

調剤用水の微生物学的検討^{*1}

足立タツ子, 澤村佳子, 松岡加津子, 高浜清子, 尾家重治, 神代 昭

山口大学医学部附属病院薬剤部^{*2}Microbial Study on Water Used for Dispensing^{*1}

TATSUKO ADACHI, YOSHIKO SAWAMURA, KAZUKO MATSUOKA

KIYOKO TAKAHAMA, SHIGEHARU OIE, and AKIRA KOSHIRO

Department of Pharmacy, Yamaguchi University Hospital^{*2}

(Received September, 11, 1986)

Microbial study on six kinds of waters used for dispensing was carried out by challenging five kinds of microbes to each water respectively. Waters used were fresh tap water, dechlorinated tap water and fresh purified water with or without 0.05% ethyl p-hydroxybenzoate (paraben). And microbes were *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* and *A. niger*. Fresh tap water was found to be effective against three microbes but only transiently effective against *P. aeruginosa* and none against *A. niger*.

Additive effects of paraben to both fresh tap water and dechlorinated tap water were not observed, especially antimicrobial activity of fresh tap water against *C. albicans* was markedly reduced.

On the other hand, additive effect of paraben was confirmed with fresh purified water and no chemical reaction, such as oxydation or ionic reaction due to free residual chlorine, was occurred. From our microbial study and chemical standpoint, fresh purified water and sterilized purified water were more suitable for dispensing use than fresh tap water.

Keywords—water used for dispensing; tap water; dechlorinated tap water; purified water; microbial contamination; ethyl p-hydroxybenzoate; free residual chlorine

はじめに

内用液剤の調剤には新鮮な精製水又は常水を、また製剤には精製水を用いることが日局及び調剤指針(日本薬剤師会編)に記載されている。しかし、内用液剤の調剤または製剤時、さらには交付後に微生物汚染を受けることを予想し、定量的な検討を行った例はほとんど見あらず不明なままに残されている。そこで著者らは、まず調剤用水(以下用水と略す)中の微生物動態を検討するために6種のモデルを作り、代表的な5種の微生物を選んでチャレンジテストを行った。各種用水中、5種の菌株の生菌数変化が用水の種類及び保存剤の添加の有無によって、どのように影響されるかを検討し、望ましい用

水選択の資料を得ようとした。

実験の部

1. 使用菌株

Escherichia coli NIHJ JC-2, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3919, *Staphylococcus aureus* 209P, *Candida albicans* IFO 1594 及び *Aspergillus niger* IFO 4407 の5種類の標準菌株を用いた。これらは財団法人発酵化学研究所より購入した。

2. 使用用水

本実験に使用する用水は、その目的上試験菌をチャレンジする直前まで無菌であることが要求されるので、それぞれ以下に示すように処理したものをを用いたが、本文中における用水の名称には、滅菌又は無菌の文字を冠しなかった。

(1) 水道水

水道水をメンブランフィルター(0.22 μ m)でろ過し、

^{*1} 本報は第51回九州山口薬学大会(嬉野, 1985年10月)で発表。

^{*2} 山口県宇部市 小串 1144; 1144, Kogushi, Ube-shi, Yamaguchi, 755 Japan

含まれる可能性のある一般細菌を除菌した。なお、水道水は日局常水の規格に適合している。

(2) 脱塩素水道水

水道水を121°, 20分滅菌して脱塩素した。完全に塩素が除去されていることは、DPD 法¹⁾によって確認した。

(3) 精製水

市販の日局滅菌精製水（吉田製薬）をそのまま用いた。

(4) パラベン添加水道水

水道水(1)にエチルパラベンを0.05%の濃度に添加した。

(5) パラベン添加脱塩素水道水

脱塩素水道水(2)にエチルパラベンを0.05%の濃度に添加した。

(6) パラベン添加製精水

精製水(3)にエチルパラベンを0.05%の濃度に添加した。

3. 使用培地

増菌用培地として *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* には Trypticase soy agar (BBL) を, *C. albicans*, *A. niger* には Sabouraud's agar (栄研化学) をそれぞれ用いた。

生菌数測定培地として *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* には SCDLP 寒天培地 (栄研化学) を, *C. albicans*, *A. niger* には GPLP 寒天培地 (大五栄養) を用いた。SCDLP 寒天培地及び GPLP 寒天培地はパラベン類の不活化剤として0.7%Tween®80と0.1% lecitin をそれぞれ含んでいる。

4. 試験菌の調製

E. coli, *P. aeruginosa*, *S. aureus* は37°, 18~24時間培養, *C. albicans* は30°, 48時間培養の菌体を白金耳でかき取り, 約10⁸個/mlの菌液を生理食塩水で調製した。また, *A. niger* は25°, 7日間培養後白金耳で菌体をかき取り, 生理食塩水に懸濁した後, 滅菌ガーゼでろ

過し約10⁷個/mlの *A. niger* の孢子懸濁液を調製した。

5. 生菌数の測定

2.にあげた6種の用水のそれぞれ100mlに, 4.で調製した4種の菌液または *A. niger* の孢子懸濁液のうちいずれか1種を, それぞれ1ml加えて合計30種の試験液を調製した。試験液は25°で28日間インキュベートし, 直後, 6, 24, 48時間及び7, 14, 28日後に生菌数を平板培養法²⁾で測定した。すなわち *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* はSCDLP 寒天培地で30°, 24~72時間培養, *C. albicans* はGPLP 寒天培地で30°, 48~72時間培養, *A. niger* はGPLP 寒天培地で25°, 48~72時間培養した。実験は3回くり返し, その平均値をもって測定値とした。

結 果

1. 水道水中の各菌株生菌数の変化

E. coli, *S. aureus* 及び *C. albicans* の3株は, 6時間後には完全に死滅しそのまま28日まで継続した。しかし *P. aeruginosa* はいったん減少したが24時間後に再び増殖を開始し, 7日後には約10⁶個/mlと実験開始時の菌数にまで回復した。*A. niger* はほとんど生菌数に変化を認めなかった (Table 1)。

2. 脱塩素水道水中の各菌株生菌数の変化

水道水中の有効塩素の抗菌力が消失した状態を想定して, 121°, 20分高圧蒸気滅菌を行って脱塩素した。*E. coli* は緩徐な減少を示し, また *S. aureus* も緩徐な死滅を示した。しかし *P. aeruginosa* は28日間全く生菌数の変化は認められなかった。2種の真菌類 *C. albicans* 及び *A. niger* も同様にほとんど生菌数の減少は認められなかった (Table 2)。

3. 精製水中の各菌株生菌数の変化

E. coli, *S. aureus*, *C. albicans* 及び *A. niger* の4株は Table 2 の脱塩素水道水と同様の傾向を示したが, *P. aeruginosa* は徐々に減少した (Table 3)。

Table 1. Survival of Five Microbes in Membrane Filtered Tap Water at 25°C (log₁₀ viable count • ml⁻¹)

Microbe	0	6hr	Contact Time				
			24hr	48hr	7day	14day	28day
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	6.05	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
<i>S. aureus</i> 209P	5.77	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3919	5.89	<1.00	2.17	3.70	6.11	6.08	5.95
<i>C. albicans</i> IFO 1594	6.11	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
<i>A. niger</i> IFO 4407	5.01	5.04	5.00	4.87	4.69	4.53	4.48

Table 2. Survival of Five Microbes in Sterilized Dechlorinated Tap Water (121°C, 20') at 25°C ($\log_{10}$ viable count $\cdot$ ml $^{-1}$)

Microbe	0	6hr	Contact Time		7day	14day	28day
			24hr	48hr			
<i>E.coli</i> NIHJ JC-2	6.22	6.08	6.02	5.80	5.11	4.80	2.52
<i>S.aureus</i> 209P	5.77	5.70	5.26	4.54	<1.00	<1.00	<1.00
<i>P.aeruginosa</i> IFO 3919	5.85	5.78	6.01	6.01	5.77	5.37	5.34
<i>C.albicans</i> IFO 1594	5.94	5.33	5.24	5.15	5.26	5.16	5.17
<i>A.niger</i> IFO 4407	5.01	5.19	5.07	5.00	4.93	5.04	4.68

Table 3. Survival of Five Microbes in Sterilized Purified Water at 25°C ($\log_{10}$ viable count $\cdot$ ml $^{-1}$)

Microbe	0	6hr	Contact Time		7day	14day	28day
			24hr	48hr			
<i>E.coli</i> NIHJ JC-2	6.03	5.97	5.91	5.55	4.70	3.93	3.18
<i>S.aureus</i> 209P	5.77	5.53	5.12	4.57	<1.00	<1.00	<1.00
<i>P.aeruginosa</i> IFO 3919	5.89	5.64	5.20	4.69	4.52	4.01	3.37
<i>C.albicans</i> IFO 1594	5.94	5.29	5.28	5.36	5.34	5.32	5.34
<i>A.niger</i> IFO 4407	5.01	5.08	5.03	5.07	5.12	4.90	5.02

Table 4. Survival of Five Microbes in Membrane Filtered Tap Water containing Ethylparaben (0.05%) at 25°C ($\log_{10}$ viable count $\cdot$ ml $^{-1}$)

Microbe	0	6hr	Contact Time		7day	14day	28day
			24hr	48hr			
<i>E.coli</i> NIHJ JC-2	6.05	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
<i>S.aureus</i> 209P	5.77	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
<i>P.aeruginosa</i> IFO 3919	5.89	<1.00	<1.00	<1.00	4.74	5.71	4.98
<i>C.albicans</i> IFO 1594	6.11	5.26	5.26	5.27	4.98	4.95	4.85
<i>A.niger</i> IFO 4407	5.01	5.06	4.98	4.68	4.50	3.66	3.50

4. パラベン添加水道水中の各菌株生菌数の変化

水道水中で認められた *C. albicans* に対する用水の抗菌効果は、パラベンを添加したにもかかわらず消失した。しかし、*E. coli*, *S. aureus* に対する抗菌力は水道水の場合と変わらなかった。一方、*P. aeruginosa* は48時間目まで生菌数は認められなかったが、7日後には増殖が認められた (Table 4, Fig. 1)。

そこで、水道水中で認められた *C. albicans* に対する用水の抗菌効果が、パラベン添加によって消失した原因を検討した。パラベン添加水道水中の遊離残留塩素をDPD法によって測定すると、パラベン添加前0.55mg/lであった遊離残留塩素は、添加10分後には0.1mg/l以下

と著しい減少を示し、その後はほぼそのままの状態が継続した。水道法施行規則第16条第3号には「給水せんにおける水は遊離残留塩素を0.1mg/l以上保持する」という規定があるが、前記塩素濃度はこの規定を下まわった (Fig. 2)。

5. パラベン添加脱塩素水道水中の各菌株生菌数の変化

E. coli, *S. aureus* は7日後に死滅したが、48時間では接種菌量の1/1000 (0.1%) 以下には減少しなかった。*P. aeruginosa* は48時間までは生菌数の変化は認められず、7日以降徐々に減少した。2種の真菌も14日後に1/100 (1%) 以下までには減少せず、すべての試験菌株

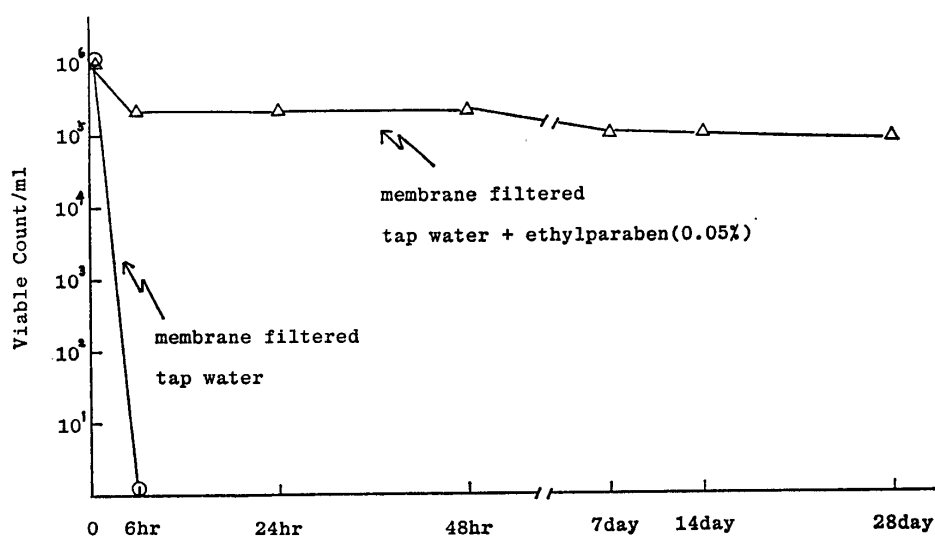


Fig. 1. Growth of *Candida albicans* in Membrane Filtered Tap Water with or without Ethylparaben (0.05%) at 25°C

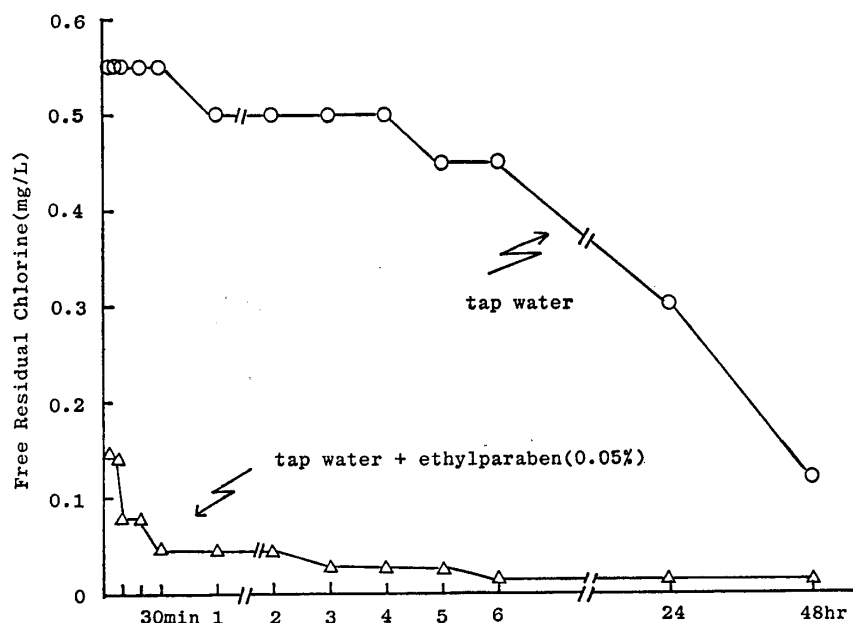


Fig. 2. Concentration of Free Residual Chlorine in Tap Water with or without Ethylparaben at 25°C

に対してパラベンの抗菌力発現は遅かった (Table 5).

6. パラベン添加精製水中の各菌株生菌数の変化

E. coli, *S. aureus* は 48 時間後に接種菌量の 0.01% 以下, *P. aeruginosa* は約 0.1% 以下, また 2 種の真菌 *C. albicans* 及び *A. niger* も 14 日後に約 1% 以下となった. このように精製水中ではパラベンの抗菌力は十分に発揮された (Table 6).

考 察

水道水, 脱塩素水道水, 精製水及び前 3 者それぞれに

エチルパラベンを 0.05% 濃度になるように添加した 6 種の用水モデルに, 5 種の微生物を別々にチャレンジしてその動態を検討した. これらの水の特徴は次の①~③で示される. すなわち, ① 水道水は Ca^{++} , Mg^{++} 及び窒素分など細菌の栄養分や, 抗菌力を示す残留塩素を含む; ② 脱塩素水道水は栄養分を含むが残留塩素を含まない; ③ 精製水は栄養分をほとんど含まないし残留塩素も含まない. したがって本実験では, パラベン添加又は非添加の用水中での微生物の動態と栄養分及び残留塩素の影響を調べたことになる.

Table 5. Survival of Five Microbes in Sterilized Dechlorinated Tap Water (121°C, 20') containing Ethylparaben (0.05%) at 25°C ($\log_{10}$ viable count $\cdot$ ml $^{-1}$)

Microbe	0	6hr	Contact Time				
			24hr	48hr	7day	14day	28day
<i>E.coli</i> NIHJ JC-2	6.22	6.10	5.69	4.67	<1.00	<1.00	<1.00
<i>S.aureus</i> 209P	5.77	5.28	4.88	2.93	<1.00	<1.00	<1.00
<i>P.aeruginosa</i> IFO 3919	5.85	5.77	5.69	5.36	4.30	4.26	3.59
<i>C.albicans</i> IFO 1594	5.94	5.35	5.38	5.21	5.19	4.65	4.38
<i>A.niger</i> IFO 4407	5.01	5.08	5.10	4.96	4.73	4.66	4.54

Table 6. Survival of Five Microbes in Sterilized Purified Water containing Ethylparaben (0.05%) at 25°C ($\log_{10}$ viable count $\cdot$ ml $^{-1}$)

Microbe	0	6hr	Contact Time				
			24hr	48hr	7day	14day	28day
<i>E.coli</i> NIHJ JC-2	6.03	5.83	4.82	1.52	<1.00	<1.00	<1.00
<i>S.aureus</i> 209P	5.77	5.17	3.22	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
<i>P.aeruginosa</i> IFO 3919	5.85	3.93	3.43	2.82	<1.00	<1.00	<1.00
<i>C.albicans</i> IFO 1594	5.94	5.31	5.31	5.33	4.71	3.90	<1.00
<i>A.niger</i> IFO 4407	5.01	5.04	4.92	4.84	4.34	3.00	2.50

まずパラベンを加えない3種の用水中での微生物の動態では、*P. aeruginosa*, *A. niger*を除く3種の菌に対し、水道水が最も強い菌の抑制を示した。脱塩素水道水が抗菌効果を示さなかったことから、水道水の強い抗菌力は残留塩素によると思われる。しかし、*P. aeruginosa*は水道水中で6時間後に急速な減少を示したが、その後徐々に増殖して7日後には実験開始時の菌数に回復した。本菌は水中でよく増殖⁸⁾、かつ消毒剤などのストレスに抵抗性を示すことがすでに報告されている⁴⁾。したがってこの増殖は、チャレンジした*P. aeruginosa*の大部分が残留塩素の抗菌効果により死滅したにもかかわらず、一部生き残った抵抗性菌が残留塩素の消失とともに増殖した結果と考えられる。一方、本菌は脱塩素水道水中では菌数是不変であり、精製水中では緩徐な減少を示したが、これらの違いは栄養分の有無によると推定される。

このように、水道水はその残留塩素によって多くの菌に対して抗菌力を示すという利点はあるが、微量の栄養分を含むため、*P. aeruginosa*のように残留塩素に抵抗性を示す菌に対しては増殖を許すことがある。

次に、パラベンを添加した3種の用水中での微生物動態は次のようであった。まずパラベン添加水道水は、

E. coli 及び *S. aureus* に対して十分な抗菌効果を示したが、*P. aeruginosa*は7日後より増殖に転じ、*C. albicans* 及び *A. niger*に対しては緩徐な抗菌効果を示すのみであった。また、パラベン添加の脱塩素水道水では、5種の菌すべてが緩徐な減少を示した。しかしこれら2種のパラベン添加用水は、英国薬局方 (BP) の内用液剤の防腐力の規定を満たさなかった。すなわち BP(1980)には「チャレンジした細菌 10^6 個/ml を48時間で1/1000以下とし、以後増殖を認めないこと、また真菌 10^6 個/ml を14日目までに1/100以下にし、以後増殖を認めないこと」と規定されている。一方、パラベン添加精製水では、5種の菌はかなりすみやかな減少を示し、BPの規定を満たしていた。

パラベン類は毒性が低く、また広範囲の pH において有効なことから、医薬品や食品などの分野で広く用いられている。しかし、本剤は著者らが示したように、緑膿菌などのグラム陰性桿菌に対して抗菌力が劣るという欠点がある⁹⁾。本実験では、病院薬局で内用液剤調剤時に繁用されているエチルパラベン0.05%濃度を用いたが、水道水及び脱塩素水道水中では十分な抗菌効果が得られなかった。したがって、水道水にエチルパラベンを添加する場合は、その濃度を増す必要がある。しかし、パラ

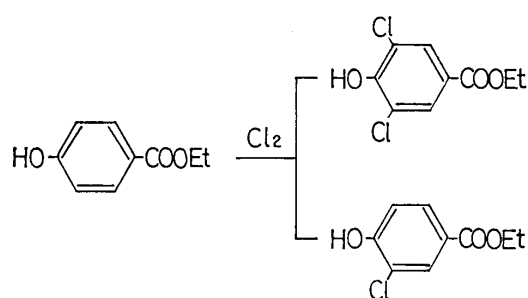


Chart. Speculative Substitution Mechanism of Chlorine to Ethyl p-hydroxybenzoate

ベン濃度を増すと結晶が析出しやすくなる。抗菌力増強とパラベンの水溶性の観点から、各種パラベン類の共融混合物が示されているので⁶⁾、水道水中での有効な組み合わせについて今後検討したい。

次に、Fig.1 及び 2 に示された水道水へのパラベン添加による *C. albicans* に対する抗菌力の低下について考察する。著者ら⁷⁾は、先にエチルパラベンを内服用ルゴール液に添加した際、脱色と共にエチルパラベンにヨウ素原子が置換した ethyl 4-hydroxy-3, 5-diiodobenzoate 及び ethyl 4-hydroxy-3-iodo-benzoate が生成したことを報告した。今回観測した塩素量の低下も全く同様に、Chart に示したようなパラベンの塩素置換の可能性を推測させる。しかし、ルゴール液との反応において見られた結晶の析出や色調などの外観変化は全く認められなかった。

小野寺ら⁸⁾は、フェノールに対する遊離残留塩素の作用を広汎な pH の水溶液中で検討している。すなわち、pH 7 ではフェノールのオルト及びパラ位の塩素置換が急速に進行し、一時的に 2, 4, 6-trichlorophenol が高率に生成することを、ECD 付ガスクロで確認しているが、その後酸化分解が進行するため生成物の単離は行っていない。著者らの実験条件は小野寺らに近い上に、エチルパラベンもフェノール系誘導体であることから、同様の塩素化及び酸化が進行するとすれば、塩素置換体を安定に単離することは困難かも知れない。

このように、塩素がパラベンと反応して、パラベンの塩素置換体を生じると仮定すると、塩素全量と反応するパラベン量は当量的にわずかで抗菌力に対する影響はほとんど考えられない。このこと及び Table 1~3 及び 5, 6 の結果から、パラベン添加水道水の *C. albicans* に対する抗菌力の消失は、遊離残留塩素の減少に大きく関係

していることが明らかとなった。

結 論

保存剤としてエチルパラベンを添加しない場合には、新鮮な水道水は遊離残留塩素による抗菌効果が明らかに認められるので、微生物学的にはすぐれていると考える。さらに使用の便利さからも水道水はまざっている。

しかしわが国における液剤調剤の実態を考えてみると、市販内用液剤を原液のまま交付する場合は割合に少なく、2 種以上の液剤又は薬剤を混合して水を加え、溶解あるいは懸濁して交付する例が圧倒的に多い。この際配合する市販液剤には保存剤としてパラベン類が最もよく用いられていること、また、病院薬局においてもパラベン類の添加が行われることを考えると、水道水の場合には前述のように残留塩素の抗菌効果が消失する恐れがある。また、遊離残留塩素によるイオン反応や酸化反応などの化学反応を起こすという不利な点もある。

一方、精製水はパラベン添加の効果がすみやかに抗菌性に反映される上に、配合される薬剤との相互作用についても全く顧慮する必要がない。使用上の便利さについては水道水に劣るが、この短所も工夫次第で改善可能である。以上の理由から、内用液剤の調剤用水として著者らは滅菌精製水又は新鮮な精製水が最もすぐれていると判断する。ただし、イオン交換法によって製造した新鮮な精製水を用いる場合は、イオン交換樹脂の微生物汚染に十分注意しなければならない。

文 献

- 1) 日本薬学会編：「衛生試験法注解」，金原出版，東京，1980，p.749.
- 2) 医科学研究所学友会編：「細菌学実習提要」，改訂 5 版，丸善，東京，1976，p.171.
- 3) 尾家重治，弘長恭三，神代 昭：日本医事新報，No.3027，48 (1981).
- 4) W. B. Hugo and A. D. Russell ed.：「Pharmaceutical Microbiology」，3rd ed.，Blackwell Scientific Publications，London，1983，p.268.
- 5) 神代 昭，尾家重治：薬剤学，41，119 (1981).
- 6) 西垣貞男：「調剤学—基礎と応用—」，南山堂，東京，1975，p.140，302.
- 7) 神代 昭，山本 久子，楠森 浩子：薬剤学，33，154 (1973).
- 8) 小野寺祐夫，加藤淳子，掃部陽子，石倉俊治：衛生化学，23，331 (1977).