

家蚕精子の生殖能力に及ぼす雄蛹及び蛾の長期冷蔵の影響

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
巻/号	682
掲載ページ	p. 133-137
発行年月	1999年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



家蚕精子の生殖能力に及ぼす雄蛹及び蛾の長期冷蔵の影響

竹村 洋子¹⁾・神田 俊男²⁾・堀江 保宏¹⁾

1) 大日本蚕糸会 蚕品種研究所

2) 蚕糸・昆虫農業技術研究所

(1999年3月8日 受理)

YOKO TAKEMURA, TOSHIO KANDA and YASUHIRO HORIE: Effect of long-term cold storage of male pupae and moth on reproductive ability of sperm in the silkworm, *Bombyx mori*

Effect of long-term cold storage of male pupae and moth on reproductive ability in the silkworm was examined by using artificial insemination. As the results of prolonged storage of male pupae and moths at 5°C, only 40% of pupae and 30% of moths were able to survive after 2 months of storage. However, the survived pupae could not emerge and the moths lost their mating ability. On the other hand, no significant difference was found in the number of eggs laid and fertilization rate between normal mating and artificial insemination with sperm collected from either cold-storage pupae or moths. This fact showed that the sperm collected from seminal vesicles of survived pupae and moths still has fertility even after 2 months cold-storage.

Furthermore, a new method for determination of comparative sperm fertility was developed using competitive fertilization between the sperm of two strains. That is, the same volumes of sperm from both 'white egg 2' and 'Hitachi × Nishiki' were mixed and the mixed semen inseminated artificially to females of 'white egg 2'. The segregation ratio of serosal color of deposited eggs, normal (pigmented) to white, revealed competitive fertility between sperm of two strains. When the mixture of two types of non-refrigerated sperm was inseminated, the female moths deposited eggs in which the segregation of serosal color was in the ratio of normal to white, 9:1, showing that the sperm precedence was stronger than white egg. On the contrary, the segregation ratio of normal color to white was reduced to 4:6 when the sperm collected from cold-storage (2 moth, 5°C) pupae of 'Hitachi × Nishiki' were used for artificial insemination in combination with sperm of non-refrigerated pupae of 'white egg 2'. This result indicated that the sperm fertility is damaged by cold-storage of pupae to some extent. 1) *Institute of Silkworm Genetics and Breeding 1053, Iikura Amimachi, Ibaraki, 300-0324 JAPAN*; 2) *National Institute of Sericulture and Entomological Science 1-2, Ohwashii Tsukubashi, Ibaraki, 305-0851 JAPAN*

Key words: Artificial insemination, sperm precedence, pupae, cold storage, fertility, *Bombyx mori*

家蚕蛹の冷蔵が産卵性に及ぼす影響については、多くの報告がある(藤本, 1957; 藤森, 1973; 神戸・山崎, 1968; 戸谷, 1968)が、これらは交尾を基本

とした産卵能力の調査を中心とするものであって、雄蛹の20日内外の冷蔵が産卵能力の限界とされている。蚕種製造の現場では発蛾調節のため、頻りに蛹の冷蔵が行われており、実用的には一週間程度が限度とされている。しかし、雄の長期冷蔵が可能となれば、経卵伝染である微粒子病の心配が無いため次

1) 〒300-0324 茨城県稲敷郡阿見町飯倉1053

2) 〒305-0851 茨城県つくば市大わし1-2

代蚕への掛け合わせによる飼育経費、労力の削減や戻し交雑等への利用が期待できる。そこで、筆者らは、家蚕の人工授精法を利用して、雄蛹及び蛾の長期冷蔵を試み、雄蛾の交尾能力のほかに、精子自体の生殖能力について研究を行い、新たな知見を得たので報告する。

本文に先立ち、種々のご教示を賜った蚕品種研究所所長村上毅博士、名誉所長田島弥太郎博士、及び大沼昭夫博士に厚く御礼申し上げる。

材料と方法

供試品種には、「ひたち×にしき」及び第2白卵系統を用いた。雄蛾は発蛾当日、1蛾ずつ冷蔵箱に入れビニールに包み、また、雄蛹は羽化前日に冷蔵箱に入れ、5℃に冷蔵した。冷蔵期間は、それぞれ10日間、2カ月間とした。受精方法として、普通交尾と精液を採取して行う人工授精を用いた。雌蛹冷蔵試験を除いて、交尾に使用する雌蛾はすべて無冷蔵の蛾を使用した。

人工授精法には、窒素ガスボンベ、圧力調整器、足踏みスイッチ、三方電磁弁、ガラスキャピラリーからなる人工授精装置を用いた(竹村ら, 1996)。精子の受精能力の判定には、冷蔵した「ひたち×にしき」の蛹及び蛾より採取した精液を無冷蔵の第2白卵の雌蛾に人工授精して、その産卵性について検討する方法を用いた。また、冷蔵処理した「ひたち×にしき」の蛾から採取した精液を無冷蔵の第2白卵の精液と均等に混合し、混合精液を第2白卵の雌蛾に人工授精して、産卵された受精卵の漿液膜色素による卵色比率から、「ひたち×にしき」精子の受精能力の判定も行った。

結 果

1. 雄蛾冷蔵が産卵性に及ぼす影響

無処理の羽化当日及び5℃に10日間冷蔵の場合、

雄蛾の生存率は100%であり、通常交尾及び人工授精とも、無処理区と比較して産卵数、受精卵率に差異はなかった(第1表)。2カ月間の冷蔵では、冷蔵障害が顕著になり、雄蛾の生存率は33%までに低下し、生存していた雄蛾に雌蛾を近付けても、翅を動かさない程弱っており、交尾行動自体が不可能であった。しかし、この生存雄蛾から精液を採取し人工授精を行ったところ、無冷蔵と差異のない産卵数、受精卵率が得られた。

2. 雄蛹冷蔵が産卵性に及ぼす影響

神戸・山崎(1968)の報告によると、羽化前日の蛹は冷蔵耐性が強いと言われている。そこで、雄蛹を羽化前日に冷蔵した。羽化直前の蛹は、生殖器官が完成し、貯精囊に精子が蓄積されており、第2表に示したように、羽化前日の蛹貯精囊から採取した精液を雌蛾に人工授精すると、産卵数、受精卵率ともに羽化当日に通常交尾させた場合とほとんど差異はみられなかった。

一方、無処理の羽化直前の雄蛹から精巣を摘出し、精巣から精子を採取して人工授精に用いた。その結果、わずかに産卵したもの、その全てが不受精卵であった。なお、無処理の雄蛹の貯精囊からの精子の人工授精では、通常交尾と同様な産卵性が得られたことから、精子が精巣から貯精囊に移動することにより、精子が受精能を獲得するように考えられる。

10日間の冷蔵を経た後でも雄蛹の生存率は100%であり、羽化率は96%でほとんど冷蔵障害はなかった。羽化した雄蛾について通常の交尾をさせた場合と精液を採取して人工授精した場合との間に、産卵数及び受精卵率に全く差が認められず、羽化当日に通常の方法で交尾させた場合とほぼ同様な結果となり、産卵性について冷蔵障害はみられなかった。一方、2カ月間冷蔵した場合には、冷蔵障害が極めて顕著であり、雄蛹の生存率は42%に低下し、羽化で

第1表 雄蛾の冷蔵期間と受精卵率

冷蔵期間	生存率	産卵方法	産卵数(粒)	受精卵数(粒)	受精卵率(%)
0日間 (羽化当日)	100%	通常交尾	602±63.3	583±76.3	96.8±6.0
		人工授精	585±37.6	564±40.1	96.5±2.4
10日間	100%	通常交尾	580±48.5	561±47.1	96.7±1.0
		人工授精	580±19.3	577±16.9	99.4±0.6
2カ月間	33%	交尾せず	—	—	—
		人工授精	552±52.2	546±53.2	98.8±0.4

各区15蛾についての平均値

第2表 雄蛹の冷蔵期間と受精卵率

冷蔵期間	生存率	羽化率	産卵方法	産卵数 (粒)	受精卵数 (粒)	受精卵率 (%)
羽化前日	100%		人工授精	583±52.0	528±22.6	91.8±4.8
羽化当日	100%	100%	通常交尾	602±63.3	583±76.3	96.8±6.0
10日間	100%	96%	通常交尾	577±41.2	537±52.5	93.0±5.5
			人工授精	567±34.5	548±33.8	96.7±2.1
2カ月間	42%	0%	人工授精	565±76.4	539±71.5	95.5±2.1
羽化前日の精巢精子			人工授精	148±85.5	0±0.0	0.0±0.0

各区 15 頭についての平均値

きた蛹は皆無であった。しかし、この生存していたが羽化できなかった雄蛹から精液を採取し人工授精を行ったところ、産卵数、受精卵率ともに無冷蔵雄蛾の通常交尾と差のない良好な結果が得られた。

3. 異系統間混合精子の受精競争を利用した精子活性の評価

蚕の系統間に精子活性の差異があるか否かについては従来、具体的な試験結果は全く得られていない。また、同一系統においても、通常交尾や人工授精法によって、表面的には産卵性に全く差異がみられない場合にも、冷蔵などのストレスによって精子活性が微妙に影響される可能性についても不明のまま残されている。そこで本実験ではその問題を明らかにするために、異系統精子間の拮抗的な受精競争を利用して、精子の活性を判定する方法を新たに考案した。具体的には、対照系統の精子としての第2白卵系統の精子と試験系統の精子とを予め等量均一に混合しておき、その混合精子を第2白卵系統の雌蛾に人工授精する。その結果、産卵した卵の漿液膜色素に由来する卵色によって、白卵系統の精子を受精した卵は白色卵になり、黒色系の精子を受精した卵は黒色になるはずである。従って、両者の産卵数の比較から精子の相対的な活性が比較でき、白卵系の同一精子を共通的に対照として利用することによって、種々の精子の活性を間接的に比較することが

可能であると推定された。そこでこの方法を実証し、併せて冷蔵蛹の精子活性を比較するために以下の試験を行った。

予め採取した「ひたち×にしき」の精液と第2白卵系統の精液とを等量混合し、第2白卵の雌に人工授精を行った。この場合、「ひたち×にしき」の精液由来の受精卵ならば産下卵は黒色になり、第2白卵の精液に由来するならば白色卵になるはずである。羽化当日の雄蛾から採取した2種の混合精液を人工授精した場合には、黒色卵が約89%、白色卵が約11%の割合で産下された(第3表)。すなわち、蚕の系統間に精子活性の差がみられ、「ひたち×にしき」の精子の方が第2白卵系よりも活性が強い傾向が認められた。これに対し、2カ月間5°Cに冷蔵した「ひたち×にしき」の蛾から採取した精液と無冷蔵の第2白卵の精液を混合した場合には、黒色卵が約43%、白色卵が約57%となり、「ひたち×にしき」の精子による受精卵の比率が低下した。すなわち、2カ月間冷蔵した「ひたち×にしき」からの精子は単独で人工授精した場合、無冷蔵蛾の精子と表面的には同等の受精能を示すが、混合精子による受精競争の方法では冷蔵精子の受精能が明らかに低下していることが分かった。

4. 雌蛹冷蔵が産卵性に及ぼす影響

雌蛹の方が雄蛹よりも冷蔵障害は顕著であり、雌

第3表 冷蔵蛾から採取した精子の活性比較

精液の種類	受精数 (粒)	黒卵数 (粒)	白卵数 (粒)	黒卵率 (%)
ひたち×にしき (無冷蔵)	572±33.1	572±33.1	0±0.0	100.0±0.0
ひたち×にしきと第2白卵 (無冷蔵) の混合	587±45.2	524±44.8	63±21.5	89.3±3.5
2カ月冷蔵ひたち×にしきと第2白卵 (無冷蔵) の混合	568±46.1	245±44.7	323±53.3	43.2±8.1

各区 15 蛾についての平均値

蛹を羽化直前に5°Cで10日間冷蔵すると、生存率には影響がみられなかったものの、産卵数はやや減少する傾向を示し、受精率も82%と顕著に減少した(第4表)。

第4表 雌蛹の冷蔵と精巢精子による受精卵率

試験区	産卵数(粒)	受精卵数(粒)	受精卵率(%)
No.1 通常交尾	602±63.3	583±76.3	96.8±6.0*
No.2 10日間冷蔵 通常交尾	564±58.8	463±100.3	82.3±15.5*

各区15蛾についての平均値

No.2: 雌蛹を羽化前日に冷蔵

* T検定により5%以上の有意差あり

考 察

著者らが従来行ってきた人工授精の実験において(竹村ら, 1996; TAKEMURA *et al.*, in press), 冷蔵による生殖能力の低下を避けるため、雄蛾は羽化後、雌蛾は羽化前日に蛹のままそれぞれ5°Cで冷蔵し、雌蛹は必要に応じて羽化させて供試したが、冷蔵期間を一週間以内に限定してきた。従って雄蛾には、冷蔵による影響がほとんどみられず、通常と変わらない交尾行動を示していた。今回の試験においても雄蛾及び蛹の冷蔵期間と生殖能力について、5°Cによる冷蔵を行った。なお最近、樋口(1998)によって蚕の蛹期の発育零点が6~8°C前後であることが報告されており、5°Cはこの温度を下回っていて、蛹の発生・分化やエネルギーの消耗を抑制する意味から長期冷蔵には適切であると考えられる。

雄蛾を5°Cで10日間冷蔵しても生存率、交尾率及び受精卵率は正常と変わりなく、人工授精においても同様な産卵性がみられた。しかし、2カ月間の冷蔵では生存率は低下し、生き残った蛾も交尾ができなかったけれども、この蛾から採取した精液による人工授精では、無冷蔵蛾の通常交尾と大差のない産卵性が得られた。すなわち、雄蛾の長期冷蔵にもかかわらず、貯精囊に蓄積されている精子と精子を活性化する前立腺分泌液(OMURA, 1936)の活性が、共に冷蔵によって障害を受けなかったことを示している。従来実用性の観点から、蛾の交尾能の低下をもって冷蔵限界期間を判定していたが、精子の受精能を基準にした冷蔵限界期間はそれよりも遙かに長いことを示している。

同様に羽化前日の雌蛹を5°Cで10日間冷蔵しても生存率、羽化率、交尾率及び受精卵率は正常と変

わりなく、人工授精においても同様な産卵性が得られた。しかし、2カ月間の冷蔵では生存率が低下し、羽化する蛹は皆無であった。それにも拘わらず、採取した精液の人工授精では、雄蛾の冷蔵の場合と同様に、無冷蔵・通常交尾と同様な産卵性が得られたことは注目に値する。すなわち、雄蛹を5°Cに2カ月間冷蔵することによって、次代の戻し交雑にもその蛹が利用できることを意味するからである。

一方、精巢内の精子を用いて人工授精を行った場合には、受精卵が得られなかった。これは、精巢内精子と貯精囊精子との性状に差異があることを示しており、成熟した精子は順次貯精囊に脱出することを示すものと推定される。また、その産下卵数も激減することから、産卵刺激にも関与していないと考えられる。なお、前立腺分泌液の代替え物質であるトリプシンを精巢精子に加えた場合には、有核精子束の解離が多少起こるものの、やはり受精卵は得られなかった(TAKEMURA *et al.*, in press)。

また冷蔵した雌蛹については、冷蔵時期、温度、日数により不受精卵歩合が変化すると報告があるが(藤本, 1957)、今回の結果においても雌蛹を10日間冷蔵した場合には受精卵率が低下し、冷蔵による不受精卵の増加要因の大部分は雌にあることが再確認された。

以上ことから、羽化前日の蛹の貯精囊にはすでに成熟した精子が蓄積されているため、蛾と同様に人工授精による受精卵を得ることが可能であり、2カ月間冷蔵でも通常交尾と差異のない受精卵が得られた。なお、死亡した蛾や蛹の貯精囊内では、無核精子が運動しており、多くの有核精子束がすでに解離していたが、この精子で受精卵を得ることはできなかった。

第2白卵の精子を混合して人工授精する方法で、精子の受精能力の差異を調査したところ、無冷蔵では「ひたち×にしき」の精子が第2白卵の精子より優っていたが、2カ月間冷蔵で生存していた個体の精子は、顕微鏡での観察で正常精子と形態的な差異が認められなかったにもかかわらず、明らかに受精能力が低下していた。受精能力の低下した精子であっても、同一系統の精子のみであれば、人工授精によって高い受精卵率が得られ、第2白卵精子との混合精子の人工授精の場合に見られる「ひたち×にしき」精子の受精能力の低下は、第2白卵精子との拮抗的な受精競争の結果を示すものと考えられる。今回の混合精子の同時人工授精法は、従来の重複交尾による選択受精とは異なり、混合精子が雌蛾の交

尾嚢内に授精された時点から、2種精子間の受精競争が同時に開始されるものと考えられ、精子の受精能力評価に適した方法と思われる。これらの結果は、蚕の系統により精子の受精能力に差のあること、この現象はおそらく異系統の精子間に受精競争があること、また、蛹や蛾の長期冷蔵により精子に何らかの冷蔵障害があり、受精能力が次第に減退することを示している。

しかしながら、生存している蛾及び蛹の貯精嚢に蓄えられた精子は、交尾や羽化能力が無くとも受精能力を持っていることが判明した。これは、2カ月間の冷蔵期間を、冷蔵保護方法を改善することにより、さらに延長できることとなれば、長期にわたる受精卵の産生に役立つことと思われる。また、混合精子を人工授精する方法は、拮抗的な受精競争による蚕品種系統間の精子の受精能力の比較や外的ストレスの産卵性に及ぼす影響の解明などにも役立つものと考えられる。

摘 要

「ひたち×にしき」と第2白卵系統の2系統を供試し、人工授精法を利用して蚕の雄蛹及び蛾の長期冷蔵による影響について検討し、次の諸点を明らかにした。

1. 雄蛾を5°Cに10日間冷蔵しても、生存率、産卵数及び受精卵率ともに冷蔵の影響はみられず、採取した精液による人工授精でも同様な産卵性がみられた。
2. 雄蛾を2カ月間冷蔵すると生存率は著しく低下し、交尾は不能になった。しかし、生存蛾からの精子による人工授精では、産卵数及び受精卵率とも無冷蔵・通常交尾と差が認められなかった。
3. 羽化前日の蛹を5°Cに10日間冷蔵しても生存率、産卵数及び受精卵率とも冷蔵の影響はみられず、蛹からの精液による人工授精でも同様な産卵性がみられた。2カ月間冷蔵すると生存率低下は

著しく、全く羽化できなかった。しかし、生存蛹からの精子による人工授精では、産卵数及び受精卵率とも無冷蔵・通常交尾と差が認められなかった。

4. 蛹の精巢から採取した精子による人工授精では、受精卵が得られなかった。
5. 雌蛹を5°Cに10日間冷蔵すると受精卵が減少し、受精卵率も低下した。
6. 2種の精子を等量・均一に混合して人工授精すると、精子間で拮抗的な受精競争が起こることが分かった。また、この方法で「ひたち×にしき」の受精能力が第2白卵系統に優ること、雄蛾の5°C・2カ月間冷蔵は精子の受精能力を低下させることが明らかとなった。

文 献

- 藤本直正(1957)：家蚕雌蛹の冷蔵と羽化および産卵について。日蚕雑，**27**，111-116。
- 藤森胡有(1973)：家蚕蛹の冷蔵による発蛾抑制試験：蛹冷蔵と産下卵の孵化について。蚕糸研究，**89**，81-85。
- 樋口康一(1998)：家蚕における蛹期間の発育零点と発育有効積算温量。日蚕雑，**67**，425-429。
- 神戸禮二郎・山崎伝司(1968)：家蚕雄蛹の冷蔵と受精能力について。群馬蚕試報，**41**，65-72。
- OMURA, S. (1936): Artificial insemination of *Bombyx mori*. J. Facul. Agr. Hokkaido Imp. Univ., **38**, 135-149.
- TAKEMURA, Y., T. KANDA and HORIE Y: (1999) Artificial insemination using trypsin-treated sperm in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., **28**. (in press)
- 竹村洋子・神田俊男・田村俊樹・新保 博・堀江保宏(1996)：家蚕の新しい人工授精法の開発。日蚕雑，**65**，456-463。
- 戸谷和夫(1968)：家蚕雌蛹の冷蔵による早期潰れ卵について。日蚕雑，**37**，420-426。