

〈短報〉

健常者における*Cutibacterium acnes*の 薬剤耐性に関する実態調査

天野 宏敏^{*1)}、原澤 彩貴¹⁾、石橋 奈央子²⁾、眞野 容子^{1,2)}、
古谷 信彦^{1,2)}、藤谷 克己^{1,3)}

The actual condition survey on antibiotic resistance of *Cutibacterium acnes* in healthy people

Hirotooshi Amano¹⁾, Saki Harasawa¹⁾, Naoko Ishibashi²⁾, Yoko Mano^{1,2)},
Nobuhiko Furuya^{1,2)} and Katsumi Fujitani^{1,3)}

Summary Although the results of drug susceptibility tests performed in *Cutibacterium acnes* strains isolated from patients with acne vulgaris are available, no result of drug susceptibility test performed in *C. acnes* strains isolated from healthy individuals is available. The magnitude of the spread of antimicrobial-resistant *C. acnes* infections among healthy individuals is not clear. In this study, we aimed to evaluate the actual scenario of drug susceptibility of *C. acnes* strains isolated from healthy individuals and investigate the actual scenario of antimicrobial-resistant *C. acnes* infections. Antibiotic susceptibility tests were conducted in 70 isolates obtained from healthy individuals living in the Kanto area. Three out of 70 strains (4.2%) showed resistance to clindamycin. Nadifloxacin- and minocycline-resistant bacteria were not detected. It was found that clindamycin tolerance in the strains obtained from healthy individuals was low. It is important to consider the importance of antibiotic treatment in order to prevent the spread of resistant bacterial infections.

Key words: *Cutibacterium acnes*, healthy people, susceptibility testing, clindamycin, resistance

¹⁾文京学院大大学院学保健医療科学研究科

²⁾文京学院大学保健医療技術学部臨床検査学科

²⁾文京学院大学保健医療技術学部作業療法学科

*文京学院大大学院学保健医療科学研究科

〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

Tel : 09027602757

E-mail : 13cm201.1228@gmail.com

¹⁾ Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University. 4-1, Mukogaoka 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

²⁾ Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University

³⁾ Department of Occupational Therapy, Faculty of Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University

受領日：2019年1月3日

受理日：2019年4月16日

I. 緒言

Cutibacterium acnes (*C. acnes*) は皮膚常在細菌叢を構成しているグラム陽性嫌気性桿菌である¹⁾。以前までは、*Propionibacterium acnes*として知られていたが、解析されたゲノム配列の違いが認められたことにより、*C. acnes*へと変更となった²⁾。*C. acnes*は、尋常性痤瘡(ニキビ)等の発症因子、あるいはその増悪因子として知られている^{3,4)}。

従来日本における尋常性痤瘡の治療は、主として炎症性皮疹を対象としており、抗菌薬療法が中心であったが、2008年には抗炎症作用を有し、レチノイド様作用を示すことで角化異常を是正するadapaleneが、そして2015年には強い殺菌作用を有する酸化剤であるbenzoyl peroxideが導入・承認されたことで、従来の抗菌薬治療に加え、それら薬剤の単独または併用による治療という選択の幅が広がった^{4,5)}。それに加え、2015年にozenoxacinが承認されたことから、日本において承認された外用抗菌薬はclindamycin、nadifloxacin、ozenoxacinの3種類となり、日本における痤瘡治療は大きく進展した⁴⁾。また尋常性痤瘡治療ガイドラインにおいて推奨されている内服抗菌薬には、doxycycline、minocycline、roxithromycin、faropenem⁶⁾があり、中等症以上の炎症に対する選択肢のひとつである^{4,5)}。

一方で、近年抗菌薬単独の長期使用による薬剤耐性*C. acnes*の出現が懸念されており、抗菌薬の長期連用を回避することが急務となっている⁵⁾。痤瘡治療の進んでいるヨーロッパ諸国では耐性菌の分離率が高いことが報告⁶⁾されている。一方、海外と比べ痤瘡治療における抗菌薬の歴史が浅い日本では、1990年代以降に耐性菌の出現の報告⁷⁾がなされてから、2009年から2010年に採取された菌株においては、clindamycin耐性菌が18.8%、clarithromycin耐性菌が23.2%占めていたという報告⁸⁾が、また2013年から2015年に採取された菌株においては、clindamycin耐性菌が38.6%、clarithromycin耐性菌が44.3%占めていたという報告¹⁾が散見される。しかし、それらの報告は痤瘡患者由来株における薬剤感受性試験の結果であり、健常者由来分離株を用いた薬剤感受性試験の結果は

無く、健常者において耐性菌が現状どの程度蔓延しているのかは定かではない。

したがって本研究では、先行研究の疫学調査⁹⁾において健常者より分離された*C. acnes*を用いて、健常者由来株におけるclindamycin、minocycline、nadifloxacinの薬剤感受性の実態把握及び耐性菌の実態調査を目的とした。

II. 方法と材料

1: 使用菌株と培養条件

先行研究の疫学調査において、2017年5月から2018年3月までの期間に、関東圏に居住する健常者70名(10代:男性6名 女性13名、20代:男性8名 女性8名、30代:男性8名 女性9名、40代:男性7名 女性11名)から、スタンプ法にて採取され、全被験者各個人の頬検体より分離された菌株を使用した。なお、これらの株はPCRを利用して*C. acnes*と同定された⁹⁾。精度管理株として*Bacteroides fragilis* ATCC 25285株を使用した。また、これらの菌株はGAM寒天培地(日水製薬、東京、日本)で嫌氣的条件下35℃、46~48時間培養を行い、薬剤感受性試験に使用した。本研究は、文京学院大学大学院の倫理審査委員会(審査番号: 2017-0020)の承認を得て行った。

2: 薬剤感受性試験

薬剤感受性は最小発育阻止濃度(Minimal Inhibitory Concentration: MIC)値によって評価し、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)に準拠した寒天平板希釈法にて測定を行った¹⁰⁾。なお、測定培地として5 mg/L hemin(東京化成工業、東京、日本)、1 mg/L vitamin K₁(コーアイセイ、山形、日本)を添加し、5%ヒツジ溶血血液を含有させたBrucella 寒天培地(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA)を用いた。ヒツジ溶血血液の調整は、緬羊無菌脱繊維血液(日本生物材料センター、東京、日本)を十分溶血するまで凍結融解を繰り返した。菌液は0.85%滅菌生理食塩水を用いてMcFarland 0.5 (1.5×10⁸ CFU/mL)に調整したものをを用いた。作製した菌液を薬剤含有寒天培地にMIT-P型マイクロプランター(佐久間、東京、日本)を用いて1 μL (1.5×10⁵ CFU/mL)接種した。接種後、嫌氣的条件下で35℃、46~48時

間培養後に菌の発育の有無で判定した。菌の発育を阻止した薬剤の最小濃度をその菌株に対するMIC ($\mu\text{g/mL}$)とし、CLSI¹⁰⁾に準じて判定した。なお、CLSIにブレイクポイントの設定のないminocyclineはクラスディスク内でtetracycline系に含まれているためtetracyclineの判定基準を代用し^{1,8)}、nadifloxacinはクラスディスク内に記載がないため、耐性のブレイクポイントを設定している論文を参考にした^{11,12)}。

3: 使用薬剤

薬剤感受性試験の薬剤には、lincosamide系薬のclindamycin (LKT Laboratories, Saint Paul, MN, USA)、tetracycline系薬のminocycline (LKT Laboratories, Saint Paul, MN, USA)、quinolone系薬のnadifloxacin (和光純薬、大阪、日本)を使用した。なお、対象薬剤の選択は、尋常性瘡癩治療ガイドライン⁹⁾において、外用薬として使用を強く推奨しているという点でclindamycinおよびnadifloxacinを、そして内服薬としての使用を推奨されている点でminocyclineを選択した。

Ⅲ. 結果

関東圏に居住する健常者由来株70株について、各種抗菌薬感受性を測定した (Table 1)。Clindamycin耐性株は70株中3株 (4.2%) 認められ、そのうち2株はMIC > 128 $\mu\text{g/mL}$ を示し、1株はMIC 16 $\mu\text{g/mL}$ を示したが、ほとんどの株

でclindamycinに良好な感受性を示した。全ての株がminocyclineおよびnadifloxacinに感受性を示した。

Ⅳ. 考察

本研究の目的は、健常者から分離された*C. acnes*の薬剤感受性を調査することで、健常者においてどの程度耐性菌が蔓延しているのか、その実態調査を行うことである。本邦における瘡癩患者由来株のclindamycin耐性株は既報より、2009年から2010年⁸⁾では18.8%、2013年から2015年¹⁾では38.6%と年々増加傾向にある。本研究では健常者からclindamycin耐性株が3株 (4.2%) 認められ、minocyclineおよびnadifloxacin耐性株は認められなかった。この結果から、瘡癩患者由来株と比較して、健常者由来株のclindamycinの耐性率およびminocycline、nadifloxacinの耐性率は極めて低いことが明らかとなった。それにより、現時点では国内の健常者間において耐性菌は蔓延していない可能性が示唆された。

本研究ではclindamycin耐性株のみが認められた。瘡癩治療のために外用でclindamycinが汎用されるが、そのclindamycin製剤の広範な使用により、*C. acnes*における耐性株の明らかな増加をもたらしたと報告⁶⁾されている。それに加えて、化学構造は異なるが作用点は同じ薬剤であるerythromycinに対する耐性菌の多くでclindamycinに交差耐性を示すことが知られており、それらはerythromycinなどのmacrolide系薬

Table 1 Antimicrobial susceptibilities for *C. acnes* (n = 70) isolated from healthy people

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		% resistant (No. of strains)
	Range	MIC90	
Clindamycin	0.03— \geq 256	0.5	4.2 (3)
Nadifloxacin	0.06—1	0.25	0
Minocycline	0.06—4	0.125	0

*Resistance breakpoint of the following antimicrobial agents were defined according to CLSI: clindamycin, 8 $\mu\text{g/mL}$.

*Resistance breakpoints of the following antimicrobial agents were defined according to a previous study^{1),8),11),12)}: nadifloxacin, 8 $\mu\text{g/mL}$; minocycline, 16 $\mu\text{g/mL}$.

*MIC90, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) inhibiting the growth of 90% of strains; R, resistance rate (%).

の濫用がclindamycin耐性*C. acnes*の増加に関与しているとの報告もされている¹³⁾。

既報⁹⁾では、耐性菌は接触時に伝播され得ると報告しており、耐性菌を保有していた場合、それらを他者へ容易に接触伝播させる可能性がある。故に耐性菌の出現を抑えて、耐性菌の蔓延を防ぐことが重要であると考えられる。

Nadifloxacin, minocyclineに対する耐性株は既報^{1,8,11,12)}においても、本研究においても認められなかった。Clindamycinと同様に治療ガイドラインで、外用薬として使用を強く推奨されているquinolone系のnadifloxacinは、clindamycinとは対照的に痤瘡治療によって耐性を獲得する可能性が低いという報告がある^{1,14)}。一方で、内服で用いられるtetracycline系薬であるが、tetracycline耐性には少なくとも2段階以上の変異が必要だと考えられている¹⁵⁾。

痤瘡治療ガイドラインでは2種類以上の抗菌薬の併用を避け、抗菌薬以外のadapaleneやbenzoyl peroxideなどの薬剤を併用することが推奨されている⁵⁾。本研究の結果より、低い割合であるが、健常者もclindamycin耐性*C. acnes*を保有していた。尋常性痤瘡は90%以上のヒトが経験する疾患¹⁶⁾であることから、治療を行う際には、耐性菌を出現させないための薬剤選択を行う必要があると考えられる。

V. 結語

健常者における*C. acnes*の薬剤感受性は、minocyclineおよびnadifloxacinに対する耐性菌は検出されず、全ての株が感受性を示した。またclindamycinに対してほとんどの株が良好な感受性を示した一方で、耐性株も認められた。このことから健常者由来株におけるclindamycin耐性率は低いことが明らかとなった。耐性菌は接触伝播し得るため、痤瘡患者には耐性菌を出現させないための薬剤選択を行い、耐性菌の蔓延を防ぐことが重要である。

VI. 謝辞

本論文を作成するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました株式会社ポーラファルマ医薬開発部の小林中先生、伊藤隆男先生に心から感

謝致します。

COI 報告書に記載したとおり、本論文内容に関連する著者(ら)の利益相反：なし

文献

- 1) Keisuke N, Nobukazu H, Yui A, Sae A and Norihisa N: Antimicrobial susceptibility and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in Japan between 2013 and 2015. *J Dermatol*, 44: 1248-1254, 2017.
- 2) Scholz CF and 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: 4422-4432, 2016.
- 3) Mcginley KJ, Webster GF, Ruggieri MR and Leyden JJ: Regional variations in density of cutaneous propionibacteria: correlation of *Propionibacterium acnes* populations with sebaceous secretion. *J Clin Microbiol*, 12: 672-675, 1980.
- 4) 林 伸和: ニキビの発症メカニズム, 治療, 予防. *日香粧品誌*, 40: 12-19, 2016.
- 5) 林 伸和, 幸野 健, 山崎研志, 赤松浩彦, 小林美和, 山本有紀, 岩月啓氏, 谷岡未樹, 宮地良樹, 大森遼子, 上中智香子, 黒川一郎, 古川福実, 古村南夫, 山崎 修, 川島 眞: 尋常性痤瘡治療ガイドライン2017. *日皮会誌*, 127: 1261-1302, 2017.
- 6) 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 and Cove JH: Clinical and Laboratory Investigations Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br J Dermatol*, 148: 467-478, 2003 .
- 7) Kurokawa I, Nishijima S and Kawabata S: Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne vulgaris. *Eur J Dermatol*, 9: 25-8, 1999.
- 8) Keisuke N, Hidemasa N, Yuko T, Nobukazu H, Makoto K and Norihisa 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: 721-728, 2014.
- 9) 天野宏敏, 原澤彩貴, 眞野容子, 細井淳裕, 古谷信彦, 藤谷克己: 健常者における尋常性痤瘡に関与する *Cutibacterium acnes* の検出状況および疫学的調査. *医学検査*, 68: 339-346, 2019.
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility test-

- ing: Twenty-Fifth Informational Supplement, M100-S25, Wayne, PA, 2015
- 11) Natsumi I, Hidemasa N, Norihisa N, Ichiro K, Setsuko N and Masanori S: Antimicrobial susceptibilities of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne vulgaris. *Microbiol Immunol*, 52: 621-624, 2008.
 - 12) Keisuke N, Hidemasa N, Norihisa N, Setsuko N and Masanori S: First report of high levels of clindamycin-resistant *Propionibacterium acnes* carrying erm(X) in Japanese patients with acne vulgaris. *J Dermatol*, 39: 794-796, 2012.
 - 13) 宮地 良樹編；野口 雅久：痤瘡治療における耐性菌の問題と回避. 痤瘡と痤瘡様皮疹のマネジメント, 83-87, 南山堂, 東京 (2017)
 - 14) Keisuke N, Yui S, Hidemasa N and Norihisa N: Emergence of fluoroquinolone-resistant *Propionibacterium acnes* caused by amino acid substitutions of DNA gyrase but not DNA topoisomerase IV. *Anaerobe*, 42: 166-171, 2016.
 - 15) Keisuke N, Hidemasa N, Yuko T, Nobukazu H, Makoto K and Norihisa N: *Propionibacterium acnes* is developing gradual increase in resistance to oral tetracyclines. *J Med Microbiol*, 66: 8-12, 2017.
 - 16) 林 伸和、川島 眞、渡辺 晋一、中田 土起丈、飯島 正文、松山 友彦、原田 昭太郎：本邦における尋常性痤瘡のアンケートによる疫学的調査成績. *日皮会誌*, 111: 1347-1355, 2001.