

## 3-Amino-6-[2-(5-nitro-2-furyl) vinyl]-1, 2, 4-triazine

およびその誘導体の構造と生物活性相関  
薬剤耐性菌の感受性化作用を中心として

友枝宗光・北村令子・山田みどり・中村幸子・犬塚 学  
金沢大学薬学部

(昭和 48 年 12 月 15 日受付)

## はじめに

友枝およびその協力者は、多薬剤耐性因子 R によって発現される細菌の感染性薬剤耐性の克服への 1 つのアプローチとして、化学物質による耐性菌の感受性化とその機構に関する研究を進めてきた。これまでに用いた化学物質は、第 1 に、生体高分子、とくに核酸との相互作用を予想される微量活性物質群であり、第 2 に、細菌の表層に 1 次的に作用すると考えられる界面活性剤群である。第 2 のカテゴリーに属するものとしては、アニオン性界面活性剤 SDS のすぐれた耐性菌の感受性化作用とその機構についてすでに報告した<sup>4,5)</sup>。今回は、第 1 群に属するもののうち、抗菌性その他特徴ある生物活性を示す表題のニトロフラン化合物 (FT-H) が、*Escherichia coli* K-12 JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> 菌に対して示した感受性化作用とその機構を中心に、その構造と生物活性相関について報告する。FT-H と類似した構造を持ちながら、抗

菌性においてそれぞれ異なる FT および FTO-Ac の作用と結果にも触れ、FT-H による結果と比較し、総合的な結論を述べる。この研究は、私達の有機ニトロ化合物の構造と生物活性に関する一連の研究の一部を占めるものであるが、異なる構造上の特徴をもつ、より広範なニトロフラン (NF) 化合物を用いた結果については、次報において報告する予定である。

## 材料および実験方法

細菌：耐性菌として、*E. coli* K-12 JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> (*fi*<sup>+</sup> *drd* *str*<sup>r</sup> *cml*<sup>r</sup> *tet*<sup>r</sup> *sul*<sup>r</sup>), JE 177 R 100-1<sup>+</sup>/*mal*-5, KE 75 R 100-1<sup>+</sup>/*lac*-85 および KE 99 R 100<sup>+</sup>(*fi*<sup>+</sup>*str*<sup>r</sup> *cml*<sup>r</sup> *tet*<sup>r</sup> *sul*<sup>r</sup>) を感受性菌として KE 70 R<sup>-</sup>/*lac*<sup>+</sup> および KE 74 R<sup>-</sup>/*lac*-85 を用いた。*fi* は R 因子の F 因子に対する機能阻害、*drd* はその抑制を解かれた突然変異型、*str*, *cml*, *tet*, *sul* はストレプトマイシン (SM), クロラムフェニコール (CM), テトラサイクリン (TC), およ

Table 1 Nitrofuran compound used

Compound	Structure	M I C ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) <i>E. coli</i> K-12 JE 2100 R 100-1 <sup>+</sup>
a) FT-H		0.5
b) FT		1.0
c) FTO-Ac		10.0

a) 3-Amino-6-[2-(5-nitro-2-furyl) vinyl]-1, 2, 4-triazine<sup>4, 5)</sup>

b) 3-(N-Bis-hydroxymethyl) amino-6-[2-(5-nitro-2-furyl) vinyl]-2, 3, 4-triazine<sup>6)</sup>

c) 3-Acetamido-6-[2-(5-nitro-2-furyl) vinyl]-1, 2, 4-triazine-5(4H)-one<sup>6)</sup>

Fig. 1 Bacteriocidal Action of FT-H on *Escherichia coli* K-12 JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> Cells

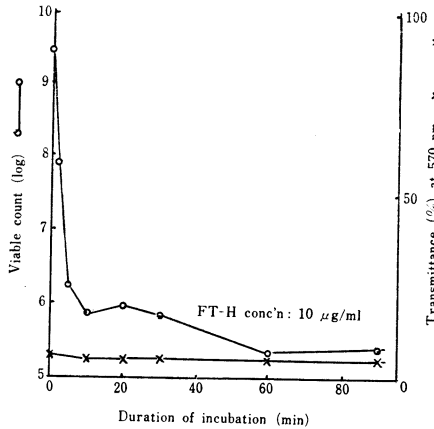


Fig. 2 Kinetics of the treatment of *Escherichia coli* K-12 JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> with FT-H

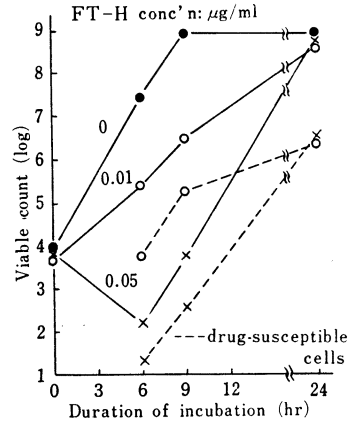


Table 2 Elimination of drug-resistance (R) factors of *Escherichia coli* K-12 R<sup>+</sup> strains by treatment with FT-H

Expt. No.	Strain	Inoculum size (cells/ml)	FT-H conc'n (µg/ml)	Time of incubation (hr)	Viable count (cells/ml)	No. of colonies showing drug-susceptibility/no. of colonies tested	Frequency of drug susceptible colonies (%)	Segregation patterns, resistance or susceptible to <i>str cml tet sul</i>	No. of segregants/no. of drug-susceptible colonies tested
1.	JE 2100 R 100-1 <sup>+</sup>	1.0 × 10 <sup>4</sup>	0	6	2.7 × 10 <sup>7</sup>	0/272	0		
				9	6.8 × 10 <sup>8</sup>	1/237	0.4	s s r s	1/1
				24	5.6 × 10 <sup>8</sup>	0/211	0		
2.		7.1 × 10 <sup>8</sup>	0.05	6	4.0 × 10 <sup>1</sup>	4/42	9.5	s s s s	4/4
				9	7.0 × 10 <sup>1</sup>	9/50	18.0	s s s s	9/9
				24	5.7 × 10 <sup>8</sup>	8/569	1.4	s s s s	8/8
3.	KE 99 R 100 <sup>+</sup>	9.7 × 10 <sup>8</sup>	0.1	6	3.0 × 10 <sup>1</sup>	1/9	11.1	s s s s	1/1
				9	2.0 × 10 <sup>1</sup>	0/21	<4.8	s s s s	
				24	5.1 × 10 <sup>8</sup>	27/754	3.6	r r s r	26/27
4.	JE 177 R 100-1 <sup>+</sup>	1.5 × 10 <sup>8</sup>	0.05	24	1.9 × 10 <sup>9</sup>	1/695	0.1	s s r s	1/27
				0.1	24	6.2 × 10 <sup>8</sup>	0/248	0	
5.	KE 75 R 100-1 <sup>+</sup>	1.8 × 10 <sup>8</sup>	0.05	24	2.1 × 10 <sup>8</sup>	11/79	13.9	r s s r	11/11
				0.1	24	5.5 × 10 <sup>8</sup>	26/578	4.5	r s s r

び *P*-アミノフェニルスルホンアミド (SA) に対する耐性, *lac* および *mal* はラクトーズおよびマルトース醗酵能, などの遺伝標識をそれぞれ表わしている。JE 株および R 100-1 と R 100 因子はもともと大阪大学 広田幸敬博士から恵与されたもの, KE 株は私達の教室で誘導分離されたものである。

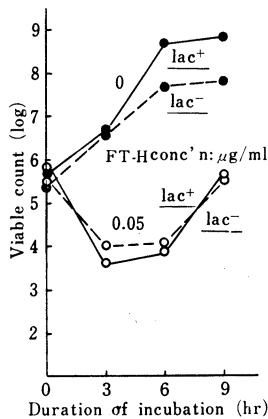
NF 化合物: Table 1 に示す 3 種の化合物を用いた。FT-H は金沢大学薬学部 三浦孝次名誉教授から, 残りの 2 化合物は富山化学工業株式会社総合研究所から恵与

された。

培地: 耐性菌の NF 化合物による感受性化実験には Penassay broth (pH 7.0~7.6) を用いた。得られた生存菌の耐性マーカー解析その他の実験に用いる培地については, これまでの論文<sup>1,2)</sup> に記した。

R<sup>+</sup> 菌の NF 化合物による感受性化実験: R<sup>+</sup> 菌を約 10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> 細胞/ml, 致死濃度以下の NF 化合物を含む Penassay broth に接種し, 24 時間まで 37°C で振盪培養し, EMB-glucose agar 上に生じた生存菌コロニーを,

Fig. 3 Reconstruction experiments between *Escherichia coli* K-12 KE 75 (*lac*<sup>-</sup> R<sup>+</sup>) and KE 70 (*lac*<sup>+</sup> R<sup>-</sup>)



SM, CM, TC および SA を含む EM-glucose agar 上にレプリカし, 耐性マーカーを解析した。対照実験として, NF 化合物を含まないものを用い, 比較検討した。耐性を一部もしくは全部失なつた感受性菌の耐性菌への自然突然復帰率は, *cml* 遺伝子をマーカーとして解析した。

耐性を全部もしくは保持した生存菌の R 因子伝達能は, KE 74 *lac*-85 を受容菌として 6~12:1 の比率で混合培養 (37°C, 20時間) して調べた。

### 結 果

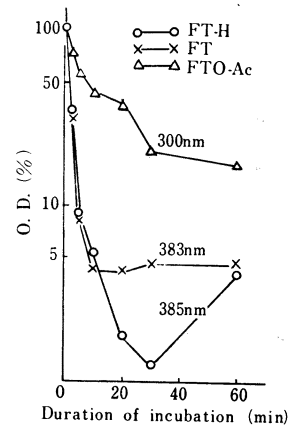
**R<sup>+</sup>菌の NF 化合物による感受性化** 10<sup>9</sup> 細胞/ml の JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> 菌を FT-H 10 µg/ml とともに処理すると, 生存菌数は10分以内に 10<sup>6</sup> 細胞/ml 以下に減少したが, O. D. に変化なく, NF 化合物には殺菌作用はあるが, 溶菌効果はないことがわかつた (Fig. 1)。

10<sup>8</sup>~10<sup>4</sup> 細胞/ml の JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> 菌に FT-H を 0.05 µg/ml に至る濃度で作用させた時の, 生存菌数の経時変化の 1 例を Fig. 2 に示した。R<sup>+</sup> 菌数は急激に減少し, 6 時間で最小に達し, その後再び増加した。その間, 生存菌中最高 10.9% の頻度 (0.05 µg/ml, 9 時間) で感受性菌が分離された。

FT-H は, KE 75 R 100-1<sup>+</sup> および KE 99 R 100<sup>+</sup> 菌に対しても同様の感受性化作用を示したが, JE 177 R 100-1<sup>+</sup> 菌では, ほとんどその作用発現を見なかつた。以上の結果のうち, FT-H による代表的なもの (Fig. 2 の結果を含む) について, Table 2 に示した。

FT は JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> 菌に対し, FT-H とほぼ同じ効率 (24.1%) で感受性化作用を示した。これに対して,

Fig. 4 Metabolic reduction behaviors of FT-H, FT, FTO-Ac in *Escherichia coli* K-12 JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> culture



FTO-Ac は同じ R<sup>+</sup> 菌に対し, 最高 4.5% の頻度でしかその作用を示さなかつた。

**感受性菌の遺伝的解析** FT-H 処理により得られた感受性菌の耐性マーカーの分離パターンを調べ, Table 2 に示した。すなわち, 4 剤感受性菌のほか, *tet*<sup>s</sup>, *cml*<sup>s</sup>, *tet*<sup>s</sup> および *str*<sup>s</sup>, *cml*<sup>s</sup>, *sul*<sup>s</sup> 変異菌が得られた。この他, FT により, *str*<sup>s</sup> および *sul*<sup>s</sup> 変異菌も分離された。

このうち, *cml*<sup>s</sup> 菌の *cml*<sup>r</sup> 野生型への自然復帰突然変異率を調べたが, すべて 10<sup>-10</sup> 以下であつた。

次に, 1 剤以上の薬剤への耐性遺伝子を保持した変異菌について, KE 74 R<sup>-</sup>/*lac*-85 への R 因子伝達能を調べたが, すべて伝達能を失なつていた。また, 4 剤耐性を保持したもののなかにも, 伝達能が 1/10 に低下したものも見出された。

**再構成実験** NF 化合物による耐性菌の感受性化が, 耐性菌集団中にもともと存在する感受性菌の選択によるものか否かを調べるために, KE 75 R 100-1<sup>+</sup>/*lac*<sup>-</sup> と KE 70 R<sup>-</sup>/*lac*<sup>+</sup> 菌を約 10<sup>6</sup> 細胞/ml, FT-H を 0.05 µg/ml 含む Penassay broth に接種し, 24 時間まで 37°C で振盪培養し, その生存菌数を追跡した。

Fig. 3 に示すように, FT-H を含まない対照実験と比較して, NF によつて R<sup>-</sup> 菌が選択的に増殖する現象は見出されなかつた。

**NF の還元代謝実験** NF 化合物の耐性菌感受性化と還元代謝速度およびその過程がどのようなかわかりを持つているかを調べるために, JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> 菌を FT-H, FT および FTO-Ac をそれぞれ 10 µg/ml 加えた DAVIS-glucose 合成培地 (pH 7.0) に約 10<sup>9</sup> 細胞/ml 接

種し、それぞれの NF 化合物の示す最大吸収波長における O. D. と生存 R<sup>+</sup> 菌数の減少を経時的に観察した。Fig. 4 に示すように、FT-H および FT においては、吸光度はひじように早く減少したが、FTO-Ac はそれほど減少しなかつた。FT-H, FT, FTO-Ac の還元速度定数はそれぞれ  $-3.5 \times 10^{-2}$ ,  $-2.1 \times 10^{-2}$ ,  $-4.3 \times 10^{-8} \text{ min}^{-1}$  であつた。

**R 因子伝達に対する阻止作用** NF 化合物が、これまでに述べたような R 因子の除去作用に加えて、耐性菌から感受性菌への R 因子伝達の阻止作用があるかどうかを検討するために、FT-H 0.5  $\mu\text{g/ml}$  および 1.0  $\mu\text{g/ml}$  を加えた Penassay broth 中に、KE 75 R 100-1<sup>+</sup>/lac<sup>-</sup> と KE 70 R<sup>-</sup>/lac<sup>+</sup> を 34 : 1 以上の比率で接種し、37°C で 24 時間まで振盪培養した。

その結果、1.0  $\mu\text{g/ml}$  濃度、2 時間培養で、FT-H を加えない対照実験に比べ、87% に至る伝達阻止効果を示した。

### 考 察

以上の結果から、次のことが指摘される。

1) NF 化合物には、薬剤耐性 (R<sup>+</sup>) 菌を感受性化させる作用がある。この事実は、ニトロフラン化合物がブドウ球菌の薬剤耐性を感受性化させるとの最近の報告に符合する<sup>7)</sup>。その効率は MIC の低い、すなわち抗菌力の強い FT-H および FT においてより著しい。この事実は、その後、他の 10 種類以上におよぶ NF 化合物を用いて、さらに証明された<sup>8-13)</sup>。なお、FT-H は、R 100-1<sup>+</sup> 菌だけでなく、R100<sup>+</sup> 菌に対しても感受性化作用を示したが、同じ R100-1 因子を持つ R<sup>+</sup> 菌でも、その作用発現をほとんど見ない JE 177 の例もある。いつぼう、三橋、高嶋ら (群馬大、私信) は、その保存する JE 2100 R 100-1<sup>+</sup> 菌を用い、FT による感受性化をほとんど認めなかつたとしている。NF 化合物による R<sup>+</sup> 菌の感受性化が広く一般性を持つ可能性については、さらに検討の必要がある。いずれにしても、私達の教室に保存する JE 2100 R100-1<sup>+</sup> 菌は、化学物質に対してきわめて高い感受性を示し、作用物質の構造と作用相関を解析するうえできわめて有利な株であるといえる。

2) 得られた感受性菌において、*cmi<sup>s</sup>→cmi<sup>r</sup>* の自然復帰突然変異率が  $10^{-10}$  以下であつたことは、NF 化合物による感受性化が、R 因子上の耐性遺伝子の全部もしくは一部を除去する機構を含んでいることを示唆する。

3) 1 剤以上の薬剤への耐性遺伝子を保持した変異菌が、その R 因子を R<sup>-</sup> 菌へ伝達しえなかつたことは、耐性を支配する遺伝子群だけでなく、接合伝達を支配する

*tra* 遺伝子群にも変異が誘発されている、興味深い事実を示唆する。

4) NF 存在下の R<sup>+</sup> 菌と R<sup>-</sup> 菌の間の再構成実験の結果 (Fig. 3) から、NF 化合物の耐性菌感受性化には、SDS の場合<sup>9)</sup> のような作用物質による感受性菌の選択が働いていないことが示唆される。

さて、NF 化合物の作用機構としては、第 1 に突然変異誘発作用によることが考えられる。事実、*E. coli* K-12 W4573 F<sup>-</sup>/Val<sup>s</sup> 菌から Val<sup>r</sup> 変異菌への突然変異誘発率は、UV を 1 とするとき、FT-H, FT, FTO-Ac はそれぞれ 5, 4, 0.3 で<sup>12,13)</sup> 感受性化効率と平行している。

いつぼう、NF 化合物の JE2100 R<sup>+</sup> 菌による代謝実験 (Fig. 4) は、その代謝還元速度定数が FT-H=FT > FTO-Ac の順に小さいことを示している。以上を考え合わせると、NF 化合物の代謝還元速度の大小と、抗菌力、R<sup>+</sup> 菌の感受性化効率、さらには突然変異誘発能の大小がすべて平行している。なお、最近、代謝還元を受けやすい FT-H と FT は、FTO-Ac に比べて、*E. coli* K-12 Rod<sup>+</sup> および Rod<sup>-</sup> 菌の分裂阻害を起こしやすい事実も明らかとなつた<sup>12,13)</sup>。

加えて、FT-H は、R<sup>+</sup> 菌から R<sup>-</sup> 菌への R 因子の伝達阻止作用があることを考え合わせると、NF 化合物の幅広い生物活性のパターンには、興味を深くそそられるものがある。結論的には、NF 化合物において、ニトロ基を中心とする共役  $\pi$  電子度の代謝還元過程が、そのすべての生物活性発現にかかわりを持つていることが示唆される。第 1 に、細菌による NF 化合物の還元代謝自体が、その細菌にとって死 (NF の殺菌性) につながっているであろう。作用物質が 3 ~ 6 時間後に代謝されつづいた時、生存菌が再び増殖を始める事実 (Fig. 2) も、この間の消息を物語っている。また、この結論を支持する論文もある<sup>14)</sup>。第 2 に、こうして生成するニトロ基の還元代謝産物 (おそらくはヒドロキシルアミノ体) もしくはその活性化体が、DNA はもとより、その他の生体高分子と結合し、あるいは干渉を起こし、いくつかの特異的かつ顕著な生物活性発現を決定づけていくであろう。病巣由来の病原菌に NF 耐性菌がほとんど見られず、試験管内でも高度耐性菌が誘導分離されがたい事実も、NF 化合物が、上記のような細菌の増殖と代謝に必須でしかも複数の過程を作用部位としていることを考える時、うなずけることである。このような機構の詳細と、本論文で述べた以外の実験結果については、次の論文で詳しく述べたい。

最後に、ニトロフラン化合物を恵与された金沢大学薬学部 三浦孝次名誉教授および富山化学工業株式会社総合研究所、大腸菌 K-12 JE 株と R 100-1 および R 100 因子を恵与された大阪大学理学部(現国立遺伝学研究所) 広田幸敬博士に感謝する。

### 文 献

- 1) TOMOEDA, M., M. INUZUKA, N. KUBO & S. NAKAMURA: Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. *J. Bact.* 95: 1078~1089, 1968
- 2) INUZUKA, N., S. NAKAMURA, M. INUZUKA & M. TOMOEDA: Specific action of sodium dodecyl sulfate on the sex factor of *Escherichia coli* K-12 Hfr strains. *J. Bact.* 100: 827~835, 1969
- 3) ADACHI, H., M. NAKANO, M. INUZUKA & M. TOMOEDA: Specific role of sex pili in the effective eliminatory action of sodium dodecyl sulfate on sex and drug resistance factors in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 109: 1114~1124, 1972
- 4) 三浦孝次, 池田政男, 大橋富次, 市村圭子, 五十嵐良子, 長谷川里子: 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。薬誌 81: 1357~1361, 1961
- 5) 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。薬誌 84: 9~16, 1964
- 6) 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。薬誌 84: 16~23, 1964
- 7) SHERISHORINA, S. I.; B. A. SHENDEROV & T. G. SIONSKAYA: *Bull. Exptl. Biol. Med.* 71: 48~50, 1971
- 8) 友枝宗光, 中村幸子, 三浦孝次: 大腸菌エピソードに関する遺伝性化学的研究。ニトロフラン誘導体による薬剤耐性(R)因子の除去。日本薬学会第89年会, 1969年4月, 名古屋
- 9) 犬塚学, 北村令子, 友枝宗光: 化学物質によるRおよびF因子の除去とその機構。日本薬学会「微生物をめぐる分子生物学とその薬学領域における応用面」シンポジウム, 1971年8月, 金沢
- 10) 友枝宗光, 犬塚学, 飯塚陽子: 有機ニトロ化合物の生物活性とその機構。ニトロフラン化合物による薬剤耐性菌の感受性化とそのニトロ基還元との相関性。日本薬学会第92年会, 1972年4月, 大阪
- 11) 友枝宗光: 薬剤耐性菌を感受性化する有効な化学物質の探索——特にその構造と作用機構を中心に——。第16回日本薬学会関東支部大会シンポジウム「抗生物質の化学的・生物学的修飾ならびに効果の改良」, 1972年11月, 東京
- 12) 山田みどり, 瀬戸純子, 友枝宗光: 有機ニトロ化合物の生物活性とその機構。ニトロフラン化合物による薬剤耐性菌の感受性化とそのニトロ基還元との相関性-2, 日本薬学会北陸支部第36回例会, 1973年6月, 金沢
- 13) 友枝宗光, 山田みどり, 瀬戸純子: ニトロフラン化合物の構造と生物活性。日本環境変異原研究会第2回研究発表会, 1973年9月, 三島
- 14) HIRANO, K., S. YOSHINA, K. OKAMURA & I. SUZUKA: Electronic aspect of the antibacterial activity of nitrofurans derivatives. *Bull. Chem. Soc. Japan* 40: 2229~2233, 1967

THE STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF  
3-AMINO-6-[2-(5-NITRO-2-FURYL) VINYL]-1,2,4-TRIAZINE AND  
ITS DERIVATIVES: ON THE CURING ACTION OF THE AGENT ON  
DRUG RESISTANT BACTERIA

MUNEMITSU TOMOEDA, REIKO KITAMURA, MIDORI YAMADA,  
SACHIKO NAKAMURA and MANABU INUZUKA  
Department of Pharmacology, Kanazawa University

A curing action of three 5-nitrofurans, possessing similar substituents with a triazine nucleus or its oxidized form at 2-position is described on some *E. coli* K-12 strains harboring R100-1 and R100 factors. Treatment of R<sup>+</sup> cells (10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> cells/ml) with sublethal concentrations of FT-H, FT, FT-Ac in Penassay broth (pH 7.6) led to the loss of part or all of these genetic elements. FT-H and FT were shown to induce the elimination of drug resistance of R<sup>+</sup> cells more efficiently than FT-Ac. Appearance of drug-susceptible variants among survivors was observed around when the viable count of R<sup>+</sup> cells decreased 10<sup>-2</sup>-10<sup>-3</sup> in 3~6 hrs. Several types of segregants were formed as well as R<sup>-</sup> cells. These segregants failed to transfer their R factors suggesting that transfer genes of their sex factors had mutated or had been deleted at least partly. *Cml*<sup>S</sup> variants gave no revertants to drug resistance. FT-H and FT were reduced metabolically by R<sup>+</sup> cells more rapidly than FT-Ac. Mutagenicities of these compounds were parallel to their metabolic reduction rates. It is concluded that all the biological activities of nitrofurans are derived from their metabolic reduction potential. It is also suggested that since the agent is not more toxic to R<sup>+</sup> cells than R<sup>-</sup> cells, the isolation of drug-susceptible variants under these conditions may be attributable to mutagenic actions of the agent.