走査電子顕微鏡で観察したシナハマダラカ卵 の表面構造

長 島 義 介

The Surface Structure of Anopheles sinensis Wiedemann, 1828 Egg observed under the Scanning Electron Microscope

by

Yoshisuke Nagashima

はじめに

マラリアを伝播するハマダラカ類には、幼虫や成虫の形態が酷似していて、特に野外で採集した場合は、鑑別するのが困難なため、調査報告では complex として取り扱われる種群(近似種 nearspecies、同胞種 sibling species)がある。しかし、ハマダラカは種によって生態やマラリア原虫に対する感受性や伝播性が異なることがあるので、マラリアの感染や撲滅のための基礎研究に当たっては正確な蚊の同定が必要である。形態の酷似したハマダラカの分類学的標徴として卵型が注目されるようになったのは、ヨーロッパのマラリア伝播蚊 Anopheles maculipennis の研究においてであった(Hackett、Hackett and Lewis)。その後、諸地域で卵型の調査(Christopher and Barra 18) ud、森下、Urbino、Baisas and Hu、Walch and Walch-Sorgdrager、Gillies、Xu and Feng)が行われ、各調査地域における既存種の再検討がなされた。我が国では第二次世界大戦終了時(1945)まで、本土のマラリア流行に関与した蚊はシナハマダラカ Anopheles sinensis 一種とみなされていた。しかし、戦後、九州方面でシナハマダラカの卵型とは異なる卵が大鶴(1949)によって発見されたことから、我が国にもシナハマダラカに形態が酷似し、マラリア伝播性が強いと考えられるオオツルハマダラカ Anopheles lesteri が分布していることが明らかになった。また、これに引き続き卵型の相違が契機となってヤツシロハマダラカの分類においても卵型は重要な分類標徴になっている。そのため、卵の形態に関する研究(三宅、甲斐田、Otsuru and Ohmori)も詳細に行われているが、光学顕微鏡の機能的限界のため、より微小な形態については不明な点も多かった。

近年,走査電子顕微鏡の出現に伴い,それらの表面微細構造を明瞭に観察することができるようになった。Hinton (1968) は走査電子顕微鏡を用い,ヨーロッパ・アメリカ・メキシコ・アフリカ・インド・ジャワ産の11種類のハマダラカの卵形態を観察し,光学顕微鏡では把握出来なかった微細構造の立体像を紹介すると共に,それらの形態が種の分類に役立つことを報告した。筆者は1974年より,本邦産シナハマダラカ近似種群の各ステージにおける形態を走査電子顕微鏡で比較観察し,特に卵腹面に存在する多角形網目内の plastron network の網目紋様が種によって異なることを報告した(長島ら,1976;長島・大鶴,1977)。最近 Xu et al. (1981)は,中国のハマダラカ(Anopheles sinensis.,An. lesteri anthropophagus.)の卵と呼吸管の微細構造に関する報告を行っている。

ここでは、光学顕微鏡では不明瞭にしか観察されなかったハマダラカの卵形態をより正確に認識するための一資料として、本邦産マラリア伝播蚊の代表種であり、アジア地域に広範に分布するシナハマダラカ Anopheles sinensis Wiedemann, 1828 卵の表面微細構造に関する走査電子顕微鏡像を記載したい。

材料及び方法

1) **材** 料 卵の微細構造が棲息地や季節によって異なることも考慮し、表1.に示した地域で得た 卵を観察に用いた。

表 1. 観察に供した卵の採集地と採集年月

	. 月	新潟県西蒲原郡巻町	1984年7,8,9月
北海道北見市 1976年8	月	福岡県柳川市	1976年 6 月
北海道伊達市 1983年8	月	熊本県荒尾市	1976年 6 月
岩手県下閉伊郡岩泉町 19	983年 8 , 9 月	沖縄県名護市	1976年 2 月
岩手県盛岡市 1983年 9	月	台湾台東県台東鎮	1975年7月
新潟県西蒲原郡弥彦村 19	978年10月	台湾花蓮県花蓮市	1975年 8 , 9 月

観察に供した卵の多くは 10 % ホルマリン液で保存したものを用いたが、 生の卵でも観察を試みた。 その結果、これまでの観察では、ホルマリンによる微細構造の変形は認められなかった。

2) 方 法 保存液から取り出した卵は、純水で洗浄後、小筆を用いて両面テープを張りつけた金属試料台へ移し形を整えた。この場合、試料台に載せた卵と両面テープの面が乾燥しない内に卵を移動することが大切であった。市販の銀ペーストは、卵が埋没したりするので接着に対しては不適当であった。卵の立体構造を観察するために、双眼実体顕微鏡の下で昆虫標本用の微針を付けた柄付き針で卵を破壊した。また、卵の乾燥によって生じる萎縮を防ぐために、柄付き針で卵に小さな穴を開け、室内で約30分間自然乾燥させた後、イオンスパッタリング法で金蒸着を施した。走査電子顕微鏡の観察に当たっては、電圧15KV、WDは15mmとし、主として1000倍~3000倍の間で観察したが、最大1万倍までの倍率で観察した。尚、本文中で用いた卵の名称は主としてHinton(1968)の用語を引用した。

卵表面微細構造の特徴

シナハマダラカの卵は、長さ0.64~0.65mm、幅0.22~0.24mmで、卵全体の形は船型(写真版 I.1-4)を呈する。卵殻は質的に異なる二層からなる。内側の内卵殻 endochorion は強靱で黒色を帯び、表面は平滑である(写真版 I.4)。外側の外卵殻 exochorion は脆くて、衝撃を与えたり乾燥すると破砕されて内卵殻より容易に剝離する。外卵殻は無色透明であるが、微小構造のために光を乱反射し、光学顕微鏡下では銀白色に見える。外卵殻は、基本的には上下に位置する二層の薄膜とその中間層に位置する支柱 vertical column からなる。これらの三層が複雑に変形して浮嚢、縁飾、疣、甲板、精門域、腹面の多角形網目等の微細形態を構築している。

1) 甲板 Deck

光学顕微鏡で観察した場合,卵背面 dorsal surface で黒色に見える領域は甲板(図1)と呼ばれている。この色は下部の内卵殻の色が透過して見える色である。甲板の上には小結節 deck tubercle が密に分布しており(写真版 II.1-6),光を乱反射して,横から見ると銀白色に見える。甲板中央部の小結節(高さ2.6 μ)は縦皺のあるコップを伏せたような形をしている(図8.B)。また,

それらの小結節の間には、より微小な突起状の小結節が分布している(写真版 \blacksquare . 10,11)。甲板の両端には中央部のものよりも若干大きく、頂部が波形の皺状構造となった小結節(高さ 4μ)があり、疣の間隙を埋めている(図 $8\cdot C$ 、写真版 $\blacksquare\cdot 12$ 、 $\blacksquare\cdot 17\sim 18$)。この甲板上の小結節の形や大きさ、配列状態は、種によって明瞭に異なる場合があることが知られている(Hinton)。この甲板の構造も三層からなるものと推察される。浮**変**下の小結節の表面は皺がなく平滑である(図 $8\cdot A$,写真版 $\blacksquare\cdot 11$, $\blacksquare\cdot 15$)。甲板の小結節面の不規則な縦皺は、恐らく外卵殻の上層薄膜が密着被覆しているためにできたものと考えられる。

2) 浮囊 Float

卵の中央部両側には半楕円型の浮嚢(長さ310~350 μ)がある。光学顕微鏡で浮嚢を卵背面から 観察すると明暗からなる横縞(23~30条)が観察される。従来,この横縞数は浮嚢長と共に卵の分類標徴として重視されている。この浮嚢の明暗模様は走査電子顕微鏡で観察すると,肋 rib と帆状に張り出した肋間膜 intercostal membrane からなることがわかる(図 2 ,写真版 \mathbb{N} · 13~16)。これまでの記載では,幅広い明部は気室 air chamber(幅 5~7 μ)と呼ばれてきたが,走査電子顕微鏡像は明瞭な隔膜で隔てられた小室には分かれていない。暗部は rib とか ridge と呼ばれているが,まさに肋骨構造を呈している(写真版 \mathbb{N} · 16)。肋(太さ2.6 μ)は外卵殻の支柱が変形したものと推察される。浮嚢の上部周縁は,甲板部まで伸展し,浮嚢と縁飾の間に位置する帯状の卵腹膜の上層薄膜と不連続的に接している(図 5)。

3) 疣 Lobed tubercle

卵の両端背面には $5\sim11$ 個の円型(直径 $10\sim13\mu$)及び楕円型の疣状構造がある(写真版 $\mathbb{N}\cdot17-18$)。光学顕微鏡で観察すると花冠状に見える。 走査電子顕微鏡で観察すると,全体としては円柱状(高さ 7.8μ)で,上部は $5\sim11$ 葉からなる小葉が花弁状に配列している。柱部の表面には繊毛状の横皺がある(図 7, $A\cdot B$)。小葉の間には穴が開口している。この疣の形や数も種によって明瞭に異なる場合があることが知られている(Hinton)。

4) 精門域 Micropylar area

卵の先端部には、ロート状をした精門 micropyle がある(図3)。その上部を覆う外卵殻は、幅広い輪状構造に変形し精門域と呼ばれている(写真版 V. 20,22)。輪 micropylar collar の表面は滑らかである。この輪の外縁は不規則な円(直径26 μ)であるが、内縁はほぼ正円で浅く7~8弁の花冠状に褶曲している。その内縁隆起部から放射状に7~8本の針状の突起 ridge が中心に位置する精門に向かって伸びている。この突起は外卵殻の中間層に位置する支柱に起因すると考えられる。この mircopylar area の形や ridge の数、長さが種間で明瞭に異なる場合があることが知られている(Hinton)。

5) 縁 飾 Frill

光学顕微鏡で観察すると、卵背面の甲板の辺縁部には紐状の構造が観察される(写真版 I · 2,3)。この縁飾の構造は、光学顕微鏡では不明瞭であるが、走査電子顕微鏡で観察すると柵状構造を呈していることが分かる(図 5)。この縁飾は卵腹膜の辺縁に該当する。両卵端の縁飾は襟状構造を呈し、内壁面は柵状から平板状に変化し、外壁面は龍骨状を呈する(図 6.A,B)。しかし、卵背面中央部では上部が紐状に肥厚している(図 5,写真版 I ·

6) 多角形網目 Poligonal network

卵腹面の卵腹膜(外卵殻)に明瞭な三層構造を呈する(図4.B,C,D)。内卵殻に接する卵腹膜

シナハマダラカ Anopheles sinensis 卵の微細構造図

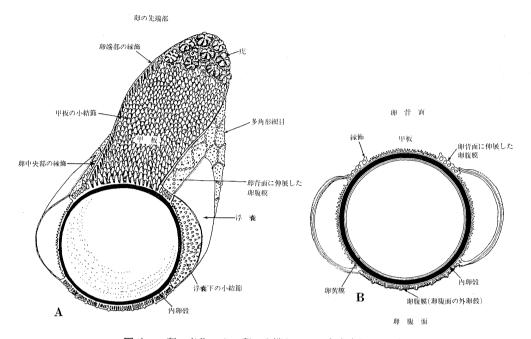


図 1. 卵の名称 A. 卵の先端部 B. 卵中央部断面図

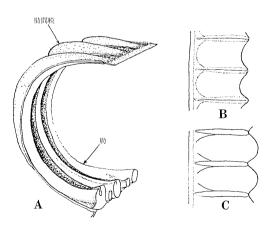


図 2. 浮囊の中央部断面

A. 肋と肋間膜

B. C. 肋間膜の状態変化

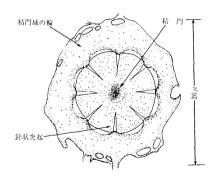


図 3. 精門域の構造

シナハマダラカ Anopheles sinensis 卵の微細構造図

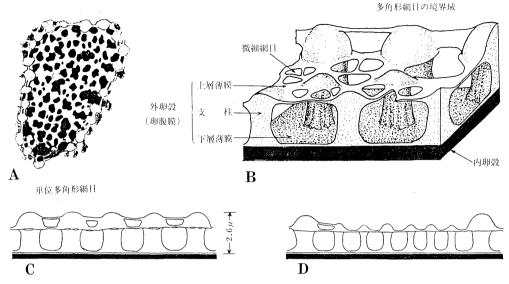


図 4. 卵腹膜(卵腹面の外卵殻)の構造 A. 低倍率で観察した単位多角形網目(polygonal network)と、その内面に存在する微細網目(plastron network) B. 卵腹膜(卵腹面の外卵殻)の立体構造図 上下二層の薄膜と、その間に存在する支柱からなる三層構造を呈する。 C. 多角形網目の境界を形成する葺状小結節の配列状態 D. 単位多角形網目の断面図

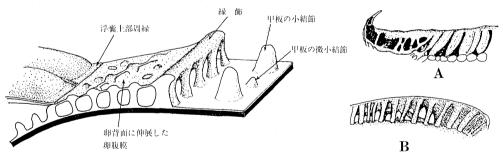


図 5. 卵背面中央部側辺部の外卵殻立体図

図 6. 卵背面両端の縁飾 A. 外壁面 B. 内壁面

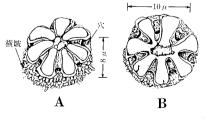


図7. 疣の構造 A. 側面 B. 上面

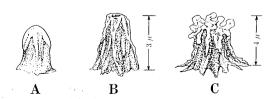


図8. 甲板上の小結節 A. 浮嚢下の小結節 B. 甲板中央部の小結節 C. 卵端背面の小結節

の基底部はシート状の薄膜(下層薄膜)からなり卵全体を覆っている(写真版 \P · 8)。この薄膜の上から支柱 vertical column が密に林立している。また,その支柱の頂部には多孔質の薄膜(上層薄膜)が覆っている。薄膜に覆われた支柱は茸状を呈する(図 \P · 8 · 8 · 9 真版 \P · 24)。支柱には大小の二種類があり,大きい茸状の支柱は30個前後で多角形状に配列し,その笠部から糸状あるいは帯状に伸びる薄膜によって互いに連結し境界を形成している。そのため,低倍率の顕微鏡で観察するとそれらは網目状に見える(図 \P · A · \P · 5 事版 \P · 21,22)。卵腹面の中央部の網目(写真版 \P · 21)は六角形(長さ \P · 23~41 \P · 幅 \P · 13~18 \P)のものが多く,両卵端部では菱形(写真版 \P · 22)となる。この多角形網目の一目に該当する領域は,雌の濾胞細胞 1 個に起因する(Hinton)。

7) 多角形網目内微細網目 Plastron network

走査電子顕微鏡で観察(3000倍)すると,多角形網目の内部には更に微細な網目が存在する(図 4・A,写真版 V・23,24)。この内面には80前後の小さな茸状の支柱 vertical column が直立し,頂部の笠状の縁から水平に伸展する薄膜が,糸状や帯状に連結して独特の網目を形成している(写真版 VI・25-30)。その紋様型は卵腹面の中央部の多角形網目内において顕著である。この plastron network の基本的紋様型は,これまでの観察結果では,地理的にも季節的にも変化が見られず,種によって安定していることがわかった。

おわりに

我が国では、マラリアは過去の疾病として人々の記憶から薄れつつある。しかし、世界的な見地 からすれば、今もなお世界人口の50%がマラリアの流行感染可能な区域に居住し、年に2億人以上 が感染していると言われている。しかも,最近マラリア絶滅計画は挫折し,新たな防除計画は模索 状態にあり、媒介蚊の分類も一つの問題点とされている(栗原・1984)。マラリアはハマダラカが 媒介する流行病であり、ハマダラカの種類によってマラリア伝播性が異なることが知られ、近年で は、亜種や品種、系統までが伝播性に関係する(神田・1984)とされているので、マラリアの研究 において媒介蚊の分類学的な研究が重要であることは言うまでもない。ハマダラカには形態が酷似 していて近似種 (near-species) とか同胞種 (sibling species) と呼ばれ一見区別しがたい種類があ り、現在もなお分類学的な取り扱については問題を有している。Simpsonは、解剖学的に極めて似 ている遺伝学的別種(同胞種)でも、より注意深く研究すると形態的な相違が認められないという のは稀としている。 小型の昆虫である蚊の 形態学的研究は、 従来光学顕微鏡下で 行われてきたの で、より微小な形態の相違点が見落とされてきた可能性もある。そこで、筆者は走査電子顕微鏡を 用い、本邦産ハマダラカ5種の各ステージにおける微小形態について比較観察を行ってきた。特に ハマダラカの卵は、分類学的標徴の一つとして注目されているので、重点的に観察してきた。その 結果, 卵の形態としては最小形態である plastron network に, 種に対応した形態的特徴が認めら れた。また、資料を増せば亜種レベルの鑑別も可能であることを示唆する観察資料も得ている(長 島ら・1983)ので、今後は亜種レベルの各ステージの微細形態を詳細に検討する必要があると考え る。ここでは、それらの微小形態を理解するための基礎資料の一つとして、我が国のマラリア伝播蚊 の代表種であり、アジア地域に広く分布しているシナハマダラカ Anopheles sinensis Wiedemann, 1828. の卵微細構造の基本的形態について記載した。

謝辞

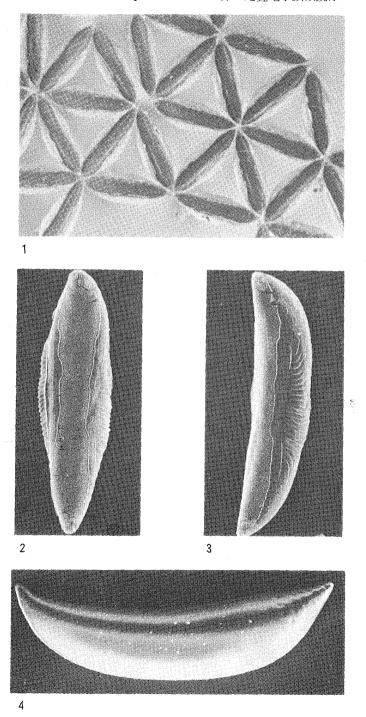
執筆に当たり,筆者が長年ご指導を頂き,本文のご校閲を賜った琉球大学医学部寄生虫学教室(前新潟大学医学部医動物学教室教授)大鶴正満教授に厚くお礼を申し上げる。また,走査電子顕微鏡の操作技術をはじめ,いろいろ研究の面でご指導頂いている 新潟大学医学部医動物学教室 関川弘雄講師,終始研究のご助力を頂いた農林水産省北海道農試畑作部畑虫害研究室 早川博文室長,卵を提供下さった沖縄県公害衛生研究所の岸本高男先生,台湾省伝染病研究所の林和木先生に深く感謝の意を表す。

主な参考文献

- 1. Baisas, F. E. and Hu, S. M. K (1936): Anopheles hyrcanus var. sinensis of the Philippines and certain parts of China, with some comments on Anopheles hyrcanus var. nigerrimus of the Philippines, Mon. Bull. Bur. Health Manila., 16:205-242.
- 2. Christophers, S. R. and Barraud, P. J. (1931): The eggs of Indian Anopheles, with discriptions of the hither to undescribed eggs of a number of species, Rec. Malar, Surv. India. 2:161-192.
- 3. Deane, M. P. and Causey, O. R. (1943): Viability of *Anopheles gamblae* eggs and morphology of unusual types found in Brazil. Am. J. trop. Med., 23:95-103.
- 4. Edwards, F. W. (1929): Mosquito Notes VII, Bull. Ent., 20:321-343.
- 5. Gillies, M. T. (1955): Notes on the eggs of some East African *Anopheles*. Ann. trop. Med. Parasit., 49:158:160.
- Hackett, L. W. (1934): The present status of our knowledge of the subspecies of Anopheles maculipennis Tr. Roy, Soc. Trop. Med. and Hyg., 28:109-28.
- Hackett, L. W. and Lewis, D. G. (1935): A new variety of A. maculipennis in Southern Europe. Riv. di Malariol., 14:377-83.
- 8. Hinton, H. E. (1968): Observations on the biology and taxonomy of the eggs of *Anopheles* mosquitos. Bull. Entomol. Res., 57:495-508.
- 9. Hinton, H. E. (1981): Biology of Insect Eggs volume 1 and 2 Pergamon Press, New York.
- 10. Herms, W. B. and Frost, F. M. (1932): A comparative study of the eggs of Californian anophelines J. Parasit., 18:240-244.
- 11. Hurlbut, H. S. (1938): Further notes on the overwintering of the eggs of *Anopheles walkeri* Theobald with a description of the eggs. J. Parasit., 24:521-526.
- 12. 甲斐田哲二 (1951): 日本産各種ハマダラカ卵の形態学的研究. 福岡医学雑誌, 42:667-679.
- 13. 栗原 毅(1984): マラリア媒介蚊防除の諸問題. 衛生動物, 35:158.
- 14. 神田錬蔵(1984): 東南アジアにおけるマラリア媒介蚊の問題点. 衛生動物, 35:159.
- 15. Ma, S.-F. (1964): Studies on the different types of *Anophels* (A.) hyrcanus sinensis within the *Anopheles* (A.) hyrcanus groups 1. comparative morphological study of eggs. Act. Entomol. Sin., 13:862-872.
- 16. 三宅三徳(1950): 日本産ハマダラカ3 卵型の形態学的研究. 福岡医学雑誌, 41:839-847.
- 17. Miyazaki I. (1951): On a new anopheline mosquito Anopheles yatsushiroensis n sp. found in kyushu. with some remarks on two related species of the Genus Kyushu Mem. Med. Sci., 11:195-208.
- 18. 森下 薫 (1932): 台湾産 Anopheles の卵に就いて. 台湾医学会雑誌, 31:331-340.
- 19. 長島義介, 大鶴正満, 関川弘雄, 中村靖人, 岸亭高男 (1976): 走査電子顕微鏡による A. sinensis と A. lesteri 卵の比較. 衛生動物, 27:53.
- 20. 長島義介, 大鶴正満 (1977): SEMによる Anopheles koreicus と Anopheles lindesaii japonicus 卵の構造. 衛生動物, 29:51.
- 21. 長島義介, 大鶴正満 (1978): 日本産ハマダラカ属卵の形態比較. 衛生動物, 29:24.
- 22. 長島義介, 関川弘雄, 大鶴正満 (1983): 本邦産 Anopheles lesteri の変異. 衛生動物, 34:114.
- 23. 長島義介, 大鶴正満 (1980): シナハマダラカ近似群の卵微細構造について. 衛生動物, 31:154.
- 24. 大鶴正満(1949): 日本産 Anopheles hyrcanus の一新型に就て. 福岡医学雑誌, 40:139-148.
- 25. Otsuru, M. and Ohmori, Y, (1960). Malaria studies in Japan after World War II. Part

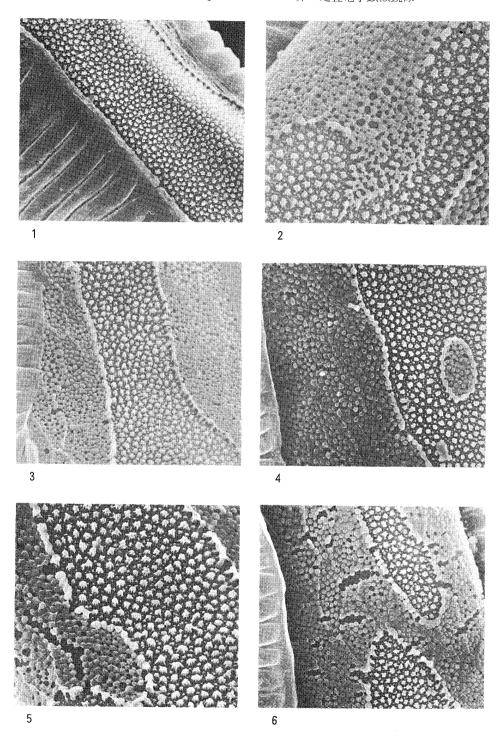
 1. The research for *Anopheles sinensis* sibling species group. Jap. J. Exp. Med., 30:33-65.
- Rozeboom, L. E. (1937): The eggs of Anophe'es pseudopunctipennis in Panama. J. Parasit., 23: 538-539.
- Rozeboom, L. E. (1942): Subspecific variations among neotropical Anopheles mosquitoes and their importance in the transmission of malaria. Am. J. trop. Med., 22:235-255.
- 28. Simpson, C. G. (1961): Principle of animal taxonomy (Columbia Univ. Press.) 邦訳 『動物分類学の基礎』白上謙一郎訳(1974 岩波書店)
- Urbino, C. M. (1936): The eggs of some Philippine Anopheles. Mon. Eull. Eur. Hlth. Philipp., 16:261-273.
- 30. Walch, E. W. and Walch-Sorgdrager G. B. (1954): The eggs of some Netherland Indian Anophelines. Trans. 9th Gongr. Far East Assoc. Trop. Med. Nanking., 2:65-81.
- 31. Xu, J. and Feng, L. C. (1975): Studies on the *Anopheles hyrcanus* group of mosquitoes in China. Act. Entomol. Sin., 18:77-104.
- 32 Xu, J., Zhao, M. and Ma J. (1981): Comparative studies on the scanning electron micrographs of *Anopheles sinensis* Wied. and *Anopheles lesteri* anthropophagus Xu et Feng. Entomotaxonomia., 3: 265-272.

シナハマダラカ Anopheles sinensis 卵の走査電子顕微鏡像



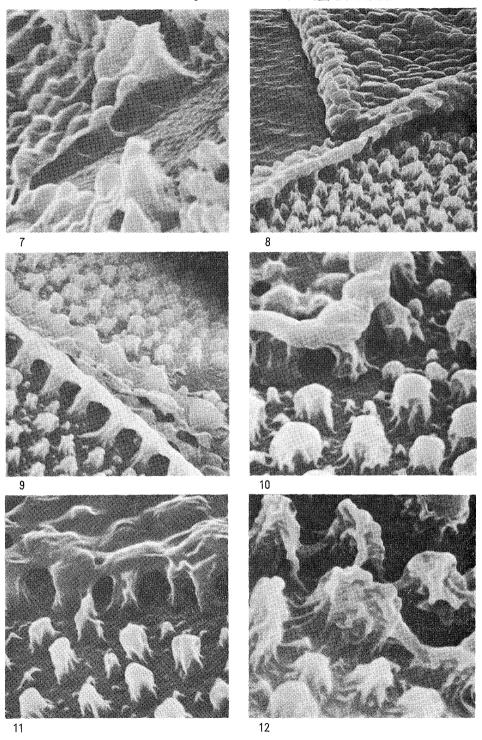
写真版1.1.水面に浮かんでいるシナハマダラカ卵鬼の光学顕微鏡像 2. 走査電子 顕微鏡で観察した卵背面像 3. 走査電子顕微鏡で観察した卵の側面像 4. 外卵殻を 剝離した卵の内卵殻像

シナハマダラカ Anopheles sinensis 卵の走査電子顕微鏡像



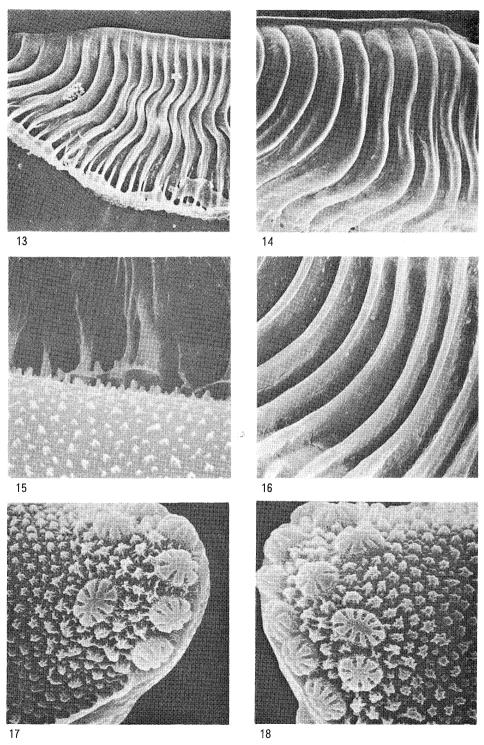
写真版 I. 甲板の季節的変異像 1. 普通の卵の甲板 2-6. 秋期に観察される縁飾の変化 (季節型卵)

シナハマダラカ Anopheles sinensis 卵の走査電子顕微鏡像



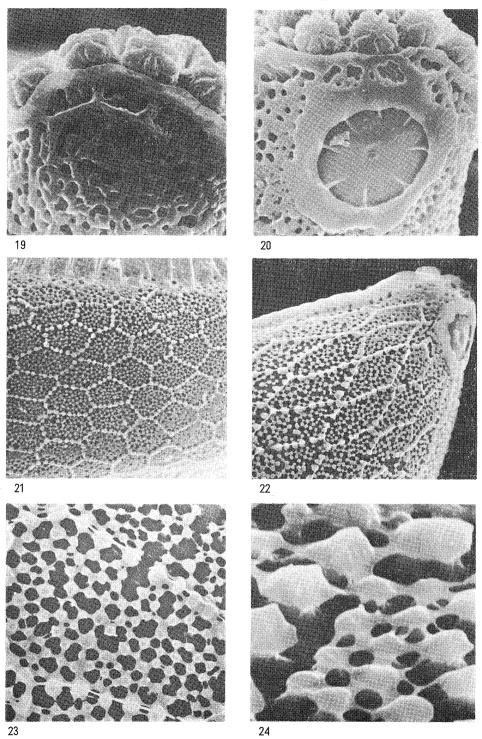
写真版 11. 甲板の微細構造像 7. 卵背面中央部辺縁部の縁飾断面 8. 内卵設より剝離し反転している外卵殻の下層薄膜の裏面 9. 縁飾の柵状構造 10. 縁飾と甲板上の小結節の拡大 11. 浮嚢下の小結節 12. 卵端部背面の小結節(頂部は波状を呈する)

シナハマダラカ Anopheles sinensis 卵の走査電子顕微鏡像



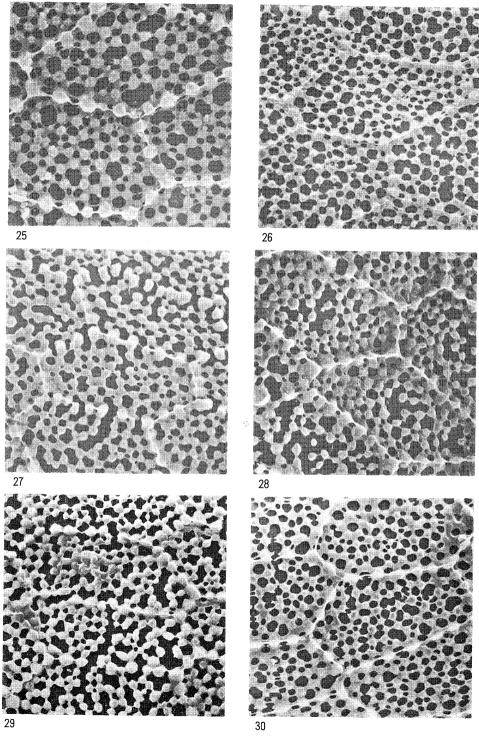
写真版 IV. 浮嚢と疣の拡大像 13. 浮嚢の内面 14. 浮嚢の外側面 15. 浮嚢の内面下部 と小結節 16. 浮嚢内面の肋骨横造 17. 卵の後端背面と疣群 18. 卵の前端背面と疣群

シナハマダラカ Anopheles sinensis 卵の走査電子顕微鏡像



写真版 V. 卵の表面拡大像 19. 卵の後先端部 20. 卵の前先端部と精門域 21. 卵腹中央部の多角形網目(六角形が多い) 22. 卵端部の多角形網目(菱形が多い) 23. 一つの多角形網目の拡大(内部は微細網目) 24. 多角形網目の境界部拡大(右下は内面の微細網目)

シナハマダラカ Anopheles sinensis 卵の走査電子顕微鏡像



写真版 N. 各産地別の多角形網目と微細網目 (plastron network) の紋様像 25. 台湾産26. 新潟県産 27. 沖縄産 28. 北海道上杵臼産 29. 九州産 30. 北海道日高産