

シアン醋酸ヒドラシッドに関する研究

高 尾 泰

東京大学伝染病研究所臨床研究部 (部長 北本 治教授)

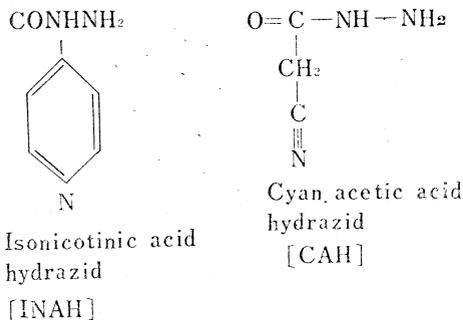
受付 昭和 31 年 8 月 21 日

I 緒 言

Isonicotizyl acid hydrazide (以下 I NH と略) およびその誘導体の抗結核作用については、従来広範な研究が行われ、先に私共も¹⁾ I NH のメタンスルホン酸誘導体すなわち Isonicotinyl hydrazide methansulfonate (以下 IHMS と略) についてその動物実験および臨床実験上毒性少なく治療効果も I NH に優るとも劣らないことを報告したが、今回は Valdecasas ら (1953)²⁾ により I NH と同様の化学療法剤であるだろうと発表され、Hartl³⁾, Scheu⁴⁾, Bavin⁵⁾, Sivrière⁶⁾, Barnett^{7,8)} により追試されたシアン醋酸誘導体すなわちシアン醋酸ヒドラシッド (Reazide) (以下 CAH と略) について、基礎的実験を施行し I NH および IHMS と比較検討した。

本薬剤は pyridin 核の N に脂肪酸の化合したもので I NH 分子の生物学的性質を備え分子量 99, 無色の結晶, 水およびアルコールに可溶であるが温度, pH および炭酸ガスにより 1 日で黄褐色となりその効力および毒性を減じ化学的にはなほだ不安定である。また化学構造式は図 1 の如くである。

図 1



II マウスにおける急性毒性試験

1) 実験方法

平均体重 15g の dd 系マウスを 1 群につき 10 匹とし 5 群に分けて実験した。薬剤は試験当日蒸留水にて溶解し, Seitz 濾過器で滅菌後稀釈使用した。薬物の投与量は最少 107mg/kg より最高 576mg/kg に至る公比 1.4 の幾何級数的漸増量とし所要量を各マウスの大腿皮下に注射し 5 時間観察しその死亡数を求めた。

2) 実験成績

表 1 に示す如く 107mg/kg では全部生存し濃度が増すに従い, 死亡数も増大し 576mg/kg では全部死亡した。これより Kälber-Behrens の方法により算定した LD₅₀ 値は 224.5mg/kg であった。なお, マウスの死亡と注射後の時間的關係は表 2 に示した。

表 1 マウス皮下注射による CAH の急性毒性試験

| 薬剤投与量 mg/kg | 107 | 150 | 210 | 294 | 411 | 576 | LD ₅₀ 値 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|
| 死亡数 | 0 | 2 | 3 | 9 | 9 | 10 | 224.5 mg/kg |
| 使用マウス数 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |

表 2 マウスの死亡と注射後の時間の関係

| 時間 (分) 投与量 mg/kg | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 150 | 300 | 計 |
|---------------------------|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 107 | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 150 | | | | | | | ● | ● | | | | | 2 |
| 210 | | | | | ● | ● | ● | ● | ● | | | | 3 |
| 294 | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | | 9 |
| 411 | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | | 9 |
| 576 | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | 10 |

●印は死亡マウス 1 匹を表わす

III 試験管内結核菌発育阻止実験

人型結核菌 H₃₇Rv 株および患者より分離せる SM, PAS, I NH 各耐性株につき I NH と CAH の抗結核作用を比較した。

1) 実験方法

Youmans 培地 5.0cc に I NH および CAH の水溶液 0.1cc を加え培地中の薬剤濃度が 0.01, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 y/cc になるようにし, これに上記の各菌株を Dubos Tween Albumin 培地に 7 日間均等培養したものを 0.01mg 接種し培養した。なお薬液調製は CAH は試験当日 Seitz 濾過器で濾過滅菌し, I NH, IHMS は蒸気滅菌し SM は無菌的に作成した。

2) 実験成績

私共の常用している法に従い, 各濃度含有培地中の 3 週後の増殖度を I NH と CAH について, 比較すると表

表3 CAHとINHのH₃₇RvおよびSM, PAS, INH各耐性株に対する発育阻止作用

| 菌株 | H ₃₇ Rv | | SM-R | | PAS-R | | INH-R | |
|-------|--------------------|------|------|-----|-------|------|-------|-----|
| | INH | CAH | INH | CAH | INH | CAH | INH | CAH |
| 0 | 8+ | Con. | 8+ | 9+ | 9+ | 9+ | 7+ | 9+ |
| 0.1 | 0 | 9+ | Con. | 9+ | 0 | 9+ | 7+ | 9+ |
| 0.5 | 0 | 9+ | 0 | 9+ | 0 | 9+ | 7+ | 9+ |
| 1.0 | 0 | 9+ | 0 | 9+ | 0 | 9+ | 3+ | 9+ |
| 2.5 | 0 | 9+ | 0 | 9+ | 0 | 8+ | 7+ | 9+ |
| 5.0 | gr 2+1 | 9+ | 0 | 8+ | 0 | 8+ | 7+ | 8+ |
| 10.0 | 0 | Con. | 0 | 2+ | 0 | Con. | 4+ | 9+ |
| 25.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9+ |
| 50.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9+ |
| 100.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

SM-R: 主動菌1000γ/cc以上 別動菌50,000γ/cc PAS-R: 主動菌50γ/cc 別動菌100γ/cc INH-R: 主動菌10γ/cc Con.: 雑菌増殖せるもの

3の如く、H₃₇Rv株に対してはINHは0.1γ/ccで完全にその発育を阻止しているのに対しCAHは10.0γ/ccないし25.0γ/ccで初めて、その発育を完全に阻止している。またSM, PAS耐性菌についてもINHは0.1ないし0.5γ/ccで完全発育阻止が認められるが、CAHは最少発育阻止濃度25.0γ/ccを示し更に10.0γ/cc INH耐性菌に対するCAHの最少発育阻止濃度は100.0γ/ccとなっている。

IV S.C.C.におけるCAHの結核菌発育阻止作用

1) 実験方法

Wrightの変法である本間の方法に従い、人型結核菌Frankfurt株およびツベルクリン反応陽性の比較的静菌力の弱い健康成人の血液を使用し、CAHとSM, INH, IHMSの静菌力を比較した。薬液調製はⅢに準じ菌液、薬液、血液混和後の最終濃度がそれぞれ0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0γ/ccとなる如くした。

判定は37°C孵卵器中にて22週間培養し一つの集落を形成する菌数を数え、80コ集落の平均を求めこれを次の6段階に分けた。すなわち対照(培養前)と同じく菌増殖をみず個々に散在するものを(-), 2~5コの菌体より成れるものを(±), 以下同様に6~10コを(+), 11~20コを(●), 21~40コを(##), 41コ以上を(###)とした。

2) 実験成績

表4に示した如くIHMS 0.1γ/cc, INH 0.25γ/cc, SM 2.5γ/ccで結核菌の発育を抑制しているのに対しCA

表4 S.C.C.における結核菌発育阻止作用

| γ/cc | 薬劑 | DHSM | INAH | IHMS | CAH |
|------|----|------|------|------|-----|
| 100 | | - | - | - | - |
| 50 | | - | - | - | ± |
| 25 | | - | - | - | ± |
| 10 | | - | - | - | ± |
| 5 | | - | - | - | ± |
| 2.5 | | - | - | - | ± |
| 1.0 | | ± | - | - | ± |
| 0.5 | | ± | - | - | ± |
| 0.25 | | ± | - | - | ± |
| 0.1 | | ± | ± | - | ± |
| 0 | | ± | ± | ± | ± |

Hは100.0γ/ccにて初めてその発育抑制が認められた。

V CAH投与後の血液の静菌作用

1) 実験方法

ツベルクリン反応陽性健康成人で比較的全血静菌力の弱い2名につきCAH 300mgを頓用させ頓用前および投与後1, 3, 6, 24時間に採血しその血液につきS.C.C.を施行した。

2) 実験成績

表5に示す如く時間的観察では300mg頓用(6.0mg/kg)では全く結核菌発育抑制は認められなかつた。

表5 CAH服用前後のS.C.C.における結核菌発育阻止作用

| 時間 | 健康人血液 | A | B |
|----|-------|---|---|
| 前 | | ± | ± |
| 1 | | ± | ± |
| 3 | | ± | ± |
| 6 | | ± | ± |
| 24 | | ± | ± |

VI マウス実験的結核症に対するCAH治療実験

1) 実験方法

平均体重20gのマウスを50匹用い各群10匹あての5群に分ち実験した。すなわち第1群はDHSM, 第2群はINH, 第3群はIHMS, 第4群はCAHを、それぞれ100mg/kgにて毎日皮下注射にて治療し、第5群は非治療対照群とした。

接種菌は予研柳沢博士より提供されたH₃₇Rv株(v.u. 1mg 14.6×10⁶)を使用し、その1mg/ccの浮游液を作り各マウスの尾静脈より0.1ccあてすなわち0.1mgあてを接種した。

菌接種2週後より毎日1回マウス大腿部に皮下注射したか薬剤はすべて水溶液とし、また化学的不安定なるC

AH は毎日新しく作り、それを Seitz で濾過滅菌して使用した。

治療開始後3週すなわち菌接種5週後に各群より5匹あてを屠殺し、肺、肝、脾の肉眼的病変の程度および結核結節の有無更に各臓器の重量を測定しまたそれぞれ臓器結核菌定量培養を行った。

臓器結核菌定量培養：各臓器全部を乳鉢で磨砕し均等乳剤となし、1%苛性ソーダで、1,000倍に稀釈しその0.1ccを1%小川培地にそれぞれ2本ずつ培養し判定は第5週の成績を以てした。

2) 実験成績

治療開始後3週間で屠殺したマウスの剖検肉眼所見は表6に示したが、臓器の腫脹の有無および結核結節の多少をそれぞれ(-), (±), (+), (H), (H)の5段階に分け記載し各臓器の重量を併記した。すなわち肉眼剖検所見で対照群と治療群では明かに前者において後者より腫脹、結核結節とも多数認められたが、各治療群に有意の差は認められなかった。上記各臓器の結核菌定量培養成績は表7の如くで CAH 治療群は対照群と同程度の治療成績で効果はほとんど認められず、SM, INH, IHMS 治療群の治療効果に比し著しく劣っているように思われる。

表6 CAHにより3週治療せるマウスの臓器肉眼所見

| マウス No. | 治療群 | DHSM 100mg/kg | | | INAH 100mg/kg | | | IHMS 100mg/kg | | | CAH 100mg/kg | | | 対 照 | | |
|---------|-----|---------------|------|-----|---------------|------|-----|---------------|------|-----|--------------|------|-----|-----|------|-----|
| | | 肺 | 肝 | 脾 | 肺 | 肝 | 脾 | 肺 | 肝 | 脾 | 肺 | 肝 | 脾 | 肺 | 肝 | 脾 |
| I | 腫脹 | - | + | H | - | + | + | - | - | + | - | - | ± | H | + | H |
| | 結節 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | ± | - | - | H | - | - |
| | 重量 | 300 | 1700 | 300 | 300 | 1700 | 200 | 300 | 1200 | 200 | 200 | 1200 | 200 | 450 | 1500 | 300 |
| II | 腫脹 | - | - | ± | - | + | + | - | - | + | - | ± | + | H | + | + |
| | 結節 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | H | - | - |
| | 重量 | 200 | 1000 | 200 | 300 | 1700 | 200 | 300 | 1700 | 200 | 300 | 1400 | 300 | 500 | 1300 | 200 |
| III | 腫脹 | - | + | ± | - | ± | + | - | - | + | - | + | H | + | + | + |
| | 結節 | - | - | - | - | - | - | ± | - | - | ± | - | - | H | - | - |
| | 重量 | 200 | 1700 | 150 | 300 | 1300 | 300 | 300 | 1100 | 300 | 400 | 2200 | 400 | 400 | 1200 | 200 |
| IV | 腫脹 | - | + | + | - | - | + | - | - | ± | - | + | + | H | + | ± |
| | 結節 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | H | - | - |
| | 重量 | 200 | 1300 | 200 | 200 | 1200 | 200 | 250 | 1800 | 300 | 400 | 1700 | 400 | 500 | 1300 | 200 |
| V | 腫脹 | - | + | + | - | ± | + | - | - | - | - | - | ± | + | H | + |
| | 結節 | ± | - | - | - | - | - | - | - | - | ± | - | - | H | - | - |
| | 重量 | 200 | 1200 | 100 | 200 | 1300 | 200 | 200 | 1500 | 200 | 400 | 1200 | 300 | 400 | 1600 | 250 |

重量単位：mg

表7 CAH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

| マウス No. | 試験管 No. | DHSM 100mg/kg | | | INAH 100mg/kg | | | IHMS 100mg/kg | | | CAH 100mg/kg | | | 対 照 | | |
|---------|---------|---------------|---|------|---------------|---|---|---------------|------|---|--------------|-----|-----|------|-----|-----|
| | | 肺 | 肝 | 脾 | 肺 | 肝 | 脾 | 肺 | 肝 | 脾 | 肺 | 肝 | 脾 | 肺 | 肝 | 脾 |
| I | 1 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 4 | 2 | 2 | 109+α | 2 | 1 | 24+α | 0 | 3 |
| | 2 | 12 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 58+α | 1+α | 0 | 7+α | | 3 |
| II | 1 | 34+α | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 70 | 1 | 2 | 49 | 0 | 2 |
| | 2 | 29+α | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3 | 1 | 53+α | 2 | 0 | 35 | 0 | 1 |
| III | 1 | 12 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 60+α | 1 | 5+α | 44 | 2+α | 0 |
| | 2 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 24+α | 7 | 0 | 11+α | 0 | 0 |
| IV | 1 | 50+α | 0 | 2 | 7 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 14 | 0 | 1 | 18+α | 1 | 2 |
| | 2 | 60+α | 0 | 3+α | 10 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 1 | 1 | 8+α | | 1 |
| V | 1 | 110+α | 3 | 5 | 0 | 1 | 0 | 3 | 10+α | 4 | 24+α | 9 | 3 | 90 | 3 | 3 |
| | 2 | 15+α | 3 | 18+α | 6 | 3 | 2 | 4+α | 14+α | 2 | 50+α | 2 | 0 | 70+α | 4 | 4+α |

数字はコロニー数を示す αは管底に密集し算定不能のもの

総括ならびに考案

I NHのシアン醋酸誘導体につき基礎的実験を施行しINHおよびIHMSと比較検討した。

急性毒性については Valdecasas ら² はラッテにおけるLD₅₀値は375mg/kg, Bavin ら⁵⁾は経口投与の場合のマウスにおけるLD₅₀値は250mg/kg, Sivrière⁶⁾はマウスにおけるLD₅₀値は325mg/kg, Barnett ら⁸⁾は同じくマウス静注によるLD₅₀値は230mg/kgと報告しているが私共が施行したマウス皮下注射によるLD₅₀値は224.5 mg/kgであった。すなわち柳沢ら⁹⁾により報告されたI NHの場合の142~187mg/kgと比較するとCAHはやや毒性が弱いようである。

次に試験管内実験については ValdecasasらはCAH水溶液は不安定で in vitro の正確な効果測定は難しいとしているが, Harth⁵⁾によると CAH の最少阻止濃度はH₃₇Rv株で5.0~10.0γ/cc, SM 100γ/cc 耐性株で10.0γ/cc, INH 100γ/cc 耐性株で20.0γ/cc, INH 10γ/cc 耐性株で5.0γ/cc, SM 100γ/cc, PAS 100γ/cc, INH 20γ/ccの三者耐性株で20.0γ/ccであったと報告しているが, Sivrière⁶⁾はCAHの最少阻止濃度がH₃₇Rv株で10γ/cc,

I NH耐性株については矢張り耐性であったと報告し, Bavin⁵⁾は同じくH₃₇Rv株で3.0γ/cc, INH 7.0γ/cc 耐性株で30.0γ/ccといい, Barnett⁸⁾は in vitro の実験でCAHが殺菌的に作用するがINHの約50倍の濃度を必要としかつ, またINHと交叉耐性を有しているが例外的に交叉耐性の認められなかつた株もあつたと報告している。著者らが行つた実験ではH₃₇Rv株に対し10.0γ/cc, SM 1000γ/cc 耐性株, PAS 50γ/cc 耐性株でそれぞれ25.0γ/cc, INH耐性株(10.0γ/cc)では100γ/ccの最少阻止濃度を示し矢張りINH耐性菌には無効の結果を得た。すなわち感受性菌に対してはCAHの効果はINHのそれに遙かに及ばず, またINH耐性菌にも交叉耐性を示し無効のように思われる。さらに著者らがS.C.C.におけるCAHの結核菌発育阻止作用をSM, INH, IHMSと比較検討したところ, IHMSが0.1γ/ccで阻止作用を認められたのに比べINH 0.25γ/cc, SM 0.25γ/ccで阻止作用を認めCAHは実に100γ/ccにて結核菌発育を阻止しえなかつた。私共はさらに人体に6.0mg/kgのCAHを頓用せしめ時間的に採血して, その血液につきS.C.C.を施行して全血の結核菌に対する阻止力を検したが, 服用後1時間より24時間に至る間全くその血液の静菌力は認められなかつた。Sivrière⁶⁾はCAHの血中濃度がINHの20倍と述べているが私共のこの実験によると血中濃度は少なくとも, 前述のCAHの最少阻止濃度以下であろうと考えられる。

動物実験ではHartl⁵⁾がモルモットを用いて感染後106日までCAHを12~30mg/kg毎日皮下注射して, 治療

した結果肉眼剖検所見ではSM治療群と同等の治療効果を認めている, またSivrière⁶⁾もモルモットに菌接種翌日から投与すれば, 結核病巣は認められず, 菌接種後30日より投与すれば小結節が脾臓に認められたにすぎないといっているが, Bavin ら⁵⁾は感染マウスを経口投与にて治療したがINHの10倍量でも, 発病を阻止しえなかつたと報告しており, またBarnett ら⁸⁾もマウスを用いての実験結核症でCAHを経口のおよび皮下注射にて, 投与したが同じくINHの10倍量以上を用いてもなおかつ発病を予防しえなかつたと報じている。私共がマウスの実験結核症について行つた実験でもCAHの効果はほとんど認められなかつた。すなわち剖検臓器肉眼所見ではINH, IHMS治療群が最も治療効果を認められ, SM治療群がこれにつきCAH治療群が最も効果が少なかつた。次に臓器定量培養成績でも矢張りINH, IHMS治療群が最も結核菌の集落数少なく, 次にSM治療群でCAH治療群の集落数は対照群のそれとほぼ同数を示しINHおよびIHMSと比較しCAH治療群は著しく治療効果が少ないように思われる。

VIII 結 語

CAHについて試験管内および動物実験による基礎的実験を行い次の成績を得た。

- 1) CAHのマウスの皮下注射におけるLD₅₀値は224.5 mg/kgであった。
- 2) CAHの試験管内結核菌発育阻止力は人型結核菌H₃₇Rv株に対しDHSM, INH, IHMSの抗結核剤のいずれよりも著しく劣り, かつSM, PAS耐性菌に対しても抗菌力弱くINH耐性菌にはほとんど無効のように思われる。
- 3) S.C.C.におけるCAHの結核菌発育阻止力もまたINH, IHMS, DHSMに比し著しく劣りかつCAHを服用せる人の全血の結核菌発育阻止力は少なくとも検査症例においては全く認められなかつた。
- 4) マウスの実験結核症に対するCAHの治療効果はINH, IHMS, DHSMに比較して著しく劣る。

本論文の要旨は昭和29年10月, 日本化学療法学会関東地方会および昭和30年4月, 同学会総会において発表した。稿を終るにあたり, 御指導と御校閲を賜つた北本教授ならびに福原博士, 更に御援助, 御協力下さつた研究室諸兄に感謝致します。

文 献

- 1) 北本治 他: Jap. J. Tuberc., 1: 92, 1953.
- 2) Valdecasas, F.G. et al. Paper read at the first meeting of spanish phys. Sci. Soc., Madrid, April, 20~23, 1953.
- 3) Hartl, W.: Schweiz. Z. Tuberk., 11: 65, 1954.

- 4) Scheu, H. : *ibid.*, 11: 77, 1954.
- 5) Bavin, E. et al. : *Lancet*, 2: 388, 1954.
- 6) Sivrière, E. : *Press. méd.*, 62: 720, 1954.
- 7) Barnett, M. : *Brit. Med. Journ.*, 2: 301, 1954.
- 8) Barnett, M. et al. : *Brit. Med. Journ.*, No. 4940 : 643, 1955.
- 9) 柳沢 謙 : *日本医事新報*, No. 1516: 1887, 昭 28.