解 説

殺ダニ剤の作用機構

石井 敬一郎

日本曹達株式会社

(昭和62年2月20日受理)

Acaricide Mode of Action

Keiichiro ISHII

Nippon Soda Co., Ltd., Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan

はじめに

植物加害性ハダニ類 (*Phytophagous mites*) は、果樹とか、ある種の蔬菜類、花卉類など多くの農園芸作物をはじめ、棉などの特用作物にとって重要害虫の一つである。これらハダニ類による作物の被害増大が世界的に問題になってきたのは、第二次世界大戦後で、とくに戦後における DDT の急速な普及と、それに続く有機リン剤の登場は、天敵への悪影響も原因して、これらの傾向を助長させる結果をもたらした。これとともに、ハダニ類防除のために有効な選択性殺ダニ剤の出現が要望されたことから、その後、各種の薬剤が開発されるに至ったが^{1,2)}、ハダニ類の薬剤抵抗性の発達に伴う薬剤の効果減退が問題化するにつれて^{3,4)}、その対応策を確立するため、抵抗性機構の解明が必要とされてきた⁵⁻⁸⁾。一方、新規殺ダニ剤の開発も、既存殺ダニ剤との交差抵抗性を示さないような新規化学構造をもったものに重点が置かれるようになり、当然ながら、殺ダニ作用機構との関連付けも重視されるようになってきた。

しかしながら、殺ダニ剤の作用機構に関しては、直接、ハダニ類を用いて行なった研究例はこれまであまり見当たらない。この分野の研究が進んでいないのは、取り扱う対象が小さすぎて、よほどの熟練技術がないとなかなか実験できないことと、実験に必要な個体数を集めることが困難なことにもよる。したがって、殺ダニ作用機構のある面は、実験材料として扱いやすいイエバエとかゴキブリなどのようなある種の昆虫を使つての実験例などから類推して比較するしかないのが現状である。本稿の記述もまた、これに従わざるをえなかった部分が多いこ

とをお断りしておきたい。もちろん、生物種が異なれば、たとえ、薬物感受性の類似点はあっても、生物学的特異性の相違が何かあると考えられることと、これを見いだすことが、“選択性”殺ダニ剤の発見にもつながることを忘れてはならない。まず、本題に入る前に、わが国において、殺ダニ剤がどのように開発されてきたか理解しておいていただくため、化学構造別にグループ分けして、これらの開発の傾向を Fig. 1 に示した。

殺ダニ剤の選択的作用性

現在までに開発されている殺ダニ剤のうち、最近開発されたもの (Fig. 2) を含む代表的なものについて、その選択的作用の面から分類をしてみた。この試みは、これらの作用発現が何らかの作用機構と関連しているという考えに基づいている。ナミハダニを用いて、その生活環 (Fig. 3) における各发育段階によって、各殺ダニ剤による中毒症状の発現がどのように違うか、それらの特徴を比較観察してみたが、その選択的作用性からみて、これらの殺ダニ剤は、大別して次の三つのタイプのグループに分けられる (Table 1)。

タイプ1グループ—tetradifon, hexythiazox, clofentazine, および flubenzimine—これらの化合物は、いずれも高い殺幼・若虫性をもっているほか、flubenzimine を除いて殺卵性も高く、これらの処理を受けた産下卵の死亡卵期が、いずれも中期で終わっているのが特徴である。また、このグループの薬剤で処理された幼虫と若虫は、次の静止期に至って死亡している。

タイプ2グループ—propargite, cyhexatin, avermectin, および fenpropathrin—これらは、殺幼・若虫性のほか

Fig. 2 The chemical structures of new acaricides.

殺成虫性も示す。いずれの処理においても、運動障害がみられるが、cyhexatin の場合には、もがくような症状も観察される。なお、cyhexatin 処理の場合には、ナミハダニの忌避的行動として、spin-down response がみられるのに対し、fenpropathrin 処理の場合には、dispersal response がみられる。脱水症状は、propargite と avermectin 処理の場合には、みられていないが、cyhexatin の場合には、ゆっくりと少しずつその症状が現われる。なお、fenpropathrin 処理の場合には、ナミハダニが興奮

症状を起こすのが観察される。

タイプ3 グループ—amitraz, benzoximate, および dicofol—これらは、ナミハダニのすべての发育段階に対して有効であるが、これらによって生じる中毒症状はそれぞれ違っている。とくに、amitraz 処理の場合には、興奮、けいれんなどの中毒症状のほか、忌避的行動として、walk-off response のみられるのが特徴である。なお、amitraz による卵処理の場合、胚子の发育は、ふ化直前までいって死亡している。これに対して、benzoximate による卵処理の場合には、死亡卵期は産下卵の发育初期であり、また、dicofol の場合は、卵期の中～後期である。Amitraz を処理した成虫では、中毒症状の進行に伴い、著しい脱水症状がみられる。同じく、benzoximate の場合も脱水症状がみられるけれど、その現われ方は激しくはない。特異的なのは、dicofol 処理によって死亡したナミハダニの場合で、脱水症状は起こさず、静止したまま、見掛けは正常のような状態で死亡しているのが特徴的な症状である。

DDT, dicofol, および DCCD のナミハダニとイエバエに対する作用効果の比較

殺ダニ作用機構が話題となるとき、よく質問されることは、同じ類縁化合物である DDT と dicofol を比べた場合、DDT は昆虫には強い殺虫性をもっているが、ハダニ類には殺ダニ効果を示さず、一方、dicofol は DDT と逆に、殺ダニ性に優れているのはなぜかということである。これは、古くして新しい問題でもあるが、殺虫性にしろ、殺ダニ性にしても、作用機構に関連した観点から、両化合物を同時に比較実験した例が、これまで、ほとんど見当たらない。そこで、イエバエとナミハダニを用いて、両化合物による中毒症状がそれぞれどのように違うのか観察してみることにした。なお、比較のため、

Fig. 3 Life cycle of mites.

Table 1 Differential activities to various life stages of two-spotted spider mites.

Acaricides	Life stages ^{a)}			Response ^{b)}				Egg
	Egg	Larva	Adult	Larva, nymph or adult				Dead stage
		Nymph		Hyper-activity	Ataxia	Repel-ency	Dehy-dration	
Tetradifon	★	★		—	—	—	} Death at chrysalis stage	Middle
Hexythiazox	★	★		—	—	—		Middle
Clofentezine	★	★		—	—	—		Middle
Flubenzimine		★		—	—	—		—
Propargite		★	★	—	○	—	×	—
Cyhexatin		★	★	—	○	○	△	—
Avermectin		★	★	—	○	—	×	—
Fenpropathrin		★	★	○	○	○	○	—
Amitraz	★	★	★	○	Convulsion	◎	○	Just before hatching
Benzoximate	★	★	★	—	—	—	△	Early
Dicofol	★	★	★	Dead mites appeared like normal			×	Middle~late

a) Each compound shows high effect in the stage: ★.

b) Symptom: ◎ very strong, ○ strong, △ slight, × no.

ATP 合成阻害剤 DCCD (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide) の作用効果についてもいっしょに観察した。

イエバエ雌成虫（羽化後3～4日目）に対して、局所施用法による実験結果では、DDT 10 µg/fly 処理の場合、中毒症状としてよく知られている脚部麻痺、激しい興奮、翅のばたつき、けいれんなどが現われ、ノックダウン率は3時間後で100%となり、24時間後の死亡状態では脱水症状がみられた。これに対して、dicofol 10 µg/fly 処理の場合には、中毒症状が現われず、100 µg/fly 処理の場合において、刺激に対する反応鈍化と、それに続いて、4時間後辺りから現われる脚部の軽い麻痺が観察された。この場合のノックダウン率は、6時間後で30%、24時間後で70%（死亡率では20%）で、仰転虫は翅の動きが微弱となり脱水症状を示さず死亡に至った。この特徴は、DDT による中毒症状とは明らかに異なる。同じく、DCCD 100 µg/fly 処理の場合も、興奮症状はみられなかったけれど、脚部の静止的麻痺が起こり、脚を延ばして歩行困難の状態となり、脱水症状を伴わず死亡した。この場合のノックダウン率は30分後で40%、1時間後で60%、2時間後で100%に達し、その効果の現われ方が早く、24時間後の死亡率は100%を示した。

一方、ナミハダニ雌成虫に対して、インゲン葉に寄生させたまま、その葉とともに浸漬処理（5秒間）した場

合の実験では、Table 2 に示すような観察結果が得られた。まず、dicofol 100 ppm 処理について実験したが、6時間後には静止状態で死亡となったので、dicofol 30 ppm 処理による中毒症状を観察した。この場合において、ナミハダニの動きはしだいに鈍くなり、50分後辺りから歩行不可となり、静止状態に入ったが、全脚を延ばしたまま、少し脚を動かす程度の麻痺症状がみられた。しかし、1時間半後にはまったく動かなくなり、24時間後の観察では、生きているような外観のまま、100%死亡していた。これに対して、DDT 100 ppm 処理の場合には、24時間後の観察で、興奮と脚部麻痺がみられたものの、48時間後になってもナミハダニの死亡個体はなかった。このため、DDT 1000 ppm 処理が行なわれたが、同様な症状がさらに進んだ状態で発現したけれど、24時間後でも、やはり死亡個体はみられなかった。しかし、一部の個体に歩行困難の苦悶虫が現われ、脚部のけいれんを伴った。

ナミハダニの場合にも、DDT による興奮現象が、イエバエの時ほど激しくはないとしても、発現するにもかかわらず、DDT の高濃度処理でも、死亡に至るまでの時間を要したのはなぜであろうか。DDT に対しては、別に何らかの解毒経路をナミハダニがもっているであろうか。ある種の昆虫において、DDT の中間代謝物の一つとして dicofol の生成することが知られてい

Table 2 Poisoning symptoms in two-spotted spider mites by DDT, dicofol and DCCD.

Chemicals	Concentration (ppm)	Poisoning symptoms					Observation
		Paralysis	Immobile	Hyperactivity	Convulsion	Dehydration	
DDT	1000	—	—	○	○	—	Legs extend and flex with convulsions. Prompt motion of legs is seen in mites with light symptom.
Dicofol	30	○	○	—	—	—	Legs paralyze with extending state. Mites die in the immobile state. Appearance of dead mites is indistinguishable from that of untreated mites.
DCCD	100	○	—	—	—	—	Legs paralyze with extending state. Legs loose prehensivity. Locomotion become sluggish.

るが、ナミハダニについても、DDT と dicofol の代謝経路の差異が比較できたならば面白いと思う。

ところで、ナミハダニの浸漬処理実験で、DCCD 100 ppm 処理の場合には、dicofol の時と似たような中毒症状をナミハダニは現わし、15 分後には歩行不可となって、全脚を延ばした状態のまま、麻痺症状を示した。しかしながら、dicofol の場合と違って、24 時間後でも死亡個体はみられなかった。DCCD は ATP 合成酵素 (ATPase) の F_0 部位の疎水性タンパク質と結合するか、 F_1 部位の β -サブユニットに作用することによって、この酵素活性を阻害することが知られている。DCCD 処理のナミハダニの場合においても、dicofol の場合と似たような中毒症状が早く発現したにもかかわらず、DDT の場合と同じように、なかなか致死に至らなかったのはなぜであろうか。中毒症状からみた殺ダニ作用効果と殺虫作用効果の差異を比べることによって、これらの特異性を知ること、作用機構を研究するためにも、重要な手掛りとなる。

ATPase 活性の阻害

塩素系炭化水素類による ATPases の阻害について、一連の研究が、Cutkompらのグループによってなされており、その多くの研究結果から、DDT の毒作用は、主として、ミトコンドリアの ATPase 複合体に対する直接的な作用によるものであるという見方が示されている⁹⁾。これらの研究に関連して、殺ダニ剤についてもいくつかの報告があるが、淡水魚 bluegill fish の脳から単離した ATPases に対する阻害効果を Cutkomp らが研究している^{10,11)}。その結果では、ミトコンドリアのオリゴマイシ

ン感受性 (OS) Mg^{2+} -ATPase に対して、chlorobenzilate, chlorfenethol および chlorfenson などのジフェニル型構造をもつ殺ダニ剤は阻害効果をもっているけれど、alkyl aryl sulfite 系の Aramite® は、その効果をほとんどもっていないことと、これらの化合物の Na^+ , K^+ -ATPase とオリゴマイシン非感受性 (OIS) Mg^{2+} -ATPase に対する阻害効果の低いことが報告されている。このほか、tetradifon が bluegill fish 脳の OS Mg^{2+} -ATPase に対して、とくに強い阻害効果を示したけれども、ワモンゴキブリの脳と基節筋からそれぞれ単離した OS Mg^{2+} -ATPase に対しては、その効果の低かったことが特異な例として観察されている^{12,13)}。これに対して、dicofol はワモンゴキブリの OS Mg^{2+} -ATPase を阻害する効果があるが、その阻害度は DDT ほど高くないことと、DDT の阻害作用が負の温度効果を示すのと反対に、dicofol による阻害は温度の上昇とともに強くなる傾向を示すことが認められている¹⁴⁾。この温度効果については、chlorfenethol および cyhexatin の場合も、dicofol と同様な傾向がみられる (Table 3)。

ナミハダニのホモジネートから得られた ATPase 酵素系について、いくつかの殺ダニ剤の阻害効果が, Desai 等らによって比較されているが¹⁵⁾、OS Mg^{2+} -ATPase および Na^+ , K^+ -ATPase の両方に、cyhexatin は chlorbenzilate, chlorfenethol および chlorfenson などより高い阻害活性をもち、とくに前者に対する阻害作用は強く、 I_{50} 値で 6.2×10^{-10} M である。なお、ナミハダニの OIS Mg^{2+} -ATPase に対して、上記 4 化合物のうち、cyhexatin 以外のものは、ほとんど阻害効果のないことと、cyhexatin の場合、 10^{-8} M の濃度では阻害効果がみられても、

Table 3 The I_{50} values for mitochondrial OS Mg^{2+} -ATPase from cockroach coxal muscle.

Chemical	I_{50} (μM)		
	17°C	27°C	37°C
<div><chem>Clc1ccc(cc1)C(Cl)(Cl)c2ccc(Cl)cc2</chem> DDT</div>	0.34	0.42	0.93
<div><chem>Clc1ccc(cc1)C(O)(Cl)c2ccc(Cl)cc2</chem> Dicofol</div>	7.65	5.20	2.91
<div><chem>Clc1ccc(cc1)C(O)(C)c2ccc(Cl)cc2</chem> Chlorfenethol</div>	23.77	16.00	9.07
<div><chem>(C1CCCCC1)3SnOH</chem> Cyhexatin</div>	0.0037	0.0017	0.0005

From Cheng & Cutkomp (1977).

Table 4 The I_{50} values for OS Mg^{2+} -ATPase by DDT and acaricides.

Compound	I_{50} (μM) at 37°C	
	Two-spotted spider mites	Bluegill fish brain
Chlorfenethol	5.3	3.1
Chlorobenzilate		27.0
Chlorfenson	Approx. 30	2.7
Tetradifon		0.049
Aramite®		>41.7
Cyhexatin	0.00062	0.000066
Dicofol		0.76
DDT		1.34

From Cutkomp *et al.* (1972); Desai *et al.* (1973); Cutkomp (1974).

これより高濃度の $1 \sim 20 \times 10^{-6} M$ の範囲では、この酵素に対する活性刺激効果のあることが観察されている。ナミハダニ・ホモジネートと bluegill fish 脳からそれぞれ得られた OS Mg^{2+} -ATPase に対する各種殺ダニ剤の I_{50} 値を、DDT も含め、Table 4 に示した。以上の Cutkomp ら一派による研究とは別に、ナミハダニの cyhexatin 抵抗

Fig. 4 Cyhexatin inhibition of oligomycin-sensitive ATPase from the cyhexatin-resistant and susceptible strains of *T. urticae*.

From Carbonaro *et al.* (1986).

性系統と感受性系統からそれぞれ得られた Mg^{2+} -ATPase について、OS と OIS の ATPase 活性の比較とともに、cyhexatin に対する感受性の差異を研究した結果が、最近、Carbonaro らによって報告されている¹⁶⁾。これによると、ナミハダニの両系統における Mg^{2+} -ATPase 活性は、全活性で比較しても、OS と OIS に分けてみても、ほとんど同等であり、全活性の約 74% が OS で、25% が OIS であった。このうち、cyhexatin による障害に対して感受性を示したのは、OS Mg^{2+} -ATPase だけであったが、抵抗性系統と感受性系統との間では、cyhexatin に対する感受性において、 I_{50} 値の比較では 6.5 倍の開きが認められている (Fig. 4)。なお、この実験に用いたナミハダニの両系統について、cyhexatin 50% WP を用いての slide-dip 法による殺ダニ活性の検定では、 LC_{50} で比較した場合、100 倍の差が抵抗性比として得られている。

ミトコンドリア ATPase の阻害が、殺ダニ作用機構と何らかの関係があると考えるならば、次に問題となるのは、このような阻害剤が ATPase のどの部位に特異的に作用するかということである。これについては、やはり、Cutkomp らが、ATPase における DDT の作用部位の解明を目的として、一連の研究を行なっているが^{17,18)}、殺ダニ剤について報告されたものは、まだ見当たらない。ミトコンドリア ATPase はミトコンドリアの内膜に存在しており、膜表在部分 F_1 と膜内在部分 F_0 (疎水性が強い) からなっている。 F_1 は、ATP 合成の触媒部位をもっており、その反応に Mg^{2+} を必要とするものを Mg^{2+} -ATPase と呼んでいる。農業のターゲットとしてのエネルギー獲得系とその阻害剤について、最近、本学会誌上

でも寺田と篠原による解説がなされており、ATPase とその阻害剤を知るうえでたいへん参考になると思う¹⁹⁾。単離した F_1 は水溶性酵素で、DDT に対する感受性は低い、 F_0 部分と結合することによって、 F_0 - F_1 を再構成すると、DDT 感受性が戻るということが、Patil と Koch によって報告されている²⁰⁾。

Cutkomp らは、DDT の作用はミトコンドリア ATPase の膜質部における疎水性をもった立体化学的感受性のある部位と関連があるかもしれないという考えのもとに、ワモンゴキブリ筋節から分離したミトコンドリア画分を用いて、これに関する研究を行なっている。彼らは最初に DDT による ATPase 活性阻害の反応速度論的解析および阻害性プローブとの間の相互作用に関する実験を試みている¹⁷⁾。この実験では、阻害性プローブとして DCCD、Nbf-Cl およびオリゴマイシンが用いられているが、DCCD は DDT と似たような阻害性と相加的作用を示したのに対して、Nbf-Cl (4-chloro-7-nitrobenzofuran; F_1 の触媒部位近くに結合することが知られている) の効果は DDT によって増強されたことと、オリゴマイシンによる阻害は DDT の影響を受けなかったことなどが観察されている。これらの結果から、DDT はタンパク質性レセプター、おそらくは、DCCD 結合性タンパク質に似たプロテオリビド-プロトンフォアに作用するかもしれないという見方が出されている。この DCCD 結合性タンパク質は、ミトコンドリア ATPase の膜質部のプロテオリビドのサブユニット、おそらくは、 F_0 サブユニットの一つで、ATP 合成・分解に必要な H^+ の輸送能をもつタンパク質で、プロトンフォアとしての性質をもつものとみられている。DDT と DCCD との関係をさらに追究するため、Cutkomp グループの Dary らは、標識化合物を用いて実験を行なっているが、ワモンゴキブリ筋組織のホモジネートから分離したミトコンドリア画分を [^{14}C]DDT および [^{14}C]DCCD とインキュベートしたのち、これから抽出分離したタンパク質を電気泳動を用いて分析している²¹⁾。この結果は、DDT と DCCD は同じタンパク質に作用しているかもしれないということを示したが、この結合性の比較実験だけでは、結合部位が同じであるという考え方を確認するまでに至っていない。このような作用機序が、かりにナミハダニとイエバエの DDT と DCCD 処理の場合にも考えられるとすると、両者による中毒症状の明らかな差異 (前述) は ATPase 阻害との関連からだけでは説明できない。ところで、DCCD 結合性プロテオリビドは各生物種によってタンパク質構成アミノ酸配列に共通部分はあっても、異なる箇所も多く、変異によって結合部位のアミノ酸置換

Fig. 5 Schematic model of proton translocation and ATP formation by mitochondrial ATPase.

が起きると、DCCD 結合能がなくなる例が大腸菌変異株などでは知られている。ATPase 活性阻害に関係すると思われるプロテオリビドのサブユニットの構造遺伝子の同定とその機能解析および阻害剤との結合によって生じるコンホメーションの変化による効果など、今後この分野における研究がもっと進めば、薬剤抵抗性に關連して ATPase 阻害作用の低下などの問題も、何か解明の手掛りが見つかるかもしれない (Fig. 5)。

一方、DDT とミトコンドリア膜との相互作用は、その大部分が脂質層で起きるという見方を Gnidec と Chefurka が取っている²²⁾。疎水性の点では、DDT に近い分配係数をもち、立体的にも似た化学構造をもつ dicofol についても、リン脂質層との何らかの相互作用が考えられるかもしれない。Haque らは DDT のほか dicofol などの類縁体について、プロトン NMR を用い、リン脂質のレシチン (β, γ -dipalmitoyl-DL-phosphatidylcholine) との相互作用を研究している^{23,24)}。低濃度状態において DDT をレシチンの CCl_4 溶液に添加していった場合、とくにコリンプロトンの共鳴シグナルにおいて化学シフトの変化が最大であったことと、逆に、DDT の CCl_4 溶液中にレシチンを添加していった場合、DDT の環プロトンの化学シフト変化とともに、benzylic プロトンにおいても大きな化学シフト変化があり、リン脂質中で何らかの相互作用のある状態が生じたことが観察された。なお、殺虫性の弱い *o, p'*-DDT の場合は、benzylic プロトンの化学シフト変化がかなり小さく、リン脂質との相互作用が弱いことを示した。また、dicofol の場合については、環プロトンの化学シフト変化が観測されたが、DDT のそれとまったく異なる傾向を示し、その共鳴線の線幅がレシチンの添加量とともに広がる特徴がみられた。このことは、フリー状態と複合体状態との間での dicofol の交換速度がかなり遅くなっていることを示している。

これらの結果から、DDT の場合は、その酸性の benzylic プロトンがリン脂質の負に荷電したリン酸部と静電的相互作用をすることによって複合体を形成することが考えられるが、dicofol の場合は、これとまったく違う結合性を示す結果から、そのhydroxyl プロトンが結合性に関与していると推測されている。ただし、この研究がなされた1970年代初期の頃ではプロトン NMR (100MHz) の化学シフトの測定精度も低かったと思われるので、最近の進歩した高分解能 NMR 装置を利用して、もう一度この実験を見直してみたら何かまた面白い結果が得られるかもしれないと思う。

ところで、脂質層に入り込んだ DDT 分子は、リン脂質がびっしり詰まったパッキングを乱すことによって、膜面に並んでいるコリン頭部と膜タンパク質との間の相互作用に影響を与えるという見方を Gnidec と Chefurka がまた述べているが、この見解は、1-aniline-8-naphthalene sulfonate (ANS) を蛍光性プローブとして、DDT 処理によって生じる亜ミトコンドリア膜表面の変化を観測した彼らの実験結果を根拠としている²³⁾。負電荷をもった ANS はリン脂質の極性コリン頭部の領域で膜と結合するとみられており、この結合によって ANS の分子内回転が妨げられるとき、特定の波長条件で励起光が蛍光として放出される。彼らは、マウス肝ミトコンドリアから得られた亜ミトコンドリア粒子を用いての実験で、これに ANS を加えたときに、蛍光強度の増加がみられたことと、DDT の存在において、この ANS-膜複合体の蛍光強度はさらに増大されたことを観察している。また、DDT で処理されたミトコンドリア膜の ANS 結合能が DDT 未処理のものより高いことと、亜ミトコンドリア粒子から脂質を除去したものでは、このような DDT の効果はみられなかったのに対して、亜ミトコンドリア粒子から抽出分離した脂質を用いてできたリポソームを DDT 処理した場合は、ANS 蛍光増加が示されたことが認められている。これらの結果から、ミトコンドリア膜から脂質抽出後の膜タンパク質においては、DDT との相互作用はほとんどないと示唆されているが、彼らの未発表の実験結果でも、膜タンパク質は [¹⁴C]DDT との結合能をほとんど無視できる程度しか示さなかったとのことである。しかしながら、Suwalsky らが DDT とリン脂質二層膜との相互作用の可能性について、DDT とリン脂質との混合溶液から得られた配向薄膜と粉末を用いて、X線回折で観測した結果では、回折パターンは純 DDT とリン脂質との二成分混合物を示しただけで、新しい相の形成はみられず、相互作用は生じてないと考察されている。ただし、異なる条件のもとで、DDT がリン

脂質と結合する可能性も推測として残されている²⁵⁾。

リン脂質が ATPase の活性発現にとって必須であることは知られているところであるが、DDT 阻害作用を理解するうえで、脂質層の乱れだけが唯一のパラメータではないことを示唆する結果が Chefurka によって得られている²⁶⁾。この研究ではイェバエ胸筋から分離されたミトコンドリアが用いられているが、EDTA を含むショ糖液中で分離したミトコンドリアの ATPase 活性において、DDT に対する感受性の増大がみられ、とくに脱共役剤 DNP または valinomycin-NH₄⁺ 複合体で活性化された ATPase の場合、DDT による阻害が強く示されている。なお、過剰のリン脂質が加えられたときには、DDT 阻害の減少が観察されている。これらの結果は、EDTA 処理により ATPase にくっついていた内在性タンパク質阻害因子が外れたことに関連があるのではないかとみられており、この阻害因子と ATPase との会合が阻害部位への DDT の接近を妨害するかもしれないと示唆されている。ATPase 阻害因子は F₁ の触媒部位に作用すると考えられており、F₁ 部分と会合して不活性複合体を形成する。これからまた阻害因子が解離することによって ATPase が活性化されるが、阻害因子そのものはミトコンドリアの内膜側により強く結合しているため膜からは遊離しないようである。最近、このような ATPase 阻害因子をミトコンドリア内膜に結合する媒体として、ATPase-阻害因子複合体(不活性型)の安定化作用をもつ二つの因子、9K および 15K タンパク質の存在が明らかにされている²⁷⁾。ATPase 阻害因子と 9K タンパク質は親水性の高い塩基性タンパク質であるため、他の極性基とイオン対を形成してミトコンドリア内膜内に存在するものとみられている。これらは相同性の高いタンパク質で、ヘリックスを形成できるアミノ酸配列をもち、酸性リン脂質との相互作用下で α -ヘリックス構造を増加させることが知られている。このヘリックス内の規則性が、調節機能の発現に大きな関与をもつと考えられるならば、DDT とリン脂質との間で相互作用があるものとする、ATPase 活性阻害・調節因子におけるヘリックス形成にそれがどの程度影響するか、また、これらの機能発現にどのような阻害を与えるか、興味ある問題がいろいろと関連して出てくると思う。

さらにまた、DDT の作用はカルシウム調節機構と関係があるかもしれないという見方が早くからあったが、これは外的添加による Ca²⁺ が DDT の神経毒作用に拮抗するという知見によるものであった。Rashatwar と Matsumura は、DDT の Na/Ca 交換系に対する DDT の効果をザリガニの神経軸索鞘膜を用いて研究している

が²⁸⁾, Ca^{2+} 取り込みの DDT による阻害が ATP の存在において軽減されることから, DDT の作用部位は Na/Ca 交換系の ATP 利用部分と関係があるとみている. 軸索鞘膜による Ca^{2+} の取り込みと $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ プロテインキナーゼ-ホスファターゼ (Ca^{2+} -ATPase) がカルモデュリンによって刺激されることと, DDT がカルモデュリンと直接相互作用を示すことが認められている. $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ プロテインキナーゼ-ホスファターゼは Na イオンと Ca イオンの交換輸送を調節する役割をもっているが, DDT によってその酵素活性が阻害されることと, 過剰のカルモデュリンと多量の ATP の添加によってこの DDT 阻害が軽減されることが見いだされている.

以上のほか, 最近, 人工酵素の合成ということで注目を集め, DDT にとっても天然レセプターの存在可能性があるかもしれないという意味で関心を引いた研究成果が Gutte らによって発表されている^{29,30)}. 彼らは, DDT 分子の周囲にアミノ酸の側鎖をパックし, その最適立体配置から活性部位の分子構造を設計した. 次いで, この分子設計に基づいて, アミノ酸残基数 24 で 4 本鎖の逆平行 β 構造 (プリーツシート) をもったポリペプチドが合成されたが, このものは結晶性で, DDT との結合性を有していることが発見されている. DDT とタンパク質との結合性については, 過去にもワモンゴキブリのリボタンパク質との結合性について報告がいくつかあるが, [^{14}C]DDT を用いての実験で, Helling らはタバコスズメガ *Manduca sexta* 幼虫の血リンパ中のリボタンパク質を含むと思われる高分子量画分に DDT が結合していることを示す結果を得ている³¹⁾. また, Chang と Plapp はイエバエ頭部の神経膜において, [^{14}C]DDT に対して高親和性結合をもつ部位があることと, その結合の飽和性と負の温度相関性および Ca^{2+} の添加による [^{14}C]DDT 結合の抑制などを示す結果から, DDT に対してイエバエ脳膜におけるレセプターの存在を示唆している³²⁾. 最近, Elia と Gardner は [^{14}C]DDT を注射したワモンゴキブリから 1 時間後に分離した腹部神経索について, [^{14}C]DDT の局在性を調べた結果を発表しているが³³⁾, これによると, [^{14}C]DDT は原形質膜画分に最も多く含まれていることと, ミトコンドリア画分ではこれよりかなり少なく, またミクロソーム画分ではさらに少ないことが認められている. なお, *in vitro* の実験では, 原形質膜とミトコンドリアとの間で [^{14}C]DDT の取り込みを示す放射性に差はなく, 非常に似たような親和性が示されている. しかしながら, *in vivo* での実験でミトコンドリアに到達した [^{14}C]DDT の量が毒性的阻害を起こすには, 文献上のミトコンドリア OS Mg^{2+} -ATPase の I_{50} 値

と比較してもかなり少なく不十分であるところから, DDT の作用部位として考えられる場所は, ゴキブリの腹部神経索に関する限り, ミトコンドリア OS Mg^{2+} -ATPase ではないという見解が示されている.

殺ダニ剤の作用機構という本題からいささか内容が脱線したが, 殺ダニ性も殺虫性もその作用機構において, どこかで共通部分があり, それを知ることが殺ダニ作用の選択的特異性をつかむ道でもあると思ったので, dicofol との構造的類似性をもつ DDT について, とくにその作用部位に関連する問題に多く触れた. 今後の殺ダニ剤作用機構の研究にとって, そのアプローチの仕方を考えるうえで何か参考になればと思う. とくに最近, 生体膜とともにレセプターに関連する問題が重要になってきているが, 脂質と膜タンパク質を構成成分とする生体膜中で起こる種々の分子間相互作用は, 水の構造を媒介として考えなければならないので³⁴⁾, 自然に近い状態での解析が可能で, 精度の高い方法の開発が待たれるところである (生体を生かしたまま, その代謝と生理状態を研究する NMR の開発は, すでに一部の昆虫で試みられている³⁵⁾).

cAMP の増加と殺ダニ活性

神経系が多くの殺虫剤にとって, 重要な作用部位であることは知られているが, 殺ダニ剤に関しては, 神経系に存在する生体アミン類のうち, オクトパミンに対する作用阻害について, formamidine 類 (おもに, chlordimeform とその誘導体) の特異的な効果が注目されている³⁶⁻³⁹⁾. オクトパミンは, 昆虫における場合, 神経伝達物質, 神経ホルモンおよび神経修飾物質としての機能をもつとみられているが⁴⁰⁻⁴²⁾, オクトパミンがそのレセプターに結合すると, これと共役しているアデニル酸シクラーゼを活性化し, ATP から cAMP を合成する. この cAMP が細胞内のプロテインキナーゼの調節サブユニットと結合し, 活性型の触媒サブユニットを遊離することにより, 基質タンパク質 (たとえば, イオンチャンネルタンパク質) をリン酸化し, これに伴うコンホメーションの変化によって, 結果的には神経膜のイオン透過能とか細胞内酵素活性を調節するような作用発現を示す (Fig. 6). なお, オクトパミンレセプターは薬理学的性質の違うオクトパミン₁レセプターとオクトパミン₂レセプターに分類されており, 後者はさらにオクトパミン_{2A} とオクトパミン_{2B}レセプターにサブ分類されている.

Formamidine 系の chlordimeform とその同族体は, 生体内で, *N*-脱メチル体に変わることによって, オクトパミンレセプターに対して, オクトパミン作働性アゴニス

Fig. 6 Diagrammatic representation of the mechanism of octopaminergic neurotransmission.

ト (完全なアゴニストとしてではないが) として作用し、これを活性化して cAMP を増大させる効果を示す。この cAMP が過剰にふえることによって、cAMP 依存性プロテインキナーゼによる基質タンパク質のリン酸化と、そのホスホプロテインホスファターゼによる脱リン酸化との循環サイクルが制御バランスを失って変調し、正常な機能発現が阻害されるものと思われる。ゴキブリ伸筋において、cAMP の増加効果はオクトパミン₂ レセプターによって仲介されるとみられているが、cAMP の増大はシナプス後膜に存在するホスホジエステラーゼの阻害によってもまた起こる。この酵素はカルモデュリンによって Ca^{2+} 存在下に活性化され、cAMP のリン酸環を開裂して不活性型の 5'-AMP にするが、その阻害剤として 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) が知られている。Evans らはサバクトビバッタ *Scistocerca gregaria* 脛節伸筋におけるオクトパミンレセプターを介しての cAMP 増大効果を、chlordimeform (CDM) と demethyl-

chlordimeform (DCDM) について比較しているが、これらの単独処理の場合より IBMX の存在においていずれも効果の増強がみられることと、とくに CDM の *N*-脱メチル体である DCDM において、IBMX 存在下ではその応答ピークの立ち上がりが CDM より早く、その低下も遅いことを観察している⁴³⁾。また、Nathanson も *Manduca* 神経索の cAMP 含量に及ぼす DCDM の効果を IBMX 存在の場合と比較した実験で、IBMX による効果の増強を認めている⁴⁴⁾。 *N*-Substituted phenyl-*N*, *N*-dimethylformamides のナミハダニに対する殺ダニ活性と、それらに対応する *N*-monomethylformamides (*N*-脱メチル体) のオクトパミン感受性アデニル酸シクラーゼ活性化能力(ホタル尾部の cAMP の濃度変化で測定)との関係を比較してみた場合、*N*, *N*-dimethyl 体のうちでも殺ダニ活性の高い化合物は、それに対応する *N*-monomethyl 体においても cAMP 増大効果の高い特徴を示している³⁶⁾ (Table 5)。また、amitraz を含む一連の form-

Table 5 Lethality of *N'*-substituted phenyl-*N*, *N*-dimethylformamides to two-spotted spider mites^{a)} and capacity of corresponding *N*-monomethylformamides to stimulate the octopamine-dependent adenylyl cyclase of the adult firefly tail.^{b)}

$X_{1-2}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{CH}-\text{N}-\begin{matrix} \text{R} \\ \text{R}' \end{matrix}$				
Ring substitution	Mites LC ₅₀ (ppm)		Firefly tail (pmol cAMP/mg protein/min (±S.D.))	
	R	R'	R	R'
X	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
Basal activity	—	—	3.2± 1.7	—
DL-Octopamine	—	—	21.1±13.9	—
2-NO ₂ , 4-Cl	>500	—	3.8± 1.7	—
4-CH ₃	>500	—	4.5± 0.8	—
3,4-DiCl	>500	—	4.5± 1.1	—
2-Cl	>500	—	4.8± 0.5	—
2-CH ₃	>500	—	5.0± 1.5	—
2-CH ₃ , 5-Cl	>500	—	5.1± 1.5	—
4-Cl	400-500	—	5.4± 1.4	—
2,4-DiCl	14	—	11.8± 2.4	—
2,4-DiCH ₃	110	—	14.5± 4.1	—
2-CH ₃ , 4-Cl	19	—	21.4± 5.5	—
2-CH ₃ , 4-Br	42	—	24.3± 6.8	—

^{a)} From Hollingworth & Lund (1982). ^{b)} From Chang & Knowles (1977).

Table 6 Effects of formamides on octopamine receptors in the locust and their toxicity to two-spotted spider mites.

	Locust ^{a)} (Increase in cyclic AMP level)	Mites ^{b)} (LC ₅₀ (ppm))
DL-Octopamine	100	—
Chlordimeform (CDM)	6.3± 1.6	19
Demethylchlordimeform (DCDM)	52.8±30.6	12
UK 16353	70.1±42.3	72
Amitraz	16.3± 7.4	36

^{a)} From Davenport *et al.* (1985). ^{b)} From Chang & Knowles (1977).

amidine 誘導体について、バッタの脛節伸筋を用いてオクトパミンレセプターに対する作用効果を生化学的および生理学的観点から研究した Evans グループの Davenport らによる報告においても、脱メチル体 DCDM のほうが, chlordimeform および amitraz よりも cAMP 増大効果の高い結果が示されている⁴³⁾ (Table 6). これらの化合物のナミハダニに対する殺ダニ活性 IC₅₀ 値を, formamide 系 104 検体の化合物について調べた Chang と Knowles の実験データ⁴⁵⁾から拾って, 比較参考値として Table 6 に一緒に示した. Formamide 類に対するオクトパミンレセプターの感受性は, 生物種によって違い, 生体内の存在場所によっても違うと考えられる. なお, 生体組織中におけるオクトパミンの分布が生物種によって違うことは知られており, タコ (Octopus) の後だ液腺にはとくに多く, ゴキブリでは脳と腹・胸部神経索に多く分布していることが認められているが⁴⁶⁾, ハダニ類におけるオクトパミンの分布についてはまだ明らかではない. しかしながら, 上記の formamide 系化合物は殺ダニ性のほか, 殺虫性も有しており, 上記の作用機構において両者間に基本的な共通性はあるものと思われる.

オクトパミン類似構造を有する phenylethylamine 誘導体について、バッタ飛しょう筋ホモジネートにおけるアデニル酸シクラーゼ活性に対する効果を Lafon-Cazal と Bockaert が報告しているが⁴⁷⁾、オクトパミンの *N*-monomethyl 体である シネプリンは同様な効果を示したけれど、環 OH 基が *m*-位に付いたフェニレフリン、および *m*-位と *p*-位の両方に付いたカテコールアミン類 (ノルアドレナリンとドーパミン) の場合は、ほとんど活性増大効果を示さなかったことが観察されている。また、この実験では、チラミンが中程度の効果ではあるが、この酵素を活性化させる能力を示している。生体内アミンの生合成経路の一つとして、チロシンからチラミンを経てオクトパミン生成の経路があるが、これらの phenylethylamines は生体内でモノアミン酸化酵素 (MAO) によって酸化的に脱アミノ化を受けることが知られている。哺乳動物 MAO の場合は、formamidines による活性阻害が認められているが、昆虫とダニ類においては、MAO は formamidines の第1次作用ターゲットではないと Hollingworth と Lund によってみられている³⁶⁾。

Formamidines が合成 pyrethroids に対して synergistic 効果のあることが、Plapp によってタバコガを用いての実験で認められているが^{48, 49)}、chlordimeform に deltamethrin が加えられたとき、これらで処理したワモンゴキブリ虫体内において、二つの生体アミン、チラミンとオクトパミンの蓄積量が deltamethrin 単独処理の場合よりも著しく増加したことから、殺虫効果においても、それぞれ単独処理の場合より非常に高い synergistic 効果を示したことが、Chang ら (北京大学) によって最近発表されている⁵⁰⁾。この研究において、彼らはまた、ワモンゴキブリを用いて組織中の MAO 活性を測定しているが、組織全般に MAO が存在していることと、とくにマルピーギ管と筋組織に多く見いだされたことを観察しているほか、chlordimeform 処理後の MAO 残存活性がかなり低下していることを認めている。チラミンとオクトパミンの蓄積は、deltamethrin 単独処理の場合でも増加がみられているが、通常は、MAO の作用で *p*-hydroxymandelic acid に代謝されて無毒となるところを、chlordimeform の MAO 阻害によって、これらアミンの蓄積増大がもたらされたという見方を彼らは述べている。また、chlordimeform と DDT との併用処理においても、同様な synergistic 効果が観察されている⁵¹⁾。Fig. 7 において以上の結果を簡単に図示した。これらの研究の発端は、DDT 中毒ワモンゴキブリの血リンパ中に生じる neurotoxin の研究において、Chang らが HPLC を用いて、これがチラミンであると同定できたことに始まるよ

Fig. 7 Enhanced increase of tyramine and octopamine by the induction of tyrosine decarboxylase with DDT or deltamethrin treatment, and by the synergistic action of chlordimeform.

うである⁵²⁾。DDT 中毒後の昆虫の神経索から血リンパ中に放出されるある種の毒性物質は neurotoxin として知られているが、Sternburg らの研究によって、これは芳香族アミンカエステルであるとして 20 年前に仮同定されていたものである。Chang らは [³H]チロシンを用いた実験で、チロシンからチラミンを生成するチロシン脱炭酸酵素の活性増大が DDT または deltamethrin 処理の場合にみられることと、DDT 処理後に cAMP の増加する傾向があることを報告している⁵³⁾。この cAMP の増加はチラミンが β-ヒドロキシラーゼの作用を受けてオクトパミンになるためと考えられている。彼らの研究結果を総括した報告が、第3回日中農薬学術シンポジウム (北京, 1986) において、北京大学生物系張 宗炳教授によって発表⁵⁴⁾されたことを記しておきたい。なお、この作用機序で考えた場合、DDT との関連で dicofol の場合はどう考えられるか張教授に質問してみたが、dicofol についての実験例はないが、おそらく DDT のようなチロシン脱炭酸酵素の誘導作用はないと思われるという見解であった。

GABA レセプター系に対する作用

γ -アミノ酪酸 (GABA) は神経系の抑制性伝達物質であることが知られているが、GABA レセプター系に関して、ハダニ類を用いての生化学的同定が報告された例はまだないようである。これまで、哺乳動物の GABA レセプターに関しては、生化学的・薬理学的研究による多くの知見が得られており、さらに活発な研究が各国において進められている。最近、昆虫に関しても、殺虫剤のターゲットとして GABA の周辺が注目されるようになり^{55,56)}、昆虫 GABA レセプターに対する各種殺虫剤の作用効果について、研究発表も多くなってきている。本学会誌上でも、一昨年、GABA 支配の神経シナプスを標的とする殺虫剤の作用機構を中心とした解説が田中によって詳述されている⁵⁷⁾。

殺ダニ活性の高いこととともに、抗寄生虫（とくに線虫類）および殺虫活性も強いことで知られているマクロライド抗生物質 avermectins の主成分の一つである avermectin B_{1a} (AVM) について、GABA レセプターおよびその機能的共役系である benzodiazepine レセプターとか Cl⁻ チャンネルなどに対する特異的作用性がいろいろと研究されている。Fritz らは、AVM の低濃度処理で、寄生性線虫がすぐ動かなくなった事実から、その駆虫活性が線虫の神経系に対する効果によるものと考え、薬理学的に異なるシナプス系での AVM の効果をみようとして、ザリガニ脚筋の神経筋接合部に対する効果を観察している⁵⁸⁾。この結果、抑制性シナプス後電位 inhibitory postsynaptic potential (IPSP) の不可逆的の消失が起きたことと、筋膜抵抗の減少によって考えられる興奮性シナプス後電位 excitatory postsynaptic potential (EPSP) の振幅減少の生じたことが認められたが、この膜抵抗の変化は Cl⁻ コンダクタンスの増大の結果で、抑制性シナプスの GABA レセプターに連動した Cl⁻ チャンネルの開閉したことが原因として考えられた。なお、この AVM の効果は GABA アンタゴニストとして知られる picrotoxin によって拮抗されることから、AVM はシナプス GABA 系に作用することが示唆されているが、Cl⁻ チャンネルに直接作用するかもしれないという推測もされている。この研究に続いて、Fritz との共同研究の形で、Pong と Wang らがラット脳膜の GABA 神経に対する AVM の作用について一連の研究を始めているが^{59,60)}、彼らは作用機構として、AVM がシナプス後 GABA レセプター・Cl⁻ チャンネル複合体に特異的に結合することにより、AVM の刺激による高親和性レセプターへの GABA 結合性の増大とシナプス前終末からの GABA 放

出が起こり、これらの効果が組み合わさった結果、シナプス後膜の GABA 支配 Cl⁻ チャンネルのかなりの部分が開口し、Cl⁻ の流れが増加することによって、膜抵抗が減少すると考察している⁶¹⁾。Pong らはさらに、benzodiazepine レセプターもこの複合体の一部とみているけれど、AVM, GABA, benzodiazepines およびその他のリガンド (pentobarbital, tracazolate および picrotoxin) の認識部位は互いに異なった位置でアロステリックに共役しているとみられることと、AVM の結合部位は部分的には、picrotoxin などのリガンドの結合部位と重なり合っているかもしれないという結果を報告している⁶²⁾。現在、生化学的には、GABA レセプター、benzodiazepine レセプターおよび barbiturates レセプターとの間に、密接な機能的相互関係のあることが知られており、哺乳動物脳から GABA レセプター・benzodiazepine レセプター・Cl⁻ チャンネル複合体が単離されている^{63,64)} (Fig. 8)。

そこで、昆虫においても、AVM 作用の標的が GABA レセプターであるかどうか確かめるため、Abalis と El-defrawi がミツバチの脳膜レセプターに対する [³H]muscimol の特異的結合性と AVM との相互作用を研究しているが⁶⁵⁾、AVM は非常に低濃度で muscimol の高親和性結合を強く阻害することを認めている。この GABA アゴニストとして知られる muscimol は、ペニテングダケから見いだされたもので、GABA との類似構造をもち、GABA レセプターに対する親和性が GABA よりも

Fig. 8 A model of the GABA receptor complex.

Fig. 9 GABA_A receptor agonists.

高く、GABA レセプターの同定に、その ^3H 標識化合物がよく用いられる (Fig. 9)。ミツバチと哺乳動物とでは、GABA レセプターの感受性において、いくつかの相違点が認められているが、哺乳動物脳 GABA レセプターは神経生理学的・薬理的性質の違う GABA_A レセプターと GABA_B レセプターに分類されている。 GABA_A レセプターはおもにシナプス後膜に存在し、GABA や muscimol などによって活性化され、bicuculline (phthalide isoquinoline alkaloid) とか picrotoxinin (植物毒素 picrotoxin の毒性成分; PTX) などによって阻害を受ける。 GABA_B レセプターは非 GABA 作働性ニューロン上で前シナプス性をもって存在しているとみられており、アゴニスト baclofen (GABA の β -(*p*-chlorophenyl)誘導体) によって活性化されるが、bicuculline には非感受性である。また、 GABA_B レセプターへの GABA の結合は Ca^{2+} 依存性で、 K^+ チャンネルにおそらく共役していると考えられている。なお、 GABA_A レセプターは Cl^- チャンネルと共役しているが、 GABA_B レセプターはこれとの関連はないとされている。Abalis と Eldefrawi の研究では⁶⁵⁾、bicuculline は哺乳動物 (マウス、ラット) 脳膜 GABA_A レセプターへの $[\text{^3H}]\text{muscimol}$ の高親和性結合を阻害したけれど、ミツバチ脳膜の場合には、それを阻害しなかったことが認められている。しかし、baclofen が哺乳動物脳膜とミツバチ脳膜のいずれにおいても $[\text{^3H}]\text{muscimol}$ 結合を阻害しなかったことと、その他のアゴニストの結果から、ミツバチ脳膜レセプターは GABA_B タイプとしてよりも GABA_A タイプとしてむしろ考えられている。一方、AVM の場合は、ラット脳とミツバチ脳の両方において、 $[\text{^3H}]\text{muscimol}$ 結合を阻害したが、ミツバチ脳におけるその高親和性結合に対する阻害効果はラット脳における場合よりもはるかに強力である。さらに、AVM は GABA_A レセプターへの $[\text{^3H}]\text{flunitrazepam}$ の結合を増強することが彼らによって見いだされて⁶⁶⁾、このような benzodiazepine 結合の増強効果が GABA によっても同様に示されているところから⁶⁷⁾、ミツバチ脳膜の $[\text{^3H}]\text{muscimol}$ 結合部位に AVM が結合するとき、AVM はおそらくアゴニストとして作用するとみられている。彼らはまた、AVM はラット脳膜 GABA_A レセプターのチャンネル部位への $[\text{^3S}]\text{t-butylbicyclopheosphorothionate}$ ($[\text{^3S}]\text{TBPS}$) の結合を阻害することを認めている⁶⁸⁾。この TBPS は哺乳動物には毒性が高いが、殺虫活性は低いので、このリガンドに対する昆虫の GABA レセプターの親和性は低いとみられている。ラット脳膜への $[\text{^3S}]\text{TBPS}$ の特異的結合は PTX によっても阻害を受けるほか、 γ -BHC および cy-

clodienes 殺虫剤などによって阻害を受けることが、Lawrence と Casida、および Eldefrawi らによって見いだされている^{68,69)}。一方、Cohen と Casida は、イエバエ腹・胸部から分離した膜の $[\text{^3S}]\text{TBPS}$ 結合部位について、GABA 作働性薬と殺虫剤の作用効果を研究しているが⁷⁰⁾、その TBPS に対する親和性は哺乳動物脳膜の場合に比べて低いことと、PTX による阻害効果もかなり弱いことを観察しており、PTX と TBPS は哺乳動物脳膜では同じ部位に結合するが、イエバエ膜では互いに異なる部位に結合するとみている。ハダニ類の GABA 系についても、そのレセプターに対するこれらリガンドの結合性と殺ダニ剤によるその阻害効果の有無が調べられるならば、少なくとも、殺ダニ剤としての AVM の特異的作用効果について、作用機構に関連する何らかの知見がまた得られるかもしれない。

このほか、ワモンゴキブリの脚筋と中枢神経系に対する AVM の作用について、Tanaka と Matsumura による研究が発表されているが⁷¹⁾、脚筋細胞の $^{36}\text{Cl}^-$ 取り込みに関して、AVM の刺激によって $^{36}\text{Cl}^-$ 流入量の増大が見いだされている。また、ゴキブリの中枢神経索を用いた電気生理学的実験で、 γ -BHC によって誘起された神経興奮が AVM の灌流後 15~20 分以内で消去されたことから、 γ -BHC の第1次作用部位は PTX レセプターを含むとみられている。これとともに、 $[\text{^3H}]\text{muscimol}$ 、 $[\text{^3H}]\text{benzodiazepam}$ および $[\text{^3H}]\text{dihydropicrotoxinin}$ などのリガンドに対するゴキブリ脳膜と筋膜の結合性が AVM の存在下とその無添加の場合について観測されているが、いずれも有意な差を示さず、AVM の作用は、この昆虫種の場合、これらリガンドが特異的に結合するそれぞれのレセプター、すなわち GABA レセプター、benzodiazepine レセプターおよび PTX レセプターを介してでなく、 Cl^- チャンネルに直接働くものであることが見いだされている。続いて、Ozoe と Matsumura は benzodiazepine 誘導体の一つである chlorodiazepoxide が chlordimeform と類似構造をもっていることに着目し、リガンドとして $[\text{^3H}]\text{diazepam}$ を用い、ワモンゴキブリ脳へのその特異的結合性に関して、1,4-benzodiazepine 類と chlordimeform (CDM) 関連化合物による阻害度を測定するとともに、チャバネゴキブリに対するこれらの化合物の殺虫活性との比較を行なっている⁷²⁾。これによると、CDM とその誘導体のあるものは、ワモンゴキブリ脳における diazepam 結合部位と相互作用することと、CDM タイプの構造をもつ benzodiazepine 類縁体が同様な阻害効果とともに、かなり殺虫活性もあることが観察されており、これらの効果の間に相関のあることが示唆

されている。

GABA レセプターに対する作用効果が、膜脂質を乱すことによって、GABA レセプター複合体の脂質タンパク質の微小環境に影響を与えるためではないかとみられている例が、エタノールによる GABA レセプター刺激効果に関する Paul グループの研究で発表されている^{73,74)}。この研究では、ラット大脳皮質シナプトニューロゾームが用いられているが、GABA-共役 Cl⁻ チャンネルを介しての ³⁶Cl⁻ 取り込みに対するエタノールの刺激効果が見いだされている。また、この作用に対して特異的に拮抗するアンタゴニストとして imidazobenzodiazepine 化合物 Ro 15-4513 が見いだされている。なお、GABA_A レセプター結合の活性調節に関与する内在性因子が脳シナプス膜内に存在することが知られているが、phosphatidyl ethanolamine のようなリン脂質もその一つで、これらのリン脂質による GABA_A レセプター結合活性調節について、phospholipase C による GABA_A 結合性の活性化との関連などが研究されている。薬剤の作用機構に関連して、レセプターの結合活性阻害にリン脂質の存在がどのような関与を示すのか、レセプター周囲の問題もまた関心のもたれるところである。

キチン合成阻害

キチン合成阻害作用をもち、高い殺ダニ活性を示す化合物として、*Streptomyces tendae* から分離されたスクレオシド-ペプチド性抗生物質 nikkomycin が知られている。この抗生物質は殺ダニ剤として圃場試験がされたことがあるが⁷⁵⁾、現在のところ実用化はされていない。その化学構造は、キチン合成の前駆体基質である UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) と類似している部分があり、polyoxins とも近縁のグループに属する。ナミハダニについて、nikkomycin 処理後のキチン質構造の変化を電顕観察した結果が Mothes と Seitz によって発表されており、キチン質微細繊維の配列の乱れが認められている⁷⁶⁾。この観察結果から、その作用機構として、キチン合成酵素 (CS) の活性部位への基質 UDP-GlcNAc の結合が nikkomycin の競合的阻害作用を受けることによって、表皮形成が阻害されることが示唆されている。Cohen と Casida はコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* の餌食膜を形成する腸組織から得られた系の CS 活性について、polyoxin D および数種の化合物とともに nikkomycin の阻害効果を調べているが、これらのうち nikkomycin が最も高い阻害活性を示したことを認めている⁷⁷⁾ (Fig. 10)。

このほか、キチン形成阻害効果を示す化合物としては、

Fig. 10 Inhibition of chitin synthetase.

diflubenzuron (INSECTICIDE)

flufenoxuron (ACARICIDE/INSECTICIDE)

Fig. 11 Benzoylurea compounds.

diflubenzuron (DFB) で代表される benzoylurea 系殺虫剤があげられるが、この系列の殺虫剤で有効な殺ダニ性を示すものはこれまで見いだされていなかった。しかし、この系列でも、殺虫性のほかに、殺ダニ活性も高い化合物として、flufenoxuron のような化合物が最近発表されている⁷⁸⁾ (Fig. 11)。DFB で処理された昆虫は、次の脱皮サイクル中に非常に弱化した表皮を形成するが、表皮中のキチン含量の減少がみられたほか、処理虫において多くの場合、UDP-GlcNAc の蓄積を生じたことから、DFB の作用機構は CS 阻害であるという説が最も広く支持されてきた。Leighton らは DFB がキモトリプシン様プロテアーゼ活性を阻害する効果があることと、いくつかのキモトリプシン阻害剤がキチン合成を妨害するこ

とから、CSの不活性前駆体 (zymogen) を限定分解 (限定的ペプチド結合開裂) するある種のプロテアーゼがDFBによって阻害を受けることによって、不活性前駆体から活性型への変換が妨害されるという見方を示している⁷⁹⁾。しかしながら、昆虫CSが実際に不活性前駆体として存在するという証拠がないことから、上記の仮説に批判もあった。代わって、Cohen と Casida が出している考え方は、キチン重合部位か、あるいはその近くに、CS 活性調節機能をもつ何らかの制御機構が *in vivo* においては存在し、DFBによってこれが阻害を受けるというものである⁷⁷⁾。これに対し、無細胞系では、ある種の未確認感受性調節因子がCSの抽出に際して失われるため、DFBが存在していてもキチン重合は進行できるという見方が取られている⁸⁰⁾。これについてCohenは、DFBは *in vivo* ではキチン合成をブロックするが、無細胞系では、この重合酵素に対して直接には作用を示さないことと、さらにまた、キチン結晶化と微細繊維形成が *in vitro* でも進んだことを認めている⁸¹⁾。

昆虫の脱皮サイクルにおけるキチン分解と合成の調節機構はまだ十分明らかでないが、脱皮ホルモンの関与が知られている。DFBは幼虫における β -ecdysone量を増加させ、キチン分解酵素の活性を増強させることによって、新しい表皮中のキチン堆積を妨害するという仮説が当初立てられたことがあるが、その後の実験結果からこの説は捨てられている。昆虫のキチン分解酵素は2種類あり、キチンを水溶性オリゴマーへ分解するエンド型酵素と、さらにこれをGlcNAcに分解するエキソ型酵素に分類されているが、これらの二つの酵素はキチン分解過程において、同時に、そして協奏的に作用するとみられている。なお、脱皮の際におけるキチン分解酵素の活性発現は、脱皮ホルモンによって誘導されることが知られている。キチン分解酵素の活性化機構として、まずその不活性前駆体が真皮細胞中で合成されたのち、それが脱皮液および内原表皮に分泌、輸送され、さらにプロテアーゼによって活性化されるということが考えられているが、これらの過程において、脱皮ホルモンの関与する何らかの調節機構の存在が推測されている⁸²⁾。古い表皮中でキチン含量の多い内原表皮からキチン分解が始まるが、これと並行して、真皮細胞においてキチン合成が起こり、新しい表皮の形成が進行する。このような表皮構成物質の再循環と関連して、キチン分解と合成という相反する反応が互いに障害なく進行するためには、これらの反応に関与する両酵素の活性発現を調節する何らかの制御機構が、やはり脱皮ホルモンとも関連して存在する

ものと思われる。真皮細胞において、CSは細胞膜に結び付いているが、この酵素による触媒反応は細胞膜にきわめて近い所で起こり、重合キチンは細胞膜の外に堆積する。一方、脱皮ホルモンの活性物質エクジステロイドは細胞膜を通して細胞質内に入り、特異的レセプタータンパク質と結合して、複合体を形成し、それが核に入ってクロマチンの特定部位に結合し、特定遺伝子の活性発現を調節する。ところで、CSは不活性前駆体として真皮細胞の小胞体で生産され、キトソームと呼ばれる小胞で細胞膜に運ばれたのち、プロテアーゼによって活性化されるという見方がある⁸³⁾。これに対し、RetnakaranはDFBの作用機構に関連して、次の考え方を示している⁸⁴⁾。真皮細胞において、最初に、UDP-GlcNAcから可溶性オリゴ糖が生成され、次いでドリコールリン酸のようなポリプレノール脂質と結合した形で細胞外に輸送されたのち、第2ステップでこれらのオリゴ糖が特異的レセプタータンパク質と結合し、キャリアー脂質であるドリコール部分を離して、連鎖重合することによりキチン微細繊維を形成するというもので、このキチン合成過程の第2ステップがDFBによって阻害されるという見方が取られている。Horstはまた、豊年エビ幼虫のミクロソームとUDP-[³H]GlcNAcとのインキュベーションの結果、脂質の結合した中間体として、オリゴ糖-脂質の生成を認めるとともに、その合成がnikkomycinなどによって阻害を受けることを報告している⁸⁵⁾。MauchampとCaminadeは、DFB処理後の昆虫表皮構造の変化と細胞内の小胞についての電顕観察から、キチン合成にはいくつかのステップが関与することと、CSの不活性前駆体としてzymogenの存在がありうるということを示唆している⁸⁶⁾。最近、Mothes-Wagnerはナミハダニに対するnikkomycinsとpolyoxin Dの効果について、脱皮前後の時期における表皮形成および卵期における卵殻形成と卵黄形成などに及ぼす組織病理学的変化を電顕観察しているが、超微細構造の組織像からこれらキチン合成阻害剤の作用機構の差異が認められている⁸⁷⁾。なお、満井はヨトウガ幼虫の中腸を用いての実験で、中腸上皮細胞表面の微絨毛膜を通してのUDC-GlcNAcの輸送が、DFBによって阻害を受けることを観測し、この膜透過阻害がDFBの作用機作として考えられると発表している^{88,89)}。以上のように、キチン合成阻害機構についてはさらに解明を待たなければならない問題が多いと思われるが、殺ダニ作用機構の面からみた場合、DFBとflufenoxuronの両者における殺ダニ効力の差を考えると、同じbenzoylurea系でも殺ダニ性発揮のためには、何か別のファクターが必要であると思われる。

Thiazolidone 系殺ダニ剤 hexythiazox の作用特性の研究⁹⁰⁾に関連して、山田らは hexythiazox の高濃度 (125 ppm) で第2若虫期に処理され、第3静止期に入ったナミハダニ (成虫に脱皮することなく死亡する) について内部形態、とくに表皮の電顕観察を行なっている^{91,92)}。その電顕写真では、アポリシス (キチン分解に伴い古い内原表皮が真皮細胞から剝離することをいう) と新表皮の形成がみられているが、新表皮の下側に電子密度の高い物質の沈着、あるいは新表皮と真皮細胞の間に球状または不定形の小胞が認められており、無処理個体との相違点として観察されている。これらの影響が hexythiazox の直接的な作用によるのか、あるいは二次的効果であるのかということについては、さらに今後の検討を待たなければならない。

殺ダニ剤処理を受けたナミハダニが脱水症状を示すものと示さないものがあることを殺ダニ剤の選択的作用のところで述べたが、水分保持の保護的機能をもつ外表皮に多い脂質成分は真皮細胞とエノサイトで合成されるといわれているので、この合成阻害が薬剤による中毒過程で起こるのか、致死後の機能停止で起こるのかによって、脱水症状発現の仕方もまた変わってくると思われる。この脂質合成阻害がたとえ二次的効果であるとしても、脱水症状との関係を説明できる検討がほしいところである。逆に、脱水症状を起こさず死亡した場合についても同様である。

おわりに

以上、殺ダニ剤の選択的作用特性および関連すると思われる作用機構の主なものについて解説を試みた。マクロテトラロイド系抗生物質の殺ダニ剤 tetranactin のイオンキャリアーとしての作用と膜透過の問題およびピレスロイドの殺ダニ性、とくにハダニの呼吸に与える影響との関係などについて触れておきたかったが割愛した。最近の傾向として、薬剤の作用機構については、標的レセプターとの相互作用が重視されてきているが、生体膜における調節機構、あるいは機能性酵素タンパク質と脂質との関係などまだまだ解明が望まれるところが多いと思われる。残念ながら、殺ダニ剤に関する作用機構の研究はこれまで非常に少ないこともあって、満足な解説ができなかったことをお詫びする。なお、本稿の執筆は、筆者が昨年(1986)の日本農芸化学会昭和61年度大会(京都)のシンポジウム“ダニの生理活性物質”で講演⁹³⁾したものと、第3回日中農薬学術交流シンポジウム(北京)で講演⁹⁴⁾した内容を骨子として、できるだけ最近発表された研究成果を折り込んで補足したものである。最後に、本稿中

の各種薬剤によるナミハダニおよびイエバエの中毒症状に関する実験観察は、当社小田原研究所生物研究所山田富夫・高橋英光・北川幸夫らの研究者による協力を得たものであることを記して、感謝の意を表したい。

引用文献

- 1) 石井敬一郎: ダニ類—その分類・生態・防除—, 佐々 学編, 東大出版会, pp. 421-463, 1965
- 2) M. Ando: *Jpn. Plant Prot. Assoc.* **34**, 14 (1978)
- 3) 野村健一・斎藤哲夫: ダニ学の進歩, 一その医学, 獣医学, 生物学にわたる展望, 佐々 学・青木淳一編, 図鑑の北隆館, pp. 311-326, 1977
- 4) 真梶徳純: 植物防疫 **24**, 455 (1970)
- 5) 田畑勝洋・斎藤哲夫: 防虫科学 **36**, 169 (1971)
- 6) 河野 哲・斎藤哲夫・宮田 正: 応動昆 **25**, 101 (1981)
- 7) 浅田三津男: 農薬誌 **3**, 61 (1978)
- 8) 桑原雅彦: 植物防疫 **38**, 321 (1984)
- 9) L. K. Cutkomp, R. B. Koch & D. Desaiiah: “Insecticide Mode of Action,” ed. by J. R. Coats, Academic Press, New York, pp. 45-69, 1982
- 10) L. K. Cutkomp, D. Desaiiah & R. B. Koch: *Life Sci.* **11**, 1123 (1972)
- 11) L. K. Cutkomp: U. S. NTIS, PB Rep., No. 234404 (1974)
- 12) D. Desaiiah, L. K. Cutkomp, R. B. Koch & H. H. Yap: *Life Sci.* **11**, 389 (1972)
- 13) L. K. Cutkomp, Bh. Sabramanyam & E. Y. Cheng: *Indian J. Comp. Anim. Physiol.* **2**, 37 (1984)
- 14) E. Y. Cheng & L. K. Cutkomp: *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**, 360 (1977)
- 15) D. Desaiiah, L. K. Cutkomp & R. B. Koch: *Life Sci.* **13**, 1693 (1973)
- 16) M. A. Carbonaro, D. E. Moreland, V. E. Edge, N. Motoyama, G. C. Rock & W. C. Dauterman: *J. Econ. Entomol.* **79**, 576 (1986)
- 17) C. C. Dary & L. K. Cutkomp: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1**, 267 (1984)
- 18) C. C. Dary & L. K. Cutkomp: *Pestic. Sci.* **15**, 443 (1984)
- 19) 寺田 弘・篠原康雄: 農薬誌 **11**, 641 (1986)
- 20) T. N. Patil & R. B. Koch: *Pestic. Biochem. Physiol.* **12**, 205 (1979)
- 21) C. C. Dary, S. C. Buessow, H. Wenzler & L. K. Cutkomp: *Pestic. Sci.* **16**, 605 (1985)
- 22) E. P. P. Gnidec & W. Chefurka: *Pestic. Biochem. Physiol.* **24**, 1 (1985)
- 23) R. Haque, I. J. Tinsley & D. Schmedding: *Mol. Pharmacol.* **9**, 17 (1973)
- 24) R. Haque & I. J. Tinsley: “Mass Spectrometry and NMR Spectroscopy in Pesticide Chemistry,” ed. by R. Haque & F. J. Biros, Plenum Press, New York, pp. 239-261, 1974
- 25) M. Suwalsky, N. Bugueno, J. Tapia & F. Neira:

- Z. Naturforsch.* **40C**, 556 (1985)
- 26) W. Chefurka: *Comp. Biochem. Physiol.* **74C**, 259 (1983)
 - 27) 橋本忠雄・吉田征夫・田川邦夫: 蛋白質 核酸 酵素 **29**, 610 (1984)
 - 28) S. S. Rashatwar & F. Matsumura: *Pestic. Biochem. Physiol.* **26**, 90 (1986)
 - 29) R. Moser, R. M. Thomas & B. Gutte: *FEBS Lett.* **157**, 247 (1983)
 - 30) B. Gutte, R. Moser, S. Klauser & M. Weilenmann: "Dynamics of Biochemical Systems," ed. by J. Ricard & A. Cornish-Bowden, Plenum Press, New York, pp. 259-272, 1984
 - 31) D. J. Helling, C. Brownie & F. E. Guthrie: *Pestic. Biochem. Physiol.* **25**, 125 (1986)
 - 32) C. P. Chang & F. W. Plapp, Jr.: *Pestic. Biochem. Physiol.* **20**, 76 (1983)
 - 33) A. J. Elia & D. R. Gardner: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **4**, 205 (1987)
 - 34) 美宅成樹: パリティ **2**, 26 (1987)
 - 35) 朝倉哲郎: 高分子 **36**, 221 (1987)
 - 36) R. M. Hollingworth & A. E. Lund: "Insecticide Mode of Action," ed. by J. R. Coats, Academic Press, New York, pp. 189-227, 1982
 - 37) P. D. Evans: "Approaches to New Leads for Insecticides," ed. by H. C. von Keyserlingk, A. Jäger & Ch. von Szczepanski, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 117-131, 1985
 - 38) 清水利昭・深見順一: 化学と生物 **22**, 850 (1984)
 - 39) T. Shimizu, J. Fukami & R. J. Robbins: *Int. Pest Control* **28**, 12 (1986)
 - 40) P. D. Evans: "Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology," ed. by G. A. Kerkut & L. Gilbert, Pergamon Press, Oxford, pp. 499-503, 1985
 - 41) 日高 修: 植物防疫 **40**, 240 (1986)
 - 42) 酒井正樹: 化学と生物 **24**, 811 (1986)
 - 43) A. P. Davenport, D. B. Morton & P. D. Evans: *Pestic. Biochem. Physiol.* **24**, 45 (1985)
 - 44) J. A. Nathanson: "Membrane Receptors and Enzymes as Targets of Insecticidal Action," ed. by J. M. Clark & F. Matsumura, Plenum Press, New York, pp. 157-171, 1986
 - 45) K.-M. Chang & C. O. Knowles: *J. Agric. Food Chem.* **25**, 493 (1977)
 - 46) J. Axelrod & J. M. Saavedra: *Nature* **265**, 501 (1977)
 - 47) M. Lafon-Cazal & J. Bockaert: *Eur. J. Pharmacol.* **119**, 53 (1985)
 - 48) F. W. Plapp, Jr.: *J. Econ. Entomol.* **69**, 91 (1975)
 - 49) F. W. Plapp, Jr.: *J. Econ. Entomol.* **72**, 667 (1979)
 - 50) J. T. Chang, H. L. Tang & Y. S. Ni: "Insect Neurochemistry and Neurophysiology—1986," ed. by A. B. Bořkovec & D. B. Gelman, Humana Press, Clifton, pp. 409-413, 1986
 - 51) J. T. Chang, S. H. Wu, N. S. Chen & Y. H. Yao: *Acta Ent. Sinica* **27**, 165 (1984)
 - 52) J. T. Chang, S. H. Wu & H. L. Chin: *Acta Ent. Sinica* **27**, 15 (1984)
 - 53) Y. Luo, Y. S. Ni & J. T. Chang: *Acta Ent. Sinica* **28**, 241 (1985)
 - 54) J. T. Chang: Third China-Japan Symp. Pestic., Beijing, pp. 165-174, 1986
 - 55) 江藤守総: 化学と生物 **21**, 725 (1983)
 - 56) 深見順一: 農薬の生有機化学と分子設計, 江藤守総編, ソフトサイエンス社, pp. 225-248, 1985
 - 57) 田中啓司: 農薬誌 **10**, 555 (1985)
 - 58) L. C. Fritz, C. C. Wang & A. Gorio: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 2062 (1979)
 - 59) S.-S. Pong, C. C. Wang & L. C. Fritz: *J. Neurochem.* **34**, 351 (1980)
 - 60) S.-S. Pong & C. C. Wang: *J. Neurochem.* **38**, 375 (1982)
 - 61) C. C. Wang & S.-S. Pong: "Membranes and Genetic Disease," ed. by J. R. Sheppard, V. E. Anderson & J. W. Eaton, Vol. 97, Alan R. Liss, New York, pp. 373-395, 1982
 - 62) S.-S. Pong, R. DeHaven & C. C. Wang: *J. Neurosci.* **2**, 966 (1982)
 - 63) W. Sieghart & M. Karobath: *Nature* **286**, 285 (1980)
 - 64) E. Siegel, A. Stephenson, C. Mamalaki & E. A. Barnard: *J. Biol. Chem.* **258**, 6965 (1983)
 - 65) I. M. Abalis & A. T. Eldefrawi: *Pestic. Biochem. Physiol.* **25**, 279 (1986)
 - 66) I. M. Abalis, A. T. Eldefrawi & E. M. Eldefrawi: *J. Biochem. Toxicol.* **1**, 69 (1986)
 - 67) A. T. Eldefrawi, I. M. Abalis & M. E. Eldefrawi: "Membrane Receptors and Enzymes as Targets of Insecticidal Action," ed. by J. M. Clark & F. Matsumura, Plenum Press, New York, pp. 107-124, 1986
 - 68) L. J. Lawrence & J. E. Casida: *Life Sci.* **35**, 171 (1984)
 - 69) I. M. Abalis, M. E. Eldefrawi & A. T. Eldefrawi: *Pestic. Biochem. Physiol.* **24**, 95 (1985)
 - 70) E. Cohen & J. E. Casida: *Pestic. Biochem. Physiol.* **25**, 63 (1986)
 - 71) K. Tanaka & F. Matsumura: *Pestic. Biochem. Physiol.* **24**, 124 (1985)
 - 72) Y. Ozoe & F. Matsumura: *Pestic. Biochem. Physiol.* **26**, 253 (1986)
 - 73) P. D. Suzdak, R. D. Schwartz, P. Skolnick & S. M. Paul: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4071 (1986)
 - 74) P. D. Suzdak, J. R. Glowa, J. N. Crawley, R. D. Schwartz, P. Skolnick & S. M. Paul: *Science* **234**, 1243 (1986)
 - 75) W. Kolbe: *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer* **34**, 264 (1981)

- 76) U. Mothes & K.-A. Seitz: *Pestic. Sci.* **13**, 426 (1982)
- 77) E. Cohen & J. E. Casida: "Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment." ed. by J. Miyamoto & P. C. Kearney, Pergamon Press, Oxford, pp. 25-32, 1983
- 78) M. Anderson, J. P. Fisher & J. Robinson: Proc. 1986 Br. Crop Prot. Conf.—Pests and Diseases, Vol. 1, p. 89, 1986
- 79) T. Leighton, E. Marks & F. Leighton: *Science* **213**, 905 (1981)
- 80) E. Cohen & J. E. Casida: *Pestic. Biochem. Physiol.* **13**, 129 (1980)
- 81) E. Cohen: "Chitin in Nature and Technology," ed. by R. Muzzarelli, C. Jeuniaux & G. W. Gooday, Plenum Press, New York, pp. 139-145, 1986
- 82) 古賀大三: 化学と生物 **24**, 506 (1986)
- 83) H. R. Hepburn: "Fundamentals of Insect Physiology," ed. by M. S. Blum, John Wiley & Sons, New York, pp. 139-183, 1985
- 84) A. Retnakaran: "Chitin in Nature and Technology," ed. by R. Muzzarelli, C. Jeuniaux & G. W. Gooday, Plenum Press, New York, pp. 147-163, 1986
- 85) M. N. Horst: "Chitin in Nature and Technology," ed. by R. Muzzarelli, C. Jeuniaux & G. W. Gooday, Plenum Press, New York, pp. 45-52, 1986
- 86) B. Mauchamp & E. Caminade: "Chitin in Nature and Technology," ed. by R. Muzzarelli, C. Jeuniaux & G. W. Gooday, Plenum Press, New York, pp. 171-174, 1986
- 87) U. Mothes-Wagner: *Pestic. Sci.* **17**, 607 (1986)
- 88) 満井 喬: 農薬誌 **10**, 289 (1985)
- 89) T. Mitsui: "Chitin in Nature and Technology," ed. by R. Muzzarelli, C. Jeuniaux & G. W. Gooday, Plenum Press, New York, pp. 193-196, 1986
- 90) 山田富夫: 農薬誌 **11**, 509 (1986)
- 91) 波多野連平・山田富夫・松田達彦・高橋英光・北川幸夫: 日本応用動物昆虫学会第30回大会講演要旨集, p. 209, 1986
- 92) 山田富夫・埴山 稔・松井宣夫・米田 渥: 農薬誌 **12**, 327 (1987)
- 93) 石井敬一郎: 日本農芸化学会昭和61年度大会(京都)講演要旨集, p. 750, 1986
- 94) K. Ishii: Third China-Japan Symp. Pestic., Beijing, pp. 14-20, 1986