

# 抗酸菌に対する Isoniazid の作用機作および 抗酸菌の Isoniazid 耐性機構

## 第3報 Isoniazid 感性および人工耐性人型結核菌と非定型 抗酸菌に取り込まれた $^{14}\text{C}$ -isoniazid の菌体内分布

江 田 亨

東京大学医学部細菌学教室 (主任 秋葉朝一郎教授)

受付 昭和 38 年 2 月 5 日

前報<sup>1)2)</sup>において、isoniazid (以下 INH) 人工耐性および自然耐性ヒト型結核菌と、非定型抗酸菌は、INH 感性ヒト型結核菌に比べて、 $^{14}\text{C}$ -INH の取り込みが少なく、しかも  $^{14}\text{C}$ -INH の取り込みは、菌の INH 耐性度と相関があり、INH 人工および自然耐性ヒト型結核菌と、非定型抗酸菌の INH 耐性機構は、菌の INH に対する透過性の低下が主なものであろうと推論した。

前報<sup>1)</sup>の実験条件では、菌と INH との関係だけをみるため、磷酸緩衝液中において菌と  $^{14}\text{C}$ -INH を接触させたが、菌が増殖過程にあるとき、 $^{14}\text{C}$ -INH と接触すると、どのような態度をとるか検討する必要がある。今回はこの点と、さらに菌体内に取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -INH が、どのような運命をたどるかを追求し、これにより INH の作用機作および INH に対する耐性機構を解明しようと試みた。

### 実験材料

#### 1) 使用培地

前報<sup>1)</sup>と同様に、Tween 80 加合成培地 (TSM 培地) を使用した。

#### 2) $^{14}\text{C}$ -INH

前報<sup>1)</sup>と同様、第一化学薬品製のものであるが、 $^{14}\text{C}$  の位置は carbonyl 基に入つていて、今回使用した  $^{14}\text{C}$ -INH の specific activity は、 $1.29 \text{ mc/m}\cdot\text{mol}$  である。

#### 3) 使用菌株

前報<sup>1)2)</sup>と同様ヒト型結核菌 H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> (INH 感性株) および同 INH 人工耐性株 H<sub>37</sub>R<sub>V</sub>RINH (50  $\gamma$ /ml 以上耐性) を用いた。非定型抗酸菌は上田株を使用した。この株は前報<sup>2)</sup>で使用した株と異なり、1%小川培地に継代中、変異を起こしたと考えられ、R型を示し、しかも

INH 耐性は 10  $\gamma$ /ml であつた。この株は TSM 培地上ヒト型結核菌とほとんど同程度の発育態度を示した。

### 実験方法

#### 1) 全菌体の $^{14}\text{C}$ -INH 取り込み実験

前記ヒト型結核菌 2 株および非定型抗酸菌上田株の TSM 培地約 2 週間培養 4 ml を、7 本の容量 500 ml の三角コルベンに入れた TSM 培地 200 ml に接種し 10 日間 37°C に培養した。この培養に、 $^{14}\text{C}$ -INH を終末濃度が 2  $\gamma$ /ml または 4  $\gamma$ /ml になるように無菌的に加え、さらに 7 日間 37°C に培養した。この  $^{14}\text{C}$ -INH を加えた培養を遠心沈澱により上清と菌体とに分け、菌体を 100 ml の 0.2% Tween 80 加生理的食塩水をもつて、上清に count を認めなくなるまで 5 回洗浄した。この洗浄菌体の一部を、ガラス玉を入れた試験管内で手振法により均等化し、その一定量 (約 2~3 mg 乾燥菌量) を試料皿に取り、乾燥後 gas flow counter を用いて、菌体の radioactivity を測定し、乾燥菌量 mg 当りの ] cpm (counts per minute) で表わした。

#### 2) 無細胞抽出液中への $^{14}\text{C}$ -INH の incorporation の測定

前記 3 株の洗浄菌体を 6~8 ml の蒸溜水に浮遊させ、超音波で約 10 分菌体を破壊し、10,000 rpm、20 分遠沈し、菌体を除いた。この遠心沈澱上清を無細胞抽出液とした。この無細胞抽出液について Lowry<sup>3)</sup> の方法により蛋白を定量した。さらにこの無細胞抽出液の一定量を試料皿に取り、その radioactivity を gas flow counter を用いて測定し、蛋白量 1 mg 当りの cpm で表わした。

#### 3) 無細胞抽出液の三塩化醋酸 (TCA) 分画法および

<sup>14</sup>C-INH の incorporation の測定

前記3株の無細胞抽出液を、Schneider<sup>4)</sup>の変法によりTCA分画を行なった。すなわち無細胞抽出液2.5mlに氷冷した10% TCA 7.5mlを加え、1時間氷室に放置したのち、3,000 rpm 15分で遠沈し、上清と沈澱部に分け、上清を酸溶性分画とし、沈澱部を酸不溶性分画とした。酸溶性分画は、そのまま一定量を不銹鋼試料皿に取り、gas flow counterでradioactivityを測定し、原試料無細胞抽出液中の蛋白量mg当りのcpmで表わした。酸不溶性分画はさらに10% TCA 2.5mlで2回洗浄し、1N KOHを加えて溶解し、その一定量を不銹鋼試料皿に取り、gas flow counterでradioactivityを測定し、原試料無細胞抽出液中の蛋白量mg当りのcpmで表わした。

## 実験結果

1) INH 感性ヒト型結核菌に取り込まれた<sup>14</sup>C-INHの菌体内分布

ヒト型菌 H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> の TSM 培地 10 日培養に、<sup>14</sup>C-INH を 2γ/ml になるように加え、さらに7日間培養したあとの全菌体、その無細胞抽出液、酸溶性分画、および酸不溶性分画への<sup>14</sup>C-INHのincorporationを検討した結果を表1に示した。全菌体では458cpm/mg dry weight、

Table 1. Distribution of <sup>14</sup>C-Isoniazid Incorporated into Cells of the Isoniazid-Sensitive H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> Strain of Mycobacterium Tuberculosis

Resistance to isoniazid γ/ml	Incorporation of <sup>14</sup> C-isoniazid into cells		Distribution of <sup>14</sup> C-isoniazid in various fractions	
	Whole cells cpm/mg dry weight	Cell-free extract cpm/mg protein	Acid-soluble fraction cpm/mg protein	Acid-insoluble fraction cpm/mg protein
<0.05	458	671	469 (73.6%)	168 (26.4%)

Cells cultured for ten days were exposed to 2γ/ml of <sup>14</sup>C-isoniazid for seven days at 37°C.

その無細胞抽出液では671cpm/mg protein、さらに酸溶性分画では469cpm/mg protein、酸不溶性分画では168cpm/mg proteinであった。

無細胞抽出液内の酸溶性分画および酸不溶性分画への<sup>14</sup>C-INHのincorporationの割合は、前者に73.6%、後者に26.4%で、菌体内の<sup>14</sup>C-INHの大部分は酸溶性分画に見出された。

2) INH 人工耐性ヒト型結核菌に取り込まれた<sup>14</sup>C-INHの菌体内分布

ヒト型菌 H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> の人工 INH 耐性株の TSM 培地 10 日培養に、<sup>14</sup>C-INH を 2γ/ml になるように加え、さらに7日間培養したあとの全菌体、無細胞抽出液、酸溶性

Table 2. Distribution of <sup>14</sup>C-Isoniazid Incorporated into Cells of the Isoniazid-Resistant H<sub>37</sub>R<sub>V</sub>RINH Strain of Mycobacterium Tuberculosis

Resistance to isoniazid γ/ml	Incorporation of <sup>14</sup> C-isoniazid into cells		Distribution of <sup>14</sup> C-isoniazid in various fractions	
	Whole cells cpm/mg dry weight	Cell-free extract cpm/mg protein	Acid-soluble fraction cpm/mg protein	Acid-insoluble fraction cpm/mg protein
>50	65	53	36 (76.6%)	11 (23.4%)

Cells cultured for ten days were exposed to 2γ/ml of <sup>14</sup>C-isoniazid for seven days at 37°C.

分画および酸不溶性分画への<sup>14</sup>C-INHのincorporationを表2に示した。

全菌体では65cpm/mg dry weight、無細胞抽出液では53cpm/mg proteinであり、INH感性親株に比べて著明に少ない<sup>14</sup>C-INHのincorporationを示した。また酸溶性分画では36cpm/mg protein、酸不溶性分画には11cpm/mg proteinで、無細胞抽出液中の両分画へのincorporationの割合は、前者に76.6%、後者には23.4%で、INH感性親株同様、菌体内の<sup>14</sup>C-INHの大部分は酸溶性分画に認められた。

3) 非定型抗酸菌上田株に取り込まれた<sup>14</sup>C-INHの菌体内分布

非定型抗酸菌上田株の TSM 培地 10 日培養に、<sup>14</sup>C-INH を 4γ/ml になるように加え、さらに7日間培養後の全菌体、無細胞抽出液、酸溶性分画、酸不溶性分画への<sup>14</sup>C-INHのincorporationを検討した結果を表3に示した。全菌体では187cpm/mg dry weight、無細胞抽出液では315cpm/mg protein、酸溶性分画では226cpm/mg protein、酸不溶性分画では47cpm/mg proteinとなり、無細胞抽出液中における<sup>14</sup>C-INHの酸溶性分画および酸不溶性分画へのincorporationの割合は、前者に82.4%、後者に17.6%で、ヒト型菌同様、菌体内の<sup>14</sup>C-INHの大部分は酸溶性分画に認められた。

Table 3. Distribution of <sup>14</sup>C-Isoniazid Incorporated into Cells of Atypical Mycobacterium Ueda Strain

Resistance to isoniazid γ/ml	Incorporation of <sup>14</sup> C-isoniazid into cells		Distribution of <sup>14</sup> C-isoniazid in various fractions	
	Whole cells cpm/mg dry weight	Cell-free extract cpm/mg protein	Acid-insoluble fraction cpm/mg protein	Acid-soluble fraction cpm/mg protein
10	187	315	226 (82.4%)	47 (17.6%)

Cells cultured for ten days were exposed to 4γ/ml of <sup>14</sup>C-isoniazid for seven days at 37°C.

## 考 察

前報<sup>1)</sup>に報告したように、INH 耐性のヒト型結核菌および非定型抗酸菌は、INH 感性ヒト型結核菌または非定型抗酸菌に比べて  $^{14}\text{C}$ -INH の菌体内への取り込みが少なく、しかも INH 耐性と  $^{14}\text{C}$ -INH の菌体内取り込みは平行関係にあると考えられると述べた。前報<sup>1)</sup>においては、この関係を非増殖過程において追求したのであるが、今回は増殖過程においても INH 耐性菌は感性菌に比べて  $^{14}\text{C}$ -INH の取り込みが少ないかを検討した。

TSM 培地でヒト型結核菌を培養すると、深部に発育し、約10日から14日で対数増殖期になり、この時期において代謝活性がもつとも旺盛となる。この時期の  $\text{H}_{37}\text{R}_v$  INH、上田株の培養に  $^{14}\text{C}$ -INH を  $2\text{r/ml}$  または  $4\text{r/ml}$  に加えると、菌はそのまま増殖を続け、濁度は増加する。また  $\text{H}_{37}\text{R}_v$  でも  $^{14}\text{C}$ -INH を  $2\text{r/ml}$  に加えると、耐性株に比べてその程度は劣るが濁度は増加する。著者は TSM 培地10日培養中に  $^{14}\text{C}$ -INH を加え、菌と  $^{14}\text{C}$ -INH を接触させた結果、ヒト型結核菌でも非定型抗酸菌上田株でも同様に、INH 耐性菌は感性株に比べて  $^{14}\text{C}$ -INH の取り込みが少ないことを認めた。すなわち増殖過程においても、INH 耐性菌は感性菌に比べて  $^{14}\text{C}$ -INH の取り込みが少ないことが分かった。

しかし、全菌体の  $^{14}\text{C}$ -INH の取り込みの大小を、菌体内への  $^{14}\text{C}$ -INH の incorporation の大小と同一に考えてよいか検討する必要がある。菌体全体の  $^{14}\text{C}$ -INH の取り込みは、cell wall に吸着された  $^{14}\text{C}$ -INH および実際に細胞質内に入った  $^{14}\text{C}$ -INH の総和として表現される。したがって、真に菌体内に取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -INH の量は、cell wall 等の表面構造に吸着された  $^{14}\text{C}$ -INH を除いたもの、換言すれば無細胞抽出液中の  $^{14}\text{C}$ -INH の量を比較すべきであると考えられる。著者は菌体内に取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -INH の量を、無細胞抽出液で検討した結果、全菌体と同様に INH 耐性菌では少なく、感性菌では多かつた。すなわち INH 耐性菌は、感性菌に比べてはるかに少ない  $^{14}\text{C}$ -INH を取り込むことが明らかになった。

さらに菌体内に取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -INH の行方を追求するために、無細胞抽出液について TCA 分画法を行なった。一般に TCA 分画法によれば、酸不溶性分画には lipid, protein, 核酸等が入り、酸溶性分画には多糖体、無機塩類、ATP, DPN 等の oligonucleotide, および pyridoxal 等の coenzyme が入る。 $^{14}\text{C}$ -INH を作用させた INH 感性および耐性ヒト型結核菌と、非定型抗酸菌の無細胞抽出液について TCA で分画すると、その radioactivity の大部分は3株ともに酸溶性分画に認められた。

すなわち INH 感性および耐性ヒト型結核菌と非定型抗酸菌との間に  $^{14}\text{C}$ -INH の菌体内分布の様式に大差はないものと考えられた。INH の作用機作が、酵素の阻害を主とし、それに substrate の analogue として結合するものであれば、菌体内に取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -INH は菌体内の蛋白に結合すると考えられる。もちろん INH と enzyme との結合は不安定なものと考えられるから、TCA 分画により遊離することも考慮しなければならないが、それにしても菌体内に取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -INH の大部分が、酸溶性分画に認められたこと、および統報において述べるように酸溶性分画中に free の INH はほとんど認められないことから、INH の作用点は特定酵素蛋白と結合してこれを不活化すると考えるより、むしろ酸溶性分画中にある必須物質、たとえばある種の coenzyme と結合してこれを不活化させることにあると考えられる。しかも INH 耐性菌と感性菌で同様な結果を得たことは、INH の作用点は INH 耐性および感性菌との間に相違がないことが考えられる。

Barclay<sup>6)</sup>らは、INH に接触した INH 感性ヒト型菌は一度分裂して、そこで発育が停止すると述べている。このことは INH が菌体代謝系に入つてもしばらくは菌体の代謝系がほぼ完全に作動し、INH がなんらかの代謝を受けてから、増殖に必要な代謝系が止まるということを表わしている。今回の著者の実験においては、発育しつつある菌体に7日間  $^{14}\text{C}$ -INH が接触したのであり、そこで菌体内代謝系に  $^{14}\text{C}$ -INH が入つたと思われるから、代謝系が止まつたときの終末産物の中に、 $^{14}\text{C}$ -INH が取り込まれていると思われ、それが酸溶性分画に集まっているものと考えられる。INH 耐性菌の場合でも、少ないながらもそこに  $^{14}\text{C}$ -INH が見出だされている。したがって INH の作用機作として、INH 感性菌においてはまず INH は細胞質膜を通過し細胞質に入る。その後、代謝系に入り、INH と結合した物質が菌の発育に必要な代謝を阻害するものではないかと考えられる。

INH 耐性菌では、まず細胞質膜の INH に対する透過性が低下し、細胞質内に INH が入りにくく、したがって代謝系の阻害が起こらないと考えられる。しかし耐性菌でも細胞質中の酸溶性分画に、少しではあるが  $^{14}\text{C}$ -INH の取り込みがみられるので、これが実際に代謝系に入つたものかあるいは free の INH として存在するものか検討する必要がある。また酸溶性分画に入つた  $^{14}\text{C}$ -INH が、さらに菌体内でどのような代謝を受けて、菌に作用するか追求する必要があり、この点に関しても検討したので、次の報告で述べることにしたい。

## 結 論

ヒト型結核菌  $\text{H}_{37}\text{R}_v$  および同人工 INH 耐性株と、

非定型抗酸菌上田株の Tween 80 加合成培地 10 日培養に  $^{14}\text{C}$ -INH を加え、さらに 7 日間  $37^\circ\text{C}$  に培養した菌体における  $^{14}\text{C}$ -INH の取り込み、および菌体の無細胞抽出液中への  $^{14}\text{C}$ -INH の incorporation を検討し、さらに無細胞抽出液の TCA 分画を行ない、菌体内に取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -INH の行方を追求して次の結果を得た。

1) ヒト型結核菌および非定型抗酸菌において、増殖過程においても、INH 耐性菌は同感性菌に比べて  $^{14}\text{C}$ -INH の取り込みが少なかった。

2) 前記 3 株の無細胞抽出液においても、INH 耐性菌は同感性菌に比べて  $^{14}\text{C}$ -INH の incorporation が少なかった。

3) 前記 3 株の無細胞抽出液について、TCA 分画を行ない各分画の radioactivity をみると、INH 感性菌および耐性菌ともに、取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -INH の大部分は酸溶性分画に認められた。

4) 以上の成績より、ヒト型結核菌および非定型抗酸菌において、INH 耐性菌は  $^{14}\text{C}$ -INH を菌体内に取り込まず、INH 耐性機構は菌の INH に対する透過性の低下が主なものと思われ、また INH の作用点は coenzyme

に関係があると推定された。

本論文の要旨は、昭和 37 年 4 月 第 37 回日本結核病学会総会(京都)において発表した。

稿を終るにのぞみ、終始ご指導下さいました秋葉朝一郎教授ならびに当教室の横田健博士、高橋昭三博士に心から感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 江田亨：結核，38：37，昭 38.
- 2) 江田亨：結核，38：107，昭 38.
- 3) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fan, A.C., and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
- 4) Schneider, W.C.: J. Biol. Chem., 161: 293, 1945.
- 5) Barclay, W.R., Ebert, R.H., and Koch-Weser, D.: Amer. Rev. Tuberc., 67: 490, 1953.

#### Studies on the Action of Isoniazid to Tubercle Bacilli and the Mechanism of the Isoniazid-Resistance in Mycobacteria. III.

The author reported in previous papers that the isoniazid-resistant strains of tubercle bacilli or of atypical mycobacteria incorporated less amount of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid than the isoniazid-sensitive strains, in non-growing but actively metabolizing state.

This paper deals with the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid into the isoniazid-resistant and isoniazid-sensitive strains of mycobacteria at the growing phase, and the investigation of the metabolism of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid in these microbes.

When the isoniazid-sensitive strain of *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> was grown in the Tween 80 synthetic medium not containing isoniazid for 10 days at  $37^\circ\text{C}$ , followed by further cultivation in the same medium containing 2 mcg/ml of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid for 7 days at  $37^\circ\text{C}$ , more than 10 times amount of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid was incorporated into the

cells, as compared with the case when the isoniazid-resistant strains were cultured with the same procedure. Contents of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid in the cell-free extract of isoniazid-sensitive strain was also much higher than that of isoniazid-resistant ones, as in the case of whole cells.

When these cell-free extracts were fractionated with trichloroacetic acid, almost all radioactivity of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid was found in the acid-soluble fraction rather than in the acid-insoluble fraction.

From these results, it is suggested that the action of isoniazid to sensitive mycobacteria is the inhibition of biochemical activity of acid-soluble substance, probably of a coenzyme, rather than the inactivation of active site of an enzyme, and that the mechanism of the isoniazid-resistance depends on smaller incorporation of isoniazid by the resistant strains, probably due to the decreased permeability of cell-surface (cytoplasmic membrane) against isoniazid.