

原 著

Pyrazinamide 類縁体の抗ミコバクテリア抗菌活性：  
*In Vitro* でのスクリーニング・テスト

山 本 節 子

結核予防会結核研究所

戸 井 田 一 郎

日本 BCG 研究所

渡 辺 七 生 ・ 浦 利 和

広栄化学工業株式会社研究所

受付 平成7年 8月15日

受理 平成7年11月 2日

IN VITRO ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITIES OF PYRAZINAMIDE  
ANALOGS : RESULTS OF SCREENING TESTSSetsuko YAMAMOTO<sup>\*</sup>, Ichiro TOIDA, Nanao WATANABE  
and Toshikazu URA

(Received 15 August 1995/Accepted 2 November 1995)

Attempting to find new drugs, which are more effective than pyrazinamide against *Mycobacterium tuberculosis* and also active against *M. avium* complex (MAC), we synthesized various pyrazinamide analogs and pyrazine derivatives and assayed their antimycobacterial activities *in vitro* against *M. tuberculosis*, *M. avium* and *M. intracellulare*.

As is well known, pyrazinamide is more active in acidic medium than in neutral medium, but the growth of mycobacteria in acidic media is poor and inconsistent. Our preliminary experiments revealed that the relative antimycobacterial activities of test-drugs compared with pyrazinamide were essentially the same in pH5.5 medium as in pH6.0 medium. Therefore, Middlebrook 7H9 broth adjusted to pH6.0 was used throughout the present studies.

Among 39 compounds synthesized, four drugs were insoluble in any of the solvent suitable for culture experiments and could not be tested, and remaining 35 compounds were screened.

---

\* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

The growth of mycobacteria was followed by measuring the optical density at 530 nm (OD), and the OD of the culture in the presence of 200  $\mu\text{g/ml}$  of the test-drug (OD-TD) was compared with that in the presence of pyrazinamide (OD-PZA). Each test-drug was ranked as A, B, C, D or E according to the ratio  $(\text{OD-TD}/\text{OD-PZA}) \times 100\%$ , if the ratio was equal to or less than 10%, 11–20%, 21–40%, 41–60% or 61–80%, respectively. Any drugs showing the ratio above 80% were excluded from further examinations.

For *M. tuberculosis*, 11 drugs were ranked as A and 4 more as B. For *M. avium*, 2 drugs were ranked as A and 2 more as B. For *M. intracellulare*, 5 drugs were ranked as A and 2 more as B.

Among highly ranked ones, 4 compounds, namely, pyrazinoic acid noctyl ester, pyrazinoic acid pivaloyloxymethyl ester, pyrazine thiocarboxamide and N-hydroxymethyl pyrazine thiocarboxamide were ranked as A against *M. tuberculosis* and *M. intracellulare*, and ranked as A, B or C against *M. avium*, and considered as hopeful candidates of new antimycobacterial drugs. Their bacteriostatic and bacteriocidal activities against *M. tuberculosis* as well as *M. avium* and *M. intracellulare* have been studied in details and reported in a separate paper. *In vivo* activities against murine experimental tuberculosis of these 4 drugs is now under investigation. Further, two drugs, N-hydroxy pyrazinamide and N-hydroxy pyrazinamide-4-oxide were ranked as A against *M. tuberculosis* and ranked A or B against *M. intracellulare*, and their more precise *in vitro* antimycobacterial activities are now under examination.

**Key words :** Antimycobacterial drugs, Pyrazinamide analogs, *In vitro* antibacterial activity, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex

**キーワード :** 抗ミコバクテリア薬剤, ピラジナマイド類縁体, *In vitro* 抗菌活性, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex

## はじめに

Pyrazinamide (PZA) は最も有効な抗結核剤の一つであり、宿主の食細胞中や酸性環境に存在する結核菌に対して特に強い抗菌活性を発揮すると考えられている<sup>1)2)</sup>。しかし、PZA には、肝臓障害や高尿酸血症のような副作用の頻度が比較的高いこと、*Mycobacterium avium* complex (MAC) に対して抗菌活性が低いこと、通常の臨床検査室では感受性検査を行うのが困難であること、などの難点もある<sup>3)</sup>。

結核は今なお多くの発展途上国では主要な死亡原因であり、また、経済的先進国においても多剤耐性結核菌による集団発生をも含めて再び憂慮すべき兆しを見せている<sup>4)</sup>。さらに、MAC 感染症、とりわけ全身散布型の MAC 感染症は AIDS の最も深刻な合併症の一つである<sup>5)6)</sup>。このような状況の下で、*Mycobacterium tuberculosis* に対して PZA よりもより効果があり、MAC にも有効であるような新しい抗結核剤の開発が強く求められている。われわれは、このような新しい抗結

核剤の開発を目標にして、39種類の Pyrazine 誘導体または PZA 類縁体を合成し、それらの抗ミコバクテリア活性を検討した。*In vitro* でのスクリーニング・テストの結果を報告する。

## 材料と方法

### 1) 試験薬剤

39種類の Pyrazine 誘導体または PZA 類縁体を合成した。これらの化合物を化学構造の類似性に従って4群に分類して表に示した。これらのうち、No.4, No.30, No.24, No.28 の4化合物は、培養試験に利用しうる種類の溶媒のいずれにも不溶または難溶であって試験が出来ず、残りの35化合物についてスクリーニング・テストを行った。

### 2) ミコバクテリア

実験に用いた菌株はいずれも結核研究所細菌研究科の阿部千代治先生より分与を受けたもので、ATCC 由来の *M. avium* (ATCC25291) および *M. intracellulare* (ATCC13950) と Trudeau 研究所由来の *M.*

Table Results of Screening Tests

Pyrazinamide Derivative (200 $\mu\text{g/ml}$ )	<i>M. intracellulare</i> ATCC13950 (7 days)	<i>M. avium</i> ATCC25291 (14 days)	<i>M. tuberculosis</i> KK11-20 (21 days)
1 5-methyl pyrazinamide	×	×	×
4 pyrazinamide-4-oxide	N.D.	N.D.	N.D.
40 5-methyl pyrazinamide-4-oxide	×	×	×
21 N-hydroxy pyrazinamide	B	×	A
26 N-hydroxy pyrazinamide-4-oxide	A	×	A
14 N-hydroxymethyl pyrazinamide	×	×	×
25 N-hydroxymethyl pyrazinamide-4-oxide	×	×	A
20 N-acetyl pyrazinamide	×	×	D
27 N-hydroxyethyl pyrazinamide	×	×	×
5 N-tertiary-butyl pyrazinamide	×	E	×
16 N-tertiary-butyl pyrazinamide-4-oxide	×	×	D
29 N-phenyl pyrazinamide (HCl salt)	C	D	B
30 N-(3-chlorophenyl) pyrazinamide (HCl salt)	N.D.	N.D.	N.D.
33 N-(4-methyl-1-piperazinyl) pyrazinamide	×	×	×
34 pyrazine thiocarboxamide	A	C	A
35 N-hydroxymethyl pyrazine thiocarboxamide	A	A	A

Pyrazinoic Acid Derivative (200 $\mu\text{g/ml}$ )	<i>M. intracellulare</i> ATCC13950 (7 day)	<i>M. avium</i> ATCC25291 (14 days)	<i>M. tuberculosis</i> KK11-20 (21 days)
7 pyrazinoic acid (ammonium salt)	×	×	D
2 5-methyl pyrazinoic acid	E	×	B
6 pyrazinoic acid-4-oxide	×	×	D
8 pyrazinoic acid methyl ester	×	E	B
3 pyrazinoic acid ethyl ester	×	×	C
11 pyrazinoic acid n-propyl ester	D	×	B
12 pyrazinoic acid n-butyl ester	C	×	A
13 pyrazinoic acid iso-butyl ester	C	E	A
18 pyrazinoic acid n-octyl ester	A	B	A
17 pyrazinoic acid pivaloyloxymethyl ester	A	A	A
31 pyrazinoic acid phenyl ester	D	D	A
32 pyrazinoic acid-4-chlorophenyl ester	B	B	A

Pyrazine Derivative (200 $\mu\text{g/ml}$ )	<i>M. intracellulare</i> ATCC13950 (7 days)	<i>M. avium</i> ATCC25291 (14 days)	<i>M. tuberculosis</i> KK11-20 (21 days)
15 2-acetyl pyrazine	×	×	×
36 2-cyano pyrazine	×	×	×
37 2-hydroxy pyrazine	×	×	×
38 2-amino pyrazine	E	×	×
39 2-amino 5-methyl pyrazine	×	×	×
9 1-methyl pyrazinium iodid 4-oxid	×	×	×

Pyrazinoic Hygrazide Derivative (200 $\mu\text{g/ml}$ )	<i>M. intracellulare</i> ATCC13950 (7 days)	<i>M. avium</i> ATCC25291 (14 days)	<i>M. tuberculosis</i> KK11-20 (21 days)
19 pyrazinohydrazide	×	×	×
22 5-methyl pyrazinohydrazide	×	×	×
24 pyrazinohydrazide-4-oxide	N.D.	N.D.	N.D.
23 5-methyl pyrazinohydrazide-4-oxide	E	×	×
28 2-pyrazinoyl pyrazinohydrazide	N.D.	N.D.	N.D.

tuberculosis, H37Rv 株 (KK11-20) を標準株として用いた。凍結保存されていたこれら菌株を溶解し、Middlebrook 7H9 液体培地に培養し、さらにもう一代同培地に継代した。第二代継代の菌が対数増殖期で 530 nm での濁度 (OD) が 0.132 をやや上回ったときに、OD を 0.132 に調整して実験に用いた (接種用培養菌)。

### 3) スクリーニング・テスト

各薬剤は溶解性によって蒸留水、蒸留水と dimethyl sulfoxide (DMSO) との 1:1 (v/v) 混合溶液、または DMSO に溶解し、pH 6.0 に調整した Middlebrook 7H9 液体培地に終末濃度 200  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加した。比較のための PZA 培地の調製に当たっては、それぞれの薬剤の溶解に用いた溶解液を用いて PZA を溶解した。上述の接種用培養菌の 0.1 ml を、薬剤を添加した 7H9 液体培地 (pH 6.0) 5.0 ml (培養用試験管 14.5  $\times$  1.8 cm) に加え、37°C で培養した。530 nm での OD を 1 日または 2 日おきに測定し (Photoelectric Photometer, Model EPO-B, 平山産業, 東京), 薬剤添加培地の OD (OD-TD) を PZA 添加培地の OD (OD-PZA) と比較した。薬剤非添加培養の OD がほぼ 0.400 に達する *M. intracellulare* では 7 日目, *M. avium* では 14 日目, *M. tuberculosis* では 21 日目の値によって (OD-TD/OD-PZA)  $\times$  100% の値を計算し、各薬剤の PZA に対する相対的抗菌活性を判断した。

## 結 果

1) スクリーニング・テストに及ぼす培地 pH の影響よく知られているように<sup>2)</sup>, PZA は中性の培地においてよりも酸性の培地においてより強い抗ミコプラズマ活性を示す。しかし、pH 5.0~5.5 のような酸性培地では、ミコプラズマの増殖は貧弱で不安定である。より安定した菌の発育の見られる pH 6.0 培地で、合成した化合物の PZA に対する相対的抗ミコプラズマ活性の評価が可能かどうかを検討した。

図に示したように、PZA の抗菌活性は pH 6.0 におけるよりも pH 5.5 でのほうがやや強かったが、pH 5.5 培地での菌の発育は悪く、また、試験した PZA, No. 26, No. 29 の 3 薬剤の抗菌活性の相対的評価については両方の培地で同様であった。データは示さなかったが、*M. tuberculosis* および *M. avium* でも同様の結果であった。この結果から、PZA より優れた抗菌活性を持つ薬剤をスクリーニングする目的には pH 6.0 培地が適していると考え、今後の実験は pH 6.0 に調整した Middlebrook 7H9 液体培地を用いて行った。

### 2) スクリーニング・テストの結果

方法の項で述べた (OD-TD/OD-PZA)  $\times$  100% の

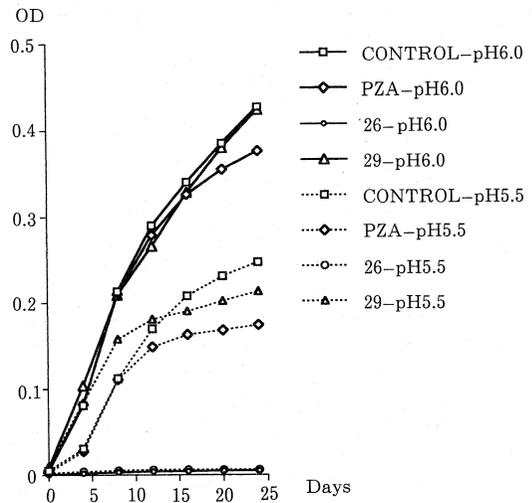


Fig. Comparison of pH 6.0 & pH 5.5, *M. intracellulare*

値によって各薬剤の PZA に対する相対的抗ミコプラズマ活性を評価した。この値が 10% 以下の場合を A ランク, 11-20% を B ランク, 21-40% を C ランク, 41-60% を D ランク, 61-80% を E ランクとし, 81% 以上の薬剤は PZA よりも優れた薬剤という目的に不適格として表では  $\times$  印で示した。結果を表に示した。

*M. tuberculosis* に対しては, 11 薬剤 (No. 12, 13, 17, 18, 21, 25, 26, 31, 32, 34, 35) が A ランクで, さらに 4 薬剤 (No. 2, 8, 11, 29) が B ランクであった。*M. avium* に対しては, 2 薬剤 (No. 35, 17) が A ランクで, 2 薬剤 (No. 18, 32) が B ランクであった。*M. intracellulare* に対しては, 5 薬剤 (No. 17, 18, 26, 34, 35) が A ランクで, 2 薬剤 (No. 21, 32) が B ランクであった。

## 考 察

PZA は最初 Hall ら<sup>7)</sup> によって aminopyrazine 合成の中間産物として合成されたが, その抗結核菌活性は 1952 年になって初めて報告されている<sup>8)-11)</sup>。同じ年に, Kushner らは<sup>12)</sup>, 49 種類の PZA 誘導体および 14 種類の関連化合物の合成法を報告し, マウスでの実験結核感染に対するそれらの *in vivo* での活性について簡単に触れているが, *in vitro* での抗ミコプラズマ活性については報告されていない。

PZA は非常にユニークな抗結核剤であり, 中性の培地ではむしろ弱い活性しか示さず, 酸性の培地でより強い活性を示す<sup>2)</sup>。食細胞内の結核菌に対して抗菌活性が

強い<sup>1)</sup>。さらに、Isoniazid との組み合わせでマウスの実験的結核症に対して著明な効果を示し<sup>13)</sup>、ヒトの結核症の短期強化化学療法において Isoniazid, Rifampicin に次ぐ重要な薬剤の地位を占めている<sup>3)14)~16)</sup>。

PZA の作用機序については不明の点が残されているが、結核菌の菌体内で結核菌の酵素である Pyrazinamide deamidase の作用によって真の活性物質である Pyrazinoic acid に転換することによって抗菌作用を発揮すると考えられている<sup>17)~19)</sup>。この仮説が成立するとすれば、PZA 類縁化合物のなかと同じような作用機序によって抗ミコバクテリア活性を示す薬剤が発見できる可能性が考えられる。

Kushner ら<sup>12)</sup> が報告した化合物では有望な成績は得られていないが、われわれは上に述べた仮説に従って種々の PZA 類縁化合物を合成し、その *in vitro* における抗ミコバクテリア活性を検討した。われわれの主要な戦略は、種々の PZA 類縁体または Pyrazine 誘導体を合成し、そのなかから *M. tuberculosis* に対して PZA よりも効果が優れ、MAC に対しても有効で、望ましくは殺菌的に働く薬剤を見いだすことである。この目的で 39 種類の化合物を合成した。このうち 7 化合物 (No.7, 8, 14, 19, 20, 21, 34) は Kushner ら<sup>12)</sup> のシリーズにも含まれている。4 化合物は培養実験に利用できる通常の溶媒に不溶または難溶でテストできず、残りの 35 化合物についてテストし、PZA との相対的抗菌活性についてランキングを行った。表に示すように、*M. tuberculosis* については 11 剤、*M. intracellulare* については 5 剤、*M. avium* については 2 剤が A ランクに、またそれぞれ 4, 2, 2 剤が B ランクにランキングされた。

これらのうち、*M. tuberculosis* および *M. intracellulare* の両菌種に対していずれも A ランクで、*M. avium* に対しても A, B または C ランクであった 4 剤、すなわち、Pyrazinoic acid pivaloyloxymethyl ester (No.17), Pyrazinoic acid n-octyl ester (No.18), Pyrazine thiocarboxamide (No.34), N-hydroxymethyl pyrazine thiocarboxamide (No.35) については、さらに詳細な *in vitro* の抗ミコバクテリア活性について検討し、PZA が *M. tuberculosis* に対して弱い静菌活性しか示さないような条件下で *M. tuberculosis* および MAC のどちらにも静菌活性のみならず殺菌活性をも示す結果を得て、別に報告した<sup>20)</sup>。これらの薬剤のマウスでの実験的ミコバクテリア感染症に対する効果については、現在検討中である。

また、*M. tuberculosis* に対して A ランクで、*M. intracellulare* に対して A または B ランクであった N-hydroxy pyrazinamide (No.21) および N-hydroxy pyrazinamide-4-oxide (No.26) の 2 剤につ

いては、現在より詳細な検討を行っている。

今回の研究はスクリーニングのための実験であるが、いくつかの興味ある事実が示唆されている。菌株別で見ると、*M. tuberculosis* に対して有効な薬剤が最も多く、*M. intracellulare* に対して有効な薬剤の数がこれにつき、*M. avium* に対して有効な薬剤は最も少なかった。*M. tuberculosis* に対して無効または低いランクで MAC に対して A, B, C などの高いランクを示す薬剤はなかった。

また、化学構造と抗菌活性との関係では、例えば、Pyrazinoic acid の ester 類においては短鎖のものでは活性が弱く、鎖長とともに活性が増し、n-octyl および pivaloyloxymethyl ester で強い活性が見られた。

また、PZA および Pyrazinamide-4-oxide の N-hydroxy 誘導体とともに *M. tuberculosis* と *M. intracellulare* に対して A ランクであったが、N-hydroxymethyl pyrazinamide は 3 菌種についていずれも × であり、N-hydroxymethyl pyrazinamide-4-oxide は *M. tuberculosis* に対しては A ランク、MAC には × であった。

これら所見は、今後の新薬開発に示唆を与えるものであり、また、PZA の作用機序としての pyrazinoic acid 仮説の検証にも手がかりを提供すると考えられる。

これらのテストはすべて pH 6.0 に調整した Middlebrook 7H9 液体培地を用いて行った。よく知られているように、PZA は pH 5.0 や 5.5 のような酸性培地において pH 6.0 におけるより強い活性を示す。しかし、pH 5.0 や 5.5 の培地ではミコバクテリアの発育は貧弱で不確実である。さらに、図に示したように、試験薬剤の PZA に対する相対的抗菌効果は pH 5.5 と pH 6.0 とで同様である。これらの結果によって、スクリーニングの目的には、むしろ pH 6.0 培地を用いる方が合理的であると言える。他の研究者らも、同様の理由で pH 6.0 培地を PZA に対する感受性試験や MIC 測定に用いている<sup>19)21)22)</sup>。

## 文 献

- 1) Mackaness GB : The intracellular activation of pyrazinamide and nicotinamide. *Am Rev Tuberc Pulm Dis.* 1956 ; 74 : 718-728.
- 2) Mc Dermott W, Tompsett R : Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments *in vitro*. *Am Rev Tuberc.* 1954 ; 70 : 748-754.
- 3) Steele MA, Des Prez RM : The role of pyrazinamide in tuberculosis chemotherapy. *Chest.* 1988 ; 94 : 845-850.

- 4) Snider DE Jr, Raviglione M, Kochi A : Global burden of tuberculosis. *In* : Tuberculosis : Pathogenesis, protection, and control, Bloom BR, ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1994 ; 3-11.
- 5) Chin DP : *Mycobacterium avium* complex and other nontuberculous mycobacterial infections in patients with HIV. *Seminars in Respir Infect.* 1993 ; 8 : 124-138.
- 6) Horsburgh CR Jr : *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl J Med.* 1991 ; 324 : 1332-1338.
- 7) Hall SA, Spoerri PE : Syntheses in the pyrazine series. II. Preparation and properties of aminopyrazine. *J Am Chem Soc.* 1940 ; 62 : 664-665.
- 8) Dessau FI, Yeager RL, Burger FJ, et al. : Pyrazinamide (Aldinamide) in experimental tuberculosis of the guinea pig. *Am Rev Tuberc.* 1952 ; 65 : 519-522.
- 9) Dessau FI, Burger FJ, Yeager RL, et al. : A method for the determination of *in vitro* sensitivity of tubercle bacilli to pyrazinamide (Aldinamide). *Am Rev Tuberc.* 1952 ; 65 : 635-636.
- 10) Malone L, Schurr A, Lindh H, et al. : The effect of pyrazinamide (Aldinamide) on experimental tuberculosis in mice. *Am Rev Tuberc.* 1952 ; 65 : 511-518.
- 11) Yeager RL, Munroe WGC, Dessau FI : Pyrazinamide (Aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc.* 1952 ; 65 : 523-545.
- 12) Kushner S, Dalalian H, Sanjurjo JL, et al. : Experimental chemotherapy of tuberculosis. II. The synthesis of pyrazinamides and related compounds. *J Am Chem Soc.* 1952 ; 74 : 3617-3621.
- 13) McCune RM Jr, Tompsett R, McDermott W : The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration techniques. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J Exp Med.* 1956 ; 104 : 763-802.
- 14) American Thoracic Society : Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 ; 149 : 1359-1374.
- 15) Fox W : Short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis and some problems of its programme application with particular reference to India. *Bull Internatl Union -Against Tuberc.* 1985 ; 60 : 40-49.
- 16) 亀田和彦 : 今日におけるピラジナマイドの地位 (第70回日本結核病学会総会・特別講演). *結核.* 1995 ; 70 : 445-455.
- 17) Konno K, Feldmann FM, McDermott W : Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis.* 1967 ; 95 : 461-469.
- 18) Heifets LB, Flory MA, Lindholm-Levy PJ : Does pyrazinoic acid as an active moiety of pyrazinamide have specific activity against *Mycobacterium tuberculosis*? *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 ; 33 : 1252-1254.
- 19) Salfinger M, Crowle AJ, Reller LB : Pyrazinamide and pyrazinoic acid activity against tubercle bacilli in cultured human macrophages and in the BACTEC system. *J Infect Dis,* 1990 ; 162 : 201-207.
- 20) Yamamoto S, Toida I, Watanabe N, et al. : *In vitro* antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 ; 39 : 2088-2091.
- 21) Salfinger M, Heifets LB : Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988 ; 32 : 1002-1004.
- 22) Heifets LB : Drug susceptibility tests in the management of chemotherapy of tuberculosis. *In* : Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections, Heifets LB, ed. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991 ; 89-121.