

## 結核感染マウスに対する 4,4'-Diisoamyloxythio- carbanilide (Isoxyl<sup>®</sup>)\* の効果

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 20 日

Buu-Hoi<sup>1)</sup> らによつて合成されたチオウレアの二重置換誘導体 4,4'-Diisoamyloxythiocarbanilide (Isoxyl<sup>®</sup>, Disoxyl<sup>®</sup>) (以下 Isoxyl と略) の生体内抗菌活性は、はじめ抗癩化学療法剤<sup>2)3)</sup> としてとりあげられていたが、Tacquet, Macquet<sup>4)</sup> らによつて, *in vitro* および *in vivo* での結核菌に対する抗菌力について発表されてより、結核症に対する新化学療法剤としても注目されるようになった。その後 Freerksen<sup>5)</sup> らも動物実験を行なつた結果、抗菌力は INH や streptomycin には劣るけれども、“miner” 級の抗結核剤としての効果を認めている。

著者も Isoxyl の分与を受け、主として動物実験を行なつたが、これに先立つて行なわれた Isoxyl の試験管内実験の成績は、その結核菌発育阻止力が比較的弱いことを示した。すなわち Isoxyl は水に難溶性のため ethanol を溶剤として、キルヒナー半流動培地を用いて結核菌に対する発育阻止力をしらべたが、H<sub>37</sub>Rv 株は 25~50 mcg/ml, Ravenel 株は 10 mcg/ml でそれぞれ発育が阻止され、その抗菌力は弱いものであつた。また小関<sup>6)</sup> らも、Tacquet<sup>4)</sup> らと同様の実験手技で行なつた試験管内実験で、著者の成績と同等の抗菌力しか認めていない。

このように、試験管内で弱い抗菌力しか示さない Isoxyl を用いて、動物実験を行なつたが、実験目標を ①延命効果の有無による Isoxyl の抗菌力判定および既知抗結核剤との比較、②臓器定量培養による Isoxyl の治療効果の確認、③Isoxyl と同様に、構造中にチオ尿素基を有する Thiocetazon (以下 Tbl と略) に耐性の結核菌感染マウスに対する Isoxyl の延命効果の有無の検討におくこととした。

### 実験材料および方法

使用動物： 体重約 20 g の dd/Y 系♂マウス  
感染に使用した結核菌株：

- 1) 牛型結核菌 Ravenel 株 (実験 I および II)
- 2) Tbl 耐性牛型結核菌 Ravenel 株 (実験 III)  
Tbl 100mcg/ml 含有 1% 小川培地よりの one-step 分離株。

2% Albumin (栄研) 加 Sauton 培地に 7~10 日表面培養した上記 2 菌株の菌膜を、濾紙吸湿後、水晶球入り丸コルペンにて形のごとく菌液をつくり、実験目的に応じて、適当な菌量をマウスの静脈内に感染した。感染後、表 1、表 2、表 4 に示したデザインによつてマウスを群分し、感染翌日から、経口的に各濃度の各薬剤をそれぞれ 1 日 1 回投与した。実験 I では週 6 回 2 週間、実験 II および III では週 6 回 3 週間続けた。

Isoxyl は水に難溶のため、Tacquet<sup>4)</sup> らは蒸溜水に懸濁してモルモットに経口的に投与しているが、著者の経験では、蒸溜水懸濁法では Isoxyl が水層上に分離し、動物に投与可能な懸濁状態となしえなかつたので、Rhuland<sup>7)</sup> らが streptovaricin を懸濁した方法にならう。2.5% ゼラチン溶液を使用した。この方法で良好な Isoxyl 懸濁液を作製することができたので、それを投与した。また対照薬剤として用いた Tbl および Ethioniamide も同様に 2.5% ゼラチン溶液に懸濁し、INH のみは蒸溜水に溶解して使用した。

実験 I および実験 III では感染後のマウスの死亡匹数および生存日数を記録し、実験 II では薬剤投与中止後 2 日目に全動物を屠殺し、剖検して内臓所見を肉眼的に観察したのち、肺、脾の定量培養を行なつた。すなわち肺、脾とも全臓器を使用し、1% NaOH 液を加えつつ 100 mg/ml 乳剤とし、蒸溜水で 10 倍稀釈を行なつて、適当稀釈のものを 1% 小川培地に接種した。37°C に 3 週間培養後、発生集落数を数えて、臓器 10 mg 中の生存菌数を算定した。

Ryuji KAKU (Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki-Chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan): Effect of 4,4'-Diisoamyloxythiocarbanilide (Isoxyl<sup>®</sup>) in Experimental Tuberculosis of Mice. —Kekkaku, 38 (2): 67~72, 1963.

\* Isoxyl<sup>®</sup>: Continental Pharma (ベルギー) の商品名。

実験成績および考察

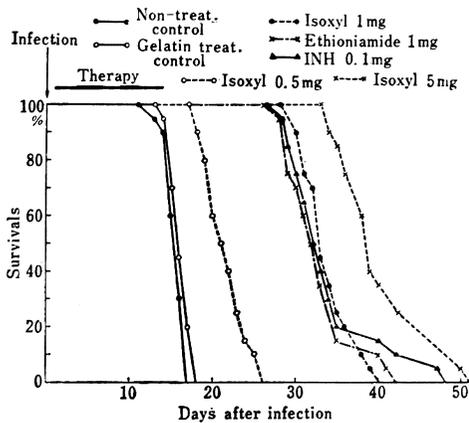
実験1：マウスの生存日数差による Isoxyl の抗結核菌力判定。

表1に示したデザインのもとにこの実験を行なった。すなわち Ravelen 株で感染 (感染生菌単位数  $8.6 \times 10^6$ ) した140匹のマウスを20匹ずつ7群に分け。このうちの3群に Isoxyl, 1群に INH, 1群に Ethioniamide を投与し, 薬剤を投与しない対照群として, 薬剤の懸濁に使用した2.5%ゼラチン溶液のみ投与の群と, 無処置群との2群をおいた。

Table 1. Design for the First Experiment

Infected intravenously with	Group (Number of animals)	Treated with	Administration dose/mouse/day
Mycob. Tub. var. bovis (Ravelen) $8.6 \times 10^6$ v. u.	20	Isoxyl	5 mg
	20	Isoxyl	1 mg
	20	Isoxyl	0.5 mg
	20	INH	0.1 mg
	20	Ethioniamide	1 mg
	20	2.5% soln. of gelatin	0.2 ml
	20	Control	None

Fig. 1. Effect of Isoxyl against Experimental Tuberculous Infection in Mice (Exp. 1)



感染後の各群マウスの survival curve は図1のごとくである。無処置対照およびゼラチン投与照群のマウスは, 感染後12~13日目から死亡しはじめて18日目までに全動物が死亡し, 平均生存日数 (ST<sub>50</sub>) が, 14.7 ± 1.4 日および, 15.3 ± 1.22 日であった。これに対し, Isoxyl 投与群では0.5 mg/mouse の最少投与量群でも, その ST<sub>50</sub> は 20.7 ± 2.49 日と延命され, 対照群との間に推計学的に有意の差がみられ, また 1 mg/mouse では, ST<sub>50</sub> はさらに延長されて, 32.8 ± 2.99 日となり, 明らかな延命効果が認められた。

この Isoxyl の延命効果, 換言すれば, in vivo にお

ける Isoxyl の抗結核菌力を INH および Ethioniamide と比較すると, Isoxyl 1 mg/mouse 投与群の survival curve は INH 0.1 mg/mouse 投与群および Ethioniamide 1 mg/mouse 投与群のそれとほとんど重なり, この3群の ST<sub>50</sub> はそれぞれ 32.8 ± 2.99 日, 32.8 ± 5.09 日および 31.7 ± 3.79 日であった。

この成績からみれば, Isoxyl の in vivo での抗結核菌力は Ethioniamide のそれと等しく, INH の 1/10 程度の活性を有していると思われる。

Isoxyl 5 mg/mouse 投与群が以上の群より長く生存したのはもちろんであり, しかも急性毒性, 遷延性毒性および頻回投与による慢性毒性と思われる所見もみられなかった。

また Ethioniamide と INH との抗結核菌力の差はマウスを用いた Rist<sup>9)</sup> らの実験成績と同じく, Ethioniamide は INH の 1/10 程度の抗菌力であった。

なお Isoxyl および Ethioniamide の懸濁に使用した2.5%ゼラチン溶液自身は, マウスに感染した結核菌の増殖にならぬの影響をも及ぼさないことが分かったので, 以後の実験にはゼラチン投与対照群をおかず, 無処置対照群のみをおいた。

実験II：臓器定量培養法による Isoxyl の抗結核菌力の判定。

実験IIのデザインは表2に示した。この実験では実験Iに対照薬剤として使用した INH の代りに Tb1 投与群をおいたが, これは Isoxyl との抗菌力を比較する目的と同時に, Tb1 耐性菌感染実験を行なうに先立ち, その Tb1 投与量が感性菌感染マウスに有効な量であることを確認する目的のためでもある。

Fig. 2. Average Body Weight Change of Four Groups of Tuberculous Mice Treated with Isoxyl Tb1, 1314 Th and of Non-treated Control (Exp. 2)

Infected intravenously with Ravelen strain

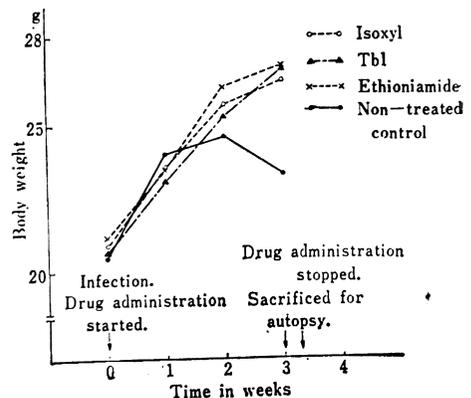


Table 2. Design for the Second Experiment

Infected intra-venously with	Group (Number of animals)	Treated with	Administration dose/mouse/day
Ravenel strain 2×10 <sup>6</sup> v. u.	10	Isoxyl	1 mg
	10	Tb1	1 mg
	10	Ethioniamide	1 mg
	10	Control	None

まず Isoxyl 投与, Tb1 投与, Ethioniamide 投与および無処置対照の4群のマウスの, 感染後3週目までの平均体重の推移をみると, 図2に示したごとくである。薬剤を投与した3群ともに体重は増加し続けているが, 無処置対照群では感染後2週目まで増加していた体重

Table 3. Numbers of Viable Bacterial Units Recoverd from the Lung and Spleen of the Mice (Exp. 2)

Number indicates viable bacterial units in 10 mg of the tissue

Groups	Mouse No.	Organ	
		Lung	Spleen
Non-treated control	1	335,000	7,000
	2	425,000	14,500
	3	1,000,000	20,000
	4	310,000	54,000
	5	>2,000,000	72,000
	6	>2,000,000	27,000
	7	700,000	14,000
	8	>3,000,000	41,500
	9	265,000	11,000
Isoxyl	11	950	7,000
	12	7,000	3,500
	13	7,000	10,500
	14	4,100	4,000
	15	34,000	66,000
	16	22,000	32,000
	17	14,500	13,500
	18	650	1,700
	19	10,500	4,600
	20	1,500	3,150
Tb1	21	1,950	2,400
	22	5,000	3,800
	23	1,950	2,500
	24	3,600	4,750
	25	19,000	6,000
	26	5,500	5,050
	27	2,550	3,000
	28	1,400	4,450
	29	9,000	2,400
	30	1,500	/
	Ethioniamide	31	53,000
32		12,000	900
33		650	3,250
34		9,500	2,200
35		11,000	3,700
36		10,000	5,500
37		7,000	8,500
38		32,500	2,050
39		7,000	2,700
40		16,500	4,100

が, 3週目には下降を始めている。この体重の推移のみからでも Isoxyl の有効なことが推定できる。

この4群のマウスを菌感染後23日目に屠殺し, 肺および脾 10 mg 中の生菌単位数をしらべた結果は表3のごとくである。

剖検時の肺の肉眼的所見を結核結節の多寡により (+)-(卅) の4段階で記載すれば,

無処置対照群の肺所見はすべて(卅)で, 高度の結核進展像がみられるが, Isoxyl, Tb1 および Ethioniamide 投与3群のそれは(+)-(卅)であり, また肺の平均重量も, 無処置対照群が約 377 mg であったのに対し, 薬剤投与3群中もつとも重かつた Ethioniamide 投与群ですら約 217 mg であった。

臓器定量培養成績とこれらの所見からみて, Isoxyl 1 mg/mouse の投与はマウス実験的結核症に対して治療効果のあることがより明らかになったと同時に, マウス肺内の生菌単位数でも, Isoxyl は Ethioniamide の抗菌力とほぼ等しいことが確認された。

また Tb1 1 mg 投与は Isoxyl や Ethioniamide の 1 mg 投与よりすぐれた抗菌力を示した。そこで実験Ⅲにおいて, Tb1 耐性菌感染マウスに処置する Tb1 の投与量も 1 mg/mouse とすることにした。

実験Ⅲ: Tb1 耐性 Ravenel 株を感染した結核感染マウスに対する Isoxyl の延命効果。

一般に, ある薬剤に対する耐性の交叉性をしらべるには, まず in vitro での実験が行なわれるのが普通であるが, 上述のように in vitro における Isoxyl の抗菌力は弱く, しかも菌発育阻止を示す濃度と, 培地中に Isoxyl が析出してくる濃度とが非常に接近しているため, 他の薬剤耐性菌との交叉性を in vitro で明らかにすることができなかつた。そこでその検査の場を in vivo に移し, 表4に示すデザインにより実験を行なつた。

感染に使用した Tb1 耐性 Ravenel 株は Tb1 100 mcg/ml 含有1%小川培地より one-step で分離した株である。

Isoxyl 投与, Tb1 投与, Ethioniamide 投与および無処置対照の4群の平均体重の推移は図3のごとくで, 菌接種3週後まで体重の増加がみられたものは Ethioniamide 投与群のみであり, Isoxyl の 1 mg/mouse を投与(実験Ⅰ, Ⅱで感性 Ravenel 株感染マウスに対し有効と確認された投与量)しても, 感染後3週後には平均体重が感染前体重よりも低下し, しかも 3/10 のマウスが生存しているのみであつた。これらのマウスの生存日数を survival curve で示したものが, 図4である。

この図4で明らかのように, Isoxyl 1 mg 投与群の survival curve は無処置対照群のそれとほとんど等しく, ST<sub>50</sub> でも全く延命効果が認められなかつた。これ

Table 4. Design for the Third Experiment

Infected intravenously with	Group (Number of animals)	Treatment with	Administration dose/mouse/day
Tb 1-resistant Ravenel strain $9 \times 10^5$ v. u.	10	Isoxyl	1 mg
	10	Ethioniamide	1 mg
	10	Tb 1	1 mg
	10	Control	None

Fig. 3. Average Body Weight Change of Four Groups of Tuberculous Mice Treated with Isoxyl, Tb1, 1314 Th and of Non-treated Control (Exp. 3)

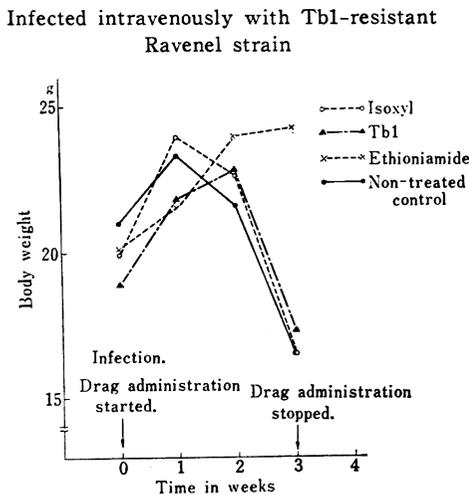
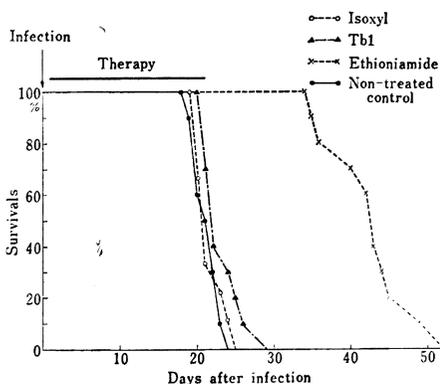


Fig. 4. The Effectiveness of Isoxyl in Mice Infected with Tb1-resistant Strain of Ravenel (Exp. 3)



に対し、in vivo で Tb1 耐性となつた菌に対しては耐性が交叉するが in vitro で分離された Tb1 耐性菌に対しては耐性が交叉しないと報告<sup>9)~12)</sup>されている Ethioniamide を投与した群のみは明らかに生存日数の延長を示した。

このことから Isoxyl は Tb1 耐性菌に対しては無効であり、Tb1 耐性菌は Isoxyl に対しても耐性であるこ

とは明らかである。

この感染実験に使用した Ravenel R-Tb1 株の in vitro での耐性度検査は行なわなかつたが、感性 Ravenel 株感染マウスに対しては十分な治療効果を示した投与量の Tb1 1 mg/mouse (実験 II) で処置した群に、無処置対照群とほとんど差のない死亡がみられていることから、この実験目的には十分な Tb1 耐性株であつたとみなすことができる。

Mayer<sup>13)~15)</sup> らは、チオ尿素誘導体の抗結核菌力を検討し、Diphenylthiourea の誘導体が一般に強い抗菌力を有することを報告し、Youmans<sup>16)</sup> らも Thiocarbanilide 類の抗菌力を認め、その後 Thiocarbanilide 化合物の一つである Thiocarbanidine の抗結核菌作用が追求<sup>17)18)</sup> され Steenken<sup>19)20)</sup> は、Thiocarbanidine は Tb1 耐性 H<sub>37</sub>Rv 株の発育を阻止しえなかつたと報告している。このことから Thiocarbanidine と同様に Thiocarbanilide 化合物の一つである Isoxyl が Tb1 耐性菌を阻止しえないであろうことは予想されたことである。

以上 Isoxyl の in vivo における抗結核菌力に関する実験成績を述べたが、とくに注目すべきことは in vitro での抗菌力の弱さに比べて in vivo での抗菌力が意外に強力なことである。

著者および小関<sup>6)</sup>らの in vitro における抗菌力と、結核菌に対する最少発育阻止濃度が 0.5 mcg/ml であるという Tacquet<sup>4)</sup> らの in vitro での成績との抗菌力出現の差違の原因については明らかでないが、彼らが in vivo での抗菌力試験のために、皮内に H<sub>37</sub>Rv 株を接種したモルモットに Isoxyl を経口的に投与し、皮膚に形成する結核性潰瘍の大きさを測定して Isoxyl の抗菌力を検討した実験では、10 mg/kg の投与ですら潰瘍の縮小がみられ、50 mg/kg により一層明白な潰瘍縮小が認められたと報告している。

またマウスを使用した Freerksen<sup>9)</sup>によれば、Isoxyl 100 mg/kg の投与は PAS 500 mg/kg 投与よりすぐれ、Ethioniamide 50 mg/kg とほぼ等しい延命効果を示したという。Isoxyl 1 mg を体重約 20 g のマウスに投与して (約 50 mg/kg) 明らかな延命効果を認めた筆者の実験成績もほぼこれと一致している。

これらのことから、in vitro で弱い抗菌力しか示しえないサンプルは、in vivo test まで行なわずに捨て去られている現行の抗結核化学療法剤の screening test 法にも一考を要する点があると思われる。

## 結 論

Thiourea の二重置換誘導体である 4-44' Diisoamyloxy thiocarbanilide (Isoxyl<sup>®</sup>, Disoxyl<sup>®</sup>) の in vivo における抗結核菌力を検した結果。

1) 薬剤感受性菌感染によるマウスの実験的結核症に対する Isoxyl の抗菌力は、延命効果でみても、臓器定量培養成績によつても 1 mg/mouse (50 mg/kg) の経口投与により明らかに示され、その抗菌力は Ethioniamide のそれとほぼ等しく、INH の 1/10 に相当した。

2) Tb1 耐性菌感染マウスに対しては、1 mg/mouse 投与で全く延命効果がみられず、Tb1 耐性菌は Isoxyl にもまた耐性であることが分かった。

3) in vitro で分離された Tb1 耐性菌は、Ethioniamide との交叉の場を in vivo で行なつても、Ethioniamide に感受性であつた。

4) in vitro で弱い抗結核菌力しか示さない化学療法剤でも、in vivo で強い抗結核菌力を示す可能性が示唆され、in vitro での screening test のみでは in vivo で強い抗菌力を発揮する薬剤を見落とすおそれがあると推察される。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜つた予研結核部室橋部長、金井室長ならびに小関室長に深謝するとともに、実験に協力された岡本技官ならびに Isoxyl の分与を載いた明治製菓に深く謝意を表す。

#### 文 献

- 1) Buu-Hoi, N.P. et Dat-Xuong, N. : C.R. Acad. Sciences, 237 : 498, 1953.
- 2) Buu-Hoi, N.P. : Internat. J. Leprosy, 22 : 16, 1954.
- 3) Buu-Hoi, N.P. : Maroc Médical, 36 : 1084, 1957.
- 4) Tacquet, A., Macquet, V., Buu-Hoi, N.P. et Dat-Xuong, N. : Ann. L'institut Pasteur Lille, 40 : 43, 1958~9.
- 5) Freerksen, E. and Rosenfeld, N. : The 16th. Internat. Tuberc. Conf. in Toront, September 1961.
- 6) 小関勇一・賀来隆二 : 未発表.
- 7) Rhuland, L.E and Stern, K.F. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 588, 1957.
- 8) Grumbach, F., Rist, N., Libermann, D., Moyeux, M., Cals, S. et Clavel, S. : C.R. Acad. Sciences, 244 : 2187, 1956.
- 9) Rist, N., et al. : Press Med., 67 : 625, 1959.
- 10) Bartmann, K. : Tuberkulosearzt, 14 : 525, 1960.
- 11) 東村道雄 : 結核, 36 : 733, 1961.
- 12) 東村道雄 : 結核, 37 : 103, 1962.
- 13) Mayer, R.L., Eisman, P.C. and Konapka, E.A. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 77 : 47, 1951.
- 14) Eisman, P.C., Konapka, E.A. and Mayer, R.L. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 121, 1954.
- 15) Konapka, E.A., Eisman, P.C., Mayer, R.L., Parker, F. Jr. and Robbins, S.L. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 130, 1954.
- 16) Youmans, G.P., Youmans, A.S. and Doub, L. : Am. Rev. Tuberc., 77 : 301, 1958.
- 17) Doub, L., Richardson, L.M., Herbst, G.R., Black, M.L., Stevenson, O.L., Bambas, L.L., Youmans, G.P. and Youmans, A.S. : J. Am. Chem. Soc., 80 : 2205, 1958.
- 18) Youmans, G.P., Youmans, A.S. and Doub, L. : Tr. 17th. Conferens on Chemotherapy of Tuberculosis, Veterans Administration-Armed Forces, p. 365, 1958.
- 19) Steenken, W. Jr., Montalbino, V., Smith, M.M. and Wolinsky, E. : ibid., p. 368, 1958.
- 20) Steenken, W. Jr., et al. : Am. Rev. Tuberc., 78 : 570, 1958.

#### Effect of 4-4' Diisoamyloxythiocarbanilide (Isoxyl®) in Experimental Tuberculosis of Mice.

Isoxyl is a di-substituted derivative of thiourea and was prepared by Buu-Hoi et al. Chemically it is 4-4' Diisoamyloxythiocarbanilide.

Isoxyl is of particular interest because of its antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* as minutely demonstrated by the *in vitro* and *in vivo* experiments made by Tacquet et al.

This paper is concerned with the confirmation of therapeutic effect of Isoxyl against experimental mouse tuberculosis.

1) Isoxyl treatment of mice infected with the drug-susceptible Ravenel strain of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*.

Albino dd/Y male strain of mice were intravenously infected and drug administration was initiated a day after the infection. These one hundred mice were divided into five subgroups of each twenty. Three groups of them were treated with Isoxyl in a dose of 0.5, 1 or 5 mg per mouse respectively. Another group was treated with 0.1 mg of isoniazid and still another group with 1 mg of ethioniamide as the positive control. Isoxyl and ethioniamide

were suspended in a 2.5 per cent water solution of gelatin and isoniazid was used as a water solution. Besides these groups, a non-treated control group and a gelatin-administered group were arranged.

Under these conditions, the non-treated control had an average survival time of  $14.7 \pm 1.4$  days and the gelatin control had an average survival time of  $15.3 \pm 1.22$  days before succumbing to their disease. In the group administered with Isoxyl in a dose of 1 mg for a period of three weeks, all of the animals survived  $32.8 \pm 2.99$  days on the average. The efficacy of Isoxyl as revealed by this prolongation of survival time is almost equivalent to that of 1 mg of ethioniamide or 0.1 mg of isoniazid. (Fig. 1).

Thus, it will be seen that Isoxyl is ten time less active than isoniazid, but much the same as ethioniamide in dose level. The same dose-efficacy relation was obtained in the additional experiment in which viable bacterial counting of homogenized organs was conducted instead of observing survival days. (Table 3).

2) Antibacterial activity of Isoxyl against the animals infected with Tb1 resistant tubercle bacillus.

A Tb1-resistant strain isolated from Ravenel strain in a single-step on glycerol egg medium (Ogawa's) containing 100mcg Tb1 per ml was used in this experiment. Forty mice were infected intravenously with the above strain. The animals were divided into four groups of ten each and treatment was started on a day after the infection. One group was left untreated as control. The remaining three groups were treated as follows :

Group 1. 1 mg per mouse of Isoxyl once daily orally.

Group 2. 1 mg of ethioniamide once daily orally.

Group 3. 1 mg of Tb1 once daily orally.

Treatment was continued for three weeks.

Average survival time in each group was as follows :

Control	$21.4 \pm 1.63$ days
Isoxyl	$21.7 \pm 1.87$ days
Tb1	$23.2 \pm 2.37$ days
ethioniamide	$42.8 \pm 5.09$ days

It will be seen that Isoxyl has not antibacterial activity against the Tb1 resistant microorganisms.