

抗真菌剤の研究 第5報

 β -ニトロステロール誘導体の抗菌、抗微性

千布益子・松田 明・石田秀弐・川村良夫・山中国夫

日本化薬株式会社 王子製薬工場

(昭和 35 年 1 月 7 日受付)

緒 言

第4報において β -ニトロステロール誘導体の抗微性に注目した理由を示したが、 $>C=C-NO_2$ の如き原子団がこの場合の主抗菌活性原子団であるか否かを確認する必要から、表1に示す如き化合物について、その抗菌、抗微性を検討し、更に $R-CH=C-NO_2$ の如き一般式で示

される化合物について構造作用相関を検討した。

β -ニトロステロール誘導体について抗微性が報ぜられたのは比較的新しく、1943年 U.S.P¹⁾に Fungicide

として記載され、次いで P. W. BRIAN²⁾, J. C. McCROWAN³⁾によつて非病原性真菌について検討されたが、わずかに織物、皮革の抗微剤として使用されているに過ぎない。又 O. DANN⁴⁾は各種のニトロ化合物の微生物発育抑制作用を Redox-potential の観点から論じ、ニトロステロールは Redox-potential が高く、その作用の本質は“Verdoppelungs prinzip”であると説明している。以上の文献ではいずれもその抗菌性について特に注目していないが、1952年 O. SCHALES⁵⁾等はアリルニトロアルケン化合物の抗細菌性を検討し、 β -ニトロステロール

表1 β -ニトロステロール誘導体の構造作用相関







No.	構 造 式	発 育 阻 止 最 大 稀 釈 倍 数 $\times 10^4$								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	 -CH ₂ -CH ₂ -NO ₂	<0.2	<0.2	0.5	0.2	<0.2	0.2	<0.2	<0.2	<0.2
2	 -CH ₂ -CH ₂ -NO ₂	0.5	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
3	 -CH ₂ CH-NOH	<0.2	<0.2	2.0	0.2	<0.2	0.2	0.5	0.2	0.2
4	 -CH-CH ₂ NO ₂ OH	0.5	1.0	128	16	8.0	32	32	4.0	8.0
5	C ₉ H ₁₉ CH=CH-NO ₂	16	<0.2	4.0	0.5	1.0	<0.2	<0.2	0.5	0.5
6	 -CH=CH-NO ₂	8.0	8.0	256	16	16	16	16	4.0	16

表2 -CH=C-NO₂ 置換体の抗微性





No.	 -CH=C-NO ₂ R'	発 育 阻 止 最 大 稀 釈 倍 数 $\times 10^4$								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
6	H	8.0	8.0	256	16	16	16	16	4.0	16
7	CH ₃	16	8.0	512	32	16	32	16	16	16
8	C ₂ H ₅	16	2.0	128	16	16	32	8.0	64	32
9	nC ₃ H ₇	2.0	<2.0	64	8.0	32	32	32	16	64
10	iC ₄ H ₉	2.0	<2.0	32	8.0	32	16	8.0	8.0	32
11	nC ₇ H ₁₅	2.0	<2.0	1.0	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4
12	nC ₁₁ H ₂₃	<0.4	<0.4	<2	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4
13	 -	4.0	<0.4	256	32	128	32	16	64	128
14	 -CH ₂ - Br	2.0	<0.4	128	8.0	64	16	8.0	1.0	64
15		32	32	128	32	32	32	32	32	32

表 3 X--CH=CH-NO₂ 置換体の抗微生物性









No.	X-  -CH=CH-NO ₂	発育阻止最大稀釈倍数 ×10 ⁴									
		X	1	2	3	4	5	6	7	8	9
6	—	8.0	8.0	256	16	16	16	16	16	4.0	16
16	<i>p</i> -NO ₂	16	16	128	16	16	32	1.0	0.2	16	
17	<i>p</i> -Cl	16	32	512	32	64	64	32	8.0	64	
18	<i>p</i> -OCH ₃	4.0	4.0	32	16	8.0	32	8.0	4.0	16	
19	3.4 	4.0	4.0	128	32	16	32	16	10	32	
20	3 OCH ₃ , 4 OH	8.0	1.0	16	4.0	4.0	8.0	1.0	1.0	4.0	

表 4 X--CH=C-NO₂ 置換体の抗微生物性
CH₃

No.	X-  -CH=C-NO ₂ CH ₃	発育阻止最大稀釈倍数 ×10 ⁴									
		X	1	2	3	4	5	6	7	8	9
7	—	16	8.0	512	32	16	32	16	16	16	16
21	<i>p</i> -NO ₂	64	16	1,024	16	32	16	32	8.0	32	
22	<i>p</i> -Cl	32	8.0	1,024	32	32	32	64	32	32	
23	<i>p</i> -OCH ₃	32	1.0	512	8.0	8.0	16	8.0	4.0	8.0	
24	3.4 	32	4.0	128	16	16	16	16	10	16	
25	3 OCH ₃ 4 OH	16	1.0	128	1.0	8.0	8.0	1.0	1.0	1.0	
26	<i>p</i> ((CH ₃) ₂ N)	<0.2	<0.2	32	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	4.0	1.0	

被検菌 No. 1 *Micrococcus pyo. aureus*, 2 *Escherichia coli*, 3 *Trichophyton mentagrophytes*,
4 *Candida albicans*, 5 *Willia anomala*, 6 *Torula utilis*, 7 *Aspergillus usami*,
8 *Penicillium chrysog.* Q 176, 9 *Saccharomyces sake*.



誘導体についても 5.0~20 mcg/cc 程度の抗菌力を認め、アルブミン添加によっても抗菌力の減弱が少く、又毒性も比較的低毒性である事を報告している。その後 1954 年以降 F. C. BOCOBO, A. C. CURTIS⁶⁻⁹) 等によって病原性真菌に対する化学療法剤の一環として β-ニトロステロール誘導体が研究せられ、彼等はこれらの化合物の抗菌性は 2 重結合を持つ炭素に強力な電子吸引基を付ける事によって起る隣接したメチレン基の活性化によると説明している。BOCOBO 等はその研究において、化合物を主として、β-ニトロステロール、β-メチル、β-ニトロステロール、*α*-メトキシ-β-ニトロステロール、*α*-アセトキシ-β-ニトロステロールに限定して検討を行なっている。中でも β-メチル-β-ニトロステロールが β-ニトロステロールに比して著しく抗菌力を増強している点から、本報においては一般式 -CH=C-NO₂ におい

て R' 置換体が抗菌力に影響を与える事が考えられるので、R₁=アルキル (炭素数 C₁~C₁₁) フェニル、ベンチルプロム置換体について、更に X--CH=CH-NO₂ 置換体及び X--CH=C-NO₂ 置換体について検討

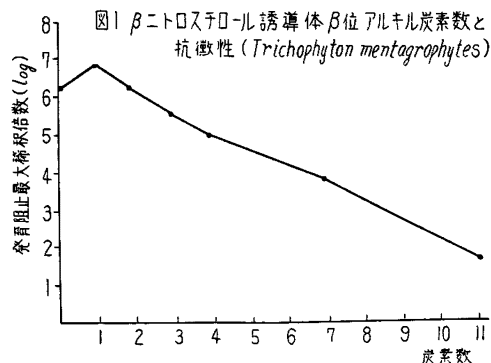
を加えた。2, 3 の化合物については病原真菌に対する抗菌性、実験白癬の治療、毒性等について検討した。

I. β-ニトロステロール誘導体の構造作用相関

実験方法 第 1 報と同様、寒天平板法。

実験結果 実験結果を一括して表 1~表 4, 図 1 に示した。表 1 に示す如く、-CH₂-CH₂-NO₂ (No. 1) 及び -CH-CH₂-NO₂ (No. 4) の如く 2 重結合の OH

消失した化合物、No. 2~No. 3 の如く 2 重結合及びニトロ基の消失した化合物は抗菌力が著しく減少している事

図 1 β-ニトロステロール誘導体 β 位アルキル炭素数と抗菌性 (*Trichophyton mentagrophytes*)

を認めた。 $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH=C-NO}_2$ 置換体において R' の炭

素数は C₁=CH₃ が最高であり、C数の増加に伴い抗働性を減じ、C₇ 以上は細菌、真菌、共に抗働力を示さない。フェニル基はメチル基について強力であり、ブロム置換体も可成り有効であるが、先の桂皮アルデヒド誘導体の場合において認められた抗働力の飛躍的増強に比較するとその効果は明かでない。この系列の化合物はいずれも抗細菌性に比して抗真菌性がすぐれていた。X- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH=CH-NO}_2$ 置換体においては X が p-Cl p-NO₂ 置換体は抗働力が強く、4-OH, 3-OCH₃ 置換体は抗働力を減

少した。X- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH=C-NO}_2$ 置換体においても X が

p-NO₂ p-Cl 置換体は抗働力増強し、その他の化合物も原型とほぼ同様の抗働力を示した。

総括及び考按

以上実験結果に示した様に β-ニトロステロール誘導体における主抗働活性原子団は $\text{C}=\text{C}-\text{NO}_2$ であり、

a ~ c に至る置換体が副抗働活性原子団と考えられる。構造作用相関を X- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH=C-NO}_2$ に限定して考え

表 5 X- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH=C-NO}_2$ 置換体の性状

No.	$\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH=C-NO}_2$ R'		抗働性 × 10 ⁴				官能試験			
	R'		1	2	3	4	C	F	O	T
6	H		8.0	8.0	256	16	C	S	±	+
7	CH ₃		16	8.0	512	32	C	S	±	±
8	C ₂ H ₅		16	2.0	128	16	Y	L	+	+
9	nC ₃ H ₇		2.0	<2.0	64	8.0	Y	L	±	+
10	iC ₄ H ₉		2.0	<2.0	32	8.0	Y	L	±	±
11	nC ₇ H ₁₅		2.0	<2.0	1.0	<0.4	Y	L	±	+
12	nC ₁₁ H ₂₃		<0.4	<0.4	<2.0	<0.4	Y	S	±	-
13	$\text{C}_6\text{H}_4\text{-}$		4.0	<0.4	256	32	Y	S	±	-
14	$\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-}$		2.0	<0.4	128	8.0	Y	L	±	±
15	Br		32	32	128	32	C	S	-	+

No.	X- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH=C-NO}_2$ R'		抗働性 × 10 ⁴				官能試験			
	X	R'	1	2	3	4	C	F	O	T
16	P-NO ₂	H	16	16	128	16	C	S	-	-
17	P-Cl	H	16	32	512	32	Y	S	±	±
19	3.4 CH ₂ $\langle\begin{smallmatrix} \text{O}^- \\ \text{O}^- \end{smallmatrix}\rangle$	H	4.0	4.0	512	32	Y-R	S	-	-
20	3 OCH ₃ 4 OH	H	4.0	1.0	32	4.0	Y-R	S	-	±
21	PNO ₂	CH ₃	64	16	512	16	C	S	-	-
22	PCl	CH ₃	32	8.0	512	32	Y	S	±	±
23	POCH ₃	CH ₃	32	1.0	128	8.0	R	S	±	±
24	3.4 CH ₂ $\langle\begin{smallmatrix} \text{O}^- \\ \text{O}^- \end{smallmatrix}\rangle$	CH ₃	32	4.0	512	16	Y	S	-	±
25	3 OCH ₃ 4 OH	CH ₃	16	1.0	128	1.0	Y	S	-	±
26	P(CH ₃) ₂ N-	CH ₃	<0.2	<0.2	32	<0.2	R	S	-	±

官能試験略号

C = 色調
F = 形状
O = 臭
T = 味

色調
—…無色
C…クリーム色
Y…黄色
R…紅色

形状
S…結晶
L…液体

臭味の基準
+ 芳香或は刺戟臭
± わずか
- なし
刺戟味

ると、R' 置換において炭素 C₁ のメチル基が抗微生物力のピークを示し、X 置換体においてフェニル核の p 位に -NO₂-Cl の如き陰性基を置換したものは明かに抗微生物力を増強するが、X の影響は R' に比して少ない。A. C. CURTIS, F. C. BOCOBO 等もスチルベン (c1ccc(cc1)-CH=CH-) との構造類似性からスチルバミジン (c1ccc(cc1)-CH=CH-C(=N)N) 桂皮酸、桂皮アルデヒド等につき抗微生物性を検討して、2 重結合に与える影響は NO₂ が最も強力であり、COOR, -COR, COOH, 或は CHO はそれに比して弱いと報告している。

以上の如き研究によつて、β-ニトロステロール誘導体はいずれも相当強力な抗微生物性を示し、中でも β-メチル-β-ニトロステロール、p-ニトロ-β-メチル-β-ニトロステロール等は新しい抗真菌剤として興味ある化合物である事を認めた。

II. β-ニトロステロール誘導体の病原真菌に対する抗微生物性

I において R-CH=C-X の一般式で示される化合物の R' 構造作用相関を検討する目的から、R = c1ccc(cc1)- X = NO₂ の場合、即ち β-ニトロステロール誘導体が最も強力な化合物である事を見出したが、その際、その抗菌、抗微

性と同時に深在性真菌症への応用を念頭に入れ、味臭等についても検討を行なつた。その成績は表 5 に一括して示した。

味、臭等の官能試験は著者等が自ら行なつた。いずれの化合物もさほど強烈な味、臭を有しないが、p-ニトロ-β-ニトロステロール、3,4-メチレンジオキシ-β-ニトロステロール、p-ニトロ-β-メチル-β-ニトロステロールは全く無味、無臭である。表中 ± の表示はいずれもわずかに芳香、刺戟味を有する程度である。

一般に R' 置換体の炭素数の変化は抗微生物性に比して味、臭に影響を与えず、いずれも + ~ ± の成績を示すが、X 置換体は比較的影響を示し、味臭共に原体 β-ニトロステロール、或は R' 置換体に比して、味臭共に減少の傾向が認められた。これらの化合物の中から、β-メチル-β-ニトロステロール、p-ニトロ-β-メチル-β-ニトロステロールについて病原真菌に対する抗微生物性を検討した。

実験方法 第 3 報と同様の寒天平板法。

実験結果 実験成績を一括して表 6 に示した。表に示す如く、2 種の β-ニトロステロール誘導体はいずれも *Trichophyton*, *Microsporium*, *Blastomyces Cryptococcus* 等に強い抗微生物性を示し、*Candida*, *Aspergillus*, *Crotrichum* 等には比較的弱い、各種の病原真菌に選択性少

表 6 β-ニトロステロール誘導体の病原真菌に対する抗微生物性

	<chem>c1ccc(cc1)-CH=C(NO2)C</chem>	<chem>O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)-CH=C(NO2)C</chem>	対 照 <chem>c1ccc(cc1)C=C(C)C(OC)OC</chem>
<i>Candida albicans</i>	16 × 10 ⁴	16 × 10 ⁴	4.0 × 10 ⁴
<i>Candida tropicalis</i>	16	32	4.0
<i>Candida pseudotropicalis</i>	32	64	8.0
<i>Candida krusei</i>	32	32	8.0
<i>Candida parakrusei</i>	8.0	8.0	2.0
<i>Candida stellatoidea</i>	64	32	16
<i>Candida guillemondi</i>	8.0	16	4.0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	64	256	128
<i>Nocardia asteroides</i>	16	16	16
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	256	512	1,024
<i>Geotrichum species</i>	8.0	8.0	2.0
<i>Sporotrichum schenckii</i>	64	64	16
<i>Harmodendrum pedrosoi</i>	128	128	128
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	256	256	128
<i>Trichophyton tonsurans</i>	512	2,048	2,048
<i>Microsporium audocimi</i>	2,048	>2,048	2,048
<i>Microsporium canis</i>	256	256	256
<i>Epidermophyton inguinale</i>	512	512	512
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8.0	2.0	4.0

(Duke 大学株, 寒天平板法)

く有効であり、表在性及び深在性真菌症への応用の可能性ある事を認めた。

III. β-ニトロステロール誘導体を用いる実験的白癬症の治療

すでに示した如き検討から p-ニトロβ-メチルβ-ニトロステロールが抗黴性、刺激性等にすぐれている事を認めたが、これを次に示す如き処方に従つて 0.5% 軟膏を調製し実験白癬の治療を行なつた。

親水軟膏の処方

p-ニトロβ-メチルβ-ニトロステロール 0.5g, プロピレングリコール 10.0g, セタノール 15g, テウリル硫酸ソーダ 2.0g, 白ロウ 1.0g, 水 72.0g

実験方法 第2報と同様。

実験結果 実験成績を一括して表7に示した。表に示す如く、各試験共に治療開始後 10 日前後から菌の消失がみられ、治療 12 日終了時には全例陰性となつた。創面の変化は治療開始 3~4 日頃から痂皮形成が起り、その後治療終了時迄に正常に復し、発赤腫脹等の刺激性は全く認められなかつた。

又 α-ブロムメチル皮アルデヒドの際と同様に実験者の腕に 0.5% 軟膏を 1 日 6 時間、連続 5 日間塗布するも何等の刺激的症状を示さなかつた。以上の如き検討から p-ニトロβ-メチルβ-ニトロステロールは抗白癬菌剤としても興味ある化合物である事を認めた。

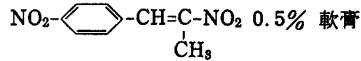
IV. β-ニトロステロール誘導体の毒性

a) 急性毒性、抗菌、抗黴性、刺激性等の諸点から注目し得る 6 種の化合物について、経口、皮下の両投与方法による毒性の予備的検討を行なつた。又この検討で興味ある化合物については更に LD₅₀ の測定も行なつた。

実験方法 第3報と同様。

実験結果 実験成績を一括して表8に示した。表に示す如く、p-ニトロβ-メチルβ-ニトロステロール、3,4-メチレンジオキシβ-ニトロステロールは両投与方法共に

表7 β-ニトロステロール誘導体の実験白癬治療



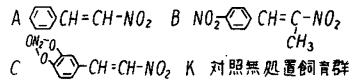
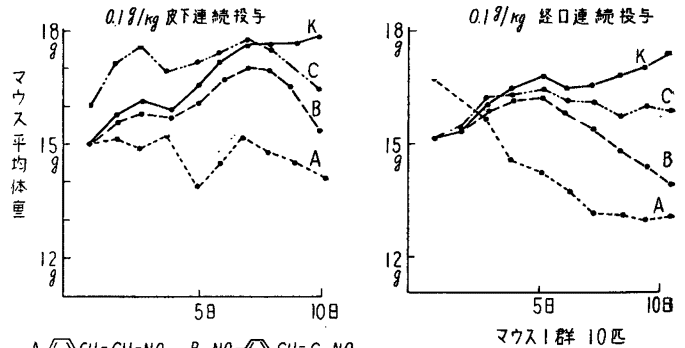
	治療前日	治療1日	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ニトロステロール 0.5% 軟膏	A	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
	D	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
	E	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
無処置対照		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表8 β-ニトロステロール誘導体の毒性

	X- C_6H_4 -CH=C-NO ₂		径口 g/kg			毒性順位 (低)	皮下 g/kg			毒性順位 (低)
	X	R'	0.1	0.5	1.0		0.1	0.5	1.0	
6	-	H	0/5	3/5	5/5	4	0/5	0/5	2/5	2
15	-	Br	2/5	3/5	5/5	5	2/5	5/5	5/5	5
17	p-Cl	H	2/5	5/5	5/5	6	0/5	1/5	5/5	4
20	3,4	CH ₂ <O<-	0/5	1/5	0/5	1	0/5	0/5	0/5	1
21	P-NO ₂	CH ₃	0/5	2/5	1/5	2	0/5	0/5	0/5	1
25	3 OCH ₃ 4 OH	CH ₃	0/5	2/5	2/5	3	0/5	3/5	3/5	3

マウス 1 群 5 匹 斃死マウス数/供試マウス数

図2 β-ニトロステロール誘導体の慢性毒性



毒性低く、ハロゲン置換体は強い毒性を示した。中でも p-ニトロβ-メチルβ-ニトロステロールは抗黴力がすぐれ、味、臭毒性の少ない注目すべき化合物であるので LD₅₀ を検討したが、LD₅₀ (per os) 約 1,400 mg/kg LD₅₀ (ip) 約 200 mg/kg であつた。

b) 慢性毒性、急性毒性の検討によつて β-ニトロステロール誘導体の中には可成り毒性の少ない化合物があり、深在性真菌症への応用も可能性を持つと考えられる。今回は慢性毒性の予備的検討として 1 g/kg の投与

によつて毒性を示さぬ化合物 *p*-ニトロ- β -メチル- β -ニトロステロール (I), 3,4-メチレンジオキシ- β -ニトロステロール (II) と対照として β -ニトロステロール (III) の3化合物を選定し, 100 mg/kg 日1回連続10日間, 経口, 皮下の各投与を行ない, マウスの体重の増減曲線から慢性毒性を観察した。

実験結果 実験成績を一括して図2に示した。

経口投与 化合物IIは投与後6日迄は対照無処置群と同様な体重増加を示したが, 7日以後若干減少の傾向が認められた。化合物Iは4日迄は対照無処置群と同様であるが5日以後ややげしい減少が認められた。化合物IIIは投与直後より体重減し, 5日以後衰弱特に著しく, 全投与期間中に試獣の70%が斃死した。

皮下投与 化合物II, 化合物Iは投与後7日迄は対照無処置群と同様の体重増加を示したが8日以後減少の傾向を示した。化合物IIIは投与後3日から体重減少がみられ, 7日以後衰弱著しく全投与期間中に20%が斃死した。

以上を綜括すると, 100 mg/kg という比較的大量の連続投与によつては, いずれの投与法においても3検体共に体重減少がみられ, 投与後5日~7日の期間に著積毒性の影響が判然としてくる傾向を認めた。3検体の中では, 化合物II>化合物I>化合物IIIの順に毒性が軽微で

あつた。A. C. CURTIS, F. C. BOCOBO¹⁰⁾ は β -ニトロステロール LD₅₀ (i. p.) 22.5 mg/kg, β -メチル- β -ニトロステロール 82 mg/kg, *p*-メトキシ- β -メチル- β -ニトロステロール 130 mg/kg の値を示している。

以上の検討によつて, β -ニトロステロール誘導体, 特に *p*-ニトロ- β -メチル置換体, 3,4-メチレンジオキシ置換体が原型の β -ニトロステロールに比して著しく毒性を減じている事を見出した。

結 論

1. β -ニトロステロール誘導体において, その主抗菌活性原子団は $>C=C-NO_2$ である事を確認した。

2. β -ニトロステロール誘導体の構造作用相関を検討し, β -メチル- β -ニトロステロール, *p*-ニトロ- β -メチル- β -ニトロステロール等, 数種の化合物が多くの病原真菌にすぐれた抗微生物性を示す事を見出した。

3. *p*-ニトロ- β -メチル- β -ニトロステロール軟膏を用いる実験的白癬症の治療を行ない有効であつた。

4. β -ニトロステロール誘導体の毒性を検討し, 急性毒性は経口, 皮下両投与法共に比較的軽微である事を認めた。

本研究に当り御懇篤なる御指導を賜つた秋葉教授, 岩田助教授に心から感謝いたします。