

Nitrofuran 系薬剤の抗菌作用様式

山岸三郎・中島良徳・石川康代・藤井京子
千葉大学薬学部微生物薬品化学教室

(昭和 48 年 12 月 15 日受付)

ニトロフラン系化合物のうち、数種のは、いわゆる合成殺菌料として、あるいは化学療法剤として25年以上も前から実用化されてきたが、その抗菌作用の分子機構は未だ解明されるに至っていない。ニトロフラン系(以下 NF) 薬剤の抗菌作用に関しては、従来から細菌細胞内でのフラン環 C₅ 位のニトロ基の NADH 依存性環元過程と密接に関連するという知見が報告されており¹⁾²⁾³⁾、その主な活性型は C₅-NO₂ が -NHOH に環元された形ではないかと類推されている。

いつぼう、ENDO ら⁴⁾⁵⁾ は NFT (3-amino-6-[2-(5-nitro-2-furyl)-vinyl]-1,2,4-triazine) が特異的に細菌の DNA 合成を阻害し、プロファージの誘発を示し、さらに高濃度の NFT による DNA 鎖切断がみられることなどを明らかにしている。また McCALLA ら⁶⁾ も同様に種々の NF 系薬剤により DNA 鎖切断のおこる可能性を示している。

今回、著者らは NF 系薬剤による抗菌作用の分子機構を解明するための研究の端緒として、主として Panfuran-S の抗菌作用様式について検討し、大腸菌などに対する発育阻害様式を明らかにした結果について報告する。

材料および方法

薬剤：65種の NF 系化合物の抗菌スクリーニング試験の結果、次の2種の薬剤を使用した。すなわち 3-dihydroxymethylamino-6-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-1,2,4-triazine (Panfuran-S; 以下 FT) および 2-[2-(5-nitro-2-furyl)-vinyl]-quinoline (以下 NFQ) である。

菌株：*Escherichia coli* 菌株として主に使用したものは Q13, W3110 *thy* およびその変異株 P 3478 *pol A1* (Dr. J. Cairns 株：名古屋大学理学部 岡崎博士から分与；AB1157 F⁻, *thr, leu, pro, arg, thi, gal, ara, xyl, mtl, str, tsx* およびその変異株 AB 2463 *rec A13* と AB 2470 *rec B21*(Dr. P. Howard-Flanders 株, 国立がんセンター杉村博士から分与) などである。NF 系薬剤の発育阻害様式の検討に主として用いたブドウ球菌は *Staphylococcus aureus* E642-1 (群馬大学医学部 三橋博士から分与) である。

培養：菌の培養には普通ブイヨン(栄研化学)もしくは HA 培地⁷⁾、およびおのおのの寒天培地を使用した。被検菌の液体培養における発育の測定は Shimadzu-Bausch & Lomb Spectronic 20 を用いて吸光度計測によって行なった。

実験成績

種々の細菌類に対する抗菌力 腸内細菌類 7 種 10 菌

Table 1 MICs of FT and NFQ against various bacteria ($\mu\text{g/ml}$)

Test organism	MICs ($\mu\text{g/ml}$)	
	FT	NFQ
<i>E. coli</i> B	<0.08	<0.08
" Q13	0.63	2.50
" W3630	0.32	2.50
<i>E. freundii</i> GN346	0.63	5.00
<i>Kl. pneumoniae</i> GN69	0.32	0.08
<i>Kl. aerogenes</i> W52	1.25	10.00
<i>Proteus vulgaris</i> GM76	0.32	0.16
" <i>rettgeri</i> GN624	5.00	5.00
" <i>mirabilis</i> 15	10.00	10.00
" <i>mirabilis</i> 25	10.00	10.00
<i>Sar. lutea</i> ATCC9341	1.25	0.32
<i>Staph. epidermidis</i> TRR13	0.16	<0.08
" TPR14	0.32	0.16
" TPR22	0.32	0.32
" TPR25	<0.08	<0.08
" TPR28	<0.08	<0.08
<i>Staph. aureus</i> 209P	0.63	0.63
" E642-1	0.63	0.63
" MS642	0.63	0.63
" MS57	0.63	0.32
" MS353	0.32	0.16
" U9	0.32	0.63
" U9NO	0.32	0.63

24~48 hr at 37°C on nutrient agar

Fig. 1 Growth curves of *E. coli* Q13 in the presence of FT

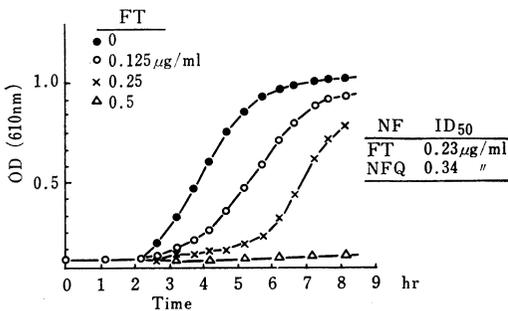
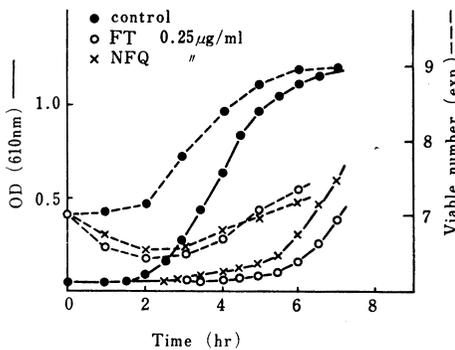


Fig. 2 Growth rates and viable numbers of *E. coli* in the presence of nitrofurans

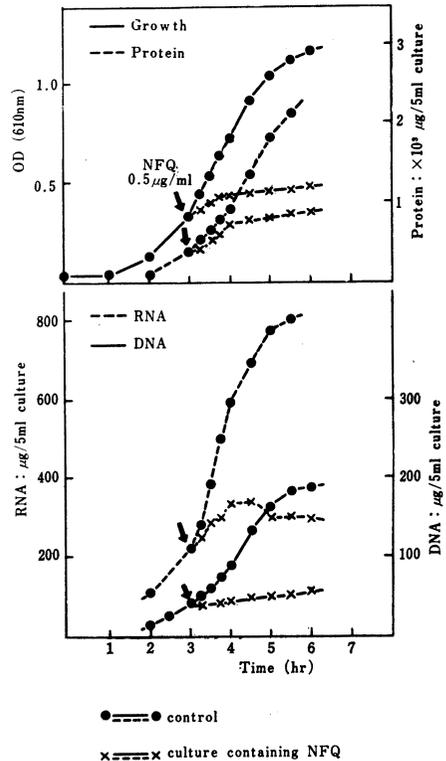


株、および *Sarcina lutea*, ブドウ球菌などのグラム陽性菌 3 種 13 菌株について FT および NFQ の 2 種類の薬剤の MIC を Table 1 に示した。この実験には普通寒天平板上に 1 夜培養液を接種した結果を示してある。この結果は腸内細菌に対しては一般に FT の抗菌活性は NFQ のそれに勝ること、例えばペニシリン耐性のような他の薬剤感受性値との連関性はみられないこと、*Proteus* 属の細菌類に対する感受性が低いこと、などが特徴的である。

薬剤の発育阻害様式 *E. coli* Q13 を被検菌としてその発育に対する FT および NFQ の阻害様式の実験例を Fig. 1 および 2 に示した。この菌に対する各薬剤の発育阻害様式は Fig. 1 に部分的に示したように発育の対数増殖期の抑制型というよりも誘導期延長型であり、それに基づいて得た ID₅₀ は FT で 0.23 µg/ml, NFQ では 0.34 µg/ml であった。また両薬剤とも Fig. 2 に示したように殺菌の経過を示しており、この条件下では約 5 時間後に生菌数の増加も著明となり、細菌細胞内での薬剤代謝様式を考える上で興味ある点であろう。

また、Fig. 3 に NFQ について *E. coli* Q13 における発育阻害、蛋白および核酸合成におよぼす影響を例示し

Fig. 3 Effect of NFQ on synthesis of macromolecules in *E. coli* Q13



た。FT を被検薬剤として用いた場合も同様な結果を得ている。細胞成分の分画法は HASH らの方法⁸⁾に準拠して行なった。その結果は、従来いわれているように DNA 合成の阻害にあることは明らかであるものの、その詳細な機構解明は目下続行中である。

Staphylococcus aureus E642-1 について同様な実験を行なった結果を Fig. 4, 5, 6 に図示した。FT はブドウ球菌に対して殺菌の経過を示さないが、NFQ は大腸菌の場合と同様に殺菌的效果を示している。この事実はフラン環 2 位の側鎖置換基の種類により生物活性の発現様式にちがいのある 1 つの例であろう。生体高分子物質合成への効果は Fig. 6 に示すように大腸菌の場合と同様であり、主な作用点が DNA 合成に対するものであることが推測される。

なお、この研究過程において *E. coli* Q13 の指数増殖期の細胞と休止期の細胞について FT 感受性のちがいを検討したが、増殖期細胞のほうが高感受性を示した。この事実は一見当然とも思えるが、その 1 つの理由として増殖期細胞のニトロフラン還元酵素活性が休止期細胞のそれに比べて著明に高いことをあげておくことが必要であろう。

Fig. 4 Growth curves of *S. aureus* E642-1 in the presence of FT

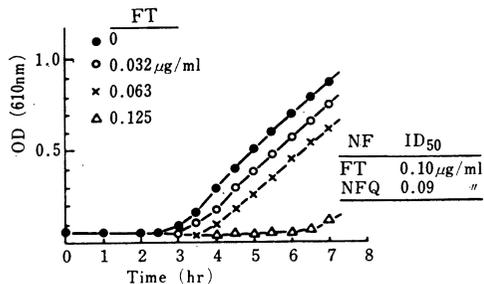


Fig. 5 Growth rate and viable number of *S. aureus* E642-1 in the presence of NF

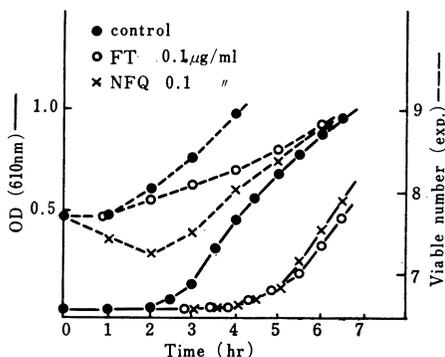


Fig. 6 Effect of FT on synthesis of macromolecules in *S. aureus* E642-1

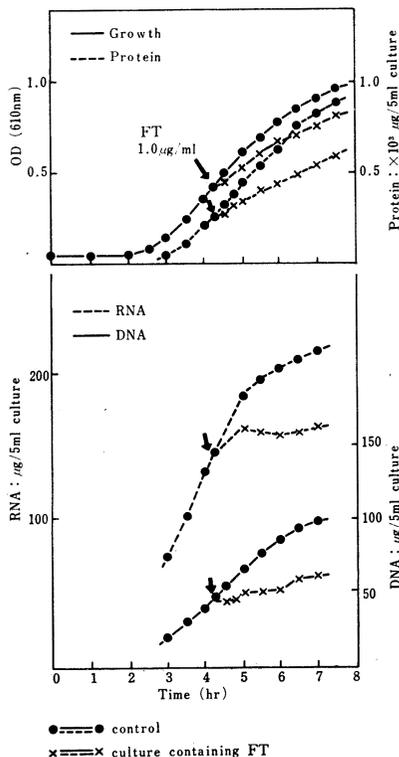


Table 2 MICs* of FT and NFQ against *E. coli*

Strain	NF	FT	NFQ
Q13		0.63	2.50
// (×100)**		0.32	...
W3110		0.32	1.25
// (×100)		0.16	0.16
P3478 <i>polA1</i> ***		0.08	0.16
// (×100)		0.02	0.04
AB1157****		1.25	5.00
// (×100)		0.63	2.50
AB2463 <i>recA</i>		0.02	0.04
// (×100)		0.005>	0.01>
AB2470 <i>recB</i>		0.32	0.63
// (×100)		0.08	0.16

* MIC : μg/ml, on agar plate

** () : inoculum diluted

*** *Pol A*⁻ derivative of *E. coli* W3110 *thy*

**** *E. coli* AB1157 F⁻, *thr*, *leu*, *pro*, *his*, *arg*, *thi*, *lac*, *gal*, *xyl*, *mtl*, *str*, MCr, *tax*

Table 3 Growth inhibitory concentrations of FT against various strains of *E. coli*

Strain of <i>E. coli</i>	ID ₅₀ * of FT (μg/ml)
Q13	0.23
W3110	0.17, 0.11
P3478 <i>polA1</i> **	0.07, 0.02
AB1157***	0.21, 0.13
AB2463 <i>rec A13</i>	0.003, 0.001
AB2470 <i>rec B21</i>	0.12

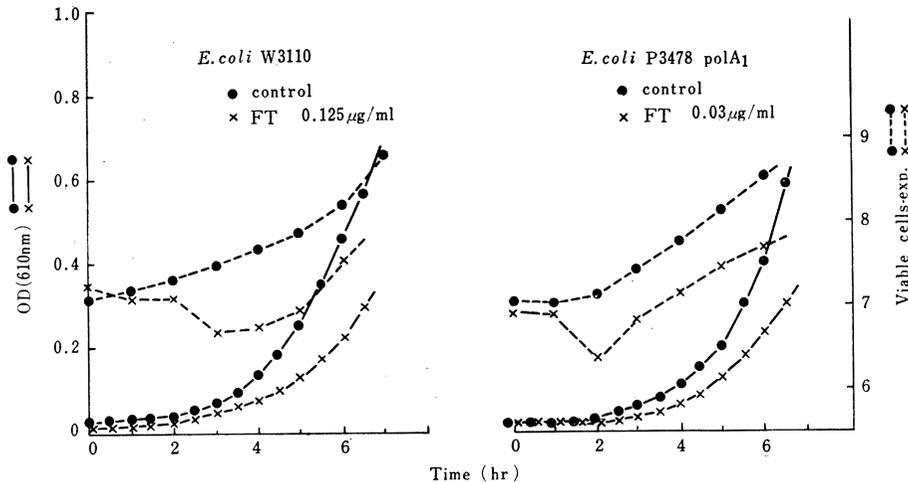
* Determined in nutrient broth or HA broth.†

** *Pol A*⁻ derivative of *E. coli* W3110 *thy*

*** *E. coli* AB1157 F⁻, *thr*, *leu*, *pro*, *his*, *arg*, *thi*, *lac*, *gal*, *xyl*, *mtl*, *str*, MCr, *tax*

大腸菌変異株の薬剤感受性 以上の結果から、大腸菌、ブドウ球菌などの細菌類におけるニトロフラン系薬剤の作用点がDNA合成に対する障害であることは明らかであるが、その機構解明のための1つの素材として、DNA障害の修復またはくみかえ機能に欠損を示す各変

Fig. 7 Growth rate and viable number of *E. coli* W3110 and its *pol A*₁ mutant in the presence of FT



異菌に対する薬剤感受性を検討，比較を試みた。その結果，寒天平板上における FT および NFQ の各菌株に対する MIC を Table 2 に，液体培養における発育阻害曲線から算出した ID₅₀ を Table 3 に示した。また，Fig. 7 には W3110 およびその DNA polymerase I 機能の欠損株である P3478 *pol A*₁ に対する FT (各 ID₅₀ 濃度) の示す阻害様式を例示した。実験結果から明らかのように，P3478 *pol A*₁ のニトロフラン系薬剤感受性はその原株である W3110 に比して 4 倍以上高いこと，*rec*-株である AB2463 *rec A*₁₃ はその原株に比して薬剤感受性の差が約 10 倍であること，この関係は寒天平板法における接種菌量を変えても同様であること，Fig. 7 の例のように，いずれの菌株に対しても FT は殺菌的效果を示すこと，などが確かめられている。これらの事実は細菌における DNA 障害の修復機能とニトロフラン系薬剤の作用機序との間の密接な連関性を示すものであるが，なお他の DNA 合成または修復機能に関する変異株については検討中である。

考 察

今回の研究結果は，従来いわれているように，ニトロフラン系薬剤の抗菌機序が細菌細胞内における還元過程と共転しながら，細菌 DNA に対する何らかの作用を通じて細菌細胞に致死的效果をもたらすことを示唆している。McCALLA⁹⁾ は *E. coli* B/r を使用してニトロフラン系薬剤による DNA 鎖の 1 本鎖切断のおこる可能性を示しているが，その切断能力はフラン環 C₂ 位に連結する側鎖置換基の種類により，また同一化合物についてはその濃度差によつて強弱のあることを認めている。著者らも FT についてほぼ同様な結果を得ているが，薬剤

除去後の修復能力の差がニトロフラン系薬剤感受性に反映するという事実を確かめている (未発表)。細菌における紫外線による障害の “dark repair” 機構については既に多数の研究報告が呈出されているが，その要点は生成する Pyrimidine dimer の部位を認識し，endonuclease によるその近傍部位の 1 本鎖切断，さらには他の nuclease, DNA polymerase 1, DNA ligase 作用による修復過程が含まれるという作用仮説が呈出されている⁹⁾。薬剤による細菌 DNA 1 本鎖切断に関しては，例えば最近 OTSUI ら¹⁰⁾ による monofunctional mitomycin に関する研究，M. NAGAO ら¹¹⁾ による 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), 4-nitropyridine 1-oxide (4-NPO) およびその誘導体による研究例などを例示しておきたい。これらの薬剤はいずれも DNA 鎖に結合する事実は確かめられており，UV 照射および 4-NQO による障害修復の初期反応に或る種の endonuclease 活性が機能することが明らかにされている¹²⁾⁻¹⁵⁾。ニトロフラン系薬剤が果して細菌 DNA に対してどのような結合様式を示し，またそれにつづく障害回復機構が 4-NQO のそれと似ているのか，あるいは 4-NQO 障害の修復機構と異なる過程であるとされている 4-NPO 障害の場合と同様なのか，または別にニトロフラン系薬剤に特異的な修復機構があり得るのかどうか，は今後の研究課題である。

文 献

- 1) R. E. ASNIS, F. B. COHEN & J. S. GOTS : Studies on bacterial resistance to furacin. *Antibiot. Chemother.* 2 ; 123~129, 1952
- 2) R. E. ASNIS : The reduction of furacin by cell-free extracts of furacin-resistant and

- parent-susceptible strains of *E. coli*. Arch. Biochem. Biophys. 66: 208~216, 1957
- 3) D. R. McCALLA, A. REUVERS & C. KAISER : Mode of action of nitrofurazone. J. Bact. 104: 1126~1134, 1970
 - 4) H. ENDO, M. ISHIZAWA, T. KAMIYA & M. KUWANO : A nitrofuran derivative, a new inducing agent for the phage development of lysogenic *E. coli*. Biochim. Biophys. Acta 68: 502~505, 1963
 - 5) K. KATO, Y. SUGINO & H. ENDO : Effects of a prophage inducer, a nitrofuran derivative, on the DNA metabolism of *E. coli*. Biochim. Biophys. Acta 119: 309~321, 1966
 - 6) D. R. McCALLA, A. REUVERS & C. KAISER : Breakage of bacterial DNA by nitrofuran derivatives. Cancer Research 31: 2184~2188, 1971
 - 7) H. S. ROSENKRANZ, H. S. CARR & H. M. ROSE : Phenetyl alcohol. I. Effect on macromolecular synthesis of *E. coli*. J. Bact. 89: 1354~1369, 1965
 - 8) J. H. HASH, M. WISHNIK & P. A. MILLER : On the mode of action of the tetracycline antibiotics in *S. aureus*. J. Biol. Chem. 239: 2070~2078, 1964
 - 9) P. HOWARD-FLANDERS : DNA repair. Ann. Rev. Biochem. 37: 175~200, 1968
 - 10) N. OTSUJI & I. MURAYAMA : DNA damage by monofunctional mitomycins and its repair in *E. coli*. J. Bact. 109: 475~483, 1972
 - 11) M. NAGAO & T. SUGIMURA : Sensitivity of repair deficient mutants and similar mutants to 4-nitroquinoline 1-oxide, 4-nitropyridine 1-oxide, and their derivatives. Cancer Research 32: 2369~2374, 1972
 - 12) J. C. KAPLAN, S. R. KUSHNER & L. GROSSMAN : Enzymatic repair of DNA. I. Purification of two enzymes involved in the excision of thymine dimers from UV-irradiated DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 63: 144~151, 1969
 - 13) H. NAKAYAMA, S. OKUBO & Y. TAKAGI : Repair of UV-damaged DNA in *Micrococcus lysodeikticus*. I. An endonuclease specific for UV-irradiated DNA. Biochim. Biophys. Acta 228: 67~82, 1971
 - 14) W. L. CARRIER & R. B. SETLOW : Endonuclease from *Micrococcus luteus* which has activity toward UV-irradiated DNA. J. Bact. 102: 178~186, 1970
 - 15) J. C. KAPLAN, S. R. KUSHNER & L. GROSSMAN : Enzymatic repair of DNA. III. Properties of the UV-endonuclease and UV-exonuclease. Biochemistry 10: 3315~3324, 1971

THE MODE OF ANTIBACTERIAL ACTION OF NITROFURAN COMPOUNDS

SABURO YAMAGISHI, YOSHINORI NAKAJIMA,
YASUYO ISHIKAWA and KYOKO FUJII

Division of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

The antibacterial activity of two nitrofurans, 3-dihydroxymethylamino-6-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-1, 2, 4-triazine (Panfuran-S : FT) and 2-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-quinoline (NFQ) was examined. The experimental results determining growth rates, viable counts (Fig. 1, 2, 4, and 5), and biomacromolecules (Fig. 3 and 6) in the presence of the nitrofurans suggested that the potent growth inhibitory action of these drugs against *Escherichia coli* Q13 or *Staphylococcus aureus* E642-1 could apparently be associated with the interference of DNA synthesis. Mutants of *E. coli*, such as the DNA polymerase I-deficient mutant *pol* A1 and the recombination-deficient mutant *rec* A13, exhibited much higher sensitivity to the nitrofurans than the corresponding parent strains did (Fig. 7, Table 2 and 3). The results indicate the close relationship between the mechanism of inhibition by the nitrofurans and the ability to repair the DNA damage caused by these drugs in the bacterial strains.