

■Original articles

皮膚上のクロルヘキシジン量と殺菌効果の関係

田ノ上 完、大久保 憲、梶浦 工

東京医療保健大学大学院

The Relation between the Amount of Chlorhexidine and its Microbicidal Activity on Skin

Hiroshi Tanoue, Takashi Okubo, Takumi Kajiura

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

要旨：

背景：クロルヘキシジングルコン酸塩（CHG）は持続的殺菌作用を持つ消毒薬として、様々な組成や濃度で広く使用されており、それらの製剤の有効性が比較検討されている。しかし、試験条件や製剤の適用方法は統一されておらず、同一製剤を用いた場合でも皮膚に存在する CHG 量には違いがある可能性がある。in vitro において濃度（溶液中の CHG 量）と殺菌効果の関係について検討した報告は多いが、皮膚上の CHG 量と殺菌効果の関係について、これまでに十分な検討はなされていない。

目的：手指消毒に使用される CHG 製剤の適用条件における皮膚上の CHG 量と殺菌効果の関係について知見を得る。

方法：殺菌力試験について、前腕屈側部に設けた試験ポイントに段階的な濃度に調製した CHG エタノール液および消毒用エタノールを塗布し、乾燥させた。その後、調製した菌液を播種し、2 分後にカップスクラブ法にて菌を回収した。これを段階希釈して寒天培地にて培養後、コロニー数をカウントし、control からの対数減少値を求めた。定量試験について、試験ポイントに CHG エタノール液を殺菌力試験と同量塗布し、乾燥させた。その後カップスクラブ法にて回収し、回収液より液体クロマトグラフィー用定量サンプルを調製して、定量した。得られた定量結果より、回収した CHG の量を算出した。

結果：皮膚上の CHG 量と殺菌効果には正の相関がみられた。また回収した CHG 量と、CHG エタノール液の濃度と適用量から求めた CHG 理論値には強い正の相関があった。

結論：本研究では、皮膚上の CHG は、その量に依存した殺菌効果を持つことが示唆された。また回収される CHG 量を比較することで、皮膚上の CHG の相対的な殺菌効果を比較できると考えられた。

Key words：クロルヘキシジン、皮膚、殺菌効果、液体クロマトグラフィー

はじめに

クロルヘキシジングルコン酸塩（CHG）は持続的殺菌作用をもつ消毒薬として、手指やカテーテル刺入部皮膚、手術野の皮膚消毒等に様々な組成や濃度で広く使用されており¹⁾、それらの製剤の有効性が比較検討されている。しかし、各研究報告における試験条件や製剤の適用方法は統一されておらず、同一製剤を用いた場合でも皮膚に存在する CHG 量には違いがあると考えられる。殺菌効果の評価は、CHG 量をもとに評価すべきである。in

vitro において濃度（溶液中の CHG 量）と殺菌効果の関係について検討した報告は多いが²⁻⁵⁾、皮膚上における CHG 量と殺菌効果の関係については、これまでに十分な検討はなされていない。

1. 目 的

本研究では、速乾性手指消毒における手指消毒薬の使用条件を想定し、種々の濃度の CHG エタノール溶液を使用した場合の皮膚上の CHG 量に注目し、外部からの汚染に対する殺菌効果との関係を検討する。

2. 方 法

本研究では、ヒトの皮膚上に、速乾性手指消毒薬の組成の基本である CHG エタノール液を塗布し、塗布面への菌液添加による殺菌力試験と塗布面から回収した CHG の液体クロマトグラフィーによる定量試験を行った。

想定した手指消毒薬の適用条件：

速乾性手指消毒薬の1回あたりの使用量は、ローション剤では3mL、ゲル剤では1.2mLが一般的である。本研究ではこの両方の使用条件を検討する。手指の表面積については個人差があるが、今回はLサイズの手袋を着用するような、大きな手指に適用することを想定した。想定した手指の表面積は、Lサイズ手袋の投影像をコピー機にて印刷し、投影像部分を切り取り、印刷用紙を均質なものと考えて印刷用紙の面積(A4: 623.7cm²)と重さ(3.96g)と切り抜いた部分の重さ(1.74g)から手指のおおよその面積を求めた。投影像の面積は274 cm²と算出されたため、両手指あわせた表面積を1096 cm²とした。これより、手指消毒薬1.2mL または 3mL を手指に均一に塗布した場合の1cm²あたりの塗布量は、それぞれ約1.09μL、約2.74μLと算出され、これを適用条件とした。

CHG エタノール液の調製：

20 w/v%CHG 水溶液をもとに、消毒用エタノールを用いて一般的な手指消毒薬として使用される範囲の濃度である0.1%、0.2%、0.3%、0.5%CHG エタノール液をそれぞれ希釈調製した。

菌液の調製：

殺菌力試験に用いる菌種は *Escherichia coli* K12(NBRC 3301)を選択し、マクファーランド比濁法により10⁸ CFU/mLの菌液を調製した。

菌回収液の調製：

CHG 不活性化作用のある、10%ポリソルベート 80、3%レンチン、滅菌精製水からなる中和剤を殺菌力試験における菌回収液とした。

CHG 回収液の調製：

CHG の定量試験サンプルの回収液として、1% NaHPO₄、0.04% KH₂PO₄、0.1% Triton X-100、精製水からなる溶液をCHG 回収液とした。

被験者：

被験者はボランティアを募り、皮膚の性状の違い等による結果への影響を排除するため、1名に固定した。

カップスクラブ法：

サンプル回収について、サンプリングポイントに内径2.1cmのステンレス製シリンダーを押し当て、中に各種回収液を注ぎ、プラスチック製エーゼを使用して45秒間のスクラブ操作を行った。操作の実施者は全実験を通して1名に限定した。

液体クロマトグラフィー条件：

1. 使用カラム：Kietex 2.6μm C18XB 3.0mm φ×100mm
2. 検出波長：UV at 254nm
3. 移動相：測定時間は7分30秒。測定開始から3分間は、5mmol/L NaH₂PO₄・2H₂O 及び 100mmol/L NaClO₄を含む水溶液をリン酸で pH 2.5 に調製した液/アセトニトリル混液 60：40。3分以降は同液 20：80。
4. 流速：0.8mL/min
5. 注入量：4μL
6. 試験標準品：日局 クロロヘキシジングルコン酸液 (20w/v%)
7. 備考：試料溶液、標準溶液はすべて 0.45μm 親水性 PTFE メンブランフィルターでろ過し分析を行った。

濃度既知の試験標準品を用いて段階的な濃度に調製した CHG 標準溶液を定量し、得られたピーク面積から検量線を作成した。その後定量サンプルを測定して得られたピーク面積を検量線と照らし合わせて濃度を求めた。

殺菌力試験：

本研究は手指消毒を想定したものであるが、均質な皮膚上から複数のサンプリングが必要となるため、これらの条件を満たす実験部位として前腕屈側部を選択した (Figure 1)。面積 3.46cm²のサンプリングポイントを5箇所設け、前述の手指消毒薬の適用条件をもとに、調製した CHG エタノール液 3.8μL (1.09μL/cm²×3.46cm²) または 9.5μL (2.74μL/cm²×3.46cm²) をそれぞれ滴下し、サンプリングポイントからはみ出さないようマイクロスパーテルで均一に塗布し乾燥させた。乾燥後、ポイントに菌液5μLを添加し、スパーテルで均一に塗り広げ、2分間放置した。その後、菌回収液5mLを使用してカップスクラブ法にて菌を回収した。回収液は、原液、10倍、100倍、1000倍と段階希釈し、各100μLを寒天培地に塗布後、30℃ 24時間培養した。4種の CHG エタノール液および control の消毒用エタノールについて同様の操

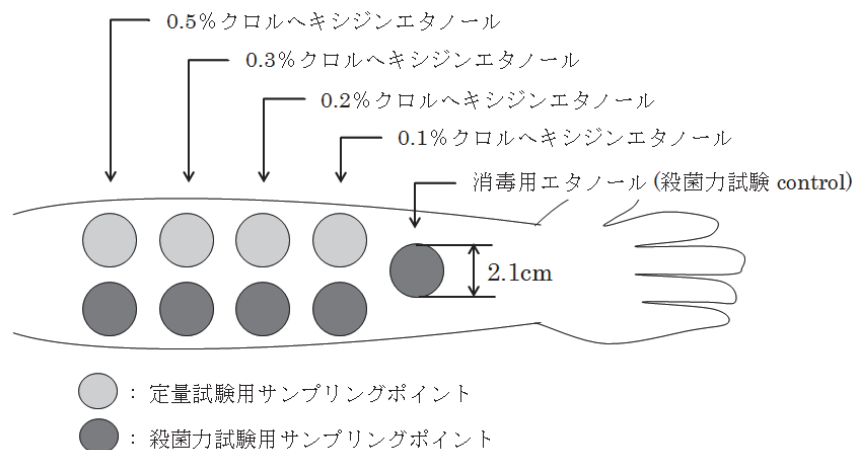


Figure 1. 殺菌力試験および定量試験のサンプリングポイント

前腕屈側部に9箇所のサンプリングポイント (3.46 cm²) を設け、8箇所に各種クロルヘキシジン (CHG) 製剤を滴下し、金属スパーテルでポイントからはみ出さないよう均一に塗り広げた。残り1箇所には消毒用エタノールを塗布した。

作を行なった。発育したコロニーを計数し、controlからの対数減少値 (LR 値) を算出した。試験は CHG エタノール液適用量別に各5回実施した。

定量試験：

殺菌力試験同様のサンプリングポイント4箇所を設け、CHG エタノール液 3.8 μ L もしくは 9.5 μ L をそれぞれ滴下し、サンプリングポイントからはみ出さないようミクロスパーテルで均一に塗布し乾燥させた。その後 CHG 回収液 2.5mL を使用してカップスクラブ法にて CHG を回収し、回収液 1mL をメタノール 1mL で希釈して液体クロマトグラフィーにより濃度を求めた。この濃度と回収液の容量 (2.5mL) をもとに、CHG 実測値を算出した。4種の CHG エタノール液について同様の操作を行なった。あわせて、殺菌力試験および定量試験に使用した4つの CHG エタノール液自体も適宜希釈、定量し、実測濃度を

確認した。さらに CHG エタノール液実測濃度と滴下量 (3.8 μ L もしくは 9.5 μ L) から CHG 理論値を求めた。この CHG 理論値と CHG 実測値をもとに、カップスクラブ法による CHG の回収率を求めた。試験は CHG エタノール液適用量別に各5回実施した。

統計解析：

統計解析は、解析ソフト JMP 8 を使用した。

3. 結 果

各条件で得られた実験結果は Table 1 のとおりであった。CHG 理論値と LR 値、CHG 実測値と LR 値には正の相関がみられ、相関係数はそれぞれ 0.80、0.79 だった (Figure 2a, 2b)。このうち CHG 実測値と LR 値の関係について CHG エタノール液の適用量ごとに分けて比較す

Table 1. 定量試験および殺菌力試験の実験結果 (平均 $\pm$ 標準偏差, n= 5)

CHG エタノール液 製剤濃度(%)	滴下量(μ L)	CHG エタノール液 実測値(%)	CHG 理論値(μ g)	CHG 実測値(μ g)	回収率(%)	殺菌力試験結果 (LR 値)
0.1	3.8	0.10 $\pm$ 0.00	3.92 $\pm$ 0.03	3.12 $\pm$ 0.20	79.77 $\pm$ 4.66	0.12 $\pm$ 0.73
	9.5	0.10 $\pm$ 0.00	9.60 $\pm$ 0.14	5.01 $\pm$ 0.40	52.24 $\pm$ 4.40	0.52 $\pm$ 0.18
0.2	3.8	0.21 $\pm$ 0.00	7.86 $\pm$ 0.09	5.49 $\pm$ 0.94	69.85 $\pm$ 11.67	0.40 $\pm$ 0.52
	9.5	0.20 $\pm$ 0.00	19.38 $\pm$ 0.36	9.07 $\pm$ 0.92	46.82 $\pm$ 5.06	1.46 $\pm$ 0.58
0.3	3.8	0.32 $\pm$ 0.01	12.03 $\pm$ 0.29	7.73 $\pm$ 1.14	64.16 $\pm$ 8.63	0.98 $\pm$ 1.01
	9.5	0.31 $\pm$ 0.01	29.41 $\pm$ 0.50	13.08 $\pm$ 1.13	44.52 $\pm$ 4.44	3.50 $\pm$ 0.85
0.5	3.8	0.53 $\pm$ 0.01	20.12 $\pm$ 0.51	11.14 $\pm$ 1.09	55.43 $\pm$ 5.97	3.69 $\pm$ 0.66
	9.5	0.52 $\pm$ 0.01	49.15 $\pm$ 0.71	23.20 $\pm$ 2.77	47.23 $\pm$ 5.94	4.04 $\pm$ 0.64

4つの濃度に調製したクロルヘキシジンエタノール液について、サンプリングポイントに滴下した量ごとに定量試験と殺菌力試験の結果および定量試験結果をもとに求めた値をまとめた。CHG：クロルヘキシジングルコン酸塩

ると、回帰直線の傾きは、9.5 μL 適用した場合より 3.8 μL 適用した場合のほうが大きく、切片の値は小さかった (Figure 3a, 3b)。CHG 理論値と CHG 実測値の相関係数は 0.97 で、非常に強い相関がみられた (Figure 4)。

回収率について、CHG エタノール液を 3.8 μL 適用した場合は、皮膚上の CHG 量が少ないサンプルほど回収率が高く、CHG 量の増加に伴い負の相関がみられた (Figure 5)。一方 9.5 μL 適用した場合は同様の相関はみられず、回収率はほぼ一定だった (Figure 6)。

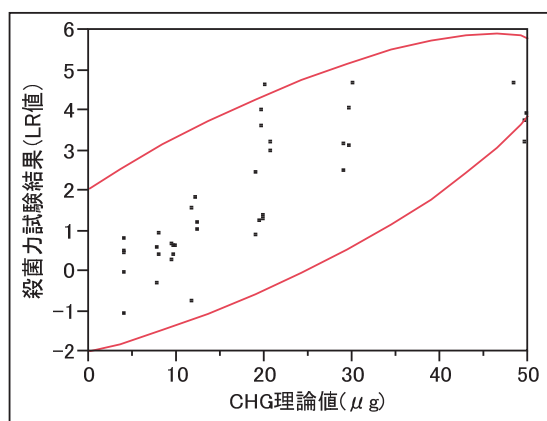


Figure 2a. CHG 理論値 (μg) と殺菌力試験結果 (LR 値) の二変量の関係
グラフ中の楕円は二変量正規楕円 ($P=0.95$) を表す。
相関係数：0.80

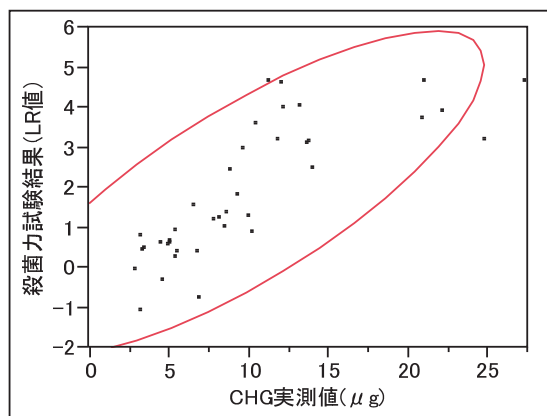


Figure 2b. CHG 実測値 (μg) と殺菌力試験結果 (LR 値) の二変量の関係
グラフ中の楕円は二変量正規楕円 ($P=0.95$) を表す。
相関係数：0.79

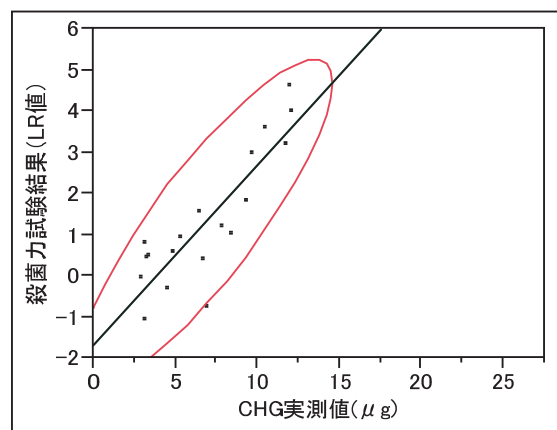


Figure 3a. CHG 実測値 (μg) と殺菌力試験結果 (LR 値) の二変量の関係
滴下量 (μL) = 3.8 μL
グラフ中の楕円は二変量正規楕円 ($P=0.95$) を、直線は回帰直線を表す。
相関係数：0.86 回帰直線式： $y = 0.44x - 1.67$

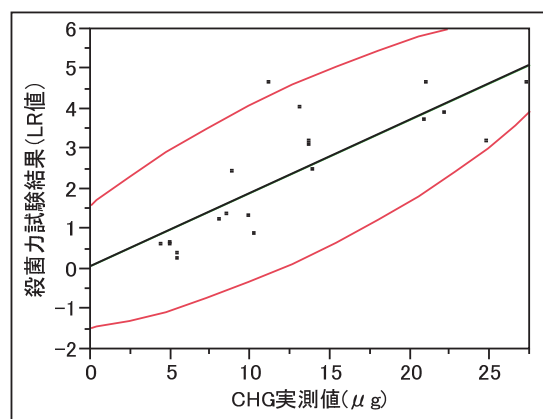


Figure 3b. CHG 実測値 (μg) と殺菌力試験結果 (LR 値) の二変量の関係
滴下量 (μL) = 9.5 μL
グラフ中の楕円は二変量正規楕円 ($P=0.95$) を、直線は回帰直線を表す。
相関係数：0.82 回帰直線式： $y = 0.18x + 0.08$

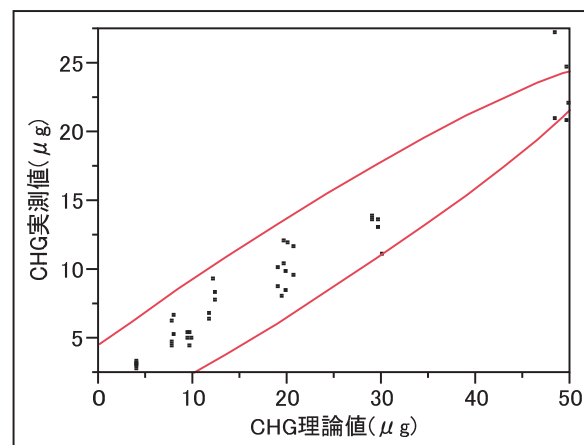


Figure 4. CHG 理論値 (μg) と CHG 実測値 (μg) の二変量の関係
グラフ中の楕円は二変量正規楕円 ($P=0.95$) を表す。
相関係数：0.97

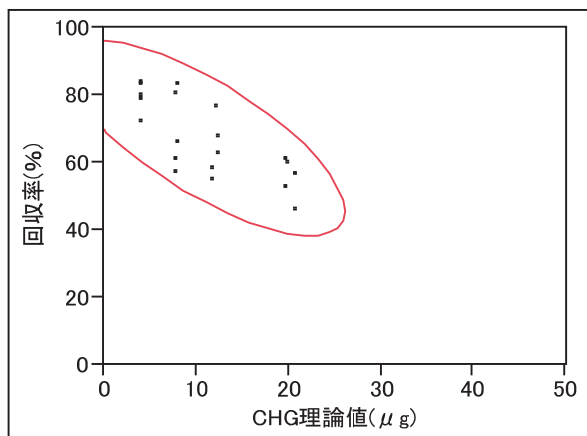


Figure 5. CHG 理論値(μg)と回収率(%)の二変量の関係
 滴下量(μL)=3.8 μL
 グラフ中の楕円は二変量正規楕円 ($P=0.95$) を表す。
 相関係数: -0.75

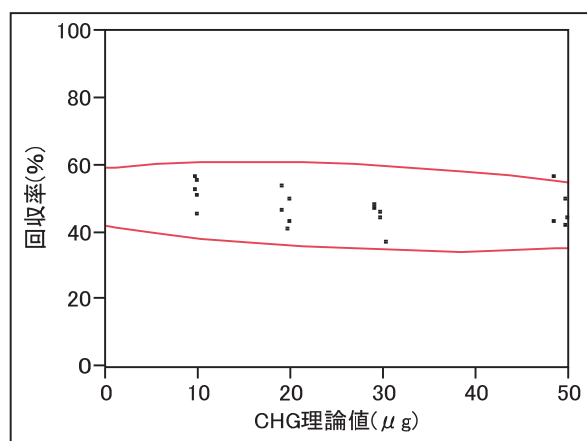


Figure 6. CHG 理論値(μg)と回収率(%)の二変量の関係
 滴下量(μL)=9.5 μL
 グラフ中の楕円は二変量正規楕円 ($P=0.95$) を表す。
 相関係数: -0.30

4. 考 察

これまでに CHG の殺菌効果に関する *in vitro* 研究において、CHG の濃度に依存した殺菌効果が報告されている^{2,4)}。本研究では、より実使用に近い条件として皮膚上での CHG 量と殺菌効果の関係を検討した。定量試験と殺菌力試験の結果より、CHG 量と殺菌効果には高い正の相関がみられた。これより、皮膚上においても CHG はその量に依存した殺菌効果をもつことが示唆された。

速乾性手指消毒薬の一般的な適用量である 1.2mL および 3mL を使用する条件を想定した、3.8 μL 適用時および 9.5 μL 適用時に分けて解析したところ、3.8 μL 適用時の回帰直線は傾きが大きく、切片は小さかった。この結果について、今回の殺菌力試験の control の菌数をもとに求

められる LR 値は 5 程度が限界であったため、CHG 量が多い 9.5 μL 適用時には値が頭打ちとなった可能性がある。また Figure 6 で示すように、3.8 μL 適用時は CHG 理論値と回収率に負の相関がみられており、CHG エタノール溶液濃度が高いほど CHG 実測値が低めにプロットされることになる。これらが CHG エタノール溶液適用量によって回帰直線に差異を生じた要因と考えられる。皮膚上の CHG の定量については、Edmiston らや Popovich らが、CHG の定性試験に用いられる発色性を利用した半定量を行なっている^{6,7)}。しかし発色の度合いによる CHG 量の判定は厳密な定量値を得られないため、今回の CHG 量と殺菌効果の関係の検討には適当でない。そこで本研究では、これまで報告のみられない液体クロマトグラフィーによる定量を行なった。皮膚上からサンプリングする場合の最適な方法が明らかでなかったため、菌回収と同じカップスクラブ法を採用した。

回収率について、3.8 μL 適用時において CHG 適用量が少ないほど回収率が高かった。一般に CHG は皮膚への浸透性を持つと言われるが⁸⁾、その性質が回収に影響したならば、適用量が少ないものほど回収率は低くなるはずである。また Karpanen らは CHG アルコール液と皮膚の 2 分間の接触では、CHG は皮膚へほとんど浸透しないと報告しており⁹⁾、今回の実験において適用した CHG エタノール溶液の乾燥時間が 1 分間程度だったことを考慮すると、CHG の吸着や皮膚内部への浸透が影響した可能性は低い。データは示していないが、0.5%CHG エタノールの定量サンプルを回収後のポイントにおいて、再度カップスクラブ法にて定量サンプルの回収を行い、予備的な定量試験を行なったところ、定量限界以下ながら CHG が検出された。これらのことから、回収液 1 回の注入と 45 秒間のスクラブによるカップスクラブ法では、今回検討した実験条件全てにおいて一定の割合で CHG を回収することができなかったと考えられる。

CHG 実測値と、CHG 理論値は非常に高い相関を示しており、皮膚上から回収される CHG 量は皮膚上に存在する CHG 量を強く反映することがわかった。このことから、皮膚上の CHG を回収して定量し、その値を比較することで、CHG による相対的な殺菌効果をおおよそ比較することができると考えられた。ただし、統計学的に大きな影響は与えなかったものの、3.8 μL 適用時の CHG 回収率が一定ではなかったため、今回の CHG 回収方法は、比較的少ない CHG を定量するには不十分である。

本研究では、皮膚上の CHG 量と殺菌効果の関係について、速乾性手指消毒薬として CHG 製剤を適用した場合、CHG は皮膚上の量に依存した殺菌効果を示すことが示唆された。また皮膚上の CHG の殺菌効果は、回収して定量することで相対的な比較ができると考えられた。より詳細な関係を明らかにするために、サンプルの回収方法や殺菌力試験の条件、正確かつ簡便な定量法等について、さらなる検討が望まれる。

文 献

- 1) Kathleen P, Sean CS, Paul SB, Anne VP. *Martindale The complete drug reference*, 32th edn. Pharmaceutical Press 1999; 1107-1109.
- 2) 鈴木朝勝, 久保照巳, 牧野多津子, 難波芳道. クロルヘキシジンによる器具消毒効果の実験的研究. *医科器械学* 1986; 56: 547-553.
- 3) 二宮昌樹, 中野節, 根ヶ山清, 林英生. 院内臨床分離菌に対するクロルヘキシジンの殺菌効果. *病院薬学* 1990; 16: 14-19.
- 4) 金澤勝則, 上田豊. 近年分離の各種臨床分離細菌に対するグルコン酸クロルヘキシジンの殺菌力. *Jpn J Antibiot* 2004; 57: 449-464.
- 5) 高田裕子, 安田忠司, 勝野陽子, 伊藤美香, 高橋美奈. 薬剤耐性株と感性株に対する各種消毒剤の殺菌効果の比較検討 *S. marcescens*. *基礎と臨床* 1993; 27: 6025-6039.
- 6) Edmiston CE, Krepel CJ, Seabrook GR, Lewis BD, Brown KR, Towne JB. Preoperative Shower Revisited: Can High Topical Antiseptic Levels Be Achieved on the Skin Surface Before Surgical Admission? *J Am Coll Surg* 2008; 207: 233-239.
- 7) Popovich KJ, Lyles R, Hayes R, Hota B, Trick W, Weinstein RA, Hayden MK. Relationship between Chlorhexidine Gluconate Skin Concentration and Microbial Density on the Skin on Critically Ill Patients Bathed Daily with Chlorhexidine Gluconate. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33: 889-896.
- 8) Karpanen TJ, Worthington T, Conway BR, Hilton AC, Elliott TSJ, Lambert PA. Penetration of Chlorhexidine into Human Skin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3633-3636.
- 9) Karpanen TJ, Worthington T, Conway BR, Hilton AC, Elliott TSJ, Lambert PA. Permeation of chlorhexidine from alcoholic and aqueous solutions within excised human skin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1717-1719.