

The Ovicidal Activity of Organic Sulfur Compounds. Studies on the Ovicide against the Ascaride, *Ascaris lumbricoides*. Seizo MATSUMOTO and Masayuki KURAMOTO (Fuji Chemical Industry Co. Ltd.) Received Aug. 6, 1957. *Botyu-Kagaku* 22, 333, 1957 (with English résumé, 339)

57. 有機硫黄化合物の殺卵作用について 蛔虫殺卵剤に関する研究 松本清蔵, 倉本正行 (富士化学工業株式会社) 32. 8. 6 受理.

蛔虫殺卵剤(衛生剤)としての充分なる効果を期待しうるものは皆無の状態である。そこで予備的試験として数種の農薬を選択し、更に allylisothiocyanate, phenylisothiocyanate, mercaptobenzothiazol, PCP, TCP 等各種有機化合物を合成し、蛔虫卵に対する殺卵力を検討した結果、有機硫黄化合物中 $-S-S-$, $-N=C=S$ 基を有する化合物中に有望なるものがあることが判つた。

緒 言

吾国に於ける蛔虫問題の重要性は今更言うまでもないことである。その起因するところは肥料として人糞尿を使用することに始まり、その食生活に於て生野菜や漬物を摂取することによつて、蛔虫感染の濃度は高まつてゆくものと考えなければならない。即ち国民全般の保健衛生上からも由々しき問題であると言わねばならない。蛔虫一般については夫々専門の立場の研究者により大なる成果が挙げられている様である。その駆除対策についても改良便所とか、堆肥による糞尿処理とか、化学薬品による糞尿処理等があるが、此の中化学薬品については、石井氏¹⁾は約20種類の薬品について試験し p-thiocresol, p-chloro-m-cresol が有力であること、又中略氏²⁾は carbon disulfide が $1/2000 \sim 1/5000$ で蛔虫卵の発育阻害が可能であること、国井氏³⁾は芥子油による処理試験を行い in vitro に於いて発育阻害濃度 $10^{-4} \sim 2 \times 10^{-4}$ であると述べてゐる。その他幾多の文献があるが、人糞尿の肥料価値をおとさずに糞尿処理を行い、しかもそこに含有される蛔虫卵を殺滅するに当り、実用的に充分なる成果をあげているものは殆んど皆無の状態であるので、主として有機硫黄化合物を選択し in vitro にて予備的試験を行い 2, 3 の知見を得たので報告する。尚私達は有効成分の適用にあたり製剤化に重点をおいた。

実験材料及方法

1. 供試薬剤

現在広く使用されてゐる農薬の中から殺卵力を期待出来るようなもの数種を選択し、又 allylisothiocyanate, phenylisothiocyanate, TMTS 等数種の化合物を別表の通り夫々有効成分とし、有機溶媒、乳化剤を精選して乳剤となし一部は水和剤とした。Allylisothiocyanate はロダンカリと allyl bromide より合成使用した。尚乳剤については乳化分散性、安定性、表面

張力等を検討した。

2. 蛔 虫 卵

実験に供した蛔虫卵は全部豚蛔虫の卵である。居場から採取した豚蛔虫をリンゲル氏液中に $20 \sim 30^\circ$ に飼養して24時間毎に放卵せる虫卵をリンゲル氏液でよく洗滌して使用した。

3. 実験方法

佐渡氏の方法⁴⁾によつた。即ち薬液 50cc を径 9cm のガラス皿に入れ、これに虫卵適量 (0.6cc 位) を入れて直ちによくかきまぜ $26 \sim 28^\circ$ の孵卵器中に7日間放置しその間 1, 2, 3, 7 日目に薬剤対照と同様に外観を観察したのち、液をよくかきまぜその一部をとつて検鏡し発育状態を観察した。後培養はシャーレ法によつた。薬液中の虫卵を攪拌しその一部をとり、3回以上水洗して全く薬剤を残存しなくなつた後、虫卵を水 50cc と共に径 9cm のガラス皿に移し、 28° で培養した。これを 2, 4, 7, 10, 15, 20日 或いは 25, 30日 と毎回蛔虫卵50個程度検鏡し、単細胞、多細胞、桑楯期、蟬斗期、仔虫期等の%を記載した。虫卵発育の対照としては薬液を加えぬ蒸留水を用いた。

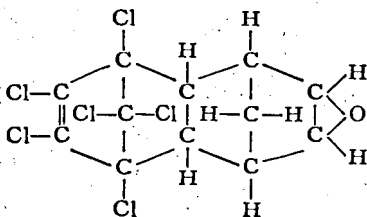
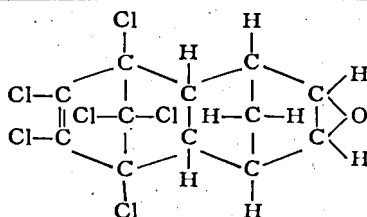
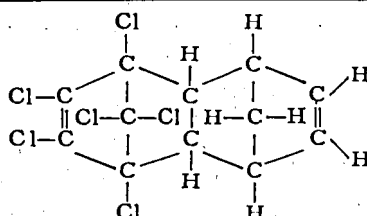
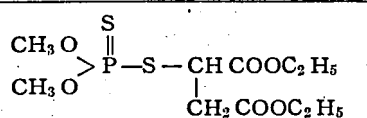
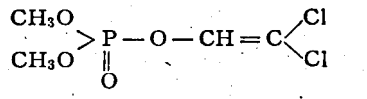
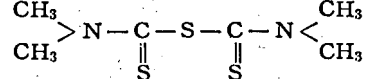
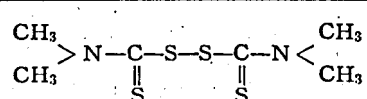
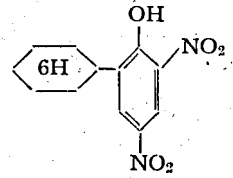
実験結果

先ず吾々は各種有機硫黄化合物につき殺卵試験を実施するに先立ち、現在農業用薬剤として広く使用されてゐるものの中から殺卵力が期待出来るようなものについて予備試験を行つた。その結果は Table 1 の通りである。

即ち有機燐製剤マラソン、DDVP は殆んど問題にならず、DN, サツピランも期待外れであつた。只有有機硫黄化合物である TMTS, TMTD がかなりの殺卵力を示すのを認めた。

引つゞき次の Table 2 に示す如き化合物につき基礎的試験を行い、次の如き結果を得た。

Table 1. The ovicidal activity of several agricultural chemicals against the eggs of the ascaride, *Ascaris lumbricoide*. The test compounds were applied by the direct contact method for 7 days at 28°C. The treated eggs were held for 30 days at 28°C, and kill % was decided by the numbers of nymph stage.

Compound	Chemical structure	Concentration of toxicant	Kill(%)
Endrin		10 ⁻²	100
		5 × 10 ⁻²	100
Dieldrin		10 ⁻²	100
		5 × 10 ⁻²	95
Aldrin		10 ⁻²	100
		5 × 10 ⁻²	80
		10 ⁻³	40
Malathion		10 ⁻²	90
		5 × 10 ⁻²	30
DDVP		10 ⁻²	100
		3 × 10 ⁻²	20
		5 × 10 ⁻²	0
TMTS		10 ⁻³	100
		5 × 10 ⁻³	60
TMTD		10 ⁻³	100
		5 × 10 ⁻³	100
DN		5 × 10 ⁻³	90
		10 ⁻⁴	30

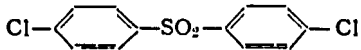
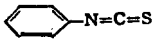
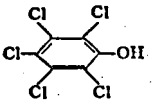
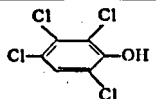
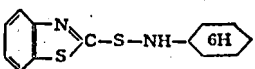
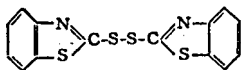
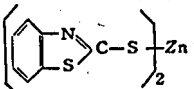
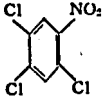
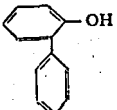
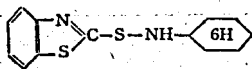
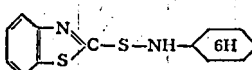
CPCBS		10 ⁻²	100
		5×10 ⁻³	70
		10 ⁻³	20

Table 2. The ovicidal activity of several organic chemicals against the eggs of the ascaride, *Ascaris lumbricoides*. The test compounds were applied by direct contact method for 7 days at 28°C. The treated eggs were held for 7~31 days at 28°C.

Test No.	Compound	Chemical structure	Conc. of toxicant	Period of culture (days)	The state of the growth					Kill %
					Far cleavage stage (%)	Cleavage stage (%)	Morula stage (%)	Germ-layer formation stage (%)	Nymph stage (%)	
1	Phenylisothiocyanate		10 ⁻³	31	100	—	—	—	—	100
			3×10 ⁻³		100	—	—	—	—	100
			5×10 ⁻³		100	—	—	—	—	100
2	P. C. P. + trichloroethylene		10 ⁻³	31	40	60	—	—	—	100
			3×10 ⁻³		10	75	5	5	5	95
			5×10 ⁻³		10	20	40	10	20	80
3	T. C. P. + trichloroethylene		10 ⁻³	31	95	5	—	—	—	100
			3×10 ⁻³		95	5	—	—	—	100
			5×10 ⁻³		80	20	—	—	—	100
4	Allyl-isothiocyanate + particular Compound	CH ₂ =CH-CH ₂ -N=C=S	10 ⁻³	31	100	—	—	—	—	100
			3×10 ⁻³		100	—	—	—	—	100
			5×10 ⁻³		70	30	—	—	—	100
5	Cyclohexyl benzo-thiazol sulfenamide		10 ⁻³	31	—	—	—	5	95	0
			3×10 ⁻²		—	—	—	2	98	0
			5×10 ⁻³		—	—	—	8	92	0
6	Dibenzo-thiazyl disulfide		10 ⁻³	31	—	—	5	5	90	0
			3×10 ⁻³		—	—	10	5	85	0
			5×10 ⁻³		—	3	10	5	82	0
7	Zn-dimer-capto benzo-thiazol		10 ⁻³	31	5	5	30	10	50	40
			3×10 ⁻³		—	—	5	5	90	0
			5×10 ⁻³		5	—	10	5	80	0
8	Trichloro-nitro-benzene		10 ⁻³	17	—	5	70	20	5	95
			3×10 ⁻³		—	5	50	40	5	95
			5×10 ⁻³		—	5	60	30	5	95
9	o-Phenyl-phenol + trichloroethylene		10 ⁻³	17	100	—	—	—	—	100
			3×10 ⁻³		5	20	30	30	5	95
			5×10 ⁻³		—	—	30	40	30	70

10	Allyl-isothiocyanate + particular compound	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{S}$	10^{-3} 3×10^{-3} 5×10^{-3}	17	100 100 100	— — —	— — —	— — —	— — —	100 100 100
11	Allyl-isothiocyanate + particular compound	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{S}$	10^{-3} 3×10^{-3} 5×10^{-3}	31	100 100 100	— — —	— — —	— — —	— — —	100 100 100
12	Cyclohexyl benzothiazole sulfenamide		10^{-3} 3×10^{-3} 5×10^{-3}	31	10 — —	85 — —	5 10 5	— 80 55	— 10 40	100 90 60
13	Cyclohexyl benzothiazole sulfenamide		10^{-3} 3×10^{-3} 5×10^{-3}	31	5 — —	95 — —	— 10 5	— 60 55	— 30 40	100 70 60

No1~4, 8~13 were applied in the form of emulsion.

No 5.6.7 in the form of wettable powder.

Table 3 The ovicidal activity of several organic chemicals when applied by the direct contact method and by the urine medium. For Test No 4. 10 and 11 the test compounds were held for 10 days at 28°C. and for Test No. 17~21 7 days at 28°C. The treated eggs were held for 20 days at 28°C.

Test. No.	Test method	Direct contact method		Urine medium*
	Degree of dilution	10 ⁴	2×10 ⁴	10 ³
4		100%	100%	100%
10		100	100	100
11		100	100	95
17		0	0	100
18		0	0	90
19		50	0	95
20		80	0	100
21		60	0	100

* pH=9.0

有効成分の効果を十分に発揮せしめるためには、有機溶媒及乳化剤が大きな因子と考えられるので、此の点に意を用いて製剤化した。有機硫黄化合物の外、殺卵力ありと言われてゐる PCP, trichloronitrobenzene 等比較のため試験した。又虫類のキチン質を溶解する性質ありと言われてゐる trichloroethylene を併用した。以上の結果から allylisothiocyanate を主成分とし、特殊物質を添加した(4), (10), (11) 及 phenylisothiocyanate (1) が in vitro に於いて殺卵効果強

大なることを知つた。(4), (10), (11) は有機溶剤は全く同じで乳化剤が若干異つたものである。即ち

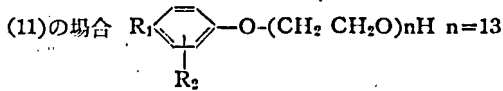
(4) の場合 $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ $n=11$

$\text{R}=\text{C}_9\text{H}_{19}$ 30%使用

(10)の場合 //

// 26%使用

外に附着性浸透性を附加するための活性剤
4%使用



20%使用

外に両性界面活性剤 10% 計30%使用

しかし 10^{-3} , 3×10^{-3} に於てはその殺卵力は有効成分の効力が顕著で、乳化剤による差は認められなかつた。しかし乍ら更に低濃度になつた場合或いは尿中処理に於ては差異を生ずるのではないかと考えられる。

そこで(4), (10), (11), を更に低濃度で直接接合法並びに尿中接触により殺卵試験を実施すると共に、此の外に有効成分は同じとし溶剤、乳化剤を変えて次の如き処理条件で実験を行つた。

尿中接触に使用した尿の pH=9.0

処理温度 28°

処理日数 No 4, 10, 11, は10日

No 17, 18, 19, 20, 21, は7日

培養20日目の観察結果は第3表の通りである。

直接接触の場合

(i) No. 4, 10, 11, は 2×10^4 倍で100%の殺卵効果を示した。但し処理口数が10口であるから7日の場合は 10^4 倍が限度ではなからうか。

(ii) No. 17, 18 は 10^4 倍で全く殺卵力が認められない。

(iii) No. 19, 20, 21 は 10^4 倍で50%程度の殺卵効果を示したが、 2×10^4 倍では全く効果がない。

以上の結果より(4), (10)と比べて(i), (ii)は乳化剤の相異が大きな因子の如く又溶剤、乳化剤の差が影響してゐる様である。

尿中接触の場合

この場合は直接接合法の場合と趣きが異り、No. 4, 10, 17, 20, 21 は 10^3 倍で100%の殺卵率を示した。

Table 3 の結果から蛔虫殺卵剤の製剤化の難しさが推定される。即ち直接接合法に於ては、製剤化の差を認めたが尿中処理では 10^3 では、ほぼ相似した結果であつたので、更に此の点を追求すべく有効成分は同じで溶剤乳化剤の殺卵効果への影響を検討した。その結果は第4表の通りである。

Table 4 Effect of the organic solvents and emulsifiers on the activity of the formulation of allylthiocyanate (10%) and particular compound (5%). The emulsifier A, B and C were the nonionic type, D and E were the mixtures of the nonionic and anionic emulsifiers. The organic solvent were mixtures of the such commonly used solvents as benzene, methanol, xylene, cyclohexanone and trichloroethylene etc.

Test No.	Organic solvent + emulsifier	Content %	Direct contact method					Urine medium		
			10^3	3×10^3	5×10^3	10^4	2×10^4	10^3	3×10^3	5×10^3
4	Organic solvent Emulsifier A	55 30	100	100	100	100	100	100	—	—
10	Organic solvent Emulsifier A Sticking agent Penetrating agent	55 26 2 2	100	100	100	100	98	100	—	—
11	Organic solvent Emulsifier B Ampholytic surfactant	55 20 10	100	100	100	100	100	90	—	—
17	Organic solvent Vegetable oil Emulsifier B	45 10 30	—	—	—	0	0	100	—	—
18	Organic solvent Fatty acid Emulsifier B	45 10 30	—	—	—	0	0	50	—	—
19	Organic solvent Emulsifier C	55 20	—	—	—	40	0	90	—	—
20	Organic solvent Emulsifier D	65 20	—	—	—	70	0	100	100	100
21	Organic solvent Emulsifier E	70 15	—	—	—	70	0	100	100	100

Table 5 Physical properties of several formulations.

Test No.	Degree of dilution	Surface tension ^{*1} dyne/cm at 20°	pH	Contact angle on the paraffin surface(θ°)	Spreading ^{*2} tension	Adhesion ^{*3} tension
4	5×10^3	38.7	6.85	58.4	-18.4	59.0
10	5×10^3	38.2	6.70	62.7	-20.6	55.7
11	5×10^3	43.0	6.80	70.0	-28.3	57.8
17	5×10^3	44.2	6.83	62.3	-23.6	64.7
18	5×10^3	45.7	6.70	70.5	-30.4	60.8
19	5×10^3	49.3	6.90	69.7	-33.1	66.4
20	5×10^3	49.9	6.8	70.3	-33.1	66.8
21	5×10^3	59.8	6.8	76.8	-46.2	73.5

*1 Measured by the method of DuNouy.

*2 Calculated as follows; (Surface tension) $\times$ (cos θ - 1)

*3 Calculated as follows; (Surface tension) $\times$ (cos θ + 1)

以上の結果より No. 4, 10, 11 は直接接触 (pH = 7 以下) では 20,000 倍でも 100% の殺卵効果を示し用途によつては有望であると思われるが、尿中接触では 1000 倍が限度の如く、便壺、便溜内で作用させるには更に製剤化の研究が必要と考える。No. 17~21 は直接接触では No. 4, 10, 11 の如き殺卵効果はないが、尿中では効果があり、殊に No. 20, 21 は尿中で 5000 倍で尚 100% の殺卵効果を示した。尿中 (アルカリ側) に於て効果がなければ実用価値はない訳であつて、以上の如き興味ある結果を得たことは何処かに製剤化の妙味がかくされてゐる様に思われる。

考 察

私達の行つた実験は蛔虫殺卵剤検索の予備的試験であり、あくまで試験管内のデーターであつて、果して糞尿中に於て殺卵効果をどの程度発揮するか、今の所不明であつて、今後更に研究を進める計画である。そして優秀なる蛔虫殺卵剤とは廉価であり、人畜無害無味無臭であると共に肥料価値を損することなく、粪池内の虫卵が簡単に殺滅されねばならない。しかし現在実用に供されて充分なる効果をあげ得るものは皆無の状態である。そこで私達は数種の農薬について予備試験を行つたが、その結果は期待外れであつた。只一部の有機硫黄化合物に可成りの殺卵力を認めたのみであつた。

十数年前農薬の研究に於て稲の三大害虫である二化螟虫に対し、R-SCN を用いて殺卵試験を行つたことがあるが、この時ある程度の効果を認め、又国井氏の芥子油処理により *in vitro* ではあるが有効濃度が

$10^{-4} \sim 2 \times 10^{-4}$ であると報告されてゐることから、allylisothiocyanate の殺卵力を中心に各種含窒素有機硫黄化合物につき試験を行つた結果、allylisothiocyanate にある特殊物質を添加し有機溶剤、乳化剤を用いて製剤化した場合、直接接触で $10^{-4} \sim 2 \times 10^{-4}$ で、又尿中処理で 5×10^{-3} で 100% の殺卵力を認めたが、その際有機溶剤、乳化剤の選択が可成りの重要性をもち、更に此の系列の化合物中に有望なるものがあるのではないかと言うことが推定出来る。即ち実験結果より $-N=C=S$ 基の存在が必要不可欠ではないかと思はれる。 $-S-C \equiv N$ 基は前者程殺卵力を発揮せず、従つて $-N=C=S$ 基が何か蛔虫卵の生理機作を破壊する様な性能があるのではなからうか。蛔虫卵の發育阻害とその機作については今後の研究にまたねばならない訳であるが、殺卵剤として当面最も重要なことは糞尿中に於て充分なる効果を如何にすれば発揮するか、直接接触では有効なものは幾多文献にも報告されてゐるが、殆んどがアルカリ側で極度に効力が低下してしまう。そこで特殊な化合物の発見に努めるか、又直接接触で卓効あるものについて製剤化の研究即ちアルカリに対して酸として作用する様な緩衝物質の添加、物理化学的性状を良好にする有機溶剤、乳化剤を厳選し殊に蛔虫卵膜に対して浸透性をもたせ、更に溶脂性の強大なるものを使用し得た場合、ある程度の目的が達成されるのではなからうか。農業用殺虫剤に於ても我々はその毒性と共にその物理化学的性状の極めて大切であることを経験してゐる。それ故私達は供試薬剤についてはこの点に特に意を用い乳化分散性、安定性、pH、表面張力、接触角等につき検討し効力発現

を期待した訳である。更に効力の点について速効性、遅効性、残効性の問題も今後検討すべき問題である。

摘 要

Allylisothiocyanate, phenylisothiocyanate, tetramethylthiuram monosulfide, -disulfide 等各種有機硫黄化合物を有効成分として製剤化し、蛔虫殺卵力を試験して次の結果を得た。

1. Allylisothiocyanate を有効成分とした乳剤は直接接触法にて $10^{-4} \sim 2 \times 10^{-4}$ にて、尿中接触にて 5×10^{-3} にて100%の殺卵力を示した。

2. 有機硫黄化合物中に少なくとも直接接触法では可成りの殺卵力が期待出来る。その一般式として $R-N=C=S$ のものが最も有効の様に思はれる。 $R-S-C \equiv N$ は前者より有効度が劣る様である。

3. その殺卵機構は未だ不明であるが、虫卵の發育阻害とその機作について特に $-N=C=S$ 基が何らかの關係があることが推定される。

4. $>N-C-S-C-N<$, $>N-C-S-S-C-N<$,
 $\begin{array}{c} R_1 \\ \diagup \\ N-C-S-C-N \\ \diagdown \\ R_2 \end{array} \begin{array}{c} \parallel \\ S \end{array} \begin{array}{c} \parallel \\ S \end{array} \begin{array}{c} R_3 \\ \diagup \\ C-N \\ \diagdown \\ R_4 \end{array}$
 $>N-C-S-S-Me-S-C-N<$ の型のもの>中、
 $\begin{array}{c} R_1 \\ \diagup \\ N-C-S-S-Me-S-C-N \\ \diagdown \\ R_2 \end{array} \begin{array}{c} \parallel \\ S \end{array} \begin{array}{c} \parallel \\ S \end{array} \begin{array}{c} R_3 \\ \diagup \\ C-N \\ \diagdown \\ R_4 \end{array}$
 $-S-S-$ が最も有効である。(Meは金属)。

5. 殺卵剤を製造するに当り有機溶剤・乳化剤の適正選択が重要因子である。

6. 製剤形態としては乳剤が適当であり、水和剤では効力発揮出来ない。

7. 現在使用されてゐる農薬の中で殺卵力が期待されそうなものについて試験したが好結果は得られなかった。

最後に本研究を実施するに当り、絶えず御指導御協力を頂いた農林省農業技術研究所技官国井喜章氏に厚く御礼申し上げる。

文 献

- 1) 森下薫：蛔虫及蛔虫症，増補篇P69，永井書店(1953)
- 2) 中略，藤田：界面活性剤 p 329 (第一工業製薬版)
- 3) 国井喜章，池内まき子：農技研報告 H (経営土地利用) 第6号，p 55
- 4) 佐渡正四郎：衛生試験所報告，72, 257 (1954)

Résumé

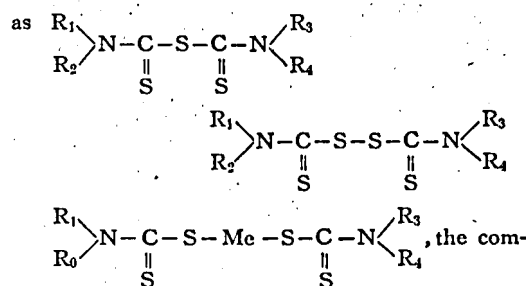
Several agricultural chemicals listed in the Table 1 and organic sulphur compounds listed in the Table 2 were prepared, and their ovicidal

activity against the eggs of the ascaride, *Ascaris lumbricoles*, were tested by the direct contact method in laboratory tests.

1 By the direct method, $10^{-4} \sim 2 \times 10^{-4}$ allylisothiocyanate in aqueous emulsion form was 100% effective and in urine medium 5×10^{-3} allylisothiocyanate was 100% effective.

2 Some of the many organic compounds appeared to be most effective as ovicide. The general formula such an effective compounds was $R-N=C=S$. The compounds which have $R-S-C \equiv N$ as general formula seemed to be less effective than the compounds which have $R-N=C=S$ as general formula.

3 Of the compounds which have such general formula



4 The authors have not the accurate knowledge why such compounds are effective, but it is suggested that the radical $-N=C=S$ have an intimate interaction with the metabolism of eggs and that such interaction is correlated to inhibition in the growth of eggs.

5 Formulating the ovicidal agents, it was the most important to select the organic solvents and emulsifiers properly.

6 When the wettable powders which contained the same effective compounds as emulsion concentrate was used, the results were negative. This result showed that the emulsion concentrate formulation was the most effective.

7 The many insecticides and fungicides which have been widely used in agriculture, and will be expected to show the ovicidal activity against the *Ascaris lumbricoles* were tested but unexpectedly.