[薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
87 (8) 1006 ~ 1009 (1967)]

UDC 615[547.789 : 547.496.3]-092.254 : 576.858

秋浜澄行, 奥出政義 : Thiazole-thiourea 誘導体の抗ウイルス性

Sumiyuki Akihama and Masayoshi Okude : Antiviral Activity
of Thiazole-thiourea Derivatives.

(Meiji College of Pharmacy^{*1})

The inhibitory effect of thiazole-thiourea derivatives on poliovirus and adenovirus replication was investigated by the tissue culture method. Among the compounds tested, 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)thiourea, (4-methyl-2-thiazolyl)thiourea, 1-*p*-tolyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea, 1-*m*-chlorophenyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea, 1-benzoyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea, 1-*p*-tolyl-3-(4-phenyl-2-thiazolyl)thiourea, and 1-*p*-chlorophenyl-3-(4-phenyl-2-thiazolyl)thiourea exerted a clear inhibition of the CPE and multiplication of polio virus, and 1-*p*-tolyl-3-(2-thiazolyl)thiourea, (4-methyl-2-thiazolyl)thiourea, 1-phenyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea, 1-*p*-chlorophenyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea, 1-benzoyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea, 1-phenyl-3-(4-phenyl-2-thiazolyl)thiourea, and 1-*p*-chlorophenyl-3-(4-phenyl-2-thiazolyl)thiourea showed antiviral activity against adenovirus.

(Received December 6, 1966)

種々の化合物についての抗ウイルス性を調べ、抗ウイルス活性基開発の基礎的知見を得る目的で、まず 2-benzothiazolylhydrazine, 1-(2-benzothiazolyl)-4-phenylthiosemicarbazide, 2-benzothiazolecarboxaldehyde や methyl および phenylketone の oxime, thiosemicarbazone 誘導体について検討を加え、2-benzothiazolyl methylketone thiosemicarbazone, 2-benzothiazolylphenylketone thiosemicarbazone, 1-(2-benzothiazolyl)-4-phenylthiosemicarbazide や 1-(2-benzothiazolyl)-4-(*p*-tolyl)thiosemicarbazide などチオセミカルバチット関連化合物が抗ポリオウイルス性を、2-benzothiazolecarboxaldehyde 2-benzothiazolylhydrazone, benzaldehyde 2-benzothiazolyl hydrazone や benzaldehyde 2-benzothiazolyl-(1-acetyl)hydrazone などヒドラゾン関連化合物が抗アデノウイルス性を示すことを知った。¹⁾ このことから著者等はチオセミカルバチットと類似の置換基チオ尿素基をもつチアゾールチオ尿素誘導体について抗ウイルス性を検討した。

実験の部

実験材料

宿主細胞 : HeLa-S₃ 細胞, HEP-2 細胞.

培養液 : 増殖培地=10% コウシ血清を加えた YLE medium (Earle 塩類液 1000 ml. に酵母エキス 1.0 g., ラクトアルブミン加水分解物 5.0 g. を加える.) 維持培地=4% コウシ血清あるいは 5% 馬血清を加えた YLE medium. 寒天培地=8% コウシ血清を加えた 2 倍濃度の YLE medium に 1.8% 寒天溶液を同量加え、さらに中性紅 (neutral red) を 25 μg./ml. 濃度に加える.

ウイルス : ポリオウイルス 1 型 (Mahoney strain), アデノウイルス 1 型を使用した. これらのウイルスは実験に使用する宿主細胞中で 3~4 代継代させた. すなわち宿主細胞の約 5×10^5 cells/ml. の増殖培地懸濁液 4 ml. を培養瓶に移し 3~4 日間 37° で静置培養して細胞単層を作る. 増殖培地を除き磷酸緩衝生理食塩水 (PBS., pH 7.2) で洗浄してから維持培地 3.6 ml., ウイルス希釈液 (10^{-2} ~ 10^{-5} 希釈液) 0.4 ml. を加えて 37° で培養する. ウイルス感染細胞が完全にこわれたのち、凍結融解を 5 回繰返し、2000 r.p.m. で 15 分遠心後上清を集めてウイルス材料とし、-20° で保存.

化合物 : 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)thiourea (I), 1-*p*-tolyl-3-(2-thiazolyl)thiourea (II), 1-*p*-chlorophenyl-3-(2-thiazolyl)thiourea (III), 2-thioureido-4-methylthiazole (IV), 1-phenyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea (V), 1-*o*-tolyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea (VI), 1-*m*-tolyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea (VII), 1-*p*-tolyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea (VIII), 1-*m*-chlorophenyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea (IX), 1-*p*-chlorophenyl-

^{*1} Nozawa-cho, Setagaya-ku, Tokyo.

1) 秋浜, 奥出, 水尾 : 明治薬科大学研究紀要, 3, 1 (1966).

3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea (X), 1-benzoyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea (XI), 2-thioureido-4-phenylthiazole (XII), 1-phenyl-3-(4-phenyl-2-thiazolyl)thiourea (XIII), 1-*p*-tolyl-3-(4-phenyl-2-thiazolyl)thiourea (XIV), 1-*p*-chlorophenyl-3-(4-phenyl-2-thiazolyl)thiourea (XV). これらの化合物はすでに宇野, 秋浜等によって合成されたものである.²⁾

実験結果

化合物の最大無毒性濃度 これを調べるために HeLa-S₃ あるいは HEP-2 細胞, 約 5×10^5 cells/ml. を懸濁した増殖培地 1 ml. を培養試験管に移し, 4 日間 37° で静置培養して細胞単層を作る. 後増殖培地を除き PBS で細胞を洗浄してから維持培地 0.9 ml., チアゾールチオ尿素誘導体の $10^{-2} \sim 10^{-6} M$ 水溶液 (水に不溶のときは 0.5% カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁) 0.1 ml. を加えて全量を 1 ml. とし 37° で培養しながら鏡検

TABLE I. Antiviral Activity of Thiazole-thiourea Derivatives
on Polio and Adenovirus Infection

No.	Compounds	Max. ^{a)} nontoxic dose ($10^{-x} M$) (<i>x</i>)	Inhibition of growth ^{b)}			
			Poliovirus type 1 (Mahoney strain)		Adenovirus type 1	
			in HeLa-S ₃	in HEP-2	in HeLa-S ₃	in HEP-2
I		5.5	1/2	1/2	0/2	0/2
II		6.0	0/2	0/2	1/2	1/2
III		6.0	1/2	0/2	0/2	0/2
IV		5.5	1/2	2/2	1/2	1/2
V		5.5	0/2	0/2	1/2	2/2
VI		5.0	0/2	0/2	0/2	1/2
VII		6.0	1/2	0/2	0/2	0/2
VIII		6.0	2/2	1/2	1/2	0/2
IX		5.5	2/2	2/2	0/2	0/2
X		6.0	0/2	0/2	1/2	1/2
XI		5.5	1/2	1/2	1/2	1/2
XII		6.0	0/2	1/2	0/2	0/2
XIII		4.0	0/2	0/2	1/2	1/2
XIV		4.0	1/2	1/2	1/2	0/2
XV		4.0	1/2	1/2	1/2	1/2
	Control (Untreated)		0/2	0/2	0/2	0/2

a) maximum nontoxic dose was shown in final concentration used

b) numerator and denominator indicate numbers of tubes with no response of CPE in number of total tubes used

2) 宇野, 秋浜: 本誌, 80, 1015 (1960).

して7日目まで毒性を示さない濃度を検討した。この実験結果は Table I に示した。

抗ポリオウイルス性 ポリオウイルス1型 (Mahoney strain) の増殖に対するチアゾールチオ尿素誘導体の阻止効果は、HeLa-S₃ や HEP-2 細胞の単層を用いて測定した。すなわち細胞単層を PBS であらかじめ洗い、それに 4% コウシ血清を加えた維持培地 0.8 ml. とあらかじめ求めた被検化合物の最大無毒性濃度の 10 倍濃度溶液 0.1 ml., ポリオウイルス希釈液 (50 TCID₅₀) 0.1 ml. を加えて全量を 1 ml. としたものを加えた。対照には被検化合物溶液の代わりに PBS 0.1 ml. を加え 37° で培養しながらウイルス増殖によって起こる細胞変性効果 (CPE) の有無を観察して7日目に判定した。

Table I に示すように対照では CPE の発現が認められるが I, IV, VIII, K, XI, XIV および XV の7種のチアゾールチオ尿素誘導体では HeLa-S₃, HEP-2 いずれの宿主細胞においても CPE の発現を抑制している。

つぎに抗ポリオウイルス性が認められたこれら7種のチアゾールチオ尿素誘導体について、その阻止効果をより定量的に求めるためにブラック法を行なった。すなわち増殖培地に HeLa-S₃ 細胞を約 2×10^5 cells/ml. になるように懸濁したもの 4 ml. をブラック瓶に撒いた。37° で 3~4 日間培養して細胞単層を作り、培養液を除き PBS で洗浄後ポリオウイルス希釈液 0.45 ml. (約 30 PFU), 被検化合物の最大無毒性 10 倍濃度溶液 0.05 ml. を加えて 1 hr. 37° で培養してウイルスを吸着させたのち PBS で2回洗浄してから被検化合物溶液 0.5 ml., 寒天培地 4.5 ml. を加えて 37° で培養する。ウイルス増殖のための対照には被検化合物溶液を加える代わりに PBS を用い、3~4 日目に形成したブラック数を調べた。

TABLE II. Anti-poliovirus Activity of Thiazole-thiourea Derivatives (Plaque method)

Compounds	Numbers of plaques in untreated group	Numbers of plaques in treated group	Inhibition percent
I	26, 27, 28, 30, 31	16, 16, 18, 20, 20	36.6
IV	26, 27, 28, 30	7, 10, 14, 16	56.3
VIII	30, 30, 32, 32, 34	11, 11, 12, 15, 16	58.8
K	27, 29, 30, 31, 32	9, 10, 13, 14, 14	59.7
XI	26, 28, 30, 30, 31	4, 6, 6, 6, 10	77.9
XIV	30, 30, 32, 32, 34	12, 16, 17, 18, 19	48.1
XV	30, 30, 32, 32, 34	19, 20, 20, 20, 26	33.5

the stock suspension of poliovirus type 1 was diluted up to 10^{-6} , then 0.45 ml. of it was inoculated maximum non-toxic dose of each compound was applied to the screening test of antiviral activity

その結果 XI が抗ポリオウイルス性試験に使用したチアゾールチオ尿素誘導体の中でもっとも強いブラック形成阻止効果を示している。

抗アデノウイルス作用 HeLa-S₃ および HEP-2 細胞におけるアデノウイルス1型の増殖におよぼすチアゾールチオ尿素誘導体の効果は、細胞単層が形成されてのち、その細胞層を PBS で5回洗浄後 5% 馬血清を加えた維持培地 0.8 ml., 被検化合物溶液 0.1 ml., アデノウイルス希釈液 (50 TCID₅₀) 0.1 ml., 対照には化合物溶液の代わりに PBS 0.1 ml. を加えて 37° で培養しながら CPE の有無を鏡検によって調べ 10 日目に判定した。

Table I に示したように II, IV, V, X, XI, XIII, および XV の7種の化合物が HeLa-S₃ および HEP-2 いずれの宿主細胞においても CPE の発現を抑制している。アデノウイルス増殖に伴って起こる CPE 発現には、ウイルス粒子と別個の CPE 発現因子も関与していることが知られている。したがって CPE 発現を阻止する7種

TABLE III. Effect of Thiazole thiourea Derivatives on Adenovirus Replication

Compounds	-log TCID ₅₀		Inhibition ^{a)} index
	Control	with Compounds	
II	6.50	5.66	0.84
IV	7.33	6.75	0.58
V	7.33	6.40	0.93
X	5.66	5.00	0.66
XI	5.66	4.81	0.08
VIII	5.66	5.00	0.66
XV	7.33	6.75	0.58

a) inhibition index was shown by negative value in logarithmic difference of TCID₅₀ with or without compounds

のチアゾールチオ尿素誘導体が真のウイルス増殖を阻止するものか、あるいは単に CPE 発現のみを阻止するものかを検討するために培養試験管に HEP-2 細胞の単層を作り、PBS で 5 回細胞単層を洗ってから 5% 馬血清を加えた維持培地 0.8 ml., 被検化合物溶液 0.1 ml., アデノウイルスの $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 希釈液それぞれ 0.1 ml. を加えて 37° で培養し、5 日目ごとに液交換を行ないながら 20 日間鏡検して 20 日目に TCID₅₀ を Reed-Muench 法で求め、被検化合物溶液の代わりに PBS 0.1 ml. を加えたウイルス対照の TCID₅₀ の差 Δ TCID₅₀ (inhibition index) を測定して検討した。

この結果これら 7 種の化合物はいずれもアデノウイルスの増殖に伴って起こる CPE の発現を阻止し、なかでも V がもっとも強い阻止効果を示している。

考 察

第 1 次スクリーニングテストで抗ポリオウイルス性の認められた 7 種のチアゾールチオ尿素誘導体について、その阻止効果をブラックアッセイ法で検討した結果 1-benzoyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea (XI) が 77.9% と最も強い阻止効果を示し、以下 K, VIII, IV, XIV, I, XV の順になっている。この結果から XI の阻止効果をウイルス原液 1 ml. あたりのブラック形成感染価 (PFU/ml.) に換算してその対数をとってウイルス対照 (PFU/ml. = 7.6) と被検化合物処理 (PFU/ml. = 7.1) との差 Δ PFU を求めると 0.5 となる。この値は 2-(α -hydroxybenzyl)-benzimidazole (HBB)³⁾ より高いがグアニジン⁴⁾の抗ポリオウイルス活性値よりも低い。化合物の構造と抗ポリオウイルス性とを見くらべてみるとチアゾール残基の及ぼす影響はベンゾチアゾール誘導体¹⁾の場合と同様ほとんど認められず、親核性のメチル基がパラ位に結合した *p*-tolyl 基、親電子性のクロールがメタ位に結合した *m*-chlorophenyl 基、また benzoyl 基などがチオ尿素の他方の N に置換した化合物に抗ポリオウイルス性が認められたことは抗ポリオウイルス活性基開発に興味あることである。

抗アデノウイルス性を示した 7 種のチアゾールチオ尿素誘導体中、最も強い阻止効果を示す 1-phenyl-3-(4-methyl-2-thiazolyl)thiourea (V) の抑制効果は ethylene biguanidine⁵⁾ とほぼ匹敵する。

本研究に際し、化合物の合成を御指導された京都大学薬学部 宇野豊三教授、ウイルスの実験に終始御指導をいただいた慶応大学医学部、豊島 滋 助教授に、また実験に協力された本学学生 佐藤勝雄氏に感謝する。

明治薬科大学

- 3) I. Tamm, R. Bablanian, *et al.*: J. Exp. Med., **113**, 625 (1961); H.J. Eggers, I. Tamm: Virology, **18**, 426 (1962); 大滝, 井上: 本誌, **85**, 926 (1965); 秋浜, 奥出: 明治薬科大学研究紀要, **3**, 6 (1966).
- 4) W. A. Rightsel, J. R. Dice, R. J. McAlpine: Science, **134**, 558 (1961); D. Crowther, J. Melnick: Virology, **15**, 65 (1961); T. Ueda, S. Toyoshima, Y. Seto: Keio J. Med., **10**, 257 (1961).
- 5) 上田, 豊島, 高田: 日本薬学会関東支部 7 月例会 (1962).