

## 学会賞受賞論文

(奨励賞)

## ピレスロイド系殺虫剤の構造活性相関と作用機構

松田 一彦

近畿大学農学部農芸化学科

## Structure-activity and Mode of Action Studies of Pyrethroids

Kazuhiko MATSUDA

*Department of Agricultural Chemistry, Kinki University, Nakamachi, Nara 631, Japan*

## はじめに

天然ピレトリン類をリード化合物として、多種多様な化合物が合成ピレスロイドとして生み出された。合成ピレスロイドのなかには、天然物の構造から大きくかけ離れた構造をもつものもあるが、それらをも含む膨大な数の化合物の構造と生理活性に関する情報を関連づける一つの方法は、化合物の構造要因に由来する性質との関係を解析することである。しかしそのような関係について正確な検討を加えるためには、個々の生理活性がどのような機構によって引き起こされるのかを理解するとともに活性値を正確に評価しなければならない。従来の研究では対象とする一連の化合物について、同一種類の生理活性について議論されているかといえば必ずしもそうとはいえない。たとえば、飛翔昆虫に対するノックダウン活性は化合物の速効性を評価するために測定されることが多いが、中毒症状の進行速度と活性の強さの二つの要因が分離されないまま評価されたり、特殊な作用機構によるものであるかのように考えられている場合もある。

通常ピレスロイドの生理活性の強さとして、虫体レベルの活性のほかに、作用点レベルでのものとして神経生理活性も測定されていることは非常に少ない。たとえば新規な関連化合物があったとして、神経生理活性を測定せずに、対象とする化合物が一種のピレスロイドであるかどうかを判定するのは困難である。ピレスロイドの神経生理活性を単なる電気生理学上の知見にとどめておくことなく、それが虫体レベルで測定した生理活性においてどのような位置づけにあるのか検討することは重要なことと考える。

以上のような状況をふまえて、本研究では合成ピレスロイドのうちとくにノックダウン効果に優れたカデスリン<sup>1)</sup>

を取り上げ、その類縁体の虫体レベルおよび摘出神経レベルで測定した生理活性の強さの変化を、化合物の物理化学的および立体的性質を表すパラメーターを用いて定量的構造活性相関 (QSAR) の手法<sup>2)</sup>により解析した。次いで、化合物の範囲をピレスロイド全般に広げ、虫体レベルで測定した生理活性が、多様な神経生理活性のうちどの種類のものによって支配されているのか明らかにするとともに、ピレスロイドにより引き起こされる神経膜の電位変化の機構についても考察を加えた。本稿では、これらのことを中心に概説する。

置換ベンジルカデスリン酸エステル類の  
定量的構造活性相関

合成ピレスロイドのなかでも、カデスリン (Fig. 1) はとりわけ飛翔昆虫に対するノックダウン効果に優れている。この特性がカデスリンのどのような構造に由来するのかを明らかにするために、本研究の開始以前から行なわれていた、置換ベンジル菊酸エステル類<sup>3-5)</sup>およびピレスリン酸エステル類<sup>6)</sup>の QSAR 解析結果を参考にして、カデスリンの酸部分 (カデスリン酸とここでは呼ぶ) のメタ置換ベンジルアルコールとのエステル類 (Fig. 1) を種々合成した。これらの化合物のワモンゴキブリに対する最小痙攣薬量 MCD (mol) および最小致死薬量 MLD (mol) を注射法により、そしてイエバエに対する半数ノックダウン薬量  $KD_{50}$  (mol) を局所投与法により求め、それぞれの値の逆対数値を各化合物の虫体レベルにおける生理活性を表す指標とした。なお、化合物投与後 30 分以内の症状から評価した痙攣活性以外は、酸化代謝阻害剤であるピペロニルブトキシドおよび加水分解代謝阻害剤である NIA16388 を併用して測定した。さらに、ワモンゴキブリより摘出した中枢神

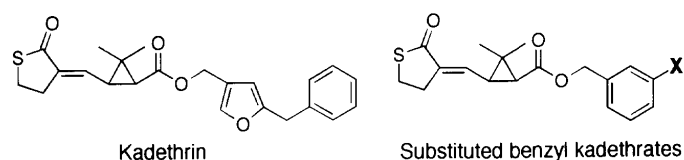


Fig. 1 Kadethrin and substituted benzyl kadethrates.

経索に反復興奮を引き起こす最小有効濃度 MEC (mol/l) と伝導遮断を引き起こす最小有効濃度 MBC (mol/l) をも外部電極法により電気生理学的に測定し、これらの逆対数値を各化合物の神経生理活性を表す指標とした。

カデスリン酸エステル類の各種の生理活性についてそれぞれの強さの変化を、アルコール部芳香環置換基の物理化学的および構造特異的パラメーターを用いて最小自乗法により解析して式 (1)～(5) を得た<sup>7)</sup>。

$$\log(1/\text{MCD}) = 8.168 + 0.252\pi - 0.122\Delta L - 0.047(\Delta B_5)^2 + 1.351I_{\text{OL}} + 0.722I_{\text{OX}} \quad (1)$$

$n=35, s=0.261, r=0.903, F_{5,29}=25.64$

$$\log(1/\text{MLD}) = 8.417 + 0.521\pi - 0.176\Delta L - 0.278\Delta B_5 + 0.918I_{\text{OL}} + 0.869I_{\text{OX}} \quad (2)$$

$n=35, s=0.254, r=0.933, F_{5,29}=39.13$

$$\log(1/\text{KD}_{50}) = 10.156 + 0.413\pi - 0.116\Delta L - 0.190\Delta B_5 + 0.912I_{\text{OL}} + 0.616I_{\text{OX}} \quad (3)$$

$n=29, s=0.264, r=0.893, F_{5,23}=18.15$

$$\log(1/\text{MEC}) = 8.167 + 0.405\pi - 0.308\Delta L - 0.059\Delta B_5 + 0.939I_{\text{OL}} + 0.697I_{\text{OX}} \quad (4)$$

$n=35, s=0.264, r=0.918, F_{5,29}=30.95$

$$\log(1/\text{MBC}) = 5.323 - 0.222\Delta L + 0.552I_{\text{OL}} + 0.624I_{\text{OX}} \quad (5)$$

$n=31, s=0.251, r=0.811, F_{3,27}=17.35$

上記5式において、 $\pi$  はベンゼン環上置換基の疎水性の尺度であり<sup>8)</sup>、 $\Delta L$  および  $\Delta B_5$  は、それぞれ置換基の最大長および最大幅を表す STERIMOL パラメーターである<sup>9)</sup>。また、 $I_{\text{OL}}$  は置換基の  $\beta \sim \gamma$  位間に二重結合が存在するかもしれないベンゼン環が含まれるとき1をとる擬変数であり、 $I_{\text{OX}}$  は置換基の  $\alpha$  または  $\beta$  位にエーテル性酸素原子が存在するときに1をとる擬変数である。式 (1)～(5) は、置換基の疎水性が高ければ高いほど、伝導遮断活性を除き生理活性が上昇するが、立体的に大きな置換基を導入すると活性が低くなること、そして置換基の  $\beta \sim \gamma$  位への不飽和結合の、また  $\alpha$  位や  $\beta$  位へのエーテル性酸素原子の導入は生理活性にとって有利であることを表している。

置換ベンジルカデスリン酸エステル類の生理活性と、同

じ置換基をもつ置換ベンジル菊酸エステル類、またはピレスリン酸エステル類の生理活性<sup>3,6)</sup>とを比較しても、あまりよい相関性はみられなかった。この事実は、エステル型ピレスロイドの酸部分とアルコール部分の生理活性に対する寄与が、厳密な意味では相加的ではないことを意味している。

### ピレスロイドによるイエバエのノックダウン症状と神経軸索膜の電位変化の進行速度

飛翔昆虫に対するノックダウン効果は、ピレスロイドの速効性を表す特徴となっている。化合物の速効性を表す尺度として、供試昆虫の50%をノックダウンさせるのに要する時間  $\text{KT}_{50}$  を用いることが多い。しかし  $\text{KT}_{50}$  は投与量に依存するので、化合物の速効性を表す正確な指標であるとはいえない。本研究では、投与量に影響されないノックダウン効果の進行速度定数 ( $k'$ ) を、既報の2コンパートメントモデル<sup>10)</sup>を用いて求め、 $\log(k' \times 10^4)$  を各化合物によるノックダウン効果の進行速度を表す指標とした。既報の46化合物についてのデータ<sup>10-12)</sup>と、本研究で新たに求めた19化合物についての結果をあわせて検討すると、いくつかの例外を除いて  $\log(k' \times 10^4)$  は化合物の疎水性を表す  $\log P$  に関して放物線状に関係づけられた (Fig. 2)<sup>13)</sup>。カデスリンといくつかの  $\alpha$ -シアノメタフェノキシベンジルエステル類はこのような関係から低目にずれた。一般にピレスロイドを投与したイエバエが激しい痙攣症状を示すのに対して、これらの化合物では運動抑制型の症状を示し、ノックダウン効果を正確に判定することが困難であった。したがって、これらの化合物の  $\log(k' \times 10^4)$  値は求められてはいるものの過小評価されている可能性がある。これらの化合物を除いた58化合物について、 $\log(k' \times 10^4)$  と  $\log P$  との関係をも最小自乗法を用いて解析することにより式 (6) を得た。

$$\log(k' \times 10^4) = -2.833 + 1.807 \log P - 0.165(\log P)^2 \quad (6)$$

$n=58, s=0.198, r=0.781, F_{2,55}=42.99$

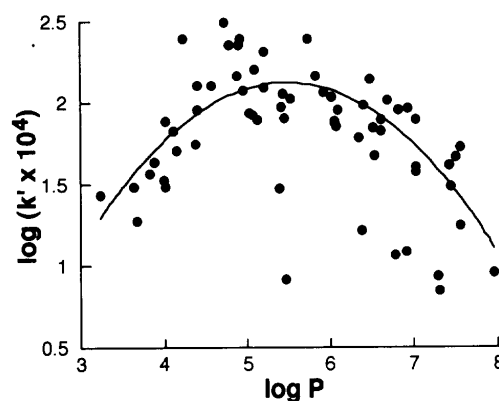


Fig. 2 Relationship between  $\log(k' \times 10^4)$  for pyrethroids and  $\log P$  values (reproduced with the permission of Academic Press).

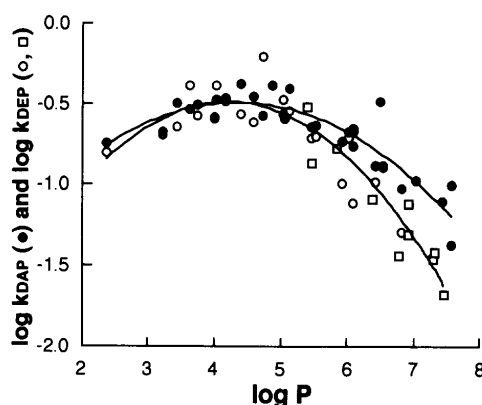


Fig. 3 Relationship between the rates of increase in membrane potentials in crayfish giant axons affected by pyrethroids and their  $\log P$  values.

The  $\log k_{\text{DAP}}$  (●) indicates the rate of elevation of the afterpotential and the  $\log k_{\text{DEP}}$  (○ and □) indicates the rate of depolarization of the resting membrane. The  $\log k_{\text{DEP}}$  values of  $\alpha$ -cyano-*meta*-phenoxybenzyl esters and kadethrin are indicated by open squares (reproduced with the permission of Academic Press).

式 (6) から、ノックダウン効果の進行速度を最適とする  $\log P$  は 5.4 と求められた。

ピレスロイドによるノックダウン症状の進行速度は、神経生理活性の発現速度により支配されることが期待できる。このことを確かめるために、ピレスロイドによってもたらされる神経軸索の膜電位変化の進行速度について検討した。効果として、脱分極性後電位 (DAP) の増大および静止電位の減少 (DEP) に注目し、化合物が試験した濃度でそれぞれの最大効果の 1/2 の電位変化を引き起こすのに要する時間  $t_{1/2}$  (min) を、アメリカザリガニから摘出した神経軸索標本を用いて測定した<sup>14, 15)</sup>。 $t_{1/2}$  は化合物の濃度に依存しなかったため、その逆対数値  $\log k$  ( $k = 1/t_{1/2}$ ) を各化合物が引き起こす膜電位変化の速度を表す指標とした。その値と  $\log P$  との関係を検討した結果、神経生理活性の種類によらず  $\log k$  は  $\log P$  の変化とともに放物線状に変化した (Fig. 3)。これらの関係を最小自乗法で解析することにより、式 (7) および (8) を得た<sup>15)</sup>。

脱分極性後電位の変化に対して：

$$\log k_{\text{DAP}} = -1.799 + 0.598 \log P - 0.069 (\log P)^2 \quad (7)$$

$n = 29, s = 0.107, r = 0.904, F_{2, 26} = 58.07$

神経軸索膜の脱分極効果に対して：

$$\log k_{\text{DEP}} = -2.403 + 0.907 \log P - 0.108 (\log P)^2 \quad (8)$$

$n = 34, s = 0.136, r = 0.932, F_{2, 31} = 101.83$

ワモンゴキブリの神経軸索標本を用いた結果について解析した場合にも、これらと同様な結果が得られた。これらの関係が式 (6) で表される関係式と類似したことから、イエバエのノックダウン症状の進行過程は、多かれ少なかれ、

ピレスロイドの神経生理活性の発現速度により影響を受けるものと考えられる。興味深いことに、 $\log P$  が 5.5 より大きな化合物については、軸索膜を脱分極させる速度が、脱分極性後電位を増大させる速度より遅くなる傾向がみられた。多くのピレスロイドは、低い濃度では脱分極性後電位を増大させ、高い濃度では静止電位を減少させるが、 $\alpha$ -シアノメタフェノキシベンジルエステル類は神経軸索標本に対して脱分極性後電位を誘起せず、低濃度で軸索膜を脱分極させる。2 個のコンパートメントからなる薬物の浸透移行についてのモデルにおける仮定<sup>10)</sup>から、化合物投与後短時間内に生ずる昆虫の中毒症状、つまりノックダウン効果の進行速度は、2 種類の神経効果のうちおもに低濃度側で引き起こされる神経生理効果、つまり脱分極性後電位の増大速度の影響を強く受けるものと考えられる。一方、 $\alpha$ -シアノメタフェノキシベンジルエステル類は脱分極性後電位を誘起しないので、これらの化合物により引き起こされるノックダウン症状は、神経軸索膜の脱分極の影響を受けるはずである。これらの化合物の多くのものが 5.5 より大きな  $\log P$  値をもつことを考え合わせると、ノックダウン症状の進行速度が、これらと同程度の疎水性をもつシアノ基をもたないピレスロイドが引き起こすノックダウン症状の進行速度より遅くても不思議ではない。

ピレスロイドによるイエバエのノックダウン症状であれ、摘出神経標本の膜電位の変化であれ、いずれの速度変化も主として分子全体の疎水性によって支配されることが明らかとなった。この事実は、ノックダウン症状の進行が、投与部位からレセプターへの化合物の非特異的な浸透移行過程を反映するものであることを示している。

#### ピレスロイドによる神経軸索膜の脱分極機構

神経軸索標本で観察された反復興奮誘起効果や興奮の伝導遮断効果の機構について検討するため、ワモンゴキブリ中枢神経の巨大軸索の膜電位を内部電極法で測定した。化合物を含む生理食塩水で神経標本を処理し、その後 1 時間以内に膜を 10 mV だけ脱分極させるのに要する薬剤濃度  $\text{DC}_{10}$  (M) を求めた<sup>16)</sup>。 $\text{DC}_{10}$  の逆対数値を化合物の脱分極活性の指標とし、同じ神経標本を用いて外部電極法により測定した反復興奮誘起活性  $\log(1/\text{MEC})$  および興奮の伝導遮断活性  $\log(1/\text{MBC})$  のそれぞれと比較したところ、反復興奮活性よりも興奮の伝導遮断活性と高い相関性を示した (式 (9))。

$$\begin{aligned} \log(1/\text{MBC}) = & -1.327 + 1.059 \log(1/\text{DC}_{10}) \\ & + 0.095 \log P \quad (9) \\ n = 17, s = 0.193, r = 0.967, F_{2, 14} = 99.66 \end{aligned}$$

式 (9) における  $\log(1/\text{DC}_{10})$  の係数が 1 に近いことから、ピレスロイドによる神経軸索膜の脱分極効果は、伝導遮断

の直接的な原因となっているものと思われる。このようにして測定した脱分極活性は、ワモンゴキブリに対する殺虫活性に対しても高い相関を示した。供試化合物のなかには、昆虫に対して興奮現象をもたらさないで實際上反復興奮活性を求められない  $\alpha$ -シアノメタフェノキシベンジルエステル類もいくつか含まれている。これらの化合物は、巨大軸索標本に対して脱分極性後電位を誘起しないうえに<sup>17, 18)</sup>、哺乳類の GABA<sub>A</sub> レセプターにも阻害作用を示すことや<sup>19-24)</sup>、昆虫や哺乳類の中毒症状が他のピレスロイドによる中毒症状と異なる<sup>25-28)</sup>ことなどから特別視され、type II ピレスロイドと呼ばれている。しかし、type II ピレスロイドを含めた化合物の殺虫活性が脱分極活性と高い相関を示したという事実は、type II ピレスロイドの殺虫活性発現機構に、他のグループのピレスロイド (type I ピレスロイド) の作用部位とは別の部位を想定する必要はないことを示唆している。

カデスリンは軸索膜において強い脱分極活性をもち、しかもその効果は、化合物との処理開始後短時間内に最大レベルに達する。このような性質に注目し、カデスリンによる軸索膜の脱分極機構について検討した<sup>16)</sup>。アメリカザリガニの軸索標本をカデスリンで処理すると、軸索膜電位は時間の経過とともに増大し、処理後 20 分以内に極大レベルに達した (Fig. 4A, B)。神経標本を  $1.0 \times 10^{-7}$  M のカデスリンで 2 時間処理した後にナトリウムチャネルの特異的ブロッカーであるテトロドトキシン (TTX) を作用させると、膜電位はカデスリンとの処理前のレベルにまで回復した (Fig. 4A)。カデスリンの濃度を  $5.0 \times 10^{-7}$  M に上げると、TTX による膜電位の回復の程度が減少した (Fig. 4B)。カデスリンの濃度がさらに高濃度 ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) の場合には、膜電位の変化はさらに大きくなり、TTX と処理してもそれはほとんど回復しなかった (Fig. 4C)。このような効果は、ワモンゴキブリから摘出した中枢神経索標本でもみられた。しかし、カデスリンの処理濃度が  $1.0 \times 10^{-5}$  M という高濃度であっても、その処理開始後間もなく TTX を与えると、膜電位はカデスリンとの処理前のレベルにまですみやかに回復した (Fig. 5A)。したがって、カデスリンとの処理直後にみられた膜の脱分極は、カデスリンがナトリウムチャネルを開いた状態に拘束してナトリウムイオンに対する透過性を上昇させたためであり、それ以降の TTX に非感受性となった脱分極効果は、膜をある程度以上の高濃度のピレスロイドとしかも長時間処理したときに現れたものと考えた。しかし、軸索標本をあらかじめ TTX を含む生理食塩水で灌流しておく、カデスリンの濃度や処理時間に関わらず膜電位は変化しなかった (Fig. 5B)。このことから、カデスリンとの処理直後にみられた TTX に対して感受性の脱分極効果と、その後現れた TTX に非感受性の脱分極効果とは互いに独立したのではなく、両者は密接

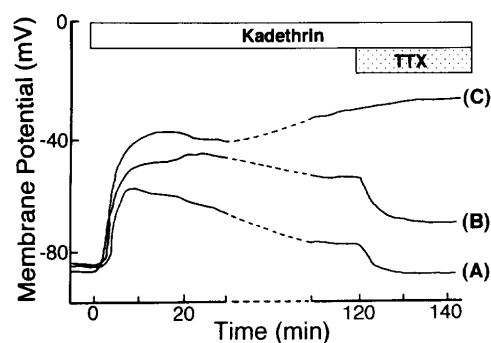


Fig. 4 Effects of kadethrin and tetrodotoxin (TTX) on the resting membrane potential of crayfish giant axon.

The nerve preparation was treated with (A)  $1.0 \times 10^{-7}$  M, (B)  $5.0 \times 10^{-7}$  M, or (C)  $1.0 \times 10^{-6}$  M kadethrin starting at zero time. To each nerve preparation,  $1.0 \times 10^{-5}$  M TTX was then added at 120 min (reproduced with the permission of Academic Press).

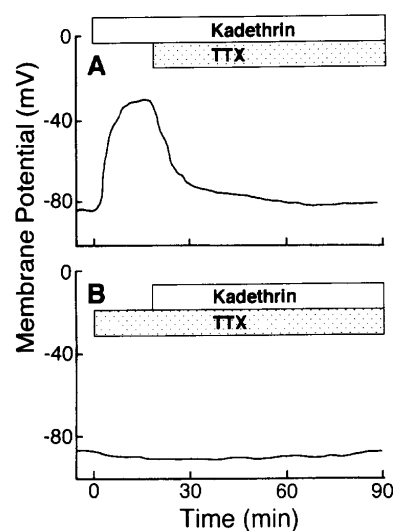


Fig. 5 Effects of kadethrin and TTX on the membrane potential of crayfish giant axon.

The nerve preparation was first treated with  $1.0 \times 10^{-5}$  M kadethrin (A) or  $1.0 \times 10^{-5}$  M TTX (B), and then with  $1.0 \times 10^{-5}$  M TTX (A) or  $1.0 \times 10^{-5}$  M kadethrin (B) (reproduced with the permission of Academic Press).

に関連していることがわかった。ここでは結果を図示しないが、TTX に非感受性となった脱分極効果は、外部生理食塩水のナトリウムイオンを、ナトリウムチャネルを通過できないコリンイオンに置き換えても消失しなかった。よって、TTX に対して非感受性となった脱分極効果は、イオン透過性が増大したナトリウムチャネルが TTX に対する感受性を失ったために生じたのではないと考えた。

神経軸索膜は、外部生理食塩水のカリウムイオン濃度を上げても脱分極させることができる。このような操作で膜を 2 時間にわたって約 40 mV 脱分極させ、その後カリウムイオン濃度を正常なレベルに下げると、膜電位は前のレベルにまで回復した。この結果から、高濃度あるいは長時間カデスリンで処理したときにみられた TTX に非感受性の

脱分極効果は、単に膜電位の上昇によるのではなく、カデスリンとの処理直後に起こる膜のナトリウムイオンに対する透過性の上昇に由来した現象であることが明らかとなった。

### 光親和性標識能をもつピレスロイドの設計

ピレスロイドの主とした作用点といわれるナトリウムチャンネルの機能発現は、さまざまなタンパク質分子により制御されている。たとえばラット脳のIIA ナトリウムチャンネルは、チャンネル部分を形成する $\alpha$ サブユニットと補助タンパク質である $\beta 1$ および $\beta 2$ サブユニットからなり、とくに $\beta 1$ サブユニットが $\alpha$ サブユニットと共存すると、 $\alpha$ サブユニット単独時よりも速く不活性化することが明らかにされている<sup>29)</sup>。一方、ショウジョウバエの*para* ナトリウムチャンネルは、補助タンパク質であるTipEタンパク質が共存しなければ効率よく機能を発現しないことが報告されている<sup>30)</sup>。これらの補助タンパク質以外に、ナトリウムチャンネルはprotein kinase 類、phosphatase 類<sup>31)</sup>およびGTP結合タンパク質などにより制御されている<sup>32)</sup>。とくに、cAMP依存性protein kinase 類<sup>33)</sup>とGTP結合タンパク質<sup>34, 35)</sup>は、ある種のピレスロイドと相互作用するともいわれている。このような事実をも考慮して、ピレスロイドの神経生理学的効果のすべてが、化合物とナトリウムチャンネルとの相互作用によってのみ説明できるのかどうか注意深く検討する必要がある。仮に、ナトリウムチャンネルと直接に相互作用する

としても、ピレスロイド分子のどの部分がチャンネルのどの部分と相互作用するのかを明らかにすることは興味深い。これらの疑問を解くためのプローブとするため、光親和性官能基であるアジド基やジアジリン基を導入したピレスロイドを合成した (Fig. 6)<sup>36, 37)</sup>。これらの化合物はいずれも殺虫効果のほかに、膜電位レベルでピレスロイドに特徴的な効果を示した。とくにジアジリン化合物については Fig. 7に示したように、ザリガニ神経や培養細胞の一種であるGH<sub>3</sub>に対して、膜電流レベルでも既存のピレスロイドと類似の効果を示した。現在、これらの化合物の構造上の改良を試みると同時に、標識実験についても検討している。

### おわりに

本研究では、QSAR解析の一手法を用いてカデスリン類縁体の各種生理活性における置換基効果や、ノックダウン効果や神経軸索膜の電位変化の進行速度と化合物の疎水性との関係を明らかにした。さらに、軸索膜の脱分極現象についても検討し、化合物のナトリウムチャンネルに対する作用だけでは説明できない要因も含まれていることを見出した。光親和性ピレスロイドを用いた研究は端緒についたばかりであるが、その研究によって以上述べた知見に対する何らかの裏づけができればと願っている。

本研究を行なうにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜いました京都大学名誉教授 藤田稔夫先生には心からお礼申し上げます。大阪府立大学教授 西村勲一郎先生には、研究を進めていくうえで常に的確なご指導を賜り、心から感謝申し上げます。ここに述べた研究の大部分は近畿大学で行なったものであり、近畿大学元教授 濱田昌之先生、教授 駒井功一郎先生には日頃から多大なご支援とご指導を賜りましたことに対して厚くお礼申し上げます。また、本研究を進めていく過程でご声援、ご助言賜りました京都大学名誉教授 栗原紀夫先生、京都大学 上野民夫教授、岩村 倣教授、赤松美紀助教授、中川好秋博士、小林孝光博士、清水 良博士に深謝致します。アース製薬株式会社には供試昆虫を、そして Roussel UCLAF 社にはカデスリンと関連化合物を賜り、お礼申し上げます。最後になりましたが、本研究は、沖本浩博士、原 省吾、堀内丈晴、中村久満、井上裕美子、西川 学、老観徳子、川尻敦子、喜多啓二、兵頭紀子、居原田晃司、鈴木浩之、山下美由紀、羽田野良治、東田一希、小宮麻紀、松本真理子、半田勝敏の各氏をはじめとする近畿大学農学部農薬化学研究室的の皆さまによる協力があったからこそ行なうことができました。ここに厚くお礼申し上げます。

### 引用文献

- 1) J. Lhoste & F. Rauch : *Pestic. Sci.* **7**, 247 (1976)
- 2) C. Hansch & T. Fujita : *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1616 (1964)
- 3) S. Nakagawa, N. Okajima, T. Kitahaba, K. Nishimura, T. Fujita & M. Nakajima : *Pestic. Biochem. Physiol.* **17**, 243 (1982)
- 4) S. Nakagawa, N. Okajima, K. Nishimura, T. Fujita & M. Nakajima : *Pestic. Biochem. Physiol.* **17**, 259 (1982)
- 5) K. Nishimura, T. Kitahaba, N. Okajima & T. Fujita : *Pestic. Biochem. Physiol.* **23**, 314 (1985)

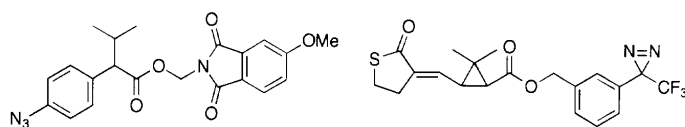


Fig. 6 Photoreactive pyrethroids.

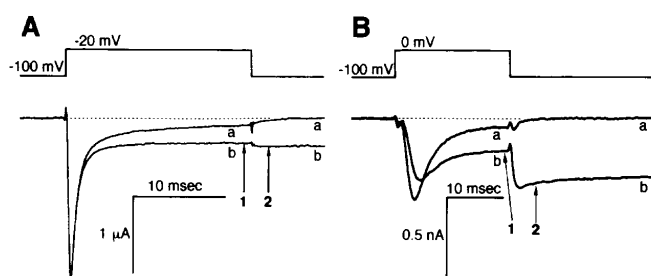


Fig. 7 Effects of a photoreactive pyrethroid on the sodium currents recorded from a crayfish giant axon (A) and a GH<sub>3</sub> cell (B) in response to a step pulse.

In A, **a** is the control and **b** was obtained 28 min after the internal application of the compound ( $2.0 \times 10^{-5}$  M). In B, **a** is the control and **b** was recorded 4 min after application of the compound ( $5.0 \times 10^{-5}$  M). Arrows 1 and 2 in each record indicate the residual and tail currents, respectively (reproduced with the permission of Pesticide Science Society of Japan).

- 6) K. Nishimura, M. Ohoka & T. Fujita : *Pestic. Biochem. Physiol.* **28**, 257 (1987)
- 7) K. Matsuda, M. Hamada, K. Nishimura & T. Fujita : *Pestic. Biochem. Physiol.* **35**, 300 (1989)
- 8) T. Fujita, J. Iwasa & C. Hansch : *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 5175 (1964)
- 9) A. Verloop : "Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment," ed. by J. Miyamoto & P. C. Kearney, Vol. 1, Pergamon, Oxford, pp. 339-344, 1983
- 10) K. Nishimura, N. Okajima, T. Fujita & M. Nakajima : *Pestic. Biochem. Physiol.* **18**, 341 (1982)
- 11) T. Kobayashi, K. Nishimura, M. Ohoka & T. Fujita : *Pestic. Biochem. Physiol.* **35**, 275 (1989)
- 12) K. Nishimura, S. Kuroda, A. Sugiyama & T. Fujita : *Pestic. Biochem. Physiol.* **36**, 209 (1990)
- 13) K. Matsuda, H. Nakamura, M. Hamada, K. Nishimura & T. Fujita : *Pestic. Biochem. Physiol.* **41**, 178 (1991)
- 14) K. Matsuda, M. Hamada, K. Nishimura & T. Fujita : *Pestic. Biochem. Physiol.* **37**, 200 (1990)
- 15) K. Matsuda, N. Oimomi, K. Komai & K. Nishimura : *Pestic. Biochem. Physiol.* **52**, 201 (1995)
- 16) K. Matsuda, M. Nishikawa, M. Hamada, K. Nishimura & T. Fujita : *Pestic. Biochem. Physiol.* **41**, 170 (1991)
- 17) A. E. Lund & T. Narahashi : *Pestic. Biochem. Physiol.* **20**, 203 (1983)
- 18) T. Kobayashi, K. Nishimura & T. Fujita : *Pestic. Biochem. Physiol.* **35**, 231 (1989)
- 19) L. J. Lawrence & J. E. Casida : *Science* **221**, 1399 (1983)
- 20) D. W. Gammon & G. Sander : *Neurotoxicology* **6**, 63 (1985)
- 21) L. J. Lawrence, K. W. Gee & H. I. Yamamura : *Neurotoxicology* **6**, 87 (1985)
- 22) K. M. Crofton, L. W. Leiter & R. B. Mailman : *Toxicol. Lett.* **35**, 183 (1987)
- 23) S. C. R. Lummis, S. C. Chow, G. Holan & G. A. R. Johnston : *J. Neurochem.* **48**, 689 (1987)
- 24) M. A. Ramadan, N. M. Bakry, A.-S. M. Marei, A. T. Eldefrawi & M. E. Eldefrawi : *Pestic. Biochem. Physiol.* **32**, 106 (1988)
- 25) D. W. Gammon, M. A. Brown & J. E. Casida : *Pestic. Biochem. Physiol.* **15**, 181 (1981)
- 26) J. E. Casida, D. W. Gammon, A. H. Glickman & L. J. Lawrence : *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 413 (1983)
- 27) R. D. Verschoyle & W. N. Aldridge : *Arch. Toxicol.* **45**, 325 (1980)
- 28) L. J. Lawrence & J. E. Casida : *Pestic. Biochem. Physiol.* **18**, 9 (1982)
- 29) L. L. Isom, K. S. DeJongh, D. E. Patton, B. F. X. Reber, J. Offord, H. Charbonneau, K. Walsh, A. L. Goldin & W. A. Catterall : *Science* **256**, 839 (1992)
- 30) G. Feng, P. Deak, M. Chopra & L. M. Hall : *Cell* **82**, 1001 (1995)
- 31) W. A. Catterall : *Physiol. Rev.* **72**, S15 (1992)
- 32) J. Y. Ma, M. Li, W. A. Catterall & T. Scheuer : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12351 (1994)
- 33) F. Matsumura & J. M. Clark : "NEUROTOX '88 Molecular Basis of Drug & Pesticide Action," ed. by G. G. Lunt, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 235-244, 1988
- 34) P. D. Rossignol : *Pestic. Biochem. Physiol.* **41**, 103 (1991)
- 35) P. D. Rossignol : *Pestic. Biochem. Physiol.* **41**, 121 (1991)
- 36) K. Matsuda, K. Iharada, H. Suzuki, M. Yamashita, H. Okimoto, K. Nishimura, T. Ueno & K. Komai : *J. Pesticide Sci.* **20**, 487 (1995)
- 37) K. Matsuda, K. Iharada, K. Komai, H. Okimoto, T. Ueno & K. Nishimura : *J. Pesticide Sci.* **21**, 179 (1996)

**略歴**

松田一彦

生年月日：1962年12月19日

最終学歴：京都大学大学院農学研究科修士課程

趣味：蝶の収集およびその写真撮影、スポーツ観戦

**Society Awards 1997**

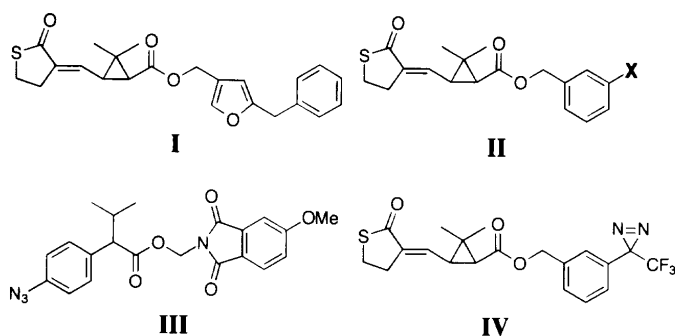
(on high prospectiveness)

## Structure-activity and Mode of Action Studies of Pyrethroids

Many synthetic pyrethroids have been synthesized based on natural pyrethrins. Some members have prominent knockdown effects while others are insecticidal. This class of compounds has various nerve effects. The mechanisms underlying the whole-body effects can be clarified by examining the substituent effects on *in vivo* and *in vitro* activities and analyses of correlations between these effects.

Kadethrin (I) has a marked knockdown effect. To elucidate the structural factors governing the knockdown

as well as other activities, a set of *meta*-substituted benzyl "kadethric" acid esters (II) were synthesized, and their whole-body activities, convulsive and insecticidal activities against American cockroaches and the knockdown activity against house flies, were measured. Nerve activities of the compounds to cause repetitive firing and conduction block in the central nerve cords of American cockroaches were also measured by the extracellular recording method. Variations in whole body and nerve activities were quantitatively analyzed with physico-



chemical parameters of the substituents. The equations derived from regression analyses indicated that these activities were higher in compounds with greater hydrophobicity and smaller substituents. Addition of indicator variables  $I_{OL}$ , taking unity for the substituents having an olefinic bond at the  $\beta\gamma$  position, and  $I_{OX}$ , taking unity for the substituents having an ether type oxygen atom at the  $\alpha$  or  $\beta$  position, significantly increased the correlations. The results indicated that the introduction of these particular structures at the  $\alpha-\gamma$  positions is favorable to the activities. Each of these activities of compounds **II** was poorly correlated with that of substituted benzyl chrysanthemates and pyrethrates having the same substituents, suggesting that the acid and alcohol moieties of pyrethroids do not act additively to these activities.

The knockdown activity is governed by the intrinsic activity, which could be measured with inhibitors of metabolic degradation, and the rate of development of the effect. To estimate the rate of development of the knockdown symptom induced by pyrethroids including kadethrinates (**II**) in house flies, the rate constant  $k'$  for the progress of the symptom was determined for each compound by the first-order kinetics with a two-compartment model. The  $\log(k' \times 10^4)$  values were parabolically related to the hydrophobicity parameter,  $\log P$ , with some exceptions. The exceptional compounds were kadethrin and  $\alpha$ -cyano-*meta*-phenoxybenzyl esters. Flies treated with these compounds were quiet and did not show the typical knockdown symptoms produced by most other compounds, especially at the earliest stage of intoxication, probably, leading to underestimation of the  $k'$  value. To examine the role of nerve effects in the development of the knockdown symptom, a half time,  $t_{1/2}$ , required to give half the maximum responses of the depolarizing afterpotential and depolarization of the resting membranes caused by pyrethroids was measured in crayfish and cockroach giant axons by means of the intracellular recording method. The rate indices,  $\log k$  ( $k = 1/t_{1/2}$ ), for both nerve effects were related to  $\log P$  of

the compounds with optimum values similar to those observed for the rate of development of the knockdown effect, suggesting that the development of the knockdown symptom is affected by the progress of these nerve effects.

The depolarizing activity of a set of pyrethroids against axonal membranes of American cockroaches [ $\log(1/DC_{10})$ ] was measured to examine correlations of their repetitive [ $\log(1/MEC)$ ] and blocking [ $\log(1/MBC)$ ] activities that were measured extracellularly in the central nerve cords of the cockroach. The depolarizing activity was better correlated to the blocking activity, suggesting that the conduction block caused by pyrethroids is attributable to the inactivation of sodium channels in the depolarized membrane. The depolarizing activity of pyrethroids including several  $\alpha$ -cyano-*meta*-phenoxybenzyl esters was also related to the insecticidal activity, suggesting that the  $\alpha$ -cyano compounds kill insects by basically the same mechanism as that underlying the insecticidal effects of other pyrethroids.

Kadethrin rapidly depolarized the resting membrane of the axonal preparation at very low concentrations, while induction of the depolarizing afterpotential was negligibly small. Based on this feature, the mechanism underlying the membrane depolarization caused by kadethrin was examined in the crayfish and cockroach giant axons. The depolarization observed within a short period after the start of treatment with kadethrin was completely blocked by tetrodotoxin (TTX), indicating that the depolarization is due to increase in the permeability of the membrane to sodium ions. Prolonged exposure of the membrane to kadethrin at a concentration higher than a certain level resulted in a depolarized membrane, which could not be repolarized by TTX. However, pretreatment with the toxin modified the membrane not to be depolarized by kadethrin, suggesting that the TTX-insensitive phase also arose from the increase in the permeability of the membrane to sodium ions. This view was supported by the finding that the membrane depolarized by soaking in an external saline with a high concentration of  $K^+$  ions was easily repolarized to the normal level by washing, as observed before the start of the experiment.

Pyrethroids modify the gating mechanism of sodium channels. Other proteins besides the channel protein, have also been found to regulate the gating mechanism of the channel. Whichever the target protein of pyrethroids, a tool compound is needed to identify the site of interaction. Being as active as conventional pyrethroids at both whole-body and nerve levels, the photoreactive pyrethroids (**III**, **IV**) synthesized in this study should be key compounds for studies in this field.