

アルコール処理 Bacillus 属芽胞の消毒薬耐性に関する研究

渡 邊 貢 次

(養護教育教室)

The resistance of spores of Bacillus strains pre-treated
with ethylalcohol to disinfectants

Koji WATANABE

(Department of Health Education)

Abstract

This report was studied on influences of resistance of spores of Bacillus strains, when spores were treated with ethylalcohol for 15 minutes prior to treatment with a disinfectant (hibitane solution or osvan solution).

In osvan solution, spores pre-treated with ethylalcohol presented a slight decrease of resistance at the concentration of 200~800 μg /ml compared with spores non-treated. In hibatane solution, spores pre-treated also presented a slight decrease of resistance at the concentration of 400 μg /ml. But a spore-cidal rate was a little high compared with the case of osvan solution.

Totally, this procedure was not given enough effects.

I 緒 言

Bacillus 属芽胞は化学的因子, 物理的因子に強い抵抗性を示す。前回¹⁾は消毒薬(ヒビテン液およびオスバン液)に対する芽胞の耐性について報告した。今回はさらに, 芽胞をいったんエチルアルコール処理することよりその消毒薬耐性がどの程度影響をうけるか検討した。

II 材 料 と 方 法

1. 被検菌株の分離

Bacillus 属は家庭用冷蔵庫 6 台(庫内, 扉内など 1 台につき 7 箇所, 合計 42 箇所を設定)より採集分離した。すなわち, 普通寒天上に発育した定型的な rough 型コロニーのうち, グラム染色陽性かつ有芽胞細菌であることが確認された中から, 採集 1 箇所につき 2 株を

限度として釣菌し、*B.cereus* 選択培地である10%卵黄加 NGKG 培地（ニッスイ製）上で特徴的な発育を示し、卵黄反応陽性を示した39株を選択分離し、被検菌株とした。

さらにこれらの菌株については、運動性（半流動寒天培地）、でんぷん分解性、グルコース分解性、乳糖分解性、カタラーゼ産生性、硝酸塩還元性、Voges-Proskauer 反応、クエン酸利用性（Christensen 培地）の諸性状を調べた。

2. 使用消毒薬

前回同様常用される消毒薬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10W/V %液）

3. 最小発育阻止濃度（MIC）測定

被検菌株の栄養型のときの、ヒビデン液およびオスバン液での感受性試験を、日本化学療法学会の最小発育阻止濃度（MIC）測定法²⁾に拠り、各消毒薬の主成分濃度として100 μ g/ml以下0.025 μ g/mlまでの連続2倍希釈で、常法通り行った。本文では主成分濃度として記述する。

4. 芽胞浮遊液の調製

エチルアルコール非処理芽胞液の調製：分離保存していた菌株を *Schaeffer* 培地（組成は前報¹⁾参照）で37℃、8～10日間斜面培養し、そのまま芽胞を形成させた。各株とも99%以上芽胞が形成されていることを鏡検により確認し、コロニー（芽胞塊）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、芽胞がそれぞれ単離するように充分攪拌した。

次いで、この浮遊液に滅菌蒸留水を加え、光電比色計で optical density (OD, 600m μ) が0.3となるように調製した。これにより、各々 1.6×10^7 個/mlの芽胞浮遊液が得られたことになる。調製直後のものをエチルアルコール非処理芽胞液とした。

エチルアルコール処理芽胞浮遊液の調製：上記同様 *Schaeffer* 培地で増殖したコロニーの一部を0.5mlの滅菌蒸留水に浮遊させ、充分攪拌した。次いで、この液に99.5%エチルアルコール1.2ml加え（エチルアルコール最終濃度70%となる）、よく混和した。

15分間温室維持後、5mlの滅菌蒸留水を加え、エチルアルコールの影響を減弱させ、直ちに4℃、3500rpm、10分間冷却遠心した。

遠心分離後、上清液をすて、芽胞沈渣に滅菌蒸留水を加え、ODが0.3となるように調製した。調製直後のものをエチルアルコール処理芽胞液とした。

5. 消毒薬耐性試験

芽胞の耐性試験のための消毒薬液の使用濃度は、ヒビテン液、オズバン液ともに主成分濃度として1600 μ g/ml以下100 μ g/mlまでの連続2倍希釈（v/v）である。本文では主成分濃度として記述する。

ミニ試験管に上記濃度系列の消毒薬液0.9mlにエチルアルコール処理または非処理の芽胞浮遊液0.1mlを分注し、よく混和し、これを37℃に維持した。

1 および4時間後に芽胞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、感性ディスク培地上に接種した。これを37℃、24時間培養し、コロニー形成の有無を確認し、芽胞の消毒薬に対する耐性を判定した。

III 結 果

1. 分離 *Bacillus* 属株の諸性状

分離した *Bacillus* 属39株の諸性状の結果を Table 1 に示す。でんぷん分離性は陽性25株 (64%), 陰性14株 (36%) と大きく分れた。グルコース分解性, カタラーゼ産生性, 硝酸塩還元性の各試験はすべて陽性を示した。運動性, V P 反応, クエン酸利用性に陰性を示すもの, 乳糖分解性に陽性を示すものがそれぞれ 1 ~ 2 株認められた。卵黄加 MGKG 選択培地上での発育, 卵黄反応陽性などから *B. cereus* の可能性が高い³⁾⁻⁵⁾が, 同定には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。

Table 1 Biological characteristics of 39 *Bacillus* strains

test	positive	negative
motility	37*	2
hydrolysis of starch	25	14
acid from glucose	39	0
lactose	2	37
catalase	39	0
nitrate reduction	39	0
Voges-Proskauer	38	1
citrate	38	1

* No. of strains

2. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

被検菌株の栄養型細胞に対するヒビテン液およびオスバン液の MIC 分布を Table 2 に示す。両液ともに1.56~3.13 μ g/mlに分布の集中がみられた。筆者のこれまでの報告^{1),6)}と比較すると最大頻度は1 濃度段階程度の差はあるが, 分布範囲には大きな変化はない。しかし今回, 栄養型細胞時において MIC 25 μ g/ml以上でも耐性を示すものが, ヒビテン液では2株, オスバン液では3株認められた。

Table 2 Sensitivity of vegetative cells of 39 *Bacillus* strains to disinfectants

disinfectants	MIC (μ g/ml)												
	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<
hibitane. sol.	0*	0	0	0	0	27	10	0	0	0	0	1	1
osvan sol.	0	0	0	0	0	7	22	5	2	1	0	1	1

* No. of strains

3. 芽胞の消毒薬耐性試験

Table 3 はエチルアルコール15分処理芽胞および非処理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, 1 時間後, 4 時間後に取り出し, 芽胞が発育したすなわち耐性を示した株数を表したものである。

処理芽胞・非処理芽胞のいずれに対しても, ヒビテン液は200 μ g/mlから, オスバン液は400 μ g/mlから殺滅効果がしだいに大きく現われた。

処理・非処理による効果の死滅効果の差を検討すると, オスバン液では200~800 μ g/mlで1~2株とわずかの違いがみられるものの, 耐性を示した数 (生残率) からみると有効な

差とはいえない。一方、ヒビテン液では両処理の差は200～1600 μ g/mlで1～6株であるが、特に400 μ g/mlでは耐性を示した数（生残率）からみると、エチルアルコール処理した芽胞は死滅率が高くなる傾向があるといえる。

Table 3 The resistance of spores of 39 *Bacillus* strains to disinfectants

mixing time(hr)	conc. of hibitane sol. (μ g/ml)					conc. of osvan sol. (μ g/ml)				
	100	200	400	800	1600	100	200	400	800	1600
1	37/37*	33/31	20/14	4/ 2	1/ 0	37/37	36/35	23/22	2/ 2	0/0
4	37/37	26/26	7/3	1/ 1	0/ 0	36/36	36/35	17/15	1/ 0	0/0

*No. of strains. roman ; non-treated with ethylalcohol

italic ; pre-treated with ethylalcohol for 15 min.

4. 栄養型耐性菌株と芽胞耐性の関連性

2. で述べた栄養型時の耐性菌株（ヒビテン液1株、オスバン液2株）の芽胞時での抵抗性をみたが、ヒビテン液、オスバン液いずれも400 μ g/ml～800 μ g/mlで死滅しており、特に強い耐性は示さなかった。

IV 考 察

芽胞の外層は外側にたんぱく質を成分とする孢子殻 spore coat と内側にペプチドグルカン成分とする皮層 cortex とからなっている。なかには、さらに最外層に外皮 exosporium を形成するものもある。構造は栄養型時の細胞壁 cell wall とは全く異なるものである。孢子殻たんぱく質は疎水アミノ酸を非常に多く含んでおり、このことは外的因子からの防御に役立っている。

エチルアルコール、ヒビテン液、オスバン液の薬効には、細胞膜損傷、細菌たんぱく質の変性・凝固・酵素代謝系の損害、脱脂他があり、これらが複合的に作用して栄養型細菌に対しては殺菌剤として有効に働く。しかし、芽胞に対しては薬剤成分の吸着、浸透性は孢子殻で阻止され、低濃度の薬剤ではその効力を生かすことができない。

さて、エチルアルコールは芽胞の殺滅に対してほとんど効力がない。しかし、芽胞をエチルアルコール処理することにより、外層に何らかの影響—例えば、軽度の細胞膜損傷—を与えているならば、続いて用いる薬剤によっては、殺滅効果を高めることが期待できる。今回のエチルアルコール処理と非処理の結果を比較すると、程度こそ大きくないものの影響がみられた。さらに、第2液をヒビテン液とした場合とオスバン液とした場合では若干の差がみられ、前者の方が殺滅効果が高かった。両液の芽胞外層に対する薬効特性の差にもよるところがあるものと考えられる。全体的にみると、数値的にはエチルアルコール処理によりわずかではあるが殺滅効果が認められたが、極めて増強されたというものではなかった。

本試験は2剤の混合ではなく連続使用による効果を検討したものであるが、消毒薬の混合効果については近藤^{7),8)}、飯場⁹⁾が薬剤の組合わせや被検菌種（芽胞含まず）の違いなどから検討している。その中で、条件によっては2剤混合の相乗効果が認められると述べている。今後は、芽胞に対しても薬剤の組合わせ、混合・連続、作用時間・温度、芽胞数、試験方法など多くの観点から研究を進めたい。

V 結 論

今回は、*Bacillus* 属芽胞を15分間エチルアルコール処理することによりヒビテン液あるいはオスバン液に対して耐性が処理しない芽胞よりどの程度影響をうけるか比較検討した。その結果、オスバン液ではエチルアルコール処理芽胞と非処理芽胞の死滅効果にわずかの違いが200~800 μ g/mlでみられるものの有効な差とはいえない。一方、ヒビテン液はオスバン液よりはいくぶん差がみられ、特に400 μ g/mlにおいてエチルアルコール処理した芽胞は死滅率がやや高くなる傾向が認められた。しかし、全体の結果からみると、15分間のエチルアルコール処理により殺滅効果が極めて高まったというものではなかった。

VI 文 献

- 1) 渡邊貢次：空中由来 *Bacillus* 属芽胞の消毒薬耐性に関する報告，愛知教育大学研究報告 第35輯，167-174，1986
- 2) 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
- 3) 品川邦汎：*Bacillus cereus*，臨床と微生物，12(3)，284-290，1985
- 4) 厚生省監修：微生物検査必携 細菌・真菌検査 第二版，287-293，日本公衆衛生協会（東京），1978
- 5) 坂崎利一，編：細菌・真菌・原虫用培地「ニッスイ」マニュアル 第3版，156-157，日本製薬株式会社（東京），1982
- 6) 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
- 7) 近藤芳子：消毒薬の混合効果，日本公衛誌，26(6)，289-297，1979
- 8) 近藤芳子：混合消毒薬の物理的性状と殺菌効果，日本公衛誌，26(9)，462-466，1979
- 9) 飯場美知子，他：消毒薬の殺菌効果に関する研究，保健の科学，23(12)，859-862，1981

（平成2年9月11日受理）