

学 位 論 文 題 名

Studies on artificial insemination of
the silkworm, *Bombyx mori*

（カイコにおける人工授精法とその応用に関する研究）

学位論文内容の要旨

昆虫の人工授精に関しては、ミツバチにおいて精力的に研究がなされ、ミツバチの系統維持、品種改良などに利用されており、この技術は実用技術として確立・体系化され、養蜂業に大きく貢献している。しかし、ミツバチ以外の昆虫については人工授精の研究は極めて少ない。大村（1933）はカイコの人工授精に初めて成功したが、それ以降、人工授精の技術的困難さのため、また、再現性の高い結果が得られなかったため、ほとんど研究の進展がなかった。

本研究では、カイコの簡便かつ確実・安定な人工授精法を開発し、さらに、この人工授精法を用いて、産卵成績に及ぼす諸条件について検討を行った。また、精子の活性化及び凍結保存方法についての諸条件の検討を行った。本研究の概要は以下の通りである。

1. カイコの人工授精法の開発

窒素ガスポンペ、圧力調整器、足踏みスイッチ、三方電磁弁、キャピラリーから構成したカイコの人工授精装置を開発し、カイコの人工授精を行った。この方法は簡易で成功率が高く、自然交尾の場合と全く同等の産卵数と受精卵率を得ることができた。雄蛾貯精囊から採取した精液と前立腺分泌液の混合精液および交尾した雌蛾交尾囊から採取した精液を雌蛾に人工授精することにより得られた受精卵は、正常の孵化能力を持ち、次代蚕の飼育成績も対照区と変わらないことも確認された。

2. カイコ精子の活性化

雄蛾貯精囊から採取した精液だけでは受精卵を得られず、前立腺分泌液を加えることにより精子は受精能を持つ。貯精囊精液のみを人工授精した場合、雌蛾交尾囊内で有核精子束は解離されず、受精卵の産下はなく、不受精卵の産卵数も少なかった。これに対し、貯精囊精液と前立腺分泌液との混合液では、これをグレース昆虫培地で2倍に希釈し人工授精しても自然交尾と同様の産卵性が得られた。それ以上に精液を希釈すると産卵数、受精卵率とも希釈倍率に反比例して低下した。また、受精卵率は、雌蛾受精囊内の精子量と密接に関係し、両者は正比例した。希釈液として、グレース昆虫培地以外に数種を用いたが、希釈液間に大きな差異は認められなかった。

貯精囊精子への運動性賦与ならびに受精能活性化にはトリプシン添加が有効であり、

活性化のための最適濃度は、 $0.3 \mu\text{g/ml}$ であった。トリプシン以外のプロテアーゼやコハク酸を、貯精囊精液に添加しても精子の運動性や精子束解離に有効であったが、受精能を獲得させることはできなかった。

3. 超低温下に保存したカイコ精子による人工授精

凍結保護剤として5%ジメチルスルホキシドを用いて精子の凍結保存法について検討した。この場合、精子を -80°C のディープフリーザーで冷却・凍結し、以後、液体窒素内で -196°C に凍結する方法をとった。この方法で凍結保存した精子はこれを人工授精することにより自然交尾させたものと同様の産卵性を得ることができた。凍結精子の受精能は、 -80°C までの冷却速度に強く依存し、 45°C/min. が最適速度であることが判った。許容範囲は、 $5\sim 65^{\circ}\text{C/min.}$ である。精子を直接液体窒素に投入して凍結させると精子束は切断されてしまい、受精卵率は0%となった。5%ジメチルスルホキシドの存在下で、凍結保存温度が -80°C の場合には、保存限界は65日以内であったが、 -196°C では356日間凍結保存しても、人工授精により自然交尾と同様な産卵数と受精卵率を得ることができた。また、有核精子を凍結前に解離させるとその解離程度により凍結後の人工授精による産卵数、受精卵率が著しい影響を受けた。このことから、精子の凍結耐性は、精子束の形で維持されることが明らかになった。

次に第2白卵系統の精子と正常卵色（黒色）系統の精子を混合し、これを第2白卵系統の雌蛾に人工授精し、二種の精子間に受精競争を行わせることにより、両系統の精子間の受精能力の相違を判定することが可能となった。この方法を用いて、凍結された場合に精子が受ける障害度を調べたところ、凍結精子をそのまま第2白卵の雌蛾に人工授精した場合には、産下卵は正常色で産卵数や受精卵率に特に異常は認められなかったにもかかわらず、凍結精子と第2白卵の無凍結精子を混合して人工授精を行った場合には、凍結精子による正常着色卵の割合が著しく低下することが認められた。

4. 人工授精法の応用に関連した2、3の問題

雄蛾の冷蔵による影響を人工授精を用いて調査した。その結果、 5°C に2ヶ月間冷蔵したことにより交尾不能となった雄蛾から採取した精子を人工授精した場合でも産卵性や受精能力とも無冷蔵・自然交尾のものと変わらなかった。しかし、2ヶ月間冷蔵した雄蛾の精子を、第2白卵系統精子と混合して受精競争させた場合には、明らかに受精能の低下を認めることができた。

羽化前日の雄蛹を 5°C に2ヶ月間冷蔵した雄蛹は全く羽化しなかった。しかしその蛹の精子を人工授精すると、正常の産卵性を示した。このことから、雄蛹や雄蛾の長期冷蔵によって、精子は受精能力を維持するが、徐々に冷蔵障害を受け、受精能力が減退していることが明らかとなった。

精子の凍結耐性に関して品種間差異が認められるか否かを明らかにするため、交雑種と原種とを比較した。無凍結精子の人工授精については、両者の間に産卵性に関し特に影響は認められなかったが、凍結精子を人工授精した場合には、交雑種は自然交尾の場合と比べ産卵性は変わらなかったが、原種では、産卵性が劣った。即ち、原種の精子では凍結耐性が交雑種より弱いことが判明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 塚 敏 彦

副 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 教 授 清 水 弘

学 位 論 文 題 名

Studies on artificial insemination of the silkworm, *Bombyx mori*

(カイコにおける人工授精法とその応用に関する研究)

本論文は、図 5、表 28、引用文献 64 を含み、5 章からなる総頁 115 の和文論文である。別に参考論文 6 編が添えられている。

昆虫の人工授精に関しては、ミツバチにおいて精力的に研究がなされ、ミツバチの系統維持、品種改良などに利用されており、この技術は実用技術として確立・体系化され、養蜂業に大きく貢献している。しかし、ミツバチ以外の昆虫については人工授精の研究は極めて少ない。大村（1933）はカイコの人工授精に初めて成功したが、それ以降、人工授精の技術的困難さのため、また、再現性の高い結果が得られなかったため、ほとんど研究の進展がなかった。

本研究では、カイコの簡便かつ確実・安定な人工授精法を開発し、さらに、この人工授精法を用いて、産卵成績に及ぼす諸条件について検討を行った。また、精子の活性化及び凍結保存方法についての諸条件の検討を行った。得られた結果の概要は下記の通りである。

1. カイコの人工授精法の開発

DNA微量注射装置を改良したカイコの人工授精装置を開発し、カイコの人工授精を行った。この方法は簡便で成功率高く、自然交尾の場合と全く同等の産卵数と受精卵率を得ることができた。雄蛾貯精囊から採取した精液と前立腺分泌液の混合精液および交尾した雌蛾交尾囊から採取した精液を雌蛾に人工授精することにより得られた受精卵は、正常の孵化能力を持ち、次代蚕の飼育成績も対照区と変わらないことも確認された。

2. カイコ精子の活性化

雄蛾貯精囊から採取した精液だけでは受精卵は得られず、前立腺分泌液を加えることにより精子は受精能を持つことが確認された。貯精囊精液と前立腺分泌液との混合液をグレース昆虫培地で2倍に希釈し人工授精しても自然交尾と同様の産卵性が得られた。それ以上に精液を希釈した場合には産卵数、受精卵

率とも希釈倍率に反比例して低下した。また、受精卵率は、雌蛾受精嚢内の精子量と密接に関係し、両者は正比例した。

貯精嚢精子への運動性賦与ならびに受精能活性化にはトリプシン添加が有効であり、活性化のための最適濃度は、 $0.3 \mu\text{g/ml}$ であった。

3. 超低温下に保存したカイコ精液による人工授精

凍結保護剤として5%ジメチルスルホキシドを用いて精液の凍結保存法について検討した。この場合、精液を -80°C のディープフリーザーで冷却・凍結し、以後、液体窒素内で -196°C に凍結する方法をとった。この方法で凍結保存した精液はこれを人工授精することにより自然交尾させたものと同様の産卵性を得ることができた。凍結精液の受精能は、 -80°C までの冷却速度に強く依存し、 $45^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ が最適速度であることが判明した。凍結保存温度が -80°C の場合には、保存限界は65日以内であったが、 -196°C では356日間凍結保存しても、人工授精により自然交尾と同様な産卵数と受精卵率を得ることができた。

次に第2白卵系統の精子と正常卵色（黒色）系統の精子を混合し、これを第2白卵系統の雌蛾に人工授精し、二種の精子間に受精競争を行わせることにより、両系統の精子間の受精能力の相違を判定することが可能となった。また、この方法を用いて、凍結された場合に精子が受ける障害度も調査することが可能となった。

4. 人工授精法の応用に関連した2、3の問題

5°C に2ヶ月間冷蔵したことにより交尾不能となった雄蛾から採取した精子を人工授精した場合でも産卵性や受精能力とも無冷蔵・自然交尾のものと変わらなかった。しかし、2ヶ月間冷蔵した雄蛾の精子を、第2白卵系統精子と混合して受精競争させた場合には、明らかに受精能の低下を認めることができた。

羽化前日の雄蛹を 5°C に2ヶ月間冷蔵した雄蛹は全く羽化しなかった。しかしその蛹の精子を人工授精すると、正常の産卵性を示した。

精子の凍結耐性に関して品種間差異が認められるか否かを明らかにするため、交雑種と原種とを比較した。無凍結精子の人工授精については、両者の間に産卵性に関し特に影響は認められなかったが、凍結精子を人工授精した場合には、交雑種は自然交尾の場合と比べ産卵性は変わらなかったが、原種では、産卵性が劣った。

以上のように本研究は、カイコの人工授精装置の開発により、簡便、容易に人工授精を可能にするとともに、精液の長期凍結保存法を確立した。また、カイコ系統間の精子間競争等従来学問的に不明であった問題の解決を可能にした。このことは、学術的にも養蚕業への応用についても貢献するものである。

よって審査員一同は、竹村洋子が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。