Studies on Anti-Leprotic Agents : On 4-Dimethylaminobenzaldehyde-4'-oxyphenyl- thiosemicarbazone (DOT) and It's Drivatives

YOSHITSUGU SATAKE

National Leprosarium Kikuchi-Kefuen (Director. Dr. K. Shiga)

Since the discovery of anti-leprotic agents such as Sulfone, long acting Sulfamine, Antibiotics and Thiourea etc., other new drugs have been studied in respect to their anti-leprotic activity.

The thiourea family drugs have been applied in leprosy by many authors, all reporting good results. The chemical structural formula of thiourea and thiosemicarbazide are exactly like each other. There-fore, the author has expected good effect to treatment of leprosy by thiosemicarbazide drugs. On this idea, the author has synthesed new some of compounds as follow.

These compounds have proved antibacterial action ($H_{37}RV$) in 70,000 100,000 times diluted solutions, and these toxicity was very little in experiment.

Accordingly, the author believes these compounds can be used to application for clinic of leprosy or tuberculosis.

治癩薬の研究: 4-Dimethylaminobenzaldehyde 4'-oxyphenyl-thiosemicarbazone (DOT) 並びにその誘導体について

佐 竹 義 継

国立療養所菊池恵楓園

(園長 志賀一親博士)

(受付1965年11月11日)

A. 前 言

sulfone¹⁾ 剤が癩に有効である事は周知の通りである。次に thiourea²⁾ 系薬物が登場しその効果は認められた。著者は前者と構造を近似する thiosemicarbazide 系化合物中にも有効な治癩剤があるだろうことは予想しその研究に着手した³⁾。A. M. Alonso もこの系列の T B 1 について治癩効果を発表している。よって著者は化学構造が Cida 1906 に類似した thiosemicarbazone 化合物即ち 4-Dimethylaminobenzaldehyde-4'-oxyphenyl-thiosemicarbazone (DOT と仮称) 及びその -OH 基の H を alkyl 基で置換した methoxy, ethoxy, の誘導体を新たに合成した。(Fig 1) しかもその中 DOT は優秀な抗菌作用 (M. tuberculosis AOYAMA に対して) を

示し、他の二者もこれにはやや劣るが各々抗菌力を有する事を知った。

よってこれ等を臨床に應用する前提として基礎実験を行なったのでここに発表する。

B. 実 験 の 部

1. 合 成

次のような行程によって合成を行なった。(Fig2) 先づ p-aminophenol (または methoxy 或は ethoxy-aniline) を二硫化炭素と煮沸し析出する 4,4'-dioxidyphenylthiourea (または 4,4'-dimethoxy, 或は 4,4'-diethoxyphenylthiourea) を濾取しこれを hydrazinhydrate で分解して p-oxyphenylthiosemicarbazide (または p-methoxy 或いは p-ethoxyphenylthiosemicarbazide) 得

Fig. 1 The structural formula of compounds

Fig. 2 Process of synthesis of alkyloxy-DOT

(R = CH₃, C₂H₅)

る。これと dimethylaminobenzaldehyde とを無水 Et-OH で縮合させて DOT (または methoxy-DOT, および ethoxy-DOT) を得た。

4, 4'-dioxy-diphenyl-thiourea の合成

Kalckhoff⁵⁾ および Hegershoff⁶⁾ の方法によって合成した, p-aminophenol 22.0g, Et-OH 250ml CS₂ 7.6g. 少量の S, 以上混合水浴上に 2 hrs. 加温沸騰, 冷後析出した鱗片状結晶を熱湯から再結晶した。収量 10g, m. p. 220°~225°C C₁₃H₁₂O₂N₂S 元素分析 Calcd, C 60.0% H 4.61% N 10.7%, : Found C 59.70% H 4.71% N 9.35%, 本品は文献記載のものと一致する。

4, 4'-dimethoxy-diphenyl-thiourea の合成

H. Salkowski⁷⁾ の方法に準拠して合成した。p-anisidin 24.8g, Et-OH 150ml, CS₂ 7.6g, S 少量を加えて 2 hrs. 加温煮沸した。冷後針状結晶析出, Et-OH から再結晶, m. p. 191°~192°C 収量 12g, C₁₅H₁₆O₂S 元素分析 Calcd, C 63.34% H 5.63% N 8.54% H 6.01% N 8.25% よって文献記載物と一致する。

4, 4'-diethoxy-diphenyl-thiourea の合成

Hegershoff⁶⁾ の方法によって合成した。即ち p-phenetidin 50g に CS₂ 20g, Et-OH 300ml., S 7g. を混合し水浴上 2 hrs. 還流煮沸した。析出した鱗片状結晶を熱湯から再結晶した。収量 40g, m. p. 168°~170°C, C₁₇H₂₀O₂N₂S, 分元素分析 Calcd C 64.5% H 6.3%

N 8.8%, Found C 64.82% H 6.43% N 8.95%, よって文献記載物に一致する。

4-oxy-phenyl-thiosemicarbazide の合成

4, 4'-dioxy-phenyl-thiourea 20g に 50% hydrazine hydrate 10g, Et-OH 300ml を加えて 4 hrs. 水浴上に還流煮沸すれば最初黄色から緑色となり再び淡黄色の溶液となる。約半量になるまで Et-OH を溜去し放冷すれば結晶析出する。Et-OH から再結晶, mp 168°~170°C 収量 12g C₇H₉ON₃S, 元素分析 Calcd, C 45.9%, H 4.92% N 23.0% : Found C 45.28% H 4.80% N 23.90%

4-methoxy-phenyl-thiosemicarbazide の合成

本化合物の合成として既に Busch, Ulmer⁸⁾ 等の報告があるが著者は 4, 4'-dimethoxy-diphenyl-thiourea より出発した。即ち本品を 10g. とりこれに 50% NH₂NH₂ 5g. Et-OH 150ml を加えて 4 hrs. 水浴上に還流煮沸して冷後析出する板状淡紅色の結晶を濾取し Et-OH から再結晶した。収量 3g., mp 145~146°C, C₈H₁₁ON₃S, 元素分析 Calcd. C 48.73%, H 5.58%, N 21.31%, : Found C 49.21%, H 5.32%, N 20.92%

4-ethoxy-phenyl-thiosemicarbazide の合成

本合成は前述同様 4, 4'-diethoxy-diphenyl-thiourea より出発した。本品 50g, を 50% NH₂NH₂ 25g, Et-OH 500ml, の溶液に加え 4 hrs. 還流煮沸した。冷後析出す

1) Elementary analysis thiosemicarbazide derivatives

No.	Formula	Molecular weight	mp C°	Appearance	Analysis					
					Calcd. (%)			Found (%)		
					C	H	N	C	H	N
I	R=H C ₁₆ H ₁₈ ON ₄ S	314	215	yellow needles	61.14	5.75	17.83	60.86	6.01	18.01
II	R=CH ₃ C ₁₇ H ₂₀ ON ₄ S	328	207~209	yellow powder	62.19	6.09	17.09	63.07	6.16	16.92
III	R=C ₂ H ₅ C ₁₈ H ₂₂ ON ₄ S	342	198~202	yellow powder	63.2	6.4	16.3	64.86	7.13	29.16

る白色結晶を濾取し更に濾液を減圧濃縮してその結晶を集めた。Et-OHから再結晶，収量20g. mp. 145~147°C, $C_9H_{13}ON_3S$, 元素分析 Calcd. C 51.1%, H 6.2%, N 19.9% : Found C 52.34%, H 6.39%, N 19.16%

4-dimethylamino-benzaldehyde-4'-oxyphenyl-thiosemicarbazone の合成

4-oxyphenyl-thiosemicarbazide 2.5gを先づ無水Et-OH

100ml. に溶解し次に 4-dimethylamino-benzaldehyde 2.1g. を加えて水浴上に還流煮沸 2 hrs. 最初黄色の液となり次に黄色針状の結晶析出する。冷後濾別して熱 Et-OHより再結晶する。mp. 215°C収量3.0g., $C_{16}H_{18}ON_4S$ 元素分析 Calcd C 61.14%, H 5.75%, N 17.83%, : Found. C 60.86%, H 6.01%, N 18.01%,

4-dimethylamino-benzaldehyde-4'-methoxy-phenyl-thiosemicarbazone の合成

2) Infrared absorption spectra

4-methoxy-phenyl-thiosemicarbazide 2.5g. を無水 Et-OH 300ml. に溶解し、これに 4-dimethylamino-benzaldehyde 1.8g. を加え水浴上に還流煮沸 2 hrs. 冷後析出した結晶を濾取し Et-OH から再結晶、収量 2.3g. 淡黄色粉状結晶, mp. 207~209°C, $C_{17}H_{20}ON_4S$, 元素分析 Calcd. C 62.19%, H 6.09%, N 17.07% : Found. C 63.07%, H 6.16%, N 16.92%

4-dimethylamino-benzaldehyde-4'-ethoxyphenyl-thiosemicarbazone の合成

4-ethoxyphenyl-thiosemicarbazide 15g. を無水 Et-OH 300ml. に溶解し、これに 4-dimethylamino-benzaldehyde 10.5g. を加え水浴上で還流煮沸 2 hrs. 最初澄明に溶解し時間の経過とともに黄褐の液となる、そして更に黄色結晶が析出する。冷後濾別 Et-OH の多量から再結晶, mp. 198~202°C 黄色粉状結晶収量 2.8g. $C_{18}H_{22}ON_4S$, 元素分析 Calcd. C 63.2%, H 6.4%, N 16.3% : Found C 64.86%, H 7.13%, N 16.92%

DOTおよび Methoxy-DOT, Ethoxy-DOT の元素分析並びに赤外線吸収スペクトルについて図表 1), 2) を参照

2. 毒性と抗菌作用

a) 毒性について

20g. 前後のマウス 8 の腹腔内にこれら化合物の生理食塩水懸水物を注射し 5 日間に於けるマウスの斃死を検討した。

平均致死量は次の通りである。

DOT 4300mg/kg ±

Methoxy-DOT 6850mg/kg ±

Ethoxy-DOT 5250mg/kg ±

以上の結果毒性はかなり弱かった。

b) 抗菌作用について

i) 使用菌…H₃₇RV 青山株

ii) 培地…変法 Kichner 合成培地に人血漿を10%に加えたものを使用した。

処 方

グリセリン	20ml
グルタミン酸ソーダ	10.0g.
クエン酸ソーダ	2.5g.
硫酸マグネシウム	0.6g.
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	3.0g.
K ₂ HPO ₄	4.0g.

以上を精製水100ml に溶解し、10%NaOHでPH6.8になるよう調整した。次に120°Cで20min. 滅菌しこれに人血漿を10%になるよう加えた。

iii) 試料……DOT, Methoxy-DOT, Ethoxy-DOT, の各々を少量の ethylenglycol に温時溶解し、この液を一定量採取し所定の濃度になるよう培地に加えた。

iv) 実施方法……上記の培地4.5ml を滅菌試験管に入れ一定濃度になるように培地にこの溶液を加えてその試料の濃度が1万倍から10万倍になるように各試験管を準備した。これに上記菌浮游液を0.1ml宛加えて37°Cに17日間培養し、その菌の発育程度を観察した。

以上の結果 DOT が最も抗菌作用 (H₃₇RV, 青山株 に対して) が強く Ethoxy-DOT, がこれに次ぎ, Methoxy-DOT が最も弱いがかし何れも優れた抗菌を有することが判明した。

Toxicity of DOT, Methoxy-DOT and Ethoxy-DOT
(administered intra-abdomineously)

Mice 20g. ±

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
dose mg. /kg.	3000	3500	4000	4500	5000	5500	6000	6500	7000	7500	8000
total of death	DOT	0/10	2/10	4/10	8/10	7/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Methoxy-DOT	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	3/10	6/10	8/10
	Ethoxy-DOT	0/10	0/10	1/10	2/10	4/10	6/10	7/10	10/10	10/10	10/10

Antibacterial action to *M. tuberculosis*
*H*₃₇RV (Aoyama) , 27 days

Dilution Compunds	10.000	20.000	30.000	40.000	50.000	60.000	70.000	80.000	90.000	100.000
	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
DOT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
Methoxy-DOT	—	—	—	—	—	—	—	+	++	++
Ethoxy-DOT	—	—	—	—	—	—	+	+	++	++
Contrast	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

c) 結 言

本研究に於て次の事項を明らかにすることを得た。
1) DOT, Methoxy-DOT, Ethoxy-DOT の合成法を確立した。
2) 以上3化合物の各々は毒性が低く医薬品として使用可能と考えられる。
3) この3化合物の各々は優れた抗菌作用を結核菌 *H*₃₇RV に於て示した。
以上の結果からDOT, Methoxy-DOT, Ethoxy-DOT は「らい」および結核症の臨床に応用し得る可能性があるものと思考される。
本研究に多大な激励と援助を賜った当園長志賀一親博士, 並びに医務部長中村啓八郎博士, および熊本大学赤塚政美博士, 化血研清崎俊之課長に敬意を表する。

参 考 文 献

1) Faget, et al : Public Health Report, 58, 1709 (1943)
2) Davey, T.F. and Currie, G. : Leprosy Review, 27, 94. (1956)
3) 佐竹 : 九州薬学会々報17, 10 (1961) 佐竹 : レプ
ラ第34巻第1号 (1965)
4) A. M. Alonso : VII International Cong. of Lepro-
logy. (1958)
5) Kalckhoff : Berichte der Deut. Chem. G. 16,
(1830)
6) Hegershoff : Ber. Deut. Chem. G. 32, 2246
7) H. Salkowski : Ber. Deut. Chem. G. 7, 1012
8) Busch, Ulmer : Ber. Deut. Chem. G. 35, 1714