

The Statistico-Physiological Consideration on the Estimation of Synergistic Action of Insecticides applied jointly. Tatsuro KONO (Shikoku Agricultural Experiment Station, Zentsuji) Received April 1, 1967. *Botyu-Kagaku*, 32, 34, 1967 (with English Summary, 39).

#### 4. 混合剤の相乗効果評価に関する統計生理学的考察 河野達郎 (四国農業試験場) 42. 4. 1 受理

混合剤の連合作用を吟味するために用いられている交互検定法を中心として考察を試みた。交互検定法は similar joint action を根底とするものであって、independent joint action の場合に用いても混合比に対する期待死虫率の回帰が直線にならないために検定のためのモデルとしては不適當であること、したがって相乗効果などの検出にもほとんど無力であることなどを指摘した。これよりもむしろ葉量死虫率プロビット回帰線による比較検定の方が簡明であり、客観性が保証されることを例によって示した。ツマグロヨコバイ幼虫を供試して、sevin・BHC 混合剤の連合作用を実験的に検討した結果、sevin と BHC の間には independent joint action 以外の特別な作用は認められないことを明らかにした。

2種あるいはそれ以上の殺虫剤を混合して用いたとき、その殺虫効果にいわゆる相乗作用 (synergistic action) が認められたかどうかを客観的に証明することは必ずしも容易ではない。このことは、これまでに多くの研究者によって連合作用 (joint action) についての実験的あるいは数理統計学的な究明が試みられたとはいえ、単剤の作用機構すらまだ完全に明らかにされていない現在、混合剤での連合作用が充分説明できないことはむしろ当然と言えよう。

Bliss<sup>1)</sup> は joint action の基本的な types をとりあげ、そこに期待される殺虫作用の量的側面から数学的に明伏な定義を与えた。もっとも、これらはあくまで基本的な場合について提起された基準的なモデルであって、現実の複雑な連合作用のすべてを説明するものではない。しかし Bliss<sup>1)</sup> によって数学的に定義された類似連合作用 (similar joint action) と独立連合作用 (independent joint action) の概念は、その後の研究者も認めているように<sup>2)</sup>、現実の連合作用について、より具体的に数量的に究明する足場を確立した点で高く評価される。

近年、殺虫剤などの混合使用が普及し、その連合作用を吟味するためのいろいろな方法が用いられているが、こうした評価方法の裏付けとなっている連合作用の数理的基盤に対する正しい理解が不充分なため、その適用を誤まっている例が少なくない。その最も甚だしいものとして Horsfall<sup>3)</sup> が提唱したいわゆる交互検定法 (alternative method) があげられる。こうした方法の盲目的適用によって、不当な評価や行きすぎた結論が横行する弊害を一掃するため、主として交互検定法を用いて行なわれる混合剤の生物検定 (殺虫試験) について、統計生理学的立場から考察を加えてみたい。本稿を起すにあたって、連合作用の本質、方法論などについて長沢純夫、酒井清六両博士から有益な助言を

いただいた。ここに記して謝意を表したい。

#### 交互検定法に関する統計生理学的考察

ここで Bliss<sup>1)</sup> や Finney<sup>2)</sup> が解説している連合作用について改めて説明を加える必要はないと思うが、ただ一つ independent joint action と similar joint action の関係について指摘しておかねばならないことがある。まず、Bliss<sup>1)</sup> が言うところの independent と similar という表現は彼の説明と数学的定義をみればわかるように、混合剤を構成する成分の作用機構が同質か異質かを表わす対立概念として提起されたものであって、供試昆虫が示す感受性相関の程度とは必ずしも関係がない。しかしこの表現が適切でなかったために、その後多少の誤解と混乱を招いたことは否めない。Plackett and Hewlett<sup>4,5)</sup> や酒井<sup>7)</sup> はこうした点を考慮して連合作用についての新概念を提起したが、そこで用いられている independent という用語はもはや Bliss<sup>1)</sup> が最初に定義した概念からはかなり異なったものとなっている。つぎに指摘しておきたいこと、それは Bliss が定義した independent と similar の 2 作用は現象的には連合作用を大別する概念ではあるが、これに対して与えられた数式モデルはそれぞれの中の基本的場面の幾つかを定義したものにすぎないということである。したがって、得られたデータがこれによる適合を示した場合はその作用の存在を一応認めることはできるが、適合しないからと言って直ちにこれらの連合作用型を完全に否定し、相乗作用や拮抗作用が認められると判断することはきわめて危険である。

Bliss<sup>1)</sup> は相乗作用 synergistic action についても 2 種の数式モデルを提起したが、これまた幾つかの条件が充たれないと具体的な場面に常に用いることはできない。これに対して Horsfall<sup>3)</sup> が用いた交互検定法なるものは一見まことに簡明で実用的にも価値ある方

法のように見える。しかしここで忘れてならないことは、交互検定法が similar joint action を基礎にして考えられたものであるという点である。だからこの方法で期待死虫率を与える回帰の直線性は similar joint action を仮定しないと保証されない。したがって交互検定において混合比軸の上における実験死虫率の回帰が直線にならないとしても similar action の存在が否定されるだけであって、このことをもって相乗効果などの存在を主張することは許されない。このことはY軸の死虫率のかわりにそれぞれの混合比における log LD<sub>50</sub>を用いる方法でも同じことが言える (Finney<sup>2)</sup>)。さらに言えば、2種の薬剤間に相乗作用や拮抗作用がなくても死虫率の回帰は直線とはならず、多くの場合上下に湾曲した軌跡をたどる。例によって説明してみよう。

いまお互いに independent joint action の関係にある6種の殺虫剤 (A~F) を考え、各単剤が次のような薬量死虫率プロビット回帰線を持つとする。図で示すと第1図の通りである。このようにそれぞれの単剤の slope (b) や potency (LD<sub>50</sub>) が必ずしも同一で

Table 1. Dosage-mortality regressions and LD-50 of six imaginary insecticides presumed to act quite independently each other.

Insecticide	Regression equation $y=5+b(x-\log LD_{50})$	LD-50 (ppm)
A	$y=5+1(x-4)$	10.000
B	$y=5+2(x-2)$	100
C	$y=5+1(x-3)$	1.000
D	$y=5+4(x-1)$	10
E	$y=5+3(x-2)$	100
F	$y=5+0.8(x-5)$	100.000

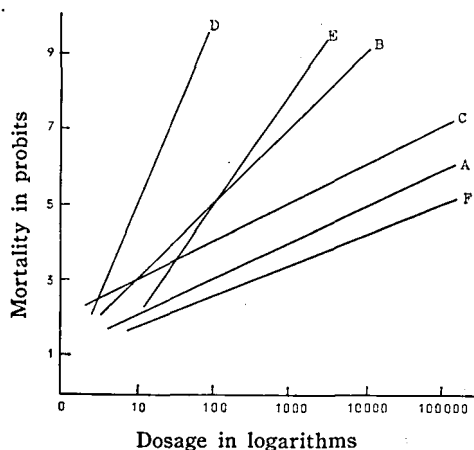


Fig. 1. Dosage-mortality regression lines of six imaginary insecticides shown in table 1.

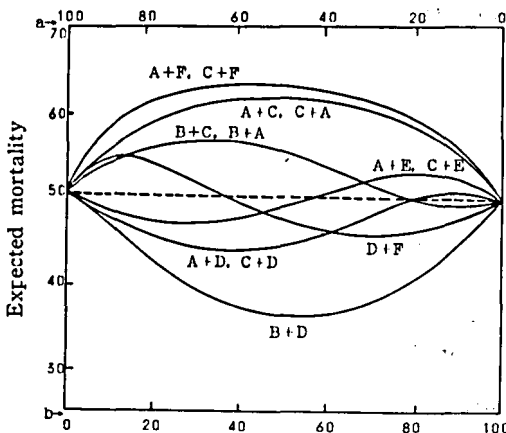
ないもののあいだの混合剤を作って交互検定を行なう場合を考える。計算を簡単にするために各単剤の LD<sub>50</sub> を基準として混合比を変えてゆくことにする。したがって期待死虫率回帰の両側の起点は50%である。

これら6種の殺虫剤から任意の2種 (a, b) をとって混合剤を作る場合、どの組み合わせをとってもそれぞれの単剤に対する供試昆虫の感受性に全く相関がなく ( $\rho=0$ )、またそのあいだに independent な連合作用しか期待されないとすれば、a+b 混合剤から期待される死虫率は次式から求められる (Bliss)<sup>1)</sup>

$$P_m = P_a + P_b(1 - P_a) \quad (1)$$

$P_a$  や  $P_b$  の値は第1表の各単剤のプロビット回帰式に混合剤中のそれぞれの単剤の薬量を代入して求める。こうして計算した混合剤の期待死虫率を、a, b 剤の混合比をx軸にとってプロットすると第2図となる。点線は2種の単剤間の作用が similar であるとき期待される混合剤の死虫率であり、この場合は水平線であるが、一般式で表現すれば

Quantity (%) of the first insecticide in mixture



Quantity (%) of the second insecticide in mixture

Fig. 2. Several loci of expected mortalities calculated by formula (1) for mixtures blended at different proportions any two of six insecticides shown in table 1.

$$P_m = L_a + \lambda_b(L_b - L_a) \quad (2)$$

または

$$P_m = L_b + \lambda_a(L_a - L_b) \quad (3)$$

となる。L<sub>a</sub>, L<sub>b</sub> はそれぞれ a, b 単剤の基準死虫率 (level of mortality),  $\lambda_a$ ,  $\lambda_b$  はそれぞれ混合剤中の a および b 剤の混合%である。第2図は2種の単剤間の連合作用が全く independent で、これに対する供試昆虫の感受性相関係数  $\rho$  が0であっても混合剤の死虫率回帰は直線とはならないことをはっきり示してい

る。混合比の基準となる両単剤の薬量(この場合はLD・50)を変更しても、すなわち基準死虫率を変えても同じである。

従来、交互検定による生物検定で、混合剤の実験死虫率が直線回帰を示さず、上方あるいは下方に外れる結果が得られた場合、これをもって直ちに相乗作用や拮抗作用があると主張している研究報告を散見するが、上のような例をみてもわかるようにそれが行き過ぎた結論であることは自明である。このように交互検定法は similar action かどうかを判定するときに有効な方法であるにすぎず、いわんや相乗効果などを検出するためにはほとんど無力であり、用いるべきでない。

ここで、ついでに independent joint action の場合に、第2図の期待死虫率の回帰がどのような軌跡をもつかということについてふれておく。その回帰線が凸になるか、凹になるかは混合剤に含まれる各単剤の薬量死虫率プロビット回帰線の勾配(b)の大きさによってのみ決まる。bの値といってもそれは薬量の単位によっても変わるが、一般的に言って、より大きいbの値をもつ薬剤を含む混合剤ほど、その回帰は下方に弯曲し(第2図, B+D)、逆に小さいb値の薬剤が含まれていれば上方に山形となる傾向が強くなる(A+F)。混合剤中の単剤がいずれも小さいbをもつ場合は一層上方にふくらんだ回帰となることはもちろんである。また両単剤のbが等しいときは、回帰が凸でも凹でも死虫率回帰は左右相称となり(A+C)、b値に差があればあるほど相称性はくずれ、より複雑な形となる(D+Fなど)。

一方各単剤の potency たとえば LD・50 の大小も回帰型に関係があるのではないかと考えがちであるが、それは錯覚であって、この場合は全く関係がない。また independent joint action であるかぎり、混合剤の死虫率回帰が第2図の点線のように直線となるようないかなる単剤の組合せもあり得ない。もしあるとすれば、どちらか一方または両方の単剤の薬量死虫率プロビット回帰線は直線ではなく複雑な曲線でなければならない。

以上のようなことは、両単剤の薬量死虫率プロビット回帰式が全く同じであったとしても、independent action の条件下では第2図の回帰が直線とはならないことを知ればより一層よく理解されるだろう。交互検定における期待死虫率の回帰が similar action の場合だけしか直線とならない理由はつぎのことからも理解できる。

- 1) 一般に薬剤の効果には域値(threshold value)が存在し死虫率0%と薬量0とは対応しない。
- 2) 薬剤の効果は一般に logarithmic であるのに交互検定では混合比の基礎となる薬量は実数であ

る。

ところで、交互検定方式を independent action の場合の検定に利用することが全く不可能というわけではない。しかしそのためには、それぞれの単剤の薬量死虫率プロビット回帰線を精密に推定し、これをもとにして(1)式から第2図のような期待死虫率回帰を計算し、これに対して実験死虫率がどれほどくちがっているか、その方向と大きさを求めて検討するだけの手続が必要である。これでは交互検定法の利点とされる簡便さは全く失われることになる。それならば、同じ(1)式を用いるにしても、薬量死虫率プロビット回帰線によって直接比較検討する方がかえって近道であると言える。そうしてその結果、混合剤の薬量死虫率プロビット回帰がもし(1)式から期待されるそれとくちがっていた場合は、さらに感受性相関  $\rho=0$  とおいて吟味してみる必要がある。その具体例として著者が行なった実験の結果を次に述べる。

#### Sevin・BHC 混合剤のツマグロヨコバイに対する効果について

sevin と BHC を混合使用するといわゆる相乗効果が期待できるとするデータとそれを否定するデータが見られるが、相乗効果が認められるとする場合にかぎって交互検定法が用いられていることが多い。この点を再検討するためにツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps* Uhler) を供試して、薬量死虫率プロビット回帰線による比較検討を行なった。

##### 1) 実験材料および方法

供試薬剤: sevin 乳剤\* (15%), BHC 乳剤 (15%)  
sevin・BHC 混合剤 (等量混合)、それぞれの単剤を所定濃度に稀釈したのち、散布直前に混合した。

供試虫: 四国農試水稲圃場で採集した成虫に産卵させて飼育した次世代3令幼虫(ふ化7日後)。

殺虫試験法: ガラス円筒(径3cm, 長さ12cm)の一端に水で湿らせたポリウレタン海綿にイネ苗(6~7cm)を10本宛包んで支え、他端より所定濃度に稀釈した供試薬剤を1ccずつ噴霧して30分間放置したのち、供試虫20頭を放ち、27°Cに保護して3時間、24時間後にそれぞれ生死を判別し記録した。各濃度区とも5回実験を反復した。

##### 2) 実験結果

各供試薬剤で得られた処理3時間後および24時間後

\* sevin は米国 UCC 社の開発になる研究番号 C & C 7744 として試験された *N*-methyl-1-naphthyl carbamate を有効成分とする新しい殺虫剤として1957年に発表されたものである〔(J. Econ. Ent., Vol. 50(4): p. 504, (Aug. 1957), (5): p. 577, 651 (Oct. 1957), (6): p. 714 (Dec. 1957)].

Table 2. Dosage-mortality data for sevin, BHC and equiconcentration mixture of these toxicants applied in water emulsions to larvae of the green rice leafhopper, at 3 and 24 hrs. after spray.

Dilution	Dosage (ppm)	Mortality in per cent					
		Sevin		BHC		Mixture	
		3 hrs.	24 hrs.	3 hrs.	24 hrs.	3 hrs.	24 hrs.
125	1,200			84	100		
250	600			72	100		
500	300			43	100	100	100
1,000	150	100	100	25	91	100	100
2,000	75	100	100	9	89	93	100
4,000	37.5	95	100	3	52	89	98
8,000	18.75	74	100	0	48	55	94
16,000	9.38	41	94	0	14	15	90
32,000	4.69	25	87	0	10	9	41
64,000	2.34	5	51	0	2	4	25
128,000	1.17	0	34			0	7

の結果は第2表の通りである。なお無処理区では24時間後も死虫が現われなかったので実験死虫率の補正は行なわなかった。sevin および BHC の単剤だけについて計算した葉量死虫率プロビット回帰線と LD・50の値は第3表のようである。LD・50の値が示すようにツマグロヨコバイに対して BHC の殺虫効力はきわめて弱い、それと同時に回帰線の勾配 (b) も sevin に比較して小さいことが指摘される。

3) Sevin と BHC の連合作用に対する吟味

第2表の殺虫試験の結果を見ただけでは sevin と BHC の間に相乗作用があるかどうかを判断することはできない。第3表が示すように、この両単剤のプロビット回帰線の勾配にはかなりの差があり、LD・50における大きい差も考慮すると、両剤の作用が similar である可能性は甚だ少なく、ツマグロヨコバイに対しても異質の作用機構をもった薬剤とみなされる。このことは笠井・荻田<sup>9)</sup>がこの両薬剤に対するイエバエの抵抗性の遺伝的解析によって明らかにしており、したがってこの実験結果についても independent joint

action を想定して(1)式によって検討するのが妥当である。

第3表の各単剤のプロビット回帰式に混合剤中の両

Table 4. Comparison between the observed mortality of larvae of the green rice leafhopper to sevin-BHC mixture and the expected mortality calculated by formula (1) based on independent joint action.

Dosage (ppm)	Mortality in per cent			
	3 hrs. after		24 hrs. after	
	Observed	Expected	Observed	Expected
150.00	100	99.19	100	100
75.00	93	94.32	100	99.98
37.50	89	78.15	98	99.52
18.75	55	49.07	94	96.96
9.38	15	20.61	90	85.10
4.69	9	5.30	41	61.30
2.34	4	0.80	25	28.25
1.17	0	0	7	9.80

Table 3. Results of regression analysis for dosage-mortality data shown in table 2.

Hrs. after treatment	Insecticide	Regression equation $y=5+b(x-\log LD50)$	LD-50 (ppm)
3	sevin	$y=5+2.645(x-0.981)$	9.57
	BHC	$y=5+1.943(x-2.543)$	349.20
24	sevin	$y=5+2.623(x-0.291)$	1.96
	BHC	$y=5+1.947(x-1.438)$	27.42

単剤の薬量を代入して、これに対応するプロビット値を求め、これを死虫率に変換する。これを  $P_a, P_b$  として(1)に代入し混合剤の期待死虫率を算出すると第4表の数値が得られる。これらの値を実験死虫率と同様にプロビットに変換してグラフ上に描くと第3図、A Bの点線となる。この場合は一見直線のように見えるが、厳密には直線ではない。

図でみるように、処理後の時間にかかわらず、混合

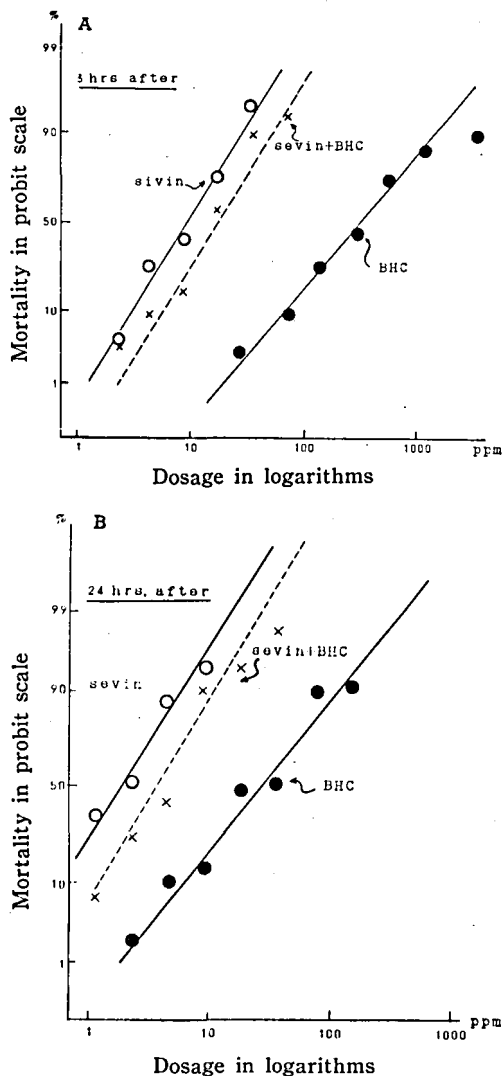


Fig. 3. Dosage-mortality regression lines for sevin, BHC, and their mixture applied in water emulsions to larvae of the green rice leafhopper.

(Dotted line: regression line of expected probit for the sevin BHC mixture, calculated by equation (1)).

剤の実験死虫率プロビットはすべて両単剤の回帰線のあいだにある。ここで両単剤間に independent joint action が認められるかどうかを吟味するには、第4表の期待死虫率系列と実験死虫率との偏差の程度を検討するか、もしくは第3図 (A, B) における混合剤の期待死虫率プロビット回帰からの実験死虫率プロビットの外れの程度によって判定するのがよい。

第4表および第3図が示すように、適合検定を試みるまでもなく、混合剤で得られた実験死虫率は期待死虫率系列にくらべてほとんど有意な差ではない。すなわち、この場合では sevin と BHC の混合剤には independent action から期待される作用しか認められず、そこに相乗効果のような特殊な作用は起こっていないと考えてよい。この実験は等量混合の場合であるが、混合比を LD<sub>50</sub> の比にしても、また他の混合比にしてもこの実験の結果とそれほどちがった結論は出ないと考えられる。なお、このほかに虫体散布を行なったときのデータについても同様の検定を行なったがこの場合とほとんど同じ結果が得られたことをつけ加えておく。

### おわりに

Swisher<sup>8)</sup> も指摘しているように、これまでに殺虫剤と殺虫剤との混合剤でいわゆる相乗効果が認められたとされているものの中にはその評価がかなり疑わしいものが多いように思う。従来、相乗効果あるいは共力作用が明らかに立証された例をみると大部分は2種の殺虫成分の混合といったものではなく、一方の成分だけではほとんど殺虫効果が期待できないが、ある種の媒介的な作用をもち、他方の殺虫成分の作用を activate するような働きをもつ場合が多い。殺虫力をもつもの同志では薬害を助長するなどむしろ拮抗的な結果をもたらすことが少なくない。このような観点からすれば、殺虫剤間の混合は防除の省力化を目的とする場合にはよいとしても、相乗効果を期待することはかなり無理のように思われる。したがってこれまでに相乗効果を認めたものについても再検討の必要があるが、こうした結果を招いた一因として交互検定法にも問題があるように思われてならない。

これらの方法に対する理解が不十分なために、盲目的に誤って用いられ、その結果から簡単に相乗効果の存在を主張する報告が跡をたたないことは科学的立場からみて甚だ残念である。本稿がこうした点から理解され、このような誤まちを少なくするのに役立つば幸いである。

本稿では交互検定法を批判の対象にしなが、 independent joint action の場合の基本的で初歩的な場面だけについて考察したにすぎない。 synergistic action

そのものについては Bliss<sup>1)</sup> はじめ多くの研究者の研究があり、当然ここでもとりあげるべきであったがこれらについては次の機会にゆずることとする。

### 文 献

- 1) Bliss, C. I.: *Ann. Appl. Biol.*, 26, 585 (1939).
- 2) Finney, D. J.: *Probit Analysis*, Cambridge Univ. Press (1947).
- 3) Horsfall, J. G.: *Fungicides and their action*. Chronica Botanica Co. (1945).
- 4) 笠井 勉・荻田善一: 防虫科学 30, 12 (1965).
- 5) Plackett, R. L. and Hewlett, P. S.: *Ann. Appl. Biol.*, 35, 347 (1948).
- 6) Plackett, R. L. and Hewlett, P. S.: *J. Roy. Sta. Soc., S. B.* 14, 141 (1952).
- 7) 酒井清六: 殺虫剤の連合作用に関する昆虫毒物学的研究 (1960).
- 8) Swisher, E. M.: *J. Econ. Ent.*, 37, 690 (1944).

### Summary

In order to evaluate synergistic action of two insecticides applied jointly, the alternative method

for insecticidal assay has been applied. This method is, however, applicable to the similar joint action, and is unsuitable for the estimation of the independent joint action. If this method is applied for the estimation of the synergistic action, regression line calculated from expected mortalities in various proportions of two insecticides should not be expectable in linear. The author pointed out that it is undesirable to apply this method for estimation of the independent joint action to detect synergism. Thus, it seems that the application of dosage-mortality-regression line is reasonable for the estimation of synergistic action between two insecticides.

As for an example, the insecticidal action between sevin and BHC against the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler was studied, and the result obtained was considered to be only independent joint action, and could not be expected synergism between the two insecticides.

---

**Joint Sterilizing Effect of a Mixture of Apholate and Hempa on the Azuki Bean Weevil, *Callosobruchus chinensis* L.** Studies on the Chemosterilants of Insects. VIII. Sumio NAGASAWA and Hiroshi SHINOHARA (Ihara Agricultural Chemicals Institute, Shimizu, Shizuoka) Received April 27, 1967. *Botyu-Kagaku*, 32, 39, 1967. (with English Summary, 43)

**5. Apholate と hempa のアズキゾウムシに対する連合不妊作用** 昆虫の化学不妊剤に関する研究. 第8報. 長沢純夫・篠原 寛 (イハラ農薬研究所) 42. 4. 27 受理

Apholate と hempa のアズキゾウムシに対する連合不妊作用様式を、浸漬処理した成虫が産下した卵のふ化率によって検定した結果は similar で、hempa のapholate に対する相対有効度は 2.06% であった。

Apholate と hempa は、これをアズキゾウムシの成虫に処理したとき、それらの産下した卵のふ化を顕著に阻害することは、さきに報告した<sup>5)</sup>。apholate はエチレンイミン環をもつ、アルキル化剤のひとつであるのに対して、後者の hempa は phosphoric triamide のひとつで、アルキル化作用をもたない化合物である。本文においては、このようにことなつた化合物の、アズキゾウムシに対する連合不妊作用様式をしる目的をもっておこなつた実験の結果をのべる。なおあわせて Wadley<sup>6)</sup>、Finney<sup>7)</sup> の方法によって実験結果を解析し、えられた平行な回帰線群の方程式から、synergism の尺度  $A_1$  を算定したとき、その有意性を検定する方

法をのべる。本文に入るに先立ち、数値解析の方法について、種々の御教示をいただいたエジンバラ大学の Dr. D. A. Williams に謝意を表する。

### 実験材料および方法

実験材料、方法、飼育、実験施行時の環境条件など、すべてさきの報告<sup>7)</sup>と同じで浸漬法によってこれをおこなつた。apholate と hempa の間の連合不妊作用は、これらを 1:19 の比率に混合した場合をえらんで検討した。実験はひとつの濃度段階について10回のくりかえしを、すなわち雌雄10対の産下した卵についてそのふ化を観察した。なおこの実験は1966年7月12日