

Studies on the Mechanisms of Synergistic Action in Insecticides. III. On the Inhibition of Enzymatic Detoxification of Pyrethrins Caused by Dihydroconiferyl Alcohol and its Related Compounds. Hiromichi MATSUBARA (Laboratory of Agricultural Chemicals, Faculty of Agriculture, Gifu University) Received Oct. 8, 1955. *Botyu-kagaku* 20, 117, 1955 (with English résumé, 120)

18. 殺虫剤に於ける共力作用機構に関する研究(第3報)ピレトリンの酵素的解毒に対する Dihydroconiferyl Alcohol 及び関連化合物の阻害について\* 松原弘道(岐阜大学農学部 農薬化学研究室) 30. 10. 8. 受理

イエバエの酵素によるピレトリンの分解に対する dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の阻害を、アカイエカの幼虫を用いる生物試験によつて研究し、ピレトリンのイエバエに対するノックダウン効力への共力剤の作用機構の一部は、ピレトリンの酵素的解毒に対する共力剤の阻害作用に基くものである事を明らかにした。

前報に於て著者<sup>1)</sup>はイエバエの酵素によるピレスロイドの分解に対する piperonyl butoxide の阻害作用を研究し、ピレスロイドのイエバエに対する致死効力への共力剤の共力作用機構を、Chamberlain<sup>2)</sup>によつて提唱された解毒作用阻害説をもつては、全面的に解明する事が不可能である事を知つた。また著者<sup>3,4)</sup>は別に、ピレトリンに対する dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の共力効果について研究し、ピレトリンのアカイエカの幼虫に対する致死並びにノックダウン効力へ dihydroconiferyl alcohol, グアヤコール, アニソール, フェノール,  $\gamma$ -(*m*-methoxyphenyl)-及び  $\gamma$ -phenyl-propyl alcohol は総て共力効果を示さないにも拘らず、イエバエの成虫に対するノックダウン効力へは、前4者はエゴノール以上の共力効果を示す事を認めた。

昆虫の致死並びにノックダウン現象は複雑な多数の因子の総合の結果とみられるが、市販の共力剤の如く何れの現象にも共力効果を示す化合物の共力作用機構の解明よりも、上述の諸実験によつて明らかとなつた、ノックダウン現象に対してのみ共力効果を示す化合物のその解明の方が、より容易と考えられる。

故に著者はピレトリンのイエバエに対するノックダウン効力への、上記諸化合物の共力作用機構を明らかにする目的をもつて、イエバエの酵素によるピレトリンの分解に対する dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の阻害作用を、アカイエカの幼虫を用いて生物学的に研究し、其の作用機構の一部を解明する事が出来たので、こゝに報告する。

## 實 験

### I. 実験材料及び方法

\* 本報告の概要は、昭和30年3月30日、日本農薬化学会大会(東京)にて講演。

1. 供試薬剤 除虫菊エキスはピレトリン I 5.99%, ピレトリン II 9.96%, 全ピレトリン 15.95%の市販品で、dihydroconiferyl alcohol (I),  $\gamma$ -(*m*-methoxyphenyl) propyl alcohol (II),  $\gamma$ -(*p*-oxyphenyl) propyl alcohol (III),  $\gamma$ -phenylpropyl alcohol (IV) グアヤコール(V), アニソール(VI) 及びフェノール(VII) は著者<sup>3)</sup>が先に報告したものと同様のものである。また Tween 80 及びキシロール (bp 137~140°) は何れも市販品を其の儘用いた。

2. 供試昆虫 イエバエ *Musca domestica vicina* Macq. の成虫は第1報<sup>1)</sup>に記載したものと同じで、其の生体組織磨砕液の調製法並びに加熱不活性化の方法は前報<sup>1)</sup>に記載したそれと同様である。

アカイエカ *Culex pipiens* var. *pallens* Coqui. は著者<sup>3)</sup>が先に報告したと同じ、孵化後6~8日目の3齢幼虫である。

3. 実験方法 イエバエの酵素によるピレトリンの分解に対する dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の阻害実験は、前報<sup>1)</sup>に記載した方法に準じて行つた。即ち A, B 及び C の3系列の乳剤を調製し、A系列に於ては 0.05% ピレトリン乳剤 (除虫菊エキス 0.1254g, Tween 80 1.20g, キシロール 0.6746g, 水で 40cc とする) 2cc にイエバエの磨砕液 1cc 及び水 13cc を混和し、24時間、30°の定温器に入れ定期的に振盪後、0.4% dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の乳剤 (I~VII 0.16g, Tween 80 1.20g, キシロール 0.64g, 水で 40cc とする) 或は 0.4% 基礎乳剤 (Tween 80 1.20g, キシロール 0.64g, 水で 40cc とする) の 2cc を添加する。B系列は A系列のイエバエの磨砕液の代りに、加熱不活性化イエバエの磨砕液を添加する外はこれと全く同じに操作し、C系列は最初から 0.05% ピレトリン乳剤 2cc, イエバエ

の磨砕液 1cc, 0.4% dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の乳剤或は基礎乳剤 2cc 及び水 11cc を混和, 24時間同様に処理後, 3系列の乳剤共, 前報<sup>4)</sup>に記載した実験と同様に適宜稀釈し, アカイエカの幼虫を用いる生物検定を行い, 24時間後の致死率からイエバエの酵素によつて分解されたピレトリン量並びに分解作用への dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物或は基礎乳剤の阻害率を求めた。

なお本実験の検液の pH は, 緩衝液による乳剤の破壊を避けるためと, 生体磨砕液の pH (6.2) と検液のそれとが大差がない事から, 其の調整を行わず, 其の儘解毒実験を行つた。酵素液添加後の検液の pH はフェノールの 5.8,  $\gamma$ -(*p*-oxyphenyl) propyl alcohol の 6.0 以外は総て 6.2 であつた。

II. 実験結果

前述の方法に従い, 得た A, B 及び C 各系列原乳剤 16cc に対する稀釈率と稀釈乳剤によるアカイエカの幼虫の致死率との関係は第 1 及び 2 表に示す通りである。なお A, B 及び C の右下に附記した I~VI は加用した化合物の記号をあらわす。

先に著者<sup>6)</sup>は  $\gamma$ -(*p*-oxyphenyl) propyl alcohol がピレトリンのアカイエカの幼虫に対する致死効力へ僅か共力効果を有する事を観察し, 本化合物が解毒試験中イエバエの酵素によつて分解或は不活性化される

か否かを検する必要を生じたので, 第 1 表の D<sub>II</sub> 及び E<sub>II</sub> に於ては, 本化合物の乳剤にイエバエの生体酵素 (D<sub>II</sub>) 或は同じく加熱不活性化酵素 (E<sub>II</sub>) を 24 時間作用せしめ, 後 0.05% ピレトリン乳剤を加え, A 及び B と同様にアカイエカの幼虫を用いる生物検定を行つた。

また A<sub>b</sub>, B<sub>b</sub> 及び C<sub>b</sub> 系列は解毒に及ぼす基礎乳剤中の Tween 80 及びキシロールの影響を知るための対照実験として行つたもので各供試化合物の代りに該化合物を含まない基礎乳剤を添加して同様に操作した。

なお各実験毎に無処理対照区として, 100~200匹の昆虫について生存虫率を求め, Abott の式によつて補正した。実験時の水温は 25.5~28.0° であつた。

III. 考察

第 1 及び 2 表の結果を法 Bliss の probit 法により整理し, 其の回帰方程式を求め, 更にそれから葉量-致死率回帰線を描き, 各回帰線相互間に果して有意の差がある否かについて, Bliss の方法に基いて吟味を行つた。即ち  $\chi_a^2 + \chi_b^2$  の値が 5.991 より大となつて有意の差を認め (n=2, Pr=0.05) 回帰線は, A<sub>b</sub>-B<sub>b</sub>, A<sub>I</sub>-B<sub>I</sub>, A<sub>II</sub>-B<sub>II</sub>, A<sub>III</sub>-B<sub>III</sub>, A<sub>IV</sub>-B<sub>IV</sub>, A<sub>V</sub>-B<sub>V</sub>, A<sub>VI</sub>-B<sub>VI</sub>, A<sub>II</sub>-C<sub>II</sub>, であり, 其の値が 5.991 より小で, 有意の差を認めなかつたのは, A<sub>b</sub>-C<sub>b</sub>, A<sub>I</sub>-C<sub>I</sub>, B<sub>I</sub>-C<sub>I</sub>, A<sub>I</sub>-C<sub>I</sub>, A<sub>II</sub>-

Table 1. Dosage (ppm)-mortality (%) of larvae of the common house mosquito in the experiments for inhibition of enzymatic detoxification of pyrethrins caused by base emulsion, dihydroconiferyl alcohol or its related compounds. One hundred individuals were used in each dosage.

Dilution	Dosage	A <sub>b</sub>	B <sub>b</sub>	C <sub>b</sub>	A <sub>I</sub>	B <sub>I</sub>	C <sub>I</sub>	A <sub>II</sub>	B <sub>II</sub>	C <sub>II</sub>	A <sub>III</sub>	B <sub>III</sub>	C <sub>III</sub>	D <sub>II</sub>	E <sub>II</sub>
8000	125.00	86.96	94.57	89.13	—	—	—	93.00	97.00	94.00	—	—	—	—	—
12000	83.333	64.13	75.00	67.39	70.10	79.38	78.35	77.00	88.00	78.00	100.00	100.00	98.98	95.96	94.95
16000	62.500	47.83	57.61	48.91	51.55	60.82	55.67	62.00	69.00	56.00	90.82	92.86	93.88	90.91	91.92
24000	41.667	27.17	30.43	23.91	23.71	30.93	28.87	28.00	37.00	33.00	69.39	81.63	78.57	70.71	69.70
32000	31.250	0.00	15.22	10.87	11.34	17.53	15.46	16.00	21.00	15.00	56.12	65.31	57.14	60.61	62.63
48000	20.833	—	—	—	3.09	5.15	4.12	—	—	—	26.53	36.73	24.49	32.32	28.28

Table 2. Dosage (ppm)-mortality (%) of larvae of the common house mosquito in the experiments for inhibition of enzymatic detoxification of pyrethrins caused by  $\gamma$ -phenylpropyl alcohol, guaiacol, anisol or phenol. One hundred individuals were used in each dosage.

Dilution	Dosage	A <sub>IV</sub>	B <sub>IV</sub>	C <sub>IV</sub>	A <sub>V</sub>	B <sub>V</sub>	C <sub>V</sub>	A <sub>VI</sub>	B <sub>VI</sub>	C <sub>VI</sub>	A <sub>VII</sub>	B <sub>VII</sub>	C <sub>VII</sub>
6000	166.67	95.00	98.00	95.00	98.98	96.97	94.95	—	—	—	—	—	—
8000	125.00	81.00	87.00	84.00	94.95	84.85	79.80	95.83	97.92	95.83	91.30	97.83	95.65
12000	83.333	47.00	62.00	55.00	77.78	65.66	62.63	78.13	82.29	80.21	46.74	81.52	77.17
16000	62.500	27.00	41.00	31.00	55.56	32.32	33.33	57.29	68.75	62.60	22.83	53.26	44.57
24000	41.667	4.00	10.00	8.00	20.20	12.12	18.18	23.96	30.21	32.29	1.09	16.30	7.61
32000	31.250	—	—	—	—	—	—	9.38	19.79	16.67	0.00	3.26	2.17

C<sub>II</sub>, D<sub>II</sub>-E<sub>II</sub>, A<sub>IV</sub>-C<sub>IV</sub>, A<sub>V</sub>-C<sub>V</sub>, 及び B<sub>VI</sub>-C<sub>VI</sub> である。

このうち D<sub>II</sub>-E<sub>II</sub> の毒力には有意の差が認められないので、 $\gamma$ -(*p*-oxyphenyl) propyl alcohol はイエバエの酵素によって分解或は不活性化されない事が明らかとなつた。

上記の各回帰線から、大沢等のの方法によつて各乳剤の絶対有効度を求めると第3表に示すような結果が得られる。

今 LD-50 によつて示された各乳剤の毒力から、イエバエの酵素によるピレトリンの分解に対する基礎乳剤, dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の阻害作用を考察すれば、A<sub>b</sub>~C<sub>b</sub> 系列の実験に於て Tween 80 及びキシロールのみを含む基礎乳剤は全く解毒作用を阻害しないので、これに他の化合物を加用した乳剤の場合、それに含有せられる基剤の影響を無視出来る事が示されている。

次式

$$100 - \frac{CLD-50 - BLD-50}{ALD-50 - BLD-50} \times 100$$

=阻害率

によつて求めた、ピレトリンの酵素的解毒に対する dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の阻害率並びに著者<sup>6)</sup>が先に報告した、ピレトリンのイエバエの成虫に対するノックダウン効力への同一化合物の共力度を示せば第4表の通りである。

第4表の結果からピレトリンのイエバエに対するノックダウン効力へ共力効果を示す dihydroconiferyl alcohol, グアヤコール, アニソール 及びフェノールは、イエバエの酵素によるピレトリンの分解を全面的に、或は極めて強く阻害するに反し、共力効果を示さない  $\gamma$ -(*m*-methoxyphenyl)-,  $\gamma$ -(*p*-oxyphenyl)-及び  $\gamma$ -phenyl-propyl alcohol は、其の分解を全く阻害しないか、或は其の阻害度が少なく、かつピレトリンのノックダウン効力に対する共力度の大なるもの程、分解作用に対する阻害度が大きい事が示されてい

Table 3. Absolute effectiveness of pyrethrum emulsions detoxified by housefly enzyme in the presence of dihydroconiferyl alcohol or its related compounds to larvae of the common house mosquito.

Code sign	Standard deviation in susceptibility	Efficiency of lethal action	Index of median lethal dose	Median lethal dose LD-50 (ppm)
A <sub>b</sub>	0.281	3.565	1.80281	63.505
B <sub>b</sub>	0.230	4.340	1.74609	55.730
C <sub>b</sub>	0.247	4.030	1.80349	63.605
A <sub>I</sub>	0.243	4.115	1.79076	61.768
B <sub>I</sub>	0.240	4.160	1.72837	53.502
C <sub>I</sub>	0.237	4.220	1.74827	56.011
A <sub>II</sub>	0.235	4.253	1.74123	55.110
B <sub>II</sub>	0.214	4.670	1.68416	48.328
C <sub>II</sub>	0.237	4.223	1.74196	55.203
A <sub>IV</sub>	0.252	3.970	1.47514	29.864
B <sub>IV</sub>	0.260	3.849	1.40299	25.292
C <sub>IV</sub>	0.204	4.902	1.46360	29.080
A <sub>V</sub>	0.183	5.455	1.62862	42.523
B <sub>V</sub>	0.193	5.182	1.55917	36.239
C <sub>V</sub>	0.197	5.072	1.59834	39.659
A <sub>VI</sub>	0.191	5.241	1.77353	59.365
B <sub>VI</sub>	0.194	5.152	1.71944	52.413
C <sub>VI</sub>	0.234	4.269	1.72003	52.484
A <sub>VI</sub>	0.196	5.102	1.76256	57.884
B <sub>VI</sub>	0.212	4.718	1.70537	50.742
C <sub>VI</sub>	0.223	4.474	1.72252	52.786
A <sub>VI</sub>	0.140	7.140	1.91714	82.630
B <sub>VI</sub>	0.154	6.501	1.78114	60.414
C <sub>VI</sub>	0.150	6.682	1.81805	65.773

る。

Chamberlain<sup>6)</sup> は先に共力剤の作用機構として、ピレトリンの解毒作用への阻害説を提唱したが、其の研究中ワモンゴキブリ *Periplaneta americana* L. のリパーゼに対する各種共力剤の阻害率とピレトリンの致死効力へのそれ等の共力度との間に明らかな相関関係が認められず、更に研究を必要とすると述べている。

著者による本実験に於て、A<sub>II</sub>-C<sub>II</sub> 並びに A<sub>IV</sub>-C<sub>IV</sub> の両回帰線間には有意差が認められない (n=2, P=0.05) という結果を得ているので、 $\gamma$ -(*p*-oxyphenyl)-及び  $\gamma$ -phenyl-propyl alcohol の阻害率を一応考慮外とすれば、ピレトリンのイエバエに対するノックダ

**Table 4.** Per cent inhibition of enzymatic detoxification of pyrethrins caused by dihydroconiferyl alcohol or its related compounds and their degrees of synergism for knock down effect of pyrethrins on housefly.

Compounds tested	Per cent inhibition	Degrees of synergism
dihydroconiferyl alcohol	69.7	1.27
$\gamma$ -( <i>m</i> -methoxyphenyl) propyl alcohol	0.0	0.48
$\gamma$ -( <i>p</i> -oxyphenyl) propyl alcohol	17.1	0.66
$\gamma$ -phenylpropyl alcohol	45.6	0.57
guaiacol	99.0	2.39
anisol	71.4	1.70
phenol	75.9	2.30

ウン効力への dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の共力度と、ピレトリンの酵素的解毒へのそれ等の阻害率との間には相関性がある事となる。

以上の結果からピレトリンのイエバエの成虫に対するノックダウン効力への共力剤の共力作用機構のうち、少くとも其の一部はピレトリンの酵素的解毒に対する共力剤の阻害作用に基くものと称し得られる。

総 括

ピレトリンのイエバエの成虫に対するノックダウン効力への共力剤の作用機構を明らかにする目的で、イエバエの生体組織磨砕液によるピレトリン乳剤の酵素的解毒に対する dihydroconiferyl alcohol 及び関連化合物の阻害作用を、アカイエカの幼虫を用いる生物試験によつて研究した。

ピレトリンのイエバエに対するノックダウン効力へ共力効果を示す dihydroconiferyl alcohol, グアヤコール, アニソール及びフェノールは、其の解毒を全面的に或は強度に阻害し、其の阻害率と共力度との間には相関が認められるけれども、共力効果を示さない  $\gamma$ -(*m*-methoxyphenyl)-,  $\gamma$ -(*p*-oxyphenyl)- 及び  $\gamma$ -phenyl-propyl alcohol は、其の解毒を全く阻害しないか、或は阻害度が少ないのを観察し、ピレトリンのノックダウン効力への共力作用機構の一部は、ピレトリンの酵素的解毒に対する共力剤の阻害作用に基くものであるとの結論に達した。

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

並びに本学高橋悌藏教授及び実験に助力せられた青木智君に夫々厚く感謝する。

文 献

- (1) 松原弘道：防虫科学, 19, 61 (1954)
- (2) Chamberlain, R. W. : Am. J. Hyg., 52, 153 (1950).
- (3) 松原弘道：防虫科学, 19, 47 (1954)
- (4) 松原弘道：日本農芸化学会中部支部第4回講演会講演, 静岡, 昭和30年9月17日
- (5) 松原弘道：防虫科学, 18, 75 (1953)
- (6) 松原弘道：防虫科学, 18, 10 (1953)
- (7) 大沢 済, 長沢純夫：防虫科学, 7-8-9, 1 (1947)

Résumé

For the purpose of clarifying the mechanism of action of synergist for knock down effect of pyrethrins on housefly, the author has studied on inhibition of enzymatic detoxification of pyrethrins caused by dihydroconiferyl alcohol and its related compounds, by means of bioassay with larvae of the common house mosquito, *Culex pipiens* var. *pallens* Coqui.

The detoxification of pyrethrins by the triturated tissue of adults of the common housefly, *Musca domestica vicina* Macq. (by enzymatic action) was totally or powerfully inhibited by dihydroconiferyl alcohol, guaiacol, anisol and phenol which were synergistic with pyrethrins for knock down effect on housefly, but not at all or a little by  $\gamma$ -(*m*-methoxyphenyl)-,  $\gamma$ -(*p*-oxyphenyl)- and  $\gamma$ -phenyl-propyl alcohol which were not synergistic with the same. And, there are correlation between per cent inhibition and degree of synergism.

It comes to conclusion, therefore, that a part of mechanism of action of synergist for knock down effect of pyrethrins on housefly is due to the inhibition of enzymatic detoxification of pyrethrins caused by synergist.