

各種病巣由来菌に対する Nitrofuran 剤の感受性分布について

高嶋 哲夫・田中 徳満・三橋 進

群馬大学医学部微生物学教室

(昭和 48 年 12 月 15 日受付)

緒 言

ニトロフラン誘導体の抗菌作用が注目され、これが医薬として臨床的に応用されるに至ったのは1944年 Dodd & STILLMAN¹⁾による Furacin の発見以降である。わが国においても1946年西海枝²⁾により Furacin が合成され、その抗菌作用が報告されて以来、多くのニトロフラン誘導体が合成されてきた。ところが、その後、Penicillin の発見を契機として抗生物質の華々しい発展の陰にかくされ、それほどニトロフラン誘導体の価値が認められなかった。近年、抗生物質の普及により多剤耐性菌が年々増加の傾向にあり、これら耐性菌に対する有効な化学療法剤の出現が強く要望されるようになった。このような情勢下に再びニトロフラン誘導体が見直される機運になってきた。1951年卯尾田ら³⁾によつて Panazon が合成され、赤痢ならびに腸疾患の治療剤として使用されているが、三浦ら^{4,5)}、高井ら^{6,7)} はたまたま Panazon をアルカリ存在下に有機溶媒中で加熱することにより強力な抗菌作用を示す新物質を見出し、その構造は 1, 2, 4-トリアジン核を有する新規ニトロフラン誘導体 Panfuran であることが判明した。しかし、Panfuran は各菌種に対して強い抗菌力を示すにもかかわらず、臨床面において問題があつたため、さらに Panfuran をジハイドロオキシメチル化することによつて Panfuran-S⁸⁾ が合成され、臨床的価値が認められるに至つた。数多く合成されたニトロフラン誘導体の抗菌性については少数の細菌を用いてすでに報告されている⁹⁻¹⁶⁾。

著者らは人病巣由来の多剤耐性菌および感受性菌を含めた多くの菌株を用いて市販されている代表的なニトロフラン剤 5 種の感受性分布を求め、抗菌力の比較、ニトロフラン耐性菌の分離状況、*Shigella* では血清型別に、*Proteus* では species 別に、*Salmonella* では group 別に対するニトロフラン剤の感受性の比較、抗生物質との交叉耐性、および試験管内ニトロフラン耐性の安定性などについて検討したので報告する。

実験材料および実験方法

1) 使用菌株およびその薬剤耐性型

使用した菌株は人病巣由来の *Shigella* (1969 年分離

株)、*E. coli* (1971年)、*Ps. aeruginosa* (1966~1968年)、*Proteus*(1967~1970年)、*Salmonella*(1971年)、および *S. aureus* (1970年) おのおの 100 株である。*Shigella* は、TC, CP, SM, SA の 4 剤耐性菌 50 株、その 4 剤に ABPC, KM または NA 耐性の加わつた 5 剤耐性菌 15 株、3 剤耐性から 1 剤耐性まで各耐性型の菌株 25 株、感受性菌 10 株の合計 100 株を用いた。それら各耐性型の *Shigella* を血清型別にそれぞれ *sonnei* 49 株、*flexneri* 50 株、*dysenteriae* 1 株を使用した。*E. coli* は *Shigella* と同じように 4 剤耐性菌 34 株、それに ABPC または KM 耐性の加わつた 5 剤、6 剤耐性菌 10 株、3 剤耐性から 1 剤耐性の菌株 36 株、感受性菌 20 株の合計 100 株を用いた。*Proteus* は *E. coli* の耐性型とほぼ同じ菌を選び、6 剤耐性から 1 剤耐性まで各耐性型の菌株 97 株、感受性菌 3 株の合計 100 株を用いた。それら各耐性型の *Proteus* を species 別にそれぞれ *mirabilis* 31 株、*morganii* 15 株、*vulgaris* 22 株、*rettgeri* 25 株、*inconstance* 7 株を使用した。*Salmonella* は SA または KM 1 剤耐性菌 43 株、その耐性に TC, CP, SM, KM または PC 耐性の加わつた 2 剤耐性から 5 剤耐性の各耐性型の菌株 35 株、感受性菌 22 株の合計 100 株を用いた。それら各耐性型の *Salmonella* を group 別にそれぞれ A 群 1 株、B 群 50 株、C 群 25 株、D 群 15 株、E 群 9 株を使用した。*S. aureus* は TC, CP, SM, SA, KM, PC または EM 耐性がおのおの組み合わせつた 6 剤耐性から 1 剤耐性までの各耐性型の菌株 79 株、感受性菌 21 株の合計 100 株を用いた。*Ps. aeruginosa* は TC, CP, SM, SA, KM および ABPC などに対して高い耐性を示すものを使用した。

2) 使用薬剤

Panfuran-S (FT)、Panfuran acetate (FT-Ac)、Panazon (PZ) は富山化学工業 K. K., Furazolidone (FZ) は武田薬品工業 K. K., Furadantin (FD) は山之内製薬 K. K. から送付されたものを使用した (Table 1)。

各ニトロフラン剤は N, N'-ジメチルホルムアミド (和光純薬、特級) に溶解後、滅菌蒸留水で希釈して使用した。

Table 1 Chemical structure of nitrofurán derivatives

Chemical structure	Compound	Abbreviation
	Dihydroxymethyl furatrizine (Panfuran-S)	FT
	Acetyl furatrizine (Panfuran Acetate)	FT-Ac
	Furazolidone	FZ
	Nitrofurantoin (Furadantin)	FD
	Difurazone HCl (Panazon)	PZ

3) 感受性値の測定

各菌の37°C, 18時間ペプトン(極東製薬)水培養液を100倍に希釈し, それを1白金耳ずつ2倍段階希釈された各ニトロフラン剤を含むHeart Infusion Agar(栄研, HIA) pH 7.4に滴下する寒天平板希釈法を用いた。判定は菌接種後37°C, 18時間後に最小発育阻止濃度(MIC)を求めた。

4) 接種菌量の検討

50株の*Shigella*を用い, それらのペプトン水中37°C, 18時間培養液をそのまま(原液)か, あるいは, 10, 100, 1000および10000倍希釈したもの, 従がつて平板当たり10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³および10²個に相当する各段階の菌量を接種し, 37°C, 18時間培養後おのおのMICを測定した。

5) 試験管内でのFT耐性化

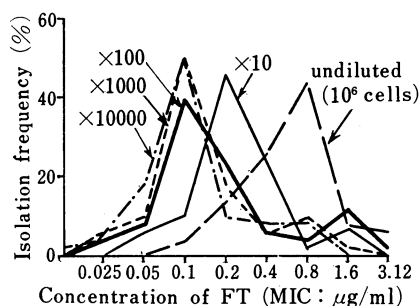
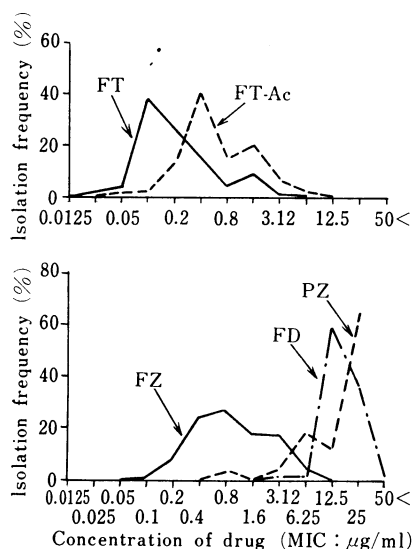
Shigella 2株と*E. coli* 2株を選び, それら1白金耳接種したBrain Heart Infusion broth(Difco, BHI broth) pH 7.4の37°C, 18時間培養液を新鮮なBHI培

地で10倍希釈後37°C, 4時間振盪培養し, その培養液(10 ml)を3000 rpm, 10分遠心分離して10¹⁰ cells/mlになるように濃縮した。その菌液を各FT濃度を含むドリガルスキー改良寒天培地(BTB平板)に0.1 mlずつ塗布し, 37°C, 48時間培養した。平板上に発育したコロニーをさらに各FT濃度を含むBTB平板でsingle colony isolationし, 37°C, 18時間培養した。最高濃度のFTを含む平板上に発育したコロニーをFT耐性菌とした。そのFT耐性菌のMICは前項の方法で測定した。

6) FT耐性菌の継代培養によるFT耐性の安定性

前項の人工的に得られたFT耐性菌を普通ブイヨン(ペプトン1%, 肉エキス1%, NaCl 0.5%, pH 7.4)に1白金耳接種し, 37°C, 24時間培養した。その培養液の1白金耳を新鮮ブイヨンに接種し, 37°C, 24時間培養というように毎日継代培養を15日間行なつた。1, 2, 3, 5, 10および15日目の培養液のFT耐性のMICは前項の方法で測定した。

Fig. 1 Relation between inoculum size and antibacterial activity

Fig. 2 Antibacterial activity of nitrofuran derivatives against *Shigella* strains

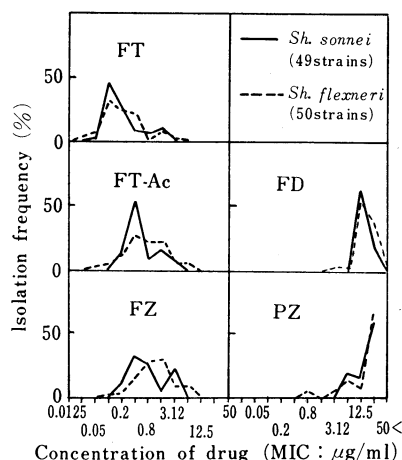
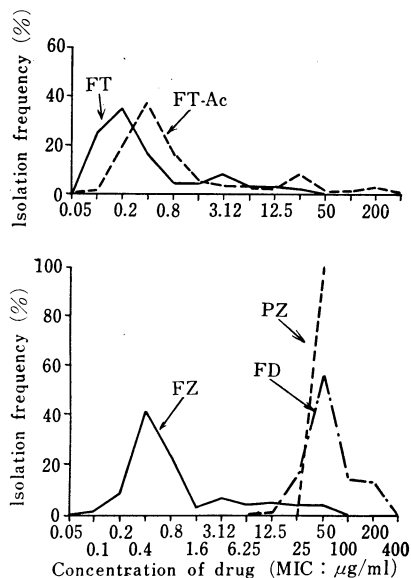
実験結果ならびに考察

1) 接種菌量と感受性分布の関係

寒天平板希釈法の接種菌量はニトロフラン剤以外の抗生物質について、すでに報告されている¹⁷⁾。ニトロフラン剤において接種菌量と感受性分布の関係を Fig. 1 に示した。18時間前培養液を100, 1000, 10000倍希釈しても分布のピークが変動しないことがわかった。従がつて他の抗生物質の場合と同様にニトロフラン剤の場合も前培養液を100倍希釈したものを使つてMICを測定する方法が適当であることが明らかになった。

2) *Shigella* に対するニトロフラン剤の抗菌性

感受性分布を Fig. 2 に示した。5種のニトロフラン剤の中でFTが最も低濃度の位置に分布のピーク(0.1 µg/ml, 分離頻度38%)を示し, FT 6.25 µg/ml 以上

Fig. 3 Relation between antibacterial activity of nitrofuran derivatives and serotype of *Shigella* strainsFig. 4 Antibacterial activity of nitrofuran derivatives against *E. coli* strains

のMICを示す株は認められなかつた。*Shigella* を血清型別に感受性分布で表わした (Fig. 3)。FT および FT-Ac において血清型の相違でピークの位置は変動しなかつたが, *Sh. sonnei* のほうがシャープな分布曲線を示した。FZ において *Sh. sonnei* のほうが低濃度の位置に分布のピークを示した。

3) *E. coli* に対するニトロフラン剤の抗菌性

感受性分布を Fig. 4 に示した。5種のニトロフラン

Fig. 5 Antibacterial activity of nitrofuran derivatives against *Ps. aeruginosa* strains

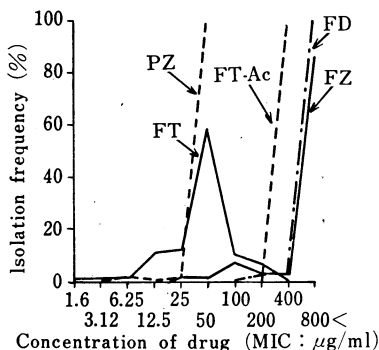
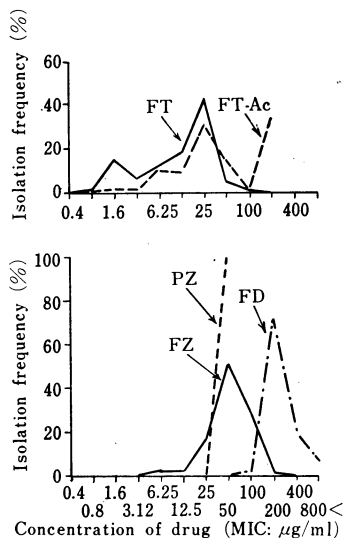


Fig. 6 Antibacterial activity of nitrofuran derivatives against *Proteus* strains



剤の中で FT が最も低濃度の位置に分布のピーク (0.2 µg/ml, 分離頻度35%) を示し, FT 50 µg/ml 以上の MIC を示す株は認められなかった。 *E. coli* に対するニトロフラン剤の特徴は FT, FT-Ac および FZ の分布曲線に見られるように低い MIC を示す株が約80%で, 他の20%の株は高い MIC の個所に数株ずつ尾を引くように分布していた。

4) *Ps. aeruginosa* に対するニトロフラン剤の抗菌性感受性分布を Fig. 5 に示した。5種のニトロフラン剤の中で FT だけが分布曲線にピーク (50 µg/ml, 分離頻度58%) を示し, FT 400 µg/ml 以上の MIC を示す株は認められなかった。 FT 以外のニトロフラン剤について溶解度など物性の点で Fig. 5 に示した MIC 以

Fig. 7 Relation between antibacterial activity of FT and species of *Proteus*

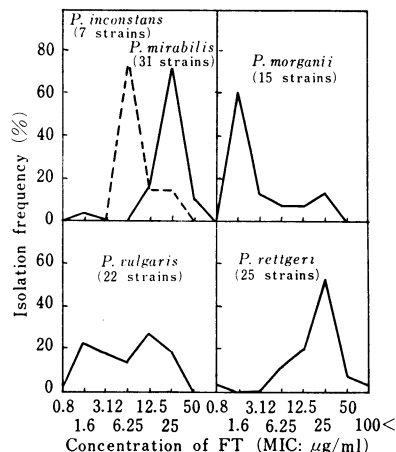
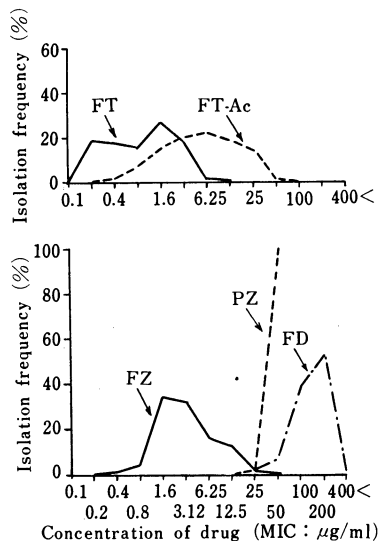
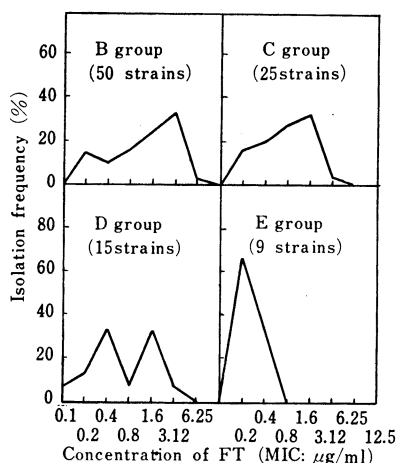


Fig. 8 Antibacterial activity of nitrofuran derivatives against *Salmonella* strains



上は測定不能であつた。

5) *Proteus* に対するニトロフラン剤の抗菌性感受性分布を Fig. 6 に示した。5種のニトロフラン剤の中で FT と FT-Ac が 25 µg/ml の位置に分離頻度のおおの42%, 31%を示した。しかし, FT は 1.6 µg/ml の位置にも15%の小さいピークを示す特徴があつた。そうして, FT 感受性を species 別に解析した結果を Fig. 7 に示した。それから MIC 1.6 µg/ml の位置にピークを示した species は, *P. morganii* が大部分であり, 25 µg/ml の位置にピークを示した specie

Fig. 9 Relation between antibacterial activity of FT and group of *Salmonella*

は、*P. mirabilis* と *P. rettgeri* が大部分であった。*P. inconstance* はそれらの中間の MIC の位置にピークを示した。さらに FT について 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す株は認められなかった。

6) *Salmonella* に対するニトロフラン剤の抗菌性

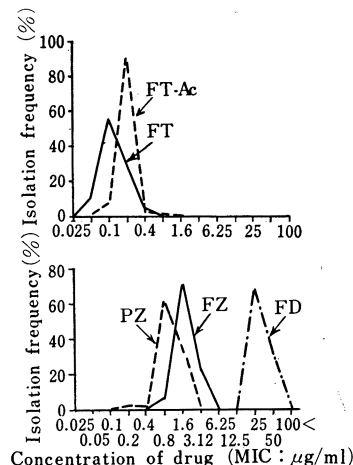
感受性分布を Fig. 8 に示した。5種のニトロフラン剤の中で FT と FZ が 1.6 $\mu\text{g/ml}$ の位置に分離頻度のおおの27%, 34%を示した。しかし、FT は 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の位置にも19%の小さいピークを示す特徴があった。そうして、FT 感受性を group 別に解析した結果を Fig. 9 に示した。それから MIC 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の位置にピークを示した group は、E group が大部分であり、1.6 $\mu\text{g/ml}$ の位置にピークを示した group は B および C group が大部分であった。さらに FT について 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す株は認められなかった。

7) *S. aureus* に対するニトロフラン剤の抗菌性

感受性分布を Fig. 10 に示した。5種のニトロフラン剤の中で FT が最も低濃度の位置に分布のピーク (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 分離頻度56%) を示し、FT 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示す株は認められなかった。*S. aureus* に対する特徴はいずれの薬剤にもシャープな分布曲線を示し、高濃度の MIC のほうへ尾を引いていなかった。

8) 交叉耐性

Shigella および *E. coli* の中から多剤耐性菌と感受性菌を選んで、それらの菌に対するニトロフラン剤の MIC を Table 2 および Table 3 に示した。それらから *Shigella* および *E. coli* とも多剤耐性菌と感受性菌との間でニトロフラン剤の MIC に差がないことから、TC, CP,

Fig. 10 Antibacterial activity of nitrofurantoin derivatives against *S. aureus*

SM, SA, KM および ABPC とニトロフラン剤の間に交叉耐性は全く認められなかった。

いつぼう、A group と B group を比較すると、FT の高い MIC を示す株は他の4種のニトロフラン剤にも高い MIC を示すことからニトロフラン剤の間で交叉耐性が認められた。

9) 試験管内 FT 耐性化および人工耐性菌の継代培養による FT 耐性の安定性

MIC 0.2 $\mu\text{g/ml}$ を示した *Shigella* JS 11811 および 1.6 $\mu\text{g/ml}$ を示した JS 11789 を使用し、one-step で FT 耐性がおおの16倍、4倍に上昇した (Fig. 11)。どうように MIC 0.2 $\mu\text{g/ml}$ を示した *E. coli* GN 3646 および 3.12 $\mu\text{g/ml}$ を示した GN 3506 を使用し、one-step で FT 耐性がいずれも8倍に上昇した (Fig. 12)。*Shigella* および *E. coli* とも FT 耐性獲得は one-step で最高16倍の上昇を認めたが、高度 FT 耐性菌は得られなかった。それら人工耐性菌をブイヨンで継代培養すると *Shigella* (JS 11789 および JS 11811) の場合、FT 耐性菌は5日目まで親株と同じまたは親株より1段高い MIC まで低下した。いつぼう、*E. coli* (GN 3506 および GN 3646) の場合、FT 耐性菌は5日目まで親株より1段高い MIC まで、または2日目まで親株と同じ MIC まで低下した。それらのことから人工的に得られた FT 耐性は不安定であるといえる。

結 論

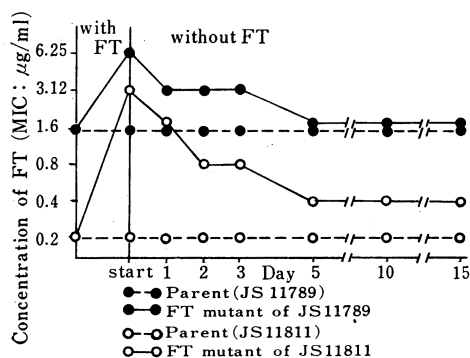
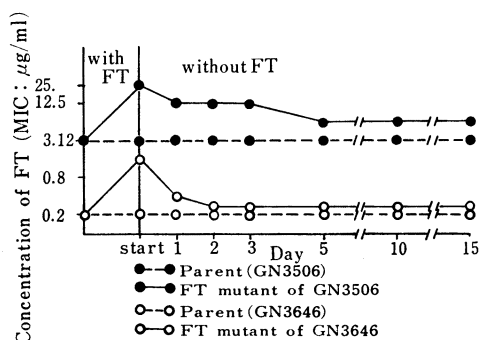
人病巣由来の *Shigella*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Proteus*, *Salmonella* および *S. aureus* おおの100株ずつについて Panfuran-S, Panfuran acetate, Panazon,

Table 2 Sensitivity of *Shigella* strains to nitrofuran derivatives

Group	Strain	Resistance pattern	Sensitivity to nitrofuran derivatives				
			FT	FT-Ac	FZ	FD	PZ
A	JS 11482	TC CP SM SA	0.1	0.2	0.2	12.5	6.25
	JS 11377	TC CP SM SA KM	0.1	0.4	0.4	12.5	6.25
	JS 11215	TC CP SM SA ABPC	0.1	0.2	0.4	12.5	6.25
	JS 11746	sensitive	0.1	0.4	0.8	25	6.25
	JS 11866	sensitive	0.1	0.2	0.4	12.5	6.25
B	JS 11064	TC CP SM SA	0.8	1.6	3.12	12.5	25<
	JS 11465	TC CP SM SA KM	0.4	1.6	1.6	12.5	25<
	JS 11413	TC CP SM SA ABPC	0.4	1.6	3.12	12.5	25<
	JS 11767	sensitive	0.4	1.6	1.6	25	25<
	JS 11886	sensitive	0.4	1.6	3.12	25	25<

MIC ($\mu\text{g/ml}$)Table 3 Sensitivity of *E. coli* strains to nitrofuran derivatives

Group	Strain	Resistance pattern	Sensitivity to nitrofuran derivatives				
			FT	FT-Ac	FZ	FD	PZ
A	GN 3464	TC CP SM SA KM	0.2	0.4	0.4	25	50<
	GN 3611	TC CP SM SA ABPC	0.2	0.4	0.4	50	50<
	GN 3465	TC CP SM SA ABPC KM	0.2	0.4	0.4	25	50<
	GN 3438	sensitive	0.2	0.4	0.4	25	50<
	GN 3474	sensitive	0.2	0.4	0.8	50	50<
B	GN 3469	TC CP SM SA	0.8	1.6	3.12	50	50<
	GN 3629	TC CP SM SA	0.8	3.12	3.12	100	50<
	GN 3632	TC SM SA	1.6	3.12	3.12	100	50<
	GN 3499	TC SM SA ABPC	1.6	1.6	3.12	50	50<
	GN 3477	sensitive	0.8	1.6	3.12	100	50<

MIC ($\mu\text{g/ml}$)Fig. 11 Genetic properties of *in vitro* developed FT resistance (*Shigella*)Fig. 12 Genetic properties of *in vitro* developed FT resistance (*E. coli*)

Furazolidone および Furadantin の抗菌力を比較して、次の結論を得た。

- 1) 寒天平板希釈法でニトロフラン剤の MIC を測定する場合、接種菌量は他の抗生物質と同様に前培養液を 100 倍希釈する方法 (10^4 cells/plate) が適当であった。
- 2) 5 種のニトロフラン剤の中で Panfuran-S が各種病巣由来菌に対して最も強い抗菌力を示した。
- 3) Panfuran-S は *Shigella sonnei*, *Proteus morganii* および *Salmonella* の E group に対して強い抗菌力を示した。
- 4) これまでの調査では高度 Panfuran-S 耐性菌は各種病巣由来菌から分離されなかった。
- 5) 各種病巣由来菌に対してニトロフラン剤の間で交叉耐性が認められたが、TC, CP, SM, SA, KM および ABPC とニトロフラン剤の間に交叉耐性は認められなかった。
- 6) 試験管内で one-step による Panfuran-S 耐性はわずかの上昇しか示さず、高度 Panfuran-S 耐性菌は得られなかった。人工的に得られた Panfuran-S 耐性は不安定であった。

文 献

- 1) DODD, M. C. & STILLMAN, W. B.: The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. J. Pharm. & Exp. Therap. 82: 11, 1944
- 2) 西海枝東雄: ニトロフロール概説。薬学研究 20: 24, 1946
- 3) 卯尾田秀隆, 谷崎太吉, 栗山章道: 特許196651, 1951
- 4) 三浦孝次, 池田政男, 大橋富次, 五十嵐良子, 市村圭子: フラン誘導体の化学的ならびに実験化学療法的研究 (第20報), 1,5-Bis (5-nitro-2-furyl)-3-pentadienone guanylhydrazone hydrochloride の加熱による抗菌力の増強について。薬学雑誌 81: 1372~1374, 1961
- 5) 三浦孝次, 池田政男, 大橋富次, 市村圭子, 五十嵐良子, 長谷川栄里子: フラン誘導体の化学的ならびに実験化学療法の研究 (第21報), 1,5-Bis (5-nitro-2-furyl)-3-pentadienone guanylhydrazone hydrochloride (NFA. HCl) 分解成績体の構造ならびに抗菌性について。薬学雑誌 81: 1357~1361, 1961
- 6) 高井明, 才川勇: ニトロフラン系化合物の薬学的研究 (第1報), 1,5-Bis (5-nitro-2-furyl)-1,4-pentadien-3-one amidinohydrazone および関連化合物の閉環反応。薬学雑誌 84: 1~9, 1964
- 7) 高井明, 才川勇: ニトロフラン系化合物の薬学的研究 (第2報), 1,5-Bis (5-nitro-2-furyl)-1,4-pentadien-3-one amidinohydrazone およびその閉環成績体の加水分解反応について。薬学雑誌 84: 9~16, 1964
- 8) 高井明, 才川勇: ニトロフラン系化合物の薬学的研究 (第3報), 3-Amino-1,2,4-triazine 誘導体の合成ならびに抗菌性について。薬学雑誌 84: 16~23, 1964
- 9) ROGERS, G. S., BELOFF, G. B., PAUL, M. F., YUREHENCO, J. A. & GENER, G.: Furazolidone, a new antimicrobial nitrofuran. Antibiotics & Chemotherapy 6: 231~242, 1956
- 10) 木村義民, 甲斐原守夫, 吉田耕作, 新井義夫, 高橋昌己, 宮永嘉隆: 1,2,4-Triazine 核を有する新規ニトロフラン誘導体に関する基礎的研究 (第1報)。Chemotherapy 10: 68~74, 1962
- 11) 木村義民, 甲斐原守夫, 吉田耕作, 新井義夫, 高橋昌己, 栗山一夫, 富永嘉隆: 1,2,4-Triazine 核を有する新規ニトロフラン誘導体に関する基礎的研究 (第2報)。Chemotherapy 11: 238~246, 1963
- 12) 藤本克郎: ニトロフラン誘導体の化学構造と抗微生物作用との関係について, I, 試験管内菌発育阻止作用。Chemotherapy 15: 228~245, 1967
- 13) 水成進一: ニトロフラン系剤の抗菌活性と生体内不活化機構の解析。Chemotherapy 16: 869~876, 1968
- 14) 甲斐原守夫, 田中穆子: 新フラン誘導体パンフランの性状と抗菌試験成績。日本伝染病学会雑誌 36: 129~135, 1962
- 15) 善養寺浩, 大久保暢夫, 五十嵐英夫, 堀幹郎, 板井千三: 腸炎ビブリオおよびコレラ菌の各種抗菌剤に対する感受性。日本伝染病学会雑誌 40: 337~344, 1966
- 16) 佐藤信義, 沢江義郎, 井上博, 白石元治, 木村光雄: Dihydroxymethylfuratrizine の分離菌に対する抗菌力と臨床効果。臨床と研究 43: 1684~1690, 1966
- 17) グラム陰性桿菌感染症研究会 (班長: 石山俊次): グラム陰性桿菌の薬剤耐性の研究 (2), 1966年に分離されたグラム陰性桿菌の同定と薬剤耐性の動向について。Chemotherapy 17: 42~46, 1969

STUDIES ON SUSCEPTIBILITY OF CLINICALLY ISOLATED BACTERIAL STRAINS TO NITROFURAN DERIVATIVES

TETSUO TAKASHIMA, TOKUMITSU TANAKA and SUSUMU MITSUHASHI

Department of Microbiology, Gunma University School of Medicine

Antibacterial activity of Panfuran-S, Panfuran acetate, Panazon, Furazolidone and Furadantin was investigated by using each 100 strains of *Shigella*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Proteus*, *Salmonella* and *S. aureus* which were isolated from clinical specimens.

1. In 5 nitrofurans, Panfuran-S showed very strong antibacterial activity against bacterial strains tested.
2. Panfuran-S showed strong antibacterial activity against *Shigella sonnei*, *Proteus morganii*, and E groups of *Salmonella*.
3. The bacterial strains highly resistant to Panfuran-S were not isolated from our survey during 10 years.
4. Cross resistance was observed between nitrofurans, but not observed between nitrofurans and TC, CP, SM, SA, KM and ABPC.
5. *In vitro* developed strains highly resistant to Panfuran-S were not demonstrated so far as examined, and *in vitro* developed resistance was found to be labile and decreased after several subcultures in nutrient broth.