

Cholinesterase Inhibition and Metabolism of Schradan in Various Insects. Tetsuo SAITO (Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Anjo, Aichi, Japan) Received Oct. 28, 1960. *Botyu-Kagaku*, 26, 163, 1960 (with English résumé, 167)

29. 各種昆虫における schradan の代謝と cholinesterase 阻害について 斎藤哲夫 (名古屋大学農学部害虫学教室) 35. 10. 28 受理

Schradan はクモヘリカメムシ, クロカメムシ並びにツマグロヨコバイ成虫に対しては強い殺虫力を示すが, ニカメイガ幼虫, ワモンゴキブリ並びにイエバエ成虫に対しては殺虫力が低い。筆者はさきに P^{32} -schradan をもちいてこれらの昆虫体内における薬剤の分布を比較し, 感受性昆虫の中樞神経組織には非感受性のそれよりも多くの薬剤が集積することを示した。本報ではさらにこの問題についてこれらの昆虫の cholinesterase の感受性並びに代謝について検討した。schradan はいずれの昆虫の cholinesterase にも阻害作用は弱く, その酸化物の schradan N-oxide は 1,000~10,000 倍の強い阻害力を示した。そして, この酵素感受性並びに昆虫組織切片の P^{32} -schradan 代謝は昆虫の種類により異なった。しかし, これらは schradan に対する昆虫の感受性とは密接な関連が認められなかった。したがって, schradan の選択毒性の原因はここに検討した schradan の代謝能力の差異や昆虫の cholinesterase の感受性の差異よりもむしろ昆虫体内における薬剤の分布様相の差異が重要であると考えられる。

滲透殺虫剤とくに schradan は吸収性口器を有する昆虫には強い殺虫力を有するが, 咀しゃく性口器を有する昆虫には殺虫力が弱い。

この schradan の選択毒性の機作究明のために筆者²⁴⁾は P^{32} -schradan をもちいて昆虫体内における薬剤の分布移行を比較したところ, 感受性昆虫は非感受性昆虫よりも schradan の作用点と考えられる中樞神経組織に多くの薬剤が集積し, 感受性昆虫の神経組織への schradan の透過性は非感受性昆虫の組織よりも大きく, 神経組織を包む膜の透過性が schradan の選択毒性の原因の一つであることをあきらかにした。しかし, schradan は昆虫体内の神経の cholinesterase を阻害して殺虫作用を発揮するとされている。そこで, この選択毒性の原因について Casida, Chapman, Stahmann, Allen²⁵⁾ は昆虫の cholinesterase の毒物に対する感受性の差異によるものではないかと考えた。また, schradan は昆虫体内にはいり酸化の活性化をうけその代謝物が cholinesterase 阻害作用を起すため, この活性化代謝の相違が毒性の差異をひきおこす原因になるのではないかと考えられている^{4,8,10,20,25)}。

本報では, すでに報告した²⁴⁾ schradan 感受性並びに非感受性昆虫についてその毒性発揮に重要な関係をもつ cholinesterase の schradan およびその活性化物に対する感受性を比較するとともに P^{32} -schradan をもちいて昆虫組織による代謝能力の差異を比較検討して, これらが *in vivo* における毒性といかなる関係があるかをしらべた結果を報告する。

本文に入るにさきだち, つねにご懇篤なご指導を下さった名古屋大学農学部弥富喜三教授並びに京都大学

農学部内田俊郎教授, 河野達郎助教授に厚く御礼申しあげる。また供試昆虫の採集にご協力下さった石川県農業試験場友永富技師, 愛知県中山間営農指導所職員及び有益なご助言とご協力を下さった名古屋大学農学部兼久勝夫助手及び本多八郎技官に心からお礼申しあげる。

実験材料

実験にもちいたワモンゴキブリ *Periplaneta americana* L. の成虫雄, ニカメイガ *Chilo suppressalis* Walker の 3-4 令幼虫, イエバエ *Musca domestica* L. の成虫雌, ツマグロヨコバイ *Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler 成虫雌, クロカメムシ *Scotinophora lurida* Burmeister 成虫ならびにクモヘリカメムシ *Leptocoris varicornis* Fabricin 成虫はさきに報告した²⁴⁾ものと同様である。

P^{32} -標識 schradan は英国の Amersham の Radiochemical centre で製造されたもので 4.2mc/0.61g (1959年10月1日)の比放射能を有するものである。

実験方法及び結果

A. Cholinesterase 活性の測定

Hesterin¹²⁾の比色法に準じてつぎの様にを行った。

適量の 1/15M-磷酸塩緩衝液 (pH8.0) と生存供試昆虫を水冷しつつガラス製 Potter-Elvehjem 型ホモゲナイザーをもちいて磨砕し, 本液を 3000rpm で 5 分間遠沈し, 上澄を酵素液として 0.5cc づつもちい, これに 0.008M acetylcholine chloride 磷酸塩緩衝液 (pH8.0) 0.5cc を加え, 37°, 2 時間反応させ, 2M hydroxylamin 塩酸塩溶液並びに 3.5N 苛性ソーダ溶

液の等量混合液 2cc を加え、10分間放置し、これに 3.5/3N 塩酸 3cc を加え、さらに 0.1N 塩酸にとかした 0.3/2M 塩化第2鉄溶液 2cc を加え、沈澱物を分別し、この褐色液を島津光電分光光度計 Q B 2 型もちいて波長 540m μ で acetylcholine chloride ならびに酵素液を含まない液をブランクとして比色測定した。なお反応時間中における基質の非酵素的加水分解並びに酵素液による着色を補正するために測定にはつねに acetylcholine 液のみを同一反応条件に保ち、hydroxylamin 苛性ソーダ液を添加後同一酵素液を加えさき

分解させたのち、等量 chloroform で3回抽出し、未分解 schradan を抽出除去し、抽出残液について Allen¹⁾ の磷酸比色定量法にもとずき schradan N-oxide の濃度を測定した。かくして得た schradan N-oxide 濃度既知の chloroform 溶液をそのまま阻害実験に使用した。精製 schradan あるいはここに得た schradan N-oxide 濃度既知の chloroform 溶液の所定量を試験管にとり、通気して chloroform を除去し、これにさきと同様の操作で得た各種昆虫の酵素液を 0.5cc 加えて 37° に30分保ち、ついでさきと同じ acetylcholine

Table 1. Cholinesterase activities in various insects

	Cholinesterase activities
Rice stem borer (III-IV instar larva)	16.5 μ MACH/g/hr
American cockroach (male adult)	6.5
House fly (female adult)	404.4
Green rice leafhopper (female adult)	263.7
Black rice bug (adult)	3.7
Rice bug (adult)	12.3

と同様の操作により残存 acetylcholine を比色定量し、ここに得た値と酵素液を作用させた時の値との差をもって酵素により分解された acetylcholine 量とした。この方法により得た acetylcholinesterase 活性度は第1表にしめす如くである。

B. Schradan 並びに schradan N-oxide による cholinesterase 阻害度の測定

141.8-142.2°/3mm で蒸溜した schradan 0.7156g を 5cc の水にとかし、これに過マンガン酸カリ 0.79g, 塩化バリウム 1.55g を 90cc の水にとかした液 45cc を加え、37° で3時間反応させ、過マンガン酸カリが完全に褪色したのをたしかめて、等量の chloroform で3回抽出し、硫酸ソーダで乾燥後、適量まで減圧濃縮した。本液はさきに報告した如く²⁾、未反応の schradan が混在するため、その一部をとり、chloroform を通気除去し、0.1%炭酸ソーダ液 (pH10.8) を加え、30° に24時間保ち、不安定な schradan N-oxide のみを加水

chloride 磷酸緩衝液 0.5cc を加え、37° で2時間反応させ、以下さきと同様の操作により酵素活性を比色測定した。阻害剤を加えないで同様の操作を行った場合を正常活性値として阻害度の百分率で示せば第2、3表の如くである。

C. 昆虫組織切片による P³²-schradan の代謝

生存供試昆虫を凍結し、厚さ約 1mm の切片をつくり、切片 1g 当り、1/15M 磷酸塩緩衝液と 0.85% 塩化ナトリウム、0.04%塩化マグネシウム液の等量混合液 (pH7.1) にとかした 1 \times 10⁻²M P³²-schradan ringer 磷酸塩緩衝液 10cc を加え、時々振とうしつつ 30° に3時間保ち、反応後氷冷しつつガラス製 Potter-Elvehjem 型ホモゲナイザーで磨砕し、等量 chloroform で3回遠心抽出し、この chloroform 抽出液を合わせて、chloroform を減圧除去し、適量の 0.1%炭酸ソーダ液を加え 30° に24時間保ち、等量 chloroform で3回抽出する。この抽出物は schradan であり、炭酸ソーダ

Table 2. Percentage inhibition of cholinesterase by schradan observed in various insects

Molar concentrations	Rice stem borer	American cockroach	House fly	Green rice leafhopper	Black rice bug	Rice bug
2.0	72.2%	73.9	92.6	100.0	87.3	70.7
1.0	55.7	44.0	87.2	92.3	73.4	47.8
0.5	39.0	17.0	81.4	74.1	55.7	25.6
0.1	10.2	0.2	62.7	32.0	16.5	1.6
0.05	3.7	0.0	54.0	19.0	7.2	0.0
0.01	0.2	—	29.2	4.9	0.5	—
0.005	0.0	—	21.1	0.8	0.0	—

Table 3. Percentage inhibition of cholinesterase by schradan N-oxide in various insects

Molar concentrations	Rice stem borer	American cockroach	House fly	Green rice leafhopper	Black rice bug	Rice bug
2×10^{-2}	— %	100.0	—	100.0	100.0	100.0
1×10^{-2}	100.0	92.1	—	91.0	90.2	95.9
2×10^{-3}	75.9	14.2	—	65.2	44.0	26.6
1×10^{-3}	51.7	1.1	—	51.0	21.2	7.2
2×10^{-4}	6.0	0.0	100.0	17.4	1.2	0.0
1×10^{-4}	1.2	—	97.0	10.1	0.2	—
2×10^{-5}	0.0	—	72.7	1.5	0.0	—
1×10^{-5}	—	—	50.0	0.5	—	—
2×10^{-6}	—	—	12.1	0.0	—	—
1×10^{-6}	—	—	3.1	—	—	—
2×10^{-7}	—	—	0.0	—	—	—

Table 4. Metabolism of P^{32} -schradan by various insect slices (30° , 3 hrs.)

	Schradan	Schradan N-oxide	Hydrozates	Protein incorporates	Corrected	
					Hydrozates	Sachradan N-oxide
Rice stem borer	94.8%	1.2	3.8	0.2	3.6	1.6
American cockroach	90.2	1.0	7.9	0.9	7.0	2.8
House fly	93.4	1.7	4.5	0.4	4.2	2.4
Green rice leafhopper	92.6	1.2	5.6	0.6	5.0	2.4
Rice bug	97.0	0.8	1.8	0.2	1.7	1.3

液に残ったものは不安定な N-oxide の加水分解物に相当する。さきの磨砕液 chloroform 抽出液に等量の 2 N 蟻酸アルコール液を加え、氷冷し、4000rpm で 10 分間遠沈し、この操作を 3 回くりかえし、蟻酸アルコール抽出物即ち schradan の分解物と、沈澱物即ち蛋白結合物とを得る。ここに得た 4 分割の放射能を測定し、その割合を示せば第 4 表の如くである。

考 察

Metcalfe, March¹⁰⁾, Duspiva¹⁰⁾, O'Brien, Spencer^{20,21)} ならびに David, Gardiner⁷⁾ 等は schradan の各種昆虫に対する殺虫力を比較し、吸収性口器を有する昆虫には強い殺虫力を発揮するが咀嚼性口器を有する昆虫には極めて低い毒性を示すことを知った。筆者²²⁾もさきに報告した如く、schradan の腹部塗布処理において、本報にもちいたニカメイガ幼虫 ($LD_{50} > 26222\gamma/g$)、ワモンゴキブリ成虫 ($2170\gamma/g$)、イエバエ成虫 ($1932\gamma/g$) は低い感受性を示し、ツマグロヨコバイ成虫 ($160\gamma/g$)、クロカメムシ成虫 ($92\gamma/g$)、クモヘリカメムシ成虫 ($< 23\gamma/g$) の半翅目昆虫はさきの 3 種に較べてはるかに高い感受性を示した。

Schradan は昆虫体内にはいり、代謝活性化されて、中枢神経組織の cholinesterase を阻害して、神経の刺激伝達機能を破壊し、死に到らしめると考えられてい

る。そこで schradan の選択毒性の原因はこの作用機構から少くともつぎの 3 つの事項が重要な原因となるであろう。

1. 作用点と考えられる中枢神経組織への毒物の集積の難易
2. 神経の cholinesterase の毒物に対する感受性の差異
3. schradan の酸化的活性化あるいは解毒分解に関する代謝能力の差異。

第 1 の薬剤の神経組織への集積についてはさきに筆者が P^{32} -schradan をもちいた結果について報告した如く²⁴⁾、感受性昆虫では非感受性昆虫よりも容易に多量の薬剤が作用点に集中し、これが選択毒性の原因の一つと考えられる。

第 2 の酵素感受性についてはすでに他の有機磷殺虫剤についても数多くの検討がなされており、昆虫の種類を異にするとこの酵素の性質や阻害剤に対する感受性も異なることが報告されている^{2,17,22,26)}。そして Casida, Chapman, Stahmann, Allen²⁵⁾ は schradan 酸化物の cholinesterase 阻害作用をしらべ、感受性の高い昆虫はよりうすい濃度でこの酵素活性が阻害されるところから、schradan 活性化代謝物に対する cholinesterase の感受性の相違によるのではないかと述べている。そこで第 2 表、並びに第 3 表に示した結果に

Table 5. Molar concentrations of schradan and schradan N-oxide for 50 and 80% inhibitions of cholinesterase (from table 2, 3)

Inhibitors	Schradan		Schradan N-oxide	
	IN-50	IN-80	IN-50	IN-80
Rice stem borer	$8 \times 10^{-1} M$	2.7	1×10^{-3}	2.2×10^{-3}
American cockroach	1.2	2.3	4.2×10^{-3}	6.8×10^{-3}
House fly	4×10^{-2}	3.8×10^{-1}	9.8×10^{-6}	2.5×10^{-5}
Green rice leafhopper	2×10^{-1}	7.2×10^{-1}	9.8×10^{-4}	3.0×10^{-3}
Black rice bug	4.1×10^{-1}	1.3	2.4×10^{-3}	5.6×10^{-3}
Rice bug	1.1	2.8	3.2×10^{-3}	5.8×10^{-3}

ついて Gardiner, Kilby¹¹⁾が行った如く阻害度を probit に、薬剤濃度を対数にとり、阻害度—濃度直線を作図し、酵素活性を 50 並びに 80% 阻害する濃度を算出すると第 5 表の如くなる。

第 5 表に掲げた 50% 阻害モル濃度についてみると、schradan ではイエバエの cholinesterase が最も感受性が高く、ついでツマグロヨコバイ、クロカメムシ、ニカメイガであり、クモヘリカメムシとワモンゴキブリは最も低い感受性を示す。また schradan N-oxide においてもイエバエが最も感受性が高く、ついでツマグロヨコバイであり、ニカメイガ、クロカメムシ、クモヘリカメムシ並びにワモンゴキブリの酵素はお互にあまり差異のない低い感受性を示した。しかしこの阻害度—濃度直線はお互に平行的関係はなく、その回帰直線の傾きを異にするためさきへのべた 50% 阻害度を示す濃度のみで比較するのは十分でない。また Mengle, Casida¹⁵⁾が各種の有機燐剤をもちいて昆虫の中毒症状の発現と cholinesterase 阻害度との関係をしめした結果や、筆者²³⁾が行ったワモンゴキブリに処理した schradan の中毒症状発現と酵素阻害度との関係においても、昆虫体内においてその cholinesterase が 50% 内外阻害されている位では未だ明らかな中毒症状は発現されず、それが 80% 近くなるに及んで強い瘰癧性症状が発生する。また Narahashi, Yamasaki¹⁹⁾は神経機能とその cholinesterase 阻害度との関係をしらべ機能の変化はこの酵素が約半分阻害される様になって現われ、刺戟伝達のブロックされた時には酵素活性は全く失われていることを知った。従って cholinesterase 阻害作用については以上にのべたことからむしろ 50% 阻害度よりも高い 80% 阻害度で比較を行った方が *in vivo* における毒作用との関連により適当であろうと考える。そこで第 5 表に示した 80% 阻害度を示す薬剤のモル濃度を比較すると、schradan ではイエバエが最も高く、ついでツマグロヨコバイ、クロカメムシ、ワモンゴキブリ、ニカメイガ、クモヘリカメムシの順になる。schradan N-oxide に対してはイ

エバエが他の昆虫よりもはるかに高い感受性を示し、他の昆虫はほとんど大なる差異は認め難い。以上の考察から昆虫の種類を異にすることによりその cholinesterase の schradan あるいは schradan N-oxide に対する感受性は著しく異なるが、さきに報告した *in vivo* における schradan の毒性と比較すると比較的感受性の低いイエバエの酵素は極めて阻害されやすく、感受性の最も高いクモヘリカメムシの酵素は比較的阻害されにくく、酵素の毒物に対する感受性と毒性との間には一連の関係は認め難い、したがって、これらの昆虫においてはさきへのべた Casida, Chapman, Stahmann, Allen²⁾の結論とは一致しない。そこで昆虫の cholinesterase の毒物に対する感受性のみをもって schradan の選択毒性を説明し得ないかと断じざるを得ない。

第 3 の代謝能力の差異にもとづく選択毒性の原因としては、Duspiva¹⁰⁾, Du Bois, Boull, Coon⁹⁾は schradan 非感受性昆虫はその体内で cholinesterase 阻害作用の強い活性化代謝物を作らないのではないかと推論した。しかし、この推論は非感受性昆虫でも活性化作用を示すので否定されたが、昆虫の種類により活性化を強く示す組織の異なることから O'Brien, Spencer^{20, 21)}はこのことが選択毒性と関係があるのではないかと述べてをり、また Tsuyuki, Stahmann, Casida²²⁾は代謝生成物が異なるのではないかと考えている。また、schradan の解毒分解酵素については例えば malathionase^{5, 6, 27)}, paraoxonase¹³⁾, DFP-ase^{14, 18)}の如く明白な事実は判明していないが、すくなくとも毒性発揮に役立つ活性化代謝物の schradan N-oxide が極めて不安定で容易に加水分解することから、この代謝が逆に解毒分解機構に役立っているのではないかとの推論がなされている^{20, 21)}。そこで第 4 表に示した昆虫組織切片による P³²-schradan の代謝について検討するため、つぎに示す式にしたがって活性化量並びに分解量の補正を行うと第 4 表の補正值に示した如くなる。

補正活性化率%

$$= \frac{\text{N-oxide比放射能} + \text{蛋白結合比放射能}}{\text{最初にもちいた schradan の比放射能}} \times 100$$

補正分解率%

$$= \frac{\text{分解物比放射能} - \text{蛋白結合比放射能}}{\text{最初にもちいた schradan の比放射能}} \times 100$$

さて、schradan の毒性は活性化の強いほど、あるいは分解力の弱いほど大きいはずである。そこでここに得た数値と *in vivo* における毒性とを比較すると、感受性の高いクモヘリカメムシが最も低い活性化力を示し、感受性のはるかに低いニカメイガよりも小さい値である。また分解力（解毒力）においても感受性の高いツマグロヨコバイが非感受性のニカメイガやイエバエよりも高い値を示す。またこの活性化と分解との割合においてもこれらの昆虫の感受性とも一連の傾向を認め難い。したがって、さきに *Duspiva*¹⁰⁾ や *DuBois* 等⁹⁾ が推論した、schradan 非感受性昆虫は schradan を活性化させる能力を有しないのではないかとの推論は、その後 O'Brien, Spencer^{20), 21)} 等により否定されたと同様に本報においても否定される。そして、schradan の活性化あるいは解毒分解能力は昆虫の異なることにより差異は認められるが、*in vivo* における毒性との一連の関係は認め難く、これらの2つの能力の割合についてもその関係はない様である。

文 献

- 1) Allen, R. : *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940)
- 2) Babers, F. and Pratt, J. : *Physiol. Zool.*, **24**, 127 (1951)
- 3) Casida, J., Chapman, R., Stahmann, M. and Allen, T. : *J. Econ. Entomol.*, **47**, 64 (1954)
- 4) Chadwick, L. and D. Hill : *J. Neurophysiol.*, **10**, 235 (1947)
- 5) Cook, J., Blake, J., Yip, G. and Williams, M. : *J. Ass. Off. Agr. Chem.*, **41**, 397 (1958)
- 6) Cook J. and Yip, G. : *ibid.*, **41**, 407 (1958)
- 7) David, W. and Gardiner, B. : *Ann. Appl. Biol.*, **41**, 261 (1954)
- 8) Davison, A. : *Biochem. J.*, **61**, 203 (1955)
- 9) DuBois, K., Boull, J. and Coon, J. : *J. Pharmacol. Expt. Therap.*, **99**, 376 (1950)
- 10) *Duspiva*, F. : *Mitt. Biol. Zentralanstalt Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, **70**, 91 (1951)
- 11) Gardiner, J. and Kilby, B. : *Biochem. J.*, **51**, 78 (1952)
- 12) Herterin, S. : *J. Biol. Chem.*, **180**, 249 (1949)
- 13) Main, A. : *Biochem. J.*, **74**, 10 (1960)
- 14) Mazur, A. : *J. Biol. Chem.*, **164**, 271 (1946)
- 15) Mengle, D. and Casida, J. : *J. Econ. Entomol.*, **51**, 750 (1958)

- 16) Metcalf, R. and March, R. : *J. Econ. Entomol.*, **42**, 721 (1949)
- 17) Metcalf, R. and March, R. : *ibid.*, **43**, 670 (1950)
- 18) Mounter, L., Floyd, C. and Chnutin A. : *J. Biol. Chem.*, **204**, 221 (1953)
- 19) Narahashi, T. and Yamasaki, T. : *応動昆*, **4**, 64 (1960)
- 20) O'Brin, R. and Spencer, E. : *J. Agr. Food Chem.*, **1**, 946 (1953)
- 21) O'Brin, R. and Spencer, E. : *ibid.*, **3**, 56 (1955)
- 22) Roan, C. and Maeda, S. : *J. Econ. Entomol.*, **47**, 507 (1954)
- 23) 斎藤哲夫 : *防虫科学*, **25**, 57 (1960)
- 24) 斎藤哲夫 : *ibid.*, **25**, 64 (1960)
- 25) Tsuyuki, H., Stahmann, M. and Casida, J. : *J. Agr. Food Chem.*, **3**, 922 (1955)
- 26) Van Asperen, K. : *Ent. exp. & Appl.*, **1**, 130 (1958)
- 27) Yip, G. and Cook, J. : *J. Ass. Off. Agr. Chem.*, **42**, 405 (1959)

Résumé

Schradan is low toxic to the larva of rice stem borer, the adult of American cockroach and house fly, but it is highly toxic to the adult of rice bug, black rice bug and green rice leafhopper.

With regard to the selective toxicity, the author have discussed the distribution of P³²-schradan in susceptible and nonsusceptible insects.

This paper deals with the relationship between cholinesterase inhibitions, metabolisms and toxicities of schradan in those insects.

In activity of anticholinesterase, Schradan itself was very week but oxidized schradan (schradan N-oxide) was strong as much as 1,000—10,000 times in comparison with Schradan. Susceptibilities of cholinesterases in those insects to schradan and its N-oxides (Table 2, 3, 5) as well as metabolic rates of P³²-schradan of insect slices (Table 4) were diverse considerably, and any definite relationship was not found between enzyme inhibitions, metabolisms and toxicities.

It may be concluded that the selective toxicity of schradan to those insects is not due to the variation in their ability to metabolize schradan nor to the differences in sensitivity of insect cholinesterase to anticholinesterase agents, and it is attributed to the differences in the distribution of schradan in insect bodies.