

# 微生物遺伝資源利用マニュアル（14）

- 昆虫培養細胞株 -

今西重雄・谷合幹代子・秋月岳

**MAFF Microorganism Genetic Resources Manual No. 14**

**Methods of insect cell culture**

平成15年3月

March, 2003

農業生物資源研究所

National Institute of Agrobiological Sciences

# 目 次

．はじめに	1
．培養の準備	
1．装置類	2
2．培養用ラブウェア製品	2
3．培養液調製に必要な機器	3
．細胞培養液等の調製法	
1．細胞培養液	4
2．抗生物質混合物	4
3．細胞用平衡塩類溶液	4
4．牛胎児血清(FBS)の非働化とロットチェック	5
5．昆虫体液を牛胎児血清の代わりに使用する場合	6
．初代培養細胞の培養法	
1．鱗翅目昆虫由来細胞	7
2．鞘翅目昆虫由来細胞	7
3．半翅目昆虫由来細胞	8
4．双翅目昆虫由来細胞	8
．樹立細胞株の取り扱い法	
1．無菌操作	8
2．培養細胞の植継ぎ	8
3．コンタミの予防	9
4．細胞の増殖に要する倍加時間の測定法	10

5 . トリパンプル - 染色液を用いた細胞の生死の判定	1 0
6 . 細胞密度の測定法	1 0
7 . 細胞株の凍結保存法	1 1
8 . 細胞の輸送法	1 2
. 昆虫培養細胞の大量培養	
1 . 付着性細胞培養法	1 2
2 . 浮遊性細胞培養法	1 3
. 昆虫培養細胞のクローニング	
1 . 限外希釈法	1 4
2 . Single Cell Cloning 法	1 5
3 . 付着性細胞のコロニー形成法	1 6
4 . 軟寒天を用いたコロニー形成法	1 6
. 培養細胞の染色体数の測定法	
1 . 染色体数測定のための準備	1 8
2 . 細胞の膨潤操作	1 8
3 . 固定	1 8
4 . 拡散	1 8
5 . 染色	1 8
. 昆虫培養細胞株の識別法	
アイソザイム分析 ( Agar Gel 電気泳動 )	1 9
. 参考文献	
. MAFF 登録昆虫培養細胞株リスト	2 3

## . はじめに

20世紀の前半、科学技術取り分け化学の進歩に伴って組織培養の技術が開発された。この培養はやがて組織から遊離してくる細胞の培養へと発展し、現在では医学、生物学、農学などの広範囲な自然科学の分野における様々な基礎および応用的研究に不可欠な技術となっている。

脊椎動物の細胞培養は1907年にDr. Harrison, R.G.のカエルの神経原細胞の培養にはじまる。昆虫では1915年にDr. Goldschmidt, R.によるセクロピアサン精細胞の培養が最初である。しかしいずれも連続継代性細胞系の作出には至らず、組織または器官の一時的な培養に過ぎなかった。連続継代性細胞系の樹立は、脊椎動物では1940年に至ってDr. W.R.Earleによるマウス繊維芽細胞系L929の培養成功に始まり、無脊椎動物では1962年Dr.T.D.C.Graceによる野蚕 *Antheraea eucalypti* 蛹卵巣由来の連続継代性細胞系が最初である。昆虫細胞系は、現在ではおよそ500種もの昆虫細胞株があるものと推定されているが、その多くは鱗翅目昆虫種由来である。

無脊椎動物および昆虫における細胞培養技術の発展は脊椎動物の細胞培養の場合に似た経路を辿り、人工培地上では培養の困難な病原性微生物の培養技術の開発を目的として出発した。これまで、昆虫細胞培養は主として昆虫ウイルスの増殖、細菌毒素の検定、昆虫生理活性物質の検定、ショウジョウバエの遺伝学的研究に貢献している。最近、特に鱗翅目昆虫由来の培養細胞における遺伝子組換え系、すなわちバキュロウイルスベクター系による有用遺伝子発現が遺伝学、医学をはじめ各方面の研究者から注目をあびるようになってきた。しかし、自然科学の多様な研究分野における昆虫培養細胞の本格的な利用はこれからである。昆虫細胞培養技術が発展し、培養細胞を用いた研究の深化が大いに期待されている。

## . 培養の準備

### 1 . 装置類 :

1 ) 細胞培養装置(Incubator) ; 炭酸ガス培養装置は昆虫培養細胞系の培養には不必要である。無脊椎動物細胞の培養は 20 ~ 30 を至適範囲とするため、5 ~ 40 の調整範囲を有するものであれば良い。

2 ) クリーンベンチ(Laminar flow cabinet) ; クリーンベンチ(Laminar flow cabinet)には気流がキャビネット内を循環する垂直循環型とキャビネット外に気流が流出する垂直吹き出し型の2種類がある。バイオ・医療分野関連では前者が望ましい。

3 ) 位相差顕微鏡(inverted microscope with a phase-contrast optic system) ; 対物レンズは10倍、20倍と40倍、接眼レンズは10倍が最低限必要である。

4 ) 遠心分離器 ; 遠心力は 3,600 g 以下の能力で十分である。細胞の遠心洗浄に利用する。

5 ) 冷凍庫 ; アミノ酸混合溶液、ビタミン混合溶液、不安定化学物質の保存には - 30 ~ - 40 の能力が必要である。同時に培養細胞の凍結保存も併用するには - 80 以下の温度が維持できる冷凍庫が望ましい(サンヨー MDF-1155AT : -152 保証)。

6 ) 細胞凍結保存容器 ; 凍結保護剤を加えた培養細胞を凍結保存チューブに詰め、液体窒素中で保存するために必需品である。

7 ) マグネティックスターラ ; 培養液の作製や浮遊性細胞のスピナー培養に使用する。

8 ) 滅菌器 ; 高圧蒸気滅菌器(オートクレーブ)または乾熱滅菌器。

9 ) ピペット補助器(pipetting aids) ; 手動式のピペットポンプ、電動ピペット補助器(electric pipette aid; Drummond Sci.Co)がある。

### 2 . 培養用ラブウェア製品 :

#### 1 ) プラスティック製品

(1)ピペット ; 10ml 用、25ml 用の個包装が望ましい。

(2)フラスコ ; 付着性細胞用と浮遊性細胞用の2種類のフラスコがある。継代用として培養面積 25cm<sup>2</sup>・容量 50ml の規格を通常使用する。大量培養用として培養面積 75cm<sup>2</sup>

・容量 250ml と培養面積 225cm<sup>2</sup> ・容量 800ml の規格を使用する。

(3)凍結保存チューブ； 2 ml 用・平底タイプが便利である。

## 2) ガラス・金属製品

(1)ねじ口瓶；乾熱滅菌と高圧蒸気滅菌の両方が可能な瓶であって、100ml 用、250ml 用、500ml 用、1000ml 用の各種の大きさの瓶を複数準備するのが望ましい。

(2)パスツールピペット；全長が 230mm であること。

(3)滅菌缶；ステンレス製でパスツールピペットが収まる大きさであること。

## 3. 培養液調製に必要な機器：

1) 培養液保存容器としてガラス製培養瓶を高圧蒸気滅菌器（オートクレーブ）や乾熱滅菌器を用いて滅菌する。高圧蒸気滅菌器では 121 で 30 分間、乾熱滅菌器では 180 で 3 時間の処理とする。市販の培養瓶のキャップには高圧蒸気滅菌器用と乾熱滅菌器用の 2 種類があるので注意が必要である。

2) 培養液用水は超純粋生成装置（Millipore 製逆浸透水製造装置 Milli-RO シリーズと Millipore 製超純粋製造装置 Simpli-Lab）で調製する。

3) 培養液の除菌は少量（300ml 以下）の場合、Millipore Sterifil-D を用い、中量（500ml ~ 1,000ml）の場合、Steritop-フィルターユニット（Millipore 製 SCGVT05RE, フィルター 0.20 μ m）を滅菌培養瓶の口に取り付け、減圧装置により直接濾過除菌する。大量（1 ~ 2 リットル）の場合、定量型チューブポンプアッセンブリ装置（Millipore 製）に装着した Sterivex フィルターユニット（Millipore 製 SVGVB1010）を用いて連続的に培養液を除菌する。（写真 1）

培養液の除菌方法



右：少量用（Millipore Sterifil-D）、右から 2 つ目：中量用（Millipore Steritop フィルターユニット）、右から 3 つ目：大量用（Millipore 定量型チューブポンプアッセンブリ。チューブの先端に Millipore

Sterivex フィルターユニットを装着)

## ・細胞培養液等の調製法

昆虫の培養液の組成は、1962年に Dr.T.D.C.,Grace が作成した Grace 培養液<sup>1)</sup>が最初である。組成はアミノ酸類、糖及び有機酸類、ビタミン類、無機塩類であり、必要に応じて抗生物質を添加する。また牛胎児血清(FBS)は細胞増殖の促進のために添加する。現在昆虫細胞培養液の多くは Grace 培養液を基本組成にして作成されている。

### 1 . 細胞培養液

#### 1 ) 市販品の利用

分譲された細胞株ごとに培養液が異なるので適宜培養液を調製する必要がある。第1表には代表的な培養液として IPL-41 の組成表を載せた。本培養液は各組成を順に混合して作製が可能であり、また第2表には市販品で入手できる培養液を記載した。培養液はそのまま使用可能である。粉末培地は超純水を加えた後 NaHCO<sub>3</sub> を加え、5 規定 NaOH を用いて培養液の pH6.2 を調整した後フィルター除菌する。

#### 2 ) 除菌操作

調製した培養液は .3.3) に示した機器を用いて除菌後、培養瓶に分注する。

#### 3 ) 保存

培養液は除菌後培養瓶から一部をサンプルとして採取し 37 に保存して細菌等の混入がないことを確認する。培養液は冷蔵庫に保存し、半年以内に使用する。

### 2 . 抗生物質混合物

ストレプトマイシン硫酸塩 1 g、ペニシリンGカリウム 100,000 単位、ノボビオシン 0.1 g、蒸留水 100 ml、 これらを 100 倍に希釈して使用する。

### 3 . 細胞用平衡塩類溶液 ( Carlson 液 ) :

哺乳動物用の平衡塩類溶液で細胞の洗浄に用いる。

組成表 ; NaCl 0.7 g、 KCl 0.02 g、 CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.02 g、 MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.01 g、 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 g、 NaHCO<sub>3</sub> 0.012 g、 Glucose 0.8 g、 蒸留水を加えて 100ml にする。

塩類を混合溶解後、0.20 μmサイズのフィルターで濾過除菌する。濾過後室温に数日間放置し、微生物のコンタミのないことを確認する。数ヶ月であれば室温保存可能。

第1表 IPL-41 培養液組成 (Weiss et al., 1981) <sup>2)</sup>

成分	mg/ 1litter	成分	mg/ 1 litter
<b>Inorganic salts</b>		L-Tryptophan	100
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,131	L-Tyrosine (dissolve in 1N HCl)	250
NaHCO <sub>3</sub>	350	L-Valine	500
KCl	1,200	<b>Sugar</b>	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1880	Glucose	2,500
<b>Miner inorganic salts</b>		Maltose	1,000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.04	Sucrose	16,500
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.05	<b>Organic acids</b>	
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.20	Malic acids	53.6
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.02	-Ketoglutaric acid	29.6
ZnCl <sub>2</sub>	0.04	Succinic acid	4.8
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.55	Fumaric acid	4.4
<b>Amino acids</b>		<b>Vitamins</b>	
L-Arginine · HCl	800	Thiamine · HCl	0.08
L-Aspartic acid	1,300	Riboflavine (dissolve in 1N KOH)	0.08
L-Asparagine	1,300	Ca-pantothenate	0.008
-Alanine	300	Pyridoxine · HCl	0.04
L-Cystine (dissolve in 1N HCl)	100	p-Aminobenzoic acid	0.32
L-Glutamic acid	150	Folic acid	0.08
L-Glutamine	1,000	Niacin	0.16
L-Glycine	20	Isoinositol	0.40
L-Histidine	200	Biotin	0.16
L-Hydroxyproline	800	Cyanocobalamine (Vitamine B <sub>12</sub> )	0.24
L-Isoleucine	750	Cholone chloride	20
L-Leucine	250	<b>Tryptose broth (Difco)</b>	2,600
L-Lysine · HCl	700	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	500
L-Methionine	1,000	新たに調製した 4 N KOH で pH6.2 に調整	
L-Proline	500		
L-Phenylalanine	1,000		
DL-Serine	400		
L-Threonine	200		

#### 4 . 牛胎児血清(FBS)の非働化とロットチェック

1) 購入した牛胎児血清(FBS)はそのまま昆虫細胞の培養に利用できる場合もあるが、通常は凍結 FBS を室温で融解後、ボトルごと 56 ℃ の加温水中に 30 分間浸漬する。熱処理した FBS は滅菌瓶等に小分けして - 20 ℃ 以下の冷凍庫で保存する。

2) FBS は購入前に業者からロットサンプルをいくつかもらい、手持ちの昆虫培養細胞



で生死並びに増殖を検定（ - 4、 V - 5 参照）し、もっとも良い FBS を購入する。  
 この場合もあらかじめ FBS は熱処理したものを検定に使用する。

第 2 表 主な市販培養液（参考）

培養液の名称	メーカー	適応培養細胞系
Insect Cell Media, Serum-free, HyQ SFX-Insect	HyClone Laboratories, Inc	High Five, <i>Drosophila mel 2</i> (D mel 2), <i>Heliothis zea</i>
Insect Cell Media, HyQ TNM-FH	HyClone Laboratories, Inc	<i>Trichoplusia ni</i> の細胞系
Insect Cell Media, Serum-free, HyQ IPL-41	HyClone Laboratories, Inc	<i>Spodoptera frugiperda</i> の細胞系
Insect Cell Media, IP301 Baculo Express	HyClone Laboratories, Inc	Sf9, Sf21
Insect Cell Media, SF-3 と 4 BaculoExpress	HyClone Laboratories, Inc	Sf9, Sf21, High Five, D.mel 2
Grace's Insect TC Medium	HyClone Laboratories, Inc	双翅目、鱗翅目の細胞全般
Mitsubishi/Maramorosch Insect Medium	HyClone Laboratories, Inc	蚊の細胞に適した培養液
Schneider's Drosopila Medium	HyClone Laboratories, Inc	<i>Drosophila</i> 細胞の培養用
Sf-900 II SFM(無血清用)	Invitrogen Corporation	Sf-9, 鱗翅目昆虫由来の細胞系
Express Five SFM( " )	Invitrogen Corporation	BTI-TN-5B1-4 細胞系
<i>Drosophila</i> -SFM( " )	Invitrogen Corporation	シヨウジョウバエの細胞系
Grace's(血清添加培養液)	Invitrogen Corporation	TN-368, Sf-9
IPL-41( " )	Invitrogen Corporation	Sf-9, 鱗翅目細胞系
Schneider's( " )	Invitrogen Corporation	シヨウジョウバエの細胞系
EX-CELL 400,401,420	株式会社ニチレイ	Sf-9, Sf-21
EX-CELL 405	株式会社ニチレイ	High Five(BTI-TN-5B1-4; TN-5)
Grace's insect medium	株式会社ニチレイ	鱗翅目、双翅目の細胞全般
IPL-41 insect medium	株式会社ニチレイ	Sf-9, 鱗翅目細胞系
TC-100 insect medium	株式会社ニチレイ	鱗翅目細胞系
TNM-FH Insect Medium	株式会社ニチレイ	鱗翅目細胞系
Shields-SangM3	株式会社ニチレイ	シヨウジョウバエの細胞系

## 5 . 昆虫体液を牛胎児血清（FBS）の代わりに使用する場合

### 1 ) 昆虫の幼虫および蛹体液採取

鱗翅目昆虫の幼虫または蛹から採血する。カイコでは5 齢幼虫（5 齢脱皮後3 ~ 4 日目）が用いられる。ハサミで腹脚に小さい切り傷をつけ、体を圧迫して体液を絞り出す。体液は氷で冷やしながらかチューブに受けメラニゼーションを防止するか、または体液 1 ml 当たり 1 mg の還元型グルタチオン水溶液を添加する。

## 2) 体液の加熱処理

60 で 30 分間加熱する。次に室温にまで温度を下げた後、3,000 ~ 4,000rpm、30 分間遠心し、上清を採取する。使用まで凍結保存する。

## 3) 体液の濾過

昆虫体液は粘性が高く、そのままではフィルターを用いた濾過除菌がし難いので培養液に加えた後濾過除菌をすると良い。

# ・ 初代培養細胞の培養法

## 1 . 鱗翅目昆虫由来細胞

鱗翅目昆虫の組織の中で細胞株化しやすいものは胚子、幼虫脂肪体、幼虫・蛹・成虫の卵巣等である。まず、70 %エタノールと2 %ホルマリン液にそれぞれ5分間浸漬して表面殺菌した昆虫体からクリーンベンチ内で目的とする組織を切り出し、大きい組織は出来るだけ小さく切り刻んで培養液と一緒に培養容器に入れる。組織はトリプシン等の蛋白分解酵素で単個細胞まで解離しないほうが生存・増殖が良い。初代培養用の培養液は市販の培養液(例えば、IPL-41、EXCELL-400 など)に牛胎児血清を30 %容量になるように添加して用いる。血球は細胞系を樹立する迄に長期間を要するため難しい。血球は Carlson 液などの中に体液を滴下して、遠心処理(150 g、5 分間)で洗ってから培養液に分散して培養する。体液を完全に排除するのが難しいのでメラノシス防止のため還元型グルタチオンを培養液 1 ml 当たり 1 mg 添加しておく。細胞がフラスコ面にほぼ一面に増えたらならばピペッティング等により細胞をフラスコ底面から剥離して植継ぎを行う。継代培養の初期の頃は増殖が非常にゆるやかである。しかし植継ぎを反復するうちに増殖速度が上がり植継ぎ間隔が一定してきて細胞株の樹立が宣言できる。

## 2 . 鞘翅目昆虫由来細胞

胚子、幼虫の脂肪体、幼虫・成虫の卵巣の組織由来細胞や血球などが培養しやすい。方法・培養液は鱗翅目昆虫の場合と同様である。

### 3 . 半翅目昆虫由来細胞

胚子が培養の対象となる。鱗翅目昆虫と同様、卵表面を殺菌した後滅菌水で十分に洗淨する。卵をピンセットで押しつぶし、胚子を卵黄ごと滅菌ペトリ ディッシュに出す。胚子だけを集めて大きな胚子はメスでいくつかに切って培養液と一緒に培養容器に移す。その他、方法・培養液は鱗翅目昆虫の場合と同様である。

### 4 . 双翅目昆虫由来細胞

胚子または無菌的に孵化させた新生幼虫全体が対象となる。卵は非常に小さいので、表面殺菌した多数の卵を 70 %エタノールに浸漬して滅菌したガラス製ホモジナイザーでつぶし、目の細かい網を通して卵殻を除き、培養液に分散して培養する。新生幼虫の場合は幼虫をいくつかの断片に切って培養液と共に培養容器に入れる。その他、方法・培養液は鱗翅目昆虫の場合と同様である。

## ・ 樹立細胞株の取り扱い法

### 1 . 無菌操作

クリーンベンチ内の紫外線ランプは常時点灯するか、または使用前最低 2 時間は点灯する。クリーンベンチの内部には実験器具を置かないことを原則とする。使用器具は 70 %エタノールで拭いてから搬入する。手を石鹼で洗い、70 %エタノールで消毒する。実験終了後は必ず 70 %エチルアルコールで実験台面を拭き、コンタミの原因となる培養液のこぼれ、外部から搬入したものに付着している汚れの除去を行う。実験室は使用時以外は殺菌灯を点灯し、汚染の防止を行うのが望ましい。

### 2 . 培養細胞の植継ぎ

#### 1 ) 弱付着性細胞株の場合

(1) 鱗翅目昆虫由来樹立細胞株の多くは穏やかなピペッティングで底面から細胞を培養液に浮遊させることができる。ピペッティングにより培養液に泡を作らない。

(2) 植継ぎ後細胞密度が約  $2 \sim 5 \times 10^5$  cells/ml になるように算出した(1)の細胞浮遊液(培養中の細胞を含む培養液を言う。以下同様)を新鮮培養液に加える。細胞浮遊液

は血球計算盤（Burker-Turk 盤）で細胞密度を測定しておくのが望ましい。（後述）

(3)危険分散のため、新たに継代した細胞の安全が確認されるまで元のフラスコの細胞の培養を継続する。

2) 強付着性細胞株（NISES-BoMo-15A c の場合）

(1)細胞浮遊液をパスツールピペットで遠心用滅菌チューブに採取する。

(2)細胞用平衡塩類溶液(Carlson 液)を加え、細胞の表面を軽く洗浄する。

(3)パンクレアチン細胞分散液（調製法は後述）を細胞が軽く浸る程度に加え、10 分間放置する。

(4)パンクレアチン細胞分散液を除去した後、(1)で採取した細胞浮遊液を加えピペッティングで細胞を培養容器面から剥離する。

(5)細胞浮遊液をチューブに移し、150 g、5 分間遠心する。

(6)上澄みを捨て新鮮培養液を加え、軽くピペッティングして細胞を分散する。

(7)培養容器に細胞浮遊液を移して通常の培養を行う。

パンクレアチン細胞分散液：

・保存液の調製；凍結保存が可能

蒸留水 90 ml、NaCl 1.12 g、KCl 0.02 g、NaHCO<sub>3</sub> 0.035 g、EDTA 0.02 g、Glucose 0.1g、Pancreatin 0.03125 g、pH 7.2 蒸留水 to 100 ml

・保存液から使用液の調製：

保存液 10 ml、蒸留水 85 ml、NaCl 1.12 g、KCl 0.02 g、NaHCO<sub>3</sub> 0.035 g、EDTA 0.02 g、Glucose 0.1 g、pH 7.2 蒸留水 to 100 ml

3) 継代間隔

鱗翅目昆虫由来細胞株の継代は通常 25 で行う。25 の静置培養では約 7 日間隔おきに継代する。一方、27 の静置培養では 4 ~ 7 日間隔、20 静置培養では 3 ~ 4 週間間隔で継代が可能である。

### 3. コンタミの予防

1) 微生物によるコンタミ

(1)培養液に抗生物質混合物の溶液を培養液 100ml 当たり、1 ml 加えておく。

(2)培養液は使用後室内の暗所に2日間放置することにより液内の微生物コンタミが無いことを確認した後冷蔵保存する。

(3)新たに継代した細胞の安全が確認されるまで元のフラスコの細胞をそのまま培養する。コンタミが発生しても、抗生物質の添加により微生物を除去する手段をとらない。コンタミした細胞株の代替のため、予備の細胞を凍結保存しておく。

(4)昆虫ウイルスが継代用細胞へ侵入することを防止するため、別途ウイルス実験専用のクリーンベンチを設置し、培養容器を継代用クリーンベンチに移動しない。

#### 2)異なる細胞株を間違えて混合する誤操作の防止

(1)ラベリングの過ちによる細胞株の取違い防止のため、継代には1種類の細胞株のみをクリーンベンチ内に搬入する。

(2)培養液は細胞株毎にラベリングした専用の培養瓶を用意する。

(3)複数の細胞株の継代に当たって、同一のピペットを使用しないよう注意する。

#### 4.細胞の増殖に要する倍加時間の測定法

細胞が増殖して総数が2倍に増加する時間は以下の式で算出できる。

PDT(Population Doubling Time)の計算方式:

1)対数的増殖期にある2点において細胞の計測を行う

2)第1点における細胞密度の測定値を $N_0$ とし、第2点における測定値を $N$ とする。

また培養開始から第1点までの時間を $t_0$ とし、第2点までの時間を $t$ とする。

$$PDT=(t-t_0)\log 2 / (\log N-\log N_0)$$

#### 5.トリパンプル - 染色液を用いた細胞の生死の判定

1)細胞浮遊液をピペッティングし細胞同士の付着を分散しておく。

2)0.5mlの0.5%トリパンプル - 染色液に0.5mlの細胞浮遊液を加える。

3)細胞株により、染色時間は異なるがおよそ5分から10分間の染色を目安する。

死んだ細胞は染色剤により青色に染色される。

#### 6.細胞密度の測定法

1)細胞の準備

浮遊性細胞の場合、軽くピペッティングして細胞を培養液中に均一に分散しておく。

付着性細胞の場合、(2.7)で記述したパンクレアチン細胞分散液で細胞を培養容

器から剥離し、次にピペティングにより細胞を均一に分散しておく。

## 2) 血球計算盤(Burker-Turk type)の準備

カバーガラスを計算盤上に密着させ、ニュートンリング (Newton's ring:水面に見られるオイルの油膜のような模様) が見えることを確認する。

## 3) 細胞数の計測操作

- (1) トリパンプルー染色液と細胞浮遊液とを等量均一に混合する。
- (2) マイクロピペットに(1)の混合液を吸い、次に吸込んだ液から最初の5滴を捨てる。
- (3) マクロピペットを血球計算盤とカバーガラスとの間隙にあてがい、およそ 10  $\mu$ l を注入する。過度の注入によるカバーガラスからの懸濁液の流出、または過不足による計測不能を回避する。

## 4) 細胞数の算出

- (1) 1  $\text{mm}^2$  の計測面内にある細胞数を数える。(最外線上に掛かっている細胞も数える)
- (2) 同一細胞浮遊液について3)の(2)から(3)を3回反復して細胞を数え平均値を計算。
- (3) 1 ml に含まれる細胞数は  $2 \times \text{平均値} \times 10,000$  で概算できる。( (1) の2倍希釈を換算するため2倍する。計測面 1  $\text{mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}$  (計算盤とカバーガラスとの間隙) では 0.1  $\text{mm}^3$  の容積であるので 1  $\text{cm}^3$  の容積に換算するには実測値を 10,000 倍する必要がある )

## 7. 細胞株の凍結保存法

- 1) 単層培養した対数増殖期の細胞をピペティングで底面から剥離し培養液中に浮遊させ血球計算盤で細胞数を算定する。
- 2) 凍結保存チューブ (  $2 \times 10^6$  cells/tube ) を含む細胞液を 150 g、5 分間遠心する。
- 3) 沈殿した細胞を市販の細胞凍結保存液 (セルバンカー BLC-1、日本全薬工業) に浮遊させ、  $2 \times 10^6$  cells/ml になるように調整する。
- 4) 凍結保存チューブに 1 ml ずつ分注し、チューブをさらに Cryoflex (Nunc) でシーリングし、貯蔵中における汚染を防止する。
- 5) チューブを小型発泡スチロール箱に入れ、冷凍庫 (-85 ) に移す。
- 6) 1 晩経過後、チューブをアンプルケーンに取り付けて液体窒素中に保存する。または小型発泡スチロールのチューブを専用保存箱に移し代えて極低温の冷凍庫 ( - 152 ) に保存する。

## 8 . 細胞の輸送法

凍結保存処理をした細胞浮遊液をドライアイスとともに梱包して送る場合は  $1 \sim 3 \times 10^6$  cells/ml の細胞密度にする。また、生細胞を培養容器で送る場合、対数的増殖期の細胞の浮遊液を容器の口近くまで詰め、空気量をできるだけ少なくしてキャップをする。国内便は速達、国外は航空便で送る。輸送中の低温と高温を出来るだけ避けるために発泡スチロール製の箱に入れてなるべく気候の良い時期 ( 15 ~ 28 ) に送る。

### . 昆虫培養細胞の大量培養

動物培養細胞には足場依存性 ( 付着性 ) 細胞と浮遊性細胞の 2 種がある。一般に前者ではローラボトル培養法、後者はスピナーフラスコ培養法が採用されている。( 写真 2 )。大量培養は数リットルから数百リットルの規模にまで拡大は可能と考えられるが、規模が拡大するほど細胞への酸素補給<sup>3, 4, 5)</sup>、栄養補給<sup>5, 6)</sup> と老廃物の廃棄、正確な温度<sup>7)</sup>、培養液の pH の維持<sup>5, 8)</sup> など厳密な培養条件が制御可能な装置を必要とする。ここでは実験室規模を想定して数リットルを培養する場合の 2 つの方式を選んだ。



写真 2 左 : スピナーカルチャー装置、 右 : ローラボトルカルチャー装置

## 1 . 付着性細胞培養法

### 1 ) 装置と機材

(1)ローラーボトルカルチャー装置 ( WHEATON ROLLER CULTURE APPARATUS 製 )、  
(2)組織培養用ローラーボトル ( FALCON, 850cm<sup>2</sup> 表面積、No.353007 )、(3)細胞培養フ  
ラスコ ( 住友ベークライト、25 cm<sup>2</sup> 用 MS-21050R、および 75 cm<sup>2</sup> 用 MS-2125R)、(4)イ  
ンキュベーター

## 2 ) 細胞の準備と培養

(1)浮遊性培養細胞を底面積 25 cm<sup>2</sup> の細胞培養フラスコを用いて培養し、コンフルエン  
トな状態に到達後さらに大きめの細胞培養フラスコ ( 底面積 75cm<sup>2</sup> ) に植え替える。  
(2)この操作を複数のフラスコで行い、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  個の細胞を集める。  
(3)あらかじめ、28 ℃ に設定したインキュベーター内にローラーボトルカルチャー装置  
を運んでおく。細胞を組織培養用ローラーボトルに植え替え、新鮮な培養液を 300 ~  
500ml になるように加える。  
(4)ボトルの回転速度は遅すぎても、速すぎても細胞の増殖に不適當である。前者の場  
合、培養液内への空気の取り込みが減少すると考えられる。また、後者の場合、付着し  
た細胞がボトル表面から脱落する恐れがある。

ちなみに SES-MaBr-4 細胞株<sup>5)</sup>では、ボトルの回転速度は 0.83 rpm が好結果を示し、10  
日間培養で約 6.5 倍に増殖した。これ以下の回転速度では培養開始直後の細胞の増殖、  
到達細胞数も緩やかであった。

\* ) 培養条件 : 培養液量 ; 500 ml、初期細胞密度 ;  $2 \times 10^5$  cells/ ml 培養液、到達細胞  
密度 ;  $1.3 \times 10^6$  cells/ ml 培養液、培養液 ; MM 無血清培地<sup>9)</sup>

## 2 . 浮遊性細胞培養法

### 1 ) 装置と機材

(1)マグネチック スターラー ( EYELA, 東京理化機械、CELL STIRRER, MCS-401 )  
(2)CORNING Spinner Flask ( 250 ml 用、1,000 ml 用 )、(3)インキュベーター

### 2 ) 細胞の準備と培養

(1)細胞の増殖方法は . 1. 2). (1), (2)と同様である。  
(2)あらかじめ、28 ℃ に設定したインキュベーター内にマグネチック スターラーを運  
んでおく。細胞を Spinner Flask に植え替え、新鮮な培養液を加える。  
(3)攪拌用プロペラの回転速度は遅すぎても、速すぎても細胞の増殖に不適當である。



前者の場合、培養液内への空気の取り込みが減少すると思える。また、後者の場合、破断に弱い細胞が死ぬ恐れが生じる。

付着性細胞をスピナーフラスコを用いて培養する方法もある。この場合、マイクロキャリアという多孔質担体に細胞を付着させ、この担体ごと旋回培養する方法である<sup>15,17)</sup>。細胞密度は短時間の間に高めることができる。

ちなみに SES-BoMo-15A 細胞株<sup>\*\*5)</sup>では、プロペラの回転速度は 100 rpm が好結果を示し、10 日間培養で約 10 倍に増殖した。これ以下の回転速度では培養開始直後の細胞の増殖、到達細胞数も緩やかであった。これ以下の回転速度では培養開始直後の細胞の増殖、到達細胞数も緩やかであった。

\*\* ) 培養条件： 培養液量；500 ml、初期細胞密度； $1 \times 10^5$  cells/ml 培養液、到達細胞密度； $1 \times 10^6$  cells/ml 培養液、培養液；MM+3%血清添加培地

## ・ 昆虫培養細胞のクローニング

初代培養細胞は組織から遊出した様々な細胞の集団である。特に胚組織由来の細胞では胚子の発育段階に応じて細胞種の構成は複雑と考えられる。これは胚組織に限らず他の組織でも同様と考えられる。そこで実験の目的に応じて1個の細胞に由来する細胞株の作出が必要になる。

### 1 . 限外希釈法

#### 1 ) 細胞密度の調整

(1)細胞浮遊液中の細胞数を血球計算盤で計測し、100 ~ 200cells を含む細胞浮遊液を遠心用滅菌チューブに採取する。

(2)150 g、5 分間遠心した後、上清を捨てる。

(3)チューブに培養液を 1 ml 加える。

#### 2 ) 1 個の細胞の分離

(1)チューブ内の培養液 10  $\mu$  l を採取し、96 穴マイクロテストプレートの各穴に入れる。

1 つの穴に 1 個の細胞があることを顕微鏡で確認し、印を付ける。

### 3) 培養

- (1) クローニングに当たって元の親株が維持されていた温度で培養を行う。
- (2) 増殖した細胞が穴の底面に増殖したら少し大きめの培養容器に移す。
- (3) この操作を反復する。急に培養面積を拡大すると細胞密度が大きくなり低下し、増殖が困難になる。

## 2. Single Cell Cloning 法

### 1) 細胞密度の調整

- (1) 細胞浮遊液をパスツールピペットで遠心用滅菌チューブに採取する。
- (2) 血球計算盤で細胞数を測定する。
- (3) 150 g、5 分間の遠心処理後上清を捨てる。
- (4) 培養液をチューブに加えて培養液 1 ml 当たり細胞が 1 個になるように調整する。
- (5) (4) の液 1 ml を小型滅菌ペトリ ディッシュ (直径 3 cm) に入れ、倒立顕微鏡 (対物 × 10 倍、接眼 × 10 倍) で細胞が視野に 1 個しか存在しないことを確認する。

### 2) キャピラリーの作製

- (1) ガスバーナーの炎を小さくし、パスツールピペットの先端部分を 2 回くぐらせる。
- (2) 15 ~ 20 $\mu$ m の細胞が通れる太さの位置でパスツールピペットを切断し、パスツールピペットを L 字形に曲げる。

### 3) パスツールピペットへ細胞の取り込み

- (1) パスツールピペットの基部に the cell-aspirating system のゴムチューブを装着する。
- (2) 倒立顕微鏡の鏡台面上に小型滅菌ペトリ ディッシュを置き、パスツールピペットの先端を細胞に近づけて、毛細管現象で細胞をピペット先端部位に吸引する。

### 4) マイクロテストプレートの穴に細胞の取り込み

- (1) 96 穴マイクロテストプレートを倒立顕微鏡の鏡台面上に置く。
- (2) 穴の中央にピペットの先端を近づけ、細胞が含まれる培養液を放出する。
- (3) 穴の底が被われるように培養液をさらに加える。
- (4) パラフィルムでプレートをシールする。
- (5) 1 個の細胞が穴にあることを顕微鏡で確認する。

### 5) 培養と乾燥からの防止

- (1)乾燥による培養液の蒸発を防止するためにプレートを密封容器内に保存する。
- (2)さらに乾燥防止のため容器の内部の周囲に滅菌水を浸した滅菌綿を置く。
- (3)25℃で培養する。
- (4)細胞が穴の底面全体に増えたらピペティングで細胞を剥離し、少し大きめの培養容器に移す。

**コメント：**ある種の細胞を培養して作製した順化培地はあらゆる細胞のクローニングに適さない。クローニングでは新鮮培養液と順化培地を等量ずつ混合した高栄養価の培養液がしばしば利用される<sup>3)</sup>。

### 3. 付着性細胞のコロニー形成法

#### 1) 細胞の準備

- (1)適当な蛋白分解酵素（例えば、パンクレアチン）で付着細胞を培養容器から剥離して遠心用滅菌チューブに採取する。
- (2)150 g、5 分間の遠心後、上清を捨て新鮮培養液を加えて細胞を分散する。

#### 2) 細胞密度の調整

- (1)深さ 3 ~ 5 mm のペトリディッシュに培養液を加える。
- (2)10 cells/ml または 2 cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度になるように培養液を加えて調整する。
- (3)25℃で培養する。

#### 3) コロニーの採取

- (1)ペトリディッシュ面に細胞のコロニーを確認する。
- (2)直径 5 mm、高さ 5 mm 程度のシリコン製のリングを高圧蒸気滅菌する。
- (3)リングの縁に滅菌シリコンを塗布し、細胞コロニーを囲むようにリングを置く。
- (4)リング内の培養液と蛋白分解酵素液とを交換する。
- (5)リング内の液をチューブに採取し 150 g で 5 分間の遠心後上清を捨てる。
- (6)新鮮培養液を 0.5ml 加える。

#### 4) 培養の再開

- (1)48 穴マイクロテストプレートに細胞液を入れる。
- (2)細胞液の乾燥防止のためプレートの周りをビニールテープでシールする。

### 4. 軟寒天を用いたコロニー形成法<sup>11, 12)</sup>

## 1) 軟寒天(Sea Plaque Agarose) (シーケム社) の作り方

- (1) 1.0% 濃度の Sea Plaque Agarose 水溶液 (超純水を使用) を試験管につくり、口をアルミホイルで覆う。
- (2) Agarose 水溶液を高圧蒸気滅菌器で 5 分間滅菌する。
- (3) 滅菌が終了し、高圧蒸気滅菌器の庫内の温度が 90 になってから Agarose 水溶液を取出し、あらかじめ 35 位に調節したウォーターバスに浸漬する。
- (4) Agarose 水溶液が 35 位に低下したところに 2 倍濃度の培養液 (35 に保温) とクリンベンチ内で十分に混合する。
- (5) ペトリディッシュ (60 × 15mm) に 7 ml 加える。
- (6) ペトリディッシュの蓋をやや半開きにしてアガロースの固体化を促す。

## 2) 細胞の準備

- (1) 対数的増殖期の細胞を用意し、血球計算盤で細胞密度を測定する。
- (2) 細胞液を遠心用滅菌チューブにとり、150 g、5 分間の遠心を行う。
- (4) 上清を捨て、新鮮培養液を加えて  $10^4$  cells/ml の低密度に調整する。
- (5) この 1ml の細胞浮遊液を 1) の (6) で作製したアガロースの上に加える。
- (6) ペトリディッシュの蓋をビニールテープでシールする。
- (7) 28 で培養する。
- (8) 10 ~ 14 日後にコロニーの形成を調査する。
- (9) コロニーはパスツールピペットで Agarose ごと吸い取り、新鮮培養液を加えた培養容器内に吐出して培養を開始する。

他のクローニング方法については *Invertebrate Tissue Culture Methods*. (2002) Jun Mitsuhashi. Springer Lab. Manual <sup>13)</sup> を参照されたい。

## ・ 培養細胞の染色体数の測定法 <sup>14)</sup>

昆虫培養細胞は継代を重ねると細胞株を構成する染色体数が異数化するなどの変異を

おこすことがある。この異数化の様相を調べることにより、ミスラベルなどから個々の細胞株を一時的に識別するのに利用できる。この染色体数の異数化は鱗翅目昆虫由来の培養細胞で顕著であるが、通常の実験には支障はなく利用できる。

### 1．染色体数測定のための準備

- 1) 対数的増殖期の細胞を含む培養液を遠心用滅菌チューブに採取する。
- 2)  $5 \times 10^{-3}$  M コルヒチン溶液を細胞浮遊液の 1/10 量加えて 4 ~ 5 時間の培養する。
- 3) 細胞浮遊液を 150 g、5 分間遠心した後、上清を捨てる。

### 2．細胞の膨潤操作

1) KCl の低張液(昆虫の細胞株ごとに低張液の濃度は異なる、カイコ細胞株は 0.067M) をチューブの 2/3 程までゆっくり加える。

- 2) 室温で 15 分間放置する。

### 3．固定

- 1) 当日作製のカルノア固定液(エタノール 3 : 氷酢酸 1) を 1 ml 加える。
- 2) ゆっくりピペティングして混合する。
- 3) 150 g、5 分間遠心後、上清を静かに捨てる。
- 4) チューブの 1/3 程度にカルノア固定液を加える。
- 5) ピペティング後、15 分間放置する。
- 6) チューブの 2/3 程度までカルノア固定液を加え、軽くピペティングする。
- 7) 150 g、5 分間 遠心後、上清を捨てる。
- 8) チューブの 1/3 程度までカルノア固定液を加え、15 分間放置する。
- 9) 150 g、5 分間遠心後、上清を捨てる。

### 4．拡散

- 1) 0.1 ~ 0.3ml のカルノア固定液をチューブに入れる。
- 2) 10 ~ 15cm 上から、カバーガラスの中央に細胞浮遊液の 5 滴を垂らす。
- 3) 空気を吹き付けてカバーガラスを乾燥させる。(風乾)

### 5．染色

- 1) 1/15 M Phosphate buffer(pH6.4) でギムザ染色液を 1/10 に希釈する。
- 2) 希釈ギムザ液を加えたペトリディッシュの中で 10 ~ 15 分間染色する。

3) 水をカバーガラスの裏面にかけて洗浄する。過度の染色はエタノール液の中にカバーガラスを浸漬して脱色する。

4) 適度の脱色のあと、迅速かつ完全にエタノールを水で洗い流す。

5) 染色状態を調べる。

6) 適度の染色であれば、カバーガラスを風乾する。まだ濃染ならば、3) ~ 6) を反復する。薄染ならば、2) ~ 6) を反復する。

7) バルサム液をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを封印する。

注) 染色体の数は細胞株ごとに常に不変ではない。培養の経過に伴って複数種類の細胞から特定の細胞が増加すれば、細胞株の染色体数の全体像は変化していく。一方 Karyotype の決定は連続性培養細胞株を表す基本的な必要事項として求められている。

## ・ 昆虫培養細胞株の識別法

### アイソザイム分析 (Agar Gel 電気泳動) <sup>15, 16, 17)</sup>

昆虫種が異なる細胞株では、電気泳動法により分離したアイソザイムのバンドパターンにより識別できる。しかし、同種間と種内の組織、器官の区別はこの方法では識別できない。昆虫では主にリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、燐酸グルコース イソメラーゼ、燐酸グルコムターゼ等が昆虫細胞の識別に適切な酵素である。これらはキットとして Authenti Kit (Corning 社) から販売されている。

Authenti Kit を用いた方法を以下に記述する。

#### 1) 分析に必要な機器

・ Authenti Kit 電気泳動装置、・ 恒温器、・ 遠心分離器、・ ガラスホモジナイザー

#### 2) Kit に付属の緩衝液など

以下は Authenti Kit を構成するものである。・ Authenti Kit 抽出緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM EDTA, 2 % Triton X-100 ; 4 ℃ に保存のこと)、・ Authenti Kit 酵素安定化緩衝液、・ 泳動緩衝液 (0.05 M PHAB)、・ 酵素活性測定用緩衝液 (0.1 M PHAB)、・ 酵素基質試薬、0.5 ml の 0.1 M PHAB 緩衝液を酵素基質試薬瓶に使用開始 30 分前に加える。

### 3) ゲル

Authenti Kit film(0.8 % agarose gel)

### 4) 酵素サンプルの調製

- (1)対数的増殖期の細胞を  $5 \times 10^6$  cells から  $1 \times 10^7$  cells を含む培養液を遠心用滅菌チューブに採取する。
- (2)150 g、5 分間の遠心後、上清を捨てる。
- (3)Carlson 液を加え、良く混合して細胞を洗浄する。この操作を 2 ~ 3 回繰り返す、細胞を洗浄する。
- (4)0.1 ml の Authenti Kit 抽出緩衝液を細胞塊に加える。
- (5)ガラス製ホモジナイザーを用いて細胞を破壊する。
- (6)磨砕液を 2,000 g、10 分間の遠心後、等量の酵素安定剤を加えて、 $-30$  以下の冷凍庫に保存するか、遠心抽出物を用いて直ちに分析の実験を行う。

### 5) 電気泳動

- (1)解凍した分析用サンプルの  $1 \mu\text{l}$  を Authenti Kit フィルムの溝に加える。
- (2)フィルムを泳動装置にセットし、160 V、25 分間泳動する。

### 6) 染色

- (1)電気泳動後、フィルムを泳動槽から外し、フィルター紙の上に載せる。
- (2)フィルムの端に 5 ml 用ガラス製ピペットをおき、ピペットとゲルの接触面にそうして 5 ml の基質試薬液を添加する。
- (3)ピペットをフィルム上の端から端まで 3 回、転がし試薬液をフィルム上に塗布する。
- (6)バットの中に水を湿らしたフィルター紙を置き、その上にフィルムを置いて 20 分間、 $37$  で加温する。
- (7)発色し、バンドが確認できたらフィルムを蒸留水で洗浄し、ゲルドライヤーで乾燥する。

細胞株間の識別には、本アイソザイム法の他に前述の染色体数測定法や新しい手法として RAPD-PCR 法<sup>18)</sup>もある。RAPD-PCR 法については文献を参照されたい。

## . 参考文献

- 1 . Grace, T.D.C. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature* 195, 788-789.
- 2 . Weiss, S.A., Smith, G.C., Kalter, S.S. and Vaughn, J.L. (1981) Improved method for the production of insects cell cultures in large volume. *In Vitro* 17, 495-502.
- 3 . Kamen, A.A., Tom, R.L., Caron, A.W., Chavarie, C., Massie, B. and Archambault, J. (1991) Culture of insect cells in a helical ribbon imoeller bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*38, 619-628.
- 4 . Jem, K.J., Gong, T., Mullen, J. and Georgis, R. (1997) Development of an industrial insect cell culture process for large scale production of baculovirus biopesticides. In: Maramorosch, K. and Mitsuhashi, J. (eds) *Invertebrate Cell Culture, Novel Direction and Biotechnology Applications*, Science Publishers, Enfield, pp 173-180.
- 5 . 今西重雄・富田秀一郎・中尾 肇 (1996) 鱗翅目昆虫の浮遊性培養細胞の高密度大量培養について . *日蚕雑* 65 ( 1 ) 7 - 12 .
- 6 . Ackermann, M., Hellenbrich, D.H.J., and Jager, V. (1994) Improvement of the performance of commercially available insect cell culture media for the baculovirus-directed production of recombinant proteins in bioreactors. *Cytotechnology* 14 (Suppl.1), 2-8.
- 7 . Schuler, M.L., Cho, T., Wickham, T., Ogonah, O.Kool, M., Hammer, D.A. and Granados, R.R. (1989) Bioreactor development for production of viral pesticides or heterologous proteins in insect cell cultures. *Ann. N.Y. Acad.Sci.*97, 399-422.
- 8 . Hensler, W., Singh, V. and Agathos, S.N. (1994) Sf9 insect cell growth and galactosidase production in serum and serum-free media. *Ann.N.Y.Sci.*745, 149-166.
- 9 . Mitsuhashi, J. and Maramorosch, K. (1964) Leafhopper tissue culture: Embryonic, nymphal and imaginal tissues from aseptic insects. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 22, 435-460.
- 10 . Ito, T. and Mitsuhashi, J. (1995) Effects of various conditioned media on proliferation of an isolated single cell from insect cell lines. *In Vitro Cell.Dev.Biol.*32A, 814-816.
- 11 . McIntosh, A.H. and Rectoris, C. (1974) Insect cells; colony formation and cloning in agar



medium. In Vitro 10, 1-5.

1 2 . S. Tomita, T. Tamura and S. Imanishi (1999) Stable transformation of lepidopteran cultured cells with novel cloning method. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal. 35: 311-313.

1 3 . J. Mitsuhashi (2002) Invertebrate Tissue Culture Methods. Springer.

1 4 . S. Imanishi, S. and Y. Ohtsuki. (1988) Characteristics of cell lines established from embryonic tissues of several races of the silkworm *Bombyx mori*, cultured in vitro. J. Seric. Sci. Jpn. 57, 184-188.

1 5 . Inoue, H. and Mitsuhashi, J. (1988) Characterization of a new continuous cell line from silkworm (*Bombyx mori*) embryos. Appl. Entomol. Zool. 23, 8-14.

1 6 . Mitsuhashi, J. and Inoue, H. (1988) Obtainment of a continuous cell line from the larval fat bodies of the mulberry tiger moth, *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera: Atctiidae). Appl. Entomol. Zool. 23, 488-490.

1 7 . Kadono, K., Imanishi, S. and Inoue, H. (1992) Identification of cell lines of *Bombyx mori* and some lepidopteran insects by electrophoresis. J. Seric. Sci. Jpn. 57, 184-188.

1 8 . Kawai, Y. and Mitsuhashi, J. (1997) An insect cell line discrimination method by RAPD-PCR. In Vitro Cell. Dev. Biol. 33A, 512-515.

## X . MAFF 登録昆虫培養細胞株リスト

一部 MAFF 登録昆虫培養細胞株リストから引用

No.	MAFF 番号	培養細胞学名	登録時の株名	培養液
1	275004	<i>Papilio xuthus</i>	NIAS-PX-58	MM (3%FBS)
2	275005	<i>Papilio xuthus</i>	NIAS-PX-64	MM (3%FBS)
3	275006	<i>Mamestra brassicae</i>	NIAS-Mb-19	MM (3%FBS)
4	275007	<i>Mamestra brassicae</i>	NIAS-Mb-25	MM (3%FBS)
5	275008	<i>Mamestra brassicae</i>	NIAS-Mb-32	MM (3%FBS)
6	275009	<i>Sarcophaga peregrina</i>	NIH-SaPe-4	MM (3%FBS)
7	275010	<i>Mamestra brassicae</i>	NIAS-MaBr-85	MM (3%FBS)
8	275011	<i>Aedes albopictus</i>	NIAS-AeAl-2	MM (3%FBS)
9	275012	<i>Leucania separata</i>	NIAS-LeSe-11	MM (3%FBS)
10	275013	<i>Spilosoma seriatopunctata</i>	NIAS-SpSe-1	MM (3%FBS)
11	275014	<i>Mamestra brassicae</i>	SES-MaBr-1	MM (3%FBS)
12	275015	<i>Mamestra brassicae</i>	SES-MaBr-2	MM (3%FBS)
13	275016	<i>Mamestra brassicae</i>	SES-MaBr-3	MM (3%FBS)
14	275017	<i>Mamestra brassicae</i>	SES-MaBr-4	MM (3%FBS)
15	275018	<i>Mamestra brassicae</i>	SES-MaBr-5	MM (3%FBS)
16	275019	<i>Mamestra brassicae</i>	NIAS-MaBr-92	MM (3%FBS)
17	275020	<i>Mamestra brassicae</i>	NIAS-MaBr-93	MM (3%FBS)
18	275021	<i>Spilosoma imparilis</i>	FRI-SpIm-1229	MM (3%FBS)
19	275022	<i>Spilosoma imparilis</i>	FFPRI-SpIm-2AM	IPL41 (10%FBS)
20	275023	<i>Spodoptera litura</i>	TUAT-SpLi-221	MM (3%FSB)
21	275024	<i>Bombyx mori L.</i>	SES-BoMo-15A	MGM448 (10%FBS)
22	275025	<i>Bombyx mori L.</i>	SES-BoMo-J125	MGM448 (10%FBS)
23	275026	<i>Bombyx mori L.</i>	SES-BoMo-C129	MGM448 (10%FBS)
24	275027	<i>Bombyx mori L.</i>	NISES-BoMo-Cam1	MGM448 (10%FBS)
25	275028	<i>Bombyx mori L.</i>	NISES-BoMo-15AIIc	MGM448 (10%FBS)

## X . MAFF 登録昆虫培養細胞株リスト

No.	MAFF 番号	培養細胞学名	登録時の株名	培養液
26	275029	<i>Bombyx mori L.</i>	SES-BoMo-J125K1	MGM448 (10%FBS)
27	275030	<i>Bombyx mori L.</i>	SES-BoMo-J125K2	MGM448 (10%FBS)
28	275031	<i>Bombyx mori L.</i>	SES-BoMo-J125K5	MGM448 (10%FBS)
29	275032	<i>Bombyx mori L.</i>	SES-BoMo-J125K6	MGM448 (10%FBS)
30	275033	<i>Samia cynthia pryeri</i>	NISES-SaCy-12	MGM448 (10%FBS)
31	275034	<i>Antheraea perni</i>	NISES-AnPe-428	MGM448 (10%FBS)
32	275035	<i>Antheraea yamamai</i>	NISES-Anya-0611	MGM448 (10%FBS)
33	275036	<i>Bombyx mori L.</i>	NISES-Bomo-BEN5	EXCLL400 (5%FBS)
34	275037	<i>Spodoptera frugiperda</i>	NISES-Sf-NEOβgal	Sf900 (3%FBS)
35	275038	<i>Spodoptera frugiperda</i>	NISES-Sf-FRTβ-gal	Sf900 (3%FBS)
36	275039	<i>Malacosoma neustria</i> <i>testacea</i>	FRI-MntH-520A	MM (3%FBS)
37	275040	<i>Bombyx mori L.</i>	NISES-Bomo-E1	MGM448 (10%FBS)
38	275041	<i>Bombyx mori L.</i>	NISES-Bomo-E2	MGM448(10%FBS)
39	275042	<i>Bombyx mori L.</i>	NISES-Bomo-E3	MGM448 (10%FBS)
40	275043	<i>Bombyx mori L.</i>	NISES-Bomo-E4	MGM448 (10%FBS)
41	275044	<i>Bombyx mori L.</i>	NISES-Bomo-E5	MGM448(10%FBS)
42	275045	<i>Spodoptera frugiperda</i>	NISES-Spfr-D1	Sf900 (3%FBS)
43	275046	<i>Spodoptera frugiperda</i>	NISES-Spfr-M1	Sf900 (3%FBS)
44	275047	<i>Spodoptera frugiperda</i>	NISES-Spfr-K1	Sf900 (3%FBS)
45	275048	<i>Spodoptera frugiperda</i>	NISES-Spfr-O1	Sf900 (3%FBS)
46	275049	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Sf9	Sf900 (3%FBS)
47	275050	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Sf21AEII	Sf900 (3%FBS)
48	275051	<i>Bombyx mori L.</i>	BMN-4	EXCLL400(10%FBS)
49	275052	<i>Spilosoma imparilis</i>	FFPRI-SpIm-2AM-SF	IPL (0)
50	275053	<i>Spilosoma imparilis</i>	FFPRI-SpIm-2AM-IP	IPL (10%FBS)

L411