

Methoprene のカイコに対する幼若ホルモン活性 への cyclodextrin 包接化の影響

中村利家*・持田和男*・斎藤修*・木村由紀雄**

Effect of Methoprene Complexation with Cyclodextrins
on the Juvenile Hormone Activity to Silkworm.

Toshiie NAKAMURA, Kazuo MOCHIDA, Osamu SAITO
and Yukio KIMURA

It has been known that the application of methoprene, one of *Cecropia* juvenile hormone (JH) analogues, delays metamorphosis in 5th instar larvae of silkworm, *Bombyx mori* L., and results in the increase of silk production. This study was carried out to know the effect of cyclodextrin inclusion of methoprene on the JH activity. Methoprene was included with α and β -cyclodextrins (CD) and α and β -cyclodextrin peracetates (CDA). In the application with dimethylsulfoxide-methanol mixture as a common solvent, the feeding period after the application was clearly prolonged in β -CD and β -CDA complexes but nearly equivalent in α -CD and α -CDA complexes in comparison with free methoprene. While, in the application with acetone as solvent, the activity of α -CDA and β -CDA complexes was equally superior to that of free methoprene. For a good activity, the selection of solvent was important. The cocoon weight was apparently increased with the prolongation of feeding period, whereas the cocoon layer weight was not always so and the cocoon layer ratio was decreased with the high activity. On the cuticle of larvae, the disappearance rate of methoprene in β -CD and β -CDA complexes was apparently slow compared to free methoprene. It appears that the slow release of methoprene resulted in high activity of the complexes.

緒 言

幼若ホルモン (juvenile hormone : JH) 活性物質をカイコ, *Bombyx mori* L., の終令幼虫に投与すると, 食桑期間が延長され繭重および繭層重が増大することは既に明らかにされており, その1つである methoprene, isopropyl (*E, E*)-11-methoxy-3, 7, 11-trimethyl-2, 5, 4-dodecadienoate, が増繭剤として実用化されている, 一方, 環状オリゴ糖の cyclodextrin (CD) はその分

子内疎水性空洞中に種々の化合物をとり込み, 包接複合体 (inclusion complex) を形成して化合物の物理的・化学的性質を変化させる。化合物の生物活性や安定性の増大, 或は製剤品質の向上が期待できるため, 医薬製剤への応用研究が盛んである。⁶⁾ 農業への応用例は未だ少ないが, 化合物は安定化されても必ずしも生物活性の向上に結びつかない面があるようである。^{7,8)}

本研究では, グルコース6および7分子よりなる α および β -CD と, それぞれの疎水性を増大させた α および β -cyclodextrin peracetate (CDA) を用いて, methoprene を包接化したときのカイコに対する JH 活

* 生物汚染化学研究室

** 鳥取県蚕業試験場

性ならびに増菌効果への影響を検討した。さらに活性増大の原因について若干の検討を行ったので、それらの結果を報告する。

実験材料および方法

1. 化合物

Methoprene は市販のアルトシッド[®]10F (大塚製薬) より抽出した純度82.3%のものを用いた。分析用標準品 (94.7%) は大塚製薬より提供をうけた。

Cyclodextrin (CD) は、 α -CD は東京化成工業、 β -CD は和光純薬工業の試薬をそのまま用いた。

Cyclodextrin peracetate (CDA) は、McCLENHAM⁹⁾の方法を若干改変して合成した。すなわち α または β -CD の 5g を脱水ピリジン 50ml に溶解し、無水酢酸 15ml を加え 60℃ で 24 時間還流加熱して反応させた。反応液を 500ml の冷水中に注ぎ、生じた沈殿を濾集し、冷水でピリジンを洗浄後 P_2O_5 上で一夜真空乾燥した。得られた α および β -CDA は TLC でモノスポットであることを確認した。

2. 包接複合体

1) α および β -CD complex

α -CD 2.8g を水 20ml に、または β -CD 1.5g を水 100ml に加え飽和水溶液とし、各 CD の 2 倍モル量の methoprene (それぞれ約 1.8g および 0.8g) をアセトン 2ml に溶解して加え、5℃ で 24 時間攪拌した。水冷しながら静置し、生じた沈殿を濾集し、過剰の methoprene をエチルエーテル 5ml で 5 回洗浄後、 P_2O_5 上で一夜真空乾燥した。

2) α および β -CDA complex

α -CDA 2.28g、または β -CDA 2.67g を水 300ml 中に懸濁させ、各 CDA の 2 倍モル量の methoprene (約 0.8g) をアセトン 10ml に溶解して加え、5℃ で 24 時間攪拌した。水冷静置後沈殿を濾集し、過剰の methoprene を 20% アセトン水溶液 5ml で 5 回洗浄後、 P_2O_5 上で一夜真空乾燥した。

3) Complex 組成

各 complex における methoprene 量および CD または CDA 量を次のように定量し、組成を検討した。

i) Methoprene

α および β -CD complex では、それぞれ 50mg を 10% $NaClO_4$ 水溶液 50ml に溶解し、*n*-ヘキサン 10ml ずつで 3 回分配 (シェーカー振とう 10分) し methoprene を抽出した。*n*-ヘキサン層を合わせ無水 Na_2SO_4 で脱水処理後溶媒を減圧留去 (40℃) した。これに内部標準として *n*-ドコサン 335ppm を含む *n*-ヘキサン溶液の適量を加え、ガスクロマトグラフィー (GC) 注入液と

した。

α および β -CDA complex では、それぞれ 100mg を *n*-ヘキサン 25ml に加え、シェーカーで 10 分間振とう後沈殿を濾別した。抽出液の溶媒を減圧留去し、上と同様に内部標準溶液の適量を加え GC 注入液とした。

GC 条件は次のとおりとした。装置：FID 付柳本 G-80型、カラム：5% Silicone OV-101/Chromosorb W, AW, DMCS (80/100 mesh), 3mm ϕ ×1.5m ガラス製、温度：カラム 240℃、注入口・検出器 280℃、キャリアガス： N_2 , 25ml/min。

ii) CD および CDA

いずれもジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液とし、波長 405nm における施光度を測定して定量した。検量線はいずれも 0.2~1.0%, w/v の範囲で作成し、各 complex を 1.0%, w/v 溶液とし測定した。装置はユニオン技研 AUTOMATIC DIGITAL POLARIMETER PM 101 を用いた。

3. カイコ投与試験

1) 供試カイコ

品種は日146号×支147号を用いた。1~3 齢期は人工飼料 (ヤクルト製) を用い、27.9~29.8℃, 86~87% RH の全明条件下で飼育した。4 齢以後は桑葉を用い、薬剤投与までは 24.6℃, 89% RH の室内条件下で、投与後は温湿度とともに制御せず夜間保温のみの室内条件下で飼育した。

2) 薬剤投与方法

各 CD および CDA complex ならびに free の methoprene に対し、DMSO-メタノール (3:7) 混合液を共通溶媒として選択した。各試料を methoprene 量を基準として段階的に稀釈し、5 齢桑付後 48 時間の幼虫胸背部に 1 頭当り 5 μ l あてマイクロピペットを用いて塗布した。

さらに、 α および β -CDA complex はアセトンに可溶であるので、これらについてはアセトンを溶媒として用いた投与試験を別に行った。

いずれの投与試験でも対照区には溶剤のみを塗布し、また供試カイコ数は 1 葉量段階に対し雌雄あわせて 20~26 頭とした。

3) 調査方法

JH 活性の発現程度は通常 5 齢幼虫の食桑期間の延長で比較される。ここでは 12 時間ごとの熟蚕出現数を雌雄込みで集計し、薬剤投与から熟蚕までの日数で比較することにした。

増菌効果については、上蔭後およそ 10 日目に繭を切開し、健全に蛹化したものについて雌雄別に繭重と繭層重を測定して比較した。

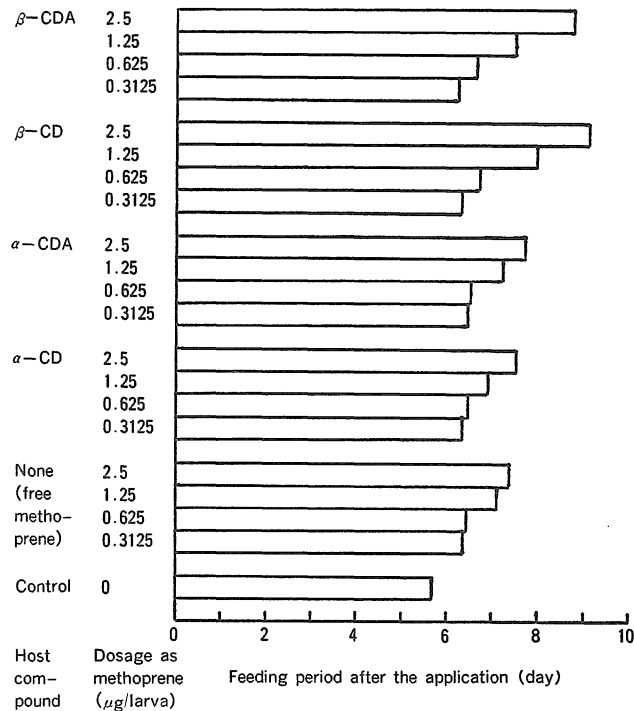


Fig. 1. Feeding period of silkworms after the topical application with methoprene and its CD or CDA complexes dissolved in DMSO-methanol mixture (3:7) at 48th hour of 5th instar.

4. カイコ体表上の methoprene

カイコは前と同品種だが、稚蚕期より25℃、50% RHの室内条件下で人工飼料（ヤクルト製）のみで飼育したものを用いた。freeのmethopreneとβ-CDおよびβ-CDA complexを、methopreneとして2.0μg/μlとなるように前記の共通溶媒に溶解し、1頭当り10μlをマイクロピペットを用いて塗布した。所定時間ごとにそれぞれ10頭ずつを取り出し、共通溶媒で体表上の残存methopreneを洗浄した。洗浄液に1%食塩水30mlを加え、*n*-ヘキサン20mlずつで3回分配（シェーカー振とう10分）し抽出した。*n*-ヘキサン層を合わせ、無水Na₂SO₄で脱水処理後溶媒を留去し、以下前記と同様にしてGCによりmethopreneを定量した。実験はすべて2反覆で行った。

結果および考察

1. 包接複合体の調製

αおよびβ-cyclodextrin (CD)とmethopreneの包接複合体(complex)の調製は比較的容易と思われた。各CDの飽和水溶液中にmethopreneのアセトン溶液を加えると速やかに白色沈殿物が生成するので、包接化

は確実と見てよい。これを濾集後、エチルエーテルで洗浄したときほぼ一定の組成比を示した。しかし包接のモル比(methoprene/CD)を求めるといずれも0.2に近く、この洗浄条件では多少とも包接化methopreneを溶出させ失った可能性がありうる。

一方、αおよびβ-cyclodextrin peracetate(CDA)はいずれも水溶解性が低いので、懸濁状態でmethopreneと接触させ、CDAの溶解につれて包接沈殿化させる方法をとった。濾集した沈殿物は、エチルエーテル洗浄では殆どのmethopreneが速やかに溶出されてしまったが、20%アセトン水溶液で洗浄することによりほぼ一定の組成比を示した。ただし包接モル比(methoprene/CDA)を求めるといずれも1.3前後であり、この洗浄条件ではなお若干過剰のmethopreneの混在の可能性がありうる。

以上のとおり、各complexとも調製方法についてなお検討すべき点が残されたが、今回はこのまま以下の実験に供することにした。

2. カイコに対する JH 活性と増齢効果

カイコへのJH活性の大きさは、5齢（終齢）幼虫に投与したときの幼虫期間すなわち食桑期間の延長で評価

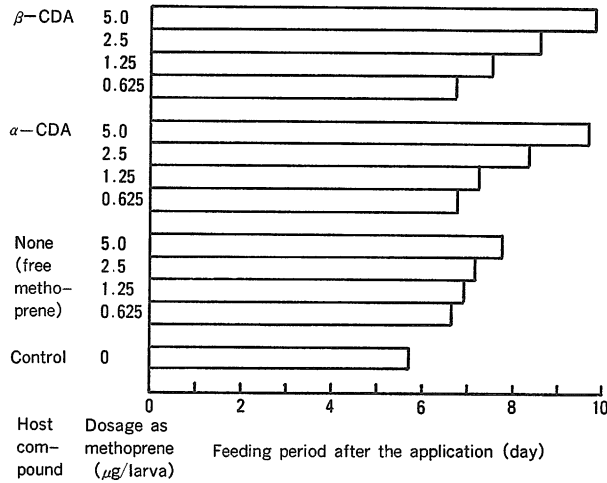


Fig. 2. Feeding period of silkworms after the topical application with methoprene and its CDA complexes dissolved in acetone at 48th hour of 5th instar.

でき、その結果として増繭効果がもたらされる。^{1)~5)}

Methoprene については、通常 5 齢 48~60 時間の投与が適当とされているが、⁵⁾ 増繭効果の面ではより遅い処理の方が高いようである。^{5,10)} 本検討では JH 活性への影響の評価を重視し、投与時期は 5 齢 48 時間後とした。

薬剤投与時の溶剤には通常アセトンがよく用いられるが、α および β-CD complex に対し溶解力が不足した。そこで各 complex に対する共通溶媒を検討し、DMSO-メタノール(3 : 7) 混合液を選択した。しかし α および β-CDA complex はアセトンに溶解するので、念のためこれらについてはアセトンを用いた投与試験を追加して行うことにした。

各 complex および未包接 (free) の methoprene を共通溶媒に溶解して投与したときの、投与後の食桑期間を示したのが Fig. 1 である。この場合は雌雄間に殆ど差が見られなかったので合計数で示した。無処理に比し free の methoprene に明らかに活性が認められ、α-CD および α-CDA complex もこれと同等の活性であったが、β-CD および β-CDA complex の活性は明らかにそれらにまさっていた。

別に α および β-CDA complex をアセトンに溶解して投与したときの結果は Fig. 2 のとおりであった。処理量を一段高い方にずらしたが、free の methoprene の活性は前とほぼ同等と見てよい。これに比し α-CDA および β-CDA complex の活性は明らかに顕著であり、かつ両者間に殆ど差が認められなかった。

以上のとおり、包接化により methoprene の JH 活性が増大することは確かである。しかし α-CDA complex

で投与時に用いる溶媒が活性発現に大きく影響することも示された。その原因として、混合溶媒中では complex からの methoprene の溶出すなわち free 化が⁵⁾おこり易く、その程度が β 系よりも α 系 complex で大きいことが推測できる。アセトンではそのような影響が小さい

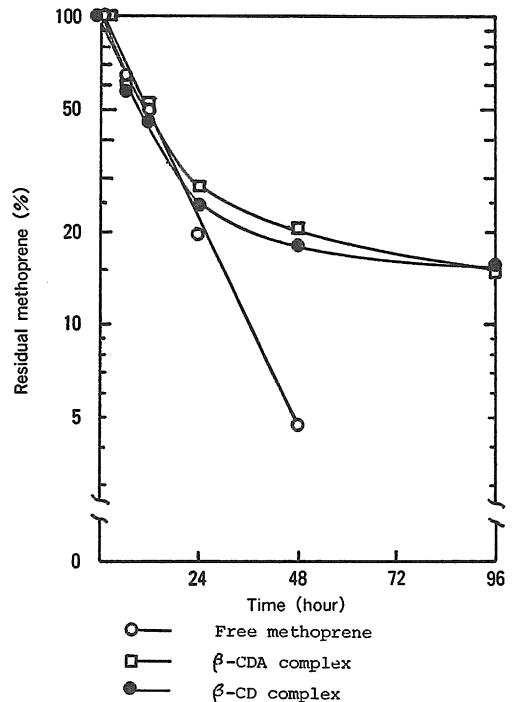


Fig. 3. Disappearance of methoprene on the cuticle of silkworms.

Table 1 Effect of methoprene and its CDA complexes on the cocoon formation.

Sex	Host compound	Dosage as methoprene ($\mu\text{g}/\text{larva}$)	n	Ratio to the control (average value)			
				Cocoon weight	Cocoon shell weight	Cocoon shell percentage	
Male	β -CDA	5.0	6	141	113	80	
		2.5	8	138	115	83	
		1.25	8	126	125	100	
		0.625	12	110	108	99	
	α -CDA	5.0	6	148	113	77	
		2.5	9	131	119	91	
		1.25	7	120	122	102	
		0.625	11	120	120	100	
	None (free methoprene)	5.0	10	129	121	94	
		2.5	10	122	112	92	
		1.25	11	118	123	104	
		0.625	9	118	116	98	
	Control	0	11	100 (2.00g)	100 (50.3cg)	100 (25.2%)	
	Female	β -CDA	5.0	10	134	107	79
			2.5	11	126	105	82
1.25			10	115	113	98	
0.625			14	114	112	99	
α -CDA		5.0	9	133	106	80	
		2.5	14	125	108	87	
		1.25	14	115	114	99	
		0.625	13	118	109	93	
None (free methoprene)		5.0	12	120	115	96	
		2.5	7	118	112	95	
		1.25	13	113	111	99	
		0.625	13	112	109	98	
Control		0	13	100 (2.66g)	100 (55.7cg)	100 (20.9%)	

Methoprene and its complexes dissolved in acetone were applied topically at 48th hour of 5th instar.

ことになる。興味のある現象であるが、確認のための検討は行っていない。

増繭効果については、両試験とも雌雄別に繭重と繭層重を測定し繭層歩合を求めた。傾向は同様であったので、ここでは活性の発現が顕著であったアセトン溶媒とした試験の結果のみを Table 1 に示す。

食桑期間の延長 (Fig. 2) につれて明らかに繭重は増大したが、繭層重は必ずしもそうでなく、繭層歩合は逆に低下する傾向が認められた。すなわち、この条件下では繭層重の増大には限界があり、カイコの肥大がそのまま吐糸能力の増大に直結しなかったことを示している。他の報告にも繭層重の増大には限度があると見られる例も多く、^{4,5,10)} また過剰投与は生理障害も惹起するようである。¹¹⁾ 投与の時期や処理方法などなお検討は必要と思われるが、包接化の実用的意義を考える場合の問題点である。

3. カイコ体表上の methoprene

カイコに塗布された methoprene は、速やかに吸収¹¹⁾され、代謝排泄されることが既に明らかにされている。

したがって体表上での methoprene の動態を比較することで、ある程度生物活性を説明しうらと思われた。

ここでは共通溶媒を用いた投与でも JH 活性がすぐれていた β -CD および β -CDA complex と free の methoprene について、カイコ体表上における消失速度を検討した結果を Fig. 3 に示す。図から明らかなように、free の methoprene は一次速度式に従って速やかに消失し、吸収が早いことを示唆した。これに比し、両 complex とも methoprene の消失は初期の 12 時間は free と同様であったが、以後の消失がゆるやかであった。初期消失は前項で推測した共通溶媒中での complex からの methoprene の free 化の影響であり、その後の complex からの methoprene の徐放が活性増大に寄与したと考えると説明し易い。ちなみに、カイコの血中に移行した methoprene の残存期間は短く、また JH 活性物質は 1 度に多量投与するより何回かに分け同量を投与¹¹⁾した方が活性が高いとされている。

各 complex の生物活性或は投与時の溶媒の影響をより明確にするにはなお検討を要するが、少なくとも

methoprene の包接化による活性増大はその徐放効果によると考えるのが自然だと思われる。

謝 辞

本研究に当り、有益なご助言ならびにご協力をいただいた鳥取県蚕業試験場の嘉住一郎場長および船原幹夫養蚕科長に深甚なる謝意を表する。

要 約

Methoprene を α および β -cyclodextrin (CD) ならびに α および β -cyclodextrin peracetate (CDA) を用いて包接複合体 (complex) とし、カイコの終齢幼虫に投与したときの幼若ホルモン (JH) 活性および増繭効果への影響を検討した。

各 complex に対する共通溶媒として DMSO-メタノール混合液を用いた投与では、未包接の methoprene と比較し、 α -CD と α -CDA complex の活性は同等であったが、 β -CD と β -CDA complex の活性は明らかにまされた。一方、 α -CDA と β -CDA complex をアセトンに溶解して投与したときは、いずれもすぐれた活性を示し、溶媒の選択が重要であることが示された。この JH 活性の増大につれて、明らかに繭重は増大したが、繭層重はそうでなく、増繭効果には限界がうかがわれた。

カイコ体表上では、未包接の methoprene の消失は

速やかであったが、 β -CD および β -CDA complex ではゆるやかであり、包接による methoprene の徐放化が活性増大に寄与したものとされた。

引 用 文 献

1. H. AKAI and M. KOBAYASHI : *Appl. Entomol. Zool.*, **6**, 138 (1971).
2. H. AKAI, K. KIGUCHI and K. MORI : *ibid*, **6**, 218 (1971).
3. C-F. CHANG, S. MURAKOSHI and S. TAMURA : *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 692 (1972).
4. S. MURAKOSHI, C-F. CHANG and S. TAMURA : *ibid*, **36**, 695 (1972).
5. 小針要吉・赤井弘 : 日蚕雑, **47**, 315 (1978).
6. 上釜兼人 : 薬学雑誌, **101**, 857 (1981).
7. I. YAMAMOTO *et al.* : *J. Pesticide Sci.*, **1**, 41 (1976).
8. I. YAMAMOTO *et al.* : *ibid*, **2**, 41 (1977).
9. W. S. McCLENAHAM : *J. Amer. Chem. Soc.*, **64**, 2139 (1942).
10. 小針要吉・赤井弘 : 日蚕雑, **48**, 37 (1978).
11. 青森隼二・小沢洋一・新村正純 : *ibid*, **46**, 69 (1977).
12. 島田秀弥・釜田壹・浅野昌司 : *ibid*, **50**, 391 (1981).