

第 11 回 日本化学療法学会 東日本支部 総会

昭和 39 年 11 月 28 日, 29 日 東京都日本都市センター

会長: 上 田 泰

(1) ピリミジン同族体によるポリオ・
ウィルスの増殖抑制 (第 2 報)

山地幸雄・宮永嘉隆・留目優子

日本医大細菌

赤松 洋・関谷 駿一

日本医大村上小児科

私達はさきに、14 種のニトロフラン核を有するピリミジン誘導体、およびその他の 9 種のピリミジン同族体の HeLa 細胞におけるポリオ・ウィルス抑制作用を多段階増殖の系で検討し、2-ethylmercapto-4{-4(5-nitro-furyl) butadienyl}-pyrimidine (SP 62011), 2-methylmercapto-4-methyl-5-carboxyethyl-pyrimidine (S-7), 2-ethylmercapto-4-methyl-5-carboxyethyl-pyrimidine (S-9) にウィルス増殖および、CPE 抑制作用があることを発見した。そこでさらに、2-methylmercapto-4(-3-methyl-4-parachlorbenzylbutadienyl)-pyrimidine (S-10), 2-methylmercapto-4{-2(2-hydroxy-5-brombenzyl) ethenyl}-pyrimidine (S-11), 2-methylmercapto-4{-2(2-hydroxy-3,5-dichlorbenzyl) ethenyl}-pyrimidine (S-12), 2-methylmercapto-4(-4-benzylbutadienyl)-pyrimidine (S-13), 2-methylmercapto-4(-2-parachlorbenzylethenyl)-pyrimidine (S-14), 2-methylmercapto-4(-2-parachlorbenzyl-ethenyl)-pyrimidine (S-15), 2-methylmercapto-4{-2(2-hydroxy-3,5-dibrombenzyl) ethenyl}-pyrimidine (S-16), 2-methylmercapto-4(-2-parabrombenzylethenyl)-pyrimidine (S-17), 2-methylmercapto-4{-2(2-hydroxy-5-chlorbenzyl) ethenyl}-pyrimidine (S-18), 2-methylmercapto-4-methyl-pyrimidine (PS-1), 2-ethylmercapto-4-methyl-pyrimidine (PS-2), 2-n-propylmercapto-6-methyl-pyrimidine (PS-3), 2-n-butylmercapto-4-methyl-pyrimidine (PS-4), 2-n-pentylmercapto-4-methyl-pyrimidine (PS-5), 2-n-octylmercapto-4-methyl-pyrimidine (PS-6), 2-arylmercapto-4-methyl-pyrimidine (PS-7), 2-tetrahydrofuran-methyl-4-methyl-pyrimidine (PS-8), 2-n-hexadecyl-4-methyl-

pyrimidine (PS-9) の 18 種の化合物について検討したところ、S-10 に抗ウィルス作用が認められた。

以上の実験から次の結論がなされる。(1) ニトロフラン核を有するものでは、SP-62011 のみが有効で、butadienyl 鎖に Cl あるいは CH₃ を有する SP-62017, SP-62018 は、2 の位置に ethylmercapto 基を有するけれども、選択的抗ウィルス作用はなく、2 の位置に methylmercapto 基を有する SP-6106, SP-6401 にも、選択的ウィルス抑制作用はない。(2) その他の化合物では、S-7, S-9, S-10 の 3 種が有効で、被験化合物についての抗ポリオ ウィルス作用の必要条件は、2 の位置に -SCH₃ または、-SC₂H₅ を有すること、(i) 4-methyl-化合物では 5 の位置に carboxyethyl のあること、(ii) 4 の位置に 3-methyl-4-parachlor-benzylbutadienyl 鎖があることである。また、2-ethylmercapto 化合物には 4°C で経年変化がみられた。

以上の有効化合物のうち、安定でしかも水に溶け易い S-7 について、一段階増殖実験でのウィルス抑制作用を検討した。この化合物がウィルス吸着を阻止しないことは、ブラック計数法によりすでに確認されているが、メジウムに 3% コウシ血清加 YLE を用いると、3 日前から薬剤を加えておいても、8~10 時間 h のウィルス収量の低下は約 1 log 程度であつた。そこで、血清を含まない EAGLE 培地を用いて検討したところ、2 log 以上のウィルス増殖低下がみられた。すなわち、この化合物は、血清その他の YLE 成分により拮抗されると考えられる。

SP-62011, S-7 および S-10 の存在において、ポリオ II 型ウィルスを継代したところ、それぞれの化合物に感受性の低下した変異株が得られ、それらの変異株には、S-9 をも含めて、交叉耐性がみられた。従つて、これら化合物の作用機転の、少なくとも大部分は、共通のものと考えられる。

S-7 および S-9 は、ウィルス抑制に要する以上の濃度で、非感染 HeLa 細胞の増殖および、単層形成を阻害せず、また PARDEE の法で検討したところ、S-7 は非感染 HeLa 細胞の酸素消費を抑制しなかつた。

(2) Helvolic acid 誘導体に関する基礎的研究 I

Helvolic acid 誘導体の合成と抗菌力

中山 勇 弥・松田 明

国 島 葵・田原 耕作

日本化薬

奥田重信・岩崎成夫・津田恭介

東大応微研

Helvolic acid は 1943 年, E. CHAIN 等により *Aspergillus fumigatus* の培養液から抽出された抗生物質で, グラム陽性菌に抗菌力を有する。既に奥田, 岩崎, 津田, 秦, 佐野, 中山, 山口等は, この物質が *Cephalosporium* から多量に産生されることを発見し, 従来 ALLINGER 等によつて提出されていた構造式を修正して修正式を提出している^{*1-3)}。

演者等はその *Staphylococcus* 活性に注目し, 還元, 酸化, 加水分解, ハロゲン化等の諸反応で, 種々の誘導体を合成単離し, その抗菌力を測定して化学構造と微生物活性との相関々係について検討し, 新化学療法剤発見のための基礎的データを得ようとした。

以下, 抗菌力比は Bouillon agar 中で寒天平板割線法で Sta. 209 P, Sta. 76 の両者について, 原の Helvolic acid と比較したときの平均値である。

誘導体の *Staphylococcus* に対する抗菌力と構造との関係

(1) 1位の2重結合を還元すると抗菌力は1/6となり, 1位の2重結合と末端の2重結合を還元すると抗菌力は1/2となる。

(2) 3位のC=Oをオキシム=N·OHとすると抗菌力はなくなる。C=Oを還元して-CH·OHとすると抗菌力は1/6となる。

(3) 7位のアセチルを加水分解して-CH·OHとすると抗菌力は2~4倍となる。このアセチルを加水分解してから種々のアシル化合物をつくつた。即ち CHOCO_Xのうち X=C₂H₅がこの系列の化合物では抗菌力最大で約2倍である。其他のアシル体では一般に抗菌力が低下したが, X=OCH₂C₆H₅が約2倍の抗菌力を示した。

(4) -COOH基をエステル化すると抗菌力はなくなる。

(5) 7-deacetyloctahydrohelvolic acid と 7-deacetylhexahydrohelvolic acid との抗菌力比から, 17位の

2重結合を還元すると抗菌力が1/4以下に低下したことがわかつた。

(3) Helvolic acid 誘導体の基礎的研究 II

Sodium Helvolinate の生物学的検討

松田 明・堀端謙吉・宮本浩吉

坪崎正寿・中山勇弥・田原耕作

日本化薬

第1報において選択した Sodium Helvolinate について Helvolic acid と共にその試験管内抗菌力, 抗菌力と pH, 血清の関係, 他剤との協力作用, 血清蛋白質結合率, 毒性, 実験動物における吸収排泄及びブドウ球菌を用いるマウス実験的感染症の化学療法を行なつた。

Sodium Helvolinate と同様にグラム陽性菌, 中でもブドウ球菌に 0.4~0.8 mcg/ml の抗菌力を示し, グラム陰性菌, 真菌には無効である。PC 等の抗生物質と交叉耐性はないが Fucidin との間に交叉耐性あり。

平衡透析法による血清蛋白質結合率は 80~83%, 毒性は少なく, 経口投与等で比較的高い血中濃度を認めた。

以上の事実から種々の接種法(腹腔, マウス下肢筋内, 等)によるマウスブドウ球菌感染を 20~100 mg/kg の1回又は分割経口投与によつて治療を行ない, 効果を認めた。

(4) 抗真菌性抗生物質 "Capiamycin" の研究

加藤由美子・加治晴夫

黒田 収子・新井 正

千葉大学腐敗研究所

私達の研究室で *Streptomyces hygrosopicus* var. *chrysallogenens* と名付けられた放線菌 No. 1898 株の菌体より抗真菌性抗生物質が得られ, Copiamycin と命名してその一部は去る 10 月に第 8 回日本医真菌学会に報告したが, ここでは更にその後得られた物理化学的性状, 及び生物学的作用について報告する。

Capiamycin の抽出は, 放線菌 No. 1898 株を大豆粉培地中 27°C, 90 時間振盪培養して得た菌体を分離, メタノールで抽出する。黄褐色一赤褐色の抽出液を濃縮し析出する淡黄色沈澱を濾取し, アセトンで洗うと黄色物質が除かれ, 白色の沈澱を得る。これを少量のクロロホルム・メタノール混液(3:1)に溶解し, シリカゲルのカラムクロマトを行ない, 有効部を集め, メタノールよ

*1) Chem. Pharm. Bull. 12(1), 121 (1964)

2) 第 19 回日本薬学大会講演 6 F-36

3) 第 8 回天然有機化合物討論会講演 35

り再結晶をくり返し行ない Copiamycin の標品を得た。

Copiamycin の物理化学的性状は、結晶は無色板状を呈し 144°C で分解する。元素分析の結果は炭素：58.30, 水素：8.90, 窒素：3.94 で、硫黄、ハロゲン含有しない。

旋光度は右旋性を示し、メタノール中 14.4° である。紫外部吸収はメタノール中 220 m μ 以上では特異な吸収の極大を示さない。I. R. は表示の波数に吸収を有する。

溶媒に対する溶解性は、低級アルコール、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、水酢酸には溶解するが他の有機溶媒及び水には不溶もしくは難溶である。

呈色反応は、Dragendorff 反応、Fehling 反応、ヨード白金酸反応に陽性、biuret 反応、Molisch 反応、2,4-dinitrophenyl hydrazine 反応、Liebermann-Burchard 反応、Nynhydrin 反応に陰性である。

又、濃硫酸に pink~brown を呈し、臭素、過マンガン酸カリウムを褪色させる。

Copiamycin は 5% C. M. C. に懸濁し、腹腔内、筋肉内注射及び経口投与でいずれも 1,000 mg/kg で何らの毒性も示さない。この様に非常に毒性が少なく、興味ある抗生物質として、その生物活性の検査を行なった。

Staphylococcus aureus 209 P, *Escherichia coli* F₁, *Mycobacterium* 607 等グラム陽性菌、陰性菌、抗酸性菌には 200 mcg/ml で無効であるが、一般カビ類については *Willia anomala* の 25 mcg/ml を除いては 2.5~10.0 mcg/ml でその発育を阻止する。

Copiamycin は中性物質と考えるが、被検菌を *Candida tropicalis* とし、培地に SABOURAUD broth を用いた場合、培地の pH を 6.0, 7.0, 8.0 と変えても力価に変化は見られなかつた。

同じ被検菌を用い、inoculum size による力価の変動を比濁法と稀釈法で調べた。

比濁法による dose response curve の作製は inoculum broth に被検菌を 37°C, 1 夜振盪培養し、その培養菌液を別の inoculum broth に 25% の割に加え、更に 3 時間振盪培養した後、0°C に 30 分静置し、これを assay broth に 2.5% に加えた。

この菌数計算を行ない、所定の菌数を含む様に稀釈した assay broth に Copiamycin のジメチルスルホキシド・メタノール・水混液 (3:4:3) による稀釈液を 1% 濃度に加えた。37°C で振盪培養し、3 時間後に 610 m μ に於ける吸光度を測定して dose response curve を描いた。横軸に吸光度を縦軸に Copiamycin 濃度を対数グラフで示す。菌数が 2×10^6 cells/ml, その 2 倍, 3 倍, 4 倍と変つても夫々の curve の mid point を示す Co-

piamycin 濃度はいずれも約 2.5 mcg/ml と同じ値が得られた。この様に Copiamycin は菌数によりその抗菌性を変えないことは SABOURAUD broth, Heat infusion broth を使つての稀釈法についても確かめられた。

その生物活性については目下追求中である。

(5) 胆汁酸代謝におよぼす非吸収性抗生物質の影響

吉利 和・清水喜八郎・原田敏雄
島山正己・陣立恒夫・島田 馨
奥村 有史
東京大学吉利内科

われわれは先に第 12 回本学会総会において、広域性抗生物質の投与と血清コレステロール値の関連について報告し、腸内細菌叢の変動が胆汁酸代謝に何等かの影響を与え、これが血清コレステロールの低下をもたらすものであらうと示唆した。今回は Fradiomycin 投与時の胆汁酸代謝過程について実験を行ない、若干の知見を得たので報告する。

健康成人 4 人に Fradiomycin sulfate 3.0 g を連日 2 週間投与し、投与前・後および投与中の糞便について、その 1 日の全量を 3~4 日毎に採取し、以下に示す方法で胆汁酸を分離し、定性および定量を行なった。また同時に血清コレステロールを測定した。なおこの間、食餌については各人の自由に任せ特に規制はしていない。また、定量において胆汁酸と呼称するものは遊離の cholic acid および dihydroxycholic acid を指すものと御了承願いたい。

先ず予備実験として *in vitro* で示すように Heart Infusion Broth および Thioglycolate Broth に、糞便を懸濁し、Sodium glycocholate, Sodium Taurocholate の 2 種の結合型胆汁酸を添加し、24 時間~48 時間培養し、薄層クロマトグラフィーで展開、隣モリブデンで発色すると、すべて遊離型となり、cholic acid および Dihydroxycholic acid に相当する Spots がみられた。同様に Cholic acid を添加した場合も 24 時間で既に Dihydroxycholic acid への転換がみられたが、更につづけて観察した場合も、また Desoxycholic acid を添加した場合にも他の物質への転換はみられなかつた。

次に Fradiomycin 投与前・後および投与中の糞便について同様にそれぞれ Solvent (1) および Solvent (2) で展開したものを示す。Solvent (1) は胆汁酸の結合型・遊離型を同時に展開することが出来、Solvent (2) は遊離型胆汁酸の展開に適したものである。いずれの場合にも結合型は認められない。定性可能な Cholic acid と

Dihydroxycholic acid および Dihydroxycholic acid と Lithocholic acid との間にそれぞれ定性出来ない 1~2 の Spot を認めるが、全体として Fradiomycin 投与前後と投与中の Pattern には本質的な差違は認められない。

次に乾燥糞便 10g 当りの胆汁酸を MOSBACH 等の方法により吸光度を示すように Cholic acid は 320 m μ で、Chenodesoxycholic acid および Desoxycholic acid は 385 m μ で測定した。Dihydroxycholic acid の換算には Desoxycholic acid の検量線を使用し、胆汁酸量を定量した。なお Lithocholic acid は本法によつては測定出来ない。

白線は総胆汁酸の排泄量を、斜線は Cholic acid を、斑点は Dihydroxycholic acid の量を示す。Fradiomycin 投与中は 10g あたりの胆汁酸量は 1.5~2.0 倍に増加し、Fradiomycin 投与中は糞便量が増加するので、1日の総排泄量をみれば、2~2.5 倍以上の増加となるのである。また上方の点線は、この間における血清コレステロール値の低下傾向を示したものである。

以上の変化を一括して Schema にまとめて示す。すなわち Fradiomycin の投与により腸内細菌数は急速に減少し、胆汁酸の排泄量の増加がみられ、血清コレステロール値はゆるやかに低下する。そしてこれ等の変化は Fradiomycin の投与を中止すると共に投与前の状態に戻るのである。

[考 按]

胆汁中の胆汁酸組成は 1 つには肝において生成される胆汁酸の Pattern により、他は腸内細菌により転換され、Enterohepatic circulation による胆汁酸の種類により規定され、或程度種特異性がみられる。人では glycocholate が最も主要なものとされており、胆汁と共に腸内に排出される Glycocholate, Taurocholate, Glycochenodesoxycholate, Taurochenodesoxycholate, Glycodesoxycholate 等の結合型胆汁酸が Desoxycholic acid, Lithocholic acid への転換に際して、腸内細菌の作用点では、CHAREY 等によると 7- α の Dehydroxylation であり、従つて糞便中に排泄される胆汁酸は主に遊離の Desoxycholic acid および Lithocholic acid であると云う。われわれも *in vitro* の aerobic condition で極めて容易に結合型胆汁酸が遊離型となり、かつ、恐らくは Desoxycholic acid と推定される Dihydroxycholic acid 迄は転換されることを確認したが、それ以上の変化は認められなかつた。Neomycin 投与時の血清コレステロール値の低下と糞便中胆汁酸の排泄増加については、GOLDSMITH, LEVEILLE, HAMILTON, POWELL 等により比較的最近報告されている。HAMILTON は Neo-

mycin を投与すると Cholic acid から Desoxycholic acid への転換が阻止され、Cholic acid および 7- α Ketodeoxycholic acid が増加すると述べ、それにも拘らず結合型胆汁酸は認められず、総て遊離型のみである点から、Neomycin 投与により結合型を加水分解する腸内細菌は影響されないであろうと述べている。POWELL は Neomycin 投与中は Dihydroxycholic acid の排泄は変わらないが、Cholic acid の著しい排泄増加がみられ、Dihydroxy/cholic acid の比率が低下すると述べている。LEWIS は不飽和脂肪酸の投与によつて同様の変化が起ることを観察している。われわれの実験では胆汁酸総量の排泄は 2~2.5 倍に増加したが、D/C の比率の変化は著明でなく、2 例において低下の傾向を認めたにすぎない。

以上 Fradiomycin の投与により、一次的に腸内細菌叢の変動を来し、一方、胆汁酸の糞便中への排泄増加がみられ、その結果コレステロールの Cataholic pathway が促進されることが、Body pool としての血清コレステロール値の比較的緩徐な低下を来す 1 因と推定される。しかし、コレステロール・胆汁酸の代謝に関しては腸内細菌の関与以外に肝での生成、排出、feedback mechanism による regulation、食餌等々の複雑な因子が関与することが考えられ、更に検討を要する問題が多いと考へる。

(6) 実験コレラ症に対する抗生物質、主として Chloramphenicol の影響

服部善八郎・三沢 洋
三共株式会社研究所
小張 一峰
駒込病院

家兎小腸結紮法 (De の法) を用い *Vibrio cholerae* の接種を行ない、病変発現におよぼす Chloramphenicol (CM) の影響を検討した。

23 株の *V. cholerae* の *in vitro* における CM, Streptomycin, Erythromycin, Aminobenzyl-Penicillin および Punfran-S に対する感受性の検討を行なつた結果、Punfran-S に対する感受性が最も強く、4 種の抗生物質の中では CM が最も抗菌力が大である事を認めた。

De の法により種々の実験を行なうに先立ち移植菌量の検討を行なつたところ、18 時間 Bouillon 培養液の 100 倍希釈液 0.5 ml 以上の菌量が必要であることが認められた。

V. cholerae 接種家兎結紮小腸の CM 投与による病変発現抑制効果の検討を行なった結果、菌接種直後より 4 時間毎に、50, 100 および 150 mg/kg/day 静脈内投与を行なったものは、何れも病変発現抑制効果が認められた。

菌接種後 2, 4 および 6 時間後に投与した例では 200 mg/kg/day 投与においても病変発現抑制効果はなかった。

投与 CM の反応 Loop 内への移行を検討する為病変発現 Loop 内の滲出液中の活性 CM の定量を行なった結果、菌接種後、病変発現前に CM を投与しても、また病変発現後 CM を投与しても何れも滲出液中に活性 CM の存在が認められた。CM 量は同一家兎の血中濃度の大概 1/10 以下であった。

Bouillon のみを接種した対照 Loop は滲出液がない為腸管を水浸加熱し定量を行なったが CM の存在は認められなかった。

次にコレラ感染の際の脱水症状が腸管内の Na^+ , K^+ 量の消長と関連があるのではないかと考え滲出液中の Na^+ , K^+ 量を腸炎 *Vibrio* 感染家兎を対照として EKO-Langeflame photometer で定量した結果、 Na^+ も K^+ 量も対照の腸炎 *Vibrio* との間に殆んど差が認められず、同一家兎の血清内濃度と比較した際 Na^+ 量のみが 10% 前後増加する傾向が認められた。家兎結紮小腸内においては Na^+ , K^+ の著しい変化を認めることが出来なかった。

治療実験において菌接種直後に CM 投与した場合は病変の発現を抑制するが 2 時間以上経過後においては抑制効果のないことは *V. cholerae* の病変発現が早いためではないかと考える。また活性 CM が Control Loop 内に認められないことは興味ある点と思われる。

以上種々の点より見て、De の法が腸管感染症に対する化学療法剤の予防ならびに治療実験に応用し得るのではないかとと思われる。

(7) ぶどう球菌に対する TC ならびに CP の抗菌力と実験的治療効果について

三方一沢・五味二郎・吉沢繁雄
青柳昭雄・熊谷 敬・小穴正治
慶大三方内科

化学療法剤の治療効果は、試験管内抗菌力ならびに実験動物による感染治療実験によつて推定されるのであるが、これらの実験成績は種々な条件によつて影響される。ことに 2 つの化学療法剤の治療効果を比較しようと

する場合には実験条件について充分なる考慮が必要である。

私どもは、この点を考慮して TC と CP の試験管内抗菌力、感染治療実験成績を比較検討したので、ここに報告する。

感染治療実験 その 1

感染菌株 数株のぶ菌のうち、TC および CP に対する試験管内感受性のほぼ等しい菌株として No. 635 株を使用した。No. 635 株の TC および CP の最小発育阻止濃度はともに 5.0 mcg/ml であるが、寒天拡散法では CP は TC よりすぐれた抗菌力を示した。

実験動物 dd 系のマウス雄 15~17 g のものを用い、TC 治療群、CP 治療群、対照群各 5 匹づつを用いた。

接種菌量及び感染 No. 635 株を 24 時間普通ブイオンに培養し、これを生理的食塩水にて 10 倍に稀釈せるのちに、更に 5% ムチン液にて 10 倍に稀釈し、その 0.5 cc をマウスの腹腔内に接種した。

治療法 感染 1 時間後より治療を開始し、TC および CP はマウス 1 匹あたり 1 日 1 mg とし、これを 0.5 mg づつ 1 日 2 回筋注し治療は 2 日間おこなつた。

成績 CP は 24 時間以内に 60% の死亡率を示したが、TC では死亡したマウスは認められなかった。

感染治療実験 その 2

感染菌株 ぶ菌 No. 760 株は、稀釈法による最小発育阻止濃度は TC は 2.5 mcg/ml であり、CP は 5.0 mcg/ml である。寒天拡散法では No. 635 株と同様に CP は TC よりすぐれた抗菌力を示した。

接種菌量及び感染 接種方法は実験 1 と同様であるがマウスは 1 群 10 匹を使用した。

治療法 TC はマウス 1 匹あたり 1 日 1 mg, CP は 1 日 1 mg, 2 mg ならびに 5 mg の 3 治療法をおこない、いずれも 1 日 2 回に分割して筋注した。治療は感染 30 分後より開始した。

成績 CP は 5 mg 群、2 mg 群ともに 10% の死亡率を認めたが、TC では死亡したマウスはなかった。

以上の動物実験より、TC は CP よりすぐれた治療成績を示すといひ得るが、その治療効果の差は、試験管内抗菌力の成績では説明しがたい。

ぶ菌 10 株 (Coagulase (+), 感受性デスクにより TC-CM に感受性を示した) に対する TC ならびに CP の普通ぶいよんを用いた稀釈法による試験管内抗菌力は、TC では 1 株が 1 mcg/ml, 9 株では 2.5 mcg/ml, CP では 1 株が 7.5 mcg/ml, 9 株が 5.0 mcg/ml で TC は CP の約 2 倍の抗菌力を示した。

普通ぶいよんでなく、ペプトンを含まぬぶいよんを用いた際の TC の最小発育阻止濃度はすべて 1.0 mcg/ml