虫剤抵抗性対策委員会を設置し、その翌年からは、当委員会の中に果樹ハダニ部会を発足させて、対策研究を進めてきた。この間多くの試験成績を公表して、一応の成果をあげたことによって、稲作害虫部会は昭和40年度で、果樹ハダニ部会は47年度をもって、研究を終了し、対策委員会の事業は一応終了した。しかし、抵抗性問題が完全に片付いたわけではなく、最近では、ツマグロヨコバイのカーバメート抵抗性問題が新しい課題として登場しており、また、生産が拡大した野菜、果樹類の害虫の中にも抵抗性増大が懸念される種類が散見され、防除技術上解決すべき問題として重要視されている。

このような現状から、農林省や各県の防除関係者、農薬企業などからの要望もあり、この際新たに殺虫剤抵抗性研究会を設け、抵抗性害虫の分布、実態調査、抵抗性検定法、抵抗性増大のメカニズム解析、抵抗性発現回避技術の開発など、より効率的な対策研究を始めることにした。

委員 (アイウエオ順、敬称略)

委員長 河野達郎 (農林省農業技術研究所)
委員 浅川 勝 (同上)
彌富喜三 (東京農業大学)
岩田俊一 (農林省農業技術研究所)
梅谷猷二 (農林省果樹試験場)
刑部 勝 (農林省茶業試験場)
腰原達雄 (農林省野菜試験場)
斎藤哲夫 (名古屋大学農学部)
高木信一 (日本植物防疫協会研究所)
田中俊彦 (農林省農業技術研究所)
野村健一 (千葉大学園芸学部)
福永一夫 (理化学研究所)
松谷茂伸 (農林省農薬検査所)
守谷茂雄 (農林省九州農業試験場)

○「会員通信 植防コメント」の配布について

従来機関単位に配布していた「植防コメント」は今年度から本会の会報となり、会員だけに配布することになりました。

「植物防疫」の定期購読者でも本会に通常会員として入会されていない方には配布されません。

通常会員は「植物防疫に関する業務及びその研究に従事する者」(法人を除く)であれば、どなたでも入会できます。

入会は氏名、生年月日、自宅住所、勤務先及び勤務先所在地を明記し、会費を添えてお申し込み下さい。会費の額は毎年総会で決められますが、昭和49年度は年間100円です。1,000円の前納が認められています(ただし、会費の額に変更がありましたら、その時点で精算致します)。

○編集部日より

残暑お見舞申し上げます。今年は異常気象で梅雨が長く、東京では平年より9日遅い7月25日に梅雨明けとなり、その後毎日最高温度が30度を越えています。低温・多雨・日照不足と三拍子揃った記録づくめの梅雨のため、関東・東北地方ではいもち病が多発しているとのこと、これらの地方では防除に追われ、大変なことでしょう。

49年6月中に新しく登録された農薬はありませんので、休載いたしました。御了承下さい。

新刊本会発行図書

農薬安全使用基準のしおり

昭和49年版

A5判 34 ページ 200 円 送料 55 円

農薬残留に関する安全使用基準、農薬の残留基準、作物残留性農薬および土壌残留性農薬の使用基準、水産動物の被害の防止に関する安全使用基準を1冊にまとめた書

植物防疫

第28巻 昭和49年8月25日印刷
第8号 昭和49年8月30日発行

実費 320 円 送料 16 円 1カ年 3,360 円
(送料共概算)

昭和49年

編集人 植物防疫編集委員会

8月号

発行人 遠藤武雄

(毎月1回30日発行)

印刷所 株式会社 双文社

—禁 転 載—

東京都板橋区熊野町13-11

— 発 行 所 —

東京都豊島区駒込1丁目43番11号 郵便番号 170

社団法人 日本植物防疫協会

電話 東京(03)944-1561~4番
振替 東京 177867番

増収を約束する

日曹の農業

稲の一生の スタートを守る

新発売!

水銀を含まない種子消毒剤

ホーマイ

- 種もみのばかなえ病、いもち病、ごまはがれ病防除にすぐれた効果があります。
- 箱育苗に浸種前処理ができます。また、高濃度短時間処理、低濃度長時間処理が可能です。
- 毒性やかぶれの心配がない安全な薬剤です。



日本曹達株式会社

本社 東京都千代田区大手町2-2-1 〒100
支店 大阪市東区北浜2-90 〒541



新刊本会発行図書

登録農薬適正使用総覧

農林省農蚕園芸局植物防疫課 監修

昭和48年1~12月の1年間分 8,000円 送料サービス 好評発売中

昭和49年1~12月の1年間分 9,000円 送料サービス 1~3月分原稿作製中

B5判 加除式カード形式 表紙カバー付

昭和48年1月14日以降に再登録され、毒性及び残留性に関する試験成績に基づき、その安全性が評価された農薬の再登録年月日、種類名、名称、有効成分の種類及び含有量、適用病害虫の範囲及び使用方法(作物名、適用病害虫名、10アール当り使用量、希釈倍数、使用時期、使用回数、使用方法)などを詳細にとりまとめた資料

お申込みは前金(現金・振替・小為替)で本会へ

本 会 出 版 物

本会に委託された農薬や抵抗性の試験成績などをまとめた印刷物。在庫僅少のものあり、お申込みは前金で本会へ。 〔記載以外は品切れ〕

☆昭和 40 年度	委託試験成績	第 10 集	(殺虫剤・殺線虫剤)	1900円
〃	〃	〃	(殺菌剤・防除機具)	1900円
昭和 41 年度	〃	第 11 集	(殺虫剤・殺線虫剤・殺虫殺菌混合剤)	2000円
〃	〃	〃	(殺菌剤・防除機具)	1900円
昭和 42 年度	〃	第 12 集	(殺菌剤・防除機具)	2000円
昭和 45 年度	〃	第 15 集	稲関係 (殺虫剤・殺虫殺菌剤)	2000円
〃	〃	〃	野菜等関係 (殺虫剤・殺虫殺菌剤)	1400円
〃	〃	〃	(殺菌剤)	1500円
昭和 46 年度	〃	第 16 集	稲関係 (殺虫剤・殺虫殺菌剤)	1800円
〃	〃	〃	(殺菌剤)	1500円
〃	〃	〃	野菜等関係 (殺虫剤・殺線虫剤)	1500円
〃	〃	〃	(殺菌剤)	1200円
昭和 47 年度	〃	第 17 集	稲関係 (殺虫剤・殺虫殺菌剤)	2000円
〃	〃	〃	(殺菌剤)	1500円
〃	〃	〃	野菜等関係 (殺虫剤・殺線虫剤)	2000円
〃	〃	〃	(殺菌剤)	1500円
昭和 48 年度	〃	第 18 集	稲関係 (殺虫剤・殺虫殺菌剤)	2000円
〃	〃	〃	野菜等関係 (殺虫剤・殺線虫剤)	2000円
〃	〃	〃	(殺菌剤)	2000円
☆昭和 40 年度	委託試験成績	第 10 集	続編	750円
昭和 42 年度	〃	第 12 集	〃	800円
昭和 43 年度	〃	第 13 集	〃	1000円
昭和 44 年度	〃	第 14 集	〃	1000円
☆昭和 40 年度	委託試験成績	第 10 集	総合考察	400円
昭和 41 年度	〃	第 11 集	〃	520円
昭和 42 年度	〃	第 12 集	〃	570円
昭和 43 年度	〃	第 13 集	〃	770円
昭和 44 年度	〃	第 14 集	〃	570円
昭和 45 年度	〃	第 15 集	〃 (稲・野菜関係)	800円
〃	〃	〃	〃 (カンキツ, 落葉果樹, 茶, 桑, リンゴ各農薬連絡試験)	700円
昭和 46 年度	〃	第 16 集	〃 (稲・野菜関係)	1000円
昭和 47 年度	〃	第 17 集	〃 (〃)	1000円
昭和 48 年度	〃	第 18 集	〃 (〃)	1000円
☆昭和 39 年度	カンキツ農薬連絡試験成績	第 1 集		1800円
昭和 40 年度	〃	第 2 集		1800円
昭和 41 年度	〃	第 3 集		1200円
昭和 47 年度	〃	第 9 集		2000円
☆昭和 42 年度	落葉果樹連絡試験成績	第 2 集		1200円
昭和 43 年度	〃	第 3 集		1500円
昭和 44 年度	〃	第 4 集		1600円
昭和 48 年度	〃	第 8 集		2400円
☆果樹ハダニ類の薬剤抵抗性に関する試験成績		(1963年)		350円
〃		(1964年)		800円
〃		(1968年)		1000円
☆土壌殺菌剤特殊委託試験成績		(1965年)		1300円
〃		(1967年)		1000円
〃		(1968年)		900円
☆農薬の新用法に関する特別研究試験成績		(1969年)		1800円
〃		(1970年)	殺虫剤	1600円
〃		〃	殺菌剤	1300円
〃		(1971年)	殺虫剤	1500円
〃		〃	殺菌剤	1200円
☆非水銀いもち病防除剤全国連絡試験成績		(1967年)		500円
☆いもち病防除剤全国連絡試験成績		(1968年)		500円
☆キタジン P 粒剤の水面施用に関する特別研究試験成績		(1969年)		1000円
☆BT剤に関する試験成績		(1972年)		1400円
〃		(1973年)		1500円

確かな効きめ を選ぼう！

ガス効果が高く、作物中の成育中の葉面・地表面散粒で高い効果を
示します。もちろん浸透移行性があり土壌処理でも有効です。
毒性が少なく、薬害の心配もないので安心して使えます。

手まきでアブラムシが防げる

ホスドシ

粒剤



《イソチオエート粒剤》



日本農薬株式会社
東京都中央区日本橋1-2-5

資料請求券
ホスドシ
植防

茶の新芽に薬害のない新抗生物質殺ダニ剤!!

遂に登場

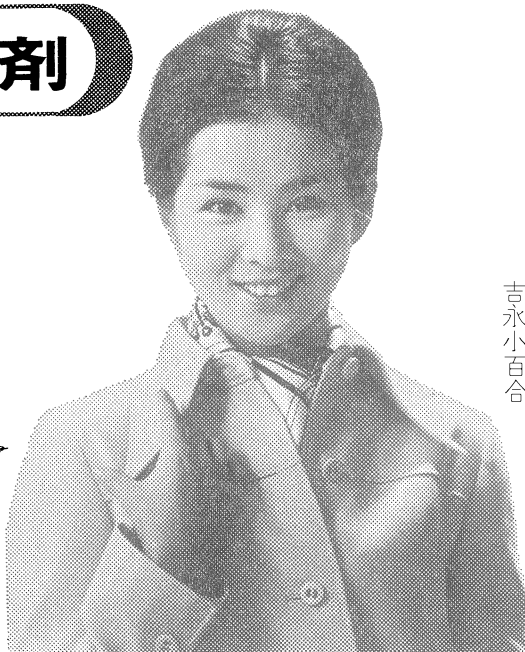
マイトサイジンB乳剤

- 中外が研究開発した新抗生物質ポリナクチンを主成分とした全く新しい型の殺ダニ剤で、茶、りんご、花のハダニ類にすぐれた効果を発揮します。
- 特異な有効成分による殺ダニ剤ですから、各種ハダニ類に対して薬剤抵抗性がつきにくく、また従来の殺ダニ剤との交叉抵抗も認められておりません。
- 茶に対して残臭期間が短かく(7日)、しかも新芽に対して薬害がないので摘採前にも使用することができます。使用時期は収穫14日前までです。

茶のハマキムシ・ホソガ防除に

虫シュアVP乳剤

- 茶のハマキムシ、ホソガなど茶の重要害虫に的確なききめがあります。
- 茶の新芽に薬害の心配がなく、しかも茶葉を汚しません。
- 茶に対する残臭は7日で最も短い薬剤で、摘採前に使えます。



吉永小百合



中外製薬株式会社

東京都千代田区岩本町1-10-6
TMMビル TEL 03(862)8251

使う人・食べる人

の安全を考える 兼商の農薬

■果樹・そさい病害防除の基本薬剤

キンダー[®]

■安全性が確認された塩素系殺虫剤

マリックス

■新しい殺虫殺ダニ剤

トーラック

■果樹園・桑園・牧草地の除草剤

カソロン 粒剤



- 適正摘果で安定高収益を！
- 使い易いみかんの摘果剤

ヒオモン

- 最も信頼されているダニ剤

スマイト[®]

- 水田のヒルムシロ・ウキクサ
アオミドロ・ウリカワ防除に

モゲトン[®]



兼商株式会社

東京都千代田区丸の内2-4-1

近畿大学教授・平井篤造

神戸大学教授・鈴木直治共編

—第2版出来—

感染の生化学 —植物—

A5判 474頁

2800円 140円

前編—糸状菌および細菌病

*感染(神戸大学農学部教授・鈴木直治) *細胞壁と細胞膜(香川大学農学部教授・谷利一) *呼吸(北海道農業試験場病理昆虫部技官・富山宏平) *光合成(農業技術研究所病理昆虫部技官・稲葉忠興) *蛋白質代謝(近畿大学農学部教授・平井篤造) *核酸代謝(京都大学農学部助教授・獅山慈孝) *フェノール物質の代謝(東北大学農学部教授・玉利勤治郎) *ファイトアレキシン(島根大学農学部教授・山本昌木) *ホルモン(農業技術研究所生理遺伝部技官・松中昭一) *毒素(鳥取大学農学部教授・西村正暘)

後編—ウイルス病

*感染(近畿大学農学部教授・平井篤造) *呼吸(岩手大学農学部教授・高橋 壮) *葉緑体(名古屋大学農学部助手・平井篤志) *蛋白質代謝(植物ウイルス研究所研究第1部技官・児玉忠士) *核酸代謝(岡山大学農学部助教授・大内成志) *感染阻害物質(九州大学農学部助手・佐古宣道)

農業技術協会刊

東京都北区西ヶ原1-26-3 (〒114)

振替 東京 176531 TEL (910) 3787 (代)

ゆたかな実り＝明治の農薬



野菜、かんきつ、もも、こんにゃくの細菌性病害防除に
タバコの立枯病に

アグレプト水和剤

テラウエアの種なしと熟期促進に 野菜の成長促進・早出しに

ジベレリン明治

トマトのかいよう病特效薬

農業用ノボビオシン明治

イネしらはがれ病防除に

フェナジン明治粉剤・水和剤



明治製菓・薬品部
東京都中央区京橋 2 - 8

昭和四十九年
八月二十五日
発行
（毎月一回三十日発行）
植物防疫 第二十八卷第八号
認可

住友信託銀行

生きた情報とアドバイスを
お届けする銀行です——



Mr. TOMORROW一家

TOMORROW!

たしかな
明日のために

実費 三三〇円（送料 一六円）