

黄色ブドウ球菌に対するクロルヘキシジンおよび オラネキシジンの最小殺菌濃度の検討

中澤 靖^{1,2)}・田村 卓¹⁾・堀 誠治²⁾

*The Minimum Killing Concentrations of Chlorhexidine Gluconate and Olanexidine Gluconate on Clinically Isolated *S.aureus* Strains*

Yasushi NAKAZAWA^{1,2)}, Taku TAMURA¹⁾ and Seiji HORI²⁾

¹⁾Department of Infection Control, Jikei University Hospital,

²⁾Department of Infectious Disease and Infection Control, Jikei University School of Medicine

(2017年5月16日受付・2017年10月24日受理)

要 旨

血液ならびに創部から検出された黄色ブドウ球菌に対する Chlorhexidine gluconate (CHG) および Olanexidine gluconate (OLN) の最小殺菌濃度 (MKC) を測定した。CHG に対する 50% の株を殺菌する濃度 (MKC₅₀) は 0.1250%, 90% の株を殺菌する濃度 (MKC₉₀) は 0.5000% であった。OLN では MKC₅₀ は 0.0020%, MKC₉₀ は 0.0156% であった。*qac A/B* 遺伝子を保有株は 18 株 (13.7%) で、*qac A/B* の保有による MKC の上昇は認めなかった。OLN は CHG に比し臨床分離黄色ブドウ球菌株に対して低濃度での殺菌効果を示した。

Key words : クロルヘキシジン, オラネキシジン, MRSA, MSSA, 最小殺菌濃度

黄色ブドウ球菌は院内感染の原因菌として周知されているが、プラスミド性の *qac A/B* 遺伝子等の獲得や染色体上の遺伝子変異にて、薬剤排出機構を獲得し消毒薬に耐性化する事が報告されている¹⁾。Noguchi らは 1998 年から 1999 年に日本で分離された 413 株のうち *qac A/B* 遺伝子を有している株は 44.3% であったと報告している²⁾。

近年、CDC のガイドラインなどを参考にして、日本でも手術術野や血管内留置カテーテル挿入部などの皮膚消毒において Chlorhexidine gluconate (CHG) が汎用されているようになってきた。欧米では以前より感染対策に CHG が使用されているが、日本においては 2~4% CHG 製剤が使用できず、0.5~1% 製剤を使用している現状がある。一方、CHG と同じビグアナイド系殺菌消毒薬である Olanexidine gluconate (OLN) が上市され、手術術野を中心に使用されるようになった。本研究では、近年分離された臨床分離株にて黄色ブドウ球菌臨床分離

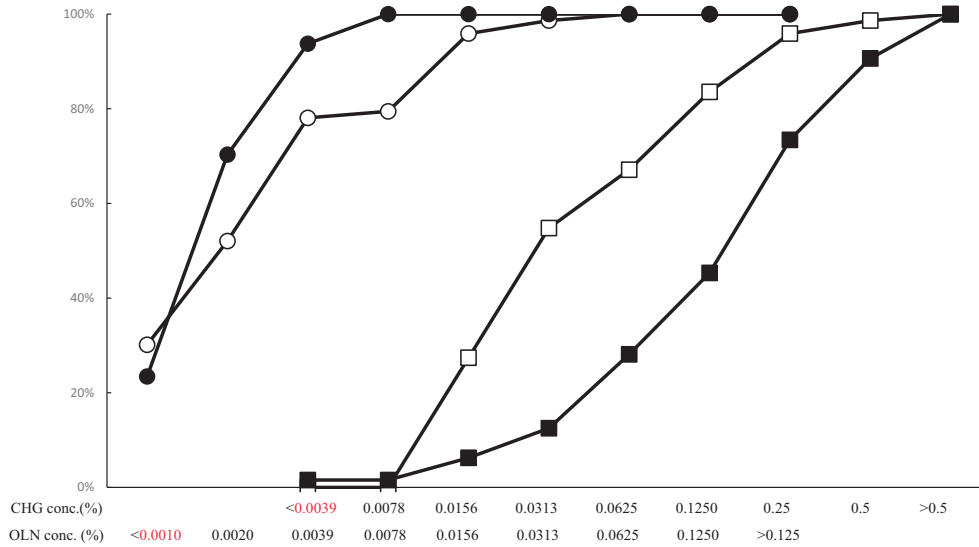
株に対する CHG と OLN の消毒効果と、*qac A/B* 遺伝子の保有状況ならびに当該遺伝子保有株の CHG, OLN の消毒効果を検討した。

2015~2016 年に、東京慈恵会医科大学附属病院にて血液培養または創部培養から検出された黄色ブドウ球菌 137 株と標準株 *S.aureus* JCM 2413 を研究に供した。黄色ブドウ球菌株の内訳は MRSA 73 株 (創培養分離株 43 株, 血液培養分離株 30 株), MSSA 64 株 (創培養分離株 34 株, 血液培養分離株 30 株) である。

使用消毒薬は CHG として 20% クロロヘキシジングルコン酸溶液[®] (和光純薬工業), OLN としてオラネジン消毒液 1.5%[®] (大塚製薬) を使用した。培地はミューラーヒントン液体培地 (Becton, Deckenson and Company), SCDLP 培地「ダイゴ」[®] (和光純薬工業) を使用した。

消毒薬の細菌学的効果の測定法については、日本化学療法学会標準法に定める微量液体希釈法に、一定時間での消毒効果を検討するために辻や Nogichi らの報告している消毒薬の不活化成分 (レシチン, ポリソルベート 80) を含んだ液体培地での検査法を組み合わせ検討を行った^{3,4)}。まず黄色ブドウ球菌をミューラーヒントン液体培

¹⁾東京慈恵医科大学附属病院感染対策室, ²⁾東京慈恵医科大学感染制御科



The open cube (□) represents MKC of CHG against MRSA isolates, the closed cube (■) CHG on MSSA, the open circle (○) OLN on MRSA and closed circle (●) OLN on MSSA.
 MKC : Minimum killing concentration CHG : Chlorhexidine gluconate OLN : Olanexidine gluconate

Figure 1. Cumulative MKCs of CHG and OLN against MRSA and MSSA isolates.

地で24時間培養し、生理食塩水に懸濁して約 10^7 CFU/mLの菌を調整した。96穴のマイクロプレート上に蒸留水にてCHG 1.0000%~0.0078%, OLN 0.2500%~0.0020%に8段階の濃度希釈系列(50 μ L/ウェル)を作成した。各ウェルに菌液50 μ Lを添加し、室温中に3分放置した。別途、96穴のマイクロプレートに消毒薬不活化成分を含んだSCDLP液体培地(100 μ L/ウェル)を作成し、消毒薬と混合した菌液を手動式イノキュレーター(長瀬産業)にて約5 μ L接種した。36 $^{\circ}$ C 18~24時間培養後菌の発育を判定し、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最小殺菌濃度(Minimum killing concentration : MKC)と定義した⁴⁾。この方法で測定した標準株 *S. aureus* JCM 2413のMKCはCHGで0.2500%, OLNで0.0020%であった。

また薬剤感受性検査に供した臨床分離株の *qac A/B* 遺伝子の保有状況についてはPCR法にて確認した。黄色ブドウ球菌をミューラーヒントン液体培地にて36 $^{\circ}$ C 18~24時間培養後、95 $^{\circ}$ Cで5分間保温した後、その上清1 μ LをPCRに供した。プライマーはHoらを用いた⁵⁾。95 $^{\circ}$ C1分間、55 $^{\circ}$ C1分間、72 $^{\circ}$ C1分間で30サイクル増幅し、電気泳動し、特異的DNAの増幅産物の有無をエチジウムブロマイド染色し、確認した。

供試した黄色ブドウ球菌株の50%を殺菌するCHG濃度(MKC₅₀)は0.1250%, 90%の株を殺菌する濃度(MKC₉₀)は0.5000%であった。OLNのMKC₅₀は0.0020%, MKC₉₀は0.0156%であった。MRSA, MSSA株共にCHGに比べOLNは低いMKCであったが、MRSAとMSSA

にMKCの差は認めなかった(Fig. 1)。CHGはMRSAとMSSAの消毒効果は変わらないという報告があるが⁶⁾、OLNにおいても同様の結果であった。

日本においては0.5%~1%濃度の成分のCHGが臨床現場で使用されている。本研究の結果で臨床効果との相関性を議論することは難しいが、近年分離された創部感染、菌血症の原因であった黄色ブドウ球菌株に対しては、CHGは一部の株をのぞき臨床適応濃度以下のMKCを示し、OLNについてはすべての株が臨床適応濃度以下のMKCを示した。

供試した137株のうち *qac A/B* 遺伝子を保有する株は18株(13.7%)であった。*qac A/B* 遺伝子保有株は、MRSAにおいて13株(17.8%)であったが、MSSAでは5株(7.8%)であり、MRSAにおいて保有率は高い傾向にあった($p=0.084$, χ^2 検定)。日本ではMRSAにおいて *qac A/B* 遺伝子の保有率は高い²⁾。HoらはMSSAに比べてMRSAが *qac A* 遺伝子を多く保有していたことを報告している⁵⁾。今後も臨床分離株の *qac A/B* をはじめとする様々な耐性遺伝子の保有率の監視が必要であると考えられた。

qac A/B 保有株のCHGおよびOLNに対するMKC₅₀およびMKC₉₀は非保有株のそれと比べて大差なかった(Table 1)。*qac A/B* 遺伝子の保有によってCHGおよびOLNのMKCが高くなる傾向は認めず、薬剤排出ポンプ機構が存在したとしてもその細菌学的なインパクトは大きくないと考えられた。

今回使用した黄色ブドウ球菌株は創部感染や菌血症由

Table 1. Minimum killing concentrations of chlorhexidine gluconate and olanexidine gluconate against *S. aureus* isolates.

	n	CHG		OLN	
		MKC ₅₀	MKC ₉₀	MKC ₅₀	MKC ₉₀
<i>S. aureus</i> total	137	0.1250	0.5000	0.0020	0.0156
MRSA total	73	0.0313	0.2500	0.0039	0.0156
<i>qacA/B</i> positive	13	0.0313	0.2500	0.0039	0.0039
<i>qacA/B</i> negative	60	0.0313	0.2500	0.0020	0.0156
MSSA total	64	0.2500	0.5000	0.0020	0.0039
<i>qacA/B</i> positive	5	0.2500	0.2500	0.0020	0.0031
<i>qacA/B</i> negative	59	0.2500	1.0000	0.0020	0.0039

MKC: Minimum killing concentration
 CHG: Chlorhexidine gluconate
 OLN: Olanexidine gluconate

来であり、比較的病原性が高いと考えられる。それらの株に対して OLN は CHG に比し高い消毒効果を示し、有効性が期待できる。Inoue らの報告でも OLN は MRSA において 1~3 分の接触時間で CHG に比べ高い消毒効果を認めている⁷⁾。Hagi らは CHG とは違う作用メカニズムの存在を示唆している⁸⁾。OLN は現在アルコール無添加製剤として実臨床に供されているが、アルコールアレルギーや手術室での引火事故の防止につながる消毒薬としても期待される。今後、多施設で分離された菌株を使用した更なる研究が必要である。

本研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認 (28-150 8393) を得て実施した。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

1) 笹津備規：黄色ブドウ球菌の消毒剤耐性。日本細菌学雑誌 1996; 51: 755-65.
 2) Noguchi N, Suwa J, Narui K, Sasatsu M, Ito T, Hiramatsu K, *et al.*: Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia

during 1998 and 1999. *J Med Microbiol* 2005; 54: 557-65.
 3) 成井浩二, 野口雅久, 笹津備規：中和剤を用いた改良最小発育阻止濃度測定法による消毒薬耐性黄色ブドウ球菌の消毒薬感受性の評価。医療薬学 2003; 29: 279-86.
 4) 辻 明良：感染制御のための消毒の基礎知識, ヴァンメディカル, 東京, 2009. p. 81-5.
 5) Ho CM, Li CY, Ho MW, Lin CY, Liu SH, Lu JJ: High rate of *qacA*- and *qacB*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from chlorhexidine-impregnated catheter-related bloodstream infections. *AntiMicrob Agents Chemother* 2012; 56: 5693-7.
 6) 国定孝夫, 山田恵子, 織田志保美, 原 修：MRSA に対する各種消毒剤の殺菌効果。環境感染 1999; 14: 142-7.
 7) Inoue Y, Hagi A, Nii T, Tsubotani Y, Nakata H, Iwata K: Novel antiseptic compound OPB-2045G shows potent bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus* both in vitro and in vivo: a pilot study in animals. *J Med Microbiol* 2015; 64: 32-6.
 8) Hagi A, Iwata K, Nii T, Nakata H, Tsubotani Y, Inoue Y: Bactericidal Effects and Mechanism of Action of Olanexidine Gluconate, a New Antiseptic. *AntiMicrob Agents Chemother* 2015; 59: 4551-9.

〔連絡先：〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8
 東京慈恵医科大学附属病院感染対策室 中澤 靖
 E-mail: ynakazawa@jikei.ac.jp〕

The Minimum Killing Concentrations of Chlorhexidine Gluconate and Olanexidine Gluconate on Clinically Isolated *S.aureus* Strains

Yasushi NAKAZAWA^{1,2)}, Taku TAMURA¹⁾ and Seiji HORI²⁾

¹⁾*Department of Infection Control, Jikei University Hospital,*

²⁾*Department of Infectious Disease and Infection Control, Jikei University School of Medicine*

Abstract

We investigated the minimum killing concentrations of chlorhexidine gluconate (CHG) and olanexidine gluconate (OLN) on clinically isolated *Staphylococcus aureus* strains. The concentration of CHG that inhibited growth of 50% of *S. aureus* strains (MKC₅₀) was 0.1250%; the concentration that inhibited growth of 90% strain (MKC₉₀) was 0.5000%. For OLN, MKC₅₀ was 0.0020% and MKC₉₀ was 0.0156%. Of the 137 strains, 18 strains (13.7%) had the *qacA/B* gene, the increase in MKC by holdings *qacA/B* was not observed. OLN showed bactericidal effect at low concentration compared with CHG.

Key words: chlorhexidine, olanexidine, MRSA, MSSA