UDC 615.778.25-034

285. 宇野豊三, 河野昌雄: スルフイソキサゾールの体内変化に関する研究

(第5報^{*1}) N^1 -Acetylsulfisoxazole の腸内細菌

による脱アセチル化について

Toyozo Uno and Masao Kono: Studies on the Metabolism of Sulfisoxazole. V.

On the Deacetylation of N^1 -acetylsulfisoxazole by Intestinal Bacteria.(Pharmaceutical Faculty, Kyoto University^{*2})

In order to clarify the mode of deacetylation of N^1 -acetylsulfisoxazole by enteric bacteria, examinations were made on the washed cell suspension of *Escherichia coli communior*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Streptococcus faecalis* R. All these three kinds of bacteria effected deacetylation, the rate of deacetylation increasing with increasing pH in the range of pH 4~9, and *E. coli* was found to have the highest deacetylation effect. It follows, therefore, that deacetylation of N^1 -acetylsulfisoxazole in the intestine is due partly to the enteric bacteria, such as the foregoing three kinds, present in the intestines, as well as by enteric juice, enteric membrane, and digestive enzyme. It was also found that deacetylation by these bacteria decreased on addition of glucose.

(Received February 6, 1961)

スルフイソキサゾールは苦味を有するが、その誘導体の N^1 -acetylsulfisoxazole は無味で同程度の抗菌力を示すことから、臨床に適用されている¹⁻³⁾。 N^1 -acetylsulfisoxazole は胃液では殆んど脱アセチル化しないが、腸液、腸粘膜、腸内消化酵素、人工腸液など^{1,4)} で脱アセチル化されてスルフイソキサゾールを生成することが報告されている。有田⁵⁾ はチオアセタゾンの脱アセチル化が *Streptococcus faecalis* R により促進されることを報告しており、著者等も、 N^1 -acetylsulfisoxazole の腸内での脱アセチル化には腸内に生息する細菌も関与するのではないかと考えた。そこでこの点を明らかにする目的で腸内に生息する細菌の中 *E. coli communior*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecalis* R の3種について純粋培養を行ない、 N^1 -acetylsulfisoxazole の脱アセチル化について検討を行なった。

まず3種の細菌の N^1 -acetylsulfisoxazole 脱アセチル化作用の有無を知るため、 N^1 -acetylsulfisoxazole 100 γ /cc および乾燥菌量 10 mg/cc を含む pH 7.4 の洗浄体浮遊液を 37° で5時間反応させた後、ペーパークロマトグラフィーにより検索したところ、いずれの細菌においても N^1 -acetylsulfisoxazole のスポットの他にスルフイソキサゾールのスポットを確認し得た。したがって、この3種の細菌は何れも N^1 -acetylsulfisoxazole の脱アセチル化作用を有することを知った。

Fig. 1.

Influence of pH on Deacetylation of N^1 -Acetylsulfisoxazole by Various Bacteria

- *E. coli communior*
- ×—× *Lactobacillus acidophilus*
- *Streptococcus faecalis* R
- △---△ Reference

*¹ 第4報: 本誌 81, 1496(1961).*² Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) L. O. Randall, et al.: Antibiotics & Chemotherapy 4, 877(1954).

2) H. L. Elmer, G. M. William: Ibid. 5, 609(1955).

3) 西村, 中島, 島岡: 塩野義年報 5, 36(1955).

4) 水上, 永田: 塩野義年報 6, 58(1956).

5) 有田: 本誌 76, 993(1956).

つぎに反応時の pH と脱アセチル化率の関係を知るため, N^1 -acetylsulfisoxazole 100 γ /cc および乾燥菌量 10 mg/cc を含む pH 4~9 の洗浄菌体浮遊液を 37° で 3 時間反応させた後, 未変化の N^1 -acetylsulfisoxazole と脱アセチル化して生成したスルフィソキサゾールの量を紫外吸収スペクトル法¹⁾により測定し, その脱アセチル化率を求め Fig. 1 に示す結果を得た. 3 種の細菌はいずれも pH を高くする程脱アセチル化率は高くなり, 特にアルカリ性側において高い脱アセチル化率を示す. 一方, 細菌を加えなかつた対照液については Fig. 1 に示すように殆んど脱アセチル化は進行しない.

なお, 腸内の pH は一般に約 8.4 までと考えられるので, 下記実験においては pH 7.4 と 8.4 について検討することにした.

ついで反応時の時間と脱アセチル化率の関係を知るため, N^1 -acetylsulfisoxazole 100 γ /cc および乾燥菌量 10 mg/cc とした pH 7.4 と 8.4 の洗浄菌体浮遊液を用いて時間的にその脱アセチル化率を測定したところ, pH 7.4 の場合は Fig. 2, pH 8.4 の場合は Fig. 3 に示す結果を得た. *E. coli communior* は pH 7.4, 8.4 共に 8 時間で脱アセチル化を完了するに対し, *Lactobacillus acidophilus* および *Streptococcus faecalis* R ではそれより長時間を要し pH 8.4 において 12 時間で脱アセチル化を完了することを認めた.

Fig. 2. Relationship between Time of Incubation and Deacetylation of N^1 -Acetylsulfisoxazole at pH 7.4 by

(•—•) *E. coli communior*,
(×—×) *Lactobacillus acidophilus*, and
(○-----○) *Streptococcus faecalis* R.

Fig. 3. Relationship between Time of Incubation and Deacetylation of N^1 -Acetylsulfisoxazole at pH 8.4 by

(•—•) *E. coli communior*,
(×—×) *Lactobacillus acidophilus*, and
(○-----○) *Streptococcus faecalis* R.

有田⁵⁾ はチオアセタゾンの脱アセチル化を検討した時, *Streptococcus faecalis* R の洗浄菌体浮遊液にブドウ糖を添加した時にはその脱アセチル化が殆んど行なわれないことを報告している. そこで N^1 -acetylsulfisoxazole についても同様にブドウ糖添加による影響の検討を行なつた. N^1 -acetylsulfisoxazole 100 γ /cc, 乾燥菌量 10 mg/cc を含む pH 7.4 と 8.4 の洗浄菌体浮遊液に 1% の割合にブドウ糖を添加したものについて, 時間的にその脱アセチル化率および pH の変動を測定し Table I に示す結果を得た. Table I より, pH は時間の経

Table I. Deacetylation of N^1 -Acetylsulfisoxazole in the Presence of Glucose

pH at the beginning of incubation	Bacteria	Time of incubation (hr.)						
		0.5	1	2	4	8	12	
7.4	<i>E. coli communior</i>	Deacetylation (%)	8.4	12.1	14.9	17.4	18.7	19.5
		pH	6.2	5.5	4.8	4.7	4.7	4.6
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Deacetylation (%)	2.5	4.1	5.6	8.1	9.3	10.1
		pH	5.8	5.2	4.3	4.0	3.7	3.7
	<i>Streptococcus faecalis</i> R	Deacetylation (%)	0.4	0.9	2.0	3.8	5.0	6.2
		pH	4.8	4.6	4.3	4.2	4.1	4.0
8.4	<i>E. coli communior</i>	Deacetylation (%)	11.8	14.9	20.3	23.7	25.8	27.0
		pH	6.5	5.8	5.0	4.9	4.3	4.7
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Deacetylation (%)	7.1	8.4	9.2	9.9	10.8	11.9
		pH	6.2	5.6	4.5	4.1	3.8	3.7
	<i>Streptococcus faecalis</i> R	Deacetylation (%)	3.0	5.1	6.9	8.6	9.0	9.2
		pH	5.0	4.6	4.4	4.2	4.1	4.0

過と共に次第に酸性に傾き、それにつれて脱アセチル化の速度も減少している。そしてブドウ糖添加をしない場合の Fig. 2, 3 と比較して非常に低い脱アセチル化率を示している。pH と脱アセチル化率の関係 (Fig. 1) に示されているように pH が酸性に傾けばその脱アセチル化は減少しているので、この場合も添加したブドウ糖の醗酵により有機酸を生じ pH が酸性に傾き、このために脱アセチル化反応の速度が減少したのではないかと考えられる。

以上の結果、*E. coli communior*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecalis* R の3種の細菌はいずれも N¹-acetylsulfisoxazole の脱アセチル化を行ない、その脱アセチル化は pH 4~9 の間では pH が高くなるほど促進され、*E. coli communior* は他の2種の細菌と比較して高い脱アセチル化率を示す。したがって N¹-acetyl-sulfisoxazole の腸内での脱アセチル化には腸内に生息しているこれらの細菌も関与することが明らかとなった。

またブドウ糖を添加すると脱アセチル化は減少することを認めた。

実 験 の 部

試 薬 0.5% N¹-acetylsulfisoxazole 液；N¹-acetylsulfisoxazole⁶⁾ の微細粉末 500 mg を蒸留水で 100 cc とし使用時振りまぜる、緩衝液；Clark-Lubs 緩衝液 (pH 4, 5, 6, 7, 7.4, 8, 8.4, 9)。

洗浄菌体浮遊液 *E. coli communior* の場合はブドウ糖ブイヨン寒天培地、*Lactobacillus acidophilus* および *Streptococcus faecalis* R の場合は乾燥酵母エキスを 0.5% の割合に添加したブドウ糖ブイヨン培地に 37° で 18 hr 培養した後、菌体を集め、蒸留水で数回十分に洗浄後、菌体を少量の蒸留水に浮遊させその 1 cc 当りの乾燥菌量を求め、各緩衝液に菌体液および 0.5% N¹-acetylsulfisoxazole 液を適当な割合に加えて全体として目的の乾燥菌量および N¹-acetylsulfisoxazole を含む洗浄菌体浮遊液を調製し検体とする。

ペーパークロマトグラフィー 洗浄菌体浮遊液中の N¹-acetylsulfisoxazole およびスルフィソキサゾールの確認に用いたペーパークロマトグラフィーは下記の通りである。

試料の調製：洗浄菌体浮遊液に同量の EtOH を加えて混和後、汙過し汙液を試料とする。

汙紙：東洋汙紙 No. 51, および pH 7.4 の緩衝液に浸して風乾した東洋汙紙 No. 51。

展開溶媒：MeOH・iso-AmOH・benzene・H₂O (4:2:2:1), BuOH・PrOH・H₂O (2:1:1)。

他の条件および呈色試薬は第1報⁷⁾と同様である。

N¹-acetylsulfisoxazole およびスルフィソキサゾールの R_f 値を Table II に示す。

Table II. R_f-Value of N¹-Acetylsulfisoxazole and Sulfisoxazole

Solvent		Paper	N ¹ -Acetylsulfisoxazole	Sulfisoxazole
MeOH	4	Toyo Roshi No. 51	0.87	0.63
iso-AmOH	2			
benzen	2			
H ₂ O	1			
BuOH	2	Toyo Roshi No. 51 treated with buffer solution (pH 7.4)	0.90	0.59
PrOH	1			
H ₂ O	1			

脱アセチル化率の測定 検体である洗浄菌体浮遊液 1 cc を取り、iso-PrOH で 10 cc としよく混和後、東洋汙紙 No. 5B で汉過し、汉液につき、Randall 等¹⁾の UV スペクトルによる分離定量法 (測定波長 272 mμ および 292 mμ) により N¹-acetylsulfisoxazole ならびにスルフィソキサゾールの濃度を測定し脱アセチル化率を算出する。

本研究に当り御便宜を賜わった京都大学 掛見喜一郎教授ならびに御助言を賜わった有田隆一助教授に謹謝します。また、本研究に使用した細菌の中 *E. coli communior* は医学部微生物学教室、*Lactobacillus acidophilus* は農学部農芸化学科醗酵生理学教室および *Streptococcus faecalis* は医学部付属病院栄養治療室保存のものをそれぞれ分与して戴いたものであり、付記して感謝します。

京都大学薬学部

6) 加納, 牧角, 緒方: 塩野義年報 5, 32(1955).

7) 宇野, 河野: 本誌 80, 201(1960).