

light-off with 2- to 4-day-old moths which had been kept under continuous light similar to that reported on *Spodoptera litura*⁴⁾.

By this method, a concentration—response line was obtained (Fig. 4) and above 5×10^{-5} F. E. of the crude extract could be detected.

Summary

The functions of the female sex pheromone of the rice stem borer moth, *Chilo suppressalis* W., were investigated both in the field and in the laboratory. Attractiveness of the pheromone to male moths, which had been suggested earlier, was ascertained by the field test. Moreover, in the laboratory observations, the 'mating dance' of the male prior to the copulation was also proved to be released by the pheromone.

A laboratory bioassay method for the sex

pheromone using the male mating dance as a criterion was designed and some factors influencing the responsiveness to the pheromone were examined.

It was found that suitable assay could be carried out in darkness after 2 to 5 hours after light-off with 2- to 4-day-old male moths which had been held under LL at ca. 25°C.

References

- 1) Tatsuki, S. and J. Fukami: *Kontyū*, 40, 203 (1972).
- 2) Tatsuki, S. et al.: *Botyu-Kagaku*, 40, 143 (1975).
- 3) Jacobson, M.: *Insect Sex Pheromone*, Academic press, N. Y. and London (1972).
- 4) Tamaki, Y. et al.: *Botyu-Kagaku*, 38, 147 (1973).

On the Mechanisms of Resistance in Malathion Resistant Sapporo Strain of Houseflies.
Akifumi HAYASHI^{*,**}, Rokuro KANO^{**} and Sadami ISHIBASHI^{***} (Section of Medical Zoology, Public Health Laboratory, Chiba Prefecture^{*}, Department of Medical Zoology, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University^{**}, and Entomological Laboratory, Tokyo University of Agriculture and Technology^{***}, Tokyo, Japan) Received June 20, 1975. *Botyu-Kagaku*, 40, 154, 1975. (with English Summary 158)

29. 札幌系イエバエの malathion 抵抗性の作用機構について 林 晃史^{***}, 加納六郎^{**}, 石橋定己^{***} (千葉県衛生研究所医動物研究室^{*}, 東京医科歯科大学医学部医動物学研究室^{**}, 東京農工大学農学部植物保護学科^{***}) 50. 6. 20 受理

Malathion 抵抗性イエバエ (札幌系, 首里系) の *in vitro* での各種殺虫剤の分解量を測定した。抵抗性イエバエ群の札幌系, 首里系の両系統が malathion, acethion および PAP に対して高札幌系に比較して顕著な活性を示すが三崎系ではその差異が認められなかった。なお, ホモジネートの上清部と沈澱部で各基質の酵素活性を調べたところ, 沈澱部に活性の高いことがわかった。また, malathion 抵抗性イエバエの札幌系と三崎系は酵素活性の面でも明かに差異のあることがわかった。

林ら¹⁾は malathion 抵抗性の札幌系イエバエの *in vitro* における malathion の分解率は感受性系統に比較して高いが, カルボキシエステラーゼ阻害剤である TOCP を混用した場合, その分解率が顕著に低下することを明かにした。また, 林ら²⁾は P³²-malathion を用いた *in vitro* の実験で, 札幌系の malathion 抵抗性機構の一つは malathion を基質とするカルボキシエステラーゼの増大に起因することを報告している。さらに札幌系の malathion 抵抗性の遺伝は単一の遺伝子に支配されていることも明かにさ

脚注) 本研究の一部は昭和50年度文部省科学研究費による。

れた²⁾。

林³⁾は malathion 抵抗性イエバエを札幌型と三崎型に分けているが, これについて酵素レベルでも検討して置く必要があるので, malathion 抵抗性系統である札幌系, 首里系および三崎系を用いて *in vitro* でエステラーゼ活性について比較検討を行なった。

実験材料および方法

供試昆虫: 実験に用いたイエバエ *Musca domestica* Linné, 1758は感受性系統の高札幌系, malathion 抵抗性の札幌系, 首里系および malathion, sumithion 抵抗性の三崎系で, いずれも当研究室で累代飼育中の個

体群である。実験には羽化後4日から5日目の成虫を使用した。

酵素液：各系統のイエバエの羽化後4日目の成虫（雌雄，1：1）10頭を氷冷した磁製乳鉢に入れ，少量の精製水で磨砕し，稀釈（2匹/ml）した後，これを10,000 gで20分間遠心分離し，上清部と沈澱部に分け，沈澱部は水で再分散させ稀釈（2匹/ml）してそれぞれを酵素液とした。また，阻害剤の実験では1/15Mりん酸緩衝液（pH，7.0）で磨砕し，稀釈した液（2匹/ml）を酵素液とした。

基質：基質の調製は malathion（純度，95.5%），sumithion（純度，98.7%），acethion（純度，98%）および PAP（純度，94%）などはおのおの10 mg，NAC（工業用）25 mg， β -naphthyl acetate（試薬特級）50mg，*p*-nitrophenyl acetate（試薬特級）10mg，methyl salicylate（試薬特級）50 mg，methyl-*n*-butyrate（試薬特級）200 mg，methyl stearate（試薬特級）50mg をそれぞれ秤取し，エタノールを加えて10mlとした。

酵素活性の測定：有機りん剤を基質とした場合は調製酵素液5 mlを50ml共栓遠沈管にとり，1/15Mりん酸緩衝液（pH，7.0）5 mlを加え，33°Cの恒温槽に1分間浸した後各基質0.1 mlを加えて15分間反応せしめ，40% TCA 溶液1 mlを加えて反応を停止した。これに，あらかじめ内部標準物質を溶かした *n*-hexane 10mlを加えて激しく振盪して残存している有機りん剤を抽出し，遠心分離した後，*n*-hexane 層を GLC 用定量試料とした。ガスクロマトグラフ操作条件は次の如くである。

機種：島津 GC-4 B 型

検出器：水素炎熱イオン化型（FTD）

分離管：長さ1 m，内径4 mm，ガラス製

充填剤：シリコン GE-XE 60.5%（クロモソルブ W，60～80メッシュ，AW，DMCS 処理）

分離管温度：210°C，試料注入口，検出器温度25°C

キャリアーガス：He，流量30ml/分

基質が methyl-*n*-butyrate，methyl stearate，methyl salicylate の場合も反応条件は有機りん剤の場合と同様で，反応後に稀塩酸で酸性とした。これをエーテル15mlで3回抽出し，全抽出液を合せて無水硫酸ナトリウムで脱水後，溶媒を低溫で留去し，残留物に内部標準物質を溶かしたアセトン溶液1 mlを加えて GLC 用定量試料とした。Methyl stearate，methyl salicylate はその残存量を，methyl-*n*-butyrate は生成した Butyric acid を測定した。なお，ガスクロマトグラフ操作条件は次の如くである。

機種：島津 GC-4 B 型

検出器：水素イオン化検出器（FID）

分離管：長さ1 m，内径4 mm，ガラス製

充填剤：DEGS，5%（クロモソルブ W，60～80メッシュ，1% H_3PO_4 処理）

分離管温度：90°C（Butyric acid）

110°C（methyl salicylate）

210°C（methyl stearate）

基質が *p*-nitrophenyl acetate， β -naphthyl acetate および NAC の場合も有機りん剤の場合と同様の反応条件である。ことなる点は対照液として基質なし，酵素なしの試料を加えて操作した。反応後，40% TCA 溶液1 mlを加えて汙過（東洋汙紙 No.7）し，汙液について水を対照として吸光度を測定した。

Malathion 分解酵素の阻害実験はおのおのの濃度が 0.31 (μ mol/ml) の Eserine，0.01 (mol/ml) の EDTA，0.45 (μ mol/ml) の DDVP の各阻害剤1ml（水）を酵素液に加えて有機りん剤の実験条件と同じ条件で操作し malathion の測定を行なった。

実験結果および考察

薬剤感受性の異なる4系統のイエバエの酵素液による各種殺虫剤の分解量についてまとめると表1に記載した如くである。

札幌系と首里系は高槻系に比較して malathion，acethion および PAP を顕著に分解した。しかし，三崎系と高槻系では殆んど差異が認められなかった。また，札幌系や首里系における malathion の分解は上清部より沈澱部において顕著であった。なお，この結果から札幌系と三崎系は酵素活性が異なることも明かである。また，札幌系，首里系の malathion 分解酵素は acethion，PAP の分解酵素と同じと考えられる。なお，sumithion，NAC では系統間に差異が認められなかった。

札幌系や首里系イエバエの酵素が malathion のように carboxyester を持つものに活性が強いことが明かになったので，各種の carboxyester 類を用い基質特異性を調べた。

基質は acetate 類のうちから非特異的基質と考えられる β -naphthyl acetate，*p*-nitrophenyl acetate を，有機酸では低級脂肪酸エステルとして methyl-*n*-butyrate，高級脂肪酸として methyl stearate，芳香族酸エステルとして methyl salicylate などを選んで実験に使用した。

実験の結果は表2に記載した如くである。 β -naphthyl acetate，methyl salicylate および methyl stearate は系統間に活性の差異は認められなかった。しかし，*p*-nitrophenyl acetate および methyl-*n*-butyrate では三崎系で高い活性が認められた。

Table 1. Degradation of several insecticides by the homogenates in 4 housefly strains.

Compound	Insecticide Structure	Enzyme fraction	Insecticide degradation (μ -mol/fly/15min.)			
			TAKATSUKI	SAPPORO	SHURI	MISAKI
Malathion	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \diagup \text{S} \\ \text{CH}_3\text{O} \diagdown \text{P} - \text{S} - \text{CHCOOC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$	Sup.*	1.5	3.4	4.6	2.9
		Sed.	1.0	16.0	14.8	2.8
		Total	2.5	19.4	19.4	5.7
Acethion	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \diagup \text{S} \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \diagdown \text{P} - \text{S} - \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$	Sup.	0.7	8.7	10.4	5.1
		Sed.	4.2	13.5	13.5	6.8
		Total	4.9	22.2	23.9	11.9
Papthion	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \diagup \text{S} \\ \text{CH}_3\text{O} \diagdown \text{P} - \text{S} - \text{CHCOOC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	Sup.	0.	8.2	9.0	0.5
		Sed.	1.5	11.0	11.5	0.7
		Total	1.5	19.2	20.5	1.2
Sumithion	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \diagup \text{S} \\ \text{CH}_3\text{O} \diagdown \text{P} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)(\text{NO}_2) \end{array}$	Sup.	2.9	4.0	3.6	5.0
		Sed.	3.0	2.4	2.6	1.1
		Total	5.9	6.4	6.2	6.1
Sevin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H} - \text{N} - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \text{C}_{10}\text{H}_7 \end{array}$	Sup.	2.7	1.6	0.7	2.3
		Sed.	0.3	0.5	0.7	0.5
		Total	3.0	2.1	1.4	2.8

Incubation : Phosphate buffer pH 7.0, 33°C, 15min.

* 10,000×g, 20min., 0°C.

酵素阻害剤の malathion 分解におよぼす影響については表3の如き結果を得た。

Acetyl cholinesterase の阻害剤として知られる eserine, 金属を要求する酵素の活性を阻害するEDTAは本実験に用いたイエバエの酵素の malathion 分解活性に関与しなかった。しかし, carboxyesterase 阻害剤として作用する phosphate 型有機りん剤である DDVP の加用によって札幌系, 首里系の malathion 分解が顕著に抑制された。このことは札幌系, 首里系の酵素活性は主として carboxyesterase であるといえる。

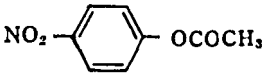
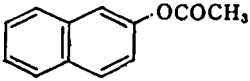
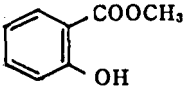
さらに, 以上の結果から次のような考察ができる。

札幌系, 首里系における malathion 分解酵素の活性はホモジネートの沈澱部 (10,000 g, 20分) に顕著で, このことは malathion 分解酵素は膜結合酵素として存在していると推察される。また, 上清部の活性が系統間において顕著な差異がない点は興味ぶかく, 今後検討されるべき問題点といえる。

なお, このことは膜結合酵素を可溶化しなければ系統間差異を論ずることが困難であることを示すものであり, 電気泳動を用いて検討する場合には注意する必要がある。

すでに, Matsumura ら⁴⁾ も malathion 抵抗性 *Culex tarsalis* の実験で NaCl を用いて可溶化する手

Table 2. Degradation of several substrates by the homogenates in 4 housefly strains.

Substrate		Enzyme fraction	Substrate degradation (μ -mol/fly/15min)			
Compound	Structure		TAKATSUKI	SAPPORO	SHURI	MISAKI
<i>p</i> -Nitrophenyl acetate		Sup. *	28.7	16.7	17.2	54.1
		Sed.	68.5	55.4	47.0	76.9
		Total	97.2	72.1	64.2	131.0
β -Naphthyl acetate		Sup.	193.0	186.0	170.9	196.7
		Sed.	166.1	163.4	172.0	164.5
		Total	359.1	349.4	342.9	361.2
Methyl- <i>n</i> -butyrate	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	Sup.	251.6	228.1	106.7	359.3
		Sed.	228.1	272.2	186.0	713.7
		Total	479.7	500.3	292.7	1073.0
Methyl salicylate		Sup.	107.1	134.0	99.9	130.8
		Sed.	112.3	111.0	118.9	102.5
		Total	219.4	245.0	218.8	233.3
Methyl stearate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOCH}_3$	Sup.	91.9	81.2	82.2	72.0
		Sed.	56.0	37.5	57.0	70.0
		Total	147.9	118.7	139.2	142.0

Incubation : Phosphate buffer pH 7.0, 33°C, 15min.

* 10,000 $\times$ g, 20 min., 0°C.

Table 3. The effect of inhibitor on the degradation of malathion by homogenates of 4 housefly strains.

Inhibitor	Concentration (M)	Malathion degradation (%)			
		TAKATSUKI	SAPPORO	SHURI	MISAKI
None		5.4	59.2	65.8	13.0
Eserine	3.1×10^{-7}	6.4	48.5	64.5	12.0
EDTA	1.0×10^{-2}	3.8	46.5	64.0	8.3
DDVP	4.5×10^{-7}	2.3	13.8	6.4	10.2

法で malathion 分解酵素はミトコンドリア部に多いことを明かにしていることからいえる。

抵抗性の検討で、酵素レベルで抵抗性を論ずる場合、基質特異性ということがきわめて重要である。ことに、本実験においても認められた如く、同程度の β -naphthyl acetate 分解活性をもっている malathion group の殺虫剤に対する生理活性に顕著な差異を持つ場合や、三崎系において観察されるように強い methyl-*n*-butyrate 分解活性をもつにもかかわらず殺虫剤に対しては活性の低い場合などがある。

イエバエの抵抗性に関する酵素レベルの研究に Ogita ら^{6,7)} の電気泳動を用いた優れた研究報告がある。しかし、この結果も分解物の測定法の問題から明瞭をかく部分も多い。この研究で β -naphthyl acetate を基質とするイエバエの esterase はすくなくとも 24 種認められているが分離されずに over-lap しているものもすくなくないと考えられる。これらの esterase 群のうち E₂, E₄ と名づけられたものが有機りん剤と最も関係が深いといわれているが⁸⁾、それが malathion group を分解するという実験例はない。Malathion group を基質とする esterase は限られたものであることは、非特異的基質である β -naphthyl acetate の反応モル数と malathion group の反応モル数の比較、あるいは各系統イエバエの malathion group の活性傾向と各種エステルの活性傾向の比較から推定される。結果的には、これらの esterase のおのおのを単離し、その基質特異性、反応速度論的な検討が加えられなければならない。

この実験で esterase 活性の測定に際しては従来、 β -naphthyl acetate は β -naphtol をジアゾ化して発色させて測定する方法が広く行なわれているが、UV を使用して発色させずに定量する方法を明かにした。また、methyl-*n*-butyrate は従来ワールブルグ法で測定していたがガスクロマトグラフィーを用いて酪酸を測定する方法を確立した。

要 約

1) Malathion 抵抗性系統(札幌, 首里, 三崎)感受性系統(高槻系)イエバエ成虫の全虫体のホモジネートによる *in vitro* での各種殺虫剤および一連の有機酸エステルの分解量を測定した。

抵抗性イエバエ群において札幌, 首里の両系統が malathion, acethion および PAP に対して高槻系に比較して顕著な活性を示し、三崎系ではその差が認められなかった。

Esterase を基質とした β -naphthyl acetate, *p*-nitrophenyl acetate, methyl-*n*-butyrate, methyl salicylate および methyl stearate の分解量を系統

間で比較した場合、三崎系が methyl-*n*-butyrate と *p*-nitrophenyl acetate の活性が顕著に高かった。しかし、他の基質については殆んど同程度であった。

2) 数種の酵素阻害剤を添加して、系統間の malathion 分解におよぼす影響を調べた。Eserine, EDTA は各系統に影響はなく、carboxyesterase に阻害効果を持つ DDVP が札幌系, 首里系の malathion 分解を著しく抑制した。

3) イエバエ成虫の全体のホモジネートを 10,000 g で 20 分間遠心分離を行ない、上清と沈澱を分画しておのおのについて各基質の酵素活性を測定したところ、札幌系, 首里系における malathion, acethion および PAP の分解量は沈澱画分に多い傾向が認められた。

他の有機りん酸エステル類では顕著な差異は認められなかった。このことから、malathion の分解に関与する酵素はかなりのものが膜に結合しているものと推定される。

4) Malathion 抵抗性イエバエの札幌系と三崎系は酵素活性の面でも明かに差異が認められた。首里系は札幌系に類似したパターンを示した。首里系は aromatic 有機りん剤に対して少々感受性が低下しているので札幌系には存在しない他の抵抗性因子を持つものと推察される。

引用文献

- 1) 林 晃史ら：防虫科学, 37, 7 (1972).
- 2) 林 晃史ら：北海道立衛生研究所特別報告 No.7 (1974).
- 3) 林 晃史：防虫科学, 44, 6 (1974).
- 4) Matsumura, F. et al.: J. Ecom. Entomol., 54, 6 (1961).
- 5) Matsumura, F. et al.: J. Ecom. Entomol., 56, 3 (1963).
- 6) Ogita, Z. et al.: Japan J. Genetica, 40, 1 (1965).
- 7) Ogita, Z. et al.: Japan J. Genetica, 40, 3 (1965).
- 8) 安富和男：衛生動物, 19, 1 (1968).

Summary

In vitro degradations of several insecticides (Malathion, Acethion, Papthion, Sumithion, NAC) and esters (*p*-nitrophenyl acetate, β -naphthyl acetate, methyl-*n*-butyrate, methyl salicylate, methyl stearate) were studied in a susceptible and 3 resistant strains of *Musca domestica* Linné. Among the resistant strains, Sapporo and Shuri strains considerably degraded Malathion, Acethion

and Papthion better than the susceptible strain (Takatsuki), and for the esters, only Misaki strain exhibited a higher carboxylesterase activity to methyl-*n*-butyrate and *p*-nitrophenyl acetate.

Eserin and EDTA had no effect on the degradation of Malathion in all the strains. Sapporo and Shuri strains, as expected, were considerably inhibited by DDVP which was known to be a carboxylesterase inhibitor.

Both supernatant and sediment (10,000 × g, 20 min, 0°C) fractions were used as enzyme sources.

It was shown that the sediment fractions from Sapporo and Shuri strains degraded Malathion more than the supernatant fractions.

It was proved that characters of the enzymes of Sapporo strain were different from those of Misaki strain, but similar to those of Shuri strain. Susceptibility of Shuri strain to some insecticides, however, was different from that of Sapporo strain.

Therefore it seems likely that Shuri strain may have other resistant factors.

Efficacy of "Vydate" Oxamyl for the Control of Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Attacking Tomato. M. Mashkoo ALAM, Abrar M. KHAN and S. K. SAXENA (Section of Plant Pathology & Nematology, Department of Botany, Aligarh Muslim University, Aligarh-202001, India) Received May 20, 1975. *Botyu-Kagaku*, 40, 159, 1975.

30. トマトを加害するネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita* に対する "Vydate" Oxamyl の効果 M. Mashkoo ALAM, Abrar M. KHAN and S. K. SAXENA (Department of Botany, Aligarh Muslim University, India) 50. 5. 20 受理

トマトに寄生するネコブセンチュウを防除するため, "Vydate" oxamyl (methyl *N'*, *N'*-dimethyl-*N*-[(methylcarbamoyl) oxy]-1-thiooxamimidate) 1,200 ppm 液にタバコ 苗の根を30分間浸漬してから移植し, その後毎週1回5週間連続して茎葉に噴霧すると著しい効果がある。葉害は全く認められない。茎葉噴霧だけではあまり効果がない。

The root-knot nematode, *Meloidogyne* Spp. causes enormous losses to vegetables every year (Swarup and Seshadri²⁾, 1974) and can be regarded as pest No.1 of vegetables in India. D-D and some other halogenated hydrocarbons have been successfully used as fumigants for the control of root-knot (Hart and Maggenti⁴⁾, 1971; Brodie and Good²⁾, 1973). However, all these nematocides are phyto-toxic and thus require a long waiting period before a crop is sown. Recently, some systemic nematocides have been used successfully for controlling nematodes without being phyto-toxic. "Vydate" oxamyl (Methyl *N'*, *N'*-Dimethyl-*N*-[(methylcarbamoyl) oxy]-1-Thiooxamimidate), has been used as drench and foliar applications for controlling root-knot, on pole beans and roses by Radewald *et al.*⁶⁾ (1970); on groundnut by Dickson and Smart³⁾ (1971). Hart and Maggenti⁴⁾ (1971) applied oxamyl to rose root stocks as drench, root-dips and foliar spray treatments and found that drench treatment was most effective

against *M. hapla*. Miller⁵⁾ (1971) found that repeated foliar sprays with oxamyl on gardenia plants almost eradicated the root-knot nematode, *M. incognita* and it was as good as drench or bare-root-dip treatments. Alam *et al.*¹⁾ (1973) found that a 30 minute root-dip with oxamyl (1,200 ppm, active ingredient) followed by five successive weekly foliar-sprays reduced the root-knot development on eggplant, however, on okra five weekly-sprays alone were not much effective. In the present paper, the efficacy of "Vydate" oxamyl for the control of root-knot nematode, *M. incognita* on tomato has been reported.

Materials and Methods

Three-week-old seedlings of tomato var. Marglobe, raised in autoclaved soil, were dipped in an aqueous solution of "Vydate" oxamyl (1,200 ppm, active ingredient) for 30 minutes and later transplanted to 10 cm clay-pots having 250 g of steam sterilized soil, sand and compost mixture