

皮膚感染症関連菌に対するゲンタマイシンの抗菌力と突然変異耐性菌出現頻度

岩木真生,^a 野口雅久,^{*,a} 中南秀将,^a 笹津備規,^a 伊藤正俊^b

Antimicrobial Activity and Frequency of Spontaneous Gentamicin-resistant Mutants in Bacteria Related Skin Infections

Mao IWAKI,^a Norihisa NOGUCHI,^{*,a} Hidemasa NAKAMINAMI,^a
Masanori SASATSU,^a and Masatoshi ITO^b^aDepartment of Microbiology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan, and ^bFaculty of Medicine, Toho University, 6-11-1 Omorinishi, Ota-ku, Tokyo 143-8541, Japan

(Received June 17, 2011; Accepted August 29, 2011; Published online September 1, 2011)

Gentamicin is used in an ointment form for the treatment of skin infections. To investigate the effect of gentamicin used as an ointment, the antimicrobial susceptibilities against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus pyogenes*, and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from community and medical settings were studied and compared with other antibacterial agents such as fradiomycin, chloramphenicol, and bacitracin used as active ingredient for each ointment. Gentamicin showed antibacterial activities for all standard bacteria tested, but fradiomycin and chloramphenicol showed no such activities for *St. pyogenes* and *P. aeruginosa*, respectively. Bacitracin showed activity for *St. pyogenes* only. The strains of staphylococci isolated from healthy people were highly susceptible to gentamicin, while 49.3% of the isolates from the patients with skin infections were resistant to gentamicin and 96.4% of the gentamicin-resistant staphylococci carried the aminoglycoside-resistance gene *aacA-aphD*. The growths of all strains tested, except for two strains of *P. aeruginosa*, were inhibited by close below 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of gentamicin. Furthermore, the frequencies of spontaneous mutants resistant to gentamicin, fradiomycin, and chloramphenicol were each investigated using *S. aureus*, *S. epidermidis*, *St. pyogenes*, and *P. aeruginosa*. At doses of more than 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of gentamicin, no resistant mutants in any of bacteria strains tested were obtained. The concentration of gentamicin on the skin was calculated at approximately 895 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at least when the commercially used 0.1% gentamicin ointment was applied to the skin. Therefore, our study strongly indicates that the gentamicin ointment used has a potency of sufficiently inhibiting the growth of bacteria, including gentamicin-resistant strains, which cause skin infections in the community.

Key words—gentamicin; skin infection; staphylococci; antimicrobial susceptibility; resistance

緒 言

ゲンタマイシンは *Micromonospora* 属の放線菌から発見されたアミノグリコシド系に属する水溶性の抗生物質である。細菌のリボソームの 30S サブユニットに特異的に作用してタンパク質合成を阻害することで殺菌的な抗菌活性を発現する。¹⁾ 抗菌スペクトルはグラム陽性菌からグラム陰性菌まで幅広い。しかし、組織・細胞内への移行性は低く、消化管からの吸収はほとんどない。そのため、注射薬又は外用薬として使用されている。注射薬では、体内

の薬剤の大部分が腎へ蓄積され、尿中に排泄される。腎毒性や耳毒性などの強い副作用を有するため、ゲンタマイシン注射薬の使用は一部のグラム陰性菌感染症に限られている。現在、病院内では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 等において、ゲンタマイシン耐性菌の分離が報告されている。^{2,3)} アミノグリコシド系薬の主な耐性機序は、修飾酵素の産生による薬剤の不活性化である。修飾酵素の作用には、アセチル化 (AAC)、リン酸化 (APH)、アデニル化 (AAD) があり、ゲンタマイシン耐性には主に AAC (6') と APH (2'') が関与し、⁴⁾ ブドウ球菌ではこれらの酵素をコードする *aacA-aphD* 遺伝子が広く分布している。^{5,6)} 他の耐性機序としては、

^a東京薬科大学薬学部病原微生物学教室, ^b東邦大学医学部

*e-mail: noguchin@toyaku.ac.jp

リボソームの 50S サブユニット構成タンパク質 L6 をコードする *rplF* 遺伝子の変化による薬剤の標的部位への親和性低下やアミノグリコシド系薬の膜内への透過の阻止による耐性が知られている。^{7,8)} しかし、その耐性レベルは低く、臨床分離株ではほとんど認められていない。

一方、外用薬では、フラジオマイシンやクロラムフェニコールなどの軟膏薬もあるが、ゲンタマイシンは皮膚からの吸収がほとんどなく、副作用を考慮せず高濃度で使用できるため、表在性の皮膚感染症の治療においてゲンタマイシン 0.1% 濃度の軟膏又はクリーム製剤として実績のある有用な外用薬剤である。⁹⁾

表在性の細菌性皮膚感染症の主な原因菌はブドウ球菌であり (70%)、ほかに、化膿レンサ球菌 (A 群レンサ球菌, *Streptococcus pyogenes*) などが分離される。¹⁰⁾ 院内において分離されたブドウ球菌、化膿レンサ球菌や緑膿菌の感受性の調査研究は報告されているが、市中の健常者や皮膚感染症患者から分離された細菌におけるゲンタマイシン耐性菌の分離状況を調査した報告は少ない。また、ゲンタマイシン軟膏薬使用によるゲンタマイシン耐性菌の流行と出現についてはほとんど不明である。そこで、本研究では、外用薬としてのゲンタマイシンの有効性を調査するため、健常者から分離したブドウ球菌を中心に他の外用抗菌薬を含めて薬剤感受性を調査した。さらに、皮膚感染症関連菌におけるゲンタマイシンの突然変異耐性菌の出現について基礎的研究を行った。

実験方法

1. 使用薬剤と培地 外用薬として使用されているゲンタマイシン (Sigma-Aldrich Co., USA)、フラジオマイシン (Sigma-Aldrich Co., USA)、クロラムフェニコール (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)、バシトラシン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) の原末を用いた。

ブドウ球菌と緑膿菌の増殖用培地は tryptone soya broth (TSB: Oxoid Ltd., England) に 1.5% 寒天 (Agar bacteriological: Oxoid Ltd., England) を加えた Tryptone soya agar (TSA) を用いた。化膿レンサ球菌の増殖には、5% (v/v) 馬脱繊維血 (Nippon Bio-test Laboratories) を加えた Brain Heart In-

fusion (BHI: Oxoid Ltd., England) 寒天培地を使用した。最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) の測定と突然変異耐性株の出現頻度の測定には、Muller-Hinton broth (MHB: Oxoid Ltd., England) と MH agar (MHA) を用いた。

2. 使用菌株 菌株は、2008–2009 年に健常者の鼻腔より分離された黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 32 株、コアグラールゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative staphylococci, CNS) 68 株を使用した。皮膚疾患患者由来ブドウ球菌は 2008–2009 年にとびひ (伝染性膿痂疹) 患者の患部から分離された黄色ブドウ球菌 100 株、CNS 50 株を使用した。このうち、MRSA は 40 株であった。化膿レンサ球菌は 2009–2010 年に入院患者から分離された 5 株を、緑膿菌は 2006–2008 年に入院患者から分離された 16 株及び病院内環境から分離された 10 株を使用した。標準株として、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の薬剤感受性試験の quality control 株である黄色ブドウ球菌 JCM2874 (ATCC29213) と緑膿菌 JCM6119 (ATCC27953)、菌種同定の type strain である表皮ブドウ球菌 JCM2414 (ATCC14990)、化膿レンサ球菌 JCM5674 (ATCC12344) 及び MRSA N315¹¹⁾ を使用した。

3. 薬剤感受性の測定 薬剤感受性は、CLSI の 2 倍寒天平板希釈法に準じて最小発育阻止濃度 (MIC: $\mu\text{g/ml}$) を測定した。¹²⁾ MHA で 35°C、20–24 時間培養した菌を MHB に McFarland standard 0.5 と同程度 (約 1.5×10^8 cells/ml) になるように懸濁した。菌懸濁液を MHB で 10 倍希釈後、一連の薬剤含有 MHA にマイクロプランター MIT-P 型 (Sakuma Ltd.) を用いて $1 \mu\text{l}$ (約 10^4 cells/spot) 接種した。35°C、20–24 時間培養後、菌の生育を視覚により判定し、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 とした。耐性の解釈は CLSI の注射薬又は経口薬のブレイクポイントを参照とした。¹²⁾ ブドウ球菌におけるブレイクポイントはゲンタマイシンが $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ 、クロラムフェニコールが $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ 、化膿レンサ球菌におけるクロラムフェニコールと緑膿菌におけるゲンタマイシンのブレイクポイントは $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ とした。各々の菌種において CLSI にブレイクポイントが設定されていない薬剤については耐性を評価しなかった。

4. 突然変異耐性株の出現頻度 皮膚感染症関連菌の標準株を用い、ゲンタマイシン、フラジオマイシン、クロラムフェニコールに対する突然変異耐性株の増殖頻度を野口らの方法を参照して以下の方法で測定した。¹³⁾ 試験菌は BHI 液体培地を用い、35°C、20–24 時間培養し、3000 rpm、10 分間の遠心によって集菌した。沈殿菌体を 10% Glycerol 含有 MHB を用いて約 10^9 cells/ml になるように懸濁し、使用時まで -20°C に保存した。調製した試験菌液を試験抗菌薬の MIC の 2 倍から 16 倍の薬剤含有 MHA に 100 μ l (約 10^8 – 10^9 cells/plate) 塗抹した。35°C、48 時間培養後、発育したコロニー数 (A) を計測した。実験使用菌数 (B) は、適当に希釈した菌液を薬剤非含有 MHA に塗抹し、発育したコロニー数から算出した。¹⁴⁾ 大量の菌体を塗抹した場合、試験薬剤の MIC 濃度では非変異株も発育することがあるため、以下の方法で耐性変異株を測定した。選択培地に増殖したコロニー数が 100 コロニー以上のときはランダムに 100 コロニー選択し、100 コロニー未満のときはすべてのコロニーを、0, 4, 16, 64 μ g/ml の薬剤を含有する MHA にレプリカした。35°C、48 時間培養後、実験使用菌に対する試験薬剤の MIC 以上の薬剤含有寒天培地に増殖したコロニーを耐性変異株とした。調べた耐性変異株と選択培地上に生育したコロニーから耐性変異株の比率 ($C = \text{耐性変異株数} / \text{レプリカ試験株数}$) を求め、式 $F = A \times C / B$ から突然変異耐性株の出現頻度 F を算出した。

5. ゲンタマイシン耐性遺伝子の解析 黄色ブドウ球菌のゲンタマイシン耐性遺伝子 *aacA-aphD* 遺伝子の検出は、*aacA-aphD* の特異的プライマー (5'-TACAGAGCCTTGGGAAGATG, 5'-CATTTGTGGCATTATCATCATATC) を用いて PCR により遺伝子を増幅し、アガロース電気泳動によって行った。⁵⁾ リボソームの 50S サブユニット構成タンパク質 L6 をコードする遺伝子 *rplF* は、プライマー (5'-ATGAGTCGTGTTGGTAAGAA, 5'-AC-CAGTTTTACCTTCTTTACG) を用いて PCR により増幅後、ABI PRISM BigDye[®] terminator v.3.1 cycle sequence kit (Applied Biosystems, USA) を用い、キャピラリー型 DNA シーケンサー (Applied Biosystems) によって決定した。¹⁵⁾ DNA 塩基配列は塩基配列解析ソフトウェア GENETYX[®] software

ver. 8.0 (GENETYX) を用いて解析した。

結 果

1. 薬剤感受性の測定 外用軟膏薬として使用されているゲンタマイシン、フラジオマイシン、クロラムフェニコール、バシトラシンの薬剤感受性を評価するため、MIC を測定した。化膿レンサ球菌と緑膿菌では健常者由来の菌株がなかったため、患者又は病院内環境由来株を使用した。Table 1 に健常者 (healthy people) 及び患者 (clinical isolate) 由来ブドウ球菌、患者由来化膿レンサ球菌並びに患者及び病院内環境 (environmental setting) 由来緑膿菌の各種抗菌薬の MIC の分布を示す。薬剤感受性である標準菌株における各種抗菌薬の MIC を下線で示した。ゲンタマイシンでは、健常者由来ブドウ球菌はほとんどが感受性を示し、耐性株は 10% (10/100) であった。一方、患者由来ブドウ球菌においては、耐性株が 49.3% (74/150) 存在した。その内訳は、41.9% (31/74) が MRSA、39.1% (29/74) がメチシリン感受性黄色ブドウ球菌、18.9% (14/74) が CNS であった。これらのゲンタマイシン耐性ブドウ球菌の MIC はすべて、16–128 μ g/ml であった。化膿レンサ球菌は全株が感受性を示した。緑膿菌は患者及び病院内環境由来の半数が、低感受性株であった。

フラジオマイシンも同様に健常者における耐性菌の保有率は低かった。一方、化膿レンサ球菌や緑膿菌に対して、ほとんどの株が感受性を示さなかった。

クロラムフェニコールでは、緑膿菌以外の細菌において、ほとんどが感受性を示していた。バシトラシンは化膿レンサ球菌に高い感受性を示したが、他の細菌には感受性が低かった。

ゲンタマイシン耐性を示したすべてのブドウ球菌について、主要な耐性遺伝子 *aacA-aphD* 遺伝子の存在を PCR で調べた。その結果、96.4% の耐性株で *aacA-aphD* 遺伝子が検出された。したがって、調査したゲンタマイシン耐性ブドウ球菌のほとんどは、*aacA-aphD* 遺伝子の獲得によって耐性化した株であることが明らかとなった。また、ゲンタマイシン耐性株の *aacA-aphD* 遺伝子非保有株 3 株について、*rplF* 遺伝子の変異を調べたが、すべての株で *rplF* 遺伝子に変異は認められなかった。¹⁶⁾

Table 1. Distribution of Minimum Inhibitory Concentration against Bacteria Isolated from Healthy People, Clinical, and Environmental Setting

Drug	Strain	Origin	No. of strains that were distributed into the following MIC ($\mu\text{g/ml}$)														Total
			≤ 0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥ 256		
GM	SA	H	3	15	<u>10</u>	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	32	
		C	0	0	<u>7</u>	0	0	0	0	33	23	15	14	8	0	100	
	CNS	H	50	5	<u>3</u>	1	0	0	0	1	5	1	1	1	0	68	
		C	24	0	<u>0</u>	0	0	0	1	11	4	5	2	3	0	50	
	ST	C	0	0	<u>0</u>	0	0	0	4	<u>1</u>	0	0	0	0	0	5	
	PA	En	0	0	<u>0</u>	0	2	<u>2</u>	0	1	1	2	1	0	1	10	
		C	0	0	<u>0</u>	0	2	<u>2</u>	0	1	1	2	1	0	1	10	
FRM	SA	H	2	2	9	16	1	2	0	0	0	0	0	0	0	32	
		C	21	9	0	46	2	0	0	0	0	4	17	1	0	100	
	CNS	H	19	29	11	1	0	1	1	1	1	0	3	0	1	68	
		C	35	3	1	0	0	0	0	4	4	1	1	1	0	50	
	ST	C	0	0	<u>0</u>	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	5	
	PA	En	0	0	<u>0</u>	0	0	1	0	1	1	1	3	1	2	10	
		C	0	0	<u>0</u>	0	0	1	0	1	1	1	3	1	2	10	
CP	SA	H	0	0	0	0	1	9	20	2	0	0	0	0	0	32	
		C	0	0	0	0	0	0	1	89	0	0	10	0	0	100	
	CNS	H	0	0	0	1	2	46	17	0	0	1	1	0	0	68	
		C	0	0	0	0	3	32	1	0	0	1	12	0	1	50	
	ST	C	0	0	<u>0</u>	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	5	
	PA	En	0	0	<u>0</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	
		C	0	0	<u>0</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	
BC	SA	H	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	19	6	1	32	
		C	0	0	0	0	1	1	4	0	0	13	20	61	0	100	
	CNS	H	0	0	0	0	0	0	3	3	3	15	35	7	2	68	
		C	0	0	0	0	0	0	0	0	10	14	26	0	0	50	
	ST	C	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
	PA	En	0	0	<u>0</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	
		C	0	0	<u>0</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	

GM, gentamicin; FRM, fragiomycin; CP, chloramphenicol; BC, bacitracin; SA, *Staphylococcus aureus*; CNS, coagulase negative staphylococci; ST, *Streptococcus pyogenes*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; H, healthy people; C, clinical isolate; En, environmental setting; MIC, minimum inhibitory concentration. The MICs of the standard strains are underlined.

2. 突然変異耐性株の出現頻度 抗菌薬含有軟膏薬の使用による耐性菌の出現頻度をゲンタマイシン、フラジオマイシン、クロラムフェニコールについて実験を行った。バシトラシンは化膿レンサ球菌以外の菌種には感受性が低いため、本実験は行わなかった。大量の細菌が薬剤に曝露された場合、培養時間や温度などの条件により感受性株でも MIC 付近の薬剤含有寒天培地に増殖するコロニーが観察される。そこで、より正確に突然変異耐性株の出現頻度を測定するため、薬剤含有寒天培地上に増殖したコロニーについてレプリカ法にて薬剤感受性を調べ、選択濃度以上の MIC を示す耐性変異株の菌数

を算出した。Table 2 に皮膚感染症の原因になり得る細菌における突然変異耐性株の出現頻度の測定結果を示す。また、本実験における各抗菌薬の mMIC は、CLSI に準拠した菌数ではなく、変異試験に用いた菌液 (10^9 – 10^{10} cells/ml) で測定した MIC である。実験は 2 – $128 \times \text{mMIC}$ の濃度で行ったが、Table 2 には $16 \times \text{mMIC}$ までを表記した。黄色ブドウ球菌と化膿レンサ球菌において、ゲンタマイシン、フラジオマイシンでは、 $4 \times \text{mMIC}$ 以上で耐性変異株は分離されなかった。黄色ブドウ球菌では $2 \times \text{mMIC}$ において、15 株のゲンタマイシン耐性変異株が分離された。表皮ブドウ球菌と緑膿菌に

Table 2. Frequency of Spontaneous Antimicrobial-resistant Mutants in Standard Strains

Bacteria	Drug	mMIC ($\mu\text{g/ml}$)	No. of cells (cfu/ml)	Frequency at the following multiple of the mMIC ($\mu\text{g/ml}$)			
				$\times 2$	$\times 4$	$\times 8$	$\times 16$
<i>S. aureus</i> JCM2874	gentamicin	0.5	1.0×10^{10}	2.6×10^{-7}	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$
	fradiomycin	1		3.3×10^{-7}	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$
	chloramphenicol	8		$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$
<i>S. epidermidis</i> JCM2414	gentamicin	0.25	1.0×10^{10}	2.6×10^{-7}	8.6×10^{-7}	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$
	fradiomycin	0.5		2.6×10^{-7}	8.6×10^{-7}	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$
	chloramphenicol	8		$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$	$<1.0 \times 10^{-10}$
<i>St. pyogenes</i> JCM5674	gentamicin	8	2.9×10^9	6.6×10^{-7}	$<2.9 \times 10^{-9}$	$<2.9 \times 10^{-9}$	$<2.9 \times 10^{-9}$
	fradiomycin	≥ 256		—	—	—	—
	chloramphenicol	4		—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> JCM6119	gentamicin	4	2.9×10^9	4.3×10^{-6}	4.3×10^{-8}	$<2.9 \times 10^{-9}$	$<2.9 \times 10^{-9}$
	fradiomycin	≥ 256		—	—	—	—
	chloramphenicol	≥ 256		—	—	—	—

mMIC is a MIC value for 10^9 cells/ml of bacteria used in the mutation experiment. *S.*, *Staphylococcus*; *St.*, *Streptococcus*; *P.*, *Pseudomonas*; —, not determined.

においては、 $8 \times \text{mMIC}$ 以上で耐性変異株は分離されなかった。また、クロラムフェニコールでは、ブドウ球菌において、 $2 \times \text{mMIC}$ で耐性変異株は分離されなかった。分離された耐性変異株のゲンタマイシンに対する MIC を測定したところ、すべて $64 \mu\text{g/ml}$ 以上は認められなかった（ゲンタマイシン耐性の MIC は $16 \mu\text{g/ml}$ 以上）。

ランダムに選択した黄色ブドウ球菌のゲンタマイシン耐性変異株 4 株について、*aacA-aphD* 遺伝子の有無とゲンタマイシン耐性に係わる代表的な染色体性遺伝子 *rplF* の変異を DNA シーケンス法で調べた。*aacA-aphD* 遺伝子はすべての株で検出されなかった。一方、*rplF* 遺伝子の塩基配列は、2 株において 241 番目の C が T に置換し、その結果、81 番目のグルタミンにナンセンス変異 (TAA) が生じていた。他の 2 株に *rplF* 遺伝子の変異は認められなかった。この結果より、ゲンタマイシン選択による耐性変異株は、*aacA-aphD* 遺伝子の獲得ではなく、染色体上の *rplF* 遺伝子などのゲンタマイシン耐性に係わる遺伝子の変異によって出現したことが強く示唆された。

考 察

薬剤耐性菌の出現と流行は、抗菌薬の使用が深く関係している。日本での抗菌薬の使用は海外と異なり、抗菌薬の OTC は一部の外用薬に限られ、基本的に医師による処方が必要である。ゲンタマイシンは、皮膚感染症に対する外用薬として病院や市中の

クリニックにおいて汎用されている。そのため、病院だけでなく市中にも薬剤耐性菌の蔓延が懸念されることから、健常者の薬剤耐性菌の保菌状況を調査した。通常、薬剤耐性菌の判定は、注射あるいは内服における薬剤の血中あるいは組織内濃度を考慮して算出された感受性株と耐性株の境界 MIC (ブレイクポイント) によって評価されている。外用薬におけるブレイクポイントが設定されていないため、本研究においても、CLSI によって設定されたブレイクポイントを用いて評価した。本研究から、健常者由来ブドウ球菌においては、少なくとも 85% の株がゲンタマイシンに感受性を示すことが明らかとなった。一方で、患者由来ブドウ球菌では、ゲンタマイシン耐性株が約 50% に達していることが示された。さらに、ゲンタマイシン耐性遺伝子 *aacA-aphD* の保有を PCR で調べたところ、耐性と感受性の中間 (MIC: $8 \mu\text{g/ml}$) 分布した 33 株を含めた MIC が $8 \mu\text{g/ml}$ 以上のすべての株がゲンタマイシン耐性遺伝子 *aacA-aphD* を保有していた (data not shown)。したがって、*aacA-aphD* の遺伝子の保有から評価すると皮膚患者ではゲンタマイシン耐性株が 83% に達していることが示された。緑膿菌ではゲンタマイシンが抗緑膿菌の注射薬として古くから汎用されており、患者及び病院内環境由来株においてもゲンタマイシンの耐性株が広く分布していることが認められた。軟膏剤の塗布では、ステロイド軟膏で報告された 1 FTU (finger-tip-unit) という単位が広く認知されている。^{17,18)} 1 FTU は大人の

人差し指の先から第一関節までに口径 5 mm のチューブから軟膏を絞り出した量で、5 cm² の範囲に塗ることが適当とされている。皮膚感染症に処方される 0.1% ゲンタマイシン軟膏薬の 1 FTU を皮膚に塗抹すると、注射薬とは異なり、理論上、皮膚表面には少なくとも塗抹軟膏剤中約 895 µg/ml 濃度のゲンタマイシンが存在することとなる。本研究において、ゲンタマイシン耐性と判定した株は、緑膿菌の 2 株 (≥256 µg/ml) を除いて、市中感染型 MRSA も含めたすべての菌株において、ゲンタマイシンの MIC が 128 µg/ml 以下であった。したがって、0.1% ゲンタマイシン軟膏薬塗抹時の濃度では、健常者及び患者由来ゲンタマイシン耐性株も十分に治療が期待できることを示している。

皮膚疾患患者より分離されたゲンタマイシン耐性ブドウ球菌における耐性機序は、ゲンタマイシン耐性遺伝子 *aacA-aphD* 遺伝子の存在から、獲得した耐性遺伝子による薬剤の修飾であることが明らかとなった。この結果は、ゲンタマイシンは上市後 40 年以上経過しているにもかかわらず、流行しているゲンタマイシン耐性菌がニューキノロン系薬のような薬剤の使用によって出現する耐性変異株ではないことを強く示唆している。この考察を確認するため、ゲンタマイシン、フラジオマイシン、クロラムフェニコールの使用による耐性変異株の出現頻度を皮膚感染症関連菌で検討した。突然変異耐性株は、MIC 近傍で出現し、高濃度では耐性変異株も薬剤によって増殖が阻害あるいは殺菌される。この耐性変異株を出現させない最小の濃度を薬剤耐性変異株抑制濃度 (Mutant Prevention Concentration: MPC) と定義されている。MIC と MPC の間を耐性菌選択濃度域 (Mutant Selection Window: MSW) と言い、耐性変異株が優位に増殖する薬剤濃度範囲と解釈されている。そのため、この濃度範囲 (幅) が狭いほど、また MPC が低いほど耐性変異株が出現し難いとされている。¹⁹⁾ 本研究で得られたゲンタマイシン耐性変異株は、*rplF* を含め種々の染色体上の変異と推測されたが、32 µg/ml 以上のゲンタマイシン濃度では検出されなかった。すなわち、本実験においてはゲンタマイシンの MPC は 32 µg/ml であり、この濃度は 0.1% ゲンタマイシン軟膏薬を使用した場合のゲンタマイシン濃度 (塗抹軟膏剤中約 895 µg/ml) より低く、外用薬としての使用量では

出現したゲンタマイシン耐性変異株も殺菌できることが示唆された。

現在、フラジオマイシンやクロラムフェニコールを含有する外用軟膏薬が OTC として販売されているが、フラジオマイシンはゲンタマイシンでは有効な化膿レンサ球菌に無効であるため、その製剤にはバシトラシンが添加されている。クロラムフェニコールは緑膿菌に感受性がなく、かつ吸収性があるため安全性に問題がある。一方、外用軟膏薬において、ゲンタマイシンは皮膚吸収が少ない安全な抗菌薬であり、かつ本研究結果は外用のゲンタマイシンが表在性皮膚感染症関連菌に有効な広域抗菌スペクトルを有し、出現したゲンタマイシン耐性変異株の増殖を十分に抑制可能であることを示していた。したがって、0.1% ゲンタマイシン軟膏薬を適正に使用することにより、常用量で市中の表在性皮膚感染症に効果が期待できることが明らかとなった。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂いた東京薬科大学薬学部病原微生物学教室の戸田裕太氏、樋川珠代氏に心より感謝致します。

REFERENCES

- 1) Misumi M., Nishimura T., Komai T., Tanaka N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 358–365 (1978).
- 2) Ida T., Nonoyama M., Hasobe T., Shimauchi C., Inoue M., Okamoto R., *Jpn. J. Antibiot.*, **47**, 585–594 (1994).
- 3) Tsuchimochi N., Takuma T., Shimono N., Nagasaki Y., Uchida Y., Harada M., *J. Infect. Chemother.*, **14**, 99–104 (2008).
- 4) Lyon B. R., Skurray R., *Microbiol. Rev.*, **51**, 88–134 (1987).
- 5) Nakaminami H., Noguchi N., Ikeda M., Hasui M., Sato M., Yamamoto S., Yoshida T., Asano T., Senoue M., Sasatsu M., *J. Med. Microbiol.*, **57**, 1251–1258 (2008).
- 6) Rouch D. A., Byrne M. E., Kong Y. C., Skurray R. A., *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 3039–3052 (1987).
- 7) Jana S., Deb J. K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 140–150 (2006).
- 8) Miller K., O'Neill A. J., Chopra I., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 23–29

- (2004).
- 9) Interview form of Getacin Ointment 0.1%, MSD, 2010.
 - 10) Tada J., *Medicina*, **40**, 968–972 (2003).
 - 11) Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N. K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H., Hiramatsu K., *Lancet*, **357**, 1225–1240 (2001).
 - 12) Clinical and Laboratory Standards Institute, “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement,” M100–S19, 2010.
 - 13) Noguchi N., Tamura M., Narui K., Wakasugi K., Sasatsu M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1129–1132 (2002).
 - 14) Hosaka M., Yasue T., Fukuda H., Tomizawa H., Aoyama H., Hirai K., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**, 2108–2117 (1992).
 - 15) Holden M. T., Feil E. J., Lindsay J. A., Peacock S. J., Day N. P., Enright M. C., Foster T. J., Moore C. E., Hurst L., Atkin R., Barron A., Bason N., Bentley S. D., Chillingworth C., Chillingworth T., Churcher C., Clark L., Corton C., Cronin A., Doggett J., Dowd L., Feltwell T., Hance Z., Harris B., Hauser H., Holroyd S., Jagels K., James K. D., Lennard N., Line A., Mayes R., Moule S., Mungall K., Ormond D., Quail M. A., Rabinowitsch E., Rutherford K., Sanders M., Sharp S., Simmonds M., Stevens K., Whitehead S., Barrell B. G., Spratt B. G., Parkhill J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9786–9791 (2004).
 - 16) Buckel P., Buchberger A., Bock A., Wittmann H. G., *Mol. Gen. Genet.*, **158**, 47–54 (1977).
 - 17) Finlay A. Y., Edwards P. H., Harding K. G., *Lancet*, **2**, 155 (1989).
 - 18) Long C. C., Finlay A. Y., *Clin. Exp. Dermatol.*, **16**, 444–447 (1991).
 - 19) Drlica K., *J. Antimicrob. Chemother.*, **52**, 11–17 (2003).