

KP01 ビス型第四アンモニウム塩系化合物の構造と制菌・細胞毒性

(名大院生命農) ○大倉 一人

(徳大工) 助野 晃子、長宗 秀明、前田 拓也、高麗 寛紀

はじめに

MRSA などの院内感染症が社会問題となるなか安全にバクテリアなどの除去を行うことは非常に重要な問題である。benzalkonium chloride や cetylpyridinium chloride は食品や医薬品などに広く使用されているが、組織に対する毒性が懸念されている。我々はこれまでに、モノマー型第四アンモニウム塩系化合物 (mono-QACs) を合成して、その抗菌活性について報告してきた (1)。今回、ブリッジ構造の異なるビス型第四アンモニウム塩系化合物 (bis-QACs、図 1) を設計合成し、各種バクテリアに対する抗菌能とヒト細胞 (皮膚表皮細胞、真皮線維芽細胞、赤血球、リンパ球) に対する毒性 (急性)、および構造について検討した。

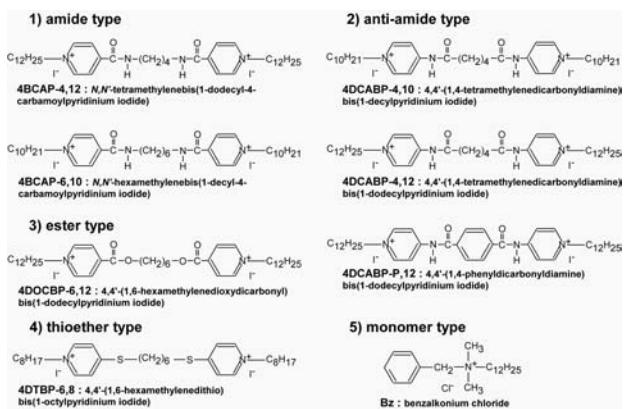


図 1. QACs の構造

方法

急性毒性はヒト細胞のモデルとして、表皮細胞 NHEK(F)、線維芽細胞 NB1RGB、赤血球、リンパ球 JM を用いて MTT アッセイなどにより検討した。各 QACs の抗菌能は各菌種に対する minimum inhibitory concentration (MIC) として決定した。ま

た、QACs の global minimum を CONFLEX により探索し、得られたコンフォーマからピックアップした 9 個のサンプルについて MO 計算などを行い構造を解析した。

結果と考察

各 QACs のヒト細胞に対する急性毒性を表 1 に示した。今回検証した QACs は 10^{-5} ~ 10^{-4} M で接触したヒト細胞を死滅させ、なかでも NHEK(F) が最も感受性が高かった。アミド型ブリッジ構造を有する (4BCAP-4,12, 4BCAP-6,10)QACs では NHEK(F) に対して同程度の毒性を示した。アンチアミド型 4DCABP-4,12 は他のアンチアミド型 (4DCABP-4,10, 4DCABP-P,12) と比べて、表皮細胞に対して低い LD₅₀ 値を示した。エステル型 (4DCCBP-6,12)、チオエーテル型 (4DTBP-6,8) は NHEK(F) に対して各々 13 ± 2 、 $8 \pm 2 \mu\text{M}$ の LD₅₀ 値を示した。

表 1. QACs のヒト細胞に対する急性細胞毒性

QACs	LD ₅₀ in human cells (μM)			
	NHEK(F)	NB1RGB	Erythrocyte	JM
Bz	19 ± 2	54 ± 4	74 ± 5	65 ± 5
4BCAP-4,12	13 ± 3	40 ± 3	6 ± 2	20 ± 3
4BCAP-6,10	13 ± 2	31 ± 3	18 ± 2	22 ± 4
4DCABP-4,10	42 ± 6	52 ± 4	6 ± 1	23 ± 3
4DCABP-4,12	16 ± 5	53 ± 3	12 ± 2	30 ± 4
4DCABP-P,12	34 ± 4	50 ± 4	22 ± 3	46 ± 3
4DCCBP-6,12	13 ± 2	52 ± 3	11 ± 3	50 ± 5
4DTBP-6,8	8 ± 2	48 ± 4	25 ± 4	41 ± 4

Bz: benzalkonium chloride.

MIC を見ると、4BCAP-4,12 は 0.4 ~ $12.5 \mu\text{M}$ でありヒト細胞に対する LD₅₀ と同程度であった (表 2)。4DCABP-4,12 は <0.1 ~ $12.5 \mu\text{M}$ と各ヒト細胞の LD₅₀ 値と同程度であった。 *Pseudomonas aeruginosa* に

対して 4DOCBP-6,12 は 80 μ M の MIC を示し、これは 4 種のヒト細胞に対する LD₅₀ より高く、安全面で不利である。4DTBP-6,8 の MIC レンジは LD₅₀ と比較して <0.2~10.0 μ M と低く今回検証した中で最も有益な化合物と言えた。驚いたことに Bz では MIC が 4.2~205 μ M と高く安全面が懸念された。

表 2. QACs に対する感受性

QAC	strain	MIC(μ M)
Bz	<i>B. subtilis</i> IFO3134	4.2
Bz	<i>P. mirabilis</i> IFO3849	205
4BCAP-4,12	<i>P. vulgaris</i> ATCC13315	0.4
4BCAP-4,12	<i>K. pneumoniae</i> ATCC13883	12.5
4DCABP-4,12	<i>P. vulgaris</i> ATCC13315	<0.1
4DCABP-4,12	<i>P. aeruginosa</i> (all three strains)	12.5
4DOCBP-6,12	<i>S. aureus</i> IFO12732	3.3
4DOCBP-6,12	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27583	80.0
4DTBP-6,8	<i>B. subtilis</i> IFO3134	<0.2
4DTBP-6,8	<i>P. mirabilis</i> IFO3849	10.0

Most susceptible and resistant strains was *Bacillus subtilis* IFO3134 and *Proteus mirabilis* IFO3849 to benzalkonium chloride (Bz); *Proteus vulgaris* ATCC13315 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 to 4BCAP-4,12; *Proteus vulgaris* ATCC13315 and all three stains (ATCC27583, ATCC10145, IFO3080) of *Pseudomonas aeruginosa* to 4DCABP-4,12; *Staphylococcus aureus* IFO12732 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27583 to 4DOCBP-6,12; *Bacillus subtilis* IFO3134 and *Proteus mirabilis* IFO3849 to 4DTBP-6,8, respectively.

4DTBP-6,8 について global minimum search を行い 1125 個のコンフォーマを得た (図 2)。このうちエネルギー順に 9 個のサンプルを抽出して MO 計算から solvation free energy (dGW) を求めたところ 2 つの極小点がみとめられた (図 4)。

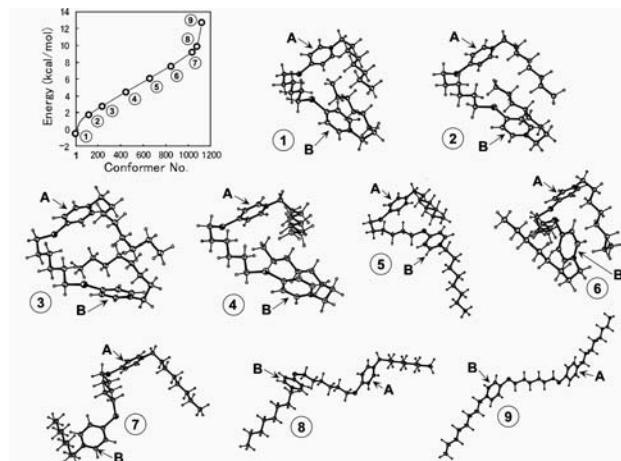


図 2. 4DTBP-6,8 の構造

4DTBP-6,8 の global minimum search によって 1125 個のコンフォーマを得た。このうち 9 個のサンプル (①~⑨) を抽出して解析に用いた。2 つの pyridinium ring を A, B として示した。

同様に 4DTBP-m,n 系化合物 (図 3) の探索を行ったところ、4DTBP-4,8 においても 2 つの極小点がみとめられた (図 4、右パネル)。4DTBP-3,8, -8,8, -10,8 では 1 つの極小点のみ得られた (左パネル)。

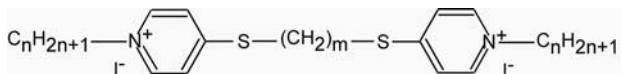


図 3. 4DTBP-m,n

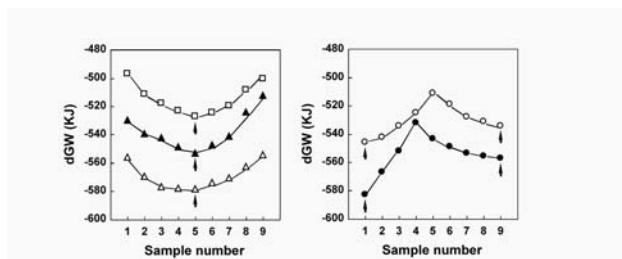


図 4. 4DTBP-m,n 化合物の dGW
9 個のサンプルについて dGW を求めた。右 : 4DTBP-6,8 (○)、4DTBP-4,8 (●)。左 : 4DTBP-3,8 (△)、4DTBP-8,8 (▲)、4DTBP-10,8 (□)。

ヒト線維芽細胞 (NB1RGB) に対する急性毒性を検討したところ、4DTBP-3,8 (20~100 μ M)、4DTBP-8,8 (10~40 μ M)、4DTBP-10,8 (20~40 μ M) で濃度依存的に毒性を示した。一方、4DTBP-4,8、4DTBP-6,8 では、濃度に対して二層性の毒性発現様式を示した。9 個のサンプリングしたコンフォーマーでの dGW 解析の結果から、前者のグループ (4DTBP-3,8, -8,8, -10,8) と後者のグループ (4DTBP-4,8, -6,8) ではヒト細胞に対して異なる作用 (膜作用など) を示すことが考えられた。さらに、ブリッジ部分のモデル化合物: R-(CH₂)₆-R (R = amide, anti amide, ester, thioether type) を用いて解析したところ、4DTBP-m,n 系の化合物が最も柔軟な挙動を示すことが予想された (2)。

以上のことから、4DTBP-m,n 系化合物、なかでも 4DTBP-6,8 の持つ柔軟な構造と二層的な疎水性の微妙なバランスが安全で有益な抗菌能の発現に関与すると考えられた。

References

- [1] KOHRAI, H. et al. *J. Antibact. Antifungal Agents* 1994, 22, 461-468.
- [2] OHKURA, K. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 5035-5043.