

Decamethylenebis-(4-amino-5,6,7,8-tetrahydroquinaldinium)

塩の抗微生物作用

小林富二男・青木優典・徳永三和子

興和株式会社東京研究所

(昭和 42 年 10 月 19 日受付)

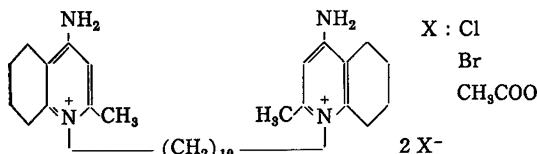
はじめに

1953 年, COLLIER and TAYLAR¹⁾ が decamethylenebis-isoquinolinium bromide が抗微生物作用を有することを報告して以来, Polymethylene-bis-heterocyclic な化合物の抗微生物作用について種々の報告がある^{2,3,4)}. 特に BABBS, COLLIER *et al.*⁵⁾ によつて報告された Decamethylenebis-4-aminoquinaldinium 塩は強力な抗微生物作用を有し, 今日殺菌剤として用いられている。

今回, 上記化合物と類似構造を有する 3 種の Tetrahydroquinaldinium 塩について抗微生物作用を検討したので報告する。

実験材料および方法

供試薬剤: Decamethylenebis-(4-amino-5,6,7,8-tetrahydroquinaldinium) (以下 THQ と略) chloride, bromide および acetate の 3 種と, 比較のために Decamethylenebis-(4-aminoquinaldinium)acetate (Dequadin) を用いた。



培地: 抗菌試験用の培地としては, 一般細菌には Heart infusion 寒天を用い, 必要に応じてウマ血液 10% または食塩 3% を加えた。真菌類には 4% Glucose Sabouraud 寒天を, 結核菌には Kirchner 液体培地, *Trichomonas* には浅見培地を使用した。またブドウ球菌に対する殺菌作用には日野⁶⁾ が用いた 0.25% Casamino acid 加生食水 (pH 7.4) を用い, その他には Brain Heart Infusion Broth を使用した。

抗菌作用の測定: 腸菌班法にしたがって行なつた。接種菌量は一般細菌では Peptone 水 (炎ヒブリオでは 3% 食塩加 Peptone 水) に 37°C 2 代継代したものを 1 白金耳, *Hemophilus* 属, *Streptococcus* 属, *Diplococcus* 属, *Corynebacterium* 属の細菌は 10% ウマ血液寒天平板に発育した集落を Peptone 水に 1 mg/ml の割合に浮遊させ, その 1 白金耳を塗抹した。真菌では 4%

Glucose Sabouraud Broth に浮遊させた胞子液 (10⁶ 個/ml) を塗抹した。結核菌では DUBOS 培地に 37°C 10 日間培養した菌液を 2 倍希釈し (10⁷ 生菌単位/ml). 駒込ベットで 1 drop/2 ml 培地に接種した, *Trichomonas* では浅見培地に虫体 10⁶ 個/ml を接種した。

判定は一般細菌では 37°C 18 時間後, 結核菌は 2 週間後, 真菌類は 26°C 1 週間後に, また *Trichomonas* は 37°C 72 時間後にそれぞれ最少発育阻止濃度を測定した。

菌の濁度および生菌数の測定: 菌の濁度は Shimadzu Baush & Lomp の Spectro 20 光電比色計を用いて 660 mμ で測定した。生菌数は常法により寒天混釈法により測定した。

石炭酸係数測定: *Staphylococcus aureus* (209 P) を用い, 衛生検査指針にしたがって行なつた。

実験成績

[I] 試験管内抗微生物作用

Table 1 に示すように, THQ の chloride と acetate は Dequadin と同様に強力な抗菌, 抗真菌作用を示した。しかし *P. aeruginosa* や *Asp. fumigatus* には 100 mcg/ml で無効であつた。THQ の bromide は chloride および acetate より抗微生物作用は弱かつた。

[II] 抗菌作用におよぼす血清および pH の影響

pH の調整は培地に薬剤を添加したのち, N/10 NaOH と N/10 HCl とで無菌的に行なつた。pH はアルカリ性に傾くにしたがって抗菌力の増強が認められた。また血清添加による影響は 20% 添加でもわずかに抗菌力の低下がみられたにすぎなかつた。

Table 2. The influence of pH on the antimicrobial activity.

pH	Dequadin	THQ-Chloride	THQ-Bromide	THQ-Acetate
5.0	12.5*	6.25	25	6.25
6.0	0.78	0.78	6.25	0.78
7.0	0.78	0.78	6.25	0.78
8.0	0.39	0.2	1.56	0.1

Note: Test organism: *Staphylococcus aureus* 209 P.

* Each figure indicates the MIC in terms of mcg/ml.

Table 1 Antimicrobial activity of THQ-salts and Dequadin.

Test organism	Medium	Compound (mcg/ml)			
		Dequadin	THQ Chloride	THQ Bromide	THQ Acetate
<i>Sal. typhi</i>	HI	25	12.5	50	12.5
<i>Sal. paratyphi A</i>	HI	50	25	100	25
<i>Sal. paratyphi B</i>	HI	100	50	100	25
<i>Sal. typhimurium</i>	HI	100	50	100	25
<i>Sh. flexneri 2 a</i>	HI	12.5	6.25	50	6.25
<i>Sh. flexneri 3 a</i>	HI	12.5	1.56	12.5	3.12
<i>Sh. sonnei</i>	HI	25	6.25	25	3.12
<i>E. coli</i> No. 1	HI	25	12.5	50	12.5
<i>E. coli</i> No. 2	HI	25	12.5	50	12.5
<i>E. coli</i> No. 3	HI	25	12.5	100	50
<i>Ps. aeruginosa</i>	HI	100	100	100	100
<i>Kl. pneumoniae</i>	HI	50	25	100	25
<i>Pr. vulgaris</i>	HI	50	50	100	25
<i>B. subtilis</i>	HI	3.12	3.12	25	3.12
<i>S. aureus</i> 209 P	HI	0.78	0.78	3.12	0.78
<i>S. aureus</i> No. 1	HI	1.56	1.56	6.25	1.56
<i>S. aureus</i> No. 2	HI	1.56	1.56	12.5	3.12
<i>S. aureus</i> No. 3	HI	1.56	1.56	12.5	1.56
<i>St. faecalis</i>	HI	50	25	100	25
<i>St. hemolyticus</i> S-8	BH	1.56	1.56	12.5	1.56
<i>St. hemolyticus</i> Cook	BH	1.56	3.12	12.5	3.12
<i>C. diphtheriae</i> No. 1	BH	3.12	1.56	6.25	1.56
<i>C. diphtheriae</i> No. 2	BH	1.56	0.78	6.25	0.78
<i>D. pneumoniae</i>	BH	6.25	6.25	25	3.12
<i>H. influenzae</i>	BH	3.12	0.78	6.25	0.78
<i>Bor. pertussis</i>	BH	3.12	0.78	6.25	1.56
<i>V. parahaemolyticus</i>	NHI	100	100	100	100
<i>M. tuberculosis</i> H 37 Rv	KL	25	3.12	25	12.5
<i>T. asteroides</i>	GS	0.78	0.78	3.12	0.78
<i>T. interdigitale</i>	GS	0.78	0.78	3.12	1.56
<i>T. rubrum</i>	GS	0.78	0.78	6.25	1.56
<i>Can. albicans</i>	GS	3.12	3.12	12.5	3.12
<i>A. fumigatus</i>	GS	100	100	100	100
<i>Mi. gypseum</i>	GS	0.78	0.78	6.25	1.56
<i>Tri. vaginalis</i>	A	25	25	100	100

Note : HI—Heart infusion agar
 BH—Heart infusion agar containing 10% blood.
 NHI—Heart infusion agar containing 3% NaCl.
 KL—KIRCHNER medium.
 GS—4% Glucose SABOURAUD agar.
 A—Asami medium.

[III] 試験管内殺菌作用

消毒薬検定法にしたがいブドウ球菌に対する石炭酸係数を測定すると、THQ の chloride は 30, acetate は 63, Dequadin は 40 であり、acetate は Dequadin よ

り優れた値を示した。そこでさらに acetate と chloride および Dequadin の 100 mcg/ml, 50 mcg/ml のブドウ球菌に対する殺菌作用を 20°C で調べてみると Fig.1 のような成績が得られた。

Table 3. The influence of addition of serum on the antimicrobial activity.

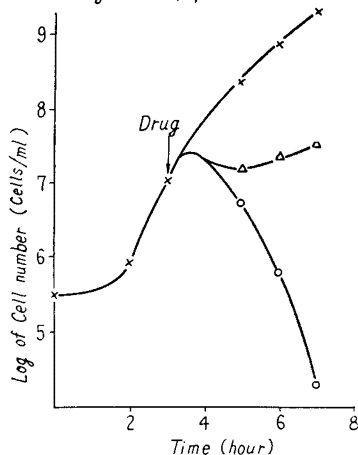
Serum added (%)	Dequadin (mcg/ml)	THQ-Chloride (mcg/ml)	THQ-Bromide (mcg/ml)	THQ-Acetate (mcg/ml)
0	0.78	0.78	6.25	0.78
5	0.78	0.78	6.25	0.78
10	1.56	1.56	6.25	0.78
20	1.56	1.56	6.25	1.56

Note: Test organism—*Staphylococcus aureus* 209 P.

Table 4. Bactericidal activity of THQ-salts against *Staphylococcus aureus*.

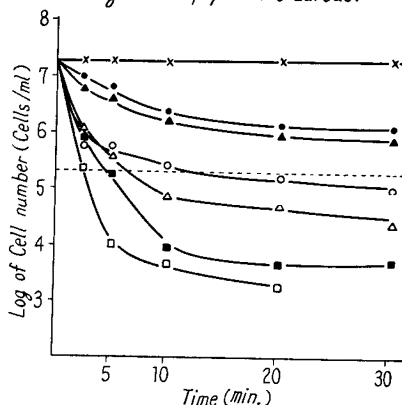
Chemical	Dilution	Time (min.)			
		2.5	5	10	15
Dequadin	×3,000	+	-	-	-
	×3,200	+	+	-	-
	×3,400	+	+	+	-
THQ-Coloride	×2,200	-	-	-	-
	×2,200	+	+	-	-
	×2,400	+	+	-	-
	×2,600	+	+	+	+
THQ-Acetate	×4,500	+	-	-	-
	×5,000	+	+	-	-
	×5,500	+	+	+	+
Phenol	×60	-	-	-	-
	×70	+	-	-	-
	×80	+	+	-	-
	×90	+	+	+	+

Fig. 3 Antimicrobial activity of THQ-salts against *Staphylococcus aureus*



Note: x-x: Control. Δ-Δ: Dequadin (25 mcg/ml). ○-○: THQ-Ac. (25 mcg/ml).

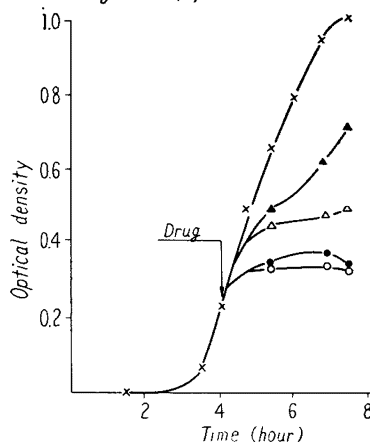
Fig. 1 Bactericidal activity of THQ-salts against *Staphylococcus aureus*.



Note: Bactericidal activity of THQ was tested at 20°C.

x-x: Control. ○-○: THQ-Cl. (100 mcg/ml). ●-●: THQ-Cl. (50 mcg/ml). Δ-Δ: Dequadin (100 mcg/ml). ▲-▲: Dequadin (50 mcg/ml). □-□: THQ-Ac. (100 mcg/ml). ■-■: THQ-Ac. (50 mcg/ml).

Fig. 2 Antimicrobial activity of THQ-salts against *Staphylococcus aureus*



Note: x-x: Control. ●-●: THQ-Ac. (12.5 mcg/ml). ▲-▲: Dequadin (12.5 mcg/ml). ○-○: THQ-Ac. (25 mcg/ml). Δ-Δ: Dequadin (25 mcg/ml).

各薬剤とも5分までは菌の急速な死滅がみられ、その後は菌の死滅は緩慢である。各薬剤の100 mcg/mlにおける99%死滅時間はTHQのacetateが約2.5分、ついでDequadinが約7.25分、chlorideが11.25分であり、同一濃度における殺菌効果はTHQ acetate > Dequadin > THQ chlorideの順であった。

また分裂増殖中のブドウ球菌にTHQ acetateの25 mcg/mlを加えるとやはり急速な菌の死滅がおこつた。その殺菌効果も同一濃度のDequadinより強力であった。

Table 5. The curative effect to the experimental Staphylococcal infection of mice.

Dose (mg/kg)	EM	THQ Chloride	THQ Acetate
12.5	3/3	3/3	3/3
0.65	3/3	3/3	3/3
0.32	2/3	1/3	3/3
0.16	1/3	1/3	0/3
0.08	1/3	0/3	0/3
None	0/3		

Note : Survival/Total

The drugs were administered intraperitoneally.

Table 6. Acute toxicity (LD₅₀) of mice.

Compound	mg/kg
Chloride	6.4
Acetate	8.7
Dequadin	10.0

Note : The drugs were administered intraperitoneally.

The VAN DER WAERDEN method was applied for determination of LD₅₀.

[IV] マウスブドウ球菌感染症に対する治療実験

3週8マウス (ICR系) に4% mucin に懸濁させた菌液を10MLD腹腔内に接種し、2時間後に薬剤溶液を同一腹腔内に投与し、48時間後にマウスの生存数を観察した。成績をTable 5に示す。

THQ chloride も acetate も Erythromycin と同様に0.63 mcg/ml でマウスを生存せしめた。

[V] 毒性

体重20g前後の8マウス (ICR系) 1群6匹を用いて腹腔内投与によるLB₅₀を測定した。成績はTable 6にみられるごとく、THQはDequadinよりいくぶん毒性が強かった。

考 察

COLLIERらはbisisoquinolinium塩について methylene 基の炭素数とその抗菌性を検討し、ブドウ球菌、赤痢菌、レンサ球菌では炭素数が8が、大腸菌では炭素数13が最も抗菌力があることを報告した。さらにCALDWELL, COX *et al.*⁷⁾はN-alkyl-4-aminoquinoline および4-aminoquinaldineの誘導体について同様にalkyl基の長さとの関係を調べている。

著者らはTHQの3種の塩について *in vitro* および *in vivo* における抗微生物作用を比較検討した。THQの3種類の塩のうちbromideはchlorideおよびacetateにくらべて抗菌力が弱かったが、後者2つはDequadinと同等の抗菌作用を示した。

マウスを用いたブドウ球菌感染治療実験では腹腔内投与でErythromycinとほぼ同程度の治療成績を得たが毒性が強く化学療法剤としての可能性はむしろ小さいと思われる。THQはDequadinと同様にpHがアルカリ性に傾くと抗菌力の増強がみられ、20%の血清添加でもわずかに影響されるだけであつた。

BABBS, COLLIER *et al.*もDequadinは血清でほとんど影響されず、胆汁、ミルク、Lecithinでわずかに影響されることを報告している。最近、安茂ら⁸⁾は6種のDecamethylene bis-4-aminoquinaldinium塩について抗菌作用を検討し、これらの薬剤は血清では影響されず、pHが酸性に傾いたり、培地中の寒天濃度を高めると抗菌力が低下することを報告した。

本実験でTHQについて行なつたpH、血清添加の影響、抗菌スペクトラム、毒性などの成績は上述の研究者らの成績と類似しており、THQはDequadinと構造もさることながら、生物学的活性もきわめて類似した化合物である。

しかし殺菌作用の成績からTHQのacetateはブドウ球菌に関する限りその殺菌力は強力であり殺菌剤として有用であると思われる。抗菌性物質は一般的に低濃度では発育阻止作用を示し、高濃度では殺菌作用を示すと考えられる。したがって殺菌的薬剤とは発育阻止濃度と殺菌濃度とがきわめて接近したものであり、静菌的薬剤とは両者間にある程度の開きがあるものと考えることができる。THQ acetateは発育阻止濃度がDequadinと同等であり殺菌濃度が低く、したがってDequadinより殺菌的な薬剤であると言える。

安茂らは6種のDecamethylene-4-aminoquinaldinium塩の抗菌性をしらべた結果、抗菌力に差異がなかつたことを報告している。本実験ではTHQのbromideが他の2者より抗菌力が弱かつた。この原因については不明であるが、イオン強度とか解離度の問題が関係しているかもしれない。

ま と め

3種のTHQ塩についてその抗微生物作用を検討した結果、次のような成績を得た。

9. THQ acetate および chloride は強力な抗微生物作用を示した。

2. THQ acetate のブドウ球菌に対する殺菌作用はDequadin および THQ chloride より強力であつた。

3. THQ 塩はpHがアルカリ性に傾くと抗菌力の増強がみられた。

4. 20%の血清添加でTHQ塩の抗菌力はほとんど影響されない。

5. マウスに対するブドウ球菌感染治療実験では、

acetate および chloride とともに Erythromycin とほぼ同等の治療効果を示した。

6. マウス腹腔内投与による LD₅₀ は acetate 8.7 mg/kg, chloride 6.4 mg/kg で Dequadin (10 mg/kg) よりわずかに強い毒性が認められた。

本論文の要旨は第 14 回日本化学療法学会東日本支部総会において発表した。

終りにあたり御指導、御校閲を得た都衛研 善養寺部長、東邦大 桑原教授に対し、また静岡薬科大 三淵教授並びに本研究の発表を許可された当社の上司のかたがた、試料を合成された当研究所 谷博士に厚く感謝する。

文 献

- 1) H. O. J. COLLIER, M. D. POTTER & E. P. TAYLOR: Antibacterial activities of some bisisoquinolinium salts. Brit. J. Pharmacol. 8, 34~37, 1953
- 2) W. A. COX & P. F. D'ARCY: The activity of polymethylene-bis-4-aminoquinaldinium salts against *Pityrosporum ovale* and *Candida albicans*. J. Pharm. Pharmacol. 13, 34~38, 1961
- 3) H. O. J. COLLIER, M. D. POTTER & E. P. TAYLOR: Antifungal activities of bisisoquinolinium and bisquinolinium salts. Brit. J. Pharmacol. 10, 343~348, 1955
- 4) W. A. COX & L. H. C. LUNTS: A note on a series of decamethylenebis [(4-substituted amino) quinaldinium] salts with potent antibacterial properties. J. Pharm. Pharmacol. 19, 155~160, 1967
- 5) M. BABBS, H. O. J. COLLIER, W. C. AUSTIN, M. D. POTTER & E. P. TAYLOR: Salts of decamethylene-bis-4-aminoquinaldinium (Dequadin), a new antimicrobial agent. J. Pharm. Pharmacol. 8, 110~119, 1956
- 6) 日野玲子: 生理的食塩水浮遊液中におけるブドウ球菌の死滅について (その1)。日本細菌学雑誌 20(5), 264~69, 1965
- 7) D. CALDWELL, W. A. COX, P. F. D'ARCY & L. R. ROWE: The antibacterial activity of new derivatives of 4-aminoquinoline and 4-aminoquinaldine. J. Pharm. Pharmacol. 13, 554~564, 1961
- 8) 安茂寿夫, 小団扇省三, 香取佐智子: 抗真菌剤の研究 (第5報) 皮膚殺菌剤としてのデカリウム塩に関する研究 (その1) デカリウム塩の抗菌作用について。薬剤学 26, 131~134, 1966

ANTIMICROBIAL ACTION OF DECAMETHYLENEBIS-(4-AMINO-5, 6, 7, 8-TETRAHYDROQUINALDINIUM) SALTS

FUJIO KOBAYASHI, MASANORI AOKI & MIWAKO TOKUNAGA

Tokyo Research Laboratories, Kowa Company, Ltd.

Three kinds of new compounds, decamethylenebis-(4-amino-5, 6, 7, 8-tetrahydroquinaldinium) salts were investigated on their antimicrobial activities *in vitro* and *in vivo*, and the results were obtained as follows:

1. THQ acetate and chloride possessed a powerful antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi.
2. The bactericidal activity of THQ acetate against *Staphylococcus aureus* was more powerful than that of dequadin and THQ chloride.
3. The antimicrobial activities of THQ salts increased in proportion to the tendency of alkalinity of pH.
4. The decrease of antimicrobial activities of THQ salts was almost none by addition of serum.
5. The antimicrobial activities of THQ salts *in vivo* were further discussed.