アミノステロイド化合物の抗菌活性に関する研究¹⁾

柳下弘毅,^{2a)} 永井義郎^{2b)}

国立予防衛生研究所抗生物質部,^{2a)} 帝国臓器製薬株式会社^{2b)}

Studies on Antimicrobial Activities of Aminosteroids¹⁾

KOKI YAGISHITA^{2a)} and YOSHIRO NAGAI^{2b)}

Department of Antibiotics, National Institute of Health of Japan^{2a)}
and Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.^{2b)}

(Received March 3, 1969)

Antimicrobial activities of some aminosteroid compounds were tested. Among the new compounds, 17 β -amino-3,5-androstadiene, 17 β -amino-5-androstene, and their salts showed inhibition at 5–10 μ g/ml against gram-positive bacteria, at 50–100 μ g/ml against gram-negative bacteria, at 1–5 μ g/ml against *Mycobacterium*, at 1 μ g/ml against *Candida albicans*, at 1 μ g/ml against *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium citrinum*, and at 10 μ g/ml against *Gibberella fujikuroi* and other fungi. The relationship between structure and antimicrobial activities is discussed.

ステロイド構造を有する化合物が抗菌作用を示すことはかなり以前から知られている。Meier 等,³⁾ Seneea,⁴⁾ 黒沢⁵⁾ および Lester 等⁶⁾ が性ホルモンまたは副腎皮質ホルモンの抗菌活性について述べているが、いずれもこれらの化合物の場合、活性はあまり強くなく、みるべきものはない。また含窒素ステロイドについては、James 等,⁷⁾ Hilton 等⁸⁾ あるいは Herzog 等⁹⁾ などの報告があり、これらの中にはアミノ胆汁酸の *n*-ヘキシルエステルのように 4 μ g/ml で黄色ブドウ球菌を阻止する抗菌活性の強いものもみられる。また変型ステロイド(フシダン型)構造を有する抗生物質として fusidic acid,¹⁰⁾ helvolic acid,¹¹⁾ cephalosporin P₁¹²⁾ などが知られており、特に fusidic acid の誘導体についてはその構造と抗菌性に関して Godtfredsen 等¹³⁾ の詳細な報告がある。

筆者等はアミノステロイドの研究中、17 β -amino-3,5-androstadiene (5) (新規化合物) およびその類似化合物が *Trichophyton asteroides* (白癬菌) および *Penicillium citrinum* QM-1226 (青カビ) に対しかなり強い阻止作用を示すことをみいだした。¹⁾ そこで合成した各種関連ステロイド化合物について一般細菌、抗酸性菌、酵母、カビおよび植物病原菌に対する抗菌活性をしらべ、これらアミノステロイドのある種のものがグラム陽性菌、抗酸

1) 日本化学会第 19 年会で 1 部発表, 横浜, 1966 年 3 月。

2) Location: a) Kamiōsakichōjamaru, Shinagawaku, Tokyo; b) Shimosakunobe, Kawasaki.

3) K.E. Meier, K. Ivens, *Naturwissenschaften*, **41**, 284 (1954); K.E. Meier, K. Ivens, *ibid.*, **42**, 129 (1955).

4) H. Seneea, *Antibiot. Chemotherapy*, **6**, 41 (1956).

5) 黒沢雄一郎, 農化, **32**, 415 (1958).

6) G. Lester, O. Hechter, *J. Bacteriol.*, **76**, 365 (1958).

7) S.P. James, F. Smith, M. Stacey, M. Webb, *J. Chem. Soc.*, **1946**, 665.

8) M.L. Hilton, A.S. Jones, J.R.S. Westwood, *J. Chem. Soc.*, **1955**, 3449.

9) H.L. Herzog, C.C. Payne, E.B. Hershberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5324 (1955).

10) W.O. Godtfredsen, W. von Daehne, S. Vangedal, D. Arigoni, A. Marquet, A. Melera, *Tetrahedron*, **21**, 3505 (1965).

11) S. Okuda, S. Iwasaki, M.I. Sair, Y. Machida, A. Inoue, K. Tsuda, Y. Nakayama, *Tetrahedron Letters*, **24**, 2295 (1967).

12) T.G. Halsall, E.R.H. Jones, G. Lowe, C.E. Newall, *Chem. Comm.*, **1966**, 685; P. Oxley, *Chem. Comm.*, **1966**, 729.

13) W.O. Godtfredsen, W. von Daehne, L. Tybring, S. Vangedal, *J. Med. Chem.*, **9**, 15 (1966); W.O. Godtfredsen, C. Albrethsen, W. von Daehne, L. Tybring, S. Vangedal, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1965**, 132.

性菌, 特にカビおよび植物病原菌に対し阻止作用が強いことを認めた.¹⁴⁾ 本報ではこれらアミノステロイド化合物の抗菌作用について述べ, また構造との関係について考察する。

実験の部

実験方法

I 抗菌試験法 抗菌作用は寒天平板希釈法によって, 肉眼的にその発育を完全に阻止するに要した最小発育阻止濃度 MIC ($\mu\text{g/ml}$) で示すこととした。

1: グラム陽性, 陰性菌の抗菌試験には, medium-1 (普通寒天培地, pH 6.8—7.0) を使用し, 37° で 48 hr 培養し, その MIC を観察した。

2: 抗酸性菌の抗菌試験には, medium-2 (グリセリン 1%, ポリペプトン 0.75%, 肉エキス 0.75%, NaCl 0.2%, 寒天 1.8% で pH 6.8—7.0) を使用し, 37° で 5 日間培養してその MIC を観察した。

3: 抗カビ試験には medium-3 (グルコース 1%, ポリペプトン 1%, 寒天 1.5%, 無修正 pH 6.0) の寒天培地を使用し, 37°, 7 日間培養し観察した。27°, 7 日間培養して発育阻止状態を観察する場合は medium-4 (サッカロース 2%, ポリペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, グルタミン酸ソーダ 0.2% および寒天 1.5%, pH 6.0) の寒天培地を用いた。

II 安定性試験 もっとも抗菌作用の強い 17 β -amino-3, 5-androstadiene hydrochloride (6) について行なった。室温の場合は試料を pH 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 および 8.0 の 400 $\mu\text{g/ml}$ の水溶液とし, 25° で 0, 24, 48 および 72 hr 後の活性をカップ法で測定した。カップ法の標準液には 400 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ を用い, 試験菌は *Bacillus subtilis* NRRL B-558 および *Candida albicans* 3147 を用いた。*B. subtilis* の場合, ストレプトマイシン検定用の寒天培地を用い, *Candida albicans* の場合には, グルコース 2%, ポリペプトン 1%, 寒天 1.4% (無修正) の寒天培地を使用した。なお上記のごとく調製した pH 2.0—8.0 の 400 $\mu\text{g/ml}$ 水溶液を 60° で 20 min 加温し, その活性をカップ法で測定した。

III 合成¹⁵⁾ 17 β -Amino-3,5-androstadiene (5): LiAlH_4 5 g をエーテル 400 ml に加え, 30 min 還流して得た懸濁液に 17-hydroxyimino-3,5-androstadiene (3) 3.0 g を 100 ml のエーテルに溶かした溶液を攪拌しながら添加し, 10 hr 反応後, 過剰の LiAlH_4 を水を加えて分解, ロッシェル塩溶液を加え, エーテル抽出, エーテル層を水洗後, エーテル層から希塩酸抽出, 酸性溶液を 10% NaOH で pH 9.0—10.0 とし析出した沈殿をエーテル抽出, 水洗, 乾燥 (Na_2SO_4) 後エーテルを留去, 粗結晶 2.1 g を得。エーテル・石油エーテルから再結晶 mp 88—90°. Anal. Calcd. $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}$; C, 84.07; H, 10.77; N, 5.16. Found: C, 83.87; H, 10.82; N, 5.03. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{ethanol}}$ m μ (log ϵ): 228 (4.26), 235 (4.28), 243 (shoulder 4.08)。

5 の塩類: 5 500 mg をエーテル 100 ml に溶かしこれに有機酸 1.5 当量を含むエーテル溶液 50 ml を加え析出した結晶をろ別, メタルノール・エーテルから再結晶した。

実験結果

I ステロイド化合物の抗菌活性

試験に供したステロイド化合物についてその構造式および融点を Table I に供した。

これら化合物中 1—5, 7—11 のグラム陽性菌, グラム陰性菌, 抗酸性菌, 糸状菌, 酵母に対する最小発育阻止濃度は Table II に示されている。その抗菌スペクトルからこれら化合物は 3 グループに大別できる。

1. 試験菌の総てに無効なもの: 3,5-Androstadien-17-one (1), 3,5-androstadien-17 β -ol (2), 17-hydroxyimino-3,5-androstadiene (3), 17 β -amino-5-androsten-3 β -ol acetate (4) の 4 化合物は, 試験菌株 44 株に対し阻止作用を示さなかった。これらの化合物は 17 β -アミノ基を有していないか, また有していても 3 位に水酸基を有している。

2. 試験菌の 1 部に有効なもの: 3,5-Androstadien-17 β -yltrimethylammoniumiodide (7) はグラム陽性菌に対し 20—100 $\mu\text{g/ml}$ 程度で有効であった。

3. グラム陰性菌を除く他の試験菌に有効なもの: 5, 8, 9, 10, 11 の 5 化合物はグラム陽性菌, 抗酸性菌, 糸状菌, 酵母および植物病原菌に 1—100 $\mu\text{g/ml}$ で有効であった。これらは 17 β -amino-3,5-androstadiene (5) の酢酸, サリチル酸, ケイ皮酸およびマンデル酸などのそれぞれの塩であり, 母核はいずれも 5 である。この活性を fusidic acid などと比較すると fusidic acid はグラム陽性菌に 0.005—5.0 $\mu\text{g/ml}$ で有効であるのに対し 5 は 5—20 $\mu\text{g/ml}$ で有効でかなり差がある。しかし抗酸性菌に対しては共に 1—2 $\mu\text{g/ml}$ で有効であり同程度の活性

14) 柳下弘毅, 橋本英子, 木本幸男, 国立予防衛生研究所年報, XVIII, 168 (1965)。

15) 合成については別に報告予定, 執筆中。

TABLE I. Steroid Compounds

No.	Structure	mp (°C)	No.	Structure	mp (°C)
1		82—85	7		208—211 (decomp.)
2		156—158	8	5. AcOH	164—167
3		155—158	9	5.	205—208 (decomp.)
4		227—230 (decomp.)	10	5.	169—171 (decomp.)
5		88—90	11	5.	215—217 (decomp.)
6		>300 (decomp.)	12		98—100
			13		>300 (decomp.)

TABLE II. The Bacteriostatic Effects of Some Steroids tested by Agar Streak Method

Medium	Organisms	Compounds MIC (μg/ml)						
		7	5	8	9	10	11	1, 2, 3, 4
1	<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	25	10	5	10	20	10	>100
	<i>Staphylococcus aureus</i> terajima	20	5	1	5	5	10	>100
	<i>Staphylococcus aureus</i> smith	25	5	5	10	5	10	>100
	<i>Bacillus megatherium</i>	50	10	10	10	10	10	>100
	<i>Bacillus anthracis</i>	50	10	10	10	10	10	>100
	<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-558	100	20	5	10	10	10	>100
	<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	100	10	5	10	10	10	>100
	<i>Sarcina lutea</i> PCI 1001	25	5	5	5	10	10	>100
	<i>Micrococcus flavus</i> M-16	25	5	5	5	10	10	>100
	<i>Escherichia coli</i>	>100	25	20	20	25	25	>100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI 602	>100	25	10	10	25	25	>100
	<i>Salmonella typhimurium</i> 1406	>100	50	25	20	50	100	>100
	<i>Salmonella paratyphi</i> A	>100	100	50	100	100	100	>100
	<i>Salmonella paratyphi</i> B	>100	100	100	100	100	100	>100
	<i>Shigella dysenteriae</i>	>100	50	25	20	25	10	>100
	<i>Shigella flexneri</i>	>100	50	25	20	25	10	>100
	<i>Shigella boydii</i>	>100	50	25	15	25	10	>100
	<i>Shigella sonnei</i>	>100	10	10	10	10	10	>100

	<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	>100	50	25	25	>100	50	>100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>Pseudomonas pyocyaneus</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>Pseudomonas tabaci</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 607	>100	1—2	5	10	10	10	>100
	<i>Mycobacterium phlei</i>	>100	1—2	5	5	10	5	>100
3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	>100	20	10	25	100	50	>100
	<i>Penicillium citrinum</i>	>100	20	10	25	100	50	>100
	<i>Aspergillus niger</i>	>100	50	100	100	100	100	>100
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	>100	10	10	25	10—25	25—50	>100
	<i>Trichophyton asteroides</i>	>100	10	10	25	10—25	25—50	>100
	<i>Saccharomyces sake</i>	>100	15	20	25	25	50	>100
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>100	15	10	25	25	50	>100
	<i>Hansenula anomala</i>	>100	20	15	25	50	100	>100
	<i>Torula utilis</i>	>100	20	20	25	50	25	>100
	<i>Candida albicans</i>	>100	10	20	25	50	50	>100
	<i>Candida pseudotropicalis</i>	>100	20	10	20	50	50	>100
	<i>Candida stellatoidea</i>	>100	20	10	20	50	50	>100
	<i>Candida tropicalis</i>	>100	10	10	20	50	50	>100
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	>100	10	20	20	50	25	>100
4	<i>Gibberella fujikuroi</i>	>100	5—10	10	5	10	5	>100
	<i>Helminthosporium sativum</i>	>100	10	10	10	20	10	>100
	<i>Pyricularia oryzae</i>	>100	10	10	20	20	10	>100
	<i>Xanthomonas oryzae</i>	>100	20	20	25	25	25—50	>100
	Toxicity LD ₀ (i.p.) (mg/kg)	4.5 ^{a)}	150	37.5	150	150	150	

a) LD₁₀₀ of 10 to mice was 4.5 mg/kg intraperitoneally.

を有しているといえる。さらに抗カビおよび抗酵母活性については明らかに 5 が強く、5—20 µg/ml で有効であるのに対して fusidic acid は全く無効である。

以上のごとく 3 群に大別されたが、次に各種塩についてみると、サリチル酸塩およびマンデル酸塩は 5 と比較して活性はほぼ同じであるが、ケイ皮酸塩はやや弱くなっている。酢酸塩は菌株によっては活性が強くなるものもある。

II 毒性

マウス腹腔内注射による急性毒性は、5 が LD₀ 150 mg/kg であり毒性は少ないといえる。しかし 7 は LD₁₀₀ 4.5 mg/kg で非常に毒性が強い。また 8 は 5 より強く LD₀ 37.5 mg/kg であった。9, 10 および 11 は 5 とほぼ同じであった。

III 特に有効な 17β-Amino-3,5-androstadiene Hydrochloride (6), 17β-Amino-5-androstene (12) およびその塩酸塩 (13) の抗菌活性

以上から 5 が毒性低く強い阻止作用を示したが、本物質は水に高濃度で溶解し難い。そこで上述の有機酸の代りに塩酸塩を調製した。すなわち 6, 12 および 13 (新規化合物) をつくり、²⁾ 細菌、抗酸性菌、カビおよび酵母に対する抗菌活性を調べた。これら 3 化合物の抗菌作用は Table III に示されている。グラム陽性菌に 5—10 µg/ml, グラム陰性菌に 50—100 µg/ml, 抗酸性菌に 5 µg/ml で発育阻止を示し、特にカビおよび酵母には Table II の場合より強く、6 は *Candida albicans* に 1 µg/ml, *Penicillium chrysogenum* および *Penicillium citrinum* に 1 µg/ml で発育阻止を示した。二重結合が 1 つ少ない 13 も 6 とほぼ同等の抗カビおよび抗 *Candida* 活性を示した。6 および 13 は共に、それぞれの遊離アミンである 5 および 12 より活性が強い。

IV 安定性

6 は常温、72 hr (pH 2.0—8.0) および 60°, 20 min (pH 2.0—8.0) の条件でその安定性を *B. subtilis* および *Candida albicans* を用いて試験した結果いずれの場合も安定であった。

TABLE III. Antibiotic Spectrum of Some Aminosteroids

Medium	Organisms	Compounds MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		6	12	13
1	<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	5	5	5
	<i>Staphylococcus aureus</i> terajima	5	10	5
	<i>Staphylococcus smith</i>	5	5	5
	<i>Bacillus megatherium</i>	10	5	5
	<i>Bacillus anthracis</i>	10	10	5
	<i>Sarcina lutea</i> 1001	5	10	5
	<i>Micrococcus flavus</i> M-16	3—5	10	5
	<i>Escherichia coli</i>	50	50	50
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50	50	50
	<i>Salmonella typhimurium</i> 1406	100	100	100
	<i>Salmonella paratyphi</i> C	50	100	50
	<i>Shigella sonnei</i>	50	100	50
	<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	50	100	100
	<i>Pseudomonas pyocyaneus</i>	>100	>100	>100
	<i>Pseudomonas tabaci</i>	>100	>100	>100
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	>100	>100	>100
2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 607	5	5	5
	<i>Mycobacterium phlei</i>	5	5	5
3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	5	1
	<i>Penicillium citrinum</i>	1	5	5
	<i>Aspergillus niger</i>	3—5	5	1
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	5	5	5
	<i>Saccharomyces sake</i>	10	10	5
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	5	5
	<i>Hansenula anomala</i>	10	5	5
	<i>Torula utilis</i>	5	10	5
	<i>Candida albicans</i>	1	5	1
	<i>Candida stellatoidea</i>	5	5	5
	<i>Candida pseudotropicalis</i>	1	5	1
	<i>Candida tropicalis</i>	10	10	10
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5	5	5

考 察

ステロイド化合物の抗菌活性は初めに述べたように James 等⁷⁾ がアミノノルコラン誘導体で, Meier 等⁸⁾ が性ホルモンの, Hiltone 等⁹⁾ がアミノ胆汁酸で, Seneca⁴⁾ が副腎皮質ホルモンでそれぞれ細菌特にブドウ球菌を用いて研究を行ないその活性を試験したが, これら活性はいずれも 1—10 mg/ml で阻止する程度で極めて弱く, 抗カビおよび抗酵母活性はほとんどない. また Herzog 等⁹⁾ は 3 β -hydroxybisanthracol-5-enoic acid の誘導体が *Candida albicans* に 0.1—1.0 mg % で有効であるが毒性が強いと述べており, またその他の微生物については試験していない. またいわゆるフシダン型抗生物質である fusidic acid などはグラム陽性菌に対しては強い活性を示すが, カビおよび酵母には無効である.

筆者等が明らかにしたことは, 5 および 12 さらにこれらの塩類がグラム陰性菌を除く諸種の微生物に対して強い抗菌活性を有することである. つぎにアミノステロイドの化学構造と活性との関係について考察する. 別に筆者等が *Trichophyton asteroides* および *Penicillium citrinum* の 2 菌種のみを対象として得た構造と活性との関係についての結論¹⁾ が Table II および III における 40 数株の試験菌に対する場合も同様に成立することを確認した. このことから非常に多数の菌種に対して 5 および 12 などのアミノステロイドが同様の作用機序で抗菌

活性を示しているものと推察される。これら結果から構造とその抗菌活性について、つぎのように考察される。i) 17 β -アミノステロイドの AB 環の構造が重要である。3 位の炭素に水酸基などが導入されると不活性になり、また AB 環が平面的で rigid であるものに活性が強い。¹⁾ ii) AB 環が活性型でも 17 β 位にアミノ基がないときは不活性である。17 β -アミノ基は活性を示すために重要と考えられる。

謝辞 本研究に当り御指導を賜りました国立予防衛生研究所 抗生物質部長 梅沢浜夫教授に深く感謝いたします。また御協力をいただいた帝国臓器製薬株式会社常務 中馬一操博士同じく安藤晴弘博士に深く感謝いたします。