

原 報

高取吉太郎, 浅野進吾, 長田 慶^{*1}, 伊藤昭生: 2-アミノチアゾールのロダン化(第3報).^{*2}

化学療法剤としての2-アミノ-5-ロダンチアゾール誘導体について

Kichitaro Takatori, Shingo Asano, Kei Nagata, and Akio Ito:

Thiocyanation of 2-Aminothiazoles. III.

Research on the Derivatives of 2-Amino-5-thiocyano-thiazoles
for the Chemotherapeutic Agents.

2-Acylamido-5-thiocyano-thiazoles generally have the strong bacteriocidal activity to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Mycobacterium tuberculosis*. Also, 2-Formamido-5-thiocyano-thiazoles and 2-acetamido-5-thiocyano-thiazoles have the strong fungicidal activity to *Trichophyton*, *Candida*, *Piricularia oryzae* and *Alternaria solani*. LD₅₀ of 2-Formamido-5-thiocyano-thiazole, 2-acetamido-5-thiocyano-thiazole, and 2-acetamido-4-methyl-5-thiocyano-thiazole have been measured.

¹⁾ 第1報, ²⁾ 第2報 において報告した2-アミノ-5-ロダンチアゾール誘導体を, 化学療法剤として検討した結果をここにまとめた.

先ず球菌の代表として *Staphylococcus aureus*, 桿菌の代表として *Escherichia coli* に対する *in vitro* の抗菌力試験を行った. 検討した化合物の検体番号, 構造式を第1表に示し, 抗菌力試験の結果を第2表および第3表に示した. この結果から次のような考察をした.

(1) 2-Aminothiazole (No.1), 2-Amino-4-methyl-thiazole (No.2) は, 葡萄状球菌, 大腸菌のいずれにも殆ど抗菌作用を示さないのに, そのアミノ基をアシル化した化合物では抗菌作用を増大する. 増大の程度はアシル基の種類により異なり, 第1表の化合物では sulfanilyl>acetyl>benzoyl の順序であった. 先に松川, 伴,³⁾ 今田 はパラニトロ安息香酸アニリド類が葡萄状球菌, 肺炎双球菌に対する *in vitro* の抗菌力弱いのに, 2-(*p*-Nitrobenzamido)-thiazole は強い抗菌力を有することを報告している. 2-(*p*-Nitrobenzamido)-thiazole も 2-Aminothiazole のアシル化物である故, この点興味深い.

(2) 高取, 上田は前報⁴⁾ で, 2-Aminothiazole のモノベンゾイル化物が, そのアセチル化物とともに, 希苛性アルカリ可溶性であることを報告した. そして Sulfathiazole が Sulfabenzamide より抗菌力が大であるのも, 異項環アミンのモノアシル化物がアシルアニリドと異なり希苛性アルカリ可溶性となる性質と関連を有するのではないかと考えて, この点を報告した.

*1 旧姓小瀬

*2 第2報: 薬誌 80, 789 (1960).

1) 高取, 西田: 薬誌 71, 1367 (1951).

2) 高取, 浅野: 薬誌 80, 789 (1960).

3) 松川, 伴, 今田: 薬誌 71, 479 (1951).

4) 高取, 上田: 薬誌 71, 1374 (1951).

Table 1. Test Compounds

Test No.	Constitutions	Test No.	Constitutions
No. 1		No. 2	
No. 3		No. 4	
No. 5		No. 6	
No. 7		No. 8	
No. 9		No. 10	
No. 11		No. 12	
S. T.	Sulfathiazole		

Table 2. *Staphylococcus aureus* (Heatley) (*in vitro* tests)

Days	1 st						2 nd						3 rd						
	Molar concentration	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Test No.																			
1	-	-	++	++	++	++	-	-	##	##	##	##	-	-	##	##	##	##	##
2	-	-	++	++	++	++	-	-	##	##	##	##	-	-	##	##	##	##	##
3	-	-	-	+	++	++	-	-	++	++	++	++	-	-	##	##	##	##	##
4	-	-	±	++	++	++	-	-	++	++	++	++	-	-	##	##	##	##	##
5	-	-	-	±	++	++	-	-	-	+	++	++	-	-	-	++	++	##	##
6	-	-	-	+	++	++	-	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	##	##
7	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	##	##	##
8	-	-	-	-	±	+	-	-	-	±	+	++	-	-	-	±	##	##	##
9	-	-	-	-	-	++	-	-	-	±	++	++	-	-	-	++	##	##	##
10	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	++	##	##
11	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	##	##	##
12	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	##	##	##
S. T.	-	-	-	-	-	+	-	-	±	±	±	++	-	-	±	±	++	##	##
Control			++						##						##				

Degree of Turbidity: -None ±Slight +Perceptible ++Remarkable ##Strong

Table 3. *E. coli* (*in vitro* tests)

Days	1 st						2 nd						3 rd					
	Molar concentration						Molar concentration						Molar concentration					
Test No.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	-	-	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	-	-	##	##	##	##
2	-	-	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	-	-	##	##	##	##
3	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	++	++	-	-	##	##	##	##
4	-	-	±	+	+	++	-	-	+	++	++	++	-	-	++	##	##	##
5	-	-	-	+	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	+	++	++
6	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	##
7	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	+	##	-	-	-	-	##	##
8	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	##	##
9	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	++	++	-	-	-	##	##	##
10	-	-	-	+	++	++	-	-	+	++	++	++	-	-	++	##	##	##
11	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	##	##
12	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	++	++
S. T.	-	-	-	-	±	+	-	-	-	±	+	++	-	-	±	+	+	++
Control	++						++						##					

Degree of Turbidity: -None ±Slight +Perceptible ++Remarkable ##Strong

(3) 2-Amino-5-thiocyano-thiazole (No. 7), 2-Amino-4-methyl-5-thiocyano-thiazole (No.8) は, 葡萄状球菌, 大腸菌のいずれにも Sulfathiazole と同程度の極めて強い *in vitro* の抗菌力を示した. 5位のチオシアン基導入が著しく抗菌力を大ならしめるわけである. この両化合物の遊離アミノ基をアシル化した 2-Acetamido-5-thiocyano-thiazole (No.9), 2-Acetamido-4-methyl-5-thiocyano-thiazole (No.10), 2-Benzamido-5-thiocyano-thiazole (No.11), 2-Benzamido-4-methyl-5-thiocyano-thiazole (No.12) も, 母化合物の強い抗菌力を其の儘保有している.

第2に 2-Acetamido-5-thiocyano-thiazole (No.9), 2-Acetamido-4-methyl-5-thiocyano-thiazole (No.10) について, 結核菌に対する *in vitro* の抗菌力試験を行なった. Dubos 改変培地を用い, 人型結核菌 (Frankfurt 株) を接種し 2 週間培養後の成績を第4表に示した. 両化合物は 10⁻⁴/2 モル濃度でも抗菌作用を示し, *in vitro* で結核菌に対し強い抗菌力を有する. 先に高取, 小瀬⁵⁾ は *p*-Thiocyanoacetanilide, *p*-Thiocyanobenzanilide が *in vitro* で結核菌に対し殆ど抗菌力を有しないことを報告したが, チアゾール系ロダン化合物は芳香

Table 4. *Mycobacterium tuberculosis* (Frankfurt) (*in vitro* tests)

Test No.	Molar concentration														Control A	Control B
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ /2	10 ⁻⁴ /5	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵ /2	10 ⁻⁵ /5	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶ /2	10 ⁻⁶ /5	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷ /2	10 ⁻⁷ /5				
9	-	-	+	+	++	++	++	++	++	##	##	##	##	##	##	
10	-	-	+	+	++	++	++	++	++	##	##	##	##	##	##	

Very large growth of bacilli

++ Large growth of bacilli

+ Slight growth of bacilli

- No growth of bacilli

5) 高取, 小瀬: 葉誌 72, 113 (1952).

族系ロダン化合物と、この点で大いに性質を異にするようである。No. 9, No.10 の結核菌に対する *in vitro* 効果は大体 Thibion 程度と考えられる。

第3に我々は溶解性の関係から選んで 2-Formamido-5-thiocyano-thiazole (FART), 2-Acetamido-5-thiocyano-thiazole (AART) について、病原糸状菌として趾間白癬菌 *Trichophyton interdigitale*, カンジダ菌 *Candida albicans*, 植物病原糸状菌として稻熱病菌 *Piricularia oryzae*, 夏疫病菌 *Alternaria solani* に対する *in vitro* の抗菌力を検討した。その結果を第5表に示した。この表を見るとわかるように FART は AART より強力であり、抗糸状菌物質として極めて有望である。現在なお詳しく検討中である。

Table 5. Minimum Fungistatic Concentration (*in vitro* tests)

T. i.: *Trichophyton interdigitale*
 C. a.: *Candida albicans*
 P. o.: *Piricularia oryzae*
 A. s.: *Alternaria solani*

No.	Compound	Minimum fungistatic Concentration (γ /ml)			
		T. i.	C. a.	P. o.	A. s.
1	2-Formamido-5-thiocyano-thiazole	6.25	12.5	2.5	5
2	2-Acetamido-5-thiocyano-thiazole	50	—	5	50

最後に 2-Formamido-5-thiocyano-thiazole, 2-Acetamido-5-thiocyano-thiazole, 2-Acetamido-4-methyl-5-thiocyano-thiazole の LD₅₀ を比較すると、第6表に示すようにこの順序で毒性が大となる。2-Acetamido-4-methyl-5-thiocyano-thiazole の毒性増大は、Sulfathiazole より Methylsulfathiazole の方が毒性増大する事実と平行する。2-Formamido-5-thiocyano-thiazole の経口毒性は大ではあるが、LD₅₀96.2mg/kg と比較的他の二者より弱い故、内用化学療法剤として全く不適とはいえないと思われる。

Table 6.

No.	Compound	LD ₅₀ mg/kg
1	2-Formamido-5-thiocyano-thiazole	96.2 (経口)
2	2-Acetamido-5-thiocyano-thiazole	43 (皮下注)
3	2-Acetamido-4-methyl-5-thiocyano-thiazole	15 (皮下注)

6) なお水野伝一は、寒天平板法で組織培養した各種移植癌に対する *in vitro* のスクリーニングを約 2000 種の化合物で試みているが、その中で *p*-Thiocyano-acetanilide も強力な制癌作用を有する化合物の一つであることを報告している。もっとも石館、桜井、吉田等⁷⁾は吉田肉腫によるスクリーニングで、2-Acetamido-5-thiocyano-thiazole を陰性化合物として報告しているが、癌の種類によっては 2-Acylamido-5-thiocyano-thiazoles は有望ではないかという想定のもとに、Acyl 基を変化させて実験継続中である。

本研究の一部は昭和36年度および37年度の東海学術奨励金(中日新聞)によった。また抗菌力試験, LD₅₀ 測定実験には、名古屋市立大学医学部薬理学教室久田四郎教授、日曹生物研究所野口照久氏、山之内製薬研究所宮本文雄氏の御協力、御助言を賜った。併せ記して深甚な謝意を申し上げます。

6) Japanese Journal of Medical Science and Biology 12, 175—292 (1959).

7) 石館, 桜井, 吉田: 癌 47, 378 (1960).

実 験 の 部

(1) 葡萄状球菌, 大腸菌に対する抗菌力試験 (第2表, 第3表参照).

(a) 培養基の調製および分注 肉エキス 10 g, ペプトン 10 g, 食塩 5 g, 水 1000 ml という処方では Bouillon-Pepton 液を調製し, N/10 苛性ソーダで pH 7.0~7.2 となるように修正した. 綿栓を施し, 予かじめ乾熱滅菌せる試験管内に 4.5 ml ずつ分注後オートクレーブ中で 120° 以上 15 分間加熱滅菌した.

(b) 希釈列の調製

(i) 薬物を各 0.001 mol ずつ秤量し, その 0.001 mol が 1 ml 水溶液中に存在するようにして 1 mol 溶液を調製する. No. 3, No. 4, No. 5, No. 6, No. 9, No. 10, No. 11, No. 12 および 対照薬物である Sulfathiazole は少量の 10% 苛性ソーダ添加, No. 1, No. 2, No. 7, No. 8 は少量の 10% 塩酸添加により, 容易に 1 mol 溶液を調製する事ができた.

(ii) 薬物 1 mol 液 0.5 ml をメスピペットで採り, 培養液 (Bouillon-pepton) 4.5 ml 中に加えると 10^{-1} mol 液, 10^{-1} mol 液 0.5 ml を別の分注した Bouillon-pepton 4.5 ml 中に加えると 10^{-2} mol 液, 順次 10^{-6} mol 液迄作る. 希釈により濁りを生じた場合には希苛性ソーダあるいは希塩酸を滴下して溶消せしめる. *Staphylococcus aureus* の発育可能 pH 域は 4.5~9.8, *E. coli* は 4.6~8.8 といわれ⁸⁾, この方法で作った 10^{-2} ~ 10^{-6} mol 溶液は大体この pH 域中にあった. この希釈列を 120° 以上 15 分間滅菌した.

(c) 接種 試験前日貯蔵培養基から移して Bouillon-Pepton 中に前培養した菌を, 薬物の 10^{-1} ~ 10^{-5} mol 液に 1 白金耳づつ接種, 10^{-6} mol 液には接種しないで雑菌混入の有無を知る標識とした. 別に薬物を加えない Bouillon-Pepton 液中に菌を接種して対照とした.

(d) 成績判定 接種した希釈列を対照とともに孵卵器中に載め, 24 時間, 48 時間, 72 時間後の濁濁度を観察した. その標準は第2表, 第3表の下の欄に附記した.

(2) 結核菌に対する抗菌力試験 (第4表参照).

(a) 培養基 次のように改変した Dubos 培地を使用した.

基礎培地	KH ₂ PO ₄	1.0 g	}	を加熱して溶解する.
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6.3 g		
	味の素	2.0 g		
	蒸溜水	100 ml		

これに次のものを加える. これが基礎培地となる.

蒸溜水	850 ml	
消化カゼイン	2 g	(5% ポリタミン注射液を 40 ml)
クエン酸鉄アンモン	0.01 g	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g	(1% 溶液を 1 ml)
CaCl ₂	0.0005 g	(0.05% 溶液を 1 ml)
ZnSO ₄	0.0001 g	(0.01% 溶液を 1 ml)
CuSO ₄	0.0001 g	(" を 1 ml)

以上の混液を pH 6.8 に補正する. かくして作製された基礎培地 900 ml に Tween 80 0.5 g (10% 溶液を 5 ml) を加え, 高圧滅菌後, 葡萄糖 5 g (50% 溶液を 10 ml), 牛血清 100 ml を無菌的に添加する.

8) 伝染病研究所学友会編 “細菌学実習提要” (第9版) 26頁参照.

(b) 被検薬物希釈列の調製 被検薬物は水に難溶性故、70%アルコールに溶解、第7表、第8表の示す様に希釈列を作った。

Table 7.

2-Acetamido-5-thiocyano-thiazole の希釈

No.	希 釈 法	モル濃度
I	70% C ₂ H ₅ OH 10ml 中の検体重量 (秤取 後, 希釈する)	199mg 10 ⁻³ mol
II		99.5 $\frac{10^{-3}}{2}$
III		39.8 $\frac{10^{-3}}{5}$
IV	70% C ₂ H ₅ OH にて希釈する	Iを1:10に 10 ⁻⁴
V		IIを1:10に $\frac{10^{-4}}{2}$
VI		IIIを1:10に $\frac{10^{-4}}{5}$
VII		IVを1:10に 10 ⁻⁵
VIII		Vを1:10に $\frac{10^{-5}}{2}$
IX		VIを1:10に $\frac{10^{-5}}{5}$
X		VIIを1:10に 10 ⁻⁶
XI		VIIIを1:10に $\frac{10^{-6}}{2}$
XII		IXを1:10に $\frac{10^{-6}}{5}$

Table 8.

2-Acetamido-4-methyl-5-thiocyano-thiazole の希釈

No.	希 釈 法	モル濃度
I	70% C ₂ H ₅ OH 10ml 中の検体重量 (秤取 後, 希釈する)	213mg 10 ⁻³ mol
II		106.5 $\frac{10^{-3}}{2}$
III		42.6 $\frac{10^{-3}}{5}$
IV	70% C ₂ H ₅ OH にて希釈する	Iを1:10に 10 ⁻⁴
V		IIを1:10に $\frac{10^{-4}}{2}$
VI		IIIを1:10に $\frac{10^{-4}}{5}$
VII		IVを1:10に 10 ⁻⁵
VIII		Vを1:10に $\frac{10^{-5}}{2}$
IX		VIを1:10に $\frac{10^{-5}}{5}$
X		VIIを1:10に 10 ⁻⁶
XI		VIIIを1:10に $\frac{10^{-6}}{2}$
XII		IXを1:10に $\frac{10^{-6}}{5}$

(c) 結核菌浮游液の調製 岡, 片倉培地に3週間培養した人型結核菌 (Frankfurt株) から, 手摺法によって結核菌 1mgが1mlの生理的食塩水に浮游している菌浮游液を調製した。

(c) 希釈薬物添加培地の調製および接種 滅菌試験管 (直径16~18mm) 12本を架列し, これに各4.5mlずつの培地を分注, 先に調製した被検薬物溶液の各0.5mlずつを加え, 第9表に示すような希釈薬物添加培地の系列を得た。

Table 9. 希 釈 薬 物 添 加 培 地

試 験 管 番 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
培 地	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5	ml 4.5
被 検 薬 物 溶 液	ml I 0.5	ml II 0.5	ml III 0.5	ml IV 0.5	ml V 0.5	ml VI 0.5	ml VII 0.5	ml VIII 0.5	ml IX 0.5	ml X 0.5	ml XI 0.5	ml XII 0.5
モ ル 濃 度	mol 10 ⁻⁴	mol $\frac{10^{-4}}{2}$	mol $\frac{10^{-4}}{2}$	mol 10 ⁻⁵	mol $\frac{10^{-5}}{2}$	mol $\frac{10^{-5}}{5}$	mol 10 ⁻⁶	mol $\frac{10^{-6}}{2}$	mol $\frac{10^{-6}}{5}$	mol 10 ⁻⁷	mol $\frac{10^{-7}}{2}$	mol $\frac{10^{-7}}{5}$

別に対照として, 培地4.5mlに70%アルコール0.5mlを加えたもの(A), 及び培地5mlを分注したもの(B)を置いた。

以上のように分注後, 37° の孵卵器に蔵め, 48 時間後に無菌なることを確かめてから, 結核菌浮游液 0.1ml (=10⁻¹mg) を接種, 37° にて培養した.

(d) 成績判定 14 日後に菌の発育, 増殖の有無, 程度を肉眼的および鏡検して判定した. 判定の標準は第 4 表の下の欄に附記した.

(3) 糸状菌に対する抗菌力試験 Sabouraud の培地を用い, *Trichophyton* は 25°C 10 日間, *Candida* は 37°C 5 日間, P.o. 及び A.s. は 25°C 4 日間培養後の成績を観察した.

(4) LD₅₀ の測定 2-Formamido-5-thiocyano-thiazole (FART) と 2-Acetamido-5-thiocyano-thiazole (AART), 2-Acetamido-4-methyl-5-thiocyano-thiazole (AAMRT) は時間を異にして, 別の条件で LD₅₀ 測定が行なわれた.

(i) FART の場合 10% アラビアゴム液に薬物を分散させ, 10mg/ml の濃度の懸濁液を作り, 体重 17~22g のマウスに経口投与して, 48 時間後の急性毒性を観察した. その結果を第 10 表に示した. この結果から Litchfield-Wilcoxon 法で LD₅₀ を算出した.

Table 10. FART の急性毒性

Dose mg/kg	50	65	84.5	110	143	186	242	315
死亡率	1/10	6/10	5/10	6/10	7/10	8/10	8/10	10/10

(ii) AART, AAMRT の場合 2% アラビアゴム懸濁液を作り, 体重 20~25g のマウスに 0.2~0.4ml を皮下注射して, 48 時間後の急性毒性を観察した. その結果を第 11 表および第 12 表に示した. 此の結果から Behrens-Kärber 法で LD₅₀ を算出した.

Table 11. AART の急性毒性

Dose mg/kg	15	30	40	60
死亡率	0/4	1/4	1/4	4/4

Table 12. AAMRT の急性毒性

Dose mg/kg	5	10	15	30
死亡率	0/4	2/4	2/4	4/4

竹中英雄, 伊藤 元, 大橋 芳, 谷野孝子, 岩田博俊:

ショ糖脂肪酸エステル製の製剤学的応用研究 (第1報*)

ビタミンAの安定度におよぼす影響について

Hideo Takenaka, Hajime Ito, Kaoru Ohashi, Takako Tanino and
Hirotoishi Iwata: Studies on the Pharmaceutical
Applications of Fatty Acid Esters of Sucrose. I.
The Effect of Sucrose Fatty Acid Esters on the Stability of Vitamin A.

Fatty acid esters of sucrose are a superior surfactant compared with hitherto available surfactants. For the pharmaceutical applications of these surface-active materials, authors examined the use as a filler.

*本論文の要旨は日本薬学会東海支部例会 (1962年2月10日) において発表した.