学会賞受賞論文

(奨励賞)

抑制性神経シナプスを標的とする殺虫活性物質の作用機構

田 中 啓 司

三共株式会社農業研究所

Mode of Action of Insecticidal Compounds Acting at Inhibitory Synapse

Keiji TANAKA

*Agricultural Chemicals Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.,
Yasu-cho, Yasu-gun, Shiga 520-23, Japan*

All cyclodiene-resistant strains of the German cockroach, the house fly and the mosquito are also resistant to picrotoxinin, a well-known GABA antagonist. By using electrophysiological techniques, picrotoxinin was confirmed to act at a presynaptic region, resulting in a stimulation of the release of an excitatory transmitter. The electrophysiological symptoms caused by picrotoxinin were quite similar to those of γ -BHC and dieldrin. It was determined by using a ^3H -dihydropicrotoxinin binding method that the nerve membrane in CNS of the American cockroach contained a component having a high affinity toward picrotoxinin and heptachlor epoxide, which can be regarded as a picrotoxinin receptor. By using a sucrose density centrifugation technique, it was determined that the fraction sedimented at the interphase of 1.0 and 1.2 M sucrose at $100,000 \times g$ contained the highest level of specific binding site. The ^3H -dihydropicrotoxinin binding on the receptor was inhibited by all cyclodienes tested and γ -BHC. Toxaphene, bicyclic phosphate and TETS also bound with the receptor. Dieldrin resistant German cockroach showed cross-resistance to the chemicals having binding potencies to picrotoxinin receptor. Milbemycin and avermectin were found to stimulate Cl^- uptake by the leg muscles of the American cockroach within 4 min at 10^{-7} M. This stimulatory action could be antagonized by picrotoxinin (10^{-4} M). It was concluded that the action of milbemycin and avermectin is to open the chloride channel on the plasma membrane. Their actions do not seem to be mediated through GABA receptor, picrotoxinin receptor and benzodiazepam receptor, suggesting their direct attack on the chloride channel proper both in the central nervous and the neuromuscular systems.

はじめに

BHC や DDT 等が各種害虫に対し高い殺虫活性を有することが発見されてから使用禁止になるまでの 20 年以上の間、世界各地でさかんに使用されてきた。その間、これら殺虫剤が人類福祉に果たしてきた功績は大きく、第 2 次世界大戦後の害虫防除による食糧増産や、風土病、マラリア病等の原因となる衛生害虫の撲滅に貢献してきた役割りを忘れてはならない。が、しかし、同時に、これら殺虫剤の作用機構等について十分に、あるいはまったく知られていない状態で永年使用され、ついに

使用禁止になったという事実も忘れてはならない。いまは過去のものとなったこれら殺虫剤の作用機構を十分に知ることは、今後の新農薬創製や、現在使用されている殺虫剤のより深い理解につながると思われ、人類が将来も化学物質で自然の一部を少しでもコントロールしようとするかぎり、このような知見の蓄積はきわめて重要である。

昆虫と哺乳動物との間で高い選択性を有する殺虫剤をイメージに描く場合、まず両者の生理・生態の違いに着目する。この点から、神経系の違いも選択性のあるケミカルコントロール殺虫剤の大きなターゲットになる。

γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid: GABA) は、昆虫、哺乳動物いずれにおいても抑制性の神経伝達物質として機能しているが、昆虫の場合、その重要度ははるかに高く、この機能を攪乱する化合物は高い選択性を有する殺虫剤になりえると古くから考えられてきた。しかし、GABA の関与する神経系についての理解は、acetylcholine の場合ほど進んでいない。Acetylcholine の場合、この系をターゲットとする有機リン系やカーバメート系殺虫剤がすでに知られており、これらの化合物の作用機構解明とともにその理解が深まってきた。しかし GABA の系の場合、先の有機リン剤に相当する化合物はほとんどなく、その点から GABA の系—すなわち抑制性神経シナプスを標的とする殺虫剤の出現が待たれていた。神経薬理の分野では、GABA の agonist として muscimol が、一方、antagonist として picrotoxinin (PTX) と bicuculline が知られている。

本論文では、 γ -BHC や cyclodiene が PTX と同様に GABA の antagonist として一作用している事実を、また、milbemycin や avermectin が GABA 様の一正確には GABA の agonist としてではない一作用をしている事実を、どのように解明していったか、順次、簡単にではあるが説明していく。詳しくは、オリジナルの報告を参照されたい。なお筆者が本学会誌に解説としてまとめた“GABA 支配の神経シナプス”¹⁾は、本論文を理解するうえで手助けとなるであろう。

γ -BHC と cyclodiene の作用機構

1. PTX との交差抵抗性

本研究の端緒は、ミシガン州立大学 Matsumura 教授グループにより、PTX が dieldrin 抵抗性のチャバネゴキブリに対し交差抵抗性を示すことが明らかにされたこ

とから始まる²⁾。これを受けて、筆者は、 γ -BHC や dieldrin に対し抵抗性を示すイエバエ、カに、同様の PTX との交差抵抗性現象が認められるかどうか調べた³⁾。その結果が Table 1~3 である。古くから γ -BHC と dieldrin あるいは toxaphene との間に例外のない交差抵抗性が知られていた^{4~6)}が、上記昆虫でも同様に PTX との交差抵抗性が認められた。この現象はチャバネゴキブリだけに特異的なものでなく、広く種々の昆虫間に認められる普遍的なものとして、とらえてよさそうである。なおイエバエの CLD 系統は dieldrin 抵抗性であり、カの Isla Verde 系統も同様 dieldrin 抵抗性系統である。Rockefeller 系統は DDT 抵抗性ではあるが dieldrin に対しては Trinidad 系統同様感受性を示したことから DDT は PTX、 γ -BHC、cyclodiene とは交差抵抗性を示さなかった。

2. 電気生理

Shankland ら⁷⁾ や Uchida ら⁸⁾ は、dieldrin や γ -BHC が昆虫の中枢神経のシナプス前膜に作用し、アセチルコリンの異常放出を引き起こすとする説を提出している。いずれの研究も電気生理による観察にもとづいたものである。筆者は、共同研究者の J. Scott の協力を得て、PTX が γ -BHC や cyclodiene と同様に作用しているかどうか、電気生理学的手法によって確かめた⁹⁾。Fig. 1 は PTX による自発性放電であるが、そのパターンは γ -BHC や dieldrin ときわめて類似していた。PTX がシナプス前膜に作用しているかどうかは、Shankland らの方法にならって確かめた。すなわち PTX の自発性放電は、シナプス前膜からの神経伝達物質の放出をさまたげる Mg^{2+} の存在により抑制された。また、アセチルコリンの生合成阻害剤であるヘミコリニウム-3 (HC-3) でも同様 PTX による異常放電は抑制され、ついにはまったく放電しなくなった。しかし、この時点で

Table 1 Susceptibility of dieldrin-resistant and dieldrin-susceptible German cockroaches to dieldrin, γ -BHC and picrotoxinin.²⁾

Strain	Dieldrin ^{a)} LT ₅₀ (hr)	γ -BHC LD ₅₀ (μ g/♂)	Picrotoxinin LD ₅₀ (μ g/♂)
CSMA	6.4	0.23	0.11
FRPP	33.6	0.95	0.70
LPP	120.0	2.17	5.11

^{a)} Surface contact method (2) 参照).

Table 2 Susceptibility of dieldrin-resistant and dieldrin-susceptible houseflies to dieldrin, γ -BHC and picrotoxinin.

Strain	LD ₅₀ (ng/♀)		
	Dieldrin	γ -BHC	Picrotoxinin
SBO	12.9	3.9	22.6×10^3
CLD	254.0	22.4	$>50.0 \times 10^3$ ^{a)}

^{a)} At 50 μ g/fly the actual mortality was 10%.

Table 3 Susceptibility of three strains of *Aedes aegypti* larvae against picrotoxinin.^{a)}

Strain	Picrotoxinin (ppm)	Piperonyl butoxide (ppm)	LT ₅₀ (hr)	
			Expt. 1	Expt. 2
Trinidad	30	3	9	12.5
Rockefeller	30	3	16	16.5
Isla Verde	30	3	>48	>48
Isla Verde	30	9	8	13
Isla Verde	—	9	17.5	18
Isla Verde	30	12	14.3	9
Isla Verde	—	12	9	12

^{a)} Application method through sand coating.

も神経自体は nicotine に対し正常に反応したことから、シナプス後膜自体は正常であることが明らかとなり、PTX が γ -BHC や dieldrin 同様にシナプス前膜に作用していることがわかった。

神経薬理学では PTX が GABA の代表的な antagonist であること、そして哺乳動物に対し痙攣や興奮を誘起することが知られている¹⁰⁾。そこで、哺乳動物においてその存在が認められている GABA 受容体や PTX 受容体が昆虫に存在するかどうか、さらに、存在するなら、その受容体の存在場所と受容体上で PTX と γ -BHC や cyclodiene との拮抗がみられるかどうかをきわめて重要な問題となる。これらの点について定性面および定量面での解明のためのアプローチを試みた。GABA 受容体の存在はあとでふれるとして、まず PTX 受容体について論を進める。

3. PTX 受容体

PTX 受容体に対する放射性リガントとして ³H-dihydropicrotoxinin (³H-DHPTX) を用いた。DHPTX は PTX の isopropenyl 基の二重結合を還元したもので自身 PTX より生理活性は少し劣るが、しかし依然高い活性を保持している¹⁰⁾。

Fig. 1 Picrotoxinin poisoning symptoms in the isolated abdominal nerve cord of *P. americana* (A) before treatment, and (B) 40 and (C) 60 min after treatment at 10^{-5} M.

供試昆虫としてはワモンゴキブリ、チャバネゴキブリを用いて、それらの神経膜フラクシオンを調製した。また同様の方法によりイエバエ、カからも神経膜フラクシオンを調製した。粗に調製したフラクシオン (P_2+P_3) に PTX 受容体が存在するかどうか調べた結果が Fig. 2 である。ワモンゴキブリの脳 (A. brain) と前胸および腹部中枢神経節 (B. nerve cord) いずれにも、低濃度の PTX で置換され、しかも 10^{-5} M 近辺の濃度で飽和する、きわめて PTX に高い親和性を示すフラクシオン (PTX 受容体) が存在することが明らかとなった。次いで、この粗 P_2+P_3 フラクシオンのどの部分に PTX 受容体が局在するかについて調べた。 P_2+P_3 フラクシオンをシロ糖密度勾配遠心分離法によって細かく分画した結果、Table 4 に示したとおりシロ糖濃度 1.0~1.2 M に分画される部分に、もっとも多く PTX 受容体は存在していた。この 1.0~1.2 M に分画される部分には、シナプトゾームと呼ばれるシナプス膜由来の小胞体が存在しており、PTX の作用部位が γ -BHC や cyclodiene 同様シナプス前膜であるとする先の電気生理実験結果と一致する。

次に、この PTX 受容体に対して γ -BHC や dieldrin が高い親和性を有しているかどうか重要なポイントとなる。そこで heptachlor epoxide を用いて以下の実験を行なった。 γ -BHC や dieldrin のかわりに heptachlor

Fig. 2 Competitive inhibition of $[^3\text{H}]\alpha$ -dihydropicrotoxinin (DHPTX) binding to nerve components of *P. americana* by picrotoxinin.

The concentration of $[^3\text{H}]\text{-DHPTX}$ used in the experiments was (A) brain, 11.1 nM; (B) nerve cord, 8.4 nM. Data are expressed as means $\pm$ S.E. of three determinations (dpm/mg protein).

Table 4 Subcellular localization of $[^3\text{H}]\alpha$ -dihydropicrotoxinin binding in American cockroach head.

Sucrose density gradient fraction (M) ^{a)}	Binding (dpm/mg protein) ^{b, d)}	
	Total	Specific
0.8	13,777 $\pm$ 104	720 $\pm$ 186
0.8-1.0	15,862 $\pm$ 359	720 $\pm$ 102
1.0-1.2	16,688 $\pm$ 104	1783 $\pm$ 66
1.2-1.5	12,344 $\pm$ 45	605 $\pm$ 10
1.5-1.8	10,072 $\pm$ 630	553 $\pm$ 417
1.8	11,970 $\pm$ 1061	— ^{c)}

a) Fraction 0.8(M), cell membrane; 0.8-1.0, large pieces of cell membrane and small pieces of nerve ending particles; 1.0-1.2, pinched off nerve endings (synaptic vesicles) and a few mitochondria; 1.2-1.5, nerve ending particles (more electron dense nature) and mitochondria; 1.5-1.8, cell fragments and a few mitochondria; 1.8, nonnural tissue.

b) $[^3\text{H}]\alpha$ -Dihydropicrotoxinin (sp act, 30 Ci/mmol), 11.1×10^{-9} M.

c) Not tested.

d) Data are expressed as means $\pm$ S.E. of two experiments, each experiment involving three determinations.

epoxide を用いたのは, γ -BHC や dieldrin に比べきわめて代謝をうけにくく, これまで heptachlor epoxide の代謝物がまったく知られていないからである. 受容体-リ

ガント結合実験と, *in vivo* (虫体)あるいは *in vitro* (神経レベル)でのそのリガントによる中毒症状とを,互いに化学量論面から比較検討する際, heptachlor epoxide の場合には代謝物の関与を考慮に入れなくてはむからである. Fig. 3 に示したとおり heptachlor epoxide は $^3\text{H-DHPTX}$ の PTX 受容体への結合を拮抗的に阻害した. IC_{50} 値はほぼ 3×10^{-7} M 近辺であった. 次にこの結合実験で PTX 受容体に結合していた heptachlor epoxide を定量し, *in vivo* で heptachlor epoxide による中毒症状を呈しているワモンゴキブリの中枢神経中に見いだされる heptachlor epoxide の量とをそれぞれ定量・比較し, PTX 受容体への heptachlor epoxide の結合が実際の中毒症状発現を説明できるレベルにあるかどうか, 化学量論面から検証した. ワモンゴキブリ雄成虫に 10^{-7} mole/ゴキブリの heptachlor epoxide を腹部に施用すると, 室温下, 約 12 時間後に痙攣を伴った cyclodiene や γ -BHC 特有の中毒症状を呈しはじめた. まさにその時に中枢神経を注意深く取り出し, その神経中に存在する heptachlor epoxide を定量したところ, 中枢神経(胸部と腹部)と脳にはそれぞれ 94.4 と 36.7 ng/mg protein 存在していた. この神経をさらにホモゲナイズし, ショ糖密度勾配遠心分離法によって各分画に分け, ショ糖濃度 1.0~1.2 M に分画される神経膜小片に結合している heptachlor epoxide の定量を行なった (Table 5). *In vivo* で中毒症状を呈しはじめたワモンゴキブリの中枢神経系とりわけシナプス前膜部分 (1.0~1.2 M の分画) に結合していた heptachlor epoxide の量は, 先の PTX 受容

Fig. 3 Competitive inhibition of $[^3\text{H}]\alpha$ -dihydronicrotoxinin (DHPTX) binding to nerve components from the brain of *P. americana* by heptachlor epoxide.

The concentration of $[^3\text{H}]\alpha$ -DHPTX used in the experiment was 16.6 nM. Data are expressed as means $\pm$ S.E. of three determinations.

Table 5 Subcellular localization of heptachlor epoxide in American cockroach central nervous system: comparison of heptachlor epoxide accumulation *in vivo* vs *in vitro*.

Fraction (Sucrose density gradient (M))	Heptachlor epoxide recorded (ng/mg protein) ^{a)}		
	<i>in vivo</i> ^{b)}		<i>in vitro</i> ^{c)}
	Central nerve cord	Brain	Brain
0.8	81.2 $\pm$ 29.4	41.5 $\pm$ 9.9	200.3 $\pm$ 30.9
0.8–1.0	101.0 $\pm$ 51.2	53.7 $\pm$ 21.8	122.1 $\pm$ 10.8 ^{d)}
1.0–1.2	123.3 $\pm$ 69.3	56.9 $\pm$ 17.1	
1.2–1.5	66.0 $\pm$ 24.3	25.3 $\pm$ 13.1	107.3 $\pm$ 20.8
1.5–1.8	10.2 $\pm$ 4.9	5.1 $\pm$ 5.8	38.5 $\pm$ 29.5
1.8	16.7 $\pm$ 5.2	8.2 $\pm$ 5.3	49.2 $\pm$ 21.4

a) The determination of the level of heptachlor epoxide in-subcellular fraction was carried out by gas liquid chromatography after extraction by ether. Data are expressed as mean $\pm$ S.E. of two experiments.

b) Heptachlor epoxide was topically applied on the abdomen: 1×10^{-7} mole/roach. The insects which showed convulsions were immediately dissected. Their brains and central nerve cords were separately homogenized in 0.25 M sucrose. The homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The supernatant was recentrifuged at $20,000 \times g$ for 45 min. The pellets were disrupted with osmotic shock and then were centrifuged in a discontinuous sucrose gradient.

c) The crude mitochondrial fraction was incubated with heptachlor epoxide (1×10^{-6} M) for 25 min at 0°C . After centrifugation of this fraction, the pellet was disrupted and centrifuged as shown in b).

d) The data of fraction 0.8–1.2.

体結合実験で、 ^3H -DHPTX の結合を 50% 以上阻害していた際の heptachlor epoxide の量とほぼ等しく、heptachlor epoxide の中毒症状が heptachlor epoxide の PTX 受容体への結合を経て起こっているとする考えを定量面から支持した。なおラット脳シナプトソームでの heptachlor epoxide による ^3H -DHPTX の PTX 受容体結合阻害の IC_{50} 値は 2×10^{-6} M とワモンゴキブリの場合よりも高く、この違いは現に *in vivo* での heptachlor epoxide

の哺乳動物と昆虫に対する毒性に選択性があることから興味深い。

他の cyclodiene や pyrethroid 等、種々の殺虫剤による ^3H -DHPTX の PTX 受容体への結合阻害程度を調べた結果が Table 6 である。Cyclodiene はすべて ^3H -DHPTX の結合を阻害した。しかも阻害の程度は、aldrin < dieldrin < photodieldrin, heptachlor < heptachlor epoxide, isodrin < endrin といずれの場合とも epoxy 化されたもの

のほうが高く、殺虫活性傾向と一致した。BHCの四つの異性体(α , β , γ , δ)のうち γ -BHCにきわめて高い ^3H -DHPTX阻害活性が認められ、これも殺虫活性結果と一致した。ただ殺虫活性のない δ -BHCにも高い阻害活性が認められている点についてはその詳細は不明である

Table 6 Effect of cyclodienes and other agents on [^3H] α -dihydropicrotoxinin binding.^{a)}

Agents ^{b)}	Percentage inhibition of [^3H] α -dihydropicrotoxinin specific binding ^{c)}
Dihydropicrotoxinin	100
Aldrin	36.6 $\pm$ 0.6
Dieldrin	58.5 $\pm$ 2.3
Photodieldrin	79.0 $\pm$ 4.3
Heptachlor	36.6 $\pm$ 18.6
Heptachlor epoxide	57.3 $\pm$ 31.3
Isodrin	35.6 $\pm$ 3.8
Endrin	62.3 $\pm$ 12.4
γ -Chlordane	56.2 $\pm$ 2.0
Oxychlordane	77.8 $\pm$ 6.2
Hexachlorocyclopentadiene	0.3 $\pm$ 2.2
Mirex	14.7 $\pm$ 15.7
Kepone	135.5 $\pm$ 18.4
Toxaphene	72.3 $\pm$ 28.1
DDT	5.4 $\pm$ 3.6
α -BHC	21.4 $\pm$ 18.5
β -BHC	15.3 $\pm$ 15.4
γ -BHC (lindane)	91.5 $\pm$ 20.0
δ -BHC	55.0 $\pm$ 16.0
Parathion	4.1 $\pm$ 26.3
Allethrin	13.2 $\pm$ 6.7
Cypermethrin	7.7 $\pm$ 3.1
Decamethrin	-0.1 $\pm$ 1.0
Fenvalerate	-0.4 $\pm$ 5.8
Chlordimeform	7.8 $\pm$ 4.7
Pentobarbital	21.1 $\pm$ 8.1
Benzodiazepam	45.1 $\pm$ 10.8
SQ-65396	21.5 $\pm$ 5.7
SQ-20009	-8.3 $\pm$ 4.2
Tetramethylene-disulfotetramine	27.1 $\pm$ 13.0
<i>t</i> -Butyl bicyclic phosphate	46.6 $\pm$ 2.9

^{a)} [^3H] α -Dihydropicrotoxinin, 11.1 nM; five American cockroach heads were used for one experiment (one agent), which involves three determinations.

^{b)} Dihydropicrotoxinin, 100 μM ; others, 10 μM .

^{c)} Data are expressed as means $\pm$ S.E. of two or three experiments, each experiment involving three determinations.

が、 δ -BHCに強い興奮抑制作用のあること¹¹⁾と関係がありそうである。これは今後の問題であらう。ラット脳シナプトソームでの ^3H -DHPTX結合が、強い興奮抑制作用のある barbiturateにより阻害されることが知られている¹²⁾。

DDT, 有機リン剤, pyrethroid には ^3H -DHPTXの結合に対する阻害活性は認められなかった。Type IIの pyrethroid が PTX 受容体と結合して、その作用を発現しているとする説も提出されている¹³⁾が、少なくとも、ワモンゴキブリでは関係がなさそうである。

4. 抵抗性メカニズム

γ -BHC に対しても抵抗性を示す“第3夢の島”系イエバエは、Table 7 に示すとおり高い代謝分解活性を有していたが、同時にターゲット部位(神経系)での γ -BHCに対する感受性の低下も認められた¹⁴⁾。すなわち、殺虫活性(LD₅₀値)における大きな同位体効果は高い代謝活性の存在を、また、中毒症状を呈しはじめた直後の虫体内 γ -BHC-*d*₆(γ -BHCより代謝されにくい¹⁵⁾)の量の違いはターゲット部位での γ -BHCに対する感受性の

Table 7 Insecticidal activity and isotope effect on LD₅₀ values of lindane and [*d*₆]-lindane.

Insecticide	LD ₅₀ ^{a)} ($\times 10^{-10}$ mol/fly ^{b)})		Ratio (R/S)
	S _{NAIDM}	Third Yumenoshima (R)	
Lindane	6.53	>2200	>337
[<i>d</i> ₆]-Lindane	2.06	86.2	41.8
H/D ^{c)}	3.17	>25	

^{a)} Twenty-four-hour mortality after topical application. The standard error of the listed mean value was less than 15% of each value.

^{b)} Four-day-old female adult.

^{c)} LD₅₀(lindane)/LD₅₀([*d*₆]-lindane).

Table 8 Effective amount of internal [*d*₆]-lindane producing convulsions on 50% of flies within 30 min.

Amount of [<i>d</i> ₆]-lindane (mol/fly) ^{a)}		Ratio ^{b)}
Third Yumenoshima	S _{NAIDM}	
10.3 (± 2.1) $\times 10^{-9}$	6.2 (± 1.8) $\times 10^{-11}$	166 (± 58)

^{a)} Average values of three runs with standard error in parentheses. In each experiment, 10 flies were used.

^{b)} Third Yumenoshima/S_{NAIDM}.

Table 9 Minutes to onset of poisoning symptoms: Abdominal nerve cord of susceptible and resistant German cockroach (*B. germanica*).

Strain	Minutes to onset of poisoning	
	Dieldrin (10^{-5} M)	Picrotoxinin (10^{-5} M)
CSMA (S)	53.8 ± 5.5 (5)	61.8 ± 11.5 (4)
LPP (R)	$>91.8 \pm 12.8$ (5)	$>120.3 \pm 11.7$ (4)

Table 10 Time to onset of poisoning symptoms in the abdominal nerve cord of susceptible (CSMA) and resistant (LPP) German cockroaches: Dihydropicrotoxinin (10^{-5} M) with piperonyl butoxide (10^{-4} M).

Strain	Minutes to onset of poisoning symptoms ^{a)}
CSMA	26.5 ± 3.7
LPP	74.0 ± 6.7

^{a)} Data are expressed as means $\pm$ S.E. of five experiments.

違いを示している (Table 8).

Dieldrin 抵抗性チャバネゴキブリの神経レベルターゲット部位での dieldrin に対する感受性の低下を電気生理学的に直接証明したのが Table 9 である。感受性と抵抗性両系統の中枢神経を同一濃度の薬液に浸し、Fig. 1 に示したような自発性放電が観察されるまでの時間経過を追うことにより、神経に取り込まれた薬物の量と抵抗性との関係を明らかにしようとしたもので、同一条件下、同一レベルの症状を呈するのに、明らかに抵抗性のほうが長時間を要した⁹⁾。 ^3H -DHPTX を用いて同様の実験を行なうとともに、神経自体への放射能の取り込みも調べた (Table 10, Fig. 4)⁹⁾。神経自体への放射能の取り込みには、両系統間でほとんど差が認められなかった。したがって自発性放電があらわれた時点で両系統の神経に取り込まれていた放射能 (^3H -DHPTX) にはかなりの量的な違いが生じていたことになる。同一レベルの症状を誘起するのに、抵抗性系統の神経では多量の薬剤が必要だったわけである。なお γ -BHC- d_6 の LD_{50} 値における同位体効果の大小を目安とした系統間の代謝能比較実験で興味ある結果が得られた。Dieldrin で淘汰された dieldrin 抵抗性チャバネゴキブリは、感受性系統とほとんど代謝能が同じか、あるいは、逆に抵抗性系統のほうが低いという結果であり、dieldrin は酸化的代謝によ

Fig. 4 Penetration of ^3H -DHPTX into the abdominal nerve cords of the two German cockroach strains: dieldrin susceptible CSMA (●) and resistant LPP (○) strains.

Data are expressed as means $\pm$ S.E. of four nerve cords.

ってほとんど解毒されず、逆に活性化される可能性のあることが示唆された。

電気生理学的に確認されたターゲット部位—神経—での dieldrin に対する感受性の低下を PTX 受容体レベルでどうなっているか知ろうとした⁹⁾。

抵抗性系統のチャバネゴキブリの中枢神経膜では、感受性系統に比べ、 ^3H -DHPTX の特異的結合部分 (specific binding) が少なく、その程度は Table 11 に示すとおり抵抗性レベルと負に相関していた。一方、筋肉から調製した神経膜では、そのような傾向は認められず、抵抗性が中枢神経の PTX 受容体レベルでの現象であることも明らかとなった。中枢神経膜での結合実験データを、さらに詳しく解析するため Scatchard 分析したのが Fig. 5 である。PTX 受容体の数、解離定数 (K_d) とも抵抗性系統のほうが小さかった。同様の現象は、イエバエ、カの幼虫でも認められたことから、かなり普遍的な現象とみなすことができそうである。昆虫は PTX 受容体の質と量をかえることによって、 γ -BHC や cyclodiene に対する抵抗性を獲得していったのである。

以上の研究結果をまとめると次のようになる。

- 1) γ -BHC, dieldrin, PTX が交差抵抗性を示した。
- 2) γ -BHC, dieldrin, PTX はシナプス前膜に作用して、特徴的な自発性放電 (Fig. 2) を引き起こした。
- 3) 昆虫には PTX 受容体が存在し、 γ -BHC, cyclodiene, toxaphene 等はそれと特異的に結合した。

Table 11 Comparison of specific [^3H] α -dihydropicrotoxinin binding to head and body homogenates^{a)} from the susceptible and two resistant strains of German cockroaches *in vitro*.

Strain	[^3H] α -Dihydropicrotoxinin binding (dpm/mg protein)			
	Head		Muscles	
	Total	Specific	Total	Specific
CSMA	46,157 $\pm$ 2898	6013 $\pm$ 1670	41,891 $\pm$ 256	1769 $\pm$ 64
FRPP	47,328 $\pm$ 1229	4887 $\pm$ 1006	37,932 $\pm$ 173	3178 $\pm$ 355
LPP	44,150 $\pm$ 993	1382 $\pm$ 419	44,008 $\pm$ 1361	2768 $\pm$ 1340

a) The heads and the muscles (thorax and legs) from 100 male cockroaches per experiment were homogenized in 0.25 M sucrose and centrifuged at $800 \times g$ for 10 min. The supernatant fraction was centrifuged at $20,000 \times g$ for 45 min and the pellets were resuspended in 0.2 M NaCl in 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) including piperonyl butoxide (final concentration: 10^{-5} M for the head and 10^{-4} M for the body experiment) for [^3H] α -dihydropicrotoxinin binding assay (sp act 59.5 Ci/mmol, 1.65×10^{-8} M final concentration). Specific binding was defined as pelletable radioactivity ($20,000 \times g$, 20 min) which could be displaced by 0.1 mM of nonlabeled dihydropicrotoxinin. Data are expressed as means $\pm$ S.E. of two or three experiments, each experiment involving three determinations.

Fig. 5 Scatchard plot analysis of [^3H]-DHPTX binding to the brain membrane preparations from two German cockroach strains: dieldrin susceptible CSMA (●) and resistant LPP (○) strains.

$B_{\max}$ (receptor number) mole/mg protein was CSMA, 9.0×10^{-8} ; LPP, 7.1×10^{-14} ; K_d (dissociation constant (M)) was CSMA, 5.8×10^{-7} ; LPP, 6.45×10^{-8} . Data are expressed as means of two independent experiments, each experiment involving three determinations.

4) γ -BHC や dieldrin 抵抗性昆虫は PTX 受容体の数と質を変えることによってその抵抗性を獲得していた。

PTX が γ -BHC や cyclodiene とまったく同一の作用機構を有していたのは驚きである。ただ、構造上に類似性

がないわけではない¹⁶⁾。かりに 1)~3) を同時に満たす化合物が存在すれば、それは γ -BHC や cyclodiene とまったく同一の作用機構を有する—GABA antagonist, PTX agonist—化合物ということになる。Table 6, 12~14 を注意深くみると bicyclic phosphate, TETS 等はそれに該当する。

Milbemycin と avermectin の作用機構

抑制性神経伝達物質 GABA の agonist 的な作用を有するものに milbemycin と avermectin がある¹⁾。“Agonist 的”と断った理由としては次の 2 点がある。これらの化合物が GABA 同様神経膜の Cl^- イオンのコンダクタンス変化をもたらす点がその一つである¹⁷⁾。もう一点は“的”のほうで GABA やその agonist である muscimol には、milbemycin や avermectin にみられるような高い殺虫・殺ダニ活性^{18,19)} はみられず、また、GABA の作用は可逆であるのに対し、これらの化合物は不可逆的に作用して Cl^- イオンのコンダクタンス変化を引き起こすことから必ずしも GABA agonist と位置づけられぬからである。

Milbemycin や avermectin の GABA agonist 的な作用—神経膜の Cl^- イオンの透過性を高める—がどのようにして引き起こされているかについてワモンゴキブリの脚部筋肉 (coxal muscle) を用いて調べた²⁰⁾。この筋肉には抑制性の神経が入り込んでいることが知られている²¹⁾。

1. $^{36}\text{Cl}^-$ 取り込み ($^{36}\text{Cl}^-$ influx) 実験^{20,22)}

顕微鏡下で解剖し、取り出したワモンゴキブリの脚部

Table 12 Comparative toxicities of cyclodiene insecticides to dieldrin susceptible (CSMA) and resistant (LPP) German cockroaches.^{a)}

Cyclodiens ^{a)}	LT ₅₀ (hr) ^{b)}		Resistance ratio (LPP/CSMA)	Dieldrin ^{c)} type nerve excitation
	CSMA strain	LPP strain		
Aldrin	5.8±0.3	51.1±5.4	8.8±1.2	+ ^{d)}
Dieldrin	11.6±0.9	181.6±21.9	15.7±2.2	+
Photodieldrin	11.1±0.5	101.0±8.8	9.1±0.9	+
Heptachlor	4.3±0.4	57.5±7.8	13.4±2.2	+
Heptachlor epoxide	7.0±0.2	111.2±5.9	15.9±1.0	+
Isodrin	9.1±0.3	21.3±1.7	2.3±0.2	+
Endrin	8.7±0.5	16.3±1.3	1.9±0.2	+
α-Chlordane	14.3±2.1	>192	>13.4	+
Oxychlordane	5.3±2.1	60.5±5.4	11.4±1.1	+

^{a)} Surface contact method (3 mg/jar/10 roaches).^{b)} Median lethal time, values are given as X±S.E. in hr.^{c)} At 10⁻⁵ M concentration of chemicals in 2 hr.^{d)} Symbol + means that dieldrin type nerve excitation was observed.Table 13 Comparative toxicities of pyrethroids, parathion, chlordimeform and DDT to dieldrin susceptible (CSMA) and resistant (LPP) German cockroaches.^{a)}

Chemicals	Dose (μg/jar)	KT ₅₀ (min) ^{b)}		Resistance ratio LPP/CSMA	Dieldrin ^{d)} type nerve excitation
		CSMA strain	LPP strain		
Bioallethrin	200	8.0±2.3 (26.5±1.6) ^{c)}	5.8±1.4 (26.8±2.0) ^{c)}	0.73±0.27 (1.01±0.08)	—(10 ⁻⁷ M)
Permethrin	150	18.0±3.4 (26.2±0.7) ^{c)}	17.4±3.4 (22.8±1.0) ^{c)}	0.97±0.26 (0.87±0.04)	—(10 ⁻⁷ M)
Fenvalerate	150	17.3±3.3 (40.4±8.1) ^{c)}	14.9±2.9 (37.1±3.6) ^{c)}	0.86±0.23 (0.92±0.20)	—(10 ⁻⁷ M)
Cypermethrin	100	17.3±6.2 (37.5±3.4) ^{c)}	19.6±6.5 (36.2±3.3) ^{c)}	1.13±0.55 (0.97±0.12)	—(10 ⁻⁷ M)
Deltamethrin	20	13.4±2.7 (35.7±3.9) ^{c)}	9.7±4.5 (33.5±8.2) ^{c)}	0.72±0.37 (0.94±0.25) ^{c)}	—(10 ⁻⁷ M)
Parathion	1000	65.9±4.3 (7.5±2.0) ^{c)}	58.9±2.1 (8.7±2.9) ^{c)}	0.89±0.07 (1.17±0.50)	—(10 ⁻⁵ M)
Chlordimeform	1000	126.4±19.2	101.8±16.4	0.81±0.18	—(10 ⁻³ M)
DDT	6000	638.8±107.0	342.6±48.8	0.54±0.12	—(10 ⁻⁵ M)

^{a)} Surface contact method (μg/jar/10 roaches).^{b)} Median knockdown time, values are given as X±S.E. in min.^{c)} LT₅₀ values of the above chemicals (values are given as X±S.E. in hr) are shown in parentheses.^{d)} Dieldrin type nerve excitation was not observed at the concentration shown in parentheses.

筋肉を放射性塩素イオン (³⁶Cl⁻) を含む昆虫用リンゲル液に一定時間浸し、筋肉内に取り込まれた放射能を測定する方法を用いて、各種薬剤による神経膜の Cl⁻ イオン透過性の影響を調べた。内部標準として ³H 標識の man-nitol を用い筋肉内に取り込まれた ³⁶Cl と ³H とを 2 チャンネルの液体シンチレーションカウンターで同時に測定した。³H を併用した理由は、リンゲル液の non specific

な筋肉表面への付着や筋肉内部への取り込みを知るため、データの補正には必須である。

Milbemycin や avermectin は ³⁶Cl⁻ イオンの取り込みを高めた (Table 15)。³⁶Cl⁻ イオンの取り込み量は薬剤濃度、処理時間に依存しており、これらの薬剤により specific な Cl⁻ イオンの筋肉内への取り込み (influx) が起こったことがわかる。この ³⁶Cl⁻ の取り込みの一部は PTX

Table 14 Comparative toxicities of various chemicals to dieldrin susceptible (CSMA) and resistant (LPP) German cockroaches.^{a)}

Chemicals	Hour	LD ₅₀ ^{b)} (μ g/roach)		Resistance ratio (LPP/CSMA)	Dieldrin ^{g)} type nerve excitation
		CSMA strain	LPP strain		
Mirex	84	3.12 $\pm$ 0.94	2.85 $\pm$ 0.95	0.91 $\pm$ 0.41	— (10 ⁻⁴ M)
Kepone	60	6.89 $\pm$ 1.84	14.78 $\pm$ 3.86	2.15 $\pm$ 0.80	+ (10 ⁻⁴ M) ^{h)}
	84	5.08 $\pm$ 0.83	5.92 $\pm$ 1.10	1.17 $\pm$ 0.29	
Toxaphene	24	2.46 $\pm$ 0.40	>40 ^{d)}	>16.36	+ (10 ⁻⁵ M)
	48	1.28 $\pm$ 0.19	>40 ^{e)}	>31.25	
α -BHC	24	7.67 $\pm$ 4.51	>50 ^{f)}	>6.51	+ (10 ⁻⁴ M)
γ -BHC	24	0.23 $\pm$ 0.07	11.75 $\pm$ 2.79	50.87 $\pm$ 19.70	+ (10 ⁻⁵ M)
2,10-Dichlorobornane ^{c)}	24	16.90 $\pm$ 7.20	55.00 $\pm$ 7.80	3.25 $\pm$ 1.46	
Benzodiazepam ^{c)}	24	15.70 $\pm$ 7.20	20.90 $\pm$ 6.50	1.33 $\pm$ 0.74	— (10 ⁻⁴ M)
TETS ^{c)}	24	0.32 $\pm$ 0.05	1.92 $\pm$ 0.31	6.00 $\pm$ 1.35	— (10 ⁻⁴ M)
<i>t</i> -Butyl bicyclic phosphate ^{c)}	24	0.10 $\pm$ 0.02	1.46 $\pm$ 0.38	14.60 $\pm$ 4.79	+ (10 ⁻⁴ M)
SQ-65396 ^{c)}	72	Not insecticidal at 30 μ g			— (10 ⁻⁴ M)
SQ-20009 ^{c)}	72	Not insecticidal at 30 μ g			— (10 ⁻⁴ M)

^{a)} Topical application method (mirex, toxaphene and γ -BHC) and injection method (α -BHC 2,10-dichlorobornane, benzodiazepam, TETS, *t*-butyl bicyclic phosphate, SQ-65396 and SQ-20009) were used.

^{b)} Median lethal dose, values are given as $\bar{X} \pm \text{S.E.}$ in μ g.

^{c)} Piperonyl butoxide (10 μ g/roach) was applied 1 hr before the treatment of the test chemicals.

^{d)} No mortality at 40 μ g.

^{e)} 30% mortality at 40 μ g.

^{f)} No mortality at 50 μ g.

^{g)} Symbols + and — mean that dieldrin type nerve excitation was observed and not observed, respectively, at the concentration shown in parentheses.

^{h)} The effect was weak and transient.

Table 15 Comparison of action of GABA, milbemycin, and avermectin on ³⁶Cl⁻ uptake processes in the leg muscles of the American cockroach.

Compounds	<i>n</i>	³⁶ Cl ⁻ influx (%)
Control	8	100.00 $\pm$ 4.32
Avermectin (10 ⁻⁷ M)	8	115.87 $\pm$ 7.95
Milbemycin (10 ⁻⁷ M)	8	116.63 $\pm$ 4.99
GABA (10 ⁻³ M)	8	104.18 $\pm$ 5.92
Avermectin (10 ⁻⁷ M) + GABA (10 ⁻³ M)	8	116.30 $\pm$ 8.22

Table 16 Antagonistic actions of picrotoxinin and bicuculline on avermectin-induced increase in ³⁶Cl⁻ uptake by the cockroach leg muscles.

Compounds	<i>n</i>	³⁶ Cl ⁻ influx (%)
Control	8	100.00 $\pm$ 4.32
Avermectin (10 ⁻⁷ M)	8	115.87 $\pm$ 7.95
Avermectin (10 ⁻⁷ M) + picrotoxinin (10 ⁻⁴ M)	8	108.12 $\pm$ 6.72
Avermectin (10 ⁻⁷ M) + bicuculline methiodide (10 ⁻⁴ M)	8	113.08 $\pm$ 4.73

により阻害されたが, bicuculline ではほとんど阻害されなかった (Table 16). 一方, リンゲル液中の Na⁺ 全部を, 神経膜を通過しない第4級アンモニウムに置き換え, 同様の実験を行なったが, これら薬剤による ³⁶Cl⁻ イオン取り込みの増大は同様にみられた. したがって, これら薬剤による神経膜の Cl⁻ イオンに対する透過性の

増大は Na⁺ に依存せず, Cl⁻ イオンに specific な現象であることが明らかとなった.

2. GABA, PTX, benzodiazepam 受容体

ワモンゴキブリの中枢神経, 筋肉には, GABA, PTX, benzodiazepam それぞれが高い親和性を示す部位が存在しているが, これらの部位へのそれぞれの放射性リガン

Table 17 Effect of avermectin on [³H]muscimol, [³H]benzodiazepam, and [³H]dihydropicrotoxinin binding.

Ligands and treatments	dpm/mg protein		
	American cockroach		Rat brain
	Head	Muscle	
^[3H] Muscimol ^{a)}			
Control	5813.5±397.5	4607.7±169.7	12,730.3±278.2
+ GABA (10 ⁻⁴ M)	2688.2±61.2	3293.1±81.7	2125.3±40.9
+ Avermectin (10 ⁻⁵ M)	5486.3±330.3	4470.0±115.4	15,431.9±154.5
+ Avermectin (10 ⁻⁷ M)	5792.1±232.8	4586.5±145.3	12,123.7±42.3
^[3H] Benzodiazepam ^{b)}			
Control	59,008.1±262.8	45,941.9±334.3	63,412.1±2065.7
+ Benzodiazepam (10 ⁻⁴ M)	49,801.2±443.0	44,521.3±535.5	35,866.8±717.6
+ Avermectin (10 ⁻⁵ M)	57,724.2±310.7	45,646.3±333.1	74,054.3±1461.8
+ Avermectin (10 ⁻⁷ M)	57,842.9±841.7	45,667.9±282.8	69,315.5±1079.1
^[3H] Dihydropicrotoxinin ^{c)}			
Control	29,038.9±200.9	20,403.8±84.6	—
+ Dihydropicrotoxinin (10 ⁻⁴ M)	27,044.0±260.1	19,659.2±186.8	—
+ Avermectin (10 ⁻⁵ M)	28,650.9±233.4	20,392.6±442.6	—
+ Avermectin (10 ⁻⁷ M)	29,128.3±506.8	20,434.2±799.8	—

a) [³H]Muscimol (7.8×10⁻⁹ M).b) [³H]Benzodiazepam (2.43×10⁻⁹ M).c) [³H]Dihydropicrotoxinin (22.2×10⁻⁹ M).

ドの結合には、avermectinは何ら影響を与えなかった (Table 17). ラット脳シナプトソームでは、avermectinはGABA, benzodiazepamいずれの受容体に対してもそれぞれの放射性リガンドの結合の増大がみられ、昆虫、哺乳動物間できわだった違いが認められた。Milbemycinでも同様の現象が認められた。

以上のことから、milbemycinやavermectinによる神経膜のCl⁻イオンの透過性の増大は、Cl⁻イオンチャネルの開閉を司っているGABA受容体や、benzodiazepam受容体、PTX受容体にこれら薬剤が作用しての結果ではなく、別の部位に作用し直接Cl⁻イオンチャネルを開の状態にすることによっていると解釈できる。

お わ り に

すでに殺虫剤としては過去のものとなったγ-BHCやcyclodieneが、どのような作用メカニズムで昆虫を興奮させていたか、そのおおよその輪郭は明らかとなった。一方新規な殺虫剤、あるいは駆虫薬として世に出てきたmilbemycinやavermectinも、γ-BHCやcyclodieneと同じ抑制性シナプスに作用していたが、その作用性はまったく逆であることが明らかとなった。一見関連のまったくないようにみえる中毒症状が、実は同じ作用部位—

GABA-PTX-Cl⁻イオンチャネルを介してのものであったわけである。これらの知見は、この抑制性シナプス理解の第一歩であって、冒頭ふれたとおり、理解しようとする部位に特異的に作用する薬剤がいったんわれわれの手に入ると、その部位に関する理解は飛躍的に深まるはずであり、その意味から本研究が今後の“GABA”研究進展の一助になれば幸いである。

最後に、本研究に従事する機会を与えてくださり、かつ終始懇篤なるご指導を賜ったミシガン州立大学教授松村文夫先生、京都大学名誉教授中島稔先生に深く感謝の意を表します。また、ミシガン州立大学において机を並べ有益なるディスカッションによって種々啓発してくださった島根大学農学部尾添嘉久博士に心からお礼申し上げます。終始貴重など指導、ご助言を賜った京都大学教授藤田稔夫先生、同教授栗原紀夫先生に心からお礼を申し上げます。そして、終始ご支援、ご助言をいただきました三共株式会社高橋省吾氏、石田三雄博士ならびに農薬研究所の皆様へ深謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 田中啓司: 農薬誌 10, 555 (1985)

- 2) A. A. Kadous, S. M. Ghiasuddin, F. Matsumura, J. G. Scott & K. Tanaka: *Pestic. Biochem. Physiol.* **19**, 157 (1983)
- 3) K. Tanaka & F. Matsumura: "Membrane Receptors and Enzymes as Targets of Insecticidal Action," ed. by J. M. Clark & F. Matsumura, Plenum Press, New York, p. 33, 1986
- 4) S. B. Soloway: *Adv. Pest Control Res.* **6**, 85 (1965)
- 5) J. R. Busvine & M. G. Townsend: *Bull. Entomol. Res.* **53**, 763 (1963)
- 6) J. R. Busvine: *Bull. Entomol. Res.* **55**, 271 (1964)
- 7) D. L. Shankland & M. E. Schroeder: *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**, 77 (1973)
- 8) M. Uchida, T. Fujita, N. Kurihara & M. Nakajima: "Pesticide and Venom Neurotoxicity," ed. by D. L. Shankland, R. M. Hollingworth & T. Smyth, Jr., Plenum Press, New York, p. 133, 1978
- 9) K. Tanaka, J. G. Scott & F. Matsumura: *Pestic. Biochem. Physiol.* **22**, 117 (1984)
- 10) C. H. Jarboe, L. A. Porter & R. T. Buckler: *J. Med. Chem.* **11**, 729 (1968)
- 11) L. J. Mullins: *Science* **122**, 118 (1955)
- 12) M. K. Ticku & R. W. Olsen: *Life Sci.* **22**, 1643 (1978)
- 13) L. J. Lawrence & J. E. Casida: *Science* **221**, 1399 (1983)
- 14) K. Tanaka, M. Nakajima & N. Kurihara: *Pestic. Biochem. Physiol.* **16**, 149 (1981)
- 15) K. Tanaka, N. Kurihara & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **6**, 386 (1976)
- 16) F. Matsumura & K. Tanaka: "Cellular and Molecular Neurotoxicology," ed. by T. Narahashi, Raven Press, New York, p. 225, 1984
- 17) L. C. Fritz, C. C. Wang & A. Gorio: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 2062 (1979)
- 18) H. Mishima: "Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment," ed. by J. Miyamoto & P. C. Kearney, Vol. 2, Pergamon Press, Oxford, p. 129, 1983
- 19) R. A. Dybas: "Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment," ed. by J. Miyamoto & P. C. Kearney, Vol. 1, Pergamon Press, Oxford, p. 83, 1983
- 20) K. Tanaka & F. Matsumura: *Pestic. Biochem. Physiol.* **24**, 124 (1985)
- 21) K. G. Pearson & C. R. Fournier: *Can. J. Zool.* **51**, 859 (1973)
- 22) K. Tanaka, A. Aoki & F. Matsumura: in preparation