

Histopathological Observation of Chemosterilizing Effect of Metepa and Hempa on Female Adults of the Azuki Bean Weevil, *Callosobruchus chinensis* L. Isamu NAKAYAMA (Research Department, Pesticide Division, Sumitomo Chemical Co. Ltd., Takarazuka-shi, Hyogo 665, Japan) Received Dec. 25, 1976. *Botyu-Kagaku*, 42, 92, 1977. (with English Summary 96)

12. アズキノウムシ雌成虫に対する metepa, hempa の影響, とくにその病態組織学的観察 中山 勇 (住友化学工業株式会社農薬事業部研究部, 兵庫県宝塚市高司 4 丁目) 51. 12. 25 受理

(要約) アズキノウムシ雌成虫に対する metepa および hempa の不妊化機構を病態組織学的に検討した。羽化直後に metepa (40 μ g/雌) を局所施用した雌の72時間後の卵巣は縮小すると同時に卵原細胞部に多くのピクノーシスが認められた。またこの雌が産下した卵では、分割核は見い出せなかった。

したがって metepa の不妊化機構は卵巣の縮小による産卵抑制と卵形成途上の卵原細胞のピクノーシスに起因する卵化阻害によると推察した。Hempa では metepa と異なり卵巣は正常であり、卵原細胞の異状もほとんど認められなかった。しかし産下直前の卵が総輸卵管で縮小しているのが観察された。これらの事実から hempa の不妊化機構を考察した。

結 言

化学不妊剤のアズキノウムシ *Callosobruchus chinensis* 成虫に対する不妊効果についてはすでに数多く報告されており、その内 metepa は両性に不妊化をもたらすが雄処理による効果は雌のそれに対し、約3倍強いことが明らかにされている¹⁾。一方 hempa の作用は、孵化抑制と産卵抑制に起因する雌性不妊であり、雄の約6倍の効果を示している²⁾。これらの作用機構の究明については中山・長沢³⁾によって、アズキノウムシ雄に対する metepa の孵化抑制機構が明らかにされた。本報告においては metepa および hempa の雌成虫処理によってもたらされる不妊化機構を病態組織学的に究明した結果を述べる。

本文に入るに先だち、論文の御稿閲の労を賜った島根大学農学部・長沢純夫教授、ならびに種々の御助言をいただいた東京教育大学農学部八木繁実助教授、さらに実験の御協力をいただいた同学部比留間潔氏に対し深く感謝申し上げます。

実験材料および方法

供試薬剤および供試昆虫：この実験にもちいた metepa (Tris (2-methyl-1-aziridinyl) phosphine oxide) と hempa (Hexamethylphosphoric triamide) は research grade の試料で、それぞれアセトン溶液としてもちいた。またアズキノウムシ *Callosobruchus chinensis* L. は当研究所で数年来累代飼育をつづけて今日にいたる系統である。

実験方法：1. 産下卵の胚発生—羽化直後に 40 μ g の metepa (完全な不妊化量) を処理した雌と無処理の雄、1対を70~90粒のアズキと共に直径 9cm のペト

リ皿に入れて産卵させた。さらにひとつのペトリ皿に無処理の雌雄1対を入れてこれらの産下した卵の外部形態を解剖顕微鏡下で産下直後から経時的に比較観察した。

また産下後所定時間を経過した卵をカルノア液で固定し、フォイルゲン染色をほどし脱水し、全体をカナダバルサム中に封じた後、胚発生の進行状態を調べた。

2. 成虫の卵巣に及ぼす作用—羽化脱出直後の雌に metepa (40 μ g/ μ l) または hempa (200 μ g/ μ l) を処理し72時間後に生理食塩水中で卵巣を取り出し、ブアン液で固定し常法にしたがって組織切片を作成した。染色はデラフィールドヘマトキシリンとエオシンによった。また hempa 処理した雌の卵巣については解剖顕微鏡下でその長径 (卵管先端迄) および短径を測定した。

実験結果および考察

1. Metepa

Metepa をアズキノウムシ雌成虫に処理して得られる不妊化は産下卵に見られる孵化抑制と産卵抑制であることはすでに知られており、この機構をしらべるために、まず雌処理によって得られた卵の外部形態をしらべ Fig. 1 に示した。雌処理×無処理雄区の産下卵の形態は雄処理×無処理雌区と同様に正常卵とは明らかに異なり、卵殻内で幼虫態は形成されていなかった。しかし雄処理×無処理雌区の卵と比較すると若干異なった経過を示すようであるが、明確な形態的相違は見い出せなかった。次にこの点を明らかにするために卵全体を染色し、卵黄内の分割核を直接観察することによって、その分裂核数を Table 1 に示した。無処理

区の産下直後の卵では6個の分割核が観察され、6時間後にはさらに発生が進み胚盤が形成されていた。しかし雌処理×無処理雄区の卵では24時間経過しても分割核は見い出せなかった。この事実は卵内へ精子が侵入した後、卵分割が全く進行しなかったことを示している。即ち、産下時にすでに卵核の壊死ないし消失がもたらされたものと考えられる。雄処理×無処理雌区

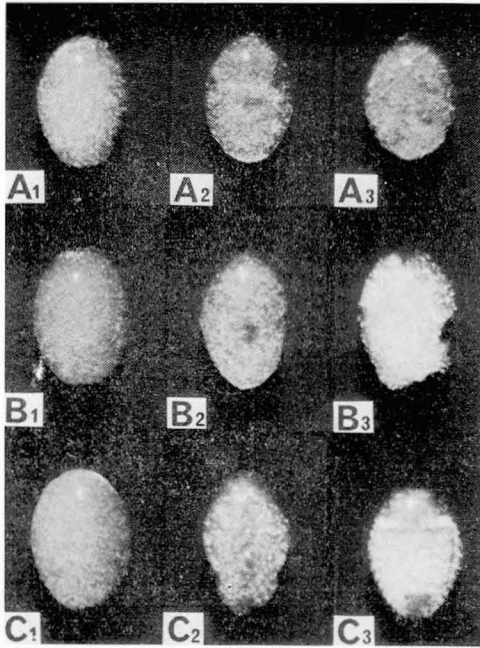


Fig. 1. External shapes of eggs deposited by untreated male × metepa (40 μ g) treated female (A), by metepa (40 μ g) treated male × untreated female (B), and by untreated male × untreated female (C). 1, 2, and 3 showing developmental stages at 0, 24, and 96 hours after deposition, respectively.

Table 1. Number of cleavage nuclei of eggs deposited by *C. chinensis*.

Sex treated**	Hours after deposition	No. of cleavage nuclei*
Untreatment	0	6
	6	Blastoderm
Female	6	1
	24	1
Male	6	4

* Means of 5 eggs

** Metepa 40 μ g/weevil

では雌処理×無処理雄区の場合より若干分割核が多く観察され、受精後卵分割が数回なされたことを示しており、前報³⁾で病態組織学的に明らかにした点と一致した。

以上のことから、雌処理によって産下された卵の卵核はすでに産卵以前に異状をきたし、壊死、消失したのであろうと推察される。

産下された卵の卵核の異状は当然雌成虫に metepa を処理した時期の卵形成途上に作用点があると考えられるので、処理後72時間目に卵巣を取り出し、その組織切片を調べ、Fig. 2 に示した。Metepa 処理区の

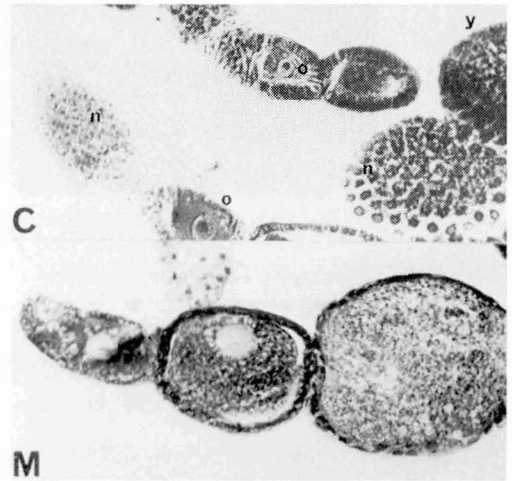


Fig. 2. Ovarian tissues of *C. chinensis* at 72 hours after emergence.

C: untreatment, M: metepa treatment 40 μ g/♀, n: nurse cell, o: oocyte, y: yolk.

Table 2. Average unhatchability of eggs deposited by 5 pairs of *C. chinensis* applied metepa at zero or 24 hours after emergence.

Time treated (hour)	Dosage (μ g/female)	Unhatchability (%)
0	40	100
	20	99.1
	10	79.9
	Untreatment	3.7
	40	96.1
24	20	94.7
	10	64.6
	Untreatment	4.6

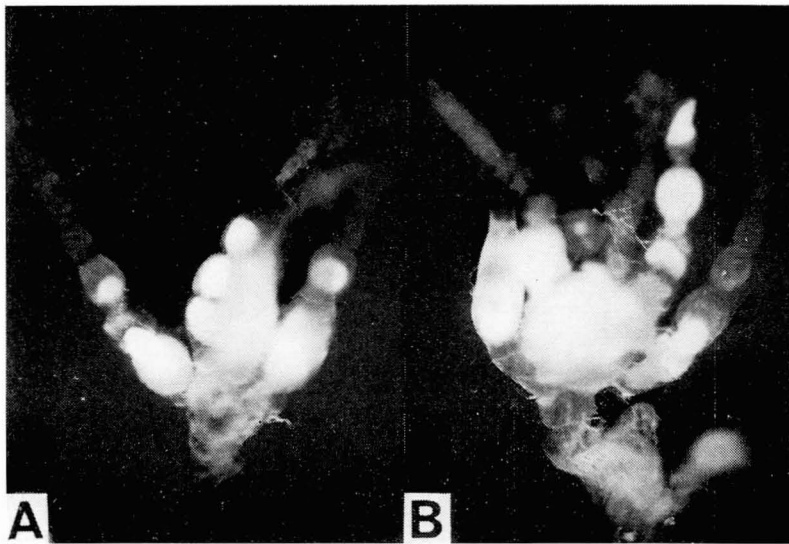


Fig. 3. Ovaries of *C. chinensis* at zero (A) and 24 hours (B) after emergence.

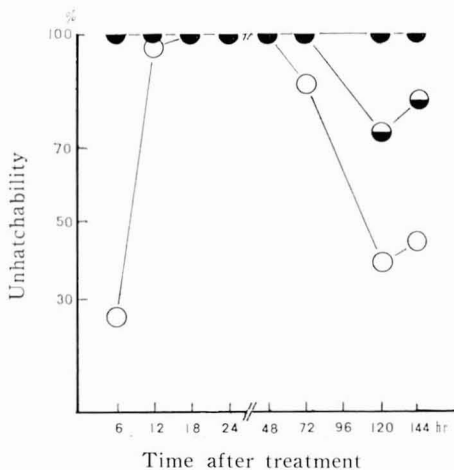


Fig. 4. Change of unhatchability of eggs deposited at various intervals after treatment by sterilized female $\times$ normal male, metepa; $\circ$ —10 μ g, $\ominus$ —20 μ g, $\bullet$ —40 μ g/♀

卵管先端部では卵原細胞部に多くのピクノシスが見られた。また、卵形成中期にも若干認められたが、後期には少なかった。これは卵原細胞部のように、直接核が露出している場合と比較して、後期の卵母細胞が卵黄, follicle cell, さらに卵殻によって包まれているため、薬剤の影響を受け難いのであろうと考えられる。したがって一つの卵巣小管の卵形成途上で、明らかに metepa に対する感受性に相違のあることがわかる。この点は次に示す二つの点からも明らかである。ひと

つは Table 2 に示したごとく羽化直後の成虫と羽化 24 時間後の個体に metepa を処理したときの効果の相違である。即ち、羽化直後にくらべ 24 時間後に metepa を処理した場合の不妊効果が低下する。これは Fig. 3 に示したように羽化後 24 時間を経過すると卵巣の発育程度は羽化直後と著しく異なり、24 時間後では産下直前の完成卵が多数含まれている。この時期に metepa の処理を行なってもこれらの完成卵にはほとんど効果がない。第 2 点として、Fig. 4 に示したごとく雌処理では 20 μ g, 10 μ g 区で、72 時間後に未孵化率が低下し、正常卵を産む。これは明らかに卵形成途上で Fig. 2 に見られたごとく感受性の異なる時期の存在を示している。

ところで、高用量の処理によって雌成虫に誘起される重要な不妊化の機構は Fig. 5 に示したような顕著な卵巣の縮少である。こうした卵巣の卵形成途上における感受性の相違ならびに卵巣の縮少については LaChance *et al.*¹⁾ によって、ラセンウジバエ, イエバエ, *Bracon*, ショウジョウバエ等で、いずれも羽化後の処理時期によって、成熟卵管と退化卵管数の異なることがのべられている。

以上のことから、metepa を雌成虫に処理して起る不妊化の機構は、卵巣における卵形成の阻害によって卵巣が縮少し産下卵数が減少することと、卵形成途上における卵原細胞の卵核の壊死に起因する孵化阻害によるものと考えられる。

2. Hempa

Hempa を処理したアズキゾウムシの卵巣を測定し

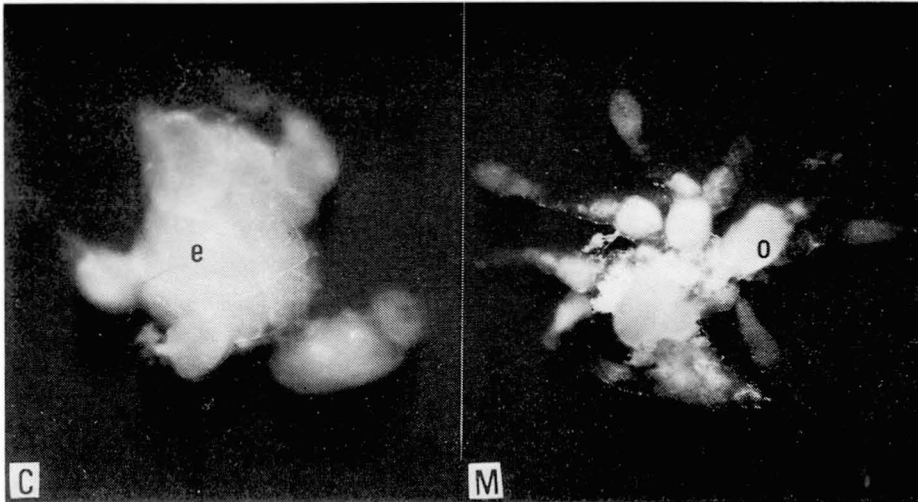


Fig. 5. Ovaries of *C. chinensis* at 72 hours after emergence. C: untreated, M: metepa treatment, $40\mu\text{g}/\text{♀}$ e: egg in the oviduct, o: ovariole.

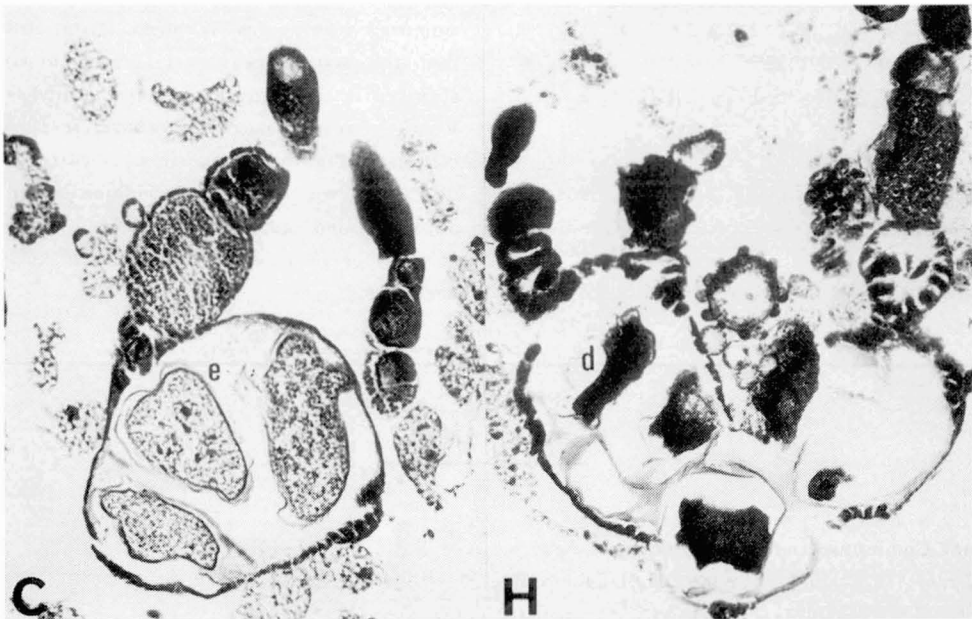


Fig. 6. Ovarian tissues of *C. chinensis* at 72 hours after emergence. C: untreated, H: hempatreatment, $200\mu\text{g}/\text{♀}$ e: egg, d: degenerated egg.

た結果を示したのが Table 3 である。この結果から明らかにように、hempa においては無処理の卵巣と変わらず metepa の $40\mu\text{g}$ 処理で得られたような卵巣の縮少は認められない。それにもかかわらず産卵が抑制される理由を明らかにするために hempa 処理後 72 時間目の卵巣を取り出して組織切片を作成し、卵と

卵巣の関係をしらべた。その結果、Fig. 6 に見られるように、hempa を処理した個体の卵巣では卵原細胞部にわずかながらピクノーシスが観察されるが Fig. 2 の metepa 程顕著ではない。さらに総輸卵管内で産下直前の卵が縮少しているのが観察された。こうした成熟卵の縮少、吸収については Campion⁵⁾ が

Table 3. Size of ovaries of *C. chinensis* at 72 hours after treatment of hempa and metepa.

Chemical	Dosage $\mu\text{g}/\text{♀}$	Size(mm)
Hempa	100	$1.65 \pm 0.096 \times 2.28 \pm 0.104$
	50	$1.65 \pm 0.073 \times 2.41 \pm 0.101$
Metepa	40	$1.44 \pm 0.022^* \times 1.85 \pm 0.062^*$
Untreatment	0	$1.65 \pm 0.063 \times 2.47 \pm 0.104$ $(1.35 \pm 0.064 \times 1.65 \pm 0.028)^{**}$

* Difference between treatment and control is significant at the 5% level.

** Just after emergence.

不妊剤, tretamine 処理した数種の昆虫で認められることを報告した。またこれらの薬剤によって生じる未成熟卵の異常な卵黄形成についても多くの例を報告している。これらの報告例と本実験の結果から, hempa は卵形成途上の卵核よりむしろ栄養細胞に作用して異常卵が形成され, その後これらの卵は卵管壁へ吸収され, 産下卵数の減少, 一部産下された卵の孵化抑制がもたらされるのであろうと推察される。

引用文献

- 1) 長沢純夫・中山勇: 防虫科学, 33, 146 (1968).
- 2) 長沢純夫・篠原寛・柴三千代: 防虫科学, 31, 108 (1966).
- 3) 中山勇・長沢純夫: 応動昆, 10, 192 (1966).

- 4) LaChance, L. E., D. T. North and W. Klassen: In Principles of Insect Chemosterilization, (Ed. by LaBrecque, G. C. and C. N. Smith) Apleton-Century-Crofts, New York, 1968. p. 99.
- 5) Campion, D. G.: Bull. ent. Res., 61, 577 (1972).

Summary

Some histopathological observations were made to realize the mechanism of sterilizing effect of metepa and hempa on female adults of the azukibean weevil, *Callosobruchus chinensis* L. Chemosterilants were applied to the dorsal side of the just emerged female adults. Reduction in the size of ovaries and picnosis of oogonial cell nuclei were admitted 3 days after metepa treatment. No cleavage nuclei in eggs deposited by metepa treated female was observed. On the other hand, the size of ovaries was normal and picnosis of oogonial cell nuclei were scarcely admitted with hempa treatment. It was observed that the mature eggs just before deposition shrunk in the oviduct of hempa treated female. From the results mentioned above, it could be considered that the mechanism of sterilizing effect of metepa was due to the inhibition of egg deposition and egg hatching induced by reduction of ovary or picnosis of oogonial cell nuclei in oogenesis.

新刊紹介

Animal Communication by Pheromones. Academic Press (1976) 167頁 5,940円 H. H. SHOREY 著
著者は緒言で, 百科事典の記述のように, フェロモンの種類と作用を網羅しているわけではないことをことわっている。特に, 従来の殆どどのフェロモンに関する著作が何人かの研究者による分担執筆であったのに対し, 一人で書いたことを強調しているのは, 著者なりのフェロモンの意味論を展開したかったに違いない。従って, 動物全般についてのフェロモンの研究を, 消化し総合して, 統一した方法で紹介している。むしろ昆虫, 魚類についての研究の紹介は最小限に留め, 動物特に脊椎動物について広く記述されているのも特徴である。

2章では, 昆虫と哺乳類のフェロモン分泌腺, フェロモン作用のある匂い物質発散の機構について記述されている。

3章は, 著者の最も得意とするフェロモン源に対する定位・移動のメカニズムの考察である。

もう一つの特徴をあげれば, 今までのフェロモンの分類が, 行動の結果によっていたのに対し, むしろ原因となる行動によって分類していることであろう。

一貫した著者の主張が盛りこまれているが, 独善的にならずに多くの例証をあげており, フェロモンの研究者には, 自身の研究に照らしあわせて一読する価値がある。(高橋正三)