

チル耐性菌株の出現。日植病報 33 : 27—31. 4) 上  
杉康彦 (1978) 薬剤耐性 植物病理化学最近の進歩 (平  
井・鈴木両教授還暦記念) : 211—220. 5) 山本 磐  
(1975) ベノミル耐性灰色かび病菌の野菜における発生

と対策。植物防疫 29 : 194—196. 6) 山本 磐 (19  
76) 薬剤耐性菌に関するシンポジウム, 17, 日本植物防  
疫協会, 53pp.

(1978年7月26日受領)

## 薬剤抵抗性ツマグロヨコバイに対するマラソンと カーバメイト剤の共力作用とその機作

渋 谷 一 郎 (八洲化学工業株式会社研究所)

I. SHIBUYA : Joint action of malathion and carbamate insecticides and its mode of action to the insecticide-resistant green rice leafhopper, *Nephrotettix cincticeps* Uhler

近年問題となっているカーバメイト剤抵抗性ツマグロヨコバイは、すでに有機リン剤抵抗性の発達した個体群にさらにカーバメイト剤に対する抵抗性が発達して来たものが多く、そのため有機リン剤とカーバメイト剤の両方に対し、抵抗性を示しその防除は極めて困難になっている。

一方マラソンに抵抗性を示すツマグロヨコバイに対し、DDVP, IBP, 各種カーバメイト剤がマラソンと共力効果を有することがすでに報告されている<sup>1,2,3,4)</sup>。DDVP とマラソンの共力作用については小島ら<sup>5)</sup>によって、DDVP がマラソンの分解酵素の 1 つであるカルボキシルエステラーゼを阻害し、それによりマラソンの効果が増強されることが報告され、またカーバメイト剤とマラソンを含む有機リン剤の抵抗性ツマグロヨコバイに対する共力効果についても抵抗性個体群の有機リン剤を分解する酵素がカーバメイト剤により阻害されることが浜<sup>6)</sup>らにより推察されている。

著者ら<sup>7)</sup>は前報において、長野県北安曇郡松川村で採集したツマグロヨコバイのマラソン, BPMC, MTMC, MPMC に対する抵抗性レベルとこれら薬剤に対するコリンエステラーゼの感受性についての知見を報告した。今回は松川抵抗性系ツマグロヨコバイ個体群を用い、BPMC, NAC, MPMC, XMC, DDVP, EDDP をそれぞれマラソンと混合した場合の共力効果を検討し、さらにそれらの共力作用の機作について、各薬剤の in vitro におけるマラソン分解酵素および非特異的エステラーゼ (アリエステラーゼ) の阻害について検討した。

本文に入るに先だち、本稿の校閲をしていただいた農業技術研究所浜弘司技官に深く謝意を表する。

### I 材料および方法

抵抗性系として用いたツマグロヨコバイは1977年9月中旬に長野県北安曇郡松川村の水田で採集し、その後八洲化学工業株式会社の研究所で稻幼苗を用いて継代飼育を行い、5~6世代を経過したものである。また感受性系としては長野市の八洲化学工業株式会社研究所の圃場から1969年に採集され、その後八洲化学工業研究所で無淘汰で継代飼育されてきたものである。この 2 系統のマラソン, ダイアジノン, BPMC および NAC に対する局所施用法による検定で得た LD<sub>50</sub> 値は第 1 表に示したとおりである。

Table 1. LD<sub>50</sub> value ( $\mu\text{g/g}$  of body weight) of malathion, diazinon, BPMC and NAC to Matsukawa (R) and Yashima (S) strains of the green rice leafhopper

Insecticide	Matsukawa	Yashima
malathion	97.9	1.6
diazinon	69.0	4.1
BPMC	81.9	2.1
NAC	22.0	4.3

供試薬剤はマラソン, BPMC, NAC, XMC, MPMC PHC は純品を用い、DDVP は減圧蒸留により精製したもの (99%), また EDDP は分析用標準品 (90%) を用いた。各薬剤は 1 % のアセトン溶液とし、-20°C のフリーザーに貯蔵した。

混合施用の試験にはマラソンと供試薬剤の等濃度のアセトン溶液を 1 : 1 に混合した後、所定濃度に稀釀して

用いた。殺虫試験は局所施用法によった。すなわちCO<sub>2</sub>麻酔したツマグロヨコバイ雌成虫の腹部腹面に混合液0.2μlをミクロアブリケーターで処理し、イネ芽出しを入れた透明なプラスチック容器(直径8cm、高さ4cm)に入れ、25±1°Cの定温室に置き、24時間後に生死を判定した。各処理区それぞれ25頭ずつ供試し、2回復で行なった。結果はBliss法により計算し、中央致死量(LD<sub>50</sub>)を算出した。なお施用量は混合した2薬剤の薬量の和で示した。

マラソン分解酵素活性の測定は次のように行なった。リン酸緩衝液(1/15M, pH7.0)1ml当り100mgのツマグロヨコバイ成虫(雄および雌)をガラスホモジナイザーを用いて磨碎し、3,000rpmで10分間遠沈した上澄を酵素液とした。この酵素液4mlに基質としてマラソンのエタノール溶液(10ppm)を40μl加え、30°Cで2時間反応させた後、40%TCA溶液0.4mlを加えて反応を停止させた。これに内標準物質としてMEP(10ppm)を溶かしたヘキサンを4ml加えて激しく振盪し、残存しているマラソンを抽出し、遠心分離した後、ヘキサン層中のマラソンをガスクロマトグラフを用いて定量した。ガスクロマトグラフの操作条件は次のとおりである。

機種:島津GC-5A

検出器:FTD(KBrチップ)

分離管:φ3m/m長さ1m

充填剤:2%DEGS(chromosorb G)

Aw DMCS 60~80mesh

分離管温度:205°C, 注入口, 検出器温度:220°C,

キャリアガス:N<sub>2</sub>, 流量:40ml/min。

非特異的エステラーゼ活性の測定にはmethyl n-butyrateとβ-naphthyl acetateの2基質を用いた。methyl n-butyrateを基質にした場合にはリン酸緩衝液(1/15M, pH7.0)1ml当り松川系は4~5頭、感受性系は10頭の雌成虫をガラスホモジナイザーを用いて磨碎し、ガラスウールでろ過したものを酵素液とし、この酵素液1mlに基質として0.004Mのmethyl n-butyrate1mlを加え、30°Cで20分間反応させた後残存基質をHestrin法で発色させ、530nmで比色定量した。測定は5回復行い、酵素活性は酵素液中の蛋白1mg当りの基質分解量で示した。

β-naphthyl acetateを基質とした場合はリン酸緩衝液(1/15M, pH7.0)10mlあたり感受性系は10雌成虫、抵抗性系は2雌成虫をガラスホモジナイザーを用いて磨碎後、ガラスウールでろ過したものを酵素液とし、前報<sup>5</sup>の方法に準じて行なった。基質液はβ-naphthyl acetate 10mgを2mlのアセトンに溶かし、リン酸緩衝液で100mlにしたもの用いた。反応時間は30°C、5分

間とした。酵素活性は酵素液中の蛋白1mg当りのβ-naphthol生成量で表示した。

なお蛋白量は血清アルブミンを標準物質としてLowry法により定量した。

カーバメイト剤およびDDVP, EDDPによるマラソン分解酵素とアリエステラーゼの阻害実験は、いわゆるPre-incubation法によった。各阻害剤のアセトン溶液をマイクロシリングで所定量(各阻害剤の最終濃度は10<sup>-6</sup>Mとした)取り、アセトンを減圧下で除去した後、酵素液を所定量加え、30°Cで15分間阻害させた。阻害実験に用いた酵素液は前述の酵素活性の測定に用いたものと同様の方法で調製したものである。阻害後の残存活性は、前述の方法に準じ測定し、無処理区の活性に対する比を阻害率とした。

## II 結果および考察

松川系ツマグロヨコバイ(R系)に対するマラソン、BPMC、NAC、XMC、MPMC、MTMC、DDVP、EDDPのLD<sub>50</sub>値およびそれぞれの薬剤とマラソンの混合液のLD<sub>50</sub>値とそれらの共力作用係数を第2表に示した。共力作用係数はSun and Johnsonの方法により計算した。供試した各薬剤はすべて共力作用係数が100以上を示し、松川抵抗性系ツマグロヨコバイに対し高い共力効果を示すことが判明した。またマラソン+DDVPの組み合せがやや高いLD<sub>50</sub>値であったが他の組み合せではいずれもLD<sub>50</sub>値は13μg/g前後に集中した。このようにLD<sub>50</sub>値が比較的狭い範囲に集中することは浜らの結果と類似していた。

Table 2. The synergistic effect of mixtures of malathion with DDVP, EDDP and five carbamate insecticides to the Matsukawa strain (R)

Insecticide	LD <sub>50</sub> (μg/g of body weight)	Co-toxicity Coefficient
malathion	97.9	
+ BPMC	81.9	
+ MTMC	57.5	
+ MPMC	67.2	
+ XMC	71.6	
+ NAC	22.0	
+ DDVP	493.9	
+ EDDP	44.0	
malathion		
+ BPMC	10.9	818
+ MTMC	15.6	462
+ MPMC	13.1	608
+ XMC	15.1	548
+ NAC	13.1	274
+ DDVP	25.6	628
+ EDDP	10.9	557

Table 3. The activity of enzymes hydrolyzing  $\beta$ -naphthyl acetate, methyl *n*-butyrate and malathion in the homogenates of Matsukawa (R) and Yashima (S) strains of the green rice leafhopper.

Substrate	R	S	(R/S)
$\beta$ -naphthyl acetate	237.3 <sup>a</sup>	36.8 <sup>a</sup>	6.4
methyl <i>n</i> -butyrate	652.6 <sup>b</sup>	107.1 <sup>b</sup>	6.1
malathion	4.6 <sup>c</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.6

a :  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of protein/5 min.  
b :  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of protein/20 min.  
c :  $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  of body weight/2 hr.

Table 4. Effect of inhibitors on the degradation of malathion,  $\beta$ -naphthyl acetate and methyl *n*-butyrate by homogenate of Matsukawa (R) and Yashima (S) strains.

Inhibitor ( $10^{-6}\text{M}$ )	Inhibition of each substrate hydrolyzed (%)				
	mala-		$\beta$ -naphthyl	methyl <i>n</i> -butyrate	
	thion	acetate	acetate	R	S
BPMC	80.6	86.1	72.1	28.9	61.5
NAC	82.1	84.6	73.8	39.6	62.8
MPMC	55.2	58.0	52.7	80.3	59.0
XMC	67.2	74.7	65.3	84.1	60.7
PHC	—	73.6	66.7	94.4	63.6
DDVP	92.5	96.4	87.4	82.7	74.5
EDDP	92.5	96.0	83.2	87.2	65.7

松川抵抗性系および感受性系ツマグロヨコバイのホモジネート中のマラソン分解酵素およびアリエステラーゼ活性を第3表に示した。マラソン分解酵素の活性は松川系では感受性系よりも4.6倍高く、またアリエステラーゼ活性も松川系では、 $\beta$ -naphthyl acetate を基質とした場合は6.4倍、methyl *n*-butyrate を基質とした場合は6.1倍、感受性系よりも高かった。これらの結果はマラソン抵抗性ツマグロヨコバイにおいて認められている結果と同様である。

マラソンと共力効果を示した7薬剤によるマラソン分解酵素およびアリエステラーゼの阻害実験の結果は第4表に示したとおりである。この実験では各薬剤の最終濃度はすべて  $10^{-6}\text{M}$  で行なった。

マラソン分解酵素は、DDVP と EDDP により90%以上阻害された。カーバメイト剤の中では、BPMC と NAC が強い阻害力を示したが、MPMC と XMC は比較的阻害力が弱かった。このように DDVP, EDDP および各種カーバメイト剤が比較的低濃度でマラソン分解酵素を阻害することは、これらの薬剤とマラソンの共力作用が、マラソンと混合された薬剤により、マラソン分解酵素が阻害されることによって発現することを示唆させ

る。

また小島ら<sup>13</sup>はワールブルグ検査法でマラソン分解酵素活性を測定し、NAC がこの酵素を阻害しないことを報告しているが、本試験では NAC はマラソン分解酵素を明らかに阻害した。

また本試験に用いた各種カーバメイト剤および DDV P, EDDP はアリエステラーゼも阻害した。抵抗性系の  $\beta$ -naphthyl acetate を水解するエステラーゼ活性の阻害率は、マラソン分解酵素の阻害率と類似した傾向を示した。すなわち両酵素とも、DDVP と EDDP により最も強く阻害され、BPMC, NAC による阻害率がそれに続き、XMC, PHC, MPMC はやや阻害力が弱かった。感受性系のアリエステラーゼも同じ傾向を示したが、抵抗性系のものに較べるとやや低かった。本種のアリエステラーゼの阻害がマラソン分解酵素と類似した傾向を示したこととは興味深い。

methyl *n*-butyrate を分解する酵素活性も各種薬剤に阻害されたが、PHC が他剤よりもやや強い阻害力を示したほか、他剤はほぼ同程度の阻害力であり、上述のマラソン分解酵素および  $\beta$ -naphthyl acetate を分解する酵素とはその傾向が多少異なっていた。抵抗性系のアリエステラーゼは感受性系の酵素に比較し、供試したいずれの薬剤に対しても感受性がむしろ高かったが、このことは抵抗性系と感受性系の酵素の質的な違いを暗示させる点で興味深い。既に浜ら<sup>14</sup>は中川原抵抗性系統の methyl *n*-butyrate を加水分解する酵素が PHC により感受性系のものより  $I_{50}$  値で約100倍強く阻害されることを報告している。

## 摘要

1 BPMC, NAC, MPMC, XMC, DDVP, EDDP をマラソンと混合し、有機リン剤とカーバメイト剤に対し抵抗性を示す松川系ツマグロヨコバイに局所施用した場合、いずれの組合せでも高い共力効果が確認された。

2 松川抵抗性系のマラソン分解酵素、 $\beta$ -naphthyl acetate および methyl *n*-butyrate を加水分解する酵素活性は感受性系のそれぞれ4.6倍、6.4倍、6.1倍高かった。

3 BPMC, NAC, MPMC, XMC, DDVP, EDDP の各薬剤は  $10^{-6}\text{M}$  の濃度でマラソン分解酵素活性を55~92%阻害した。それらの阻害力は DDVP=EDDP>NAC>BPMC>XMC>MPMC の順であった。

4 上記6薬剤と PHC ( $10^{-6}\text{M}$ ) は  $\beta$ -naphthyl acetate を分解する酵素活性もマラソン分解酵素と同程度阻害したが、その阻害程度は DDVP=EDDP > BPMC > NAC>XMC>PHC>MPMC の順であった。

5 methyl *n*-butyrate を分解する酵素も各薬剤により同様に阻害を受けるが、阻害程度は薬剤間であまり差がなかった。

6  $\beta$ -naphthyl acetate と methyl *n*-butyrate を分解する酵素活性の各薬剤による阻害程度はいずれも感受性系よりも抵抗性系で高かった。

### 引用文献

- 1) 小島建一, 石塚忠克 (1959) ツマグロヨコバイ成虫に対する malathion 効力の DDVP による増強について, 防虫科学 25 : 16—22.
- 2) 小島建一, 石塚忠克 (1959) ツマグロヨコバイ成虫における数種有機リン酸エステル殺虫剤の酵素的解毒とくに malathion 解毒酵素とその阻害について, 防虫科学 25 : 22—30.
- 3)

浜弘司, 岩田俊一 (1973) 殺虫剤抵抗性ツマグロヨコバイに対するカーバメイト系殺虫剤と有機リン系殺虫剤の共力作用. 応動昆 17 : 181—186.

4) 吉岡幸治郎, 松本益美, 別宮岩義, 金森正剛 (1975) 殺虫剤抵抗性ツマグロヨコバイに対する IBP と各種殺虫剤の共力作用 四国植防 10 : 49—58.

5) 渋谷一郎, 小林莊一 (1977) 薬剤抵抗性ツマグロヨコバイの 2, 3 の酵素的性質 北陸病虫研報 25 : 63—66.

6) Hama, H. and T. Iwata (1972) Sensitive alisterase to a carbamate insecticide, propoxur, in the resistant strains of the green rice leafhopper. Appl. Ent. Zool. 7 : 177—179.

(1978年7月24日受領)

## イネいもち病菌代謝産物の生物活性について

佐藤善司 (北陸農業試験場)

### Z. SATO : Studies on biological activities of phytotoxic metabolites of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*

玉利ら (1954)<sup>5)</sup> はイネいもち病菌の培養液からピリキュラリン (構造式未定) 及び  $\alpha$ -ピコリン酸の 2 物質を単離して、いもち病菌の毒素として報告した。ピリキュラリンの害作用を受けたイネの体内に多量のクマリンが集積すること<sup>6)</sup>、又、いもち病罹病イネからも多量のクマリンが分離されること<sup>7)</sup>から、玉利 (1966)<sup>8)</sup> はいもち病罹病イネの“ずりこみ”現象はピリキュラリンによるイネの代謝阻害によって生じる第三の毒素クマリンの異常集積と密接な関連があるのでないかと推論している。

しかし、著者ら (1971)<sup>4)</sup> はいもち病罹病イネからクマリンを検出できなかったことから、東京大学応用微生物研究所第 8 研究部 (主任教授奥田重信博士) と共同でピリキュラリン毒素説の再検討を始めた。

その結果、いもち病菌の培養液から既知化合物を含めて 11 種の代謝産物 (図 1, I ~ X) を単離してその化学構造を明らかにしたが<sup>1,2,3)</sup>、ピリキュラリン及び  $\alpha$ -ピコリン酸は全く検出されなかった。

本報告はこれら 11 種の代謝産物のイネに対する生物活性についての実験結果である。実験を行うに当たり、有

益な御指導と多大な御援助を頂いた東大応微研 8 研奥田重信教授を始め、同研究部の各位に厚くお礼申し上げる。

なお、本実験は著者が農業技術研究所在任中に行ったものである。

### I 実験方法

1 いもち病々斑類似の壊死斑形成作用 シードリングケース ( $5 \times 15 \times 10$  cm) に栽培した品種愛知旭の最上完全展開葉 (第 6 葉) の葉身片側 2 個所に病菌接種用リーフパンチで付傷し (径 1.5 mm), その付傷部に所定濃度の供試液  $5 \mu\text{l}$  を滴下し、もう一方の片側 2 個所には対照として蒸溜水だけを滴下して室温で乾燥させた後、 $28^{\circ}\text{C}$  の温室に 24 時間保持した。その後、 $26^{\circ}\text{C}$  の温室に移して 6 日後迄壊死斑形成の有無を調査した。1 区 2 葉計 4 個所を供試した。

2 イネ幼苗の生育阻害作用 消毒した品種愛知旭の種子を  $30^{\circ}\text{C}$  で 2 日間水没して発芽させ、芽長のそろった 8 個の種子を選んでアクリル樹脂製の種子保持器にはさみ、所定濃度の供試液  $2 \text{ ml}$  を入れたガラス管 (3