

氏 名(本籍) さい とう しげる
 齋 藤 茂

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 7 0 6 号

学位授与年月日 平 成 18 年 3 月 2 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 Studies on Insecticidal Activity of Pyridalyl
 (ピリダリルの殺虫活性に関する研究)

論文審査委員 (主 査) 教 授 松 田 一 寛
 (副 査) 教 授 谷 口 旭
 教 授 桑 原 重 文
 助教授 昆 野 安 彦

論文内容要旨

1939年のDDTの殺虫活性発見、その後の農薬としての実用化以来、多くの化学合成殺虫剤が開発され、農作物の安定生産に貢献してきた。優れた効力を示す殺虫剤は広範に繰り返し使用され、そのため害虫はこれらの殺虫剤に抵抗性を獲得し、さらに抵抗性害虫を防除するために新たな殺虫剤が開発されるということが繰り返されている。一方、近年は食品の安全性や環境保全への関心の高まりに伴い、農薬に対する要求事項も複雑化しつつある。優れた効力や使いやすさ、人畜毒性の低さは言うに及ばず、現在では標的外生物に対する影響が少ないこと、生物や土壌、水系などに蓄積しないことなど、環境に対する影響が少ないことも強く求められている。

住友化学株式会社農業化学品研究所においては、そうした要求事項を満足させるべく、特に鱗翅目害虫に対する選択性に優れる新規殺虫剤の創出に注力した探索研究の結果、ピリダリルの発見に至った。ピリダリルはこれまでの殺虫剤とは全く異なる化学構造を有し、殺虫作用もユニークであることから、殺虫作用機構は既存の殺虫剤とは異なる新規のものであると予想された。新規殺虫剤の開発に当たっては、その効率的な使用方法の提案のため、基本的な性能を明らかにすることが必須である。本研究では、ピリダリルの基本的性能を明らかにするため、殺虫活性の特長およびその作用メカニズムについて調べた。

第1章 ピリダリルの各種鱗翅目害虫および有用昆虫類に対する殺虫活性

ピリダリルの各種鱗翅目害虫に対する殺虫活性を評価したところ、農業分野の主要な鱗翅目害虫（オオタバコガ, *Helicoverpa armigera*、ハスモンヨトウ, *Spodoptera litura*、ヨトウガ, *Mamestra brassicae*、コナガ, *Plutella xylostella* など）に対するピリダリルの LC₉₀ 値は 1.5~14 mg

active ingredient (AI)/liter の範囲であった (Table I-1)。また、コナガの殺虫剤感受性系統および既存の各種殺虫剤に対して抵抗性を獲得した系統に対する殺虫活性を比較したところ、殺虫剤抵抗性の系統は合成ピレスロイド剤（神経軸索上のナトリウムチャンネルを開放し、神経伝達を攪乱させて殺虫作用を示す）のシフルトリン、有機リン剤（シナプス間の伝達物質アセチルコリンを分解する酵素アセチルコリンエステラーゼの作用を阻害し神経伝達を攪乱して殺虫作用を示す）のピリミホスメチルおよびベンゾイルフェニル尿素剤（キチンの生合成阻害により幼虫の脱皮を不完全にさせ殺虫する）のクロルフルアズロンに対する感受性が大幅に低下していたのに対し、ピリダリルに対しては感受性系統と同等の感受性を示した (Table I-2)。一方、天敵昆虫のナミテントウ、*Harmonia axyridis* やクサカゲロウ、*Chrysoperla carnea*、花粉媒介昆虫のセイヨウミツバチ、*Apis mellifera*、ツチマルハナバチ、*Bombus terrestris* 等に対しては、100ppm またはそれ以上の高濃度で処理しても顕著な影響は認められなかった。

Table I-1. Insecticidal activity of pyridalyl against various lepidopterous larvae.

<i>Species</i>	LC ₅₀ [*]	LC ₉₀ [*]
<i>Cnaphalocrosis medinalis</i>	1.80	4.95
<i>Helicoverpa armigera</i>	1.36	6.51
<i>H. zea</i>	3.23	6.06
<i>Heliothis virescens</i>	4.29	9.06
<i>Mamestra brassicae</i>	1.98	4.92
<i>Spodoptera exigua</i>	0.93	1.90
<i>S. litura</i>	0.77	1.53
<i>Pieris rapae</i>	3.02	6.10
<i>Plutella xylostella</i>	4.48	13.8

^{*} The data are expressed in mg AI/liter.

Table I-2. Insecticidal activity of pyridalyl and other insecticides against insecticide resistant and susceptible strains of *Plutella xylostella*.

Insecticide	Class	LC ₅₀ (mg AI/liter)	
		resistant strain	susceptible strain
pyridalyl		2.6	4.5
cyfluthrin	synthetic pyrethroid	> 500	3.7
pyrimiphos methyl	organophosphate	> 450	12.0
chlorfluazuron	benzoyl phenylurea	> 25	3.4

以上から、ピリダリルは鱗翅目害虫に対して選択的に高い殺虫活性を示し、有用昆虫類に対する影響は少ないことが示された。また、既存の殺虫剤とは異なる作用機構を有することが示唆された。

第2章 ハスモンヨトウに対する殺虫作用の観察

ピリダリルのハスモンヨトウ幼虫に対する殺虫作用を詳細に調べた。ピリダリルはアセトン溶液にしてハスモンヨトウ 5 齢幼虫の胸部背板に所定量を局所施用した。処理 3 日後の死虫率に基づいて LD₅₀ 値を求めたところ、約 25ng/個体であった。

ピリダリルの即効的作用を観察するため、50、100、200、400ng を処理した個体については処理後 1~6 時間まで毎時苦悶または死亡している個体数を記録した。一方、1.56、6.25、25ng を処理した個体については、6 齢幼虫になった率、蛹化率および羽化率を調査した。その結果、100 ng/個体以上の処理においては処理 2 - 3 時間後以降、弛緩、麻痺の症状が発現し、致死までの時間は薬量依存的に早まった (Fig.II-1)。25 ng/個体以下の低薬量処理においては処理部位に火傷状の特徴的症狀が観察され、脱皮、蛹化または羽化が不完全で死亡する個

体の割合は薬量依存的に増加した(Fig.II-2)。以上から、ピリダリルはハスモンヨトウ幼虫の表皮細胞に作用している可能性が高いと考えられた。

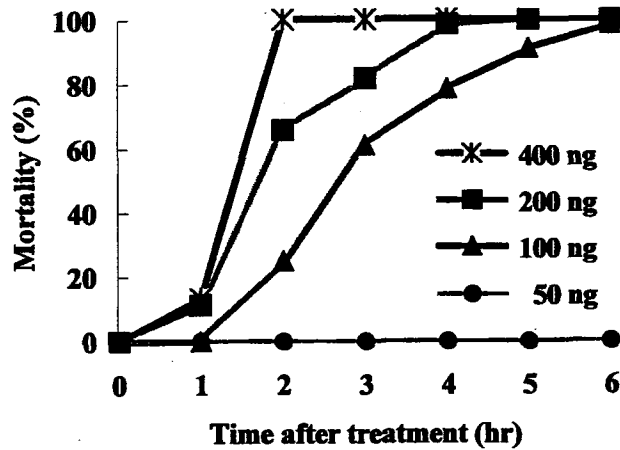


Fig.II-1 Time course of mortality in larvae treated with pyridalyl topically at 50, 100, 200 and 400 ng/larva.

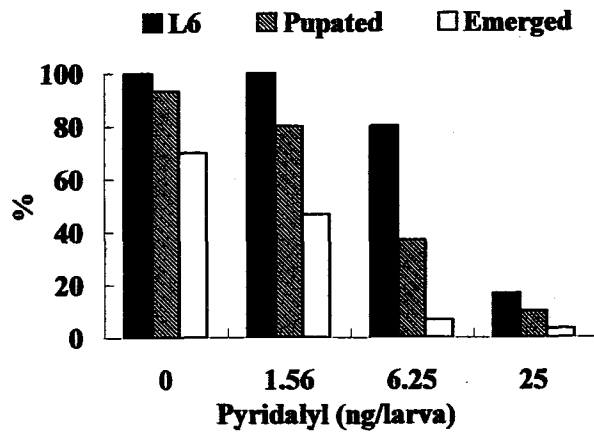


Fig.II-2 Effect of sub-lethal dosages of pyridalyl on metamorphoses. Percentages of individuals turning into sixth-instar larvae (L6), pupae and adults were recorded at 4, 14 and 28 days after treatment, respectively.

第3章 Sf9細胞に対する作用

ハスモンヨトウ幼虫において観察された症状から、ピリダリルは細胞に対して作用していると考えられたので、fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* の卵巣から確立された市販の培養細胞 Sf9 に対する作用を調べた。その結果、ピリダリルは $1.0-10\ \mu\text{M}$ の濃度で Sf9 の増殖を抑制した。さらにアフィディコリン(DNAポリメラーゼ α のみを阻害し細胞に対する致死作用は無い)との同時投与による実験では、 $10\ \mu\text{M}$ 処理において明らかに細胞数を減少させたことから Sf9 を致死させていると考えられた。また、殺虫活性と細胞毒性の相関を調べるため、幾つかのピリダリル類縁化合物について Sf9 に対する作用を調べたところ、殺虫活性を有する類縁化合物が Sf9 に対してピリダリル同様の影響を及ぼしたのに対し、わずかな化学構造の違いにもかかわらず殺虫活性を示さない類縁化合物では、 $10\ \mu\text{M}$ の濃度でも明確な影響を及ぼさなかった。

細胞内の ATP 濃度に対する影響を調べたところ、ピリダリル $0.1-10\ \mu\text{M}$ を処理した Sf9 では ATP 濃度は時間経過とともに低下し、低下の程度は処理濃度に依存した。これを既知の細胞毒性を示す各種化合物と比較したが、RNA 生合成を阻害する 5-フルオロウラシルやタンパク生合成を阻害するアニソマイシンとは明らかに異なった。一方、ミトコンドリア呼吸を阻害する各種化合物の作用とは類似する例も見られた。

さらに、細胞毒性のメカニズムとして最初に考えられるミトコンドリア呼吸に対する作用についても調べた。その結果、ピリダリルはハスモンヨトウ成虫の胸部飛翔筋から単離したミトコンドリアの酸素消費速度にまったく影響を及ぼさなかった。

以上のように、ピリダリルの殺虫作用は細胞毒性によるものであることが示唆され、細胞毒性のメカニズムはミトコンドリア呼吸阻害ではな

く、5-フルオロウラシルやアニソマイシンとも異なると考えられた。

第4章 ハスモンヨトウ幼虫の表皮細胞およびSf9細胞の超微細構造に及ぼす影響

Sf9細胞を用いた実験で、ピリダリルが昆虫の細胞に毒性を示し、それが殺虫作用と関連している可能性が高いと考えられた。そこで、実際にピリダリルを処理したハスモンヨトウ幼虫の細胞においてどのような変化が起こっているかを調べるため、電子顕微鏡観察を行った。同様にSf9細胞についても観察を行った。

ピリダリル 100ng/個体をハスモンヨトウ幼虫の胸部背板に局所施用し、2、4、6時間後に解剖して処理部の表皮を摘出した。また、処理6時間後についてのみ、処理部節付近の中腸、神経球および処理部よりも10mmほど尾部よりの表皮を摘出した。これらのサンプルを定法により固定し電子顕微鏡観察に供した。その結果、処理部表皮細胞においては処理4時間後からミトコンドリアの膨化が観察され、供試虫が死亡した6時間後にはその他に核と核膜との間隙、小胞体やゴルジ体の拡張、クチクラ側細胞境界におけるマイクロビリー状の構造の消失、空泡状粒子の増加が観察された(Fig.IV-2)。一方、中腸、神経球および尾部寄りの表皮においては明確な変化は認められなかった。また、比較のため合成ピレスロイド剤のシペルメトリンを同様に処理し、2時間後に死亡した個体からも処理部表皮のサンプルを調製し、観察したがその細胞内の微細構造は無処理個体(Fig.IV-1)と同様であった。

ピリダリル 1.0 μ Mを処理したSf9細胞においては、処理4時間後からミトコンドリアの膨化が見られ、処理24時間後までにミトコンドリアのクリステ消失、核の膨化、ポリゾームの解離、分散を含む水腫様の症状が観察された。

以上から、ピリダリルはハスモンヨトウ幼虫の表皮細胞および Sf9 細胞に壊死を引き起こしていることが明らかとなった。

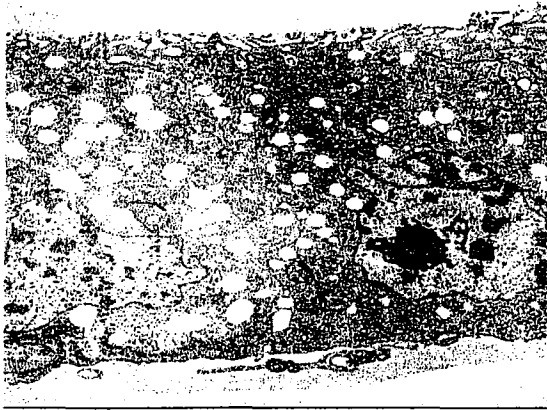


Fig. IV-1. Ultrastructures of epidermal cell of untreated *Spodoptera litura* larva.

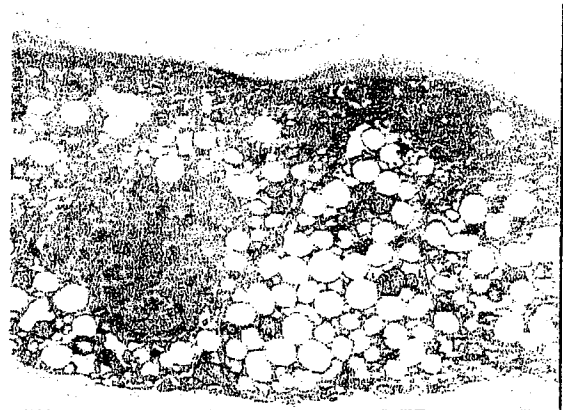


Fig. IV-2. Ultrastructures of epidermal cells in *S. litura* larvae treated with 100 ng of pyridalyl.

結論

ピリダリルは鱗翅目害虫幼虫に対して高い殺虫活性を示し、既存の殺虫剤に抵抗性の系統にも感受性系統と同様に高い殺虫活性を示す一方、天敵昆虫や花粉媒介蜂には影響が少ないことが明らかとなった。その殺虫作用は独特であり、培養細胞 Sf9 を用いた検討およびハスモンヨトウ幼虫表皮の電子顕微鏡観察から細胞に毒性を示していることが明らかとなった。また、細胞毒性のメカニズムはミトコンドリア呼吸の阻害ではなく、既存の殺虫剤とは明らかに異なる殺虫作用機構を有すると考えられた。

以上のように、ピリダリルはこれまでの殺虫剤とは異なる特徴を有し、総合的害虫管理および殺虫剤抵抗性管理のための有用な資材であり、農作物の安定的生産に貢献すると考えられた。

論文審査結果要旨

ピリダリル (IUPAC名: 2,6-dichloro-4-(3,3-dichloroallyloxy) phenyl 3-[5-(trifluoro methyl)-2-pyridyloxy] propyl ether) は主としてワタおよび野菜の鱗翅目害虫防除用に開発された新規殺虫剤である。同殺虫剤は現在までに日本、韓国などで販売されているのをはじめ、今後欧米等での登録取得、販売を目標に開発中である。本研究はその効率的な使用方法の検討に必要な基本的な性能を明らかにするため、殺虫活性および殺虫作用機構について詳細に調べたものである。

まず、農業分野の主要な鱗翅目幼虫に対する殺虫活性を調べ、幅広い鱗翅目幼虫に対しても高い殺虫活性を示すことを明らかにした。また、既存殺虫剤に抵抗性を発達させたコナガに対しても感受性のコナガに対するのと同様に高い殺虫活性を示すことを明らかにした。一方、寄生蜂や捕食性の天敵昆虫類およびミツバチ等の花粉媒介蜂類に対する毒性が低いことも明らかにした。

殺虫作用機構の検討では、ピリダリル処理によるハスモンヨトウ *Spodoptera litura* 幼虫の中毒症状を葉量段階的、経時的に詳細に観察し、弛緩、麻痺といった急性症状および処理部分の表皮の異常（亜急性症状）から、昆虫の細胞に対して作用しているという仮説を建てた。*Spodoptera frugiperda* 由来の培養細胞 Sf9 に対するピリダリルの影響を調べ、同化合物が Sf9 の増殖を抑制し、致死作用を示すことが明らかとなった。また、いくつかの類縁化合物を用いた検討により、殺虫活性と Sf9 細胞に対する作用が関連している可能性が高いことを示した。さらに、細胞内の ATP 濃度に及ぼす影響を調べ、ピリダリルが Sf9 の ATP 含量を処理後数時間で減少させることを明らかにしたが、ミトコンドリア呼吸を攪乱する作用は示さないことを単離したミトコンドリアを用いた酸素消費モニタリングにより証明した。

次に、電子顕微鏡によってピリダリル処理後のハスモンヨトウ表皮細胞および Sf9 細胞における超微細構造に及ぼす影響を経時的に観察し、同化合物が実際に供試虫の表皮細胞および Sf9 細胞に壊死を引き起こしていることを明らかにした。

以上のように、本研究は殺虫剤ピリダリルについてその殺虫活性の特徴を明らかにし、作用機構についても既存の殺虫剤とは異なることを示し、今後の農業生産における総合的害虫管理 (IPM) あるいは殺虫剤抵抗性マネジメントに活用、貢献し得る知見を与えた優れた研究である。したがって、審査員一同は、本論文の著者に対し、博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判断した。