アズキゾウムシの雄成虫に対する metepa の影響, とくにその病理組織学的観察^{1,2}

中山 勇・長沢 純夫

イハラ農業研究所

(1966年6月20日 受領)

Histopathological Observation of Chemosterilizing Effect of Metepa on Male Adults of the Adzuki Bean Weevil, *Callosobruchus chinensis* L. Studies on the Chemosterilants of Insects. XII. Isamu NAKAYAMA and Sumio NAGASAWA (Ihara Agricultural Chemicals Institute, Shimizu, Shizuoka-Pref.) *Jap. J. appl. Ent. Zool.* 10: 192-196(1966)

Some histopathological observations were made to realize the mechanism of sterilizing effect of metepa on male adults of the adzuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* L. Metepa was dissolved in acetone at the concentrations of 10, 20, 40 and 100 μg per μl . One μl of test solution was applied to the dorsal side of the just emerged male adults. Treated weevils were left for 0-7 days. These dosages applied were the amounts completely inhibiting the hatchability of deposited eggs. No histopathological changes in testicular tissue were observed by the application of metepa at any dosage or at any elapsed time after application. The external shapes of eggs deposited by treated male $\times$ untreated female and by untreated male $\times$ untreated female were normal. Although a single untreated female did not deposit eggs on the adzuki beans in the Petri dishes, when 10 individuals of untreated female were introduced into the Petri dishes together with adzuki beans, they deposited their eggs on beans. The external shapes of eggs, however, were abnormal. From the results mentioned above, it could be considered that the spermatozoa of treated male maintained the ability for fertilization. This assumption could be proved by the histopathological examination about the eggs deposited by treated male $\times$ untreated female. The embryogeny of the eggs deposited by treated male $\times$ untreated female progressed until the early stage of cleavage, but the blastoderm was not formed. The necrosis of cleavage nucleus and plasmolytic atrophy of vitellus were observed in the eggs at 48 and 96 hours after deposition respectively.

化学不妊剤あるいは放射線の、昆虫生殖器官に及ぼす影響を、病理組織学的に観察した報告はすでにいくつかなされている (CANTWELL and HENNEBERY, 1963; SCHWART, 1964; 須貝, 1965; SUGAI and HIRANO, 1965)。そしてこれらが雄個体に対して有効な場合は、その処理によって精巣組織に顕著な形態異変がおこり、精子欠損、異常精子 (LINDQUIST *et al.*, 1965; SUGAI and HIRANO, 1965)、未受精卵の増加 (須貝, 1965)、受精後の優性致死、突然変異の誘発 (RAI, 1963, 1964; 平野, 1965) な

どがもたらされ、その結果ふ化抑制が起こるとされている。アズキゾウムシに対する metepa の不妊作用については、処理された雄と正常な雌との交配によってえられた座下卵にもふ化抑制がみられることは、長沢・篠原 (1964) により詳細に報告されているが、本報では、この場合のふ化抑制の機構を、病理組織学的に究明した結果をのべる。本文に入るに先立ち、精巣組織標本の解読など、細部にわたって御教示をいただいた東京農工大学農学部須貝悦治博士に深謝の意を表する。

1. 昆虫の化学不妊剤に関する研究。第12報。

2. 本文の要約は1966年4月30日、昭和41年度日本衛生動物学会大会 (新潟) において示説発表。

実験材料および方法

この実験にもちいた metepa [tris (2-methyl-1-aziridinyl) phosphine oxide] は research grade の試料で、またアズキゾウムシ *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。予備実験の結果から雄 1 個体あたり $10\mu\text{g}$ を処理し、これと無処理の雌と交配した場合、その産下卵のふ化は、完全に抑制されることがあきらかにされていたので、まずアセトンで 10, 20, 40, $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度に試料を希釈し、micropipet をもちいてこれを、羽化直後の雄の背部に $1\mu\text{l}$ ずつ滴下処理した。それぞれの薬量段階で、24 時間ごとにその精巣を摘出し、ブアン液で固定、つぎにイソプロピルアルコールで順次脱水し、パラフィン包埋後、常法にしたがって 7μ の組織切片を作った。切片はフォイルゲンまたはハイデンハインの鉄ヘマトキシリンとライトグリーンの複染色を行ない、精巣組織の経時的变化を無処理のものと比較観察した。

べつに羽化直後、1 匹あたり $40\mu\text{g}$ の metepa を処理した雄 1 匹と無処理の雌 1 匹とを、70~90 粒のアズキと共に直径 9 cm のペトリ皿に入れて産卵させた。さらに一

つのペトリ皿に無処理の雌雄 1 対、無処理の雌だけを 1 匹、および 10 匹入れた場合をもうけ、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。

また産下卵をアズキ表面から剥離し、ブアンまたはカルノア液で固定、数回イソプロピルアルコールで洗滌した後、95% イソプロピルアルコール中で卵殻を剥離し、精巣の場合と同様な操作によってその切片を作製、産下直後からの卵分割の推移を観察した。飼育、実験はいずれの場合も 25°C 、関係湿度 50~60% の恒温室内でおこなった。

結果と考察

それぞれの薬量段階で、処理直後から死に致るまで約 7 日間の精巣組織を、無処理のものと比較しながら観察したが、処理薬量、処理後の経過日数いずれの場合も、boll weevil (LINDQUIST *et al.*, 1964), ショウジョウバエ (CANTWELL *et al.*, 1963), カイコガ (須貝, 1965) などでみとめられた精母細胞の消失、精子形成の中断、異常精子束などの形態的变化は観察されなかった。また

第 1 図 羽化直後 metepa $40\mu\text{g}$ を処理した個体 (A) および無処理個体 (B) の羽化後 5 日目の精巣組織切片。ハイデンハインの鉄ヘマトキシリンとライトグリーンの複染色法によって染色、切片の厚さ 7μ ($\times 400$)。1 は精子形成中期の部分、2 は精子形成後期部分をしめす。a: 精母細胞、b: 精子束。

apholate 処理による screw worm で報告されている精巣の色調の変化縮少 (CHAMBERLAIN, 1963) などみとめられなかった。第1図は処理薬量, $40\mu\text{g}$, 処理後5日目の組織標本を示したものである。羽化した当時のアズキゾウムシの精巣は, 精子形成の後期に相当し, 大部分が分裂の進んだ精母細胞, および精子束でしめられている。カイコガで, 放射線および化学不妊剤に対して, この時期の精巣組織は非常に形態的変異を受けにくいことが知られている(須貝, 1965)。カイコガと同様に, アズキゾウムシにおいても, その成虫期に metepa を処理してもその精巣組織には何らの形態的变化はおこらないも

のと考えられる。すなわち羽化後約7日間に生産される精子は, metepa の滴下処理によっては影響をうけず, 形態的に正常なものであったとみなしてさしつかえないであろう。

つぎにこの精子が授精能力を持っているか否かを, 卵の外部形態の上から明らかにした。その結果を示したものが第1表および第2図である。これに見られるように, 無処理の雌と雄の交配によって産下された卵は普通の正常卵であるが, 処理雄×無処理雌の産下した卵もまた, これと同様正常な形態をもっていた。しかしこの場合の卵は, 産下後6時間以上経過しても胚発生が進まず,

第2図 Metepa 処理雄×無処理雌 (C), 無処理雄×無処理雌 (D) および無処理の雌10匹 (E)をひとつのペトリ皿にいれたときに産下された卵の外部形態。1, 2, 3, 4および5は産下後0, 3, 6, 12および72時間目の状態をしめす。

第1表 直径9cmのペトリ皿に、アズキ70粒をいれ、これにアズキゾウムシの雌雄を種々の比率で導入したとき、それらによって産下された卵の外部形態および受精の有無

アズキゾウムシの数	くりかえし	産卵数	ふ化数	ふ化率	卵形	受精の有無
処理雄1	I	69	0	0		正常受精
	II	88	0	0		
無処理雌1	III	86	0	0		
	IV	91	0	0		
無処理雌1	I	69	65	94.2		正常受精
	II	82	60	73.2		
無処理雌1	III	56	50	89.3		
	IV	81	62	76.5		
無処理雌0	I	0	—	—		—
	II	0	—	—		
無処理雌1	III	0	—	—		—
	IV	0	—	—		
無処理雌0	I	238	0	0		異常未受精
	II	88	0	0		
無処理雌10	III	48	0	0		
	IV	46	0	0		

ふ化がえられなかった。さきの無処理の雌と雄との交配によってえられた卵は、72時間後には卵殻を通して幼虫の形が観察できた。雌1匹の場合には産卵が行なわれなかったが、雌10匹を1容器にいれ、これらは何らかの産卵刺激を受けて産卵をおこなった。しかしこの場合、産下卵の形はすべて異常でふ化はみられなかった。したがって正常な交尾が行なわれ受精されたものは正常な卵形を呈し、未受精のものは異常な形を有する卵として産下されたとみなしうる。

以上の事実から、metepa で処理された雄の精子は、授精能力を有するものと判断され、卵のふ化抑制は、受精後の卵分割に変異をきたした為であると推測した。つぎにこの点を確かめる目的で、それぞれの産下卵の組織切片を作製した。その結果が第3図である。産下直後の正常卵においては、正常に受精が行なわれ、分割核が卵殻へ移動する胚盤形成の途上にある(第3図F₁, G₁)。正常な形を有する卵のうち、無処理雄×無処理雌によって産下されたものは、第3図G₂にみられる様に産下後、約6時間で胚盤が形成され、その後ひきつづき胚子発生

第3図 Metepa 処理雄×無処理雌(F)と無処理雄×無処理雌(G)によって産下された卵の組織切片。1,2,3 および 4 はそれぞれ産下後 0,6,48, および96時間のものをしめす。フォイルゲンとライトグリーン の複染色法により染色、切片の厚さ7μ(×100)。c: 卵黄, d: 分割核, e: 胚盤葉, f: 卵黄核, g: 分割核のネクロシス。

が進行し、おおよそ5日後には胚の初期発育が完了する(第3図G₁~G₄)。しかしもう一方の処理雄×無処理雌の場合には、産下6時間後に分割核は認められるが、胚盤の形成はみられない(第3図F₂)。48時間後には分割核の顕著なネクロシスが認められ、またすでに核の退化消失した胚葉の痕跡も観察された(第3図F₃)。その後核の退化消失にともない卵黄の縮少が認められた(第3図F₄)。したがってこの場合には卵分割の初期まで行なわれ、その後に何らかの変異をきたし、胚発生の中断が起きたものと考えられる。

以上の事実から、アズキノウムシの雄の成虫時における *metepa* の処理によって起こるふ化抑制は、精子の形態的異常によるものではないことはほぼ間違いなく、精子核に起因する受精後の優性致死、突然変異などにもなう卵分割の中止によるものおよび受精が不完全でその刺激で発生がある程度進むことなどが考えられる。この胚盤葉形成途上の分割核の退化、消失時期、その機構などについては、まだ不明の点が多いので今後ひきつづき検討する予定である。

摘 要

アズキノウムシ精巣組織に対する *metpa* の影響を検討することを目的に、産下卵のふ化を完全に抑制する、薬量 10, 20, 40, 100 μ g を羽化直後の雄に滴下処理した。その結果つぎの事実をあきらかにすることができた。

1. 処理薬量および経過時間にともなう精巣組織の形態的变化はみられなかった。
2. 外部形態的には、処理雄×無処理雌および無処理雄×無処理雌の産下卵は正常な形(受精卵)を呈し、雌だけ10匹をひとつのペトリ皿に置いておいた場合の産下卵は、異常な形態(未受精卵)をもっていた。これは処理された雄の精子が、正常な授精能力をそなえていたも

のと考えられる。

3. 卵の組織切片による観察では、処理雄×無処理雌の産下卵の発生は、初期卵割まではすすむが、その後の胚盤形成は認められなかった。48時間後に分割核のネクロシスが、96時間後には卵黄の縮少退化が認められた。

引用文献

- CHAMBERLAIN, W.F. (1962) Chemical sterilization of the screw-worm. J. Econ. Entomol. 55: 240~248.
- CANTWELL, G. E. and T. J. HENNEBERRY (1963) The effects of gamma radiation and apholate on the reproductive tissues of *Drosophila melanogaster* MEIGEN. J. Insect Pathol. 5: 251~267.
- 平野千里(1965) カイコガに対する apholate の不妊作用. 防虫科学 30: 109~114.
- LINDQUIST, D.A., L.J. GYRZYCKI, M.S. MAYER, A.L. SCALES, and T.B. DAVICH (1964) Laboratory studies on sterilization of the boll weevil with apholate. J. Econ. Entomol. 57: 745~750.
- 長沢純夫・篠原寛(1964) *Metepa* のアズキノウムシに対する不妊作用、とくに処理された成虫が産下した卵のふ化率. 応動昆 8: 272~276.
- RAI, K. S. (1963) Cytological effects of apholate in *Aedes aegypti* LINN. Bull. Entomol. Soc. Am. 9: 173.
- RAI, K.S. (1964) Cytogenetics of chemosterilant-induced sterility in the mosquito *Aedes aegypti* LINN. (Diptera). Program XIIth Intern. Congress Entomol., London. p.75.
- SCHWARTZ, P.H. (1964) Effects of apholate, *metepa* and *tepa* on reproductive tissues of *Hippelates pusio* LOEW. J. Invertebrate Pathol. 7: 148~151.
- 須貝悦治(1965) 放射線によるカイコの雄性不妊に及ぼす温度の影響. 応動昆 9: 266~270.
- SUGAI, E. and C. HIRANO (1965) Studies on the sterility in the silkworm, *Bombyx mori* L., induced by apholate. Japan. J. Genetics 40: 357~363.