

in April of 1960 and reared successively without any insecticide exposure. It is considered that this population had no experience of contact with malathion in past.

Pure sample of malathion was used for the present experiment.

A half μ l of acetone of a given dosage of malathion was applied topically to the pronotum of female adult which anaesthetized by refrigeration using a micrometer driven syringe.

Experiment was carried out under the condition kept at 25°C. Mortality count was made at 24 hours after treatment.

The results are summarized as follows:

1) Female adults of the green rice leafhopper collected in Kōti in September 1961, showed more

resistance to malathion than those of Odawara strain, showing LD_{50} 's were 4.38 and 0.78 μ g/g respectively, namely Kōti strain was about 5.6 times resistant to malathion than Odawara strain.

2) A subcolony divided immediately after collecting from the original population of Kōti strain and reared without any insecticide pressure, showed gradual decrease of resistance to malathion, while another subcolony selected with LD_{50} of malathion kept the resistance to this compound consistently.

3) In the case of Odawara strain, the population selected with LD_{50} of malathion, showed the tendency of decreasing susceptibility to malathion, and in the 10th generation about 3.3 times tolerant to malathion than the original standard strain.

Mechanism of Resistance to Malathion in the Green Rice Leafhopper, *Nephotettix cincticeps*.
Ken'ichi KOJIMA, Tadayoshi ISHIZUKA and Setuo KITAKATA (Institute of Agricultural Chemicals, Tōa Noyaku Co. Ltd., Odawara, Kanagawa). Received Jan. 14, 1963. *Botyu-Kagaku*, 17, 28, 1963 (With English résumé, 24).

5. ツマグロヨコバイの malathion に対する抵抗性の機構* 小島健一・石塚忠克・北方節夫
(東亜農薬株式会社 農薬研究所) 38. 1. 14. 受理

高知産のツマグロヨコバイが malathion に対して抵抗性を有することは、すでに報告した。その機構を高知産の抵抗性系統と小田原産の非抵抗性系統とをもちいて検討した結果、cholinesterase の活性度やこの酵素の malaoxon に対する感受性とは関係なく、malathion を分解する carboxyesterase 活性の増加に由来するものと考えられた。また malathion 抵抗性ツマグロヨコバイに対して malathion と Dibrom の混合剤が顕著な synergism を示すと同時に、マウスに対して potentiation を示すことを認めた。

さきに著者ら²⁰⁾は高知産ツマグロヨコバイの malathion 抵抗性について報告したが、同時にその機構を追究し若干の知見をえたのでその結果を報告する。

本文に入るにさきだち、終始ご指導とご鞭撻を賜った農林省農業技術研究所深谷昌次博士、尾崎幸三郎博士、名古屋大学弥富喜三教授、東京農業大学山本亮教授に対し、また有益なご助言を賜ったイハラ農薬研究所長沢純夫博士にここに謹んで感謝の意を表する。なお実験に際し、材料の採集、その他に多大のご援助を賜った高知県農業試験場吉井孝雄、石本茂、松崎征美、当研究所椎野明雄、田中文一、山崎純一の各氏に厚くお礼申し上げる。

実験材料および方法

供試昆虫と飼育方法：この実験にもちいたツマグロヨコバイはさきに²⁰⁾その飼育方法と管理の方法とを併せてしるした小田原系統 A と高知系統 B の雌成虫である。

供試薬剤：溶出カラム・クロマトグラフ法で精製した malathion, malaoxon, paraoxon, DDVP, Dibrom をもちいた。

ツマグロヨコバイの生物検定法：ツマグロヨコバイ雌成虫の malathion と malaoxon に対する感受性は、さきに²⁰⁾しるした微量局所施用装置により検定した。また同じ装置をもちいて malathion と Dibrom の連合作用を実験し、その結果の解析は Horsfall¹⁵⁾ の方法にもとずいておこなった。

マウスに対する毒性試験：malathion と Dibrom の混合乳剤のマウスに対する急性経口毒性は、さきに²¹⁾

* 殺虫剤の解毒に関する研究、第11報。本報告の概要は昭和37年4月2日、日本応用動物昆虫学会昭和37年大会において発表した。

した方法と同じである。混合乳剤の調製に当っては、malathion と Dibrom の所要量に対して、重量比で乳化剤 Newkalgen-2006 30%, キシロール 20% をもちいた。

ツマグロヨコバイの酵素活性度測定法：各酵素の活性度はワールブルグ検圧計法をもちいて測定した。すなわち、検圧計の容器を通じてガス腔の空気を炭酸ガス 5% と窒素 95% の組成のガスと交換した。反応液は、37.5°C 恒温水槽に浸漬して約 10 分間振盪し、温度平衡に達せしめた後、基質を主室に添加し反応を開始した。反応液の pH は約 7.6 である。

この実験にもちいた重炭酸塩緩衝液の組成は塩化ナトリウム (NaCl) 0.150M, 塩化マグネシウム ($MgCl_2$) 0.040M および重炭酸ナトリウム ($NaHCO_3$) 0.025M である。酵素液はツマグロヨコバイ雌成虫を秤量乳鉢で上記の緩衝液を加えてよく磨砕し、所要量の緩衝液を加えた後磨砕液中の大型破片を除去するため遠心分離 (3000 r. p. m. 10 分間) して調製した。

1) Cholinesterase 活性度の測定：反応容器の側室に基質として acetylcholine bromide 0.06M 液の 0.5ml を入れ、主室に酵素液 (75mg/ml) 1.0ml と緩衝液 1.5ml を入れて測定した。基質は上記の緩衝液をもちいて調製した。基質の最終濃度は 0.01M である。

2) B-esterase 活性度の測定：反応容器の側室に基質として methyl-*n*-butyrate 0.06M 液の 0.5ml を入れ、主室に酵素液 (38mg/ml) 1.0ml と緩衝液 1.5ml を入れて測定した。基質は上記の緩衝液をもちいて調製した。基質の最終濃度は 0.01M である。

3) Carboxyesterase 活性度の測定：基質は malathion と malaoxon をもちいた。そして 2% Triton X-100 を含む上記の緩衝液で 0.6% 液を調製した。反

応容器の側室に基質 0.5ml (3mg) を入れ、主室に酵素液 (300mg/ml) 1.0ml と緩衝液 1.5ml を入れて測定した。基質の最終濃度は 1.0mg/ml である。

4) Phosphatase 活性度の測定：基質は paraoxon と DDVP をもちいた。基質液、酵素液の調製法、濃度および使用量は、carboxyesterase 活性度の測定法の場合と同じである。

以上の方法により各酵素の活性度の測定に当り、炭酸ガスの発生量は、cholinesterase と B-esterase の場合 30 分間、carboxyesterase と phosphatase の場合 60 分間、計測した値を表示した。

Carboxyesterase の阻害実験：小田原系統 A と高知系統 B の雌成虫の carboxyesterase の阻害剤に対する感受性は、前加温法により実験した。すなわち、反応容器の主室に阻害剤 0.1ml を入れ、気流を送って溶媒を蒸散せしめた後、酵素液 (300mg/ml) 1.0ml を入れ、さらに重炭酸塩緩衝液 1.5ml を添加した。そして側室に基質 0.5ml (malathion 3mg) を入れた。ガス交換した反応液は、上述の 37.5°C 恒温水槽に浸漬して約 30 分振盪し、阻害反応せしめた後、側室の基質を主室に添加し反応を開始した。炭酸ガスの発生量は 60 分間計測し、阻害率を計算した。阻害剤は malaoxon, paraoxon, DDVP, Dibrom をもちいアセトン溶液とした。

実験結果

小田原系統 A と高知系統 B の parent を材料にして、雌成虫の malathion および malaoxon に対する感受性、各酵素の活性度、cholinesterase と B-esterase の malaoxon に対する感受性をしらべた結果は第 1 表の通りである。

さらに両系統の carboxyesterase の malaoxon,

Table 1. Insecticide susceptibility and esterase activity of malathion susceptible and resistant strains in female adults of the green rice leafhoppers.¹⁾

		Susceptible	Resistant
Malathion susceptibility	LD ₅₀ (μ g/♀) Oct. 1961	0.003	0.021
Malaoxon susceptibility	LD ₅₀ (μ g/♀) Oct. 1961	0.009	0.012
Cholinesterase activity ²⁾	for acetylcholine bromide (0.01 M)	114	116
B-esterase activity ³⁾	for methyl- <i>n</i> -butyrate (0.01 M)	95	157
Cholinesterase sensitivity	I ₅₀ for malaoxon	5.6×10^{-7}	5.6×10^{-7}
B-esterase sensitivity	I ₅₀ for malaoxon	2.6×10^{-7}	1.9×10^{-7}
Carboxyesterase activity ⁴⁾	for malathion (1 mg/flask)	9	24
	for malaoxon (1 mg/flask)	0	0
Phosphatase activity ⁴⁾	for paraoxon (1 mg/flask)	0	0
	for DDVP (1 mg/flask)	17	16

1) Enzyme activity was assayed manometrically at pH 7.6 and 37.5°C., 2) μ l CO₂/75 mg/30 min.,

3) μ l CO₂/38 mg/30 min., 4) μ l. CO₂/300 mg/60 min.

Table 2. Susceptibility to some organophosphates of carboxyesterase of malathion susceptible and resistant strains of female adults of the green rice leafhoppers.

Inhibitor and amount ($\mu\text{g}/\text{flask}$)	Time of preincubation (min.)	Amount of malathion added as substrate (mg/flask)	Per cent inhibition in one hour	
			Susceptible	Resistant
Malaoxon 10	30	1	40	5
Paraoxon 10	30	1	100	100
DDVP 10	30	1	79	87
Dibrom 10	30	1	100	100

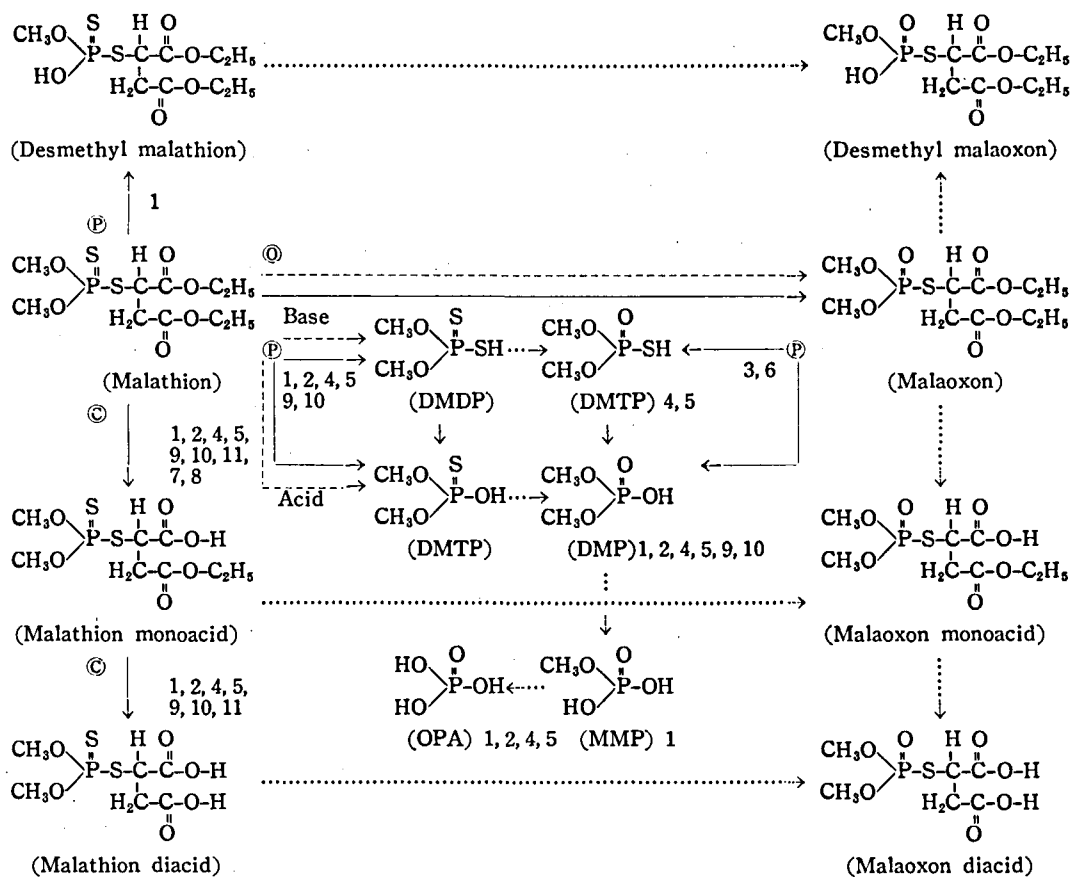


Fig. 1. Scheme for metabolic pathways and chemical conversions of malathion and its derivatives in mammals, insects and plants.

1. Cow, dog, rat, mouse.^{18,27,50)}
2. Malathion susceptible *M. d. domestica*.²⁷⁾
3. Malathion resistant *M. d. domestica*.^{31,42)}
4. Malathion susceptible *C. tarsalis*.^{10,32)}
5. Malathion resistant *C. tarsalis*.³²⁾
6. Malaoxon resistant *C. tarsalis*.³²⁾
7. Malathion susceptible *N. cincticeps*.^{22, this paper)}
8. Malathion resistant *N. cincticeps*.^{This paper)}
9. Malathion susceptible *P. americana*.²⁷⁾
10. Malathion susceptible *B. germanica*.²⁷⁾
11. Plants.¹⁹⁾

—→ identified and suggested paths

----→ chemical path^{34,36)}

.....→ possible path

©=carboxyesterases

(p) = phosphatases

①=oxidative enzymes

Table 3. Joint toxic action of malathion and Dibrom against female adults of malathion resistant strain of the green rice leafhoppers, applied topically in acetone.

Ratio of mixing	Malathion ¹⁾ (%)	100	80	60	50	40	20	0
	Dibrom ²⁾ (%)	0	20	40	50	60	80	100
Observed mortality		48	72	86	84	78	58	30
Expected mortality ³⁾		48	44	41	39	37	34	30
Potency ⁴⁾		1.00	1.64	2.10	2.15	2.11	1.71	1.00

1) $Y=4.6774+2.790(X-1.498)$ 2) $Y=4.7257+5.016(X-2.973)$ 3) Equation of the level of mortality is $Y=0.18X+30$, in which Y and X represent mortality and proportion of the combined insecticide respectively.

4) Divide observed mortality by expected mortality.

Table 4. Acute toxicity and potentiation of malathion, Dibrom and their mixtures against mice administrated orally as water emulsions. (E.C. is the abbreviation of emulsifiable concentrate.)

Insecticide	LD ₅₀ (mg/kg)		Ratio of expected LD ₅₀ to observed LD ₅₀
	Observed	Expected	
50% malathion E.C.	347	—	—
50% Dibrom E.C.	98	—	—
37.5% malathion plus 12.5% Dibrom mixtures E.C.	57	285	5.0
30% malathion plus 20% Dibrom mixtures E.C.	36	247	6.9
25% malathion plus 25% Dibrom mixtures E.C.	36	223	6.2

paraoxon, DDVP, Dibrom に対する感受性を実験した結果が第2表である。

第3表は、高知系統Bをもちいて、malathion 抵抗性ツマグロヨコバイ雌成虫に対する malathion と Dibrom の連合作用をしらべた結果である。また第4表はマウスに対する malathion と Dibrom の混合乳剤の毒性を経口投与によってしらべた結果である。

論 議

最近有機燐殺虫剤(以下単にOP殺虫剤とする)の使用の増加と共に、それらに対して抵抗性を有する昆虫の出現は、実際の防除面から重要視され、その抵抗性機構の究明が世界各地でおこなわれている^{6,7)}。

昆虫のOP殺虫剤に対する抵抗性因子としては、昆虫の忌避習性(行動的抵抗性)、昆虫の附節および神経球のリポイド含量、薬剤の表皮透過性、薬剤の体内における活性化あるいは安定性、薬剤あるいは活性化物質の分解解毒、cholinesterase 活性の変化と阻害様相、acetylcholine の蓄積、B-esterase 活性の変化と阻害

様相の諸要因が挙げられる。

イエバエの malathion 抵抗性の例において、その原因は抵抗性系統が感受性系統(以下それぞれ単に R, S 系統とする)よりも malathion に耐えうという生理的抵抗性のみならず、R 系統の昆虫が薬剤を避ける行動的抵抗性に由来するものが知られているが^{13,17,40)}、ツマグロヨコバイの malathion に対する行動的抵抗性については未検討である。それゆえ以下本文では生理的ないし生化学的な抵抗性因子だけをとりあげて論議をすすめることにする。

イエバエ *Musca domestica* の成虫、イエカの1種 *Culex tarsalis* の幼虫、ニカメイガ *Chilo suppressalis* の幼虫の OP 殺虫剤抵抗性の機構の研究において、つぎの諸因子は R 系統と S 系統との間にあまり差のないことが立証されている。すなわち、1) 薬剤の表皮透過性^{20,25,28,30,32,33,40,46)} 2) 昆虫体内における薬剤の活性化^{10,20,25,28,29,31,33,40,41)} 3) cholinesterase 活性度と阻害剤に対する感受性^{2,4,8,9,20,25,30,31,32,40,45,48)}。

Oppenoorth⁴⁰⁾, March³¹⁾ は、昆虫の OP 殺虫剤に

に対する抵抗性は昆虫の解毒機構に関係していて、作用点に有毒物質が薬効発現の臨界濃度に蓄積される速さに対し、その有毒物質が体内で分解解毒されて無毒物質に変化する速さとの関係によって定まることを指摘した。

イエバエ成虫において March³¹⁾ は malathion 抵抗性の Stauffer 系統が S 系統よりも生体外において malaoxon を速かに分解することを見出した。また Oppenoorth⁴²⁾ も malathion 抵抗性の Savannah (Bethesda-45) 系統で同様な結果をえた。そしてその分解は parathion や Diazinon R 系統が parathion や Diazinon を分解する phosphatase と同様な分解酵素に由来すると考えた^{3,43)}。そして増大した解毒力と malathion 抵抗性とは異常に低下した B-esterase 活性と関係し、これらの特質は S 系統との戻し交雑によっても遺伝的に分離しないことを証明した⁴²⁾。これは malathion 抵抗性の対立遺伝子が phosphatase 活性の増大と B-esterase 活性の低下に同時に関与するからであると考えた⁴³⁾。

一方、Matsumura and Brown³²⁾ はイエカの 1 種の幼虫の malathion 抵抗性の主要な要因が carboxy-esterase 活性の増大に由来することを明確にした。また同時に malaoxon の分解を触媒する phosphatase 活性の増大をみとめ、これが malaoxon に対する抵抗性の原因をなすものと考えた。そして交雑実験によって、carboxyesterase 活性の増大と malathion 抵抗性とは遺伝的に分離できず、malathion 抵抗性は 1 個の優性対立遺伝子が関与していると推察した。

ところで、ツマグロヨコバイ成虫の malathion に対する抵抗性機構は、結論的にはイエバエ成虫よりもイエカの 1 種の幼虫のそれに似ている。

今回の実験では、malathion の表皮透過性については検討しなかったが、これは S 系統と R 系統で余り変わらないものとする。Cholinesterase の活性度やその malaoxon に対する感受性は両系統で殆んど差異がなかった。また現段階では、malaoxon に対する感受性は両系統で余り変わらないが、生体内での malathion の malaoxon への酸化活性化の差異については明確でない。

すでに小島・石塚²²⁾ はツマグロヨコバイ雌成虫には OP 殺虫剤の分解酵素として carboxyesterase とある種の phosphatase とが存在することを指摘したが、この実験でこの虫の malathion 抵抗性は carboxy-esterase 活性の増加と密接な関係のあることを示した。すなわち、R 系統は S 系統よりも malathion を速やかに分解した。しかし両系統とも malaoxon を分解しなかった。この carboxyesterase と基質との特異性については、小島・石塚²²⁾ が電子論的説明を試み

た。

Phosphatase 活性については、DDVP の分解を触媒する酵素について測定できたが、その活性は両系統間で余り差異がなかった。そして paraoxon や malaoxon の分解酵素については、この実験にもちいた方法では両系統とも測定できなかった。

すでに触れたように、Asperen and Oppenoorth^{1,2,42)} らが発見した OP 殺虫剤抵抗性イエバエのもつ B-esterase 活性 (methyl-*n*-butyrate 加水分解活性) の低下現象は、Bigley and Plapp⁴⁵⁾ によってイエバエで確認されたが、この酵素の paraoxon や malaoxon などの阻害剤に対する感受性は S 系統と R 系統とで余り違わない⁴⁵⁾。ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* においては、B-esterase の活性が DDT, BHC, parathion に対して交叉抵抗性をもたらす第Ⅰ染色体上の遺伝子とは関係なく、その活性は第Ⅲ染色体上に存在する遺伝因子と関係する³⁹⁾。また小島ら^{20, 25)} はニカメイガ幼虫の parathion 抵抗性と B-esterase 活性とは関係がないことを指摘した。そして Matsumura and Brown³²⁾ はイエカの 1 種の幼虫の malathion 抵抗性の研究において、B-esterase 活性が R 系統と S 系統とで有意な差異がないにもかかわらず、malathion は S 系統より R 系統において速かに分解されることを示した。今回のツマグロヨコバイの場合、基質として methyl-*n*-butyrate と malathion をもちいたとき、分解酵素の活性はいずれの基質の場合にも S 系統より R 系統において高かった。しかるに malaoxon に対する酵素の感受性は、methyl-*n*-butyrate を基質とした場合には、第 1 表に示すように、両系統で殆んど差異がみられなかったが、malathion を基質とした場合には、第 2 表に示すように、S 系統より R 系統において酵素の感受性が低い傾向を示した。したがって、この methyl-*n*-butyrate と malathion とが単一酵素によって分解されているものか否か明確でない。Asperen¹⁾, Asperen and Oppenoorth²⁾ はイエバエには少なくとも性質の異なる carboxylic ester hydrolase が 2 種以上存在することを指摘している。また酵素の性質は重複基質特異性があるため複雑であるので、今後の研究によって酵素の性質が明確になるまで、いわゆる B-esterase とは、非殺虫物質の carboxylic esters を分解する酵素の活性を示すものとして、また carboxyesterase とは、含 carboxylic ester 殺虫剤を分解する酵素の活性を意味するものとして取り扱うこととする。

以上に論じたように、malathion を分解する酵素の活性は、生体の種類や系統によって異なる。すなわち、第 2 図に malathion の分解経路の概要を示したが、OP 殺虫剤に対して感受性のイエバエ成虫²⁷⁾において

は, malathion を分解する phosphatase 作用が, マウス²⁷⁾とイエカの 1 種の幼虫³²⁾においては, carboxy-esterase 作用が優性である。

ワモンゴキブリとチャバネゴキブリ成虫では phosphatase と carboxyesterase 作用とが略等しい²⁷⁾。しかし malathion に対して抵抗性が発達すると, イエバエ成虫では, malaoxon を分解する phosphatase 作用が高まり³¹⁾, イエカの 1 種の幼虫³²⁾やツマグロヨコバイ成虫では, carboxyesterase の増大をもたらすものと考えられる。March³¹⁾ はさらに malathion の選択毒性に関与する weak link³⁷⁾が, 哺乳動物の場合と malathion に対して抵抗性の発達したイエバエ成虫の場合とで, 必ずしも同じでないとしたが, ツマグロヨコバイ成虫やイエカの 1 種の幼虫の場合には, 同じ link が関係をもつらしい。

OP 殺虫剤抵抗性昆虫の防除対策として, 1) 新殺虫物質 2) OP 殺虫剤の協力剤 3) 負相関性薬剤の開発は, 抵抗性機構の究明と関連してきわめて興味ある重要な課題である。

さらに小島・石塚^{21, 22)} は, malathion に適当な carboxyesterase 阻害剤 (例えば, DDVP) を混用することによって malathion 感受性ツマグロヨコバイ成虫に対して malathion の殺虫力を増強することができることを報告した。

今回の実験において, 著者らは malathion 抵抗性ツマグロヨコバイ成虫の carboxyesterase 阻害剤として Dibrom が DDVP より強力な作用をもつことを知った。さらに生物試験によって, malathion と DDVP の混合剤 (1:1) より malathion と Dibrom の混合剤 (1:1) の方が有効であることを確認した。

最近 malathion の協力剤の研究は海外において盛んにおこなわれている。Oppenoorth and Asperen⁴⁰⁾, Dresden, Oppenoorth and Asperen¹¹⁾ は *n*-propyl paraoxon が malathion の協力剤として malathion 抵抗性および感受性イエバエ成虫に対して有効であることを報告した。著者らは, malathion と Dibrom の混合物が malathion 抵抗性および感受性イエバエ成虫に対しても顕著な synergism を示すこと, また malathion 抵抗性および感受性ツマグロヨコバイやイエバエ成虫に対して *n*-propyl paraoxon と *iso*-propyl paraoxon が malathion の協力剤として有効であることを確認した (未発表)。Plapp and Eddy⁴⁷⁾ は malathion 抵抗性および感受性イエバエやイエカの 1 種の幼虫に対してある種の磷酸エステル類, 例えば, triphenyl phosphate, tributyl phosphorotri-thioate, tributyl phosphorotri-thioate が, malathion の殺虫力を増強することを報告した。また Jones, Garman and Dichinson¹⁶⁾ はイエバエ, ダイズハダニ

Tetranychus telarius, マメヒゲナガアブラムシ *Macrosiphum pisi*, カメムシの 1 種 *Murgantia histrionica*, *Anasa tristis*, Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* に対して malathion と各種の carbamate, carbonate ester との混合剤が連合毒作用を示すことを特許としている。

著者らは, この実験と同時に, 混合構成割合の異なる malathion と DDVP, Piperonyl butoxide, tri-*o*-cresyl phosphate (以下単に TOCP とする), trimethyl phosphate, triethyl phosphate, triphenyl phosphate, tributyl phosphate, Phenylcarbamide, XOC (O) NHP (X は H, 3-または 4-NO₂Ph, 2-, 3-または 4-ClPh), 尿素, チオ尿素, チオ尿素誘導体との各種混合乳剤を調製し, 稲葉浸漬法により malathion 抵抗性ツマグロヨコバイ雌成虫に対する殺虫効力を実験検討したが, 実験の結果は malathion と Dibrom との混合乳剤に優るものは見出せなかった。

以上に述べた昆虫に対する malathion と phosphate ester との連合毒作用の研究²¹⁾は, malathion に EPN を前もって, または同時に投与すると, 哺乳動物に対して malathion の毒性が増加すること, そしてこの連合作用毒性は EPN のような殺虫力をもつ phosphate ester でも, TOCP のような殺虫力をもたない phosphate ester でもみられるという, Frawley, Fuyat, Hagan, Blake and Fitzhugh¹⁴⁾や Murphy, Anderson and DuBois³⁵⁾ の報告に出発する。

そしてこの連合毒作用の機構は malathion の分解解毒 (carboxyesterase 作用) が phosphate ester によって阻害されるものと考えられている^{12, 22, 39)}。Casida⁸⁾ は, マウスについて, malathion に対する phosphate ester の協力作用と, B-esterase 阻害度との間には密接な関係のあることを立証した。したがって, さらに小島・石塚²¹⁾が指摘したように, malathion に carboxyesterase 阻害剤を加えた混合剤は昆虫に対して連合毒作用を示すと同時に, 哺乳動物に対しても毒性が増加する。この実験における malathion と Dibrom 混合乳剤の場合にも, マウスに対してその毒性が高まった。この事実は, 少なくともある場合には OP 殺虫剤に対する昆虫の抵抗性の増加を殺虫剤の解毒機構の阻害によって克服しうる可能性を示すものである。しかしあくまでも昆虫の解毒機構を阻害しても, 哺乳動物のそれに影響のない選択性阻害剤の発見に努力すべきであることは論をまたない。

摘 要

1) ツマグロヨコバイの malathion に対する抵抗性の機構を, 高知産の R 系統と小田原産の S 系統をもちいてワールブルグ検圧計法により実験検討した。

2) 微量局所施用法による malaoxon に対する感受性は両系統で余り差異がなく、現段階では malaoxon に対して交叉抵抗性を示さなかった。しかし両系統の malathion を malaoxon に活性化する作用の差異については明らかでない。

3) 生体外において、cholinesterase の活性度や malaoxon に対する感受性は R 系統と S 系統とで余り違わなかった。

4) 生体外において基質として methyl-*n*-butyrate と malathion をもちいたとき、分解酵素の活性はいずれの基質の場合も S 系統より R 系統において高かった。しかし malaoxon に対する酵素の感受性は、methyl-*n*-butyrate を基質とした場合には両系統で殆んど差異がみられなかったが、malathion を基質にした場合には S 系統より R 系統において酵素の感受性が低い傾向を示した。したがって、この methyl-*n*-butyrate と malathion の分解が単一酵素によるものか否かは明確でない。

5) 生体外において、R 系統は S 系統よりも malathion を速かに分解するが、両系統とも malaoxon を分解しないことを確認し、ツマグロヨコバイ成虫の malathion 抵抗性は malathion を分解する carboxy-esterase 活性の増大に由来するものと推察した。

6) 現段階においては、malaoxon, paraoxon, DDVP などを分解する phosphatase 活性は増加していないように思われる。しかし、DDVPase 以外の phosphatase 活性はこの実験にもちいた方法では測定できなかった。

7) 生体外において、両系統の carboxyesterase 作用は paraoxon, malaoxon, DDVP, Dibrom によって阻害される。そして carboxyesterase の paraoxon, DDVP, Dibrom に対する感受性は両系統で殆んど差異がみられなかったが、malaoxon に対しては R 系統の carboxyesterase の方が S 系統のそれより感受性が低い傾向がみられた。

8) R 系統に対する malathion と Dibrom の連合毒作用を、微量局所施用法によりしらべた結果、混合比が 50 : 50 の場合に最高の synergism を示した。

9) Malathion と Dibrom の混合乳剤のマウスに対する毒性を経口投与によってしらべた結果、Dibrom は malathion の毒性を potentiation した。

文 献

- Asperen, K. van : *J. Ins. Physiol.*, **3**, 301 (1959).
- Asperen, K. van and Oppenoorth, F. J. : *Ent. Exp. Appl.*, **2**, 48 (1959).
- Asperen, K. van and Oppenoorth, F. J. : *Ent. Exp. Appl.*, **3**, 68 (1960).
- Bigley, W.S. and Plapp, F.W. Jr. : *Ann. Ent. Soc. Am.*, **53**, 360 (1960).
- Bigley, W.S. and Plapp, F.W. Jr. : *J. Econ. Ent.*, **54**, 904 (1961).
- Brown, A.W.A. : *Adv. Pest Control Res.*, **2**, 351 (1958).
- Brown, A.W.A. : *Ann. Rev. Ent.*, **5**, 301 (1960).
- Casida, J.E. : *Bioch. Pharmacol.*, **5**, 332 (1961).
- Chardwick, L.E. (1955) : Ref. Brown, A. W.A., *Ann. Rev. Ent.*, **5**, 301 (1960).
- Darrow, D.I. and Plapp, F.W. Jr. : *J. Econ. Ent.*, **53**, 777 (1960).
- Dresden, D., Oppenoorth, F. J. and Asperen, K. van : Overdrak uit de Mededelingen van de Landboawhogeschool en de Opzoekingsstions van de Staat te Gent. 1961, Eeel XXVI.
- DuBois, K.P. : *Adv. Pest Control, Res.* **4**, 117 (1961).
- Fay, R.W., Kilpatrick, J.W. and Morris, G.G. : *J. Econ. Ent.*, **51**, 452 (1958).
- Frawley, J.P., Fuyat, H.N., Hagan, E.C., Blake, J.R. and Fitzhugh, O.G. : *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **121**, 96 (1957).
- Horsfall, J.G. : Fungicides and their action, Chronica Botanica Co., Waltham, Mass. (1945).
- Jones, H.A., Garman, J.A. and Dickinson, B.C. : U.S. Patent 2,945,780 ; 2,946,718 ; 2,946,719 ; 2,955,069 ; 2,955,070 ; 2,960,430 ; 2,960,431 ; 2,961,369 ; 2,961,370 ; 2,963,398 (1960) ; U.S. Patent 2,970,940 ; 2,990,315 ; 2,990,316 ; 2,990,317 ; 2,990,318 ; 2,990,319 ; 2,990,322 ; 2,990,323 (1961).
- Kilpatrick, J.W. and Schoof, H.F. : *J. Econ. Ent.*, **51**, 18 (1958).
- Knaak, J.B. and O'Brien, R.D. : *J. Agr. Food Chem.*, **8**, 198 (1960).
- Koivistoinen, P. : *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser A, 4. Biologica* **51** (1961).
- 小島建一 : 応動昆 **5**, 159 (1961).
- 小島建一・石塚忠克 : 防虫科学 **25**, 16 (1960).
- 小島建一・石塚忠克 : 防虫科学 **25**, 22 (1960).
- 小島建一・石塚忠克 : 防虫科学 **25**, 144 (1960).
- 小島建一・石塚忠克・椎野明雄 : 農芸化学会関東東北支部合同大会講要 p. 20 (1961).
- 小島建一・石塚忠克・椎野明雄 : 応動昆大会講要 p. 12 (1961).

- 26) 小島建一・北方節夫・椎野明雄・吉井孝雄：防虫科学 28, 13 (1963).
- 27) Krueger, H. R. and O'Brien, R. D.: *J. Econ. Ent.*, 52, 1063 (1959).
- 28) Krueger, H. R., O'Brien, R. D. and Dauterman, W. C.: *J. Econ. Ent.*, 53, 25 (1960).
- 29) Lewallen, L. L. and Nicholson, L. M.: *Ann. Ent. Soc. Am.*, 52, 767 (1959).
- 30) March, R. B. (1958): Ref. Brown, A. W. A., *Ann. Rev. Ent.*, 5, 301 (1960).
- 31) March, R. B.: *Mis. Publ. Ent. Soc. Am.*, 1, 13 (1959).
- 32) Matsumura, F. and Brown, A. W. A.: *J. Econ. Ent.*, 54, 1176 (1961).
- 33) Mengle, D. C. and Casida, J. E.: *J. Agr. Food Chem.*, 8, 431 (1960).
- 34) Muehlmann, R. and Schrader, G.: *Z. Naturforsch* 12 b, 196 (1957).
- 35) Murphy, S. D., Anderson, R. L. and DuBois, K. P.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 100, 483 (1959).
- 36) Norris, M. V., Vail, W. A. and Averell, P. R.: *J. Agr. Food Chem.*, 2, 570 (1954).
- 37) O'Brien, R. D.: *Can. J. Biochem. Phys.*, 37, 1113 (1959).
- 38) O'Brien, R. D.: Toxic phosphorus esters, Academic Press, New York (1960).
- 39) Ogita, Z.: 防虫科学 26, 93 (1961).
- 40) Oppenoorth, F. J.: *Nature (London)* 181, 425 (1958).
- 41) Oppenoorth, F. J.: *Ent. Exp. Appl.*, 2, 216 (1959).
- 42) Oppenoorth, F. J.: *Ent. Exp. Appl.*, 2, 304 (1959).
- 43) Oppenoorth, F. J. and Asperen, K. van: *Science* 132, 298 (1960).
- 44) Oppenoorth, F. J. and Asperen, K. van: *Ent. Exp. Appl.*, 4, 311 (1961).
- 45) Plapp, F. W. Jr. and Bigley, W. S.: *J. Econ. Ent.*, 54, 103 (1961).
- 46) Plapp, F. W. Jr., Bigley, W. S., Darrow, D. I. and Eddy, G. W.: *J. Econ. Ent.*, 54, 389 (1961).
- 47) Plapp, F. W. Jr. and Eddy, G. W.: *Science* 134, 2043 (1961).
- 48) Quarterman, K. D. (1958): Ref. Brown, A. W. A., *Ann. Rev. Ent.*, 5, 301 (1960).
- 49) Schoof, H. F. and Kilpatrick, J. W.: *J. Econ. Ent.*, 51, 546 (1958).

- 50) Seume, F. W. and O'Brien, R. D.: *J. Agr. Food Chem.*, 8, 36 (1960).

Résumé

Biochemical aspects on malathion resistance of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler, were studied manometrically *in vitro*.

The insects used in this experiments were the same as the description in the previous paper.²⁶⁾ That is, malathion resistant strain of the green rice leafhopper was collected in September, 1961, in Nangoku, Kōti prefecture where malathion has become to be ineffective to control this pest and reared successively from generation to generation at Tōa Agricultural Chemicals Institute with the selection of LD₅₀ of malathion corresponding to each generation. The susceptible strain used for comparison was collected at Kozu, Odawara, Kanagawa prefecture in April, 1960, and reared successively without exposure to any insecticide. This population had no experience of contacting with malathion until that time. The former strain had 5.6 times resistance to malathion compared with the latter strain when they were applied topically with acetone.

The results of experiment are summarized as follows:

- 1) At this stage of investigation, the cross resistance to malaoxon can not be recognized in the malathion resistant strain. But, the difference in the active rate of malathion to malaoxon *in vivo* was not found obviously between the both strains.

- 2) Cholinesterase activity in susceptible strain was nearly equal to that of resistant strains *in vitro*, and also, any difference could not be recognized in the sensitivity to malaoxon of cholinesterase between both strains.

- 3) Hydrolase activity of resistant strain was higher than that of susceptible strain, and in both cases, methyl-*n*-butyrate and malathion were used as substrate. When methyl-*n*-butyrate was used as substrate, however, there was little difference in sensitivity of hydrolase against malaoxon between both strains. When malathion was used as substrate, susceptibility to hydrolase of resistant strain was lower than that of susceptible strain. Accordingly, it was not clear

whether this methyl-*n*-butyrate and malathion were hydrolyzed by a single enzyme. As pointed out by Asperen and Oppenoorth,^{1,2)} in the housefly, there are more than two kinds of carboxylic ester hydrolases having different characteristics, and the characteristics of hydrolase have overlapping substrate specificities. Furthermore, until being clear the characteristic of enzyme, authors would like to consider that, as they are very complicated, the so-called B-esterase shows the activity of enzyme which hydrolyzes carboxylic esters of non-insecticidal properties, and also carboxyesterase means the activity of enzyme which hydrolyzes insecticides containing carboxylic ester.

4) Resistant strain hydrolyzed malathion *in vitro* more rapidly than susceptible strain, but both strains did not hydrolyze malaoxon, and also, these results suggest that the resistance to malathion in this insect is corresponding to the increase of carboxyesterase activity hydrolyzing malathion.

5) At this stage of investigation, it was considered that activities of phosphatases hydrolyzing malaoxon (malaoxonases), paraoxon (paraoxonases) and DDVP (DDVPases) did not increase in resistant

strain. Malaoxonase and paraoxonase activities, however, could not be measured in both strains by the analytical method used in this experiment. DDVPase activity did not show any difference between the both strains *in vitro*.

6) Carboxyesterase actions of both strains *in vitro* were inhibited by inhibitors such as paraoxon, malaoxon, DDVP and Dibrom. The sensitivities of carboxyesterase to paraoxon, DDVP and Dibrom did not show any difference between the both strains, but the carboxyesterase of resistant strain had more resistance to malaoxon than that of susceptible strain, as pointed out above.

7) Remarkable synergism was recognized when malathion and Dibrom was applied jointly to female adults of resistant strain. The maximum synergism was obtained in a mixture of malathion and Dibrom in the ratio of 1:1.

8) At the same time, Dibrom potentiated the oral toxicity of malathion to mice when malathion and Dibrom administrated jointly as water emulsion. The degrees of potentiation were 5.0, 6.9 and 6.2 in the 75:25, 60:40 and 50:50 mixtures of malathion and Dibrom respectively.

抄 録

置換 phenyl N-methyl carbamate の位置異性と生物活性

Position isomerism in relation to activity of substituted-phenyl N-methyl carbamates.

R. L. Metcalf, J. R. Fukuto, and M. Y. Winton.
J. Econ. Ent. 55 889. (1962)

従来の研究では置換 phenyl N-methyl carbamate (以下PNMCと略す)の殺虫力は、一般に meta, ortho, para, の順序にあるものとされている。しかしながら, alkoxy-PNMC 置換体では o-isopropoxy-PNMC のような ortho 置換体が, それらの meta 置換体よりも強い活性を示すことから, PNMC 置換体の化学構造と比較虫力を調べるべく, 49種 (そのうち22種新化合物) の PNMC 置換体を合成し, それらの, 三種の昆虫に対する抗 chE 作用と毒性に就いて検討した。

材 料 と 方 法

すでにいくつかの PNMC 置換体に就いては述べら

れているが, 一般には, 相当する phenol と過剰の 50 %methyl-isocyanate とをトルエン中耐圧瓶を用いて 100°C で反応せしめて合成し, 得られた carbamates は skellysolve B や hexane 等から再結した。その他の合成法としては, たとえば m-iodophenol は m-amino phenol から diazonium 中間体を経て, o-cyclopentylloxy phenol は pyrocatechol と cyclopentyl bromide から Klarmann の方法で合成した。これらはいずれも N-methyl carbamate ester として元素分析により確認した。

昆虫に対する毒性並びに抗 chE 作用の検定は夫々, Fukuto, Kolbezen の方法によった。

その結果, 以前得られていた I_{50} 値がごく僅かに修正されるものはいくつかみられた。

考 察

Cabamates は昆虫の chE に対する拮抗的阻害剤であって, 阻害剤の存, 不存時の酵素作用速度に対して