

ざ瘡由来アクネ菌における
伝達性薬剤耐性因子に関する研究

Transferable antimicrobial resistance factors in
Cutibacterium acnes isolated from acne vulgaris

令和2年度

東京薬科大学大学院 薬学研究科

青木 沙恵

【 目 次 】

序論	・ ・ ・ ・ ・ 1
第 1 章 日本における痤瘡由来 <i>C. acnes</i> の薬剤耐性調査	
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 7
方法	
1. 使用菌株および患者背景	・ ・ ・ ・ ・ 8
2. <i>C. acnes</i> の分離および培養	・ ・ ・ ・ ・ 8
3. 薬剤感受性の測定	・ ・ ・ ・ ・ 8
4. 使用薬剤	・ ・ ・ ・ ・ 9
5. 薬剤耐性因子の検出	・ ・ ・ ・ ・ 9
6. <i>C. acnes</i> の遺伝学的分類法による解析	・ ・ ・ ・ ・ 10
7. 統計学的解析	・ ・ ・ ・ ・ 10
8. 倫理的配慮	・ ・ ・ ・ ・ 10
結果	
1. 薬剤感受性調査	・ ・ ・ ・ ・ 12
2. マクロライドおよび clindamycin 耐性因子の解析	・ ・ ・ ・ ・ 12
3. <i>C. acnes</i> が分離された痤瘡患者の特徴	・ ・ ・ ・ ・ 15
4. <i>C. acnes</i> の遺伝学的分類法による解析	・ ・ ・ ・ ・ 16
考察	・ ・ ・ ・ ・ 18
第 2 章 <i>C. acnes</i> における <i>erm(X)</i> の伝播機構の解析	
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 20
方法	
1. 使用菌株	・ ・ ・ ・ ・ 21
2. <i>C. acnes</i> の分離および培養	・ ・ ・ ・ ・ 21
3. 薬剤感受性の測定および使用薬剤	・ ・ ・ ・ ・ 21
4. <i>C. acnes</i> の遺伝学的分類法による解析	・ ・ ・ ・ ・ 23
5. マクロライドおよび clindamycin 耐性因子の解析	・ ・ ・ ・ ・ 23
6. Filter mating 法による <i>erm(X)</i> の伝達	・ ・ ・ ・ ・ 24
7. 統計学的解析	・ ・ ・ ・ ・ 24
結果	
1. マクロライドおよび clindamycin 耐性 <i>C. acnes</i> の増加と耐性因子	・ ・ ・ ・ ・ 25

2. <i>C. acnes</i> 間における <i>erm(X)</i> の伝達	・ ・ ・ ・ ・ 27
考察	・ ・ ・ ・ ・ 29
第 3 章：新規 clindamycin 耐性因子の探索	
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 31
方法	
1. 使用菌株	・ ・ ・ ・ ・ 32
2. ゲノム DNA の抽出	・ ・ ・ ・ ・ 32
3. ゲノムシーケンスおよび解析	・ ・ ・ ・ ・ 32
4. pTZC1 の検出	・ ・ ・ ・ ・ 33
5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による解析	・ ・ ・ ・ ・ 34
6. <i>C. acnes</i> の遺伝学的分類法による解析	・ ・ ・ ・ ・ 34
7. Filter mating 法による pTZC1 の伝達	・ ・ ・ ・ ・ 35
8. 薬剤感受性の測定および使用薬剤	・ ・ ・ ・ ・ 35
結果	
1. 新規 clindamycin 耐性因子の探索	・ ・ ・ ・ ・ 36
2. pTZC1 の検出と保有株の特徴	・ ・ ・ ・ ・ 39
3. pTZC1 の伝達機構の解析	・ ・ ・ ・ ・ 39
考察	・ ・ ・ ・ ・ 43
総括	・ ・ ・ ・ ・ 45
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 47
参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 48
研究成果の掲載	・ ・ ・ ・ ・ 56

【 略 語 一 覧 】

AMR	antimicrobial resistance
BLAST	basic local alignment search tool
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Petersen
CFU	colony forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	deoxyribonucleic acid
GAM	gifu anaerobic medium
IGF	insulin-like growth factor
IL	interleukin
MIC	minimum inhibitory concentration
MLS _B	macrolides-lincosamides-streptogramin B
MLST	multilocus sequence typing
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
O.D.	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
QOL	quality of life
QRDR	quinolone resistance-determining region
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
SLST	single-locus sequence typing
SNP	single nucleotide polymorphism
ST	sequence type
TNF	tumor necrosis factor
TLR	toll-like receptor
tRNA	transfer ribosomal ribonucleic acid
TSA	tryptone soya agar
TSB	tryptone soya broth
WHO	World Health Organization

【 序 論 】

アクネ菌 *Cutibacterium acnes* は、嫌気性のグラム陽性桿菌であり、大きさはおよそ $0.5\sim 0.8\times 1.0\sim 5.0\ \mu\text{m}$ の芽胞非形成菌である。ヒトの皮膚常在菌であり、皮脂腺が分布する顔面や胸背部に定着している¹⁾。*C. acnes* は、これまで *Propionibacterium acnes* として広く知られていたが、2016年に菌株が分離される試料やコアゲノムの違いから、*P. acnes* に加えて、*P. avidum*、*P. granulosum*、*P. humerusii*、*P. namnetense* が、ヒトの皮膚 (cutis) から命名された *Cutibacterium* 属に再編された²⁾。

ヒトの皮膚上には、*C. acnes* や *Staphylococcus epidermidis* などの細菌のみならず、真菌やウイルスなど種々の微生物が常在し、常在微生物叢を形成することで病原体に対する物理的なバリアーとして働いている^{1,3)}。また、常在微生物が免疫刺激となり宿主の免疫防御機能を向上させる化学的バリアーとしての一面も有しており、これらの働きによって病原体がヒトの皮膚へ定着することを防いでいる。加えて、皮膚常在菌の代謝によって生じた脂肪酸や glycerol は皮膚の湿潤維持等にも寄与していることから、病原微生物の定着防止および皮膚機能の維持に重要な役割を担っている^{1,4,5)}。

C. acnes の遺伝子分類法として、主に phylogenetic typing、multilocus sequence typing (MLST)、single-locus sequence typing (SLST) の3種が知られている。2005年に McDowell *et al.* によって報告された phylogenetic typing は、housekeeping gene である *recA* 遺伝子および溶血毒素をコードする *tly* 遺伝子の塩基配列から、*C. acnes* を type I および II に分類し、その後、6つの phylotype (IA₁、IA₂、IB、IC、II、III) に細分化している⁶⁻⁹⁾。MLSTは複数の housekeeping gene の塩基配列を解析し allele 番号を割り当て、その組み合わせから sequence type (ST) を決定する。普遍的でより詳細な菌株の疫学解析を目的に作成された方法であり、*C. acnes* 以外の様々な菌種でも利用されている。*C. acnes* では、解析対象となる housekeeping gene が8つの手法 (MLST₈) と9つの手法 (MLST₉) がある^{8,10)}。2018年には、*C. acnes* に特異的な1つの housekeeping gene の塩基配列を解析して分類する SLST が開発された¹¹⁾。SLSTは、解析対象となる housekeeping gene が1つであることから、低コストかつより簡便に分類することが可能である。

C. acnes が産生する病原因子として、溶血毒素や lipase、hyaluronidase などが報告されている^{12,13)}。2004年に明らかとされた *C. acnes* KPA171202 株の全ゲノム配列より、Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) factor の homolog が見出され、病原性因子としての可能性が示されたが、*C. acnes* が関連する痤瘡病態との関連性については不明であり、現在まで各遺伝子分類法で決定された遺伝子型に特徴的な病原因子は見出されていない^{4,14)}。

一般にニキビとして知られている痤瘡は、*C. acnes* が増悪因子となることが知られている。加えて、近年では、*C. acnes* が眼科や整形外科、形成外科における手術部位感

染症、前立腺がんやサルコイドーシスの病態に関与することが報告されており、治療の対象として臨床における重要性は高まっている^{3,15-19}。

痤瘡は世界中の多くのヒトが経験する慢性の炎症性皮膚疾患であり、病態は次のようなプロセスを経る^{1,20-22}。まず、皮脂などの老廃物の貯留により形成される角栓で毛包が閉塞した微小面皰 (microcomedo) が形成される。その後、皮脂が蓄積し、非炎症性皮疹 (白ニキビ) となる。ついで、毛包の閉塞により嫌気条件下となったことで *C. acnes* が過剰増殖する。過剰増殖した *C. acnes* の菌体は、免疫細胞の toll-like receptor (TLR) -2 および TLR-4 を介して、転写因子である nuclear factor-kappa B (NF-κB) の活性化および炎症性サイトカイン産生の誘導に関与する¹³。また、皮脂に含まれる脂肪酸が毛包漏斗部の上皮細胞を刺激することで、interleukin (IL) -1 や IL-6、IL-8、tumor necrosis factor (TNF) -α を始めとする炎症性サイトカインなどの産生が増強され、炎症性皮疹 (赤ニキビ) へと進展する^{13,22}。さらに、*C. acnes* は、propionic acid などの短鎖脂肪酸の産生や、細菌性 lipase によって皮脂中の triglyceride を分解し脂肪酸を遊離させる⁴。一方、宿主であるヒトにおいても、高血糖食によって分泌される insulin-like growth factor (IGF) -1 による炎症性サイトカインおよび皮脂産生の亢進が報告されている²³。

痤瘡の発症は、皮脂産生が活発となる青年期がピークとされ、ドイツにおける有病率の調査では 10 歳代後半で 61.7%、20 歳代で 64.0% と非常に高く、また、30 歳代でも 43.5% と青年期以降にも認められる²⁴。皮脂産生以外にも、ストレスや月経などが痤瘡に関連する因子として報告されていることから、痤瘡の発症および増悪には *C. acnes* だけではなく、宿主側の因子も含め、様々な要因が複雑に関連している²⁵。さらに炎症の進行とともに、皮膚の陥没や隆起、色素沈着から成る瘢痕が形成される。瘢痕は治癒が困難であり、患者に精神的ストレスを与えるだけではなく、若年層においてはいじめや不登校、自殺の原因になる可能性がある^{26,27}。したがって、痤瘡は患者の quality of life (QOL) を大きく低下させることから、治療の重要性は高い。

痤瘡治療では、発症や増悪に関連するとされる *C. acnes* の除菌を目的として、抗菌薬が処方されている。日本では、古くから抗菌薬が経験的に使用されていたが、2008 年に痤瘡治療ガイドラインが策定され、痤瘡の治療レベル向上を目的とした標準的な治療法が提示された²⁸。さらに、2016 年にガイドラインが改訂され、薬剤耐性菌の出現を抑制するために、痤瘡の治療方針を急性炎症期と維持期 (非炎症期) に分類して示している²⁹。痤瘡治療においては、外用抗菌薬としてリンコマイシン系の clindamycin やキノロン系の nadifloxacin および ozenoxacin の使用がガイドラインで推奨されている。また、中等症以上の患者には、経口抗菌薬としてテトラサイクリン系の doxycycline や minocycline、マクロライド系の roxithromycin、β-ラクタム系の faropenem などの使用が推奨される。さらに、非炎症性皮疹に対する面皰改善薬とし

て、2008年に表皮角化細胞の分化を抑制し角層の肥厚を抑制する adapalene が、2015年に角層剥離を促して角層の肥厚を改善する benzoyl peroxide が導入されたことで、痤瘡治療の幅が広がり、様々な病態の患者への対応が可能となっている^{28,29)}。

一方で、抗菌薬の使用に伴い、世界中で薬剤耐性 *C. acnes* の出現が報告されている。1970年頃に外用 erythromycin が使用され始めると、1979年にアメリカ、1988年にヨーロッパでマクロライド耐性 *C. acnes* が初めて分離され、現在までその流行は拡大している³⁰⁻³³⁾。さらに、経口薬として使用されるテトラサイクリン系薬に対する耐性株は、1983年にアメリカで初めて報告され、2000年以降はヨーロッパやシンガポールなど世界中で分離されるようになった^{33,34)}。日本においては、1996-1997年の時点で薬剤耐性 *C. acnes* の存在は認められていなかった³⁵⁾。しかし、1999年に erythromycin や clindamycin、doxycycline に耐性を示す菌株が分離されるようになり、2006-2007年には erythromycin および clindamycin の耐性株がそれぞれ 10.4%および 8.3%認められた³⁶⁻³⁹⁾。さらに、2009-2010年になると、erythromycin および clindamycin 耐性率の顕著な増加が認められ、doxycycline 耐性株も認められた⁴⁰⁾。また、levofloxacin 耐性株も認められているが、痤瘡治療でキノロン系薬が使用される地域が日本やインド、一部のヨーロッパなどに限定的であるため、耐性菌分離の報告は少ない^{33,40-43)}。

マクロライド系薬は、50S ribosome の subunit である 23S rRNA の peptidyl transferase をコードする domain V に結合し、細菌のタンパク質合成を阻害することで抗菌作用を示す⁴⁴⁾。種々の細菌種におけるマクロライド耐性機構として、薬剤標的部位の変異や修飾、薬剤の修飾に起因する結合親和性の低下や、薬剤排出ポンプの獲得が知られている⁴⁵⁾。*C. acnes* においては、薬剤標的部位の変異および修飾による耐性化が報告されている (Fig. 1)。薬剤の結合部位である 23S rRNA の遺伝子変異は、2057位における guanine から adenine への変異 (G2057A)、2058位および 2059位における adenine から guanine への変異 (A2058G、A2059G)、2611位における cytosine から guanine への変異 (C2611G) が知られている^{46,47)}。変異による耐性化は、変異部位によってマクロライド系薬および clindamycin に対する耐性レベルが異なり、ほとんど認められない G2057A 変異株を除き、14員環マクロライド系薬である erythromycin や roxithromycin には高度耐性を示すが、clindamycin には低感受性～高度耐性を示す (Table 1)^{47,48)}。もう1つの耐性因子である標的部位の修飾は、外来性薬剤耐性遺伝子 *erm(X)* の獲得が知られている。*erm(X)* にコードされる 23S rRNA methylase が、薬剤標的部位である 23S rRNA の 2058位における adenine のジメチル化修飾を行うことにより、薬剤親和性を低下させる⁴⁶⁾。*erm(X)* の獲得による耐性化は、マクロライド系薬および clindamycin のどちらに対しても高度耐性を示す (Table 1)。これらの耐性機構は、薬剤の標的部位を変化・修飾させることから、マクロライド系薬だけでなく、化学構造は異なるが標的部位が同一であるリンコマイシン系の clindamycin やストレプトグラミン系薬に交差

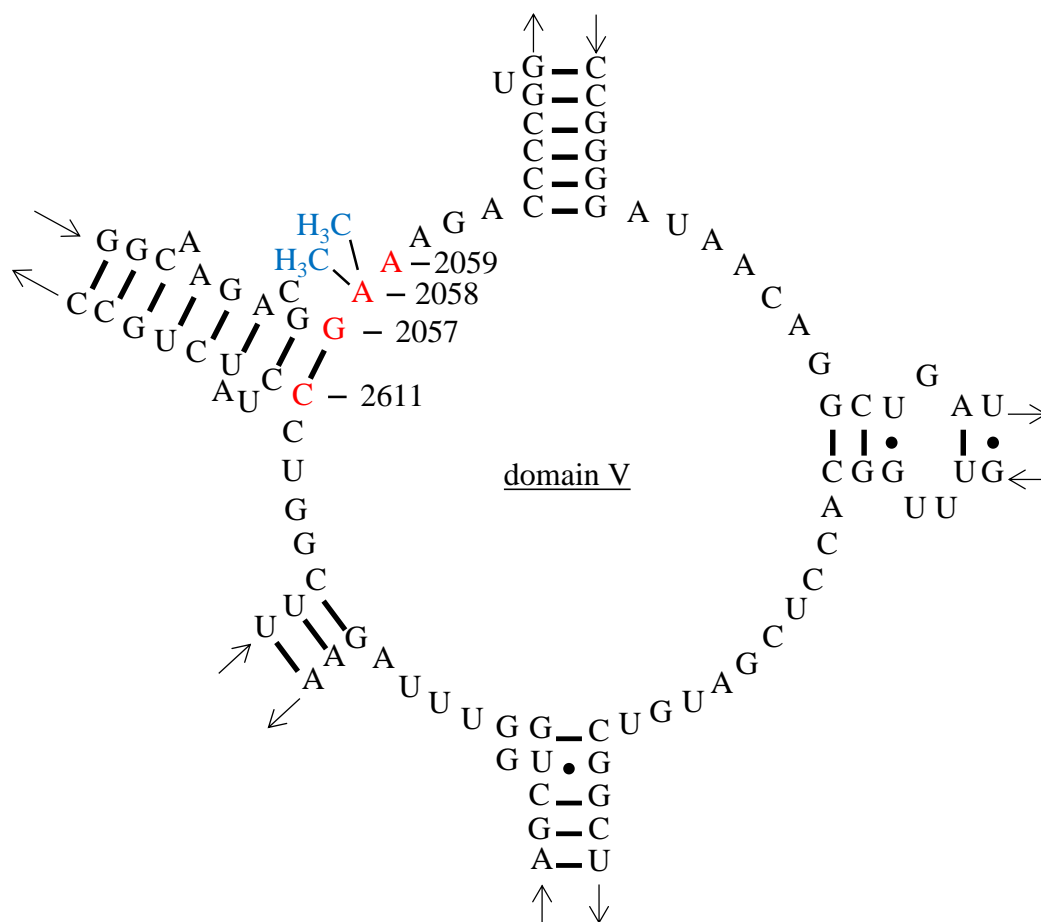


Fig. 1. The secondary structure of 23S rRNA domain V.

Mutations at nucleotides shown in red and dimethylation of adenine at position 2058 by Erm(X) confer the resistance to macrolides and clindamycin.

Table 1. Susceptibilities of erythromycin and clindamycin in *C. acnes* isolates having each resistance determinant^{47,48)}

Resistance determinant	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	Erythromycin	Clindamycin
23S rRNA mutation		
G2057A	1 - 2	≤ 0.5
A2058G	≥ 512	4 - 512
A2059G	≥ 512	1 - 64
C2611G	≥ 256	≤ 0.5
<i>erm(X)</i>	≥ 512	≥ 512
None (susceptible)	≤ 0.5	≤ 0.5

MIC, minimum inhibitory concentration

耐性を示すため、macrolides-lincosamides-streptogramin B (MLS_B) 耐性とも呼ばれる^{44,46}。

経口薬として使用されるテトラサイクリン系薬は、30S ribosome の subunit である 16S rRNA に結合し、aminoacyl tRNA とリボソームの結合を阻害することで細菌のタンパク質の合成を阻害し、抗菌作用を示す⁴⁹。テトラサイクリン耐性機構として、薬剤標的部位の遺伝子変異および薬剤排出ポンプをコードする *tet(K)* や ribosomal protection protein をコードする *tet(M)* や *tet(O)*、薬剤を不活化させる *tet(X)* などの耐性遺伝子の獲得が知られている⁴⁹⁻⁵²。*C. acnes* においては、16S rRNA の 1036 位における guanine から cytosine への遺伝子変異 (G1036C) および *rpsJ* 遺伝子にコードされる 16S rRNA を構成する ribosomal S10 protein のアミノ酸置換に起因する結合親和性の低下による耐性化が知られており、耐性因子を複数獲得することで段階的に耐性レベルが上昇する⁵³。

キノロン系薬は、GyrA と GyrB から構成される DNA gyrase および ParC と ParE から構成される DNA topoisomerase IV と DNA の複合体に結合し、細菌の DNA の複製を阻害することで抗菌作用を示す⁵⁴⁻⁵⁶。キノロン耐性機構として、各 subunit の quinolone resistance-determining region (QRDR) におけるアミノ酸置換や、*aac(6')-Ib-cr* 遺伝子にコードされる acetyltransferase による薬剤の修飾、*qacB* 遺伝子にコードされる排出ポンプによる薬剤の排出が知られている⁵⁷⁻⁵⁹。*C. acnes* においては、GyrA における 101 および 105 番目 (*Escherichia coli* の 84 および 88 番目に相当) のアミノ酸置換 (Ser101Leu および Asp105Gly) に起因する薬剤親和性の低下による耐性化が報告されている⁶⁰。

現在、世界中で薬剤耐性菌が出現および流行しており、2011 年に世界保健機関 (World Health Organization, WHO) は、薬剤耐性 (antimicrobial resistance, AMR) 問題を世界中で取り組むべき課題として挙げ、2015 年には世界的な AMR 対策として、薬剤耐性菌の動向や抗菌薬使用量の継続的な監視、医療だけではなく畜水産等の分野も含めた抗菌薬の適正使用の推進といった、グローバルアクションプランが採択された⁶¹。本邦においても、2016 年に WHO が提起したプランに国際協力を加えた独自の AMR 対策アクションプランが決定された⁶²。薬剤耐性菌は、抗菌薬の有効性を低下させ、重症化や治療の長期化につながる可能性がある。痤瘡における抗菌薬治療は 2 週間～3 か月と、他の感染症と比べ非常に長いことから、薬剤耐性菌が出現しやすいと言えるため、より適切な抗菌薬の使用が求められる。そこで本研究では、日本の痤瘡患者における薬剤耐性 *C. acnes* の流行状況を明らかにするため、痤瘡由来 *C. acnes* の薬剤感受性について調査した。さらに、日本で著しい増加が認められ、痤瘡治療にも影響を及ぼす可能性がある clindamycin 耐性 *C. acnes* の流行状況および出現と増加のメカニズムについて研究した。

第 1 章では、日本の痤瘡患者における薬剤耐性 *C. acnes* の流行状況の把握および痤

瘡治療における抗菌薬使用による薬剤耐性化への影響を評価するため、瘡膿検体を収集し *C. acnes* を分離・解析した。第2章では、*C. acnes* で保有が報告されている外来性薬剤耐性遺伝子である *erm(X)* の伝達および伝達機構について研究した。第3章では、既知の耐性因子が検出されない高度 clindamycin 耐性 *C. acnes* における耐性因子の探索と *C. acnes* 間での耐性因子の伝達について研究した。

第 1 章：日本における痤瘡由来 *C. acnes* の薬剤耐性調査

【 緒 言 】

感染症治療において、薬剤耐性菌は抗菌薬の有効性を低下させるため、その出現および拡大を抑制することが重要である。痤瘡治療においては、増悪因子である *C. acnes* の除菌を目的として抗菌薬が使用され、特にマクロライド系薬および clindamycin は、抗菌作用だけでなく、抗炎症作用も示すことから、世界各国のガイドラインでその使用が推奨されている^{29,63-65)}。しかし、これらの抗菌薬の使用に伴い、マクロライドおよび clindamycin 耐性 *C. acnes* の出現および増加が世界中で報告されている³³⁾。外用薬として使用される clindamycin に対する耐性菌は日本でも増加傾向にあり、1999 年では 4.0%であったのに対し、2009-2010 年では 18.8%と著しい増加が認められている^{35,40)}。そこで本章では、現在の日本における痤瘡患者から分離される *C. acnes* の薬剤耐性状況を明らかにし、痤瘡治療における抗菌薬使用による薬剤耐性化への影響を評価するため、2013-2015 年に病院の痤瘡専門外来を受診した痤瘡患者から分離した *C. acnes* について研究した。

【 方 法 】

1. 使用菌株および患者背景

2013-2015 年に虎の門病院の瘡瘍専門外来を受診した 113 名の患者検体のうち、68 名から分離された 70 株の *C. acnes* を使用した。*C. acnes* が分離された瘡瘍患者 68 名のうち、軽症患者は 28 名 (41.2%)、中等症患者は 28 名 (41.2%)、重症患者は 10 名 (14.7%) であり、重症度不明は 2 名であった。情報が得られた患者の平均年齢は 25.3 ± 7.0 歳であり、男性 10 名 (20.9 ± 2.8 歳)、女性 56 名 (26.2 ± 7.3 歳) であった。

薬剤感受性試験には、感受性基準株として *C. acnes* ATCC11828 株、type strain として *C. acnes* ATCC6919 株を使用した。

2. *C. acnes* の分離および培養

検体は Transystem[®] CARY BLAIR medium plastic applicator rayon tipped (COPAN) を使用して、瘡瘍膿疱内容物を採取した。検体は modified Gifu anaerobic medium (GAM) agar (Nissui Pharmaceutical) に塗布し、35°C、嫌気条件下で 72 hr 培養した。増殖したコロニーを、嫌気条件下で modified GAM agar、好気条件下で tryptone soya broth (TSB: Oxoid) に、1.5%の濃度となるように agar bacteriological No. 1 (Oxoid) を加えて調整した tryptone soya agar (TSA) にて純培養した。modified GAM agar でのみ増殖したコロニーを嫌気性菌とし、Favor G “Nissui” (Nissui Pharmaceutical) を使用してグラム染色を行った。グラム陽性桿菌と判定された菌について、API 20A (bioMérieux) を用いて *C. acnes* の同定を行った⁴⁰⁾。

3. 薬剤感受性の測定

C. acnes の薬剤感受性は、minimum inhibitory concentration (MIC) を測定し、判定した。MIC は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の嫌気性菌測定法に準じ、寒天平板希釈法により測定した^{66,67)}。測定用寒天培地には、5 µg/mL hemin (Alfa Aesar)、1 µg/mL vitamin K (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.)、5% lysed defibrinated sheep blood (Nippon Bio-Test Laboratories) を含有した Brucella agar (Becton Dickinson) を用いた。菌懸濁用液体培地には、5 µg/mL hemin、1 µg/mL vitamin K、5% lysed defibrinated horse blood (Nippon Bio-Test Laboratories) を含有した Brucella broth (Becton Dickinson) を用いた。Lysed blood は、血液を十分溶血が起こるまで凍結融解を繰り返し、 $12,000 \times g$ 、20 min 遠心分離を行い、その上清を用いた。測定用寒天培地に塗布し、35°C、嫌気条件下で 48 hr 培養した菌を、懸濁用液体培地に MacFarland standard (bioMérieux) 0.5 と同程度 [約 1.5×10^8 colony forming unit (CFU)/mL] となるように懸濁し、各種抗菌薬を含有した測定用寒天培地にミクロプランター MIT-P 型 (Sakuma) を用いて接種した。接

種した培地は、35°C、嫌気条件下で 48 hr 培養した。菌の生育を目視で判定し、菌の発育を阻止した最小の抗菌薬濃度をその菌株に対する MIC ($\mu\text{g/mL}$) とした。得られた MIC 値がブレイクポイント以上を示した場合を耐性とした。各々の薬剤に対するブレイクポイントは CLSI の値および本研究室で定めた値を用いた (Table 2)^{40,68}。なお、外用薬として使用される nadifloxacin および gentamicin にはブレイクポイントを設定しなかった。

Table 2. Resistance breakpoint of antimicrobial agents used in this study

Antimicrobial agent	Breakpoint ($\mu\text{g/mL}$)	Antimicrobial agent	Breakpoint ($\mu\text{g/mL}$)
Amoxicillin	16	Azithromycin	2*
Cefaclor	16	Clindamycin	8
Cefdinir	64	Ciprofloxacin	8
Cefditoren	64	Levofloxacin	8
Faropenem	16	Nadifloxacin	ND
Erythromycin	2*	Doxycycline	16
Clarithromycin	2*	Minocycline	16
Roxithromycin	2*	Gentamicin	ND

ND, not defined; * Defined in this study

4. 使用薬剤

薬剤感受性測定には、16 種の抗菌薬を使用した。Cefditoren sodium (Meiji Seika Pharma)、faropenem sodium (Maruho)、nadifloxacin (Otsuka Pharmaceutical) は製造元から入手した。Amoxicillin、cefaclor、cefdinir、levofloxacin hydrochloride、erythromycin、clarithromycin、roxithromycin、clindamycin hydrochloride、doxycycline hyclate、minocycline hydrochloride は SIGMA-ALDRICH から、azithromycin は Tokyo Chemical Industries から、ciprofloxacin hydrochloride、gentamicin sulfate は FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. から購入した。

5. 薬剤耐性因子の検出

マクロライドおよび clindamycin 耐性因子である 23S rRNA 遺伝子の変異は、DNA sequencer による塩基配列解析で決定した⁶⁹。0.2 mL tube (Bio-Bik) に菌液を 1 μL 、配列特異的な合成 primer (Table 3) を各々 10 pmol、Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) を 10 μL 加え、滅菌超純水で全量を 20 μL となるように混合した。菌液は、シングルコロニーを滅菌水 100 μL に懸濁した試料を用いた。これを Veriti Thermal

cycler (Thermo Fisher Scientific) にセットし、初期変性を 98°C、30 sec で行った後、98°C、10 sec の変性、58°C、30 sec のアニーリング、72°C、2 min の伸長反応を 25 サイクル行った。DNA 増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。PCR 産物の精製は Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて行った。精製した PCR 産物は、BigDye[™] Terminator ver. 3.1 Cycle sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、ジデオキシターミネーター法によりシーケンス反応を行った。データ解析は、DNA sequencing Analysis ソフトウェア Version 5.1 (Thermo Fisher Scientific)、ATGC Ver. 6 (Genetyx)、GENETYX ver.10 (Genetyx) を用いて、標的遺伝子の塩基配列を解析した。標的遺伝子の参照配列として、全ゲノムが既知である ATCC11828 株 (Accession number: CP003084) を使用した。

また、*erm(X)* の検出は PCR により行った。0.2 mL tube に菌液を 1 µL、配列特異的な合成 primer (Table 3) を各々 10 pmol、GoTaq[®] green master mix (Promega) を 5 µL を加え、滅菌超純水で全量を 10 µL となるように混合した。これを Veriti Thermal cycler にセットし、初期変性を 94°C、3 min で行った後、94°C、30 sec の変性、56°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。DNA 増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。

6. *C. acnes* の遺伝学的分類法による解析

C. acnes の遺伝学的分類は SLST で行った¹¹⁾。0.2 mL tube に菌液を 1 µL、配列特異的な合成 primer (Table 3) を各々 10 pmol、Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase を 10 µL 加え、滅菌超純水で全量が 20 µL となるように混合した。これを Veriti Thermal cycler にセットし、初期変性を 98°C、30 sec で行った後、98°C、10 sec の変性、60°C、30 sec のアニーリング、72°C、20 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。DNA 増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。PCR 産物は、第 1 章【方法】5 と同様の方法で精製および塩基配列の解析を行った。SLST は、”SLST for *Propionibacterium acnes*” (<http://medbac.dk/sl原因/pacnes>) で決定した。

7. 統計学的解析

患者の年齢と痤瘡の重症度については *t*-test、耐性株分離率と抗菌薬使用歴については Fisher's exact test により、 $P < 0.05$ のときに統計学的に有意とした。

8. 倫理的配慮

虎の門病院倫理委員会の承認の下、患者のインフォームドコンセントを取り、検体採取が行われた。アンケート調査の結果は、個人が特定される情報を完全に切り離れた上で提供を受けた。

Table 3. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Oligonucleotide (5' to 3')	T _m (°C)	Product size (bp)	Reference
<i>E. coli</i> -23S_F	AGTCGGGACCTAAGGCGAG	58.0	1,551	37)
<i>E. coli</i> -23S_R	TTCCCGCTTAGATGCTTTCAG	58.2		
acnes 23S_sequence-F	TTGACTGTGAGACTGACAGG	53.4	Sequencing	37)
acnes 23S_sequence-R	ATCACAACCCGACGTAGCCA	53.2		
<i>erm</i> (X)_I-F	CTCACCAACCACAAGATCATC	62.0	710	37)
<i>erm</i> (X)_I-R	GAAGAGATCGATCCAGTCGTT	62.1		
SLST-F	CAGCGGCGCTGCTAAGAACTT	62.7	Variable	11)
SLST-R	CCGGCTGGCAAATGAGGCAT	66.1		

SLST-F and -R were also used for DNA sequencing.

【 結 果 】

1. 薬剤感受性調査

2013-2015 年に分離された 70 株の *C. acnes* について薬剤感受性を測定した (Table 4)。β-ラクタム系薬である amoxicillin や cefaclor、cefdinir、cefditoren、faropenem に対して 1 株を除いて良好な感受性を示した。一方、マクロライド系薬および clindamycin 耐性株は、それぞれ、31 株 (44.3%, 31/70 株) および 27 株 (38.6%, 27/70 株) 認められた。加えて、キノロン系薬である levofloxacin に耐性を示す菌株は 8 株 (11.4%, 8/70 株) 認められた。テトラサイクリン系薬である doxycycline に耐性を示す菌株は 1 株 (1.4%, 1/70 株) のみであったが、低感受性株 (MIC \geq 8 μ g/mL) は 3 株 (4.3%) 認められた。

2. マクロライドおよび clindamycin 耐性因子の解析

マクロライド系薬に耐性を示した 31 株の *C. acnes* について、耐性因子である 23S rRNA 遺伝子変異の解析および外来性薬剤耐性遺伝子 *erm(X)* の検出を行った (Table 5)。遺伝子変異を有する耐性株が 17 株と最も多く、*erm(X)* 保有株は 6 株であった。一方で、既知の耐性因子が認められない耐性株 (not determined) が 8 株認められた。耐性因子ごとにマクロライド系薬および clindamycin の MIC を比較したところ、23S rRNA 変異株は、マクロライド系薬に対し高度耐性 (64 - \geq 256 μ g/mL) を示した (Fig. 2A)。一方、clindamycin に対しては、低度～高度耐性 (2 - \geq 256 μ g/mL) であった (Fig. 2B)。*erm(X)* 保有株は、マクロライド系薬および clindamycin の両薬剤に対して、高度耐性 (64 - \geq 256 μ g/mL) を示した。同様に、既知の耐性因子が認められない耐性株も、マクロライド系薬および clindamycin に高度耐性 (MIC \geq 256 μ g/mL) を示した。

Table 4. Antimicrobial susceptibility of *C. acnes* isolated from patients with acne vulgaris in 2013 to 2015

Antimicrobial agent	2013 (n = 32)		2014 (n = 20)		2015 (n = 18)		Total (n = 70)	
	MIC ₉₀	Resistance (%)	MIC ₉₀	Resistance (%)	MIC ₉₀	Resistance (%)	MIC ₉₀	Resistance (%)
Amoxicillin	0.13	0	0.13	0	0.13	0	0.13	0
Cefaclor	1	0	2	0	2	5.6	2	1.4
Cefdinir	≤0.06	0	≤0.06	0	≤0.06	0	≤0.06	0
Cefditoren	0.25	0	≤0.06	0	0.13	0	0.13	0
Faropenem	≤0.06	0	≤0.06	0	≤0.06	0	≤0.06	0
Erythromycin	≥256	46.9	≥256	55.0	≥256	27.8	≥256	44.3
Clarithromycin	≥256	46.9	≥256	55.0	≥256	27.8	≥256	44.3
Roxithromycin	≥256	46.9	≥256	55.0	≥256	27.8	≥256	44.3
Azithromycin	≥256	46.9	≥256	55.0	≥256	27.8	≥256	44.3
Clindamycin	≥256	37.5	≥256	50.0	≥256	27.8	≥256	38.6
Ciprofloxacin	4	0	8	10.0	2	5.6	4	4.3
Levofloxacin	16	12.5	16	15.0	1	5.6	8	11.4
Nadifloxacin	8	-	16	-	1	-	8	-
Doxycycline	2	0	2	5.0	4	0	2	1.4
Minocycline	1	0	0.5	0	2	0	1	0
Gentamicin	32	-	16	-	2	-	32	-

Resistance breakpoints of nadifloxacin and gentamicin were not defined.

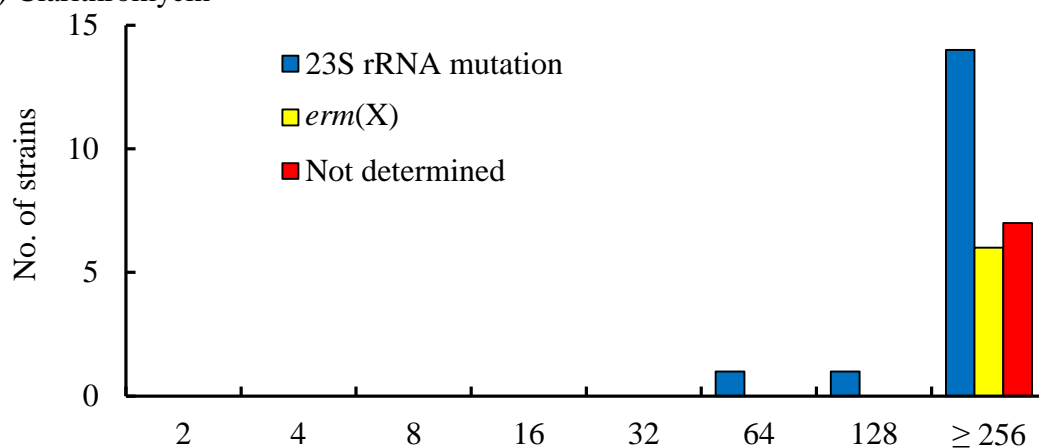
MIC₉₀ means minimum inhibitory concentration (µg/mL) inhibiting the growth of 90 % of strains.

Table 5. Determination of macrolide resistance factors in macrolides-resistant *C. acnes*

Resistance determinant	No. (%) of strains			
	2013 (n = 15)	2014 (n = 11)	2015 (n = 5)	Total (n = 31)
23S rRNA mutation	10 (66.7)	5 (45.5)	2 (40.0)	17 (54.8)
A2058G	6	2	2	10
A2058T	1	0	0	1
A2059G	3	3	0	6
<i>erm(X)</i>	1 (6.7)	4 (36.4)	1 (20.0)	6 (19.4)
Not determined*	4 (26.7)	2 (18.2)	2 (40.0)	8 (25.8)

* The strains had undetermined resistance factor.

(A) Clarithromycin



(B) Clindamycin

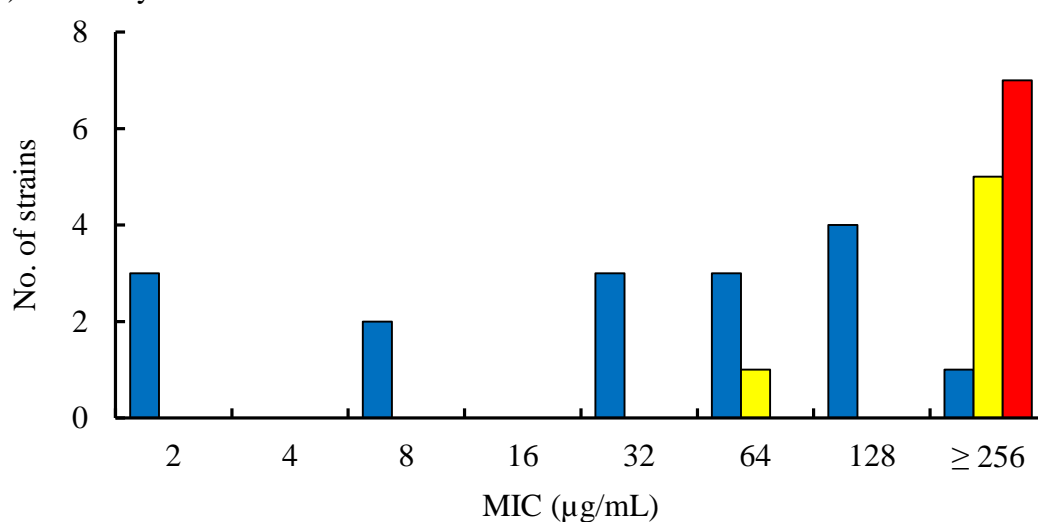


Fig. 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) distributions of (A) clarithromycin and (B) clindamycin-resistant *C. acnes*.

3. *C. acnes* が分離された痤瘡患者の特徴

痤瘡患者を重症度ごとに解析した (Table 6)。重症患者の平均年齢は軽症および中等症の患者より有意に低かった ($P < 0.05$)。また、マクロライド系薬および clindamycin 耐性株の分離率は、軽症および重症患者で高かった。抗菌薬の使用歴は、外用薬である clindamycin では重症度による使用歴に違いは認められなかったが、その一方で、内服薬であるマクロライド系薬やテトラサイクリン系薬では、軽症患者と比べ重症患者で使用歴を有している患者が有意に多かった。

患者の各抗菌薬の使用歴の有無とその薬剤に対する耐性菌の分離率を解析した (Fig. 3)。マクロライド系薬もしくは clindamycin を使用していた患者の 55.3% (26/47 名) からマクロライド系薬および clindamycin 耐性株が分離され、使用していない患者の 21.7% (4/19 名) と比べ、有意に高い分離率を示した ($P < 0.05$)。同様に、テトラサイクリン系薬についても、使用していた患者の方が高い耐性菌分離率を示した。

Table 6. Characteristics of the patients from which *C. acnes* were isolated

Characteristic	Acne severity		
	Mild (n = 28)	Moderate (n = 28)	Severe (n = 10)
Mean age (years)	26.9 ± 7.2*	24.9 ± 7.0*	21.6 ± 3.6
Females (%)	92.9 [†]	82.1	60.0
Antimicrobial-resistant <i>C. acnes</i> (%)			
Macrolides	53.6	35.7	50.0
Clindamycin	46.4	32.1	40.0
Quinolones	14.3	14.3	0
Tetracyclines	0	3.6	10.0
History of antimicrobial agents use (%)			
Oral macrolides	17.9 [†]	25.0	60.0
Topical clindamycin	67.9	53.6	60.0
Quinolones [‡]	17.9 [†]	25.0	60.0
Oral tetracyclines	32.1	42.9	60.0
Others [§]	0	7.1	20.0

* Significantly different vs. severe acne patient by *t*-test ($P < 0.05$).

[†] Significantly different vs. severe acne patient by Fisher's exact test ($P < 0.05$).

[‡] Quinolones include topical nadifloxacin and oral levofloxacin.

[§] Others consist of topical gentamicin and oral faropenem.

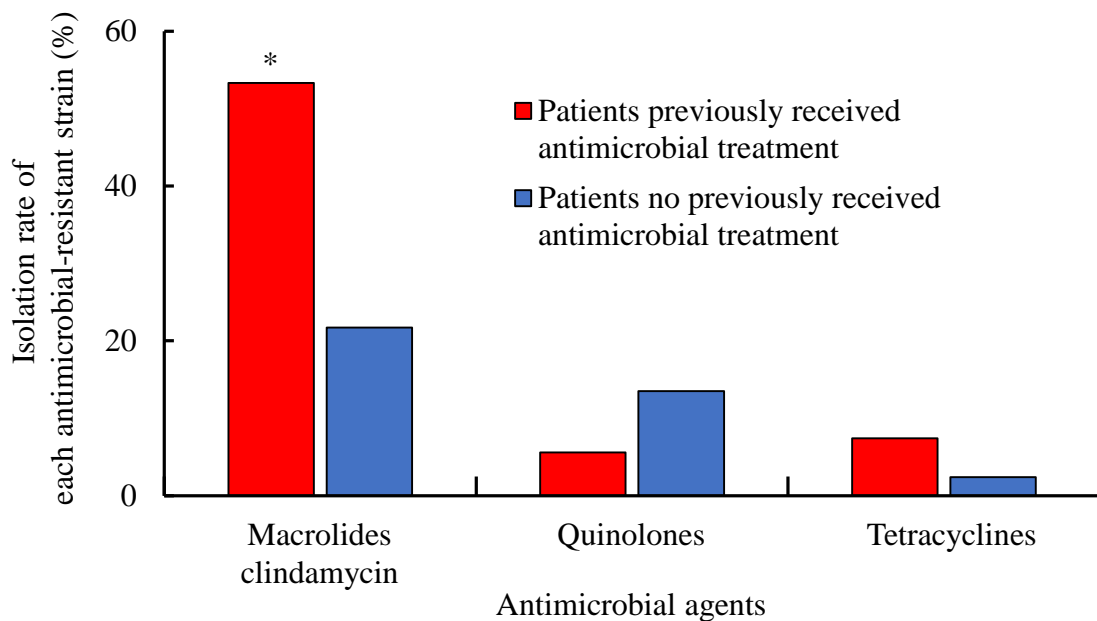


Fig. 3. Relationship between antimicrobial use and isolation rate of antimicrobial-resistant *C. acnes*.

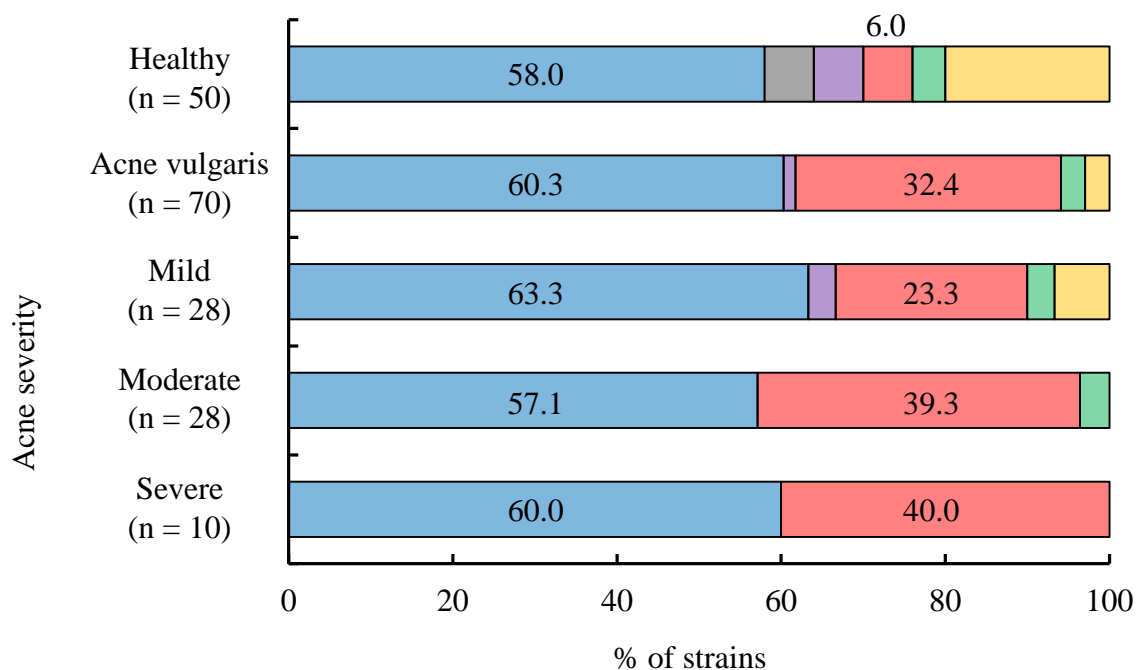
* Significantly different vs. patients no previously received antimicrobial treatment by Fisher's exact test ($P < 0.05$).

4. *C. acnes* の遺伝学的分類法による解析

C. acnes について、SLST を用いて遺伝子型を決定した。その結果、13 の遺伝子型に決定され、近縁な遺伝子型ごとに A、E、F、H、K の 5 つの clade に分類された (Fig. 4)。痤瘡患者から分離された *C. acnes* では、健康成人の皮膚から高頻度で分離される clade A に分類される菌株の占める割合が 60.3% と最も多かった (Fig. 4A)。次いで、健康成人の皮膚からはほとんど認められない clade F に分類される菌株が 32.4% 認められた。痤瘡の重症度別に解析すると、clade A の菌株が占める割合は、重症度に関わらず最も多かった。一方、clade F の菌株は軽症患者で 23.3% であったのに対し、中等症および重症患者では 39.3% および 40.0% と高頻度に分離された。

軽症患者と中等症および重症の患者から分離された *C. acnes* の遺伝子型が異なっていたことから、遺伝子型ごとに clindamycin 耐性率と耐性因子について解析した (Fig. 4B)。その結果、clindamycin 耐性 *C. acnes* は、clade A の菌株が 61.3%、ついで clade F の菌株が 32.3% であり、感受性株と顕著な違いは認められなかった (clade A, 59.0%; clade F, 33.3%)。耐性因子別に解析を行うと、23S rRNA 変異株は clade A の菌株が 82.4% と多く、加えて clade E、F、K と複数の clade で認められた。*erm(X)* 保有株は clade A (83.3%) と F (16.7%) に分類された。一方、既知の耐性因子が認められなかった菌株は、すべて clade F の菌株に分類された。

(A) Acne severity



(B) Macrolide-clindamycin resistance determinant

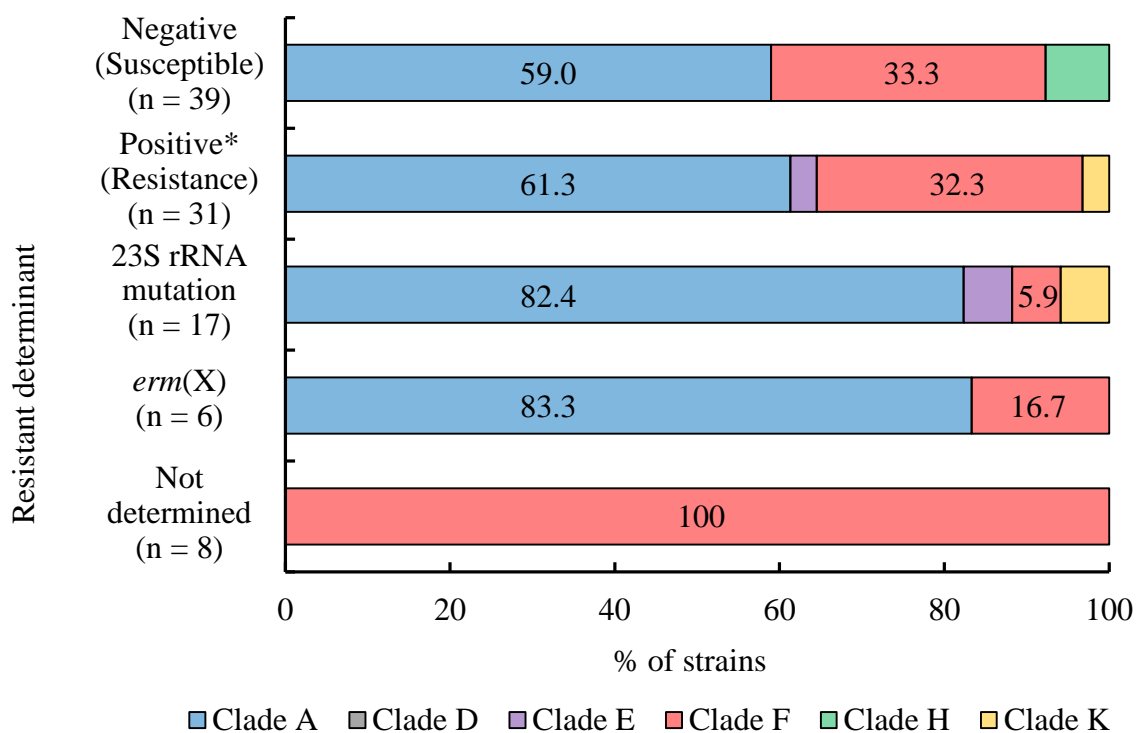


Fig. 4. Proportion of *C. acnes* belonging to each SLST clade.

(A) *C. acnes* isolated from patients of each acne severity.

(B) Macrolides-resistant *C. acnes* having each resistance determinant.

* strains with any resistance determinant.

【 考 察 】

本章では、日本の痤瘡患者から分離された *C. acnes* の薬剤耐性状況を明らかにするため、2013-2015 年に分離された菌株について薬剤感受性調査を行った。

薬剤耐性 *C. acnes* の分離率は、2009-2010 年に日本の大学病院で行われた調査と比較して増加傾向にあり、マクロライド系薬および clindamycin 耐性株は 2 倍、levofloxacin 耐性株は 3 倍の増加が認められた⁴⁰⁾。特に、痤瘡治療で汎用される clindamycin に対する耐性株の増加は、抗菌薬治療の奏効率の低下につながる可能性があるため問題となりうる。そこで、clindamycin 耐性株増加の要因を明らかにするため耐性因子を解析すると、erm(X) 保有株が全体の 8.6%と、2009-2010 年の保有率 (1.4%) と比べ増加していた⁴⁰⁾。加えて、既知の耐性因子が検出されない菌株が 11.4%認められた。したがって、マクロライド系薬および clindamycin 耐性 *C. acnes* の増加は、耐性因子の多様化に起因していることが示唆された。erm(X) 保有株および既知の耐性因子が検出されない耐性株は、マクロライド系薬および clindamycin に対し、MIC $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ を示す高度耐性株であった。Clindamycin は外用薬であるため、痤瘡患部に高濃度で曝露することが可能であり、4 週間使用時の膿疱内濃度は $600 \mu\text{g/mL}$ になると報告されている⁷⁰⁾。しかし、erm(X) 保有株は clindamycin に対して MIC $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ を示すことが報告されており、適切に使用した場合でも十分に抗菌作用を得られない可能性がある⁴⁸⁾。したがって、erm(X) 保有株および既知の耐性因子が検出されない耐性株の増加は、抗菌薬治療の有効性低下に大きく影響を与える可能性がある。

痤瘡治療における抗菌薬の使用と薬剤耐性 *C. acnes* 分離の関連性を解析したところ、抗菌薬使用歴がある患者で高い耐性菌分離率を示した。特に、マクロライド系薬および clindamycin の使用歴がある患者では、これらの薬剤に対する耐性株の分離率が有意に高かった。この要因として、*C. acnes* に対し、マクロライド系薬および clindamycin を MIC 以下の濃度 (sub-MIC) で長期間曝露することで、23S rRNA 変異株が選択されることが挙げられる⁷¹⁾。Clarithromycin 内服時の皮下組織における C_{max} は $0.23 \mu\text{g/mL}$ と報告されており、痤瘡膿疱内の *C. acnes* に対してはさらに低濃度での曝露になることが推測される⁷²⁾。また、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による分子疫学的解析により、同一の耐性株が痤瘡患者で流行していないことが明らかにされている⁴⁰⁾。したがって、服用忘れや漫然とした使用などの不適切な抗菌薬使用によって、患者ごとに耐性菌が出現していることが示唆された。

抗菌薬の使用歴がある患者は、痤瘡の重症度が高いほど多くなる傾向にあったが、重症の痤瘡に対する内服抗菌薬の有効性が認められており、本邦の治療ガイドライン

でも中等症以上の患者に内服抗菌薬の使用が推奨されている (推奨度 A)²⁹⁾。一方で、マクロライド系薬および clindamycin 耐性株の分離率は、重症患者だけではなく軽症患者でも高い傾向にあった。これは、軽症であるために自己判断による治療の中断など不適切な抗菌薬使用をしている可能性が考えられる。しかし、キノロン耐性株については、使用歴の有無と耐性菌分離率に関連性が認められなかった。キノロン系薬は抗菌スペクトルが広いことから、種々の感染症治療に使用されている。したがって、薬剤耐性 *C. acnes* の出現には、痤瘡の重症度や、痤瘡治療における抗菌薬使用歴だけでなく他の感染症に対する抗菌薬の使用歴についても考慮する必要がある。加えて、痤瘡患者において *C. acnes* と同検体から分離された *S. epidermidis* のキノロン耐性率は、*C. acnes* のキノロン耐性率の変化と高い相関を示した⁷³⁾。つまり、痤瘡治療における抗菌薬の使用により、*C. acnes* のみならず他の皮膚細菌も耐性化していることが示唆され、痤瘡治療においても AMR 対策を考慮した抗菌薬の使用が求められる。

SLST を用いて *C. acnes* の遺伝子型を解析したところ、5 つの clade に分類された。痤瘡患者では、clade A の菌株が最も多く、次いで clade F が多く認められた。日本の健康成人の皮膚由来株では、clade A の菌株が最も多く (58.0%)、clade F に属する菌株の分離はまれ (6.0%) であった。同様に、フランスおよびデンマークの健康成人の皮膚における調査では、clade A の菌株が大半を占め、clade F の菌株は認められていない^{11,74)}。また、フランスの痤瘡患者由来株においても clade A の菌株が主流であり、clade F の菌株は認められなかった。スウェーデンの人工関節感染症由来の *C. acnes* でも、clade F の菌株はほとんど分離されることはなく、clade D や K の菌株の関与が報告されている⁷⁵⁾。したがって、clade F の菌株は日本の痤瘡患者に特異的な菌株であることが示唆され、日本人の痤瘡病態と関連している可能性がある。

以上の結果より、第 1 章では、日本の痤瘡患者から分離される *C. acnes* の薬剤耐性状況を明らかにし、マクロライド系薬および clindamycin 耐性株の分離率が増加していることを示した。また、薬剤耐性菌の分離には抗菌薬の使用が大きく関連していることを明らかにした。したがって、耐性菌の出現を抑制するためには、*C. acnes* の薬剤感受性を把握し、適切に抗菌薬を使用することが重要であると考えられる。さらに、一部の痤瘡患者から分離される *C. acnes* 株は、健康成人の皮膚から分離される菌株とは遺伝子型が異なり、clade F に分類される菌株が多いことを示した。Clade F の菌株は、日本の痤瘡患者に特異的な菌株であることが推測されるが、痤瘡病態や薬剤耐性との関連性について、さらなる研究が必要である。

第 2 章

C. acnes における *erm(X)* の伝播機構の解析

【 緒 言 】

痤瘡治療では、外用 clindamycin が多くの国で汎用されている^{29,64,65}。一方で、clindamycin 耐性 *C. acnes* の世界的な流行が認められている³³。*C. acnes* における主な clindamycin 耐性機構は、薬剤標的部である 23S rRNA の変異および外来性薬剤耐性遺伝子 *erm(X)* の獲得による修飾である。特に、外来性遺伝子である *erm(X)* は *Corynebacterium* 由来と考えられる insertion sequence IS1249 を両端に有する transposon Tn5432 上にコードされているため、*C. acnes* 間で転移および伝播する可能性がある (Fig. 5A)^{69,76,77}。しかしながら、*C. acnes* は菌種間や菌株間における遺伝子授受に関する研究が乏しいため、*erm(X)* の伝播については報告されていない。

第 1 章において、日本の痤瘡患者由来 *erm(X)* 保有 *C. acnes* の増加が認められた。そこで、本章では、*erm(X)* 保有株の流行状況を把握するため、2016-2017 年に分離された痤瘡由来 *C. acnes* の薬剤感受性測定および耐性因子の決定を行った。さらに、*C. acnes* 間での *erm(X)* の伝達について研究した。

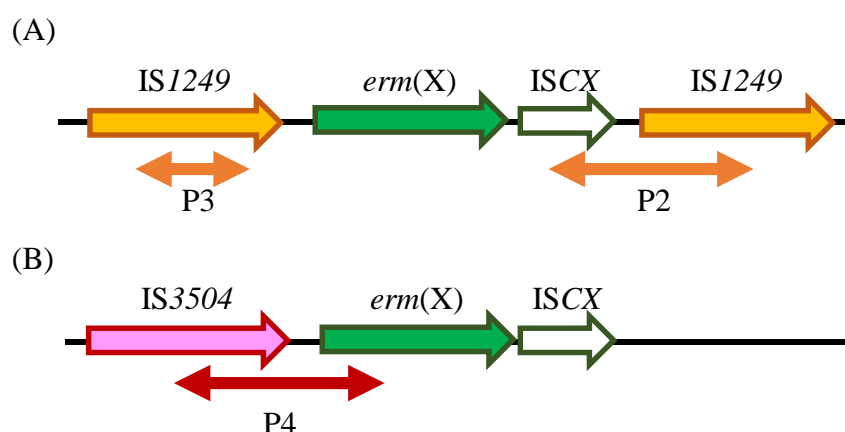


Fig. 5. The organization of flanking regions of *erm(X)*.

The two-way arrows show the position of PCR products for detection of transferable factors (A) Tn5432 and (B) IS3504.

【 方 法 】

1. 使用菌株

菌株は、2016-2017年に虎の門病院の痤瘡専門外来を受診した65名の痤瘡患者から分離された34株の*C. acnes*を使用した。加えて、*erm(X)*の伝達機構を解析するため、*erm(X)*保有*C. acnes*として、2009-2010年に東京女子医科大学病院を受診した痤瘡患者由来株1株および2013-2017年に分離された10株の計11株を使用した⁴⁰⁾。伝達実験には、*erm(X)*供与株として、2014年に分離された*C. acnes* TP-CU411株を使用した。この菌株はTn5432上にコードされる*erm(X)*を保有している。*erm(X)*受容株として、遺伝子型(SLST)が異なる*C. acnes* ATCC11828株(SLST, K9)、ATCC6919株(SLST, A1)、TP-CU459株(SLST, F4)を使用した。これらの菌株は*erm(X)*伝達株として選択するため、遺伝子変異によってrifampicin耐性を付与した。Rifampicin耐性変異株は、Nakaminami *et al.*の方法を参考に、modified GAM broth (Nissui Pharmaceutical)で48 hr培養した*C. acnes*を、5 µg/mL rifampicin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.)含有modified GAM agar上に0.1 mL塗布し、35°C、嫌気条件下で5日間培養することで作製した⁷⁸⁾。加えて、Tn5432の再伝達性を試験するため、受容株として、*C. acnes* ATCC11828株に遺伝子変異によってキノロン耐性を付与し作製したLV4-1株を使用した⁶⁰⁾。

2. *C. acnes* の分離および培養

*C. acnes*の分離および培養は、第1章【方法】2に記した方法により行った。*C. acnes*の同定およびphylogenetic typeの決定には、Barnard *et al.*が報告したmultiplex PCRを用いた⁹⁾。Phylogenetic typeは、12種の配列特異的primerを使用し、決定した(Table 7)。増幅反応は、初期変性を94°C、2 minで行った後、94°C、30 secの変性、62°C、30 secのアニーリング、72°C、40 secの伸長反応を30サイクル行った。DNA増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。

3. 薬剤感受性の測定および使用薬剤

薬剤感受性は第1章【方法】3に記した方法でMICを測定し、評価した。薬剤は、clarithromycinおよびclindamycin hydrochlorideを使用した。

Table 7. Oligonucleotide primers used in this study ⁹⁾

Primer	Oligonucleotide (5' to 3')	T _m (°C)	Product size (bp)	Phylogenetic type of <i>C. acnes</i>					
				IA ₁	IA ₂	IB	IC	II	III
PArA-1	AAGCGTGAGTGACGGTAATGGGTA	60.5	677	+	+	+	+	+	+
PArA-2	CCACCATAACGTGCTGGCAACAGT	62.2							
PAMp-1	GCGTTGACCAAGTCCGCCGA	62.5	494	+	+	-	+	-	-
PAMp-2	GCAAATTCGCACCGCGGAGC	62.5							
PAMp-3	CGGAACCATCAACAAACTCGAA	56.7	145	-	+	+	-	-	-
PAMp-4	GAAGAACTCGTCAATCGCAGCA	58.6							
PAMp-5	AGGGCGAGGTCCTCTTCTACCAGCG	67.0	305	-	-	-	+	-	-
PAMp-6	ACCCTCCAAGTCAACTCTCCGCCT	65.4							
PAMp-7	TCCATCTGGCCGAATACCAGG	60.4	351	-	-	-	-	+	-
PAMp-8	TCTTAACGCCGATCCCTCCAT	58.5							
PAMp-9	GCGCCCTCAAGTTCTACTCA	58.4	225	-	-	-	-	-	+
PAMp-10	CGGATTTGGTGATAATGCCA	54.3							

4. *C. acnes* の遺伝学的分類法による解析

C. acnes の遺伝学的分類は、第 1 章【方法】6 に記した方法を用いて、SLST で行った。

5. マクロライドおよび clindamycin 耐性因子の解析

23S rRNA 遺伝子の塩基配列解析および *erm(X)* の検出は第 1 章【方法】5 に記した方法で行った。また、Tn5432 に含まれる IS1249 の検出は、Mahdy *et al.* が報告した primer を用いて、PCR で行った (Table 8, Fig. 5A)⁷⁹⁾。P2 領域の増幅反応は、初期変性を 94°C、3 min で行った後、94°C、30 sec の変性、52°C、30 sec のアニーリング、72°C、1 min の伸長反応を 30 サイクル行った。P3 領域は、初期変性を 94°C、3 min で行った後、94°C、30 sec の変性、56°C、30 sec のアニーリング、72°C、1 min の伸長反応を 30 サイクル行った。また、*erm(X)* は Tn5432 以外にも、*Corynebacterium diphtheriae* が有する plasmid pNG2 上に IS3504 とともにコードされていることが報告されていることから、Tauch *et al.* が報告した遺伝子配列を参考に、配列特異的な primer を設計し IS3504 の検出を PCR で行った (Table 8, Fig. 5B)⁸⁰⁾。増幅反応は、初期変性を 94°C、3 min で行った後、94°C、30 sec の変性、60°C、30 sec のアニーリング、72°C、1 min の伸長反応を 30 サイクル行った。DNA 増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。P2 および P3 領域、双方の増幅バンドが確認できた場合、Tn5432 上に *erm(X)* がコードされているとした。また、P4 領域の増幅バンドのみが確認できた場合、IS3504 上に *erm(X)* がコードされているとした。

Table 8. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Oligonucleotide (5' to 3')	T _m (°C)	Product size (bp)	Reference
P2-F	GAAACAACGTACGGAGC	52.0	1,105	⁷⁹⁾
P2-R	GGTTGAGGTAGACAAAC	50.0		
P3-F	CCGCTACACCACCACCAACC	62.5	455	⁷⁹⁾
P3-R	GATCGTCAGGCAGTTCCGTTTTTA	58.8		
P4-F	CGGTGTATCAGGCAAAGGCAA	58.5	1,400	This study
P4-R	GAAGAGATCGATCCAGTCGTTG	60.4		

6. Filter mating 法による *erm(X)* の伝達

erm(X) 供与株および受容株は、modified GAM broth で 35°C、嫌気条件下で 72 hr 培養した。培養液 50 μ L を、新たな液体培地 20 mL に接種し、600 nm における optical density (O.D. 600) が 0.2 になるまで培養後、供与株と受容株の菌量比が 4 : 1 となるように、メンブランフィルター (diameter, 13 mm; pore size, 0.45 μ m; ADVANTEC) 上に集菌した。メンブランフィルターを modified GAM agar に置き、35°C、嫌気条件下で 5 日間培養した。その後、フィルター上の菌を液体培地に懸濁し、50 μ g/mL rifampicin および 5 μ g/mL clarithromycin 含有 modified GAM agar に 0.1 mL 塗布、35°C、嫌気条件下で 5 日間培養した。増殖したコロニーについて、*erm(X)* の検出を行い、SLST と phylogenetic type が受容株と同一の菌株を、*erm(X)* 伝達株とした。さらに、*erm(X)* の伝達が Tn5432 に起因するものかを確認するため、第 2 章【方法】5 に記した方法を用いた IS1249 の検出を行った。また、伝達株における再伝達性の試験を同様の方法で行った。再伝達株の選択には 5 μ g/mL levofloxacin および 5 μ g/mL clarithromycin 含有 modified GAM agar を使用した。試験は 3 回行い、その平均値から伝達頻度を算出した。

7. 統計学的解析

耐性率および耐性因子保有率の比較は、Fisher's exact test により行った。

【 結 果 】

1. マクロライドおよび clindamycin 耐性 *C. acnes* の増加と耐性因子

2016-2017年に分離された34株の*C. acnes*について、clarithromycinおよびclindamycinに対する感受性を測定したところ、それぞれ、58.8% (20/34 株) および 44.1% (15/34 株) の菌株が耐性を示した (Fig. 6)。耐性率は、2009-2010年に大学病院を受診した痤瘡患者を対象に行った調査 (23.2%および 18.8%) と比較し、有意に上昇していた ($P < 0.05$)⁴⁰)。また、第1章で明らかにした2013-2015年 (44.3%および 38.6%) と比べても増加傾向が認められた。

そこで、20株のマクロライド耐性*C. acnes*について耐性因子を解析した。その結果、23S rRNA 変異株は全体の32.4% (11/34 株) で認められ、2009-2010年 (21.7%) および2013-2015年 (24.3%) と有意な差は認められなかった (Fig. 6)。一方、*erm(X)*は11.8% (4/34 株) の菌株から検出され、2009-2010年と比較して有意に増加していた (1.4%, $P < 0.05$)。さらに、23S rRNA 変異および*erm(X)*が検出されない耐性株 (not determined) が5株 (14.7%) 認められた。耐性因子ごとに薬剤感受性を比較すると、23S rRNA 変異株はclarithromycinに高度耐性 ($MIC \geq 256 \mu\text{g/mL}$) を示したが、clindamycinに対しては低感受性～中等度耐性 ($MIC = 1 - 64 \mu\text{g/mL}$) であった (Table 9)。一方、*erm(X)*保有株は両薬剤に高度耐性 ($MIC \geq 256 \mu\text{g/mL}$) を示し、さらに、既知の耐性因子が検出されない菌株についても、すべての菌株が両薬剤に高度耐性 ($MIC \geq 256 \mu\text{g/mL}$) を示した。

*erm(X)*保有*C. acnes*の増加に、転移因子を介した菌株間での伝播が関連していると推測し、これまでに分離された11株の*erm(X)*保有株 (2009-2010年, 1株; 2013-2015年, 6株; 2016-2017年, 4株) について、その転移因子を検出した。その結果、*C. acnes*で報告されているIS1249を含むTn5432が7株 (63.6%) と最も多かった。次いで、IS3504が2株 (18.2%)、これらの転移因子が検出されない株が2株認められた。

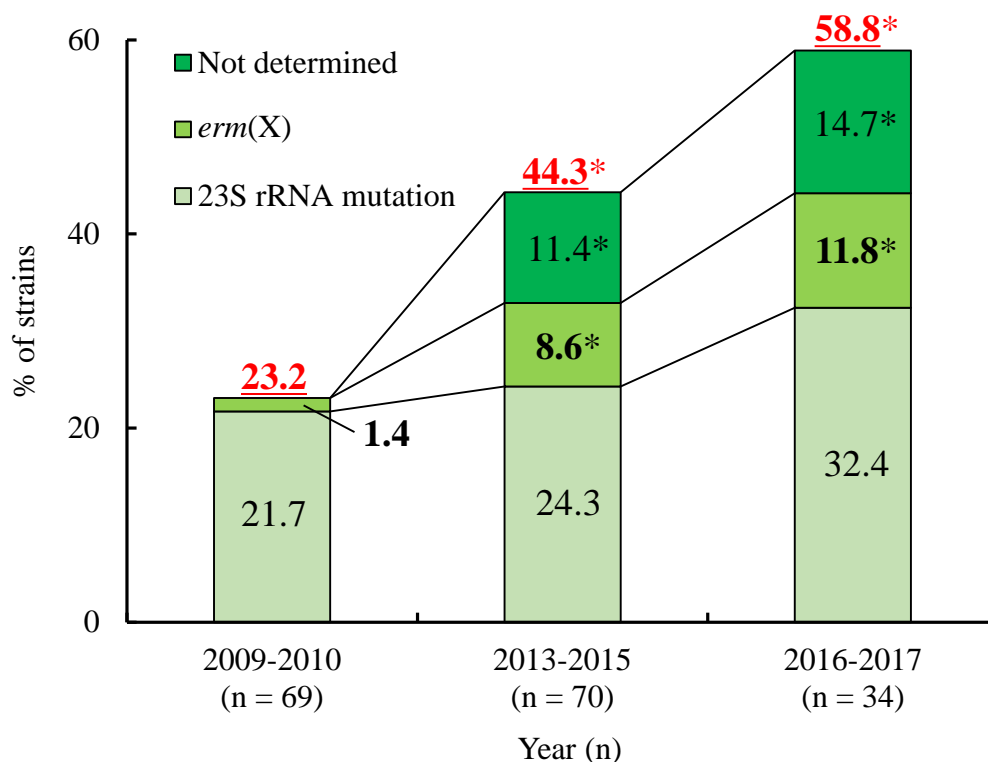


Fig. 6. Distribution of macrolides-clindamycin resistance factors in *C. acnes*.
 * Significantly different vs. 2009-2010 by Fisher's exact test ($P < 0.05$).

Table 9. Antimicrobial susceptibilities for *C. acnes* in 2016-2017 (n = 34)

Resistance determinant	No. of strains	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	
		Clarithromycin	Clindamycin
23S rRNA mutation	11	≥ 256	1 - 64
<i>erm(X)</i>	4	≥ 256	≥ 256
Not determined	5	≥ 256	≥ 256
None (susceptible strain)	14	≤ 0.06	$\leq 0.06 - 0.25$

MIC, minimum inhibitory concentration

2. *C. acnes* 間における *erm(X)* の伝達

erm(X) 保有 *C. acnes* の多くが Tn5432 として *erm(X)* を獲得していたことから、*erm(X)* 保有株の流行に Tn5432 が関連していることが強く示唆された。そこで、*C. acnes* 間における *erm(X)* の伝達実験を filter mating 法を用いて行った。その結果、試験したすべての菌株で選択培地上にコロニーの発育が認められた。発育したコロニーは *erm(X)* および IS1249 を保有しており、また、受容株と同一の phylogenetic type および SLST に分類されたことから、遺伝子型の異なる 3 株の受容株は *erm(X)* および IS1249 を含む Tn5432 を獲得したことが明らかとなった (Table 10)。*erm(X)* の伝達頻度は、ATCC6919 株で 1.6×10^{-4} 、ATCC11828 株で 2.9×10^{-4} であった。TP-CU459 株は、 2.1×10^{-3} と他の受容株と比較して約 10 倍高い伝達頻度であった。また、*erm(X)* 供与株として TP-CU459 株由来の *erm(X)* 伝達株 TP1654 株を使用し、Tn5432 の再伝達実験を行ったところ、受容株は *erm(X)* および IS1249 を含む Tn5432 を獲得した。再伝達頻度は 2.7×10^{-4} であり、TP-CU411 株と ATCC11828 株における伝達頻度と同程度であった。さらに、得られた *erm(X)* 伝達株および再伝達株は、供与株と同様にマクロライド系薬および clindamycin に対して高度耐性 (MIC $\geq 256 \mu\text{g/mL}$) を示した。

Table 10. Characteristics of conjugated *C. acnes* strains acquiring *erm(X)*

Strain	Conjugation frequency	<i>erm(X)</i>	IS1249 (Tn5432)	Phylogenetic type	SLST	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
						Clarithromycin	Clindamycin
TP-CU411 (D)		+	+	IA ₁	A2	≥ 256	≥ 256
ATCC6919 (R)		-	-	IA ₁	A1	≤ 0.06	≤ 0.06
Transconjugant	$1.6 \pm 0.7 \times 10^{-4}$	+	+	IA ₁	A1	≥ 256	≥ 256
TP-CU459 (R)		-	-	IA ₂	F4	≤ 0.06	≤ 0.06
Transconjugant	$2.1 \pm 0.2 \times 10^{-3}$	+	+	IA ₂	F4	≥ 256	≥ 256
ATCC11828 (R)		-	-	II	K9	≤ 0.06	≤ 0.06
Transconjugant	$2.9 \pm 0.8 \times 10^{-4}$	+	+	II	K9	≥ 256	≥ 256
TP1654 (D)		+	+	IA ₂	F4	≥ 256	≥ 256
LV4-1 (R)		-	-	II	K9	≤ 0.06	≤ 0.06
Retransconjugant	$2.7 \pm 0.5 \times 10^{-4}$	+	+	II	K9	≥ 256	≥ 256

(D), donor; (R), recipient; SLST, single-locus sequence typing; MIC, minimum inhibitory concentration; TP1654 and LV4-1 are transconjugant of TP-CU459 and fluoroquinolone-resistant mutant of ATCC11828, respectively.

【 考 察 】

本章では、本邦におけるマクロライド系薬および clindamycin 耐性 *C. acnes* の流行状況を把握するため、2016-2017 年に日本の痤瘡患者から分離された *C. acnes* について解析した。Clindamycin 耐性率は、2009-2010 年の調査と比較し、有意に増加していた⁴⁰⁾。また、第 1 章で明らかにした 2013-2015 年における耐性率と比較しても増加傾向にあった。増加の要因を明らかにするため、耐性株の耐性因子を解析すると、2013-2015 年および 2016-2017 年の *erm(X)* 保有率は、2009-2010 年と比べ有意に増加していた。ヨーロッパにおいては、*erm(X)* 保有 *C. acnes* は、痤瘡患者由来マクロライド耐性株のうち、10%程度存在することが報告されているが、その流行は認められていない⁴⁸⁾。日本においては、2009-2010 年では、耐性株の 6.3%で認められ、ヨーロッパと同程度であったが、2013-2015 年および 2016-2017 年は、耐性株の約 20%と著しく増加していた⁴⁰⁾。したがって、clindamycin 耐性 *C. acnes* の増加には *erm(X)* 保有 *C. acnes* の増加が寄与していることが示唆された。

さらに、*erm(X)* 保有 *C. acnes* が増加した要因を明らかにするため、*C. acnes* 間での *erm(X)* の伝達を検討した。*C. acnes* においては、*Corynebacterium striatum* M82B 株の染色体上で見出された transposon Tn5432 にコードされる *erm(X)* を保有していることが報告されている^{77,79)}。*erm(X)* は、他菌種でもその保有が報告されており、*Bifidobacteria* においては、IS3 と IS1249 に挟まれた形でコードされ、filter mating 法により *Enterococcus faecalis* に約 10^{-8} 程度と低い頻度で伝達することが報告されている⁸¹⁾。本研究では、*erm(X)* 保有株の多くが Tn5432 上にコードされる *erm(X)* を保有していたことから、Tn5432 保有株を用いて、filter mating 法による *C. acnes* 間での伝達実験を行った。*erm(X)* は *C. acnes* 間を、*Bifidobacterium longum* と *E. faecalis* 間での伝達頻度と比べ高い頻度で伝達した。*erm(X)* 伝達株の *erm(X)* 周辺領域を解析すると、*erm(X)* を Tn5432 として獲得していたことから、Tn5432 が conjugative transposon として *erm(X)* の伝達に寄与することが強く示唆された。

本研究では、*C. acnes* における *erm(X)* の伝達が 10^{-4} から 10^{-3} と高い頻度で菌株間を伝達したが、痤瘡患者から分離される *erm(X)* 保有株の割合は決して高くない。本研究で用いた filter mating 法では、*erm(X)* 保有株と非保有株を、同一のフィルター上に集菌し、高密度で確実に接触させたが、ヒトの皮膚上には、staphylococci や、*Corynebacterium* など多くの細菌種が定着しており、*C. acnes* の菌量は *in vitro* に比べはるかに少ない⁸²⁾。したがって、皮膚上では *C. acnes* 同士が接触する頻度が低いため、保有株の分離率が

低いと推測される。しかし、*erm(X)*保有株の増加に伴い、皮膚上での *C. acnes* 同士の接触頻度も上昇する可能性があるため、*erm(X)*保有株のさらなる増加が危惧される。

C. acnes 間における *erm(X)*の伝達頻度は、受容株間で異なっていた。外来遺伝子を獲得するための制御メカニズムとして CRISPR/Cas system が知られ、*C. acnes* においては、phylogenetic type II (SLST, clade K) に分類される菌株が CRISPR/Cas gene を有している⁸³⁾。本研究では、phylogenetic type II に分類される ATCC11828 株と、CRISPR/Cas gene を有さない phylogenetic type IA₁ (SLST, clade A) に分類される ATCC6919 株で *erm(X)*の伝達頻度に差が認められなかったことから、*erm(X)*の獲得に CRISPR/Cas system は影響しないと考えられる。また、日本の痤瘡患者に特徴的な phylogenetic type IA₂ (SLST, clade F) に分類される臨床分離株 TP-CU459 株を受容株にしたとき、他の菌株よりも高い伝達頻度を示した。2016-2017年における clade F に属する菌株が占める割合は 2009-2010年と比べ有意に増加していたことから、clade F 株の増加が *erm(X)*保有株の増加に関連している可能性が示唆された。

以上より、第2章では、2016-2017年に痤瘡患者より分離された *C. acnes* について解析し、マクロライド系薬および clindamycin に高度耐性を示す *erm(X)*保有 *C. acnes* が著しく増加していることを明らかにした。さらに、*in vitro* において、*erm(X)*が Tn5432 によって *C. acnes* 間を伝達することを示した。本結果は、*C. acnes* において *erm(X)*がさらに流行する可能性を示唆しており、clindamycin への耐性化がより深刻化する恐れがある。今後も継続して *erm(X)*保有 *C. acnes* の流行状況を注視する必要がある。

第3章

新規 clindamycin 耐性因子の探索

【 緒 言 】

第1章および第2章において、2013-2017年の日本の痤瘡患者でマクロライドおよび clindamycin 耐性 *C. acnes* が急増していることを明らかにした。増加の要因として、*erm(X)* 保有株の増加に加えて、既知の耐性因子である 23S rRNA の変異および *erm(X)* の獲得が認められない耐性株の出現および増加が挙げられる。当教室では、2008年に日本の皮膚科クリニックを受診した痤瘡患者から、既知の耐性因子が認められない高度 clindamycin 耐性 *C. acnes* を1株分離している⁴⁰⁾。未知の耐性因子が、*erm(X)*と同様に可動性因子上にコードされている場合、*C. acnes* 間で流行する可能性がある。

そこで、本章では、既知の耐性因子が認められない *C. acnes* の耐性機構を明らかにするため、全ゲノム配列を解析し、耐性に関連する因子の探索を行った。加えて、新規耐性因子が伝達する可能性について研究した。

【 方 法 】

1. 使用菌株

菌株は、既知の耐性因子が検出されない高度 clindamycin 耐性 *C. acnes* 株として、2008 年に大阪府にある西嶋皮ふ科を受診した痤瘡患者由来株 1 株および第 1 章と第 2 章で分離した 12 株の計 13 株を使用した⁶⁹⁾。薬剤感受性試験の基準株として *C. acnes* ATCC11828 株、type strain として *C. acnes* ATCC6919 株を使用した。また、テトラサイクリン耐性因子の解析には、16S rRNA 遺伝子および S10 protein をコードする *rpsJ* 遺伝子の wild type として、ATCC11828 株 (Accession number: CP003084) を使用した⁵³⁾。

2. ゲノム DNA の抽出

既知の耐性因子が検出されない高度 clindamycin 耐性 *C. acnes* 株である TP-CU389 株について、ゲノム DNA の抽出を行った。modified GAM broth で 35°C、嫌気条件下で 48 hr 培養した後、4,000 ×g、10 min 遠心分離し、集菌した。集菌した菌は、Tris-EDTA (TE) buffer (pH 7.0) [10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA] に菌塊がなくなるまで懸濁し、microtube 1.5 mL (Bio-Bik) に 120 μL ずつ分注した。10 mg/mL lysozyme (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.)、5 mg/mL achromopeptidase (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) を溶解した TE buffer を 150 μL 加え、37°C、30 min 反応させた。その後、2% sodium dodecyl sulfate (SDS: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) を 150 μL 加え、microtube を転倒混和した。等量の phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) (NIPPON GENE Co.) を加え、タッチミキサーで 5 min 懸濁、5 min 平衡化した後、19,000 ×g、10 min で遠心し、上層を新しい microtube に移した。遠心後の中間層がなくなるまで phenol/chloroform/isoamyl alcohol 処理を繰り返した。抽出後、ethanol 沈殿および洗浄を行った。減圧乾燥により、ethanol を除去した後、TE buffer 50 μL に溶解し、タッチミキサーで懸濁したものを精製ゲノムとした。

3. ゲノムシーケンスおよび解析

TP-CU389 株より精製したゲノムは、Macrogen Japan Co. に依頼し、PacBio RSII (Pacific Biosciences Inc.) を用いて塩基配列を決定した。Annotation 解析は、Bacterial Annotation System (BASys; <https://www.basys.ca/>) を用いて行った。アミノ酸および塩基配列の比較解析には、National Center for Biotechnology Information (NCBI) が公開する Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使用

した。参照ゲノムとして、TP-CU389 株と SLST が同一の clade F に分類される *P. acn33* 株 (Accession number: CP003195) を使用した。

なお、*C. acnes* TP-CU389 株の染色体および plasmid pTZC1 の塩基配列は、NCBI が提供する GenBank に accession No. AP019664 および LC473083 として登録された。

4. pTZC1 の検出

pTZC1 上にコードされている *erm(50)* および *tet(W)*、*traE* の検出は PCR により行った。各遺伝子は、0.2 mL tube に菌液を 1 μ L、合成 primer を各々 10 pmol、GoTaq[®] green master mix を 10 μ L 加え、滅菌超純水で全量が 20 μ L となるように混合した。使用した primer は、ゲノムシーケンスにより決定した塩基配列をもとに設計した (Table 11)。その後、Veriti Thermal cycler にセットし、増幅反応を行った。*erm(50)* については、初期変性を 94°C、3 min で行った後、94°C、30 sec の変性、59°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。*tet(W)* については、初期変性を 94°C、3 min で行った後、94°C、30 sec の変性、57°C、30 sec のアニーリング、72°C、40 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。*traE* については、初期変性を 94°C、3 min で行った後、94°C、30 sec の変性、60°C、30 sec のアニーリング、72°C、40 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。DNA 増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。また、得られた PCR 産物は、第 1 章【方法】5 と同様の方法で精製および塩基配列の解析を行った。

Table 11. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Oligonucleotide (5' to 3')	T _m (°C)	Product size (bp)
<i>erm(50)</i> -F	TCAATGAGGCGACGATCAGAC	58.5	571
<i>erm(50)</i> -R	GGTGAACACGTCATGGACGA	58.4	
<i>tet(W)</i> -F	CTGCCCGTTGGTGTAAGG	58.4	1,549
<i>tet(W)</i> -R	ATGCCCTGCGGAAAATGAACA	56.5	
<i>traE</i> -F	CCATTTTCCCGAACACGCTC	58.4	522
<i>traE</i> -R	GCGGAGCTCGAGATGCAGA	60.4	

5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による解析

PFGE 法における DNA の抽出および制限酵素による切断は Oprica *et al.* の方法で行った⁸⁴⁾。試料となる菌を modified GAM broth にて嫌気条件下で 35°C、48 hr 培養した。培養後、菌液 100 μ L を新たな液体培地 20 mL に接種し、同一条件下で 24 hr 培養した。培養菌液を O.D. ₆₀₀ = 0.4 に調製し、20,000 \times g、1 min の条件で遠心分離後、上清を捨て 100 μ L の TE buffer (pH 8.0) に懸濁した。懸濁液に酵素溶液 [20 mg/mL lysozyme、10 mg/mL achromopeptidase] を 10 μ L 加え、室温で 20 min 放置した。その後、embedding agarose [1.5% low melting point agarose (Bio-Rad)、10 mM Tris-HCl、0.1 M NaCl] を 150 μ L 加え、直ちに disposable plug mold (Bio-Rad) に 100 μ L 流し込み、4°C で 30 min 冷やし固めた。固まったプラグを、30 μ L の酵素溶液と 300 μ L の lysis buffer [10 mM Tris、100 mM EDTA、1% N-lauroyl sarcosine sodium salt、0.5% polyethylene dodecyl ether (n = approx. 35)、0.2% sodium deoxycholate] の混合液に移し、37°C で 6 hr 反応させた。反応後、20 mg/mL proteinase K (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) を 12 μ L 加えた 300 μ L の proteolysis buffer [1% SDS、0.5 M EDTA] に移し替え、50°C で 12 hr 反応させた。その後、buffer を除去し、プラグを 600 μ L の TE buffer で、60 min ごとに室温で 4 回洗浄した。TE buffer を除去した後、1 \times CutSmart buffer (New England Biolabs) を 500 μ L 加え、室温で 60 min 放置し、プラグを洗浄した。洗浄したプラグを、*SpeI* (New England Biolabs) を 2 μ L 加えた 300 μ L の 1 \times CutSmart buffer に移し、37°C で 20 hr 反応させた。その後、1.2% pulsed field certified agarose (Bio-Rad) ゲルを用い、プラグに含まれる DNA 断片を次の方法で泳動した [initial switch time, 2.98 sec; final switch time, 12.02 sec; run time, 24 hr; angle, 120°; gradient, 6.0 V/cm; temperature, 14 °C; ramping factor, linear]。泳動終了後、ゲルを 100 μ g/mL ethidium bromide (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) 溶液で 30 min 染色し、精製水中で 1 hr 脱色したあと、305 nm の紫外線照射下で写真撮影を行った。得られた PFGE の DNA 泳動パターンは、Bio Numerics (Applied Maths, Ver. 7.6.3) を用いて解析した。系統樹は、Dice 係数を用いた平均距離法 (unweighted pair group method of average) により作成した (band tolerance, 1.5%; optimization, 1.5%)。100%の相同性を示す菌株以外を遺伝学的に異なる菌株であるとした。

6. *C. acnes* の遺伝学的分類法による解析

C. acnes の遺伝学的分類は、SLST および Kilian *et al.* が報告した 9 つの housekeeping gene (*cel*、*coa*、*fba*、*gms*、*lac*、*oxc*、*pak*、*recA*、*zno*) の配列によって決定する MLST₉ を使用した¹⁰⁾。SLST は第 1 章【方法】6 に記した方法で行った。MLST₉ は、0.2 mL

tube に菌液を 1 μ L、合成 primer を各々 10 pmol、Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase を 10 μ L 加え、滅菌超純水で全量が 20 μ L となるように混合、Veriti Thermal cycler にセットし、増幅反応を行った。*fba*、*gms*、*oxc*、*pak*、*recA* については、初期変性を 98°C、30 sec で行った後、98°C、10 sec の変性、60°C、15 sec のアニーリング、72°C、20 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。*cel*、*coa*、*zno* については、初期変性を 98°C、30 sec で行った後、98°C、10 sec の変性、60°C、20 sec のアニーリング、72°C、20 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。*lac* については、初期変性を 98°C、30 sec で行った後、98°C、10 sec の変性、68°C、20 sec のアニーリング、72°C、20 sec の伸長反応を 30 サイクル行った。DNA 増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。PCR 産物は、第 1 章【方法】5 と同様の方法で精製および塩基配列の解析を行った。

7. Filter mating 法による pTZC1 の伝達

第 2 章【方法】6 と同様に、filter mating 法を用いて pTZC1 の伝達を行った。試験には、耐性因子供与株として 2008 年および 2013-2015 年に分離した既知の耐性因子が検出されない高度 clindamycin 耐性株 8 株を使用し、耐性因子受容株として、第 2 章【方法】1 で作成した遺伝子型が異なる 3 つの rifampicin 耐性 *C. acnes* 株を使用した。

8. 薬剤感受性の測定および使用薬剤

薬剤感受性は、第 1 章【方法】3 に記した方法で MIC を測定し、評価した。薬剤は、clarithromycin、roxithromycin、clindamycin hydrochloride、tetracycline (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.)、doxycycline hyclate、minocycline hydrochloride を使用した。

【 結 果 】

1. 新規 clindamycin 耐性因子の探索

既知の耐性因子が検出されない高度 clindamycin 耐性 *C. acnes* の耐性因子を解明するため、2013 年に分離された TP-CU389 株の全ゲノム配列を解析した。その結果、染色体以外に、環状 plasmid を見出した。染色体は 2,494,387 bp で GC content は 60.0% であった。TP-CU389 株と同一の SLST F1 に分類される P.acn33 株の染色体と比較すると、複数の single nucleotide polymorphism (SNPs) が認められたが、*C. acnes* における新規の遺伝子は認められなかった。また、新規の環状 plasmid として pTZC1 が認められ、そのサイズは 31,440 bp で、GC content は 64.9%、23 の open reading frames (ORFs) をコードしていた (Table 12)。これら ORFs について BLAST 解析したところ、既知の replication origin と推測される ORF は認められなかったが、recombinase や transposase、伝達に関与すると思われる IV 型分泌装置を構成する遺伝子群 (*vir operon*) が認められた。pTZC1 における *vir operon* は、VirB4 (TraE)、VirB3 (PrgI)、VirB6、VirD4 (TraG)、VirD2 (TraI) で構成されていた。さらに、薬剤耐性に関連する遺伝子が 2 つ認められた。1 つは、テトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(W)* であり、*B. longum* (Accession number: EU434756) および *Streptococcus suis* (Accession number: FN396364) の塩基配列と 100% (1,920/1,920 bp) および 98.6% (1,900/1,920 bp) の相同性を示した。もう 1 つは、マクロライド系薬および clindamycin 耐性に関連する *erm* 遺伝子と推測され、*Cory. glutamicum* CS176 株の染色体に存在する 23S rRNA adenine N-6-methyltransferase をコードする遺伝子と、塩基配列で 92.3% (731/792) (Accession number: BAYH01000055)、推定アミノ酸配列で 98.9% (260/263) (Accession number: GAV98608) の相同性を示した。既知の Erm とアミノ酸配列を比較すると、Erm(39)との相同性が 55.7%、類似性が 85.4% と最も高かった (Fig. 7)。したがって、既知の Erm との相同性が 80%未満であったことから、Nomenclature Center for MLS Genes (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>) において、新規のマクロライドおよび clindamycin 耐性遺伝子として *erm(50)* と命名された。

Table 12. Features of pTZC1 open reading frames

No.	Location (bp)	Size (aa) ^a	Homologue as determined by conserved domain search		
			Description	Identity (%)	Accession no.
1	993 - 22	323	ParA : plasmid partitioning protein	97	WP_081012458
2	2291 - 1047	414	ImmA : anti-repressor of ImmR	64	WP_138428067
3	4556 - 2535	673	Hypothetical protein	93	WP_155642656
4	6273 - 4993	426	MinD : plasmid partitioning protein	64	TQL85407
5	6940 - 6290	216	Hypothetical protein	61	WP_139738731
6	8457 - 6937	506	VirB1 : lytic transglycosylase of type IV secretion system	66	WP_081083033
7	10733 - 8463	756	VirB4 (TraE) : ATPase of type IV secretion system	66	WP_096359759
8	11337 - 10801	178	VirB3 (PrgI) : component of type IV secretion system	64	WP_094695311
9	12186 - 11341	281	VirB6 : inner membrane protein of type IV secretion system	41	VUX37384
10	14491 - 12791	566	VirD4 (TraG) : coupling protein of type IV secretion system	55	WP_081323192
11	16803 - 15094	569	VirD2 (TraI) : relaxase of type IV secretion system	73	WP_123645371
12	17198 - 16800	132	MobC : relaxosome protein	75	WP_123645370
13	18640 - 18059	194	Resolvase	97	WP_027587600
14	19413 - 18637	258	Nucleotidyl transferase AbiEii toxin	88	WP_013162108
15	20848 - 20057	263	Erm(50) : rRNA adenine <i>N</i> -6-methyltransferase	92	GAV98608
16	21445 - 22056	203	Invertase	100	WP_070434800
17	22083 - 23513	476	Transposase	96	AJK70086
18	23510 - 24325	271	Rep : AAA+ ATP-binding protein (probable replication initiation protein)	100	WP_070434713
19	24906 - 24622	94	Hypothetical protein	99	WP_022050196
20	27238 - 25319	639	TetW : Tetracycline resistance protein	100	WP_002586627
21	28893 - 28156	245	Hypothetical protein	99	WP_052450878
22	30160 - 29078	360	DNA methylase	99	WP_052450877
23	31094 - 30186	302	Hypothetical protein	55	WP_045246207

^a aa, amino acids.

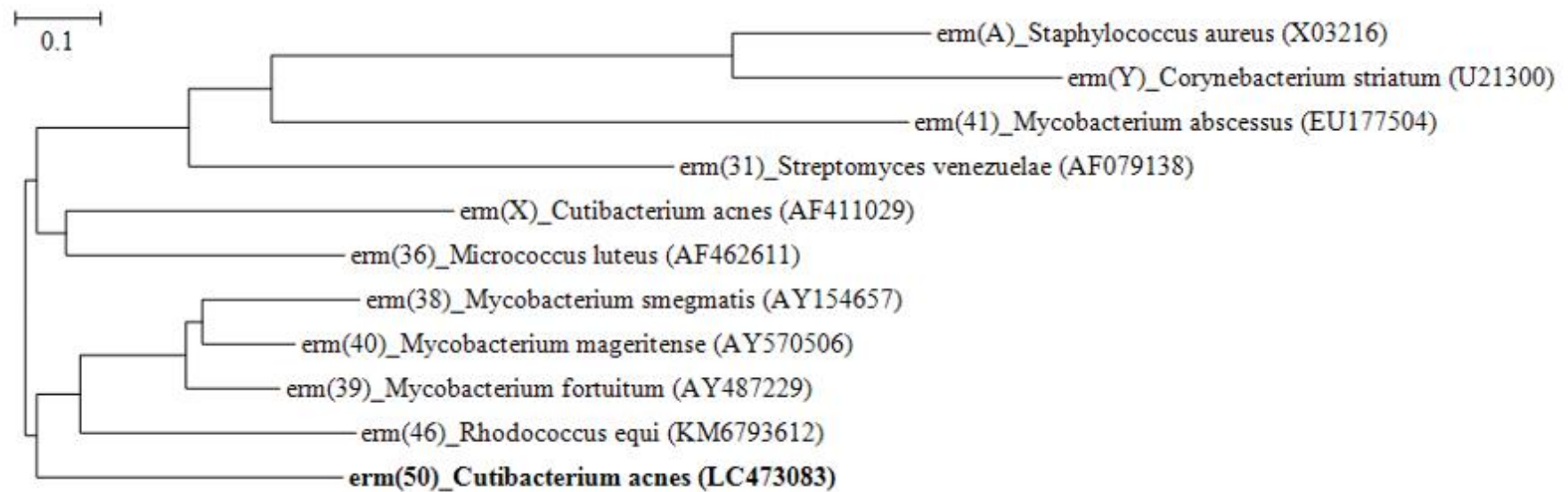


Fig. 7. Phylogenetic tree of the amino acid sequences encoded by known *erm* genes, including *erm(50)* found in this study.

2. pTZC1 の検出と保有株の特徴

耐性因子が検出されなかった菌株について、*erm(50)*および *tet(W)*、*traE* の検出を行った結果、すべての菌株で3つの遺伝子が検出され、pTZC1を保有していることが示された。また、*erm(50)*および *tet(W)*の塩基配列を解析したところ、すべての株で TP-CU389 株の配列と完全に一致していた。以上から、同一の菌株が流行していることが推測されたため、2008年および2013-2015年に分離された pTZC1 保有 *C. acnes* について、PFGEによる分子疫学的解析を行った (Fig. 8)。その結果、2013-2015年に分離された7株の pTZC1 保有株は、80%以上の高い近縁性を示したが、同一株ではなかった。加えて、SLST解析では、F1もしくはF4の遺伝子型に、MLST解析では、SLST F1の菌株はST28に、F4の菌株はST28の single-locus variant にあたるST67および double-locus variant にあたるST70に分類された。一方、2008年に分離されたTP-CU73株は、PFGEにおける他の pTZC1 保有株との近縁性は75%以下で、SLSTはC1、MLSTはST3に分類され、2013-2015年に分離された菌株と明らかに異なった。したがって、同一の pTZC1 保有株が流行していないことが示された。

薬剤感受性を測定すると、すべての株が clarithromycin および roxithromycin、clindamycin に高度耐性を示した。一方で、テトラサイクリン系薬においては、菌株によって異なっていたが、感受性の低下が認められた。特に、*tet(W)*に加えて、16S rRNA と S10 ribosomal protein の変異を有するTP-CU73株と、S10 ribosomal protein の変異を有するTP-CU437株は、*tet(W)*のみを保有する菌株よりも高い耐性レベルを示した。

3. pTZC1 の伝達機構の解析

同一の pTZC1 保有株が流行しているのではなく、異なる菌株が pTZC1 を獲得していることが示唆されたため、*C. acnes* 間での pTZC1 の伝達実験を行った。pTZC1 供与株として、2008年および2013-2015年に分離された pTZC1 保有株8株を用いて実施したところ、試験したすべての組み合わせにおいて pTZC1 伝達株が得られた (Table 13)。伝達頻度は 5.3×10^{-6} から 3.0×10^{-5} の範囲であった。伝達株は、マクロライド系薬および clindamycin に対し高度耐性 (MIC $\geq 256 \mu\text{g/mL}$) を示したが、テトラサイクリン系薬の耐性レベルは使用した pTZC1 供与株によって異なった。また、受容株の遺伝子型による伝達頻度の違いを明らかにするため、TP-CU389 株を供与株とし、異なる遺伝子型に分類される *C. acnes* へ pTZC1 を伝達させた (Table 14)。その結果、試験した3株すべてで pTZC1 は伝達し、その伝達頻度は 6.1×10^{-6} から 1.2×10^{-5} であり、違いは認められなかった。

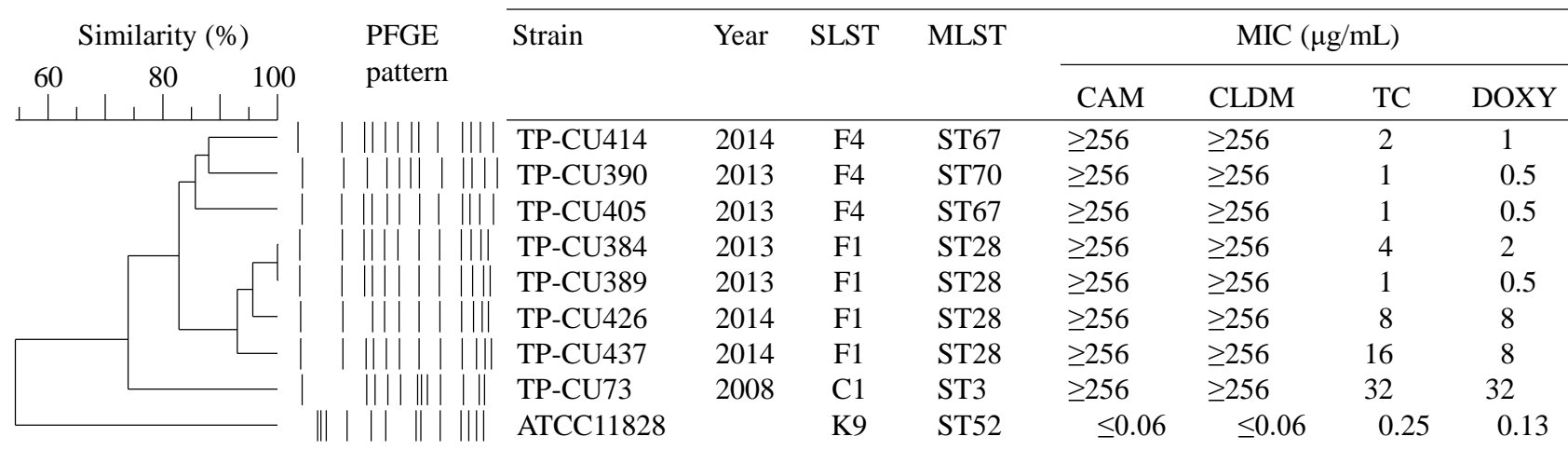


Fig. 8. Molecular epidemiological analysis of *C. acnes* strains carrying pTZC1.

PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; SLST, single-locus sequence typing; MLST, multilocus sequence typing;

MIC, minimum inhibitory concentration; CAM, Clarithromycin; CLDM, Clindamycin; TC, Tetracycline; DOXY, Doxycycline

Table 13. Antimicrobial susceptibilities for transconjugants acquiring pTZC1

Strain	Conjugation frequency	Minimum inhibitory concentration (µg/mL)					
		CAM	RXM	CLDM	TC	DOXY	MINO
TP-CU73 (Donor)*		≥256	≥256	≥256	32	32	8
11828-73 (Transconjugant)	5.3×10^{-6}	≥256	≥256	≥256	8	1	0.5
TP-CU384 (Donor)		≥256	≥256	≥256	4	2	0.5
11828-384 (Transconjugant)	8.4×10^{-6}	≥256	≥256	≥256	4	2	0.25
TP-CU389 (Donor)		≥256	≥256	≥256	1	0.5	0.13
11828-389 (Transconjugant)	1.2×10^{-5}	≥256	≥256	≥256	1	0.5	0.13
TP-CU390 (Donor)		≥256	≥256	≥256	1	0.5	0.13
11828-390 (Transconjugant)	1.2×10^{-5}	≥256	≥256	≥256	1	0.25	≤0.06
TP-CU405 (Donor)		≥256	≥256	≥256	1	0.5	0.13
11828-405 (Transconjugant)	3.0×10^{-5}	≥256	≥256	≥256	1	0.25	0.13
TP-CU414 (Donor)		≥256	≥256	≥256	2	1	0.13
11828-414 (Transconjugant)	1.3×10^{-5}	≥256	≥256	≥256	2	0.5	0.13
TP-CU426 (Donor)		≥256	≥256	≥256	8	8	2
11828-426 (Transconjugant)	2.0×10^{-7}	≥256	≥256	≥256	4	2	0.25
TP-CU437 (Donor)*		≥256	≥256	≥256	16	8	2
11828-437 (Transconjugant)	1.4×10^{-5}	≥256	≥256	≥256	8	1	0.25
ATCC11828 (Recipient)	-	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0.25	0.13	≤0.06

CAM, Clarithromycin; RXM, Roxithromycin; CLDM, Clindamycin; TC, Tetracycline; DOXY, Doxycycline; MINO, Minocycline

* TP-CU73 (amino acid substitution of S10 protein, 16S rRNA mutation, and *tet(W)*) and TP-CU437 (amino acid substitution of S10 protein and *tet(W)*) had multiple tetracycline resistance factors.

Table 14. Characteristics of conjugated *C. acnes* strains acquiring pTZC1

Strain	Conjugation frequency	pTZC1	Phylogenetic type	SLST	MIC (µg/mL)	
					Clindamycin	Doxycycline
TP-CU389 (Donor)		+	IA ₂	F1	≥256	0.5
ATCC6919 (Recipient)		-	IA ₁	A1	≤0.06	0.13
Transconjugant	$6.1 \pm 1.2 \times 10^{-6}$	+	IA ₁	A1	≥256	0.5
TP-CU459 (Recipient)		-	IA ₂	F4	≤0.06	0.25
Transconjugant	$1.1 \pm 0.6 \times 10^{-5}$	+	IA ₂	F4	≥256	0.5
ATCC11828 (Recipient)		-	II	K9	≤0.06	0.13
Transconjugant	$1.2 \pm 0.8 \times 10^{-5}$	+	II	K9	≥256	0.5

SLST, single-locus sequence typing; MIC, minimum inhibitory concentration

【 考 察 】

本章では、既知の耐性因子が検出されない高度 clindamycin 耐性 *C. acnes* の耐性因子を明らかにするため全ゲノムを解析し、新規の環状 plasmid である pTZC1 を見出した。pTZC1 上には、マクロライド系薬および clindamycin への高度耐性を付与する新規の遺伝子 *erm(50)* がコードされており、既知の耐性因子が検出されなかった株のすべてから検出された。以上より、本邦における高度 clindamycin 耐性 *C. acnes* の増加には外来性薬剤耐性遺伝子の獲得が関連していることを明らかにした。加えて、pTZC1 にはテトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(W)* もコードされており、*C. acnes* における新たなテトラサイクリン耐性機構として、外来性遺伝子の獲得による耐性化を初めて見出した。さらに、本研究で、*tet(W)* に加えて、既知のテトラサイクリン耐性因子である 16S rRNA 変異と S10 ribosomal protein のアミノ酸置換といった複数の耐性因子を有する菌株は、*tet(W)* のみを保有する菌株よりもテトラサイクリンに高い耐性レベルを示すことを明らかにした。したがって、pTZC1 保有株の流行により、clindamycin 耐性に加え、テトラサイクリン系薬にも耐性を示す多剤耐性 *C. acnes* の増加が懸念される。

瘡瘍患者から分離された pTZC1 保有株および伝達実験で得られた pTZC1 伝達株は、マクロライド系薬および clindamycin に対し、MIC ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ の高度耐性を示した。一方、テトラサイクリン系薬に対しては、菌株によって感受性が異なり、pTZC1 伝達株の薬剤感受性も供与株に依存していた。本研究で見出した *tet(W)* は、*tet(M)* や *tet(O)* と同様に ribosomal protection protein をコードしており、薬剤標的部である 16S rRNA を保護することによってテトラサイクリン耐性を生じる⁸⁵⁾。*tet(M)* 保有 *S. pneumoniae* においては、promoter 領域の変異によってテトラサイクリン系薬への耐性レベルが異なることが報告されている⁸⁶⁾。しかし、本研究で、*tet(W)* の promoter 領域を解析したところ、変異は認められなかった (data not shown)。pTZC1 上には複数の hypothetical protein がコードされていたことから、pTZC1 上には *tet(W)* の調節機能を担う ORFs が存在している可能性がある。

Plasmid は、一般的に性線毛などを介した接合伝達で伝播する⁸⁷⁾。pTZC1 上には、IV 型分泌装置を構成する *vir operon* がコードされていた。IV 型分泌装置は、構成するタンパク質の違いから type A から C の 3 つに分類される⁸⁸⁾。pTZC1 上にコードされる IV 型分泌装置は、*S. suis* が有する type IV C 型分泌装置と類似しており、pTZC1 の伝達に関与している可能性が推測された⁸⁹⁾。しかし、本研究では pTZC1 上にコードされる推定分泌装置が実際に伝達に寄与しているかについては検討しておらず、その機能は明らかになっていない。また、pTZC1 保有株について解析すると、2013-2015 年に分離された菌株は SLST clade F に分類されたが、2008 年に分離された菌株は clade C に分類された。さらに、

伝達実験において、*C. acnes* の遺伝子型が異なる受容株を用いた場合でも伝達株が得られたことから、pTZC1 は遺伝子型に関係なく様々な *C. acnes* 菌株間を伝播することが推測される。したがって、pTZC1 の伝達機構を理解するために、*vir operon* の機能解析など、pTZC1 上にコードされている因子に関するさらなる研究が必要である。

以上より、第 3 章では、既知の耐性因子が検出されない高度 clindamycin 耐性 *C. acnes* から、マクロライド系薬や clindamycin に加え、テトラサイクリン系薬に対しても耐性を付与する新規の多剤耐性 plasmid pTZC1 を見出した。また、*in vitro* において、pTZC1 が *C. acnes* 間を伝達することを明らかにした。pTZC1 の伝播により、多剤耐性 *C. acnes* が拡大するおそれがあることから、日本国内のみならず、世界規模で pTZC1 保有株の流行状況を監視すべきである。

【 総 括 】

本研究は、日本の痤瘡患者から分離された *C. acnes* について解析を行った。

第1章では、日本の痤瘡患者における薬剤耐性 *C. acnes* の最新の流行状況を明らかにするために疫学調査を行った。その結果、マクロライド系薬および clindamycin 耐性株が増加していることが明らかになった。さらに、耐性菌が分離された患者背景について解析し、痤瘡治療による抗菌薬の使用が薬剤耐性菌の出現に関連することを明らかにした。

マクロライドおよび clindamycin 耐性株が増加している原因として、*erm(X)* 保有株および既知の耐性因子が検出されない菌株が増加していることを明らかにした。そこで第2章では、*C. acnes* における *erm(X)* の獲得機構を明らかにするため、*C. acnes* 間での伝達実験を行った。その結果、*erm(X)* が transposon Tn5432 として *C. acnes* 間を伝達し、さらに、*erm(X)* 獲得株はマクロライド系薬および clindamycin に高度耐性を示すことを明らかにした。

第3章では、既知の耐性因子が検出されない clindamycin 耐性株の全ゲノムを解析し、耐性因子を研究した。その結果、新規のマクロライドおよび clindamycin 耐性遺伝子 *erm(50)* およびテトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(W)* をコードする環状 plasmid pTZC1 を見出した。さらに、pTZC1 は *C. acnes* 間を伝達し、clindamycin には高度耐性を、テトラサイクリン系薬には供与株に依存した薬剤耐性を付与することを明らかにした。

本邦における clindamycin 耐性 *C. acnes* の増加の要因を明らかにするため、耐性因子とその機構を解析すると、23S rRNA 遺伝子変異が主流であったが、遺伝子変異株の増加は認められなかった。一方、外来性遺伝子である *erm(X)* を保有する菌株は、2009 年以降増加傾向にあった。加えて、pTZC1 保有株が 2013 年に顕在化し、2016-2017 年には全体の 15% を占めた。したがって、*C. acnes* における clindamycin 耐性化機構が多様化していることが示された。

erm(X) および pTZC1 は、*C. acnes* に対し高度 clindamycin 耐性を付与することから、抗菌薬の有効性を低下させるおそれがある。また、これら耐性遺伝子は菌株間を伝達するため、抗菌薬を使用していない患者においても耐性遺伝子を獲得した菌株を保菌する可能性がある。抗菌薬は副作用が比較的少なく、加えて抗炎症作用を有するものもあることから、痤瘡治療では使用しやすい薬剤であるといえる⁹⁰⁾。しかし、痤瘡は慢性疾患であることから、治療期間が長期に及ぶため、他の感染症と比べ抗菌薬の使用期間も長くなりやすい。そのため、急性炎症期と維持期（非炎症期）を区別せずに抗菌薬を使用することは、薬剤耐性菌の出現につながる。

現在、世界中で薬剤耐性菌が増加しており、AMR 対策として、抗菌薬の適正使用が求められている。日本の痤瘡治療ガイドラインでも、抗菌薬は薬剤耐性菌の出現を防止するために急性炎症期に限定して使用するよう明記されている

29)。また、維持期（非炎症期）に adapalene や benzoyl peroxide のような面皰改善薬を使用することは痤瘡の再燃予防につながるが、これらの薬剤は皮膚刺激性が強いため、使用においては十分な患者指導を行うことが好ましい。したがって、薬剤耐性菌を出現させず、患者の QOL の向上につながる痤瘡治療を実現するためには、皮膚科医師だけでなく、薬剤師も痤瘡の病態や治療戦略を熟知したうえでチーム医療に参画することが重要であると考えられる。

本研究成果は、本邦の痤瘡患者より分離された *C. acnes* の薬剤耐性状況を明らかにし、痤瘡治療における薬剤耐性 *C. acnes* の出現および増加を抑制することを目的とした抗菌薬適正使用のための有益な情報となる。さらに、本研究で初めて見出した伝達性 plasmid の解析は、*C. acnes* で応用可能な組換え DNA 実験系における遺伝子導入 vector の構築といった基礎細菌学の発展にも貢献できる。

【 謝 辞 】

本論文作成にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学 病原微生物学教室 野口 雅久 名誉教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始熱心な御指導、御助言を頂き、また、様々な面で数多くのお力添えを賜りました東京薬科大学 病原微生物学教室 中瀬 恵亮 助教に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、学部学生の頃より研究の御助言、御指導頂きました東京薬科大学 病原微生物学教室 中南 秀将 准教授、輪島 丈明 講師に深く感謝致します。

また、臨床検体の提供に御協力頂きました 虎の門病院皮膚科 部長 林 伸和 先生および検体を提供して下さった患者の方々に篤く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂きました吉田 葵 氏、清 彩佳 氏、福元 彩菜 氏をはじめとする東京薬科大学 病原微生物学教室の諸氏に深く感謝致します

本研究は、公益社団法人日本薬学会の研究奨励支援事業である日本薬学会長井記念薬学研究奨励金の支援を受けたものであり、大学院での研究生活における経済的支援を賜り、本事業に心より感謝申し上げます。

最後に、この4年間、様々な悩みを聞いてくれた大房 (旧姓 黒澤) 遼子 氏、大房 海人 氏、赤司 恵美 氏、通学を支えてくれた祖父母と叔父、そして終始支えてくれた父、母、妹、パルに心より御礼申し上げます。

【 参 考 文 献 】

- 1) Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, **16**, 143-55 (2018).
- 2) Scholz CFP, Kilian M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **66**, 4422-32 (2016).
- 3) Christensen GJ, Bruggemann H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef Microbes*, **5**, 201-15 (2014).
- 4) Bruggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A, Hujer S, Durre P, Gottschalk G. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*, **305**, 671-3 (2004).
- 5) Xie W, Khosasih V, Suwanto A, Kim HK. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. *J Microbiol Biotechnol*, **22**, 84-91 (2012).
- 6) McDowell A, Valanne S, Ramage G, Tunney MM, Glenn JV, McLorinan GC, Bhatia A, Maisonneuve JF, Lodes M, Persing DH, Patrick S. *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. *J Clin Microbiol*, **43**, 326-34 (2005).
- 7) Valanne S, McDowell A, Ramage G, Tunney MM, Einarsson GG, O'Hagan S, Wisdom GB, Fairley D, Bhatia A, Maisonneuve JF, Lodes M, Persing DH, Patrick S. CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. *Microbiology*, **151**, 1369-79 (2005).
- 8) McDowell A, Barnard E, Nagy I, Gao A, Tomida S, Li H, Eady A, Cove J, Nord CE, Patrick S. An expanded multilocus sequence typing scheme for *Propionibacterium acnes*: investigation of 'pathogenic', 'commensal' and antibiotic resistant strains. *PLoS One*, **7**, e41480 (2012).
- 9) Barnard E, Nagy I, Hunyadkurti J, Patrick S, McDowell A. Multiplex touchdown PCR for rapid typing of the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*. *J Clin Microbiol*, **53**, 1149-55 (2015).
- 10) Kilian M, Scholz CF, Lomholt HB. Multilocus sequence typing and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes*. *J Clin Microbiol*, **50**, 1158-65 (2012).
- 11) Scholz CF, Jensen A, Lomholt HB, Bruggemann H, Kilian M. A novel high-resolution single locus sequence typing scheme for mixed populations of *Propionibacterium acnes* *in vivo*. *PLoS One*, **9**, e104199 (2014).

- 12) Hoeffler U. Enzymatic and hemolytic properties of *Propionibacterium acnes* and related bacteria. *J Clin Microbiol*, **6**, 555-8 (1977).
- 13) Cong TX, Hao D, Wen X, Li XH, He G, Jiang X. From pathogenesis of acne vulgaris to anti-acne agents. *Arch Dermatol Res*, **311**, 337-49 (2019).
- 14) Dreno B, Pecastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **32 Suppl 2**, 5-14 (2018).
- 15) Schimel AM, Miller D, Flynn HW, Jr., Endophthalmitis isolates and antibiotic susceptibilities: a 10-year review of culture-proven cases. *Am J Ophthalmol*, **156**, 50-2 e1 (2013).
- 16) Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Med Mal Infect*, **44**, 241-50 (2014).
- 17) Davidsson S, Molling P, Rider JR, Unemo M, Karlsson MG, Carlsson J, Andersson SO, Elgh F, Soderquist B, Andren O. Frequency and typing of *Propionibacterium acnes* in prostate tissue obtained from men with and without prostate cancer. *Infect Agent Cancer*, **11**, 26 (2016).
- 18) Jiang D, Huang X, Geng J, Dong R, Li S, Liu Z, Wang C, Dai H. Pulmonary fibrosis in a mouse model of sarcoid granulomatosis induced by booster challenge with *Propionibacterium acnes*. *Oncotarget*, **7**, 33703–14 (2016).
- 19) Omori M, Bito T, Yamada M, Ogura K, Eishi Y, Nishigori C. Systemic sarcoidosis with bone marrow involvement showing *Propionibacterium acnes* in the lymph nodes. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **29**, 2059-60 (2015).
- 20) Bojar RA, Holland KT. Acne and *Propionibacterium acnes*. *Clin Dermatol*, **22**, 375-9 (2004).
- 21) Kurokawa I, Danby FW, Ju Q, Wang X, Xiang LF, Xia L, Chen W, Nagy I, Picardo M, Suh DH, Ganceviciene R, Schagen S, Tsatsou F, Zouboulis CC. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol*, **18**, 821-32 (2009).
- 22) Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. *Lancet*, **379**, 361-72 (2012).
- 23) Kim H, Moon SY, Sohn MY, Lee WJ. Insulin-like growth factor-1 increases the expression of inflammatory biomarkers and sebum production in cultured sebocytes. *Ann Dermatol*, **29**, 20-5 (2017).
- 24) Schafer T, Nienhaus A, Vieluf D, Berger J, Ring J. Epidemiology of acne in the general population: the risk of smoking. *Br J Dermatol*, **145**, 100-4 (2001).
- 25) Ghodsi SZ, Orawa H, Zouboulis CC. Prevalence, severity, and severity risk factors of acne

- in high school pupils: a community-based study. *J Invest Dermatol*, **129**, 2136-41 (2009).
- 26) Hayashi N, Higaki Y, Kawamoto K, Kamo T, Shimizu S, Kawashima M. A cross-sectional analysis of quality of life in Japanese acne patients using the Japanese version of Skindex-16. *J Dermatol*, **31**, 971-6 (2004).
- 27) Hayashi N, Kamochi H, Kikukawa Y. Questionnaire survey on the therapeutic needs and treatment conditions of patients with postinflammatory erythema and postinflammatory hyperpigmentation after acne vulgaris. *J Dermatol*, **130**, 2221-31 (2020).
- 28) Hayashi N, Akamatsu H, Iwatsuki K, Kurokawa I, Kono T, Tanioka M, Hidaka R, Furukawa F, Yamasaki O, Yamasaki K, Yamamoto Y, Miyachi Y, Kawashima M. An acne vulgaris treatment guideline. *J Dermatol*, **118**, 1893-923 (2008).
- 29) Hayashi N, Akamatsu H, Iwatsuki K, Shimada-Omori R, Kaminaka C, Kurokawa I, Kono T, Kobayashi M, Tanioka M, Furukawa F, Furumura M, Yamasaki O, Yamasaki K, Yamamoto Y, Miyachi Y, Kawashima M. Japanese Dermatological Association Guidelines: Guidelines for the treatment of acne vulgaris 2017. *J Dermatol*, **45**, 898-935 (2018).
- 30) Fulton JE, Jr., Pablo G. Topical antibacterial therapy for acne. Study of the family of erythromycins. *Arch Dermatol*, **110**, 83-6 (1974).
- 31) Crawford WW, Crawford IP, Stoughton RB, Cornell RC. Laboratory induction and clinical occurrence of combined clindamycin and erythromycin resistance in *Corynebacterium acnes*. *J Invest Dermatol*, **72**, 187-90 (1979).
- 32) Cooper AJ. Systematic review of *Propionibacterium acnes* resistance to systemic antibiotics. *Med J Aust*, **169**, 259-61 (1998).
- 33) Sardana K, Gupta T, Garg VK, Ghunawat S. Antibiotic resistance to *Propionobacterium acnes*: worldwide scenario, diagnosis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **13**, 883-96 (2015).
- 34) Leyden JJ, McGinley KJ, Cavalieri S, Webster GF, Mills OH, Kligman AM. *Propionibacterium acnes* resistance to antibiotics in acne patients. *J Am Acad Dermatol*, **8**, 41-5 (1983).
- 35) Nishijima S, Kurokawa I, Katoh N, Watanabe K. The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. *J Dermatol*, **27**, 318-23 (2000).
- 36) Kurokawa I, Nishijima S, Kawabata S. Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne vulgaris. *Eur J Dermatol*, **9**, 25-8 (1999).
- 37) Ishida N, Nakaminami H, Noguchi N, Kurokawa I, Nishijima S, Sasatsu M. Antimicrobial susceptibilities of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne vulgaris.

- Microbiol Immunol*, **52**, 621-4 (2008).
- 38) Oprica C, Nord CE, Bacteria ESGoARiA. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. *Clin Microbiol Infect*, **11**, 204-13 (2005).
 - 39) Hassanzadeh P, Bahmani M, Mehrabani D. Bacterial resistance to antibiotics in acne vulgaris: an *in vitro* study. *Indian J Dermatol*, **53**, 122-4 (2008).
 - 40) Nakase K, Nakaminami H, Takenaka Y, Hayashi N, Kawashima M, Noguchi N. Relationship between the severity of acne vulgaris and antimicrobial resistance of bacteria isolated from acne lesions in a hospital in Japan. *J Med Microbiol*, **63**, 721-8 (2014).
 - 41) Rosedale R, Westman EC, Konhilas JP. Clinical experience of a diet designed to reduce aging. *J Appl Res*, **9**, 159-65 (2009).
 - 42) Gonzalez R, Welsh O, Ocampo J, Hinojosa-Robles RM, Vera-Cabrera L, Delaney ML, Gomez M. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in northern Mexico. *Int J Dermatol*, **49**, 1003-7 (2010).
 - 43) Choudhury S, Chatterjee S, Sarkar DK, Dutta RN. Efficacy and safety of topical nadifloxacin and benzoyl peroxide versus clindamycin and benzoyl peroxide in acne vulgaris: A randomized controlled trial. *Indian J Pharmacol*, **43**, 628-31 (2011).
 - 44) Nakajima Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *J Infect Chemother*, **5**, 61-74 (1999).
 - 45) Fyfe C, Grossman TH, Kerstein K, Sutcliffe J. Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **6**, a025395 (2016).
 - 46) Ross JI, Eady EA, Cove JH, Jones CE, Ratyal AH, Miller YW, Vyakrnam S, Cunliffe WJ. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 1162-5 (1997).
 - 47) Nakase K, Nakaminami H, Takenaka Y, Hayashi N, Kawashima M, Noguchi N. A novel 23S rRNA mutation in *Propionibacterium acnes* confers resistance to 14-membered macrolides. *J Glob Antimicrob Resist*, **6**, 160-1 (2016).
 - 48) Ross JI, Snelling AM, Carnegie E, Coates P, Cunliffe WJ, Bettoli V, Tosti G, Katsambas A, Galvan Perez Del Pulgar JI, Rollman O, Torok L, Eady EA, Cove JH. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br J Dermatol*, **148**, 467-78 (2003).
 - 49) Goldman RA, Hasan T, Hall CC, Strycharz WA, Cooperman BS. Photoincorporation of tetracycline into *Escherichia coli* ribosomes. Identification of the major proteins photolabeled by native tetracycline and tetracycline photoproducts and implications for the inhibitory action of tetracycline on protein synthesis. *Biochemistry*, **22**, 359-68 (1983).
 - 50) Manavathu EK, Fernandez CL, Cooperman BS, Taylor DE. Molecular studies on the

- mechanism of tetracycline resistance mediated by Tet(O). *Antimicrob Agents Chemother*, **34**, 71-7 (1990).
- 51) Speer BS, Salyers AA. Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. *J Bacteriol*, **171**, 148-53 (1989).
 - 52) Hu M, Nandi S, Davies C, Nicholas RA. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the *rpsJ* gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 4327-34 (2005).
 - 53) Nakase K, Nakaminami H, Takenaka Y, Hayashi N, Kawashima M, Noguchi N. *Propionibacterium acnes* is developing gradual increase in resistance to oral tetracyclines. *J Med Microbiol*, **66**, 8-12 (2017).
 - 54) Hooper DC. Quinolone mode of action. *Drugs*, **49 Suppl 2**, 10-5 (1995).
 - 55) Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*, **22**, 438-45 (2014).
 - 56) Tretter EM, Berger JM. Mechanisms for defining supercoiling set point of DNA gyrase orthologs: I. A nonconserved acidic C-terminal tail modulates *Escherichia coli* gyrase activity. *J Biol Chem*, **287**, 18636-44 (2012).
 - 57) Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*, **10**, 1719-39 (2019).
 - 58) Vetting MW, Park CH, Hegde SS, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside *N*-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. *Biochemistry*, **47**, 9825-35 (2008).
 - 59) Nakaminami H, Noguchi N, Sasatsu M. Fluoroquinolone efflux by the plasmid-mediated multidrug efflux pump QacB variant QacBIII in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 4107-11 (2010).
 - 60) Nakase K, Sakuma Y, Nakaminami H, Noguchi N. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Propionibacterium acnes* caused by amino acid substitutions of DNA gyrase but not DNA topoisomerase IV. *Anaerobe*, **42**, 166-71 (2016).
 - 61) World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf, (2015).
 - 62) The Government of Japan. NAP on Antimicrobial Resistance (AMR) 2016-2020. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000->

- Kenkoukyoku/0000138942.pdf, (2016).
- 63) Amsden GW. Anti-inflammatory effects of macrolides--an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *J Antimicrob Chemother*, **55**, 10-21 (2005).
 - 64) Nast A, Dreno B, Bettoli V, Degitz K, Erdmann R, Finlay AY, Ganceviciene R, Haedersdal M, Layton A, Lopez-Estebarez JL, Ochsendorf F, Oprica C, Rosumeck S, Rzany B, Sammain A, Simonart T, Veien NK, Zivkovic MV, Zouboulis CC, Gollnick H, European Dermatology F. European evidence-based (S3) guidelines for the treatment of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **26 Suppl 1**, 1-29 (2012).
 - 65) Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, Alikhan A, Baldwin HE, Berson DS, Bowe WP, Graber EM, Harper JC, Kang S, Keri JE, Leyden JJ, Reynolds RV, Silverberg NB, Stein Gold LF, Tollefson MM, Weiss JS, Dolan NC, Sagan AA, Stern M, Boyer KM, Bhushan R. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, **74**, 945-73 e33 (2016).
 - 66) CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods of Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria-Eighth Edition; Approved Standard M11-A8. (2012).
 - 67) CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth informational supplement., vol approved standard M100-S20. (2009).
 - 68) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved standard. M07-A8. (2009).
 - 69) Nakase K, Nakaminami H, Noguchi N, Nishijima S, Sasatsu M. First report of high levels of clindamycin-resistant *Propionibacterium acnes* carrying *erm(X)* in Japanese patients with acne vulgaris. *J Dermatol*, **39**, 794-6 (2012).
 - 70) Guin JD, Lummis WL. Comedonal levels of free clindamycin following topical treatment with a 1% solution of clindamycin phosphate. *J Am Acad Dermatol*, **7**, 265-8 (1982).
 - 71) Nakase K, Okamoto Y, Aoki S, Noguchi N. Long-term administration of oral macrolides for acne treatment increases macrolide-resistant *Propionibacterium acnes*. *J Dermatol*, **45**, 340-3 (2017).
 - 72) Traunmuller F, Zeitlinger M, Zeleny P, Muller M, Joukhadar C. Pharmacokinetics of single- and multiple-dose oral clarithromycin in soft tissues determined by microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 3185-9 (2007).
 - 73) Nakase K, Yoshida A, Saita H, Hayashi N, Nishijima S, Nakaminami H, Noguchi N. Relationship between quinolone use and resistance of *Staphylococcus epidermidis* in patients with acne vulgaris. *J Dermatol*, **46**, 782-6 (2019).

- 74) Dagnelie MA, Corvec S, Saint-Jean M, Bourdes V, Nguyen JM, Khammari A, Dreno B. Decrease in diversity of *Propionibacterium acnes* phylotypes in patients with severe acne on the back. *Acta Derm Venereol*, **98**, 262-7 (2018).
- 75) Liew-Littorin C, Bruggemann H, Davidsson S, Nilsson-Augustinsson A, Hellmark B, Soderquist B. Clonal diversity of *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*) in prosthetic joint infections. *Anaerobe*, **59**, 54-60 (2019).
- 76) Ross JI, Eady EA, Carnegie E, Cove JH. Detection of transposon Tn5432-mediated macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) resistance in cutaneous propionibacteria from six European cities. *J Antimicrob Chemother*, **49**, 165-8 (2002).
- 77) Tauch A, Kassing F, Kalinowski J, Puhler A. The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene *ermCX*. *Plasmid*, **34**, 119-31 (1995).
- 78) Nakaminami H, Chen C, Truong-Bolduc QC, Kim ES, Wang Y, Hooper DC. Efflux transporter of siderophore staphyloferrin A in *Staphylococcus aureus* contributes to bacterial fitness in abscesses and epithelial cells. *Infect Immun*, **85**, (2017).
- 79) El-Mahdy TS, Abdalla S, El-Domany R, Mohamed MS, Ross JI, Snelling AM. Detection of a new *erm(X)*-mediated antibiotic resistance in Egyptian cutaneous propionibacteria. *Anaerobe*, **16**, 376-9 (2010).
- 80) Tauch A, Bischoff N, Brune I, Kalinowski J. Insights into the genetic organization of the *Corynebacterium diphtheriae* erythromycin resistance plasmid pNG2 deduced from its complete nucleotide sequence. *Plasmid*, **49**, 63-74 (2003).
- 81) Wang N, Hang X, Zhang M, Peng X, Yang H. New genetic environments of the macrolide-lincosamide-streptogramin resistance determinant *erm(X)* and their influence on potential horizontal transferability in bifidobacteria. *Int J Antimicrob Agents*, **50**, 572-80 (2017).
- 82) Gao Z, Perez-Perez GI, Chen Y, Blaser MJ. Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *J Clin Microbiol*, **48**, 3575-81 (2010).
- 83) Bruggemann H, Lomholt HB, Tettelin H, Kilian M. CRISPR/*cas* loci of type II *Propionibacterium acnes* confer immunity against acquisition of mobile elements present in type I *P. acnes*. *PLoS One*, **7**, e34171 (2012).
- 84) Oprica C, Lofmark S, Lund B, Edlund C, Emtestam L, Nord CE. Genetic basis of resistance in *Propionibacterium acnes* strains isolated from diverse types of infection in different European countries. *Anaerobe*, **11**, 137-43 (2005).
- 85) Taylor DE, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 1-5 (1996).
- 86) Grohs P, Trieu-Cuot P, Podglajen I, Grondin S, Firon A, Poyart C, Varon E, Gutmann L.

- Molecular basis for different levels of *tet(M)* expression in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **56**, 5040-5 (2012).
- 87) Cabezon E, Ripoll-Rozada J, Pena A, de la Cruz F, Arechaga I. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev*, **39**, 81-95 (2015).
 - 88) Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol*, **12**, 1203-12 (2010).
 - 89) Zhang W, Rong C, Chen C, Gao GF. Type-IVC secretion system: a novel subclass of type IV secretion system (T4SS) common existing in gram-positive genus *Streptococcus*. *PLoS One*, **7**, e46390 (2012).
 - 90) Rathi SK. Acne vulgaris treatment : the current scenario. *Indian J Dermatol*, **56**, 7-13 (2011).

【 研究成果の掲載 】

本論文は以下の報告を中心にまとめた。

【第1章】

1. Keisuke Nakase, Nobukazu Hayashi, Yui Akiyama, Sae Aoki, Norihisa Noguchi. Antimicrobial susceptibility and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in Japan between 2013 and 2015. *Journal of Dermatology*, **44**, 1248-1254 (2017).

【第2章】

2. Sae Aoki, Keisuke Nakase, Nobukazu Hayashi, Norihisa Noguchi. Transconjugation of *erm(X)* conferring high-level resistance of clindamycin for *Cutibacterium acnes*. *Journal of Medical Microbiology*, **68**, 26-30 (2019).

【第3章】

3. Sae Aoki, Keisuke Nakase, Hidemasa Nakaminami, Takeaki Wajima, Nobukazu Hayashi, Norihisa Noguchi. Transferable multidrug-resistance plasmid carrying a novel macrolide-clindamycin resistance gene, *erm(50)*, in *Cutibacterium acnes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **64**, e01810-19 (2020).