

# 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2報 患者分離人型結核菌および非定型 抗酸菌の $^{14}\text{C}$ -isoniazid の取り込み

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 37 年 10 月 17 日

前報<sup>1)</sup>において、ヒト型結核菌人工 isoniazid (以下 INH) 耐性株は、INH 感性親株に比べて明らかに少ない  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake を示し、また INH 感性株では菌の発育令の若い時期および菌の代謝活性の旺盛な時期に  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake が多いことを述べた。そしてヒト型結核菌の INH 耐性機構は、おそらく耐性菌の INH に対する選択的透過性の低下によるものと考えられることを述べた。

薬剤耐性機構について、とくに腸内細菌の多剤耐性の機構にあつては、人工耐性菌と自然耐性菌との間に相違があるという当教室の横田らの報告<sup>2)</sup>がある。ヒト型結核菌の INH 耐性においても、そのような相違点があるかどうか検討するため、患者分離のヒト型結核菌について、前報告<sup>1)</sup>と同様に INH 耐性と  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake との関係を追求め、さらに菌の Catalase 活性との関係を検討した。また非定型抗酸菌についても同様に菌の  $^{14}\text{C}$ -INH に対する態度を検討したが、自然分離ヒト型結核菌および非定型抗酸菌についても、菌の INH 耐性と  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake に相関がみられたのでここに報告する。

### 実験材料

#### 1) 使用培地

前報告<sup>1)</sup>と同様、Tween 80 加合成培地 (TSM 培地) を用いた。

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

前報告<sup>1)</sup>と同様のものを用いた。

#### 3) 使用菌株

肺結核患者の喀痰より新しく分離したヒト型結核菌 5 株および教室保存ヒト型結核菌 3 株と、教室保存非定型抗酸菌 scotochromogen 4 株、non-photochromogen 2

株、計 6 株を用いた。

これらの菌株は、2週に1度 TSM 培地に継代して用いた。TSM 培地におけるこれらの菌株の発育はほぼ均等な発育をし、ヒト型菌では H<sub>37</sub>Rv とほとんど同程度の発育を示し、非定型抗酸菌では菌株により多少発育速度に差がみられ、概して発育は速いようであつた。

### 実験方法

#### 1) INH 感受性の測定

通常の 1% 小川培地を用いる方法によつた。

用いた薬剤の希釈段階は 0.05, 0.1, 1, 10, 50, 100  $\gamma/ml$  であり、各菌株の INH 耐性は表 1, 表 2 に示したとおりである。

#### 2) Catalase 活性の測定

1% 小川培地に発育した菌に 30% 過酸化水素水と 10% Tween 80 加 albumin 液の等量混合液を滴下し、3分以内に持続的発泡を認めた場合に陽性とし、それ以外を陰性と判定した。

#### 3) 菌による $^{14}\text{C}$ -INH の uptake の測定

前報告<sup>1)</sup>と同様の方法で行なつた。すなわち、上記患者分離ヒト型結核菌および非定型抗酸菌を 200 ml の TSM 培地に接種し、2週間培養後無菌的に遠沈して集菌し、菌体を pH 7.0 の磷酸緩衝液で 3 回洗浄した。この洗浄菌体を 100 ml の磷酸緩衝液 (pH 7.0) に浮遊し、光電比濁計を用いて濁度を一定にし、さらに  $^{14}\text{C}$ -INH を終末濃度が 1  $\gamma/ml$  または 5  $\gamma/ml$  になるように加えた。この  $^{14}\text{C}$ -INH を加えた菌浮遊液を 37°C に 24 時間放置し、60°C 30 分加熱滅菌後、遠沈により菌体を集め、0.2% Tween 80 加生理的食塩水で 5 回洗浄し、菌体の一定量を試料皿に取り、菌体の radioactivity を gas flow counter にて測定して、乾燥菌量 mg 当りの cpm

(counts per minute) で表わした。

### 実験結果

1) 新分離ヒト型結核菌の  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake および、 $^{14}\text{C}$ -INH-uptake と catalase 活性との関係

新分離ヒト型結核菌5株および教室保存ヒト型結核菌3株の TSM 培地2週培養菌、菌体燐酸緩衝浮遊液に、 $^{14}\text{C}$ -INH を  $1\text{r/ml}$  または  $5\text{r/ml}$  に加え、 $37^\circ\text{C}$  24時間  $^{14}\text{C}$ -INH を接触させたのちの  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake の成績および各菌株の catalase 活性と INH 感受性とを表1に示した。新分離ヒト型結核菌においても、INH 耐性菌

は INH 感性菌に比べて  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake が少なかった。 $^{14}\text{C}$ -INH-uptake と catalase 活性との関係を見ると、catalase 陽性菌では  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake が多く、同陰性菌では少ないことが分かった。

2) 非定型抗酸菌の  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake および  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake と catalase 活性との関係

非定型抗酸菌のうち non-photochromogen 2株, scotochromogen 4株について、TSM 培地2週培養菌の燐酸緩衝浮遊液に  $^{14}\text{C}$ -INH を  $5\text{r/ml}$  に加え、 $37^\circ\text{C}$  24時間接触させたのちの菌体の示す count を測定し、それと INH 感受性および catalase 活性との関係を対比した

Table 1. The Catalase-Activities and the Capacities to Incorporate  $^{14}\text{C}$ -Isoniazid at Resting State, of Isoniazid-Sensitive and Isoniazid-Resistant Strains of Tubercle Bacilli Isolated from the Sputa of Tuberculosis Patients

Name of strain	Sensitivity to isoniazid	Catalase activity	Uptake of $^{14}\text{C}$ -isoniazid	Remark
	mcg/ml		cpm/mg dry weight	
H <sub>37</sub> Rv	0.05 : Sensitive	+	228	Cells were exposed to 5 mcg/ml of $^{14}\text{C}$ -isoniazid in buffer at $37^\circ\text{C}$ for 24 hours.
H <sub>2</sub>	0.05 : Sensitive	+	258	
H <sub>37</sub> RvR INH	50 : Resistant	-	57	
Matsukawa	50 : Resistant	-	52	Cells were exposed to 1 mcg/ml of $^{14}\text{C}$ -isoniazid in buffer at $37^\circ\text{C}$ for 24 hours.
Tanaka	50 : Resistant	-	64	
H <sub>37</sub> Rv	0.05 : Sensitive	+	164	
Hayashi	0.1 : Sensitive	+	108	Cells were exposed to 1 mcg/ml of $^{14}\text{C}$ -isoniazid in buffer at $37^\circ\text{C}$ for 24 hours.
H <sub>37</sub> RvR INH	50 : Resistant	-	24	
Sawano	50 : Resistant	-	42	
Sato	50 : Resistant	-	38	

Table 2. The Catalase-Activities and the Capacities to Incorporate  $^{14}\text{C}$ -Isoniazid at Resting State, of Various Strains of Atypical Mycobacteria

Name of strain	Type of strain	Sensitivity to isoniazid	Catalase activity	Uptake of $^{14}\text{C}$ -isoniazid
		mcg/ml		cpm/mg dry weight
Ishii	Scotochromogen	1	+	221
Niikura	Non-photochromogen	1	+	175
Ookubo	Scotochromogen	10	+	82
Matsumoto	Scotochromogen	10	+	65
Watanabe	Scotochromogen	10	+	108
Ueda	Non-photochromogen	50	+	48

Two weeks cultured cells were exposed to 5 mcg/ml of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid in buffer at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hours.

結果を表2に示した。非定型抗酸菌においても、ヒト型菌の INH 感性菌に比べて、INH 耐性菌では  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake は少なかった。非定型抗酸菌中には、今回の実験においては catalase 陰性株は見出されなかつたので、菌の catalase 活性と  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake との関係を明らかにすることができなかつたが、catalase 陽性菌株でも INH 耐性が高ければ  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake は少なかった。

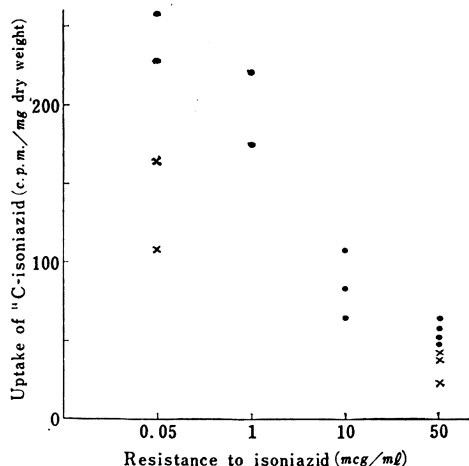
3) ヒト型結核菌および非定型抗酸菌の INH 耐性度と

$^{14}\text{C}$ -INH-uptake との関係

上記ヒト型結核菌8株および非定型抗酸菌6株の INH 耐性度と菌の  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake との関係を見ると、図1に示すごとくである。 $^{14}\text{C}$ -INH  $5\text{r/ml}$  および  $1\text{r/ml}$  接触群で、それぞれ菌の  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake と INH 耐性度にある程度の相関がみられた。

また  $^{14}\text{C}$ -INH の接触濃度と  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake との関係を見ると、INH 感性菌では  $^{14}\text{C}$ -INH  $5\text{r/ml}$  接触群

Fig 1. Interrelationships between the Amount of  $^{14}\text{C}$ -Isoniazid Incorporated and the Isoniazid-Sensitivity of Tubercle Bacilli and Atypical Mycobacteria



- : Cells were exposed to 5 mcg/ml of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid at 37°C for 24 hours.
- x: Cells were exposed to 1 mcg/ml of  $^{14}\text{C}$ -isoniazid at 37°C for 24 hours.

と 1  $\gamma$ /ml 接触群の間に著明な差がみられ、 $^{14}\text{C}$ -INH の濃度の上昇とともに  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake が多くなっているが、INH 耐性菌 (50  $\gamma$ /ml) ではそれほど明らかな差が認められなかつた。

### 考 察

前報告<sup>1)</sup>で述べたように、ヒト型結核菌の INH 人工耐性菌と INH 感性親株の間には  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake に著しい差があり、耐性菌において明らかに少ない。よつて今回はこの関係が自然分離株および非定型抗酸菌においても同様であるか否かを検討した。

患者分離ヒト型結核菌の INH 耐性を検すると、INH 50  $\gamma$ /ml で完全耐性の菌株も多く、またこの程度の耐性を示す菌は INH 耐性という点に関しては、大多数の非定型抗酸菌の耐性と同様である。しかし一方非定型抗酸菌中にも比較的 INH 耐性の低い、たとえば 1  $\gamma$ /ml 程度の耐性を示す菌があるので、この両者について  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake を検討して INH 感性のヒト型結核菌のそれと比較した。その結果、INH 耐性分離株も INH 人工耐性株も同程度の  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake を示し、その間に著しい差を認めなかつた。この点、腸内細菌において自然分離耐性株と人工耐性株の間に耐性機構の差があるという報告<sup>2)</sup>とは異なり、ヒト型結核菌の INH 人工耐性株ならびに分離 INH 耐性株においては、いずれも INH 耐性機構に関して相違はなく、INH に対する菌の選択的透過性の低下が存在しているものと考えられる。

さらに非定型抗酸菌について検討した結果はヒト型結核菌と同様で INH 1  $\gamma$ /ml 耐性株においては INH 感性

ヒト型菌と同程度、またはそれに近い  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake を示しており、50  $\gamma$ /ml 耐性株ではヒト型菌の 50  $\gamma$ /ml 耐性菌と同程度の  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake を示し、10  $\gamma$ /ml 耐性株ではその中間の  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake がみられている。すなわち INH 耐性度とその菌株の示す  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake にヒト型菌とほぼ同様な関係があることが分かる。

INH 耐性値と、 $^{14}\text{C}$ -INH-uptake を示す count 数を 2つの軸として各菌株を plot すると、INH 耐性および感性ヒト型結核菌と非定型抗酸菌はいずれも 1枚の図表に plot され、INH 耐性ヒト型結核菌と、非定型抗酸菌を区別しえない。すなわちおそらく、INH 耐性の機構に関してはこの両者の間にも相違を求めるとは困難であろうと思われる。

この両者の間にある一つの大きな差は、Catalase 活性である。ヒト型結核菌では 50  $\gamma$ /ml の INH 耐性株はすべて catalase 反応が陰性であつた。しかし非定型抗酸菌においてはそれが常に陽性であつた。すなわち非定型抗酸菌においてはヒト型結核菌と異なり、INH 耐性と catalase 活性の消失とは関係がないと考えられる。ヒト型結核菌においては、INH 耐性菌は catalase 活性の消失をきたすが<sup>3)</sup>その関係はしばしば不定であり<sup>4)</sup>、INH 耐性と  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake の間にみられるほどの相関はない。INH の作用機序の一つとして、catalase の阻害説<sup>5)~7)</sup>があり、また Garattini ら<sup>8)</sup>は、Myc. paratuberculosis を用いて  $^{14}\text{C}$ -INH の uptake は INH 耐性と関係はあるが、菌の catalase 活性および  $\text{H}_2\text{O}_2$  感受性により相関があると述べている。著者は  $^{14}\text{C}$ -INH uptake と catalase 活性との関係を追求したが、ヒト型結核菌では用いた菌株において、 $^{14}\text{C}$ -INH-uptake は catalase 陽性菌に多く、陰性菌に少なかつた。しかしこのことは前にも述べたように、catalase 活性との関係よりもむしろ INH 耐性との関係がより深いとみるのが適当と考えられる。

非定型抗酸菌では全菌株が catalase 反応陽性であつたが、 $^{14}\text{C}$ -INH-uptake は catalase 活性に関係なく、INH 耐性度と相関を示している。もし著者の考えのように<sup>1)</sup>、 $^{14}\text{C}$ -INH-uptake が INH の菌体内取込みの大小を示すとすると catalase 活性と関係なく、INH は菌体内に入りしかも代謝を受けるわけであるが、 $^{14}\text{C}$ -INH-uptake が INH 耐性度と相関を示す点よりみると、INH の作用点を catalase 活性の阻害には求めがたいように思われる。

以上述べたように、ヒト型結核菌においては INH 人工耐性株および INH 自然耐性株ともに  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake が減少し、また非定型抗酸菌においても INH 耐性株は  $^{14}\text{C}$ -INH-uptake が少なく、しかもそれは菌の INH 耐性度とある程度の相関がみられた。これらの結

果をみると、ヒト型結核菌および非定型抗酸菌の間において INH 耐性機構に差が認められず、また前報告<sup>1)</sup>で考察した INH 耐性機構が、INH に対する菌の細胞質膜の選択的透過性の低下によるという推論が一そう考えられる。しかし INH 耐性菌では菌体内に INH が取り込まれないことは菌体の無細胞抽出液で検討する必要がある、また菌体内に取り込まれた INH が感性菌と耐性菌の菌体内で、どのように代謝を受け、または作用するかを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たいと思う。

### 結 論

肺結核患者の喀痰より分離した INH 感性および耐性ヒト型結核菌と、非定型抗酸菌の Tween 合成培地 2 週培養菌を磷酸緩衝液に浮遊し、<sup>14</sup>C-INH に接触させ、その <sup>14</sup>C-INH の uptake と INH 耐性および catalase 活性との関係を検討して次の結果を得た。

- 1) 新分離ヒト型結核菌においても、INH 耐性株は、INH 感性株に比べて <sup>14</sup>C-INH の uptake が少なかった。
- 2) 非定型抗酸菌においても、INH 耐性株は INH 感性株に比べて <sup>14</sup>C-INH の uptake が少なかった。
- 3) ヒト型結核菌および非定型抗酸菌ともに、INH 耐性と <sup>14</sup>C-INH の uptake との間に相関が認められた。
- 4) <sup>14</sup>C-INH の uptake は菌の catalase 活性と関係が乏しいものと思われた。

5) <sup>14</sup>C-INH の uptake という面よりみると、INH 耐性機構は、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の間に相違はないものと思われる。

本論文の要旨は、昭和 35 年 7 月第 33 回日本細菌学会総会（札幌）において発表した。

稿を終るのにぞみ、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、粟田口重美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) 横田健・秋葉朝一郎：医学と生物学，58：151；172，昭36。63：115；160，昭37。
- 3) Middlebrook, G. et al: Amer. Rev. Tuberc., 69: 471, 1954.
- 4) 堀三津夫：結核研究の進歩，24：168，昭34。
- 5) Knox, R., Meadow, P.M., and Worssam, A.R.H.: Amer. Rev. Tuberc., 73: 726, 1956.
- 6) Woods, C.J.: Amer. Rev. Resp. Diseases., 84: 913, 1961.
- 7) Winder, F.: Amer. Rev. Resp. Diseases., 81: 68, 1960.
- 8) Garattini, S., Leonardi, A., and Paoletti, R.: Amer. Rev. Resp. Diseases., 80: 110, 1959.

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

The mechanism of the isoniazid-resistance in tubercle bacilli isolated from sputa of tuberculosis patients and in atypical mycobacteria conserved in our laboratory was studied with <sup>14</sup>C-labelled isoniazid. Cells of isoniazid-sensitive or isoniazid-resistant strains of these microbes, grown in the Tween-synthetic medium at 37°C for 14 days, were washed with and suspended in the phosphate buffer. Then 1~5 mcg/ml of <sup>14</sup>C-isoniazid was added to the cell-suspension, followed by further incubation at 37°C for 24 hours. The amount of <sup>14</sup>C-isoniazid incorporated into the cells of tubercle bacilli and of atypical mycobacteria was counted with a gas

flow counter, after thorough washing of the cells. Thus results as described below were obtained. The incorporation of <sup>14</sup>C-isoniazid into the cells of naturally isolated, isoniazid-resistant tubercle bacilli was much less than that of isoniazid-sensitive strains. This decreased incorporation of <sup>14</sup>C-isoniazid into the cells of the isoniazid-resistant strains was also confirmed in atypical mycobacteria. Although a proportional relationship between the isoniazid-sensitivity and the amount of incorporated <sup>14</sup>C-isoniazid was observed in not only tubercle bacilli but also in atypical mycobacteria, no regular connection between the <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake and the catalase-activity in both tubercle bacilli and atypical mycobacteria was demonstrated.