

The Induction of Sexual Sterility in the Silk-Worm Moth by an Alkylating Agent, Apholate.
Chisato HIRANO (National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Tokyo, Japan) Received
September 9, 1965. *Botyu-Kagaku* 30, 1965 (with English summary, 114)

18. カイコガに対する Apholate の不妊作用 平野千里 (農林省農業技術研究所) 40. 9. 9 受理

カイコガ幼虫に Apholate を投与し、その不妊作用を検討した。適当量の投与により、成虫の生殖能力はいちじるしく減退する。雌では卵形成の阻害および卵の被受精能力の低下が観察され、雄では精子形成の阻害あるいは精子死亡、および優性致死変異の誘起が認められた。一方、多量の Apholate を投与した場合には、蛹の触角、脚、翅にいちじるしい退化がみられた。

1. 緒 言

不妊雄の放飼による害虫の防除は、アメリカ合衆国東南部での大規模なスクリーワームの絶滅に成功して以来、新しい害虫防除技術の一つとして注目を集めるに至った¹⁾。これと同時に昆虫に、不妊化を起こさせるために従来使用されてきた X 線やガンマ線に代って、不妊化作用をもつ化学物質の探索も開始された^{2,3)}。このような作用をもつ化合物として、最初はビタミン B 類、アミノ酸、核酸構成成分など生化学的に重要な物質にたいする代謝拮抗物質が注目され、aminopterin, amethopterin, 5-fluorouracil などかなり有効な化合物が見いだされた^{4,5,6)}。

1960 年に至って、La Brecque らがアジリジン誘導体の tretamine や morzid に不妊作用を認め⁷⁾、さらに翌年 aphamide, aphoxide (tepa), apholate の優れた不妊効果⁸⁾が報告されて以来、昆虫不妊物質研究の興味の中心はアジリジン系化合物に移り、このグループの多数の化合物の不妊化作用が検討されている^{9,10)}。

この間供試された昆虫は、イエバエをはじめスクリーワーム、サシバエ、かなど双翅目の、いわゆる衛生害虫がほとんどであり^{9,10)}、農業害虫についてはミバエ^{11,12)}、アズキノウムシ^{13,14)}、テントウムシダマシ¹⁵⁾、ブルムゾウ¹⁶⁾、ワタミゾウ^{17,18,19)}、ハダニ^{20,21)}などで、わずかな試験が行なわれているにすぎない。とくに農業害虫として重要なグループである鱗翅目や有翅目については、ほとんど試験が行なわれていない。

本報では、食葉性鱗翅目昆虫にたいするアジリジン系化合物の不妊化作用を知る目的で、カイコガの幼虫に apholate を投与した予備的実験の結果を報告する。供試昆虫としてカイコガを選んだのは、発育状態の斉一な個体群が容易に得られることにもよるが、最大の理由は人工交配が容易であり、また蔵卵数、産卵数の個体変異がきわめて小さいという、不妊効果を正確に判定するための必要条件を満たしていることによる。

アジリジン系不妊剤について多くの御教示をいただき、また供試 apholate の入手について御高配いただき

いたアメリカ農務省昆虫研究部の C. N. Smith, G. C. La Brecque の両氏、および Squibb 研究所の S. S. Ristich 氏に厚く御礼申し上げる。農林省蚕糸試験場化学部の福田紀文、須藤光正両技官は供試カイコの入手および実験にあたり、いろいろ御世話下さった。東京農工大学農学部須貝悦治博士は実験結果について多くの御意見を寄せられ、農林省農業技術研究所湯嶋健技官は研究上多くの御便宜をはかれ、また原稿閲読の労をとられた。これらの方々の御厚意に深く感謝の意を表する。

2. 材料および方法

供試虫：カイコガ幼虫 (*Bombyx mori* L.) 口128×支128を用いた。農林省蚕糸試験場で常法により飼育された幼虫で、薬剤は終令起眠5日目の個体に投与した。

薬剤：Apholate [2, 2', 4, 4', 6, 6'-hexahydro-2, 2', 4, 4', 6, 6'-hexakis (1-aziridinyl)-1, 3, 5, 2', 4, 6-triazatriphosphorine] を用いた。The Squibb Institute for Medical Research の S. S. Ristich 博士より送付されたもので、使用まで塩化カルシウム乾燥器に入れて氷室に保存した。Apholate は時間の経過とともに重合して不溶性になると同時に、その生物的活性を失う。不溶性重合物を除くため、実験前日にベンゾールから再結し、実験当日に蒸留水に溶解して供試薬液とした。

投与量は雌雄とも1頭あたり20 μ g, 80 μ g, 320 μ g, 1280 μ g および5120 μ gの5段階とし、それぞれ0.1 ml 中に溶解した。

投与方法：先端を丸くした注射針を着装した注射筒を使用し、各薬量を含む供試薬液を0.1 ml 宛、径口的に幼虫の消化管内に注入した。この方法によれば注射針の先端は口器、食道を経て消化管に達するため、虫体内部器官にまったく傷害を与えず、また体液や消化液の損失もなく、一定量の薬剤を正確に消化管内に送り込むことができる。一部の個体では薬液注入後に、消化液の嘔吐がみられたので、実験区より除いた対照区には蒸留水0.1 ml を注入した。

Table 1. Responses of *Bombyx mori* to apholate administration.

Sex	Microgram Apholate given	Number of larvae treated	Number and (%) of			
			larvae cocooned	insects pupated	pupae normal	adults emerged
Female	0	32	25 (78%)	22 (69%)	22 (69%)	22 (69%)
	20	9	8 (89)	8 (89)	8 (89)	8 (89)
	80	10	8 (80)	8 (80)	8 (80)	8 (80)
	320	12	11 (92)	8 (67)	(7)*(58)	(7)*(58)
	1,280	10	7 (70)	7 (70)	0 —	0 —
	5,120	10	7 (70)	1 (10)	0 —	0 —
Male	0	28	25 (89%)	22 (79%)	22 (79%)	22 (79%)
	20	11	9 (82)	9 (82)	9 (82)	9 (82)
	80	10	9 (90)	9 (90)	8 (80)	8 (80)
	320	8	5 (63)	5 (63)	(5)*(63)	(5)*(63)
	1,280	10	9 (90)	9 (90)	0 —	0 —
	5,120	10	4 (40)	2 (20)	0 —	0 —

* Slight degeneration occurred at antennae, legs and wings.

調査法：薬剤投与後の幼虫には桑葉を与えて 25°C に保護し、老熟後は紙製円筒内で営繭化蛹させる。さらに成虫の羽化をまち、交配実験を行なった。

交尾：産卵は常法により行なわせ、さらに産卵後の雌ガについて腹部に残留する成熟卵数を調査し、産下卵数と併せて蔵卵数とした。産下卵は浸酸法により非休眠性とし、その孵化状態を調査した。

3. 実験結果

営繭・蛹化および蛹の形態：各濃度区とも apholate 投与による影響には、雌雄差はみられなかった。結果を第1表に要約し、併せて蛹の腹面を第1図に示す。

1頭あたり 80µg 以下を投与した場合には、営繭状

態、蛹、成虫とも外形的な異常はみられない。320µg 投与区では営繭状態は正常であったが、蛹の翅、触角、脚がわずかに退化した。しかし成虫の羽化、交尾はほぼ正常に行なわれた。

さらに投与量が増すと、蛹では翅、触角、脚がいちじるしく退化し、成虫化は起こるが羽化脱皮はできない。すなわち 1,280µg 投与区では、営繭率、蛹化率は低下しないが、繭はやや薄くなる。また蛹の触角、脚は完全に退化し、翅もいちじるしく退化する。5,120µg 投与区では営繭率はほとんど影響を受けないが、繭はかなり薄くなる。蛹化率は他区にくらべて低下し、蛹化した個体も翅、触角、脚は完全に退化し、外見的には認めることができない。

Table 2. Antifertility effects on *Bombyx mori* of Apholate administered orally in the larval stage. Number of eggs is given per single female.

Cross combination	Number of pairs	Number of eggs			Number of eggs		Number of eggs	
		produced (A)	laid (B)	B/A×100 (%)	fertilized (C)	C/B×100 (%)	hatched (D)	D/B×100 (%)
F ₀ × M ₀	10	701	665	95	664	100	631	95
F ₀ × M ₂₀	5	676	723	94	671	99	649	96
F ₂₀ × M ₀	4	719	665	93	661	99	640	96
F ₂₀ × M ₂₀	4	699	650	93	648	100	625	96
F ₀ × M ₈₀	4	699	663	95	659	99	540	82
F ₈₀ × M ₀	4	705	666	95	664	100	653	98
F ₈₀ × M ₈₀	4	633	679	93	677	100	526	77
F ₀ × M ₃₂₀	3	727	263	36	231	88	33	13
F ₃₂₀ × M ₀	4	110	62	56	32	52	27	43
F ₃₂₀ × M ₃₂₀	2	215	59	27	15	26	0	—

* F: Female; M: Male; Numerals indicate Apholate µg given.

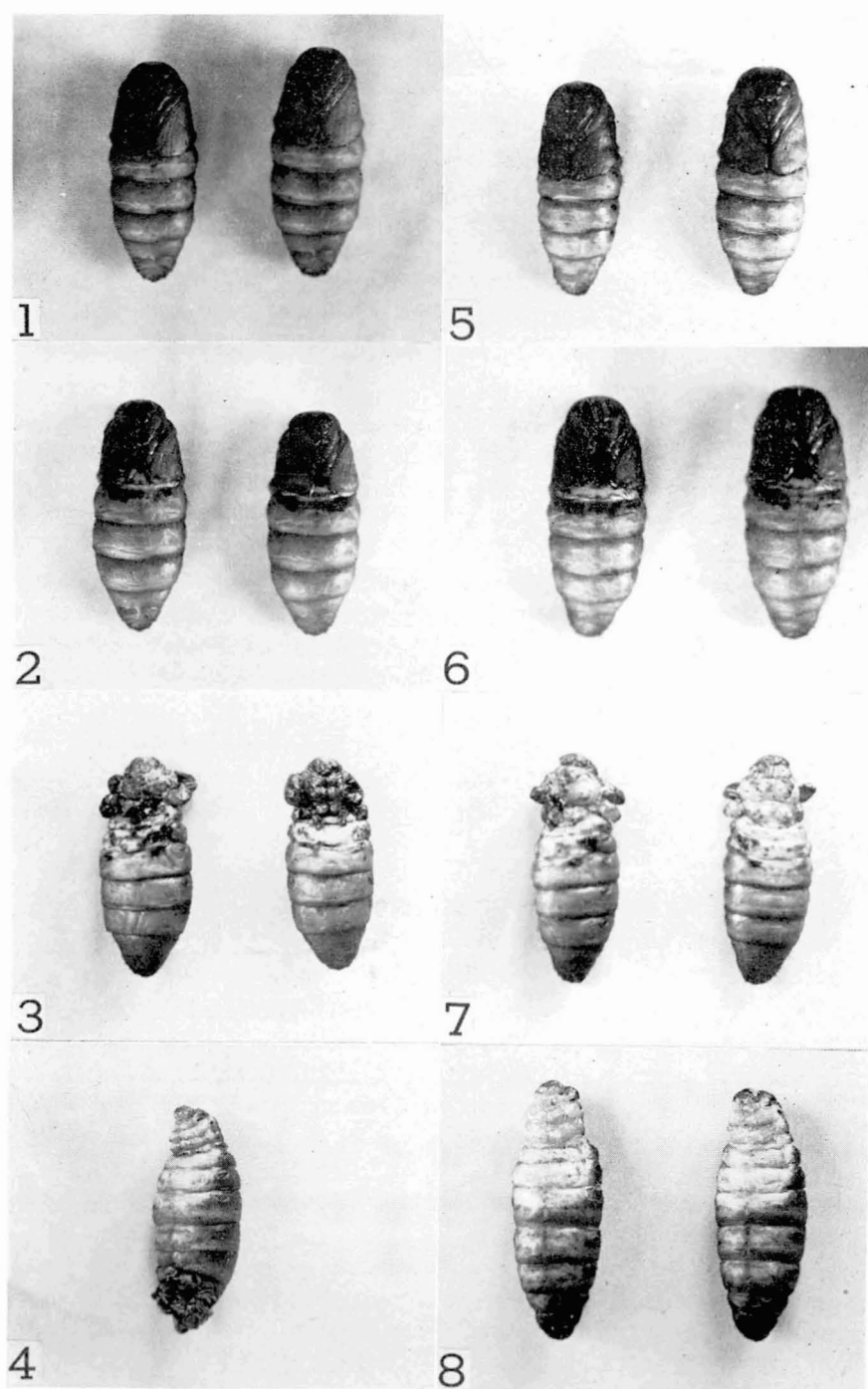


Fig. 1. Morphological degeneration in *Bombyx* pupae, induced by larval administration of Apholate.

1, 2, 3, 4.....Female pupae, given apholate 0, 320, 1280 and 5120 μ g, respectively.
5, 6, 7, 8.....Male pupae, given apholate 0, 320, 1280 and 5120 μ g, respectively.

不妊作用：成虫が羽化した 320 μ g 以下の投与区間で交配実験を行なった。結果を第2表に要約する。

まず蔵卵数は、雌に 320 μ g 投与すると約 $\frac{1}{2}$ に減少する。しかし 80 μ g 以下の投与では全く影響がない。

産卵数は、雌雄とも 80 μ g までは影響を受けない。しかし雌に 320 μ g 投与すると、雄の処理条件にかかわらず産卵数は60個内外となり、他区の $\frac{1}{2}$ 以下である。また雄に 320 μ g 投与した場合にも、無処理雌の産卵数は約 $\frac{1}{2}$ に減少する。

受精卵数は 320 μ g 区を除いて、産卵数とほぼ等しく、受精率(受精卵数/産卵数)はほとんど 100%を示す。雄に 320 μ g を投与した場合には、受精率は 88%とかなり高いが、これは不受精卵の大半が産下されなかったためで、受精能力としては蔵卵数(727個)の $\frac{1}{2}$ 以下を受精させたに過ぎない。雌に 320 μ g を投与すると、産下卵の約半数は不受精卵となり、被受精能力をもつ卵は約 $\frac{1}{2}$ にすぎなかった。

孵化数は、雌では 80 μ g 以下の投与ではほとんど影響を受けず(孵化率 95~98%)、320 μ g 投与区でも産卵数にたいする孵化率は受精率が低いため 43%であるが受精卵にたいする孵化率は 85%とあまり低くない。一方雄に処理した場合の孵化率は、80 μ g 投与区で 80% ($F_0 \times M_{80}$: 82%, $F_{80} \times M_{80}$: 77%) と多少低下し、320 μ g 投与区ではいちじるしく低い。これは受精後に发育を停止した卵が多いことを示しており、精子において優性致死変異(dominant lethal mutation)が高い頻度で誘起されているものと推定される。

4. 考 察

カイコガ終令幼虫の消化管内に apholate を注入すると、雌雄とも 320 μ g の投与でいちじるしい不妊現象がみられた。

雌では蔵卵数の減少からも明らかのように、卵巣および卵の发育がいちじるしく阻害され、また産卵率や受精の低下からみて卵の被受精能力の減退も推定される。しかし受精卵の孵化歩合がかなり高いことからみて、優性致死変異による受精後の发育障害はあまり起こっていないものようである。

一方雄でも、320 μ g 投与区では受精能力が約 $\frac{1}{2}$ に低下することから、精子形成の阻害あるいは精子死亡が明示される。さらに注目すべきことは、無処理区雌と 320 μ g 区雄の細み合わせで、受精卵数 231 個(受精率 88%)をこたいして孵化数が 33 個(孵化率 13%)にすぎなかったことから考えて、精子におけるいちじるしい優性致死変異の誘発が推定される。

精子における優性致死変異の誘起は、80 μ g 投与区の成績からもうかがうことができる。すなわち、第2表から 雌 0 \times 雄 80 雌 80 \times 雄 0 および雌 80 \times 雄 80

の3区の受精率と孵化率を比較すると、受精率では区間にまったく差がないにもかかわらず、孵化率は雄処理の場合に低下する。したがって精子では、320 μ g 投与区ではもちろん 80 μ g 投与区でも優性致死変異が誘起されることがわかる。Apholate による精子の優性致死変異はワタミゾウムシ *Anthonomus grandis* でも認められており、この場合は孵化直後の幼虫の死亡がいちじるしい¹⁹⁾。

以上のように、カイコガにたいする apholate の不妊作用は、雌では卵形成の阻害および卵の被受精能力の減退を起こさせ、一方雄には精子形成の阻害あるいは精子死亡、および精子における優先致死変異を誘導する。しかし最終的にみた apholate の不妊効果には、ほとんど雌雄差はみられない。一応の指標として孵化数を比較してみると、雌に 80 μ g を投与した場合には全く不妊効果はないのに、雄処理により孵化数が約 20%減少する点を除けば、全体としての不妊効果には雌雄差は認められない。

同様に apholate の不妊作用に雌雄差が認められない例は、イエバエ *Musca domestica*²¹⁾ やテントウムシダマシ *Epilachna varvestis*²²⁾ で報告されている。一方カ *Aedes aegypti*²²⁾ やサシバエ *Stomoxys calcitrans*²³⁾ では雄が雌よりも感受性が高く、スクリュウワーム *Cochliomyia hominivorax*²⁴⁾、アズキゾウムシ *Callosobruchus chinensis*¹⁴⁾ では逆に雌が影響を受け易い。現在までに得られた知見から apholate の不妊作用にたいする雌雄差について、一般的な結論を出すことは困難である。供試昆虫の種類によって異なるばかりでなく、どのような发育期の昆虫を供試したかによっても、異なった結果が得られる可能性がある。

多量の apholate を投与した場合に、蛹にみられた形態的異常は興味深いものがある。まず触角、脚、翅の段階的な退化で示されるように、異常が定向的に起こることは注目に値する。Apholate の不妊効果は、その強力なアルキル化作用によって、主として増殖中の細胞に働いて正常な細胞分裂を阻害したり、染色体やこれを構成する核酸分子に異常を起こさせることによる²⁵⁾。したがって触角、脚、翅の发育を特異的に阻害することは、これらの器官を構成する細胞の増殖が、apholate 投与時あるいはその後には活発に行なわれたことを示唆している。もちろん、apholate によって大きい影響を受ける卵巣や精巣での生殖細胞の形成も、apholate 投与時以後に活発であったことは明らかである。一方、大きな影響を受けなかった他の諸器官の形成は、apholate 投与時にはすでにほぼ完了していたものと考えてよいであろう。

また、この形態異常(触角、脚、翅の退化)が、幼虫期に適量の X 線やガンマ線を照射した場合にみら

れる蛹の形態異常ときわめてよく一致していることも、興味ある事実である。生物体、とくに増殖中の細胞にたいする apholate などアジリジン系化合物の作用が電離放射線のそれとよく類似していることを示している。

Apholate の不妊化作用は、これまでイエバエ、スクリューワーム、サシバエ、カなど主として人畜に有害な双翅目昆虫で確認されており^{7,9,10,22-30}、とくにイエバエでは野外試験も行なわれ、かなりの成績が得られている^{31,32}。

これに反し、農業害虫関係での研究例は少なく、テントウムシダマシ¹⁵、アズキゾウムシ^{13,14}、ワタミゾウ^{17,18,19}、ハダニ類^{20,21}で試験されているにすぎない。試験された種類はいずれも apholate によって不妊化されるが、テントウムシダマシやワタミゾウでは処理により、成虫死亡率の増加や生存日数の短縮が認められている。

とくに興味あるのは、ミカンハダニ *Panonychus citri* やナミハダニ *Tetranychus telarius* を処理した場合である。ハダニの雌に apholate を投与すると産卵数孵化数ともに低下するが、雄に投与した場合には産卵数も孵化数もあまり低下しない。ところが孵化した幼虫はほとんど雄になってしまう。ハダニでは未受精卵は雄に発育することが知られており、この現象はハダニの雄が apholate によって受精能力を失ったことを明瞭に示している。

本実験で得られた結果から、apholate がカイコガに対しても強力な不妊作用をもつことは確実である。しかし一般に、鱗翅目昆虫に対して有効であるかどうかは、今後の広範囲な試験をまたねばならない。また Smith² も述べているように、不妊剤の実用化にあたっては、対象とする昆虫の1種類1種類について、殺虫剤の場合にくらべて遙かに詳細な試験を行ない、十分な知識を得ることが必要である。このことは不妊化という作用様式からも当然考えられるところであり、たとえば投与方法や投与時期などはとくに検討せねばならない。

さらに充分な理解のためには、その作用機構についても明らかにすることが必要である。カイコガに対する apholate の不妊化作用の機構については、現在細胞学的な検討を進めており、別に公表する予定である。

5. 摘 要

カイコガに対する apholate の不妊作用を検討するため、終令中期の幼虫の消化管内に apholate 水溶液を注入した。1頭あたり 20~80 μ g を投与した場合には蛹は形態的に正常であるが、320 μ g を投与すると蛹の触角、脚、翅はわずかに退化した。さらに投与量を

増加すると蛹の触角、脚、翅は全く形成されない。

成虫について生殖能力を検討した結果、次のように雌では卵形成の阻害および卵の被受精能力の減退が観察され、雄では精子形成の阻害あるいは精子死亡、ならびに優性致死変異の誘起が認められた。

1. 雌の産卵数は 320 μ g 投与区で、約 $\frac{1}{2}$ に減少する。しかし 80 μ g 以下の投与では無処理区とかわらない。
2. 産卵数は雌雄とも 80 μ g 以下の投与では影響を受けない。しかし雌に 320 μ g 投与すると産卵数は $\frac{1}{2}$ 以下となる。雄に 320 μ g 投与した場合にも無処理雌の産卵数は約 $\frac{1}{2}$ に減少する。
3. 受精卵数は、雌雄とも 80 μ g 以下の投与では無処理区とかわらない。雌に 320 μ g 投与すると産下卵の約 $\frac{1}{2}$ は不受精卵となり、卵の被受精能力の低下が認められた。雄に 320 μ g 投与した場合には全産卵数の $\frac{1}{2}$ を受精させ得たにすぎず、精子形成の阻害あるいは精子死亡が推定される。
4. 雌処理の場合には、受精卵はほとんど孵化する。しかし雄処理の場合には、受精卵の孵化率低下が認められた。これは受精後の死亡を意味しており、精子において優性致死変異が高い頻度で誘起されたことを示している。

引用文献

- 1) Knipling, E. F., *Sci. Am.*, 203, 54 (1960)
- 2) Smith, C. N., *Adv. Chem. Ser.*, 41, 36 (1963)
- 3) Smith, C. N., LaBrecque, G. C. and Borkovec, A. B., *Annu. Rev. Ent.*, 9, 269 (1964)
- 4) Goldsmith, E. D. and Frank, I., *Am. J. Physiol.*, 171, 726 (1952)
- 5) Mitlin, N., Butt, B. A. and Shortino, T. J., *Physiol. Zool.*, 30, 133 (1957)
- 6) LaBrecque, G. C., Adcock, P. H. and Smith, C. N., *J. Econ. Ent.*, 53, 802 (1960)
- 7) LaBrecque, G. C., *J. Econ. Ent.*, 54, 684 (1961)
- 8) Borkovec, A. B. and Woods, C. W., *Adv. Chem. Ser.*, 41, 47 (1963)
- 9) LaBrecque, G. C., *Adv. Chem. Ser.*, 41, 42 (1963)
- 10) Weidhaas, D. E. and McDuffie, W. C., *Bull. Ent. Soc. Am.*, 9, 268 (1963)
- 11) Shaw, J. G. and Riviello, M. S., *Science*, 137, 754 (1962)
- 12) Shaw, J. G. and Riviello, M. S., *J. Econ. Ent.*, 58, 26 (1965)
- 13) Shinohara, H. and Nagasawa, S., *Ent. Exp.*

Appl., 6, 263 (1963)

- 14) 長沢純夫・篠原 寛, 応動昆 8, 272 (1964)
- 15) Henneberry, T. J., Smith, F. F., and McGovern, W. L., *J. Econ. Ent.*, 57, 813 (1964)
- 16) Hays, S. B. and Cochran, J. H., *J. Econ. Ent.*, 57, 217 (1964)
- 17) Hedin, P. A., Cody, C. P. and Thompson, A. C., Jr., *J. Econ. Ent.*, 57, 270 (1964)
- 18) Davich, T. B., Keller, J. C., Mitchell, E. B., Huddleston, P., Hill, R., Lindquist, D. A., McKibben, G. and Cross, W. H., *J. Econ. Ent.*, 58, 127 (1965)
- 19) Lindquist, D. A., Gorzycki, L. J., Mayer, M. S., Scales, A. L. and Davich, T. B., *J. Econ. Ent.*, 57, 745 (1964)
- 20) Cressman, A. W., *J. Econ. Ent.*, 56, 111 (1963)
- 21) Smith, F. F., Boswell, A. L. and Henneberry, T. J., *J. Econ. Ent.*, 58, 98 (1965)
- 22) Weidhaas, D. E., *Nature*, 195, 786 (1962)
- 23) Harris, R. L., *J. Econ. Ent.*, 55, 882 (1962)
- 24) Chamberlain, W. F., *J. Econ. Ent.*, 55, 240 (1962)
- 25) Weidhaas, D. E. and Schmidt, C. H., *Mosquito News*, 23, 23 (1963)
- 26) Gouck, H. K., Crystal, M. M., Borkovec, A. B. and Meifert, D. W., *J. Econ. Ent.*, 56, 506 (1963)
- 27) Gouck, H. K., *J. Econ. Ent.*, 57, 239 (1964)
- 28) Murvosh, C. M., LaBrecque, G. C. and Smith, C. N., *J. Econ. Ent.*, 57, 89 (1964)
- 29) Chang, S. C. and Borkovec, A. B., *J. Econ. Ent.*, 57, 488 (1964)
- 30) Hair, J. A. and Adkins, T. R., Jr., *J. Econ. Ent.*, 57, 586 (1964)
- 31) Gouck, H. K., Meifert, D. W. and Gahan, J. B., *J. Econ. Ent.*, 56, 445 (1963)
- 32) Hansens, E. J. and Granett, P., *J. Econ. Ent.*, 58, 157 (1965)

Summary

1. To examine the effectiveness of an alkylating agent, apholate (2, 2, 4, 4, 6, 6-hexahydro-2, 2, 4, 4, 6, 6-hexakis (1-aziridinyl)-1, 3, 5, 2, 4, 6-triazatriphosphorine) on sterilizing the silkworm moth (*Bombyx mori* L.), aqueous solution of apholate was administered orally to the last instar larvae (5 days old).

2. In pupae, development of antennae, legs and wings were inhibited slightly when 320 μ g apholate was administered. Degeneration of antennae, legs and wings became remarkable with increasing amounts of apholate given, and complete degeneration of these organs was induced by administration of 5mg apholate.

3. Egg production in adult females remarkably when 320 μ g apholate was given, whereas no reduction occurred with apholate administration up to 80 μ g. Inhibitory effect of apholate on oögenesis was suggested.

4. When adult females that were given 320 μ g apholate were mated with untreated males, approximate 50 per cent of eggs laid was unfertilized egg, showing decrease of fertilization ability in female germ cells.

5. Numbers of eggs laid and of eggs fertilized reduced remarkably when untreated adult females were mated with males that were given 320 μ g apholate. Apholate should inhibit sperm formation or cause sperm mortality.

6. When untreated adult females were mated with males that given 80 μ g or 320 μ g apholate, percentage hatch of fertilized eggs considerably decreased. This means embryo mortality, and should be due to frequent induction of dominant lethal mutations in sperms by apholate. However, conclusive evidence to support the occurrence of dominant lethal mutation in female germ cells has not been found.