31. 谷山兵三, 竹村庄司, 安井凡平*, 内田 譽**: 結核菌に対する化学療法剤の研究
(第1報) 試験管内に於ける数種の 4-チアゾリドン類の抗菌作用及び試験方法

Hyozo Taniyama, Shoji Takemura, Bonpei Yasui*, and Homare Uchida**:

Studies on Chemotherapeutics for *Mycobacterium tuberculosis*. I.

Antibacterial Activity of several 4-Thiazolidones *in vitro* and
a Test Method for Bacteriostatic Effect.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Osaka*, and National
Sanatorium, Toneyama Hospital**)

in vitro で結核菌の発育を強く抑制する (–)-2-(5-carboxypentyl)-4-thiazolidone は或る種の放線菌から Sobin¹⁾, Sylvester²⁾, Williams 等³⁾, 三宅等⁴⁾, 梅沢等⁵⁾ により抽出され, 構造決定がそれぞれ単独に行われ, 続いて合成が McLamore 等⁶⁾ により完遂されたが, この 4-チアゾリドン誘導体の基本骨核に関連する化合物の結核菌に対する化学療法剤の合成研究を著者等は当時行っていた. 又これに関する報告⁷⁾ も若干ある. その後この 4-チアゾリドン誘導体の結核菌に対する抗菌性と化学構造との関係を調べる目的で, まず基本型の構造を有する4種の化合物, 即ち 2-imino-4-thiazolidone (I), 2-thio-4-thiazolidone (II), 2-oxo-4-thiazolidone (III), 2-hydrazono-4-thiazolidone (IV) の *in vitro* に於ける結核菌に対する抗菌試験を行つて Table I の如き結果を得た. これによると骨核そのものは抗菌性を認め得ないが, 只 2-hydrazono-4-thiazolidone (IV) が前3者よりすぐれた抗菌性を有することは注目すべきである.

谷山, 竹村⁷⁾ が先に合成した化合物であるが, (I), (II), (III) の5位でアセトアミノベンズアルデヒドと縮合して得られた, 5-acetaminobenzal-2-imino-4-thiazolidone (V), 5-acetaminobenzal-2-thio-4-thiazolidone (VI), 5-acetaminobenzal-2-oxo-4-thiazolidone (VII) の3種の化合物の抗菌試験を試みたが, 何れも大した阻止作用が認められなかつた. 3種の中では (VII) が最も強いようである. 試験結果は Table II に掲げる.

Table I

Compound	Strain	Highest dilution inhibiting growth				
		Takagaki	Aoyama B	H ₂	B.C.G.	
(I)		<500	<500	<500	<500	hydrochloride
(II)		500	500	500	500	
(III)		500	500	500	1,000	
(IV)		10,000	5,000	5,000	10,000	hydrochloride

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CO} \\ | \quad | \\ \text{S} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ || \\ \text{NH} \end{array} \quad (\text{I})$$

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CO} \\ | \quad | \\ \text{S} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ || \\ \text{S} \end{array} \quad (\text{II})$$

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CO} \\ | \quad | \\ \text{S} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ || \\ \text{O} \end{array} \quad (\text{III})$$

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CO} \\ | \quad | \\ \text{S} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ || \\ \text{N} \cdot \text{NH}_2 \end{array} \quad (\text{IV})$$

* Hotarugaike, Toyonaka, Osaka-fu.

** Minamitoneyama, Toyonaka, Osaka-fu.

1) B. A. Sobin: J. Am. Chem. Soc. **74**, 2947 (1952).

2) J. C. Sylvester: Antibiotic and Chemotherapy **2**, 399 (1952).

3) J. H. Williams, et al.: Ibid., **2**, 333 (1952).

4) 三宅, 森本, 樹下: Pharm. Bull. (Japan), **1**, 84 (1952).

5) 前田, 岡見, 小坂, 田矢, 梅沢: J. Antibiotics (Japan) **5**, 572 (1952).

6) W. M. McLamore, et al.; J. Am. Chem. Soc., **75**, 105 (1953).

7) 内田, 谷山, 竹村, 安井, 井上: 医学 **7**, 148 (1952); 谷山, 竹村: 本誌 **73**, 167 (1953); 谷山, 田中: 本誌 **73**, 528 (1953).

Table II
Highest dilution inhibiting growth

Compound	Strain	H ₃₇ RV	Aoyama B	H ₂
(V)		2,000	2,000	2,000
(VI)		10,000	5,000	20,000
(VII)		20,000	5,000	20,000

$\text{CH}_3\text{COHN}-\text{C}_6\text{H}_{10}-\text{CH}=\text{C}-\text{CO}-\text{S}-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ <p>(V)</p>	$\text{CH}_3\text{COHN}-\text{C}_6\text{H}_{10}-\text{CH}=\text{C}-\text{CO}-\text{S}-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ <p>(VI)</p>	$\text{CH}_3\text{COHN}-\text{C}_6\text{H}_{10}-\text{CH}=\text{C}-\text{CO}-\text{S}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ <p>(VII)</p>
--	--	---

試験管内結核菌発育阻止試験は、使用菌の菌型、菌量、培地成分、菌の増殖の状況（表面培養、深部培養）などにより、発育阻止又は抑制濃度の値が広範囲に動くのである。例えばチオアセタゾンでは Domagk の鶏卵加培地では 30 万倍で発育を阻止しているが、著者等の無蛋白の Kirchner 改変培地を使用した実験では Table III の如く 2 万倍で抑制する程度である。

結核菌に対する試験管内抗菌試験

培養基 培地は Kirchner 基礎培地 (KH₂PO₄ 4g, Na₂HPO₄·12H₂O 3g, MgSO₄ 0.6g, Na-citrate 2.5g, asparagin 5g, glycerin 20 cc, aq. dest. 1000 cc) の asparagin に代うるにグルタミン酸ナトリウム 10g を、又グリセリンは 2 倍量の 40 cc を用いた改変合成培地を使用する。

この Kirchner 改変培地で、諸種の抗結核剤に試みた発育阻止限界濃度の結果は Table III の如くである。

Table III

物質名	1 万倍	2 万倍	5 万倍	10 万倍	20 万倍	50 万倍	100 万倍	200 万倍	500 万倍	1,000 万倍	2,000 万倍	5,000 万倍	1 億倍	対照
イソニコチン酸ヒドラジド									—	—	±	±	±	±
p-アミノサリチル酸	+	+	+	+	+	+	+	±	±					±
ストレプトマイシン					—	±	±							±
ツベルフラビン				—	+	±								±
o-アミノフェノール			—	+	±									±
ヒノキチオールナトリウム			—	±	±	±								±
メチルプロミゾール			±	±										±
チオアセタゾン	—	+	±											±

試験物質の溶解、希釈及び滅菌方法 検体が水に可溶の場合はそのまま培養基に溶解、希釈すればよい。水に不溶物質のときは溶媒を使用するが、そのときの菌の発育に及ぼす影響を予め知る必要がある。プロピレングリコールは既に文献⁸⁾があるが、ピリジン使用を予期し、如何なる濃度で発育障害を来すかにつき試験を行い、Table IV の結果を得た。

これら溶媒に溶解及び希釈の方法は検体を一定小量のピリジン、プロピレングリコールに溶解し、濃度 2 倍の培地を等量加えた後、検体の含有量が要求する希釈濃度になるまで培地で希釈す。実験結果から両溶媒ともに 10

Table IV

菌型菌株	10%	5%	2%	1%	対照
人型 H ₃₇ RV, 青山 B, H ₂ 株	—	±~±	±	±	±
牛型 R ₁₄ , BCG 菌	—	±~±	±~±	±	±
鳥型 竹尾株	—	±	±	±	±

Notes: —: 全く発育していないもの。+: 小量であるが発育しているもの。±: ほぼ試験管表面全体に発育しているもの。±: 管壁に沿って 3~5cm 近い上つて発育しているもの。±: 管壁に沿って 7~8cm 以上発育し、しかも菌台の厚いもの。

8) Bush, Harowitz: Am. Rev. Tuberc. 62, 638 (1950); Hottmann, Nickel: Tuberculosearzt. 1950, 695.

%以上の高濃度では結核菌の發育を阻止し, 1%以下では全く發育に影響を及ぼさないから, 培地の調製にあたり培地中の溶媒の濃度が 1%以下の影響なき状態で取扱えばよいことを知つた。検体を含有せる培地は内径 21 mm $\pm$ 0.2 mm の試験管にピペットで正確に分注し, 120° で 20 分滅菌を行う。

使用菌と培養法 結核菌は上記の Kirchner 改変培地に 20 代以上継代培養し, 十分に馴致した下記の菌株を用う。即ち人型菌では H₃₇ RV 株, 青山 B 株, H₂ 株, 高垣株等のうち 3 株を, 牛型菌 R₁₄ 又は BCG 菌及び鳥型竹尾株である。各菌株は培養基 100 cc を入れた表面積 6 cm $\times$ 10 cm の平型角培養瓶の表面に發育せしめ, その幼弱な均等菲薄菌膜を直径約 3 mm の白金耳で, なるべく均一に試料を含める培地液へ移植し, 37° で保つようにする。

判定法 対照培地の菌の發育が静止極期に達して約 1 週間後に判定する。人型菌, 牛型菌, BCG 菌では移植後 3~4 週に, 鳥型菌では 10~12 日後に判定する。

終りに本研究に於いて終始御鞭撻を戴いた国立療養所刀根山病院長渡辺三郎博士並びに大阪大学医学部薬学科上尾庄次郎教授に深甚なる謝意を表す。

大阪大学医学部薬学科 国立療養所刀根山病院

Summary

Antibacterial action, *in vitro*, of 2-imino-4-thiazolidone (I), 2-thio-4-thiazolidone (II), 2-oxo-4-thiazolidone (III), and 2-hydrazono-4-thiazolidone (IV), possessing fundamental structures of 4-thiazolidone derivatives, was tested and (IV) was found to be better than the other three. 5-Acetaminobenzal-2-imino- (V), 5-acetaminobenzal-2-thio- (VI), and 5-acetamino-2-oxo-4-thiazolidone (VII) were also found not to possess strong inhibitory action against bacteria. For *in vitro* tests against tubercle bacilli, a basic Kirchner medium in which asparagin was substituted with sodium glutamate and the amount of glycerol was increased to twice the usual volume, was used. Under the assumption that pyridine would be used as a solvent, its effect on human, bovine, and avian type tubercle bacilli was examined and it was found that it had no effect on the bacillary growth at a concentration below 1%.

(Received October 9, 1953)