

- 22) 佐藤仁彦・斎藤哲夫：昭和39年度応動昆虫大会講演要旨 22 (1964).
 23) 貫文三郎・植木昭和：薬理学実験 p. 193 東京・金原出版 (1952).
 24) 山崎輝男・石井敏夫：応昆 10, 128 (1954).
 25) Yeager, J. S. and R. D. Swain: *Iowa J. Sci.*, 8, 519 (1934).

Summary

The present paper describes symptoms of intoxication with NS 2662 (*O, O*-dimethyl 2,2-dichloro 1-hydroxyethyl phosphonate) in the American cockroach and the mouse.

1) Cockroaches poisoned with LD_{50} or LD_{95} doses of NS 2662, trichlorfon or dichlorvos showed hyperactivity, followed by paralysis and finally death. These are the characteristic symptoms of organophosphorus insecticides poisonings.

2) Syndromes of poisoned cockroaches were analysed quantitatively by the leg-jerk method. Cockroaches treated with NS 2662, the dehydrochlorinated compound of NS 2662, *O, O*-dimethyl 2-monochlorovinyl phosphate (DMVP), trichlorfon, dichlorvos, parathion, *pp'*-DDT or γ -BHC showed violent symptoms of hyperactivity, convulsion and paralysis. While cockroaches poisoned with rotenone, sodium fluoroacetate or potassium cyanide paralysed very soon without showing apparent hyperactivity or convulsion.

3) NS 2662 has low mammalian toxicity against mice (LD_{50} ; 2,600 mg/kg) and poisoned mice showed no marked hyperactivity, while those treated with DMVP, sodium fluoroacetate, trichlorfon or dichlorvos showed severe hyperactivity and convulsion.

Comparative Study on Saligenin Cyclic Phosphorus Esters and Triphenyl Phosphate in the Specificity of Esterase Inhibition. Hideo OHKAWA, Morifusa Eto and Yasuyoshi OSHIMA (Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University Fukuoka, Japan) Received January 31, 1968. *Botyu-Kagaku*, 33, 21, 1968 (with English Summary 24)

4. 環状りん酸エステルと Triphenyl phosphate のエステラーゼ阻害における特異性の比較
 大川秀郎・江藤守穂・大島康義 (九州大学農学部 農芸化学科, 福岡市) 43. 1. 31 受理

Triphenyl phosphate (TPP) と Tri-*o*-cresyl phosphate (TOCP) の代謝生産物であるサリゲニン環状りん酸エステル類のイェバエステラーゼに対する阻害作用を比較した。

TPP のエステラーゼ阻害効果はサリゲニン環状りん酸エステル類に比べて極めて弱く 1 万分の 1 であった。また、エステラーゼ阻害の特異性を寒天ゲル電気泳動法で比較した結果、サリゲニン環状りん酸エステル類は極めて特徴的な Zymogram を示すが、TPP は非特異的であった。

Tri-*o*-cresyl phosphate (TOCP) およびその類縁化合物の *in vivo* におけるエステラーゼ阻害作用はその代謝生産物であるサリゲニンの環状りん酸エステルによることが既に明らかにされている^{1,2)}。一連のサリゲニン環状りん酸エステル誘導体の生理作用を検討した結果は側鎖の長さを変えると異なった作用を示すことが明らかとなった^{3,4)}。メチル誘導体 (K-7)*¹ は cholinesterase (ChE) を阻害して強力な殺虫作用を示すがフェニル誘導体 (K-2)*² は aliesterase (AliE) を特異的に阻害して、殺虫作用は示さず malathion に対して共力作用を示す。

ところが Plapp らは構造的に環状りん酸エステル

には代謝され得ない triphenyl phosphate (TPP) がイェバエの aliesterase を阻害して malathion の共力剤として有効であると報告している⁵⁾。

そこで著者らはイェバエのエステラーゼ類に対する TPP の阻害効果を検討し、さらに TPP とサリゲニン環状りん酸エステル類のエステラーゼ阻害の特異性を寒天ゲル電気泳動法を用いて比較した。

試料および実験方法

試 料

阻害剤：TPP は Plapp より供与されたものと当研究室でオキシ塩化りんとフェノールから合成したものを使用した。サリゲニン環状りん酸エステル類 (K-2, K-7) および TEPP は当研究室で合成した^{3,4)}。malaoxon は malathion を *N*-bromosuccinimide で酸化することにより得た。

*1. 2-methoxy-4H-1, 3, 2-benzodioxaphosphorin-2-oxide.

*2. 2-phenoxy-4H-1, 3, 2-benzodioxaphosphorin-2-oxide.

基質： α および β -naphthyl acetate はそれぞれ対応する naphthol と acetyl chloride から合成した。*m*-cresyl acetate, *m*-*N*, *N*-dimethylaminophenyl acetate (dimethylaminophenyl acetate) は *m*-*N*, *N*-dimethylaminophenol と acetyl chloride をピリジンの存在下に反応させて得た。*m*-(acetoxylphenyl) trimethyl ammonium iodide (ammoniumphenyl acetate) は dimethylaminophenyl acetate と methyl iodide から合成した。

薄層クロマトグラフィー (TLC)

TPP はシリカゲルの薄層を用いてヘキサン：アセトン (4:1) の溶媒系で展開した後に 2N KOH アルコール溶液をスプレーして加熱し、水解して生ずるフェノールをジアゾ化スルファニル酸で発色させて検出した。

AliE 活性の測定

Warburg 検圧法³⁾：酵素液は 0.9% NaCl 溶液にイエバエ全体のアセトン粉末 200mg を加えてガラスホモジナイザーでホモジネートとして調製した。測定は反応容器の主室に TPP のアセトン溶液を入れて法セトンを蒸発させた後に酵素 2ml を入れる。側室には 0.25M NaHCO₃ の 0.2ml と基質 methyl *n*-butyrate 0.01ml を加える。N₂:CO₂ (95:5) の混合ガスを通して 37°C に 10 分間放置後に側室内容を主室に移して反応を開始し、5 分毎に 30 分間測定する。

比色法：基質に phenyl acetate, naphthyl acetate を用いて酵素水解によって遊離するフェノールとナフトールをアゾ色素として発色させ分光光度計で 520m μ または 550m μ の吸光度を測定する。酵素液はイエバエ成虫全体 2 匹に対して脱イオン水 1ml の割合でホモジネートし、2,000r.p.m 10 分間遠心分離して得た上清を使用した。1ml の酵素液に 5ml の 0.03M 基質溶液 (pH7.0, 0.04M のりん酸緩衝液に溶かしたもの) を加えて 27°C に 30 分インキュベートした後 1ml の naphthanil diazoblue B 溶液 (4mg/ml) を加えて発色させ分光光度計で測定した。

寒天ゲル電気泳動法

荻田らの寒天ゲル薄層電気泳動法^{7,8)} に準じて行なった。即ち pH6.8 のりん酸緩衝液 ($\mu=0.025$) 100ml に Difco agar noble 0.7g と polyvinyl pyrrolidone 2g を加えて加熱溶解し、16.5×20.0cm ガラス板上に流して厚さ 0.9mm の寒天膜を作る。酵素液はイエバエ (高槻系) 3g に 1ml の脱イオン水を加えてホモジネートとし、10,000r.p.m で 60 分遠心分離して得られた上清を使用した。酵素液に阻害剤を加えて 30 分 0°C にインキュベートした後、2mm×12mm の濾紙に浸してゲル層にのせて 30 分冷所に置いた後に濾紙をはがして泳動を行なう。泳動には pH6.8 のりん酸緩

衝液 ($\mu=0.05$) を用い、低温器中 (7°C) でゲル巾 1cm 当り 2mA を 90 分間通電する。泳動後 1% 基質溶液をスプレーして 37°C に 20~40 分間インキュベートし、0.5% naphthanil diazoblue B 水溶液に浸たして発色させる。

結果および試験

Triphenyl phosphate のエステラーゼ阻害作用

イエバエの AliE に対する TPP の阻害効果を測定した結果は $I_{50}=4.9 \times 10^{-4}M$ (64 γ /fly) であり、Plapp らの報告した値 (23 γ /fly) の 1/3 の阻害効果であった。

次に活性なピロリン酸型不純物の混入を考慮して、TPP 標品を 0.5N NaOH 処理したものについて AliE 阻害を測定した。その結果はアルカリ処理した TPP と未処理の TPP で差がほとんど認められず、いずれも弱い阻害効果を示した (第 1 表)。また TPP を TLC で展開して、TPP のスポット部分とそれ以外の部分との AliE 阻害を比較したが TPP より強い AliE 阻害効果を示す区分は認められなかった (第 2 表)。

Table 1. AliE inhibition of TPP treated with 0.5N NaOH

	inhibition %
TPP $5 \times 10^{-4}M$	46
TPP treated with 0.5N NaOH	50

Table 2. AliE inhibition of T. L. C. fractions

	inhibition %
Rf 0.0-0.3	37
Rf 0.3-0.6 (TPP portion)	50
Rf 0.6-1.0	6
TPP (300 γ)	53

以上の結果から TPP 自身に AliE 阻害作用があることは確実であるが TOCP の代謝生産物であるサリゲニン環状りん酸エステル類 (K-2, $I_{50}=1.3 \times 10^{-8}M$)⁹⁾ に比較して約 1 万分の 1 であり極めて弱い。また、使用した TPP 標品に関しては阻害力の大きな不純物の混入は考えられなかった。

電気泳動に用いる基質の検討

TPP および TOCP の代謝類似化合物としてのサリゲニン環状りん酸エステル類のイエバエ AliE に対する阻害特異性を寒天ゲル電気泳動法を用いて検討した。電気泳動法で鮮明な Zymogram を得るにはエステラーゼに特異的に働き、しかも酵素反応後に鋭敏に発色できる基質が必要である。まず、エステラーゼの強力な阻害剤に構造が類似して、しかも酵素分解後に発色可能な構造を持った基質の合成を試みた。即

ちカーバメート系殺虫剤 sevin に構造の類似したものとして α -および β -naphthyl acetate, ChE の特異的な阻害剤 neostigmine に類似したものとして acetoxyl phenyl 基のメタ位に置換基を持った *m*-cresyl acetate, *m*-dimethylaminophenyl acetate, ammoni-umphenyl acetate の5個の基質を合成した。これらの基質についてエステラーゼに対する基質特異性を比較した。即ちこれら基質のイェバエホジネートによる分解に対する ChE の特異的阻害剤 eserine による阻害度を検討した(第1図)。dimethyl aminophenyl acetate が最もよくイェバエホジネートにより分解されるがその45%に ChE によっている。次いで β -naphthyl acetate がよく、ChE によって約20%が分解される。*m*-cresyl acetate と ammoniumphenyl

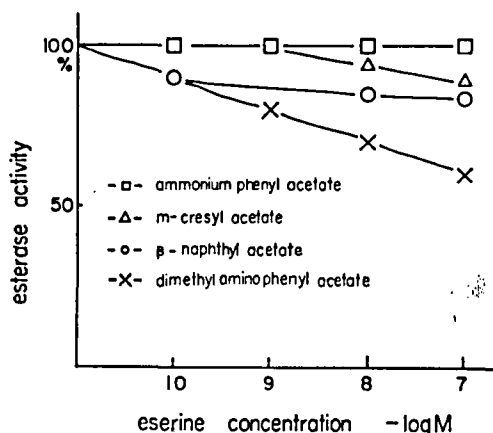


Fig. 1. Effect of eserine on esterase activity against several substrates.

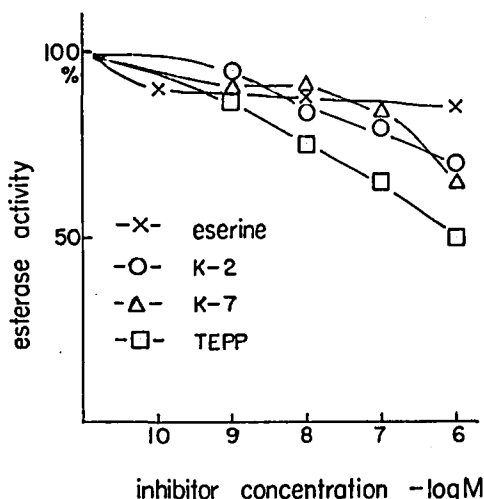


Fig. 2. Effect of several inhibitors on esterase substrate: $3 \times 10^{-4} \text{M}$ β -naphthyl acetate.

acetate はいずれも基質として良好でなく、発色効果良くなかった。

次に β -naphthyl acetate と dimethylaminophenyl acetate を基質に用いてイェバエのエステラーゼに対する種々の有機りん化合物の阻害効果を比較した(第2, 3図)。 β -naphthyl acetate を基質に用いた場合のイェバエのエステラーゼに対する阻害効果は TEPP > K-7 > K-2 > eserine の順に強く認められた。dimethylaminophenyl acetate 基質に用いた場合の阻害効果は TEPP > K-7 > eserine > K-2 の順序であった。

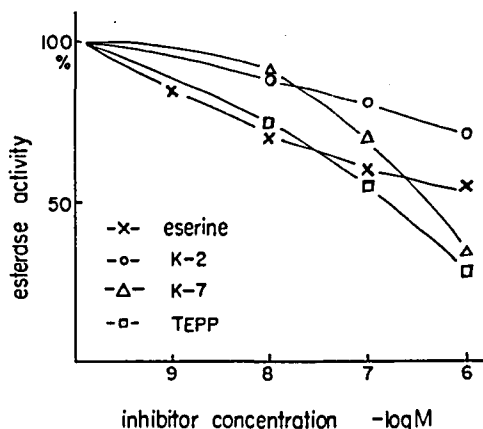


Fig. 3. Effect of several inhibitors on esterase substrate: 10^{-4}M dimethylaminophenyl acetate.

以上のように dimethylaminophenyl acetate の方が ChE に特異性が高いと考えられるけれども、いずれの基質もその他のエステラーゼ類、即ち有機りん剤によって阻害される aliesterase およびそれらによって阻害されない arylesterase によって分解される。

電気泳動法による阻害特異性の検討

前記2種の基質を用い、寒天ゲル電気泳動法によってイェバエのエステラーゼを分離し、種々の阻害剤によるエステラーゼ阻害の特異性を検討した。 β -naphthyl acetate を基質に用いた場合はイェバエ(高槻系)のエステラーゼは6本の活性帯に分離され(第4図)、その中で TEPP は陽極側から第1, 2帯を完全に阻害し、第5帯を僅かに阻害した。K-7 は第3~6帯を阻害したが、K-2 はそれと全く逆に第1, 2帯のみを特異的に阻害した。TPP の阻害力は極めて弱く、濃度を 10^{-2}M まで高くすると全ての活性帯が非特異的に阻害された。eserine による ChE の阻害効果は Zymogram 上に明確に認められず僅かに第5帯が阻害された。

dimethylaminophenyl acetate では7本の活性帯が認められたが(第5図)、最も陽極側に移動する活性

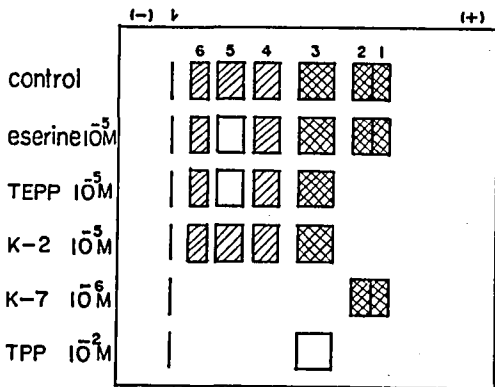


Fig. 4. Effect of eserine and organophosphorus esters on esterase zymogram patterns of adults house flies
substrate: 1% β -naphthyl acetate.

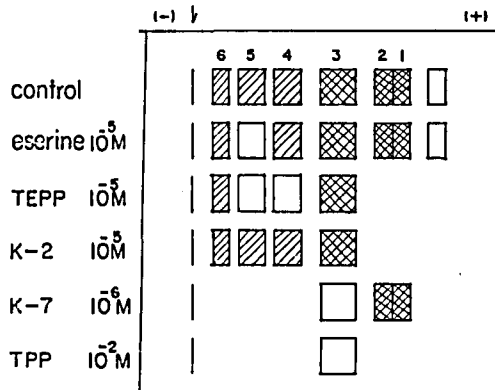


Fig. 5. Effect of eserine and organophosphorus esters on zymogram patterns of adults house fly esterases
substrate: 1% dimethylaminophenyl acetate.

帯は不安定でしかも酵素調製後に短時間で消失してしまう。TEPP は第1,2帯を完全に阻害し、第4,5帯を僅かに阻害した。K-7 は第3~6帯を阻害したが、K-2 は逆に第1,2帯のみを特異的に阻害した。TPP は $10^{-2}M$ で活性帯の全体的な阻害が認められた。eserine による阻害効果は明確でなく第5帯の僅かな阻害が認められた。

β -naphthyl acetate を基質に用いた場合と dimethylaminophenyl acetate の場合とでエステラーゼ Zymogram を比較してみた結果は差異がほとんど認められなかった。しかしながら dimethylaminophenyl acetate の場合は酵素反応時間を短かく ($37^{\circ}C$, 20分) しても十分に Zymogram を認めることができたが、発色後は速やかに退色してしまった。 β -naphthyl acetate では酵素反応時間を長く ($37^{\circ}C$, 40分) する

必要があるが、発色後の色調は安定で長時間の保存が可能であった。

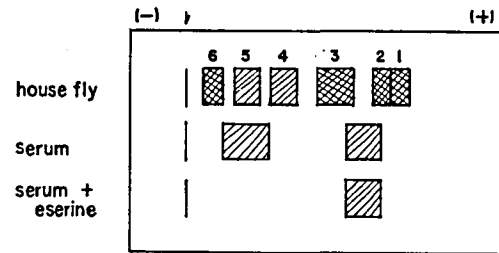


Fig. 6. Zymograms of esterases of house fly and human serum
substrate: 1% β -naphthyl acetate.

ChE に対してより特異的に働くと考えられる dimethylaminophenyl acetate を基質に用いた場合でも ChE の位置を Zymogram 上に確認することができなかった。そこで強い ChE 活性を持つ人 serum のエステラーゼ Zymogram をイエバエと比較してみた(第6図)。serum には2本のエステラーゼ活性帯が認められ、その中で陰極側の第2帯、即ちイエバエのエステラーゼ Zymogram の第5帯に一致する活性帯が eserine で完全に阻害されたしかしイエバエエステラーゼの第5帯は eserine で僅かしか阻害されないことからイエバエの場合には第5帯は ChE と他のエステラーゼを含んでいると考えられ、両者の分離はここで用いた条件では不完全であった。

要 約

TPP は TOCP metabolite 類(サリゲニン環状りん酸エステル)に比し、エステラーゼ阻害効果は極めて弱い。

寒天ゲル電気泳動法によりイエバエホモジネートから多くのエステラーゼが検出され、これらに対してサリゲニン環状りん酸エステルは高い阻害選択性を有し、側鎖の種類に従って極めて特徴的な Zymogram を示すが、TPP は全く特異性を示さない。

謝辞：本研究を行なうに当り寒天ゲル電気泳動法の御指導いただいた大阪大学医学部荻田善一博士ならびに TPP を供与された F.W. Plapp 博士に対し深く感謝致します。

Summary

The inhibitory effect of triphenyl phosphate (TPP) on house fly esterases was examined. Saligenin cyclic phosphorus esters analogous to active metabolite of tri-*o*-cresyl phosphate (TOCP)

were compared with TPP in respect of the specificity of their antiesterase activity by means of agar gel electrophoresis.

It was shown that TPP was about one-tenthousandth weaker in antiesterase activity than TOCP metabolite. For agar gel electrophoresis, β -naphthyl acetate and dimethylaminophenyl acetate were excellent substrates for esterases. They were immediately hydrolyzed by all kinds of esterases and their hydrolyzed products were easily coloured by diazotization. The soluble esterases of the house fly (Takatuki strain) were separated to six active bands by agar gel electrophoresis. Among of them, 3rd to 6th bands were inhibited by K-7 (saligenin cyclic methyl phosphate, salioxon) and conversely 1st and 2nd bands were inhibited by K-2 (saligenin cyclic phenyl phosphate). When the exo-cyclic substituent was changed, saligenin cyclic phosphorous esters

showed highly characteristic antiesterase activity. On the other hand, TPP showed nonspecific inhibition of esterases.

文 献

- 1) Casida, J. E. and M. Eto: *Nature*, 191, 1396 (1961).
- 2) Eto, M. and J. E. Casida: *Biochim. Pharmacol.*, 11, 337 (1962).
- 3) Eto, M., Hanada K., Namazu Y. and Y. Oshima: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 723 (1963).
- 4) Eto, M., Matsuo S. and Y. Oshima: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 870 (1963).
- 5) Plapp, F. W., Bigley W. S., Chapman G. A. and G. W. Eddy: *J. Econ. Entomol.*, 56, 643 (1963).
- 6) Asperen K. von: *J. Ins. Physiol.*, 8, 401 (1962).
- 7) Ogita, Z.: *Metabolism and Disease*, 2, 78 (1965).
- 8) Ogita, Z.: *Jap. Jour. Genetics*, 40, 1 (1965).

綜 説

Evolution by Natural Selection and its Influence on Population Fluctuation of Insects.

Fumiki TAKAHASHI (Entomological Laboratory, College of Agriculture, Kyoto University, Kyoto).

Received January 11, 1968. *Botyu-Kagaku*, 33, 25, 1968 (with English Summary 35).

自然選択による遺伝的变化が昆虫個体数変動におよぼす影響 高橋史樹 (京都大学農学部昆虫学研究室)

43. 1. 11 受理

1. はじめに

森林害虫や作物害虫の加害量はそれらの個体数と相関が非常に高いので、個体数の増加や、それを抑える機構についていろいろの方面から研究が進められている。ここではとくに世代間の個体数の変動について、増加と抑制に関係のある生態的な性質が遺伝的に変化することの意義を考察したい。

昆虫の密度の変化に伴って、個体群内の各個体に質的な変化がみられることが多い。たとえば体の大きさの変化、多型あるいは相変異や休眠虫などの出現がそうであって、形態的な変化のみならず、生理、生態、習性にも大きい変化が認められる。相変異⁽¹⁾や休眠⁽²⁾の現象において、親世代の型が子世代の型や形質におよぼす影響や、人為選択の効果がしらべられているけれども、これらの現象の研究は普通には一時的あるいは1世代だけにとどまる変化に重点がおかれている。しかし環境要因の作用、とくに昆虫個体数の増加を抑制する作用による選択(淘汰)で個体群の遺伝的構造

が変化することを示すような実験的な研究が最近多くみられるようになった。また野外の個体群にみられる生態的性質の遺伝的な変化や変異にも、環境要因の選択作用によって生じたと考えられる例がいろいろと知られてきた。

個体群の性質が遺伝的に変化する様子を明らかにすることによって種の分化や進化の過程を追跡しようとする試みが多くの人々の興味をひいている。そのようなことは勿論必要なことではあるが、選択作用が個体群密度を変動させる諸要因とどのような関係にあり、その効果が個体数の変動にどのような役割を演ずるかを知らることが応用的にはより重要であると考えられる。

昆虫個体数の変動を支配する要因やその作用を明らかにすることは今もなお個体群生態学での重要な課題のひとつになっているが、いろいろの意見が一致しないから、個体群の生態的性質の遺伝的な変化が、個体数変動におよぼす意義についても意見がわかるものと思われる。ここでは2, 3の個体数変動機構の考え方からみたとき、遺伝的な性質の変化はどのような意