

The Inhibitions and Recoveries of Cholinesterase and Carboxyesterase Activities in the Mice and the American Cockroaches poisoned with Malathion. Ken'ichi KOJIMA and Tadayoshi ISHIZUKA (Institute of Agricultural Chemicals, Toa Noyaku Co., Ltd., Odawara, Kanagawa). Received Oct. 5, 1960. *Botyu-Kagaku*, 25, 144, 1960 (with English résumé, 155).

27. Malathion 被毒マウスおよびワモンゴキブリにおける cholinesterase と carboxy-esterase 活性の阻害と回復* 小島健一・石塚忠克 (東亜農薬株式会社 農薬研究所) 35. 10. 5 受理

Malathion 被毒マウス雄およびワモンゴキブリ成虫雌の中毒症状と脳 cholinesterase および肝臓または消しよく管 carboxyesterase 阻害との相互関係を比較検討した。兩種動物の兩種酵素は malathion の処理によって著しく阻害された。この兩種酵素の阻害反応速度、最大阻害時期、回復時期、回復速度は処理薬量やマウス雄とワモンゴキブリ成虫雌とで異なる。はげしい中毒症状や死は兩種動物とも脳 cholinesterase および肝臓または消しよく管 carboxyesterase の最大阻害期以後に観察された。malathion 処理による代謝活性物質に対する兩種酵素の感受性はマウス雄とワモンゴキブリ成虫雌とで著しく異なり、マウス雄では肝臓 carboxyesterase より脳 cholinesterase の方が、ワモンゴキブリ成虫雌では脳 cholinesterase より消しよく管 carboxyesterase の方が感受性が高かった。この結果は *in vitro* における兩種酵素の malaoxon に対する感受性の順序と一致する。*in vivo* における兩種動物の兩種酵素の阻害反応は可逆的であった。本文において、著者らは carboxyesterase の malathion に対する基質分解反応と malaoxon による阻害反応機構を電子論的に説明するとともに、有機燐化合物の哺乳動物と昆虫に対する選択毒性について論議した。

有機燐剤の毒作用と cholinesterase (以下 ChE と略す) 阻害作用との関係を研究した業績はきわめて多く^{1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), 12), 13), 14), 15), 16), 17), 18), 19), 20), 21), 22), 23), 24), 25), 26), 27), 28), 29), 30), 31), 32), 33), 34), 35), 36), 37), 38), 39), 40), 41), 42), 43), 44), 45), 46), 47), 48), 49), 50), 51), 52), 53), 54), 55), 56), 57), 58), 59), 60), 61), 62), 63), 64), 65), 66), 67), 68), 69), 70), 71), 72), 73), 74), 75), 76), 77), 78), 79), 80), 81), 82), 83), 84), 85), 86), 87), 88), 89), 90), 91), 92), 93), 94), 95), 96), 97), 98), 99), 100)}。O'Brien¹⁰⁾, Mengle and Casida¹⁶⁾ はワモンゴキブリおよびイエバエ成虫の malathion による中毒症状と *in vivo* における脳 ChE との関係について報告した。さらに著者ら^{8), 9), 10)} は、哺乳動物と昆虫に存在する carboxyesterase (以下 Carboxy-E と略す) について研究し、本酵素は動物の種類、組織によって異なるが *in vitro* において malaoxon によって阻害され、その阻害作用は哺乳動物では弱く、昆虫では強いことを指摘した。またマウス雄およびワモンゴキブリ成虫雌について malathion と malaoxon の主要解毒部位を明らかにし、malathion の選択毒性の原因について論じた。有機燐剤による被毒動物の体内における解毒酵素の動的变化や、さらに ChE 阻害作用との相互関係を比較生化学的に究明した研究は見当らない。著者らは malathion 被毒マウス雄およびワモンゴキブリ成虫雌の中毒症状と脳 ChE ならびに主要解毒部位における Carboxy-E の動的变化について調べたので、ここにその概要を報告する。

本文に入るにさき、終始ご指導を賜った当社研究所所長平塚喜造博士、有益なご助言を賜った名古屋大学弥富三教授、八洲化学工業株式会社研究所酒井清六氏、発表に当り種々ご教示を賜った京都大学内田俊郎教授ならびに河野達郎助教授に厚くお礼申

し上げる。またこの研究は当研究所永江祐治、故渡辺智夫、椎野明雄、田中文一の諸氏の熱心な助力に負うところが大きい。記して感謝の意を表する。

I *in vivo* における ChE および Carboxy-E の阻害と回復

実験材料および方法

1) 供試薬剤：本実験に用いた malathion 原薬は前報⁹⁾に記したものと同じで、溶出クロマトグラフ法によって精製した純品を使用した。

2) マウスでの実験：上記原薬を用いてつぎの組成の malathion 乳剤を調製した。

malathion	50%
Xylene	30%
Newkalgen 2006	20% (w/w)

この乳剤を水で稀釈し、前報⁹⁾に記したものと同一マウス *Mus musculus musculus* 雄個体を供試し、体重 kg 当り malathion 100, 250, 500 mg 相当量を経口投与した。なお、無処理のマウス雄を対照とした。処理したマウス雄は5頭を1区として直径 15.0 cm, 高さ 7.5 cm の腰高シャーレーに収容し、オリエンタル酵母株式会社製の動物用固形飼料と新鮮なカンラン緑葉を与えて 25° 恒温室で飼育した。実験は各処理区

* 殺虫剤の解毒に関する研究 第5報

について 5~18 頭を使用し、投薬後 1, 2, 4, 8, 12 および 24 時間に各処理区より正常状態の個体 3 頭を選び前報¹⁰⁾に記載した方法に準じて解剖し、肝臓と脳を摘出した。摘出した組織は酵素活力の測定時まで 0~-5° に冷蔵した。肝臓酵素液は 3 頭分を乳鉢でよく磨砕し、その 1 部 300mg を別の乳鉢にとり、重炭酸塩緩衝液 (0.150M NaCl, 0.040M MgCl₂, 0.025M NaHCO₃) 6ml を加えてよく攪拌混合し、二重ガーゼで濾過した⁹⁾。また、解剖時には中毒症状を正常、麻痺、致死の 3 段階に分けて観察した。

3) ワモンゴキブリでの実験

実験に用いたワモンゴキブリ *Periplaneta americana* L. は前報⁹⁾に記載したものと同じで動物用固形飼料を用いて長年連続飼育した東京大学系の雌成虫である。薬剤処理は前記の精製 malathion の 0.5% あるいは 1% acetone 溶液を前報¹⁰⁾に記載したと同じ“AGLA”micrometer syringe を用いて供試虫の腹部腹面中央に 1~5 滴滴下した。この方法で acetone 液 1 滴は 0.001ml であり、個体当り malathion 10, 25, 50 μ g 相当量を処理したことになる。同様に acetone のみ 5 滴滴下した個体群を対照とした。処理部位を腹部腹面中央に選定した理由は、解剖時に処理した malathion によって摘出組織の汚染をできるだけ防止するためである。

処理した虫は 5 頭を 1 区として直径 12cm 高さ 3cm のシャーレーに収容し、5% ミルク・蔗糖液を与えて 25° 恒温室で飼育した。実験は各処理区について 15 頭を供試し、処理後 1, 2, 4, 8, 12 および 24 時間に各処理区より正常状態の個体 5 頭を前報⁹⁾に記載した方法に準じて背中線に沿って切開し、消しよく管と頭部から脳を摘出した。摘出した組織は酵素活力の測定時まで 0~-5° に冷蔵した。消しよく管酵素液は 5 頭分を乳鉢でよく磨砕し、重炭酸塩緩衝液 5ml を加えてよく攪拌混合し、二重ガーゼで濾過した⁹⁾。また、解剖時には中毒症状を正常、興奮、仰転倒伏の 3 段階に分けて観察した。ChE および Carboxy-E 活性の測定は両種動物についていずれの場合も摘出後 3 日以内に終了するようにした。

4) Carboxy-E 活力の測定法

本酵素の活力は前報⁹⁾に記載したと同じでワールブルグ検圧法によって測定した。酵素の活性値は対照酵素液の活力を 100 として算出した。

5) ChE 活力の測定法

Ammon¹¹⁾の方法を改変してワールブルグ検圧法を用いて測定した。マウス雄脳 ChE の分布および活性は脳の領域によって異なると思われるので、予備的に脳の最前部より 4 等分し、各部位を乳鉢でよく磨砕

し、それぞれその 1 部 50mg を別の乳鉢にとり、重炭酸塩緩衝液 5ml を加えてよく攪拌混合し、常法によって酵素活性を測定した結果、ChE 活力は脳の最前部より 118, 58, 64, 42 μ l CO₂/20 min. を示し、各部位によって相違が認められた。それゆえ、本実験ではマウス雄 3 頭分の脳全体を乳鉢でよく磨砕し、その 1 部 100mg を別の乳鉢にとり、重炭酸塩緩衝液 10 ml を加えてよく攪拌混合し酵素液とした。

ワモンゴキブリ成虫雌の脳は 5 頭分を乳鉢でよく磨砕し、重炭酸塩緩衝液 5ml を加えてよく攪拌混合し酵素液とした。

酵素活力の測定は反応容器の側室に 0.008M の acetylcholine bromide (以下 ACh-Br と略す) 0.5 ml を入れ、主室に酵素液 1.0ml と重炭酸塩緩衝液 1.5ml を入れた。ついで炭酸ガス 5% と空素 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置換した。検圧計容器は 37.5° の恒温水槽に入れて 10 分間放置した後、側室の ACh-Br 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 分毎に酵素の作用によって発生する CO₂ を 30 分間測定し、得た結果を μ l CO₂/hour に換算して ChE の活性値を求めた。なお、基質の自家分解がきわめて僅かあったので補正し、酵素の活性値は対照酵素液の活力を 100 として算出した。

実 験 結 果

上記の方法によって得た malathion 被害による両種動物の中毒症状と中枢神経組織 ChE およびマウス雄肝臓またはワモンゴキブリ成虫雌消しよく管 Carboxy-E の阻害と回復との関係を図示すると、第 1 図および第 2 図の通りである。

本実験は両種動物ができるだけ生き残り得る薬量と観察時間の範囲内で実施した。両種動物の処理薬量が高、中および低薬量区の 3 段階に分けた。中薬量区はマウス雄の場合、経口投与 72 時間後の 50% 致死薬量 (以下 Oral LD₅₀ と略す) 350mg/kg に大略相当し、ワモンゴキブリ成虫雌の場合、局所塗布 72 時間後の 50% 致死薬量 (以下 Topical LD₅₀ と略す) 24mg/kg に相当する。高薬量区はそれぞれ中薬量区の 2 倍量、低薬量区は中薬量区の 1/2 量であった。高および中薬量区の 1 部の個体は処理 24 時間以内に致死した。

第 1 図のマウス雄での実験結果によると、マウス雄脳の ChE と肝臓 Carboxy-E 活性は処理後時間的に変化し、活性の低下は処理薬量の増加にともなって増大し、高薬量ほどはげしい中毒症状の発現が観察された。また、マウス雄の脳 ChE は肝臓 Carboxy-E より時間的に早くかつ強く阻害され、両種酵素の最大阻

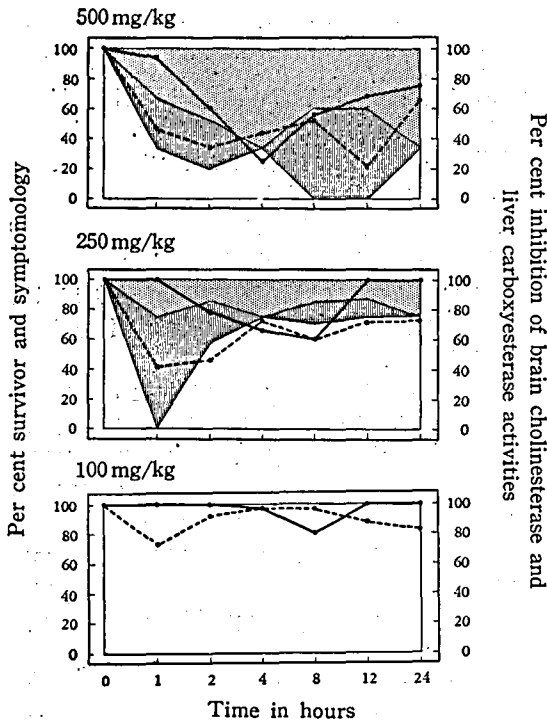


Fig. 1. Time mortality and symptomology curves with brain cholinesterase and liver carboxyesterase activities of the surviving male mice following oral administration with malathion.

- Death
- Paralysis
- Normal
- Brain cholinesterase
- Liver carboxyesterase
- 実線

害期はかならずしも一致しなかった。マウス雄の致死量以下の薬量区における生存個体の脳 ChE は一般に肝臓 Carboxy-E より活性低下の割合が高かったが、致死量区では大体同じか、その逆であった。

Malathion 被害による脳 ChE および肝臓 Carboxy-E の最大阻害期は処理薬量によって多少異なるが前者は処理 1～1.5 時間後に、後者は処理 4～8 時間後に観察された。

低薬量区では中毒症状は発現しなかった。脳 ChE および肝臓 Carboxy-E の活性値はそれぞれ正常の前で 70%，後で 80% 以下に低下することはなかった。そして、前者は処理 4 時間後に、後者は処理 12 時間後にそれぞれ正常値あるいはそれに近い値まで回復した。

中薬量区における生存個体（処理後 1 時間区は軽い

中毒症状を示す個体群）の脳 ChE の最大阻害期は処理 1 時間後に認められ、その活性は正常値の約 40% に低下し、その後、処理 24 時間後に正常値の約 73% まで回復した。しかし、肝臓 Carboxy-E の活性は脳 ChE の最大阻害期にはまだ正常であって、その最大阻害期は処理 8 時間後に認められ、その活性は正常値の約 60% であった。その後正常個体の肝臓 Carboxy-E は速かに回復し、処理 12 時間後には正常値に戻った。高および中薬量区の供試個体で脳 ChE の活性が正常値の 50% 以下に阻害された個体では不活動、苦悶状態を示す外見の中毒症状が認められ、感受性個体は死亡した。通常、その後脳 ChE の活性が 50% 以上に回復した個体は生き残った。

高薬量区では脳 ChE の最大阻害期（処理 2 時間後）

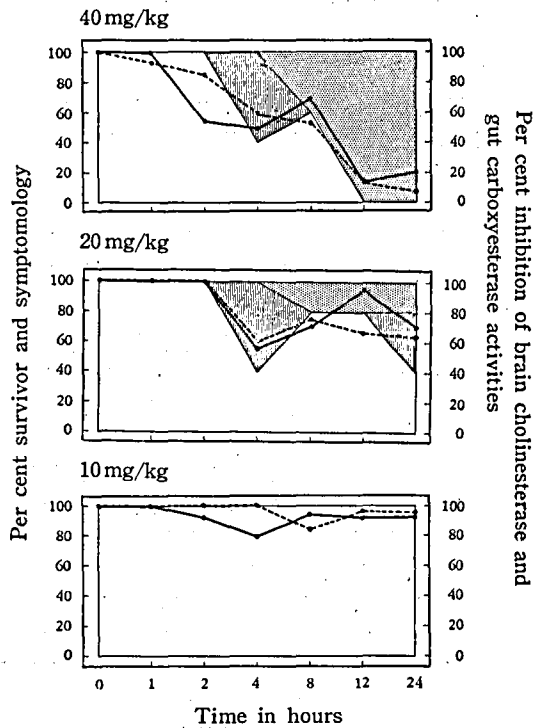


Fig. 2. Time mortality and symptomology curves with brain cholinesterase and gut carboxyesterase activities of the surviving female American cockroaches following topical treatment with malathion.

- Knock down
- Excitation
- Normal
- Brain cholinesterase
- Gut carboxyesterase

の後期に致死率の高い時期（処理4時間後）が認められ、この時期に肝臓 Carboxy-E 活性は最も強く阻害されていた。一般に強い中毒症状は脳 ChE や肝臓 Carboxy-E の最大阻害期以後に観察されたが、処理8、12時間後の麻痺個体でも両酵素の活性はいずれも回復する。しかし、その回復は脳 ChE より肝臓 Carboxy-E の方が速いである。

第2図のワモンゴキブリ成虫雌での実験結果によると、malathion の被毒によって消しよく管 Carboxy-E は脳 ChE より時間的に早くかつ強く阻害される点でマウス雄の結果と著しく異なる。

被毒による脳 ChE の最大阻害期は処理薬量によって異ったが消しよく管 Carboxy-E のそれは処理薬量に関係なく処理4時間後に認められた。

低薬量区では中毒症状は認められず、脳 ChE および消しよく管 Carboxy-E 活性はそれぞれ正常値の80%以下に低下しなかった。そして、前者は処理12時間後に、後者は処理8時間後に正常値あるいはそれに近い値まで回復した。

中薬量区における正常個体の脳 ChE の最大阻害期は処理4時間後に観察され、その活性は正常値の約60%まで低下し、その後漸次回復し、処理12時間後には正常に近い値まで回復した。興奮は大体脳 ChE の最大阻害期に観察され、仰転倒伏 (knock down) は脳 ChE 活性が正常値の約70%に回復した時に始まった。そして、致死するまで相当長時間を要した。他方、消しよく管 Carboxy-E 活性は正常の約56%に低下したが、その後正常に近い値まで回復する傾向が観察された。しかし、ふたたび処理24時間後に脳 ChE および消しよく管 Carboxy-E の両活性が低下する傾向が認められる。これは調査時の個体に比較的中毒症状の進んだ供試虫が含まれたものと考えられる。

高薬量区では処理12時間後に大部分の供試虫が中毒し、正常個体について両酵素の活性を測定できなかった。処理12～24時間後の仰転倒伏個体における脳 ChE および消しよく管 Carboxy-E 活性はいずれも正常の20%以下に阻害されていた。

II Malathion 被毒マウス雄肝臓および ワモンゴキブリ成虫雌消しよく管 Carboxy-E の *in vitro* における回復について

前項に述べたように、ワモンゴキブリ成虫雌消しよく管およびマウス雄肝臓 Carboxy-E は malathion の処理によってその活性が阻害されるが、生存個体では漸次回復する。さきに若者ら¹⁰⁾は *in vitro* の実験において malaoxon が Carboxy-E 作用を阻害し、またワモンゴキブリ成虫雌の各組織に存在する Carboxy-

E は malaoxon を分解解毒する能力がないことを報告した。malathion は哺乳動物や昆虫の組織によって活性化され malaoxon を産出する^{12,14,21)}。したがって、*in vivo* における Carboxy-E の阻害は malaoxon によるものと考えられ、生存個体における回復現象は本酵素が新に生産されるか、阻害された Carboxy-E (磷酸化酵素) が脱磷酸して再び活性を取戻すかのいずれかである。この点を明らかにするため、つぎの実験を行った。

実験材料および方法

1) 供 試 薬 剤：本実験に用いた malathion および acethion は前報¹⁰⁾に記載したものと同じで、溶出クロマトグラフ法によって精製した純品を使用した。

2) ワモンゴキブリでの実験：前項に記載したと同じワモンゴキブリ成虫雌の健全個体8頭を選び、そのうち5頭の腹部腹面中央に前記の方法によって1% malathion-acetone 溶液を5滴、すなわち、個体当たり50 μ g を局所塗布した。処理個体の飼育管理および消しよく管の摘出方法は前項に述べた通りである。消しよく管の摘出は処理16時間後 (Carboxy-E の阻害度は約90%に相当する) に行った。摘出した5頭の消しよく管は乳鉢でよく磨砕し、重碳酸塩緩衝液5mlを加えて酵素液 (1gut/ml) とした。また同様に acetone のみを個体当たり5滴滴下した3頭の対照個体の消しよく管を乳鉢でよく磨り潰し、重碳酸塩緩衝液6mlを加えて対照酵素液 (0.5gut/ml) とした。酵素活力の測定は前項記載の方法に準じた。

実験法A 処理区の酵素液 1.0ml (1gut/ml) または無処理区の対照酵素液 0.5ml (0.25gut/ml) を主室に入れ、さらに重碳酸塩緩衝液を加えて2.5mlとした。側室には基質として acethion 0.5ml (6mg/ml) を入れて常法で酵素活力を測定した。基質として acethion を選定した理由は、本酵素の基質に対する活性が malathion に比べて acethion で高く¹⁰⁾、阻害された Carboxy-E の脱磷酸化による酵素活性の回復を明瞭に観察できると考えたからである。

実験法B 処理区の酵素液 1.0ml (1gut/ml) または無処理区の対照酵素液 1.0ml (0.5gut/ml) を用い、基質に malathion 0.5ml (6mg/ml) を用いて acethion と比較したほかは実験法Aと同じである。

阻害された Carboxy-E の脱磷酸化を証明するに当り、処理区の酵素液による基質分解初速度 *a* と無処理区の対照酵素液のそれ *b* を一致させて測定し、その後の基質分解量の比率を求めるのが妥当であると考えられるが、それは実験操作がきわめて困難である。そこ

で上述のように、実験法Aでは $a > b$ 、実験法Bでは $a < b$ にして測定し、基質分解量の比率を求めて結果を考察することにした。

3) マウスでの実験

実験方法をかえて *in vitro* の手法だけを用いて阻害された Carboxy-E の脱リン酸化の証明を試みた。すなわち、前項に記載したと同じマウス雄の健全個体より肝臓を摘出し、その 200mg と malaoxon 2000 μg とを乳鉢でよく磨砕混合し、室温に 30 分間放置し、重炭酸塩緩衝液 4.0ml を加えてよく攪拌混合し酵素液Aとした。また、同じ肝臓切片 200mg のみを乳鉢でよく磨り潰し、重炭酸塩緩衝液 4.0ml を加えて操作したものを対照酵素液Bとした。酵素活力の測定はすでに述べた方法を用いた。すなわち、主室に酵素液Aまたは対照酵素液Bを 1.0ml と重炭酸塩緩衝液 1.5ml を入れ、2.5ml としたものを反応液(AまたはB)とした。また、対照酵素液Bを 0.15ml と重炭酸塩緩衝液 2.35ml を入れて 2.5ml にしたものを反応液 B₁ とした。側室には基質として malathion 0.5ml (6mg/ml) を入れて常法にしたがって測定した。

実験結果

前記の方法によって得たワモンゴキブリ成虫雌の消

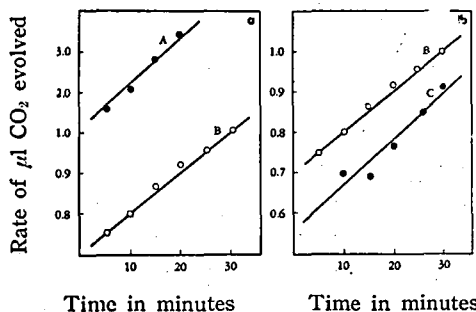


Fig. 3. Recovery *in vitro* of inhibited gut carboxyesterase of the female American cockroaches at 16 hours after topical treatment with 40 mg/kg of malathion.

- A. Enzyme of malathion treated roaches 1.0ml (1gut/ml)/enzyme of malathion untreated roaches 0.5ml (0.5gut/ml), used acethion as substrate.
- B. Enzyme of malathion treated roaches 1.0ml (1gut/ml)/enzyme of malathion untreated roaches 1.0ml (0.5gut/ml), used acethion as substrate.
- C. Enzymes are the same with A except malathion used as substrate.

しよく管についての実験結果を図示すると第3図a, bの通りである。

第3図aの直線Aは実験法A、直線Bは実験法Bによる結果で malathion 処理ワモンゴキブリ成虫雌の阻害された消しよく管 Carboxy-E 酵素液と無処理の対照酵素液の基質分解量の比率を求めたものである。この比率は処理区の阻害された Carboxy-E が脱リン酸化して活性を回復しなければ漸次減少するはずである。しかし、実験結果は直線A、Bともに反応時間の経過にともなう増大している。また、両直線の増加の傾向はほぼ平行の関係が認められる。第3図bの直線Cは実験法Bによって基質として malathion を使用して測定した結果と、同じ方法で基質として acethion を使用して測定した結果を比較図示したものである。その結果は同様にほぼ平行の関係が観察された。この事実は *in vivo* で阻害された消しよく管 Carboxy-E が *in vitro* において徐々に脱リン酸化して活性を回復するためであると推察される。

つぎの第4図はマウス雄肝臓 Carboxy-E の脱リン酸化について行った実験結果である。この実験はすべて *in vitro* で操作したものである。

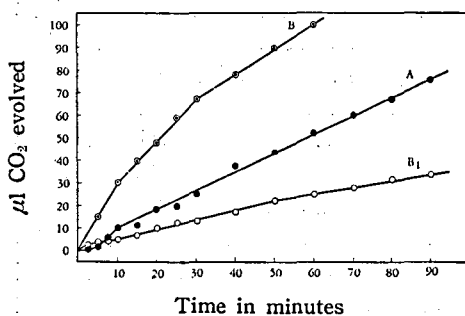


Fig. 4. Recovery of inhibited liver carboxyesterase of the male mouse treated with malaoxon *in vitro*.

- A. Treated enzyme 1.0ml (200mg liver+2000 μg malaoxon/4.0ml).
- B. Untreated enzyme 1.0ml (200mg liver/4.0ml).
- B₁. Untreated enzyme 0.15ml (the same with B).

第4図で明らかなように、malaoxon 処理酵素液Aと無処理酵素液Bの酵素活力の相違は malaoxon の影響によるもので、処理酵素液Aの Carboxy-E は malaoxon とリン酸結合し、その活性が著しく阻害されていることを示している。処理酵素液Aの活力、すなわち、阻害されずに残っている活性な酵素量は基質に対する分解能力から推定して少くとも反応初期(反応10

分後まで)には無処理酵素の反応液 B_1 に比べて少なかったものと考えられる。しかし、反応液 B_1 では反応 10 分以後に酵素活性が低下し、基質の分解速度がやや緩やかになる傾向が認められる。これは基質に対する酵素活性が飽和してきたためであると考えられる。しかるに、処理酵素液 A ではその活力が逆に反応 10 分以後徐々に増大する傾向を示している。この現象は malaoxon によって阻害されていた Carboxy-E が脱磷酸して活性を回復しはじめ、基質に作用するためであると推察される。したがって、処理酵素液 A と無処理酵素の反応液 B_1 による基質分解曲線の間にみられる差は阻害されていた Carboxy-E の回復量と見做すことができよう。いま、第 4 図の実験結果から、処理酵素液 A と無処理酵素の反応液 B_1 との基質分解量の比率を求めて阻害されていた Carboxy-E の再活性率(脱磷酸化率)を示すと第 5 図の通りである。

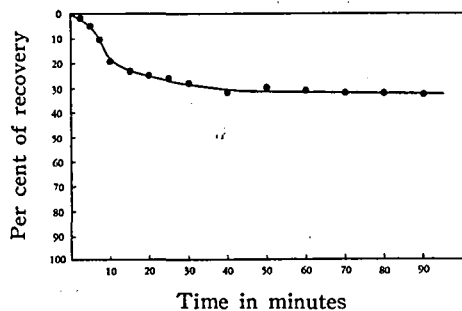


Fig. 5. Recovery rate of inhibited liver carboxy-esterase of the male mouse treated with malaoxon *in vitro*. Recovery curve indicates the rate of A/B in Fig. 4.

III 論 議

本実験ではマウス雄およびワモンゴキブリ成虫雌の各組織における malathion およびその酸化活性物質の分布については調査しなかった。それは兩種動物の ChE や Carboxy-E に対する影響が体内での代謝の総合的效果によるものと考えたからである。第 1 図と第 2 図に示した実験結果は薬剤の処理方法、処理薬量が異なるため客観的に比較検討できないが、ChE および Carboxy-E の阻害反応速度、最大阻害時期、回復時期、回復速度は動物の種類および処理薬量によってかなり異なる。Krueger and O'Brien¹²⁾ は P^{32} 指標 malathion をマウスおよびワモンゴキブリに注射 (30 $\mu\text{g/g}$) し、malaoxon の産出量を調べた。マウスでは処理 30 分後に 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、で最高値に達し、ワモンゴキブリでは処理 30 分後に 0.2 $\mu\text{g/g}$ 、60 分後に 0.3 $\mu\text{g/g}$ 、120 分後に最高値の 0.4 $\mu\text{g/g}$ を産出したと報じ

た。この結果は本実験における兩種動物の兩種酵素の阻害の始まる時期とよく一致する。しかし、マウス雄では肝臓 Carboxy-E より脳 ChE の方が、ワモンゴキブリ成虫雌では脳 ChE より消しよく管 Carboxy-E の方が早く阻害される点で顕著な差異が認められた。これは体内で産出された酸化活性物質に対する酵素の感受性が異なり、マウス雄脳 ChE は肝臓 Carboxy-E より、ワモンゴキブリ成虫雌消しよく管 Carboxy-E は脳 ChE より低い濃度の酸化活性物質によって阻害されることを暗示する。この傾向はさきに著者ら¹⁰⁾が兩種動物について報告した *in vitro* における兩種酵素の malaoxon に対する感受性とよく一致する。兩種動物の脳 ChE 阻害と中毒症状発現との関係は、O'Brien¹⁹⁾、Mengle and Casida¹⁶⁾ の報告と一致し、通常死亡開始期は脳 ChE の最大阻害期以後に認められた。これは薬剤の作用点と考えられる中枢神経組織の ChE を速かに攻撃するが、薬剤の阻害効果は比較的ゆっくり現われることを暗示する。また *in vivo* における兩種動物の兩種酵素の阻害反応は可逆的である。

第 6 図は哺乳動物と昆虫における malathion の解毒作用と選択毒性機構を説明するために著者らの見解と O'Brien²²⁾ の報告を加えて工夫した模式図である。また第 7 図は Carboxy-E と基質および阻害剤との相互作用を示した仮説的構造模型である。ここでは著者らが得た Carboxy-E に関する知見を述べる。

Carboxy-E の天然基質は不明であるが、本酵素には少なくとも 2 種類の active site があると考えられる。その 1 つは負に荷電した陰イオン部位 (anionic site) であり、他の 1 つはエステルを分解する部位 (esteratic site) である。そして、エステル分解部位には酵素活性が pH の影響を受けることから親電子基と求核基の 2 つの存在が考えられる。Carboxy-E と基質との間の分解反応機構は ChE による acetylcholine の加水分解反応について提案されている機構³⁴⁾と似ていて、第 7 図に示したように、malathion を例にとると carboxyester 部位が Carboxy-E の活性表面におけるエステル分解部位に引かれ、結合した瞬間に分解が行われ、まず alcohol を遊離し、そのつぎに *O,O*-dimethyl *S*-(1,2-bis-carboxy)-ethyl phosphorodithioate が離脱するものと考えられる。本酵素のエステル分解部位は通常カルボン酸エステル基と強い親和性を持つが、ある種の磷酸エステル基と反応してその機能を阻害される。すなわち、Carboxy-E と malaoxon との阻害反応機構は、本酵素が paraoxon, DDVP, DFP 等の他種有機磷酸によって阻害される事実¹⁹⁾から、有機磷酸と ChE との阻害反応について提唱されている一般的な阻害機構¹⁷⁾に似ていると考えられ、

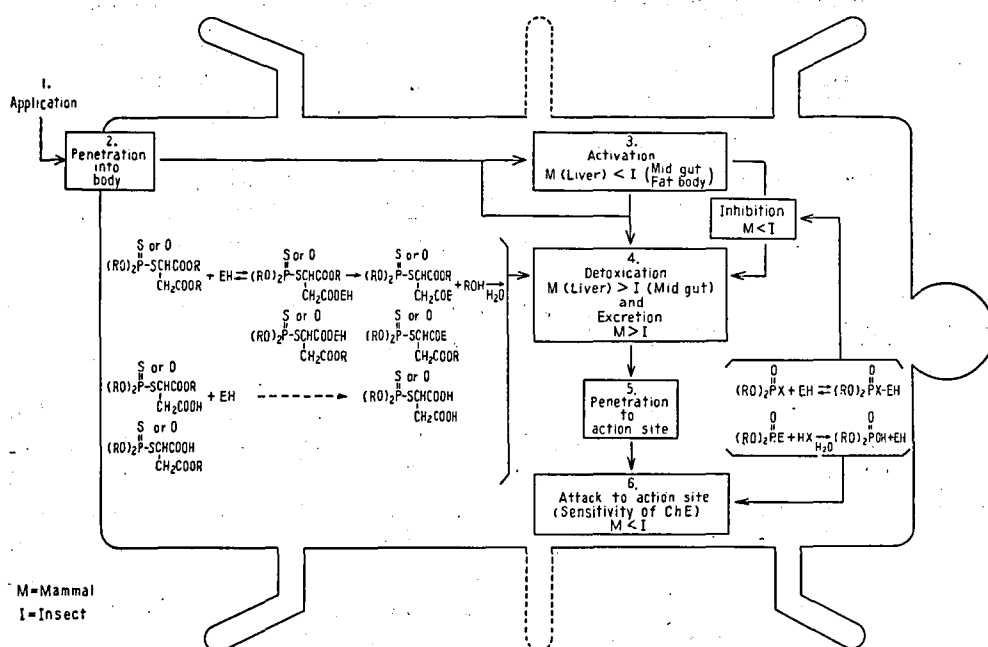


Fig. 6. Proposed selective toxicity and detoxication mechanism of malathion against the mammals and the insects (O'Brien-Kojima·Ishizuka.).

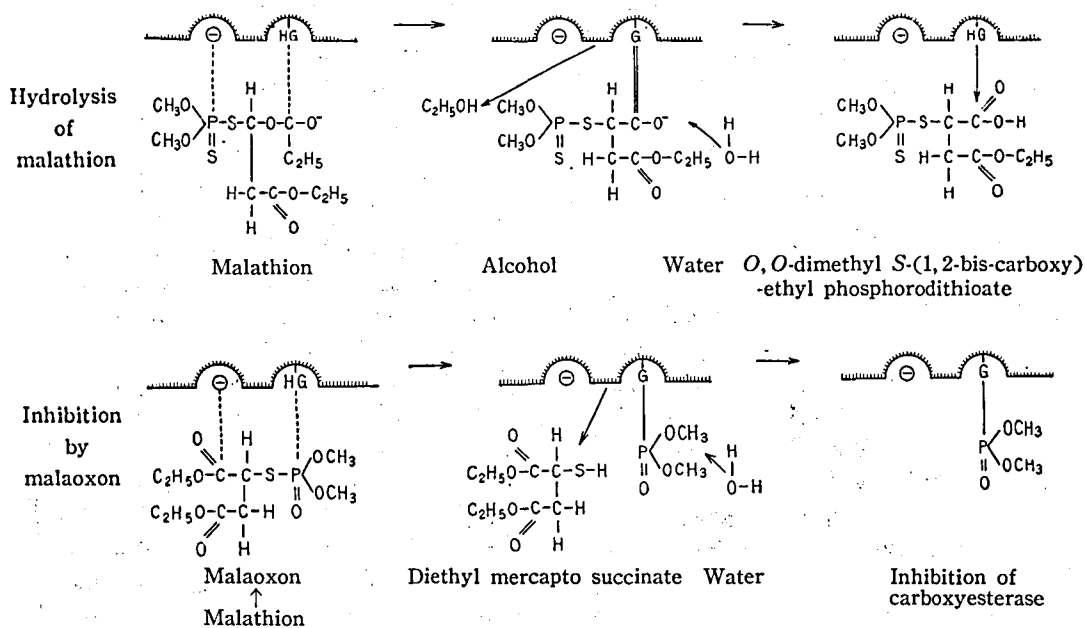
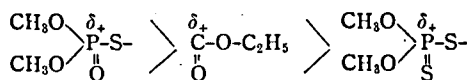


Fig. 7. A hypothetical scheme of the interaction between the active surface of the carboxy-esterase molecule and malathion or malaoxon molecule.

Carboxy-E と有機燐剤との阻害反応は P 原子に直接結合している結合の分裂を含むものと思われる。malaoxon (第7図) または paraoxon による阻害を例にとると、燐酸はエステル分解部位に結合する瞬間に加水分解が行われて diethyl mercapto succinate または *p*-nitrophenol を遊離するが、残りの燐酸エステルは非可逆的に Carboxy-E と結合してしまう。燐酸で活性部位の1つを閉塞された Carboxy-E には malathion 分子のカルボン酸エステル基が接近結合しえなくなるものと推察される。

ここで最も重要なことは Carboxy-E に対する malathion と malaoxon の相互関係である。両者は構造的に類似しているが、前者は専ら基質として分解され、後者は昆虫では主として阻害剤として阻害反応するという点についての疑問である。Carboxy-E 分子のエステル分解部位に存在する官能基の正確な性質は全く不明であるが、本酵素の基質分解力は恐らく酵素に対する強力な親和性によるもので、この親和性は基質分子の総体的な立体配置が関係するであろう⁸⁹⁾。しかし、上記薬剤の基質分解反応と阻害反応との選択性の謎は電子論的に説明できる。malathion と malaoxon における構造変化の影響を電子論的に考察すると、その変化は phosphorodithioate (-S-P=S) 結合と phosphorothiolate (-S-P=O) 結合の点で異なる。また両薬剤におけるカルボン酸エステル分子の C 原子と他原子との相互作用を考えてみると、C 原子と O 原子との間の電気陰性度の差 (C: 2.5, O: 3.5) および C 原子と C 原子との間の電気陰性度の差 (C: 2.5, C: 2.5) のために、C 原子はその周囲に電子不足をきたして小さい陽電荷を帯び、カルボン酸エステルの求電子中心になっていると考えられる。他方、燐酸エステル分子の求電子中心になっていると考えられる P 原子と S 原子との間の電気陰性度の差は (P: 2.1, S: 2.5)、P 原子と O 原子との間のそれは (P: 2.1, O: 3.5) であり、malathion および malaoxon 分子における電子吸引性の順序はおおよそつぎのように並べられると考えられる。



それゆえ、これらの効果を支配する既知の原理を用いれば、malathion の燐酸エステル分子における P 原子はそのカルボン酸エステル分子における C 原子ほど大きい陽電荷を帯びていないものと考えられ、そのため malathion ではカルボン酸エステル分子が Carboxy-E のエステル分解部位に引きつけられて酵素-基質分解反応を起すものと考えられる。また malaoxon のカル

ボン酸エステル分子における C 原子の帯電荷は燐酸エステル分子の P 原子より小さいため、P 原子が酵素の活性表面に誘引されて酵素-阻害反応を起すものと推論される。この電子論的解釈はさきに著者ら¹⁰⁾が報告した acethion および acetoxon の酵素-基質分解反応ならびに酵素-阻害反応との関係にも適用される。また本酵素に対する上記他種有機燐剤の阻害作用^{9,89)}の関係についてもよく説明しうる。

有機燐殺虫剤は第2次世界大戦以後急速な進歩を遂げつつあるが、研究初期の DFP, tuban, Sarin, TEPP, paraoxon, schradan 等の有機燐剤は比較的非選択性殺虫剤である。その後数年間に選択性の増加した多数の有機燐剤が発見されたが、これらの新物質はすべて大規模な組織的な化学合成とスクリーニングの手法によって創製された。我々は常に人畜に危害のない方法による害敵の駆除を理想としている。害虫の化学的防除法に関する限り、その最大の目的は選択的毒物の発展であらう。

殺虫剤には種々の異なる選択毒性現象が観察される。最も重要なものは、人畜無害、強力殺虫剤を理想とする薬剤の哺乳動物と昆虫との間にみられる選択毒性である。また昆虫や哺乳類の種間に現われる毒性の相違すなわち昆虫種間の特異性や殺虫剤抵抗性問題に関連した感受性系統と抵抗性系統の間にみられる相違である。さらに我が国の国情から魚介類に対する選択毒性は重要な現象であらう。

最近 O'Brien²²⁾は低毒性有機燐殺虫剤の発展に関連して新しい概念を発表し、“weak link” 学説を提唱した。以下にこれら先覚者の見解と著者らが malathion について調べた選択毒性の科学的な原理とを連絡させ、有機燐剤の作用機構に関する研究を基礎にした新しい選択性有機燐殺虫剤の創製方法に関する概念を例証を挙げて論議してみたい。第1表は各種有機燐剤のマウス雄、イエバエ成虫雄、ニカメイチュウ越冬幼虫に対する毒力を比べ、その毒力比(哺乳動物/昆虫)を示したものである。第1表に示した化合物はそれぞれ顕著な選択毒性を示し、1群は昆虫に対して選択的に強い毒力を示し、他群は哺乳動物に対して選択的に強い毒性を示している。まず問題は有機燐剤の種類によってどうしてこのように生物に対して選択的に作用するかということであり、これに対する完全な解答が得らるならば、新しい選択性有機燐殺虫剤の創製に有用な暗示を与えるものと考えられる。薬剤が施用されてから毒作用を発揮するまでの経路と毒作用に関与する因子については、すでに山崎・石井³⁷⁾、O'Brien²²⁾らによって系統的分類と概念が発表されている。著者らはその大要を改変して第6図に示した。その他に考え

Table 1. Toxicity ratios (mammal/insect) of organophosphates.

	Mouse	Mouse
	House fly	Rice stem borer
Mammallicidal compound		
Schradan	0.004	0.003
TEPP	0.4	0.2
Demeton	0.3	0.3
Methyl demeton	0.4	0.9
Insecticidal compound		
Phosphamidon	0.6	5.8
Guthion	0.6	8.3
Paraoxon	3.0	0.5
Phosdrin	5.0	4.2
Parathion	5.2(6.1)	1.5
Chlorthion	8.6	8.5
EPN	6.4	18.6
Methyl parathion	14.1	36.6
Malathion	20.0(53)	385.6
Dipterex	22.8	4.2
Bayer 29493	27.5	88.1
Diazinon	31.6(27)	24.0
Acethion	51.6(136)	
DDVP	93.8	72.1
Dimethoate	280.0(326)	

- 1) The figures show the ratio of the oral LD₅₀ for the male mouse to the topical LD₅₀ for the male house fly or the hibernating larva of the rice stem borer, on the basis of mg/kg.
- 2) The figures in parentheses show the data from Krueger and O'Brien¹²⁾ and Krueger et al¹³⁾.

られる段階は貯蔵であるが、薬剤の毒作用については、体内侵入、体内における変化、作用点における毒作用の3つが最も大きい要因と考えられる。いまある種の有機燐剤が昆虫に対して毒作用を発揮し、哺乳動物に対して作用しないならば、両種動物の間には第6図に示した経路の1つ以上が異なると考えられる。この見解は見方を変えれば、抵抗性昆虫と感受性昆虫あるいは昆虫種間の特異性の原因についても考えられることである。

まず第1に②の表皮の透過性が問題になるが、これは薬剤の昆虫に対する局所塗布法の代りに注射法によって避けることができる。Krueger and O'Brien¹²⁾, Krueger, O'Brien and Dauterman¹³⁾の資料から計算すると、局所塗布法と注射法による哺乳動物と昆虫

に対する数種有機燐剤の毒力比は、マウス腹腔 LD₅₀/ワモンゴキブリ局所塗布 LD₅₀ では parathion 6, acethion 2, Diazinon 20, dimethoate 70, malathion 99, またマウス腹腔 LD₅₀/ワモンゴキブリ注射 LD₅₀ では parathion 6, acethion 34, Diazinon 53, dimethoate 140, malathion 221 となり、薬剤の表皮透過性の難易が選択毒性に大きい影響を与えているとは思われない。ある種の殺虫剤について、薬剤に対する抵抗性が表皮の侵入と関係することが示されているが³⁾,むしろ昆虫は哺乳動物より保護力のよい表皮組織構造を持っていると考えられる。

哺乳動物および昆虫に対する有機燐剤の体内における作用点は同じであると考えられている。そしてそれは中枢神経組織の ChE と仮定されており、有機燐剤の毒作用が ChE の阻害と密接な関係があることは疑問の余地がない^{17,31,32)}。昆虫の ChE は哺乳動物の特異的 ChE によく類似した性質のものであるが、全く等しいものではない。Van Asperen and Dekhuijzen³³⁾, Mengle¹⁵⁾によれば、DDVP, DFP, paraoxon による哺乳動物の脳 ChE の阻害は *in vivo* でも *in vitro* でも可逆的である。これに反して昆虫頭部 ChE の阻害は *in vivo* では可逆的であるが、*in vitro* では非可逆的であることが確証された。目下その原因は不明であるが、哺乳動物と昆虫の ChE の性質が根本的に相違することが発見できれば、その性質の相違を利用して昆虫の ChE だけを阻害する新物質の創製が考えられよう。

つぎに⑥の両種動物における中枢神経組織 ChE の感受性と選択毒性との関係を考察すると、Van Asperen and Dekhuijzen³³⁾によれば、選択性有機燐剤 DDVP はマウス脳 ChE とよりもイエバエ頭部 ChE と大きい親和性を示すことが立証された。有機燐剤の ChE 阻害力は酵素源によって多少異なるが、著者らの実験によれば、第2表に示したように、一般に昆虫の ChE は哺乳動物のそれより高い感受性を持つと考えられ、有機燐剤の選択毒性の原因を説明しえないようである。

残る主要な問題は体内における薬剤の変化、すなわち、代謝効果の相違と作用点への薬剤の侵入の2つである。前者は活性化と解毒の2つに分けて考えられる。③の酸化的活性化は phosphorothionate および phosphoramidate 系化合物に限って必要である。これらの相当する酸化物質は強い抗 ChE 作用を発揮し、毒作用物質の本体であると考えられる。そして、哺乳動物および昆虫はいずれも体内組織に強い活性化能力を持っている^{17,31)}。したがって、生体内で産出される酸化活性物質の量はその毒力と関係する可能性が充分

Table 2. Comparative susceptibilities of cholinesterases in the human plasm and the fly head to organophosphates.

Sample	I_{50}^*	
	Plasm ChE	House fly head ChE
DDVP	5.7×10^{-8}	2.3×10^{-9}
Dipterex	2.1×10^{-6}	8.0×10^{-8}
Phosdrin	1.7×10^{-7}	2.9×10^{-8}
Phosphamidon	6.7×10^{-8}	1.3×10^{-7}
Parathion	6.5×10^{-6}	1.6×10^{-6}
Paraoxon	1.2×10^{-8}	9.1×10^{-9}
Methyl parathion	4.8×10^{-4}	4.7×10^{-5}
Methyl paraoxon	7.5×10^{-7}	8.5×10^{-8}
Malathion	1.5×10^{-4}	1.5×10^{-6}
Malaoxon	4.0×10^{-7}	6.5×10^{-9}
Guthion	7.3×10^{-7}	8.5×10^{-9}
Guthion oxide	6.2×10^{-7}	
Trithion	1.5×10^{-5}	2.3×10^{-6}
Trithion oxide	2.4×10^{-8}	
EPN	1.2×10^{-4}	3.9×10^{-6}
EPN oxide	7.6×10^{-8}	
Diazinon	2.5×10^{-6}	9.0×10^{-7}
Diazinon oxide	1.8×10^{-9}	

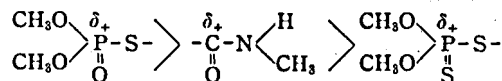
* Molar concentration for 50% inhibition of cholinesterase (ChE).

考えられるが、Krueger and O'Brien¹²⁾, Krueger, O'Brien and Dauterman¹³⁾は哺乳動物と昆虫における数種有機磷剤の毒力と代謝との関係を研究し、酸化活性物質の体内産出量は哺乳動物で少く、昆虫で多いことを指摘した。malathion の例についてはすでに述べた。この傾向は比較的選択的な parathion についても観察された。この現象や酸化活性化に要する時間は解毒代謝に有利な機会を与えるであろう。また昆虫に比べて哺乳動物における薬剤の速かな体外排出が薬剤の毒作用発揮を低下させる原因として考えられるが、哺乳動物の泌尿排泄による毒物質の量はきわめて少量であり、有機磷剤の選択毒性を説明する決定的要因でないことが証明され、その原因は両種動物の解毒能力の著しい相違によるものであると推論された。なお、選択性有機磷剤 DDVP は体内での代謝活性化を必要としない。

malathion の解毒代謝は Carboxy-E および phosphatase の作用によって起り, Carboxy-E は Cook et al.⁴⁾ がラッテについて, 著者ら^{8,10)} はラッテ, マウス, ツマグロヨコバイ成虫, ワモンゴキブリ成虫雌, その他の昆虫 (未発表) に存在することを証明した。また

著者ら¹⁰⁾は哺乳動物と昆虫における Carboxy-E の分布、活性、性質を比較生化学的に詳細に研究し、兩種動物の間に著しい差異のあることを見出した。また著者ら¹⁰⁾は O'Brien²¹⁾の推察とは異なり、ある種の昆虫を除いて昆虫の Carboxy-E は malaoxon を分解解毒できないことを指摘した。すでに述べたが O'Brien は有機燐剤の選択毒性の科学的な原理を合理的に説明するために“weak link”学説を提唱した。weak link は有機燐剤の分子中に存在し、この分子結合は非感受性動物によって容易に分解されるが、感受性動物では開裂しない。malathion および acethion の場合について、この weak link は上述のように carboxyester 基であって Carboxy-E によって酵素的に分解される。著者らはすでにその詳細を上述した。

以下は今後立証しなければならないが、著者らは選択性有機燐剤 dimethoate の weak link は carboxy-amide 基であって、昆虫に比較して哺乳動物において高い amidase 活性によって酵素的分解^{3,20}を受けるものと考えている。dimethoate とその酸化物質の分子電子吸引性の順序はつぎのように考えられ、



malathion と同様な論拠で amidase と dimethoate との基質分解反応は電子論の説明が与えられ, phosphorodithioate 型で分解されるものと予測される。また第 1 表に示した有機燐剤のうち, DDVP, Diazinon, Bayer 29493, Chlorthion, Dipterex, あるいは Co-Ral, ronnel, Trolene 等は選択性有機燐殺虫剤であるが、この種の有機燐剤は carboxyester 基あるいは carboxyamide 基を持たないので、通常 P-O, P-S あるいは P-C 結合において開裂し、phosphatase の作用によって分解されるものと考えられる⁹⁾。Diazinon およびその酸化物質は感受性のゴキブリに比べて非感受性のマウスによって強く分解解毒される¹³⁾。しかしマウスおよびゴキブリによる parathion¹³⁾、ラッテ肝臓およびツマグロヨコバイ成虫雌の phosphatase による paraoxon, methyl paraoxon⁹⁾ の解毒能力には大差のないことが知られている。したがって、哺乳動物と昆虫では存在する phosphatase が異なるか、哺乳動物には相応する phosphatase が存在し、昆虫には存在しないとも考えられる。著者らはこの種の有機燐剤の weak link は phosphorus-oxygen-alkyl 基であって、有機燐化合物分子の電荷分布が解毒酵素と密接な関係を有しているものと推察している。phosphorus-oxygen-alkyl 基の開裂は生体系における各種有機燐剤の代謝の研究によって証明されており、

一般に選択性有機磷殺虫剤についてその例証が多い^{2,6,26,27,28)}。Krueger et al.¹¹⁾の最近の研究によれば、哺乳動物における Co-Ral の phosphorus-oxygen-ethyl 基の開裂は Diazinon や parathion に比べて感受性が高いことが明らかにされた。

⑤の神経組織への透過性については、哺乳動物に対して毒性のある物質がかならずしも昆虫に対して毒性を発揮するとは限らないことが知られている。例えば、ある種の、1) イオン化合物、イオン化しやすい化合物、3) 非イオン化合物等の選択毒性剤である。これらの毒物質の作用はつぎのように考えられている。すなわち、昆虫は哺乳動物に比べると体内の生理的機能の有機的組織化が異なるとも考えられるが、昆虫には1種のイオン障壁が存在し、哺乳動物には存在しないと仮定する考え方で、昆虫の神経組織には有毒イオンの侵入を防ぐ機構があると考えられている^{7,20,23,24,32,36)}。この仮説を立証する研究は電気生理学的研究³²⁾、酵素学的研究²⁰⁾、組織化学的研究³⁶⁾、放射性化学的研究²⁹⁾ならびに電子顕微鏡的観察³⁰⁾等がある。

有機磷剤の選択毒性に関連するいろいろな因子のうちで、イオン化の役割について最もよく知られているものは O'Brien ら^{23,24)}による含窒素有機磷剤の Tetram の研究であろう。これらの研究によれば、中性分子の Tetram はゴキブリの神経索内へよく浸透するが、イオン化 Tetram は浸透しにくいことが知られている。ある pH における中性分子に対するイオンの割合は、問題の物質の pKa によって定まる。高い pKa 値を有する塩基は生理的 pH で主としてイオン化される。上述したように昆虫に対する毒作用は中性分子だけが有効であるから、このような物質の殺虫作用は弱いと予想できよう。したがって、殺虫剤の創製に許される pKa の範囲にはある一定の限界があると考えられる。Tetram の pKa は約 8.4 であるといわれている。このイオン障壁の問題は今後各種の重要害虫について研究を進展し、昆虫の種間に相違があるかどうか十分に比較検討しなければならないと考える。

おわりに、上述したように生体系における解毒酵素の有機磷剤に対する第1目標は weak link の加水分解攻撃であって、通常抗 ChE 作用の弱い含磷陰イオン物質を生成する。著者らは weak link の存在が有機磷剤の哺乳動物と昆虫に対する選択毒作用に密接な関係を持っていると確信する。それゆえ、殺す必要のある有害種と存続させなければならない有益種についての比較生化学的研究を進展し、有益種において活性が高く、有害種において活性の低い保護組織系の酵素（恐らく加水分解酵素のようなもの）を発見するか、既知酵素の基質特異性を利用し、有益種によって分解

され有害種によって分解されない link を発見し、この link を潜在的に抗 ChE 作用の強い含磷陽イオン物質に導入すれば、新しい選択性有機磷剤が得られるものとする。また今後の研究にまたねばならないが、ある種の有機磷殺虫剤における昆虫の種間特異性あるいは薬剤抵抗性問題の科学的な原理も weak link 学説の導入によって説明できるものと期待される。

文 献

- 1) Ammon, R. : Rflügers Arch. ges. Physiol., 233, 486 (1933).
- 2) Arthur, B. W. and Casida J. E. : J. Agr. Food Chem., 6, 360 (1958).
- 3) Brown, A. W. A. : Insect control by chemicals. John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 233 (1951).
- 4) Cook, J. W., Blake, J. R., Yip G. and Williams M. : J. Assoc. Offic. Agr. Chem., 41, 399 (1958).
- 5) Dauterman, W. C., Casida, J. E. Knaak J. B. and Kowalczyk, T. : J. Agr. Food Chem., 7, 188 (1959).
- 6) Dauterman, W. C., Knaak, J. B., Kowalczyk, T. and Casida, J. E. : 5th Ann. Meeting, Ent. Soc. Amer., Memphis, December, (1957).
- 7) Hoyle, G. : J. Exptl. Biol., 30, 121 (1953).
- 8) 小島建一・石塚忠克 : 防虫科学, 25, 16 (1960).
- 9) 小島建一・石塚忠克 : 防虫科学, 25, 22 (1960).
- 10) 小島建一・石塚忠克・永江祐治 : (印刷中).
- 11) Krueger, H. R., Casida, J. E. and Niedermeier, R. P. : J. Agr. Food Chem., 7, 182 (1959).
- 12) Krueger, H. R. and O'Brien, R. D. : J. Econ. Ent., 52, 1063 (1959).
- 13) Krueger, H. R., O'Brien, R. D. and Dauterman, W. C. : J. Econ. Ent., 53, 25 (1960).
- 14) March, R. B., Fukuto, T. R., Metcalf, R. L. and Maxon, M. G. : J. Econ. Ent., 49, 185 (1956).
- 15) Mengle, D. C. and O'Brien, R. D. : Biochem. J., 75, 201 (1960).
- 16) Mengle, D. C. and Casida, J. E. : J. Econ. Ent., 51, 750 (1958).
- 17) Metcalf, R. L. : Bull. Ent. Soc. Amer., 5, 3 (1959).
- 18) 永江祐治・小島建一 : 九州病害虫研究会報, 3, 87 (1957).
- 19) O'Brien, R. D. : J. Econ. Ent., 49, 484 (1956).
- 20) O'Brien, R. D. : Ann. Ent. Soc. Amer., 50,

- 223 (1957).
- 21) O'Brien, R. D. : J. Econ. Ent., **50**, 159 (1957).
 - 22) O'Brien, R. D. : Can. J. Biochem. Physiol., **37**, 113 (1959).
 - 23) O'Brien, R. D. : J. Econ. Ent., **52**, 812 (1959).
 - 24) O'Brien, R. D. and Fisher, R. W. : J. Econ. Ent., **51**, 169 (1958).
 - 25) O'Brien, R. D., Thorn, G. D. and Fisher, R. W. : J. Econ. Ent., **51**, 714 (1958).
 - 26) Plapp, F. W. and Casida, J. E. : J. Agr. Food Chem., **6**, 662 (1958).
 - 27) Plapp, F. W. and Casida, J. E. : J. Econ. Ent., **51**, 800 (1958).
 - 28) Robbins, W. E., Hopkins, T. L. and Eddy, G. W. : J. Econ. Ent., **49**, 801 (1956).
 - 29) 斎藤哲夫 : 防虫科学, **25**, 64 (1960).
 - 30) 斎藤哲夫・松井千秋 : 防虫科学, **25**, 71 (1960).
 - 31) Spencer, E. Y. and O'Brien, R. D. : Ann. Rev. Ent., **2**, 261 (1957).
 - 32) Twarog, B. M. and Roeder K. D. : Biol. Bull., **111**, 278 (1956).
 - 33) Van Asperen, K. and Dekhuijzen, H. M. : Biochim. Biophys. Acta, **28**, 603 (1958).
 - 34) Wilson, I. B. and Bergmann F. : J. Biol. Chem., **186**, 683 (1950).
 - 35) Winteringham, F. P. W. and Lewis, S. E. : Ann. Rev. Ent., **4**, 303 (1959).
 - 36) Winton, M. Y., Metcalf, R. L. and Fukuto, T. R. : Ann. Ent. Soc. Amer., **51**, 436 (1958).
 - 37) 山崎輝男・石井敏夫 : 応用昆虫, **10**, 128 (1954).
 - 38) Yip, G. and Cook, J. W. : J. Assoc. Offic. Agr. Chem., **42**, 405 (1959).

Résumé

In the present paper, the authors attempted to demonstrate the correlation between toxicity, symptomology and the inhibitions of cholinesterase, and carboxyesterase activities in the male mice and the female adults of the American cockroach poisoned with malathion. Malathion was applied to the mice orally and to the cockroaches topically using the micro-syringe.

The brain cholinesterases and the liver or gut

carboxyesterases in the mouse and the cockroach inhibited remarkably *in vivo* by the treatment of malathion. The rates and the times of the inhibition and the recovery of the brain cholinesterases and the liver or gut carboxyesterases in the survived mice and cockroaches showed great difference between the species of animals and the dosage of application.

After the brain cholinesterase and the liver or gut carboxyesterase activities had shown considerable recovery, the death of the mice and the cockroaches occurred.

The brain cholinesterases and the liver or gut carboxyesterases showed difference in susceptibility to the active antiesterase agent produced *in vivo* when malathion applied to the test animals. The mouse brain cholinesterase was inhibited faster than its liver carboxyesterase, whereas the cockroach gut carboxyesterase was inhibited faster than its brain cholinesterase. This results *in vivo* corresponded with the relative susceptibility of the brain cholinesterases and the liver or gut carboxyesterases for the male mouse and the female adult of the cockroach to malaoxon *in vitro*. The brain cholinesterases and the liver or gut carboxyesterases in the mouse and the cockroach *in vivo* were inhibited reversibly.

The authors proposed the hypothetical scheme of the interaction between the active surface of the carboxyesterase molecule and malathion or malaoxon molecule as shown in Fig. 7. The hydrolyzing reaction between carboxyesterases and malathion, or the inhibitory reaction between carboxyesterases and malaoxon can be explained by the relative electronegativity differences of the electrophilic center on the phosphate ester group and the carboxyester group.

Moreover, the authors discussed on the mechanism of selective toxicity of the general organophosphorus compounds as well as malathion and dimethoate, to the mammals and the insects in the present paper.