

化学療法剤の研究第1報

数種 Nitrostyrene 化合物の基礎的研究

服部善八郎

三共株式会社高峰研究所

(昭和38年2月7日受付)

I. 緒言

抗生物質による化学療法的发展に伴い耐性菌の出現が重大な問題となつて来た。

著者は化学療法剤の検索の一端として耐性赤痢菌ならびに耐性ブドウ球菌に対して抗菌作用を示す化合物を探索するため、Screeningを試みて来たが、その中で、3の有効な Nitrostyrene 化合物を発見したので、それについて若干の基礎的な検索を行なつた。

II. 試料ならびに実験方法

1) 試料

表1に示した R₁, R₂ の組み合わせによる 66 種の当研究所で合成された Nitrostyrene 誘導体を使用し各項において述べた方法により実験した。

2) 実験方法

(i) *E. coli* および *Sta. aureus* による Screening Nitrostyrene 関連化合物 66 検体について *Escherichia coli* NIHJ および *Staphylococcus aureus* 209-P に対する試験管内抗菌作用を検索した。培地は普通寒天を使用

し、平板希釈法により測定した。検体の溶解にはアセトンを用い、培地中のアセトン量は最高濃度においても 5% 以下となるよう調整した。

判定は 37°C, 24 時間培養後その発育の有無を観察し、最少発育阻止濃度をもつて抗菌力を示した。

(ii) No. 2 および No. 8 の抗菌作用

66 検体中 No. 2 および No. 8 において比較的強い抗菌作用を認めため、これについて *Sarcina lutea*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella paratyphi* B, *Shigella flexneri*, *Proteus*, 病原性好塩菌, *Pseudomonas*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, ならびに *Trichophyton* 等の試験管内抗菌作用の検討を行なつた。

使用培地は病原性好塩菌に対しては 3% NaCl 加普通寒天, *Mycobacterium* に対しては 10% アルブミン加 KIRCHNER 培地, *Trichophyton* には SABOURAUD 固型培地を、その他の菌株に対しては普通寒天培地を使用した。

試験方法は固型培地は総て平板法により、*Mycobacterium* は希釈法により検討した。

検体の溶解は当初何れもアセトンを用い、培地中のアセトン量は最高濃度において 5% となるよう調整した。

培養温度ならびに時間は、*Mycobacterium* は 37°C 4 週間, *Trichophyton* は 27°C に 1 週間、その他は 37°C に 24 時間培養した。

移植菌は、*Trichophyton* は SABOURAUD 培地に 1 週間培養の菌体を用い、平板法におけるその他の菌は、24 時間普通ブイオンに培養したものを 1 白金耳づつ塗抹した。*Mycobacterium* は 37°C で岡、片倉培地に 3 週間培養した菌体を採取し硝子玉入りの滅菌生理食塩水内でよく振盪懸濁させたものを使用した。

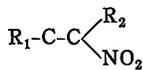
(iii) 耐性菌に対する抗菌作用

耐性赤痢菌 17 株、耐性ブドウ球菌 2 株について Heart infusion agar を用い平板法により No. 2 および No. 8 の 2 検体の抗菌力試験を実施した。

検体の溶解、培養方法等は総て実験 (i) と同一な方法によつた。

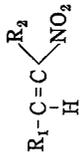
また本実験において上記耐性菌の耐性度の検索も兼ね

表1 使用検体



R ₁		R ₂
	CH ₃ - 	H
Cl- 	CH ₃ O- 	CH ₃
	OH- 	C ₂ H ₅
		C ₃ H ₇
NO ₂ - 		C ₄ H ₉
NO ₂ - 		

表 2 Nitrostyrene 関連化合物の抗菌作用



菌 株	Escherichia coli NIHJ										Staphylococcus aureus 209-P															
	No.	H	No.	CH ₃	No.	C ₂ H ₅	No.	C ₃ H ₇	No.	C ₄ H ₉	No.	-C ₆ H ₅	No.	H	No.	CH ₃	No.	C ₂ H ₅	No.	C ₃ H ₇	No.	C ₄ H ₉	No.	-C ₆ H ₅		
	1	25	2	6.2	3	6.2	4	6.2	5	>100	6	>100	1	50	2	<3.1	3	<3.1	4	>100	5	>100	6	>100	6	>100
	7	25	8	6.2	9	12.5	10	>100	11	>100	12	>100	7	50	8	<3.1	9	<3.1	10	<3.1	11	<3.1	12	<3.1	12	<3.1
	13	12.5	14	12.5	15	>100	16	25	17	>100	18	>100	13	25	14	<3.1	15	<3.1	16	<3.1	17	<3.1	18	<3.1	18	<3.1
	19	12.5	20	12.5	21	12.5	22	>100	23	>100	24	>100	19	25	20	<3.1	21	<3.1	22	<3.1	23	6.2	24	24	24	<3.1
	25	100	26	25	27	100	28	>100	29	>100	30	>100	25	50	26	<3.1	27	<3.1	28	6.2	29	<3.1	30	30	30	50
	31	25	32	6.2	33	12.5	34	50	35	>100	36	>100	31	50	32	6.2	33	6.2	34	<3.1	35	<3.1	36	36	36	>100
	37	25	38	12.5	39	50	40	>100	41	>100	42	>100	37	50	38	3.1	39	6.2	40	6.2	41	12.5	42	42	42	<3.1
	43	50	44	12.5	45	50	46	>100	47	>100	48	>100	43	100	44	6.2	45	6.2	46	6.2	47	<3.1	48	48	48	100
	49	50	50	25	51	50	52	100	53	>100	54	>100	49	50	50	25	51	12.5	52	6.2	53	12.5	54	54	54	25
	55	50	56	25	57	50	58	100	59	>100	60	>100	55	>100	56	12.5	57	6.2	58	6.2	59	3.1	60	60	60	>100
	61	100	62	12.5	63	100	64	>100	65	>100	66	>100	61	100	62	<3.1	63	<3.1	64	<3.1	65	<3.1	66	66	66	<3.1

数字は最少発育阻止濃度 mcg/cc を示す。

て Chloramphenicol (CM), Tetracycline (TC), Streptomycin (SM) を対照として使用した。

(iv) 抗菌作用の機作

普通ブイオン培地中にアセトンに溶解した前記2検体を各々 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 mcg/cc ずつ添加し、これに 24 時間ブイオン培養の *E. coli*, *Sta. aureus* を 0.1 cc ずつ移植し 37°C に培養した。培養後、5 分、10 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間および 8 時間と経時的に薬剤を含有しない培地に 0.1 cc ずつ転培を行ない、37°C に 24 時間培養し、菌発育の有無により静、殺菌作用の検討を行なった。

検体添加培地中のアセトン量は 5% 以下となるようにした。

(v) 血清添加による影響

E. coli, *Sta. aureus*, *Shig. flex* (2a) および多剤耐性 *Shig. flex* (1b) の 4 株に対して培地中に馬血清を添加し効力低下の検討をこころみた。

血清はザイツ濾過による無菌血清を使用し、約 50°C に冷却した普通寒天培地中に 10% および 20% となるよう添加し、よく混合したものを使用した。

試験方法は前実験と同様平板法により、検体の溶解、培養および移植菌等は実験 (i) と同一である。

本実験に使用した多剤耐性 *Shig. flex* は CM に対し 300 mcg/cc, TC に対し 400 mcg/cc, SM に対しては 800 mcg/cc の耐性を有するものである。

(vi) 局所刺戟作用

1 群 3 羽の 2.5 kg 前後の雄性家兎を用い、その眼結膜および角膜に対する刺戟作用をナスタチンを対照として比較検索した。

検液の濃度は、1, 0.5, 0.05, 0.005% とし、ナスタチンは有効成分の 2, 1, 0.5, 0.1% とし、それぞれ 0.1% のトラガント末を加え懸濁液として使用した。

投与方法は家兎の下眼瞼を索引し 0.05 cc を点眼し速かに眼瞼を閉じ正確に 1 分間保持した後、1, 2, 3, 4, 6, 24 時間後の眼瞼の開閉、流涙、粘膜の充血等を観察した。

本実験における刺戟の判定基準は下記の通りとした。

- 一：眼瞼を閉じず流涙等の刺戟作用を認めない場合。
- 十：眼瞼は閉じないが流涙等を認めた場合。
- 十十：粘膜の充血を認めるが水泡形成を認めない場合。
- 十十十：水泡形成を認めた場合。

(vii) 急性毒性

20 g 前後の 1 群 5 匹の ddS 系、雄のマウスを使用し、経口および腹腔内投与により急性毒性を観察した。各検体はトラガント末を 0.1% となるように加えよく混合し懸濁液として使用した。

LD₅₀ は投与 7 日後の致死率から VANDER WÄRDEN の面積法によつて算出した。

III. 実験成績

(i) *E. coli* および *Sta. aureus* による Screening
種々の Nitrostyrene 関連化合物に対し、*E. coli* と *Sta. aureus* を用い Screening を行なった結果が表 2 である。

表に明らかなごとく、何れの菌に対しても R₂ がメチル基であるものが抗菌力の強い傾向が認められた。また *E. coli* においては R₂ のアルキル炭素数が増加する事により抗菌力の低下する事が認められたが、*Sta. aureus* の場合は炭素数の増加による抗菌力低下の傾向は認められなかつた。

これらの化合物の内、抗菌力の比較的強いと思われる No. 2 および No. 8 の 2 検体について以下の実験を行なった。

(ii) No. 2 および No. 8 の抗菌作用

2 検体の普通寒天培地における菌発育阻止作用は表 3 に示した通りである。

Sta. aureus, *E. coli* の他に *Salmonella*, *Proteus*, 病原性好塩菌, *Candida*, *Trichophyton* および *Mycobacterium* にも抗菌作用を示した。

特に *E. coli* に比し *Shig. flex* に強い作用が認められた。*Pseudomonas* に対しては僅かに感受性を示したに過ぎなかつた。

表 3 試験管内抗菌作用

菌 株	化 合 物	No. 2	No. 8
<i>Sarcina lutea</i>		6.25	3.12
<i>Salmonella typhosa</i>		12.5	12.5
<i>Salmonella paratyphi-A</i>		6.25	6.25
<i>Salmonella paratyphi-B</i>		12.5	12.5
<i>Shigella flexneri 2a</i>		0.78	0.78
<i>Proteus rettgeri</i> IFO ₃₈₅₀		6.25	6.25
<i>Proteus mirabilis</i> IFO ₃₈₄₉		25.0	25.0
<i>Proteus morgani</i> IFO ₃₈₄₈		6.25	3.12
<i>Proteus vulgaris</i> YO-1		0.78	0.78
病原性好塩菌 3086		1.56	0.78
" KT-17		1.56	1.56
" KC-4		1.56	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		100.0	50.0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -H ₃₇ R _v		2.5	5.0
<i>Candida albicans</i> YU-1200		0.78	0.78
<i>Trichophyton asteroides</i>		0.39	<0.39
<i>Trichophyton interdigitale</i>		<0.39	<0.39
<i>Trichophyton rubrum</i>		<0.39	<0.39

数字は最少発育阻止濃度 mcg/cc を示す

(iii) 耐性菌に対する抗菌作用

2 検体について *Shig. flex.*, *Shig. son.* および *Sta. aureus* の耐性菌に対する抗菌作用の検討を行なった結果が表 4 である。その結果は一部のものを除き *Shig. flex.* に対しては比較的高い効果が認められるが、*Shig. son.* に対する感受性は弱いようである。また前実験の *Shig. flex.* の感受性菌と比較した場合耐性菌に対しては約数倍抗菌力が低下すると思われる。

Sta. aureus の耐性菌に対しては *Shig. flex.*, *Shig. son.* の場合と同様感受性菌に比し効力低下が認められるが、比較的良好な成績を得た。

使用した耐性菌は *Shigella* の場合は何れも CM, TC, SM に対し高度耐性である事が認められた。

(iv) 抗菌作用の機作

Nitrostyrene 化合物が諸種の細菌に対して静菌的に作用するか、あるいは殺菌的に作用するかの点について、No. 2, No. 8 の 2 検体を用い検討を行なった。

すなわち検体添加培地に *E. coli*, *Sta. aureus* を 24 時間培養した所、*E. coli* は 3.12 mcg/cc 添加のもののみ菌の発育を認め、*Sta. aureus* は何れの培地にも菌の発育は認められなかつた。これらの培養液を菌発育の有無に関係なく薬剤無添加培地に転培を行なった結果、本実験における濃度においては総て菌の発育が認められた。

以上の結果より 100 mcg/cc 以下の濃度において、8 時間以内の作用時間では No. 2, No. 8 とともに静菌的に作用する事を認めた。

(v) 血清添加による影響

馬血清を培地に添加した際の感受性低下の成績は表 5 に示す通りである。No. 2 の場合 *E. coli* に対しては 10%, 20% 添加はともに 1/2, *Sta. aureus* に対しては何れも 1/8, *Shig. flex.* 感受性菌は 10% 添加で 1/8, 20% 添加で 1/16, 耐性菌は何れも 1/8 に効力の低下する事が認められた。

No. 8 においては *E. coli* に対して 10% 添加が 1/8, 20% 添加で 1/16, *Sta. aureus* においても 10% 添加

表 4 耐性菌に対する抗菌作用

菌 株	No. 2	No. 8	Chloramphenicol	Tetracycline	Streptomycin
<i>Shigella flexneri</i> 1 b	3.1	3.1	400	500	1,000
" " "	6.2	3.1	500	500	>1,000
" " 2 a	3.1	1.5	300	300	500
" " "	6.2	3.1	400	500	>1,000
" " "	3.1	3.1	3.1	100	300
" " "	3.1	1.5	1.5	6.2	>1,000
" " 2 b	6.2	6.2	300	500	1,000
" " "	6.2	6.2	500	500	>1,000
" " 3 a	12.5	12.5	1,000	1,000	>1,000
" " variant-X	3.1	3.1	3.1	3.1	1,000
" " variant-Y	12.5	25	>1,000	>1,000	500
" " SI-467	50	25	>1,000	500	>1,000
" " SI-488	50	50	>1,000	1,000	>1,000
" " 4 型-478	12.5	12.5	>1,000	>1,000	>1,000
" " 4 型-491	12.5	6.2	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Shigella sonnei</i> 10	25	25	>1,000	1,000	700
" " 78	25	25	>1,000	1,000	500
<i>Staphylococcus aureus</i> 3242	3.1	1.5	50	12.5	>100
" " 3238	3.1	3.1	30	6.2	100

数字は最少発育阻止濃度 mcg/cc を示す。

表 5 馬血清添加による影響

化合物 血清添加量 菌 株	No. 2			No. 8		
	0%	10%	20%	0%	10%	20%
<i>Escherichia coli</i>	6.2	12.5	12.5	6.2	50	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1	25	25	0.7	6.2	12.5
<i>Shigella flexneri</i> 2 a	0.7	6.2	12.5	0.7	12.5	25
" " 1 b	3.1	25	25	3.1	50	100

数字は最少発育阻止濃度 mcg/cc を示す。

1/8, 20% 添加 1/16 に低下し、*Shig. flex.* 感受性菌も耐性菌も共に 10% 添加で 1/16, 20% 添加で 1/32 の効力低下が認められた。

(vi) 局所刺戟作用

家兔の眼結膜および角膜に対する局所刺戟作用は表 6 に示す通りである。

その結果刺戟作用の強さは、No. 8 > No. 2 > ナイスタチンの順であり No. 2 の 0.05% はナイスタチンの 1% に、No. 8 の 0.05% はナイスタチンの 2% にほぼ相当することが認められた。

また点眼の際ナイスタチンは何れの濃度においても動物は沈静であるが、2 検体は何れも 1% および 0.5% 点眼の際約 5 分間程度動物が苦悶する点が認められた。

(vii) 急性毒性

マウスに対する急性毒性試験を経口および腹腔内注射

表 6 局所刺戟作用

試験物質	濃度 (%)	判 定					
		1	2	3	4	6	24
対 照		—	—	—	—	—	—
ナイスタチン	2	++	+++	+++	++	++	++
	1	++	++	+++	++	++	+
	0.5	+	+	+	—	—	—
	0.1	—	+	—	—	—	—
β -methyl- β -nitrostyrene	1.0	+++	++	++	+++	+++	++
	0.5	++	++	+++	++	++	++
	0.05	++	+++	++	++	++	++
	0.005	—	—	—	—	—	—
β -methyl- β -nitro- <i>p</i> -chlorostyrene	1.0	+++	+++	+++	+++	+++	++
	0.5	++	++	++	++	+++	+++
	0.05	+++	+++	++	++	++	++
	0.005	—	+	—	—	—	—

により測定した結果は次の通りである。

No. 2: 経口投与 LD_{50} 1,176 \pm 117 mg/kg

腹腔内注射 LD_{50} 154 \pm 11 mg/kg

No. 8: 経口投与 LD_{50} 408.5 \pm 26.5 mg/kg

腹腔内注射 LD_{50} 150.5 \pm 2.5 mg/kg

No. 2 は経口において毒性は弱く、腹腔内注射においては両者において有意の差は認められなかつた。

IV. 考按および総括

β -Nitrostyrene 化合物が殺菌、殺虫作用を有する事は多くの研究者¹⁻³⁾により報告されている。これら関連化合物の抗菌性について一部 高峰研究所年報⁴⁾に報告したが、更に詳細な検討を行なつた。*St. aureus*, *E. coli* を用い Screening を行なつた所、 R_1 の位置のベンゼン核に、クロール基、ートロ基、メチール基、メトキシール基あるいはメチレンジオキシ基等導入した何れのものにおいても、 R_2 をメチール基としたものが何れの菌に対しても有効に作用する事が認められた。また *E. coli* においては R_2 のアルキル炭素数の増加により抗菌力の低下が認められたが、*St. aureus* においては炭素数の影響が認められなかつた事は興味ある点と思われる。

次に Screening において比較的抗菌力の強かつた No. 2 および No. 8 の 2 検体について検討を試みた。

この 2 検体は *E. coli*, *St. aureus* 以外の菌にも有効に作用する事が認められ、*Shig. flex.*, 病原性好塩菌、*Candida* および *Trichophyton* に対しては特に強い抗菌作用を示した。

以上の結果よりこれらの化合物が耐性赤痢菌および耐性ブドウ球菌に対しても有効ではないかと思ひ、16

種の高度耐性の *Shig. flex.*, *Shig. son.* および 2 種の耐性 *St. aureus* に対し *in vitro* の感受性の検討を行なつた所、一部の菌株を除き殆んど 10 mcg/cc 以下で菌の発育を抑制した。この際 *Shig. son.* に対しては若干感受性が低いようであり、また耐性度の高い菌に対しては検体の感受性もまた弱いような傾向が認められた。

抗菌力の作用機作の検討においては、本実験における培地中含有薬剤最高濃度 100 mcg/cc においても殺菌作用はなく、静菌的に作用する事が認められた。

2 検体の血清添加による効力低下の検討を行なつた所、相当力価の低下する事が認められ、No. 2 が No. 8 に比し若干低下率は少いようであつた。また阻止濃度の低いもの程血清による効力低下は大である傾向を認めた。このような点よりして実験 (ii) において *Trichophyton* に対して強い抗菌作用が認められた事は SABOURAUD 培地を使用したため、培地組成の関係より良好な成績が出たものとも考えられる。局所刺戟作用は比較的強いように思われる。対照として用いたナイスタチンに比し No. 2 は 20 倍、No. 8 は 40 倍の刺戟作用が認められた。

毒性⁵⁾は No. 2 の LD_{50} が経口では 1,176 mg/kg、腹腔では 154 mg/kg であり、一方 No. 8 は経口で 408.5 mg/kg、腹腔で 150.5 mg/kg であつた。この結果は経口投与では No. 8 の方が毒性の強い事を示しているが、これは No. 2 が消化管からの吸収が悪いため経口毒性が弱く出たのではないかと考えられる。

以上、 β -methyl- β -nitrostyrene (No. 2) および β -methyl- β -nitro-*p*-chlorostyrene (No. 8) の 2 検体ならびにこれらの誘導体は *in vitro* においては何れも強い抗菌作用を示し、耐性菌に対しても良好な成績が得られているので、血清添加による効力低下、あるいは刺戟性が若干強い点などが問題として残されてはいるが、一応化学療法剤として有効な化合物ではないかと考えられる。

終りに耐性赤痢菌を御分与下された駒込病院 小張一峰院長、試料の提供を受けた惟村光宣博士ならびに合成研究室の方々、御指導御校閲を賜つた薬理研究室長 水上明彦博士、御協力を頂いた五十嵐勇、北村公一の諸氏に深謝する。

文 献

- 1) SCHALES, D. & GRAEFE, H. A.: J. Am. Chem. Soc. 74, 4486, 1952.
- 2) BOCOBO, F. C., CURTIS, A. C., BLOK, W. D., HARRELL, E. R., EVANS, E. E. & HAINES, R. F.: Antib. & Chem. 6, 6, 385, 1956.
- 3) BROWN, W. A., ROBINSON, D. B., HONTEG, H. & WENNER, B. J.: Canadian J. Research 26, 188, 1948.
- 4) 惟村光宣, 服部善八郎・高峰研 13: 222, 1961.
- 5) 惟村光宣: 高峰研 13: 228, 1961.