

α -ethylthioisonicotinamide (1314 Th) の

血中濃度測定法に関する一知見

豊原 希一・塚越 兼吉・高橋 テル

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎竜郎)

受付 昭和 38 年 2 月 3 日

(1) 緒 言

1956 年 Liebermann¹⁾らによつて 1314 Th が合成され Rist, Brouet らによつてこれが抗結核剤として有効であることが認められて以来²⁾³⁾, わが国でもいく多の基礎的臨床的研究がなされ^{4)~6)}, その抗結核剤としての地位は漸く確固となつてきた。したがつて INH その他の抗結核剤と同様に投与時における血中濃度の測定もまた時にのそんで行なわれることが望ましい⁷⁾。しかるに 1314 Th は INH と異なり水に難溶性であり, その結核菌に対する抗菌力も INH の約 1/10 であり, ことに鶏卵培地を使用する場合は薬剤の不活性化が強くなる⁴⁾等の悪条件が重なり INH の場合と同じように 1314 Th の血中濃度を生物学的に測定するには困難がある。この目的のためには 1314 Th に対し感受性のできるだけ高い菌を, また 1314 Th を不活性化しない培地を用いるべきであろう。さらに血中濃度をより速やかに知るため以上の条件において発育速度の速い菌があれば一そうよいであろう。また測定法としては, 希釈法と拡散法を比較すると後者のほうが濃度が連続的に示され, 1 本の試験管ですむのでより有利と考えられる。

以上の観点から種々検索し, 使用菌株として非定型抗酸菌である Brownell 株, 培地として Kirchner 血清加寒天培地を用い, 直立拡散法 (小川氏)⁸⁾によつて血中

濃度を測定することがこの目的に叶う条件の一つであることを知つたので報告する。

(2) 実験方法

(a) 使用菌株と培地

1. Brownell 株

Brownell 株は米国 Dr. Steenken より譲与された非定型抗酸菌で Runyon の分類の第 1 群に相当する光発色性抗酸菌である。この生物学的性状を $H_{37}R_V$ と比較すると表 1 のごとくなる。Brownell 株は小川培地では発育は $H_{37}R_V$ に比しわずかに速い程度であるが, 血清加寒天培地では発育が促進される。また Kirchner 血清培地によつて 1314 Th に対する感受性を調べると表 2 のごとく Brownell 株は $H_{37}R_V$ に比べ感受性がやや

Table 2. Sensitivity in Vitro to 1314 Th of the Employed Strains

Strain	Drug concentration (mcg/ml)					
	0	0.5	1	2.5	5	10
$H_{37}R_V$	###	##	+	±	—	—
Brownell	##	##	±	—	—	—

Medium: Kirchner serum media.

Inoculum size: $\frac{1}{100}$ mg.

Observation: Third week.

Table 1. Biological Properties of $H_{37}R_V$ and Brownell's Strain

Strain	Biological property											
	Colony type	Light exposure	Catalase	Peroxidase	Niacin	Neutral red	Cord	Virulence		Sensitivity (mcg/ml) to		
								Mouse	Guinea pig	SM	INH	PAS
Brownell	Rs	Photochromogen	##	±	—	—	Weak	##	—	10 partially resistant	1 partially resistant	1 partially resistant
$H_{37}R_V$	R	Non-photochromogen	##	##	+	+	Strong	##	##	1 sensitive	0.1 sensitive	0.1 sensitive

Mareichi TOYOHARA, Kenkichi TSUKAGOSHI and Teru TAKAHASHI (Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan): A Method for Measuring Blood Concentration of α -ethylthioisonicotinamide (1314 Th). — Kekkaku, 38 (6): 235~238, 1963.

高い。

2. 培地

鶏卵培地では 1314 Th の不活性化がおこることはすでに知られているので、培地として Kirchner 血清加寒天培地⁹⁾を用いた。

(b) 実施要領

小川氏考案の平底首まがり試験管⁷⁾を用いて Kirchner 血清寒天培地を作製し、これに1%小川培地に培養14日目の Brownell 株および H₃₇R_V の 0.5 mg/ml の菌液をつくり、その 0.2 ml を接種し試験管を水平にし孵卵器中に入れ、2日後に下記の各濃度の薬剤溶液を 1 ml ずつ培地表面にふれないように管底に注ぎ、そのまま垂直に立てて培養を継続する。なお寒天培地の代わりに1%小川培地を用いた実験を同様に行なつた。

薬剤濃度は 20 mcg/ml, 10 mcg/ml, 5 mcg/ml, 2.5 mcg/ml, 1 mcg/ml とする。この場合、溶媒として蒸留水を用いるか血清を用いるかについても検討を行なつた。すなわち熱水をもつて 2 mcg/ml の 1314 Th 溶液をつくり、これを水で段階希釈し 20 mcg/ml, 10 mcg/ml, 5 mcg/ml, 2.5 mcg/ml, 1 mcg/ml の溶液群と 100 mcg/ml までは水で希釈しその後、馬血清で前者と同様に段階希釈する群をもつて両者を比較した。

(3) 実験成績

Kirchner 血清加寒天培地を使用すると Brownell 株では菌接種後7日目、H₃₇R_V の場合は14日目に測定可能な状態となつた。

寒天培地における薬剤濃度と阻止帯の長さとの関係は表3に示す。阻止帯の長さは液面から菌の明瞭な発育帯の下縁までとし mm で示す。

各条件下において薬剤濃度と阻止帯の長さとの関係を統計学的に検定すると Brownell 株で Kirchner 血清加寒天培地を用い、薬剤の希釈を馬血清で行なつた場合の

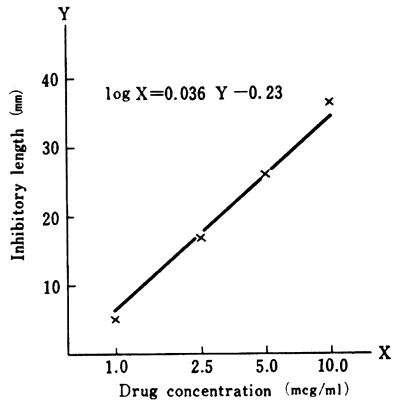
Table 3. Relation between Drug Concentration and Inhibitory Length (mm) in Kirchner Serum Agar Medium (Vertical diffusion method)

Strain	Solvent for drug solution	Drug concentration (mcg/ml)	Days of reading
		0 1 2.5 5 10 20	
Brownell	Distilled water	0 5 24 33 45 51	7
	Horse serum	0 5 17 26 36 45	7
H ₃₇ R _V	Distilled water	0 6 23 36 58 65	14
	Horse serum	0 4 11 18 34 51	14

Number means inhibitory length (mm). Average of two tubes.

1 mcg/ml から 10 mcg/ml の間のみ直線回帰がみられ、 $\log X=0.036 Y-0.23$ の回帰方程式が成立する。ここに X は薬剤濃度 (mcg/ml) であり、Y は阻止帯長 (mm) である。(図1)

Fig. 1. Relation between Drug Concentration and Inhibitory Length



次に1%小川培地を用いた場合の濃度と阻止帯長との関係は表4のごとくである。表にみるごとく小川培地を使用すると 2.5 mcg/ml 以上の濃度になつてはじめて阻止帯が現われるが、濃度の対数と阻止帯長との間には一次回帰関係が成立しなかつた。

Table 4. Relation between Drug Concentration and Inhibitory Length (mm) in Ogawa's Egg Medium (Vertical diffusion method)

Strain	Solvent for drug solution	Drug concentration (mcg/ml)	Days of reading
		0 1 2.5 5 10 20	
Brownell	Distilled water	0 0 3 7 15 20	7
	Horse serum	0 0 2 5 13 18	7
H ₃₇ R _V	Distilled water	0 0 3 6 15 21	14
	Horse serum	0 0 2 4 13 18	14

Number means inhibitory length (mm). Average of two tubes.

(4) 考案

血中濃度の測定は化学療法の効果を判定するためにはぜひとも行なわなければならないことであるが、これを直立拡散法によつて測定する場合、臨床検査上次の2点に常に留意する必要がある。すなわち一つはできるだけ低濃度まで血中濃度を測定しうることであり、他の一つはできるだけ短期間に濃度を知りうることであり、このためには培地と使用菌株の両面から検討しなければなら

ない。すなわち 1314 Th に対し感受性のより高く、かつ発育の速い菌株を得ることが第一である。著者は多くの抗酸菌を検索し、抗結核剤の血中濃度の生物学的測定に繁用される $H_{37}R_V$ に比べ非定型抗酸菌 Brownell 株が 1314 Th に対し、より感受性が高くかつ寒天培地において発育速度も速いことを知り、使用菌株として Brownell 株を用いることとした。

次に培地としては鶏卵培地では 1314 Th の不活性化が大きいため馬血清加寒天培地を用いる必要がある。小川培地を用いると Brownell 株でも 2.5 mcg/ml 以下の濃度では阻止帯が現われない。これに対し馬血清加寒天培地を用いると Brownell 株で 1 mcg/ml まで測定でき、かつ $1/10 \text{ mg}$ 接種で7日目に濃度を知ることができる。 $H_{37}R_V$ を用いても 1 mcg/ml で阻止帯が現われるが観察に14日を要する。

また標準線をつくるときの 1314 Th の溶媒に馬血清を使った場合と水を使った場合とでは、同一濃度でも阻止帯の長さが異なるので、血中濃度測定の場合は標準線作製時の溶媒に水を用いることは避けるべきであろう。馬血清加寒天培地で溶媒を馬血清とした場合は、薬剤濃度の対数と阻止帯長との間には Brownell 株を用いた場合にのみ 1 mcg/ml から 10 mcg/ml の間で直線回帰関係が成立する。 $H_{37}R_V$ を用いても一見、直線関係が成立するようであるが統計処理を行なうと有意の回帰関係は成り立たない。このことは直立拡散法によつて 1314 Th の血中濃度を測定するのに $H_{37}R_V$ を使うことが一考を要するものであることを示唆する。

(5) 結 論

1314 Th の血中濃度の測定法に一法を考案した。すなわち小川培地に代わるに Kirchner 血清加寒天培地、菌株として非定型抗酸菌である Brownell 株を用い、直立拡散法により 1314 Th の血中濃度を7日間で 1 mcg/ml から 10 mcg/ml の範囲で測定することができる。

終わりに臨み、実験遂行中常に御指導、御鞭撻をいただいた岩崎所長ならびに工藤祐是博士に感謝の意を表す。

文 献

- 1) Liebermann, D. et al.: Bull. Soc. Chim. Biol., 38: 231, 1956.
- 2) Rist, N.: Bull. Internat. Union Tbc., 28: 208, 1958.
- 3) Brouet, G. et al.: Am. Rev. Tuberc., 79: 6, 1959.
- 4) 西川元通・豊原希一: 胸部疾患, 5: 224, 昭36.
- 5) 堂野前維摩郷: 日本医事新報, 1897: 9, 昭35.
- 6) 堂野前維摩郷: 日本医事新報, 1934: 27, 昭36.
- 7) 小貫稔 他: 日本胸部臨床, 20: 881, 昭36.
- 8) Ogawa, M.: Ann. Rep. Jap. Assoc. Tuberc., 3: 117, 1958.
- 9) 衛生検査指針 I (厚生省): 細菌血清学的検査指針 (Ⅴ): 19, 昭33.

A Method for Measuring Blood Concentration of α -ethylthioisonicotinamide (1314 Th)

Since 1314 Th was synthesized by Lieberman and his collaborators and was proved of its effectiveness as an anti-tuberculosis agent by Rist et al., many fundamental and clinical studies have been reported about it. From the clinical point of view, it is required to establish a method for measuring the blood concentration of this drug, just as in the case of INH. But in order to measure this drug by bioassay there are some difficulties, such as, its low solubility in water, its relatively low activity against tubercle bacilli, amounting to only one tenth of INH, and its inactivation by the egg medium, etc. For overcoming these difficulties, there are indicated several points for future improvements, such as, the use of more sensitive strain than $H_{37}R_V$ and the employment of culture medium which does not inactivate 1314 Th. Furthermore it will be more con-

venient if we can use a strain which grows more rapidly than the strains generally in use. In several studies made from these viewpoints the author found that both the use of an atypical mycobacterial strain Brownell, and of Kirchner's agar medium added with horse serum was most adequate for the present purposes.

In the present experiment, the blood concentration of 1314 Th was measured by the bioassay employing vertical diffusion method with the above described materials.

1. Methods:

(a) Bacterial strain and medium employed:

Brownell's strain, a photochromogenic strain belonging to the first group according to Runyon's classification, was used. The biological properties of this strain are shown in Table 1. The rate of growth of this strain was similar with $H_{37}R_V$ in Ogawa's egg medium, but more rapid than $H_{37}R_V$

in Kirchner's serum agar medium. It was more sensitive to 1314Th than $H_{37}R_V$ in Kirchner's serum medium, with which the inactivation of 1314Th was less marked than the egg medium.

(b) Procedures :

Kirchner's serum agar medium was prepared using flat based test tubes specially made for the vertical diffusion test, and was inoculated with 0.2 ml of 0.5 mg/ml bacillary suspension prepared from the 2-week-old culture of Brownell's strain or that of $H_{37}R_V$. After two days of incubation, 1 ml each of the solution of 1314Th, with various concentrations, such as, 20, 10, 5, 2.5 and 1 mcg/ml, was added to the bottom of the tube.

Furthermore, examinations were made as to which of distilled water or of serum was more suitable for the solvent of 1314Th.

2. Results :

With Kirchner's serum agar medium, the length of growth inhibitory zone became measurable on the 7th day after the inoculation in the case of Brownell's strain and on the 14th day in the case of $H_{37}R_V$.

The relation between the drug concentration and the length of the growth inhibitory zone is indi-

cated in Table 3. A linearity was found only between the concentrations of 1 mcg/ml and 10 mcg/ml, when the system of Brownell's strain, Kirchner's serum agar medium and horse serum for the serial dilution of 1314Th was employed, and the following formula was obtained.

$$\text{Log } X = 0.036 Y - 0.23 \text{ (Figure 1)}$$

Here, X is the concentration of 1314Th (mcg/ml), and Y is the length of growth inhibitory zone (mm).

In Ogawa's egg medium, a linearity was not found between the drug concentration and the inhibitory zone. Even by the use of Brownell's strain, it was difficult to measure the concentrations below 2.5 mcg/ml.

3. Summary :

A method for bioassay of the blood concentration of 1314Th was presented in this paper.

Kirchner's serum agar medium instead of Ogawa's egg medium, and Brownell's strain, an atypical mycobacterium, were employed for the examination.

Results revealed that the blood concentration of 1314Th was measurable between the concentrations of 1 mcg/ml and 10 mcg/ml on the 7th day after the inoculation, by using the vertical diffusion method.