2-Nitrobenzofuran 誘導体の化学療法的研究¹⁾

栗山 澄, 松沢幹彦, 宇野政栄, 大石義孝, 池本雅彦
科研薬化工株式会社京都研究所²⁾

Chemotherapeutic Studies on 2-Nitrobenzofuran Derivatives¹⁾

KIYOSHI KURIYAMA, MIKIHICO MATSUZAWA, MASAE UNO,
YOSHITAKA OHISHI and MASAHICO IKEMOTO
Kyoto Research Institute, Kaken-yaku Kako Co., Ltd.²⁾

(Received July 22, 1977)

Antibacterial activities of 2-nitrobenzofuran derivatives (NBFD) against 8 strains of gram-positive and -negative bacteria were comparable to nitrofurantoin, or somewhat more potent than that. Elongated cells were occasionally observed in the culture medium containing NBFD. When NBFD (12.5—100 mg/kg) was orally administered to rats, the metabolites excreted in urine also showed antibacterial activity. The antibacterial spectrum of the urinary metabolites, however, was different from that of the intact compound. The cytotoxicity of NBFD and nitrofurantoin was examined using cultured chick embryo fibroblasts. The inhibition of cell multiplication appeared in the concentration range of 0.39—25 µg/ml.

It was noted that in the case of 7-substituted NBFD the compound which possessed a high antibacterial activity indicated a low cytotoxicity. A reverse relationship between antibacterial activity and cytotoxicity seemed to depend on the size of a substituent in the 7-position of NBFD.

Keywords—benzofuran derivative; nitrofuran drug; cultured chick embryo fibroblast; minimum inhibitory concentration; urinary excretion and plasma level; cytotoxicity; structure-activity relationship; *in vitro* antibacterial activity; nitrofurantoin

従来のフラン剤の化学構造は、そのほとんどすべてが、2-置換-5-ニトロフランの基本型を有している。ごく最近になって Royer ら³⁾ は furan 環に benzene 環が縮合した benzofuran 環をもつ 2-nitrobenzofuran 型化合物を合成し、それらの抗微生物活性について若干の知見を報告している。

一方我々は独自に数多くの benzofuran 誘導体の合成と、それらの抗菌活性スクリーニングを行っているなかで、比較的強力な抗菌作用を有する十数種類の 2-nitrobenzofuran 誘導体を見出し、それらの尿路感染症治療剤としての可能性について若干の生物学的検討を行ったので報告する。

実 験 の 部

被検化合物 Chart 1 に示した 13 種類の 2-nitrobenzofuran 誘導体 (以下 NBFD と略す) はすべて当研究所において合成され、それぞれ元素分析、赤外線吸収スペクトルおよび核磁気共鳴スペクトルを用いて、その化学構造を確認したものである。⁴⁾ また対照薬として用いた 1-(5-nitro-2-furfurylideneamino)hydantoin (nitrofurantoin; 以下 NF と略す), 3-dihydroxymethylamino-6-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-1,2,4-triazine (Panfuran-S; 以下 PNS と略す) および 1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid (nalidixic acid; 以下 NA と略す) の 3 剤は、フラダンチン C (山之内製薬), パンフラン S (富山化学) およびウイントマイロン (第一製薬) よりそれぞれ適当な溶媒で抽出、再結晶した元素分析値の一致したものをを用いた。

実験方法 1) 試験管内抗菌活性の測定—Table I に示したグラム陽性および陰性の 8 種類の菌に対する *in vitro* での minimum inhibitory concentration (MIC) を寒天平板希釈法にて検討した。すなわち被検化合物

1) 日本薬学会第 96 年会で発表, 名古屋, 1976 年 4 月。

2) Location: Sinomiya, Yamashina-ku, Kyoto.

3) J.P. Buisson, R. Cavier, J. Lemoine, L. Rene, R. Royer, *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.*, 1975, 43 (1975).

4) 日本薬学会第 96 年会, 名古屋, 1976 年 4 月。

Chart 1

の各濃度含有の寒天平板に、20 時間培養ブイオン菌の 1 白金耳を画線し、37° 24 時間培養後、接種菌の増殖が完全に阻止された平板の濃度 (μg/ml) をもって被検化合物の MIC とした。

2) 試験菌の形態変化——Heart Infusion ブイオン (栄研製) 5 ml に MeOH に溶解した試料 0.25 ml を加え、最終ブイオン濃度が MIC の 1/2—1 MIC 付近になるようにした。37° 24 時間静置したのち、*Salmonella enteritidis* No. 11, *Escherichia coli* ATCC 8739, または *Shigella flexneri* 2a の 1×10^6 /ml 菌液を 1 白金耳加え、37° 24 時間培養後、増殖菌をメチレンブルー染色してその形態変化を観察した。

3) ラットにおける抗菌活性物質の尿中排泄および血中濃度——NBFD および対照薬 3 剤の所定量を 10% アラビアゴム水溶液に懸濁し、18 時間絶食させた 200—300 g の Wister 系雄ラットに 10 ml/kg あて強制経口投与した。尿採取はラットを nembutal 麻酔下にて外尿道口を結紮し下腹部を開腹後、被検化合物投与直前、投与 2, 4, 6, および 8 時間後に、膀胱より注射針にて行った。また採取尿の抗菌活性の測定は、paper disc method により行った。すなわち径 8 mm の disc (東洋ロ紙製) に 0.05 ml の採取尿を含ませ乾燥後、常法により作成した *E. coli* 寒天平板培地上に置き、37° 20 時間培養後、菌増殖阻止円の有無を観察した。さらに最終時点の尿採取後採血し、血清中の *E. coli* に対する抗菌活性物質の存否を、尿の場合と同様の方法で調べた。

4) ラット尿中活性物質の各試験菌に対する抗菌活性比——200 g の Wister 系雄ラットに、10% アラビアゴム水溶液に懸濁した NBFD 9 の 100 mg/10 ml/kg を強制経口投与し、前記と同様の方法にて薬剤投与後 4 時間までの尿を採取した。その低温濃縮液の 8 種の菌に対する抗菌力を前記と同じ寒天平板希釈法で測定し、*Bacillus subtilis* に対する抗菌力を基準とした時の他の試験菌に対する抗菌活性比を求め、投与前のそれと比較した。

5) 培養鶏胎児線維芽細胞に対する作用——a) 供試培養細胞：10 日令白色レグホーン発育胚より、頭部四肢内臓を除去し細切したものを 0.25% Trypsin 液 (Difco 製) にて 37° 10 分間消化後、その消化液を細胞ろ過器でろ過し、そのろ液を低速遠心して細胞沈渣を得た。この沈渣を適量の培養液に懸濁して、neutral red で染色し、Tatai 式血算板で生細胞数を計測した。さらに最終培養液 ml 当たりの生細胞数が $80-100 \times 10^4$ 個になるように培養液を加えて調整したのち、4 オンス培養びん (細胞定着面の面積が約 15 cm² のもの) に 5 ml ずつ分注した。37° 24 時間静置培養し、生育した単層鶏胎児線維芽細胞 (以下 CEF と略す) を以下の実験に供した。なお培養液は Eagle's minimum essential medium に 3% の L-glutamine 水溶液を 1% (v/v) で、fetal calf serum (GIBCO 製) を 2—5% (v/v) の割合でそれぞれ加え、5% NaHCO₃ にて pH 7.0—7.2 に調整したものをを用いた。

b) 被検化合物の添加および細胞増殖に対する作用：供試培養細胞の培養液を新規作成の培養液 5 ml に置き換えた後、最終濃度が所定量となるよう被検化合物の MeOH 溶液 0.02 ml を加えた。37° 48 時間培養したのち 10% 中性ホルマリン液にて固定し、Jenner Gimsa 染色にて各種の細胞変化を顕微鏡下で観察した。他方同様の処理した培養細胞に、crystal violet 0.02% および EDTA 0.02% を含む 0.1 M クエン酸溶液 (少量の formalin を加えたもの) 3 ml/bottle を加え、37° で静置した。24 時間後溶液中に浮遊する染色された核数をカウントし、培養びん当たりの細胞数を対照群と比較して被検化合物の細胞増殖抑制制度を求めた。

実 験 結 果

1) 試験管内抗菌活性

8 菌種の試験菌に対する供試 NBFD 1—13, NA, NF, および PNS の MIC を Table I に示した。活性に強弱はあるがほとんどの供試 NBFD において試験菌のグラム染色性に関係なく抗菌活性が認められた。なかでも NBFD 3, 4 および 8 等では NF と同程度の作用がみられたが、PNS のそれには及ばなかった。また NA や PNS に比べ NBFD は NF と同様、他試験菌に対するよりも *Proteus vulgaris* や *Pseudomonas aeruginosa* に対して抗菌力が弱かった。

2) NBFD による試験菌の形態変化

E. coli, *S. enteritidis* または *S. flexneri* の試験菌の Heart Infusion ブイオンに NBFD 4 を添加して培養す

TABLE I. Antibacterial Activity of NBFD, NA, NF and PNS (MIC: $\mu\text{g/ml}$)

Compd.	<i>St. aur.</i> ^{a)}	<i>B. sub.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typh.</i>	<i>S. ent.</i>	<i>S. flex.</i>	<i>P. vul.</i>	<i>Ps. aer.</i>
NBFD 1	50	50	6.25	6.25	12.5	6.25	50	>50
2	25	1.56	1.56	3.13	6.25	1.56	25	>50
3	12.5	0.39	1.56	3.13	6.25	3.13	12.5	>50
4	12.5	0.78	0.78	6.25	12.5	3.13	12.5	>50
5	25	6.25	6.25	50	50	25	25	>50
6	>50	12.5	12.5	>50	>50	>50	>50	>50
7	6.25	25	6.25	6.25	6.25	6.25	50	>50
8	12.5	0.10	0.78	1.56	3.13	0.78	25	50
9	>50	1.56	1.56	6.25	12.5	6.25	>50	>50
10	>50	0.39	1.56	25	>50	25	>50	>50
11	12.5	0.39	12.5	>50	>50	>50	>50	>50
12	25	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	>50	>50
13	12.5	1.56	6.25	12.5	12.5	6.25	25	>50
NA	50	12.5	1.56	1.56	3.13	1.56	3.13	>50
NF	25	12.5	6.25	12.5	12.5	6.25	50	>50
PNS	0.78	0.39	0.10	0.39	0.39	0.39	6.25	50

a) *St. aur.*: *Staphylococcus aureus* 209P; *B. sub.*: *Bacillus subtilis* PCI 219; *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 8739; *S. typh.*: *Salmonella typhimurium* 1406; *S. ent.*: *Salmonella enteritidis* No. 11; *S. flex.*: *Shigella flexneri* 2a; *P. vul.*: *Proteus vulgaris* OX-19; *Ps. aer.*: *Pseudomonas aeruginosa* Shioji.

ると Fig. 1 に示すような正常菌の数倍の長さの菌が正常菌に混在して多数出現した。

3) ラットにおける抗菌活性物質の尿中排泄

実験結果を Table II に示した。ラットに NBFD を 100 mg/kg 経口投与して、投与後 8 時間まで *E. coli* に対して抗菌活性を示す尿排泄が認められたのは、NBFD 9 だけであり、その場合でも 50 mg/kg までは活性尿が持続排泄しているが、25, 12.5 mg/kg ではそれが急速に低下した。それに対して NA および NF の活性尿排泄は、3.13, 12.5 mg/kg という低用量でも 8 時間まで持続しており、NBFD に比べてはるかにすぐれた作用を有していた。しかし PNS は *E. coli* に対する MIC が他

剤よりもすぐれているにもかかわらず活性尿の排泄は高用量 (100 mg/kg) でもごくわずかしき認められなかった。また投与 8 時間後の血清の *E. coli* に対する抗菌性は NBFD 9 と NA の 2 化合物においてわずかに認められたにすぎなかった。

4) ラット尿中活性物質の各種試験菌に対する抗菌活性比

NBFD 中で *E. coli* に対する抗菌活性物質の排泄が最もすぐれていた NBFD 9 について、その濃縮尿の各試験菌に対する抗菌力を測定し、投与前のそれと比較した。Fig. 2 に示すように NBFD 9 では *B. subtilis* を基準とした場合の他の試験菌に対する抗菌活性比には余り著しい差が認められないが、代謝物を含むと考えられる活性尿では大きな差が認められた。

5) 培養鶏胎児線維芽細胞増殖に対する作用

実験結果を Table III に示した。7 位に各種置換基を有する 6 種類の供試 NBFD は、25-0.4 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲内で、程度の差はあるがいずれの化合物でも CEF に対する細胞毒性が認められた。すなわち NBFD 1,2,3,5 および 6 の化合物は高濃度において Fig. 3-c, d に示したように核濃縮、核および細胞質の崩壊を伴う極めて強い細胞毒性を招来し、Fig. 3-a に示したような正常な細胞はほとんど見られなかった。特に NBFD 1, 2 および

Fig. 1. Morphological Changes induced in Cells of *E. coli* by NBFD 4 (0.78 $\mu\text{g/ml}$) [$\times 500$]

TABLE II. Urinary Excretion and Plasma Level after Oral Administration of NBFD, NA and PNS in Rat

Compd.	Dose (mg/kg)	Urinary activity ^{a,b)} Elaspe time after admin. (hr)				Serum activity ^{a,b)} at last urine collection
		0-2	2-4	4-6	6-8	
NBFD 1	100	+	-	-	-	-
3	100	-	-	-	-	-
4	100	+	+	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
8	100	-	-	-	-	-
9	100	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	25	-	+	+	-	-
	12.5	-	+	-	-	-
NA	3.13	+	+	+	+	+
	1.56	+	+	+	-	+
	0.40	+	+	+	-	+
NF	12.5	+	+	+	+	-
	6.25	+	+	+	-	-
	3.13	+	+	+	-	-
PNS	100	+	+	+	-	-
	50	+	-	-	-	-

a) test organism: *E. coli* ATCC 8739.

b) (+): detectable with paper disk method.

(-): not detectable with paper disk method.

Fig. 2. Antibacterial Spectrum of NBFD 9 and Its Active Substance in Urine after Oral Administration in Rat

6 では 0.39 $\mu\text{g/ml}$ という低濃度でも強い細胞毒性が認められた。一方 NBFD 4 は供試 NBFD 中細胞毒性が最も弱く、高濃度でも Fig. 3-b に示した NF とほぼ同程度の作用で正常細胞もかなり見られた。また NBFD 4 および NF では細胞増殖は抑制されるが CEF 特有の細胞質の伸びは全く抑制されなかったのに対して、他の NBFD では細胞が球形化を起こしており、時によっては細胞核の肥満化がみられることもあった。さらに全ての供試化合物において、用量依存性は見られなかったが、正常細胞には見られない多核細胞が随所に観察された。

Fig. 3. Chick Embryo Fibroblast treated with NF, NBFD 2 and NBFD 6 [$\times 50$]

a) not treated, b) NF (concd. 25 $\mu\text{g/ml}$), c) NBFD 2 (concd. 25 $\mu\text{g/ml}$), d) NBFD 6 (concd. 25 $\mu\text{g/ml}$); cultured 48 hr 37°.

TABLE III. Influence of NBFD and NF on Cultured Chick Embryo Fibroblast

Compd.	Concn. ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition ^{a)} of cell multiplication	Inhibition of cytoplasmic development	Picnosis	Nuclear collapse	Cytoplasmic collapse
NBFD 1	25	###	+	+	+	+
	6.25	###	+	+	+	+
	1.56	###	+	+	+	+
	0.39	###	+	+	+	+

2	25	###	+	+	+	+
	6.25	##	+	+	+	+
	1.56	##	+	+	+	+
	0.39	##	-	+	+	+
3	25	##	+	+	+	+
	6.25	##	+	+	+	+
	1.56	##	+	+	+	+
	0.39	+	-	+	+	+
4	25	+	+	+	-	-
	6.25	+	-	+	-	-
	1.56	+	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-
5	25	###	+	+	+	+
	6.25	##	+	+	+	+
	1.56	##	+	+	+	+
	0.39	+	-	+	+	+
6	25	###	+	+	+	+
	6.25	##	+	+	+	+
	1.56	##	+	+	+	+
	0.39	##	-	+	+	+
NF	25	+	-	+	+	+
	6.25	+	-	-	-	-
	1.56	+	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-

a) ###: 90% or more; ##: 70—90%; #: 50—70%; #: 30—50%; +: 10—30%; -: 10% or less.

Fig. 4. Relationship between Inhibition of Cell Multiplication in Chick Embryo Fibroblast and Antibacterial Activity of 7-Substituted-2-Nitrobenzofuran

Inhibition of cell multiplication in CEF; □: 0.39 µg/ml; ▨: 25 µg/ml.
Antibacterial activity; ▤: *St. aureus*; ▥: *E. coli*.

Fig. 4 に各種 NBFD の細胞増殖抑制制度と抗菌力との関係を示した。すなわち横軸に NBFD の 7 位置換基を水素、水酸基、 C_{1-4} alkoxy 基の順にならべ、縦軸にそれらの CEF に対する細胞増殖抑制制度を 5 段階に、また *S. aureus* と *E. coli* に対する抗菌力を ethoxy 基の MIC を 1 として 5 段階に表わした。

考 察

我々はニトロフラン系抗菌剤に類縁の十数種の NBFD について、抗菌性と一般細胞毒性との関係にも一部着目しながら、尿路感染症への応用の可能性を中心に若干の生物学的検討を加えた。その結果 *in vitro* での抗菌活

性は、グラム染色性に関係なく強く、市販の化学療法剤と同程度と考えられるものも少なくない。しかしそのスペクトラムおよび MIC は既存のフラン剤の域を脱しえない。またその作用様式は、 $1/2-1$ MIC の濃度において *E. coli* 等が一部異常伸長する事から、何らかの作用によって細胞分裂調節機能が阻害されるのであらうと考えられる。またこのような現象は、一部のフラン剤でも認められており、⁵⁾ NBFD の作用機序もまた従来のフラン剤の範囲に入るものであらうと思われる。⁶⁾

一方ラットに NBFD を経口投与した場合、活性物の尿中排泄は極めて悪く、また血中での活性の持続もほとんど見られなかった。これらの現象は、一義的には消化管吸収が悪いためと考えられるが、投与前の NBFD と活性尿とで各試験菌に対する活性比が大きく異なる事から、薬物の生体内代謝による不活化も考えられる。

またこの種の抗菌化合物では、一般細胞への毒性発現量と抗菌性発現量が抗生物質の場合程離れていないことが多い。そこで我々はその一端をさぐるべく 7 位に種々の置換基をもつ NBFD の CEF に対する毒性を検討し、それと抗菌活性との関係について考察してみた。すなわち 7 位に異なる 6 種の置換基を有する NBFD について CEF に対する細胞毒性を検討してみた結果、抗菌性発現量に近い濃度で動物細胞に致死的な種々の変性を伴う強い細胞増殖抑制作用がみられた。このことは NBFD が抗菌作用と同様の機作で動物細胞に対して毒性を示すのではないかということを示唆した。しかしそのなかで NBFD 4 だけが、比較的強い抗菌活性を示す一方、NF と同程度の弱い細胞毒性しか示さなかった事に興味をもたれた。さらに Fig. 4 をみると、7 位置換基の大きさによって抗菌活性と細胞増殖抑制制度とが逆の関係で変化をしていることがわかる。すなわち ethoxy 基を中心として 7 位置換基が大きくなっても小さくなくても抗菌活性は低下し、細胞毒性は増大している。この現象は広い意味での動物細胞と細菌細胞での NBFD の膜透過性の相違によるものであらうと予測されるが今後の研究に負うところが大きい。

以上 13 種の 2-nitrobenzofuran 誘導体について若干の化学療法的検討を行ってきたが供試化合物は *in vitro* での抗菌作用様式が従来のニトロフラン剤の域を脱しえず、また *in vivo* への応用も難しいことが示唆された。

5) 小池聖淳, 飯田恭子, 中島幸一, *Chemotherapy* (Tokyo), 22, 1146 (1974).

6) M.H.L. Green, J. Donch, J. Greenberg, *Mutat. Res.*, 8, 409 (1969); W.E. Waterbury, J. Boydstun, A.G. Castellani, R. Freedman, J.J. Gavin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1966, 339-344 (1966).