

|         |   |
|---------|---|
| 氏名（本籍）  | <sup>あおき</sup> 青木 <sup>さえ</sup> 沙恵（東京都） |
| 学位の種類   | 博士（薬学）                                  |
| 学位記番号   | 博第 311 号                                |
| 学位授与の日付 | 令和 3 年 3 月 19 日                         |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当                        |
| 学位論文題目  | 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             |
| 論文審査委員  | （主査）准教授 中南 秀将<br>教授 佐藤 隆<br>教授 杉浦 宗敏    |

## 論文内容の要旨

アクネ菌 *Cutibacterium acnes* は嫌気性グラム陽性桿菌で、ヒトの皮膚常在菌である。脂肪酸を産生することで皮膚機能の維持を担っているが、面胞内で異常増殖することにより痤瘡（ニキビ）の増悪因子となることが知られている。痤瘡は、世界中の多くのヒトが思春期から青年期にかけて経験する炎症性の慢性皮膚疾患である。顔や胸背部に好発し、さらに、瘢痕が形成されると治癒が難しくなり、患者の quality of life を大きく低下させるため、痤瘡治療の重要性は高まっている。痤瘡の急性炎症期には、増悪因子である *C. acnes* を標的とした抗菌薬治療が行われ、日本では外用薬としてリンコマイシン系の clindamycin やキノロン系の nadifloxacin、ozenoxacin が使用される。中等症以上の患者には、経口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 などが使用されることがある。痤瘡治療では、抗菌薬が数か月以上と長期間使用されることもあり、世界中で薬剤耐性 *C. acnes* が分離されている。特に、マクロライド系薬および clindamycin に耐性を示す菌株の流行が認められている。*C. acnes* における耐性機構として、これらの薬剤の標的部位である 23S rRNA における遺伝子変異および外来性遺伝子 *erm(X)* にコードされる 23S rRNA methylase による修飾が知られている。そのため、これらの耐性因子を獲得することで、マクロライド系薬および clindamycin に交差耐性を示す。

痤瘡治療では抗菌薬単剤の長期処方といった不適切な使用が認められ、薬剤耐性菌の出現および増加の原因となっていると推測される。また、*erm(X)* による耐性化は、痤瘡治療で汎用される外用 clindamycin に対して高度耐性を示すため、痤瘡の難治化につながる可能性がある。本研究では、日本の痤瘡患者における薬剤耐性 *C. acnes* の流行状況を把握するため、痤瘡由来 *C. acnes* について調査した。さら

に、clindamycin 耐性 *C. acnes* が流行している要因を明らかにするため、薬剤耐性因子とその伝達機構について研究した。

## 第 1 章 日本における痤瘡由来 *C. acnes* の薬剤耐性調査

日本における痤瘡由来薬剤耐性 *C. acnes* の流行状況を明らかにするため、2013-2015 年に、痤瘡専門外来を有する病院を受診した痤瘡患者から分離された 70 株の *C. acnes* について研究した。薬剤感受性を測定した結果、 $\beta$ -ラクタム系薬やテトラサイクリン系薬に耐性を示す菌株はほとんど認められなかった (Table 1)。一方、マクロライド系薬および clindamycin に対し、それぞれ、44.3% および 38.6% の菌株が耐性を示した。マクロライド系薬に耐性を示した 31 株の耐性因子を解析したところ、23S rRNA 遺伝子変異株が 17 株、*erm(X)* 保有株が 6 株認められた。加えて、既知の耐性因子が検出されない菌株が 8 株認められた。患者の抗菌薬使用歴を解析すると、マクロライド系薬または clindamycin を使用していた患者で耐性菌分離率が著しく高かった (55.3%,  $P < 0.05$ )。 *C. acnes* が有する housekeeping gene の塩基配列で分類する single-locus sequence typing (SLST) を用いて痤瘡由来 *C. acnes* の遺伝子型を決定したところ、健常者の皮膚で最も多く認められる clade A の菌株が最も多かったが、その一方で、健常者ではほとんど認められない clade F の菌株が 32.4% を占めた。以上の結果より、日本の痤瘡患者からマクロライド系薬および clindamycin 耐性 *C. acnes* が分離され、耐性株の分離に抗菌薬の使用が関連していることが強く示唆された。加えて、一部の痤瘡患者から分離される *C. acnes* の遺伝子型は、健常者から分離される *C. acnes* の遺伝子型とは異なることが示された。

Table 1. 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 <sub>90</sub> | R    | MIC <sub>90</sub> | R    | MIC <sub>90</sub> | R    | MIC <sub>90</sub> | R    |
| Amoxicillin         | 0.13              | 0    | 0.13              | 0    | 0.13              | 0    | 0.13              | 0    |
| Cefdinir            | ≤0.06             | 0    | ≤0.06             | 0    | ≤0.06             | 0    | ≤0.06             | 0    |
| Faropenem           | ≤0.06             | 0    | ≤0.06             | 0    | ≤0.06             | 0    | ≤0.06             | 0    |
| Levofloxacin        | 16                | 12.5 | 16                | 15.0 | 1                 | 5.6  | 8                 | 11.4 |
| Nadifloxacin        | 8                 | -    | 16                | -    | 1                 | -    | 8                 | -    |
| 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 |
| Clindamycin         | ≥256              | 37.5 | ≥256              | 50.0 | ≥256              | 27.8 | ≥256              | 38.6 |
| Doxycycline         | 2                 | 0    | 2                 | 5.0  | 4                 | 0    | 2                 | 4.3  |
| Minocycline         | 1                 | 0    | 0.5               | 0    | 2                 | 0    | 1                 | 0    |

Resistance breakpoint of nadifloxacin was not defined.

MIC<sub>90</sub>, minimum inhibitory concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) inhibiting the growth of 90 % of strains; R, resistance rate (%).

## 第 2 章 *C. acnes* における *erm(X)* の伝播機構の解析

マクロライド系薬および clindamycin に対する耐性率と耐性因子の変化を明らかにするため、第 1 章と同一施設で 2016-2017 年に分離された 34 株の痤瘡由来 *C. acnes* について解析した。その結果、耐性株の分離率は 2009-2010 年と比べ、著し

く増加していた ( $P < 0.05$ , Fig. 1)。耐性因子を比較したところ、23S rRNA 遺伝子変異株の分離率に有意な変化は認められなかった。一方で、*erm(X)* 保有株が有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。 *C. acnes* では、遺伝子転移因子 transposon Tn5432 上にコードされた *erm(X)* を保有していることが報告されており、*C. acnes* 間での *erm(X)* の水平伝播が推測された。そこで、*erm(X)* 保有株が増加した要因を明らかにするため、菌株間における *erm(X)* の伝達実験を filter mating 法を用いて行った。*erm(X)* 供与株として瘡瘡由来 Tn5432 保有 *C. acnes* TP-CU411 株を、*erm(X)* 受容株として遺伝子型が異なる 3 株の *C. acnes* ATCC11828 株 (SLST, K9)、ATCC6919 株 (SLST, A1)、TP-CU459 株 (SLST, F4) を使用した。伝達実験の結果、試験した全ての菌株で、Tn5432 として *erm(X)* が伝達していた (Table 2)。得られた伝達株は、供与株と同様にマクロライド系薬および clindamycin に対して高度耐性を示した。伝達頻度は菌株の遺伝子型によって異なり、瘡瘡患者で多く認められる clade F の菌株が他の菌株と比較し、高い傾向を示した。また、供与株として TP1654 株を使用し、Tn5432 の再伝達実験を行ったところ、再伝達株が得られ、その頻度は先述の伝達実験と同等であった。以上の結果より、*erm(X)* が *C. acnes* 間を水平伝播することが明らかとなり、transposon による伝達が *erm(X)* 保有 *C. acnes* の増加に寄与していることが強く示唆された。

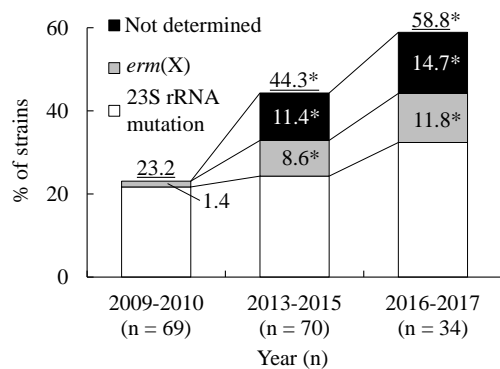


Fig. 1. Distribution of macrolides-clindamycin resistance factors in *C. acnes*.

\*,  $P < 0.05$  vs. 2009-2010 by Fisher's exact test

Table 2. Characteristics of conjugated *C. acnes* strains acquiring *erm(X)*

| Strain           | <i>erm(X)</i> | IS1249<br>(Tn5432) | SLST | MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) |             |
|------------------|---------------|--------------------|------|--------------------------|-------------|
|                  |               |                    |      | CAM                      | CLDM        |
| TP-CU411 (D)     | +             | +                  | A2   | $\geq 256$               | $\geq 256$  |
| ATCC6919 (R)     | -             | -                  | A1   | $\leq 0.06$              | $\leq 0.06$ |
| Transconjugant   | +             | +                  | A1   | $\geq 256$               | $\geq 256$  |
| TP-CU459 (R)     | -             | -                  | F4   | $\leq 0.06$              | $\leq 0.06$ |
| Transconjugant   | +             | +                  | F4   | $\geq 256$               | $\geq 256$  |
| ATCC11828 (R)    | -             | -                  | K9   | $\leq 0.06$              | $\leq 0.06$ |
| Transconjugant   | +             | +                  | K9   | $\geq 256$               | $\geq 256$  |
| TP1654 (D)*      | +             | +                  | F4   | $\geq 256$               | $\geq 256$  |
| LV4-1 (R)        | -             | -                  | K9   | $\leq 0.06$              | $\leq 0.06$ |
| Retransconjugant | +             | +                  | K9   | $\geq 256$               | $\geq 256$  |

(D), donor; (R), recipient; \*, TP1654 and LV4-1 are transconjugant of TP-CU459 and fluoroquinolone-resistant mutant of ATCC11828, respectively.

SLST, single-locus sequence typing; MIC, minimum inhibitory concentration  
CAM, clarithromycin; CLDM, clindamycin

### 第3章 新規 clindamycin 耐性因子の探索

第1章および第2章で分離された clindamycin 耐性 *C. acnes* において、未知の耐性株 (Not determined) の出現および増加が認められた (Fig. 1)。本章では、これらの菌株の耐性機構を明らかにするため、*C. acnes* TP-CU389 株の全ゲノム配列を解析した。その結果、染色体以外に新規の環状 plasmid pTZC1 を見出した。染色体 (2,494,387 bp) 上には、薬剤耐性に寄与する遺伝子変異や耐性遺伝子は認められなかった。一方、pTZC1 (31,440 bp) 上に、23S rRNA methylase をコードする新規の *erm* 遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(W)* を見出した。新規 *erm* 遺伝子

は、既知の *erm* 遺伝子のアミノ酸配列との相同性が 80%未満であったことから、新規の clindamycin 耐性遺伝子 *erm(50)*と命名された。また、これまでに分離されたすべての未知の耐性株は、pTZC1 を保有していた。そのため、同一菌株が流行していると推測し、pTZC1 保有株の近縁性を解析したところ、同一菌株ではないことが明らかとなった (Fig. 2)。したがって、pTZC1 が菌株間を伝播していることが示唆された。そこで、pTZC1 保有株を用いて伝達実験を行ったところ、試験した全ての組み合わせにおいて pTZC1 伝達株が得られた。伝達株は、マクロライド系薬および clindamycin には高度耐性を示したが、テトラサイクリン系薬は pTZC1 供与株によって異なった。以上の結果より、*C. acnes* において新規の clindamycin 耐性遺伝子 *erm(50)*が、伝達性 plasmid pTZC1 上にコードされていることが明らかとなった。本 plasmid の伝播が clindamycin 耐性率の上昇に寄与しており、加えて、pTZC1 上にはテトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(W)*もコードされていたことから、多剤耐性株が増加する可能性が示唆された。

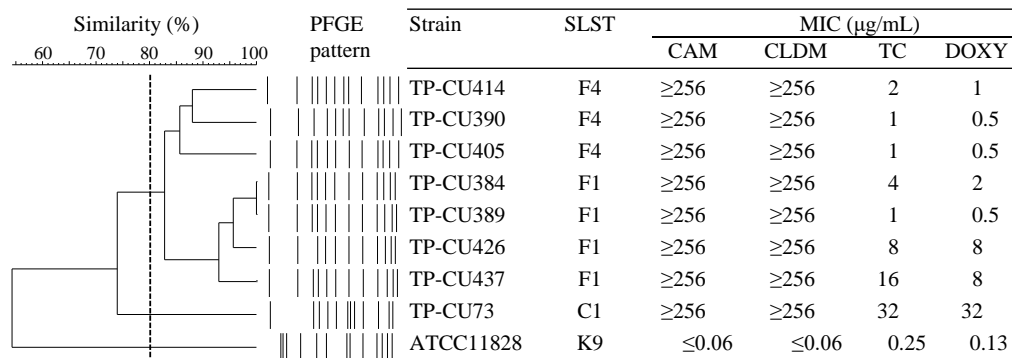


Fig. 2. Molecular epidemiological analysis and antimicrobial susceptibility for *C. acnes* carrying pTZC1.

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

MIC, minimum inhibitory concentration; CAM, clarithromycin; CLDM, clindamycin;

TC, tetracycline; DOXY, doxycycline

## 総括

本研究では、日本における痤瘡由来 *C. acnes* において、マクロライド系薬および clindamycin 耐性株が増加しており、耐性菌の出現には抗菌薬の使用が関連していることを明らかにした。加えて、耐性因子の解析により、*erm(X)* 保有株および *erm(50)* と *tet(W)* をコードする pTZC1 保有株の増加が、clindamycin 耐性率の上昇に寄与していることを明らかにした。これらの耐性因子は *C. acnes* 間を伝播するため、患者の抗菌薬使用の有無にかかわらず耐性菌が出現・増加する可能性がある。薬剤耐性 *C. acnes* の流行状況および耐性因子の伝達機構を明らかにした本研究成果は、痤瘡治療における薬剤耐性菌の出現および増加の抑制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。また、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。

【研究結果の掲載】

1. *J Dermatol*, **44**, 1248-1254, (2017)
2. *J Med Microbiol*, **68**, 26-30, (2019)
3. *Antimicrob Agents Chemother*, **64**, e01810-19, (2020)

## 論文審査の結果の要旨

*Cutibacterium acnes* はヒトの皮膚常在菌で、通常は皮膚機能の維持を担っている。一方で、痤瘡の増悪因子となることが知られている。痤瘡は、思春期から青年期にかけて顔や胸背部に好発し、患者の QOL を大きく低下させることから、近年では *C. acnes* を標的とした抗菌薬治療が行われている。しかし、薬剤耐性 *C. acnes* の出現が報告され、特にマクロライド系薬および clindamycin 耐性株の増加が認められている。痤瘡治療では、抗菌薬が単剤で長期にわたって処方されるなど、不適切な使用が薬剤耐性 *C. acnes* の出現および増加の原因となっていることが推測される。そこで本研究では、日本の痤瘡患者由来 *C. acnes* における薬剤耐性菌の流行状況と薬剤耐性因子の伝達機構について研究した。

第 1 章では、痤瘡患者における薬剤耐性 *C. acnes* の流行状況を調査した。その結果、マクロライド系薬および clindamycin 耐性株の著しい増加が認められた。マクロライド耐性株の耐性因子を解析したところ、従来の標的部位の変異だけでなく、外来性の耐性遺伝子である *erm(X)* 保有株の増加が認められた。また、既知の耐性因子が検出されない新規の耐性株を見出した。次に、患者の抗菌薬使用歴を解析したところ、マクロライド系薬または clindamycin を使用していた患者において、耐性菌の分離率が著しく高いことが分かった。さらに、健常者ではほとんど認められない遺伝子型の菌株が高頻度に認められた。以上、第 1 章の結果より、日本の痤瘡患者において、マクロライド系薬および clindamycin の使用によって、薬剤耐性 *C. acnes* が増加していることが強く示唆された。加えて、痤瘡患者から分離される *C. acnes* は、健常者とは異なる遺伝子型を有することが示された。

第 2 章では、外来性の耐性遺伝子である *erm(X)* 保有株が顕著に増加していることを受け、その伝播機構について研究した。その結果、*erm(X)* は試験した全ての菌株において、トランスポゾンとして伝達し、マクロライド系薬および clindamycin に高度耐性を付与した。伝達頻度は菌株の遺伝子型によって異なり、痤瘡患者で多く認められた遺伝子型の菌株は、他の菌株よりも高い傾向を示した。以上、第 2 章の結果より、薬剤耐性遺伝子である *erm(X)* が、*C. acnes* 菌株間を水平伝播することを初めて明らかにした。

第 3 章では、新規 clindamycin 耐性因子について研究した。既知の耐性因子が検出されない clindamycin 高度耐性株の全ゲノム配列を解析した結果、新規のプラスミドを見出した。このプラスミドには、23S rRNA methylase をコードする新規の *erm* 遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(W)* の存在が明らかになった。さらに、このプラスミドは、*C. acnes* 菌株間を水平伝播することが分かった。伝達株は、マクロライド系薬および clindamycin には高度耐性を示し、テトラサイクリン系薬には低感受性を示した。以上、第 3 章の結果より、*C. acnes* において、新規 clindamycin 耐性遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子をコードする伝達性の多剤耐性プラスミドを見出した。

本研究によって、薬剤耐性 *C. acnes* の流行状況および耐性因子の伝達機構を明らかになった。本研究成果は、痤瘡治療における薬剤耐性菌の出現および増加の抑制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。また、本研究で初めて見出した伝達性プラスミドの

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と考える。したがって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として相応しいものと判断する。