

## ベンゾチアゾール誘導体, その他 2,3 化合物の抗キャンディダ作用

—化学療法剤の研究 (第4報)—

戸田忠雄・徳永徹

九州大学医学部細菌学教室

(昭和34年4月30日受付)

近年抗生物質の普及に伴いその副生的疾患としてのキャンディダ症が漸く治療界の注目を浴びるに至っているが、今日尙特効的な薬剤は見出されていない。茲に著者らは有効な抗キャンディダ剤の発見を企図し、ベンゾチアゾール誘導体並びに 2, 3 新化合物を用いて試験管内抗キャンディダ試験を行なつたので報告する。

ベンゾチアゾール誘導体は 1879 年, HOFFMANN の合成的研究<sup>1,2)</sup> に始まり、その後シアニン色素や染料化学の面などで発展を見たが、化学療法剤としての研究の歴史は未だ極めて新しい。1947 年 FREEDLANDER<sup>3)</sup> が抗結核作用について報告し、KATZ<sup>4,5)</sup>、高橋ら<sup>6-9)</sup> も抗結核剤としての同誘導体の合成を試みている。このほか蛔虫駆除剤として MACKIE<sup>10)</sup>、殺宮入剤として宮木<sup>11)</sup>、横井<sup>12)</sup>の研究がある。

抗カビ剤としては 1940 年 EVERITT<sup>13)</sup> が 2-mercaptobenzothiazole などの抗カビ作用や毒性について報告した。その後多数の 2 位及び 6 位の置換体の抗カビ試験がなされたが、中でも GRUNBERG ら<sup>14)</sup> は 2-dimethyl amino-6-( $\beta$ -diethylaminoethoxy)-benzothiazole dehydrochloride が *Trichophyton*, *Microsporum* に属する皮膚病菌に高度の活性を有することを見出した。このものは STRITZLER ら<sup>15)</sup>、EDELSON ら<sup>16,17)</sup>、RAVITS<sup>18)</sup> などによつて臨床効果が確かめられ、Asterol として市販された<sup>19)</sup>。本邦においても鶴岡ら<sup>20-22)</sup> は 2, 6 置換ベンゾチアゾール誘導体の抗カビ性について報告している。1956 年西海枝及び吉名はベンゾチアゾール核を有する感光色素を合成し<sup>23)</sup>、戸田、藤川ら<sup>24)</sup>はこの抗キャンディダ作用を検討した結果、構造中にこの核を有するものが *C. albicans* に対し有効であることを報告した。吉名は更に抗キャンディダの目的で 2-methyl-benzothiazole を多数合成した<sup>25)</sup>。本報において供試された化合物は吉名氏の合成による同誘導体、及びその合成過程において得られた 2, 3 の新化合物である。

## 実験方法

供試薬剤は第 1 表に一括表示した。

使用菌株は教室保存の *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondi* の 3 株と、その他一部に *Staphylococcus aureus*-209 P, *Escherichia coli*-B, *Shigella flexneri*

Table 1. The compounds examined.

No.	Compound
B 1	2-Methyl-6-benzothiazole carboxylic acid
B 2	2-Methyl-6-benzothiazole carboxylic acid ethyl ester
B 3	2-Methyl-6-oxybenzothiazole acetic acid
B 4	2-Methyl-6-cyanobenzothiazole
B 5	2-Methyl-4,7-dichlor-6-cyanobenzothiazole
B 6	2-Methyl-5-8-dichlor-6-benzothiazole carboxylic acid
B 7	2-Methyl-6-carbamoylbenzothiazole
B 8	2-Methyl-6-benzothiazole carboxylic acid hydrazide hydrochloride
B 9	Benzoquinone 2-methyl-6-benzothiazole carbonyl hydrazone
B 10	3'-Chlorbenzoquinone-2-methyl-6-benzothiazole carbonyl hydrazone
B 11	Quinoxime-2-methyl-6-benzothiazole carbonyl hydrazone
B 12	2'-Isopropyl-5'-methyl quinoxime-2-methyl-6-benzothiazole carbonyl hydrazone
B 13	2-Amino-6-methylbenzothiazole
B 14	2-Amino-6-benzothiazole carboxylic acid ethyl ester
B 15	2-Acetamino-6-methylbenzothiazole
B 16	Monochlorobenzoquinone
B 17	2,5-Dichloro-4-thiocyano aniline
B 18	Bis (2,5-dichloro-4-amino) disulfide
B 19	3-Thiocyano-4-aminobenzoic acid ethyl ester
B 20	Nitrosothymol

2 a, *Salmonella typhi* H 901, *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Rv の 5 種の細菌を用いた。結核菌は試験管内で段階的に SM 1,000 mcg 及び INAH 100 mcg の耐性を獲得せしめた H 37 Rv の耐性菌をも用いた。

使用培地はキャンディダに対してはサブローブイヨンを用い、一般細菌には普通ブイヨン、結核菌には牛血清加キルヒナーを用いた。

薬剤の溶解法、稀釈法などは前報<sup>26-28)</sup>に記した通りである。

判定はキャンディダは 37°C, 24 時間及び 72 時間後に、一般細菌は 24 時間、48 時間後に、結核菌は 21 日、

28 日後に夫々発育抑制の有無を肉眼的に判定した。

毒性試験は ddN 系マウスを用い、腹腔内に被検薬剤の所要量を 1 回注射し 48 時間後の生死をもつて判定した。対照として INAH を用いた。

#### 実験成績

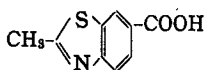

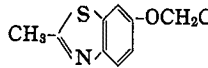

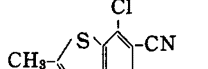
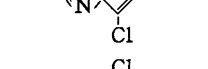
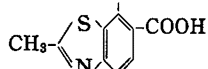
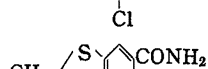
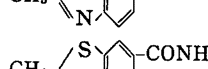
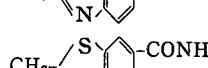
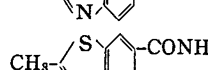
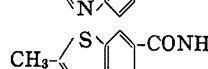
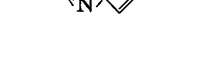
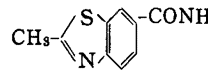
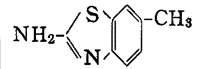
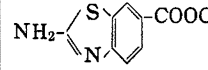
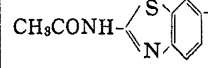
試験管内抗カンディダ作用について第 2 表に示した。この表に明らかなる如くベンゾチアゾール誘導体は B 6, B 13, B 4, B 9 など少数のものが若干の発育抑制作用を示したのみで一般に抗菌価が低く、期待された抗カンディダ作用をあらわさなかつたが、その他の化合物中に B 17, B 19, B 16 の如くかなり秀れた抗菌力をもつ物質が見出された。特に 2,5-dichloro-4-thiocyano-anilin は 16 万倍で完全に 3 株の発育を抑制した。

次に化学構造上面白いと思われる薬剤 4 種を選び試験管内抗結核作用を検討した結果を第 3 表に示した。対照にとつた SM が 1.6 mcg で発育抑制を示したのに対し、B 1 は 200 mcg 以下、B 7, B 8 も 50 mcg で阻止を示すにすぎなかつたが、B 17 は 6.3 mcg で発育を完全に抑制し、抗カンディダ作用だけではなく抗結核作用においてもかなり秀れていることが知られた。

そこで本剤 (B 17) の一般細菌に対する抗菌作用及び薬剤耐性結核菌に対する作用をしらべた結果が第 4 表である。即ち各種細菌に対して 16 万~32 万倍稀釈濃度で発育を抑制しており、48 時間後にも抗菌力の著しい低下は認められなかつた。又薬剤耐性結核菌に対しても感受性菌と同様に 16 万倍で発育を阻止し、耐性菌にも有効であつた。

更に本剤のマウスに対する毒性試験を行なつた。結果は第 5 表の通りである。即ち INAH が体重 kg 当り 400 mg の 1 回注射で全数死亡したのに対し、本剤は 800 mg/kg で 48 時間後も尚 3/4 が生存した。もつとも本剤は

Table 2. Effects on *Candida in vitro*.

No.	Compound	Strain	Incubation (hr.)		<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. guill.</i>	
			24	72	24	72	24	72		
B 1			<0.5*	<1	<1					
B 2			<0.5	<0.5	<0.5					
B 3			0.5<0.5	0.5<0.5	0.5<0.5					
B 4			<0.5	<1	2	1				
B 5			<0.5	<0.5	<0.5					
B 6			1<0.5	1<0.5	1<0.5					
B 7			0.5<0.5	1<0.5	<0.5					
B 8			<0.5	1<0.5	<0.5					
B 9			2	1	0.5<0.5	0.5<0.5				
B 10			<0.5	<0.5	<0.5					
B 11			<0.5	<0.5	<0.5					
B 12			<0.5	1<0.5	<0.5					
B 13			1<0.5	1<0.5	1<0.5					
B 14			<1	<1	<1					
B 15			<0.5	<0.5	<0.5					
B 16			2<0.5	1<0.5	2<0.5					
B 17			16	16	16	16	16	16	16	

B 18		<0.5	<0.5	<0.5
B 19		4	1	2<0.5
B 19		1<0.5	0.5<0.5	

\* The number shows the minimum concentration at which complete inhibition of bacterial growth occurred. (unit 1 : 10,000 dilution)

水に難溶であり、そのことが毒性の発現に影響していることも考えられるので、その点を更に検討の必要があろう。

因みに本剤は、無水アルコール、アセトン、エーテル類にはよく溶ける。50% プロピレングリコールには室温では難溶であつたが、50~80°C に加温するとかなり溶解する。50% アルコールには難溶、Tween-80 にはかなり溶解した。毒性試験は単に磨砕後生食水に suspend

Table 3. Effects of several compounds on *Myc. tbc. in vitro*

No.	mcg/cc								
	200	100	50	25	13	6.3	3.2	1.6	0.8
B 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B 8	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B 17	-	-	-	-	-	-	+	+	+
SM	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Table 4. Antibacterial activity of 2,5-dichloro-4-thiocyananiline

Bacterial strain	24 h.	48 h.	
	<i>Staph. aureus</i> -209 P	16*	16
<i>Esch. coli</i> -B	32	32	
<i>Shig. flex</i> 2 a	16	8	
<i>Sal. typhi</i> -H 901	16	8	
<i>Myc. tbc.</i>	Sensitive	3W	4W
	SM 1,000 mcg resist.	16	8
H 37 Rv	INAH 100 mcg resist.	16	8

\* unit 1 . 10,000

Table 5. Toxicity of 2,5-dichloro-4-thiocyananiline

Compound	mg/kg	800	400	200
	[B 17]		3/4*	4/4
[Control] INAH			0/4	4/4

\* mice survived 48 hr. after injection/mice injected intraperitoneally

の状態で注射した。

#### 考 按

銅その他の金属イオンと容易にキレート化合物を生成する物質中に高い抗菌力を有するものがあることは、INAH 誘導体においては ROTH ら<sup>29)</sup> が、PAS, Tibione については CARL<sup>30)</sup> LIEBERMEISTER<sup>31)</sup> が、8-hydroxyquinoline においては SORKIN<sup>32,33)</sup> な

どが明らかにしているところである。2-Methyl-6-benzothiazole carboxylic acid hydrazide の関連化合物 (B1~B8) はキレート化合物の生成能が大きく、分子自体はアルカリ性に傾き而も適当度の極性を有すると考えられるので、その抗菌作用に期待がもたれたが、キャンディダに対しても又結核菌に対しても秀れたものは見出されなかつた。

又キノン類の抗菌作用に関しても既に古くから知られており<sup>23)</sup>、著者の成績でも monochlorobenzoquinone (B16) はある程度の抗キャンディダ作用を示した。因みにベンゾキノ誘導体に関しては DOMAGK 一派<sup>34)</sup> の広範な研究を始め多数の研究があるが、抗キャンディダ作用に関しては報告が見受けられない。このキノン類、キノキシムとベンゾチアゾールの縮合体が B9~B12 であるが、これらもわずかに抗キャンディダ作用を示したのみで著しく秀れたものは見出されなかつた。

又 2-Methyl-6-benzothiazole carboxylic acid を合成する過程において得られる 2位がアミノ基の化合物 B13, B14 も著しい抗キャンディダ性を示さなかつた。

然るに更にこのものを得る過程で anesthesin を確シアン化して得られる 3-thiocyano-4-aminobenzoic acid ethyl ester (B19) がかなり高い抗菌性を有することが知られた。更にこの関連化合物 2,5-Dichloro-4-thiocyano aniline (B17) が著しい抗菌力を示したことは実験成績の示すとおりでである。

この抗菌機作については尙明らかでないが、B17 が単に秀れた抗キャンディダ作用をもつだけでなく、グラム陽性、陰性の各種細菌に対して抗菌力を有することは興味あることである。而もキャンディダ症が抗生物質療法の副生的疾患である<sup>35)</sup>と考えられるので、本剤が人型結核菌、就中 INAH, SM などの薬剤耐性菌に対し有効であることは、重要な意味があるものと言わねばならない。而も毒性がかなり低いと考えられるにおいて、である。今後は溶解性の上昇その他薬理学的検討が必要であると同時に、*in vivo* の実験など、より一層実用へ向つての検討が進められるべきである。

## 結 論

20種類のベンゾチアゾール誘導体その他2,3の化合物について抗キャンディダ作用及び抗結核作用を検討した結果、2,3の有効な化合物を見出した。就中2,5-dichloro-4-thiocyno anilineは16~32万倍の濃度で各種*Candida*、細菌の発育を抑制した。薬剤耐性結核菌に対しても同様の抗菌力を有し、マウス体重kg当り800mgの注射によりその3/4は急性をあらわさなかつた。従つて本剤は抗キャンディダ剤として秀れた可能性を有している。

終りに臨み、薬剤を合成提供され、種々御教示を賜つた九大薬学科 西海枝教授及び吉名助手（現名城大助教授）に深謝する。

## 文 献

- 1) HOFFMANN, A. W.: Ber. Deut. Chem. Ges., 12, 1127, 1879.
- 2) HOFFMANN, A. W.: Ibid., 13, 9, 1880.
- 3) FREDLANDER, B. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 66, 362, 1947.
- 4) KATZ, L.: J. A. C. S., 73, 4007, 1951.
- 5) KATZ, L.: Ibid., 75, 712, 1953.
- 6)~9) 高橋ら: 薬誌, 66, 58, 168, 1946. 同誌, 67, 42, 123, 1947, 同誌, 71, 423, 898, 902, 1442, 1951, 同誌, 72, 1492, 1952.
- 10) MACKIE, A.: J. Org. Chem. Soc., 4430, 1954.
- 11) 宮木: 科学, 25, 366, 1955.
- 12) 横井 同誌, 25, 471, 1955.
- 13) EVERITT, E. L.: J. Wash. Acad. Sci., 30, 152, 1940.
- 14) GRUNBERG, *et al.*: Trans. N. Y. Acad. Sci., 13, 22, 1950.
- 15) STRITZLER, C. *et al.*: Arch. Derm. Syphil., 63, 606, 1951.
- 16) EDELSON, *et al.*: Ibid., 64, 444, 1951.
- 17) EDELSON, *et al.*: Ibid., 66, 244, 1952.
- 18) RAVITS: J. Am. Med. Assoc., 148, 1005, 1952.
- 19) 特許公報, 昭 26-4620.
- 20~22) 内海, 鶴岡ら 薬誌, 74, 238, 1954, 同誌 74, 241, 1854, 同誌, 74, 245, 1954.
- 23) 西海枝, 吉名: 薬学研究, 28, 341, 1956.
- 24) 藤川: 医学研究, 26, 140, 1956.
- 25) 吉名: 2-メチルベンゾチアゾール誘導体の合成化学的研究, 1956.
- 26)~28) 戸田, ほか: Chemotherapy, 6, 91, 1958. Ibid., 6, 96, 1958, Ibid., in press, 1959.
- 29) ROTH, W. *et al.*: Helv. Chem. Acta., 37, 95, 1954.
- 30) CARL, E.: Z. Naturforsch., 46, 280, 1949.
- 31) LIEBERMEISTER, K.: Ibid., 56, 79, 254, 1950.
- 32) SORKIN, E.: Ibid., 34, 427, 1951.
- 33) SORKIN, E.: Experimentia, 7, 64, 1951.
- 34) PETERSON, S.: Ang. Chem., 67, 217, 1955.
- 35) 西海枝, 吉名: 薬学研究, 28, 266, 1956.