

Fate of Insecticide Used on Paddy Fields for Controlling the Vector Mosquito of Japanese Encephalitis Epidemics*.** Osamu MAEDA*, Tadashi MIYATA**, Hachiro HONDA** and Tetsuo SAITO** (*Public Health Research Institute of Kyoto City, Nakagyoku, Kyoto, Japan and **Laboratory of Applied Entomology and Nematology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusaku, Nagoya, Japan) Received Nov. 17, 1975. *Botyu-Kagaku*, 41, 60, 1976. (with English Summary 64)

11. 日本脳炎媒介蚊防除のために散布した殺虫剤の動向 前田 理*, 宮田 正**, 本多八郎**, 斎藤哲夫** (*京都市衛生研究所, 京都市中京区壬生東高田町, **名古屋大学農学部害虫学教室, 名古屋市千種区不老町) 50. 11. 17 受理

Fenthion の玄米中への移行を確認する目的で, 1967年以来コガタアカイエカ防除を目的として毎年 fenthion 粒剤を散布している京都市の3地点と対照地区の1地点で, 玄米, 稲わら, 土壌を採取し, fenthion の化学分析を行ない, 同時に土壌からのアセトン抽出物の殺虫力をコガタアカイエカ幼虫を用いて調べた成績と対比し, 検討を加えた. TLC による clean up によって, 何れのサンプルの fenthion 量も検出限界以下となった. 一部の土壌からの抽出物でみられた殺虫力を検討するために, 各種除草剤のコガタアカイエカ幼虫に対する感受性を調べた結果, 標準施用量でコガタアカイエカ幼虫に十分影響をあたえる可能性が確認された.

はじめに

京都市では1967年以来, 日本脳炎媒介蚊であるコガタアカイエカ防除を目的として, 毎年7月 fenthion を散布しており, その土壌中での残留および玄米中への移行の有無は重要な問題である. 1972年と73年, 散布地区の数地点で, 玄米, わら, 土壌などを採取し, その中に含まれる fenthion の残留分析を行なった. 同時に土壌のアセトン抽出物について, コガタアカイエカ1令幼虫を用いた生物試験を行ない, 化学試験の結果と対比して検討を加えた. さらに殺虫力と関連が

あると思われる除草剤について, コガタアカイエカ幼虫の殺虫剤感受性を調べたので, それらの結果をあわせて報告する.

材料と方法

試料採取地点および採取方法

試料の採取地点は表1に示す4地点で, A, B, Cでは1967年以来表1に示すようなコガタアカイエカ防除を実施してきている. 各地点とも完熟期に約3.3m²あて坪刈りし, その地点の土壌を約1ヵ月後に採取した. また1972年にはA水田では灌漑水取り入れ口, 中央,

Table 1. History of insecticide spraying and the number of samples collected at each station

Station	Soil character	History of insecticide spraying				No. of samples						
		1967	1968	1969	1970 1973	1972			1973			
						Rice grain	Straw	Soil	Rice grain	Straw	Soil	Water on paddy field
Mukojima (A)	Sandy loam	F	E	E	F'	3	3	6	1	1	1	—
Hagakushi (B)	Clay loam	F	F'	E	F'	1	1	1	1	1	1	9
Yokooji (C)	Sandy loam	—	—	E	F'	1	1	1	1	1	1	—
Yodo (D)	Clay loam	—	—	—	—	1	1	1	1	1	1	—

Remarks: F and F' represent that 5% fenthion granules were sprayed at the dosage of 50 kg and 30kg per hectare respectively. E represents that 1.5% EPN granules were sprayed at the dosage of 10kg per hectare.

*** この論文の要旨は昭和49年4月2日, 第26回日本衛生動物学会大会(大阪)で発表した.

流出口の3カ所について、作土と下層土にわけて採取した。1973年には散布直後からB地区の2地点で定期的に採水し、その水を塩化メチレンで抽出し、化学分析を行なうと同時に生物試験によって殺虫力を調べた。

ガスクロマトグラフィによる分析方法

ガスクロマトグラフィによる分析は高瀬ら^{1,2)}に準じて以下に行なった。

a) 玄米からの抽出 玄米 50g を 60メッシュ以下に粉碎し、アセトン (200 ml) で1時間振とう抽出した。吸引濾過後 40°C で 10 ml 程度にまで減圧濃縮し、4% NaCl が 250 ml 入った分液ロートに移した。塩化メチレン 50 ml で 3回抽出したのち、塩化メチレン層に硫酸ソーダを加えて乾燥し、1%ジエチレングリコール 2滴を加え、2 ml 程度に減圧濃縮し、N₂下で溶媒を完全に除き、2 ml の *n*-ヘキサンに溶かした。これを15%含水アルミナ (酸性) 10 g をつめたカラムに加え、*n*-ヘキサン:エーテル=1:1 で 250 ml 溶出させ、1%ジエチレングリコール 2滴を加え濃縮し、先と同様に溶媒を完全に除き、2 ml のアセトンに溶かした。この試料を TLC により clean up 後ガスクロマトグラフィにより定量した。

b) 稲わらからの抽出 細切り稲わら 50g をアセトン (400 ml) で1時間振とう抽出した。吸引濾過後、以下玄米と同様の方法で定量した。

c) 土壌からの抽出 風乾土壌 50g を 30メッシュ以下に粉碎し、アセトン (200 ml) で1時間振とう抽出した。吸引濾過後、残渣は80%アセトン (200 ml) で1時間振とう再抽出し、アセトン層を 40°C 以下で濃縮し、4% NaCl が 250 ml 入った分液漏斗に移し、

塩化メチレン 50 ml で 3回抽出した。塩化メチレン層を硫酸ソーダを加えて乾燥後、1%ジエチレングリコール 2滴を加え、2 ml 程度にまで減圧濃縮し、N₂下で溶媒を取除き、2 ml のアセトンに溶かし、TLC で clean up 後ガスクロマトグラフィで定量した。

d) 水田水からの抽出 1 l の水を 250 ml ずつ 4回にわけ、50 ml の塩化メチレンで 3回抽出し、以下土壌と同じ方法で定量した。

e) TLC アルミナ G プレートに試料をつけ、*n*-ヘキサン:アセトン=3:1 で展開し、fenthion および代謝産物相当位置をかき取り、アセトンで抽出し 2 ml とした。R_f 値は表 2 に示した。

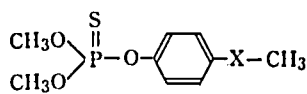
f) ガスクロマトグラフの操作条件 1 m ガラスカラム、シリコン DC-200、10% ガスクロム Q、80-100メッシュ、検出器温度 230°C、注入口 230°C、カラム温度 195°C、キャリアガス、ヘリウム 20 ml/分、上記試料のアセトン溶液 2 ml を日本電子 JGC-810 型 (FTD) ガスクロマトグラフで分析、fenthion およびその代謝産物の保持時間およびこの方法による検出限界は表 2 のとおりである。

生物試験による分析方法

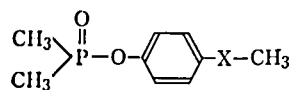
土壌の場合には試料 50g をアセトン 200 ml で 3回抽出し、10 ml に濃縮したもの、水の場合には 1 l を 50 ml の塩化メチレンで 3回抽出し、1%ジエチレングリコール 2滴を加えて 2 ml 程度にまで減圧濃縮し、N₂下で溶媒を完全に取り除き、10 ml のアセトンに溶かした。これをそれぞれ 250 ml の水に濃度を変えて入れ、コガタアカイエカ 1 令幼虫を投入し、24時間後の死亡率から LC₅₀ 値を求め、あらかじめ求めておい

Table 2. Detection limit, retention time and R_f values in fenthion and its metabolites

Compound	Detection limit	Retention time in GC (minutes)	R _f value by TLC
P=S, SO ₂	5 ng	4.80	0.50
P=S, SO	10 ng	5.25	0.21
P=S, S fenthion	0.5 ng	1.95	0.71
P=O, S fenoxone	2 ng	1.75	0.36
P=O, SO	10 ng	4.45	0.05
P=O, SO ₂	10 ng	3.45	0.10



I a; X=SO₂
b; X=SO
c; X=S



II a; X=S
b; X=SO
c; X=SO₂

た fenthion の濃度死亡率回帰直線式から殺虫力を fenthion 濃度に換算した。検出限界は土で 0.1ppm, 水で 0.02 ppm とガスクロによる分析の場合の土で 0.05 ppm, 水で 0.25 ppb より感度はかなり低い。

結 果

化学分析による土壌についての分析値は表 3 に示すとおりで、TLC によって clean up しなかった場合には定量値がえられたが、玄米、わらの場合も含めて、散布歴との関連性がみとめられず、これは妨害物質によるものと考えられた。TLC による clean up を行なったところ、土、わら、玄米いずれのサンプルでも残留量はガスクロマトグラフィによる検出限界以下 ($P=S$, $S<0.005$ ppm, $P=O$, $S<0.02$ ppm, $P=O$, $SO_2<0.1$ ppm, $P=S$, $SO<0.1$ ppm, $P=S$, $SO_2<0.05$ ppm, $P=O$, $SO<0.1$ ppm) であることがわかった。一方土からの抽出物の生物試験では、表 3 に示すように 1972 年には C と B, 1973 年には C と D に殺虫

力が見られた。1973 年の水田から採取した水での化学分析による分析値と生物試験の結果は表 4 に示すとおりで、散布 2 週間後まで fenthion および fenthion の代謝産物が認められ、3 日後および 7 日後のサンプルでは生物試験での殺虫力と近い値を示したが、他のサンプルではかなりのくい違いがみられた。散布直後のサンプルでは、化学分析と生物試験のサンプルを別々に抽出したため、くい違いを生じたものと思われるが、B-2 地点の 14 日後の採水のサンプルでかなり強い殺虫力がみられたのは、恐らくこの頃実施されたダイアジノンなどによるメイ虫防除の影響ではないかと考えられる。

考 察

このように玄米、わら、土壌からの抽出物での fenthion 量はすべてガスクロマトグラフィによる検出限界 (0.005 ppm) 以下であった。WHO³⁾ によると FAO できめた fenthion の残留許容量 0.0005mg/kg/

Table 3. Residual amounts of fenthion in the soils determined by chemical and biological assays

Year	Station	Fenthion concentration		Lethal effect of extracts being equivalent to fenthion concentration (ppm)
		Non clean-up by TLC	Clean-up by TLC	
1972	A	0.0054-0.015	<0.005	<0.1
	B	0.0125	<0.005	<0.1
	C	0.0067	<0.005	0.3
	D	0.005	<0.005	<0.1
1973	A		<0.005	<0.1
	B		<0.005	<0.1
	C		<0.005	0.14
	D		<0.005	0.22

Table 4. Residual amounts of fenthion in the water of the paddy field

Station	Date of sampling	Days after spraying	Chemical assay (ppb)						Bioassay (ppb)
			P=S, S	P=S, SO	P=S, SO ₂	P=O, S	P=O, SO	P=P, SO ₂	
B-2	July 3	0	<0.25	<5	<2.45	<1	<5	<5	40
	July 6	3	0.56	22.6	<2.45	4.6	<5	<5	<20
	July 10	7	3.0	10	<2.45	1.8	<5	<5	<20
	July 17	14	<0.25	<5	<2.45	4.0	<5	<5	142
B-3	July 3	0	<0.25	<5	<2.45	<1	<5	<5	79
	July 6	3	15	240	<2.45	1.4	<5	<5	40
	July 10	7	10.2	14.6	<2.45	2.4	<5	<5	23
	July 17	14	0.56	<5	<2.45	1.6	<5	<5	<20
	July 31	28	<0.25	<5	<2.45	<1	<5	<5	<20
Detection limit			0.25	5	2.45	1	5	5	20

Table 5. LC_{50} values in first instar larvae of *C. tritaeniorhynchus* for water diluent of acetone solution of various herbicides and their metabolites

Chemicals	LC_{50} (ppm)
MO	0.12
MO-NH ₂	1.13
MO-NHCH ₃	1.37
MO-NHCONH ₂	≤5
NIP	0.22
NIP-NH ₂	2.12
NIP-NHCOCH ₃	≥10
Chlomethoxynil (X-52)	0.65
Chlomethoxynil-NH ₂	3.11
CFNP	0.20
CFNP-NH ₂	3.45
PCP	1.89
p-nitrophenol	≥10
2,4,6-trichlorophenol	≥10
2,4-dichlorophenol	7.73
p-aminophenol	≥10
Benthiocarb	2.99
Simethryne	≥10

Table 6. LC_{50} values in each stage of *Culex tritaeniorhynchus* larvae for emulsion diluents of two herbicides (ppm)

Stage	MO	NIP
1st instar	0.011	0.017
2nd instar	0.021	0.037
3rd instar	0.042	0.061
4th instar	0.045	0.068

Table 7. Effect of several herbicides against third instar larvae of *C. tritaeniorhynchus* in laboratory test

Herbicide	kg per 10a	Dosage mg per container (0.08m ²)	No. of larvae after 5 days		Mortality (%)
			Dead	Pupated	
NIP	3	240	167	63	72.6
7% granule	0.6	48	32	183	14.9
MO	3	240	247	0	100
7% granule	0.6	48	22	221	9.1
Chlomethoxynil	3	240	259	30	89.6
7% granule	0.6	48	170	113	60.1
Saturn S gr.	3	240	203	0	100
(Benthiocarb 7%) (Simethryne 1.5%)	0.6	48	219	24	90.1

** 体重 50 kg の人が 1 日 500 g を食べる場合の許容量として換算。

day から換算すると、米の残留許容量は 0.05 ppm** となる。このことから今回の分析値は残留許容量よりかなり低い水準にあり、fenthion 量に関しては問題ないものと思われる。しかし一部の土のサンプルからの抽出物で殺虫力が認められたことから、fenthion 以外の何らかの物質の存在を考えてみる必要がある。これらの地区では近年 NIP, MO などの除草剤が広く使用されており、これらのコガタアカイエカに対する殺虫力をまず検討した。表 5 に示す各種除草剤とその代謝産物のアセトン溶液を作り、それを 300ml の水に量を変えて入れ（アセトン濃度で 0.5% 以下）、各種濃度段階の懸濁液を作った。よく攪拌後、コガタアカイエカ 1 令幼虫を 30~50 個体ずつ投入し、24 時間後の死亡率から LC_{50} 値を求めた。 LC_{50} 値は MO で 0.12ppm, NIP で 0.22ppm とかなり低い値がえられ、近縁の化合物 Chlormethoxynil あるいは CFNP など、ともに何れも 1 ppm 以下の LC_{50} 値を示し、以前に広く使用された魚毒性の強い PCP (LC_{50} 値で 1.89ppm)、近年広く使用され始めたサターン S（有効成分は benthiocarb および Simethrine, LC_{50} 値はそれぞれ 2.99 ppm, 10 ppm 以上）などと比較して、何れも高い殺虫力を示した。また MO, NIP などのニトロ体・アミノ体などの代謝産物は、MO または NIP そのものより何れも殺虫性が劣っていた。NIP, MO をキシレンに溶解し、乳化剤を加えて乳剤を調製し、水で希釈して前と同様に 1 令幼虫でコガタアカイエカに対する感受性を調べたが、表 6 に示すように MO で 0.011 ppm, NIP で 0.017ppm とさらに感受性が高くなった。また除草剤の市販品（粒剤）を表 7 に示すように標準施用量 3 kg/10a とその 1/5 量、それぞれ 7l の水に対し有効成分で 16 ppm, 3.4 ppm となるように入れ、5

日後の蛹化率から死亡率を求めた。MO, NIP の粒剤では 3.4 ppm の濃度でもかなりの生き残りが見られた。一方 Chlormethoxynil あるいはサターン S では 3.4 ppm でもかなり高い死亡率がえられ、アセトン溶液を用いた場合と多少違った結果がえられた。

以上のように除草剤 MO, NIP の乳剤を用いた試験ではコガタアカイエカ 1 令幼虫での LC_{50} 値がそれぞれ 0.01, 0.017 ppm, アセトン溶液を用いた試験では 0.12, 0.22 ppm となり、粒剤を用いた試験では 3 令幼虫で数 ppm でもかなりの生き残りがみられた。このことは試験方法による効力の差がかなり大きいことを示しており、その理由としては NIP, MO では水にわずかししか溶解せず、剤型によって水への溶出に差を生じ、効力に差を生じているものと思われる。これらの除草剤は田植前後に一斉に広く使用され、標準施用量 3 kg/10a で水深 5 cm の場合、全部が溶解すれば 80 ppm にもなりうるところから、場所により条件次第でこれらの除草剤がコガタアカイエカ幼虫にかなりの期間効く可能性は十分に考えられる。したがって除草剤が近年におけるコガタアカイエカの減少、さらに日本脳炎のいちじるしい減少に影響している可能性は十分に考えられ、野外調査などを通じて今後の検討が必要であろう。

なおこの報文を作成するにあたり、日本特殊農薬株式会社高瀬巖氏および名古屋大学農学部諏訪昭三氏から種々ご助言いただいたことに感謝の意を表する。

文 献

- 1) 高瀬 巖, 津田秀子, 中村慎子, 久山真平: 農薬生産技術, 22, 13 (1970).
- 2) 高瀬 巖, 中村慎子, 津田秀子, 上山功夫: 農薬生産技術, 23, 31 (1971).
- 3) WHO: Technical Report Series No. 525 (1973).

Summary

In suburban area of Kyoto City where insecticide sprayings had been carried out since 1967

for the vector control of Japanese encephalitis epidemics as shown in Table 1, samples of rice grains, straws and soils were collected in autumn of 1972 and 1973. The fraction extracted with acetone from each sample was concentrated in a reduced pressure, reextracted with dichloromethane, dehydrated, reextracted, chromatographed through 1% alumina column and then cleaned up by TLC using alumina G plate. Fenthion and its metabolites were analysed quantitatively by GC. Amount of fenthion was also estimated by bioassay method using *Culex tritaeniorhynchus* larvae. Amounts of fenthion and its metabolites in the rice grains, the straws and the soils were below detection limit of chemical analysis as shown in Table 4, but in bioassay lethal effects to mosquito larvae were found from extracts of the soil as shown in Table 3. Because herbicides, MO and NIP have been widely used on paddy fields in recent years, LD_{50} values in *C. tritaeniorhynchus* larvae for various herbicides and their metabolites were estimated using water diluents of acetone solution and emulsion diluents as shown in Tables 5 and 6 respectively. Effects of several herbicide granules were investigated in laboratory test in which third instar larvae of the mosquito were reared for 5 days in a plastic container (Table 7). More larvae survived and pupated in a higher concentration of 3.4 ppm of MO and NIP than that of the water diluent of acetone solution or the emulsion diluents. It is considered that these differences in lethal effect depend on water insolubility of these herbicides. Thus, several herbicides were highly toxic to *C. tritaeniorhynchus* larvae. Therefore, the vector mosquitoes may be possibly effected by wide uses of these herbicides in recent years.