

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09872

研究課題名（和文）口腔細菌の薬剤耐性化および各種抗生剤に対する交叉耐性獲得の網羅的検索

研究課題名（英文）Comprehensive study for drug resistance in oral bacteria and acquisition of cross-resistance to antibiotics

研究代表者

廣瀬 奈々子（Hirose, Nanako）

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：10780819

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、クロルヘキシジンの長期使用による口腔細菌の耐性獲得の有無を検討し、その耐性獲得機構を検証した。ゲノム情報の取得が容易なEnterococcus faecalis ATCC29212を対象とし、クロルヘキシジンに最小発育阻止濃度以下の濃度で連続暴露したところ、E. faecalis ATCC29212は耐性を獲得し、野生株に比べて耐性株では、薬剤輸送タンパクに関連する遺伝子の発現上昇が認められることが明らかとなった。さらに、耐性株は一部の抗生剤に対して交叉耐性を獲得する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬の使用頻度の増加とその不適切な使用により、新たな薬剤耐性菌の出現と拡散が世界的な脅威となっている。しかし、口腔細菌における耐性獲得に関する詳細な報告はまだ限られている。本研究では、ゲノム情報の取得が容易なEnterococcus faecalisを用いてクロルヘキシジン耐性株を作成し、その耐性獲得機構を検証することに成功した。今後、交叉耐性獲得機構の解析を含め、更に詳細な検討を継続することで、口腔内での新たな薬剤耐性菌の出現を事前に予防する対策の構築に繋がるものと期待される。

研究成果の概要（英文）： In this study, we investigated the acquisition of resistance by oral bacteria due to the long-term use of chlorhexidine and verified its resistance acquisition mechanism. It was demonstrated that repeated exposure to chlorhexidine at concentrations below the minimum inhibitory concentration resulted in the acquisition of resistance by Enterococcus faecalis ATCC29212, for which genomic information is easily obtainable. In resistant strains, an increase in the expression of genes associated with drug transporters was observed compared to wild-type strains. Furthermore, it was suggested that resistant strains would acquire cross-resistance to certain antibiotics.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：薬剤耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、抗菌薬の使用頻度の増加とその不適切な使用により、新たな薬剤耐性菌の出現と拡散が世界的な脅威となっている。2017年、WHOは新しい抗菌薬の研究開発のための Priority pathogens list for research and development of new antibiotics を発表し、薬剤耐性菌がどのようにして耐性を獲得するかを解明し、新しい抗菌薬の開発の緊急性を訴えた。しかし、国連による2019年の報告書によれば、現在も世界中で毎年70万人もの人々が薬剤耐性菌によって死亡している。

薬剤耐性の機構には、作用点の突然変異、修飾酵素や分解酵素による薬剤の無効化、細胞膜の変化による薬剤透過性の低下、薬剤排出ポンプによる薬剤の排出などがある。これらのうち、どの機構が耐性獲得に最も影響しているかはまだ十分に理解されていないが、*Staphylococcus aureus* や *Escherichia coli* などの主要な細菌種に関しては、遺伝子解析を利用した薬剤耐性獲得機構の主因の解明が行われ、報告がなされている (Lakhundi *et al.*, *Clin Microbiol Rev*, 2018, Suzuki *et al.*, *Nat Commun*, 2014)。しかし、口腔細菌における薬剤耐性獲得に関する詳細な報告はまだ限られており、口腔内での薬剤耐性菌の出現に関する研究は不十分である。一方、我が国では、クロルヘキシジンなどの抗菌剤が配合された洗口剤が頻繁に使用されており、このような抗菌剤の使用による口腔細菌の耐性獲得に関する研究により、口腔内での新たな薬剤耐性菌の出現を事前に予防する対策の構築が不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究では、クロルヘキシジンの長期使用による口腔細菌の耐性獲得の有無を検討し、その耐性獲得機構を検証した。具体的には、ゲノム情報の取得が容易な *Enterococcus faecalis* ATCC29212 を対象とし、クロルヘキシジンに最小発育阻止濃度以下の濃度で28回連続暴露した後の遺伝子発現の変化を解析し、薬剤耐性獲得の原因となる遺伝子を特定した。さらに、耐性を獲得した細菌の抗生剤に対する感受性を評価し、交叉耐性の有無を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) *E. faecalis* ATCC29212 の耐性獲得の評価

最小発育阻止濃度測定による *E. faecalis* ATCC29212 の耐性獲得

*E. faecalis* ATCC29212 の菌液を  $2 \times 10^7$  CFU/mL に調整し、クロルヘキシジン塩酸塩の最小発育阻止濃度測定値を micro dilution assay にて測定した。その後、最小発育阻止濃度判定時に増殖が認められたもののうち、最大濃度のクロルヘキシジン塩酸塩を含む細菌懸濁液を用いて  $2 \times 10^7$  CFU/mL の菌液を再度調整し、28回まで最小発育阻止濃度測定を繰り返した。

クロルヘキシジン耐性株の形態観察

耐性獲得による *E. faecalis* の形態変化を確認するため、走査型電子顕微鏡を用いてクロルヘキシジン耐性株および野生株の形態を観察した。

培養中の他種細菌混入の有無の検討

PCR およびリアルタイム PCR により、クロルヘキシジン耐性株と野生株のリボソーム RNA 配列を解析し、28回の継代培養中に他種細菌の混入が認められないかどうかについて検討した。

#### (2) クロルヘキシジン耐性株の遺伝子発現の変化に関する検討

クロルヘキシジン耐性株および野生株から抽出したトータル RNA サンプルから、rRNA 除去法によりストランド特異的 cDNA ライブラリを調整し、Illumina NovaSeq 6000 を用いて1サンプルあたり1400-1800万の150 bp ペアエンドシーケンスリードを取得した。これらの PE FASTQ ファイルをさらに Trimmomatic を用いてトリミングした後、HISAT2 によるシーケンスリードのマッピングを行い、featureCounts による遺伝子ごとのリードカウントを経て、DESeq2 による発現変動遺伝子の解析を行った。

#### (3) クロルヘキシジン耐性株の各種抗生剤に対する交叉耐性獲得の有無に関する検討

実験(1-)と同様に、クロルヘキシジン耐性株および野生株に対するアジスロマイシンおよびエリスロマイシンの最小発育阻止濃度を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) *E. faecalis* ATCC29212 の耐性獲得の評価

*E. faecalis* ATCC29212 をクロルヘキシジン塩酸塩に1回暴露させた後の *E. faecalis* ATCC29212 に対するクロルヘキシジンの最小発育阻止濃度は  $2 \mu\text{g/mL}$  であったのに対して、14回連続暴露させた後の最小発育阻止濃度は  $8 \sim 12 \mu\text{g/mL}$  にまで増加した。さらに、クロルヘキシジン塩酸塩への暴露を繰り返し続けることにより、*E. faecalis* ATCC29212 に対するクロルヘキシ

ジンの最小発育阻止濃度は増加し、28 回連続暴露後には最大で 54 µg/mL にまで最小発育阻止濃度が増加した。

28 回目の最小発育阻止濃度測定時に増殖が認められた最大濃度のクロルヘキシジン塩酸塩を含む細菌懸濁液を回収し、さらに 24 時間培養したものをクロルヘキシジン耐性 *E. faecalis* ATCC29212 株として凍結保存した。

さらに、耐性獲得による形態の変化を確認するため、走査型電子顕微鏡を用いてクロルヘキシジン耐性 *E. faecalis* 株の形態を観察したところ、耐性株の形態は野生株と変わらなかった。

また、PCR およびリアルタイム PCR によりクロルヘキシジン耐性株と野生株のリボソーム RNA 配列を解析したところ、両菌株間で同様のリボソーム RNA 配列を持っていたことから、28 回の継代培養を行っても、クロルヘキシジン耐性株に他種細菌の混入は認められないことを確認した。

## (2) クロルヘキシジン耐性株の遺伝子発現の変化

前述のように、クロルヘキシジン塩酸塩に 28 回暴露を繰り返し続けることで、クロルヘキシジン耐性 *E. faecalis* ATCC29212 株を作成することが可能であることを確認した。しかし、長期間凍結保存したクロルヘキシジン耐性株を使用して、RNA シークエンスによりクロルヘキシジン耐性による遺伝子発現の変化を解析したところ、遺伝子発現の変化が認められないことが判明した。

そこで、実験(1)の手法により、クロルヘキシジン耐性 *E. faecalis* ATCC29212 株を作成した直後に、RNA シークエンスによりクロルヘキシジン耐性株の遺伝子発現の変化を再度検討したところ、遺伝子オントロジー解析の結果、クロルヘキシジン耐性株は chromosome segregation、cellular component organization、および disaccharide metabolic process (以上、Biological Process : BP)、proteasome complex、HslUV protease complex、および cytosolic proteasome complex (以上、Cellular Component : CC)、ion binding および drug binding でアノテーションされた遺伝子の発現上昇が認められた。その中で、野生株と比べて 5 倍以上の発現上昇が認められた 7 種の遺伝子のうち、5 種が薬剤輸送タンパクである ATP 結合カセットトランスポーターに関連する遺伝子であることが明らかとなった。

## (3) クロルヘキシジン耐性株の各種抗生剤に対する交叉耐性獲得の有無

野生株と比較して、クロルヘキシジン耐性株に対するアジスロマイシンとエリスロマイシンの最小発育阻止濃度は低下した。

以上のように、ゲノム情報の取得が容易な *Enterococcus faecalis* ATCC29212 を対象とし、クロルヘキシジンに最小発育阻止濃度以下の濃度で連続暴露することで、*E. faecalis* ATCC29212 は耐性を獲得し、野生株に比べて耐性株では薬剤輸送タンパクに関連する遺伝子の発現上昇が認められた。さらに、耐性株は一部の抗生剤に対して交叉耐性を獲得する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mehdawi I, Kitagawa R, Kitagawa H, Yamaguchi S, Hirose N, Kohno T, Imazato S	4. 巻 41
2. 論文標題 Incorporation of chlorhexidine in self-adhesive resin cements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 675 ~ 681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2022-004	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

1. 著者名 Kitagawa H, Kitagawa R, Tsuboi R, Hirose N, Thongthai P, Sakai H, Ueda M, Ono S, Sasaki JI, Ooya T, Imazato S	4. 巻 37
2. 論文標題 Development of endodontic sealers containing antimicrobial-loaded polymer particles with long-term antibacterial effects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 1248 ~ 1259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2021.04.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	北川 晴朗 (Kitagawa Haruaki) (50736246)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教  (14401)	
研究分担者	高橋 雄介 (Takahashi Yusuke) (60397693)	大阪大学・歯学部附属病院・講師  (14401)	

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
---------	---------