Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

蛋白共存下における消毒剤の殺菌効果に関する基礎的検討*1

石井良和，小笠原正良，市川正孝*2，入船賢司，
菅原和行，山口恵三，臼井敏明*3
長崎大学医学部附属病院薬剤部*2
長崎大学医学部附属病院検査部*3

Basic Study on Bactericidal Activities of Disinfectants in the Presence of Human Blood Albumin*1

YOSHIKAZU ISHII, MASAYOSHI OGASAWARA, MASATAKA ICHIKAWA*2,
KENJI IRIFUNE, KAZUYUKI SUGAHARA, KEIZO YAMAGUCHI, TOSHIAKI USUI*3
Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital*2
Department of Clinical Laboratory, Nagasaki University Hospital*3

(Received August 10, 1987)

The bactericidal activities of 4 disinfectants (chlorhexidine gluconate, benzethonium chloride, benzalkonium chloride and povidone iodine) and 2 antibiotics (polymyxin B and amphotericin B) were evaluated for organisms isolated clinically from urine (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*), using *E. Coli* NIHJ JC-2 as a standard strain. Povidone-iodine was remarkably effective for all strains, but chlorhexidine gluconate was slightly effective.

The bactericidal activities of potassium permanganate, benzalkonium chloride, chlorhexidine gluconate, alkyldiaminoethylglycine hydrochloride, acrinol, povidone iodine and polymyxin B against *E. coli* NIHJ JC-2 were also investigated in the presence of human blood albumin. Povidone-iodine, potassium permanganate, benzalkonium chloride, alkyldiaminoethylglycine hydrochloride, acrinol and polymyxin B had a tendency for decreasing in the bactericidal activity. On the other hand, the bactericidal activities of benzethonium chloride and chlorhexidine gluconate were not changed. Relating to histopathological changes of the rat urinary bladder, interstitial edema was observed when the rat was treated with chlorhexidine gluconate, povidone-iodine or alkyldiaminoethylglycin hydrochloride, but there was little change in the case of treatment with benzalkonium chloride.

Keywords——disinfectant; surface active agents; bactericidal activity; treatment of human blood albumin; histopathological change; urinary bladder

はじめに

最近の抗生物質の開発により化学療法は非常に進歩してきた．しかし一方では，抗生物質に対する耐性菌の出現等も惹起し，その結果，臨床材料からの分離菌の種類にも変化がみられ，宿主側の変化とも相まって感染症自体大きく変貌してきたように思われる．特に病院内では感染防御機能が低下した状態にある患者（immunocompromised host）が増加の傾向を示し，最近これに発症する院内感染症が大きな問題となっている．その起炎菌としては，院内に幅広く分布している弱毒菌の関与が注目されている．院内感染を予防するための一手段として，院内環境，使用器具，手指等に分布あるいは付着している細菌に対する消毒がきわめて重要となっており，消毒剤の殺菌効果やその使用法についての報告はすでに数多くなされている[1~9,11,12]．

*1 本剤の一部は日本薬学会第106年会（千葉，1986年）にて発表．

*2,3 長崎市坂本町7－1；7-1, Sakamoto-machi, Nagasaki, 852 Japan

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

今回著者らは，尿路感染症やその予防を目的として膀胱洗浄に使用される消毒剤や抗生物質の殺菌効果について，蛋白非共存下ならびに共存下で比較するとともに，消毒剤による組織傷害性についても若干検討を加え興味ある知見が得られたので報告する．

材料および方法

1. 各種消毒剤と抗菌剤の殺菌力についての検討

尿路由来の臨床分離株，*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, および *C. albicans* を対象とするとともに，標準菌株として *E. coli* NIHJ JC-2 を用いた．消毒剤としてはグルコン酸クロルヘキシジン(0.01%, 0.02%, 0.04%)，アルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウム (0.0125%, 0.025%, 0.05%)，塩化ベンザルコニウム (0.0125%, 0.025%, 0.05%)，ポビドンヨード (0.01%, 0.02%, 0.04%) を，また，抗生物質としては硫酸ポリミキシンB (1000 U/ml, 2000U/ml, 4000 U/ml)，アムホテリシンB (0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4mg/ml) を用いた．

方法は供試菌株をブレインハートインフュージョンブロス (BHI) で一晩前培養後，これを新たな BHI を用いて 37°C で約4時間振とう培養した．これを 3500rpm で10～15分間遠心集菌し，この沈殿を生理食塩液に再浮遊し，菌量として約 10^9CFU/ml に相当するものを供試菌液とした．この 0.2ml を 1.8ml の各種消毒剤に接種し，15秒，30秒，1分，2分，5分，10分間作用させた後，その 10μl を新たな BHI 2ml に接種した．これを 37°C，48～72時間培養した後，菌の発育の有無を確認した．

2. 蛋白共存下での殺菌効果

標準菌株の *E. coli* NIHJ JC-2 を対象に，過去において膀胱粘膜に適応のあったものはその濃度：グルコン酸クロルヘキシジン(0.04%)，アルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウム (0.025%)，塩化ベンザルコニウム (0.025%)，また現在適応のある消毒剤はその濃度：ポビドンヨード(0.02%)，過マンガン酸カリウム(0.01%)，アクリノール(0.01%)，硫酸ポリミキシンB (2000U/ml) の殺菌効果を人血清アルブミンの存在下で検討し，非存在下での成績と比較した．

方法は，*E. coli* NIHJ JC-2 を BHI を用いて 37°C で約 10^8CFU/ml となるように振とう培養後，これを 3500rpm で10～15分間遠心集菌し，この沈殿を10^7CFU/ml となるように生理食塩液に再浮遊したものを供試菌液とした．人血清アルブミンの各希釈濃度 (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0 mg/ml) の溶液を作成し，この 5 ml に上記消毒剤の濃度の2倍に調製した各種消毒剤を等量添加し，直ちに UV/Visible Digital Spectrophotometer UVIDEC-40 (日本分光) を用い吸光度を測定した (ポビドンヨード：500nm，過マンガン酸カリウム：550nm，グルコン酸クロルヘキシジン，アルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウム，塩化ベンザルコニウム，アクリノール，硫酸ポリミキシンB：630nm)．また，この消毒剤と人血清アルブミンの混合溶液 1.8ml に，先に調製した供試菌液 0.2ml を接種した．接種1分後に吉村らの方法[6]に準じ，中和剤を用いて消毒剤の菌体に対する反応を停止し，スパイラルシステムを用いて生菌数を測定した．

また遊離ヨウ素量は，第十一改正日本薬局方のヨウ素定量法[10]に準じて測定した．

3. 組織傷害性についての検討

6週齢のウイスター系雄性ラットを用いてグルコン酸クロルヘキシジン (0.02%, 0.04%)，塩化ベンザルコニウム (0.025%, 0.05%)，塩酸アルキルジアミノエチルグリシン (0.02%, 0.04%)，ポビドンヨード (0.02%, 0.04%) の組織傷害性を検討した．

方法は，ラットをペントバルビタールで麻酔後開腹し，直接膀胱内に27G注射針付注射筒にて消毒剤を 1ml 注入した後，いったん腹壁を縫合した．2時間後に屠殺して膀胱を取り出し，ホルマリンで固定後，ヘマトキシリン・エオジン染色を施し，顕微鏡下で組織傷害の程度を観察した．

実 験 結 果

1. 各種消毒剤と抗菌剤の殺菌力についての検討

0.02%のグルコン酸クロルヘキシジンの殺菌効果は，作用時間2分以内では *P. aeruginosa*, *C. albicans* および *E. coli* NIHJ JC-2 に対してのみしか認められなかったが，0.04%の濃度では *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, および *E. coli* NIHJ JC-2 の各菌種に対して，作用時間1分以内で殺菌効果が認められた (Fig. 1-A)．0.0125%のアルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウムは作用時間10分以内で *P. aeruginosa*, *C. albicans* および *E. coli* NIHJ JC-2 に対して殺菌効果を認めた．また 0.025% 以上の濃度ではグルコン酸クロルヘキシジンの0.02%以上の場合と比較し，殺菌時間の短縮が認められた (Fig. 1-B)．塩化ベンザルコニウムは 0.0125%の濃度でも作用時間2分以内で *S. aureus*, *S. marcescens* を除く菌種に対した殺菌効果が認められた

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

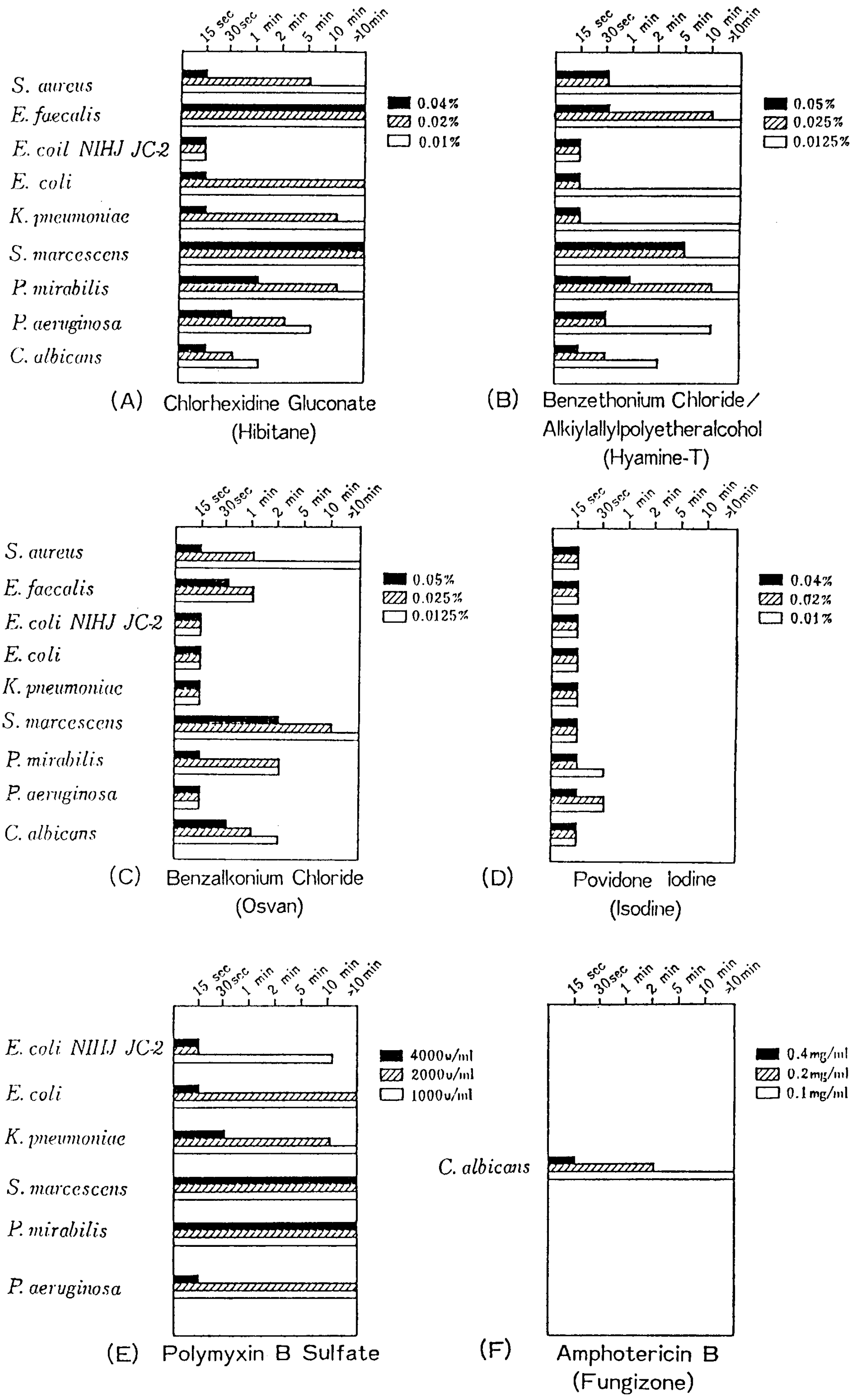

Fig. 1. The Bactericidal Activities of Disinfectants

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

(Fig. 1-C). ポビドンヨードは本実験に用いた薬剤の中で最も強力で，かつ各菌種に対して幅広い殺菌効果を示し，すべての菌株に対し作用時間30秒以内にその殺菌効果が認められた (Fig. 1-D). ポリミキシンBは適応濃度である 2000U/ml では作用時間10分以内で *K. pneumoniae* および *E. coli* NIHJ JC-2 に対して殺菌効果が認められた (Fig. 1-E). アムホテリシンBは適応濃度である 0.2mg/ml 以上の濃度で，作用時間2分以内で適用菌種として指定されている *C. albicans* に対して殺菌効果を示した (Fig. 1-F).

2. 蛋白共存下での殺菌効果

アルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウム及びグルコン酸クロルヘキシジンは，1000mg/ml のアルブミン添加では殺菌効果の低下が認められなかった．これに反しアクリノールとポビドンヨードは 3.13mg/ml，塩酸アルキルジアミノエチルグルシン，塩化ベンザルコニウムは 12.5mg/ml，ポリミキシンBは 50mg/ml 以上のアルブミン添加で明らかな殺菌効果の低下が認められた．なお過マンガン酸カリウムはアルブミンを添加しない場合でも殺菌効果が認められなかった (Fig. 2).

またアクリノールは 0.78〜6.25mg/ml，塩酸アルキルジアミノエチルグリシンは 0.20〜1.56mg/ml，塩化ベンザルコニウムは 1.56〜6.25mg/ml，アルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウムは0.78〜3.13mg/ml の範囲でアルブミンを添加した際に溶液の白濁が観察された．またポビドンヨード，過マンガン酸カリウム液の場合には，ともに 0.78mg/ml 以上のア

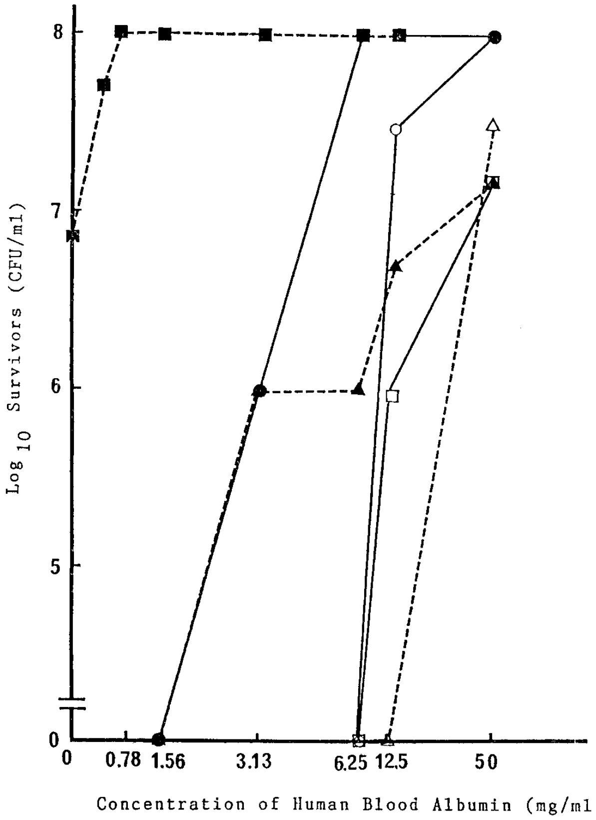

Fig. 2. The Change of Bactericidal Activities of Povidone Iodine (●), Potassium Permanganate (■), Benzalkonium Chloride (○), Alkyldiaminoethylglycine Hydrochloride (□), Acrinol (▲), and Plymyxin B (△) in Various Concentration of Human Blood Albumin

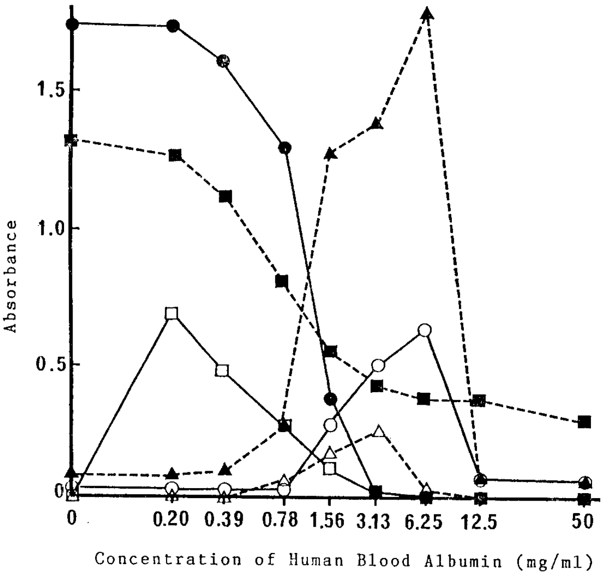

Fig. 3 The Absorvance Changes of Povidone Iodine (●), Potassium Permanganate (■), Acrinol (▲), Benzethonium Chloride Alkylallylpolyetheralcohol (△), Benzalkonium Chloride (○), and Alkyldiaminoethylglycine Hydrochloride (□) in Various Concentration of Human Blood Albumin

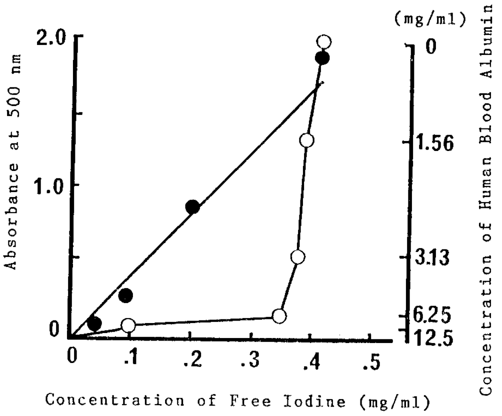

Fig. 4. The Absorbance Changes of Free Iodine in the Presence of Various Concentration of Human Blood Albumin (○) and Diluted with Water (●)

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

ルブミン添加時に溶液の混濁が著明であった(Fig. 3).

ポビドンヨードの遊離ヨウ素濃度はアルブミン添加12.5mg/ml で 0.1mg/ml となった. またアルブミン添加 6.25mg/ml 及び 3.13mg/ml では, それぞれ 0.36 mg/ml, 0.39mg/ml の遊離ヨウ素の濃度が確認された(Fig. 4).

3. 組織傷害性についての検討

Fig. 5-A に正常な膀胱の組織を示した. 0.04% のグルコン酸クロルヘキシジンを作用させた膀胱粘膜は, 間質部の浮腫が著明で, 移行上皮の偏平化, および組織液の浸潤が観察された(Fig. 5-B). 0.02%のグルコン酸クロルヘキシジンを作用させた膀胱粘膜は, 浮腫状の変化を呈した (Fig. 5-C). 0.04% のポビドンヨードを作用させた膀胱粘膜は, 間質部の著明な浮腫状の変化が観察され, 移行上皮の偏平化, および組織液の浸潤も観察された (Fig. 5-D). 0.02%のポビドンヨードを作用させた膀胱粘膜にも浮腫状の変化が観察された(Fig. 5-E).

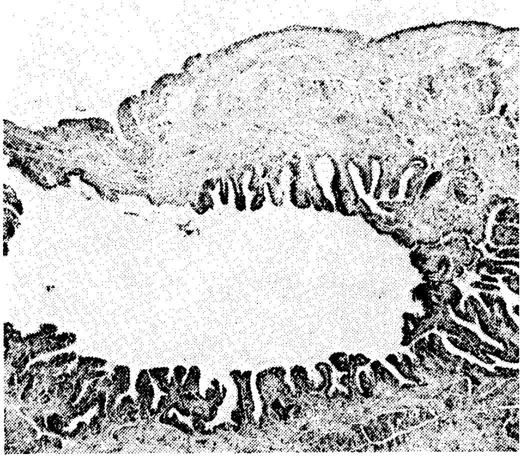

Fig. 5-A. Normal Rat Urinary Bladder

Fig. 5-B. Histopathological Change of Rat Urinary Bladder Treated with 0.04% Chlorhexidine Gluconate

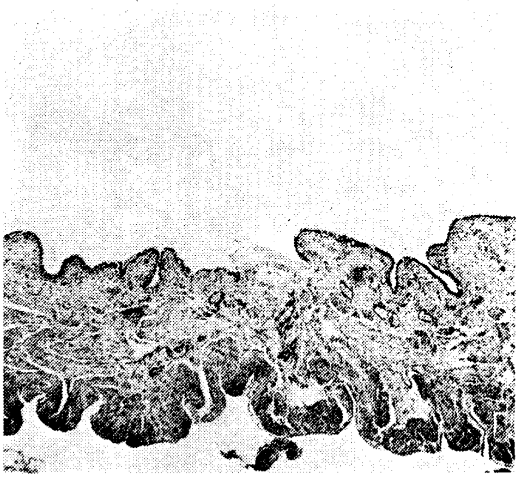

Fig. 5-C. Histopathological Change of Rat Urinary Bladder Treated with 0.02% Chlorhexidine Gluconate

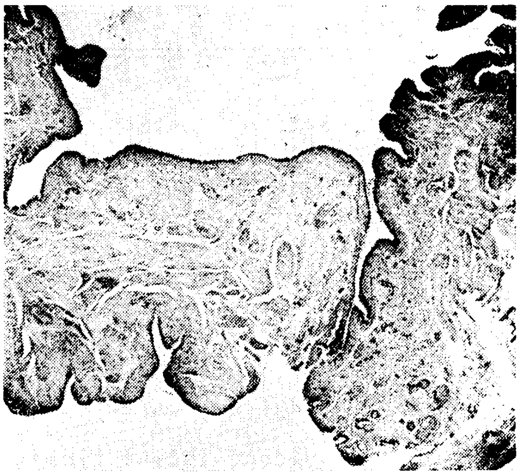

Fig. 5-D. Histopathological Change of Rat Urinary Bladder Treated with 0.04% Povidone Iodine

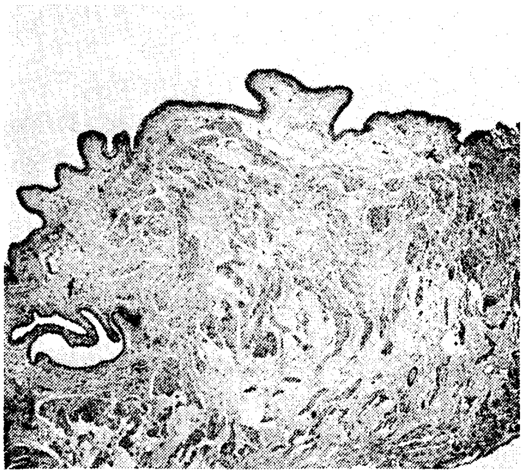

Fig. 5-E. Histopathological Change of Rat Urinary Bladder Treated with 0.02% Povidone Iodine

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

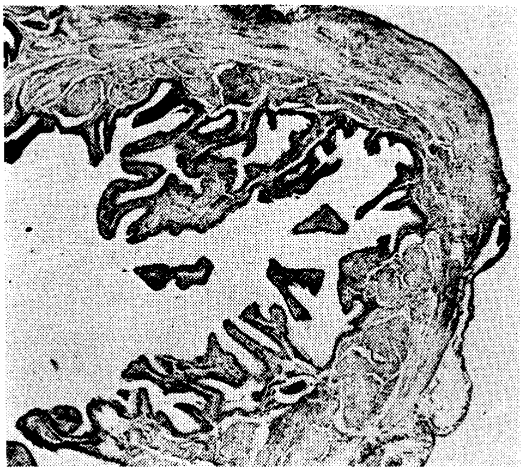

Fig. 5-F. Histopathoiogical Change of Rat Urinary Bladder Treated with 0.04% Benzalkonium Chloride

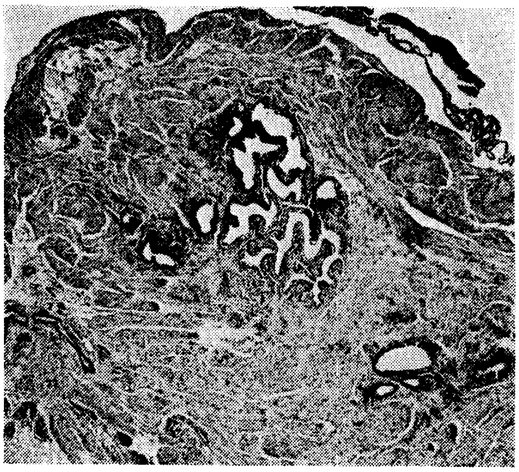

Fig. 5-G. Histopathological Change of Rat Urinary Bladder Treated with 0.02% Benzalkonium Chloride

Table 1. Histopathological Change of Rat Urinary Bladder

	Concentration 0.02%	Concentration 0.04%
Control		
Saline Solution	-	
Disinfectants		
Chlorhexidine Gluconate (Hibitane)	+	++
Benzalkonium Chloride (Osvan)	-	-
Alkyldiaminoethylglycine-Hydrochloride (Tego-51)	+	++
Povidone Iodine (Isodine)	+	++

Interstitial edema, marked : ++
moderate : +
no change : -

塩酸アルキルジアミノエチルグリシン液の場合はグルコン酸クロルヘキシジン液と同様な変化が膀胱粘膜にみられた．塩化ベンザルコニウム液を作用させた膀胱組織には，いずれの濃度においてもほとんど変化が認められなかった (Fig. 5-F, G)．以上の結果を一括して Table 1 に示した．

考　察

今回は，膀胱の洗浄液として過去において使用される頻度が高かったもの，および現在使用されている消毒剤の有用性を，蛋白の非共存下，共存下での殺菌力，および組織傷害性の面から比較検討を加えた．

1984年度の長崎大学医学部附属病院検査部細菌室における尿由来の分離菌で，しかも一般に起炎菌として有意とされる 10^5CFU/ml 以上の菌量で分離された菌種の分離頻度は，*E. coli*, *S. marcescens*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* の順となった．グラム陰性の弱毒菌が尿路感染症の起炎菌として臨床的に主な要因と考えられることから，これらを対象菌種とした．

また当院薬剤部を経由する消毒剤の消費量をみると，グルコン酸クロルヘキシジン，ポビドンヨード，アルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウムなどが主要な薬剤である．これらの消毒剤は，過去において膀胱の洗浄消毒に繁用されていたことから，今回の検討に加え他の薬剤と比較した．

グルコン酸クロルヘキシジン，アルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウムおよび塩化ベンザルコニウムなどは同系統の消毒剤であるにもかかわら

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

ず，これらの間には明らかな殺菌時間の差が認められた．これは先に述べたように，グルコン酸クロルヘキシジンやアルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウムが長期にわたって使用されたために，これらに対する耐性菌が出現したものと推測される．したがって，1種類の消毒剤のみを長期間使用せず，多種類の消毒剤を交互に使用することなどによって，耐性菌の出現を抑制することが可能性であろう．

今回，蛋白の共存下でポビドンヨードの殺菌力，溶液の色，遊離ヨウ素量の間に明確な相関関係は認められなかったが，洗浄廃液の色が元のポビドンヨード液の色に近くなるまで洗浄消毒を繰り返せば，蛋白の非共存下の実験でみられたような強力な殺菌効果を期待できるものと思われる．グルコン酸クロルヘキシジン及びアルキルアリルポリエーテルアルコール・塩化ベンゼトニウムは，50mg/ml のアルブミンを添加しても殺菌効果を示しており，使用部位によっては有用な消毒剤であると思われた．またグルコン酸クロルヘキシジンを除く界面活性剤とアクリノールは，アルブミンの添加により溶液が白濁したが，この濁度と殺菌効果には直接の関係を認めることはできなかった．

組織傷害性に対する実験で認められた浮腫状の変化には濃度依存性があるように思われた．消毒剤の浸透圧の測定も試みたが，いずれの消毒剤の浸透圧も測定限界以下であり，その浸透圧にはほとんど差がないと思われる．このことから消毒剤による組織傷害の程度は，浸透圧の差によるものではなく，組織に対する消毒剤の直接的な刺激作用によるものであろうと推察している．

有効かつ安全に消毒剤を使用するためには，殺菌効果のみからではなく，消毒剤の種類，使用濃度などに対するより具体的な検討を，使用部位に対する安全性，製剤の安定性，耐性菌に対する問題を含め総合的に評価する必要があると思われた．

謝辞 本研究で組織傷害性を検討するにあたりご指導，ご助言をいただいた長崎大学医学部第二内科学教室，神田哲郎博士，ならびに消毒剤の浸透圧測定においてご協力いただいた明治製菓薬品開発研究所の皆様に深く感謝いたします．

文献

1) T.J. Marrie and W. Costerton: Appl. Environ. Microbiol., 42, 1093 (1981).
2) 坂 義人：日泌尿会誌，64，839 (1973).
3) 安生紗枝子，佐藤たか子，加賀美操，大倉真知子，上島待子，石坂哲夫，金子康子，川崎賢二，辻明良，五島瑳智子：病院薬学，3，208 (1978).
4) 島田慈彦：北里医学，12，512 (1982).
5) 川上由行，宮本秀雄，金井正光，早松京子：臨床と細菌，10，427 (1983).
6) 吉村正一郎，竹中千里，大月千祐，勝野陽子，日比えい子，入山純司，石郷潮美，浅野祐子：医薬ジャーナル，21，1089 (1985).
7) 城野久美子，植村都美子，久野光造，東出栄治：薬学雑誌，105，751 (1985).
8) 東海林徹，白石正，髙橋修二，仲川義人，北目文郎：病院薬学，12，272 (1986).
9) 白石正，東海林徹，仲川義人，北目文郎，菅原和信：病院薬学，11，463 (1985).
10) 日本公定書協会編："第十一改正日本薬局方解説書"，広川書店，東京，1986，C-1619.
11) 五島瑳智子，辻 明良：臨床検査，27，1406 (1983).
12) 太田 伸，全田 浩，神尾好是，寺脇良郎：薬学雑誌，104，458 (1984).

NII-Electronic Library Service