

研究紹介

電気生理学的手法を用いた
昆虫神経作用物質の探索

仁戸田 照彦

(生物資源開発学講座)

Search for Insect Neuroactive Substances
Using an Electrophysiological Method

Teruhiko Nitoda

(Department of Bioresources Chemistry)

A simple and rapid bioassay was developed to search for novel insect neuroactive substances. This method was based on the electrophysiological response of the metathoracic leg nerve of *Periplaneta americana*. Using this assay, 41 methanol extracts of Kenyan plants and 15 methanol extracts of Indonesian plants were tested to show various activities. Several compounds were isolated from these methanol extracts with the guidance of the activity increasing spontaneous-impulse frequencies.

Key words : bioassay, insect, neuroactive substance, *Periplaneta americana*

緒 言

地球規模での環境問題に関心が高まりつつある現在, 病害虫防除のための薬剤に求められているのは, ターゲットに対する強力な効果はもちろんのこと, 高い選択性と適度な生分解性である. そのような優れた特性をもつ薬剤のリード化合物となる生理活性物質を自然界から見い出そうと, これまでに数多くの試みがなされてきた. その手段となるのが生物試験であり, 新たな生物試験法の開発が, 新規の活性化合物の発見につながることもある. そこで著者は, 昆虫の神経を作用点とする天然生理活性物質を探索するための新たな生物試験法の開発を試みた. 昆虫

神経作用物質は, その効果が強力かつ速効性であることが多い点, また, 植物や微生物に対し影響を及ぼしにくい点で有効なリード化合物として期待される. さらに, 昆虫と哺乳動物とでは代謝に多くの違いがあるため, 昆虫には強力な毒性を示しても人畜への毒性は低いことが多い. 天然ピレスロイドは, このような昆虫神経作用物質の長所を合わせ持つ, 理想的な例であった. 自然界には, ピレスロイドと同等, またはそれ以上に優れた防除剤となりうる昆虫神経作用物質が存在するはずである. しかし, 昆虫神経作用物質探索のための生物試験法はまだ一般的ではない. 神経活動の観察には通常, 電気生理学的手法が用いられているが, 細かい作業と長い時間を要するものが多く, 薬剤の作用機構の解明など, 生理学的研究の手段とはなっても, スクリーニングのための生物試験として確立されたものはほとんど知られていない. 著者はワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) の後肢神経系を用いて, 昆虫神経作用物質探索のための簡便で迅速な生物試験法を開発した. また, この試験を指標としてケニヤ産植物およびインドネシア産植物のメタノール抽出物から, いくつかの活性化合物を単離した.

材料と方法

供試昆虫

試験には, 市販の昆虫用固形飼料と水道水を用いて25°C, 明条件16時間, 暗条件8時間で飼育したワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) の雄成虫を用いた.

試 料

試料には, 既知の神経作用物質としてL-グルタミン酸, γ -アミノ酪酸(GABA), クラレー, 硫酸ニコチン, マラチオン, パーメスリン, α -ジヒドログラヤノトキシシンIIを用い, スクリーニングサンプルとしてケニヤ産植物のメタノール抽出物41種類 (Table 1) およびインドネシア産植物のメタノール抽出物15種類 (Table 2) を用いた.

生物試験

試験は, Fig. 1 に示すような装置を用いて行った. 炭酸ガス麻酔したワモンゴキブリの後肢を切りとって, 粘土製の台上に置いた. 微小電極用増幅器に接

Table 1 Insect neuroactivity of methanol extracts of Kenyan plants

Family	Species	Parts ^{a)}	Types ^{b)}	Activity ^{c)}	Family	Species	Parts ^{a)}	Types ^{b)}	Activity ^{c)}
Agavaceae					Liliaceae				
	<i>Sansevieria cylindrica</i>	W				<i>Aloe graminicola</i>	F1		
	<i>Sansevieria ehrenbergii</i>	W				<i>Aloe graminicola</i>	L		
						<i>Aloe secundiflora</i>	F1		
Apocynaceae					Loranthaceae				
	<i>Plumeria</i> sp.	W				<i>Loranthus</i> sp.	W	I, II, III	+++
	<i>Acokanthera friesiorum</i>	FrL	I	+++	Malvaceae				
Asclepiadaceae						<i>Hibiscus aponeurus</i>	LS	II	
	<i>Calotropis procera</i>	L	I	+++	Meliaceae				
	<i>Calotropis procera</i>	Fr	I	+		<i>Azadirachta indica?</i>	Fr	III	
	<i>Sarcostemma riminale</i>	W	I, II	+++	Monimiaceae				
Asteraceae						<i>Xymalos monospora</i>	L	I, III	+++
	<i>Tagetes minuta</i>	LS			Polygonaceae				
	<i>Vernonia hindii</i>	FIL	III			<i>Oxygonum sinuatum</i>	W	II	
	<i>Vernonia lasiocarpus</i>	FILS	I, III	+++	Solanaceae				
Boraginaceae						<i>Physalis angulata</i>	LS	II	
	<i>Heliotropium subulatum</i>	W	I	++		<i>Solanum incanum</i>	FrS	I	+++
Capparidaceae						<i>Solanum</i> sp.	FrL	III	
	<i>Capparis</i> sp.?	L	II, III			<i>Solanum</i> sp.?	L	I	+
Convolvulaceae						<i>Solanum</i> sp.?	root		
	<i>Asteripomoea</i> sp.	FILS	I	+++	Verbenaceae				
	<i>Ipomoea</i> sp.	W				<i>Vitex kenyansis</i>	Fr		
Euphorbiaceae					Vitaceae				
	<i>Euphorbia nyikae</i>	W				<i>Cissus rotundifolia</i>	W	II	
	<i>Euphorbia</i> sp.	LS			Unidentified				
Labiatae						unidentified-1	W		
	<i>Leonotis nepetifolia</i>	FILS				unidentified-2	W	I, III	+++
Leguminosae						"Mununga" in Kikuyu ^{d)}			
	<i>Caesalpinia</i> sp.	L	III			"Kiruma" in Kikuyu ^{d)}	LS	I	+++
	<i>Cassia</i> sp.	FIL							
	<i>Crotalaria agatiflora</i>	Fr	I	+					
	<i>Lotus</i> sp.?	W							
	<i>Sesbania sesban</i>	L							

a) Fl : flower, Fr : fruit, L : leaf, S : stem, W : whole plant

b) types of response

c) type I-activity

d) local name

続した記録電極虫ピン2本を腿節に、グラウンド電極虫ピンを基節に差し込み、粘土台まで貫通させることにより後肢を固定し、同時に神経活動を電気的信号として取り出した。腿節の表皮(1.5 mm×2.0 mm)を注意深く剥離して内部組織を露出させ、この部分に10%のメタノールを含む生理的食塩水に溶解または分散させた試料2 μlを投与した。試料の投与1分前から投与後30分までのあいだ、オシロスコープを

用いて神経の電気活動を観察し、高周波特性記録計を用いてそれらの記録を行った。またその際、外界からの機械的刺激に対する受容器官である腿節のとげを一定時間ごとに刺激装置により押し曲げて、興奮性インパルスを発生させ、その様子を観察、記録した。マイクロ・マニピュレーターを用いることにより、記録電極、刺激装置を比較的容易に適切な位置へセットすることができた。

Table 2 Methanol extracts of Indonesian plants examined

Family	Species	Parts ^{a)}
Companulaceae	<i>Lobelia montana</i>	LS
Ericaceae	<i>Vaccinium</i> sp.	LS
Melastomataceae	<i>Melastoma</i> sp.	L
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i>	LS
Moraceae	<i>Ficus deltoideal</i>	FrLS
Polypodiaceae	<i>Polyodium feir</i>	L
Rutaceae	<i>Triphasia aulantiora</i>	Fr
Verbenaceae	<i>Vitex frifolia</i>	LS
Unidentified	unidentified-1	L
	unidentified-2	L
	unidentified-3	LS
	unidentified-4	LS
	unidentified-5	Fr
	unidentified-6	L
	Jamb air ^{b)}	Seed

a) Fr : fruit, L:leaf, S:stem
b) local name

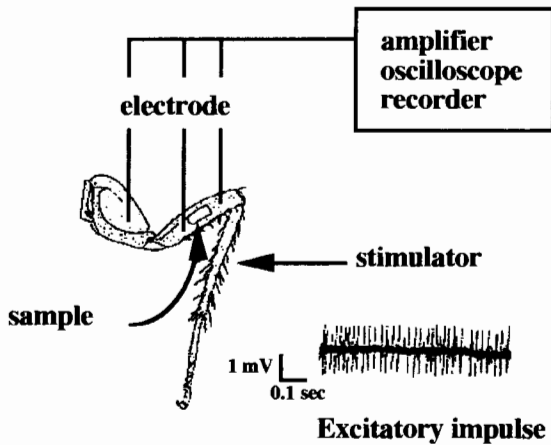


Fig. 1 The bioassay for insect neuroactivity using the metathoracic leg nerve of *Periplaneta americana*.

結果および考察

各種神経作用物質の生物試験

ワモンゴキブリの後肢神経系を用いた生物試験に、代表的な神経作用物質を供して、応答を調べた。シナプスに作用する物質としてL-グルタミン酸、γ-アミノ酪酸(GABA)、クラールレ、硫酸ニコチン、マラチオンを、神経軸索膜に作用する物質としてパーメ

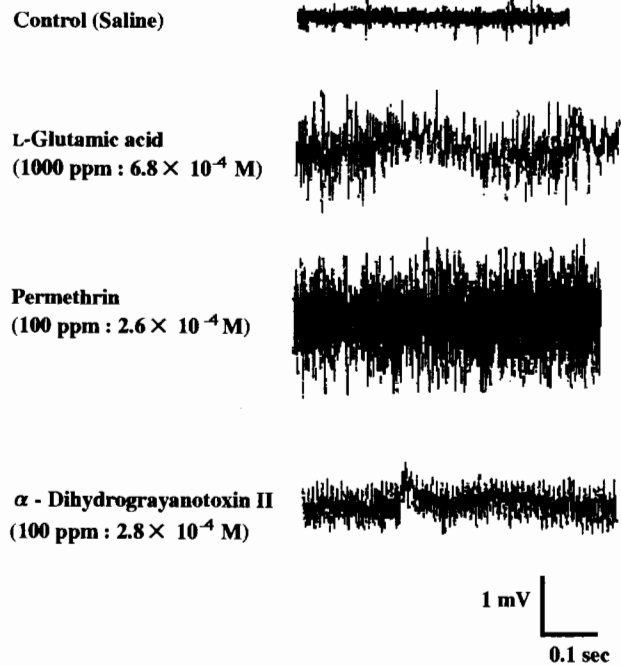


Fig. 2 Responses to neuroactive substances.

スリン、α-ジヒドログラヤノトキシシンIIを試料として用いた。その結果、L-グルタミン酸は100 ppm以上、パーメスリン、α-ジヒドログラヤノトキシシンIIはともに10 ppm以上の濃度で投与後数分のうちに自発性インパルスの発生頻度を急増させたが(Fig. 2)、その他の神経作用物質はいずれも1000 ppm以上の濃度においても顕著な応答を誘導しなかった。このことから、本試験は、シナプスを作用点とする物質よりも、むしろ神経軸索膜に作用する物質の探索に適しているのではないかと考えられた。また、本試験の神経作用物質に対する応答が、主として自発性インパルスの発生頻度の変化として現われたことから、活性の判定手段の1つとして試料投与前後におけるインパルス頻度の変化(ΔF)を用いることとし、次のようにして求めた。

$$\Delta F = A/B$$

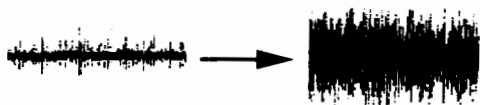
A : 試料投与後30分以内の最高インパルス頻度

B : 試料投与直前のインパルス頻度

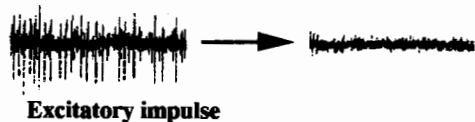
このΔFを用いて、活性の判定基準を次のように設定した。

- ΔF < 2.0 : ±
- 2.0 ≤ ΔF < 3.0 : +
- 3.0 ≤ ΔF < 5.0 : ++
- 5.0 ≤ ΔF : +++

Type I (Increase in impulse frequency)



Type II (Decrease in impulse frequency)



Type III (Fluctuation of potential base line)



Fig. 3 Three patterns of responses to methanol extracts of Kenyan plants.

ケニヤ産植物メタノール抽出物の試験

ケニヤ産植物のメタノール抽出物41種類を1000 ppmの濃度で本試験に供したところ、電位のベースラインおよびインパルス頻度にさまざまな影響がみられ、それらは大きく分けて次の3種類の活性に分類できた (Table 1, Fig. 3).

- Type I : インパルス頻度を増加させる活性
- Type II : 刺激装置により発生する興奮性インパルスの頻度を減少させる活性
- Type III : 電位のベースラインを変動させる活性

このうち、Type Iの活性については、前述のようにインパルス頻度の変化 (ΔF) を用いた活性の判定基準を設定しているが、Type II, Type IIIの活性についてはまだ明確な判定基準を設定できていない。そこで、まず Type Iの活性をもつ試料について、その活性成分の単離を試みた。

Calotropis procera の葉に含まれる活性化合物

ガガイモ科の植物である *Calotropis procera* の葉 (30 g wet) のメタノール抽出物は、強い Type Iの活性 (+++) を示した。そこで、この活性を指

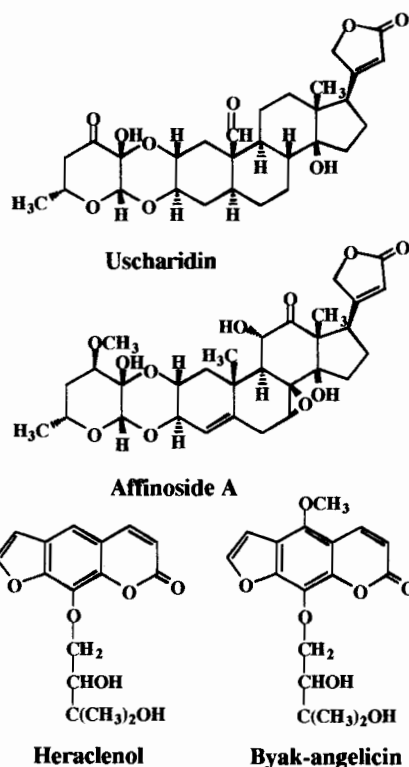


Fig. 4 Compounds isolated with guidance of insect neuroactivity.

標にして精製を行った結果、本抽出物の酢酸エチル可溶部から、化合物1 (2.1 mg) を単離した。UV, IR, NMR スペクトル分析の結果より、化合物1は本植物のステロイド強心配糖体成分の1つとして知られる uscharidin¹⁻³⁾ (Fig. 4) と考えられた。

Xymalos monospora の葉に含まれる活性化合物

モニヤ科の植物である *Xymalos monospora* の葉 (30 g wet) のメタノール抽出物も、強い Type Iの活性 (+++) を示した。活性成分の精製を行った結果、本抽出物の酢酸エチル可溶部から化合物2 (2.3 mg) を単離した。UV, IR, NMR, MS スペクトル分析の結果より、化合物2はキョウチクトウ科の植物 *Anodendron affine* のステロイド強心配糖体成分の1つである affinoside A^{4,5)} (Fig. 4) と推定され、文献記載のデータと比較することにより同定した。

ステロイド強心配糖体は神経膜のイオン透過性に影響を与えることが知られており、上記2つの例は、ワモンゴキブリの後肢神経系を用いた生物試験法による神経作用物質の探索が可能であることを強く支持するものである。

インドネシア産植物 *Triphasia aulantiara* の果実に含まれる活性化化合物

インドネシア産植物のメタノール抽出物15種類を1000 ppmの濃度で本試験に供したところ、ミカン科の植物である *Triphasia aulantiara* の果実 (10 g wet) のメタノール抽出物のみが強い Type I の活性 (++) を示した (Table 2)。活性成分の精製を行った結果、本抽出物の酢酸エチル可溶部から化合物3 (1.0 mg) および化合物4 (0.5 mg) を単離した。UV, IR, NMR, MS スペクトル分析の結果より、化合物3は heraclenol⁶⁻⁸⁾ (Fig. 4)、化合物4は byak-angelicin^{7,9,10)} (Fig. 4) と推定され、ともに文献記載のデータと比較することにより同定した。両化合物はともにフロクマリン類に属するが、フロクマリン類が神経系に影響を及ぼすという報告はこれまでになく、関心もたれる。

以上のことから、ワモンゴキブリの後肢神経系を用いた生物試験は、昆虫神経作用物質探索のための有効な手法であると考えられた。なかでも Type I の活性を指標とした場合、主として神経軸索の膜透過性に影響を与える物質の探索に有効であることが示唆された。本試験では選択性の評価は困難と考えられるが、これは一般的な生物試験により可能である。したがって、本試験を他の試験とうまく組み合わせ、さらに Type II, Type III の活性についても判定基準を設定して、Type I の活性とともに指標として用い、様々な起源の試料についてスクリーニングを行えば、新規の昆虫神経作用物質あるいは既知化合物の新しい生理活性が見いだされることも十分期待される。

要 約

昆虫神経作用物質の探索のため、ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) の後肢神経系を用いた電気生理学的手法による簡便で迅速な生物試験法を開発した。本試験にケニヤ産植物のメタノール抽出物41種類およびインドネシア産植物のメタノール抽出

物15種類を供したところ、様々な活性がみられた。それらの活性のうち、神経の自発性インパルスの頻度を増加させる活性を指標にして、これらのメタノール抽出物からいくつかの化合物を単離した。

文 献

- 1) Cheung, H. T. A., F. C. K. Chiu, T. R. Watson and R. J. Wells : Cardenolide glycosides of the Asclepiadaceae. New glycosides from *Asclepias fruticosa* and the stereochemistry of uscharidin, voruscharidin and calotoxin. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2827-2835 (1983)
- 2) Brüscheiler, F., W. Stöcklin, K. Stöckel and T. Reichstein : Die Glycoside von *Calotropis procera* R. Br. Helv. Chim. Acta, **52**, 2086-2106 (1969)
- 3) Brüscheiler, F., K. Stöckel and T. Reichstein : *Calotropis*-Glycoside, vermutliche Teilstruktur. Helv. Chim. Acta, **52**, 2276-2303 (1969)
- 4) Abe, F. and T. Yamauchi : Affinoside A and companion glycosides from the stem and bark of *Anodendron affine*. Chem. Pharm. Bull., **30**, 1183-1193 (1982)
- 5) Yamauchi, T., K. Miyahara, F. Abe and T. Kawasaki : Chem. Pharm. Bull., **27**, 2463-2467 (1979)
- 6) Sharma, Y. N., R. C. Sharma, A. Zaman and A. R. Kidwai : Chemical examination of *Heracleum candicans*. II Isolation and structure of a new furcoumarin, heraclenol. Naturwissenschaften, **51**, 537 (1964)
- 7) 馬場きみ江・松山容子・福本雅代・小沢貞：エゾニウの成分研究。薬学雑誌, **103**, 1091-1095 (1983)
- 8) Harkar, S., T. K. Razdan and E. S. Waight : Steroids, chromene and coumarins from *Angelica officinalis*. Phytochemistry, **23**, 419-426 (1984)
- 9) Laguna, A. : Coumarins from the leaves of *Amyris lineata*. Planta Med., 528-529 (1985)
- 10) Laguna, A., M. Fajardo and E. Alvarez : Coumarins from the bark of *Amyris lineata*. Planta Med., 391-392 (1987)