の spot を見た。対照プロピオン酸及び酪酸と一致した。

(V) の水素添加 (V) 80 mg のエーテル液を白金 10 mg を用いて還元、水素添加時間 30 分、水素 16.2 cc 吸収(計算値 16.0 cc)。触媒汜別、溶剤を減圧蒸留し除去、残留物は無色の油。

Maleic anhydride adduct の生成 Jacobson 法：(V) 100 mg, maleic anhydride (新たに蒸留脱水せるもの) 40 mg, ベンゼン 0.8 cc を混じ、100~170° 加温、冷後溶剤を減圧留去、結晶を見ず。

著者改良法 (V) 100 mg を maleic anhydride 50 mg (計算量より過剰)、ベンゼン 1 cc に一旦加温溶解して一日放置、翌日 70°, 1 時間加温し溶剤を減圧留去、エーテルに溶かし冷水で過剰の試薬を除去し、乾燥後溶剤留去、残留物を減圧蒸留 bp_{0.1} 180° 以下で未反応物を留去し、蒸留残留物に酢酸エチルを注加溶解するに目的物は不溶で残る。酢酸エチル・石油エーテルから再結晶、mp 165° 辛味、麻酔性なし。

徳島大学薬学部

3) F. Brown: Nature **166**, 4210(1950).

UDC 582.282.12 : 547.581.9' 562.1

62. 山岸三郎：チオールエステルに関する研究(第4報*)

Aspergillus niger の菌糸及び胞子に対する阻害について

Saburo Yamagishi: Studies on Thiol Esters. IV. Mycostatic and Sporostatic Effects on *Aspergillus niger*.

(Pharmaceutical Faculty, University of Chiba**)

Examinations were made on the effect of phenyl thiolbenzoate (Fig. 1), thiophenol ester of fatty acids (Fig. 2 and Table I), and thiophenol ester of aromatic and heterocyclic carboxylic acids (Table II) on the mycelium and spores of *Aspergillus niger*. It was found that the intensity of the effect of phenyl thiolacetates against mycelia and spores (Fig. 3) by the introduction of methyl or bromine in the para-position of thiophenol ring was in the order of bromine > hydrogen > methyl, in parallel with their acyl migration reactivity (Fig. 4) under organic chemical experimental conditions. It was observed that the antisporic effect of phenyl thiolacetate tended to become stronger by the addition of pyridine (cf. Fig. 5).

(Received September 28, 1957)

前報¹⁻³⁾までに宮木及び山岸はチオールエステル類の抗微生物性について検討報告した。それらの acyl thiol 誘導体約 50 種について得られた結果からチオフェノール類のエステルのみが抗微生物力を有することを見出した。また同時にその抗微生物作用の機構はそれらエステルのアシル基が微生物発育上必須のアミノ基またはチオール基等へのアシル基転移反応即ち transacylation の起ることに関連しているものと考察した。事実このようなエステル類のアシル基がアニリン誘導体のアミノ基へ transacylate することを有機化学的条件下に実証した。

本報においては *Aspergillus niger* を供試菌として、生理的にも物質代謝的にも差違のある菌糸と胞子とに対する阻害の効果を検討した結果について報告する。即ち柳田、山岸⁴⁾の方法を用いて脂肪族、芳香族、異項環等の各カルボン酸チオールエステルの効果を比較した。この実験法により phenyl thiolbenzoate の抗菌糸 (mycostatic activity), 抗胞子 (sporostatic activity), 及び殺菌糸 (mycocidal activity), 殺胞子 (sporocidal activity) の各阻害曲線を描くことができ、その結果を Fig. 1 に示した。

このようにして phenyl thiolbenzoate の菌糸及び胞子に対する作用の状態を別々に且つ定量的に知ることができる。例えば抗胞子性は抗菌糸性に比して 50%阻害濃度において 2.4 倍の濃度を必要とすること、或いは殺

* 第3報 本誌 **76**, 1200(1956).

1) 宮木, 山岸: 本誌 **76**, 436(1956).

3) 山岸: 本誌 **76**, 1200(1956).

** Inohana, Chiba.

2) 宮木, 山岸: 本誌 **76**, 1196(1956).

4) T. Yanagita and S. Yamagishi: in press

Fig. 1 Inhibition Curves of Phenyl Thiolbenzoate ($C_6H_5COSC_6H_5$)

M.-static (-cidal): Mycostatic (-cidal)

S.-static (-cidal): Sporostatic (-cidal)

Fig. 2. Inhibition Curves of Thiophenol Esters of Aliphatic Carboxylic Acids

菌糸及び殺孢子濃度は更に高濃度を必要とすること等が明らかである。

次に脂肪族カルボン酸チオフェニルエステル類については、それらの発育阻害作用の相互の関係は Fig. 2 に示した。

これより明らかなことはこれらエステルの阻害曲線がマロン酸エステル以外はいずれも近接していることである。ただ diphenyl dithiolmalonate のみが抗菌糸性と抗孢子性との間に大きな濃度の差が認められる。Table I はこれらエステルの菌糸及び孢子に対する 50%阻害濃度をまとめて比較したものである。なおこの中 phenyl thiolcaprylate は第 1 報¹⁾で記したスクリーニングテストにおいて $10^{-3} M$ で発育阻止を示さなかつたものである。Table I からアシル鎖が長くなる程、抗孢子性が弱くなることが明らかである。また孢子の菌糸に対する 50%阻害濃度の比 (S/M-ratio) はやはり diphenyl dithiolmalonate 以外はいずれも似通つた小さい値を示しており、このことは各エステルの菌糸及び孢子に対する阻害曲線が互に近接していることを示している。

Table II は芳香族、異項環カルボン酸類等のエステルについて同様に菌糸及び孢子に対する 50%阻害濃度を示した表である。この表からこれら大部分のエステルが菌糸及び孢子に対してその発育をかなり低濃度で阻害す

Table I. 50% Inhibitory Concentrations of Thiophenol Esters of Aliphatic Carboxylic Acids

Thiol Esters	Mycostatic (M)	Sporostatic (S)	S : M
$\text{CH}_3\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_5$	$1.38 \times 10^{-4} M$	$1.45 \times 10^{-4} M$	1.05
$\text{C}_3\text{H}_7\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_5$	1.15×10^{-4}	1.70×10^{-4}	1.48
$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_5$	1.45×10^{-4}	1.91×10^{-4}	1.32
$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_5$	1.59×10^{-4}	$>1.00 \times 10^{-3}$	....
$\text{CH}_3\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3 (p)$	1.22×10^{-4}	3.47×10^{-4}	2.84
$\text{CH}_3\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Br} (p)$	4.57×10^{-5}	8.91×10^{-5}	1.97
$\text{CH}_2(\text{COSC}_6\text{H}_5)_2$	2.14×10^{-5}	4.41×10^{-4}	20.88

Table II. 50% Inhibitory Concentrations of Thiophenol Esters of Aromatic and Heterocyclic Carboxylic Acids

Thiol Esters	Mycostatic (M)	Sporostatic (S)	S : M
$\text{C}_6\text{H}_5\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_5$	$6.76 \times 10^{-5} M$	$1.70 \times 10^{-4} M$	2.40
$p\text{-Cl}-\text{C}_6\text{H}_4\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_5$	3.32×10^{-4}	$>1.00 \times 10^{-3}$	....
$\text{C}_4\text{H}_9\text{O}^*\text{-COS}-\text{C}_6\text{H}_5$	1.45×10^{-5}	8.71×10^{-5}	6.00
$\text{C}_4\text{H}_9\text{O}^*\text{-COS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3 (p)$	5.13×10^{-5}	3.16×10^{-4}	6.10
$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}^{**}\text{-COS}-\text{C}_6\text{H}_5$	2.09×10^{-5}	7.25×10^{-5}	3.47
$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}^{**}\text{-COS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3 (p)$	2.82×10^{-5}	9.77×10^{-5}	3.46
$\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2^{***}\text{-COS}-\text{C}_6\text{H}_5$	1.51×10^{-5}	1.00×10^{-4}	6.62

ることが明らかである。但し phenyl *p*-chlorothiobenzoate は前報¹⁾ のスクリーニングテストにおいて $10^{-3} M$ で発育阻止を示さなかつたものである。これらの場合には S/M-ratio は前記脂肪族カルボン酸エステル類に比べてやや大きくなつてゐることが認められる。また類似した構造をもつエステルはそれぞれ同様に近接した S/M-ratio を与えることが注目される。更にチオフエノール環の *p*-位に CH_3 -基が導入されると抗菌糸並びに抗胞子性共に未置換のものより効果が落ちることが知られる。また以上すべての場合においてどれも抗胞子性に比べて抗菌糸性の方が強力であり、その逆の場合は全く認め得なかつた。柳田及び山岸²⁾ は他の種々の化合物について同様な結果を得ているので、細菌の場合と同様に繁殖型の細胞は栄養型の細胞より薬物への抵抗が大きいように思われる。また thiophenol, *p*-thiocresol, *p*-bromothiophenol の抗胞子活性を調べてみた処、その 50% 阻害濃度はそれぞれ $9.1 \times 10^{-4} M$, $>10^{-3} M$, $>10^{-3} M$ でありそれ程強くないことがわかり、これらのチオールエステルの抗菌機作を考える上に興味ある処である。

Fig. 3 は *p*-X-substituted phenyl thiolacetate の抗菌糸、抗胞子及び殺菌糸、殺胞子各阻害曲線であり、この図から明らかなようにこれらエステルの発育阻止作用の強さの順序は *p*-置換基について $\text{Br} > \text{H} > \text{CH}_3$ の順である。これらエステルの抗黴作用の強さの順序と次に示す実験の transacylation の反応性の順序とが同じであるということと比較して考えてみると抗黴作用の機作を考える上に非常に興味がある。Fig. 4 は次のような実験の結果を示すものである。即ちここに示された直線は上記のエステルを *p*-anisidine と等 mol ずつエタノール中で反応せしめた際に transacylation の結果生成するチオフエノール類の量を $0.02 N \text{ I}_2$ 溶液の消費量により各時間毎に滴定して追跡したものである。なお、予めこれらエステルのエタノール中でのエタノリシスの速度は考慮に入れる必要のない程小さいことを確めてある。この結果から明らかな如く電子索引基 (Br) の *p*-位置換は transacylation の反応性を増大し、逆に電子反撥基 (CH_3) の置換により低下せしめられることが明らかとなつた。このような有機化学的な反応性がそのまま生体内に於ける反応性と結びつけられるかどうかは別としてもそれと発育阻止作用の強さとの間に並行関係が認められたことは注目に値しよう。

最近 Schwyzer⁵⁾ は phenyl thiolbenzoate のアミン類との反応速度が重金属イオン特に Ag^+ により促進されることを報告している。また前報³⁾ において山岸は phenyl thiolacetate と *p*-anisidine との反応において

5) R. Schwyzer: Helv. Chim. Acta 37, 155(1954).

Fig. 3. Inhibition Curves of $\text{CH}_3\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{X}$

•—• : X=H
 △—△ : X=Br
 ×—× : X=CH₃

Fig. 4. Titration Curves of Thiophenols by I_2 -Solution on the Reaction of

(1) △—△ : X=Br
 (2) •—• : X=H
 (3) ×—× : X=CH₃

Fig. 5. The Influence of Pyridine and Glycine Ethyl Ester upon the Sporostatic Activity of Phenyl Thiolacetate

pyridine の添加により anilide の収率が上昇することを報告した。そこで phenyl thiolacetate の抗胞子性に対して AgNO_3 , pyridine, trimethylamine, triethylamine 等が作用を増強するかどうか、或いは $\text{HSCH}_2\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ 等が作用を減弱するかどうかについて検討した。その結果 pyridine ($10^{-4} M$) 添加の場合にのみ 50%阻害濃度においてその抗胞子性を倍に増強することがわかった。この場合勿論 pyridine 自体はその濃度で何らの阻害作用も示さない。他の場合については余り顕著な作用は認められず、わずかに $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ には多少抗胞子性を減弱するかのような結果が認められたにすぎない。この関係は Fig. 5 に示されている。

以上のような実験結果から次のような結論が得られよう。

- (1) この実験方法によりチオールエステル類の菌糸及び胞子に対する作用を定量的に、かつ詳細に分析することができた。
- (2) それらの発育阻止作用と有機化学的な実験のデータとの関係を比較すると、この場合各チオールエステルの細胞膜透過性の差を考慮する必要はあるが、ある程度宮木、山岸の考察した transacylation による抗黴作用の機作の論拠を得たものと考えられる。

終りにのぞみ、終御懇篤な御指導を頂いた恩師宮木教授に深甚なる感謝の意を表する。同じく本研究に当り種々御高教をかたじけなくした腐敗研究所柳田教授にあつく感謝する。本研究費の一部を文部省科学研究費に仰いだことを感謝する。

実 験 の 部

抗菌糸阻害実験 *Aspergillus niger* をペプトン-酵母エキス-ブドウ糖の複合培地* (以下本報では総てこの培地を使用) に 48 時間振盪培養し、生成したペレットを waring blender にて処理し、無菌ガーゼにより濾過し多数の菌糸断片を含む菌糸浮游液を得た。この浮游液 0.1 cc を適当濃度の薬物を含む寒天平板上にコンラージ棒により塗抹接種し、 30° , 24 時間培養した後生成するコロニー数を数えた。

抗胞子阻害実験 10 mg の乾燥胞子を 5 cc の 0.02% Tween 80 液に浮游させた浮游液 0.05 cc を、各薬物を含む寒天平板上に塗抹接種し、 30° , 4~5 時間培養した後、顕微鏡下に胞子の膨潤状態を観察し、膨潤した胞子及び膨潤していない胞子数をそれぞれ数えた。

以上の抗菌糸および抗胞子阻害の実験において或濃度の薬物の阻害度は次式によつて算出した。

$$I\% = \left(1 - \frac{N}{N_0}\right) \times 100$$

上式中 N_0 および N はそれぞれ薬物が存在せぬ場合と存在せる場合におけるコロニー数 (或いは膨潤胞子数) を示す。このようにして求めた阻害度を縦軸に、mol 濃度の対数を横軸にとつて各阻害曲線を描くことができる。

殺菌糸および殺胞子阻害実験 抗菌糸 (また抗胞子) 阻害実験においては薬物を接触させたままの状態を実験観察したが、殺菌糸および殺胞子実験では薬物溶液と菌糸または胞子を 20 分間、 30° に振盪培養した後薬物を除き、以下上記と同様に処理しその生存率を算出した。

Phenyl thiolacetate と *p*-anisidine との反応 (Fig. 4) $\text{CH}_3\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_5$ [または $\text{CH}_3\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ (*p*), $\text{CH}_3\text{COS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Br}$ (*p*)] 及び精製した *p*-anisidine をそれぞれ 2×10^{-3} mol ずつとり 50 cc の無水エタノール中に溶解、 $60 \pm 0.1^\circ$ に反応せしめ、各時間毎にその 5 cc をとり出して 0.02 *N* I_2 溶液により滴定した。Fig. 4 に I_2 溶液消費量を示した。

千葉大学薬学部

* ペプトン 20 g, 酵母エキス 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, MgSO_4 0.5 g, ブドウ糖 10 g を蒸留水により 1 L とした。pH 6.2.