

サルの INH 代謝型

砂原茂一・浦野元幸・川井和夫

国立療養所東京病院

本庄重男・高坂精夫・藤原 哲

国立予防衛生研究所

受付 昭和 42 年 12 月 15 日

THE PATTERNS OF ISONIAZID INACTIVATION
IN MACACA IRUS*Shigeichi SUNAHARA, Motoyuki URANO, Kazuo KAWAI,*
Shigeo HONJO, Seio TAKASAKI and Tetsu FUJIWARA**

(Received for publication December 15, 1967)

236 *Macaca irus* imported from Cambodia, Malaya and Viet Nam were loaded with 4 mg/kg, 8 mg/kg or 16 mg/kg of body weight of isoniazid orally and 4 or 6 hour plasma levels of the biologically active isoniazid were determined by the vertical diffusion technique.

As indicated in Fig. 1, 2 and 3, the sign of trimodality was shown in some experiments, but the final result of our experiment revealed only bimodal distribution as shown in Fig. 4.

Investigation of the acetylating capacity of the organ homogenate demonstrated that also the kidney and the spleen acetylated sometimes isoniazid as shown in Fig. 5. We were not successful to demonstrate a close relationship between the acetylating activity of the liver homogenate on the one hand and the blood level of the biologically active isoniazid on the other as indicated in Fig. 6.

This report was presented to the 8th annual meeting of the Japan Society of Human Genetics and the resumé was published in the Japanese Journal of Human Genetics 8, 283, 1963.

1. はじめに

INH 代謝型は常染色体性の遺伝型質であつて、迅速代謝型 (rapid inactivator), 中間代謝型 (intermediate inactivator) および遅延代謝型 (slow inactivator) の 3 型に分類されることはわれわれ (砂原ら^{1)~5)}, ついで Dufour ら⁶⁾ によつて確かめられた。一方 INH 代謝には著しい動物種属差の存在することは Hughes ら⁷⁾ やわれわれ (砂原⁸⁾⁹⁾ によつて指摘された。また動物における INH acetyl 化能の主な局在部位は肝臓であ

り、細胞分画の中では microsome ではなく上清画分であることもわれわれ (砂原ら⁸⁾⁹⁾ によつて報告された。

今回の報告は、INH 代謝の種属差に関連して人間以外の動物においてもわれわれの見出した代謝型分布の三峰性が観察されるかどうかを確かめ、すすんで INH 代謝の遺伝学的研究を動物実験の場に移すことが可能であるかどうかを検討しようとするものである。

2. 材料および方法

実験材料としてはマラヤ、カンボジアおよびベトナム

From Tokyo National Chest Hospital() and National Institute of Health. (**)

Reprint may be obtained from Shigeichi Sunahara, Director, Tokyo National Chest Hospital, Kiyosemachi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

から輸入された *Macaca irus* (テナガザル) を用いた。血清の生物学的活性 INH 濃度は直立拡散法 (小川¹⁰⁾, 砂原⁹⁾) を用いて測定した。

肝その他臓器の組織ホモジネートの acetyl 化能は次のようにして測定した。組織片 4g をステンレス鉢を用いて切りきざみ 0.9% KCl, 0.17% NaHCO₃ 液 10ml 中に混じり室中でガラスホモジナイザーにかけた。Acetyl 化の測定は次の反応液および反応条件のもとに Warburg 装置を用いて行なわれた。

| | | |
|-----|-------------------------|--------|
| 主室 | 1/15 M 燐酸 buffer | 0.3 ml |
| | 0.01 M Na-ATP | 0.3 |
| | 0.1 M MgCl ₂ | 0.1 |
| | 0.4 M NaF | 0.1 |
| | 0.1 Na-acetate | 0.4 |
| | 500 mcg/ml INH | 0.4 |
| | 40% 組織ホモジネート | 1.0 |
| | H ₂ O | 0.4 |
| | 計 | 3.0 |
| 中心室 | 20% KOH | 0.2 ml |
| | 温度 37°, ガス相 空気 | |
| | 時間 30 分 | |

Acetyl 化能は全 INH と遊離 INH の差として現われ、INH 測定は Short¹¹⁾ 法によつた。

3. 実験成績

i) 負荷 INH 量と血中濃度測定時間

INH を体重 1 kg 当り 4 mg, 8 mg あるいは 16 mg 経口投与後 4 時間目および 6 時間目の血漿の生物学的活性 INH 濃度を図 1, 図 2 および図 3 に示した。4 mg/

kg 投与後 4 時間値では 0.1 mcg/ml と 0.2 mcg/ml の間および 0.4 mcg/ml と 0.8 mcg/ml との間に、また 8 mg/kg 投与後 4 時間値では 0.1 mcg と 0.2 mcg の間および 0.8 mcg/ml と 1.6 mcg/ml との間に境界線を引くことができるようである。16 mg/kg 負荷例は比較的少数であるが 0.4 mcg/ml および 1.6 mcg/ml のあたりで 3 群に分かれる。

図 1, 図 2 をみると Malaya 産のテナガザルには 4

Fig. 2. Plasma Levels of Biologically Active Isoniazid 4 Hours and 6 Hours after the Dose of 8 mg/kg of the Drug to Monkeys

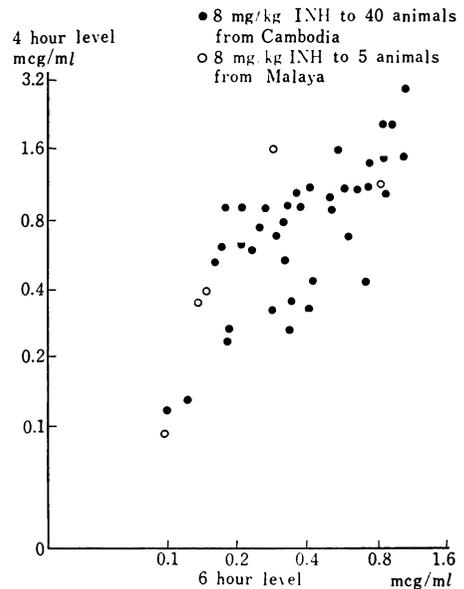


Fig. 3. Plasma Levels of Biologically Active Isoniazid 4 Hours and 6 Hours after the Dose of 16 mg/kg of the Drug to Monkeys

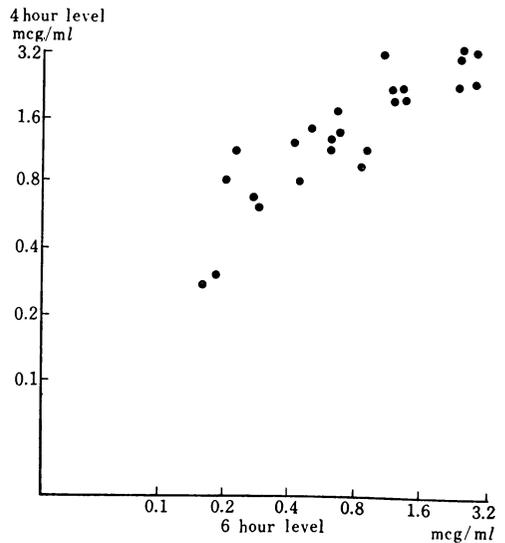
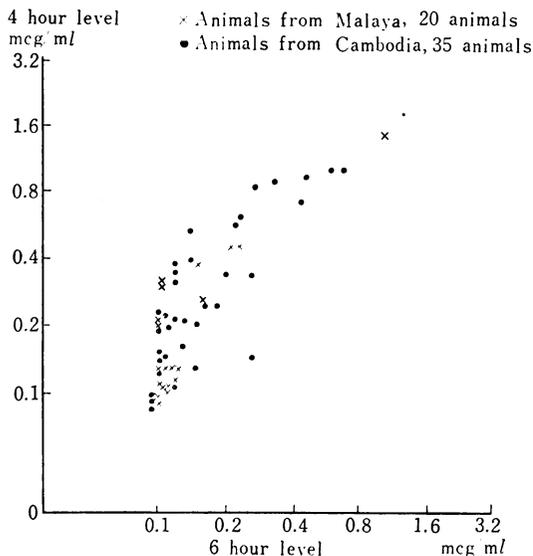


Fig. 1. Plasma Levels of Biologically Active Isoniazid 4 Hours and 6 Hours after the Dose of 4 mg/kg of the Drug to Monkeys

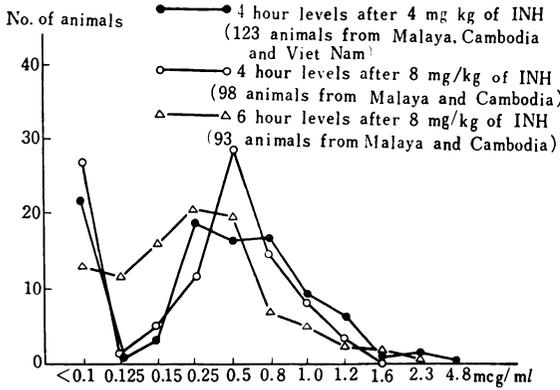


mg/kg 負荷後6時間値が 0.3 mcg/ml 以上のものは 1 匹のみで、また 8 mg/kg 負荷後6時間値が 0.4 mcg/ml 以上のものがない。これだけから推定すると Malaya 産は Cambodia 産よりも低濃度で、したがって不活性化能が高いようにみえるが、何分にも検査例数が少ないので結論は出ない。

ii) 生物学的活性 INH 濃度の度数分布

図4はさらに検査例数を増した場合の 4 mg/kg INH

Fig. 4. Frequency Distribution Curve of Plasma Levels of Biologically Active Isoniazid 6 Hours after the Dose of the Drug to Monkeys



負荷4時間値 (123例), 8 mg/kg INH 負荷後の4時間値 (98例) および6時間値 (93例) をまとめて図示したものであるがこの場合の谷間は 4 mg/kg 4時間値と 8 mg/kg 4時間値において 0.125 mcg/ml に認められるだけで 16 mg/kg INH 負荷群では全く谷間が認められず、また3群とも図1, 2, 3において認められた 0.4 mcg/ml と 0.8 mcg/ml との間、あるいは 0.8 mcg/ml と 1.6 mcg/ml との間の谷間は確認できなかった。

図1, 2, 3, 4を通覧するとサルの場合は迅速型とその他の群(中間型と遅延型の合計)との2つの群に区別可能であるが中間型と遅延型との区別はつねに可能であるとはいえないようである。

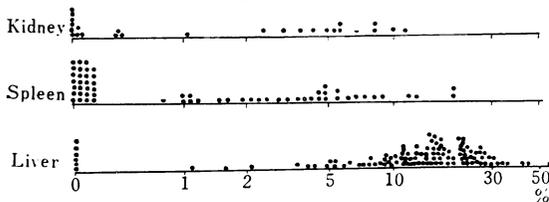
つまり二峰性の存在は確かであるが三峰性の存在は不確かである。

iii) サル肝, 脾および腎の INH acetyl 化能

107匹のサルの肝, 60匹の脾および26匹の腎の INH acetyl 化能の測定成績を図5に示した。

肝のみならず脾, 腎にもサルの場合は INH acetyl 化

Fig. 5 Acetylating Capacity of Monkey Liver, Spleen and Kidney

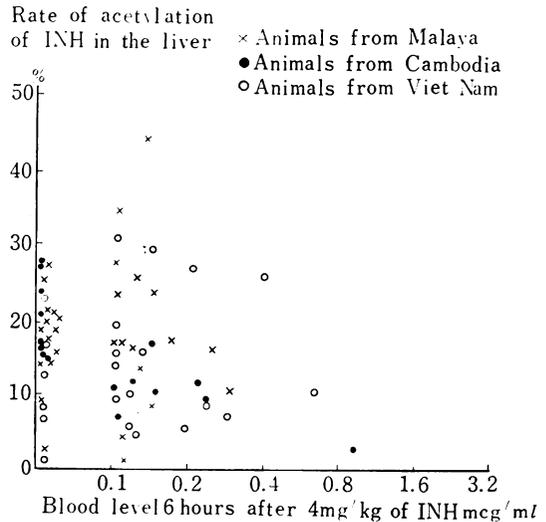


作用が認められることがある。しかもその acetyl 化能には著明な個体差が認められ、肝の場合でも非常に活性の低い個体が存在する。なお肝ホモジネートの acetyl 化能はやや二峰性に近い分布を示していることが注目される。

iv) 肝 acetyl 化能と血漿活性 INH 濃度との相関

4 mg/kg 負荷後6時間の血漿活性 INH 濃度と肝アセチル化能との関係を図6に示した。肝の活性が血中濃度

Fig. 6. Relationship between Plasma Isoniazid Level and Acetylating Capacity of Monkey Liver



に全く反映されていない。異なつた INH 負荷量, 異なつた採血時間の場合についても作図を行なつたが結果は同じであつた。

4. 考 案

i) INH 代謝の多型現象の証明について

ヒトにおける血清または血漿の生物学的活性 INH 濃度の三峰性は砂原ら¹¹⁻¹³⁾によつて見出されたものであつて Dufour ら⁶⁾が追試, 確認に成功するまでは欧米の研究者達は二峰性分布説を容易にすてなかつたのである。Dufour らの報告が出てからも、たとえば「砂原らの日本人の場合における三峰性証明は是認されるが、Dufour らの白人, 黒人についての成績にはただちに賛同しがたい」という見解(Jenne¹²⁾)がまだ一部に残っている。それというも白人, 黒人の場合は第一峰(迅速代謝型に相当)がきわめて低いためそれは人為的産物ではないかという疑いがさしはさまれるためであろう。

しかしこの点に関しては砂原らが Dufour らとの共同研究(砂原⁹⁾)を始める以前、つまり白人, 黒人の血液採取の機会をもちえなかつた時期に、なるべく白人, 黒人に近い代謝型を示すアジア人種を求めて、タイ人お

よび中国人についての測定を行ない、日本人に比べると著しく低い第一峰を伴った三峰性を証明しているのである。とくにタイ人の場合は迅速型の頻度は白人に近いので日本人と白人との橋渡しとしての意義が大きいと考えたのである。このように迅速代謝型の多い人種から少ない人種まで、第一峰の移り行きをたどつてみると白人における三峰性を承認するのにいささかも抵抗を感じない。まして砂原らは Philadelphia から送られた、Dufour らの測定したのと同一の血清について東京で独立に測定を行なつて、アメリカ側の発表と高度に近似した度数分布曲線を得ているのであるから、白人、黒人における三峰性の真実さを疑うことはできない。(砂原ら⁹⁾)

日本人の場合でも、たとえば 4 mg/kg INH 負荷後の 4 時間値、8 mg/kg 負荷後の 6 時間値をとれば、当然血中濃度は 4 mg/kg 負荷 6 時間値の場合よりも高くなるから、第一峰はきわめて低くなるのである。(砂原ら¹³⁾)

このようにヒトにおける度数分布曲線の人種間の偏りおよび負荷量と測定時間の影響についての観察を念頭において、サルの場合の研究を行なつたのである。

図1、2および図3が示しているように比較的少数例を扱っている間は迅速、中間および遅延の3群におおよそ分かれるようにみえたが、より多数の動物についての成績をとりまとめた図4では迅速とその他との2群には分かれるが、中間と遅延とは分かれがたいようにみえる。

したがつて現在のところサルにおいて人間の場合にみられるような三峰性を確認しがたいというべきであろう。せいぜい二峰性が観察されたに止まる。しかし今後 INH 負荷量、採血時間などに関してさらに工夫をこらせば、三峰性を浮び上がらせることが全く不可能とはいきれないかもしれない。

さしあつては、ヒトにおける遺伝仮説をそのまま動物、ことにサルに適用可能であるという根拠は得られなかつたわけであるから、動物を用いてのかけあわせによる遺伝実験に進むことはできない。

われわれがサルについてのこれらの実験成績を発表したのは、1963年の日本内科学会と日本人類遺伝学会であつた(砂原ら^{14,15)})。ところがその後(1965年)、Petersら¹⁶⁾が17匹の *Macaca mulatta*、12匹の *Macaca cynomolgus* および12匹の *Cercocebus fulliginosus* に 40 mg/ml の INH 溶液を体重 1 kg につき 20 mg/kg (われわれの場合より大量である) の割合で筋肉内注射し、24時間尿の全 INH 量と acetyl INH の比を acetyl 化率とみなして代謝型の研究を行なつた。前2種のサルでは正規分布曲線しか得なかつたが第3の種類(*cercebus fulliginosus*) の場合は二峰性であつた。Peters¹⁷⁾ はわれわれの実験成績と彼自身の成績とを比較検討して、彼らの場合は使用動物数がきわめて少ないために望ましい結果が得られなかつたのでないかと考察しているが、

われわれがすでにたびたび指摘したように(砂原ら^{9,18)}) 負荷量についての工夫も必要であると思われるし、またもともと尿中排泄物から多型現象をはつきりととらえることは、ヒトの場合でも困難であるという事情も考慮に入れなくてはならないと思われる。

なおわれわれの実験の範囲ではサルの種類、性別等による INH acetyl 化能の差異を見出しえなかつた。

Goeddeら¹⁹⁾ はアフリカ産のサル *Cercopithecus aethiops* 37匹を用いて、20 mg/kg の INH 投与後3時間値を測定して、うち7匹の濃度が他を引き離して高いことをもつて二峰性の存在を推論しているが、彼らの論文中の図をみるとこの推論は必ずしも妥当ではないように思われる。Petersら¹⁶⁾ もその結論に疑いをはさんでいる。

Petersら¹⁶⁾ は *Macaca mulatta* の6匹について、Sulfamethazine の代謝様式を追及しているが、INH 代謝型との間に関連を見出していない。

ウサギについて Frymoyerら¹⁹⁾ は INH あるいは Sulfadiazine を静脈注射して化学的に遊離分画を測定しているが、血中 INH 濃度についても Sulfadiazine についても二峰性を認めているが、Sulfadiazine のほうがより明確であつて個別的にみても両者の代謝速度が平行している。

INH 代謝における多型現象が気づかれたとき、同じく acetyl 受容体である Sulfa 剤、PABA、PAS などについても同様の現象が認められるのではないかという考えが当然浮び上がった。われわれの当時の研究(向山ら²⁰⁾) では Sulfisoxazole の場合は INH の代謝型にいくらかの相関が認められた。しかし相互に重り合いがあるため Sulfa 剤代謝を指標として INH の3代謝型をはつきりと分別することは不可能であつた。PABA の代謝は INH 代謝型に全く関係がなかつた。その後の肝ホモジネートの acetyl 化能の研究では、Sulfisoxazole よりも Sulfanilamide のほうが INH 代謝能に平行しやすいことを見出している(砂原ら⁹⁾) から、Sulfa 剤の種類によつては INH 代謝とのより高度の平行関係を観察しえたかもしれない。その後 Price Evansら²¹⁾ は INH の迅速代謝型では、尿中に排泄された Sulfamethazine の acetyl 化率が高く、INH の遅延代謝型では低いこと、またヒトの肝の生検材料について INH 迅速代謝型では、Sulfamethazine の代謝速度が大きいことを報告した。

これらのヒトにおける実験成績と先に引用した Petersらおよび Frymoyer らのサル、ウサギにおける実験成績を一つの平面にのせてみると、現在の段階では INH と Sulfa 剤との代謝様式の相関性ないし、その程度について結論を与えうる段階ではないようである。

ii) 血中遊離 INH 濃度と組織の acetyl 化能との

関係

INH 代謝の多型現象はすでに述べたとおり、ヒトにおける血中活性 INH 濃度の個体差から気づかれた。しかし最初にわれわれによつて明らかにされた三峰性分布は1つには白人、黒人についての証明が遅れたこと、2つには生物学的測定法によつていたことゆえに、靴をへだててかかとをかくのうらみがないではなかつた。今日では白人、黒人についても観察されたし、われわれが最近開発した化学的定量法によつて再確認された(中川ら²²⁾)から事態は一応揺がなくなつたといつていいであろう。しかし血中の生物学的活性 INH にしろ、化学的に測定された遊離 INH にしろ、もとの形の INH のうち生体内で変化を受けなくて残つた部分を定量しているのであつて、acetyl 化能そのものを測定しているのではないから、なんといつても間接的なアプローチであるといわなくてはならない。便宜的に血中活性または遊離 INH を問題にするにしても、それと組織の acetyl 化能を結びつける試みがなされなくてはならない。

われわれのサルにおける試みは図6に示したように全く失敗に終わった。

Goedde ら¹⁸⁾はわずか2匹のサルについてはあるが、化学的に定量された遊離INH濃度と肝ホモジネートとのINH acetyl 化能が平行すると報告した。Frymoyer らはウサギについて Sulfadiazine の血中の半減期と肝ホモジネートの Sulfadiazine acetyl 化能とがよく相関することを報告した。そのうえ彼ら²³⁾はウサギ肝ホモジネートについて、Sulfadiazine の acetyl 化能が三峰性であることを報告している。(INH については肝における acetyl 化の三峰性を認めていないし、Sulfadiazine についても血中濃度については二峰性しか認めていないのである)

なおヒトの生検肝について Price Evans ら²¹⁾は血中濃度に基づいた2つの INH 代謝型(彼らは本来二峰性説をとつている)に対応して INH の acetyl 化率が異なると報告している。

要するに Frymoyer や Price Evans らは、われわれとは異なつて血中濃度と肝の活性とを結びつけることにある程度成功しているように見えるが、ヒトとウサギ、INH と Sulfa 剤、二峰性と三峰性等の問題が複雑に入りこんでいるので、彼らの結論を今のところ全面的には信じがたいように思われる。

ことに肝を唯一の acetyl 化臓器とみなしていいかどうか疑わしい。確かにハトやワトリでは肝の活性が圧倒的である(砂原ら⁹⁾)けれどもウサギにおいては、われわれは腸の活性が無視できないことを報告したし(中川ら²²⁾)、図5にみるようにサルでも脾、腎に相当程度の活性が認められるのである。Blondheim²⁴⁾はヒトにおいて腸の acetyl 化能がけつして小さくないことを報告し

ている。このように肝外活性を考慮しなくてはならないとしたら、血中濃度と肝活性を直接むすびつける試みが簡単に成功する可能性は本来少ないはずである。

acetyl 化に關与する主要組織あるいは全個体の acetyl 化能を測定する実験計画が問題の最終的解決のためには必要なのではないだろうか。

5. む す び

1. 236 匹のサル (*Macaca irus*) を用い、INH 負荷後の血中活性 INH 濃度を測定した。部分的には三峰性に近い度数分布を観察したが、全例をまとめると二峰性しか確認できなかつた。

2. 肝の acetyl 化能と血中濃度とは相関しなかつた。

付記 1. 志村甲子男、奥村和子、鈴木七郎、柳橋淳三の諸氏の協力を感謝する。

2. 本研究は第8回日本人類遺伝学会(1963)において発表された。

文 献

- 1) Sunahara, S., Urano, M. and Ogawa, M. *Science* 134: 1530, 1961.
- 2) 砂原: 結核, 36: 521, 昭 36.
- 3) Sunahara, S.: *Bull. Int. Un. Against Tuberc.*, 32: 513, 1962.
- 4) Sunahara, S. et Urano, M.: *Med. Thorac.*, 20: 289, 1963.
- 5) Sunahara, S., Urano, M., Ogawa, M., Yoshida, S., Mukoyama, H. and Kawai, K. (英文): *人類遺伝学雑誌*, 8: 93, 1963.
- 6) Dufour, A. P., Knight, R. A. and Harris, H. W.: *Science*, 145: 391, 1964.
- 7) Hughes, H. B., Schmidt, L. H., Biehl, J. P.: *Trans. 14 Conf. Chem. Tuberc.*, 217, 1955.
- 8) 砂原: 結核, 39: 278, 昭 39.
- 9) Sunahara, S., Kawai, K. and Urano, M. (英文): *人類遺伝学雑誌*, 10: 95, 1965.
- 10) 小川: *日本臨床結核*, 16: 417, 昭 32.
- 11) Short, E. I.: *Tubercle, Lond.* 42: 218, 1961.
- 12) Jenne, J. W.: 私信.
- 13) Sunahara, S., Urano, M., Lin, H. T., Cheg, T. J. and Adirek Jerumilinda: *Act. Tuberc. Scand.*, 43: 181, 1963.
- 14) 砂原・川井・浦野: *日本内科学会雑誌*, 52: 519, 昭 38.
- 15) 砂原・浦野・小川・川井・本庄: *人類遺伝学雑誌* 8: 283, 昭 38.
- 16) Peters, J. H., Gordon, G. R. and Brown, P.: *Proc. Exp. Biol. Med.*, 120: 2, 1965.
- 17) Peters, J. H.: 私信.
- 18) Goedde, H. W., Schoepf, E. u. Fleishmann, D.: *Biochem. Pharmacol.*, 13: 1971, 1964.
- 19) Frymoyer, J. W. and Jacox, R. F. J. *J. Lab. Clin. Med.*, 62: 891, 1963.
- 20) 向山・砂原・小川・川井: *結核*, 38: 1, 昭 38.

- 21) Evans, D. A. P. and White, T. A. : J. Lab. Clin. Med., 63 : 394, 1964.
- 22) 中川・砂原 : 結核, 42, 203, 昭 42.
- 23) Frymoyer, J. W. and Jacon, R. F. J. Lab. Clin. Med., 62 : 905, 1963.
- 24) Blondheim, S. H. and Kunkel, H. G. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73 : 38, 1950.