

(1928)

Résumé

Previous investigations of the relation of chemical structure with insecticidal potency in the DDT series, have largely been concerned with altering nuclear substituents or varying the nature and number of the halogen atoms in the aliphatic portion of the molecule. Studies of the effectiveness of compounds containing cyclopropane ring in the molecule against insects would be very suggestive from the various points of view. The authors, therefore, have studied the effect of replacing trichloroethylene group in DDT molecule by cyclopropane group. In the present work, a number of 1, 1-diphenylcyclopropane derivatives were afforded by treating 1, 1-diphenylethylenes with either ethyl diazoacetate or diazomethane. Reaction sequence is schematically diagrammed in Fig. 1.

When benzophenone and its *p, p'*-disubstituted derivatives (*p, p'*-dichloro-, *p, p'*-dibromo- and *p, p'*-dimethoxy-benzophenone) (I) were added to the ethereal solution of methylmagnesium iodide, diphenylmethylcarbinol and the corresponding carbinols (II) were obtained. Then these carbinols were changed to 1, 1-diphenylethylenes (III) by dehydration. Ethyl diazoacetate obtained from glycine ethylester

hydrochloride was added dropwise to the above 1, 1-diphenylethylenes (III) under heating in the presence of copper powder. After removal of copper, the products were distilled under reduced pressure, and ethyl esters of 2, 2-diphenylcyclopropane-1-carboxylic acid (IV) were obtained. By the hydrolysis of these esters with methanolic potassium hydroxide, 2, 2-diphenylcyclopropane-1-carboxylic acids (V) were obtained, which recrystallized from carbon tetrachloride or petroleum ether.

On the other hand, ethereal solution of diazomethane obtained from nitrosomethylurea, was added to the 1, 1-diphenylethylenes (III) and the resulting solutions were kept at room temperature for about two weeks, and then the crystals of 5, 5-diphenylpyrazolines (VI) were separated by the removal of ether. These pyrazolines were recrystallized from petroleum ether or ethanol, and decomposed to 1, 1-diphenylcyclopropanes (VII) by heating about 150°, which were recrystallized from methanol or ethanol. Melting or boiling points of above-mentioned compounds were shown in Table I.

None of these compounds proves as effective as DDT, and fuller particulars of the bioassay method and results will be published elsewhere.

Studies on the Mechanisms of Synergistic Action in Insecticides. I. On the Difference in Lipase Activity and Detoxification of Pyrethrins in Adults Female and Male of the Common Housefly (*Musca domestica* L.) Hiromichi MATSUBARA (Dept. of Agr. Chem., Faculty of Agr., Gifu University) Received May 6, 1953. *Botyukagaku* 18, 75, 1953. (with English résumé 83)

16. 殺虫剤に於ける共力作用機構に関する研究 (第1報) イエバエの雌雄による Lipase Activity 及び Pyrethrins に対する解毒作用の差異に就て* 松原弘道 (岐阜大学農学部 農芸化学教室) 28. 5. 6. 受理

イエバエの雌雄による pyrethrins に対する抵抗性の差異に關しては MURRAY⁽¹⁾, MILLER et al.⁽²⁾ 及び長沢⁽³⁾等の研究があり、一般に雌の方が雄より抵抗性が大である事が認められている。此の抵抗性の差異の原因に就て最近長沢⁽³⁾はイエバエ成虫の油脂含量の多少によるものでない事を報告しているが、其他体

重の差、虫体 cuticle 層の成分及び構造の差による薬剤透過速度或は透過量の差異、所含 lipid の組成の差に基く薬剤受容量の差異、發育所要積算温度或は發育日数の差異更に又体内 cytochrome oxydase 或は解毒酵素の activity の差異等によるものと考えられるけれども現在これ等は總て推論に過ぎず、其の原因は殆んど不明と云つてもよい。

* 本研究の概要は昭和28年4月6日 日本農芸化学会大会にて報告した。

又 KERR⁽⁴⁾の研究により種々の共力剤を添加した

pyrethrins 所謂 synergized pyrethrins に対するイエバエの雌雄による抵抗力の差は pyrethrins 単剤の場合のそれよりかなり小である事が示されて居り、Woke⁶⁾ は pyrethrins にも最も効果ある解毒酵素は lipase である事を証明し、更に CHAMBERLAIN のによれば pyrethrins に対する共力剤の共力作用機構は pyrethrins の解毒酵素である lipase の作用を阻害する為であるという。

此の学説に基けば此のイエバエの雌雄による pyrethrins 単剤並に synergized pyrethrins 剤に対する抵抗力の差の相違はイエバエの lipase activity に対する共力剤の阻害度が雌雄により異なる為によるものではないかと想像せられるので、それを証明する為に先づイエバエ成虫の脱脂粉末を用ひ其の lipase の最適 pH 及び温度を決定し、又雌雄による lipase activity の差異、更にそれ等による pyrethrins に対する解毒作用の差異に就て研究し、イエバエの lipase activity と pyrethrins に対する解毒作用、並に解毒作用と pyrethrins に対する抵抗力との関連に就て一知見を得たので此処に報告する。尚イエバエ酵素による pyrethrins の解毒作用に対する piperonyl butoxide (pip. but.) の阻害に就ても試験した。

実験

I. 実験材料

(1) 供試薬料

lipase の基質として用ひた tributyrin は純化価 544.3, 酸価 0.37 の Merck 製品、buffer solution 調製用の potassium biphosphate 及び sodium phosphate は Kahlbaum 製 (nach SREINSEN) を其のまま、pip. but., xylol, 硫酸化油及び除虫菊エキ스는著者が先に用ひたものと同様のもので、除虫菊エキスの成分は pyrethrin I 6.56%, pyrethrin II 5.22%, total pyrethrins 11.78% である。又白燈油は bp 180~200° の蒸溜精製品を用ひた。

(2) イエバエの酵素試料

京都大学化学研究所に於いて最初極く少量の個体から発生させ数年の累代飼育を経て形態学的にも、生理学的にも略一定した遺伝的性質を有すると見做される高槻系イエバエ *Musca domestica* L. を薬用酵母添加豆腐菌培基と小麦粉糊の給餌によつて飼育し、羽化後 2~5 日を経た健全な個体を選び酵素試料として雌雄別に其の脱脂粉末及び生体磨砕液を下記方法によつて調製した。尚酵素試料は虫体の各部分別にすべきであるが小虫体であるので実施困難の上、pyrethrins を受容し且之を解毒する部分が現在明かでないのをこれを区別せず全虫体を試料とした。

a) 脱脂イエバエ粉末の調製法

エーテル蒸気にて麻醉せしめ雌雄別にした供試イエ

バエ (羽化後 4~5 日) を乳鉢中で破碎し、これに生体重量の 3 倍量のアセトン注入し、良く攪拌して水分及びアセトン可溶物を抽出除去する。

此の操作を 3 回繰返し、次にアセトンとエーテルの等容混合液を生体重量の 3 倍量加へ 1 回抽出し、最後に生体重量の 5 倍量のエーテルで同様操作を繰返し完全に脱脂し、後エーテルを揮散せしめ、更に瑪瑙の乳鉢中で良く粉碎し微粉末とし、冷蔵庫中 (約 2°C) に防湿的に貯蔵し、実験の都度取出して使用した。調製に関する詳細な数値は第 1 表の如くである。

Table 1. The numerical table in preparation of defatted housefly powder.

Date	Feb. 11; 15, 1952 (Takatsuki)		Oct. 16, 1952 (Gifu)	
	Female	Male	Female	Male
Sex				
No. of individuals	2767	3057	50	53
Total weight of living individuals (g)	55.640	51.741	1.111	0.770
Average weight of one individual body (mg)	20.1	16.9	22.6	14.6
Total weight of housefly powder (g)	13.671	12.681	0.211	0.169
Yield of housefly powder per living individuals (%)	24.57	24.51	19.01	21.95
Yield of housefly powder from one living individual (mg)	4.941	4.148	4.226	3.192

本粉末を 6 ヶ月間冷蔵庫中に貯蔵したものと新しく調製した粉末との lipase activity を比較したところ、両者のそれは全く同じく、貯蔵中に activity の低下を起さない事が観察された。又上記方法で調製したイエバエ粉末の lipase activity とイエバエ生体の磨砕液のそれとの比較を行つと (同一生体量に対して)、後者の方が遙かに強い activity を示す。これは粉末調製に際し lipase が不安定の為一部分分解したか、或は不活性化したかに原因するものと考へられる。尚実験に用ひた脱脂イエバエ粉末は皆調製後又 2 ヶ月以内のものである。

b) イエバエ生体磨砕液の調製法

雌雄別とした供試イエバエを瑪瑙の乳鉢中にて生体重量の 10 倍量の水を加へてよく磨り潰す。此の操作は如何に完全にしても猶ビペットの小孔詰める小片が碍るので、これを防ぐ為ガーゼ二重にて濾過し、其の濾

液の一定量を探つて直ちに実験に用ひた。調製に関する詳細な数値は第 2 表の如くである。

Table 2. The numerical table in preparation of living housefly's ground solution.

Sex	Female	Male
No. of individuals	61	47
Total weight of living individuals (g)	0.838	0.532
Average weight of one individual body (mg)	13.7	11.3
Yield of ground solution (cc)	8.4	5.3
Living housefly's weight per 1cc of ground solution (mg)	100.0	100.0
No. of individuals per 1 cc of ground solution	7.2	8.9
pH value	6.2	6.3

上記方法によつて調製した両酵素試料を実験に用いる際は、雌雄共に同一生体重量に相当する量を採用した。

3) 生物試験用昆虫

現在微量の pyrethrins の化学的定量はかなり困難であるので、アカイエカ幼虫の殺虫試験による生物学的定量法を採用した。使用したアカイエカ *Culex pipiens L. var. pallens* Coqui. の幼虫は著者⁶⁾が先に農薬の共力剤に関する研究に於て用いたものと同様に、岐阜市郊外の著者宅の下水溜から採集した卵塊を水道水を盛つた水槽中で孵化せしめ、薬用酵母を餌として飼育したもので、孵化後 5~7 日の 3 齢虫である。

II. イエバエの雌雄による Lipase Activity の差異に関する実験

イエバエの雌雄による lipase activity の差異は其の pyrethrins に対する抵抗性との関連から興味ある問題であるが、これに就ては殆んど知られていないので、先づイエバエ成虫の lipase の最適 pH 及び温度を決定し、更に雌雄による其の activity の差異に就て研究を行つた。

(1) 実験方法

Lipase activity の試験には基質の分解により生ずる有機酸をアルカリ滴定により測定する WILSTÄTTNER のアルカリ滴定法に依つた。即ち 50cc 容のエrlenmeyer フラスコに基質 500mg と乳化剤 (1% オレイン酸ソーダ溶液) 1cc を加へ良く振盪して完全に乳化せしめ、次で防腐剤 (0.1% hexylresorcinol 溶液) 2cc, SØRENSEN の磷酸塩緩衝液 (M/15 sodium phosphate + potassium biphosphate solution), 5cc を加え、最後に lipase 試料として前述のイエバエ粉

末 50mg を添加し、更によく振盪し、密栓して定温器中に一定温度に保持し乍ら定期的に振盪し、48 時間後無水アルコール 20cc とエーテル 10cc を以て濾紙を通して別のフラスコに移し、phenolphthalein を indicator とし N/10 KOH アルコール溶液にて遊離 butyric acid を滴定し、別に空試験を同様操作にて行い、上の滴定数から差引き基質の分解率を求めた。尙酵素液を 100°, 30 分処理し不活性化したのもでも僅か tributyrin を分解する能力を持つているのを認めめたが、分解率に対して此の補正は行わず表示事とした。

(2) 実験結果及び考察

基質として初めオリーブ油 (日本薬局方) を用いたが、第 3 表に示す様に分解率 (48 時間後) が極めて低く、又滴定終点の判定が困難の為 tributyrin を用いる事とした。tributyrin はオリーブ油に比して高い分解率を示すが、最高でも 10% に過ぎない。これは緩衝液が基質の乳化状態を劣化せしめる事と、振盪法によらず静置法によつた為と考えられる。

Table 3. The comparison of percentage hydrolysis of tributyrin and olive oil by housefly powder at 40°C.

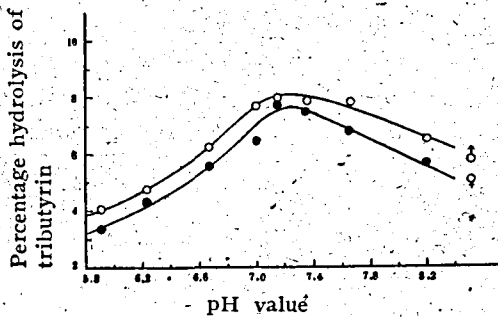
pH	Tributyrin		Olive oil	
	Female	Male	Female	Male
5.91	3.34	4.09	—	—
6.98	6.35	7.64	1.47	1.81

最初イエバエ lipase の最適 pH を決定する為 SØRENSEN の phosphate buffer solution を用い、pH 5.91~8.20 間の 8 段階に就て 40° で加水分解を行い第 4 表及び第 1 図に示す様な結果を得た。尙本実験は各々 2 回行い其の平均を表した。

Table 4. The effect of pH value upon percentage hydrolysis of tributyrin by housefly powder at 40°C.

pH	Percentage hydrolysis of tributyrin	
	Female	Male
5.91	3.34	4.09
6.24	4.28	4.73
6.64	5.56	6.20
6.98	6.35	7.64
7.15	7.75	7.92
7.35	7.48	7.81
7.65	6.75	7.81
8.20	5.58	6.45

Fig. 1. The effect of pH value upon percentage hydrolysis of tributyrin by housefly powder at 40°C.



一般に酵素の最適 pH は基質、緩衝液等により影響を受けるものであり、普通 lipase の最適 pH は 5 と 8 の間にあるといわれているが、本実験の如く基質として tributyrin、緩衝液として磷酸塩を用いる時は、イエバエ粉末の lipase の最適 pH は 7.1~7.3 の間にあり、40° では lipase activity は何れの pH でも雄の方が雌より僅か大であるのが観察される。尚 CHAMBERLAIN⁽⁷⁾ はイエバエの lipase を用いる加水分解の研究に於て pH 約 7.5 で行っているが、これは少しくアルカリ側に傾き過ぎているという事が出来る。

次にイエバエ粉末の lipase 最適温度を決定する為、前実験に於て得られた最適 pH 7.15 (SØRENSEN の phosphate buffer solution) を採用し、20~50° の間の 7 段階に就て tributyrin の加水分解実験を行い、第 5 表及び第 2 図の様な結果を得た。尙本実験は各々 2~3 回行い、其の平均にて表した。

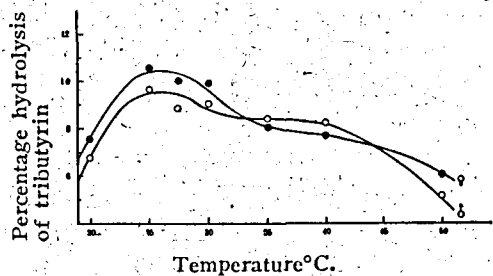
Table 5. The effect of temperature upon percentage hydrolysis of tributyrin by housefly powder at pH 7.15.

Temperature °C.	Percentage hydrolysis of tributyrin	
	Female	Male
20	7.57	6.79
25	10.58	9.69
27.5	10.00	8.83
30	9.92	9.02
35	8.01	8.43
40	7.65	8.21
50	6.03	5.14

一般に動物性 lipase は、40° 前後で其の作用が最も強いといわれているが、イエバエでは第 5 表及び第 2 図に示された如く其の最適温度は 25~27° の間に

存在する。イエバエの棲息の最適温度は約 25° といわれているが、此の温度と略々一致するのは興味あるところである。25° 以下に於ては lipase activity は急激に、30° 以上では徐々に夫々減少しているのが観察される。又雌雄による lipase activity の差異を見るに 33~44° の間では雌より雄の方が僅かそれが大であるが、これ以外の温度では総て雌の方が雄より大である。此の lipase activity の逆転現象は興味ある事であるが、其の原因は明かでない。

Fig. 2. The effect of temperature upon percentage hydrolysis of tributyrin by housefly powder at pH 7.15.



性別の酵素化学的考察に就ては田所⁽⁸⁾の多くの研究があり、一般に雄の方が雌より enzyme activity が大であるといわれているが、(但し山藤⁽⁹⁾による家蚕血液 lipase では殆んど差異が無いという)、本研究ではイエバエの lipase activity は逆に概して雌の方が雄より大であるという結果を得た。前述の如く WOKER⁽⁶⁾によれば lipase に富む組織では pyrethrins に対する解毒作用が強いといひ、CHAMBERLAIN⁽⁷⁾は同氏及び著者⁽¹¹⁾が認めた pyrethrins が低温程有効度が大である現象は、虫体内の解毒酵素が低温でより低い activity を示す為であると、pyrethrins に対する酵素的解毒説を提称している。一般に酵素は種々の外的条件により其の作用を変化するが、上記の著者の実験結果のみから考察すれば、イエバエ棲息の適温である 25° にて lipase activity が常に雄より雌の方が大であり、且 25° 以下で急激に lipase activity が減少する事実は、pyrethrins に対してイエバエの雌が雄より抵抗性の大である理由は、雌の pyrethrins に対する解毒酵素の activity が雄のそれより大である為であり、更に又 pyrethrins の解毒酵素は lipase であるという WOKER 及び CHAMBERLAIN の説に支持を与える様に思はれる。但し後述の実験では此の説に否定的な結果を与えている。

III. イエバエの雌雄による Pyrethrins に対する解毒作用の差異に関する実験

前実験にてイエバエの lipase activity は常温で雌より雌の方が大であるという結果を得て、lipase

activity の強弱と pyrethrins に対する抵抗性の大小との間に相関関係が成立つ様な暗示を与えられたので、更にこれを確認する為、lipase activity と pyrethrins に対する解毒作用並に pyrethrins に対する解毒作用と pyrethrins に対する抵抗性との間の相関を知る為、イエバエの雌雄による pyrethrins に対する解毒作用の差異に就て実験を行った。

(1) 実験方法

除虫菊エキスを原料とし、キシロールを基剤、硫酸化油を乳化剤として用いた 0.05% pyrethrins emulsion (除虫菊エキス 0.1698 g, 硫酸化油 0.6 g, キシロール 1.2302g, 水にて 40cc) に一定量のイエバエの脱脂粉末、同粉末懸濁液或はイエバエ生体磨碎液及び上記酵素試料を加熱不活性化 (イエバエ粉末は 105~110° 数時間空気浴中、懸濁液及生体磨碎液は 100°, 30 分重蒸籠中で各々加熱) したものを加え、更に pH を 7.0 とする為適量の 1% オレイン酸ソーダ溶液を加へ (緩衝液は乳化状態を破壊するので用いられない)、更に水で全液を 16cc とし、24時間一定温度の定温器に入れ、定期的に振盪し、後酵素により解毒分解せられなかつた pyrethrins 残量をアカイエ

カ幼虫の殺虫試験により生物学的に測定した。

アカイエカの殺虫試験は著者が先に報告した方法と同様で、上記処理した 16cc の乳変を最初 2000cc に水で稀釈し、更に対数間隔に稀釈した液各々 5 種を作り、これを 200cc 容のペトリー皿に盛り、アカイエカ幼虫 10 匹宛を入れ、24 時間後に毛細管で虫体に刺戟を与える事により其の生死を判別した。

実験は一稀釈液に就て 10 箇のペトリー皿計 100 匹の昆虫に就て行つた。又イエバエの粉末、懸濁液或は生体磨碎液のみの処理区の場合も 2000cc (125 倍) に稀釈した液に就て同様 100 匹に就て殺虫試験を行い、更に無処理対照区として 100 匹の昆虫に就て併せて 24 時間後の生死を観察した。

解毒作用の実験は 3 種類に分けて行い、実験 I はイエバエ粉末 0.09g (雄イエバエ約 20 匹分に相当する) を直接 pyrethrins emulsion に添加し 35° にて行い、実験 II は酵素試料としてイエバエ粉末の懸濁液を使用した。即ち粉末 0.75 g を水 10cc に懸濁させ、ガーゼ二重にて濾過して大なる粒子を除き、よく振盪しつゝ其の 1cc (イエバエ 17 匹分に相当する) を採つて用い 35° で実験し、更に実験 III ではイエバエ生体磨碎

Table 6. The formulation of the test solution for enzymatic detoxification of pyrethrins.

Test No.	Code sign of exp. series	Fly powder g.	Fly powder-susp. cc	Living body's ground sol. cc	0.05% Pyr.emul. cc	1% Na-oleate sol. cc	Water cc
I (35°)	A (♀VE)	0.09	—	—	1.0	0.8	14.2
	B (♀HE)	0.09	—	—	1.0	0.8	14.2
	C (♂VE)	0.09	—	—	1.0	0.8	14.2
	D (♂HE)	0.09	—	—	1.0	0.8	14.2
	E (Pyr.)	—	—	—	1.0	0.6	14.4
	F (♀VE)	0.09	—	—	—	0.6	15.4
	G (♂VE)	0.09	—	—	—	0.6	15.4
II (35°)	A (♀VE)	—	1.0	—	1.0	0.7	13.3
	B (♀HE)	—	1.0	—	1.0	0.7	13.3
	C (♂VE)	—	1.0	—	1.0	0.7	13.3
	D (♂HE)	—	1.0	—	1.0	0.7	13.3
	E (Pyr.)	—	—	—	1.0	0.6	14.4
	F (♀VE)	—	1.0	—	—	0.6	14.4
	G (♂VE)	—	1.0	—	—	0.6	14.4
III (30°)	A (♀VE)	—	—	1.5	1.0	0.7	12.8
	B (♀HE)	—	—	1.5	1.0	0.7	12.8
	C (♂VE)	—	—	1.5	1.0	0.7	12.8
	D (♂HE)	—	—	1.5	1.0	0.7	12.8
	E (Pyr.)	—	—	—	1.0	0.6	14.4
	F (♀VE)	—	—	1.5	—	0.6	13.9
	G (♂VE)	—	—	1.5	—	0.6	13.9

VE-- viable enzyme, HE-- heat-inactivated enzyme, Pyr.-- pyrethrins only.

Table 7. Dosage X (ppm)-mortality Y (%) table for detoxified pyrethrum emulsions by housefly enzyme to larva of the common house mosquito.

Dilution V	Dosage X(ppm)	Number of insects	A (♀ VE)			B (♀ HE)			C (♂ VE)			D (♂ HE)			E (Pyr.)			F (♀ VE)			G (♂ VE)		
			I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
125	8000	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
250	4000	100	96	99	100	96	100	100	96	100	98	99	100	100	98	100	100	98	100	100	—	—	—
500	2000	100	80	88	92	67	86	95	69	86	80	79	86	93	78	87	91	—	—	—	—	—	—
1000	1000	100	27	17	47	18	17	51	22	14	35	28	28	52	26	29	54	—	—	—	—	—	—
2000	500	100	0	0	5	1	0	6	2	0	0	0	1	8	0	0	12	—	—	—	—	—	—

Table 8. Summary of data of experiments for relation of dosage and mortality to larva of the common house mosquito in detoxified pyrethrum emulsions.

Code sign of exp. series	Number of insects	Regression equation $y=a+b(x-\bar{x})$	χ^2	Degree of freedom n	Probability in χ^2 test Pr	Variance of parameter a $V(a)$	Variance of parameter b $V(b)$
A	500	$y=5.00535+5.05056(x-3.01985)$	0.04349	1	0.89206	0.00866	0.21385
B	500	$y=5.00718+5.30644(x-2.99504)$	0.02399	1	0.94046	0.00895	0.22922
C	500	$y=5.34861+4.05629(x-3.18081)$	0.23261	1	0.63487	0.00826	0.20903
D	500	$y=5.02609+4.78561(x-2.99673)$	0.01819	1	0.95485	0.00828	0.19326
E	500	$y=5.03961+4.18054(x-2.98762)$	0.00246	1	0.93894	0.00738	0.15360

液を用いた。即ち羽化後2日後のイエバエに10倍量の水を加え前述の方法により酵素液を調製し、其の1.5cc (雌では約11匹分、雄では約13匹分に相当する)を用い、30°で解毒実験を行った。

各実験に於ける試験夜の組成は第6表の如くである。

(2) 実験結果及考察

第6表の如き処方では、各温度にて24時間処理した各試液を、上記実験方法によりアカイエカの幼虫に適用し其の毒力を求めた。

各試液(16ccに対する)の稀釈倍率(V)、薬量(X ppm) = 1/Vと死亡率との関係(本実験に於ては無処理対照区の生存虫率は100%)を表示すると第7表の如くである。尚殺虫試験時の水温は実験I及びIIは30±1°, IIIは27±1°であつた。

第7表の実験結果をlog-probability paper上にプロットし、其処に描かれた予備回帰線のprobit 5.0の点から考察すれば、実験I, II及びIII共Aの有効度はCより常に大である、即ちイエバエ粉末並に生体磨砕液のpyrethrinsに対する解毒作用は30°及び35°に於て何れも雌より雄の方が大である事が示されている。

尚イエバエ粉末特に雌の粉末では加熱不活性化されたものでもかなりpyrethrinsに対する解毒作用を有しているのが観察される。

前実験に於てイエバエ粉末のlipase activityは

30°では雌の方が雄より大であるが、35°では其の逆であるとの結果を得ているので、本実験によりlipase activityとpyrethrinsに対する解毒作用との間の相関の存在に疑問を生じて来る事となる。

今実験III即ちイエバエ生体磨砕液を30°にてpyrethrinsに作用せしめた場合の結果に就て、更に精密の比較を行う為、薬量Xを其の対数xに、死亡率Yをprobit yに変換し、Blissの薬量-死亡率曲線一次変換操作を施して、其の回帰方程式 $y=a+b(x-\bar{x})$ 並に其れに附随する二、三の数値を求めると第8表の通りである。

第8表の結果から薬量死亡率回帰線を描くと第3図の如くなる。

上の如く求められた回帰線に基き、各乳液の絶対有効度並に相対有効度を算出すれば第9表及び第10表に示す通りである。

第10表の結果のうち、Aのpyrethrins分解率からBのそれを差引いたものは、雌イエバエ酵素によるpyrethrinsの真の分解率にて、其の値は5.42%であり、同様に雄のそれは20.59%である。即ち雄イエバエ生体磨砕液のpyrethrins分解率は雌のそれより遙か大で、雌の3.80位に当る。本実験は生体磨砕液を用いた30°に於ける解毒作用であるが、前述の如くイエバエ粉末及び粉末懸濁液を用いた35°に於ける同実験でも同様に雄の解毒力が雌のそれより大であるのが、

Table 9. Absolute toxicity of detoxified pyrethrum emulsions by housefly enzyme to larva of the common house mosquito.

Code sign of exp. series	A	B	C	D	E
Standard deviation of susceptibility σ	0.19800	0.18842	0.24653	0.20896	0.23929
Efficiency of lathal action $b=1/\sigma$	5.05056	5.30644	4.05629	4.78561	4.18054
Log median lathal dose	3.01879	2.99369	3.09487	2.99128	2.97815
Median lathal dose LD-50 (ppm)	1044.2	985.57	1244.1	980.12	950.93

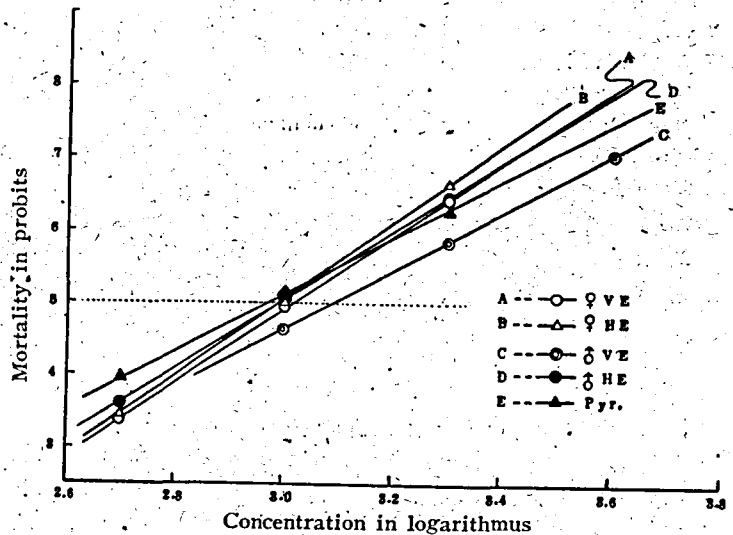
Table 10. Relative toxicity of detoxified pyrethrum emulsions by housefly enzyme to larva of the common house mosquito.

Code sign of exp. series	A (♀VE)	B (♀HE)	C (♂VE)	D (♂HE)	E (Pyr.)
Median effective equivalent	0.91066	0.96486	0.76433	0.97022	1.00000
Median effective pyrethrins equivalent concentration (ppm)	0.027064	0.028674	0.022715	0.028834	0.029719
Percentage detoxified pyrethrins	8.9337	3.5143	23.567	2.9781	0.0000

観察された。又最初のイエバエの lipase に関する実験によれば 35° に於けるイエバエの lipase activity は雌より雄が大であるので、此の温度では lipase activity と pyrethrins に対する解毒作用との間に相関がある如く思われるが、同実験に於ける 30° では逆の結果を得て居り、本実験の結果と矛盾を来すので、Woke⁶⁾により先に報告せられた Southern armyworm¹⁾に於ける lipase に富む組織が pyrethrins に対し強い解毒作用を有する事実がイエバエの lipase activity と pyrethrins に対する解毒作用との間には成立しない事となる。

一般にイエバエの雌が雄より pyrethrins に対し抵抗性の大である原因の一つは、雌の解毒酵素の activity が雄のそれより大であるのに基くものではないかと推察されていたが、以上実験によりイエバエ粉末及び生体磨碎液の pyrethrins に対する解毒作用とイエバエの pyrethrins に対する抵抗性の間には相関が無い事が示されている。従つて又イエバエの lipase activity と pyrethrins に対する抵抗性との間の相関

Fig. 3. Probit regression lines for the toxicity of detoxified pyrethrum emulsions to larva of the common house mosquito.



の存在にも疑問が持たれるに至つた。但しイエバエ成虫の全虫体の脱脂粉末或は生体磨碎液の lipase activity 及び pyrethrins に対する解毒作用が薬液適用時に於けるイエバエ生体内の pyrethrins 受容部分のそれ等と同一であるや否やの点に就ては未だ疑問が残されているので、更に研究を必要とするものと考えら

れる。

IV. イエバエ酵素による Pyrethrins の解毒作用に対する Piperonyl Butoxide の阻害に関する実験

CHAMBERLAIN⁷⁾ は pyrethrins に対する共力剤の共力作用機構は pyrethrins に対する酵素的解毒作用への共力剤の阻害に基づくとの説を述べ、イエバエ及びゴキブリ lipase による pyrethrins の加水分解に対する pip. but. 及び他の pyrethrins の共力剤の阻害作用を Warburg manometer を用いて観察しているが、同氏自身も猶研究すべき部分が残されているのを認めて居り、且同氏の実験は pyrethrins の加水分解により生じた有機酸に基づく炭酸瓦斯の発生容量のみからの観察であるので、加水分解率と其の pyrethrins の解毒率との関係は明かでない。

著者による前実験でイエバエの雌雄による pyrethrins に対する解毒作用の差から pyrethrins に対する抵抗性の差の原因を説明する事が現在のところ不可能となり、従つて pyrethrins 並に synergized pyrethrins に対するイエバエの雌雄による抵抗性の差の相違する現象を、解毒作用への共力剤の阻害度の差から解明する事は無意味となつた。

然し pyrethrins の解毒作用に対する共力剤の阻害に就ての生物学的測定に関する報告はないので、pyrethrins に対する解毒作用の強い雄イエバエ粉末の懸濁液による pyrethrins の解毒作用に対する pip. but. の阻害に就ての予備的実験を行つた。

(1) 実験方法

基質として用いた 0.05% pyrethrins emulsion は前実験と同一のもの、0.4% pip.but.emulsion は pip.but. 0.4g, 硫酸化油 4.0g, 白燈油 5.6g, の混合溶液を水にて 100cc としたもので、イエバエ粉末の懸濁液は前実験と同様な方法で、雄イエバエの粉末から調製したもので、其の 1cc は雄イエバエの約17匹に相当する。

上の諸試料を以て次の A, B 及び C の3液を調製した。其の配合量は次に示す通りである。

尚 pip. but. の混合量は pyrethrins の8倍量とし、sodium oleate solution は全乳液の pH を 7.0 とする為添加したものである。

- A { 0.05% Pyrethrins emulsion 1.0cc
- 1% Sodium oleate solution 0.7cc
- (Water 11.3cc (I, II) or 12.4cc(III)
- B 0.4% Pip. But. emulsion 1.0cc
- C Male housefly powder's suspension 1.0cc

実験は I, II 及び III の3系列とし、I は A, B 及び C の各液を最初から混合し、II は最初 A 及び C

液を混合し、24時間処理後殺虫試験直前に B 液を混合する。III は対照区にして A 及 B 液のみ最初から混合して置く。

上の3系列の試液を 50cc のエルレンマイヤーフラスコ中に仕込み、30° の定温器中にて定期的に振盪し乍ら24時間放置し後対数間隔的に I 系列の稀釈液を5種作り、1 稀釈液に就て20箇のベトリ-皿計 200 匹の昆虫に就て前実験と同様に、アカイエカ幼虫の殺虫試験を行ひ、24時間後の死虫率から解毒されず残留している pyrethrins 量を求めた。

アカイエカ幼虫は孵化後4日のもので、殺虫試験時の水温は 30±1° であつた。

其の結果を表示すると第11表の如くである。

此の場合の薬量濃度は便宜上 0.05% pyrethrins emulsion 原液に対する割合にて表した。

Table 11. Dosage (ppm) -mortality (%) table at the assay with mosquito larva, in the experiments for inhibition of enzymatic detoxification of pyrethrins caused by pip. but.

Dilution	Dosage (ppm)	Number of insects	I (A+B+C)	II [(A+C)+B]	III (A+B)
16000	62.500	200	100.0	100.0	100.0
32000	31.250	200	100.0	100.0	100.0
64000	15.625	200	85.5	90.0	93.0
128000	7.8125	200	17.5	26.0	19.0
256000	3.9063	200	0	0.5	0

第11表の結果を log-probability paper 上にプロットし、其処に描かれた薬量-死虫率予備回帰線から乳液の毒力を probit 5.0 の点にて比較すると II > III > I の順であるので、pyrethrins の解毒率は II < III < I の順となる。即ち最も解毒率が大きであると予想せられた II のそれが最も小となり、小であると予想せられた I が最も大なる解毒率を示した。又 III 実験の代りに加熱不活化した雌及び雄イエバエ粉末を最初から (A+B) 液に加えた同様の実験を行つたが略々同一の結果が得られた。

此の様な実験結果はイエバエ酵素による pyrethrins の解毒作用に対する pip.but. の阻害を否定する事となるが、I の毒力の最も小なる理由は、白燈油を基剤とし硫酸化油を乳化剤として用いた pip.but. 乳剤が比較的的不安定で、特にイエバエ粉末懸濁液に長時間接触したので、其の間に乳化状態がかなり破壊され、アカイエカ幼虫に対する殺虫率が低下した為と推定される。又 synergized pyrethrins に於て pyrethrins

の含量の僅かの差がアカイエカ幼虫の死虫率に如何なる程度影響するか、更に又白燈油の pyrethrins 解毒酵素に対する影響に就ても現在の処未だ明かでないので、pip. but. が果してイエバエの酵素による pyrethrins の解毒作用を阻害するか否かは、此の実験で断定する事は不可能で、更に研究を必要とするものと考えられる。

総 括

Pyrethrins 剤に対し一般にイエバエの雌が雄より遙かに抵抗性が大である事が認められて居り、又 synergized pyrethrins 剤に対するイエバエ雌雄による抵抗性の差は pyrethrins 単剤の場合のそれより一般に小である事が、KERR 等により明かにされているが、此の機構を CHAMBERLAIN による所謂共力作用は pyrethrins に対する酵素的解毒作用との共力剤の阻害に基くとの仮説によつて証明する為、著者はイエバエの脱脂粉末並に生体磨碎液を用い、pyrethrins 解毒酵素と見做される lipase の性質並びに雌雄による lipase activity 及び pyrethrins に対する解毒作用の差異に就て研究し次の如き結果を得た。

イエバエ lipase の最適 pH は 40° では 7.1~7.3 (phosphate buffer solution) にて、其の最適温度は pH 7.15 では 25~27° であり、25° 以下では急激に其の activity が減少する。lipase activity は 33~44° では雄の方が雌より僅か大であるが、これ以外の温度では総て雌の方が大である。

イエバエ粉末及び生体磨碎液の pyrethrins に対する解毒作用をアカイエカ幼虫を用うる生物学的定量法により研究し、其の作用は 30° 及び 35° 共に雄の方が雌より大で、特に 30° に於ける生体磨碎液の pyrethrins 解毒率は雌が 5.42%、雄が 20.59% で、雄の方が雌の 3.80 倍に相当するのを認めた。

従つてイエバエの lipase activity と pyrethrins に対する解毒作用、更に又 pyrethrins に対する解毒作用と其の pyrethrins に対する抵抗性との間の相関の存在には疑問が持たれるに至つた。

又雄イエバエの粉末による pyrethrins の解毒作用に対する pip. but. の阻害に就てアカイエカ幼虫による生物学的定量法にて研究したところ、其の阻害作用を観察する事が出来なかつた。

これは pip. but. の阻害作用が無いのを意味するものではなくて、イエバエ粉末が操作中に乳剤の安定性を破壊する事に原因するものと想像せられる。

本研究は京都大学農学部武居三吉教授を代表者とする「害虫の化学的防除に関する基礎的研究」に関する総合研究の一部で、終始御鞭撻を賜つた武居三吉教授並に本学高橋柳蔵教授、貴重な試料を賜つた京都大学化学研究所長沢純夫氏及び実験に熱心に助力せられた三

輪三郎君に夫々厚く感謝する。

文 献

- (1) MURRAY, C. A. : Soap Sanit. Chem., 14 (2); 99 (1938)
- (2) MILLER, C. A. and W. A. SIMANTON : ibid, 14 (5), 103 (1938)
- (3) 長沢純夫、漆葉千鶴子 : 本誌, 14, 31 (1947)
長沢純夫 : 本誌, 17, 123 (1952)
長沢純夫 : 応用昆虫, 8, 29 (1952)
- (4) 長沢純夫 : 本誌, 17, 123 (1952)
- (5) KERR, R. W. : Commonwealth Sci. Ind. Research Org., Australia, Bull. No. 261, 1 (1951)
- (6) WOKF, P. A. : J. Agr. Research, 58, 289 (1939)
- (7) CHAMBERLAIN, R. W. : Am. J. Hyg., 52, 153 (1950)
- (8) 著者 : 本誌, 18, 9 (1953)
- (9) 田所哲太郎 : 性別の化学的考察, 丸善 (1931)
- (10) 山藤一雄 : 農化, 10, 17 (1934)
- (11) 著者 : 本誌, 16, 234 (1951); 18, 9 (1953)

Résumé

By many previous investigators it is observed that generally, the resistability of adults of the common housefly (*Musca domestica* L.) against pyrethrins is greater in the case of females than in males, and that the sexual difference in resistability against synergized pyrethrins is less than that against pyrethrins only.

In order to prove the mechanism of this observation with the hypothesis that pyrethrum synergist inhibits the enzymatic detoxification of pyrethrins proposed by CHAMBERLAIN⁽⁷⁾, the author studied on the characteristics of housefly lipase which is regarded as a detoxifying enzyme of pyrethrins, and on the difference in lipase activity and detoxification of pyrethrins in female and male of the common housefly, using defatted housefly powder and living housefly's ground solution, and obtained the following results :

The optimum pH value of housefly lipase is 7.1~7.3 (phosphate buffer solution) at 40° and optimum temperature is 25~27° at pH 7.15, its activity rapidly decreasing under 25°. The lipase activity of male housefly is slightly greater than that of females between 33° and 44°, but

beyond or under this range of temperature, that of females is usually greater than males.

The rate of detoxification caused by defatted housefly powder and living housefly's ground solution for pyrethrins, which was determined by assay with mosquito larva, is greater in the case of males than females both at 30° and 35°, especially the rate of detoxification by female housefly's ground solution at 30° is 5.42% and that of males is 20.59%, showing the latter corresponding with 3.80 times as much as the former.

Therefore, there are some doubts in the existence of correlations between lipase activity of

housefly and detoxifying power for pyrethrins, and then between detoxifying power of housefly enzyme for pyrethrins and resistability for pyrethrins.

The inhibition of enzymatic detoxification for pyrethrins caused by pip. but. had not been recognized by assay with mosquito larva; this dose not mean that pip. but. had no inhibitory action for the enzymatic detoxification of pyrethrins, but it is caused, as the author supposes, by de-emulsification of pip. but. emulsion by male housefly powder in the experimental process.

抄 録

Lindane vapor のカナリヤと鳩に及ぼす影響並びに熱帯魚に対する毒性 S. MOORE, The Effect of Lindane Vapor on Canaries and Pigeons, J. Econ. Ent. 45 (6) 1002-93 (1952); F. SCHULZE; Toxicity of Lindane Vapor to Tropical Fish. ibid. 1094-96

最近種々の虫害を防除する為の連続蒸発法が発達して広く用いられる様になつたが、それと共に人畜に対するその毒性が問題となつて来た。この報告では lindane vapor が家畜、家禽、熱帯魚に及ぼす影響について行つた試験結果を述べる。

これまで多くの家畜を数日乃至数ヶ月間 lindane vapor にさらした試験によれば牛馬羊豚には、はつきりした害作用は認められず、家禽ではカナリヤ、又熱帯魚が指示薬量に対して毒性を示した。

I. カナリヤと鳩に関する試験

Lindane を恒温調節した電気加熱装置によつて連続的に、昆虫に有効で人体に安全な限度として指示されている 1g/20,000 cu. ft./day よりや、高い割合で蒸発させた。即ち 14,000 cu. ft. の部屋でカナリヤを小さいかごに入れ、1.60g/20,000 cu. ft./day の割合で34日間蒸発させた所、その健康状態は次第に悪くなつた。これを殺して組織を抽出しハエに対する

生物試験の結果20%の致死率であつた。14.02g/20,000 cu. ft./day の割合で蒸発させた場合にはカナリヤは4日目に死亡し、その組織抽出物のハエに対する致死率は100%であつた。

鳩は通風のよい普通の鳩舎で 3.10g~20.55g/20,000 cu. ft./day の高濃度で14日間蒸発試験を行つたが害作用は全く認められなかつた。

II. 熱帯魚に關する試験

この試験は熱帯魚の飼育に馴れた人の家で13種類の魚について行つた。6,000 cu. ft. の部屋で 53.28g の lindane を55日間を要して蒸発 (0.9687g/day の割合で指示薬量の約 2.4 倍) し、水槽に魚を入れて lindane を含む室内空気が水面にふれる様になると共に室内空気を compressor を用いて水槽中に bubbling させて、上面の大部分をガラスで cover した。魚は lindane に対して極めて敏感に反応を示し、運動状態が変調になつて、死亡するものが多くあつた。死亡した魚は直ちに凍結させて化学分析にかけ、一方 CCl₄ によつて組織の抽出を行つたがその抽出物は90%のハエを殺した。又 lindane の毒性からの恢復について行つた実験の結果、熱帯魚はそれが非常に緩慢なことが明かになつた。(陸月 亨)

昭和28年5月24日印刷 防虫科学第18号-II 定價 円100.00
昭和28年5月25日發行

主 幹 武 居 三 吉
京都市左京区北白川 京都大學農学部
編 集 者 内 田 俊 郎
發 行 者 京都市左京区北白川 京都大學農学部

發行所 財團法人 防虫科学研究所
京都市左京区吉田町 京都大學内
(振替口座・京都 5899)
印刷者 石 井 喜 太 郎
印刷所 大 宝 印 刷 株 式 會 社
京都市下京區東九條山王町三八