

# 螢光定量法による INH 血中濃度の研究

鏡山松樹・間嶋正男

健康保険星ヶ丘病院

受付 昭和 36 年 7 月 11 日

## まえおき

従来の INH 血中濃度の化学的定量法は、測定限界が 0.5  $\gamma/cc$  程度で臨床的应用に不適当であり<sup>1)~3)</sup>、また細菌学的方法是感度は高いが熟練を要し、結果判定までに数日間を要する<sup>4)~7)</sup>等の欠点がある。しかるに最近 Peters が螢光法による INH の新定量法を発表し、測定限界は 0.1  $\gamma/cc$  で臨床的に応用可能な方法であると報告した<sup>8)</sup>。そこでわれわれは Peters の定量法を追試検討したところ、氏の報告のごとく敏感で臨床的应用に適した方法であることが分かった。われわれはさらにこの方法を利用して後述の研究を行なった。

## 研究方法および成績

### 1) Peters の INH 定量法の追試検討

まず本法の概略を紹介する。

チトラート血漿 2 cc (原法は 3 cc) を有栓三角コルベンに取り硫酸アンモニウム 3.2 g, N/10 苛性ソーダ 1.0 cc を加え、1~2 分間よく振り、ついでイソアミルアルコール・エチレンジクロリド (3:7) 混合液 40 cc を加え、振盪抽出後 1,500 r.p.m. で 15 分間遠心分離、上清 30 cc を別の有栓三角コルベンに取りアルカリ性硫酸液 5 cc \*1 を加え、上と同条件で振盪 15 分後、1,500 r.p.m. で 10 分間遠心分離、上層 25 cc を別の三角コルベンに取り、N/10 塩酸 5 cc (原法は 4 cc) を加え、上と同条件で振盪抽出 15 分後、1,500 r.p.m. で 5 分間遠心分離、上層の塩酸抽出液を可検液とする。

塩酸抽出液 2 cc を遊離 INH 用として有栓試験管に取り、0.2 N-苛性ソーダ 1.0 cc、アンモニア緩衝液 (pH 8.3) 0.5 cc、5% ブロムシアン液 0.5 cc \*2、1.8 N-苛性ソーダ 0.5 cc、エタノール 2.0 cc を順次加え、よく混和し、発した螢光強度を測定する。

塩酸抽出液の残りの 1.0 cc を総 INH 用として目盛付試験管に取り、Peters と同様に Kelley, Poet<sup>1)</sup>の

変法により、3 N-塩酸 1.0 cc、エールリッヒ氏アルデヒド試薬 1.0 cc を順に加え、沸騰水中で 1 時間加熱、水浴で冷却してのち、0.1N-塩酸で全量を 5.0 cc に補正、比色定量する。

われわれは本定量法における振盪抽出は振盪機を用い、1 分間 200 回、振幅 7 cm の同条件で行なつたが、抽出率は表 1 に示すように 92% で一定であり、PAS、サルファ剤、PZA と完全に分離抽出される。またこの抽出率は INH の水溶液でも、既知量の INH を添加した血清でも同率であることを確かめた。

Table 1

### Rate of Extraction by Peters' Procedure

Volume of sample.....2cc  
Volume of organic solvent.....40cc  
Volume of organic solvent taken after extraction...25cc  
Volume of 0.1 N-HCl used for extraction...5cc

The recovery is 25% of the initial concentration, if INH is extracted 100%,  $25/40 \times 2/5 = 0.25$

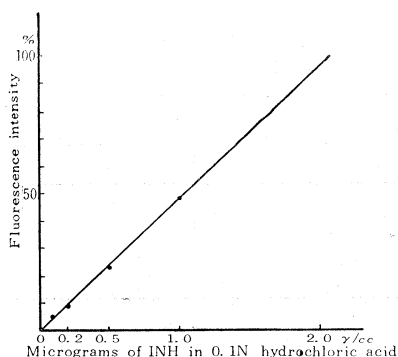
Recovery of INH extracted from INH 10 $\gamma/cc$ aqueous ( $\gamma/cc$ )	2.3	2.3
Concentration of INH, when INH is extracted 100% from INH 10 $\gamma/cc$ aqueous ( $\gamma/cc$ )	2.5	2.5
Rate of extraction (%)	92	92

遊離 INH の螢光定量は八木式の螢光光度計を使用、励起光選択フィルター UV D<sub>1</sub> (365  $m\mu$ )、遮断フィルター UV O<sub>1</sub>、螢光選択フィルター FL B<sub>1</sub> (430  $m\mu$ ) を用い (原法では励起光 300  $m\mu$  を使用、発した螢光は 405  $m\mu$  を選択している)、感度 100、液槽 10 mm で測定した。螢光強度曲線は図 1 に示すとおりで、螢光の強さは濃度に正比例し、信頼性のある測定限界は血漿中濃度で 0.1  $\gamma/cc$  である。また発現した螢光は 10 分後に最高となり 1 時間安定である。

総 INH の比色定量は日立 EPOB 型光電光度計を用い、フィルター S 47、液槽 10 mm で測定した。吸光度曲線は図 2 に示すとおり、0.5~10  $\gamma$  まで直線

\*1 100 cc の溜水に硫酸アンモニウム 70 g を溶解し、pH メータを使用、飽和苛性ソーダで pH 7.8 に調整する。

\*2 塩化アンモニウム 10.7 g、第 2 磷酸カリ 7.8 g に水を加えて 100 cc とし濃アンモニア水 (28%) で pH メータを使用して pH 8.3 に調整する。



Yagi's photofluorometer was used.  
 Maximum activation wave length, 365 $m\mu$  was selected with filter UVD<sub>1</sub>.  
 Maximum fluorescence wave length, 430 $m\mu$  was selected with filter FLB<sub>1</sub>.  
 The instrument was set sensitivity-100, T%-100% with 0.02  $\gamma/cc$  quinine in 0.1N sulfuric acid

Fig. 1. Relationship between INH content of the assay solution and fluorescence intensity by Peters' procedure.

的で、遊離 INH をサンプルとした場合もアセチル INH をサンプルとした場合も、吸光度曲線はほぼ同様であつた。測定限界は血漿中濃度で 0.5  $\gamma/cc$  である。

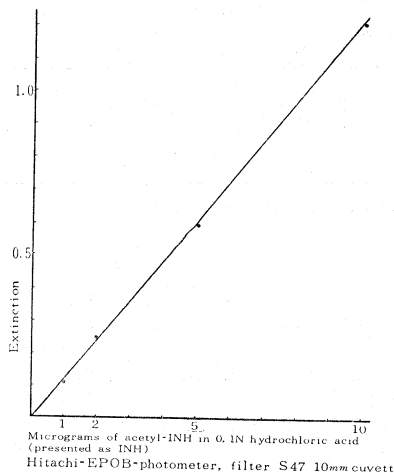
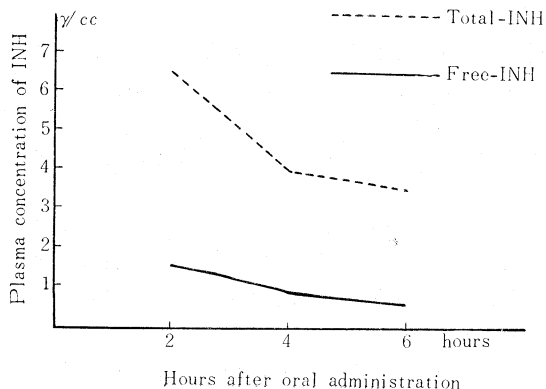


Fig. 2. Calibration curve of acetyl-INH by Kelley, Poet's procedure.

Table 2  
 Plasma Concentration of Free-INH and Total INH in 5 Healthy Persons Receiving INH in Doses of 0.2 g orally

Plasma concentration ( $\gamma/cc$ )			2 hours		4 hours		6 hours	
			Free-INH	Total-INH	Free-INH	Total-INH	Free-INH	Total-INH
■	♂	40	2.1	7	1.7	5.5	1.2	4.5
■	♀	28	1.6	5.5	1.2	3.5	0.9	3.5
■	♀	23	1.4	7.5	0.5	4.5	0.4	4.0
■	♀	28	1.6	7	0.7	2	0.2	2
■	♂	43	1.8	5.5	0.4	4.5	0.3	3.5
Average			1.7	6.5	0.9	4	0.6	3.5



本法は遊離 INH, 総 INH を同時に測定可能で操作はやや複雑であるが、同時に多数行なえば実施はさして困難ではなく、測定所用時間も 3~4 時間でたりのので、臨床的に応用可能な方法である。

2) 健康人の INH 0.2 g 内服後の逐時的 INH 血中濃度推移 (5 例)

投与 2, 4, 6 時間後の血中濃度は表 2 に示すとおりで遊離 INH の平均値はそれぞれ 1.7, 0.9, 0.6  $\gamma/cc$ , 総 INH の平均値はそれぞれ 6.5, 4, 3.5  $\gamma/cc$  であつた。

3) 結核患者の INH 0.2 g 単独内服 2 時間後の血中濃度 (41 例)

表 3 に示すとおり遊離 INH 最高 4.4  $\gamma/cc$ , 最低 0.2  $\gamma/cc$ , 平均 1.9  $\gamma/cc$ , 総 INH は最高 13  $\gamma/cc$ , 最低 3  $\gamma/cc$ , 平均 6.5  $\gamma/cc$  であつた。以上の成績を、

Table 3  
Plasma Concentration of INH in 41 Tuberculous Patients at 2 Hours  
after Oral Administration of 0.2 g of INH

Classification of INH	Plasma concentration of INH ( $\gamma/cc$ )		
	Maximum	Minimum	Average
Free-INH	4.4	0.2	1.9
Total-INH	13	3	6.5
Acetyl-INH			4.6

Average rate of acetylation=70%

Table 4  
Influence of PAS on Plasma Concentration of Free and Total INH

Subject	Sex	Age	Weight	INH alone		INH+PAS		Influence of PAS	
				Free-INH	Total-INH	Free-INH	Total-INH	Free-INH	Total-INH
■	♂	18	70 kg	1.1 $\gamma/cc$	3.5 $\gamma/cc$	1.4 $\gamma/cc$	3.5 $\gamma/cc$	same	same
■	♂	31	45	1.1	3	1.9	4	up	same
■	♂	39	59	1.3	3.5	0.5	5.5	down	up
■	♂	40	54	0.2	5	1.4	7	up	up
■	♂	35	54	1.0	5	1.0	5	same	same
■	♂	30	53	1.3	7	2.2	7	up	same
■	♂	21	53	2.1	3.5	2.8	6	up	up
■	♀	23	40	2.6	11	3.4	9	up	down
■	♀	25	42	1.3	7	3.9	7	up	same
■	♂	39	61	1.1	7	1.4	7	same	same
■	♀	23	56	1.0	5	2.9	7	up	up
■	♀	22	52	1.8	7	2.4	6	up	same
■	♂	20	67	1.1	5	2.9	7	up	up
■	♀	28	57	0.5	4	1.5	5	up	same
■	♀	21	48	1.4	5	1.4	5	same	same
■	♀	28	41	2.8	9	1.8	5	down	down
■	♀	23	38	2.9	9	2.6	5	same	down
Average				1.5	5.5	2.1	6		

Free INH up 10 same 5 down 2  
Total INH up 5 same 9 down 3

同一方法による Peters<sup>9)</sup> の成績と比較すると、遊離 INH は低値であり、総 INH はほぼ同様である。醋化率は平均 70% で Peters の 50% に比しかなり高い。年令別および性別による差は認められず、一定濃度の INH を投与しても、血中濃度は必ずしも体重と反比例せず著しい個人差のあることが分かった。

#### 4) PAS 併用の INH 血中濃度に及ぼす影響 (17例)

INH 単独使用と PAS 併用との双方について INH 血中濃度を同一個体で比較すると、表 4 に示すとおり遊離 INH では上昇 10、不変 5、下降 2。総 INH では上昇 5、不変 9、下降 3 である。平均値では単独使用時遊離 INH 1.5  $\gamma/cc$ 、総 INH 5.5  $\gamma/cc$ 、PAS

併用時は遊離 INH 2.1  $\gamma/cc$ 、総 INH 6  $\gamma/cc$  となり、総 INH においては大差はないが、遊離 INH は明らかに上昇を示す。

#### 5) サルファ剤併用の INH 血中濃度に及ぼす影響 (15例)

表 5 に示すとおり、遊離では上昇 1、不変 5、下降 9。総 INH では上昇 4、不変 6、下降 5 で、この群の平均値では単独使用時遊離 INH 2.3  $\gamma/cc$ 、総 INH 7  $\gamma/cc$ 、併用時では遊離 INH 1.8  $\gamma/cc$ 、総 INH 7  $\gamma/cc$  で、従来の成績と異なり遊離 INH 値の下降する例がしばしばみられた<sup>13)14)</sup>。

Table 5  
Influence of Sulfa Drug on Plasma Concentration of Free and Total INH

Subject	Sex	Age	Weight	INH alone		INH+Sulfa drug		Influence of sulfa drug	
				Free-INH	Total-INH	Free-INH	Total-INH	Free-INH	Total-INH
■■■■	♂	22	52	2.2 r/cc	5 r/cc	1.7 r/cc	2 r/cc	down	down
■■■■	♂	25	46	4.0	13	0.7	5.5	down	down
■■■■	♂	24	53	2.1	5.5	2.3	9	same	up
■■■■	♂	31	50	4.1	7	1.6	6	down	same
■■■■	♂	23	51	1.5	3.5	1.0	5.5	down	up
■■■■	♂	19	50	2.9	7	1.2	5.5	down	same
■■■■	♀	34	42	3.1	9	1.7	9	down	same
■■■■	♀	27	43	1.8	7	1.8	9	same	up
■■■■	♀	18	50	1.6	7	1.5	9	down	up
■■■■	♀	27	39	1.0	7	1.3	6	same	same
■■■■	♀	30	55	2.7	9	2.2	7	down	down
■■■■	♀	34	50	1.7	9	1.5	7	same	down
■■■■	♀	18	53	2.3	9	1.7	9	down	same
■■■■	♀	21	44	2.7	10	2.7	8	same	down
■■■■	♀	28	53	1.7	9	2.4	9	up	same
Average				2.3	7	1.8	7		

Free INH up 1 same 5 down 9  
Total INH up 4 same 6 down 5

考 察

本定量法とほとんど同時に Quentin<sup>9)</sup> がイオン交換樹脂による INH の分離定量法を発表し、本邦では稲垣<sup>10)</sup> の追試があるが、操作が複雑で臨床的应用には不適當であるという。Peters 法は敏感で比較的容易な化学的定量法であるが、ただ欠点として抽出の最後の段階で N/10 塩酸を使用するため、ヒドラゾン型 INH が分解されて遊離 INH として測定されることである。結合型 INH の大部分はアセチル INH であるため、Peters も述べているように臨床的应用にはたいして支障がないと思われるが、ヒドラゾン型 INH も分離定量されるように改良することができればさらに完全なものとなろう。蛍光光度計は Peters の使用したような励起光波長を自由に変えうるものは本邦では得がたく、われわれも高圧水銀燈による 365m $\mu$  を使用したが、上述のとおり血漿中 INH の定量には支障がなかったが、臓器の抽出液では励起光の差によるためか盲蛍光が大で測定できなかつた。病巢中の INH 濃度が問題にされている今日、この点をさらに検討する必要がある。

臨床実験にさいし投与 INH 量は体重比とせず、臨床的应用を考え通常行なわれている一率 0.2 g とし、測定時間は諸家の成績をあわせ考え、胃腸の状態に左右される率も少なく、かつ高濃度を示す投与 2 時間後と

した。

日本人の遊離 INH 値の低いことは Morse<sup>11)</sup> 等のすでに報告したところであるが、われわれの成績でも同様で、アセチル化率は Peters の成績よりかなり高く、日本人の遊離 INH 値の低いのは白人に比しアセチル化能が強いためと考えられる。

PAS 併用の INH 血中濃度に及ぼす影響については、Middlebrook<sup>4)</sup> 一派が PAS 併用により INH 血中濃度が上昇すると報告し、その後、Morse<sup>11)</sup>、河盛<sup>12)</sup> 等の報告があるが、われわれは上述のとおり PAS 併用により遊離 INH 値が上昇することを認めた。

サルファ剤併用の INH 血中濃度に及ぼす影響については内藤<sup>13)</sup>、貝田<sup>14)</sup> 等は INH の血中濃度が上昇すると報告しているが、われわれの成績は前述のとおりで上昇を認めがたい。

総 括

- 1) Peters の INH 血中濃度定量法は臨床的に応用しうる優秀な方法である。
- 2) Peters の方法による INH 血中濃度測定値は日本人は白人に比し総 INH 値は大差ないが、遊離 INH 濃度では明らかに低値を示す。年齢および性別による差はないが、個体差は著しい。
- 3) PAS 併用により遊離 INH の血中濃度は大多数において上昇し、総 INH 濃度はほぼ不変である。

4) サルファ剤併用により INH 血中濃度の上昇するという従来の成績は疑わしい。

本研究の要旨は第36回日本結核病学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Kelley, Poet : Am. Rev. Tuberc., 65 : 484, 1952.
- 2) 堂野前・青木 : 最新医学, 7 : 643, 昭27.
- 3) Scott : J. Pharm. Pharmacol., 4 : 681, 1952.
- 4) Mandel, Middlebrook : Proc. Soc. Exp. Biol.

- Med., 91 : 409, 1956.
- 5) 河盛 : 日本医事新報, 1790 : 25, 昭33.
- 6) Schmiedel : Beitr. Klin. Tbk., 119 : 206, 1958.
- 7) 小川政敏 : 日本臨牀結核, 16 : 417, 昭32.
- 8) Peters : Am. Rev. Res. Dis., 81 : 485, 1960.
- 9) Quentin : Am. Rev. Res. Dis., 81 : 364, 1960.
- 10) 稲垣 : 第36回日本結核病学会発表, 昭36.
- 11) Morse : 結核, 33 : 75, 昭33.
- 12) 河盛 : 結核研究の進歩, 24 : 55, 昭34.
- 13) 内藤 : 内科, 2 : 140, 昭33.
- 14) 貝田 : 最新医学, 15 : 1338, 昭35.

### Studies on the Plasma Concentration of INH (Isoniazid) by Peters' Fluorometric Procedure.

Matsuki KAGAMIYAMA and Masao MAJIMA (Hoshigaoka Health Insurance Hospital, Osaka)

#### Introduction

The sensitivity of chemical procedure in measuring INH in plasma is 1.5~1.0 $\gamma$  per ml.. Hence this can not be used for clinical purpose. The microbiological method is very sensitive, but one must be skilled, and needs a week or more to perform the procedure. Recently Peters reported on a new fluorometric method in measuring INH, whose sensitivity was not less than 0.1  $\gamma$  per ml. and is an excellent method for clinical use. The authors studied this method and found this method to be a sensitive and excellent method for clinical purpose as reported by Peters. The following investigation was made using this method.

#### Experimental Methods

As mentioned above the authors used the procedures of Peters as the method of determining plasma concentration of free INH. The rate of extraction using Peters' procedure was 92 per cent, by performing the extraction by a shaker under the same condition. INH was extracted and completely separated with PAS, PZA and sulfa drugs.

In measuring the fluorescence intensity, Yagi's photofluorometer was used in place of Aminco-Bowman spectrofluorometer, so the activation wave length of 365 m $\mu$  was selected with filter UVD<sub>1</sub>, and fluorescence wave length of 430 m $\mu$  of the INH-cyanogen bromide reaction product

was selected with filter. This was in contrary to that of Peters.

The plasma concentration of INH was measured satisfactorily by using Yagi's instrument as mentioned above. The sensitivity was no less than 0.1  $\gamma$  per ml. of plasma as given in his report.

The total INH was determined by Kelly & Poet's procedure, by using a part of the extracted sample.

Healthy persons and tuberculous patients were used as subjects. These subjects received INH in dosis of 0.2 g orally with no relation to weight. Plasma concentration of INH was measured 2 hours after administration, because this was the time when the concentration of INH was relatively high and least influenced by the condition of the digestive organs as was reported by others.

#### Results

1) The average plasma concentration of free INH in 5 healthy persons receiving INH was 1.7 $\gamma$  per ml. at 2 hours, 0.9 $\gamma$  per ml. at 4 hours and 0.6 $\gamma$  per ml. at 6 hours, and the concentration of total INH was 6.5 $\gamma$  per ml., 4 $\gamma$  per ml. and 3.5 $\gamma$  per ml. at the same time.

2) The plasma concentration of free INH in 41 tuberculous patients receiving INH was from 4.4 $\gamma$  per ml. to 0.2 $\gamma$  per ml. and was 1.9 $\gamma$  per ml. on an average. The concentration of the total INH was from 13 $\gamma$  per ml. to 3 $\gamma$  per ml. and was 6.5 $\gamma$  per ml. on an average. Difference by age and sex was not observed, but individual difference was evident.