

## Nitrofuran 化合物の生化学的研究 III

Halomethyl ketone 体 (NF 151) と Methyl ketone 体 (NF 150) の 2, 3 の性状について

西田 実・奥井正雄・松原忠雄・横田好子

藤沢薬品中央研究所

(昭和 41 年 7 月 4 日受付)

われわれはさきに Nitrofuran 化合物のうち Holo-methyl ketone 体 (NF 151) および Methyl ketone 体 (NF 150) と生体成分または SH 化合物との反応性がかなり異なることを認めた<sup>1,2)</sup>。

本報ではこのような反応性の差異が両薬剤の作用様式の上にどのように反映するかという点について検討した。

## 実験方法

1) *E. coli* の生菌数の測定

1% 加糖培地 (0.5% ポリペプトン, 0.5% 肉エキス, 0.2% 食塩, 1% ブドウ糖) 70 ml を培養フラスコ中に入れ, これに *E. coli* NIHJ の約 20 時間前培養液を 0.7 ml 植菌し, 37° で振盪培養する。また振盪開始と共に各薬剤をそれぞれ MIC の 1/2 濃度に添加し一定間隔で培養液を採取して, その生菌数を測定した。

## 2) 蛋白量の測定

10% 加糖ブイオン 1.5 l に *E. coli* NIHJ 前培養液 15 ml を植菌し, NF 151 および NF 150 をそれぞれ MIC の 1/4 濃度に加え 37° で約 20 時間培養し, 菌体を遠心分離後, 凍結乾燥したものを試料として用いた。蛋白量の測定にはこの乾燥菌体 5 mg を採取し, ビューレット<sup>3)</sup>法により呈色せしめ 550 m $\mu$  の波長において吸光度を測定した。

## 3) RNA および DNA 量の測定

上記の *E. coli* NIHJ 乾燥菌体を SCHMIDT, THANNHAUSER 法<sup>4)</sup>で処理し, RNA 分画をオルシン反応<sup>5)</sup>で, DNA 分画をジフェニールアミン反応<sup>6)</sup>で定量した。

4) Nitrofuran 化合物の微生物定量<sup>7)</sup>

*E. coli* NIHJ を試験菌として服部の方法に従がっておこなった。

## 5) 酸素吸収の測定

ワールブルグ検圧計を用いて酸素吸収を測定。主室には生菌浮遊液 0.5 ml, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml, 蒸留水 0.4 ml, 主室中央部には発生する CO<sub>2</sub> を吸収するために 30% KOH 0.2 ml, 側室には M/10 基質 0.4 ml を加え, 容器内全量は 2.0 ml として 37° の恒温槽に検圧計を装置, 10 分間振盪後主室と側室を混合し, 酸素吸収を測定。酸素吸収量は 2 時間値をあらわ

す。

## 6) 脱水素酵素活性の測定

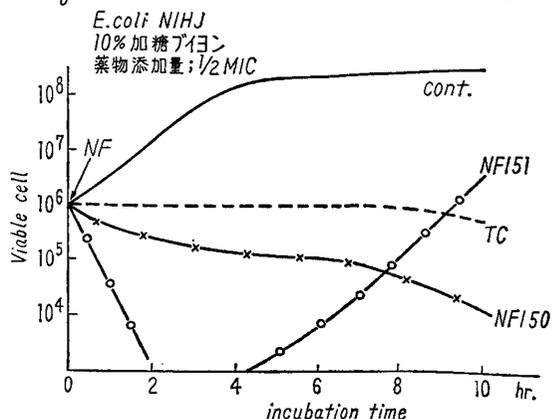
ツンベルグ管の主室に M/10 基質 1 ml, 0.01% methylene blue 1 ml, M/10 磷酸緩衝液 2 ml, 薬物 MIC 濃度を入れ, 側室には生菌浮遊液 1 ml を加えて減圧で嫌気性条件とし, 37° の恒温槽中で主室と側室とをあわせて振盪する。メチレンブルーの色が消えるまでの時間を測定し, その時間の逆数が活性に比例する。色をみる対照として 0.1 ml のメチレン・ブルーを 6 ml の水にうすめたもの (メチレン・ブルーが 90% 還元された時の色にあたる) を用いる。

## 結 果

1) *E. coli* の生菌数にたいする影響

NF 150 および NF 151 を加糖ブイオンにそれぞれ 1/2 MIC 濃度に添加し, これに *E. coli* を植菌して 37° で振盪培養した時の生菌数を経時的に観察した結果は Fig. 1 の通りである。

まず薬剤無添加の場合, 生菌数は 4 時間まで増加し, その後 10 時間まで著明な増加は認められない。これにたいし NF 151 では 3 時間まで生菌数が激減し, その後 10 時間でもとの生菌数にまで回復する。NF 150 ではこのような激しい影響を与えないが生菌数は 10 時間までゆっくりした減少傾向を示した。また対照薬剤として用いた Tetracycline はこの濃度では 10 時間まで殆んど生菌数には変化を与えなかつた。

Fig. 1 *E. coli* の Viable cell count にたいする影響

2) *E. coli* 培養液における抗菌活性の推移

NF 151 と NF 150 の生菌数に及ぼす影響が極端に異なることは前述の通りである。

他方 NF 151 は蛋白および SH 化合物との結合性が特に強い<sup>1,2)</sup>。このような点から Fig.1 の培地に添加した NF 150 および NF 151 の抗菌活性の推移を検討した。

まず培地に NF 151 を MIC の 1/2 濃度に添加して、その抗菌活性を経時的に測定すると、添加 20 分後には抗菌活性の残存率は添加量の約 20% となり、この化合物は菌との接触によつてかなり急速に抗菌活性を失うことがわかる。また NF 151 の濃度を MIC の 8 倍とした場合でも、1 時間以内に約 70% が失活することがわかつた。これにたいして NF 150 ではこのような急激な抗菌活性の消失は認められず、Fig.2 に示すとおりゆるやかな失活傾向を示した。このような結果は NF 151 の添加による生菌数の減少が一過性で、数時間後に回復するという事実と対応するものと考えられる。

3) *E. coli* の蛋白, RNA, DNA にたいする影響

実験の項で述べたような方法に従い、NF 151 および NF 150 を 1/4 MIC 濃度に添加して *E. coli* を接種し 37° 約 20 時間培養後、菌体を凍結乾燥した。この乾燥菌体の蛋白, RNA, DNA 量をそれぞれ測定した。

Fig.2 *E. coli* culture における抗菌活性の消長

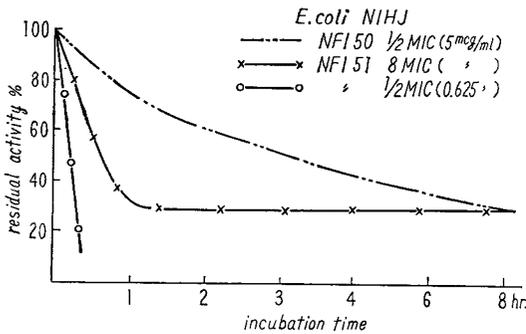


Fig.3 *E. coli* protein, RNA, DNA 量にたいする作用

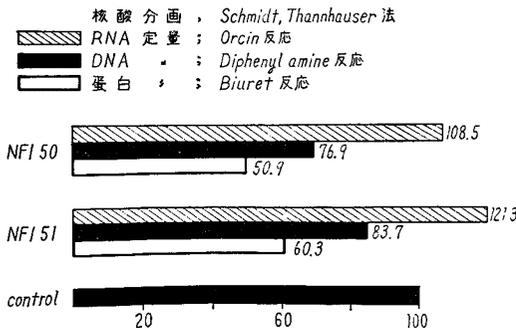


Fig. 3 には Nitrofuran 化合物無添加の場合の値を 100 とした時の比を示した。すなわち RNA 量は NF 150 の添加によつて 109, NF 151 の添加で 121 とやや増加の傾向があり、DNA 量はそれぞれ 77 および 84 とやや減少し、蛋白量は 51 および 60 と何れも半減した。MIC の 1/4 濃度で蛋白および DNA 量の相当な減少が認められたが、これが Nitrofuran 化合物全般の第 1 次的な作用かどうか、なお充分明らかではない。

4) *E. coli* intact cell の各種の基質酸化にたいする影響

Pyruvate,  $\alpha$ -ketoglutarate, succinate, fumarate, glucose をそれぞれ基質として、これに NF 151 および NF 150 を MIC 濃度に添加し  $O_2$ -uptake を求めた。NF 151 では pyruvate を基質とした時の影響が特に強く無添加の場合の 90% 以上の阻害効果を示した。Glucose,  $\alpha$ -ketoglutarate, fumarate では 60~70% の阻害を示したが succinate 酸化にたいする影響は最も弱く約 30% であつた。

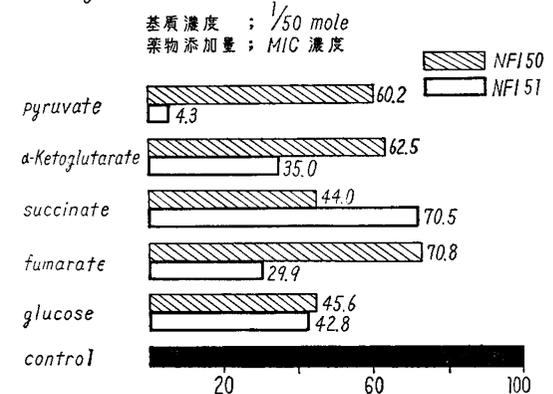
これにたいし NF 150 の添加により pyruvate 基質の場合、約 40% 阻害とさきの成績と極めて対象的であつた。また succinate, glucose の酸化阻害は約 55% であつた。

これらの実験では pyruvate にたいする NF 150 および NF 151 の阻害効果の差異および succinate 酸化の阻害傾向の逆転が注目されるところである。

5) *E. coli* の脱水素酵素活性にたいする影響

*E. coli* intact cell による基質酸化にたいする NF 150 および NF 151 の阻害効果が電子伝達系の脱水素酵素阻害によるものかどうかについて検討した。NF 151 は succinate 以外の基質の酸化にたいしてその阻害効果は NF 150 より強かつたが、脱水素酵素活性にたいしては  $\alpha$ -ketoglutarate の場合に対照の約 69% の阻害を示した以外は全般に弱かつた。従つて NF 151 の上記の基質

Fig.4 *E. coli* intact cell の呼吸阻害



酸化にたいする効果は脱水素酵素系以外の呼吸系の阻害によるものと推定される。

一方 NF 150 の場合、実験に用いた全ての基質の脱水素酵素活性にたいして強い阻害効果を示した。

考 察

NF 150 および NF 151 は Table 1 のとおり生物学的にはかなり異なつた性状をもっている。NF 151 の試験管内抗菌作用は NF 150 よりも強く、SH 化合物との反応性および血清蛋白との結合性も NF 150 より強い。

このような差異が *E. coli* の基質酸化、脱水素酵素活性、菌体の蛋白、RNA、DNA 量にどのように反映するかを検討した。

Nitrofuran 化合物の作用機作としては glucose dehydrogenase 系<sup>9)</sup>、xanthine oxidase 系<sup>9)</sup> の阻害が報告されている。また宮井は *E. coli* の tryptophanase による indole 生成を Guanofuran が抑制することを報告している<sup>10)</sup>。また鈴木らは Furacin が succino oxidase 系には影響を与えないが、oxaloacetate, pyruvate, malate, acetate の酸化にたいしては、強い阻害効果をもつことを報告している<sup>11)</sup>。

NF 151 は succinate を基質とした場合を除き上記の各基質の酸化にたいして強い阻害効果を示す。これにたいして NF 150 はこれらの基質酸化にたいする影響は全般に弱かつた。

また NF 150 および NF 151 の dehydrogenase 活性にたいする影響を比較すると、呼吸阻害の場合とは逆に NF 150 が全般に強い dehydrogenase 阻害を示した。このような事実から NF 151 の *E. coli* の基質の酸化阻害は dehydrogenase の段階以外の部位にたいするものと考えられる。NF 150 と NF 151 の dehydrogenase 活性にたいする作用の差異が、両者の SH-sensitivity 又は蛋白結合性と、どのように関連するか現在のところ不明で今後検討を加えたい。

要 約

- 1) NF 151 は *E. coli* の viable cell count にたいし一過性の、強い減少効果を示す。これにたいし NF 150 の効果は弱いながら持続性である。
- 2) *E. coli* の培養液中に添加した NF 151 は急激に失活するが NF 150 の失活は緩慢である。
- 3) NF 150 および NF 151 は、*E. coli* の蛋白量を

Table 1. NF-Methyl ketone 体及び Halomethyl ketone 体の性状

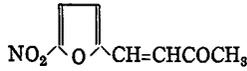
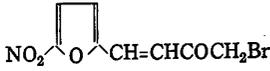
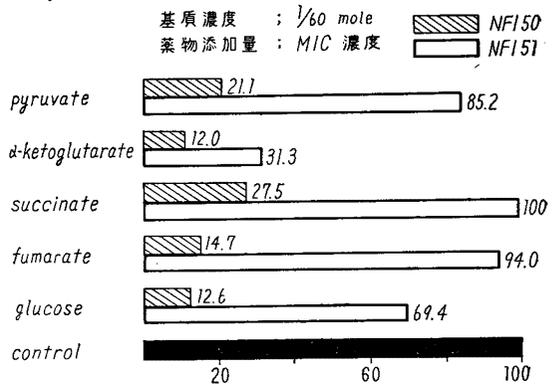
NF	NF 150 Methyl ketone 体	NF 151 Halomethyl ketone 体
化学構造		
抗菌力 { <i>S. aureus</i> (MIC) { <i>E. coli</i>	20 mcg/ml 10	1 mcg/ml 1.25
血清蛋白との結合性	弱 い	結合→失活
SH 化合物との反応性	弱 い	結合体生成
呼吸系にたいする作用	一般に弱い	強 い
脱水素酵素にたいする作用	強 い	弱 い
蛋白量阻害	50% 減少	40% 減少
核酸量 {RNA DNA	0	0
	23% 減少	40% 減少

Fig. 5 *E. coli* intact cell の脱水素酵素活性の阻害効果



40~50% 減少せしめた。

4) NF 151 は pyruvate 酸化を殆んど完全に阻害し、glucose,  $\alpha$ -ketoglutarate, fumarate では 60~70% の阻害効果を示した。これにたいし NF 150 のこれらの基質にたいする酸化阻害効果は、NF 151 の場合よりも弱かつた。ただ succinate の酸化にたいしては、NF 150 がより強い阻害効果を示した。

5) NF 151 は *E. coli* の脱水素酵素活性阻害は、全般に弱く、これにたいし NF 150 は比較的強い阻害効果を示した。

稿を終るに当り、御指導、御鞭撻を賜つた当研究所の小原正郎所長、熊田第3部長に感謝いたします。

文 献

- 1) 西田実ら：Chemotherapy 13, 476(1965).
- 2) 西田実ら：Chemotherapy 13, 480(1965).
- 3) 水島三一郎ら：蛋白質化学 2, 119.
- 4) G. SCHMIDT, S. J. THANNHAUSER : J. Biol. Chem. 161, 83(1945).
- 5) A. H. BROWN : Arch. Biochem. 11, 269(1946).

- 6) Z. DISCHE, K. SCHWARZ : Mikrochim. Acta 2, 13(1937).  
7) 服部哲也 : 順天堂医学雑誌 7(1961).  
8) GREEN, M. N. : Arch. Biochem. 19, 397(1948).  
9) TAYLER, J. D. : J. Biol. Chem. 191, 223(1951).  
10) 宮井修ら : J. Osaka City Med. Cent. 4, 33 (1955).  
11) 鈴木友二ら : 薬学雑誌 76, 1013(1956)

### BIOCHEMICAL STUDIES ON NITROFURAN COMPOUND. III

Some Properties of Halomethyl Derivative and Halomethylketone Derivative

MINORU NISHIDA, MASAO OKUI, TADAO MATSUBARA & YOSHIKO YOKOTA

Third Division, Research Laboratory of Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

#### Abstract

- 1) The lethal effect of NF 151 for the viability of *E. coli* was powerful but momentary, while NF 150 was less active on the viability, but showed the prolonged action.
- 2) When the nitrofurans were added into the growing culture of *E. coli*, NF 151 in the culture was inactivated rapidly, on the contrary, that of NF 150 was slow.
- 3) Protein contents of *E. coli*, exposed to the nitrofurans, decreased 40~50%.
- 4) Pyruvate oxidation of *E. coli* was completely inhibited by NF 151, and also the oxidations of glucose,  $\alpha$ -ketoglutarate and fumarate were inhibited 60~70%. Inhibitions of NF 150 for such oxidation were generally weaker than those of NF 151, while only for the oxidation of succinate, the effect of NF 150 was stronger than that of NF 151.
- 5) In the experiment for dehydrogenase of *E. coli*, NF 151 was less inhibited in comparison with NF 150.