# 【原著・臨床】

# マイクロプレート法による各種消毒薬の評価および臨床的検討

相澤久美子・吉田 正樹・柴 孝也 東京慈忠会医科大学内科学講座 (腎臓・高血圧内科)\*

(平成 12 年 11 月 28 日受付・平成 12 年 12 月 13 日受理)

臨床より分離された methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) 10 株、Pseudomonas aeruginosa 6 株を用い、マイクロプレート法により浮遊状態、付着状態の歯に対する4 種類の消毒薬(グルコン酸クロルヘキシジン (CHG)、塩化ベンザルコニウム (BAC)、塩酸アルキルジアミノエチレングリシン(AEG)、ポピドンヨード (PVP-I))の殺菌効果を比較検討した。また、compromised host である透析患者19 例を対象に皮膚におけるこれらの消毒薬の消毒率を比較検討した。浮遊状態にある歯に対して、今回検討した4種の消毒は、MRSA、P. aeruginosa 共に高い殺菌効果を発揮した。しかし、MRSAに対する PVP-I、CHG、P. aeruginosa に対する CHG の殺菌効果は、それぞれ低濃度において低下した 一方、浮遊状態に比べ付着状態にある歯に対する消毒薬の殺菌効果は低下し、MRSAでは、消毒率は浮遊状態の歯に対する場合の 20%~50% に低下した。P. aeruginosaでは、4種類の消毒薬いずれにおいても高濃度および長時間の消毒によっても殺菌効果は増加しなかった。また、MRSA に対する消毒薬の殺菌効果への行機物存在の影響は PVP-I、AEG で有機物を含まない状態の 30% 程度に低下した。臨床検討では PVP-I が有効な消毒率を示した。PVP-I 使用後に hypo alcohol (HA)を使用する効果はほとんど認められなかった。また CHG では 0.05% の濃度において消毒時間を延長することで効果が増加する傾向が認められた。消毒後の残存菌として、Bacillus が多く、Staphylococcus epidermidis も検出される場合があった。

Key words: 消毒薬,マイクロプレート、殺菌作用、浮遊菌、付着菌

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) は 1961年イギリスにて最初に報告された1~30。本邦では1980 年代に第3世代セフェム系薬の汎用により MRSA 感染症が 増加し,病院感染に対する認識および重要性が高まった。 MRSA はメチシリン以外の多くの抗菌薬にも耐性を示すこ とから、MRSA に起因する感染症が一度惹起されるとその 治療は非常に困難となる。特に compromised host の集まっ た病院における感染の管理および予防は重要な意味をもつと 考えられる。そこで、MRSA をはじめとする各種病原菌の 拡散を予防するために、臨床現場での基本的手技である消毒 方法および消毒薬に対する再認識、再検討がなされている。 適切な消毒薬の選択により, 有効な感染予防が可能であると 考えられる4.50。消毒薬が、すべての細菌に対して、等しい殺 菌力を有するわけではないので、病院感染をはじめとする感 染拡大を予防するためには、適切な消毒薬の選択および濃度 の検討が必要である。しかし消毒薬の殺菌効果を測定する標 準的な方法は決められていない。現状では個々の消毒薬に対 しての検討はなされているが、複数の消毒薬の殺菌効果比較 した検討は少ない。また, 臨床的立場での消毒薬の効果を検 討した報告はほとんどない。本報告は、臨床の場で日常的に 広く用いられている消毒薬を用い、病院感染の原因菌の多く を占める MRSA, Pseudomonas aeruginosa を用い、浮遊 状態および付着状態における消毒効果の比較検討したもので

ある。また、MRSAについては、消毒薬の殺菌力におよぼす 有機物の影響もあわせて検討した。さらに、臨床的検討として医療現場においてもっとも繁用される日常的手技である 皮膚消毒における各種消毒薬の効果について、compromised host である透析患者を対象として検討した。

## I. 材料と方法

#### 1. 試験菌

東京慈恵会医科大学付属病院にて検出された臨床分離 株の MRSA 10 株 P. aeruginosa (非ムコイド型) 6 株 を用いた。

#### 2. 消毒薬

20% グルコン酸クロルヘキシジン液(CHG, 和光純薬), 10% 塩化ベンザルコニウム液(BAC, 和光純薬), 10% 塩酸 アルキルジアミノエチレングリシン液 (AEG, 日本商事), 10% ポピドンヨード液 (PVP-I, 明治製菓)を使用した。

### 3. 実験方法

#### 1) 消毒薬濃度の調節

それぞれの消毒薬を 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.313%, 0.16%, 0.078% に調製した。調製した消毒薬は、調製後ただちに使用した。

#### 2) 菌液の作製

血液寒天培地で20時間培養したMRSAおよびBTB

寒天培地で20時間培養したP. aeruginosa を、McFarland No.0.5 (1×10\*CFU/mL) に調整した。

## 3) 浮遊菌に対する殺菌力測定

それぞれの濃度に調整した消毒液を 200 μL ずつマイクロプレート (96 穴) に分注し、菌量 1×10 CFU/mL に調整した MRSA および *P. aeruginosa* の菌液を 5 μL (5×10 CFU) 接種した。一定時間 (10 秒, 20 秒, 40 秒, 80 秒, 160 秒, 320 秒) 消毒薬と接触後、5 μL をサンプリングし、Soybean-Casein-Digest-Lecithin-Polysorbate 80 培地 (SCDLP 培地) 200 μL 分注したマイクロプレートに接種した。予備実験により、48 時間培養した場合の生菌数は 24 時間培養したしてあることを確認したので、35 °C、24 時間培養し、生菌数を測定した。

### 4) 有機物存在下の浮遊菌に対する殺菌力の測定

有機物として乾燥酵母 (日本薬局方乾燥酵母) を使用した。乾燥酵母をオートクレーブ処理し、0.6 g を 10 m の蒸留水に懸濁し、6% (W/V) 懸濁液を作製した。96 穴マイクロブレートにこの懸濁液を  $100 \mu$  L 分注し、さらに各濃度に調整した消毒液を  $100 \mu$  L 分注し、3% (W/V) 酵母含有の消毒液を作製した。浮遊菌と同様の方法にて、各濃度の酵母含有消毒液を分注したマイクロプレートに、 $1\times10^{8}$  CFU/mL に調整した菌液  $5 \mu$  L  $(5\times10^{8}$  CFU/mL) を接種後、10 秒、20 秒、40 秒、80 秒、160 秒、320 秒後に  $5 \mu$  L ずつ吸い上げ、SCDLP 培地へ接種し、35 で にて 24 時間培養後、生菌数を測定した。

## 5) 付着菌に対する殺菌力測定

96 穴のマイクロプレートにミューラーヒントン培地 200  $\mu$ Lを分注し、さらに  $1\times10^8$ CFU/mL に調整した MRSA およ U P. aeruginosa の 菌 液 を  $5\mu$ L  $(5\times10^8$ CFU)分注した。2 時間培養後、未付着菌を除去した後、WELL 内を生理食塩水  $200\,\mu$ L にて 2 回洗浄した。各濃度の消毒液を  $200\,\mu$ L ずつマイクロプレートに分注した。一定時間  $(10\,$  秒、 $20\,$  秒、 $40\,$  秒、 $80\,$  秒、 $160\,$  秒、 $320\,$  秒)菌と消毒薬を接触させた後、消毒薬を除去、マイクロプレート内へ SCDLP 培地  $200\,\mu$ L を分注した。予備実験により  $48\,$  時間以上培養すれば再現性のある成績が得られることを確認したので、 $35\,$ C、 $48\,$  時間培養し、生菌数を測定した。

# 4. 臨床検討

### 1) 対象

対象は、透析療法を受けている慢性腎不全 19 例 (男性 14 例、女性 5 例) であり、腹膜透析患者 5 例、血液透析患者 14 例であった。この 19 例に対して 28 回の検査を行った。平均年齢は 68.0±0.4 歳、平均透析期間 61.7±3.2 か月であった。

## 2) 使用消毒薬

使用した消毒薬は、0.025% 塩化ベンザルコニウム液 (塩化ベンザルコニウム液 10 W/V% 丸石製薬)、0.05 %グルコンサンクロルヘキシジン液(グルコンサンクロルヘキシジン液 5 W/V%, セネガ製品), 10% ボビドンコード液(日局ボピドンヨード 100 mg 明治製菓), 10% ボビドンコード液(日局ボピドンヨード 100 mg 明治製菓), 10% チオ硫酸ナトリウム添加 35% イソプロピルアルコール (hypo alcohol, HA), チオ硫酸ナトリウム 5 水和物(関東化学)であった。いずれの消毒薬濃度も臨床的に使用している濃度であり、使用消毒薬は使用直前に滅菌蒸留水を用いて調製したものを用いた。

#### 3) 方法

- (1) 透析患者の腹部の皮膚を5分割し、各部位より、フィルムスタンプ型 SCDLP 寒天培地(日研生物医学研究所)を用いて、細菌を採取した。
- (2) それぞれの消毒薬にて減菌綿棒によるスワブ法にて2回消毒を行った。消毒方法は、各消毒薬を単剤で使用および PVP-I 使用後に HA を併用する5 通りの方法にて行った。
- (3) 消毒後、フィルムスタンプ型 SCDLP 寒天培地にて細菌を採取した。皮膚と消毒薬の接触時間は 20秒、皮膚と培地との接触時間は 5秒とした。なおこの方法にて十分消毒効果の得られなかった消毒薬について、接触時間を 40秒、80秒、160秒、320秒まで延長し効果の判定を行った。
- (4) 37℃, 24 時間培養後, 培地中央部 3×3 cm²の 消毒前後のコロニー数を比較し, 消毒率にて効果を判定 した。

消毒率 = |(消毒前コロニー数 - 消毒後コロニー数) /消毒前コロニー数|×100 とした。

- (5) 消毒後残存菌の同定を行った。
- (6) 検定は Welchi's t-test にて行った。

#### T. 結 果

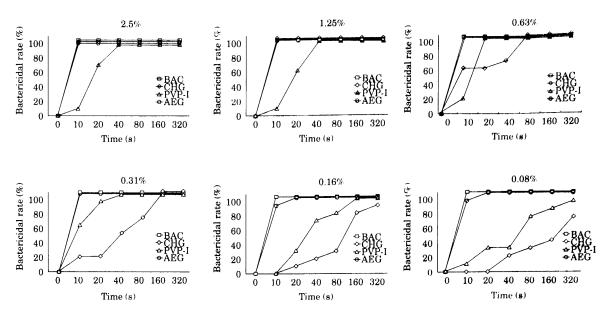
## 1) 浮遊菌に対する殺菌力の測定

MRSAに対しては、各消毒薬ともに高い殺菌効果を得られた。しかし、CHG、PVP-Iでは低濃度でやや殺菌率の低下が認められ、CHGでは1.25%液において10秒で殺菌されるが0.63%液では40秒間でも残存する菌が見られた。CHG、PVP-Iでは濃度の低下とともに接触時間を延長しないと殺菌できないことが明らかとなった(Fig. 1)。

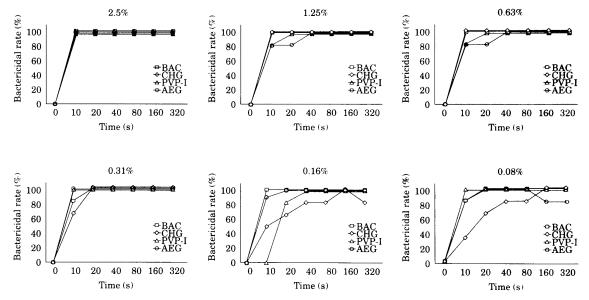
P. aeruginosa では、いずれの消毒薬も高い殺菌効果が認められたが、CHG 短時間処理群では 0.16% 以下の低濃度において殺菌効果が低値であった (Fig. 2)。

## 2) 有機物存在下の浮遊菌に対する殺菌力の測定

有機物存在下の浮遊 MRSA 菌に対して、BAC では 0.63% 以上でほぼ 100% の殺菌率を認めた。CHG は 1.25% 以上で 100% の殺菌率を認めたが、低濃度域 (0.31%) では殺菌効果は 50% 程度となり、320 秒の接触でも残存菌が認められた。一方、PVP-I および AEG では 2.5%、1.25% の高濃度でも殺菌率の低下を認めた。PVP-I では 2.5%、1.25% で 160 秒、また、AEG



BAC: benzalconium chloride. CHG: chlorhexidine, PVP-I: popidone iodine, AEG: alkyldiaminoethylglycine hydrochloride
Fig. 1. Bactericidal activity of 4 disinfectants on floating methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA).
All disinfectant showed excellent bactericidal activity on MRSA, but PVP-I and CHG showed weaker bactericidal activity in lower concentrations.



BAC: benzalconium chloride, CHG: chlorhexidine, PVP-I: popidone iodine, AEG: alkyldiaminoethylglycine hydrochloride Fig. 2. Bactericidal activity of 4 disinfectants on floating *Pseudomonas aeruginosa*. All disinfectants showed excellent bactericidal activity on *P. aeruginosa*, but CHG showed lower bactericidal activity in lower concentrations.

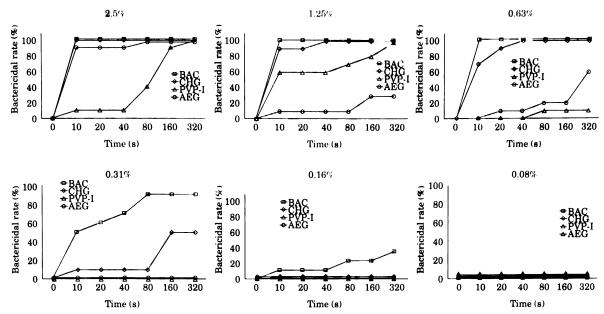
においては 2.5% では 40 秒, 1.25% では 320 秒処理に おいても残存菌を認めた。

0.31% 以下では PVP-I, AEG 共にまったく殺菌効果 が認められなかった (Fig. 3)。

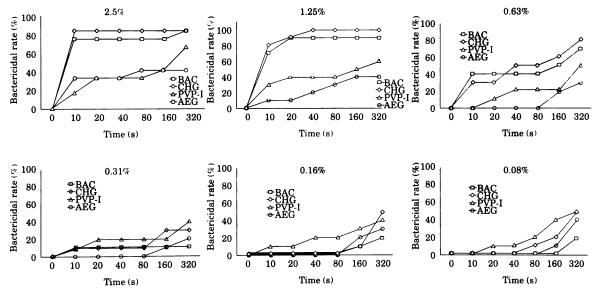
## 3) 付着菌に対する殺菌力

MRSA に対しては、すべての消毒薬で浮遊菌よりも 殺菌効果の低下が認められた。 付着状態 MRSA では、 BHC および CHG は 2.5%、1.25% などの高濃度で高 い殺菌効果を示したが、濃度が 0.63% 以下であると著 しい殺菌効果の低下を認め、浮遊菌に比して著しい殺菌作用の低下が認められた。PVP-I、AEG は 2.5% の高濃度においても殺菌効果が低下しており、320 秒においても残存菌が認められた。ただし、PVP-I においては他の消毒薬に比べて接触時間の延長に伴い殺菌効果の増強傾向が認められた。(Fig. 4)。

P. aeruginosa に対しては、すべての消毒薬で浮遊状態に比して著しい殺菌効果の低下を認めた。消毒薬の高濃度と殺菌効果との間にはある程度相関傾向が認められ



BAC: benzalconium chloride. CHG: chlorhexidine. PVP-I: popidone iodine. AEG: alkyldiaminoethylglycine hydrochloride Fig. 3. Bactericidal activity of 4 disinfectants on floating methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the presence of 3% yeast. The bactericidal activity of PVP-I and AEG with 3% yeast was lower than that of without yeast.



BAC: benzalconium chloride, CHG: chlorhexidine, PVP-I: popidone iodine, AEG: alkyldiaminoethylglycine hydrochloride Fig. 4. Bactericidal activity of 4 disinfectants on adhered methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). The bactericidal activity of AEG and BAC against adhered bacteria was 20%~30% of activity against floating bacteria. The bactericidal activity of PVP-I and CHG was 30%~50% of activity against floating bacteria.

るが、接触時間との間には相関性はほとんどみられなかった (Fig. 5)。さらに、接触時間を 180 分まで延長したが、効果は十分でなく残存菌が認められた。

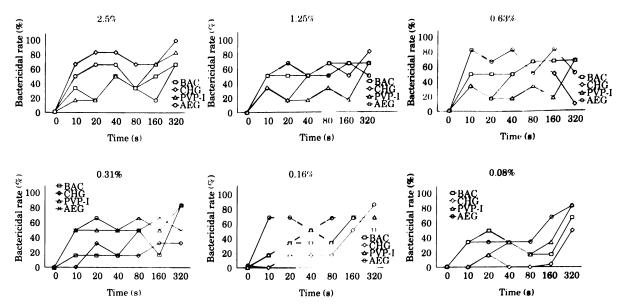
#### 4) 臨床的検討

消毒前コロニー数分布状況は Fig. 6 のごとくで、消毒総回数は 125 回、消毒前コロニー総数は 7,779 であり、消毒前平均コロニー数は 62.2 であった。今回の検討の対象を消毒前コロニー数の平均値から、60 未満お

よび 60 以上の 2 群に分けて検討した。なお、消毒前コロニー数が 10 未満および 200 以上は消毒薬の効果評価が困難なため除外した。

i) 消毒前コロニー数 10 以上 60 未満群(以後 60 未 満群)

BAC (n=12) の消毒率は 76.4±30.8% であった。PVP-I (n=10) では 87.68±18.5%、CHG (n=10) 73.5±25.8%、HA (n=7) 76.1±35.8%、PVP-I+HA (n=11) は



BAC: benzalconium chloride, CHG: chlorhexidine, PVP-I: popidone iodine, AEG: alkyldiaminoethylglycine hydrochloride Fig. 5. Bacteicidal activity of 4 disinfectants on adhered *Pseudomonas aeruginosa*. The bactericidal effect of disinfectants on adhered bacteria was lower than that on floating bacteria. The bactericidal activity of all disinfectants on adhered *P. aeruginosa* was not affected in high concentraions and long exposure.

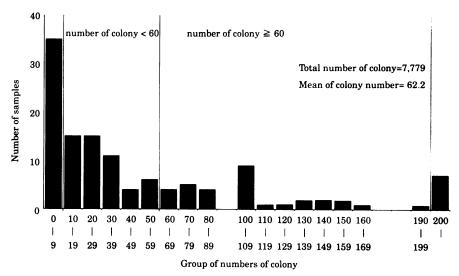


Fig. 6. Distribution of numbers of colony before disinfection.

77.9±23.4% であった。各群間消毒率には有意差を認めなかった (Fig. 7)。

ii) 消毒前コロニー数 60 以上 200 未満群 (以後 60 以上群)

BAC (n=5) の消毒率は89.2±35.4%であった。PVP -I (n=8)では98.2±4.2%, CHG (n=7)73.7±25.3%, HA (n=8)85.4±29.1%, PVP-I+HA (n=3)は96.7±2.9%であった。CHG に比べ PVP-I の消毒率は有意に優れていた。その他の群間には有意差を認めなかった (Fig. 7)。接触時間の延長による消毒効果の変化を6例にておいて検討した。CHG では接触時間の延長により消毒効果の増強傾向が認められ、320秒後では20秒後に比べ20%の増加が認められたが、BAC では0.025%

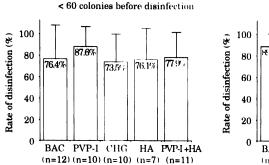
において増加傾向が認められなかった。

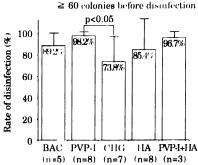
#### iii) 残存菌菌種

残存菌ではいずれの消毒薬においても Bacillus が多く、そのうち Bacillus cereus が多く認められた。他に a -haemolytic Streptococcus spp., Corynebacterium spp., Staphylococcus epidermidis, Neisseria spp., Pseudomonas spp., MRSA などが認められた(Fig. 8)。

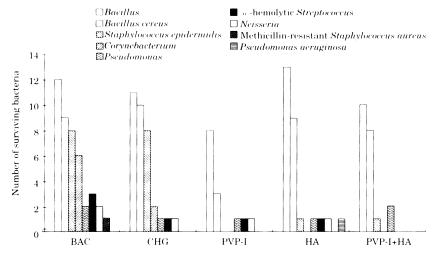
## III. 考 察

今日、病院感染の防止の上から、また、介護の場における感染防止の上から、消毒薬の重要性は増加しており、正しい消毒薬の選択・使用が必要である。そのためには、消毒薬の簡便かつ信頼性のある評価法が求められている。一般に、医療施設においては、消毒薬・消毒法





BAC: benzalconium chloride, CHG: chlorhexidine, PVP-I: popidone iodine, HA: hypoalcohol Fig. 7. Bactericidal activity of disinfectants in clinical study. In < 60 colonies, the bactericidal activity was not significantly different among four disinfectants. In  $\ge$  60 colonies, the bactericidal activity of PVP-I was significantly stronger than that of CHG (p<0.05).



BAC: benzalconium chloride, CHG: chlorhexidine, PVP-I: popidone iodine, HA: hypoalcohol Fig. 8. Bacteria survival after disinfection. *Bacillus* were the most frequent isolates after the disinfection.

の評価・選択は、刺激性、臭気、金属腐敗性の有無などが重視されている。しかし、消毒薬の作用が殺菌作用であることから、この点を重視した評価が必要であることは言をまたない。本研究において、少量の検体で、消毒薬の殺菌作用を定量的に判定できるマイクロプレート法を用い、各種消毒薬の殺菌作用を検討した。

浮遊状態においてマイクロプレート内の消毒薬濃度はBAC、CHG、AEG は実際に臨床の現場で使用する濃度より高濃度であることを考えると実際の消毒では接触時間を考慮する必要があると考えられた。特に CHG の場合は、短時間接触において十分な消毒効果が認められず、CHG の単独使用の際には注意が必要であると考えられた。一方、BAC、AEG、PVP-I においては日常汎用されている濃度で十分消毒効果が期待でき、抗菌薬と消毒薬に対する細菌の抵抗性(耐性)の作用機序の相違を考える<sup>6~8)</sup>と、多剤耐性の MRSA、P. aeruginosa に対しても消毒薬の効果が十分期待できると考えられた。CHG の消毒効果成績は、P. aeruginosa には CHG 耐

性株があること、BACに比較して殺菌作用が遅延性であるとの報告と一致している9-11。

浮遊 MRSA 菌では既存の報告同様に有機物の存在下 では消毒効果が減少する結果が得られた12~150。4種類の 消毒薬のうち特に PVP-I, AEG において有機物の影響 を受けやすく高濃度の 2.5%, 1.25% においても消毒効 果の減少が著しく、低濃度ではまったく消毒効果が認め られなかった。これに対して、BAC および CHG は、PVP -I および AEG に比して有機物による影響が少なく、こ の成績を支持する報告も散見されている16~18)。さらに、 有機物の形態によっても, 消毒効果に差があるとの報告 があり19.201, 可溶性物質よりも粒状物質の方が強い消毒 薬吸着作用を示す可能性が示唆されている。酵母は粒状 物質の有機物として作用しており、2.5% 乾燥酵母の共 存は、10%の血清の共存よりも消毒効果を強く阻害す るとの報告がある210。また、形状に加えて有機物の量に より消毒効果は影響を受けることから多量の有機物が付 着している可能性のある場合、あらかじめ除去する作業

を怠ってはならないと考えられた。

付着状態の MRSA において、マイクロプレート内に 実際に付着した菌量はそれぞれのプレート内において多 少の差異があることが考えられるが、付着歯量の定量を 行ったところ約2~3×10 CFU/mLであり、浮遊状態 (1.25×10 CFU/mL) とほぼ同量の接種菌量と考えられ た。AEG、BAC は浮遊状態で有効な消毒効果が得られ たにもかかわらず、付着状態の歯では、同じ濃度の消毒 薬でも消毒効果の減少が著しく、特に AEG の消毒効果 の低下が著明であった。また、P. aeruginosa も付着状 態へと変化すると消毒効果が著しく低下し、消毒時間を 3 時間まで延長しても残存菌が認められた。この歯の状 態により消毒効果が著しく減弱する現象は MRSA より 著明であった。しかも、この付着状態の P. aeruginosa は消毒薬の濃度を高めたり、作用時間を延長しても効果 が増強しなかった事実は本菌の形態的変化が考えられ る。P. aeruginosa は、glycocalyx を産生しbiofilmと いう形態をとることが知られている<sup>22-26</sup>'。 biofilm はム コイド生成により、P. aeruginosa の定着を有利にして いるといわれている2つ。またこのムコイドは生体の免疫 機構に対する抵抗因子(barrier)として機能する<sup>28,29</sup>。 P. aeruginosa が生体に感染すると数日以内にムコイド を主成分とした biofilm が形成され、投与された抗菌薬 はムコイドを透過しにくく菌体内では低濃度にとどま り、抗菌活性に対する抵抗性の原因となるといわれてい る29'。この biofilm 形成は電子顕微鏡にて確認されてお り<sup>29,30</sup>, 付着した菌体の表面に slime の分泌と考えられ る多糖類を主成分とする突起様構造物 = glycocalyx が出 現し、それを架橋として細菌が次々と凝集して biofilm が形成されることが明らかとされている300。これらの事 実をふまえると、消毒薬の菌体への到達の過程において も、同様の現象が起こっていると考えられる。付着状態 においては MRSA 同様の接着状態に加えて P. aeruginosa では特有の形態的変化との協力作用により消毒作 用をより受けにくくなっていると考えられた。この barrier を破るためには消毒薬に多糖類分解酵素および 蛋白分解酵素を前処理または併用する方法も今後検討す る必要があると考えられた。実際の臨床の場において は、細菌は付着状態にあることがはるかに多いと考えら れる。したがって、限られた時間で確実な消毒を行うた めにも、消毒に際して局所を洗浄するなど菌そのものを 浮遊状態に近い状態に変換することを心がける必要があ

臨床的検討として、compromised host である透析患者における皮膚消毒における各種消毒薬の影響を検討した。消毒前コロニー数が 60 未満の群では、各消毒薬間の消毒効果に有意差は認めなかった。消毒前コロニー数が 60 以上の群において、PVP-I の消毒効果が CHG に比して優れていた。菌量が増加すると PVP-I は有効な

消毒効果が得られた。CHGでは、0.05%の機度において、消毒時間を延長することで効果が増強する傾向が認められた。したがって、臨床の場において、消毒において知時間でばらつきのない有効な消毒を行うためにはPVP-Iが優れているといえる。ただし、有機物混入によりPVP-Iの作用が低下しやすいことを考慮すると、清拭洗浄などで消毒前にあらかじめ有機物を減少させる。さらにHAは皮膚刺酸性があり、またPVP-I単独使用時とPVP-I後HAを使用する場合とにおける消毒効果に有意差を認めないことからPVP-I使用後にHAを使用することはできるかぎり避けPVP-Iと皮膚との長時間接触を保つことが必要と考えられた。またCHGは粘膜など使用不可の場合が多く単剤で使用するには考慮が必要である。

消毒後の残存菌に関しては、いずれの消毒薬において も Bacillus が多く認められた。34種の Bacillus のな かで人に病原性が明らかなものは Bacillus anthideis と Bacillus cereus の2種である。このうち今回消毒後 に多く認められた B. cereus は、以前は食中毒の原因菌 として取り扱われてきたグラム陽性有芽胞桿菌である。 近年, compromised host における敗血症, 心内膜炎, 髄膜炎、さらに肺炎などの重篤な感染症を惹起すること が報告されている<sup>32~34)</sup>。また、Curtis ら<sup>35</sup> は、血液透析 装置や血管内留置カテーテルの汚染による敗血症が増加 していると報告している。腹膜透析に関連した腹膜炎の 原因菌として報告も認められる36。上壌、牛乳、植物な ど自然界に広く分布している Bacillus は臨床材料から もしばしば検出されるが、いままでは contamination として軽視されてきた。しかし、B. cereus は compromised host のみならず免疫正常者に対しても病原性を 発揮することが明らかとなり"、また、B. anthratis 以 外の Bacillus 属の大部分は  $\beta$ -ラクタム系薬に耐性であ ることから、Bacillus 属を軽視した不適切な消毒薬の 選択使用は、重篤な感染症を惹起する危険性があると考 えられる380。本研究において、消毒後残存菌として、 Bacillus 属が多く認められた。これらの菌が、重症感 染症の原因菌となりうることを示しており、適切な消毒 薬の選択・使用が必須であることを示唆している。今 後,臨床の現場では,非病原菌として見捨てる前に分離 株の病原的意義を慎重に検討する必要がある。特に,種々 の消毒を重ね、最終的に消毒薬に抵抗を示す芽胞菌の残 存が問題となる。それらの菌のもつ病原性の意味は重要 であり、新たな病原菌となりうる可能性を含んでいる。

今後、消毒薬の果たす役割は大きいと考えられるも、主たる作用である殺菌作用の標準的な評価法が確立されていないのが現状である<sup>39,40)</sup>。今回用いたマイクロプレート法は少量の検体でさまざまな菌種に対する定量的効果判定を同時に行うことが可能であり、しかも各種消毒薬の種類、濃度の多様な設定が容易であるという利点を

もっている。本法ではマイクロブレートを用いているため、広いスペースを必要とせず、簡単に消毒薬の評価を行うことが可能となった。また、医療現場で見られる細菌環境に近い付着状態の菌を設定することが可能となった。今回の成績から、細菌の浮遊・付着の状態および有機物の存在の有無によって、消毒薬の殺菌効果が著しく異なることが明らかとなった。マイクロブレート法は、それぞれの状態の菌を用い、各種消毒薬の殺菌効果の比較検討が容易にできる点、消毒薬の評価法として従来の方法に比べ優れている。

また、病院感染がもっとも懸念される compromised host である透析患者を対象とした臨床的検討において、実際に医療現場で用いられる消毒薬のなかでは PVP -I が安定かつ優れた殺菌効果を示した。

臨床の現場において、各種カテーテル、褥側などにおける付着状態での細菌の消毒が困難であることは、しばしば経験することであり、いくつかの報告が散見される\*\*・42\*。今回のマイクロブレート法による成績より、同一菌種であっても、ひとたび付着状態に変化することで消毒薬の効果が著しく低下することを定量的に裏づけることがきた。さらに付着状態の細菌は時間を経過することにより、さらにその結合性を増し消毒薬の効果を減少させることが考えられるため、より浮遊状態に近い状態で消

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました東京慈恵会 医科大学内科講座 細谷龍男教授ならびに酒井 紀名誉 教授に感謝申し上げます。終始御指導・御鞭撻をいただ きました同講座臨床細菌研究室の皆様に深謝し、また、 御協力をいただきました同大学腎・高血圧内科の皆様に 感謝申し上げます。

毒を行うことの重要性を認識させるものである。

#### 文 献

- Jevons M P: "Celbenin"-resistant Staphylococci. Br Med J 14: 124~125, 1961
- Stewart G T. Holt R J: Evolution of natural resistance to the newer penicillins. Br Med J 2: 308~311, 1963
- 3) Benner E J, Kayser F H: Growing clinical significance of Staphylococcus aureus. Lancet 28: 741~744, 1968
- 4) 辻 明良: MRSA 感染対策における消毒薬の役割。環 境感染 12: 154~156, 1997
- 5) Traore O. Allaert F A. Fournet-Fayard S. et al.: Comparison of in-vivo antibacterial activity of two skin disinfection procedures for insertion of peripheral catheters: povidone iodine versus chlorhexidine. J Hosp Infect 44: 147~150, 2000
- 6) 染谷雄一,山口昭人:細菌の薬剤排出蛋ゴ。日本細菌 学雑誌 50: 403~421、1995
- 7) 笹津備規: 黄色ブドウ球菌の消毒剤耐性。日本細菌学雑誌 51: 755~765, 1996
- 8) 菅野治重: 高度耐性メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)の化学療法。外科診療 34: 171~179, 1992
- 9) 城野久美子、上村都美子、久野光造、他: 塩化ベンザ

- ルコニウムおよびグルコン酸クロルヘキシジンの殺菌 力と殺菌速度 - 薬学雑誌 105: 751~759, 1985
- 10) 五島基智子、金子康子、川崎賢二、他:常用消毒薬の ケラム陰性程菌の臨床分離株に対する殺菌作用につい て。臨床病理 25: 684~690, 1974
- 11) 東山 奏、坂上吉一、横山 浩、他: 小児病棟患者および医療スタッフより分離されたメチシリン耐性黄色 ブトウ球菌 (MRSA) に対する抗生剤および役歯消毒 剤の効果。防菌防黴 20: 456~474, 1992
- 12) 吉田太郎、上田明宏、高木一大、他: 第4級アンモニウム塩およびグルコン酸クロルヘキシジンの抗菌活性に及ぼす培地成分の影響。防菌防黴 21: 117~124, 1993
- 13) 辻 明良、関目金雄、金子康子、他: 各種消毒薬の作 用濃度、作用時間および血清添加による殺菌効果の変 動。感染症学雑誌 53: 292~302, 1979
- 14) 小林寛伊: MRSA の消毒 日内誌 81: 1652~1656. 1992
- 15) 藤田浩三: 消毒薬の種類と使い方一家庭における使いかた一。日本薬剤師会雑誌 36: 351~360, 1984
- 16) 酒井直光, 小林 悟, 朝生 忍, 他: 市販殺菌消毒剤 のアルブミン存在下による殺菌力への影響。防菌防黴 17: 377~380, 1989
- 17) 斃その子, 栗原友正、杉田光章、他: 消毒剤の手指消毒効果とペプトン存在下の試験管内殺菌効果との関係。感染症雑志 66: 1532~1536, 1992
- 18) 神谷和人: 各消毒薬の実験濃度における殺菌効果に影響する有機物について。愛媛県立看護短期大学雑誌 26: 95~100, 1994
- 19) 赤松 孝,後藤康秀、田端耕一、他:手術用イソジンとヒビスクラブの殺菌効果および有機物共存下における殺菌力。医薬ジャーナル 25: 1031~1036, 1989
- 20) 余 明順、岡崎育代、伊藤秀明、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: 205~211,1984
- 21) 由良二郎,石川 周: 外科における消毒剤使用上の問題点 特に有機物による不活性化について。医器学 62: 124~130, 1992
- 22) 小林宏行: 細菌バイオフィルム。感染症学 21: 161~ 173, 1991
- 23) Costerton J W. Irvin R T, Cheng K J: The bacterial Glycocalyx in nature and disease. Ann Rev Microbiol. 35: 299~324, 1981
- 24) Michael R W B, Paul W.: The influence of envirinment on envelope properties affecting survial of bacteria in infections. Ann Rev Microbiol. 39: 527~556, 1985
- 25) Costerton J W, Cheng K J, Gill G G, et al: Bacterial biofilms in nature and disease. Ann Rev Microbiol. 41: 435~464, 1987
- 26) 大垣憲隆, 小林宏行: 難治感染症と biofilm。ファルマシア 126: 1129~1132, 1990
- 27) Anwar H, Costerton J W: Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas* aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 34: 1666 ~1671, 1990
- 28) Taylar D, Prosser B, Cleeland R: Activity of antimicrobial agents against Staphylococcus epidermidis in established biofilms on latex catheter material and on titanium. J Antimicrob. Chemother. 21: 510

- $\sim 512, 1988$
- 29) 藤巻一雄,池田 靖,高畑正裕,他: In vitro における緑膿菌のバイオフィルムの性状について。Chemotherapy 40: 886~893, 1992
- 30) 池田文明, 横田好子, 峰 靖弘: Staphylococcus epidermidis の slime 産生株による biofilm 形成と抗菌 剤の作用について。感染症学雑誌 65: 875~882, 1991
- 31) 熊田徹平: セレウス南感染症。日本臨床 43: 985~ 987, 1985
- 32) Coonrod J D, Leadley P J, Eickhoff T C: Bacillus cereus pneumonia and bacteremia. A case reprort. Am Rev Respir Dis 103: 711~714, 1971
- 33) Craig C P, Lee W S, Ho M: Bacillus cereus endocarditics in an addict. Ann Intern Med. 80: 418  $\sim$ 419, 1974
- 34) Leff A. Jacobs R. Gooding V. et al.: Bacillus cereus pneumonia. Survival in a patient with cavitary disease treated with gentamicin. Am Rev Respir Dis 115: 151~154, 1977
- 35) Curtis J R, Wing A J, Coleman J C: Bacillus cereus bacteremia. A complication of intermittent hemodialysis. Lancet I: 136~138, 1967

- 36) Biasioli S, Chiaramonte A, Fabris A, et al.: *Bacillus* cereus as agent of peritonitis during peritoneal dialysis. Nephron 37: 211~212, 1984
- 37) Sliman R, Rehm S, Shlaes D M: Serious infection caused by *Bacillus* Species. Medicine 66: 218~223, 1987
- 38) Steen M. K. Bruno-Murtha L.A. Chaux G. et al.: Bacillus cereus endocarditis Report of a case and review. Clin Infect Dis. 14: 945, 1992
- 39) 中野愛子: 消毒薬の殺菌効力試験 防菌防黴 11: 685 ~692, 1983
- 40) 五島瑳智子, 辻 明良: 消毒薬の評価法。検査と技術 8: 200~206, 1980
- 41) Oic S, Huang Y, Kamiya A, et al.: Efficacy of disinfectants against biofilm cells of methicillin-resisitant Staphylococcus aureus. Microbios. 85: 223~230, 1996
- 42) Cochran W L, McFeters G A, Stewart P S: Reduced susceptibility of thin Pseudomonas aeruginosa biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. J Appl Microbiol 88: 22~30, 2000

# Microbiological evaluation of disinfectants by microplate method and clinical study

# Kumiko Aizawa, Masaki Yoshida and Kohya Shiba

Division of Nephrology and Hypertension, Department of Internal Medicine. Jikei University School of Medicine. 3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

The bactricidal activity of benzalconium chloride (BAC), chlorhexidine (CHG), popidone iodine (PVP–I) and alkyldiaminoethylglycine hydrochloride (AEG) on methicillin–resistant Staphylococcus aureus (MRSA, 10 clinical isolates) and Psudomonas aeruginosa (6 clinical isolates) was evaluated by the microplate method. And the effect of organic substances (3% yeast) on the bactericidal activity of these disinfectants was examined. All disinfectants showed excellent bactericidal activity on floating MRSA and P. aeruginosa. The bactricidal activity of PVP–I on MRSA and that of CHG on MRSA and P. aeruginosa were weaker than other disinfectants in lower concentrations. All of four disinfectants showed weaker bactericidal activity on adhered bacteria than on floating bacteria. Against adhered MRSA, the bactericidal activity of AEG and BAC decreased to 20–30%, and the activity of PVP–I and CHG to 30–50% of the activity against floating bacteria. As to P. aeruginosa, the bactericidal activity against adhered bacteria was weaker than that against floating bacteria. The bactericidal activity of PVP–I and AEG in the presence of 3% yeast was decreased to 30% of the activity without yeast. In the clinical study, PVP–I had excellent eradication rate. The most common survival bacteria was Bacillus.