

新サルファ剤 Sulfalene (ポリサイダル) に関する基礎的研究

木村義民・中村典男・井上喜恵・山下精彦

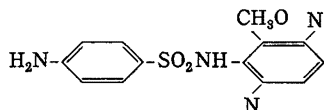
日本医科大学細菌学教室

(昭和 42 年 2 月 22 日受付)

まえがき

近年投薬後生体内で活性が長期間持続する持続性サルファ剤の研究が進み、感染症とくに慢性ないし軽症感染症の治療、予防に広汎に使用されている。

新たに開発された新サルファ剤 Sulfalene (ポリサイダル) は、化学名を 2-(P-aminobenzene-sulfanamide)-3-methoxy-pyrazine と称し、次の構造式を有する。



本剤は分子量 280.3, 融点 176~178°C, 白色結晶性粉末で、アルカリ性において、100 mg/ml に溶解する。

本剤 Sulfalene については 1961 年来基礎的並びに臨床治験成績の報告¹⁻⁹⁾をみ、その持続性サルファ剤としての効果が認められている。

我々も今回エーザイ研究部より提供を受けた本剤 (ポリサイダル) について、*in vitro* の抗菌作用、*in vivo* の感染死防禦効果を検討した。また経口投与後の血中濃度、尿中排泄濃度を経時的に検討すると共に臓器組織内濃度についても検討した。またその作用機構を解析するため、本剤の蛋白吸着能等についても併せ検索したので、これらの基礎的研究成績を一括して報告する。

実験方法並びに成績

1) *In vitro* の抗菌作用

供試菌株としては、表 1 に示すようにグラム陽性並びに陰性の球・桿菌 10 数種について、型の如く各種濃度含有平板寒天培地の dilution method によつて検討した。

即ち供試薬剤 (ポリサイダル) をプロピレン・グリコールで 10 mg/ml に溶解し、滅菌蒸留水を以て倍数稀釈系列を作り MÜLLER-HINTON 寒天培地中に 1/10 量加え、薬剤各種濃度含有培地を作製する。次いで MÜLLER-HINTON 液体培地に供試薬の 1 白金耳を接種し、37°C に 24 時間培養した菌液の 10 倍稀釈液を上記平板上に画線培養し、37°C 48 時間後における菌の発育の有無によつて判定した。実験結果は、表 1 に示す如くである。

本実験結果から、グラム陽性菌 (ブドウ球菌、レンサ

球菌、枯草菌) に対しては 3~18 mcg/ml の比較的低濃度で完全発育阻止効果を示し、グラム陰性菌に対しては変形菌、腸チフス菌に対して 18 mcg/ml を示したが、

表 1 諸種細菌に対する本剤の抗菌作用 (dilution method による完全発育阻止濃度)

試験菌株	完全発育阻止濃度 (mcg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> (209 P)	18.7
<i>Streptococcus pyogenes</i> (group A, type 12)	3.125
<i>Bacillus subtilis</i> (PCI)	9.3
<i>E. coli</i> (O-55)	400
<i>Proteus mirabilis</i>	18.7
<i>Salmonella typhae</i>	18.7
<i>Salmonella paratyphi</i>	200
<i>Salmonella enteritidis</i>	50
<i>Shigella dysenteriae</i> (A-2 a)	75
<i>Shigella sonnei</i> (D)	200
<i>Brucella melitensis</i>	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	400

表 2 本剤の経口投与によるマウス感染死防禦効果 (感染菌 *Salmonella enteritidis*)

処置群 (処置量)	生存数/例数	ED ₅₀ (mg/kg)
無処置 (対照)	10/10	621.5 mg/kg.
1600 mg/kg	3/5	
800	3/5	
400	2/5	
200	1/5	
100	1/5	
50	0/5	
25	0/5	
無処置 (対照)	10/10	159.3 mg/kg
1600 mg/kg	4/5	
800	4/5	
400	3/5	
200	3/5	
100	2/5	
50	1/5	
25	0/5	

- fanilamido-3-methoxypyrazine. *Minerva Medica* 52(40), 1796~1800, 1961
- 6) CLINI, V.: G. KAUCHTSCHISCHWILI & G. MARS: Therapy of chronic bronchitis with sulfa-methoxypyrazine in elderly patients. *Giornale Italiano di Chemioterapia*, V. 6-9 (4), Oct. Dec. 1962
- 7) COLOMBO, G.P.: Preliminary results obtained with 2-sulfanilamido-3-methoxypyrazine in pediatric field. *Minerva Medica* Vol. 52 (40), 1805~1809, 1961
- 8) POTSCH, N. & E. TEIXEIRA: On the treatment of children's diarrhoea with sulfamethoxypyrazine. *Revista Brasileira de Medicina* Vol. 22(8), 1965
- 9) CARBONEL, J.G.: Low dosage in long-acting sulfonamidothrapy-clinical observations. *Folia Medica* 49(3), 183, 1954
- 10) BRATTON, A.C. & MARSHALL, E.K.: A new coupling component for sulfonamide determination. *J. Biol. Chem.* 128, 537, 1939

FUNDAMENTAL STUDIES ON A NEW SULFONAMIDE, SULFALENE (POLYCIDAL)

YOSHITAMI KIMURA, TSUNEO NAKAMURA, YOSHIE INOUE
and KIYOHICO YAMASHITA

Department of Bacteriology, Nippon Medical School, Tokyo

Summary

A new compound (2-P-aminobenzene sulfonamide-3-methoxypyrazine) "Sulfalene (Polycidal)", a long-acting sulfonamide, was proved to have a relatively broad antibacterial spectrum against gram-positive and negative microorganisms *in vitro*.

By the pretreatment of the drug to mice, protective effect against the bacterial infection (*Salmonella enteritidis* or *E. coli*) was surely observed.

The concentrations of the drug absorbed in plasma and tissues or excreted in urine after the oral administration were chemically and biologically determined and the comparatively high concentrations of the drug were determined 1~4 hours after the administration and the effective dose were also demonstrated even at 24~48 hours after the administration.

The binding of the drug to plasma or tissue proteins varies with the concentration of drug present, as has been shown to be true for sulfa drugs in general. The degree of binding to proteins is rather less, however, than that with other sulfa drugs.

他菌株では 50~400 mcg/ml の比較的高濃度を要した。

2) 生体感染死防禦効果

本剤経口投与によるマウスの感染死防禦効果を検討した。即ち体重 15±1.2 g の DD 系マウスを用い、各群 5 匹宛のマウスに分ち、薬剤投与群は薬剤の各濃度（何れも 5% アラビアゴム食塩水に懸濁）を菌攻撃に先立つて 0.5 ml 宛ビニールゾンデを以て経口投与し、菌接種 5 時間後に更に同一量を経口投与した。

攻撃菌としては、*Salmonella enteritidis*、並びに *E. coli*(0-55) の TODD-HEWITT broth 培養菌の 10⁻¹ 液を 0.5 ml 宛腹腔内に注射した。マウスの生死判定については毎日これを観察し、1 週間後の死亡数を以て死亡率並びに感染死防禦率を算出した。実験成績は、表 2 に示す通りである。

本実験結果から明らかなように、*S. enteritidis*、*E. coli* 接種群では何れに於ても対照無処置群では全例死亡したに対し、薬剤処置群では 50% 感染防死量 (ED₅₀) が前者に対しては、621.5 mg/kg、後者に対して 159.3 mg/kg であった。

3) 血中への吸収及び尿中への排泄

本剤を経口投与後の血中への吸収及び尿中への排泄量を経時的に検討した。

薬剤濃度の測定は主として BRATTON-MARSHALL¹⁰⁾ 法によつて遊離及び全スルファミン量を比色定量した。また一部については寒天平板濾紙法によつて定量した。

A 比色定量法：血液については稀酸ソーダを 2 mg/ml の割で血液に混じて凝固を阻止したもの 2 ml を容量 50 ml の三角フラスコに入れ、0.5 g/l のサポニン溶液 30 ml を加えて 2 分間室温に放置して溶血せしめ、15 g/dl のトリクロール酢酸 8 ml を 1 滴宛加えて攪拌しながら振盪、次いで濾過する。

遊離スルファミンの定量には上記濾液 10 ml に 0.1 g/dl の亜硝酸ソーダ 1 ml を加えて 3 分間放置し、0.5 g/dl のスルファミン酸アンモン液 1 ml を加え 2 分間放置後 0.1 g/dl の N-(1-naphthyl)-ethylendiamine-2-hydrochloride 1 ml を加え 5 分間放置後 545 m μ で比色定量した。

全スルファミン量の測定には、前記濾液 10 ml に 4 規定塩酸 0.5 ml を加え、沸騰水中で 60 分間煮沸し、水溶中よりとり出して、いつたん冷却、蒸発により減少した量には蒸留水を加えて 10 ml とし、以下遊離スルファミン量の測定に準じて行なつた。

尿の場合は予め投薬後 20 時間以内の尿については 20 倍、20 時間以降の尿については 5 倍に蒸留水で稀釈し、その 25 ml に対し 4 N 塩酸 2.5 ml を加え、全量が 50 ml になるまで蒸留水を加えたものの 10 ml をとり、血

液の場合と同様に以下処置して比色定量した。

なお予じめ本剤による既知濃度の検量曲線を作製しておき、被検材料の定量値からその濃度を算定した。

B 生物学的定量法：*Bacillus subtilis* の芽胞溶液を 0.8% の溶融 MÜLLER-HINTON 寒天培地に 1 100 の割に加え、滅菌シャーレに 10 ml 宛分注し、濾紙（東洋濾紙 No. 6、経 7 mm×7 mm）に被検血清或いは尿を浸したものを、平板上に静置し氷室に 1 夜放置後、37°C に 8 時間培養後の濾紙周辺の発育阻止円の径を測定し、同時に被検薬剤の阻止円の径による基準曲線に照して被検材料中に含有される薬剤の活性濃度を測定した。

表 3 血中の遊離並びに全スルファミン量 (ウサギ)

経口投与後	30分	1時間	3時間	6時間	24時間	48時間
スルファミン						
遊離スルファミン	76.0	117.8	83.2	76.1	28.17	1.4
全スルファミン	100.7	148.2	120.9	110.2	49.4	2.85

註：スルファミン量の数値は mcg/ml で表わす

図1 本剤経口投与後の血中濃度(ウサギ)

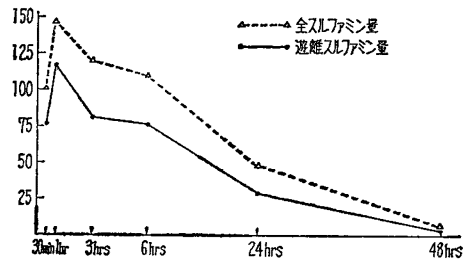


表 4 尿中遊離スルファミン量の経時的検索 (本剤 1g 経口投与後の尿中濃度) 人体 (55 kg) 例

採取時	6時間後	12時間後	18時間後	27時間後	48時間後
mcg/ml	184	312	72	27.5	16.2

図2 経口投与後の尿中遊離スルファミン量 (人体実験例)

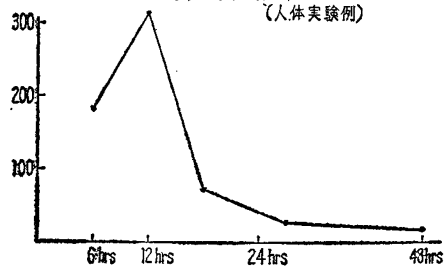


表 5 経口投与後の組織内濃度
(mcg/g) (モルモット)

	1 hr 後		4 hrs 後		24 hrs 後	
	free	total	free	total	free	total
腸	35.0	41.76	33.6	41.2	5.6	9.24
腎	60.4	60.2	58.8	72.8	8.4	8.96
肝	50.4	78.4	89.6	90.6	7.0	11.76
肺	33.6	44.8	44.0	60.2	6.44	7.84
脾	31.3	32.4	30.6	49.0	4.2	8.4

実験成績を一括すると、次の如くである。

1. 経口投与後の血中濃度 (経時的関係)

本剤を 10% アラビアゴム食塩水中に懸濁し 100 mg/kg の割でウサギに経口投与し、経時的 (経口投与後 30 分, 1 時間, 3 時間, 6 時間, 24 時間, 48 時間) に採血し、血中の遊離並びに全スルファミン量を測定した。

実験結果は、表 3 並びに図 1 に示す通りである。

2. 経口投与後の尿中濃度 (経時的関係)

本剤を人体 (55 kg) に 1 g 経口投与し、経時的に採取した尿について遊離スルファミン量を比色定量した。

実験結果は、表 4 及び図 2 に示す通りである。

4) 経口投与後の組織内濃度についての検討

本剤を体重 400~450 g の雄性モルモットに 100 mg/kg (10% アラビアゴム食塩水に懸濁) の割で経口投与し、経口投与後 1 時間, 4 時間及び 24 時間後に殺し組織 (腸管, 腎, 肝, 脾及び肺臓) 内濃度を定量した。各群モルモットについては 3 例宛行ない、各組織についてはこれを細切の上ホモジナイズし、g 当り 5 ml の生理食塩水で抽出した後蒸留水を加えて全量 20 ml とし、更に 15 g/dl のトリクロール酢酸 8 ml を 1 滴宛加えながら攪拌しつつ振盪濾過する。

本濾液からの遊離並びに全スルファミン量の定量は血液からの場合と同様に処理した後、比色定量した。実験成績を一括すると、表 5 の如くである。

5) 本剤の血清蛋白への結合能に関する検討

ウマ血清をセロファンチューブ内に 5 ml 入れてしぼり、50 ml 容量のコルペン中に入れ、本剤 (10 mcg/ml) を 20 ml 入れ、氷室内で 1 昼夜透析後、外液及びセロファン内液の全スルファミン量を前述の方法で抽出、比色定量した。

同一条件において 2 回繰り返した実験結果は、次の如くである。

溶液	total sulfamin 量
外液	7.8 mcg/ml
内液(セロファン内)	15.6 mcg/ml

外液:内液=1:2 (スルファミン濃度比)

このことから本剤は蛋白への結合が認められる。

総括並びに結論

新サルファ剤 Sulfalene (ポリサイダル) についてグラム陰・陽性菌に対する *in vitro* の抗菌作用、マウス感染死防禦能、モルモット或は人体内に経口投与後の血中並びに尿中への吸収・排泄濃度、組織内濃度等について経時的に検討すると共に、本剤の蛋白結合能について検討し、本剤が持続性サルファ剤として優れた効力を有し、急・慢性の感染症、とくに気道の経口腔感染症等に有効であろうことを基礎学的に実証し得たものと思う。実験成績を一括すると次の如くである。

1. 本剤の *in vitro* における抗菌作用について十数種の菌株について検討した結果、グラム陽・陰性菌に広汎な抗菌スペクトルを有することが分つた。特にグラム陽性球、桿菌に対して発育阻止作用が強力であつた。

2. 本剤の経口投与によつてマウスの感染死防禦効果が認められた (*Salmonella enteritidis*, *E. coli*)。

3. 本剤の経口投与後、血中並びに組織内濃度 (遊離型, 結合型) を BRATTON-MARSHALL 法に準じて比色定量したが、1~4 時間後に於ては極めて高濃度が保持され、24~48 時間後に於てもなお明らかに有効濃度が証明された。

4. 尿中への排泄濃度からみても、明らかに長時間 (24~48 時間) に亘つて有効活性濃度が認められる。ただし、血中、組織中並びに尿中の何れにおいても遊離型のものより結合型のものの方が高い値を示すことは、他のスルファミン剤の場合と同じであつた。

5. 本剤の血清蛋白への吸着能を検討したが、血清蛋白への結合比は 2 を示した。従がつて本剤は他のスルファミン剤同様、蛋白への結合はあるものと認められる。

References

- BERTAZZOLI, C.; A. BUOGO, C. CICERI, M. CHIONE, E. TUROLLA & V. ZAVAGLIO: A new sulfonamide-2-sulfanilamido-3-methoxypyrazine. *Minerva Medica* 52(40): 1789, 1961
- HERTING, R. L.; F. LOPEZ, E. SCHERFLING, J. C. SYLVESTER & R. WIEGAND: Clinical pharmacology of 2-sulfanilamido-3-methoxy-pyrazine. Report at Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1964
- GHIONE, M.; A. BUOGO & V. ZAVAGLIO: Experimental therapeutic activity of a new long-acting sulphonamide, sulphopyrazine methoxine. Communication to the 2nd Therapeutic Symposium, Napoli, 14-17 Sept. 1961
- CROMWELL, H. A.: Clinical evaluation of sulfalene (2-sulfanilamido-3-methoxypyrazine). *Current Therapeutic Research* 7(8); Aug. 1965
- CESANA, A. & R. VENTURA: Clinical trials with a new long-acting sulfonamide: 2-sul-