

中和剤を用いた改良最小殺菌濃度測定法による 消毒薬耐性黄色ブドウ球菌の消毒薬感受性の評価

成井浩二, 野口雅久*, 笹津備規

東京薬科大学病原微生物学教室†

Evaluation of the Antiseptic Susceptibility of Antiseptic-resistant *Staphylococcus aureus* by a Modified Method to Determine the Minimum Bactericidal Concentration using a Neutralizer

Koji Narui, Norihisa Noguchi* and Masanori Sasatsu

Department of Microbiology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science†

[Received October 28, 2002]
[Accepted February 11, 2003]

The susceptibilities of various antiseptics to *Staphylococcus aureus* carrying antiseptic-resistance genes, *qacA*, *smr* and/or mutated *norA*, were evaluated by a method to determine the minimum bactericidal concentration (MBC) and the minimum inhibitory concentration (MIC). In benzalkonium chloride, benzethonium chloride and alkyldiaminoethylglycine hydrochloride, which are used for the washing of hands, skin-surfaces and wounds, we observed, in terms of MIC, no clear difference between the strains with and without antiseptic-resistance gene (s). However, we found that, in the modified method of MBC using a neutralizer, antiseptic-resistant strains survived after exposure to those antiseptics for 5 min at the minimum standard concentration (100 µg/mL). The results showed that *S. aureus* strains carrying antiseptic-resistance gene(s) exhibited resistance to various antiseptics. Therefore, the modified determination of MBC was thus found to be useful for evaluating the susceptibility of antiseptics to antiseptic-resistant *S. aureus*.

Keywords — antiseptic, antiseptic-resistance gene, *Staphylococcus aureus*, minimum bactericidal concentration (MBC)

緒 言

近年, 感染率の高い病原性細菌による感染症よりも, 宿主側の要因による易感染性患者の院内感染や日和見感染が急増している. さらに, 高齢化社会に伴う在宅医療の急速な展開から, 医療施設外における細菌汚染の危険性が懸念されている. 細菌感染を防止する上で消毒薬は最も一般的で有用なツールである. そのため, 消毒薬の抗菌力や抗菌スペクトルを把握することは感染制御にお

いて非常に重要である. しかし, 消毒薬はその種類により化学的性質が異なるだけでなく, 手指, 皮膚, 粘膜あるいは医療器具などの消毒対象により, 使用濃度や消毒時間が大きく異なっている. そのため, 日本では消毒薬の殺菌効果の測定法が未だ標準化されておらず^{1,2)}, 抗菌薬と同様に, 最小発育阻止濃度(MIC)か, 最小殺菌濃度(MBC)を測定し, 殺菌効果を評価している. これらの方法は, 薬剤を培地に入れ, 被検菌株を接種し, 通常24時間後の発育で判定する. しかし, 消毒薬は有機物(培

† 東京都八王子市堀之内1432-1; 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo, 192-0392 Japan

地)と反応して消毒効果が減弱することが知られている³⁾。さらに、消毒時間が培養時間であり、数分間の手指・洗浄消毒や数十分間の浸漬消毒を想定した消毒時間ごとの消毒効果を観察することができない。また、アルコール類などの揮発性の消毒薬などは評価できない。この薬剤の減弱と消毒効果の持続化のため、MIC等の測定法による消毒効果の評価は消毒薬本来の消毒効果を反映していないと考えられる。

院内感染や日和見感染の主な原因菌として黄色ブドウ球菌が知られている。Noguchiら⁴⁾は、1992年までに日本全国から分離されたMRSA98株について薬剤感受性を調べ、71株(72%)のMRSAが消毒薬に耐性であったと報告している。また、プラスミド上の*qacA*遺伝子⁵⁾または*smr*遺伝子⁶⁾の獲得や染色体上の*norA*遺伝子⁷⁾の変異が黄色ブドウ球菌の消毒薬耐性に関与する耐性遺伝子として報告されている。これらの遺伝子は菌体内に流入してきた消毒薬を菌体外に排出する薬剤排出ポンプとして機能するタンパク質をコードし、消毒薬の排出により多剤耐性化を示すと考えられている。これらの消毒薬耐性遺伝子を保有する株に対する消毒薬のMICは、現行の使用濃度よりも著しく低い。したがって、仮に消毒薬耐性黄色ブドウ球菌が広く分布しているとしても、既存の感受性測定法では消毒薬に対する感受性株と耐性株を区別することは難しいため、ほとんどの医療施設で消毒薬耐性菌に対する対策が行われていないのが現状である。消毒薬耐性黄色ブドウ球菌に対する対策を講じるためには、耐性株の消毒薬に対する感受性を明確に判定できる新たな消毒薬感受性測定法の開発が必要である。われわれが以前報告した消毒薬評価法⁸⁾はMIC測定法では観察できない消毒時間ごとの消毒効果を評価できるMBC測定方法であった。しかし、消毒時間後に薬剤が増殖培地へ持ち込まれ、消毒効果が持続化することが懸念されていた。そこで、中和剤を用いて、消毒時間後の

残留薬剤を不活化する行程を導入した改良MBC測定法を開発した。

本研究では、改良MBC測定法(本法)を用いてMBCを測定し、現行の消毒薬の使用濃度、消毒時間と消毒薬耐性に関与する遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌の感受性の相関性を調べた。

材料・方法

1. 使用菌株とプラスミド

本研究で使用した菌株とプラスミドはTable 1に示した。JCM2874(ATCC29213)は薬剤感受性試験における標準対照株として用いた。pTZts77を保有するRN2677株とTP171株はTS77株との接合伝達法¹¹⁾により得た。pTZ1311-ts99はpTZts99を制限酵素HincIIで切断し、プラスミドベクターpTZ1311のPvuII部位に*smr*遺伝子をコードする2.3-kb HincII断片を組み込むことにより枯草菌BR151株において作製した。

2. 使用薬剤と奨励使用濃度

使用消毒薬は、色素としてアクリフラビン(AF, シグマ(株))と臭化エチジウム(EB, 和光純薬工業(株))、四級アンモニウム系消毒薬として塩化ベンザルコニウム(BKC, シグマ(株))と塩化ベンゼトニウム(BTC, 和光純薬工業(株))、界面活性剤として塩酸アルキルジアミノエチルグリシン(ADH, (株)アズエール)、ビグアナイド系消毒薬としてグルコン酸クロルヘキシジン(CHG, 和光純薬工業(株))を用いた。

消毒薬の不活化にはヨーロッパ殺菌・消毒薬統一規格¹⁾で奨励されている中和剤(3%ポリソルベート80, 0.3%レシチン, 0.5%チオ硫酸ナトリウム, 0.1%L-ヒスチジン, 3%サポニン, 0.1%トリプトン加生食)を用いた。

Table 1. The Bacterial Strains and Plasmids Used in this Study.

Strain or plasmid	Description (resistance marker)	Reference
Strain:		
<i>S. aureus</i>		
RN2677	restriction-defective mutant, NOV ^r , RFP ^r	9
TP171	NorA over-expressed RN2677 mutant	9
TS77	clinical isolate MRSA carrying pTZts77	4
TS99	clinical isolate MSSA carrying pTZts99	4
JCM2874	type strain of <i>S. aureus</i>	
<i>B. subtilis</i> BR151	<i>trpC2</i> , <i>lys-3</i> , <i>metB10</i>	10
Plasmid:		
pTZ1311	4.1-kb plasmid vector of <i>B. subtilis</i> and <i>S. aureus</i> (NEO ^r)	10
pTZts77	25-kb transconjugative plasmid carrying <i>qacA</i> gene (GM ^r)	
pTZts99	2.3-kb plasmid carrying <i>smr</i> gene	
pTZ1311-ts99	pTZ1311 carrying 2.3-kb HincII fragment with <i>smr</i> gene of pTZts99	this study

NOV, Novobiocin; RFP, Rifampicin; NEO, Neomycin; GM, Gentamicin; ^r, resistance.

以下の消毒薬の使用濃度を“奨励使用濃度”とした³⁾。また、浸漬時間は1, 5, 10, 30, 60, 180分, 24時間で行いMBCを測定した。手指, 皮膚, 粘膜の洗浄消毒(手指・洗浄消毒)の場合, BKC, BTCとADHは100-2000 μ g/mL。CHGは500-5000 μ g/mL。医療器具, リネンなどを消毒液に浸ける消毒(浸漬消毒)の場合, BKCとBTCは1000 μ g/mLで10分間または500 μ g/mLで30分間。ADHは500 μ g/mLで15分間または5000 μ g/mLで10分間。CHGは1000 μ g/mLで30分間または5000 μ g/mLで10分間。

3. 感受性の測定方法

MICは, National Committee for Clinical Laboratory Standardsの定める方法に準じ, 2倍寒天希釈法で測定した¹²⁾。35℃で18~24時間培養後, 菌の生育を判定し, 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MIC(μ g/mL)とした。MBCは, われわれが以前に報告した消毒薬評価法⁸⁾を基準に改良した以下の方法により測定した。マクファーランドNo. 3に相当する菌懸濁液の1 μ L(10^6 cells)をMIC2000イノキュレーター(ダイナテック)を用いて, マイクロプレート内の滅菌水で2倍希釈系列に調製した消毒薬の希釈液100 μ Lに接種した。室温において, 一定時間(1, 5, 10, 30, 60, 180分間と24時間), 菌を薬剤に接触させた後, その混液1 μ L(10^4 cells)をMIC2000イノキュレーターを用いて, 残留する消毒薬を不活化するため, ただちに中和剤100 μ Lに接種した。その1 μ L(10^2 cells)をMueller-Hinton培地(ディフコ)100 μ Lに接種した。35℃で18~24時間培養後, 菌の生育を判定し, 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MBC(μ g/mL)とした。

4. DNA操作

枯草菌の形質転換はコンピテントセル法により行った¹⁰⁾。黄色ブドウ球菌の形質転換はエレクトロポレーション法により行った¹⁰⁾。黄色ブドウ球菌の伝達株は接

合伝達法により作製した¹¹⁾。*qacA* 遺伝子と*smr* 遺伝子の検出を行ったpolymerase chain reaction法は以前, Noquchiら⁴⁾が示した方法により行った。*qacA* 遺伝子検出プライマーは5'-GCAGAAAGTGCAGAGTTTCG(構造遺伝子内の310番目の塩基→328番目の塩基にアニーリングするように設計した)と5'-CCAGTCCAATCATGCCTG(670→653)を用いた⁵⁾。*smr* 遺伝子検出プライマーは5'-GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA(25→48)と5'-GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT(219→195)を用いた⁶⁾。

結 果

1. 最小発育阻止濃度(MIC)の測定

黄色ブドウ球菌の感受性株と耐性遺伝子を保有する耐性株において, 6種の消毒薬に対する感受性を抗菌薬の測定法であるMICで測定した(Table 2)。色素系薬剤のAFとEBにおいては, 耐性遺伝子を保有する耐性株に対するMICは感受性株よりも明らかに高い値を示した。しかし, ADHとCHGにおいては, 耐性株に対するMICの僅かな上昇が観察されたが, 感受性に明らかな差は認められなかった。また, *qacA* 遺伝子を保有する消毒薬耐性株3株に対するMICは, すべての消毒薬において, 感受性株よりも高い値を示した。しかし, それらのMIC値はそれぞれの消毒薬の奨励使用濃度の約1/3-1/2500ときわめて低い値であった。

2. 中和剤の有効性の検討

MBCの測定では薬剤と細菌の接触時間(消毒時間)後に残留する薬剤がしばしば問題となる。そこで, MBC測定法によって正しく消毒時間と薬剤濃度を評価するため, 増殖培地に残留する薬剤を不活化する中和剤の有効性を検討した。黄色ブドウ球菌の薬剤感受性標準菌株JCM2874を用い, BTC, ADHおよびCHGのMBCを中和剤を用いずにMBCを測定する方法(従来法)と中和剤

Table 2. MIC of Antiseptics for *S. aureus*.

Strain	Plasmid	Resistance gene	AF	EB	BKC	BTC	ADH	CHG
RN2677	none	none	4	2	1	0.5	16	1
	pTZts77	<i>qacA</i>	512	256	8	8	32	2
	pTZ1311-ts99	<i>smr</i>	32	64	4	4	16	1
TP171	none	<i>norA</i>	512	64	4	4	16	2
	pTZts77	<i>norA</i> and <i>qacA</i>	512	256	8	8	32	2
	pTZ1311-ts99	<i>norA</i> and <i>smr</i>	512	128	4	4	16	2
TS77	pTZts77	<i>qacA</i>	512	256	8	8	32	2
TS99	pTZts99	<i>smr</i>	512	512	8	8	32	1
JCM2874	none	none	32	8	2	2	32	2

AF, Acriflavine; EB, Ethidium bromide; BKC, Benzalkonium chloride; BTC, Benzethonium chloride; ADH, Alkyldiaminoethylglycine hydrochloride; CHG, Chlorhexidine gluconate.

Unit: μ g/mL

を用いて MBC を測定する方法(本法)で測定し、それぞれの MBC を比較した(Table 3)。その結果、短時間(1分間)での消毒時間において、本法は従来法よりも約4倍の差が認められた。また、実験結果として示さないが、本法は、少なくとも5回の測定で、従来法よりも再現性が認められた。したがって、中和剤の使用は MBC の測定値の再現性を高め、消毒時間ごとにおける MBC の測定には中和剤の使用が有用であることが示された。

3. 最小殺菌濃度の測定

qacA, *smr* および変異 *norA* 遺伝子を保有する耐性株と耐性遺伝子を保有しない感受性株の明瞭な感受性の差を示す測定条件を検討するため、本法を用いて、6種の消毒薬の消毒時間ごとの MBC を測定した。

1) 色素(AF: Table 4-1), (EB: Table 4-2)

MIC と同様に、感受性株と耐性株の感受性の差は、AF において16から64倍以上、EB において64から128倍以上と本法でも明瞭に認められた。一方、異なった消毒薬耐性遺伝子を保有する耐性株、TP171(*qacA*)と TP171(*smr*) において、MIC ではあまり差が認められなかった(Table 2)が、本法ではこれらの2株に対する180分間の消毒時間において、明らかな差が認められた。

2) 4級アンモニウム系(BKC: Table 4-3), (BTC: Table 4-4)

手指・洗浄消毒の奨励使用濃度はともに100-2000 μ g/mL である。耐性遺伝子を保有する株において、1分間の消毒時間における BKC および BTC の MBC はすべて 512 μ g/mL 以上であった。また、TP171(*qacA*)に対する60分間の消毒時間における MBC は256 μ g/mL で、最小奨励使用濃度(100 μ g/mL)以上の128 μ g/mL でも生存していた。

一方、浸漬消毒の奨励使用濃度はともに1000 μ g/mL (10分間)-500 μ g/mL (30分間)である。すべての被検菌株において、10分間の消毒時間における MBC は512 μ g/

mL 以下であり、また、30分間の消毒時間では256 μ g/mL 以下であった。

3) 両性界面活性剤(ADH: Table 4-5)

手指・洗浄消毒の奨励使用濃度は100-2000 μ g/mL である。すべての被検菌株において、1分間の消毒時間における MBC は256 μ g/mL 以上であった。また、*norA* 遺伝子に変異を持つ3株に対する5分間の消毒時間における MBC は256 μ g/mL で、最小奨励使用濃度(100 μ g/mL)以上の128 μ g/mL でも生存していた。

一方、浸漬消毒の奨励使用濃度は5000 μ g/mL (10分間)-500 μ g/mL (15分間)である。すべての被検菌株において、10分間の消毒時間における MBC は128 μ g/mL 以下であり、また、30分間の消毒時間では64 μ g/mL 以下であった。

4) ビグアナイド系(CHG: Table 4-6)

CHG の手指・洗浄消毒の奨励使用濃度は BKC, BTC や ADH よりも高く500-5000 μ g/mL である。また、浸漬消毒の奨励使用濃度は5000 μ g/mL (10分間)-1000 μ g/mL (30分間)である。すべての被検菌株に対する MBC は消毒時間に関係なく256 μ g/mL 以下であった。

考 察

本研究では感受性株と耐性遺伝子を保有する耐性株の感受性の差や消毒薬耐性遺伝子間の耐性レベルの差を明確にすることができる消毒効果測定法を開発した。本法を検定するために、まず初めに、黄色ブドウ球菌の消毒薬耐性を示す被検菌株を作製した。宿主ベクター系として確立されている RN2677株を宿主として用い、菌株の遺伝子的背景を統一した。市販されている消毒薬には薬剤の安定化のために緩衝剤などが添加されていたり、消毒効果の増強のために溶媒としてアルコール類が用いられている。また、成分濃度がロットや製薬会社によって、わずかであるが異なる場合がある。そこで、本研究では消毒薬本来の消毒効果を評価するため、使用消毒薬

Table 3. MBC of Antiseptics for *S. aureus* JCM2874.

Antiseptics	Neutralizer	MBC (μ g/mL) in the following time (min.)					
		1	5	10	30	60	180
BTC	-	50	12.5	6.25	3.13	3.13	3.13
	+	200	200	50	25	12.5	12.5
ADH	-	50	12.5	6.25	3.13	3.13	3.13
	+	>400	100	100	50	25	25
CHG	-	100	100	100	100	50	12.5
	+	400	200	200	100	50	25

BTC, Benzethonium chloride; ADH, Alkyldiaminoethylglycine hydrochloride; CHG, Chlorhexidine gluconate.

Table 4-1. MBC of Acriflavine for *S. aureus*.

Strain	Plasmid	Resistance gene	MBC ($\mu\text{g/mL}$) in the following time						
			min.						hr.
			1	5	10	30	60	180	24
RN2677	none	none	128	128	128	32	32	8	4
	pTZts77	<i>qacA</i>	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	2048	2048	64
	pTZ1311-ts99	<i>smr</i>	512	512	512	512	128	64	32
TP171	none	<i>norA</i>	≥ 2048	2048	2048	2048	1024	256	64
	pTZts77	<i>norA</i> & <i>qacA</i>	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	64
	pTZ1311-ts99	<i>norA</i> & <i>smr</i>	≥ 2048	2048	2048	2048	1024	256	64
TS77	pTZts77	<i>qacA</i>	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	64
TS99	pTZts99	<i>smr</i>	≥ 2048	≥ 2048	2048	1024	1024	128	64

Table 4-2. MBC of Ethidium Bromide for *S. aureus*.

Strain	Plasmid	Resistance gene	MBC ($\mu\text{g/mL}$) in the following time						
			min.						hr.
			1	5	10	30	60	180	24
RN2677	none	none	32	32	32	32	32	32	16
	pTZts77	<i>qacA</i>	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	4096	256
	pTZ1311-ts99	<i>smr</i>	1024	512	512	512	256	256	128
TP171	none	<i>norA</i>	2048	2048	2048	1024	1024	1024	64
	pTZts77	<i>norA</i> & <i>qacA</i>	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	512
	pTZ1311-ts99	<i>norA</i> & <i>smr</i>	2048	2048	2048	1024	1024	1024	256
TS77	pTZts77	<i>qacA</i>	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	1024
TS99	pTZts99	<i>smr</i>	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	4096	4096	1024	512

Table 4-3. MBC of Benzalkonium Chloride for *S. aureus*.

Strain	Plasmid	Resistance gene	MBC ($\mu\text{g/mL}$) in the following time						
			min.						hr.
			1	5	10	30	60	180	24
RN2677	none	none	128	128	64	64	64	32	16
	pTZts77	<i>qacA</i>	≥ 1024	256	256	128	128	128	64
	pTZ1311-ts99	<i>smr</i>	512	256	128	128	128	128	64
TP171	none	<i>norA</i>	512	128	128	128	128	128	64
	pTZts77	<i>norA</i> & <i>qacA</i>	1024	256	256	256	256	128	128
	pTZ1311-ts99	<i>norA</i> & <i>smr</i>	512	128	128	128	128	128	64
TS77	pTZts77	<i>qacA</i>	≥ 1024	256	256	256	128	128	128
TS99	pTZts99	<i>smr</i>	1024	512	128	128	128	128	128

の原末または原液を用いた。本法は以前に報告した消毒薬評価法⁸⁾(従来法)を基に開発した。しかし、従来法は薬剤が増殖培地へ持ち込まれ、消毒効果が持続化することが懸念されていた。薬剤の残留を防止するためにさまざまな消毒薬評価法^{1,2,13)}では中和剤を用いている。そこで、本法では、ヨーロッパの19の加盟国からなるヨーロッパ基準委員会が制定するヨーロッパ殺菌・消毒薬統

一規格¹⁾で奨励されている中和剤を用いて、消毒時間後の消毒薬を不活化する行程を導入した。中和剤の有用性の検討から、中和剤を用いることにより、消毒薬の増殖培地への持ち込みや細胞表面での残留性が少なくなり、再現性の高い結果が得られたと考えられた。また、本法はMBCを経時ごとに測定できるため、MIC法よりも消毒薬の種類だけでなく手指・洗浄および浸漬消毒などの

Table 4-4. MBC of Benzethonium Chloride for *S. aureus*.

			MBC (µg/mL) in the following time						
			min.						hr.
Strain	Plasmid	Resistance gene	1	5	10	30	60	180	24
RN2677	none	none	256	128	128	128	128	64	16
	pTZts77	<i>qacA</i>	2048	256	256	256	128	128	64
	pTZ1311-ts99	<i>smr</i>	1024	256	256	256	128	128	64
TP171	none	<i>norA</i>	512	256	128	128	128	64	64
	pTZts77	<i>norA</i> & <i>qacA</i>	2048	256	256	256	256	128	128
	pTZ1311-ts99	<i>norA</i> & <i>smr</i>	1024	256	256	256	128	128	128
TS77	pTZts77	<i>qacA</i>	2048	512	512	128	128	128	64
TS99	pTZts99	<i>smr</i>	2048	512	512	128	128	128	128

Table 4-5. MBC of Alkyldiaminoethylglycine Hydrochloride for *S. aureus*.

			MBC (μg/mL) in the following time						
			min.						hr.
Strain	Plasmid	Resistance gene	1	5	10	30	60	180	24
RN2677	none	none	256	128	64	32	16	16	8
	pTZts77	<i>qacA</i>	256	128	64	64	32	32	16
	pTZ1311-ts99	<i>smr</i>	256	128	64	64	32	32	16
TP171	none	<i>norA</i>	512	256	128	64	64	32	32
	pTZts77	<i>norA</i> & <i>qacA</i>	512	256	128	64	64	32	32
	pTZ1311-ts99	<i>norA</i> & <i>smr</i>	512	256	128	64	64	32	32
TS77	pTZts77	<i>qacA</i>	256	128	128	64	64	64	32
TS99	pTZts99	<i>smr</i>	512	128	8	8	8	8	8

Table 4-6. MBC of Chlorhexidine Digluconate for *S. aureus*.

			MBC (μg/mL) in the following time						
			min.						hr.
Strain	Plasmid	Resistance gene	1	5	10	30	60	180	24
RN2677	none	none	64	32	32	16	8	4	4
	pTZts77	<i>qacA</i>	256	64	64	32	16	16	8
	pTZ1311-ts99	<i>smr</i>	64	64	64	32	8	8	8
TP171	none	<i>norA</i>	128	128	128	8	8	8	8
	pTZts77	<i>norA</i> & <i>qacA</i>	128	128	128	8	8	8	8
	pTZ1311-ts99	<i>norA</i> & <i>smr</i>	128	128	128	8	8	8	8
TS77	pTZts77	<i>qacA</i>	256	64	64	16	16	16	4
TS99	pTZts99	<i>smr</i>	32	8	8	4	4	4	4

消毒方法も評価可能であり、臨床的な消毒法の評価に対応した測定法であると考えられた。

qacA, *smr* および変異 *norA* 遺伝子を保有する耐性株と耐性遺伝子を保有しない感受性株に対する 6 種消毒薬の MBC を測定した。AF はアクリジン系の色素で以前は消毒薬として用いられていた(第 7 改正日本薬局方からは削除)。EB は発癌性が疑われ消毒薬として用いら

れていないが、現在では両色素とも *in vitro* における消毒薬耐性の指標として用いられている薬剤である。MBC の測定結果から、本法は感受性株と耐性株の感受性の差ばかりでなく、消毒薬耐性遺伝子間の耐性レベルの差も明確にすることができることが明らかになった。BKC と BTC は 4 級アンモニウム系の消毒薬であり、主な商品としてそれぞれオスバン(日本製薬株)、武田薬品工業

(株), ハイアミン(三共株)などがある。また, ADH は両性界面活性剤で陽イオンの殺菌力と陰イオンの洗浄力を併せ持つ消毒薬である。テゴ-51(株アズエール)として市販されている。いずれも, 手指, 皮膚, 粘膜の洗浄消毒, 医療器具, リネンなどの浸漬消毒に用いられる。手指消毒はガイドラインによると3分間の消毒時間が設定されているが, 実際には30秒程度である。MBCの測定結果から, 手指・洗浄消毒において, BKC, BTC および ADH の最小奨励使用濃度(100 μ g/mL)で5分間以上の消毒時間でも消毒薬耐性遺伝子を保有する耐性黄色ブドウ球菌が生存していることが初めて観察された。これは, ガイドラインに従った消毒時間でも消毒薬耐性 MRSA の殺菌は不十分であることを示唆している。一方, 浸漬消毒においては感受性株も耐性株も現行の奨励使用濃度で十分な殺菌効果が得られると考えられた。CHG はビグアナイド系の消毒薬で, BKC, BTC および ADH と同様に, 手指, 皮膚, 粘膜の洗浄消毒, 医療器具, リネンなどの浸漬消毒に用いられる。主な商品としてヒビテン(アストラゼネカ株)などがある。MBCの測定結果から, 手指・洗浄消毒および浸漬消毒においても現行の奨励使用濃度で消毒薬耐性黄色ブドウ球菌を殺菌できることが考えられた。この原因として, 黄色ブドウ球菌に対する BKC, BTC および ADH の MIC は CHG より高いにもかかわらず, 最小奨励使用濃度が CHG よりも低く設定されていることと, 消毒薬耐性株は BKC, BTC および ADH において耐性の上昇レベルが高いが, CHG においては耐性の上昇レベルが低いことが考えられた。現在の手指・洗浄消毒の最小奨励使用濃度では BKC と BTC において180分間以上, ADH において10分間以上の消毒時間が必要である。そのため, 現行の濃度は殺菌可能な限界の値であることが示された。奨励使用濃度が現行のままであると, 今後さらに消毒薬耐性黄色ブドウ球菌が広く伝播することが考えられる。しかし, わが国では消毒薬殺菌効果の標準測定法が未だ定められていない。辻ら²⁾, 国定ら¹³⁾の測定法やヨーロッパ殺菌・消毒薬統一規格¹⁾などが知られているが, 本法を含めたこれらの方法は接種菌量, 中和剤の組成(サポニン, トリプトンおよび塩化ナトリウムを含有する中和剤と含有しない中和剤), 中和行程および判定基準などの違いがある。それぞれの方法を比較, 改良し, 標準法を確立した上で, 消毒薬の使用濃度の改正が必要であると考えられた。

本研究は, 消毒薬の使用において, 使用濃度, 用法および薬剤管理に十分な注意が必要であることを強く示している。本研究では黄色ブドウ球菌において, 現行の消毒薬の使用濃度, 消毒時間と消毒薬耐性遺伝子の相関性

を調べたが, 高齢化社会に伴い易感染性患者が増加し, 黄色ブドウ球菌ばかりでなくさまざまな細菌の感染が危惧されている。そのため, さまざまな菌種, その他の消毒薬についても消毒薬の使用濃度, 消毒時間と消毒薬耐性遺伝子の相関性を調べる必要がある。

引用文献

- 1) 梶浦工, 欧州の殺菌・消毒薬効力評価試験法について, 防菌防黴誌, **28**, 327-332(2000).
- 2) 辻明良, 消毒薬耐性とその問題点, *Infection Control*, **10**, 130-136(2001).
- 3) 日本病院薬剤師会編集, “院内における消毒剤の使用指針-改訂版”, 薬事日報社, 東京, 1994, pp.15-29.
- 4) N. Noguchi, M. Hase, M. Kitta, M. Sasatsu, K. Deguchi, M. Kono, Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **172**, 247-253(1999).
- 5) D.A. Rouch, D.S. Cram, D. DiBerardino, T.G. Littlejohn, R.A. Skurray, Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline and sugar-transport proteins, *Mol. Microbiol.*, **4**, 2051-2062(1990).
- 6) L. Grinius, G. Dreguniene, E.B. Goldberg, C.H. Liao, S.J. Projan, A Staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family, *Plasmid*, **27**, 119-129(1992).
- 7) H. Yoshida, M. Bogaki, S. Nakamura, K. Ubukata, M. Konno, Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones, *J. Bacteriol.*, **172**, 6942-6949(1990).
- 8) 野口雅久, 成井浩二, 笹津備規, 市販消毒薬に対する細菌の感受性, 医学と薬学, **46**, 195-202(2001).
- 9) N. Noguchi, M. Tamura, K. Narui, K. Wakasugi, M. Sasatsu, Frequency and genetic characterization of multidrug-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* after selection with individual antiseptics and fluoroquinolones, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1129-1132(2002).
- 10) N. Noguchi, Y. Tamura, J. Katayama, K. Narui, Expression of the *mphB* gene for macrolide 2'-phosphotransferase II from *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **172**, 247-253(1998).
- 11) J. Katayama, H. Okada, K. O'hara, N. Noguchi, Isolation and characterization of two plasmids that mediate macrolide resistance in *Escherichia coli*: transferability and molecular properties, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 326-329(1998).

- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard M7-A5, 5th ed., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 1997, pp. 1-29.
- 13) 国定孝夫, 山田恵子, 織田志保美, 折笠義則, グラム陰性菌に対する各種消毒剤の *In vitro* 殺菌効果, 環境感染, **15**, 156-162(2000).