

結核菌の化学予防剤イソニアジドへの耐性

新潟大学医学部 2 年

三浦 智史

指導：細菌学教室

種池 郁恵・小塩 精一・小原 竜軌・山本 達男

Resistance to a Prophylaxis Agent Isoniazid of
Mycobacterium tuberculosis

Tomofumi MIURA

School of Medicine, Niigata University
Supervisor: Ikue TANEIKE, Seiichi KOJIO,
Tatsuki OHARA and Prof. Tatsuo YAMAMOTO
Department of Bacteriology

Isoniazid, a synthetic antimicrobial agent, was found to be effective against tuberculosis in 1952 and still remains a valuable drug for the prophylaxis and treatment of *Mycobacterium tuberculosis* infections. Isoniazid shows its harmful effect on *M. tuberculosis* through activation by KatG (catalase-peroxidase). The primary target of the activated structure is InhA (NADH-dependent, 2-*trans* enoyl-acyl carrier protein reductase), whose inactivation results in loss of the precursor to mycolic acid (a major component of the cell wall skeleton) and accumulation of hexacosanoic acid (C_{26:0}).

Isoniazid resistance was thus conferred by mutations in the *katG* gene as well as *inhA* gene. Involvement of additional genes such as *ahpC* (encoding alkyl hydroperoxidase), *kasA/B* (encoding β -ketoacyl ACP synthase), or *ndh* (encoding NADH dehydrogenase)

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

have also been proposed. It is considered that the mutations in the *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes cover up to 80% of isoniazid resistance of clinical isolates of *M. tuberculosis*.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazid, mode of action, resistance
結核菌, イソニアジド, 作用機序, 耐性

はじめに

学校や高齢者関係施設あるいは病院での結核の集団感染の発生の制御は依然困難な状態にある。厚生省は平成11年7月に結核緊急事態宣言を発表し、再興感染症としての結核の脅威と対策の必要性を国民に訴えた¹⁾。

患者（塗抹陽性者）に接触した人の中で、ツベルクリン反応で感染者と診断された人は、特に集団感染の場合には、イソニアジド (isoniazid, INH) を使った化学予防の対象となる²⁾。我が国では6ヶ月間の服用（予防内服）が標準とされている。しかし、結核菌の臨床分離株の中には、イソニアジド耐性が我が国の場合 4.4%³⁾、世界で 4.1%⁴⁾ 存在しており、今後の予防内服の效果に不安を抱かせてもいる。

本総説では、化学予防剤であるイソニアジドの作用と耐性メカニズムをまとめるとともに、迅速 DNA 診断の可能性を検討した。

イソニアジド

イソニコチン酸ヒドラジド (isonicotinic acid hydrazide). INAHとも略される。合成抗菌剤で、1912年に合成され、1952年になって抗結核作用が報告された。他の抗結核薬に比べて、副作用が少なく、安価で、現在でも最も信頼されている抗結核薬である⁵⁾。

イソニアジドの作用

イソニアジドは結核菌の細胞壁成分であるミコール酸の合成を阻害し、かつ、菌体内に炭素数26の有害飽和脂肪酸を蓄積させる⁶⁾。イソニアジドの作用標的は以下の如く理解されている。

イソニアジドはキャリア蛋白（仮定）の働きで細胞質膜を通過すると、ヘム結合性カタラーゼ・ペルオキシダーゼ (KatG) の作用で活性型のイソニアジド (INH*) に変換される (図1)⁷⁾。イソニアジド自身に

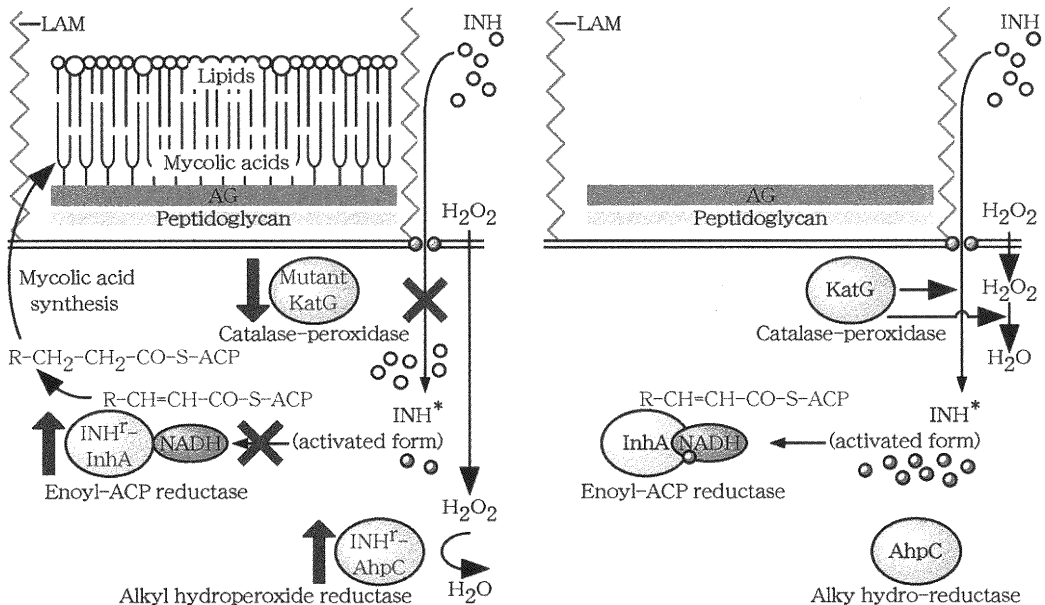


図1 イソニアジドの作用と耐性メカニズム

右図は感受性菌に於けるイソニアジドの作用を、左図は耐性菌に於ける耐性メカニズムを示す。

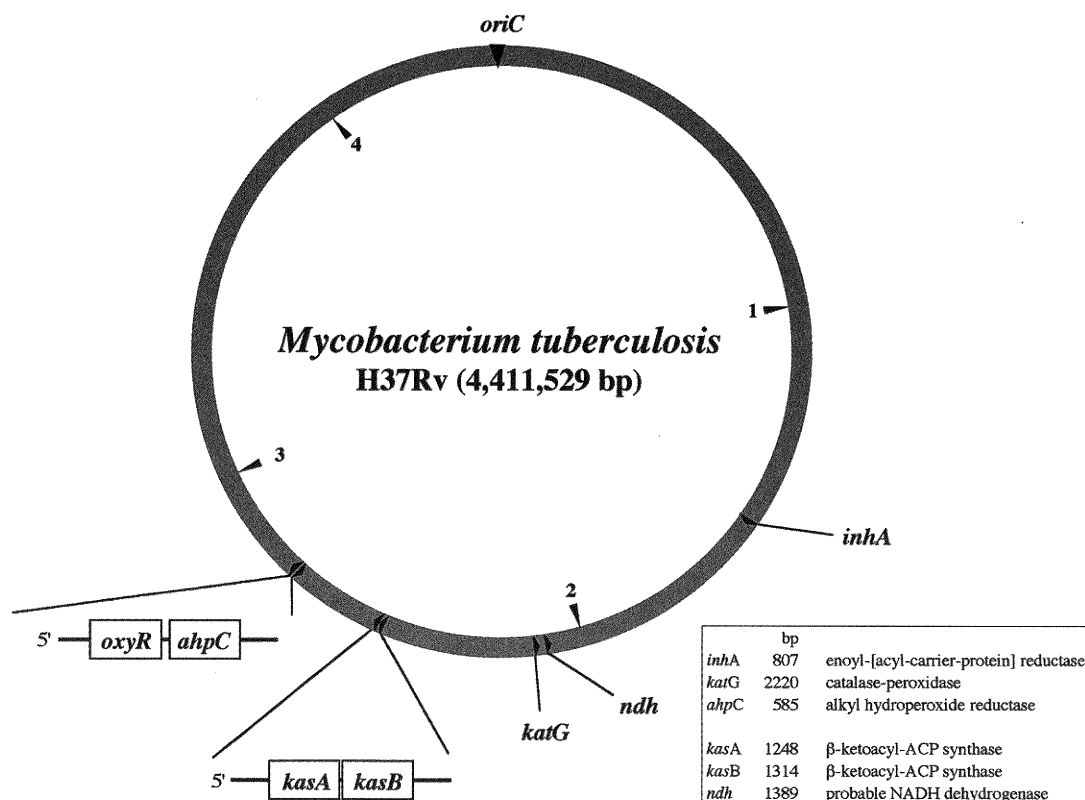


図2 イソニアジド耐性に関連する遺伝子と染色体上の位置
ゲノム情報は文献31とパスツール研究所のホームページから引用。

は抗菌作用がなく、この活性型イソニアジドが抗菌作用を現す⁸⁾。

活性型イソニアジドの標的は、脂肪酸の合成経路 FAS II で働くエノイル ACP レダクターゼ (ACP は acyl carrier protein の略) (InhA) である⁹⁾。InhA は、NADH を補酵素として、2, 3-デヒドロアシル ACP 複合体をアシル ACP 複合体に還元する¹⁰⁾。

InhA には NADH が1分子結合するが、この結合 NADH に活性型のイソニアジドが共有結合すると、InhA・NADH・INH* の強固な複合体が形成されてしまい、InhA の酵素活性が阻害される^{11)–13)}。

アシル ACP 複合体のアシル基は、結核菌に特有な炭素数の多い高級脂肪酸であるミコール酸 (mycolic acids) の基本構造となる。有名な細胞壁の構成成分であるコードファクターは、2分子のミコール酸とトレハロースの結合物である。

したがって、活性型イソニアジドによって、InhA に

よるアシル ACP 複合体の合成反応が阻害されると、脂質に富む強固な細胞壁の骨格 (ペプチドグリカン-アラビノガラクトン-ミコール酸複合体) の形成が損なわれ、結核菌は死滅する (図1右)¹⁴⁾¹⁵⁾。

これとは別に、脂肪酸の合成経路 FAS II に位置する InhA が阻害されると、脂肪酸合成経路 FAS I の最終産物である炭素数26の飽和脂肪酸が蓄積してしまい、結核菌が死滅するとも考えられている⁶⁾。

イソニアジド耐性のメカニズム

3つの house-keeping genes の変異が耐性と関連する (図1左)⁷⁾¹⁶⁾。

KatG が変異して活性が低下すると、イソニアジドの活性型への変換が起こらず、結核菌はイソニアジド耐性となる¹⁷⁾。

InhA が変異して、活性型イソニアジドの作用点が少なくなると、やはり結核菌が耐性化する。この場合、

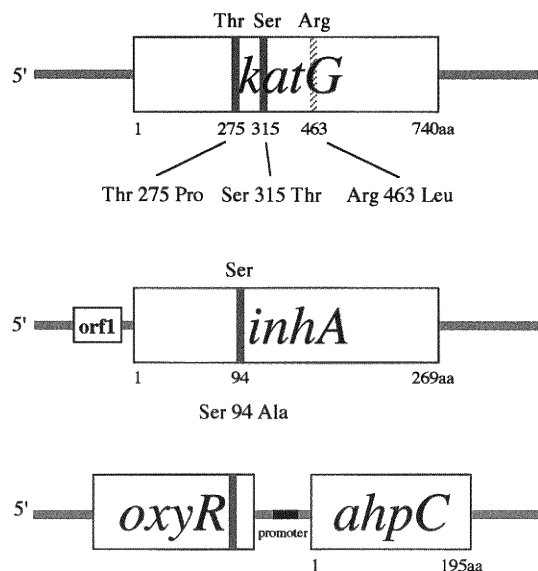


図3 イソニアジド耐性に関連する遺伝子変異
遺伝子あるいは遺伝子間配列に示した縦線は、多
く分離される変異領域を表す。

InhA の NADH への結合親和性が低くなって、InhA 上の NADH が少なくなる場合と、InhA の過剰発現の場合がある¹⁸⁾。

もう一つは、アルキルヒドロペルオキシダーゼ (AhpC) の変異で、この活性が高まると、過酸化水素やイソニアジドに関連した過酸化物の還元能力が高くなる。一般に、KatG の活性が低下すると、AhpC の活性が上昇する¹⁹⁾。

以上の3つの耐性メカニズムの他に、次の2つの耐性メカニズムが報告あるいは提案されている。

脂肪酸の合成経路 FAS II に位置する β -ケトアシル ACP シンターゼ (3-オキソアシル ACP シンターゼ) (KasA/B) もイソニアジドの標的酵素の一つであって、感受性菌では、INH・AcpM (acyl carrier protein)・KasA の複合体が形成され、AcpM 蛋白上に炭素数26の飽和脂肪酸が蓄積してしまう。1例の耐性菌で KasA 変異が確認されている⁶⁾。

NADH デヒドロゲナーゼ (Ndh) 活性を減少させる変異は、細胞内の NADH/NAD⁺ 比を増加させ、イソニアジドに耐性となると考えられる²⁰⁾。

イソニアジド耐性に関連する遺伝子と変異

主要な3つの標的酵素の遺伝子 *katG*, *inhA*, *ahpC*

のゲノム上の位置を図2に示した。

katG 変異では、遺伝子全体の欠落は稀で、多くは単塩基置換、単塩基欠失、あるいは単塩基挿入である (図3)²¹⁾²²⁾。分離頻度が高い変異は Arg463Leu (CGG→CTG) であるが、これは感受性レベルに変化がなく、*katG* の多型と考えられている¹⁹⁾。Thr275Pro (GAC→GCC) や Ser315Thr (AGC→ACC) 変異では KatG (カタラーゼ) 活性が 1/20 前後に低下する²³⁾²⁴⁾。多くの *katG* 変異では AhpC の上昇が認められるが、Ser315Thr (AGC→ACC) 変異は例外で AhpC 活性の上昇を伴わなかった²³⁾²⁴⁾。

inhA の変異で分離頻度が高いのは Ser94Ala (TCG→GCG) で、NADH に対する Km 値が 5~8 倍高くなる (図3)¹⁰⁾。他に、Ile16Thr (ATC→ACC)、Ile21Val (ATC→GUC)、Ile47Thr (ATT→ACT) 変異が Km 値を上昇させた¹⁸⁾。やはり耐性に関連した Val78Ala (GTG→GCG) 変異では NADH に対する Km 値に変化は確認されなかった¹⁸⁾。一方、*inhA* の21塩基上流には *orf1* が存在していてオペロンを形成している²⁵⁾。*Orf1* の上流の発現調節配列に変異が出現すると、*IhA* の発現量が増し、イソニアジド耐性になると考えられている¹⁶⁾。

ahpC の上流には調節遺伝子 *oxyR* が存在している (図3)²⁶⁾。耐性の変異で分離頻度が高いのは *ahpC* のすぐ上流にあるプロモーター配列中の C→T 変異で、この結果 AhpC の発現量が 3~7 倍高まる²⁷⁾²⁸⁾。この他に、*oxyR* の変異も報告されている²⁶⁾²⁹⁾³⁰⁾。

臨床分離株の場合、高度耐性の大部分は *katG* 変異で、低度耐性は *inhA* 変異あるいは *ahpC* 変異が原因であると考えられている。そして、イソニアジド耐性の約80%は *katG* 変異、*inhA* 変異、*ahpC* 変異の3つでカバーされると考えられている。

おわりに

結核菌のイソニアジド耐性は、外来性耐性遺伝子の獲得ではなく、house-keeping gene の変異によって出現する。多くは出現し易い単塩基変異であり、イソニアジドの使用によって耐性菌が選択されて、临床上重要な問題となる。

臨床分離株の数がイソニアジド耐性である。イソニアジド耐性菌による感染の場合、化学予防には、レボフロキサシンが選択されることもあるが、イソニアジドでよい (あるいはイソニアジドしかない) とする意見もある。

耐性菌対策として、耐性の迅速診断が重要である。イソニアジド耐性の約80%は DNA 診断が可能であるが、まだそのような広域の DNA 診断法は開発されていない。簡便で安価なイソニアジド耐性迅速検出キットの開発が望まれる。

参 考 文 献

- 1) 結核緊急事態宣言: 厚生大臣, 平成11年7月26日.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention. The use of preventive therapy for tuberculous infection in the United States Recommendations of the Advisory Committee for Elimination of Tuberculosis. MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep., **39** (RR-8): 9~12, 1990.
- 3) 阿部千代治: 平成11年度 日米医学会協力計画報告書.
- 4) Cohn, D.L., Bustreo, F. and Reviglione, M.C.: Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. International Union Agents Tuberculosis and Lung Disease. Clin Infect. Dis., **24** suppl. 1: S121~S130, 1997.
- 5) Kucers, A.: Drugs mainly for tuberculosis. In The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs, Kucers, A., Crowe, S.M., Grayson, M.L., and Hoy, J.F. eds., pp. 1179~1242, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997.
- 6) Mdluli, K., Slayden, R.A., Zhu, Y., Ramaswamy, S., Pan, X., Mead, D., Crane, D.D., Musser, J.M. and Barry, C.E. III: Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl ACP synthase by isoniazid. Science, **280**: 1607~1610, 1998.
- 7) Deretic, V., Pagan-Ramos, E., Zhang, Y., Dhanda-yuthapani, S. and Via, L.E.: The extreme sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to the front-line antituberculosis drug isoniazid. Nat. Biotechnol., **14**: 1557~1561, 1996.
- 8) Johnsson, K. and Schultz, P.G.: Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Am. Chem. Soc., **116**: 7425~7426, 1994.
- 9) Vilcheze, C., Morbidoni, H.R., Weisbrod, T.R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchettini, J.C. and Jacobs, W.R., Jr.: Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induce accumulation of the FAS I end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriol., **182**: 4059~4067, 2000.
- 10) Sacchettini, J.C. and Blanchard, J.S.: The structure and function of the isoniazid target in *M. tuberculosis*. Res. Microbiol., **147**: 36~42, 1996.
- 11) Rozwarski, D.A., Grant, G.A., Barton, D.H.R., Jacobs, W.R. Jr. and Sacchettini, J.C.: Modification of the NADH of the isoniazid target (*inhA*) from *Mycobacterium tuberculosis*. Science, **279**: 98~102, 1998.
- 12) Johnsson, K., King, D.S. and Schultz, P.G.: Studies on the mechanisms of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. J. Am. Chem. Soc., **117**: 5009~5010, 1995.
- 13) Zabinski, R.F. and Blanchard, J.S.: The requirement for manganese and oxygen in the isoniazid-resistant inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase. J. Am. Chem. Soc., **119**: 2331~2332, 1997.
- 14) Takayama, K., Wang, L. and David, H.L.: Effect of isoniazid on the *in vivo* mycolic acid synthesis, cell growth and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents. Chemother., **2**: 29~35, 1972.
- 15) Wang, L. and Takayama, K.: Relationship between the uptake of isoniazid and its action on *in vivo* mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents. Chemother., **2**: 438~441, 1972.
- 16) Musser J.M.: Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria: molecular genetic insights. Clin. Microbiol. Rev., **8**: 496~514, 1995.
- 17) Musser, J.M., Kapur, V., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., van Soolingen, D. and van Embden, J.D.A.: Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and-susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. J. Infect. Dis., **173**: 196~202, 1996.
- 18) Basso, L.A., Zheng, R., Musser, J.M., Jacobs,

- W.R. Jr. and Blanchard, J.S.: Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistance clinical isolates. *J. Infect. Dis.*, **178**: 769~775, 1998.
- 19) Rattan, A., Kalia, A. and Ahmad, N.: Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg. Infect. Dis.*, **4**: 195~209, 1998.
 - 20) Miesel, L., Weisbrod, T.R., Marcinkeviciene, J.A., Bittman, R. and Jacobs, W.R., Jr.: NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, **180**: 2459~2467, 1998.
 - 21) Altamirano, M., Marostenmaki, J., Wong, A., FitzGerald, M., Black, W.A. and Smith, J.A.: Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Infect. Dis.*, **169**: 1162~1165, 1994.
 - 22) Stoeckler, M.Y., Guan, L., Riegler, N., Weitzman, I., Kreiswirth, B., Kornbium, J., Laraque, F. and Riley, L.W.: Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. *J. Infect. Dis.*, **168**: 1063~1065, 1993.
 - 23) Heym, B., Alzari, P.M., Honore, N. and Cole, S.T.: Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, **15**: 235~245, 1995.
 - 24) Rouse, D.A., DeVito, J.A., Li, Z., Byer, H. and Morris, S.L.: Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol. Microbiol.*, **22**: 583~592, 1996.
 - 25) Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K.S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G. and Jacobs, W.R., Jr.: *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, **263**: 227~230, 1994.
 - 26) Deretic, V., Philipp, W., Dhandayuthapani, S., Mudd, M.H., Curcic, R., Garbe, T., Heym, B., Via, L.E. and Cole, S.T.: *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. *Mol. Microbiol.*, **17**: 889~900, 1995.
 - 27) Dhandayuthapani, S., Zhang, Y., Mudd, M.H. and Deretic, V.: Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in *Mycobacteria*: characterization and inducibility of *ahpC* by peroxides in *Mycobacterium smegmatis* and lack of expression in *M. aurum* and *M. tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, **178**: 3641~3649, 1996.
 - 28) Wilson, T.M. and Collins, D.M.: *ahpC* a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol. Microbiol.*, **19**: 1025~1034, 1996.
 - 29) Sherman, D.R., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Arain, T.M., Mahairas, G.G., Yuan, Y., et al.: Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 6625~6629, 1995.
 - 30) Sherman, D.R., Mdluli, K., Hickey, M.J., Arain, T.M., Morris, S.L., Barry, C.E. III. and Stover, C.K.: Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, **272**: 1641~1643, 1996.
 - 31) Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. III, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**: 537~544, 1998.