銚田産 diazinon 抵抗性イエバエの 抵抗性の機構に関する研究

I. *In vivo* における ^{32}P -diazinon の代謝

正 野 俊 夫

東京大学農学部害虫学研究室 (東京都文京区弥生 1-1-1)

(受領: 1973年10月4日)

Studies on the mechanism of resistance in diazinon resistant Hokota strain of houseflies.

I. *In vivo* metabolism of ^{32}P -diazinon.

Toshio SHONO

Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture,
University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo

有機塩素系の殺虫剤が環境汚染の問題から使用が禁止され、衛生害虫の防除には、有機リン系殺虫剤が重要な役割を果たしている。しかし、有機リン系殺虫剤に対して、安富 (1961), Suzuki *et al.* (1961) による茨城県内での diazinon 抵抗性イエバエ出現の報告に端を発し、我国の衛生害虫でも多くの抵抗性の事例が報告されるにいたった (鈴木, 1968; Yasutomi, 1970, 1971, 1973; 林ら, 1971)。特に、イエバエに関しては、最近、林 (1973) がとりまとめたように、日本全国各地に有機リン剤に抵抗性を示すコロニーが存在し、将来、防除上、大きな障害となるものと思われる。然るに、我国においては、これらの抵抗性衛生害虫の抵抗性の機構に関しては、その解明はほとんどなされていない。そこで、我国で最初に有機リン剤に抵抗性を示したといわれる茨城県銚田町産の diazinon の抵抗性イエバエ (以下銚田系) を、国立予防衛生研究所より譲り受け、diazinon に対する抵抗性の機構の解明を試みた。

イエバエの diazinon に対する抵抗性の機構は、diazinon の皮膚透過性 (Krueger *et al.*, 1960; Forgash *et al.*, 1962) と、解毒酵素として phosphatase (Oppenorth and Asperen, 1961; Lewis and Sawicki, 1971) glutathione-S-transferase (Lewis and Sawicki, 1971, mixed function oxidase (Yang *et al.*, 1971) などが関与しているとの報告があるが、一つの系統にこれらすべ

での機構が関与しているわけではなく、抵抗性イエバエの産地、淘汰歴などによって、抵抗性の機構は異なっている。銚田系の diazinon 抵抗性の機構を調べるにあたり、まず有機リン殺虫剤の標的酵素である acetylcholinesterase (以下 AChE) の diazinon およびその生体内活性化物である diazoxon に対する親和性と、 ^{32}P -diazinon を用いて、diazinon のイエバエ体内への浸透および *in vivo* における代謝を調べた。

材料および方法

イエバエ

茨城県銚田町美原地区より採集され、国立予防衛生研究所で累代飼育された diazinon 抵抗性の銚田系イエバエ (安富, 1961) を譲り受け、diazinon で淘汰を加えながら累代飼育した。diazinon 感受性系統としては NAIDM 系を用いた。イエバエ幼虫は、ふすま、動物用固形飼料の培地で飼育し、成虫には粉ミルク、砂糖、水を与えた。実験には羽化後4~6日の雌成虫を用いた。

供試薬剤

diazinon [O, O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphorothioate]: 工業用原体を更に2度蒸留したものを用いた。diazoxon [O, O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphate]: 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxy-pyrimidine と O, O-di-

ethylchlorophosphate より Louloudes *et al.* (1956) の方法で合成した。沸点 $87^{\circ}\text{C}/0.0007\text{ mmHg}$ 。元素分析, UV 吸収スペクトル, IR 吸収スペクトルより diazoxon であることを確認した。 ^{32}P -diazinon: The Radiochemical Center (Amersham, Buckinghamshire, England) より購入した。入手時の比放射能は 10 mCi/mM であった。 ^{32}P -diazinon は benzene に溶かし, 冷蔵庫中に保存した。比放射能の高い ^{32}P -diazinon は, 自己の放射能により分解して, 水溶性の分解物を生じる。この分解物を取り除くため, 毎使用時直前に, ^{32}P -diazinon の benzene 溶液に, 1% (W/V) Na_2CO_3 水溶液および chloroform を加えて, よく振とうし, 静置分液後 chloroform 層を取り出し, 乾燥気流中で chloroform を蒸発させて, ^{32}P -diazinon を得た。この ^{32}P -diazinon を paper chromatography で調べたところ, 不純物の混入は認められなかった。 ^{32}P -diazoxon: The Radiochemical Center より購入した。入手時の比放射能は 10 mCi/mM であった。

殺虫試験

局所用法の場合は, 所定濃度の diazinon または diazoxon の acetone 溶液を, 微量注射器を用いて, $0.6\text{ }\mu\text{l}$ ずつ, イエバエの胸部背面に滴下し, 24時間後の死虫数を調べた。各濃度ごとに, 20頭, 3回の繰返しを行い, 中央致死薬量 (以下 LD_{50}) を求めた。注射法の場合は, 所定濃度の diazinon を acetone, 蒸留水の混合液 (80:20) に溶かし, イエバエ雌成虫の胸部小楯板の下から, 胸部の筋肉中へ, 皮下用 $1/5$ の注射針をつけた微量注射器を用いて, $0.3\text{ }\mu\text{l}$ ずつ注射した。注射針はハエに刺したまま, 注射後10秒間放置して, 注射液が傷口から体外へ流出するのを防いだ。24時間後に死虫数を調べ, LD_{50} を求めたが, この場合, 対照区の死虫率は常に 5% 以下であった。

AChE の阻害

酵素液: イエバエ成虫の頭部を切り取り, 氷冷した生理食塩水 (0.15 M NaCl , 0.04 M MgCl_2) で, 氷冷した乳鉢を用いて, よく摩砕し, 3 頭部/ml の濃度の摩砕液を得た。この摩砕液をガーゼでろ過し, 更に 500 g で5分間遠沈して, その上清を酵素液として用いた。

AChE 活性の測定: AChE の活性はワールブルグ検圧計を用いて, 常法により測定した。反応液の組成は次のとおりである。

主室	生理的食塩水	0.5 ml
	diazinon 又は diazoxon の水溶液	0.5 ml
	重曹水溶液 (0.138 M)	0.5 ml
	酵素液	1.0 ml
側室	アセチルコリン水溶液 (0.06 M)	0.5 ml

ガス腔 窒素 95% , 炭酸ガス 5%

反応容器を 37°C の恒温水槽に約5分間浸漬後, 側室のアセチルコリン水溶液を主室に注入して, 反応を開始した。10分ごとに30分間検圧計の変化を測定し, 測定値から, μl 炭酸ガス発生量/30分を求め, これを AChE の活性度とした。阻害剤無添加区の AChE の活性度を 100% として, diazinon, diazoxon 添加区の阻害度を求めた。

^{32}P -diazinon の体内侵入および代謝

所定量の ^{32}P -diazinon を処理したイエバエ雌成虫は, 25頭ずつ 50 ml の Erlenmeyer フラスコに入れ, フラスコの口部はステンレス製の金網でふたをした。所定時間後に, フラスコ内の knock down したハエの数を調べ, ハエを炭酸ガスで麻酔して取り出し, 共栓付試験管に移し, 5 ml の chloroform と 5 ml の蒸留水を加え, よく振とうして, 体表面に付着している diazinon および, 代謝物を洗い落とした。洗液は遠沈して, chloroform と水に分液した。更に2回, ハエを chloroform と蒸留水で洗った。第1回, 第2回の洗液の放射能活性を合わせて, 体表面の chloroform 可溶性分画および水溶性分画とした。3回目の洗液には放射能の活性はほとんど認められなかった。体表面を洗ったハエは, ガラス製の Potter and Elvehjem の homogenizer へ移し, 2 ml の蒸留水を加えて, 摩砕した。摩砕液はタンパク質を凝固させるために 100°C で1分間加熱し, 冷却後, 2 ml の蒸留水, 4 ml の chloroform を加えて, よく振とうし, その後遠沈して chloroform と水に分液した。おのおのの分画をそれぞれ体内の chloroform 可溶性分画, 水溶性分画とした。

一方, ハエを入れた容器は 2 ml の chloroform, 2 ml の蒸留水でよく洗い, chloroform 可溶性分画, 水溶性分画を得た。この場合, 前者はハエによって, 体表面よりこすり落された diazinon, 後者は排泄された diazinon の解毒分解物と考えられる。実験は, 各時間ごとに3回繰り返した。

Silica gel column chromatography による chloroform 可溶性分画よりの diazoxon の分離

^{32}P -diazinon を局所処理した場合のイエバエ体内における diazoxon の蓄積量を調べるために, chloroform 可溶性分画から, silica gel column chromatography によって diazoxon の分離を試みた。 4 g の silica gel (Mallinckrodt 社製, Analytical Reagent, 100メッシュ) に固定相として 2 ml の 90% methanol を加えて, よくかきまぜてから, 展開溶媒である 90% methanol を飽和させた *n*-hexane を用いて, 直径 1 cm の吸着用ガラス管に流し込み, 湿式法で吸着柱を作った。イエバエ

体内の chloroform 可溶性分画の一部を、窒素気流中で chloroform を蒸発させ、その残りに少量の展開溶媒を加えて、吸着柱上に移し、上記の展開溶媒で溶出し、流出液を 2 ml ずつ分取し、diazoxon を分離した。

放射能活性の測定

水溶性分画は、一定量をステンレス製の放射能測定用試料皿に取り、赤外線ランプで乾燥し、GM-counter で放射能活性を測定した。chloroform 可溶性分画および silica gel column chromatography の各分画は、放射能の蒸散を防ぐため、一定量の試料を試料皿に取ってから、diazinon, diazoxon を分解するための 20% KOH の ethanol 溶液と蒸散防止のために Triton X-100 1 滴を加え、赤外線ランプでゆっくり乾燥した後、GM-counter で放射能活性を測定した。

結果および考察

diazinon およびその生体内活性化物である diazoxon の銚田系および NAIDM 系に対する LD_{50} 値と resistance ratio を表 1 に示した。局所施用法により diazinon を処理した場合、銚田系は NAIDM 系に対して 62.7 の resistance ratio を示した。diazoxon に対しても 38.2 の値を示し、銚田系は diazoxon に対しても、交差抵抗性を示すことが観察された。注射法により diazinon を処理した場合も、resistance ratio は 54.0 を示し、局所施用法の場合と大きな差は見られなかった。

Table 1 Toxicity of diazinon and diazoxon to diazinon resistant HOKOTA strain and susceptible NAIDM strain of housefly

Insecticide	Strain	LD_{50} (μ g/fly)	Resistance ratio
Topical application			
	Diazinon		
	HOKOTA	4.03	62.7
	NAIDM	0.0643	1.0
Diazoxon	HOKOTA	1.42	38.2
	NAIDM	0.0372	1.0
Injection			
	Diazinon		
	HOKOTA	1.80	54.0
	NAIDM	0.0340	1.0

銚田系および NAIDM 系イエバエの頭部 AChE の diazinon による阻害は、図 1 に示したとおり、両系統間に差が認められず、 In_{50} は $8.6 \times 10^{-6} M$ であった。同様に、diazoxon による、AChE の阻害も両系統間に差が認められなかった（図 2）。その In_{50} は $4.4 \times 10^{-10} M$ であった。

Voss and Matsumura (1964), および Smissert (1964) は有機リン殺虫剤抵抗性のナミハダニ (*Tetra-*

Fig. 1 *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase of HOKOTA and NAIDM strains by diazinon

Fig. 2 *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase of HOKOTA and NAIDM strains by diazoxon

nychus urticae) で、抵抗性系統の ChE と感受性系統の ChE の間に、有機リン剤に対する親和性に差があり、抵抗性系統のダニの ChE は有機リン剤によって阻害されにくいことを報告し、これが抵抗性の要因の 1 つになっていることを指摘している。家畜を加害するマダニの 1 種 *Boophilus microplus* でも同様の現象が観察されている (Wharton and Roulston, 1970)。昆虫では、Hama and Iwata (1971) がカーバナメート系殺虫剤抵抗性のツマグロヨコバイには、カーバメート剤で、阻害されにくい ChE が存在し、それが抵抗性の機構として働いていることを示した。しかし、この 1 例を除いて、ChE の親和性が抵抗性の機構になっている例は昆虫では知られておらず、とくに、有機リン殺虫剤の抵抗

性に関しては、抵抗性系統と、感受性系統との間に有機リン剤に対する ChE の親和性に差がある例は報告されていない。銚田系の場合も、diazinon, diazoxon に対する AChE の親和性は NAIDM 系とまったく差がみられず、AChE の diazinon, および diazoxon に対する親和性は、抵抗性の機構に関係がないことが確認された。

Fig. 3 Penetration and metabolism of ^{32}P -diazinon ($0.5 \mu\text{g}/\text{female fly}$) applied topically to HOKOTA (○) and NAIDM (●) strains

- A : Radioactivity in water extractable fraction from the container and, the surface and inside of houseflies.
- B : Radioactivity in chloroform extractable fraction from the container.
- C : Radioactivity in chloroform extractable fraction from the inside of houseflies.
- D : Radioactivity in chloroform extractable fraction from the surface of houseflies.
- E : Percent of houseflies knocked down.

$0.5 \mu\text{g}/\text{fly}$ の ^{32}P -diazinon を銚田系および NAIDM 系のイエバエに、局所施用法で処理し、diazinon の体内への侵入および代謝を調べた結果を図 3 に示した。この薬量の diazinon を処理すると、30分後に、NAIDM 系の 90%、銚田系の 30% が knock down する。しかし、60分後では、銚田系のハエは knock down から回復するが、NAIDM 系の knock down 率は 100% に達

した (図 3 E)。体表面からの diazinon の消失は、感受性の NAIDM 系では、抵抗性の銚田系に比べて、かなり速やかに行なわれる (図 3 D)。容器に付着している diazinon (容器内の chloroform 可溶性分画) は、ハエが体表面からこすり落としたものと考えられるが、この量は、両系統間にほとんど差が認められなかった。(図 3 B)。それ故、NAIDM 系で、diazinon が体表面から速やかに消失するのは、NAIDM 系が銚田系に比べ、diazinon を体内へ速く浸透させるためであると推定される。NAIDM 系体内における chloroform 可溶性分画中の放射能活性のレベルは銚田系のそれより、かなり高く、NAIDM 系イエバエにおける速やかな diazinon の体内侵入を裏付けるものであろう (図 3 C)。体内の chloroform 可溶性分画は diazinon とその生体内活性化物である少量の diazoxon をともに含むものと考えられる。銚田系のハエが、ほとんど中毒症状を示さないでいるのは、体内 chloroform 可溶性分画中の diazinon と diazoxon のレベルが低いことに起因しているものと考えられた。一方、diazinon の分解生成物である水溶性分画中の放射能活性 (体内に残留しているもの、容器に排泄されたもの、および体表面に付着した排泄物を合わせた量) は、NAIDM 系で中毒症状が現われる処理後 30分から 120分にかけて、むしろ NAIDM 系の方が銚田系より多い (図 3 A)。diazinon を $0.5 \mu\text{g}/\text{fly}$ の薬量で処理した場合、NAIDM 系のハエは knock down するが、銚田系のハエは、ほとんど中毒症状を示さない。NAIDM 系における速い diazinon の体内浸透が、NAIDM 系の中毒症状の原因ではなく、むしろ逆に、ハエが knock down したために、ハエの生理的機能に変化をもたらし、diazinon を速く体内へ侵入させる可能性がある。この点を検討するために、処理薬量を $0.02 \mu\text{g}/\text{fly}$ にして実験を行なった。 $0.02 \mu\text{g}/\text{fly}$ の薬量で処理した場合、銚田系、NAIDM 系の両系統とも中毒症状をまったく示さなかった。この薬量でも、diazinon の体内浸透は NAIDM 系で速く (図 4 C)、その結果、体内の chloroform 可溶性分画のレベルも NAIDM 系のほうが高かった (図 4 B)。解毒による分解生成物の量も NAIDM 系で多く (図 4 A)、 $0.5 \mu\text{g}/\text{fly}$ の薬量を処理したのと同様な結果が得られた。それ故、NAIDM 系における速い diazinon の体内への侵入は中毒症状による二次的現象でないことが確認された。

Krueger ら (1960) は、diazinon 抵抗性および感受性のイエバエに、 ^{32}P -diazinon を $30, 4 \mu\text{g}/\text{g}$ (それぞれ約 $0.75, 0.1 \mu\text{g}/\text{fly}$ に相当) の薬量で局所施用し、感受性のハエでは抵抗性のハエに比べて、diazinon を速く

Fig. 4 Penetration and metabolism of ^{32}P -diazinon ($0.02 \mu\text{g}/\text{female fly}$) applied topically to HOKOTA (○) and NAIDM (●) strains

A : Radioactivity in water extractable fraction from the container and, the surface and inside of houseflies.

B : Radioactivity in chloroform extractable fraction from the inside of houseflies.

C : Radioactivity in chloroform extractable fraction from the surface of houseflies.

体内へ浸透させ、そのため体内の chloroform 可溶性分画のレベルが高く、また解毒される diazinon の量も感受性系統のほうが多いことも示した。また、Forgash *et al.* (1962) は、Krueger *et al.* (1960) が用いたのと同じ系統のイエバエで、 $0.025 \mu\text{g}/\text{fly}$ の薬量を処理して、同様に感受性系統では、diazinon の体内への浸透が速いことを観察し、この皮膚の diazinon 透過性の差が、抵抗性の1つの要因になっているとした。銚田系の場合も、Krueger *et al.*, Forgash *et al.* の結果と同じように皮膚の diazinon 透過性に差が認められ、これらが抵抗性の1つの要因になっていることが明らかにされた。

皮膚による diazinon の透過性の差を除外するために、 ^{32}P -diazinon を $0.5 \mu\text{g}/\text{fly}$ の薬量で注射し、diazinon の代謝を調べた。処理後30~60分で NAIDM 系のハエは全部 knock down したが、銚田系のハエでは顕著な中毒症状は観察されなかった。処理後30~60分では chloroform 可溶性分画のレベルは、銚田系、NAIDM 系の間で大きな差が認められない (図5)。これは中毒症状の発現と体内の chloroform 可溶性分画のレベルとの間に直接的な因果関係がないことを示している。

Fig. 5 Radioactivity in chloroform extractable fraction from the inside of houseflies, after injection of ^{32}P -diazinon ($0.5 \mu\text{g}/\text{female fly}$)

Fig. 6 Radioactivity in water extractable fraction from the container and, the surface and inside of houseflies, after injection of ^{32}P -diazinon ($0.5 \mu\text{g}/\text{female fly}$)

水溶性代謝物の生成量は処理後30分では、銚田系の方が大きい、30~60分後では、両系統間に大きな差が認められなくなった (図6)。局所用法で ^{32}P -diazinon を処理した場合、NAIDM 系で水溶性代謝物の生成量が多かったのは、体内侵入した diazinon が NAIDM 系で多いため、注射法によって体内の diazinon の量を同じにすれば、水溶性代謝物の生成量も2系統間に差がなくなることが明らかにされた。体内の chloroform 可溶性分画の回収率が低いのは、残りが体表面の chloroform 可溶性分画として回収されるからである。これは、注射した ^{32}P -diazinon が、傷口から体表面へ逆流したのか、chloroform で体表面を洗う際、chloroform

Table 2 Penetration and metabolism of ^{32}P -diazinon in HOKOTA and NAIDM strain, 60 min after topical application ($1\mu\text{g}/\text{female fly}$)

Location of radioactivity	Percent of applied dose found in	
	HOKOTA	NAIDM
Chloroform extractables	79.9	82.4
Insect surface	69.4	66.8
Insect internal	6.5	13.7
Container	3.9	2.0
Water extractables	14.3	9.9
Insect surface	1.0	1.0
Insect internal	11.9	8.8
Container	1.4	0.2
Total amount recovered	93.6	92.4

が傷口から体内へ侵入して、体内の diazinon を抽出するのいずれかによるものと推定された。

体内の chloroform 可溶性分画に含まれる diazoxon の量を調べるために、 $1\mu\text{g}/\text{fly}$ の ^{32}P -diazinon を局所施用法で処理した。銚田系のハエでは中毒症状の発現が観察できなかったが、NAIDM 系のハエは60分後に100% knock down した。この時点での ^{32}P 放射能活性の分布は表2に示したとおりである。体内の chloroform 可溶性分画のレベルは NAIDM 系では銚田系の約2倍に達している。この chloroform 可溶性分画の一部を取り、silica gel column chromatography の試料とした。まず標準物質の ^{32}P -diazinon と ^{32}P -diazoxon を column chromatography で分離したところ図7に示すように diazinon と diazoxon を分離することができた。そこで、体内の chloroform 可溶性分画をこの方法で diazinon と diazoxon に分離した(図

Fig. 7 Column chromatography on silicic acid of the authentic ^{32}P -diazinon and ^{32}P -diazoxon.

Fig. 8 Column chromatography on silicic acid of chloroform extractable fraction from the inside of houseflies, 60 min after topical application of ^{32}P -diazinon ($1\mu\text{g}/\text{female fly}$) to HOKOTA (○) and NAIDM (●) strains.

Table 3 ^{32}P -diazoxon contents of HOKOTA and NAIDM strain, 60 min after topical application of ^{32}P -diazinon ($1\mu\text{g}/\text{female fly}$).

	HOKOTA	NAIDM
Diazoxon concentration in internal chloroform extractable fraction (%)	0.3	6.4
Diazoxon content ($\text{m}\mu\text{g}/\text{fly}$)	0.20	8.77

8). イエバエ体内の chloroform 可溶性分画に含まれる diazoxon の割合は、表3に示したとおり、銚田系では0.3%、NAIDM 系では6.4%と、約20倍の差があった。これは、1頭当たりで換算すると約43倍になり。感受性の NAIDM 系では、銚田系に比べて、多量の diazoxon を体内に蓄積していることが明らかにされた。有機リン剤抵抗性に関して、感受性の昆虫が抵抗性の昆虫に比べて、体内に多量の $\text{P}=\text{O}$ 誘導体を蓄積していることは、Krueger *et al.* (1960) がイエバエで、Matsumura and Brown (1961) が *Culex* で報告している。

diazinon が昆虫体内で diazoxon に活性化されてから、作用点である AChE を阻害することはよく知られており、それは図1、図2に示したように、diazoxon は diazinon に比べて強い AChE 阻害力を持つことでも明らかである。NAIDM 系における多量の diazoxon の蓄積は、NAIDM 系イエバエの knock down の直接の原因であり、また死の直接の原因でもある。換言すれば、銚田系のハエが diazinon を処理されても生存できるのは、銚田系では diazoxon を体内に蓄積させないた

めに解毒酵素などが存在し、これが抵抗性の主な機構として働いているものと思われる。

Plapp and Hoyer (1968) は organotin-R と呼ばれる遺伝子が殺虫剤のイエバエ体内への浸透を低下させることを示し、この遺伝子単独では抵抗性を発現しないが、他の抵抗性の遺伝子が同時に存在すると、その働きを増強すると報告している。銚田系における皮膚の diazinon 透過性の低下も、たしかに体内の chloroform 可溶性分画のレベルを NAIDM 系の $1/2$ に低下させるが、chloroform 可溶性分画中に占める diazoxon の割合が、銚田系では NAIDM 系の $1/20$ と低いことから、diazoxon の蓄積を低くしている解毒酵素などの働きに比べて、皮膚の透過性の抵抗性機構における役割は補助的なものと思われる。

要 約

銚田系 diazinon 抵抗性イエバエは、感受性の NAIDM 系に対して、局所施用法で処理した場合、diazinon に対して62.7, diazoxon に対して38.2の resistance ratio を示した。注射法で処理した場合も、diazinon に対して54.0の resistance ratio を示した。

頭部 AChE の diazinon, diazoxon に対する感受性は銚田系、NAIDM 系の間で差が認められなかった。

^{32}P -diazinon を局所施用法で処理し、diazinon のイエバエ体内への浸透を調べたところ、NAIDM 系では速やかに diazinon を体内へ浸透させ、その結果、体内の chloroform 可溶性分画のレベルは銚田系の約2倍に達した。

$1\mu\text{g}/\text{fly}$ の ^{32}P -diazinon を局所施用法で処理し、NAIDM 系のハエが100% knock down した処理後60分に、体内の chloroform 可溶性分画に含まれる diazoxon の割合を調べたところ、銚田系では0.3%, NAIDM 系では6.4%であった。これは、それぞれ1頭当り0.20 m μg , 8.77 m μg に相当し、NAIDM 系は銚田系の約44倍の diazoxon を蓄積していることが明らかになった。NAIDM 系におけるこの高い diazoxon の蓄積は、一部は、皮膚の透過性に起因するが、主として、解毒などの他の要因によるものと推定された。

謝 辞

本研究のご指導を賜った東京大学農学部山崎輝男名誉教授、同松本義明教授、ならびにご助言と各種化合物をご提供くださった理化学研究所深見順一博士、農業技術研究所宍戸孝博士、銚田系イエバエをご提供くださった国立予防衛生研究所朝比奈正二郎博士、同安富和男博士に深く感謝申し上げる。

文 献

- Forgash, A. J., B. J. Cook and R. C. Riley (1962) : Mechanisms of resistance in diazinon-selected multi-resistant *Musca domestica*. *J. Econ. Entomol.*, **55**(4) : 544-551.
- Hama, H. and T. Iwata (1971) : Insensitive cholinesterase in the Nakagawara strain of the green leafhopper, *Nephotettix cincticeps* UHLER (Hemiptera: Cicadellidae), as a cause of resistance to carbamate insecticides. *Appl. Ent. Zool.*, **6**(4) : 183-191.
- 林晃史, 甘日出正美, 長谷川恩, 服部睦作 (1971) : 北海道におけるイエバエ成虫の殺虫剤感受性について. 防虫科学, **36**(2) : 41-42.
- 林晃史 (1973) 日本におけるイエバエの殺虫剤抵抗性の現状について. 防虫科学, **38**(3) : 158-164.
- Krueger, H. R., R. D. O'Brien and W. C. Dauterman (1960) : Relationship between metabolism and differential toxicity in insects and mice of diazinon, dimethoate, parathion and acethion. *J. Econ. Entomol.*, **53**(1) : 25-31.
- Lewis, J. B. and R. M. Sawicki (1971) : Characterization of the resistance mechanisms to diazinon, parathion and diazoxon in the organophosphorus-resistant SKA strain of house flies (*Musca domestica*). *Pesticide Biochem. Physiol.*, **1** : 275-285.
- Louloudes, S. J., J. N. Kaplanis and C. C. Roan (1956) : The synthesis of radioactive diazinon using ^{32}P . *J. Org. Chem.*, **21** : 685.
- Matsmura, F. and A. W. A. Brown (1961) : Biochemistry of malathion resistance in *Culex tarsalis*. *J. Econ. Entomol.*, **54** : 1176-1185.
- Oppenoorth, F. J. and K. van Asperen (1961) : The detoxication enzymes causing organophosphate resistance in the housefly; properties, inhibition and the action of inhibitors as synergists. *Entomol. Exp. Appl.*, **4**(4) : 311-333.
- Plapp, F. W., Jr. and R. F. Hoyer (1968) : Insecticide resistance in the housefly : Decreased rate of absorption as the mechanisms of action of a gene that acts as a intensifier of resistance. *J. Econ. Entomol.*, **61**(5) : 1298-1303.
- Smissart, H. R. (1964) : Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science*, **143** : 129-131.
- Suzuki, T., S. Hirakoso and H. Matsunaga (1951) : Diazinon resistance in house flies of Japan. *Jap. J. Exp. Med.*, **31**(5) : 351-364.
- 鈴木猛 (1968) : 各種有機燐殺虫剤に抵抗性のアカイエカの発見. 衛生動物, **19**(2) : 98-100.
- Voss, G. and F. Matsumura (1964) : Resistance to organophosphorus compounds in the two-spotted spider mite: two different mechanisms of resistance. *Nature*, **202** : 319-320.
- Wharton, R. H. and W. J. Roulston (1970) : Re-

- sistance of ticks to chemicals. *Ann. Rev. Entomol.*, **15** : 381-404.
- Yang, R. S., E. Hodgson and W. C. Dauterman (1971) : Metabolism in vitro diazinon and diazoxon in susceptible and resistant houseflies. *J. Agr. Food Chem.*, **19**(1) : 14-19.
- 安富和男 (1961) : 各種昆虫の殺虫剤に対する抵抗性の研究 第8報. イエバエの diazinon に対する抵抗性の発達と消失について. 衛生動物, **12**(2) : 124-129.
- Yasutomi, K. (1970) : Studies on organophosphate-resistance and esterase activity in the mosquitoes of the *Culex pipiens* group I. *Jap. J. Sanit. Zool.*, **21**(1) : 41-45.
- Yasutomi, K. (1971) : Studies on diazinon-resistance and esterase activity in *Culex tritaeniorhynchus* I. *Jap. J. Sanit. Zool.*, **22**(1) : 8-13.
- Yasutomi, K. (1973) : Insecticide resistance in the houseflies of New Yumenoshima, the 15th dumping-island of Tokyo. *Jap. J. Sanit. Zool.*, **23**(3) : 255-256.

Summary

By topical application, Hokota strains was 63 times as resistant as susceptible NAIDM strain to diazinon, and 38 times to diazoxon. Resistance

of Hokota strain to diazinon, on the other hand, was about 54 times, when the insecticide was injected.

Acetylcholinesterase preparations from both Hokota and NAIDM strain were affected similarly by diazinon or diazoxon, *in vitro*. IN_{50} values for acetylcholinesterase of both strains were respectively 8×10^{-7} M to diazinon and 4×10^{-10} M to diazoxon.

By topical application of ^{32}P -diazinon, it was revealed that diazinon penetrated the integument of NAIDM strain more rapidly than that of Hokota strain. Consequently, greater quantities of chloroform extractables were found in the susceptible flies than in the resistant flies.

Diazoxon contents in chloroform extractables in Hokota and NAIDM strain were 0.3 and 6.4%, respectively, which were equivalent to 0.20 and 8.77 $\mu g/fly$, 1 hr after topical application of 1 $\mu g/fly$ diazinon. The higher diazoxon level in susceptible strain, which was immediate cause of death in susceptible flies, seems to depend partly on rapid diazinon penetration through the integument, but mainly on the other mechanisms, such as lower rate of degradation of the insecticide.