

ヒドロキシイソチオシアナートの合成およびその微生物系に対する効果

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/26911

氏 名	田嶋 宏邦
学 位 の 種 類	博士 (工学)
学 位 記 番 号	博甲第 1056 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 20 年 9 月 26 日
学 位 授 与 の 要 件	課程博士(学位規則第 4 条第 1 項)
学 位 授 与 の 題 目	ヒドロキシイソチオシアナートの合成およびその微生物系に対する効果
論文審査委員 (主査)	中本 義章 (理工研究域・教授)
論文審査委員 (副査)	山岸 忠明 (理工研究域・准教授), 加納 重義 (理工研究域・教授), 国本 浩喜 (理工研究域・教授), 松郷 誠一 (理工研究域・教授)

Summary

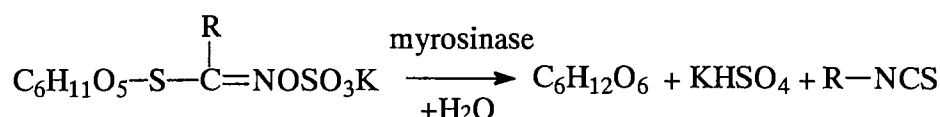
Both natural occurring and synthetic isothiocyanates (ITCs) are widespread compounds of biological activity. Some alkyl ITCs with a hydroxy substituent exist in the natural products and it is known that the hydroxy group plays an important role in antimicrobial activity. However such kind of hydroxy ITCs are difficult to prepare by applying the usual methods using thiophosgene or chloroethylformate. We prepared hydroxy ITCs in high yields by treating aqueous hydrogen peroxide with a mixture of the corresponding hydroxy primary amine, carbon disulfide, and a catalytic amount of triethylamine, in a water-miscible organic solvent at 0~10 °C.

The hydroxy ITCs synthesized by using the above method were strongly antimicrobial; for example, 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl ITC inhibited the growth of all bacteria and fungus strains examined at concentrations of 7.8 to 15.6 µg/ml. All of hydroxyl ITC compounds had antimicrobial effects by blocking sulfhydryl groups while 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl ITC showed antibacterial synergism, specifically with aminoglycoside antibiotics. The synergism was seen in the presence of certain sugars such as glucose, fructose, and maltose. On the course of those experiments, a peculiar suppression of antibiotics (antagonistic effect) at a low concentration of 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl ITC was observed, besides the antibacterial synergism.

In the examination of the effect of hydroxy ITCs on bacterial virus and M13 DNA, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl ITC synthesized from dopamine, showed antiviral activity on ϕ K. Since 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl ITC suppressed annealing (reassociation) of denatured DNA, it is supposed to react mildly with virus and the single-stranded DNA.

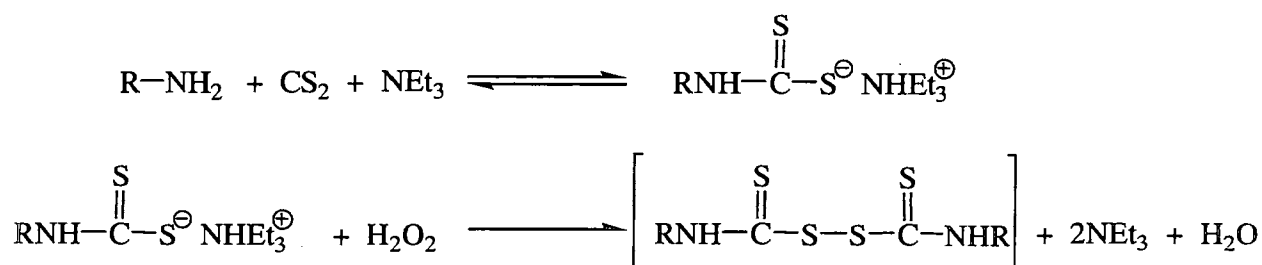
学位論文要旨

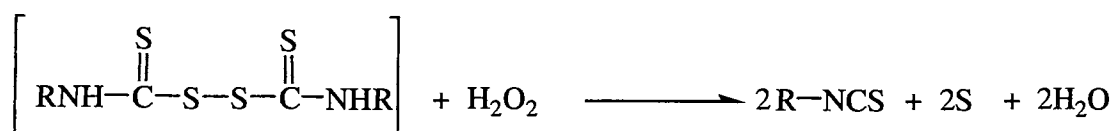
ワサビ、西洋ワサビ、大根等のアブラナ科 (Brassicaceae) 植物組織にはグルコシノレート・カラシ油配糖体が存在し、細胞の破壊と同時に組織中に存在する酵素ミロシナーゼにより加水分解されてイソチオシアナート・カラシ油を生成することが知られてい



る。カラシ油には抗菌・殺虫活性があり、対昆虫、対微生物の重要な生体防御物質として働いている。しかしながら、カラシ油独特の刺激臭を有することより、使用方法ならびに用途が限定されている。そこで、無臭または低臭気 of イソチオシアナート抗菌剤を開発するために、極性置換基(水酸基)を有するイソチオシアナートの合成を検討するとともに、微生物に対する効果を調べた。

第一級アミンと二硫化炭素、塩基からジチオカルバメートを形成させたのち、過酸化水素により脱硫化水素させイソチオシアナートを得るワンポット合成法において、水と混合可能な有機溶媒を用いることで、アルキルイソチオシアナート、ジイソチオシア





ナート、ヒドロキシルイソチオシアナート、芳香族イソチオシアナートを高収率で合成できることが分かった。一般にイソチオシアナート合成に使用される有毒なチオホスゲン、クロロギ酸エチル等を使用することなく、かつ効率的に様々なイソチオシアナートを高収率で合成でき汎用性があることより、工業的にみて非常に優れた合成法であると考え。特に水酸基を有するアミンからヒドロキシイソチオシアナートの合成は、既知の合成法では極めて困難であるが、上記開発法において触媒量のトリエチルアミンを添加、脱硫化水素時の温度を0~10℃に制御することで定量的にヒドロキシイソチオシアナートが得られた。

一方、合成法検討の過程で、ヒドロキシアミンからワンポットでアセトキシイソチオシアナートを合成する方法を見出した。その方法は、ヒドロキシアミン、二硫化炭素から得られるジチオカルバメートに脱硫化水素剤として無水酢酸を作用させることで、生成したヒドロキシイソチオシアナートが逐次にO-アセチル化される。脂肪族の場合、溶媒にジオキサンをアセチル化触媒としてDABCOを、芳香族の場合、蒸留水中でトリエチルアミンを使用したとき高収率で標的化合物が得られた。

様々なヒドロキシイソチオシアナート誘導体を合成し、*Aspergillus niger*、*Aspergillus fumigatus*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus equisimilis*、*Escherichia coli*.に対する抗菌性を寒天および液体培地で調べたところ、これらの化合物は高い抗菌性を示し、特に2-(4-ヒドロキシフェニル)エチルイソチオシアナートが7.8-15.6 µg/mlで試験菌の増殖を阻害した。連鎖球菌のストレプトリジンS産生を阻害、システイン添加により抗菌活性が打ち消されることより、ヒドロキシイソチオシアナートがSHブロッカーとして抗菌作用していることが推察された。

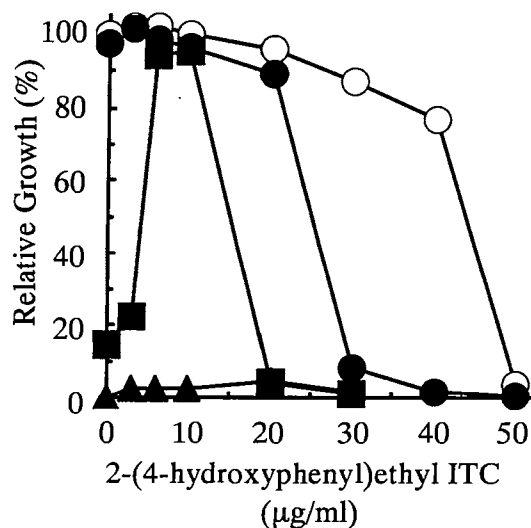
Minimum Inhibitory, Minimum Bactericidal and Minimum Fungicidal Concentrations of Hydroxy Isothiocyanates.

Isothiocyanate	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			MFC or MBC ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>S. aureus</i>
4-Hydroxybutyl	31.3	15.6	125	62.5	31.3	125
(Butyl) ^a	(NA) ^b	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)
5-Hydroxypentyl	31.3	15.6	125	62.5	15.6	125
(Pentyl)	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)
6-Hydroxyhexyl	31.3	15.6	62.5	125	15.6	125
(Hexyl)	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)
2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl	15.6	7.8	15.6	15.6	7.8	62.5
2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl	125	125	31.8	250	125	62.5
(2-Phenylethyl)	(31.3)	(7.8)	(15.6)	(62.5)	(62.5)	(250)

^a The compound in parentheses is the counterpart deficient in a hydroxy group.

^b NA: no activity at 250 $\mu\text{g/ml}$.

また、2-(4-ヒドロキシフェニル)エチルイソチオシアナートと抗生物質との併用を検討したところ、2-(4-ヒドロキシフェニル)エチルイソチオシアナートはストレプトマイシン等のアミノ糖系の抗生物質とのみ相乗作用を示し、また相乗作用は培地中の糖(グルコース、フルクトース等)が関与していることが分かった。一方、ストレプトマイシンとの併用抗菌相試験において、抗菌相乗作用に加えて、低濃度の2-(4-ヒドロキシフェニル)エチルイソチオシアナートによりストレプトマイシンの抗菌活性が抑圧される拮抗作用が観察された。この拮抗作用は、2-(4-ヒドロキシフェニル)



Effect of Combination of 2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl ITC and Streptomycin on Growth of *E. coli*.

Indicated dose of 2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl ITC was added to a suspension of *E. coli* IFO 3972 in M9 minimal medium, 20 min before administration of streptomycin, and culture turbidity (OD_{660}) was measured after 24 h of incubation.

Streptomycin concentration: ○ 0, ● 1, ■ 2, ▲ 3 $\mu\text{g/ml}$

エチルイソチオシアナートの添加初期段階で起きており、またアミノ糖系抗生物質のみではなくクロラムフェニコール等でも観察された。このような相乗効果と拮抗作用が、薬剤の添加濃度に依存して起こる現象は非常に特異的であり、人が野菜などに含まれる天然イソチオシアナート類摂取後、ある種の医薬品の投与・服用する際にも起こり得るかもしれない。

ヒドロキシ置換フェニルおよびフェニルアルキルイソチオシアナート、特に2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチルイソチオシアナートが ϕ Kに対して高い抗ウィルス活性を示した。これらのイソチオシアナートは二本鎖RF DNAよりも一本鎖SS DNAを効果的に阻害し、またDNAのアニールリングを抑制したことより、イソチオシアナートがウィルスおよびDNAと穏やかに反応していると考えられる。

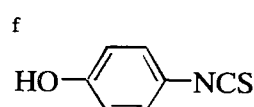
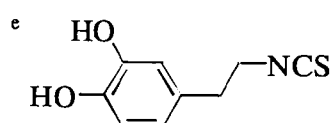
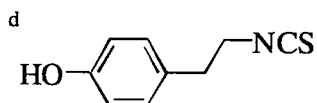
Effect of Isothiocyanates on Infectivity of Bacterial Virus ϕ K

Isothiocyanate ^a	PFU/ml ^b	Relative infectivity
Unadded control ^c	6.1×10^5	
Hydroxy ITCs		
2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl ITC ^d	4.5×10^3	7.5×10^{-3}
2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl ITC ^e	5	8.2×10^{-6}
4-Hydroxyphenyl ITC ^f	9.6×10^2	1.6×10^{-3}
trans-4-Hydroxycyclohexyl ITC	4.0×10^5	6.6×10^{-1}
6-Hydroxyhexyl ITC	2.8×10^5	4.6×10^{-1}
Other ITCs		
2-Phenylethyl ITC	3.0×10^5	4.9×10^{-1}
Phenyl ITC	2.5×10^5	4.1×10^{-1}
6-Hexyl ITC	2.1×10^5	3.4×10^{-1}
Allyl ITC	2.9×10^5	4.8×10^{-1}

^a ITC concentration in ϕ K suspension was 4.46 μ mol/ml.

^b ϕ K was treated with ITC for 24 h at 37°C.

^c Instead of ITC solution, only DMSO was added to ϕ K suspension.



最後に無臭のアルコキシイソチオシアナートを合成し、ガス相

での抗菌性を評価した。アルコキシ基の存在により抗菌活性は高められ、特に非分岐型アルコキシイソチオシアナートおよび4-メトキシフェニルイソチオシアナートの抗菌活性は高く、*E. coli*、*A. niger*に対する最小発育阻止ガス濃度はアリルイソチオシアナートの約1/2～1/100であった。構造活性相関では、非分岐型アルコキシイソチオシアナートは分配係数の大きい、すなわち疎水性の高いものほど、抗菌活性が強い傾向が認められた。

Minimum Inhibitory and Minimum Bactericidal (Fungicidal) Gas-Concentrations, of volatile Isothiocyanates on *E. coli* and *A. niger* in vapor phase.

Compounds	<i>E. coli</i>		<i>A. niger</i>	
	MICgas	MBCgas	MICgas	MFCgas
Isotiocyanate	(nmol/ml)	(nmol/ml)	(nmol/ml)	(nmol/ml)
Methoxyphenyl	0.12	0.12	0.0030	0.0030
Methoxyethyl	0.24	0.24	0.044	0.044
Ethoxyethyl	0.22	0.22	0.043	0.043
Propioxyethyl	0.21	0.21	0.018	0.018
Methoxylpropyl	0.31	0.31	0.072	0.072
Ethoxypropyl	0.51	0.51	0.014	0.014
Methoxy-isopropyl	1.11	1.11	0.10	0.230
isoPropioxyethyl	0.70	0.70	0.053	0.053
Allyl	0.43	0.77	0.22	0.22
Methyl	0.76	1.26	0.10	0.10
Butyl	1.05	1.05	0.20	0.45
Hexyl	2.74	2.77	0.016	0.12
Phenyl	0.77	1.06	0.015	0.033

前述の無臭の各イソチオシアナート化合物を抑制ターゲットまたは使用方法に応じて選定することにより、臭気の問題を解決し、更には抗菌・防カビ・抗ウィルス性能の向上が図れる可能性がある。

学位論文審査結果の要旨

提出学位論文について、予備審査会を開催し、さらに平成 20 年 8 月 5 日の口頭発表および質疑応答の結果を踏まえて、同日開催した審査会において以下のとおり判定した。

ワサビ等のアブラナ科植物にはカラシ油配糖体が存在し、酵素作用によりイソチオシアナート遊離して、昆虫・微生物に対する防御物質として働いている。本論文では、イソチオシアナート類の抗菌剤への応用展開を目的として、その合成方法を詳細に検討している。塩基存在下、アミン類と二硫化炭素からジチオカルバメートを生成させ、過酸化水素でイソチオシアナートを得るワンポット合成法を開発した。本法は有害試薬を用いることなく、工業的にも有利な方法であり、従来低収率であったヒドロキシ基含有アミン類からのヒドロキシイソチオシアナート合成においても、高収率であった。合成ヒドロキシイソチオシアナート類は高い抗菌・防カビ作用を示し、無臭性の抗菌剤として有望なことを示している。特に 2-(4-ヒドロキシフェニル)エチルイソチオシアナートは優れた抗菌剤として期待できる。さらに、ヒドロキシイソチオシアナートと抗生物質との相乗効果が働く場合、および抗生物質に対する阻害作用が起こる場合について議論し、抗ウイルス活性を示すヒドロキシイソチオシアナートについても明らかにしている。

以上の研究成果は、学術的かつ応用的にも価値が高く、本論文は博士（工学）の学位に値するものと判定する。