の意を表する．またこの実験は当研究所永江祐治，椎野明雄，瀬戸一郎の諸氏ならびに研究所各位の熱心な助力に負うところが大きい．ここに記して深甚なる謝意を捧げる．

文 献

1) Bliss, C.I. : Ann. Appl. Biol., **22**, 134(1935).
2) Bliss, C.I. : Ann. Appl. Biol., **26**, 585(1939).
3) Cook, J.W., J.R. Blake, and M.W. Williams : J. Assoc. Offic. Agr. Chem., **40**, 664(1957).
4) Cook, J.W., J.R. Blake, G.Yip, and M.W. Williams : J. Assoc. Offic. Agr. Chem., **41**, 399 (1958).
5) Finney, D. J. : Probit analysis, Cambrige (1952).
6) Frawley, J. P., H. H. Fyat, E. C. Hagan, J.R. Blade, and O.G. Fitzhugh : J. Pharmacol. and Exptl. Therap., **121**, 96 (1957).
7) 酒井清六・弥富喜三：日本昆虫学会第13回大会講演要旨 (1953).
8) 山本亮：新農薬研究法 (1958).

Résumé

In the present paper, the authors attempted to esitmate the insecticidal effects of the mixtures of DDVP with malathion or some other organophosphorus insecticides in emulsions against the adults of the green rice leafhopper, *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler, by the method of cage test in laboratory conditions.

In this test, the authors prepared original emulsions containing malathion, methyl paraoxon, methyl parathion, Phosphamidon or CIBA 885 mixed with DDVP in various ratios as shown in Table 1, using xylene and an emulsifier and then examined their knock-down effects to the adults of the green rice leafhopper after the spraying. The values of median knock-down time (KT_{50}) were calculated from the time-per cent knock-down curve by probit method of Bliss, as an indication of the effectiveness of emulsion.

The insecticidal effects of mixtures tested against the adults of the green rice leafhopper as shown in Table 2, were more increased at the cases mixed with DDVP in a certain ratio than the corresponding insecticides alone but the effect of DDVP alone was not so effective against insect tested.

The degree of increasing effectiveness was higher in the case of the malathion plus DDVP emulsion than in the other combined emulsion and the former emulsion showed its highest effectiveness in the case of the ratio of 4:1. These results, suggest that DDVP has a certain synergistic action for malathion or some other organophosphorus insecticides. The potentiated effect appears to be an interference with the detoxification process.

An investigation was also made of the acute oral and subcutaneous toxicities of various dosages of malathion, DDVP alone and their mixture in the ratio of 4:1 formulated in emulsion against the male mouse. The median lethal dose (LD_{50}) was calculated from dosage-mortality curve by the graphic approximate method of Finney. The acute toxicity of malathion plus DDVP emulsion was about a 10 times greater than that of the corresponding dosage of each insecticide alone when its mixture was administered orally to mouse, but no potentiation was indicated when it administered subcutaneouslly.

The Enzymatic Detoxification of Some Organophosphorus Insecticides in the Adults of the Green Rice Leafhopper, *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler, Especially an Enzyme Detoxifying Malathion and Its Inhibition. Ken'ichi KOJIMA and Tadayoshi ISHIZUKA (Institute for Agricultural Chemicals, Toa Noyaku Co. LTD., Odawara, Kanagawa). Received Dec. 20, 1959. *Botyu-Kagaku*, **25**, 22, 1960 (with English résumé, 29).

6. ツマグロヨコバイ成虫における数種有機燐酸エステル殺虫剤の酵素的解毒，とくに malathion 解毒酵素とその阻害について*

小島建一・石塚忠克（東亜農薬株式会社 農薬研究所）
34. 12. 20 受理

* 殺虫剤の解毒に関する研究 第3報 本報告の概要は昭和34年4月5日，日本応用動物昆虫学会大会において発表した．

ツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による有機燐酸エステル殺虫剤の解毒をワールブルク検圧法を用いてラッテ肝臓の生体組織磨砕液と対照的に研究し，両試料中には malathion 解毒酵素とある種の有機燐酸エステル解毒酵素の2種酵素が存在することを明らかにし，malathion 解毒酵素については両試料の間で activity，酵素の性質，とくに阻害剤に対する感受性の相違を認めた．さらに malathion および他種有機燐酸エステル殺虫剤と DDVP との混合乳剤のツマグロヨコバイ成虫に対するノックダウン効力への協力作用機構の一部は，少くとも酵素的解毒に対する DDVP の阻害作用または拮抗作用に基くものであることを明らかにした．

昆虫の解毒作用に関する酵素反応を阻害する機作が殺虫剤の効力維持，または増強に役立つという学説は，DDT抵抗性イエバエにおけるDDT解毒酵素に対する piperonyl butoxide の阻害による協力作用[29),32)]，各種昆虫に対する pyrethrins-lipase-synergists の一連の解毒阻止系[9, 17, 18, 33, 34)] にみられる．*in vivo* および *in vitro* における有機燐酸エステル類の分解，解毒に関与する酵素の研究は割合に多く，その位置と割合は殺虫剤の毒力を決定する重要な因子であると考えられている．最近 Cook ら[11)]はラッテ肝臓組織に malathion を特異的に分解，解毒する酵素の存在することを明らかにし，これを malathionase と仮称した．

Frawley ら[13)]はラッテおよび犬に malathion と EPN を同時に投与した場合，その毒性はそれぞれ単独投与の場合より増大する現象を観察したが，Cook ら[11)]によればこの増加現象は malathion 解毒酵素に対する EPN の阻害に基くものであるという．

この学説に基けば前報において著者ら[15)]が報告したツマグロヨコバイ成虫に対する malathion あるいは他種有機燐酸エステル殺虫剤と DDVP との混合乳剤のノックダウン効力にみられる協力作用は，ツマグロヨコバイ成虫の有機燐酸エステル解毒酵素に対する DDVP の妨害によるためではないかと想像されるので，それを証明するためにまずラッテ肝臓生体組織磨砕液を対照として，ツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による有機燐酸エステル殺虫剤の酵素的解毒および解毒酵素に対する DDVP の作用について研究し，その作用機構の一部を解明することができたので，ここに報告する．

実験材料および方法

1）供試薬剤：本実験に用いた殺虫剤の種類は第1表の通りで，薬剤はカラム・クロマトグラフ法または結晶法によって精製したものを使用した．

Table 1. Common and chemical names of insecticides used in this experiment.

Common name	Chemical name
CIBA 885	Unknown chemical structure
DDVP	*O*, *O*-dimethyl *O*-2, 2-dichlorovinyl phosphate
malathion	*O*, *O*-dimethyl *S*-(1, 2-dicarboethoxyethyl) phosphorodithioate
malaoxon	*O*, *O*-dimethyl *S*-(1, 2-dicarboethoxyethyl) phosphorothiolate
methyl paraoxon	*O*, *O*-dimethyl *O*-*p*-nitrophenyl phosphate
parathion	*O*, *O*-diethyl *O*-*p*-nitrophenyl phosphorothioate
paraoxon	*O*, *O*-diethyl *O*-*p*-nitrophenyl phosphate
Phosphamidon *	*O*, *O*-dimethyl *O*-(2-chloro-2-diethylcarbomoyl-1-propen-2yl) phosphate
Sevin **	1-naphtyl *N*-methylcarbamate

* Trademark CIBA Ltd.
** Trademark Carbide and Carbon Chemical Co.

2）酵素試料：ツマグロヨコバイ *Nephotettix bipunctaus cincticeps* Uhler 成虫は，すでに報告記載[15)]したそれとおなじで，生体組織磨砕液の調製直前に野外から採集した健全な個体群である．なお有機燐酸エステル殺虫剤に対し一般にツマグロヨコバイ成虫の雌が雄より抵抗性が大であることが認められており，酵素試料は雄雌別に，また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な上，有機燐酸エステル類を受容しこれを解毒する部位が現在明らかでないのでこれを区別せず全虫体を試料とした．

ラッテ *Rattus norvegicus* は市販の雄の肝臓を用いた．

3）生体組織磨砕液の調製法：供試ツマグロヨコバイ成虫を乳鉢中で生体重量の 3.3 倍量（300mg/ml）

の重炭酸塩緩衝液（0.150 M-NaCl, 0.040 M-$MgCl_2$, 0.025 M-$NaHCO_3$）を加えてよく磨り潰した。

ラッテ肝臓組織は調製前に摘出した新鮮な試料を乳鉢中で生体重量の20倍量（50 mg/ml）の上記緩衝液を加えてよく磨り潰した。この操作は如何に完全にしてもピペットの小孔を詰める小片が残るので，これを防ぐため二重ガーゼで沪過し，その沪液の一定量を採って実験に用いた。両試料は冷蔵庫中（−5°C）に貯蔵し，3日ごとに試料を更新した。

4）基質液：Cook ら[11]はラッテ肝臓生体組織磨砕液による malathion の解毒作用の研究において5%の Triton X-100 を含む重炭酸塩緩衝液を用いて基質を溶解しているが，著者らが主として malathion 解毒酵素について酵素の activity に及ぼす基質の乳化状態を検討した結果 Triton X-100 の濃度は2%が最適であることを確認したので，ここでは重炭酸塩緩衝液に Triton X-100 を2%添加したものを基質に加えてよく振盪して乳化せしめ，最終濃度 1.0 mg/ml とした。

5）阻害剤：malathion 解毒酵素に対する数種殺虫剤の阻害実験において阻害剤は最初 ethanol を加えて溶解し，その分割液を上記重炭酸塩緩衝液に加えてよく振盪稀釈した。そして，阻害剤の使用量は 0.1 ml とし反応容器当りの ethanol 量が 0.1 ml を超えないようにした。酵素の activity に及ぼす ethanol の影響は上記の濃度では認められなかった。

6）酵素作用の測定：malathion および他種有機燐酸エステル殺虫剤の酵素的解毒作用ならびに malathion 解毒酵素に対する数種阻害剤の阻害実験には，Cook ら[11]が用いた Warburg manometer 法を改変して測定した。

解毒酵素の測定実験は，反応容器の側室に基質液 0.5 ml をいれ，主室に酵素液 1.0 ml と重炭酸塩緩衝液 1.5 ml をいれた。ついで炭酸ガス5%と窒素95%の組成のガスを検圧計の容器を通じてガス腔の空気を交換した。

検圧計容器は 37.5°C 恒温水槽にいれて10分間放置したのち，側室の基質を主室に添加して反応を開始した。それゆえ，反応液の pH は約7.6となる。添加後10分ごとに酵素の作用によって発生する CO_2 を30〜60分間測定し，得た結果を CO_2 μl/ml 生体組織磨砕液/時間に換算して酵素の活性値を求めた。なお基質の自家分解がきわめてわずかあったので補正した。

Malathion 解毒酵素に対する阻害剤の阻害実験には preincubation および simultaneous administration 法の2つの試験法を用いた。前者の方法は反応容器の側室に基質液 0.5 ml をいれ，主室に酵素液 1.0 ml と阻害剤 0.1 ml とをいれ，さらに重炭酸塩緩衝液 1.4 ml を添加したのち，上記混合ガスでガス交換した。そして検圧計容器を 37.5°C の恒温水槽にいれてラッテ肝臓試料については50分間，ツマグロヨコバイ成虫試料については30分間振盪し，阻害反応させたのち，側室の基質液を主室に添加して反応を開始し，発生する CO_2 をラッテ肝臓試料については30分間，ツマグロヨコバイ成虫試料については60分間測定した。後者の方法は本来2側室付反応容器を用いて基質と阻害剤を別個の側室にいれて実験すべきであつたが，著者らの手持ち容器の関係で本実験では反応容器の側室に基質液 0.5 ml と阻害剤 0.1 ml をいれ，主室に酵素液 1.0 ml と重炭酸塩緩衝液 1.4 ml をいれたのち，上記混合ガスでガス交換した。そして，検圧計容器を 37.5°C の恒温水槽にいれて10分間放置したのち，側室の基質液と阻害剤を主室に添加して反応を開始し，発生する CO_2 を前者の方法の場合と同様に測定した。

実 験 結 果

(1) ラッテ肝臓の生体組織磨砕液による有機燐酸エステル殺虫剤の酵素的解毒，とくに malathion 解毒酵素の activity とその阻害について。

前述の方法によって得た実験結果は第2表の通りであり，解毒酵素の activity は有機燐酸エステル殺虫剤の種類によってそれぞれ異った結果が得られていることは興味深く，そのうち malathion に対するラッテ肝臓生体組織磨砕液の解毒力は極めて大であることを観察した。

Table 2. Rates of enzymatic detoxification of malathion and some other organophosphorus insecticides by the living ground-tissue solution from the rat livers.

Substrate *	Activity (μl. CO_2/100 mg/hr)	Ratio
malathion	1957	1.0
malaoxon	155	0.079
CIBA 885	84	0.042
DDVP	37	0.019
methyl paraoxon	8	0.004
paraoxon	0	0

* Final concentration, 1 mg/ml

つぎにラッテ肝臓生体組織磨砕液の malathion 解毒作用に対する数種阻害剤の阻害に関する実験結果は第1図に示した。

すなわち，paraoxon および DDVP は試験法の相違に関係なくラッテ肝臓酵素による malathion の解毒作用を極めて強く阻害するのに反し，malaoxon の

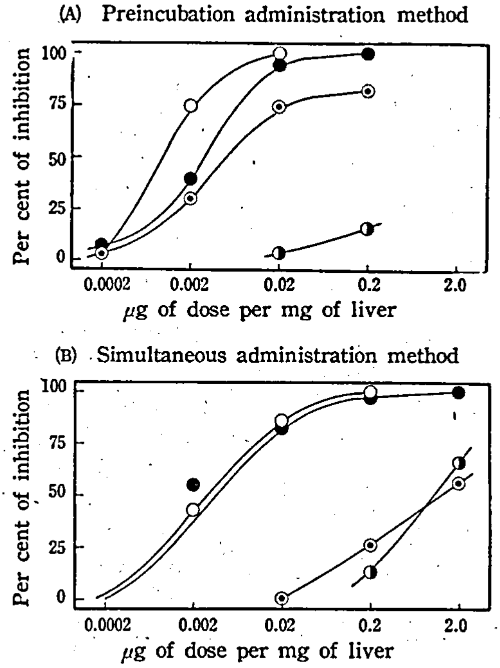

Fig. 1. Inhibition of enzymatic detoxification of malathion in the living ground-tissue solution of the rat livers by some insecticides.

○——○ paraoxon　⊙——⊙ Sevin
●——● DDVP　◑——◑ malaoxon

阻害作用は比較的弱いことを認めた．また Sevin のそれは試験法の相違によって異なることを示している．

(2) ツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による有機燐酸エステル殺虫剤の酵素的解毒，とくに malathion 解毒酵素の activity とその阻害について．

前実験によりラッテ肝臓の生体組織磨砕液による malathion の酵素的解毒に関する Cook ら[11]の業績を定量的に追試し確認することができたので，ツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による有機燐酸エステル殺虫剤の酵素的解毒を研究し，malathion 解毒酵素の存在を明らかにしようと試みた．

その結果を示すと第3表の通りで，有機燐酸エステル殺虫剤に対するツマグロヨコバイ成虫生体組織磨砕液の解毒作用はラッテ肝臓生体組織磨砕液の場合と同様に種類によって異なり，その解毒量の比率は高等動物と昆虫ではかなり異なる結果が得られていることは興味深い．

また著者ら[15]が先に報告したツマグロヨコバイ成虫に対するノックダウン効力の比較的弱い DDVP に対する解毒力は著しく大で malathion の約2倍に相当する．

またツマグロヨコバイ成虫生体組織磨砕液ではラッテ肝臓磨砕液で観察されたような malathion に対する強い特異的な解毒作用は認められなかった．ツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による malathion の酵素的解毒に対する数種阻害剤の阻害作用に関する実験結果は第4表のごとくで，ツマグロヨコバイ成虫とラッテ肝臓の生体酵素ではかなり異った結果を示している．

Table 3. Rates of enzymatic detoxification of malathion and some other organophosphorus insecticides by the living ground-tissue solution of the adults of green rice leafhopper, *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler.

Substrate *	Activity (μl. CO_2/100 mg/hr)	Ratio
DDVP	18.3	2.15
CIBA 885	16.0	1.88
malathion	8.5	1.00
methyl paraoxon	4.7	0.55
malaoxon	0	0
Phosphamidon	0	0
parathion	0	0
paraoxon	0	0

* Final concentration, 1 mg./ml.

Table 4. Inhibition of enzymatic detoxification of malathion in the living ground-tissue solution of the adults of the green rice leafhopper, *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler. Inhibitors added to enzyme for 30 minutes before malathion (final concentration at 1 mg/ml) was added.

Inhibitor *	Time of incubation (min.)	Per cent of inhibition
DDVP	60	79.3
paraoxon	60	57.8
malaoxon	60	40.3
Sevin	60	0

* 0.033 μg/mg of tissue.

(3) ツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による malathion の解毒に対する DDVP の阻害作用

前報において著者ら[15]は malathion と DDVP との混合乳剤の殺虫作用を研究し，malathion のツマグロヨコバイ成虫に対するノックダウン効力への協力作用を観察したことを報告した．この現象の作用機構を生化学的に考察すれば，(2)に示した実験結果により明らかなごとく，(A) malathion 解毒酵素に対する DDVP の妨害もしくは，(B) DDVP 解毒酵素に対する malathion (恐らく *in vivo* では malathion 酸化物) の妨害の2つの事象が考えられる．

in vitro で行った実験結果を示すと第2図および第3図の通りで，(B)の考えは否定され，malathion+DDVP 混合剤の協力作用は malathion の酵素的解毒作用への DDVP の阻害に基くものであると考えられる．

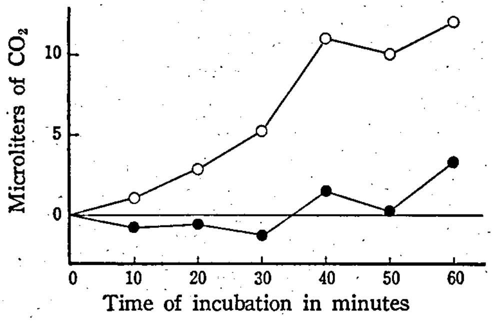

Fig. 2. Effect of DDVP on the malathion detoxifying enzyme in the living ground-tissue solution of the adults of the green rice leafhopper, *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler. DDVP (final concentration, 4.0 μg/ml) preincubated for 30 minutes with the enzyme before adding of malathion (final concentration, 1.0 mg/ml)

○—○ Untreated ●—● Treated

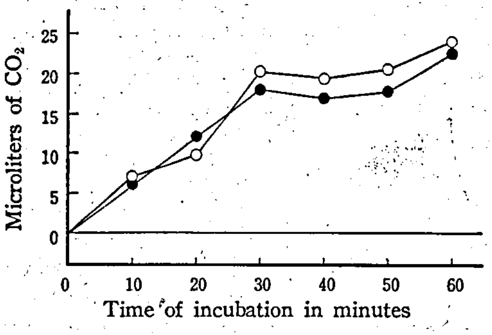

Fig. 3. Effect of malaoxon on the DDVP detoxifying enzyme in the living ground-tissue solution of the adults of the green rice leafhopper, *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler, Malaoxon (final concentration, 4.0 μg/ml) preincubated for 30 minutes with the enzyme before adding of DDVP (final concentration, 1.0 mg/ml).

○—○ Untreated ●—● Treated

上記の実験的推論が正しいとすれば，ツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による malathion の解毒量の差異はその阻害度の差異によって左右されるものではないかと考えられるので，第4表の実験において用いた阻害剤と malathion の分解量について同様な実験を行った．実験結果は第4図の通りで，ツマグロヨコバイ成虫の malathion 解毒酵素に対する各種阻害剤の阻害力と malathion の分解量との間には明らかな相関関係が認められ，阻害作用を示さない Sevin では全く影響がない事を示している．

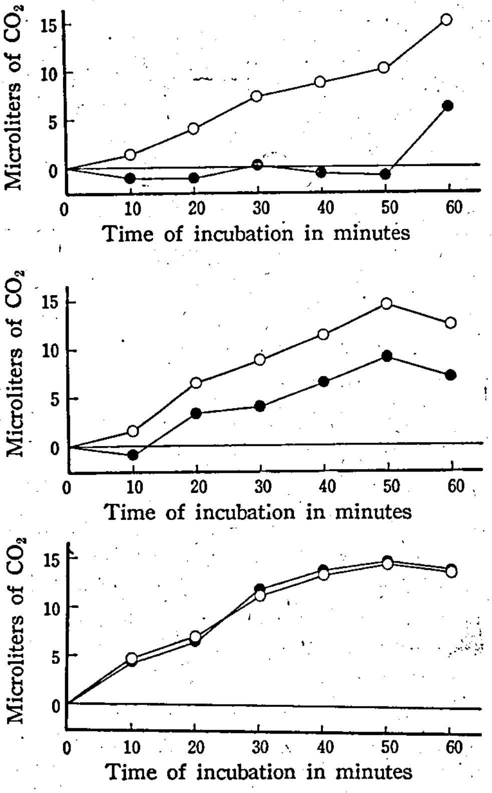

Fig. 4. Correlation between the degree of inhibition of enzymatic detoxification of malathion and inhibitory activity of inhibitors in the living ground-tissue solution of the adults of the green rice leafhopper, *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler.

Above, paraoxon ○—○ Untreated
Middle, malaoxon
Below, Sevin ●—● Treated

(4) ツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による有機燐酸エステル殺虫剤の解毒に対する DDVP の拮抗作用．

前記実験においてツマグロヨコバイ成虫生体組織磨砕液が DDVP, methyl paraoxon および CIBA 885 などの有機燐酸エステル殺虫剤を分解，解毒することを知ったが，この種酵素の詳細は全く不明である．しかしながら，前項に述べたと同様に著者ら[15]は各種有機燐酸エステル殺虫剤と DDVP との混合乳剤の殺虫作用を研究し，ツマグロヨコバイ成虫に対するノック

ダウン効力への協力作用のあることを報告した．この種混合剤の協力作用機構を生化学的に解明するために，methyl paraoxon と DDVP との組合せについて両化合物を解毒する酵素が同一のものであるか否か検討した．

この実験の結果は第5表の通りで，ツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による methyl paraoxon および DDVP の分解量と methyl paraoxon+DDVP 混合物の分解量を比較し，methyl paraoxon+DDVP 混合物の分解量が (A′) それぞれ単独の場合の分解量の和に等しければ異なる酵素によるものであり，(B′) 分解量の和より小であれば同一酵素によるものであると推量される．実験結果によれば，(A′) の考えは否定され，methyl paraoxon+DDVP 混合剤の協力作用はある種の有機燐酸エステル解毒酵素に対する DDVP の“せり合い”(拮抗) に基づくものであると考えられる．

Table 5. Competition on the enzymatic detoxification of DDVP and methyl paraoxon in the living ground-tissue solution of the adults of the green rice leafhopper, *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler

Substrate *		Rate of hydrolysis ($\mu l\ CO_2$/100 mg/hr)			
(A)	(B)	(A)	(B)	(A)+(B) (determined)	(A)+(B) (calculated)
DDVP	methyl paraoxon	13.0	6.7	15.6	19.7

* Final concentration, 1 mg/ml

論　　　議

in vivo および *in vitro* において有機燐酸エステル殺虫剤が酵素によって分解，解毒を受ける事実は，従来多くの研究者によって報告されている．これらの酵素による分解は主として P-S, P-O, P-F, あるいは P-C の開裂(I) であって，それぞれ dialkyl phosphoric acid ester および alcohol または phenol を生成する．その例として DFP[8,19,22]，TEPP[2,24]，paraoxon[1,4,6]，parathion[20]，O-ethyl dimethylphosphoroamidocyanidate (tabun)[7] および N-N-bisdimethyl phosphoroamide fluoridate[28] が知られている．Mounter and Whittaken[23] および Aldridge[3] は哺乳類について，Metcalf ら[20] は昆虫について，有機燐酸エステル殺虫剤を解毒する酵素の性質について詳細な研究を行っているが，近年に至って有機燐酸エステル分子結合における P の配位結合と異なる位置の官能基に対する酵素的分解 (II) の研究が行われるようになった．例えば，March ら[16]，Cook ら[11] および Cook and Yip[12] は malathion について，Arther and Casida[5] および Metcalf ら[21] は Dipterex について，O'Brien ら[27] は acethion についてそれぞれ優れた研究を行っている．

さらに Plapp and Casida[30] は dialkyl aryl phosphorothioates について alkyl phosphate の解離 (III) を認め，それは aryl phosphate の分解と alternative に起るものであると推定している．(II) および (III) 型の酵素的分解は有機燐酸エステル殺虫剤の選択毒性に関連するものと考えられ注目されている．

Malathion の代謝機構については上記の March ら[16] および O'Brien[26] のほか多くの研究者により普遍性の高い価値ある研究考察がなされ，わが国でも富沢・山科ら[31] の業績がある．

本実験は高等動物および昆虫における malathion の解毒機構を明らかにするため行った一連の調査の一部であり，ここでは malathion の解毒酵素が昆虫組織に存在するか否かについて検討することに重点を置いてラッテ肝臓組織と対照的に実験を進めた．

すでに Cook ら[10,11] および Murphy and DuBois[25] は malathion の酵素的解毒が他種有機燐酸エステル殺虫剤によって強く阻害され，その阻害度は ChE 阻害作用と類似し，とくに P=O 化合物において顕著であるとしている．したがって，上記実験で得た malathion および malaoxon を除く有機燐酸エステル殺虫剤の解毒は，malathion 解毒酵素とは異なる酵素によるものであることを暗示し，ラッテ肝臓およびツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液には少くとも2種の解毒酵素が存在する．

第2表および第3表の結果から malathion に対するラッテ肝臓生体組織磨砕液の解毒力は極めて大であるのに反し，ツマグロヨコバイ成虫生体組織磨砕液のそれは遙か微弱で 100 mg/hr 当り後者は前者の約 1/230 に過ぎない事実は，後述の malaoxon に対する酵素的解毒ならびに malathion 解毒酵素に対する malaoxon の阻害作用とあいまって高等動物および昆虫に対する malathion の毒性に関する特異性を説明する一資料を提供するものであろう．

先覚者の研究について Mounter[24] はウサギの血漿中に存在する酵素は DFP, paraoxon, TEPP および *p*-substituted aromatic esters を分解するが，この分解はすべて同一酵素によるものであることを明らかにし，その酵素は A-esterase であると述べている．Hobbiger[14] はこの酵素が diethyl 3-*N*-methylquinoline phosphate methosulfate を分解することを明らかにしている．また Metcalf ら[20]は昆虫組織による paraoxon, parathion および類縁化合物の酵素的解毒が A-esterase によるものであることを認めている．

これらの事実から，ラッテ肝臓およびツマグロヨコバイ成虫の生体組織磨砕液による methyl paraoxon および DDVP の解毒作用は A-esterase によるもので，恐らく CIBA 885 の解毒も同一酵素によるものであろうと推定される．しかし，ブタの腎臓中に存在する DFP 解毒酵素が paraoxon を解毒しない[24]ことを考慮すれば，上記有機燐酸エステル殺虫剤の解毒が常に必ずしも A-esterase によるものであるとは限らない．またこの種有機燐酸エステル殺虫剤に対する両生体組織磨砕液の解毒は極めて少ないことが認められるが，これは磨砕液の解毒力が本来微弱である外に至適 pH, 基質濃度，あるいは温度等が本実験における条件と異なるか，そのいずれによるかはさらに検討を必要とする．

in vivo および *in vitro* における malathion の解毒代謝が diethylsuccinate の mono-acid 誘導体への解離に基くことは，March ら[16]，Cook and Yip[12] および著者らの実験資料の CO_2 発生量から計算した結果により明らかであり，当然 malathion 解毒酵素と malathion の thiol phosphate 同族体，malaoxon との関係について考慮されなければならないと思われるが，Cook ら[11]はこの関係について全く触れていない．malathion は in vivo で酵素的に酸化されて強い ChE 阻害物質に転換され，それは malathion の作用機構上重要な役割をはたしている点で軽視できない．

著者らの本実験においてラッテ肝臓生体組織磨砕液による malaoxon の解毒は malathion の約 1/8 に相当する程度であり，ツマグロヨコバイ成虫生体組織磨砕液によるそれは極めて微弱で解毒によるガス発生は殆んど認められなかった．この要因には(1)解毒酵素に対する malaoxon の阻害作用，(2)解毒酵素に対する基質特異性などが考えられる．前記の阻害実験の結果によれば，paraoxon および DDVP は試験法の相違に関係なくラッテ肝臓の酵素による malathion の解毒を極めて強く阻害するのに対し，malaoxon の阻害作用は比較的弱いことを示している．他方ツマグロヨコバイ成虫の酵素による malathion の解毒は DDVP によって最も強く阻害され，malaoxon にもかなり強く阻害される．また有機燐酸エステル殺虫剤と同様に ChE 阻害物質である Sevin の malathion 解毒酵素に対する阻害作用は，ツマグロヨコバイ成虫の酵素では全く認められないのに反し，ラッテ肝臓の酵素では試験法によって阻害度がかなり異なるが，その阻害作用を観察することができる．これらの関係より malathion 解毒酵素の性質はラッテ肝臓生体組織磨砕液とツマグロヨコバイ成虫生体組織磨砕液との間で多少異なり，malaoxon に対する malathion 解毒酵素の感受性は動物の種類によって異なることが予測される．その詳細は後報にゆずる．

前報において著者ら[15]はツマグロヨコバイ成虫に対する各種有機燐酸エステル殺虫剤と DDVP との混合乳剤の生物効果を研究し，ノックダウン効力を助力せしめるある種の連合作用のあることを認め，その作用機構について考察した．本実験ではその作用機構の解明を *in vitro* において有機燐酸エステル殺虫剤の酵素的解毒作用への DDVP の妨害に基くとの仮説により証明を試みることに心がけた．

その結果，上記混合乳剤のツマグロヨコバイ成虫に対するノックダウン効力への DDVP の協力作用機構のうち，少くともその一部は(1) malathion の解毒酵素に対する DDVP の阻害作用，(2)ある種の有機燐酸エステル解毒酵素に対する DDVP の拮抗作用に基くものであると称し得る．

摘　　要

ツマグロヨコバイ成虫における malathion 解毒酵素の存在を明らかにするためにラッテ肝臓を対照にしてワールブルク検圧法を用いて定量的に研究し，ツマグロヨコバイ成虫およびラッテ肝臓の生体組織磨砕液には少くとも malathion 解毒酵素とある種の有機燐酸エステル解毒酵素の2種酵素が存在することを明らかにし，後者の酵素は A-esterase と同一酵素であろうと推定した．malathion 解毒酵素の activity はツマグロヨコバイ成虫生体組織磨砕液よりラッテ肝臓生体組織磨砕液の方が極めて大であり，前者は後者の約 1/230 に相当するのを認めた．またツマグロヨコバイ成虫およびラッテ肝臓の生体組織磨砕液による malathion の酵素的解毒に対する数種阻害剤の阻害作用を研究した結果，malathion 解毒酵素の性質ならびに阻害剤に対する感受性が動物の種類によって異なることを認めた．さらに本実験の結果およびすでに得られている知見から，ツマグロヨコバイ成虫に対する malathion および他種有機燐酸エステル殺虫剤と DDVP との混合乳剤のノックダウン効力への協力作用機構の一部は，(1) malathion の酵素的解毒に対する DDVP の阻害作用，(2)ある種の有機燐酸エステル解毒酵素に

対する DDVP の拮抗作用に基くものであると結論されよう.

本研究を行うに当り終始御指導と御鞭撻を賜った当社研究所所長平塚喜造博士, 有益な御助言を戴いた八州化学工業株式会社研究所酒井清六氏, 発表に当り種々御教示戴いた京都大学内田俊郎教授ならびに長沢純夫博士に厚く御礼申上げる. またこの実験は当研究所永江祐治, 椎野明雄, 瀬戸一郎の諸氏, ならびに研究所各位の熱心な助力に負うところが大きい. その御厚情を銘記して厚く感謝する.

文　献

1) Aldridge, W. N.: Biochem. J. **49**, 1 (1951).
2) Aldridge, W. N. and A. N. Davison: Biochem. J. **51**, 62 (1952).
3) Aldridge, W. N.: Biochem. J. **53**, 110(1953).
4) Aldridge, W. N.: Biochem. J. **53**, 117(1953).
5) Arthur, B. W. and J. E. Casida: 3rd Ann. Meeting, Ent. Soc. Amer. (Cincinnati, Ohio, (1955)).
6) Augustinsson, K. B.: Acta Pharmacol. Toxicol. **9**, 245 (1953).
7) Augustinsson, K. B. and G. Heimburger: Acta Chem. Scand. **8**, 753 (1954).
8) Augustinsson, K. B. and G. Heimburger: Acta Chem. Scand. **8**, 1533 (1954).
9) Chamberlain, R. W.: Am. J. Hyg., **52**, 153 (1950).
10) Cook, J. W., J. R. Blake and M. W. Williams: J. Assoc. Offic. Agr. Chem. **40**, 664 (1957).
11) Cook, J. W., J. R. Blake, G. Yip and M. W. Williams: J. Assoc. Offic. Agr. Chem. **41**, 399 (1958).
12) Cook, J. W., and G. Yip: J. Assoc. Offic. Agr. Chem. **41**, 407 (1958).
13) Frawley, J. P., H. N. Fuyat, E. C. Hagan, J. R. Blake and O. G. Fitzhugh: J. Pharmacol. Exptl. Therap. **121**, 96 (1957).
14) Hobbiger, F.: Brit. J. Pharmacol. **9**, 159 (1954).
15) 小島建一・石塚忠克: 防虫科学 **25**, 16 (1960).
16) March, R. B., T. R. Fukuto, R. L. Metcalf and M. G. Maxon: J. Econ. Ent. **49**, 185(1956).
17) 松原弘道: 防虫科学 **19**, 61 (1954).
18) 松原弘道: 防虫科学 **20**, 117 (1955).
19) Mazur, A.: J. Biol. Chem. **164**, 271(1946).
20) Metcalf, R. L., M. Maxon, T. R. Fukuto and R. B. March: Ann. Ent. Soc. Amer. **49**, 274 (1956).
21) Metcalf, R. L., T. R. Fukuto and R. B. March: J. Econ. Ent. **52**, 44 (1959).
22) Mounter, L. A., C. S. Floyd and A. Chanutin: J. Biol. Chem. **204**, 221 (1953).
23) Mounter, L. A. and V. P. Whittaker: Biochem. J. **54**, 551 (1953).
24) Mounter, L. A.: J. Biol. Chem. **209**, 813 (1954).
25) Murphy, S. D. and K. P. DuBois: Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. **96**, 813 (1957).
26) O'Brien, R. D.: J. Econ. Ent. **50**, 159(1957).
27) O'Brien, R. D., G. D. Thorn and R. W. Fisher: J. Econ. Ent. **51**, 714 (1958).
28) Okinaka, A. J., J. Doull, J. M. Coon and K. P. DuBois: J. Pharmacol. Exptl. Therap. **112** 231 (1954).
29) Perry, A. S. and W. M. Hoskins: Science **111**, 600 (1950).
30) Plapp, F. W. and J. E. Casida: J. Econ. Ent. **51**, 800 (1958).
31) 富沢長次郎・佐藤敦郎・山科裕郎・久保博司・宮原義雄: 日本応動昆大会講演要旨 (1958).
32) Winteringham, F., P. Loveday and A. Harrison: Nature **167**, 106 (1951).
33) Winteringham, F., A. Harrison and P. Bridges: Biochem. J. **61**, 359 (1955).
34) Woke, P. A.: J. Agr. Research **58**, 289(1939).

Résumé

The present investigations were attempted to study on the enzymatic detoxification of malathion and some other organophosphorus insecticides in the adults of the green rice leafhopper, *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler, in comparison with the livers of rat, *Rattus norvegicus*.

The enzymatic activity was determined by the Warburg manometric method according to the procedure of Cook et al.[11], except for the substrate solution was made by dissolving it in 2% Triton X-100 in the bicarbonate buffer, and the reaction was measured at 37.5°C. The following substances were used as substrates or inhibitors; malathion, malaoxon, DDVP, methyl paraoxon, paraoxon, parathion, Phosphamidon, CIBA 885 and Sevin, which were purified from the samples of technical grade materials by column chromatography or

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 CO_2 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 dotoxification 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 (東亜農薬株式会社 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緑化合物にかぎられ，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．