

■ Concise communications

抗菌効果の評価のための細菌播種試験の実験条件に関する検討

－皮膚に播種された細菌の生残菌数の推移の視点から－

曾川芳郎, 小林寛伊, 梶浦 工

東京医療保健大学大学院

The study on the requirements for bacterial inoculation method when performing antimicrobial evaluation - from the viewpoint of time course in viable bacterial count after inoculation -

Yoshiro Sogawa, Hiroyoshi Kobayashi, Takumi Kajiura

Division of Infection Prevention and Control, Postgraduate School, Tokyo Healthcare University

要旨:

背景・目的: 殺菌消毒薬等の評価の手法として, 細菌懸濁液を人為的に皮膚に播種して評価する手法がある。このような試験では *Serratia marcescens* や *Escherichia coli* がよく使用されるものの, 皮膚に播種されたあとの経時的な挙動は必ずしもよくわかっていない。そこで *S. marcescens* および *E. coli* を皮膚に播種したあとの生存性を調べることににより, 抗菌効果の評価のための細菌播種試験に必要な条件を考察した。

方法: 供試菌は, 米国や欧州の殺菌消毒薬の *in vivo* 評価試験で繁用される安全性の高い *S. marcescens* (ATCC 14756) および *E. coli* K 12 (NBRC 3301) とし, リン酸生理食塩液を用いてそれぞれ約 10^9 /mL, さらに 1000 倍希釈して約 10^6 /mL の菌液を調整した。健康成人ボランティア (2 例) の左右両前腕部の皮膚表面に直径 3.5cm の円形テスト部位を 3 ヶ所ずつ設け, 右前腕のテスト部位には約 10^9 /mL の菌液を, また左前腕のテスト部位には約 10^6 /mL に薄めた菌液を滴下し, それぞれ均一に塗り広げた。菌液播種 2 分後, 5 分後, 10 分後に, カップスクラブ法で細菌を回収した。回収したサンプリング液を連続希釈し, 一定量をトリプトソイ寒天培地に塗抹し, 培養後の発育コロニー (CFU; colony forming unit) を計数した。

結果: 菌液播種 2 分後, 5 分後, 10 分後の生残菌数 ($\log_{10}$ CFU/site) は, 10^9 /mL の菌液を塗布した場合, *S. marcescens* では, 6.57, 5.70, 5.31, *E. coli* では 6.40, 5.04, 4.82 と推移した。また, 10^6 /mL の菌液を塗布した場合, *S. marcescens* では, 3.76, 2.99, 2.66, *E. coli* では 3.35, 1.70, 1.40 と推移した。両菌種とも, 播種菌液の濃度に関係なく, 菌液播種後の時間経過に伴って生残菌数が著しく減少した。

考察: 皮膚播種後の生残菌数の減少は著しく, 皮膚上での乾燥による細菌死滅の影響を受けたためと思われる。約 10^6 /mL の菌液を播種した場合, 播種 5 分後には十分な生残菌数が確保できておらず, 抗菌効果の評価の精度に影響を及ぼす可能性が危惧されたが, 約 10^9 /mL の菌液を播種した場合は, 播種 10 分後でも十分な生残菌数が確保できていると思われた。これらのことから, *S. marcescens* や *E. coli* を皮膚に播種して殺菌活性の評価を行う場合, 播種する菌液を適切な濃度, たとえば標準的な浮遊試験での初発菌濃度である 10^7 CFU が皮膚上で得られるようにすること, 播種細菌回収までの時間を可能な限り短くすること (5 分～10 分内), さらに常に対照を置いて播種した細菌の生残菌数を確認することが必要と思われた。

Key words : bacterial inoculation, time course, viable bacterial count, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*

はじめに

生体用殺菌消毒薬等の評価の手法として、あらかじめ調製した細菌懸濁液（菌液）を人為的に皮膚に播種し、この細菌に対する影響をみることによって評価する手法がある¹⁻⁷⁾。しかしながら、一般に細菌（とくにグラム陰性細菌）は乾燥に弱いとされており⁸⁾、人為的に細菌を皮膚に播種する抗菌活性評価試験の信頼性を確保するためには、慎重に実験方法ならびに実験条件を策定する必要がある。*Serratia marcescens* および *Escherichia coli* は欧米の殺菌消毒薬の *in vivo* 評価試験⁵⁻⁷⁾で繁用される菌種であるものの、皮膚に播種されたあとの経時的な挙動は必ずしもよくわかってない。

1. 目 的

S. marcescens および *E. coli* の菌液を皮膚に播種し、2分、5分、10分経過したのちに回収して生残菌数を測定することにより、これらの細菌の皮膚播種後の経時的な生存性を調べ、抗菌効果の評価のための細菌播種試験に必要な条件を考察した。

2. 方 法

供試した菌は、米国 American Society for Testing and Materials (ASTM)⁵⁾や欧州 European Norm (EN)の殺菌消毒薬の *in vivo* 評価試験^{6,7)}で繁用される安全性の高い

S. marcescens (ATCC 14756 (NBRC 12648)) および *E. coli* K 12 (NBRC 3301) とし、リン酸生理食塩液を用いてそれぞれ約 10^9 /mL の菌液原液を、さらに 1000 倍希釈して約 10^6 /mL の菌液を調整した。

健常成人ボランティア（2 例）の左右両前腕部の皮膚表面を、抗菌成分無添加の液体石鹸（無添加せっけん泡のハンドソープ；ミヨシ石鹸株式会社）を用いて 30 秒間洗浄し、さらに 3mL の 1%Triton X-100 で 30 秒間洗浄して、流水で洗い流して乾燥させた。被験者の左右前腕屈側部に内径 3.5cm のステンレス製シリンダーを押し当てて周囲をマーキングし、円形テスト部位を 3 ヶ所ずつ設け、手掌に近位の部位から、2 分後、5 分後、10 分後に細菌を回収する部位とした。右前腕屈側の 3 ヶ所には約 10^9 /mL の菌液原液を、また左前腕屈側 3 ヶ所には 1000 倍に薄めた菌液（約 10^6 /mL）を 15 μ L 滴下し、滅菌済みのステンレス製スパーテルを用いてそれぞれのテスト部位内に均一に塗り広げた。菌液播種 2 分後、5 分後、10 分後に、各テスト部位に内径 3.5cm の滅菌済みのステンレス製シリンダーを押し当て、サンプリング液（3%レシチン 10%ポリソルベート 80）5mL を注入し、プラスチック棒で 60 秒間縦横にスクラブして（カップスクラブ法）細菌を回収した。回収したサンプリング液から 50 μ L 取って連続希釈し、100 μ L をトリプトソイ寒天培地に塗抹し、 $32.5 \pm 2^\circ\text{C}$ で 24 時間培養したのちそれぞれの培地の発育コロニー（CFU；colony forming unit）を計数し、対数に変換した。なお、播種した菌液についてもトリプトソイ寒天培地で培養し、発育コロニーを計数した。

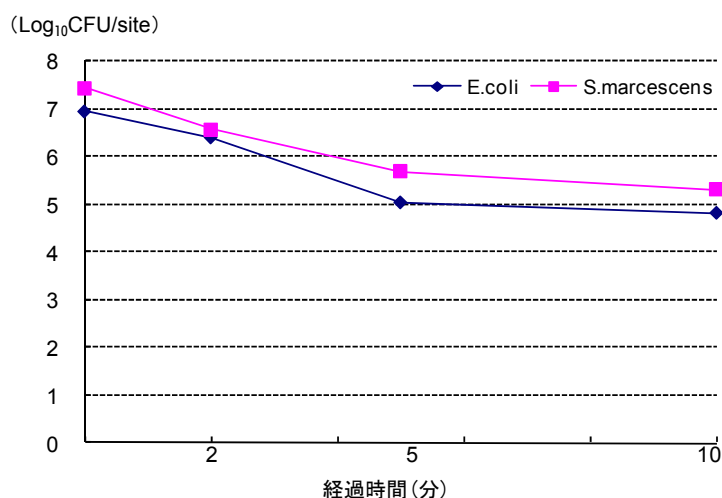


図1 10⁹/mL の菌液原液を播種した場合の *S. marcescens* および *E. coli* の皮膚上の生残菌数の経時変化 (Log₁₀CFU/site, n=1)

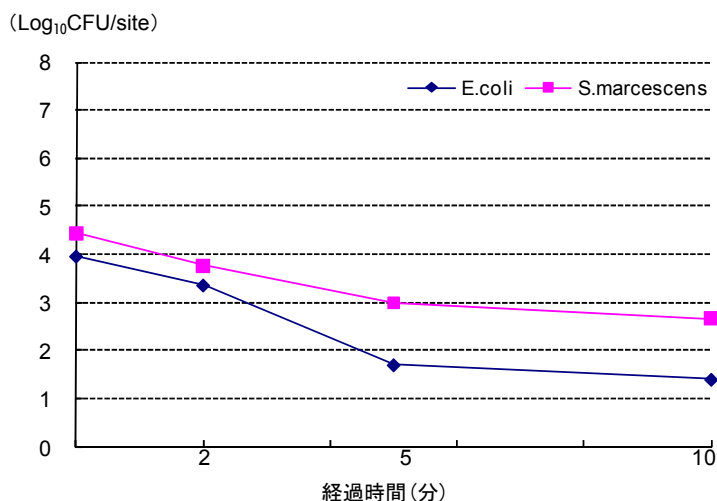


図2 10⁶/mL の 1000 倍希釈した菌液を播種した場合の *S. marcescens* および *E. coli* の皮膚上の生残菌数の経時変化 (Log₁₀CFU/site, n=1)

3. 結 果

調製した菌液原液の菌数 (Log₁₀ CFU/mL) は, *S. marcescens* が 9.27, *E. coli* が 8.77 であった。したがって, テスト部位に播種された原液および 1000 倍希釈液の初発菌数 (Log₁₀ CFU /15μL) は, *S. marcescens* では 7.44 および 4.44, *E. coli* では 6.95 および 3.95 と算出された。

菌液原液 (15μL) を右前腕皮膚に播種したあとの経過時間と生残菌数の結果を図 1 に, 1000 倍希釈した菌液 (15μL) を左前腕皮膚に播種した場合の経過時間と生残菌数の結果を図 2 に示した。菌液播種 2 分後, 5 分後, 10 分後の生残菌数 (Log₁₀ CFU /site) は, *S. marcescens* (n=1) では 6.57, 5.70, 5.31, *E. coli* (n=1) では 6.40, 5.04, 4.82 と推移した。また, 1000 倍希釈した菌液を播種した場合, *S. marcescens* (n=1) では 3.76, 2.99, 2.66, *E. coli* (n=1) では 3.35, 1.70, 1.40 と推移した。

なお, 実験室の気温・湿度は 25~27°C, 53.0~57.5% で, 菌液は播種後約 90 秒で乾燥したことを視認した。

4. 考 察

今回我々は, *S. marcescens* (ATCC 14756 (NBRC 12648)) および *E. coli* K 12 (NBRC 3301) を被験者の左右前腕皮膚に播種し, 2 分, 5 分, 10 分経過したのちに回収して播種後の細菌の生存性について調べた。

その結果, いずれの菌種も, 皮膚上での乾燥による細

菌死滅の影響を受けたためか, 菌液播種後の生残菌数は経過時間に伴って著しく減少した。とくに 1000 倍に薄めた菌液 (約 10⁶/mL) を播種した場合, 両菌種とも播種 5 分後には 10³ CFU/site を下回り, 抗菌効果の評価の精度に影響を及ぼす可能性が危惧された。しかし, 約 10⁹/mL の菌液を播種した場合は, 播種 10 分後でも 10⁵ CFU/site 前後の生残菌数を示しており, 十分な生残菌数が確保できていると思われた。

これらのことから, *S. marcescens* あるいは *E. coli* を皮膚に播種する手法を用いて抗菌効果の評価等を行う場合は, 皮膚上での乾燥による細菌死滅の影響を考慮し, 播種する菌液を適切な濃度にする, たとえば標準的な浮遊試験⁹⁾での初発菌濃度である 10⁷ CFU が皮膚上で得られるような濃度にする, さらに播種細菌回収までの時間を可能な限り短くすること (5 分~10 分内) などが求められると考えられた。また, 常に対照を置いて播種した細菌の生残菌数を確認する必要があると考えられた。

■ 文 献

- 1) Rotter M, Sattar S, Dharan S, Allegranzi B, Mathai E, Pittet D : Methods to evaluate the microbicidal activities of hand-rub and hand-wash agents. J Hosp Infect Journal of Hospital Infection 2009 ; 73 : 191-9.
- 2) Billhimer WL, Berge CA, Englehart JS, Rains GY, Keswick BH : A modified cup scrub method for assessing the antibacterial substantivity of personal cleansing products. J Cosmet Sci 2001 ; 52 : 369-75.
- 3) Herruzo R, Vizcaino MJ, Herruzo I : In vitro-in vivo sequence studies as a method of selecting the most efficacious alcohol-based solution for hygienic hand disinfection. Clin Microbiol Infect

2010 ; 16 : 518-23.

- 4) Kaiser N, Klein D, Karanja P, Greten Z, Newman J : Inactivation of chlorhexidine gluconate on skin by incompatible alcohol hand sanitizing gels. *Am J Infect Control* 2009 ; 37 : 569-73.
- 5) ASTM International. E 1174. Standard test method for evaluation of the effectiveness of health care personnel or consumer hand wash formulations. 2000.
- 6) EN 1499. Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic hand wash. Test method and requirements. Brussels: Comité Européen de Normalisation; 1997.
- 7) EN 1500. Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic hand wash. Test method and requirements. Brussels: Comité Européen de Normalisation; 1997.
- 8) Kramer A, Schwebke I, Kampf G : How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* 2006 ; 6 : 130.
- 9) EN 1040. Chemical disinfectants and antiseptics. Basic bactericidal activity. Test method and requirements. Brussels: Comité Européen de Normalisation; 1997.

The study on the requirements for bacterial inoculation method when performing antimicrobial evaluation - from the viewpoint of time course in viable bacterial count after inoculation -

Yoshiro Sogawa, Hiroyoshi Kobayashi, Takumi Kajiura

Division of Infection Prevention and Control, Postgraduate School, Tokyo Healthcare University

Background and Objectives: Bacterial inoculation method is often demonstrated in the *in vivo* studies for measuring/evaluating antimicrobial efficacy. Both *Serratia marcescens* and *Escherichia coli* are the major microorganisms for inoculation method, however survivability after inoculation is not well known. Our objectives were to clarify the time course of viable bacterial count for both *S. marcescens* and *E. coli* after inoculated on the skin and also to inquire the requirements to ensure the reliability of bacterial inoculation method.

Materials and Methods: *S. marcescens* (ATCC 14756) and *E. coli* K 12 (NBRC 3301) were chosen for the study. Inoculums for both *S. marcescens* and *E. coli* were prepared at the target concentration of 10^9 /mL and 10^6 /mL with phosphate buffered saline. Two healthy volunteers were recruited and three circular test sites (3.5cm diameter) were set on anterior skin of both right and left forearms. Prepared inoculums, 10^9 /mL and 10^6 /mL, were applied to the test sites on the right and left forearms, respectively. After 2, 5, 10 minutes, specimens were collected using cup scrub technique from each test sites, and were serially diluted with sampling solution (3% lecithin and 10% polysolvate 80) and smeared on trypticase soy agar plates. Colony forming unit (CFU) of each plates were calculated after 24hrs culture.

Results: Bacterial colony counts ($\log_{10}$ CFU) of each culture plates for 2, 5, 10 minutes after inoculation were as follows. 6.57, 5.70, 5.31 for *S. marcescens* (10^9 /mL), 6.40, 5.04, 4.82 for *E. coli* (10^9 /mL), 3.76, 2.99, 2.66 for *S. marcescens* (10^6 /mL), 3.35, 1.70, 1.40 for *E. coli* (10^6 /mL), respectively. The viable bacterial colony counts after inoculation were drastically and exponentially declined along with the time in both tested bacteria regardless the initial concentration of inoculums.

Discussion: Reduction of viable bacterial count was severe and it was concerned there were not enough viable bacteria after 5 minutes when 10^6 /mL inoculums were applied. However, it seemed enough even after 10 minutes when 10^9 /mL was inoculated. Based on the obtained results, followings were suggested for bacterial inoculation method when performing antimicrobial evaluation. Bacterial inoculums should be prepared as an appropriate concentration which could keep around 10^7 CFU/ site when inoculated on the skin. Specimen sample should be collected within 5-10 minutes after inoculation. The control should be placed not only for antimicrobial evaluation but for viable bacterial counts monitoring to ensure the reliability.