

6-アミノニコチン酸アミド誘導体の合成とその生物活性に関する研究

宮坂克彦, 浅野進吾, 北村二朗,^{1a)} 高取吉太郎^{1b)}岐阜薬科大学,^{1a)} 名古屋大学医学部附属病院薬剤部^{1b)}

Syntheses of 6-Aminonicotinamide Derivatives and Their Biological Activities

KATSUHIKO MIYASAKA, SHINGO ASANO, JIRO KITAMURA^{1a)} and KICHITARO TAKATORI^{1b)}Gifu College of Pharmacy^{1a)} and Pharmacy of Nagoya University Hospital^{1b)}

(Received September 11, 1974)

Ten derivatives of 6-aminonicotinamide (6-ANA, I), 6-methylamino-(II), 6-ethylamino-(III), 6-isopropylamino-(IV), 6-cyclohexylamino-(V), 6-benzylamino-(VI), 6-dimethylamino-(VII), 6-diethylamino-(VIII), 6-piperidino-(IX), 6-morpholino-(X) and 6-pyrrolidino-nicotinamide (XI) were synthesized, and their biological activities were examined. Similar to I, intraperitoneal administration of II to XI to male mice of ddY strain produced acute toxicity, and the main symptoms were paralysis of hind legs and diarrhea. However, simultaneous administration of nicotinamide prevented appearance of toxic symptoms. LD₅₀ increased in the order of I, IV, VIII, III, II, VI, V, VII, XI, IX, and X. Effect of these compounds on *Lactobacillus arabinosus* 17—5 (ATCC 8014), which requires nicotinamide was examined. In the incubation medium containing I and IX showed strong and weak inhibitory effect, respectively, on the growth of this microorganism, but other compounds did not show any inhibitory effect, or rather showed additive growth-promoting activity. These compounds, except I, IX, and X, could generally replace nicotinamide and promoted bacillary growth in the incubation medium which lacked nicotinamide. The substituted derivatives of primary amines showed greater replacing activity than the secondary amine derivatives, and in the former, replacing activity decreased in the order of IV, VI, II, and V. However, this activity was rather small and the strongest IV showed only 0.0003 times as much activity as nicotinamide.

Johnson ら²⁾ は 6-aminonicotinamide (I) の nicotinamide (NAA) に対する強い拮抗作用を発見した。ついで McColl ら³⁾ は (I) がラットの Walker carcinoma 256 に対し, Shapiro ら⁴⁾ はマウスの adenocarcinoma 155 に対し, Sugiura ら⁵⁾ はマウスの Friend virus leukemia にたいし, それぞれ制癌作用を有することを報告した。最近 Lewis ら⁶⁾ は 6-dimethylaminonicotinamide の制癌作用について報告している。著者らは (I) の 6 位アミノ基を諸種の第一級および第二級アミン原基で置換した (I) と近縁構造を有する一群の化合物を合成し, 構造と生物学的活性の関係を検討した。その際得られた若干の知見をここに報告する。

著者らは Organic Syntheses 記載の方法⁷⁾ で 6-hydroxynicotinic acid を合成し, Mills らの方法によりこ

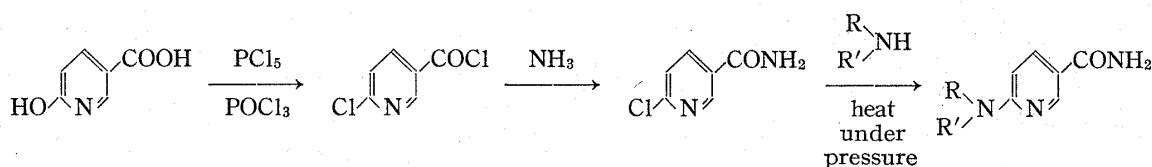
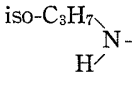
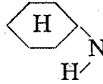
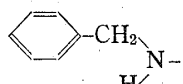


Chart 1

- 1) Location: a) Mitahora, Gifu; b) Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya.
- 2) W.J. Johnson, J.D. McColl, *Science*, **122**, 834 (1955).
- 3) J.D. McColl, W.B. Rice, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **35**, 795 (1957).
- 4) D.M. Shapiro, L.S. Dietrich, *Cancer Research*, **17**, 600 (1957).
- 5) K. Sugiura, C.C. Stock, *Acta Unio. Intern. Contra. Cancrum.*, **16**, 780 (1960).
- 6) L.R. Lewis, C.C. Cheng, *J. Med. Chem.*, **15**, 849 (1972).
- 7) J.H. Boyer, W. Schoen, "Organic Syntheses," Coll. Vol. IV, 1963, p. 532.

TABLE I. 6-Substituted Nicotinamides

Compd. No.	R-	mp (°C)	Appearance (recryst. solvt.)	Yield (%)	Formula	Analysis (%)			LD ₅₀ ^{a)} (mg/kg)
						Calcd. (Found)	C	H N	
I	H ₂ N-	241—242	white prisms (EtOH)	—	C ₆ H ₇ ON ₃	52.54 (52.10)	5.15 (5.10)	30.64 (30.52)	35.0
II		187—189	white needles (benzene + EtOH)	20.0	C ₇ H ₉ ON ₃	55.61 (55.36)	6.00 (5.99)	27.80 (27.92)	90.0
III		211—213	white prisms (H ₂ O)	31.2	C ₈ H ₁₁ ON ₃	58.16 (57.70)	6.71 (6.70)	25.44 (24.98)	57.5
IV		176—178	white needles (benzene)	17.0	C ₉ H ₁₃ ON ₃	60.31 (60.38)	7.31 (7.28)	23.45 (23.54)	45.8
V		183—184	white leaflets (benzene)	35.9	C ₁₂ H ₁₇ ON ₃	65.72 (65.48)	7.81 (7.75)	19.16 (18.77)	112.5
VI		167—169	white needles (H ₂ O)	75.9	C ₁₃ H ₁₃ ON ₃	68.70 (68.91)	5.77 (5.78)	18.49 (18.37)	97.5
VII		229—230 ^{b)}	white prisms (H ₂ O)	47.5	C ₈ H ₁₁ ON ₃	58.16 (57.93)	6.71 (6.70)	25.44 (25.26)	258.8
VIII		125—127	white leaflets (benzene)	32.4	C ₁₀ H ₁₅ ON ₃	62.15 (62.01)	7.82 (7.76)	21.75 (21.60)	54.2
IX		185—186	white needles (H ₂ O)	50.0	C ₁₁ H ₁₅ ON ₃	64.36 (64.35)	7.37 (7.36)	20.47 (20.41)	530.0
X		210	white needles (H ₂ O)	70.0	C ₁₀ H ₁₃ O ₂ N ₃	57.96 (57.43)	6.32 (6.70)	20.28 (20.13)	983.3
XI		252—253	white leaflets (H ₂ O)	50.0	C ₁₀ H ₁₃ ON ₃	62.80 (62.56)	6.85 (6.83)	21.98 (21.87)	529.2

^{a)} measured by Behrens-Kaerber method^{b)} lit. 224—226⁸⁾

れをオキシン塩化磷中で五塩化磷と反応させ 6-chloronicotinic acid chloride となし,⁸⁾ ベンゼン溶液中で乾燥アンモニアガスを導入して 6-chloronicotinamide に導き,⁹⁾ 最後にこの 1 モルと諸種アミンの数モルとを封管中で加熱, 目的物を得ることが出来た. 合成経路を Chart 1 に, 得られた化合物を Table I に, それぞれ示した.

実 験 の 部

合 成 6-Chloronicotinamide 1 mole に対し, 5 mole の原料アミンの 50% 水溶液を加え, この混合物を封管中で, 液温 150—160° の油浴内に 5—6 時間加熱して, 目的物を容易に合成することができた. この中で methylamino 置換体 (II), isopropyl 置換体 (IV) だけは, 反応成績体をアルミナクロマトにかけ, アセトン・エタノール混液 (4:1) を用いて展開, 精製し, 得られた粗結晶を再結晶して純品を得た. 各化合物 (II—XI) は, いずれも共通して希硫酸に易溶であった. 各化合物の融点, 性状, 収量, 元素分析値を Table I に示した.

LD₅₀ 測定と急性毒性観察 ddY 系雄の体重 20 g 内外のマウス各 5 匹に, 腹腔内に 1 回注射したときの LD₅₀ を Behrens-Kaerber 法により求め, Table I に示した. 観察期間は 10 日間とした. 原化合物 (I) は Aldrich Chemical Co. 製品を購入して使用した. 各検体は当量の希硫酸を加え溶解後, 生理食塩水で希釈し pH 7.0 に調整して使用した.

Lactobacillus arabinosus に対する微生物活性の検討 I および著者らの合成した II—XI の 11 検体について, ニコチン酸 (NA) およびニコチン酸アミド (NAA) の定量に用いられる乳酸菌 *Lactobacillus arabinosus* 17—5 (ATCC 8014) に対する微生物活性を検討した. この場合, NAA 非存在培地および NAA 存在培地の両方について, 各検体の活性を検討した. 菌株保存, 基礎培地の組成, 接種菌液の調製, 培養条件については, 米局

8) W.H. Mills, S.T. Widdows, *J. Chem. Soc.*, 93, 1379 (1907).

第 14 版 (1950) 記載の方法に準拠した.⁹⁾ 微生物増殖度の測定は, 光電比色計 (エレクトロニクス 20) を使用し, 波長 600 m μ の透過率を比較した.

実 験 結 果

LD₅₀ 測定と急性毒性観察

Table I を見るとわかるように, 第一級アミン, 第二級アミン置換体 (II—VIII) に比べ環状アミン置換体 (IX—XI) の方が LD₅₀ 値が大であった. 急性毒性症状として一般に後肢の麻痺を認め, 下痢, 流涙, 失明, 体重減少などが観察され, 3—7 日後に死亡した. 環状アミン置換体では投与 30 分以内に横転して四肢痙攣を起すのを認めた, この症状は一過性で翌日には回復していた. なお検体投与と同時に検体と等モル量の NAA を腹腔内投与しておけば, 後肢麻痺などの急性毒性症状を減弱あるいは消失させることが出来た.

6-ANA 誘導体の *Lactobacillus arabinosus* に対する発育促進作用

6-ANA 誘導体は NAA と構造近縁であるから, まず 6-ANA 誘導体が NAA と類似した *Lactobacillus arabinosus* に対する発育促進能を有するか否かを検討した. この目的で必須因子 NAA を全く含まない培地に, 種々の濃度の 6-ANA (I) および 6-ANA 誘導体 (II—XI) を添加後 *Lactobacillus arabinosus* 17-5 (ATCC 8014) を接種, 24 時間培養後の濁度を光電比色計で比較し, その結果を Table II および Fig. 1 に示した.

この結果を見るとわかるように, I, IX, X を除いて, 一般に実験に使用した 6-ANA 誘導体は *Lactobacillus arabinosus* に対し程度の差はあるが NAA に代替する微生物増殖促進作

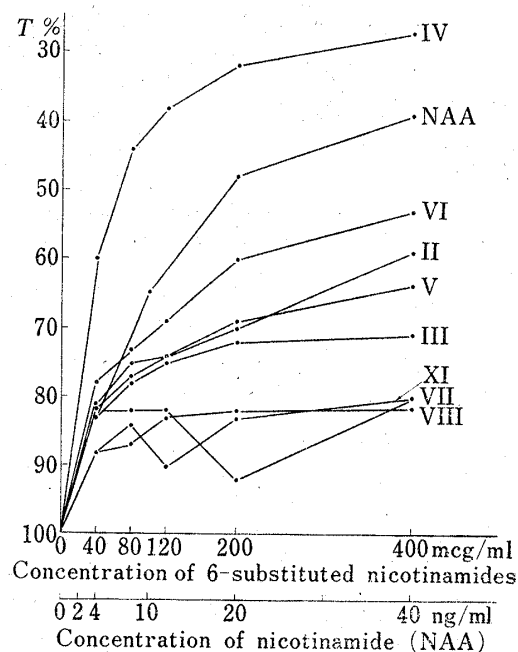


Fig. 1. Growth Curve of *Lactobacillus arabinosus* in the Presence of Nicotinamide or 6-Substituted Nicotinamides

TABLE II. Growth of *Lactobacillus arabinosus* in the Presence of Nicotinamide (NAA) or 6-Substituted Nicotinamides

Compd. No.	Transmission percentage											
	Concentration of NAA (ng/ml)						Concentration of test compds. (mcg/ml)					
	0	2	4	10	20	40	0	40	80	120	200	400
NAA	100	89	83	65	48	39	—	—	—	—	—	—
I	—	—	—	—	—	—	100	100	100	100	100	100
II	—	—	—	—	—	—	100	81	75	74	70	59
III	—	—	—	—	—	—	100	83	78	75	72	71
IV	—	—	—	—	—	—	100	60	44	38	32	27
V	—	—	—	—	—	—	100	82	77	74	69	64
VI	—	—	—	—	—	—	100	78	73	69	60	53
VII	—	—	—	—	—	—	100	82	82	82	92	80
VIII	—	—	—	—	—	—	100	88	87	83	82	81
IX	—	—	—	—	—	—	100	100	100	100	100	100
X	—	—	—	—	—	—	100	100	100	100	100	100
XI	—	—	—	—	—	—	100	88	84	90	83	80

9) 高取吉太郎, 北村二郎, 今井一夫, 薬誌, 85, 1071 (1965).

用を示した。この NAA 代替能は第一級アミン置換体が第二級アミン置換体より一般に大なる値を示した。また第一級アミン置換体の中では isopropyl (IV) が最大で, benzyl (VI), methyl (II), cyclohexyl (V) の順に小となった。しかしその代替力価は一般に小で, 最大の isopropyl 置換体でも NAA の力価を 1 として示した時に 1/3300 (0.0003) に過ぎなかった。

6-ANA 誘導体の NAA に対する拮抗作用

NAA 2 ng/ml および 4 ng/ml の存在する培地に, 種々の異なった濃度の 6-ANA (I) および 6-ANA 誘導体 (II—XI) を添加してから, *Lactobacillus arabinosus* 17-5 (ATCC 8014) を接種培養し, 24 時間後の濁度を光電比色計で測定する方法により, 6-ANA 誘導体の NAA に対する拮抗作用の有無を検討した。その際得られた結果を Table III, Fig. 2 および Table IV, Fig. 3 に示した。これを見るとわかるように, 原化合物 6-ANA (I) そのものは高濃度になると NAA に対し強い拮抗作用を示した。すなわち NAA 2 ng/ml 含有培地で I の 200 mcg/

TABLE III. Effect of 6-Substituted Nicotinamides on the Growth of *Lactobacillus arabinosus* coexist with NAA (2 ng/ml)

Compd. No.	Transmission percentage Concentration of test compd. (mcg/ml) added to NAA (2 ng/ml)					
	0	40	80	120	200	400
I	82	83	86	91	100	100
II	82	87	73	70	68	65
III	82	82	77	75	73	69
IV	82	61	52	45	40	34
V	82	80	77	74	68	65
VI	82	72	67	65	59	55
VII	82	91	85	83	82	74
VIII	82	83	78	77	76	75
IX	82	78	75	69	75	89
X	82	83	88	85	82	72
XI	82	86	81	78	77	73

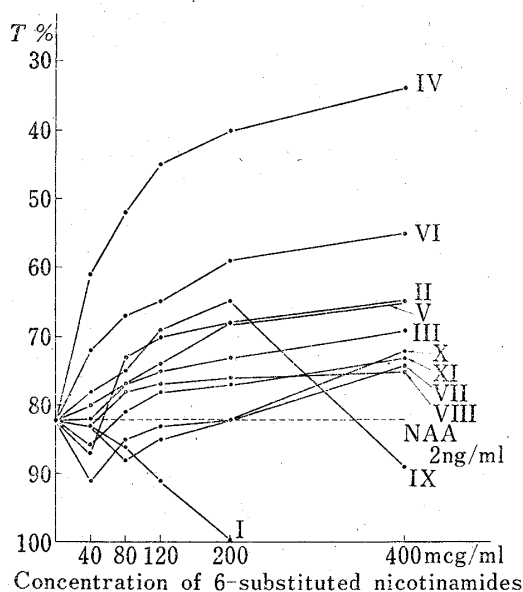


Fig. 2. Effect of 6-Substituted Nicotinamides on the Growth Curve of *Lactobacillus arabinosus* coexist with NAA (2 ng/ml)

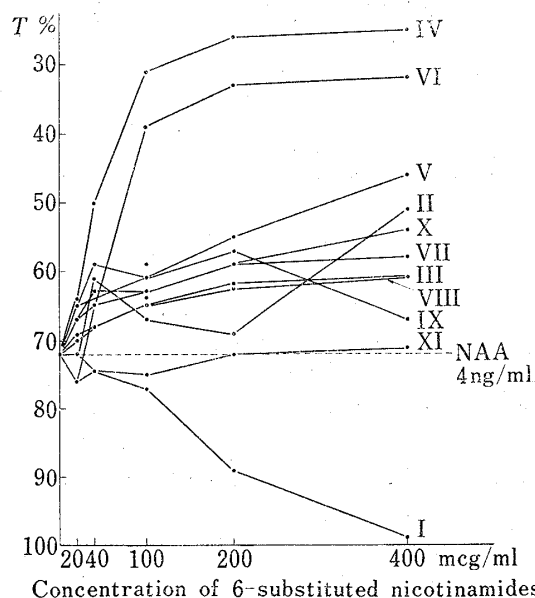


Fig. 3. Effect of 6-Substituted Nicotinamides on the Growth Curve of *Lactobacillus arabinosus* coexist with NAA (4 ng/ml)

TABLE IV. Effect of 6-Substituted Nicotinamides on the Growth of *Lactobacillus arabinosus* coexist with NAA (4 ng/ml)

Compd. No.	Transmission percentage Concentration of test compds. (mcg/ml) added to NAA (4 ng/ml)					
	0	20	40	100	200	400
I	72	72	74	77	89	99
II	72	72	61	67	69	51
III	72	70	68	65	63	61
IV	72	64	50	31	26	25
V	72	65	64	61	55	46
VI	72	76	65	39	33	32
VII	72	67	63	63	59	58
VIII	72	69	68	65	62	61
IX	72	65	59	61	57	67
X	72	67	65	63	59	54
XI	72	76	74	75	72	71

ml, NAA 4 ng/ml 含有培地で I の 400 mcg/ml が、それぞれ完全な発育抑制を示し、拮抗指数はほぼ $1:10^5$ であった。しかるに I の構造近似化合物の中で、piperidino 置換体 (IX) に弱い微生物増殖抑制作用が認められたのみで、他の 9 種の 6-ANA 誘導体では増殖抑制は殆んど認められず、逆に NAA に対し相加的な微生物増殖促進作用が認められた。この NAA 代替作用の強さは NAA を含まない培地で検討した NAA 代替作用検討の結果とはほぼ平行し、第一級アミン置換体が大であり、第一級アミン置換体の中では isopropyl (IV) が最大で、benzyl (VI), methyl (II), cyclohexyl (V) の順序に小となった。

考 察

既知のニコチン酸拮抗体¹⁰⁾のうち、6-ANA (I) については、高等動物に対する抗ビタミン作用として実験動物癌に対する制癌作用、実験動物に対する毒性がまず注目され、微生物活性については従来あまり報告が見られなかった。しかるに前述のように強力な I の乳酸菌 *Lactobacillus arabinosus* に対する増殖抑制作用が発見されたのは興味がある。

しかるに著者らの合成した 10 種の 6-ANA 誘導体 (II—XI) は、I との構造近似にもかかわらず、NAA 存在培地で piperidino 置換体 (IX) に弱い増殖抑制作用が認められただけで、NAA に拮抗する増殖抑制作用は殆んど認められず、高濃度では NAA に相加する微生物増殖促進作用が認められた。また NAA 不含培地では 6-ANA (I), piperidino (IX), morpholino (X) では認められなかったが、その他の化合物では一般に高濃度で NAA に代替する微生物発育促進作用が認められた。この NAA 不含培地での発育促進作用の強弱は NAA 含有培地で NAA に相加する発育促進作用の強弱の序列とはほぼ平行し、第一級アミン置換体が強力で、isopropyl (IV) がもっとも大きく、benzyl (VI), methyl (II), cyclohexyl (V) の順に小となった。元来著者らの合成した 10 種の 6-ANA 誘導体は原化合物 6-ANA (I) と同様にマウスの腹腔内投与により下肢麻痺を主徴とする急性毒性症状を示し、LD₅₀ は原化合物 (I) がもっとも小さく、isopropyl (IV), diethyl (VIII), ethyl (III), methyl (II), benzyl (VI), cyclohexyl (V), dimethyl (VII) の順序に大となり、環状アミン置換体になるとさらに大となった。下肢麻痺症状は NAA 同時投与により減弱、消失させることが出来る故、6-ANA (I) および 6-ANA 誘導体 (II—XI) のニコチン酸拮抗体としての毒性発現と考えられる。これに対して *Lactobacillus arabinosus* に対し、I が明瞭な、IX が弱い、それぞれ発育抑制作用を示したのみで、他の 6-ANA 誘導体は一般に発育促進作用を示したことは、高等動物と微生物とでニコチン酸拮抗体の示す毒性もしくは阻害作用の発現機構に差異があるためと考えられる。

10) R.M. Hochster, J.H. Quaster, "Metabolic Inhibitors," Academic Press, New York & London, 1963, Vol. I, pp. 466—468, Vol. II, pp. 12—15.