

Cinnamic acid hydrazide 誘導体の抗結核性に関する研究

金井 興美・小関 勇一・室橋 豊穂

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受付 昭和 38 年 11 月 28 日

抗酸菌あるいは結核菌に対してのみ有効な狭い抗菌スペクトルをもつ抗生物質は、これまでしばしば報告されているが、このような物質は現在臨床的価値をもちえなくても、将来この菌属の物質代謝その他の研究面に寄与する可能性をもっている。最近、Ohkuma ら¹⁾によつてはじめて分離され、Tuberin と命名された新抗生物質も、抗酸菌に対してのみ抗菌力を発揮するが、このものの化学構造は Anzai²⁾³⁾ によつて trans-p-methoxystyrylamine であることが証明され、trans-p-methoxycinnamic acid より合成された。

この構造決定にいたる予備段階において、いろいろの近縁物質あるいは合成への中間物質がつくられたが、著者らは cinnamic acid hydrazide を中心とするそれらの材料の抗結核性を検討する機会を得たので、その成績をここに報告する。

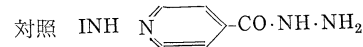
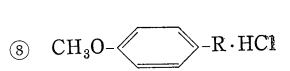
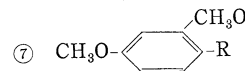
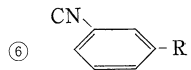
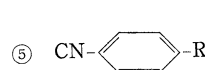
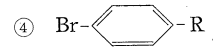
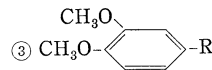
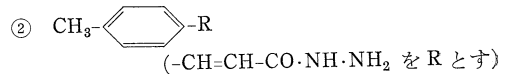
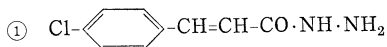
実験材料および方法

使用菌株：保存菌株である人型結核菌 H37R_v およびその isoniazid 耐性変異株 H37R_v INH-R を試験管内実験に使用し、マウス感染実験には牛型結核菌 Ravenel 株を用いた。

使用培地：抗菌力を検討する試験管内実験のためには、Kirchner 半流動培地 (Kirchner 液体培地の塩類組成に馬血清 10%，寒天 0.1%，マラカイトグリーン 4 r/ml に含む) を中試験管に 5 ml ずつ分注して用いた。動物実験における臓器よりの感染菌分離培養には、原液に KH₂PO₄ を 1% に含有する小川鶏卵培地を使用した。

動物：体重 18±2g の市販 dd 系マウスの雄を使用した。固型飼料と水とで飼育した。

被検薬剤：次の 8 種類の合成品の抗結核菌力を INH を対照として検討した。



動物実験による抗結核性検討のためには、このうち① (p-chlorocinnamoyl hydrazide), ② (p-methylcinnamic acid hydrazide), および p-methoxycinnamoyl hydrazide を選び、これにさらに cinnamic acid hydrazide を加えて、INH, 1314 TH を対照として実験を行なった。

薬剤を培地に加えるには次のごとくにした。蒸留水に対する溶解性は⑧と INH を除いてはすべて難溶である。一方、エタノールには③, ⑤, ⑥を除いてはかなりよく溶解し、原液として 6.4 mg/ml 溶液をつくりえた。上記 3 剤のうち⑤は 0.8 mg/ml エタノール溶液となりえたが、③, ⑥はともにさらに難溶であつた。しかし溶剤を統一する目的でこの 2 剤にもエタノールを使用し、比較的均等な浮游液として③の場合は 6.4 mg/ml 浮游液, ⑥では 3.2 mg/ml 浮游液を作り、それぞれ原液とした。各薬剤とも原液から 2 倍稀釈のエタノール溶液 (ないし浮游液) 系列をつくり、いずれも 0.1 ml ずつ上記培地に注加し、標準系列として 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 mcg/ml 薬剤含有培地を調製した。なお、対照培地にもエタノールを 0.1 ml 加えて用いた。

水難溶性の化学合成品を動物に経口投与するには、これを乳鉢中でよく磨砕しつつ 2% のゼラチン溶液を加え

て均等に浮遊せしめ、その濃度は0.2 ml 中に一回投与量が含有されるようにした。INH は蒸留水に溶解せしめて同様の方法で投与した。経口投与はゾンデを用いて行なつた。

菌液調製：水晶球入り丸コルベンを用い手振り法で均等な 1 mg/ml 菌浮遊液を調製した。試験管内実験に用いた菌は、いずれも小川培地上 10 日発育菌であり、動物実験のものは、Sauton 合成液体培地上に 10~14 日発育の菌膜から得た。

成績判定：試験管内実験は、37°C 3 週培養の読みで判定したが、発育がないか、あるいは少数の集落しか発育しなかつた培地は 4 週の成績も加え判定した。動物実験は 2 mg 菌量静注後の致死感染に対する延命効果、あるいは 0.01 mg 静注後の脾内感染菌数増殖阻止効果より、薬剤投与の有効性を判定した。投与は感染翌日より開始し、2 週間連日行なつた。脾からの感染菌分離は感染翌日および以後 1 週ごとに、各群より 2~3 匹を剖検し、脾全体を乳鉢中に入れ、はじめに蒸留水、のちに 1% NaOH を加えて 10 倍乳剤とし、以後蒸留水による 10 倍連続稀釈液として、それらを 0.1 ml ずつ小川培地に接種培養し、発育集落数より脾全体の感染菌数を算出した。

実験成績

Table 1 に試験管内実験の成績を総括して示した。菌接種 4 週後の最少発育阻止濃度をもつて比較したが、対照として用いた INH の 0.08 mcg/ml に比べてはるかに高濃度であり、8~16 mcg/ml が中心で 4, 32 mcg/ml のものがそれぞれ一つあつた。さらに興味があることは、INH 耐性菌に対してこれらの cinnamic acid hydrazide 誘導体は効力が弱く、INH と耐性が部分的に交叉している現象である。すなわち、H37R_v INH-R 株は、原株 H37R_v に比べて 800 倍も INH に耐性となつているが、同時に 8 種の cinnamic acid hydrazide 誘導体に対しても多少なりとも耐性上昇し、数倍から 30 倍の程度である。また、培地には 2% にアルコールが混入したが、対照培地において比較したところ、アルコールによる発生集落数の変化はみられず、ただ発育速度が多少おくれる程度であつた。

Table 1. Growth-Inhibitory Activity *in vitro* of the Derivatives of Cinnamic Acid Hydrazide against H37R_v and its Variant Strain Resistant to INH

Drug examined	Minimum inhibitory concentration (mcg/ml) against	
	H37R _v	H37R _v INH-R
1	8	128
2	8	128
3	16	128
4	8	64
5	>16*	>64*
6	16	>16*
7	32	128
8	4	128
9	0.08	64

Note: Size of inoculum was 0.001 mg per tube.

* The highest level was not determined due to the insolubility of the drugs.

R----- -CH=CH-CO-NH-NH₂

マウス実験結核症に対する効果試験は 2 度行なつたが、これらの実験様式は、Table 2 と 3 に示し、その結果は Fig. 1 (A, B) と Fig. 2 に示した。Fig. 1 (A) は延命効果に関する検討であるが、対照群は 10 日間ですべて死亡し、感染のきわめて強度であつたことが知られるが、1314 TH 2 mg 投与群、INH 0.1 mg 投与群は感染 23 日目においてそれぞれ 100%、70% の生残率を示し、これらの抗結核剤のきわめて有効なることを証明している。一方、被検 cinnamic acid hydrazide 誘導体 4 種による治療群は、すべて対照群よりすみやかに死亡し、投与による全身状態の悪化が認められた。これらの薬剤の毒性が、感染による致死過程を早めたものと考えられる。Fig. 1 (B) は感染菌増殖阻止効果をみたものであるが、この場合は感染量 0.01 mg で早急に感染死を来たさなかつたが、被検薬剤投与群は実験終了前に死亡するものがあり、脾における感染菌数の消長を 4 週まで追求することができなかつた。しかしいずれにせよ、INH、1314 TH に比べて、これら cinnamic acid hydrazide 誘導体の増殖阻止効果は弱く、しかも、毒性を軽減するため投与量を減少せしめる必要性が示唆された。この意味で、マウスでの実験 2 は Table 3 に示すごとく、感染量を前実験の 1/4 の 0.5 mg とし、同時に、投与量をそれぞれ 0.5 mg とした。Fig. 2 に示すごとく

Table 2. Design for Mouse Experiment I

Group Number	Number of mice used	Subgrouped into equal half	Intravenous size of inoculum (mg)	Treated with	Evaluation of effectiveness
1	40	20	2	None	For control
		20	0.01		
2	20	10	2	Cinnamic acid hydrazide 2 mg orally	% Survival Fate of bacilli
		10	0.01		
3	20	10	2	p-chlorocinnamoyl hydrazide 2 mg orally	% Survival Fate of bacilli
		10	0.01		
4	20	10	2	p-methoxycinnamoyl hydrazide 2 mg orally	% Survival Fate of bacilli
		10	0.01		
5	20	10	2	p-methylcinnamic acid hydrazide 2 mg orally	% Survival Fate of bacilli
		10	0.01		
6	20	10	2	INH 0.1 mg intraperitoneally	% Survival Fate of bacilli
		10	0.01		
7	20	10	2	1314 TH 2 mg orally	% Survival Fate of bacilli
		10	0.01		

Table 3. Design for Mouse Experiment II

Group	Number of mice used	Size of intravenous inoculum	Treatment	Evaluation of effectiveness
1	20	0.5 mg of a bovine type of tubercle bacilli (Ravenel strain)	None	% Survival
2	10		INH 0.5 mg orally	
3	10		1314 TH 1.0 mg orally	
4	10		Cinnamic acid hydrazide 0.5 mg orally	
5	10		p-methoxycinnamoyl hydrazide 0.5 mg orally	
6	10		p-methylcinnamic acid hydrazide 0.5 mg orally	
7	10		p-chlorocinnamoyl hydrazide 0.5 mg orally	

く、対照群は18日より27日にかけて全部死亡したが、実験1に比べれば感染度の弱いことが分かる。しかし、被検4剤投与群のうち、p-methoxycinnamoyl hydrazide 投与群を除いた3群は、それぞれ対照群より少し早めに全動物死亡し、これらの薬剤の無効性と、この投与量における多少の毒性の存在が実証された。INH、1314 TH はそれぞれその顕著な治療効果が表現されている。

考 察

以上の成績から、被検 cinnamic acid hydrazide 誘導体が抗結核薬として臨床的に用いられる可能性はないものといえるが、興味ある副次的所見として hydrazide をその構造中にもつため、これらの薬剤が INH と部分的に耐性が交叉することに注目したい。このことは、イソニコチン酸の誘導体と考えられる 1314 TH が、INH

と耐性交叉しない事実とあわせて、細菌の薬剤耐性問題に示唆する点もあり、同時に、今後この系統の新しい抗結核剤を合成していくうえに、参考とすべき点であろう。in vitro の効力の強いものをとくに選んで動物実験を行なったのであるが、それらの LD₅₀ は腹腔内で 200 mg/kg 以上であり⁴⁾、1回注射では当然耐えられる量、すなわち1匹当り 2mg、あるいは 0.5 mg を1日量として用いたが、投与を繰返すことによつて慢性毒性が発現した。この慢性毒性はわれわれが新抗結核薬探索にあつてしばしばぶつかる問題であつて、このため多くの物質が実用的価値を失つた。最近われわれの研究室で扱つた in vitro できわめて強力な抗結核菌力をもつ Ilamycin⁵⁾⁶⁾ もその1例である。また、in vitro の抗菌力がそのまま in vivo の抗菌力とならないことも当然であつて、新抗結核剤探索にあつてはいろいろ問題点が多い。cinnamic acid hydrazide 誘導体の実用的価値

はともかくとして、新抗生物質の化学構造より合成剤としての化学療法剤への発展という1例をここに報告し、将来の参考としたい。また逆に、新抗結核性抗生物質 Questionmycin の構造が明らかにされたとき、それはわれわれが以前検討したことのある Orthoaminophenol であったという経験もある⁷⁾。

結 論

新抗結核菌性抗生物質 Tuberin (trans-p-methoxystyrylamine) の化学構造決定にさいして合成された8種類の cinnamic acid hydrazide 誘導体について、試験管内抗菌力を検討し、これらが4~32 mcg/ml に最少発育阻止濃度をもつて、有毒結核菌に有効であることが証明された。しかし、これらの化合物は INH と耐性が部分的に交叉し、またそのうち発育阻止効果の強いものも、マウス実験結核症に対しては無効であり、慢性毒性のため実用的価値はないと考えられる。

Studies on the Antituberculous Activity of the Derivatives of Cinnamic Acid Hydrazide.

Recently, a new antituberculous antibiotic was isolated by Ohkuma et al.¹⁾ and named as Tuberin. The chemical structure of Tuberin was then indentified as trans-p-methoxystyrylamine and it was synthesized from trans-p-methoxycinnamic acid by Anzai²⁾. In the course of this chemical research, some derivatives of cinnamic acid hydrazide were prepared as the intermediate compounds to Tuberin synthesis by him. The present authors had an opportunity to examine those compounds *in vitro* and *in vivo* for antituberculous activity. The minimum inhibitory concentrations against H37R_v and its iso-

Cinnamic acid hydrazide を提供された理研鈴木博士、安斉博士に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Ohkuma, K., et al.: J. Antibiotics Ser. A, 15: 115, 昭37.
- 2) Anzai, K.: J. Antibiotics Ser. A, 15: 117, 昭37.
- 3) Anzai, K.: J. Antibiotics Ser. A, 15: 123, 昭37.
- 4) Anzai, K.: 私信, 昭37.
- 5) 賀来隆二: J. Antibiotics Ser. B, 16: 93, 昭38.
- 6) 賀来隆二: J. Antibiotics Ser. B, 16: 99, 昭38.
- 7) Anzai, K., et al.: J. Antibiotics Ser. A, B: 125, 昭35.

niazid-resistant variant strain (H37R_v INH-R) in Kirchner semisolid agar medium are as shown in Table 1, namely they are ranging from 4 to 32 mcg/ml against H37R_v. Of particular interest is the fact that H37R_v INH-R is more or less resistant to those derivatives of cinnamic acid hydrazide. The antituberculous activity against experimental mouse tuberculosis of the derivatives was examined two times in the designs as shown in Table 2 and 3, and the results are presented in Fig. 1 and 2. It will be seen from these figures that the test samples have chronic toxicity and are not effective against intravenous infection of mice. The compounds would not have practical value.