

strain of housefly, was studied. The supernatant from the housefly homogenates degraded diazinon efficiently in the presence of reduced glutathione. There was no significant difference between the rates of diazinon degradation by the supernatant of Hokota and NAIDM strain. The main degradation products were identified as diethyl phosphorothioic acid and S-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione. The optimum pH for diazinon degradation was situated approximately at 8.5. Diazinon degradation by glutathione-S-transferase in the supernatant seems not to play an important role in the resistance mechanism of diazinon-resistant Hokota strain.

phorothioic acid and S-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione. The optimum pH for diazinon degradation was situated approximately at 8.5. Diazinon degradation by glutathione-S-transferase in the supernatant seems not to play an important role in the resistance mechanism of diazinon-resistant Hokota strain.

Studies on the Mechanism of Resistance in Diazinon Resistant Hokota Strain of Houseflies.

IV. Diazinon Metabolism by Mixed-Function Oxidase. Toshio SHONO (Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, University of Tokyo) Received April 1, 1974. *Botyukagaku*, 39, 80, 1974. (with English Summary 84)

16. 銚田産 diazinon 抵抗性イエバエの抵抗性の機構に関する研究 IV. Mixed-function oxidase による diazinon の代謝 正野俊夫 (東京大学農学部害虫学研究室) 49. 4. 1 受理

¹⁴C で標識した diazinon と diazoxon の microsome による代謝を、diazinon 抵抗性の銚田系と感受性の NAIDM 系のイエバエで調べた。Diazinon は、NADPH の存在下に、microsome の mixed-function oxidase によって diazoxon と diethyl phosphorothioic acid に代謝された。一方、diazoxon は mixed-function oxidase により構造未確認の ether 可溶性の物質に代謝された。Diazinon, diazoxon を代謝する microsome の mixed-function oxidase の活性は、銚田系の方が NAIDM 系より約3倍強く、また、mixed-function oxidase の阻害剤である sesamex が、銚田系のイエバエで、diazinon に共力作用を示すことから、mixed-function oxidase が、銚田系の diazinon 抵抗性の機構として大きな役割を果たしていることが明らかになった。

Diazinon [O, O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphorothioate] 抵抗性の銚田系イエバエについて、その抵抗性の機構を調べたところ、銚田系のイエバエでは、皮膚の diazinon 透過性が低下し、また、体内における diazoxon [O, O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphate] の蓄積量が少ないことが明らかにされた(正野, 1974a)¹⁾。更に、銚田系のイエバエでは、diazoxon を分解する phosphatase の活性が高く、これが抵抗性の機構として大きな役割を果たしていることも明らかにされた(正野, 1974b)²⁾。

本実験では、microsome に存在する mixed-function oxidase (以下 mfo) による diazinon, diazoxon の代謝を、抵抗性の銚田系と感受性の銚田系の間で比べ、mfo の diazinon 抵抗性機構において果たす役割について検討した。

材料および方法

イエバエ Diazinon 抵抗性の銚田系と感受性の NAIDM 系イエバエを用い、羽化後4~5日の成虫を実験に供した。

供試薬剤 Ethyl-1-¹⁴C-diazinon, ethyl-1-¹⁴C-diazoxon: 住友原子力工業株式会社より購入した。入手

時の比放射能活性は、それぞれ0.600 mCi/mM, 0.645 mCi/mM であった。Sesamex [2-(3,4-methylenedioxyphenyl)-3,6,9-trioxadecane]: 工業用原体を中外製薬株式会社より譲り受けた。

酵素液 Tsukamoto and Casida (1967)³⁾ によれば、イエバエの頭胸部には mfo の inhibitor が存在するので、実験には腹部のみを用いた。羽化4日後のイエバエ成虫の腹部を切り取り、その2gを10mlの0.25M ショ糖、0.01 M EDTA を含むリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.05 M) で、homogenizer を用いて磨砕した。磨砕液をガーゼでろ過した後、10,000gで10分遠沈して、mitochondria を取り除き、その上清を104,000gで1時間遠沈した。得られた沈殿を1.5%の bovin serum albmine fraction V (Armour Pharmaceutical Co.製) を含むリン酸緩衝液 (pH 7.5, 0.05M) に懸濁させ、microsome 分画を得、これを酵素液とした。

酵素活性の測定 50 μg の ¹⁴C-diazinon または ¹⁴C-diazoxone を 0.1 ml の n-hexane に溶かし、15 ml の三角フラスコに入れ、hexane を蒸発させた後、1 ml の酵素液と、1mM の NADPH を加え、27°C で、フラスコを振とうしながら2時間 incubate した。反応時間終了後、反応液に3 ml の蒸留水を加え、蒸留し

た ether 各 5 ml を用い 3 回抽出した。水分画, ether 分画の一部を取り, それぞれ放射能活性を測定した。Ether 分画は, 2 g の無水硫酸ナトリウムを加え, deepfreezer (-15°C) 中に 1 夜放置して, 脱水した。脱水した ether 分画は, 窒素気流中で, ether を蒸発させ, 残渣に, 少量の *n*-hexane を加えて, TLC の試料とした。

代謝物の分離, 同定 TLC: 厚さ 0.25mm の silica gel G (Merck 社製) [薄層を 110°C で 1 時間活性化し, acetone, *n*-hexane (2:3) で展開した。Radioautography: 展開した薄層プレートに, X 線 film (富士写真フィルム株式会社製, 医療用) を重ね, 暗所に約 1 週間放置後, 現像し, 薄層上の ¹⁴C の位置を確かめた。放射能の存在が確認された位置の薄層をかき取り, その放射能活性を測定した。イオン交換 column chromatography: 水溶性の代謝物は, Plapp and Casida (1958)⁴⁾ の考案したイオン交換 column chromatography で同定した。100~200 メッシュの Dowex 1-X8 イオン交換樹脂 50 g を内径 1.5 cm のクロマト管に充てんし, 次の溶出液を用いて gradient 法により溶出した。

(I) pH 2 HCl 500ml/~pH 1 HCl 500ml

(II) pH 1 HCl 200ml/~1 N HCl 200ml

溶出液は 10ml/ずつ分画し, 各分画より 2ml を取り, 放射能活性を測定した。また, 標準物質の diethyl phosphorothioic acid (以下 DEPTA), diethyl phosphoric acid (以下 DEPA) を加えて cochromatography を行なった場合は, 各分画より 1ml を取り, 過塩素酸で壊機した後, Allen の方法でリンを比色定量した。

放射能活性の測定 水溶性分画は, 試料 0.5~2ml を測定用バイアルに入れ, dioxane 系シンチレーター (PPO 10g, DMPOPOP 0.25g, naphthalene 100g に dioxane を加えて 1l にする) を加えた。Ether 分画は測定用バイアルに試料 0.5~2ml を入れ, ether を蒸発させてから toluene 系シンチレーター (PPO 4g, DMPOPOP 0.1g を 1l の toluene に溶かす) 15ml を加えた。TLC の薄層からかき取った silica gel は測定用バイアルに入れ, 15ml の toluene 系シンチレーターを加えた。イオン交換 chromatography によって得られた試料は, 2ml を測定用バイアルに入れ, toluene-Triton 系シンチレーター (PPO 5g, DMPOPOP 0.3g, toluene 667 ml, Triton X-100 333ml) を加えた。放射能活性は液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した。

共力作用の測定 7 µg/lly の薬量で, sesamex の acetone 液を, 雌成虫の腹部腹側に処理し, 30 分後に所定濃度の diazinon の acetone 液を胸部背側に

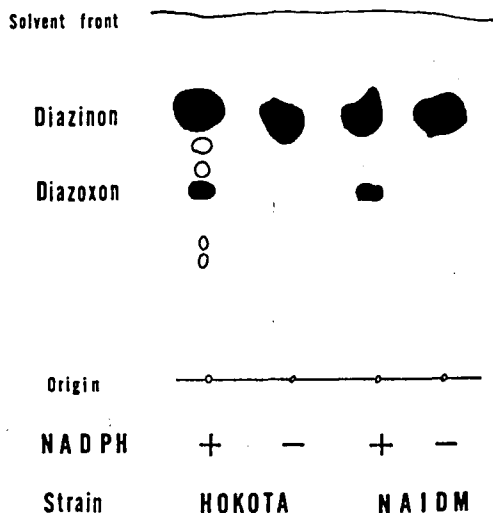


Fig. 1. Autoradiogram showing production of ether extractable metabolite of ethyl-¹⁴C-diazinon by microsomes from the abdomens of HOKOTA and NAIDM strain. The developer for TLC was *n*-hexane and acetone (3:2).

処理した。処理したイエバエは, 27°C に放置し, 24 時間後に死虫率を求めた。Sesamex の共力効果を判定するため, Sun and Johnson (1960a, b)^{5,6)} の方法によって Cototoxicity Coefficient を算出した。

結 果

Diazinon の代謝 NADPH を加えた時のみ, diazinon は microsome 分画によって代謝され, その ether 可溶性の主代謝物は diazoxon であった (第 1 図)。Diazoxon 以外にも 4 個の ether 可溶性の代謝物が存在するが, 微量のため放射能活性を測定することができず, またその化学構造を同定することもできなかった。Diazinon から diazoxon への代謝は NADPH を必要とするから, mfo の働きによるもの

Table 1. The effect of NADPH on the formation of metabolic products of ethyl-¹⁴C-diazinon by microsomes from the abdomens of HOKOTA and NAIDM strain.

| Metabolite | µg/20 abdomens/2 hr | | | |
|---|---------------------|--------|-------|--------|
| | HOKOTA | | NAIDM | |
| | None | NADPH* | None | NADPH* |
| (C ₂ H ₅ O) ₂ PSOH | 0.61 | 5.85 | 0.45 | 1.77 |
| Diazoxon | 0.24 | 1.80 | 0.16 | 0.57 |

* Final concentration of NADPH was 10⁻³M.

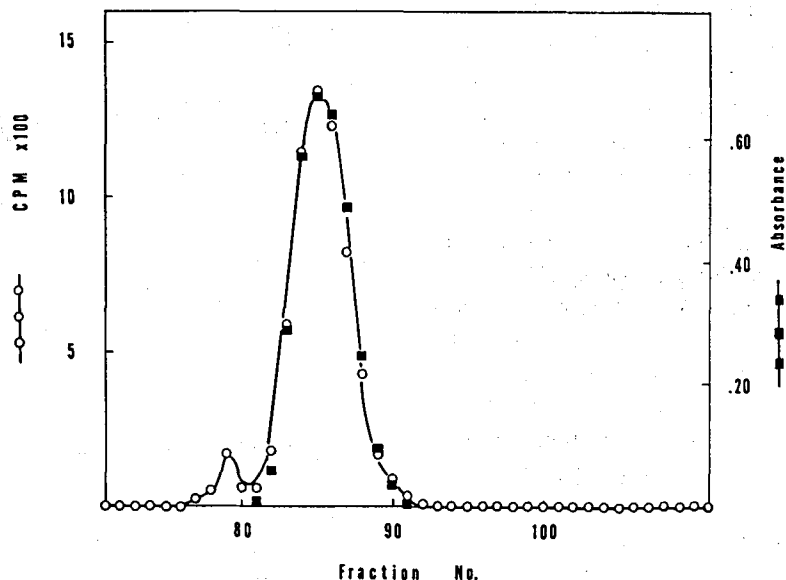


Fig. 2. Ion-exchange column chromatography of water soluble metabolites of ethyl-¹⁴C-diazinon by microsomes from the abdomens of HOKOTA strain in the presence of NADPH. To the solution to be chromatographed was added authentic diethyl phosphorothioic acid.

と考えられた。Diazinon の生成量は、銚田系では、NAIDM 系の約 3 倍を示し、mfo の活性が銚田系で NAIDM 系より強いことを示している (第 1 表)。

水溶性代謝物はイオン交換 chromatography によ

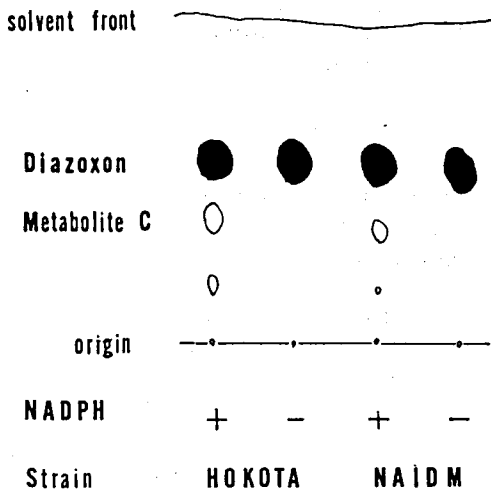


Fig. 3. Autoradiogram showing production of ether extractable metabolites of ethyl-¹⁴C-diazoxon by microsomes from the abdomens of HOKOTA and NAIDM strain. The developer for TLC was *n*-hexane and acetone (3 : 2).

り、DEPTA と同定された (第 2 図)。Diazinon の DEPTA への代謝は NADPH を加えると増大することから、この反応も mfo によって行なわれていることは明らかである (第 1 表)。Mfo による diazinon の DEPTA への分解量も銚田系では NAIDM 系より約 3 倍多かった。

Diazoxon の代謝 Diazoxon はイエバエの microsome 分画によって ether 可溶性の代謝物 metabolite C と、水溶性の代謝物に代謝される (第 3 図)。

第 2 表に示したように、ether 可溶性の metabolite C は、抵抗性の銚田系、感受性の NAIDM 系の両系統とも、NADPH の添加によって生成量が増加する。それゆえ、diazoxon の metabolite C への代謝は、mfo

Table 2. The effect of NADPH on the formation of metabolic products of ethyl-¹⁴C-diazoxon by microsomes from the abdomens of HOKOTA and NAIDM strain.

| Metabolite | μg/20 abdomens/2 hr | | | |
|---|---------------------|--------|-------|--------|
| | HOKOTA | | NAIDM | |
| | None | NADPH* | None | NADPH* |
| (C ₂ H ₅ O) ₂ POOH | 2.41 | 2.89 | 2.44 | 2.84 |
| Metabolite C | 0.22 | 4.13 | 0.12 | 0.63 |

* Final concentration of NADPH was 10⁻³M.

によるものと考えられた。Diazoxon を基質とした場合も、diazinon を基質とした場合と同様に、mfo は NAIDM 系より銻田系で強い活性を示した。Shishido *et al.* (1972)⁷⁾ は、ラットの肝臓 microsome に存在する mfo が、diazoxon を hydroxy diazoxon [*O*, *O*-diethyl *O*-[2-2'-hydroxy-2'-propyl]-4-methyl-6-pyrimidinyl] phosphate] に代謝することを示した。イエバエの microsome によって得られた diazoxon の代謝物 metabolite C が、その TLC の R_f から hydroxy diazoxon である可能性は大きい、同定するまでには至らなかった。Metabolite C の性質が不明なため、diazoxon の metabolite C への代謝が、抵抗性の機構として、どのような役割を果たしているか、検討できなかった。

水溶性の代謝物は、イオン交換 chromatography により、DEPA と同定された (第 4 図)。Microsome 分画によって、diazoxon は NADPH を加えなくてもかなり分解され、また、NADPH を加えても分解量はあまり増大しない (第 2 表)。これは、microsome 分画による diazoxon の DEPA への分解は、主として phosphatase により、mfo はあまり大きな役割を果たしていないことを示している。

Sesamex の共力作用 Sesamex は銻田系のイエバエでは、diazinon に共力効果を示し、diazinon の LD₅₀ を下に低下させた (第 3 表)。しかし、NAIDM 系に対しては、まったく共力効果を示さなかった。

Table 3. Synergistic effect of sesamex with diazinon applied topically to HOKOTA and NAIDM strain.

| Strain | Diazinon LD ₅₀ (μ g/female fly) | |
|--------|---|---------------|
| | Alone | With sesamex* |
| HOKOTA | 1.51 | 0.49 (3.08)** |
| NAIDM | 0.041 | 0.048(0.85)** |

* Sesamex was applied at the dose of 7 μ g/female fly 30 min before diazinon application.

** Cototoxicity coefficient.

考 察

イエバエの microsome に存在する mfo によって、diazinon は diazoxon と DEPTA に代謝され、diazinon 抵抗性の系統では、感受性の系統に比べて、mfo の活性が高い (Yang *et al.*, 1971⁸⁾; Lewis and Sawicki, 1971⁹⁾)。銻田系でも、diazinon を代謝する mfo の活性は、感受性の NAIDM 系より高いことが明らかにされた。しかし、抵抗性系統における mfo 活性の上昇は、diazinon の DEPTA への解毒を促進すると同時に、diazinon から、その約 1,000 倍の抗 cholinesterase 活性を持つ diazoxon への活性化も促進することを意味する。それゆえ、mfo 活性の上昇が、抵抗性のイエバエにとって、その生存に有利に働いているとは速断できない。Sesamex は、銻田系のイエバエにおいて、diazinon に共力作用を示し、

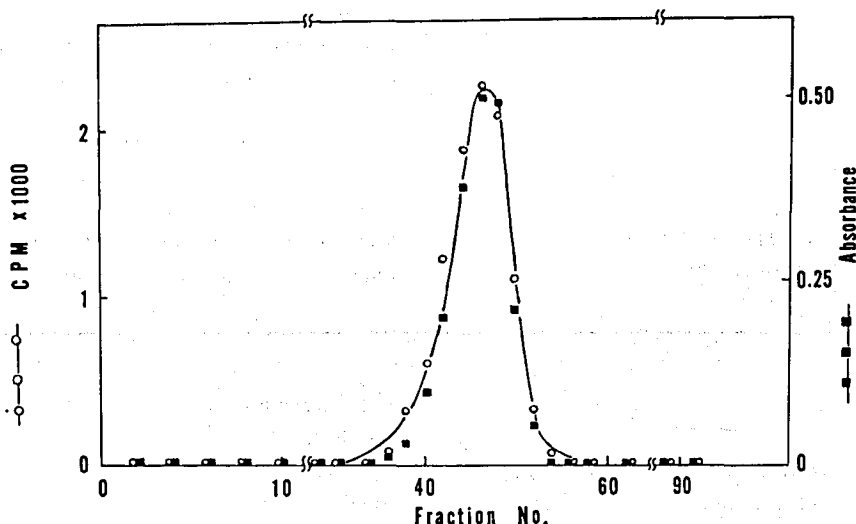


Fig. 4. Ion-exchange column chromatography for water soluble metabolites of ethyl-¹⁴C-diazoxon by microsomes from the abdomens of HOKOTA strain in the presence of NADPH. To the solution to be chromatographed was added authentic diethyl phosphoric acid.

その LD₅₀ を約半に低下させた。Sesamex などの methylendioxyphenyl 基を持つ pyrethroid の共力剤は mfo を阻害する (Casida, 1970)¹⁰。Sesamex によって mfo が阻害され、それによって銚田系の LD₅₀ が低下したことは、mfo 活性の上昇が銚田系イエバエの生存に有利に働いていたことを意味している。それゆえ、銚田系における mfo 活性の上昇は、diazinon 抵抗性の機構として重要な働きをしていることが結論された。

イエバエの diazinon 抵抗性の機構として、次の 4 つの要因が知られている。(1) 皮膚の diazinon 透過性の低下 (Krueger *et al.*, 1960¹¹); Forgash *et al.*, 1962)¹²。(2) Diazoxon を分解する phosphatase 活性の上昇 (Oppenoorth and Asperen, 1961)¹³。(3) Mfo 活性の上昇 (Yang *et al.*, 1971⁸); Lewis and Sawicki, 1971)⁹。(4) Diazinon を分解する glutathione-S-transferase 活性の上昇 (Lewis and Sawicki, 1971)⁹。これらの要因のうち、銚田系のイエバエでは、diazoxon を分解する phosphatase 活性の上昇 (正野, 1974b)² と mfo の活性の上昇が抵抗性の機構として重要な働きをしている。皮膚の diazinon 透過性の低下は、diazinon 抵抗性の機構としては補助的な役割を果たしているにすぎない (正野, 1974a)²。また、銚田系においては、glutathione-S-transferase による diazinon の分解は、抵抗性の機構としては大きな役割を果たしていない (正野, 1974c)¹⁴。

謝辞 本研究のご指導を賜った東京大学農学部山崎輝男名誉教授、同松本義明教授、ならびにご助言をいただいた理化学研究所深見順一博士、農業技術研究所穴戸孝博士に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 正野俊夫: 衛生動物, 24, 249 (1974a).
- 2) 正野俊夫: 防虫科学, 39, 54 (1974b).
- 3) Tsukamoto, M. and J.E. Casida: *J. econ. Entomol.*, 60, 617 (1967).

- 4) Plapp, F. W., Jr. and J.E. Casida: *Analyt. Chem.*, 30, 1622 (1958).
- 5) Sun, Y. and E. R. Johnson: *J. Agr. Food Chem.*, 8, 261 (1960a).
- 6) Sun, Y. and E. R. Johnson: *J. econ. Entomol.*, 53, 887 (1960b).
- 7) Shishido, T., K. Usui and J. Fukami: *Pesticide Biochem. Physiol.*, 2, 27 (1972).
- 8) Yang, R. S., E. Hodgson and W. C. Dauterman: *J. Agr. Food Chem.*, 19, 14 (1971).
- 9) Lewis, J. B. and R. M. Sawicki: *Pesticide Biochem. Physiol.*, 1, 275 (1971).
- 10) Casida, J. E.: *J. Agr. Food Chem.*, 18, 753 (1970).
- 11) Krueger, H. R., R. D. O'Brien and W. C. Dauterman: *J. econ. Entomol.*, 53, 25 (1960).
- 12) Forgash, A. J., B. J. Cook and R. C. Riley: *J. econ. Entomol.*, 55, 544 (1962).
- 13) Oppenoorth, F. J. and K. van Asperen: *Ent. exp. appl.*, 4, 311 (1961).
- 14) 正野俊夫: 防虫科学, 39, 75 (1974c).

Summary

The metabolism of ethyl-¹⁴C-diazinon and diazoxon was studied using microsomes from the abdomens of diazinon-resistant Hokota strain and -susceptible NAIDM strain of houseflies. Diazinon was metabolized to diazoxon and diethyl phosphorothioic acid, by the microsomal mixed-function oxidase which required NADPH. Resistant Hokota strain possessed higher activity for mixed-function oxidase.

Sesamex synergized diazinon against Hokota strain, but not against NAIDM strain. Synergistic effect of sesamex against Hokota strain suggests that the mixed-function oxidase is one of the important factors in the mechanism of resistance.

抄 録

実験室及び野外におけるワタアカミムシの誘引作用
Attraction of the Male Pink Bollworm Moth
under Laboratory and Field Conditions.

M. Jacobson and W. A. Jones. *Environmental Letters*, 6, 297 (1974).

最近, Hummel らは, われわれの先の報告を否定

して, propylure, deet は, ワタアカミムシの腹部末端抽出物に発見されず, バイオアッセイでも雄に活性を示さなかったと報告した。しかし, われわれは, Hummel らのいう性フェロモン ((Z, Z)-, (Z, E)-7,11-hexadecadien-1-ol acetate) は発見できず, propylure, deet を再確認した。この二つの混合物は野外試験で確かに誘引性を示している。

(高橋正三)