

イソニコチン酸ヒドラジッドメタンスル フォン酸ソーダに関する研究

第1報 急性毒性試験並びに試験管内及び 動物実験による基礎的研究

東京大学伝染病研究所 臨牀研究部(部長 北本治教授)

坂 本 立 身

(受付 昭和 29 年 8 月 12 日)

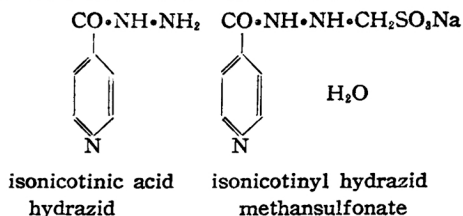
I 緒 言

Isonicotinic acid hydrazide (以下 INAH と略記する)及びその誘導体の抗結核作用については、米国の Hoffmann-La-Poche 社¹⁾²⁾³⁾, E.R. Squibb & Sons 社⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾及び独乙の Bayer 社⁸⁾の研究所で広範な研究が行われ、一応 INAH が最も優れた物質¹⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾として広く臨牀上に用いられるようになったが、その誘導体については 1-isonicotinyl-2-isopropyl hydrazine (marsilid)や1-isonicotinyl-2-glucosyl hydrazine などが有効な物質として報告されている。又 Domagk 等⁸⁾によれば Isonicotinsäurebenzylhydrazid (Isoteben), p-Oxybenzylisonicotinsäurehydrazon (F lavoteben), m-Oxybenzylisonicotinsäurehydrazon (Acroteben), p-Chlorbenzylisonicotinsäurehydrazon 等も有効であり特に Isoteben は試験管内及び動物実験においても INAH を凌駕した成績であると報告している。又 Peter P.T. 等¹¹⁾は D-Galacturonic acid isonicotinyl hydrazone はその抗菌価が高く動物に対する毒性は INAH より少ないと報告している。又 Brouet 等¹²⁾は Glycyrone lactone isonicotinyl hydrazone は抗菌価が INAH と同等であり、その LD₅₀ 値は INAH の 5~6 倍で新化学療法剤として採用されるべきものであると報告している。その後スイスの OM 社は Reazide と称するシアン醋酸ヒドラジッドを試みているがこのものは抗菌価は INAH にやや劣るけれども INAH 耐性結核菌にも作用し 1日 5mg/kg 投与では殆んど副作用が認められないといわれている¹³⁾¹⁴⁾。

北本教授及び著者等はさきに INAH の誘導体に就いて検索中¹⁵⁾ INAH のメタンスルフォン酸誘導体すなわち Isonicotinyl hydrazide methansulfonate (Na塩)(以下 IHMS と略記する)が INAH と抗菌価が等しく、マウスに対する LD₅₀ 値は INAH の 6~7 倍でその毒性が著明に少ないことを認めたので、さらに試験管内及び動物実験による基礎的研究を行った。

IHMS の化学構造は次に示す通りで無臭の白色乃至

類白色の結晶性粉末である。水にはよく溶解しアルコールにはわずかに溶けエーテルには極めて難溶である。水溶液は殆んど中性で融解点は 166°C~168°C である。



類白色の結晶性粉末である。水にはよく溶解しアルコールにはわずかに溶けエーテルには極めて難溶である。水溶液は殆んど中性で融解点は 166°C~168°C である。

II マウスにおける急性毒性試験

1) 実験方法

体重 12g 許容範囲 $\pm 2g$ のマウスを 1 群につき 8 匹とし 5 群に分つて実験した。薬剤は第一製薬の試用品を水溶液としてその所要量を 0.2cc 中に含ましめるようにし 100°C 30 分間蒸気滅菌後使用した。

薬物投与量の決定: まず予備実験としてマウス 3 匹を 1 群として 3 群に分ち、それぞれ 1000mg/kg, 1500mg/kg, 1800mg/kg の量を本実験と同一条件のもとに皮下に注射し、2 時間の観察により第 1 群は全部生存し第 2 群及び第 3 群は全部死亡することを確認して次の投与量を決定した。すなわち最少 700mg/kg より最高 1996mg/kg に至る 5 段階としその間を公比 1.3 の幾何級数的な漸増量とした。

上記水溶液 0.2cc をマウスの背部に皮下注射し 5 時間を限度として決定したが 24 時間、48 時間まで観察した。

2) 実験成績

第 1 表は各濃度におけるマウスの死亡数を示したもので 700mg/kg では全部生存しており、濃度が増すとに従

第 1 表 IHMS のマウスに対する急性毒性試験成績

投与量	700	910	1183	1538	1996	LD ₅₀
死亡数	0	3	4	7	8	1106mg/kg
使用マウス数	8	8	8	8	8	

第2表 マウスの死亡と注射後の時間との関係

時間(分)	20	30	40	50	60	70	80	90	100	120	時 2.5	3	3.5	4	4.5	5	計
投与量 mg/kg	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	910	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	3
	1183	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	4
	1538	0	0	0	0	1	2	0	1	0	3	0	0	0	0	0	7
	1996	0	0	1	0	1	0	2	0	0	1	0	1	0	1	1	8

い死亡数も増大し 1996mg/kg では全部死亡した。これより Behrens-Kärber 法により算定した LD₅₀ 値は、1106mg/kg であった。

次に急性中毒症状に就いてみると、大部分は注射後一時興奮しつつ眼をとじ安静となり次に間代性痙攣を起しこれが強直性痙攣に移行しこれを繰り返して遂に死亡した。第2表は死亡までの時間を示したもので大部分のものは2.5時間以内に死亡し、5時間以内に少数死亡しそれ以後は24時間、48時間まで観察したがいずれも死亡しなかつた。

Ⅲ 試験管内結核菌発育阻止実験

1) 実験方法

人型結核菌 H₃₇RV, H₂, Frankfurt 及び患者より分離した SM 耐性の小沢株, PAS 耐性の吉田株, SM 及び INAH に耐性である丸株について Youmaus 培地を用い INAH と IHMS とを比較実験した。すなわち Youmans 培地 5cc に INAH 及び IHMS の水溶液 0.1cc を加え培地中の濃度がそれぞれ 0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0γ/cc になるようにし、上記の各菌株を Dubas Tween Albumin 培地に7日間均等培養し、あらかじめ調製せる濃度一定の BCG 浮游液を基準として比濁法により菌量を測定し Youmans 培地 5cc に対し各菌株 0.01mg を接種した。菌接種後孵卵器にて 37°C に保ち週1回とり出して菌の増殖程度を記載し6週間観察したが判定は増殖状態のほぼ固定する3~4週後に行つた。

判定基準：北本氏の基準¹⁶⁾により主動菌・中間菌・別動菌の3つに分けて記載した。すなわち対照と同程度の発育を示すものを主動菌とし、とび離れて高濃度のところで発育してくる少数の低感受性個体を別動菌とし、その中間に位するものを中間菌としてそれぞれに対する最高発育濃度を記載した。

2) 実験成績

第3表に示したように人型結核菌 H₃₇RV, H₂, Frankfurt 及び SM 耐性小沢株, PAS 耐性吉田株に対しては、INAH と IHMS の発育阻止力に殆んど差違はなく主動菌の最高発育濃度は両者ともに 0.1γ/cc であった。しかし INAH に対し主動菌 50γ/cc, 別動菌 100

第3表 IHMS の人型結核菌標準株及び SM・PAS・INAH 耐性株に対する発育阻止作用

	INAH γ/cc			IHMS γ/cc		
	主動菌	中間菌	別動菌	主動菌	中間菌	別動菌
H ₃₇ RV	0.1	0.25	1.0	0.1	0.25	0.5
H ₂	0.1	0.25	5.1	0.1	0.25	5.0
Frankfurt	0.1	0.25	5.0	0.1	0.25	5.0
* 1 丸(SM・INAH耐性株)	50.0		100.0	100.0		
* 2 小沢(SM耐性株)	0.1			0.05		0.25
* 3 吉田(PAS耐性株)	0.1	0.25	5.0	0.1	0.25	5.0

*1 SM 耐性 主動菌 5000γ/cc 別動菌 50000γ/cc

INAH耐性 主動菌 50γ/cc 別動菌 100γ/cc

*2 SM 耐性 主動菌1000γ/cc 中間菌 5000γ/cc
別動菌 1000γ/cc

*3 PAS 耐性 主動菌 250γ/cc 別動菌 500γ/cc

γ/cc である丸株は IHMS に対してもまた主動菌 100γ/cc を示した。

Ⅳ マウス実験結核症に対する IHMS 治療実験

1) 実験方法

体重 15g 前後のマウス 120 匹を使用し、1群を 20 匹とし6群に分つて実験した。すなわち第1群は DHS M 50mg/kg, 第2群は INAH 50mg/kg, 第3群は IHMS 50mg/kg, 第4群は IHMS 100mg/kg, 第5群は IHMS 500mg/kg にて治療し第6群は非治療対照群とした。

接種菌は人型結核菌 H₃₇RV を用い 3% 小川培地にて4週間培養した集落をとり、乳鉢で磨砕し滅菌蒸留水で稀釈して、あらかじめ調製せる濃度一定の BCG 浮游液を基準として比濁法により菌量を測定し、その 0.1mg をマウスの尾静脈に接種した。

菌接種2週後より治療を開始したが薬剤の投与はすべ

て水溶液とし所要量を 0.1cc 中に含ましめるようにし、毎日 1 回マウスの大腿部皮下に注射した。

治療開始後 3 週すなわち菌接種後 5 週に各群より 4 匹ずつを屠殺し、肺・肝・脾の肉眼的病変の程度及び結核結節の多少を検し、そのうち各群 2 匹ずつに就いては肺・肝・脾の臓器結核菌定量培養を行った。

又治療開始 4 カ月後に前記同様各群より 4 匹ずつ（但し対照群は 2 匹）を屠殺し各臓器の肉眼的病変を検し、各群 2 匹ずつ（但し対照群は 1 匹）に就いては臓器結核菌定量培養を行い、又生じた集落に就いてそれぞれの治療薬剤に対する耐性測定を行った。

臓器結核菌定量培養：各臓器を乳鉢で磨碎し平等乳剤となし 1% 苛性ソーダーで 1000 倍に希釈し、その 0.1 cc を 1% 小川培地にそれぞれ 2 本ずつ培養し週 1 回孵卵器よりとり出して生じた集落数を算定し 6 週間観察したが判定は 4 週目に行った。なお治療開始 4 カ月に屠殺したマウスの臓器結核菌定量培養では生ずる集落数が少ないことを考慮して乳剤 10 倍希釈の培養をそれぞれ 1 本ずつつけ加えた。

耐性測定：Youmans 培地 5cc に各薬剤の濃度がそれぞれ 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5,

10.0Y/cc になるように加え、定量培養によりマウスより分離した各菌株を Dubos Tween Albumin 培地に 7 日間均等培養し、前記 BCG 浮遊液を基準として比濁法により菌量を測定し Youmans 培地 5cc に対してそれぞれ 0.01mg を接種し 3 乃至 4 週後に判定した。

判定の基準は前記同様の基準に従った。

2) 実験成績

治療開始 3 週後に屠殺したマウスの各臓器の剖検所見は第 4 表に示した通りで、上段は肉眼的病変の程度を示し下段は結核結節の多少を示している。いずれも一より卅までの 5 段階に分けて記載してある。すなわち対照群には著明な結核性病変が認められ、SM 50mg/kg 治療群及び IHMS 50mg/kg 治療群には軽度の病変が認められ、INAH 50mg/kg 治療群、IHMS 100mg/kg 治療群、IHMS 500mg/kg 治療群には殆んど病変が認められなかつた。

治療開始 4 カ月後に屠殺したマウスの各臓器の剖検所見は第 5 表に示した通りで、各群とも病変を認めたが対照群が最も著明でついで SM 50mg/kg 治療群、INAH 50mg/kg 治療群及び IHMS 50mg/kg 治療群で IHMS 100mg/kg 治療群及び IHMS 500mg/kg 治療群は

最も軽微であつた。

治療開始 3 週後の各臓器の結核菌定量培養成績は第 6 表に示した通りで、すべての群に結核菌を認めたが治療群では SM 50mg/kg 治療群が集落数最も多く次に INAH 50mg/kg 治療群と IHMS 50mg/kg 治療群で IHMS 100mg/kg 治療群と IHMS 500mg/kg 治療群は最も少なかつた。

治療開始 4 カ月後の各臓器の結核菌定量培養成績は第 7 表に示した通りで、対照群、SM 50mg/kg 治療群及び INAH 50mg/kg 治療群には比較的多数の集落を証明したが、IHMS 50mg/kg 治療群では 10 倍希釈で 1 集落を、IHMS 100mg/kg 治療群では 1000

第 4 表 IHMS により 3 週間治療せるマウスの剖検肉眼的所見

	SM 50 mg/kg			INAH 50 mg/kg			IHMS 50 mg/kg			IHMS 100 mg/kg			IHMS 500 mg/kg			対 照		
	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
1	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	(300)	(1400)	(350)	(250)	(550)	(100)	(350)	(800)	(250)	(250)	(1300)	(100)	(200)	(700)	(100)	(300)	(700)	(100)
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	卅
	(350)	(1000)	(300)	(-)	(-)	(250)	(200)	(1500)	(150)	(250)	(1300)	(250)	(150)	(800)	(100)	(400)	(900)	(350)
3	-	-	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	卅
4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	±	-	卅

() 内は臓器の重さ (mg) を示している

第 5 表 IHMS により 4 カ月間治療せるマウスの剖検肉眼的所見

	SM 50mg/kg			INAH 50 mg/kg			IHMS 50 mg/kg			IHMS 100 mg/kg			IHMS 500 mg/kg			対 照		
	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
1	+	-	卅	+	+	卅	-	+	+	-	+	-	-	+	-	卅	+	卅
	(300)	(650)	(250)	(400)	(1700)	(300)	(250)	(1050)	(150)	(200)	(1800)	(200)	(300)	(1500)	(200)	(700)	(2500)	(800)
2	+	+	卅	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	卅	+	卅
	(300)	(1300)	(300)	(300)	(1450)	(250)	(300)	(1100)	(200)	(300)	(1500)	(100)	(300)	(1900)	(300)	(700)	(1300)	(300)
3	±	卅	卅	±	卅	卅	+	卅	+	-	+	+	-	-	-			
	(300)	(1250)	(300)	(300)	(1550)	(350)	(200)	(1800)	(200)	(300)	(1850)	(300)	(250)	(1300)	(250)			
4	±	+	+	-	卅	-	-	+	-	-	+	-	-	±	-			
	(250)	(800)	(200)	(250)	(1800)	(100)	(300)	(1400)	(150)	(300)	(1700)	(250)	(300)	(1200)	(300)			

() 内の数字は臓器の重さ (mg) を示している

第6表 IHMS により3週間治療せるマウスの臓器結核菌定量培養成績
(1000倍稀釈4週判定)

	SM50 mg/kg			INAH 50 mg/kg			IHMS 50 mg/kg			IHMS 100 mg/kg			IHMS 500 mg/kg			対 照		
	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
1	52 67	23 28	20 32	1 1	50 50	50 50	3 7	50 40	2 10	1 0	5 7	9 2	3 0	15 30	9 3	卅 卅	卅 卅	卅 ⁺ 卅 ⁺
2	50 67	53 50	60 60	2 3	35 40	2 27	5 16	23 38	15 17	0 0	11 16	4 3	0 0	70 40	17 6	卅 ⁺ 卅 ⁺	48 30	11 6

数字はコロニー数を示し、卅は 100~300 コロニー、卅は 300コロニー以上を示している

第7表 IHMS により4カ月間治療せるマウスの臓器結核菌定量培養成績
(1000倍稀釈4週判定)

	SM50 mg/kg			INAH 50 mg/kg			IHMS 50 mg/kg			IHMS 100 mg/kg			IHMS 500 mg/kg			対 照		
	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
1	10 10	0 0	0 1	120 120	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	51 126	0 0	1 0
2	20 16	0 0	1 0	0 0	0 0	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0			

(10倍稀釈4週判定)

1	卅	0	31	卅	7	24	0	1	0	0	0	0	0	0	0	卅	11	27
2	卅	2	116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

数字はコロニー数を示し、卅は 100~300 コロニー、卅は 300コロニー以上を示している

第8表 4カ月間治療せるマウスより分離した結核菌の耐性測定成績

(1) SM 耐性

	主動菌	中間菌	別動菌
SM 50 mg/kg 群1肺	0.25		2.5
SM 50 mg/kg 群2肺	0.25		1.0
対 照 群 1肺	0.25		

(2) INAH 耐性

	主動菌	中間菌	別動菌
INAH 50 mg/kg 群1肺	0	0.75	10.0
INAH 50 mg/kg 群2肺	0		5.0
対 照 群 1肺	0		2.5

(3) IHMS 耐性

	主動菌	中間菌	別動菌
IHMS50 mg/kg 群1肝	0.1	0.25	7.5
IHMS100 mg/kg 群2肝	0.1	0.25	10.0
対 照 群 1肺	0.1	0.25	2.5

倍稀釈で1集落を認めたのみで IHMS 500mg/kg 治療群には全く集落の発生が認められなかつた。

治療開始4カ月後にマウスより分離した結核菌につい

て行つたそれぞれの治療薬剤に対する耐性測定成績は第8表に示した通りで、各群ともそれぞれの治療薬剤に対する主動菌の感受性には変化が認められなかつたが、SM 50mg/kg 治療群には 2.5Y/cc で発育する別動菌を認め、IHMS 50mg/kg 治療群には 7.5Y/cc で発育する別動菌を認め、INAH 50mg/kg 治療群及び IHMS 100 mg/kg 治療群にはそれぞれ 10.0Y/cc で発育する別動菌を認めた。

V 考案

INAH はその抗結核作用が認められて以来広く臨牀上に用いられているが、その副作用に就いても中枢神

経¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾や末梢神経²¹⁾²²⁾に対する作用を始めとして若干報告²³⁾²⁴⁾²⁵⁾がなされている。

1884年 Aminopyrin が合成されて以来これの改良が企てられ、Loening はこれから Mebubrin を合成し更に Consbruch²⁶⁾ は Sulpyrin を作った。これは鎮痛下熱作用は Aminopyrin におとらず副作用はきわめて少ないことが認められた。又 1910年 Ehrlich は Salbarsan を合成したが 1927年に至り Koller²⁷⁾ は Myosalbarsan を作った。これは前者より安定で且つ局所刺激作用少なく皮下或いは筋肉注射も可能であることが認められた。

Sulpyrin 及び Myosalbarsan の化学構造式を示すと次の通りであつて、それぞれ Aminopyrin 及び Salbarsan のメタン sulfon 酸誘導体であり、INAH のメタン sulfon 酸誘導体である IHMS が INAH に比して毒性が少ないか否かを実験することはきわめて興味のあることであつた。

INAH の皮下注射によるマウスに対する毒性に就いては Benson 等²⁾ は $160 \pm 11.2 \text{ mg/kg}$ を LD₅₀ 値として報告している。又邦製 INAH 製剤に就いては柳沢²⁸⁾ は厚生省結核療法研究協議会の報告をまとめ、製剤 16 種類に就いてマウス皮下注射による LD₅₀ 値は 142~187mg/kg であつたと報告している。これに対し

- 1952.
- 6) Bernstein, J., et al: Am. Rev. Tuber. , 67 : 354, 1953.
- 7) Bernhtein, J., et al: Am. Rev. Tuber. , 67 : 366, 1953.
- 8) G. Domagk, e tal: Beitr. Klin. Tuber., 107 : 325, 1952.
- 9) Steenken, W., et al: Am. Rev. Tuber. , 65 : 365, 1952.
- 10) Robitzek, E. H. and Selikoff, I.J.: Am.Rev. Tuber. , 65 : 402, 1952.
- 11) Peter, P. T., et al: J. Amer. pharmac. Ass-oc. , XLII-10, 612, 1953.
- 12) G. Brouet, B. N., et al : Presse med. , 61 : 863, 1953.
- 13) W. Hartl: Schweiz. Z. Tuber. , 11: 65, 1954.
- 14) H. Scheu: Schweiz. Z. Tuber. , 11: 77, 1954.
- 15) 北本外 4 名: 日本臨牀結核, 11 : 408, 1952.
- 16) 北本治: 臨牀, 6 : 334, 1953.
- 17) R.A.Hunter: Lancet, CCLXIII-6742, 960, 1953.
- 18) Conrad, K., et al: Dtsch. med. Wschr. , 78 : 604, 1953.
- 19) Stadler, L. : Dtsch. med. Wschr. , 78 : 612, 1953.
- 20) Irving J. Selikoff, et al: Am. Rev. Tuber., 67 : 212, 1953.
- 21) Bénger, P.K. et al: Dtsch. med. Wschr. , 78 : 1459, 1953.
- 22) Narold N. Lubing: Am. Rev. Tuber. , 68 : 458, 1953.
- 23) Auersbach, K.: Dtsch. med. Wschr. . 78 : 1767, 1953.
- 24) Alexander Kransnitz: Am. Rev. Tuber. , 68 : 249, 1953.
- 25) R.B. Mc Connel, et al: Lancet CCLXIII-6742, 959, 1952.
- 26) Loening: müuch. med. Wschr. , 59 : 469, 1952.
- 27) Koller: Dtsch. med. Wschr. , 53 : 475, 1927.
- 28) 柳沢謙: 日本医事新報, 1516 : 1887, 1953.

