

オオクロヤブカ *Armigeres subalbatus* の精子に及ぼす dichlorvos の微細形態学的影響

岡山大学医学部寄生虫学教室（指導：稲臣成一教授）

頼 俊 雄

（昭和57年4月1日受稿）

Key Words: *Armigeres subalbatus*,
dichlorvos, ultrastructure,
abnormal spermatozoa, incidence

序 文

蚊の微細形態については Clements and Potter¹⁾, 頼宮ら²⁻⁵⁾, 村主ら^{6,7)}, Meola and Lea⁸⁾, Ramalingam and Graig, Jr.⁹⁾, McIver and Siemicki¹⁰⁾, 北田ら¹¹⁾が報告して来た。すなわち, Clements and Potter¹⁾ と頼宮ら^{2,5)}らは蚊の精子について報告しているが Clements and Potter は雌の受精嚢内の精子に関して, 又, 頼宮ら⁵⁾は *Aedes aegypti* の雄の付属腺内の精子について部分的に記載している。特に頼宮ら²⁾ はアカイエカ *Culex pipiens pallens* の精巣内の精子についての形態を電顕レベルで観察し, その結果を模式化している。しかし奇型精子の存在については触れていない。著者はオオクロヤブカ *Armigeres subalbatus* の雄成虫の貯精嚢を観察し, 正常な状態で室内飼育されている蚊の奇型精子の発生率を観察した。更に現在多く使用されている有機燐剤系の殺虫剤 dichlorvos (DVP) が精子形成に関して如何に影響を及ぼすかを観察した。

材料及び方法

材料のオオクロヤブカ *Armigeres subalbatus* は神奈川県で採集後, 実験室内で27°C, 湿度80%の条件の下に160代継代飼育して来たものを用いた。

コントロールの蚊の奇型精子発生率

羽化後3日目の雄成虫10個体の貯精嚢を観察した。貯精嚢は Earle's solution 中で蚊を解剖

し取り出した。直ちに3.5%の冷グルタルアルデヒド（燐酸緩衝液でpH 7.4, 0.1M）で2時間前固定し, 同じ緩衝液で3回洗浄の後, 1%オスミウム（燐酸緩衝液pH 7.4, 0.1M）で1時間以上固定した。二重固定の後, アルコールで脱水し, グリシジルエーテルを通してエポン樹脂に包埋した。貯精嚢は Porter-Blum の超ミクロトームを用いて中央部で横断切片とした。これを酢酸ウラニールと水酸化鉛で二重染色し, 日立 HS-8 型電子顕微鏡で観察した。1枚の横断切片には2個の貯精嚢管腔が出現するが, この内の1個の管腔内の精子を形態的に観察し, 奇型と正常型とを分けてそれぞれの総数を計算した。奇型の判定には精子の横断像でミトコンドリアと鞭毛の数に増減のあるものを奇型精子とした。従って精子頭部の核域, 尾部末端の鞭毛だけの部位, 更に縦断像はこの区別が出来ないため計算から除外した。更に精子の他, 貯精嚢壁の処見も付加えた。

4 令幼虫を dichlorvos (DDVP) に24時間浸漬時の LC-50 値

DDVP (dichlorvos, O,O-dimethyl O-(2,2-dichlorovinyl) phosphate) は市販の50%乳剤を使用した。こし高シャーレに0.150 ppm から0.311 ppm (0.150, 0.180, 0.216, 0.259, 0.311 ppm) まで1.2倍希釈の5段階の濃度を設定し, この中に4令幼虫を各シャーレに25匹ずつ24時間浸漬した。生死の判定は完全に底に沈んで動かないもの, あるいは底に沈んでわずかに運動しているものは死と判定した。LC-50 値は Lit-

Table 1. Numbers of normal and abnormal spermatozoa in the vesicles of each of 10 control mosquitoes (Counts taken from one side of the double-lumen of a cross-section)

SV	F M	1					2							3	4	Total		Abnormal incidence (%)				
		1	2 (normal)	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	1	3	5		0	3	Examined	Abnormal
I		165	8.777	256	25	3		6	4	4	1									9.241	464	5.02
II		131	5.026	106	9			2	31	19	10	1								5.335	309	5.79
III		63	4.733	16	2			5	39	29	3				2	3	1			4.896	163	3.32
IV		32	2.732	34	2				5	2										2.807	75	2.67
V		110	3.141	81	7	2	1	8	34	41	16	2	1	1			1	1		3.447	306	8.87
VI		53	4.518	82	1				5	4	3									4.666	148	3.17
VII		138	6.047	115	2				6	6										6.314	267	4.22
VIII		62	5.936	32	1				17	9										6.057	121	1.99
IX		49	3.769	43					3	6										3.870	101	2.60
X		22	2.815	188	4			1	1	1	4									3.036	221	7.27
Total		825	47.494	953	53	5	1	16	147	121	40	1	3	1	3	3	1	1	1	49.669	2,175	4.37

F : flagella, M : mitochondria, SV : seminal vesicles

chfield-Wilcoxon 法¹²⁾を用いて計算した。

dichlorvos (DDVP) による奇型精子の発生率

4 令幼虫を先に決定した LC-50 値の DDVP

(0.201 ppm) を加えたシャーレに入れて24時間浸漬し、その後正常な水にもどして飼育した。

羽化後3日目の雄成虫の貯精嚢をコントロール蚊と同様の方法で観察し、精子の総数とその中の奇型精子の数を計算した。ただしここでは2個の貯精嚢管腔内の精子を総て計算した。

結 果

コントロールの蚊の精子の形態と奇型精子の発生率

蚊の正常な精子の形態は頭部に電子密度の高い核 (Fig. 5, N) があり、この核の後端より1本の鞭毛 (Fig. 5, C) が長く尾端まで走っている。更に2本の棒状のミトコンドリア (Fig. 5, M) がやはり核後端より鞭毛の両側にそって尾端近くまでのびている。しかし奇型の精子 (Figs. 4, 5, 6, 7, 矢印) はミトコンドリア又は鞭毛の数に増減がみられる。これらコントロールの蚊10個体に於る精子の総数と奇型精子の発生率については Table I に示した。又奇型精子の形態は Figs. 4, 5, 6, 7 (矢印) に示した。1 切片中の精子総数は1管腔内だけで最少は2,807個、最高は

9,241個であった。10個体を平均すると4,967個になった。鞭毛の数は1本から最高4本までみられ、ミトコンドリアは0本から最高7本の精子があった。最も多い奇型精子は鞭毛が1本でミトコンドリアが1本と3本のもので全体の82%であった。次に多いのは鞭毛が2本でミトコンドリアは2本と3本のもので、全体の12%であった。鞭毛が4本のはわずかに0.09%みられ、ミトコンドリアが6本あるいは7本のものもそれぞれ0.2%と0.05%にすぎなかった。これら奇型精子の発生率は最低がNo.VIIIの1.99%、最高はNo.Vの8.87%であり、10個体の平均では4.37%の奇型精子発生率を示した。又貯精嚢壁は一層の細胞 (Fig. 3) で、それを環状筋 (Fig. 3, M) が取囲んでいる。

4 令幼虫を dichlorvos (DDVP) に24時間浸漬した時の LC-50 値

4 令幼虫を DDVP に24時間浸漬した時の LC-50 値は Litchfield-Wilcoxon 法¹²⁾を用いて計算すると0.201 ppm となった。

dichlorvos (DDVP) による奇型精子の発生率

0.201 ppm の濃度の DDVP 中に4令幼虫を24時間浸漬し、その後通常の水にもどして羽化した成虫10個体の奇型精子の総数及びその発生率は Table II に示した。又その奇型精子の形態

については Figs. 8, 9, 10, 11, 12 (矢印) に示した。Fig. 1 は DDVP で処理した虫体の貯精囊全体の中央部での横断切片を示している。10個の貯精囊内の精子総数も両管腔を計算して平均 3,378個でコントロール (1 管腔で平均 4,967個) に比べ減少しており、そのため Table II では両管腔内の精子を計算してある。更に貯精囊壁の細胞も肥厚して細胞質内は空胞化 (Fig. 2, V) が顕著である。DDVP 処理の精子はコントロールに較べると鞭毛及びミトコンドリアの数が異常に増加し、鞭毛は最高 6 本、ミトコンドリアは 11 本のものも観察される。しかし最も多い奇型精子はやはりコントロールと同じく鞭毛が 1 本で、ミトコンドリアが 1 本 (Fig. 10) と 3 本 (Fig. 9) の精子である。これは総奇型精子の 72% を占めている。次に多いのは鞭毛を 2 本有する奇型精子で、奇型精子全体の約 21% を占めている。鞭毛数が多くなる程少なくなり、3 本では 29 個で 0.4%、4 本では 8 個で 0.1%、5 本では 5 個で 0.07%、6 本のものはわずかに 1 個で 0.02% 弱にすぎない。ミトコンドリアの数も最高の 11 本になると 1 個しか認められない。DDVP 処理の奇型精子発生率は最低でも No. IV の 8.11%、最高では No. I の 29.3% となっており、10 個体の平均は 19.1% である。これはコントロールの平均 (4.37%) と比較すると約 4.4 倍の増加を示しており、DDVP 処理のものは明らかに形態的奇型の振幅が大きいことを示した。

考 察

正常な蚊の精子の形態については頓宮ら²⁾ が継代飼育のアカイエカ *Culex pipiens pallens* について電子顕微鏡で観察している。それによると頭部は電子密度の高い核からなり核後端より 1 本の鞭毛が長い尾端にまで達していて、更にコード状のミトコンドリアが鞭毛と平行して尾端近くまで走っている。しかし奇型精子の存在については触れてはいない。今回用いた材料は継代飼育のオオクロヤブカ *Armigeres subalbatus* であるが、形態的には頓宮ら²⁾ の報告したアカイエカ *Culex pipiens pallens* のものと変るところはない。奇型精子に関しては、奇型と正常の区別は精子の横断像で観察してミト

コンドリアと鞭毛の数に異常のあるものを奇型とみなした。従って頭部、尾端又は縦断像からは形態的に判別出来ないため、これらは計算より除外している。そのため核等に異常のある奇型精子を加えるならば真の奇型精子の発生率はもっと高くなる筈である。コントロールの 10 個体の内最も低率なものは No. VIII の 1.99% で、最高は No. V の 8.87%、これらを平均すると 4.37% となった。これで見ると個体差もかなりあるように思われる。更に蚊の種類、生息地等によってもその発生率は異なってくるのではないかと考えられる。

今回用いた殺虫剤 dichlorvos (DDVP) は有機燐系殺虫剤として現在広く用いられており、その殺虫力は最も強いと言われ、アカイエカ成虫で LC-50 は 0.0039 μg (水谷、鈴木¹³⁾)、幼虫で LC-50 は 0.029 ppm (水谷、鈴木¹³⁾) を示している。蚊の殺虫剤低抗性に関する研究は他に池庄司ら¹⁴⁾、水谷、鈴木¹⁵⁾、Moriya et al.¹⁶⁾、安富ら^{17,18)} が行なっているが、池庄司ら¹⁴⁾ によれば *A. subalbatus* は *A. aegypti* や *C. pipiens pallens* に比べ薬剤に対する感受性が高いようだと述べている。オオクロヤブカの DDVP に対する効力試験は成虫に対する水谷、鈴木¹⁵⁾ の報告があるのみである。今回オオクロヤブカの 4 令幼虫に対する LC-50 値を求め、これを基準量として 4 令幼虫を 24 時間浸漬して、成虫の奇型精子発生率の変化を観察した。Table II に示したように鞭毛あるいはミトコンドリアの本数が最高それぞれ 6 本と 11 本に増えている。発生率も最低は No. IV の 8.11% とコントロールの最高値とほぼ同じであるが、最大は No. I の 29.3% と非常に高くなっている。10 個体の平均値をみても 19.1% でコントロールに比較し約 4.4 倍の奇型精子発生率を示している。これらの値は最小二乗法で検定してみると 99% の信頼幅で有意の差を持っている。従来有機燐剤は昆虫の神経伝達に重要な役割を担っているコリンエステラーゼの活性を阻害し、神経組織にアセチルコリンの蓄積を生じてその機能を攪乱するといわれ、その結果興奮、麻痺を起こして体内の生理的障害により致死せしめる (林、加納⁹⁾) とされて来た。蒲生、栗林²⁰⁾ によると有機燐系殺虫剤の

Table II. Numbers of normal and abnormal spermatozoa in the vesicles of each of 10 (Counts taken from both sides of the double-lumen of a cross-section)

SV	F M	1									2							
		1	2 (normal)	3	4	5	6	7	9	11	0	1	2	3	4	5	6	7
I		239	1,940	317	115	43	11	8	1	1	7	12	13	13	7	2		
II		548	2,760	51	1						1	6	2					
III		105	2,628	245	25	2	1				26	183	223	140	20	2		
IV		111	4,599	155	16						3	30	65	19	4			
V		228	1,236	70	7	2					8	38	37	12	2		1	
VI		181	1,925	507	49	8	2				2	9	9	8	5	1	1	
VII		155	3,165	285	25						1	3	46	36	4			
VIII		244	4,135	498	28	6						31	36	24	4		1	
IX		337	3,061	207	2	1					2	2	25	12	3	1		
X		74	1,881	94	18	5					5	66	82	74	7	2		
Total		2,222	27,330	2,429	286	67	14	8	1	1	2	55	423	529	329	54	7	3

F : flagella, M : mitochondria, SV : seminal vesicles

カイコ卵の胚致死を導く原因として排泄されずに体内に残留するものが卵形成の過程で卵内に取り込まれ、産下後も消失することなく残留し、神経系が発達する胚末期においてコリンエステラーゼ活性を阻害して胚致死を導くと推論している。今回の実験結果から蚊の幼虫期の DDVP への浸漬により、精原細胞からの精子形成期に薬剤に暴露されることによって明らかに精子形成に異常を起こすことが解った。更に精子の総数も10個体平均で3,378個(両管腔計算)でコントロールの平均4,967個(1管腔計算)に比べて非常に減少している。これは精子形成そのものも阻害されている事を示している。又、貯精囊壁は厚くなり、細胞質にも空胞化が顕著に認められる。精子の減少や奇型化はこれらが受精の際、たとえ受精しても健全な胚の発育には至らないものと考えられる。従って蚊の産卵率及び孵化率までも調査すれば恐らく減少しているのではないかと推定される。

ま と め

オオクロヤブカ *Armigeres subalbatus* の精子に及ぼす dichlorvos (DDVP) の影響を電子顕微鏡で観察した。使用した蚊は 160代実験室内で継代飼育したものを用いた。4令幼虫を DD

VP の 0.201 ppm 混入した水で24時間飼育し、後正常な水で飼育、羽化後3日目の雄の貯精囊を中間部で1枚の横断切片とした。この中に出現する精子の内、ミトコンドリアと鞭毛の数に異常のあるものを奇型精子とした。正常な精子はミトコンドリアが2本で鞭毛が1本であるが、奇型の精子では最高ミトコンドリアが11本、鞭毛が6本のものが観察された。DDVP 処理の10個体の奇型精子の発生率は最低が8.11%で最高は29.3%の高率を示した。平均では19.1%の奇型率でコントロールの平均4.37%の約 4.4倍であった。又貯精囊の両管腔内の精子総数を計算したにもかかわらずその総数は10個体の平均で3,378個にすぎず精子総数もコントロールに比べ減少している。その他貯精囊壁自体も非常に厚くなり、細胞質中には多くの空胞化が認められた。今回の実験で DDVP が蚊の精子形成に影響を及ぼしている事が判明した。

謝 辞

この研究にあたって、終始懇切なる御指導を賜った岡山大学の稲臣成一教授並びに頼宮廉正助教授、安治敏樹助手、香川医科大学の村主節雄助教授に又技術的な御援助を戴いた板野一男技官、山本友子技術員に謝意を表します。

mosquitoes treated with DDVP

3								4							5			6	Total		Abnormal incidence (%)
0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	4	5	6	10	3	4	6	3	Examined	Abnormal	
1 2 1 2 1								1 1 2											2,744	804	29.30
																			3,369	609	18.07
2 1																			3,603	975	27.06
2																		1	5,005	406	8.11
1	1	2	3		1	1		1 1							1				1,653	417	25.22
								1 1											2,709	784	28.94
2 1								1 1											3,725	560	15.03
1 1															1 1				5,011	876	17.48
1															1				3,655	594	16.25
															1				2,309	428	18.53
1	4	5	10	3	2	2	1	1	1	1	1	1	2		2	1	2	1	33,783	6,453	19.10

文 献

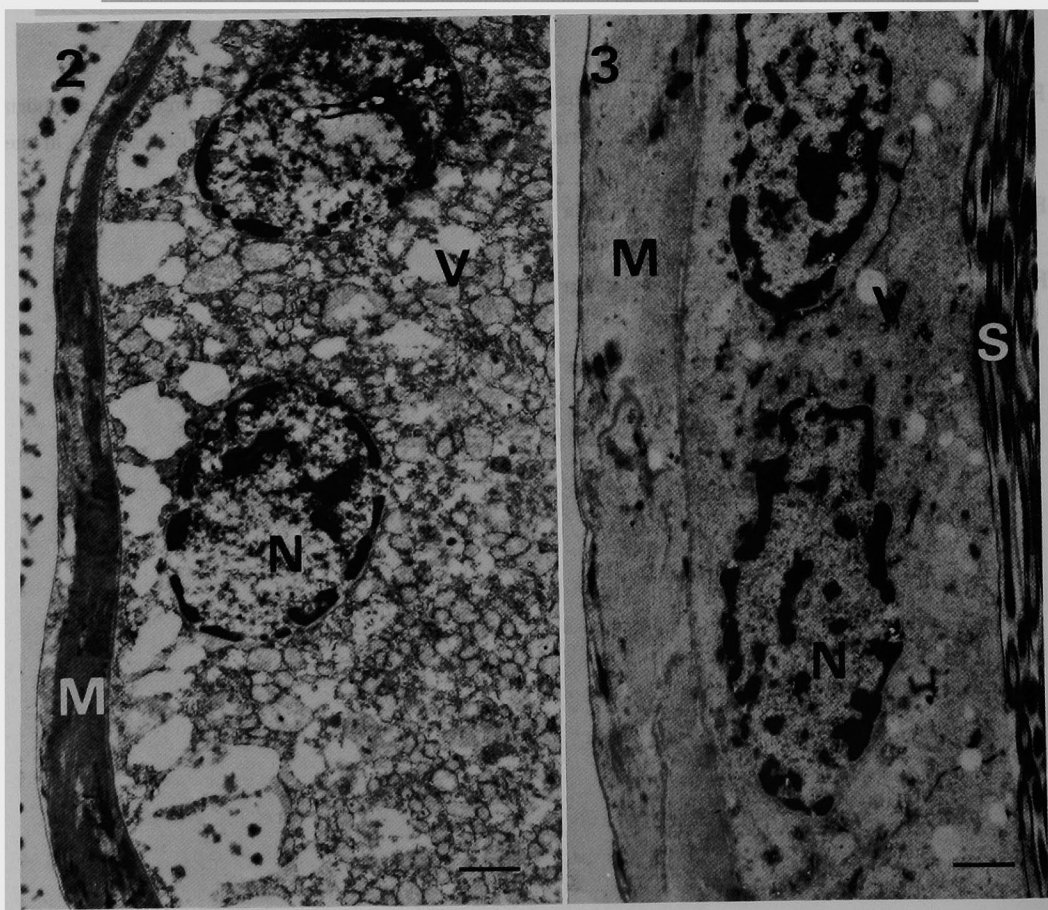
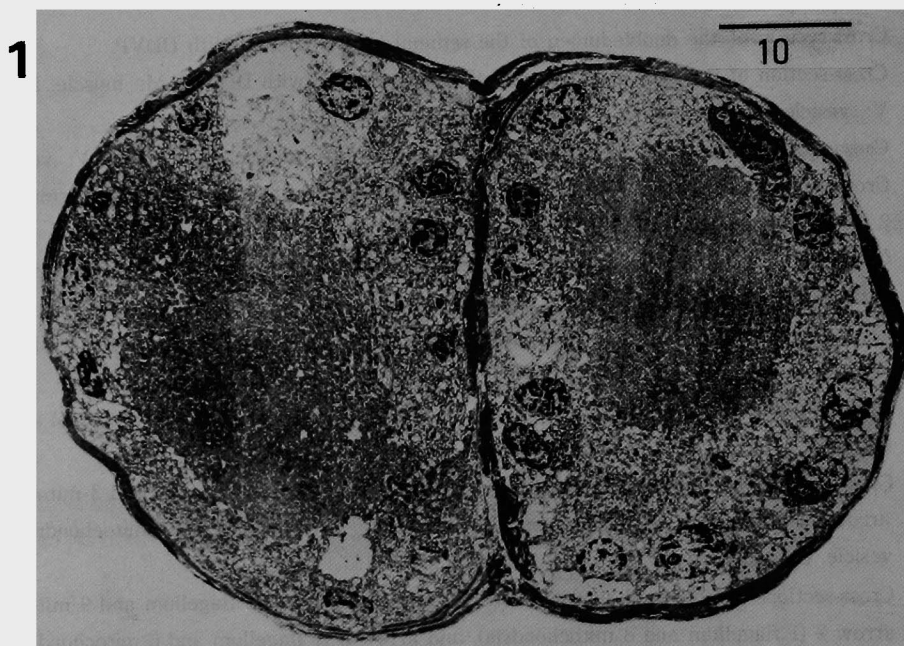
1. Clements, A.N. and S.A. Potter : The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **13**, 1825—1836, 1967.
2. 頓宮廉正, 村主節雄, 板野一男, 作本台五郎, 稲臣成一 : 蚊の微細構造. 1. アカイエカの精子について. 衛生動物, **19**, 215—222, 1968.
3. 頓宮廉正, 村主節雄, 作本台五郎, 板野一男, 稲臣成一 : 蚊の微細構造. 3. ネツタイシマカの後腸について. 衛生動物, **20**, 168—176, 1969.
4. Tongu, Y., Suguri, S., Sakumoto, D., Itano, K. and S. Inatomi : The ultrastructure of mosquitoes. IV. Flight muscle of *Culex pipiens pallens*. *Research in Filariasis and Schistosomiasis*, **2**, 43—49, 1972.
5. Tongu, Y., S. Suguri, D. Sakumoto K. Itano and S. Inatomi : The ultrastructure of mosquitoes. VI. Male accessory gland of *Culex pipiens pallens*. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **23**, 129—139, 1972.
6. 村主節雄, 頓宮廉正, 板野一男, 作本台五郎, 稲臣成一 : 蚊の微細構造. 2. アカイエカのマルピギー氏管の構造. 衛生動物, **20**, 1—6, 1969.
7. Suguri, S., Tongu, Y., Sakumoto, D., Itano, K., and Inatomi, S. : The ultrastructure of mosquitoes. V. Salivary gland of *Culex tritaeniorhynchus*. *Research in Filariasis and Schistosomiasis*, **2**, 51—65, 1972.
8. Meola, S.M. and A.O. Lea : The ultrastructure of the corpus cardiacum of *Aedes sollicitans* and the histology of the cerebral neurosecretory system of mosquitoes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **18**, 210—234, 1972.
9. Ramalingam, S. and G.B. Craig, Jr. : Fine structure of the male accessory glands in *Aedes triseriatus*. *J. Insect Physiol.* **24**, 251—259, 1978.
10. McIver, S. and Siemicki, R. : Fine structure of antennal sensilla of male *Aedes aegypti* (L.). *J. Insect Physiol.* **25**, 21—28, 1979.

11. 北田仁一, 松谷幸司, 松本 昭: トウゴウヤブカ (*Aedes togoi*) 幼虫尾葉の微細構造. 衛生動物, **32**, 17—22, 1981.
12. Litchfield, J.T. and F. Wilcoxon: A simplified of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **96**, 99, 1949.
13. 水谷 澄, 鈴木 猛: アカイエカに対する各種殺虫剤の効力比較. 衛生動物, **13**, 56—63, 1962.
14. 池庄司敏明, 平社俊之助, 鈴木 猛: 数種の蚊幼虫に対する各種殺虫剤の LC-50 と低抗性の検討. 衛生動物, **9**, 302—307, 1958.
15. 水谷 澄, 鈴木 猛: 各種蚊の幼虫及び成虫の殺虫剤感受性に関する1962年の成績. 衛生動物, **14**, 89—91, 1963.
16. Moriya, K., T. Yabe and Harada, F: Resistance levels in larvae of *Culex tritaeniorhynchus sum-morosus* day in Kanagawa prefecture. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **20**, 161—167, 1969.
17. 安富和男: 各種昆虫の殺虫剤に対する抵抗性の研究, 第7報, 抵抗性の相乗作用について. 衛生動物, **11**, 202—205, 1960.
18. 安富和男: 殺虫剤および重金属の昆虫に与える影響. 遺伝, **34**, 37—41, 1980.
19. 林 晃史, 加納六郎: 家庭用殺虫剤学概論, 北隆館, 東京, pp.108, 1974.
20. 蒲生卓磨, 栗林茂治: 農薬のカイコにおよぼす慢性影響. 遺伝, **34**, 29—36, 1980.

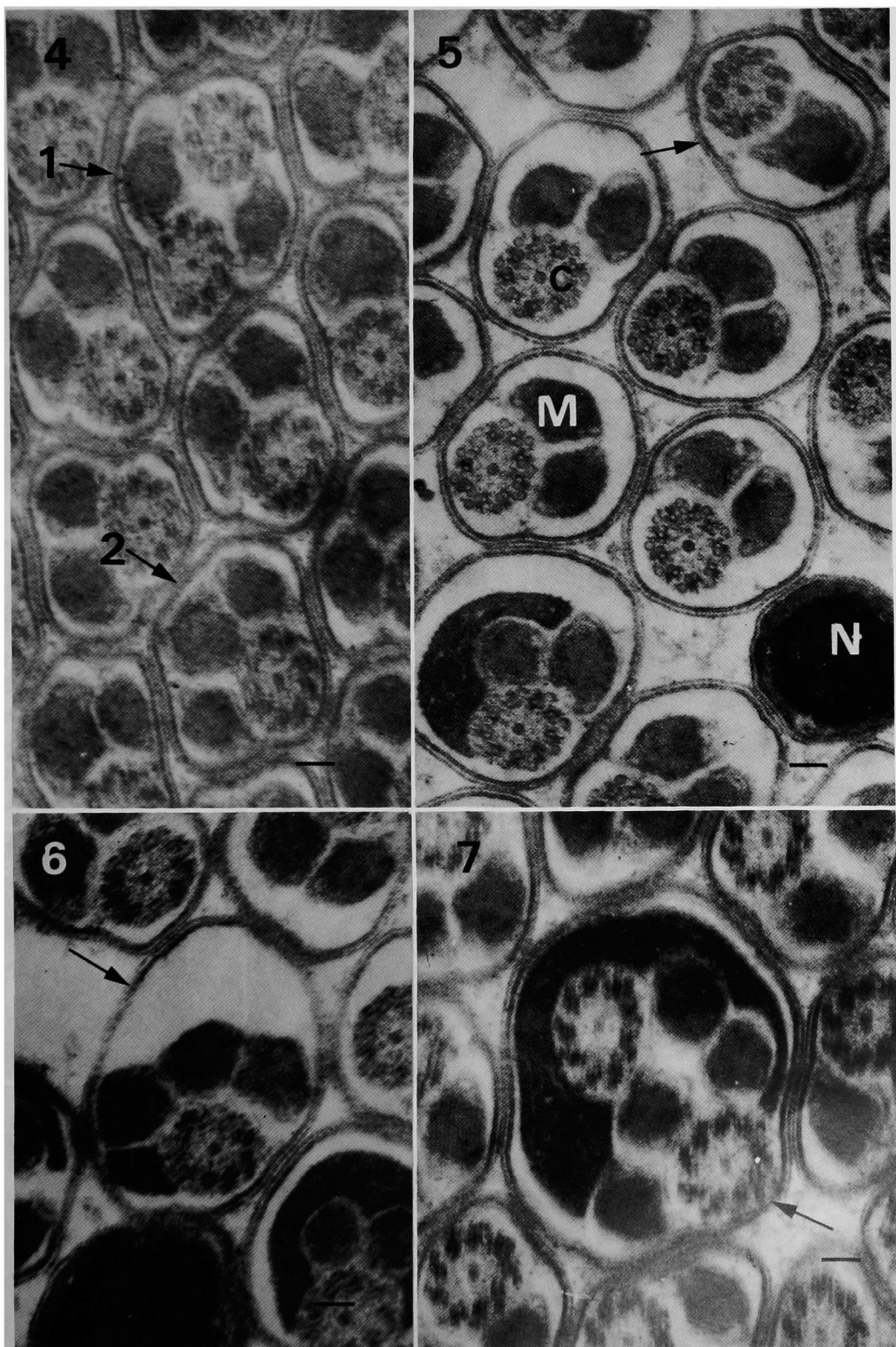
Explanation of figures

- Fig. 1. Cross-section of the double-lumen of the seminal vesicle treated with DDVP.
- Fig. 2. Cross-section of the wall of male seminal vesicle treated with DDVP. M: muscle, N: nucleus, V: vesicle
- Fig. 3. Cross-section of the wall of control seminal vesicle. M: muscle, N: nucleus, V: vesicle
- Fig. 4. Cross-sections of spermatozoa in control seminal vesicle. Showing abnormal spermatozoa with 2 flagella (arrow 1) and 3 mitochondria (arrow 2).
- Fig. 5. Cross-section of spermatozoa in control seminal vesicle. Showing an abnormal spermatozoon with 1 mitochondrion (arrow). C: flagellum, M: mitochondria, N: nucleus
- Fig. 6. Cross-section of an abnormal spermatozoon with 4 mitochondria (arrow) in control seminal vesicle.
- Fig. 7. Abnormal spermatozoon (arrow) contained 2 flagella and 4 mitochondria in control seminal vesicle.
- Fig. 8. Cross-sections of abnormal spermatozoa indicated by arrow 3 (2 flagella and 3 mitochondria), arrow 1 (2 flagella and 5 mitochondria), and arrow 2 (3 flagella and 4 mitochondria) in the vesicle treated with DDVP.
- Fig. 9. Cross-sections of abnormal spermatozoa indicated by arrow 1 (1 flagellum and 9 mitochondria), arrow 2 (1 flagellum and 8 mitochondria), and arrow 3 (1 flagellum and 5 mitochondria) in the seminal vesicle treated with DDVP.
C: flagellum, Mi: mitochondria
- Fig. 10. Cross-sections of abnormal spermatozoa indicated by arrow 1 (1 flagellum and 4 mitochondria), arrow 2 (1 flagellum and 7 mitochondria), and arrow 3 (1 flagellum and 6 mitochondria) in the seminal vesicle treated with DDVP.
- Fig. 11. Abnormal spermatozoon with 4 flagella and 6 mitochondria (arrow) in the seminal vesicle treated with DDVP.
- Fig. 12. Abnormal spermatozoon with 5 flagella and 4 mitochondria (arrow) in the seminal vesicle treated with DDVP.

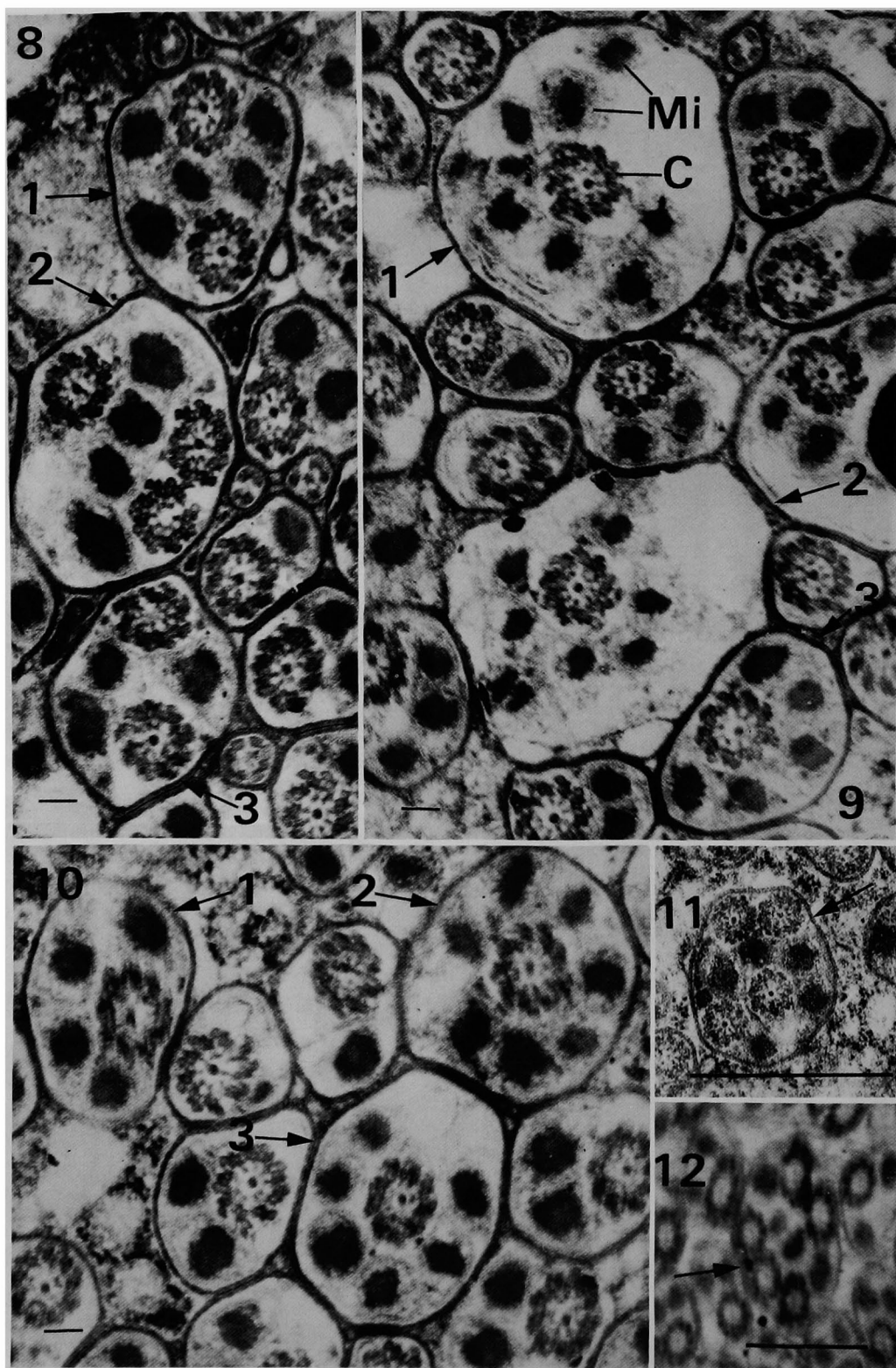
(Bar in Fig. 1 indicates 10 μ m.
Bar indicates 1 μ m in Fig. 2 to Fig. 12)



頼 俊雄論文附図



賴 俊 雄 論 文 附 圖



Effect of dichlorvos on spermatogenesis of *Armigeres subalbatus*
(Coquillett, 1898)

Jim-Shung Lai

Department of Parasitology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

The incidence of abnormal spermatozoa in normal and dichlorvos-treated *Armigeres subalbatus* was examined morphologically by electron microscopy. The mosquitos used in this study had been maintained in the laboratory for 160 generations after being collected in Kanagawa prefecture. For control mosquitos, ten seminal vesicles were removed from male adults 3 days after emergence, and sectioned at the middle. The numbers of all normal and abnormal spermatozoa in one side of the double-lumen of a cross-section were counted except for head nucleus parts, tail ends, and tangential sections which could not be identified as normal or abnormal. Normal spermatozoa had 1 flagellum and 2 mitochondrial cords, but abnormal ones had unusual numbers of them. Control mosquitos showed a 4.37% incidence of abnormal spermatozoa as averaged from data on 10 seminal vesicles.

For the insecticide treatment, living 4-th stage larvae which were exposed to 0.201 ppm of dichlorvos (DDVP) for 24 hours were put back into normal water without DDVP. The seminal vesicles from 10 male adults 3 days after emergence were examined likewise to control ones. The count was taken from both sides of the double-lumen of a cross-section. The average incidence of abnormal spermatozoa treated with DDVP was 19.1% which was 4.4 times higher than in control mosquitos. The total number of spermatozoa decreased in vesicles which were treated with DDVP. A large number of abnormal spermatozoa consisted of 1 flagellum and 1 or 3 mitochondria. The wall of seminal vesicles treated with DDVP became thicker than that of controls, and contained many vacuoles in the cytoplasm.