

---

## 衛生・農業害虫防除を目的とする生態化学的研究

Eco-chemical approaches to control of pest insects of medical and agricultural importance

代表研究者	東京農業大学農学部教授 Prof., Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture Izuru YAMAMOTO	山本 出
協同研究者	神戸大学農学部教授 Prof., Faculty of Agriculture, Kobe Univ. Shoichi MATSUNAKA	松中 昭一
	名古屋大学農学部教授 Prof., Faculty of Agriculture, Nagoya Univ. Shozo KUWATSUKA	鍛塚 昭三
	東京農業大学農学部教授 Prof., Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture Hiroshi HONDA	本田 博
	東京農業大学総合研究所講師 Lecturer, NODAI Res. Inst., Tokyo Univ. of Agriculture Kanju OHSAWA	大沢 貫寿
	東京農業大学農学部副手 Res. Assoc., Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture Kaoru TANAKA	田中 薫

The potentiality of pest insect control was attempted by finding the ecological Achilles tendon of the pests in terms of ecochemicals which mediate the interaction of an organism with organisms or the environment. The following three subjects were chosen for pursuing such possibility.

- I. Regulation of sex and oviposition behaviors of bean weevils.
- II. Mode of mosquito larvicidal action of diphenyl ether herbicides in relation to apparent correlation between the decrease of Japanese encephalitis patients and the increased use of the herbicides.
- III. Provision of model ecosystems which will serve to predict environmental behaviors of ecochemicals and environmental pollutants.

### Subject I

1. Many facets of the life cycles of bean weevils are regulated by ecochemicals. Males of the azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis*, are attracted to females by a sex attractant. From over 120 thousand virgin females, a distinctly attractive fraction was isolated and partially characterized.

2. The males attracted to the females are stimulated by a copulation release pheromone, erectin, which induces them to extrude their genital organ and to attempt copulation. Erectin was isolated only in minute amounts and consists of two synergistically acting fractions, neither having any activity. One is a mixture of several hydrocarbons, the other is (E)-3,7-dimethyl-2-octene-1,8-dioic acid (C-acid). If erection can be available in an amount sufficient for practical use and if the copulation can be disturbed with erectin, resulting in the lowering of the population density, this method may become a new control approach. The first requisite was achieved by developing a convenient synthetic method of C-acid from 2,6-dimethylcyclohexanone. Also the

complex hydrocarbon mixture was substituted by a single hydrocarbon, say octadecane. Each enantiomer of C-acid was synthesized and was shown to be active, while the absolute configuration was not determined by this method. The second requisite has been examined by using a female dummy consisting of aluminum foil having gap of ca. 50 micrometers and erectin, to which the male makes copulation and ejaculation of spermatophores.

From the closely related cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, the presence of a copulation release pheromone was demonstrated by an innovative bioassay method. The chemical nature seemed different from erectin of *C. chinensis*. Furthermore, the presence of a copulation release pheromone was detected from yellow mealworm, *Tenebrio molitor*. From this insect a sex attractant was also detected.

3. After copulation the females deposit the eggs uniformly among the host beans. However, eggs which are deposited beyond the capacity of a bean which feeds the larvae do not hatch. Such strategy is for reducing the competition among the larvae and for maximally utilizing the host beans, and seems to be regulated by BCS (biological conditioning substance), which is released from the body of the weevil. BCS is a mixture of lipids and each component was identified. The time course study of egg deposition and distribution among host azuki beans indicated that both the eggs and BCS affected preferential oviposition by the weevils on the less conditioned eggs until the stage of 3 eggs and 20  $\mu\text{g}$  of BCS per bean, then the subsequent oviposition was conducted randomly. BCS accumulated to a level of 100  $\mu\text{g}$  shows ovicidal action, thus eliminating most of the eggs except those oviposited in earlier stages which have already hatched and penetrated into the bean. Pretreatment of beans with BCS in an excess amount killed all the eggs, thus protecting the beans. Search for ovicidal substances other than natural BCS among synthetic chemicals and tropical plants provided several effective substances.

#### Subject II

1. The statistics suggested that the decrease in numbers of Japanese encephalitis patients had close correlation with the rapid increase in application of diphenyl ether herbicides in paddy fields which began in 1966. Although an attempt to confirm such correlation by surveying annual changes of the patients and use of such herbicides in Kumamoto prefecture where still a small number of the patients are observed in each season, or the difference from other prefectures was failed, because the number of patients in Kumamoto in 1982 was too small to obtain any statistically significant result, the effect of diphenyl ether herbicides to decrease mosquito larvae was studied in detail.

For laboratory study, *Culex pipiens molestus* was used instead of *Culex tritaeniorhynchus* which is the vector of the encephalitis. Nitrofen, a representative diphenyl ether herbicide, suppressed the number of mosquito larvae in flooded paddy field, but had no effect on respiration and acetylcholinesterase of the larvae. In a small vessel, nitrofen decreased its larvicidal activity when the number of the larvae increased. No increase in leakage of ions, proteins or nucleic acids from larval bodies was detected, while some components of cellular membrane adsorbed nitrofen effectively. Therefore, it is assumed that nitrofen is first adsorbed on cellular membrane, then inhibits the function of the membranes when the adsorbed amount increases over certain limit, thus resulting in killing of the larvae.

#### Subject III

The fate of two pesticides, diazinon and benthocarb, were compared in terms of the disappearance of the active ingredients from soil, the transfer into the air, and their effects on the population of soil microorganisms in five types of paddy ecosystems: a paddy field, Wagner pots, two types of closed model ecosystems, and flasks in a flooded soil condition. Thus the system is shown to be workable for predicting behaviors of chemicals put into the environments.

---

#### 研究目的

本研究は害虫駆除に対して必ずしも殺生剤 (biocides) によらず、昆虫生態の化学的研究を基

礎として害虫密度を被害許容限度内に保つ制虫剤 (insectistatics) を開発することを主たる目的としている。

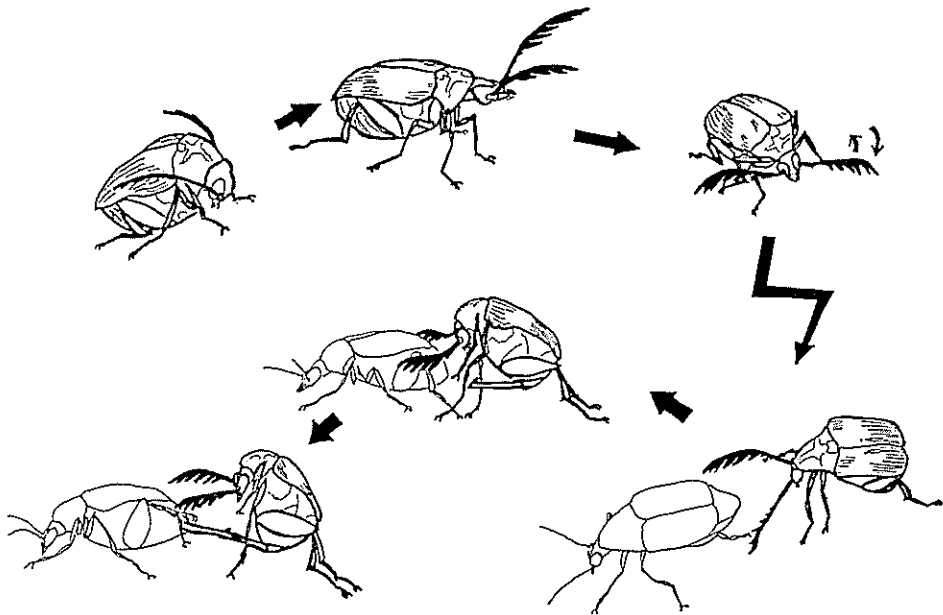


図 1 アズキゾウムシの配偶行動

在来型農薬 (pesticides) はその英名の示すごとく標的生物の生理・生化学的重要作用点に働いて致死効果をもたらすものである。その本質が殺生剤であるため厳しい毒性学的評価を受け、特に生態系への影響については、その対象が複雑多岐にわたるため、実用使用前の十分な評価が困難であり、往々にして不測の事故を起こす。これに対し農薬開発の従来型アプローチをさらに精緻にすることが行なわれているが、それだけにいわゆる無公害農薬の開発は加速度的に困難となってきた。

ここに発想を新たにしたアプローチの必要性がある。生物相互の間、生物とその環境の間の生態的相互作用が化学物質を介して行なわれることがあり、特に昆虫において著しい。この化学物質を生態相関物質 (ecochemicals) という。本研究はこのような化学物質の観点から生物間、生物と環境との相互作用を理解し、この知見をフィードバックして昆虫の生態制御による駆除の可能性を探らうとするものである。

そこでマメゾウムシ類をとりあげ、この繁殖生態上の弱点を化学的に解明してここに作用する薬剤の探索・利用をめざした (研究 I)。

またジフェニルエーテル系の除草剤が日本脳炎の媒介昆虫のコガタアカイエカの防除に有効らしいという従来型農薬が本来の目的と異なった生態的効果を示す情報があり、このことの科学的根拠を解明することによる新たな展開を期待した (研究 II)。

さらに環境汚染物質はもとより、生態相関物質といえども環境中における挙動は十分に追跡されるべきであり、モデルエコシステムの設計を試みた (研究 III)。

研究 I マメゾウムシ類の交尾・産卵行動の化学とその制御: 山本 出, 本田 博, 大沢貫寿, 田中 薫

研究 II 蚊幼虫へのジフェニルエーテル系除草剤の作用: 松中昭一

研究 III モデルエコシステムによる化学物質の挙動解析: 鍛塚昭三

#### 研究経過と成果

研究 I マメゾウムシ類の交尾・産卵行動の化学とその制御研究

I-1. アズキゾウムシの配偶行動 (図 1)

静止またはランダムに歩行していた雄は、雌が

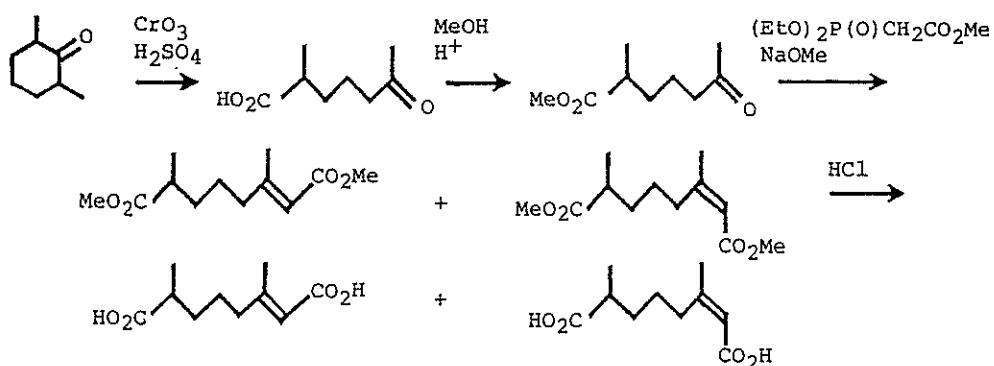


図 2 Callosobruchusic acid の合成法

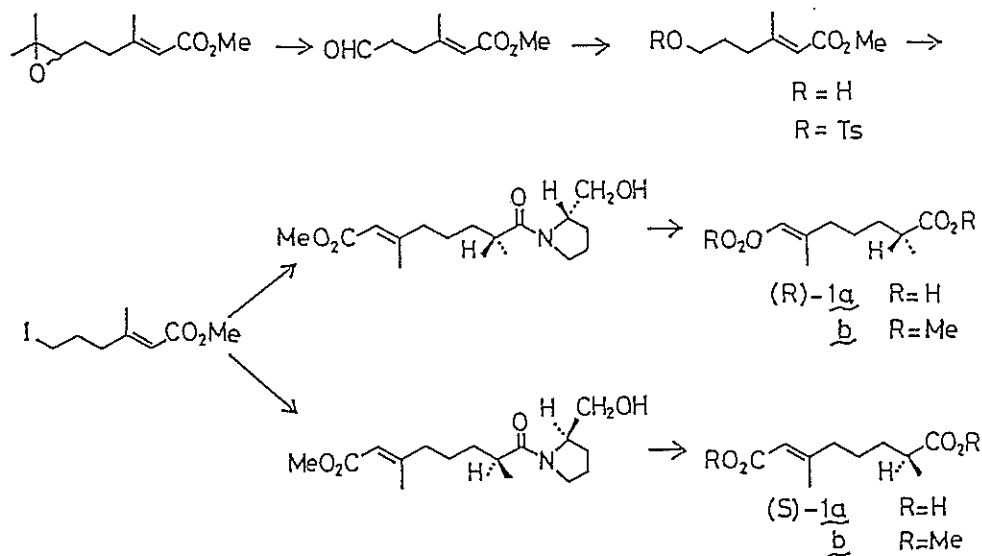


図 3 Callosobruchusic acid の光学活性体の合成法

近いと触角を立て、ジグザグに雌の方向にかけだす。飛しょう中の雄は雌の近くでホバリングを行ない、やがて着地して雌に向いかけだす。この行動を被誘引行動とよぶ。雌に触れると雄は触角を下げ、頭を曲げようとする。雌は前進することもあるが、雄は触角を下げたまま追いかけて、雌が静止すると頭を曲げ、腹部末端を押出し、交尾器を

突きだし、交尾を成立させる。この行動を交尾行動とよぶ。以上の配偶行動は死んだ雌によっても触発されるが、エーテル洗浄すればもはやみられなくなるので、化学因子の存在が推定された。処女雌を容器内で飼育し、通気し、揮発性物質を捕集したところ、これが雄に被誘引行動を触発することを見出した。しかしこの性誘引フェロモンは

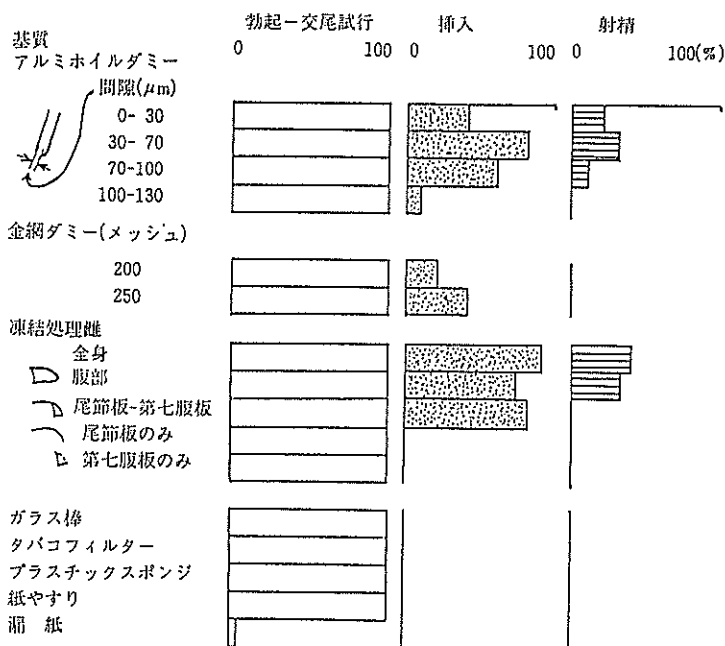


図4 アズキゾウムシの雌分泌物をつけた各種基質への雄の反応

交尾行動は触発しなかった。その後雌飼育容器の付着物から交尾行動のみを触発する交尾フェロモンを見だし、これを *erectin* と命名した。

a. 性誘引フェロモンの分離 未交尾雌約 12 万 5000 頭が放出する揮発成分を吸着剤 PORAPAK-Q で捕集し、ペンタンで抽出し、抽出物を液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー (PEG-HT, OV-17) により分画し、誘引試験と組合せ活性化化合物を分離した。保持時間は *tetradecyl acetate* と *diethyl sebacate* との間にあり、外部標準試料との比較から、性誘引フェロモンの量は約 7 pg/♀ と計算された。EI マススペクトルの基準ピークは  $m/z$  69 で、他に 57, 81, 95, 109, 121, 137, 150, 163, 177, 191, 205, 218, 229, 246 を認めた。CI マススペクトルの基準ピークは  $m/z$  111 であって、246 もあるが小さく、他にも小さいピークがあるため、分子量を 246 と確定はできなかった。研究を続行中である。

b. 交尾フェロモン, *erectin* の合成 *Erectin* は数種の炭化水素と *callosobruchusic acid* [(E)-

3,7-dimethyl-2-octen-1,8-dioic acid, C-酸と略] とからなり、両者を合せた時のみ活性が現れる。いずれも合成済みであるが、C-酸を効率よく合成する新しい方法を考案した (図 2)。C-酸に市販の炭化水素 (例えば *octadecane*) を加えれば, *erectin* 同様の活性を示した。

表 1 アズキゾウムシへの天然および合成 *callosobruchusic acid* の交尾発発活性

	反応した雄の数
天然 C-酸*	16.3
合成 (R)-C-酸*	14.3
合成 (S)-C-酸*	16.0

\* *Callosobruchusic acid* 15 ng を雌から得た炭化水素混合物 12 μg と合せ試験。

c. *Callosobruchusic acid* の立体化学構造解明の試み (図 3) C-酸 (1a) は 7 位に不斉炭素をもつ。R と S の光学活性体をそれぞれ合成し、天然物と交尾フェロモン活性を比較した。表 1 に示すように 3 者間に差はなかった。したがって合成的には絶対立体配置は決定できなかったが、他方天然物の代りに合成ラセミ体を使用できること

表 2 アズキゾウムシの生物学的条件づけ物質 (BCS) の組成

BCS	約 40 $\mu\text{g}/\text{♀}$ (%)	約 10 $\mu\text{g}/\text{♂}$ (%)	約 48 $\mu\text{g}/\text{♂♀}$ (%)
酸性成分	12.7	13.2	12.1
lauric acid	0.1	—	—
myristic acid	0.1	0.3	—
palmitic acid	3.1	3.6	2.4
stearic acid	2.2	2.3	1.4
oleic acid	4.0	5.5	5.5
linolic acid	2.2	1.3	1.3
linolenic acid	0.6	—	0.5
others acid	0.4	0.1	0.9
中性成分	87.1	86.4	87.7
炭化水素	32.8	80.2	56.5
3-methylpentacosane	0.3	0.5	0.9
Heptacosane	3.1	7.2	4.9
11-methylheptacosane	4.7	28.2	14.2
3-methylheptacosane } 11,15-dimethylheptacosane }	6.9	24.6	15.2
octacosane } 10,11-dimethylheptacosane }	0.2	0.5	0.4
12-methyloctacosane	0.1	0.2	0.1
nonacosane	0.2	0.1	0.1
11-methylnonacosane } 13-methylnonacosane }	4.8	10.6	8.9
3-methylnonacosane } 11,15-dimethylnonacosane }	3.0	7.7	5.9
13-methylhentriacontane	0.5	0.2	0.5
9,13-dimethylhentriacontane } 11,15-dimethylhentriacontane }	2.6	0.5	1.9
11,15-dimethyltritriacontane	0.6	0.2	0.7
トリグリセリド	44.1	5.1	24.3
C <sub>3</sub> +C <sub>45</sub>	0.4	—	0.2
C <sub>3</sub> +C <sub>50</sub>	8.4	1.0	4.6
C <sub>3</sub> +C <sub>62</sub>	21.1	2.4	11.6
C <sub>3</sub> +C <sub>64</sub>	14.0	0.7	7.7
C <sub>3</sub> +C <sub>66</sub>	0.3	—	0.1
その他	10.2	1.1	6.9

がわかった。C-酸のラセミ体と光学活性アルコールとのジアステレオアイソマーのエステルをガスクロマトグラフィーで分離し、C-酸の光学活性体を得る試みを実施中である。

d. Erectin をつけた雌ダミーの開発 切断した雌腹部に対し雄は全交尾行動 (勃起-交尾試行, 挿入, 射精) を示すが, erectin をつけたガラス棒に対しては勃起-交尾試行しか行なわない。そこで挿入, 射精を起こさず基質の探索を行ない, 2 種の雌ダミーを作成した。一つは erectin をつけた金網 (200, 259 メッシュ) であり, 勃

起-交尾試行と挿入が行なわれた。他は erectin をつけたアルミホイル製管である。アルミホイル (1×0.7 cm) を直径 1 mm になるように巻き, ピンセットでつぶした。隙間の間隔が重要であり, 30-70  $\mu\text{m}$  の場合 80% の雄が挿入し, 30% が射精した (図 4)。その際隙間の開口部が床から 1 mm の高さの場合挿入が最も良かった。

e. ヨツモンマメゾウムシの交尾フェロモン アズキゾウムシの場合と同じ生物試験法 (ガラス棒に雌分泌物をつける) ではヨツモンマメゾウムシの雄は勃起-交尾試行を示さなかった。ヨツモ

表 3 アズキゾウムシによる産卵選択

S 側	vs.	C 側	Ns/Nc									
			あらかじめ産卵させた卵数 (マメ 1 個当たり)									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
i) 産卵マメ	vs.	新鮮マメ	0.40	0.26	0.04	0	0.02	0	0.01	0.03	0.03	0
ii) 産卵マメ	vs.	産卵マメを エーテル洗浄	0.41	0.11	0.11	0.01	0.02	0.04	0.05	0	0.06	0
iii) 卵除去マメ	vs.	新鮮マメ	0.70	0.48	0.48	0.64	0.27	0.29	0.35	0.26	0.11	0.33
iv) 産卵マメを エーテル洗浄	vs.	新鮮マメ	0.84	0.42	0.27	0.24	0.33	0.55	0.28	0.05	0.08	0.16

S, C それぞれ 10 個をシャーレに交互に配置し, 雌成虫 10 匹を 1 時間放つ。

表 4 アズキゾウムシにおける卵および BCS の産卵分布型への影響

		アズキ 1 粒当たり 平均産卵数	適合性 $\chi^2$	分布型
対照区		3.0	52.5	一様分布
i. 3 卵区	a. BCS なし	2.8	14.6*	ポアソン分布
	b. BCS 20 $\mu\text{g}/\text{マメ}$	2.5	17.6	一様分布
ii. 7 卵区	a. BCS なし	3.0	5.7**	ポアソン分布
	b. BCS 60 $\mu\text{g}/\text{マメ}$	2.6	41.9	集中分布
iii. BCS	a. 40 $\mu\text{g}/\text{マメ}$	2.9	23.5	一様分布
	b. 80 $\mu\text{g}/\text{マメ}$	2.3	7.5**	ポアソン分布
	c. 160 $\mu\text{g}/\text{マメ}$	2.4	16.1	集中分布
iv. 経時変化				
1 日後		2.0	53.5	一様分布
2 日後		3.4	65.6	一様分布
(2 日後-1 日後)		1.4	25.3	一様分布
3 日後		4.9	50.2	一様分布
(3 日後-2 日後)		1.5	7.8**	ポアソン分布
4 日後		5.8	60.5	一様分布
(4 日後-3 日後)		0.9	9.0**	ポアソン分布

\* 有意水準 5% でポアソン分布が有意。

\*\* 有意水準 1% でポアソン分布が有意。

シャーレにアズキ 150 粒を入れ, 雌雄 10 対を放つ。i, ii, iii は 4 日後に観察。

ンマメゾウムシの雄の交尾器はアズキゾウムシのそれよりはるかに短く, このため雄は前脚および中脚で雌をかかえこんで交尾するが (アズキゾウムシの場合雄の前脚は離れており, わずかに触れる程度), ガラス棒ではこの動作がしにくいためと解した。そこで虫体をエーテルで脱脂したものに雌分泌物をつけたところ, 勃起-交尾試行が観察しやすく反応率も高かった。この試験法を用い分画を行ない, 酸性物質を得た。アズキゾウムシからの C-酸は単独でヨツモンマメゾウムシの雄の交尾行動を触発したが, 上記の酸性物質は C-酸とは異なるものであった。

f. チャイロコメノゴミムシダマシの性フェロモン 雌のエーテル抽出物は  $10^{-2}$  雌当量で約 80% の雄の交尾行動を触発した。活性を呈する中性区分を液体クロマトグラフィーで分画, 活性区分を TMS 化してガスクロマトグラフィーで分画, 各区分の TMS 基を加水分解して活性を検定し, 活性成分を分離した。同定の試みを実施中である。またこの昆虫に性誘引フェロモンの存在を認め, 中性物質であることを知った。

#### I-2. マメゾウムシの産卵行動

アズキゾウムシ, ヨツモンマメゾウムシについて二つのめだつた現象がある。第 1 は低密度飼育

条件下では雌成虫はアズキ間にほぼ均等に産卵することである。第2は密度が高くなり、アズキ1個当たりの産卵数が平均10個をこえるようになると、産卵分布はランダムになるとともに初期の数個の卵のみが孵化し、他は死亡する。この戦略は子孫に均等に餌を配分し幼虫間の競争を避けさす目的にかなっている。これには雌雄成虫が分泌し、寄主アズキ上を這いまわる間に付着さす生物的条件づけ物質 (biological conditioning substance, BCS と略) が関係しており、BCS は産卵初期には量が少ない方のマメに産卵を導く産卵目印フェロモンとして働き、産卵が過度になり、BCS の量が増すと殺卵物質として働き、マメゾウムシの密度調節機能を果たしている。

a. BCS の化学組成 脂肪酸, グリセリド, 炭化水素の混合物からなる。アズキゾウムシについて成分の詳細を表2に示す。

b. アズキゾウムシの産卵行動の解析 b-(1) 産卵選択の要因 あらかじめ1-10個の卵を産卵させておいたアズキを準備し、ある処理(S)を施したアズキ10粒と別の処理(C)を施したアズキ10粒とをシャーレ内に交互に並べ、受精雌10頭を1時間放ち、S側とC側の試験中に行なわれた産卵数(NsとNc)を数えた。その結果を表3に示す。この試験はアズキ表面の次の状況を比較したものである。i) 卵+BCS vs. なし, ii) 卵+BCS vs. 卵, iii) BCS vs. なし, iv) 卵 vs. なし。この結果から卵あるいはBCSは数ないし量が多いほど産卵選択への効果が大きく、自然条件下では卵とBCSとが協力してそれらの少ない方に産卵を導いていることがわかった。マメ全部をBCSで処理しておくとも多少ためらうが結局無処理同様に産卵するのでBCSは産卵阻止効果をもつものではない。

b-(2) 産卵分布に及ぼす要因 (表4) あらかじめ産卵させたアズキ(3卵/マメ)をエーテル洗浄した場合(i-a), しない場合(i-b), 7卵/マメにつき同様の処理をした場合(ii-a, b), あらかじめ新鮮アズキをBCSで処理した場合(iii), 毎日雌を更新しアズキに産卵させた場合(iv)につき産卵分布をみた。結論として、雌は一度産卵したアズ

表5 食用油脂によるマメ害虫への殺卵効果

	孵化卵(%)	
	ヨツモンマ メゾウムシ	アズキ ゾウムシ
対照	84	95
Sesame oil	10	10
Lard	0	0
Rice oil	4	12
Cotton seed oil	36	25
Peanut oil	15	8
Soybean oil	46	58
Whale oil	21	53
Coconut oil	7	34
Palm oil	39	8
Margarine oil	3	26
Butter oil	8	10
Salad oil	5	26
Rapeseed oil	0	8
Olive oil	8	53

油脂(150 $\mu$ g/マメ)処理したアズキ300粒に成虫20対を放ち産卵させた。

キを離れ、アズキ上の卵とBCSの多少を感知し、少ない方のアズキに選択産卵することで一様分布となるが、卵数、BCS量が増えると差を感知できずランダムに産卵し、ポアソン分布を呈する。平均産卵数が6-10卵のときも見掛け上一様分布を示すが、経時的に増加する分の産卵分布を解析すると、3-4卵/マメ以後の産卵はランダムに行なわれていることがわかった。つまり選択産卵が行なわれるのは約3卵/マメ(BCS20 $\mu$ g/マメ)以下のときであり、それから先はランダム産卵であるが約10卵/マメまでは見掛け上一様分布の型をとる。その後ポアソン分布を呈し、卵やBCSが更に多くなると雌は動きが鈍く産卵周辺アズキに産卵する傾向がまし、集中分布となる。

c. リピド利用によるマメ害虫の防除 BCSは量が増すと殺卵効果を呈する。炭化水素区分の活性が他よりも大であった。食用油脂による殺卵効果を表5に示す。供試した合成物のうちでデカン酸が最強であった。いくつかの植物のうちアノナとナンキンハゼの抽出物の活性が大であった。

研究II 蚊幼虫へのジフェニルエーテル(DE)系除草剤の作用



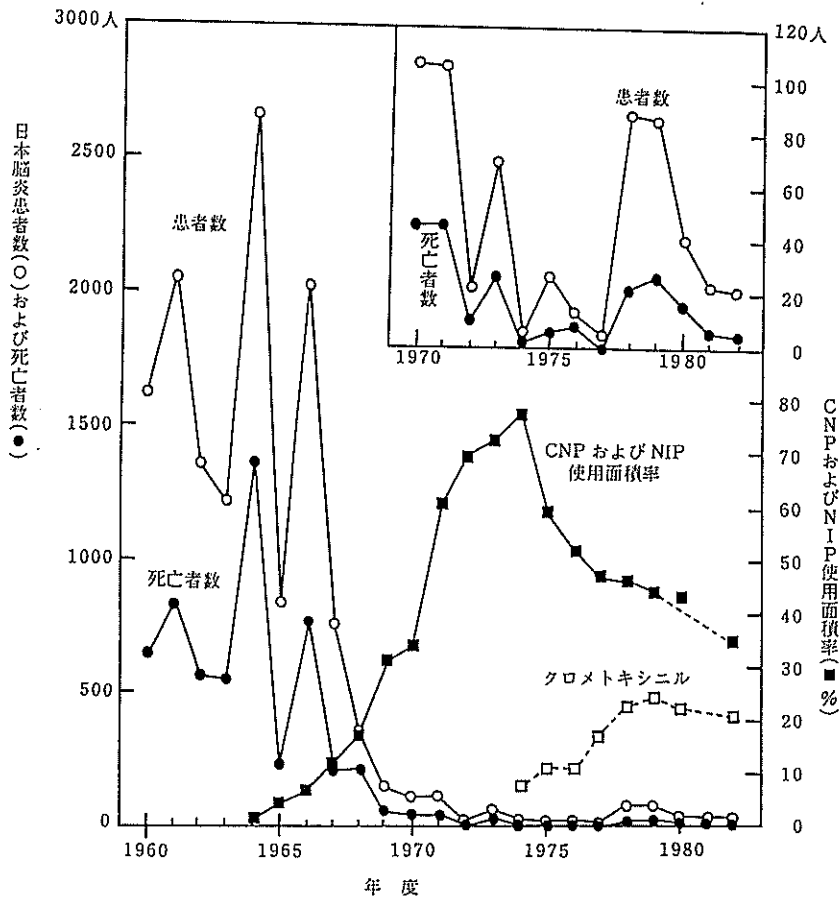


図 5 わが国におけるジフェニルエーテル系除草剤使用量と日本脳炎患者数の変遷

### II-1. DE系除草剤の使用暦と日本脳炎患者数の変遷

日本脳炎はコガタアカイエカの媒介によって発生するが、わが国では 1960 年代末より激減し、1977 年には死者が 0 となった。その後も患者数は年間 100 人以下を保ってきている (図 5)。この減少の要因としてコガタアカイエカの発生数の激減が考えられているが、この蚊の減少の原因については結論がでていない。1950 年より日本脳炎患者数を年次別にみると (前後 3 年平均) (図 6)、1950 年代の 3,000 人前後から 1960 年代前半の 1,700 人前後、そして 1970 年代の 100 人以下への移行の 2 段階がみられる (矢印)。前段の低下には、栄養状態の好転やワクチンの影響以外に、水田に施用された殺虫剤の影響等を考えることがで

きよう。しかし 1960 年代末からの患者数の激減は顕著であり、特別の要因の介入が推定される。この要因が除かれた場合患者数が 1960 年代前後のレベルに戻る危険性がある。研究 II はこの点に関するものである。

松中は、水田に施用される各種除草剤の蚊幼虫に対する影響に関する朝比奈らの報告より、魚毒性の低い DE 系除草剤 (CNP や nitrofen) が蚊幼虫に強い殺虫力をもつことを知った。そこでこれら 2 種の除草剤およびいずれかを含有する混合剤の年間出荷量を調査し、その粒剤使用量を 3 kg/10 a として、使用面積を計算し、その年の水田作付面積で除した面積率 (%) を求めた (図 5)。その上昇カーブと患者数の減少カーブとは交叉していた。この結果から日本脳炎患者数の減少

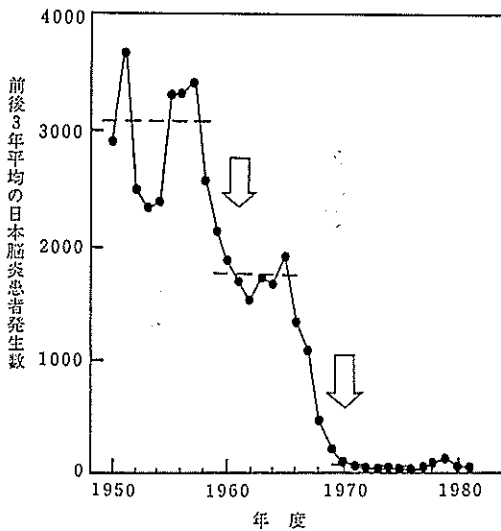


図 6 わが国における日本脳炎患者数の変遷 (前後3年平均)

原因としてこれら DE 系除草剤の使用量増加をあげることは性急ではあるが、以下の理由によりその可能性を検討してみる必要はあると考えた。1. 水田に水が入り「しろかき」が行なわれるとコガタアカイエカ越冬成虫は水面に飛来し産卵する。水田への入水後 3-5 日すると田植が行なわれ、7 日以内に上記除草剤が施用される (7 日以降は雑草が大になり、除草効果が低下するので使用されない)。2. 208 万 ha、日本の全水田面積の 78% に DE 系除草剤が使用されたが、このような大面積に蚊防除用薬剤が使われたことはない。DE 系除草剤が殺蚊力をもつならば一次発生の蚊幼虫数を全国的に低下させ、したがってコガタアカイエカの二次発生を減少させる可能性がある。そこで II-2 ではこれら除草剤が水田条件下実用用量で殺蚊効力を示すかどうか、示すならその作用機構はどうかを明らかにすることを試みた。

#### II-2. DE 系除草剤の蚊幼虫に対する影響

a. DE 系除草剤の室内での殺蚊効力 ニトロフェンの 24 時間処理の  $LC_{50}$  値はコガタアカイエカで 0.60 ppm, チカイエカで 0.46 ppm と大差がないため、飼育が容易なチカイエカを以下の実験に用いた。ニトロフェンとクロメトキシニルの飽和水溶液 (各々約 1 ppm, 約 0.3 ppm) の

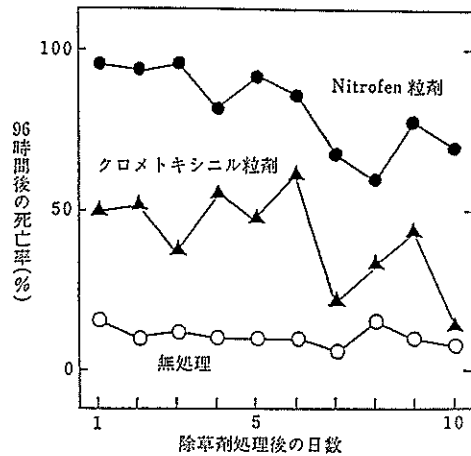


図 7 野外水田におけるニトロフェン粒剤およびクロメトキシニル粒剤の 4 令幼虫 (チカイエカ) に対する殺蚊効果 (各日付の日に幼虫を投入し、その 4 日後の死亡率を示した)

2 令幼虫への効果を見ると (薬液を 2 日おきに更新), 前者はほぼ完全な殺蚊効果を示すが、後者は弱い。殺蚊効果はクロメトキシニルでは時間がかかるが、ニトロフェンでは処理直後に現れ、また生存虫が成虫になるまでの日数が 2-3 倍かかっている。ニトロフェンを 1/2 にうすめクロメトキシニルに近い濃度にするると効力は落ちた。卵の孵化に対する効果は両者とも水と差がなかった。産卵への影響も水と有意差はなかった。両者の粒剤を用いた室内容器内試験でもニトロフェンが強い効力を示した。

b. 野外水田における殺蚊効果 水稲苗移植 1 日後、ニトロフェン粒剤 (7%) とクロメトキシニル粒剤 (7%) をそれぞれ製品で 4 kg/10 a 施用した。その後直径 9 cm, 高さ 13 cm の円形のネットを各 8 区ずつ水田内に設置し、これに毎日 2 区ずつ 4 令幼虫を各々 25 匹を投入、4 日後の死亡率を調査した。5 日目には前の生存虫を除いて新たに幼虫を入れ、10 日間幼虫投入を繰り返した。水深は 4-8 cm に保持した (図 7)。両薬剤とも処理後約 1 週間効力を持続し、とくにニトロフェン粒剤の効力は大きであった。同じ時期水田に発生していたカブトエビやホウネンエビなどの水生生物への影響はなかった。

表6 有機リン殺虫剤抵抗性蚊幼虫に対するニトロフェンの殺虫効果

化合物	LC <sub>50</sub> (ppm)		抵抗性
	抵抗性*	感受性	感受性
nitrofen	0.61	0.46	1.3
ダイアジノン	0.23	0.031	7.4

\* 有機リン殺虫剤抵抗性

### II-3. DE 系除草剤の蚊幼虫への殺虫機構

a. 除草剤としての作用機構の関与 ニトロフェンや CNP 等は殺草力の発現に光が必要であるが、殺蚊力は明暗条件下変らなかった。一方化学構造が DE と異なる oxadiazone, MK-129, phenoplylate はニトロフェンと全く同じ殺草機構をもつが、殺蚊力はなかった。さらに DE であるが暗黒条件下でも殺草活性を示す TOPE (HE-314; 3,5-dimethylphenyl 4-nitrophenyl ether) はニトロフェンなどと異なる殺草機構をもつにもかかわらず、かなりの殺蚊力を示した。以上より DE の蚊幼虫への殺虫機構はそれらの殺草機構とは異なるものといえる。

b. ニトロフェンと各種殺虫剤との殺虫特性の比較 殺虫機構につき、手掛かりを得る目的で効果の発現速度、持続時間、蚊幼虫の行動、摂食量につき DDT, ダイアジノン,  $\gamma$ -BHC, ロテノン, ネライストキシンと比較したところ、ネライストキシンに類似しており、少なくともこれ以外の殺虫剤とは異なるといえる。

c. ニトロフェンの蚊幼虫の呼吸への影響 ワールブルグ検圧計にニトロフェン  $1 \times 10^{-5}$  M 水溶液 (殺蚊力あり) 5 ml をいれ、4 令中期幼虫 20 匹をいれ測定したところ、処理後 30 分-3 時間の間、約 30% の呼吸昂進がみられた。

d. ニトロフェンの蚊幼虫アセチルコリンエステラーゼへの作用 有機リン殺虫剤のダイアジノンが  $1 \times 10^{-8}$  M 以下で阻害するのに対し、ニトロフェンは  $1 \times 10^{-5}$  M (2.84 ppm) の高濃度でもほとんど阻害しなかった。一方有機リン殺虫剤に感受性・抵抗性のチカイエカ幼虫に対しニトロフェンは同等の活性を示した (表 6)。

e. ニトロフェンおよび各種殺虫剤の殺虫力に

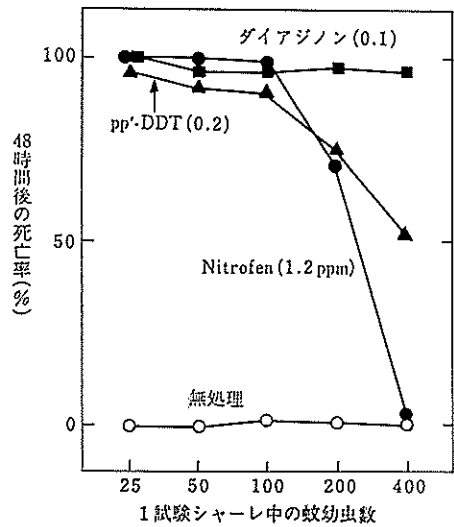


図8 1シャーレ中の蚊幼虫数が薬剤殺虫力に及ぼす影響

及ぼす実験条件の影響 室内殺虫力試験は WHO の方法に準じた。直径 9 cm, 高さ 6 cm の腰高シャーレに 200 ml の試験溶液を入れ、4 令 (終令) 幼虫を投入 48 時間後の死虫率を調査した。投入虫数が 25 匹の場合 100% であったが、虫数が増すと低下し、400 匹投入の場合ほとんど死虫は見られなかった (図 8)。この虫数効果は DDT でも見られたが、ダイアジノン,  $\gamma$ -BHC, ロテノン, ネライストキシンでは見られなかった。48 時間経過後新しいニトロフェン溶液と交換したところ、24 時間後 200 匹区で 90%, 400 匹でも 45% の死虫率を得た。一方幼虫数を 25 匹に固定し、試験溶液量を減らしたところ、これに伴い死虫率は低下し 12.5 ml 区ではほとんど死虫は見られなかった。DDT でも液量効果が見られたが、他の殺虫剤では見られなかった。以上よりニトロフェンは相当量蚊幼虫体に吸着されるか、体内で解毒されるものと推察された。

f. ニトロフェンの蚊幼虫体への吸着 蚊幼虫を熱湯に浸漬し殺してからニトロフェン溶液に入れ、一定時間後虫体を除去し、その残液で殺虫試験を行なった。投入虫数が多いほど死虫率は低下したところから、虫数効果は幼虫の生死に無関係であった。一方ニトロフェンとの接触時間を変

表 7 蚊幼虫によるニトロフェンの吸着 (ガスクロマトグラフィによる測定)

虫体数	残留全量 ( $\mu\text{g}/200\text{fm}$ )	吸着量 ( $\mu\text{g}$ )	1匹当たり 吸着量( $\mu\text{g}$ )
0	200	—	—
25	129.3	70.7	2.83
100	64.6	135.2	1.35
400	8.5	191.5	0.48

え、虫体を除去し、その残液で殺虫試験を行なった。時間が長いほど死虫率は低下し、800匹投入区では4時間以内にほとんどのニトロフェンが虫体へ吸着した。さらに幼虫浸漬残液からニトロフェンを抽出しガスクロマトグラフィで定量した結果(表7)、400匹を3日間浸漬した場合残液にはほとんどニトロフェンは残存せず、25匹区(幼虫はほとんど死亡する)の場合1匹当たりのニトロフェン吸着量は約3 $\mu\text{g}$ と計算された。以上の諸実験から蚊虫体がニトロフェンを相当量吸着することが判明した。

g. 殺虫効果への温度の影響 虫体への吸着についてニトロフェンと DDT は類似の挙動を示したが、DDT の殺虫効果の特徴である負の温度効果(低温のほうが殺虫力大)はみられず、16°Cより26°Cのほうが高い殺虫力を示した。

h. 虫体体内物質漏出へのニトロフェンの影響 イオン、タンパク質、核酸の漏出効果はなかった。

i. ニトロフェン吸着物質の検索 各種生体関連物質とニトロフェンを共存させ殺虫力を調べた結果、活性がなかったものは次のごとくである。コレステロール、コレステロールステアレート、バリン、リジン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、システイン、アスコルビン酸、2,6-ジ-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール、ブチルヒドロキシアニソール、メチレンブルー。一方、ウシ血清アルブミン(BSA)は顕著に殺虫力を低下させた。蚊幼虫を1日BSAと共存させた後、BSAなしでニトロフェン溶液に触れさせたところ、BSA無処理区同様蚊は死亡した。これからしてBSAが蚊の生理に影響しニトロフェン耐性にしたのではなく、ニトロフェンを吸着して殺虫力を低下させ

たとえられる。BSAとニトロフェンとの吸着は1時間以内に完了する一方、他の5種類の殺虫剤とBSAとの吸着は見られなかった。1シャーレ宛25匹の蚊幼虫とニトロフェンを入れた区に、その殺虫力が0(0hr)、20%(8hr後)、50%(18hr後)、90%(36hr後)に達したとき、BSA50mgを各シャーレに加え、その後の殺虫力の変化を観察した。どの区も直ちに殺虫力は消失し、少なくとも24-36時間は死亡の増加は見られなかった。BSA以外に9種のタンパク質につきその影響をみたところ、ヒト血清アルブミン(HSA)とコムギグルテンに活性を認めた。BSAを加熱、脱塩、脂肪酸フリー、メチル化などの処理を施すと活性が低下した。さらにBSA、HSAを構成するアミノ酸単独、またはBSA50mgに相当する全アミノ酸混合物につき調べたが活性はなかった。

j. ニトロフェンの殺虫力に及ぼすpHおよびS-S-化合物の影響 pH3.0-9.0の範囲でニトロフェンは中性付近で多少効果発現が遅れるほかは、pHの影響はなかった。BSAの-SH、-S-S-基に注目し、BSA、シスチン、グルタチオン、パンテチンの酸化型とNaBH<sub>4</sub>で還元した還元型(-SH)につき調べたところ、BSAは両型とも活性があったが、他の3薬剤は両型とも不活性であった。

k. ニトロフェンの殺虫力に及ぼす蚊幼虫虫体抽出成分の影響 100°C×10分の熱処理をした蚊幼虫虫体でも活性があるが、虫体ホモジネートにも活性があった。そこで虫体からタンパク質と脂質を抽出したところ、タンパク質には活性がなく脂質またはその加熱物に強い活性があった。

l. ニトロフェンの殺虫力に及ぼす脂質の影響 検討した脂質関係化合物のうち、L- $\alpha$ -phosphatidyl ethanolamineの効果が最も大きく、L- $\alpha$ -phosphatidic acid Na塩、L-phosphatidyl serineがこれにつき、スフィンゴミエリン、コレステロール、パルミチン酸等は無効であった。

m. クロメトキシニルとの比較 除草剤溶液を大量の虫体で処理した後の残液につき、タイヌビエ殺草力をみたところ、ニトロフェンでは殺草

力が激減したが、クロメトキシニルではその程度がかなり低く、蚊虫体への吸着が少ないことが示唆された。一方蚊幼虫殺虫力に関し、クロメトキシニルとニトロフェンは共力効果を示した。

以上より、ニトロフェンや CNP などの DE 系除草剤は実用場面のイネ移植直後の水田でコガタアカイエカを殺滅するのに効果があり、その作用機構は従来の殺虫剤と全く異なり、蚊虫体のタンパク質とリン脂質の一部、すなわち生体膜に吸着し、その吸着程度が一定以上になると、その生体膜の機能を攪乱・阻害して幼虫を死に至らせるものと考えられる。

研究 III モデルエコシステムによる化学物質の挙動解析—水田モデルによる農薬の挙動解析の評価

### III-1. モデルエコシステムへの考え方

化学物質の環境内挙動を知るのに、無限に近い種々の環境条件の試料を採取・分析することは人手・費用を要し、しかも完全を期しがたい。そこでモデルエコシステムによる解析の試みが従来なされているが、一部研究者の試みのように、巨大な環境空間を箱庭に閉じ込め、その中で化学物質の挙動をもって自然条件下での挙動を解析することにも無理がある。むしろ環境の一部分づつのモデル系を幾種類か作り、個々の系での挙動を調べ、その結果を総合して環境中での挙動を考察する方が合理的、簡便と考えた。そこで、本研究では水田モデル系として、圃場、ポット、2種のサイズの密閉水田モデル系、容器の5種類を用い、それぞれの系で代表的な2種類の水田施用剤、ダイアジノン殺虫剤とベンチオカーブ除草剤の消長と土壌微生物への影響を調べ、各試験法を比較評価した。

### III-2. 農薬の消長と微生物相への影響

a. 供試土壌と農薬 供試土壌：名古屋大学構内水田圃場の沖積砂壤土。pH 6.1 (H<sub>2</sub>O), C 含量 1.75%, N 含量 0.15%, C.E.C 8.32, 粘土鉱物はカオリン主体。供試農薬：ダイアジノン 40% 乳剤とベンチオカーブ 50% 乳剤を同量混合、水で 4000 倍に希釈、有効成分としてダイアジノンが 240 g/10 a, ベンチオカーブが 300 g/10 a に相

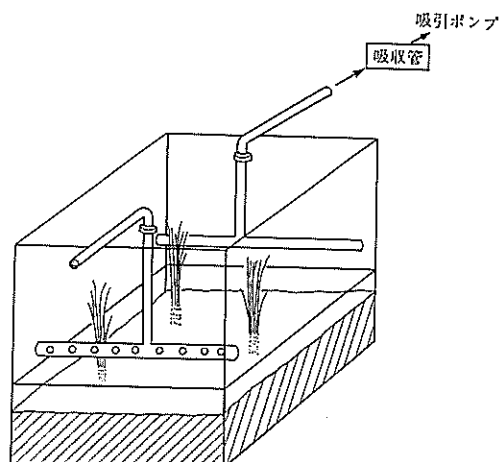


図 9 密閉時における水槽水田モデル

当するように各モデル系の表面水中にスプレーで均一に散布。なお実用場面での標準施用量はダイアジノンが 240-320 g/10 a, ベンチオカーブが 300-400 g/10 a である。

### b. 試験方法

水田圃場試験 大学構内水田圃場 (25m×25m) の水出口付近の一画を 1m×2m に波板で囲い、薬剤散布区とし、同じ圃場の水口に近い一画を無散布区とした。5 月末耕運, 6 月 18 日灌水, 6 月 25 日代掻き, 7 月 9 日稚苗移植, その後薬剤散布部分を波板で囲い, 7 月 21 日薬剤散布。

ポット試験 2000 分の 1 ワグネルポット 2 個に、上記の圃場の土壌をつめ、圃場試験と同じ日に代掻き、稚苗移植、薬剤散布を実施した。苗 3 本をポット中央の 1 箇所に植え、ポットの下口はゴム栓でつめ、水抜きはしなかった。

水槽試験 大型水槽として熱帯魚用水槽 (46cm×26cm×30cm 高) に上記の圃場の土壌を深さ約 7cm につめ、深さ約 3cm に灌水した。圃場試験と同一時期に灌水、代掻き、稚苗移植 (3 本苗 3 箇所)、薬剤散布を実施した。同一条件の第 2 の水槽は薬剤散布せず対照とした。24 時間後図 9 に示すような送吸風用ガラス管を取り付けたガラス板で水槽をおおった。一方のガラス管の先端は XAD-8 樹脂をつめた長さ 10cm の吸引管につなぎ、吸引ポンプで 2 l/分の速度 (略無風状態) で

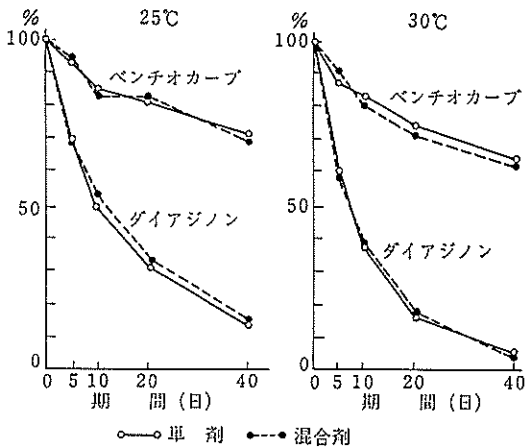


図 10 容器内試験における 土壤中の農薬残留量の推移 (I)  
ベンチオカーブ 5 ppm, ダイアジノン 4 ppm 添加。

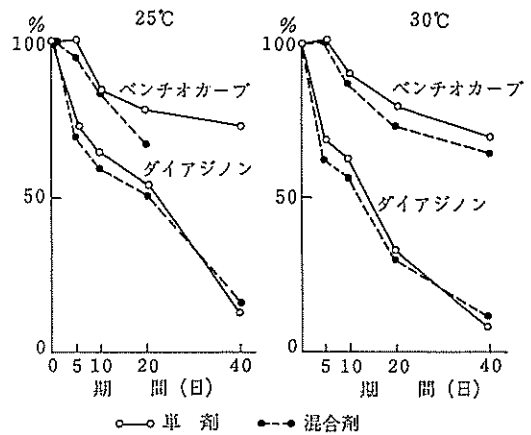


図 11 容器内試験における 土壤中の農薬残留量の推移 (II)  
ベンチオカーブ 50 ppm, ダイアジノン 40 ppm 添加。

吸引し、揮散した薬剤を吸着した。24時間通風後蓋をとり、放置し、以後薬剤散布 3, 6, 10, 16, 21 日後に蓋をし、各 24 時間通風して揮散薬剤を捕捉した。この間蒸発した水は噴霧により補充した。

小型水槽 (28 cm × 24 cm × 25 cm 高) を用いた試験は上記と本質的に同じである。薬剤散布直後および 2, 5, 9, 15, 20 日後に、上記の仕方では揮散薬剤を捕捉した。

圃場、ポット、水槽の各試験では、薬剤散布 0 (直後)、5, 10, 23, 50, 80 日後に各 4 箇所から、先端を切り落とした内径 2.5 cm の注射筒 (50 ml 用) を用い、田面水上から土壌の深さ 5 cm までを円柱として採取し、水を他の容器に移し、残った土壌は生菌数の計測と薬剤残留量の測定に用いた。

容器内試験 100 ml の三角フラスコに風乾しないままの土壌を乾土換算 50 g 入れ、水 50 ml を加え、水深約 1 cm とし、アルミホイルで蓋をし、25, 30°C で暗所 2 週間ブレインキュベーションした。これにダイアジノン、ベンチオカーブを加え 25, 30°C で暗所で保温静置した。土壌中の生菌数、農薬残留量、農薬揮散量の測定は常法によった。

### c. 土壌中の農薬残留量の消長 容器内試験

の結果を図 10, 11 に示す。容器内試験では土壌の全量を分析するので、圃場試験におけるような撒きむらによるバラツキがなく、整一な減衰曲線が得られた。薬量が 10 倍に増すと (図 11) ダイアジノンの半減期は約 2 倍となったが、10 分の 1 量に減る期間は、両者でほとんど差がなかった。ベンチオカーブでは薬量が 10 倍に増すと初期の分解は少し遅れるが、その後の経過は両者であまり差がなかった。25, 30°C で高温の方が多少分解が早い程度であった。両薬剤は単独で与えても、混合で与えても差はなかった。このような容器内試験では土壌の大部分は強還元状態にあり、嫌気条件下での分解を見ていることになる。圃場で散布されると、薬剤は少なくとも 1-2 週間は土壌表層の酸化層に留まるので、薬剤の分解が好気 (酸化) 条件下と嫌気 (還元) 条件下とで異なる場合、容器内試験は圃場の状況を反映しないことになる。ベンチオカーブは、嫌気条件下の湛水土壌では好気条件下に比べ分解速度が著しく遅いことが知られており、この容器内試験でのベンチオカーブの減衰は圃場におけるよりも遅いと推定できる。

圃場、ポット、大小の水槽を用いた野外試験の結果を図 12 に示す。いずれも薬剤の散布むらに起因すると思われるバラツキが大で、消失曲線は

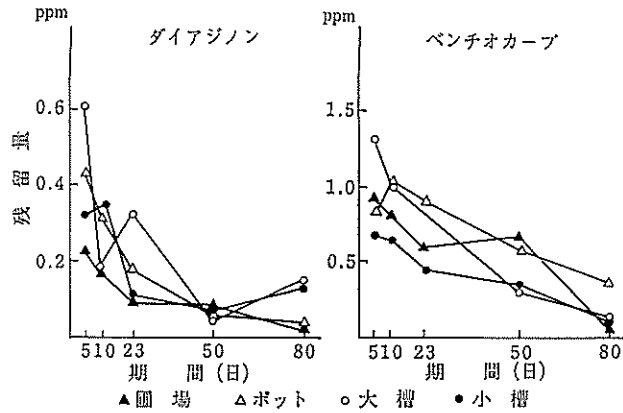


図 12 野外試験における土壌中の農薬残留量の推移

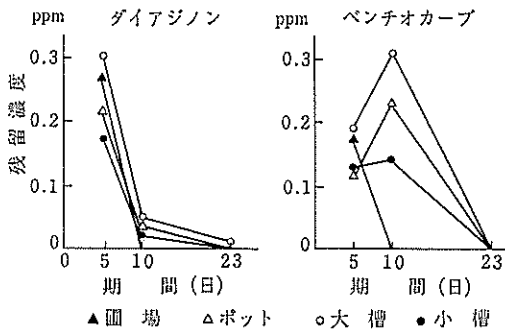


図 13 田面水中の農薬残留量の推移

ジグザグの折線となった。このバラツキを最低限に抑えるには1点の試料の採取量を増やすとともに、同一試料の採取点数を増やす必要があるが、本試験のサイズではこれが不可能であったので、さらに大きなサイズにするべきであろう。しかし、圃場、ポット、大小の水槽を用いた試験結果は類似しているので、採用した試験法は基本的には水田での薬剤の挙動追跡モデル系として使えるものといえる。

d. 田面水中の薬剤の消長 野外試験の結果を図 13 に示す。圃場ではダイアジノン、ベンチオカーブ両薬剤とも急速に減り、10日後には消失した。圃場では透水があるためと考えられる。ポットや水槽といった水の溶脱のない状態では10日後も残存したが、23日後はほとんど消失した。ダイアジノンに比べ、ベンチオカーブが10日後に多く見られるのは、土壌-水間の分配の差による

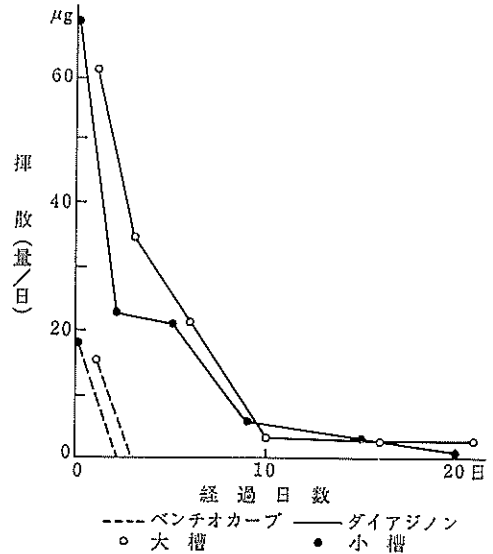


図 14 24時間当たりの農薬揮散量の消長

ものと推察している。

e. 大気中への薬剤の揮散 ベンチオカーブの沸点は  $126-129^{\circ}\text{C}/0.008\text{ mmHg}$ 、蒸気圧は  $1.476 \times 10^{-6}\text{ mmHg}$  ( $20^{\circ}\text{C}$ ) で薬剤自体はそれほど揮発性ではないが、水溶液からは水と共蒸留される。したがって一般に水田に投入された薬剤は大気中にかなり放散される可能性がある。大小の水槽を用いた田面水から大気中への揮散の推移を図 14 に示す。ダイアジノンは水中残存量が少なくなった10日後(図 13 参照)までに揮散量は急速に減ったが、その後も引き続き微量が検出され

た。小型水槽での結果からの計算によれば、投入した 1612  $\mu\text{g}$  のうち 15% にあたる 237  $\mu\text{g}$  が揮散した。一方圃場では図 13 のように透水により薬剤はすみやかに土壌中に入り、10日後田面水中にはダイアジノン検出されなかった。仮りに7日後までの揮散量を求めると 197  $\mu\text{g}$  となり、投入量の 12% が揮散したことになる。一方ベンチカーブは図 13 のように 10 日後でも田面水中に存在するにもかかわらず、大気への揮散はダイアジノンよりはるかに少なかった。

f, 微生物相への影響 本試験では 2 種薬剤の散布区と無散布区、また常用量とその 10 倍量とで、糸状菌、放線菌、好気性細菌の菌数の経時変化に差はなかった。20の薬剤について行なった過去の容器内試験でも 10 倍の薬量差では影響はなく、100 倍の差で影響が現れた。したがって散布時、高濃度に薬剤が局在したところで影響があっても、全体としては影響はないといえる。しかし過去の試験で硝酸化成菌、メタン細菌など、個々の微生物相への影響はかなり低濃度でもあった。

#### 今後の課題

本研究により生物相互間の生態学的相互作用が化学物質により媒介されている様相、また、この知見の害虫防除への応用可能性が浮き彫りにされた。また自然界での化学物質の生態的効果の解析から、新しい防除薬剤を展開する可能性も示された。この可能性を現実化するには、現場研究者との協力が必要である。これらはケーススタディではあるが、従来型の農薬開発とは趣きを異にし、

新しいアプローチの展望を与えるものであり、こういった基礎的研究をさらに積み上げてゆくことが、今後の課題である。また自然界での化学物質の挙動を解析するためのいくつかのモデル系を提供することができたが、自然条件との対応を改善するため、これをさらに精緻にすることが必要である。

#### 発 表

- 1) 松中昭一：除草剤使用と日本脳炎発生とに関する一考察，日本学術会議植物防疫研究連絡委員会主催「衛生害虫と農薬との相互関係」に関するシンポジウム（昭和 57 年 1 月）。
- 2) 本田 博，酒井案理，山本 出：アズキノゾムシの産卵選択因子と産卵分布，第 27 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨集（58 年 4 月，東京）。
- 3) 東野純明，松中昭一：蚊幼虫に対するジフェニルエーテル系化合物の作用機構に関する研究，第 8 回日本農薬学会大会講演要旨集（58 年 4 月，福岡）。
- 4) Kaoru Tanaka, Kanju Ohsawa, Hiroshi Hondo and Izuru Yamamoto: Synthesis of Erectin, a copulation release pheromone of the azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* L., *J. Pesticide Sci.*, 7, 535-537 (1982).
- 5) Kenji Mori, Teruhito Ito, Kaoru Tanaka, Hiroshi Honda and Izuru Yamamoto: Synthesis and biological activity of optically active forms of (E)-3, 7-dimethyl-2-octen-1, 8-dioic acid (callosobruchusic acid), *Tetrahedron*, 39, 2303-2306 (1983).
- 6) 東野純明，松中昭一：蚊幼虫に対するジフェニルエーテル系系除草剤の作用機構に関する研究，第 2 報，除草剤 nitrofen の蚊幼虫虫体成分への吸着について，第 9 回日本農薬学会大会講演要旨集（59 年 3 月，静岡）。