STUDIES ON ANTIMYCOBACTERIAL SUBSTANCES

I. SELECTION OF ANTILEPROUS SUBSTANCES
WORTHY FOR CLINICAL TRIAL

Osamu TAMEMASA and Sadae TSUTSUMI

(National Institute for Leprosy Research)

In view of the lack of adequate methods for the selection of antileprous substances worthy for clinical trial, the authors have been much interested in Bun-Hoi's postulation that substances effective against human leprosy exhibit both antituberculous and antifungal activities, and that these substances are soluble in fat solvents. In this connection about twenty substances known to be antileprous, antituberculous or antifungal were determined of the *in vitro* antituberculous and antifungal activities, as well as of solubility in fat solvents.

Almost all the substances known to be antileprous showed, though not so strong, definite antituberculous and antifungal activities. Their solubility in fat solvents, however, was not remarkable. Among the tested substances, o-aminophenol was found to possess the properties to satisfy best Buu-Hoi's postulation, but it was ineffective in few cases of lepromatous leprosy. This discrepancy might be due to the specific response of o-aminophenol on the dehydrogenase reaction of *Mycobacteria* including human and murine leprosy bacilli.

In conclusion, it was difficult to determine whether Buu-Hoi's postulation has any practical use as a screening test for the selection of antileprous substances worthy for clinical test.

抗酸菌病治療剤の研究(第1報)

人治らい実験を試みる価値のある薬物の選択について

為 政 脩, 堤 貞 衛

国 立 人 治 ら い 研 究 所

(1959年8月15日受稿)

人治らいの実験的薬療法の研究のために試用される薬物の選択は現在主として、強力な抗菌作用を有する抗結核剤、抗鼠らい物質、あるいはそれらと近縁の化学構造を有する化合物の中から行なわれている。人治らい菌の試験管内抗菌力の測定あるいは化学療法的動物実験の不可能な現状においては、なんらかの次善の選別法の出現することが望ましいことは言及するまでもない。この問題

に対して Buu-Hoi¹⁾ は今までに 治らい作用の認められた物質は、抗結核菌作用と抗微生物作用を共に有して、その上脂溶性を有する物質であるとの考察を行つてゐる。

著者らは人治らいの臨床実験に供して見る価値のある薬物の選択基準に乏しい現在、Buu-Hoi の見解に興味をおぼえたのであるが、同教授は、DDS、Thibione、大風子油

脂肪酸, SM, INAH, PAS などの比較的少数の薬物についての性質からその結論を下しているにすぎないことと, 試験管内抗菌力の具体的データの記載のないことにかんがみ, さらに多くの薬物について試験管内抗菌力および脂溶性溶媒に対する溶解性を測定した上, 同氏の見解を検討してみることにした。

実験方法および実験結果

1) 供試薬物

下記の21種の化合物を選んだが, その内相当数の物質はすでにらいの臨床実験に供せられたことがあるか, あるいは現在治療に用いられており, (No. 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 (但しそのグリセッド)), またその他の物質は試験管内または生体内抗結核作用(No. 1~11, 18, 19), 抗黴作用(No. 20, 21)のあることの認められている物質, あるいはまたそれらとなんらかの関係を有する物質である。

(1) p-Aminosalicylic acid (PAS), (2) Dihydrostreptomycin (DHSM), (3) p-Acetylaminobenzaldehyde thiosemicarbazone (Thibione), (4) Isonicotinic acid hydrazide (INAH), (5) Pyrazineamide (PZA), (6) o-Aminophenol (AP)²⁾, (7) Hydroxyprocaine sulfate (HOP), (8) Hydroxyprocaine-penicillin sulfate (HOPP), (9) Oxymycillin (OM)(=HOPP plus DHSM)³⁾, (10) Ftivaside (FS), (11) Acidomycin (AM)⁴⁾, (12) Diaminodiphenylsulfone (DDS), (13) Proethyl, (14) Promizole, (15) Promacotin, (16) Dihydrazinodiphenylsulfone (DHDS)⁵⁾, (17) Diaminodiphenylsulfoxide (DDSO), (18) Chaulmoogric acid, (19) α -Phenylmyristic acid⁶⁾ (20) Dehydroacetic acid, (21) Nonylpyrazole⁷⁾

2) 試験管内抗結核菌作用 (第1表)。

抗結核菌作用の測定は岡本らの²⁾ 方法に順拠して行つた。培地としては10%馬血清加キルヒナー培養液を用い, 接種菌量は H 37 Rv 株の 37°C, 10日間培養菌の菌浮遊液 0.1 mg を被試験液 5 cc に接種し, 37°C, 21日間培養後の結果について, 完全発育阻止濃度と対照の発育より明かに劣るとみられる不完全発育阻止作用を判定した。抗菌力を示した表中, 発育阻止濃度の記載のないのは高濃度で薬物の不溶なためである。抗菌力の測定はすべて薬物の同一濃度について2本の試験管について観察した。

3) 試験管内抗黴作用 (第2表)

Aspergillus niger, *Trichophyton mentagrophytes* を選び, 前者はツアベックとサブローの液体培地について

Tabl 1. *In Vitro* Antitubercular Activities

Substance	Minimum Growth-inhibitory Concentration	
	completely inhibited	imcompletely inhibited
1. PAS	1: 256.000	1: 1.024.000
2. DHSM	1: 256.000	1: 1.024.000
3. Thibione	1: 16.000	1: 256.000
4. INAH	1: 512.000	1: 2.048.000
5. Pyrazineamide	1: 4.000	1: 16.000
6. o-Aminophenol	1: 512.000	1: 1.024.000
7. Hydroxyprocaine sulfate	1: 256.000	1: 1.024.000
8. Hydroxyprocaine-penicillin sulfate	1: 128.000	1: 512.000
9. Oxymycillin	1: 256.000	1: 1.024.000
10. Ftivaside	1: 256.000	1: 2.048.000
11. Acidomycin	1: 64.000	1: 1.024.000
12. DDS	1: 4.000	1: 32.000
13. Proethyl	1: 4.000	1: 16.000
14. Promizole	1: 2.000	1: 8.000
15. Promacotin	1: 2.000	1: 4.000
16. Dihydrazinodiphenylsulfone	1: 4.000	1: 16.000
17. Diaminodiphenylsulfoxide	1: 2.000	1: 8.000
18. Chaulmoogric acid (Na salt)	1: 8.000	1: 16.000
19. α -Phenylmyristic acid (Na salt)	1: 8.000	1: 32.000
20. Dehydroacetic acid	1: 2.000	1: 4.000
21. Nonylpyrazole	1: 16.000	1: 32.000

Note: Medium—Kirchner's nutrient fluid (pH 7.0) containing 10% horse serum.

Bacilli inoculated—M. tuberculosis H 37 Rv, 0.1 mg/5 cc medium.

Observation—After 21 days at a temp. of 37°C.

後者は, サブロー培地についてのみ行なつた。菌量は湿菌量で0.1mg/5cc 試験液を接種した。判定は *Asp. niger* については, ツアベック培地中では 25°C, 3日間後, サブロー培地中では 25°C, 2日間後に行い, *Tri. mentagrophytes* については25°C, 5日間後に行なつた。培地の pH はいずれも 7.0.

4) 脂溶性溶媒に対する溶解性 (第3表)

物質 5 mg を試験管内に秤取し, 2 cc の溶媒を加えて溶解される状態を観察した。

成績の総括と考察

以上の抗菌力測定の結果から, 現在治らい効果のあるとされている薬物は, 程度の差はあるが, またいわゆる抗結核剤と比較して微弱ながら一定の試験管内抗結核菌作用を示し, このことはすでに報告された諸家の実験結果と一致する。そして抗黴作用については治らい作用を

Table 2. *In Vitro* Antifungal Activities

Substansec	<i>Aspergillus niger</i>				<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	
	Minimum Growth-inhibitory Concentration					
	completely inhibited		imcompletely inhibited		completely inhibited	imcompletely inhibited
	Czapek's medium	Sabouroud's medium	Czapek's medium	Sabouroud's medium	Sabouroud's medium	Sabouroud's medium
1. PAS			1: 1,000	1: 1,000		<1: 1,000
2. DHSM			<1: 1,000	<1: 1,000		1: 2,000
3. Thibione			<1: 4,000	<1: 4,000		<1: 4,000
4. INAH			1: 1,000	1: 1,000		<1: 1,000
5. Pyrazineamide			1: 1,000	<1: 1,000		<1: 1,000
6. o-Aminophenol	1: 32,000	1: 8,000	1: 256,000	1: 32,000	1: 32,000	1: 128,000
7. Hydroxyprocaine	1: 2,000		1: 4,000	1: 1,000		<1: 1,000
8. Hydroxyprocaine-penicillin sulfate			1: 1,000	1: 1,000		<1: 1,000
9. Oxymycillin			1: 1,000	1: 1,000		1: 1,000
10. Ftivaside			1: 1,000	1: 1,000		<1: 2,000
11. Acidomycin			1: 8,000	1: 4,000		1: 1,000
12. DDS	1: 2,000		1: 4,000	1: 2,000		<1: 2,000
13. Proethyl			1: 2,000	1: 2,000		<1: 2,000
14. Promizole			1: 2,000	1: 2,000		<1: 2,000
15. Promacetin			<1: 1,000	<1: 1,000		<1: 1,000
16. Dihydrazinodiphenylsulfone	1: 2,000	1: 2,000	1: 4,000	1: 2,000	1: 2,000	1: 8,000
17. Diaminodiphenylsulfoxide			1: 2,000	1: 2,000		<1: 2,000
18. Chaulmoogric acid (Na salt)	1: 2,000	1: 2,000	1: 4,000	1: 4,000		1: 2,000
19. α -Phenylmyristic acid (Na salt)	1: 2,000	1: 2,000	1: 4,000	1: 4,000		1: 2,000
20. Dehydroacetic acid	1: 2,000	1: 2,000	1: 16,000	1: 16,000	1: 4,000	1: 8,000
21. Nonylpyrazole	1: 64,000	1: 64,000	1: 128,000	1: 128,000	1: 128,000	1: 512,000

Note: The amount of fungi inoculated—0.1 mg/5 cc medium. Observation—In the case of *Asp. niger*, after 3 days at a temp. of 25°C when using Czapek's medium and after 2 days at a temp. of 25°C when using Sabouroud's medium. In the case of *Tri. mentagrophytes*, after 5 days at a temp. of 25°C when using Sabouroud's medium.

有するある種の物質は微弱な試験管内発育阻止作用を有している。即ち DDS, Chaulmoogric acid, Dihydratinodiphenylsulfone はツアベック培地中の *Asp. niger* に対して 1: 2,000 で完全に発育を阻止し, Promizole, Proethyl, Diaminodiphenylsulfoxide は 1: 2,000 で不完全発育阻止作用をするが, Promacetin は 1: 1,000 の濃度でも発育になんらの影響を及ぼさない。またこれら物質は *Tri. mentagrophytes* に対して 1: 1,000 で完全発育阻止作用が現われないかまたは極めて微弱な発育阻止作用を示すに過ぎない。また一般に, 判定の日数は異なるのであるが, 被試験物質は *Tri. mentagrophytes* に対してより *Asp. niger* に対してより強く抗微生物的に作用する。

脂溶性については, 治らい作用のある物質は Chaulmoogric acid を除いてさほど強い溶解性をもっているとは

考えられない。この性質は, 人らい菌がリビッドに富んでおり, また多くの菌は脂肪の多い泡沫細胞中にいるのでらいの化学療法上重要であるかも知れない。

試験した物質のうちには, 強い抗結核菌作用とかなり強力な抗微生物作用を示し, また脂溶性にも富んでいる物質として o-Aminophenol があり, また抗結核菌作用は劣るが抗微生物作用の強い Nonylpyrazole がある。そこで o-Aminophenol が Buu-Hoi の仮説によく適合する物質であるので, 国立多磨全生園で原田博士⁸⁾ が数例の結節型患者に応用されたがみるべき治療効果は得られなかった。またこれより数年前に谷奥教授⁹⁾ が独自に同物質について行なわれた臨床経験においても治らい作用は認められなかった由である。この問題に関する Buu-Hoi 教授との討論¹⁰⁾において, 同氏が最近らいに有効であるこ

Table 3. Solubility in Fat Solvents

Substance	Ether	Acetone	Chloro- form	Benzen
1. PAS	—	++	—	—
2. DHSM	—	+	—	—
3. Thibione	—	+	—	—
4. INAH	—	+	—	—
5. Pyrazineamide	—	++	++	—
6. o-Aminophenol	++	++	+	—
7. Hydroxyprocaine sulfate	—	—	—	—
8. Hidroxyprocaine- penicillin sulfate	—	—	—	—
9. Oxymyccillin	—	—	—	—
10. Ftivaside	—	+	—	—
11. Acidomycin	—	+	—	—
12. DDS	—	++	+	—
13. Proethyl	—	++	+	—
14. Promizole	—	++	—	—
15. Promacotin	—	++	—	—
16. Dihydrayinodiphe- nylsulfone	—	+	—	+
17. Diaminodiphenyl- sulfoxide	—	+	+	+
18. Chaulmoogric acid	++	++	++	++
19. α -Phenylmyristic acid	++	++	++	++
20. Dehydroacetic acid	++	++	++	++
21. Nonylpyrazole	++	++	++	++

Note: —5 Milligrams of a substance is added into 2 cc of a solvent and the solution is permitted to stand for 24 hrs. at the room temperature. —... practically insoluble, +...fairly soluble, ++...almost or perfectly soluble.

とを報告した Diphenylthiourea 誘導体が抗微生物作用を有することからしても自己の見解は依然妥当であると思ひ、また治らい効果を有する物質は抗結核菌、抗微生物作用ならびに脂溶性を有する物質の中に存在するが、逆にそれらの性質を具有する物質がすべてに有効であるとは考えていないとの見解を表明した。

最近著者ら¹¹⁾の研究によると、上記の o-Aminophenol は鼠らい菌の脱水素に対して影響を与える数少ない物質の中の一つであり、従つて o-Aminophenol はらい菌に対して特殊の作用を有する物質であると考えられるから、o-Aminophenol を Buu-Hoi の見解の反証として引用することは不適當であるかも知れない。らい菌の所属する *Mycobacterium* は分類学的にも生化学的にも微と近縁の關係にあり、依然として Buu-Hoi の見解には興味を持たれるわけであるが、本実験の範囲では明確な結論は得られなかつた。従つて今後出現するであろう抗らい物質についてこれらの性質を検討した上で結論を下すのがより妥当であると考えられる。またらいの臨床実験

に供すべき薬物は抗結核菌作用のみでなく、抗微生物試験、脂溶性試験を行なつて今後の資料とすることが望ましいと思われる。

結 論

治らい作用を示す物質は抗結核菌作用と抗微生物作用を共有し、脂溶性を有するという Buu-Hoi の見解を検討する目的で、20余種の治らい関係の物質について試験管内抗結核菌力、抗微生物力および脂溶性を測定した。その結果、スクリーニングテストとして利用するほどの価値のある明確な關係は得られなかつたが、全く価値がないとも断定できなかつた。

本研究を始めるに当たり、終始御鞭撻を得ている本研究所小林所長、義江研究部長、東京大学石館教授に深謝し、実験上の薬物を分与された平野（東京女子医大）、石館（東大）、岡本（金沢大）、桶田（日本曹達研）、奥田（科研化学）、武田（東大伝研）、立岡（武田薬工研）の諸博士に感謝する。また抗菌力の測定に当り便宜を与えられた細菌研究室の中山、林岡博士に感謝する。

文 献

- 1) Buu-Hoi, N. P.: Intern. J. Leprosy **22**, 16(1954).
- 2) Okamoto, H.: 金沢結研年報 **4** Appendix (1946).
- 3) Percy, E.: Intern. J. Leprosy **23**, 231 (1955).
- 4) 佐谷, 西村, 野島, 桜井, 宮崎他: レブラ **24**, 174 (1955); Intern. J. Leprosy: **23**, 124 (1955).
- 5) Yoshie, Y., Takeda, Y. *et al.*: Japanese J. Exp. Med. **22** 317 (1952).
- 6) 浅野, 本松, 為政: 薬誌 **70** 28 (1950).
- 7) 小菅, 桶田, 寺石, 伊藤, 小坂: 同上 **74**, 819 (1954).
- 8) 原田: 私信
- 9) 谷奥: 第29回 (1956, 4月) 日本らい学会総会における討論発言
- 10) プ・ホイ講演会: 1957・5月11日於伝染病研究所 (レブラ **26**, 294 (1957) 参照).
- 11) Tamemasa, O., Tsutsumi, S.: Japanese J. Exp. Med. **28**, 183 (1958).