

Acknowledgement We wish to thank Mr. M. Uyeta, Kochi Prefectural Public Health Laboratory for analysing the leafhoppers and spiders, and Mr. K. Yamamoto, Laboratory for Pesticide Residues, Kochi Pref. Inst. Agric. & Forest Science, for analysing the soils and rice plants for BHC residues. Thanks are also due to Drs. J. P. Dempster, Monks wood Experimental Station, England; M. Chiba, Vineland Research Station, Canada Department of Agriculture; and C. Hirano, Kochi University, Japan.

References

- 1) Kiritani, K., T. Yushima and J. Kanazawa: *Kagaku*, 41, 306 (1971). (in Japanese)
- 2) Kobayashi, T.: Special Rep. on Prediction of Pest, Ministry of Agric. and Forestry, No. 3, 126 pp, (1961) (in Japanese, with English Summary).
- 3) Sasaba, T. and K. Kiritani: *Technocrat* 5, 50 (1972).
- 4) Carson, R.: *Silent spring*, Houghton-Mifflin Co., Boston 368 pp (1962).
- 5) Rudd, R. L.: *Pesticides and the living landscape*, Faber and Faber Ltd. London 320 pp (1964).
- 6) van Halteren, P.: *J. Econ. Entomol.* 64, 1055 (1971).
- 7) McClanahan, R. J.: *Nature* 215, 5104 (1967).
- 8) Dempster, J. P.: *Ent. exp. and appl.* 11, 51 (1967).
- 9) Moriarty, F.: *New Scientist*, 16, 594 (1972).
- 10) Moriarty, F.: *Sci. Total Environ.* 1, 267 (1972).
- 11) Kawahara, S., K. Kiritani and T. Sasaba: *Botyu-kagaku* 36, 121 (1971) (in Japanese, with English Summary).
- 12) Horiguchi, H.: *Plant Protection* 24, 461 (1970) (in Japanese).
- 13) Kiritani, K.: *Proc. Assoc. Pl. Prot. Shikoku*, 6, 1 (1971) (in Japanese).

Metabolism of Pyridafenthion, O, O-Diethyl-O-(3-oxo-2-phenyl-2H-pyridazin-6-yl) phosphorothioate, in Mouse and Rat. Takatoshi UDAGAWA, Tetsuo SAITO and Tadashi MIYATA (Laboratory of Applied Entomology and Nematology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, Japan) Received December 12, 1972. *Botyu-Kagaku*, 38, 75, 1973. (with English Summary 81)

11. Pyridafenthion, O, O-Diethyl-O-(3-oxo-2-phenyl-2H-pyridazin-6-yl) phosphorothioate のマウスおよびラットにおける代謝 宇田川隆敏, 斎藤哲夫, 宮田 正 (名古屋大学農学部害虫学教室, 名古屋市千種区不老町) 47. 12. 12 受理

³²P- および 3,6-pyridazine-¹⁴C-pyridafenthion をマウスおよびラットに経口投与し、一定時間毎に尿への排泄量、24時間後における糞、各種臓器における放射能を調べた。いずれの場合も急速に代謝され24時間後には ³²P-fenitrothion と同様に投与量の70%以上が尿に分解物として排泄された。3週間、100ppmの薬剤を連続投与しても ³²P-, ¹⁴C-pyridafenthion の代謝排泄は ³²P-fenitrothion の連続投与の場合と同様変化はなかった。投与薬剤の大部分は尿に水溶性物質として排泄され、ラットでは phenyl maleic hydrazide と desethyl-pyridafenthion-oxon、マウスでは phenyl maleic hydrazide とその glucuronide であった。従って pyridafenthion のマウス、ラットにおける主要な分解は P-O-aryl 開裂であり、¹⁴C-phenyl maleic hydrazide は ³²P-O, O-diethyl phosphorothioic acid と同様に急速に排泄された。

有機リン化合物はすぐれた殺虫力と高等動物に対する低い毒性、短い残留性から有機塩素系殺虫剤にかわって、近年代表的殺虫剤群となり、各種の化合物が実用されてきている。これらの化合物はいずれも五価のリンを中心としたもので、これに結合するアルキル基やアリル基等の置換によりその特性は著しくかわる。

本報では新規有機リン殺虫剤である pyridafenthion, O, O-diethyl-O-(3-oxo-2-phenyl-2H-pyridazin-6-yl) phosphorothioate、について ³²P または ¹⁴C で標識し、マウスやラットにおける代謝を調べたので報告する。

材料と方法

³²P-pyridafenthion および ¹⁴C-pyridafenthion はいずれも三井東圧化学株式会で合成されたもので、³²P-pyridafenthion は実験当初 13.0 mCi/g, ¹⁴C-pyridafenthion は pyridazine 環の 3, 6 の位置に ¹⁴C で標識したもので、比放射能は 1.116 mCi/g, 化学的純度は98%以上のものである。³²P-fenitrothion は ³²P-O, O-dimethyl thiophosphorochloride と sodium 3-methyl-4-nitrophenyl とを等モル脱水 methyl ethyl ketone 中で加熱攪拌し methyl ethyl ketone をロータリーエバポレーターで除き chloroform 一水に分配し, chloroform 層をとり脱水後 chloroform を除いた。当初の比放射能は 11.6 mCi/g で純度は97%以上であった。マウスおよびラットは実験動物中央研究所より購入したもので、マウスは ICR-JCL 系と DD 系で体重は 30~40g のもので、ラットは Wistar 系で体重は 150~160g のものである。

適当濃度に propylene glycol にとかした放射性殺虫剤を1頭当り 0.2ml あて金属製胃ゾンデをつけた小型注射器で胃内に経口投与し、代謝ケージに入れ、尿は一定時間毎に採集し、24時間後には糞を採集した。供試動物は ³²P-化合物の時は全体を -20°C で凍結し、小型肉ひき器でミンチして、一定量を取り chloroform と水で 3 回遠心抽出し chloroform 抽出物と水抽出物、沈でん物に分け Aloka 薄窓ガスフローカウンターで測定した。¹⁴C-化合物の場合は密閉代謝ケージに入れ通気し (400~600 ml/min) 一定時間毎に呼吸を methyl cellosolve : ethanolamine (2 : 1v/v) に吸収させ methanol で定容後、一定量をバイアルにとり PPO 3g, DMPOPOP 0.1g, toluene 1l のシンチレーターを 10ml 加え常法に従って Packard, Tri-Carb 2311型液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した。尿は一定時間毎に代謝ケージからとり出し methanol で定容後、一定量をバイアルにとり Bray (1960)¹⁾ のカクテル (PPO 4g, DMPOPOP 0.2g, naphthalene 60g, ethylene glycol 20ml, methanol 100ml, dioxane 1l) を 10ml 加え先と同様液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した。糞は 24時間後採集し methanol に一夜浸漬し抽出後、抽出液は先と同様に測定するとともに、残渣は、亀谷ら (1967)²⁾ の方法により湿式酸化し発生した ¹⁴CO₂ を捕集し測定した。供試動物は chloroform で麻酔後解剖し、肝臓、消化器、脳、心臓、肺臓、腎臓、脾臓、膀胱、精巣、血液をとり出し、細切し、残りの皮フ、筋肉、骨等は小型肉ひき器でミンチし、肝臓、消化器およびミンチは methanol に一夜浸漬し、抽出液は定容後バイアルにとり先と同様放射能を測定

した。さらにその時の残渣と他の臓器は秤量後一定量を糞と同様に湿式酸化し発生した ¹⁴CO₂ を測定した。

非放射性 pyridafenthion または fenitrothion を少量の acetone に溶かし、飲料水と粉末飼料に 100 ppm になるように加え、21日間連続投与し、21日目に ³²P- または ¹⁴C-pyridafenthion を先と同様に胃ゾンデにより経口投与し、代謝ケージに入れ、先と同様な方法により代謝排泄を調べた。

¹⁴C-pyridafenthion の実験において得た尿を集め、ロータリーエバポレーター (35°C) で濃縮し、20×20cm, 厚さ 0.25 mm の silica gel GF 254 の薄層プレートの原点にこの濃縮液をつけ、chloroform : methanol (9 : 1) または *n*-butanol : formic acid : water (6 : 1 : 2) で展開し、乾燥後、X線フィルムに1週間密着し、現像後、標準化合物の R_f 値と比較し、黒化部分をプレートからていねいに削りとりバイアルに入れ先と同様放射能を測定した。一方、東洋ろ紙 No. 51A の原点に濃縮液をつけ isopropyl alcohol : ammonia (3 : 1) または acetonitrile : ammonia : water (40 : 1 : 9) で 25cm 展開し乾燥後 Aloka 4π 低バックグラウンドペーパークロマトグラム自動測定装置を用いて放射能を測定、さらにX線フィルムに密着し現像後、標準化合物の R_f 値と比較した。

尿に存在する代謝物の薄層クロマトグラムの未知物質部分をていねいにかきとり、80% methanol で浸漬抽出後、ロータリーエバポレーター (35°C) で濃縮し、中西ら (1971)⁴⁾ の方法に準じて、1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 2ml にとかし、この液を 2 分し、一方に β-glucuronidase (Worthington Biochemical Corporate, 41U/g) 20mg を添加し、これと添加しない液とをともに 37°C, 15時間インキュベートし、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し methanol を加えて薄層クロマトグラフに付し、*n*-butanol : formic acid : water (6:1:2) で展開し、乾燥後X線フィルムに密着現像し、さらに原点からフロントまでを 5mm づつていねいに削りとり、それぞれバイアルに入れ液体シンチレーションスペクトロメーターで先と同様に測定した。実験はすべて 3 回繰返した。供試動物は各区 3 頭づつ使用した。

結果と考察

³²P-pyridafenthion と ¹⁴C-pyridafenthion を各系統のマウス、ラットに経口投与した時の代謝と排泄は、Table 1, 2 に示した。いずれの場合も急速に代謝排泄され、尿に投与量の約 70~90% が 24 時間後に排泄される。このことはリンを中心とした代謝物のみならず pyridazine 環も同様に急速に排泄されることを示している。

Table 1. Metabolism and excretion of orally applied ³²P-pyridafenthion in mouse and rat.

Dose (mg/kg)	Strain and sex	Chloroform extracts					Water extracts					Precipitates			
		Urine (hr)				Feces	Whole body	Urine (hr)				Feces	Whole body	Feces	Whole body
		3	10	24	Total			3	10	24	Total				
20	ICR-JCL male mouse	0.3	0.5	0.2	1.0	0.2	3.3	55.3	12.3	8.1	75.7	5.1	3.3	3.4	8.0
	ICR-JCL female mouse	0.7	0.6	0.6	1.9	0.6	1.0	30.4	22.4	8.9	68.3	2.2	2.8	8.4	14.8
	DD male mouse	0.9	0.6	0.5	2.0	0.6	0.5	42.3	18.4	11.1	71.8	3.0	2.2	15.5	4.4
	Wistar male rat	0.1	0.1	0.1	0.3	0.3	1.1	23.0	23.2	26.0	72.2	3.4	1.2	5.3	16.2
	Wistar female rat	0.2	0.2	0.1	0.5	0.1	1.2	33.7	33.2	14.4	81.3	2.7	3.1	3.6	7.5
200	ICR-JCL male mouse	0.6	1.0	0.2	1.8	0.1	1.9	39.1	21.9	16.9	77.9	6.3	2.2	2.7	7.1

1) Figures are expressed as percentage of the applied dose.

Table 2. Metabolism and excretion of ¹⁴C-pyridafenthion in male mouse (ICR-JCL) and male rat (Wistar).

Dose (mg/kg)	Animal	Urine (%)				Feces (%)	Tissues (%)			Recovery (%)
		3hr	6	24	Total		Liver	Gut	Others	
20	Mouse	34.4	13.2	41.7	89.3	2.1	0.1	2.2	1.1	94.7
	Rat	0.6	28.9	60.1	89.6	3.3	0.2	0.5	2.4	96.0
200	Mouse	58.4	11.8	13.3	83.5	4.1	0.5	3.2	2.8	94.1

1) The radioactivities in the expiration were less than 0.05%.

2) The radioactivities in the internal organs except liver and gut were less than 0.05%.

Table 3. Metabolism and excretion of orally applied ³²P-fenitrothion in untreated male mouse (ICR-JCL) and treated male mouse receiving 100 ppm of unlabeled fenitrothion in the drinking water and food over a 3 weeks period.

	Dose (mg/kg)	Chloroform extracts (%)					Water extracts (%)					Precipitates (%)			
		Urine				Feces	Whole body	Urine				Feces	Whole body		
		3hr	10	24	Total			3hr	10	24	Total				
Un-treated mouse	20	3.2	0.8	0.3	4.3	0.1	0.7	41.1	28.9	12.3	82.3	1.4	3.2	3.6	4.4
	200	0.5	1.2	2.1	3.8	0.1	8.0	25.7	14.3	20.3	60.3	1.9	4.3	10.9	10.7
Treated mouse	20	3.0	1.9	0.7	5.6	0.2	0.8	38.9	22.1	20.3	78.0	1.5	2.4	6.2	5.3

Table 4. Metabolism and excretion of ³²P-pyridafenthion (20mg/kg) in male mouse, ICR-JCL, receiving 100 ppm of unlabeled pyridafenthion in the drinking water and food over a 3 weeks period.

	Chloroform extracts (%)						Water extracts (%)						Precipitates (%)	
	Urine				Feces	Whole body	Urine				Feces	Whole body	Feces	Whole body
	3 hr	10	24	Total			3 hr	10	24	Total				
Untreated 100 ppm received	1.2	0.9	1.0	3.1	0.5	0.2	50.8	15.9	10.8	77.4	6.4	2.9	5.9	3.6
	1.5	1.1	1.2	3.8	0.3	2.5	46.8	19.1	9.8	75.7	4.0	3.8	4.6	5.3

Table 5. Metabolism and excretion of ¹⁴C-pyridafenthion (20mg/kg) in male mouse, ICR-JCL, receiving 100 ppm of unlabeled pyridafenthion in the drinking water and food over 3 weeks period.

	Urine (%)				Feces	Tissues (%)			Recovery (%)
	3 hr	6	24	Total		Liver	Gut	Others	
Untreated	47.3	22.0	21.6	90.9	4.5	0.1	0.5	1.6	95.6
100 ppm received	45.8	13.5	26.1	85.4	2.5	0.1	1.0	2.9	93.9

1) The radioactivities in the expiration and internal organs except liver and gut were less than 0.05%.

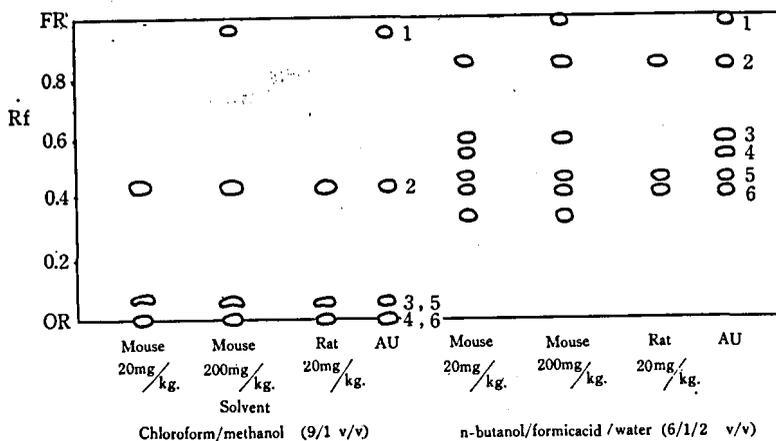


Fig. 1. Thin layer chromatograms of ¹⁴C-pyridafenthion and its metabolites in the urine of mouse and rat.

AU: authentic compounds

- 1; pyridafenthion 2; phenyl maleic hydrazide
- 3; desethyl-pyridafenthion 4; 3-Na salt
- 5; desethyl-oxon 6; 5-Na salt

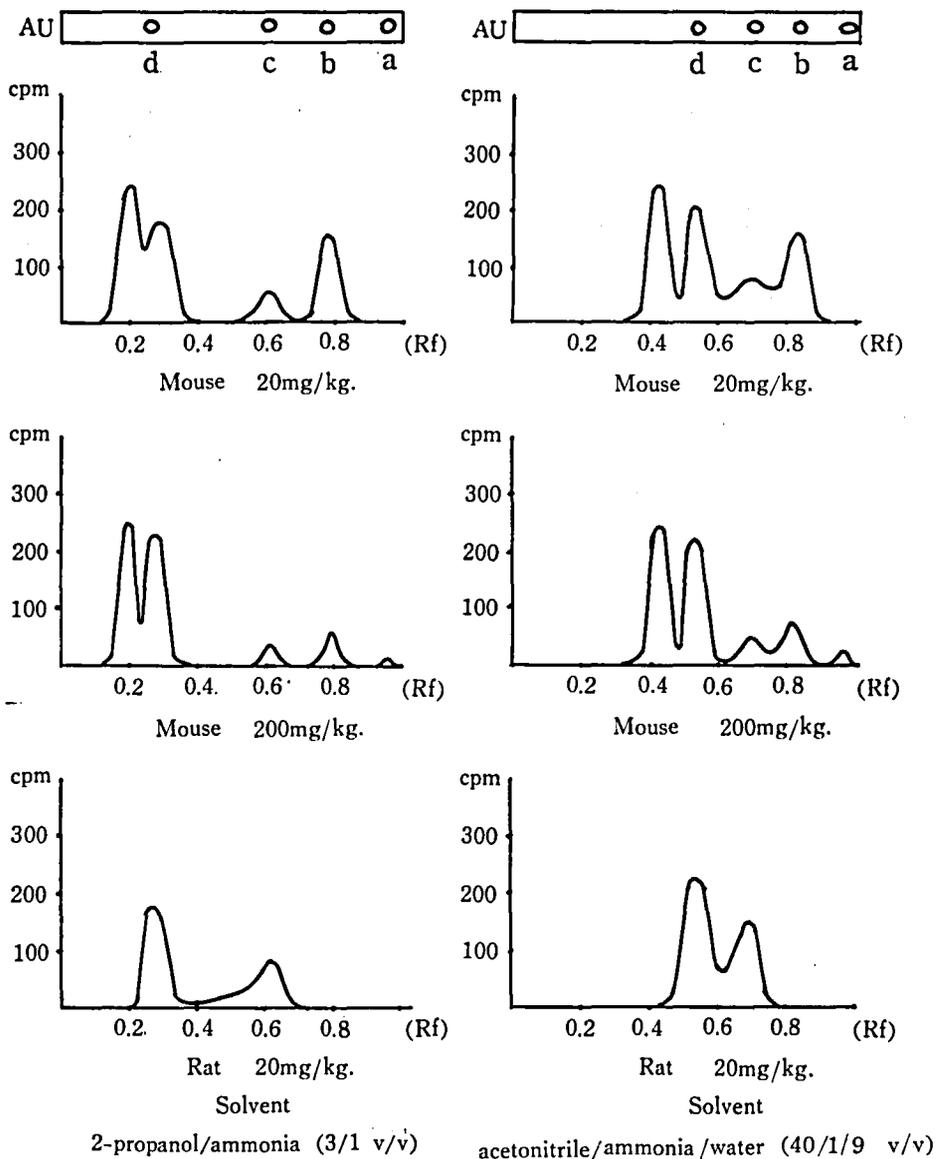


Fig. 2. Paper chromatograms of the metabolites of ^{14}C -pyridafenthion in the urine of mouse and rat.

AU : authentic compounds
 a ; pyridafenthion b ; desethyl-pyridafenthion
 c ; desethyl-oxon d ; phenyl maleic hydrazide

これは ^{32}P -fenitrothion についておこなった実験 (Table 3) でも同様であり pyridafenthion は fenitrothion と同様マウスやラットでは急速に代謝されると考えられる。

次に Tsumuki *et al.* (1970)⁵⁾がおこなったと同じく21日間非放射性 pyridafenthion を 100 ppm 飼料に

混入して連続投与した場合の ^{32}P -または ^{14}C -pyridafenthion の代謝を比較した。結果は Table 4, 5 に示したように、いずれの場合も21日間正常な飼料を与えたものと差異はなく ^{32}P -fenitrothion の場合も同様であった。

Fig. 1, 2 に示したように ^{14}C -pyridafenthion を

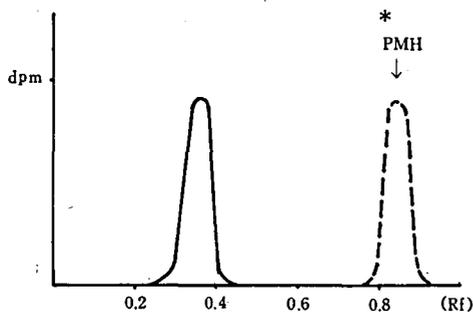


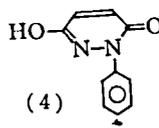
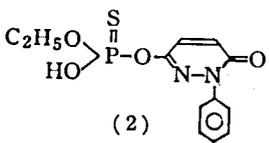
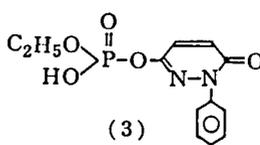
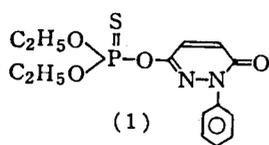
Fig. 3. Thin layer chromatogram of unknown metabolite
 solvent: *n*-butanol : formic acid : water (6 : 1 : 2)
 —: before the treatment with β -glucuronidase
 ---: after the treatment with β -glucuronidase
 * PMH : phenyl maleic hydrazide

投与したラットの尿中代謝物は phenyl maleic hydrazide と desethyl-pyridafenthion-oxon が主要なものであり、マウスの場合にはクロマトグラム上不明な代謝物が最も多かった、そこでこの部分をかきとり先に述べた方法で β -glucuronidase を作用させると ^{14}C -phenyl maleic hydrazide に相当する位置に放射能がえられた。以上の結果を総合すると Table 6 に示すようになり、マウスにおいては phenyl maleic hydrazide の glucuronide が主要な代謝物であり、ついで phenyl maleic hydrazide および desethyl-pyridafenthion, desethyl-pyridafenthion-oxon であった。pyridafenthion は pyridazine と phenyl ring をもつ興味ある殺虫剤であり、国武ら (1972)⁶⁾ によれば有機リン剤として比較的の低毒性である。すでに diazinone について報告されているように³⁾, ^{14}C -ring 部分も ^{32}P -*O,O*-diethyl phosphorothioic acid と同じく動物体内から急速に排泄された。

Table 6. Percentage of ^{14}C -pyridafenthion metabolites in the urine of mouse and rat.

Metabolites ^{a)}	Mouse 20 mg/kg	Mouse 200 mg/kg	Rat 20 mg/kg
Pyridafenthion (1)	0.0%	0.8%	0.0%
Desethyl-pyridafenthion (2)	29.6	11.8	0.0
Desethyl-pyridafenthion-oxon (3)	9.2	3.9	45.1
Phenyl maleic hydrazide (4)	17.8	33.2	54.9
Unknown ^{b)}	43.4	50.3	0.0

- a) Structural formulas are shown below.
 b) The unknown metabolite is shown to be glucuronide of phenyl maleic hydrazide in Fig. 3.



文 献

1) Bray, G.A.: *Anal. Biochem.*, 1, 279 (1960).
 2) 亀谷勝昭, 井上陽一, 丸山孝一: *Radioisotopes*, 16, 41 (1967).
 3) Mücke, W., K. O. Alt and H. O. Esser: *J. Agr. Food Chem.*, 18, 208 (1970).
 4) 中西美智夫, 加藤安之, 古田哲弥, 三浦誠二: *防虫科学*, 36, 116 (1971).

- 5) Tsumuki, H., T. Saito, T. Miyata and K. Iyatom: Biochemical toxicology of insecticides. (Ed. R. D. O'Brien et I. Yamamoto) Academic Press Inc., New York, 65 (1970).
- 6) 岡武栄三郎, 児玉泰, 信友浩一, 占部倫子, 石西伸: 日衛誌, 27, 111 (1972).

Summary

^{32}P - and 3,6-pyridazine- ^{14}C -pyridafenthion were administrated orally to mouse and rat, and the excretion in the urine at regular interval after treatment and the radioactivity of the feces and various organs at 24 hours after treatment were investigated. In all cases, more than 70% of administrated dose was excreted in the urine as decomposed products as in the case of fenitrothion.

When the animals were fed for a 3 weeks

period with unlabeled pyridafenthion at level of 100 ppm on a dairy matter and water, the rate of excretion of ^{32}P - and ^{14}C -pyridafenthion was not changed as in the case of ^{32}P -fenitrothion.

The greater part of administrated insecticide was excreted in the urine as water soluble substances. The main metabolites were phenyl maleic hydrazide and desethyl-pyridafenthion-oxon in the case of rat, and were phenyl maleic hydrazide and its glucuronide in the case of mouse, respectively.

Therefore, the main breakdown position of pyridafenthion in mouse and rat was the cleavage of P-O-aryl bond.

^{14}C -Phenyl maleic hydrazide and ^{32}P -O, O-diethyl phosphorothioic acid were excreted simultaneously and rapidly.

Metabolism of NS 2662 in the Mouse. Tadashi MIYATA and Tetsuo SAITO (Laboratory of Applied Entomology and Nematology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, Japan.) Received January 23, 1972. *Botyu-Kagaku*, 38, 81, 1973 (with English Summary 86)

12. マウスにおける NS 2662 の代謝¹⁾ 宮田 正, 斎藤哲夫 (名古屋大学農学部害虫学教室, 名古屋市千種区不老町) 48. 1. 23 受理

^{32}P -NS 2662 をマウスに経口投与し, 尿, 糞への排出速度, マウス全体およびマウス肝臓, 脳における代謝をしらべた。

1) マウスに経口投与した ^{32}P -NS 2662, ^{32}P -DMVP, ^{32}P -trichlorfon および ^{32}P -dichlorvos はともに投与12時間後には投与量の70~80%が体外に排出された。 ^{32}P -NS 2662 および ^{32}P -trichlorfon を経口投与し, マウス全体による代謝をしらべたところ, 両薬剤ともワモンゴキブリの場合に比べ一層急激に代謝され, それぞれの生物学的半減期は ^{32}P -NS 2662 では約90分, ^{32}P -trichlorfon では約80分であった。

2) 尿中およびマウス全体の分解物は, NS 2662 では大部分 dimethyl phosphoric acid と phosphoric acid であったが, trichlorfon の場合では前記2化合物の他 desmethyl-dichlorvos と monomethyl phosphoric acid も認められた。

3) マウスにおける NS 2662 の低毒性の原因の一つとして, マウスにおいて NS 2662 が急激に代謝, 排出されるためと考えられた。またマウスにおける NS 2662 の主要な代謝経路は P-C 結合の開裂と考えられた。

NS 2662 (O, O-dimethyl 2, 2-dichloro-1-hydroxyethyl phosphonate) をマウスに経口投与したところ, 有機リン剤中毒特有の激しい興奮, けいれん症状を示さず, まひ状態を呈し死亡し, その毒性も対照にもち

¹⁾ 本研究の一部は昭和46年度文部省科学研究費の援助を受けた。

いた trichlorfon より更に低かった。しかし, NS 2662の脱塩酸物質 DMVP (O, O-dimethyl 2-mono-chlorovinyl phosphate) を経口投与したマウスでは激しい興奮, けいれん症状を示し, 死亡し, 毒性も高かった¹⁾。

Trichlorfon の低毒性について, DuBois and Cot-