

Thiobis-halogenophenol 類の抗真菌作用に関する研究

田鹿義雄・大家 宏・坪川 弘

中外製薬株式会社研究所

岩 田 和 夫

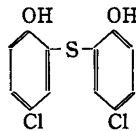
東京大学医学部細菌学教室

(昭和 33 年 6 月 23 日 受付)

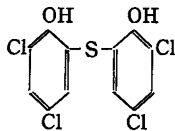
1906 年 BECHHOLD 及び EHRLICH は bis-halogenophenol 類の抗菌作用について研究し, halogenophenol 類よりも抗菌作用のすぐれていることを報告したが, 最近 MARSH 等^{2,3)}並びに PFLEGER 等⁴⁾は, これ等 bis-phenol 類の抗菌作用は 2,2'-結合のものが最も強い事を指摘した。1949 年 PFLEGER 等は, bis-phenol の中 thiobis-halogenophenol 類が強力な抗菌抗真菌作用を有することを発見し, 続いて翌年 RICHTER^{5,6)}等は 2,2'-thiobis (4-chlorophenol) が真菌感染症に有効であることを報告した。

われわれは下記の 2 種の thiobis-chlorophenol, 即ち

1. 2,2'-thiobis (4-chlorophenol)



2. 2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol)



について試験管内抗真菌作用を研究した結果, 各種病原性真菌に対し両薬剤共強力な発育阻止作用を示し, 特に前者は殺真菌作用もより強力なことを認めた。ついで既知各種抗真菌剤との抗真菌作用の比較, pH と抗真菌作用との関係, 抗トリコモナス作用, 耐性の獲得と復帰, 交叉耐性及び毒性についても検討を加えた。

I. 各種病原性真菌に対する発育阻止並びに殺菌作用

A. 発育阻止作用

使用菌株: *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton inguinale*, *Microsporum canis*, *Sporotrichum Schenckii*, *Aspergillus nidulans*, *Nocardia asteroides*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, の各保存菌株。

培地: Sabouraud's glucose broth (glucose 1%)。

本文は, 昭和 30 年 4 月日本薬学会大会において一部を発表した。

接種用菌液 *C. albicans* 及び *Cr. neoformans* は Sabouraud's glucose (1%) broth に 37°C で, 前者は 24 時間, 後者は 96 時間培養したものを用いた。他の菌種はいずれも Sabouraud's glucose agar slant (glucose 1%) にて 27°C, 7 日間培養後, その菌苔をかきとり乳鉢にて 1 slant/10 cc の割に生理食塩水を加えてよく磨砕し, 均等な菌液とした。*N. asteroides* は同様に homogenize して 1 mg/cc の浮遊液とした。

薬剤は前記培地で階段稀釈し, 100°C 30 分 3 回間歇滅菌後, その各 5 cc に対し菌液を 1 白金耳づつ接種した。*C. albicans* は 37°C, 24 時間, *Cr. neoformans* は 37°C, 96 時間, その他の菌種はいずれも 27°C, 1 週間培養後に, それぞれ発育阻止の程度を観察した。

B. 殺菌作用

使用菌種並びに菌液は前実験と同じ。菌接種後一定時間後に後培養し, その発育の有無によつて殺菌作用をしらべる方法を採用した。後培養には Sabouraud's broth を使用し, *C. albicans* は 37°C, 48 時間, *Cr. neoformans* は 37°C, 6 日間, 他の菌種はいずれも 27°C, 7 日間培養した。薬剤を蒸留水で稀釈後, その各々 9 cc に菌液 1 cc を接種し, 20°C にて 10 分及び 24 時間放置後, その各 1 白金耳を後培養し, それぞれの作用時間における殺菌作用をしらべた。

実験成績:

第 1 表に示すように, 両薬剤共に強力な発育阻止作用を示しているが, 一般に 2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) の方が強力であつた。一方, 殺菌作用は 2,2'-thiobis (4-chlorophenol) の方がすぐれており, 特に *Nocardia*, *Cryptococcus*, *Candida* に対し有効である。

II. 各種抗真菌剤との抗真菌作用の比較

上述の如く, 各種病原性真菌に対し著明な抗菌性を認めたので, 既知各種抗真菌剤と抗真菌作用を比較してみた。

供試抗真菌剤として benzalkonium chloride, butyl p-oxybenzoate, 8-oxyquinoline, salicyl anilide, phenyl mercuric acetate 及び undecylenic acid の 6 種の化合物を用い, *T. mentagrophytes* (Duke 株) 及

第1表 Thiobis-chlorophenols の各種病原性真菌に対する発育阻止並びに殺菌作用

供 試 菌	2, 2'-thiobis (4-chlorophenol)			2, 2'-thiobis (4, 6-dichlorophenol)		
	菌 発 育 阻 止 最大稀釈倍数	殺菌最大稀釈倍数		菌 発 育 阻 止 最大稀釈倍数	殺菌最大稀釈倍数	
		10 分	24 時 間		10 分	24 時 間
<i>Tr. interdigitale</i>	512,000	<2,000	22,000	2,048,000	6,000	20,000
<i>Tr. mentagrophytes</i>	512,000	<2,000	30,000	2,048,000	<4,000	18,000
<i>Ep. inguinale</i>	1,024,000	<2,000	5,000	8,192,000	<4,000	7,000
<i>M. canis</i>	1,024,000	<2,000	<2,000	2,048,000	<4,000	<4,000
<i>Sp. Schencki</i>	512,000	<2,000	<2,000	512,000	<4,000	<4,000
<i>Asp. nidulans</i>	64,000	<2,000	9,000	<4,000	<4,000	<4,000
<i>Noc. asteroides</i>	512,000	6,000	220,000	512,000	16,000	40,000
<i>Crypt. neoformans</i>	1,024,000	80,000	220,000	4,096,000	40,000	70,000
<i>C. albicans</i>	64,000	45,000	50,000	128,000	<4,000	<4,000

註 <はそれ以下の濃度では作用しなかつたことを示す

び *C. albicans* (No. 2 株) に対する発育阻止作用と、*C. albicans* に対する殺菌作用を比較試験した。実験条件は前実験と同じ。

実験成績：

第2表に示すように、両薬剤共、諸種抗真菌剤に比し、*T. mentagrophytes* に対してはるかにすぐれた発育阻止作用を示した。また *C. albicans* に対しても、前実験と同様、強力な発育阻止並びに殺菌作用を示すが、この菌に対しては他の抗真菌剤、例えば、benzalkonium chloride, phenyl mercuric acetate の如きものも強力に作用する。

III. 抗トリコモナス作用

一般に抗真菌作用の強い薬剤は抗原虫作用も強いことが期待されるので、両検体の *T. vaginalis* に対する作用を benzalkonium chloride, butyl *p*-oxybenzoate, 8-oxyquinoline, salicyl anilide, phenyl mercuric acetate, 及び undecylenic acid と比較してみた。

実験には直接法及び稀釈法を用いた。

第2表 Thiobis-chlorophenols と各種抗真菌剤との抗真菌作用の比較

薬 剤	<i>T. men-</i> <i>tagrophytes</i>	<i>C. albicans</i>	
	菌 発 育 阻 止 最大稀釈倍数	菌 発 育 阻 止 最大稀釈倍数	殺菌最大 稀釈倍数
2, 2'-thiobis (4-chlorophenol)	512,000	64,000	45,000
2, 2'-thiobis (4, 6-dichlorophenol)	2,048,000	128,000	<4,000
benzalkonium chloride	64,000	1,024,000	6,000
butyl <i>p</i> -oxybenzoate	64,000	8,000	<4,000
8-oxyquinoline	32,000	64,000	<1,000
salicyl anilide	64,000	16,000	<1,000
phenyl mercuric acetate	64,000	512,000	15,000
undecylenic acid	8,000	2,000	<1,000

註：第1表の註参照

直接法 検体を培地で稀釈後、トリコモナスを接種し、顕微鏡下 37°C で作用させ、10 分後に運動を停止するに要した薬剤の最大稀釈倍数をもつて、抗トリコモナス作用を表した。

稀釈法： 検体の培地稀釈系列にトリコモナスを接種し、37°C、3 日間培養後における発育阻止最大稀釈倍数

第3表 Thiobis-chlorophenols 及び各種抗真菌剤の抗トリコモナス作用

薬 剤	直接法	稀釈法
2, 2'-thiobis (4-chlorophenol)	24,000	40,000
2, 2'-thiobis (4, 6-dichlorophenol)	16,000	40,000
benzalkonium chloride	3,000	4,000
butyl <i>p</i> -oxybenzoate	<4,000	<4,000
8-oxyquinoline	2,000	20,000
salicyl anilide	<4,000	4,000
phenyl mercuric acetate	120,000	512,000
undecylenic acid	<4,000	<4,000

註 第1表の註参照

を求めた。

培地 10% 血清加 V.F. ブイヨン (血清は非酸性にしたものを用いた)。

菌株：*Trichomonas vaginalis* YAMADA MYA 101 (日本医科大学産婦人科教室より分与をうけた)。

接種量 直接法は検液 0.1 cc にトリコモナス 96 時間培養液を同量接種し、稀釈法では検液 4.5 cc に同じ培養液を 0.5 cc 加えて Hall tube にて培養した。

実験成績：

第3表に示すように、直接法、稀釈法共に、phenyl mercuric acetate が最も強く、ついで 2,2'-thiobis (4-chlorophenol), 2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) が強かつた。

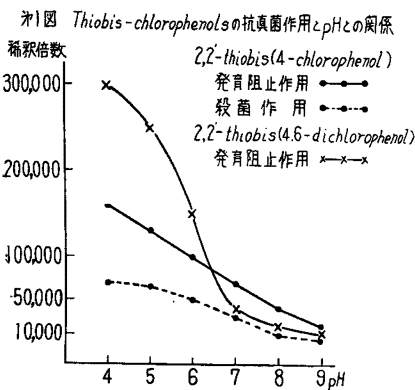
IV. 抗真菌作用に及ぼす pH の影響

両化合物の発育阻止並びに殺菌作用に pH がいかなる影響を及ぼすかをしらべた。ただし dichlor 体の方は殺菌作用が弱いため、発育阻止作用と pH との関係のみを検討した。

使用菌株は *C. albicans* (No.2 株) で、pH は 4, 5, 6, 7, 8, 9 の6段階についてしらべた。発育阻止作用、殺菌作用共に、既述の方法にて試験した。

実験成績

第1図にみられる如く、いずれの場合にも酸性側において強く作用し、アルカリ性側に移行するにつれて作用が低下した。

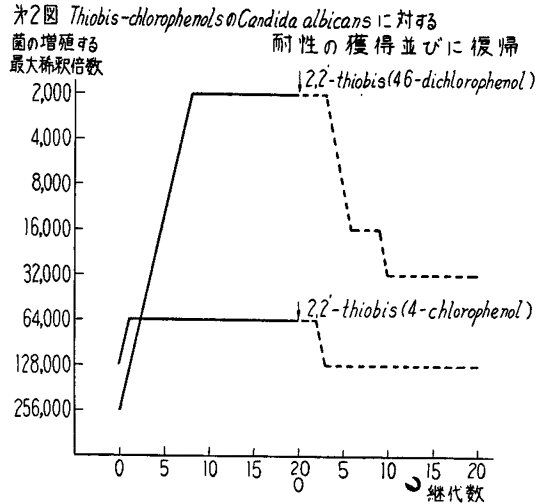


V. 耐性の獲得復帰及び交叉耐性

菌株は *C. albicans* (No.2 株) を用い、培地は Sabouraud's glucose (1%) broth を使用した。

薬剤を培地で倍数稀釈し、これに 37°C, 24 時間培養した *C. albicans* を 1 白金耳づつ各試験管に接種し、37°C, 72 時間培養後、菌の発育を認めた最大稀釈倍数の試験管より新しい薬剤の稀釈系列に接種し、順次これを繰返し 20 代継代培養することにより *C. albicans* に対する耐性の獲得の状態をしらべた。その結果、両株共、程度の差はあるが耐性の獲得が認められたので、継代を続けても耐性の上昇が一応それ以上進まなくなつたと思われるところで、両耐性株を薬剤を含まない培地に 72 時間毎に 20 代継代培養することにより、復帰の状態を観察した。それらの成績は第2図に示されている。

交叉耐性は 2,2'-thiobis (4-chlorophenol) 耐性株の 2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) に対する感受性と、2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) 耐性株の 2,2'-thiobis (4-chlorophenol) に対する感受性を試験した (第4表



註：実線一耐性獲得実験。破線一耐性復帰実験
矢印一復帰実験の開始

実験成績：

使用した *C. albicans* は 2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) に対して比較的急速かつ高度に耐性を獲得し、その復帰は 20 代の継代培養を行なつた限りでは、完全には原株の感受性に到らなかつた。一方 2,2'-thiobis (4-chlorophenol) の耐性獲得は低度にしか認められず、復帰も速かで完全であつた。

交叉耐性実験においては、2,2'-thiobis (4-chlorophenol) 耐性株は 2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) にも耐性を示したが、2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) 耐性株は 2,2'-thiobis (4-chlorophenol) に対して耐性にはならなかつた。

第4表 Thiobis-chlorophenol 耐性 *Candida albicans* の交叉耐性

菌株	薬剤 2,2'-thiobis (4-chlorophenol)	2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol)
2,2'-thiobis (4-chlorophenol) 耐性株	32,000	4,000
2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) 耐性株	64,000	1,000

註 表中の数値は菌発育阻止最大稀釈倍数を示す

VI. 毒性

両薬剤共難溶性であるので、5% アラビヤゴム水溶液にて懸濁液とし、経口投与により毒性実験を行なつた。動物は dd 系マウスを、体重 15~20g のものを用いた。

両薬剤共、6 群に分け、各群 10 匹づつ使用した。

実験成績：

第5表 Thiobis-chlorophenols のマウスに対する毒性

2, 2'-thiobis (4-chlorophenol)		2, 2'-thiobis (4, 6-dichlorophenol)	
投与量 (mg/kg)	死亡数/ 処置数	投与量 (mg/kg)	死亡数/ 処置数
658	0/10	432	0/10
757	2/10	497	3/10
870	3/10	572	4/10
1,000	6/10	658	5/10
1,150	8/10	757	7/10
1,320	10/10	870	10/10

第5表に示すが如き結果が得られた。FINNEY の graphic approximate method により LD₅₀ を算出して次の値を得た。

2, 2'-thiobis (4-chlorophenol) . LD₅₀=944.6 mg/kg
 $p=0.05$ における信頼限界は 866.9~1028.1 mg/kg.
 2, 2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) LD₅₀=644.2 mg/kg
 $p=0.05$ における信頼限界は 557.2~744.7 mg/kg.

考 察

2, 2'-thiobis (4-chlorophenol) と 2, 2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) との2検体の抗真菌作用を比較して、前者が殺菌作用がより強く、後者が発育阻止作用がより強いということは、後者において6, 6'-位に塩素が1個づつ多いということの他に化学構造上の相異はないのであるから、結果的にみて、この位置における塩素の添加如何に帰せられるべきであるが、その作用機序の究明は、今後の検討にまたねばならない。このことは抗トリコモナス作用についてもいえることである。

培地の pH が酸性側で両薬剤共より強い抗真菌作用を示すのは、これらが酸性物質である点当然と考えられ、従つて治療薬として用いる場合には、酸性側にて適応する方が望ましいであろう。

C. albicans を用いた耐性獲得とその復帰及び交叉耐性実験において示した両検体の態度の相異も、前述の如く、化学構造のわずかの相異と、そのもたらす抗真菌作用との関連において検討を要する問題を含んでいる。

また毒性の点でも若干の相異が認められたが、一般に芳香族化合物では、ハロゲン性置換基の数が増すにつれて毒性が増大することが知られており、この点これらの化合物においても同様のことがうかがわれた。

以上の諸実験を通じて、殺菌作用にまさり耐性獲得が少く、かつ毒性も比較的低下である 2, 2'-thiobis (4-chlorophenol) の方が、少くとも局所療法的適応にはよりすぐれていると思われるが、全身的適応の如何に関しては、なお検討を加えねばならない。

結 論

2, 2'-thiobis (4-chlorophenol) 及び 2, 2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) の2検体について、抗真菌作用その他の関連諸性状をしらべ、次の如き結果をえた。

1. 両薬剤共、各種病原性真菌に対し著明な発育阻止作用を示した。菌発育阻止作用は一般に後者がまさるが、殺菌的にはむしろ前者の方がすぐれている。

2. 各種抗真菌剤と比較して、両薬剤共、より強い抗真菌作用を有することが認められた。

3. 両薬剤共、かなりの抗トリコモナス作用を有することを認めた。

4. 培地の pH の影響については、*C. albicans* に対し、両薬剤共酸性側において強力に作用し、アルカリ性側に移るにつれて作用減弱した。

5. *C. albicans* は 2, 2'-thiobis (4-chlorophenol) に対し耐性を獲得し難く、復帰も速かであるのに反して、2, 2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) に対しては耐性を獲得し易く、復帰も不完全であった。2, 2'-thiobis (4-chlorophenol) 耐性株は 2, 2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) にも耐性であったが、2, 2'-thiobis (4,6-dichlorophenol) 耐性株は 2, 2'-thiobis (4-chlorophenol) に交叉耐性を示さなかつた。

6. 両薬剤の毒性は、マウスの経口投与において、比較的低下と思われた。

本研究に御指導を頂いた東京大学医学部細菌学教室 秋葉朝一郎教授に深い感謝を捧げる。

また 2, 2'-thiobis (4-chlorophenol) を合成し分与された中外製薬研究所成倉成雅夫氏及びトリコモナスを分与された日本医科大学産婦人科教室に御厚意を感謝する。

文 献

- 1) BECHHOLD, H. & EHRlich, P.: Beziehung zwischen chemischen Konstitution und Desinfektionswirkung. Z. physiol. Chem., 47, 173, 1906.
- 2) MARSH, P. B. & BUTLER, M. L.: Fungicidal activity of bisphenols as mildew preventives on cotton fabrics. Ind. Eng. Chem., 38, 701, 1946.
- 3) MARSH, P. B., BUTLER, M. L. & CLARK, B. S.: Fungicidal activity of bisphenols. Ind. Eng. Chem. 41, 2176, 1949.
- 4) PFLEGER, R., SCHRAUFSTÄTTER, E., GEHRINGER, F. & SCIUK, J.: Zur Chemotherapie der Pilzinfektionen. I. Mitteilung: *In vitro* Untersuchungen aromatischer Sulfide. Naturforsch., 46, 344, 1949.
- 5) RICHTER, R. & SCHRAUFSTÄTTER, E.: Zur Chemotherapie der Pilzinfektionen. III. Mitteilung Tierexperimentelle Untersuchungen zur Toxizität des 2, 2'-Dioxy-5, 5'-dichlordiphenylsulfids (D-25) und des 2, 2'-Dioxy-3, 3', 5, 5'-tetrachlordiphenylsulfids (D-26). Arch. Dermatol. u. Syphilis, 190, 563, 1950.
- 6) RICHTER, R.: Zur Chemotherapie der Pilzinfektionen. IV. Mitteilung Klinische Erfahrungen der Anwendung von 2, 2'-Dioxy-5, 5'-dichlorophenyl sulfide (D-25) bei Pilzkrankungen. Arch. Dermatol. u. Syphilis, 190, 563, 1950.