学会賞受賞論文

(業績賞)

アミドリン酸エステル系殺虫剤の生理活性および
代謝に関する研究

上 路 雅 子

農林水産省農業環境技術研究所農薬動態科

Biological Activity and Metabolism of Phosphoramidate Insecticides

Masako UEJI

National Institute of Agro-Environmental Sciences, Kannondai, Tsukuba 305, Japan

The mode of action of phosphoramidothioates was examined with reference to their anti-AChE activity. *N*-Isopropylphosphoramidothioate, isofenphos, was the most toxic to the adzuki bean weevil among *N*-alkyl substituted compounds. LD₅₀ values for the insects were not correlated with the *in vitro* anti-AChE activity of these oxons. It was demonstrated that phosphoramidothioates and these oxons became potent inhibitors of AChE by the incubation with the rat liver microsomal NADPH system and the chemical treatment with peracid. The inhibition of AChE activity was reduced by the addition of SKF 525-A to the microsomal system. The stereospecificity of isofenphos and its oxon on biological activity was obvious. The (+)-isomers of both the compounds were more toxic to insects than the (–)-isomers. Chiral isomers and racemate of isofenphos-oxon were activated with the microsomal NADPH system and the I₅₀ values became 1.47×10^{-7} M, and 6.19×10^{-5} M for the (+)- and (–)-oxon, respectively. The data suggested that the (+)-isomer was easily bioactivated and the I₅₀ values of chiral isomers after the bioactivation were sufficient to explain their insecticidal activity. ¹⁴C-Isofenphos metabolism was different between animals and plants. In mammals and insects, isofenphos was rapidly transformed into the water soluble metabolites, and in plant isofenphos and isofenphos-oxon were very persistent. Isofenphos was metabolized by (1) oxidative desulfuration, (2) desphenylation, (3) des*N*-alkylation and (4) *N*-desalkylation, and the formation of water soluble metabolites through isofenphos-oxon was proposed to be the main metabolic pathway. In all experiments, the conversion to water soluble metabolites was dominant in the cleavage of *P*-*O*-*C* (aryl) bond and only desphenyl compounds were found in plants. The effect of chirality was seemingly small in the metabolism of isofenphos based on the examination in the rat liver microsomal system and in the housefly. The amount of isofenphos-oxon metabolized from the (–)-isofenphos was always larger than that from the (+)-isomer, but quantitative differences of other metabolites between both the chiral isofenphos was obscure.

は じ め に

有機リン殺虫剤は農業害虫あるいは衛生害虫の防除剤として広く使用され、農産物の収量増加や高品質化、生活環境の向上などに大きく寄与してきた。有機リン化合物の殺虫力は、神経伝達に参与するアセチルコリンエス

テラーゼ (AChE) を阻害することによって発現し、強力な AChE 阻害活性を持つ化合物が、構造活性相関の見地に立って創製されてきた。有機リン殺虫剤の多くは、それ自身 AChE 阻害活性がないチオホスホリル基を持つチオノ体であり、生体内酸化酵素により生成されるオキソノ体が AChE 阻害剤となるような活性化現象が認め

られている。しかし、化学構造内に窒素原子を含有するアミドリン酸エステル系殺虫剤の場合、殺虫活性とオキソ体の AChE 阻害活性との間の関係が必ずしも明確でなく^{2,3)}、殺虫力の発現には異なった反応様式による体内活性化が寄与することが示唆されてきた⁴⁾。アミドリン酸エステル系殺虫剤の歴史は、浸透移行性の高い薬剤として開発された schradan で見られるように 1940 年代と古い。初期の化合物は哺乳動物に対する高い毒性と、合成上の困難さに由来して農薬としての使用は少なかった。近年、これらの問題点が解決され再びこの種の化合物の研究開発が活発に行なわれるようになってきたが、研究例は少なく、とりわけ殺虫力の発現機構について十分に解明されているとはいえなかった。

本研究は、*O,N*-dialkyl *O*-arylphosphoramidothioate (amidate) で表わされるアミドリン酸エステル系殺虫剤の生理活性発現機構、哺乳動物・昆虫・植物における代謝機構、および生理活性発現と代謝におよぼす光学特異性について解明する目的で行なわれたものである。以下、現在までの研究の概要を述べる。

生 理 活 性

1. 殺虫活性と AChE 阻害活性

窒素原子につく alkyl 基を $C_0 \sim C_4$ まで変えた *O*-ethyl *O*-2-isopropoxycarbonylphenyl *N*-alkylphosphoramidothioate ($P=S$ 結合、チオノ体) と各 phosphoramidate ($P=O$ 結合、オキソ体) を合成し、貯穀害虫のアズキゾウムシに対する殺虫力を試験管法により検定した。アズキゾウムシはチオノ体あるいはオキソ体との接触により苦悶を始め死に至るが、その症状は緩慢に進行した。殺虫力はアルキル置換基により非常に異なるほか、チオノ体とオキソ体との間でも相違が見られた。Table 1 で示す LD_{50} 値で比較すると、*n*- C_3H_7 、*n*- C_4H_9 基を例外として一般にチオノ体のほうが高い殺虫効果を示した。最も強力な殺虫力を持つ化合物は *N*-isopropyl (チオノ体) であり、 NH_2 、*N*- CH_3 、*N*- C_2H_5 誘導体も fenitrothion より強力であった。また、アルキル基の炭素数が同じでも構造の違いによって効力に差が認められ、殺虫力の強さを置換基の違いで表わすと、*iso*- $C_3H_7 > C_2H_5 > CH_3 > H > sec$ - $C_4H_9 > n$ - $C_3H_7 > n$ - $C_4H_9 > iso$ - $C_4H_9 > tert$ - C_4H_9 の順であった。

殺虫力の発現を説明するため、有機リン化合物では対象昆虫の酵素の阻害活性を調べることが一般的な実験方法である。一連の化合物のオキソ体によるアズキゾウムシおよび牛血清の AChE に対する阻害を調べた結果、実験に供したオキソ体は概して両 AChE に対し弱い阻

Table 1 Toxicity of *O*-ethyl *O*-2-isopropoxycarbonylphenyl *N*-alkylphosphoramidothioates and their phosphoramidates to the adzuki bean weevil.

N-Alkyl	48 hr LD_{50} (μg /test tube)	
	P=S	P=O
H	1.03	4.00
CH_3	0.99	3.01
C_2H_5	0.63	1.02
<i>n</i> - C_3H_7	7.01	5.68
<i>iso</i> - C_3H_7	0.52	0.85
<i>n</i> - C_4H_9	15.58	14.85
<i>iso</i> - C_4H_9	25.03	56.28
<i>sec</i> - C_4H_9	4.49	9.41
<i>tert</i> - C_4H_9	50.91	272.26
Fenitrothion	2.34	
Fenitroxon		1.76

Table 2 Inhibition by *O*-ethyl *O*-2-isopropoxycarbonylphenyl *N*-alkylphosphoramidates of acetylcholinesterase of the adzuki bean weevil and bovine serum.

N-Alkyl	I_{50} (M)	
	Adzuki bean weevil	Bovine serum
H	6.12×10^{-6}	3.37×10^{-5}
CH_3	1.36×10^{-5}	1.75×10^{-5}
C_2H_5	3.22×10^{-5}	2.63×10^{-5}
<i>n</i> - C_3H_7	1.55×10^{-4}	2.36×10^{-4}
<i>iso</i> - C_3H_7	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$
<i>n</i> - C_4H_9	2.52×10^{-4}	2.06×10^{-4}
<i>iso</i> - C_4H_9	5.21×10^{-4}	1.26×10^{-4}
<i>sec</i> - C_4H_9	3.43×10^{-4}	1.37×10^{-4}
<i>tert</i> - C_4H_9	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$
Fenitroxon	2.61×10^{-7}	1.31×10^{-6}

害剤であった (Table 2)。 I_{50} 値は、 NH_2 、*N*- CH_3 、*N*- C_2H_5 誘導体で $10^{-6} \sim 10^{-5}$ M を示したが、それ以外の化合物ではすべて 10^{-4} M 以上であり、とくに殺虫力の最も高かった isopropyl 誘導体の I_{50} 値は、 10^{-3} M 以上と *in vitro* での AChE 阻害はきわめて弱かった。Fukuto⁵⁾ は *N*-置換 alkylphosphoramidate の AChE 阻害活性にアルキル基の立体効果が大きく影響することを明らかにしており、Table 2 の結果はこれを支持したものである。

なお、実験に供した phosphoramidothioate の持つ高い殺虫活性は、オキシ体の AChE 阻害活性から説明することは困難であり、昆虫体内で活性代謝反応が進行していることを示唆した⁹⁾。

2. 酸化的活性化による酵素阻害の発現

有機リン殺虫剤の活性化反応は一般には、 $P=S \rightarrow P=O$ への脱硫化反応、チオエーテルあるいは $>\overset{||}{P}-S-$ で示される硫黄原子の酸化反応^{7,8)}、そして schradan で報告されているように窒素原子が関与するであろう酸化反応^{9,10)} などが現在まで明らかにされている。各活性化反応には、生体内酸化酵素が関与することが広く知られており、なかでも補酵素 NADPH 依存の薬物酸化酵素 mixed function oxidase (mfo) が重要な役割を果たしている。そこで、一連の合成化合物の活性化反応を確認する目的で mfo 活性の強いラット肝臓ミクロゾーム画分を用いて酸化反応を行ない酵素阻害について検討した。基質として *O*-ethyl *O*-2-isopropoxycarbonylphenyl *N*-alkylphosphoramidothioate および *N*-isopropyl 置換のオキシ体を使用し、常法に従って調製したラット肝臓ミクロゾーム-NADPH 系での反応後の牛血清 AChE 阻害活性を測定した。Table 3 は、*N*-isopropylphosphoramidothioate およびそのオキシ体の場合の結果を示しているが、チオノ体、オキシ体ともに NADPH の添加によって AChE 阻害は 25→82%，1→43% と高まり、両化合物は酸化を受けることにより活性化されることが明らかになった。さらに、mfo 阻害剤である SKF 525-A の添加が、チオノ体とオキシ体の AChE 阻害を抑制し、両化合物の酸化的活性化は mfo によって起こることを示唆した。さらに異なる *N*-alkyl 置換基を持つチオノ体の活性化の程度は、その置換基によって相違があり (Table 4), isopropyl, *n*-butyl, isobutyl 体で大きく現われたのに対し、*tert*-butyl, *sec*-butyl 体では低く、活性化の程度からのみだちに殺虫力の相違を求めることは難しい。

酸化的活性化反応は生体内酵素によるばかりでなく、過酸などとの化学的な酸化反応によっても起こることが報告されている¹¹⁾。そこで、殺虫効力および酵素反応による活性化の程度が最も大きかった *N*-isopropyl 体のチオノおよびオキシ体と、酸化剤 *m*-chloroperbenzoic acid (MCPBA) との反応後の AChE 活性を測定した。Table 5 に示すように、いずれの化合物も MCPBA 処理で AChE 阻害活性が高まり化学的酸化反応でも活性体が生成されて、AChE 阻害効果を発現することが明らかになった。mfo が関与する酸化反応から類推して、今回実験に供した アミドリン酸 エステルの酸化反応は、

Table 3 Effect of NADPH and SKF 525-A on oxidative activation by the rat liver microsomal system of *O*-ethyl *O*-2-isopropoxycarbonylphenyl *N*-isopropylphosphoramidothioate and its oxon.

Compound	NADPH	SKF 525-A	AChE inhibition (%)
P=S	+	—	82
	+	+	36
	—	—	25
P=O	+	—	43
	+	+	28
	—	—	1

Phosphoramidothioate and phosphoramidate 1×10^{-3} M.

Table 4 Oxidative activation by the rat liver microsomal system of *O*-ethyl *O*-2-isopropoxycarbonylphenyl *N*-alkylphosphoramidothioates.

<i>N</i> -Alkyl ^{a)}	AChE inhibition (%)	
	NADPH	— +
H		45 79
<i>n</i> -C ₃ H ₇		15 48
<i>iso</i> -C ₃ H ₇		25 82
<i>n</i> -C ₄ H ₉		24 76
<i>iso</i> -C ₄ H ₉		30 79
<i>sec</i> -C ₄ H ₉		25 37
<i>tert</i> -C ₄ H ₉		3 5

^{a)} *N*-isopropyl- and *N*-*tert*-butylphosphoramidothioate 1×10^{-3} M and other compounds 1×10^{-4} M.

Table 5 Oxidative activation by chemical agent of *O*-ethyl *O*-2-isopropoxycarbonylphenyl *N*-isopropylphosphoramidothioate and its oxon.

Compound	MCPBA ^{a)}	AChE inhibition (%)
P=S ^{b)}	—	3
	+	42
	++	68
P=O ^{b)}	—	0
	+	39
	++	54

^{a)} Amount of MCPBA was equi-molar (+) and twice-molar (++) .

^{b)} Phosphoramidothioate and phosphoramidate 3.3×10^{-4} M.

P=S 結合 → P=O 結合への酸化的脱硫化反応のほかに窒素原子周辺で起きていることが推察され、とくに活性代謝物は *N*-酸化反応あるいは *N*-脱アルキル反応によって生成されるものと考えられる。この種の化合物の生体内活性化の研究は、1950年代に schradan について活発に行なわれたが^{12,13)}、活性代謝物の構造が明確にされたとはいいがたい。活性代謝物の存在が示唆されてもその化合物の不安定性に起因して化学構造が決定されていないことも多く、さらに多くのアミドリリン酸エステル系殺虫剤を創製するためにも、真の活性代謝物の構造決定が期待される。

なお、本実験に供した化合物のなかで最も殺虫活性の高かった isopropyl 誘導体(チオノ体)は、現在、甲虫類たとえばコガネムシ、ドウガネブイブイのような土壌害虫の防除剤 isofenphos として使用されている。

生理活性におよぼす光学特異性

1. 光学活性体の殺虫力

有機リン酸エステルにつく3個の置換基が異なる場合にリン原子が不斉となり、光学異性体が存在する。有機リン殺虫剤でも生物活性と立体構造との関係について盛んに研究が進められ、光学異性体間で殺虫活性、魚毒性、あるいは哺乳動物に対する毒性などが異なることが報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。しかし、光学活性なアミドリリン酸エステル系殺虫剤の生物活性についての研究例がないことから、isofenphos およびオキソ体の isofenphos-oxon を用いてそれぞれの光学特異性を調べた。光学分割は光学異性体分離用充填剤 CHIRALCEL OC カラムをつけた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって行なった。移動相溶媒として *n*-ヘキサン：2-プロパノールを用い、isofenphos は $[\alpha]_D^{20} +17.89$ (*c* 2.09), -17.01 (*c* 1.47), そして isofenphos-oxon については, $+16.65$ (*c* 2.27), -16.70 (*c* 3.21) の旋光度を持つ活性体が得られ、さらに円二色性 (CD) の測定の結果、各光学活性体の CD 曲線は相互に完全な対称の関係にあった。イエバエとアズキゾウムシに対する殺虫活性は、Table 6 で示すように光学異性体間で明確な差が認められ、isofenphos, isofenphos-oxon とともに殺虫活性は (+)->(±)->(-)-体の順に強力で、(±)-体の LD₅₀ 値は(+)-体にきわめて近い値を示した。また試験に供した昆虫によっても光学異性体間の殺虫力の差は異なり、とくに、イエバエに対して (+)-isofenphos-oxon は (-)-体に比べ約 83.5 倍強力で、このような異性体間の大きな差は他に例を見ないものであった。

Table 6 Toxicity of chiral isomers and racemates of isofenphos and isofenphos-oxon to the housefly and adzuki bean weevil.

	Housefly	Adzuki bean weevil
	LD ₅₀ (μg/g)	LD ₅₀ (μg/test tube)
(+)-Isofenphos	6.57	0.95
(±)-Isofenphos	7.26	1.03
(-)-Isofenphos	72.97	10.84
(+)-Isofenphos-oxon	4.55	1.38
(±)-Isofenphos-oxon	7.34	1.89
(-)-Isofenphos-oxon	379.75	9.30

Table 7 Inhibition of acetylcholinesterase of the housefly by chiral isomer and racemate of isofenphos-oxon on activation with the rat liver microsomal system.

	NADPH	I ₅₀ (M)
(+) - Isofenphos-oxon	+	1.47×10^{-7}
	-	1.24×10^{-4}
(±) - Isofenphos-oxon	+	9.61×10^{-7}
	-	2.43×10^{-4}
(-) - Isofenphos-oxon	+	6.19×10^{-5}
	-	2.59×10^{-4}

2. 光学活性 isofenphos の酸化的活性化

光学活性体の殺虫活性は、酵素阻害の光学特異性に大きく影響を受ける^{17,18)}。しかしながら、isofenphos-oxon はいずれの活性体ともに *in vitro* で AChE の阻害活性はほとんど認められないことから、光学活性体について酸化反応後の AChE 阻害活性を測定し、活性化への光学特異性の関与の有無を検討した。ラット肝ミクロゾーム-NADPH 系で光学活性 isofenphos-oxon をインキュベートし AChE 活性を測定した結果、NADPH の添加の効果は異性体間で際立った違いがあり (Fig.1), (+)-oxon のほうがより強力な AChE の阻害剤となることが明らかになった。さらに、活性化後の I₅₀ 値をまとめてみると (Table 7), AChE 阻害は NADPH の添加により (+)-体で約 843 倍高められたのに対し、(-)-体ではわずか 4 倍にすぎず、異性体間で著しい差があった。この光学活性体およびラセミ体の isofenphos-oxon のミクロゾーム-NADPH 系における酸化的活性化後の AChE 阻害程度は、先に示した殺虫活性ときわめて高い相関関係にあり、(+)-, (±)-体の強力な殺虫力の発現が、活性化後の AChE 阻害活性に起因することを明確にし

Fig. 1 Bioactivation of chiral isomers of isofenphos-oxon by the rat liver microsomal system. (+)-Isfenphos-oxon: 5.61×10^{-6} M, (-)-isfenphos-oxon: 5.83×10^{-6} M.

Fig. 2 Inhibition of the adzuki bean weevil AChE by the chiral isomers and racemate of isofenphos-oxon with *m*-chloroperbenzoic acid.

た¹⁹⁾。なお、AChE の酵素源としてアズキゾウムシを用いた場合もイネバエと同様に活性化に光学特異性が認められた。

活性化は酸化剤との反応によっても引き起こされることを先に述べた。Fig. 2 は、過酸 MCPBA との反応後のアズキゾウムシ AChE 活性の阻害を示したもので、光学異性体間の I_{50} 値から (+)-体が (-)-体より約 100 倍強い活性を持ち、化学的酸化によっても (+)-体のほうがより強力な AChE 阻害剤に変換することが窺われた。このような活性化反応における結果から、光学特異性を発揮する反応ステップとしては、① 光学活性 isofenphos-oxon の酸化反応そのものか、あるいは ② 酸化

Fig. 3 Autoradiograms showing distribution of radioactivity in the rat body with the application of [O-ethyl-1- 14 C]isofenphos.

反応を受けて活性化された isofenphos-oxon と AChE との結合においてか 2 通りの可能性が提起された。前者の場合、光学異性体の代謝研究より活性代謝物を含めた代謝物の生成量と生成速度の差から、また、後者では基質と酵素との親和性の違いから推察できると考えられる。たとえば、光学活性体の生体内酸化活性化後の AChE 阻害活性が、リン酸化された AChE の再活性化における光学特異性と相関関係にあることが報告されている²⁰⁾。なお、活性化された isofenphos-oxon と AChE との反応性について検討した結果、親和性には光学特異性があり、(+)-体のほうが強力に結合することを見いだしている²¹⁾。

代 謝 機 構

1. 哺乳動物における代謝

ラットに [O-ethyl-1- 14 C]isofenphos を投与して経時的な 14 C-化合物の体内分布と排泄、代謝を調べた。 14 C-化合物は投与 6 時間後で多くの器官に分布しだいに減少したが、肝臓での蓄積が長期間におよんだ (Fig. 3)。ま

Fig. 4 Excretion of radiocarbon from male rats orally administered with $[O\text{-ethyl-1-}^{14}\text{C}]\text{isofenphos}$.

た、 ^{14}C -化合物の尿、糞、呼気への排泄を見ると (Fig. 4), 投与1日目にそれぞれの画分に投与量の73.0, 7.9, 2.3%が回収され, 2日目以降の排泄は急激に減少し実験終了日までに合計で91.8%が回収された。尿および糞から得られた大部分の ^{14}C -化合物は水溶性代謝物であり, isofenphosは投与後急速に極性の高い化合物に変換され排泄されたものと考えられる²²⁾。 ^{14}C -代謝物として構造が同定された化合物および未同定物質について, TLCによる R_f 値をTable 8にまとめた。同定された代謝物は, 有機溶媒可溶性物質として, aminoisofenphos (II), isofenphos-oxon (III), 水溶性物質として, des N -isopropyl isofenphos (IV), desphenyl isofenphos (V), des N -isopropyl isofenphos-oxon (VI), desphenyl isofenphos-oxon (VII), O -ethyl hydrogen phosphoramid-

Table 8 R_f values of isofenphos and its metabolites in thin-layer chromatography.

	Hexane: acetone (5: 2)	Benzene: MeOH (20: 1)	<i>iso</i> PrOH: NH_4OH : H_2O (75: 10: 15)	<i>n</i> -BuOH: AcOH: H_2O (80: 5: 5)
(I) $\begin{array}{c} \text{EtO} \\ \diagup \\ \text{R}_1\text{NH} \end{array} \text{P(S)OR}_2$	0.54	0.90		
(II) $\begin{array}{c} \text{EtO} \\ \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{P(S)OR}_2$	0.35	0.30		
(III) $\begin{array}{c} \text{EtO} \\ \diagup \\ \text{R}_1\text{NH} \end{array} \text{P(O)OR}_2$	0.26	0.20		
(IV) $\begin{array}{c} \text{EtO} \\ \diagup \\ \text{HO} \end{array} \text{P(S)OR}_2$			0.93	0.90
(V) $\begin{array}{c} \text{EtO} \\ \diagup \\ \text{R}_1\text{NH} \end{array} \text{P(S)OH}$			0.87	0.80
(VI) $\begin{array}{c} \text{EtO} \\ \diagup \\ \text{HO} \end{array} \text{P(O)OR}_2$			0.61	0.50
(VII) $\begin{array}{c} \text{EtO} \\ \diagup \\ \text{R}_1\text{NH} \end{array} \text{P(O)OH}$			0.54	0.25
(VIII) $\begin{array}{c} \text{EtO} \\ \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{P(O)OH}$			0.44	0.13
(IX) $\begin{array}{c} \text{EtO} \\ \diagup \\ \text{HO} \end{array} \text{P(O)OH}$			0.06	0.08
Unknown I	0.65	0.95		
II	0.44	0.71		
III	0.15	0.12		
IV			0.73	0.66
V			0.23	0.14
VI			0.15	0.10

Et: CH_2CH_3 ,

R_1 : $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,

Table 9 Percentage of radiocarbon recovered in the benzene and aqueous fraction on the incubation of [*O*-ethyl-1-¹⁴C]isofenphos with the rat liver homogenate and subcellular fractions.

	Isofenphos (M)	NADPH	PB ^{a)}	Benzene fraction (%)	Aqueous fraction (%)
Liver homogenate	3.03×10^{-5}	+	—	63.1	36.9
	"	—	—	87.3	12.7
Mitochondria	1.88×10^{-5}	+	—	77.8	22.2
	"	—	—	99.2	0.8
Supernatant fraction	1.88×10^{-5}	+	—	87.1	12.9
	"	—	—	97.9	2.1
Microsome	1.88×10^{-5}	+	—	38.8	61.2
	"	—	—	98.0	2.0
	2.78×10^{-5}	+	+	88.3	11.7
	2.67×10^{-4}	+	—	84.3	15.7

^{a)} Concentration of piperonyl butoxide (PB) was 1×10^{-4} M.Table 10 Distribution of radioactivity of metabolites recovered by the incubation of [*O*-ethyl-1-¹⁴C]isofenphos with the rat liver microsomal system.

Compound	Isofenphos (M)	2.67×10^{-4}	2.78×10^{-5}		2.78×10^{-5}
	NADPH, PB	+, —	+, —	+, +	—, —
I		36.5	24.6	70.4	96.3
II		0.8	0.3	0.2	0.1
III		26.3	1.6	13.7	0.2
IV		0.7	4.3	2.2	
V		3.0	12.7	3.7	
VI		0.8	6.6	1.3	
VII		9.8	28.9	5.5	
Unknown I		0.9			
II		3.9	0.6	3.0	0.3
III		6.4	0.5	0.5	0.4
IV		1.4	6.7	1.3	

Piperonyl butoxide (PB) was 1×10^{-4} M.

ate (**VIII**), *O*-ethyl dihydrogen phosphate (**IX**) であり, 脱 phenyl 体の生成がきわめて多かった. さらに, 代謝経路を想定するため代謝がより緩慢に進行する *in vitro* 条件下での代謝実験を行ない, 関与する酵素反応について検討を加えた. ラット肝を細胞分画して各画分と ¹⁴C-isofenphos をインキュベートし ¹⁴C-化合物のベンゼンおよび水層への分配を見た結果, いずれの反応系でも NADPH を添加することで水層からの ¹⁴C-化合物の回収割合が増加し, とくにこの傾向はミクロゾーム-NADPH 系で顕著であった (Table 9). ミクロゾーム-NADPH 系での代謝結果は Table 10 に示すように, isofenphos の多量区 (2.67×10^{-4} M) で isofenphos-oxon の増加と水溶性代謝物の減少が認められた. このことは isofenphos の主代謝経路が isofenphos → isofenphos-

oxon → 水溶性代謝物の生成であることを意味している²³⁾. さらに mfo 阻害剤である piperonyl butoxide の効果は, isofenphos の残留量, isofenphos-oxon の生成量の増加, 水溶性物質の生成の抑制をもたらした. mfo が関与する反応様式として明らかにされているように²⁴⁾, isofenphos の主反応である P=S 結合から P=O 結合への変換, *P-O*-aryl のエステル開裂の両反応に mfo が作用することが裏付けられた.

2. 昆虫における代謝

防除対象害虫としての甲虫目ドウガネブイブイと双翅目イエバエを供試昆虫として isofenphos の挙動を追跡した. 体表面に処理した ¹⁴C-isofenphos は, 速やかに体内に取り込まれ代謝を受け排泄されたが, 両昆虫間で体内吸収量, 代謝速度あるいは排泄速度に差異があった.

Fig. 5 Distribution of radioactivity recovered in the housefly and cage rinse with the topical application of [O-ethyl-1- 14 C]isofenphos.

Fig. 5 はイエバエに局所施用した時の 14 C-化合物の分布を経時的に示しており、処理1時間後で投与量の76%が体内に分布し、そして体内で代謝を受けて水溶性物質が生成され、時間の経過に伴って排泄量が増加することを明らかにしている。なお、体内吸収、水溶性物質への変換、そして排泄いずれもドウガネブイブイと比較してイエバエのほうが速やかであった²⁵⁾。 14 C-化合物を分析すると生成された代謝物の種類は両昆虫ともに同じであり、またそれはラットの *in vivo* で得られた代謝物とまったく同じであった。主代謝物質はやはり isofenphos-oxon で、さらにドウガネブイブイでは IX、イエバエでは VIII がとくに多く検出された。ドウガネブイブイのミクロゾーム-NADPH 系での *in vitro* 実験でも酵素活性は弱いもののラットと同様の結果が得られ、昆虫での isofenphos の代謝も mfo が関与する酸化反応が主要な代謝反応であることが示された。なお、ドウガネブイブイ飼育の土壌から回収された 14 C-化合物の大部分は体表面からはく離したと考えられる isofenphos であり、また、土壌での isofenphos の分解は緩慢であるという結果を得ている²⁶⁾。

3. 植物における代謝

Isofenphos をドウガネブイブイの寄主であるヒノキ苗木の茎頂部、茎基部あるいは根部に処理し、ヒノキへの吸収、移行および代謝を処理方法の違いから検討した。吸収は遅く、たとえば茎頂部への局所施用では処理30日目に体内取込量が最高になった。ヒノキ体内での 14 C-化合物の30日後の分布を Fig. 6 で見ると、処理方法でその分布に差が認められ、根部処理ではかなりの割合で処理部位より上部へ移行するが、地上部に処理された場合

には移行が少なく、とくに下方への移行性はきわめて小さかった。なお、地上部での 14 C-化合物はヒノキ茎の樹脂嚢に蓄積されたことが推察されている²⁷⁾。代謝はラットや昆虫と比較すると緩慢で isofenphos および isofenphos-oxon が長期間にわたって残留し、他の代謝物質はわずかであった (Table 11)。Isofenphos-oxon は地上部に処理した場合に多く回収されて、P=S 結合から P=O 結合への変換に太陽光が大きく影響することが、有機リン化合物の光分解の報告²⁸⁾から類推された。アミドリソンの植物における主代謝経路として脱 phenyl 反応が明らかにされているが²⁹⁾、ヒノキでも水溶性代謝物はこの反応によってのみ確認された。

各種生物における [O-ethyl-1- 14 C]isofenphos の代謝実験より得られた結果をもとにして、哺乳動物、昆虫、植物での代謝想定経路を Fig. 7 にまとめた。代謝は生物種間で isofenphos の代謝分解速度、生成する代謝物の種類と量などで明確な相違があった。また代謝様式として (1)酸化的脱硫化反応、(2)脱 phenyl 反応、(3)脱 N-alkyl 反応、(4) N-脱 alkyl 反応が関与することを明らかにした。Isofenphos は、土壌害虫に対して長期間にわたり殺虫活性を持続する^{30,31)}。この残効性が isofenphos の土壌および植物根での長期間の残留で説明づけられた。

光学活性 isofenphos の代謝

1. ラットにおける *in vitro* 代謝

生理活性に光学特異性が発揮されることを先に述べたが、薬物が生物体内に吸収され代謝が進行する過程でも、酵素反応などで光学特異性の影響を受け光学活性を持つ

Fig. 6 Autoradiograms of the Japanese cypress applied to the stem top, stem base and root with [*O*-ethyl- l - 14 C]isofenphos after 30 days.

Fig. 7 Proposed metabolic pathways of isofenphos in mammal, insect and plant.

Table 11 Distribution of radioactivity of metabolites from the Japanese cypress applied with [*O*-ethyl-1-¹⁴C]isofenphos.

Compound	Stem top application			Stem base application			Root application			
	4	10	30	4	10	30	4	10	30	75 (day)
I	90.0	84.6	49.6	76.3	73.3	68.7	93.7	87.2	87.8	71.0
II	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
III	7.3	12.3	45.3	21.7	25.1	28.3	3.3	9.6	7.7	23.6
V	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1
VII	0.1	0.1	0.2	1.7	1.2	2.5	0.3	0.4	0.2	0.1

Fig. 8 Metabolism of chiral isomers of [*O*-ethyl-1-¹⁴C]isofenphos by the incubation with the rat liver microsomal NADPH system.

代謝物が生成されることが明らかにされている^{32,33}。また、殺虫活性に反映する活性代謝物質が光学特異的に生成され、それによって異性体間での殺虫力を説明することが cyanofenphos などで行なわれた¹⁶⁾。そこで HPLC 法に従って光学分割した ¹⁴C-isofenphos を用いてラット肝細胞画分と反応させた結果、isofenphos の残存量、isofenphos-oxon の生成量あるいは水溶性代謝物質の生成量などに光学異性体間でわずかながら差異が見られた³⁴⁾。結果を Fig. 8 にまとめてみると、光学異性体間での違いは isofenphos-oxon 量に最も明確に現われ、さらに V などでも差があるが他の代謝物では生成量に光学異性体間の顕著な差は認められなかった。ミクロソーム-NADPH 系に piperonyl butoxide を添加した場合、未同定物質 II が (-)-isofenphos の反応においてのみ特異的に多く回収されたが、mfo による酸化反応については今後立体構造的な側面に立っての研究の必要性が示

唆された。

2. イエバエにおける代謝

一般に活性代謝物の生成量あるいは蓄積量が多い光学活性体ほど、強力な殺虫力を発揮することが予想される。イエバエでは、先に示したように isofenphos-oxon の光学異性体間の殺虫力の差が有機リン剤では例を見ない大きいものであったので、光学活性 isofenphos のイエバエ体内吸収、代謝物の生成速度、生成量を分析してこの化合物の光学特異性を探ってみた。体内吸収あるいは生成された代謝物の種類では、いずれの活性体でも同じであったが、(+)-体のほうが有機溶媒可溶性 ¹⁴C-化合物の減少が早く、すなわち水溶性代謝物の生成が速やかであった。Table 12 に処理 3, 24 時間後のイエバエのホモジネートおよび飼育容器洗浄液から回収された ¹⁴C-化合物量を示した。体内に取り込まれた isofenphos は (+)-体のほうが長時間残留したのに対し、isofenphos-

Table 12 Percentage of metabolites recovered in internal extract and container rinse of housefly topically applied with chiral isomers of [*O*-ethyl-1-¹⁴C]isofenphos.

Compound	(+) -Isfenphos				(–) -Isfenphos			
	Internal extract		Container rinse		Internal extract		Container rinse	
	3	24	3	24	3	24	3	24 (hr)
I	14.7	5.2	3.6	2.5	4.4	1.2	5.0	2.6
II	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.4
III	3.2	1.5	0.8	0.7	19.2	3.8	0.5	0.4
IV	2.2	1.5	1.8	1.8	3.6	1.3	1.6	2.4
V	6.6	3.1	4.2	5.0	1.9	0.7	1.7	2.9
VI	1.2	0.9	0.8	0.7	2.0	1.0	0.3	0.4
VII	1.2	2.0	0.9	0.8	1.7	0.6	0.8	0.9
VIII	6.2	6.6	6.4	8.8	3.9	3.2	5.6	10.9
IX	1.6	0.5	0.6	2.7	2.1	1.5	0.5	2.5
Unknown II	0.5	0.2	0.1	0.1	0.3	0.7	0.1	0.2
III	0.2	0.1	0.1	0.1	1.3	0.6	0.1	0.2
IV	2.8	2.0	2.0	2.4	1.4	0.2	1.6	3.3
VI	3.9	2.3	7.5	7.6	6.6	0.9	3.9	5.3

oxon の虫体ホモジネートからの回収は(–) -体のほうが多いなど、異性体間での差があった。しかし、これらの代謝実験の結果は光学活性 isofenphos および isofenphos-oxon の殺虫活性を説明できるほど明快ではなかった。光学異性体の代謝において異性体間で明らかな差が認められることもあるが³⁵⁾、差がほとんどないことも報告されている³⁶⁾。光学活性有機リン化合物は、異性体間で生理活性が著しく異なることも多く、環境毒性学の面からも今後光学活性農薬の使用が強く望まれている。アミドリン酸エステル系殺虫剤の生理活性発現に対する光学特異性の関与については、代謝酵素あるいは阻害酵素との反応性などの点からさらに検討すべき問題が残されていると考えられる。

お わ り に

殺虫剤がその殺虫力を発現するためには、その化合物と生物との接触、生体内への吸収、作用点への移行、生体内における代謝反応による化合物の活性化あるいは解毒、蓄積、排泄などいろいろな要因が関与する。有機リン殺虫剤は、1940年代からさまざまな角度に立って活発に研究が積み重ねられ、その結果数々の優れた殺虫剤が実用化されてきている。しかし、アミドリン酸エステル系殺虫剤は有機リン殺虫剤の登場とともに研究が開始されたものの、いくつかの問題点が残されてこの種の化合物の創製が遅れていた。本研究は、酸化反応によるアミドリン酸エステルの活性化機構を明らかにしたもので、この成果は Casida ら³⁷⁾の研究グループによっても確認されて

いるように、アミドリン酸エステル系殺虫剤の作用機構の解明に先導的役割を果たした。現在、生態系に調和したより安全で効率的な農薬の使用が望まれているが、この種の新規殺虫剤を創製するうえで、作用機構および代謝機構の本研究の結果が重要な知見を提供するものと考えている。

本研究遂行に当たり終始ご指導賜りました元農林水産省農業環境技術研究所農業動態科 富澤長次郎博士、ならびに農業動態科 宍戸 孝科長に心から感謝申し上げます。また、本研究進展にご指導とご協力をいただきました東北大学農学部 山下恭平教授、千葉大学園芸学部 本山直樹助教授、農林水産省林業試験場前林業薬剤第2研究室長 田畑勝洋博士、天敵微生物研究室長 三橋淳博士に深く感謝いたします。さらに、種々のご助言や励ましをいただきました農業動態科 上杉康彦元科長、村井敏信前科長をはじめ農業動態科の方々にも厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) J. C. Gage: *Biochem. J.* **54**, 426 (1953)
- 2) T. R. Fukuto, R. L. Metcalf, M. Y. Winton & R. B. March: *J. Econ. Entomol.* **56**, 808 (1963)
- 3) E. H. Blair, J. L. Wasco & E. E. Kenaga: *J. Agric. Food Chem.* **13**, 383 (1965)
- 4) M. Eto: "Organophosphorus Pesticides. Organic and Biological Chemistry," CRC Press, Inc., Cleveland, pp. 165–167, 1974
- 5) T. R. Fukuto: *Bull. Wld. Health Org.* **44**, 31

- (1971)
- 6) M. Ueji & C. Tomizawa: *J. Pesticide Sci.* **9**, 675 (1984)
- 7) J. J. Menn: *J. Econ. Entomol.* **55**, 90 (1962)
- 8) N. P. Hajjar & E. Hodgson: *Biochem. Pharmacol.* **31**, 745 (1982)
- 9) H. Tsuyuki, M. A. Stahmann & J. E. Casida: *J. Agric. Food Chem.* **3**, 922 (1955)
- 10) J. E. Casida, T. C. Allen & M. A. Stahmann: *J. Biol. Chem.* **210**, 607 (1954)
- 11) M. L. Fenwick: *Biochem. J.* **79**, 373 (1958)
- 12) E. Y. Spencer, R. D. O'Brien & R. W. White: *J. Agric. Food Chem.* **5**, 123 (1957)
- 13) J. E. Casida & M. A. Stahmann: *J. Agric. Food Chem.* **1**, 883 (1953)
- 14) A. A. Nomeir & W. C. Dauterman: *Pestic. Biochem. Physiol.* **10**, 121 (1979)
- 15) H. Ohkawa, N. Mikami & J. Miyamoto: *Agric. Biol. Chem.* **41**, 369 (1977)
- 16) H. Ohkawa, N. Mikami, Y. Okuno & J. Miyamoto: *Environ. Contam. Toxicol.* **18**, 534 (1977)
- 17) T. R. Fukuto & R. L. Metcalf: *J. Econ. Entomol.* **52**, 739 (1959)
- 18) A. J. Ooms & H. L. Bortter: *Biochem. Pharmacol.* **14**, 1839 (1965)
- 19) M. Ueji & C. Tomizawa: *J. Pesticide Sci.* **11**, 447 (1986)
- 20) A. H. Glickman, K. D. Wing & J. E. Casida: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **73**, 16 (1984)
- 21) 船城衛介・上路雅子: 日本農薬学会第13回大会講演要旨集, p. 70, 1988
- 22) M. Ueji & C. Tomizawa: *J. Pesticide Sci.* **12**, 245 (1987)
- 23) M. Ueji & C. Tomizawa: *J. Pesticide Sci.* **10**, 691 (1985)
- 24) T. Nakatsugawa & P. A. Dahm: *Biochem. Pharmacol.* **16**, 25 (1967)
- 25) M. Ueji & C. Tomizawa: *Appl. Entomol. Zool.* **22**, 380 (1987)
- 26) 上路雅子: 農業環境技術研究所報告 **4**, 125 (1988)
- 27) M. Ueji, C. Tomizawa & K. Tabata: *J. Pesticide Sci.* **10**, 703 (1985)
- 28) H. Ohkawa, N. Mikami & J. Miyamoto: *Agric. Biol. Chem.* **38**, 2247 (1974)
- 29) K. Mihara, K. Namba, Y. Misaki & J. Miyamoto: *J. Pesticide Sci.* **1**, 207 (1976)
- 30) K. O. Lawrence: *J. Econ. Entomol.* **74**, 543 (1981)
- 31) H. Tashiro, T. D. Spittler & E. Greco: *J. Econ. Entomol.* **75**, 906 (1982)
- 32) H. Ohkawa, N. Mikami & J. Miyamoto: *Agric. Biol. Chem.* **40**, 2125 (1976)
- 33) A. Miyazaki, M. Kawaradani, S. Marumo & C. Tomizawa: *J. Pesticide Sci.* **8**, 115 (1983)
- 34) M. Ueji & C. Tomizawa: *J. Pesticide Sci.* **12**, 269 (1987)
- 35) H. Ohkawa, N. Mikami & J. Miyamoto: *Agric. Biol. Chem.* **42**, 445 (1978)
- 36) P. W. Lee, R. Allahyari & T. R. Fukuto: *Pestic. Biochem. Physiol.* **8**, 146 (1978)
- 37) G. W. Gorder, O. Kirino, A. Hirashima & J. E. Casida: *J. Agric. Food Chem.* **34**, 941 (1986)