結核菌に対する化学療法剤の研究 (第21報¹⁾) 2-Pyridylthiourea,
4-Antipyrinylthiourea および 2-Benzothiazolylthiourea
誘導体の合成ならびに抗結核菌作用について

藤川福二郎, 平井邦夫, 平山晃久,^{2a)} 内藤益一,
津久間俊次, 蒲田迪子, 太田令子^{2b)}
京都薬科大学,^{2a)} 京都大学附属結核胸部疾患研究所^{2b)}

Studies on Chemotherapeutics for *Mycobacterium tuberculosis*. XXI.¹⁾
Synthesis and Antibacterial Activity on *Mycobacterium tuberculosis*
of 2-Pyridylthiourea, 4-Antipyrinylthiourea and
2-Benzothiazolylthiourea Derivatives

FUKUJIRO FUJIKAWA, KUNIO HIRAI, TERUHISA HIRAYAMA,^{2a)}
MASUKAZU NAITO, SHUNJI TSUKUMA, MICHIKO
KAMATA, and YOSHIKO OHTA^{2b)}
Kyoto College of Pharmacy^{2a)} and Chest Diseases
Research Institute, Kyoto University^{2b)}

(Received June 14, 1968)

Forty-one kinds of 1-(2-pyridyl)-3-alkyl(or aryl)-2-thiourea, 1-(4-antipyrinyl)-3-alkyl(or aryl)-2-thiourea, and 1-(2-benzothiazolyl)-3-alkyl(or aryl)-2-thiourea were systematically synthesized and their antibacterial action against human type tubercle bacilli H37Rv strain was comparatively examined using the Kirchner medium added with 10% serum or Tween-albumin medium. 1-(2-Benzothiazolyl)-3-butyl-2-thiourea, 1-(2-benzothiazolyl)-3-hexyl-2-thiourea, 1-(2-benzothiazolyl)-3-(*p*-ethoxyphenyl)-2-thiourea, and 1-(2-benzothiazolyl)-3-(*p*-tolyl)-2-thiourea showed antibacterial activity comparable to Isoxyl (1,3-bis(*p*-isoamyloxyphenyl)-2-thiourea) and Thioban (4-(2-pyridyl)-4'-isobutoxythiocarbonyl) used as the control.

著者等はすでに種々の phenylthiourea 誘導体を合成し、その構造と人型結核菌 H 37 Rv 株に対する抗菌作用との関連性についてその一端を明らかにした。³⁾

現在までに著者等のえた結果ならびに数多くの文献よりチオ尿素系誘導体には Tibione 以外の抗結核剤と交叉耐性がなく動物実験でもかなりの治療効果を示す化合物のあることが判明してきた。⁴⁾

今回著者等は 2-pyridylthiourea, 4-antipyrinylthiourea および 2-benzothiazolylthiourea 誘導体の合成とそれら化合物の抗結核菌作用について報告するが 2-pyridylthiourea については Feist⁵⁾ が 2-pyridylthiourea の 1, 2 の alkyl 誘導体の合成についてのみ, N.P. Buu-Hoi⁶⁾ は 2-pyridylthiourea の aryl 誘導体の合成は行なっているが抗結核菌作用については報告なく, Glasser⁷⁾ は alkyl 誘導体のみの合成を行ない Dubos の培地を用いて人型結核菌 H37 Rv 株に対する抗菌作用を報告している。つぎの 4-antipyrinylthiourea 誘導体について

- 1) 第 20 報: 藤川福二郎, 中村泰三, 西牧敏子, 白井邦子, 松井清, 横山年子, 内藤益一, 津久間俊次, 薬誌, 88, 1264, (1968); 本研究は日本薬学会 88 年会にて発表した, 東京, 1968 年 4 月。
- 2) Location: a) Yamashina-misasagi, Higashiyama-ku, Kyoto; b) Shogoin-kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto.
- 3) 藤川福二郎, 平井邦夫, 中谷義熙, 今西きぬ子, 内藤益一, 津久間俊次, 薬誌, 84, 993 (1964).
- 4) 前川暢夫, 京大胸部研紀要, 2 (1968) に掲載予定
- 5) K. Feist, W. Awe, J. Schultz, F. Klatt, Arch. Pharm., 272, 100 (1934).
- 6) N.P. Buu-Hoi, J. Chem. Soc., 1573 (1955).
- 7) Arthur C. Glasser, Richard M. Doughty, J. Pharm. Sciences, 51, 1031 (1962).

また Glasser⁷⁾ は 4-antipyrinylthiourea の aryl 誘導体のみ合成を行ない人型結核菌 H 37 Rv 株に対する抗菌力を Dubos の培地を用いて試験している。最後の 2-benzothiazolylthiourea については Russo⁹⁾ は主として alkyl 誘導体、Bhargava¹⁰⁾ は主として aryl 誘導体についてのみ合成研究を行なっているが抗結核菌作用についての報告はない。

Chart 1

は高橋⁸⁾等が除痛剤の目的で alkyl ならびに aryl 誘導体を合成しているが抗結核菌作用についての報告はない。

著者等は Chart 1 に示す方法に従って 2-aminopyridine, 4-aminoantipyrine ならびに 2-aminobenzothiazole に alkyl isothiocyanate ならびに aryl isothiocyanate を反応させて文献既知の化合物 30 種, 未知の化合物 11 種, 計 41 種の化合物を系統的に合成し人型結核菌 H 37 Rv 株に対する抗菌作用を従来著者等が用いてきた 10% 血清加 Kirchner 培地と今回新たに Tween-albumin 培地の 2 種の培地を用いて比較検討した結果, 構造と抗菌作用との関係について 2, 3 の知見をえたので報告する. なお高橋⁸⁾等は antipyrinyl isothiocyanate に amine 類を作用せしめて 4-antipyrinylthiourea を合成しているが, 著者等はこれとは逆の方法すなわち alkyl isothiocyanate および aryl isothiocyanate に 4-aminoantipyrine を作用させて合成した.

合成方法 F.B. Dains¹¹⁾ の方法により alkylamine あるいは arylamine に二硫化炭素とアンモニアを加え冷時攪拌しながら反応させ、生成したジチオカルバミン酸アンモンに硝酸鉛を加えて分解し alkyl および aryl isothiocyanate を製しこれらと 2-aminopyridine, 4-aminoantipyrine および 2-aminobenzothiazole をそれぞれ EtOH を溶媒として水浴中で加熱反応させ合成した。収率は 2-pyridylthiourea 誘導体は 50% 前後、4-antipyrinylthiourea 誘導体は定量的、2-benzothiazolylthiourea 誘導体は 20—30 % 程度であった。

抗菌作用 2-Pyridyl-, 4-antipyrinyl-, および 2-benzothiazolylthiourea 誘導体 41 種について INAH, Isoxyl すなわち 1,3-di-(*p*-isoamyloxyphenyl)-2-thiourea, Tibione および Thioban すなわち 4-(2-pyridyl)-4'-isobutoxythiocarbanilide を対照にとり比較検討した結果は Table I に示すように 2-pyridylthiourea 誘導体においては 10% 血清加 Kirchner 培地ではほとんど 25 μ g/ml 以上, Tween-albumin 培地でも 6.25 μ g/ml 程度で抗菌力において見るべきものがなかった. また 4-antipyrinylthiourea 誘導体では Kirchner 培地で 50 μ g/ml 以上, Tween-albumin 培地でも 25 μ g/ml 以上の結果を示し問題とする化合物は見出せなかった. しかるに 2-benzothiazolylthiourea 誘導体では前述の 2-pyridyl および 4-antipyrinylthiourea 誘導体に比較して顕著な抗菌力を有する化合物が数種あることが判った. すなわち Table I から明らかなように 1-(2-benzothiazolyl)-3-butyl-2-thiourea, 1-(2-benzothiazolyl)-3-hexyl-2-thiourea, 1-(2-benzothiazolyl)-3-(*p*-tolyl)-2-thiourea, 1-(2-benzothiazolyl)-3-(*p*-ethoxyphenyl)-2-thiourea などの 2-benzothiazolylthiourea 誘導体は対照薬剤として用いた thiourea 系化合物すなわち Isoxyl および Thioban と比較して 10% 血清加 Kirchner

8) 高橋酉藏, 兼松 頤, 藥誌, 79, 172 (1959).

9) F. Russo, *Boll. Chim. Farm.*, **100**, 252 (1961).

10) P.N. Bhargava, K. Syamala Devi, *J. Indian Chem. Soc.*, **40**, 868 (1963).

11) F. B. Dains, *Org. Syn.*, Col. Vol. I, 488.

TABLE I. Antibacterial Activities of 2-Pyridylthiourea, 4-Antipyrinylthiourea and 2-Benzothiazolylthiourea Derivatives [Minimum Bacteriostatic Concentration ($\mu\text{g/ml}$) against *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H 37 Rv strain]

	R	Kirchner medium with 10% bovine serum	Tween-albumin medium

I	CH_3	≥ 25.0	12.5
II	C_2H_5	≥ 25.0	12.5
III	C_3H_7	≥ 25.0	6.25
IV	C_4H_9	≥ 25.0	12.5
V	C_6H_{13}	≥ 25.0	12.5
VI	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	≥ 25.0	12.5
VII	C_6H_5	12.5	6.25
VIII	<i>o</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	≥ 25.0	6.25
IX	<i>m</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	≥ 25.0	6.25
X	<i>p</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	≥ 25.0	6.25
XI	<i>o</i> - $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$	≥ 25.0	12.5
XII	<i>p</i> - $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$	≥ 25.0	6.25
XIII	<i>o</i> - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_4$	≥ 25.0	12.5
XIV	<i>p</i> - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_4$	≥ 25.0	12.5

XV	CH_3	≥ 50.0	≥ 25.0
XVI	C_2H_5	≥ 50.0	≥ 25.0
XVII	C_3H_7	≥ 50.0	≥ 25.0
XVIII	C_4H_9	≥ 50.0	≥ 25.0
XIX	C_6H_{13}	≥ 50.0	≥ 25.0
XX	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	≥ 50.0	≥ 25.0
XXI	C_6H_5	≥ 50.0	≥ 25.0
XXII	<i>o</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	≥ 50.0	≥ 25.0
XXIII	<i>m</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	≥ 50.0	≥ 25.0
XXIV	<i>p</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	≥ 50.0	≥ 25.0
XXV	<i>o</i> - $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$	≥ 50.0	≥ 25.0
XXVI	<i>p</i> - $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$	≥ 50.0	≥ 25.0
XXVII	<i>o</i> - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_4$	≥ 50.0	≥ 25.0
XXVIII	<i>p</i> - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_4$	≥ 50.0	≥ 25.0

XXIX	CH_3	≥ 25.0	12.5
XXX	C_2H_5	≥ 25.0	12.5
XXXI	C_3H_7	≥ 25.0	12.5
XXXII	C_4H_9	12.5	3.13
XXXIII	C_6H_{13}	12.5	0.78
XXXIV	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	≥ 25.0	12.5
XXXV	C_6H_5	12.5	6.25
XXXVI	<i>o</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	12.5	6.25

XXXVII	$m\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	12.5	3.13
XXXVIII	$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	12.5	3.13
XXXIX	$o\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$	≥ 25.0	12.5
XXXX	$p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$	12.5	12.5
XXXXI	$p\text{-C}_2\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_4$	6.25	3.13
Control	INAH	0.125	0.0625
	Isoxyl	≥ 25.0	3.13
	Tibione	≥ 50.0	0.156
	Thioban	12.5	1.56

培地においては可成り強い抗菌力を示し、また Tween-albumin 培地でも同等あるいはより強い抗菌力を示した。

考 察

著者等は昭和 25 年頃から新しい抗結核菌剤の探究のための screening test を続けているが、*in vitro* の実験にはすべて 10% 血清加 Kirchner 培地を用いてきた。一方 Dubos^{12,13)} 等は 1946 年界面活性剤 Tween 80 および Bovine albumin fraction V を特殊成分とするいわゆる Dubos 培地を作成、結核菌の深部均等培養に成功した。その後 Tween-albumin 培地の優れた性質が広く認識され米国では 1952 年頃から screening test にも用いられている。わが国でも 1955 年頃から市販されているが、最近まで screening test に常用されるに至らなかった。しかしすでに著者等が報告しているように抗結核菌剤の抗菌作用は使用培地によって影響されるものが多く、¹⁴⁾ 10% 血清加 Kirchner 培地に比べて Tween-albumin 培地では大部分の抗結核菌作用は 2—4 倍増強され、とくに thiourea 誘導体の Isoxyl および Thioban ならびに thiosemicarbazone 誘導体の抗菌作用は 10 倍近く増強されることが明らかにされている。今回の実験結果でも Table I に示すように 1-(2-benzothiazolyl)-3-butyl-2-thiourea と 1-(2-benzothiazolyl)-3-hexyl-2-thiourea の場合のように 10% 血清加 Kirchner 培地では同一の抗菌力を示すが、Tween-albumin 培地ではいずれも抗菌作用が増強し、しかも 2 種の化合物の間に相当の差異のあることが明らかにされた。すなわち Tween-albumin 培地の使用により多くのチオ尿素誘導体の抗菌力を溶媒の影響を無視しうる段階まで増強させ、各種誘導体の構造と抗菌力との関係をよりわかり易くすることが出来た。Tween-albumin 培地は高価で、雑菌汚染との鑑別がつきにくいなどの欠点はあるが、一般に抗菌力が強く表われ、かつ Kirchner 培地に比較して培養期間を 2 週間短縮できる利点があり、今後は *in vitro* の実験には Tween-albumin 培地を使用する考えである。なお thiourea 誘導体の抗結核菌作用については 1953 年の R.L. Mayer¹⁵⁾ の報告以来多数にのぼっており、この中 Thioban および Isoxyl が臨床的に試用されているが、今回報告の化合物の中にはすでに記述したように 1-(2-benzothiazolyl)-3-butyl-2-thiourea, 1-(2-benzothiazolyl)-3-hexyl-2-thiourea, 1-(2-benzothiazolyl)-3-(*p*-tolyl)-2-thiourea および 1-(2-benzothiazolyl)-3-(*p*-ethoxyphenyl)-2-thiourea のように *in vitro* の抗菌作用においては両者に匹敵するものもあり、今後 thiourea 誘導体の *in vitro* および *in vivo* の検索を続けてゆく計画である。

実 験 の 部

1-(2-Pyridyl)-3-(alkyl or aryl)-2-thiourea の合成 (V) 1-(2-Pyridyl)-3-hexyl-2-thiourea—2-Aminopyridine 0.015 mole と *n*-hexyl isothiocyanate 0.015 mole を EtOH 5 ml に溶解し、5 hr 還流冷却器を付し沸騰水浴中で加熱反応。EtOH を濃縮し析出する結晶を EtOH より再結晶。mp 83—85° 無色の柱状晶、収量 1.5 g, 収率 63%。同様な方法で Table II に示すような誘導体を合成した。

1-(4-Antipyrinyl)-3-(alkyl or aryl)-2-thiourea の合成 (XIX) 1-(4-Antipyrinyl)-3-hexyl-2-thiourea—4-Aminoantipyrine 0.015 mole と *n*-hexyl isothiocyanate 0.015 mole を EtOH 25 ml に溶解し、5 hr 還流冷却器を付し沸騰水浴中で加熱反応。冷後析出せる結晶を 90% EtOH より再結晶。mp 193—195°。無色針状晶。

12) R.J. Dubos, B.D. Davis, *J. Exp. Med.*, **83**, 409 (1946).

13) R.J. Dubos, G. Middlebrook, *Amer. Rev. Tuberc.*, **56**, 334 (1947).

14) 津久間俊次, 胸部疾患, **2**, 522 (1958).

15) R.L. Mayer, P.C. Eisman, E.A. Konopka, *Proc. Soc. Exp., Biol. Med.*, **82**, 769 (1953).

TABLE II. R-NHCSNH-R'

No.	Compd. R	R'	mp (°C)	Solvent	Appearance	Formula	Analysis (%)			
							Calcd.		Found	
							C	H	C	H
V	C ₆ H ₁₃	1	83—85	EtOH	colorless prisms	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ S	60.73	8.07	60.59	8.26
VIII	<i>o</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	1	178—180	dil. dioxane	colorless prisms	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ S	64.17	5.39	64.32	5.17
XI	<i>o</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄	1	209—210	dil. dioxane	colorless prisms	C ₁₃ H ₁₃ ON ₃ S	60.22	5.05	60.45	5.07
XIV	<i>o</i> -C ₂ H ₅ OC ₆ H ₄	1	165—167	dil. dioxane	colorless needles	C ₁₄ H ₁₅ ON ₃ S	61.53	5.53	61.60	5.23
XVII	C ₃ H ₇	2	211—213	90% EtOH	colorless needles	C ₁₅ H ₂₀ ON ₄ S	59.19	6.62	59.22	7.05
XVIII	C ₄ H ₉	2	205—207	90% EtOH	colorless needles	C ₁₆ H ₂₂ ON ₄ S	60.36	6.97	60.40	7.18
XIX	C ₆ H ₁₃	2	193—195	90% EtOH	colorless needles	C ₁₈ H ₂₆ ON ₄ S	62.40	7.56	62.88	7.72
XX	CH ₂ CH=CH ₂	2	203—204	90% EtOH	colorless needles	C ₁₅ H ₁₈ ON ₄ S	59.59	6.00	59.91	6.02
XXXI	C ₃ H ₇	3	181—183	EtOH	colorless prisms	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ S ₂	52.58	5.22	52.40	5.24
XXXIII	C ₆ H ₁₃	3	124—125	EtOH	colorless needles	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ S ₂	57.32	6.53	57.80	6.92
XXXIX	<i>o</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄	3	187—188	EtOH	colorless needles	C ₁₅ H ₁₃ ON ₃ S ₂	57.14	4.16	57.63	4.36

収量 4.5 g, 収率 89%. 同様な方法で Table II に示すような誘導体を合成した.

1-(2-Benzothiazolyl)-3-(alkyl or aryl)-2-thiourea の合成 (XXXIII) 1-(2-Benzothiazolyl)-3-hexyl-2-thiourea—2-Aminobenzothiazole 0.015 mole と *n*-hexyl isothiocyanate 0.015 mole を EtOH 25 ml に溶解し, 30 hr 還流冷却器を付し, 沸騰水浴中で加熱反応. 冷後水で希釈するに油状物析出する. アミンを除去する目的で 10% HCl で処理し, 冷蔵庫に放置するに油状物とともに結晶性物質が析出する. この結晶をろ取りし EtOH より再結晶. mp 124—125°. 無色針状晶, 収量 1.0 g, 収率 22%. 同様な方法で Table II に示すような誘導体を合成した.

抗菌力試験の実験材料および実験方法 使用菌株—*Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H 37 Rv strain.

使用培地—10% 牛血清加 Kirchner 液体培地および Tween-albumin 培地. 後者は Difco の Bact TB Broth Base with Tween 80 と Armour Pharmaceutical Co. の Bovine Albumin とで作成した. 最終濃度は Tween 80 は 0.05%, Albumin は 0.5% である.

薬剤—INAH は 70% EtOH に滅菌溶解, その他は DMFA (N,N-dimethylformamide) で 0.1% の割合に溶解し実験に供した.

実験方法—常用の試験管通滅倍数希釈法を用い, 1 試験管当りの培地量は 2 ml でこれに H 37 Rv 株の Tween-albumin 培地 10 日培養液の 10 倍希釈液 1 滴を接種, 37° に培養し, 10% 血清加 Kirchner 培地は 4 週間, Tween-albumin 培地は 2 週間後に判定した.