N-Acetyl-D-Glucosaminyl-Isonicotinic Acid Hydrazide (AG-INH) の抗結核性に関する研究

京都大学結核研究所化学療法部（主任　教授　内藤 益一）

前川暢夫・浜田浩司・川合　満・中井　準

日本新薬株式会社研究所

楠田冬樹・森　一雄

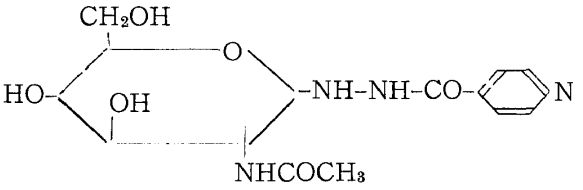
（内 容 抄 録）

結核マウスの生存日数を指標として AG-INH の抗結核性を INH 及び INHG と比較検討した結果，背部皮下注射では，AG-INH は全く効果を示さなかつたが，1日 5.0γ/g 以上の経口投与では，INH よりは劣るが可成りの治療効果を示し，AG-INH と INHG との両者の効果の間には著明な差が認められなかつた。毒性では3者の中，AG-INH が最も弱く 10,000 γ/g (10 mg/g) の大量投与でもマウスの死亡を認めなかつた。

第1章　緒　　言

Isonicotinic acid hydrazide (INH) の優れた抗結核性が発表されて以来[1)2)]，その毒性の低下と抗菌力の増大を企図して，多くの hydrazone 誘導体に関する研究が相次いで発表され[3)]，既に数種のものが結核化学療法の臨床に利用されていることは周知の如くである。結核症の如き，薬剤の長期投与を必須とする疾患に於いて，毒性が低くかつ抗菌力の強い INH 誘導体を得ることは有意義なことであるが，今回筆者等はその目的で合成された N-Acetyl-D-glucosaminyl-isonicotinic acid hydrazide (AG-INH) について二三の実験的検討を試み興味ある知見を得たので報告する。AG-INH は(Ⅰ)式の如き構造を有し，1957年 J. Kimmig[4)] 等により合成され，*in vitro* の抗菌力は略々 INH に匹敵し，マウスに対する毒性は INH の 1/60 で，モルモットの実験結核症に対して有効であると報告されている。即ち AG-INH は低い毒性と可成りの抗結核菌作用を有すると考えられるので，筆者等はマウスに対する急性毒性及び慢性毒性を

(Ⅰ)



検討すると共に，マウスの生存率と体重の変化とを指標とする Screening test の一方法[5)]を用いて，現在頻用されている INH 及びNa-glucuronate-isonicotinyl hydrazone (INHG) の効果と比較検討した。投与量については，先ずマウス体重g当り INH 1γ 連日投与を対照として，AG-INH を分子量比（AG-INH はそれぞれ1分子中に1ケの INH を含有するので）及びその5倍量の割合とし，背部皮下注射及び経口投与の2方法を用いてその影響を検討し，次いで INH 0.5γ/g 投与を対照として AG-INH 5γ/g, 7.5γ/g 及び 10γ/g 投与と INHG 5.4γ/g 及び 10.8γ/g 投与との効果を経口投与で比較する実験を行なつた。

第2章　実 験 方 法

第1節　急性及び慢性毒性

体重 18g 前後の dd 系マウスを用いた。急性毒性測定の際は各薬剤の水溶液を，注射針の太いものの尖端を切断し，適当な長さとしたものを注針筒にはめた簡易ゾンデによつて，強制的に胃内に注入し，投与後24時間及び48時間のマウスの生存数を調べた。慢性毒性については，INH 10γ/g の各薬剤分子量比相当量

を一日一回経口投与し，90日間継続し，体重の変化を測定した。

第2節　結核マウスの生存率に及ぼす影響

1)　接種菌株及び接種方法

有毒人型結核菌黒野株を3～4週間グリセリン・ブイヨン培地に培養しその菌膜を釣取，滅菌沪紙で水分を除去した後秤量して「めのう」の乳鉢で磨砕し，適当量の生理的食塩水を加え，1cc 中に 5mg の菌量で浮游するように調整し，これの 0.1cc(0.5mg)を実験用マウスの尾静脈内に注射した。これらの各10匹を1群とする8群を編成し供試検体投与を開始した。

2)　供試検体投与法

供試検体はすべて体重に比例した投与量を水溶液として1日1回背部皮下に注射或は経口的に投与した。尚，非治療対照群には治療群と同じ方法で生理的食塩水を投与し，薬剤投与は治療群中の何れか1群の半数のマウスが死亡するまで継続した。

3)　成績の判定

成績の判定は主として生存率曲線により，体重曲線を参考として行なつた。観察期間は原則として1ケ月とし，毎日1回生死を調べ，斃死マウスは毎回剖検して結核病変の有無を確めた。体重は5日間隔に測定して記録した。更に生存群について，その中より2匹を任意に選び，屠殺して肺をとり出し各9倍量の2％苛性ソーダ水を加え，よくすり潰し，駒込ピペットにてその 0.1cc を，又その10倍稀釈より 0.1cc をそれぞれ1％小川培地に流し込み，37°C にて4週間及び6週間培養して発育状態を観察した。

第3章　実　験　成　績

第1節　急性及び慢性毒性

1)　急　性　毒　性

INH 及び INHG を対照として AG-INH の経口投与による急性毒性を検討した結果は第1表に示す如くで，INH は 200γ/g 投与で半数が死亡し，300γ/g 投与で 6/8 が死亡し，400γ/g 投与で殆んど全部のマウスが死亡している。又，INHG は 3,000γ/g 投与で半数が死亡し，4,000γ/g 投与で 7/8 が死亡，5,000γ/g 投与では全例が死亡しているのに対して AG-INH では 10,000γ/g まで投与したが1例も死亡を見なかつた。

2)　慢　性　毒　性

AG-INH 及び INHG の INH 10γ/g 相当量即ち 25γ/g 及び 27γ/g を90日間連続経口投与した結果，死亡，体重の減少等を認めなかつた。AG-INH はこれらの成績からみても可成り毒性の少ない薬剤であるといえよう。

第2節　結核マウスの生存率に及ぼす影響

1)　INH と AG-INH との比較実験

マウス各10匹を1群として8群を編成し，第1群は INH 1γ/g，第2群は AG-INH 2.5γ/g (分子量比)，第3群 AG-INH 12.5γ/g，第4群は非治療対照群として，生理的食塩水1匹当り 0.15cc 投与とし，第5群以下に同様な量の皮下注射群を設け，第2表に掲げる如く経口投与群—4群，皮下注射群—4群の計8群とした。

成績は経口投与について第1図に，皮下注射群について第2図に示したが，経口投与群（第1図）では対照群の死亡に比して INH 1γ/g 投与群の死亡が著明に遅延せられているのに，分子量比で投与した AG-INH 2.5γ/g 群では対照群に比べて僅かな生存の延長が認められたのみであつたが，これの5倍量の AG-INH 12.5γ/g 群では30日間の観察で死亡を見なかつた。この成績では AG-INH は INH との分子量比で投与した場合には INH に比べて可成り劣るが，その5倍量を投与すれば相当すぐれた延命効果を発揮する様である。

第 1 表　マウスに対する急性毒性（経口投与）

INH 投与量	生存数		AG-INH 投与量	生存数		INHG 投与量	生存数	
	24 hrs	48 hrs		24 hrs	48 hrs		24 hrs	48 hrs
100 γ/g	8/8	8/8	4,000 γ/g	8/8	8/8	2,000 γ/g	8/8	8/8
200 γ/g	4/8	3/8	6,000 γ/g	8/8	8/8	3,000 γ/g	4/8	4/8
300 γ/g	2/8	2/8	8,000 γ/g	8/8	8/8	4,000 γ/g	1/8	1/8
400 γ/g	1/8	0/8	10,000 γ/g	8/8	8/8	5,000 γ/g	0/8	0/8

第 2 表　実験群の編成

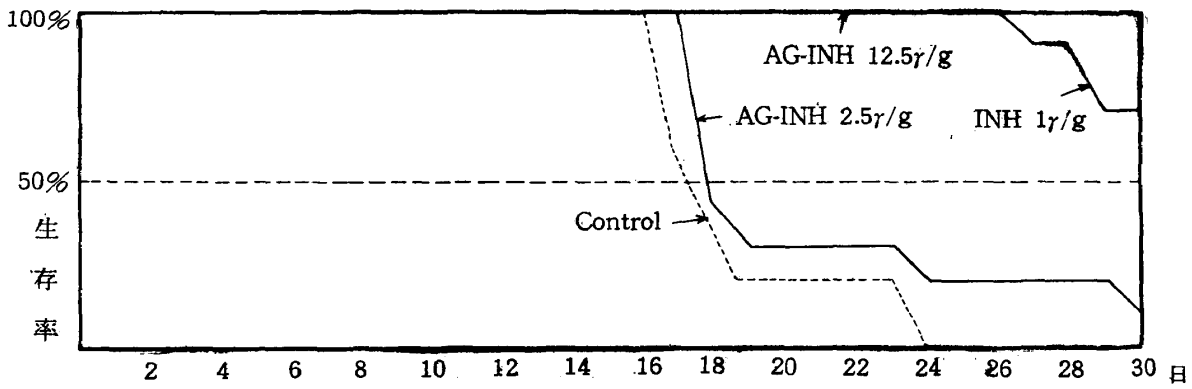
	治療の種類	薬剤	投与量
第 1 群	経口投与	INH	1 γ/g
第 2 群	〃	AG－INH	2.5 γ/g
第 3 群	〃	〃	12.5 γ/g
第 4 群	〃	対照	生理的食塩水g当り 0.15cc/per mouse
第 5 群	皮下注射	INH	1 γ/g
第 6 群	〃	AG－INH	2.5 γ/g
第 7 群	〃	〃	12.5 γ/g
第 8 群	〃	対照	生理的食塩水g当り 0.15cc/per mouse

皮下注射群（第2図）では INH 1γ/g 注射群はやはり対照に比して著明な延命効果を認めたが，AG-INH 群は INH との分子量比で投与した 2.5γ/g 群は勿論，その5倍量の 12.5γ/g 投与群でも極めて延命効果は微弱で，INHのすぐれた効果に比して AG-INH のそれはかなり劣る成績であつた。この成績をみると，INHは経口投与でも皮下注射でも同様に結核マウスの死亡を著明に遅延させるが，AG-INHは皮下注射では殆んど効果が認められず，経口投与では INH との分子量比で投与した場合は INH に比べて可成り劣るが INH との分子量比で5倍量を投与すれば INH に劣らぬ成績を収めることを認めた。

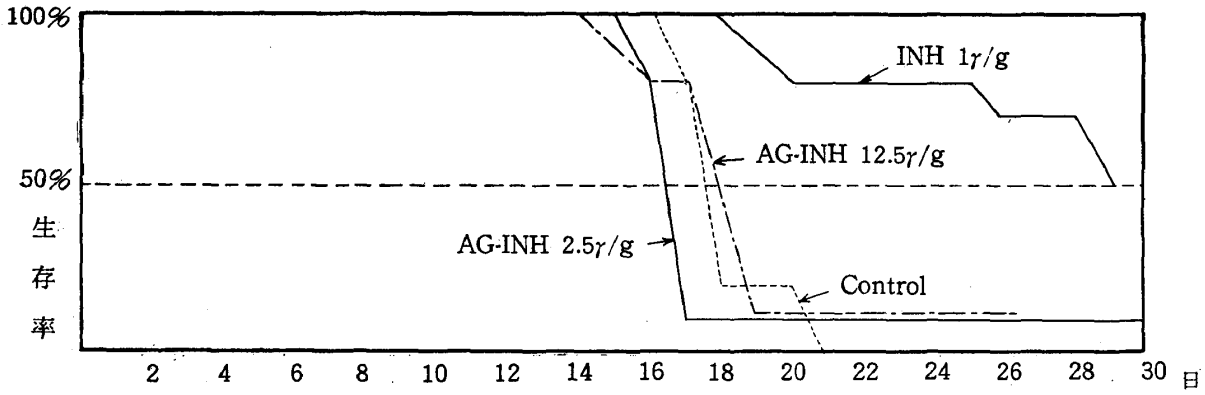
2) AG-INH と INHG との比較実験

第1図の結果で AG-INH 12.5γ/g (INH 12.5

第 1 図　経口投与群



第 2 図　注射投与群



γ/g 相当量）投与で AG-INH 治療群に全く死亡を認めなかつたので，薬剤量を減少させて AG-INH では 5γ/g，7.5γ/g 及び 10γ/g の量で，INHG では 5.4γ/g 及び 10.8γ/g の量を投与して INH 0.5γ/g投与を対照としてすべて経口投与により治療効果を検討した。即ち，マウス10匹を1群として第3表に示した如く第1群を INH 0.5γ/g，第2群 AG-INH 5γ/g，第3群AG-INH 7.5γ/g，第4群AG-INH 10γ/g，第5群 INHG 5.4γ/g，第6群 INHG 10.8γ/g，第7群非治療対照群とする7群に編成した。

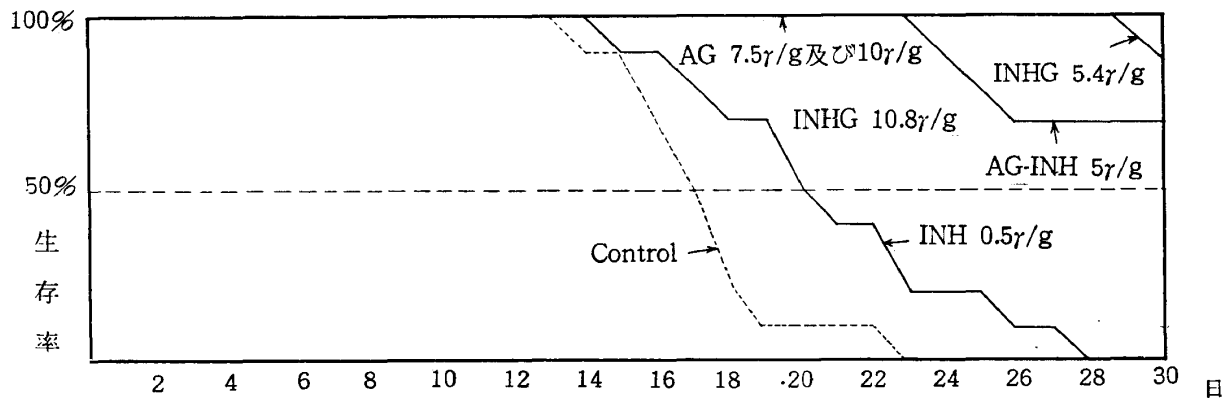
成績は第3図及び第4表に示すが，生存日数に及ぼす影響では第3図に見られる如く INH 0.5γ 経口投与群は対照群に比べて明らかな延命効果を示したが，AG-INH 5γ/g 以上及び INHG 5.4γ/g 以上を投与した群では更に強い延命効果が認められ，此の成績からは目的とした両薬剤の延命効果の比較が困難であつたので，全数生存した各群のマウスの体重平均値を静脈内黒野株接種当日の体重を1.00とし以後の増減を4日目毎に比率で現わして，主として AG-INH 及び INHG 両剤の経口投与が結核マウスの全身状態に及ぼす影響を比較観察しようとしたのが第4表に示す成績である。29日目迄は AG-INH 7.5γ/g 及び 10γ/g 群，INHG 5.4γ/g 及び 10.8γ/g 群の4群のマウスが全数生存したが，これらの群の体重比率を見ると，AG-INH の方が INHG に比べて結核マウスに対して稍々良好な影響を与えているようである。

次いで，全数生存した AG-INH 10γ/g 投与群と INHG 10.8γ/g 投与群の2群のマウスを尾静脈内結核菌接種後30日間観察した後，更に1週間非治療のままで飼育した後一斉に屠殺し，肉眼的には病変の認められない肺を取り出して小川氏の方法による臓器内結核菌定量培養を，臓器の10倍及び100倍稀釈液について行なつた成績を見ると第4表右欄の如くで，10倍稀釈の場合は勿論100倍稀釈の場合でも4週間の判定

第 3 表　実験群の編成

	治療の種類	薬剤	投与量
第 1 群	経口投与	INH	0.5 γ/g
第 2 群	〃	AG-INH	5 γ/g (INH 2 γ/g 相当量)
第 3 群	〃	〃	7.5 γ/g (〃 3 γ/g 〃)
第 4 群	〃	〃	10 γ/g (〃 4 γ/g 〃)
第 5 群	〃	INHG	5.4 γ/g (〃 2 γ/g 〃)
第 6 群	〃	〃	10.8γ/g (〃 4 γ/g 〃)
第 7 群	〃	対照	生理的食塩水 0.15cc/per mouse

第 3 図　経口投与群



第 4 表　体重の変日（5日間隔測定）と培養所見

		Start	5日目	9 〃	13 〃	14 〃	15 〃	16 〃	17 〃	18 〃	19 〃	20 〃	21 〃	23 〃	24 〃	25 〃	26 〃	28 〃	29 〃	30 〃	結核菌培養成績 4週	6週
第 1 群	マウス生存数	10	10	10	10	10	9	9	8	7	7	5	4	2	2	2	1	0	0	0		
INH 0.5γ/g	体重比率	1.00	1.06	1.03	0.88	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
第 2 群	〃	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	8	7	7	7	7		
AG-INH 5γ/g	〃	1.00	1.04	1.02	0.97	—	—	—	0.91	—	—	—	0.82	—	—	—	—	—	—	—		
第 3 群	〃	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
AG-INH25γ/g	〃	1.00	1.03	1.03	1.00	—	—	—	1.00	—	—	—	0.97	—	—	0.95	—	—	0.95	—		
第 4 群	〃	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10倍稀釈卌	卌
AG-INH10γ/g	〃	1.00	1.03	1.05	1.03	—	—	—	1.05	—	—	—	1.03	—	—	1.09	—	—	1.09	—	100 〃 廿	廿
第 5 群	〃	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9		
INHG 5.4γ/g	〃	1.00	1.06	0.08	1.02	—	—	—	1.00	—	—	—	0.94	—	—	0.94	—	—	0.90	—		
第 6 群	〃	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10倍稀釈卌	卌
INHG 10.8γ/g	〃	1.00	1.05	1.03	1.04	—	—	—	1.09	—	—	—	1.03	—	—	1.03	—	—	1.03	—	100 〃 廿	廿
第 7 群	〃	10	8	8	8	7	7	6	4	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
対照	〃	1.00	0.98	0.95	0.83	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

で，培地面に旺盛な結核菌集落の発育を認め集落数の算定不能で，AG-INH 群と INHG との間に菌発育の上でも差異を認めることは出来なかつた。

第4章　総括並びに考按

以上の実験成績を総括すると，AG-INH の急性毒性は10,000γ/g の大量投与にてもマウスに死亡を認めず，これを INH 及び INHG と比較すると，INH の 1/50 以下，INHG の 1/3 以下であつて恐らく既存の如何なる抗結核剤よりも低いと思われるが，これは AG-INH の生体内変化に際して，遊離した glucosamine が解毒的に作用するのではなかろうかとも考えられる。又3ケ月間にわたる長期連続投与に於いても，マウスの体重の減少又は死亡を認めないことは興味ある事実である。長期投与時に於ける体内各臓器に対する影響には興味深いものがあり，又組織学的検索を行なわずに毒性を論ずるのは早計であるが，著者らの観察所見からも AG-INH は他の如何なる既知抗結核剤よりも毒性が低いであろうことは容易に想像できる様である。結核マウスの生存率を指標とする治療実験に於いて，経口投与では分子量比で INH 1γ/g 相当量即ち 2.5γ/g の AG-INH 投与では INH 投与に比して著明に劣るが，5倍量の 12.5γ/g の AG-INH を投与すれば INH に劣らない延命効果を発揮するのに反して皮下注射群では INH 投与群にのみ治療効果が認められて，AG-INH 投与群には INH 換算 1γ/g 相当量（AG-INH 2.5γ/g）及び 5γ/g（AG-INH 12.5γ/g）投与の両群共，治療効果が殆んど認められないのは注目すべき事実であるが，辻野[6]は数量の INH 誘導体の抗結核作用の研究に於いて Isonicotinyl-hydrazino-pyruvinate,（IP）INHG に於いても同じく皮下注射にては無効であると報告しているので，恐らくこれらの誘導体は，経口投与時に於いて，体内に吸収される際，加水分解を受け，その際遊離する INH より抗結核性が生ずるものと判断される。

経口投与法による治療実験に於いて，INH 換算 1γ/g 相当量の AG-INH（2.5γ/g）では殆んど治療効果は認められなかつたが，INH 5γ/g 相当量（AG-INH 12.5γ/g）の大量投与を行なつた場合は全く結核症による死亡が認められなかつた。

次に行なつた INHG と AG-INH との比較実

験に於いては，AG-INH の 5γ/g 及び INHG 5.4γ/g 投与群（INH 換算 2γ/g）を除いては，実験期間中，全例が生存する結果を得た。第2図に見られる如く INH 換算2γ/g程度では INHG の方が AG-INHよりやや延命効果が高い様であるが，INH 換算 4γ/g 程度では両者に差が認められず，逆に体重曲線では AG-INH 投与群の方が INHG 投与群に比べてややすぐれている結果が得られた。然し乍らこれを1週間飼育して后一斉に屠殺し，肉眼的には病変の認められない肺を取り出してアルカリ処理后1％小川培地にて定量培養を行なつた所，何れも結核菌の発育が見られ，AG-INH 群と INHG 群との間にその集落数に顕著な差が認められなかつた。然し乍らこれは臓器の 100倍稀釈液しか行なつていないので 100倍以上の稀釈液について培養を行なえば両者の差が或いは観察出来たかも知れないと考えられる。

第5章 結　　論

マウスに対する急性及び慢性の毒性試験の成績と結核マウスの生存日数に及ぼす影響を観察した成績から N-Acetyl-D-glucosaminyl isonicotinic acid hydrazide（AG-INH）に関して次の如き結論を得た。

1) 急性毒性では経口投与 10,000γ/g（10mg/g）にてマウスの死亡を認めず，INH 及び INHG に比して著しく毒性の低いものと考えられた。慢性毒性では AG-INH と INHG との間に明らかな差を認めなかつた。

2) 黒野株 0.5mg 尾静脈内感染による結核マウスの生存日数に及ぼす影響を見た実験に於いて AG-INH は INH に比しては相当劣るが INH 換算 2γ/g 以上の連日連与に於いて明らかな延命効果が認められた。

又，INHG との比較では AG-INH はINH2γ/g 相当量にては INHG よりも延命効果がやや劣ることが認められたが，それ以上の投与量にては両者の間に著明な差は認められなかつた。

3) 同様な実験方法で INH 及び AG-INH の皮下注射による延命効果を見た所，INH はすぐれた効果を発揮したが，AG-INH は殆んど効果を認めなかつた。

文　　献

1) Fox et al : Science 116; 129 (1929)
2) G. Domagk et al : Naturforsch. 7 ; 446 (1952)
3) 今井：（綜説）薬学研究，28 ; 570 (1956).
4) J. Kimmig et al : Arzneimitteforschung, 157 (1957)
5) 浜田：京都大学結研紀要，7; 315,（昭34）
6) 辻野：ibid 7; 365,（昭34）