ニトロフラン化合物の生物学的研究

第1報 比濁法によるニトロフラン化合物の定量

Biological Studies on Nitrofuran Compounds
I. Turbidimetric Assay of Nitrofuran Compounds服 部 哲 也*
Tetsuya HATTORI

フルフラール及びフラン誘導体に防腐殺菌作用のあることはかなり古くより認められていたが、化学療法剤として脚光を浴びるに至つたのは1944年 Dodd & Stillman¹⁾ が42種のフラン誘導体の中より Nitrofurazone (Furacin) を発見して以来のことである。その後欧米に於て5位にニトロ基を有するニトロフラン誘導体が多数合成され臨床応用化の研究が行われてきた。一方、我が国に於ても Dodd らとは全く別個に西海枝ら²⁾ によつてフラン誘導体の医薬品としての応用研究が行われ、Nitrofurazone が合成されたのを始め多数のニトロフラン誘導体が次々と合成されている。又、その抗菌作用、毒性や作用機作についても木村ら³⁾ の報告を始めとして数多くの報告がある。然し乍ら、これらの化合物の中、実用化されたものは数少く、しかも使用に限界があるためか続々と登場した抗生物質の蔭におもわれてしまつた感があつた。近年、サルファ剤や抗生物質に耐性のブドウ球菌、赤痢菌などが増加するに至り、之等抗菌性物質と交叉耐性を示さないニトロフラン化合物が再び斯界の注目を集めている。

ニトロフラン化合物の臨床応用化が遅々として進展しなかつたのは、一つには有用化合物を探索するための合成研究に於て、試験管内抗菌力が判定指標となり、生体内効力はそれが最終目標であるにも拘らずその試験法即ち感染防禦実験乃至治療実験が甚だ煩雑であるため第二義的に扱われていたためではないかと考えられる。従つて、簡便な生体内安定性試験乃至効果確認試験法が確立されるならば、合成研究の成果を大とし、更にはそれに新しい示唆を与えることも可能であると思惟する。

斯様な考えの下に一連の本研究に於てニトロフラン化合物の生物学的性質を生体内効果との関連性を目標として新に検討した。

先ずニトロフラン化合物の定量法であるが、之迄 Paul

et al⁴⁾, Buzard et al⁵⁾, 高木等⁶⁾, 柴田等⁷⁾ の化学的定量法と、生物学的方法として春日⁸⁾, 菅沼⁹⁾ の重層法が報告されている。著者の研究目的からすると薬剤の活性体のみを定量する生物学的定量法が合目的的であり、更に微量測定の見点からすると比濁法がその原理から適していると考えられる。ニトロフランの比濁法に就ては未だ報告をみないので、本報に於て著者はこの基礎的検討を行った。

実験方法および材料

試験菌としては *Escherichia coli* NIHJ 株を用いた。本菌を pH 7.0 のブイヨン斜面寒天培地上にて 37°C, 2日培養した後、室温に保存し1週間毎に植継いだ。

被検薬剤としては種々なる構造のニトロフラン化合物6種を用いた。その略号並びに化学構造は表1に示す通りである。いずれも結晶を dimethylformamide に 1mg/ml の濃度に溶解し、次に蒸留水にて稀釈して望む濃度とした。

基培地としては肉エキス(ミクニ化学製)0.5%, ペプトン(武田薬品製)0.5%, 食塩0.25%, pH 7.0 の培地を用いた。

感性曲線は基本として次の如き方法によつて求めた。保存試験菌の1白金耳を上記培地に接種し 37°C にて 18~20時間培養した。この前培養液を1%の濃度に前記と同一組成の培地に接種し、よく振盪し乍らその 4.5ml を 18×180mm の綿栓付試験管に分注する。これに夫々の濃度の薬剤液 0.5ml を加え 37°C にて 18時間培養し、その後直ちにフォルマリン 0.1ml を各試験管に加えてよく振盪後、634mμ 広域フィルター付光電比色計(島津製)を用い 15×150mm 試験管セルにて培養液の濁度を測定し、吸光度にて示した。1条件につき4本の試験管を用い、それらの濁度の平均値をもつて測定値とした。

先ず NF-3 を用いて条件を検討し、ついで5種の化合物に応用してみた。

* 藤沢薬品工業株式会社研究所

1960年10月14日受付

表1 供試ニトロフラン化合物

略号 (一般名又は商品名)	化学構造
NF-2 (Z-furan)	$R^*-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}_2$
NF-3 (Furazolidone)	$R-\text{CH}=\text{N}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{ } \end{array}$
NF-4	$R-\text{CH}=\text{C}-\text{CONH}_2$
NF-13 (Furaltadone)	$R-\text{CH}=\text{N}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{ } \end{array} \text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{ } \end{array}$
NF-16	$R-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{N}-\text{OH}$
NF-25	$R-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}_2$

図1 基本条件に於ける感性曲線
 試験菌: E. coli NIHJ 株
 培地: 肉エキス 0.5%, ペプトン 0.5%,
 NaCl 0.25%, pH 7.0
 培養: 37°C, 18 時間

実験結果および考察

A. NF-3 についての実験結果

感性曲線: 前述の方法に準じ NF-3 を用いて感性曲線を求めた。方眼紙上 X 軸に薬剤濃度を、Y 軸に濁度を取り、得られた測定値をプロットしこれらを結んだ。図1がその感性曲線である。1.6 mcg/ml の濃度で完全阻止がみられ、0.2~0.8mcg/ml の間で薬剤濃度差による発育度差即ち傾斜が得られている。

培地 pH 及び組成の影響: 菌接種直前に培地を 2N NaOH にて pH 6.0 (無修正), 7.2, 8.0 の各々に調節し、これらの培地を用いて他は基本条件のまま同時に感性曲線を求めた結果は図2の如くである。pH 8.0 の場合に傾斜が最も大きく、又、0.8mcg/ml にて完全発育阻止がみられ、微量測定には最も有利なので以下の実験では全て pH 8.0 の培地を用いることにした。

ブドウ糖を各濃度に添加した場合の感性曲線は図3の如くである。ブドウ糖の添加により試験菌の発育は良好となるが、0.5%, 2% の場合には感性曲線の傾斜は少くなっている。これは試験菌の薬剤感受性が低下していることを示し、従つて著者の目的とする微量定量にはブドウ糖の添加は不適当である。

酵母エキス (Difco 製) を各濃度に培地に添加せる場

図2 感性曲線に及ぼす培地 pH の影響

図3 感性曲線に及ぼす葡萄糖添加の影響

図5 感性曲線に及ぼすエタノール添加の影響

図4 感性曲線に及ぼす酵母エキスの影響

図6 感性曲線に及ぼす培養温度の影響

合の感性曲線は図4に示す如くで、この場合もブドウ糖の場合と同様に添加しない方が適当である。

エタノールを各濃度に培地に添加した場合の感性曲線は図5の如くである。5%の添加ではエタノールの発育抑制作用により試験菌の発育度が悪くなり、感性曲線の傾斜も殆どなくなる。2%添加では少々その発育抑制作用がみられるが、感性曲線の傾斜は無添加の場合と同程度であり、測定に応用した場合の感度、精度はエタノール無添加培地の場合と変わらないと思われる。エタノールの添加は後述の如く生体内薬剤濃度測定に有利であるので、この実験結果から以後の実験にはエタノール2%添加培地を用いることにした。

培養温度培養時間の影響： 培養温度を 28°C, 37°C

の各々とした場合を比較すると図6の如くであり、後者の場合に感性曲線の傾斜が大きく、37°Cの方が適当と考えられる。培養時間を18時間より長くした場合は図7に示す如く時間の推移と共に完全阻止濃度は高くなり、又低濃度に於ける感度も悪くなる。従つて18時間程度が適当と考えられる。

前培養時間の影響： 前培養を夫々16時間、20時間、48時間、72時間行つた培養液を接種菌に用いた場合の感性曲線は図8に示す如くである。前培養が48時間以上になると0.2~0.4mcg/mlの低濃度に於ける傾斜が少く、感度が悪くなる。各時間の前培養液の菌数を測定してみると夫々 2.8×10^8 , 3×10^8 , 5.4×10^8 , 6.6×10^8 cells

図7 感性曲線に及ぼす培養時間の影響

図8 感性曲線に及ぼす前培養時間の影響

/ml であつた。従つて、培地への接種菌量も夫々異なることになる訳であるが、この程度の単なる菌量差では感性曲線の感度に影響のないことが次項の実験結果より判明しているので、この場合の感度の低下は試験菌を24時間以上培養することによりその薬剤感受性が鈍くなる

ためと考えられる。前培養時間は18~20時間が適当である。

接種菌量の影響：18時間前培養液を種々の濃度にて接種し感性曲線を求めた結果は図9の如くである。この場合の接種直後の培地中の菌数及び濁度は表2に示す通りである。菌数は前培養液中の菌数を平板培養法で測定し、この値と稀釈率から計算したものである。図9にみ

図9 感性曲線に及ぼす接種菌量の影響

表2 接種菌量と接種直後の培地中菌数及び濁度との関係

接種菌量	接種直後の培地	
	菌数	濁度(吸光度)
0.01%	5.8×10^4 cells/ml	0.066
0.1	5.8×10^5	0.069
0.5	2.9×10^6	0.071
1	5.8×10^6	0.075
2	1.1×10^7	0.083
10	5.8×10^7	0.152

られる如く接種菌量と感性曲線の感度とは密接な関係があり、10%接種では1mcg/mlでも殆ど発育の阻止が認められない。一方、接種菌量を0.01%の如く余り少くすると試験菌の増殖が不良で感性曲線の傾斜は小さくなる。0.5%附近即ち菌数として 3×10^6 cells/ml程度の場合に最も感度の高い感性曲線が得られる。

以上の条件検討の結果より、感性曲線の傾斜が大きく、感度、精度に有利である条件を組合せることにより

次の如き比濁法が得られる。

- a. 試験菌 *Escherichia coli* NIHJ 株
- b. 前培養 肉エキス0.5%, ペプトン0.5%, 食塩0.25%, pH 6.0 の培地に試験菌—白金耳を接種し, 37°C, 18時間培養する。
- c. 試験培地 肉エキス0.5%, ペプトン0.5%, 食塩0.25%, エタノール2%。調製法は肉エキス, ペプトン, 食塩を溶解後 120°C にて20分滅菌して保存し, 使用に際してエタノールを加え, 更に 2N NaOH にて pH を8.0に調整する。
- d. 試験培養操作 18×180mm 綿栓付試験管に薬剤液(標準液又は検液) 0.5ml をとり, 次に前培養液を0.5%の濃度に接種した培地 4.5ml を加えて 37°C で18時間, 直立静置培養する。
- e. 薬剤液の調製 試料(ニトロフラン化合物)を di-methylformamide に 1mg/ml の濃度に溶解し, これを更に蒸留水にて望む濃度に希釈して標準液又は検液とする。培地中の濃度はその 1/10 となる。

表3 定量法の精度

試験管	発育度(吸光度)			* 算定濃度 (%)
	0.1 mcg/ml	0.15 mcg/ml	0.2 mcg/ml	
1	0.432	0.357	0.293	101
2	0.453	0.357	0.285	102
3	0.398	0.340	0.294	103
4	0.432	0.347	0.293	105
5	0.442	0.357	0.293	102
6	0.403	0.345	0.275	96
7	0.432	0.328	0.290	113
8	0.415	0.367	0.288	90
9	0.432	0.337	0.280	105
10	0.429	0.368	0.302	96
11	0.456	0.347	0.302	111
12	0.432	0.376	0.308	95
平均	0.430	0.352	0.292	101.6
最大標準偏差	0.032	0.026	0.018	13
〃 **	0.016	0.014	0.009	6.5
信頼限界	±0.053	±0.043	±0.029	±21.2
〃 **	±0.026	±0.022	±0.015	±10.6

* 0.15mcg/ml のものを検体とし 0.1, 0.2mcg/ml のものを標準として検体の力価を算定した値(B)と理論値(A=0.15mcg/ml)との比である。

$B/A \times 100(\%)$

** 4本の試験管の平均値を取った場合

f. 濁度測定 試験培養終了後, 各試験管に局方フォルマリン 0.1ml を加えてよく振盪し, 634mμ 広域フィルター付光電比色計を用いてその濁度を測定し吸光度にて示す。

g. 測定値の算定 方眼紙上, X 軸に薬剤濃度を, Y 軸に発育度(濁度)をとり, 標準液について得られた各濃度に対する発育度をプロットし之を結んで標準曲線とする。検体の発育度から図上でその薬剤濃度を算定する。

定量法の精度: 以上に設定された標準方法を実際に即して調べ, 誤差を検討してみた。NF-3 の 0.1, 0.15, 0.2mcg/ml 3種濃度の培地を入れた試験管を夫々12本用意し, 同時に培養して濁度を測定した。同一濃度に於けるバラツキを算定すると共に, 各濃度より無作為に1つ宛測定値をとつて3つで1組となし, この中の 0.1, 0.2mcg/ml のものを標準とし 0.15mcg/ml のものを検体とみなして発育度よりその濃度を算定した。これを12組について行い, これらの算定値からその誤差を計算した。結果は表3に示す如く1検液について4本の試験管を用いてその平均値をとるならばその最大標準偏差は6.5%で, 本定量法の誤差は実用範囲内にあることが判つた。

B. 6種化合物についての実験結果

NF-3 とこれと構造を異にする5種のニトロフラン化合物に(NF-2, 4, 13, 16, 25)について同時に標準曲線を画いてみた。結果は図10に示す通りである。各化合物

図10 各化合物の感性曲線

表4 最低可測濃度

化合物	濃度 (A)	発育度差 (B)	係数 (C)	最低可測濃度 (A/C)
NF 2	0.2	0.076	1.5	mcg/ml 0.13
NF 4	0.01	0.072	1.4	0.007
NF 25	0.02	0.035	0.7	0.028
NF 3	0.1	0.076	1.5	0.07
NF 13	0.2	0.052	1.0	0.20
NF 16	0.4	0.073	1.5	0.26

A: 濃度指数 1 の場合の薬剤濃度 mcg/ml

B: 濃度 0 培地と 濃度 1 (指数) 培地との発育度差 (吸光度)

C: B を発育度有意差値 0.050 で除した値

の抗菌力の強弱により標準曲線を描く薬剤濃度範囲も当然異なるので X 軸には薬剤濃度指数をとった。

図 10 の各標準曲線と表 3 の発育度誤差値より各薬剤の最低可測濃度 (培地中) を算定すると表 4 の如くなる。本表の成績は本比濁法の微量定量法としての性能を示すものである。

次に図 10 に示された各標準曲線の傾斜の度合、即ち薬剤濃度差による発育度差を調べた。この場合完全阻止濃度が夫々異なる薬剤間の比較をするのであるから、薬剤濃度差とは絶対値を意味するのではなく完全阻止濃度を 1 とした場合の比率値でなければならない。そこで図 10 を用いて各薬剤の濃度 x に於ける部分阻止率を次式によつて求め、更に完全阻止濃度の 1/2 濃度に於ける部分阻止によつて各薬剤の標準曲線の傾斜の度合を比較した。

薬剤濃度 x に於ける

$$\text{阻止率 (\%)} = \left(1 - \frac{D_x - D_{100}}{D_0 - D_{100}}\right) \times 100$$

D₁₀₀ = 完全阻止濃度に於ける発育度D₀ = 薬剤濃度 0 に於ける発育度D_x = 薬剤濃度 x に於ける発育度

結果は表 5 に示す通りであつて、完全阻止濃度の 1/2

表5 各化合物の発育阻止率の比較

化合物	各濃度に於ける阻止率* (%)					MIC の 1/2 濃度 (mcg/ml)		A, B に於ける阻止率	
	2	4	6	8	10	A**	B**	A	B
NF 2	68	89	100	100	100	0.6		78	
NF 4	65	82	97	99	100	0.04		82	
NF 25	32	63	78	88	98		0.10		70
NF 3	65	78	96	99	99	0.4		78	
NF 13	41	72	89	98	99	1.0	0.8	84	72
NF 6	65	83	98	100	100	1.6	1.2	83	74

* 濃度は指数で示した

** A は 99% 阻止以上を MIC とした場合の値

B は 98% 阻止を MIC とした場合の値

濃度に於ける部分阻止率はいずれも実験誤差範囲内に於て同値である。この結果から上記 6 種化合物は同じ感性曲線を作ることが判り、従つて本比濁法により相互間の抗菌力の比較が可能である。

総 括

ニトロフラン化合物の比濁定量法を検討した。Escherichia coli を試験菌とし Furazolidone を用いて感性曲線を検討した結果、培地 pH, 培養時間、接種菌量が薬剤の抗菌力と密接な関係にあることを認めた。

pH 8.0 の肉エキス培地を用い、菌接種量 3×10^6 cells/ml, 18 時間培養する方法で NF-3 につき約 0.05 mcg/ml まで測定可能な感性曲線を得た。

本法の誤差は 1 検液について 4 本の試験管を用いて繰返し実験を行う場合にはその最大標準偏差は 6.5% である。

種々のニトロフラン化合物の感性曲線を検討したが、供試した acid amide 型 3 種, aminooxazolidone 型, morpholinomethyloxazolidone 型, oxim 型 各 1 種の夫々の感性曲線は何れも同様な形状を示した。

(文献は第 3 報末尾に一括掲載する)

Summary

Optimum conditions were investigated for the turbidimetric determination of furazolidone using Escherichia coli, as the test organism, and meat extract medium.

The sensitivity of E. coli to the drug was affected by the pH of the medium, incubation period, and inoculum size. The optimum growth curve was obtained by using the medium containing 0.5 per cent meat extract, 0.5 per cent pepton, 0.25 per cent sodium chloride, 2 per cent ethanol, at pH 8.0, by inoculating 3×10^6 cells/ml. of the test organism, and incubating for 18 hours at 37°C. By using this standard growth curve, it is possible to determine a concentration as low as about 0.05 mcg/ml. of furazolidone.

When four tubes were used for one test solution, the maximum standard deviation in this method was approximately 6.5 per cent.

All the growth curves obtained of different types of nitrofuranderivatives (3 of acid amide type, each one of aminooxazolidone type, morpholinomethyloxazolidone type and oxim type) were almost the same in shape.

Research Laboratory, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.