

Nitrofuran 化合物に関する生化学的研究 I

Halomethylketone 体 (NF 151) の生体成分との反応

西田 実・松原 忠雄

甲斐原 守夫・大谷 好子

藤沢薬品中央研究所第3部

(昭和40年2月4日受付)

各種の化学療法剤の生体内消長については多数の報告がなされてきた。ただこれらの報告の多くに共通した点は、対象となつている化学療法剤の構造的な特性を考慮しないで生体内濃度の消長を論じていることである。

われわれはモデルとして化学構造が明確で、かつ構造的修飾の容易な Nitrofuran 化合物から Halomethylketone 系の化合物 (NF 151) を選び、これの生体成分との反応について検討した。対象とした NF 151 は反応性の高いハロゲンをもち、抗菌作用の面では *in vitro* では強い抗菌活性を示すが *in vivo* では無効である。こうした構造上、作用上の特性をその脱ハロゲン体である Methylketone 体 (NF 150) と比較検討した。

実験方法

1) 抗菌力測定

Disk 法

E. coli (NIHJ 株) の 20 時間培養菌を 1.0% 植菌した普通寒天培地をシャーレに流し、これにあらかじめ検液を浸した東洋濾紙製 Disk (抗生物質検定用) をのせて 37°, 18 時間培養後、その阻止帯を標準阻止帯と比較算定する。

2) 血清との反応

ラットまたはウサギ血清の 2.25 ml に Nitrofuran の最終濃度が 1 mg/ml となるように加え 37° で 1 時間 incubate した。

3) 組織ホモジェネートとの反応

Nitrofuran の 1 mg/ml 液と 10% 組織ホモジェネート (Krebs-Ringer phosphate buffer にて調製) を 37° で 1 時間 incubate した。

各組織による NF 151 の分解実験では incubate した反応液 1 ml にアルコール 2 ml を加えて酵素反応を止め、さらに蒸留水 7 ml で希釈したものを試料として使用した。対照としては同様に処理した組織ホモジェネートをもちいた。

肝ホモジェネートによる metabolite

の検索の場合は反応液を酸性にし、酢酸エチルエステルで抽出し、抽出液を水で 2 回洗浄後、酢酸エチルエステル層を減圧濃縮する。

4) 薄層クロマトグラフィー²⁾

ガラス板 (20 cm²) にメルク製シリカゲルを 1 mm の厚みに塗布し、乾燥後試料液をスポットしクロロホルムで展開し、有機ニトロ化合物の検出には 5% アルカリ液をもちいた。

5) 反応生成物の濾紙電気泳動³⁾

血清との反応物を 0.85% NaCl 溶液で冷暗所で透析し透析内液を東洋濾紙製ペーパークロマトグラフィー用濾紙 No. 50 にスポットし濾紙幅 1 cm 当り 0.33 mA で約 5 時間泳動をこころみた。なお電気泳動用の緩衝液として Veronal 緩衝液 pH 8.5 を使用した。

実験結果

1) NF 151 と血清の反応物の薄層クロマトグラフィー

NF 151 は Table 1 のとおりに *in vitro* で抗菌力を示すが *in vivo* で活性物質が血液、尿からは検出されない。またマウスにたいする各種の感染防禦効果も無効であった。NF 151 のこのような性質を解析するため、まづ生体成分とくに血清との接触による不活性化の有無を検討したところ Fig. 1 のような結果を得た。

すなわちラット血清と NF 151 とを 37° で 30~90 分 incubate すると何れの場合も原点に有機ニトロ呈色

Table 1. Halomethylketone 体の抗菌力

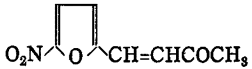
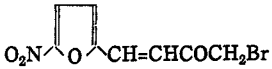
Lab. No.	Structure	MIC (mcg/ml)		
		<i>S. aureus</i> 209-P	<i>E. coli</i> NIHJ	<i>Tr. vaginalis</i>
NF 150	 2-(5-Nitro-2-furyl) vinyl methyl ketone	20	10	40
NF 151	 2-(5-Nitro-2-furyl) vinyl bromomethyl ketone	1	0.5	40

Fig. 1 NF151と血清の反応物の薄層クロマトグラフィー

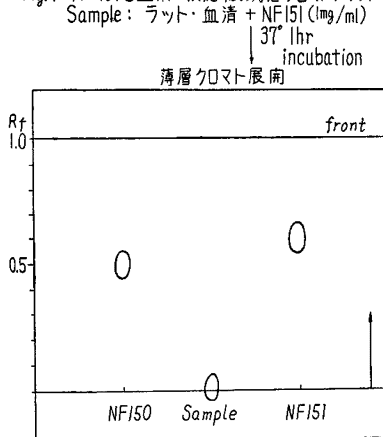
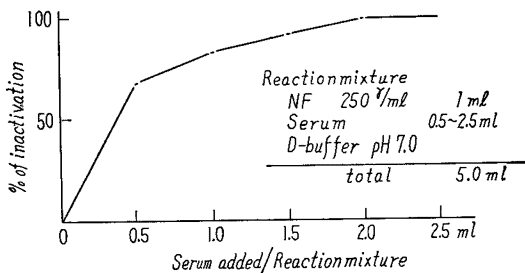


Fig. 2 NF151のウサギ血清による不活性化



物質が検出され、標準の NF 151 およびその脱ハロゲン体に対応する位置には有機ニトロ呈色物質は認められなかった。このような NF 151 の血清との反応はラット以外にウサギ、ヒト血清にも認められた。なおこの条件で被検血清蛋白はこれらの溶媒で移動せず原点にとどまる。

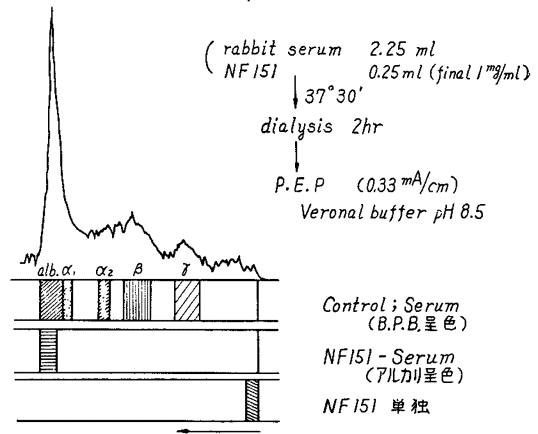
2) NF 151 の血清による不活性化

Fig. 1 で NF 151 が血清と反応して薄層クロマトグラム上 NF 151 と異なる物質に変化するのを認めた。この反応によつて NF 151 の抗菌性がどのように変化するかを知るため、一定量の NF 151 (250 mcg) にたいして反応血清量を 0.5~2.5 ml とかえ、不活性化の有無とその傾向を調べた。

Fig. 2 に明らかとなり血清添加量の増加に応じて不活性化率は増強され、NF 151 の 250 mcg が完全に不活性化されるためには約 2 ml 以上の血清の必要ことが認められる。

以上 Fig. 1 および Fig. 2 の実験の結果から NF 151 は血清との反応によつて不活性化をうけ、その不活性化で反応物は血清蛋白成分と同様に薄層クロマトグラム上

Fig. 3 NF151 bound serum protein の P.E.P.



原点にとどまることが認められた。

3) NF 151 (Halomethylketone 体) と NF 150 (Methylketone 体) の比較

つぎにこのような NF 151 の SH sensitive な性質が分子内の比較的活性なハロゲンに起因するかどうかを検討した。NF 150 を NF 151 と同様に血清と反応せしめ、薄層クロマトグラフィーで処理すると標準の NF 150 と同じ位置に有機ニトロ呈色物が認められ原点にはスポットはみられなかった。この実験の結果に明らかとなり Halomethylketone 体 (NF 151) の血清による失活にはその分子中の比較的活性なハロゲンの関与によつておこるものと考えられる。それ以外の位置、たとえば二重結合部、ニトロ基などの反応性によるものでないことが判明した。

4) NF 151 血清反応生成物の濾紙電気泳動

NF 151 が血清成分との反応によつて失活すること、および血清蛋白と同じく薄層クロマトグラム上原点にとどまる事実からその血清との結合が予想された。そこで NF 151 と血清を反応後これを透析し、透析内液を濾紙電気泳動で処理した。

Fig. 3 に明らかとなり NF 151 を血清と反応後有機ニトロ呈色物質は透析内液中に存在し、とくに血清アルブミンに局在するような結果を与える。この結果は NF 151 は血清蛋白と結合し非透析性の物質として存在することを示唆する。ただこの場合 NF 151 が実際に血清アルブミンと特異的に結合するのか、または血清中のアルブミン含量が多いので見かけ上この分画と特異的に結合したような結果を与えるのかその点はなお不明である。またこの血清の NF 151 結合能は血清をあらかじめ透析した後でも失われぬ。したがつて NF 151 の血清との反応は血清中の低分子成分によるものでないことがわかる。さらに一旦血清蛋白と結合した NF 151 は 2N-

Table 2. NF 151 の各組織による分解

実験方法				
NF 151 1 mg/ml + tissue homog. 10%				
↓ 37° 1 hr incubation				
Sample 1 : Alcohol 2				
↓ aq. dilution				
Bioassay				
結 果				
組 織	分解率(%)	組 織	分解率(%)	
胃	0	脾	59	
小 腸	24	腎	62	
肝	64	心	40	

HCl, 100°, 1時間の加熱で NF 151 または抗菌活性物質は遊離されない。

5) 生体成分とくに組織ホモジネートによる不活性化

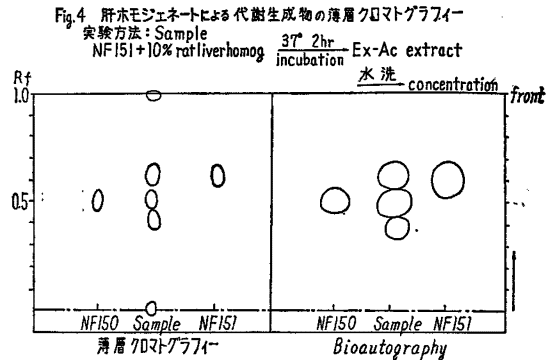
NF 151 が血清蛋白と反応し結合体を生成して不活性化を受けることについては上述のとおりである。血清蛋白によるこのような不活性化にたいして、組織ホモジネートではどの程度の影響をうけるかという点について検討を加えた。結果は Table 2 のとおりである。

まず胃、小腸などの消化管ホモジネートによる影響をみると胃では失活をうけず、小腸ホモジネートで 24% の分解が認められた。さらに肝、脾、腎、心などによる分解率をみると、それぞれ 64%、59%、62%、40% といずれも消化管組織よりも強い分解率を示した^{5,6)}。

6) 肝ホモジネートによる代謝生成物の薄層クロマトグラフィー

前述のとおり NF 151 は胃以上の組織ホモジネートによって不活性化をうけるが、この種の不活性化とさきの血清蛋白による不活性化とを比較した。実験方法に記載した条件で肝ホモジネートで処理すると反応液の抽出濃縮液から 5 個の有機ニトロ呈色スポットがみられた。このスポット部をとってその抗菌活性をみると Fig. 4 のような結果を得た。

まず抗菌活性は 5 個のスポットのうち原点および溶媒前線のものには認められなかった。その他の活性をもつ 3 個のスポットは未変化の NF 151、およびその脱ハロゲン体 (Methylketone 体, NF 150) でなお 1 個は未確認のものである。これらのスポットのうち原点部分にとどまる物質は血清の場合に認められた蛋白結合体ではないかと推定される。いづれにせよ代謝活性の高い肝ホモジネートの場合には、血清と NF 151 の反応の場合に



みられたものよりも複雑な不活性化様式をとるものと推定される^{4,6)}。

考 察

特定の化合物の生体内運命を制約する要因としては、その薬剤の投与をうけた生体側の代謝機能と薬物の化学構造的特性があげられる。われわれは *in vivo* で急速に不活性化をうける Nitrofurane 化合物として Halomethylketone 体をモデルとして、これの失活を化学構造的な特性を考慮しつつ検討した。ハロゲンを有しない Methylketone 体 (NF 150) が血清と反応しない事実から、NF 151 の血清蛋白との結合はそのハロゲンとの反応をとしておこることが予想される。この点からこの化合物の血清蛋白との結合様式として蛋白 SH 基との結合が考えられる。一方従来、構造的に SH 感受性がそれほど強くない Nitrofurane 化合物が Bioassay の上で SH 化合物の存在下に不活性化をうけることが報告されている^{4,6)}。しかし本報で述べたように NF 151 の血清蛋白との反応が蛋白の SH 基によるものであるとすれば、一般に Nitrofurane にたいする SH 化合物の不活性化作用を単に SH-block として一元的には説明することはできないようである。

つぎに血清によって迅速に失活する NF 151 が、消化組織ホモジネートによつては不活性化をうけないことをみた。これが原因として両者の SH 量などについては興味のあるところである。ただ現在までに得られた結果から、この種の化合物の不活性化の位置は消化管以外の部位ではないかと考えられる。したがって一たん吸収後、不活性化をうけるとみるのが自然である。つぎに血清蛋白と結合した NF 151 のその後どのような代謝的運命をたどるものか不明であるがこれも興味のあるところである。

要 約

化学療法剤の不活性化機構のモデルとして Halomethylketone 系 Nitrofurane 化合物 (NF 151) を選び、

この化合物について検討した。

1) NF 151 は血清成分と急速に反応して失活すること。

2) この血清との反応はその分子内の活性化ハロゲンの反応性にもとづく。

3) 血清との反応は蛋白成分との反応によると考えられる。

4) NF 151 は血清以外に肝、腎などの組織ホモジェネートと反応して不活性化をうけるが消化管組織による失活は弱い。

以上、NF 151 の不活性化の性状について報告した。

当研究所の小原正郎所長、熊田第3部長の御鞭達と御援助を感謝します。

文 献

- 1) R. J. SCHNITZER, *et al.*. Experimental chemotherapy II. p. 307.
- 2) 鈴木郁生：薄層クロマトグラフィーの実際
- 3) 森 五彦ら：濾紙電気泳動の実際
- 4) M. F. PAUL, *et al.*: Antibiotics & Chemotherapy 10, 287, 1960.
- 5) J. A. BUZARD, *et al.*: Am. J. Physiol. 201, 492, 1961.
- 6) BENDER, R. C., *et al.*: J. B. C. 191, 217, 1951.