学会賞受賞論文

(奨励賞)

殺虫剤抵抗性研究への薬物速度論的手法の応用

大井 正典

バイエル植物防疫センター

Application of Toxicokinetic Approaches
to Insecticide Resistance Studies

Masanori Oi

PF-E/MR, Pflanzenschutzzentrum Monheim, Bayer AG, D-51368 Leverkusen/Bayerwerk, Germany

はじめに

薬物速度論は体内における薬物の挙動、すなわち薬物の吸収、組織への分布、代謝、排泄等の速度過程を定量的に評価する方法として、すでに臨床薬理学の分野では学問的レベルおよび薬物療法への応用の両面で重要な役割を担っている。一方、昆虫における殺虫剤の効果は殺虫剤と生体とのさまざまな相互作用の結果生ずるが、このような相互作用を数量的に表現する方法として薬物速度論的手法の利用が考えられる。そこで薬物速度論的手法を殺虫剤抵抗性研究に応用することによって、1) イエバエのダイアジノン抵抗性をモデルに、複数の抵抗性要因が実際に生体内で果たす役割や相互作用を評価した。その結果、*in vitro* 実験では間接的にしか知ることのできなかった抵抗性要因の役割を、直接 *in vivo* で評価できるようになった。2) 解毒酵素と作用点などが含まれる単純な数学モデルを用いて殺虫剤の連合作用が生ずる条件について調べた。このなかでもとくに相乗作用が生ずる条件に着目し、抵抗性を克服できるような殺虫剤の組合せを効率よくスクリーニングすることが可能であることを示した。これらの研究について以下に概説する。

殺虫剤抵抗性の薬物速度論的解析：

イエバエのダイアジノン抵抗性をモデルとして

本研究で用いた八千代系イエバエは、ダイアジノンによる数回の淘汰の後 $50 \mu\text{g}/\text{♀}$ の LD_{50} を示し、感受性系統と比較して抵抗性比が 1400 倍というきわめて高いものであった。 ^{14}C -ダイアジノンを用いた *in vitro* 実験により、チトクローム P450 依存性モノオキシゲナーゼ系（チトク

ローム P450）およびグルタチオントランスフェラーゼ（GST）がダイアジノンの解毒に関与し、また GST およびリン酸トリエステラーゼがダイアゾクソンの解毒に関与していた。また作用点であるアセチルコリンエステラーゼ（AChE）の低感受性も抵抗性に関与していた¹⁾。

薬物速度論的解析を行なうのに十分な資料を得るために、複数の投与方法によってダイアジノンを処理した。まず胸部背板にダイアジノンを処理し、代謝ケージである 20 ml のシンチレーションバイアルにイエバエを入れ、その後の挙動を調べたところ、感受性系統と比較して抵抗性系統では胸部背板からの薬剤の消失が遅かったことから、皮膚における薬剤透過性の低下が示唆された。また抵抗性系統ではさらに高薬量を処理したが、高薬量ほど体内へ透過するダイアジノンの割合が少なくなるという薬量依存性を示した（Fig. 1）。一方胸部背板にダイアジノンを処理した後のダイアゾクソン量は系統間で明らかな違いを示し、体内におけるダイアゾクソン量の違いが抵抗性に大きく貢献していることを示唆した（Fig. 2）。これらの結果、抵抗性では感受性と同程度の AChE を阻害するにははるかに多くの薬量を要した（Fig. 3）。またこれらの実験以外にも、ドライフィルム法により代謝ケージにダイアジノンを処理した実験を行なったが、この場合もダイアジノンが体内に取り込まれる速度は抵抗性イエバエで遅く、皮膚における薬剤透過性の違いが示唆された²⁾。

系統間におけるダイアジノンの挙動を比較するために AChE の阻害を二次速度式で、その他の速度過程を一次速度式で近似し、得られた連立微分方程式と実験結果を用いてコンピュータシミュレーションを行なった。シミュレーションには MULTI³⁾に基づいて作成された市販のプログ

Fig. 1 Distribution of diazinon applied topically to CSMA (S) and Yachiyo (R) strains.

Strains and applied doses are shown in the figures. ●: external rinse, ○: chloroform-soluble vial wash, △: chloroform-soluble internal extract, ▲: sum of water-soluble internal extract and excreta. The curves were obtained by computer simulation based on the rate constants.²⁾

Fig. 2 Time-course of internal diazoxon following topical application of diazinon in CSMA (S) and Yachiyo (R) strains.

Diazinon applied to CSMA strain, 0.02 µg/female (●) and 0.1 µg/female (○); resistant strain, 5 µg/female (●) and 50 µg/female (○). The curves were obtained by computer simulation, based on rate constants.²⁾

ラム「マイコンによる薬物体内動態解析法」(南江堂)を用い、最小二乗法によって実験値との誤差がもっとも少なくなるようなパラメータ値を算出した。パラメータ値を系統間で比較したところ、ダイアジノンの透過性に約2倍の差

Fig. 3 Time-course of residual AChE activity in the head following topical application of diazinon in CSMA (S) and Yachiyo (R) strains.

Diazinon applied to CSMA strain, 0.02 µg/♀ (●) and 0.1 µg/♀ (○); Yachiyo strain, 50 µg/♀. The curves were obtained by computer simulation, based on rate constants.²⁾

があった。またAChEの阻害には3倍から10倍の差があった。しかし体内における挙動、とくに抵抗性系統におけるダイアジノンの活性化とダイアゾクソンの解毒に関してはおのおののパラメータの誤差が大きく、系統間の比較が困難であった²⁾。

そこで体内におけるダイアジノンの挙動に関するパラメータをより正確に求めるため、ダイアジノンおよびダイアゾクソンを注射投与するという方法をとった。ダイアジノンを注射投与したところ、ダイアジノンとダイアゾクソンを含むクロロホルム可溶性放射能の極性物質への代謝(全体の解毒)は抵抗性系統のほうが速かったが、その差はわずかであった。また高薬量ほど代謝の割合が少なくなるという薬量依存性を示した(Fig. 4)。一方、ダイアジノン注射後のダイアゾクソン量には顕著な差があったので、ダイアゾクソンを注射投与したところ、ダイアゾクソンの解毒速度には系統間で明らかな違いが認められ、ダイアゾクソンの解毒の役割が重要であることを示唆した(Fig. 5)⁴⁾。

これらの挙動を系統間で比較するために一次の連立微分方程式を用いてシミュレーションを行なった。その結果、全体の解毒のパラメータは1.5倍程度の差しかなかった。このクロロホルム可溶性放射能のほとんどはダイアジノンであったことと、ダイアジノンの消失の多くはダイアゾクソンを経由しない直接の解毒であることがパラメータの比較により示唆されたことから、ダイアジノンの解毒の役割は小さいであろうと推察された。一方、薬量や投与方法によってパラメータの値は異なったものの、ダイアゾクソンの解毒に関しては系統間で2倍から6倍の差があった。また体内のダイアゾクソン量がきわめて低い理由をダイアゾクソンの解毒だけで説明することは不十分で、ダイアゾクソンへの活性化能の減少も抵抗性に関与していることが示唆された⁴⁾。

Fig. 4 Degradation of organo-soluble internal radioactivity following injection of various doses of diazinon in CSMA (●) and Yachiyo (○) strains.

The curves were obtained by computer simulation, based on the rate constants.⁴⁾

Fig. 5 Percent diazoxon remaining following injection of diazoxon in CSMA (S) and Yachiyo (R) strains.

Applied doses are 0.01 μg/♀ (●, ○), and 0.1 μg/♀ (▲, △). The lines were obtained graphically from solid points, based on the rate constants.⁴⁾

以上のように一次の速度式で近似してシミュレーションを行ない、得られたパラメータを系統間で比較することは簡便な方法といえる。しかし、皮膚における薬剤透過や解

Fig. 6 Kinetic model describing the over-all dynamics of diazinon applied topically.

The model consists of volatilization, cuticular penetration, detoxification of chloroform-soluble compounds and activation (S strain) under Michaelis-Menten kinetics, AChE inhibition under second-order reaction and the other processes under apparent first-order kinetics. X_1 : diazinon applied on the thorax, X_2 : diazinon volatilized in the cage, X_3 : diazinon picked up by external surface of fly body, X_H : diazinon and diazoxon in hemolymph, X_T : diazinon and diazoxon distributed to internal tissues, X_W : water-soluble metabolites and excreta, $X_C = X_T + X_H$, X_6 : internal diazoxon, X_7 : metabolites of diazoxon, E_A : AChE, PX : diazoxon (P and X denote diethyl phosphoric acid moiety and pyrimidine ring, respectively). All parameters and the values are listed in Table 1.

毒などいくつかの速度過程は薬量依存的であり、この場合薬量によってパラメータの値が異なるため薬量の異なるデータを比較することは適切ではない。そこで薬理学の分野で行なわれた研究^{5,6)}を参考に、抵抗性要因の役割と相互作用を評価するために以下のような方法論を提案した⁷⁾。すなわち、薬量依存性の認められた速度過程には、酵素レベルで用いられる Michaelis-Menten 型の速度式を *in vivo* でも用いることによって、薬量によってパラメータの値が異なることのないようにした。実験に基づいて得られたダイアジノンの挙動を示す模式図を Fig. 6 に示すが、この模式図から得られる速度式は以下になる。

$$\begin{aligned} dX_1/dt = & -V_{12} \cdot X_1/(K_{12} + X_1) \\ & -V_{14} \cdot X_1/(K_{14} + X_1) \end{aligned} \quad (1-1)$$

$$dX_2/dt = V_{12}X_1/(K_{12} + X_1) - k_{23}X_2 + k_{32}X_3 \quad (1-2)$$

$$dX_3/dt = k_{23}X_2 - (k_{32} + k_{34})X_3 \quad (1-3)$$

$$\begin{aligned} dX_H/dt = & V_{14}X_1/(K_{14} + X_1) + k_{34}X_3 - k_{HT}X_H \\ & + k_{TH}X_T - V_{HW}X_H/(K_{HW} + X_H) \end{aligned} \quad (1-4)$$

$$dX_W/dt = V_{HW}X_H/(K_{HW} + X_H) \quad (1-5)$$

$$dX_T/dt = k_{HT}X_H - k_{TH}X_T \quad (1-6)$$

$$X_C = X_H + X_T \quad (1-7)$$

$$dX_6/dt = V_{46}X_C/(K_{46} + X_C) - k_{67}X_6 \quad (\text{S strain}) \quad (1-8)$$

$$dX_6/dt = k_{46}X_C - k_{67}X_6 \quad (\text{R strain}) \quad (1-9)$$

$$dX_7/dt = k_{67}X_6 \quad (1-10)$$

$$dE_A/dt = k_{6A}X_6E_A \quad (1-11)$$

以上の式はかなり複雑であるが、実際には体内における解毒のパラメータの算出にはダイアジノンの注射投与のデータを用いるなど、なるべくモデルを小さくすることによって上記の式の一部を用いてシミュレーションを行ない、パラメータの誤差を少なくした。シミュレーションには複数の薬量のデータを同時に用いることによって Michaelis 定数 (K) および最大解毒速度 (V) を求めた。薬量依存性の認められなかった速度過程のパラメータには一次速度式を用いて得られた値の平均値を用いるなどした。このようにして得られた値を Table 1 に示す。これらのパラメータの一部は仮定に基づく値であるが、シミュレーションによって得られる予測値は実験値と大きく異なることはなかった。Table 1 のパラメータを薬剤が体内に透過するまで (透過)、全体の解毒、活性化、ダイアゾクソンの解毒、AChE の阻害の五つの速度過程に分け、感受性または抵抗性のいずれかのパラメータを速度式に代入することにより、合計 32 通りの組合せで一定量の AChE を阻害するのに必要なダイアジノン量を算出した (Table 2)。単独の要因の場合にはダイアゾクソンの解毒分解能の増大、ダイアゾクソンへの活性化能の減少、AChE の低感受性が主要因で、皮膚の透過性の低下、全体の解毒の働きは小さいことが示された。さらにこれらの要因の組合せの効果について調べたところ、たとえば単独での役割の大きかったダイアゾクソンの解毒分解能の増大、ダイアゾクソンへの活性化

Table 1 Kinetic parameters for the model given in Fig. 6.

Pathway	Parameter	Parameter value	
		S	R
Penetration	K_{12}	0.662	0.662
	V_{12}	0.495	0.495
	K_{14}	0.315	0.315
	V_{14}	0.634	0.314
	k_{23}	1.11	0.606
	k_{32}	1.04	0.917
	k_{34}	1.52	0.706
Over all detoxification	k_{HT}	1.75	1.75
	k_{TH}	0.806	0.806
	K_{HW}	0.135	0.225
	V_{HW}	0.515	1.19
Activation	K_{46}	0.562	N.D.
	V_{46}	0.383	N.D.
	k_{46}	N.D.	0.104
Diazoxon detox.	k_{67}	4.84	31.9
AChE inhibition	k_{6A}	178	53.5

Units of k , K , V and k_{6A} are hr^{-1} , μg , $\mu g/hr$ and $\mu g^{-1} \cdot hr^{-1}$, respectively. N.D.: not determined.

Table 2 Predicted dose of diazinon, inhibiting 50% AChE activity *in vivo* 4 hr after topical application, determined by computer simulation using the rate constants listed in Table 1 for the model given in Fig. 6.

Mechanism ^{a)} (1; 2; 3; 4; 5)	I_{50} ($\mu g/\varphi$)	Mechanism (1; 2; 3; 4; 5)	I_{50} ($\mu g/\varphi$)
+++++	∞	++++-	∞
-++++	∞	-+++-	2.11
+-----	∞	+--+-	4.35
---++	∞	---+-	1.27
++-++	∞	+-+--	0.562
-+-++	1.52	-+-+--	0.384
+--++	1.99	+--+--	0.392
---++	0.960	---+-	0.272
++++-	2.55	++++-	0.526
-++--	1.12	-++--	0.357
+--+-	1.29	+--+-	0.370
---+-	0.732	---+-	0.254
++---	0.273	++---	0.0783
-+---	0.195	-+---	0.0581
+----	0.198	+----	0.0579
-----	0.142	-----	0.0433

^{a)} Mechanisms 1, 2, 3, 4 and 5 denote penetration, over all detoxification, activation, diazoxon detoxification and AChE inhibition, respectively.

能の減少, AChE の低感受性の要因が組み合わさった場合には 4 時間後に 50% の AChE を阻害することは不可能になった。もちろん 24 時間後までシミュレーションを行なった場合には, 50% の AChE を阻害する薬量を算出することは可能であるが, 言い換えれば一定量の AChE を阻害するのにより多くの時間を要するということがいえる。このような条件下では AChE の脱リン酸化も無視できない可能性がある。また, ダイアゾクソンが低濃度のまま推移するので AChE を阻害できる有効な濃度になかなか達しないといったことも考えられる。これらの時間的要因も抵抗性の要因が相乗的に働く原因になると推察される。

殺虫剤の連合作用に関する研究

殺虫剤の連合作用が発揮される理論的条件を探索するために, 単一の酵素による解毒と作用点 (AChE) の阻害などが含まれる単純なモデルを用いコンピュータシミュレーションを行なった⁸⁾。

以下のスキーム (a) において, 阻害剤が E, ES またはその両方のどれに結合するかによって, それぞれ拮抗阻害 (competitive inhibition), 不拮抗阻害 (uncompetitive inhibition) および非拮抗阻害 (noncompetitive inhibition) の三つのタイプに分けられる。このなかで異物代謝の研究上重要な拮抗阻害と非拮抗阻害を仮定し, 解毒速度に与える薬剤の組合せの効果を調べた。

Fig. 7 Effect of combination of two compounds (A and B) on degradation process of each compound, assuming competitive inhibition (right) and noncompetitive inhibition (left).

For competitive and noncompetitive inhibition Eqs. (2-1) and (2-2), as well as (2-3) and (2-4) given in the text were used, respectively. Curves A_0 to A_5 and B_0 to B_5 indicate degradation process of compounds A and B, respectively. Parameter values of K_A , V_A , K_B and V_B used for computation were, respectively, 1, 10, 1 and 10 for A_0 and B_0 ; 1, 10, 1 and 0.1 for A_1 and B_1 ; 1, 10, 0.1 and 10 for A_2 and B_2 ; 1, 10, 0.01 and 10 for A_3 and B_3 ; 1, 10, 0.01 and 1 for A_4 and B_4 ; 1, 10, 0.01 and 0.1 for A_5 and B_5 .

E: enzyme, S: substrate, P: product

薬剤 A と B の解毒にかかわる酵素が一つであるとすれば、二つの阻害様式によって得られる速度式は以下のようになる。

$$d[A]/dt = -V_A[A]/\{[A] + (1 + [B]/K_B)K_A\} \quad (2-1)$$

$$d[B]/dt = -V_B[B]/\{[B] + (1 + [A]/K_A)K_B\} \quad (2-2)$$

$$d[A]/dt = -V_A[A]/\{(1 + [B]/K_B)[A] + (1 + [B]/K_B)K_A\} \quad (2-3)$$

$$d[B]/dt = -V_B[B]/\{(1 + [A]/K_A)[B] + (1 + [A]/K_A)K_B\} \quad (2-4)$$

式 (2-1) と式 (2-2) は拮抗的阻害を、式 (2-3) と式 (2-4) は非拮抗的阻害を仮定した場合の式である。ここで、 $[A]$ と $[B]$ はそれぞれ薬剤 A と B の薬量を、 V_A と V_B は薬剤 A と B それぞれの最大解毒速度を、 K_A と K_B はそれぞれの Michaelis 定数を示す。

以上の (2-1) ~ (2-4) 式に各パラメータ値を与えたときの薬剤 A と B の消失を Fig. 7 に示すが、たとえば K_A , V_A , K_B , V_B をそれぞれ 1, 10, 0.01, 1 とした場合、 A_4 と B_4 の

ような消失の曲線となり、いずれの阻害様式も薬剤 B が存在している間は薬剤 A の解毒は起こりにくくなる。このとき薬剤 B と比較して薬剤 A が作用点に対する阻害力の大きい薬剤であれば高い相乗作用となる。

AChE 阻害に関する以下の式 (2-5) および薬剤が単独の場合の速度式を加え、Sun & Johnson の協力係数¹⁰⁾を指標にし、連合作用が生ずる条件について調べた結果、連合作用のなかでもとくに相乗作用に関して以下のような一般的性質が明らかになった。

$$d[E]/dt = -(k_A[A] + k_B[B])[E] \quad (2-5)$$

なお、E は薬剤を組み合わせた場合の AChE の残存活性度を示す。

(1) 相乗作用の基本的条件は次の条件が満たされることである。

$$V_B \ll V_A I_B / I_A, \quad K_B \ll K_A I_B / I_A \quad \text{かつ} \quad K_B \ll I_B$$

なお I は解毒酵素を含んだ条件で作用点を 50% 阻害する薬剤の濃度、すなわち I_{50} を表す。 I_A が小さく、 V_A が大きいほうがこの条件を満たすことから、薬剤 A は作用点に対する阻害能力が大きく、かつ解毒されやすいという条件が必要である。薬剤 B は作用点を阻害するのに必要な濃度よ

りも低濃度で薬剤 A の解毒を阻害できなければならない。この条件を満たすほど“相乗作用のポテンシャル”は大きく、薬剤 B が薬剤 A の解毒酵素を阻害する結果、薬剤 A の濃度が増し作用点の阻害速度を増加させることになる。

(2) 相乗作用がもっとも大きくなる薬剤 A と B の混合比は I_A と I_B の比 (LD_{50} の比) に等しい。

以上の理論的解析の結果を証明するために、*in vitro* 実験を行なった¹¹⁾。単一の酵素(ブタ肝カルボキシルエステラーゼ) (CE) による解毒と作用点(電気ウナギ 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、マラオクソンとジクロロポス (Table 3) およびマラオクソンとパラオクソン (Table 4) の組合せがもっとも相乗作用の条件を満たしていた。それぞれの組合せによる 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、また相乗作用のもっとも大きくなる混合比は薬剤単独での I_{50} 値に等しかった。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を支持した。

上記の理論的解析の結果をもとに、有機リン剤抵抗性イエバエ八千代系に対して相乗作用をもたらす薬剤の組合せを殺虫試験のレベルで探索した¹²⁾。理論的解析で示した相乗作用を発揮するために必要な、解毒を阻害される側の薬

剤(薬剤 A) または解毒を阻害する側の薬剤(薬剤 B) の性質をもつ薬剤のどちらか一方を見つけることができれば、相乗作用を見つける確率を増すことができるはずである。

そこで最初に薬剤 A の性質、すなわち作用点に対する阻害能力が大きく、かつ解毒されやすい、という性質をもつ薬剤を協力剤の効果を指標にしてスクリーニングし、それに対して相乗作用を発揮する薬剤 B をみつけるという方法をとった。供試昆虫として八千代系イエバエを用い、薬剤として一連の有機リン剤、カーバメート剤、ピレスロイド剤を用い、協力剤としてチトクローム P450 の阻害剤であるピペロニルブトキシド (PBO)¹³⁾、チトクローム P450 と GST を阻害するとの報告のあるマレイン酸ジエチル (DEM)¹⁴⁾、リン酸トリエステラーゼを阻害する DEF¹⁵⁾、およびカルボキシルエステラーゼ¹⁶⁾や GST¹⁷⁾を阻害することが知られている IBP の 4 種を用いた。その結果、協力剤の効果の高いいくつかの殺虫剤がスクリーニングされた (Table 5)。とくにダイアジノンに対しては DEF、カルボフランに対しては PBO の効果が高かった。このなかで薬剤 A の性質をもっていたダイアジノンに対して他の殺虫剤を組み合わせたところ、いくつかの組合せが相乗作用を示したが、このなかでもダイアジノンとカルボフランの組合せはきわめて高い相乗作用を示し、相乗作用のもっとも大きくなる混合比は LD_{50} の比に等しかった (Table 6)。どちらの薬剤も協力剤の効果が高く薬剤 A としての性質をもっていたので、相乗作用のメカニズムについて調べたところ、まずダイアゾクソンとカルボフランの組合せでは相乗作用が認められず、またカルボフランはダイアゾクソンの解毒には影響しなかったため、ダイアゾクソンの解毒はダイアジノンのカルボフランの相乗作用のメカニズムには関与していないことを示唆した。これとは逆にダイアジノ

Table 3 Effect of the mixing ratio of malaoxon and dichlorvos on the co-toxicity coefficient calculated from I_{50} for AChE inhibition in the presence of CE.

Ratio		$I_{50}^{a)}$ (μ M)	Co-toxicity coefficient
Malaoxon	Dichlorvos		
1	: 0	25.7	
1	: 0.01	13.9	172
1	: 0.1	4.37	345
1	: 0.114	2.74	523
1	: 1	1.75	301
1	: 10	1.92	166
0	: 1	2.93	

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

Table 4 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		$I_{50}^{a)}$ (μ M)	Co-toxicity coefficient
Malaoxon	Paraoxon		
1	: 0	25.7	
1	: 5.7×10^{-4}	12.7	198
1	: 5.7×10^{-3}	6.24	352
1	: 3.22×10^{-2}	2.30	577
1	: 5.7×10^{-2}	1.85	529
1	: 5.7×10^{-1}	0.660	326
0	: 1	0.828	

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

Table 5 Effect of several synergists on the toxicity of various insecticides against Yachiyo strain of the housefly.

Insecticide	Dose applied (μ g/♀) ^{a)}	Mortality (%)				
		Synergists				
		None	PBO	DEM	DEF	IBP
Pirimicarb	2.15	20	88	23	43	25
Carbofuran	4.18	23	98	55	75	30
Methomyl	0.0300	33	13	13	23	23
Propoxur	2.61	10	8	25	43	43
Dioxabenzofos	0.200	5	0	5	3	0
Dichlorvos	0.460	3	3	8	0	0
Acephate	4.22	0	23	3	35	20
Diazinon	23.6	10	5	13	98	30
d-Allethrin	0.885	25	85	18	43	30
Tetramethrin	0.751	33	90	43	63	40
Fenvalerate	0.0814	18	78	20	38	20

^{a)} A dose equivalent to LD_{10} of each insecticide was applied topically to the thorax at 1 hr after the flies received a synergist (10 μ g/♀) on the tip of abdomen.

Table 6 Synergism between diazinon (insecticide A) and the other insecticides (insecticide B) against Yachiyo strain of the housefly.

Insecticide B	Mixing ratio ^{a)}	LD ₅₀ ^{b)} (μg/♀)	Co-toxicity coefficient
Pirimicarb	0.107	14.2	242
Carbofuran	0.05 ^{c)}	3.75	1438
	0.236	1.86	2067
	1 ^{c)}	1.70	1399
	10 ^{c)}	6.32	250
Methomyl	0.00183	22.7	137
Propoxur	0.147	8.07	442
Dioxabenzofos	0.00632	34.4	91
Dichlorvos	0.0166	63.4	50
Acephate	0.185	8.62	427
d-Allethrin	0.0395	45.6	71
Tetramethrin	0.0432	12.4	263
Fenvalerate	0.00580	17.0	184

a) LD₅₀ of B/LD₅₀ of A.

b) Expressed as the sum of two insecticides mixed.

c) Various ratios were tested to investigate the effect on synergism.

Fig. 8 Effect of diazinon on the degradation of carbofuran *in vivo*.

Carbofuran at the dose of 0.1 μg/♀ was injected to the flies of Yachiyo strain with (○) or without (●) 0.5 μg/♀ diazinon.

ンとカルボフランの混合液を注射投与したところ、ダイアジノンは LD₅₀ (注射投与) 以下の薬量でカルボフランの解毒を阻害し、カルボフラン消失の一次速度定数は 3.4 倍低下した (Fig. 8). さらに *in vivo* においてダイアジノンとカルボフランの混合液の処理によって阻害された AChE の脱アシル化速度 (k_3) と、*in vitro* においてダイアゾクソンまたはカルボフランによって阻害された AChE の脱アシル化速度を比較したところ、*in vitro* においてダイアゾクソンによってリン酸化された AChE は、実験条件下 (30 分) では活性の回復がまったく認められなかったのに対して、カルボフランによってカルバミル化された AChE の回復は速く、 k_3 は 0.0137 であった。一方、*in vivo* においてダイアジノンとカルボフランの混合液を処理した後に阻害された AChE の見かけの k_3 は脱カルバミル化定数に近く、 k_3 は 0.0109 であったことから、実際に AChE を阻害しているの

はカルボフランであることが示された。したがって、この相乗作用の機構は、ダイアジノンがそれ自体では作用点を阻害しない薬量でカルボフランの解毒を阻害した結果、カルボフランの体内濃度が増加し AChE の阻害力を高めたことによることが明らかとなった。ダイアジノンに関して解毒が速いのはダイアゾクソンで (Fig. 5), ダイアジノンの解毒 (Fig. 4) はカルボフランの解毒 (Fig. 8) よりも遅いことを考慮すれば、ダイアジノンが解毒を阻害する側の薬剤 B だとしても理論的解析から得られた結論と矛盾することはない。

なおカルボフランの解毒酵素と考えられるチトクローム P450 をダイアジノンが阻害する機構であるが、たとえばパラチオンの酸化により生成する硫黄原子がチトクローム P450 に共有結合して失活させることや¹⁸⁾、スルフォニルウレア系の除草剤の解毒に関与するチトクローム P450 をマラチオンが阻害する¹⁹⁾という例もあり、同様の阻害機構である可能性が考えられる。殺虫剤抵抗性に関連して、興味深い今後の研究課題である。

おわりに

本研究で示したように、*in vivo* のデータを薬物速度論的手法を用いて解析することによって、昆虫体内における殺虫剤の挙動をよりダイナミックに表現することができる。また薬物速度論的手法が抵抗性要因の役割や相互作用を評価するために有用であることを示した。本研究で行なった解析は市販のプログラムで十分可能であることから、殺虫剤抵抗性研究の方法論の一つとして利用価値が高いと思われる。

殺虫剤の組合せが相乗作用を示す例として、有機リン剤とカーバメイト剤の組合せなどいくつかの例があるが、実際にこれらの組合せはウンカ・ヨコバイ類の防除に使用されてきた²⁰⁾。しかし実際にはランダムな組合せのなかから、防除可能な組合せをみつけることは容易ではない。本研究では協力剤の効果を指標に、既存の薬剤のなかから相乗作用を示す組合せを効率よくみつけることが可能であることを示した。薬剤の相乗作用を利用した防除方法を、上記の例に限らずより広範囲に役立てるためにも、本研究で示した方法は抵抗性害虫の防除法の一つとして利用できるのではないと思われる。

本研究を行なうにあたりご指導、ご鞭撻いただいた千葉大学教授、本山直樹先生 (現在、生態制御化学) に厚くお礼申し上げます。また、本研究は環境生物学研究室 (当時) の方々の多くのご協力と有意義な議論を得て行なわれたものであり、あわせて感謝いたします。

引用文献

- 1) M. Oi, W. C. Dauterman & N. Motoyama: *J. Pesticide Sci.*

- 15, 217 (1990)
- 2) M. Oi, W. C. Dauterman & N. Motoyama: *Appl. Entomol. Zool.* **27**, 371 (1992)
- 3) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa & T. Uno: *J. Pharmacobio.-Dyn.* **4**, 879 (1981)
- 4) M. Oi, W. C. Dauterman & N. Motoyama: *Appl. Entomol. Zool.* **28**, 59 (1992)
- 5) G. Levy, T. Tsuchiya & L. P. Amsel: *Clin. Pharmacol. Ther.* **13**, 258 (1972)
- 6) E. Nelson, M. Hanano & G. Levy: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **153**, 159 (1966)
- 7) 大井正典: 千葉大学園芸学部修士論文 (1987)
- 8) 大井正典・本山直樹: 農薬誌 **16**, 465 (1991)
- 9) 本山直樹: 毒性生化学, 本山直樹・佐藤哲男 編, ソフトサイエンス社, p. 136, 1982
- 10) Y. P. Sun & E. R. Johnson: *J. Econ. Entomol.* **53**, 887 (1960)
- 11) 大井正典・本山直樹: 農薬誌 **16**, 475 (1991)
- 12) 大井正典・本山直樹: 応動昆 **35**, 231 (1991)
- 13) J. E. Casida: *J. Agric. Food Chem.* **18**, 753 (1970)
- 14) W. Welling & J. W. de Vries: *Pestic. Biochem. Physiol.* **23**, 358 (1985)
- 15) L. T. Jao & J. E. Casida: *Pestic. Biochem. Physiol.* **4**, 465 (1974)
- 16) R. H. Yang, E. Hodgson & W. C. Dauterman: *J. Agric. Food Chem.* **19**, 14 (1971)
- 17) C. L. Yeoh, E. Kuwano & M. Eto: *J. Pesticide Sci.* **7**, 31 (1982)
- 18) T. Kamataki & R. A. Neal: *Mol. Pharmacol.* **12**, 933 (1976)
- 19) K. Kreus, P. R. Fonne & P. J. Porpiglia: *Plant Physiol.* **96**, 27 (1991)
- 20) 浜 弘司: 害虫はなぜ農薬に強くなるか: 薬剤抵抗性のしくみと害虫管理, 農文協, p. 160, 1992

Society Awards 1996

(on high prospectiveness)

Application of Toxicokinetic Approaches to Insecticide Resistance Studies

INTRODUCTION

Pharmacokinetics, which evaluate internal dynamics of drugs, *e.g.* absorption, distribution into internal tissues, metabolism, excretion and so on, play an important role in the field of clinical pharmacology. By applying this approach (toxicokinetics) to insecticide resistance studies, the significance and interaction of resistance factors were evaluated *in vivo*. This approach was also used to elucidate theoretical conditions which produce potentiation of insecticidal activity. Based on these conditions, one of the methods which overcome resistance by using the potentiation was demonstrated with a resistant housefly.

TOXICOKINETIC APPROACHES TO THE MECHANISMS OF DIAZINON RESISTANCE IN HOUSEFLY

A housefly colony collected at a sanitary land fill was selected with diazinon for several generations in the laboratory. The resultant strain (Yachiyo strain) was 1400 times more resistant to diazinon (LD_{50} : 50 μ g per fly). It had increased activity in each of the three

enzyme systems in involved in detoxification. Cytochrome P450-dependent monooxygenases and glutathione transferase (GST) catalyzed diazinon degradation. GST and phosphotriester hydrolase catalyzed diazoxon degradation. The resistant strain also showed a decreased sensitivity to inhibition of acetylcholinesterase (AChE), at the site of action.

Toxicokinetic analysis was employed to investigate the significance of various factors responsible for resistance in susceptible and resistant strains of housefly to diazinon. Topical application and application by exposure to a residual film of the compound in a holding vial was conducted. Significant differences were observed between the strains in the penetration of diazinon, the amount of diazoxon present, and the degree of AChE inhibition. Certain *k* values estimated by computer simulation using the experimental data and linear differential equations derived from the toxicokinetic models proposed for the external and internal dynamics of diazinon demonstrated an inter-strain difference. In particular, the ratio of diazoxon degradation over activation of diazinon was much greater in the resistant strain than in the susceptible strain, suggesting the low accumu-

lation of diazoxon was the most important resistance factor. Insensitive AChE also played an important role *in vivo*.

To investigate the internal dynamics of diazinon more accurately, the effects of diazinon and diazoxon administered by injection were studied. Flies which received diazinon by injection showed only a small interstrain difference in the internal amount of diazinon. In contrast, large interstrain difference was observed in the internal amount of diazoxon when the flies received diazinon or diazoxon by injection. Several kinetic models were postulated and examined to describe the internal dynamics of diazinon. Interstrain comparison of the kinetic parameters estimated by computer simulation revealed that fast degradation of diazoxon played an important role. It is also suggested that fast degradation of diazinon and less activation are responsible for the decreased accumulation of diazoxon.

The above simulation using linear equations was a convenient way to compare the resultant parameters between strains. However, some pathways, *e.g.* penetration and degradation were dose-dependent processes and the rate constants varied with the dose. Therefore Michaelis-Menten type equation which is used in enzymology was proposed *in vivo* for the dose-dependent processes. The apparent Michaelis constant and maximum velocity were simulated with experimental data from several doses. The other processes which did not show dose-dependence were approximated with linear equations except for AChE inhibition which was simulated with 2nd order equation. The differential equations using Michaelis-Menten type equations allowed the following analysis.

The parameters were divided into five processes (mechanisms), *i.e.* penetration, polarization of organo-soluble diazinon and diazoxon (overall detoxification), activation, detoxification of diazoxon and AChE inhibition. Then the amounts of diazinon which inhibit 50% AChE four hours after application were calculated for a total of 32 combinations derived from various combinations of each mechanism.

With respect to the individual processes, detoxification of diazoxon, less activation of diazinon and insensitive AChE were the main mechanisms, on the other hand penetration and overall detoxification play a minor role. By combining the above three main mechanisms, inhibition of 50% AChE by diazinon needed more time than four hours. The time-dependent factor also seemed to be important to consider for the synergism of resistance mechanisms.

STUDIES ON JOINT ACTION OF INSECTICIDES

Theoretical studies were conducted by computer simulation on the condition that a combination of two compounds produces a joint action. A simple model was

employed with the main components of a single enzyme for degradation and a site of action for inhibition. Studies were based on the assumption that two compounds inhibit the degradation enzyme either competitively or non-competitively. The following factors governing the joint action of insecticides were elucidated based on the co-toxicity coefficient value:

1. Potentiation appears at $V_B \ll V_A I_B / I_A$, $K_B \ll K_A I_B / I_A$ and $K_B \ll I_B$, where A and B denote compounds A and B, and the degradation of each compound is under control of maximum degradation velocity (V_A and V_B) and Michaelis constant (K_A and K_B) of the Michaelis-Menten type rate equations. I_A and I_B denote concentrations of compounds A and B affording 50% inhibition of the target in the presence of the degradation process. The situation indicates that compound A should have a high potential to inhibit the target and at the same time should be susceptible to degradation. Compound B should be able to inhibit the degradation of compound A at a lower concentration than required to inhibit the target. The more the properties of compounds A and B fulfill the above condition, the greater the resultant potentiation. With other words, compound B inhibits the degradation of compound A resulting in an increased accumulation of compound A, which in turn leads to a stronger inhibition of the target.

2. Potentiation is maximum when the ratio of compounds A and B is equal to the ratio of I_A and I_B (this could be substituted for convenience by the ratio of LD_{50} of the compounds).

To substantiate that the level of potentiation produced by joint action of insecticides could be predicted by using the above parameters, *in vitro* studies were carried out. The parameter values were determined in a simple model system that consists of only a single enzyme for degradation, *i.e.* carboxylesterase from porcine liver, and a target for inhibition of AChE from 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 in a satisfactory manner. A comparison of I_{50} for AChE inhibition under the conditions of the degradation enzyme involved actually demonstrated a high level of potentiation with the above two combinations. Furthermore, the mixing ratio of the two insecticides which produced the maximum potentiation level was equal to the ratio of I_{50} of the individual insecticides. These results were in agreement with the theoretical analysis by computer simulation.

A toxicity test was conducted in search of a combination of insecticides that is effective against the organophosphorus-resistant, Yachiyo strain of housefly. According to the theoretical results mentioned above, if an insecticide fulfilling the condition of compound A can be screened in advance, the probability to find out a

combination which produces potentiation would increase. It should be considered that the more fulfill the condition compound A, the more the effect of inhibitor of the degradation enzyme increase. Therefore, some inhibitors were combined with insecticides to find out a compound A in advance. Some of the insecticides tested fulfilled the condition of compound A, in particular the activity of diazinon is strongly increased in combination with DEF, a phosphotriester hydrolase inhibitor and carbofuran in combination with PBO, a cytochrome P450 inhibitor. Accordingly, diazinon was combined with a series of insecticides. Remarkable potentiation was exhibited when diazinon was paired with carbofuran. The LD_{50} values for diazinon, carbofuran and the mixture at the ratio of LD_{50} were 62.2, 14.7 and 1.86 μg per fly, respectively. The potentiation was greatest when the two compounds were mixed at the ratio of their LD_{50} . However, diazoxon coupled with

carbofuran showed little potentiation. Since carbofuran did not inhibit the degradation of diazoxon, it seems that diazoxon degradation is not involved in the potentiation between diazinon and carbofuran. When a mixture of diazinon and carbofuran was injected into houseflies, diazinon at a concentration below the LD_{50} inhibited carbofuran degradation, decreasing the first order rate constant 3.4 times for the carbofuran disappearance. A comparison of the rate of deacylation of acylated AChE produced *in vivo* by application of a mixture of diazinon and carbofuran and that produced *in vitro* by diazoxon or carbofuran, showed that the *in vivo* inhibition of AChE is mainly caused by carbofuran. From these results it is reasonable to conclude that the potentiation is attributable to an increase in the internal concentration of carbofuran, which inhibits more AChE, resulting from inhibition of carbofuran degradation by diazinon at sublethal concentrations.