

4,4'-Diisoamyloxythiocarbanilide (Isoxyl®) の in vitro 抗結核作用

小 関 勇 一・賀 来 隆 二

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受付 昭和 37 年 9 月 18 日

緒 言

4,4'-diisoamyloxythiocarbanilide は、チオ・尿素誘導体の一つとして Buu-Hoï (1953)¹⁾らによつて初めて合成された抗結核剤である。最初 Mayer (1941)²⁾が抗カビ剤の中から抗結核剤の開発をはかり、チオ尿素誘導体とくに 1-sulfanilyl-2-thiourea に着目した。同剤は Pichat³⁾, Celice & Boudreaux⁴⁾, Jouin & Buu-Hoï⁵⁾らにより人結核症においてもかなり効果あることが認められた。1953 年に Mayer 一門⁶⁾⁷⁾はチオ尿素誘導体の合成とその抗結核性テストを広汎に再開しとくに thiocarbanilide 族に注目すべき成績を得た。同年 Buu-Hoï & Xuong¹⁾は、Mayer らの成績を確認したのち彼らもまた多くの同系化合物の合成をすすめるにいたりそれら化合物の中に Isoxyl が加えられている。一方、Mayer らは thiocarbanilide の研究において、マウス (1954)⁸⁾とくにモルモット (1954)⁹⁾の結核で SU 1748 (Isoxyl) の効果を検討しているが、SU 1906 や他の合成剤に注目して以後の彼らの研究対象から Isoxyl は除外されている。¹⁰⁾⁻¹²⁾

これに反し Buu-Hoï (1954)¹³⁾は Isoxyl のマウスに対する無毒性を確かめたうえ、初めて臨床に用いライ患者 3 例の治療でよい成績が得られたと報告している。彼らはその後も¹⁴⁾⁻¹⁶⁾ thiocarbanilide 族の開発を続けているが、最近再び Isoxyl を単独にとり上げ in vitro および in vivo の抗結核性を報告¹⁷⁾した。その後 Freerksen ら¹⁸⁾は実験的結核症に対する Isoxyl の効果を報告し有望視している。

チオ尿素誘導体の研究は上に述べた流れのほかにも第 3 のグループすなわち、Doub ら (1958)¹⁹⁾, Youmans ら (1958)²⁰⁾によつて精力的に進められ彼らはとくに 4-(α -pyridyl)-4-isobutoxy thiourea に着目し、実験的結核症の成績から PAS より優れていると期待したが、臨床

的には無効と判定されるにいたつている²¹⁾⁻²³⁾。

以上のごとく Mayer に始まる抗結核剤としてのチオ尿素誘導体の研究は多くの曲折を経て現在に及んでいるが、いまなお抗結核剤としての評価が望まれているものの一つが Isoxyl である。われわれは本剤の分与を受け、その抗結核作用をテストする機会があつたので、ここに in vitro の成績を報告する。なお in vivo の成績は賀来²⁴⁾が他に報告する予定である。

実験材料および方法

1. 使用菌株：下記の研究室保存株をいずれも 1% 小川培地に 10~11 日間培養して接種に用いた。

実験 I ; 人型 H₃₇Rv 株 (感性), H₃₇Rv-SM 耐性 A 株 (SM 10³ mcg 不完全, 500 mcg 完全耐性) および H₃₇Rv-INH 耐性 A 株 (INH 10mcg 不完全耐性)。

実験 II ; 人型 H₃₇Rv 株, H₃₇Rv-SM 耐性 B 株 (SM 10³mcg 完全耐性), H₃₇Rv-INH 耐性 B 株 (INH50 mcg 完全耐性) および牛型 Ravenel 株 (感性)。

2. 使用培地：次の 3 種を用いた。1% 小川培地, 10% 馬血清加 Kirchner 半流動培地および Dubos 液体培地 (Tween 80 を除く)。

3. Isoxyl 含有培地の作り方：Isoxyl は分子量 400 の白色粉末結晶で水に不溶、アルコールに可溶、エーテルに易溶である。実験 I では Tacquet ら¹⁸⁾の方法に準じて Isoxyl の稀積液を作つたが実験 II では稀積にすべてエタノールを用いた。

実験 I ; Isoxyl 50 mg を 90% エタノール 25 ml に 37°C 加温で溶解し 2 mg/ml とした。これを滅菌蒸溜水で 8 倍稀釈し 250 mcg/ml とし (白濁を生ず), 以下逐次、滅菌蒸溜水を用いて所要培地濃度の 25 倍濃度懸濁液を調製した。1% 小川培地の場合は上記液をいずれも培地 1/25 量ずつ原液に混入後、卵液を加え分注、凝固した。Kirchner 半流動培地および Dubos 培地ではあらか

Yuichi KOSEKI and Ryuji KAKU (Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kami-osaki-Chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan): In Vitro Activity of 4,4'-Diisoamyloxythiocarbanilide (Isoxyl®) against Mycobacterium Tuberculosis. —Kekkaku, 38(2): 62~66, 1963.

* Isoxyl®: Continental Pharma (ベルギー)。

Table 1. Growth Inhibitory Effect of Isoxyl against Tubercle Bacilli H₃₇Rv Strain and Its Streptomycin-Resistant and Isoniazid-Resistant Variants (Exp. I)

Strain	Inoculum size (mg)	Medium	Drug concentration (mcg/ml)						
			0	0.25	0.5	1	2.5	5	10
H ₃₇ Rv	10 ⁻¹	Ogawa's Kirchner's Dubos'	4+ 4+ 4+	n* 4+ 4+	n 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 3+ 3+	4+ 2+ 2+
	10 ⁻³	Ogawa's Kirchner's Dubos'	2+ 2+ 2+	n 2+ 2+	n 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 1+ 1+
H ₃₇ Rv SM-R (A)	10 ⁻¹	Ogawa's Kirchner's Dubos'	4+ 4+ 4+	n 4+ 4+	n 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 3+	4+ 3+ 3+	4+ 3+ 1+
	10 ⁻³	Ogawa's Kirchner's Dubos'	2+ 2+ 2+	n 2+ 2+	n 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 1+	2+ 2+ 1+	2+ 2+ 1+
H ₃₇ Rv INH-R (A)	10 ⁻¹	Ogawa's Kirchner's Dubos'	4+ 4+ 4+	n 4+ 4+	n 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 3+ 3+	4+ 2+ 3+	4+ 1+ ±

Readings were made after three weeks of incubation.
*n = not tested.

Table 2. Growth Inhibitory Effect of Isoxyl against Tubercle Bacilli H₃₇Rv Strain, Its Streptomycin-Resistant and Isoniazid-Resistant Variants, and Ravenel Strain (Exp. II)

Strain	Inoculum size (mg)	Medium	Drug concentration (mcg/ml)							
			0	0.25	0.5	1	2.5	5	10	25
H ₃₇ Rv	10 ⁻¹	Ogawa's Kirchner's Dubos'	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 3+ 4+	4+ 2+ 3+	4+ 2+ 1+	3+ 0
	10 ⁻³	Ogawa's Kirchner's Dubos'	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 1+ 2+	2+ 37 2+	2+ 7 1+	1+ 0
H ₃₇ Rv SM-R (B)	10 ⁻¹	Ogawa's Kirchner's Dubos'	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 3+	4+ 4+ 3+	4+ 4+ 3+	4+ 4+ 3+	4+ 4+ 3+	4+ 3+ 2+	4+ 18 1+
	10 ⁻³	Ogawa's Kirchner's Dubos'	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 1+ 1+	2+ 0 ±
H ₃₇ Rv INH-R (B)	10 ⁻¹	Ogawa's Kirchner's Dubos'	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 4+ 4+	4+ 3+ 3+	4+ 2+ 2+	4+ 0 1+
	10 ⁻³	Ogawa's Kirchner's Dubos'	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 2+ 2+	2+ 1+ 1+	2+ 1+ 0	1+ 0
Ravenel	10 ⁻¹ 10 ⁻³	Kirchner's Kirchner's	4+ 2+	n* n	3+ 2+	3+ 2+	3+ 2+	2+ 1+	0 0	n n

Readings were made after three weeks of incubation.
n* = not tested.

じめ中試験管に 5 ml ずつ分注した培地に 1/25 量すなわち 0.2 ml ずつ注加し所要濃度含有培地とした。

実験Ⅱ ; Isoxyl 5 mg/ml-99.5% エタノール溶液を作
り、これより 99.5% エタノールを用いて階段稀釈し、

所要濃度の 50 倍系列を作った。これらエタノール溶液を実験 I 場合と同じ操作で各種培地に培地 1/50 量ずつ加えて Isoxyl 含有培地とした。

4. 菌液の調製 : 水晶球入り丸コルベン手振り法により上記培養菌から 1 mg/ml 菌浮游液を作った。

5. 判定 : 37°C 3 週培養成績で判定した。

実験成績

実験 I ; H₃₇Rv 株とその SM 耐性および INH 耐性 3 株を用いて Isoxyl の発育阻止作用を検討した。培地に薬剤を含有させるさい、Isoxyl 2 mg/ml- エタノール溶液より滅菌蒸溜水を用いて階段稀釈液を作ったが、最初の稀釈によつてすでに稀釈液に白濁結晶を生ずるので出来あがつた薬剤含有培地中の Isoxyl 濃度にはかなりの不正確さが予想される。3 週培養の判定成績を表 1 に示す。

表に示したごとく Isoxyl の in vitro 抗菌力はかなり弱い。すなわち、1% 小川培地上では 10 mcg/ml でも全く阻止作用がみられず、Kirchner 半流動、Dubos 培地では 5 (2.5) ~ 10 mcg/ml で軽度ないし中等度の阻止が認められるにとどまる。SM, INH の各耐性株も感性株とおおよそ同じ感受性を示すと思われた。

実験Ⅱ : この実験では培地混入用 Isoxyl 溶液の調製に、溶媒として純エタノールを用い階段稀釈にもすべてエタノールを使用した。したがつて薬剤含有培地中の Isoxyl 濃度は実験 I に比し正確であるが、約 2%

のエタノールが培地に混入している。

H₃₇Rv, H₃₇Rv-SM 耐性 B, H₃₇Rv-INH 耐性 B 株ならびに人型 Ravenel 株に対する Isoxyl の阻止作用を 3 週で判定した成績が表 2 である。

Table 3. Estimated Number of Viable Cells per Milligram of Bacterium in Bacterial Suspensions Used in Experiment I and II

Exp.	Bacterial suspension (Strain)	Control medium used		
		Ogawa's	Kirchner's	Kirchner's with 2% ethanol
I	H ₃₇ Rv	3.5 × 10 ⁶	7 × 10 ⁶	n*
	H ₃₇ Rv SM-R(A)	6.5 × 10 ⁶	9 × 10 ⁶	n
	H ₃₇ Rv INH-R(A)	10.5 × 10 ⁶	n	n
II	H ₃₇ Rv	6 × 10 ⁶	3.5 × 10 ⁶	8 × 10 ⁶
	H ₃₇ Rv SM-R(B)	15 × 10 ⁶	22 × 10 ⁶	28.5 × 10 ⁶
	H ₃₇ Rv INH-R(B)	5 × 10 ⁶	15 × 10 ⁶	10 × 10 ⁶
	Ravenel	n	12.7 × 10 ⁵	n

n* = not tested.

Table 4. Influence of Initial pH on Growth of Tubercle Bacilli H₃₇Rv Strain in Kirchner's Semiliquid Medium with and without Isoxyl

Inoculum size (mg)	Initial pH of medium	Drug concentration (mcg/ml)							
		0	0.25	0.5	1	2.5	5	10	25
10 ⁻³	6.8	2+	n*	n	n	2	1+	18	5.7
	5.9	(2+)	n	(2+)	(2+)	(2+)	(1+)	(±)	(0)
10 ⁻⁵	6.8	1+	n	n	n	5.3	1.3	0	0
	5.9	(1+)	n	(±)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
10 ⁻⁶	6.8	12.7	n	n	n	n	n	n	n
	5.9	(0)	n	n	n	n	n	n	n

Readings were made after three weeks of incubation in pH 6.8 medium and after four weeks of incubation (parenthesized) in pH 5.9 medium.

n* = not tested.

実験 I におけると同じく Isoxyl の in vitro 抗菌力は 1% 小川培地では 25 mcg/ml までほとんど認められない。Kirchner 半流動および Dubos 培地では 5~10 mcg/ml で軽度ないし中等度の阻止, 25 mcg/ml ではじめて高度ないし完全阻止がみられる。用いた菌株間の感受性差は著明でない。ただ牛型 Ravenel 株は Kirchner 半流動培地で 10 mcg/ml による完全阻止をうけ他の菌株に比しやや感受性が強く現われているが, 表 3 に示すごとく接種生菌数が他に較べてやや少ないので断言できない。

表 3 は両実験に用いた各菌液の生菌単位 (V. U./mg) を対照培地を用いて求めた成績であるが, 実験 II におけるエタノール混入 (2%) の影響は少なくとも生菌数推定に関するかぎり無視しうることが分かる。ただし菌の発育速度をかなり抑制する。

考 察

Isoxyl の in vitro 抗菌力について記載があるのは, Tacquet ら¹⁸⁾の報告のみであるが, 彼らの成績の与える印象は, 以上述べたわれわれの成績と著しく異なっている。彼らの成績によると Dubos 液体培地 (Tween 80 を除く) では, 保存株の H₃₇Rv, BCG および Ravenel (いずれも感性ならびに INH 耐性株) を 1/2 × 10⁻³ mg

接種した場合, 0.5~1 mcg/ml で発育阻止がみられ, また患者からの分離菌 69 株を 1/2 × 10⁻¹ mg 接種した場合 2 mcg/ml に発育しえたのは約 1/7 すなわち 10 株にとどまり, 5 mcg/ml では全株が発育阻止されたとして述べている。

これに反しわれわれの場合は, 少量接種量 10⁻³ mg, 大量 10⁻¹ mg でいずれも彼らの 2 倍量ではあるが最小発育阻止濃度は 25 mcg/ml あるいは > 25 mcg/ml であり, 阻止力の表現に大きな差がみられる。この差がいかなる原因に基づくか 2, 3 の考察を加えたい。

i) 判定をわれわれは各培地とも 3 週で行なつたが Tacquet らは 2 週で行なつていいる。培養 2 週は対照培地における菌の増殖がまだ盛んに営まれている時期でわれわれは培養 3 週を判定時期に選んだ。この 1 週間の差が発育の読みに大きな影響を与えるだろうと推定される。ことに Tacquet らが報告の中で, Isoxyl の培地中力価は 37 °C 1 週間の保存で約 1/10 に減弱するとしているがこれが正しいとすれば上の推定はより確かと思われる。次に

ii) 接種菌量であるが, 大量接種のさいは一般に最小阻止濃度は高い値をとる。この場合, 接種生菌数も菌量 (mg) に劣らず重要な要因であるが彼らの報告には Tween-albumin 液体培地の 10 日菌を用いたとあるのみで生菌単位の明記がなくわれわれの成績と直接比較しがたい。

iii) Isoxyl の抗菌力に影響する因子の一つとして彼らは培地 pH をあげている。Dubos 液体培地 (Tween 80 を除く) における H₃₇Rv 株に対する Isoxyl の抗菌力は, pH 6.3~6.8~7.0 でもつとも弱く, pH 5.9 および pH 7.5 でもつとも強く現われたと述べている。しかし後者 2 つの pH は結核菌発育に不利な条件であり彼らのごとく 2 週培養で判定すれば当然最小阻止濃度は低い値を示すはずである。この点を確かめるためわれわれは, Kirchner 半流動培地の pH を 5.9 および 6.8 の 2 点に選び H₃₇Rv 株に対する Isoxyl の抗菌力をしらべた (表 4)。表に明らかなごとく, pH 5.9 の対照培地では菌の発育がきわめて悪く 4 週培養で判定してもなお pH 6.8 対照培地の 3 週成績に較べて劣っている。このことは菌の発育を抑制した状態で抗菌力の強弱を推論するのは不当であることを示している。

iv) 培地の種類について一言すると, Tacquet らは H₃₇Rv (1/2 × 10⁻³ mg) を接種培養したさい, 血液加 Youmans 培地では 5 mcg/ml, Dubos 培地では 0.5

mcg/ml で発育が阻止されたが、Löwenstein 培地では 10 mcg/ml でも阻止されなかつたと述べている。われわれの3週判定成績でも小川培地では明らかに阻止作用が弱く、卵培地に関するかぎり同じ傾向が認められた。

以上の考察から Tacquet らとわれわれの成績の相違は、主として判定時期の違いにも基づき、さらに接種菌量(あるいは菌数)の差も関与しているのではないかと推定される。

結 論

人型結核菌 H₃₇Rv 株ならびにその SM および INH 耐性株、また一部実験に牛型 Ravenel 株を用いて Isoxyl の in vitro 発育阻止作用を調べた。3週判定で1%小川培地の場合は 25 mcg/ml までほとんど阻止作用が認められず、Kirchner 半流動培地および Dubos 液体培地(Tween 80 を含まず)では 5~10 mcg/ml で軽度ないし中等度の阻止、25 mcg/ml で初めて強度ないし完全阻止が認められた。用いた菌株間の感受性差は著明でない。

以上要約すれば、Isoxyl の in vitro 抗結核作用は弱いと結論される。

終りに御校閲下さった室橋部長ならびに Disoxyl を分与された明治製薬株式会社に感謝する。

文 献

- 1) Buu-Hoï, N. P. et Xuong, N. D.: Compt. Rend. Acad. Sci., 237 : 498, 1953.
- 2) Mayer, R. L.: Rev. Méd. France, 9 : 393, 1941.
- 3) Pichat, P.: Compt. Rend. Soc. Biol., 139 : 124, 1945.
- 4) Celice, J. et Boudreaux, J.: Gaz. Méd. France, 53 : 113, 1946.
- 5) Jouin, J. P. et Buu-Hoï, N. P.: Ann. Inst. Pasteur, 72 : 580, 1946.
- 6) Mayer, R. L., Eisman, P. C., and Konopka, E. A.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 82 : 769, 1953.
- 7) Huebner, C. F., Marsh, J. L., Mizsoni, R. H., Mull, R. P., Schroeder, D. C., Troxell, H. A., and Scholz, C. R.: J. Amer. Chem. Soc., 75 : 2274, 1953.
- 8) Eisman, P. C., Konopka, E. A., and Mayer, R. L.: Am. Rev. Tuberc., 70 : 121, 1954.
- 9) Konopka, E. A., Eisman, P. C., Mayer, R. L., Parker, F., and Robbins, S. L.: Am. Rev. Tuberc., 70 : 130, 1954.
- 10) Konopka, E. A., Gisi, T., Eisman, P. C., and Mayer, R. L.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 89 : 388, 1955.
- 11) Mayer, R. L., Eisman, P. C., Gisi, T. A., and Konopka, E. A.: Am. Rev. Tuberc., 77 : 694, 1958.
- 12) Mayer, R. L., Eisman, P. C., Geftic, S., and Konopka, E. A.: Intern. J. Leprosy, 27 : 8, 1959.
- 13) Buu-Hoï, N. P.: Intern. J. Leprosy, 22 : 16, 1954.
- 14) Buu-Hoï, N. P., Xuong, N. D., Nam, N. H., Gazave, J. M., Pillot, J. et Schembri, L.: - Experientia, 11 : 97, 1955.
- 15) Buu-Hoï, N. P., Xuong, N. D., and Nam, N. H.: J. Chem. Soc. London, 1573, 1955.
- 16) Buu-Hoï, N. P., Danthinne, P. et Xuong, N. D.: Experientia, 12 : 102, 1956.
- 17) Tacquet, A., Macquet, V., Buu-Hoï, N. et Xuong, N. D.: Ann. Inst. Pasteur de Lille, 10 : 43, 1958~1959.
- 18) Freerksen, E. and Rosenfeld, M.: Arzneimittelforschung, 12 : 280, 1962.
- 19) Doub, L., Richardson, L. M., Herbst, D. R., Black, M. L., Stevenson, O. L., Bambas, L. L., Youmans, G. P., and Youmans, A. S.: J. Amer. Chem. Soc., 80 : 2205, 1958.
- 20) Youmans, G. P., Youmans, A. S., and Doub, L.: Amer. Rev. Tuberc., 77 : 301, 1958.
- 21) Schmidt, L. H., Grover, A. A., and Hoffmann, R.: Tr. Eighteenth Conf. on Chemoth. of TB., 312, 1959.
- 22) Donohoe, R. F., Katz, S., Duke, C. J., and Romansky, M. J.: Tr. Eighteenth Conf. on Chemoth. of TB., 317, 1959.
- 23) Larkin, J. C.: Tr. Eighteenth Conf. on Chemoth. of TB., 324, 1959.
- 24) 賀来隆二: 結核, 38 : 67, 昭 38.

In Vitro Activity of 4,4'-Diisoamyloxythiocarbonyl (Isoxyl) against Mycobacterium Tuberculosis.

Growth inhibitory effect of Isoxyl was observed in vitro using human strain H₃₇Rv, its variants resistant to streptomycin or isoniazid, and bovine

strain Ravenel. Three types of media were used: Ogawa egg medium, Kirchner semisolid medium with 10% horse serum added, and Dubos liquid medium without Tween 80. The drug concentrations incorporated in these media were 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, and 25 mcg per ml, respectively. Bacterial suspension was prepared from 10- to 11-day-old culture grown on Ogawa egg medium and the inoculation was made in large and small amounts, 10^{-1} mg and 10^{-3} mg. Growth recording was made on the twenty-first day of incubation at 37°C.

The result was as follows:

In the case of Ogawa egg medium, there was no growth inhibition even in the presence of 25 mcg per ml of the drug. In both Kirchner semi-solid medium and Dubos liquid medium, slight to moderate inhibition was recognized at the concentrations of 5 and 10 mcg per ml and marked or complete inhibition in the presence of 25 mcg per ml of Isoxyl. There was no definite difference among the six strains tested with respect to susceptibility to the drug.

In short, the in vitro activity of Isoxyl against tubercle bacilli was considered to be less striking.