

Sulfamethoxypyrazine の基礎的検討 第1報

金政泰弘

岡山大学医学部微生物学教室

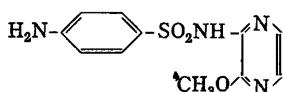
河部靖・金沢保・大郷利治

池田友久・佐藤勝

エーディ株式会社研究所

(昭和 42 年 4 月 22 日受付)

1961 年 Farmitalia 社の BERTAZZOLI ら¹⁾は 2-sulfanilamido-3-methoxypyrazine (sulfamethoxypyrazine (SMP)) が新しい興味あるサルファ剤であることを発表した。すなわち彼等の報告によれば SMP は Farmitalia 社研究陣がはじめて合成したものであり、持続性で経口投与時の吸収もよく血中濃度が高いこと、さらに動物の実験的感染症に対するすぐれた治療成績を示し、急性毒性も低く長期投与に耐えられるなど数々の特徴をあげている。



SMP

2-sulfanylamido-3-methoxypyrazine

次いで GHIONE らも²⁾ SMP は他のサルファ剤に比較して感染防禦効果が特にすぐれていることを強調し、臨床的にも価値あるサルファ剤であることを示唆した。

このように新しく注目をあびた SMP は欧州をはじめ米国でも臨床が行なわれ、その臨床成績に関しては枚挙にいとまないほど多数の報告が見られる現状である。

著者らは今回 SMP につき諸種の基礎実験を行なう機会を得たので本報告では *in vitro* における抗菌性、蛋白結合性及び血球への吸着性、急性毒性、さらに実験的感染症に対する治療効果につきここにとりまとめて報告する。

I. *In vitro* における抗菌性

A. 最小発育阻止濃度 (MIC)

SMP の *in vitro* 抗菌力は BERTAZZOLI ら¹⁾が 50% 発育阻害濃度で表現したり、DI MARCO ら³⁾は 37°C に 72 時間という長時間培養の結果を他のサルファ剤と比較し抗菌力に大差のないことを報告している。しかしいずれも著者らが実施している MIC 算出方法とかけはなれているためあまり参考にならないと思われる。

著者らは一般細菌に対する抗菌試験は MUELLER-HINTON 培地 (Difco) を使用し、菌数 $4 \sim 8 \times 10^4$ cells/ml の菌液より 1 白金耳量を薬剤含有の試験平板に画線

塗抹、37°C に 24 時間培養後の MIC を求めた。結核菌に対する抗菌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 日間前培養した *Mycobacterium tuberculosis* BCG 株の菌希釈液 (菌量 2 mg/ml) 0.1 ml を添加、37°C に 10 日間培養後 MIC を判定した。

なお対照には sulfadimethoxine (SDM) および sulphisomezole (SIM) を使用した。

以上のことにより得た試験成績を第 1 表に示した。

B. 血清蛋白共存下における抗菌力

MUELLER-HINTON 培地に仔牛血清をそれぞれ 10%, 20%, および 40% の比率で添加し、代表的細菌を用いて前述と同様の試験法で MIC を判定した成績を第 2 表に示した。

C. 細菌の増殖曲線に及ぼす影響

第 1 表 SMP の *in vitro* 抗菌力
MIC (mcg/ml)

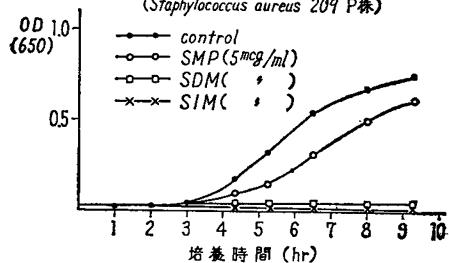
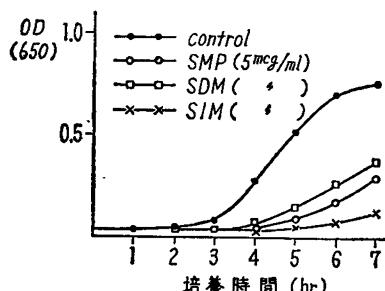
Drug	S M P	Control	
		S D M	S I M
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	50	25	12.5
<i>Micrococcus flavus</i> PCI 1216	6.25	3.13	1.56
<i>Sarcina lutea</i> PCI 1001	3.13	3.13	0.8
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	6.25	6.25	3.13
<i>Escherichia coli</i> O-111	>200	>200	25
" " K-12	3.13	6.25	1.56
<i>Shigella flexneri</i> 2 a	6.25	3.13	3.13
" " sonnei MATSUNAGA*	>200	>200	>200
<i>Salmonella typhimurium</i> 1406	>200	200	100
" " paratyphi A 1015	200	200	100
" " B 8006	200	50	50
" " pullorum	25	25	6.25
<i>Proteus vulgaris</i> OX ₁₉	25	12.5	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A ₃	>200	>200	100
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> BCG	50	50	50

* 多剤耐性赤痢菌

第2表 仔牛血清添加時における SMP の抗菌力 (MUELLER-HINTON 培地)

Drug Calf serum %	S M P				S D M				S I M				MIC(mcg/ml)
					control				control				
	0	10	20	40	0	10	20	40	0	10	20	40	
Bacteria													
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	50	100	200	>200	25	25	25	200	12.5	25	50	>200	
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	6.25	12.5	12.5	25	6.25	25	25	50	3.13	12.5	12.5	25	
<i>Escherichia coli</i> K-12	3.13	6.25	12.5	25	6.25	12.5	12.5	25	1.56	3.13	6.25	12.5	
<i>Proteus vulgaris</i> OX ₁₉	25	25	50	50	12.5	12.5	12.5	25	1.56	3.13	3.13	6.25	

第1図 細菌の増殖曲線におよぼす

SMPの影響
(*Staphylococcus aureus* 209 P株)第2図 細菌の増殖曲線におよぼす
SMPの影響(*Salmonella typhi* H 901 株)

細菌の増殖曲線が SMP の適量を添加することによりどのような pattern の変化をうけるかにつき SDM, SIM と比較検討した。試験菌としては *Staphylococcus aureus* 209 P 株ならびに *Salmonella typhi* H 901 株を使用した結果をそれぞれ第1図および第2図に示した。

II. 蛋白結合率

Farmitalia 社研究陣⁴⁾の報告によると SMP の人血漿での蛋白結合率は 66% を示し、他のサルファ剤と比較して結合率の少いことを強調し、SMP の特徴の 1つとしている。

著者らは新鮮人血漿を使用し、LAVIETES⁵⁾の限外濾過法により SMP の蛋白結合率を測定した。すなわち新鮮人血漿と試料液を 9:1 の比に混じ血漿中濃度がそれ

第3表 SMP の蛋白結合率

試料	Drug	濾過前濃度 [A] (mcg/ml)	濾液濃度 [B] (mcg/ml)	結合率 (%) $\frac{A-B}{A} \times 100$
人血漿	SMP	60	36.6	39.0
	SDM	40	20.0	50.0
	SIM	20	9.3	53.5
牛血清	SMP	60	23.3	61.6
	SDM	40	4.9	87.8
	SIM	20	0.9	94.5
人血漿	SMP	60	28.4	52.7
	SDM	40	15.0	62.5
	SIM	20	5.3	73.6
牛血清	SMP	20	9.0	55.0
	SDM	20	1.7	91.4
	SIM	20	6.5	67.5

それ 20 mcg/ml, 40 mcg/ml, および 60 mcg/ml となるよう試験溶液を調製、LAVIETES 限外濾過装置でセロファン膜を通じて 0~5°C に 30 時間濾過を行ない、濾液を BRATTON-MARSHALL 法⁶⁾により比色定量を行なつた。なお牛血清も使用して人血漿の場合と全く同様にして蛋白結合率を算出した。これらの成績を第3表に示した。

III. 赤血球吸着率

サルファ剤の種類により赤血球吸着率に差が見られるかどうかを検討する目的で SMP と SDM, SIM を比較しながら吸着率を測定した。

すなわち新鮮人赤血球の生理食塩水浮遊液 (ヘマトクリット値 55.0%) 4 ml に適量の生理食塩水およびサルファ剤試料液 (生理食塩水溶液) を加えて全量が 6 ml になるようにすると同時にサルファ剤濃度としても 100 mcg/6 ml, 200 mcg/6 ml, 400 mcg/6 ml となるようそれぞれの試料を調製した。

第4表 SMP の赤血球吸着率

薬液濃度	Drug	SMP		SDM		SIM				
		100	200	400	100	200	400	100	200	400
吸着前の薬剤濃度(mcg/6 ml) (赤血球浮遊液)		100	200	400	100	200	400	100	200	400
吸着後の薬剤濃度(mcg/ml) (上清)		14.5	30.0	63.0	13.2	27.0	55.0	14.2	30.0	62.0
赤血球吸着率(%)		1.23	1.17	1.10	1.36	1.33	1.30	1.26	1.17	1.15

$$\text{赤血球吸着率} = \frac{CV - c(V-v)}{CV} \times 100$$

C : 赤血球浮遊液の薬剤濃度

V : 赤血球浮遊液全容積

c : 上清(吸着後)の薬剤濃度

v : 赤血球浮遊液の赤血球容積

第5表 N⁴-acetyl SMP の溶解性

(37°C)

Drug	pH	6.0 (mcg/ml)	7.0 (mcg/ml)	8.0 (mcg/ml)
SMP		1076	1265	4025
N ⁴ -acetyl SMP		449	2057	3385
SDM		95	432	1340
N ⁴ -acetyl SDM		110	742	2057
SIM		992	1472	2365
N ⁴ -acetyl SIM		372	1911	3648

このように調製した薬剤含有の赤血球浮遊液を室温に30分間放置して薬剤の吸着を完結せしめたのち、注意して低温で遠沈し上清をとり蛋白結合率測定の場合に準じて比色定量し赤血球吸着率を算出した。その成績を第4表に示した。

IV. N⁴-アセチル体の溶解性

サルファ剤のN⁴-アセチル体が水に対する溶解性の悪い場合には尿路結石その他の副作用の原因となる。そこでSMP, SDM, SIM それぞれのN⁴-アセチル体のpH 6.0~8.0, 37°Cにおける溶解性をしらべた成績が第5表である。

溶液はリン酸クエン酸緩衝液を使用し、定量は前述のBRATTON-MARSHALL法によつた。

V. 急性毒性

dd系マウス(♂, 体重20±2g)を用い、SMPの各投与routeにおける急性毒性をSDMと比較した成績が第6表である。生死の判定は薬物投与後72時間目に行なつた。さらにSMPでは体重約250gの呑嚥系ラット(♂)を使用してマウスの場合と同様にLD₅₀を算出し、3,400mg/kg(p.o.), 2,120mg/kg(s.c.)という値を得た。

また犬の場合では6匹を使用し、最大量3,500mg/kgまで経口投与したが、このような大量投与の場合でもbehaviorとして投与後2~3時間目で嘔吐、ふるえが観察された程度でその後次第に正常に回復し、投与24

時間後から72時間目(観察終了時)までは投与前とくらべて、なんら変化は見られなかつた。

VI. 実験的マウス感染症に対する治療効果(ED₅₀)

BERTAZZOLIら¹¹によればSMPは実験的マウス感染症に他のサルファ剤よりすぐれた治療効果(ED₅₀)を示したことを報告し、これがSMPの大きな特徴であるとしている。

著者らは今回ブドウ球菌、溶血性連鎖球菌(溶連菌)、および腸炎菌をそれぞれマウスに感染させて生じた感染症に対する治療効果(ED₅₀)をSDM、SIMおよびsulfamethizole(SMZ)と比較しながら検討を行なつた。

1) 実験動物

dd系マウス(♂), 体重17±1gのものを1群に10匹使用した。

2) 試験菌株と動物への接種

血液寒天培地に累代継代したブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* SMITH株)、溶連菌(*Streptococcus hemolyticus* S₂₃株)、および腸炎菌(*Salmonella enteritidis* S-11株)よりそれぞれ1白金耳量を肉汁ブイヨン4.5mlに接種し、37°Cに18時間培養したものを菌原液とした。ブドウ球菌および腸炎菌の場合は原液を、溶連菌の場合は原液の10⁴倍生理食塩水希釈液(いずれも10·LD₅₀に相当する)をそれぞれマウス腹腔内に0.25ml/mouse量接種した。

3) 薬剤の調製ならびに動物への投与

各薬剤は0.5%CMCを用いて2倍希釈系列濃度の懸濁液をつくり、菌接種直後経口投与(mg/kg)、以後24時間間隔で4日間連続投与した。

4) 観察と判定

菌を接種した後、毎日生死を観察し、ブドウ球菌および溶連菌の場合は5日目の生死を、腸炎菌の場合は12日目の生死を判定し、LITCHFIELD-WILCOXON法により各薬剤のED₅₀を算出した。

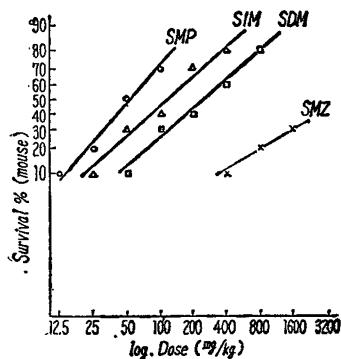
第6表 SMP のマウスにおける急性毒性(LD₅₀)(mg/kg)

投与方法	SMP	SDM
i.v.	1160	1050
s.c.	1590	1180
p.o.	1710	>4000

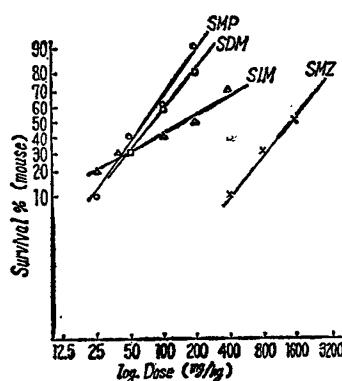
i.v., s.c. は希アルカリ溶液(pH 9.0~9.5)として投与(0.02ml/g)

p.o. はアラビアゴム懸濁液として投与(0.02ml/g)

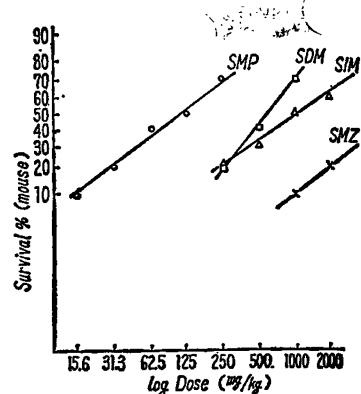
第3図 SMPのブドウ球菌感染マウスに対する治療効果
(*Staphylococcus aureus* SMITH株)



第4図 SMPの溶連菌感染マウスに対する治療効果
(*Streptococcus hemolyticus* S23株)



第5図 SMPの腸炎菌感染マウスに対する治療効果
(*Salmonella enteritidis* S-11株)



第7表 SMPのブドウ球菌感染マウスに対する治療効果 (ED_{50})
(*Staphylococcus aureus* SMITH 株)

投与量 mg/kg/day	SMP	SDM	SIM	SMZ
12.5	1/10			
25	2/10		1/10	
50	5/10	1/10	3/10	
100	7/10	3/10	4/10	
200	10/10	4/10	7/10	
400		6/10	8/10	1/10
800		8/10		2/10
1600				3/10
ED_{50} (mcg/ml)	54	255	125	>2000

(生存マウス数/実験マウス数)

第8表 SMPの溶連菌感染マウスに対する治療効果 (ED_{50})
(*Streptococcus hemolyticus* S23 株)

投与量 mg/kg/day	SMP	SDM	SIM	SMZ
12.5				
25	1/10			2/10
50	4/10	3/10	3/10	
100	6/10	6/10	4/10	
200	9/10	8/10	5/10	
400			7/10	1/10
800				3/10
1600				5/10
ED_{50} (mg/kg)	70	82	160	1600

(生存マウス数/実験マウス数)

第9表 SMPの腸炎菌感染マウスに対する治療効果 (ED_{50})
(*Salmonella enteritidis* S-11 株)

投与量 mg/kg/day	SMP	SDM	SIM	SMZ
15.6	1/10			
31.3	2/10			
62.5	4/10			
125	5/10			
250	7/10	2/10	2/10	
500		4/10	3/10	
1000		7/10	5/10	1/10
2000			6/10	2/10
ED_{50} (mg/kg)	115	590	1100	>2000

(生存マウス数/実験マウス数)

のように抗菌力が低下するが、これは SMP に限らず SDM, SIM にも共通に見られた現象であり、低下の度合

VII. 考 察

1) In vitro 抗菌性

SMP は他のサルファ剤と同様にグラム陽性、陰性両菌種に抗菌性を示し、MIC は SDM とほぼ同程度と考えられるが SIM よりは若干抗菌力は弱いようと思われた。このことは SMP および SDM, SIM を 5 mcg/ml 添加した場合の細菌の増殖曲線を検討した第1図、第2図の結果からも同様のことがうかがわれる。MUELLER-HINTON 培地に calf serum をそれぞれ 10%, 20%, 40% と添加した場合は血清量の増加に比例して第2表

もいずれも似たものであるといえる。

以上の事より SMP は *in vitro* 抗菌性の点では他のサルファ剤と比較して特筆する程の利点は見られなかつたといえる。

2) 蛋白結合率

第3表の成績から明らかのように SMP は SDM, SIM に比較して薬剤濃度の多少にかかわらず血漿蛋白結合率は最も少いものであることがわかつた。Farmitalia 社研究所⁴⁾の報告もこの点を強調しており、蛋白結合率の高いサルファ剤、たとえば SDM の如きは生体内でのアレルギー反応に関与し、副作用も生じやすいとされている点からしても SMP はサルファ剤で起こりがちな薬疹その他の副作用も少ないであろうと推定され興味ある成績と考えられる。

3) 赤血球吸着率

人赤血球への吸着率は SMP と SIM はほとんど差がないが、SDM は両者にくらべると蛋白結合率の場合と同様、最も高いという成績が得られた。

4) N⁴-アセチル体の溶解性

サルファ剤解毒機構の1つに N⁴-アセチル体の成生があるが、第5表に示した各サルファ剤の N⁴-アセチル体の溶解度試験の成績から見ると SMP と SIM の N⁴-アセチル体はほとんど同程度と見ることができる。SDM の N⁴-アルチル体の溶解度は前2者に比較して良くなない。従がつて SMP は SIM と同様に用事尿路結石をつくる心配は少ないものといえる。

5) 急性毒性

BERTAZZOLI ら¹⁾は SMP の急性毒性 (LD₅₀) はマウスに 1,560 mg/kg (i.v.), 1,660 mg/kg (s.c.), 2,164 mg/kg (p.o.)、ラットでは 2,400 mg/kg (i.v.), 5,000 mg/kg (p.o.) という成績を報告しているが、著者らが検討した成績と大差ないものと考えられる。これらの結果を総合しても SMP は公知のサルファ剤に比し、急性毒性も強くないものであるといえる。とくに著者らの実施した犬での成績では 3,500 mg/kg の経口投与で観察時、なんらの重篤な behavior も見られなかつたことからして比較的安全なものであると考えられる。

6) 実験的マウス感染症に対する治療効果 (ED₅₀)

BERTAZZOLI ら¹⁾は実験的マウス感染症に対する SMP の ED₅₀ としてブドウ球菌に 50 mg/kg (p.o. 5 日間連続投与)、肺炎双球菌に 20 mg/kg (p.o. 2 日間連続投与) という値を得ているが、この ED₅₀ は他のサルファ剤に比し感染防禦効果のすぐれていることを強調している。

ED₅₀ は使用するマウスの種属と週令、菌の種類と接種時の毒力、薬剤の投与 route と回数、生死観察の日

数などの諸条件に支配されるため文献は单なる参考に留まるにすぎないが、著者らは同一条件下で実験を繰返し第7表～第9表に示す ED₅₀ を得た。

ここに得た数値を推計処理した結果、溶連菌における SMP と SDM の相互間にのみ有意差が見られなかつた程度で、あとは SMP は明らかに他のサルファ剤に比し推計学的に有意差を認め、BERTAZZOLI ら¹⁾の報告通り SMP は従来のサルファ剤よりも感染防禦効果のすぐれたものであることが動物実験上でも確認された。

すなわちこのことは SMP がたとえ少量投与であつても従来のサルファ剤と全く同様の治療成績が得られるであろうことを示唆するものと考えられる。

緒 括

新しい持続型サルファ剤 SMP につき諸種の基礎的検討を加えた。本報告では *in vitro* の諸実験ならびに急性毒性と感染防禦実験の成績をまとめた結果、

- 1) SMP の抗菌力は SDM と同程度で SIM のほうが抗菌力としては強いといえる。
- 2) 血漿蛋白結合率、赤血球吸着率は SMP が他のサルファ剤より少ない。
- 3) N⁴-acetyl SMP の溶解度は N⁴-acetyl SIM と同程度で、N⁴-acetyl SDM より大きい。
- 4) SMP のマウス、ラット、および犬における急性毒性は低い。
- 5) 実験的マウス感染症に対する SMP の感染防禦効果 (ED₅₀) は他のいずれのサルファ剤よりもすぐれてい る。

以上のことより SMP は新サルファ剤として興味あるものと考えられる。

本実験に御指導を賜わつた岡山大学医学部微生物学教室 村上栄教授、御鞭撻頂いたエーザイ株式会社 研究本部長 田辺普博士、検査所長 勝井五一郎博士に厚く感謝致します。また実験に御協力頂いたエーザイ株式会社 研究所 木下健策、堤淳三、依田智東の各研究員に謝意を表します。

文 献

- 1) BERTAZZOLI, C. et al. : Minerva Medica 52: 1789, 1961
- 2) GHIONE, M. et al. : Communication to the II nd Chemotherapeutic Symposium, Napoli, Sept. 14~17, 1961
- 3) DI MARCO, A. et al. : Research Laboratory Report, Farmitalia Co.
- 4) Research Laboratory Confidence Report, Farmitalia Co.
- 5) LAVIETES, P. H. : J. Biol. Chem. 120: 267, 1937
- 6) BRATTON, A. C. et al. : J. Biol. Chem. 128: 537, 1939

BASIC STUDIES ON SULFAMETHOXYPYRAZINE (I)

YASUHIRO KANEMASA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

KIYOSHI KAWABE, TAMOTSU KANAZAWA, TOSHIHARU OHGO,

TOMOHISA IKEDA & MASARU SATO

Eisai Research Laboratories

Basic studies on sulfamethoxypyrazine (SMP), a new sulfonamide, were performed in comparison with sulfadimethoxine (SDM) and sulfisomezole (SIM). The results of Report I are summarized as follows.

- 1) *In vitro* antibacterial activities of SMP were as effective as SDM, but less than that of SIM.
- 2) The affinity of SMP in human plasma and its adsorption rate on human erythrocytes were less than SDM and SIM.
- 3) N⁴-Acetyl derivative of SMP was easily soluble as well as N⁴-acetyl SIM at pH 6.0~8.0 in buffer solution.
- 4) Acute toxicities (LD₅₀) of SMP in mice were 1,160 mg/kg (i. v.), 1,590 mg/kg (s. c.), and 1,710 mg/kg (p. o.).
- 5) ED₅₀ of SMP in infected mice were superior to other three sulfonamides. The results were 54 mg/kg on *Staphylococcus*, 70 mg/kg on *Streptococcus*, and 115 mg/kg on *Salmonella*.