

α -ethyl-thio-isonicotinamide-sulphoxide の抗結核菌作用について

山崎正保・古川佳也・奥田良雄
遠藤一男・中野真人

国立療養所刀根山病院 (院長 山口 寿 博士)

受付 昭和 39 年 9 月 24 日

STUDIES ON ANTITUBERCULOUS ACTIVITY OF
 α -ETHYL-THIOISONICOTINAMIDE-SULPHOXIDE*

Masayasu YAMASAKI, Yoshiya FURUKAWA, Yoshio OKUDA,
Kazuo ENDO and Masato NAKANO

(Received for publication September 24, 1964)

Kane, Bieder and coworkers formerly reported on α -ethyl-thioisonicotinamide-sulphoxide (Th-sulphoxide) as a metabolite of 1314 Th, and in the previous paper we also published on its chemical natures and polarographic behaviors by using the material synthesized by Prof. Taniyama.

The present paper deals with an experiment conducted for the purpose of investigating the effect of Th-sulphoxide on the tubercle bacilli in vitro, and its toxicity in vivo.

1) Toxicity of Th-sulphoxide

The toxicity of Th-sulphoxide in mice (17 g of weight) was so slight that LD₅₀ was between 750 mg/kg and 1,000 mg/kg by intraperitoneal injection, and above 1,000 mg/kg oral administration (Table 1 a, b).

2) Antituberculous effect of Th-sulphoxide

a. The effect in Ogawa's egg media by vertical diffusion method.

The length of growth inhibitory area for each concentration of Th-sulphoxide was longer than that of 1314 Th (Table 2). For example, in 1 γ /0.5 ml concentration of the drug, the length of inhibitory zone of Th-sulphoxide was 7.3~9.6 mm, while that of 1314 Th was 5.4 mm, indicating that water soluble Th-sulphoxide is much more diffusible than water insoluble 1314 Th.

b. The effect in liquid culture media and in 1% Ogawa's egg media.

Both in the Kirchner-albumin medium and Dubos-albumin liquid one, the minimal growth inhibitory concentration of Th-sulphoxide was 2.5~5.0 γ /ml, revealing almost the same grade of antituberculous activity as that of 1314 Th. However in 1% Ogawa's egg medium the minimal inhibitory concentration of the drug was 10~25 γ /ml (Table 4 a, b), showing that the inhibitory effect of Th-sulphoxide is far smaller in the Ogawa's egg medium than in the liquid medium. Since Th-sulphoxide is unstable to heating, the above difference in the antituberculous activity between both media may be partly due to the effect of heating.

3) Antituberculous activity of the serum of rabbit intraperitoneally injected with Th-sulphoxide

Rabbits were injected intraperitoneally with 300 mg of Th-sulphoxide and at intervals of 30, 60, 120 and 240 minutes, their blood was taken. The antituberculous activity of these sera was examined by the vertical diffusion method (Table 6). The growth inhibitory activity of

* From National Sanatorium Toneyama Hospital.

the serum was highest 30 minutes after the injection and after 240 minutes there was not observed any activity, showing that the absorption and excretion of Th-sulphoxide in vivo is relatively rapid.

緒 言

α -ethyl-thioisonicotinamide (1314 Th) の出現以来、その優れた抗結核菌作用のために、いわゆる二次抗結核剤として、今日の結核治療のうえに、その占める位置は大きい¹⁻⁵⁾。

われわれは1314 Thの抗結核菌作用およびその臨床的効果について、すでに報告し^{6,7)}、またその生体内代謝についても研究をすすめ、1314 Th投与家兎および患者の尿中に α -ethyl-isonicotinic acidと α -ethyl-isonicotinamideの出現することをも報告してきた^{8,9)}。また先報¹⁰⁾において、1314 Th服用患者中にKane¹¹⁾、Bieder¹²⁾らのいう α -ethyl-thioisonicotinamide-sulphoxideのごく微量がしばしば認められることを、谷山らによつて合成された α -ethyl-thioisonicotinamide-sulphoxide (Th-sulphoxideと記す)と比較検討して、これを確認し、またTh-sulphoxideの性状について報告した。

今回はこのTh-sulphoxideの抗結核菌作用およびその毒性について検討したのでここにその一部を報告する。

実験方法および成績

I. Th-sulphoxideの急性毒性実験

マウスに対するLD₅₀について

Th-sulphoxideは先報にて報告したように、水に可溶であるが、25 mg/ml以上では溶解しがたく、懸濁液となる。したがつてわれわれはTh-sulphoxideの水溶液および懸濁液を用いて、以下の実験を試みた。

使用マウスは体重17 g内外のdd系雄を用い、当院にて少なくとも2週間同一餌料にて飼育したものである。

(a) マウス腹腔内注射による急性毒性実験

マウス腹腔内に0.2 ml中にTh-sulphoxideの所要量を含有する水溶液または懸濁液を注射し、24時間後にその斃死の状況を判定した。対照はすべて0.2 mlの滅菌蒸留水を腹腔内に注射した。

Table 1 a に示すように、0.2 mlのTh-sulphoxide液を腹腔内に注入して、そのマウスの死亡率から、

LD₅₀をみると、1,000 mg/kgと750 mg/kgの間にあつて、そのLD₅₀値は比較的高い濃度値を示す。これらの死亡したマウスはそのほとんどが薬液注入後1~2時間以内に死亡するものであつて、これ以上生存したものは、24時間後には全く対照マウスと変わりなく、なんらの異常をも認めなかつた。

(b) マウス経口投与による急性毒性実験

dd系マウスに細いピニールゾンデによつて、経口的にTh-sulphoxideの所要量を0.2 ml胃内に注入し、24時間後の生存の状況を観察した。

Table 1 b に示すように、経口投与による場合は1,000 mg/kgの大量においても、その死亡は5匹中1匹であつて、Th-sulphoxideの急性毒性実験の成績は、マウスに対して、かなりの大量の投与によつても、十分に堪えうることが明らかである。

II. Th-sulphoxideの抗結核菌作用について

(a) 直立拡散法による抗菌作用

Table 1 a. Toxicity of Th-Sulphoxide against Mice (Intraperitoneal injection)

Dosages/Body weight	Control	1,000 mg/kg	750 mg/kg	500 mg/kg	250 mg/kg
Number of Death/Total Number of mice	0/15	10/15	4/15	1/15	0/15

Table 1 b. Toxicity of Th-Sulphoxide against Mice (Oral administration)

Dosages/Body weight	Control	1,000 mg/kg	750 mg/kg	500 mg/kg	100 mg/kg
Number of Death/Total Number of mice	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5

Table 2. Relation between Drug Concentration and Inhibitory Length (mm) in Vertical Diffusion Method (1% Ogawa's egg media)

Strein	Drug	$\gamma/0.5 \text{ ml}$								
		500 γ	100 γ	50 γ	25 γ	10 γ	5 γ	1 γ	0 γ	
H ₃₇ Rv	1314 Th	—	60.0	41.0	35.0	18.6	9.3	4.5	2.8	
	Th-sulph.	—	—	46.3	40.0	25.0	19.5	7.3	0	
H ₃₇ Rv-INH·R*	1314 Th	—	—	43.0	34.0	22.5	11.0	5.4	2.5	
	Th-sulph.	—	—	50.5	42.0	26.5	18.5	9.6	0	
H ₃₇ Rv-SM·R**	1314 Th	—	—	42.3	35.0	20.3	9.6	5.0	2.5	
	Th-sulph.	—	—	48.6	40.0	25.0	18.0	9.0	0	

* INH·R : INH-Resistant Strain
** SM·R : SM-Resistant Strain

Table 3 Growth Inhibitory Effect of 1314 Th and Th-Sulphoxide against $H_{37}Rv$ and $H_{37}Rv$ -INH-Resistant Strain in Liquid Media

Strain	Media	Drug	γ/ml	Contr.	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0	25.0	50.0	100.0
$H_{37}Rv$	Kirchner Al-Media	1314 Th	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
		Th-sulph.	+++	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	-
	Dubos Al-Media	1314 Th	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		Th-sulph.	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
$H_{37}Rv$ -INH-R	Kirchner Al-Media	1314 Th	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
		Th-sulph.	+++	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	-
	Dubos Al-Media	1314 Th	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
		Th-sulph.	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

1% 小川培地上に、結核菌液 ($H_{37}Rv$ 菌, $H_{37}Rv$ -INH 耐性菌, $H_{37}Rv$ -SM 耐性菌および $H_{37}Rv$ -PAS 耐性菌) 0.1 ml (菌量 10^{-3} mg) を接種し、2 昼夜 37°C の温室中に放置後、その管底に Th-sulphoxide 水溶液 0.5 ml を試験管壁に沿って挿入し、ゴムキャップにて封じて、4 週間 37°C に培養し、培地上における結核菌発育の阻止帯の長さを検討した。対照として 1314 Th-エチレングリコール溶液 0.5 ml の結核菌発育阻止帯を比較検討した。

Table 2 に示す値はそれぞれの阻止帯の長さ (mm) を示すもので、各菌株について、3 回同一実験を繰り返した平均値を記載したものである。 $H_{37}Rv$ 菌および $H_{37}Rv$ -INH 耐性菌においても、Th-sulphoxide の阻止帯の長さは 1314 Th に比べて、いずれの濃度においても、やや長い阻止帯を示し、また $H_{37}Rv$ -SM 耐性菌、 $H_{37}Rv$ -PAS 耐性菌にても同様の成績を得た。

(b) 液体培地上における抗菌作用

Kirchner-Albumin, Dubos-Albumin (栄研) 培地に Th-sulphoxide および 1314 Th 溶液をそれぞれ無菌的に添加し、これに結核菌液 0.1 ml (10^{-3} mg) を接種し

て、37°C の温室中に 2 週間培養後、その管底における菌の発育の程度を判定した。

Table 3 に示すように、 $H_{37}Rv$ 菌、 $H_{37}Rv$ -INH 耐性菌のいずれにおいても、1314 Th の最小発育阻止濃度は Kirchner-Al 液体培地では 5.0 γ/ml であり、Dubos-Al 液体培地では 2.5 γ/ml であつたが、Th-sulphoxide は Kirchner-Al, Dubos-Al 液体培地において 2.5 γ/ml にて最小発育阻止濃度を示している。しかし液体培地での菌の発育の観察からは、1314 Th-Th-sulphoxide の両者における差異はほぼ同程度のもので、必ずしも厳密な有意の差異は認めがたく、Th-sulphoxide の抗菌力も 2.5 γ ~5 γ/ml に最小発育阻止度を示すものと判定することが妥当と考えられる。

(c) 固型培地上における抗菌作用

先報にて述べたように、Th-sulphoxide は低濃度においては比較的温度的影響を受けやすいことから、Th-sulphoxide 含有 1% 小川培地を作製するに当たり、70°C 前後、40 分間の凝固器内にて作製する場合と、80°C またはそれ以上、60 分間の凝固器内にて作製する場合の抗菌力の差異を検討した。

Table 4 a は 70°C 程度の温度にて、40 分間凝固して作製した培地上での結核菌の発育阻止状態を示すもので、 $H_{37}Rv$ 菌では Th-sulphoxide の最小発育阻止濃度は 10 γ/ml から 25 γ/ml の間、1314 Th においては 10 γ/ml にあつて、 $H_{37}Rv$ -INH 耐性菌では両者ともに 25 γ/ml であつた。したがつて Th-sulphoxide はもちろん 1314 Th においても、1% 小川培地上での最小発育阻止濃度は液体培地におけるよりも高い値を示し、その発育阻止力は低下している。

Table 4 b は 80°C あるいはそれ以上の温度にて、60 分間凝固して作製

Table 4 a. Growth Inhibitory Effect of 1314 Th and Th-Sulphoxide against $H_{37}Rv$ and $H_{37}Rv$ -INH-Resistant strain in 1% Ogawa's Egg Media Coagulated at 70°C for 40 Min.

Strain	Drug	γ/ml										
			0	0.5	1.0	5.0	10.0	25.0	50.0	100.0		
$H_{37}Rv$	1314 Th	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	
	Th-sulph.	+++	+++	+++	+	2	-	-	-	-	-	
$H_{37}Rv$ -INH-R	1314 Th	+++	+++	+++	+	12	-	-	-	-	-	
	Th-sulph.	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	

Table 4 b. Growth Inhibitory Effect of Th-Sulphoxide against $H_{37}Rv$ and $H_{37}Rv$ -INH-Resistant Stain in 1% Ogawa's Egg Media Coagulated at 80°C for 60 Min.

Strain	Drug	γ/ml										
			0	0.5	1.0	5.0	10.0	25.0	50.0	100.0		
$H_{37}Rv$	Th-sulph.	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	
$H_{37}Rv$ -INH-R	Th-sulph.	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	

した1%小川培地上での菌の発育を示したもので、Th-sulphoxideの最小発育阻止濃度は50γ/mlに低下し、明らかに加温による影響の大きいことを示している。

(d) 患者喀痰から分離した結核菌に対する抗菌作用

上述の実験成績からTh-sulphoxide含有1%小川培地の作製に当たっては、温度に留意し、70°C、40分間の凝固操作にて培地を作製した。患者喀痰から分離した菌は、生理的食塩水にて 10^{-8} ~ 10^{-4} mg/0.1 mlとなるように菌液を作り、これを培地上に接種して、4~6週間37°Cで培養した。

Table 5 aは1314 ThまたはTibionの未使用患者の喀痰から分離した菌に対するTh-sulphoxideの抗菌力を示すもので、最小発育阻止濃度10γ/mlを示すものは8株中0、25γ/mlに発育阻止を示すものは8株中5株、他の3株は25γ/ml以上に発育阻止濃度を認めた。これに対して、1314 Thでは10γ/mlに8株中3株、25γ/mlに8株中5株を認め、Th-sulphoxideは1314 Thに比べて試験管1本のずれを示す。この点Th-sulphoxideは1314 Thに比べて不安定である。

Table 5 bは1314 Th既服用患者から分離した菌に対する抗菌力を示し、これらの分離菌は1314 ThおよびTh-sulphoxideに対して、すでに耐性を示すもので、50γ/mlにてもよく発育している。

III. Th-sulphoxide 投与家兔血清の抗菌作用について

体重3kgの正常家兔の腹腔内にTh-sulphoxide 300 mg/ml溶液1 mlを注入し、経時的に家兔の耳静脈から採血し、血清を分離して、その血清0.5 mlを直立拡散法によつて、H₃₇R_v菌の発育阻止帯の長さを観察した。

Table 6に示すように、Th-sulphoxide注射後、30分の血清において、もつとも強い阻止帯を認め、60分の血清ではその約1/2の長さとなり、120分の血清ではごくわずかの阻止帯を認めるにすぎなかつた。また240分後の血清ではもはや阻止帯を認めることができなかった。

Table 5 a. Growth Inhibitory Effect of 1314 Th and Th-Sulphoxide against Tubercle Bacilli Isolated from the Sputum of Patients Receiving no 1314 Th Treatment

Strain	Drug	γ/ml								
		0	0.5	1.0	5.0	10.0	25.0	50.0	100.0	
No. 1 (SM 10γ, INH 1γ)*	1314 Th	##	##	+	+	-	-	-	-	
	Th-sulph.	##	##	+	+	+	-	-	-	
No. 2 (SM 10γ, PAS 1γ) INH 5γ	1314 Th	##	##	##	##	+	-	-	-	
	Th-sulph.	##	##	##	##	+	-	-	-	
No. 3 (SM 10γ, INH 5γ)	1314 Th	##	##	##	##	+	-	-	-	
	Th-sulph.	##	##	##	##	##	12	-	-	
No. 4 (SM 100γ) INH 5γ	1314 Th	##	##	##	##	+	-	-	-	
	Th-sulph.	##	##	##	##	+	-	-	-	
No. 5 (SM 10γ, INH 5γ) PAS 10γ	1314 Th	##	##	##	##	-	-	-	-	
	Th-sulph.	##	##	##	##	##	-	-	-	
No. 6 (SM 10γ, INH 1γ)	1314 Th	##	##	+	+	+	-	-	-	
	Th-sulph.	##	##	+	+	+	+	-	-	
No. 7 (SM 10γ, INH 5γ)	1314 Th	##	##	##	##	+	-	-	-	
	Th-sulph.	##	##	##	##	##	##	-	-	
No. 8 (SM 10γ, INH 1γ)	1314 Th	##	##	##	##	+	-	-	-	
	Th-sulph.	##	##	##	##	+	-	-	-	

(*) shows the resistant degrees for SM, PAS and INH.

Table 5 b. Growth Inhibitory Effect of 1314 Th and Th-Sulphoxide against Tubercle Bacilli Isolated from the Sputum of Patients who Were Administered with 1314 Th

Strain	Drug	γ/ml								
		0	0.5	1.0	5.0	10.0	25.0	50.0	100.0	
No. 1 after administration with 1314 Th	1314 Th	##	##	##	##	##	##	+	-	
	Th-sulph.	##	##	##	##	##	##	##	-	
Before adm. with 1314 Th	1314 Th	##	##	##	##	+	-	-	-	
No. 2 after adm. with 1314 Th	1314 Th	##	##	##	##	##	##	##	-	
	Th-sulph.	##	##	##	##	##	##	##	-	
No. 3 after adm. with 1314 Th	1314 Th	##	##	##	##	##	##	-	-	
	Th-sulph.	##	##	##	##	##	##	+	-	

Table 6 Anti-tuberculous Activity of the Serum of Rabbit Administered with Th-Sulphoxide (100 mg/kg) Intraperitoneally (Vertical diffusion method)

	Before	After administration with Th-sulphoxide			
		30 min.	60 min.	120 min.	240 min.
Growth Inhibitory Length (mm)	0	15	9	3	0

総 括

われわれの使用したTh-sulphoxideは共同研究者谷山教授によつて合成されたもので、その性状についてはすでに先報¹⁰⁾にて述べたように、比較的不安定であり、

とくに加熱によつて分解しやすい。したがつてその抗菌力を検定する場合、本報にて明らかなように、固型培地によるよりも、液体培地あるいは直立拡散法によるほうがいつそう安定した成績が得られる。さて 1314 Th と Th-sulphoxide の抗菌力を比較すると、液体培地ではほぼ同等の抗菌力を示し、 $2.5\gamma\sim 5.0\gamma/ml$ に最小発育阻止濃度を示すが、一方直立拡散法による場合には 1314 Th よりも Th-sulphoxide のほうが、強い阻止帯を示す。この現象は Th-sulphoxide は水に可溶であるに対し、1314 Th はエチレングリコール、プロピレングリコールに溶解せねばならないところに、培地への薬剤の拡散度に差異があるものと考えられる。

また抗結核剤の力価は液体培地に比べて、固型培地では低下するという事実は一般によく知られたことであるが、われわれの Th-sulphoxide もこの例に洩れず、液体培地と固型培地では明らかな抗菌力の差がみられ、しかも前述のように加温によつて、Th-sulphoxide の菌発育阻止効果が弱められるために、1314 Th に比べても低い価を示すという結果が生ずる。

Th-sulphoxide の毒性は急性毒性実験からも明かなように、比較的少ないが、われわれは目下慢性毒性実験、ことに肝に対する障害を詳しく検討中で、近く報告の予定である。

Th-sulphoxide の吸収・排泄については、家兎腹腔内注射による血清抗菌作用実験と、Table 2 に示す Th-sulphoxide の直立拡散法による抗菌作用とを対比して、血清中の Th-sulphoxide 濃度を換算すると、 100 mg/kg の Th-sulphoxide 注入後 30 分の血清には $15\sim 20\gamma/ml$ で、60 分の血清ではその約半分、120 分の血清ではほとんど、240 分の血清では全く消失することから、本薬剤の吸収はもとより生体内における分解排泄も速やかであると考えられる。

結 論

1. Th-sulphoxide のマウスに対する急性毒性実験において、その LD_{50} は 17 g のマウスで $750\text{ mg}\sim 1,000$

mg/kg の間にあり、したがつてその毒性は少ない。

2. Th-sulphoxide の抗菌力は液体培地では 1314 Th と同様、その最小発育阻止濃度は $2.5\sim 5\gamma/ml$ の間にある。ただし直立拡散法による場合は Th-sulphoxide は 1314 Th に比べて、ややその阻止帯は長い。しかし固型培地においては著しくその最小発育阻止濃度は高く、1314 Th よりも菌の発育阻止作用は低下する。

3. Th-sulphoxide を家兎腹腔内に注入し、その家兎血清の抗菌作用を経時的にみると、30 分後の血清において、かなり強い抗菌作用を認め、2 時間後の血清ではすでにその作用は認められない。

稿を終るに当たり、ご校閲を賜つた院長山口先生に深謝し、Th-sulphoxide の合成に、また種々ご助言をいただいた長崎大学谷山教授に厚くお礼申しあげます。

文 献

- 1) Brouet, G., Marche, J., Rist, N., Chevallier, J. and LcMeur, G.: Amer. Rev. Tuberc., 79 : 6, 1959.
- 2) 堂野前維摩郷 : 日本医事新報, No. 1897 : 9, 1960. 同上 No. 1911 : 8, 1960.
- 3) M^{e11e} Grumbach, F.: Rev. Tuberc. Pneum., 25 : 1365, 1961.
- 4) 篠原研三・安部胤一・稲垣忠子・由利吉郎・森口幸雄・長島璋・桑原弘信・斎藤健利 : 日本胸部臨床, 20 : 243, 1961.
- 5) 岡捨己・今野淳・工藤穠・大泉耕太郎・山口進 : 日本胸部臨床, 22 : 537, 1963.
- 6) 山崎正保・遠藤一男・仁土賢一・中井陸雄・柳沢康夫 : 日本胸部臨床, 21 : 111, 1962.
- 7) 山崎正保・遠藤一男・中野真人・奥田良雄・古川佳也・真崎博昭・中井陸雄・堀野三郎 : 胸部疾患, 7 : 99, 1963.
- 8) 山崎正保・奥田良雄・古川佳也 : 最新医学, 18 : 913, 1963.
- 9) Okuda, Y.: Rev. Polarography, 11 : 197, 1963.
- 10) 古川佳也・山崎正保・奥田良雄 : 結核, 投稿中.
- 11) Kane, P. O.: Nature, 195 : 495, 1962.
- 12) Bieder, A., Brunel, P. et M^{e11e} Mazeau, L.: Annal. pharmac. franç., 21 : 375, 1963.