

Résumé

The influences of several insecticides, DDT, lindane, methyl parathion and rotenone, on the distribution of radioactive phosphate in the different tissues of the cockroach, *Periplaneta americana* L. and the incorporation of radioactive phosphate into phosphorylated intermediates in the nerve cord and the femur muscle of the insect were studied.

1. Radioactive phosphate injected into abdomen of the insect translocated quickly to head, legs, wings, nerve cord and femur muscle. The feature of the distribution of radioactive phosphate in the different tissues of the insect body was similar to that of other insect which consumed orally radioactive phosphate. Half past six hours after the injection, the order of the accumulation of radioactive phosphate in the tissue was as follows:

gut>nerve cord>legs>head>wings.

When the insect was treated with insecticide, the accumulation of radioactive phosphate in the nerve cord and the wings of the insect was affected by methyl parathion or DDT.

2. The radioactive phosphorylated intermediates contained in the nerve cord and the femur muscle were traced by paper chromatography. As the result, orthophosphate, ATP, ADP, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, hexosediphosphate, 3-phospho-

glycerate and two unidentified compounds were found in the nerve cord, while the same eight compounds mentioned above and six unidentified compounds were found in the muscle. In the both tissues, most radioactive phosphates were occupied with orthophosphate, ATP and ADP. Several phosphate esters which are known to be intermediates of glycolysis were also found to be present in the both tissues, but their contents were relatively small. The ratio of orthophosphate (P^{32}) to ATP+ADP (P^{32}) was higher in the muscle than in the nerve cord.

When the insect was treated with insecticide, the rate of the incorporation of radioactive phosphate into phosphorylated intermediates in the nerve cord and the muscle was inhibited, especially in the latter tissue. The ratio of orthophosphate (P^{32}) to ATP+ADP (P^{32}) was different from that of untreated one as shown in Table 2. The incorporation of radioactive phosphate into phosphorylated intermediates in the nerve cord and the muscle were inhibited by treatment with insecticide as the following order: methyl parathion>DDT>lindane>rotenone. Also, the incorporation of radioactive phosphate into lipide and residual parts in trichloroacetic acid insoluble fraction was inhibited by methyl parathion or DDT. Lindane and rotenone had a little effect on the incorporation of radioactive phosphate into the above fraction.

Studies on the Degradation of Pyrethrins. III. Yoshio KATSUDA, Tadayoshi TIKAMOTO, and Kōkichi NAKASHIMA (Research Laboratory of Dainippon Jotyugiku Co. Ltd.) Received Oct. 29, 1956. *Botyu-Kagaku*, 21, 139, (1956). (with English résumé, 144.)

29. 除虫菊有効成分の変質に関する研究 第III報* 勝田純郎・近本惟好・中島行吉(大日本除虫菊株式会社 研究所) 31. 10. 29. 受理

除虫菊新鮮花の搾汁液中に殺虫成分 pyrethrins を分解する酵素系が存在する事を確め、乾花貯蔵中に pyrethrins を変質させる因子として酵素作用が大きく働いている事を指摘し、同時に pyrethrins 分解酵素系の諸性質を検討した。

除虫菊有効成分 pyrethrins を変質させる諸因子の中で著者等は前報¹⁾に於て太陽光線、熱、及び所謂“酸酵”(むれ)の影響に就いて polarograph 的定量

法及び Seil 変法に依り比較検討し、真の変質(polarograph 法の値によるもの)は従来考へられていたより遙かに激しいものである事を知った。然し乍ら除虫菊乾花の貯蔵に当つて、以上の如き変質の諸因子を十分考慮して管理しても、尚収獲後時間の経過と共に相当量の変質を示し、特に収獲当初数ヶ月間の変質は激しいものがある。除虫菊乾花の貯蔵条件(高温、

* 本研究を行ふに当り御懇篤な御指導を賜つた武居教授、大野教授に感謝する。併せて睦月亭、村上さとの諸君の御助力に対し謝意を表する。

低温貯蔵等)と変質に就いては武居、今木ら²⁾及び其の他³⁾の研究も既に多く発表され同様な結果を得ているが酵素作用に依る変質に就いては考へられていない。

著者等は収獲後の変質の因子として前報¹⁾で触れた酵素作用が大きく働いているものと考え研究を行ひ、除虫菊新鮮搾汁液の中に pyrethrins を分解する酵素系の存在する事を確認し、この enzyme に依る変質を防止する方法として熱処理、冷却貯蔵及び二、三の inhibitors* を考へて実験を行ひ、いずれも変質を抑制し得る有効な結果を得た。収獲後数ヶ月間に特に殺虫成分の変質が激しいのは、当初の旺盛な enzyme の作用に依るものと考えられるから、収獲時に現地で適当な処理を施せば以後の変質は減少し、除虫菊工業にとつて注目すべき問題であると考へる。

本報に於ては除虫菊乾花の熱処理並に冷却貯蔵と pyrethrins の変質、除虫菊の開花状態と pH の関係及び pyrethrins 分解酵素系の最適 pH と温度に就いて検討し、更に新鮮花の搾汁液 (pyrethrins 分解酵素系を含む) と、熱処理花から得た搾汁液を同様に基質に作用させて、その変質程度の差から pyrethrins 分解酵素系の存在を確認した。

(1) 除虫菊乾花の熱処理並に冷却貯蔵と pyrethrins の変質

Enzymes による pyrethrins の分解を確めるために、除虫菊新鮮乾花を 80° に 30 分間熱処理を行ひ、対照と共に同一条件の下に貯蔵して、以後変質の程度を測定法に依り一年間検討した。その結果はいずれも熱処理を行つたものの方が対照より変質は少なかった。更に除虫菊乾花を夫々ビニール袋に容れて一方は恒温室 (30°) に、他方は冷蔵庫 (5°) に貯蔵して以後変質の程度を同様に検討し、冷却貯蔵の方が明に変質が少ない結果を得た。武居、今木ら²⁾も低温貯蔵の試験を行ひ、同様な結果を得、温度が変質に大きな影響を与える事を指摘しているが、酵素作用に就いては触れていない。著者等は乾花の熱処理によつて enzymes が大部分破壊されたか、或は低温貯蔵によつてその活性が抑制されたため、変質の程度が低かつたものと考えられる。従つて pyrethrins 変質の因子として、酵素作用が大きく働いているものと考えてよい。除虫菊の乾燥は現在、圃場で天日乾燥を行つているが、出来れば火力乾燥を行ひ、併せて enzymes を破壊することが変質防止の上からも最も望ましいと考へられる。

(2) 除虫菊開花状態と組織搾汁液の pH

和歌山県当社圃場で同じ管理の下に栽培された同系統の除虫菊品種を開花状態の進みにつれて採取し、直

ちに乳鉢で磨砕して搾汁液の pH を硝子電極に依り測定した。蕾から満開直後に至る迄いづれも強い酸性を示した之は他の植物の組織汁液が畧々中性乃至弱酸性⁴⁾のものが多いのに較べて特徴のある事実である。植物体内に於ける ester (pyrethrins) 生合成が酸性側で行はれている事は pyrethrins の安定性の上からも興味深い事である。現在迄確認された遊離酸^{5,6)}はすべて飽和一塩基性酸であるが著者等は上記搾汁液から既に数種の二塩基性酸を新に chromatography 法に依り確認*し、目下研究中である。

(3) Pyrethrins 分解酵素系の最適 pH

和歌山県当社圃場から満開後 5 日程度の除虫菊新鮮花を採取し、直ちに種々の pH を有つ緩衝液を加へて磨砕して各種 pH の酵素液を得た。この酵素液を基質 (除虫菊粉) に混和して 30° で作用させた後、基質の pyrethrins 含量を検討した。その結果いづれも pH 6 附近に於て pyrethrins の減量が最も著しかった。以上より pyrethrins 分解酵素系の最適 pH は 6 附近にある事を知つた。

(4) Pyrethrins 分解酵素系の最適温度

和歌山県当社圃場から満開乃至満開後 5 日程度の除虫菊新鮮花を採取し、緩衝液 (pH 7.0) を加へて直ちに磨砕し、酵素液を得た。この酵素液を基質 (除虫菊粉) に混和して種々の温度に於て作用させた後、基質の pyrethrins 含量を検討した。その結果はいずれも 30° の場合に pyrethrins の減量が最も著しかった。以上より pyrethrins 分解酵素系の最適温度は 30° 附近にある事を知つた。

(5) 除虫菊乾花搾汁液中に pyrethrins 分解酵素系が存在する事を確め、且之が pyrethrins を変質させる一因子であるかどうかを確める為に収獲後二ヶ月の除虫菊乾花を粉碎した後二分して一方は 80° に 90 分間熱処理を行ひ、夫々に蒸留水を加へて搾汁液を得、之を基質 (除虫菊粉) に作用させて時間の経過と共に基質の pyrethrins 含量を調べた。その結果いづれも熱処理を施さないものから得られた搾汁液を作用させた基質のみに pyrethrins の減量を示した。以上より収獲後 2 ヶ月経過の除虫菊乾花中にも pyrethrins 分解酵素系が存在し、之が pyrethrins 変質の一因子となつていゝものと考えられる。

実 験**

分析方法はすべて前報¹⁾の通りに行つた。

(1) 除虫菊乾花の熱処理並に冷却貯蔵と pyrethrins の変質

* 別に報告の予定。

** 表中の数字はすべて数試料に就き行つた分析の平均値で、統計学的吟味を加へたものである。

* 別に報告の予定。

1955年北海道産の収穫後3ヶ月を経過した除虫菊乾花を厚さ3cmの屑にして電気乾燥器で80°に30分間熱処理を行い、他方熱処理を行はない対照区と共に石油缶に容れて室温で同一条件下に貯蔵して、以後 polarograph 法及び Seil 変法に依り pyrethrins 含量を検討した。その結果は Table 1 に示す如く、いづれも熱処理を行つたものは当初 pyrethrins は加熱に依る変質を受けて対照区より低い値を示すが以後の変質は極めて緩やかで対照区より高い pyrethrins 値を示した。之は熱処理を行つたものは enzymes が破壊又は不活性化されるため処理後はこれによる変質が少いものと考えてよい。

更に上記の実験に使用したものと同一の乾花を2kg

宛ビニール袋(無色、透明、厚さ0.04mm)に容れて密封し、一方は30°の恒温室に、他方は冷蔵庫(約5°)に貯蔵し、以後測定法に依り pyrethrins 含量を検討した。その結果は Table 2 に示す如くいづれも後者の方が常に高い pyrethrins 値を示した。之は冷蔵庫に貯蔵したものは enzymes の作用が弱く、反対に恒温室に貯蔵したものは旺盛なためであろうと考へられる。

(2) 除虫菊開花状態と組織汁液の pH

和歌山県当社園場で同じ管理の下に栽培された同系統の除虫菊品種を開花状態の進むにつれて採取し、直ちに乳鉢で磨砕して搾汁液を得、硝子電極に依り pH を測定した。その結果は Table 3 に示す如く、蕾か

Table 1. Degradation of pyrethrins in dried pyrethrum flowers by application of heat (80°C., for 30 mins.).

Pretreatment	Date	Polarographic method		Modified Seil's method (abs. %)			
		Pys. abs. %	Decrease ratio %	Pys. I %	Pys. II %	Total pys. %	Decrease ratio %
None	1955 Oct.	1.24	—	0.69	0.81	1.50	—
	1956 Jan.	1.10	11.3	0.64	0.71	1.35	10.0
	1956 May	1.02	17.7	0.61	0.68	1.29	14.0
At 80°C. for 30 mins.	1955 Oct.	1.20 ^{a)}	—	0.68	0.80	1.48 ^{a)}	—
	1956 Jan.	1.15	4.2	0.63	0.78	1.43	3.4
	1956 May	1.12	6.7	0.65	0.76	1.41	4.7

a) Analytical value immediately after treatment with heat.

Table 2. Degradation of pyrethrins in dried pyrethrum flowers stored at 30°C. and 5°C.

Date		Polarographic method		Modified Seil's method (abs. %)			
		Pys. abs. %	Decrease ratio %	Pys. I %	Pys. II %	Total pys. %	Decrease ratio %
At 30° C.	1955 Oct.	1.18	—	0.65	0.73	1.38	—
	1956 Jan.	1.05	11.0	0.59	0.68	1.27	8.0
	1956 May	0.94	20.3	0.53	0.64	1.17	15.2
At 5° C.	1955 Oct.	1.18	—	0.65	0.73	1.38	—
	1956 Jan.	1.14	3.4	0.63	0.72	1.35	2.2
	1956 May	1.12	5.1	0.63	0.71	1.34	2.9

ら満開直後に至る迄いづれも pH 5 附近を示し、開花状態と pH の間には一定の関係は見られないが強い酸性を示した。

Table 3. pH-values of pyrethrum flowers juice at several stages of efflorescence.

Stage of development	pH-values at 25°C.
Closed buds	5.00
1st. row disk floret open	5.09
2nd. and 3rd. row disk floret open	4.60
Fully open	4.90
5 days after fully open	4.73

(3) Pyrethrins 分解酵素系の最適 pH

和歌山県当社圃場から満開乃至満開後 5 日程度の除虫菊新鮮花を採取し、その 400 g に蒸溜水 200 cc を加えてヤゲンで磨砕して pH 5.9 の搾汁液 (酵素液) 200 cc を得た。この酵素液に等量の緩衝液を加えて各種 pH の酵素液 (pH 4.2, 5.9, 6.6, 7.4, 8.7, 9.1) を調製した。除虫菊粉 (基質) 15 g をシャーレに容れ、之に上記酵素液を 30 cc 宛加えて混和した後 30° の恒温器に 15 時間入れて基質に作用させた。シャーレに石油エーテルを加えて enzymes の作用を停止させた後、石油エーテルで soxhlet 抽出器に依り 15 時間抽出を行い、抽出液を測定量法に依り pyrethrins 含量を検討した。対照として酵素液を含まない各種緩衝液を上記と同一基質に混和して 30° に 15 時間保持して同様に処理して pyrethrins を定量した。その結果は Table 4 及び Fig. 1 に示す如く対照区の pyrethrins は酸性側では変化していないが alkali 性にな

るに従い変質を示している。尚酵素液中には測定量法共 pyrethrins の存在を認めなかった。酵素液を作用させた基質は pH 5.9 に於て最も変質が著しく、pyrethrins 分解酵素系の最適 pH は 6 附近にある事を認めた。

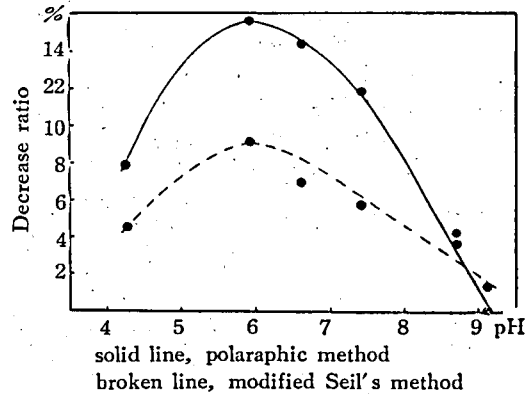


Fig. 1. Decrease ratio of pyrethrins in pyrethrum powder when treated with the pyrethrin decomposing enzyme preparation vs. pH values.

(4) Pyrethrins 分解酵素系の最適温度

和歌山県当社圃場から満開乃至満開後 5 日程度の除虫菊新鮮花を採取し、その 400 g に pH 7.0 の緩衝液 200 cc を加えてヤゲンで磨砕して pH 6.0 の搾汁液 (酵素液) 225 cc を得た。別に除虫菊粉 (基質) 15 g をシャーレに入れ、之に上記酵素液を 30 cc 宛加えて混和した後、直ちに 20°, 30°, 40° 及び 50° の恒温器に入れた。15 時間夫々の温度に於て作用させ

Table 4. Degradation of pyrethrins in pyrethrum powder when treated with the pyrethrin decomposing enzyme preparation at several pH-values.

pH	Polarographic method			Modified Seil's method				
	Control ^{b)}	Enzyme ^{a)} prepn.	Decrease ^{c)} ratio	Control ^{b)}		Enzyme prepn. ^{a)}		Decrease ^{c)} ratio
				Pys. I	Total pys.	Pys. I	Total pys.	
	%	%	%	%	%	%	%	%
4.2	0.77	0.71	7.8	0.39	0.88	0.36	0.84	4.5
5.9	0.77	0.65	15.6	0.39	0.88	0.34	0.80	9.1
6.6	0.77	0.66	14.3	0.38	0.87	0.35	0.81	6.9
7.4	0.76	0.67	11.8	0.39	0.87	0.35	0.82	5.7
8.7	0.71	0.68	4.2	0.35	0.82	0.33	0.79	3.7
9.1	0.67	0.67	0	0.32	0.73	0.31	0.72	1.4

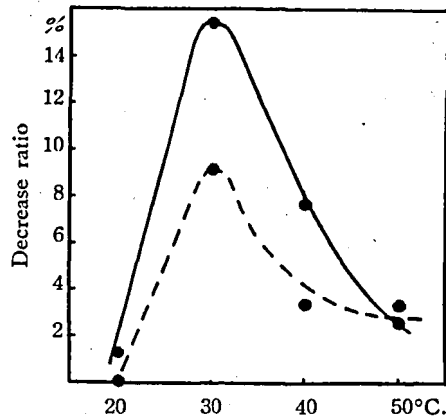
a) Prepared by adjusting pH-values of raw juice obtained from pyrethrum flower with buffer solution.

b) Buffer solution only of the same pH-values as those of enzyme preparation.

c) The ratio to respective value in control.

た後、石油エーテルを加えて enzymes 作用を停止させ、石油エーテルで soxhlet 抽出器に依り 15 時間抽出を行い、各抽出液について両定量法に依り pyrethrins 含量を検討した。対照として酵素液の代りに緩衝液 (pH 6.0) だけを加えて夫々の温度に保持した後同様に処理して pyrethrins を定量した。その結果は Table 5 及び Fig. 2 に示す如くいづれも対照区の pyrethrins は減少していないが enzymes を作用させたものは 30° の場合に最も変質が著しく、pyrethrins 分解酵素系の最適温度は 30° であることを認めた。尚酵素液は両定量法共 pyrethrins の存在を認めなかつた。

(5) 収穫後 2 ヶ月を経過した和歌山県当社圃場産出の除虫菊乾花を hammer mill で約 40 mesh に粉碎し、この 1 kg を厚さ 2 cm の層にして電気乾燥器で 80° に 90 分間熱処理を行い、緩衝液 (pH 6.4) 4 L. を加えて搾汁液 3 L. (pH 6.0) を得た。除虫菊粉 (基質) 15 g をシャーレに入れ、之に上記搾汁液 30 cc を混和して 30° の恒温器に入れ 1 時間、3 時間、6 時間



solid line, polarographic method

broken line, modified Seil's method

Fig. 2. Decrease ratio of pyrethrins in pyrethrum powder when treated with the pyrethrin decomposing enzyme preparation of pH 6.0 vs. temperature.

Table 5. Degradation of pyrethrins in pyrethrum powder when treated with the pyrethrin decomposing enzyme preparation at several temperatures and pH 6.0

Temp. °C.	Polarographic method			Modified Seil's method				
	Control ^{b)} %	Enzyme ^{a)} prepn. %	Decrease ^{c)} ratio %	Control ^{b)}		Enzyme prepn. ^{a)}		Decreased ^{d)} ratio %
				Pys. I %	Total pys. %	Pys. I %	Total pys. %	
20	0.78	0.77	1.3	0.39	0.88	0.38	0.88	0
30	0.77	0.66	15.4	0.38	0.88	0.33	0.80	9.1
40	0.78	0.72	7.7	0.38	0.87	0.36	0.85	3.4
50	0.77	0.76	2.6	0.39	0.87	0.36	0.85	3.4

a) Prepared by adjusting pH-value of raw juice obtained from pyrethrum flower at 6.0 with buffer solution.

b) Buffer solution of pH 6.0

c) The ratio to 0.78% in control.

d) The ratio to 0.88% in control.

Table 6. Degradation of pyrethrins in pyrethrum powder when treated with the juice of pyrethrum flowers previously treated with heat at 80°C. for 90 mins.

Hrs. ^{a)}	Polarographic method				Modified Seil's method					
	Without heat		Heat		Without heat			Heat		
	Pys. %	Decrease ratio %	Pys. %	Decrease ratio %	Pys. I %	Total pys. %	Decrease ratio %	Pys. I %	Total pys. %	Decrease ratio %
0	0.71	0	0.71	0	0.38	0.89	0	0.38	0.89	0
1	0.69	2.8	0.69	2.8	0.38	0.88	1.1	0.39	0.89	0
3	0.67	5.6	0.70	1.4	0.36	0.84	5.6	0.38	0.87	2.2
6	0.66	7.0	0.69	2.8	0.35	0.83	6.7	0.37	0.86	3.4
24	0.65	8.5	0.69	2.8	0.34	0.81	9.0	0.38	0.88	1.1

a) Time of treatment of pyrethrum powder with flower juice.

及び24時間後に夫々石油エーテルを加へた後、soxhlet 抽出器に依り15時間石油エーテル抽出を行ひ、抽出液中の pyrethrins を測定量法に依り検討した。又同時に熱処理を行はない粉1kgを同様に処理して搾汁液3L (pH 6.0)を得、同様に基質に作用させて pyrethrins を定量した。その結果は Table 6 に示す如く熱処理を施さないものから得られた搾汁液を作用させた基質のみに pyrethrins の減量を示した。以上より収穫後2ヶ月経過の除虫菊乾花中にも pyrethrins 分解酵素系が存在し、之が乾花貯蔵中に於ける pyrethrins 変質の重要な一因子となつているものと考へられる。

結 論

- (1) 除虫菊乾花の熱処理及び冷却貯蔵と pyrethrins の変質を検討し、更に熱処理に依り enzymes を不活性化させた除虫菊乾花から得られた搾汁液と無処理の乾花から得られた搾汁液を基質に作用させ、その pyrethrins の減量を検討し、pyrethrins を変質させる因子として酵素作用が大きく働いている事を確認した。
- (2) 除虫菊新鮮花の搾汁液の pH は蕾から満開直後に至る迄いつも強い酸性を示した。このように植物体内に於ける pyrethrins の生合成が酸性側で行われている事は pyrethrins の安定性の上からも興味深い事実である。
- (3) 除虫菊新鮮花の搾汁液を基質(除虫菊粉)に作用させ pyrethrins 分解酵素系の最適 pH 及び温度は pH 6, 30°である事を認めた。

文 献

- 1) Katsuda Y. et. al. : *Botyu-Kagaku*, **20**, 21 (1955).
- 2) Takei S. and Imaki T. : *Nogyo oyobi Engei*

(Japan), **8**, 1399 (1933).

- 3) Gnadinger, C. B., Evans, L. E., and Corl, C. S. : *Colo. Agr. Exp. Sta. Bul.*, 428 (1936).
- 4) Small J. : Hydrogen ion conc. in plant cells and tissues, (1929).
- 5) Ripert, J. and Gnadinger, O. : *Compt. rend. Acad. Sci.*, **200**, 2219 (1935).
- 6) Takei S. et. al. : *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, **16**, 389 (1940).
- 7) Katsuda Y. et. al. : *Botyu-Kagaku*, **20**, 15 (1955).

Résumé

Influences of the pyrethrin decomposing enzymes on the degradation of pyrethrins during the storage of dried pyrethrum flowers were studied.

(1) Enzymatic action was confirmed to be one of the most important factors of degradation of pyrethrins in dried pyrethrum flowers by means of the pretreatment with heat and storage in the cold.

It seems most desirable to treat with heat just after the harvest in order to avoid the enzymatic degradation of pyrethrins.

(2) pH of the juice obtained from fresh flowers was strongly acidic throughout the period of efflorescence. It is interesting from the viewpoint of stability of pyrethrins that they are biosynthesized under such an acidic condition.

(3) The pyrethrin decomposing enzyme preparation from fresh flowers has its optimum at pH 6 and at 30°C and acts on the substrate of pyrethrum powder most vigorously under such an acidic condition.

Closed Tank for Animal Manure. A New Device for Controlling the Fly Maggots from Animal Manure. Nanzaburo OMORI (Department of Medical Zoology, Research Institute of Endemics, Nagasaki University) Received Nov. 6, 1956. *Botyu-Kagaku* **21**, 144, 1956. (with English résumé, 148)

30. 大森式密閉堆肥舎について 大森南三郎(長崎大学 風土病研究所 衛生動物学研究室) 31.

11. 6. 受理

従来、物理的或は化学的な、いかなる方法でも駆除の極めて困難であつた堆肥から発生するイエバエ、サシバエの幼虫を完全に殺し得る密閉堆肥舎を考案試作したのでその概要を解説する。

緒 言

農村でのイエバエ、サシバエの主要な発生源は動物舎(馬、牛、豚、山羊、綿羊等の畜舎及び堆肥舎)で

あるが、動物舎及び堆肥舎の改善或は薬剤の撒布によつてこれらの蠅類を撲滅することが従来極めて困難であつたことは周知の通りである。諸外国でも古くからこの問題について頭を悩まし色々な物理的或は化学的