報 文

In Vitro における殺虫剤の連合作用

大井正典, 本山直樹

千葉大学園芸学部環境生物学研究室

(平成3年1月21日受理)

In Vitro Studies on Joint Action of Insecticides

Masanori OI and Naoki MOTOYAMA

*Laboratory of Environmental Biology, Faculty of Horticulture,
Chiba University, Matsudo, Matsudo 271, Japan*

In vitro studies were carried out to substantiate the result obtained from theoretical analysis that the level of potentiation produced by joint action of insecticides could be predicted by using such parameters as the affinity of each insecticide to the degradation enzyme involved, the rate of degradation, and the I_{50} for target inhibition in the presence of the degradation enzyme. These parameter values were determined in a simple model system that consists only a single enzyme for degradation, carboxylesterase from the porcine liver, and the target for inhibition AChE from the electric eel. The results showed that a combination of malaoxon and paraoxon as well as malaoxon and dichlorvos among various combinations of insecticides evaluated fulfilled the conditions for potentiation satisfactorily. A comparison of I_{50} for AChE inhibition actually demonstrated a high level of potentiation with the above two combinations. Furthermore, the mixing ratio of two insecticides which produced the maximum potentiation level was equal to the ratio of I_{50} of individual insecticides. These results were in agreement with what the theoretical analysis by computer simulation suggested.

緒 言

わが国では種々の目的のために殺虫剤の混用が広く実施されている。混用によって得られる連合作用の理論的解析に関しては、連合作用の大きさを数量的な理論に基づいて解析した例はあるものの¹⁾、連合作用が生ずるような条件を理論的に解析した例はなかった。前報²⁾において、著者らは薬物速度論的な手法を用いることによって、連合作用を生むための条件を理論的に明らかにした。すなわち、AChE 阻害剤の組合せを仮定し、作用点と解毒酵素のみが含まれる単純なモデルを用いてコンピュータシミュレーションを行なった。その結果、組み合わせた2薬剤が解毒酵素を拮抗的または非拮抗的に阻害し合うような場合には、殺虫剤の連合作用の大きさは組み合わせたおのおのの殺虫剤の解毒酵素に対する親和性

(K_m) と最大解毒速度 (V)、および解毒酵素を含んだ条件での作用点阻害の I_{50} によって予測できることを示した。また、その場合最も相乗作用の大きくなる二つの薬剤の混合比は理論的には I_{50} の比に等しいということを示した。本研究の目的は、このような理論的解析の結果を *in vitro* の実験によって証明することである。そのために、作用点としてアセチルコリンエステラーゼ (AChE)、解毒酵素としてカルボキシルエステラーゼ (CE) を含む *in vitro* の系をモデルとして実験を行なった。

材 料 と 方 法

1. 試 薬 類

IBP (*S*-benzyl *O,O*-diisopropyl phosphorothioate) (純度 90%) はクミアイ化学工業株式会社から、マラチオン

(*S*-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl *O,O*-dimethyl phosphorodithioate) (純度 95.4%) は住友化学工業株式会社より提供していただいた工業用原体をそのまま用いた。その他の試薬および酵素についてはすでに報告³⁾したとおりであり、AChE は電気うなぎから精製されたもの (Sigma 社製, タイプ III, 950 unit/mg タンパク), CE はブタ肝臓から精製されたもの (Sigma 社製, タイプ I, 230 または 335 unit/mg タンパク) を用いた。

2. CE の阻害

阻害実験は前報³⁾に述べた方法に従って、パラニトロフェニルブチレート (*p*NPB) を基質として行ない、解離定数 K_d , アシル化 (リン酸化またはカルバミル化) 定数 k_2 , および脱アシル化定数 k_3 を求めた。なお、反応液の組成は、30 mM *p*NPB アセトン溶液 10 μ l, 各濃度の阻害剤のアセトン溶液 50 μ l, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 2990 μ l, 0.17 unit/ml の酵素液 20 μ l である。基質の濃度は CE に対しては基質に対する K_m 値 (76.2 μ M) よりやや大きくとった。阻害剤の濃度は K_d 付近で数段階とった。どの阻害剤を用いた場合も $k_2 \gg k_3$ であったので、Hart and O'Brien 法の改良法³⁾ または $1/B \sim 1/[I]$ プロット^{3,4)} (B は酵素活性の減少の大きさを表わし, $[I]$ は阻害剤濃度と同様の次元をもつ) を用いて各パラメータを求めた。なおカルバリルについては k_3 がすでに知られているので³⁾, この値を $1/B \sim 1/[I]$ プロットに代入し他のパラメータを求めた。

3. AChE の阻害

Main and Dauterman⁵⁾ の方法を用い、アセチルチオコリン (ATCh) を基質として、AChE 阻害の 2 分子速度定数 (k_i) を求めた。反応液の組成と手順は前報³⁾に述べた方法と同様である。ただし、この方法では阻害剤濃度が K_d より十分に小さいという条件が必要なので、コントロール活性と阻害剤の存在下における活性の初期値が等しくなるように阻害剤濃度を設定した。

4. 解毒酵素の存在下における AChE 阻害の I_{50} の測定

解毒酵素である CE の存在下における AChE 阻害の I_{50} 値は、前阻害の後に基質を加えて AChE の残存活性を調べ、プロビット法により算出した。前阻害時の反応液組成は、各濃度の阻害剤のアセトン溶液が 50 μ l, AChE (10 unit/ml) が 20 μ l, CE (151 unit/ml) が 100 μ l, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) が 2830 μ l である。37°C で 1 時間前阻害した後、0.02 M の ATCh と 0.02 M の DTNB をおのおの 100 μ l ずつ反応液に加えて直ちに攪拌し、分光光度計を用いて 412 nm における吸光度の変化を測定した。

結果と考察

Table 1 には、一連の化合物による CE 阻害反応のパラメータ、すなわち、酵素-阻害剤の可逆的複合体形成の親和性を表わす解離定数 K_d , アシル化定数 k_2 , 脱アシル化定数 k_3 の各値、およびアシル化と脱アシル化の

Table 1 Kinetic constants of carboxylesterase inhibition with various inhibitors.

Inhibitor	K_d (μ M)	k_2 (min^{-1})	k_3 (min^{-1})	$K_m^a)$ (μ M)
Paraoxon	0.702 ^{a)}	0.660	0.0272	0.0278
DEF	0.428	0.563	0.0739	0.0497
Dichlorvos	0.251	0.297	0.129	0.0760
Carbaryl	14.3 (2.4) ^{b)}	0.548 (0.082)	0.0263	0.655
IBP	71.6 (16.6)	1.93 (0.55)	0.0451 (0.0173)	1.63
Propoxur	20.4	0.344	0.0445	2.34
Metolcarb	46.2	0.289	0.0442	6.13
Malathion	76.6 (5.3)	0.0439 (0.0017)	0.00741 (0.00156)	11.1
Methomyl	890	1.04	0.0157	13.2
Malaoxon	82.0	0.273	0.173	31.9
Pirimicarb	474 (35)	0.608 (0.292)	0.125 (0.015)	80.8

^{a)} $K_m = K_d \times k_3 / (k_2 + k_3)$.

^{b)} Data without standard deviation are from the previous paper.³⁾

^{c)} Values in parenthesis show standard deviation.

速度が等しい定常状態における見かけの親和性を表わす Km 値 ($Km = K_d k_3 / (k_2 + k_3)$)⁶⁾ を示した。なお、括弧内に標準偏差を伴った値は本研究において求めた値であり、標準偏差を伴っていない値は前報³⁾ より引用した。これらの値を薬剤間で比較すると、とくに K_d と Km に関しては薬剤間で大きく値が異なった。ジクロロボス、DEF およびパラオクソンは K_d と Km が小さく、反応初期の可逆的複合体の形成と定常状態における親和性が高いことが示された。一方、メソミルとピリミカルブは反応初期の可逆的複合体の形成における親和性が小さく、マラオクソンとピリミカルブは定常状態における親和性が小さかった。また、 k_2 や k_3 値の薬剤間の違いは K_d や Km 値と比較して小さかった。マラチオンなどのチオノ体による CE のリン酸化は起こりにくにもかかわらず、マラチオンは CE に対してわずかな阻害活性を示した。この理由は不明であるが、もし、iso-マラチオン⁷⁾ が不純物として混在していれば、この化合物が CE 阻害の原因であるかもしれない。マラチオンによって阻害された CE の k_3 値は他の阻害剤と比較して小さかった。

AChE に対する阻害力を示すパラメータとして測定した 2 分子速度定数 k_1 は、Table 2 に示した。DEF と IBP による AChE の阻害は認められなかった。 k_1 で判断すると、AChE 阻害力の最も大きい化合物はマラオクソンであり、メソミル、プロボクスル、パラオクソン、ジクロロボス、カルバリルの順で阻害力が小さくなった。AChE に対する k_1 と CE に対する k_i ($k_i = k_2 / K_d$) には相関関係を認めることはできなかった。

一連の阻害剤による AChE 阻害の I_{50} 値を CE の存在下および非存在下において調べた結果は Table 3 に示した。CE の非存在下における I_{50} 値は Table 2 に示す k_1 値から算出した。すなわち、Aldridge⁸⁾ の式 $\log_{10} P = 2 - k_1 [CX] t / 2.303$ ($[CX]$ は阻害剤濃度を表わす) に P (阻害度) = 50% と t (時間) = 60 min を代入すると 60 分後に AChE を 50% 阻害するような阻害剤濃度を導き出す式、すなわち $I_{50} = 0.0116 / k_1$ の式が得られ、 I_{50} が計算できる。各阻害剤の AChE 阻害に及ぼす CE の影響の大きさは、CE の存在下と非存在下における I_{50} の比から予測できる。この比はマラチオンでは 37 倍で、マラオクソンでは 528 倍であり、他の化合物と比較してはるか大きかった。両化合物ともカルボキシリンエステルが CE によって加水分解されるので⁹⁾、CE はこれらの阻害剤を解毒することによって AChE 阻害能力に大きな影響を与えたといえる。他の阻害剤については、CE の存在下と非存在下における I_{50} の比はマラチオンやマラオ

Table 2 Bimolecular rate constant of AChE inhibition.

Inhibitor	k_1 (min ⁻¹ mm ⁻¹) $\pm$ S.D.
DEF	N.D. ^{a)}
Dichlorvos	24.8 $\pm$ 1.5
Carbaryl	20.0 $\pm$ 2.2
IBP	N.D.
Propoxur	57.7 $\pm$ 1.8
Paraoxon	37.9 $\pm$ 2.1
Metolcarb	2.16 $\pm$ 0.16
Malathion	1.14 $\pm$ 0.041
Methomyl	65.0 $\pm$ 4.6
Malaoxon	258 $\pm$ 13
Pirimicarb	0.431 $\pm$ 0.040

^{a)} No detectable inhibition was observed under the experimental condition.

Table 3 I_{50} of AChE inhibition with various inhibitors^{a)} determined in the presence (+CE) or absence (-CE) of carboxylesterase (CE).

Inhibitor	I_{50} (μ M)		Ratio
	-CE ^{b)}	+CE	
Paraoxon	0.306	0.828	2.7
DEF	>1000	>1000	N.D.
Dichlorvos	0.468	2.93	6.3
IBP	>1000	>1000	N.D.
Carbaryl	0.580	1.10	1.9
Propoxur	0.201	0.471	2.3
Metolcarb	5.37	8.24	1.5
Malathion	10.2	380	37.3
Methomyl	0.178	0.253	1.4
Malaoxon	0.0487	25.7	528
Pirimicarb	26.9	64.7	2.4

^{a)} AChE was preincubated with inhibitors for 1 hr prior to the addition of the substrate, ATCh.

^{b)} I_{50} in the absence of CE was calculated using k_1 values listed in Table 2 according to the following equation: $I_{50} = 0.0116 / k_1$.

クソンの場合よりもはるかに小さいが、 I_{50} の差は明らかに存在する。その中でとくにジクロロボスにおける I_{50} の比が比較的大きかったのは、 I_{50} がもともと小さく反応液中の濃度が小さかったことと、 k_3 が大きいために (Table 1) CE によって解毒されるジクロロボスの割合が多かったためと推察される。一方、他の化合物においては I_{50} の比はいずれも 2 倍付近に集中した。CE の非存在下における I_{50} 値は $k_3 = 0$ を仮定して k_1 から計算

したが、前阻害の時間が1時間と長いことから、CE存在および非存在下における I_{50} の差は、阻害剤の解毒というより脱アシル化によって生じた差と考えられる。さらに、実際に k_3 を 0.02 min^{-1} と仮定して予備的にコンピュータシミュレーションを行ない I_{50} の値を求めたところ、1時間の前阻害では I_{50} の比は約2倍となり上記の推察を支持した。

殺虫剤の連合作用に関する理論的解析の結果¹⁾によれば、連合作用の大きさは、組み合わせた薬剤をA、Bとすると、解毒酵素に対する薬剤の親和性を表わすMichaelis定数(おのおの K_A と K_B)、最大解毒速度(おのおの V_A と V_B)および解毒酵素の存在下でのAChE阻害の I_{50} (おのおの I_A と I_B)を用いて予測できる。すなわち、相乗作用は $K_B \ll K_A I_B / I_A$ 、 $V_B \ll V_A I_B / I_A$ かつ $K_B \ll I_B$ の場合に発揮される。本研究では実際に各阻害剤に対するCEの V の値を求めなかったが、マラチオンとマラオクソンに関してのみCEの存在下と非存在下における I_{50} に大きな違いがあったので(Table 3)、これらの阻害剤は他の阻害剤と比較してはるかに V の値が大きいと考えられる。したがって、マラチオンまたはマラオクソンを阻害剤Aとみなせば、 $V_B \ll V_A I_B / I_A$ の条件が満たされるような阻害剤Bとの組合せは多いと考えられる。また、この条件に加えて、 $K_B \ll K_A I_B / I_A$ と $K_B \ll I_B$ の条件を十分に満たしている阻害剤Bほど相乗作用が大きいことになる。ただし、この場合の阻害はアシル化を伴うので阻害剤の解毒酵素に対する親和性は、阻害の進行とともに反応開始直後における阻害剤と酵素の解離定数(K_d)

から定常状態におけるみかけの親和性(Km)に変化する。そこで、親和性が K_d である場合と Km である場合のそれぞれで相乗作用をもたらし組合せを検討してみた。Table 4ではマラオクソン(阻害剤A)を他の阻害剤(阻害剤B)と組み合わせた場合、Table 5ではマラチオン(阻害剤A)を他の阻害剤(阻害剤B)と組み合わせた場合の連合作用の大きさを予測した結果を示した。ただし、 Km_A 、 K_{dA} 、 I_A はおのおの阻害剤Aの Km 、 K_d 、およびCE存在下での I_{50} を表わす。 Km_B 、 K_{dB} 、 I_B はおのおの阻害剤Bの Km 、 K_d 、およびCE存在下での I_{50} を表わす(Km と K_d はTable 1、 I_{50} はTable 3に記載)。 $Km_A I_B / I_A$ と $K_{dA} I_B / I_A$ をおのおの q および r とおくと、 Km_B / q および K_{dB} / r が小さいほど $K_B \ll K_A I_B / I_A$ の条件を満たすことになり、相乗作用が大きいことを示唆する。その結果、マラオクソンをマラチオン、ジクロロボスまたはパラオクソンと組み合わせた場合に Km_B / q および K_{dB} / r の値が共に小さかった(Table 4)。またこれらの薬剤のなかで、ジクロロボスが $Km_B \ll I_B$ と $K_{dB} \ll I_B$ の両方、マラチオンとパラオクソンは $Km_B \ll I_B$ という条件を満たしていた。したがって、これらの組合せにおいて相乗作用が大きくなることが予測される。一方、マラチオンと他の阻害剤を組み合わせた場合は Km_B / q と K_{dB} / r の値は1より大きいものがほとんどで、相乗作用は小さいことが予測された(Table 5)。DEFやIBPを混合した場合の相乗作用についてはとくに検討しなかった。これらの阻害剤はAChEに対する阻害能力がないので、これらの濃度を上げるほど相乗作用が大きくなる

Table 4 Parameters for the evaluation of potentiation level produced by a joint action of malaoxon (inhibitor A) combined with various other compounds (inhibitor B).

Inhibitor	Parameter			
	$Km_A I_B / I_A$ (q)	Km_B / q	$K_{dA} I_B / I_A$ (r)	K_{dB} / r
Malathion	472	0.0234	1217	0.0629
Paraoxon	1.03	0.0276	2.65	0.327
Dichlorvos	3.64	0.0283	9.38	0.0314
Carbaryl	1.37	0.479	3.52	4.06
Metolcarb	10.2	0.517	26.4	1.52
Malaoxon	31.9	1	82.3	1
Pirimicarb	80.3	1.01	207	2.29
Propoxur	0.585	3.99	1.51	13.5
Methomyl	0.314	42.2	0.810	1112

Km_A , K_{dA} and I_A denote Km , K_d , and I_{50} for AChE inhibition in the presence of CE, respectively, of inhibitor A. Similarly, Km_B , K_{dB} and I_B denote Km , K_d and I_{50} for AChE inhibition in the presence of CE, respectively, of inhibitor B.

Values given in Tables 1 and 3 were used for computation of these parameters.

Table 5 Parameters for the evaluation of potentiation level produced by a joint action of malathion (inhibitor A) combined with various other compounds (inhibitor B).

Inhibitor	Parameter			
	$Km_A I_B / I_A$ (q)	Km_B / q	$K_{dA} I_B / I_A$ (r)	K_{dB} / r
Malathion	11.1	1	76.6	1
Paraoxon	0.0241	1.18	0.167	5.19
Dichlorvos	0.0853	1.21	0.591	0.499
Carbaryl	0.0320	20.5	0.222	64.5
Metolcarb	0.240	22.1	1.66	24.1
Malaoxon	0.748	42.7	5.18	15.9
Pirimicarb	1.88	42.9	13.0	36.3
Propoxur	0.0137	170	0.0949	215
Methomyl	0.00739	1800	2.37	380

Km_A , K_{dA} and I_A denote Km , K_d and I_{50} for AChE inhibition in the presence of CE, respectively, of inhibitor A. Similarly, Km_B , K_{dB} and I_{50} denote Km , K_d and I_{50} for AChE inhibition in the presence of CE, respectively, of inhibitor B.

Values given in Tables 1 and 3 were used for computation of these parameters.

ことが容易に予測される。

Table 4 において相乗作用が予測されたマラオクソンとジクロロボス、およびマラオクソンとパラオクソンの組合せを用いて協力係数に与える混合比の影響を調べた結果は、おのおの Table 6 と Table 7 に示した。なお相乗作用の予測されたマラオクソンとマラチオンの組合せについては、どちらの阻害剤も V が大きく、 $V_B \ll V_A I_B / I_A$ の条件を満たすかどうか不明であったので、この組合せについてはとくに調べなかった。相乗作用の大きさは協力係数¹⁰⁾を用いて比較した。前報²⁾で述べた理論的解析の結果によれば、最も相乗作用の大きくなる混合比は解毒酵素存在下における単独処理での I_{50} の比、すなわち I_A と I_B の比に等しくなるが、 I_A と I_B の比はマラオクソンとジクロロボスの混合で 1:0.11、マラオクソンとパラオクソンの混合で $1:3.2 \times 10^{-2}$ である (Table 3)。実際の実験結果において最も大きな協力係数を与えた混合比は、マラオクソンとジクロロボスを混合した場合は 1:0.1 (Table 6)、マラオクソンとパラオクソンを混合した場合は $1:5.7 \times 10^{-2}$ (Table 7) となり、理論値に最も近い混合比で、最も大きな相乗作用が認められた。

以上のように最も協力係数の大きくなる混合比は I_A と I_B の比に等しいことが実験的に証明されたので、マラオクソン (薬剤 A) と一連の阻害剤 (薬剤 B) を I_A と I_B の比と等しくなるように混合し協力係数を求めた (Table 8)。協力係数はパラオクソン、ジクロロボス、マラチオン、ピリミカルブの順で大きく他の阻害剤がこれに続いた。協力係数はこの場合 Km_B / q と K_{dB} / r の値

Table 6 Effect of the mixing ratio of malaoxon and dichlorvos on co-toxicity coefficient calculated from I_{50} for AChE inhibition in the presence of CE.

Ratio		$I_{50}^{a)}$ (μM)	Co-toxicity coefficient
Malaoxon	Dichlorvos		
1	: 0.01	13.9	172
1	: 0.1	4.37	345
1	: 1	1.75	301
1	: 10	1.92	166

^{a)} Data expressed as the sum of both inhibitors.

Table 7 Effect of the mixing ratio of malaoxon and paraoxon on the co-toxicity coefficient calculated from I_{50} for AChE inhibition in the presence of CE.

Ratio		$I_{50}^{a)}$ (μM)	Co-toxicity coefficient
Malaoxon	Paraoxon		
1	: 5.7×10^{-4}	12.7	198
1	: 5.7×10^{-3}	6.24	352
1	: 5.7×10^{-2}	1.85	529
1	: 5.7×10^{-1}	0.660	326

^{a)} Data expressed as the sum of both inhibitors.

(Table 4) が小さくなるほど大きくなると予想されるが、マラオクソンとマラチオンの組合せは、マラオクソンをジクロロボスやパラオクソンと組み合わせた場合よ

Table 8 I_{50} and co-toxicity coefficient for AChE inhibition determined in the presence of CE in various combinations of malaoxon (inhibitor A) and other inhibitors (inhibitor B) which were mixed at a ratio designated in the table.

Inhibitor B	Ratio ^{a)}	I_{50} (μ M) ^{b)}	Co-toxicity coefficient
Malathion	14.8	61.7	329
Paraoxon	0.0322	2.30	577
Dichlorvos	0.114	2.74	523
Carbaryl	0.0428	8.51	158
Metolcarb	0.321	14.1	120
Pirimicarb	2.52	14.0	323
Propoxur	0.0183	6.03	217
Methomyl	0.00984	10.5	124

^{a)} I_{50} of inhibitor B/ I_{50} of inhibitor A.

^{b)} Data expressed as the sum of inhibitors A and B.

りも協力係数が小さかった。この結果はマラオクソンと同様にマラチオンの分解活性も高いことから、おそらくマラオクソン（薬剤A）とマラチオン（薬剤B）を組み合わせた場合の $V_B/(V_A I_B/I_A)$ はマラオクソンをジクロロボスやパラオクソンと組み合わせた場合よりも大きくなるからだと考えられる。

前報²⁾で示した理論的解析による結論、すなわち、相乗作用は各薬剤の解毒酵素に対する親和性、解毒速度および解毒酵素の存在下での作用点阻害の I_{50} によって予測できるということ、また相乗作用の最も大きくなる混合比は I_{50} の比と等しいことは以上の結果によって支持された。本研究の結果から、殺虫剤どうしの組合せにおいて、相乗作用の機構が解毒酵素の阻害に基づく場合の薬剤A（解毒を阻害される側）と薬剤B（解毒を阻害する側）の特徴を明確に示すことができる。すなわち、薬剤A（たとえばマラオクソン）は作用点に対する阻害能力が大きいこと、解毒されやすいこと、および解毒酵素に対する親和性の小さい薬剤である。薬剤B（たとえばジクロロボスとパラオクソン）は解毒酵素に対する親和性が高く、作用点を阻害するよりも低濃度で薬剤Aの解毒を阻害できる薬剤といえる。著者らは以上のような結論に基づいて、すでにダイアジノン抵抗性のイエバエに

対してきわめて高い相乗作用を示す薬剤の組合せを見つけており、その相乗作用の機構は以上のような結論によって説明可能であることを明らかにしている¹¹⁾。

摘 要

殺虫剤の相乗作用の大きさはおのおのの薬剤の解毒酵素に対する親和性、解毒速度および解毒酵素の存在下での作用点阻害の I_{50} 値によって予測できるという理論的解析の結果²⁾を証明するために、*in vitro* 実験を行なった。単一の酵素（ブタ肝カルボキシエステラーゼ）（CE）による解毒と作用点（電気うなぎ AChE）阻害のみが含まれる単純なモデルを用いて、相乗作用の予測に必要な各パラメータを求めたところ、マラオクソンとパラオクソンおよびマラオクソンとジクロロボスの組合せが最も相乗作用の条件を満たしていた。各種組合せによる AChE 阻害の I_{50} を比較したところ、上記の組合せは実際に高い相乗作用を示し、また、相乗作用の最も大きくなる混合比は薬剤単独での I_{50} の比に等しかった。以上の結果はコンピュータシミュレーションによる理論的解析の結果²⁾を支持した。

引 用 文 献

- 1) 酒井清六：殺虫剤の連合作用に関する昆虫毒物学的研究，八州化学工業株式会社，1960
- 2) 大井正典・本山直樹：農薬誌 **16**, 465 (1991)
- 3) 大井正典・W. C. Dauterman・本山直樹：農薬誌 **16**, 257 (1991)
- 4) T. Nishioka, K. Kitamura, T. Fujita & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **6**, 320 (1976)
- 5) A. R. Main & W. C. Dauterman: *Nature* **198**, 551 (1963)
- 6) M. L. Bender, F. C. Kézdy & F. C. Wedler: *J. Chem. Education* **44**, 84 (1967)
- 7) P. T. Lin, A. R. Main, W. P. Tucker, N. Motoyama & W. C. Dauterman: *Pestic. Biochem. Physiol.* **21**, 223 (1984)
- 8) W. N. Aldridge: *Biochem. J.* **46**, 451 (1950)
- 9) 本山直樹：薬物抵抗性，深見順一・上杉康彦・石塚皓造編，ソフトサイエンス社，pp. 54-85 (1983)
- 10) Y. P. Sun & E. R. Johnson: *J. Econ. Entomol.* **53**, 887 (1960)
- 11) 大井正典・本山直樹：応動昆 **35**, 231 (1991)