

Isoniazid (INH) 耐性の機構

(第1報) INH 耐性株による INH の分解

戸 井 田 一 郎

結核予防会結核研究所生化学研究室 (所長 限部英雄)

受付 昭和34年2月6日

I 序 言

Isoniazid (INH) はもつとも優秀な抗結核剤であるが、この INH による結核治療にさいしても、菌の耐性化という現象から免れることはできない。Mycobacteria の INH に対する耐性は、耐性株の毒力が減弱すること、感性復帰がしばしばみられることなどの点で、Streptomycin などに対する耐性とは臨床的意義を異にするかもしれないが、これらの点についてはなお多くの異論もあり、いずれにせよ耐性の出現そのものを防止することがもつとも望ましいことであろう。そのためには、菌の薬剤耐性の機構を明らかにしなければならない。Davis¹⁾は薬剤耐性の機構として、

① 代謝経路に変化がおこり、薬物によつて阻害される反応を通過しなくてもすむような側路が形成される。

② 薬物によつて阻害される酵素が、今までより大量に生産されるようになる。

③ 薬物と拮抗的に作用する物質の量が増大する。

④ 薬物によつて阻害をうける代謝系の反応生成物をあまり必要としないようになる。

⑤ 薬物の破壊が盛んになる。あるいは薬物が生体内で活性化されてから効力を発揮するような場合、その活性化が阻害される。

⑥ 薬物が代謝拮抗物質として阻害作用を示す場合、薬物との親和性が減少した、あるいは基質との親和性が増大した、新しい酵素が形成される。

⑦ 薬物に対する細胞、あるいは細胞内単位の透過性が減少する、あるいは薬剤の通過を妨害するような物質と透過機構との親和性が増大する。の諸項目をあげている。

INH に対する Mycobacteria の耐性獲得の機構については、庄司²⁾³⁾、Barclay ら⁴⁾は⑦の機構を思わせる事実を示しているが、これらの業績によつて INH 耐性の機構が最終的に明らかにされたとはいえない。

また⑤の機構の存在を思わせる報告²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾もあるが、いずれも予報的なものに止まっている。

われわれもこの問題について検討を行つてきたが、実験¹⁾で示すように、Mycobacteria が INH を分解

すること、耐性株ではこの INH 分解能力が著明に増大していることを見出し、この現象について種々の検討を行つた。ここに若干の知見を報告する。

II 材料および実験方法

① 菌株および培養方法

Mycob. 607 と Mycob. avium AVT とを用いた。M. 607 は東大応用微研より、M. AVT は都立家畜衛研より分与され 1% 小川培地に継代保存したものを、実験にききだつて Sauton 培地に十分馴らしてから使用した。耐性株としては、これら原株を INH 100 γ/ml 添加 Sauton 培地に継代し、感性株が Sauton 培地に発育するのと全く同等の発育を示すようになったものを用いた。培養は、感性株は Sauton 培地に、耐性株は INH 100 γ/ml 添加 Sauton 培地に、それぞれ 38°C で 4 日間表面静置培養し、収獲、水洗ののち、常法に従つて acetone 乾燥粉末に調製し、実験にさいして水浮游液として使用した。実験結果①のほかは M. AVT をもつばら用いた。

② Hydrazine 定量法

被検液をそのまま、あるいは適当に稀釈して、その 2.0 ml をとり、p-dimethylaminobenzaldehyde 試薬 (p-dimethylaminobenzaldehyde 500.0 mg を約 12 ml の氷醋酸にとかし、4.0 ml の 70% perchloric acid を加え、さらに氷醋酸を加えて 25.0 ml にする。当日調製の 2.0 ml を加え、2 分以後 5 分以内に Beckman 型分光光度計で 457 $m\mu$ における吸光度を測定し、Hydrazine hydrat ($H_2N-NH_2 \cdot H_2O$) を用いて作つた標準曲線より被検液の Hydrazine 濃度を算出する。以下の実験のさいに被検液中に存在すると考えられる濃度の範囲では、INH および Isonicotinic acid (INA) は、この定量を妨害しない。この方法は Freier⁷⁾らの変法である。

③ INH 分解能力の測定

M/15 phosphate buffer (pH 6.8) 2.0 ml, acetone 乾燥粉末 (20 mg/ml) 水浮游液 1.0 ml を Thumberg 管主管にいれ、INH 1,000 γ/ml 水溶液 1.0 ml を Thumberg 側管にいれ、rotary pomp で真空にし、38°C で 15 分間 preincubate したのち側管内容を主管に加

え、さらに 38°C で 30 分間 incubate, 1.0 ml の colloidal iron を入れた遠沈管に反応液をあけ、飽和 CuSO₄ 水溶液 1 滴を加えて 10 秒間振盪, 1,500 r.p.m. 3 分間遠沈, この上澄について上述の方法で Hydrazine を定量する。盲検として I NH の代りに水を加えた以外は全く同様に操作したものの値を差引く。この値をもつて acetone 乾燥粉末の I NH 分解能力を表現する。

III 実験結果

① Mycobacteria による I NH の分解

M. 607 および M. AVT の感性株および耐性株から調製した acetone 乾燥粉末水浮游液と I NH とを incubate したときの Hydrazine 生成を表 1 に示す。I NH のみを incubate した場合には Hydrazine 生成はほとんど認められず, acetone 乾燥粉末とともに incubate すると Hydrazine が認められるが, このさい M. 607, M. AVT ともに耐性株では感性株の 10 倍以上も I NH 分解能力が増強しているのが認められる。

表 1 Mycobacteria による I NH の分解

Thumberg 管番号	反応系成分		吸光度		生成 Hydrazine mM/l × 10 ³
	主	側管	測定 値	補正 値	
1	Buffer + 水	水	0.0000		
2	Buffer + 水	INH	0.0186	0.0186	1.80
3	Buffer + 607-S	水	0.0048		
4	Buffer + 637-S	INH	0.0757	0.0709	6.86
5	Buffer + 607-R	水	0.0119		
6	Buffer + 607-R	INH	0.8182	0.8063	78.02
7	Buffer+AVT-S	水	0.0066		
8	Buffer+AVT-S	INH	0.1169	0.1103	10.67
9	Buffer+AVT-R	水	0.0123		
10	Buffer+AVT-R	INH	1.2218	1.2095	117.02

② 加熱による影響

M. AVT 耐性株 acetone 乾燥粉末の I NH 分解能力は, これをあらかじめ加熱することによって容易に失われる (表 2)。このことは以下に示す諸性質とともに, 耐性株の I NH 分解能力が酵素作用によることを考えさせる。

表 2 加熱による I NH 分解能力の消失

加熱条件		生成 Hydrazine mM/l × 10 ³		加熱処理による I NH 分解能力消失率
温度	時間	実験①	実験②	
加熱せず	—	88.71	79.17	0
60°C	5分	11.90	—	86.6 %
100°C	1分	17.74	—	80.0 %
100°C	5分	—	2.32	97.1 %

③ 反応条件の変化による影響

① 反応温度: (表 3)

② Buffer および至適 pH: (図 1) borate buffer の阻害については続報で検討する。

③ 時間の経過: (図 2)

④ I NH 濃度: (図 3)

⑤ acetone 乾燥粉末の量: (図 4)

⑥ 酸素の有無: (表 4) すなわち, Hydrazine 生成は有酸素状態では真空中におけるよりもはるかに少ない。これは酸素の存在下では, 生成された Hydrazine が Mycobacteria により酸化的に代謝されて消費されるためと考えられる。この問題は窒素同化の問題とも関連して興味深い問題であり⁸⁾, 別の機会に検討したい。

⑦ 他の抗結核剤の影響: (表 5) 各抗結核剤はいずれも 200 γ/ml の終末濃度になるように, preincubation に先立って Thumberg 管主管に加えておく。PAS および Sulfisoxazole は p-dimethylaminobenzaldehyde 試薬によって黄色に呈色し Hydrazine 定量を妨げるので実験できなかつた。Streptomycin, Kanamycin, Viomycin は Hydrazine 生成を促進しているようにみえるが, これについては, acetone 乾燥粉末によって Hydra-

表 3 反応温度

反応温度	生成 Hydrazine mM/l × 10 ³
4°C	79.17
15°C	7.82
40°C	3.78
60°C	0.00

表 4 酸素の有無

実験条件	生成 Hydrazine mM/l × 10 ³		
	実験①	実験②	実験③
真 空 中	97.32	103.74	85.53
空 気 中	61.77	63.90	53.65
空気中/真空中 × 100	63.5%	60.1%	62.7%

表 5 抗結核剤の影響

抗結核剤	生成 Hydrazine mM/l × 10 ³			対照を100とした ときの比率 (平均)
	実験①	実験②	実験③	
なし (対照)	87.72	83.35	82.66	100.0
Streptomycin	110.67	101.19		123.8
Viomycin			128.65	155.6
Kanamycin			138.63	167.7
Pyrazinamide	91.63		84.53	104.4
T B ₁			86.15	102.3

注: この実験では INH 終末濃度 200 γ/ml

図1 Buffer および pH

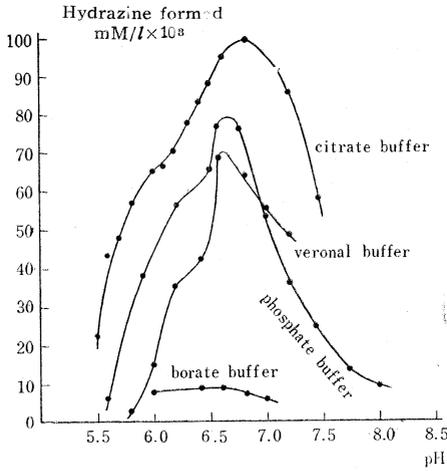


図2 時間の経過

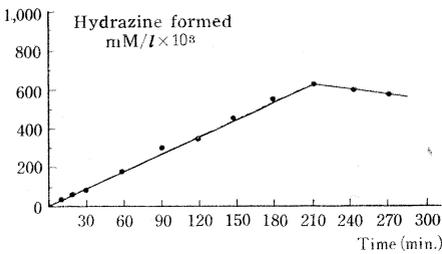


図3 I NH 濃度

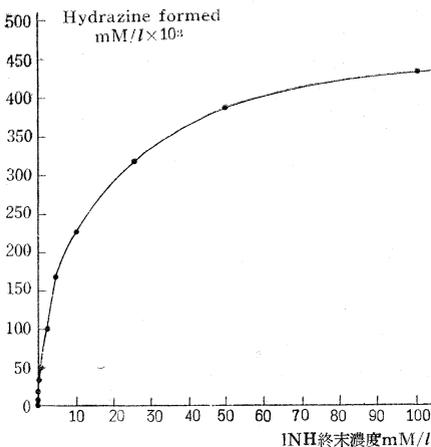
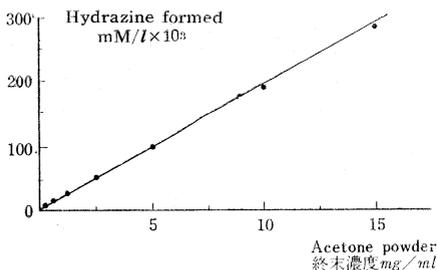


図4 Acetone powder の量



zine が代謝されるのを阻害するための、みかけの促進と考へており、前項で述べた Hydrazine 代謝と関連して検討する予定である。

④ I NH 誘導体の分解

I NH の副作用を少なくする、あるいは有効血中濃度を長く持続させるなどの目的で、各種の I NH 誘導体が市販されている。これらはすべて I NH と交叉耐性を示すことが知られているが、このことは I NH に対する耐性と誘導体に対する耐性とが共通の機構によることを考えさせる。したがつてもし I NH 誘導体があるままの形で抗結核作用をもつものならば、I NH 耐性株はこれら誘導体をも分解するだろうとの予想のもとに、I NH 耐性株と誘導体とを incubate し Hydrazine 生成量を定量した。

誘導体としては市販のネオイスコチン、ピボナイブレン、ヒドロソンのほか、I NH の生体内代謝産物である acetyl-I NH⁹⁾、glucose-I NH⁹⁾ および Diisonicotinoyl-hydrazone¹⁰⁾ を合成して使用した。誘導体はすべて I NH 1,000 γ/ml と等モルになるように水溶液にして用いた。表 6 に示すように、ネオイスコチン、ピボナイブレンでは I NH よりは著明に少ないが一定の Hydrazine 生成を認め、他の誘導体ではほとんど Hydrazine 生成を認めなかつた。堂野前¹¹⁾ は、市販の誘導体はそのままの形で抗結核作用をもたず、生体内で I NH に分解されてはじめて抗結核作用を示すことを証明しているが、われわれの実験結果も間接的にこの結論を支持すると思われる。

表 6 I NH 誘導体の分解

I NH 誘導体	生成 Hydrazine mM/l x 10 ³
I NH	119.58
ネオイスコチン	27.81
ヒドロソン	2.33
ピボナイブレン	10.07
Acetyl-I NH	1.80
Glucose-I NH	2.07
Diisonicotinoylhydrazone	1.19

IV 考 案

I NH は Mycobacteria の種々の酵素系を阻害するが、現在までに知られたかぎりでは、この阻害は無細胞抽出酵素系を用いた実験では、感性株でも耐性株でもほぼ同程度にみられ、したがつてさきに述べた Davis の①の機構によつては I NH 耐性は説明できない^{2) 3)}。Barclay ら⁴⁾ は carboxyl 基の C を labell した ¹⁴C-I NH と菌とを incubate した場合、感性株では菌体内に ¹⁴C が蓄積するのに対し、耐性株では蓄積しないことを報告している。庄司^{2) 3)}、堀¹²⁾ は、それ自

体抗菌力をもたぬ *o*-oxybenzaldehyde hydrazone が共存すると、耐性菌の発育が耐性表示濃度以下の I NH で阻害されることを示し、耐性株では I NH に阻害される酵素系にまで I NH が到達できないように保護機構ができていて、この保護機構が *o*-oxybenzaldehyde hydrazone で乱されて I NH が再び菌体内に浸入できることを推論している。しかし、これらの業績では、何故に I NH が耐性菌体内に浸入できないかの理由、あるいはいわゆる保護機構は実体的に明らかにされていず、それゆえに I NH 耐性の機構を最終的に明らかにしたとはいえない。

一方、I NH はかなり不安定な化合物であつて、培養中、滅菌操作中、保存中に分解することが知られている^{15) 14)}。また、酵素による分解についても、Porcellati^{15) 16)} は肝その他の臓器による分解、桜田¹⁷⁾ は酵母による分解、Garattini⁶⁾ は *E. coli* およびパラ結核菌による分解を証明している。そして、このような酵素的分解が *Mycobacteria* の I NH に対する耐性の機構に関連しているのではないかという仮説も多くの人々によつて追及されている^{2) 3) 5) 6)}。しかし、これらの報告はいずれも肯定的ではありながら、定性的、予報的な報告に止まっている。

われわれは、*Mycob. 607* と *Mycob. AVT* を用い、Hydrazine を定量することにより、これらの菌が I NH を分解すること、この作用は酵素によると考えられること、耐性株では I NH 分解能力が感性株の10倍以上にもなることを定量的に示すことができた。I NH 分解反応の様式、酵素の抽出精製、精製酵素の諸性状、I NH 分解酵素生産の機構などについては続いて報告する。

Barclay⁴⁾ が ¹⁴C-I NH を用いて示した事実は、I NH の浸入を妨げる機構が耐性株に生じたと考えなくとも、われわれのここに示した機構によつて十分説明できる。すなわち、Barclay⁴⁾ が自身を示しているように、carboxyl 基のCを labell した ¹⁴C-I NA では感性株にも耐性株にも浸入せず、両菌株ともに ¹⁴C の蓄積はみられないのであるから（このことは I NH と I NA の溶解性の差によるものだろう）、耐性株が ¹⁴C-I NH を Hydrazine と ¹⁴C-I NA とに分解するとすれば、耐性株の透過機構が感性株のそれと違つていなくとも、感性株では ¹⁴C が蓄積し耐性株では蓄積しないことになるからである。

V 結 論

- 1) *Mycob. 607*, *Mycob. AVT* は I NH を分解して Hydrazine を遊離させる。この作用は酵素によると考えられる。
- 2) I NH 分解能力は耐性株では感性株の10倍以上も増強している。
- 3) I NH 分解反応の反応条件を検討した。
- 4) I NH 誘導体は I NH と交叉耐性を示すにもかかわらず、I NH 耐性株による Hydrazine 生成は非常に少なく、これら誘導体は一たん I NH に分解してはじめて抗結核作用を示すと考えられる。

最後に隈部先生の御指導と御校閲を感謝いたします。湯沢先生、大沢先生の御指導と生化学研究室の皆さんの御助力を感謝いたします。

文 献

- 1) Davis, B.D. : Drug resistance in microorganisms' p. 165, 1957.
- 2) 庄司宏 : 日本臨牀結核, 16 : 567, 昭32.
- 3) 庄司宏 : 結核, 32 (増刊号) : 95, 昭32.
- 4) Barclay, W.R. et al. : Am. Rev. Tub., 70 : 784, 1954.
- 5) Garattini, S. : Atti soc. lombarda sci. med. e biol., 8 : 109, 1953.
- 6) Youmans, A.S. et al. : Am. Rev. Tub., 72 : 196, 1955.
- 7) Freier, F. et al. : Z. anal. Chem., 149 : 177, 1956. (Chem. Abst. 7664 d (1956) より引用)
- 8) 鈴木旺 他 : 酵素化学シンポジウム, —8, 74, 昭28.
- 9) 阿部政次 : 抗酸菌病研究雑誌, 11 : 231, 昭30.
- 10) Albert, A. et al. : Biochem. J., 61 : 128, 1955.
- 11) 堂野前維摩郷 : 日本医事新報, —1967, 3, 昭31.
- 12) 堀三津夫 : 第 33 回日本結核病学会総会特別講演, 昭33.
- 13) Lewin, E. et al. : Am. Rev. Tub., 71 : 732, 1955.
- 14) 勝沼六郎 : 結核研究の進歩, —1, 51, 昭28.
- 15) Porcellati, G. et al. : Enzymologia, 17 : 47, 1954.
- 16) Porcellati, G. et al. : Boll. soc. ital. biol. sper., 29 : 269, 1953.
- 17) 桜田知己 : 生化学, 29 : 693, 昭32.