

crystallisation.

Results indicated that the living ground-tissue solution of the adult green rice leafhoppers and the rat livers contain at least two types of enzymes which hydrolyze malathion and other organophosphorus insecticides, since the enzymatic hydrolysis of malathion is strongly inhibited by other organophosphorus insecticides. The authors observed that one enzyme in the living ground-tissue solutions of rat livers and of adult leafhoppers could hydrolyze DDVP, methyl paraoxon and CIBA 885 but not paraoxon, parathion and Phosphamidon. This enzyme is probably identical with the already described A-esterase.

The activity of enzyme detoxifying malathion was higher in the case of rat livers than in adult leafhoppers, for the volume of CO₂ evolved for 100 mg. of living ground-tissue solution per hour, was about 230 times greater in the former than in the latter.

In the *in vitro* tests on the inhibition of enzymatic detoxification, paraoxon and DDVP inhibited powerfully or almost completely the enzymes detoxifying malathion in both rat livers and in adult leafhoppers if they are incubated with the enzyme for 50 minutes before malathion is added, or if they are added simultaneously with malathion. Sevin, however, did not inhibit the detoxifying action of the enzyme in adult leafhoppers.

In one hand, there were some different results

in rat livers, that is, inhibitions were shown by testing with preincubation administration methods, but no inhibitions with simultaneous administration. Malaoxon had greater inhibitory effect for the enzyme in adult leafhoppers than for that in rat livers. Therefore, it appears that the enzyme which detoxifies malathion in various species of animals may differ considerably in its properties, especially in the susceptibility to malaoxon.

In the previous paper, the authors reported on the insecticidal effects of the mixtures of DDVP with malathion and some other organophosphorus insecticides in emulsions to the adults of green rice leafhopper in laboratory cage conditions. In these experiments the authors recognized that DDVP have a potential action for knock-down effects of malathion and some other organophosphorus insecticides.

In order to prove the mechanism of this phenomenon, the authors studied on the interference of enzymatic detoxification of malathion and other organophosphorus insecticides caused by DDVP. From the results obtained, it comes to conclusion that a part of mechanisms for knock-down effects of above-mentioned mixtures against the adult green rice leafhoppers is due to the inhibition of enzymatic detoxification of malathion caused by DDVP, or the competition of some organophosphorus insecticide and DDVP for the same active centers of a single detoxifying enzyme.

The Effects of Activity of Human Plasma Cholinesterase and Conversion of Inhibitors *in vitro* on the Enzymatic Determination of Organophosphorus Insecticides. Ken'ichi KOJIMA and Tadayoshi ISHIZUKA (Institute for Agricultural Chemicals, Toa Noyaku Co. LTD., Odawara, Kanagawa). Received Dec. 20, 1959. *Botyu-Kagaku*, 25, 30, 1960 (with English résumé, 40).

7. 有機燐殺虫剤の酵素微量定量に及ぼす人血コリンエステラーゼの活性度と試験管内転位の影響* 小島建一・石塚忠克(東亜農業株式会社 農薬研究所) 34. 12. 20 受理

酵素阻害による有機燐殺虫剤の微量定量法を確立するため、ChE 比色検定法による実験条件および操作法を検討し、あわせて試験管内における阻害剤の活性化、異種有機燐殺虫剤の分別定量法について論述した。

殺虫剤の微量定量法は有機燐殺虫剤の使用の増加にともない農産物中の残留量、動物および植物体内における分布や代謝などを調べる手段として重要である。paraoxon, parathion, methyl parathion および EPN

など aromatic nitro 基を有する有機燐殺虫剤の定量には、広く Averell-Norris の比色法⁴⁾が利用されている。しかし、この方法の適用範囲は上記殺虫剤および類縁化合物にかぎられ、また、それぞれの化合物、

* 本報告の概要は昭和33年3月31日 日本応用動物昆虫学会大会において発表した。

例えば, parathion と paraoxon の区別はできない。さらに新しく登場する有機燐殺虫剤やスクリーニングテスト途上にある有機燐化合物の物理化学的分析法は未知の場合が多いので燐を定量する方法⁹⁾が適用される。燐は自然界に広く分布しているので定量の誤差はまぬがれない。

有機燐および carbamate 系殺虫剤は動物の Cholinesterase (ChE と略す) を阻害する ChE 阻害剤として知られる。ChE 検定法には electrometric, titrimetric, manometric および colorimetric など種々の方法があり各種有機燐剤の代謝, 残留毒性の定量に用いられている¹⁷⁾。

Giang and Hall¹⁰⁾ は ChE 阻害に関する Michel¹⁰⁾ の electrometric 法によって有機燐殺虫剤の微量定量を報告した。

この方法は phosphate 系の TEPP, paraoxon および試験管内で強い ChE 阻害作用を示す有機燐化合物に適用できるが, phosphorothioate および phosphorodithioate 系化合物ではその阻害作用が弱いため定量できなかつた。しかし Giang & Hall¹⁰⁾ は試験管内で parathion を濃硫酸と発煙硝酸の混合液 (1:1 容量比) で酸化し, parathion 酸化物とすれば, parathion の定量も可能であることを示唆した。その後 Cook^{9), 7)}, Fallscheer and Cook⁹⁾ は Hestrin¹²⁾ および Metcalf¹⁰⁾ の ChE 比色検定法を変法するとともに酸化剤として稀臭素水を用いて phosphorothioate 系の parathion, Diazinon, methyl parathion, EPN および Chlorthion, phosphorodithioate 系の malathion など各種有機燐殺虫剤を試験管内で酸化し, もとの化合物より強力な ChE 阻害剤に転換したのち, 比色定量する方法を報告している。

筆者らは ChE 阻害による有機燐殺虫剤の微量定量法を確立するため, 主として比色法による実験条件と操作法について Fallscheer and Cook⁹⁾ の報告を追試検討した結果, 2, 3 の知見を得たので, ここにその概要を報告する。

本文に入るに先立ち, 終始御指導を賜った農林省農薬検査所所長上遠章博士, 当研究所所長平塚喜造博士, 発表にあたり種々御助言を戴いた京都大学内田俊郎教授, 京都大学化学研究所長沢純夫博士ならびに八州化学工業株式会社研究所酒井清六氏に謹んで感謝の意を表す。またこの実験は当研究所永江祐治, 渡辺智夫両氏をはじめ所員各位の助力に負うところが大きい, ここに記して深甚な謝意を捧げる。

材料および方法

1) 材 料

燐酸緩衝液 pH8.0: 燐酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot$

$2\text{H}_2\text{O}$) 11.876g/l の 95 部と燐酸カリウム (KH_2PO_4) 9.078g/l の 5 部を混合して調製する。

試薬 1: アセチルコリン溶液 上記燐酸緩衝液を用いてアセチルコリンブロマイドを溶解し, 0.004M のアセチルコリン液を作る。本液は冷蔵する。

試薬 2: 2M 塩酸ヒドロキシアミン 本液は冷蔵する。

試薬 3: 3.5N 苛性ソーダ

試薬 4: 三塩化醋酸加用塩酸 塩酸 (比重 1.18) 1 部と蒸溜水 2 部の塩酸液を作り, その 90cc に 10g の三塩化醋酸を 10cc の蒸溜水に溶解したものを加える。

試薬 5: 0.37M 塩化第 2 鉄溶液 0.1N の塩酸で塩化第 2 鉄 (FeCl_2) の 0.37M 溶液を作る。

稀臭素水: 蒸溜水 100cc に飽和臭素水 0.4cc を加えて本液は常に新しく調製する。

酵素源: 人血その他温血動物の血液およびイエバエ頭部組織液を酵素源として使用できる。しかし, 本報ではヒト血漿 (A 型) を供試する場合について述べる。

まず血液銀行から購入したヒト血液を遠心分離器にかけて血漿をとる。この血漿は 0~5°C の冷蔵庫に保存すれば数ヶ月間供試できる。

2) 方 法

ChE-activity の測定: 操作法 (A) 稀臭素水による酸化処理をおこなわない場合, 蒸溜水 0.5cc を試験管にとり, 燐酸緩衝液 1.0cc, 標準 ChE 溶液 0.5cc を加えて 2.0cc とする。つぎに一定濃度の ACh-Br 溶液 1.0cc を加え, この混合液を 37.5°C 恒温水槽中で 30 分間加温する。そして残った ACh 量を測定し, 最初の ACh 量との差をもって酵素活力の指標とする。ACh 量の測定は Hestrin の比色法にもとずく Fallscheer and Cook の方法⁹⁾を用いた。すなわち, hydroxylamine を加えてアルカリ状態で acethydroxamic acid と choline とにする。つぎに Hestrin 法では酸性液にするため 12% 塩酸液 1.0cc を添加するが, 本法では血漿蛋白質を沈澱させるため, 三塩化醋酸加用塩酸液 1.0cc を加える。さらにこれに塩化第 2 鉄溶液を加えて酸性状態で反応させると ferric acethydroxamic acid を生ずる。この最終生成物は褐色を呈するので島津光電分光光度計 Q B 2 型を用いて波長 540m μ で測定する。

操作法 (B) 稀臭素水で酸化処理する場合, 蒸溜水 0.4cc を試験管にとり, 稀臭素水 0.1cc, 燐酸緩衝液 1.0cc および標準 ChE 溶液 0.5cc を加えて 2.0cc とする。以後の操作は (A) と同様である。

実験条件の決定

ヒト血液から得た血漿 ChE は true ChE, pseudo

ChE およびその他のエステラーゼの混成物であると考えられ、その作用態は基質の相違、基質濃度、pH と酵素活力との関係、阻害剤の種類などによってかなり異なることが知られている。酵素阻害法によって有機燐殺虫剤の微量定量をおこなう場合、わずかの阻害に対しても敏感にかつ再現性のある実験条件を定めておく必要がある。そこで筆者らは、実験条件を定めるため、つぎの事項について検討した。

ChE に対する pH の影響：pH 5.9~8.6 の SÖRENSEN の燐酸緩衝液で調節した pH/activity 曲線は第1図の通りである。すなわち、至適 pH は 8.0~8.6 であり、pH 5.9 において酵素活力は殆んど失活する。

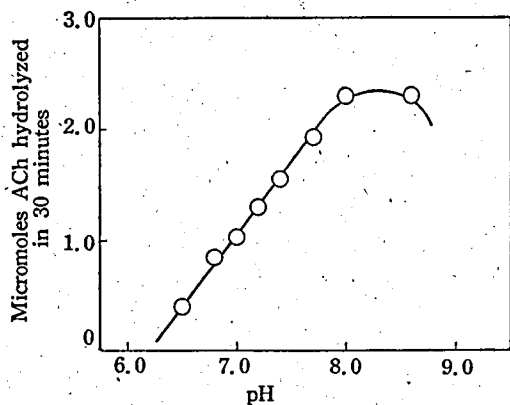


Fig. 1. Effect of pH on ChE-activity of human plasma.

ChE に対する基質濃度の影響：酵素活力に及ぼす基質濃度の影響を比色法で調べる場合、比色測定上添加基質の量に制約されるので、ここでは Metcalf⁽⁶⁾の報文にならない 0.004M の ACh-Br を基質濃度とした。この濃度では実験遂行上ならん支障を認めなかった。それゆえ、以下の実験はすべて 0.004M の ACh-Br を基質とし、pH 8.0 の条件でおこなった。

標準 ChE 溶液：上述の如く、ヒト血液から得た血漿 ChE は純粋な物質でない。ヒト血漿に含まれる ChE 量の変動は、その作用を左右し、阻害剤による阻害率の再現性に及ぼす要因の1つであると考えられる。ChE 阻害法による有機燐殺虫剤の微量定量を実施するにあたり、つねに一定の作用価をもつ標準酵素試料を使用することが望まれる。活性単位の明確な純化 ChE 標品⁽⁴⁾は海外で市販されており、また精製も可能であるが、筆者らはヒト血漿の体積と ACh 分解量との関係を調べ、両者の間に略直線の関係があることを確かめたので、まず最初に購入したヒト血漿の分割液を燐酸緩衝液で10倍に稀釈し、これを酵素の活性単位を決定するための標準 ChE 溶液と仮定する。この標準液について、その体積と ACh 分解量との関係を操作法

(A)に基いて第2図の如く作成しておき ChE 作用価の指標とする。

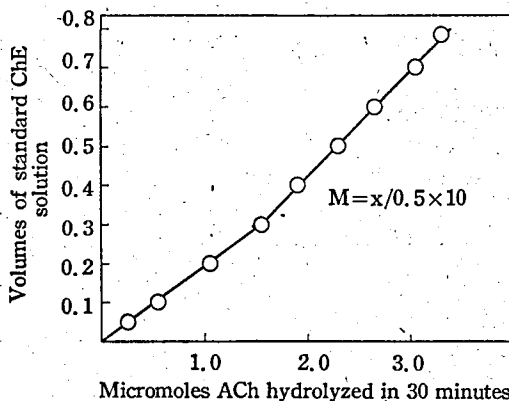


Fig. 2. Relation between ChE-activity and volume of standard ChE solution of human plasma.

そして、その後異なるヒト血液を購入した場合には、さきに定めた関係図にもとずき標準 ChE 溶液を調製するのに必要な燐酸緩衝液の稀釈割合を算出する。すなわち、新しく購入したヒト血漿の1部を前回と同様10倍に稀釈して少量の予備検定用血漿液を作り、その 0.5cc について ACh 分解量を測定し、第2図の関係図と照合して比率を求める〔本報では標準 ChE 溶液の使用基準量を 0.5cc (ChE-activity, 2.3 μ M/30min.) 〕とした。得られた比率の10倍が標準 ChE 溶液の調製に要する燐酸緩衝液の稀釈倍率 M である。関係式は $M=x/0.5 \times 10$ 、ここで x は10倍に稀釈した予備検定用血漿液 0.5cc の ACh 分解量に対応する標準 ChE 溶液の体積である。例えば、予備検定用血漿液の酵素活力が 1.9 μ M/30min であつたとすれば、x は 0.4cc に相当する。故に、 $0.4/0.5 \times 10=8$ 、すなわち、このヒト血漿を使用する場合には燐酸緩衝液で8倍に稀釈すれば、前回まで使用していたヒト血漿と同じ活性を有する ChE 溶液が得られ、阻害率の変動誤差を最小に抑えることができるわけである。このようにして調製した標準 ChE 溶液は常時冷蔵する。

稀臭素水の ChE 活性に及ぼす影響と酸化に要する量：試験管内において比較的 ChE 阻害作用の弱い phosphorothioate および phosphorodithioate 系殺虫剤を有機溶媒または水溶液中で強力な阻害剤に変換操作する場合、過剰の稀臭素水の使用は酵素活力に影響を及ぼすであろう。酵素活力を減少せしめないで完全に酸化をおこなうために必要な稀臭素水の量を検討する目的でつぎの実験をおこなった。阻害剤として純 EPN 0.05 μ g を用い、稀臭素水の最終濃度 0.02~20% の範囲について実施した。実験結果は第3図の通り

である。

酵素活力に影響を与えず阻害剤を完全に活性化するのに必要な稀臭素水の最終濃度は0.2~0.4%の範囲であった。それゆえ、以下の実験はすべて飽和臭素水0.4ccを100ccの蒸留水に希釈し、その0.1ccを阻害剤を含む蒸留水0.4ccに添加し酸化操作した。

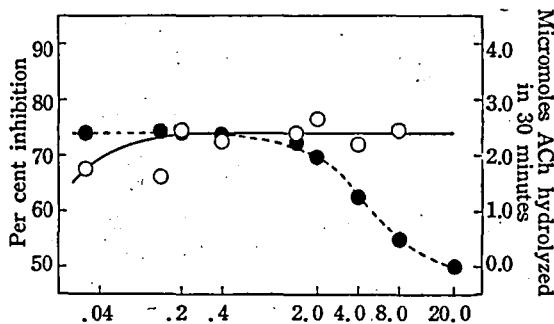


Fig. 3. Effects of concentration of bromine water on ChE-activity and oxidation of inhibitor, used 0.05 μ g. of pure EPN as inhibitor.

○—○ ChE-inhibition ●---● ChE-activity

稀臭素水添加後の酸化に要する時間：稀臭素水による阻害剤の酸化の完全、不完全は実験の精度に関与する要因の1つと考えられる。ここでは稀臭素水添加後の時間とChE阻害率との関係を純EPN 0.05 μ gを用いて調べた。実験結果は第4図に示す通りである。

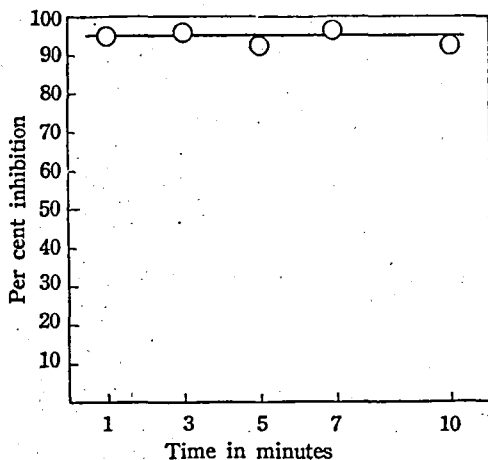


Fig. 4. Relation between ChE-inhibition and time of reaction required for oxidation after addition of bromine water to the inhibitor, used 0.05 μ g. of pure EPN as inhibitor.

阻害剤と稀臭素水の酸化反応は即時完了するようである。したがって、阻害剤に稀臭素水を加え、ただちに標準ChE溶液を加えてつぎの操作にうつってよい

が、筆者らは3分間の余裕をおくことにした。

阻害剤とChE complexに要する時間：稀臭素水によって酸化処理する場合、しない場合にかかわらず、阻害剤とChEとの結合が完了する時間の決定はすでに述べた諸要因と同様に重要である。この点について実験した結果は第5図の如くである。阻害剤は純EPN 0.025 μ gである。阻害剤とChE complexが飽和状態に達する時間は大体30分であった。

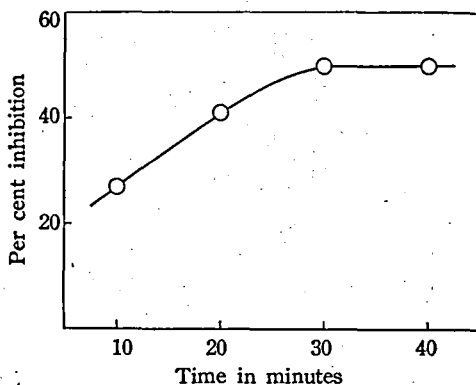


Fig. 5. Relation between ChE-inhibition and time of incubation with enzyme and inhibitor, used 0.025 μ g. of pure EPN as inhibitor.

以上の実験結果から、ChE阻害法による有機燐殺虫剤の微量定量を実施する場合の実験条件と操作法を取り纏めて要約するとつぎの如くである。

1) 阻害剤検定液：阻害剤を含むアセトンまたはエーテル溶液の一定量を試験管にとり、溶媒を吸引蒸散させる。ついで蒸留水0.4cc、稀臭素水0.1ccを加え、3分間酸化反応させ、磷酸緩衝液1.0cc、標準ChE溶液0.5ccを加えて2.0ccとする。この混合液を25°Cで30分間攪拌し阻害剤とChEとを反応させたのち、0.004M ACh溶液(試薬1)1.0ccを加え、ただちに37.5°Cに加温しストップウォッチで正確に計り30分間反応する。

反応後、残ったACh量を2M hydroxylamine(試薬2)と3.5N苛性ソーダ(試薬3)の等量混合液(本液は使用前に混合する、以下これを試薬(2)+(3)と略す)2.0ccを加え、三塩化醋酸加用塩酸液(試薬4)1.0ccを加え、更に塩化第2鉄(試薬5)1.0ccを加えて発色する。

ただちに透過して波長540 μ mで比色測定する。

2) 正常酵素液：蒸留水0.4cc、稀臭素水0.1ccを試験管にとり、3分間攪拌したのち、磷酸緩衝液1.0cc、標準ChE溶液0.5ccを加えて2.0ccとする。25°Cで30分間攪拌したのち、(試薬1)1.0ccを加えて37.5°Cで30分間加温する。以後の操作は(1)と

Table 1. Comparison of the quantities of several organophosphorus insecticides required for *in vitro* human plasma ChE inhibition before and after bromine treatment.

| Insecticide | | Dosage required for <i>in vitro</i> inhibition | | | | | | | |
|---------------------|-----------|--|--|---|--|--|--|---|--|
| | | Untreated | | | | Treated by bromine | | | |
| | | Regression equation* $Y=\bar{y}+b(X-x)$ | 50% Inhibition (μg) | 20-80% Inhibition (μg) | Limit of detection (μg) | Regression equation* $Y=\bar{y}+b(X-x)$ | 50% Inhibition (μg) | 20-80% Inhibition (μg) | Limit of detection (μg) |
| Phosphates | | | | | | | | | |
| paraoxon | Pure | $Y=5+1.477(X-1.70)$ | 0.005 | 0.0014-0.019 | 0.0005 | $Y=5+1.477(X-1.70)$ | 0.005 | 0.0014-0.019 | 0.0005 |
| malaoxon | Pure | $Y=5+1.365(X-3.15)$ | 0.14 | 0.034-0.59 | 0.025 | $Y=5+1.365(X-3.15)$ | 0.14 | 0.034-0.59 | 0.025 |
| Phosdrin | Tech. (A) | $Y=5+1.500(X-2.90)$ | 0.079 | 0.021-0.29 | 0.005 | $Y=5+1.556(X-3.48)$ | 0.30 | 0.09-1.0 | 0.025 |
| | Tech. (B) | $Y=5+1.109(X-2.62)$ | 0.042 | 0.007-0.24 | 0.0001 | $Y=5+1.556(X-3.48)$ | 0.30 | 0.09-1.0 | 0.025 |
| DDVP | Tech. | $Y=5+1.591(X-2.86)$ | 0.07 | 0.02-0.25 | 0.005 | $Y=5+1.591(X-2.86)$ | 0.07 | 0.02-0.25 | 0.005 |
| Comp. 23947 | Tech. | $Y=5+1.771(X-3.32)$ | 0.20 | 0.07-0.62 | 0.025 | $Y=5+1.771(X-3.32)$ | 0.20 | 0.07-0.62 | 0.025 |
| Comp. 23948 | Tech. | $Y=5+1.636(X-3.44)$ | 0.27 | 0.09-0.89 | 0.025 | $Y=5+1.636(X-3.44)$ | 0.27 | 0.09-0.89 | 0.025 |
| Phosphonate | | | | | | | | | |
| Dipterex | Pure | $Y=5+1.417(X-3.98)$ | 0.96 | 0.24-3.7 | 0.05 | $Y=5+1.417(X-3.98)$ | 0.96 | 0.24-3.7 | 0.05 |
| Phosphorothioates | | | | | | | | | |
| parathion | Tech. (A) | $Y=5+0.969(X-4.35)$ | 2.2 | 0.30-17 | 0.1 | $Y=5+1.477(X-1.70)$ | 0.005 | 0.0014-0.019 | 0.0005 |
| | Tech. (B) | $Y=5+1.111(X-3.30)$ | 0.2 | 0.03-1.1 | 0.01 | $Y=5+1.889(X-1.80)$ | 0.0063 | 0.0024-0.018 | 0.0005 |
| methyl parathion | | | | | | | | | |
| Diazinon | Pure | $Y=5+1.361(X-6.46)$ | 288 | 69-1202 | 10 | $Y=5+1.357(X-3.46)$ | 0.29 | 0.07-1.2 | 0.01 |
| | Emul. | $Y=5+1.522(X-4.30)$ | 2.0 | 0.56-7.1 | 0.1 | $Y=5+1.750(X-1.08)$ | 0.001 | 0.0004-0.004 | 0.0003 |
| Thionophosphonate | | | | | | | | | |
| EPN | Pure | $Y=5+1.383(X-5.74)$ | 55 | 13-224 | 5 | $Y=5+2.688(X-2.48)$ | 0.03 | 0.015-0.062 | 0.01 |
| Phosphorodithioates | | | | | | | | | |
| malathion | Tech. | $Y=5+1.327(X-6.01)$ | 102 | 24-437 | 5 | $Y=5+1.365(X-3.15)$ | 0.14 | 0.034-0.59 | 0.01 |
| Trithion | Tech. | $Y=5+1.722(X-4.99)$ | 10 | 3.2-30 | 1 | $Y=5+1.875(X-2.12)$ | 0.013 | 0.005-0.037 | 0.001 |
| Guthion | Emul. | $Y=5+1.281(X-4.66)$ | 4.6 | 1.0-21 | 0.3 | $Y=5+1.425(X-3.42)$ | 0.26 | 0.068-1.0 | 0.025 |

* Y is the per cent inhibition in Probit, X is the logarithm of dose $X \cdot 10^4$.

同じである。

3) 対照酵素液: 蒸溜水 0.4cc, 稀臭素水 0.1cc を試験管にとり, 3分間攪拌したのち, 磷酸緩衝液 1.0cc, 標準 ChE 溶液 0.5cc を加えて 2.0cc とする。25°C で30分間攪拌したのち, (試薬1)の代りに磷酸緩衝液 1.0cc を加えて 37.5°C で30分間加温する。以後の操作は(1)と同じである。

4) 盲検液: 磷酸緩衝液 3.0cc を試験管にとり, 37.5°C で30分間加温する。以後の操作は(1)と同じである。

5) 無酵素液: 標準 ChE 溶液の添加を試薬(2)+(3)の添加後にする外, 操作順序は(2)と同じである。

上記の操作方法は試験管内において稀臭素水によって酸化処理する場合について述べたが, その必要のない場合には, 蒸溜水 0.4cc と稀臭素水 0.1cc の代りに磷酸緩衝液 0.5cc を試験管にとり, 以後の操作は前述の方法によればよい。

実験例

各種有機燐殺虫剤の標準検量曲線

試験管内において稀臭素水で処理した場合としない

場合の有機燐殺虫剤の標準検量曲線の1例を示すと第6図の如くである。これらの曲線は葉量の対数と ChE 阻害率の probit との間に直線関係が認められる。同様な関係について, Giang and Hall¹⁰⁾ は葉量の対数と ChE 阻害率の間に直線関係が認められると述べている。

第1表の数値は各種有機燐殺虫剤の標準検量曲線から求めた50% ChE 阻害葉量 (I_{50}), 最適検出範囲(各曲線における 20~80% ChE 阻害に要する葉量をとった)および検出限界葉量を示したものである。これらの数値から明らかな如く, paraoxon, DDVP および他の phosphate 系殺虫剤は試験管内において強い ChE 阻害作用を示し, この種殺虫剤の定量は稀臭素水で処理しなくとも測定が可能である。しかし, 現市場で重要な有機燐殺虫剤の大部分をしめる phosphorothioate および phosphorodithioate 系殺虫剤のそれは比較的弱く, そのままでは ChE 阻害法による定量がむずかしい。しかし, 供試した両系殺虫剤はいずれの化合物も試験管内における稀臭素水の処理によってより強力な阻害剤に変換され定量が容易となる。

第6図に示した曲線(c)は純 paraoxon を稀臭素水で

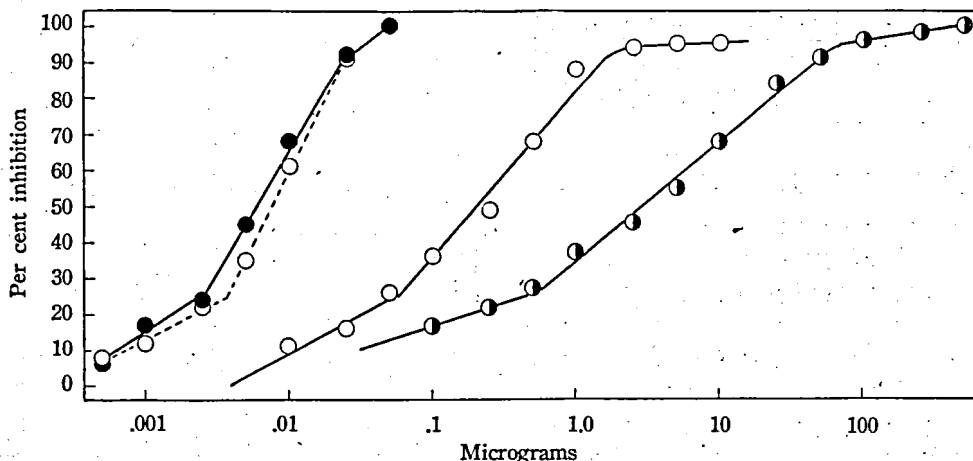


Fig. 6. Standard curves for two samples of parathion and paraoxon before and after bromine treatment.

- 96.5% technical parathion (A) before bromine treatment. (a)
- Unknown purity of parathion (B) before bromine treatment. (b)
- Pure paraoxon before and after bromine treatment, and (A) after bromine treatment. (c)
- (B) after bromine treatment. (b)

処理した場合と処理しない場合における結果である。純 paraoxon は稀臭素水の処理に対して安定であり, 処理前後における ChE 阻害力には変化が認められず, 処理による影響はうけなかった。また, 同図曲線(a)と(b)は純度の異なる parathion 原薬でえた稀臭素水無処

理の結果である。曲線(a)は96.5%工業用 parathion 原薬(第1表中A)であり, 曲線(b)は性状不明の parathion 原薬(第1表中, B)である。精製 parathion 原薬の試験管内における ChE 阻害作用は弱く, 工業用 parathion 原薬の強い ChE 阻害作用は S-ethyl,

S-phenyl 異性体, paraoxon およびその他の不純物の影響によるものであり, 工業用 parathion 原薬の ChE 阻害力の差異は原薬に含まれる S-ethyl 異性体の量に左右されるといわれている。^{1,2,3,19)}

上記2種 parathion 原薬の50% ChE 阻害薬量は稀臭素水無処理の場合において略11.0倍のひらきが認められたが, これを稀臭素水で処理すると, 両原薬の ChE 阻害作用は純 paraoxon と同じ力価をもつようになった。すなわち, parathion 原薬Aの作用曲線(a)は純 paraoxon のそれと全く同位置(曲線c)にあたえられ, parathion 原薬Bの作用曲線(b)は同様にそれに近い位置(曲線b')に示される。そして, ChE 阻害力(I_{50})の増大は工業用 parathion 原薬Bで約32倍, 工業用 parathion 原薬Aで約440倍に達し, 両原薬の差異は略1.3倍に縮小した。

このように ChE 阻害剤として比較的阻害作用の弱いグループに属し, 同時に不純物の影響の大きい化合物では, ChE 阻害法による定量がむずかしいが, 上例の如く試験管内において稀臭素水で処理して酸化物とすれば, ChE 阻害力は増大しかつ不純物の影響を無視して定量が可能である。稀臭素水処理によって生産される酸化物の詳細は後述する。

同様に phosphate 系殺虫剤に属する純 malaoxon 工業用 DDVP, 工業用 Phosdrin 2種, 純 Dipterex およびスクリーニングテスト途上にある物理化学的定量法不明の合成化合物の標準検量回帰線は第1表の通りである。

Giang ら¹¹⁾は electrometric ChE 検定法による DDVP の散布残留量の測定法を述べている。また Casida ら⁹⁾は Phosdrin の残効性の研究に ChE 阻害法を利用している。Phosdrin は置換 vinyl phosphate 系殺虫剤として強い殺虫性を有し, 約%の cis 異性体と約%の trans 異性体から成り, cis 異性体の昆虫および哺乳類に対する毒性は trans 異性体に比べて略100倍強いといわれている。第1表中 Phosdrin A は Shell 社製95%工業用原薬 (I_{50} は $0.079\mu\text{g}$), Phosdrin B は当研究所で合成した純度不明の工業用原薬 (I_{50} は $0.042\mu\text{g}$) である。この2種原薬の試験管内における ChE 阻害力の相違は各異性体の含量の差によるものか, 不純物の影響によるものか明らかでない。両原薬の ChE 阻害力は稀臭素水の処理によって顕著に減退した。すでに Casida ら⁹⁾はハロゲン, ハロゲン化水素および各種酸化剤による Phosdrin の化学的処理がその ChE 阻害作用を減じ, また本剤は直接毒浸透殺虫剤として有効に働き, 植物体内での代謝がこの種殺虫剤の活性化に必要でない。事実, 多くの植物体内では Phosdrin が変換されずに残るか, ChE 阻害作用が弱められていると報じている。なお, 純 malaoxon, 工

業用 DDVP, および純 Dipterex は稀臭素水処理による影響をうけなかった。

また, 比較的 ChE 阻害作用の弱い phosphorothioate および phosphorodithioate 系殺虫剤の実験結果は第1表中の標準検量回帰方程式に示される如く, この種の有機燐殺虫剤はいずれも試験管内の稀臭素水処理によって強い ChE 阻害剤に変換され, diazinon は $1/3000$, Trithion は $1/1000$, methyl parathion, EPN および malathion は $1/100$, Guthion は $1/400\mu\text{g}$ の微量を探知することができる。

植物抽出液の影響と検出率

ChE 阻害法による有機燐殺虫剤の定量をおこなう場合, 植物あるいは動物抽出液中に混存するエステル類, 油および蠟物質等の影響が予測されるので, この点について検討した。カンランの緑葉10gを採取し, これに一定量の純 EPN を添加したのも, 同様に水稻苗の茎葉10gに一定量の工業用 Trithion を添加したものをエーテルで抽出した。この抽出液を100ccとし, 分割液1.0ccについて稀臭素水の処理を施し, 抽出液の影響と添加薬剤の検出率を調べた。まずカンランおよび水稻苗抽出液の酵素活力に及ぼす影響を示すと第7図の如くである。

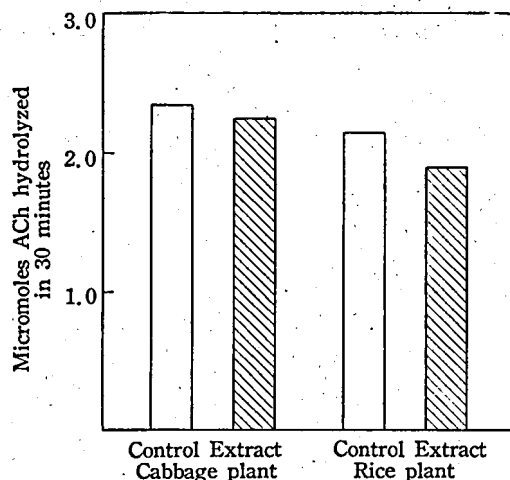


Fig. 7. Effect of plant extract on ChE-activity.

この結果によれば, 植物抽出液の影響は多少認められるようであるが, 添加薬剤の検出率は, 第2表に示す如く比較的高い数値を示し満足すべき結果を得た。なおこの場合, 植物抽出液の稀臭素水処理を標準曲線作成のときと同じ量(0.4%, 0.1cc)でおこなうと, ChE 阻害率が理論値よりやや低い値を示し, 阻害剤の活性化が充分でないように思われた。そこで稀臭素水の使用量を増加(0.2cc)して操作したところ, 添加薬剤の検出率は理論値にちかずいた。

Table 2. Recovery of EPN and Trithion added to young plant.

| Amount added (μg.) | EPN* | | Trithion** | |
|--------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | Found (μg.) | Recovery (%) | Found (μg.) | Recovery (%) |
| 0.005 | — | — | 0.0055 | 110 |
| 0.010 | 0.0135 | 135 | 0.0115 | 115 |
| 0.020 | 0.0195 | 97.5 | — | — |
| 0.025 | — | — | 0.0295 | 118 |
| 0.032 | 0.0320 | 100 | — | — |
| 0.050 | 0.0437 | 87.5 | 0.0550 | 110 |
| 0.080 | 0.0676 | 84.5 | — | — |

* added to cabbage

** added to rice

Parathion と paraoxon の分別定量

Giang and Hall⁽¹⁰⁾は ChE 阻害法によれば ChE 阻害力の異なる異種有機磷殺虫剤の分別定量が可能であることを示唆した。まゝに、試験管内で parathion を稀臭素水で処理し parathion 酸化物にすれば、その ChE 阻害作用は著しく増大することを述べた。いま未知量の parathion と paraoxon が混存すると仮定し、その混合物の ChE 阻害力を稀臭素水で処理した場合と処理しない場合について求め、阻害力の増大率より逆算して parathion と paraoxon の混合比を知ることができる。例えば、parathion と paraoxon が不明の割合で混存するか、あるいは parathion を処理した生体から抽出した液を濃縮して 10cc にしたとする。〔検査法1〕分割液 0.1cc を試験管にとり、測定は操作法(B)にしたがい稀臭素水で処理した場合の阻害率を求めてみる。その結果、阻害率が 88.0% であったとすれば、第6図に示した paraoxon の標準検査曲線(c)と照合してこの分割液には paraoxon 相当量として 0.02μg が含まれることになる。故に、抽出液 100cc 中には 2.0μg の paraoxon 相当量が存在することになる。ついで抽出液から paraoxon 相当量として 0.01μg を含むよう分割液を試験管にとる。本例では 0.05cc をとり、操作法(A)にしたがい稀臭素水で処理せずに阻害率を求める。得られた結果が 30.0% であったとすれば、第8a図に示した parathion と paraoxon の混合比が 0:10 から 9:1 のときの標準検査曲線と照合すると、その比は 7:3 となり、抽出液中の parathion と paraoxon の存在量はそれぞれ 1.4μg と 0.6μg となる。〔検査法2〕上例の実験において、もし稀臭素水で処理せずに検査したとき、得られた阻害率が 4.0% 以下であれば、第8a図の標準検査曲線によると精度が著しく悪くなる。それゆゑ、この場合には分割液の使用量を10倍に増加し、あらためて稀臭素

水で処理せずに検査する。得られた阻害率が 32.0% あったとすれば、第8b図に示した parathion と paraoxon の混合比が 99:1 から 999:1 のときの標準検査

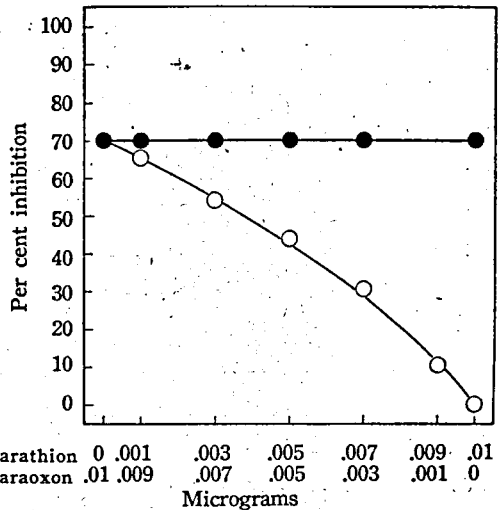


Fig. 8a. Standard curves for distinguishing parathion and paraoxon.

○—○ 96.5% technical parathion and pure paraoxon mixtures (0:10 to 9:1) (A) before bromine treatment.
●—● (A) and 96.5% technical parathion alone after bromine treatment, or pure paraoxon alone before and after bromine treatment.

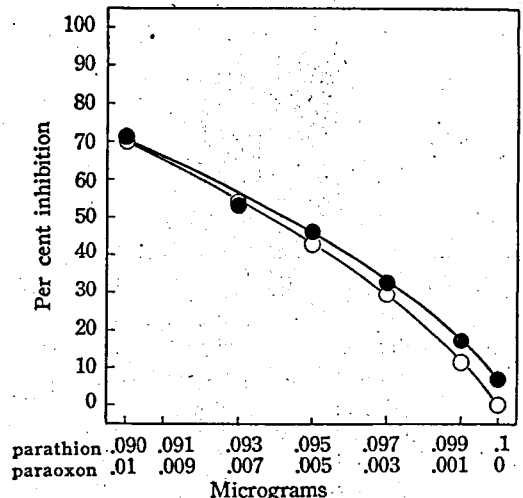


Fig. 8b. Standard curves for distinguishing parathion and paraoxon.

○—○ 96.5% technical parathion and pure paraoxon mixtures (99:1 to 999:1) (A) before bromine treatment.
●—● (A) and 96.5% technical parathion alone after bromine treatment, or pure paraoxon alone before and after bromine treatment.

曲線と照合すると、その混合比は97:3となり、抽出液の parathion と paraoxon の存在量はそれぞれ 1.94 μ g と 0.06 μ g となり分別定量できる。

考 察

昆虫に対する有機磷殺虫剤の殺虫作用は、主として

ChE 阻害作用に基づく神経刺激伝導の正常な機能に障害を起すことによると考えられている。この種酵素系の阻害は哺乳類に対する毒性とも関連するため、ChE 阻害作用に関する生化学的分析法の確立は高い関心が与せられている。多くの有機磷殺虫剤の in vitro の阻害作用は比較的弱い、生体内で強い ChE

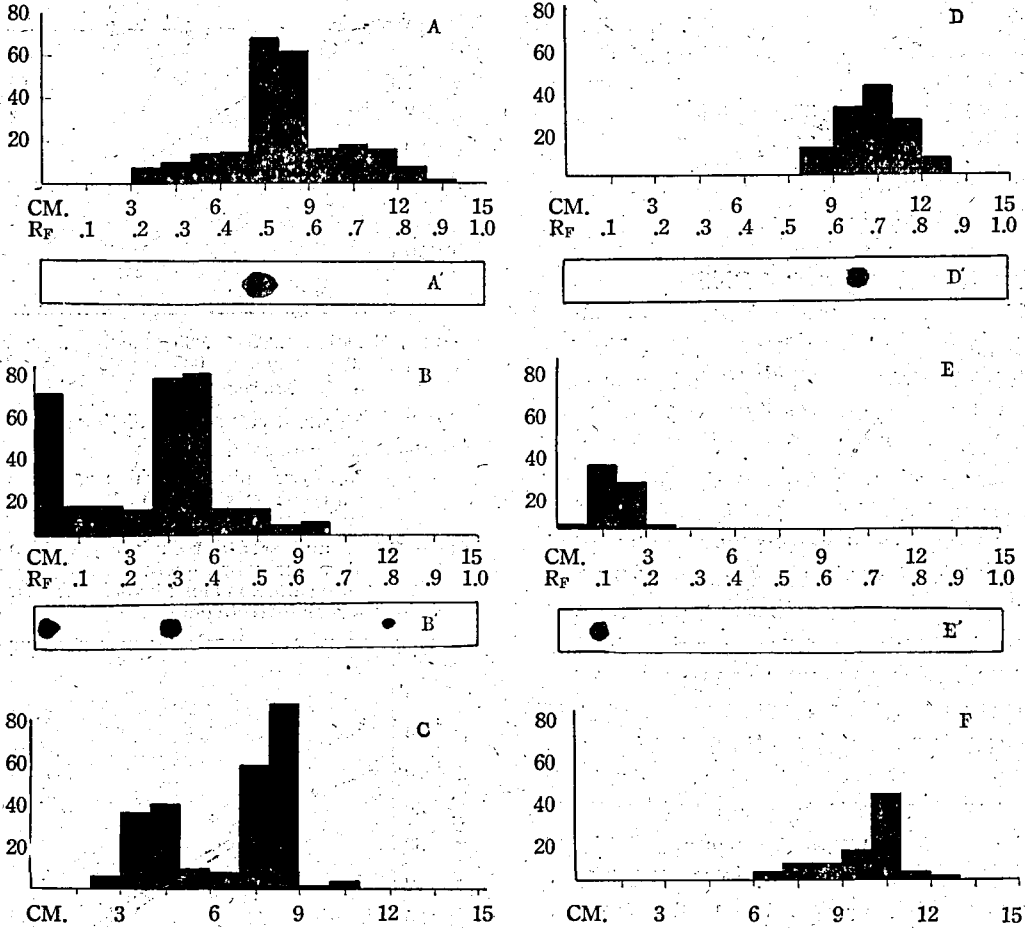


Fig. 9. ChE-activity-Rf curves and spots on paper chromatograms of parathion, paraoxon, malathion and malaoxon.

- A : 0.05 μ g. of pure paraoxon before and after bromine treatment.
 - A' : 50 μ g. of pure paraoxon before and after bromine treatment.
 - B : 0.05 μ g. of 96.5% technical parathion before and after bromine treatment.
 - B' : 50 μ g. of 96.5% technical parathion before bromine treatment.
 - C : 0.05 μ g. of 96.5% technical parathion after bromine treatment.
 - D : 1 μ g. of pure malaoxon before and after bromine treatment.
 - D' : 100 μ g. of pure malaoxon before and after bromine treatment.
 - E : 1 μ g. of 95% technical malathion before bromine treatment.
 - E' : 100 μ g. of 95% technical malathion before bromine treatment.
 - F : 1 μ g. of 95% technical malathion after bromine treatment.
- A, B, C, D, E and F : detected by ChE-inhibition method.
 A', B', D' and E' : detected by spraying with Hanes-Ischerweid reagent and irradiated with ultra-violet lamp.

阻害性を有する物質に代謝変換されるため、ChE 検定法は主として薬剤の代謝、薬理あるいは農作物の残留毒性に関する定性的研究に利用されているに過ぎない。筆者らは Fallscheer and Cook⁹⁾の方法を追試しつつ有機燐殺虫剤の定量的検定法の実験条件を検討した結果、本法は広く各種の定量的研究に応用できるものと思う。

まず ChE 試料の標準化は生化学的定量の精度を高めるうえに必要である。酵素単位の規定された純化 ChE 標品の入手が困難な現状から、筆者らは血液銀行から最初に購入したヒト血漿と ACh 分解量との関係をあらかじめ調べておき、つねに一定の ChE 活性を有するヒト血漿量を定量実験に供用する方法を考察し、ChE 阻害率の再現性を計った。

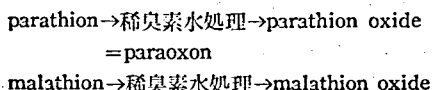
試験管内で阻害剤を活性化する方法について濃硫酸と発煙硝酸の混合液、醋酸と過酸化水素の混合液、N-bromosuccinimide (NBS と略す)、稀臭素水および各種酸化剤の使用が試みられている。Fallscheer and Cook⁹⁾は NBS の過剰使用は酵素活力に影響をあたえるが、稀臭素水はそのような影響があまり認められず酸化剤として最適であると報じている。筆者らがこの点に関して追試した結果では、稀臭素水の最終濃度が 0.4% 以上になると、ChE 活性は漸次減少する傾向が認められ、最終濃度 20% で失活した。

また、最終濃度 0.2% 以下では阻害剤を完全に活性化しえないことがわかり、ChE 活性に影響を与えず阻害剤を完全に酸化するのに必要な稀臭素水の最終濃度は 0.2~0.4% の範囲であった。

すでに述べた如く、それぞれの事項について検討した実験条件と操作法に基づき各種有機燐殺虫剤の標準検量曲線を作成した。これらの標準検量曲線は S 字形曲線で示され、ChE 阻害率を probit に、薬量を対数に変換したとき、直線関係が認められた。第 1 表には、標準検量曲線から得られた phosphate, phosphorothioate および phosphorodithioate 系殺虫剤の試験管内における稀臭素水処理前後の 50% 阻害薬量、最適検出範囲および検出限界薬量の数値を掲げた。これらの数値は Fallscheer and Cook⁹⁾の報告と一致していることから、本実験が大体妥当であったものと解される。

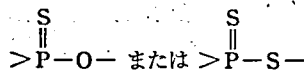
試験管内で phosphorothioate または phosphorodithioate 系殺虫剤を稀臭素水で処理したとき生産される酸化物はそれぞれ phosphate または phosphorothioate 系化合物であることをペーパークロマトグラフ法^{15), 16)}を用いて確めた。その結果は第 9 図に示した。

例えば

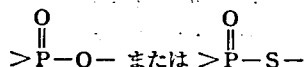


= malaoxon

故に



構造はつぎのように酸化されるものと考えられる。



さて、ChE 阻害法による有機燐殺虫剤の微量定量にかぎらず、化学的、物理的分析法においても動物あるいは植物抽出液が測定精度に影響する傾向の認められる例は少ない。Giang and Hall¹⁰⁾によればマメ類の葉、チシャ、カンラン、トマト、オオムギ、アルファルファ、オランダイチゴ、ネギ、マツバ、ハリモミ、タバコ、キク、ゼラニウムおよびラッカセイ等の ChE 活性に及ぼす植物抽出液の影響は認められないと述べている。また、Patchett and Batchelder²¹⁾は Giang and Hall¹⁰⁾と同じ ChE 検定法を用い Trithion の検出率を多種類の植物果実、葉および種子について検討した結果、一般に検出率に及ぼす植物抽出液の影響は少いが、油や蠟物質を多量に含む植物では検出率が悪くなる傾向が認められる。しかし、これらの影響も Jones and Riddick¹⁹⁾の acetonitrile 分配抽出法を併用すれば防止できると報じている。われわれの今次の実験では、酵素活力に及ぼす植物抽出液の影響は多少認められるようであったが、検出率は比較的高かった。今次の実験結果だけでは、供試材料の種類も少く詳述できないが、酵素活力や検出率に及ぼす抽出液の影響は、植物および動物の種類、あるいはその部位によっても異なるであろうから、あらかじめ抽出液の影響を調べておくとか、acetonitrile 分配抽出法を併用するとか、対象材料のホモジネートに検体を添加して標準検量曲線を作成するとか、実験の目的、条件に応じた方法を選択すればよいと考える。

最後に、操作法はやや複雑になるきらいがあるが、酵素阻害法により ChE 阻害力の差異を利用して異種有機燐殺虫剤の分別定量が可能である。よって本法はペーパークロマトグラフ法や溶媒分配法とあわせて有機燐殺虫剤の作用機構や他の定量的研究に応用の道がひらけるものとする。

以上、我々は今次の実験を基礎にさらに検討を加え、ChE 阻害による有機燐殺虫剤の微量定量法の発展を期待したい。

摘 要

ChE 阻害による有機燐殺虫剤の微量定量法を確立する目的で、主として ChE 比色検定法による実験条件と操作法ならびに試験管内における阻害剤の稀臭素水

による活性化について検討した。

(1) Fallscheer and Cook⁹⁾がおこなった有機燐殺虫剤の試験管内における活性化の方法を追試した結果、ChE 活性に及ぼす稀臭素水の影響は最終濃度が0.4%以上になると、ChE 活性は漸次減少の傾向が認められ、20%で失活する。また、最終濃度が0.2%以下では、阻害剤を完全に活性化できないことがわかり、ChE 活性に影響を与えず阻害剤を酸化するのに要する稀臭素水の最終濃度は0.2~0.4%の範囲であった。

(2) Phosphorothioate および phosphorodithioate 系殺虫剤の ChE 阻害作用は、試験管内における稀臭素水の処理によって著しく増大する。したがって、この操作をおこなえば、ChE 阻害法によりこれら両系燐殺虫剤のうち、Diazinon は 1/3000, parathion は 1/2000, Trithion は 1/1000, methyl parathion, EPN および malathion は 1/100, Guthion は 1/40 μ g の微量を定量しうる。また phosphate 系殺虫剤の paraoxon, Phosdrin, malaoxon および DDVP, ならびに phosphonate 系殺虫剤の Dipterex は 1/2000~1/20 μ g の微量を探知しうる。この種有機燐殺虫剤の稀臭素水処理による影響は認められなかった。しかし phosdrin の ChE 阻害作用は稀臭素水の処理によって低下した。

(3) ペーパークロマトグラフ法を用いて試験管内で phosphorothioate ($\text{>P}^{\text{S}}\text{-O-}$) または phosphorodithioate ($\text{>P}^{\text{S}}\text{-O-}$) 系殺虫剤を稀臭素水で処理したとき、生産される ChE 阻害剤の阻害作用は、それぞれ phosphate ($\text{>P}^{\text{O}}\text{-O-}$) または phosphorothiolate ($\text{>P}^{\text{O}}\text{-S-}$) 系化合物に相当することを確認した。

(4) ChE 活性に及ぼす植物抽出液の影響は多少認められるようであるが、検出率は比較的高かった。

(5) 有機燐殺虫剤の ChE 阻害力の差異を利用した異種有機燐殺虫剤の分別定量法について操作法を述べた。

文 献

- 1) Aldridge, W.N. and J.M. Barnes: Nature 169, 345 (1952).
- 2) Aldridge, W.N. and A.N. Davison: Biochem. J. 52, 663 (1952).
- 3) Allen, R.J.L.: Biochem. J. 34, 345 (1940).
- 4) Averell, P.R. and M.V. Norris: Anal. Chem. 20, 753 (1948).
- 5) Casida, J.E., P.E. Gatterdam, L.W. Getzin, Jr. and P.K. Chapman: J. Agr. Food and Chem. 4, 236 (1956).
- 6) Cook, J.W.: J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 36, 569 (1953).
- 7) Cook, J.W.: J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 38, 826 (1955).
- 8) Diggle, W.M. and J.C. Gage: Biochem. J. 49, 491 (1951).
- 9) Fallscheer, J.O. and J.W. Cook: J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 39, 691 (1956).
- 10) Giang, P.A. and S.A. Hall: Anal. Chem. 23, 1830 (1951).
- 11) Giang, P.A., F.F. Smith and S.A. Hall: J. Agr. Food and Chem. 4, 621 (1956).
- 12) Hestrin, S.: J. Biol. Chem. 180, 249 (1949).
- 13) Jones, L.R. and J.A. Riddick: Anal. Chem. 24, 569 (1952).
- 14) Lesuk, A.: U.S. Patent 2, 475, 792 (1949); U.S. Patent 2, 475, 793 (1949).
- 15) March, R.B., R.L. Metcalf and T.R. Fukuto: J. Agr. Food and Chem. 2, 732 (1954).
- 16) Metcalf, R.L.: J. Econ. Entomol. 44, 883 (1951).
- 17) Metcalf, R.L.: Advance in pest control research Vol. 1, Interscience Publishers, Inc., New York. (1957).
- 18) Metcalf, R.L. and R.B. March: J. Econ. Entomol. 46, 288 (1953).
- 19) Metcalf, R.L. and R.B. March: Science. 117, 527 (1953).
- 20) Michel, H.O.: J. Lab. Clin. Med. 34, 1564 (1949).
- 21) Patchett, G.G. and G.H. Batchelder: Stauffer Chemical Co., March (1957).

Résumé

The present investigations dealt with enzymatic method for estimating the organophosphorus insecticides based on their *in vitro* inhibition of cholinesterase (ChE) and attempted to study the procedure for distinguishing the certain organophosphorus insecticides which have large differences in inhibitory activity, for example, parathion and paraoxon, by the enzymatic method. The colorimetric method of Fallscheer and Cook⁹⁾ was modified in this work. The human blood was used as enzyme source, which was purchased at local blood banks. The stock solution of human plasma ChE was obtained from centrifuged blood, diluted with Sørensen

phosphate buffer. After determining the potency of ChE-activity in the stock solution of human plasma, the dilution multiple required for making up the standard ChE solution was calculated from the equation, $M=X/0.5 \times 10$, as shown in Figure 2. In the equation, M represents the dilution multiple required for making up the standard ChE solution by adding the buffer and X is the volume (in ml.) of standard ChE solution equivalent to the hydrolyzing acetyl-choline bromide by the 0.5 ml. of trial solution in stock human plasma. The standard ChE solution has constantly the potency of ChE-activity, which was hydrolyzed 2.3 μ M. of ACh per 30 minutes when its activity tested under condition described below.

After preliminary investigations, all our experiments were performed under the condition at Metcalf's¹⁶⁾ substrate concentration of 0.004M ACh-Br., phosphate buffer at 8.0 (Fig. 1) and 30 minutes' reaction at 37.5°C. (Fig. 5).

In Fallscheer and Cook's technique⁹⁾ on the use of bromine water as oxidizing agent to convert phosphorothioates and phosphorodithioates to *in vitro* more strong inhibitors, his final concentration of bromine water was successful, but the excess bromine water (0.4% over) interfered with the enzymatic action of the anti-ChE method and it was inactivated at final concentration of 20%, and also

the deficient bromine water (0.2% below) did not convert completely with the small amounts of inhibitor. The optimum final concentration of bromine water was 0.2-0.4% (Fig. 3). The bromine water reacted instantaneously with inhibitor (Fig. 4).

The inhibition and the standard curves of the materials tested, before and after bromine treatment, in this experiments, are shown in Table 1. This is in good agreement with the data of Fallscheer and Cook⁹⁾. Of the materials tested, Phosdrin only reduced in anti-ChE activity by treatment with bromine water.

In the experiments where known amounts of EPN and Trithion were added to young plants, the interfering effects of plant extracts on the enzyme-inhibition method were observed slightly (Fig. 7) but the recovery percentages were generally high (Table 2).

Figures 8a and 8b shows the standard curves to distinguish between parathion and paraoxon which have large difference in ChE-inhibitory activity. Parathion and paraoxon can be distinguished at ratios of 0:10 to 9:1 (0:0.1 to 0.09:0.01 μ g.) by the standard curves in Figure 8a, and at ratios of 99:1 to 999:1 (0.09:0.01 to 0.099:0.001 μ g.) by the standard curves in Figure 8b.

Studies on the Control of the Far Eastern Urticating Moth, *Euproctis flava* Bremer.
Hiroshi MATSUZAWA (Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, Kagawa University) and Yukihiko FUJII (Nibu Health Centre, Kagawa Prefecture). Received Dec. 20, 1959.
Botyu-Kagaku, 25, 41, 1960 (with English résumé, 46).

8. ナミドクガの防除に関する研究* 松沢 寛・藤井幸彦 (香川大学農学部・香川県丹生保健所)
34. 12. 20 受理

近年各地で問題になっているナミドクガの防除法を再検討した。幼虫に対しては各種の殺虫剤を、成虫に対しては波長をことにする各種の蛍光灯を用いて試験した。

結 言

近年本邦における毒蛾禍の問題は年とともに広範囲に論議を展開しているが¹⁻¹²⁾、見方によってはたしかに戦後日本に毒蛾が相当に増加して来ているようにも感じとられる。四国地方においてもこの種の問題は年々生起する頻度をまし、香川県などでは随所に大量発

生もしくはその前兆が認められるに到っている⁵⁾。

ところで問題のナミドクガ *Euproctis flava* については、この2、3年特に生態に関する方面に研究が集中され⁵⁾⁶⁾⁸⁾⁹⁾¹¹⁾、多くの興味ある事項が明らかになって来たが、防除に関する研究はただ殺虫剤を撒布すればよいとか、誘蛾灯を用いたらよいといったような安易な常識にわざわざされてか²⁾、若干を除き余り見る

* 香川大学農学部応用昆虫学研究室 業績 No. 41