

ダニとの戦い (ショウジョウバエ通信4号より)

最上 要

ショウジョウバエを使って研究している時に困ることとして、ダニの問題があります。ハエにつくダニはヒトには寄生しませんので、汚染する可能性が高いのは野外からハエを取ってきたり、他の研究室からハエを分けてもらったりする時です。ダニは小さいので普通のスポンジ栓程度は通り抜けてしまい、気がつかないでいると研究室中のストックに感染してしまいます。ダニがいるとハエが弱くなりますし、またハエの遺伝子をクローニングしたつもりが実はダニの遺伝子だった、なんてことになっては目もあてられません。ダニ退治の方法は昔からいろいろと開発されていますが、ここでは我々の研究室で行っている卵洗いによる方法をご紹介します。

まず必要な道具と薬品は以下のとおりです。

1. ハエに産卵させ、卵を集めるための道具一式。

これには各研究室ごとにいろいろな工夫があることでしょう。我々はスライドグラス、ナイロンメッシュ、グレープジュース入りの寒天、50 ml のプラスチック遠心管 (コーニング)、スポンジ栓を使います。

2. 集めた卵を入れるステンレスメッシュ。

150 から 200 メッシュ程度のものを10cm 角に切り、まん中を直径 3cm 程度へこませたもの。

3. シャーレ。

4. ピンセット。

5. コマゴメピペット。

6. 実体顕微鏡。

7. 卵を集めてエサに埋め込むためのヘラ。

我々は歯医者さんや電子顕微鏡屋さんの使うワックススパーテルを流用しています。先端のとがり具合が、卵を集めてエサに埋め込むのにちょうどよいのですが、なければマイクロスパーテルでもよいでしょう。

8. 洗ビン。

9. クレゾール石鹼液。

10. 次亜塩素酸ナトリウム溶液。 11. 蒸留水。

手順は、

1. まず産卵用の寒天を作ります。水 50 ml に寒天 2 g を入れ、1 回沸騰させてとかします。とけたらグレープジュース 50 ml と酢酸 1.2 ml、エタノール 1.2ml を加えます。これをスライドグラス上に盛り上がるようにのせ、固まったら冷蔵庫に保存しておきます。

2. ハエの準備ができたらスライドグラスを取り出し、寒天にナイロンメッシュをはりつけ、とかした酵母を塗ります。これとハエを遠心管に入れて一晩産卵させます。暗くした方がよく生みます。プラスチック遠心管は強くつかむと中のスライドグラスを保持できるので、成虫だけを出す時に便利です。

3. スライドグラスを取り出し、ナイロンメッシュをはがすと卵がついてきますので、洗ピンを使い、蒸留水で卵をステンレスメッシュに集めます。
4. 卵を蒸留水でよく洗います。
5. 実体顕微鏡で見て、卵以外の例えばハエの死骸などをピンセットで除きます。
6. シャーレに10%クレゾール石鹼液を入れ、ステンレスメッシュごと卵をつけて9分待ちます。この間、卵がよく洗えるように、メッシュの外側からクレゾール石鹼液をコマゴメピペットで吸い、内側に戻す操作を繰り返します。9分というのは普通の胚に耐えられるぎりぎりの長さです。もし系統によって孵化率が低いようでしたらこの時間を短くします。
7. メッシュを取り出し、蒸留水でよく洗います。
8. シャーレに50%次亜塩素酸ナトリウム溶液を入れ、メッシュをつけて卵のコリオンをはがします。2分位で済むはずですが、検鏡しながら確認します。
9. 蒸留水でよく洗います。
10. スパーテルで卵を集め、新しいエサに埋め込みます。ダニが死んでいたら、その付近の卵は取らないようにします。またコリオンをはがした卵は乾燥しやすいので、エサに埋め込むようにしますが、あまり幅の広い溝を掘ってしまうとそこからエサと卵が乾燥します。

卵洗い法では胚が丈夫なことを利用しているわけですが、ダニもおそらく卵ならば頑丈なものではないでしょうか。他のダニ退治法ではこの点どうなのでしょう。例えば蛹を100%エタノールで洗う方法がありますが、ダニの卵はエタノールで死ぬのでしょうか。卵洗い法ではたとえダニの卵がついていたとしてもコリオンといっしょに取り除かれてしまいます。カビも除けますが、カビの胞子はダニよりも小さいので再汚染を防ぐにはより注意が必要です。少々追加しますと、まずダニのいるおそれのあるストックはできれば別の部屋に隔離した方がよいでしょう。大きめの容器にクレゾール石鹼液を入れ、その中に飼育ピンを立てるようにすれば万が一ダニが出てきても死んでしまいます。安息香酸ベンジルで隔離する方法もあります。ただし、これはダニを殺す効果はなく、粘度が高いので移動が抑えられるということのようです。値段は高いですが、普通のスポンジ栓よりも密でダニを通さないような紙栓もあります。ダニがいないように見えても古い飼育ピンを放置しておくのは危険です。もし汚染されていると、ハエがほとんど死に絶えたようなビンからでもダニが無数に出てきます。我々は使い終わったピンは直ちに電子レンジにかけています。ダニはハエよりも水気が少ないのか、ハエが死ぬ時間の倍ぐらいかけないとしぶとく動きまわっています。もちろんオートクレーブでもダニを殺せます。もし部屋全体にダニが広がっているようならバルサンを炊くのが有効です。しかしダニも卵の状態だとバルサンが効かないので、1週間程度おいて2回以上炊くのがよいと発売元では言っていました。

ダニのやっかいな点は全くいないのか、いても少数なのでわからないのか区別し難いことです。他の研究室からハエをもらう時は、たとえダニがいらないと言っている相手も気がついていないだけかも知れませ

ん。また自分の方にダニがいるならば、他人にあげる時はその旨告げるべきでしょう。ストックセンターは割と安全なのですが、過信は禁物です。センターはハエを送り出すだけではなく受け入れてもいるわけですから、汚染の危険は常にあります。ダニがいるかどうか確認したければ、古い飼育ビンを厳重に隔離した上でこまめに観察すればわかります。もしダニがいると増えて実体顕微鏡で見つけやすくなります。ハエの排泄物程度の大きさで、ハエの幼虫でもないのに動き回っていたらダニです。色は白と赤があって、赤い方が悪質であると言われていています。しかしこのような確認作業はできるだけやらない方が無難です。隔離が不十分だとかえってダニを増やしてまきちらすことになりかねないからです。ダニはハエより世代交代時間が長いので、頻繁にトランスファーし、古いビンを長く置かないようにすれば、少数のダニがまぎれこんでも駆逐されてしまいます。日常そのような注意を払い、新しいハエを受け入れるときは卵洗いするようにすれば、ダニに悩まされることはないでしょう。我々の研究室では数年前深刻な汚染に遭遇しました。何百というストックを隔離し、卵洗いすることによって、ダニのない環境にもどすことができましたが、その間に各人が払った犠牲はたいへんなものでした。ここでご紹介した方法や経験は主に当時のスタッフと大学院生諸君とで開発したり遭遇したものです。もし今ダニに汚染されていないならば、その環境を保ち続けられるよう注意されることをお勧めします。不幸にして汚染してしまった時は、卵洗いによって駆逐できます。ストックの数が多いたいへんですが、臨時アルバイトの方などをお願いして、一気に洗ってしまった方が結局は楽でしょう。ここでは我々の経験を述べましたが、多くの方の参考にしていただくためには、皆様方の研究室での経験・工夫をさらにこの通信上でご紹介していただけるとよいのではないかと考えています。

なお筆者が留学した Theodore Wright 研でやっていた手順も以下に紹介します。外国でクレゾール石鹼液が入手できない時などに参考にして下さい。

1. 卵を集め、蒸留水でよく洗う。
2. コリオンを除く。50% Clorox で 5 分。
3. 蒸留水でよく洗う。
4. 2% cetyl trimethyl ammoniumbromide 中で 2 分。
(卵はベタベタくっつくようになる。)
5. 3% sucrose 溶液 (滅菌したもの) で洗う。
(卵は離れる。)
6. 蒸留水でよく洗う。
7. 新しいエサに埋め込み、22° C に移す。

卵洗い法

(95/7/19：上と若干重複します)

東京大学理学部物理 最上 要 mogami@tkyvax.phys.s.u-tokyo.ac.jp

ショウジョウバエのストックからダニやカビを退治するための卵の洗い方です。

必要な道具と薬品

1. ハエに産卵させ、卵を集めるための道具一式。

スライドグラス、ナイロンメッシュ、グレープジュース入りの寒天、50 ml のプラスチック遠心管（コーニング）、スポンジ栓。

2. 集めた卵を入れるステンレスメッシュ。

150 から 200 メッシュ程度のものを10cm 角に切り、まん中を直径 3cm 程度へこませたもの。

3. シャーレ。

4. ピンセット。

5. コマゴメピペット。

6. 実体顕微鏡。

7. 卵を集めてエサに埋め込むためのヘラ。

歯医者さんや電子顕微鏡屋さんの使うワックスパーテルを流用。先端のとがり具合が、卵を集めてエサに埋め込むのにちょうどよい。なければマイクロパーテルでも可。

8. 洗ビン。

9. クレゾール石鹼液。

10. 次亜塩素酸ナトリウム溶液。

11. 蒸留水。

手順

1. まず産卵用の寒天を作る。水 50 ml に寒天 2 g を入れ、1 回沸騰させてとかす。とけたらグレープジュース 50 ml と酢酸 1.2 ml、エタノール 1.2 ml を加える。これをスライドグラス上に盛り上がるようにのせ、固まったら冷蔵庫に保存しておく。

2. ハエの準備ができたらスライドグラスを取り出し、寒天にナイロンメッシュをはりつけ、とかした酵母を塗る。これとハエを遠心管に入れて一晩産卵させる。暗くした方がよく生む。プラスチック遠心管は強くつかむと中のスライドグラスを保持できるので、成虫だけを出す時に便利。

3. スライドグラスを取り出し、ナイロンメッシュをはがすと卵がついてくるので、洗ビンを使い、蒸留水で卵をステンレスメッシュに集める。

4. 卵を蒸留水でよく洗う。

5. 実体顕微鏡で見て、卵以外の例えばハエの死骸などをピンセットで除く。

6. シャーレに10% クレゾール石鹼液を入れ、ステンレスメッシュごと卵をつけて9分待つ。この間卵がよく洗えるように、メッシュの外側からクレゾール石鹼液をコマゴメピペットで吸い、内側に戻す操作を繰り返す。9分というのは普通の胚に耐えられるぎりぎりの長さなので、系統によって孵化率が低いようならこの時間を短くする。

7. メッシュを取り出し、蒸留水でよく洗う。

8. シャーレに50% 次亜塩素酸ナトリウム溶液を入れ、メッシュをつけて卵のコリオンをはがす。2分位で済むはずであるが、検鏡しながら確認。

9. 蒸留水でよく洗う。

10. スパーテルで卵を集め、新しいエサに埋め込む。ダニが死んでいたら、その付近の卵は取らないようにする。またコリオンをはがした卵は乾燥しやすいので、エサに埋め込むようにするが、あまり幅の広い溝を掘ってしまうとそこからエサと卵が乾燥する。