37. 高取吉太郎, 小瀬 慶: ズルフオンアミド剤合成の研究 (第3報)

化学療法剤としてのロダン系ズルフオンアミド

Kichitaro Takatori and Kei Ose: Syntheses of New Sulfonamides. III.
Sulfonamides Containing Thiocyano Group as Chemotherapeutic Agents.

(Gifu College of Pharmacy*)

第1報¹⁾, 第2報²⁾ で報告したロダン系ズルフオンアミドを化学療法剤として検討した. 検討すべき化合物の検体番号は次の如く定めた.

Sulfathiazole
S. T.

先ず *Staphylococcus aureus* 及び *E. coli* に対する試験管内発育阻止力試験を行つた. 其の結果を Table I, II に示す. (1) 最も有効なのは No. 1, No. 2, No. 3 及び沃度を含む No. 7 である. (2) *Staphylococcus aureus* に対し No. 1, No. 2, No. 3, No. 7 は Sulfathiazol と同程度に有効であるが, *E. coli* に対しては稍々劣る. (3) No. 4, No. 5 は *Staphylococcus aureus* に対しても *E. coli* に対しても作用が弱い. Carbomethoxy 基, Carboäthoxy 基の導入は効力の減弱を來す. (4) No. 5 は *Staphylococcus aureus* に対しては効力弱きも *E. coli* に対しては相当の効力がある.

Table I *Staphylococcus aureus* (Heatley) *in vitro* tests

Test No.	Days					1 st					2 nd					3 rd				
	Molar concentration					10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	—	—	—	±	±	—	—	—	±	+	—	—	—	+	+	—	—	—	+	±
2	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	±
3	—	—	—	±	+	—	—	—	±	±	—	—	+	±	±	—	—	—	±	±
4	—	—	+	±	±	—	—	+	±	±	—	—	+	±	±	—	—	±	±	±
5	—	—	±	±	+	—	—	±	±	±	—	—	±	±	±	—	±	+	±	±
6	—	—	+	+	±	—	—	+	±	±	—	—	+	±	±	—	—	+	±	±
7	—	—	—	—	+	—	—	—	—	±	—	—	—	—	±	—	—	—	—	±
S. T.	—	—	—	—	±	—	—	±	±	+	—	—	±	±	+	—	—	±	+	±
Control						±					±					±				

* Kokonoe-cho, Gifu.

2) 本誌 70, 271 (1950).

1) 本誌 67, 191 (1947).

Table II *E. coli* in vitro tests

Days		1 st					2 nd					3 rd				
Test No.	Molar concentration	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1		-	-	-	+	++	-	-	-	++	++	-	-	-	++	++
2		-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++
3		-	-	-	+	++	-	-	-	+	++	-	-	-	++	++
4		-	±	+	++	++	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
5		-	-	±	+	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	++
6		-	-	-	+	++	-	-	-	+	++	-	-	-	+	++
7		-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++
S. T.		-	-	-	-	±	-	-	±	±	+	-	-	±	+	++
Control		++					++					+++				

Degree of Turbidity : - None ± Slight + Perceptible ++ Remarkable +++ Strong

Table III *Staphylococcus aureus* (Heatley) in vitro tests under addition of 10⁻⁴ M PABA

Days		1 st					2 nd					3 rd				
Test No.	Molar conc.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1		-	-	-	±	+	-	-	-	+	++	-	-	-	++	++
2		-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++
3		-	-	-	+	++	-	-	-	++	++	-	-	-	++	++
4		-	-	++	++	++	-	+	++	++	++	-	+	++	++	++
5		-	-	+	++	++	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++
6		-	-	±	++	++	-	-	±	++	++	-	-	+	++	++
7		-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++
S. T.		-	-	±	++	++	-	+	++	++	++	-	++	++	++	++
Control		++					++					++				

Table IV *E. coli* in vitro tests under addition of 10⁻⁴ M PABA

Days		1 st					2 nd					3 rd				
Test No.	Molar conc.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1		-	-	-	+	++	-	-	-	+	++	-	-	-	++	++
2		-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++
3		-	-	-	+	++	-	-	-	++	++	-	-	-	++	++
4		-	-	+	+	++	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++
5		-	-	±	+	++	-	-	+	+	++	-	-	++	++	++
6		-	-	-	++	++	-	-	-	++	++	-	-	-	++	++
7		-	-	-	++	++	-	-	-	++	++	-	-	-	++	++
S. T.		-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++
Control		++					++					++				

次に *Staphylococcus aureus* 及び *E. coli* に対しパラアミノ安息香酸 (以下 PABA と略称) 存在下に於ける試験管内発育阻止力試験を行つた。其の結果を Table III, IV に示す。Sulfonamid 剤は一般に PABA と拮抗する³⁾。然るにホモスルファミン (Marfanil) は PABA と拮抗しない⁴⁾。また PABA と拮抗せぬ二三の Sul-

famin 誘導体が知られている⁵⁾。Table III, IV を見ると No. 1, No. 2, No. 3, No. 7 は *Staphylococcus aureus*, *E. coli* に対して明かに PABA と拮抗し無い事が認められる。PABA は Pepton 中に含まれ其の量は Pepton の種類に依り不足である。故に Sulfonamid 剤の試験管内発育阻止力試験は厳密には合成培地で行われるべきである。Sulfonamid 剤と PABA との正確なる拮抗比も合成培地で始めて測定し得る。然し著者等は実験の部に記した如く此の試験を普通の Bouillon-Pepton 培地で行ったから、PABA の比較的大なる濃度即ち 10^{-4} モル濃度を含む培地中での結果を観察した。かかる条件では培地中の PABA 量は無視し得る程小と考えられる。

Goetchius, Lawrence 両氏は Sulfanilyl-3,5-dibromanilid の有する抗菌性が少しも PABA に影響され無い事を報告している⁶⁾。また Blackett, Waletzky 及び Baker 氏は Sulfapyridin や Sulfadiazin が PABA と拮抗するのに 2-Sulfanilamid-5-chlorpyrimidin, 2-Sulfanilamid-5-brompyridin の抗マラリア活性が PABA に依り僅かな部分的な拮抗しか受けない事を報告している⁶⁾。即ち此の種の PABA 非拮抗性は

を Sulfamin の N_1 誘導体として導入した化合物に出現する。おそらく PABA と拮抗せぬハロゲン自身の抗菌力に依るものであらう。著者等は更に

を之等に追加した次第で、之等の化合物の PABA 非拮抗性は同一機構に依るものと考えられる。

東大医学部中内科の御協力を得て実施した実験結果を附記する。化合物 A 及び B は球菌に対して強い試験管

内細菌発育阻止力を有する。特に *Staphylococcus aureus* に対しては両化合物とも No. 1, No. 2 と同程度の強い抗菌作用を認めた。此の球菌に対する最小有効濃度試験を Table V に示す。次に化合物 A 及び D の結核菌に対する試験管内発育阻止力を Glycerin-Bouillon 培地及び Kirchner 培地で試験した。両化合物は 20 mg% の割合で直接培地に混合された。溶解度の関係から之以上の濃度で加える事は不可能であつた。しかし結核菌に対

Table V *Staphylococcus aureus* (Terashima) *in vitro* tests Minimum Effective Concentration

Molar conc. Compounds	Turbidity after 24 hours							
	$\frac{10^{-3}}{4}$	$\frac{10^{-3}}{8}$	$\frac{10^{-3}}{16}$	$\frac{10^{-3}}{32}$	$\frac{10^{-3}}{64}$	$\frac{10^{-3}}{128}$	$\frac{10^{-3}}{256}$	$\frac{10^{-3}}{512}$
A	—	—	—	±	+	+	+	+
B	—	—	—	±	+	+	+	+
No. 1	—	—	—	—	±	+	+	+
No. 2	—	—	—	—	±	+	+	+
S. T.	—	—	±	+	+	+	+	+
Control	++							

3) Northey: "The Sulfonamides and Allied Compounds" (1948), p. 467. Sulfonamide Antagonists.

4) K. A. Jensen, K. Schmith: Z. Immunitäts **102**, 261 (1942); Klin. Wochschr. **21**, 1042 (1942); C. A. **38**, 268 (1944).

5) G. R. Goetchius, C. A. Lawrence: J. Bact. **49**, 575 (1945).

6) 薬学, 特別号 I, 25 (1949) (邦訳 Roblin: Metabolite Antagonists (Chem. Rev. **38**, 255 (1946))).

して両化合物とも顕著な発育阻止力を示さなかつた。

動物実験に移る。No. 1, No. 2, No. 3, No. 7 及び関聯化合物のマウスに対する毒性試験の結果を Table VI に示す。(1) $p\text{-NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SCN}$ を Acyl した化合物は Acyl 基の種類に依つて毒性を異にする。Acetyl 化合物は非常に毒性強く, Benzoyl 化合物は毒性遙かに弱く, Sulfanilyl 化合物は更に弱い。然し No. 1 のマウスに対する耐量 30~50 mg は Sulfapyridin のマウスに対する耐量 160 mg に比べれば毒性遙かに強いと言わざるを得無い。(2) No. 1 に比べ No. 2, No. 3 の毒性は稍々強い。CH₃-基の導入は毒性を稍強くする。(3) No. 1 に比べ No. 7 は遙かに毒性が強い。

最後に No. 1, No. 2, No. 3, No. 7 及び関聯化合物の肺炎菌感染マウスに対する治療試験を行つた。其の結果を Table VII, VIII 及び IX に示した。(1) 最小致死量 18 時間 Bouillon 培養 10^{-7} なる肺炎双球菌 (X 群菌) 10^{-5} 稀釈液接種マウスの治療試験に於て No. 7 は対照と大差なく弊死し効果を認めないが No. 1 は Sulfapyridin と近似せる救助成績を示した。(2) No. 2 は 10 mg 投與では無効であるが 20 mg 投與では効果が認められる。(3) No. 1, No. 2, No. 3 は Sulfamerazin の卓越した効力には遙かに及ば無いけれども対照と大差無き Acetosulfamin に比べ生存日数を延長せしめる事がわかる。(4) 試験管内発育阻止力の強い化合物 A 及び B に効果が認められないのは毒性強き故有効量を與え得ない為かとも考えられるが, 化合物 C, D, E の如き比較的毒性少く大量投與し得た化合物にも全然効果認められざる故, 肺炎菌に対する *in vivo* の治療効果はロダン系ズルフォンアミドの一特性であると考えられる。

Table VI マウスに対する毒性試験

Compounds	一日投与量 (mg)	動物数 総 計	1~7 日間に死亡した動物数							生存数 総 計	死亡数 総 計	毒性
			1	2	3	4	5	6	7			
No. 1	50	4	0	0	0	0	1	1	0	2	2	+
	30	4	0	0	0	0	0	1	0	3	1	-
No. 7	50	2	2	-	-	-	-	-	-	0	2	+
	25	4	0	1	0	0	0	2	0	1	3	+
	10	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0	-

Compounds	耐 量	Compounds	耐 量
No. 1	30~50 mg	E	20 mg 以上
A	2 mg 以上	No. 3	20 mg 以上
D	20 mg 以上	C	2 mg 以上
No. 2	20 mg 以上	F	20 mg 以上
B	2 mg 以上	No. 7	10~25 mg

Table VII 肺炎菌感染マウス救助試験 I

被験薬剤	一日投与量 (mg)	動物数 総 計	1~10 日間に死亡した動物数										生存数 総 計
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
No. 1	20	4	0	0	2(1)*	0	0	1	1	-	-	-	0
No. 7	10	2	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Sulfapyridin (トリアノン)	20	2	0	0	0	1*	0	1	1	-	-	-	0
対 照	-	4	0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	0

* 腹水に肺炎菌を認めず

Table VIII 肺炎菌感染マウス救助試験II

被験薬剤	一日投与量 (mg)	動物数 総 計	1~10 日間に死亡した動物数										生存数 総 計
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
No. 2	10	4	1	3	—	—	—	—	—	—	—	—	0
A	20	5	0	4	1	—	—	—	—	—	—	—	0
B	2	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
Sulfathiazol	2	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
対 照	20	4	0	2	2	—	—	—	—	—	—	—	0
	—	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0

Table IX 肺炎菌感染マウス救助試験 III

被 験 薬 剤 Compounds	1 日投与量 (mg)	動物数 総 計	1~10 日間に死亡した動物数										生存数 総 数
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
No. 1	20	8	0	3	5	—	—	—	—	—	—	—	0
A	2	7	3	4	—	—	—	—	—	—	—	—	0
D	20	5	1	4	—	—	—	—	—	—	—	—	0
No. 2	20	10	0	7	3	—	—	—	—	—	—	—	0
B	2	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
E	20	5	2	3	—	—	—	—	—	—	—	—	0
No. 3	20	5	0	4	1	—	—	—	—	—	—	—	0
C	2	2	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	0
F	20	5	4	1	—	—	—	—	—	—	—	—	0
Sulfamerazin	20	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Acetosulfamin	20	6	2	4	—	—	—	—	—	—	—	—	0
対 照	—	10	3	7	—	—	—	—	—	—	—	—	0

以上の結果からロダン系ズルフォンアミドは特に球菌に対して有望な1群の化合物である事が判つた。各種の病原球菌に対して其の特異性を更に追求する予定である。

御指導と御高閲を賜つた伊藤四十二教授, 御激励と御援助を賜つた 岐阜薬科大学学長宮道博士, 御協力を賜つた東大医学部冲中内科当局に厚く感謝する。尙本研究の一部は昭和 24 年度文部省科学研究費に依つた。併せて謝意を表す。

実 験 の 部

(I) 試験管内抗菌力試験 (Table I, II 参照) (イ) 培養基の調製及び分注 肉エキス 10 g, ペプトン 10 g 食塩 5 g, 水 1000 cc なる処方で Bouillon-Pepton 液を調製し n/10 NaOH で pH 7.0~7.2 となる様に修正

Table X

検体番号	分 子 量	秤取量 (g)	10% NaOH (cc)	蒸留水 (cc)	備 考
No. 1	305	0.305	0.8	0.2	液黄色を帯びる
No. 2	319	0.319	0.8	0.2	液黄色を帯びる
No. 3	319	0.319	0.8	0.2	液黄色を帯びる
No. 4	363	0.363	0.9	0.1	液黄色を帯びる
No. 5	377	0.377	0.6	0.4	液黄色を帯びる
No. 6	319	0.319	0.7	0.3	
No. 7	344	0.344	0.9	0.1	
S. T.	255	0.255	0.7	0.3	加温溶解

した。綿栓を施し予め乾熱滅菌せる試験管内に 4.5 cc 宛分注後オートクレーヴ中で 120° 以上 15 分間加熱滅菌した。

(ロ) 稀釈列の調製 (a) 薬物の秤量 予め乾熱滅菌せる秤量瓶中に Table X の如く薬物を秤取した。(b) 稀釈剤 Sulfonamid 剤は稀 NaOH に溶ける故 Table X の如く稀 NaOH を加え溶解後蒸留水で稀釈全量 1 cc となし 1 モル液を調製した。此の 0.5 cc を分注した Bouillon-Pepton 4.5 cc 中に加えると 10^{-1} モル液, 10^{-1} モル液 0.5 cc を別の分注した Bouillon-Pepton 4.5 cc 中に加えると 10^{-2} モル液, 順次 10^{-6} モル液迄つくる。稀釈に依り濁りを生じた場合には稀 NaOH を滴下すれば溶消する。Staphylococcus aureus の発育可能 pH 域は 4.5~9.8, E. coli は 4.6~8.8 といわれ、⁷⁾ 此の方法でつくつた 10^{-2} ~ 10^{-6} 溶液は pH 7.0~9.6 位で大体此の pH 域中にあつた。此の稀釈列を 120° 以上 15 分間滅菌した。No. 1~No. 5 は滅菌に依り沈澱を生ずる部分を生じたから無菌操作で稀釈列を作つて滅菌操作を行わないで併用、其の結果をも観察した。

(ハ) 接種 試験前日貯蔵培養基から移して Bouillon-Pepton 中に前培養した菌を薬物の 10^{-1} ~ 10^{-5} モル液に 1 白金耳宛接種、 10^{-6} モル液には接種しないで雑菌混入の有無を知る標識とした。別に薬物を加え無い Bouillon-Pepton 培養基中に菌を接種して対照とした。

(ニ) 観察 接種した稀釈別を対照と共に孵卵器中に藏め 24 時間、48 時間、72 時間後の濁濁度を観察した。其の標準は Table II に附記した。

(2) PABA 拮抗試験 (Table III, IV 参照) PABA 1.37 g (0.01 モル) を秤取、10% NaOH 5 cc に溶解後蒸留水を加えて全量 10 cc となせば PABA 1 モル液を得る。1 モル液 5 cc に蒸留水を加え全量 50 cc とすれば PABA 10^{-1} モル液, 10^{-1} モル液 5 cc に蒸留水を加えて全量 50 cc とすれば PABA 10^{-2} モル液, 10^{-2} モル液 5 cc に蒸留水を加えて全量 50 cc とすれば PABA 10^{-3} モル液, 此の PABA 10^{-3} モル液 0.5 cc に Bouillon-Pepton 4 cc を加えた試験管列をオートクレーヴ中 120° 以上 15 分間加熱滅菌してから (1) と同様薬物を加えて稀釈列を作り、同様接種後孵卵器中に藏め 24 時間、48 時間、72 時間後の濁濁度を観察した。標準前と同じ。

(3) 毒性試験 (Table VI 参照) マウスは体重 12 g 前後のものを選び、薬物は適宜にアラビアゴム、水を加えて懸濁液となし、連日 24 時間毎に 5 日間経口的に投与、観察は 7 日間とした。薬物は 1 日 0.2 cc 宛使用し、0.2 cc 中に常に所要量が存在する様に調製した。かくして該期間中試験動物が外見上中毒症状を呈し無い 1 回の投与量を耐量とした。

(4) 肺炎感染マウス治療試験 (Table VII, VIII, IX 参照) 使用菌株は患者より分離せる肺炎双球菌 (X 群菌) を数代のマウスを通過せしめ毒力を一定となし、マウスの心血を Bouillon 中に加え 18 時間培養したものを原液となし、順次 Bouillon で 10 倍稀釈した。此の 0.2 cc をマウス腹腔内に注射した場合の最小致死量は 10^{-7} である。治療試験に当つては 10^{-6} 稀釈液 0.2 cc をマウス腹腔内に注射して感染せしめた。治療方法は 0.4 cc 中に薬物 1 日量を含む懸濁液を調製し、1 日 2 回 0.2 cc 宛即ち接種後 2 時間、其の後 12 時間毎に 5 日間投与し、観察は 10 日間とした。尙効力検定の対照として Sulfapyridin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Acetosulfamin を用い観察した。死因は腹水塗抹標本を作り検鏡して決定した。

岐阜薬科大学

Summary

Chemotherapeutic values of the following were examined: *p*-Sulfanilamido-thiocyanobenzene (I), *p*-sulfanilamido-*m*-methylthiocyanobenzene (II), *p*-sulfanilamido-*o*-methylthiocyanobenzene (III), *p*-sulfanilamido-*o*-carbomethoxythiocyanobenzene (IV), *p*-sulfanilamido-*o*-carbomethoxythiocyanobenzene (V), 2-sulfanilamido-6-methylbenzothiazole (VI) and *p*-sulfanilamido-iodobenzene (VII).

1) (I), (II), (III) and (VII) showed a powerful growth-inhibition *in vitro* against coccal bacteria, the action not being antagonized by *p*-aminobenzoic acid.

2) The toxicities of the acylated compounds of *p*-thiocyananiline were found to be different according to the kind of the acyl group present, the tolerable dose against mice being 2 mg. in acetyl, 20 mg. in benzoyl, and 30-50 mg. in sulfanilyl compounds.

3) The sulfanomides of thiocyanobenzene series showed some promising results in therapeutic tests against induced pneumococcal infection in mice.

(Received October 18, 1951)