

原 著

イソニアジドを用いたアセチル化遺伝的多様性の統計学的検討

河 野 晴 一

北里大学薬学部
国立療養所東京病院薬剤科

毛 利 昌 史

同 呼吸器科

片 山 透

同 外科
受付 平成4年8月31日TESTING FOR HETEROGENEITY IN GENETIC POLYMORPHISM OF
N-ACETYLATION USING ISONIAZID BY METAMETERS

— Probit, Logit, and Arcsine Transformation —

Haruichi KOHNO^{*}, Masashi MORI and Tohru KATAYAMA

(Received for publication August 31, 1992)

To investigate genetic polymorphism of N-acetylation in Japanese population we measured isoniazid (INH) and acetylisoniazid (AcINH) in the urine of 340 unrelated Japanese subjects. For the detection of polymorphism, we used probit analysis, logit analysis, and arcsine transformation of the logarithm of molar acetylation ratio {log (INH/AcINH)}.

The observed antimodes were -0.85 and -0.325 for the probit, 4.899 and 7.154 for the logit, 43.85 and 71.57 for the arcsine analysis plot. Probit and arcsine analysis were sensitive for the separation of intermediate from slow acetylators, while logit analysis was sensitive for the separation of rapid from intermediate acetylators.

Clinically it is important to know to which genetic group the patient belongs because we may have to increase the dosage for the rapid acetylators to achieve the desired therapeutic effect, while we may have to reduce the dosage for slow acetylators in whom the incidence of side effect is high.

Key words : Isoniazid, Metameter, Genetic polymorphism of N-acetylation, Japanese

キーワード : イソニアジド, メタメータ, N-アセチル化遺伝的多様性, 日本人

* From the Pharmaceutical Division, National Tokyo Chest Hospital 1-1, Takeoka 3 chome, Kiyose, Tokyo 204 Japan.

薬物代謝で代表的な第11相反応とされるN-アセチル化(N-acetylation)は遺伝的多様性を示しその代謝速度は遺伝的に支配され、著しい個体差があることが知られている¹⁾。

抗結核薬 isoniazid (INH) により代表されるアセチル化の遺伝的多様性(acetylation genetic polymorphism)の個体差分布には大別して2つのモード(bimodal distribution)が存在し²⁾、迅速代謝型(rapid acetylator: RA)と遅延代謝型(slow acetylator: SA)に分類され、その遺伝の様式は常染色体遺伝であり、SAは劣性形質からなるホモ接合体、RAは優性形質からなるホモまたはヘテロ接合体であることが確かめられている³⁾。

アセチル化遺伝的多様性による臨床薬理学的影響としてはINHの場合、1週間1回間欠投与では結核が完治しない例がRA(rapid acetylator群)で有意に高いことが知られている^{4)~6)}。副作用としてSAでは末梢性神経炎^{7)~9)}、薬物誘導性ループス¹⁰⁾¹¹⁾、肝障害^{12)~14)}、抗てんかん薬 phenytoin (DPH) 併用時の中毒¹⁵⁾が、また、日本人や中国人のRAでは肝障害¹⁶⁾の発現率がそれぞれ高いことが報告されている。このように、薬物の副作用の発現および発癌とアセチル化遺伝的多様性の関連は臨床問題であり、その関連の解明は副作用および発癌のリスクファクターの予測などの面での重要な研究課題といえる。

今回、われわれは、INH服用患者340例の尿中INHおよびacetylisoniazid (AcINH) モル濃度を3種のmetameter (プロビット、ロジット、アークサイン)に変換し、アセチル化遺伝的多様性におけるheterogeneity (遺伝的異質性)を統計学的に解析し、それぞれのmetameterの特性について検討したので報告する。

1. 対 象

対象は国立療養所東京病院に入院中の血縁関係のない日本人の肺結核患者340例(男性243例、女性97例)で平均年齢は58歳(18~80歳)、平均体重57kg(36~65kg)である。化学療法にはINH, rifampicin, ethambutol, および pyrazinamide が併用されていた。INHと薬物相互作用があるprocainamide, insulin, sodium salicylate, chlorpromazine, Phenytoin, warfarin, primidone, cortisoneなどの併用例はなかった。各被験者にはINH 300-400mgを水およそ150mlとともに服用させ、8時間蓄尿とした。尿試料は-20°Cで凍結保存し、1週間以内にINHとAcINHを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定し、そのモル比(INH/AcINH)を算出した。

2. 方 法

2-1. 尿中INHおよびAcINHモル濃度の定量

尿中INHおよびAcINHのモル濃度はHPLCにより、Kohnoら¹⁷⁾の方法を用いてduplicateで測定した。

2-2. metameterの解析

HPLCにより測定したINH服用患者340例の尿中INHおよびAcINHモル濃度をlog(INH/AcINH)値に変換、続いてプロビット、ロジット、アークサインに再変換した。シミュレーションによる対照として、25,000ポイントから成る母集団をpseudo-random numberにより3群作成し($\mu_1 = 0$, $\mu_2 = 4.0$, $\mu_3 = 8.0$)、全体についてプロビット、ロジット、アークサインに変換し、変曲点(アンチモード値^{*1)}を基準として3群がどのように分離されるか検討した(プロビット、ロジット、アークサイン変換法についてはAppendix A~Dに記載)。統計学的解析にはSYSTAT¹⁸⁾を用いた。

※1 アンチモードとはモード(最頻値)の反対の意味でモードが変わる分布の谷を意味する。

3. 結 果

log(INH/AcINH)の中央値と対応するそれぞれのmetameter値をTable 1に示す。

またlog(INH/AcINH)の中央値(X軸)と対応するそれぞれのmetameter(Y軸)との関係をFig. 1(プロビット)、Fig. 2(ロジット)、およびFig. 3(アークサイン)に示す。各metameterのアンチモード値はプロビットでは-0.85, -0.325, ロジットでは4.899, 7.154およびアークサインは43.85, 71.57であった。各metameterのアンチモード値を境界に三峰性に相当する分布をそれぞれ線形最小自乗法で近似した結果をTable 2に示す。また、参考として25,000ポイントから成る異なる分布の母集団を全体について3群作成し($\mu_1 = 0$, $\mu_2 = 4.0$, $\mu_3 = 8.0$)プロビット、ロジット、アークサインに変換した(シミュレーションの結果はFig. 4に示す)。

4. 考 察

Sunaharaら³⁾はINH投与後血中濃度の個体差を検討し、中間代謝型(Intermediator: IM)の存在を認め、trimodal distribution, 家族調査からIMはヘテロ接合体であるとした。アセチル化表現型(acetylator phenotype)の割合は人種によっても異なりコーカソイド(白色人種)、ネグロイド(黒色人種)の場合、SA:RAは1:1、モンゴロイド(黄色人種)の場合には1:9であることが報告されている¹⁹⁾。アセチル化遺

Table 1 Analysis of Differences of Probit, Logit and Arcsine Transformation

Midpoint * Probit	Logit	Logit (Y+5)	Arcsine	
-1.68	2.67	-4.595	0.405	5.74
-1.55	3.12	-3.347	1.653	9.97
-1.45	3.45	-2.752	2.248	14.18
-1.25	3.59	-2.389	2.611	16.43
-1.19	3.87	-1.946	3.054	21.13
-1.15	4.08	-1.489	3.511	25.10
-1.06	4.42	-0.954	4.046	31.95
-0.99	4.53	-0.772	4.228	34.45
-0.94	4.72	-0.435	4.565	38.65
-0.85	4.95	-0.100	4.900	43.85
-0.78	5.15	0.253	5.253	48.45
-0.73	5.28	0.460	5.460	51.35
-0.65	5.47	0.758	5.758	55.55
-0.58	5.67	1.104	6.104	60.00
-0.53	5.81	1.343	6.343	62.73
-0.45	5.95	1.636	6.636	66.42
-0.38	6.18	1.946	6.946	69.73
-0.33	6.28	2.154	7.154	71.57
-0.25	6.28	2.242	7.242	71.57
-0.17	6.41	2.470	7.470	73.57
-0.11	6.48	2.556	7.556	74.66
-0.05	6.48	2.650	7.650	74.66
0.03	6.64	2.863	7.863	77.08
0.08	6.64	3.032	8.032	77.08
0.15	6.88	3.347	8.347	80.30
0.25	7.05	3.944	8.944	81.87
0.32	7.05	4.119	9.119	81.87
0.37	7.46	4.955	9.955	84.26
0.55	7.65	5.517	10.517	84.26
0.73	8.09	6.907	11.907	84.26

* midpoint of metabolic ratio {log (INH/AcINH)}

伝的多様性を示す薬物には isoniazid (INH), caffeine, clonazepam, dapsone, hydralazine, procainamide などがあり, その投与方法と副作用の発現機序の関係は臨床重要である。また発癌物質としての benzidine, β -naphthalene, 4-aminobiphenyl もアセチル化遺伝的多様性を示し, 染料工場で SA の症例に膀胱癌の発生率が高いことが知られている²⁰⁾。

metameter は生体データなどを, 直感的判定がより容易な値に変換したものである。プロビット, ロジット値の累積度数を縦軸に, 代謝比の対数を横軸にプロットした場合, 直線性があるとプロビットの場合は正規分布が, ロジットの場合はロジスティック分布が推定できる。反対に複数の分布曲線と変曲点が認められる場合は分布が多型性である可能性が示唆され, この性質を利用し,

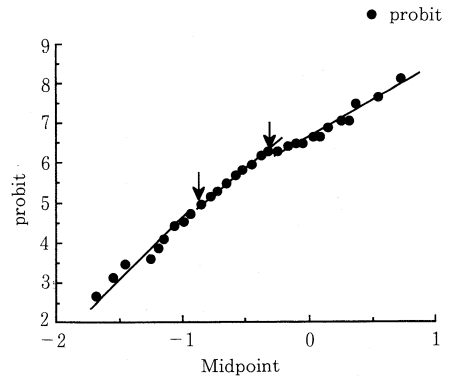


Fig. 1 Probit plots of log (INH/AcINH) in 340 unrelated Japanese. (The arrow indicates the antimodes).

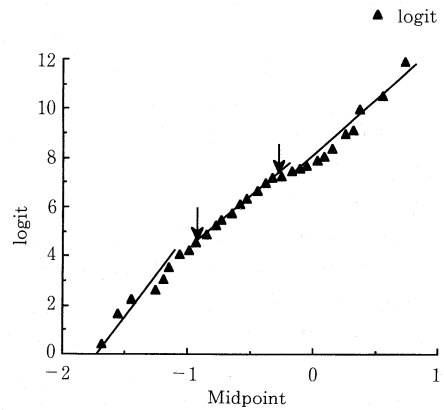


Fig. 2 Logit plots of log (INH/AcINH) in 340 unrelated Japanese. (The arrow indicates the antimode).

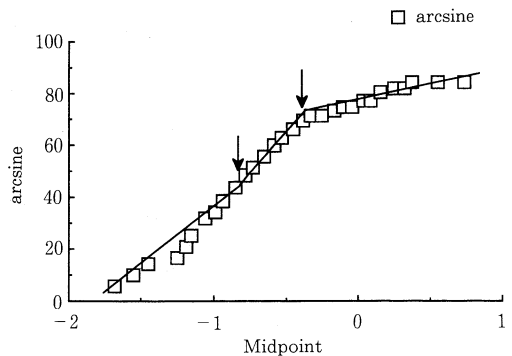


Fig. 3 Arcsine transformation of log (INH/AcINH) in 340 unrelated Japanese. (The arrow indicates the antimode).

Table 2 Correlation between Midpoint (antimode : -0.85, -0.325) vs 3 Metameters

metameter	phenotype	range	A	B	95%CI *	r
probit	RA	-1.68 to -1.85	7.161	2.660	2.319 < B < 3.000	0.988
	IM	-0.78 to -0.33	7.120	2.520	2.400 < B < 2.640	0.999
	SA	-0.25 to 0.73	6.333	1.850	1.609 < B < 2.092	0.983
logit	RA	-1.68 to -1.85	9.312	5.111	4.439 < B < 5.784	0.987
	IM	-0.78 to -0.33	8.561	4.252	4.121 < B < 4.383	0.999
	SA	-0.25 to 0.73	7.970	4.720	3.984 < B < 5.455	0.976
arcsine	RA	-1.68 to -1.85	79.23	45.48	36.50 < B < 54.47	0.972
	IM	-0.78 to -0.33	89.57	52.11	48.78 < B < 55.44	0.998
	SA	-0.25 to 0.73	76.48	14.59	11.12 < B < 18.05	0.948

RA : rapid acetylator, IM : intermediater, SA : slow acetylator

* : 95% confidential limit

遺伝的異質性を視覚的に判定できる方法としてプロビット変換が一般に用いられてきた²¹⁾。しかしロジット、アークサイン変換での同様の試みは今回の報告が最初である。

Fig. 1 (プロビット), Fig. 2 (ロジット), および, Fig. 3 (アークサイン) に示された矢印はアンチモード値で, その値はプロビット値では-0.85, -0.325, ロジットでは4.899, 7.154, アークサインは43.85, 71.57であった。

各 metameter の三峰性に相当する分布を線形最小自乗法で近似した結果 (Table. 2) では, プロビット値とアークサイン値では RA と IM は勾配がほぼ等しく 95% 信頼限界でも前者 (RA) は後者 (IM) に含まれ, 両者の分離は困難であったが, IM と SM は明瞭に分離できた。一方, ロジット値では同様の理由で, RA と IM の分離は可能であったが, IM と SA の分離は明確にはできなかった。

Jackson ら²²⁾ は pseudo-random number をヒストグラムとプロビット変換を用いて, 2つの母集団が混合している場合の検討をしているが, 母集団が3つとなっ

た場合の検討はしていない。われわれはシミュレーションとして 25,000 ポイントから成る母集団を pseudo-random number により 3 群作成し ($\mu_1 = 0, \mu_2 = 4.0, \mu_3 = 8.0$), 全体について行ったプロビット, ロジット, アークサイン変換を Fig. 4 に示したように, いずれの変換においても三峰性の存在を示唆する結果を得たが, 今回の成績では, それぞれの metameter で変換したデータ範囲に複数の区間直線性の存在を完全には立証できなかった。その理由は, 母集団の数が pseudo-random number で検討したほど多くなかったことにもよると考えられ, 今後, さらに多数例での検討が必要と思われる。しかし, 各 metameter の表現型の分離はわれわれの方法でも可能であり, IM と SA はプロビットとアークサイン変換により, RA と IM はロジット変換によりそれぞれ鋭敏に分離ができる可能性が示唆された。

表現型の確認は臨床で, 重要な意味がありインドや欧米では INH 投与時, RA の患者には連日投与, SA の患者では 1 週間 1 回間欠投与が勧められている^{4)~6)}。さ

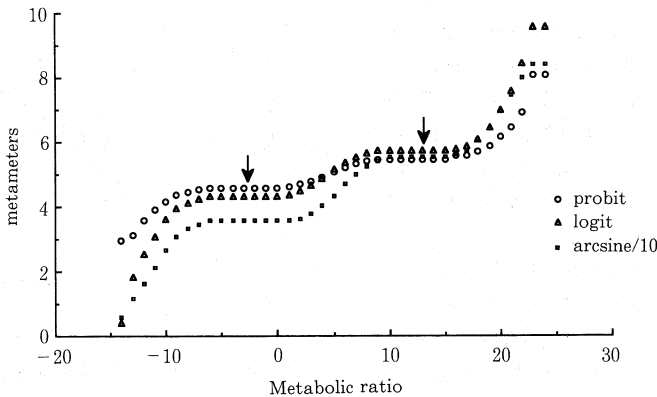


Fig. 4 Sample 75000 points from a mixture distribution (The arrow indicates the antimode).

らにわが国では肺結核化学療法の間を6~12カ月としているが²³⁾、われわれの方法によるアセチル化表現型の判定は個々の症例の至適治療期間の決定などにも参考となり、その臨床的価値は大きいと考えられる。

一方、薬物代謝の立場から考察するとINHのアセチル化は解毒以外に、代謝的活性化 (metabolic activation) を受け、特に、代謝の遅いグループSAでは最終代謝物としてN-hydroxyacetylhydrazineとなりDNAやタンパクを含む高分子と共有結合し、肝硬変、SLE、突然変異、発癌の原因ともなると考えられている²⁴⁾。さらに heterocyclicamine を含む arylamine (INH も含む) には多くの誘導体が存在し、サルモネラ試験で変異原性を示すものが少ない。アゾ色素原料の benzidine, 2-naphtylamine によるヒトの膀胱癌の発現や、加熱物質 Glu-P-1, PhIP の代謝的活性化による癌原性などもよく知られている²⁵⁾。SAでは代謝的活性化を受けた物質がRAやIMよりも長時間体内に残存するため肝硬変、SLEなどを起こす危険はその分高くなる。日本人では10人に1人の確率でSAが存在する³⁾と報告され、その発見は臨床に極めて重要といえる。INH以外でも同様であり、遺伝的多様性の解析は薬物の副作用予防、薬理作用の発現制御に有力であり、今後このような検討は発癌と遺伝的多様性の関連性、副作用の予測などその臨床に重要と考えられる。

4. 結 語

1) 日本人の肺結核患者340例(男性243例, 女性97例)の尿中INHおよびAcINHモル濃度をHPLCで測定し得られた値をlog(INH/AcINH)変換後、プロビット値, ロジット値, アークサイン値に再変換した。

2) 各 metameter で推定されたアンチモードはプロビット値では-0.85, -0.325, ロジットでは4.899, 7.154, アークサインは43.85, 71.57であった。

3) IMとSAはプロビットとアークサイン変換により, RAとIMはロジット変換によりそれぞれ鋭敏に分離可能であり, 本法は多くの遺伝的多様性を示す薬物の解析に応用できることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり, ご指導, ご校閲をいただいた北里大学薬学部高田純教授に深謝いたします。

Appendix A

log(INH/AcINH)のプロビット変換

観察値Yの正規当価偏差(normal equivalent deviation: NED)は, 次式で定義される。正規当価偏差 $= Y = (X - \mu) / \delta$

ここで

X = 観察値

μ = 観察値の平均値

δ = 観察値の標準偏差

Yは $X < \mu$ の時に負となるので, 5を加えて負号を消した変換値をprobit(probability unit)という²⁶⁾。すなわちプロビットY'は $Y' = Y + 5 = 5 + (X - \mu) / \delta$ と定義される。

Appendix B

観測値Yのロジット変換はlogit(Y) = ln{Y/(1-Y)}と定義され, ln{Y/(1-Y)}をロジットと呼ぶ²⁷⁾。ロジット変換は $p = 0.5$ の時Y = 0となり, $P < 0.5$ で負, $P > 0.5$ で正となるので5を加えて負号を消すことが一般的である。本研究でもY+5をロジット値として扱った。

Appendix C

観察値Yのアークサイン変換は, arcsine(Y) = $\sin^{-1}Y$ ($-1 \leq Y \leq 1$)と定義され, $\sin^{-1}Y$ をアークサイン変換²⁷⁾と呼ぶ。

Appendix D

シミュレーションとして25,000ポイントから成る母集団は, 以下の式によりpseudorandom numberを3群, 発生させて作成した。

$$Y = e^{-\theta} \quad \text{ただし } \theta = (\mu - X)^2$$

μ は分布の中央値, $\mu - X$ は中央値の標準偏差を示す²²⁾。

文 献

- 1) Bonicke R, Reif W: Enzymatische Inaktivierung von Isonicotinsäurehydrazid im menschlichen und tierischen Organismus. Arch Exp Pathol Pharmacol. 1953; 220: 321-333.
- 2) Evans DAP, Manley KA, McKusick VA: Genetic control of isoniazid metabolism in man. Brit Med J. 1960; 2: 485-461.
- 3) Sunahara S, Urano M, Ogawa M: Genetical and geographical studies on isoniazid inactivation. Science. 1961; 134: 1530-1531.
- 4) Tuberculosis Chemotherapy Centre, Madras: A controlled comparison of a twice-weekly and three once-weekly regimens in the initial treatment of pulmonary tuberculosis. Bull WHO. 1970; 43: 143-206.
- 5) Tuberculosis Chemotherapy Centre, Madras: A controlled comparison of two fully supervised once-weekly regimens in the treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis. Tubercle. 1973; 54: 23-45.

- 6) Tuberculosis Chemotherapy Centre, Madras : A controlled comparison of oral twice-week and oral daily isoniazid plus PAS in newly diagnosed pulmonary tuberculosis. *Br Med J.* 1973 ; 2 : 7-11.
- 7) Devadatta S, Gangadharam PRJ, Seloken J B, et al. : Peripheral neuritis due to isoniazid. *Bull WHO.* 1960 ; 23 : 587-598.
- 8) Lunde PKM, Frislid K, Hansteen V : Disease and acetylation polymorphism. *Clin Pharmacokinet.* 1977 ; 2 : 182-197.
- 9) Drayer DE, Reidenberg MM : Clinical consequences of polymorphic acetylation of basic drugs. *Clin Pharmacol Ther.* 1977 ; 22 : 251-258.
- 10) Alarcon-Segovia D : Drug-induced anti-nuclear antibodies and lupus syndromes. *Drugs.* 1976 ; 12 : 69-77.
- 11) Reidenberg MM, Levy M, Drayer DE, et al. : Acetylation phenotype in idiopathic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1980 ; 23 : 569-573.
- 12) Girling DJ : The hepatic toxicity of anti-tubercular regimens containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. *Tubercle.* 1978 ; 59 : 13-32.
- 13) Ellard GA, Gammon PT : Acetylator phenotyping of tuberculosis patients using matrix isoniazid or sulfadimidine and its prognostic significance for treatment with several intermittent isoniazid-containing regimens. *Br J Clin Pharmacol.* 1977 ; 4 : 5-14.
- 14) Gronhage-Riska C, Helstrom PE, Froseth B : Pre-disposing factors in hepatitis induced by isoniazid-rifampin treatment of tuberculosis. *Am Rev Dis.* 1978 ; 118 : 461-466.
- 15) Kutt H, Brennan R, Deheija H, et al. : Diphenylhydantoin intoxication. A complication of isoniazid therapy. *Am Rev Res Dis.* 1970 ; 101 : 377-384.
- 16) Mitchell JR, Thorgeirsson UP, Black M, et al. : Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators : possible relation to hydrazine metabolites. *Clin Pharmacol Ther.* 1975 ; 18 : 70-79.
- 17) Kohno H, Kubo H, Furukawa K, et al. : Fluorometric determination of isoniazid and its metabolites in urine by high performance liquid chromatography using in-line derivatization. *Ther Drug Monit.* 1991 ; 13 : 428-432.
- 18) Wilkinson L. SYSTAT : The System for Statistics. SYSTAT Inc. Evanston. IL. 1992.
- 19) Evans DAP : Acetylation. In Kallow W, Goedde HW and Agarwal DP (Eds), : Ethnic differences in reactions to drugs and xenobiotics. Alan R. Liss. Inc. New York. 1986 ; pp 209-242.
- 20) Cartwright RA, Glasham RW, Rogers, et al. : Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis : A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet.* 1982 ; 2 : 842-846.
- 21) Kallow W, Tang BK, Kader D, et al. : A method for studying drug metabolism in populations : Racial differences in amobarbital metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 1979 ; 26 : 766-776.
- 22) Jackson PR, Tucker GT, Woods HF : Testing for bimodality in frequency distributions of data suggesting polymorphism of drug metabolism—histograms and probit plots. *Br J Clin Pharmacol.* 1989 ; 28 : 647-653.
- 23) 日本結核病学会治療専門委員会 : 肺結核化学療法の期間に関する見解, *結核.* 1980 ; 55 : 189.
- 24) Hein DW, Weber WW : Metabolism of procainamide, hydralazine, and isoniazid in relation to autoimmune (-like) reactions. "Autoimmunity and Toxicology". Kam-müller ME, Bloksma N, and Seinen W (Eds). Elsevier Science Publishers B. V. 1989 ; pp240-265.
- 25) Ohgaki H, Takayama S, Sugimura T : "Mutagens in Food : Detection and prevention". Hayatsu H (Eds). CRC Press. Boca Raton FL. 1990 ; pp219.
- 26) Finney DJ : Probit analysis. 3rd Ed. University Press. Cambridge. London. 1971.
- 27) 佐久間昭 : 薬効評価—計画と解析 I, 第1版, 東京大学出版部, 東京, 1977, 340-343.