

抗結核薬リファンピシン, ストレプトマイシン,
エタンブトール, ピラジナミドの作用と耐性メカニズム

新潟大学医学部3年(細菌ゼミ)

岸本 美樹・金子 純也・三浦 智史・安達 聡介

指導: 細菌学教室

小塩 精一・種池 郁恵・山本 達男

Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Agents Rifampicin,
Streptomycin, Ethambutol, and Pyrazinamide:
Mode of Action and Resistance Mechanisms

Miki KISHIMOTO, Junya KANEKO,
Tomofumi MIURA and Sousuke ADACHI

School of Medicine, Niigata University

Supervisor: Seiichi KOJIO,
Ikue TANEIKE, and Prof. Tatsuo YAMAMOTO

Department of Bacteriology

Rifampicin, pyrazinamide, streptomycin, and ethambutol, in addition to isoniazid, are frequently used for treatment of *Mycobacterium tuberculosis* infections. Rifampicin exhibits its anti-bacterial action through binding to RNA polymerase β subunit, and resistance to the drug is caused by a mutation of the β subunit-encoding gene *rpoB*. Streptomycin inhibits the initiation as well as elongation steps of protein synthesis through binding to 30S ribosomal subunit (S12 protein and 16S rRNA regions), which also provide an important mutation site for drug resistance. Ethambutol is a strong inhibitor of cell wall synthesis. In ethambutol-treated bacterial cells, arabinan, a

Reprint requests to: Department of
Bacteriology, Niigata University
School of Medicine, 757 Ichibanchou,
Asahimachidori, Niigata, 951-8510, Japan

別刷請求先:
〒951-8510 新潟市旭町通1番町757
新潟大学医学部細菌学教室

component of arabinogalactan, is not generated. Resistance is mainly caused by a mutation of the key enzyme gene *embB*. Finally, pyrazinamide is considered to be converted to its toxic form (pyrazinoic acid) by the bacterial pyrazinamidase possibly within the phagosome of alveolar macrophage. A lower level of pyrazinamidase is a cause of resistance to the agent.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampicin, Streptomycin, Ethambutol, Pyrazinamide, resistance mechanisms
結核菌, リファンピシン, ストレプトマイシン, エタンブトール, ピラジナミド, 耐性メカニズム

はじめに

結核症は、開発途上国のみならず我が国を含む先進国でも、依然として重大な感染症であり、今後もさらに増加する危険性が指摘されている¹⁾。多剤耐性結核菌の出現、多発する結核集団感染等、緊急な対応をせまられる重要な課題が出現していることから、厚生省は平成11年7月に結核緊急事態宣言を発表、結核の問題を再認識し、対策の推進に取り組むよう国民に要請した²⁾。

新潟県の場合にも近年5つの集団感染事例が確認されている。また、結核症患者は全国と比べてより高齢層に偏在する傾向がある。

新規の結核患者では、抗菌剤を用いた化学療法によって、ほぼ全例で治癒が期待される。しかし、薬剤耐性菌の出現は、将来の対策に不安を抱かせてもいる。本稿では結核菌の薬剤耐性に焦点をあて、結核の化学療法、薬剤の作用、そして薬剤耐性のメカニズムについて解説した。なお、予防内服に用いられているイソニアジド (INH) については先に報告した。

結核の化学療法

イソニアジド、リファンピシン (RFP)、ストレプトマイシン (SM)、エタンブトール (EMB)、ピラジナミド (PZA) の5薬剤がよく用いられる。

化学療法の標準的な処方方は3通りである。

① 2HRZS (または E)/4HR (E を加えてもよい)

治療初期の2ヶ月間にイソニアジド、リファンピシン、ピラジナミド、ストレプトマイシン (またはエタンブトール) の4剤併用療法を行い、その後、維持療法としてイソニアジド、リファンピシンの2剤併用療法を4ヶ月間行う計6ヶ月間の治療法である。

② 6HRS (E)/3～6HR

治療初期の6ヶ月間にイソニアジド、リファンピシン、

ストレプトマイシン (またはエタンブトール) の3剤併用療法を行い、その後の3～6ヶ月間にイソニアジド、リファンピシンの2剤併用療法を行う計9～12ヶ月間の治療法である。ただし、ストレプトマイシンは始めの2～3ヶ月間は毎日、以降は週2回投与する。

③ 6～9HR

6～9ヶ月間イソニアジド、リファンピシンの2剤併用療法を行う治療法である。

リファンピシンの作用と耐性メカニズム

リファンピシンは、RNAポリメラーゼの β サブユニットに強い親和性をもち、mRNA上のRNAポリメラーゼに強く結合して、mRNA合成の開始段階を阻害する (図1右)³⁾。ただし、大腸菌から β サブユニットを精製し、リファンピシンを加えても結合しない。リファンピシンの結合には、RNAポリメラーゼの4つのコア蛋白 α β β' σ がホロ酵素を構築していることが必要である。

耐性は、 β サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子 (長さ3516塩基対) の変異により獲得される (図1左)^{4)–8)}。変異は69塩基ないし81塩基の長さのホットスポットに集中する傾向がある。特に526番目のコドン His 526 と531番目のコドン Ser 531 に変異が多くみられる (70%以上)。

変異と耐性を分子レベルで考察した文献によると、 β サブユニットの4つの場所がリファンピシンとの結合に関与している。1つは β サブユニット蛋白のN末端近くにあり、残りの3つはクラスターをなして中央部に位置している。

ストレプトマイシンの作用と耐性メカニズム

リボソームの30Sサブユニットに結合し、蛋白質の合成を阻害する⁹⁾。この阻害反応は2段階で起こる。一つは開始段階の阻害で (図2右, 左半分)、もう一つは、

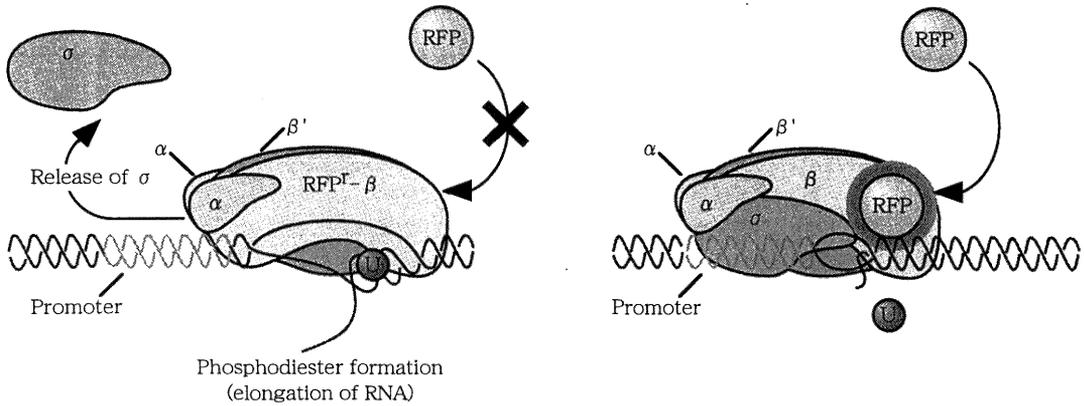


図1 リファンピシン (RFP) の作用と耐性メカニズム

右図は感受性菌におけるリファンピシンの作用を示したもので、リファンピシンはRNAポリメラーゼのβサブユニットに結合して、RNA合成を停止させる。耐性菌(左図)では、リファンピシンがRNAポリメラーゼに結合できない。

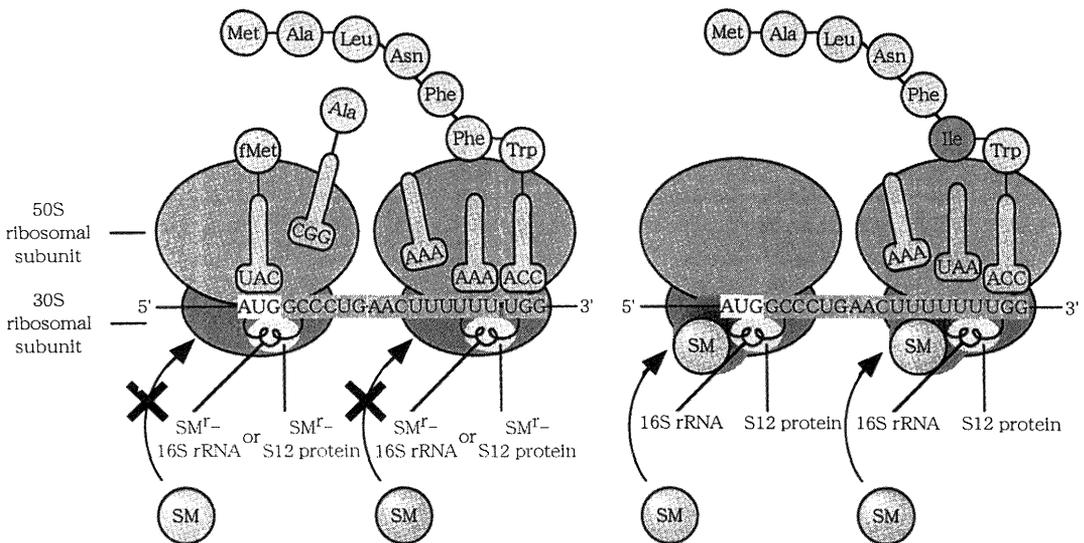


図2 ストレプトマイシン (SM) の作用と耐性メカニズム

感受性菌(右側)では、ストレプトマイシンが30SリボソームサブユニットのS12蛋白・16S rRNAに結合してしまうが、耐性菌(左側)では、ストレプトマイシンが変異30Sリボソームサブユニットに結合できない。

伸長段階の阻害で、mRNAのコードの読み違えを起こし、異常なアミノ酸配列を含むポリペプチド鎖を合成してしまう(図2右、右半分)。この結果、異常な複合体やストレプトマイシンが結合した異常なモノソームが細

胞内に蓄積し、正常なリボソーム機能が行えなくなる。

耐性の獲得は、細胞内への透過性の低下、酵素による不活化、リボソームの親和性の低下等による。

このうち、リボソームの親和性の低下は、30Sサブユ

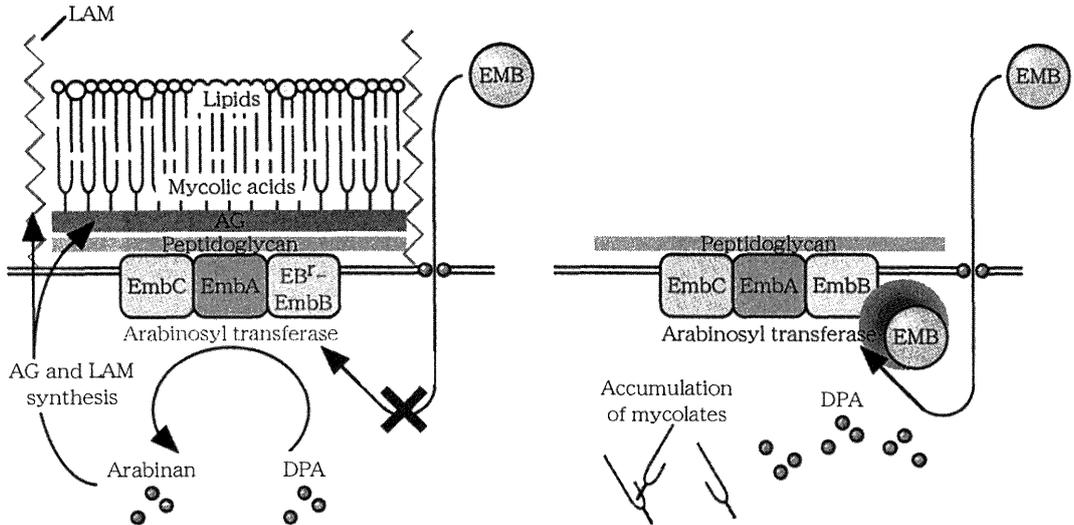


図3 エタンブトール (EMB) の作用と耐性メカニズム

感受性菌 (右側) では, エタンブトールが細胞壁の構成成分であるアラビノガラクトサン (AG) の前駆物質 (アラビナン) の合成を阻害してしまう。右側は耐性菌の場合で, 薬剤存在下でも正常にアラビナン (そしてアラビノガラクトサン) の合成が起きてしまう。

ニットを構成する S12蛋白や16S rRNA の変異による (図2左)。S12蛋白をコードする *rpsL* 遺伝子 (長さ 372 塩基対), 16S rRNA をコードする *rrs* 遺伝子 (長さ 1537 塩基対) のミスセンス変異により高度の耐性が獲得される¹⁰⁾¹¹⁾。*rpsL* 遺伝子のコドン43番目の A が G に変わることにより起こる S12蛋白の Lys43→Arg の変異は頻繁にみられる¹²⁾。16S rRNA の場合には, 530 loop 領域の 512-C, 513-A, 516-C が他塩基に変わることにより, 高度耐性が獲得される¹¹⁾¹³⁾。

エタンブトールの作用と耐性メカニズム

エタンブトールは, 細胞壁の主要構成成分であるアラビノガラクトサン (arabinogalactan, AG) の合成を阻害して結核菌を死滅させる。エタンブトールの作用点は, β -D-arabinofuranosyl-1-monophosphoryl decaprenol (DPA) からアラビナン (arabinan) への転換を触媒する arabinosyl transferase である。エタンブトールが存在すると, この酵素反応が阻害され, アラビノガラクトサンの材料であるアラビナンが合成されない (図3右)¹⁴⁾⁻¹⁸⁾。

2つの耐性メカニズムが報告されている。1つは arabinosyl transferase の一部をコードする *embB*

遺伝子 (長さ 3294 塩基対) の変異である (図3左)。分離頻度が高い変異として, Met 306 (ATG) が Ile (ATC) または Val (GTG) に変わった変異が報告されている。

もう1つは *embCAB* 遺伝子群のコピー数の増加によるもので, *embCAB* 領域が接合, 形質転換, 形質導入などで菌体内に組み込まれ, 遺伝子自体の数が増加すると, arabinosyl transferase が過剰発現され EMB 存在下でも生存できるようになる¹⁶⁾。

ピラジナミドの作用と耐性メカニズム

結核菌は, 生体内で肺胞マクロファージに取り込まれ, ファゴソーム内で生存し続ける。ピラジナミドは, 感染マクロファージのファゴソーム内に入り, その酸性環境下ではじめて抗菌作用を示す (図4右)¹⁹⁾。より詳細には, ピラジナミドは一旦菌体内に取り込まれて, *pncA* 遺伝子にコードされた pyrazinamidase (PZase) によって pyrazinoic acid (POA) に代謝され, この POA が再度ファゴソーム内に蓄積して, 酸性環境下で殺菌作用を示すと考えられている²⁰⁾。作用メカニズムには不明な点も多い。

結核菌の耐性化は, 大部分は *pncA* 遺伝子 (長さ 558

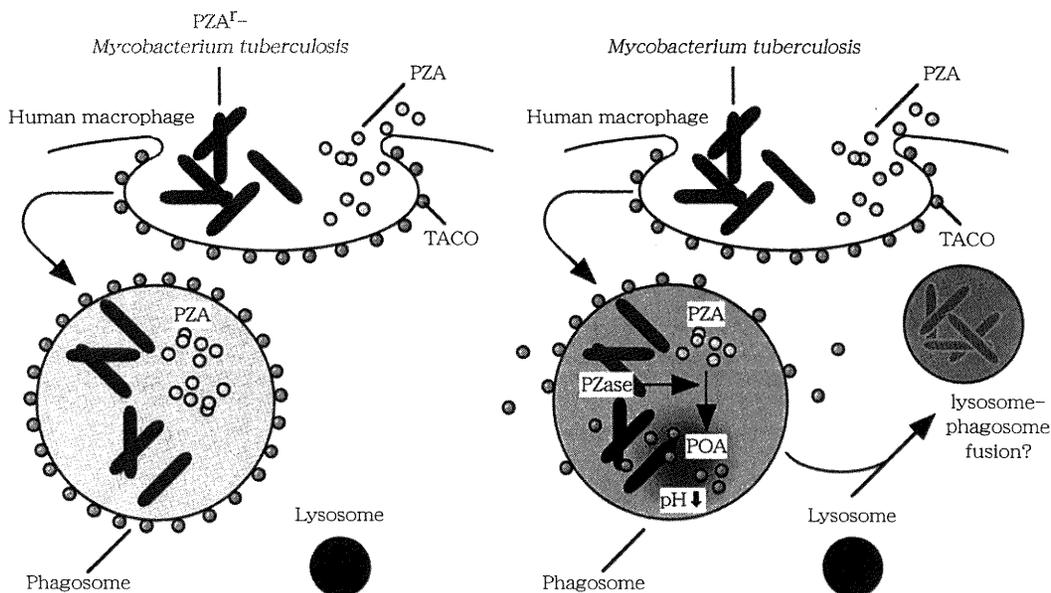


図4 ピラジナミド (PZA) の作用と耐性メカニズム

図は、マクロファージのファゴソームに取り込まれた結核菌 (図中で棒状のもの) と作用するピラジナミドを示している。右側は感受性菌の場合で、生成した toxic な物質 (POA) によって結核菌が殺される。左側は耐性菌を示したもので、ファゴソームにピラジナミドが蓄積するが、殺菌は起こらない。

塩基対) の点突然変異による²¹⁾。 *pncA* が変異した耐性菌では、pyrazinamidase の活性が低下していて、ピラジナミドが POA に変換されにくくなっている (図4左)²²⁾。変異部分は *pncA* 遺伝子内で散在していて、ホットスポット領域は確認されていない²³⁾。

おわりに

かつてニューヨークを中心とする米国東海岸で深刻であった多剤耐性結核 (MDRTB) は、世界を震撼させた再興感染症であった。しかしそれも DOTS (directly observed therapy, short course) 戦略の徹底などによって下火になり、現在では結核の薬剤耐性をより冷静な目で見つめ直す余裕が感じられる。

しかし油断は禁物で、結核をさらに追い込むために、薬剤耐性の DNA 迅速診断の確立を含む強い対策姿勢が望まれる。

文 献

1) 森 亨：結核の今日的課題。日本化学療法学会雑誌 48: 827~832, 2000.

2) 結核緊急事態宣言：厚生大臣，平成11年7月26日。
 3) Levin, M.E. and Hatfull, G.F.: Mycobacterium smegmatis RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. Mol. Microbiol., 8: 277~285, 1993.
 4) Jin, D. and Gross, C.: Mapping sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that leads to rifampicin resistance. J. Mol. Biol., 202: 45~48, 1988.
 5) Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M.J., et al: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet, 341: 647~650, 1993.
 6) Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Schidheini, T. and Bodmer, T.: Direct, automated detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Antimicrob. Agents Chemother., 37: 2054~2058, 1993.
 7) Williams, D.L., Waguespack, C., Eisenach, K.,

- Crawford, J.T., Portaels, M., Salfinger, M., et al: Characterization of rifampicin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**: 2380~2386, 1994.
- 8) Kapur, V., Li, L.L., Iordanescu, S., Hamrick, M.R., Wanger, A., Kreisworth, R.N., et al: Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J. Clin. Microbiol.*, **32**: 1095~1098, 1994.
- 9) Benveniste, R. and Davies, J.: Mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*, **42**: 471~576, 1973.
- 10) Douglass, J. and Steyn, L.M.: A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Micobacterium tuberculosis* isolates. *J. Infect. Dis.*, **167**: 1505~1506, 1993.
- 11) Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, A. and Bottger, E.C.: Molecular basis of streptomycin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alteration of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16SrRNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.*, **9**: 1239~1246, 1993.
- 12) Funatsu, G. and H.G. Wittman.: Ribosomal proteins. **33**. Location of amino-acid replacements in protein S12 isolated from *Escherichia coli* mutants resistant to streptomycin. *J. Mol. Biol.*, **68**: 547~550, 1972.
- 13) Meier, A., Kirschner, P., Bange, F.C., Vogal, U. and Botger, E.C.: Genetic alteration in streptomycin-resistance in *mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**: 228~233, 1994.
- 14) Takayama, K. and Kilburn, J.O.: Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 1493~1499, 1989.
- 15) Wolucka, B.A., McNeil, M.R., de Hoffman, E., Chojnaki, T. and Brennan, P.J.: Recognition of the lipid intermediate for asabinogactan / asabinomanan biosynthesis and its relation to the mode of action ethambutol on mycobacteria. *J. Biol. Chem.*, **269**: 23328~23335, 1994.
- 16) Belanger, A.E., Besra, G.S., Ford, M.E., Mikusova, K., Belisle, J.T., Brennan, P.J. and Inamine, J.M.: The *embAB* genes of involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 11919~11924, 1996.
- 17) Telenti, A., Philipp, W.J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K.E., Weites, B., et al: The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat. Med.*, **3**: 567~570, 1997.
- 18) Sreevatsan, S., Stockbauer, K.E., Pan, X., Kreisworth, B.M., Moghazeh, S.L., Jacobs, W.R., Jr., et al: Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**: 1677~1681, 1997.
- 19) MacDermott, W. and Tompsett, R.: Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments *in vivo*. *Am. Rev. Tuberc.*, **70**: 748~751, 1954.
- 20) Konno, K., Feldman, F. and McDermott, W.: Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of *tubercle bacilli*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **95**: 461~469, 1967.
- 21) Hirano, K., Takahashi, M., Kazumi, Y. et al: Mutations in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc lung Dis.*, **78**: 117~122, 1998.
- 22) Konno, K., Nagayama, H. and Oka, S.: Nicotinamidase; A method for distinguishing bovine type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Nature*, **184**: 1743~1744, 1959.
- 23) Angero, S., Pamela, L.L., Leonid, H., Robert, G., Salman, S., Michael, C. and Ying, Z.: Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **3**: 540~543, 1997.