

Nitrofuran 化合物に関する生化学的研究 II

Halomethylketone 体 (NF 151) と SH 化合物との反応

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)

前報で Halomethylketone 系化合物 (NF 151) が生体成分と反応して急速に不活性化をうけることなどについて報告した¹⁾。本報ではその原因を検索して、それが生体成分中に存在する SH 基をもつ物質によるものであることを認めたのでこれについて報告する。

実験方法

1) SH 定量^{2,3)}

ELLMAN 法によつた。すなわち血清または組織の 10% ホモジエネートを調製し、3,500 r.p.m. 10 分遠心分離してその上澄を実験に使用した。この試料液 1 ml, 0.2 M-Phosphate buffer (pH 7.4) 2 ml, 水 5 ml, 0.4% Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) 液 0.1 ml を混じり 420 m μ における吸光度を測定する。検量線は既知濃度の cysteine によつて作成した。

2) SH 化合物と NF 151 との反応

NF 151 と SH 化合物のモル濃度比が 1:2 となるようにした。両溶液は 37°C で 1 時間反応せしめ既報の方法によつて薄層クロマトグラフィーにより処理した。

3) *S. aureus* 209 P の酸素消費の測定

S. aureus 209 P の 18 時間培養液を 3,000 r.p.m. で 15 分遠心分離し、菌体を生理食塩水で 4 回洗浄後その菌液の 610 m μ における Optical density が 2.0 になるように菌液を調製した。ワールブルグ容器中の反応液組成はつぎのとおりである。

Main : <i>S. aureus</i> 209 P 菌液	0.5 ml
M/15 phosphate buffer (pH 7.4)	0.5 ml
水	0.2 ml
Side : M/6 Succinate	0.4 ml
SH 化合物	0.2 ml
NF 151	0.2 ml
Well : 30% KOH	0.2 ml

Gas phase は空気, Incubation time は 90 分の条件によつた。

実験結果

1) 各組織ホモジエネートの SH 含量と NF 151 の不活性化

前報でラット各組織ホモジエネートによる NF 151 の

不活性化について報告した。その結果では一定条件で NF 151 は胃ホモジエネートによつて分解されないが、小腸ホモジエネートで 24%, 肝, 腎, 脾, 心ホモジエネートでそれぞれ 50~60% 程度の分解をうけることがわかつた。各組織ホモジエネートによる分解活性の相異がそれらの SH 含量と関係があるかどうかを検討した。

Table 1 で最も活性が強いとおもわれる血清および肝ホモジエネートと、同一の条件で活性を示さなかつた胃ホモジエネートを比較した。血清では 1.63 mcg/ml の SH 含量を示したが、胃ホモジエネートでは 0.02 mcg/ml と極端な差異が認められた。また肝ホモジエネートでは 0.23 mcg/ml と両者の中間の値となつた。このように NF 151 の失活性と生体成分の SH 含量との間にある程度の相関性がみられることは、NF 151 の生体成分による分解が主として SH 基の関与する機作によつておこるものと考えられる。

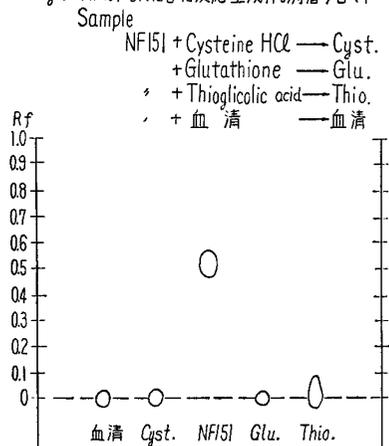
2) 各種の SH 化合物による NF 151 の不活性化

NF 151 の血清および組織ホモジエネートによる失活が血清中に存在する SH 基による可能性が強いので、各種の SH 化合物と NF 151 とを反応せしめその反応液を既報の薄層クロマトグラフィーで処理し移動性を検討

Table 1. 各組織中の SH 含有量

ELLMAN 法	
Sample : 10% tissue homog	を 3,500 \times g 10' 遠心分離し, その上澄を使用
Reagent : 0.4% 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) solution	
Method : Sample	1 ml
0.2 M Phosphate buffer	2
aq.	5
Reagent	0.1
Determination : Absorption at 420 m μ	
Result	
Sample	SH 含有量(mcg/ml)
Serum	1.63
Liver	0.23
Stomach	0.02

Fig. 1 NF151-SH化合物反応生成体の薄層クロマト



した。SH 化合物としては Cysteine, Glutathione, Thioglicolic acid を用いた。

Fig. 1 の薄層クロマトグラフィーの結果に明らかとなり、各種の SH 化合物と NF 151 の反応では何れの場合も血清と同様に原点にとどまる物質が認められた。この原点に存在する物質は抗菌活性をもたない。これまでの結果から NF 151 の SH 化合物または血清成分との反応はつぎの式によつてあらわされるものと思う。



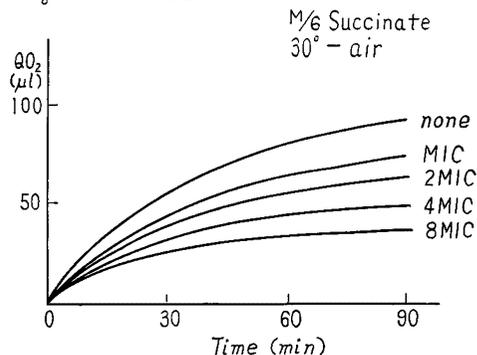
この式で R·SH は各種の SH 化合物をあらわす。またこの反応生成物が活性をもたないものと解釈される。

3) *S. aureus* の呼吸にたいする NF 151 の阻害と SH 化合物による回復

NF 151 が SH 化合物によつて失活することについては前述のとおりである。ただこれは Bioassay の結果で、培地成分と SH 化合物の Interaction も無視できない。したがつてこのような要因を除去した実験条件で、NF 151 の抗菌活性が実際に SH 化合物によつて弱められるものかどうかを検討した。

まず M/6 Succinate を基質としたさいの QO_2 の経時変化は Fig. 2 のとおりである。すなわち NF 151 の MIC に相当する濃度から、その 8 倍濃度までにわたつて影響をみたが NF 151 による *S. aureus* の呼吸阻害は当然ながら濃度に応じて強化される。

つぎにこのような NF 151 による呼吸阻害が SH 化合物の添加によつて回復されるかどうかを検討した。すなわちこの条件で NF 151 の呼吸阻害が SH 化合物の

Fig. 2 *S. aureus* 209-P の呼吸にたいする NF151 の阻害Table 2. NF 151 の呼吸阻害と SH 化合物による回復 (被検菌 *S. aureus* 209-P)

final conc.		呼吸率 (%)
NF	Cysteine	
MIC (1 mcg/ml)	none	77.3
MIC (1 mcg/ml)	1.4 mcg/ml (3 mol)	85.7
2 MIC (2 mcg/ml)	none	64.4
2 MIC (2 mcg/ml)	1.4 mcg/ml (1.5 mol)	82.3
final conc.		呼吸率 (%)
NF	Glutathione	
2.5 MIC (2.5 mcg/ml)	none	30.9
2.5 MIC (2.5 mcg/ml)	8.9 mcg/ml (3 mol)	97.0
5 MIC (5 mcg/ml)	none	16.6
5 MIC (5 mcg/ml)	8.9 mcg/ml (1.5 mol)	80.6

添加で抑制されるとすれば、SH 化合物の作用が直接的なものであることが理解される。

Table 2 に示されるとおり MIC 濃度 (1 mcg/ml) に NF 151 が存在すると 90 分値で対照 (無添加) の 77.3 % と呼吸阻害がおこる。この場合 Cysteine の 1.4 mcg/ml (NF 151 の 3 倍モル濃度に相当) が存在すると 85.7% にまで回復する。また MIC の 2 倍濃度の NF 151 の存在で対照の 64.4% に低下した呼吸は、その 1.5 倍モル濃度に相当する Cysteine の存在で 82.3% にまで回復する。つぎに Glutathione の影響をみると、MIC の 2.5 倍濃度の NF 151 の存在で 30.9% に低下した呼吸は、3 倍モル濃度に相当する Glutathione の添加で呼吸低下は 97% にまで回復する。同様に MIC の 5 倍濃度の NF 151 で 16.6% にまで低下した呼吸は、NF 151 の 1.5 倍モルに相当する Glutathione によつて 80.6

%にまで回復する。以上の結果によつて明らかとなお
り NF 151 による *S. aureus* の呼吸阻害は SH 化合物
によつて抑制される。

考 察

NF 151 の生体成分による急速な不活性化の一因が
SH 化合物との反応にもとづくことを明らかにした。種
種の構造の Nitrofuran 化合物が SH 化合物によつて失
活することについては、従来よりかなりの報告がみられ
る³⁻⁵⁾。その原因として Nitrofuran 化合物の酸化還元
電位にたいする干渉, Nitro 基にたいする影響, 側鎖構
造との反応などがあげられている。本報の成績では側鎖
構造と SH 化合物との反応説を支持する結果を得た。た
だ種々の構造をもつ Nitrofuran 化合物の SH 化合物に
よる失活を必ずしも一元的に説明することはできないと
考えている。つぎに構造的に近似な Methylketone 体
(NF 150) と Halomethylketone 体 (NF 151) では前述
のとおり SH 化合物にたいする挙動が異なる。他方 *S.*
aureus, *E. coli* にたいする *in vitro* 抗菌力は何れも
NF 151 の方が約 10 倍強い。この SH-Sensitivity と
in vitro 抗菌力との関係, さらに両者の抗菌作用機構の
異同などについて検討をおこないたい。

要 約

1) 血清, 肝, 胃ホモジエネートについて SH 含量を
測定したところ血清>肝>胃の順序となり, これはさ
きの NF 151 分解活性と同じ傾向となつた。

2) NF 151 の不活性化は Cysteine, Glutathione,
Thioglycolic acid などの SH 化合物によつてもおこ
る。

3) NF 151 による *S. aureus* の呼吸阻害は SH 化
合物によつて回復される。

以上の結果から血清その他の生体成分による NF 151
の不活性化の主因として SH 化合物によるものがあげら
れる。

本論文の要旨は昭和 39 年, 日本化学療法学会総会お
よび支部会で発表した。

当研究所の小原正郎所長, 熊田第 3 部長の御鞭撻と御
援助を感謝します。

文 献

- 1) 西田 実ら: *Chemotherapy* 13, 476, 1965.
- 2) G. E. ELLMAN: *A. B. B.* 74, 443, 1958.
- 3) " : *A. B. B.* 82, 70, 1959.
- 4) 黒田, ら: *日医大誌*, 28, 676, 1955.
- 5) 根岸, ら: *総合医学*, 10, 99, 1953.
- 6) 才川, ら: *薬学雑誌*, 84, 115, 1964.