

**Joint Toxic Action of Organophosphorus Compounds and Various Compounds in Resistant Citrus Red Mites. II. Mechanism of Synergistic Action between Malathion and K-1 (2-phenyl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide) in Organophosphate Resistant Citrus Red Mites.** Yohji TAKAHASHI\*, Tetsuo SAITO, Kisabu IYATOMI and Morifusa ETO\*\*. (Laboratory of Applied Entomology and Nematology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya and \*\*Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University, Fukuoka) Received October 23, 1972. *Botyu-Kagaku*, 38, 13, 1973. (with English Summary 21).

3. 薬剤抵抗性ミカンハダニに対する有機リン剤の連合作用 II. 有機リン剤抵抗性ミカンハダニにおける malathion と K-1(2-phenyl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide) の共力作用の機作 高橋洋治\*, 斎藤哲夫, 弥富喜三, 江藤守総\*\* (名古屋大学農学部害虫学教室, \*\*九州大学農学部農芸化学科) 47. 10. 23 受理

1. 有機リン剤抵抗性, 感受性のミカンハダニにおける malathion と K-1(2-phenyl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide) の共力作用の機作を検討した。

2. *in vitro* における感受性系統 (PS) の cholinesterase 活性は抵抗性 (SK, R) よりも高かった。 *In vivo* および *in vitro* における malathion や malaaxon による cholinesterase の阻害度は, 抵抗性の SK, R は感受性の PS より低く, これらのことは有機リン剤抵抗性の一要因になっていると考えられる。共力剤の K-1は *in vivo* において malathion の cholinesterase 阻害作用を高めた。また *in vitro* の実験において, K-1の加用は malathion や malaaxon の cholinesterase 阻害に附加的に働いた。

3. *in vitro* 実験において, 抵抗性系統の  $\beta$ -naphthyl acetate 加水分解酵素の活性は感受性系統よりも高かったが, 有機リン剤に対する感受性の程度と酵素活性との間には平行関係はなかった。K-1は  $\beta$ -naphthyl acetate 加水分解酵素の強い阻害剤であった。

4.  $^{32}\text{P}$ -malathion を使い抵抗性系統と感受性系統の malathion 代謝能を調べたところ, *in vivo*, *in vitro* ともに前者においてより多くの分解代謝物が認められ, その違いは主に carboxyesterase による代謝物であった。共力剤である K-1 を  $^{32}\text{P}$ -malathion と同時処理すると, 抵抗性, 感受性両系統において全代謝物に対する carboxyesterase 代謝物の割合が減少した。 *in vitro* における  $^{32}\text{P}$ -malathion の分解は K-1 により阻害された。このことから K-1 は malathion の解毒分解酵素の1つである carboxyesterase を阻害していることが示唆された。

殺虫剤抵抗性系統における共力剤の機作を研究するためには, 薬剤の作用機構および抵抗性の機作について充分な知見を得る必要がある。一般に薬剤抵抗性の機作としては, 薬剤の皮ふ透過性の減少, 解毒代謝の増大, 作用点の薬剤感受性の減退の3点があげられる。

初期の段階における共力剤の研究は pyrethrins に関するものがほとんどであり, この現象を, 共力剤は燻霧剤の粒子の安定化, ノックダウン割合の減少, 飛翔活動の刺激, 薬剤の安定化あるいは昆虫体内への pyrethrins の透過性の増大など種々の要因に関連させて論じられたが, 最近生化学および遺伝学的検討やトレーサーによる実験技術などにより, これまで共力作用として知られている例はほとんど殺虫剤の解毒代謝の阻害によるものであることが明らかになってきた (Metcalf; 1967)<sup>1)</sup>。

解毒代謝の阻害には, malathion に EPN を加える

と共力作用が得られるように EPN が malathion の解毒分解酵素を阻害する例と, DDT に DMC を加えると得られる場合の, 類似の化合物が同時に体内に存在することから代謝に競合が起り結果として共力作用が現われる例とがある。また, 抵抗性の系統により解毒代謝の系が異なることも考えられることから, 共力剤がすべての抵抗性系統に共力作用を示すとは限らない (Hewlett; 1968)<sup>2)</sup>。

Eto *et al.* (1963)<sup>3)</sup> は昆虫について saligenin cyclic phosphorus esters (以下 SCPE と略す) の aryl 誘導体は特異的 ali-esterase 阻害剤であることを述べ, Eto *et al.* (1965)<sup>4)</sup> はそれらと malathion との共力作用を報告し, Ohkawa *et al.* (1968)<sup>5)</sup> はその共力作用を SCPE が malathion の解毒分解酵素である carboxyesterase を阻害するためであると報告している。

本報ではこれらの報告をもとに, 著者ら<sup>6)</sup>が先に報告したミカンハダニ (*Panonychus citri* McGregor)

\* 現在, 三菱化成工業株式会社商品研究所, 横浜市緑区鴨志田1,000番地

の抵抗性と感受性系統における malathion と SCPE の1つである K-1(2-phenyl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide) との共力作用について、以下の3点について検討した結果を報告する。

1. Malathion, malaaxon のハダニ cholinesterase 阻害におよぼす共力剤の影響

有機リン剤の作用点が cholinesterase (以下 ChE と略す) であることが知られていることから、有機リン剤抵抗性と ChE の関係は抵抗性の機作を研究する上で重要な問題である。

Asperen and Oppenoorth (1959)<sup>6)</sup> は、有機リン剤抵抗性ならびに感受性のイエバエ (*Musca domestica* L.) のホモジネートを使い ChE の活性を測定し、両者の活性に差がなかったと述べ、また、Bigley and Plapp (1960)<sup>7)</sup> はイエバエの抵抗性ならびに感受性の ChE 活性度はほとんど差がなく、また阻害剤感受性にも差がなかったと報告している。このように、昆虫においては有機リン剤抵抗性と ChE の活性度とは直接関係ないようである。

一方、ダニ類では Smissaert (1964)<sup>8)</sup> が抵抗性ナミハダニ (*Tetranychus urticae* Koch) では感受性のものより ChE の活性度が低く阻害剤感受性も低いと述べ、その後 Voss and Matsumura (1964)<sup>9)</sup> はこの事実を認めている。また、山本、西田(1961)<sup>10)</sup> はミカンハダニの抵抗性ならびに感受性系統間には ChE の活性度に差がなかったと報告している。Lee and Batham (1966)<sup>11)</sup> はマダニの一種 (*Boophilus microplus*) で抵抗性のものでは感受性より ChE の活性度が低く、阻害剤との反応速度も遅いと報告している。

以上述べたように、多くの昆虫において有機リン剤抵抗性というものが ChE 阻害剤に対して抵抗性が発達したためであるにもかかわらず、抵抗性の機作としての ChE の阻害剤に対する低感受性がハダニを除いて昆虫では全く報告されていないことは注目すべきことである (Oppenoorth; 1971)<sup>12)</sup>。

本報では、有機リン剤抵抗性、感受性のミカンハダニについて ChE 活性度、阻害剤に対する感受性、阻害剤感受性におよぼす共力剤の影響について検討した。

2. Malathion, malaaxon による ali-esterase の阻害におよぼす共力剤の影響

Asperen and Oppenoorth (1959)<sup>6)</sup> は有機リン剤抵抗性のイエバエは ali-esterase (以下 Ali-E と略す) の活性が低いことを見つけ、彼等(1960)<sup>13)</sup> はそれが解毒分解酵素に変化しているためであろうという仮説を立てた。その後、一連の実験により証明しつつある (Asperen and Oppenoorth; 1960<sup>14)</sup>, Oppenoorth and Asperen; 1961<sup>15)</sup>, Asperen; 1964<sup>16)</sup>, Asperen et al.; 1965<sup>17)</sup> など)。

Ali-E の阻害剤である propyl paraoxon あるいは EPN などが malathion の解毒分解酵素を阻害し、それ故に malathion と共力作用を有することがわかっている (Oppenoorth and Asperen; 1961<sup>15)</sup>, Matsumura and Hogendijk; 1964<sup>18)</sup>)。また Plapp et al. (1963)<sup>19)</sup> はイエカ (*Culex tarsalis* Coquillett), イエバエにおいて malathion と共力作用を有する有機リン系の化合物は Ali-E 阻害能が高かったと報告している。

本報では、抵抗性および感受性系統で *in vitro* における Ali-E 活性を、基質として  $\beta$ -naphthyl acetate を用いて比較し阻害剤および共力剤に対する感受性について調べた。

3. Malathion の代謝におよぼす共力剤の影響

ハダニのような微小動物の物質代謝を知ることは容易なことではないが、近年この種の研究にラジオトレーサー技術が導入されて以来、比較的容易にこの問題を研究することができるようになった。

昆虫における有機リン剤抵抗性の機作が、主に解毒分解酵素によるものであることは多くの種において明らかにされている (Oppenoorth and Asperen; 1961<sup>15)</sup>, Matsumura and Brown; 1961<sup>20)</sup>, Bigley and Plapp; 1962<sup>21)</sup> など)。一方、ハダニにおいても Matsumura and Voss (1964)<sup>22)</sup>, Voss and Matsumura (1964)<sup>23)</sup> は、有機リン剤抵抗性ナミハダニは作用点である ChE の薬剤に対する低感受性だけでなく、薬剤の分解代謝能が高いことを報告している。Matsumura and Brown (1961)<sup>20)</sup> は、イエカにおいて malathion と EPN を同時処理すると malathion 単用のとき見られた抵抗性、感受性間の carboxyesterase 代謝物の差に有意性がなくなったと報告している。

本報では、ミカンハダニの有機リン剤抵抗性ならびに感受性系統でそれらの malathion 代謝能を比較すると同時に、共力剤 (K-1) の malathion 代謝におよぼす影響について実験を行なった結果を報告する。

#### 材料および方法

ミカンハダニ;

供試したミカンハダニは、前報<sup>20)</sup> と同じく抵抗性系統として愛媛系 (愛媛県果樹試験場森技師から入手したもので以下 R と呼ぶ)、宿系 (佐賀県果樹試験場岡技師から入手したもので以下 SK と呼ぶ) の2系統、感受性系統として PS 系 (日本農薬株式会社農薬試験場より入手、phenkaptone 抵抗性個体群より累代選抜した有機リン剤感受性系統) の1系統、合計3系統を供試した。各系統の malathion に対する感受性は第1表に示す通りである。

Table 1. Susceptibilities of resistant and susceptible strains of the adult of citrus red mite to malathion.

Strains	Dosage-mortality regression equation	LC <sub>50</sub> (%)	Resistant factor
Ehime (R)	Y=5+1.40989 (X-3.18567)	1.533	102
Shuku (SK)	Y=5+1.84663 (X-2.86658)	0.734	49
PS	Y=5+2.07220 (X-1.17730)	0.015	1

殺虫剤および共力剤；

実験に供試した殺虫剤および共力剤は次の3種類である。malathion; O,O-dimethyl S-(1,2-dicarboethoxyethyl)phosphorodithioate, malaaxon; O,O-dimethyl S-(1,2-dicarboethoxyethyl) phosphorothiolate, K-1; 2-phenyl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide. いずれも有効成分が90%以上のものである。<sup>32</sup>P-malathionは当教室で<sup>32</sup>P-リン酸より常法<sup>29)</sup>により合成し、98%以上の放射化学物純度を有するもので、実験当時の放射能は200 cpm/μgであった。

Cholinesterase 活性の測定；

*in vitro* 実験：Hestrin (1949)<sup>24)</sup>の比色法をハダニ用に変法した Motoyama and Saito (1968)<sup>25)</sup>の方法に準じて次の手順で測定した。

1) 雌成虫ハダニを3×20mmの口紙片(東洋口紙 No. 51)に先を丸くしたガラス棒で1頭づつ磨砕し体液を吸収させる。

2) これを3×5mmに細切して小試験管(1×10cm)に入れ、1/15M, pH 7.3のリン酸塩緩衝液に溶かした2.5×10<sup>-3</sup>Mのacetylcholine chloride 0.05mlと37°Cで一定時間反応させる。他に基質の自家分解とハダニの体色補正用として、acetylcholine chlorideのみの試験管を同様に保持する。

3) 反応後、これらにhydroxylamine hydrochlorideのアルカリ液(2Mのhydroxylamine hydrochlorideと3.5NのNaOHを使用時に等量混合したものを0.1ml加える。ここで補正用試験管に同頭数ハダニを磨砕した口紙を上述と同様に加える。

4) 3.5/3NのHClを0.15ml加える。

5) Ferric chlorideの酸性溶液(0.37/2M, Ferric chlorideの0.1N, HCl溶液)を0.1ml加え、分解されずに残っているacetylcholineを発色させる。

6) これを3,000 r. p. m.で10分間遠心分離して蛋白を沈殿させ、上清をマイクロキューベット(0.2ml容)にとり光電比色計(Shimazu spectronic 20)を用いて540mμで比色し、吸光度についてacetylcholineの標準曲線から未反応acetylcholine量を知る。

なお阻害実験では、2)で5×10<sup>-3</sup>Mのacetylcholine chlorideと阻害剤〔malathion (10<sup>-4</sup>M), malaaxon

(5×10<sup>-6</sup>M), K-1(10<sup>-4</sup>M) および malathion (10<sup>-4</sup>M)とK-1(10<sup>-4</sup>M), malaaxon(5×10<sup>-6</sup>M)とK-1(10<sup>-4</sup>M)の等量混合液(W/W)。これらの阻害剤はacetoneで溶解し、目的の濃度にするには蒸留水にて希釈した。その段階でのacetone濃度は0.02%以下であり阻害度におよぼす影響は無視できる。〕を等量混合した基質阻害剤液を同時反応させた。

*In vivo* 実験：*In vivo*における阻害実験ではmalathion および K-1 の50%乳剤(malathion および K-1を除く残りの50%がacetone: benzene: Newcol-863<sup>®</sup>=10:10:1である50%乳剤)の0.05%水溶液およびそれらの混合液を散布処理した後、25°Cで2時間保持しそのあと*in vitro*実験で述べた手順に従いChE活性の阻害度を測定した。

Ali-esterase 活性の測定；

Asperen(1962)<sup>26)</sup>, Smissaert (1965)<sup>27)</sup>, Motoyama and Saito (1968)<sup>25)</sup>らの報告に準じ次のように行なった。雌成虫ハダニ1頭を5×5mmの口紙片(東洋口紙 No. 51)上でガラス棒を用いて磨砕し体液を吸収させる。これを、あらかじめacetoneで溶かしておき1/15M, pH 7.0のリン酸塩緩衝液で溶かした5×10<sup>-4</sup>Mのβ-naphtyl acetate (acetone 5%含有) 3mlと27°Cで20分間反応させる。反応後1% naphthanil diazo blue B塩の水溶液と5% lauryl sulfuric acid sodium 塩の水溶液を2:5の割合に混じった溶液を0.45ml加えて発色させる。これをマイクロキューベットを使って光電比色計(Shimazu spectronic 20)で555mμについて比色する。

阻害実験の場合は、阻害剤1.5ml, pH 7.0で20分間阻害反応を行ない、次に基質(10<sup>-3</sup>M)1.5mlを加えて以下同様に処理した。

薬剤代謝実験；

*In vivo* 実験：弥富、斎藤(1965)<sup>28)</sup>の方法にしたがって次のように行なった。<sup>32</sup>P-malathionの50%乳剤(<sup>32</sup>P-malathionを除く残りの50%がacetone: benzene: Newcol-863<sup>®</sup>=10:10:1である50%乳剤)の1,000倍液をミカン葉ディスクに接種した雌成虫ハダニ25頭にクロマト用ガラススプレーで散布する。これを25°Cで一定時間保持後、ペーパークロマトグラ

ム用口紙 (東洋口紙 No. 51A, 2.8×40cm) の原点にガラス棒を用いてすりつぶし, Bigley and Plapp (1962)<sup>21)</sup> の方法にしたがって acetone: nitrile: 水: ammonia 水=85:15:1 (V/V) で 25cm 展開し, Aloka 製 4π 低バックグラウンドペーパークロマトグラム自動測定装置で放射能を測定する。このようにして測定した malathion の分解物, 未分解物は標準品ならびに Bigley and Plapp (1962)<sup>21)</sup> の報告した Rf 値を参考にして同定した。

*In vivo* の K-1 による阻害実験では, <sup>32</sup>P-malathion と K-1 (<sup>32</sup>P-malathion と同じ 50% 乳剤組成) の混合液 [malathion: 0.05%, K-1: 0.05%, 混合比 1:1 (V/V)] を散布し, 以下同様に処理した。

*In vitro* 実験: malathion の分解物, 未分解物の割合を比較するために次のごとく行なった。

1) 雌成虫ハダニ 200 頭をホールスライドガラスの上で, pH 7.3 のリン酸塩緩衝液 0.1ml でガラス棒を用いて磨砕し酵素液を作る。

2) この酵素液 40μl を小試験管にとり, *in vivo* で用いたと同じ <sup>32</sup>P-malathion の 50% 乳剤の 8×10<sup>-4</sup>M 水溶液を加え, 37°C で 1 時間反応させる。このとき malathion の自家分解をみるために <sup>32</sup>P-malathion だけの試験管を同様に保持する。

3) 反応後 chloroform で 3 回抽出し, 水分配物 (分解物), chloroform 抽出物 (未分解物) をそれぞれ別の試料皿にとる。

4) それぞれの抽出液に 6% KOH を数滴加え, 赤外線ランプ下で溶媒を蒸発させた後, 無窓ガスカウンタ (ニュークレアシカゴ製) で放射能を測定する。

K-1 による malathion の代謝阻害実験では, さきと同様に調製した酵素液 40μl に <sup>32</sup>P-malathion と K-1 の混合液 [a) malathion: 8×10<sup>-4</sup>M, K-1: 10<sup>-3</sup>M, b) malathion: 8×10<sup>-4</sup>M, K-1: 5×10<sup>-4</sup>M, 混合比はいずれも 1:1 (V/V)] を 20μl 加え測定した。

また malathion の代謝物を同定するためには, *in vivo* の実験法を応用して次のごとく行なった。

1) 雌成虫ハダニ 250 頭を 0.05ml のリン酸塩緩衝液 pH 7.3 でガラス棒にて磨砕し, 酵素液を作る。

2) この酵素液 20μl を小試験管にとり, 50% <sup>32</sup>P-malathion 乳剤の 1.5×10<sup>-3</sup>M 水溶液 10μl を加え 37°C で 1 時間反応させる。

3) 反応後, この液をペーパークロマト用口紙 (東洋口紙 No. 51A, 2.8×40cm) の原点にマイクロピペットでつける。

以下 *in vivo* 実験と同様に処理した。

阻害実験の場合は, 同様に調製した酵素液に <sup>32</sup>P-malathion と K-1 の混合液 [malathion: 1.5×10<sup>-3</sup>M, K-1: 2×10<sup>-3</sup>M, 混合比 1:1 (V/V)] を加え同時阻

害させた。

## 結 果

1. Malathion, malaoxon の cholinesterase 阻害におよぼす共力剤の影響

3 系統のミカンハダニにおける ChE 活性度と酵素濃度, 反応時間の関係は, 第 1, 2 図に示す通りである。この実験条件下では, 抵抗性のもでは感受性のもより活性度は低かった。*In vitro* における malathion, malaoxon の ChE 阻害は, 第 3, 4 図に示

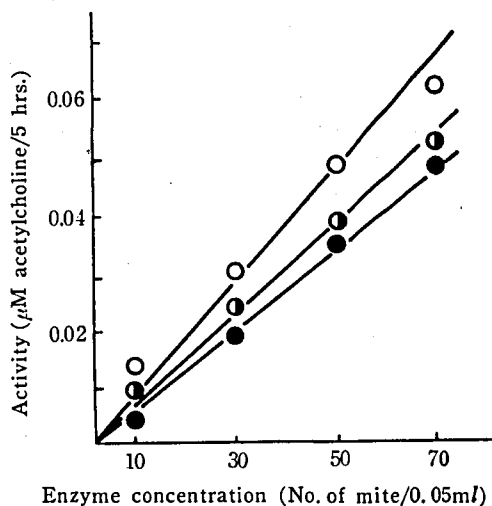


Fig. 1. Relation between enzyme concentration and cholinesterase activity.

(●: R strain, ●: SK strain, ○: PS strain)

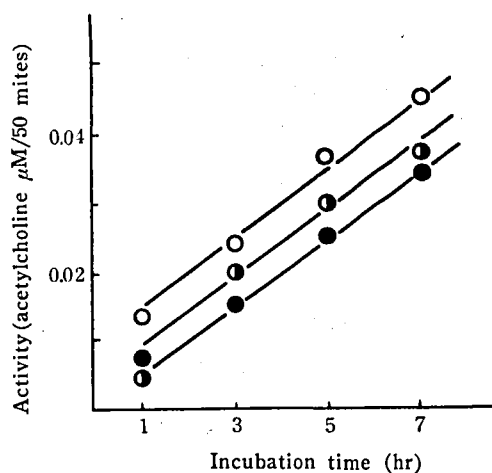


Fig. 2. Relation between incubation time and cholinesterase activity. (●: R strain, ●: SK strain, ○: PS strain)

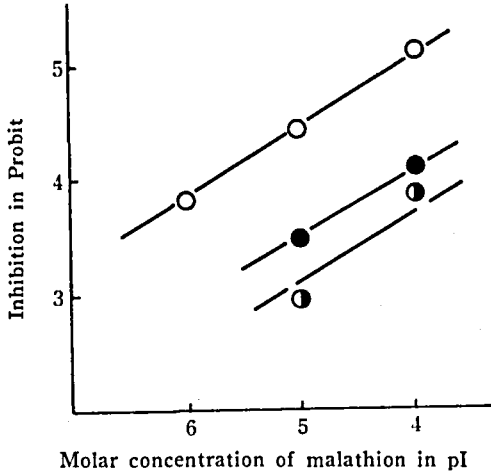


Fig. 3. *In vitro* cholinesterase inhibition by malathion (●: R strain, ◐: SK strain, ○: PS strain)

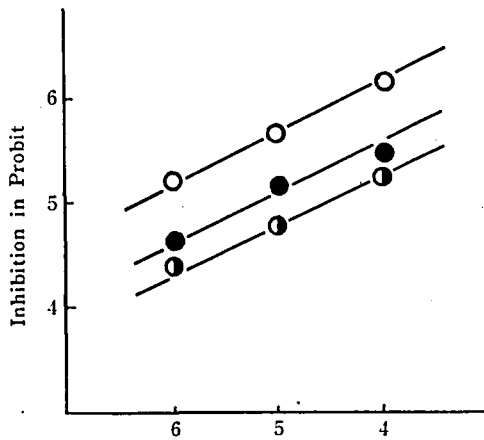


Fig. 4. *In vitro* cholinesterase inhibition by malaoxon (●: R strain, ◐: SK strain, ○: PS strain)

した通りである。感受性系統では malathion, mala-oxon いずれに対しても抵抗性系統に比べ強く阻害され、その差は malaoxon より malathion で大きかった。*In vitro*, *in vivo* における malathion, mala-oxon および共力剤である K-1 の ChE の阻害は第 2, 3 表に示す通りである。

2. Malathion, malaoxon による ali-esterase 阻害におよぼす共力剤の影響

*In vitro* における 3 系統の Ali-E 活性度の測定は 15 反復行ない結果は第 4 表に示した。また *in vitro* における各種阻害剤の Ali-E 阻害度は第 4 表に示し

Table 2. *In vitro* cholinesterase inhibition by malathion, malaoxon, K-1 and their mixtures.

Inhibitors	Rtaio (W/W)	Inhibition (%)		
		R	SK	PS
1. Malathion ( $10^{-4}$ M)		21.7	17.8	23.5
2. K-1 ( $10^{-4}$ M)		23.9	20.0	30.0
3. Malathion ( $10^{-4}$ M) : K-1 ( $10^{-4}$ M)	1:1	41.3	37.8	50.0
4. Malaoxon ( $5 \times 10^{-6}$ M)		44.4	46.5	52.3
5. K-1 ( $5 \times 10^{-6}$ M)		8.8	11.1	25.0
6. Malaoxon ( $5 \times 10^{-6}$ M) : K-1 ( $5 \times 10^{-6}$ M)	1:1	48.9	55.8	65.9

Table 3. *In vivo* cholinesterase inhibition by malathion, K-1 and their mixture.

Inhibitors	Concentration (%) sprayed on citrus red mite	Inhibition (%)		
		R	SK	PS
Malathion	0.05	9.6	3.4	40.5
K-1	0.05	50.0	45.2	56.8
Malathion : K-1 (1:1)	0.05	65.2	52.4	81.1

Table 4. *In vitro* ali-esterase ( $\beta$ -naphtyl acetate hydrolyzing enzyme) activity of three strains of citrus red mite.

Strains	Activity (O. D.)
R	0.3284 $\pm$ 0.0018
SK	0.5413 $\pm$ 0.0025
PS	0.2549 $\pm$ 0.0067

た。実験は 10 反復行ない、値はその平均値で表わしてある。

3. Malathion の代謝におよぼす共力剤の影響

*In vivo* 実験; *In vivo* における ミカンハダニの 3, 24 時間後の malathion 代謝およびそれにおよぼす

Table 5. *In vitro* ali-esterase ( $\beta$ -naphtyl acetate hydrolyzing enzyme) inhibition by malathion, malaoxon, K-1 and their mixtures.

Inhibitors	Ratio (W/W)	Inhibition (%)		
		R	SK	PS
1. Malathion ( $10^{-5}$ M)		10.8	12.1	15.1
2. Malaoxon ( $10^{-5}$ M)		75.0	77.0	78.1
3. K-1 ( $10^{-5}$ M)		65.9	72.6	74.7
4. Malathion ( $10^{-5}$ M) : K-1 ( $10^{-5}$ M)	1:1	87.8	86.6	89.4
5. Malaoxon ( $10^{-5}$ M) : K-1 ( $10^{-5}$ M)	1:1	88.7	89.7	90.4

Table 6. *In vivo* metabolism of  $^{32}\text{P}$ -malathion and its inhibition by synergist, K-1, at 3hrs. after treatment in three strains of citrus red mite.

Metabolites	Rf	Radioactivities (%)					
		R		SK		PS	
		*Mala-thion	**Mala-thion + K-1	*Mala-thion	**Mala-thion + K-1	*Mala-thion	**Mala-thion + K-1
1. Phosphoric acid	0.00						
Dimethyl phosphoric acid	0.06	5.0	6.1	7.0	4.4	5.4	7.0
2. Carboxyesterase products							
Di-carboxylic acid	0.11	5.9	6.8	8.0	11.6	7.3	5.6
Mono-carboxylic acid	0.22	12.0	12.0	9.4	12.1	8.8	6.1
(Total)		(18.0)	(18.8)	(17.4)	(23.7)	(16.1)	(11.7)
3. Phosphatase products							
Dimethyl phosphorothioate	0.41	11.0	9.0	13.5	12.1	12.0	10.2
Dimethyl phosphorodithioate	0.57	13.8	7.1	11.1	10.2	7.4	4.4
(Total)		(24.8)	(16.1)	(24.6)	(22.3)	(19.4)	(14.6)
4. Unknown	0.82	13.8	13.0	15.0	15.1	12.6	16.1
5. Malathion, Malaaxon	1.00	38.5	45.9	35.9	38.7	46.5	51.6

\* Malathion (0.05%) \*\* Malathion (0.05%) + K-1 (0.05%)

Table 7. *In vivo* metabolism of  $^{32}\text{P}$ -malathion and its inhibition by synergist, K-1, at 24 hrs. after treatment in three strains of citrus red mite.

Metabolites	Rf	Radioactivities (%)					
		R		SK		PS	
		*Mala-thion	**Mala-thion + K-1	*Mala-thion	**Mala-thion + K-1	*Mala-thion	**Mala-thion + K-1
1. Phosphoric acid	0.00						
Dimethyl phosphoric acid	0.06	26.7	30.2	16.9	31.1	20.7	35.1
2. Carboxyesterase products							
Di-carboxylic acid	0.11	15.1	7.0	21.4	9.0	18.6	10.0
Mono-carboxylic acid	0.22	24.7	11.2	21.8	11.1	4.3	10.3
(Total)		(39.8)	(18.2)	(43.2)	(20.1)	(22.9)	(20.3)
3. Phosphatase products							
Dimethyl phosphorothioate	0.41	12.3	19.1	21.4	12.1	21.4	10.0
Dimethyl phosphorodithioate	0.57	4.8	3.7	2.0	6.2	11.4	7.0
(Total)		(17.1)	(22.8)	(23.4)	(18.3)	(32.8)	(17.0)
4. Unknown	0.82	8.2	10.7	4.8	12.5	11.4	10.9
5. Malathion, Malaaxon	1.00	8.2	18.1	11.7	19.0	12.1	21.8

\*Malathion (0.05%) \*\*Malathion (0.05%) + K-1 (0.05%)

K-1の作用に関する実験結果は、第6、7表に示す通りである。実験は3反復行ない、結果はその平均値で示してある。

*In vitro* 実験; 分解物、未分解物の割合を比較するために chloroform で抽出した結果および同様にして行なった K-1の代謝阻害の結果は第8表に示す通りである。値は回収された全放射能を100としたときのパーセンテージで示してある。実験は2反復行ない、値はその平均値で表わしてある。代謝物同定のため、

Table 8. *In vitro* inhibition of  $^{32}\text{P}$ -malathion degradation by synergist (K-1) in the homogenates of citrus red mite.

Strain	Degradation (%)		
	Control	K-1 ( $5 \times 10^{-4}\text{M}$ )	K-1 ( $10^{-3}\text{M}$ )
R	42.4	37.9	18.3
SK	32.5	30.7	12.1
PS	21.7	10.1	0.0

Table 9. *In vitro* metabolism of <sup>32</sup>P-malathion and its inhibition by synergist, K-1, in three strains of citrus red mite.

Metabolites	Rf	Radioactivities (%)					
		R		SK		PS	
		*Mala-thion	**Mala-thion + K-1	*Mala-thion	**Mala-thion + K-1	*Mala-thion	**Mala-thion + K-1
1. Phosphoric acid	0.00						
Dimethyl phosphoric acid	0.06	9.6	4.6	9.4	8.5	3.8	7.9
2. Carboxyesterase products							
Di-carboxylic acid	0.11	6.9	4.6	7.9	5.1	4.4	4.1
Mono-carboxylic acid	0.22	9.0	6.8	8.2	4.2	7.4	3.1
(Total)		(15.9)	(11.4)	(16.1)	(9.3)	(11.8)	(7.2)
3. Phosphatase products							
Dimethyl phosphorothioate	0.41	3.9	3.5	2.5	3.1	6.3	3.9
Dimethyl phosphorodithioate	0.57	8.9	10.2	9.7	11.5	8.3	9.3
(Total)		(12.8)	(13.7)	(13.2)	(14.6)	(14.6)	(13.2)
4. Unknown	0.82	17.3	16.3	16.1	16.5	13.0	8.1
5. Malathion, Malaoxon	1.00	44.3	53.9	45.2	51.1	56.7	63.7

\*Malathion (1.5×10<sup>-3</sup>M), \*\*Malathion (1.5×10<sup>-3</sup>M) + K-1 (2.0×10<sup>-3</sup>M)

ーパークロマトグラフで分離測定した結果は第9表に示した。

考 察

1. Malathion, malaoxon の cholinesterase 阻害におよぼす共力剤の影響

前がきにも述べたように、有機リン剤抵抗性とChEの活性度には必ずしも相関関係はないようであるが、本実験の結果からは Fig.1 および Fig.2 に示したように、R<SK<PSの順に活性は低く、抵抗性のものは感受性のものよりChEの活性度が低いことが認められ Smissaert (1964)<sup>21</sup>の報告と一致した。またこの実験を通じて、malathion, malaoxon に対する感受性は抵抗性のもので低くミカンハダニにおいてはこのことが有機リン剤抵抗性の一要因になっているものと考えられる。しかし、Fig.3 および Fig.4 に示したように最も抵抗性の強いR系統は抵抗性であるSK系統より必ずしもmalathion, malaoxon に対してより低感受性ではなく、*in vivo*における薬剤感受性の程度とChEの有機リン剤感受性の程度には平行関係は認められなかった。

*In vitro*におけるmalathion, malaoxon および共力剤であるK-1のChE阻害を実験した第2表の結果からは、これらの両者の間には阻害度は混合することにより、附加的効果が認められる。

Eto *et al.* (1963)<sup>22</sup>は、昆虫においてSCPEのうちalkyl誘導体は強いChE阻害剤であるがaryl誘導体は*in vivo*におけるChE阻害力は弱いと述べている。

しかしながらハダニをもちいた本実験ではaryl誘導体であるK-1に高いChE阻害能が得られた。このことはミカンハダニに特有な現象であるのか、あるいは磨砕により酵素と阻害剤を*in vitro*と同じ状態にする人為的要因によるものではないとも考えられる(O'Brien; 1960)<sup>23</sup>。

2. Malathion, malaoxon による ali-esterase 阻害におよぼす共力剤の影響

Matsumura and Voss (1964)<sup>22</sup>は、有機リン剤抵抗性ナミハダニでは感受性に比較してα-naphtyl acetate, β-naphtyl acetate そしてβ-naphtyl butyrateの加水分解能は低く、β-naphtyl benzoate, nitrophenyl acetate 分解能は高かったと報告している。Smissaert (1965)<sup>27</sup>は、有機リン剤抵抗性ナミハダニのα-naphtyl acetate 分解能は感受性より低かったと述べている。本実験に供試したミカンハダニにおいては、第4表に示したように抵抗性のSK, R系統のβ-naphtyl acetate 分解能は感受性のPSより高い結果が得られた。しかしながら薬剤感受性の程度とは必ずしも平行関係にはなかった。

前がきにのべたように、malathionの共力剤はAli-E阻害能が高いことがわかっており(Oppenoorth and Asperen: 1961<sup>19</sup>, Matsumura and Hogendijk: 1964<sup>18</sup>, Plapp *et al.*: 1963<sup>10</sup>)。またEto *et al.* (1963)<sup>22</sup>はSCPEのaryl誘導体は昆虫における特異的Ali-E阻害剤であると報告している。第5表の結果から明らかなように、malathionと共力作用を示したK-1はβ-naphtyl acetate 分解酵素阻害力が3系

統においてともに高かった。Malathion 解毒分解酵素が  $\beta$ -naphthyl acetate 分解酵素であるということが明らかでなく (Ohkawa *et al.*: 1968<sup>21</sup>), また第5表に示すように malaaxon によっても阻害され, また Ohkawa *et al.* (1968)<sup>21</sup> の昆虫における実験結果を考慮すれば  $\beta$ -naphthyl acetate 分解酵素は malathion や malaaxon の分解酵素であると必ずしもいえないが, すくなくとも K-1 は malathion や malaaxon が生体内で Ali-E により分解される割合を減少させる作用はしていると思われる。そして, 共力剤である K-1 が抵抗性系統だけでなく感受性系統に対しても malathion に共力作用が認められた (高橋ら; 1972<sup>20</sup>) のは, K-1 の Ali-E ( $\beta$ -naphthyl acetate 分解酵素) 阻害が抵抗性系統に特異的なものでないことから裏づけられる。

### 3. Malathion 代謝におよぼす共力剤の影響

Matsumura and Brown (1961)<sup>20</sup> は, イエカにおいて malathion 抵抗性系統と感受性系統の薬剤代謝に関する主な違いは, *in vivo*, *in vitro* ともに carboxyesterase の活性であり, 抵抗性において carboxyesterase による代謝物が多かったと述べている。その後, 彼ら (1963)<sup>21</sup> は malathion 抵抗性のイエカの carboxyesterase について更に詳しい実験を行なっている。また, Bigley and Plapp (1962)<sup>21</sup> はイエカの malathion, malaaxon の代謝について研究し, 抵抗性のもものでは感受性より *in vivo*, *in vitro* ともに malathion の代謝能が2~11倍高く, *in vitro* の実験から抵抗性の幼虫のホモジネートは, carboxyesterase の代謝物が phosphatase のそれに比較し11倍であったのに対し感受性ではそれが2倍であったと報告している。Matsumura and Voss (1964)<sup>22</sup> は, malathion 抵抗性のナミハダニは感受性系統より malathion 代謝能が高く, *in vitro* の実験では抵抗性のもは全代謝物の約80%が carboxyesterase による代謝物であったと報告している。

本実験の *in vitro*, *in vivo* の結果からも, malathion 代謝能は抵抗性で感受性より高い値が得られた。全代謝物に対する carboxyesterase 代謝物である mono-carboxylic acid と di-carboxylic acid の割合が多かったが, それらは Matsumura and Voss (1964)<sup>22</sup> の報告ほどの大きな差異ではなかった。

Phosphatase による代謝物もかなりの量認められたが, *in vivo*, *in vitro* の実験を通じて抵抗性, 感受性系統間に一定の関係が認められず, これらの結果からは phosphatase が抵抗性に関与しているとは思えない。

Ohkawa *et al.* (1968)<sup>21</sup> は SCPE の phenyl 誘導体である K-2, 2-phenoxy-4H-1, 3, 2-benzodioxaphos-

phorin-2-oxide, はイエバエ, ツマグロヨコバイ (*Nephotettix bipunctatus cincticeps* Uhler) において, malathion の解毒分解酵素である carboxyesterase の特異的阻害剤であると報告している。ミカンハダニに対しては第6, 7表の結果より, K-1 を malathion と同時処理すると3時間後では顕著ではないが24時間後には3系統とも全代謝物に対する carboxyesterase の代謝物の割合が malathion 単用に比して少なくなり, K-1 の carboxyesterase 阻害が認められた。しかし, K-2 は前報<sup>20</sup>で報告したように感受性系統には共力作用があったが抵抗性系統では共力作用が認められず, Ohkawa *et al.* (1968)<sup>21</sup> の結果と異なった。

第8表で, 各系統ともに同じ条件下で行なった第9表の結果より全代謝物の割合が低いのは malathion の自家分解を差し引いたためである。

第8表から, 共力剤の K-1 による malathion 代謝の阻害が認められる。特に感受性系統では,  $10^{-3}$ M の K-1 で代謝は完全に阻害され代謝物は認められなかった。このことは, malathion と K-1 の共力効果が感受性系統においても認められた (高橋ら; 1972<sup>20</sup>) ことを裏づけるものと思われる。

抵抗性の機作を追求していくうちに, 感受性系統とに1つの差が明らかになっても抵抗性の機作が1つとは考えられないことから, 果してその差が実際の死亡率の差としてどの程度現われるかを数量的に表現することは難しく, 同様のことが共力作用の機作を考察する上で問題となった。

### 引用文献

- 1) Metcalf, R.L.: *Ann. Rev. Entomol.*, 12, 229 (1967).
- 2) Hewlett, P.S.: *Chemistry and Industry* No. 22, 701 (1968).
- 3) Eto, M., K. Hanada, Y. Namazu and Y. Oshima: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 723 (1963).
- 4) Eto, M., Y. Oshima, S. Kitakata, F. Tanaka and K. Kojima: *Botyu-Kagaku* 31, 33 (1965).
- 5) Ohkawa, H., M. Eto, Y. Oshima, B. Tanaka and Y. Umeda: *Botyu-Kagaku* 33, 139 (1968).
- 6) Asperen, K. Van and F.J. Oppenoorth: *Ent. Exp. Appl.*, 2, 48 (1959).
- 7) Bigley, W.S. and F.W. Plapp, Jr.: *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 53, 360 (1960).
- 8) Smissaert, H.R.: *Science* 143, 129 (1964).
- 9) Voss, G. and F. Matsumura: *Nature* 202, 319 (1964).
- 10) 山本慎二郎, 西田 昶: 高峰研究所年報 13, 237



- (1961).
- 11) Lee, R.M. and P. Batham: *Ent. Exp. Appl.*, 9, 13 (1966).
  - 12) Oppenoorth, F.J.: *Bull. Wild Hlth Org.*, 44, 195 (1971).
  - 13) Oppenoorth, F.J. and F. Van Asperen: *Science* 132, 298 (1960).
  - 14) Asperen, K. Van and F.J. Oppenoorth: *Ent. Exp. Appl.*, 3, 68 (1960).
  - 15) Oppenoorth, F.J. and K. Van Asperen: *Ent. Exp. Appl.*, 4, 311 (1961).
  - 16) Asperen, K. Van: *Ent. Exp. Appl.*, 7, 205 (1964).
  - 17) Asperen, K. Van, M. Van Maziik and F.J. Oppenoorth: *Ent. Exp. Appl.*, 8, 163 (1965).
  - 18) Matsumura, F. and C. J. Hogendijk: *Ent. Exp. Appl.*, 7, 179 (1964).
  - 19) Plapp, F.W., W. S. Bigley, G. A. Chapman and G. W. Eddy: *J. Econ. Entomol.*, 56, 643 (1963).
  - 20) Matsumura, F. and A. W. A. Brown: *J. Econ. Entomol.*, 54, 1176 (1961).
  - 21) Bigley, W.S. and F. W. Plapp, Jr.: *J. Insect Physiol.*, 8, 545 (1962).
  - 22) Matsumura, F. and G. Voss: *J. Econ. Entomol.*, 57, 911 (1964).
  - 23) Voss, G. and F. Matsumura: *Nature* 202, 319 (1964).
  - 24) Hestrin, S.: *J. Biol. Chem.*, 180, 249 (1949).
  - 25) Motoyama, N. and T. Saito: *Botyu-Kagaku* 33, 77 (1968).
  - 26) Asperen, K. Van: *J. Insect Physiol.*, 8, 401 (1962).
  - 27) Smitsaert, H.R.: *Nature* 205, 158 (1965).
  - 28) 弥富喜三, 斎藤哲夫: 「果樹ハダニ類の薬剤抵抗性に関する試験成績」日本植物防疫協会発行 (1965).
  - 29) O'Brien, R. D.: *Toxic Phosphorus esters* 434pp. Academic press, New York, N. Y.
  - 30) 高橋洋治, 斎藤哲夫, 弥富喜三, 江藤守総: *防虫科学*, 37, 13 (1972).
  - 31) Matsumura, F. and A. W. A. Brown: *J. Econ. Entomol.*, 56, 381 (1963).

### Summary

1. Mechanism of synergistic action of K-1 (2-phenyl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide) with malathion was examined in organophosphate-resistant and -susceptible strains of citrus red mite.

2. The cholinesterase activity of susceptible strain (PS) was higher than that of resistant strains (SK and R), and the susceptibilities of cholinesterase in SK and K strains were lower than those of PS strain against malaoxon and malathion. It is suggested that organophosphate resistance of citrus red mite is partly due to the decreased sensitivity of cholinesterase to organophosphates.

*In vivo* experiment, K-1 potentiated the cholinesterase inhibition of malathion. *In vitro* experiment, the inhibition of cholinesterase by K-1 was additive inhibition of malathion and malaoxon.

3. *In vitro* experiment, the activities of  $\beta$ -naphthyl acetate hydrolyzing enzymes of resistant strains were higher than those of susceptible strain. But there was no relationship between the susceptibilities to organophosphates and the activities of  $\beta$ -naphthyl acetate hydrolyzing enzymes.

4. *In vivo* and *in vitro* experiments, the breakdown activities of  $^{32}\text{P}$ -malathion in organophosphate-resistant and -susceptible strains revealed that the resistant strains (SK and R) were superior in the ability to detoxify malathion as compared with that of the susceptible strain (PS). In the case of malathion breakdown, the difference in the amount of carboxyesterase products was found among strains.

The amounts of carboxyesterase products were decreased by K-1 treatment in both resistant and susceptible strains. It was supposed that K-1 inhibit the carboxyesterase, one of the breakdown enzymes of malathion.