

Free INH の新定量法による INH 代謝の研究 (第1報)

中川 英雄・砂原 茂一

国立療養所東京病院

受付 昭和41年4月12日

STUDIES ON METABOLISM OF INH BY A NEW CHEMICAL
DETERMINATION OF FREE INH (THE 1ST REPORT)*

Hideo NAKAGAWA and Shigeichi SUNAHARA

(Received for publication April 12, 1966)

Preface

A number of determinations of free INH in serum and urine have been already reported by many resarchers, but it has been difficult to determine accurately in chemical assay the free INH under one microgram per ml.

The authors originated a new chemical determination of free INH which photometrically measured the sensitive blue color occurring in a reaction between INH and Folin's phosphotungstate reagent. By this method, we have carried out a few studies on the metabolic fate of INH in the human body.

Determination of free INH

The procedure for analysis of free INH in serum is as follows: One ml of serum is mixed with 1.2 gm of ammonium sulfate in a 15 ml of glass-stoppered tube, to which 0.025 ml of 1 N-sodium hydroxide and 10 ml of a 3:7 isoamyl alcohol-ethylene dichloride mixture are added. After shaking for 15 minutes, and centrifuged at 1,500 r. p. m. for 10 minutes, 8 ml of the organic solvent phase are transferred to another glass-stoppered tube containing 2 ml of 0.1 N-hydrochloric acid. These contents are shaken for 10 minutes and centrifuged for 5 minutes at 1,500 r. p. m. A 1.5 ml of the acid extract is transferred to a test tube. It is treated with 0.5 ml of 5%-sodium cyanate, 0.5 ml of saturated urea solution and 0.4 ml of the Folin's phosphotungstate reagent, with vigorous shaking after each addition. The reaction mixture is then allowed to stand at room temperature for one hour for complete color development. The colored solution is transferred to 1 cm quartz cuvette and read at 660 millimicrons in a Hitachi FPW-4-type spectrophotometer. The unknown value is then calculated from previously prepared free INH concentration curve.

By this method, the free INH concentration under one microgram per ml of serum was determined with a standard deviation of 0.1 microgram.

The procedure for analysis of free INH in urine is as follows: 0.1 ml of urine is diluted with 1.9 ml water in a 30 ml glass-stoppered tube, 0.1 ml of 30%-hydrogen peroxide is added, and the mixture solution is shaken vigorously. The tube and contents are boiled for 10 minutes in a water bath to oxidize perfectly other components than free INH which reduce the Folin's reagent, and cooled with stream water. One ml of this oxidized solution is mixed with 1.0g of ammonium sulfate in a glass-stoppered tube, following procedures being carried out in the same way as the determination of free INH in serum.

By this method, the free INH concentration under 10 microgram per ml of urine was

* From the National Tokyo Chest Hospital, Takeoka, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

determined with a standard deviation of 0.33 microgram.

Investigation on the metabolism of INH

The findings on the metabolism of INH after the oral administration of INH of 4 mg per kg of body weight were as follows :

- 1) There was a correlation between the serum concentration of free INH and the urinary excretion amount of free INH.
- 2) Serial change of the serum concentration of free INH after the ingestion of INH was nearly identified in the duplicative examinations.
- 3) The urinary amounts of free INH until six hours after the ingestion of INH was nearly identified in the repeated examinations.

生体内における Isonicotinic acid hydrazide (INH) の代謝については、臨床的な面と相まつて血清、尿およびあらゆる組織の INH およびその誘導体が定量的に研究され、低分子である INH は腸管より容易に吸収され、またあらゆる組織に浸透し^{1)~5)}、アセチル化あるいはヒドラゾン化等の解毒を受けてその生物学的活性を失い⁶⁾、尿中に排泄されやすいこと等が明らかにされている⁴⁾⁶⁾⁷⁾。しかしこの INH 代謝には著しい個人差がみられ^{9)~12)}、砂原らは INH 内服後の血清 INH 濃度を微生物学的測定法によつて求め、その個人差の著しい値を詳細に検討し、人体における INH 代謝には遺伝的な3代謝型のあることを明らかにした^{19)~20)}。Free INH を定量する方法には、Kelly & Poet²⁾、Hughes³⁾、堂野前⁴⁾、Short²²⁾、山口²⁴⁾、Pool & Meyer²⁵⁾、Prescott²¹⁾、Scardi²³⁾、Maher²⁶⁾、Peters³²⁾ らの化学的定量法と、Bönicke²⁷⁾、Morse²⁸⁾、Bell²⁹⁾、および小川ら³⁰⁾ の微生物学的定量法など数多く報告されてきた。しかし INH の一般治療量による血清 INH 濃度は約 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下とみられるので、常により微量 INH の定量法が望まれ、とくに INH の遺伝的代謝型の研究では化学的定量法にて 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 程度の定量限界濃度までも正確に定量できる簡易な方法が期待されている現状である。Peters は血清中 Free INH を 0.1 $\mu\text{g/ml}$ まで定量できる INH と BrCN との反応を利用する蛍光分光学的定量法を報告しているが³²⁾、実際にはあまり良い成績を示していないようである³³⁾。

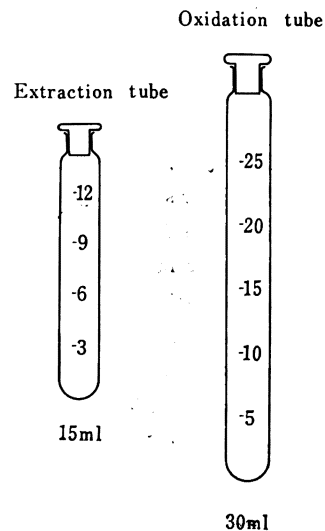
著者らは Free INH が Folin の Phosphotungstate 試薬³⁴⁾³⁵⁾を還元して青く呈色する鋭敏な反応を見出し、この呈色のもつ 680 $\text{m}\mu$ の吸収極大を利用する分光学的定量法を考案した。この方法によると 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の血清中 Free INH を 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の偏差で定量することができた。われわれは目下 INH 代謝の個人差を本法にて検討中であるが、本報ではまずこの定量法につき詳述し、あわせて INH の生体内代謝の 2, 3 について論及したい。

1. Free INH 体の定量法

A) 試薬

- 1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (特級) : 乳鉢にて粉末化して使用。
- 2) 1 N-NaOH 溶液 : 特級 NaOH にて調製する。
- 3) Dichloroethane (特級)
- 4) Isoamylalcohol (特級)
- 5) 0.1 N-HCl 溶液 : 特級 HCl にて調製する。
- 6) 5%-NaCN 溶液 : 特級 NaCN にて調製。冷所に保存し、要時室温に戻して使用する。
- 7) 飽和尿素溶液 : 特級尿素を蒸留水に室温で飽和溶解させたもの。
- 8) Phosphotungstate 試薬 (Folin の試薬)³⁵⁾³⁶⁾³⁹⁾ : $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (特級) 20 g, Na_2HPO_4 4 g を蒸留水に加水溶解し、これに 25% 硫酸溶液 (特級硫酸 5 ml を蒸留水 15 ml に加えたもの) 20 ml をゆつくり混和しながら加える。これを還流冷却器つきフラスコにて1時間おだやかに沸騰せしめ、後放冷し、水にて 200 ml とする。この試薬は要時に濾過し、その濾液を使用す

Fig. 1.



る。

9) 30%-H₂O₂: 冷所保存。

B) 器具および計器

1) 抽出試験管: 約 2,500 r. p. m. の遠沈操作に耐えるやや肉厚な硬質硝子からなる図1のごとき磨合せ有栓試験管を用いる。

2) 熱酸化処理用試験管: 図1のごとき 30 ml 容の磨合せ有栓試験管を用いる。

3) 振盪機: 振幅 4 cm, 1 分間約 400 回の横振り振盪機。

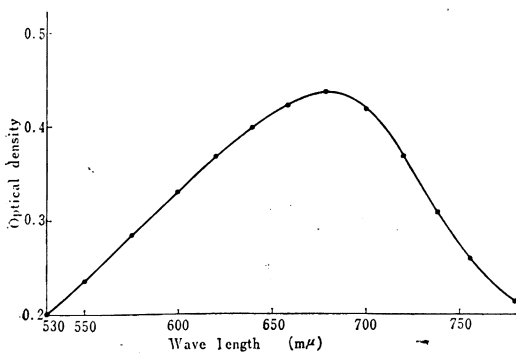
4) 光電光度計: 日立 FPW-4 型光電光度計。

C) 定量操作

1) 血清中 Free INH の定量法: 有栓抽出試験管 2 本を準備し, その 1 本を Sample 用, 他の 1 本を Blank 用とする。Sample 用試験管には血清 1 ml, Blank 用試験管には水 1 ml を入れ, 乾燥した (NH₄)₂SO₄ 末 1 g を両試験管に投じて硫酸飽和となし, さらに 1 N-NaOH 溶液 0.025 ml を加えて十分にアルカリ性とする。この両試験管に Dichloroethane 7 ml, Isoamylalcohol 3 ml の混合溶媒を重層し, これを振盪器にて 15 分間十分振盪した後, 1,500 r. p. m. で 5 分間遠沈し, 溶媒層の 8 ml を別の有栓抽出試験管にとり, これに N/10-HCl 溶液 2 ml を重層し, 振盪機にて 15 分間振盪, 溶媒中の Free INH を塩酸層に再抽出する。これを 1,500 r. p. m. で 5 分間遠沈し, この塩酸層の 1.5 ml を別の試験管にとり, 5%-NaCN 溶液 0.5 ml, 尿素飽和溶液 0.5 ml を加え, これに Phosphotungstate 試薬 0.4 ml を添加して発色を行なう。この反応呈色は図2のごとき 860 mμ に吸収極大をもつ吸収スペクトルを示すが, 反応の完結にかなりの時間を要するので, 1 時間放置後の呈色を日立光電光度計にて 660 mμ の吸光度を Blank を 0 に合わせて読み, 既製の検量線よりその濃度を求めた。

2) 尿中 Free INH の定量法: 尿中 Free INH を血

Fig. 2. Absorption Spectrum of the Reaction Color of Free INH with Folin's Phosphotungstate Reagent



清のものと同じように定量するには, Phosphotungstate 試薬と反応する Free INH 以外の尿中成分をあらかじめ完全に酸化しておく必要がある。この酸化法にはいろいろ考えられるが, Free INH は酸化しない方法として, 過酸化水素を加えて加熱する酸化法を考案した。すなわち 30 ml 容有栓試験管に尿 0.1~0.2 ml (尿中 INH 量が多い場合, または尿量の少ない場合には 0.1 ml) をとり, 水を 2 ml になるように加え, これに 30%-過酸化水素 0.1 ml を添加して十分振盪し, 水浴中にて約 10 分間加熱し, 後これを水冷する。この 1 ml を有栓試験管にとり, 以下の操作は血清 Free INH の定量法と同じである。なお尿中 Free INH の検量線は任意尿を媒体としたものを用いる。

D) 検量線の作製

1) 血清 Free INH 用の検量線: 早朝空腹時に採血して得た健常者血清に INH を 3, 2, 1, 0.5, 0.2 μg/ml 溶解したものを基準として検量線を作製する。この検量線は図3に示すごとくで, Beer の法則によく従う直線が得られる。

2) 尿中 Free INH 用の検量線: 早朝空腹時の健常者尿に INH を 30, 20, 10, 5, 2.5 μg/ml 溶解したものを

Fig. 3. Calibration Curve of Free INH in Serum

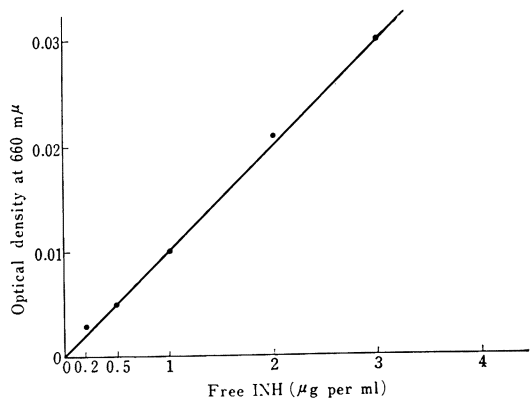
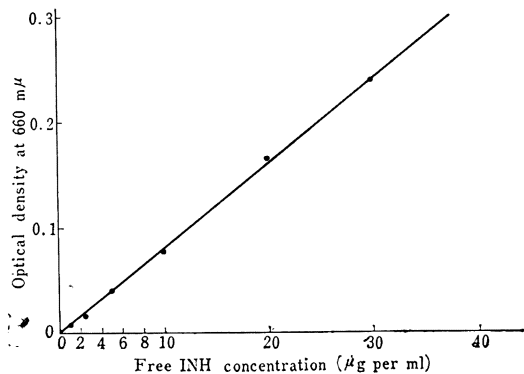


Fig. 4. Calibration Curve of Free INH in Urine



を基準としてこの検量線を作製する。この検量線は図4に示すごとくで、血清 Free INH の検量線と同様に Beer の法則によく従う直線が得られる。

2. 本法定量値の精度

1) 血清中 Free INH の定量値：血清中に含まれる Free INH 濃度が 1, 0.4, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の場合について検討すると、その成績は表1の(a)に示すごとく、各濃度とも 0.1 μg の偏差で定量でき、0.2 $\mu\text{g/ml}$ までの定量が可能とみなされる。

2) 尿中 Free INH の定量値：尿中の Free INH 濃度は血清中の濃度よりはるかに高いので、20, 10, 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度について検討した。その成績は表1の(b)に示すごとくで、10 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度を 0.3 μg の偏差で定量でき、その定量精度はきわめて高いものとみなされる。

なお表中の各測定値は 660 $\text{m}\mu$ における吸光度の読みで表現し、本定量法による分光学的定量の感度を示した。

Table 1. (a) Recovery of Free INH in Serum

| Experiment number | 1.0 $\mu\text{g/ml}$ | 0.4 $\mu\text{g/ml}$ | 0.2 $\mu\text{g/ml}$ |
|-------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0.011 | 0.004 | 0.001 |
| 2 | 0.009 | 0.003 | 0.003 |
| 3 | 0.009 | 0.006 | 0.004 |
| 4 | 0.011 | 0.005 | 0.001 |
| 5 | 0.010 | 0.004 | 0.002 |
| 6 | 0.010 | 0.004 | 0.002 |
| 7 | 0.009 | 0.005 | 0.001 |
| 8 | 0.010 | | |
| Mean | 0.010 | 0.0044 | 0.002 |
| Recovery, St. D. | 1.0 \pm 0.1 $\mu\text{g/ml}$ | 0.44 \pm 0.09 $\mu\text{g/ml}$ | 0.2 \pm 0.1 $\mu\text{g/ml}$ |

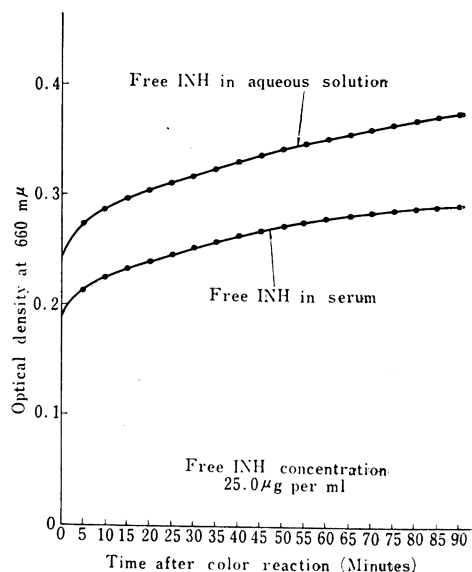
Table 1. (b) Recovery of Free INH in Urine

| Experiment number | 20 $\mu\text{g/ml}$ | 10 $\mu\text{g/ml}$ | 5 $\mu\text{g/ml}$ |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 0.156 | 0.072 | 0.036 |
| 2 | 0.163 | 0.077 | 0.035 |
| 3 | 0.150 | 0.079 | 0.041 |
| 4 | 0.155 | 0.076 | 0.041 |
| 5 | 0.154 | 0.074 | 0.040 |
| 6 | 0.161 | 0.078 | 0.041 |
| 7 | | 0.072 | |
| 8 | | 0.073 | |
| 9 | | 0.077 | |
| 10 | | 0.079 | |
| Mean | 0.157 | 0.076 | 0.039 |
| Recovery, St. D. | 19.9 \pm 0.56 $\mu\text{g/ml}$ | 9.65 \pm 0.33 $\mu\text{g/ml}$ | 4.95 \pm 0.33 $\mu\text{g/ml}$ |

3. Free INH と Phosphotungstate 試薬との反応
Sodium phosphotungstate は Picric acid, Sodium

picrate や Phosphomolybdic acid 等とともに Alkaloids の反応試薬³⁶⁾として用いられ、水溶液中の Tungstate を還元すると Tungsten blues が得られる³⁷⁾。Folin³⁴⁾は、尿酸が Sodium Phosphotungstate を還元することを認め、この青く呈色する還元反応を利用する尿酸の定量法³⁴⁾³⁸⁾を考案した。著者は、この Folin の Phosphotungstate 試薬がまた INH によって還元されることを認めたが、この INH との呈色反応の機構を調べると、尿酸との反応と全く同様で、高濃度の CN^- の共存を必要とし、さらに十分量の尿素を添加すると、この反応はより安定となり、かつ完全化することを確認した。しかしこの反応呈色の分光性は、図2に示すごとく 680 $\text{m}\mu$ に吸収極大を示し、尿酸との呈色が示す 730 $\text{m}\mu$ の吸収極大とはやや相違する。また Folin の Phosphotungstate 試薬と Free INH との呈色反応はその完結に長時間を要し、図5に示すごとく、その大部分は5分間に発色するが、以後の発色は徐々に進行し、二相性反応の様相を呈す。したがって本定量法での測定にさいしては、反応後丁度 60 分における吸光度を読むが、10分以内にその読みが終われば測定中の呈色進行は誤差の範囲に納まる。

Fig. 5. Serial Changes of Optical Density at 660 $\text{m}\mu$ of the Reaction Color of Free INH with Folin's Phosphotungstate Reagent



4. INH 誘導体の本定量法による定量の能否

本法は Free INH を定量する方法として考案したものであるが、とくに INH 誘導体について Isonicotinoyl acetate, Isonicotinoyl glycine, Isonicotinamide, Isonicotinic acid と第一製薬より特別に作っていただいた INH-hydrazone 等を選び、血清中 Free INH の本定量法により、その各定量の能否を検討した。その結果は

Table 2. Removal of Intervention of Uric Acid in Determination of Free INH by Phosphotungstate Method

Material: Uric acid aqueous solution 5 mg/dl

| Material | 30% H ₂ O ₂ | H ₂ O | Boiled for 10 minutes | IN. NaOH | (NH ₄) ₂ SO ₄ | Optical density at 660 m μ |
|----------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------|----------|---|-----------------------------------|
| 2 ml | (-) | 0.1 ml | | | (-) | 1.0 g |
| 2 | (-) | 0.1 | | 0.025 ml | 1.2 | 0.025 |
| 2 | (-) | 0.1 | | 0.050 | 1.2 | 0.010 |
| 2 | 0.1 ml | (-) | | (-) | 1.0 | 0 |
| 2 | 0.1 | (-) | | 0.025 | 1.2 | 0 |
| 2 | 0.1 | (-) | | 0.050 | 1.2 | 0 |

下記のごとくで、

| | |
|---|------|
| Free INH | 100% |
| Pyruvic acid isonicotinoyl hydrazone | 34% |
| Ketoglutaric acid isonicotinoyl hydrazone | 21% |
| d-Glucose isonicotinoyl hydrazone | 5% |
| Isonicotinoyl acetate | 0% |
| Isonicotinoyl glycine | 0% |
| Isonicotinamide | 0% |
| Isonicotinic acid | 0% |

INH-hydrazones のみがいずれも不完全ながら定量された。しかしこれら INH-hydrazones に Phosphotungstate 試薬を直接作用すると鋭敏な呈色反応を等しく発生するので、上記の各定量率はその試薬との反応性を示唆するものではなく、Free INH の抽出操作によつて各 Hydrazone がいかに分離されるかを示したものとみなされる。

5. Folin の Phosphotungstate 試薬と反応する検体成分

Folin の Phosphotungstate 試薬は、尿酸や Free INH との反応以外に Vitamin B₆ や PAS 等ともよく反応し、また Sulfa 剤とも多少反応する非特異的なもので、これらがとりわけ多く含まれる検体では当然この介入が懸念される。しかし血清中の尿酸や Vitamin B₆ は、INH の抽出にさいし、その血清を十分アルカリ性にするのみでほとんど除去されるが、尿では尿酸はもちろん、Vitamin B₆ もかなり含まれているため、これらをあらかじめ処理する必要がある。このため尿中 Free INH の定量にさいしては、あらかじめ尿に過酸化水素を加えて加熱する苛酷な酸化処理を施し、INH 以外の成分の介入を防止した。表2は本反応にもつとも関与する尿酸につきこの処理作用の効果を示したが、INH の抽出でアルカリ度を増すことのみでも尿酸はかなり除去できるが、不完全である。しかしこれに過酸化水素を作用して酸化すると、これが完全に処理されることがよく示されている。このような作用は Vitamin B₆ (Pyridoxal, Pyridoxine, Pyridoxamine) についても同じであった。また PAS, Sulfa 剤は、これが同時に内服された

場合には尿中、血中ともに十分検出されるので、当然この定量値に影響を与える。とくに PAS は過酸化水素を加えて加熱するもほとんど処理しえないので、PAS・INH 併用時の検体については Free INH の定量は不可能とみなされる。

6. 生物学的定量値と本法値との比較

ある健常者に体重 kg 当り 4 mg の INH を経口的に投与し、1時間ごとに採血し、その血清中の Free INH を小川の生物学的定量法* と本法とで同時に定量し、両者値の比較を試みた。表3の上段に示すごとく同じ試験を2回行なつたが、本法定量値では2回の経時的変化にほとんど差を認めず、INHの生体内代謝には再現性のあることを示唆したが、生物学的定量値にはそのような傾向はほとんど認められず、また本法値との不一致は 1 μ g/ml 以上の濃度においてとくに著明である。

また INH 水溶液と血清に INH を投じたものについて比較定量を試みると、表4と表3の下段に示すごとく、まず INH 水溶液については、両者ともあまり良い成績を示さず、その優劣は一概に判定しえないが、血清中の Free INH については、本法値は生物学的定量値より明らかに良い成績を示し、本法定量値(化学的定量値)の真価を明らかにしたようである。

7. 尿中に排泄される Free INH 量の再現性

尿中 Free INH の定量的研究は、INH の生体内代謝の手がかりとして早くから試みられ、Free INH の尿中排泄量にみる著しい個人差は Bönicke, Hughes らによつて注目せられ、その後 Bell らは血清中の Free INH を生物学的に定量し、その濃度にも著しい個人差のあることを明らかにし、INH 代謝の個人差を明確なものにした。しかし血清 Free INH 値にみる個人差と、Free

* 小川の生物学的定量法²⁰⁾: 10×1.5 cm の頸口中試験管に小川培地 (PABA 2 μ g/ml 含有 1% 磷酸培地) を流し込み、水平にして 90°C で加熱凝固せしめ、これに人型結核菌 H₃₇Rv 株 (Mycobacterium tuberculosis variant hominis Rough virulent strain) の浮遊液 1 ml を培地面に均等に流し込み、一旦夜解卵器中に放置した後、翌日試験管を垂直に立て、これに INH の血清標準溶液と被検血清の各 1 ml を同時におのおのの試験管の底に注入し、37°C で2週間培養した後、液面からの菌発育阻止帯の長さを測定し、INH の標準溶液にて作製した検量線より被検血清の INH 濃度を求める方法で、直立拡散法として広く利用されている。

Table 3. Comparison of Chemical Assay and Biological Assay of Free INH in Serum

| Serial changes of free INH in serum after oral administration of INH of 4 mg per kg of body weight | | | | |
|--|---|--------------|----------------------------|------------------------------|
| Hours | | Method | Chemical assay (μg per ml) | Biological assay (μg per ml) |
| Hours after oral administration of INH | 1 | The 1st test | 3.2 | >3.2 |
| | 2 | | 2.0 | >3.2 |
| | 3 | | 0.9 | 2.41 |
| | 4 | | 0.8 | 1.04 |
| | 5 | | 0.7 | 0.65 |
| | 6 | | 0.5 | 0.42 |
| | 1 | The 2nd test | 3.0 | 1.57 |
| | 2 | | 2.1 | 1.46 |
| | 3 | | 1.5 | 0.82 |
| | 4 | | 1.0 | 0.95 |
| | 5 | | 0.75 | 0.47 |
| | 6 | | 0.45 | 0.34 |

| INH concentration of serum | Chemical assay (μg per ml) | Biological assay (μg per ml) |
|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 3.0 μg ³ /ml | 3.0 | 2.58 |
| 2.0 | 2.1 | 1.68 |
| 1.0 | 1.0 | 0.58 |
| 0.5 | 0.5 | 0.35 |
| 0.2 | 0.3 | 0.18 |

Chemical assay : Phosphotungstate method
 Biological assay : Ogawa's vertical diffusion method

INH の尿中排泄量にみる個人差との間の相関性についてははまだ緊密性が実証されていない。われわれはこの問題を追求するにあたり、まず INH 内服後一定時間ま

Fig. 6. Repeated Examination of Urinary Excretion of Free INH after Oral Administration of INH of 4 mg per kg of Body Weight

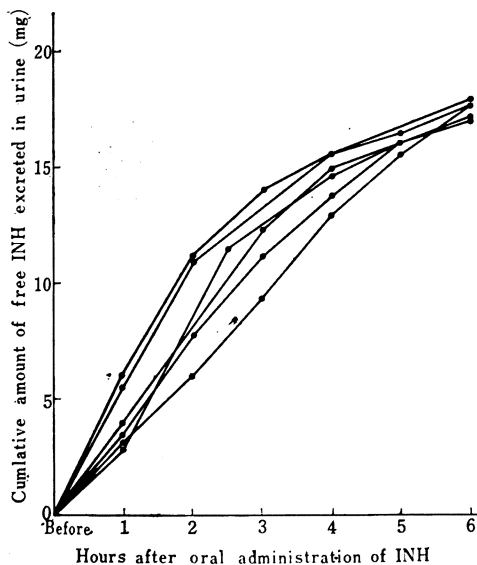


Table 4. Comparison of Simultaneous Determinations by Chemical Assay and Biological Assay of INH in Aqueous Solution

| INH concent. in Aq. Soln. | Chemical assay (μg per ml) | Biological assay (μg per ml) |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 3 μg/ml | 2.75 | 3.20 |
| 3 | 3.06 | 2.58 |
| 3 | 3.00 | 2.58 |
| 3 | 2.81 | 3.20 |
| 3 | 3.30 | 2.41 |
| Mean, St. D. | 2.98, ±0.20 | 2.79, ±0.34 |
| 1 μg/ml | 0.87 | 1.09 |
| 1 | 0.63 | 1.09 |
| 1 | 1.17 | 1.09 |
| 1 | 0.87 | 1.31 |
| 1 | 0.98 | 0.94 |
| Mean, St. D. | 0.90, ±0.18 | 1.11, ±0.12 |
| 0.5 μg/ml | 0.63 | 0.62 |
| 0.5 | 0.50 | 0.49 |
| 0.5 | 0.32 | 0.49 |
| 0.5 | 0.63 | 0.44 |
| 0.5 | 0.56 | 0.44 |
| Mean, St. D. | 0.53, ±0.12 | 0.50, ±0.07 |

Chemical assay : Phosphotungstate method
 Biological assay : Ogawa's vertical diffusion method

でに尿中に排泄される Free INH 量の繰り返し試験を試み、血清 Free INH 値に認めた再現性と同様の再現性を示すか否かについて検討を加えた。

図6はある一健常者に体重 kg 当り 4 mg の INH を内服せしめた後、1時間ごとの尿量を経時的に採取し、その尿中 Free INH を著者らの方法で定量し、日を改め同じ試験を行ない、その尿中排泄量の再現性を調べた成績である。これによると、2、3時間までの排泄量には明らかな差異を示すが、以後次第に集約し、5、6時間になるとほぼ一致した排泄量を示すようになり、腎性排泄量の再現性が認められた。

8. 血中 Free INH 値と尿中 Free INH 量との相関性

体重 kg 当り 4 mg の INH を経口投与した後、6時間時に採血して得た血清 Free INH 値と、前述のごとく再現性の認められたその6時間までの尿中 Free INH 量との相関性を検討してみた。図7は生物学的血清 Free INH 値と Short の β-Naphthoquinone 法による尿中 Free INH 量の相関性、図8は血清 Free INH の生物学的血清 Free INH 値と本法による尿中 Free INH 量との相関性をおのおの示したもので、前者の検討では、その相関傾向をほぼ認めうるという程度にとどまるが、後者の検討からは、両者の相関性はかなり高いものであ

Fig. 7. Relationship between the Free INH Concentration in Serum at 6 Hours and the Free INH Amount in Urine Excreted until 6 Hours after Oral Administration of INH of 4 mg per kg of Body Weight

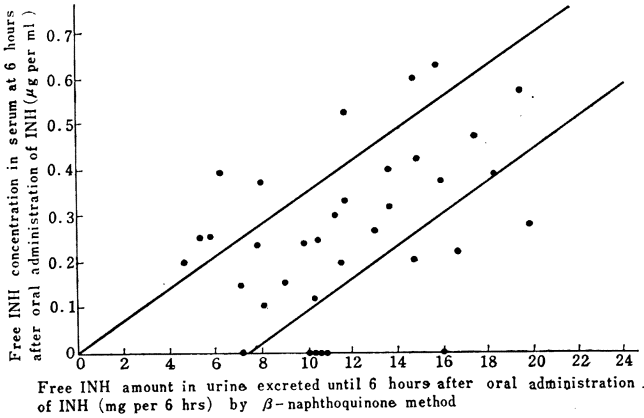
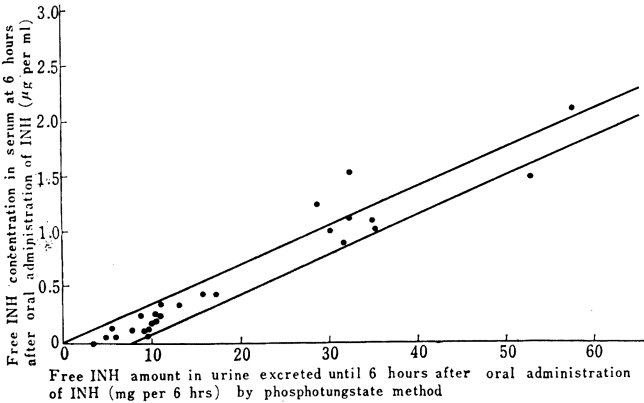


Fig. 8. Relationship between the Free INH Concentration in Serum at 6 Hours and the Free INH Amount in Urine Excreted until 6 Hours after Oral Administration of INH of 4 mg per kg of Body Weight

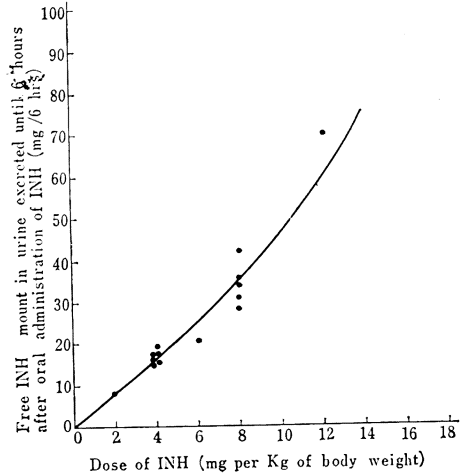


ることが実証された。かくして血中 Free INH 値の個人差と Free INH の尿中排泄量の個人差との間には正の相関性が認められ、生体内における INH 代謝の個人差が明示された。しかし血清 Free INH の化学的定量と尿中 Free INH 量との相関性についてはまだ検討しておらず、これについては今後の試みとしたい。

9. INH の経口投与量と Free INH の尿中排泄量との相関性

健常者に体重 kg 当り 2, 4, 6, 8 および 12 mg の INH を経口的に投与した後、6 時間までに尿中に排泄される Free INH 量を求めてみると、図 9 に示すごとく、INH の経口投与量とその尿中排泄量の間にはほぼ直線的な相関性が認められた。しかし kg 当り 4 mg

Fig. 9. Relationship between Free INH Amount Excreted in Urine and Dose of INH



と 8 mg の投与量による繰り返し試験の成績からみて、INH 投与量が増加するにつれ尿中に排泄される Free INH 量の再現性が低下するように見受けられる。

また図 10 は INH の各内服量による尿中 Free INH の経時的累積値を示すが、その各累積曲線は経過時にほぼ平行関係を保持し、いずれもきわめてなめらかに経過しているのが注目される。またこの成績は、一般に治療量として内服される INH が、Free INH として何時間まで尿中に排泄されるかを示しており、たとえば体重 kg 当り 8 mg の INH が内服された場合でも、12 時間以後の尿中排泄量はきわめてわずかなものとみなされる。

10. Free INH の腎クリアランス

ある健常者に体重 kg 当り 4 mg の INH を経口投与した後、1 時間ごとに採血した血清の Free INH 値と、その各 1 時間ごとの尿中 Free INH 量とを対照すると、図 11 に示すごとく、血清 Free INH 値の経時的変化と尿中 Free INH 量の変化との間には平行関係が認められる。しかし生体内における INH はきわめて代謝されやすいため、Free INH の腎クリアランスを正確に求めることは困難である。しかし強いてそのおよその値を求めるならば、4 時間から 5 時間と、5 時間から 6 時間時における腎クリアランスが van Slyke の式から算出されそうである。すなわち前者の時間では 32 ml/min、後者の時間では 36 ml/min となるが、その値はかなり高く、Free INH の腎性排泄はきわめて容易なものとなされる。

Fig. 10. Urinary Elimination of Free INH by an Adult Male Receiving INH

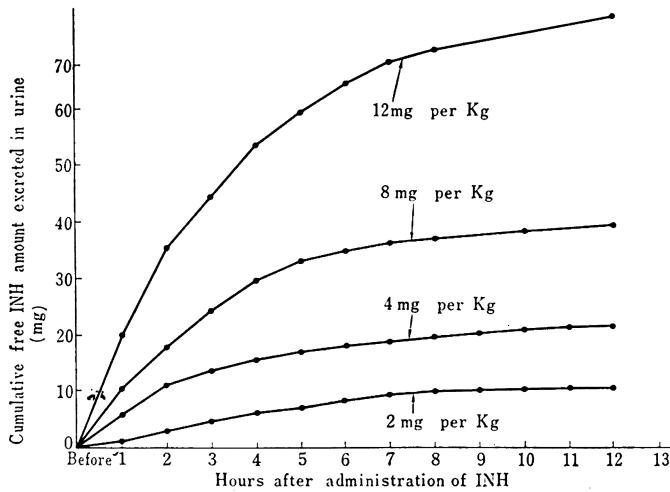
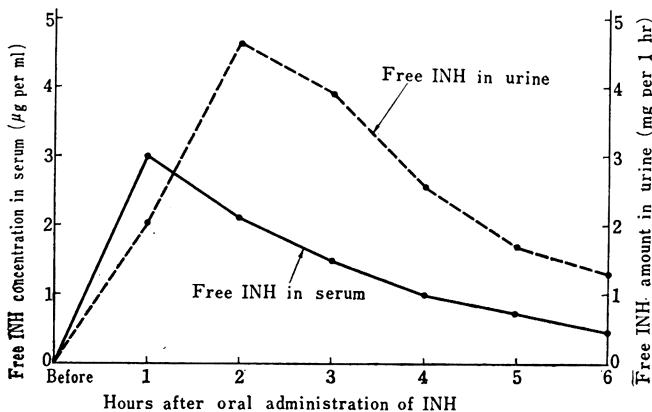


Fig. 11. Serial Changes of Free INH Concentration in Serum and Free INH Amount Excreted in Urine after Oral Administration of INH of 4 mg per kg of Body Weight



考 案

Free INH の定量に関する研究は、INH の生体内代謝の追求と、生物学的活性 INH 値の臨床的要求とに伴って促進せられ、また INH 代謝の遺伝的個人差の研究はこの課題に拍車をかけたが、抗結核剤としての INH 内服量は、体重 kg 当り 5~10 mg 程度であるため、その血清中 Free INH 濃度はおおよそ 10 µg/ml 以下で、実際には 5 µg/ml 以下、あるいは 1 µg/ml 以下の微量濃度が定量の対象となつている。このような血清中 Free INH を化学的な技法で正確に求めることはけつして容易なことではなく、生体内における INH 代謝の機序を解明する十分な定量法はまだ確立されていないようである。

既に報告されている定量法について考察すると、まず

INH との直接反応で呈色する諸試薬 (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene⁴⁰⁾⁴¹⁾, 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene²⁴⁾²⁵⁾, 4-Pyridyl pyridinium dichloride²¹⁾, Sodium β-napthoquinone-4-sulfonate^{4)42)~44)}, 3-Methyl-4-hydroxybenzaldehyde²⁶⁾, Sodium pentacyanoaminoferroate²³⁾, Chloramin T⁴⁵⁾⁴⁶⁾, Picryl chloride⁴⁷⁾) を利用した定量法が多く考案されているが、1 µg/ml 以下の血清 Free INH を正確に定量しうるものはほとんどなく、発色反応による定量値の限界が示唆された。また INH を Isonicotinic acid に導き Cyanogen bromide にて発色させる方法³⁾, INH を酸分解して Hydrazine を遊離させ、p-Dinitrobenzaldehyde との発色反応で定量する感度の高い方法²⁾もあるが、これらは INH 誘導体まで定量するので Free INH のみの定量には適用しえないようである。また INH 自身のもつ分光学的性質を利用する直接定量法^{10)~45)}も考案されているが、感度に乏しく 10 µg/ml 以下の定量は不可能とみられ、また INH 誘導体も同じ分光性を示すので、これら成分をいかに処理するかにも問題があり、発色法よりはるかに劣るようである。最近 Peters³²⁾は、Free INH がアルカリ条件で Cyanogen bromide と反応し、蛍光性をおびた複合体の生ずることに着目、感度の高い蛍光分光学的定量法を開拓し、血清中の Free INH を 0.1 µg/ml まで定量できると報告したが、実際これを多くの検体について試みた彼の成績をみると³³⁾、その再現性はやはり悪いように見受けられる。

以上のような化学的定量法とともに Bönicke²⁷⁾, Morse²⁸⁾, Mandel⁴⁸⁾, Bell²⁹⁾, Grosset⁴⁹⁾ らは H₃₇R_v 菌株に対する活性 INH を希釈法で求める微生物学的定量法を考案、本邦では小川が同じ菌株の活性 INH を直立拡散法で求める定量法を考案し³⁰⁾, Schmiedel⁵⁰⁾, Grosset⁵¹⁾, Lloyd-Mitchison⁵²⁾ らもこれに類似した定量法を報告しているが、このうちわれわれが試みた小川の方法では、血清中 Free INH を 1 µg/ml 以下の低濃度まで定量できるという利点はあるが、逆に 1 µg/ml 以上になると再現性が悪く、3 µg/ml 程度になるとその信頼性はかなり乏しいものとされている。しかしこの生物学的活性濃度 (結核菌の発育を阻止する INH 濃度) ははたして化学的定量値と同じ値を示すものか否かはまだ判然とせず、また Peters が彼の蛍光分光学的定量法で検討した比較定量値をみると両者間にはかなりのバラ

ツキがみられ、 $1\mu\text{g/ml}$ 以下のFree INHを正確に定量するという事はやはり至難とみなされる。しかし本定量法では $1\mu\text{g/ml}$ 以下の血清中Free INHを $0.1\mu\text{g/ml}$ の偏差で定量でき、かつ小川の生物学的定量法との比較でも本法値はより優れた成績を示すが、本定量法でもINH-hydrazonesの一部がなお同時に定量されるので、いまだ完全なFree INH定量法とはいえないかも知れない。

次に尿中Free INHの定量については、血清中のFree INH値ほど低濃度でないため、微量定量法としての懸念はないが、Free INHの反応試薬に対し、INHと類似した反応を示す諸物質が尿中には高濃度に含まれているため、むしろこれら成分をいかにして分離するかが問題となる。すなわちFree INHを反応する諸発色試薬はけつしてFree INHにのみ特異的なものではなく、広く用いられている β -Naphthoquinone法にしても、その発色試薬Sodium β -naphthoquinone-4-sulfonateはSemicarbazide, Hydroxylamin, p-Aminosalicylic acid, Vitamin B₆, Sulfa剤等とも反応する非特異性を示し、またこの定量法では早朝空腹時尿からもある成分が定量されるので、この反応による定量値の信頼性ははなはだ乏しいようである。このことからPeters⁶⁾は尿をAmberlite IRA-400のColumnに通し、その流出液にSodium β -naphthoquinone-4-sulfonateを加えて発色する定量法を発表した。しかしこのAmberliteによる分離操作ではp-Aminosalicylic acidは分離されるが、Acetyl INHやIsonicotinic acid等は分離しえないので、その他の成分についてもなおいつそうの検討が期待されようである。

著者の考案した尿中Free INHの定量法は、従来法とはその原理を異にする方法で、すなわち尿中Free INHを溶媒で抽出する前に、その尿を酸化的に処理し、Free INH以外の成分が同時に定量されるという難点を解決した。しかしこの過酸化水素を加えて加熱する酸化的処理にも限度があり、たとえばp-Aminosalicylic acidを含む尿からは、これも同時に定量されるという問題がまだ残されている。

結 論

1) 著者はFree INHがFolinのPhosphotungstate試薬を還元し、青色に呈色する反応を見だし、この呈色の分光性を利用する血清および尿中Free INHの新定量法を考案した。

2) 本定量法における呈色反応は血清および尿中よりFree INHを抽出したものについて行なうが、とくに尿中Free INHの定量法では、あらかじめ尿に過酸化水素を加えて加熱し、Phosphotungstate試薬を還元する他の成分を酸化的に処理したものからFree INHの抽出

を行なう。

3) 本法における定量精度はきわめて高く、 $1\mu\text{g/ml}$ 以下の血清Free INHを $0.1\mu\text{g/ml}$ の偏差、 $10\mu\text{g/ml}$ 以下の尿中Free INHを $0.3\mu\text{g/ml}$ の偏差で定量できる。

4) INH誘導体については、INH-hydrazonesのみが一部定量される。

5) Free INHの腎クリアランスはきわめて高く、 30ml/min 以上とみなされる。

6) 体重kg当り4mgのINHを終口投与した後、6時間時の血清Free INH値と、その6時間までに尿中に排泄されるFree INH量との間には正の相関性が認められる。

6) INHの経口投与量と、投与後6時間までの尿中Free INH量との間にはほぼ直線的な相関がみられる。

最後に臨み、ご指導ご校閲を賜った東京大学医学部教授島嶺順雄先生に深謝致します。(本論文の要旨は第40回日本結核病学会総会および第38回日本生化学総会にて発表した。)

文 献

- 1) Elmendorf, D.F. et al.: Am. Rev. Tuberc., 65: 429, 1952.
- 2) Kelly, J.M. & Poet, R.B.: Am. Rev. Tuberc., 65: 484, 1952.
- 3) Rubin, S.H. et al.: Dis. Chest, 21: 439, 1952.
- 4) 堂野前維摩郎 他: 最新医学, 7: 643, 1952; ibd. 7: 955, 1952.
- 5) 和知勤 他: 結核, 35: 288, 1960.
- 6) Peters, J.H.: Trans. 15th V. A. Armed Forces Conf. on the Chemotherapy of Tuberc., 37, 1959.
- 7) 松崎芳郎 他: 結核, 36: 43, 1961.
- 8) Hughes, H.B. et al.: Am. Rev. Tuberc., 70: 266, 1954.
- 9) Bönicke, R. et al.: Arch. Exptl. Path. Pharmac., 220: 321, 1953.
- 10) Hughes, H.B.: J. Pharm. Exptl. Therap., 109: 444, 1953.
- 11) Bell, J.C. et al.: Am. Rev. Tuberc., 75: 995, 1953.
- 12) Mitchell, R.S. et al.: New Engl. J. Med., 257: 1066, 1957.
- 13) Bönicke, R. et al.: Nature, 44: 314, 1961.
- 14) Price Evans, D.A.: Am. J. Med., 34: 639, 1963.
- 15) Knight, R. et al.: Trans. 18th Conf. Chemotherapy of Tuberc. V. A., 61, 1959.
- 16) Price, Evans, D.A. et al.: Brit. Med. J., II: 485, 1963.
- 17) 吉田清一 他: 結核特別号, 34: 53, 1959.
- 18) 砂原茂一 他: 結核, 36: 521, 1961; ibd. 39: 278, 1964.
- 19) Sunahara, S.: Asian Med. J., 5: 161, 1962.

- 20) Sunahara, S. et al. : *Med. Thorac.*, 20 : 289, 1963.
- 21) Prescott, B. et al. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, 84 : 704, 1953.
- 22) Short, E. I. S. : *Lancet*, 1 : 656, 1954 ; *Tubercle*, 42 : 218, 1960 ; 43 : 33, 1962.
- 23) Scardi, V. : *Clin. Chim. Acta*, 2 : 134, 1957.
- 24) 山口一敏 : *日本薬理学雑誌*, 51 : 631, 1955.
- 25) Pool, N. F., Meyer, A. E. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, 98 : 375, 1958.
- 26) Maher, J. R. et al. : *Am. Rev. Pul. Dis.*, 76 : 852, 1957.
- 27) Bönicke, R. : *Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 216 : 490, 1952.
- 28) Morse, W. C. et al. : *Trans. 15th Conf. Chemotherapy of Tuberc. V. A.*, 283, 1956.
- 29) Bell, J. C. et al. : *Am. Rev. Tuberc.*, 75 : 992, 1957.
- 30) 小川政敏 : *日臨結核*, 16 : 417, 1957.
- 31) 伊藤文雄 他 : *最新医学*, 12 : 1434, 1957.
- 32) Peters, J. H. : *Am. Rev. Resp. Dis.*, 81 : 485, 1960.
- 33) Peters, J. H. et al. : *Trans. 20th Resp. Conf. in Pulm. Dis.*, 25, 1961.
- 34) Folin, O. : *J. Biol. Chem.*, 86 : 179, 1930 ; 86 : 186, 1930.
- 35) Hawk, P. B. et al. : *Practical Physiological Chemistry*, Blakiston (New York, Toronto, Philadelphia), 1951.
- 36) Treadwell, F. P. : *Analytical Chemistry*, II : 282, 587, 1937.
- 37) Moeller, T. : *Inorganic Chemistry, An Advanced Textbook*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 881 p, 1959.
- 38) Brown, H. J. : *J. Biol. Chem.*, 158 : 601, 1945.
- 39) 向山弘茂 他 : *結核*, 38 : 1, 1963.
- 40) Ballard, C. W., Scott, P. G. W. : *Chem. & Ind.*, 715, 1952.
- 41) Scott, P. G. W. : *Dis. Chest*, 21 : 439, 1952.
- 42) 掛見喜一郎 他 : *診断と治療*, 40 : 755, 1952.
- 43) Scott, P. G. W. : *J. Pharm & Pharmacol.*, 4 : 681, 1952.
- 44) Pratt, E. L. : *Analytical Chem.*, 25 : 814, 1953.
- 45) Nielsch, W. et al. : *Arzneim. Forsch.*, 9 : 700, 1959.
- 46) Belles, Q. G. and Littleman, M. L. : *Am. Rev. Resp. Dis.*, 81 : 364, 1960.
- 47) Cuthberton, W. F. J. et al. : *Brit. Med. J.*, 4862 : 609, 1954.
- 48) Mandel, W. et al. : *Proc. Exptl. Biol. Med.*, 91 : 409, 1956.
- 49) Grosset, J. et al. : *Ann. Inst. Pasteur*, 92 : 752, 1957.
- 50) Schmidel, A. : *Beitr. Klin. Tuberk.*, 112 : 479, 1954 ; 119 : 206, 1958.
- 51) Grosset, J. et al. : *Rev. Tuberc.*, 22 : 1077, 1958.
- 52) Llyod, J. and Mitchison, D. A. : *J. Clin. Path.*, 17 : 622, 1964.