

# 実験結核症に対する 4,4'-diisoamyloxy-thiocarbanilide (Isoxyl) の抗結核作用について

豊原 希一・重松 昭世・稲垣 博一  
初鹿 野浩・大里 敏雄

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎竜郎)

受付 昭和 40 年 9 月 28 日

## ANTITUBERCULOUS ACTIVITY OF 4,4'-DIISOAMYLOXY-THIOCARBANILIDE (ISOXYL) AGAINST EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS\*

Mareichi TOYOHARA, Akiyo SHIGEMATSU, Hirokazu INAGAKI,  
Hiroshi HAJIKANO and Toshio OHSATO

(Received for publication September 28, 1965)

Many experimental studies were already made on antituberculous activity of Isoxyl, and most of them say that it is generally effective for experimental tuberculosis except one reporting its ineffectiveness for tuberculosis of guinea pigs.

Isoxyl bound with stearic acid (Isoxyl-stearate) was synthesized recently, and so the authors tried to investigate the effect of Isoxyl against tuberculosis of mice, and then the antituberculous activity against tuberculosis of guinea pigs was compared among Isoxyl, Isoxyl-stearate and 1314 TH.

### I. Therapeutic Effect of Isoxyl for Experimental Tuberculosis of Mice

#### 1. Materials and methods :

Each of twenty mice (DDy) was inoculated with 0.3 mg of H<sub>37</sub>Rv into tail vein. Mice were divided into two groups of each ten mice. One group of them was used as the untreated control and another as the treated group with Isoxyl. Mice of the treated group were administered per oral with 2 mg of Isoxyl suspended in 0.1 ml of olive-oil every day for three weeks after one week of infection. All of them were killed on the next day of the termination of treatment to observe macroscopic involvement and to cultivate tubercle bacilli in lungs and livers.

#### 2. Results :

As shown in Table 1, the results of treatment with Isoxyl were good. Index of average macroscopic involvement was 0.6 in the treated group while it was 2.2 in the untreated group. The average weight of lung was 192 mg in the former and 295 mg in the latter. The average weight of spleen was 273 mg in the treated and 441 mg in the untreated. Numbers of bacilli in 1 mg of lung were 737 in the treated and 5930 in the untreated and as to the liver 279 in the treated and 395 in the untreated.

### II. Therapeutic Effect of Isoxyl for Experimental Tuberculosis of Guinea Pigs

#### 1. Materials and methods :

Each of male guinea pigs was inoculated with 0.1 mg of strain Kurono (M. tuberculosis) subcutaneously in the abdomen. The number of viable bacilli of the employed strain was  $12 \times 10^6$ /mg. Five guinea pigs were killed three weeks after the infection and the development of tuberculosis was ensured, and then the remaining guinea pigs were divided into four groups of the untreated (the first group), the treated with Isoxyl-stearate (the second group), with

\* From Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

Isoxyl (the third group) and with 1314 TH (the fourth group). Each guinea pig of the treated groups was administered per oral with a certain dosis of each indicated drug every day for six weeks from the twenty-second day of infection. Dosis of drug was 50 mg as to Isoxyl or Isoxyl-stearate which was emulsified by methyl cellulose and 10 mg as to 1314 TH which was suspended in olive-oil.

On the second day of the termination of treatment, all the animals were sacrificed, and macroscopic tuberculous involvement was observed, one part of lung and spleen was cultivated and pathohistological changes were examined.

## 2. Results :

Macroscopic tuberculous involvement is shown in Fig. 1.

Among four groups the tuberculous involvement of the group treated with Isoxyl-stearate was the slightest and that of the group with Isoxyl was next to the former. Therapeutic effect of 1314 TH was also rather good, but it was inferior to the effect of the former two drugs.

Average weight of spleens of the untreated controls was 1.90 g, that of the group treated with Isoxyl-stearate 1.41 g, the group with Isoxyl 1.09 g and that of the group with 1314 TH was 1.17 g.

The results of cultivation of lungs and spleens are shown in Tables 3 and 4. As seen in Table 3, average number of viable bacilli in 10 mg of lung was 5.3 in Isoxyl group, 13.4 in Isoxyl-stearate group, 50.4 in 1314 TH group and 82.3 in the untreated group.

As seen in Table 4, average number of viable bacilli in 10 mg of spleen was least in the 1314 TH group, and the growth of bacilli in spleen of the groups treated with Isoxyl-stearate and Isoxyl was also decreased as compared with the untreated group.

Histological findings were also parallel with bacteriological results in general.

## Summary

Therapeutic effect of Isoxyl for experimental tuberculosis of mice and guinea pigs was studied.

1. Effect of Isoxyl was remarkable by per oral administration of daily 100 mg/kg for experimental tuberculosis of mice.

2. Both Isoxyl and Isoxyl-stearate in 100 mg/kg showed more effective results than 1314-TH in 20 mg/kg by daily oral administration for experimental tuberculosis of guinea pigs. But any remarkable difference of effect was not observed between Isoxyl and Isoxyl-stearate.

4,4'-diisoamyloxy-thiocarbaniide (以下 Isoxyl と略) の結核症に対する治療効果については A. Tacquetらの報告<sup>1)</sup> 以来すでに多くの実験的<sup>2)~6)</sup>, あるいは臨床的<sup>7)~10)</sup> 研究がなされている。実験結核症に用いられた動物としてはマウス, モルモット, 兎が主なものであり, その多くは優れた治療効果を示すというものであるが, モルモットについてはほとんど効果をみないという報告もある<sup>5)</sup>。一方臨床成績についてみると INH, SM 等一次抗結核薬と併用することにより, 相当の治療効果を認めるという報告もあるが, 併用剤のいかににおいてはさしたる効果を認めないという報告<sup>10)</sup> もあり, 抗結核剤としての地位はまださだまつていない<sup>11)</sup>。しかし水にきわめて難溶性である Isoxyl は腸内において脂質と結合し

て吸収されるであろうという考え方のもとに植物油, たとえば椿油<sup>6)</sup> とともに投与すると顕著な抗結核作用を示すという実験的報告がある。

そこでわれわれは脂肪酸と結合した Isoxyl-stearic monoglyceride-granulate formula (以下, Isoxyl-stearate と略) が, あらたに合成されたのを機会に Isoxyl の抗結核作用を再検討する意味で, まずマウスを用い Isoxyl の抗結核作用を確認し, ついでモルモット実験結核症に対する Isoxyl, Isoxyl-stearate の効果を1314-TH (TH と略) と比較検討した。TH を比較薬剤として選んだ理由は, いずれも水に難溶性であり, TH が二次抗結核薬として代表的薬剤であるからである。

[I] マウス実験結核症に対する Isoxyl の治療効果

(1) 実験材料ならびに方法

使用動物：体重 20 g 前後の DDy 系 ♂ マウス。

使用薬剤：Isoxyl 100 mg/kg の割に毎日経口投与，すなわちオリーブ油で 20 mg/ml の懸濁液をつくり，その 0.1 ml (2 mg) を注射器を用いて確実に経口投与。

使用菌：H<sub>37</sub>Rv，生菌数 3.6×10<sup>6</sup>/mg。

方法：マウス 20 匹の尾静脈内に H<sub>37</sub>Rv 0.3 mg を感染。感染後 2 群に分ち，1 群は無治療対照群，他の 1 群を治療群とする。

治療群は感染 1 週目より Isoxyl 2 mg を 3 週間毎日経口投与し治療終了翌日に全動物を殺し，肉眼的所見とともに肺，肝の還元培養を行なった。

(2) 成績

表 1 にみるごとく Isoxyl 治療群の成績は良好である。平均病変度は青木の方法<sup>12)</sup>に従うと対照群 2.2 に対し治療群 0.6 で相当な治療効果が認められる。また肺重量平均値は対照群 259 mg に対し治療群 192 mg，脾重平均値は対照群 441 mg，治療群 273 mg で肺，脾とも治療群のほうが小さかった。

次に臓器の還元培養成績をみると肺 1 mg 中対照群では 5,930 に対し治療群では 737，肝 1 mg 中では対照群 395，治療群 279 で明らかに治療効果を認めた。

(3) 小括

マウス実験結核症に対するオリーブ油懸濁 Isoxyl 100 g/kg の投与は，優れた治療効果を示した。

[II] モルモット実験結核症に対する Isoxyl の治療効果

(1) 実験材料ならびに方法

使用動物：平均体重 500 g のモルモット。

使用菌と感染方法：黒野株（人型菌）0.1 mg をモルモット腹壁皮下に感染。生菌数 12×10<sup>5</sup>/mg。

治療方法

i) 感染 3 週後にモルモット 5 匹を殺し結核症の成立を確認したのち，残りのモルモットを 4 群に分ち 1，2 群は無治療対照群，3 群は Isoxyl 治療群，4 群は TH 治療群とする。

ii) 治療期間

感染 22 日目より，日曜をのぞき 6 週間毎日。

iii) 治療量

TH：各匹 20 mg/kg 毎日。すなわちオリーブ油で 20 mg/ml の懸濁液をつくり，その 0.5 ml (10 mg) を注射器で経口投与。

Isoxyl-stearate：各匹 100 mg/kg 毎日。すなわちメチルセルロースで 100 mg/ml の乳濁液をつくり，その 0.5 ml (50 mg) を注射器で経口投与。

Isoxyl：各匹 100 mg/kg 毎日。乳濁液のつくり方および投与方法は Isoxyl-stearate と同じ。

iv) 治療終了 2 日目に全モルモットを殺し肉眼所見，肺，脾の培養，病理組織学的検査を行なう。

(2) 成績

i) 肉眼的所見

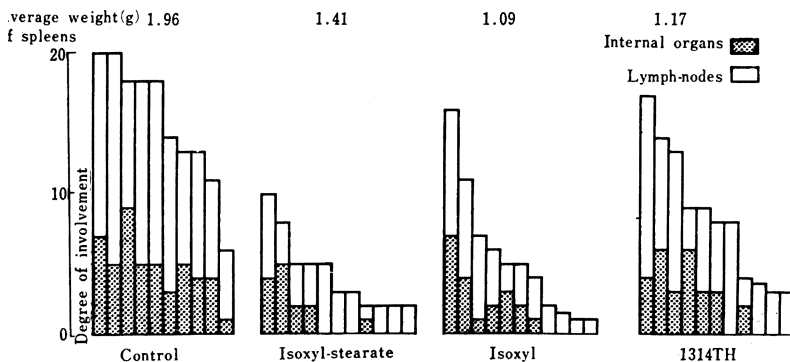
肉眼的所見をヒストグラムで示すと Fig. 1 のごとくなる。もつとも成績のよかつたのは Isoxyl-stearate 群，ついで Isoxyl 群であつた。TH の治療成績も良好であつたが前 2 群より劣つていた。これに対し対照群の病変は顕著であつた。また脾重平均値は Fig. 1 に記し

Table 1. Results of Mice

	Untreated	Treated with isoxyl
Average degree of involvement of lungs	2.2	0.6
Average weight of lungs	295 mg	192 mg
Average weight of spleens	441 mg	273 mg
Average number of bacilli in 1 mg of lung	5930	737
Average number of bacilli in 1 mg of liver	395	279

Degree of involvement is shown by Aoki's classification.

Fig. 1. Macroscopic Involvement of Guinea Pigs



たごとく対照群 1.96 g，Isoxyl-stearate 群 1.41 g，Isoxyl 群 1.09 g，TH 群 1.17 g であつた。

臓器病変度<sup>13)</sup>の平均値を各群について比較してみると表 2 のごとくなる。すなわち肺，肝，脾を中心とした内臓諸器官の病変は，TH 群は対照群の約 1/2，Isoxyl-stearate および Isoxyl 群は約 1/3 であつた。

リンパ節も内臓の病変と

Table 2. Average Degree of Involvement of Organs of Guinea Pigs

	Control	Isoxyl-stearate	Isoxyl	1314 TH
Internal organs	4.6	1.3	1.8	2.6
Lymphnodes	10.5	3	3.2	5.7

The number is arithmetic mean of macroscopic involvement classified in five degrees.

Table 3. Results of Cultivation of Lungs of Guinea Pigs

No. of guinea pigs	Control	Isoxyl-stearate	Isoxyl	1314 TH
1	145	2	0	0
2	60	90	0	70
3	151	0	17	0
4	94	0	5	290
5	207	0	0	0
6	116	0	0	15
7	0	0	0	1
8	0	11	39	53
9	50	0	0	6
10	0	0	2	116
11		44	0	3
12			0	
Mean	82.3	13.4	5.3	50.4

Numbers indicate the number of colonies in 10 mg of lungs. (average of two tubes)

Table 4. Results of Cultivation of Spleens of Guinea Pigs

No. of guinea pigs	Control	Isoxyl-stearate	Isoxyl	1314 TH
1	96	710	0	0
2	835	112	25	90
3	261	0	1470	0
4	88	44	103	244
5	231	2	25	1
6	350	34	115	130
7	39	1	63	160
8	3	145	0	36
9	1075	370	0	13
10	345	0	2	123
11		9	1	44
12			1	
Mean	332.3	129.7	150.4	76.5

Numbers indicate the number of colonies in 10 mg of spleens. (average of two tubes)

ほぼ同じ傾向を示した。

#### ii) 臓器培養成績

肺, 脾の還元培養結果を表 3, 4 に示す。表 3 にみるごとく Isoxyl, Isoxyl-stearate 治療群の肺内の菌数は少なく, 前者は 10 mg 中平均 5.3, 後者は 13.4 であった。これに対し TH 治療群では平均 50.4 で前 2 者に比

べると菌数は多いが対照群に比べると少ない。次に脾については表 4 にみるごとく, TH 治療群の菌数がかつとも少なく Isoxyl-stearate, Isoxyl の順でこれに次ぎ, 対照群に比し, いずれも菌増殖が阻止されていた。

#### iii) 病理組織学的所見

肺についてみると無治療対照群では中心壊死を認める中等大の類上皮細胞結節以外に多数の小円形細胞浸潤巣を認める。Isoxyl-stearate 治療群では結核結節を認めるが, 類上皮細胞は萎縮し血管周囲の細胞浸潤がかなり多い。Isoxyl 治療群では著明な萎縮像を示す結節がわずかにあるのみである。TH 治療群ではきわめて小さい結節を認めるのみで血管周囲の円形細胞浸潤も少なかった。脾についてみると無治療対照群では多数の類上皮細胞結節があり中心壊死を示すものもある。Isoxyl-stearate 治療群では増殖性傾向のある類上皮細胞結節や萎縮傾向の強い結節がわずかにあるのみである。Isoxyl 治療群も萎縮した類上皮細胞結節がわずかにあるのみである。TH 治療群ではかなり大きな結節があり中心壊死を認めるものもある。肝についてみると対照群では中心壊死のあるかなり大きな結節が認められる。Isoxyl-stearate 治療群では萎縮性類上皮細胞結節が認められるのみである。Isoxyl 治療群も萎縮性結節がわずかに認められる。TH 治療群では比較的小さな, あるいは萎縮した類上皮細胞結節を認めるが, グリソン氏鞘には増殖性結節を認める。

### [III] 考 察

最初に述べたごとく, Isoxyl についての報告はすでに多いのでわれわれは次の 2 点にしぼつて考察を加えてみたい。第 1 はマウスとモルモットに対する抗結核作用に大差があり Isoxyl はマウス結核症には有効であるがモルモット結核症には無効であるという報告<sup>5)</sup>があるがこれは事実であるか否か, もし事実とすれば抗結核薬の screening に繁用されているマウスの価値は再検討されねばならないであろう。第 2 は脂質と混合すれば腸壁から吸収されやすくなり効果が増大するのではないかという考えのもとに, あらたにつくられた Isoxyl-stearate の効果いかんという点である。

まず第 1 の点について考えてみよう。われわれの実験ではマウス結核症に対しては先人の報告と同様, 優れた治療効果が得られた。本実験では Isoxyl をオリーブ油に懸濁させたのであるが, 油を使用しなくとも良好な成績が得られることは文献的に明らかである<sup>4)</sup>。さらにモルモット結核症に対しても 100 mg/kg Isoxyl 毎日経口投与は TH 20 mg/kg 毎日経口投与より優れた効果を示した。モルモットの場合はマウスの場合と異なり, 感染 3 週後から治療を開始したのであるから Isoxyl は感染早期に治療を開始したときに効果を発揮するという説<sup>6)</sup>

には同意できない。Isoxylのごとく水にきわめて難溶性である物質を投与するときの薬剤形態には十分な配慮が必要であろう。ともあれわれわれの実験では Isoxyl はマウス結核症およびモルモット結核症に対し治療計画は異なるがほぼ同程度と推定できる効果を示した。したがって Isoxyl に関する実験成績からは、未知抗結核剤を探知する screening 用の動物としてのマウスの評価を変える必要はあるまいと思う。

第2の問題、すなわち脂肪酸と結合させた Isoxyl-stearate の効果について考えてみよう。

Isoxyl が脂質と結合して腸管から吸収され効果を発揮するという考えのもとに stearic monoglyceride を結合させたと思われるが、肉眼的所見からは Isoxyl そのものよりは、やや優れた効果を示したが、還元培養成績、病理組織学的所見などを総合してみると Isoxyl と大差ないと考えてよいと思う。われわれは試みながつたが実験的には局方椿油を混ぜて投与すると Isoxyl より優れた効果を示すという報告<sup>9)</sup>は興味あるが、臨床的に油と一緒に Isoxyl を投与しても効果に差はなかつたという報告<sup>14)</sup>も一応心にとめておく必要がある。ともあれ *in vitro* でも、マウス、モルモットを用いた *in vivo* 実験でも有効であつた抗結核薬が人の結核症に対しその評価が容易に定まらぬということは、いまいつその検討が必要であろう。

#### 〔IV〕 結 び

Isoxyl のマウスおよびモルモット実験結核症に対する治療効果のみ、次の結果を得た。

(1) マウス結核症に対し、Isoxyl の 100 mg/kg の毎日経口投与は、無治療対照群に比し良好な治療成績を示した。

(2) モルモット結核症に対し Isoxyl および Isoxyl-stearate の 100 mg/kg 毎日経口投与は TH 20 mg/kg 毎日経口投与より良好な治療効果が得られた。しかし

Isoxyl と Isoxyl-stearate との間には認むべき差はなかつた。

岩崎所長のご校閲および病理組織所見のご教示に感謝する。本実験遂行にあたり種々ご協力を賜つた明治製菓中央研究所、野宮博士に感謝する。また同研究所、小野田、高瀬両氏および当所徳永、高木両氏の労を多とした。記して謝意を表する。

なお、Isoxyl, Isoxyl-stearate は明治製菓 K. K. の提供によつた。

#### 文 献

- 1) Tacquet, A., Macquet, V., Bun-Hoi, N., Dat-Xuong, N. : Annales de L'Institut Pasteur de Lille, X, 43, 1958~1959.
- 2) Crowle, A. J., Mitchell, R. S., Petty, T. L. : Am. Rev. Resp. Dis., 88 : 716, 1963.
- 3) Freeksen, E., Rosenfeld, M. : Beitr. Klin. Tbk., 127 : 386, 1963.
- 4) 賀来隆二 : 結核, 38 : 67, 1963.
- 5) 金井興美・岡本 茂・室橋豊穂 : 結核, 38 : 470, 1963.
- 6) 中村玲子・小関勇一・室橋豊穂 : 結核, 40 : 303, 1965.
- 7) Butt, M. : Wien. Med. Wschr., 113 : 662, 1963.
- 8) 松宮恒夫・小林宏行・福原徳光 他 : 日本胸部疾患学会雑誌, 2 : 20, 1964.
- 9) Stähle, I. : Acta Tuberc. Scand., 44 : 327, 1964.
- 10) 結核療法研究協議会 : 第 40 回結核病学会演説.
- 11) 砂原茂一 : 胸部疾患, 8 : 1089, 1964.
- 12) 青木正和・工藤賢治・続木正大 : 結核, 36 : 355, 1961.
- 13) Toyohara, M., Kudoh, S., Obayashi, Y. : Tubercle, 40 : 184, 1959.
- 14) Mitchell, R. S., Petty, T. L., Dye, W. E. : Transactions of the 23rd Resp. Conf. in Pulm. Dis., 10 : 1964.