

■Review article

生体消毒薬の抗微生物効果と細胞毒性

岩澤篤郎、松村有里子

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科

Antimicrobial effects and cytotoxicity of antiseptics

Atsuo Iwasawa, Yuriko Matsumura

Faculty of Healthcare, Tokyo Healthcare University Postgraduate School

1. はじめに

皮膚に対する刺激・副作用が少ないことで汎用されている生体消毒薬の主成分として、クロルヘキシジングルコン酸塩、ベンザルコニウム塩化物、エタノール、そしてポビドンヨードがあげられる。これらは単剤もあるが、エタノールにクロルヘキシジングルコン酸塩やベンザルコニウム塩化物を配合したラビング剤のように複数の成分を組み合わせた製剤も多く市販されている。基本的に、消毒薬は微生物に作用するだけでなく、生体細胞にも同様に作用することから、アナフィラキシー、接触皮膚炎、手荒れなどの副作用が多く報告されている。ここでは、主に各種微生物に対する殺菌・抗ウイルス効果と、培養細胞に対する影響を検討してきた結果に基づき生体消毒

薬に関して考えてみたい。

2. クロルヘキシジングルコン酸塩とアルコール

クロルヘキシジングルコン酸塩（Chlorhexidine Gluconate, CHG）は、医療現場で汎用されている生体消毒薬の一つであり、使用時に優れた殺菌力を呈するだけでなく、皮膚に残留して持続的な効果を示す薬剤である。CHGの作用機序であるが、細胞膜透過性の傷害、ATPaseのような膜結合酵素の阻害により静菌的に作用し、殺菌的な濃度では細胞内に急速に侵入し、ATPや核酸を凝固し沈殿を生成するといわれている。

CHGの殺菌効果に関しては多くの報告¹⁻⁶⁾があるが、我々も図1に示すような殺菌効果試験方法で確認した⁷⁻⁸⁾。20w/v% CHG（大日本住友製薬）を滅菌蒸留水で、0.2, 0.5,

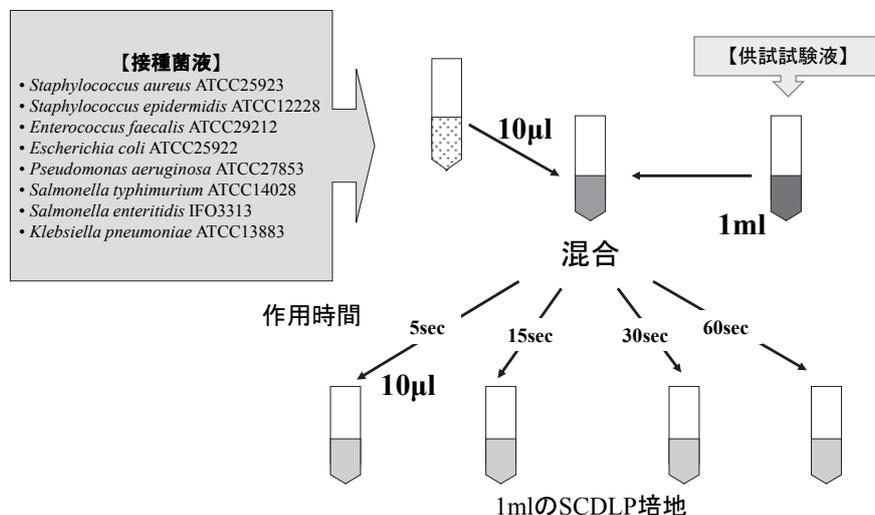


図1 殺菌効果試験方法

表 1 CHG (滅菌蒸留水で希釈) の殺菌効果

(sec.)	4% CHG				2% CHG				1% CHG				0.5% CHG				0.2% CHG			
	5	15	30	60	5	15	30	60	5	15	30	60	5	15	30	60	5	15	30	60
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S.epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	+	+	+	±
<i>E.faecalis</i>	+	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	±	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S.typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	+	±	±	-	+	+	+	±
<i>S.enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	±	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-

+:増菌 -:増菌せず

1, 2, 4%濃度に調製した供試試験液における殺菌効果試験結果を表 1 に示した。*Enterococcus faecalis* において 4%濃度であっても即効的な効果が認められなかった。このような一部の菌に対して即効的な殺菌効果が認められない欠点を補うために、アルコールを使用したラビング剤が市販されている。さらに、CDC「血管内留置カテーテル関連感染予防のためのガイドライン (2011)」⁹⁾では、中心静脈カテーテルや末梢動脈カテーテル挿入前及びドレッシング交換時の皮膚消毒は 0.5%を超える濃度の CHG アルコール製剤の使用を推奨している。このような背景から、CHG とアルコールの相互作用に関してさらに検討を行った。

消毒用アルコールで 0.2% CHG に調整した供試液は、*E.faecalis* を含め検討した全菌株で即効的な殺菌効果が認められた。しかし、この結果は、消毒用アルコールの効果によるものであり、CHG との相乗効果が明確にならなかった。そこで、滅菌蒸留水で希釈した CHG で殺菌効果が認められなかった *E.faecalis* に対して、低濃度のエタノール共存下での殺菌試験を行った結果を表 2 に示し

た。30%濃度で確実性は若干劣るものの低濃度の CHG で即効的な殺菌効果を示した。また、0.2% CHG をエタノール以外のアルコールで作成した場合、表 3 に示すように、イソプロパノールが優れた殺菌効果を示し、次いでエタノールとなった。メタノールや変性アルコールでは、即効的な殺菌効力が認められなかった。しかし、図 2 に示すように抗ウイルス効果ではイソプロパノールの効果はエタノールより劣っていた (詳細は後述)。ラビング剤として主に何を殺菌対象に使用するかによって溶剤の種類を考慮する必要があるだろう。

細菌を対象にした消毒剤の検討は多いものの、ウイルスを対象にしたラビング剤の検討はあまりない。そこで、エンベロープを有しない RNA ウイルスとして、コクサッキーウイルス A7 (Cox.A7)、コクサッキーウイルス B5 (Cox.B5)、ネコカリシウイルス F9 株 (FCV/F9)、エンベロープを有しない DNA ウイルスとしてヒトアデノウイルス 3 型 (Ad.3)、7 型 (Ad.7)、8 型 (Ad.8) に対する効果を検討した¹⁰⁾。消毒用アルコールで 0.2%と 0.5% CHG 濃度に調製した 0.2%CHG と 0.5%CHG と市販 4 製

表 2 CHG (エタノールで希釈) の殺菌効果

(sec.)	CHG 濃度	消毒用アルコール	50% EtOH	30% EtOH	10% EtOH	蒸留水							
		5 15 30 60	5 15 30 60	5 15 30 60	5 15 30 60	5 15 30 60							
<i>E. faecalis</i>	4%	-	-	-	-	±	-	-	-	+	±	±	±
	2%	-	-	-	-	±	-	-	-	+	+	+	+
	1%	-	-	-	-	±	-	-	-	+	+	+	+
	0.5%	-	-	-	-	±	-	-	-	+	+	+	+
	0.2%	-	-	-	-	±	±	-	-	+	+	+	+
	0.1%	-	-	-	-	±	±	-	-	+	+	+	+
	(-)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+

+:増菌 -:増菌せず

表3 0.2%CHG を30%アルコールで作成した場合の殺菌効果

(sec.)	<i>S.aureus</i>				<i>E.faecalis</i>				<i>S.typhimurium</i>			
	5	15	30	60	5	15	30	60	5	15	30	60
Ethanol (EtOH)	±	±	-	-	±	±	-	-	±	-	-	-
IPA:EtOH=1:9	+	±	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-
IPA:EtOH=3:7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
IPA:EtOH=5:5	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
IPA:EtOH=7:3	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
IPA:EtOH=9:1	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
iso-propanol (IPA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methanol	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
99%IPA変性アルコール*	+	+	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-
99%メタ変性アルコール*	+	+	+	±	+	+	±	-	-	-	-	-
95%IPA変性アルコール*	+	+	-	-	+	±	±	-	-	-	-	-
95%メタ変性アルコール*	+	+	+	-	+	±	±	-	-	-	-	-

*: 今津薬品工業(株)製を使用した

+: 増菌 - : 増菌せず

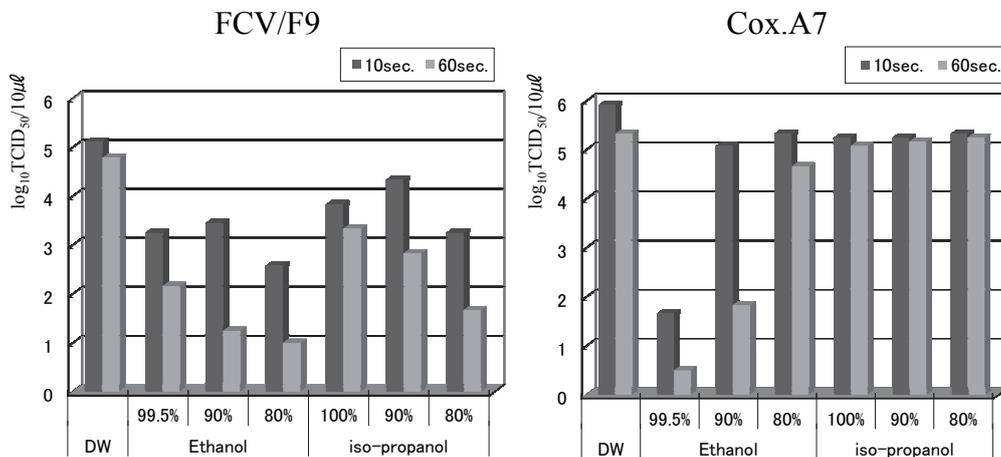


図2 エタノールとイソプロパノールの抗ウイルス効果

表4 CHGの抗ウイルス効果

	FCV/F9		Cox.A7		Cox.B5		Ad.3		Ad.7		Ad.8	
	10sec	60sec	10sec	60sec	10sec	60sec	10sec	60sec	10sec	60sec	10sec	60sec
0.5%CHG	90.88	99.98	-11.43	68.26	92.50	<99.97	<96.15	<95.34	<99.18	<95.78	<83.87	<80.50
0.2%CHG	85.77	99.90	62.24	82.22	86.66	<99.97	<99.62	<99.53	<99.62	<99.58	97.13	<98.05
CHG-1	95.78	99.91	36.61	43.55	25.01	<99.97	93.16	<99.53	91.82	<99.58	76.15	<98.05
CHG-2	98.03	99.97	7.32	93.21	71.16	<99.97	<99.62	<99.53	93.20	<99.58	76.42	<98.05
CHG-3	98.05	99.92	23.79	73.90	86.66	<99.97	<99.62	<99.53	98.79	<99.58	83.87	<98.05
CHG-4	49.30	64.15	23.79	78.29	94.87	<99.97	53.23	<99.53	91.82	98.03	76.42	<98.05
EtOH	94.38	99.97	90.73	96.31	37.63	99.997	99.32	<99.95	99.32	<99.96	76.42	96.53

%ウイルス減少率=V(control)-V(treated)/V(control)×100, V(control): 滅菌PBS(-)を使用した陰性コントロール, V(treated): 供試消毒薬

0.5% CHG, 0.2%CHG: 20%クワロヘキシジングルコン酸塩溶液(CHG、ヒビテン・グルコネート液20%、大日本住友製薬)より0.5%、0.2%濃度になるように日局消毒用アルコールに添加し使用した。CHG-1:ヒビスコールSH(サラヤ) CHG-2: ヒビスコールS(サラヤ) CHG-3: ウェルアップ(丸石製薬) CHG-4: ヒビソフト(大日本住友製薬) EtOH: 消毒用アルコール(和光純薬)

剤 (CHG-1~4) の抗ウイルス効果を、消毒用アルコール (EtOH) の結果とともに表4に示した。まず、上述した

ようにイソプロパノールよりエタノールで、抗ウイルス効果が認められ、特に Cox.A7 ではイソプロパノールで

は効果が認められなかった。アルコール濃度であるが、図2に示すように、FCV/F9はアルコールの種類によらず、濃度の低下とともに抗ウイルス効果が高い結果となり、Cox.A7はイソプロパノールでは効果が認められず、99.5%エタノールで抗ウイルス効果が高い結果となった。作用時間1分後のアデノウイルスに対する抗ウイルス効果は、Ad.7に対するCHG-4とAd.8に対するEtOHで検出限界以下となっていないが、優れた抗ウイルス効果を示した。その他のウイルスでは、FCV/F9とCox.A7ではいずれの供試消毒薬も検出限界以下とならず、特にCox.A7に対するCHG-1とFCV/F9に対するCHG-4はほとんど抗ウイルス効果が認められなかった。さらに、Cox.A7に対するCHGの抗ウイルス効果はほとんど認め

られなかった。

以上、一部のウイルスに対しては確実な効果が認められなかったが、CHGアルコール製剤は優れた効果を示すことが検証できた。次に、CHGの特徴である皮膚に残留して持続的な効果を示す点について評価した。*in vitro*における評価方法として図3に示すような方法を構築した。結果を図4に示したが、0.2%CHGまたは0.5%CHGを細胞培養用シャーレに接種、乾燥後菌液をPBS(-)または培地いずれかで作成しても、ともに菌の増殖は認められなかった。この結果から、本濃度では有機物に対する影響は少ないと考えられた。次に、残留効果を評価するために供試液添加乾燥後PBS(-)で3回洗浄することで菌の増殖の有無を検討した。特に、*Escherichia coli*で効果的

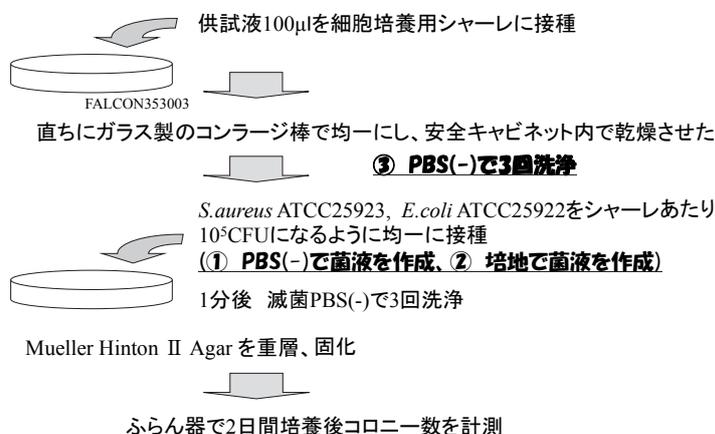


図3 シャーレにおける細菌付着阻止評価

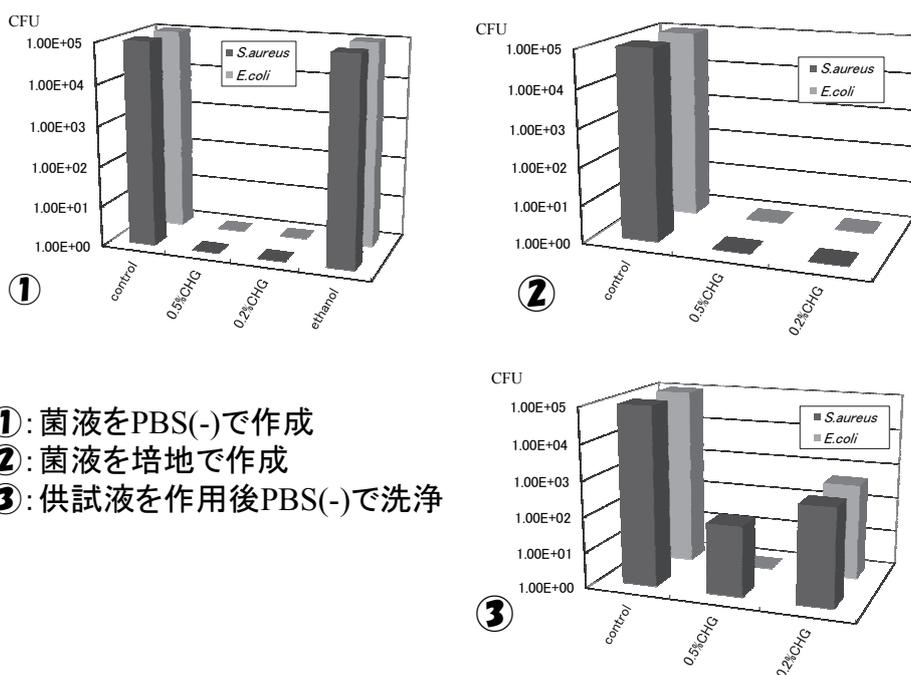


図4 シャーレにおける細菌付着阻止評価の結果

あり 0.5%CHG では菌の増殖は認められなかった。

残留効果が認められることは利点ではあるが、CHG によるアナフィラキシー発生に関する症例報告や文献的な考察¹¹⁾などのように、生体に対する副作用の問題は残されている。消毒薬は基本的に微生物のみに作用する化学物質ではなく、対象とする生体細胞にも同様に作用するからである。我々は、SIRC 細胞(ウサギ角膜由来)、Chang conjunctiva 細胞(ヒト成人結膜由来)、ヒト真皮線維芽細胞(h.D.fibro)、FRSK 細胞(ラット表皮由来)の培養細胞株を使用して、MTT assay(図5)による細胞毒性試験を実施した^{12,13)}。20w/v% CHG を滅菌蒸留水で希釈した供試液の結果を図6に示したが、いずれの細胞に対しても10万倍希釈(0.0002%)で細胞毒性の消失が認められた。市販製剤は主に0.2%CHG アルコール製剤であることから、1000倍希釈で毒性が消失することになる。また、データを示さないが、アルコールの毒性は、5~10倍希釈

消失し、イソプロパノールはエタノールより若干高い毒性が認められた。これらの結果は、ラビング剤として残留効果を高めるためには、0.5%以上のCHG濃度は必要であるが、細胞毒性を考慮すると限定した使用が望まれる。また、0.2%CHG アルコール製剤であっても、汎用することでCHGの蓄積があるため、定期的な流水洗浄と手指のケアは必要である。

3. 第四級アンモニウム塩

ベンザルコニウム塩化物(Benzalkonium Chloride, BAK)は、グラム陽性、陰性菌のみならず、カビ類といった真菌類に対しても殺菌効果を有するが、芽胞を形成する細菌、結核菌をはじめとする抗酸菌および大部分のウイルスに対する殺菌・抗ウイルス効果は期待できない。殺菌の作用機序については、タンパク変性および酵素の

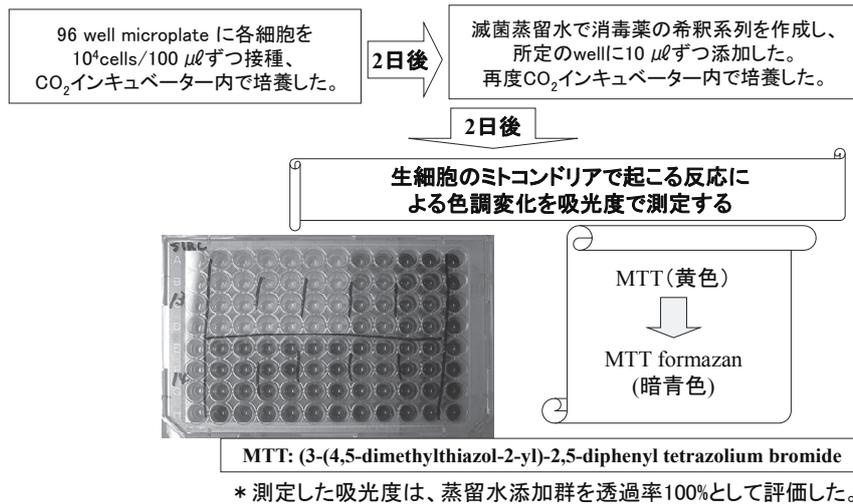


図5 MTT assay による細胞毒性試験

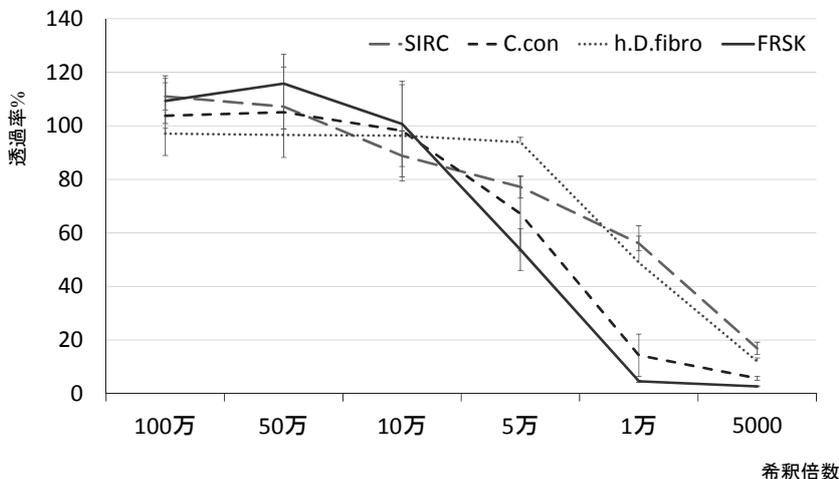


図6 CHG の細胞毒性

切断、糖の分解と乳酸の酸化など代謝への作用、膜透過性障害による溶菌、リンおよびカリウムの漏出、解糖の促進、原形質膜の活動を支える酵素に対する作用などが考えられている。

BAKの殺菌効力もCHGと同様な方法(図1)で検討し、その結果を表5に示した。*Staphylococcus aureus* (MRSA,MSSA)では0.02%以下の濃度で即効的な殺菌効果は消失したが、*E.faecalis*、*Serratia marcescens*、*E.coli*は、0.01%でも即効的な殺菌効力を保持していた⁸⁾。

細胞毒性試験もCHGと同様に、SIRC細胞(ウサギ角膜由来)、Chang conjunctiva細胞(ヒト成人結膜由来)、FRSK細胞(ラット表皮由来)を用い検討した結果を図7に示した。0.00001%添加時に若干FRSK細胞で毒性を呈していたが、ほぼ細胞毒性は消失していた。また、0.0001%添加時では、毒性の程度が異なり、SIRC、Chang conjunctiva、FRSK細胞の順に細胞毒性が認められた¹²⁾。

BAKもCHGと同様にラビング剤として有効成分0.2%のアルコール製剤が市販されている。データを示さない

表5 BAKの殺菌効力

BAK	MRSA	MSSA	<i>E.cloacae</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>Paeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
0.2%	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.
0.1%	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.
0.05%	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.
0.02%	>60sec.	>60sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.	< 5sec.
0.01%	>60sec.	>60sec.	< 5sec.	< 5sec.	<15sec.	< 5sec.

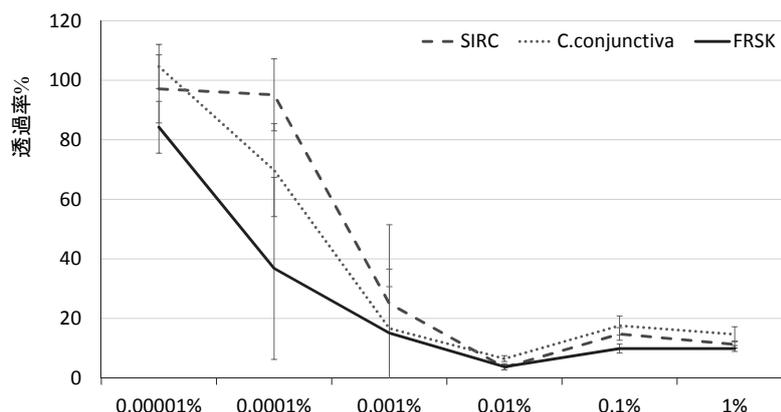


図7 BAKと細胞毒性

表6 BAKの抗ウイルス効果

	FCV/F9		Cox.A7		Cox.B5		Ad.3		Ad.7		Ad.8	
	10sec	60sec	10sec	60sec	10sec	60sec	10sec	60sec	10sec	60sec	10sec	60sec
BAK-1	98.38	99.91	-35.52	73.90	76.29	>99.97	>99.62	>99.53	>99.62	>99.58	98.39	>98.05
BAK-2	95.78	98.87	7.32	68.26	80.50	>99.97	>99.62	>99.53	>99.62	>99.58	94.90	>98.05
BAK-3	99.58	99.83	10.46	82.15	80.28	>99.97	99.43	>99.53	>99.62	>99.58	96.55	>98.05
BAK-4	99.10	99.96	22.91	91.75	88.91	>99.97	>99.62	>99.53	>99.62	>99.58	>98.39	>98.05
BAK-5	98.03	99.97	7.32	93.21	92.41	>99.97	>99.62	>99.53	>99.62	>99.58	>98.39	>98.05
BAK-6	17.78	97.98	75.76	93.17	64.92	>99.97	0	73.79	73.85	92.50	83.87	95.83
0.2%BAK	98.83	99.97	47.68	86.20	71.16	>99.97	>99.62	>99.53	>99.62	>99.58	96.55	>98.05
0.2%BZC	95.94	99.98	68.84	79.74	83.78	>99.97	>99.62	>99.53	>99.62	>99.58	>98.39	>98.05
EtOH	94.38	99.97	90.73	96.31	37.63	99.997	99.32	<99.95	99.32	<99.96	76.42	96.53

%ウイルス減少率=V(control)-V(treated)/V(control)×100, V(control):滅菌PBS(-)を使用した陰性コントロール, V(treated):供試消毒薬

BAK-1:ラビネット液(健栄製薬)、BAK-2:花王アルコールラビング液(花王)、BAK-3:ペルコムローション(吉田製薬)、BAK-4:オスバンラビング(日本製薬)、BAK-5:ウエルバス(丸石製薬)、BAK-6:ピュアミスト(J&J)、0.2%BAK:ベンザルコニウム塩化物(ナカライテスク)を0.2%濃度になるように日局消毒用アルコールに添加、0.2%BZC:ベンゼトニウム塩化物(東京化成)を0.2%濃度になるように日局消毒用アルコールに添加、EtOH:消毒用アルコール(和光純薬)

が、殺菌効力・細胞毒性には大差がなかったが、抗ウイルス効果には違いが認められた。市販6製剤(BAK-1~6)の結果を表6に示したが、Cox.A7におけるBAK-1,2と、Ad.3,7,8におけるBAK-6で抗ウイルス効果が低かった¹⁰⁾。これはBAK以外の添加物によるものと考えているが、詳細は不明である。BAK-6は、図3に示した方法で残留効果を評価すると図8に示したように*S.aureus*, *E.coli*ともに菌が検出されなかった。BAK-6は、ほかの市販製剤より残留効果が高い、もしくは高い細菌付着阻止効果が認められた。CHG製剤とも共通するが、主剤が同じでも

添加物の違いで異なる効果が認められることは興味深い。

次に、BAKは点眼薬における防腐剤として、0.002~0.02%濃度で汎用されている。これは、マルチドーズすなわち繰り返し点眼容器を使用する際に睫毛・眼瞼との接触による二次感染防止を目的として使用されている。そこで、まず、BAKの保存効力試験を実施した。保存効力試験とは、製剤の保存効力を微生物学的に評価する試験方法である。製剤の中に試験の対象となる菌種を強制的に接種、混合し、経時的に試験菌の消長を追跡するこ

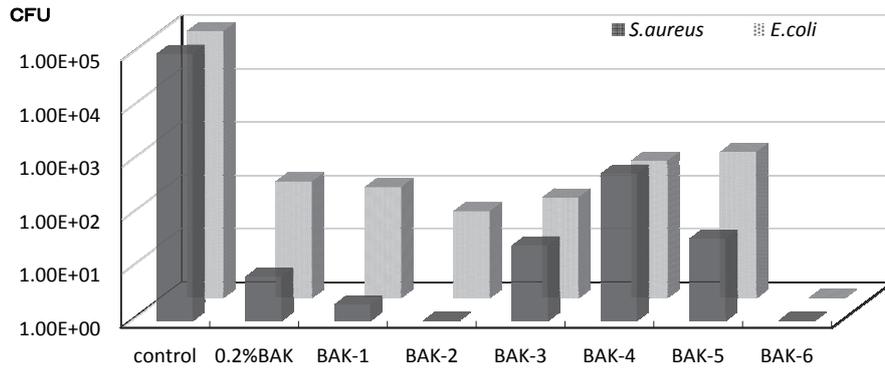


図8 シャーレにおける細菌付着阻止

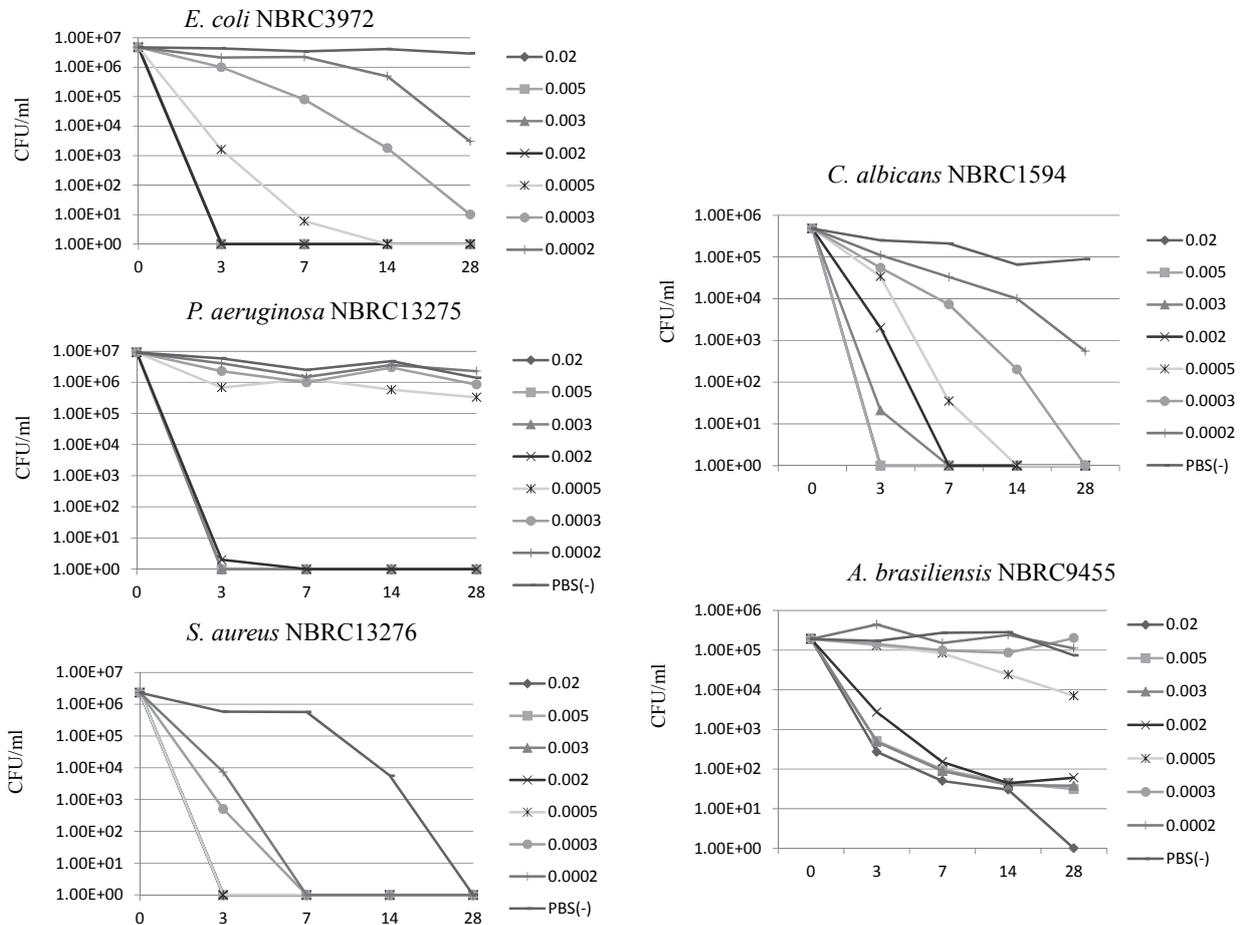


図9 BAKの保存効力試験

とにより、保存効力を評価する。試験菌株として、*E.coli* NBRC3972、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275、*S.aureus* NBRC13276、*Candida albicans* NBRC1594、*Aspergillus brasiliensis* NBRC9455 を使用した。点眼剤はカテゴリーIA、注射剤及び点耳・点眼剤を含む非経口剤に分類されるので、細菌は、14日後に接種菌数の0.1%以下、28日後で14日後のレベルと同等もしくはそれ以下、真菌は、14日後、28日後ともに接種菌数と同レベルもしくはそれ以下でなければならない¹⁴⁾。図9に示すように *E.coli* は0.0003%、*P.aeruginosa* は0.002%、*S.aureus* は0.0002%、

C.albicans は0.0002%、*A.brasiliensis* は0.0003%の濃度でクリアーした。

次に、我々は、国内の細胞銀行から入手可能な株化細胞4株 (RC-1, SIRC, Chang conjunctiva, BCE C/D-1b) を用いて、生細胞のミトコンドリアでの反応を見る MTT assay と生細胞のライソゾームでの反応を見るニュートラルレッド (NR) 試験を実施した¹⁵⁾。図10に示したように、0.02% BAK 原液と2倍希釈 (0.01%) 添加時は、10, 30, 60分いずれも顕著な細胞毒性を示した。10倍希釈 (0.002%) 添加時は Chang conjunctiva 細胞で毒性を示し

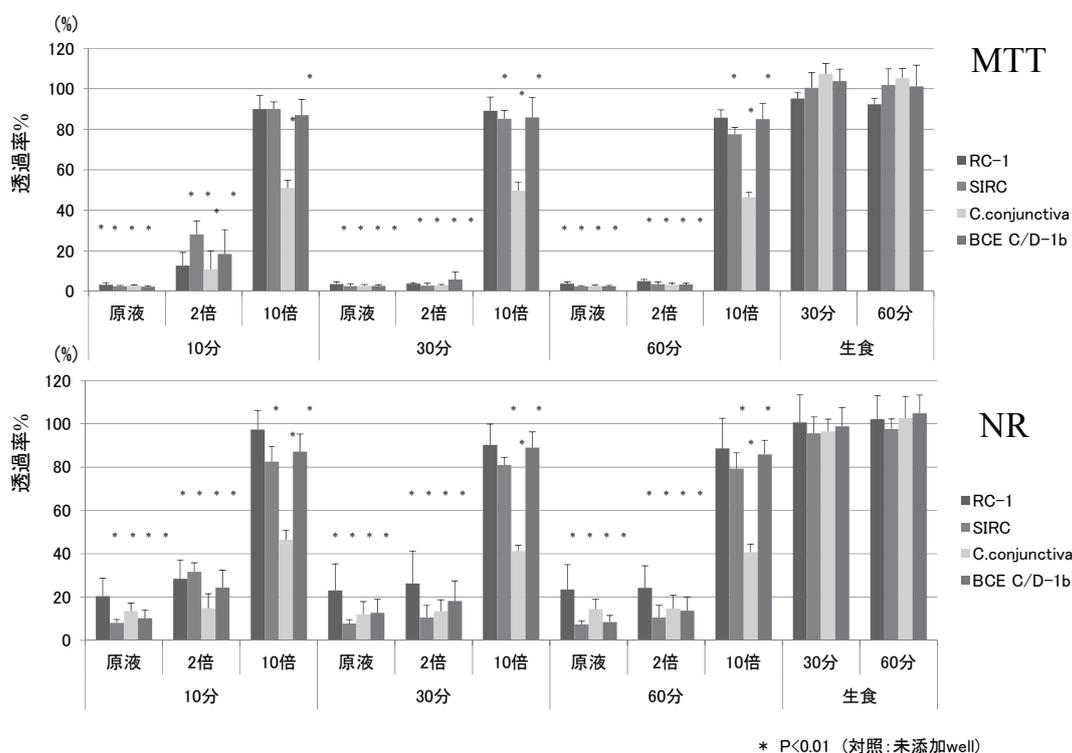


図10 0.02%BAKの結果

1. 試験薬剤を希釈系列(原液、2倍、10倍)と作用時間(10分、30分、60分)で4細胞株に作用させる。MTT法、NR試験を実施する。N=72
2. CVS90は細胞生存率が90%以上になった個数を示し、CVS80は80%以上・・・以下同様

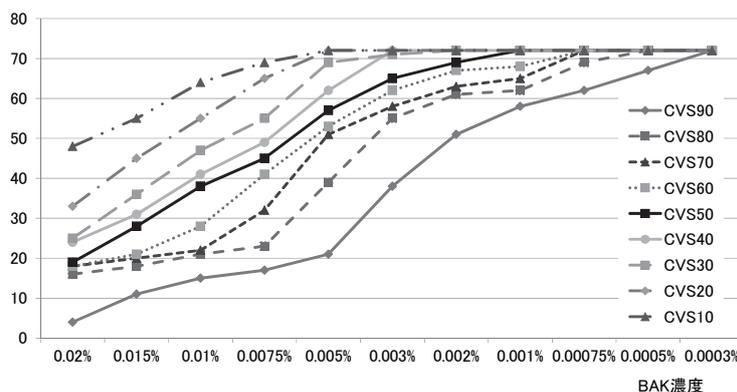


図11 Cell viability score (CVS)

たが、他の3株の毒性はほぼ消失した。このデータ解析にあたって、我々は Cell viability score (CVS) を考案し、BAK を用いて実施した。1つの同一系で得られる数はn=8で、この平均値を算出する。次いで、希釈系列(原液、2倍、10倍)と作用時間(10, 30, 60分)、4細胞株、MTT法とNR法でデータ系列はn=72となる。この72のデータ系列それぞれの平均値が90%以上になるものをカウントし、そのカウント数をCVS90として示した。すべて90%以上であれば、CVS90は72となる。同様に80%以上になるデータ数をカウントした数をCVS80とした。順次カウントしたものを図11に示した。また、図に示さないが、CVS20/90は、(細胞生存率が90%以上の個数) - (細胞生存率が20%以下の個数)を意味している。同様にCVS40/80は、(細胞生存率が80%以上の個数) - (細胞生存率が40%以下の個数)となる。このようなCVSを用いた解析により、防腐剤として点眼剤に添加されているBAK量を指標に各点眼剤の毒性の比較ができるようになった。点眼薬に関する解析結果は文献¹⁶⁻²¹⁾を参照されたい。

4. ポビドンヨード製剤

ポビドンヨード製剤は、生体に使用可能な消毒薬とし

て、手術野を始め、創傷部位・熱傷部位・感染皮膚面等へ適用されている。製剤の主成分であるポビドンヨードは、ポリビニルピロリドンとヨウ素の複合体である。水への溶解度が極めて低いヨウ素をポリビニルピロリドンに錯形成させることで水に可溶化し、含有ヨウ素量の増加・安定化することを可能としたものである。殺菌作用の本体はヨウ素であり、複合体からヨウ素が徐々に遊離することで、ヨウ素の強力な殺菌力を有しながら、組織障害を弱めることを可能とした。

ポビドンヨードは、幅広い微生物に対し強力な殺菌力を有する反面、有機物に不活化されやすい。この有機物の影響は、ヨウ素の酸化力が有機物に作用し、殺菌効果が低下することに起因する²²⁾。つまり、ヨウ素の酸化力を菌に作用させる場合は殺菌効力を示し、菌と共存する他の有機物があれば殺菌効力を阻害し、生体細胞に作用すると障害を与える。ヨウ素の作用からみると全て同じ酸化作用である。

我々は、10%ポビドンヨード製剤中の添加物の違いによる殺菌効果・細胞毒性の差を検討した。その結果、39菌株の細菌、2菌株の真菌に対する殺菌効果、5種のウイルスに対する抗ウイルス効果、いずれも製剤間の違いは認められなかった。しかし、SIRC細胞とChang conjunctiva細胞に対する毒性に大きな違いが認められた。この細胞

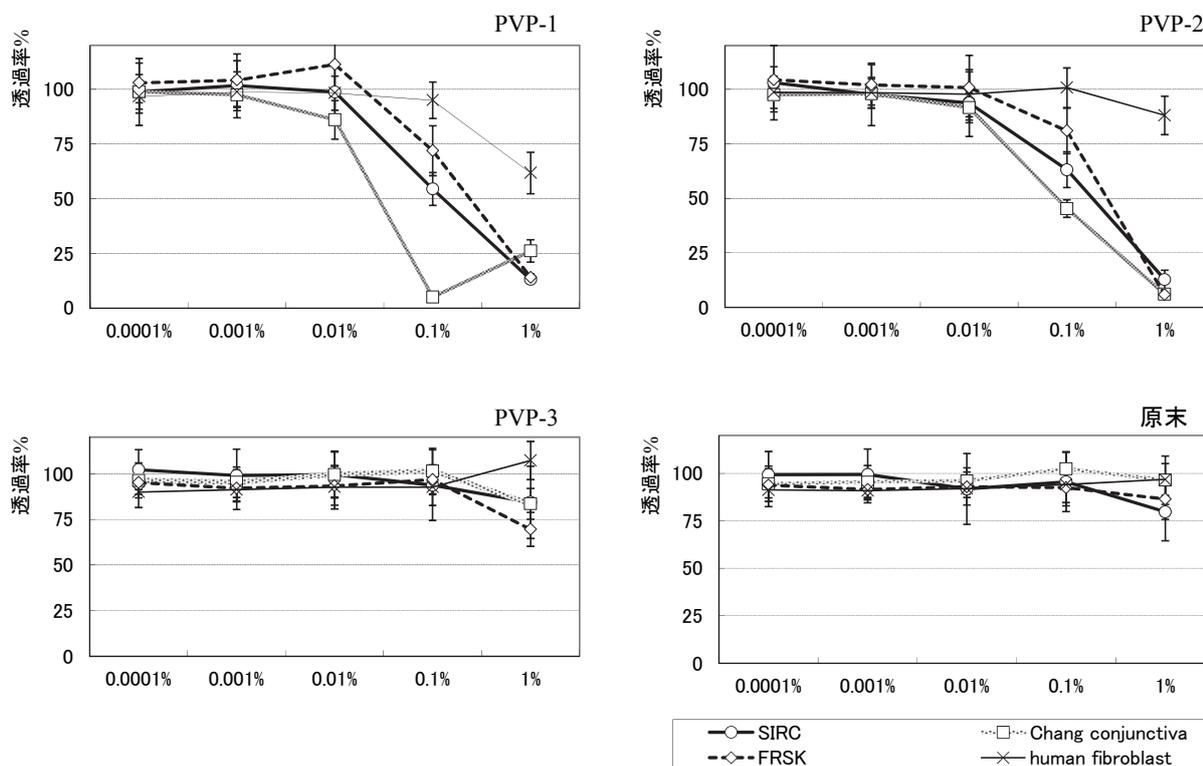


図12 ポビドンヨード製剤を5日培養後の細胞毒性

毒性は、製剤に添加物として使用されているグリセリン、ポリビニルピロリドンには認められなかったことから、添加界面活性剤の違いと考えられた²³⁾。

この界面活性剤の影響についてさらなる詳細検討を行うために、10%ポビドンヨード製剤3種(PVP-1~3)と原末を用いて細胞毒性とモルモット創傷部に対する影響で比較検討した²⁴⁾。その結果、図12に示したように、用いた細胞株の中で顕著な毒性がみられた Chang conjunctiva 細胞において、原末<PVP-3<PVP-2<PVP-1の順に毒性の強調が認められた。また、細胞株間でも毒性の違いが認められ、PVP-1とPVP-2でChang conjunctiva >SIRC>FRSK>human fibroblastの順となった。チオ硫酸ナトリウムで消色後に細胞に対する影響を評価すると、PVP-1とPVP-3で細胞毒性濃度の50%値(CC₅₀値)に変化が認められず、PVP-2と原末でChang conjunctiva 細胞とFRSK細胞に対する毒性の消失が認められた。入手

可能であった界面活性剤のうち、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル(NP-10)は、今回の検討で用いた界面活性剤の中で最も毒性が強く、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム(SBL-2N)の100倍であった。細胞株に対する感受性では Chang conjunctiva 細胞に対して顕著に認められ、次いで SIRC >FRSK>human fibroblastの順に毒性を示した(表7)。また、その毒性は処理日数が2日間より5日間の方がより顕著に認められ、PVP-1とPVP-3の製剤間の違いと相似していた。モルモット創傷部に対する検討においては、表皮細胞間距離で原末が有意に短く、全例でふさがっていた。また、炎症部位面積ではPVP-1が有意に大きく炎症の遅延が認められた。これ以外に有意差はなく、原末と比較すると、製剤は表皮細胞の滑走を阻害し、炎症の遅延傾向が認められた。

これらの結果から、ポビドンヨード製剤間の毒性の相

表7 4細胞の界面活性剤2日および5日培養後の細胞毒性濃度の50%値

	SIRC		C.conjunctiva		FRSK		human fibroblast	
	2day	5day	2day	5day	2day	5day	2day	5day
NP-2	249.5	139.5	124.1	294.8	208.7	150.9	725.4	457
NP-5	95.1	29.3	26.3	19.4	101.9	77.7	367.8	112.8
NP-10	45.4	24.3	12	8	42.5	23.4	317.5	542.4
NP-15	52.5	34.7	12.1	7.7	70.5	29.1	284.8	496
NP-20	98.2	76.2	15.1	10.9	132.6	68.5	1932.2	136.5
SBL-2N	1019.1	348.9	1632.5	572.7	731.5	788.2	3805.6	1002.4
SBL-3N	1311.4	2065.9	1092.3	436.4	755	806.6	7630.5	1079.3
SBL-4N	4380.6	786.4	3379.3	368.6	1312.3	890.8	1812.4	7652
SDS	52.8	608.4	135.8	303.7	69.3	843.5	100.7	662.4
<i>μl/ml</i>								
LAS	53.70%	100.10%	54.70%	101.20%	40.70%	98.40%	102.60%	99.40%
10mg/ml添加時								

ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル:NP-2,5,10,15,20(日光ケミカル)、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム: SBL-2N,3N,4N(日光ケミカル)、SDS: Sodium dodecylsulfate、LAS: Linear AlkylbenzeneSulfonate

Burkholderia cepacia の混入



ネオヨジン液中の菌量の推移

- ・6か月後 2.1 × 10⁴ CFU/ml
- ・7か月後 1.6 × 10⁴ CFU/ml
- ・12か月後 8.1 × 10³ CFU/ml
- ・16か月後 2.0 × 10³ CFU/ml

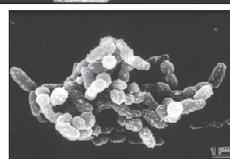


図13 PVP製剤の菌検出

違は、原末に添加されている界面活性剤の影響と考えられた。今後、本基礎検討をふまえ、創傷・粘膜・眼等への消毒にどのような添加物を含んだ製剤が適するののか、詳細な臨床治験が必要と考えられた。

ポビドンヨード製剤中に菌の汚染が認められた事例が1994年にあったが、その際に分離された *Burkholderia cepacia* のグラム染色像と電子顕微鏡像と、製剤中の菌の推移を図13に示した(濾過除菌等の対策がとられ、以後このような事例の報告はない)。この16ヵ月以上の長期生存は、電顕像に示すように菌の周囲に glycoalyx を主成分とする構造物である biofilm が形成され、10%濃度のヨウ素の酸化力では、この biofilm は多少破壊されるが菌までに達する強力な作用を示さないことが主因と考えられた。製剤のヨウ素放出量が多くなる0.1%濃度の殺菌効力は、菌汚染 lot であっても即効的な殺菌効力を呈していたことは検証済みである。しかし、10%ポビドンヨード製剤でヨウ素放出量が単に少ないために低い酸化力となったことだけで、biofilm 形成菌が殺菌されない理由は明確でない。そこで、ポビドンヨード製剤に添加されている界面活性剤の違いによるものであると仮説を立て、実験的に検証した²⁵⁾。

使用した細菌は、*P.aeruginosa* ATCC27853、NBRC13275、臨床分離株12株、*B.cepacia* IFO15124、1994年ネオヨジン分離株、臨床分離株2株を用いた。ポビドンヨード製剤はPVP-4(添加物:ラウロマクロゴール)、PVP-5(ラウロマクロゴール)、PVP-6(ポリオキシエチレンノニル

フェニルエーテル)、PVP-7(ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム)に、ポビドンヨード原末より10%溶液を作成したもの(以下原末と表記する)を用いた。

実験方法は、図14に示すように、96穴プレートにBHI培地を用いたポビドンヨード製剤の2倍希釈系列100 μ Lに、菌液10 μ L接種後フラン器にて静置培養し、吸光度(OD630nm)を測定し細胞増殖値とした。その後、培地を除去して滅菌PBS(-)で洗浄し、クリスタルバイオレット染色、エタノール溶出後、吸光度(570nm)を測定したものを biofilm 形成能とした。その結果、*P.aeruginosa* ATCC27853 と *B.cepacia* ネオヨジン分離株の biofilm 形成能が大きく異なり、*P.aeruginosa* ATCC27853 は培養1日目で16倍より高値を示したのに対し、ネオヨジン分離株の biofilm 形成能は、培養7日目で8倍より高値を示した(図15)。

次に、15mLのチューブを用いてBHI培地に *P.aeruginosa* ATCC27853 と *B.cepacia* ネオヨジン分離株を添加して2日、7日、10日静置培養することで biofilm を形成させ、遠心、上清を除去後、ポビドンヨード製剤1mLを加え、添加直後と一定時間培養後の菌生存の有無を調べた。その結果、2日培養したものは、ポビドンヨード製剤添加直後は *P.aeruginosa* の増殖が認められたが、徐々に殺菌され、2日以降検出されなかった。7日培養したものは両菌株ともに直後は増殖したが、*P.aeruginosa* では徐々に殺菌され、2日以降検出されなかった。しか

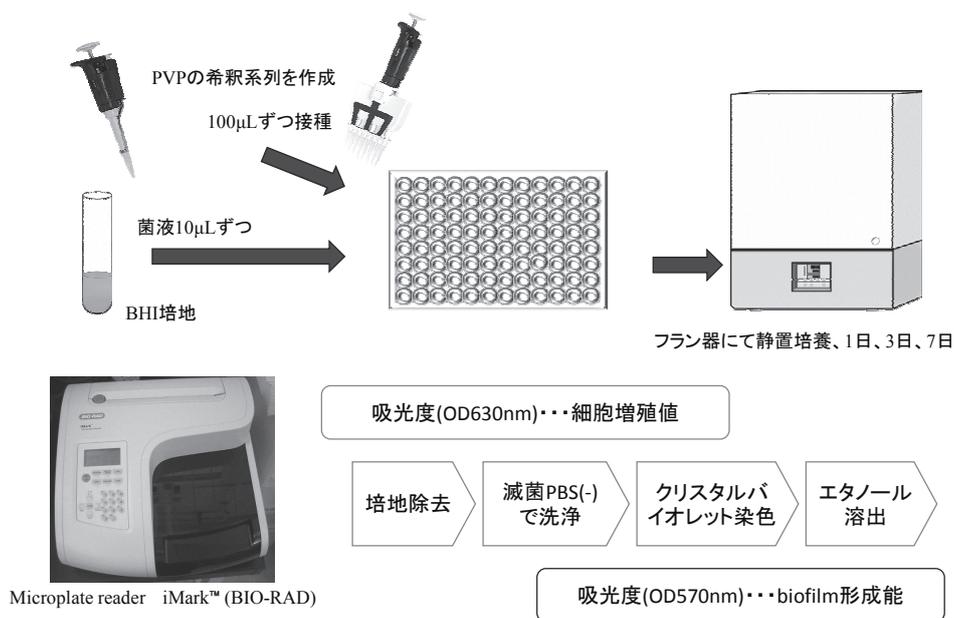


図14 96 well plateを用いた細胞増殖地と biofilm 形成能評価方法

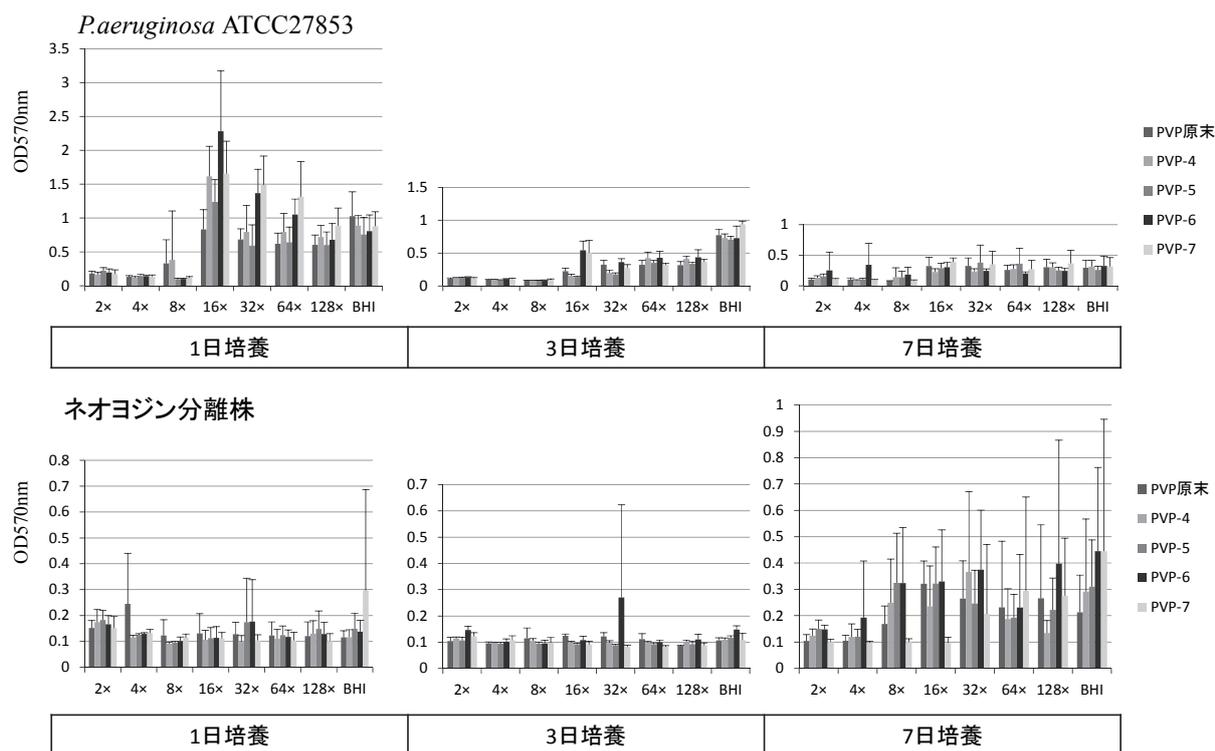


図 15 PVP 製剤の Biofilm 形成能

し、*B.cepacia* は、2日、7日、28日後にPVP-4から検出され、14日目にはPVP-6から検出した。10日培養後は、ポビドンヨード製剤添加10日目に、PVP-6から*B.cepacia*が 1.7×10^5 /mL検出された。2日よりも7日、10日培養とより長期間培養で、ポビドンヨード製剤中で生存できる可能性が高くなることが示された。この結果は、ネオヨジン分離株のように、1日培養時のbiofilm形成能は低かったものの3日、7日と長時間培養することでbiofilm形成能が高くなる菌は、ポビドンヨード製剤中に生存し続けることができると推測できる。データを示さないが、製剤間で有機物添加後のヨウ素残存量が異なることは明確になったが、添加物の違いにより、どのような条件であれば生育できるかを相関づけて説明できるデータはとれていない。主因は、ヨウ素を放出し、ある程度持続して酸化力を示さない限り、強固なbiofilmの形成状態では生存できる傾向があるのではないかと考えられた。

5. 最後 に

生体消毒薬は、皮膚に対する刺激・副作用が少ないことで使用されている。ウイルス・細菌・真菌・抗酸菌・芽胞に対する殺菌・抗ウイルス効果と、培養細胞を用いた細胞毒性試験を、同一薬剤で評価してきた結果、殺菌

効果が高い製剤ほど細胞毒性が強く、毒性が低いものほど殺菌効果が認められないデータを得ている。つまり、殺菌効果が高く、毒性が少ない消毒薬は検討した中では存在しなかった。生体消毒薬の毒性を極力無くするためにはどのような使用方法が適切なのだろうか。*in vitro*での殺菌効果と細胞毒性の結果より提示を試みたい。

本論においてデータを提示したが、CHG-アルコール製剤において、溶剤として使用されるエタノールとイソプロパノールは、調べたかぎり一般細菌に対してはイソプロパノールが、また、ノンエンベロープウイルスに対してはエタノールが適していた。同様にBAKにおいても、0.2%濃度の製剤を比較検討したが、添加物の違いで抗ウイルス効果が異なり、付着阻止効果も違いがみられた。さらに、10%ポビドンヨード製剤でも同様であった。ポビドンヨード製剤中に添加されている界面活性剤が安定して存在し、かつ細胞毒性が強いものは、単回の正常組織部位での使用であれば、臨床使用上大きな問題とならないであろう。しかし、長期に損傷部に何回も使用する場合、治癒過程に障害を与えていることは十分考えられる。現在、PVP-1の添加物は変更されているが、今後は、主剤であるポビドンヨード原末に対する評価ではなく、添加物に対する適切な臨床評価が必要であると考えられる。

消毒薬である以上、高い殺菌効果・抗ウイルス効果を求めることは必要である。今回、細胞毒性試験の結果を提示したが、この細胞毒性試験は、直接細胞に作用する場合の検出であり、個体への外挿は困難である。神経系・内分泌系・免疫系など器官に対する二次的現象や、代謝系は関与しないため、代謝活性化、不活化現象の検出は不可能である。しかし、単純系であるだけに毒性の検出が良好である。このような細胞毒性の視点から消毒薬を評価すると、主成分が同じ製剤であっても細胞毒性は異なる場合があることが明確になった。以上、実験的に生体消毒薬の主成分や添加物に対する評価は可能であるが、実際に使用する場合にはより複雑な生体系に対して消毒薬を使用することになる。臨床現場で生体消毒薬を使用する際には、最適な殺菌効果が得られる使用法と、安全性を過信せず適切に使用する努力は今後も必要であろう。

■利益相反自己申告：申告すべきものなし。

クロルヘキシジングルコン酸塩とポビドンヨード製剤の研究の一部は、リスタークラブ研究助成金を用いて行った。

■ 文 献

- 1) 城野久美子, 上村都美子, 久野光造, 東出栄治. 塩化ベンザルコニウム及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* 1985; 105:751-759.
- 2) 坂上吉一, 山崎浩史, 横山浩, 増田久子, 高崎中夫, 谷藤正明, 吉永哲男, 田中美智男, 松尾清光. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する抗生物質および消毒剤の効果. *Chemotherapy* 1989; 37:1342-1350.
- 3) 高橋孝行, 松本文夫, 増田久子, 高崎中夫, 谷藤正明, 坂上吉一, 横山浩. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する各種消毒剤の殺菌力. *日環感* 1989; 4:25-31.
- 4) 杉浦朗, 中村和世, 城野久美子, 東出栄治. *Chemotherapy* 1990; 38:203-213.
- 5) 辻明良, 山崎智子, 李秀華, 山口聖賀, 五島瑳智子. バイオフィーム形成 *Staphylococcus aureus* および *Pseudomonas aeruginosa* に対する消毒薬の殺菌効果と作用温度による影響. *日環感* 1998; 13:1-4.
- 6) 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. Antibiotics* 2004; 5:449-464.
- 7) 岩澤篤郎, 中村良子, 水野徳次. 臨床分離株に対するアクア酸化水の効果. *日環感* 1993; 8(2):11-16.
- 8) 岩澤篤郎, 中村良子. アクア酸化水の抗微生物効果(II)-他消毒薬との併用効果-. *日環感* 1994; 9(1):7-12.
- 9) Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. CDC 2011;13-21. <http://www.cdc.gov/hicpac/BSI/BSI-guidelines-2011.html>. 2016年5月24日現在.
- 10) Iwasawa A, Niwano Y, Kohno M, Ayaki M. Virucidal activity of alcohol-based hand rub disinfectants. *Biocontrol Sci* 2012;17:45-49.
- 11) 刑部敦, 大久保憲. 我が国におけるクロルヘキシジングルコン酸塩によるアナフィラキシー発生についての文献的考察. *日環感* 2015; 30:127-134.
- 12) 岩澤篤郎, 中村良子. 生体消毒薬の細胞毒性: in vitro, in vivo における強酸性電解水, ポビドンヨード製剤, グルコン酸クロルヘキシジン製剤, 塩化ベンザルコニウム製剤の比較検討. *感染症学雑誌* 2003;77:316-322
- 13) 岩澤篤郎, 川野留美子, 中村久子, 菊池敏樹. クロルヘキシジン濃度による残留効果の違いと中心静脈カテーテル挿入部の定期的消毒管理の検討. 第25回 LISTER CLUB 学術集会記録 2009;5-7
- 14) 第十四改正日本薬局方 参考情報 15. 保存効力試験 <http://jpdb.nihs.go.jp/jp14/pdf/1250-1.pdf>: 2016年6月1日現在
- 15) Iwasawa A, Ayaki M, Niwano Y. Cell viability score (CVS) as a good indicator of critical concentration of benzalkonium chloride for toxicity in cultured ocular surface cell lines. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2013;66:177-183.
- 16) Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Comparative assessment of the cytotoxicity of six anti-inflammatory eyedrops in four cultured ocular surface cell line, as determined by cell viability scores. *Clinical Ophthalmology* 2012;6:1879-1884.
- 17) Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Comparative Study of *In Vitro* Ocular Surface Cytotoxicity of a Fixed Combination of 0.5% Timolol/1% Dorzolamide Eyedrop and Its Components with 0.005% Benzalkonium Chloride. *Biocontrol Sci*, 2012;17:115-120.
- 18) Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Cell Viability Score as an Integrated Indicator for Cytotoxicity of Benzalkonium Chloride-Containing Antiglaucoma Eyedrops. *Biocontrol Sci*, 2012;17:121-128.
- 19) Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. *In vitro* Assessment of the Cytotoxicity of Six Topical Antibiotics to Four Cultured Ocular Surface Cell Lines. *Biocontrol Sci*, 2012;17: 93-99.
- 20) Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Preservative in Glaucoma Medications. *CNL-Ophthalmology* 2013;23:45-52.
- 21) Niwano Y, Iwasawa A, Ayaki M. Safety evaluation of ophthalmic moxifloxacin, an antibiotic of the fourth-generation fluoroquinolone family. *Journal of Symptoms and Signs*, 2013;2:468-474.
- 22) Zamora J.L..Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solution. *Am.J.Surg.* 1986;151:400-406.
- 23) 岩澤篤郎, 中村良子. ポビドンヨード製剤添加物の殺菌効果・細胞毒性への影響. *日環感* 2001;16(2):179-183.
- 24) 岩澤篤郎, 中村良子. ポビドンヨード製剤の細胞毒性とモット創傷部に対する影響. *感染症学雑誌* 2003;77:948-956.
- 25) 岩澤篤郎. ポビドンヨードの biofilm に対する効果. 第28回 LISTER CLUB 学術集会記録 2012;3-6