

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19034

研究課題名（和文）クロルヘキシジン使用による抗菌薬耐性緑膿菌の出現メカニズム解明

研究課題名（英文）In vitro, elucidation of the mechanism by which chlorhexidine induce to cross-resistance of various antimicrobial agents in *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

河村 真人（Kawamura, Masato）

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20524581

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：クロルヘキシジングルコン酸塩（CHG）を暴露された *P. aeruginosa* に対する抗菌薬交差耐性獲得とメカニズムを解析した。CHG含有培地で継代培養することでMICが最大で256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に上昇した。これらの臨床分離株において、シプロフロキサシンに交差耐性（MIC; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示す *P. aeruginosa* を確認した。交差耐性株は、Efflux pumpsの一つをコードする *mexCD-oprD* の発現量が  $1.9 \pm 1.1$ （平均  $\pm$  SD）倍に上昇した。消毒薬の不適切使用は、キノロン系抗菌薬の耐性に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルバペネム系薬、キノロン系薬およびアミノグリコシド系薬に耐性を獲得したMDRPの出現は、抗菌薬の不適切使用が一因にあると考えられてきた。しかし、消毒薬のCHGに抵抗性を獲得した *P. aeruginosa* の一部は、キノロン系抗菌薬のCPFXに交差耐性を獲得した。この交差耐性獲得株は、主に *MexCD-OprJ* の高発現が関与すると考えられてきた。不適切な抗菌薬使用による薬耐性菌（AMR）の出現のみならず、CHGなどの消毒薬暴露によるAMR対策も講じる必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the cross-resistance of antibiotics in *P. aeruginosa* that exposed to chlorhexidine gluconate (CHG). The testes strains were sub cultured in CHG-containing medium, and the MIC of CHG increased up to 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Among these clinical isolates exposed to CHG, *P. aeruginosa* was confirmed to be cross-resistant of ciprofloxacin (CPFX) (MIC; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Some *P. aeruginosa* strains showed no resistance of amikacin (AMK) but showed a 3-tube increase in the MIC. However, no change was observed in the MIC of meropenem of  $\beta$ -lactam drug. In the strains that acquired cross-resistance to quinolone antimicrobials, the expression level of *mexCD-oprD*, which encodes one of the efflux pumps, increased  $1.9 \pm 1.1$  (mean  $\pm$  SD) times. These results suggest that inappropriate use of disinfectant concentrations may lead to the emergence of quinolone-resistant *P. aeruginosa*.

研究分野：感染制御 感染症治療 感染対策

キーワード：消毒薬 緑膿菌 耐性菌 薬剤耐性菌（AMR） 抗菌薬 医療関連感染

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

難治性かつ重症化しやすい医療関連感染症の起因菌の一つに *P. aeruginosa* がある。この *P. aeruginosa* は、フルオロキノロン系薬のシプロフロキサシン (CPFX) やレボフロキサシン (LVFX) などの不適切使用により同系統の薬剤に耐性を示すことが知られている。また、クロルヘキシジングルコン酸塩 (CHG) や塩化ベンザルコニウム (BZC) などの消毒薬にも抵抗性を示す *P. aeruginosa* が存在することも報告されている。

*P. aeruginosa* におけるフルオロキノロン系の薬剤耐性メカニズムの一つに菌体に備わる薬剤排出ポンプ (efflux pump) がある。この efflux pump は、抗菌薬を菌体外へ排出する役割を担っている。Efflux pump は、抗菌薬の他に CHG や BZC などの消毒薬も排出する。すなわち、これらの薬剤は同一の efflux pump から排出されており *P. aeruginosa* の消毒薬抵抗性と CPFX や LVFX 耐性には関係性があると想定される。*P. aeruginosa* において BZC の MIC 変化とともに CPFX の MIC 値も上昇することが報告されており(右: Table)、これらの抗菌薬と消毒薬が交差耐性すると十分に考えられる。

Table. *P. aeruginosa* における消毒薬および抗菌薬感受性

Isolates	MIC (ug/mL)	
	BZC	CPFX
PA-3	40	0.250
PA-7	50	2
PA-11	80	2
PA-19	180	8
PA-23	200	8
PA-27	300	16
PA-29	>350	32
PA-33	>350	32

Microbiology. 156: 30-38, 2010. (改編)

### 2. 研究の目的

本研究は、*P. aeruginosa* に対する CHG などの消毒薬使用が、抗菌薬の交差耐性獲得に関与するか否か検討し、そのメカニズムを解明することを目的とする。薬剤耐性菌は、抗菌薬の過剰使用などの不適切な投与で出現すると考えられていた。抗菌薬耐性 *P. aeruginosa* は感染症治療や院内感染対策において極めて困難を要することから、本研究は医療・看護の新しい一考察となる。抗菌薬の投与のみならず消毒薬使用により抗菌薬耐性を獲得する可能性も示唆され、生体や環境に消毒薬を用いる看護師を中心とした全ての医療スタッフが耐性菌問題に取り組む必要性がある。

### 3. 研究の方法

#### 1) 対象菌株

臨床分離 *P. aeruginosa* と *P. aeruginosa* 標準株の PAO1 株

#### 2) 消毒薬と抗菌薬

消毒薬: CHG 抗菌薬: CPFX、LVFX、アミカシン (AMK)、メロペネム (MEPM)

#### 3) クロルヘキシジングルコン酸塩暴露による耐性誘導モデル (Fig)

CHG の Mutant prevention concentration (MPC) を測定した。すなわち、Muller-Hinton agar (MHA) を用いて CHG の 2 倍希釈系列 (1024-16  $\mu\text{g/mL}$ ) を作製し、この希釈系列に被験菌を  $>10^{10}$  CFU/mL 接種し 37°C 48 h 培養した。1/2 MPC に生残した菌株を異なる希釈系列に  $>10^{10}$  CFU/mL 継代培養する操作を 5 回繰り返した。また、これらの操作で得られた 1/2MPC 生残株を用いて、CHG、CPFX、LVFX および AMK の感受性を測定した。耐性判定基準は、EUCAST Ver 9.0 に従った。さらに、efflux pump の MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexXYOprM および D2 porin の mRNA 発現量を、real time RT-PCR を用いて親株を 1 とした相対比較で測定した。

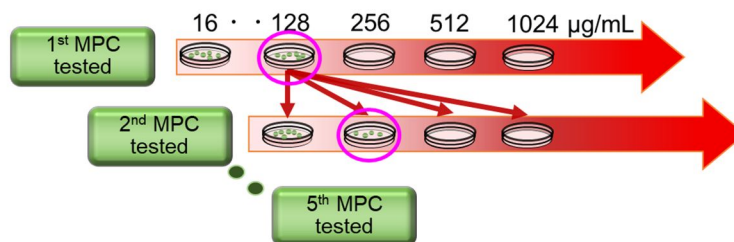


Fig. The chlorhexidine-induced tolerance model against *P. aeruginosa*.

### 4. 研究成果

□一部の対象菌株における CHG の MIC 変化を以下の Table a-e に示した。5 回の CHG 暴露で、CHG の MIC は 4-16 fold 上昇した (Table a)。このうち臨床分離株 (T1-T4) が CPFX に交差耐性 (MIC;  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ ) を示した (Table b)。特に、菌株 T4 は、CHG 暴露モデル 1 回目から CPFX 耐性を示したことから、暴露早期に交差耐性を獲得した。菌株 T2 は、CPFX および LVFX に同時に耐性を獲得した (Table b-c)。また、耐性を示さなかったが AMK の MIC も 3 管上昇した (Table d)。 $\beta$ -lactam 系薬である MEPM の MIC には、影響しなかった (Table e)

**Table a** MIC changes of chlorhexidine gluconate.

<i>P. aeruginosa</i> strain	MIC (μg/mL) of CHG					
	Wild type	1st	2nd	3rd	4th	5th
T1	16	16	16	16	256	256
T2	32	32	64	64	256	256
T3	8	16	32	32	64	64
T4	16	16	16	64	64	64
PAO1	16	16	32	32	128	128

CHG, chlorhexidine gluconate.

**Table b** MIC changes of ciprofloxacin.

<i>P. aeruginosa</i> strain	MIC (μg/mL) of CPFX					
	Wild type	1st	2nd	3rd	4th	5th
T1	0.125	0.125	1	2	2	2
T2	0.125	0.125	1	2	2	2
T3	0.25	0.25	0.5	0.5	1	1
T4	0.5	1	1	1	1	1
PAO1	0.125	0.125	0.125	0.5	0.5	0.5

CPFX, Ciprofloxacin.

**Table c** MIC changes of levofloxacin.

<i>P. aeruginosa</i> strain	MIC (μg/mL) of LVFX					
	Wild type	1st	2nd	3rd	4th	5th
T1	0.25	0.25	1	1	1	1
T2	0.125	0.125	1	2	2	2
T3	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
T4	0.5	1	1	1	1	1
PAO1	0.125	0.125	0.5	0.5	0.5	0.5

LVFX, Levofloxacin.

**Table d** MIC changes of amikacin.

<i>P. aeruginosa</i> strain	MIC (μg/mL) of AMK					
	Wild type	1st	2nd	3rd	4th	5th
T1	2	2	2	2	2	2
T2	2	2	2	2	8	16
T3	4	8	8	8	16	16
T4	8	16	16	16	16	16
PAO1	2	4	4	4	8	8

AMK, Amikacin.

**Table e** MIC changes of meropenem.

<i>P. aeruginosa</i> strain	MIC (μg/mL) of MEPM					
	Wild type	1st	2nd	3rd	4th	5th
T1	4	4	4	4	4	4
T2	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
T3	2	2	2	2	4	4
T4	16	16	16	32	32	32
PAO1	0.25	0.25	0.5	0.5	2	2

MEPM, Meropenem.

CHG 暴露の菌株に対する efflux pumps をコードする mRNA の相対発現量を右の Fig に示した。CHG 負荷により *mexCD* の発現量が  $1.9 \pm 1.1$  (平均 $\pm$ SD) 倍に上昇した。また、*mexAB* および *mexXY* は、wild type と比較すると同等の発現量であった。

D2 porin の発現量は、1.1-0.9 倍を示し、CHG 暴露による影響は限定的であったと推測された。

CHG の暴露により、CPFX および LVFX に交差耐性を示すことを確認した。抗菌薬使用による薬剤耐性のみならず、消毒薬も適切な濃度で使用されない場合にキノロン系抗菌薬の耐性 *P. aeruginosa* が出現する可能性が示唆された。

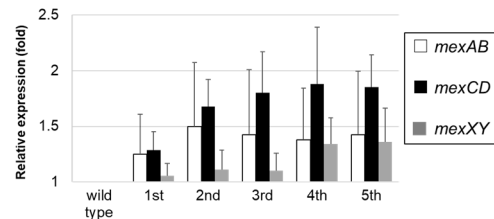


Fig. mRNAの発現量比較

CHG の暴露により、CPFX および LVFX に交差耐性を示すことを確認した。抗菌薬使用による薬剤耐性のみならず、消毒薬も適切な濃度で使用されない場合にキノロン系抗菌薬の耐性 *P. aeruginosa* が出現する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawamura Masato, Ito Ryota, Tamura Yurina, Takahashi Mio, Umenai Miho, Chiba Yuriko, Sato Takumi, Fujimura Shigeru	4. 巻 10
2. 論文標題 Overproduction of Chromosomal ampC $\beta$ -Lactamase Gene Maintains Resistance to Cefazolin in <i>Escherichia coli</i> Isolates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00058-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ping Yang, Shigeru Fujimura, Yawei Du, Bei Zhang, Li Yang, Masato Kawamura, Zhenhua Zhang, Suodi Zhai	4. 巻 10
2. 論文標題 Comparison of Pharmaceutical Characteristics between Brand-Name Meropenem and Its Generics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics10091096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 河村真人, 佐藤 匠, 藤村 茂
2. 発表標題 各種 $\beta$ -ラクタム系広域抗菌薬暴露による <i>P. aeruginosa</i> PA01株のエンドトキシン産生量
3. 学会等名 第69回日本化学療法学会東日本支部総会 / 第71回日本感染症学会東日本地方会学術集会 合同学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河村真人, 田村友梨奈, 佐藤 匠, 藤村 茂
2. 発表標題 臨床分離された <i>S. aureus</i> におけるバイオフィーム構成成分の解析
3. 学会等名 MRSAフォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河村真人, 遠藤史郎, 佐藤 匠, 藤村 茂
2. 発表標題 乾燥および湿潤環境下における <i>A. baumannii</i> の生存期間
3. 学会等名 第37回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河村真人、佐藤匠、藤村茂
2. 発表標題 クロロヘキシジン暴露 <i>P. aeruginosa</i> におけるピペラシリンの交差耐性
3. 学会等名 第69回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zhenhua Zhang, Ping Yang, Masato Kawamura, Suodi Zhai, Shigeru Fujimura, Yawei Du, Bei Zhang, Li Yang
2. 発表標題 Difference in solution stability, dissolution time, antibacterial activity and quality of preparation between brand name meropenem and generics and Its Generics
3. 学会等名 31st ECCMID (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河村真人、佐藤匠、藤村茂
2. 発表標題 MRSAにおける次亜塩素酸ナトリウムの抵抗性獲得と各種測定法による殺菌力評価
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村真人、佐藤匠、藤村茂
2. 発表標題 P. aeruginosa PA01株に対する次亜塩素酸ナトリウムの作用および抵抗性の解明
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会東日本支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村真人、佐藤匠、藤村茂
2. 発表標題 クロロヘキシジン暴露P. aeruginosa におけるピペラシリンの交差耐性
3. 学会等名 第69回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河村真人、佐藤匠、藤村茂
2. 発表標題 個人防護具の素材表面におけるS. aureusの菌数変化
3. 学会等名 第36回日本環境感染学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河村真人、佐藤匠、田村友梨奈、石坂和眞、遠藤史郎、藤村茂
2. 発表標題 バイオフィーム形成Pseudomonas aeruginosaおよびSerratia marcescensに対する各種消毒薬含侵ワイプの除菌効果
3. 学会等名 第70回日本化学療法学会東日本支部総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

発表者名：河村真人  
発表標題：院内環境における病原微生物の定着と消毒薬抵抗性について  
会名：第5回秋田県薬剤師会大館北秋田支部 生涯教育学術講演会  
発表年：2022年

発表者名：河村真人  
発表標題：消毒剤や除菌剤の抗菌作用に着目した感染症対策  
会名：第6回秋田県薬剤師会大館北秋田支部 生涯教育学術講演会  
発表年：2023

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------