

〈原著〉

*Cutibacterium acnes*のMIC測定における 寒天平板希釈法と微量液体希釈法の比較検討

原澤 彩貴¹⁾、眞野 容子^{1),2)}、古谷 信彦^{1),2)}、藤谷 克己^{1),3)}

Comparison of agar plate dilution method and broth microdilution method in MIC measurement of *Cutibacterium acnes*.

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

Summary Agar plate dilution is the method currently recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute when determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobials required to inhibit the growth of anaerobic bacteria other than those in the *Bacteroides fragilis* group. In this study, *Cutibacterium acnes*, an anaerobic bacterium cause acne, was used to examine the difference in MIC values between the agar plate dilution method and broth microdilution method. Comparison of MIC values between the agar plate dilution method and broth microdilution method using Brucella liquid medium reveals three antimicrobials (nadifloxacin, clindamycin, minocycline) were within a one-tube difference. Moreover, comparison of MIC values between the agar plate dilution method using Brucella liquid medium and the broth microdilution method using Gifu Anaerobic Medium (GAM) liquid showed that, nadifloxacin and minocycline were within a one-tube difference. Performing MIC measurements on *Cutibacterium acnes*, the broth microdilution method using Brucella liquid medium is applicable.

Key words: *Cutibacterium acnes*, minimum inhibitory concentration, agar plate dilution method, broth microdilution method

¹⁾ 文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

〒113-8668 東京都文京区向丘1-19-1

²⁾ 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

³⁾ 文京学院大学 保健医療技術学部 作業療法学科

〒356-8533 埼玉県ふじみ野市亀久保1196

連絡先：原澤 彩貴

文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

〒113-8668 東京都文京区向丘1-19-1

TEL: 03-3811-0441

E-mail: hrswsk0813@outlook.jp

¹⁾ Graduate school of Health Care Science, Bunkyo

Gakuin University

1-19-1 Mukougaoka, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8668, Japan

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

2-4-1 Mukougaoka, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

³⁾ Department of Occupational Therapy, Faculty of

Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University

1196 Kamekubo, Fujimino-si, Saitama 356-8533, Japan

受付日：2019年9月25日

採択日：2019年12月18日

I. 緒言

*Cutibacterium acnes*は嫌気性グラム陽性桿菌であり、皮膚常在菌叢を構成している¹⁾⁻²⁾。以前までは*Propionibacterium acnes*として知られていたが、ゲノム解析の結果に基づいて再分類された³⁾。*C. acnes*は、プロピオン酸を主要産物とし、炎症性ざ瘡の発生に関与するリパーゼ、プロテアーゼ、ヒアルロニダーゼ、ポルフィリンおよび走化性因子などの様々な生物活性分子および酵素を産生することができる⁴⁾⁻⁷⁾。リパーゼの作用によって皮脂トリグリセリドから放出される脂肪酸は、一般的にニキビと言われていた尋常性ざ瘡の病因に重要な役割を果たす¹⁾。尋常性ざ瘡は、90%以上の人を経験する一般的な疾患である。致命的な病態ではないが、症状が主に顔面に現れることやはん痕を残すことがあるため、患者のquality of life (QOL) に影響を及ぼす疾患である。ざ瘡治療薬として、clindamycinとnadifloxacinの外用抗菌薬が最も多く使用されているが、海外では、clindamycinに対する耐性菌の報告がある⁸⁾⁻⁹⁾。日本でもざ瘡患者におけるclindamycin耐性菌が18.8%報告され、治療が困難になりつつある¹⁰⁾。したがって、最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) の測定は適切な抗菌薬の選択に必要不可欠である。近年臨床検査の自動化が進み、細菌に対する薬剤感受性試験においても自動機器を使用した微量液体希釈法によるMICの測定が可能となってきている¹¹⁾。しかしClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が標準化している嫌気性菌の微量液体希釈法は*Bacteroides fragilis*グループに対してのみ推奨されているにすぎず、その他の嫌気性菌については寒天平板希釈法のみが推奨されている¹²⁾。寒天平板希釈法は操作が煩雑で長時間を要し、ルーチンの検査には適さない。それに比べ微量液体希釈法は操作が簡便で短時間で実施可能である¹³⁾。また*C. acnes*における寒天平板希釈法と微量液体希釈法の比較検討の報告は少ない。そこで、本研究では微量液体希釈法が寒天平板希釈法と同様に有用であるか調査することを目的とし、寒天平板希釈法と微量液体希釈法間のMIC値の比較検討を行った。

II. 材料と方法

1. 使用菌株

C. acnes ATCC11827と*C. acnes* ATCC6919、精度管理株として*B. fragilis* ATCC25285の計3株を用いた。

2. 使用薬剤

Nadifloxacin (和光純薬工業株式会社、日本)、Clindamycin Hydrochloride (LKT Laboratories Inc, USA)、Minocycline Hydrochloride (LKT Laboratories Inc, USA) の計3剤を用いた。

3. 薬剤感受性試験

寒天平板希釈法にはBrucella寒天培地を、微量液体希釈法にはBrucella液体培地とGAM液体培地を用い、寒天平板希釈法と微量液体希釈法間のMIC値の比較を行った。

1) 寒天平板希釈法：CLSI M100-S25¹²⁾ に準拠して行った。サプリメントとしてhemin (5 μ g/mL)、vitamin K₁ (1 μ g/mL)、ウマ溶血液 (5 % v/v) を加えたBrucella液体培地 (日本ベクトンディッキンソン、日本) で薬液を調製し、希釈系列を作製した。作製した薬液2 mLとMIC測定用培地であるサプリメントとしてhemin (5 μ g/mL)、vitamin K₁ (1 μ g/mL)、ヒツジ溶血液 (5 % v/v) を加えたBrucella寒天培地 (日本ベクトンディッキンソン、日本) 18 mLをシャーレに分注した。菌液はGifu Anaerobic Medium (GAM) 寒天培地 (日水製薬株式会社、日本) に前培養したコロニーを生理食塩水で 1.5×10^8 CFU/mLに調製し、これを更に10倍希釈した。調製した菌液を1スポット当たり 10^5 CFUになるように培地に接種後、37 $^{\circ}$ Cで42 ~ 48時間嫌気培養し、発育の有無によりMIC値 (μ g/mL) を判定した。なお、嫌気培養は嫌気ジャーとアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学株式会社、日本) を用いて行った。

2) 微量液体希釈法：*B. fragilis*に適應されるCLSIの方法に従って行った¹²⁾。Brucella液体培地またはGAM液体培地で薬液を調製し、96 well プレート上で液体培地を用いて薬液を倍々希釈した。菌液はGAM寒天培地に前培養したコロニーを生理食塩水で 1.5×10^8 CFU/mLに調製し、これを更に100倍希釈した。調製した菌液を培地に接種後、37 $^{\circ}$ Cで46 ~ 48時間嫌気培養し、MIC値 (μ g/mL) を判定した。

Ⅲ. 結果

Brucella寒天培地を用いた寒天平板希釈法とBrucella液体培地を用いた微量液体希釈法によるMIC値の比較では、寒天平板希釈法を基準とした場合、nadifloxacinでは微量液体希釈法と同等、minocyclineでは1管低いMIC値を示した。一方、clindamycinでは同等もしくは1管高いMIC値を示した (Table 1, Table 2)。また、Brucella寒天培地を用いた寒天平板希釈法とGAM液体培地を用いた微量液体希釈法によるMIC値の比較では、寒天平板希釈法を基準とした場合、nadifloxacinとminocyclineでは微量液体希釈法と同等であったが、clindamycinでは少なくとも1管差以上低値を示した (Table 1, Table 2)。

Ⅳ. 考察

CLSIに準拠した微量液体希釈法はBrucella液体培地であるが、血液による赤みが強い目視判定に時間を要する。それに対し嫌気性菌で一般的に用いられるGAM液体培地は透明度が強く比較的判定が容易であると考えられる。しかも、C. acnesに対するBrucella液体培地とGAM液体培地を用いた微量液体希釈法によるMIC値の比較検討は我々の知る限り報告はない。そのため、本研究では微量液体希釈法にBrucella液体培地とGAM液体培地を用いて比較検討した。一方、嫌気性菌のMIC値は寒天平板希釈法で測定することが推奨されている¹²⁾。寒天平板希釈法は標準法であるが、操作が煩雑で

Table 1 MIC values (μ g/mL) using the agar plate dilution method and broth microdilution method for three antimicrobials tested against *Cutibacterium acnes*.

Antimicrobial	nadifloxacin		clindamycin		minocycline	
Strain, ATCC No.	11827	6919	11827	6919	11827	6919
Agar plate dilution method (Brucella)	0.125	0.125	0.06	0.06	0.125	0.125
Broth microdilution method (Brucella)	0.125	0.125	0.06	0.125	0.06	0.06
Broth microdilution method (GAM)	0.125	0.125	≤ 0.03	≤ 0.03	0.125	0.125

MIC: minimum inhibitory concentration
 ATCC: American Type Culture Collection
 GAM: Gifu Anaerobic Medium

Table 2 Comparison of MIC values using the agar plate dilution method (Brucella) with the MIC values using the broth microdilution method for three antimicrobials tested against *Cutibacterium acnes*.

Antimicrobial	nadifloxacin		clindamycin		minocycline	
Strain, ATCC No.	11827	6919	11827	6919	11827	6919
Broth microdilution method (Brucella)	0*	0	0	+1**	-1**	-1
Broth microdilution method (GAM)	0	0	≤ 1	≤ 1	0	0

MIC: minimum inhibitory concentration
 ATCC: American Type Culture Collection
 GAM: Gifu Anaerobic Medium
 *Zero indicates that MIC values are identical.
 ** -1 and +1 indicate $\pm 1 \log_2$ dilution difference.

長時間を要するので、病院の検査室で多数の株の薬剤感受性試験をルーチンに行うには不向きである。それに比べ微量液体希釈法は複数の抗菌薬（10薬剤以上）を分離菌ごとに試験することができ、商用パネルが利用でき、操作が簡便で短時間での実施が可能である¹³⁾⁻¹⁴⁾。

本研究のBrucella寒天培地を用いた寒天平板希釈法と、Brucella液体培地を用いた微量液体希釈法で得られたMIC値は同様の結果を得られた。そのため、*C. acnes*において、本研究に用いた3剤の薬剤は、Brucella液体培地を用いた微量液体希釈法が寒天平板希釈法と同様に有用である可能性が示唆された。また、Brucella寒天培地を用いた寒天平板希釈法と、GAM液体培地を用いた微量液体希釈法で得られたMIC値は、本研究で使用したnadifloxacin, minocyclineにおいて同様の結果を得られたが、clindamycinにおいては同様の結果を得られなかった。そのため、*C. acnes*において、GAM液体培地を用いた微量液体希釈法は、nadifloxacin, minocyclineでは有用であるが、clindamycinでは有用でない可能性が示唆された。また、寒天平板希釈法と比較してBrucella液体培地を用いた微量液体希釈法によるminocyclineでは1管差低いMIC値を示し、GAM液体培地を用いた微量液体希釈法によるclindamycinでは1管差あるいはそれ以上低いMIC値を示した。今回は、2株の*C. acnes*の検討ではあるが、GAM液体培地によるclindamycinの薬剤感受性試験はBrucella寒天培地を用いたCLSIの標準法で本来耐性である株を感性和判定してしまう危険性が示唆された。

よって、本研究に使用した*C. acnes*の株は少ないが、GAM液体培地によるclindamycinの薬剤感受性試験は耐性を感性和判定してしまう危険性が示唆された。しかし、今回使用した*C. acnes*は標準株のみであったので、今後はさらに臨床株を含めた多数の株で検討する必要があると考えられた。

本論文内容に関連する著者(ら)の利益相反：なし

文献

1) Nakamura M, Kametani I, Higaki S and Yamagishi T: Identification of *Propionibacterium acnes* by

polymerase chain reaction for amplification of 16S ribosomal RNA and lipase genes. *Anaerobe*, 9: 5-10, 2003.

2) Nakase K, Sakuma Y, Nakaminami H and Noguchi 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.

3) Christian F. P. Scholz, Mogens Kilian: 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66: 4422-4432, 2016.

4) Kumar A, Agarwal SP, Ahuja A, Ali J, Choudhry R and Baboota S: Preparation, characterization, and in vitro antimicrobial assessment of nanocarrier based formulation of nadifloxacin for acne treatment. *Pharmazie*, 66: 111-114, 2011.

5) Nakase K, Okamoto Y, Aoki S and Noguchi N: Long-term administration of oral macrolides for acne treatment increases macrolide-resistant *Propionibacterium acnes*. *The Journal of Dermatology*, 45: 340-343, 2018.

6) Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS and Gritsanapan W: Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. *Fitoterapia*, 78(6): 401-408, 2007.

7) Jeremy AH, Holland DB, Robert SG, Thomson KF and Cunliffe WJ: Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J Invest Dermatol*, 121(1): 20-27, 2003.

8) 林 伸和：ニキビの発症メカニズム，治療，予防。日本香粧品学会誌，40(1): 12-19, 2016.

9) Hayashi N, Higaki Y, Kawamoto K, Kamo T, Shimizu S and Kawashima M: A cross-sectional analysis of quality of life in Japanese acne patients using the Japanese version of Skindex-16. *The Journal of Dermatology*, 31: 971-976, 2004.

10) Nakase K, Nakaminami H, Takenaka Y, Hayashi N, Kawashima M and Noguchi N: Relationship between the severity of acne vulgaris and antimicrobial resistance of bacteria isolated from acne lesions in a hospital in Japan. *The Journal of Dermatology*, 63: 721-728, 2014.

11) 川上小夜子, 斧康 雄, 加藤淳子, 宮澤幸久: 新規MIC測定キットを用いた抗菌力の測定: 培養条件の厳しい菌種とまれに検出される菌種を中心に.

- 感染症学雑誌, 72(10): 1017-1026, 1998.
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement. CLSI M100-S25, 2015.
- 13) Lubert P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, and Hahn H: Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Clinical Microbiology, 41(3): 1062-1068, 2003.
- 14) Audrey N. Schuetz: Antimicrobial Resistance and Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Clinical Infectious Diseases, 59(5): 698-705, 2014.