

## 空中由来 *Bacillus* 属芽胞の消毒薬耐性に関する研究

渡 邊 貢 次

Koji WATANABE

(養護教育教室)

The resistance of spores of *Bacillus* strains isolated from indoor air to disinfectants

Koji WATANABE

(Department of Health Education)

### ABSTRACT

The resistance of spores of *Bacillus* strains isolated from indoor air to two disinfectants (hibitane solution; chlorhexidine and osvan solution; benzalkonium chloride) was investigated in this report.

The results were summarized as follows.

- (1) In the short time mixture in each disinfectant (for 1-3 hours), most of spores showed resistant.
- (2) In the mixture for 24 hours, spores showed resistant to hibatane solution less than a concentration of 200  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  and showed resistant to osvan solution less than a concentration of 400  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ .
- (3) The ability of resistance of tested *Bacillus* strains to hibatane solution and to osvan solution was recognized a tendency of mutual relation.

### I 緒 言

*Bacillus* 属は、土壤中、空中などの自然界に広く分布している好気性の有芽胞桿菌である。嫌気性細菌である *Clostridium* 属とともに、その生活過程において特異的な芽胞 spore (内生孢子 endospore) を形成する。この芽胞は、薬剤などの化学的因子、放射線や熱などの物理的因子に対して強い抵抗性を示すことが知られている。<sup>1), 2)</sup>

本属の中には、*B. anthracis* (炭疽菌) のように古くから病原性細菌として知られているものもあるが、近年、腐敗、食中毒、日和見感染の原因菌として *B. cereus* が注目されている。<sup>3), 4)</sup> 特に食品衛生上の意義から、本菌の芽胞の細菌学的検討や熱抵抗性に関する研究が広

く行われている。<sup>5)-7)</sup>しかし、芽胞と液剤消毒薬とりわけ環境保健の立場から要求される手指消毒薬との関係についての報告は見られない。

さて、筆者は前報告で、生活環境より分離した<sup>8)</sup>*Staphylococcus* 属、*Bacillus* 属、coliform organisms、*Pseudomonas* 属について、常用消毒薬4種に対する感受性試験を行った。そしてこの中で、グラム陽性菌に比べて、グラム陰性菌に対する消毒薬の殺菌力の弱さを指摘した。ただし、この試験での*Bacillus* 属については、薬剤に対する感受性の高い増殖期の栄養型細胞を対象としたものであり、芽胞が形成された段階のものを対象として検討したのではない。同一株でも栄養型と芽胞とでは消毒薬に対しての感受性あるいは耐性が当然異なることが考えられる。

そこで前報にひき続き、分離菌株に対する消毒薬の殺菌効果を探る上で、今回は、空中より分離した*Bacillus* 属芽胞の消毒薬に対する耐性について検討を進め、短報をまとめた。

## II 材料と方法

### 1. 芽胞の消毒薬耐性試験

**Bacillus 属の分離：***Bacillus* 属は、空中落下法により普通寒天上に捕集した。好氣的に発育した定型的コロニーのうち、グラム染色陽性かつ有芽胞桿菌を確認した。さらに、10%卵黄加NGKG培地（ニッスイ製）上で、卵黄反応（レシチナーゼテスト）陽性を示したRough型株の8株を選択分離し、供試菌株とした。

さらに分離株については、運動性（半流動寒天培地）、カタラーゼ試験、グルコース分解性、乳糖分解性、でんぷん分解性、フォーゲス・プロスカウエル反応、硝酸塩還元性、クエン酸塩利用性（クリステンゼン培地、栄研製）の諸生物学的性状を調べた。

**芽胞浮遊液の調製：**分離保存していた各菌株をシェーファー培地で増殖させそのまま芽胞を形成させた。培地組成は、ニュートリエントブロス（DIFCO）8g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25g、KCl 1g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.278mg、 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  236mg、 $MnCl \cdot 4H_2O$  1.98mg、寒天15g、 $H_2O$  1000ml、pH 7.2である。

まず、本培地に37°C、8～10日間斜面培養した後、99%以上芽胞が形成されていることを鏡検により確認した。コロニーの一部をニクロム線ループでかきとり、約2mlの滅菌蒸留水に浮遊させ、充分に攪拌した。さらにその一部（約1ml）を、約3mlの滅菌蒸留水に再度浮遊させた。最後にこの浮遊液を光電比色計でoptical density（OD）が0.3となるように滅菌蒸留水で調製した。

これにより、それぞれ約 $2 \times 10^7$ 個/mlの芽胞浮遊液が得られたことになる。調整直後のものを供試芽胞液とした。

**消毒薬液の調整：**常用されかつ殺菌効果に関する諸報告でも検討対象となることが多い市販の消毒薬2種を選択した。

- ・ヒビテン液 *hibitane sol.*（有効主成分 クロルヘキシジン 5 w/v %液）
- ・オスバン液 *osvan sol.*（有効主成分 塩化ベンザルコニウム 10 w/v %液）

芽胞の耐性試験のための消毒薬の使用濃度は、ヒビテン液、オスバン液ともに主成分濃度として1600 $\mu$ g/ml以下100 $\mu$ g/mlまでの連続2倍希釈である。希釈はすべて滅菌蒸留水（v/v）による。

**消毒薬耐性試験：**ミニ試験管に上記濃度系列の消毒薬液0.9mlに芽胞浮遊液0.1mlを

分注し、よく混合し、これを 37°C に維持した。

1, 3, 6, 10, 24 時間後に混合液の一部を接種器（マイクロプランター MIT-P, 佐久間工業製）でとり、感性ディスク培地（ニッスイ製）に接種した。これを 37°C, 24 時間培養し、コロニー発生の有無を調べ、芽胞の消毒薬に対する耐性を判定した。

## 2. 最小発育阻止濃度（MIC）測定法

被検菌の栄養型のときの、ヒビテン液、オスバン液に対する感受性試験を行った。試験方法は、日本化学療法学会の最小発育阻止濃度（MIC）測定法に拠り、常法通り行った。

消毒薬液の最終濃度は 100 µg/ml 以下 0.025 µg/ml までの連続 2 倍希釈であり、すべて滅菌蒸留水で希釈した。増菌用には感受性測定用ブイヨン（ニッスイ製）を用い、継代培養させた後、芽胞形成されていないことを鏡検で確認した新鮮菌液を規定濃度に調製して供した。試験用寒天培地は感性ディスク培地（ニッスイ製）を用い、本培地上への被検菌液の接種は上述の接種器を用いた。

## III 結果

### 1. 分離 *Bacillus* 属株の生物学的性状

空中より分離した *Bacillus* 属 8 株について生物学的性状を調べた。その結果は Table 1 に示すとおりである。

硝酸塩還元性、クエン酸塩利用性試験において、陰性を示すものが 1 株ずつ認められた。しかし、他の試験項目においては、すべて陽性または陰性の同一性状を示した。

Table 1. Biological characteristics of *Bacillus* strains isolated from indoor air

	Positive	Negative
Egg yolk reaction (NGKG agar)	8*	0
Motility	8	0
Catalase	8	0
Acid from dextrose	8	0
lactose	0	8
Hydrolysis of starch	8	0
Voges-Proskauer	8	0
Nitrate reduction	7	1
Citrate (CHRISTENSEN's)	7	1

\* No. of strains

今回の試験項目は、必ずしも多岐とはいえないが、卵黄加 NGKG 培地上での特徴的な発育や卵黄反応陽性をはじめとしてその他の生物学的性状結果から判断すると、分離菌株はほぼ *B. cereus* と認められる。<sup>3), 4), 10) - 12)</sup> しかしながら、最終的な同定にはより完全な試験が必要なので、本稿では *Bacillus* 属株として記述することとする。

### 2. 芽胞の消毒薬耐性試験

Table 2 は、芽胞をヒビテン液あるいはオスバン液の各濃度液に接触させ、その一部を経時的に取り出し、芽胞が発育したすなわち耐性を示した株数を表わしたものである。

まず、ヒビテン液の場合についてみると、接触1時間ではほとんどの芽胞が発育した。全芽胞の死滅が認められたのは、400および800 $\mu\text{g/ml}$ では6時間後、1600 $\mu\text{g/ml}$ では3時間後であった。100および200 $\mu\text{g/ml}$ では、24時間後においても半数以上の芽胞が耐性を示した。

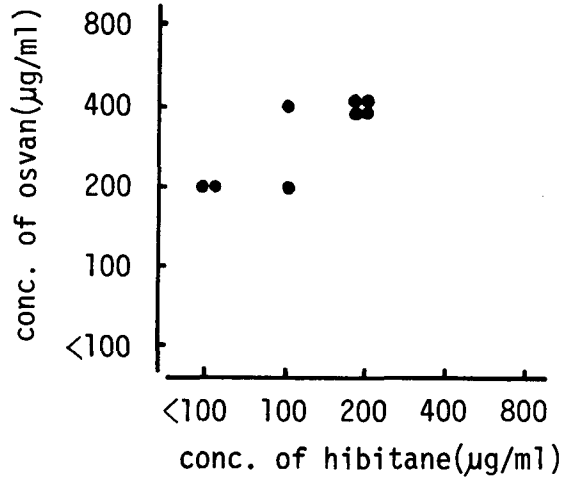
一方、オスバン液の場合は、1時間の接触では1600 $\mu\text{g/ml}$ を除いてほとんどの芽胞が耐性を示した。全芽胞の死滅が認められたのは、800 $\mu\text{g/ml}$ では6時間後、1600 $\mu\text{g/ml}$ では1時間後であった。また、24時間後においては、100および200 $\mu\text{g/ml}$ では全芽胞、400 $\mu\text{g/ml}$ では8株中5株が発育し、耐性を示した。

**Table 2.** Resistance of spores of *Bacillus* to disinfectants

Mixed time (hr)	Conc. of hibitane ( $\mu\text{g/ml}$ )					Conc. of osvan ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	100	200	400	800	1600	100	200	400	800	1600
1	8*	7	7	4	4	8	8	7	4	0
3	8	7	7	2	0	8	8	7	3	0
6	8	4	0	0	0	8	8	7	0	0
10	8	4	0	0	0	8	8	7	0	0
24	6	4	0	0	0	8	8	5	0	0

\* No. of strains

さて、Fig. 1はヒビテン液およびオスバン液に24時間接触した後の被検芽胞の最大耐性濃度（最大発育許容濃度 MAC）の関係を図示したものである。対象数が8芽胞と少ないため即断はできないが、ヒビテン液に強い耐性を示したものは、オスバン液に対しても強い性質を有している傾向が認められる。



**Fig. 1** Relation between maximum growth allowance concentration (MAC) of hibitane and osvan to spores of *Bacillus*

### 3. 最小発育阻止濃度測定

被検 *Bacillus* 属の栄養型細胞に対するヒビテン液およびオスバン液の最小発育阻止濃度を Table 3 に示す。最小発育阻止濃度は 1.56 ~ 6.25  $\mu\text{g/ml}$  に分布し、これは前回の<sup>8)</sup>空中由来 *Bacillus* 属 16 株の測定結果の分布幅の範囲内であった。栄養型細胞時において消毒薬に対して耐性を示す株は認められなかった。

Table 3. Sensitivity of vegetative cells of *Bacillus* to disinfectants

	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	0.05	---	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	---	100
Hibitane	0*	---	0	0	6	2	0	---	0
Osvan	0	---	0	2	1	5	0	---	0

\* No. of strains

### 4. 消毒薬に対する芽胞と栄養型細胞の関連性

Fig. 2 は芽胞のときの 24 時間後における最大発育許容濃度と、栄養型細胞のときの最小発育阻止濃度を消毒薬別に図示したものである。今回は対象数が少ないこともあり、両者の関連性は明確にできなかった。

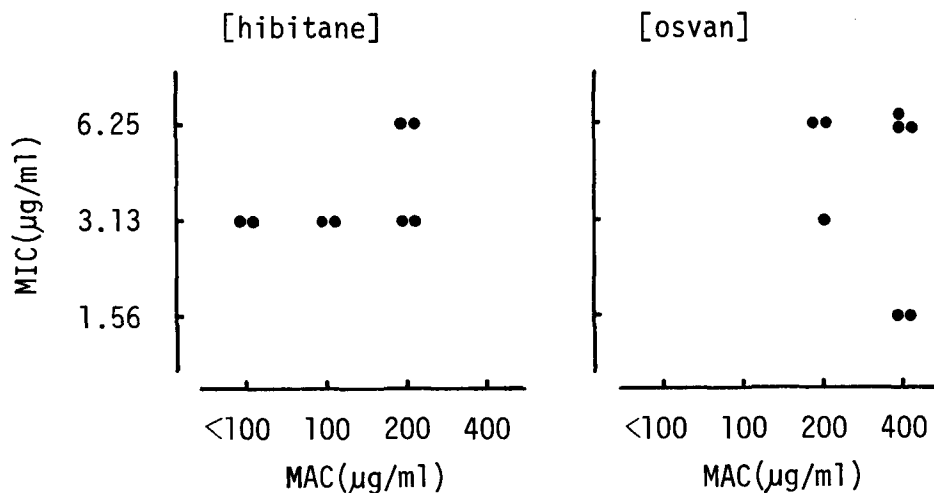
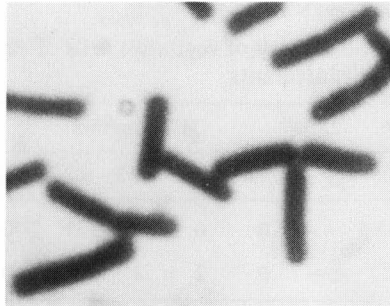


Fig. 2 Relation between MAC to spores and MIC to vegetative cells of *Bacillus*

## IV 考察

*Bacillus* 属は、いわゆる調和のとれた環境下では、栄養型細胞 (vegetative cell) となって盛んに増殖を繰り返す。この期の細胞は外的因子に対して感受性が高く、殺滅しやすい

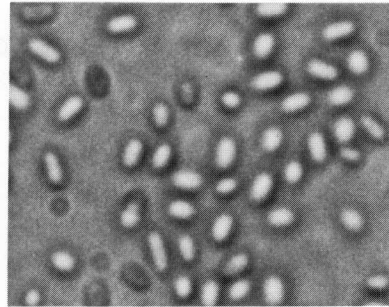
い。一方、環境条件の悪化とともに、芽胞形成細胞へと変化し、外的因子に対して抵抗性を持つようになる。最終的には極めて抵抗性のある芽胞 (spore) となる。また、休眠体 (dormant cell) となって長期的に生存することが可能となる (photo 1(a)–(c))。



(a) Vegetative cell



(b) Spore forming cell



(c) Spore

Photo 1. Life cycle of *Bacillus*

本研究は、空中より *Bacillus* 属 8 株 (生物学的性状試験から、ほぼ *B. cereus* と考えられる) を分離し、その芽胞が消毒薬に対してどの程度耐性を示すか検討を進めたものである。方法は、主成分としてクロルヘキシジン 100 ~ 1600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有するヒビテン液および主成分として塩化ベンザルコニウムを同濃度含有するオスバン液に被検芽胞を混合し、経時的に耐性の有無を確認したものである。

ところで、両液とも 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  は *Bacillus* 属の栄養型細胞にとっては致死濃度であり、一般には、0.78 ~ 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で充分殺菌作用を示す。今回の感受性試験でもこのことが確かめられている。

芽胞の耐性について全体的にみると、今回供したヒビテン液、オスバン液ともに芽胞に対しては有効性が少ないことが確認された。試験濃度や消毒薬との接触時間によっては全く無効という状況もみられる。通常、手指消毒における 5% ヒビテン液の使用濃度は、200 倍希釈すなわち主成分として 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液であり、また、10% オスバン液の使用濃

度は、100～200倍希釈すなわち主成分として500～1000 $\mu\text{g/ml}$ 溶液である。手指汚染菌について考えると、芽胞だけが単独に存在するというのではなく、多くの細菌種とともに手指に付着すると考えられる。従って、本来は手指消毒の時点で一般細菌、病原菌の除去殺滅はもとより、芽胞に対しても同様効果が発揮されなければならない。しかし、短時間に薬効力が要求される手指消毒ということを考えあわせれば、今回の結果を見る限り、上記消毒薬は芽胞に対してほとんど効果なしと判断してよいだろう。当然ながら、消毒薬の高濃度使用、長時間使用は、生体に対する毒性の点からも問題が残る。現実的には、対応策はなかなか見つからない。

ところで、竹内<sup>13)</sup>らは貸おしぼりに付着する *B. cereus* 芽胞について検討した。その結果、水洗濯、湯洗濯、重複(湯)洗濯した貸おしぼりに塩素剤を作用させたところ、芽胞も含めて *B. cereus* を完全に殺菌することはできなかったが、この方法順に効果は上昇したと述べている。このことは、手指消毒処理にも適用されるものと考えられる。すなわち、温湯を使って機械的にできるだけ芽胞を手指から分離すること。そして薬剤の殺菌能力を効率よく発揮させることである。こうなると、あらためて芽胞に有効な消毒薬の開発、あるいは、消毒処理方法の改良の必要性が痛感されるところである。

今回の消毒薬液に対する芽胞の耐性状況を見ると、ヒビテン液に対して高濃度耐性のものは、オスバン液に対しても高濃度耐性である傾向が認められた。化学的に全く異なる主成分をもつ消毒薬ではあるが、両液に対する耐性については、芽胞は共通性を発揮するとも考えられる。

ただし、芽胞での耐性濃度と栄養型細胞での最小発育阻止濃度との間には、ヒビテン液、オスバン液ともにその関連性が確認できなかった。これについては被検 *Bacillus* 属株をふやし、検討を進めればより明確になると思われる。

現在、芽胞の性状については、耐性としての化学的物理的な特異性だけでなく、芽胞と毒性<sup>3), 4), 14)</sup>の関係、芽胞の発芽機構<sup>15)</sup>の解明など多方面からの研究が進められている。

芽胞は乾燥、熱、薬剤その他多くの悪条件に耐えるとともに、伝播能力、伝染能力も高い。従って、効果のすぐれた消毒薬の開発とともに、芽胞自体の解析も必要である。今後とも研究を進めたい。

## V 結 論

空中より *Bacillus* 属芽胞を分離し、消毒薬(ヒビテン液およびオスバン液)に対する耐性試験を行った。その結果、次のようにまとめられる。

- (1) 消毒薬との短時間(1～3時間)の接触においては、ほとんどの芽胞は耐性を示した。
- (2) 24時間の接触後においては、ヒビテン液の場合は200 $\mu\text{g/ml}$ 以下、オスバン液の場合は400 $\mu\text{g/ml}$ 以下で、芽胞の半数以上が耐性を示した。
- (3) ヒビテン液、オスバン液に対する各々の耐性濃度の間には、関連性がある傾向が認められた。

(昭和60年9月14日受理)

VI 文 献

- 1) R.Y. スタニエ (高橋甫, 他訳): 微生物学 (下), 268 - 298, 培風館 (東京), 1978
- 2) 綿貫喆, 他: 滅菌法・消毒法 第2集, 4 - 9, 1979, 第4集, 8 - 34, 1981, 文光堂 (東京)
- 3) 藤原喜久夫: セレウス菌に関する研究の現状と今後の課題, 食品衛生研究, 30 (2), 113 - 124, 1980
- 4) 品川邦汎: *Bacillus cereus*, 臨床と微生物, 12 (3), 284 - 290, 1985
- 5) 安川章, 他: 大阪市内発生した *Bacillus cereus* によると推定される嘔吐型食中毒例について, 食衛誌, 20 (3), 186 - 191, 1979
- 6) 品川邦汎, 他: 食中毒事例から分離した *Bacillus cereus* と生米および米飯類から分離した *Bacillus* の生化学性状, 芽胞の熱抵抗性について, 食衛誌, 20 (3), 431 - 436, 1979
- 7) 伊藤武, 他: 1975年~1981年の7年間に東京都内で発生した *Bacillus cereus* による食中毒15事例の疫学的・細菌学的検討, 東京衛研年報, 33, 9 - 18, 1982
- 8) 渡邊貢次: 分離菌株に対する各種消毒薬の殺菌効果, 愛知教育大学研究報告第34輯, 105 - 113, 1985
- 9) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法, *Chemotherapy*, 29 (1), 76 - 79, 1981
- 10) 柘久保邦夫: 芽胞の発芽栄養要求の相違を基準にした *B. cereus* 属の分類に関する一試案, 名市大医誌, 18, 296 - 311, 1967
- 11) 日本公衆衛生協会編: 微生物検査必携細菌・真菌検査 第2版, 287 - 293, 1978
- 12) 倉田浩, 他訳: FDA・食品微生物試験マニュアル, 171 - 176, 1979
- 13) 竹内潮, 他: 貸おしぼりの衛生学的検討, 日本公衛誌, 32 (6), 275 - 286, 1985
- 14) 植村興, 他: ウエルシュ菌とセレウス菌のエンテロトキシン, 日細菌誌, 36 (5), 791 - 801, 1984
- 15) 蜂須賀養悦: 枯草菌芽胞の発芽に関する研究, 日細菌誌, 32 (5), 655 - 669, 1977