

氏名（本籍）	<small>なかせ</small> 中瀬 <small>けいすけ</small> 恵亮（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 353 号
学位授与の日付	平成 29 年 7 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	痤瘡患者由来 <i>Propionibacterium acnes</i> の抗菌薬耐性機構に関する研究
論文審査委員	（主査） 教授 野口 雅久 教授 佐藤 隆 教授 杉浦 宗敏 教授 大野 尚仁

論文内容の要旨

Propionibacterium acnes は、ヒトの上半身に広く定着している常在菌であり、好脂性の嫌気性菌である。近年では、身体の各所における様々な日和見感染の原因の 1 つとして分離され、臨床上的重要性は増している。*P. acnes* は一般的にニキビと呼ばれる痤瘡の増悪因子として知られている。痤瘡は、思春期に顔面や体幹部に発症し、患者に精神的ストレスを与え、瘢痕形成は更なるストレスの原因となる。つまり、痤瘡は致死的な疾患ではないが、その治療の重要性は非常に大きい。痤瘡の重症例は欧米で多く認められていたが、日本でも増加傾向にあり、食事の欧米化や生活習慣の乱れなどが関連していると考えられている。

痤瘡に対しては古くから薬物治療が行われており、増悪因子である *P. acnes* の除菌を目的として抗菌薬が使用されている。本邦では、2008 年に初めて、日本皮膚科学会により治療法の標準として痤瘡治療ガイドラインが示されたが、それ以前は内服と外用抗菌薬を中心とした経験的治療が行われていた。現在、外用抗菌薬は、リンコマイシン系の clindamycin およびキノロン系の nadifloxacin、ozenoxacin が適応となっている。中等症以上の患者には、しばしば経口薬も使用され、テトラサイクリン系の doxycycline、minocycline、マクロライド系の roxithromycin、フルオロキノロン系の levofloxacin、 β -ラクタム系の faropenem など様々な抗菌薬が使用されている。近年、抗菌薬の繁用により世界中で様々な抗菌薬に耐性を示す *P. acnes* が出現し、痤瘡治療を困難にしている。ところが、本邦における痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性等の情報は非常に少ないのが現状である。本研究は、痤瘡治療における抗菌薬の適正使用に貢献することを目的として、痤瘡患者から分離された *P. acnes* の薬剤感受性を調査し、さらに、薬剤耐性菌の耐性機構および出現メカ

ニズムについて解析した。

第1章 痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性調査

2008年から2011年に、皮膚科クリニックおよび大学病院の専門外来を受診した痤瘡患者から分離した191株の*P. acnes*について薬剤感受性を調査した。その結果、クリニックにおけるマクロライド耐性率は、2008年に27.6%と高い割合を示したが、2009年以降は5%前後を推移していた (Fig. 1)。2008年の高い分離率は、大学病院を受診していた患者が、クリニックを受診したことが原因と示唆された。そこで、大学病院の外来患者で薬剤感受性を調査したところ、23.2%と高いマクロライド耐性率を示した。大学病院は、治療に難渋している患者が多く受診するため、クリニックより高い耐性率を示したと考えられる。そこで、抗菌薬使用歴について解析すると、マクロライド耐性株分離患者 (81.3%) は、感受性株分離患者 (31.9%) に比べ、有意にマクロライド使用歴を有する者が多かった ($P < 0.001$)。他にも、テトラサイクリン系薬とキノロン系薬に耐性を示す *P. acnes* を日本で初めて分離した。また、耐性因子について解析すると、clindamycin の高度耐性に寄与する23S rRNAメチル化酵素をコードする *erm(X)* 保有株、16S rRNA遺伝子の G1036C 変異を有するテトラサイクリン耐性株を日本で初めて分離した。以上の結果は、本邦の痤瘡患者が様々な薬剤耐性 *P. acnes* を保菌していることを明らかにし、痤瘡患者における抗菌薬使用と耐性株保有が相関していることを示した。

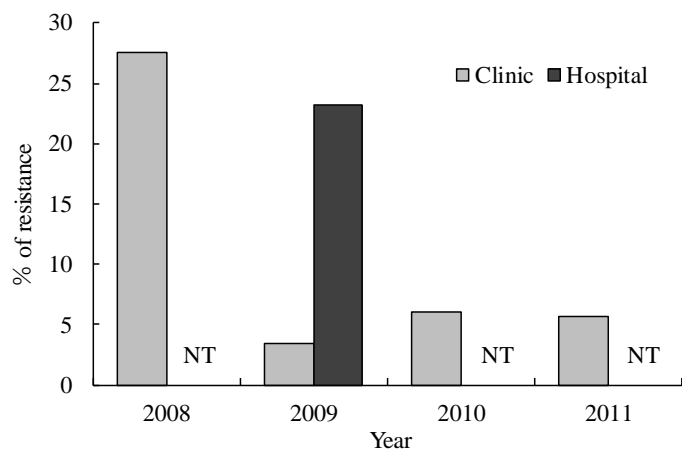


Fig. 1. Annual distribution of macrolide-resistant *P. acnes* from acne patients examined in clinic and hospital. NT, not tested

第2章 *P. acnes* におけるテトラサイクリン段階的耐性機構の解析

痤瘡治療において、内服テトラサイクリン系薬の minocycline、doxycycline は、組織移行性の良さから多くの国や地域で使用されている。第1章では、痤瘡患者より、テトラサイクリン系薬に低感受性および耐性を示す *P. acnes* 株を分離した。痤瘡治療の標準内服量とされる doxycycline を 100 mg/day で内服すると、血中濃度は約 1.5 µg/ml であると報告され、毛包内ではさらに低いことが推測される。そのため、doxycycline の MIC が 1~2 µg/ml の低感受性を示す *P. acnes* 株に対しては十分な抗菌作用を示さない可能性がある。そこで、本章では、*P. acnes* におけるテトラサイクリン低感受性および耐性化機構について研究した。

痤瘡患者から分離された doxycycline 耐性株 (MIC = 16 µg/ml) および低感受

性株 (MIC = 1 ~ 2 µg/ml) に対して、16S rRNA 遺伝子と ribosomal S3 protein 遺伝子 *rpsC*、S10 protein 遺伝子 *rpsJ* の塩基配列を解析した (Table 1)。その結果、耐性株から既知の耐性因子である 16S rRNA における G1036C 変異が認められた。*rpsJ* を解析すると、耐性と低感受性株で 5 種の変異が認められ、これらの変異はコードされる S10 protein の 57、58 番における 4 種のアミノ酸置換を生じさせた。一方、S3 protein をコードする *rpsC* に、全ての株で変異は認められなかった。そこで、16S rRNA 遺伝子変異および S10 protein のアミノ酸置換のテトラサイクリン耐性への関与を確認するために、*in vitro* で耐性変異株の作製を行った (Table 1)。その結果、doxycycline に対して MIC が 4 µg/ml を示す低度耐性変異株が得られ、それらは臨床株と同様の 4 種の S10 protein アミノ酸置換を起こす *rpsJ* の遺伝子変異を有していた。しかし、16S rRNA および *rpsC* に変異は認められなかった。以上より、S10 protein の 57 と 58 番におけるアミノ酸置換が *P. acnes* のテトラサイクリン低感受性化に関与することを明らかにした。さらに、*P. acnes* は、S10 protein アミノ酸置換により低感受性化し、加えて 16S rRNA 変異を持つことで段階的に耐性化することが示唆された。

Table 1. Tetracycline resistance profiles of clinical isolates and resistant mutants of *P. acnes*

Strain	MIC (µg/ml)			Mutations of tetracycline resistance factors	
	Doxycycline	Minocycline	Tigecycline	16S rRNA	S10 protein
Clinical isolate					
9	16	8	2	G1036C, A1180C	Tyr58Asp
11	16	8	2	G1036C, A1180C	Tyr58Asp
15b	1	0.25	0.5	Wild	Lys57Glu, Tyr58Asp
34b	16	8	2	G1036C, A1180C	Tyr58Asp
45	1	1	0.25	Wild	Lys57Asn
75b	1	0.25	0.25	Wild	Lys57Asn
77b	2	1	0.5	Wild	Lys57Met
83b	2	1	0.5	Wild	Lys57Met
85b	1	0.5	0.5	Wild	Lys57Met

Laboratory strain					
1-1	4	2	0.5	Wild	Lys57Glu
1-2	4	2	0.25	Wild	Tyr58Asp
2-2	4	2	0.5	Wild	Lys57Met
ATCC11828	0.13	≤0.06	≤0.06	Wild	Wild

ATCC11828 was the parental strain. ≤, or less

第3章 *P. acnes* におけるキノロン耐性機構の解析

世界と比較して、本邦では痤瘡治療におけるキノロン系薬の処方頻度が著しく高い。第1章における研究で、キノロン耐性 *P. acnes* を本邦で初めて分離した。キノロン系薬の多用は、さらなる耐性菌の増加を招く恐れがある。そこで、本章では痤瘡患者から分離された *P. acnes* のキノロン感受性を解析した。加えて、耐性機構を解明するために、*in vitro* で耐性変異株を作製し、解析を行った。

痤瘡患者由来 280 株の *P. acnes* について薬剤感受性を調査した結果、levofloxacin の MIC が 8 ~ 16 µg/ml を示すキノロン低感受性株が 8 株 (2.9%) 認められた。耐性因子を特定するために、キノロン系薬の標的部位である DNA gyrase 遺伝子 (*gyrA*

and *gyrB*) および DNA topoisomerase IV 遺伝子 (*parC* and *parE*) の塩基配列を解析した。その結果、DNA gyrase を構成するサブユニット GyrA にアミノ酸置換 (Ser101Leu または Asp105Gly) を起こす変異が認められた。そこで、標的部位変異のキノロン耐性への関与を確認するために、耐性変異株の作製を行った (Table 2)。その結果、内服で使用される ciprofloxacin と levofloxacin からは瘡瘡患者由来株と同じアミノ酸置換を有する耐性変異株が得られた。一方、外用薬である nadifloxacin からは、瘡瘡患者から見出されていない GyrA の Ser101Trp を有する耐性変異株が得られた。また、更なる耐性変異株の分離を行うと、GyrA に 2 つのアミノ酸置換、または GyrA と GyrB に 1 つずつのアミノ酸置換を有する耐性変異株が得られた。一方、DNA topoisomerase IV 遺伝子には変異は認められなかった。以上の結果から、*P. acnes* は他のグラム陽性菌と異なり、キノロン系薬の DNA gyrase への選択性が高く、薬剤によって異なるアミノ酸置換を生じる遺伝子変異を起こすことが示された。各キノロン系薬における耐性変異株出現頻度を測定すると、ciprofloxacin および levofloxacin は nadifloxacin よりも高い耐性変異株出現頻度を示した。耐性変異株の増殖能を比較したところ、nadifloxacin の選択で得られた耐性変異株の増殖能が、最も低かった。以上の結果は、*P. acnes* のキノロン耐性化には、内服薬の levofloxacin の服用が大きく関与し、外用薬の nadifloxacin による耐性変異株は出現しにくいことを強く示唆した。

Table 2. Quinolone susceptibilities and mutations of quinolone-resistant strains

Resistant mutant*	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				DNA gyrase substitutions	
	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Nadifloxacin	Ozenoxacin	GyrA	GyrB
1st selection						
CPFX4-1	16	16	8	0.5	Ser101Leu	-
CPFX4-8	16	4	1	0.13	Asp105Gly	-
LVFX4-1	16	16	8	0.5	Ser101Leu	-
NDFX8-1	16	32	8	0.5	Ser101Trp	-
2nd selection						
FQ-R1	16	64	32	4	Ser101Leu, Asp105Gly	-
FQ-R2	16	64	16	1	Ser101Leu	Asp476Glu
FQ-R3	16	64	32	4	Ser101Leu	Ser495Pro
FQ-R4	16	64	32	4	Ser101Leu, Asp105Gly	-
ATCC11828	0.5	0.25	0.25	≤ 0.06	-	-

*, Strain no. exhibit the antimicrobial using the selection of resistant mutants. Strains named CPFX were selected by ciprofloxacin. In similar, strains named LVFX and NDFX were selected by levofloxacin and nadifloxacin, respectively. FQ-R1, R2, and R3 were selected by levofloxacin from LVFX4-1 as a parental strain. In the same way, FQ-R4 was selected by levofloxacin from CPFX4-8. -, no substitution was found.

総括

本研究では、日本における瘡瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性状況を調査し、薬剤耐性 *P. acnes* が増加していることを明らかにした。さらに、分離された耐性菌の各種抗菌薬耐性機構および耐性菌出現機構を明らかにし、*P. acnes* におけるテトラサイクリン系およびキノロン系薬の耐性化には、内服薬が関与していることが示された。薬剤耐性 *P. acnes* の増加は、抗菌薬による除菌効果を低下させ、瘡瘡治療

を長期化させる原因となりうる。本研究結果から、耐性菌を出現・流行させないためには、痤瘡患部に高濃度で曝露できない内服抗菌薬の単剤治療は避け、外用抗菌薬や殺菌作用のある **benzoyl peroxide** を併用するべきであると考察される。また、使用方法が遵守できなければ、外用抗菌薬であっても耐性化に関与する恐れがあることから、内服薬・外用薬問わず、患者への指導を十分に行うことが、*P. acnes* の耐性化防止および有効な治療を行うために最も重要であると考ええる。本研究は、耐性菌を増加させない痤瘡治療における抗菌薬の適切な選択を行う一助となる情報を示しており、医師、薬剤師だけでなく、患者も含めた抗菌薬の適正使用に大きく貢献すると考える。

【研究結果の掲載】

1. *J Dermatol*, **39**, 794-6 (2012)
2. *J Med Microbiol*, **63**, 721-8 (2014)
3. *J Glob Antimicrob Resist*, **6**, 160-161 (2016)
4. *Chemotherapy*, **62**, 94-99 (2016)
5. *J Med Microbiol*, **66**, 8-12 (2017)
6. *Anaerobe*, **42**, 166-171 (2016)

論文審査の結果の要旨

Propionibacterium acnes (アクネ菌) は、痤瘡 (通称: ニキビ) の増悪因子である。そのため、痤瘡治療においては、*P. acnes* の除菌を目的として抗菌薬が使用されている。しかし、近年、世界中で薬剤耐性 *P. acnes* が出現し、痤瘡治療を困難にしている。抗菌薬療法においては、薬剤感受性を把握して、適正な薬剤を選択することが重要である。ところが、本邦における痤瘡患者由来 *P. acnes* の薬剤感受性等の情報は非常に少ない。中瀬氏の論文は、痤瘡治療における抗菌薬の適正使用に貢献することを目的として、痤瘡患者から分離された *P. acnes* の薬剤感受性を調査し、さらに、薬剤耐性菌の耐性及び耐性菌出現機構についてまとめたものである。

第1章では、2008年から2012年において皮膚科クリニックおよび大学病院の専門外来を受診した痤瘡患者から分離した *P. acnes* 233株の薬剤感受性を調査した。その結果、本邦にも、マクロライド系・クリンダマイシンに加え、ドキシサイクリンやレボフロキサシンなどの様々な薬剤耐性 *P. acnes* が流行していることを見いだした。特に、大学病院の痤瘡外来患者はクリニックに比べ、マクロライド系及びクリンダマイシン耐性菌の分離率が高かった。さらに、軽症患者よりも重症患者分離株や薬剤服用歴が長い患者からの分離株では、著しく高い耐性率を示すことを明らかとした。このことは、抗菌薬使用と薬剤耐性 *P. acnes* の出現が密接に関連していることを示している。また、クリンダマイシンの高度耐性に寄与する 23S rRNA methyltransferase をコードする *erm(X)* 陽性 *P. acnes* を日本で初めて分離した。以上の結果から、薬剤耐性 *P. acnes* の蔓延を防ぐために、*P. acnes* の薬剤感受性を考慮した抗菌薬の適正使用が重要であることを明らかとした。

第2章では、内服痤瘡治療に繁用されるテトラサイクリン系抗菌薬について、第1章で分離したドキシサイクリン耐性及び耐性菌出現の機構を解析した。低感受性と耐性株について、テトラサイクリン系薬の作用点である 16S rRNA 遺伝子、ribosomal S3 protein 遺伝子 *rpsC*、S10 protein 遺伝子 *rpsJ* の塩基配列を解析した結果、耐性株から 16S rRNA G1036C 変異と S10 protein にアミノ酸置換を生じる *rpsJ* の変異を見いだした。これらの変異とテトラサイクリン耐性の関連性を明らかにするため、*in vitro* で耐性変異株の作成を行った。分離した耐性株において、16S rRNA の変異は認められなかったが、臨床株と同様の S10 protein にアミノ酸置換を起こす *rpsJ* 変異を見いだした。これらの結果は、S10 protein のアミノ酸置換がテトラサイクリン低感受性化に関与し、次に 16S rRNA 変異を持つことで段階的に耐性化することを強く示唆していた。

第3章では、本邦において汎用されてるキノロン系について、*P. acnes* のキノロン感受性を再調査した。さらに、キノロン耐性機構を解明するために、*in vitro* で耐性変異株を作成した。その結果、複数のキノロン低感受性株を分離した。これらの株は、キノロン系抗菌薬の標的部である DNA gyrase 遺伝子 (*gyrA* and *gyrB*) の GyrA にアミノ酸置換を起こす変異を持つことを明らかとした。加えて、耐性変異株の作成により、内服で使用されるレボフロキサシンから、痤瘡患者由来株と同じ GyrA の変異株を分離し、*P. acnes* におけるキノロン耐性化には内服薬の服用が大きく関与していることを示した。

以上のように、本論文は、痤瘡患者から分離された *P. acnes* の耐性情報に加え、それらの耐性及び耐性菌出現機構を明らかにし、本邦の痤瘡治療における薬剤耐性菌回避のための有効な情報を提供した。よって、本論文は博士（薬学）学位申請論文として十分な価値をするものと判断する。