大日本蚕糸会

研　究　報　告

第59号　平成23年12月（2011）

目　　次

報　文

1. 繭糸交絡撹拌糸の特性

蚕糸科学研究所　岡島正章・天方美帆・鈴木果歩…… 1

2. 絹への建染染色に及ぼす空気の影響

蚕糸科学研究所　花之内智彦・塩崎英樹…… 7

3. 笹繭由来フラボノール含有抽出物のα-グルコシダーゼ阻害活性

蚕糸科学研究所　栗岡　聡・山崎昌良…… 11

4. イミダゾール化合物KK-42の投与による原種の3眠化率の品種間差異について

蚕業技術研究所　持田裕司…… 15

5. 蚕雄蛾の無精子精包による授精への利用

蚕業技術研究所　竹村洋子・持田裕司・松本正江・大沼昭夫…… 21

財団法人大日本蚕糸会
蚕糸科学研究所
蚕業技術研究所

Journal of
DAINIPPON SILK FOUNDATION
No.59, December 2011

CONTENTS

Research Reports

1. OKAJIMA, M., AMAGATA, M. and SUZUKI, K.:
Characteristic of silk yarn by "cocoon filament entangled" method. 1

2. HANANOUCHI, T. and SHIOZAKI, H.:
Influence of air on the vat dyeing of silk. 7

3. KURIOKA, A. and YAMAZAKI, M.:
α-glucosidase inhibitory activity of flavonol-containing extract from the yellow green cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. 11

4. MOCHIDA, Y.:
The effect of terpenoid KK-42 in the parental races of the silkworm, *Bombyx mori*. 15

5. TAKEMURA, Y., MOCHIDA, Y., MATSUMOTO, M. and OHNUMA, A.:
A role in insemination of spermatophre of the silkworm male moth, their tests were removed at larval stage. 21

Published by

THE DAINIPPON SILK FOUNDATION

繭糸交絡撹拌糸の特性

岡島正章・天方美帆・鈴木果歩
蚕糸科学研究所

MASAAKI OKAJIMA, MIHO AMAGATA And KAHO SUZUKI : Characteristic of silk yarn by "cocoon filament entangled" method

緒　言

近年の生糸のニーズは多様化しており，従来の規格化された生糸から，極細繊度生糸やかさ高生糸，節のある生糸等，特徴ある生糸が求められるようになっている。このような状況に対処するため，蚕糸科学研究所では，太繊度糸の開発を進めてきた。太繊度糸は，繭糸の特長を残し，軽くて温かく，柔らかく丈夫でしわになりにくい素材を目的としている。本研究所では，太繊度繰糸機として，キャッチアップ式太繊度繰糸機[1]や繭糸交絡撹拌繰糸機を開発してきた。繭糸交絡撹拌繰糸機は，キャッチアップ式繰糸機と比較して繭糸の絡みがより複雑な糸の繰製が可能となっているため，かさ高性のある生糸の繰製に期待が持てる。そこで，本報では，繭糸交絡撹拌繰糸機で繰製した糸の物性について検討を行ったので報告する。

材料と方法

1．繭糸交絡撹拌繰糸機の機構

繭糸交絡撹拌繰糸機の機構を図１に示す。繭糸交絡撹拌繰糸機では，繰糸槽内の繭を，繰糸槽底部のローター回転による渦流（図２）で撹拌しながら集緒し，枠に巻き取る。煮繭による繭の浮沈や，ローターと繰糸速度の関係によって，繰製された生糸の繊度や節の発生等が変化する。これらの条件の相互関係を捉えることによって，繰製生糸の特性をコントロールすることができると考える。

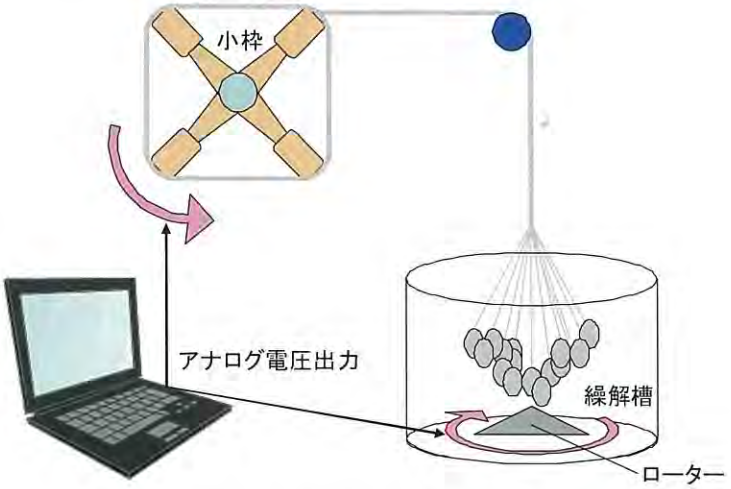

図１．繭糸交絡撹拌繰糸機の機構

図２．渦流による繭の撹拌

２．方　　法

試験は，煮繭時間，ローター回転数，繰糸速度の３因子を，２水準での組み合わせで繰糸を行った。煮繭は鍋煮繭により，繭を湯に沈めて90℃の一定温度で10分及び20分煮繭し，ローター回転数は200r.p.m.及び290r.p.m.，繰糸速度は２m/min及び５m/minとした。これによって得られた８種類の太繊度糸をNo.1からNo.8と識別番号を付し（表１），物性の調査を行った。

各試験区で得られた繰製生糸から，繊度糸を採取し，繊度を測定した。また繰製生糸のかさ高性，ヤング率を測定し，得られた測定値について，各因子が繰製糸の物性に及ぼす影響を検討した。

表１．繰製条件

No.	煮繭時間	ローター回転	繰糸速度
1	90℃ 20分 （半沈）	200r.p.m.	2m/min
2			5m/min
3		290r.p.m.	2m/min
4			5m/min
5	90℃ 10分 （浮き）	200r.p.m.	2m/min
6			5m/min
7		290r.p.m.	2m/min
8			5m/min

結果と考察

繰製した糸の100倍拡大写真を図３に示す。煮繭時間20分のNo.1～4の糸は，煮繭により繭が半沈となったため，槽の中で渦流の影響を大きく受け，繭糸の絡みが複雑になった。特に，ローター回転が速く，繰糸速度が遅いNo.3の糸の絡みが激しくなっている。

繊度の測定結果を図４に示す。煮繭時間，ローター回転数，繰糸速度ともに，生糸繊度に影響を与えているが，特に煮繭時間による影響が大きく，煮繭時間を10分から20分と長くすると，平均繊度が２～５倍と大きくなった。

かさ高性の測定結果を図５に示す。かさ高性も繊度と同様に，煮繭時間による影響が大きく，繭糸の絡みが糸に膨らみを持たせる結果となった。

ヤング率の測定結果を図６に示す。ヤング率は煮繭時間，繰糸速度に影響を受けることが分かった。ヤング率は，絡みが大きくなると低下する傾向があり，柔らかい生糸となることが分かっ

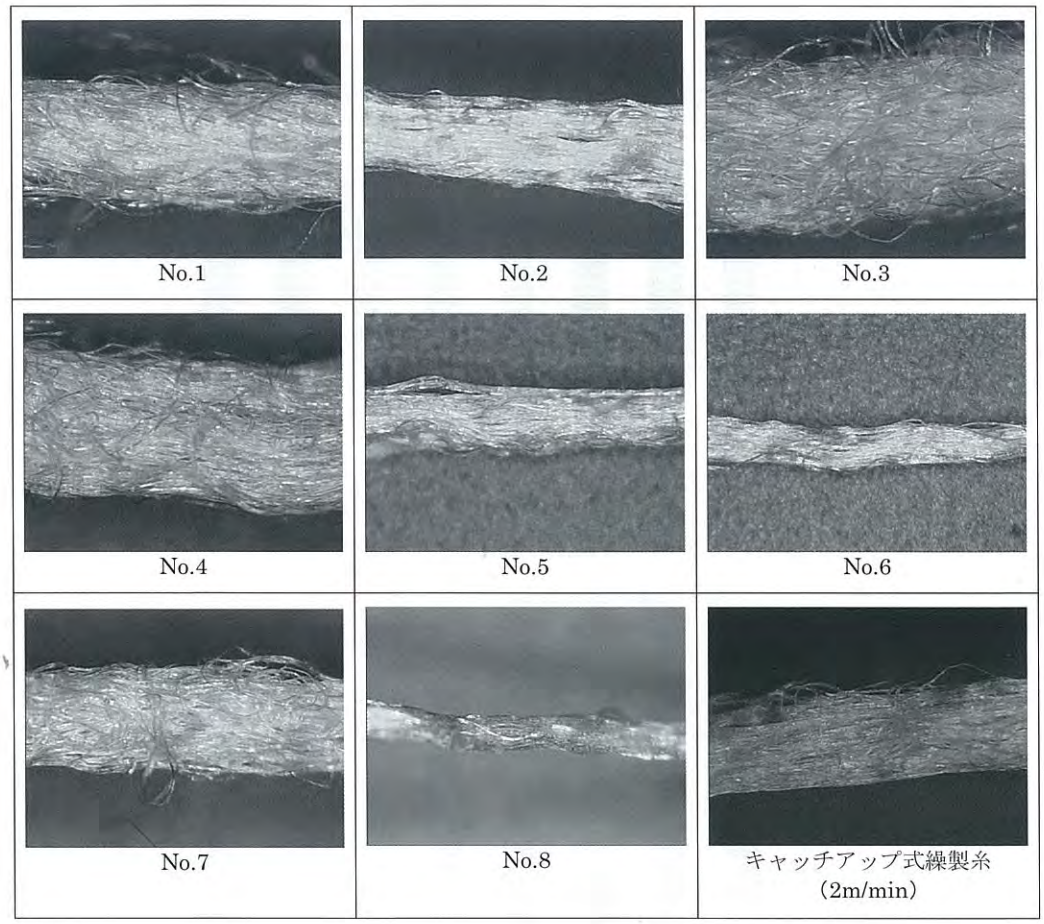

図３．繰製糸の拡大写真

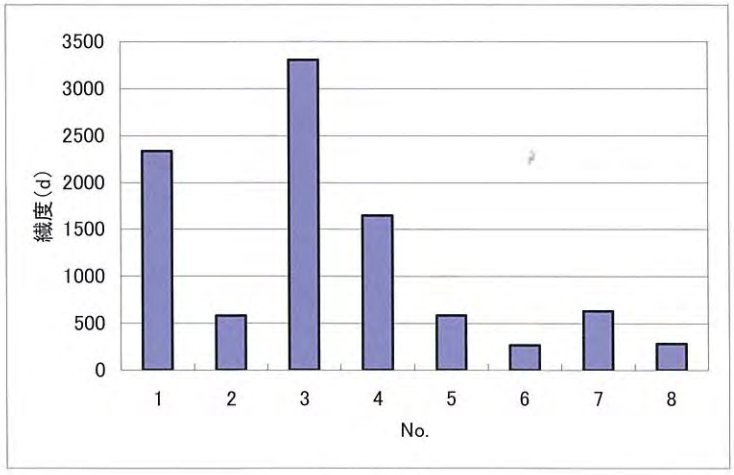

図４．繊度

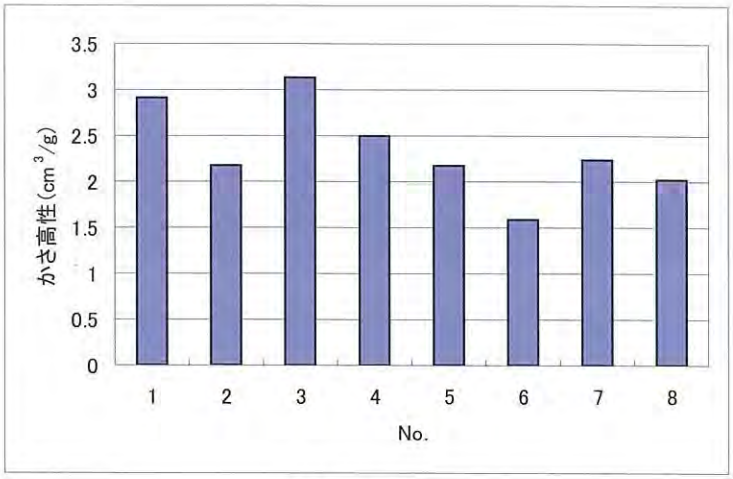

図5．かさ高性

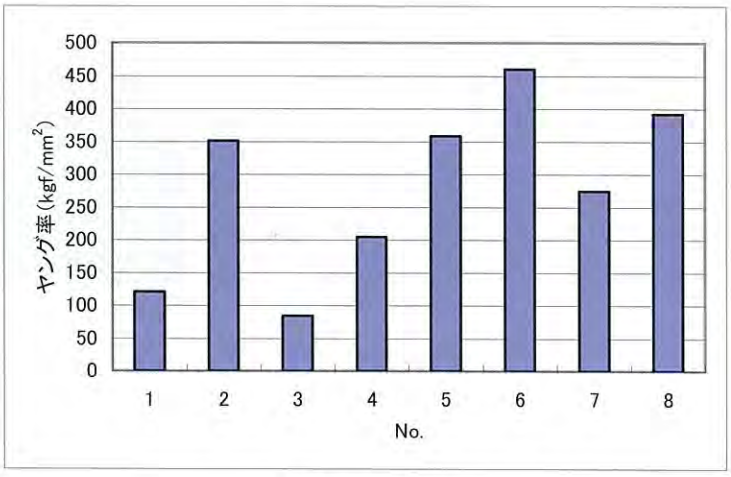

図6．ヤング率

た。今回試験した糸のヤング率は，500kgf/mm^{2}以下で，普通の生糸と比べてかなり低い値であった。しかし，糸を構成する繭糸の絡み状態，すなわち糸条形態が異なるので単純な比較はできない。かさ高性のあるネットロウシルクのヤング率が，650kg/mm^{2}程度である[2]ことからすると，本繰製生糸はさらに柔らかい生糸であるといえる。

摘　要

繭糸交絡撹拌繰糸機で繰製した糸について特性評価を行った。生糸繊度においては，煮繭時間，ローター回転数，繰糸速度の影響が非常に大きく，特に，繭の浮き沈み（浮き繰り，半沈）の差異が繊度に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。かさ高性，ヤング率についても，繭糸の絡みに影響を及ぼす煮繭時間，ローター回転数，繰糸速度の影響が大きいことがわかった。かさ高性があり，やわらかい糸を繰製するためには，繭糸の絡みを大きくする必要があることが分かった。本繰糸方法では，煮繭時間が繊度や物性に大きく関わっており，目的の太繊度糸繰製には煮繭条件が重要であるといえる。

引用文献

1) 岡島正章・黒川トシミ・天方美帆・清水重人（2009）太繊度低張力糸の特性－繰糸条件の組合せによる糸の物性試験－．大日本蚕糸会研究報告, **57**, 79-85.
2) 瓜田章二（2002）ネットロウシルクを素材とした製品化技術の検討．福島県蚕業試験場研究報告, **33**, 7-14.

絹への建染染色に及ぼす空気の影響

花之内　智彦・塩崎英樹
蚕糸科学研究所

TOMOHIKO HANANOUCHI, HIDEKI SHIOZAKI：Influence of air on the vat dyeing of silk

緒　言

絹は染色性に優れるが、綿などの他の繊維と比較して耐洗濯性に問題がある。絹の耐洗濯性の向上が図れれば、今まで使用されなかった用途にも絹を利用できることが期待される。そこで、染料種の中から鮮明で染色堅牢度に優れた建染染料に着目し、絹先練り先染衣料素材の開発を行っている。しかし、建染染料は、染料の特徴としてアルカリ剤と還元剤とを使用して染色するので、アルカリに弱い絹には使用されていない。クエン酸精練による歩練り[1]やエポキシド加工[2]等を施して、染浴のアルカリ剤や還元剤に耐性を持たせることにより建染染色用加工絹糸の調製方法を検討するとともに、染色条件を検討した[3]。

本報では、現場に即した実験を行うため染色容器の容量を固定し、建染染色時の空気が染色性に及ぼす影響について染液の安定性と染着率から検討した。

材料と方法

試　料

前報[2]に従い、エポキシド加工した27中諸撚糸を建染染色用加工絹糸として、染色試験に供した。

染色方法

染色実験は前報[3]に従い5％o.w.f建染染料（Mikethren Red FBB s/f、CI Vat Red 10）を熱湯で練り、適量の冷水を加えた後、炭酸ナトリウム20g/L、ハイドロサルファイトナトリウム12g/Lを添加して染液を調製した。そして、試料2gと染液40ml（浴比1：20）および60ml（浴比1：30）を三角フラスコに入れて密栓し、60℃、30分間の染色を行った。

染液の安定性の評価

上記で調製した染液40ml（浴比1：20）、60ml（浴比1：30）をそれぞれ三角フラスコに入れ、60分間放置し、その染液の還元色を目視判定し、染液の還元状態を評価した。

測　色

C光源，2°視野の条件で分光測色計（CM-508i、ミノルタ製）を用いて染色糸の測色を行い、最大吸収波長520nmの分光反射率より染着率を次式から算出した。

$$染着率＝(1-R)^2／2R　R：分光反射率$$

結果と考察

建染染色は、染浴に含まれる空気の影響で染料が酸化し染着率が低下する。適正に染色するには染色終了時においても染料が還元状態を維持していることが不可欠であることから、染液の安定性を評価するため、60分間放置した染液の還元状態を目視判定した。還元直後の染液は、暗褐色を呈する（図

図１　染液

(a) 浴比1：20

(b) 浴比1：20

(c) 浴比1：30

図１　染液

表１　建染染色した糸の染着率

浴比	染着率
1:20	1.9
1:30	6.0

１)。60分後の染液は、染色容器内に空気を含む浴比1：20では暗褐色ではあるがやや赤みがかり（(図２(a))、図２（ｂ）のような浮遊物が観察された。染色容器内に空気を含まない浴比1：30では、染液は暗褐色を呈していることが観察された（図２（c))。

次にそれぞれの染液量で染色実験を行った染着率の結果を表１に示す。浴比１：20の染着率は1.9となり、浴比1：30のそれは6.0と染料が繊維によく染着していることがわかった。

このことから、浴比1：20では染浴に存在する空気が還元状態の染料を徐々に酸化し、水に不溶化した

染料と還元状態の染料とが混在しているのに対し、浴比１：30では染浴に空気がほとんど存在しないので、染料の還元状態が維持されているものと思われる。

摘　要

絹への建染染色において染浴に含まれる空気が染色性に及ぼす影響について検討した。浴比１：20は染浴に空気が存在するので、染液が不安定であり、染色性が低下する。それに対して、浴比1：30では、染浴に空気が存在しないため、染液の還元性が持続し、適切に染色できることがわかった。

引用文献

1) 花之内智彦，塩崎英樹（2006）酸精練法による歩練り絹糸の調製，繊維学会予稿集, **61**, 251.
2) 花之内智彦，塩崎英樹（2006）クエン酸歩練り絹糸のエポキシドによる改質加工の試み，日本蚕糸学会関東支部学術講演会講演要旨集, **57**, 5.
3) 花之内智彦，塩崎英樹（2008）絹への建染染色　- CI Vat Red 10を例として -，日シ学集録, **56**, 84-85.

笹繭由来フラボノール含有抽出物の α-グルコシダーゼ阻害活性

栗岡　聡・山崎昌良
蚕糸科学研究所

AKIRA KURIOKA AND MASAYOSHI YAMAZAKI：α-glucosidase inhibitory activity of flavonol-containing extract from the yellow green cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*

緒　言

植物由来のポリフェノールには、植物本体を病原菌やその他の外的ストレスから守る本来の機能の他に、抗アレルギー作用、抗ウィルス作用、抗腫瘍、脂質上昇抑制、血糖値上昇抑制、抗動脈硬化及び抗酸化など多様な機能があることが知られている[1,2]。笹繭の緑黄色素は、ポリフェノールの一種である桑葉由来のフラボノールがカイコによって代謝され修飾を受けたものである[3]。笹繭を熱水処理すると、セリシンタンパク質とともに比較的水溶性の高いフラボノール配糖体を含む抽出液が得られる。この笹繭由来フラボノール含有抽出物は、化粧品素材に適した紫外線吸収作用やラジカル消去活性を有することから、化粧品素材として既に実用的に利用されている。化粧品分野以外における笹繭の用途として、笹繭フラボノールによる血糖値上昇抑制効果が認められれば、糖尿病の予防に有効な機能性食品への笹繭の活用が期待される。血糖値の上昇を抑制する有効な手段のひとつとして、小腸に存在する二糖類分解酵素であるα-グルコシダーゼの阻害剤が知られている。そこで、本報告では笹繭由来のフラボノール含有抽出物にα-グルコシダーゼ阻害剤様の機能があるか、ラット小腸由来粗酵素を用いて調べた結果を報告する。

材料と方法

材料

繭層は笹繭系統の「いろどり」繭層を用い、使用時まで冷暗所にて保管した。

繭層抽出物の調製

笹繭100g に蒸留水2L を加え、オートクレーブを用いて115℃×1時間の熱水抽出を行った。抽出液は濾過した後、凍結乾燥を行い笹繭抽出物の粉末試料を調製した。笹繭抽出物は水溶性が低いため、上清と沈殿を次の方法で分画した。笹繭抽出物を0.1M マレイン酸緩衝液 (pH6.0) に分散させ37℃で90分間インキュベートした後、分散液を15,000 r.p.m. ×15分間遠心分離し、上清を回収した。一方、沈殿は同緩衝液で洗浄を3回繰り返した後、減圧乾燥した。

α-グルコシダーゼ阻害活性測定法

ラット小腸粉末（SIGMA）1gを0.1M マレイン酸緩衝液 (pH6.0)10mL に懸濁させ、超音波処理を3分間行った。懸濁液を10,000 r.p.m ×15分間遠心分離して得られた上清を粗酵素溶液として用いた。笹繭抽出物2mg を200μl の0.1M マレイン酸緩衝液 (pH6.0) に分散させた。本実験ではα-グルコシダーゼに属する酵素のうち、スクラーゼとマルターゼの2種類の酵素に対する笹繭抽出物の阻害作用について調べるため、基質として25μL の0.5M マルトースまたは0.5M スクロースを添加してよく混合し37℃で10分間予備加熱を行った後、酵素溶液25μL を加え37℃で1時間反応させた。反応後、反応液に250μl の2.0M マレイン酸-トリス-NaOH 緩衝液（pH7.4）を加えて反応を停止させた。酵素反応によって遊離したグルコー

スをグルコースCII-テストワコー（和光純薬）を用いて定量し、α-グルコシダーゼ阻害活性を算出した。

結果と考察

笹繭抽出物は黄褐色の粉末で、0.1Mマレイン酸緩衝液（pH6.0）への溶解度が低く、不溶物が残留した。本試験では、分散液においてもα-グルコシダーゼ阻害活性があるかどうかを調べるために、不溶物を遠心除去せずに分散させた状態でα-グルコシダーゼ阻害活性を測定した。ラット小腸由来粗酵素を用いた反応系で、笹繭抽出物のα-グルコシダーゼ阻害作用を調べた結果、笹繭抽出物にはα-グルコシダーゼに属するスクラーゼ及びマルターゼを阻害する作用が認められた。スクラーゼ阻害活性とマルターゼ阻害活性はそれぞれ75%及び35%であった（図1）。以上の結果から、笹繭抽出物にはα-グルコシダーゼ阻害活性があることがラット小腸由来の粗酵素液を用いた実験で明らかとなり、笹繭抽出物によってマルターゼよりもスクラーゼのほうが強く阻害されることが明らかとなった。

笹繭抽出物にはスクラーゼ及びマルターゼを阻害する作用があることが明らかとなった。しかし、笹繭抽出物の水溶性は低く、一部が不均一系での反応であった。そこで、笹繭抽出物の上清と沈殿についてそれぞれスクラーゼ阻害活性を調べた。その結果、図2に示すように上清には強いスクラーゼ阻害活性が認められ、その阻害率は62.2%であった。一方、沈殿にも上清に比べて阻害活性は低いものの、約17%のスクラーゼ阻害活性が認められた。以上の結果から、笹繭抽出物のα-グルコシダーゼ阻害活性の6割以上は笹繭抽出物から溶出した水溶性の高い成分に起因すると考えられた。笹繭「いろどり」に含まれる水溶性のフラボノールは配糖体であることから[4]、α-グルコシダーゼ阻害活性に関与する成分は主にフラボノイド配糖体であると考えられた。一方、沈殿は洗浄を繰り返しても色素が完全に脱色されることはなく、沈殿の色は褐色であった。沈殿の主要成分はセリシンタンパク質である可能性が高いと考えられるが、セリシンタンパク質自体にα-グルコシダーゼ阻害活性があるかどうかは本実験だけでは判断できなかった。

α-グルコシダーゼに対する阻害剤は二糖類から単糖類への分解を遅らせる作用があるため、腸管での糖類の消化吸収を遅延させて食後の血糖上昇を抑制することから、糖尿病等の予防や治療に有用である。今後、笹繭由来のフラボノール含有抽出物の経口摂取による血糖上昇抑制効果について、動物実験で確かめる予定である。

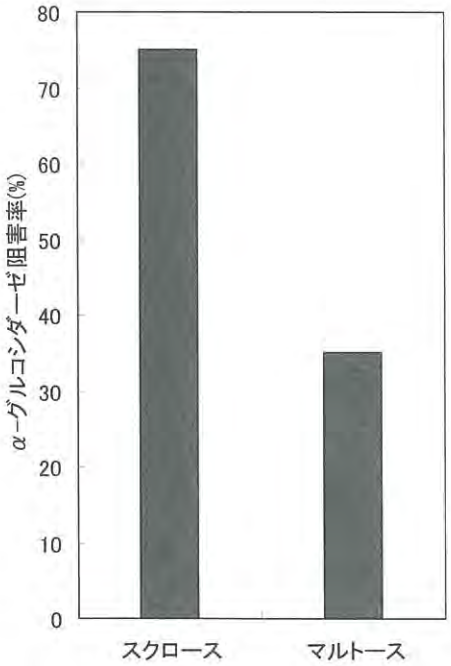

図1．笹繭抽出物のα-グルコシダーゼ阻害活性

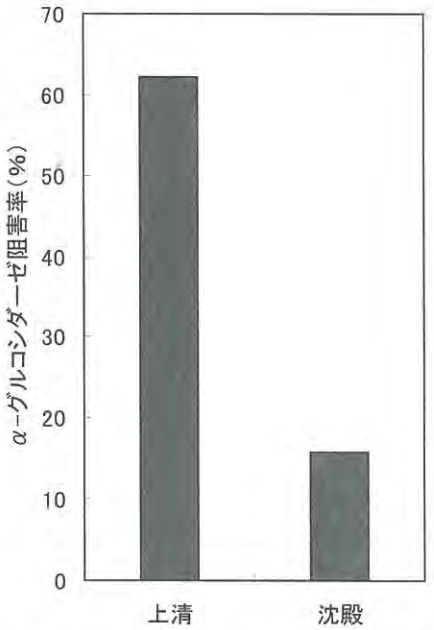

図2．笹繭抽出物のα-グルコシダーゼ阻害活性
左：上清，右：沈殿

摘　要

ラット小腸由来粗酵素液を用いてフラボノールを含む笹繭抽出物のα-グルコシダーゼ阻害活性を測定した結果、笹繭抽出物はスクラーゼ阻害活性とマルターゼ阻害活性を示し、マルターゼよりもスクラーゼを強く阻害した。笹繭抽出物のα-グルコシダーゼ阻害活性には水溶性の高いフラボノール配糖体が関与している可能性が示唆された。その阻害機構については不明であるが、セリシンタンパク質を主成分とする沈殿にもα-グルコシダーゼ阻害活性が若干認められた。

引用文献

1) C. C. Wong, H. B. Li, K. W. Cheng, and F. Chen. (2006) A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medical plants using the ferric reducing antioxidant power assay. Food Chemistry, **97**, 705-711.
2) P. N. Diouf, T. Stevanovic, and A. Cloutier. (2009) Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from Picea mariana bark and its proanthocyanidin-rich fractions. Food Chemistry, **113**, 897-902.
3) Tamura, Y., Nakajima, K., Nagayasu, M., and Takabayashi, C. (2002) Flavonoid 5-glucosides from the cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*. Phytochemistry, **59**, 275-278.
4) Kurioka, A., and Yamazaki, M. (2002) Purification and identification of flavonoids from the yellow green cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **66**, 1396-1399.

イミダゾール化合物 KK-42の投与による原種の3眠化率の品種間差異について

持田裕司
蚕業技術研究所

YUJI MOCHIDA : The effect of terpenoid KK-42 in the parental races of the silkworm, *Bombyx mori*

緒　言

イミダゾール化合物 KK-42を1齢～3齢期に塗布あるいは添食することにより，3眠蚕を誘導することができる[1,2,3]。現在，誘導3眠蚕は極細繊度繭糸の生産手段として利用されており，経過が短く，繊度が細く，繭重が軽い事が特徴である。

また，蚕の系統維持や品種改良を行うには，一度に大量の蚕を飼育しなければならず，大きな労力を必要とする。しかし，3齢飼食時に KK-42を蚕に投与し，3眠蚕を誘導することによって全齢経過を短縮して，作業労力の削減につなげることが期待できる。この3眠蚕誘導効果には，品種間差異があるように思われるが，現在普及している原種の KK-42に対する感受性，すなわち3眠化し易さは明確でない。そこで，当研究所が保有する実用蚕品種の原種の品種間差異を知るために実験を行った。それらの概要を報告する。ご指導を戴いた農業生物研究所の木内信博士に厚く御礼申し上げる。

本校に入るに先立ち，本校の御校閲を賜った蚕業技術研究所所長 井上 元博士に感謝の意を表する。

材料と方法

供試蚕品種には，日本種8品種（朝，日，芙，蓉，桑，ひたち，日137号，日604号）と中国種8品種（東，海，つくば，ね，研白，にしき，支146号，中604号）を用いた。飼育には，日本農産工株式会社製の原蚕種用人工飼料を用い，照明は16L8D，温度は通常の飼育温度（25℃～29℃）で全齢人工飼料育を行った。

供試したイミダゾール化合物 KK-42は1-Benzyl-5-[(E)-2.6-dimethy-1.5-heptadienyl] imidazole [4] であり，1.25～20μg の KK-42をアセトンに溶かした幼虫への塗布は，マイクロシリンジで3齢起蚕の背面に1頭当たり，2μlずつ塗布した。対照の蚕には，アセトンのみを同量塗布した。また添食の場合は，原蚕種用人工飼料に乾物量で2.5 ppm ～80ppm の KK-42を添加し，3齢起蚕に飼食から48時間摂食させた。供試頭数は，いずれも各区20頭とした。

結　果

1．塗布法による日本種原種の誘導3眠化率

塗布の場合，誘導3眠化率は全ての品種において，処理濃度が高くなるにつれ3眠蚕の出現頻度が高くなった。しかし，低濃度の1.25μg 投与では，「朝」5%と，「蓉」30%が3眠蚕になっただけであり，他の品種では2.5μg からが出現し始めた。高濃度の20μg 投与においては，ほとんどの品種が3眠化した。また，「蓉」のように，5μg で100%の3眠化を示した品種や「芙」のように20μg でも3眠化率65%の品種が存在した。このように感受性には明確な品種間差異が認められた（表1）。

上蔟までの発育日数は，対照の4眠蚕で23日，誘導3眠蚕は19日～22日であった。「芙」と「蓉」のように，3眠蚕が斉一に熟蚕になった品種もいれば，4日間にわたってだらだらと上蔟した品種もあり，これも感受性の差異と考えられる（表2）。

表1．KK-42塗布による日本種原種に対する誘導3眠化率

品種名	KK-42の処理量（μg）					
	0	1.25	2.5	5.0	10.0	20.0
朝	0 %	5 %	20 %	50 %	100 %	100 %
日	0	0	0	75	95	100
芙	0	0	5	25	40	65
蓉	0	30	75	100	95	95
桑	0	0	5	5	25	95
ひたち	0	0	5	25	65	100
日137号	0	0	5	50	80	95
日604号	0	0	20	95	100	100

供試頭数:20頭

表2．KK-42塗布による日本種原種の誘導3眠化率

品種名	濃度 μg	KK-42塗布日からの上蔟日数と3眠化率（%） 7日目	8日目	9日目	10日目	11日目
朝	対照 0					
	1.25			5		
	2.5		5	5	10	
	5.0			25	25	
	10.0			45	40	15
	20.0		10	90		
日	対照 0					
	1.25					
	2.5					
	5.0			25	50	
	10.0			20	75	
	20.0		50	50		
芙	対照 0					
	1.25			5		
	2.5		5	5	10	
	5.0			5	5	
	10.0			45	40	15
	20.0		5	90		
蓉	対照 0					
	1.25		30			
	2.5		75			
	5.0		100			
	10.0		95			
	20.0		95			
桑	対照 0					
	1.25					
	2.5				5	
	5.0			25		
	10.0			35	30	
	20.0			70	20	10
ひたち	対照 0					
	1.25					
	2.5					5
	5.0		10	5	5	5
	10.0		40	10	10	5
	20.0		60	30	10	
日137号	対照 0					
	1.25					
	2.5		5			
	5.0		15	35		
	10.0		45	15	20	
	20.0		60	15	20	
日604号	対照 0					
	1.25					
	2.5					20
	5.0			20	35	40
	10.0			40	60	
	20.0			10	80	10

2．塗布法による中国種原種の誘導3眠蚕化率

低濃度1.25μgの投与で，「東」と「ね」が95%，その他の品種では100%，3眠化された。このように，中国種は低濃度でも感受性が高かった（表3）。

上蔟までの経過日数は，対照の4眠蚕は20日目から上蔟したのに比べて，薬剤投与区での3眠蚕の上蔟

では,16日目から熟蚕が出始め,「東」および「つくば」,「研白」は一斉に上蔟した（表4）。なお，3日間にわたって上蔟する品種「にしき」,「支146号」がいたが，熟蚕の発生状況は，1日に集中する傾向がみられた。

表3．KK-42塗布による中国種原種に対する誘導3眠化率

品種名	KK-42の処理量（μg）					
	0	1.25	2.5	5.0	10.0	20.0
東	0 %	95 %	75 %	85 %	100 %	100 %
海	0	100	100	100	100	100
つくば	0	100	100	100	100	100
ね	0	95	100	100	100	100
研白	0	100	100	100	100	100
にしき	0	100	100	95	100	100
支146号	0	100	100	100	100	100
中604号	0	100	85	90	100	95

供試頭数:20頭

表4．KK-42塗布による中国種原種の誘導3眠化率

品種名	濃度 μg	KK-42塗布日からの上蔟日数と3眠化率（%） 7日目	8日目	9日目	10日目	11日目
東	対照 0					
	1.25		95			
	2.5		75			
	5.0		85			
	10.0		100			
	20.0		100			
海	対照 0					
	1.25			50	50	
	2.5		15	65	20	
	5.0			55	45	
	10.0			60	40	
	20.0		20	70	10	
つくば	対照 0					
	1.25		100			
	2.5		100			
	5.0		100			
	10.0		100			
	20.0		100			
ね	対照 0					
	1.25		100			
	2.5	20	70	10		
	5.0		100			
	10.0		100			
	20.0		100			
研白	対照 0					
	1.25		100			
	2.5		100			
	5.0		100			
	10.0		100			
	20.0		100			
にしき	対照 0					
	1.25		100			
	2.5	70	10	20		
	5.0	35	55	10		
	10.0	70	20	10		
	20.0	85	15			
支146号	対照 0					
	1.25		20	60	20	
	2.5		10	90		
	5.0		10	80	10	
	10.0		10	65	25	
	20.0			70	30	
中604号	対照 0					
	1.25		80	10	10	
	2.5		85			
	5.0		90			
	10.0		95	5		
	20.0		95			

３．添食法と塗布法による日本種原種と中国種原種の誘導３眠化率

添食法と塗布法の効率を比較調査した。日本種原種「芙」および「蓉」を供試し中国種原種は「つくば」および「ね」を用いた。結果は表５に示したように，品種毎の感受性は塗布も添食でもほとんど同じで，濃度が高くなるにつれ３眠化率が高くなった。しかし，添食法よりも塗布法の方がより低い処理濃度で誘導することが出来た。

表５．KK-42の添食と塗布による日本種原種と中国種原種の３眠化率

品種名	KK-42 の 添 食 濃 度 (ppm)						
	0	2.5	5	10	20	40	80
	%	%	%	%	%	%	%
芙	0	0	0	0	15	90	100
蓉	0	0	0	15	90	100	100
つくば	0	0	10	40	100	100	100
ね	0	0	0	30	100	100	100

品種名	KK-42 の 塗 布 量 (μg)					
	0	1.25	2.5	5	10	20
	%	%	%	%	%	%
芙	0	0	5	25	40	65
蓉	0	30	75	100	95	95
つくば	0	100	100	100	100	100
ね	0	95	100	100	100	100

供試頭数：各区２０頭

表６．全明30℃で飼育した場合の自然発生する３眠蚕の割合

品種名（日本種）	3眠化率（%）	品種名（中国種）	3眠化率（%）
朝	5	東	0
日	0	海	15
芙	0	つくば	30
蓉	5	ね	30
桑	0	研白	70
ひたち	0	にしき	80
日137号	0	支146号	0
日604号	0	中604号	100

供試頭数：２０頭

４．品種別の自然３眠蚕発生状況の調査

4眠蚕が自然に生じる３眠蚕は，温度や光線の影響により出現することが知られている[5]。今回，全明30℃で無停食飼育することを，自然に３眠蚕を出現させる条件とし，自然３眠蚕発生に関する品種差異を，日本種原種と中国種原種，８品種を用い各20頭について調査した。

日本種原種では「朝」と「蓉」で５％の出現みられた。また，中国種では「東」と「支146号」以外の品種で３眠蚕が出現した。とくに，中国種原種の「中604号」では100％の出現率であった（表６）。このように中国種原種には３眠化し易いという特性を持っていると考えられる。この結果は，実際の現場で使用されている実用品種の自然３眠蚕の出現状況ともよく一致している。

５．KK-42を塗布した誘導３眠蚕の次代蚕について

KK-42を塗布して誘導した３眠蚕の「芙」，「蓉」「つくば」，「ね」の繭層歩合の調査では，濃度による顕著な差異は見られなかった（表７）。

また，この４品種から卵を採種して，ふ化させた蚕（次代蚕）を人工飼料による通常飼育したところ，全ての品種が４眠蚕になり，対照区とほとんど変わらない繭質が得られた（表８）。

この次代蚕からの卵数は，表９に示したように，中国種原種の「つくば」と「ね」は，対照区よりも産卵数が増加した値が得られた。

KK-42を塗布して誘導した3眠蚕でも，その次世代は殆ど対照区と変わらない繭質と産卵数を得られることが分かった。

表7．KK-42塗布により誘導した日本種原種と中国種原種3眠蚕の繭質

品種名	塗布量 μg/頭	繭重 g	繭層重 cg	繭層歩合 %
芙	0	1.39	32.0	23.0
	5.0	0.52	8.7	16.7
	10.0	0.59	10.0	16.9
	20.0	0.61	9.3	15.2
蓉	0	1.20	28.7	23.9
	5.0	0.59	9.3	15.8
	10.0	0.62	9.8	15.8
	20.0	0.60	9.9	16.5
つくば	0	1.48	30.8	20.8
	1.25	0.62	9.9	16.0
	2.5	0.65	8.5	13.1
	5.0	0.55	8.8	16.0
	10.0	0.62	8.9	14.4
	20.0	0.66	9.3	14.1
ね	0	1.19	26.4	22.2
	1.25	0.64	11.2	17.5
	2.5	0.60	9.8	16.3
	5.0	0.60	10.2	17.0
	10.0	0.63	10.2	16.2
	20.0	0.61	9.9	16.2

表8．KK-42を塗布した誘導3眠蚕の次代蚕の繭質

品種名	世代	繭重 g	繭層重 cg	繭層歩合 %
芙	次代蚕	1.71	41.35	24.2
	対照	1.82	39.50	21.7
蓉	次代蚕	1.69	39.35	23.3
	対照	1.95	43.15	22.2
つくば	次代蚕	1.64	30.10	18.4
	対照	1.72	33.70	19.7
ね	次代蚕	1.71	34.25	20.0
	対照	1.81	32.35	17.9

供試蛾数：10蛾

表9．KK-42を塗布した誘導3眠蚕の次代蚕の産卵数

品種名	対照区 粒	3眠蚕 粒	3眠蚕の次代蚕 粒
芙	615±82	344±26	597±84
蓉	622±29	234±31	610±42
つくば	617±160	274±65	696±84
ね	602±134	289±38	648±89

供試蛾数：10蛾

考　察

原種の品種により，KK-42に対する感受性は異なり，3眠蚕を誘導する場合には，塗布量や添食量が適切になるように調製する必要があることが明らかになった。日本種原種では，「蓉」が塗布量5.0μgで100%，「芙」が20.0μgで65%の3眠化を示し，明らかに品種間差があった。中国種原種については，日本種原種に比べて感受性が高い傾向がみられ，塗布法ならびに添食法，全明30℃飼育とも3眠化率が高かった。日本種原種を3眠化させるためには，処理濃度を高く設定する必要があり，中国種原種に塗布法を施用する場合には，1.25μgでほとんど3眠化が可能と考えられる。また，塗布法は，添食法より低い濃度で3眠蚕を誘導できた。

この3眠化誘導剤を用いる方法は次代蚕の産卵数や繭重への影響も少ないことが判明したので，的確な濃度や生体への影響を詳しく調査することによって蚕の系統維持や品種改良の実用面への応用を検討していきたい。

摘　要

イミダゾール化合物KK-42の投与による原種の3眠化率の品種間差異について調査した。日本種原種では，塗布濃度と3眠化率に明らかな品種間差があった。中国種原種については，日本種原種に比べて感受性が高い傾向がみられ，塗布法ならびに添食法，全明30℃飼育とも3眠化率が高かった。また，3眠化誘導剤を用いる方法は次代蚕の産卵数や繭重への影響も少ないことが判明した。

文　献

1) Akai, H., Kimura, K., Kiuchi, M. and Shibukawa, A. (1984) The effect of anti-juvenoid treatment on cocoon and cocoon filaments in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., **53**, 545-546

2) 神田俊男・木口憲爾・村山穣助・青木　昭・高橋保・神田千鶴子・呉玉澄・桑野栄一・江藤守聡 (1985) 抗幼若ホルモン活性物質“KK-42”による早熟3眠蚕の誘導と細繊度3眠蚕絹糸の織物への利用，蚕糸試験場報告 **30**, 123-149.

3) 木内　信・木村敬助・赤井　弘 (1985) 抗幼若ホルモン活性物質投与による3眠蚕の誘導とその計量形質．日蚕雑，**54**, 77-81.

4) Kuwano, E., Takeya, R. and Eto, M. (1985) Synthesis and anti-juvenile hormone activity of 1-substituted-5-[(E)-2,6-dimethyl-1,5-heptadienyl] imidazoles. Agric. Biol. Chem., **49**, 483-486

5) 松村季美　(1941) 温湿度と養蚕 (3). 蚕糸界報，**590**, 32-37

蚕雄蛾の無精子精包による授精への利用

竹村洋子・持田裕司・松本正江・大沼昭夫
蚕業技術研究所

YOKO TAKEMURA, YUJI MOCHIDA, MASAE MATSUMOTO, AKIO OHNUMA : A role in insemination of spermatophre of the silkworm male moth, their testes were removed at larval stage

緒　言

昆虫の精包は，雄が形成する小袋であり，精子が雌に移行する際の保護の役割を担うとされている。交尾時に，蚕の雄蛾は精包を雌蛾の交尾嚢内に移送し，その精包内で前立腺液により無核精子が活性化し，引き続いて有核精子束の解離が起こり，有核精子が雌の受精嚢へ移行する。産卵過程で卵が卵管を下って前庭を通るときに，受精嚢から精子が卵の精孔を通って卵内に入り受精が成立する。この過程における精包の役割についてはまだ未解明である。大村[1]は，幼虫期に精巣を除去した雄蛾を交尾させ，精子を含まない精包を得ており，この精包は雌に産卵を誘発しないと述べている。筆者らは，蚕の人工授精法を開発し，精液を人為的に雌蛾の交尾嚢に注入することで受精卵を得，また，前立腺分泌液の代替えとして精子の活性化にトリプシンが有効である事を提示した[2]。これらの手法を用いて，今回，精巣を除去した雄蛾が形成する無精子精包が授精において，どのような役割があるかを人工授精法を用いて検討した。

本文に入るに先立ち，本稿の校閲を賜った蚕業技術研究所所長井上元博士に深く感謝の意を表する。

材料と方法

1．材料蚕

供試品種として，雌蛾は第2白卵系統を使用し，雄蛾は正常系統の「ひたち×にしき」および「烏竜」を使用し，全齢人工飼料育とした。この交配の受精卵は着色卵となる。

2．精液の採集方法

(1) 貯精嚢精液

未交尾の雄蛾を背中腺に沿って解剖して生殖器官全体を取り出し，最初に精莢腺より下部，白線および前立腺部分を取り除き，前立腺液が精液に混入しないようにした。貯精嚢をピンセットで破いて内容物を集め，貯精嚢精液とした。器官の解剖はグレース昆虫培地（GIBCO BRL）中で行った。

(2) 交尾嚢内精液

2時間交尾させた雌蛾を解剖して交尾嚢を取り出し，ピンセットを使って精包のみを集めた。精包を切開して得た内容物を交尾嚢精液とした。器官の解剖はグレース昆虫培地（GIBCO BRL）中で行った。

3．精液の凍結

採取した貯精嚢精液を等量の10%ジメチルスルフォキシド／グレース昆虫培地とよく混合し，0.25mlの凍結ストローに封入した。−80℃に10分間置いた後，液体窒素に10分間浸漬し凍結した。融解は37℃の温湯で行った。

4．人工授精の方法

窒素ガスボンベ，圧力調整器，足踏みスイッチ，三方電磁弁，キャピラリーで構成された人工授精装置を使用し，雌が1頭当たり5〜10μlの精液を注入した。

5．精巣除去した雄蛾の作出

4齢1日目から2日目の雄幼虫から，クリーンベンチ内で星状紋から精巣をピンセットで摘出して傷口をパラフィンで覆い，以後，清浄な環境で飼育した。

以上の実験の詳細は，Takemura et. al. [2,3] に依った。

結　果

1．人工授精における交尾嚢および精包

通常の交尾を行った雌蛾交尾嚢と人工授精で精液を注入した雌蛾の交尾嚢を取り出した（Fig 1-A,B)。通常交尾の雌蛾では，交尾嚢内に精包が存在し，交尾嚢からしっかりした膜の精包が取り出された。そして精包は雄蛾単独で形成され，稀に雌蛾の交尾嚢以外でも観察された（Fig 1-C)。しかし，人工授精の場合には，前立腺液を加えた貯精嚢精液や交尾嚢内精液どちらを使用しても，精包が形成されておらず，精包を解剖すると精液が流出した。しかし，受精嚢には精子が到達しており，受精卵は得られた。

また，通常交尾後1日が経過して産卵した雌蛾の交尾嚢では，精包との間に受精嚢に到達しきれなかった精子が蓄積されていた（Fig 1-D)。この交尾嚢中の精液を収集し，人工授精を試みたが，受精は全く成立しなかった。(Table 1)。

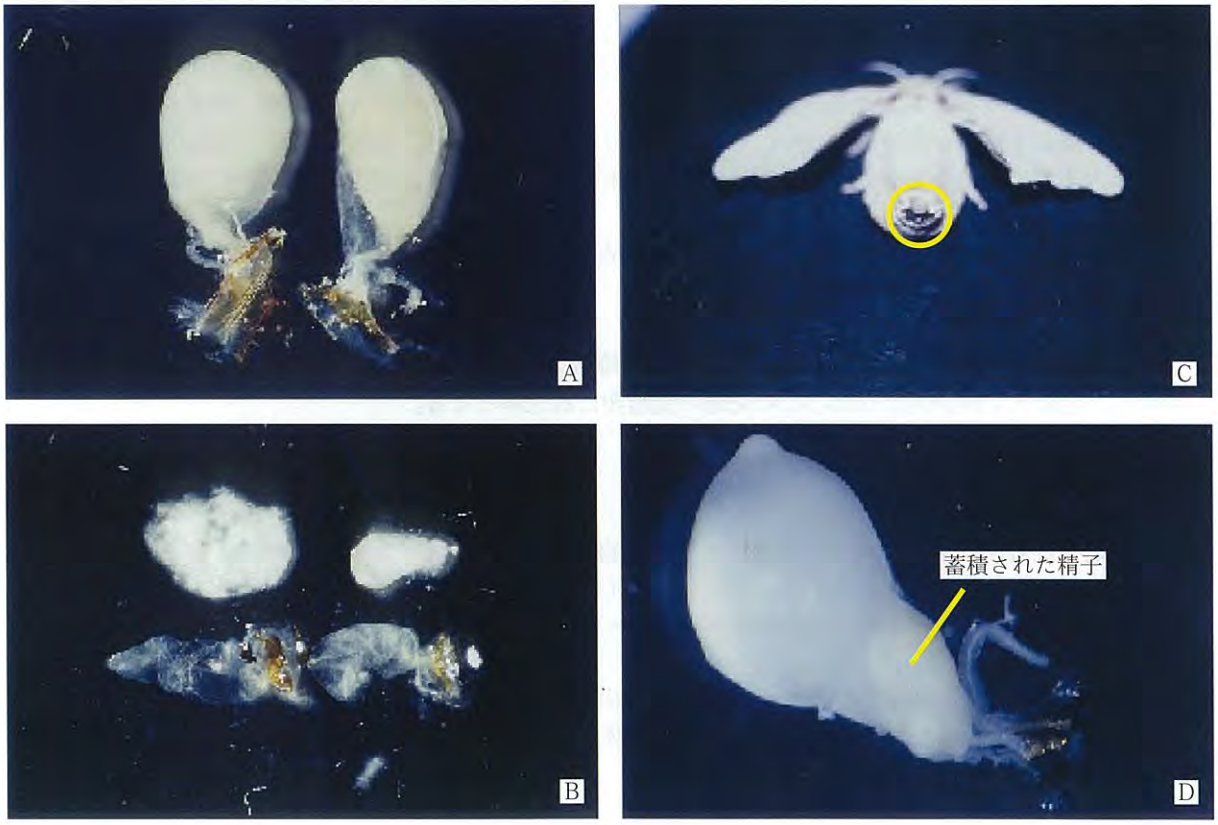

Fig 1.　雌蛾交尾嚢と精包

A－左，精子を人工授精した交尾嚢
　　右，通常交尾した交尾嚢
B－左，精子を人工授精した交尾嚢内部
　　右，通常交尾した交尾嚢内部
C，雄蛾尾部に形成された精包
D，交尾1日後の精包

Table 1.　交尾と人工授精による産卵成績

	産卵数（粒）	受精卵数（粒）	不受精卵数（粒）	受精卵率（%）
通常交尾	589±78.2	585±81.5	4± 7.7	99.2± 1.5
産卵１日後の精包内精液*1	41±18.9	0± 0.0	41±18.9	0.0± 0.0
交尾嚢破壊＋交尾*2	550±39.9	543±45.8	7± 6.2	98.7± 1.3
交尾嚢破壊＋人工授精*2	63±96.2	0± 0.0	63±96.2	0.0± 0.0
片側精巣除去	620±42.4	613±46.5	7± 6.7	98.8± 1.2
両側精巣除去	45±19.2	0± 0.0	45±19.2	0.0± 0.0

処理個体15蛾についての平均値

*1：通常交尾し，産卵1日後の雌蛾交尾嚢を解剖し，精液を収集，人工授精を行う

*2：窒素ガス圧により未交尾雌蛾の交尾嚢を破壊

一方，未交尾の雌蛾交尾嚢へ挿入したキャピラリーに人工授精装置の窒素ガスによって圧力をかけ交尾嚢を破壊した。この雌蛾に交尾を行わせると，通常交尾と同様の産卵成績を示した。この場合，雌蛾内の精包は，破壊した交尾嚢と交尾嚢導管，および精包形成時の軟栓によって交尾嚢付近に固定されており，精子の活性化が生じて，精子は精子管に移行し受精嚢に達していた（Table 1)。また，同様に交尾嚢を破壊された雌蛾に人工授精を試みると，精液は交尾嚢付近に留まることができないので，受精卵は得られなかった。

2．幼虫期に精巣を除去した雄蛾

幼虫期に精巣を全て除去した雄蛾を解剖したところ，付属腺，精管，貯精嚢，射精管まで，精巣以外の正常な生殖器官が存在していた (Fig.2-A)。器官には，それぞれの分泌液が含まれており，貯精嚢部分には乳白色の液体が存在していた。この精巣除去雄蛾を雌蛾に交尾させたところ，雌蛾の交尾嚢には，精包が存在しており，通常の精包とほぼ変わりなかった (Fig.2-B)。この精包の膜を破ると，外質と内質に明確に分かれておらず，精子は存在しなかった。また，この精包と精管の間に内容物が蓄積されていたが，受精嚢には何も到達していなかった。この両側精巣除去雄蛾と交尾した雌蛾は，産卵数が減少し，受精卵が全く得られなかった（Table 1)。

一方，幼虫期に片側精巣のみを除去した雄蛾と交尾した雌蛾は，産卵数，受精卵数，受精卵率とも対照区の通常交尾の場合とほぼ差異がなかった。

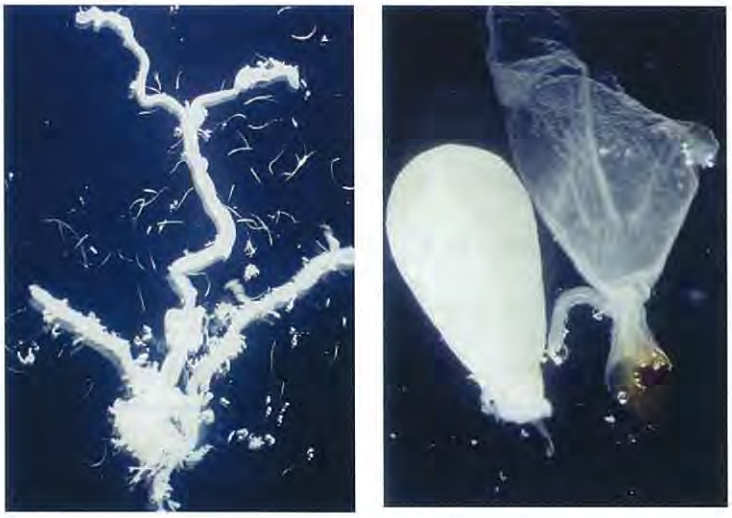

Fig 2.　幼虫期に精巣を除去した雄蛾

A，生殖器官

B，交尾した雌蛾の交尾嚢と精包

3．幼虫期に精巣除去された雄蛾の精包

上述2において，精巣除去雄蛾から精子の存在しない精包（無精子精包）が得られたので，この精包を人工授精に用いて受精率の向上を試みた。貯精嚢精液のみを人工授精した区，無精子精包の分泌液を貯精嚢精液と混合し人工授精を行った区，精巣除去雄蛾と交尾後，貯精嚢精液を人工授精した区，貯精嚢精液を人工授精したのち，精巣除去雄蛾と交尾させた区を設定した（Table 2)。貯精嚢精液のみを人工授精した区では産下卵数が少なく，全く受精卵を得られなかった。無精子精包分泌液と貯精嚢精液を混合した区では54%の受精卵が得られた。精巣除去雄蛾と交尾したのち貯精嚢精液を人工授精した区では，受精卵率は82%で，やや通常交尾より低い成績であった。貯精嚢精液を人工授精したのち精巣除去雄蛾と交尾させた区では，受精卵率は90%で，通常交尾とほぼ変わらない成績であった。

また，精巣除去雄蛾の交尾と凍結した精子の組み合わせも行った（Table 3)。精巣除去雄蛾と交尾したのち凍結精液をトリプシン溶液と混合して人工授精した区，および凍結精液を人工授精したのち精巣除去雄蛾と交尾させた区の両方の試験では，精子はわずかな量しか受精嚢に到達せず，無精子精包を利用しても受精卵率は向上しなかった。

Table 2. 様々な人工授精による産卵成績

	産卵数（粒）	受精卵数（粒）	不受精卵数（粒）	受精卵率（%）
通常交尾	542± 54.8	503± 58.7	39± 19.3	92.8± 3.6
雌蛾交尾嚢から採取した精液	599±139.4	531±145.9	68± 41.0	88.2±25.1
精液のみ	67± 67.6	0± 0.0	67± 67.6	0.0± 0.0
精液とトリプシン液の混合液	515±141.6	462±135.8	52± 30.7	84.2±23.1
精液と無精子精包液の混合液	387±217.5	238±231.4	140±109.7	53.8±25.3
精巣除去雄蛾と交尾後、精液を人工授精	539±190.5	467±214.9	73± 31.9	80.5±18.2
精液を人工授精後、精巣除去雄蛾と交尾	535± 63.0	481± 47.5	55± 42.5	90.3± 7.0

処理個体15蛾についての平均値
精液：ひたち×にしきの貯精嚢精液

Table 3. 凍結精液による人工授精

	産卵数（粒）	受精卵数（粒）	不受精卵数（粒）	受精卵率（%）
通常交尾	450± 78.0	410± 80.4	39± 31.4	91.3± 6.9
凍結精液とトリプシン液の混合液	189± 87.3	35± 20.4	154± 80.4	20.0± 9.8
精巣除去雄蛾と交尾後、凍結精液を人工授精	203± 85.6	19± 12.7	184± 87.8	12.8±12.6
凍結精液を人工授精後、精巣除去雄蛾と交尾	177± 69.2	27± 9.5	150± 66.7	17.2± 6.5

処理個体15蛾についての平均値
精液：烏竜の貯精嚢精液

考　察

通常の交尾で雌蛾交尾嚢内に移送される精包は，大きさが精液量により変化する。特に，雄蛾再交尾時の精包は，1/3以下の大きさになることもある (Fig.3)。Omura[4] は人工授精においても精包が形成すると述べているが，今回の人工授精試験において，貯精嚢精液区と交尾嚢内精液区の両方とも精包は形成されず，しかも通常の精包の内部は雄蛾生殖器官のそれぞれの分泌液により内質と外質などに層をなして分かれるが，これらの現象は見られなかった。精包は，精液が雄蛾生殖器官から射精されるときに精子量により大きさが調節され，精子を効率よく活性化および受精嚢に移行するための容器の役割を持つと考えられる。雄が精包を外界に撒き，雌が精包を拾い受け取るトビムシ類やムカデのように雌の体内で１年以上も受精能力を有する精子を保護する役割を明確に担う[5] のに比べ，蚕は精包を交尾嚢内に移送するため，精包が無くとも精子が外界の影響を受けにくく，交尾嚢が精包の代替えとなり，適正濃度であれば，精子の活性化が行われる。また，精包内の１日後の精子は，受精能を有しておらず，人工授精による受精卵は得られなかった。同じ鱗翅目のナミアゲハでは，雄から得た精包から雌が栄養を取得し，卵の成熟にも関与していると言われている[6,7]。成熟卵を体内に持ち，２，３時間後には産卵する蚕においては，雌蛾の栄養や卵の成熟に関与していることは考えにくいが，長岡ら[8] は，精包内の精子成熟のアルギニン分解カスケードの解明を行っており，今後，精包の機能の解析が進むことを期待する。

精包から精子が精子管へ移行する時の穴口が開くことについては，精子による機械的圧力および化学物質による溶解等諸説[9] があるが，精巣を除去して形成させた精子を含まない精包（無精子精包）でも穴口が開いて内容物が交尾嚢に蓄積するため，精子による機械的圧力ではないと考えられる。

また，人為的に交尾嚢を破壊したのち交尾を行うと，精包が交尾嚢導管で固定されるため，活性化した精子が受精嚢まで達し受精卵が得られた。しかし人工授精では，精子が体内に分散してしまうため，精子が受精嚢に到達せず受精卵は得られなかった。

幼虫期に精巣を除去され雄蛾は，正常に雌蛾と交尾をした。片側の精巣のみが除去された雄蛾の交尾では，産下卵数と受精卵数に影響はみられず，残り１つの精巣の精子で十分な受精卵率を得ることができた。両側の精巣が除去された雄蛾の交尾では，受精卵は産下されず，産卵も誘発されないことを再確認した。この両側精巣を除去された雄蛾は，精巣以外の全ての生殖器官を有しており，各分泌液も存在し，この分泌液を正常の雄蛾貯精嚢精液と混合して人工授精を行うと受精卵が得られた。しかし，通常の人工授精の

Fig 3.　交尾回数と精包と受精嚢の大きさ
左，１回目の交尾
中，２回目の交尾
右，３回目の交尾

場合よりも低い受精卵率であった。この場合，精包液には前立腺液のみでなく付属腺などからの分泌液も含まれており，これら分泌液の混濁の影響が出たものと考えられる。

本研究では，精巣除去雄蛾と交尾した雌蛾に，人工授精によって無精子精包内へ貯精嚢精液を注入することで，精包の影響の有無を調べたところ，通常の人工授精と変わらない成績であった。逆に，貯精嚢精液を人工授精した雌蛾を精巣除去雄蛾と交尾させると，通常交尾とほぼ変わらない産卵成績であった。精液と無精子精包内の分泌液は，精包膜に遮られているが，精子管付近にできる精包の穴口から前立腺液が流れだし，これにより活性化した精子が確実に受精嚢に到達できたと考える。実際，交尾嚢を解剖すると，精包の周りに解離した有核精子が多数存在した。

また，精巣除去雄蛾と交尾した雌蛾に，凍結精子の人工授精を行ったが成績は向上しなかった。もし，精包および内部の分泌液に受精に対する特別な役割があるならば，凍結の影響を受けている精子でも受精嚢に到達し，受精率は向上するであろうと期待された。

このように，蚕の人工授精では精包が形成されていないにもかかわらず，受精卵が獲得できる。また，未活性の精液を人工授精した雌蛾に，精巣を除去した無精子精包雄蛾を交尾させると，授精が成立してトリプシン処理の代替方法となった。しかし，凍結精子の人工授精の雌蛾に対しては効果的な影響を与えないことが判明した。

摘　要

人工授精においては，雌蛾の交尾嚢内に精包が形成されておらず，交尾嚢内で活性化した精子は直接受精嚢に到達する。交尾嚢を破壊した雌蛾に通常の雄蛾を交尾すると，交尾嚢導管に精包が固定され，通常交尾と同様の受精卵を産み，精包は交尾嚢の代替えとなりえるが，人工授精では受精卵は産下されなかった。精巣を除去した無精子精包は，精子以外の全ての分泌液を含んでいる。未活性精子を人工授精した雌蛾にこの無精子精包雄蛾を交尾させると受精卵が産下され，この方法は人工授精法における精子のトリプシン処理の代替えとなり得ることが明らかになった。

引用文献

1) 大村清之助（1939）家蚕蛾産卵の機構Ⅰ．産卵を誘発する刺激．日蚕雑, **10**, 49-57.
2) Takemura, Y., Kanda, T., and Horie, Y. (1999) Artificial insemination using trypsin-treated sperm in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. **45**, 471-477.
3) Takemura, Y., Kanda, T., and Horie, Y. (2000) Artificial insemination using cryopreserved sperm in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. **46**, 491-497
4) Omura S. (1936) Artificial insemination of *Bombyx mori*. J. Facul. Agr. Hokkaido Imp. Univ., **38**, 135-149
5) Hale, W. G. (1965) Observations on the breeding biology of collembola (Ⅰ). Pedobiologia, **5**, 146-152.
6) Watanabe, M. (1988) Multiple matings increase the fecundity of the yellow swallowtail butterfly, *Papilio xuthus L.*, in summer generations. Journal of Insect Behavior, **1**:17-29.
7) Watanabe, M. (1992) Egg maturation in laboratory-reared females of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus L. (Lepidoptera:Papilionidae)*, feeding on different concentration solutions of sugar. Zoological Science, **9**:133-141.
8) 長岡純治（2009）精子が動き出す仕組み．虫たちが語る生物学の未来．pp114-119,（財）衣笠会，京都
9) Omura S. (1938) Structure and function of the female genital system of *Bombyx mori* with special reference to the mechanism of fertilization. J. Facul. Agr. Hokkaido Imp. Univ., **40**, 111-128