

分離菌株に対する各種消毒薬の殺菌効果

渡 邊 貢 次

Koji WATANABE

(養護教育教室)

Bactericidal effects of disinfectants on isolated strains

Koji WATANABE

(Department of Health Education)

I 緒言

消毒薬 disinfectant はいうまでもなく、病原性微生物を完全に死滅させるかあるいはその数を極めて減少させることにより、疾病の感染源を断つための薬剤である。近年、消毒の用途によって各種の消毒薬が開発されており、医学、学校保健、食品衛生などの分野で、さらには日常生活において重要な役割を担ってきている。

さて、従来の消毒薬の殺菌効果に関する報告は、その性質上、臨床分離の細菌株を被検対象とするものがほとんどであった。このため、非病原性と称されている細菌を消毒薬の評価のための対象から除くことが多くみられた。しかし、今日では、日和見感染 opportunistic infection についての知見、特にグラム陰性桿菌についての知見、あるいは環境衛生の意識向上などが高まるにつれて、生活周辺の非病原性細菌をも消毒薬の評価のための検討対象とすることが重要視されるようになってきた。¹⁾

ところで、消毒薬の効力を検討するための方法としては、石炭酸係数 phenol coefficient (PC) 測定法、最小発育阻止濃度 minimal inhibitory concentration (MIC) 測定法、最小殺菌濃度 minimal bactericidal concentration (MBC) 測定法などの感受性試験や、臨床的な評価のための皮膚テストなどがある。²⁾ この中では、効力を直接評価する方法として現在のところ、石炭酸係数による測定法が活用される場合が多い。しかし、この方法は多数株を検討するには、時間や労力がかかりすぎる。

これらの点をふまえて、本研究は、代表的な手洗い用消毒薬（ただし、希釈を要する液剤）について、生活環境に常在する細菌を対象とし、最小発育阻止濃度を測定することにより、各分離菌種、菌株に対する殺菌作用の差を比較検討したものである。さらに、2種の消毒薬混合による制菌効果についても検討を加えた。若干の知見を得たので報告する。

II 材料と方法

1. 感受性試験

(1) 供試消毒薬

病院、学校などで汎用されていること、また、消毒薬の殺菌効果に関する諸報告でも対

象となることが多いことから、次の4種の薬剤を選択した。

- ① クレゾール石ケン液 saponated cresol sol. (有効主成分 クレゾール 42～52 v/v %液, 岩城製薬)
- ② ヒビテン液 hibitane sol. (有効主成分 グレコン酸クロルヘキシジン 5 w/v %液, アイ・シー・アイファーマ)
- ③ 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, 武田薬品工業)
- ④ ハイアミンT液 hyamine-T sol. (有効主成分 塩化ベンゼトニウム 10 w/v %液, 三共)

上記のうち, ③, ④はいわゆる逆性石ケン液である。これらの消毒薬はすべて滅菌した脱イオン蒸留水で希釈 (v/v) し, 使用原液を作製した。

(2) 供試菌株

生活環境の代表的な常在菌のうち, グラム陰性菌 2 種, グラム陰性菌 2 種を直接分離し, 供試菌株とした。それぞれ, ぶどう球菌コアグララーゼ陽性株 *Staphylococcus coagulase* (+) は化膿や食中毒, バチルス属 *Bacillus* は腐敗, 大腸菌群 *coliform organisms* は水系汚染の指標, シュードモナス属 *Pseudomonas* は日和見感染の代表的な菌種として選んだ。これらの菌種菌株の分離・同定方法は, グラム染色性, 菌形状, 菌配列, カタラーゼテストの他, 表 1 に示すような概要で行った。分離株の総計は 117 株である。

表 1 菌株の分離・同定方法の概要

| 菌名 | 採菌対象 | 分離培地・同定方法 | 分離菌株数 |
|--------|--|--|-------|
| グラム陽性菌 | ぶどう球菌コアグララーゼ陽性型 (<i>Staphylococcus coagulase</i> (+)) | 成人前腕部皮膚 ・スタヒロコッカス 110 培地 ・嫌氣的ぶどう糖分解性: Hugh-Leifson 培地による OF テスト ・コアグララーゼテスト: 試験管法 | 30 |
| | バチルス属 (<i>Bacillus</i>) | 空中落下細菌 ・定型的集落に対する芽胞染色 | 16 |
| グラム陰性菌 | 大腸菌群 (<i>coliform organisms</i>) | 河川水 ・推定試験: Desoxycholate 培地 ・確定試験: Endo 培地 ・完全試験: LB ブイヨン | 35 |
| | シュードモナス属 (<i>Pseudomonas</i>) | 調理台・流し台 ・NAC 寒天 ・NAC ブイヨンによる色素産性 | 36 |

(3) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法

日本化学療法学会標準法³⁾に準拠して, 分離株の消毒薬に対する感受性試験を行い, MIC を測定した。

各消毒薬原液を必要濃度に希釈調製後, さらに感受性試験用培地 (感性ディスク培地: ニッスイ) に混釈 (v/v) した。その最終濃度は, クレゾール石ケン液は, クレゾール成

分（濃度 50%として計算）として 4000 $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、以下 0.98 $\mu\text{g/ml}$ までの連続 2 倍希釈である。ヒビテン液、オスバン液、ハイアミン T 液は、それぞれの有効主成分として 100 $\mu\text{g/ml}$ 、以下 0.025 $\mu\text{g/ml}$ までの連続 2 倍希釈である。

被検菌株をトリプトンソーヤブイヨン（ニッスイ）で 37℃、18 時間増殖させ、この菌液を接種器（マイクロプランター MIT-P、佐久間工業）を用いて、各消毒薬含有の感受性試験用培地に接種した。37℃、18 時間後、発育コロニーの有無を観察し、判定は標準法に従った。

2. 消毒薬混合による制菌効果

ヒビテン液とオスバン液の混合により、それぞれの単独時よりもどの程度制菌効果が認められるかについて、黄色ぶどう球菌の増殖曲線から検討した。

(1) 供試菌株

黄色ぶどう球菌 *Staphylococcus aureus IAM 209P* 株。

(2) 増殖曲線

普通ブイヨン培地にヒビテン液、オスバン液を 0.39 $\mu\text{g/ml}$ または 0.20 $\mu\text{g/ml}$ を単独または混合希釈させ、上記菌株を 37℃で振盪培養した。分光光度計により、経時的に比色 (optical density OD) を測定した。

III 結果

1. 感受性試験

感受性試験 (MIC 測定) の結果、各菌種菌株に対する発育阻止効果は、各消毒薬で異った態度を示した。

(1) クレゾール石ケン液

本液の MIC (有効主成分の濃度で表記、以下同じ) は、ぶどう球菌 co (+) 株、大腸菌群に対してはともに 500 ~ 1000 $\mu\text{g/ml}$ となり、その分布幅は小さい。一方、バチルス属、シュードモナス属に対してはともに 62.5 ~ 2000 $\mu\text{g/ml}$ となり、高範囲に分布した (図 1)。また、バチルス属を除いて、1000 $\mu\text{g/ml}$ に最多頻度を示し、特に大腸菌群ではほとんどの株がこの値を示した。

(2) ヒビテン液

本液のぶどう球菌 co (+) 株、バチルス属、大腸菌群、シュードモナス属に対する MIC は、それぞれ 0.20 ~ 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 、1.56 ~ 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 、1.56 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 、6.25 ~ 100 < $\mu\text{g/ml}$ となり、これらの菌種の順に MIC が高くなる傾向が認められた (図 2)。グラム陽性菌に対する方がグラム陰性菌に対するよりも発育を抑える作用はやや強いようである。

(3) オスバン液

本液の MIC は、ぶどう球菌 co (+) 株に対しては 0.39 ~ 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 、バチルス属に対しては 0.78 ~ 25 $\mu\text{g/ml}$ を示した。一方、大腸菌群に対しては 50 ~ 100 < $\mu\text{g/ml}$ 、シュードモナス属に対しては 100 ~ 100 < $\mu\text{g/ml}$ となり、いずれも高い値となった (図 3)。

(4) ハイアミン T 液

本液の MIC 分布は、オスバン液と極めて類似のパターンを示した。ぶどう球菌 co (+) 株、バチルス属に対しては、ともに 0.78 ~ 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を示した。一方、大腸菌群、シュードモナス属に対してはともに 50 ~ 100 < $\mu\text{g/ml}$ を示した (図 4)。オスバン液、ハイアミン

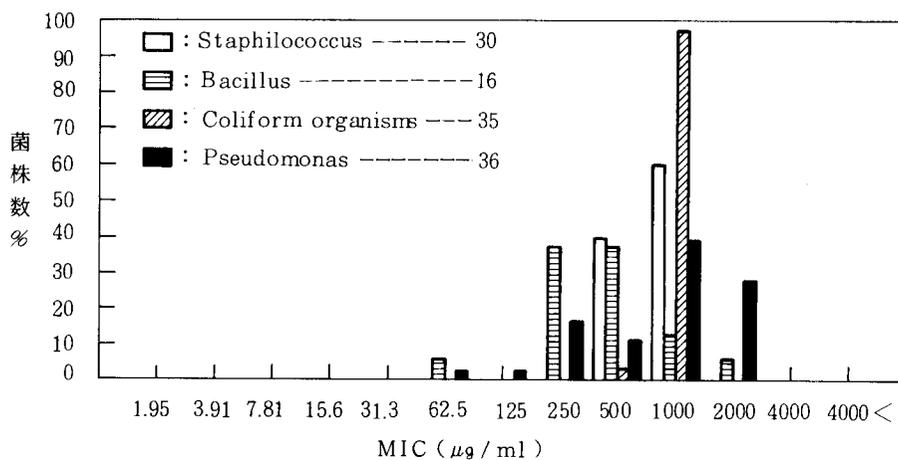


図1 クレゾール石ケン液の殺菌効果

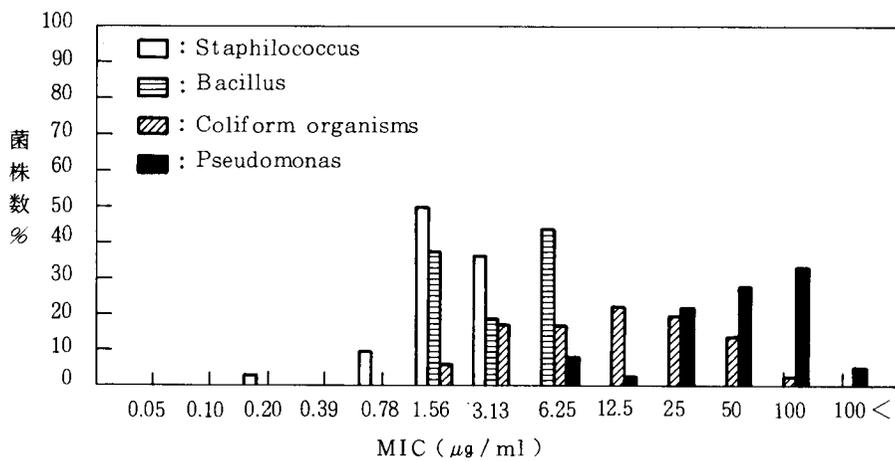


図2 ヒビテン液の殺菌効果

分離菌株に対する各種消毒薬の殺菌効果

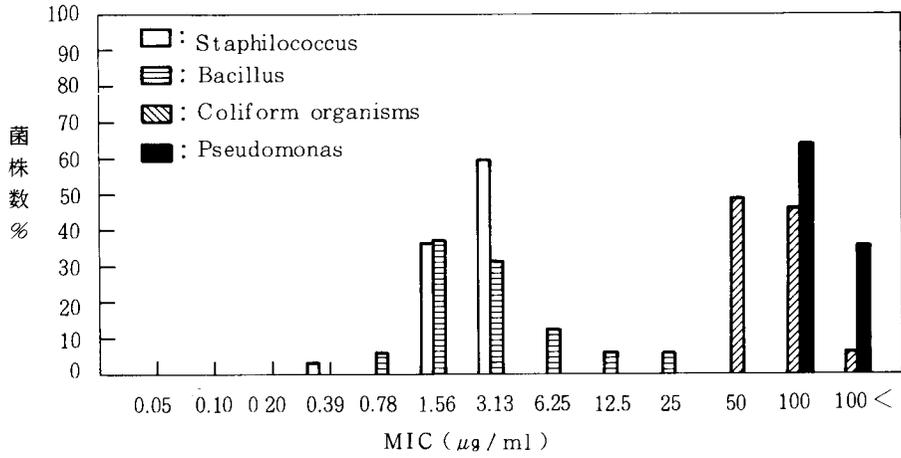


図3 オスバン液の殺菌効果

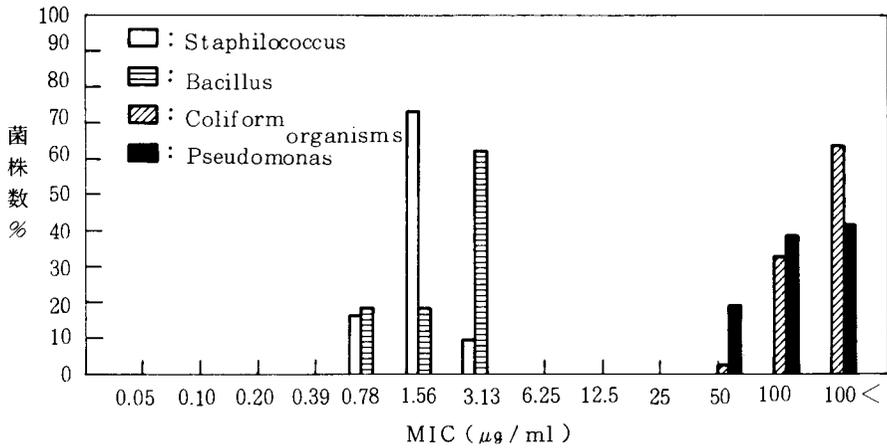


図4 ハイアミンT液の殺菌効果

T液ともにそのMICは、グラム陰性菌2種に対しては、グラム陽性菌2種に対するよりもはるかに高濃度域に分布し、逆性石ケン液の特徴が現われているといえる。

2. 消毒薬混合による制菌効果

図5に示すように、ヒビテン液またはオスバン液の単独の含有濃度0.39 $\mu\text{g/ml}$ の条件では、被検菌の増殖はコントロールよりは若干遅れるものの、それぞれ十分認められた。しかし、両液を混合して培養したところ、ともに0.39 $\mu\text{g/ml}$ 含有では、菌の増殖は完全に抑えられた。また、ともに0.20 $\mu\text{g/ml}$ 含有では、菌の増殖はかなり抑制された。

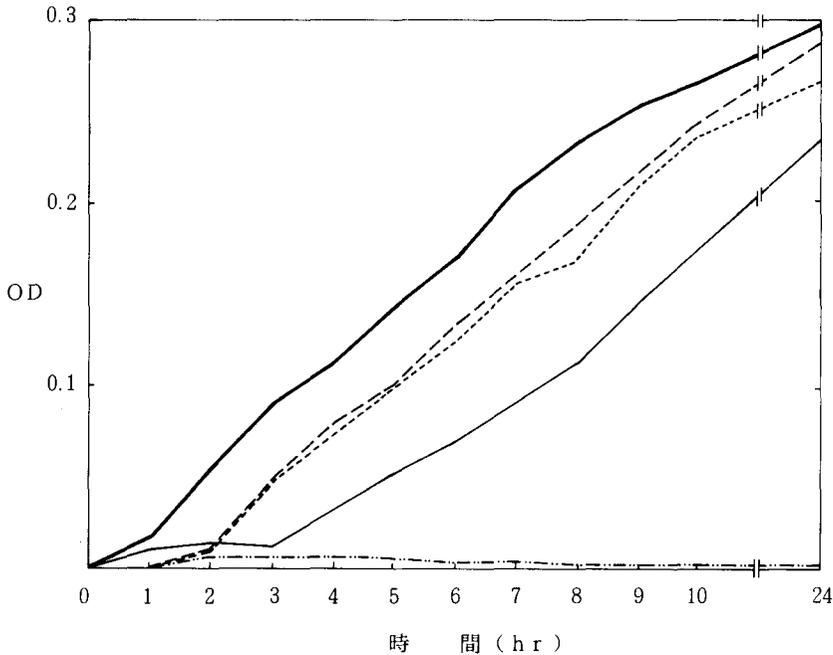


図5 消毒薬混合による黄色ぶどう球菌の増殖曲線

- : コントロール (消毒薬不含)
- : ヒビテン液 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 含有
- : オスバン液 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 含有
- · - · - : ヒビテン液 0.39 $\mu\text{g/ml}$ + オスバン液 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 含有
- · — · — : ヒビテン液 0.20 $\mu\text{g/ml}$ + オスバン液 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 含有

IV 考察

消毒薬の殺菌効果を評価するにあたっては、菌種や菌株の差違に対する変動はもとより、例えば、血清などの有機物添加、混合効果、作用温度、あるいは手洗い手技・洗浄法などの多くの条件を付加しながら、石炭酸係数やMICへの影響が検討される。これは、消毒薬のできるだけ現実的な使用状態に即した評価を与えると同時に、薬効力が最もすぐれて発揮される条件を明確にすることをねらいとする。

本研究は、多くの菌数を対象として、消毒薬の殺菌作用の差および2剤混合による制菌

効果を検討したものである。被検菌は環境より分離したもので、いずれも私達の生活にあって何らかの有害性を発揮する可能性があるものを対象としている。ぶどう球菌 co (+) 株、バチルス属(ともにグラム陽性菌)、大腸菌群、シュードモナス属(ともにグラム陰性菌)の4種である。このうち、ぶどう球菌 co (+) 株は、その多くの株が黄色ぶどう球菌 *Staphylococcus aureus* と一致すると思われ、また、シュードモナス属は、ほとんどが緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* と判定してよい¹⁵⁾。使用した消毒薬はクレゾール石ケン液、ヒビテン液、および逆性石ケン液であるオスバン液、ハイアミンT液の4種である。

総じていえば、クレゾール石ケン液を除いた他の消毒薬は、グラム陽性菌とグラム陰性菌に対する殺菌状態が異なった。特に、逆性石ケン液の2種においてその差が顕著であった。逆性石ケン液の一般の性質として、グラム陽性菌に対しては薬効力が強い反面グラム陰性菌には弱いということが指摘されている。本成績でも図3、図4に示す如く、両者への殺菌作用の差は極めて著しく、従来の成績を支持した。ヒビテン液についても、グラム陰性菌に対してはやや能力が弱い傾向を示したが、その差は逆性石ケン液程ではない。

グラム陽性菌とグラム陰性菌は細胞壁の構成成分に大きな違いがあり、物理的・化学的性状が異なる。これが、グラム染色性のもとより、消毒薬や抗生物質といった多くの薬剤に対する浸透性や抵抗性の違いに関係しているものと思われる。

一方、菌種自体の消毒薬に対する特徴をみると、本報告にはその資料を掲載していないが、ぶどう球菌コアグラゼ陰性株(その多くは表皮ぶどう球菌 *Staphylococcus epidermidis* と考えられる)についても同様に、100株以上を対象にMIC測定を行っている。その結果は、本文のぶどう球菌 co (+) 株と非常に似た分布を示した。従って、ぶどう球菌全体に対する4種の消毒薬の殺菌効果の特性としては、概ね本研究の成績で代表されるものといえよう。

バチルス属には、増殖期の栄養型と、芽胞形成期の芽胞型とがある。今回の測定は、主に栄養型に対する感受性試験といえる。両型では消毒薬に対する抵抗性も異なってくると考えられ、本属については、今後その生活環との関係からの検討も必要となるであろう。

さて、大腸菌群は数種の菌種群であるが、その消毒対象としての衛生学的意義はあらためていうまでもない。本成績のクレゾール石ケン液に対しては際立った特徴を示した。また、ハイアミンT液に対しては、分布率からみると、 $100 < \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度域においても本菌群のMIC分布の広がりが予想され、明確な定量が改めて要求される。

近年、日和見感染源 opportunistic pathogen として注目されているシュードモナス属^{4) 5) 8) 9) 17) - 19)}に関しては、その感受性に大きな変動があることが多く報告されている。本研究での本属の感受性成績をみると、他の被検菌と比較して、クレゾール石ケン液やヒビテン液でやはりMIC分布幅の広さが認められる。シュードモナス属の中には、*Pseudomonas cepacia* のように消毒薬に対する抵抗性がかなり強いものも存在する。従って、日和見感染源としての本属の研究は、さらに深めていかねばならないことはまちがいない。

さて、普通石ケン液と逆性石ケン液が混在するとその薬効力は減弱することはよく知られている。逆に、2種の消毒薬を混合したときに、消毒薬自体がお互いに拮抗しなければ、これらを併用して使用すれば、殺菌効果が高まることは予想されよう。しかし、その程度は一様ではない。近藤は^{6) 13)}多くの組み合わせによる混合効果を検討した結果、かなり増強される場合もあれば、それ程でもない場合もあると報告している。このうち、ヒビテン液とハイ

アミン液の混合成績としては、約 3.5 倍の相乗効果がみられたと報告している。本研究はヒビテン液とオスバン液との組み合わせによる増殖試験である。それぞれの単独濃度の増殖曲線と単独時の 1/2 濃度の混合時の増殖曲線とを比較すると、2 種混合による増殖抑制への相乗効果が現われていると認められる。

現在、数多くの手洗い用消毒薬が市販されているが、汎抗微生物性を発揮するものはなかなか存在しない。今回の研究成績をもとに評価すると、クレゾール石ケン液は各菌に対して安定した殺菌作用を示した。しかし、特有の臭気、成分濃度が高いことなどから、例えば、学校保健分野におけるような多人数の手洗いを対象とするには不向きと思われる。その使用には限度があろう。ヒビテン液については、低濃度で対象菌全体に発育阻止を示しており、無臭性、無刺激性などの利点もあり、今後とも利用性が高まるとと思われる。一方、オスバン液やハイアミン T 液については、グラム陽性菌に対する殺菌力の弱さが認められたが、これについては、加温処理あるいは混合処理などにより薬効力を増強させながら、その特性を生かしていけばよいであろう。

さて、オスバン液、ハイアミン T 液の測定濃度においては、一部の被検菌に対する MIC の検討が不十分なところも認められたが、全体的にみると、今回の成績は従来の成績を支持するものであった。今回の MIC は、それぞれの消毒薬の常用濃度からみれば低い濃度である。しかし、実際の消毒薬の使用状況においては、多くの妨害因子が付加されることは当然考えられる。従って、MIC がそのまま消毒効果をはたすとは限らない。菌種の中には、常用濃度でも殺菌されなかった存在例も報告されている。この意味では、消毒薬の有効的な使用のためには、まだまだ、検討すべき課題があると思われる。今後吟味を深めていきたいと考えている。

V まとめ

消毒薬の使用にあたっては、その方法が不適當であると、十分な殺菌効果が得られず、感染予防という目的が達せられない。このためには、各消毒薬の持っている特性をよく理解しておくことが必要である。

本研究は、分離菌種（ぶどう球菌コアグラゼ陽性菌、バチルス属、大腸菌群、シュードモナス属）に対する消毒薬（クレゾール石ケン液、ヒビテン液、オスバン液、ハイアミン T 液）の殺菌態度について比較検討したものである。その結果、次のようにまとめられる。

(1) クレゾール石ケン液は 250 ~ 2000 $\mu\text{g/ml}$ (有効主成分濃度、以下同じ) でほとんどの菌株の発育を阻止した。

(2) ヒビテン液の対象菌株に対する MIC は 0.20 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ と広範囲を示したが、概してグラム陽性菌に対する方が、グラム陰性菌に対するよりも低濃度で薬効力を発揮した。

(3) オスバン液、ハイアミン T 液はグラム陽性菌に対しては、それぞれ MIC 0.39 ~ 25 $\mu\text{g/ml}$ 、0.78 ~ 3.13 $\mu\text{g/ml}$ と低濃度で作用したものの、グラム陰性菌に対しては、すべて 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示し、両者に対する MIC にはかなり差違が認められた。

(4) ヒビテン液とオスバン液の混合により、細菌の増殖抑制に対する相乗効果が認められた。

(昭和59年8月28日受理)

IV 文献

- 1) 小沢敦, 他編: 臨床細菌学 講義篇, 264 - 329, 講談社(東京), 1977
- 2) 綿貫喆, 他: 滅菌法・消毒法, 第3集, 6 - 15, 116 - 121, 文光堂(東京), 1977
- 3) 小酒井望, 編: 臨床検査技術全書第7巻微生物検査, 355 - 357, 医学書院(東京), 1979
- 4) 五島瑳智子: 一私の消毒薬に対する意見—殺菌効果の評価について, 臨床と細菌, 5(3), 229 - 233, 1978
- 5) 富岡一, 他: 一私の消毒薬に対する意見—消毒薬の殺菌効果, 臨床と細菌, 5(3), 239 - 246, 1978
- 6) 近藤芳子: 消毒薬の混合効果, 日本公衛誌, 26(6), 289 - 297, 1979
- 7) 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
- 8) 小林順子, 他: *Pseudomonas* 属(緑膿菌, *P. cepacia*, *P. maltophilia*) に対するヒビテン, ハイパール#3, オスバン消毒薬の殺菌効果, 看護技術, 28(15), 119 - 125, 1982
- 9) 余明順, 他: 各種消毒薬の常用濃度における殺菌効果—特に両性界面活性剤の殺菌効果について, 臨床と細菌, 11(2), 205 - 211, 1984
- 10) 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
- 11) 中野愛子: 消毒薬の検査法の変遷と正しい使用方法, 臨床と細菌, 5(3), 220 - 228, 1978
- 12) 古橋正吉, 他: 手術室と消毒薬, 臨床と細菌, 5(3), 247 - 252, 1978
- 13) 滝幸代, 他: 現行消毒薬の再検討—超音波洗浄装置について—, 四大看護学研究会雑誌, 2(2), 44 - 54, 1979
- 14) 太田伸, 他: 手術用殺菌消毒剤4%グルコン酸クロルヘキシジン(ヒビスクラブ®)の一般手洗いへの応用について, 臨床と細菌, 9(1), 93 - 97, 1982
- 15) 栄研化学: '栄研'マニュアル, 145 - 148, 栄研化学株式会社(東京), 1977
- 16) 2)に同じ, 126 - 128, 177
- 17) 五島瑳智子, 他: 常用消毒薬のグラム陰性桿菌の臨床分離株に対する殺菌作用について, 臨床病理, 25(8), 684 - 690, 1977
- 18) 久米光, 他: 新しい消毒薬の殺菌学的評価, 臨床と細菌, 5(3), 253 - 257, 1978
- 19) 川上由行, 他: *Opportunistic pathogen* に対する各種消毒薬の殺菌効果, 臨床と細菌, 10(4), 427 - 434, 1983