$C_7H_5O_2N_3S$ 計算値 N 21.54, 実験値 N 21.55. ii) 4-thiocyananoiline 15 g と無酢 10 g をアセチルフラスコ中に入れ, 油浴上 30 分間加熱. 放冷後内容物を氷水中に投入, 析出する結晶を濾集しエタノールより再結晶. このようにして得た 4-thiocyanoacetanilide 20 g を氷酢 25 cc に溶解, 氷冷 10° 以下に保ちながら攪拌下硝酸 ($D=1.38$) 15 g を滴下する. 反応終了後内容物を氷水中に注下し, 生じた黄沈をエタノールより再結, 2-nitro-4-thiocyanoacetanilide を得. 収率 80%. 黄色針晶, mp 185° . $C_9H_7O_3N_3S$ 計算値 N 17.72, 実験値 N 17.47.

この結晶 2 g をとり 20%塩酸と 30 分間煮沸, 放冷後 10% Na_2CO_3 で中和, 生じた黄沈を濾集, エタノールより再結. 収率 85%. 黄色針晶, mp $114\sim115^\circ$. $C_7H_5O_2N_3S$ 計算値 N 21.54, 実験値 N 21.35. i) により得られた結晶と混融するも融点の降下は認められない.

2-Nitro-4-thiocyanobenzanilide (XV) 2-nitro-4-thiocyananoiline 2 g, K_2CO_3 4 g をアセトン 20 cc に溶解, 激しく攪拌しながら benzoyl chloride 3 g を加え, 更に水浴上 1 時間加熱. 放冷後 K_2CO_3 水溶液中に注加, 生じた沈澱をアセトンより再結. 収率 50%. 黄色針晶, mp $138\sim139^\circ$. $C_{14}H_9O_3N_3S$ 計算値 N 14.01, 実験値 N 13.64.

2,3'-Dinitro-4-thiocyanobenzanilide (XVI) 原料アミン 2 g をアセトン 15 cc に溶解し, K_2CO_3 3 g, *m*-nitrobenzoyl chloride 3 g を加えて (XV) の如く処理. エタノールより再結. 収率 60%. 黄色針晶, mp 148° . $C_{14}H_9O_5N_4S$ 計算値 C 48.84, H 2.33, 実験値 C 49.25, H 2.59.

2,4'-Dinitro-4-thiocyanobenzanilide (XVII) 原料アミン 2 g, *p*-nitrobenzoyl chloride 3 g, K_2CO_3 3 g, アセトン 20 cc より (XV) の如く処理. ベンゼンから再結. 収率 72%. 黄色針晶, mp $174\sim175^\circ$. $C_{14}H_8O_5N_4S$ 計算値 N 16.28, 実験値 N 16.15.

2-Nitro-4-thiocyanodiphenylurea (XVIII) 原料アミン 2.2 g, phenyl isocyanate 1.5 g をベンゼン 20 cc 中に溶解, 3 時間加熱. 放冷後析出物をベンゼンで洗滌, エタノールより再結. 収率 80%. 黄色針晶, mp $117\sim118^\circ$. $C_{14}H_{10}O_3N_4S$ 計算値 N 17.83, 実験値 N 17.90.

2,4'-Dinitro-4-thiocyanodiphenylurea (XIX) 原料アミン 1.5 g, *p*-nitrophenyl isocyanate 1.5 g をベンゼン 20 cc に溶解, 2 時間加熱. 放冷後析出物をベンゼンで洗滌, エタノールより再結. 収率 70%. 黄色針晶, mp 115° . $C_{14}H_9O_5N_5S$ 計算値 N 19.52, 実験値 N 19.06.

神戸女子薬科大学

U.D.C. 547.546 : 615.778

81. 金子太郎, 黒田久寅, 飯尾豊子: 芳香族硫シアン及び関連化合物

の合成並びに生物学的試験 (第 5 報)

芳香族硫シアン=ニトロ化合物の対生物作用について

Taro Kaneko, Hisatora Kuroda, and Toyoko Iio: Syntheses and Biological

Tests of Aromatic Thiocyanate and Related Compounds. V.

Biological Activity of Aromatic Thiocyanonitro Compounds.

(Kobe Women's College of Pharmacy)

Biological activities of aromatic thiocyanate compounds, substituted with nitro group in the ring or in the side chain, were tested against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Rabdiad bufonis*. It was thereby found that antibacterial and rabdiadical activities were present in compounds of the general formula,

$R_1-\text{C}_6\text{H}_3(R_2)-\text{SCN}$, in which R_1 is substituted with a fat-soluble group, such as $-\text{NHCONHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2(p)$, and R_2 is substituted with an electrophilic and non-dissociating group, such as $-\text{NO}_2$ and $-\text{COOC}_2\text{H}_5$.

(Received December 12, 1955)

前報にその合成について報告した側鎖或いは主核にニトロ基を導入した硫シアン化合物について抗菌試験及び殺ガマ線虫試験を行った。これらの試験成績は *Staphylococcus aureus*, *E. coli* の増殖を 50% に抑制するのに要した各試料の mol 濃度, ガマ線虫 5 匹中 3 匹の機械的刺戟に対する反応を完全に停止せしめるのに要した時間を以て表わすこととした。この試験結果は Table I のようである。

Table I. Antibacterial and Rabdiacidal Activity of Thiocyno Compounds

General Formula		Highest dilution inhibiting growth of bacteria at 50% $\times 10^{-4} M$		Time required till complete death of <i>Rabdias bufonis</i> (hrs.)
R_1	R_2	<i>Staphylo.</i>	<i>E. coli</i>	
-NH ₂	-H	2.1	5.0	0.6
//	-NO ₂	1.1	1.0	//
//	-COOH	1.5	3.0	0.8
//	-COOC ₂ H ₅	2.1	3.1	5.0
//	-CH ₃	3.6	>5.0	0.3
-NHCOC ₆ H ₅	-H	>5.0	//	>24
//	-NO ₂	//	//	//
//	-COOC ₂ H ₅	//	//	//
//	-CH ₃	//	//	//
-NHCOC ₆ H ₄ NO ₂ (o)	-H	5.0	//	24
//	-COOC ₂ H ₅	//	//	>24
//	-CH ₃	>5.0	//	//
-NHCOC ₆ H ₄ NO ₂ (m)	-H	//	//	24
//	-NO ₂	//	//	>24
//	-COOC ₂ H ₅	//	//	//
//	-CH ₃	//	//	//
-NHCOC ₆ H ₄ NO ₂ (p)	-H	4.0	//	24
//	-NO ₂	5.0	//	>24
//	-COOC ₂ H ₅	//	//	//
//	-CH ₃	>5.0	//	//
-NHCOCH ₃	-NO ₂	1.2	0.7	//
//	-COOC ₂ H ₅	1.5	2.5	//

即ち 4-thiocyanobenzanilide, 2-nitro-4-thiocyanobenzanilide, 2-ethoxycarbonyl-4-thiocyanobenzanilide, 2-methyl-4-thiocyanobenzanilide 等ベンゾイル化物はもとの化合物に比して著しく抗菌作用が低下し, またそのニトロ化合物である 2', 3', 4', 各 nitrobenzanilide 化合物にもさしたる作用の増強をみる事ができなかつた。かつもとの遊離アミノ基をもつた化合物が $2.0 \times 10^{-4} M$ 以下で *Staphylococcus* を抑制するのに對して, 何れもその 3 倍以上の濃度に於いても抗菌効果を認める事ができなかつた。またそのニトロ基の位置の相異による抗菌作用の差異も, この程度の抗菌力では殆んど判定することができなかつた。これらの実験結果からするとチオシアノ基に對し *p*-位に比較的安定な基を導入することは, この種の化合物の抗菌作用を著しく不活性化することとなり抗菌作用を示すには, この位置に何か生物学的に活性な基を導入するか, 或いは遊離の状態にしておくことが必要であることを暗示している。この傾向は *E. coli*. に對してもほぼ同様に現われている。

また著者等は前報までチオシアノ化合物につき豚蛔虫を用いて殺蛔虫性を検してきたが¹⁾, 虫体が大型であり, 試料を多量に必要とし, かつ同一条件の虫体を多数同時に採取することは極めて困難であるため, 今回は武田氏の方法²⁾に従つてガマ (*Bufo vulgaris japonicum* Schlegel) の大腸上部に寄生する線虫 *Rabdias bufonis* を使用して試験管内殺虫効力を試験した。その結果微生物に對する場合と全く同様にベンゾイル化によりその作用は急激に減少して, もとの化合物がいずれも 1 時間以内に殺虫作用を示したのに対して, 大部分の化合物は 24 時間後もその運動を停止させることができなかった。またアセチル化によつて抗菌力は減少しなかつたが殺虫力は殆んど消失した。

次にチオシアノ基に對して *p* 位にフェニル尿素を導入すると強い抗 *Staphylococcus* 作用をもつ化合物が得られたので, さらに他の数種のチオシアノ化合物の *p*-位にフェニル尿素或いは 4'-ニトロフェニル尿素を導入した

1) 金子, 黒田, 植田: 本誌 75, 303(1955).

2) 武田, 玉村, 峰下, 村上: 日本薬理誌 47, 86(1951).

Table II. Antibacterial and Rabdiacidal Activity of Phenylureyl- or Nitrophenylureyl-thiocyano Compounds

General Formula		Highest dilution inhibiting growth of bacteria at 50% $\times 10^{-4} M$		Time required till complete death of <i>Rabdias bufonis</i> (hrs.)
R_1	R_2	<i>Staphylo.</i>	<i>E. coli</i>	
-NHCONHC ₆ H ₅	-H	0.91	>5.0	>24
	-NO ₂	0.57	0.5	18
	-COOH	1.2	4.3	20
	-COOC ₂ H ₅	1.4	5.0	19
	-CH ₃	5.0	>5.0	>24
-NHCONHC ₆ H ₄ NO ₂ (<i>p</i>)	-H	1.3	1.5	0.3
	-NO ₂	0.36	0.42	7
	-COOH	0.93	0.75	14

化合物についてその対生物作用を検し Table II の成績を得た. すなわちフェニル尿素化により予想通りもとの化合物より遙かに強い抗菌作用をもつた化合物が得られフェニル尿素誘導体及び *p*-ニトロフェニル尿素誘導体はいずれもそれらを導入しないもとのチオシアノ化合物よりさらに強い抗 *staphylococcus* 作用を示した. またフェニル尿素誘導体が *E. coli* に対する作用を消失するのに対して *p*-ニトロフェニル尿素誘導体は著しくその作用を増強し, 4-thiocyanophenyl-4'-nitrophenylurea はニトロ化しないもとのフェニル尿素誘導体に比して約 10 倍以上の強い作用を示した. またγ線虫に対してフェニル尿素誘導体が殆んど作用を示さないのに対して, *p*-ニトロフェニル尿素誘導体は遊離アミノ化合物の約 2 倍以上の効力を示した. このことは分子量がもとの化合物の約 2 倍となり, 全分子量中チオシアノ基の占める%が減少しているにも拘わらず対生物作用は逆に増強されている結果を示しており, はなはだ興味深い重要な知見であるといえる.

また一般式中の R_1 を一定とし R_2 のみを変化させた場合について考察すると, -NO₂, -COOH, -COOC₂H₅, -H, -CH₃ の順に抗菌作用は減少している. 即ち R_2 として電子吸引性の基を導入した際は常に強い抗菌作用を示し, 電子放出性基は逆に抗菌作用の低下をもたらしており, この傾向はグラム陰性菌である *E. coli* に対して特に明瞭に現われている. 従つてニトロ基を R_2 として主核中に導入した時は *E. coli* に対して強い作用を示し, 2-nitro-4-thiocyananiline, 同 acetanilide 等は $0.7 \sim 1.0 \times 10^{-4} M$ で細菌の増殖を抑制している. さらに R_1 として最も強い効果の認められた *p*-ニトロフェニル尿素基及び R_2 としてこのニトロ基をもつた 2,4'-dinitro-4-thiocyanophenylurea は最強の対生物作用を示しており, *Staphylococcus* を $0.36 \times 10^{-4} M$, *E. coli* を $0.42 \times 10^{-4} M$ で抑制し, もとの化合物に比してそれぞれ約 5 倍, 10 倍以上の作用を認めることができた.

さらにこれら強い抗菌作用を示した数種の化合物の各濃度に対する *Staphylococcus* 増殖率をプロビットにとつた時の回帰直線を式で示すと Table III となり, 次のグラフ (Fig. 1) を得る.

Fig. 1.
Growth Curve of *Staphylococcus aureus* in the Medium of Thiocyno Compounds

Table III. Linear Regression between Concentration of Thiocyanate Compounds and Growth of Bacteria

General Formnla
	R ₁	R ₂	$y=ax+b$
(1)	-NH ₂	-H	$y=2.04x-4.18$
(2)	"	-NO ₂	$y=1.98x-4.25$
(3)	-NHCONHC ₆ H ₅	"	$y=1.36x-1.47$
(4)	-NHCONHC ₆ H ₄ NO ₂ (<i>p</i>)	"	$y=1.74x-3.53$
(5)	-NH ₂	-COOH	$y=2.16x-4.70$
(6)	-NHCONHC ₆ H ₄ NO ₂ (<i>p</i>)	"	$y=2.56x-6.47$
(7)	-NH ₂	-COOC ₂ H ₅	$y=1.86x-3.06$

$$0.01 > p > 0.001$$

Table III に得られた一次式 $y=ax+b$ の a が大となる程, 直線の X 軸に対する傾斜は大となり, 検体の濃度の減少に従つてより急激に増殖抑制作用が低下することを示している. Table III の結果は明らかに R_2 として $-COOH$ が導入された時 a は大となり, 濃度の減少につれて作用が急激に低下することを示している. 然し解離性である $-COOH$ をエステル化して $-COOC_2H_5$ とすれば a は小となりその作用の低下は僅少となる.

以上の実験から R_2 として常に非解離性の電子吸引性基例えば $-NO_2$, $-COOC_2H_5$ 等を導入し, R_1 として脂溶性基例えばニトロフェニル尿素基或いはその他の生物活性の基を導入することが, この種化合物の抗菌性を増大させるために必要な条件であると推定することができる.

本研究にあたり実験に協力された本学学生岸本加代子氏に感謝し, 実験上種々便宜を与えられた瀬戸文雄学長に深謝する.

実 験 の 部

抗 菌 試 験 菌株として *Staphylococcus aureus* Terashima, *E. coli* を使用した*. 各検体の 1% ポリエチレングリコール (400) 溶液をつくり, 普通ブイヨンでそれぞれ所定濃度の検体を含む培地を調製し, これに予め 37°, 24 時間普通ブイヨンに培養した菌液 2 滴を滅菌ピペットにより接種し, 37°, 48 時間培養後, 菌の発育状況を 530 Å フィルターを使用して光電光度計により比濁し, 増殖度を測定, プロビット法によりその 50% 増殖阻止濃度を算出した. なお用いたポリエチレングリコールの濃度では菌の増殖に何等影響のないことを確かめておいた.

殺 虫 試 験 武田氏等の方法に従いガマ大腸上部を切開し, 0.6% 食塩水で寄生するガマ線虫をシャーレ中に洗出し, 更に新鮮な 0.6% 食塩水中に約 2 時間 28° に保ち, 正常運動を続ける 1~1.5 cm 体長の虫体のみを選び出し試験に供した. アラビアゴム 0.8% を含む 0.6% 食塩水を用い各検体の 0.1% 懸濁液をつくり, その 4 cc ずつを試験管にとり, この中に虫体 5 匹ずつ投入し 28° に放置した. 結果の判定は 5 匹中 3 匹が白金線突端による機械的刺戟に対し全く反応消失するに至る迄の時間を測定する方法によつた. なお対照として検体を添加しなかつたものはいずれも 24 時間後に於いても正常な運動を継続していた.

神戸女子薬科大学

* 菌株は阪大微生物野研究室より分譲された. 謝意を表する.