臨床実験報告

フラン誘導体に関する研究

N-(5-nitro-2-furfurylidene)-1-amino-hydrantoin について

日本医科大学細菌学教室 (主任 木村義民教授)

児島成男, 六川俊雄

Shigeo Kojima Tosio Rokukawa

まえがき

Dodd & Stillman¹⁾ (1944) によつて Furacin (5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone) が医薬として賞用されて以来, フラン誘導体に関する研究は著しく進歩した^{2)~17)}。抗生剤の進歩はもとより諸種感染症治療上に大きな貢献をなしつつあるが, 一面これによる耐性菌の派生と流行が問題となつていゝる。1953 年 Eaton Laboratory Inc. で合成された Nitrofurantoin は欧米に於ける唯一のフラン系経口抗菌剤で, 種々な急性感染症に奏効し又その治療に用いられている。本剤は化学名を N-(5-nitro-2-furfurylidene)-1-amino-hydrantoin と称し, 次の構造を示す。

本化合物は僅に臭気と苦味を持つた黄色結晶性の粉末で, 分解点 263~265°C でチオキサン, プロピレン・グリコールには加熱により容易に溶解するが, アルコールには難溶, 水には殆んど不溶である。アルカリ, 炭酸アルカリ類に容易に溶解し, アルカリ又日光等によつて他のニトロフラン化合物同様暗色を呈する。本剤の抗菌作用に就ては, Mintzer¹⁸⁾ (1953), Carrol¹⁹⁾ (1954) によつて報告されているが, グラム陽性及び陰性の各種個菌に対し, 広範囲な抗菌スペクトラムを有するとされ菌細胞の酸素的代謝を阻害して殺菌的に作用し又フラン系剤の一般の特性として耐性を菌に興え難い。サルファ剤や抗生物質に対して耐性を獲得した耐性菌に対しても, 感性株同様に抗菌作用を示すのみか, ペニシリンやストレプトマイシンと併用すると協力作用が現われるとも云われている。一方本剤は腸からの吸収が極めて速かで, その大部分が尿中に排泄されると云われる。従つて尿路感染症, 胆汁路感染症及び敗血症^{20)~22)}にも著効を呈するものとさ

れている。

材 料

今回実験に供したフラン誘導体は, 環状フラン化合物について系統的研究を行つて来た富山化学研究部に於て合成されたもので, 先に Eaton Laboratory に於て合成されたと化学構造を全く一にするもので, 化学名を Nitrofurantoin N-(5-nitro-2-furfurylidene)-1-amino hydrantoin とし, FT (Furaitoin) と名付け

方法と成績

実験 I 試験管内抗菌作用

方 法

1) 実験に供したフラン誘導体は, 何れもプロピレン・グリコールを以て 500 倍濃度 (2 mg/ml) になるように溶解せしめ 100°C 30 分間加熱溶解を兼ねて滅菌し, これをブイオンで 5,000~160,000 倍濃度倍數稀釈した。薬剤稀釈後の液体培地は, 更に 100°C 30 分間滅菌後, これを供試した。

2) 各培地に於けるプロピレン・グリコールの最大含有濃度は 20 倍となる故, 実験毎にプロピレン・グリコール倍稀釈ブイオンを対照にした。斯かる濃度に於て実験に供した如何なる菌種も發育を阻止される事はなかつた。

3) 各菌共普通寒天 24 時間培養液の一滴をブイオンに移し, その 18 時間培養液の 10,000 倍稀釈液 0.1 ml を薬剤含有ブイオンに移植した。

成 績

1) グラム陽性並に陰性の諸菌約 10 種に対する抗菌作用結果は, 第 1 表に示す如くであつた。

以上の成績からみると, 供試 10 種の菌株に対し FT は 10,000 倍濃度に於て完全に發育を阻止し, 15,000 倍濃度に於ても緑膿菌を除く凡ての菌の發育を完全に抑制した。20,000 倍稀釈濃度に於ては 24 時

第 1 表 FT の諸種細菌に対する試験管内発育阻止作用

	×10,000	×15,000	×20,000	×40,000	×80,000	×160,000	×320,000
<i>Saphylococcus aureus</i>	—(—)	—(—)	—(—)	+(++)	++(++)	++	++
<i>E. Coli</i> (O-18)	—(〃)	—(〃)	—(+)	+(〃)	++(〃)	++	++
<i>Klebsiella</i>	—(〃)	—(〃)	—(〃)	+(〃)	+(〃)	++	++
<i>S. typhi</i> (T-63)	—(〃)	—(〃)	—(—)	—(+)	++(〃)	++	++
<i>S. paratyphi</i> A	—(〃)	—(〃)	—(〃)	+(++)	++(〃)	++	++
<i>S. enteritidis</i>	—(〃)	—(〃)	—(〃)	+(〃)	++(〃)	++	++
<i>Proteus vulgaris</i>	—(〃)	—(〃)	—(〃)	+(〃)	++(〃)	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—(〃)	—(+)	++(+)	++(++)	++(〃)	++	++
<i>Shig dysenteriae</i>	—(〃)	—(—)	—(—)	+(++)	++(〃)	++	++
<i>Brucella melitensis</i>	—(〃)	—(—)	—(〃)	+(〃)	++(〃)	++	++

注 — : 完全発育阻止 () 内は 90 時間後, 他は 24 時間後の成績

間名に緑膿菌を除く凡ての菌 (*Staphy aureus*, *E. Coli*, *Klebsiella*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* A, *S. enteritidis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteriae* group B, *Brucella melitensis*) の発育を阻止し, 96 時間名に於て尚完全に発育阻止されるものが多かった。40,000 倍濃度では 24 時間名では菌の発育が阻止されていたが, 96 時間名では菌の発育を阻止しえなかつた。

2) 好塩菌に対する FT の抗菌作用

病原性好塩菌 3 種に対する FT の試験管内抗菌作用を検べた所, 次の如くであつた。好塩菌としては滝川株 3 種 (No. 4, No. 7, No. 9) を用い, ペプトン水に 30% の割合に食塩を含有する培地を用いて行つた。実験成績は第 2 表に示す如し。

第 2 表 FT の好塩菌に対する試験管内発育阻止作用

	×8,000	×16,000	×32,000	×64,000
No. 4.	—(—)	—(+)	++	++
No. 7.	—(〃)	—(—)	++	++(++)
No. 9.	—(〃)	—(〃)	++	++(++)

注 () 内は 96 時間後, 他は 24 時間後の成績

以上の成績から FT は病原性好塩菌に対しても, 16,000 倍濃度に於て完全に発育阻止作用を示すことが明らかにされた。

3) 抗生剤耐性株に対する FT の抗菌作用

実験室内に於て得られた抗生剤耐性株 (*E. coli*, *Staphy. aureus*) 並に患者より分離した多剤耐性株 (*Staphy. aureus*, *Shigella dysenteriae*) の次のような数株について検討した。

1. *Staphy. aureus* (209 P) : SM (10 mg) 耐性株
2. " " : PC (400 unit) "
3. *E. Coli* (O-6) : SM (10 mg) "
4. " " : PC (2,000 unit) "

5. *Shig. dysenteriae* (KR-2) : CM, TM, SM(100 r) 耐性株

6. *Staphy. aureus* : PC (100 unit), CM (100 r) 耐性株 "

第 3 表 抗生剤耐性株に対する FT の試験管内抗菌作用

	×8,000	×16,000	×32,000	×64,000
<i>Staphy. aureus</i> (SM 耐性株)	—	—(++)	++	++
" (PC ")	—	—(〃)	++	++
" (PC.CM ")	—	—(〃)	++	++
" (")	—	—(+)	++	++
<i>E. coli</i> (SM ")	—	±(++)	++	++
" (PC ")	—	—(—)	++	++
<i>Sh. dysenteriae</i> (CM.TM.SM ")	—	—(〃)	++(++)	++

注 () 内は 96 時間後の発育阻止作用, 他は 24 時間後の成績

3 表の成績から分るように, 各種抗生剤耐性株に対し, FT は 8,000 倍に於て完全発育阻止作用を示すが, 16,000 倍濃度に於ては多くの菌株に対し不完全発育阻止作用を示す。これを表に示した薬剤感性株に対する作用と対比すると, 抗生剤耐性株に対し極めて軽度の交叉耐性が認められる場合があるが, 感性株のそれに対するそれと左程の差を認め得ない。この事実はフラン誘導体は抗生剤の抗菌作用機作の異なる事を裏付けている。而かも本実験に供した菌株は何れも各種抗生剤に対して高度の耐性を有する事からみて, 抗生剤耐性株に対して交叉耐性が殆ど成立しないものと言つてよからう。

実験 II 毒性試験

15 mg の DD 系マウスを用い毒性を検討した。即ち FT の生理食塩水懸濁液の腹腔内注射, 皮下注射及び経口投与による致死量を毎回 1 群 5 匹宛を用いて実験した成績を総合すると, 次の如くであつた。(注

射後 1 週間以内のマウスの生死を以つて判定した)

腹腔内注射: $LD_{50}=511.5 \text{ mg/kg}$

皮下注射: $LD_{50}=792 \text{ mg/kg}$

経口投与: $LD_{50}=975 \text{ mg/kg}$

LD_{50} は上述の如くで、フラン系薬剤としても毒性は弱い方と考えられる。

実験 III 尿中血中への排泄に関する検討方法

1) 滅菌シャーレに普通寒天を溶融したもの 5 ml 注いで固めた後、ペニシリン力価検定用カップを中央に置き、一方溶融寒天 100 ml に対し *Bac. subtilis* (PCL) の芽胞液 (1 mg/ml) の 10 倍稀釈液 1 ml を加えたものを各 20 ml 宛分注し固つた後、中央のカップを取り除く。

2) 次に形成された中央部の穴に FT の各種濃度液を 2 滴宛滴下すると共に、FT を 10 mg/kg の割で経口投与後、径時的に採血した血清及び採取を各々同様滴下し一昼夜氷室に保持して浸透後、 37°C に一昼夜保ち出現する阻止帯の直径を計測する事によつて血清並に尿中に出現する FT 濃度を算定した。

3) 血清は薬剤投与前、投与後 1 時間、2 時間、3 時間、5 時間、7 時間後について行い、尿の採取は薬剤投与前、投与後 2 時間、4 時間、7 時間及び 12 時間後について行つた。

成績

以上について血清並に尿中に出現する FT 濃度を対照として用いた。FT の各稀釈液による阻止帯の直径を求め、増山の計算図表に準じて測定値を図示すると、次の如くである。即ち健康人に FT を 10 mg/kg の割で投与後、血中並に尿中に出現する薬剤濃度は、血清中には 2～3 時間後に於て $1.6\sim 3.2 \text{ r/ml}$ 相当量出現するが 4 時間後には 1.2 r/ml 、5 時間後には既に検出しえない。一方尿中排泄量は極めて高く、2 時間後に於て既に 47 r/ml 、3 時間台には 76 r/ml 、5 時間後には 93 r/ml の最高値を示し以後徐々に減少しれが、12 時間後にも明かに尿中から排泄させる事が明

らかにされた。

総括並に考按

本報告は環状フラン化合物合成の研究の一環として見出された N-(5-nitro-2-furfurylidene)-1-amino-hydrantoin についてなされたものであるが、これは Eaton Laboratory で合成された Nitrofurantoin (1953) と構造を一にするフラン系の新経口抗菌剤である。本剤の試験管内抗菌力について検討した結果は本文中に示したように、広くグラム陽性並に陰性菌に対して 15,000～20,000 倍の抗菌作用を示し、更に各種抗生剤の高度耐性株に対しても感性株に対すると略々同程度の抗菌作用を示す事が明らかにされた。この事実は先に根岸²³⁾等がスルファミン、ストレプトマイシン或はペニシリン耐性株に対しフラン誘導体が一樣に奏効する事を報告した事実を裏付けるものである。マウスに対する毒性を検討したが LD_{50} をみると毒性は極めて微弱である。血中及び尿中への排泄量からみると、血中への排泄・吸収は甚だ低いが、尿中へは速かに且つ持続的に大量排泄される事が分つた。而かも本化合物は胃腸管内における pH の変動によつても抗菌力に影響を受けず、体内では可溶性状態で存在し、且つその大部分が尿中から排泄されるという点から考えて尿路性疾患を始めとして適応範囲の広範なフラン系抗菌剤の一となり得るものと考えられる。抗菌作用の点では中村、木村^{23) 25)}が先に報告したフラン系剤としての Bis-(5-nitro-furfurylidene)-aceto-guanyl hydrazone [Panazon] に劣るとは言え、Panazon 同様毒性の少いこと、抗生剤耐性株にも一樣に抗菌作用を発揮することは、耐性問題の重視されるに當つて大いに意義のあることと考えられる。

結 論

1. FT はグラム陽性及び陰性病原菌に対し、試験管内に於て 15,000～20,000 倍稀釈濃度に於て完全発育阻止作用を示す。
2. FT は病原性好塩菌に対し略 16,000 倍濃度に於て発育阻止を示す。
3. FT は各種抗生剤耐性株に対し、感性株に対すると略々同等の抗菌作用を示す。
4. FT のマウスに対する毒性は、腹腔内注射で $LD_{50}=511.5 \text{ mg/kg}$ 、皮下注射で 792 mg/kg 、経口投与の際は 975 mg/kg で、毒性は軽微である。
- 5) 健康人に FT を 10 mg/kg の割で経口投与した際の血中及び尿中への吸収及び排泄量からみると、血清中には投与後 2～3 時間に $1.6\sim 3.2 \text{ r/ml}$ の最高

第 1 図

値を示すが4時間以后には略々消失するが、尿中には2時間后より 50 *r/ml* 程度排泄され 3～5時間后には76～93 *r/ml* の高濃度を示し、12時間以降にもなお排泄される。

主 要 文 献

- 1) Dodd, M.C. & Stillman, W.B. : J. pharmacol., **82**, 11-28 (1944)
- 2) Cramer, D.L. & Dodd, M.C. : J. Bact., **51**, 293-303 (1946)
- 3) Cramer, D.L. : J. Bact., **54**, 119-125 (1947)
- 4) Green, M.N. : Arch. Biochem., **19**, 397-406(1948)
- 5) Paul, H.E., Austin, F.L., Paul, M.F. & Eills, V.R. : J. Bact., Chem., **191**, 217 (1951)
- 6) Jaylor, M. : J. Biol. Chem., **191**, 217 (1951)
- 7) 木村廉, 西海枝東雄, 東昇 : 薬学研究, **20**, 23-40 (1948)
- 8) 青柳安誠, 柴田清人 : 日本臨床, **7**, 671-678; 784-789 (1949)
- 9) 東 昇 : 日本細菌学雑誌, **3**, 133 (1948)
- 10) 木村廉, 東昇, 五井次郎, 西海枝東雄 : 日本細菌雑誌, **3**, 133-134 (1948)
- 11) 水野伝二 : 日本細菌雑誌, **3**, 134 (1948)
- 12) 木村 廉 : 最新医学, **5**, (4), 60 (1950)
- 13) 藤野恒三郎, 西野信夫 : 日本薬学会西部支例会(1949)
- 14) 藤野恒三郎, 中田大輔, 西野信夫, 南部廉介 : 大阪医学雑誌, **4**, (6), 10 (1950)
- 15) 藤野恒三郎, 中田大輔他 : 日本細菌雑誌, **5**, (5), 305 (1950)
- 16) 三浦孝次, 湯本実, 阪栗芳雄, 池田政男 : 十全医雑誌, **51**, 273-278 (1948)
- 17) 湯本 実 : 十全医学雑誌, **52**, 540 (1950)
- 18) Mintzer, M., E.R. Kadison, W.H. Shales & Q. Felsenfeld : Antibiotics & Chemotherapy, **3**, 151 (1953)
- 19) Carral, G. & R.V. Brennan : J. Urol., **71**, 650 (1954)
- 20) Twiss, J.R., W.V. Berger, A.R. Aronson, L. Gitte & Siegel, L. : Gastro-enterol., **30**, 820(1956)
- 21) Friedgood, C.E. & C.B. Ripstein : Bull. N.Y. Acad. Med., **30**, 322 (1954)
- 22) Salusk, T.F. : California Med., Feb. (1956)
- 23) 中村敬三, 木村義民他 : 新フラン誘導体に関する研究, 特に Bis-(5-nitro-furfurylidene)-acetone guanyl hydrazone について, 総合医学, **9**, (1), 37-39 (1952)
- 24) 根岸清, 坂本行男他 : フラン誘導体の作用機作, 特に各種化学薬品との関係について, 総合医学, **10**, (2), 99-101 (1953)
- 25) 中村敬三, 木村義民 : 新フラン誘導体合成の構想とその実地に於ける応用, 日医大誌, **19**, (9), (1952)