

有機りん剤抵抗性イエバエの電気泳動像

林 晃史

On the Enzymeactivities in the OP-resistance Houseflies by Agar Gel Electrophoresis

Akifumi KAYASHI

1 はじめに

林(1989)¹⁾は、本邦および東南アジア諸国のイエバエの殺虫剤感受性について調査研究を行い、本邦産イエバエは有機りん系殺虫剤のmalathionやfenitrothionに対し、強い抵抗性を持つ傾向にあることを明かにした。この抵抗性の作用機構を調べる方法のひとつとして、電気泳動法が萩田ら(1962, 65)^{2),3)}や安富(1968)⁴⁾によって試みられた。しかし、当時のイエバエの有機りん系殺虫剤に対する抵抗性のレベルが今日程でなかったこと、その後の研究がなく、この方法の、実用的価値が不明であった。

本報では、著者らの研究を中心に、電気泳動法による特異泳動帯と抵抗性に関する解説を試みた。

1. 最近のイエバエの殺虫剤抵抗性のレベル
イエバエの殺虫剤抵抗性が問題になるのは、一般家庭においてではなく、大形の鶏畜舎やごみ埋立地である。年間の殺虫剤散布期間が短かく、短期間に集中的に実施された、東北地方の大型養鶏場における、抵抗性のレベルを調べた。その結果は表1に整理したごとくである。この実験を行った養鶏場は、人家の無い林野に独立しており、それぞれの養鶏場との間隔は3km~5kmと離れた環境である。

表1. 東北地方(八戸地区)の大型鶏舎のイエバエの薬剤感受性

採集地	LD-50値(μg/雌) および KT-50値(時間)							
	スミチオン10% 乳剤 10倍液		ダイアジノン5% 乳剤 10倍液		バイテックス5% 乳剤 10倍液		DDVP5%乳剤 10倍液	
	LD-50	KT-50	LD-50	KT-50	LD-50	KT-50	LD-50	KT-50
第2農場	31.54 (300倍)	11.2 83.0%	2.393 (8倍)	2.3 100.0%	0.774 (7倍)	3.2 100.0%	0.234 (3倍)	2.6 90.0%
第5農場	5.011 (45倍)	9.5 75.0%	1.694 -	2.1 100.0%	1.199 (10倍)	3.6 100.0%	0.199 -	2.3 100.0%
金浜農場	3.155 (30倍)	10.0 69.0%	0.910 -	1.8 100.0%	0.561 -	4.3 100.0%	0.123 (1.4倍)	1.6 99.9%
前田農場	1.510 (14倍)	8.9 100.0%	0.397 -	1.3 100.0%	0.405 (4倍)	3.8 100.0%	0.132 -	2.5 100.0%

備考: KT-50値は、ろ紙接触法(0.5ml/シャーレ)により求めた。KT-50値の下段の数値は24時間後の致死率。LD-50値の下段の()内は抵抗性比

殺虫力は原体で、速効性(ノックダウン効果)は実用製剤で試験した。

スミチオンに対するイエバエの感受性は第二農場の300倍(31.54 μg/♀)から前田農場の14倍(1.510 μg/♀)と、いずれも抵抗性ではあるが、農場間の差異は大きい。

また、50%ノックダウン所用時間は8.9時間から11.2時間で、残留噴霧の効果は期待出来ない。

各薬剤ともに、農場間で若干の違いはあるが、供試薬剤中で、駆除効果の期待出来るものはDDVP剤、ダイアジノン剤、バイテックス剤で、スミチオン剤は抵抗性の発達が顕著で、その効果は期待出来ない。

なお、スミチオンに対する抵抗性比が50倍のイエバエ

にスミチオン10%乳剤の原液を直接噴霧した場合、50%ノックダウン所要時間は17分と運動性であった。

大型鶏舎では、低毒性有機りん剤に対し、年ごとに抵抗性が発達し、その地域は広がりつつある。

2. イエバエの系統間の電気泳動像^{3),6)}

有機りん剤抵抗性イエバエのエステラーゼZymogram型は非特異的な基質であるβ-naphthyl acetateで電気泳動を行うと、有機りん剤抵抗性系統に顕著な泳動帯が検出される。

なお、この泳動帯構成酵素はCarboxyesteraseとされている。

実験に使用したイエバエは、本邦産および外国産で各種殺虫剤に対する抵抗性レベルの明かな系統である。また、電気泳動の操作条件は次のごとくである。

電気泳動用の試料を電気泳動にかけ際の濾紙細片(1.5×12mm)に磨砕液を吸収させて、寒天ゲルフィルム(5cm)の陰極側より5cmの所にならべ、30分間、5°Cの恒温室において試料を寒天ゲルに吸収させた後、濾紙片を取り去り泳動を行った。

なお、試料の作製はイエバエを1頭づつ、ホール・スライドに入れ、脱イオン水を0.5ml加えて磨砕し調整した。

泳動条件は次のごとくである。

寒天ゲル……寒天0.7g+P.V.A. (Polyvinylpyrrolidone, K=90) 2.0g+イオン強度0.03μ, pH6.8の燐酸緩衝液170ml+脱イオン水30ml

電解液……イオン強度0.05μの燐酸緩衝液, pH6.8

基質……1%B-naphthyl acetateのアセトン溶液

発色剤……2% naphthanildiazo blue Bの水溶液

泳動時間……30mA/plateで70分(5°C恒温室)

Incubation……泳動後、37°Cで60分後

以上の条件で操作し、2%のnaphthanildiazo blue B水溶液を流して、赤紅色の活性泳動帯を発色させ、約5時間ゆるやかた流水で水洗後、乾燥器に入れて乾燥させた。

この様にして得られた電気泳動像は図1に整理したごとくである。

それぞれの系統で異ってZymogram型を示すが、識別可能な泳動帯は陰極(-)側に1本、陽極(+)側に1千本であった。

この泳動帯を陽極側より番号をつけて整理すると、明瞭な泳動像を示す5番目のE₅泳動帯を持つものは、有機りん系殺虫剤に抵抗性を示す傾向にあることがわかった。ことに、malathionに強い抵抗性を持つ場合に顕著であった。

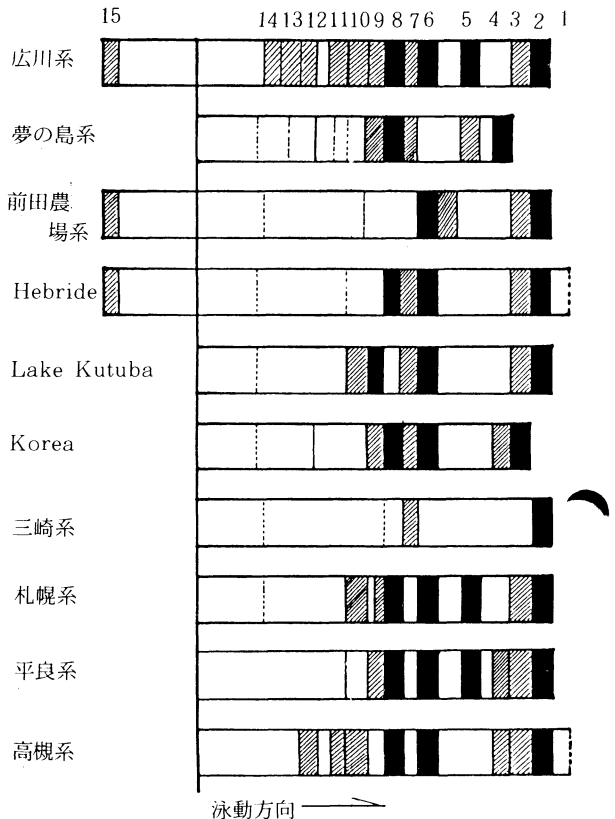


図1. 薬剤感受性の異なるイエバエの電気泳動像

E₅泳動帯が明瞭な系統は、いずれもmalathionに対するLD₅₀値が80μg/♀以上である。

なお、抵抗性系統間における個々の出率は、個体変動があるが40%以上であった。

安富(1968)¹⁾による有機りん剤抵抗性イエバエでは、E₂, E₃, E₄泳動帯が顕著であるとしているが、系統や抵抗性のレベルの違いなどで必ずしも一致しない。

しかし、E₂からE₅泳動帯の間に抵抗性レベルと関係の深い泳動帯の存在することに関しては同一見解である。

なお、Menzel, et. al. (1963)²⁾は有機りん剤抵抗性系統と感受性系統の間における泳動帯には顕著な差異がないとしている。

3. Malathionによる淘汰とE₅泳動帯の出現率³⁾

malathion抵抗性とE₅泳動帯の存在が密接な関係にあるとすれば、malathionによる淘汰で出現率が高くなるのが推定出来る。

ここでは、有機りん剤抵抗性系統であるが、累代飼育中に抵抗性が消滅した広川系を用い、malathionによ

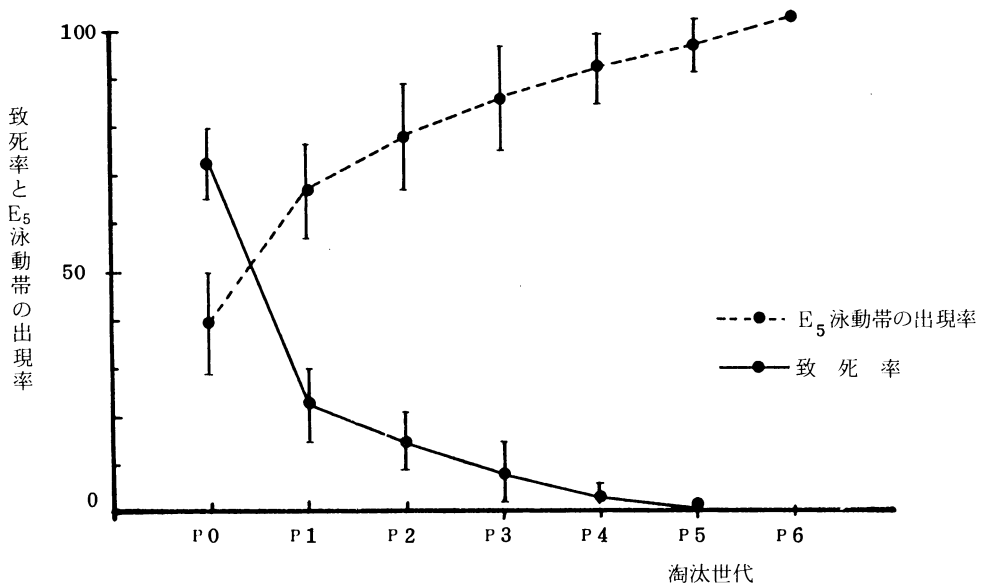


図2. Malathionで淘汰した場合の致死率とE 泳動帯の出現率
(malathion, 50 μ g/1頭)

る淘汰を行った。

この場合、2回の淘汰でLD-50値は200 μ g/♀を越え、図2に示すごとく淘汰毎にE₅泳動帯の出現率は高くなり、致死率は低下した。

淘汰6回目で、E₅泳動帯の出現率は100%に達し、malathion抵抗性とE₅泳動帯の間には密接な関係にあることが明かになった。

malathionによる淘汰は、雌雄それぞれ150頭を用い、1頭当り50 μ gの薬量を局所放用し、実施した。

なお、malathion抵抗性の抵抗性因子は、完全優性な遺伝子に支配されることが、林、長谷川(1974)⁹⁾の札幌系を用いた実験で明かにされている。

ここでは、malathionに顕著な抵抗性を持つ広川系を用い、malathion抵抗性の遺伝様式の解析とE₅泳動帯の遺伝様式について検討した。

その結果は、表2に示すごとく、札幌系と同様に完全優性遺伝であった。

また、E₅泳動帯の出現率も理論値に近く、札幌系と同様に遺伝様式は完全優性遺伝であった。

E₅泳動帯はmalathion抵抗性と密接な関係にあることが、以上の実験より明かである。

なお、E₅泳動帯の酵素を推定するため、いくつかの酵素阻害剤を用いて、これらを支持基質に混入し、電気泳動を行い、エステラーゼ Zymogram型におよぼす影

表2. 有機りん剤抵抗性系統と感受性系統の交配試験におけるmalathionに対する感受性とE₅泳動帯の出現率

供試系統	交配様式	LD 50 値 (μ g/1頭)		E 5 泳動帯出現率 (%)
		♀	♂	
抵抗性系統 (広川系) (RR)		177.407	84.912	100
感受性系統 (高規系) (SS)		0.275	0.129	0
交配 F ₁	(RS) R R × S S	173.368		90
♀ × ♂	S S × R R	147.560		85
交配 F ₂	R S × R S	死虫率25%付近にプラトー		76
戻し交配 B ₁	R S × S S	死虫率50%付近にプラトー		48

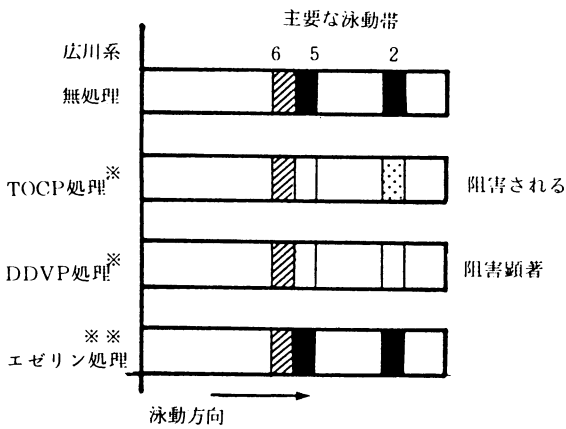


図3. 酵素阻害剤のE₂およびE₅泳動帯への影響
備考: ※はカルボキシエステラーゼの ※※はコリンエステラーゼの阻害剤

響を調べた。

実験の結果は、図3のごとくである。

カルボキシエステラーゼの阻害剤であるDDVP(10⁻⁷M)では、E₅、E₂泳動帯が著しく阻害された。同じく、カルボキシエステラーゼの阻害剤TOCP (Tri-O-Cresyl phosphite, 10⁻²M)では、E₅、E₂泳動帯が阻害された。コリンエステラーゼの阻害剤であるEserin (eserin sulphate, 10⁻⁴M)ではE₅、E₂は殆んど阻害されなかった。

以上のことから、E₅泳動帯の構成酵素はカルボキシエステラーゼである可能性が強い。

なお、malathion抵抗性の作用機構はカルボキシエステラーゼによるカルボキシエステルの解毒分解であることが明らかにされている。

P³²-標識malathionを用いて、代謝物を調べた結果は表3のごとくで、抵抗性系統の体内存在物に、カルボ

表3. マラソン抵抗性の札幌系イエバエにおけるP³²-マラソンの代謝物の分布

存在部位	代謝物質	物質の存在量	
		抵抗性系統	感受性系統
排泄物中	malathion malaoxon	少い	多い
体内存在物中	mono-Carboxylic acid dimethyl-phosphorodithioate	多い	少い

キシエステラーゼの代謝物であるカルボン酸やdimethyl phosphorodithioateなどが多く、これはmalathionの分解過程でカルボキシエステラーゼが主要な役割を果すことを示す。

II まとめ

以上の実験結果などから、電気泳動法による有機りん抵抗性イエバエの電気泳動像から抵抗性を推定することは可能である。

ことに、malathion抵抗性とE₅泳動帯との関係は密接である。したがって、E₅泳動帯をmalathion抵抗性のHenotypeとして用いることは可能である。

しかし、この方法によって有機りん系殺虫剤全般にわたる抵抗性やそのレベルを推定することは困難である。

文献

- 1) 林 晃史 (1979): 日本, 東アジアおよび南太平洋地域産イエバエの殺虫剤感受性に関する研究, お茶の水医学雑誌, 27, 331-361.
- 2) Zen-ichi, Ogita (1962): Genetico-biochemical analysis on the Enzymeactivities in the Houseflies by Agar Gel Electrophoresis. J. Genet., 37 (6), 518-521.
- 3) Zen-ichi Ogita and Tsutomu Kasai (1965): Genetic control of Multiple Esterases in Musca domestica. Japan. J. Genet. 40 (1), 1-14.
- 4) 安富和男 (1968): 数種の有機燐剤, ならびにカーバメート剤によるイエバエのエステラーゼ阻害について (第1報), 衛生動物, 19 (1), 44-51.
- 5) 林 晃史, ら (1979): 薬剤感受性の異なるイエバエの電気泳動像について(1), 有機りん剤抵抗性系統

- 間の比較, 衛生動物, 30 (1), 18.
- 6) 林 晃史, ら (1979): 薬剤感受性の異なるイエバエの電気泳動像について(2), 電気泳動像とmalathion抵抗性の関係, 衛生動物, 30 (1), 19.
- 7) 林 晃史, ら (1980): Malathion抵抗性イエバエのE泳動帯の解析, 衛生動物, 31 (2), 131.
- 8) D. B. Menzel, R. Craig and W. H. Hoskins (1963): Electrophoretic properties of esterase from Susceptible and Resistant strains of the houseflies, J. Ins. Physiol., 9, 479-493.
- 9) 林 晃史, 長谷川 恩 (1974): 北海道におけるイエバエの殺虫剤抵抗性に関する研究, 北海道立衛生研究所特別研究報告, 第7号, 1-14.