



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	5-メチル-2,3-ジフェニール-2H-テトラゾリウムクロライド(MDT)及び5-(3-フロイル)-2,3-ジフェニール-2H-テトラゾリウムクロライド( $\beta$ -OTC)の合成及びその結核菌による還元
Author(s)	柿本, 七郎; KAKIMOTO, Shichiro; 佐藤, 恒久 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 36, 13-16
Issue Date	1976-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26497">https://hdl.handle.net/2115/26497</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	36_P13-16.pdf



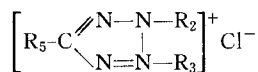
# 5-メチル-2,3-ジフェニール-2H-テトラゾリウムクロライド (MDT) 及び 5-(3-フロイル)-2,3-ジフェニール-2H- テトラゾリウムクロライド ( $\beta$ -OTC) の 合成及びその結核菌による還元

柿本七郎 佐藤恒久 山本健一

(北海道大学免疫科学研究所 化学部門・細菌感染部門)

(昭和50年10月31日受付)

著者等は、さきに生体の還元酵素により容易に還元され発色するテトラゾリウム塩に於て、その分子中に各種ヘテロ環を有するものを合成しそれが結核菌によって発色する場合、即ち培地に於て発育せるコロニーの着色の様子に種々と変化のある事を示した<sup>1)</sup>。殊にテトラゾリウム塩に於て2及び3位のR<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>は、フェニール基



I: テトラゾリウム塩

で5位のR<sub>5</sub>が2-チェニル基を有するもの5-(2-チェニル)-2,3-ジフェニール-2H-テトラゾリウムクロライド(STC)と3-チェニル基を有する5-(3-チェニル)-2,3-ジフェニール-2H-テトラゾリウムクロライド( $\beta$ -STC)との間に相異のある事を報告した<sup>2)</sup>。これを要約すると一般にヘテロ環は結核菌に親和性を有する親和基になり得る。一方結核菌の発育を阻止する原子団即ち作用基があり、それが親和基に結合している部位によって、分子全体の発育阻止作用に差異を生ずるのである。この事は全く結核菌のテトラゾリウム塩の還元発色の現象にもあてはまるのである。著者等の行った実験例の一つとしてチオフェン環を含むテトラゾリウム塩がある。チオフェン環の2位( $\alpha$ 位)に作用基であるカルボン酸ヒドラチッド基を有する2-チェニル酸ヒドラチッドは、牛型結核菌のみに対して発育阻止作用があり、人型結核菌の発育は阻止しない、一方3位( $\beta$ 位)のものはこの差がない。この事はチオフェン環は牛型結核菌のみに親和性を有するものと考えられ、作用基であるカルボン酸ヒドラチッドは親和基であるチオフェン環に結合する場所によって抗菌性は異なってくる。この事は作用基の活性が変化するととも親和性が変化するととも考えられる。この事がテトラゾリウム塩にもあてはまり、2位にてテトラゾリウムに結合したSTCでは牛型と人型を顕著に区別するこ

とが出来ることが、3位で結合した $\beta$ -STCでは区別する事が困難であった。

以上の様な事が5-(2-フロイル)-2,3-ジフェニール-2H-テトラゾリウムクロライド(OTC)<sup>2)</sup>及び5-(3-フロイル)-2,3-ジフェニール-2H-テトラゾリウムクロライド( $\beta$ -OTC)との間にSTC及び $\beta$ -STCとの間の関係と同様な事があるか又酢酸ヒドラチッドが結核菌の発育阻止作用がなく、したがって殆んど結核菌に対する親和性がないと考えられるメチル基を5位に有するテトラゾリウム塩5-メチル-2,3-ジフェニール-2H-テトラゾリウムクロライド(MDT)を作って同時に試験をした。

その方法は、前報告の如く<sup>1),2)</sup>小川培地に各種結核菌を接種してより2日目に各テトラゾリウム塩の0.5%水溶液0.1 mlを添加全表面に流した場合の16日目及び21日目のコロニーの数によって判定した。その結果は第1表及び第2表の如くSTC及びOTCの場合と異なりいづれも人型と牛型を明確に区別する事が困難であった。

MDT及び $\beta$ -OTCの合成に関しては、先づMTDに関しては、古くKuhn等<sup>3)</sup>の研究があるが結晶性に得られたのは別の方法によって作られた臭化水素塩がある。著者等は、これ等の化合物は生物実験の実験誤差の小さい事を考え、全てこの系統のものは塩化水素塩を用いている。このものに対してはKuhn等は結晶性に得られず潮解性であると記されているが、著者等は空气中に放置するも安定な純品を得た。1分子の結晶水を有する板状晶で融点104°C、分解点243°Cでフォルマザンは橙黄色で可視部の最大吸収は410 nmである。製法はアセトアルデヒドのフェニールヒドラゾンより常法に従った。

$\beta$ -OTCに関しては、3-フランアルデヒドは天然よりは分離されているが、その合成は困難であった。著者等は図の如くフランの3,4-ダイカルボン酸ジエチルエステルを部分加水分解してモノエステルとし、次に脱炭酸を

第1表 人型、牛型結核菌に対する  
MDC の抗菌性

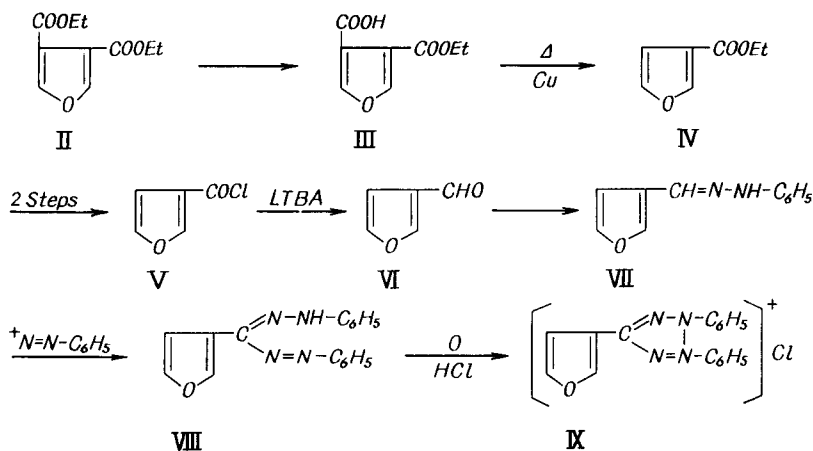
菌種	菌株	判定日	培養2日目添加		培養14日目添加	
			Aq. dest	MDC	Aq. dest	MDC
人型	青山 B	16	0	0	0	0
		21	8	7	8	9
	黒野	16	41	34	43	55
		21	70	62	63	79
	H 37 Rv	16	8	6	12	13
		21	23	19	18	26
今村	16	1	1	0	1	
	21	9	10	8	7	
牛型	Ravenel	16	71	82	78	75
		21	105	111	120	117
	牛 No. 1	16	90	81	107	95
		21	118	130	140	137
	三輪	16	0	0	1	1
		21	33	27	37	35
B C G	16	15	12	15	16	
	21	71	69	81	78	

第2表 人型、牛型結核菌に対する  
β-OTC の抗菌性

菌種	菌株	判定日	培養2日目添加		培養14日目添加	
			Aq. dest	β-OTC	Aq. dest	β-OTC
人型	青山 B	16	4	5	8	6
		21	21	21	21	18
	H 37 Rv	16	10	9	9	10
		21	25	20	19	17
	黒野	16	7	8	8	11
		21	15	16	14	21
牛型	Ravenel	16	20	5	17	19
		21	20	21	18	23
	牛 No. 1	16	+	30	+	+
		21	+	+	+	+
	三輪	16	0	0	0	0
		21	12	1	13	12
B C G	16	10	0	9	8	
	21	63	17	50	53	

+ : 200~300

#: 300~500



行って3-フランカルボン酸エステルを経て、酸クロリドとなし次にリチウムトリ-*t*-ブトキシ-アルミニウムハイドライド (LTBA) で環元して3-フランアルデヒドを得た。以下常法に従ってフォルマザンを経て、テトラゾリウム塩を製した。融点136°C、分解点238°C、結晶水を減圧で加温して定量をしようとしても除々に分解し

て定量し得ず、元素分析の結果から結晶水は1分子である。フォルマザンは赤紫色で可視部最大吸収は495 nmである。

### 実験の部

結核菌による還元発色の実験——人型又は牛型結核菌

を直径 16 mm の試験管中の斜面にした小川培地に接種する。接種菌量は対照に於てコロニー数が 21 日目に大体 50~100 位が望ましい。この接種菌の培養表面に各種テトラゾリウム塩の 0.5% 水溶液の 0.1 ml を菌接種後 2 日目及び 14 日目に添加全表面に流す。37°C にて培養 16 日目及び 21 日目にコロニーの数を数える。

**MDT の合成**—アセトアルデヒドのフェニールヒドゾーンを減圧蒸溜及びアルコールより再結晶し、融点 103°C のもの 57 g を 1 l のアルコールに溶解し (A 液)、別にアニリン 35 g を濃塩酸 300 ml を加へ、塩酸塩を含む液を亜硝酸ソーダ 15 g、水 500 ml にてジアゾ化した液 (B 液) を作る。別に苛性カリ 187 g を含むアルコール 1200 ml の溶液に 0~5°C にて A、B 両液を同時に滴下する。これを 2 時間常温に放置したる後水 700 ml を加えて一昼夜放置し、折出した少しく油状物質を含む結晶性のフォルマザン 3 g を得。更に母液に水を加えて折出した粗製フォルマザンのアルコール溶液に水を加えて再沈澱を行って、更に 3 g のフォルマザンを得る。約 6 g の粗フォルマザンを 5 ml の濃塩酸を含む 50 ml のアルコールに溶解し、これを攪拌のもとにアミルニトリット 6.6 ml を滴下する。反応液を減圧にて濃縮し、水 100 ml を加え、活性炭を加えて脱色と共に微量の油分をのぞき、水層を真空乾燥をして結晶を得、水より再結晶を繰返し、融点 104°C、分解点 243°C のもの 4.4 g を得、吸光分析用の可視部最大吸収は 410 nm。元素分析:  $C_{14}H_{13}N_4Cl \cdot H_2O$  としての理論性  $H_2O$ ; 6.20; C, 57.85; H, 5.20; 実測性  $H_2O$ ; 6.31; C, 57.60; H, 5.38。

**フラン-3,4-ジカルボン酸モノエチルエステル(III)**—ジェステル(II)の 20.2 g の 250 ml のアルコール溶液を、氷冷下に烈しく攪拌しながら 3.8 g の苛性ソーダを 15 ml の水と 50 ml のアルコールとに溶解した溶液を 1 度に加えて 5 時間烈しく攪拌した後、反応液を減圧濃縮乾溜し、125 ml の水に溶解し、エーテルにて未反応物質を抽出したる後水層を濃塩酸 13 ml を加えて、クロロホルムにて抽出す。抽出液を硫酸ソーダにて乾燥した後濃縮すると融点 133~135°C の白色結晶 13.5 g を得る。

**フラン-3-カルボン酸(IV)**—III の 45.4 g と銅粉 45.4 g を混和して乾溜する。溜出物を 50 ml のエーテルにとき、重曹水で洗滌後エーテルを溜出すると緑色がかった油、沸点 165~177°C のモノエステル 27.6 g を得。これを 25% 苛性ソーダ水溶液 72 ml と酒精 43 ml と共に加熱する事 1.5 時間の後更に水 57 ml を加えてエーテルにて未反応物を抽出したる後、水溶液を濃塩酸にて強酸性とし、エーテルにて抽出、エーテルを溜去すると白色結晶 13.2 g を得。融点 122~123°C。

**フラン-3-カルボン酸クロッド(V)**—VI 13.2 g をベンゼン 150 ml、チオニルクロリド 17 ml と共に 16 時間煮沸ベンゼンを溜去したる後減圧蒸溜す。白色結晶 5.05 g。

**フラン-3-アルデヒド(VI)**—V の 5.05 g を 150 ml のジグリムに溶かし、ドライアイス-トリクロロエチレンのバス中で LTBA の 10 g を 50 ml のジグリムに溶かした溶液を滴下し (約 1 時間) たる後 3 時間攪拌す。尚 4 時間常温で攪拌したる後、稀塩酸を酸性になるまで加え、更に沈澱がとけるまで水を加えてエーテルで抽出す。得られたジグリム溶液にフェニルヒドラチン 2.5 ml を加え、水 200 ml を加え得られた沈澱を分別す。黄色結晶 2 g を得。融点 149.5°C。

**$\beta$ -OTC の合成**—0.5 g のフラン-3-アルデヒドのフェニルヒドラゾーンを、酢酸カリ 1.4 g を含むピリジン 20 ml にとき約 0°C にたもち、別にアニリン 0.3 ml、濃塩酸 1.1 ml 及び 0.25 g の亜硝酸ソーダで常法にしたがって得たジアゾニウム溶液を滴下後 2 時間の後更に水 20 ml を加えて一昼夜放置するに、赤色結晶性フォルマザン 0.1 g を得。これをメタノール 20 ml にときアミルニトリット 0.3 ml を加え、濃塩酸 0.3 ml を滴下後更に 0.1 ml のアミルニトリット 0.3 ml を加え、濃塩酸 0.3 ml を滴下後 4 時間攪拌す。反応液を減圧乾溜して水にて抽出後活性炭にて脱色し、蒸発乾溜し水より再度再結晶を行う。収量 0.05 g、融点 136°C、分解点 238°C、可視部最大吸収は 495 nm。元素分析の結果は 1 分子の結晶水を有する。乾燥試験は除々に分解するので、正確なる結晶水定量は不可能であった。元素分析:  $C_{17}H_{13}ON_4Cl \cdot H_2O$  としての計算値: C, 59.56; H, 4.41; N, 16.34; 実測位: C, 59.47; H, 4.30; N, 16.44。

本研究の合成実験に於て化学部門の岡田信子、田代美穂両氏の御協力に対して感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Kakimoto, S., Yamamoto, K., Arima, J., and Kuze, A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 1971, 104, 754. 柿本, 山本, 有馬, 久世: 結核の研究 33, 7 (1973).
- 2) Kakimoto, S., and Yamamoto, K.: Amer. Rev. Resp. Dis., 1973, 107, 142. 柿本, 山本: 結核の研究 34, 23 (1974).
- 3) Jerchel, D., und Kuhn, R.: Ann. 568, 185 (1950). Kuhn, R., und Jerchel, D.: Ber. 74, 941, 949 (1941). Kuhn, R., und Munzig, W.: Chem. Ber. 86, 858 (1953).

Syntheses of 5-Methyl-2,3-diphenyl-  
2H-tetrazolium chloride (MDT) and 5-(3-Furoyl)-2,3-  
diphenyl-2H-tetrazolium chloride ( $\beta$ -OTC) and  
the Color-Redution by Tubercle Bacilli

Shichiro KAKIMOTO, Tsunehisa SATO  
and Ken-ichi YAMAMOTO

The pure tetrazolium chlorides, MDT and  $\beta$ -OTC were synthesized and the color-reduction by some strains of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* was tested. These compounds were unable to differentiate *M. Bovis* from *M. tuberculosis*. That was estimated presumably, since the acid hydrazides of the stem substances which exist at the 5-position of tetrazole ring, acetic acid hydrazide and furan- $\beta$ -carbonic acid hydrazide, are weak tuberculostatic action against both strains.