

Bis(2-pyridyl-N-oxide)-disulfide の抗菌性

河部 靖・金沢 保・滝本 義一

池田 友久・佐藤 勝

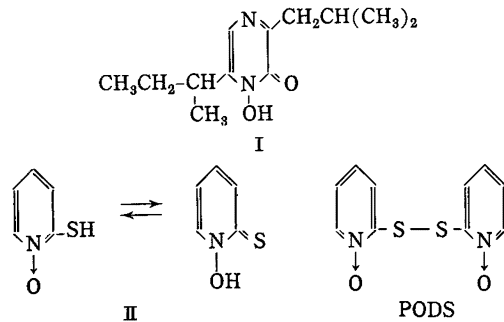
エーザイ株式会社研究所

加納 晴三郎

国立衛生試験所大阪支所細菌薬理部

(昭和 42 年 1 月 19 日受付)

SHAW ら¹⁾は aspergilllic acid (I) の化学構造中には cyclic hydroxamic acid が含まれており、これが I の抗菌性を示す原因ではないかと推定した。そこで彼等は、この抗菌性母核を中心としていくつかの誘導体を合成したが、その中でも抗菌力がとくにすぐれたものとして N-hydroxy-2-pyridinethione (II) を見つけた。しかし II は刺戟が強い上に化学構造上も不安定で、たとえば他剤と配合すれば変色が起こったり、水溶液にすれば pH 5.0~6.0 で金属と容易にキレート化合物をつくり不溶性の沈澱を生ずるなど欠点も多い。そこで著者らは II の抗菌力を保持し、かつ II より安定性のよいものを検索していたところ、bis(2-pyridyl-N-oxide)-disulfide (PODS) が比較的その目的に適合していることがわかった。



ただしこの PODS も水溶液中では pH 8.0 まではかなり安定であるが、pH 9.0 では約 50% が分解して II を生ずる。しかし刺戟と安定性という点では II よりすぐれていると思われるため PODS の抗菌性につき精査を行なった。

I. *In vitro* 抗菌性

試料を無菌水に溶解し常法通り 2 倍希釈系列をつくり、これらより 1 ml をとり寒天培地 9 ml と混和して試験平板を作成した。細菌試験には Brain Heart Infusion 寒天培地(Difco)、真菌試験には SABOURAUD 寒天培地を使用し、菌液は細菌の場合は $4\sim 8 \times 10^4$ cells/ml saline、真菌では酵母系のは 1 白金耳量/10 ml saline、糸状菌は 1 slant 量/10 ml saline、の菌希釈液をそれぞ

れ前記試験平板に 1 白金耳量画線塗抹した。細菌ならびに *Candida* 菌は 37°C にそれぞれ 24 時間および 48 時間、その他の真菌は 27°C に 7 日間培養後最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。

なお抗結核試験は試料の各希釈液 0.5 ml を 10% アルブミン加 DUBOS 培地 4.4 ml と混じ、これらに 1% 小川培地上 10 日間培養した *Mycobacterium tuberculosis* BCG 株の菌希釈液 (菌量 2 mg/ml) 0.1 ml を添加、37°C に 14 日間培養後 MIC を判定した。

またトリコモナス原虫に対する抗菌試験には試料希釈液 0.3 ml を浅見培地 (penicillin-G 200 u/ml, streptomycin 200 mcg 力価/ml 含有) 2.0 ml, 馬血清 0.6 ml の混液中に添加し、これらに 48 時間前培養した *Trichomonas vaginalis* 液 0.1 ml を加え、72 時間培養後肉眼判定と併行して検鏡確認により MIC を求めた。

第 1 表 PODS の抗菌力
MIC (mcg/ml)

菌 株	PODS	Chlorhexidine hydrochloride
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	0.8	0.8
" <i>albus</i> 80	0.8	0.4
<i>Streptococcus hemolyticus</i> Y-73-5	0.8	0.4
<i>Micrococcus flavus</i> PCI 1216	0.8	0.8
<i>Sarcina lutea</i> PCI 1001	0.8	0.4
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	1.56	0.4
<i>Escherichia coli</i> O-1	6.25	1.56
" K-12	6.25	0.4
<i>Shigella flexneri</i> 2 a	0.8	0.8
<i>Salmonella typhimurium</i> 1406	6.25	6.25
<i>Salmonella paratyphi</i> A 1015	3.13	6.25
" " B8006	6.25	0.4
" <i>pullorum</i>	3.13	3.13
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19	12.5	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A 3	>100	6.25

以上の方法により一般細菌, *Candida* 菌, 各種真菌, 結核菌, およびトリコモナス原虫に対する抗菌力の *in vitro* 成績をそれぞれ第1表~第3表に示した。さらに

第2表 各種 *Candida* 菌に対する PODS の抗菌力
MIC (mcg/ml)

<i>Candida albicans</i> No. 2	0.8
" " No. 3	0.4
" " No. 13	1.56
" " 3174	0.8
" " Yu-1200	1.56
" <i>krusei</i> NI 7492	6.25
" <i>parakrusei</i> NI 7493	0.8
" <i>tropicalis</i> NI 7495	50
" <i>pseudotropicalis</i> IAM 4829	0.4
" <i>mycoderma</i> IAM 4564	0.8
" <i>utilis</i> IAM 4215	0.8
" <i>guilliermondii</i> IAM 4412	25
" <i>robsta</i> NI 7638	0.2

第3表 PODS の各種真菌, 結核菌, およびトリコモナス原虫に対する抗菌力
MIC (mcg/ml)

<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.8
<i>Trichophyton asteroides</i>	0.4
" <i>interdigitale</i>	1.56
" <i>rubrum</i>	0.8
<i>Microsporum gypseum</i>	0.4
<i>Aspergillus niger</i>	12.25
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6.25
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> BCG	0.2
<i>Trichomonas vaginalis</i>	6.25

第4表 10% 馬血清加培地における PODS の抗菌力
MIC (mcg/ml)

<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	6.25
<i>Streptococcus hemolyticus</i> Y-73-5	6.25
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	6.25
<i>Escherichia coli</i> O-1	12.5
<i>Shigella flexneri</i> 2 a	6.25
<i>Salmonella typhimurium</i> 1406	12.5
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19	12.5
<i>Candida albicans</i> (No. 2)	12.5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6.25
<i>Trichophyton asteroides</i>	12.5
" <i>interdigitale</i>	25
" <i>rubrum</i>	12.5
<i>Microsporum gypseum</i>	12.5

細菌, 真菌試験で培地に馬血清を 10% 添加した場合の抗菌値を第4表に示した。

II. 石炭酸係数

PODS のブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* 209 P) ならびにチフス菌 (*Salmonella typhosa* H 901 W) に対する石炭酸係数を衛生検査指針に従がつて測定した。その結果は第5表, および第6表の通りである。

III. 病原菌感染動物に対する治療効果

PODS は前記 *in vitro* 諸成績のように各種細菌, 真菌, 結核菌, さらにトリコモナス原虫にまで広範囲に抗菌力を有し, また単に抗菌スペクトルが広いというだけでなくその抗菌力も相当強いものであることがわかった。

ここで病原菌感染動物での治療実験を試みる前に PODS の急性毒性を検討したところ, マウスに対する LD₅₀ は 382 mg/ka (経口), 49 mg/kg (腹腔) (いずれも 72 時間判定) を示した。

従がつてこの範囲内の投与量で感染治療実験を試みた。

1) ブドウ球菌ならびに溶血性連鎖球菌感染マウスに対する治療効果

第5表 PODS の黄色ブドウ球菌に対する石炭酸係数
(*Staphylococcus aureus* 209 P)

薬剤	作用時間 (分) 希釈	2.5	5	10	15
		PODS	1: 2000	—	—
	1: 2200	+	—	—	—
	1: 2400	+	+	—	—
	1: 2600	+	+	±	—
	1: 2800	+	+	+	—
石炭酸	1: 60	+	—	—	—
	1: 70	+	+	—	—
	1: 80	+	+	+	—

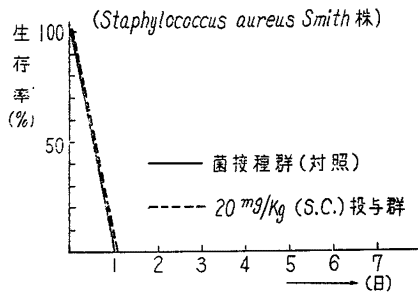
石炭酸係数 34

第6表 PODS のチフス菌に対する石炭酸係数
(*Salmonella typhosa* H 901 W)

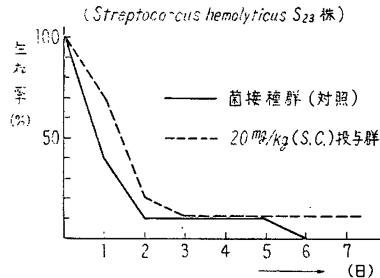
薬剤	作用時間 (分) 希釈	2.5	5	10	15
		PODS	1: 250	—	—
	1: 275	+	—	—	—
	1: 300	+	+	—	—
	1: 325	+	+	+	—
石炭酸	1: 90	+	+	—	—
	1: 100	+	+	+	—

石炭酸係数 3.4

第1図 ブドウ球菌感染マウスに対する
PODSの治療効果



第2図 溶血性連鎖球菌感染マウスに
対するPODSの治療効果



体重 17~20 g の dd 系マウス (♂) を 1 群に 10 匹使用した。血液寒天培地に継代した *Staphylococcus aureus* SMITH 株、ならびに *Streptococcus hemolyticus* S₂₃ 株を肉汁ブイヨン中で 37°C、18 時間前培養した菌液から各菌の 10 LD₅₀ に相当する毒力の菌液 (SMITH 株は原液、S₂₃ 株は 10⁻⁵ 希釈液) を前記マウスに 0.25 ml/mouse 量腹腔内に接種した。

菌接種直後 PODS の生理食塩水液を 20 mg/kg の割合で皮下投与しマウスの生死を観察した。

その治療成績を第 1 図および第 2 図に示した。ただし本実験で菌を接種せず PODS のみを 20 mg/kg 投与した薬剤対照群はすべて生存したことから PODS の毒性による死亡はないものと認められる。

2) 白癬菌感染モルモットに対する治療効果

酒井ら³⁾、野宮ら⁴⁾の実験方法を参照として実施した。すなわち *Trichophyton asteroides* の SABOURAUD's slant 上 20 日間培養菌を SABOURAUD's bouillon 10 ml とよく混和して菌浮遊液とし、これを無菌濾紙で濾別して菌糸を除去、濾液 (メチレン青単染色で多数の孢子懸濁液であることを確認) を菌液とした。

薬剤は PODS ならびに対照として pentachlorophenol (PCP) を使用し、基剤は 70% エタノールとグリセリンを 9:1 の比に混和したものに前記薬剤をそれぞれ 1% 濃度となるよう溶解した。

試験動物としては体重 500~600 g の白系モルモット

第7表 白癬菌感染モルモットにおける PODS の
治療効果

モルモット No.		1	2	3	4	5
試験群	無処置群	+	+	+	+	+
	基剤群	+	+	+	+	+
	1% PCP 群	-	-	-	-	-
1% PODS 群		-	-	-	-	-

+: 菌の発育を認めたもの

-: 菌の発育が見られないもの

(♂) を 1 群に 5 匹使用し背部を剃毛後、皮膚面 (2cm×2cm) を軽く出血する程度に傷つけ前記菌液を滅菌小筆で塗布した。モルモットに菌液を接種してから 48 時間後より 1 日 1 回、各薬剤液 0.2 ml を創面に塗布し、この操作を 9 日間連続して実施した。10 日目にモルモットを屠殺、体表面を温水洗滌後 0.1% 昇汞水中に 30 分間浸す。さらに水洗して昇汞水を充分除き、滅菌鉗でモルモットの治療部位の皮膚面を切片 (3mm×3mm) としして切除する。1カ所に 3片ずつ採取したのち、SABOURAUD 寒天培地上に並べおき、27°C に 7 日間培養して菌の発育の有無を観察し、薬剤の治療効果を判定した。その成績を第 7 表に示す。

IV. 考 察

1) *In vitro* 抗菌性

PODS はグラム陽性菌、陰性菌いずれも chlorhexidine に匹敵する強い抗菌力を示し、さらに各種真菌、結核菌、およびトリコモナス原虫にまで低濃度で発育を阻止する。つまり相当広範囲な微生物に対し強力に発育阻止作用を示すものであることがわかった。ただ石炭酸係数がブドウ球菌に 34、チフス菌に 3.4 という成績はかならずしも既知の殺菌消毒剤と比較して殺菌力が強いとはいえない。しかし *in vitro* の MIC 諸成績のよことから静菌力はかなりすぐれたものと考えられる。また各試験培地に馬血清を 10% の割合で添加したところ若干の抗菌力の減退は見られたがそれほど顕著ではない。

2) 動物治療成績

In vitro 試験では PODS は前述のように強い抗菌力を示したにもかかわらず病原菌感染マウスに皮下投与した場合は第 1 図、および第 2 図の成績のように治療効果は全く認められなかった。これは *in vitro* 実験でも血清添加により抗菌力が減退したことからして PODS は生体内に入ると大部分が容易に酵素で不活化されるため化学療法的な抗菌剤としての作用を発揮できないものと考えられる。

その反面、モルモットの皮膚感染実験でわかつたように PODS は PCP と同様にすぐれた治療成績を示したことから外用すれば不活化されることも少なく使用できると思われる。ただしモルモットの治療実験で観察したことは抗菌力では満足できても、創面の皮膚が PCP にくらべて発赤、腫脹の傾向が見られた。従つて PODS の濃度 1% の場合は皮膚創面にかなりの刺戟を伴うものと考えねばならないからこの点、今後検討を要すると思われる。

総 括

- 1) PODS はグラム陽性、陰性両菌種ならびに真菌類、結核菌、トリコモナス原虫にいずれも *in vitro* で強い発育阻止作用を示し、きわめて広範囲な抗菌スペクトルを有する抗菌剤であることがわかつた。
ただし培地に血清を添加した場合は抗菌力が若干減退することを認めた。
- 2) PODS の石炭酸係数はブドウ球菌に 34、チフス菌に 3.4 であつた。
- 3) PODS のマウスに対する急性毒性は LD_{50} 382 mg/kg (p. o.), 49 mg/kg (i. p.) を示した。
- 4) ブドウ球菌および溶血性連鎖球菌感染マウスに対する治療効果は見られなかつた。これは PODS が生体内

で容易に不活化されるためではないかと考えられる。

5) 皮膚系状菌感染モルモットに 1% PODS 液を塗布した場合は対照とした POP と同様、治療効果を認めた。ただし PCP に比較して皮膚創面に発赤、腫脹が見られた。

本研究に終始御鞭撻を賜つたエーザイ株式会社研究本部長 田辺普博士、検査所長 勝井五一郎博士、試料を御提供頂いた薬化室 豊島昭二室長、毒性試験を御援助頂いた薬理室 大津喜一室長、田島鉄弥研究員の諸氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) SHAW, E., J. BERNSTEIN, K. LOSEE, & W. A. LOTT: Analogs of aspergillilic acid. IV. Substituted 2-bromo-pyridine-N-oxides and their conversion to cyclic thiohydroxamic acids. J. Am. Chem. Soc. : 4362~4364, 1950
- 2) 酒井純雄, 斎藤伍作, 井上和男, 百木克夫: 実験的動物白癬症を用いる抗白癬剤のスクリーニング法について。真菌と真菌症 1(3) : 252~257, 1960
- 3) 野宮文三, 鍵野慶之輔: Acetylene 誘導体に関する研究 第 1 報 2,4,5-Trichlorophenyl- γ -iodo-propargyl の抗白癬作用について。日本細菌学雑誌 19(1) : 28~37, 1963

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BIS(2-PYRIDYL-N-OXIDE)-DISULFIDE

KIYOSHI KAWABE, TAMOTSU KANAZAWA, GIICHI TAKIMOTO,
TOMOHIKA IKEDA & MASARU SATO
Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.

SEIZABURO KANO

Department of Microbiology and Pharmacology, National Institute of Hygienic
Sciences, Osaka-Branch

- 1) *In vitro* antimicrobial activities of bis(2-pyridyl-N-oxide)-disulfide (PODS) on gram positive and negative bacteria, various fungi, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Trichomonas vaginalis*, were tested. As the results, the growth of these microorganisms were inhibited by low concentrations (0.2~6, 25 mcg/ml) of PODS.
- 2) Phenol coefficients of PODS were 34 on *Staphylococcus aureus* 209 P and 3.4 on *Salmonella typhosa* H 901 W.
- 3) Acute toxicities (LD_{50}) of PODS in mice showed 382 mg/kg (p. o.) and 49 mg/kg (i. p.).
- 4) In the case of subcutaneous administration (20 mg/kg) of PODS in mice infected with *Staphylococcus* and *Streptococcus*, the therapeutic effects were not shown. As the reason, it is speculated that PODS is easily inactivated by enzyme in animal organs.
But dermatomycosis of guinea pigs was cured by applying of 1% PODS solution once a day for 9 days.