

雄蚕の Apholate 処理と次代胚の致死, 特にその組織学的観察

須 貝 悦 治

東京都 東京農工大学農学部

昭和 42 年 3 月 8 日受領

ABSTRACT

Effect of Apholate on Reproductive Cells of the Male Silkworm, *Bombyx mori*, with Special Reference to Histological Observation of Embryonic Death in Their Progenies. E. SUGAI (Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo) *Zool. Mag.* 76: 190—195 (1967)

Administration of apholate to the male silkworm *Bombyx mori* had a marked effect on the hatchability of their progenies. In the histological observations on the embryonic death in the progenies of apholate-treated males, the following results were obtained. The embryonic death of the progenies occurred at about the blastokinesis stage (the reverse stage) when the male silkworms were orally administered with 300 μ g of apholate per larva on the fifth day of the fifth larval instar stadium. When administered with 100 μ g of apholate the progenies died after the formation of various organs. Furthermore, embryos that died just before hatching were frequently devoid of the epithelium of the mid-intestine, the sole tissue originated from the endoderm, whereas the organs of ectodermal and mesodermal origin were comparatively well developed. On the other hand, when the apholate at the doses of 100 μ g or 300 μ g per insect was injected into the pupae 1 day before the emergence, the spermatozoa penetrated the eggs, but most of them were unable to fertilize the egg and degenerated. If eggs were fertilized, the ectoderm and mesoderm were formed, but no further development was observed. (Received March 8, 1967).

近年, 化学薬品を使って昆虫を不妊化し, これを害虫防除に利用しようとする試みがなされ, 多くの基礎的実験結果が報告されている (Chamberlain, 1962; Donald, 1962; Hair and Adkins, 1964; Harris, 1962; 平野, 1965; Lindquist *et al.*, 1964; Mitlin *et al.*, 1957; Schwartz, 1965 など)。

LaBrecque (1961) は, これまで制癌物質として知られていた多数のアジリジン系化合物の中から, 極めて効果的に昆虫の不妊化を誘発せしめる物質を探索し, これを化学不妊剤 Chemosterilant として選出した。著者ら (Sugai and Hirano, 1965; Sugai, 1967) は, さきにこれらの化学不妊剤の一種 Apholate をカイコの雄に経口的に投与した結果, 5 令初期では顕著な不妊化が認められ, 中期および後期では, これと交尾した正常雌の産下卵は受精するが, その後の胚発生過程においてほとんど死んでしまうことを報告した。これらの問題は, 上記の応用的見地からのみならずアジリジン系化合物の生物体に対する作用機構, 特に発生遺伝学的な面を考慮した場合極めて興味深い。

本報では, このような観点から, カイコの雄に Apholate を投与し, その結果示される次代胚の致死について, その異常経過を病理組織学的にしらべた。その結果, 2, 3 の知見を得たので報告する。

材料および方法

実験には日 106× 大造種を用いた。幼虫期の経口投与では, 5 令 5 日目雄に予め蒸溜水に溶解した Apholate (2, 2, 4, 4, 6, 6—hexahydro—2, 2, 4, 4, 6, 6—hexakis (1—aziridinyl)—1, 3, 5, 2, 4, 6—triazatriphosphorine) を, 1 頭当り 100 μ g および 300 μ g になるように, 針の先をまるくした注射器で口から直接消化管内に注入した。また蛹期の処理では, 羽化前日の雄蛹の腹腔内に 1 頭当り 100 μ g および 300 μ g ずつ注射した。各区とも羽化後これに無処理の雌蛾を交配して産卵させた。次いで, 産下 24 時間後に浸酸処理 (15% HCl に 46°C で 5 分間浸す) をして, 25°C で胚発生を行なわせた。しかし, 蛹期の注射の場合に出現した不着色卵については, 一部をそのまま放置して受精の進行と

genital antrum) は広い。交接囊 (copulatory bursa) は大形で、交接囊柄 (bursa stalk) は正中線のやや右方を走り、共通生殖腔 (common genital antrum) の上方から開いている。膣 (vagina) はよく発達し、2本の輸卵黄管 (ovovitelline duct) が開孔し、多数の卵殻腺 (shell gland) が認められる。

濟州島産標本の交接器官の形態はソウル特別市牛耳洞 (Wooyi-dong) 及び西五陵 (Suonong) の標本の形態 (川勝・金, 1966, pp. 104—105, Fig. 2, Fig. 3 B—D 参照) と極めて類似している。しかし、江原道三陟郡の鐘乳洞附近から得られた標本 (Kawakatsu and Kim, In press) は上記の標本と比較して僅かな変異が認められた。これについては別報する。なお、濟州島で本種が採集された最高地点は城板岳 (Mt. Sungpan-Ag, 標高 1050M) であった。

本稿を読んでいただいた市川純彦教授に感謝する。

文 献

- ICHIKAWA, A. AND M. KAWAKATSU (1964) A new freshwater planarian, *Dugesia japonica*, commonly but erroneously known as *Dugesia gonocephala* (DUGÈS). Annot. Zool. Japon. 37: 185—194.
- 川勝正治・金元在 (1966) 韓国産ナミウズムシの形態. 動物学雑誌 75: 103—107.
- KAWAKATSU, M. AND WUN-JAI, KIM (In press) Results of the speleological survey in South Korea 1966. Freshwater planarians from limestone caves in South Korea. Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo.
- 川勝正治・手代木渉・大河原玄沖・垂井由継 (1965) プラナリア写真集 I. ナミウズムシとヨーロッパナミウズムシ. 採集と飼育 27: 330—335.

第1表 雄蚕の Apholate 処理と受精および死卵歩合

投与時期 と 方 法	投与量 ($\mu\text{g}/1\text{頭}$)	調査 蛾数	産下総 卵数(A)	受精総 卵数(B)	受精卵 歩合($\frac{B}{A}$)	致死 卵数(C)	死卵 歩合($\frac{C}{B}$)
5令5日目	100	16	8608	8287	96.2%	7653	92.3%
経口投与	300	15	6789	6518	96.0	6457	99.0
化蛹11日目	100	15	7095	215	3.0	215	100.0
注 射	300	17	8177	102	1.2	102	100.0
対 照	—	12	6341	6216	97.0	132	2.1

致死状態をしらべた。卵の致死時期の組織学的観察には、浸酸後、同一条件で催青し、対照区の卵の孵化が終わってから、処理区の卵をさらに5日間そのまま放置し、孵化しないことを確かめてから組織標本を作ってその発育状態を検討した。また、これよりさらに5日間経過した卵についても組織学的観察を行ったが、その後ほとんど発育の進行が認められなかったためこれを致死時期とした。卵の固定にはブアン液を使用し、常法にしたがって10 μ のパラフィン切片となし、デラフィールドヘマトキシリンおよびエオシン染色をおこなって観察した。一方、受精してから対照蚕の孵化が始まるまでの胚発生状態についても24時間おきに切片を作って観察した。

結 果

I 産下卵の受精と致死割合

Apholate 処理を行なった雄に正常雌を交配し、その産下卵について着色卵を受精卵、不着色卵を不受精卵として数え、さらに受精卵について孵化の状態をしらべた。その結果を第1表に示す。

すなわち、5令5日目の幼虫に、1頭当り100 μg または300 μg を経口的に与えた場合には、その産下卵はおよそ48時間目頃から正常蚕のそれと同様に、品種固有の色に着色して受精卵となった。しかし、対照区ではその後約10日間で孵化したが、処理区の卵ではほとんどがその後の胚発生過程において死滅してしまい孵化しなかった。一方、蛹の末期に腹腔内に直接注射したもので、産下卵数においては正常蚕のそれとほとんど差異がないが、浸酸処理によってその大部分が着色しないで潰れてしまった。また、浸酸しないで1~2週間そのままに放置すると着色するものが若干出現したが、孵化能力は全くなかった。

II 胚致死の組織学的観察

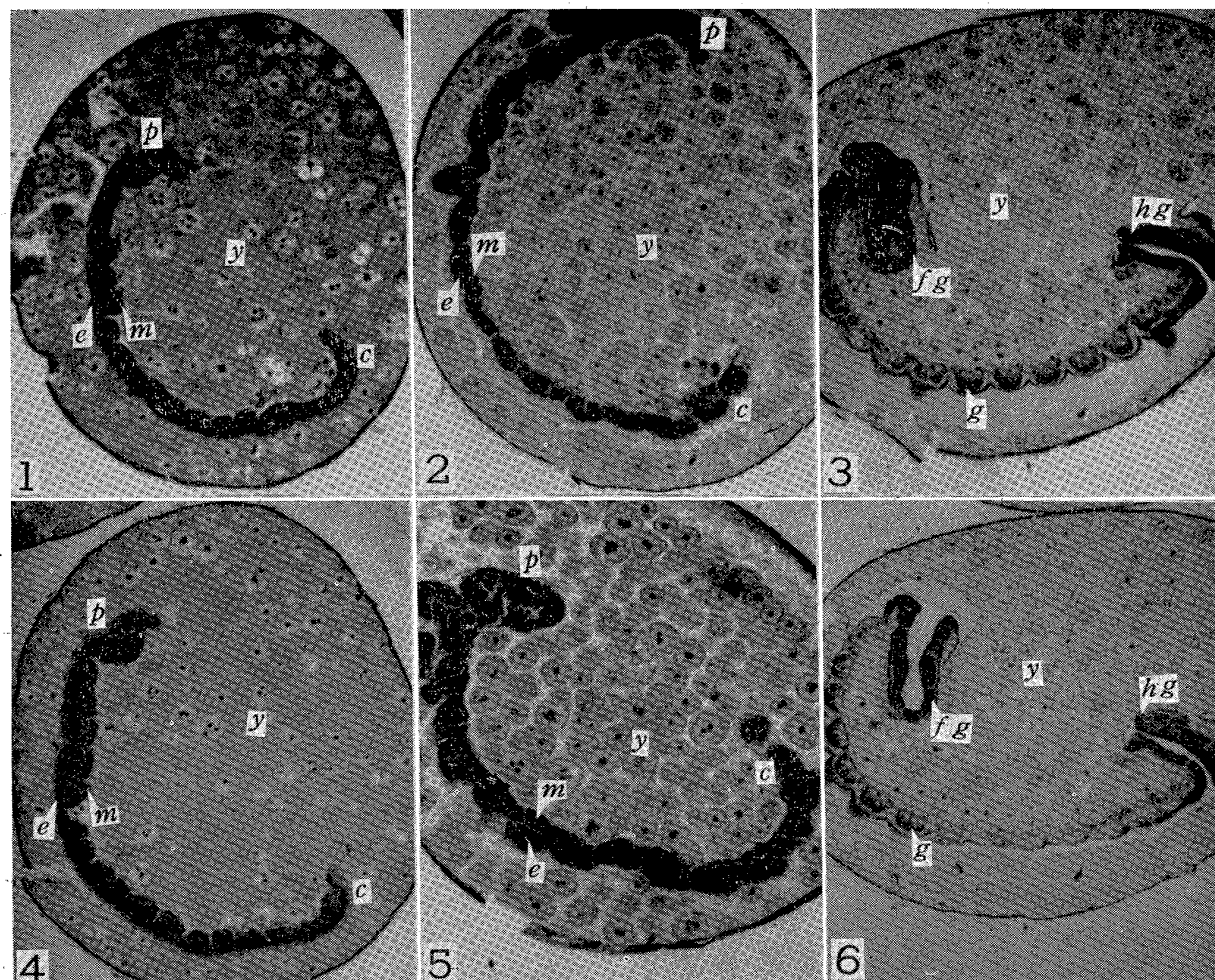
前記の実験から処理雄と交尾した正常雌の産下卵は、その後の胚発生過程においてほとんど死滅することが認められたので、その致死時期と異常化の状態を組織学的に検討した。

1) 5令5日目経口投与の場合: 対照区の孵化終了後、さらに5日間経過したのちも孵化しなかった卵につ

第2表 雄蚕の Apholate 処理と次代胚の致死時期

投与時期 と 方 法	投与量 ($\mu\text{g}/1\text{頭}$)	調 査 個体数	発 育 階 程 別 致 死 胚 子 数					
			受精前	胚盤形成期	2胚葉期	陥入期	反 転 期	器官完成期
5令5日目	100	51	0	0	0	3(5.9)	2(3.9)	46(90.2)
経口投与	300	74	0	0	5(6.7)	13(17.6)	41(55.4)	15(20.3)
化蛹11日目	100	70	58(82.9)	0	12(17.1)	0	0	0
注 射	300	89	74(83.2)	5(5.6)	10(11.2)	0	0	0

() 内の数字は%を示す



第1—11図 5令5日目に Apholate を $300\mu\text{g}$ (第1—3, 7, 8図)または $100\mu\text{g}$ (第9図) 経口投与された雄蚕の次代胚と同対照胚子 (第4—6, 10, 11図). 第1, 2, 4, 5図: 2胚葉胚 第3, 6図: 陥入期胚 いずれも顕著な形態的差異は認められない.

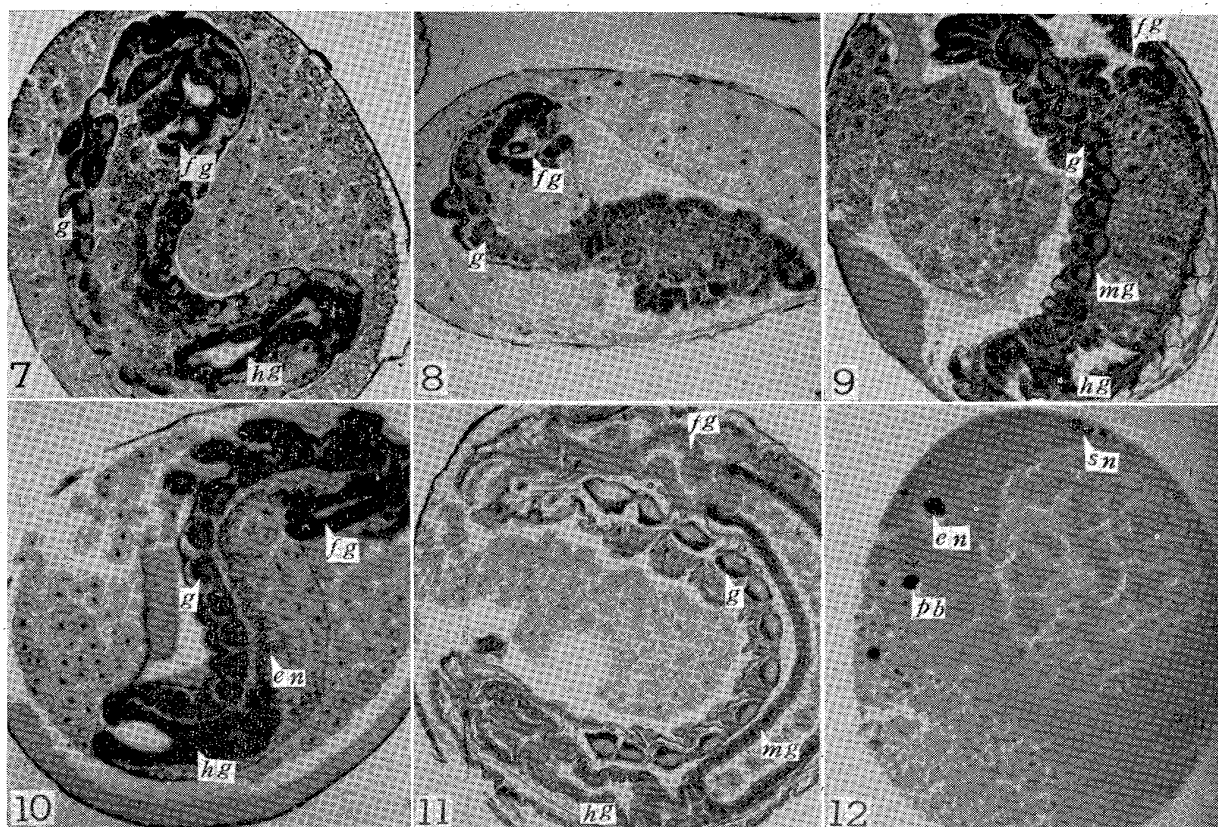
p: 頭部 c: 尾部 y: 卵黄 e: 外胚葉 m: 中胚葉 en: 内胚葉 fg: 前腸
hg: 後腸 mg: 中腸 g: 神経球 sn: 精核 en: 卵核 pb: 極体

いて胚子の発育階程を調べ第2表に示す結果を得た。

5令5日目の幼虫に1頭当り $300\mu\text{g}$ を経口的に投与した区では、大部分の胚子において、外胚葉性の前腸、後腸および神経球などの形成が観察されたが、反転期を中心にそのまま発育を停止し、 $100\mu\text{g}$ ではさらに反転期を経過し諸器官もほぼ完成して、幼虫体としての形態形成を終ってから発育を停止しているものが多かった。また、これらの胚発生過程を経時的に観察した結果、処理区のものでは発育の進行が若干遅れていたが、陥入期頃までは形態的には正常蚕のそれとほとんど差異が認められなかった (第1—3図)。しかし、反転期以後に致死するものでは、組織の崩壊症状を示す顕著な形態異常が示

された (第7, 8図)。また形態形成を終って孵化前に致死するものでは、外胚葉を起原とする神経球、皮膚、前腸、後腸などはかなりよく発達し、次いで中胚葉性の背脈管、筋肉、内部生殖器なども認められたが、ほとんどのものが内胚葉に由来する中腸皮膜組織の形成を欠いていた (第9図)。

2) 末期蛹の腹腔内注射の場合: 末期の雄蛹に1頭当り $100\mu\text{g}$ または $300\mu\text{g}$ を注射した場合に発現した不着色卵では、大部分の卵内に精子が貫入していたが、これらの精子核は小球状をなして卵の一隅に留存し、卵核と合体しているものはほとんどみられなかった。このような異常精子核の卵内留存状態は産下10日後のものでも明瞭に認められた (第12図)。



第7, 8, 10図: 反転期胚 反転不能 (第7図) や顕著な組織の崩壊症状が示される (第7, 8図). 第9, 11図: 器官完成胚 中腸皮膜組織の形成を欠く (第9図). 第12図: 末期の雄蛹に300 μ g 注射し, これと交尾した正常雌の産下した不着色卵 (産下10日後の所見). 精子は卵内に貫入しているが卵核との合体はみられない. (第1—12図 $\times 100$)

また, これらの不着色卵中に若干混在する着色卵では2胚葉形成期付近で发育を停止し孵化するものはなかった。

考 察

カイコの雄に Apholate を投与すると, これと交尾した雌の産下卵はほとんど孵化しない。また組織学的観察から, 薬量, 投与時期などによって, その異常化の程度にかなり顕著な差異がある ことなどが認められた。すなわち, 幼虫期に経口投与したものは, 胚発生がかなり進行してから死滅し, 蛹末期の注射では, 精子は卵内に貫入するがその多くは受精能力を喪失して, 卵核との合体までには到らずにそのまま退化してしまう。一般にカイコの精子形成は, 5令中期以後では将来受精に関与する生殖細胞の大部分は成熟分裂または精子変態過程にあり, 蛹の末期では完熟精子のみによって占められる。したがって, ここに示された投与時期による異常化の

違いは, 各生殖細胞の感受性差異に起因する可能性も考えられるが, ここでは投与方法が異なるので両者を直接比較することはできない。しかし, Apholate に対しては, 精子変態期の細胞も完熟精子でも, ともにかなり高い感受性を持ち続け, かつ投与量の増加にしたがって, 精子の異常化および次代胚の致死時期が早められることは間違いない。

一般にアジリジン系化合物の生物体に対する作用は, 電離放射線のそれと類似していることが知られているが (Alexander, 1960), カイコの場合, 放射線照射による雄の次代胚の致死は, ほとんどが胚発生の後期であり, その発現割合は5令6日目が最も高い (田島, 1959)。さらに, 放射線では5令初期に完全不妊を誘発させる 2,000 R の照射でも次代胚の致死割合は10%程度であり, しかも蛹の末期では減少するというが, Apholate ではほぼ 100% の高い致死割合が示された。一方, ショウジョウバエや *Habrobracon juglandis* などでも雄の照射による

次代胚の致死がみられるが、この場合、胚盤形成以前に致死するものが多く、いずれも DNA 合成の異常化に起因する優性致死突然変異であることが報告されている (von Borstel and Rekemeyer, 1959)。またアズキゾウムシでは、昆虫不妊剤の一種 Metepa を成虫化直後の雄の背部に滴下すると、核分割は行なわれるが胚盤葉形成前に致死するという (中山・長沢, 1966)。いずれにしても、受精後致死するものでは、卵細胞の方は核および細胞質とも全く正常であり、致死の原因は明らかに処理を受けた雄性配偶子の異常化にもとづくものと考えねばならない。したがって、本実験で示された胚致死は優性致死として扱うことのできるものと考えられる。しかし、これらの致死胚全部を優性致死とみなしてよいか否かについてはなお検討してみる必要がある。また、蛹期の注射によって発現した不着色卵の多くは精子の異常化に原因する不受精卵とみなしてさしつかえない。

一方、受精したものでは、若干の発育遅延が認められるが、陥入期付近までは形態的には正常蚕のそれとほとんど差異なく胚発生が進展する。しかし、反転期後に致死するものでは、外胚葉性諸器官はかなりよく発達し、次いで中胚葉性組織の形成も認められるが、内胚葉に由来する中腸皮膜組織の分化がほとんど進展しない。このような結果から、幼虫体としての形態形成が完了し、孵化直前に致死するものでは、中腸皮膜組織の欠如が胚致死の主因をなしている可能性が強い。

一般にカイコの内胚葉は、他の2胚葉よりかなり遅れて形成され、既成の外胚葉が発達し、陥入によって前腸および後腸の形態形成が開始されてから分化発達してくる。したがって、前述の中腸皮膜組織にみられる顕著な発達抑制は、雄性配偶子の持つ異常化が、次代胚の特定器官の分化発達能を選択的に抑制したと考えるより、むしろ胚発生の進展にともなって次第に積み重ねられる胚体内の組織環境の異常化が、後成される中腸皮膜組織の分化を阻害したとみる方が妥当であろう。したがって、外胚葉性器官のように早期に形成されるもの程、よく分化発達するのではなからうか。いずれにしても、このような雄性配偶子の受けた異常化が、次代の胚発生能にどのように作用するかについては未だ不明の点が多

く、さらに詳細な検索を続行中である。

要 約

カイコの雄に Apholate を投与し、次代胚の致死時期とその異常経過を組織学的にしらべた。

1. 5令5日目幼虫に1頭当り300 μ gを経口的に投与すると、次代胚は反転期を中心に致死し、100 μ gでは大部分が器官完成後に致死する。
2. 諸器官が完成し、孵化前に致死するものでは、外胚葉性器官はかなりよく発達し、次いで中胚葉性器官の形成も認められるが、内胚葉に由来する中腸皮膜組織の形成を欠くものが多い。
3. 羽化前日の蛹に1頭当り100 μ g以上を注射した場合には、精子は卵内に貫入するが、その多くは受精能力を喪失し、そのまま退化する場合が多い。また、受精しても2胚葉形成期付近で発育を停止する。

文 献

- ALEXANDER, P. (1960) Radiation-imitating chemicals. *Scientific American* 202 : 99—108.
- CHAMBERLAIN, W. F. (1962) Chemical sterilization of the screw worm. *J. Econ. Entomol.* 55 : 240—248.
- DONALD, E. W. (1962) Chemical sterilization of mosquitoes. *Nature* 195 : 786—789.
- HAIR, J. A. and T. R. ADKINS (1964) Sterilization of the face fly, *Musca autumnalis*, with apholate and tepa. *J. Econ. Entomol.* 57 : 586—589.
- HARRIS, R. L. (1962) Chemical induction of sterility in the stable fly. *J. Econ. Entomol.* 55 : 882—885.
- 平野千里 (1965) カイコガに対する Apholate の不妊作用. 防虫科学 30 : 109—114.
- LABRECQUE, G. C. (1961) Studies with three alkylating agents as house fly sterilants. *J. Econ. Entomol.* 54 : 684—689.
- LINDQUIST, D. A., L. J. GORZYCKY, M. S. MAYER, A. L. SCALES and T. B. DAICH (1964) Laboratory studies on sterilization of the boll weevil with apholate. *J. Econ. Entomol.* 57 : 745—750.
- MITLIN, N., B. A. BUTT, and J. SHORTINO (1957) Effect of mitotic poisons on house fly oviposition. *Physiol. Zool.* 30 : 133—136.
- 中山勇・長沢純夫 (1966) アズキゾウムシの雄成虫に対する metepa の影響, とくにその病理組織学的観察. 応動昆. 10 : 192—196.

- SCHWARTZ, P. H. (1965) Effect of apholate, and tepa on reproductive tissues of *Hippelates pusio* LOEW. *J. Invertebrate Pathol.* 7: 148—151.
- SUGAI, E. and C. HIRANO (1965) Studies on the sterility in the silkworm, *Bombyx mori*, induced by apholate. *Japan. J. Genetics* 40: 357—363.
- SUGAI E. (1967) Embryonic mortality in the progeny of the male silkworm, *Bombyx mori* L., orally administered apholate in the larval stage. *Jap. J. Appl. Ent. Zool.* 2: 9—12..
- 田島弥太郎 (1959) 蚕の放射線生理. 実験形態学新説 (竹脇潔他編), 養賢堂, 東京: pp. 249—271.
- VON BORSTEL, R. C. and M. L. REKEMEYER (1959) Radiation-induced and genetically contrived dominant lethality in *Habrobracon* and *Drosophila*. *Genetics* 44: 1053—1074.