



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

イモゾウムシの精子形成過程とガンマ線照射による
不妊化機構に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 桜井, 宏紀, 村上, 善紀, 内村, 晴子, 小濱, 継男, 照星, 匡 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5494

イモゾウムシの精子形成過程とガンマ線照射による不妊化機構に関する研究

桜井宏紀・村上善紀・内村晴子・小濱継男¹⁾・照屋 匡¹⁾

生物生産制御学講座
(2000年7月19日受理)

Sterilizing Mechanism of Gamma-radiation in the Male of West Indian Sweet Potato Weevil, *Eusceps post fasciatus*

Hironori SAKURAI, Yosiki MURAKAMI, Haruko UTIMURA,
Tsuguo KOHAMA and Tadasu TERUYA

Department of Controlled Plant Production

(Received July 19, 2000)

SUMMARY

To study the mechanism of gamma-radiation in the male adults of the West Indian sweet potato weevil, *Eusceps postfasciatus*, the effects of gamma-radiation on spermatogenesis were examined histologically. In the irradiated adults, histological changes related to an inhibition of spermatogenesis were found by light- and electron-microscopic observations. The radiation conditions best suited to prevent a decline in the life-span of irradiated adults were discussed.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (65):5-12, 2000

要 約

イモゾウムシ (*Eusceps postfasciatus* FAIRMAIRE) の不妊化方法を確立するため、雄成虫の精子形成過程の特徴と、成虫に照射したガンマ線の精子形成に及ぼす影響を組織学的に検討した。非照射個体では完成精子は成虫8日齢頃より形成され、貯精嚢内に貯留され始めた。14日齢成虫の精巣で精細胞と精子の微細構造が観察された。羽化2日後の成虫への50~90Gy照射により、精子形成過程が攪乱されて、貯精嚢内の精子数は激減した。14日齢の70Gy照射虫では精原細胞の萎縮、精母細胞の核濃縮や核崩壊、精細胞内での複数の核や軸糸の存在とミトコンドリアの変形が観察され、優性致死変異を示す異常精子が形成された。これらの結果から、イモゾウムシ雄の不妊化のための照射最適条件を考察した。

緒 言

イモゾウムシ (*Eusceps postfasciatus* FAIRMAIRE) はアリモドキゾウムシ (*Cylas formicarius* FABRICIUS) とともに熱帯、亜熱帯地方に広く分布するサツマイモの最重要害虫である^{1, 2)}。本種はサツマイモの茎葉や塊根を食害し、その際に防御物質としてフラノテルペノイドのイポメアマロンやクマリン類が生成され、悪臭と苦みのために被害塊根は食用ならびに家畜飼料用として利用できない³⁾。わが国では本種はトカラ列島以南に分布し、奄美群島や沖縄県では全域に分布しており、農林水産省の特殊病害虫防除事業の一環として根絶対策が鹿児島県と沖縄県で進められている^{4, 5, 6)}。イモゾウムシ、アリモドキゾウムシと同様に特殊病害虫であるウリミバエ (*Dacus cucurbitae* COQUILLED) が、ガンマ線照射による不妊虫放飼法によって1993年に沖縄県より根絶されたことから、イモゾウムシとアリモドキゾウムシの防除に対する本方法の利用のための基礎的調査が行われてきている⁷⁾。筆者等はウリミバエとアリモドキ

1) 沖縄県ミバエ対策事業所

ウムシについて放射線不妊化の機構を組織学的に検討し、配偶子形成と体細胞に対するガンマ線照射の影響を明らかにしてきた^{8, 9, 10, 11, 12, 13}。イモゾウムシの不妊化法を確立する上で、ガンマ線照射が雄の生殖機能に及ぼす影響を明確にすることは重要である。そこで、イモゾウムシの不妊化のためのガンマ線の適切な照射時期と照射線量を決定するため、精子形成過程の細胞学的特徴と精子形成に及ぼすガンマ線照射の影響を病理組織学的に検討した結果について報告する。

材料及び方法

供試昆虫：沖縄県ミバエ対策事業所で累代飼育しているイモゾウムシの雄成虫を実験に使用した。不妊化処理のため羽化後2日目の成虫にコバルト60によるガンマ線を50, 70, 90, 120Gy (グレイ) の各線量を照射した。羽化後14日目の照射虫について精子形成状況を組織観察した。

光学顕微鏡観察：70%エチールアルコールで固定した虫体を水洗し、ブタノール系列で脱水した後、パラフィン包埋し、マイクロームにより5 μ mの連続切片を作成し、光学顕微鏡により組織観察した。

電子顕微鏡観察：2.5%グルタルアルデヒド・リン酸緩衝液 (pH7.2) 中で虫体を解剖し卵巣と中腸を取り出して前固定した後、2%オスミック酸で後固定した。エタノール系列により脱水し、QY-1を浸透剤としてエポキシ樹脂に包埋した。ガラスナイフで試料の超薄切片を作成し、フォルムバルを支持膜とするシートメッシュに付着させた。2%酢酸ウラニルと佐藤の鉛染色液¹⁴で切片を二重染色し、岐阜大学機器分析センターの電子顕微鏡 (日立H-8100型) により組織観察と写真撮影を行なった。

結 果

1. 精子形成過程の光学顕微鏡観察

イモゾウムシの精巣は中腸の後端部に位置し、睾丸小胞が集合した左右一対のこぶし状の形状で、後部は貯精囊 (spermatheca) に連なり、精巣と中腸の周囲には脂肪体が多量に分布していた (Fig.1)。羽化後の精巣の発達状況を知るため、睾丸 (testis) と貯精囊とに分けて精子の形成状況を光顕観察した。羽化後0, 2, 4, 6日齢の睾丸小胞 (testicular follicle) の組織像をFig.2, A-Dに示す。0日齢では精原細胞 (spermatogonia) から精母細胞 (spermatocyte) が分化し始めていた。2日齢では精母細胞から精細胞 (spermatid) が分化して鞭毛が伸長し始めていた。4日齢では精細胞から鞭毛が発達していた。6日齢では精子形成が進んで精子束が形成され、結束部位はヘマトキシリンで濃染された。羽化後0, 2, 4, 6日齢の貯精囊の組織像をFig.3, A-Dに示す。貯精囊の容積は羽化後次第に増大し、6日齢では貯精囊は著しく大型化した。精子 (spermatozoa) は貯蔵されていなかった。羽化後8, 10, 12, 14日齢の睾丸小胞の組織像をFig.4, A-Dに示す。8日齢では精細胞群が精子束を一樣に形成していた。10~12日齢では精子束がゆるみ、精子が次第に遊離し、14日齢では睾丸小胞内に自由精子が多数分布していた。羽化後8, 10, 12, 14日齢の貯精囊の組織像をFig.5, A-Dに示す。8日齢では貯精囊の上皮細胞の核は退化し、著しく拡張した貯精囊内部には自由精子がわずかに存在していた。10日齢以降の貯精囊は上皮細胞が退化し、硬化した外壁で覆われ、内部には自由精子が

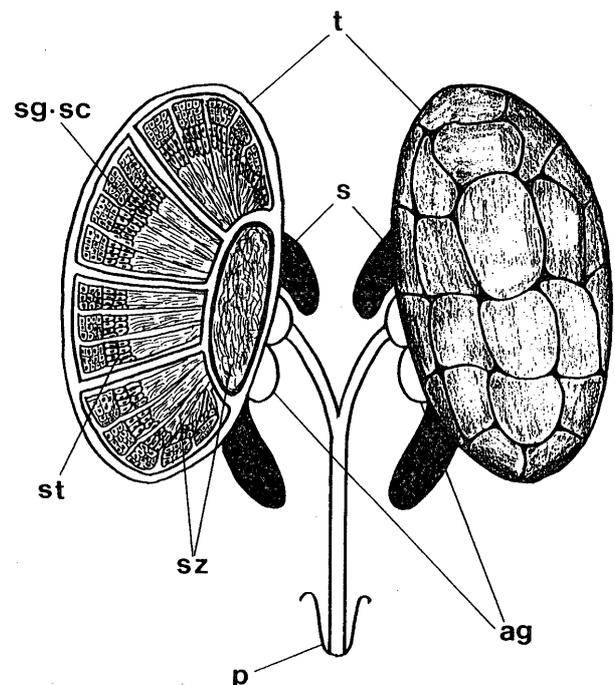


Fig.1. Diagram of reproductive system in male adult of *Euscepes postfasciatus*. Abbreviation of term in the figures; ag: accessory gland, p: penis, s: spermatheca, sc: spermatocyte, sg: spermatogonia, st: spermatid, sz: spermatozoa.

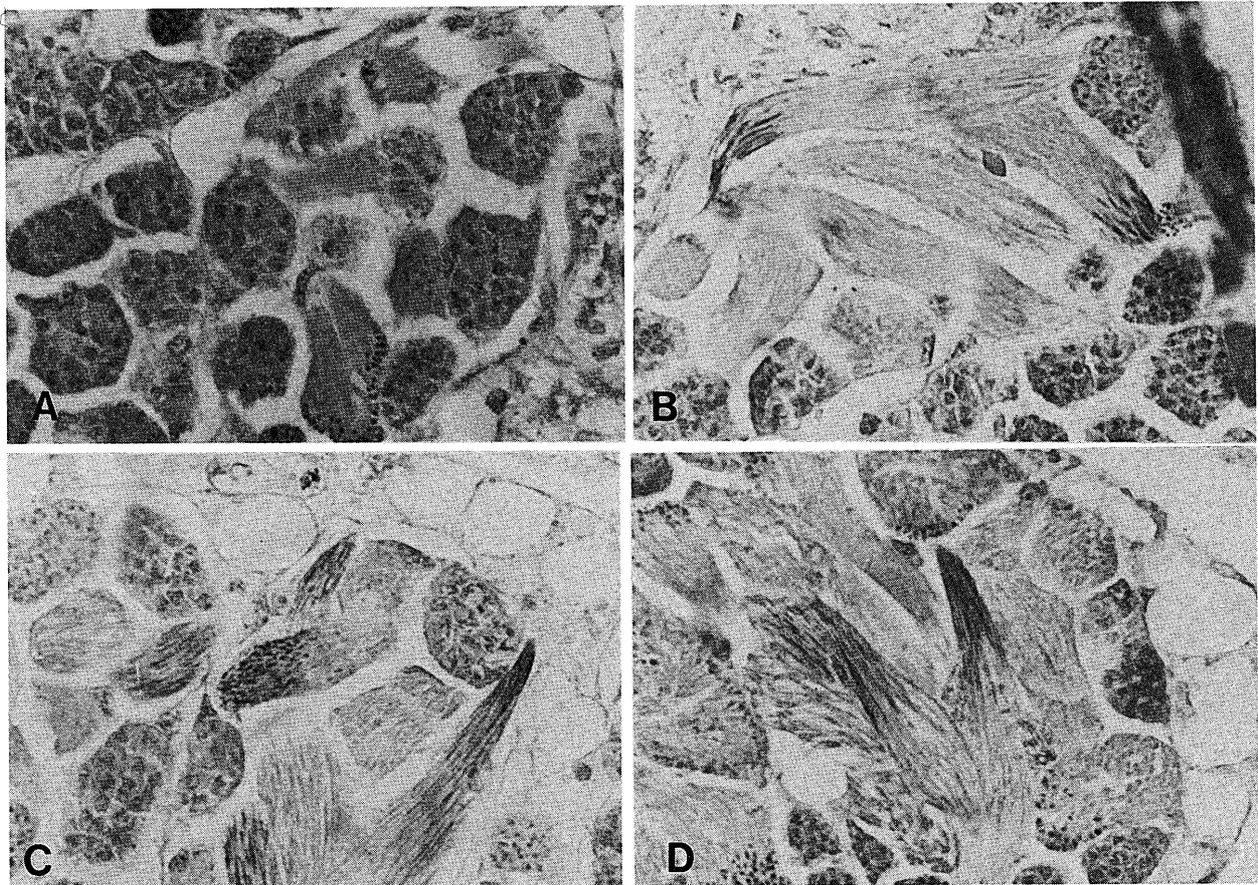


Fig.2. Spermatogenesis in the testicular follicles of 0-6 days old adults ($\times 400$).
Figs A: 0 -day, B: 2-days, C: 4-days, D: 6-days.

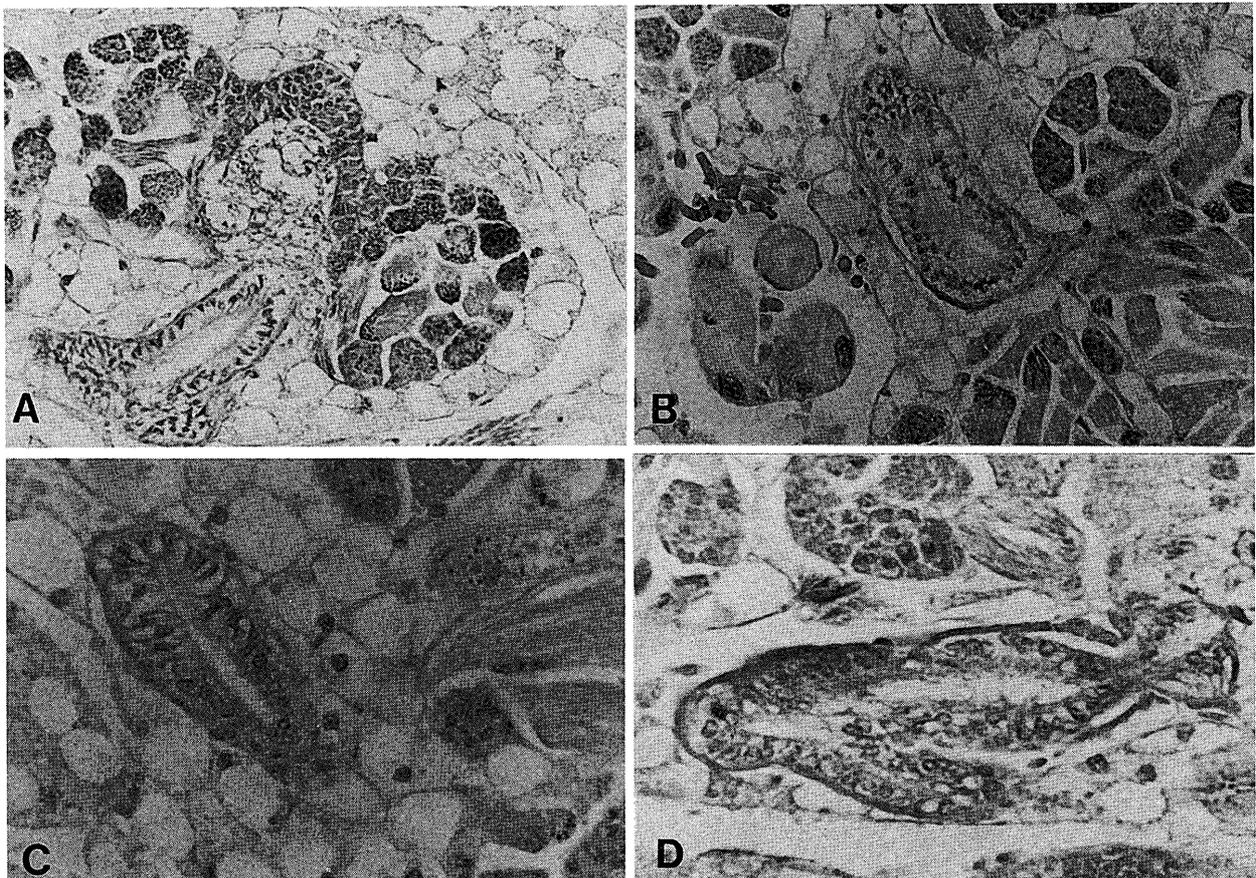


Fig.3. Spermatogenesis in the seminal vesicles of 0-6 days old adults ($\times 400$).
Figs A: 0 -day, B: 2-days, C: 4-days, D: 6-days.

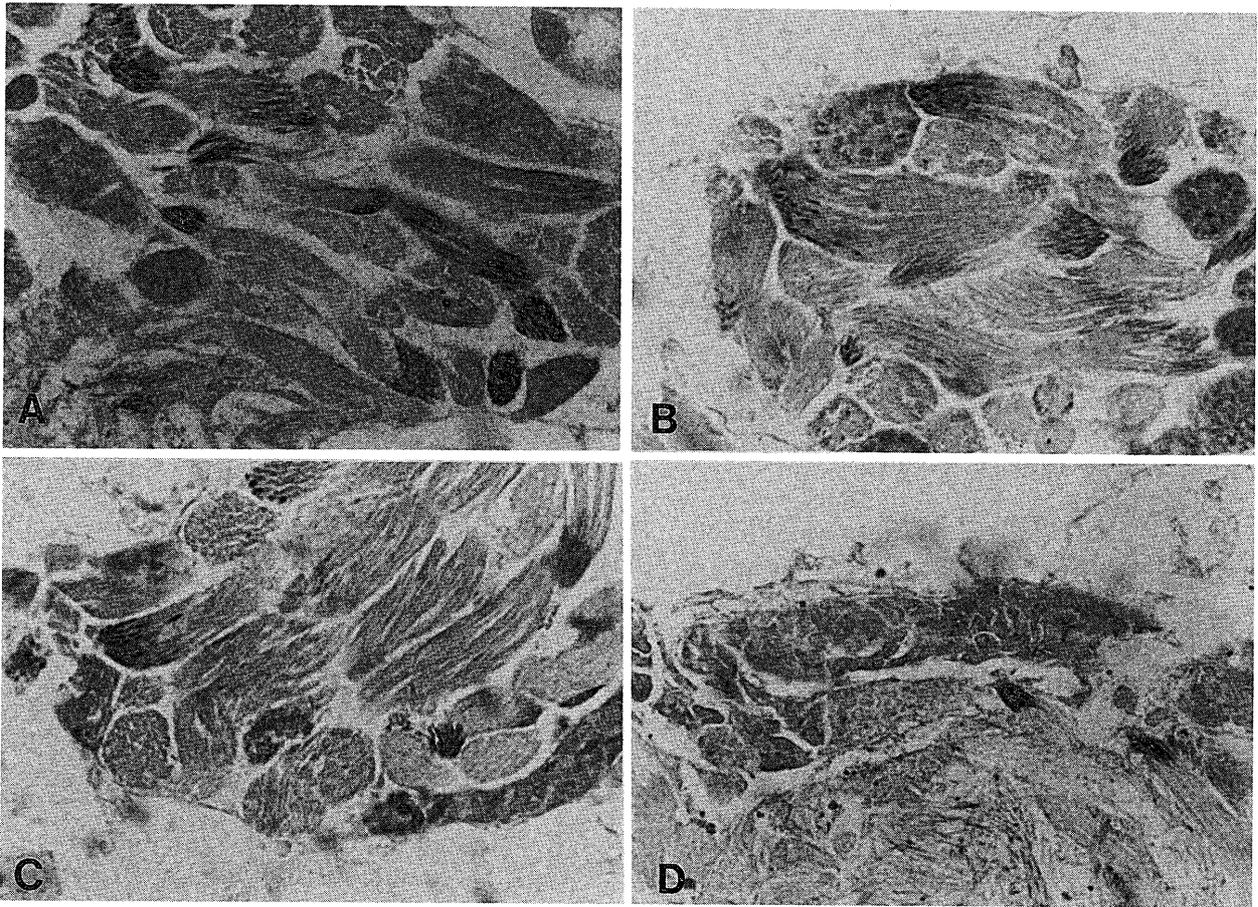


Fig.4. Spermatogenesis in the testicular follicles of 8~14 days old adults ($\times 400$).

Figs A: 8-days, B: 10-days, C: 12-days, D: 14-days.

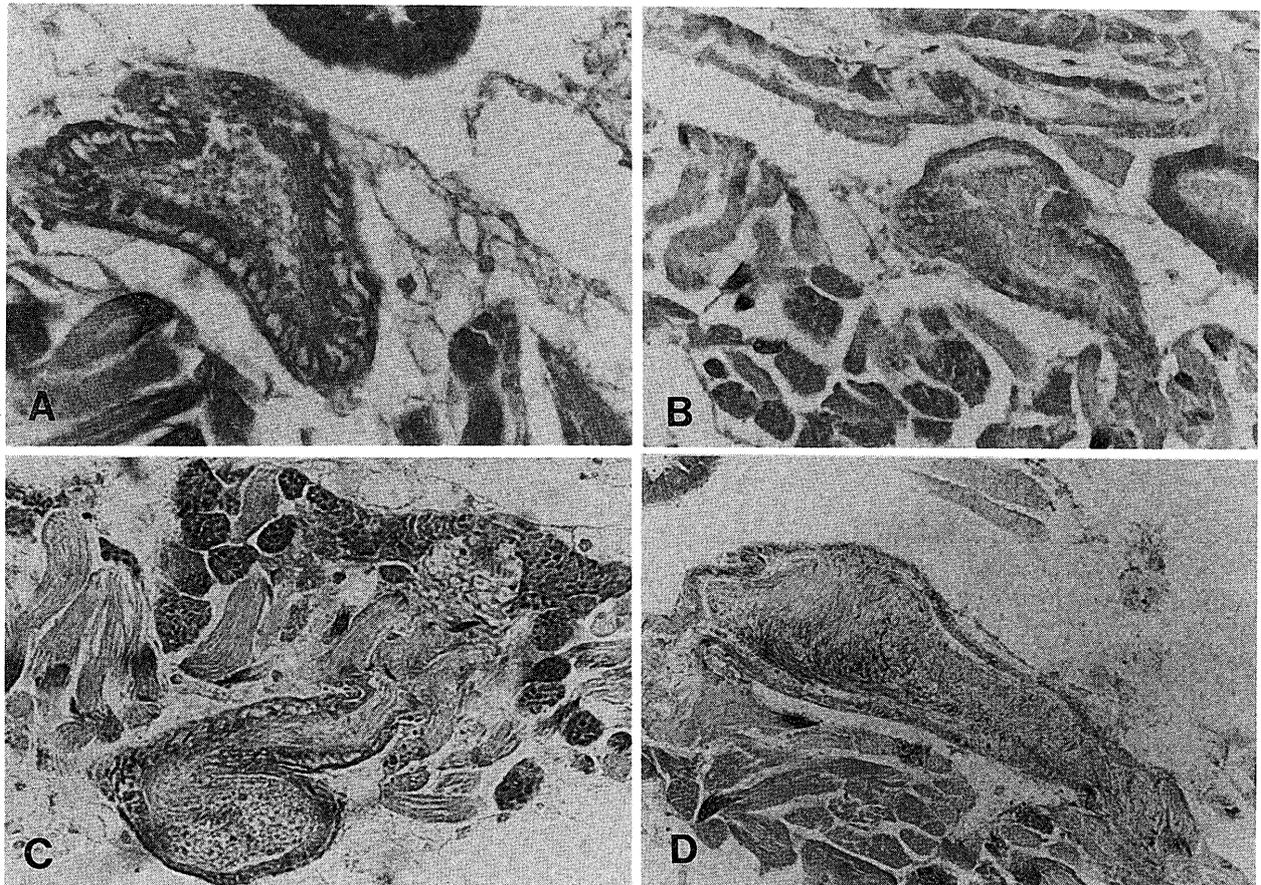


Fig.5. Spermatogenesis in the seminal vesicles of 8~14 days old adults ($\times 400$).

Figs A: 8-days, B: 10-days, C: 12-days, D: 14-days.

充満していた。これらの精子形成過程の諸事項を要約すると下記の通りである。

成虫 1 日令：精原細胞からの精母細胞の分化

2 日令：精母細胞からの精細胞の分化

4 日令：精細胞の発達

6 日令：精子束の形成

8 日令：精子束の発達，自由精子の形成，貯精囊内に精子が少量存在

10 日令：貯精囊内に精子が増加

12 日令：貯精囊内に精子が充満

このように完成精子は 8 日齢頃より形成され，貯精囊内に貯留され始めることがわかった。

2. 精子形成過程の電子顕微鏡的観察：

羽化後 14 日齢の精巢で精細胞と精子が観察された。精細胞は楕円状で，発達した核と渦巻状のミトコンドリア鞘が存在した (Fig.6, A)。睾丸小胞の転換域で精細胞は精子に転換し，それに伴い精細胞の一部が突出して鞭毛が形成された (Fig.6, B)。精子の頭部には電子密度が著しく高いクロマチンが存在した (Fig.6, C)。囊胞 (cyst) 内の精子群は，頭部をゼラチン質で固められた精子束の状態規則正しく配列していた (Fig.6, D)。完成精子の構造は，中心部に 2 本の中心小管とその周囲を 2 本 1 組のダブルレット微細小管 9 本が取り囲み，さらにその外側をアクセサリー微細小管 9 本が取り囲んだ $9 + 9 + 2$ の小管構成であり，精子の頭部では電子密度が高い核が存在し，頭部の中心体から鞭毛が形成されて，1 本のミトコンドリア鞘と 1 本の軸糸が平行して尾端近くまで伸張していた (Fig.7)。

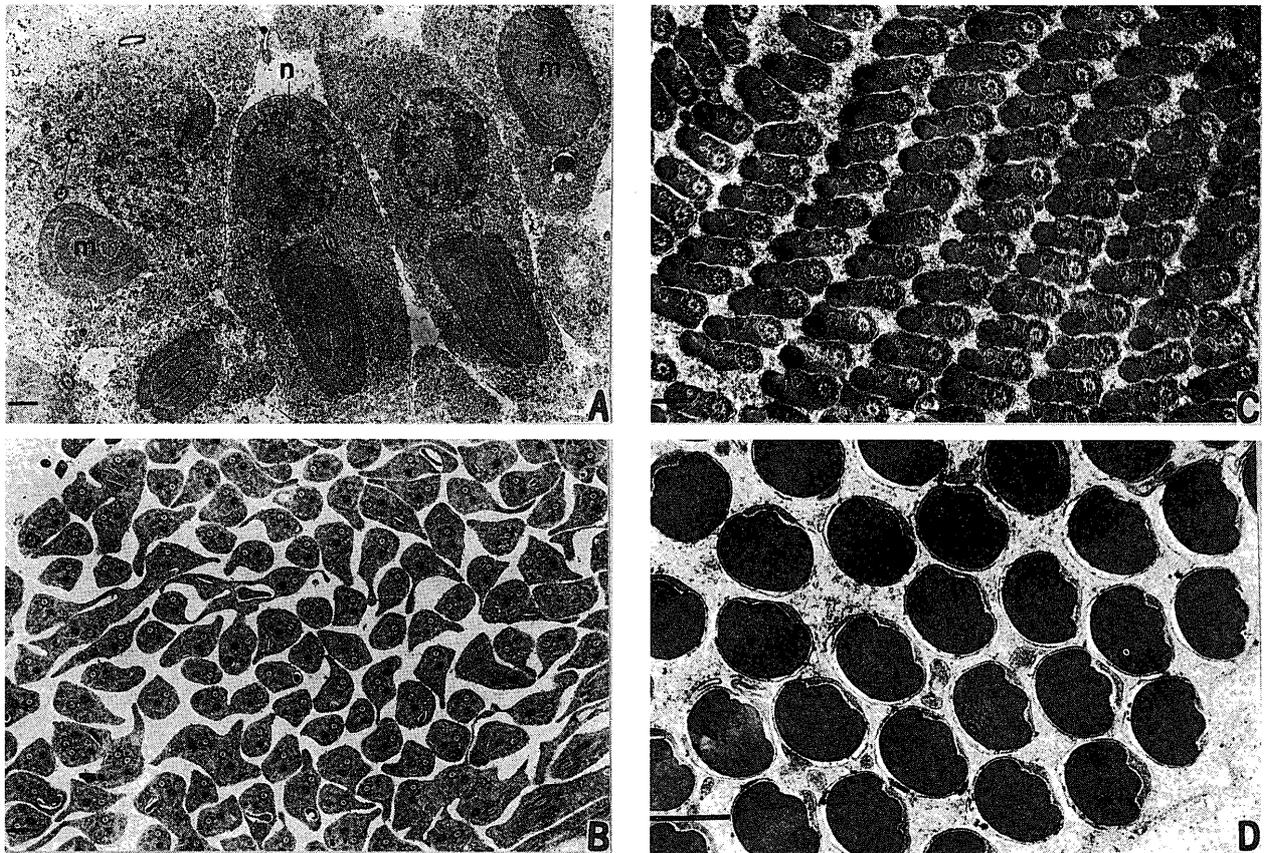


Fig.6. Electron-microscopic feature of spermatogenesis in 14-days old normal adult (scale:1 μ m).

Fig.s A: Spermatocyte, B: young spermatid, .C: Sperm bundle, D: Head part of sperm.

Abbreviation of term in the figures; c:centrioles, m: mitochondria, n: nucleus.

3. 照射虫の精巢の光学顕微鏡観察：

羽化後14日齢の50Gy, 70Gy照射虫の精巢は非照射虫と比べて小型化していた。辜丸小胞の組織像をFig.8, A, Bに示す。50Gy照射では精原細胞と精母細胞は凝縮, 退化しており, 精子束の結合はゆるく, 鞭毛は非照射個体のそれに比べて短く太かった。70Gy照射では精原細胞, 精母細胞の崩壊, 退化が顕著で, 辜丸小胞は空際化していた。50, 70Gy照射虫の貯精囊の組織像をFig.8, C, Dに示す。50Gy照射では貯精囊内に精子が充満していたが, 精子の頭部はヘマトキシリンにより異常に濃染されていた。70Gy照射では貯精囊内の精子数は50Gy照射に比べてかなり減少しており, 精子の頭部は異常に濃染されていた。

4. 照射虫の精巢の電子顕微鏡観察：

70Gy照射虫の精巢では, 精細胞内で核の消失, ミトコンドリア鞘の形態異常, 複数の軸糸の存在が示された (Fig.9, A)。辜丸小胞の転換域の精子内で, 2~4本の軸糸と1本の鞭毛の形成が観察された (Fig.9, B, C)。完成精子の頭部は歪な形状で, 大きさは不均一で核の電子密度は著しく低かった (Fig.9, D)。しかし, 正常な形状の精子も少数存在した。

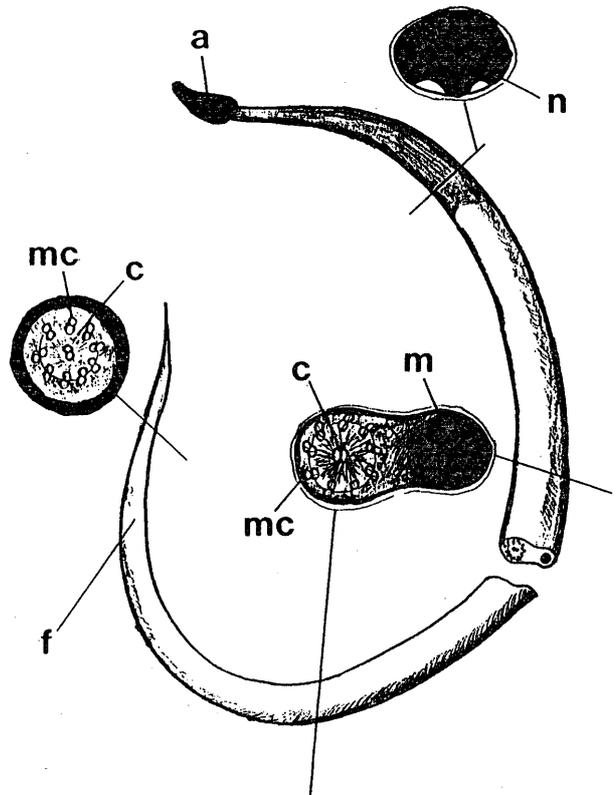


Fig.7. Diagram of spermatozoa. Abbreviation of term in the figure; a:acrosome c:centrioles, f: flagellum, m: mitochondria, mc: microtubule.

考 察

動物精子の微細構造に関して, その形状は様々であることが数多く報告がされている。イモゾウムシの精子は他の動物と同じく鞭毛状で, 成熟精子では電子密度の高い核を持った頭部と, 著しく長く力強い尾部とから形成されており, 頭部と尾部の接続部には中心粒が見られた。尾部は主軸となる1本の鞭毛と, 2本のミトコンドリアのコードから出来ている。多くの動物精子の鞭毛の軸糸には, 対になった2本の中心管を9対のダブルット微小管が取り囲む9+2のパターンをとっている。しかし, 昆虫の精子が変形精子といわれるように, 精子尾部の軸糸では, 中心部にある2本1組となった中心小管の周囲を, 2本1組のダブルット微小管9組が取り囲み, その外側に昆虫特有のアクセサリー微小管9本が円状に配列する9+9+2のパターンが見られた。これはウリミバエ⁸⁾やアリモドキゾウムシ¹³⁾の精子の微細構造の観察結果と一致し, 昆虫全般に共通的な構造と考えられる。

昆虫の精子形成過程における放射線の障害は, まず細胞分裂の盛んな精原細胞であらわれ, ついで精母細胞, 精細胞, 精子の順でみられる。イモゾウムシの成虫2日齢の個体への70Gyの照射によって, 精原細胞や精母細胞の異常を示す電子顕微鏡像が観察され, 精母細胞や精細胞の軸糸が2個や4個のものが多くみられた。このことから, 精原細胞から精母細胞, 精細胞への分化の過程が放射線照射により阻害され, 偶数個の軸糸が残ったものと推測される。また, 精細胞のミトコンドリアについても種々な形態異常が観察されたが, これらは放射線による影響と推測される。ガンマ線照射したアリモドキゾウムシでも, 精原細胞や精母細胞の異常を示す同様な組織像が観察されている¹³⁾。70Gy照射虫の一部に非照射虫と変わらない精子が見られたが, 70Gy照射雄と交尾した非照射雌はほぼ100%の不妊化率を示すことから, 70Gy照射雄で観察された正常な形状の精子は優性致死変異を示すことによって, 正常な受精を阻害しているものと推定される。

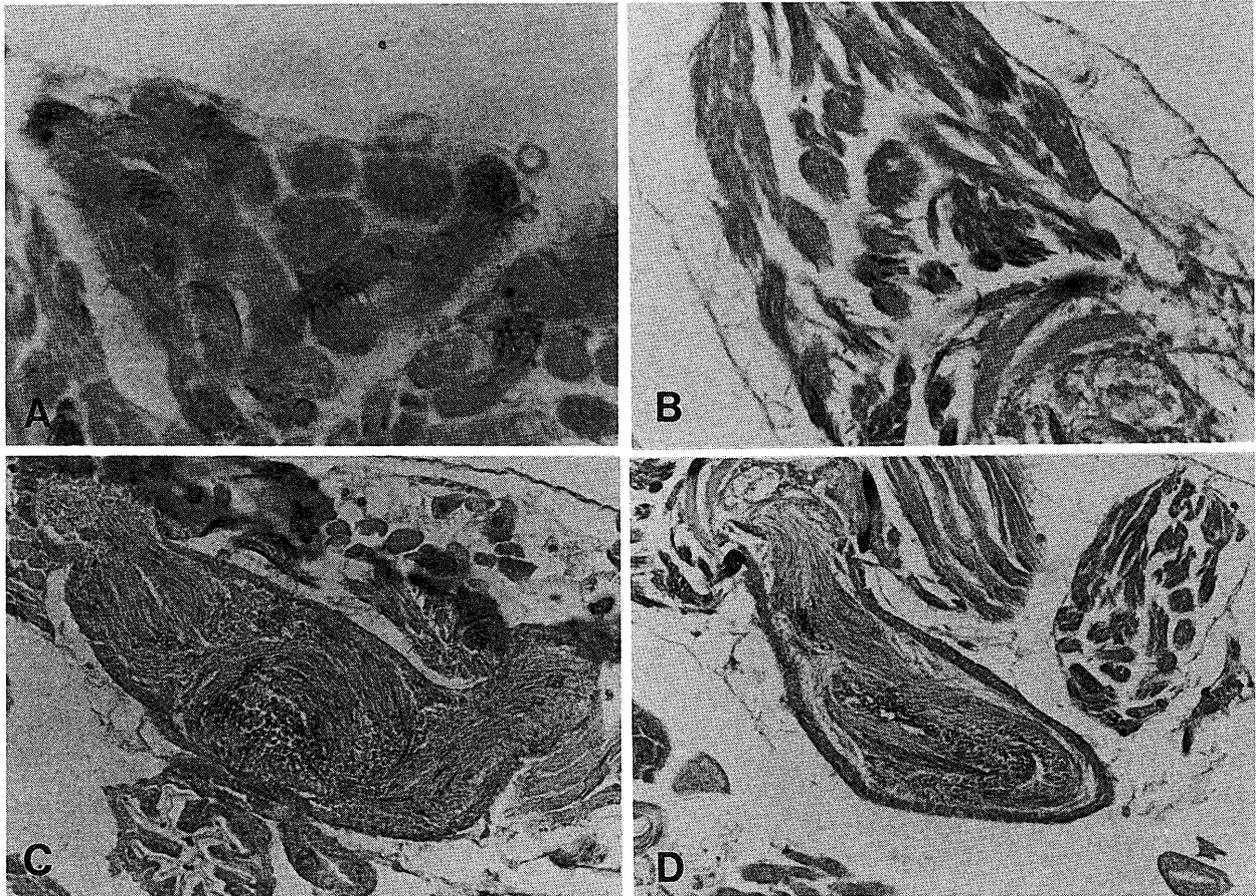


Fig.8. Histological feature of testis in 14-days old adults, irradiated with gamma-rays ($\times 40$).

Figs.A: testicular follicles, 50Gy-irradiated, B: testicular follicles, 70Gy irradiated, C: seminal vesicles, 50Gy irradiated, D: seminal vesicles, 70Gy irradiated.

イモゾウムシに対する放射線不妊化技術確立の上で、体細胞に影響を及ぼさず生殖細胞にのみ影響を及ぼし、効果的に不妊化させることができる条件を確定することが最重要課題である。一般に昆虫の不妊化のためのガンマ線照射の最適条件として考えられることは、照射時期が遅く照射線量が低いほど体細胞への影響は少なく、成虫の生存率は高くなることである。アリモドキゾウムシの不妊化試験では、蛹5日齢(羽化2日前)に50Gy照射により、不妊虫を作成しているが、照射虫の寿命は非照射虫の1/2以下に低下した。本研究のイモゾウムシの精子形成過程についての観察結果では、成虫6日令の精巣では自由精子はまだ形成されていなかった。したがって、6日齢個体に50Gyの低線量を照射し、優勢致死変異を起こす異常精子を生じる不妊雄を作ることにより、寿命低下を防ぐ方法が考えられる。一方、成虫8日令の精巣では自由精子が形成されて、貯精嚢内に精子が少量存在していたことから、8日齢個体に70~90Gyの高線量の照射を行うことにより、不完全不妊の雄を作り、寿命低下を防ぐことも考えられる。イモゾウムシの不妊虫放飼法の実用化を目指す上で、この両条件について防除効果を検討することは重要である。

謝辞：実験に際し御便宜を頂いた沖縄県ミバエ対策事業所の方々に感謝申し上げます。電子顕微鏡観察に際してご便宜を頂いた岐阜大学機器分析センターの村瀬由美子、春日美由紀両技官に感謝申し上げます。本研究の一部は文部省科学研究補助金(No.06454059)の補助を受けて行なった。記して謝意を表する。

引用文献

- 1) 杉本 毅：アリモドキゾウムシの生物学.植物防疫, 44:107-110, 1990.
- 2) 小濱継雄：沖縄におけるアリモドキゾウムシ及びイモゾウムシの侵入の経過と現状. 植物防疫, 44:115-117, 1990.

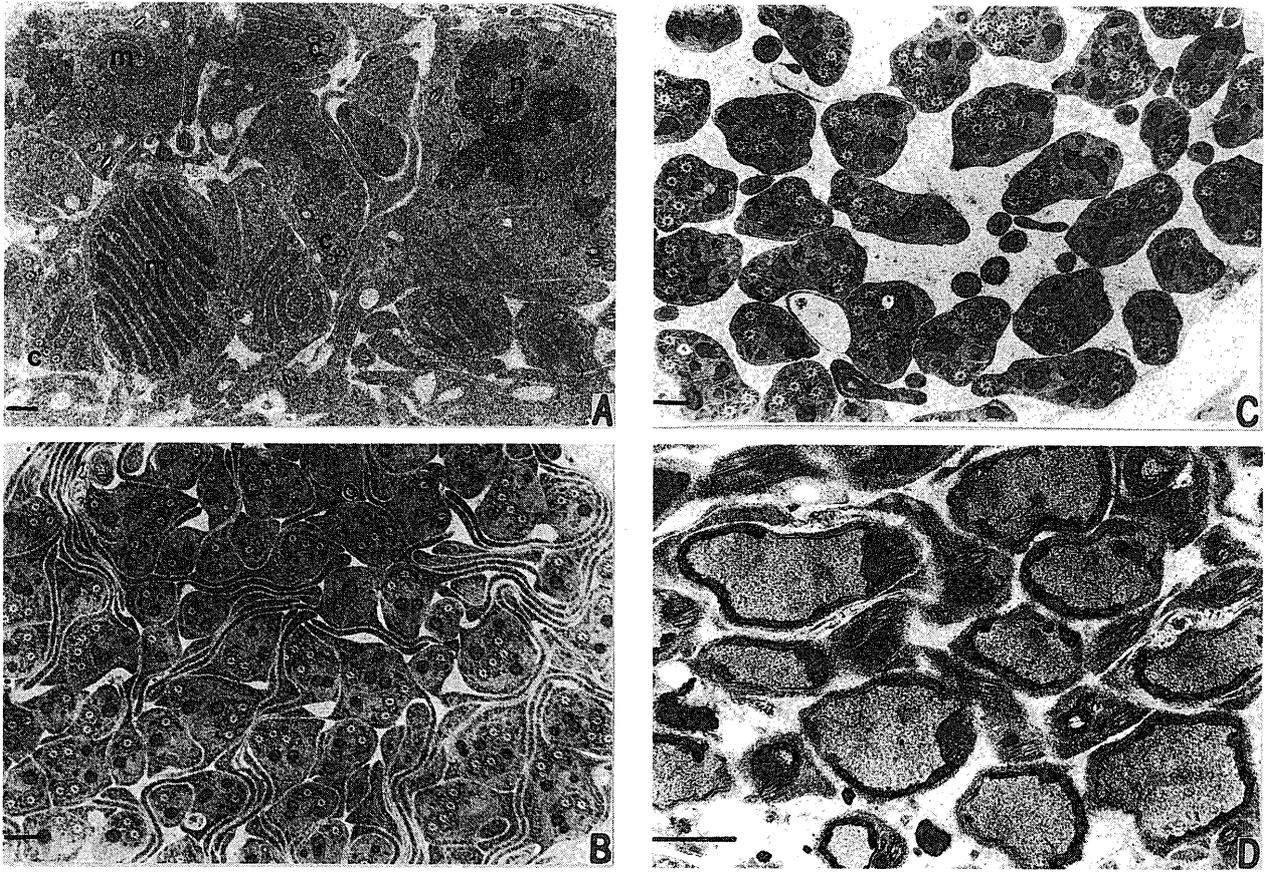


Fig.9. Electron-microscopic feature of spermatogenesis in 14-days old adult, irradiated with 70Gy gamma-rays (scale:1mm).

Fig.s A: Spermatocyte, B, C: young spermatid, D: Heaad part of sperm.

Abbreviation of term in the figures; c:centrioles, m: mitochondria, n: nucleus.

- 3) Akazawa, T., Uritani, T. & Kubota, H.: Isolation of ipomeamarone and two coumarin derivatives from sweet potato roots injured by the weevils, *Cylas foarmicarius elegantulus*. Arch. Biochem. Biophys. 88:150-156, 1960.
- 4) 瀬戸口 修: 奄美群島におけるアリモドキゾウムシの発生生態と防除対策. 植物防疫, 44:111-114, 1990.
- 5) 瀬戸口 修: アリモドキゾウムシの発生生態と性フェロモン利用による防除. 農業技術48:295-299, 1993.
- 6) 安田慶次・杉江 元: アリモドキゾウムシの合成フェロモンの野外での誘引性. 植物防疫, 44:121-123, 1990.
- 7) 岩元順二・荒巻弥弘: ガンマ線照射によるアリモドキゾウムシの不妊化. 植物防疫, 44:124-126, 1990.
- 8) 桜井宏紀・白石礼子・伊藤嘉昭・照屋 匡・武田 享: ウリミバエに対するガンマー線照射の影響. 岐阜大学農研報54:55-69, 1989.
- 9) 小谷康弘・桜井宏紀・照屋 匡・伊藤嘉昭・武田 享: ウリミバエの放射線不妊化の一機構に関する研究. 岐阜大学農研報56:51-57, 1991.
- 10) 桜井宏紀・田畑幸司・照屋匡: ガンマ線照射によるウリミバエ雌の不妊化の機構に関する研究. 岐阜大学農研報60:35-42, 1995.
- 11) 桜井宏紀・田畑幸司・照屋匡・小濱継雄: ガンマ線照射によるウリミバエ雌の不妊化機構の超微形態学的観察. 岐阜大学農研報61:31-38, 1996.
- 12) 桜井宏紀・渡辺博幸・杉本 毅・櫻谷保之・瀬戸口 修・川添幸治: アリモドキゾウムシの配偶子形成に及ぼすガンマ線照射の影響. 岐阜大学農研報59:11-20, 1994.
- 13) 桜井宏紀・土山康彦・和泉省勝・山口卓宏: ガンマ線照射によるアリモドキゾウムシ雄の放射線不妊化の超微形態学的観察. 岐阜大学農研報63:31-36, 1998.
- 14) 佐藤泰山: 医学生物学領域における電子顕微鏡試料の電子染色法. 細胞11:26-36, 1979.