

氏 名(本籍) ^{うえ}上 ^じ路 ^{まさ}雅 ^こ子

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 320 号

学位授与年月日 昭和 62 年 3 月 12 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 Phosphoramidate 系殺虫剤の生理活性
および代謝に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 山下 恭平 教授 伊崎 和夫

教授 水野 重樹

論文内容要旨

第I章 緒論

5 種の有機リン化合物は殺虫、殺菌、除草などさまざまな生理活性を示す。殺虫剤としての有機リン化合物は、神経伝達に關与するアセチルコリンエステラーゼ (AChE) を阻害して殺虫効力を発揮し、農業害虫あるいは衛生害虫の重要な防除剤として広く使用されている。一般に有機リン化合物の殺虫活性と、*in vitro* における AChE 阻害活性は平行關係にあり、強力な AChE 阻害活性を誘導するような化合物が、構造活性相関の見地から創製されてきた。しかし化学構造内に窒素原子を含有する phosphoramidate 系殺虫剤の生理活性発現機構については、必ずしも十分な説明がなされているとは言えなかった。

本研究では、最近、土壤害虫とくに甲虫類 (Coleoptera) の防除剤として開発された isofenphos (O-ethyl O-2-isopropoxycarbonylphenyl N-isopropyl phosphoramidothioate) の殺虫活性発現機構に着目し、加えて本化合物の生理活性におよぼす光学特異性について検討を行った。一方、農薬の代謝研究は環境毒物学の面ばかりでなく、農薬の生体内動態や代謝研究を通して、農薬の作用機構の解明に重要で、この観点から哺乳動物、昆虫、植物における isofenphos の比較代謝研究を行った。

第II章 Phosphoramidate の生理活性および酸化 反応による活性化機構

1. 殺虫力と AChE 阻害活性

窒素原子につく alkyl 基を C₀ ~ C₄ まで変えた O-ethyl O-2-isopropoxycarbonylphenyl N-alkylphosphoramidothioate (P=S 体) と各 phosphoramidate (P=O 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調べた結果、殺虫力は概して P=S 体が P=O 体より強く、また N-alkyl 置換基の相違による殺虫力の強さは、*iso*-C₃H₇ > C₂H₅ >

$\text{CH}_3 > \text{H} > \text{sec-C}_4\text{H}_9 > n\text{-C}_3\text{H}_7 > n\text{-C}_4\text{H}_9 > \text{iso-C}_4\text{H}_9 > \text{tert-C}_4\text{H}_9$ の順であった (Table 1)。P=O体のアズキゾウムシおよび牛血清のAChEに対する阻害は弱く、特に殺虫力が最も強いisopropyl体の I_{50} 値 (50%阻害モル濃度) は 10^{-3} M以上であった (Table 2)。この結果は、従来のdialkyl phosphate (P=O体) で見られる殺虫活性とAChE阻害活性の間の相関関係からは説明できず、殺虫力の発現には生体内で更に活性化されAChE阻害剤に変換されることが示唆された。

2. 酸化反応によるAChE阻害活性の発現

*in vitro*での活性化反応を確認するため、*N*-isopropyl体のP=S, P=O体について、薬物酸化酵素mixed function oxidase (mfo)の存在するラット肝ミクロゾーム画分とインキュベート後、牛血清AChE活性を測定したところ、NADPHを添加することによりAChE阻害は高まり、またmfo阻害剤であるSKF525-A (2-diethylaminoethyl 2,2-diphenylvaleratehydrochloride)によってその阻害が抑制された (Table 3)。さらに*m*-クロロ過安息香酸 (MCPBA)による化学的酸化でも同様にAChE阻害は高められた (Table 4)。これらの結果から、強力な殺虫力の発現には酸化反応が関与し、生体内においてはmfoによる代謝反応によって薬物の活性化が起り強力なAChE阻害剤が生成されることを明らかにした。

第三章 Isofenphos の哺乳動物、昆虫、植物における代謝

Phosphoramidothioateの中で最も強い殺虫力を持つ*N*-isopropyl体のisofenphosについては、ミクロゾーム-NADPH系で活性代謝物の生成が推定された。そこで ^{14}C 標識化合物を合成し活性代謝物の検索を行うとともに、各種の生物における比較代謝を行った。

1. ラットにおける代謝

isofenphosの *in vivo* 代謝を調べるため〔*N*-isopropyl-2- ^{14}C 〕または〔*O*-ethyl-1- ^{14}C 〕標識の isofenphos を経口投与した結果、全身オートラジオグラフィーから投与直後に ^{14}C -化合物の全身への分布が認められたが、時間の経過に伴ない ^{14}C -化合物は排泄された。しかし肝臓など一部の器官では長時間残留した。Fig. 1 に示すように ^{14}C -化合物の大部分は尿中に排泄され、また回収された ^{14}C -化合物の多くは水溶性代謝物であり、 ^{14}C -isofenphosの極性化による解毒化反応が速やかに進行することが明らかになった。

一方、代謝経路の解明を目的として、ラット肝臓を細胞分画し各分画での ^{14}C -isofenphosの代謝をみると、*in vivo*代謝と比較してisofenphosの代謝分解は緩慢であり、水溶性代謝物の生成割合は低かった（Table 5）。NADPHの添加は水溶性代謝物の生成量を増加させ、特にミクロゾーム-NADPH系でこの傾向が強く、またmfo阻害剤piperonyl butoxideの添加によつて水溶性代謝物の生成が抑制された。代謝物の分析結果から、isofenphosの主要代謝経路はisofenphos-oxonを経由する水溶性代謝物の生成であることを明らかにした。なお、ミクロゾーム-NADPH系で生成された有機溶媒可溶性代謝物について、AChE阻害活性を測定した結果、 10^{-7}M 濃度ではいずれの代謝物も阻害活性を示さず、AChE阻害活性を持った代謝物の構造の決定は未解決である。

2. 昆虫における代謝

防除対象害虫である土壌害虫ドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*, Hope) の幼虫および有機リン剤感受性イエバエ (*Musca domestica*, CSMA系) の成虫におけるisofenphosの代謝研究の結果、速やかに体内に取り込まれたisofenphosは水溶性代謝物へと変換し、特に極性化はイエバエで迅速であった (Fig. 2, 3)。生成される代謝物質は両昆虫で相違はなかったが、ドウガネブイブイの方が親化合物の代謝速度が速く、中間代謝物isofenphos-oxon(P=O体)が長時間集積した。

3. 植物における代謝

トウガネブイブイの寄主であるヒノキ苗木における〔*O*-ethyl-1-¹⁴C〕-isofenphosの代謝は、処理部位による代謝生成物の相違はないが、代謝速度、代謝物の生成量に差が認められた。処理30日後における回収¹⁴C-化合物に占める親化合物の割合は、根処理では87.8%に対し茎頂処理では49.6%と根処理の方が長期間残留した。主代謝物はisofenphos-oxon (P=O体)であり、水溶性代謝物は微量しか検出されず、しかもその代謝物は脱phenyl体に限られた。また植物体での移行性は下方より上方への移行が顕著であった(Table 6)。

以上、各生物での〔*O*-ethyl-1-¹⁴C〕isofenphosの代謝実験により得られた結果をまとめて、isofenphosの各種生物における代謝経路を示すとFig. 4になる。代謝は生物によって異なるが以下の反応が関与する。①酸化的脱硫化反応 (P=S→P=Oへの変換)、②脱phenyl反応、③*N*-脱alkyl反応、④脱*N*-alkyl反応。いずれの生物においても極性化には脱phenyl反応が主反応であるが、ラット*in vivo*代謝では*N*-脱alkyl化物の生成が非常に多く、また植物では脱phenyl体のみが生成された。

第IV章 Isofenphos の生理活性におよぼす 光学特異性

1. 光学異性体の殺虫力

isofenphosの生理活性に与える光学特異性を検討するため、光学分割用カラムをつけたHPLCで光学分割したisofenphosおよびそのoxon体のイエバエ、アズキゾウムシに対する殺虫効力を調べた結果、光学異性体間で殺虫活性は異なり、常に(+)-体が強力であり(+)-、(-)-体との殺虫力は他に例を見ない大きな差であった (Table 7)。

なお、(+)-、(-)-oxonのAChE阻害活性はほとんどなく、 I_{50} 値はイエバエおよびアズキゾウムシのAChEに対しても 10^{-3} M以上であったため、前述

のラセミ体と同様に活性化反応を行い、AChE阻害活性を調べた。

2. 肝ミクロゾーム-NADPH系における活性化反応による光学異性 isofenphos-oxonのAChE阻害

Fig. 5, Table 8 に示すように, (+)-oxonはラット肝-ミクロゾーム-NADPH系とのインキュベートにより, AChEの阻害力が高まったのに対し, (-)-oxonでは酸化反応の効果は非常に低かった。(+) - oxonはmfoとの反応によりAChE阻害力が約840倍増強されたが, (-)-oxonでは約4倍にすぎず, 生体内活性化に光学異性体間で大きな差が認められ, この活性化後のAChE阻害の I_{50} 値は, 光学異性体間の殺虫力と高い相関関係を示した。また, 光学異性体と過酸との化学的酸化反応により, (+) - 体の方が(-) - 体と比較してより強力なAChE阻害剤となり, mfoによる生体内活性化と同様, 光学特異性の存在が明確になった (Fig. 6)

第V章 Isofenphos 光学異性体の哺乳動物 および昆虫における代謝

光学異性体間で生理活性が異なる場合, 活性代謝物の生成分解反応が異性体間で相違があることが報告されており, 光学異性isofenphosの生理活性を代謝の面から検討する目的で, ラット (*in vitro*) および昆虫における代謝実験を行った。

1. Isofenphos光学異性体のラット肝 *in vitro* における代謝

ラット肝の細胞分画におけるisofenphosの代謝には, 光学異性体間で顕著な差は認められなかった。ミクロゾーム-NADPH系における代謝実験の結果, 代謝産物は光学異性体間で同じであり, 主代謝経路の中間物質isofenphos-oxonの集積は(-) - 体の方がいく分高かった (Table 9)。

2. Isofenphos光学異性体のイエバエにおける代謝

Fig.7に示すように、イエバエ体内に吸収された ^{14}C -isofenphos水溶性代謝物の生成速度および排泄は、(+)-体の投与の方がやや速かった。oxonの回収量が(-)-体の投与で各分析時間とも3~5倍多く、一方(+)-体はoxonからの加水分解による極性化反応の進行が速かであり、光学異性体間で僅かながら代謝に差が認められた。しかし、活性代謝物の生成における差、ひいてはAChE阻害活性の差を説明できる程の大きな相違はなかった。

第VI章 結 論

実験に供したPhosphoramidate系殺虫剤の強力な殺虫活性は、従来から知られているdialkyl phosphorothioate系殺虫剤の $\text{P}=\text{O}$ 体のAChE阻害活性に依るものではなく、生体内で酸化的活性化反応を受け、より強力なAChE阻害剤に変換されることに依ることを初めて明らかにした。この殺虫活性の発現機構は、有機リン殺虫剤で示されてきた殺虫活性とAChE阻害活性との相関関係とは異なる新しい様式のものであった。活性化は生体内におけるmfoにより、あるいは過酸との反応によっても起こり、酸化反応に依ることを明らかにした。

生物間における代謝研究の結果、生物種間で代謝に明確な差が確められた。すなわち、哺乳動物、昆虫では速やかに極性化が進行して解毒分解したのに対し、植物での代謝は緩慢で長時間残留した。関与する反応は生物によって異なるが(1)酸化的脱硫化反応($\text{P}=\text{S}\rightarrow\text{P}=\text{O}$)、(2)脱phenyl反応、(3)N-alkyl反応、(4)脱N-alkyl反応であり、極性化は脱phenyl反応が主で植物ではこの反応のみであった。なお、生成された代謝物にはAChE阻害力を持つ化合物は得られず、活性代謝物が不安定であることが推定された。

殺虫活性には光学特異性があり、(+)-体の方が強力な殺虫効力を発揮した。光学異性体はmfo、過酸との酸化反応により活性化を受けるが、活性化の程度

は(+)‑体の方が大きく、(+)‑体は強力なAChE阻害剤に変換した。この結果は、殺虫活性と活性化後のAChE阻害活性との間に、高い相関関係のあることを示唆した。一方、光学異性体における代謝の差は明確ではなく、代謝物の生成には光学特異性は認められなかった。したがって光学異性体間における生理活性の相違は、活性化の難易度のほかに活性化された化合物とAChEとの親和性などが関与するものと考えられ、これは今後検討すべき課題である。

Table 1 Toxicity of O-ethyl O-2-isopropoxy-carbonylphenyl N-alkylphosphoramidothioates and their phosphoramidates (oxon analog) to the adzuki bean weevil.

N-alkyl	48 hr LD ₅₀ (μg/test tube)	
	phosphoramidothioates	phosphoramidates
H	1.03	4.00
CH ₃	0.99	3.01
C ₂ H ₅	0.63	1.02
n-C ₃ H ₇	7.01	5.68
iso-C ₃ H ₇	0.52	0.85
n-C ₄ H ₉	15.58	14.85
iso-C ₄ H ₉	25.03	56.28
sec-C ₄ H ₉	4.49	9.41
tert-C ₄ H ₉	50.91	272.26
fenitrothion	2.34	
fenitroxon		1.76

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

Compound	NADPH	SKF 525-A	AChE inhibition (%)
Phosphoramidothioate	+	-	82
	+	+	36
	-	-	25
Phosphoramidate	+	-	43
	+	+	28
	-	-	1

Table 2 Inhibition by O-ethyl O-2-isopropoxy-carbonylphenyl 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 x 10 ⁻⁶	3.37 x 10 ⁻⁵
CH ₃	1.36 x 10 ⁻⁵	1.75 x 10 ⁻⁵
C ₂ H ₅	3.22 x 10 ⁻⁵	2.63 x 10 ⁻⁵
n-C ₃ H ₇	1.55 x 10 ⁻³	2.36 x 10 ⁻³
iso-C ₃ H ₇	> 10 ⁻³	> 10 ⁻³
n-C ₄ H ₉	2.52 x 10 ⁻⁴	2.06 x 10 ⁻⁴
iso-C ₄ H ₉	5.21 x 10 ⁻⁴	1.26 x 10 ⁻⁴
sec-C ₄ H ₉	3.43 x 10 ⁻⁴	1.37 x 10 ⁻⁴
tert-C ₄ H ₉	> 10 ⁻³	> 10 ⁻³
fenitroxon	2.61 x 10 ⁻⁷	1.31 x 10 ⁻⁶

Table 4 Oxidative activation by chemical agents of O-ethyl O-2-isopropoxycarbonylphenyl N-isopropylphosphoramidothioate and its phosphoramidate.

Compound	MCPBA ^a	MCBA ^a	AChE inhibition (%)
	-	-	3
Phosphoramidothioate	+	-	42
	++	-	68
	-	+	5
Phosphoramidate	-	-	0
	+	-	39
	++	-	54
	-	+	7

a) amount of MCPBA was equi-molar(+) and twice-molar(++), MCBA was equi-molar. MCPBA; m-chloroperbenzoic acid MCBA: m-chlorobenzoic acid

Table 5 Percentage of radioactivity recovered in benzene and aqueous fractions after the incubation of (O-ethyl-1-¹⁴C)isofenphos with the rat liver homogenate and its subcellular fractions.

	Isufenphos (M)	NADPH	Benzene fraction (%)	Aqueous fraction (%)
Liver homogenate	3.03 x 10 ⁻⁵	+	63.1	36.9
	"	-	87.3	12.7
Mitochondria	1.88 x 10 ⁻⁵	+	77.8	22.2
	"	-	99.2	0.8
Supernatant fraction	1.88 x 10 ⁻⁵	+	87.1	12.9
	"	-	97.9	2.1
Microsome	1.88 x 10 ⁻⁵	+	38.8	61.2
	"	-	98.0	2.0
	2.67 x 10 ⁻⁴	+	84.3	15.7
	"	-	95.7	4.3

Table 6 Percentage of radioactivity recovered from the internal uptake in the Japanese cypress applied with (O-ethyl-1-¹⁴C)isofenphos.

Days after application	4 days			10 days			30 days			75 days	
	aerial portion	applied region	root portion	aerial portion	applied region	root portion	aerial portion	applied region	root portion	aerial portion	root portion
[Step top application]											
Benzene layer	12.8	6.3	0.5	11.3	10.5	0.2	8.1	13.7	0.3		
Aqueous layer	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	nd	<0.1	0.1	nd		
Unextractable layer	0.2	<0.1	<0.1	0.2	<0.1	nd	0.8	0.1	0.1		
[Root application]											
Benzene layer	12.0		33.0	9.3	30.4	8.8		18.0	8.1	14.6	
Aqueous layer	<0.1		0.6	<0.1	0.5	<0.1		0.2	<0.1	<0.1	
Unextractable layer	0.4		0.2	0.4	0.3	0.8		0.4	0.4	0.5	

Table 7 Insecticidal activity and AChE inhibition 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)	I ₅₀ (M)	LD ₅₀ (μg/test tube)	I ₅₀ (M)
(+)isofenphos	6.57	-	0.95	-
(±) "	7.26	-	1.03	-
(-) "	72.97	-	10.84	-
(+)isofenphos-oxon	4.55	> 10 ⁻³	1.38	> 10 ⁻³
(±) "	7.34	"	1.89	"
(-) "	379.75	"	9.30	"
fenitrothion	3.01	-	2.34	-
fenitrothion-oxon	17.31	4.18 x 10 ⁻⁷	1.76	2.61 x 10 ⁻⁷

Table 9 Percentage of metabolites of chiral [O-ethyl-1-¹⁴C]isofenphos on the incubation with the rat liver microsome-NADPH system.

	(+)-isofenphos	(-)-isofenphos
(Benzene soluble fraction)		
$\begin{matrix} \text{EtO} \\ \\ \text{R}_1\text{NH} \end{matrix} \text{P}(\text{S})\text{OR}_2$	21.07	19.11
$\begin{matrix} \text{EtO} \\ \\ \text{NH}_2 \end{matrix} \text{P}(\text{S})\text{OR}_2$	0.60	0.98
$\begin{matrix} \text{EtO} \\ \\ \text{R}_1\text{NH} \end{matrix} \text{P}(\text{O})\text{OR}_2$	1.92	7.45
Unknown I	0.15	0.98
Unknown II	0.29	0.82
Origin	16.74	9.95
(Water soluble fraction)		
$\begin{matrix} \text{EtO} \\ \\ \text{HO} \end{matrix} \text{P}(\text{S})\text{OR}_2$	7.60	16.19
$\begin{matrix} \text{EtO} \\ \\ \text{R}_1\text{NH} \end{matrix} \text{P}(\text{S})\text{OH}$	14.50	6.77
$\begin{matrix} \text{EtO} \\ \\ \text{HO} \end{matrix} \text{P}(\text{O})\text{OR}_2$	6.86	1.62
$\begin{matrix} \text{EtO} \\ \\ \text{R}_1\text{NH} \end{matrix} \text{P}(\text{O})\text{OH}$	28.20	31.58
Unknown III	1.32	2.91
Origin	0.75	1.64

Table 8 Inhibition of acetylcholinesterase of the housefly by chiral isomers and racemate of isofenphos-oxon on activation with the rat liver microsomal system.

	NADPH	I ₅₀ (M)
(+)isofenphos-oxon	+	1.47 x 10 ⁻⁷
"	-	1.24 x 10 ⁻⁴
(±)isofenphos-oxon	+	9.61 x 10 ⁻⁷
"	-	2.43 x 10 ⁻⁴
(-)isofenphos-oxon	+	6.19 x 10 ⁻⁵
"	-	2.59 x 10 ⁻⁴

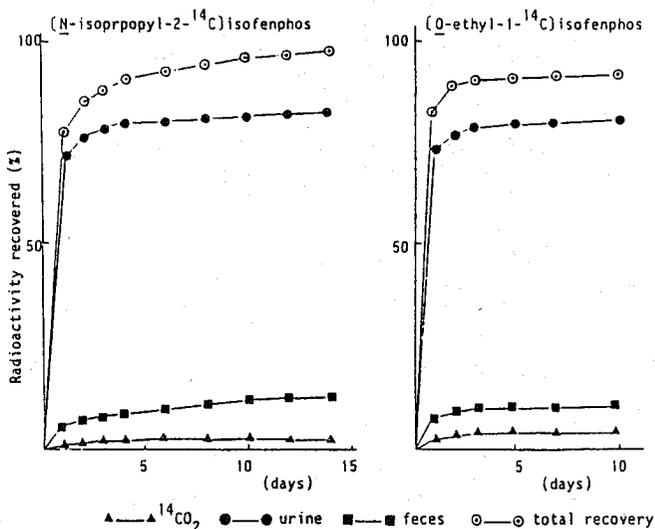
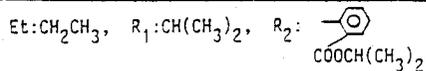


Fig. 1 Excretion of radioactivity from male rats administered orally with [N-isopropyl-2-¹⁴C]isofenphos and [O-ethyl-1-¹⁴C]isofenphos.

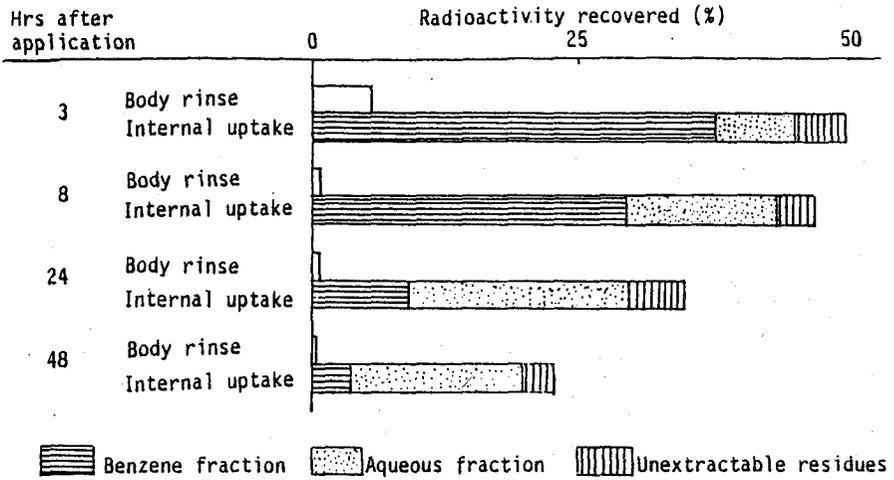


Fig. 2 Distribution of radioactivity in the cupreous chafer applied topically with of (O-ethyl-1-¹⁴C)isofenphos.

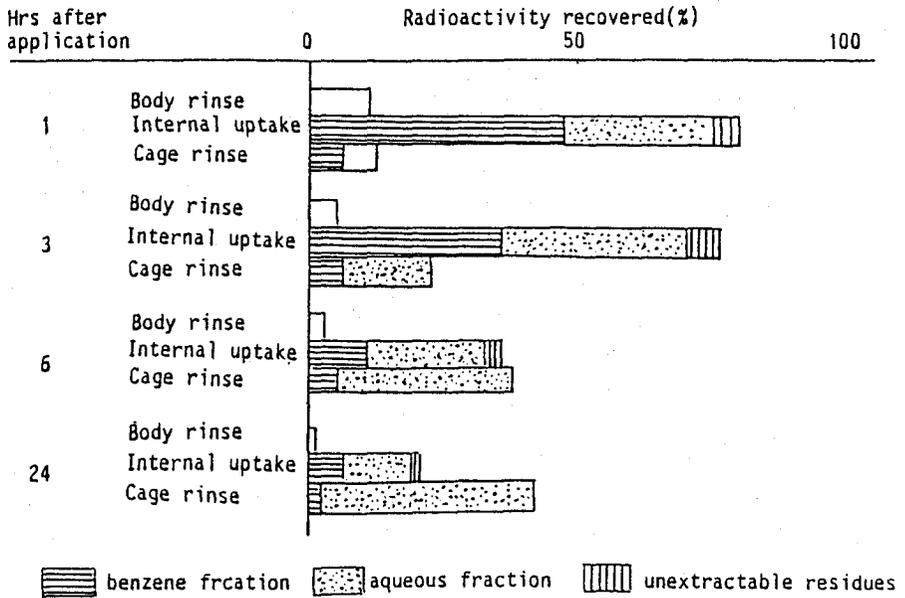


Fig. 3 Distribution of radioactivity recovered in houseflies and cage on the topical application with (O-ethyl-1-¹⁴C)isofenphos.

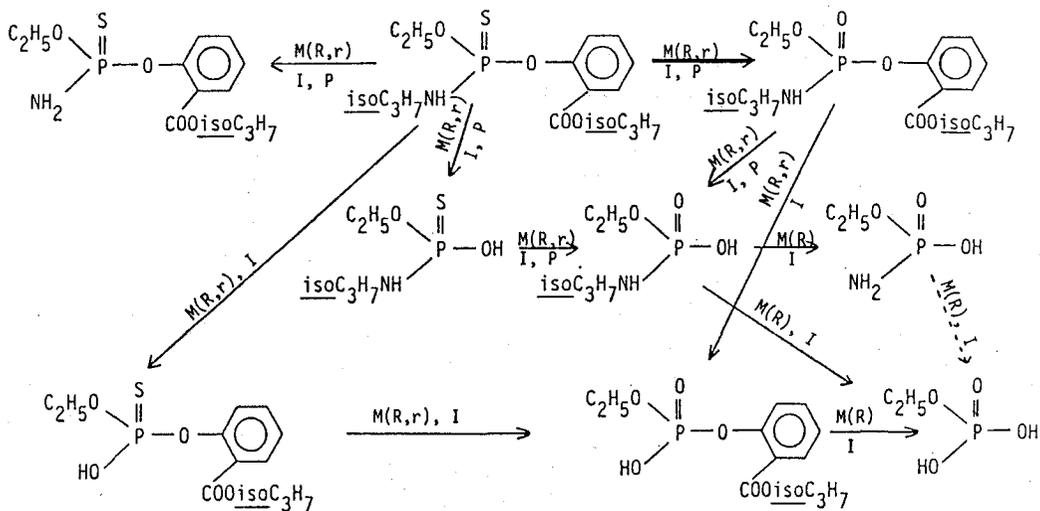


Fig.4 Proposed metabolic pathways of [O-ethyl-1-¹⁴C]isofenphos in mammal(rat), insects(cupreous chafer and housefly) and plant(Japanese cypress).

M;mammal, R(*in vivo*) r(*in vitro*); I:insect; P:plant

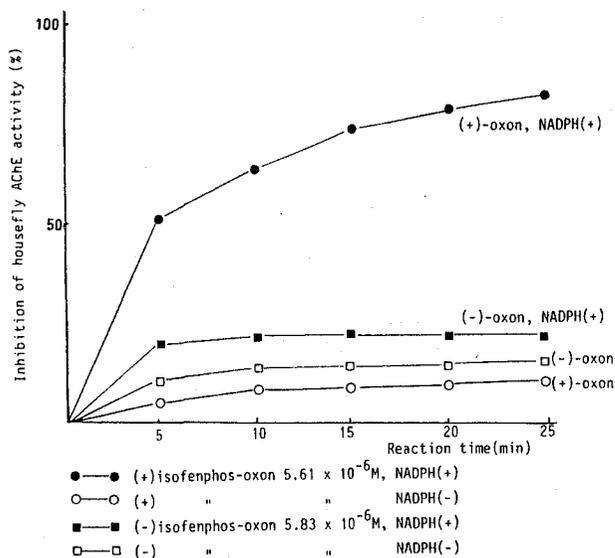


Fig. 5 Bioactivation of chiral isomers of isofenphos-oxon by the rat liver microsome-NADPH system.

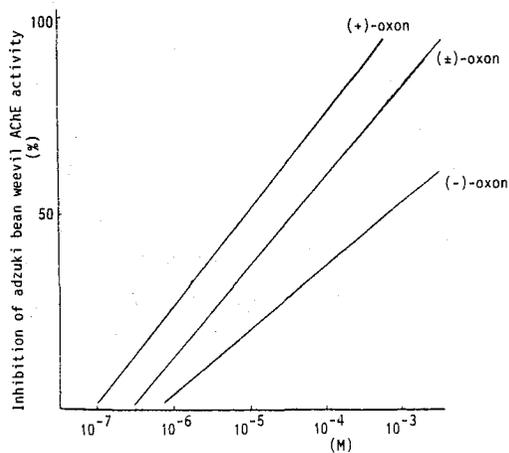


Fig.6 Inhibition of acetylcholinesterase of the adzuki bean weevil by the chiral isomers and racemate of isofenphos-oxon treated with *m*-chloroperbenzoic acid.

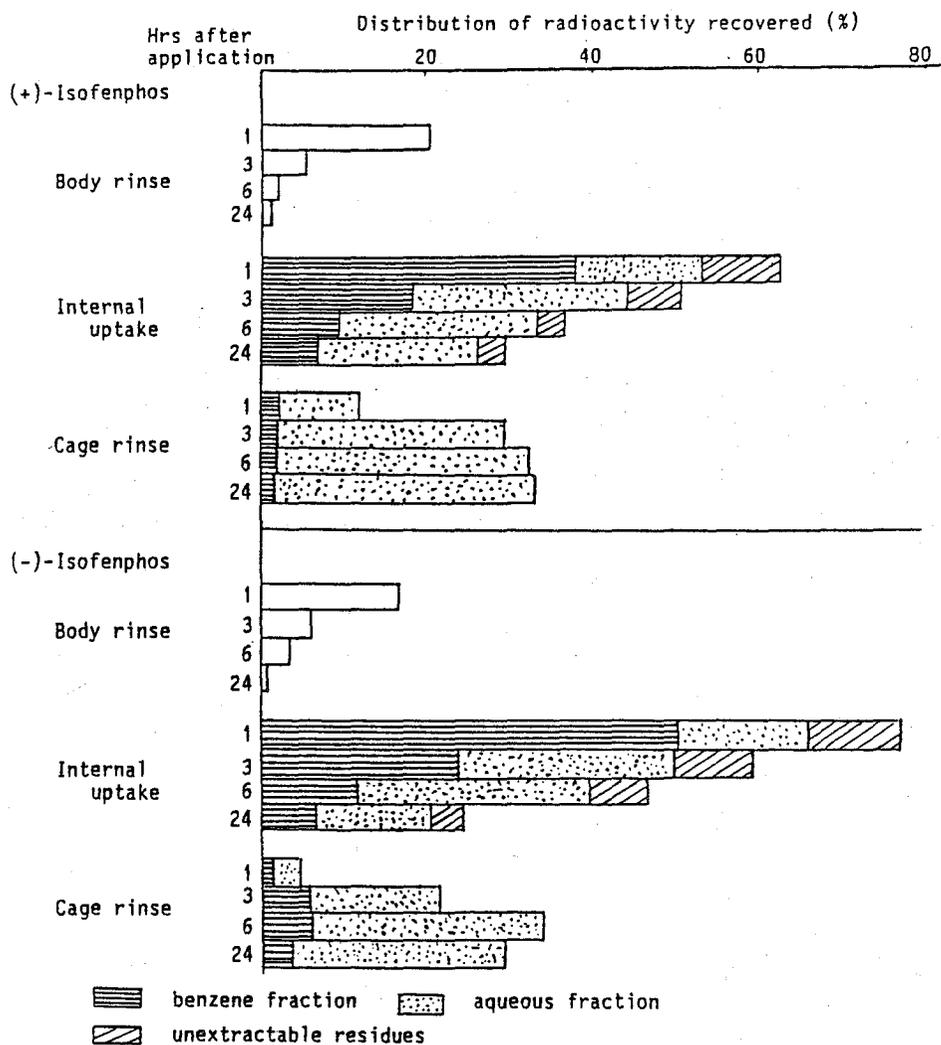


Fig. 7 Distribution of radioactivity recovered in houseflies and cage on the topical application with [O-ethyl-1-¹⁴C]isofenphos.

審査結果の要旨

殺虫剤の中で、有機リン剤は最も使用量が多く、その作用機構は一般にアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の阻害によるものとされている。然し有機リン剤の中でも窒素原子を含む phosphoramidate 系化合物の生理活性発現機構については未だ不明の点が多い。

本論文は土壌害虫の防除用に開発された phosphoramidate 系の isofenphos 関連化合物の殺虫活性発現機構の解明と、光学異性の生理活性に及ぼす差、動植物、昆虫の体内での代謝の比較検討の結果を取りまとめたものである。

Phosphoramidate 系化合物の AChE 阻害活性は P=S 体、P=O 体を合成して調べた結果、いずれも、 I_{50} 値が 10^{-3} M 以上と極めて弱く、然も P=S 体のほうが概して P=O 体より阻害活性が強かった。即ち、これら化合物では単に P=S 体が P=O 体に変換されることで殺虫活性を発現するものではないことがわかった。然し phosphoramidate は薬物酸化酵素 (mfo) や m-クロロ安息香酸処理などで AChE 阻害活性が顕著に強められることから、生体内では mfo による代謝反応で何らかの酸化的活性化が起こり、より強力な AChE 阻害剤に変換されるものであることが明らかになった。

次いで、 14 C 標識 isofenphos を合成し哺乳動物、昆虫、植物体内での代謝を比較検討し、生物種間で代謝に明確な差があることを明らかにし、代謝経路を確立した。

更に、isofenphos を光学活性カラムによる HPLC で光学分割し (+) 体と (-) 体に分けて活性を調べた結果、isofenphos 及び oxon 体は何れも AChE 阻害活性は殆どないが、イネバエでの殺虫テストでは (+) 体が (-) 体の 83.5 倍もの殺虫力を示した。このことは (+) 体及び (-) 体を mfo で酸化した際に (+) 体の AChE 阻害活性が 840 倍にも高められるのに、(-) 体は 4 倍しか阻害活性が高められないことで裏付けられた。

以上本論文では phosphoramidate 系殺虫剤の作用機構、代謝経路、立体構造-活性相関などについて、幾つかの新知見を加えたものであり、審査員一同は著者が農学博士の学位を授与される資格があると判定した。