

ピロン誘導体の試験管内抗菌作用

化学療法剤の研究 (第1報)

戸田忠雄・徳永 徹・大内田務・城谷堅一・中本隆夫

九州大学医学部細菌学教室

(昭和 32 年 9 月 16 日 受 付)

序 言

化学療法剤の最近の進歩はまことに目覚ましいものがあり、新薬剤も次々に合成されて、医療界における成果は測り知れないものがある。然し乍ら、尙有効な薬剤が見出されていない領域が残されているのみならず、薬剤耐性菌の出現や、アレルギーショックの問題など、新しい困難な事態が生じており、そうした意味からも、新化学療法剤の発見とその実用化とは、今日尙重要な課題たることを失わぬ。吾々はこのような研究の一環として、先にニトロフラン誘導体の試験管内抗菌作用について発表した⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾、今回は 30 種のピロン誘導体について、その分子構造と抗菌性との関係を論じ、新化学療法剤合成への一助としたい。

元来ピロン誘導体に関しては、 γ -pyrone の誘導体である DHA (dehydroacetic acid) が 1947 年に COLEMAN らによつて食品防腐剤としての価値を認められて以来⁽⁴⁾、主として抗カビ剤として実用に供されてきた。

一方地衣類のもつウスーン酸の抗菌性に関する研究が古くからなされているが^{(5)~(11)}、その分子構造に類似した化合物を多数合成して浮田らは、benzopyrone 誘導体である 3-acyl-4-hydroxycoumarin 系の研究を系統的に行い^{(12)~(23)}、いわゆるトリカーボニルメタン型原子団が抗菌性を発現するに不可欠であることを強調した。

同様のことは、triacetic acid lactone を中心に各種の置換基を導入した化合物の場合においても、抗菌力発現のための共通条件としてトリカーボニルメタン型原子団の必要性が認められている^{(24)~(28)}。

またこの構造は、*Penicillium citrinum* が産生する抗生物質チトリニンにおいても認められており、更に優秀な抗生物質である、オキシテトラサイクリン (テラマイシン)⁽²⁹⁾、及びクロルテトラサイクリン (オーレオマイシン)⁽³⁰⁾ においても、その 4 個の 6 角環の一端に、この原子団の存在が明らかにされている。

このような事実からして、トリカーボニルメタン型原子団を有するピロン誘導体の研究は、新化学療法剤の研究にとつて極めて興味ある一環を形成するものと云わねばならない。

今回吾々は、従来抗菌価が比較的高いピロン誘導体と

して知られている、4-Hydroxy-6-methyl-2-pyrone (P) 及び 4-Hydroxycoumarin (C) を基本骨格とし、トリカーボニルメタン型原子団を有する化合物であつて、その 3 位の側鎖の構造がいろいろ変つた場合に、それが抗菌作用に及ぼす影響を検討することを主目的とし、関連化合物の分子構造と抗菌性との関係を一層明らかにする目的で次の如き実験を行つた。

実験方法

使用薬剤は第 1 表に示した。これらは全て九大薬学科井口定男助教授、並びに久恒和仁氏によつて合成提供を受けたものであり、[1]、[4]、[7]、[10]、[30] の 5 薬剤以外は全て新化合物である⁽³¹⁾⁽³²⁾。

使用菌種は次の 11 株である。即ち、*Staph. aureus* —209 P, *E. coli*—B, *B. subtilis*, *Sh. flex.* 2a, *Myc. tbc.* H 37 Rv, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parakrusei*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondi* である。

使用培地に関しては、従来ピロン誘導体は蛋白含有培地を用いると著明に抗菌力が低下することが知られているが、吾々は化学療法剤としてのスクリーニングを主目的としたので、今回は従来方法を踏襲し⁽¹⁾、結核菌に対しては 10% 牛血清加キルヒナー培地を、その他の細菌に対してはブイオンを、*Candida* に対してはサブローブイオンを使用した。pH は全て 6.8~7.0 である。

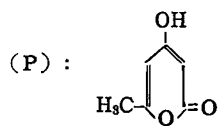
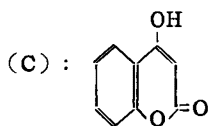
薬剤はまず水晶玉入り丸コルペン中に秤量磨砕し、各使用培地で 1 万倍に稀釈し、別に予め培地を 4 cc ずつ分注した試験管列を用意して、倍数稀釈を行つた。

菌液は各培地にて調整し、各試験管宛 10^{-2} mg 接種した。接種後 37°C の孵卵器中に培養し、結核菌は 3 週及び 4 週後、その他の細菌は 24 及び 48 時間後、*Candida* は 48 及び 72 時間後に夫々取り出して、肉眼的に増殖の有無を調べ、発育を阻止する最高稀釈濃度をもつて抗菌力の強さをあらわした。

毒性試験は体重 14g 前後の ddN 系マウスを使用し、第 4 表の如く、1 群 4 匹づつとし、体重 kg 当りの所要量を腹腔内に注射し、48 時間内の生死を観察した。尚急性中毒試験の対照薬剤としては INAH を使用した。

第1表 抗菌試験に使用したピロン誘導体

〔母 核〕



番 号	化 合 物 名	化 学 構 造 式
1	4-Hydroxy- γ -oxo-3-coumarinbutane	(C)-CO(CH ₂) ₂ CH ₃
2	Ethyl 4-hydroxy- γ -oxo-3-coumarinbutyrate	(C)-CO(CH ₂) ₂ COOC ₂ H ₅
3	4-Hydroxy- γ -oxo-3-coumarinbutyric acid	(C)-CO(CH ₂) ₂ COOH
4	4-Hydroxy- ϵ -oxo-3-coumarin hexane	(C)-CO(CH ₂) ₄ CH ₃
5	Ethyl 4-hydroxy- ϵ -oxo-3-coumarin hexanoate	(C)-CO(CH ₂) ₄ COOC ₂ H ₅
6	4-Hydroxy- ϵ -oxo-3-coumarin hexanoic acid	(C)-CO(CH ₂) ₄ COOH
7	4-Hydroxy- ι -oxo-3-coumarin decane	(C)-CO(CH ₂) ₈ CH ₃
8	Ethyl 4-hydroxy- ι -oxo-3-coumarin decanoate	(C)-CO(CH ₂) ₈ COOC ₂ H ₅
9	4-Hydroxy- ι -oxo-3-coumarin decanoic acid	(C)-CO(CH ₂) ₈ COOH
10	Ethyl 4-hydroxy- γ -oxo-6-methyl-2-pyrone-3-butanoate	(P)-CO(CH ₂) ₂ COOC ₂ H ₅
11	4-Hydroxy- γ -oxo-6-methyl-2-pyrone-3-butanoic acid	(P)-CO(CH ₂) ₂ COOH
12	Ethyl 4-hydroxy- ϵ -oxo-6-methyl-2-pyrone-3-hexanoate	(P)-CO(CH ₂) ₄ COOC ₂ H ₅
13	4-Hydroxy- ϵ -oxo-6-methyl-2-pyrone-3-hexanoic acid	(P)-CO(CH ₂) ₄ COOH
14	4-Hydroxy- ι -oxo-6-methyl-2-pyrone-3-decane	(P)-CO(CH ₂) ₈ CH ₃
15	Ethyl 4-hydroxy- ι -oxo-6-methyl-2-pyrone-3-decanoate	(P)-CO(CH ₂) ₈ COOC ₂ H ₅
16	4-Hydroxy- ι -oxo-6-methyl-2-pyrone-3-decanoic acid	(P)-CO(CH ₂) ₈ COOH
17	4-Hydroxy-3-coumarin amide	(C)-CONH ₂
18	4-Hydroxy- ϵ -oxo-3-coumarin hexanamide	(C)-CO(CH ₂) ₄ CONH ₂
19	4-Hydroxy- ι -oxo-3-coumarin decanamide	(C)-CO(CH ₂) ₈ CONH ₂
20	4-Hydroxy- α -imino-3-coumarin ethane	(C)- $\overset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}$ -CH ₃
21	4-Hydroxy- γ -imino-3-coumarin butane	(C)- $\overset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$
22	4-Hydroxy- ϵ -imino-3-coumarin hexane	(C)- $\overset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
23	Ethyl 4-hydroxy- ϵ -imino-3-coumarin hexanoate	(C)- $\overset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-(\text{CH}_2)_4\text{COOC}_2\text{H}_5$
24	4-Hydroxy- ϵ -imino-3-coumarin hexanamide	(C)- $\overset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-(\text{CH}_2)_4\text{CONH}_2$
25	4-Hydroxy- ι -imino-3-coumarin decane	(C)- $\overset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$
26	Ethyl 4-hydroxy- ι -imino-3-coumarin decanoate	(C)- $\overset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-(\text{CH}_2)_8\text{COOC}_2\text{H}_5$
27	4-Hydroxy- ι -imino-3-coumarin decanamide	(C)- $\overset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-(\text{CH}_2)_8\text{CONH}_2$
28	4-Hydroxy- α -imino-3-coumarin amine	(C)- $\overset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}$ -NH ₂
29	4-Hydroxy-3-coumarinonitrile	(C)-CN
30	4-Hydroxy- α -oxo-3-coumarin ethane	(C)-CO-CH ₃

数値は稀釈倍数を示す（単位：万）

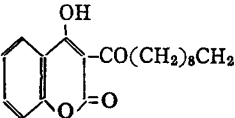
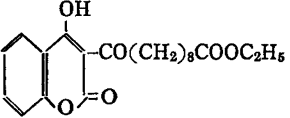
[illegible]

第3表 抗 キャンディダ 作用

単位: $\times 10,000$

菌株 化合物	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida pseudotr.</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parakr.</i>	<i>Candida guill.</i>
[2]	<1	<1	<1	<1	<1	<1
[7]	<1	<1	<1	<1	<1	<1
[8]	<1	<1	<1	<1	<1	<1
[9]	<1	<1	<1	<1	<1	<1
[10]	<1	<1	<1	<1	<1	<1
[11]	<1	<1	<1	<1	<1	<1
[12]	<1	<1	<1	<1	<1	<1
[14]	<1	<1	<1	<1	<1	<1
[15]	<1	<1	<1	<1	<1	<1

第4表 3-*n*-Decanoyl-4-hydroxy coumarin 及び Ethyl 4-hydroxy-*l*-oxo-3-coumarin decanoate の急性毒性試験

化合物	mg/kg	133	200	300	450	675	1013	1520
		2/4	1/4	1/4	0/4	0/4		
					4/4	4/4	4/4	0/4

(数値は 生存匹数/使用匹数)

実験成績

30 種の薬剤に対する試験管内抗菌力は第2表に示す通りである。数値は全て稀釈倍数を示しており、単位は $\times 10,000$ である。抗 *Candida* 作用に関しては第3表に、又毒性試験の結果は第4表に示した。

考 按

(a) トリカーボニルメタン型原子団の必要性について

1948 年、柴田らはウスニン酸がグラム陽性菌及び鳥型結核菌に対して試験管内抗菌力が顕著であることを見出した⁽⁶⁾。同様の事実は STOLL⁽⁶⁾, MARSHAK⁽⁷⁾, VARTIA⁽⁸⁾ らによつても認められており、臨床面においては日置ら⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ がデフテリア及び actinomycosis に使用した報告がある。

このウスニン酸の研究に端を発して、浮田らはその右環が有する3コのカーボニル基によつて置換されたメタンに注目し、更に 3-Acetyl-4-hydroxycoumarin が相当高い抗菌力を有することを見出した⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。

而もこの3位のアチル基をアルキル基に変えると、抗菌性が著明に減弱する⁽¹³⁾ ことなどから、この3コのカーボニル基が抗菌力発揮の上に必要不可欠なものと推論し

ている。

吾々はこの3位のアチル型側鎖の α 位のOがイミノ基に置換された場合の抗菌力を検討した。即ち第2表の[20]より[28]までの化合物の抗菌力と、3位がアチル型である[1]より[19]までの化合物のそれと比較するに、その結果全般的に抗菌力が低下することを認めた。例えば同型の薬物である[4]と[22], [7]と[25], [8]と[26]などを比較すればその差は明らかである。

尤も α 位にイミノ基が入った場合においても、[22][23][28]に見る如く若干の抗菌性を示すものはあるが、然しより高い抗菌価を得るためには、 α 位のOが必要である。

(b) 3位の側鎖の長さや抗菌性について

従来抗菌性を有する物質として知られたものの中には長い炭素連鎖をもつたものが少なく、高級脂肪酸自体が抗結核菌作用を有することは、よく知られている。

既に浮田らは3-Acyl-4-hydroxycoumarin 類の3位のアチル基の炭素数を種々に延長した結果、その抗菌力は炭素数が増大するに従つて増大し、3位がデカノイル基になった場合に最高となると報告した⁽¹³⁾⁽¹⁷⁾。

吾々も炭素連鎖が2コ、4コ、6コ、10コの場合について、第2表の如く検討を行つたが、やはりデカノイル基の場合に最高値を示した。

この傾向は母核がクマリン(C)の場合にも、ピロン(P)の場合にも同様であつた。

但し3位側鎖の α 位にイミノ基が入った場合には第2表[20]~[28]に示す如く炭素数が10コの場合よりも6コの場合にむしろ抗菌価は高いものと考えられた。

(c) ベンゼン環の有無と抗菌性について

ピロン誘導体の抗菌性については、既に並木ら⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾, 宮木ら⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾, 玉利ら⁽²⁸⁾の研究があるが、浮田らはクマリンからベンゼン核を除いた 6-Methyl-4-hydroxy-3-octanoyl-pyrone-2 を合成し⁽¹³⁾, これとクマリンを母核としたものとの抗菌価を比較した結果、抗菌性が低下することを認めた。吾々はこの点に更に検討を加えるために、[10]より[16]に至る7種の薬物と[2][3][5][6][7][8][9]の7種との抗菌価を夫々対比した結果、ベンゼン

核のないピロン誘導体は, benzopyrone の誘導体に比し, 一般に抗菌価が低いことを認めた。

但し人型結核菌に対しては, [14] は [7] に劣らない抗菌力を示した。

(d) 3 位側鎖の末端構造について

この点は従来の研究では全く触れられていない。吾々は炭素数が同じで, 只末端構造がメチル基 ($-\text{CH}_3$) のものと, エトキシカルボニル基 ($-\text{COOEt}$) のものと, カルボキシル基 ($-\text{COOH}$) のものと, 更に酸アミド ($-\text{CONH}_2$) のものとを得て, その抗菌性を比較検討した。即ち, [7] [8] [9] [19], [4] [5] [6] [18], [14] [15] [16], などに見られる如く, 一般に 3 位の側鎖末端が酸アミド乃至はカルボキシル基の場合には抗菌性は殆ど消失し, 抗菌力は次の順で上昇するものと考えられた。

酸アミド基 < カルボニル基 < エトキシカルボニル基 < メチル基

(e) 抗菌スペクトルについて

吾々の用いた化合物は, 全てグラム陰性菌である大腸菌, 赤痢菌に対して 1 万倍で抗菌力を示さず, グラム陽性菌であるブドウ球菌及び枯草菌に対しては, かなり高い抗菌性を示した。この点ウスン酸のそれと同様である。人型結核菌及び *Candida* に対する抗菌性は従来知られていなかったが, 吾々の実験では前者にはある程度有効であり, 後者には全く無効であった。

尚使用培地中で特に著しい抗菌力を発揮する新化合物は見出されなかった。

(f) 急性毒性試験について

3-*n*-Decanoyl-4-hydroxycoumarin については, 浮田らがマウス腹腔内注射により, 2.0 mg 1 回注射で 2 時間後にその全数が死亡した旨報告しているが⁽¹²⁾⁽¹⁴⁾, 吾々はこれを対照にとり, Ethyl-4-hydroxy-*l*-oxo-3-coumarin-decanoate [8] の急性毒性を調べた。即ち第 4 表の如く腹腔内 1 回注射を行つたところ, 1,013 mg/kg では 48 時間後 1 例の死亡も見られなかった。表中死亡したものは全て 2 時間以内に死亡した。急性中毒に関しては, 3 位側鎖末端がメチル基の場合に比し, エトキシカルボニル基の場合は著しく毒性が減弱するものと考えられる。

小 括

(1) ピロン誘導体が高い抗菌力をもつためには, いわゆるトリカルボニルメタン型原子団を有することが必要である。

(2) 3 位側鎖は炭素数 10 コの場合が最高の抗菌力を示す。但し α 位の O がイミノ基で置換された場合はむしろ 6 コのものに劣る。

(3) Benzopyrone 誘導体の方が一般に benzene 核

のない pyrone 誘導体よりも抗菌価が高い。

(4) 3 位側鎖の末端構造は次の順で抗菌価が低下する。

メチル基 > エトキシカルボニル基
> カルボニル基 > 酸アミド基

(5) 一般にグラム陽性菌に対しては秀れた抗菌力を持ち, グラム陰性菌に対しては効力がない。4-Hydroxy-*l*-oxo-3-coumarindecane 及び 4-Hydroxy-*l*-oxo-6-methyl-2-pyrone-3-decane は牛血清加培地で人型結核菌に対し 8 万倍程度の抗菌力をもつ。*Candida* に対しては全て効力がない。

(6) Ethyl-4-hydroxy-*l*-oxo-3-coumarin-decanoate は 1,013 mg/kg マウス腹腔内注射によつてこれを斃死せしめない。1,520 mg/kg では 2 時間内に全数死亡した。3 位側鎖の末端がメチル基の場合に比し, エトキシカルボニル基の場合には著しく毒性が減弱するものと考えられる。

終りに臨み, 被検薬剤を全て合成提供して下さつた九大薬学科 井口定男助教授, 並びに久恒和仁氏に対して深甚なる謝意を表する。

参 考 文 献

- (1)~(3) 戸田, ほか: 結核, 28, 19, 1953. 同, 30, 総会特集号. 細菌, 10, 724, 1955.
- (4) COLEMAN, G. H., *et al.*: Chem. Abst., 43, 6758, 1947.
- (5) 柴田, ほか: J. Penicillin, I, 588, 1948.
- (6) A. STOLL, *et al.*: Experimentia, 3, 115, 1947.
- (7) A. MARSHAK, *et al.*: Science, 106, 394, 1947.
- (8) K. O. VARTIA: Ann. Med. Exp. et Biol., 27, 46, 1949.
- (9)(10) M. HEKI, *et al.*: Jap. Med. J., 2, 244, 1949. *Ibid.*, 3, 49, 1950.
- (11) B. JOHNSON, *et al.*: Arch. Biochem., 28, 317, 1950.
- (12)~(19) 浮田, ほか: 薬学雑誌, 70, 18, 1950., J. Antibiotics, IV, 196, 1950., IV, 264, 1950., IV, 268, 1950., J. Pharm. Soc. Jap., 70, 18, 1950., 71, 234, 1951., 71, 857, 1951., Jap. J. Exp. Med., 20, 109, 1950.
- (20) K. TOMITA: J. Pharm. Soc. Jap., 71, 1100, 1951.
- (21)~(23) 井口: 薬学雑誌, 72, 122, 1952., 72, 128, 1952., 72, 131, 1952.
- (24)(25) 並木, ほか: 農化, 25, 472, 476, 1951., 26, 178, 211, 1952.
- (26)(27) 宮木, ほか: 薬学雑誌, 73, 985, 1954., 75, 43, 1956.
- (28) 玉利, ほか: 農化, 29, 190, 1955.
- (29) F. A. HOCHSTEIN, *et al.*: J. Am. Chem. Soc., 74, 3708, 1952.
- (30) C. R. STEPHENS, *et al.*: J. Am. Chem. Soc., 74, 4976, 1952.
- (31)(32) 井口, ほか: 薬学雑誌, 77, 94, 1957., 77, 98, 1957.