415. 清水正夫, 内藤武男, 太田元吉, 吉川 徹, 堂森泰三: イソニコチン酸
ヒドラジド類縁化合物の合成並びに “*Mycobacterium tuberculosis*
A. T. C. C. No. 607” に対する抗菌性 (第1報)

Masao Shimizu, Takeo Naito, Genkichi Ohta, Tohru Yoshikawa, and Renzo
Dohmori: Synthesis of Compounds Related to Isonicotinic Acid Hydrazide
and their Bacteriostatic Activity against “*Mycobacterium*
tuberculosis A. T. C. C. No. 607.” I.

(Yanagishima Research Laboratory, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.*)

1952 年 2 月下旬にイソニコチン酸ヒドラジド (以下 INAH と略す) の抗結核作用が発表されて以来臨床成績の集積するに従つて結核症に対する有力な化学療法剤とならんとしつつある。著者等は此の報に接するや直ちに INAH を合成し諸所の細菌病理臨床の研究室に提供し外国製品との比較試験を試みてもらった。その結果は一部既に本年 5 月 17 日, 日本結核病学会関東地方学会に於いて伝研北本教授, 結研岩崎博士等に依つて報告せられ, その成績は米国に於ける発表と略々同一であるとの結論であつた。著者等は INAH 製造の工業化に対する研究を進めると共に各種酸ヒドラジドを合成し, その抗菌性を INAH と比較し化学構造の変化が及ぼす影響を知る目的で本研究に着手した。今回 INAH の位置異性体及び核素素を *N*-オキシドとしたる場合, 或いは之等を酸アミドとした場合に就いて一応の成績を得たので報告する次第である。

酸ヒドラジド, 酸アミドの合成法としては各カルボン酸エステルにヒドラチンヒドラート, 水性アンモニアを反応せしめる一般法に依つた。α, β, γ 共にすべて文献既知の物質で記載の融点に一致した (Table)。ただ INAH のみは 163⁽¹⁾ 167⁽²⁾ 170.5~171.5⁽³⁾ の記載があるが, 著者等の得た物質は mp 171~173° で分析値は一致した。*N*-オキシドはエステルを過酸化水素水醋でオキシド化した後ヒドラジド化アミド化する経路を取つた。此の場合 α のみは例外でエステルを過酸化水素水醋で処理すると mp 161~162° (decomp) で分析値がピコリン酸 *N*-オキシド (III) に一致する物質が得られた。(III) は Diels, Alder⁽⁴⁾ の記載に従いピコリン酸 (I) より過酸化水素水醋で得られ, 混融に依り同一なる事を確めた。Spring⁽⁵⁾ は (III) をメタノール塩酸でメチルエステ

ル (IV) となし, 次いでアミド化して (V) を得, mp 161~162° と記載している。著者等もこれを追試して同一 mp の物質を得た。更にヒドラチンヒドラートを作用せしめて mp 148~148.5° の (VI) を得た。なお (II) のエステルに過フタル酸を作用せしめて得た油状物 (VII) より各 (V) (VI) と同一物を得た。ニコチン酸エステルの場合には過酸化水素水醋或いは過フタル酸に依り同一のエステルの *N*-オキシドが得られる。イソニコ

* Hirakawabashi, Sumida-ku, Tokyo.

1) H. Meyer, G. Mally: Monatsh. **33**, 393 (1912).

2) 亀谷, 飯田: 本誌 **71**, 998 (1951).

3) C. Niemann, N. L. Richard, J. T. Hays: J. Am. Chem. Soc. **64**, 1678 (1942).

4) Diels, Alder: Ann. **505**, 103 (1933).

5) Spring: J. Chem. Soc. **1949**, Suppl. No. 1, 133.

チン酸エステルの場合過酸化水素氷醋で *N*-オキシド化し三塩化磷で処理したる後ヒドラチンヒドラートで処理し INAH が得られる故, エステルの *N*-オキシドである事確実である. 又 γ -エチルピリジン *N*-オキシドにヒドラチンヒドラートを作用せしめても原料を回収するのみであるから, *N*-オキシドはヒドラチンヒドラートに依り変化する事は考えられない.

抗菌試験に於いて著者等の採用した方法は所謂 *Mycobacterium tuberculosis* A.T.C.C. No. 607 を試験菌株とし Lockemann-Bloch の合成培地を使用して発育抑制作用を菌蓋の形成有無を肉眼で検する方法である. IN-AH は 32 万倍 (3 日培養) 16 万倍 (7 日培養) の稀積度で菌の発育を完全に抑制した. 対照の *d*-ウスニン酸ソーダ⁶⁾ は 32 万倍 (3 日, 7 日培養) であつた. INAH は B.C.G. に対し 5000 万倍⁷⁾ H_{37rv} に対しては 2000 万倍⁸⁾ (Tween-albumin 培地 7 日培養) 或いは 200 万倍⁹⁾ (Kirchner 培地 14 日培養) 等のデータが発表されている. 著者等の使用せる所謂 *M. tuberculosis* A.T.C.C. No. 607 は菌学的に種々批判¹⁰⁾ もあり, 上記のデータと比較すると INAH に対しかかなり抵抗を有する事が認められるが, 培養日数短少なる事, 非病原性なる事の利点を有する為 INAH の抗菌力を標準とし類縁化合物の抗菌力を比較するスクリーニングテストとしては便利なる方法と考え爾後この方法に依る事とした. 試験の結果は Table の如くである. 標品 12 種の内 INAH のみが前記稀積度で発育を抑制するに反し他は悉く 1 万倍の稀積度で菌蓋の形成が認められた. 即ちピリジンカルボン酸ヒドラジド三種の内 γ 位のもののみが優れた作用を有して居り, 酸アミドは抗菌力減退し INAH に於いても *N*-オキシドにすると同様に減退するという結果になつた. 著者等の試みた標品中 B.C.G. に対し Bernstein 氏等⁷⁾ が報告して居るのは次の如くである. INAH (0.02 γ /ml) ピコリン酸ヒドラジド (0.15 γ /ml) ニコチン酸ヒドラジド (2.0 γ /ml) イソニコチン酸アミド (1000 γ /ml) で INAH を中心としての定性的比較値に於いては著者等の結果も之に一致する. 更に Grunberg 氏等¹¹⁾ は動物実験に於いてピリジナルデヒドチオセミカルバゾン中 α 位のものは無効, γ , β 位のものはチピオンと同程度の効力がある事を報告しているが, これ等を総合すると, INAH に於ける -CONHNH₂ 基が γ 位に存する事は抗菌力を発揮する上に於いて重要な要因なるものの様に考えられる.

Table I. Bacteriostatic Activity against the so-called "*Mycobacterium tuberculosis* A.T.C.C. No 607"

α				β				γ			
		$\text{>N}\rightarrow\text{O}$				$\text{>N}\rightarrow\text{O}$				$\text{>N}\rightarrow\text{O}$	
-CONH ₂	-CONH-NH ₂	-CONH ₂	-CONH-NH ₂	-CONH ₂	-CONH-NH ₂	-CONH ₂	-CONH-NH ₂	-CONH ₂	-CONH-NH ₂	-CONH ₂	-CONH-NH ₂
* 107 ^{○12)}	100 ^{○13)}	161~ 162 ^{○)}		128~ 131 ^{○14)}	158~ 159 ^{○15)}			155~ 156 ^{○16)}	170.5~ 171.5 ^{○3)}		
** 105~ 107 [°]	98~100 [°]	161~ 162 [°]	148~ 148.5 [°]	128~ 129 [°]	157~ 159 [°]	283~ 284 [°] decomp.	222 [°] decomp.	155~ 157 [°]	171~ 173 [°]	303 [°] decomp.	327 [°] decomp.
*** <10,000	<10,000	<10,000	<10,000	<10,000	<10,000	<10,000	<10,000	<10,000	320,000 (3 days) 160,000 (7 days)	<10,000	<10,000

* m.p. (referred)

** m.p. (authors')

*** Highest dilution inhibiting the growth of "*M. t.* A.T.C.C. No. 607" in Lockemann-Bloch medium.

6) 柴田, 浮田, 三浦, 田村: ベニシリン I, 588 (1948).

7) J. Bernstein, et al.: Am. Rev. Tuberc. **65**, 357 (1952).8) W. Steenken, Jr., E. Wolinsky: Am. Rev. Tuberc. **65**, 365 (1952).

9) 柳沢謙: 結核の新薬ヒドラジド (河出書房) 168 (1952).

10) W.C. Tobie: Am. Rev. Tuberc. **58**, 693 (1948); C. Levaditi, et al.: Compt. rend. **228**, 1610 (1949); C.A. **45**, 10305h (1951).11) E. Grunberg, B. Leiwaut: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **77**, 47~50 (1951); C.A. **45**, 7246d (1951).12) Engler: Ber. **27**, 1786 (1894).13) H. Meyer: Monatsh. **33**, 395 (1912).

14) U.S.P. XIII.

15) Curtius: Ber. **31**, 2493 (1898).16) Ternáigó: Monatsh. **21**, 459 (1900).

本研究の発表を許可せられ終始鞭撻を賜った第一製薬株式会社社長篠田博士に謹んで謝意を表する。抗菌試験に於いて、御指導と御配慮を得た東京大学医学部生薬学教室柴田教授、名取信策氏、生化学教室三浦博士、菌株の御分与と御教示を得た予防衛生研究所梅沢博士、水野技官、東京大学伝染病研究所浮田助教授に厚く御礼申し上げる。元素分析は当工場試験課根岸、林両氏を煩わした。併せて謝意を表する。

実 験 の 部

Isonicotinic acid hydrazide (I) ethyl isonicotinate とヒドラジンヒドドラートと縮合せしめて製す。メタノールより4回再結晶。無色柱状晶。mp 171~173°, $C_6H_7ON_3$ 計算値 C 52.56, H 5.11, N 30.66. 実験値 C 52.62, H 5.17, N 30.71.

Ethyl isonicotinate N-oxide (II) ethyl isonicotinate 15.1 g, 30% 過酸化水素 13.6 g, 氷醋 68 g を 70~80° に9時間加温後減圧で濃縮, 黄色の残留液を水中に加え炭酸ソーダアルカリ性としてクロロホルムで抽出後芒硝で乾燥溶媒を留去減圧蒸留 bp₃ 145° 12.2 g, 得率 73.05% エーテル石油エーテルより再結晶, mp 62~64°, $C_8H_9O_3N$ 計算値 N 8.38. 実験値 N 8.73.

Isonicotinic amide N-oxide (III) (II) 4.0 g, 28% アンモニア水 20 cc を混合1時間後結晶を濾過乾燥 2.5 g, 得率 76% 水より再結晶. mp 303° (decomp) $C_6H_6O_2N_2$ 計算値 N 20.29. 実験値 N 20.71.

Isonicotinic acid hydrazide N-oxide (IV) (II) 5.0 g 80% ヒドラチンヒドドラート 3.0 g, メタノール 10 cc を 10 分間還流後放置析出せる結晶を含水メタノールより再結晶, 無色針状晶 mp 227° (decomp) $C_8H_7O_3N_3$ 計算値 N 27.45. 実験値 N 27.80.

(II) と PCl_3 との反応 (II) 1.0 g をクロロホルム 10 cc に溶解し PCl_3 1.7 cc を加え 70~75° に1.5 時間還流後水片 10 g を加え水層を苛性ソーダアルカリ性としエーテル 25 cc で2回抽出し芒硝乾燥後エーテルを留去, 油状の残留物 0.6 g を得. この油状物 0.2 cc にヒドラチンヒドドラート 0.3 cc を加え水浴上に加熱, 得られた結晶をメタノールより再結晶 mp 171~173°, 混融に依り (I) と同一物なる事を確めた.

Methyl nicotinate N-oxide (V) methyl nicotinate 13.7 g に 30% 過酸化水素 14 cc 氷醋 65 cc を加え 80~90° に7時間加温, 時々水を加えて減圧濃縮後水 50 cc を加え炭酸ソーダで中和クロロホルムで抽出芒硝乾燥後溶媒を留去減圧蒸留. bp₃ 145~147° 8.0 g, 得率 53%, 冷後固化メタノールより再結晶 mp 101~102° (文献¹⁷⁾ 97°). $C_7H_7O_3N$ 計算値 N 9.15. 実験値 N 9.09. (V) は又 methyl nicotinate 2.5 g をエーテル 50 cc に溶解し過フタル酸エーテル溶液 180 cc (活性酸素 0.09 g) を加え一夜放置し常法の如く処理して得.

Nicotinic acid amide N-oxide (VI) (V) 5.0 g 25% アンモニア水 10 cc を混合し1時間後析出する結晶を濾取水洗し乾燥, 水より再結晶 mp 282~284° (decomp) 2.6 g $C_6H_6O_2N_2$ 計算値 N 20.29. 実験値 N 20.25.

Nicotinic acid hydrazide N-oxide (VII) (V) 3.0 g 80% ヒドラチンヒドドラート 2.0 g. メタノール 5 cc を水浴上5分間加熱析出せる結晶をメタノールより再結晶無色粒状晶 mp 222° (decomp) 1.7 g. $C_8H_7O_3N_3$ 計算値 N 27.45. 実験値 N 27.39.

Ethyl nicotinate (VIII) に対する過酸化水素氷醋の作用 (VIII) 15 g 30% 過酸化水素 14.7 g 氷醋 64 g を 90~95° に7時間加温後1晩放置すると板状晶が析出, 母液は時々水を加えて減圧濃縮すると板状晶析出. 得量 13 g 得率 79% 母液は水中に加え炭酸ソーダアルカリ性としてクロロホルムで抽出すると油状物少量を得るに過ぎない. アルコールより再結晶するに mp 161~162° (decomp) $C_8H_9O_3N$ 計算値 C 51.84, H 3.62, N 10.08 実験値 C 50.94, H 4.02, N 10.40. 本物質は Diels-Alder⁴⁾ の法に依り picolinic acid を 30% 過酸化水素氷醋と 80~90° に6時間加温後減圧濃縮し残留せる結晶をメタノールより再結晶して得たる mp 161~162° (decomp) の picolinic acid N-oxide と混融して降下せず.

Picolinic acid amide N-oxide 及び Picolinic acid hydrazide N-oxide 1) picolinic acid N-oxide 2.5 g, メタノール 40 cc を還流しつつ塩酸ガスを導入 2.5 時間後 1/3 に濃縮後水片を加え炭酸ソーダアルカリ性となしクロロホルムで抽出芒硝乾燥後クロロホルムを追う. 油状物 0.7 g を得. 油状物 0.3 g を 28% アンモニア水 1.0 cc に加え一夜放置後析出する結晶をメタノールより再結晶 mp 161°, Spring⁵⁾ の記載に一致. 又 mp 161~162° (decomp) の picolinic acid N-oxide と混融すれば降下する. 本物質は又 ethyl picolinate 2.0 g を過フタル酸で N-oxide 化して得た 3 mm 浴温 170° の油状物をアンモニアと作用せしめても得られる.

2) 前記油状物 (エステル N-オキシド) はいづれも 80% ヒドラチンヒドドラートに依り mp 148~148.5° (アルコールより再結晶) の白色針状品を得. $C_8H_7O_2N_3$ 計算値 N 27.44. 実験値 N 27.37.

γ-Ethylpyridine N-oxide とヒドラチンヒドドラートの反応 γ-ethylpyridine N-oxide (bp₁₀ 150°) 1.2 g 80% ヒドラチンヒドドラート 1.2 g を水浴上1時間加熱すれば原料に溶解す. 加温後エーテル抽出芒硝乾燥溶媒留去残渣は吸湿性結晶塊, 減圧蒸留 bp₁₂ 155°, mp 100~120°, 湿性の為明瞭でない. picrate はメタノールより再結晶. 黄色針状晶 mp 117~118°. 原料 γ-ethylpyridine N-oxide の picrate mp 117~118° と混融して降

下せず。

抗菌試験

Lockemann-Bloch 合成培地¹⁸⁾ Na_2HPO_4 1.5 g, KH_2PO_4 2.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.25 g, クエン酸ソーダ 1.25 g 鉄明礬 0.05 g glycol 2.5 g glycerin 12.5 cc 蒸留水 500 cc pH 7.0 煮沸後濾過加圧滅菌。

検液の調製 検体 2.0 mg を 2.0 cc の培地に溶解し (1,000 倍) 此の 0.6 cc を 5.4 cc の培地に加える (10,000 倍) 以下倍数稀釈法に依り 5010,000 倍まで調製, 100° 30 分, 24 時間々隔に滅菌. 15 分, 15 分。

菌の接種 グリセリン寒天培地に培養せる *M. tuberculosis*, A.T.C.C. No. 607 乾燥菌 60 mg を秤取し 6 cc の培地中で良くすりつぶし $\frac{1}{4}$ のツベルクリン用注射器で 1 滴宛 (菌体約 0.4 mg) を検液 2 cc 宛に接種. 37° で培養し 3 日, 7 日目に液面に浮遊する菌蓋の生成有無を以つて (+) (-) を判定. 同一検体に就いて二系にて試験した。

第一製薬株式会社柳島工場

Summary

In order to examine the effect of chemical structure on antibacterial activity, some pyridine carboxylic acid derivatives shown in the Table were prepared. The results of *in vitro* tests against the so-called "*Mycobacterium tuberculosis* A.T.C.C. No. 607" are also given in the Table. Of the three isomers of acid hydrazide, the one of γ -substituent, i. e. isonicotinic acid hydrazide (INAH), alone showed excellent antibacterial action, which decreased when the compound was derived to its *N*-oxide. During the preparation of above samples, ethyl picolinate was found to undergo saponification by treatment with hydrogen peroxide and glacial acetic acid, forming picolinic acid *N*-oxide. With the others, esters were derived to their *N*-oxides by treatment with hydrogen peroxide and glacial acetic acid, then led to acid amides and acid hydrazides with aqueous ammonia and hydrazine hydrate, respectively.

(Received July 17, 1952)

18) H. Bloch, et al.: *Helv. chim. Acta*, **27**, 414 (1944).