KOR. JOUR. MICROBIOL. Vol. 11, 134~151 (1973)

昆虫組織培養과 바이러스研究

Arthropod Tissue Culture and Virus Research

李 淵 台

LEE, Yun Tai, M.S., Dr. Med. Sci.

(가톨릭大學 醫學部 微生物學敎室)

(Department of Microbiology, Catholic Medical College, Seoul, Korea)

1. 序 論
2. 細胞培養液
3. 細胞培養液의 *p*H
4. 細胞培養의 温度
5. 培養用細胞의 選擇
   1) 初代細胞培養
   2) 繼代細胞培養
      (a) Grace 繼代細胞株
      (b) Chiu & Black 繼代細胞株
      (c) Singh 繼代細胞株
      (d) 繼代細胞株
6. 應 用
   1) Arbovirus 研究
   2) 其他 動物 virus 研究
   3) 植物 virus 研究
   4) 電子顯微鏡的 觀察
7. 結 論
8. 參考文獻

1. 序 論

昆虫의 組織培養은 約 50餘年前부터 바이러스學者와 昆虫學者들이 特別한 興味를 가지고 昆虫과 바이러스間의 關係를 理解하고저 많은 努力을 기울여 왔다. 그 中에서도 1915年 Goldsmidt가 最初로 *Cecropia* moth의 精細胞를 試驗管內에 培養하는 데 成功하므로써 이 方面의 研究가 活氣를 띄우기 始作했다. 그러나 1960年代 以前까지는 여러가지 技術的인 難關에 부딪쳐서 별다른 進前을 보지 못하다가 1960年代 以後에 비로소 획기적인 大發展을 보게 되었다. 따라서 最近 이것은 arbovirus, plant virus, insect virus, 細胞學, 生理學, 遺傳學, 昆虫學 및 寄生虫學等 諸般學問領域의 研究資料로 提供되는 훌륭한 實驗資料中의 하나로 登場하게 되었다.

過去 이 方面의 研究가 지연된 이유를 여러가지 들 수 있겠으나 其中 몇가지 原因을 지적하면 昆虫의 hemolymph에 對한 不充分한 研究와 培養液 및 適切한 培養用細胞의 選擇이 適合치 못했던 關係로 分析된다.

Trager(1935)는 간단한 昆虫細胞培養液을 調製하였고, Wyatt(1965)에 依하여 좀더 進步된 培養液이 改良되었는데 이것은 Wyatt(1956, 1961)가 昆虫의 hemolymph 成分을 化學的으로 分析하는 데 成功케 됨에 따라서 昆虫의 細胞培養에 關한 研究는 더욱 急速한 進展을 보게 되었다. 따라서 近年에 Grace(1962, 1966), Singh(1967), Chiu등(1967) 및 Hsu등(1970, 1972)에 依하여 昆虫細胞의 初代培養(Gubler, 1963)은 물론, 여러가지 繼代細胞株까지도 開發하므로써 現在는 arbovirus, 植物바이러스 및 昆虫바이러스等 各 方面의 實驗材料로 많이 利用되고 있다.

筆者는 이 方面에 興味를 가지고 있는 同學을 爲하여 各種 昆虫組織의 初代細胞培養과 繼代細胞株 및 이 細胞의 利用度等에 그 近況을 紹介하고저 한다.

2. 細胞培養液

初期에 있어서 昆虫組織의 細胞培養液은 hemolymph單獨 또는 hemolymph에 簡單

Table 1. Components of the blood of two insects. (From Wyatt, 1961)

Component	*Bombyx mori* larva (mg/100 ml)	*Hyalophora cecropia* diapause pupa (mg/100 ml)
Na, K, Ca, Mg, Cl	400	400*
phosphates	1,100	600
citrate	600	200
trehalose	400	500
glycerol	0	2,800
amino acids	1,200	900
other non-protein N	1,900	2,000
protein	1,900	7,000
total of above	7,500	14,500
total non-volatile matter	7,800	15,800

* From values of *Antheraea polyphenus*

Table 2. Composition of free amino acids in biological and synthetic solutions (mg/100 ml)

Component	human plasma*	lactalbumin hydrolysate+ 0.4%	lactalbumin hydrolysate+ 1.0%	blood‡ *Bombyx mori*	blood‡ *Galleria mellonella*	Wyatt's physiological solution§	vertebrate synthetic medium M. 199‖
alanine	3.41	10.8	27	50	223	45	5
arginine	1.51	12.5	31	28	39	—	7
arginine HCl	—	—	—	—	—	70	—
a-partic	0.03	3.8	9.5	10	38	35	6
asparagine	0.58	—	—	59	13	35	—
cysteine+cystine	1.18	8.7	21.5	0	0	2.5	2
glutamic acid	0.70	15.9	40	10	22	60	15
glutamine	8.30	(10)	25	143	169	60	10
glycine	1.54	1.8	4.5	73	51	65	5
histidine	1.15	1.5	4	273	136	250	2
isoleucine	0.89	12.4	31	29	42	10	4
leucine	1.69	37	92.5			15	12
lysine	2.72	17.8	45	164	168	—	7
lysine HCl	—	—	—	—	—	125	—
methionine	0.38	6.7	16.5	14	27	10	3
phenylalanine	0.84	14.3	35.5	11	11	15	5
proline	2.36	4.1	10	36	520	35	4
serine	1.12	9.2	23	111	47	110	5
threonine	1.39	6.5	16.5	36	62	35	6
tyrosine	1.01	10.8	27	31	76	5	4
tryptophane	1.11	4.3	10.8	—	—	10	2
valine	2.88	15.8	40	23	29	20	5
total of above	34.8	293	470.3	—	—	1012	—
peptide bound	—	101	250	—	—	—	—
overall total	34.8	304	720	—	—	1012	—

* Stein & Moore(1954). +Kagawa *et. al.*(1960). ‡Wyatt *et. al.*(1956). §Wyatt(1956). ‖Morgan *et. al.*(1950).

한 鹽類 및 sugar等을 添加한것이 主로 細胞培養에 使用되어 왔다(Goldschmidt, 1915; Lewis, 1916; Glaser, 1917; Lazarenk, 1925). 그러나 Trager(1935, 1956)는 어느

Table 3. Tissue-culture medium[a] for *Bombyx mori*[b]

Component	Concentration, mg/100 ml	Component	Concentration, mg/100 ml
NaH_2PO_4	110	DL-Alanine	45
$MgCl \cdot 6H_2O$	304	β-Alanine	20
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	L-Proline	35
KCl	298	L-Tyrosine	5
$CaCl_2$	81	DL-Threonine	35
		DL-Methionine	10
Glucose	70	L-Phenylalanine	15
Fructose	40	DL-Valine	20
Sucrose	40	DL-Isoleucine	10
		DL-Leucine	15
L-Arginine HCl	70	L-Tryptophan	10
L-Histidine	250	L-Cystine	2.5
L-Aspartic acid	35	Cysteine HCl	8
L-Asparagine	35		
L-Glutamic acid	60	Malic acid	67
L-Glutamine	60	α-Ketoglutaric acid	37
Glycine	65	Succinic acid	6
DL-Serine	110	Fumaric acid	5.5
		Antibiotics	(as required)

[a] *p*H, 6.5.
[b] From S.S. Wyatt, 1956.

程度 完成된 簡單한 基本細胞培養液을 調製하게 되었고, Wyatt(1956)는 昆虫(silkworm)의 hemolymph에 對한 分析(table 1,2,3)을 하여 silk worm(*Bombyx mori*) hemolymph와 類似한 細胞培養液을 調製하여 細胞를 培養하는 데 成功하였다. 또 Vago (1963)등도 leafhopper(*Macrosteles*와 *Philaenus*)의 hemolymph를 分析한 바 sodium 濃度는 낮고 potassium과 magnesium이 高濃度로 含有되어 있다고 했고, leafhopper의 組織은 넓은 sodium range에서 잘 增殖된다고 했다(Mitsuhashi & Maramoroschi, 1964). 特히 昆虫의 血液은 amino acid의 含量이 人血淸보다 높고 (Martigoni, 1960 ; Wyatt, 1961) 두 種의 *Lepidoptera*와 1種의 *Hymenoptera*의 境遇 사람血漿보다 約 70倍의 amino acid를 더 含有했다(Wyatt *et.. al.*, 1956). Wyatt (1956)는 leafhopper細胞를 培養하는데 細胞培養液의 amino acid濃度를 TC-199培地보다 10倍로 增加시켜 使用했다. Day(1959)들은 hemolymph에 높은 濃度의 amino acid를 必須的으로 添加시켜야 한다고 주장했다. 그러나 20%의 fetal calf serum을 細胞培養液에 添加하므로써 leafhopper 細胞培養에 amino acid量을 半으로 減少시킬 수 있었다(Mitsuhashi & Maramorosch, 1964).

한편 Grace(1958b)는 Wyatt의 培地를 더욱 改良 補充(第4表)하여 實驗한 바 silkworm 및 여러種의 Saturniidae細胞가 잘 增殖됐다고 했다. 이 培地는 10가지의 vitamin B 複合劑와 K, Na, Ca 및 Mg ion 濃度를 Saturniidae의 hemolymph와 類似하게 調製하였고 培養液의 *p*H를 6.35에서 6.5로 變便調定한 것이다. Hemolymph는 56°C로 30분간 加熱處理한 것을 5% 첨가했고, 1%의 bovine plasma albumin도 同時에 添加했다. 한편 이 細胞培養液으로 mosquito *Antheraea eucalypti* Scott 및 silkworm(*Bombyx mori*)의 細胞를 培養하는 데 大端한 效果를 얻었다고 한다(Grace,

Table 4. Insect tissue-culture medium[a]

Component Group Name	Concentration, mg/100 ml	Component Group Name	Concentration, mg/100 ml
A. Salts		C. Sugars	
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	114	Sucrose(gm)	2.668
$NaHCO_3$	35	Fructose	40.0
KCl	224	Glucose	70.0
$CaCl_2$(separate)	100		
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	228	D. Organic	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	278	Malic acid	67
		α-Ketoglutaric acid	37
B. Amino acids			
L-Arginine HCl	70		
L-Aspartic acid	35	Succinic acid	6
L-Asparagine	35	Fumaric acid[c]	5.5
L-Alanine	22.5		
β-Alanine	20	E. Antibiotics	
L-Cystine HCl	2.5	Penicillin"G"	
L-Glutamic acid	60	(Na salt)	3
L-Glutamine	60	Streptomycin sulfate	10
L-Glycine	65		
L-Histidine	250		
L-Isoleucine	5	F. Vitamins	
L-Leucine	7.5	Thiamine HCl	0.002
L-Lysine HCl	62.5	Riboflavin	0.002
L-Methionine	5	Calcium pantothenate	0.002
L-Proline	35	Pyridoxine HCl	0.002
L-Phenylalanine	15	p-Aminobenzoic acid	0.002
DL-Serine	110	Folic acid	0.002
L-Tyrosine[b]	5	Niacin	0.002
L-Tryptophan	10	Isoinositol	0.002
L-Threonine	17.5	Biotin	0.001
L-Valine	10	Choline chloride	0.002

[a] After Grace(1962).
[b] Dissolved in 1N HCl.
[c] Neutralize organic acids with KOH.

1962, 1966, 1967). 그러나 Grace의 *Antheraea* 및 모기(*A. aegypti*)細胞株는 培養時 細胞培養液內에 hemolymph를 必須로 添加해야 했다. 이 hemolymph는 購得 및 處理가 複雜한 過程을 거쳐야 하므로 細胞培養時에 hemolymph를 除去하려는 努力이 始作되었다. 그래서 Yunker등 (1967)은 hemolymph代身 fetal calf serum을 培養液에 加하여 *Antheraea*繼代細胞를 培養하는 데 成功하게 되었다. 또 Hsu(1969)는 Grace系 모기細胞(*A. aegypti*)에서 Yunker(1967)와 同一한 效果를 얻었다. 따라서 이와같은 硏究는 昆虫의 細胞增殖에 hemolymph가 必須的인 要素가 아님을 證明한 實驗이라고 생각된다. Grace의 細胞系에 利用되는 細胞培養液은 그 構成成分이 값 비싼 amino acid와 vitamin 等이 必須的으로 많이 要求되어 非經濟的이고 또 培養液 製調過程도 大端히 煩雜하여 이 方面의 硏究者에게 歡迎을 받지 못하는 實

Table 5. Components of various insect tissue culture medium (mg/100 ml)

Component	Trager 1935	Mitsuhashi *et. al.* 1964	Kitamura 1964	Singh 1967	Gubler 1968	Hsu *et al.* 1970	Hsu *et al.* 1972
NaCl	7.6	700	650	700	680	450	157.5
KCl		20	50	20	40	80	28
$CaCl_2$	11.1		20			35	12.25
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$		20		20	20		
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	20.3	20		10	10		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$						40	14
Na_2HPO_4					6		
$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$		20		20			
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	20.7						
$NaHCO_3$		12	10	12	100	100	35
KH_2PO_4					6	25	8.85
K_2HPO_4	20.4						
Glucose			800		70		
D-glucose		400		400		160	56
Fructose					50		
Sucrose					50	600	210
Malic acid					60		
l-Malic acid						60	21
α-Ketoglutaric acid					40	40	14
Succinic acid					6	6	2.1
Fumaric acid						6	2.1
Ascorbic acid					10		
Lact. albu. Hy.		650	1000	650	1000	2000	865
TC-yeastolate		500		500	100	200	320
Bacto-peptone						500	175
Fetal calf serum		20ml		20ml		10ml	10ml
TC-199			20ml			2part	2part
*p*H	6.7	7.0	7.0	7.0	6.7	6.6	6.6
Temperature	28-29°C	28°C	24°C	28°C	28°C	28°C	28°C

情에 있다. 따라서 이와같은 理由로 近来에 Mitsuhashi 및 Maramoroschi (1964)의 細胞培養液이 많이 利用 發展되고 있는 形便이다. 그 例로서 Mitsuhashi(1965)는 rice stem borer (*Chilo suppressalis*)의 組織을 昆虫 Ringer溶液에 TC-199을 適切히 混合하여 細胞를 增殖시켰고, Chiu & Black(1967)은 leafhopper (*Agallia constricta*)를, Mitsuhashi(1967a)는 rice stem borer (*C. suppressalis*)를, Ohanessian과 Echalier(1967)은 *Drosophila melanogaster*의 細胞를 各各 간단한 세포배양에서 能率的으로 培養하는 데 成功하게 되었다.

特히 最近에 arbovirus, 昆虫生理學 및 遺傳學研究에 利用되고 있는 Singh(1967)의 *A. aegypti* 및 *A. albopictus* 繼代細胞는 대단히 簡單한 基本細胞培養液(Mitsuhashi & Maramoroshi, 1964)으로 細胞培養이 잘 되고 있어 學界에 크게 歡迎을 받고 있는 실정이다.

한편 Gubler(1968)도 簡單한 細胞培養液을 調製하여 mosquito細胞를 短時日內에 單層細胞로 培養하는 데 成功하게 되었고 特히 Hsu등 (1970, 1972)은 Gubler의 細胞培養

Table 6. Hydrogen ion concentration and incubated temperature for the various insect cells culture

Tissue		*p*H	Temperatures	Refferences
Silkworm(*Bombyx mori*)	ovary	6.7	28—29°C	1956, Wyatt
Silk moth(*Philosamia adrena*)	ovary	6.35	25°C	1960, Johnes *et al.*
Antheraea eucalypti Scott	ovary	6.5	27—29°C	1962, Grace
Culex pipiens	ovary	7.0	24°C	1964, Kitamura
Rice stem borer(*Chilo suppressalis*)	larvae	6.2	25°C	1965, Mitsuhashi
Green rice leafhopper (*Nephotettix cinticeps*)	ovary	6.5	25°C	1965, Mitsuhashi
Aedes aegypti	larvae	6.7	28°C	1965, Peleg
Aedes aegypti & *Philosamia cyntia*	pupae	6.7	28°C	1965, Peleg *et al.*
Pea aphid(*Acyrthosiphum pisum*)		6.5	25°C	1966, Tokumitsu *et al.*
Culex pipiens, *A. aegypti* & *A. albopictus*	ovary	7.0	24°C	1966, Kitamura
Antheraea eucalypti(Grace cell line)	ovary	6.5	28°C	1966, Suitor
Agallia constricta	embryo	7.0	27°C	1967. Chiu *et al.*
Chillo suppressalis	hemocyte	6.2	25°C	1967, Mitsuhashi
Drosphila melanogaster	embryo	2	26°C	1967, Ohanessian
A.albopictus & *A.aegypti*	ovary	7.0	28°C	1967, Singh
A.albopictus & *A.aegypti*	ovary	7.0	30°C	1968, Singh *et al.*
Grace *Antheraea* cells	ovary	6.4	27°C	1968, Yunker *et al.*
Culex molestus	ovary	7.0	25°C	1968, Kitamura *et al.*
Aedes aegypti	embryo	6.7	28°C	1968, Peleg
Aedes aegypti	embro	6.7	28°C	1968, Peleg
Culex pipiens	midgut pupae	6.7	27°C	1968, Gubler
Antheraea eucalypti (Grace)	ovary	6.5	28°C	1969, Lee
A.aegypti & *A. triseriatus*	larvae	6.8	25, 30, 37	1969, Johnson
Tick (*Dermacentor andersoni*)	nymph	6.9	26—28°C	1967, Yunker *et al.*
Culex quinquefasciatus	ovary	6.6	28°C	1970, Hsu *et al.*
Cabbage looper (*Trichoplusiani*)	ovary		27°C	1970, Hink
Culex salinarius	larvae	7.0	28°C	1970, Lite *et al.*
Ctenocephalides felis	larvae	7.2	30°C	1971, Rehacek *et al.*
Culex triteaniorhyncus	ovary	6.6	28°C	1962, Hsu *et al.*

液의 成分中 一部를 變便調製하여 *Culex quinquefasciatus*와 *Culex triteaniorhyncus*로 부터 短時日內에 繼代細胞株를 얻는데 成功하여 오늘날 廣範한 硏究에 많이 利用되고 있다. 따라서 昆虫의 細胞培養을 發展시키려면 먼저 優秀한 培養液이 選定되어야만 한다. Day & Grace(1959)는 昆虫細胞培養에 있어서 두가지 重要한 事實을 指的한 바 있다. 그것은 첫째로 細胞는 larval stage의 細胞가 잘 자라고, 둘째로 選擇된 昆虫血液의 充分한 分析이 考慮되어야 한다고 指摘했다. 細胞培養液의 成分中 glucose는 細胞增殖에 energy源으로 必要한 因子라고 강조했고, 또 要求되는 glucose, fructose, sucrose의 比는 4 : 2 : 1이 되게 添加하는 것이 細胞培養에 效果的이라고 强調하였다. Wyatt(1956)은 maltose, ketoglutarate, succinate 및 fumarate等의 成分은 細胞의 增殖에 뚜렷한 刺戟을 주고, 또 vitamin混合物은 leafhopper 組織細胞의 增殖을 促進시키지 못하나 TC-yeastolate는 促進한다고 報告한 바 있다(Mitsuhashi). 特히 TC (Tissue Culture)-yeastolate는 細胞分裂時에 增殖을 적극 돕는다고 했다(Bryn, 1962). 따라서 現在 이런 사실을 考慮하여 많은 種類의 昆虫細胞培養液이 開發

되고 있다. 그러나 Mitsuhashi & Maramoroschi(1964)는 자기들이 제조한 細胞培養液이 가장 優秀한 細胞培養液이라고 主張하고 있는 데 Gubber의 細胞培養液도 이에 못지 않는 좋은 곤충조직 배양액이다(Mitsuhashi, 1969).

3. 細胞培養의 *p*H

昆虫細胞를 만족하게 배양하는데는 培養液의 *p*H가 큰 영향을 준다. 昆虫細胞培養에 가장 適合한 *p*H는 Table 6에 表示된 바와 같으며 大槪 6.5~7.0 사이다. (Grace, 1962, 1966; Suitor, 1966; Yunker, 1967; Singh, 1967; Gubler, 1968; Johnson, 1969; Hsu, 1970)

Wyatt(1956)는 數種의 silkworm (*Bombyx mori*) hemolymph의 *p*H價를 測定한 結果 大部分이 *p*H 6.38~6.60사이 였다고 했다. 또 Grace(1962, 1966)는 *p*H 6.5에서 moth와 mosquito細胞를 成功的으로 培養했고, Singh(1967)와 Yunker(1968)등은 *p*H 7.0에서 세포를 增殖시켰다.

最近 Hsu(1972)는 培養液의 *p*H를 달리한 實驗에서 즉 *p*H 6.6 에서 細胞가 가장 잘 增殖했다고 報告한 바 있다. 따라서 *p*H는 增殖시키려는 細胞株에 따라서 相互 다르다.

4. 細胞培養의 溫度

昆虫細胞培養에 適合한 溫度는 細胞의 種類와 培養方法에 따라서 若干 다르다. Table 6에서와 같이 主로 25°~28°C에서 細胞培養을 實施하였다. Suitor등 (1965)은 25°C에서는 virus增殖이 되지 않는다고 했고, 李淵台(1968)는 Grace細胞培養液에서 溫度에 對한 SF virus의 安定度를 測定한 바 28°C가 가장 적합하다고 했다. Johnson(1969)은 *Aedes*모기 初代培養細胞에 VEE와 EEE virus를 感染시킨 바, 25°C 및 35°C에서 virus의 增殖이 抑制되고, 30°C에서 多少 virus가 增殖되었다. 따라서 細胞—바이러스에 關係되는 溫度는 28°C 前後가 細胞 및 virus 增殖에 適當하다(Grace, 1959).

5. 培養用細胞의 選擇

細胞培養에 使用된 細胞株들은 第7表에 表示된 바와 같이 主로 各種 昆虫들의 生殖細胞가 大部分이었으나 그 外에도 神經, 唾液腺 및 腸管細胞 等도 細胞培養에 많이 利用되었다. 그 中 바이러스의 硏究에 使用된 組織들은 主로 모기의 細胞들이다. 이러한 細胞培養 方法은 初代細胞培養과 繼代細胞培養으로 크게 大別하여 생각할 수 있다.

1) 初代細胞培養

各種 初代細胞培養에 成功한 例도 Table 7와 같이 많은 例가 있으나 가장 좋은 例로서는 Trager(1935)가 silkworm (*Bombyx mori*)의 ovary細胞를 培養하는데 成功한 것이며, 그後 Wyatt(1956)는 Trager의 培養液에 10%의 hemolymph를 添加하여 같은 細胞를 3週까지 培養하였다. Grace(1958, 1967)는 *Promethea* moth (*Colloramia promethea*)와 silkworm (*Bombyx mori*)의 卵巢細胞를 長期間培養하였고, Mitsuhashi (1965a, 1965b)는 rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker)의 larvae 細胞와 green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps*)의 胚細胞를 培養하여 그의 生物學的 性狀을 調査한 바 있다.

Peleg(1965)는 모기(*Aedes aegypti*)의 larvae細胞를 Trager의 細胞培養液에 增殖시켰고, Kitamura(1965)도 모기(*Culex pipiens*)의 卵巢細胞를 培養했는데 이때 10%의 chicken extract와 bovine albumin을 培地에 添加한 바 細胞의 增殖이 良好하였으며, 特히 20%의 TC-199를 加한 群에서는 細胞의 增殖이 더 좋았다고 했다. 이와 같은 方法으로 세가지 모기(*Culex molestus, Aedes albopictus, Aedes aegypti*)의 卵巢細胞도 成功的으로 增殖시킨 바 있다(Kitamura, 1966). 한편 Gubler(1968)도 簡單한 細胞培養液을 製造하여 모기(*Aedes aegypti*)의 larvae 細胞를 培養시킨 바 있다.

Varma(1969)는 Mitsuhashi (1964)들과

Kitamura(1965)의 細胞培養液을 比較使用하여 모기(*Aedes aegypti*)의 larvae 細胞를 効率的으로 增殖시켰다. 또한 最近 Hink (1970)는 cabbage looper(*Trichoplusiani*)의 成熟 卵巢細胞를 增殖시켜 그 生物學的 性狀을 報告한 바 있다. 以上과 같이 各種 昆虫組織의 細胞를 効率的으로 培養하게 됨에 따라서 virus 硏究에 크게 貢獻을 하게 되었다.

2) **繼代細胞株培養**

(a) Grace繼代細胞株

이 細胞株는 *Antheraea eucalypti* moth와 모기(*Aedes aegypti*)의 細胞株로 大別되는데 前者는 pupal stage의 卵巢로 부터 由來된 細胞로서 trypsinization에 依하여 分離培養된 最初의 昆虫繼代細胞株이다. 이 細胞는 繼代培養後 增殖速度가 매우 느렸던 것이 10個月 繼代後부터 試驗管內 培養에 適應하기 始作하여 細胞의 增殖速度가 漸次 빨라져서 繼代後 週1回마다 계대하게 되었다(Grace, 1962).

細胞의 모양들은 大體로 3가지로 區分되는데(Fig. 1), ① 크기가 20~40μ이고 多角型이며 細胞質에 granule이 있다. ② 크기는 15~20μ이고 細胞質內 granule이 없다. ③ 작고(10~15μ) 圓型이며 透明한 細胞質을 가지고 있다(Suitor, 1966).

두번째의 Grace(1966)의 繼代細胞株는 모기(*Aedes aegypti*)의 larvae로 부터 分離한 細胞로서 역시 *Antheraea eucalypti* 細胞培養液에 培養한 細胞株이다. 이 細胞는 *Antheraea eucalypti*細胞보다 더 빨리 增殖되었으며, 쉽게 試驗管內 培養에 適應하였다. 세포의 形態는 大體로 두가지로 區分되었는데 크기가 40~50μ인 spindle型이있고 다른 하나는 20μ정도의 크기로 圓型의 細胞들이었다(Fig. 2).

(b) Chin & Black繼代細胞株

Chiu와 Black(1967)에 依하여 分離된 繼代細胞株는 leafhopper (*Agallia constricta*)의 胚兒로부터 分離培養된 細胞株로서 거의 上皮細胞들이며 이 細胞는 4~8日 간격으로 55代繼代하여 固定된 細胞이다. 繼代培養時 細胞의 濃度를 4.8×10^6/m*l*로 培養했을 때 24時間內 細胞單層을 形成했다. 이 細胞는 植物바이러스 硏究에 主로 쓰이며 特히 wound tumor바이러스 연구에 많이 利用되고 있다.

(c) Singh繼代細胞株

Singh(1967)細胞는 모기(*Aedes aegypti* 및 *Aedes albopictus*)의 larvae를 부화 즉시 잘라서 0.25%의 trypsin으로 處理하여 細胞培養한 것으로 *Aedes albopictus*細胞는 培養 第二日에 增殖이 始作되어 배양後 第二週에 細胞單層을 形成하였다. 그후 細胞生長期間이 단축되어 週2回 繼代로 完全한 細胞單層을 形成하였다. 이 細胞의 形態는 세가지로 觀察되었는데 ① 크기가 6~20μ되는 圓型의 細胞들이 大部分이고, ② 7~10μ되는 spindle型이 그다음이며 ③ 15~9μ되는 길고 넓은 세포도 있었다(Fig. 3). 한편 *A. aegypti*繼代細胞는 細胞培養後 第3日에 單層細胞를 形成하였으며 vesicle을 形成하는 上皮細胞樣인 것이 많았다. 이 細胞는 增殖이 약간 느린 것이 特徵이다.

(d) Hsu繼代細胞株

Hsu繼代細胞는 3~5日된 암모기(*Culex quinquefasciatus*)의 卵巢를 적출하여 capillary試驗管에 培養하여 얻은 細胞로 49日 培養後 增殖이 빨라져 그後 3代 繼代한 바 增殖速度가 더 빨라져서 2~3日에 1回 繼代하게 되었고 이로서 充分한 單層細胞를 形成하였다(Hsu, 1970).

細胞形態는 主로 spindle形이 가장 많았고 크기는 21.5×12.9μ 程度로 細胞質이 透明하다. 다른 하나는 圓形細胞로 細胞質에 果粒이 存在하고 있다(Fig. 4).

또 다른 細胞株는 Hsu(1972)가 모기(*Culex triteaniorhyncus*)의 卵巢를 적출하여 細胞培養을 실시한 것인데 培養 3日에 增殖이 始作되어 18日까지 培養하였
日에 繼代하여 9週까지 週 1回 繼
5代 繼代後부터 細胞의 增殖速度가
3~4日만에 細胞를 繼代하게 되었

Table 7. Reported attempts to culture arthropod tissue

Tissue	Arthropod	Reference
Reproductive Tissues or Organs: Gonads(both sexes)	*Bombyx* (silkworm)	1959, Gaw, Liu & Zia
	Philosamia cynthia (moth)	1963, Peleg & Trager
	Galleria mellonella larva (bee moth)	1963, Lender& Duvean
Testes	grasshopper	1916, Lewis
	Drosophila (fruit-fly)	1940, Stern
Spermatocytes	*Cecropia* moth	1915, Goldschmidt (First report)
	"	1916, Goldschmidt
	"	1917, Goldschmidt
	"	1924, Takakusa
	"	1953, Schmidt & Williams
Ovary	cricket	1926, Murray
	silkworm	1935, Trager
	silkworm—ovarian tubule	1937, Trager
	silkworm	1956, Wyatt
	silkworm	1958, Grace
	Lepidoptera nymph	1959, Aizawa & Vago
	Lepidoptera	1960, Sanborn & Haskell
	silkworm	1960, Jones & Gunningham
	silkworm	1961, Jones & Gunningham
	moth	1962a, Grace (continuous)
	Periplaneta americana (cockroach)	1963, Guveau-Hagege
	Culex pipiens (house mosquito)	1964, Kitamura
	Aedes aegypti & *Aedes albopictus*	1966, Kitamura
	Aedes aegypti & *Aedes albopictus*	1967, Singh (continuos)
	Culex molestus	1968, Kitamura
	Culex quinquefasciatus	1970, Hsu *et al.*(continuos)
	Cabbage looper (*Trichoplusiani*)	1970, Hink
	Culex pipiens	1971, Lee & Lee
	silk moth (*Philasamia adrena*)	1960, Johnes *et al.*
	Culex triteaniorhyncus	1972, Hsu *et al.*(continuos)
Ovariole	silkworm	1935, Hibbard
Embryo cells	grasshopper neuroblasts	1946, Carlson
	grasshopper	1947, Gaulden & Carlson
	Drosophila melanogaster (fruit-fly)	1964, Horikawa & Fox
	leafhopper	1964a, Hirumi & Maramorosch
	Drosophila (fruit-fly)	1965, Lesseps
	Greenrice leafhopper	1965, Mitsuhashi
	Agallia constricta	1967, Chiu & Black
	Drosophila melanogaster	1967, Ohanessian
	Aedes aegypti	1968, Peleg

Immatures:		
Larval body	*Aedes aegypti*(yellow-fever mosquito)	1965, Peleg
	Aedes aegypti(yellow-fever mosquito)	1966, Grace (continuous)
	Aedes aegypti & *Aedes triseriatus*	1969, Johnson
Larval epithelium	*Lepitoptera* larvae	1959, Aizawa & Vago
	Culex salinarius	1970, Lite *et al.*
	Ctenocephalides felis	1971, Rehacek *et al.*
Pupal body	*Peridroma margaritosa* (cutworm)	1958, Martignoni, Zitcer & Wagner
Pupal wing anlagen	tsetse-fly	1959, Trager
	butterfly	1930, Charin
	Aedes aegypti & *Philosamia cynthia*	1965, Peleg *et al.*
	Culex pipiens molestus	1968, Gubler
Nymph body	ticks	1958, Rehacek
	〃	1961, Rehacek & Hana
	〃	1962, Rehacek
	〃	1962, Martin & Vidler
	cockroach	1965, Ting & Brook
	tick	1965, Rehacek
	tick	1967, Yunker & Cory
Imaginal discs	fly	1928, Frew
	mosquito	1938, Trager
	Drosophila wing & leg disc (fruit-fly)	1939, Fischer & Gottschewski
	Drosophila eye discs (fruit-fly)	1939, Gottschewski & Fischer
	Aedes aegypti (yellow-fever mosquito)	1963, Peleg & Trager
Adult tissues or organs		
Epithelial cells	*Rhodnius* (reduviid bug)	1947, Luscher
Nerve	*Corethra* (*Chaoborus* mosquito)	1937, Pfeiffer
	Corethra ganglia (*Chaoborus* mosquito)	1939, Pfeiffer
	Drosophila ganglia (fruit-fly)	1963, Rezzonico & Ghini
Muscle	*Dytiscus* (diving-beetle)	1925, Schmidtmann
	Vespa (hornet)	1942, Pfeiffer
Salivary gland	mosquito	1941, Gavrilov & Cowez
	Drosophila melanogaster (fruit-fly)	1963, Demal & Leloup
	Sciara coprophila (army-worm)	1964, Cannon
	Culex pipiens	1971, Lee & Lee
Silk gland	*Bombyx* (silkworm)	1959, Gaw, Liu & Zia
Gut	*Musca* (house-fly) & *Calliphora* (blow-fly)	1920, Collier
	mosquito	1941, Gavrilov & Cowez
	Lepidoptera	1959, Aizawa & Vago
	Bombyx (silkworm)	1959, Gaw, Liu & Zia
	cockroach	1964, Larsen

Malphigian tubules	*Blaberus cranufer* (cockroach)	1964, Larsen
Heart	*Blaberus cranufer* (cockroach)	1964, Larsen
Trachea	*Bombyx* (silkworm)	1959, Gaw, Liu & Zia
Firefly light organ	firefly	1937, Takeda
Hemocytes	*Malacosoma* (tent-caterpillar)	1917, Glaser
	Oryctes (chafer)	1925, Lazarenoko
	cockroach	1935, Taylor
	silkworm	1938, Wermel
	Drosophila blood cells (fruit-fly)	1939, Fischer & Gottschewski
	various spp.	1946, Millara
	Forficula (earwig)	1946, Arvy & Gabe
	Rhodnius (reduviid bug)	1947, Luscher
	Drosophila blood (fruit-fly)	1959, Horikawa & Kurodu
	cutworm blood	1961a, Martignoni & Scallion
	Chilo suppressalis	1967, Mitsuhashi
Not listed by specific tissue	various insects	1924, Palliot
	tissues of mosquito, grasshopper & dragonfly	1930, Kohring
	various Lepidopteran & aphid tissue	1961, Vago, Fosset & Meynadier
	monarch butterfly	1964b, Hirumi & Maramorosch

* This list is believed to be fairly complete up to October 1965, but there may be unintentional omissions.

胞의 形態는 fibroblast 및 spindle型으로 되어 있었으며 세포의 길이가 15~31μ이고 넓이는 5~21μ인 圓型 및 卵圓型의 細胞들이었다.

6. 應 用

昆虫細胞培養은 應用生物學領域의 各分野에서 여러가지 實驗에 利用되고 있다. 即 動物virus (arbovirus, adenovirus, serum hepatitis virus等), insect 및 plant virus, rickettsia, 遺傳學, 細胞學, 生理學 및 寄生虫學等의 硏究에 利用되고 있다. 그러나 여기에 取扱하려는 것은 arbovirus와 植物 및 昆虫 virus에 關한것 만을 主로 記述하려 한다.

1) Arbovirus硏究

Rehacek(1965)는 진드기(tick) 組織을 初代 培養하여 이 細胞에 arbovirus를 包含한 22種의 바이러스를 感染시킨 結果 lymphocytic choriomeningitis 바이러스가 가장 增殖이 잘 되었다고 한다.

Trager(1938)는 WEE바이러스를 모기細胞(*Aedes aegypti*)에 培養하였는데 28日에 바이러스 感染粒子가 最高 100,000倍나 增殖되었고, Haine(1958)도 EEE바이러스를 모기(*Aedes aegypti*) 培養細胞에 感染시켜 같은 成績을 얻었고, Peleg(1963)도 같은 모기細胞에서 WN바이러스를 感染시켜서 좋은 成績을 얻었다. 또 Peleg & Trager (1965)는 *Aedes aegypti* 및 moth細胞에 WN바이러스를 接種한 바 모기의 細胞에서만 바이러스가 增殖된다고 했다. Yunker (1967)는 Colorado tick fever 바이러스를 媒介體인 tick의 組織을 初代細胞培養하여 바이러스를 感染시킨 바 第35日에 最高 約 10,000倍의 바이러스粒子가 增殖되었다고 했다. Peleg(1968)도 모기(*Aedes aegypti*)의 胚細胞를 培養하여 Semliki Forest(SF), EEE 및 WN바이러스를 感染시킨 결과, 培養 60日에 Semliki forest virus가 가장 잘

增殖되었으며 WN바이러스는 徐徐히 자라고 EEE바이러스는 그 中間으로 增殖되는 性狀을 보였는데 細胞의 病變은 없었다고 했다. Johnson(1969)은 모기(*Aedes aegypti* 및 *Aedes trisercatus*)의 유충을 初代細胞培養하여 各種溫度 條件下에서 WEE 및 EEE virus의 增殖性을 調査하였고, 또 感染모기와 pupae 세포에 비교 實驗한 바 pupae細胞에서 virus가 더 잘 增殖되었다(Johnson, 1971). 한편 繼代維持되고 있는 細胞株에서 arbovirus의 增殖性을 보면, Suitor(1966)가 最初로 Grace(1962)의 *Antheraea eucalypti* moth 繼代細胞株에 日本腦炎바이러스(T-143株)를 100倍 增殖시켰고, 李淵台(1969)도 이 細胞株에 Nakayama株와 HM株(韓國株)를 增殖시켜본 結果, 培養期間 35日中 제21日에 最高의 바이러스粒子가 增殖된다는 사실을 보고했다.

Yunker(1969)는 arbovirus를 포함한 34種의 virus를 *Antheraea eucalypti* 細胞系에 感染시킨바 Bunymwera바이러스를 비롯한 몇종의 바이러스만를 增殖시켰고, CPE는 觀察하지 못하고 細胞에 對한 바이러스의 感受性은 細胞의 形態別로 cloning하여 실험하는것이 좋다고 했다. Singh(1967) 細胞株를 利用한virus硏究로 Singh (1969)들은 이 細胞가 各種바이러스에 對해 感受性이 顯著하며 dengue type virus를 分離하는데 特히 좋다고 했다. Singh의 繼代細胞株는 現在 virus硏究에 많이 利用되고있다.

李鍾訓과 李淵台등(1972)도 이 細胞에 JE SF RSSE virus를 培養하여 좋은 結果를 얻은바 있다.

한편 Hsu(1970)의 細胞에 李(1972)가 實驗한 바에 의하면 使用한 바이러스에 對하여 特別한 感受性을 認定하지 못했다.

Rehacek(1968)도 모기(*Aedes albopictus*)繼代細胞에 9種의 arbovirus를 感染시켜 그 성상을 보고한 일이 있다. 이상과 같이 昆虫細胞를 利用한 arbovirus硏究는 아직까지도 基礎段階에 있는 형편으로 무궁한 연구의 대상이 된다.

2) 其他 動物 virus의 硏究

Arbovirus의 硏究外 其他動物바이러스의 硏究에 昆虫培養細胞를 使用한 業蹟도 있다. Rehacek(1965)는 choriomeningitis 바이러스를 tick의 培養細胞에 增殖시킨 바 있다. 그 後 Prince(1970)와 Harvkes(1972)들은 熱帶地方에서 모기가 血淸肝炎바이러스(serum hepatitis virus)를 傳播시키는데 크게 關與하리라는 報告를하여 Smith(1972)들은 모기(*Culex pipiens fatigans*)의 唾液腺에서 Australia antigen(Au)을 螢光抗體法에 依하여 檢出한 바 있다. 또 모기細胞培養法으로 이 바이러스를 增殖시킬 수 있을 것이라고 시사했다.

또 Shortridge (1972)등은 모기細胞에 adenovirus type 5를 增殖시켜 좋은 결과를 얻었다. 따라서 以上과 같은 結果로 미루워 보아 animal virus 硏究에도 새로운 開拓을 가져올 것으로 豫測된다.

3) 植物 및 昆虫바이러스硏究

많은 植物바이러스가 그들의 媒介體인 昆虫體內에서 아무런 病을 일으키지 않고 增殖되고 있다(Grace, 1969). 特히 이 方面의 硏究는 農學部門에서 leafhopper에 關하여 많은 硏究가 되어 있다(Smith, 1967). 이와 같은 바이러스들은 植物에 對하여 심한 感染을 일으키나 昆虫의 體內에서는 바이러스만 增殖되고 無害하다(Maramorosch, 1955).

오늘날 特히 이 方面의 硏究는 植物病理學者들에게 큰 關心거리로 많이 硏究되고 있다. Maramorosch(1956)는 aster leafhopper (*Macrosteless fascifrons*) 細胞를 培養하여 aster yellow virus를 最初로 이 細胞에 增殖시킨 바 있고, Nasu(1965)는 rice dwarf 바이러스가 leafhopper에 依하여 感染을 일으킨다고 했고, Mitsuhashi(1969)는 rice dwarf virus가 female의 (*N. cincticeps*)卵巢를 通해서 傳達한다고 指的했다. 또 Chiu (1966)등은 *Agallia constricta*가 wound tumor virus(WTV)를 傳播시킨다고 했다. Chiu (1967)들의 繼代細

胞株에 WT바이러스가 뚜렷한 感受性이 있고 바이러스感染 期間中 細胞의 病變을 일으키지 않는다고 했다.

類似한 硏究로 Smith(1962)는 *Tipula iridescent* 바이러스(TIV)가 fly (*Tipula paladosa*)에 依하여 傳播되고, *Sericesthis pruinoscent* 바이러스(SPV)는 scarab(*Sericesthis pruinosa*) (Steinhaus *et al.*, 1963)에 依하여 感染을 일으키고, *Chilo iridescent* 바이러스(CIV)는 rice stem borer (*C. suppressalis*)에 依하여 傳播된다고 報告했다(Bellet, 1965). 따라서 이와같은 硏究는 昆虫細胞培養이 可能하게 되자 植物과 昆虫사이를 往來하는 바이러스를 硏究하는데 至大한 功獻을 하게 되었고 特히 將來에 植物바이러스와 昆虫바이러스 調査硏究의 門을 開放한 業蹟들이라고 말할 수 있다.

4) 感染細胞의 電子顯微的 觀察

Filshie와 Rehacek(1968)는 Murray valley encephalitis (MVE)바이러스와 日本腦炎바이러스를 *Aedes aegypti* (Grace, 1966)細胞系에 感染시켜 細胞內바이러스의 感染像을 仔細히 觀察하게 되었다. MVE 感染바이러스 粒子는 感染後 第 6日에 細胞內에서 觀察되었는데 初期에는 바이러스 粒子가 細胞質內의 空胞에 單粒子 및 結晶型으로 觀察되나 感染 第九日에 小胞體(endoplasmic reticulum)에서 無數한 바이러스 感染粒子를 形成하고 있는 것을 觀察하였다. 한편 日本腦炎바이러스의 感染粒子는 感染後 第 3日에 感染粒子가 出現하여 漸次로 大形空胞와 reticulum에서 觀察되었다. Bellet(1964)는 *Antheraea eucalypti* (Grace, 1962)세포에 *Tipula iridescent* virus를 感染시켜본 결과, 細胞質內에 골고루 바이러스粒子가 散在하고 있음을 觀察했다. 李鍾訓과 李淵台(1971)도 모기(*Culex pipens*)의 卵巢 培養細胞에 日本腦炎바이러스를 感染시킨 實驗에서 第八日에 細胞質內 空胞에서 無數한 日本腦炎바이러스의 感染粒子를 觀察한 바 있다.

Mitsuhashi (1965, 1967)는 green rice dwarf virus를 leafhopper의 胚兒細胞에 感染시킨 후 電子顯微鏡 觀察을 하였는데 작은(30mμ)感染粒子가 全細胞內에서 發見되었다고 하며 또 *Chilo suppressalis* 細胞에 *Chilo iridescent* virus를 感染시켰던 바 細胞質內에 結晶型인 感染바이러스가 無數히 觀察되었다고 한다. Mitsuhashi(1969)는 바이러스感染後 第28日에 rice dwarf virus 粒子의 particle이 線像으로 配列되어 있음을 觀察하였다.

7. 結 論

過去 10餘年 동안 昆虫組織細胞의 培養技術이 顯著한 發展을 하여 應用生物科學硏究面에 廣範하게 利用되어 왔다. 따라서 이것이 現在 各種 바이러스硏究에 새로운 實驗도구로 登場하게 된 것은 疑心할 여지가 없게 되었다.

昆虫의 細胞培養을 成功的으로 이끈 硏究로는 Wyatt의 昆虫血液硏究와 繼代細胞株를 개발한 Grace, Peleg, Singh, Black 및 Hsu들의 業蹟이다. 한편 昆虫培養細胞를 利用하여 arbovirus增殖實驗에 關한 硏究業蹟으로는 Suitor와 Rehacek에 의하여 새로운 開拓을 하게 되었고, Chiu, Bellet와 Mitsuhashi는 植物 및 昆虫 virus에 對한 硏究에 貢獻한 바 크며, adenovirus 및 hepatitis virus 硏究에도 그 응용이 기대된다.

이러한 硏究業蹟은 各種 arbovirus 및 植物바이러스가 그들의 媒介昆虫에 依하여 宿主細胞에 傳播되는 機作을 調査하는데 貢獻하게 됐다.

또 어떤 境遇는 哺乳動物培養細胞에 依存한 vaccine生産이 後期에 cancer가 惹起되어 問題가 되므로 (Hayflick, 1972) 이와같은 點을 除去할 수 있는 展望을 可能하게 했고, 昆虫의 殺虫作用에 關한 機作 硏究까지도 貢獻하게 되었다.

現在까지 이들 細胞를 利用한 硏究들은 單純한 바이러스의 增殖與否에 對한 定性實驗이 爲主였으나, 將來에는 各種바이러스에 對한 廣範한 定量實驗과 細胞內바이러스의

增殖 및 發展에 對한 生物學的인 硏究가 要求되고 있다.

또한 바이러스가 昆虫腸管內를 어떻게 通過하며 細胞內로 어떻게 侵入하여 增殖되는지에 關한 硏究도 追求되어야 할것으로 생각된다.

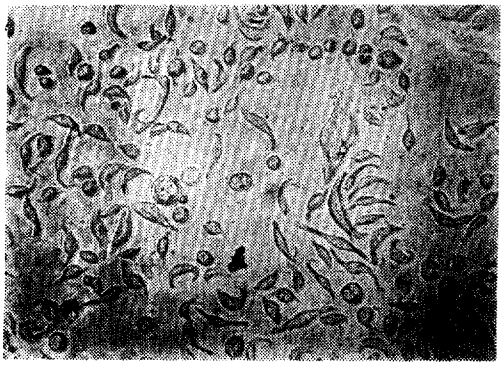

Fig. 1. Grace's *Antheraea eucalypti* cell line (×300).

Fig. 3. Singh's mosquito (*Aedes albopictus*) cell line(×350).

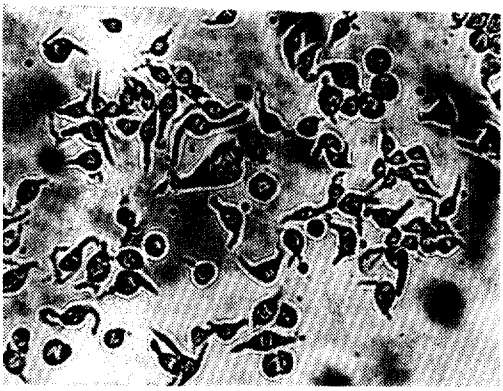

Fig. 2. Grace's mosquito (*Aedes aegypti*) cell line(×200).

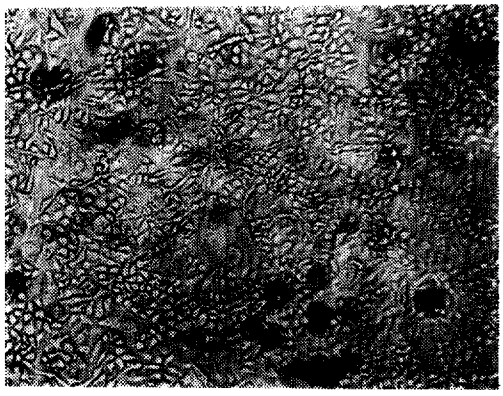

Fig. 4. Hsu's mosquito (*Culex quinqefasciatus*) cell line(×380).

REFERENCES

1. Aizawa, K., and Vago, C.C.R., 1959. *Acad. Sci.*, **249**, 928—930.
2. Arvy, L., and Gabe, M., 1946. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **140**, 787—789.
3. Bellet, A.J.D., and Mercer, E.H., 1964. The multiplication of *Sericesthis iridescent* virus in cell cultures from *Antheraea eucalypti* Scott. 1. Qualitative experiments. *Virology*, **24**, 645—653.
4. Bellet, A.J.D., 1965. The multiplication of *Sericesthis iridescent* virus in cell cultures from *Antheraea eucalypti* Scott. Ⅱ. An *in vitro* assay for the virus. *Virology*, **26**, 127—131.
5. Bryn, M.J., 1962. The cultivation of insect cells and tissue. *Biol. Rev. of Cambridge*, Philisophical Soci. Cambridge at the university press. **37**, 512—536.
6. Cannon, G.B., 1964. *Science*, **146**, 1063.
7. Carlson, J.G., 1946. *Biol. Bull.*, **90**, 109—121.
8. Charin, N., 1930. Trav. Inst. Recerechss Sci. Univ. Voroneje, **4**, 103—123.
9. Chiu, R.J., Reddy, D.V.R., & Black, L.M., 1966. Inoculation and infection of leafhopper tissue cultures with a plant virus.

Virology, **30**, 562—566.

10. Chiu, R.J., and Black, L.M., 1967. Monolayer cultures of insect lines and their inoculation with a plant virus. *Nature*, **215**, 1076—1078.
11. Collier, W.A., 1920. *Z. Wiss. Insektenbiol.*, **16**, 1—5.
12. Duveau-Hagege, J. C.R., 1963. *Acad. Sci.*, **256**, 5429—5430.
13. Day, M.F., and Grace, T.D.C., 1959. Culture of insect tissues, *Ann. Rev. Entoml.* **4**, 17—38.
14. Fisher, I., and Gottschewski, G., 1939. *Naturwissenschaften*, **27**, 391—391.
15. Filshie, B.K., and Rehacek, J., 1968. Study of the morphology of Murray valley encephalitis and Japanese encephalitis viruses growing mosquito cells. *Virology*, **34**, 435—443.
16. Frew, J.G., 1928. *J. Exp. Biol.*, **6**, 1—11.
17. Fujita, N., Yasui, Y., Kitamura, S., and Hotta, S., 1968. Cultivation of Japanese encephalitis virus in primary *Culex* mosquito tissue cultures. *Kobe J. Med. Sci.*, **14**, 241—249.
18. Gaulden, M.F., and Carlson, J.G., 1947. *J.G. Genetics*, **32**, 87.
19. Gavrilov, W., and Cowez. S., 1941. *Ann. Parasit. Humaine et Commparee*, **18**, 180—186.
20. Gaw, Z.Y., Liu, N.T., and Zia, T.U., 1959. *Acta Virologica*, **3**, 55—60.
21. Glaser, R.W., 1917. *Psyche.*, **24**, 1—7.
22. Gottscshewski, G., and Fischer, I., 1930. *Naturwissenschaften*, **27**, 584.
23. Goldschmidt, R., 1915. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, US. **1**, 220—222.
24. Goldschmidt, R., 1916. *Biol. Zentr.*, **36**, 161—167.
25. Goldschmidt, R., 1917, *Arch. Zellforsch.*, **14**, 421—450.
26. Grace, T.D.C., 1958a. The prolonged growth and survival of ovarian tissue of the *Promethea* moth (*Colloramia prometoea*) *in vitro*. *J. Gen. Physiol.*, **41**, 1027—1034.
27. Grace, T.D.C., 1958b. *Australian J. Bioch. Sci.*, **11**, 401—417.
28. Grace, T.D.C., 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, **195**, 788—789.
29. Grace, T.D.C., 1966. Establishment of a line of mosquito (*Aedes aegypti* L.) cell grown *in vitro*. *Nature*, **211**, 366—367.
30. Grace, T.D.D., 1967. *Nature*, **216**, 613.
31. Gubler, D.J., 1966. A method for the *in vitro* cultivation of ovarian and midgut cells from the adult mosquito. *Amer. J. Epid.*, **87**, 502—508.
32. Hawkes, R.A., Vale, T.G., and Marshall, I.D., 1972. Contrasting seroepidemiology of Australia antigen and arbovirus antibodies in New Guinea. *Am. J. Epid.*, **95**, 228—237.
33. Haines, T.W., 1958. Tissue culture of *Aedes aegypti* cell and its application in studies on the behavier of Eastern equine encephalomyelitis virus. Ph. D. thesis, University of Maryland.
34. Hibbard, H., 1935. *Bull. Mount Doser Is. Biol. Lab.* **37**, 16—18.
35. Hink, W.F., 1970. Established insect cell line from the cabbage looper, *Tichoplusia* in *Nature*, **266**, 466—467.
36. Hirumi, H., and Maramorosch, K., 1964a. *Science*, **144**, 1465—1467.
37. Hayflick, L., 1972. Human virus vaccine: Why monky cells? *Science*, **176**, 813—814.
38. Horikawa, M., and Fox. A.S., 1964. *Science*, **145**, 1437—1439.
39. Horikawa, M., and Kurodu, Y., 1959. *Nature*, **184**, 2017.
40. Hsu, S.H., 1967. Further decription of a subline of Grace's mosquito (*A. aegypti* L.) cells adapted hemolymph free medium. *Mosquito News*, **29**, 439—446.
41. Hsu, S.H., Mao, W.H., and Cross, J.H., 1970. Establishment of a line of cells derived from ovarian tissue of *Culex quinquefasciatus* Say. *J. Med. Entom.*, **7**, 703—707.
42. Hsu, S.H., Li, S.Y., and Cross, J.H., 1972. A cell line derived from ovarian tissue

of *Culex triteaniorhyncus* Summorosus dyar. *J. Med. Ent.* **9**, 86—91.

43. Johnson, J., 1969. Growth of Venezuelan, and Eastern, equine encephalomyelitis viruses in tissue cultures of minced *Aedes aegypti* larvae. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, **18**, 103, 114.

44. Jones, B.M., and Cunningham, I., 1960. Growth by cell division insect tissue culture. *Nature*, **187**, 1072—1074.

45. Jones, B.M., and Cunningham, I., 1961. *Exp. Cell. Res*, **23**, 386—401.

46. Kitamura, S., 1964. The *in vitro* cultivation of tissues from the mosquito, *Culex pipiens* var, molestus. *Kobe J. Med. Sci.*, **10**, 85—94.

47. Kitamura, S., 1965. An improved culture medium useful for ovarian tissue culture. *Kobe J. Med. Sci.*, **11**, 23—30.

48. Kitamura. S., 1966. Further studies on the cultivation of ovarian tissues of three mosquito species and the examination of the origin of cells grown *in vitro*. *Kobe J. Med. Sci.*, **12**, 63—70.

49. Kohring, V., 1930, *J. Morphol.*, **49**, 45—137.

50. Larsen, W., 1964. *Life Sciences*, **3**, 103—106.

51. Lazarenck, T., 1925. *Z. Mikroskop anat. Forsch.*, **3**, 409—499.

52. Lender, T., and Duveau-Hagege. 1963. *Developmental Biol.*, **6**, 1—22.

53. Lesseps, R.J., 1965. *Science*, **148**, 502—503.

54. Lee, Y.T., and Suitor, E.C. Jr., 1969. Growth of Japanese encephalitis virus (Nakayama & HM) insect tissue culture. *J. Korean Soci. Microbiol.*, 4, 13—19.

55. Lee, C.H., and Lee, Y. T., 1971. Cultivation of *Culex* mosquito tissue *in vitro* and growth of Japanese encephalitis virus cultured cells. *The New med. J.*, **14**, 771—779.

56. Lee, Y.T., 1968. Stability of semliki forest virus in Grace's insect cell culture medium. *The New Med. J.*, **11**, 55—59.

57. Lewis, M.R., 1916. *Anat. Record*, **10**, 287—299.

58. Luscher, M., 1947. *Nature*, **160**. 873—874.

59. Lite, S.W., and Wallis, R.C., 1970. Growth of primary monolayer cell culture from the mosquito, *Culex sainarius*, *Mosquito News*, **30**, 539—542.

60. Maramorosch, K., 1956, *Vriology*, 2, 369—376.

61. Maramorosch. K., Mitsuhaschi, J., Streissle, G., and Hirumi, H., 1965. Bact, Proc. p.120.

62. Martigoni, M.E., 1960. Problems of insect tissue culture. *Experimentia*, **16**, 125—128.

63. Mitsuhashi, J., and Maramorosch, K., 1964. Leafhopper tissue culture: Embryonic, nymphal and imaginal tissues from aseptic insects. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **22**, 435—460.

64. Mitsuhashi, J., 1965a. Tissue culture of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (*Lepidoptera*; Pyralidae). I. Cell migration from the explanted tissue of diapausing larvae. *Japan J. Ent. & Zool.*, **9**, 217—224.

65. Mitsuhashi, J., 1965b. *In vitro* cultivation of the embryonic tissue of the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps* Uhler (*Homoptera:* Cicadellidae), *Japan J. Appl. Ent. & Zool.*, **9**, 107—115.

66. Mitsuhashi, J., 1967a. Establishment of an insect cell strain persistently infected with an insect virus. *Nature*, **215**, 863—864.

67. Mitsuhashi, J., 1969. Cited from Maramorosch, K. (1969). Virus, vector & vegetation, A Division of Johnwiley & Sons, New York. p.475—503.

68. Martigoni, M.E., and Scallion, R.J., 1961a. *Biol. Bull.*, **121(3)**, 507—520.

69. Martigoni, M.E., 1958. *Science*, **128**, 360.

70. Martin, H.M., and Vidler, B.O., 1962. *Exp. Parasit.*, **12(3)**, 192—203.

71. Millara, P., 1946. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **140**, 1006—1008.

72. Murray, M.R., 1926. *Biol. Bull.*, **50**, 210—235.

73. Nasu, S., 1965. Proc. Conf. relationships between arthropods and plant-pathogenic virus, *United States-Japan Scientific Cooperation Program, Publ.*, **1**, 91—95.

74. Ohanessian, A., and Echalier, G., 1967. Multiplication of *Drosophila hereditarx virus* in *Drosophila* embryonic cell cultivated *in vitro*. *Nature*, **213**, 1049—1050.

75. Palliot, A., 1924. *Bull. Histol. Appl. Physiol. et Pathol. et Tech. Micr.*, **1**, 216—223.

76. Pavri, K.M., and Ghosh. S.N., 1969. Complement fixation tests for simultaneous isolation and identification of dengue viruses using tissue culture. *Bull. WHO*, **40**, 984—986.

77. Peleg, J., and Trager, W., 1965. Cultivation of insect tissues *in vitro* and their application to the study of arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, **12**, 820—824.

78. Peleg, J., 1965. Growth of mosquito tissue *in vitro*. *Nature*, **206**, 427—428.

79. Peleg, J., 1968. Growth of Aroboviruses in primary tissue culture of *Aedes aegypti* embryo. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.*, **17**, 219—223.

80. Pfeiffer, H.H., 1937. *Arch. Exp. Zellforsch. Gewebezucht*, **20**, 225—229.

81. Pfeffer, H.H., 1939. *Naturwissenschaften*, **27**, 389—390.

82. Pfeiffer, H.H., 1942. *Arch. Exp. Zellforch. Gewebezucht*, **24**, 273—287.

83. Prince, A.M., 1970. Prevalence of serum hepatitis related antigen in different geograaphic regions, *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, **19**, 872—868.

84. Rehacek, J., 1958. *Acta. Virologica*, **2**, 253—254.

85. Rehacek, J., 1962. *Acta Virologica*, **6**, 188.

86. Rehacek, J., and Hana, L., 1961. *Acta Virologica*, **5**, 57—58.

87. Rehacek, J., 1965. Cultivation of different viruses in tick tissue cultures. *Acta Virologica*, **9**, 332—337.

88. Rehacek, J., 1968. *Acta Virologica*, **12**, 241—246.

89. Rehacek, J., and Fischer, R.G., 1971. Primary cells cultures derived from larvae of *Ctenocephalides felis* Bouche. *J. Med. Ent.*, **8**, 66—67.

90. Rezzonico, G., and Ghini, C., 1963. *Ann. Epiphyties*, **14**, 153—160.

91. Schmidt, E.L. and Williams, C.M., 1953. *Biol. Bull.*, **105**, 174—187.

92. Schmidtmann, M., 1925. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **45**, 714—742.

93. Smith, K.M., 1967. Insect Virology. Academic Press, New York.

95. Shortridge, K.F., Pudney, M., & Varma, M.G.R., 1972. Infection of a mosquito cell line with human type 5 adenovirus. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, **66**, 363—368.

95. Smith, J.A., Ogunba, E.O., & Francis, T.I., 1972. Transmission of Australia Au(1) antigen by *Culex* mosquitoes. *Nature*, **237**, 231—232.

97. Smith, K.M., & Hills, G.J., 1962. Proc. 5th International Congres Electron Microscopy, Philadelphia 2, Art. V-i, Acad. Pres., New York.

97. Steinhaus, E.A., and Reutenegger, R., 1963. *J. Inesct Pathol.*, **5**, 266—270.

98. Stern, C., 1940. **4**, 377—382.

99. Singh, K.R.P., and Sharda, P., 1969a. Isolation of dengue viruses in *Aedes albopictus* cell culture. *Bull. WHO*, **40**, 984—986.

100. Singh, K.R.P., 1967. Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* Skuse and *Aedes aegypti* L. *Current Sci.*, **36**, 506—508.

101. Suitor, E.C. Jr., 1966. Growth of Japanese encephalitis virus in Grace's continous

line of moth cell. *Virology*, **30**, 143—144.

102. Suitor, E.C. Jr., 1966. Arthropod tissues culture. A brief outline of its development and description of several of its application, personal communication, personal communication. NAMRU—2. p.1—24.

103. Takakusa, S.Z., 1924. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, **1**, 12—28.

104. Takeda, K., 1937. *Kyoto Ikadaigakugasshi*, **21**, 905—906.

105. Taylor, A., 1935. *Ann. Ent. Soc. Am.*, **28**, 135—148.

106. Ting, K.Y., and Brooks, M.A., 1965. *Ann. Ent. Soc. Am.*, **58(1)**, 197—202.

107. Trager, W., 1935. Cultivation of the virus of grasserie in silkworm tissue cultures. *J. Exptl. Med. Med.* **61**, 501—513.

108. Trager, W., 1938. Mutiplication of the virus of equine encephalomyelitis in surviving mosquito tissue. *Am. J. Trop. Med.* **18**, 387—393.

109. Trager, W., 1959. Tsetse-fly tissue culture and the development of trypanosomes to the infective stage. *Ann. Trp. Med. & Parasitol.*, **53**, 473—491.

110. Trager, W., 1937. *J. Parasit.*, **23**, 226—227.

111. Tokumitsu, T., and Maramorosch, K., 1966. Survival of aphid cells *in vitro*, *Exp. Cell, Res.*, **44**, 652—655.

112. Vago, C., and Fosset, J., 1961. *C.R. Acd. Sci.*, **252**, 2759—2761.

113. Vago, C., and Flandre, O., 1963. Culture prolongee de tissue d'insectes et de vecterus de maladies en coagulum plasmatique, *Ann. Epiphyties*, **14**, 129—139.

114. Varma, M.G.R., and Pudney, M., 1969. The growth and serial passage of cell lines from *Aedes aegypti* L. larvae in different media. *J. Med. Ent.*, **6**, 432—439.

115. Wermel, M.E., 1938. *Byull. Eksptl. Biol. Med.*, **5**, 6—9.

116. Wyatt, G.R., Loughheed, T.C., and Wyatt, S.S., 1956. The chemistry of insect hemolymph. *J. Gen. Physiology*, **39**. 853—868.

117. Wyatt, S.S., 1956. Cultivation *in vitro* of tissue from the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Gen. Physiol.*, **39**. 841—852.

118. Wyatt, G.R., 1961. The biochemistry of insect hemolymph, *Ann. Rev. Entmol.*, **6**, 75—102.

119. Yunker, C.E., Vaughn, J.L., and Cory, J., 1967. Adaptation of an insect cell line (Grace's *Antheraea* cells) to medium free of insect hemolymph. *Science*, **155**, 1565—1565.

120. Yunker, C.E., and Cory, J., 1967. Growth of Colorado tick fever (CTF)virus in primary tissue cultures of its vector, *Demacentor andersoni* Stiles (*Acarina*: Ixodidae), with notes on tick tissue culture. *Experimental Parasit.*, **20**, 267—277.

121. Yunker, C., and Cory, J., 1968. Infection of Grace *Antheraea* cells with arboviruses. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, **17**, 889—993.