

持続性 Sulfonamide 剤の抗菌作用と毒性について

大山昭夫・田中志郎・野村美恵・堀田 進

神戸医科大学微生物学教室

(昭和 36 年 1 月 27 日受付)

DOMAGK(1935) が Prontosil による化学療法の端緒を開いて以来, Sulfonamide 誘導体を用いた化学療法の発展には日覚しいものがある。その間, 数多くの誘導体の合成も進み, 幾多の研究が重ねられて, 化学療法剤として優秀な誘導体も数々発見されてきたが, その歩んだ道を顧ると, 数多くの抗生物質の発見, 応用により若干の盛衰は免かれなかつた (梅沢, 1954)。

併し乍ら, 抗菌スペクトラム, 毒性, 投与方法或いは耐性菌の出現など化学療法に必然的に付随する諸問題を考慮する時, Sulfonamide 剤は, 化学療法に於て欠く可からざる薬剤の 1 つであり, 今後共その価値が減ずるものとは思われず, 益々その検討の進められることが期待される。

今回, 従来の Sulfonamide 誘導体に較べ, 有効血中濃度を長時間に亘つて保ち得る持続性 Sulfonamide 剤が新に得られたので, *in vitro* 及び *in vivo* の抗菌作用及び毒性を検討した。

また, 吾々の教室で諸種化学療法剤とヒト・ガンマー・グロブリン (γG) との併用治療効果を検討した結果, 特に Sulfadiazine との併用により極めてすぐれた治療効果が発揮されることが明らかとなつたので (大山 *et al*, 1959 a, b, 1960; 栗村, 1960), 持続性 Sulfonamide 剤と γG との併用治療効果も併せて検討した。

実験材料

供試薬剤

第 1 表に示す 6 種類の誘導体*を用いた。その内, Sulfaphenazol (No. 1), Sulfisomezole (No. 2) 及び Sulfadimethoxine (No. 3) は, 持続性 Sulfonamide 剤として用いられたものであり, 従来使用されてきた Sulfadiazine (No. 4) 及び Sulfaisoxazole (No. 5) 及び Sulfisomidine (No. 6) は対照の意味で用いられた。ガンマー・グロブリン (γG) は市販品**であり, 用に臨み生理的食塩水にて適宜に希釈された。

供試微生物 (第 2 表)

In vitro の実験に供した微生物は, *Staphylococcus*

* 大日本製薬株式会社学術部より分与せられた。

**日本ブラッドバンク製 同社 内藤良一博士, 森末新一博士より分与せられた。

Table 1 Compounds tested

No.	Name	Chemical formula
No. 1	Sulfaphenazol	
No. 2	Sulfisomezole	
No. 3	Sulfadimethoxine	
No. 4	Sulfadiazine	
No. 5	Sulfaisoxazole	
No. 6	Sulfisomidine	

Table 2 Microorganism used for test

Species	Strain
<i>Staphylococcus aureus</i>	KAT (Osaka Univ.)
<i>Staphylococcus albus</i>	AKM (Osaka Univ.)
<i>Bacillus subtilis</i>	PCI 219 (Kobe Med. College)
<i>Escherichia coli</i> <i>communior</i>	UKT-1 (Osaka Univ.)
<i>Shigella dysenteriae</i>	(Kobe Med. College)
<i>Salmonella typhi</i>	Boxhill No. 58 (Kobe Med. College)
<i>Diplococcus pneumoniae</i> type I	(Kobe Hyg. Inst.)

aureus, *Staphylococcus albus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli communior*, *Shigella dysenteriae*, *Sal-*

Table 3 Synthetic medium used

Na ₂ HPO ₄	2.5 g
KH ₂ PO ₄	0.35 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.5 g
NH ₄ Cl	0.5 g
Fe SO ₄ 7 H ₂ O	0.01 g
Mg SO ₄ 7 H ₂ O	0.01 g
Nicotinic acid amide	0.01 g
Glucose	2.0 g
Aq. dest.	1,000 ml
	pH 7.2

monella typhi で何れも普通寒天培地、或いはブイヨンに数代継代したものを第3表に示す合成培地 (大山 *et al.*, 1959 a) に更に数代植え継ぎ、著明に発育増殖を示すのを俟つて使用した。

In vivo の実験に供した *Diplococcus pneumoniae* type I*** は 3% TSB 培地 (Trypticsoy broth, Difco 製) に 5% の割に脱線維素ウサギ血球を加えたものに継代し、常法の如くマウス通過を数代繰返して充分毒力を高めたものを一定量用いた。使用の都度、その LD₅₀ 及び生菌数は確認して実験を行なった。

供試動物

実験に供した動物は、何れも商人より購入した 10~13 g の DD 系健康マウスであつて雄のみを用いた。

実験方法

1) 試験管内抗菌作用 (大山 *et al.*, 1960)

各供試薬剤を先づ 50 mg 宛計量、1/10 N. NaOH にて溶解、1/10 N. HCl にて pH 8.0~9.0 とした上、蒸留水で全量 10 ml となるように溶解した。さらに合成培地で供試薬剤溶液を 1 万倍に希釈、10 ポンド・10 分間高圧蒸気滅菌を行ない、2 万倍より 128 万倍までの合成培地による倍数希釈系列を作った。

このよに薬剤を含有した各試験管に前記合成培地に充分発育増殖した各種菌を 1/3 注射針にて 2 滴宛均等に滴下して夫々菌の接種を行なった。

37°C の孵卵器に静置培養し、24 時間毎に観察、菌の発育の有無を肉眼的濁りにより判定して、菌発育抑制最少希釈濃度を求めた。最終的な成績判定は 96 時間培養を以て行なった。

2) 毒性試験

各供試薬剤を秤量し、乳鉢にて充分磨砕した後、10% 可溶性澱粉浮游液に懸濁させ、たえず攪拌しつつ平等な懸濁液としてゾンデによりマウスに経口投与した。7 日間観察した後、マウスの生死を指標として、LD₅₀ を計算した (鳥居 *et al.*, 1956)。

*** 神戸市衛生研究所 堀道紀博士より恵与せられた。

3) 供試肺炎双球菌 I 型の LD₅₀

マウス通過により充分毒力を高め、しかも安定した肺炎双球菌 I 型²⁾を、5% ウサギ血液加 3% TSB 培地に 24 時間培養した培養液を同培地にて 10 倍階段希釈を行ない、夫々の 0.1 ml をマウスの腹腔内に接種し、3 日間その生死を観察して、LD₅₀ の算定を行なった。同時に 5% ウサギ血液加寒天ブイヨンに同材料を混合培養して 37°C に 48 時間培養し、発生した集落数を計算して、夫々に含まれる生菌数を算定した。

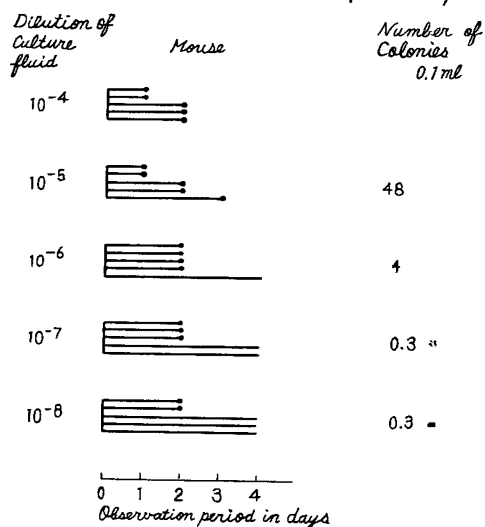
その 1 例を第 1 図に示す。本例において供試肺炎双球菌 I 型の LD₅₀ は 10^{7.33} で、その 0.1 ml に含まれる生菌数は大よ 1 箇であつた。

4) 治療実験

供試肺炎双球菌 I 型を 5% ウサギ血液加 3% TSB 培地に 24 時間培養した液の 10⁻⁶ 希釈液 0.1 ml を各頭マウスの腹腔内に接種した。その時の生菌数は大よ 50 箇であつた。

薬剤投与量は、夫々の薬剤の毒性を考慮した上で決定されるべきであるが、本教室に於ける Sulfadiazine を用いた治療実験 (大山 *et al.*, 1959, a, b) の成績と比較検討する意味で総て 10 mg を 1 回投与することとした。これら供試薬剤のマウスにおける LD₅₀ はいずれも 10 mg より大であることが確められているので、この量を投与して大きな不都合はない。

Fig.1 Mouse-LD50 of Pneumococci used in the present study



One line represents a mouse inoculated. A black dot at the end of line indicates that the death of mouse occurred at that moment. These descriptions will be applied in the later figures in this article.

* One colony on one plate of three.

各頭マウスに薬剤を 10 mg 宛投与し、その直後、4 時間後、8 時間後及び 12 時間後に夫々上記の量の肺炎双球菌 I 型を感染せしめ、3 日間観察してその治療成績を検討した。

5) ヒト rG との併用治療効果

治療実験に併行して rG との併用実験が行なわれた。Sulfaphenazol 10 mg の投与と同時に rG の 10 倍生理的食塩水稀釈液 0.1 ml を大腿筋肉内に注射し、その 2 時間、4 時間、6 時間及び 8 時間後に夫々菌を接種して 7 日間観察してその薬剤単独の治療効果と rG との併用治療効果を比較検討した。実験方法の詳細は既に発表した処と同様である (大山 *et al.*, 1959 a, b, 1960; 栗村, 1960)。

実験成績

1) 試験管内抗菌作用 (第 4 表)

96 時間培養後の発育抑制最少稀釈濃度が第 4 表に示されている。多くの Sulfonamide 剤の特性として知られている如く、Gram 陽性菌に対して、Gram 陰性菌に対するよりもその抗菌作用は著明に認められた。*Staphylococcus albus* は、*Staph. aureus* に較べて総ての薬剤に感受性が高かった。*E. coli* に対する抗菌作用は、他の菌種に較べて殆んど認められなかった。*Sh. dysenteriae* に対しては Sulfisomezole が 128 万倍以上、Sulfaphenazole 及び Sulfadiazine は 32 万倍の抗菌価を示したが、他の誘導体では、*Sal. typhi* に対すると同様著明な抗菌作用は認めなかった。

2) 毒性試験 (第 2 図)

夫々の供試誘導体の毒性には互に可成りの差異が認められる。よつて、マウスに対する 1 回の投与量も、20 mg, 40 mg, 80 mg 及び 160 mg 投与の系列と、6.25 mg, 12.5 mg, 25 mg, 50 mg 及び 100 mg 投与の系列とを試み、両者の平均値を以て LD₅₀ の量を算定した。

Sulfadimethoxine は LD₅₀ が 160 mg 以上で最も毒

Table 4 Antibacterial activity *in vitro* of long-lasting sulfadugs (Minimal growth-inhibiting dose, as expressed by dilution) $\times 10^4$

Microorganism	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. albus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sh. dysent.</i>	<i>Sh. flex.</i>	<i>Sal. typhi</i>	<i>Prot. vulg.</i>
Drug								
Sulfaphenazol	64	>128	32	2	16	32	8	8
Sulfisomezole	>128	>128	64	4	>128	>128	16	>128
Sulfadimethoxine	64	>128	16	4	8	16	8	8
Sulfadiazine	>128	>128	32	4	32	8	4	8
Sulfaisoxazole	64	>128	32	4	8	16	<2	8
Sulfisomidine	64	>128	16	4	32	16	4	16

Fig 2 Toxicity for mouse of sulfonamide compounds tested

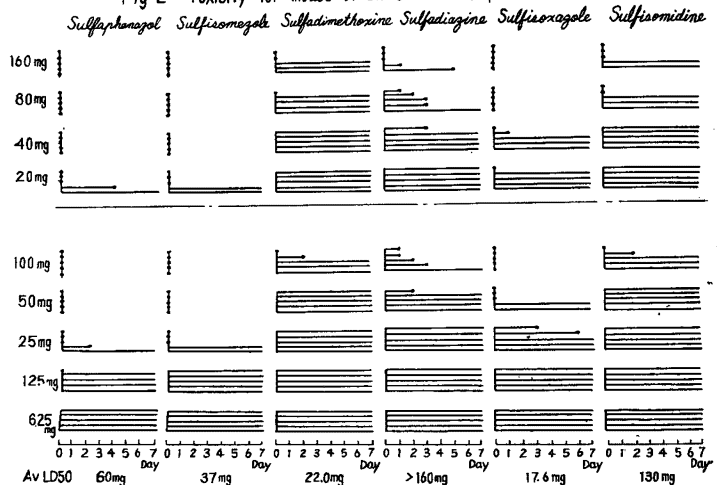
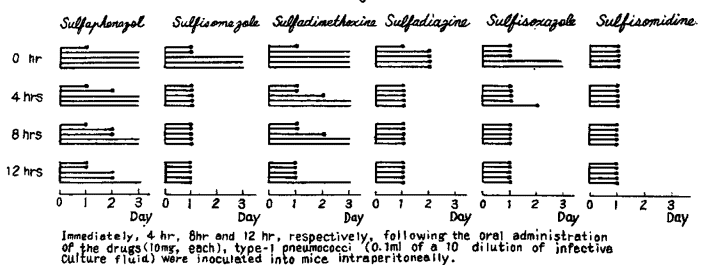


Fig. 3

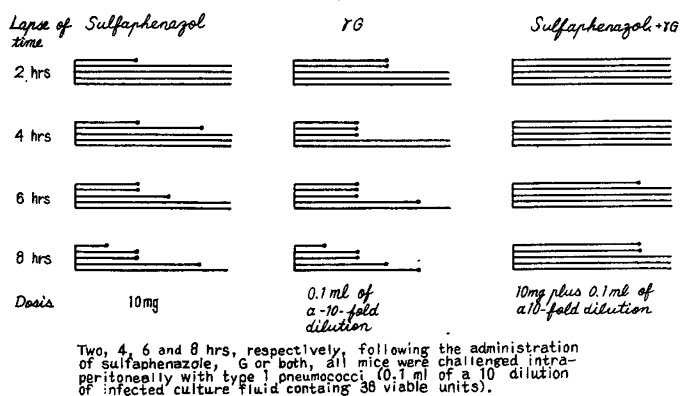


性が少なかったが、Sulfisomezole 及び Sulfaphenazole に於ては 20~30 mg の毒性を示した。

3) 治療実験 (第 3 図)

菌接種と同時に薬剤を投与した場合には、Sulfisomidine を除き何れも治療効果を示したが、薬剤投与後、時間を経過するに従つてその治療効果は減少し、薬剤投

Fig. 4 Combined effect of Sulfaphenazole and human gamma-globulin



与の4時間後に菌を接種した場合は, Sulfadimethoxine 及び Sulfaphenazol を除く他の薬剤は全く治療効果を示さなかつた。

4) rG との併用治療効果 (第4図)

rG 単独でも治療効果を認めるが, Sulfaphenazol と併用することにより薬剤及び rG 投与の6時間後においてすら顕著な併用治療効果を認めた。

考 按

以上, 新しい持続性 Sulfonamide 剤の試験管内抗菌作用, マウスによる毒性の検定, 治療実験並びに rG との併用治療効果の検討などが従来の Sulfonamide 剤との比較においては行なわれた。

試験管内抗菌作用に於て, 供試微生物の栄養要求を充分満足す点に於てはブイヨン培地を用いるべきであるが, その中に含まれる Peptone, Methionine などが Sulfonamide 剤の作用を阻害して (KOHN & HARIS, 1941; O'MEORA, 1947), 信頼すべき成績が得られない故, 今回は一律にこれら阻害性物質を含まない簡単な合成培地を用いて抗菌作用を検討した。

Staph. aureus に対しては何れも 64~128 万倍の抗菌価を示したが, 同じブドウ球菌でも *Staph. albus* に対しては何れも 128 万倍以上の抗菌価で, 菌の病原性とも考え合せ興味ある点であつた。

多くの Sulfonamide 剤が Gram 陽性菌に対して強い感受性があるのと同様に, 持続性 Sulfonamide 剤も Gram 陰性菌, 特に *E. coli* には殆んど抗菌作用を示さなかつた。

Sh. dysenteriae に対して Sulfisomezole が 128 万倍以上, Sulfaphenazole 及び Sulfadiazine が 32 万倍の抗菌価を示したが, 他の誘導体に於ては著明な差を認めず, *S. typhi* に対しては何れの誘導体も優れた抗菌作用

は示さなかつた。

同じ Sulfonamide 剤の N_1 置換体に於てもその毒性を夫々検討すると, 著明にその差が認められ, 特に Sulfamethoxine 及び Sulfisomidine の構造をもつものの毒性が少いことは興味ある点であつた。

化学療法剤に於て, 如何に抗菌作用が優れ, 毒性が少くとも, 実際に治療を行なうにあたり投与方法の複雑困難な薬剤は実用に適し難い。従来の Sulfonamide 剤は, その血中濃度を一定に維持し, 作用時間を長く保たせるためには投与回数増加を余儀なくされた。本実験に於て

は, 夫々の薬剤の LD_{50} の量を考慮することなく, 同じ条件という意味で総て 10 mg 経口投与を行ない, 肺炎双球菌 I 型の感染マウスに対して治療実験を行なつたのであるが, Sulfisomezole, Sulfadiazine, Sulfaisoxazole 及び Sulfisomidine に於ては, 薬剤投与後4時間にてすでに治療効果が認められなかつたに対し, Sulfadimethoxine 及び Sulfaphenazole に於ては, 投与後8時間で菌を接種しても, 5匹中2匹は死を免れた。併し乍らその毒性に於て, Sulfadiazine 及び Sulfisoxazole の LD_{50} は大約 40~60 mg, Sulfisomidine のそれは 100 mg 以上の価を示しているかにかかわらず, 投与量を一律に 10 mg と定めたことはいささか問題があり, この点に關し今後の検討を要する。

rG は単独投与によつても細菌の感染に対してある程度の治療効果を示すことが知られているが (HARRIS & SCHICK, 1954; ROSENTHAL *et al.*, 1957; BARANDUN *et al.*, 1957), 一方 Chloramphenicol との併用に関する実験成績 (FISCHER, 1957; MANNING *et al.*, 1948; FISCHER & MANNING, 1958) および吾々の教室に於ける Sulfadiazine との併用治療効果 (大山 *et al.*, 1959a, b, 1960; 栗村, 1960) 並びにこの併用治療効果の持続維持に関する研究成績 (堀田, 1960) などが報告されており, rG の特殊な作用が注目せられている。本研究において持続性 Sulfonamide 剤の1つである Sulfaphenazol と rG との併用治療効果を検討したところ, 単に薬剤の治療効果を維持するだけでなく併用効果をも維持させることが明らかとなつた。このことは, rG の作用機序を窺う1つの手がかりとして将来さらに追求すべき問題点を示唆するものである。

結 論

新しい持続性 Sulfonamide 剤として Sulfaphenazol

Sulfisomezole 及び Sulfadimethoxine, 従来使用されてきた Sulfonamide 剤として Sulfadiazine, Sulfaisoxazole 及び Sulfisomidine につき試験管内抗菌作用, 毒性, 肺炎双球菌 I 型感染マウスの治療実験並びにヒトガンマー・グロブリンとの併用治療実験を行ない, 次の様な結果を得た。

1) 合成培地を用いて試験管内抗菌作用を検討した結果, 何れもブドウ球菌に対しては 64 万~128 万倍の抗菌価を示した。

2) 大腸菌に対しては何れも抗菌作用を殆んど認めなかった。

3) 志賀赤痢菌に対して, Sulfisomezole が 128 万倍以上, Sulfaphenazol 及び Sulfadiazine が 32 万倍以上の抗菌価を示した。

4) マウスに対する毒性を検討し, LD_{50} を求めた結果, Sulfadimethoxine の毒性が最も少く, Sulfisomidine, Sulfadiazine, Sulfaisoxazole, Sulfisomezole 及び Sulfaphenazole の順に毒性は強くなった。

5) 肺炎双球菌 I 型感染マウスに対して治療実験を行なったが, Sulfaphenazol 及び Sulfadimethoxine では薬剤 10 mg 投与後 8 時間に於てもなおかつ一定の治療効果を認めたが, Sulfisomezole, Sulfadiazine, Sulfaisoxazole 及び Sulfisomidine では同じく薬剤 10 mg 投与後 4 時間で既に治療効果を失っていた。

6) 肺炎双球菌 I 型感染マウスに Sulfaphenazol 10 mg, ヒトガンマー・グロブリン 10 倍稀釈液 0.1 ml を併用して治療実験を行ない, 薬剤投与後 4 時間に於ても治療効果を持続出来ると同時に, 併用効果の点に於ても各々の単独使用よりすぐれていることを知った。

菌株を恵与せられた堀道紀博士及び薬剤を恵与せられた大日本製薬株式会社学術部並びに日本ブラッドバンク内藤良一博士, 森末新一博士に深謝の意を表す。

参 考 文 献

- 1) BARAUDUN, S., KIPFER, R., RIVA, G. & NICOLET, A.: Über die Therapeutische Verwendung von Gammaglobulinen die Bakteriellen Infektionen. Schweiz. Med. Wchshr., 87: 155-159, 1957
- 2) DOMAGK, G.: Ein Beitrag zur Chemotherapie der Bakteriellen Infektion. Deut. Med. Wchshr., 61: 250-253, 1935
- 3) FISCHER, M. W.: Synergism between human Gamma globulin and chloramphenicol in the treatment of experimental bacterial infections. Antibiot. & Chemoth., 7: 315-321, 1957
- 4) FISCHER, M. W. & MANNING, M. C.: The specific antibody nature of the therapeutic action of gamma globulin in experimental bacterial infections in mice. Antibiotics Annual, 1957/1958, 572-576, 1958
- 5) HARRIS, J. R. & SCHICK, B.: The use of gamma globulin in infection refractory to antibiotics. J. Mt. Sinai Hosp., N. Y., 21: 148-161, 1954
- 6) 堀田 進: 第 8 回日本化学療法学会近畿支部総会 (大阪), 化学療法剤と他の療法との併用, ガンマー・グロブリンと化学療法との併用 (基礎的研究), 1960
- 7) KOHN, H. I. & HARRIS, J. S.: On mode of action of sulfonamides: Specific antagonism between methionine and sulfonamides in *Escherichia coli*. J. Pharmacol. & Exper. Therap., 73: 383-400, 1941
- 8) 栗村 徹: 化学療法剤とヒトガンマー・グロブリンとの併用効果に関する実験的研究。神戸医科大学紀要, 18(3): 329-352, 1960
- 9) O'MEORA, R. A. Q., McNALLY, P. A. & NELSON, H. G.: Intracellular mode of action of sulfonamide derivatives. Lancet, (ii): 747-752, 1947
- 10) 大山昭夫・和泉正人・藤原朗・栗村徹 田中志郎 吉田淳: 新たに合成せられた Sulfonamide 誘導体の試験管内抗菌作用。神戸医科大学紀要, 16: 261-270, 1959
- 11) 大山昭夫・栗村徹・堀田進: 感染に対する化学療法剤とガンマー・グロブリンとの併用効果に関する研究 (第 1 報)。Chemotherapy 7(3): 190-191; 7(5): 321-326, 1959 a
- 12) 大山昭夫・栗村徹・堀田進: 化学療法剤とガンマー・グロブリンとの併用効果に関する研究 (第 2 報): 併用機序に関する一考察。Chemotherapy, 7(4): 217-218; ibid (1960) 日本細菌学雑誌, 15(4): 394-401, 1959 b
- 13) 大山昭夫・池田雄二・和田和夫・弥永浩: 新合成持続性 Sulfonamide 誘導体の試験管内抗菌作用。神戸医科大学紀要 (印刷中) 1960
- 14) 鳥居敏雄・高橋昭正・土肥一郎: 医学生物学のための推計学。東京, 東大出版会, p. 109-121, 1956
- 15) 梅沢純夫: 抗菌性物質。東京, 培風館, 1954