

Mechanism of Dicofol Resistance in Spider Mites. 1) Fate of Topically Applied ^3H -Dicofol in Citrus Red Mite, *Panonychus citri* McGregor. Katsuhiko TABATA and Tetsuo SAITO (Laboratory of Applied Entomology and Nematology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, Japan) Received August 27, (1971). *Botyu-Kagaku* 36, 169 (1971) (with English Summary 174).

22. ハダニの Dicofol 抵抗性の作用機構 1) ミカンハダニ雌成虫に塗布処理した ^3H -dicofol

の動向 田畑勝洋・斎藤哲夫 (名古屋大学農学部害虫学教室, 名古屋市千種区不老町) 46. 8. 27 受理

1) dicofol 抵抗性ハダニの作用機構をしらべるため, ^3H -dicofol を感受性の異なる各種ミカンハダニ雌成虫の系統に局所施用し, 一定時間毎の体表, 体内および排泄物中の放射能を測定し検討した。

2) いずれの系統においても処理32時間後で全塗布量の約40~50%が体表から体内へ浸透移行した。又, 浸透量においては系統間に明らかな差は認められなかった。

3) 体内の水抽出物量は dicofol に対して抵抗性を示す WRS において最も高かったが, 中間的感受性を示す MS では dicofol 感受性系統に比較して明らかな差は認められなかった。

4) 処理葉量に対する排泄物中の放射能はすべての系統において低い値を示したが, 水可溶物の dioxane 可溶物に対する割合は WRS および MS では処理8時間後をさかいとして, 時間の経過とともに次第に高くなった。

5) 以上のことから, dicofol 抵抗性ハダニは体内で dicofol を水溶性物質に変換する能力が感受性系統よりも大きく, 薬剤抵抗性の1つの要因となっていると考えられた。

はじめに

parathion 等の有機燐殺虫剤にハダニの薬剤抵抗性が認められて以来¹⁾, 数多くの殺ダニ剤に対してハダニの薬剤抵抗性の問題が重要になって来た。

我国においても schradan を始めとして²⁾, parathion, EPN について phenkapton, tetradifon に対するハダニの抵抗性の発達を見るにいたり³⁾, 果樹, 花卉等の園芸作物栽培上ハダニの薬剤抵抗性はきわめて大きな問題となって来た。

ハダニの薬剤抵抗性の本体を究明するには生態学的, 遺伝生化学的研究も⁴⁾ されながら薬剤の作用機構をしらべることが重要である。

昆虫の薬剤の作用機構の研究は数多い⁵⁻¹³⁾ が, ハダニ類に関しては少ない¹⁴⁻¹⁶⁾。しかもこれらの研究は主として有機燐殺虫剤に対する報告で, これ以外の殺ダニ剤特に dicofol (Kelthane) の作用機構に関してはいままではほとんど研究がなされていない。

Dicofol は1955年頃 Roam and Haas 社により FW-293 として開発され, シクラメン葉上に生息するハダニの防除に使用された殺ダニ剤であり¹⁷⁾, OH 基をもつ DDT の誘導物質の1つで, アルカリ条件下で 4,4'-dichlorobenzophenone と chloroform に分解する。この薬剤に関する分析^{18,19)} および triatoma infestans の幼虫における代謝研究²⁰⁾ はあるが, 他

の殺虫剤にくらべてその研究は少ない。Dicofol は広くハダニの防除に使用されているが数年前から我国においてもこれに抵抗性を示すハダニが各地で出現している²¹⁻²³⁾。

このようなことから本実験では dicofol に対するハダニの薬剤抵抗性の作用機構をしらべるため, 田畑・斎藤 (1970)²⁴⁾ の方法にもとづき, 各系統のミカンハダニ雌成虫に ^3H で標識した dicofol を塗布処理し, 表皮透過性および体外への排泄について調べた。

尚, 本実験にさいしてご指導たまわった名古屋大学農学部害虫学教室の弥富喜三教授およびミカンハダニの飼育等に多大のご助言を頂いた本多八郎文部技官に深謝すると共に, ^3H -dicofol を提供された三洋貿易株式会社および Roam and Haas 社に御礼申し上げる。

さらに供試ミカンハダニ各系統を頂いた佐賀県果樹試験場の関 道生氏ならびに和歌山県果樹園芸試験場の八田茂嘉氏に厚く感謝の意を表する。

材料および方法

1. a) 供試薬剤: ^3H -dicofol は phenyl ring の水素を ^3H で標識したもので比放射能は 3.82mCi/g, 放射能純度は TLC で約94%であった。

b) 供試ハダニ:

WRS: 和歌山県果樹園芸試験場の dicofol 連用試験区 (1965~1969) において年平均2回, dicofol によ

り淘汰された系統。

WSS：和歌山県果樹園芸試験場の連用試験区に対する無散布区の系統。

TRS：佐賀県果樹試験場より入手した系統で従来より tetradifon に対して抵抗性を示す系統。

MS：名古屋大学農学部実験圃場のミカン幼木に自然発生した系統。

以上の4系統を温室内のミカン苗木で累代飼育したミカンハダニ雌成虫である。

2. In vivo における代謝実験：田畑・齋藤（1970）

²¹⁰の方法にしたがい、ミカンハダニ雌成虫80頭をカバーガラス上に接種し、fulfryl alcohol にとかした³H-dicofol (0.02 μ g/2m μ l/1頭)をハダニ後体部背板に局所施用し、25°Cの恒温器に保存した。所定時間後、死虫数を実体顕微鏡でかぞえ、つぎの方法で、表皮残存量、体内浸透量および排泄物に分け放射活性を測定した。

表皮残存量は一定時間後、ハダニを径4.5cmのG-2ガラスフィルター上に移し0.5mlのn-hexaneで体表を洗滌し、さらにハダニを取り除いた後、ガラスフィルターを0.5mlのn-hexaneで再び洗い、さきの洗滌液と合わせて液体シンチレーションスペクトロメーター用ガラスバイアルにとりtoluene scintillator (toluene : 100ml, PPO : 0.4g, POPOP : 0.005g) 10mlを加えて測定した。

体内浸透量は、このハダニを10mlのスピッツグラスにとり少量の水を加え先端をまるくしたガラス棒でよく磨砕し、さらに水を加えて1mlとし、これに等量のchloroformを加えてよく振り、830 $\times$ gで3分間遠心した、この抽出操作を3回繰返した後、chloroform抽出物と水抽出物に分け、ガラスバイアルにとり、前者は溶媒を除去した後、10mlのtoluene scintillatorを、後者はそのままdioxane scintillator (dioxane : 100ml, PPO : 0.6g, POPOP : 0.027g, naphthalene : 11.2g) 10mlを加えて測定した。また、カバーガラスを約3mlの水で洗滌しこれをガラスバイアルにとり、1mlまで濃縮しdioxane scintillator 10mlを加えて測定し、これを排泄物中の水可溶物とした。さらにカバーガラスを10mlのdioxane scintillatorで洗滌し、洗滌液をガラスバイアルにとり測定し、排泄物中のdioxane可溶物とした。

以上これらの放射活性は液体シンチレーションスペクトロメーター (Aloka LSC-502) により測定した。実験すべて3回反復した。

結果および考察

本実験に供試したハダニ1頭あたりの薬量はWSS

の24時間後のLD-95の薬量²¹⁾に相当する。一般に代謝実験に供される薬量は亜致死量で行なわれることが多い。また、その場合、投与した薬量の放射能は正確な測定を行なうには少なくとも数千カウントあることが望ましい。今回の代謝実験においては³H-dicofolのハダニ1頭あたり(平均体重/0.02 μ g)の放射能は100d.p.m.で、80頭を供試したとき、数千カウントの放射能を得るにはこれ以下の低薬量では困難であり、やむを得ず高薬量で行なった。

第1表は各系統の処理時間毎の死亡率を示した。WSSは処理32時間後で98.0%、TRSでは75.1%、MSは23.4%の死亡率をそれぞれ示した。又WRSについては処理32時間後でも全く死虫を認めることが出来なかった。

このようなことからTRSはdicofolに対して感受性の高い系統、MSはWSS、TRSに比較し感受性の低い系統であるといえる。すでに報告した結果では²¹⁾WSSに対するWRSの感受性の差は約300倍である。

Table 1. Mortality of citrus red mite adult female applied topically with ³H-dicofol (0.02 μ g/2m μ l/mite) (25°C).

strain	mortality (%)			
	WSS	WRS	TRS	MS
time (hour)				
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0
8	10.0	0.0	16.2	14.7
16	55.9	0.0	61.0	16.7
32	98.0	0.0	75.1	23.4

Table 2. ³H-dicofol recovered from citrus red mite adult female applied topically with ³H-dicofol.

strain	recovery (%)			
	WSS	WRS	TRS	MS
time (hour)				
0	85.3	83.8	94.9	93.0
1	101.0	89.5	107.1	96.2
2	90.0	89.7	101.6	107.2
4	96.4	90.2	105.0	94.9
8	104.9	92.7	80.3	102.0
16	116.6	92.7	93.1	83.7
32	91.7	115.8	83.2	69.5

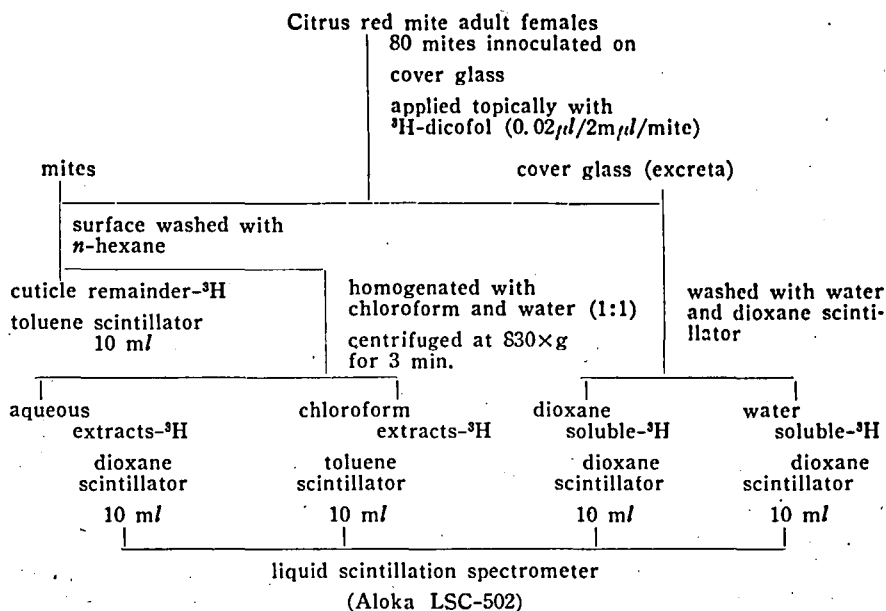


Figure 1. Isolation and determination of radioactive metabolites from citrus red mite adult females topically applied with ^3H -dicofol.

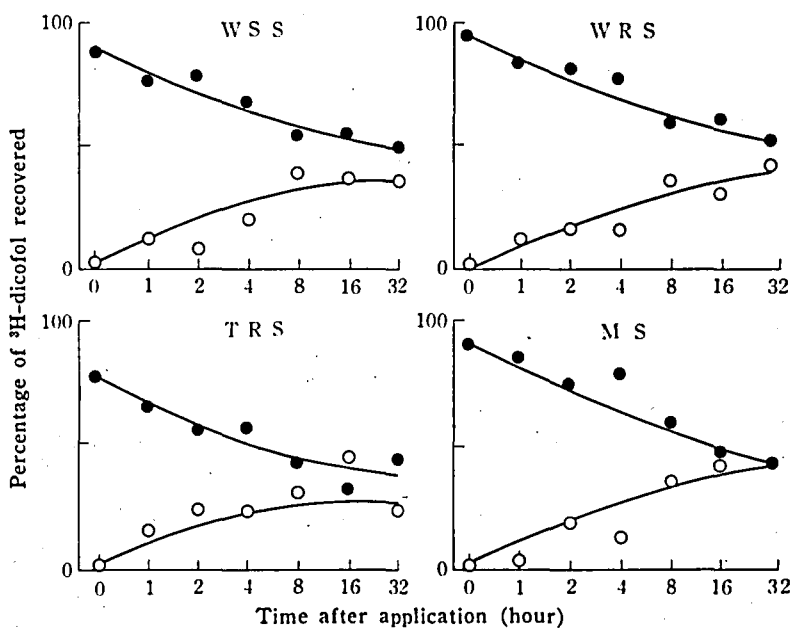


Figure 2. The change of radioactivity of cuticle remainder- ^3H and penetrated- ^3H of citrus red mite adult female treated topically with ^3H -dicofol.

- cuticle remainder- ^3H
○—○ penetrated- ^3H .

note: Percentage was represented as per cent of ^3H -dicofol recovered from citrus red mite adult female administrated ^3H -dicofol topically. Cuticle remainder- ^3H was shown as surface and penetrated- ^3H as body and excreta in this report.

代謝実験を行なう場合、投与した薬量がどの程度回収されるかどうか実験の再現性の問題として重要である。本実験における各処理時間毎の塗布量に対する3回反復実験の回収率は第2表に示す通りで、本実験ではハダニ磨砕後の残渣中に含まれる放射能は測定していないが、MSの処理32時間後の69.5%を除けば十分満足しうるものであった。

第2図は体表および体内の ^3H -dicofolの経時的変化を示したものである。このさい、体表は体表残存量を、体内浸透量は体内のchloroformと水の2分画および排泄物のdioxaneと水の2分画の合計をそれぞれ処理薬量でわった百分率として表わした。その結果いずれの系統においても処理32時間後で約40~50%が体表から体内へ浸透移行した。

薬剤抵抗性の諸要因の中で、接触毒性を有する殺虫剤において薬剤の皮膚透過性が薬剤感受性の重要な一因となり、このようなことから昆虫の皮膚の構造と物質の皮膚透過性の研究が行なわれている^{22,23,24,25,26}。しかし、今回の実験結果では抵抗性および感受性系統の間にはdicofolの皮膚透過性の差はほとんど認められなかった。薬剤の皮膚透過性が薬剤感受性の重要な役割をしないといえればつぎに、薬剤抵抗性の要因として薬剤の体内における代謝が考えられる。

第3図は体内 chloroform 抽出物および水抽出物の経時的变化を示したが各系統間の chloroform 抽出物量には著しい差は認められなかったが、体内水抽出物量については WRS は他の3系統に比較してかなり高い値を示した。

しかし第1表にも示した通り、dicofol に対して中間的な感受性を示す MS については皮膚透過性のみならず体内での代謝においても感受性系統とほとんど差がなかった。さらに後述するが、この系統の排泄物中の水可溶物の割合は処理32時間後では WSS, TRS にくらべて高かったが体内浸透量における全水抽出物量(体内の水抽出物量+排泄物中の水可溶物量)は WRS においては感受性系統のそれの3~4倍(体内浸透量の約20%)であったにもかかわらず MS でははっきりした差は認められなかった。

つぎに排泄物中の放射能はいずれの系統もかなり低く、特に MS では全塗布量の5%以下であった。加えて排泄物中の水可溶物量の dioxane 可溶物量に対する割合は WSS および TRS では低かったが WRS においては処理8時間後をさかいとして時間の経過とともに次第に高くなる傾向が認められた。このことはまた、MS においても同様であった。

以上のことから、薬剤感受性の程度と体内での薬剤

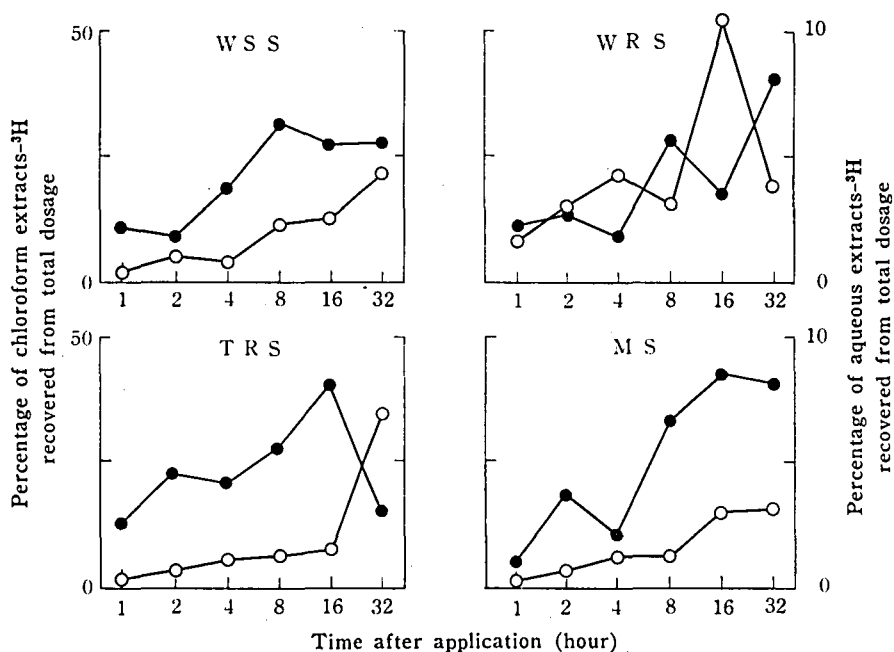


Figure 3. The change of radioactivity of chloroform and aqueous extracts- ^3H in the body of topically applied citrus red mite adult female.

●—● : chloroform extracts- ^3H
○—○ : aqueous extracts- ^3H

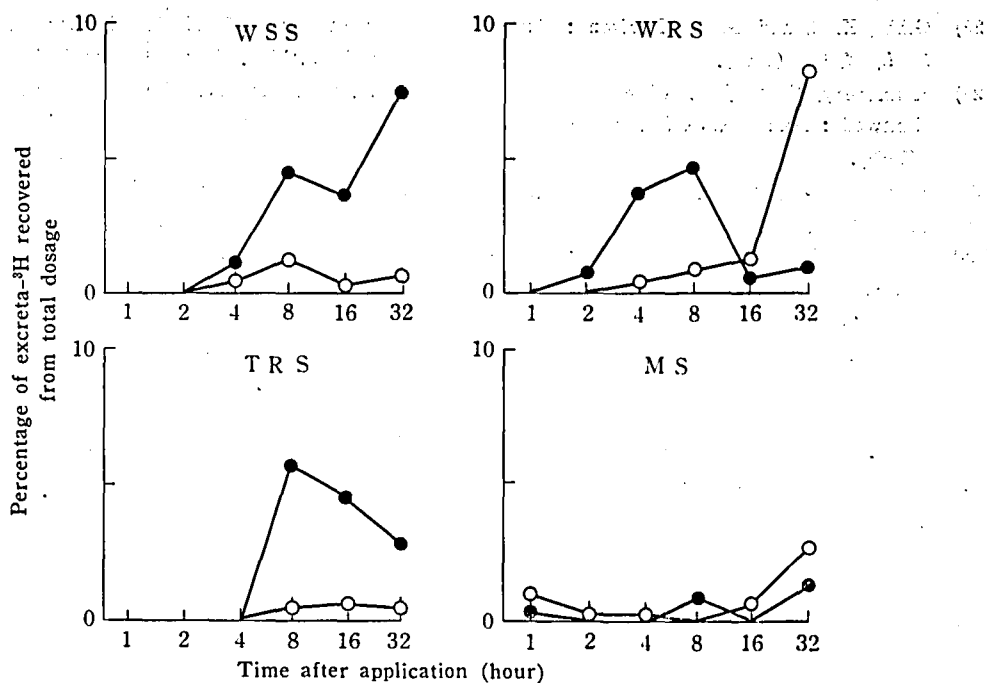


Figure 4. The change of radioactivity of dioxane soluble-³H and water soluble-³H in excreta of citrus red mite adult female treated topically with ³H-dicofol.

●—● : dioxane soluble-³H

○—○ : water soluble-³H

の代謝がどの程度関連性を有しているかについては今後の問題として残されるが、あたえた dicofol が dicofol 抵抗性ハダニ体内で水溶性物質に変化し、排泄する量は感受性系統より多いことが考えられ、薬剤抵抗性の1つの要因となっていると思われる。

文 献

- Garman, P.: *J. Econ. Entomol.*, 44, 372 (1950).
- Newcomer, C. R. and V. A. Morris: *J. Econ. Entomol.*, 33, 517 (1940).
- 関 道生: 植物防疫, 24, 203 (1970).
- 刑部 勝: 応動昆, 12, 18 (1968).
- 菅原寛夫: 植物防疫, 20, 66 (1966).
- Ballantyne, G. H. and R. A. Harrison: *Ent exp. appl.*, 10, 231 (1967).
- Franco, M. G. and F. G. Oppenoorth: *Ent. exp. appl.*, 5, 119 (1962).
- Bradbury, F. R. and H. Standen: *J. Sci. Food Agric.*, 6, 90 (1955).
- Butts, J. S., S. C. Chang, B. E. Christensen and C. H. Wang: *Science*, 117, 699 (1953).
- Menzel, R. E. and C. W. Dauterman: *J. Agr. Food Chem.*, 18, 1031 (1970).
- 齋藤哲夫: 名古屋大学農学部害虫学教室特別報告第1号, (1961).
- Sternburg, J., C. W. Kearns and W. N. Bruce: *J. Econ. Entomol.*, 43, 214 (1950).
- 塚本増久: 防虫科学 24, 141 (1959).
- Smissaert, H. R.: *Science*, 143, 129 (1964).
- Smissaert, H. R., Simon Voerman, Lies Ooatenbrugge, NelReooy: *J. Agr. Food Chem.*, 18, 66 (1970).
- Voss, G. and F. Matsumura: *Nature*, 202, 319 (1964).
- Jefferson, R. N. and F. S. Morishita: *J. Econ. Entomol.*, 49, 392 (1956).
- George, D. A., J. E. Fahey and K. C. Walker: *J. Agr. Food Chem.*, 9, 264 (1961).
- Gunter, Z. and S. A. People: *J. Agr. Food Chem.*, 11, 72 (1961).
- Agosin, M. A. M. and N. Scaramelle: *J. Econ. Entomol.*, 57, 974 (1964).
- 田畑勝洋, 齋藤哲夫: 応動昆, 14, 218 (1970).

- 22) Gibbs, K. E. and F. O. Morrison : *Can. J. Zool.*, 37, 633 (1959).
- 23) Hennebery, T. J., J. R. Adams and G. E. Cantwell : *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 58, 532 (1963).
- 24) 小泉清明 : 昆虫学実験法 (深谷, 石井, 山崎編), 日本植物防疫協会, 393 (1960).
- 25) Krueger, H. R. and R. D. O'Brien : *J. Econ. Entomol.*, 52, 1063 (1959).
- 26) Olson, W. P. : *Com. Biochem. Physiol.*, 35, 273 (1970).

Summary

1) The mechanism of dicofol resistance in citrus red mite, *Panonychus citri* McGregor was investigated. ^3H labeled dicofol was administrated topically ($0.02\mu\text{g}/2\text{m}\mu\text{l}/\text{mite}$) to dicofol resistant (WR), slight resistant (M) and susceptible (WS and TR) strains of citrus red mite female adults. Radioactivities on the cuticle, in the body and in the excreta were determined by a liquid scintillation spectrometer.

2) About 40 to 50% of dicofol was penetrated in the body within 32 hours after topical application in every strains. No significant difference in penetration between resistant and susceptible strains was found.

3) Radioactivity of the water soluble metabolites of dicofol in the body of WRS was higher than those in susceptible strains.

4) Radioactive-substances in excreta were small amounts in all strains. The ratio of the water soluble-materials to the dioxane soluble-materials in excreta of WRS and MS increased gradually from 8 hours after topical application, but those of WSS and TRS were small until 32 hours after topical application.

5) Basing on the facts described above, it is possible to conclude that dicofol resistant strains have higher ability than dicofol susceptible strains to metabolize dicofol to the water soluble materials, and that this ability is one of factors responsible for resistance to dicofol in citrus red mite.

Green Rice Leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler, Resistant to Carbamate Insecticides.
Toshikazu IWATA and Hiroshi HAMA (Division of Entomology, National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Kita-ku, Tokyo) Received September 6, 1971. *Botyu-Kagaku* 36, 174 (1971). (with English Summary 179).

23. カーバメート系殺虫剤抵抗性のツマグロヨコバイについて* 岩田俊一, 浜 弘司 (農林省農業技術研究所) 46. 9. 6. 受理

ツマグロヨコバイに対するカーバメート系殺虫剤の効果が最近低くなったといわれる地点 (佐賀および藤枝), および著しく低いといわれる地点 (中川原) で採集したツマグロヨコバイについて, 各種カーバメート系殺虫剤の効力を感受性系統と比較したところ, 採集系統ではすべて感受性系統より高い LD_{50} がえられた。なかでも中川原系統は他の2系統より抵抗性が高く, 各種カーバメート剤に対する抵抗性スペクトルも異なることがわかった。抵抗性3系統はマラソンおよびメチルパラチオンに対しても高い抵抗性を示し, なかでも中川原系統はその程度が著しく高く, また他の有機りん殺虫剤に対しても高い抵抗性を示した。NAC およびサンサイドに対するピペロニルブトキシイドの共力効果は感受性および中川原系統ともに顕著ではなく, かつ系統間の差も明らかでなかった。

有機りん殺虫剤抵抗性のツマグロヨコバイがカーバメート系殺虫剤に交差抵抗性を示さないために, マラソンその他の有機りん殺虫剤に抵抗性のツマグロヨコバイが出現した地域では, その後の防除薬剤はもっぱらカーバメート系殺虫剤によってかえられてきた。そしてすでに数年が経過しているが, 最近二, 三の場所

でカーバメート系殺虫剤による本種の防除効果がすぐれないという問題が起こっている。

ツマグロヨコバイにおいてはマラソンその他の有機りん殺虫剤抵抗性に関する研究はかなり多数報告されているが, カーバメート系殺虫剤抵抗性についてはまだ報告はない。のみならず海外ではイエバエその他でカーバメート系殺虫剤抵抗性に関する研究はかなり行なわれているのに, わが国ではこれに関する研究も非常に少ない現状である。筆者等はツマグロヨコバイに

* 本報の大部分は1971年度日本応用動物昆虫学会大会において講演した。