

normal curve, excepting the curve on the 18th day after the oviposition at 60°C. It seems that this exception is caused by the difference in the excavating place of weevils.

(3) At 50°C of hot water, the susceptibility of weevil takes the lowest value at the 18th day after oviposition (pupal period) and decreases in descending order at the 1st day (the first stage of egg period), at the 10th (3rd instar), at the 5th day (1st instar) and at the 3rd day (the termination of egg period), when comparing by the median lethal time (LT-50).

(4) The susceptibility at 40°C shows almost similar value regardless the different stages of growth. It is probably due to the influence produced by the dipping itself, not by temperature.

At the initial stage of egg period, the 3rd day and the 5th day after oviposition, the susceptibility at 60°C is comparatively higher than at other stages, while, after that the susceptibility decreases with the growth. It seems that this decrease depends upon the ratio, body size to body surface, which decreases with the progress of insect age.

(5) Susceptibilities on the 18th day after oviposition are 310 min., 17.76min., 0.42min. and 0.16min. (9.40sec.), respectively in the cases of 40°C, 50°C, 60°C and 70°C When indicated by the 95% lethal time (LT-95).

The temperature of 40°C and 50°C could not be available in practice of control because in these cases long duration of immersion is needed

to kill the weevil. It seems that the temperature higher than 60°C is suitable to kill.

(6) The susceptibility of Azuki bean to hot water is shown by the cumulative curve of symmetrical normal curve.

(7) In 97°C-80°C of hot water, such short durations of immersion as 0.33 min. 2.40 min. are sufficient to attain LT-50. As descending temperature, the duration of immersion increases gradually at 75°C, linearly at 70°C-60°C. At 50°C the duration time does not increase as temperature falls.

(8) When the Azuki bean is immersed into the water of comparatively higher temperature, the influence produced by temperature is stronger than that produced by lower temperature; and when the bean was immersed into the water of comparatively lower temperature, the influence made by dipping appears remarkably.

(9) In order to know the availability of the present immersion method, the safety margin which ranges between LT-5 of bean and LY-95 of weevil is determined. The widest part situates at 60°C and 50°C, 65°C, 70°C, 75°C and 80°C in descending order. The susceptibility of bean increases rapidly above 80°C.

(10) For complete control of the pest, the range of temperature of hot water should be from 60°C to 75°C.

(11) The damage on beans caused (1.804 Litres) by the weevil should be completely controlled by dipping the bean into hot water of 70°C for 5 min.

Studies on the Inhibition of Enzymes by the Antibiotics. Part. 2 Inhibition of Cholinesterase by Unsaturated Ketones. By Minoru KAMODA, Tatsuo CHIBA, Kazuo MORI, and Nobuo ITO (Department of Agricultural Chemistry, Hokkaido University.)
Received Aug. 12, 1953. *Botyu-Kagaku* 18, 117, 1953. (with English résumé 121)

23 抗生物質による酵素阻害反応に関する研究 (第2報) 不飽和ケトンによるコリンエステラーゼ作用の阻害 鴨田 稔*, 千葉辰雄, 森 量夫, 伊藤信夫 (北海道大学 農学部 農芸化学科) 28.8.12 受理

不飽和ケトンの殺虫作用及び抗菌作用に就いては多くの報告があるが、その作用機構、特に殺虫作用の立場から不飽和ケトンの作用機構を検討した報告は無い。

筆者等は前報^①に於て、生活細胞に不飽和ケトンを加える事によつてそこにかかる個々の現象からその作用機構を解析する事もこの機構を解明する上に重要な一方法と考え、先づ papainase に対する不飽和ケトンの作用を生活細胞に生成する代謝物質の拮抗と単一酵

* 現在日本精糖工業会技術部勤務, 旧姓渡辺

素に対する抑制作用との関連性の面から追求し、不飽和ケトンが papainase の活性基 -SH 基に作用する事を見出した。

しかし不飽和ケトンは殺虫作用、抗菌作用の他に哺乳動物に対しても抗生作用を有している。即ち acetophenone をモルモットの皮下に 1cc 注射すると深麻酔に陥り、数時間中に致死する⁽⁸⁾。又体重 17kg の犬に 1cc 静脈注射すると深麻酔に陥り⁽⁹⁾、呼吸及び循環系を障碍し、蛋白尿及び血尿を排泄する。ethyl phenylketone, propylphenyl ketone⁽¹⁰⁾ は acetophenone と同様の作用を有しており前者を 1.75g/kg 与え、9時間持続的に眠り後者を 1.8g/kg 与えると4時間軽く眠り、2.5g 与えると反射機能の消失、唾液漏及び知覚障碍を起して死ぬ事等が報告されている。

筆者等は殺虫作用及び哺乳動物に対する催眠、麻酔作用或いは病状として起る自律神経系の支配する諸器官の障碍等の見地から不飽和ケトンが cholinesterase 作用を抑制するのではないかとこの考察の下に不飽和ケトン10化合物を用いこれ等の cholinesterase に対する作用を試験した。

尚 cholinesterase は所謂 true-cholinesterase と pseudo-cholinesterase の2型に区別さなっているがこの区別は作用基質の異りのみでなくその至適基質濃度にも明瞭に差異があり、true-cholinesterase は pseudo-cholinesterase に比し可成り低濃度に於て反応最適点を持ち、しかも過剰の基質が阻害的に作用する。両酵素型の差異が如何なる機構に基づくものであるかは未だ仮説の域を出ていないが、Bisseger 等⁽¹¹⁾は true-cholinesterase では酵素と基質の結合はアセチルコリンの N とアセチル基の2ヶ所に於て行われ、pseudo-cholinesterase はアセチル基の部分だけで結合するとしておりそれ故非コリンエステルをも分解し得ると述べている。又 Koelle⁽¹²⁾等は true-cholinesterase はアセチルコリンと2つの場所で結合し $E=S$ 結合をつくり反応が進行するが、若し基質が過剰になると $E<S$ の如き不活性結合体を生ずる為に高基質濃度では活性度が低下するのであろうと説明している。宿谷⁽¹³⁾も反応速度論的に解析して同様の結論を得ている。長谷⁽¹⁴⁾は色素による阻害反応より pseudo-cholinesterase の両基質に対する作用基は別個のもので同一酵素蛋白質体上にならび存在するのではないかと報告している。

筆者等は不飽和ケトンの抗生作用機構の解明と共に cholinesterase の作用機構に関してもその解明に努めた。

実験方法

実験に用いた不飽和ケトンは次の化合物である。acetophenone, acrylophenone, benzophenone,

benzalacetophenone, furfuralacetone, furfuralacetophenone, 4-aminoacetophenone, 4-aminobenzophenone, 4,4'-diaminobenzophenone, 4,4'-diacetaminobenzophenone

これ等は何れも文献記載の方法により合成し、その特数によつて確めた。供試化合物は何れも水に不溶なのでエタノールに溶解して水で稀釈し acetophenone, acrylophenone は 0.48%, 他の化合物は 0.96% エタノール溶液として使用した。対照試験として同濃度のエタノールを添加したが基質がトリアセチン、アセチルコリンの場合は共に阻害作用も又特に賦活も認められなかつた。酵素試料は馬血清を用いた。馬血清の cholinesterase の作用力は無菌的に保つと数ヶ月間活性であると言われ⁽¹⁵⁾、人間の血清 cholinesterase は 2~4°C に保存すると約10日間は作用変化を起さないと報告されている⁽¹⁶⁾。筆者等は予備試験の結果から採血後2週間以内の試料を用いた。基質はトリアセチン、アセチルコリンを使用し、cholinesterase 作用の測定は steadman 法⁽¹⁷⁾によつて行つた。即ちエステルの加水分解反応によつて生ずる酸の生成速度を一定の pH に於て測定した。指示薬としてブローム・チモールブルーを用い変化する反応液の pH を一定に保つように 0.0225 N の苛性ソーダを滴下し、アルカリ消費量を時間に対して記録し、滴下アルカリ量-時間曲線をつくつた。本実験は全て pH 7.4, 温度 30°C である。反応系は下記の如くである。

(1) トリアセチン 0.1g, 蒸溜水 98cc, 供試化合物エタノール溶液 1cc, 馬血清 1cc。

(2) アセチルコリン塩酸塩 (0.1g/cc) 1cc, 蒸溜水 97cc, 供試化合物エタノール溶液 1cc, 馬血清 1cc。

結果及び考察

先づトリアセチン基質の反応混液中に当初から供試化合物を添加すると Fig 1* に見る如く acetophenone, acrylophenone 以外は顕著な阻害作用を示した。その内でも benzophenone 系化合物の阻害作用が最も大で、4-aminobenzophenone, 4,4'-diaminobenzophenone, benzophenone, 4,4'-diacetaminobenzophenone の順序である。長瀬等⁽¹⁸⁾、その他の研究者による不飽和ケトンの殺虫試験に於ては benzophenone が最も強力に作用しており、本実験の結果との間には明瞭な関連性が見られる。次にアセチルコリン基質の反応系に上記の不飽和ケトンを反応当初より添加すると Fig 2 に見る如くである。即ち furfuralacetophenone が最も阻害作用が大であり、ついで benzalacetophenone であるが他の acetophenone 化

* 実験中同一強度の酵素試料を得る事が出来ぬので図中のコントロールは異なる

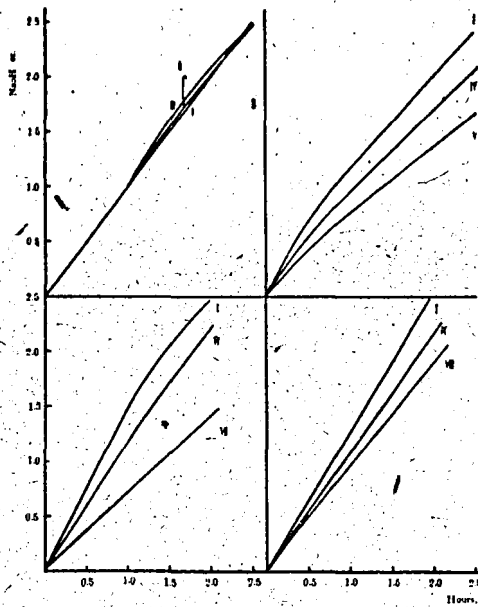


Fig. 1 Inhibition of Cholinesterase by Unsaturated Ketones.

I: Control II: Acetophenone ($8.3 \times 10^{-4} M$) added, III: Acrylophenone ($7.6 \times 10^{-4} M$) added, IV: Benzalacetophenone ($4.8 \times 10^{-4} M$) added, V: Benzophenone ($5.4 \times 10^{-4} M$) added, VI: 4-Aminoacetophenone ($7.4 \times 10^{-4} M$) added, VII: 4-Aminobenzophenone ($5.1 \times 10^{-4} M$) added, VIII: 4,4'-Diaminobenzophenone ($4.7 \times 10^{-4} M$) added, IX: 4,4'-Diacetaminobenzophenone ($3.9 \times 10^{-4} M$) added.

The reaction mixture (total volume 100cc.) contains 98cc of distilled water containing 0.1g of triacetine, 1cc of horse serum and 1cc of drugs solution to make a final pH 7.4 by 0.025N NaOH.

化合物の作用力は弱い。benzophenone 系化合物は一般的に顕著な阻害作用を示した。furfuralacetophenone の阻害作用が最も大である事は該化合物が papainase 作用を最も強く阻害した事実から見て興味ある事である。

benzophenone による cholinesterase 作用の阻害様式を知る為に反応開始後10分に於て $5.4 \times 10^{-4} M$ の benzophenone を添加した。その結果は Fig. 3 の如く反応初期より同濃度の benzophenone を加えた場合と反応速度が直ちに等しくなる。即ち benzophenone は cholinesterase の活性中心に対し速かに捕捉的抑制をなすのではないかとと思われる。

cholinesterase はイペリット等のハロイド系毒物⁽¹²⁾又砒素化合物⁽¹³⁾により阻害されるので SH 系酵素と考えられており賦活剤としてもチオール系酵素に共通

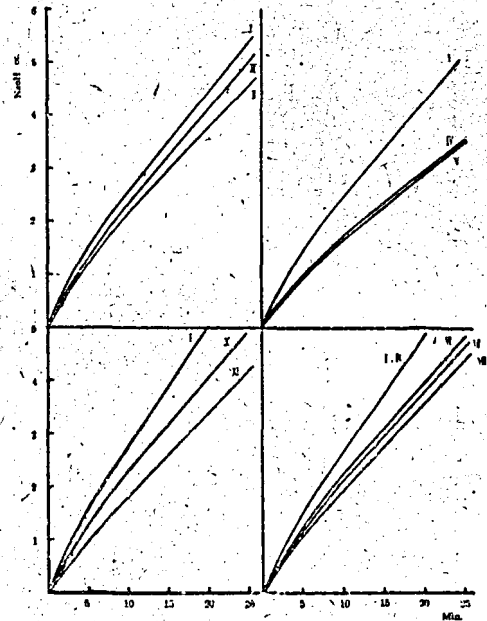


Fig. 2 Inhibition of Cholinesterase by Unsaturated Ketones.

Same as the preceding experiment, except addition of $7.7 \times 10^{-4} M$ Furfuralacetone (X), and $5.1 \times 10^{-4} M$ Furfuralacetophenone (N). The reaction mixture (total volume 100cc) contains 97cc of distilled water, 1cc of acetylcholine (0.1g/cc), 1cc of horse serum, and 1cc of drugs solution to make a final pH 7.4 by 0.025N NaOH.

Table 1. Inhibition of Cholinesterase in Horse Serum by Unsaturated Ketones.

Substance ($8.3 \times 10^{-4} M$)	Substrate		Per Cent Inhibition	
	Triacetine	Acetylcholine	Triacetine	Acetylcholine
Acetophenone	0	14	%	%
4-Aminoacetophenone	11	12		
Benzalacetophenone	20	46		
Furfuralacetophenone	—	55		
Acrylophenone	0	0		
Furfuralacetone	—	22		
Benzophenone	47	44		
4-Aminobenzophenone	71	32		
4,4'-Diaminobenzophenone	51	40		
4,4'-Diacetaminobenzophenone	36	0		

の賦活剤グルタチオン、システイン等が報告されている。又アルカロイドとしてピロカルピン、ジンバト

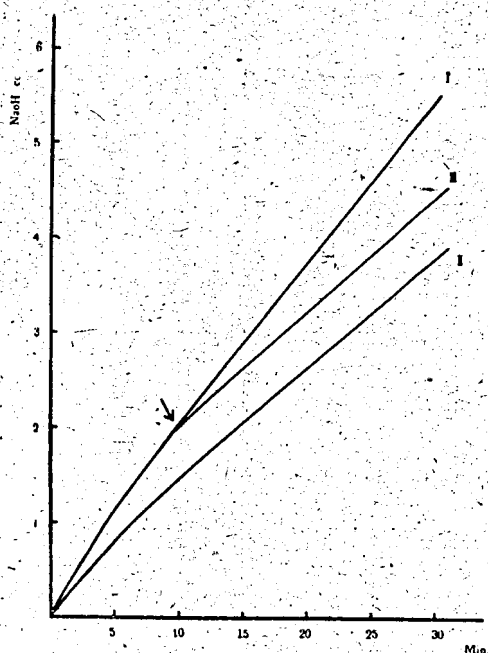


Fig. 3 Inhibition of Cholinesterase by Benzophenone.

I : Control (ChE), II : ChE + 5.4×10^{-4} M Benzophenone, III : Arrows indicate addition of 5.4×10^{-4} M Benzophenone.

ル等も cholinesterase に対し賦活作用をなす事が知られている。筆者等は不飽和ケトンの阻害作用と賦活剤による活性化作用の関連性から不飽和ケトンの作用機構を究明する為に賦活剤としてピロカルピンを用い次の試験を行つた。Fig. 4 はピロカルピンによる cholinesterase 活性化曲線である。即ち 5×10^{-4} M では約 24%, 10^{-3} M では約 7% 活性化される。それ故予めピロカルピン (5×10^{-4} M) により cholinesterase を活性化させておき反応開始後 10 分に於て benzophenone (5.4×10^{-4} M) を添加し又一方予め benzophenone (5.4×10^{-4} M) で阻害した cholinesterase に同じく 10 分後ピロカルピン (5×10^{-4} M) を添加すると Fig. 4 に示される如くピロカルピンで活性化された cholinesterase は反応途中に benzophenone を添加する事により阻害作用を受けアセチルコリンの分解速度は反応初期より同濃度の benzophenone を添加した場合と略値を同じくする。又一度 benzophenone で阻害された cholinesterase 作用は反応途中に於てピロカルピンを添加しても回復は見られない。更にピロカルピンの濃度を 10^{-3} M, 2.5×10^{-3} M としても benzophenone の阻害作用は回復しない (Fig. 4)。即ちピロカルピンと不飽和ケトンの

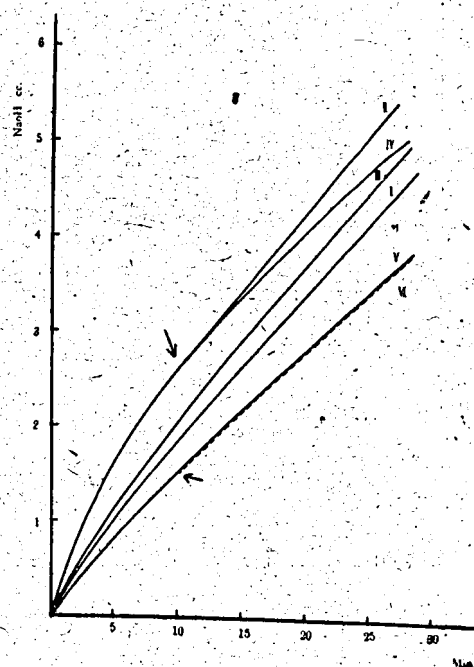


Fig. 4 Inhibition of Cholinesterase by Benzophenone and the antagonistic Action of Pilocarpine.

I : Control (ChE), II : ChE + 5×10^{-4} M Pilocarpine, III : ChE + 1×10^{-3} M Pilocarpine, IV : Arrows indicate addition of 5.4×10^{-4} M Benzophenone, V : ChE + 5.4×10^{-4} M Benzophenone, VI : Arrows indicate addition of 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 2.5×10^{-3} M Pilocarpine.

作用が cholinesterase の同一作用基に作用する結果起るのであるとすれば不飽和ケトンと作用基の結合力がピロカルピンと作用基との賦活反応よりも大なる為に benzophenone により一度阻害された酵素作用は高濃度のピロカルピンを添加しても阻害作用の減少、除去は見られず、ピロカルピンにより賦活された酵素作用は benzophenone の添加により容易に反応初期に、単独に benzophenone を添加した場合と同一になるのではないかとと思われる。又ピロカルピン及び benzophenone が夫々異つた作用基に作用するものとすれば、不飽和ケトンによつて阻害される作用基の作用力減退は直ちに酵素全体に対する作用力の減退を招き、この場合に他の作用基がピロカルピンにより賦活されても酵素全体から見ると何ら作用効果が示されないのではないかと考えられる。

前述の如く cholinesterase の活性中心の一つは -SH 基であるとされ、グルタチオン、システイン等により賦活されるのは可逆的な還元により SH 基が遊離になる為であろうと報告されている。筆者等は反

底初期に於て 5×10^{-6} M benzophenone, 各濃度のシステイン (10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M) を添加した。(Fig. 5) 即ち当量であつても benzophenone の阻害作用は完全には打消されてはおらず, 全般的に benzophenone の作用が強くなつてゐる。チオキソネ素としての立場からは更に詳細に検討したいと思ふ。

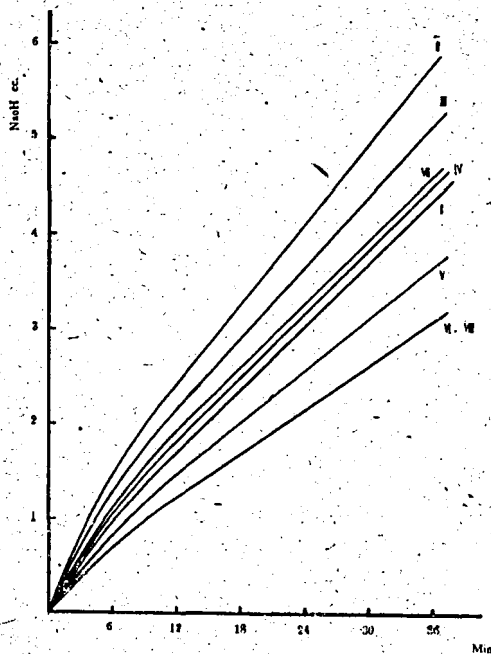


Fig. 5. Inhibition of Cholinesterase by Benzophenone and the Antagonistic Action of Cysteine.

I: Control (ChE), II: ChE + 1×10^{-3} M Cysteine, III: ChE + 5×10^{-4} M Cysteine, IV: ChE + 1×10^{-4} M Cysteine, V: ChE + 5×10^{-4} M Cysteine + 5×10^{-4} M Benzophenone, VI: ChE + 1×10^{-4} M Cysteine + 5×10^{-4} M Benzophenone, VII: ChE + 1×10^{-3} M Cysteine + 5×10^{-4} M Benzophenone, VIII: ChE + 5×10^{-4} M Benzophenone.

以上を総括すると, 不飽和ケトン は馬血清の cholinesterase を阻害し, 基質がトリアセチンの場合は 4-aminobenzophenone, アセチルコリンの場合は furfuralacetophenone の阻害作用が最も大であつた。benzophenone 系化合物は全般的に顕著な阻害作用を示した。ピロカルピンの賦活作用は容易に不飽和ケトンにより打消される。更に諸試験の結果より不飽和ケトンの殺虫作用機構の一因は cholinesterase 作用の阻害にあるものと思はれる。又 cholinesterase は -SH 基をも含む 2 つ或いはそれ以上の作用基を含

む酵素の複合体が或いは異つた方法により活性化される異つた中心を持つものではないかと思はれる。

終りに酵素試料の採取に御援助を賜つた獣医学部生 化学教室伊藤時哉氏並びにピロカルピンを御恩与下された真下誠氏に厚く感謝の意を表します。

Résumé

The antibiotic mechanisms of unsaturated ketones, some of which are now known to be important as insecticides or antibacterials, are not yet appreciated in spite of many investigations. In order to clarify the mechanisms and the phenomenal specificity as antibiotics, the present authors have studied the inhibitory action of some α, β -unsaturated ketones, as acetophenone, 4-aminoacetophenone, benzalacetophenone, furfuralacetophenone, acrylophenone, furfuralacetone, benzophenone, 4-aminobenzophenone, 4,4'-diaminobenzophenone, and 4,4'-diacetaminobenzophenone, to cholinesterase in horse serum. The activity and its inhibition by the ketones were measured by Steadman's method, and the results are represented in Fig. 1, 2.

Each ketone inhibited the enzyme activity evidently and furfuralacetophenone was the most powerful inhibitor (substrate-acetylcholine) and 4-aminobenzophenone was the most substrate-triacetone. These results indicated that there was some relation between the enzyme inhibiting action of the ketones and these insecticidal activities, already reported by many authors.

To find out the metabolite antagonist of the inhibitors, the present authors investigated the antagonistic actions of pilocarpine and cysteine, known as the activators of the enzyme, to the ketone upon inactivated cholinesterase, and the behavior of pilocarpine and cysteine-cholinesterase.

Cysteine antagonized to the ketone slightly, but pilocarpine had no effect. (Fig. 3-5).

The authors considered that cholinesterase is a mixture of different enzymes, or that it possesses various centers which are activated in a different way.

文 献

- (1) 渡辺 稔, 岡田邦久, 森 量夫, 伊藤信夫: 防虫科学, 17, 1 (1952)
- (2) Baglioni: Zeit. f. allg. Physiol., 3, 313 (1870)

(3) Laborde and Ouinqueud: *Compt. rend. soc. Biol.*, **30**, 209 (1886)

(4) Albanese and Barabini: *Ann. di Chim. ed. Farmacol.*, **15**, 225 (1892)

(5) A. Bissegger and E. A. Zeller: *Helv. Physiol. Pharm. Acta.*, **1**, 86 (1943)

(6) G. B. Koelle and A. Gilman: *J. Pharm. exptl. Therap.*, **95**, 66 (1949)

(7) 稻谷良一: *生化学*, **23**, 129 (1952)

(8) 長谷榮二: *酸素化学シンポジウム*, **3**, 25 (1949)

(9) E. Steadman and L. H. Easson: *Biochem. J.*, **26**, 2056 (1932)

(10) 玉井 明: *生化学*, **22**, 32 (1950)

(11) 長瀬 誠: *農化*, **18**, 187 (1941)

(12) Thompson: *J. Physiol.*, **105**, 370 (1947)

(13) J. J. Gorder and J. H. Quastel: *Biochem. J.*, **42**, 337 (1948)

綜 説

A Fifth Digest and List of Publications on Benzene Hexachloride. Masayuki HAMADA, *Bolyu-Kagaku* **18**, 122 (1953)

24

BHC 文献集とその抄録 第 V 集*

浜田昌之

昨年6月第IV集編纂以後本年7月末迄に編者の手許に原報或は抄録として入手せられた文献のうちその主なものについて概要を紹介し併せて文献目録を掲載する。BHC に関する文献の数は前集迄に既に 800 件弱に達し本集の分を併せると実に 1,000 件を突破している。然も尚この外に本文献集に掲載しなかつた主として殺虫効果に関する文献の数も亦多数に上つている。

本文献目録中特に化学関係のものについては調査洩れの為掲載が遅れて或は時期を失している様に思はれるものもあるが、之は出来るだけ多くの文献を洩れなく集録したい為であるから御了承願いたい。尚この点編者1人ではやゝもずると手落がありがちなので、読者諸氏の御協力を賜はる事に依つてこの抄録文献集が少しでも御役に立つものとなれば編者の望外の喜びとするところである。

尚本集より講演発表のみのものは特に重要と思はれるものを除いて省略する事とした。又外国に於ける本抄録文献集と似かよつた企画はドイツの RIEMSCHEIDER 等 (185) (186) に依つて行はれて居り、之は文献集のみであるが DDT, BHC 及び Diën 化合物全般に亘つ生物関係の文献も亦多数集録されているから必要な方は参照されたい。

抄 録

構造、性質: BHC の新異性体として eta (mp 89.8~90.6°), theta 両異性体が KOLKA 等 (114) に依つて分離されその構造が決定された。之等は先に彼等が分離に成功した benzene tetrachloride を経て

得られたもので、之に依つて既に発見された BHC 異性体の数は 7 個となつた。次に WHETSTONE 等 (244) は BHC の α , β , γ , δ 4 異性体を夫々無水塩化鉄と共に窒素気流閉管中で 140° 又はそれ以上に加熱する事によつて一部分が他の異性体に変化する事を見出した。

JAUNIN 等 (108) は tetrachlorocyclohexane の塩素化に依つて BHC ではない hexachlorocyclohexane の新異性体 (mp 108~109°) を分離した。又 RIEMSCHEIDER (175) (176) は α -1, 1, 2, 4, 4, 5-hexachlorocyclohexane (所謂異性体) の構造と性質について更に検討を加へている外、tetrachlorocyclohexane, δ -BHC 等についても構造、性質等の詳細な研究を行つている。(180) (181)。

LORETAN (122) は BHC 4 異性体の結晶学的研究を行つて居り、BASTIANSSEN (17) は先に CALINGARRT 等に依つて分離された benzene tetrachloride の 5 異性体について電子廻折によつてその構造を研究している。又 BLACKITH (22) によると BHC は紫外線によつて変化を受けないと云はれる。

CRISTOFI 等は引續いて BHC 異性体の脱塩酸反応の機作について研究を行い、稀薄酒精溶液中に於ける α , β , ϵ 異性体の脱塩酸作用に及ぼす温度及び溶媒組成の影響 (43), 及び β 異性体を重水素を含む酒精中で脱塩酸を行つた際少量の重水素を含む β 異性体が得られる事 (43) を報告している。SCHWABE (201) は滴下水銀電極に於ける BHC 4 異性体の挙動について詳細に研究している。又深海等 (64) は γ -BHC を -1.45 V の陰極電位で定電位電解を行つて 1 分子当り 6 ケの電子を消費して定量的にベンゼンを得た。

合成: 中島等 (146) (147) によると無声放電の電

第I集 本誌 **11**, 24~59 (1949)

第II集 // **13**, 62~64 (1949)

第III集 // **15**, 118~21 (1951)

第IV集 // **17**, 64~74 (1952)