

Studies on the Characteristics of Action of Fumigants. I. The Fifty Per Cent Knock Down Dose of Hydrogen Phosphide to the Azuki Bean Weevil, *Callosobruchus chinensis* L., Calculated from the Uptake Amounts of Oxygen by the Weevil. Kimihiko SATO, Yoshihiro HIGUCHI and Masana SUWANAI (Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo) Received October 26, 1972. *Botyu-Kagaku*, 38, 22, 1973. (with English Summary 25).

4. くん蒸剤の作用特性に関する研究 (第1報) アズキノウムシの酸素消費量によるリン化水素の50%ノックダウン症状を呈させる薬量の推算 佐藤仁彦, 樋口義広, 諏訪内正名 (東京農工大学農学部) 47. 10. 26 受理

アズキノウムシ成虫の酸素消費量および所定濃度のリン化水素ガスによる50%ノックダウン時間(KT₅₀)を測定した。

酸素消費量は温度の上昇につれて増加し, KT₅₀は減少した。

リン化水素の濃度(C)とKT₅₀値(t)との関係は $Ct=k$ (一定) という式で表わされた。

k×酸素消費量の値は, 温度の変化にかかわらず, 同様の値となった。

以上の結果を用いて, リン化水素がアズキノウムシ成虫の50%ノックダウン症状を呈させる薬量を推算したところ, 3.5ng/頭となった。

リン化水素(PH₃)はヨーロッパでは以前から貯殺害虫および植物検疫用くん蒸剤として用いられており, わが国においても使用されつつある。これは, メチルプロマイドやエチレンジプロマイドなどとは異なり, 無機化合物であるため, 有機合成殺虫剤とは異なった作用をすると考え, Bond *et al.*^{1,2)}はリン化水素が毒性を発揮するためには酸素が必要であると報告しており, また, Nakakita *et al.*³⁾はラット肝のミトコンドリアを用いて, リン化水素の呼吸酵素系阻害を見いだした。これらの知見から, リン化水素は呼吸作用によって生物体内へ入ることが示唆されるので, 本報においては, アズキノウムシを用いて, その酸素消費量を測定し, それと共に, アズキノウムシに対するリン化水素のくん蒸作用を詳細に観測し, 両者の関係を調べ, アズキノウムシを50%ノックダウンさせるのに必要なリン化水素の作用薬量を推算してみた。

材 料

供試虫: 28°C 恒温器中でアズキ(品種: 大納言)を餌にして累代飼育中のアズキノウムシで, 羽化後24時間以内, 平均体重 4.3mg の雌雄混性成虫である。

供試薬剤: 西ドイツ, デ・ゲッシュ社製のホストキシン錠剤で, 空気中の水分を吸収して1錠(3g)につき1gのリン化水素ガスを発生するとされている。

方 法

酸素消費量の測定

第1図に示すような, 虫を収容する金網カゴ(B)を吊した内容積67mlのガラス容器(A)を恒温水槽に設

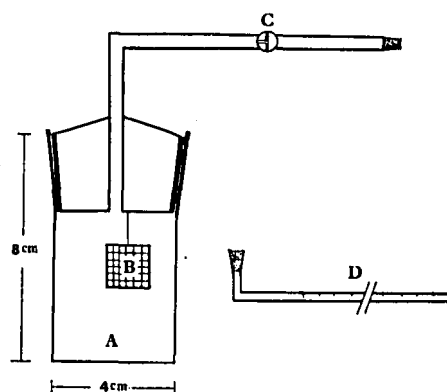


Fig. 1. Apparatus for determining oxygen uptake by azuki bean weevils.

A; vessel, 67ml, B; cage for confining the weevils, C; three-way tap, D; glass tube for measuring.

置し, Bの中へ虫1g(233頭)を閉じ込め, 静止状態にさせる。所定温度, 20, 30, 40°Cに保ちながら, 0.4%塩化ベンゼトニウム水溶液の入った内径3mmの気体測定用ガラス細管(D)の液柱移動距離を観測することにより虫の酸素消費量を求めた。AとDを連結するガラス管の中ほどにある三方コック(C)を5分毎に切りかえ, 180分間連続して観測した。なお, 虫が吐き出す二酸化炭素を吸収させるため20%水酸化カリウム水溶液5mlをAの底部に差し入れておいた。また, A内の気体を攪拌するために, 小型スターラーを稼働させておいた。

リン化水素の作用薬量観測法

所定濃度のリン化水素ガスを採取するには、諏訪内・石橋⁶⁾がメチルプロマイドガスを採取する際に用いた方法を応用して次のように行なった。第2図に示すような、内容積21.5lの大型ガラスビン(E)に所定濃

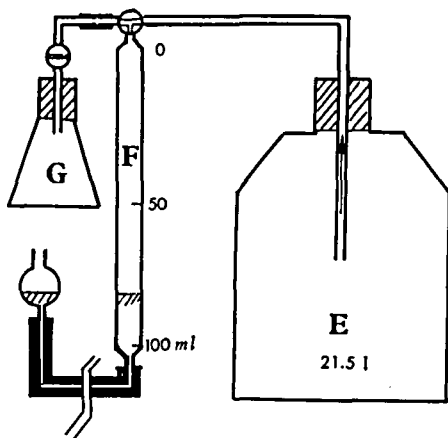


Fig. 2. Apparatus for observing knock down time of azuki bean weevils. E; glass bottle containing the original hydrogen phosphide gas, F; mercury gas pipett, G; flask for observing knock down time of the weevils by the gas.

度の濃厚ガスが発生するように所定量のホストキシン錠剤片を少量の水と一緒に差し入れ、ガスが漏れないようにガラス管のついた栓をして、連結された三方コックを閉じておく。E内のリン化水素ガス濃度の決定には、ガスクロマト法⁵⁾、リン化水素を酸化してリンモリブデン酸アンモンとした後定量する方法⁶⁾などがあるが、ここでは、White and Bushey⁷⁾が用いた方法を応用して次のように行なった。

$$PH_3 + 3HgCl_2 \rightarrow P(HgCl)_3 + 3HCl$$

 の反応により生ずる塩酸を水酸化ナトリウムで滴定し、

リン化水素量を求め、濃度を決定した。

E内の既知濃度のリン化水素ガスを、水銀を用いたガスピペット(F)を操作して必要なガス量を得るようにし、所定数の虫が差し入れてある観測用フラスコ(G)へ所要量のリン化水素ガスを導入し、コックを閉じてガス漏れないようにした。その際、Gをあらかじめいく分減圧しておき、ガスの導入による加圧を防ぐようにし、ガス導入後ただちにコックを調節して常圧に戻すようにした。所定温度20, 30, 40°Cに保管し、虫の行動を観察し、虫の50%がノックダウンするのに要した時間(以下KT₅₀という)を観測し、記録した。Gの内容積を、230, 345, 550, 1360, 2310mlと変え、また虫数を、10, 20, 40, 60, 80頭と変え、種々の実験条件下に実験をくり返した。

結果および考察

酸素消費量

5分間毎の虫1g当りの酸素消費量を、測定開始時から180分まで測定し、第3図のような結果を得た。各温度とも、測定値が安定する期間(120~180分)の値をみると、20°Cで100, 30°Cで230, 40°Cで380 μ l/g/5minであった。これらの値を各温度における酸素消費量とした。温度が高くなるにつれて、酸素消費量が多くなっていることがわかる。

リン化水素の作用

リン化水素の虫に対する作用は、低濃度で長時間、高濃度では短時間で効力が発揮される。作用効力を評価する指標として、ノックダウンを採用した。その理由は、ノックダウンした虫を測定用フラスコから外へ出してやると、間もなく動かなくなり致死したものと見なせるためである。

測定用フラスコの容積、虫数を変え、種々の組合せ条件により実験を行なったところ、それらの実験条件に関係なく、ガス濃度CとKT₅₀値tとの間には一定の関係が見られ、第4図に示したように、log C-log tは直線となった。これは虫に対する作用がガス濃度

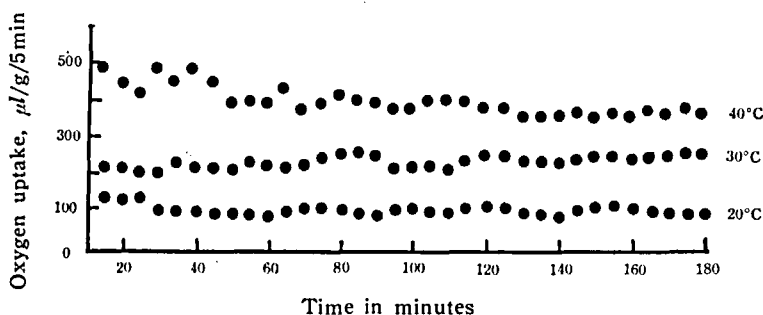


Fig. 3. Oxygen uptake by azuki bean weevils for each five minutes corresponding to the time at the temperature of 20, 30 and 40°C.

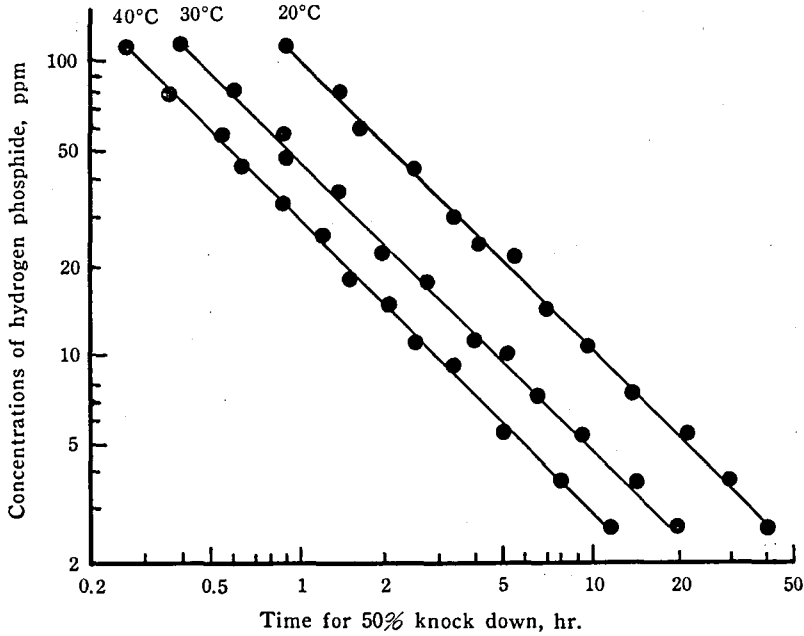


Fig. 4. Correlation between the concentrations of hydrogen phosphide in air and the fifty per cent knock down time of azuki bean weevils at the temperature of 20, 30 and 40°C.

に支配されていることを示す。この直線関係を書き変えると、 $Ct=k$ (一定) となる。この関係は諏訪内⁹⁾がアズキゾウムシに対する数種殺虫剤の気体濃度 (C) と致死時間 (t) との関係を検討して、 $Ct=k$ (一定) という実験式を導いたのと同様のものである。また、佐藤¹⁰⁾はマウスに対するリン化水素の濃度 (C) と致死時間 (t) との関係を求め、 $(\log C)t=k$ (一定) という実験式を導いたが、本実験の結果とは異なっていた。

第4図において温度が20, 30, 40°Cと上昇するにつれて直線が左へ平行移動しているのは、酸素消費量と関連していると考えられる。すなわち、先に述べたように、温度が高いほど酸素消費量が増大する。つまり、空気呼吸量が増大する。実験条件として、一定量のリン化水素が混合されている空気を用いているので、虫が体内にリン化水素を取り込む速度が早まることになる。その結果、虫がノックダウンするのに要する時間

が短縮されるためと考えられる。

実験条件に選ばれた各温度における C と、観測された t から $C \times t$ 値を求め、これに対応する酸素消費量 O_u を第3図から求め、それらの関連性を第1表にとりまとめた。それによると温度上昇に伴って、 $C \times t$ 値、 k は小さくなり、逆に O_u は大きくなっている。それらの数値に基づき、 $k \times O_u$ 値を算出してみたところ、表の最後の項に示したように、温度に無関係にはほぼ一定の値となることが判った。先に述べたように、実験に用いた空気には、温度に無関係に一定量のリン化水素が含まれている。このことから、温度に関係なく、一定量のリン化水素が呼吸によって虫体内に取り込まれれば、その毒作用により、ある特定の症状 (50%ノックダウン) を呈するというを示唆している。したがって、虫が呼吸しない状態におかれれば、リン化水素は虫体内に入ることができないので、毒作用を示

Table. 1. Correlation between $C \times t$ product and oxygen uptake by azuki bean weevils at the temperature of 20, 30 and 40°C.

Temperature °C	$C \times t$ product, k^*	Oxygen uptake, O_u $\mu\text{l/g/5 min}$	$k \times O_u$
20	105	100	1.05×10^4
30	47.5	230	1.09×10^4
40	29	380	1.10×10^4

* The product of the concentration of hydrogen phosphide in air, ppm, and the fifty per cent knock down time, hr.

Table. 2. The uptake weight of hydrogen phosphide to fifty per cent knock down of azuki bean weevils at the temperature of 20, 30 and 40°C.

Temperature °C	Oxygen uptake $\mu\text{l}/\text{weevil}/\text{min}$	Air uptake, Au $\mu\text{g}/\text{weevil}/\text{min}$	t^* min	P^{**} ng/weevil
20	0.086	0.58	630	3.6
30	0.196	1.23	290	3.5
40	0.329	2.03	175	3.5

* The fifty per cent knock down time of azuki bean weevils in the atmosphere containing 10 ppm hydrogen phosphide gas.

** The uptake weight of hydrogen phosphide to fifty per cent knock down of azuki bean weevils.

し得ない。酸素欠乏下においては、グラナリヤコクゾウなどの貯殺害虫に対してリン化水素が無毒であるという Bond *et al.*^{1,2)} の実験結果は当然の結果といえよう。

作用薬量の算出

アズキノウムシの呼吸による酸素消費の効率が100%であると仮定し、虫の50%がノックダウンする時の症状を指標にして、虫体内にどのくらいのリン化水素が侵入したときにそのような症状を呈するかを求めることを行なってみた。

第1表より、1分間当り虫1頭が消費する酸素量を計算した。空気の組成は主成分が窒素と酸素であり、酸素百分比が20.95%とされている。即ち、空気の平均分子量は28.9とみなせるので、先に求めた観測値に基き虫1頭が1分間に吸い込む空気量 Au を求めてみると第2表のようになる。一方、第4図から、リン化水素の濃度がある濃度 C のとき、それぞれの温度における、 C に対応する KT_{50} 値 t が読みとれる。いま、作用薬量 (体内に取り込まれ50%ノックダウンさせるに要する薬量) を P とすれば、

$$P = Au \times C \times t$$

となる。第2表の最後の項に掲げた作用薬量 P の値は C を 10ppm として計算した場合の数値である。20°C で 3.6ng/頭、30°C および 40°C で 3.5ng/頭という値になっている。同様の計算により他の濃度についても P の値は簡単に求まるが、いづれも同程度の値であるので省略した。以上の結果から、リン化水素のアズキノウムシ成虫に対する作用薬量 (50%がノックダウンするのに要する薬量) は、温度、濃度の条件にかかわらず約 3.5ng/頭であるという結論が得られた。同様にして、99%がノックダウンするのに要する薬量を求めたところ約 8.1ng/頭であったことをつけ加えておく。

文 献

- 1) Bond, E. J., H. A. Monro and C. T. Buckland: *J. stored Prod. Res.*, 3, 289 (1967).
- 2) Bond, E. J., J. R. Robinson and C. T. Buckland: *ibid.*, 5, 289 (1969).
- 3) Nakakita, H., Y. Katsuyama and T. Ozawa: *J. Biochem.*, 69, 589 (1971).
- 4) 諏訪内正名, 石橋定己: 農業生産技術 No. 26, 25 (1971).
- 5) Dumas, T.: *J. Agr. Food Chem.*, 12, 257 (1964).
- 6) Bruce, R. B., A. J. Robbins and T. O. Tuft: *ibid.*, 10, 18 (1962).
- 7) White, W. E. and A. H. Bushey: *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 1966 (1944).
- 8) 諏訪内正名: 農業技術研究所報告 C, 第7号, 113 (1957).
- 9) 佐藤仁彦: 衛生動物, 22, 218 (1971).

Summary

The uptake amounts of oxygen by the azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* L., were measured, and the weevils were observed the fifty per cent knock down time, KT_{50} , in flasks containing the atmosphere of various concentrations of hydrogen phosphide at the temperature of 20, 30 and 40°C.

The uptake amounts of oxygen, O_u , increased with the temperature rising. Correlation between the concentrations of hydrogen phosphide in air, C , and KT_{50} to the weevils, t , was according to the equation, $Ct = k$ (constant), moreover, k decreased with the temperature rising.

The products of k and O_u were constant at every temperature. Consequently, the effective dose of the fumigant to the weevil was found to depend on the uptake amounts of oxygen by the weevil. Therefore, the dose of hydrogen phosphide to fifty per cent knock down of weevils was calculated at about 3.5ng/weevil.