

[J. Ferment. Technol., Vol. 50, No. 4, p. 273~279, 1972]

## グルタールアルデヒドの抗菌作用特性

泉尾 信彦・登田 善久・岡崎 光雄・芝崎 勲

(大阪大学工学部醸酵工学教室)

## Some Aspects of Antimicrobial Action of Glutaraldehyde

Nobuhiko Izuo,\* Yoshihisa Toda, Mitsuo Okazaki,\*\* and Isao Shibasaki

(Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,  
Osaka University, Suita-shi, Osaka)

The bactericidal activity of glutaraldehyde against *Bacillus subtilis* spores and vegetative cells and the inhibition of spore germination was increased with increasing pH; on the contrary, its bacteriostatic activity was decreased with increasing pH in the test medium.

The effect of glutaraldehyde upon the macromolecular synthesis of cells during the early logarithmic phase of *B. subtilis* was investigated; it was found that protein and DNA synthesis were markedly inhibited by a minimum inhibitory concentration or below of glutaraldehyde.

A synergistic effect of streptomycin on the bacteriostatic action of glutaraldehyde was found against *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. This synergistic effect was not found at pH 6.0, although it was significant at pH 7, 8, and 9. It was found that the inhibition of DNA synthesis with glutaraldehyde was markedly enhanced by the addition of streptomycin in a minimal concentration.

## 結 言

グルタールアルデヒドは医療関係の殺菌剤として最近注目されているが、ホルムアルデヒドにくらべて8~10倍の殺菌作用力をもっているといわれ、とくに細菌胞子の殺菌力の強いことが強調されている。<sup>1~3)</sup>

著者らは種々の薬剤での相乗性について検討している際、グルタールアルデヒドを取り上げたが、一方このものは環境殺菌剤として特異的特性をもっているので、その抗菌作用特性を検討し、2, 3の興味ある結果をえたのでここにその概要を述べる。

## 実 験 方 法

## 1. 供試菌株および薬剤 供試菌としては教室保存

\* 田辺製薬株式会社化成研究所 (大阪市東淀川区加島町962)

\*\* 大阪大学薬学部製薬化学科 (豊中市刀根山)

の *Bacillus subtilis* PIC 219 を主として用いたほか、相乗性の試験には、*Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aerobacter aerogenes*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus nigricans*, *Chaetomium globosum* を用いた。

グルタールアルデヒドは和光純薬工業製の25%水溶液、抗生物質としてジヒドロストレプトマイシン硫酸塩 (武田薬工)、エリスロマイシンおよびタイロシン乳酸塩 (塩野義製薬)、アクチノマイシンD (メルク) を用い、その他培地成分などは市販の試薬を用いた。

2. 抗菌作用力の測定 *B. subtilis* の胞子浮游液はPGY 培地 (ペプトン0.5%, グルコース1.0%, 酵母エキス0.3%, 肉エキス0.2%, pH 7.0) を用い、37°C、7日間振盪培養して調製した。これをM/10リン酸緩衝液で pH 6, 7, 8 に調整したグルタールアルデヒド

溶液に添加し、30°Cに保持し、経時的に試料を採取し、PGY 寒天培地で30°C、40時間後に形成されるコロニー数より生菌数を算出した。栄養細胞はPGY培地で30°C、20時間培養した洗浄細胞を用いた。

発育阻害作用をみるときは、30°C、20時間培養した細胞を前培養とし、これを新鮮培地4mlを入れたL字管に5%となるように接種し、30°Cで振盪培養し、経時的に660 m $\mu$ での吸光度を測定した。孢子発芽阻害は、0.125% L-アラニン添加のM/20リン酸緩衝液を用い、30°Cで振盪培養し吸光度の低下経過より検討した。

3. 抗菌作用機構 グルタルアルデヒドの抗菌作用機構の検討に当っては、PGY培地で20時間培養した細胞を、新鮮培地に5%接種し、対数増殖期中期に所定量のグルタルアルデヒドを加えて培養を続け、吸光度測定によって最小発育阻止濃度をもとめた。つぎに基本培地として、グルコース8g、酵母エキス1g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 27.2g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g、CaCl<sub>2</sub> 0.01g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0005gを全容1lに溶かした(pH 7.0に調整)。上と同様な培養操作をし、対数期の培養に<sup>14</sup>C-アミノ酸(第1化学薬品、50 Ci/0.1 ml)あるいは<sup>14</sup>C-アデニン(第1化学薬品、20 Ci/0.1 ml)をグルタルアルデヒドと共に添加し、経時的に試料を採取し、Schmidt-Thanhauser-Schnei-

der 法<sup>4)</sup>に準ずる方法によって蛋白、あるいは核酸区分を分離し、取り込まれた放射能はNuclear Chicago製の液体シンチレーションカウンターにて測定した。この場合<sup>14</sup>C-アミノ酸は培養当り2 $\mu$ Ciあるいは5 $\mu$ Ci、<sup>14</sup>C-アデニンは5 $\mu$ Ciを用いた。

細胞の呼吸活性はワールブルグ検圧法により、対数期の細胞浮游液1.75 mlを容器に採り、これにグルタルアルアルデヒド溶液0.5 mlを添加して酸素摂取量を測定した。

4. 相乗性試験 PGY培地で30°C、20時間培養してえた細胞を薬剤の所定濃度添加した培地に5%量接種し(L字管)、30°Cで振盪培養し、0、2、4、6、24時間後の発育量を660 m $\mu$ での吸光度で測定した。そして各薬剤の組み合わせ実験において、発育を50%阻害する濃度をもとめ、そのプロットが単独での阻害濃度を結ぶ直線の内側にくるとき相乗性があるとし、この線上にくるときは相加的、外側にあるときは無効ないし拮抗的と判定した(かびに対しては24時間後の発育の有無より判定した)。

## 実験結果

1. グルタルアルデヒドの抗菌作用とpH グルタルアルデヒド(以下GAと略称する)の殺菌作用に対するpHの影響については、Pepperなど<sup>5)</sup>

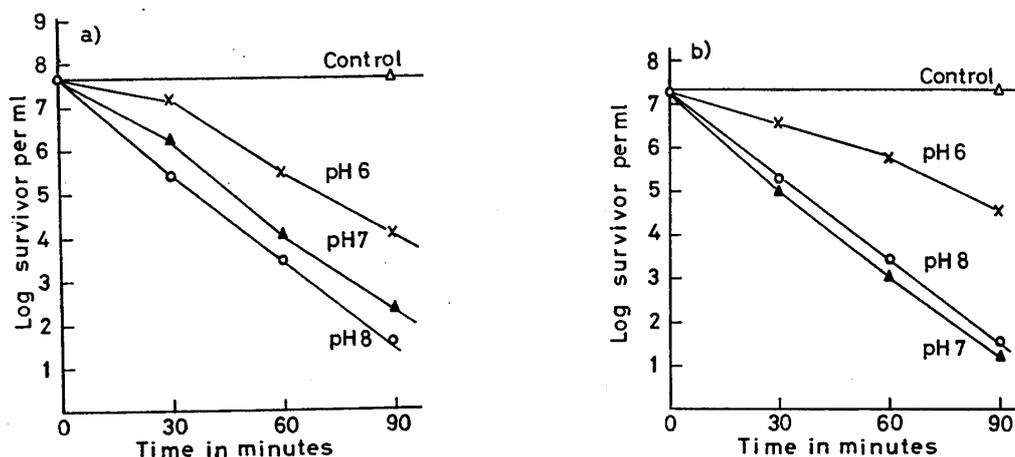


Fig. 1. Effect of pH on the bactericidal activity of glutaraldehyde (1%) against *B. subtilis* spores at 30°C.

a) in M/10 phosphate buffer b) in PGY medium

The spores were harvested from a 7-day old culture in PGY medium at 30°C, washed twice with M/10 phosphate buffer and suspended in M/10 phosphate buffer at various pH values. At intervals, samples were removed and then plate-counted in PGY agar medium at 30°C for 40 hours.

PGY medium: peptone 0.5%, glucose 1%, yeast extract 0.3%, meat extract 0.2%, (pH 7.0).

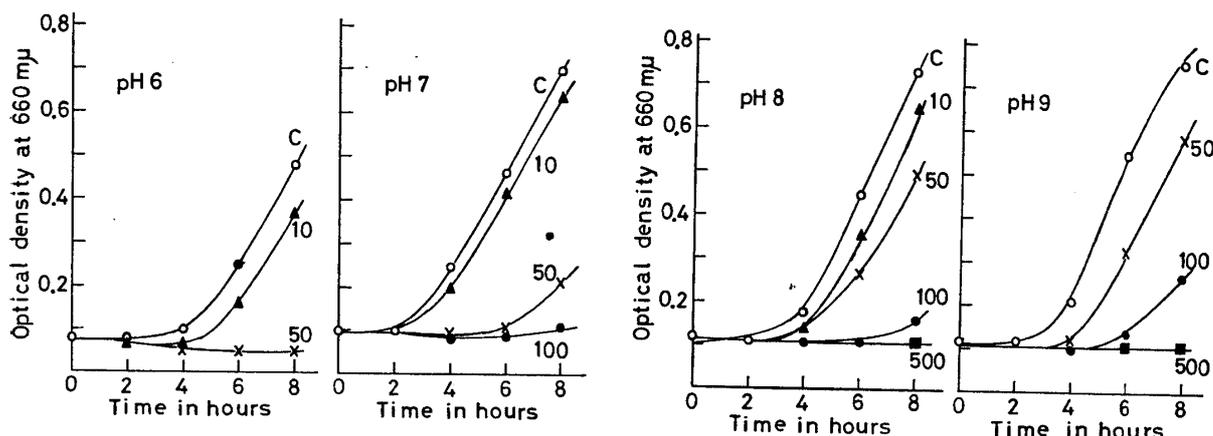


Fig. 2. Effect of pH on the bacteriostatic activity of glutaraldehyde against *B. subtilis*.

The 18 hour-cultured cells were inoculated at the rate of 5% to fresh PGY medium with or without glutaraldehyde in L-type culture vessel, incubated at 30°C with shaking and the optical density at 660 mμ measured at regular intervals.

The PGY medium was adjusted as to pH by the addition of phosphoric acid or caustic soda.

C: control 10, 50, 100, 500: concentration of glutaraldehyde (μg/ml)

Munton および Russel,<sup>6)</sup> の報告があるが、本研究では、試験菌として *B. subtilis* を用い、殺菌作用と静菌作用とにわけて pH の影響を検討した。Fig. 1 には *B. subtilis* 胞子に対し、pH 6, 7, 8 に調製した緩衝液および PGY 培地中での殺菌経過を示した。すでに示されているようにアルカリ側に傾くにつれて殺菌作用力は増強されたが、この場合、pH 調整に炭酸塩を用いた場合、リン酸塩にくらべて死滅率は上昇する傾向のあることを認めた。栄養細胞に対しても、胞子と同様にアルカリ側で殺菌効果は大となった(実験結果省略)。

*B. subtilis* 胞子の発芽に対する GA の影響をしらべたが、0.1%濃度では約 60% の発芽阻害率を示したが、培地 pH を加えると、発芽阻害率は次のごとくなり、酸性側では阻害率は $\frac{1}{2}$ 以下に低下することを認めた。

pH	6	7	8
発芽阻害率(%)	25	68	55

しかしながら栄養細胞の発育経過に対する GA の阻害作用効果は Fig. 2 に示したように、pH 6, 7, 8, 9 の順に低下する傾向を認めた。この場合、炭酸塩の影響は殺菌作用の場合よりは顕著であった。つぎの結果は PGY 培地をそれぞれの薬剤で pH 8.0 に調製し、GA 100 μg/ml を添加して培養した場合の誘導期延長時間である。

苛性ソーダ	3.2 hr
リン酸塩	2.6
重炭酸ソーダ	5.2

以上の実験結果より、GA の殺菌作用と胞子発芽阻害作用はアルカリ側で、静菌作用は逆に酸性側でより強力となることが明らかとなった。このことは GA の安定性と関連づけることができるが、実用上十分考慮すべき特性である。

## 2. グルタルアルデヒドの抗菌作用機構 GA の抗菌作用機構についてはほとんど研究がないといって

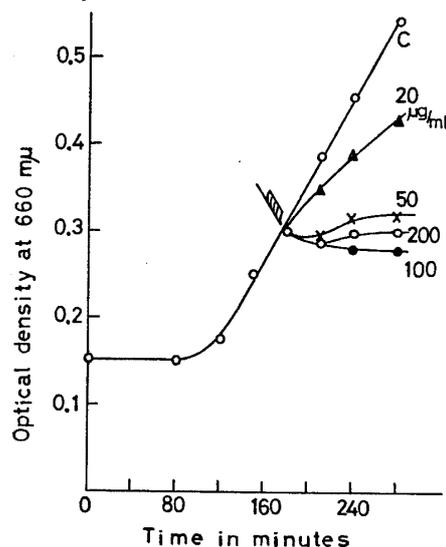


Fig. 3. Minimum inhibitory concentration of glutaraldehyde against early logarithmic phase cells of *B. subtilis*.

The arrow indicates the time of addition of glutaraldehyde.

Culture condition: PGY medium, 30°C, shake culture

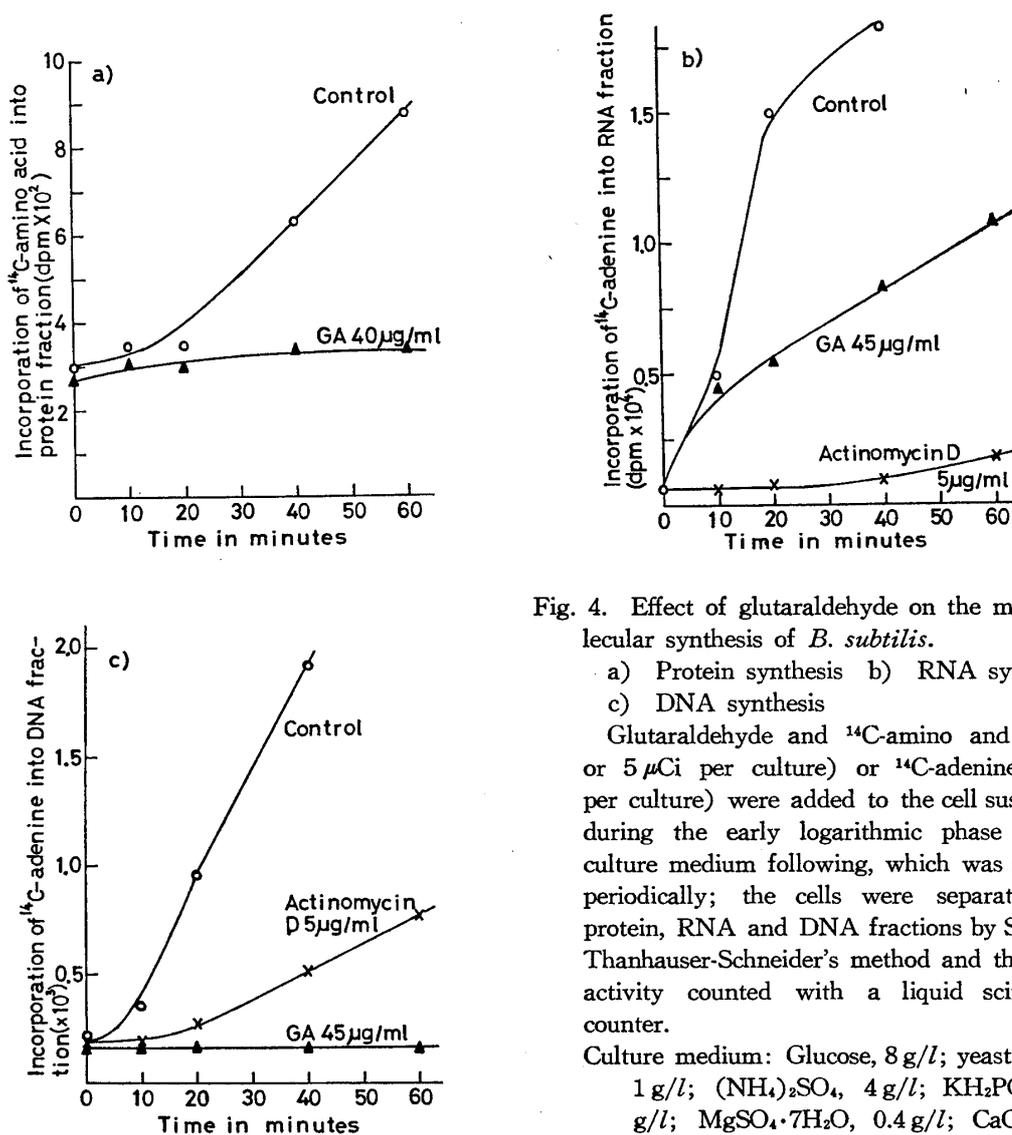


Fig. 4. Effect of glutaraldehyde on the macromolecular synthesis of *B. subtilis*.

a) Protein synthesis b) RNA synthesis  
c) DNA synthesis

Glutaraldehyde and  $^{14}\text{C}$ -amino and ( $2 \mu\text{Ci}$  or  $5 \mu\text{Ci}$  per culture) or  $^{14}\text{C}$ -adenine ( $5 \mu\text{Ci}$  per culture) were added to the cell suspension during the early logarithmic phase in the culture medium following, which was sampled periodically; the cells were separated into protein, RNA and DNA fractions by Schmidt-Thanhauser-Schneider's method and the radioactivity counted with a liquid scintillation counter.

Culture medium: Glucose, 8 g/l; yeast extract, 1 g/l;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 27.2 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 g/l;  $\text{CaCl}_2$ , 0.01 g/l;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0005 g/l (pH 7.0).

よい。そこで *B. subtilis* の対数増殖期の細胞を用いて、蛋白、RNA、DNA 合成系および呼吸活性に対する GA の影響を検討することとした。

対数増殖期の細胞に対する GA の最小発育阻止濃度は Fig. 3 に示したように、 $50 \mu\text{g/ml}$  程度である。そこでこれに近い濃度の GA を添加して、 $^{14}\text{C}$ -アミノ酸の蛋白区分への取り込み、 $^{14}\text{C}$ -アデニンの RNA および DNA 区分への取り込みに対する影響を検討した。その結果は Fig. 4 である。RNA 区分への  $^{14}\text{C}$  の取り込み阻害は対照として用いたアクチノマイシン D に比べてかなり少なかったが、蛋白や DNA 区分への取り込み阻害は顕著であった。このような GA の阻害作用は濃度を  $20 \mu\text{g/ml}$  に希釈した場合でも著しかった。GA の呼吸活性におよぼす影響が対照とした 0.01 MKCN に比べて少ないことは Fig. 5 より明

らかである。以上の実験結果を総合すると Table 1 のごとくであるが、DNA 合成系の阻害作用がきわめて顕著であって、GA  $20 \mu\text{g/ml}$  の濃度でも 95% の阻

Table 1. Summarized results of antibacterial action of glutaraldehyde against *B. subtilis*.

Mechanism	GA ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	40	20
Protein synthesis	90*	70
RNA synthesis	50	—
DNA synthesis	100	95
Respiration	50	30

\* Calculated from the data at 30 or 40 minute-incubation indicated in Figs. 4 and 5.

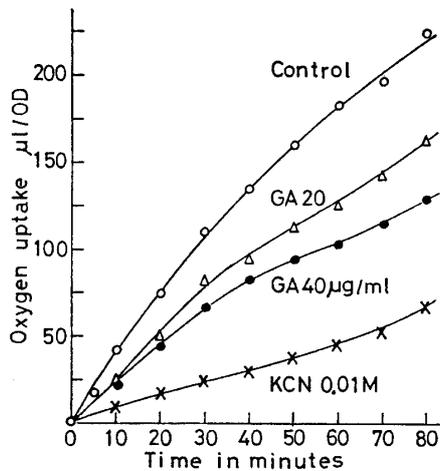


Fig. 5. Effect of glutaraldehyde on the respiration of *B. subtilis*.

During early logarithmic phase 1.75 ml of cell suspension was taken in Warburg's vessel, added diluted glutaraldehyde solution, measured oxygen uptake by the ordinary procedure.

害率を示した。これらの結果よりただちに GA の作用点を断定することはできないが、一応 GA の抗菌作用の一次点として DNA 合成系の阻害であると推定することができ、他の系の阻害は二次的なものとみなすことができよう。

**3. グルタルアルデヒドの相乗性** 防腐剤, 殺菌剤, 抗生物質などを供試して, 相乗的な組み合わせについて, *B. subtilis* を試験菌としてスクリーニングしたが\*, GA が蛋白合成系の阻害作用がたしかめられているストレプトマイシン, エリスロマイシン, タイロシンと顕著な相乗効果のあることを認めた。そこで GA とストレプトマイシン (以下 SM と略称する) と組み合わせについて詳細な検討を加えた。Fig. 6 には両者の組み合わせ効果の例を示したが, 相乗性の認められた微生物は, *E. coli*, *Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *B. subtilis*。であって, *Aer. aerogenes*, *S. lutea*, *Brevibacterium sp.*, *Han. anomala*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *P. citrinum*, *R. nigricans*, *Chaet. globosum* は相加的ないしは無効であった。このような結果より, GA と SM との組み合わせによる相乗性は対象とする微生物の面よりは何ら規則性を見いだすことはできなかった。

GA および SM はともに作用環境 pH により抗菌作用が影響をうけるが, 両者を組み合わせた場合は, pH 6.0 では相乗性はなく, pH 7, 8, 9 では著しい

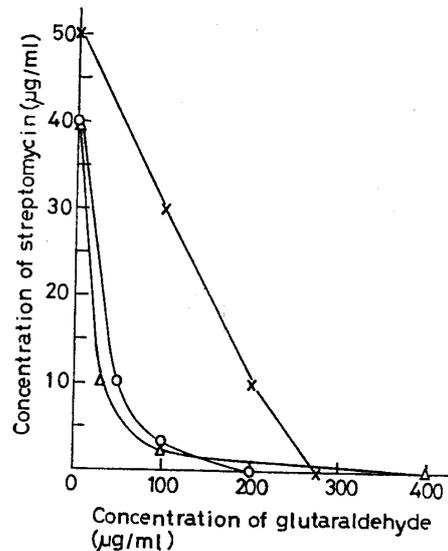


Fig. 6. Synergistic effect of streptomycin on the bacteriostatic activity of glutaraldehyde.

—○— *Staph. aureus* —△— *E. coli*  
—×— *Brevibacterium sp.*

The 20 hour-cultured cells were inoculated at the rate of 5% to PGY medium with or without test drug(s) in an L-type vessel, incubated at 30°C with shaking, and the optical density at 660 m $\mu$  measured after 2, 4, 6, and 24 hours.

Bacteriostatic activity in a combination of two drugs or alone was indicated by 50% inhibition concentration. The synergistic effect was determined from a curve obtained by plotting a 50% inhibition concentration with glutaraldehyde, streptomycin, or their combination.

相乗性を示した (Fig. 7)。相乗性はまた対象とする微生物の発育相によっても変動があり, *B. subtilis* の対数増殖期の細胞ではほとんど相乗性は認められなかった。

定常期の *B. subtilis* の細胞を用いた場合の相乗効果のある組み合わせ例としては, GA 12  $\mu$ g/ml+SM 30  $\mu$ g/ml, GA 12  $\mu$ g/ml+SM 50  $\mu$ g/ml, GA 25  $\mu$ g/ml+SM 12.5  $\mu$ g/ml をあげることができる。このうち GA 12  $\mu$ g/ml+SM 50  $\mu$ g/ml の組み合わせにおいては, *B. subtilis* に対する殺菌効果, 呼吸活性, 蛋白および RNA 合成阻害に対して何ら相乗効果は見いだされなかったが, DNA 合成阻害に対して両者の組み合わせによる相乗効果のあることが見いだされた。すなわち Table 2 に示したように, GA 単独では 12  $\mu$ g/ml でもかなりの DNA 合成阻害が認められたが, DNA 合成阻害作用の全くない SM の併用によって, 100% 阻害することが明らかとなった。

\* 泉尾：昭和45年度醸酵工学専攻修士論文

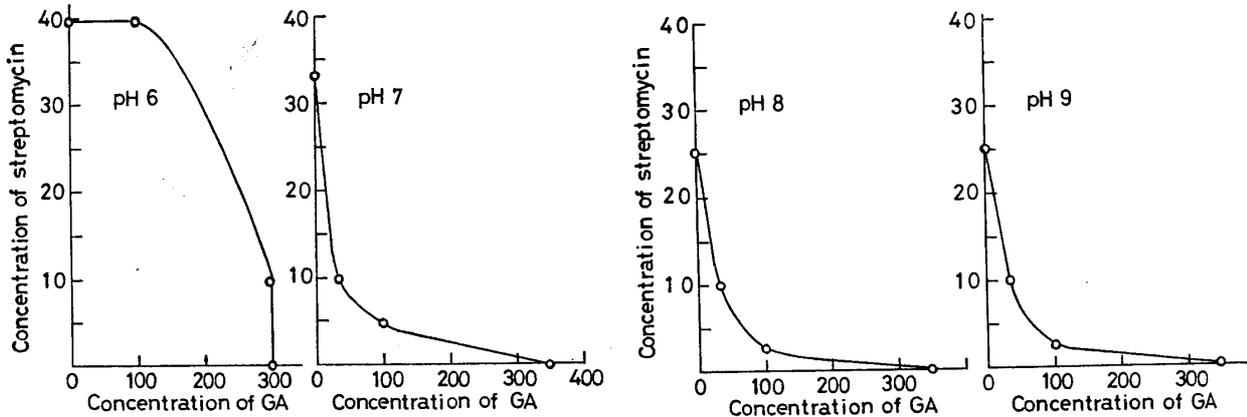


Fig. 7. Effect of pH on the synergism between streptomycin and glutaraldehyde against *B. subtilis*. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 6.

Table 2. Synergistic effect of streptomycin upon the inhibition of macromolecular synthesis and respiration in *B. subtilis* with glutaraldehyde.

Experimental conditions were similar to those described in Fig. 4, except that cell suspensions from the stationary phase were used.

Mechanism	Inhibition (%)		
	SM 50 $\mu$ g/ml	GA 12 $\mu$ g/ml	GA 12 $\mu$ g/ml+SM 50 $\mu$ g/ml
Respiration	10*	50	55
Protein synthesis	0	67	67
RNA synthesis	0	59	59
DNA synthesis	0	57	100

\* Calculated from the data at 2 hrs incubation

## 考 察

GA はアルデヒドに属する殺菌剤としては強力なもの1つであって、消毒剤として医療関係で利用されている。<sup>1,2)</sup> すなわちホルムアルデヒドやグリオキサールに比べて、広範囲の微生物に対して強力な殺菌作用力をもつとされ、とくに細菌胞子に対する作用力の強いことが注目される。

GA の作用特性について pH の影響が大であって、とくに炭酸塩の共存によって殺菌作用力が著しく増強されることが報告されている。<sup>5,6)</sup> 著者らはアルカリ側で利用できる強力な環境殺菌剤として GA に注目し、まず *B. subtilis* 胞子および栄養細胞を用いて、pH の影響を検討した。pH 7 以上であればこの pH 効果を十分期待することができ、胞子発芽の阻害作用もアルカリ側の方がより強力なことを認めた。しかし GA の発育阻害作用に対しては全く逆に、酸性側で強力であり、pH 6.0 では GA 50 $\mu$ g/ml で8時間完全に発育を阻止したが、pH 8, 9 ではこの10倍の500 $\mu$ g/ml

を必要とした。これらの現象は GA の安定性(反応性)と符号する結果であり、今後の GA の作用機序の検討の上からみても興味ある問題と考えられる。

GA などのアルデヒド系の殺菌剤は所謂アルキル化剤に属し、細胞内で重要な役割を演ずる物質のアミノ基、スルフヒドリル基などの反応性のたかいことが予想されるが、GA の抗菌作用機構に関する研究はほとんどない。ただ Munton および Russel<sup>6)</sup> が *E. coli* について細胞壁損傷を示す結果を示しているが、必ずしも十分に明確化されているとはいえない。

本研究では *B. subtilis* の対数期の細胞に対する最小発育阻止濃度を用いて、細胞内の高分子物質の合成阻害効果を検討した。その結果、蛋白合成および DNA 合成の阻害作用が顕著であり、とくに後者の阻害が最小発育阻止濃度の1/2の20 $\mu$ g/ml で95%にも達する阻害率を示したことから、GA の抗菌作用の一次点として DNA 合成系をあげることができる。しかし今後 DNA 合成系の細部の検討を経なければ決定的な結論は出せないし、GA の特性よりみて必ずしも作用の選

択性があるともいえないので、他の可能な作用点との関連性についても詳細な研究を必要とするものと考えられる。

緒言に示したように本研究の動機は各種薬剤間の相乗性を解明することにあつたが、今回の研究では、*B. subtilis* などについて蛋白合成阻害剤として知られているストレプトマイシン、タイロシン、エリスロマイシンと GA とが静菌作用について相乗作用のあることを認めた。そしてストレプトマイシンと GA との組み合わせについて詳細な研究を行ない、その結果、試験した広い範囲の微生物のすべてに相乗性があるのではなく、*B. subtilis*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Staph. aureus* に相乗効果が見いだされたにすぎない。この静菌力の相乗性に対しても pH の影響は特異的であつて、pH 6 では全く相乗性は見いだされなかつた。これは GA の静菌力に対する pH の影響とは対象的である。

ストレプトマイシンの GA に対する作用は、強力な GA の DNA 合成阻害作用に対して相乗性を示すことを認めた。今後薬剤間の相乗機構の検討のための一つのモデルとして GA とストレプトマイシンなどの蛋白合成阻害薬剤とを用いることができ、GA の作用点のより詳細な研究と相まつて、薬剤間の相乗作用の機構解明に貢献するところ大なるものが期待できる。

#### 総 括

アルデヒド系の環境殺菌剤のうちではすぐれた作用力を示すグルタルアルデヒドの抗菌作用特性を2, 3検討を加えた。

グルタルアルデヒドの抗菌作用上とくに注目される pH の影響については、殺菌作用、孢子発芽阻害作

用および静菌作用にわけて検討し、前二者ではアルカリ側程作用力が増強することを、後者については逆に酸性側で強力な作用を示すことを認めた。

対数増殖期の細胞について、グルタルアルデヒドの最小発育阻害濃度における呼吸活性、高分子物質の合成に対する阻害効果を検討し、蛋白合成、DNA 合成系阻害作用の顕著であることを認め、グルタルアルデヒドの抗菌作用の一次点として DNA 合成系を推定した。

さらにグルタルアルデヒドに対するストレプトマイシンの相乗作用を検討した結果、この相乗性は広い範囲の微生物には認められず、中性およびアルカリ性の環境にかぎられること、ストレプトマイシンがグルタルアルデヒドの DNA 合成阻害に対して相乗的にはたらいっていることを示した。

#### 文 献

- 1) 芝崎：食品殺菌工学，230，光琳書院（1967）。
- 2) Spaulding, E. H.: *Disinfection, Sterilization and Preservation* (Lawrence, C. A., Block, S. S.), 527, Lea & Febiger (1968).
- 3) Russell, A. D.: *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell* (Hugo, W. D.), 566, Academic Press (1971).
- 4) Volkin, E., Cohn, W. E.: *Methods of Biochemical Analysis*, I, 287 (1954).
- 5) Pepper, R. E., Chandler, V. L.: *Applied Microbiol.*, **11**, 384 (1963).
- 6) Munton, T. J., Russel, A. D.: *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 410 (1970).

(昭47.1.7受付)