

欧州標準（European Norm(EN)）試験法を用いた
消毒薬の評価における留意点
—浮遊試験における菌液調製用液ならびに
表面試験における乾燥菌体の調製法

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 博士課程

2017 年 3 月 7 日

植田 知文

(東京医療保健大学大学院学位論文)

欧州標準 (European Norm(EN)) 試験法を用いた
消毒薬の評価における留意点
—浮遊試験における菌液調製用液ならびに
表面試験における乾燥菌体の調製法

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 博士課程

2017 年 3 月 7 日

植田 知文

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻
博士論文 要旨

欧州標準（European Norm(EN)）試験法を用いた消毒薬の評価における
留意点 ―浮遊試験における菌液調製用液ならびに表面試験における
乾燥菌体の調製法

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 医療保健学専攻
博士課程
領 域 名 感染制御学
学籍番号 HD014001
氏 名 植田 知文

背景（Introduction）

消毒薬が増殖可能な菌体の数（生菌数）を減少させる能力（殺菌効果）の評価においては、欧州標準（European Norm(EN)）試験法などの標準化された試験規格が海外では繁用されている。消毒薬の殺菌効果は種々の条件の影響を受けることが明らかとなっているが、EN 試験法の浮遊試験（懸濁状態の菌体に対する殺菌効果の評価法）では消毒薬と菌液の混合比に複数の選択肢が存在し、表面試験（乾燥状態の菌体に対する殺菌効果の評価法）では乾燥前の菌液を塗り広げるか否かが記載されていない。これらは各評価法における主要な条件であり、殺菌効果に対するその影響を明らかにすることは、今後の評価法やその指針の制定において有用であると考えた。

目的（Objective）

EN 試験法の浮遊試験における消毒薬と菌液の混合比、ならびに表面試験における乾燥前の菌液の塗り広げが殺菌効果に与える影響を明らかにする。

方法(Methods)

浮遊試験については、菌液の占める割合を 10%及び 1%とした作用液を調製し、両作用液における消毒薬（クロルヘキシジングルコン酸塩(CHG)、ベンザルコニウム塩化物(BAC)、ポリドンヨード(PVP-I)、次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)及びエタノール(EtOH)）の殺菌活性（生菌数の減少度(減少値)）を比較した。表面試験については、ステンレスディスクをキャリアとして、キャリア当たり約 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU の菌液を滴下し、一方はそのまま、もう一方はキャリア上に塗り広げた後に乾燥させた。それぞれの乾燥菌体上に消毒薬（70w/w% EtOH 及び 0.2% BAC）を滴下し、作用させた場合の殺菌活性を比較した。

結果(Results)

浮遊試験における各消毒薬の殺菌活性は、作用液に占める菌液の割合及び菌液調製用液成分（トリプトン、NaCl）の濃度によって変化し、作用時の菌液調製用液の成分濃度が高い作用液では CHG の殺菌活性は高く、BAC、PVP-I 及び NaOCl の殺菌活性は低かった。また、EtOH の殺菌活性も菌種によっては高かった。表面試験においては、いずれの接種菌数においても、キャリア上に菌液を塗り広げた方が両消毒薬の殺菌活性は高かった。

結論 (Conclusions)

EN 試験法の浮遊試験では、作用液に占める菌液の割合は消毒薬の殺菌活性に影響を与えること、その影響は作用液中の菌液調製用液成分の濃度によることが示唆された。浮遊試験により消毒薬の殺菌効果を評価する際には、作用液に占める菌液の割合を低くすることが望ましいと考える。また、表面試験では、キャリア上に菌液を塗り広げた場合、評価される殺菌効果が高くなることが示唆された。表面試験により消毒薬の殺菌効果を評価する際には、菌液を塗り広げずに乾燥させる試験方法の方が消毒薬をより厳しく評価でき、望ましいと考える。

キーワード (Key Words)

欧州標準 (EN) 試験法 殺菌活性 消毒薬 評価法 浮遊試験 表面試験

目次

はじめに	・ ・ ・ ・ ・ 1
1. 浮遊試験	・ ・ ・ ・ ・ 3
1.1. 背景と目的	・ ・ ・ ・ ・ 3
1.2. 材料と方法	・ ・ ・ ・ ・ 4
1.3. 結果	・ ・ ・ ・ ・ 6
1.4. 考察	・ ・ ・ ・ ・ 9
2. 表面試験	・ ・ ・ ・ ・ 12
2.1. 背景と目的	・ ・ ・ ・ ・ 12
2.2. 材料と方法	・ ・ ・ ・ ・ 13
2.3. 結果	・ ・ ・ ・ ・ 15
2.4. 考察	・ ・ ・ ・ ・ 17
まとめ	・ ・ ・ ・ ・ 19
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 20
引用文献	・ ・ ・ ・ ・ 21
図表	・ ・ ・ ・ ・ 24
用語	・ ・ ・ ・ ・ 38
英文要旨 (Abstract)	・ ・ ・ ・ ・ 39

はじめに

消毒薬製剤（処方）が増殖可能な菌体の数（生菌数）を減少させる能力（殺菌効果）を知ることは、その開発や販売を行なう製薬企業等だけでなく、それを使用する医療従事者にとっても、製剤を選択し、適切な消毒を実施する上で重要である。消毒薬の殺菌効果の評価においては、標準化された試験規格である欧州の欧州標準（European Norm(EN)）試験法と米国の American Society for Testing and Materials（ASTM）試験法及び Association of Official Analytical Chemists（AOAC）試験法が海外では繁用されている¹⁻⁵⁾。海外においては、これらの試験法は公的に認められており、製剤の承認申請にも用いられている。

日本国内における消毒薬の公的な評価法としては、第十七改正日本薬局方の参考情報「消毒法及び除染法」⁶⁾に記載されている試験菌懸濁法と硬質表面キャリア法が挙げられる。しかしながら、試験条件が不明確であり、また、医療環境より汚染度が低いと想定される医薬品の製造環境が対象であるためか、前述の海外の試験規格に比べ、殺菌活性（消毒薬の作用による生菌数の減少度(減少値)）の要求基準が低い。業界団体が設定したその他の試験法^{7,8)}も含め、医療領域の消毒薬製剤に対する公的な評価法は、日本国内に現時点では存在しない。

消毒薬は、人体の消毒を対象とした生体消毒薬と、器具や環境などを対象とした非生体消毒薬に大別される。日本国内において、ボランティアを用いた生体消毒薬の評価（*in vivo* 試験）については、日本環境感染学会から指針（ガイドライン）が発表され、EN 試験法と ASTM 試験法が採用されている^{9,10)}。一方、試験管内における非生体消毒薬の評価（*in vitro* 試験）の指針は未発表である。

非生体消毒薬の評価法は、懸濁状態の菌体を消毒対象とする浮遊試験と、乾燥状態の菌体を消毒対象とする表面試験、浸漬試験及び清拭試験などに大別される¹⁻⁵⁾。浮遊試験は、懸濁状態の菌体に対する消毒薬の基本的な殺菌効果の評価法であり、菌懸濁液を消毒薬と混合して作用させる¹¹⁻¹³⁾。後述の表面試験などとは異なり、菌液の乾燥操作が不要で実施しやすく、同時に多くの製剤や試験条件を評価できるため、製剤評価の第一段階として繁用されている¹⁻⁵⁾。但し、実使用時の消毒対象の菌体は乾燥状態であることが多く、懸濁状態と比べ、消毒薬で殺傷されにくいため^{3,14)}、実使用時の殺菌効果を評価するには、大半の場合、乾燥菌体を用いた試験が必要である。

乾燥菌体を用いた試験法は、いずれもキャリア（ステンレス製のディスク(円盤)やペニシリンダー、スライドガラス（ガラス板）、プラスチックシートなど、試験法により素材や形状が異なる）上で乾燥させた菌体を殺傷及び除去する能力を評価するが、実際の使用法を模擬した消毒薬の作用法が試験法により異なる¹⁵⁻²¹⁾。表面試験は、物理的な除去効果を含まない、乾燥状態の菌体に対する消毒薬の基本的な殺菌効果の評価法であり、キャリア表面上の乾燥菌体に消毒薬を滴下して作用させる^{15,16)}。

消毒薬の殺菌効果は種々の試験条件の影響を受けることが明らかとなっているが、試験条件の中には、その試験法における主要な条件であるにも関わらず、評価結果への影響が明らかでないものも存在する。例えば、EN 試験法では、浮遊試験における菌液と消毒薬の混合比に複数の選択肢が与えられており、また、表面試験における乾燥

菌体の調製法について記載が無い条件が存在する。

このような条件が評価結果に影響を与える場合、その条件を改善するか、あるいは結果と共に明記されるべきである。評価結果に対する主要な試験条件の影響を明らかにしておくことは、今後の評価法やその指針（ガイドライン）の制定において、非常に有用であると考ええる。

そこで本研究では、EN 試験法における評価法の中から、懸濁状態と乾燥状態の菌体に対する基本的な殺菌効果の評価法である浮遊試験と表面試験を取り上げ、浮遊試験ではその作用法（菌液と消毒薬の混合比）が、表面試験では消毒対象（乾燥菌体）の調製法（菌液の塗布面積）が殺菌効果に与える影響をそれぞれ検討した。

1. 浮遊試験

1.1. 背景と目的

浮遊試験は消毒薬と菌懸濁液を混合して作用させたときに、消毒薬が増殖可能な菌体の数（生菌数）を減少させる能力（殺菌効果）を評価する試験法であり、作用液には菌懸濁液や添加物といった消毒薬以外の成分及び溶液も含まれる。このため、作用時に消毒薬濃度は低下する。例えば、EN 試験法の浮遊試験では、消毒薬（薬液）、負荷物、及び菌液を 8:1:1 で混合して作用させるため、薬液は作用時に 80%濃度に希釈される^{11,12,22)}。

実使用時における消毒薬の殺菌効果の参考とする場合、その使用状況に近い条件で評価することが重要であるが、浮遊試験においては、作用時の消毒薬濃度が評価対象の消毒薬と近似していることが望ましい。このため、EN 試験法の浮遊試験では、評価したい消毒薬の 125%濃度の薬液を用いるように指示している。しかしながら、希釈せずに用いる製剤や複数の成分を含む製剤などは、125%濃度の薬液を用いて殺菌効果を評価することが困難であった。

このような背景から、2012 年に改訂された EN 試験法 EN13727²²⁾では、希釈せずに用いる製剤を対象とした、薬液、負荷物及び菌液の混合比が 97:2:1 の作用法が新たに追加された。追加された作用法では、薬液の割合が 97%に上昇した一方で、菌液の割合は 10%から 1%に低下している。なお、混合前の負荷物濃度及び菌液の生菌数はそれぞれ従来の 5 倍、10 倍に上昇しており、作用時の負荷物濃度及び生菌数は従来の作用法と同じである。

しかしながら、上記の混合割合が選択された過程は報告されておらず、作用法の変更が消毒薬の殺菌活性（消毒薬の作用による生菌数の減少度(減少値)）に与える影響、言い換えると、作用時の消毒薬濃度を揃えたときに 2 つの作用法で評価される殺菌活性が同程度であるかは明らかでない。

そこで今回、EN 試験法において、作用液中に占める菌液の割合が殺菌活性に与える影響を確認するため、菌液の割合を 10%及び 1%とした作用液を調製し、両作用液における各種消毒薬の殺菌活性を比較した。また、両作用液における殺菌活性に差が見られた消毒薬についてはその原因を検討した。

1.2. 材料と方法

消毒薬製剤

市販の 0.5%クロルヘキシジングルコン酸塩 (CHG) 水溶液 (0.5%ヘキサック®水 W)、0.01%ベンザルコニウム塩化物 (BAC) 水溶液 (逆性石ケン液 0.01「ヨシダ」)、0.05%次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) (次亜塩 0.05%液「ヨシダ」)、10%ポビドンヨード (PVP-I) (ポピヨドン®液 10%) 及び無水エタノール (EtOH) (無水エタノール「ヨシダ」、99.5v/v%以上) (全て吉田製薬) をそのまま、または精製水 (滅菌精製水「ヨシダ」、吉田製薬) で希釈して用いた。なお、特記したものを除き、本論文における濃度表記は全て w/v%を表している。

試薬

菌株の培養には SCD 寒天培地 (トリプトソイ寒天培地‘栄研’、栄研化学) を用いた。トリプトンは Bacto Tryptone (Becton Dickinson) を用いた。塩化ナトリウム (NaCl)、塩化カリウム (KCl)、臭化ナトリウム (NaBr)、臭化カリウム (KBr)、ヨウ化ナトリウム (NaI)、ヨウ化カリウム (KI)、L-ヒスチジン及びチオ硫酸ナトリウムは関東化学の特級品を、サポニンは関東化学の一級品をそれぞれ用いた。レシチンは和光純薬の一級品を、ポリソルベート 80 は和光純薬の化学用をそれぞれ用いた。

菌株

本研究で用いた菌株は以下の通りである。

Staphylococcus aureus ATCC 6538、*Enterococcus faecalis* JCM 5803、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442、*Escherichia coli* ATCC 10538、*Serratia marcescens* JCM 1239。ATCC 株は American Type Culture Collection から、JCM 株は理化学研究所 (RIKEN BioResource Center) からそれぞれ入手した。

殺菌活性の測定

殺菌活性は EN 試験法 EN1040¹¹⁾を参考にした方法で測定した。

各菌株を SCD 寒天培地に塗布し、36℃で 1 日培養した。SCD 寒天培地に植え継ぎ、同条件で培養後の菌体集落を掻き取り、菌液調製用液 (0.1%トリプトン、0.85%NaCl) に懸濁することで菌懸濁液 (約 10⁹CFU/mL) を調製した。消毒薬製剤 4.5mL、各添加成分 (精製水、0.1%トリプトン、0.85%NaCl、または菌液調製用液) 0.45mL 及び菌懸濁液 0.05mL を混合し、20℃で作用した。各作用時間後に作用液の一部を不活性化剤に回収し、作用を停止させた。不活性化剤は、CHG と EtOH には 3%レシチンと 10%ポリソルベート 80 を、BAC、NaOCl 及び PVP-I には 0.3%レシチン、3%ポリソルベート 80、0.1%L-ヒスチジン、3%サポニン、0.5%チオ硫酸ナトリウム、0.1%トリプトン及び 0.85%NaCl をそれぞれ用いた。作用液回収後の不活性化剤を SCD 寒天培地で混釈後、36℃で 2 日間培養し、作用後の生菌数を計測した。また、作用に用いた菌懸濁液の生菌数も同様の方法で計測した。

計測した生菌数を消毒薬で作用前 (作用開始時点) 及び作用後の作用液 1mL 当たり

の生菌数（CFU／mL 作用液）に換算し、「作用前の生菌数」を「作用後の生菌数」で除した値の常用対数値を殺菌活性とした。

$$\text{殺菌活性} (\log_{10} \text{ reduction}) = \log_{10} (\text{「作用前の生菌数」} / \text{「作用後の生菌数」})$$

他の塩類の添加効果の検討

ナトリウムとカリウムの各ハロゲン化物について、1.08%KCl、1.50%NaBr、1.73%KBr、2.18%NaI、2.41%KI の水溶液をそれぞれ調製した。各水溶液のモル濃度は 0.85%NaCl と同じである。これらを添加成分として用いて殺菌活性を測定した。

赤外吸収分光法

赤外吸収スペクトルは臭化カリウム錠剤法を用いて測定した。被験物質粉末を臭化カリウム粉末とよくすり混ぜた後、錠剤成型器に入れて加圧製錠した錠剤に波数 700~4000(1/cm)の光を照射し、吸収スペクトルを測定した。測定は IRPrestige-21（島津製作所）を用いて行った。

統計処理

試験結果の統計処理は Microsoft Excel 2010 を用いた。有意差検定は、*Student's t-test* を用い、等分散または非等分散の 2 標本を対象とした t-検定を選択し、両側検定時の *p* 値が 0.05 未満のとき、両者には有意差があると判断した。なお、等分散または非等分散の判断は、F 検定を用い、両側検定時の *p* 値が 0.05 未満のとき、2 標本は非等分散であると判断した。

1.3. 結果

CHG の殺菌活性に対する菌液割合の影響

図 1 に示すように、消毒薬製剤として 0.5%CHG 水溶液を用いて、菌液の占める割合を 10%または 1%とした作用液(i)~(iv)を調製し、その殺菌活性を比較した。

図 2 は各作用液における殺菌活性 ($\log_{10}$ reduction) を表す。菌液割合が低い作用液(i)と比べ、菌液割合が高い作用液(iv)では殺菌活性が高かった。例えば、*P. aeruginosa* に対して 30 秒作用時の殺菌活性 (平均値 $\pm$ 標準偏差) は、作用液(i)では 3.2 ± 0.2 であったが、作用液(iv)では 5.9 ± 0.5 であった。また、作用液調製時の混合順が異なっても、菌液調製用液 (トリプトン加生理食塩液(Trp 生食)) の割合が同じ作用液(i)と(iii)、及び作用液(ii)と(iv)の殺菌活性はそれぞれ同程度であった。

消毒薬の殺菌活性に対する菌液調製用液成分の影響

菌液調製用液 (Trp 生食) の成分である 0.1%トリプトン及び 0.85%NaCl が種々の消毒薬の殺菌活性に与える影響を検討した。精製水、0.1%トリプトン、0.85%NaCl 及び Trp 生食を用いて、各成分の濃度が異なる作用液を調製し、両作用液における各消毒薬の殺菌活性を比較した。消毒薬としては、CHG に加え、BAC、PVP-I、NaClO 及び EtOH を選択した。各消毒薬の試験濃度は、常用濃度及びその殺菌活性を参考に設定した。実使用時の濃度では、作用後に生菌が残存しない消毒薬については、生菌が残存する濃度に低下させて試験を実施した。

図 3 は CHG における検討結果を表す。0.5% (作用時 0.45%) CHG 水溶液の殺菌活性は、Trp 生食及び NaCl の添加により向上した。例えば、*P. aeruginosa* に対して 30 秒作用時の殺菌活性は、精製水を添加した作用液では 3.5 ± 0.1 であったが、Trp 生食及び NaCl を添加すると、それぞれ 5.8 ± 0.2 、 5.2 ± 0.0 であった。また、トリプトンの添加によっても、殺菌活性の向上が見られる菌種が存在した。

図 4 は BAC における検討結果を表す。図 4A に示すように、0.001% (作用時 0.0009%) BAC 水溶液の殺菌活性は、Trp 生食及びその成分 (0.1%トリプトン及び 0.85%NaCl) の何れの添加によっても低下した。例えば、*S. marcescens* に対して 5 分作用時の殺菌活性は、精製水を添加した作用液では 5.2 ± 0.0 であったが、Trp 生食、トリプトン及び NaCl を添加すると、それぞれ 3.2 ± 0.3 、 4.6 ± 0.2 、 3.6 ± 0.3 であった。また、図 4B、4C に示すように、0.005% (作用時 0.0045%)、0.01% (作用時 0.009%) BAC 水溶液の殺菌活性も、Trp 生食及びトリプトンの添加により低下した。但し、0.001%BAC 水溶液の場合と比べ、添加の影響は小さかった。0.005%、0.01%BAC 水溶液では、NaCl の添加の影響は菌種や BAC 濃度により異なっており、添加により殺菌活性が低下する場合と添加しても殺菌活性が同程度の場合が存在した。

図 5 は PVP-I 製剤における検討結果を表す。多くの菌種において、10% (作用時 9%) PVP-I 製剤の殺菌活性は、Trp 生食及びトリプトンの添加により著しく低下した。例えば、*S. marcescens* に対して 10 秒作用時の殺菌活性は、精製水を添加した作用液では 4.8 ± 0.3 であったが、Trp 生食及びトリプトンを添加すると、それぞれ 3.9 ± 0.3 、 3.7 ± 0.4 であった。一方、NaCl を添加しても殺菌活性は同程度 (4.7 ± 0.4) であった。また、*E.*

faecalis においては、Trp 生食の添加により殺菌活性が低下したが（5 分作用時の殺菌活性：5.4±0.3(精製水)、3.6±0.3(Trp 生食))、その成分を単独で添加しても、殺菌活性は同程度(同、5.2±0.1(トリプトン)、5.3±0.2(NaCl))であり、添加の影響は見られなかった。

図 6 は NaOCl における検討結果を表す。50ppm（作用時 45ppm）NaOCl 水溶液の殺菌活性は、Trp 生食及びトリプトンの添加により大きく低下した。特に、*S. aureus* と *E. faecalis* では、精製水を添加した作用液は 10 秒作用時に検出限界以上の活性（両菌種とも 6.5 以上）を示したが、Trp 生食を添加すると活性がほぼ消失していた（*S. aureus*：0.1±0.0、*E. faecalis*：0.0±0.0）。一方、NaCl を添加しても、殺菌活性は同程度（両菌種とも 6.5 以上）であり、添加の影響は見られなかった。なお、NaOCl 濃度を 100ppm（作用時 90ppm）に上昇させた場合、いずれの作用液においても 10 秒作用で検出限界以上の活性を示し、Trp 生食及びその成分が殺菌活性に与える影響は検出できなかった（data not shown）。

図 7 は EtOH における検討結果を表す。図 7A に示すように、*S. aureus*、*E. faecalis* 及び *P. aeruginosa* では、検討した何れの EtOH 濃度（30~60w/w%、作用時はこの 90% 容量濃度。以下同様）においても、Trp 生食の添加による殺菌活性の変化は見られなかった。一方、図 7A、7B に示すように、*E. coli* と *S. marcescens* に対する 40w/w%EtOH の殺菌活性は、Trp 生食及び NaCl の添加により向上した。例えば、*E. coli* に対して 10 秒作用時の殺菌活性は、精製水を添加した作用液では 2.6±0.3 であったが、Trp 生食及び NaCl を添加すると、それぞれ 4.0±0.5、6.2±0.6 であった。*E. coli* において、トリプトンは NaCl と共に添加すると 40w/w%EtOH の殺菌活性を低下させたが、単独で添加した場合には殺菌活性の低下は見られなかった（殺菌活性：2.5±0.2）。

CHG の殺菌活性に対する NaCl 以外の塩の影響

検討した各消毒薬において、Trp 生食及びその成分が殺菌活性に与える影響を比較すると、CHG は検討した全ての菌種において殺菌活性が向上しており、他の消毒薬とは異なっていた。そこで、CHG の殺菌活性が向上する要因を明らかにすることを目指し、NaCl 以外の塩が CHG の殺菌活性に与える影響を検討した。塩はナトリウムとカリウムのハロゲン化物（KCl、NaBr、KBr、NaI 及び KI）を選択し、これらを添加した作用液における CHG の殺菌活性を検討した。

図 8 は各塩を添加した CHG 水溶液の殺菌活性を示す。ハロゲン化物イオンが同じナトリウム塩とカリウム塩（例えば、NaCl と KCl）を添加した作用液における殺菌活性は同程度であった。また、ハロゲン化物イオンにより殺菌活性の向上効果は異なり、ヨウ化物（NaI、KI）>臭化物（NaBr、KBr）>塩化物（NaCl、KCl）を添加した作用液の順で殺菌活性が高かった。例えば、*E. coli* に対して 15 秒作用時の殺菌活性は、ヨウ化物（NaI：6.5±0.0、KI：6.5±0.0）、臭化物（NaBr：4.2±0.1、KBr：4.1±0.1）、塩化物（NaCl：2.7±0.3、KCl：2.6±0.2）、添加なし（精製水：1.9±0.1）であった。

CHG への NaCl の添加による生成物の同定

CHG またはクロルヘキシジン酢酸塩にアニオンを添加すると置換反応が起きること、

また、その生成物であるクロルヘキシジンの塩（イオン対）の物性及び殺菌活性は、添加したアニオンにより異なることが報告されている²³⁻²⁶⁾。この知見と NaCl 以外の塩の添加検討の結果と合わせ、CHG への NaCl の添加によりグルコン酸イオンと塩化物イオンの置換反応が起き、クロルヘキシジン塩酸塩が生成していると考えた。

クロルヘキシジン塩酸塩が生成しているかを確認するため、1%CHG 水溶液に 1.7%NaCl（混合後の濃度は 0.17%）を添加することで析出した物質をろ取し、赤外線吸収スペクトルを測定した。その結果、図 9 に示すように、この生成物のスペクトルは、クロルヘキシジン塩酸塩（MP Biomedicals）を用いて測定したものと同様に、3300、3200、3120、1640、1540、1490 及び 1420 cm^{-1} 付近に強いピークが見られ、その他のピークも両試料で共通していた。

1.4. 考察

本研究では、EN 試験法の浮遊試験において、作用液に占める菌液の割合が殺菌活性に与える影響を検討した。

消毒薬の殺菌活性は、作用液に占める菌液の割合及び菌液調製用液成分（トリプトン、NaCl）の濃度によって変化した。このことは、EN 試験法において、作用液に占める菌液の割合は消毒薬の殺菌活性に影響を与えること、及びその影響は作用液中の菌液調製用液成分の濃度によることを示唆している。

作用時の菌液調製用液の成分濃度が高い作用法では、CHG の殺菌活性は高く、BAC、PVP-I 及び NaClO の殺菌活性は低かった。また、EtOH の殺菌活性も菌種及び濃度によっては高かった。

各消毒薬における殺菌活性の変化の要因について、久保ら^{24,25)}は、CHG へのナトリウムのハロゲン化物の添加により、クロルヘキシジンの油水分配係数が増加し、その値は NaI > NaBr > NaCl の順であること、また、アルコール共存条件下における複数種の有機アニオン性化合物の結果ではあるが、油水分配係数の増加に伴い、クロルヘキシジンの殺菌活性が向上することを報告している。これらの報告は、CHG の殺菌活性の向上効果が、ヨウ化物 > 臭化物 > 塩化物の順であることを示唆しており、本研究において得られた結果と一致する。NaCl の添加による生成物の分析結果と合わせ、CHG の殺菌活性の向上は、NaCl が CHG と反応し、CHG より高活性と想定されるクロルヘキシジン塩酸塩が生成したためと考える。なお、ハロゲン化物の添加により CHG の殺菌活性が向上する要因は、久保ら²⁵⁾が考察しているように、クロルヘキシジンのイオン対の親油性の向上により、菌体表面の脂質との親和性が高まることで、菌体との接触及び菌体内への侵入が起きやすくなるためと考えている。また、*S. aureus*、*P. aeruginosa* 及び *E. coli* では、トリプトンの添加によっても CHG の殺菌活性が向上したが、トリプトンに混在した塩またはトリプトンの分解物によるものと推測している。

BAC、PVP-I 及び NaClO の殺菌活性の低下は、これらの消毒薬が負荷物の影響を受けやすく²⁷⁻³¹⁾、ASTM 試験法では負荷物として使用されるトリプトン¹⁶⁾との接触により、菌体と接触できる消毒薬の量が低下するか、または消毒薬と菌体との接触頻度が低下したためと考える。

低濃度（0.001%）BAC の殺菌活性の低下にはトリプトンと共に NaCl も寄与しており、EtOH の殺菌活性の向上も NaCl によるものであった。BAC や CHG などのカチオン系消毒薬は、消毒薬に対して相対的に多量の塩が共存すると、カチオンの競争吸着により消毒薬の菌体への接触量が低下し、殺菌活性が低下することが報告されており^{26,32)}、今回見られた NaCl による BAC の殺菌活性の低下の要因の 1 つと考えられる。また、多量の塩化物イオンにより、BAC の電離平衡が正電荷の小さい分子型に傾き、負電荷を有する菌体表面と接触しにくくなった可能性もあり、それも一因と考えられる。

なお、上記の既報告²⁶⁾では、クロルヘキシジンの殺菌活性も塩の添加により低下しているが、本研究（CHG：0.45%（5.6mM）、塩：14.5mM）に比べ、そのクロルヘキシジン濃度（0.0045%（0.056mM））は低く、逆にクロルヘキシジンに対する相対的な塩の添

加量（43mM(0.25%NaCl)）は多い。クロルヘキシジンに対する塩の添加効果が本研究と逆であるのは、これらの違いによると考えている。つまり、クロルヘキシジンに対する相対的な塩の添加量が、本研究のように少ないときは殺菌活性は向上するが、既報告のように多いときはその逆に殺菌活性は低下すると推察される。また、塩の添加量により、殺菌活性に対する効果が逆転することから、殺菌活性が極大となる塩の添加量が存在すると思われる。

EtOH による殺菌は、菌体表面のタンパク質の変性による溶菌が主な要因と考えられている^{27,28,33,34}。アルコールに対する真菌（酵母）の抵抗性には菌体表面の脂質組成や膜の流動性が関わるとの報告もあり³⁵、表面構造の違いにより、EtOH に対する抵抗性が異なることが想定される。本研究においても、細胞壁の薄いグラム陰性菌は、グラム陽性菌よりも低濃度のエタノールで殺傷される傾向にあった。また、菌体外の塩濃度の変化は菌体を膨張または収縮させる浸透圧を生じさせるため³⁶、その抵抗性には表面構造が寄与しており、浸透圧への応答時にはその構造が変化していることが想定される。以上のことから、*E. coli* 及び *S. marcescens* で見られた NaCl による EtOH の殺菌活性の向上は、浸透圧の上昇、あるいは膜構造の変化などにより、溶菌が起きやすくなったことが一因と考えている。NaCl による活性の向上が上記の 2 菌種のみで見られたことから、菌体の表面構造（組成）及び浸透圧への抵抗性は菌種により異なることが示唆される。また、*E. coli* における NaCl と共に添加した場合のトリプトンによる殺菌活性の低下は、上で述べた NaCl による菌体への影響がトリプトンにより阻害されたためと推察している。

なお、各消毒薬の菌体に対する作用機構は複数存在し、また、消毒薬により異なるが、上で述べた以外の作用機構に対する菌体調製用液の影響については不明である。

上述のように、作用液に占める菌液の割合が 10%である従来の作用法では、菌液調製用液の成分の影響により、消毒薬が過大評価または過小評価されており、実際の殺菌効果を正確に評価できていない恐れがある。一方、新たに追加された菌液の割合が 1%の作用法は、消毒薬濃度（処方）の維持だけでなく、菌液調製用液の成分による影響も軽減されており、従来の作用法と比べて評価法として優れていると考えられる。また、消毒薬の殺菌活性は、作用による生菌数の低下を基に評価するため、殺菌活性の検出限界値（作用時の生菌数）を維持したまま、菌液の割合を低くする場合、それに応じて生菌数を増量した菌液を調製する必要がある（例えば、菌液の割合を 0.1%にする場合、約 10^{10} CFU/mL の菌液を調製する必要がある）。しかしながら、そのためには、菌種によっては前培養の寒天培地を増やす必要があり、また、扱う菌液量も作用液が 10mL の場合でも 10 μ L と扱いにくい（計量誤差が生じやすい）液量になる。試験実施の容易さや評価結果の再現性という観点でも、1%という菌液割合は妥当な割合と思われる。但し、この作用法においても、菌液調製用液は作用液の 1%に含まれるため、その成分による殺菌活性への影響を考慮しなければならない場合は、その影響を軽減させるために、菌液調製用液を変更することが望ましいと考える。

EN13727 以降に改訂された EN13624³⁷（殺真菌活性）及び EN14476³⁸（ウイルス不活性化活性）（いずれも phase2/step1）についても、薬液：負荷物：菌液=97:2:1（菌液

割合 1%) の作用法が追加されている。しかしながら、これらの EN 試験法においても、追加された作用法は希釈せずに用いる製剤を対象としたものであり、それ以外の製剤は従来通りの作用法で評価することになっている。また、負荷物を含まない条件において消毒薬の基本的な殺菌効果を評価する phase1 の試験法 (EN1040¹¹⁾ 及び EN1275¹²⁾) については、2005 年以降改訂されておらず、従来の作用法 (菌液割合 10%) のまま評価、運用されているのが現状である。

本研究の結果から、浮遊試験により消毒薬の殺菌効果を評価する際には、評価結果への影響ならびに作用時の消毒薬濃度の維持の観点から、作用液に占める菌液の割合を低くし、さらには必要に応じて精製水などを用いて菌体以外の成分を可能な限り含まない接種菌液を用いることが望ましいと考える。但し、精製水は塩や金属イオンなどの濃度が低いため、菌液調製に用いた場合、浸透圧などのストレスによる菌体の損傷及び適応変化により、消毒薬に対する抵抗性が変化する可能性が想定される。加えて、従来の試験法 (Trp 生食で菌液調製、菌液割合 10%) との条件の隔たりを勘案すると、接種菌液の調製用液は従来通り (Trp 生食) で、作用法 (接種菌液の生菌数及び薬液との混合比) が異なる試験法、つまり EN 試験法に追加された試験法が現実的な選択肢ではないかと考える。

EN 試験法では、現状、製剤の使用法 (用時希釈の有無) により、2 つの作用法を使い分けているが、従来の試験法の対象である用時希釈する製剤についても、菌液割合 1% の試験系における殺菌活性を確認しておくことが望ましいと考える。

2. 表面試験

2.1. 背景と目的

表面試験は非生体（器具・環境）表面上の乾燥菌体に対する生菌数を減少させる能力（殺菌効果）の評価法である。

欧州の欧州標準（EN）試験法 EN13697¹⁵⁾と米国の ASTM 試験法 E2197¹⁶⁾はいずれも硬質表面を用いた標準試験法である。両試験法は共にステンレスディスクをキャリアとして用いており、キャリアに接種する菌数も同程度である（EN13697 では約 10^8 CFU/mL の菌液を 50 μ L 接種、ASTM E2197 では約 10^9 CFU/mL の菌液を 10 μ L 接種。いずれもキャリア当たりの菌数は約 10^7 CFU）。一方、キャリア上の菌体の分布について、ASTM E2197 には乾燥前に菌液を塗り広げないことが明記されているが、EN13697 には菌液の塗り広げに関する記述がなく、両試験法で異なる可能性がある。

日本国内の試験法については、第十七改正日本薬局方の参考情報「消毒法及び除染法」に記載されている硬質表面キャリア法⁶⁾は、接種菌液を塗り広げた後に消毒薬を作用させている。また、洗剤・石けん公正取引協議会（日本石鹸洗剤工業会）が設定した「住宅用合成洗剤及び石けんの除菌活性試験方法」⁸⁾も、EN13697 が参考とされているが、乾燥前に接種菌液を塗り広げている。

作用液中に菌体が分散している浮遊試験とは異なり、表面試験では、菌体はキャリア表面上で密集して乾燥しており、また、細溝や細孔を有するキャリアを用いた場合には菌体はその内部にも入り込んでいる。このため、消毒薬が菌体に作用するには、乾燥菌体層やキャリアの窪みの内部に消毒薬が到達する必要があるとあり、製剤の浸透性などにより消毒薬と菌体の接触機会が異なると考えられる。このように、表面試験は、浮遊試験で評価された製剤の持つ殺菌効果に加え、実使用時の有効性に寄与すると想定される、製剤の浸透性などの特性も含めた殺菌効果を検討し、その有効性を評価することを目的としていることが推定される。しかしながら、菌液の塗り広げは、乾燥後の菌体の層を広く、薄くするため、殺菌効果に対する消毒薬の特性の影響を小さくすると推測される。

表面試験以外にも、キャリア上の乾燥菌体を消毒対象とする試験法は、浸漬試験や清拭試験など多く存在するが¹⁷⁻²¹⁾、それぞれ菌液の接種方法は菌液への浸漬、菌液の滴下、塗布とさまざまである。これらの接種法の違いは殺菌活性（消毒薬の作用による生菌数の減少度(減少値)）に影響を与える可能性が予想されるが、実際にそれを検討した報告は確認できない。

そこで、本研究では、EN 試験法の表面試験における乾燥菌体の調製法（菌液の塗り広げの有無）が殺菌活性に与える影響を検討することにした。

2.2. 材料と方法

使用製剤

市販の 0.2%ベンザルコニウム塩化物水溶液（逆性石ケン液 0.2「ヨシダ」、吉田製薬）及び 70w/w%エタノール（消毒用エタノールに相当）を用いた。70w/w%エタノールは無水エタノール（無水エタノール「ヨシダ」、99.5v/v%以上、吉田製薬）を精製水（滅菌精製水「ヨシダ」、吉田製薬）で希釈して調製した。なお、本論文における濃度表記は、特記しているものを除き、全て w/v%を表している。

使用菌株

Staphylococcus aureus ATCC 6538 を用いた。本菌株は American Type Culture Collection から入手した。

培地と試薬

菌株の培養には SCD 寒天培地（トリプトソイ寒天培地‘栄研’、栄研化学）を用いた。トリプトンは Bacto Tryptone（Becton Dickinson）を用いた。塩化ナトリウム、L-ヒスチジン及びチオ硫酸ナトリウムは関東化学の特級品を、サポニンは関東化学の一級品をそれぞれ用いた。レシチンは和光純薬の一級品を、ウシ血清アルブミンは和光純薬の生化学用を、ポリソルベート 80 は和光純薬の化学用をそれぞれ用いた。

殺菌活性の測定

殺菌活性は EN 試験法 EN13697¹⁵⁾を参考にした方法で測定した。

菌株を SCD 寒天培地に塗布し、36℃で 1 日培養した。SCD 寒天培地に植え継ぎ、同条件で培養後の菌体集落を掻き取り、菌液調製用液（0.1%トリプトン、0.85%NaCl）に懸濁することで菌懸濁液（約 10⁸CFU/mL）を調製した。菌懸濁液と 0.06%ウシ血清アルブミン水溶液を等量ずつ混合し、接種菌液とした。ステンレスディスク（SUS304、直径 2cm）の中央部に接種菌液 50μL を滴下し、一方はそのまま、他方はディスク上に塗り広げた後に、36℃培養器中で乾燥させた。本検討において、乾燥に要した時間は、菌液を塗り広げた場合は 20~25 分、塗り広げない場合は 30~35 分であった。菌液の乾燥は目視にて確認した。乾燥菌体上に薬液 300μL を滴下し、室温（約 22~24℃）で作用した。作用時間後にステンレスディスクを不活性化剤に回収し、作用を停止させた。不活性化剤は、エタノールには 3%レシチン、10%ポリソルベート 80 を、ベンザルコニウム塩化物には 0.3%レシチン、3%ポリソルベート 80、0.1%L-ヒスチジン、3%サポニン、0.5%チオ硫酸ナトリウム、0.1%トリプトン及び 0.85%NaCl をそれぞれ用いた。作用後のキャリア及び薬液を回収した不活性化剤を SCD 寒天培地で混釈後、36℃で 2 日間培養し、作用後の生菌数を計測した。また、接種菌液を滴下、乾燥後、消毒薬で作用せずに不活性化剤に回収した場合の生菌数も同様の方法で計測した。

計測した生菌数を消毒薬で作用前（作用開始時点）及び作用後のキャリア上の生菌数（CFU/carrier）に換算し、「作用前の生菌数」を「作用後の生菌数」で除した値の対数値を殺菌活性と表記した。

殺菌活性 ($\log_{10}$ reduction) = $\log_{10}$ (「作用前の生菌数」 / 「作用後の生菌数」)

接種菌数及び単位塗布面積当たりの菌数の影響を検討する際には、生菌数を 7 倍に増加、または 1/7 倍に減少させた接種菌液（菌懸濁液）を用いて、同様の方法で殺菌活性を測定した。生菌数の増減率は、菌液の塗り広げによる塗布面積の増加率を基に設定した。すなわち、塗布領域の直径は、塗り広げ有りが約 17~18mm、塗り広げ無しが約 6~7mm であった。中間値を用いて面積の増加率を算出すると、 $(17.5/6.5)^2 \div 7.2$ 倍となる。このため、「接種菌量 10^7 CFU/disk の塗り広げ有り」は「接種菌量 1/7 倍の塗り広げ無し」と、また「接種菌量 10^7 CFU/disk の塗り広げ無し」は「接種菌量 7 倍の塗り広げ有り」と、それぞれ理論上の単位塗布面積当たりの菌量は同程度となる。

統計処理

試験結果の統計処理は Microsoft Excel 2010 を用いた。有意差検定は、*Student's t-test* を用い、等分散または非等分散の 2 標本を対象とした t-検定を選択し、両側検定時の p 値が 0.05 未満のとき、両者には有意差があると判断した。なお、等分散または非等分散の判断は、F 検定を用い、両側検定時の p 値が 0.05 未満のとき、2 標本は非等分散であると判断した。

2.3. 結果

菌液の塗り広げが消毒薬の殺菌活性に与える影響

EN 試験法に従い、ステンレスディスクをキャリアとして、キャリア当たり約 10^7 CFU の菌液を滴下し、一方はそのまま、もう一方はキャリア上に菌液を塗り広げた後に乾燥させた。それぞれの乾燥菌体上に消毒薬を滴下し、任意の時間作用させた場合の殺菌活性を比較した。以下、菌液をそのまま乾燥させたものを drop 条件、塗り広げた後に乾燥させたものを spread 条件とそれぞれ表記する。

図 10 は 70w/w%エタノールと 0.2%ベンザルコニウム塩化物 (BAC) の殺菌活性をまとめたものである。

図 10A に示すように、70w/w%エタノールで 15 秒作用時の殺菌活性 ($\log_{10}$ reduction) は塗り広げの有無によらず同程度であったが、それ以降の作用時間の延長に伴う殺菌活性の増加は、drop 条件と比べ、spread 条件で大きく、1 分作用時及び 2 分作用時の活性は共に spread 条件の方が有意に高かった ($p<0.05$)。例えば、2 分作用時の殺菌活性 (平均値 $\pm$ 標準偏差、以下同様) は spread 条件では 5.1 ± 0.3 であったのに対し、drop 条件では 3.6 ± 0.1 であり、spread 条件は EN 試験法の要求基準 (4 $\log_{10}$ reduction 以上) を満たしたが、drop 条件は満たさなかった。なお、1 分作用時には、spread 条件での殺菌活性は 3.4 ± 0.3 であり、上記の要求基準を満たさなかった。

図 10B に示すように、0.2%BAC で 30 秒作用時の殺菌活性は、spread 条件が 4.1 ± 0.1 、drop 条件が 2.5 ± 0.2 であり、spread 条件の方が有意に高かった ($p<0.01$)。spread 条件は EN 試験法の要求基準を満たした。1 分作用時には両接種条件とも生菌が検出されず、検出限界以上の活性を示した。

菌液の塗り広げの有無による活性差に接種菌数を与える影響

次に、菌液の塗り広げによる殺菌活性の向上に対する接種菌数、及び単位塗布面積当たりの菌数の影響を確認するため、接種菌数を 7 倍 (約 10^8 CFU/disk) に増加、または 1/7 倍に減少させた (約 10^6 CFU/disk) 条件において、菌液の塗り広げが殺菌活性に及ぼす影響を検討した。作用時間は、接種菌数が 10^7 CFU/disk のときに、spread 条件が EN 試験法の殺菌活性の要求基準を満たした最短の作用時間であった 2 分 (70w/w%エタノール) 及び 30 秒 (0.2%BAC) を選択した。

図 11 は、70w/w%エタノールと 0.2%BAC の殺菌活性をまとめたものである。

図 11A に示すように、70w/w%エタノールの殺菌活性は、spread 条件では $10^6, 10^7, 10^8$ CFU/disk の順に $5.2\pm0.3, 5.1\pm0.2, 5.5\pm0.3$ であったのに対し、drop 条件では同 $3.6\pm0.3, 3.7\pm0.2, 4.2\pm0.2$ であり、接種菌数を増減させた場合でも、spread 条件での活性は drop 条件でのそれと比べ、有意に高かった ($p<0.01$)。 10^6 CFU/disk 及び 10^7 CFU/disk における、spread 条件間及び drop 条件間の殺菌活性にはそれぞれ有意差は認められなかったが、 10^8 CFU/disk における両接種条件の殺菌活性は、 10^6 CFU/disk 及び 10^7 CFU/disk と比べ、drop 条件間では有意に高く ($p<0.05$)、spread 条件間でも高い傾向が見られた。

図 11B に示すように、0.2%BAC の殺菌活性は、70w/w%エタノールと同様に、いず

れの接種菌数においても、spread 条件の方が、drop 条件よりも有意に高く、 $10^6, 10^7, 10^8$ CFU/disk の順に、spread 条件では 4.2 ± 0.3 、 4.1 ± 0.3 、 2.7 ± 0.5 、同 drop 条件では 2.8 ± 0.5 、 2.7 ± 0.4 、 1.2 ± 0.3 であった ($p < 0.01$)。 10^6 CFU/disk 及び 10^7 CFU/disk における、spread 条件間及び drop 条件間の殺菌活性にはそれぞれ有意差は認められなかったが、 10^8 CFU/disk における両接種条件の殺菌活性は、 10^6 CFU/disk 及び 10^7 CFU/disk と比べ、spread 条件間及び drop 条件間のいずれにおいても有意に低く ($p < 0.01$)、70w/w% エタノールの場合と傾向が異なっていた。

2.4. 考察

本研究では EN 試験法の表面試験について、菌液の塗り広げの有無（塗布面積）が消毒薬の殺菌活性に与える影響を検討した。

70w/w%エタノール、0.2%ベンザルコニウム塩化物（BAC）ともに、キャリアへの接種菌数が同じ場合、菌液を塗り広げた方（spread 条件）が塗り広げない場合（drop 条件）と比べ、殺菌活性は高かった。

塗り広げによる殺菌活性の向上について、①理論上の単位塗布面積当たりの菌数（菌密度）が異なる、 10^6 CFU/disk と 10^7 CFU/disk の spread 条件間、drop 条件間の殺菌活性は同程度、②理論上の菌密度が同じである 10^6 CFU/disk の drop 条件と 10^7 CFU/disk の spread 条件では、後者の方が高活性、③ 10^8 CFU/disk の spread 条件と比べ、 10^6 CFU/disk の drop 条件は、理論上の菌密度が低いにも関わらず、殺菌活性は同程度以下、という 3 つの結果は、その原因が菌密度では説明できず、また、結果②からは、塗り広げによる消毒薬と菌との接触面積の拡大も殺菌活性の向上の原因ではないことも示唆され、塗り広げによる消毒薬の殺菌活性の向上はこれらとは異なる要因が関与していると考ええる。

塗り広げにより殺菌活性が向上した原因の仮説として、塗布領域の中央部の体積割合の増加、及び菌液の乾燥時間の短縮の影響を考えている。

本検討において、接種した菌液は塗布領域の周辺部から乾燥していったことが視覚的に観察された。このため、菌体層の中央部は、周辺部よりも相対的に乾燥度が低く、消毒薬が浸透して作用しやすいと推定され、その体積割合が高い接種条件（spread 条件）の方が高活性を示したと推察している。

また、drop 条件は spread 条件よりも接種した菌液が乾燥しにくく、spread 条件では 20~25 分で乾燥したのに対し、drop 条件では 30~35 分を要した。培養温度（28~37℃）により、細菌（*S. aureus*）の脂質組成³⁸⁾や抗菌薬に対する抵抗性³⁹⁾が変化することが報告されており、本研究においても、乾燥器内（約 36℃）に存在した時間の違いにより、菌体自体の消毒薬抵抗性が両接種条件で異なっていた（drop 条件の方がより抵抗性）可能性も考えられる。

接種菌数を 10^8 CFU/disk に増加したときの殺菌活性の変化が、70w/w%エタノールと 0.2%BAC で異なった要因については、消毒薬の浸透性の違いと推察している。70w/w%エタノールの表面張力は 25.5 mN/m (20℃)である⁴⁰⁾。一方、BAC の臨界ミセル濃度（0.34mg/g）における表面張力は 39.5 mN/m (22℃)であり、さらに濃度を上げて表面張力はほとんど変わらないことから⁴¹⁾、0.2%BAC の表面張力は 70w/w%エタノールよりも大きく、70w/w%エタノールよりも乾燥菌層への浸透力が弱いと推定される。このため、0.2%BAC の方が、接種菌数の増加により菌層が厚く、広くなったときに接触しにくい菌体が生じやすく、殺菌活性が低下したと考える。

また、接種菌数を増加すると、菌体に対する負荷物質の相対的な濃度が低くなるため、負荷物質による活性抑制効果は小さくなると推測される。70w/w%エタノールにおいて、接種菌数の増加により殺菌活性が向上した要因は、上述の菌体層の拡大による活性低下よりも、この負荷物質による活性抑制効果の軽減が大きかったためと推察さ

れる。

実際の消毒対象物である器具や環境の表面においては、菌体を含む液滴が乾燥する（乾燥菌集落 1 個当たりの面積が狭い）場合と液だまりが乾燥する（同、広い）場合のどちらの状況もあり得ると想定される。このため、表面試験における接種菌液の塗り広げの有無については、どちらの場合で評価した殺菌活性が絶対的に正しいとは判断できない。一方で、消毒薬の評価の目的の 1 つは、十分な殺菌効果を有さない製剤の使用を防止することであるため、そのような製剤が基準を満たさないような評価方法が望ましいと私は考える。

本研究は、単一の菌株（*S. aureus*）に対する 2 種のみの消毒薬（70w/w%エタノールと 0.2%BAC）の検討という制限がある研究ではあるが、キャリア上に菌液を塗り広げた場合、評価される殺菌活性が高くなり、設定された要求基準を満たしやすくなった。菌液の塗り広げの影響として上述した塗布領域内の乾燥度の違いは、キャリア上の菌体の分布が原因であり、*S. aureus* のみならず、供試菌において普遍的に起こる現象と推測される。また、素材の異なる 6 種のキャリアを用いて消毒薬 3 種（80w/w%エタノール、0.05%BAC 及び 1500ppm 次亜塩素酸ナトリウム）の殺菌活性を検討したところ、各消毒薬の活性は素材間では異なるものの、3 種の消毒薬の活性順はいずれの素材でも同様との報告³⁾から、キャリア上の乾燥菌体の殺傷に関わる要因は消毒薬やキャリア素材によらず共通していると推定される。実際、本研究で検討した 2 種の消毒薬における、菌液の塗り広げの影響は一致していた。よって、菌液の塗り広げによる殺菌活性の向上は、本研究において未検討の菌種、消毒薬及びキャリア素材を用いた試験においても、程度の差こそあれ、観察されるものと推察される。

以上のことから、表面試験における菌液の接種法は殺菌活性に影響を与えることが想定され、菌液を塗り広げずに乾燥させる試験方法の方が消毒薬をより厳しく評価でき、望ましいと考える。

まとめ

本研究では、非生体消毒薬の評価方法のなかの、EN 試験法における浮遊試験と表面試験について、浮遊試験では作用液の調製法（作用時の菌液割合）が、表面試験では乾燥菌体の調製法（接種菌液の塗り広げの有無）が消毒薬の殺菌活性（消毒薬の作用による生菌数の減少度）に与える影響について、それぞれ検討した。

浮遊試験の検討では、菌液調製に用いる溶液の成分が消毒薬の殺菌活性に影響を与えており、EN 試験法における従来の試験法（Trp 生食で菌液調製、菌液割合 10%）では、殺菌活性の過大評価または過小評価に繋がることが示唆された。また、表面試験の検討では、条件に明記されていない接種菌液の塗り広げは消毒薬の殺菌活性を向上させ、評価法の要求基準を満たしやすくなることが示唆された。消毒薬の評価法として、長年繁用されている EN 試験法について、両試験における評価結果（殺菌活性）が必ずしも実態を反映していないことを指摘した本研究の知見は驚きであり、消毒薬の評価法に一石を投じるものであると考えている。

消毒薬の評価においては、欧州や米国の試験法が繁用されているが、それらの試験法をそのまま用いるのではなく、その試験方法（手順）の妥当性をよく吟味し、必要であれば適宜、変更して実施することが望ましい。一方で、試験法が公的に定められている場合、実施者の主観的な判断で試験方法を変更すると、その評価結果の客観性が損なわれる可能性があることから、受容されにくく、適当ではないと思われる。このため、評価法及びその指針を策定する団体はその方法がより妥当なものとなるよう、広く知見を集め、定期的に見直しを行なっていくことが重要であると考えられる。また、製薬会社が発行する消毒製品の学術的資料や研究発表といった評価結果の受け手（ユーザー、研究者など）は、その殺菌活性だけでなく、どのような条件で消毒薬を作用したときの活性であるのか、その試験法を詳細に確認することが望ましい。

評価法の検討過程を知ることは、実際の使用法や消毒操作の参考となる可能性もある。例えば、本研究において、表面試験において得られた、面積の小さい、液滴状の乾燥菌体は殺傷されにくかった結果を参考に、そのような菌体の汚染には注意して、物理的に菌層を破壊した後に消毒薬を作用させるか、あるいは作用時間を所定時間より長めにするなどの対応が考えられる。

消毒薬の評価法に関する理解や認識が深まることで、適切な製剤の開発や選択、また、そのような製剤を用いた消毒法の改善が進むことが期待される。

謝辞

本研究を遂行し、学位論文を執筆する上では多くの皆様にご指導、ご助力いただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科の小林寛伊 名誉学長、木村哲 教授、大久保憲 教授、梶浦工 教授、岩澤篤郎 教授、菅原えりさ 准教授、吉田理香 准教授、遠藤博久 准教授、松村有里子 講師には、先生方の知識や見解を基にした多くのご指導とご助言をいただき、本研究及び感染制御に対する私の視野を広げていただきました。心より御礼申し上げます。

感染制御学コースの修了生の皆様、学友の皆様には、研究に関する議論や研究合宿などにおける交流を通して研究生活を実りあるものにしていただきました。深く感謝申し上げます。

吉田製薬株式会社 吉田俊介 会長（前社長）ならびに遠藤正洋 社長には、東京医療保健大学大学院にて研究を行なう機会を与えていただき、また、研究開発本部の皆様には、社内業務と研究との両立を支えていただきました。厚く御礼申し上げます。

皆様のお力添えがなければ、私の研究は学位論文にまで至らなかったと思います。重ねて感謝申し上げます。

引用文献

1. 熊谷善敏, Soumitra Sen. ヨーロッパにおける統一標準殺菌効力試験の現状. *防菌防黴* 1999; 27(2): 109-113.
2. 梶浦工. 欧州の殺菌・消毒薬効力評価試験法について. *防菌防黴* 2000; 28(5): 327-332.
3. 梶浦工, 和田英己. 外国における消毒薬の抗微生物評価の現状. *防菌防黴* 2007; 35(6), 375-381.
4. 植田知文, 梶浦工, 小林寛伊. 海外における殺菌・消毒薬の効力評価法 —欧州、米国の試験規格の比較. *医療関連感染誌* 2015; 8, 10-16.
5. McDonnell GE. Evaluation of Efficacy. In: *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization*. Washington, DC: ASM Press 2007: 32-44.
6. 消毒法及び除染法. 於: *第十七改正日本薬局方*. 2016; 2414-2417
http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/JP17_SAN KOU.pdf. 2016 年 11 月 22 日確認
7. 一般社団法人 日本衛生材料工業連合会. ウエットワイパー類の除菌性能試験方法.
http://www.jhpia.or.jp/standard/wet_wiper/img/wetwiper_standard05-3.pdf. 2016.11.15 確認
8. 日本石鹼洗剤工業会. 住宅用合成洗剤と石けんの除菌活性試験方法.
http://jsda.org/w/web_jftc/koutorikyo/jyutakushiken070731.pdf. 2016.11.15 確認
9. 日本環境感染学会 消毒薬評価委員会. 生体消毒薬の有効性評価指針：手指衛生 2011.
http://www.kankyokansen.org/common/fckeditor/editor/filemanager/connectors/php/transfer.php?file=/JSEI/uid000005_68616E642D68796769656E655F323031312833292E706466. 2016.12.15 確認
10. 日本環境感染学会 消毒薬評価委員会. 生体消毒薬の有効性評価指針：手術野消毒 2013.
http://www.kankyokansen.org/common/fckeditor/editor/filemanager/connectors/php/transfer.php?file=/JSEI/uid000005_7379756A757475796173796F75646F6B75323031334B65697361695F322E706466. 2016.12.15 確認
11. EN 1040:2005. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics. Test method and requirements (phase 1).
12. EN 1275:2005. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic fungicidal or basic yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics. Test method and requirements (phase 1).
13. ASTM E2315-03. Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure.
14. Weavers LK, Wickramanayake GB. Kinetics of the Inactivation of Microorganisms. In: Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5th edn. Philadelphia:

- Lippincott Williams & Wilkins 2001: 65-78.
15. EN 13697:2015. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2).
 16. ASTM E2197-11 Standard Quantitative Disk Carrier Test Method for Determining Bactericidal, Virucidal, Fungicidal, Mycobactericidal, and Sporocidal Activities of Chemicals.
 17. BS EN 14561:2006 Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative carrier test for the evaluation of bactericidal activity for instruments used in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 2)
 18. AOAC Official Method 955.15. Testing Disinfectants Against *Staphylococcus aureus* Use-Dilution Method.
 19. BS EN16615:2015. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative test method for the evaluation of bactericidal and yeasticidal activity on non-porous surfaces with mechanical action employing wipes in the medical area (4- field test). Test method and requirements (phase 2, step 2).
 20. ASTM E2362-09 Standard Practice for Evaluation of Pre-saturated or Impregnated Towelettes for Hard Surface Disinfection.
 21. ASTM E2967-15 Standard Test Method for Assessing the Ability of Pre-wetted Towelettes to Remove and Transfer Bacterial Contamination on Hard, Non-Porous Environmental Surfaces Using the Wiperator.
 22. BS EN 13727:2012. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 1).
 23. Senior N, Some observation on the formulation and properties of Chlorhexidine. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 1973; 24(4): 259-278.
 24. 久保一義, 梅本知子, 矢田登, 鎌田皎. クロルヘキシジンと無機または有機アニオン性化合物とのイオン対形成. *薬剤学* 1986; 46(3): 175-181.
 25. 久保一義, 伊藤壮一, 矢田登, 鎌田皎. クロルヘキシジンと種々アニオンのイオン対の殺菌活性. *薬剤学* 1986; 46(3): 182-188.
 26. 古田太郎, 上田明宏, 高本一夫, 村田雄司, 木原孝治. 第四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* 1993; 21(3): 117-124.
 27. 小林寛伊、大久保憲、尾家重治. 消毒薬. 於：小林寛伊編集. [新版 増補版] *消毒と滅菌のガイドライン*. 東京：へるす出版 2015 ; 121-144.
 28. 吉田製薬 文献調査チーム. 各種消毒薬の特性. 於： *消毒薬テキスト*. 第5版. 東京：協和企画 2016 ; 170-200.
 29. Dyckdala GR. Chlorine and Chlorine Compounds. In:Block SS, ed. *Disinfection*,

- Sterilization, and Preservation*, 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001: 135-157.
30. Gottardi W. Iodine and Iodine Compounds. In:Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001: 159-183.
 31. Merianos JJ. Surface-active agents. In:Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001: 283-320
 32. Nadir MT, Gilbert P. Influence of potassium chloride upon the binding and antibacterial activity of chlorhexidine diacetate and (ethoxy)5 octyl phenol (Triton X45) towards *Bacillus megaterium* KM-. *Microbios* 1979; 26(103): 51-63.
 33. Ali Y, Dolan MJ, Fendler EJ, Larson EL. Alcohol. In:Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001: 229-253.
 34. McDonnell GE. Chemical Disinfection. In: *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization*. Washington, DC: ASM Press 2007: 79-148
 35. Russell AD. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52(5): 750-63.
 36. BS EN 13624:2013. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 1).
 37. BS EN 14476:2013. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area. Test method and requirements (Phase 2/Step 1).
 38. Pisano MA, Ball DJ, Eriquez L. Temperature-related variations in the lipid composition of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 17(6): 1170-2.
 39. Canawati HN, Witte JL, Sapico FL. Temperature effect on the susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to four different cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 21(1): 173-5.
 40. Gonzalo V, Estrella A, Jose MN. Surface Tension of Alcohol + Water from 20 to 50 C. *J. Chem. Eng. Data* 1995; 40(3): 611-14.
 41. Stanislaw P, Dorota WS, Malgorzata S. Surface tensometry studies on formulations of surfactants with preservatives as a tool for antimicrobial drug protection characterization. *J. Biophysical Chemistry* 2012; 3(4): 324-333.

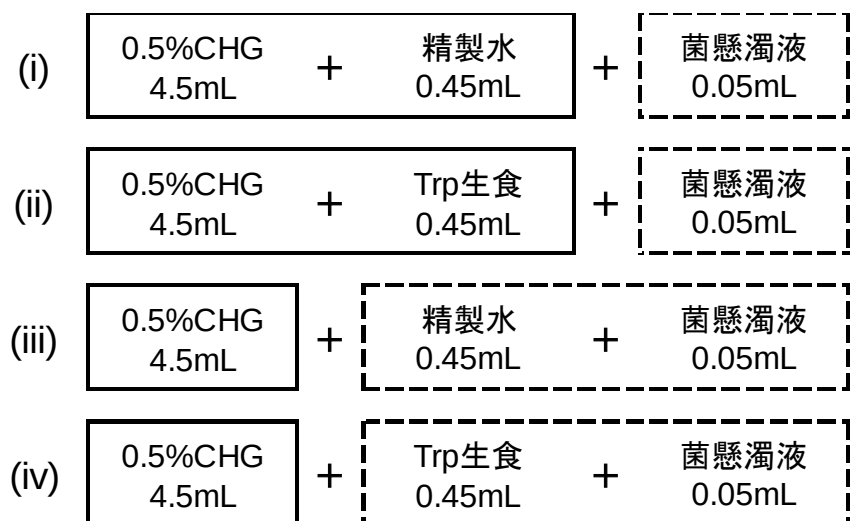


図1. 菌液割合が殺菌活性に与える影響の検討に用いた作用液の調製法

実線、破線のboxは、各作用液における薬液、接種菌液をそれぞれ表す。

(i)と(ii)はそれぞれ精製水及びTrp生食と混合した0.5%CHG水溶液を薬液とし、(iii)と(iv)は0.5%CHG水溶液をそのまま薬液として用いた。

また、(i)と(ii)は菌懸濁液をそのまま菌液とし、(iii)と(iv)はそれぞれ精製水及びTrp生食と混合(希釈)した菌懸濁液(約 10^8 CFU/mL)を菌液として用いた。

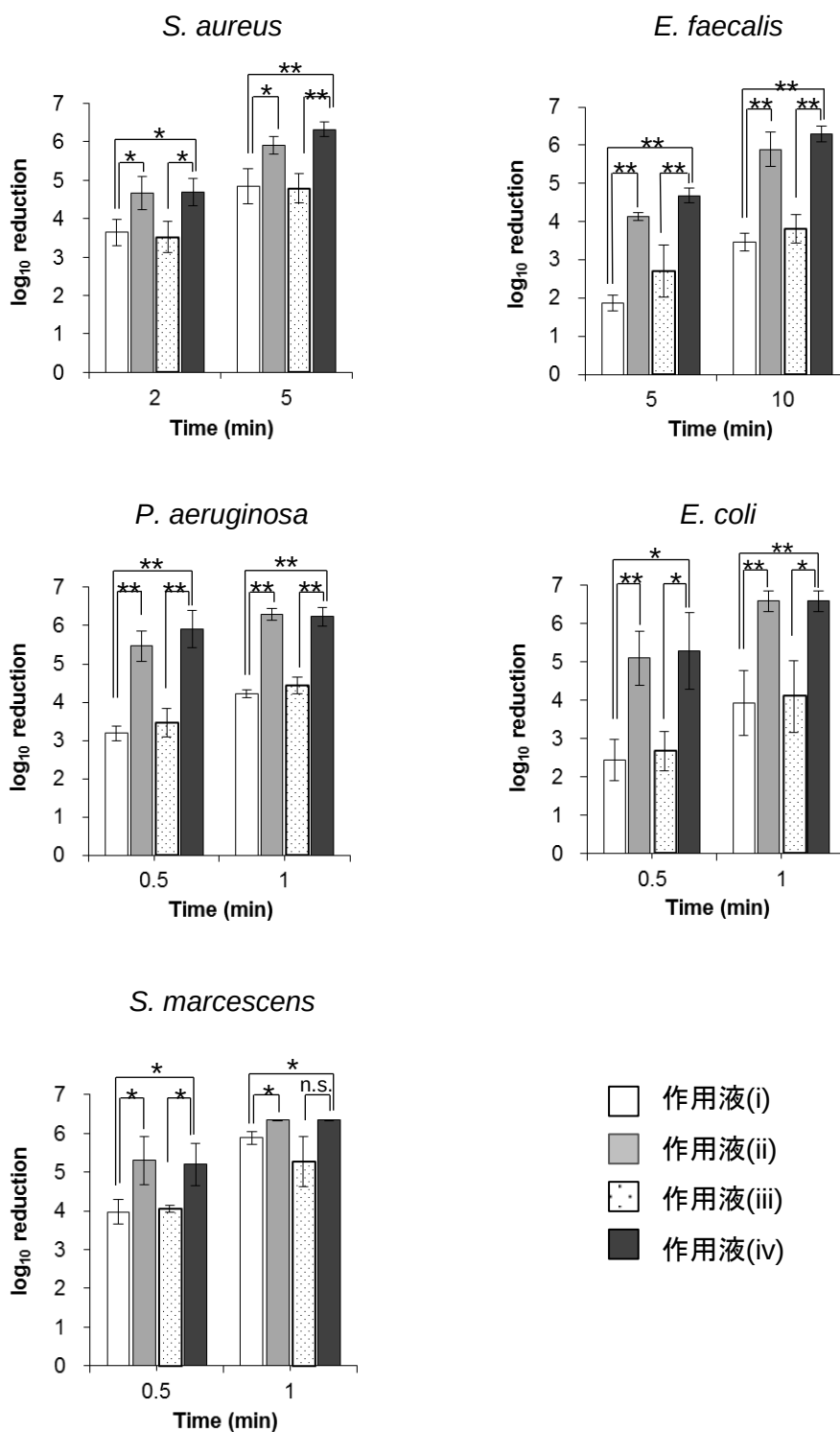


図2. CHGの殺菌活性に対する菌液の割合の影響

図1に示した4種の作用液(i)~(iv))における殺菌活性を検討した。
 n=3、平均値±標準偏差、* $p<0.05$, ** $p<0.01$ (by Student's *t*-test)

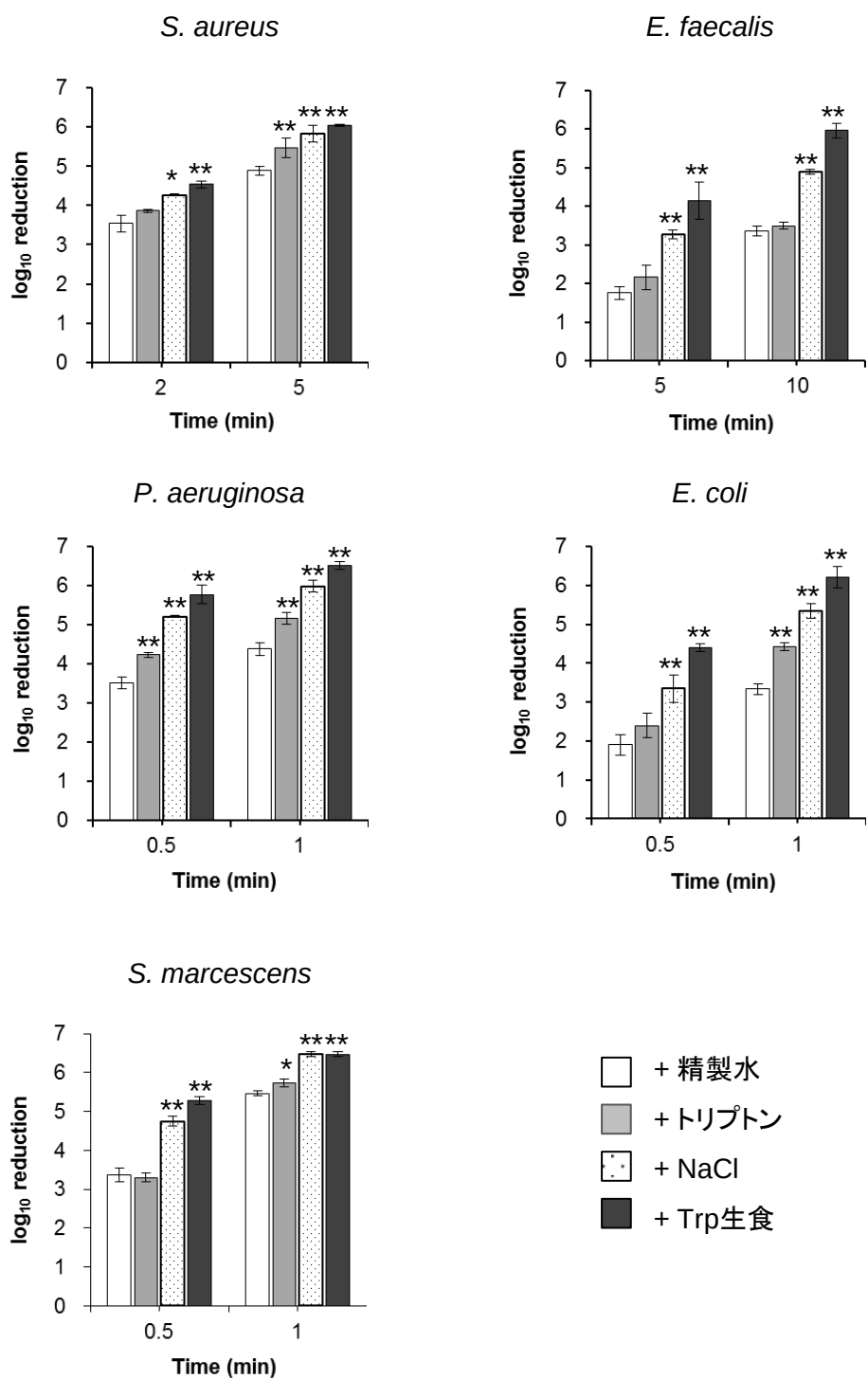


図3. CHGの殺菌活性に対する菌液調製用液の成分(トリプトン、塩化ナトリウム)の影響

精製水、トリプトン、塩化ナトリウム、Trp生食を添加した0.5% (作用時0.45%) CHGの殺菌活性を検討した。

n=3、平均値±標準偏差、精製水添加との有意差 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (by Student's *t*-test)

A.

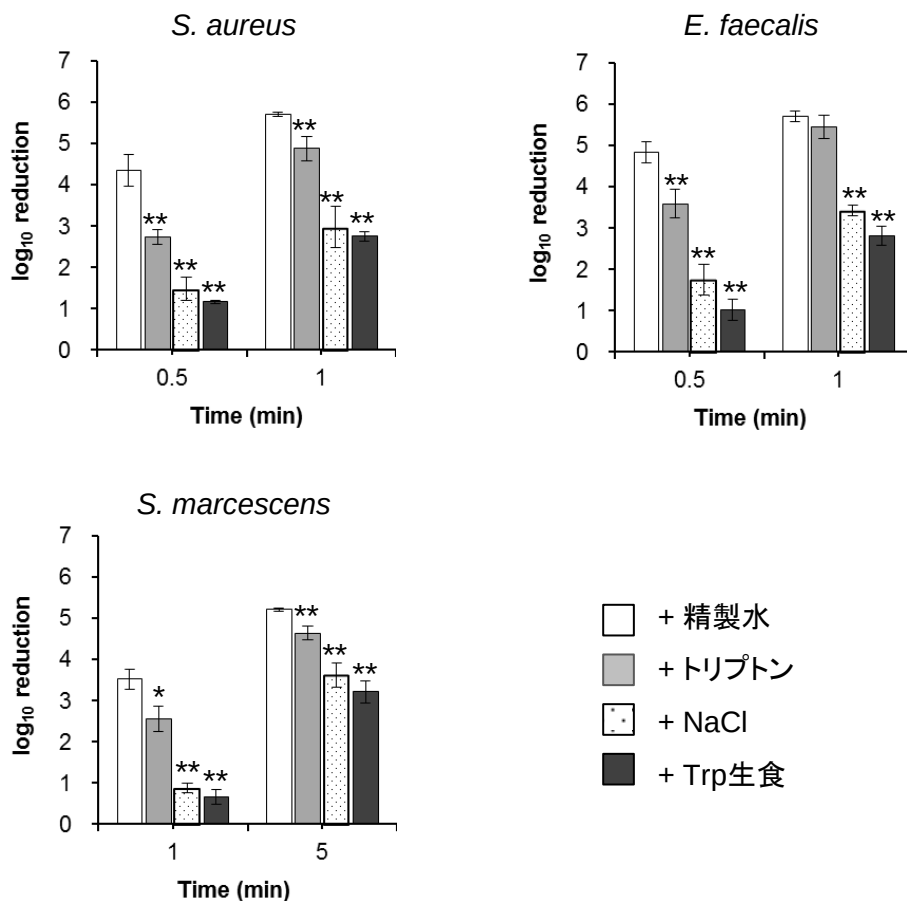


図4A. 0.001% BACの殺菌活性に対する菌液調製用液の成分
(トリプトン、塩化ナトリウム)の影響

精製水、トリプトン、塩化ナトリウム、Trp生食を添加した0.001% (作用時0.0009%) BACの殺菌活性を検討した。

n=3、平均値±標準偏差、精製水添加との有意差 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (by Student's *t*-test)

B.

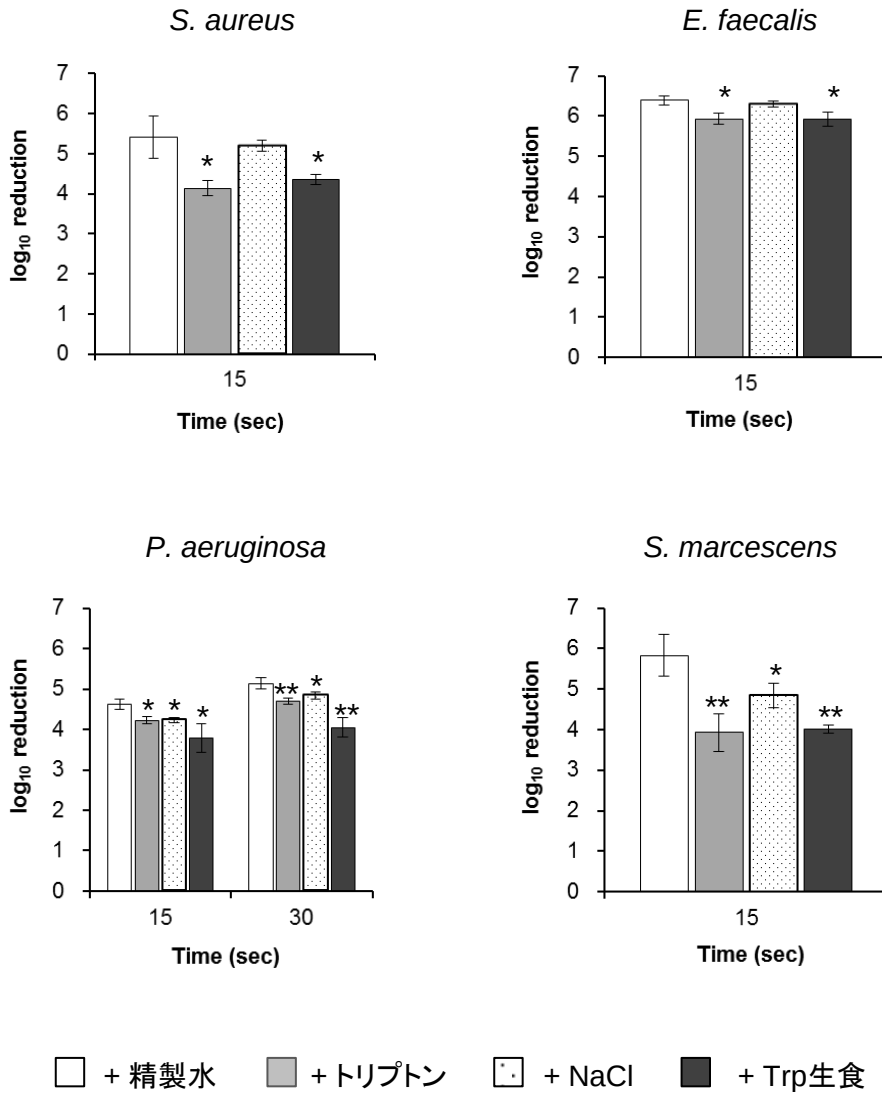


図4B. 0.005% BACの殺菌活性に対する菌液調製用液の成分
(トリプトン、塩化ナトリウム)の影響

精製水、トリプトン、塩化ナトリウム、Trp生食を添加した0.005% (作用時0.0045%) BACの殺菌活性を検討した。

n=3、平均値±標準偏差、精製水添加との有意差 * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (by Student's *t*-test)

C.

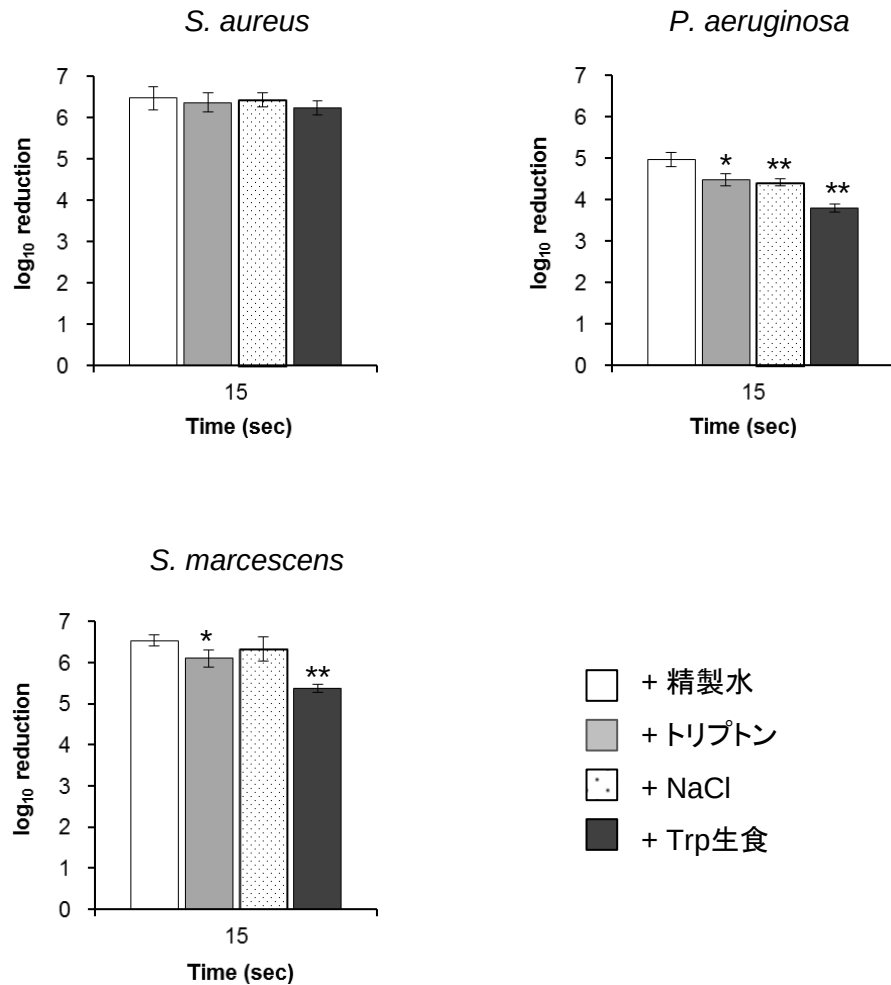


図4C. 0.01% BACの殺菌活性に対する菌液調製用液の成分
(トリプトン、塩化ナトリウム)の影響

精製水、トリプトン、塩化ナトリウム、Trp生食を添加した0.01% (作用時0.009%) BACの殺菌活性を検討した。

n=3、平均値±標準偏差、精製水添加との有意差 * $p < 0.05$, $p < 0.01$ (by Student's *t*-test)

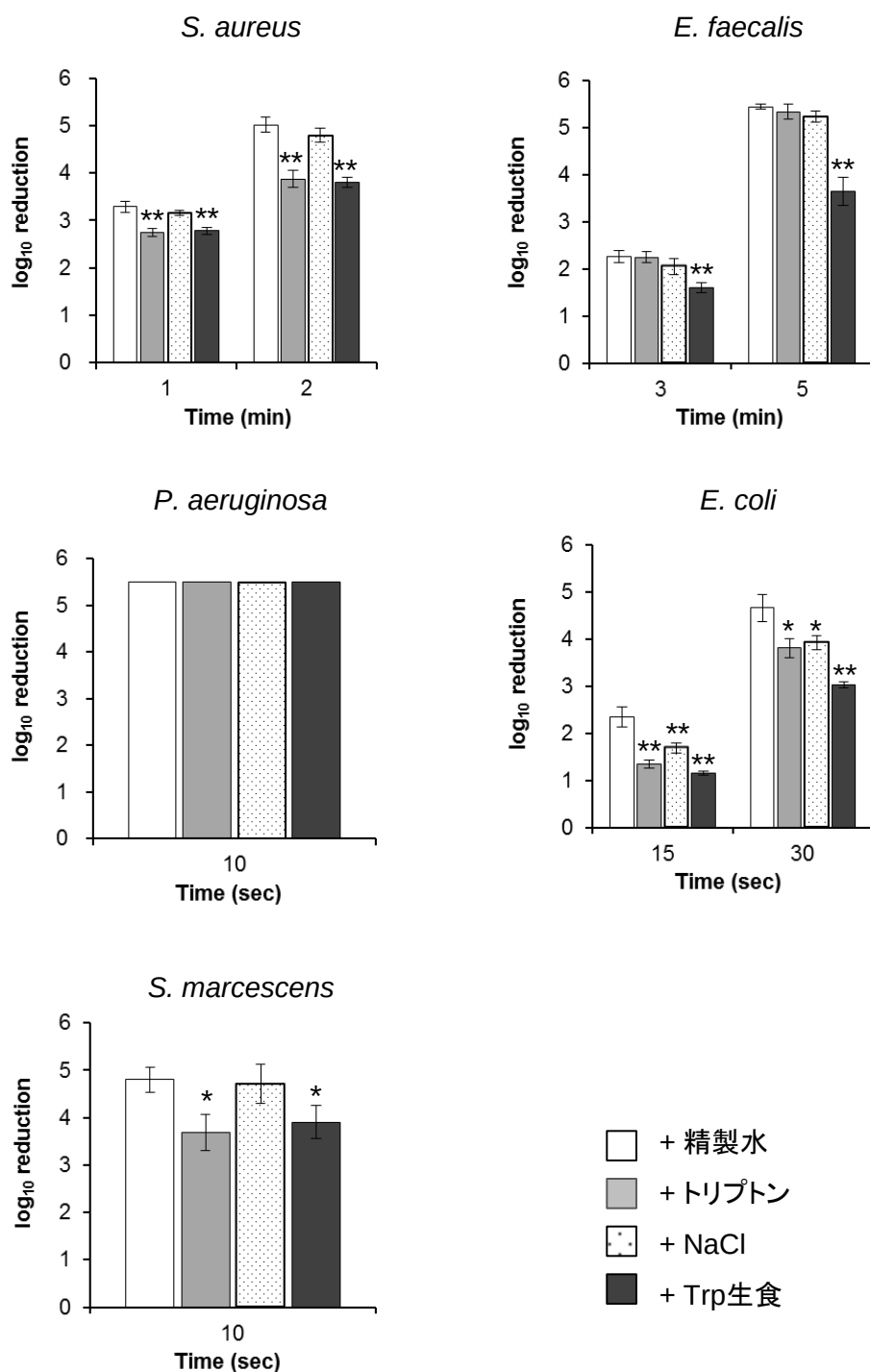


図5. PVP-Iの殺菌活性に対する菌液調製用液の成分(トリプトン、塩化ナトリウム)の影響

精製水、トリプトン、塩化ナトリウム、Trp生食を添加した10%(作用時9%)PVP-Iの殺菌活性を検討した。

n=3、平均値±標準偏差、精製水添加との有意差 * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (by Student's t -test)

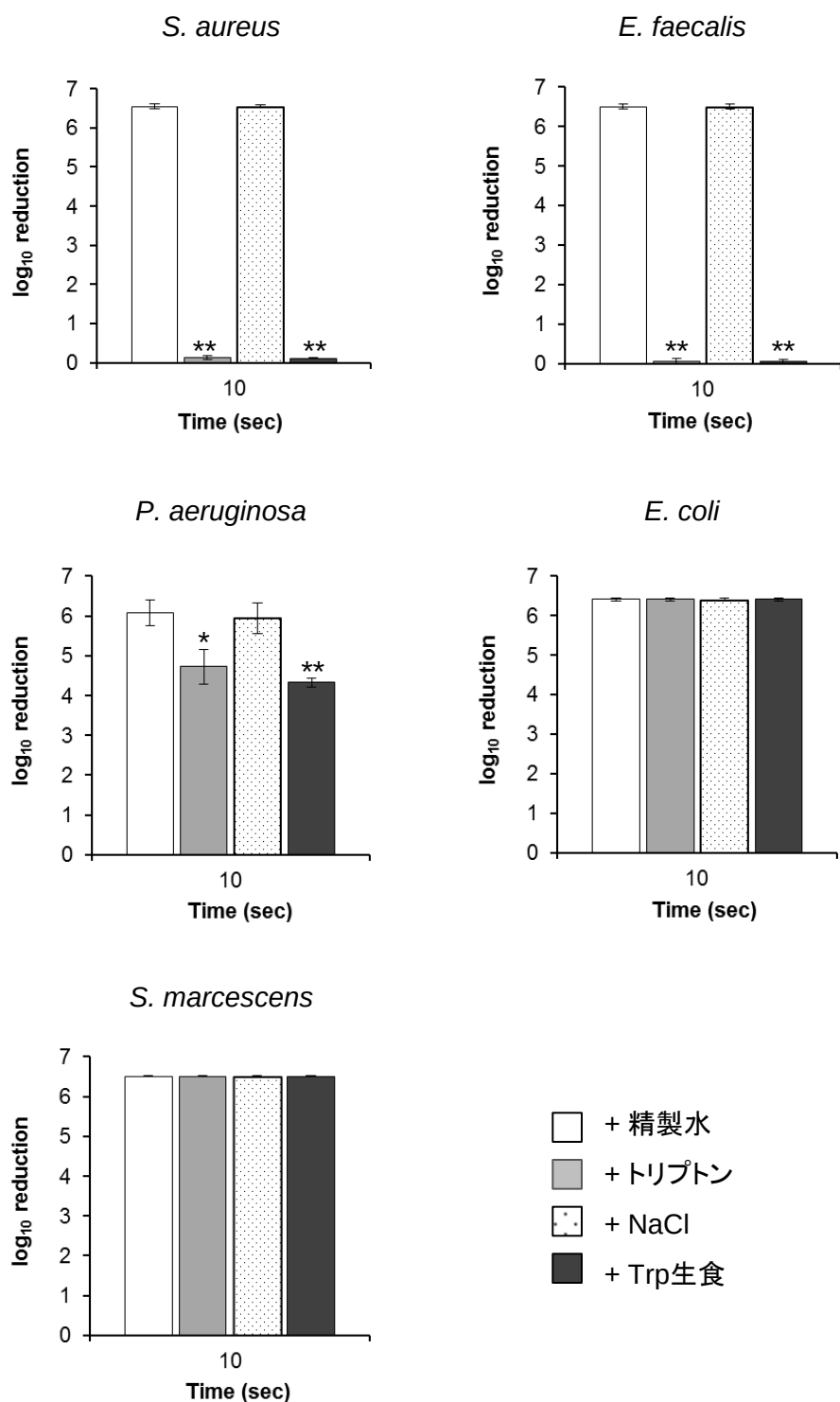


図6. NaOClの殺菌活性に対する菌液調製用液の成分(トリプトン、塩化ナトリウム)の影響

精製水、トリプトン、塩化ナトリウム、Trp生食を添加した50ppm(作用時45ppm)NaOClの殺菌活性を検討した。

n=3、Average±SD、精製水添加との有意差 * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (by Student's *t*-test)

A.

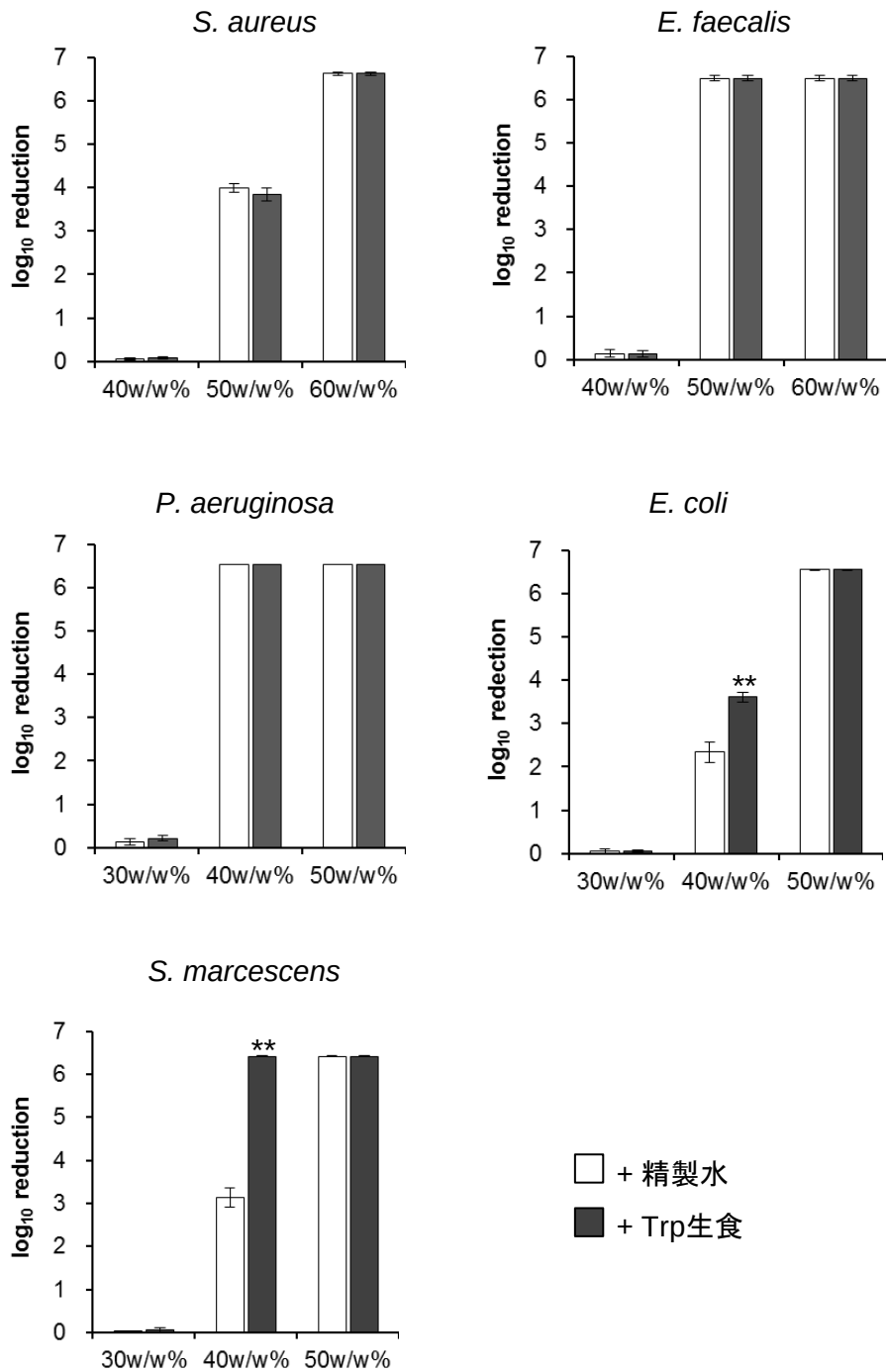


図7A. エタノールの殺菌活性に対する菌液調製用液の影響

精製水、Trp生食を添加した30~60w/w% (作用時はこの9/10容量濃度) エタノールの殺菌活性を検討した。作用時間はいずれも10秒作用。

n=3、平均値±標準偏差、精製水添加との有意差 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (by Student's *t*-test)

B.

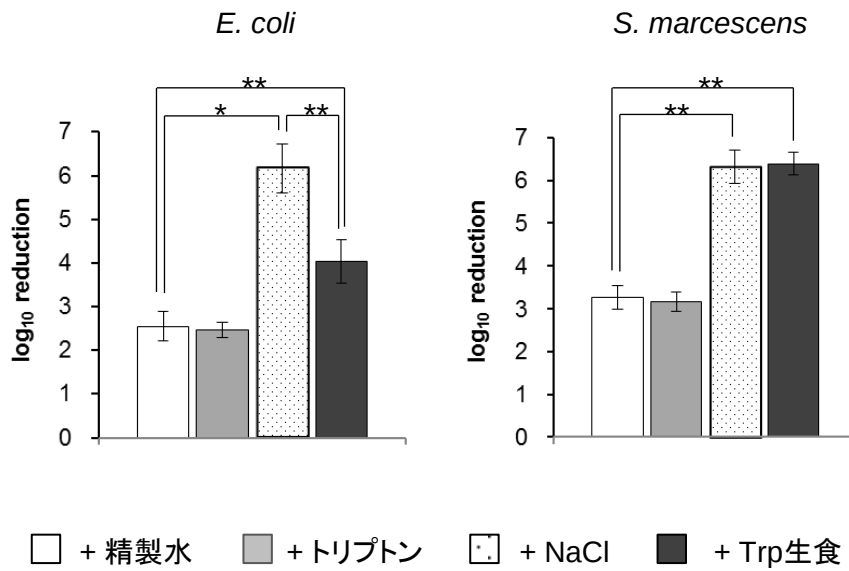


図7B. エタノールの殺菌活性に対する菌液調製用液の影響

精製水、トリプトン、塩化ナトリウム、Trp生食を添加した40w/w% (作用時はこの9/10容量濃度) エタノールの殺菌活性を検討した。作用時間はいずれも10秒作用。

n=3、平均値±標準偏差、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (by Student's *t*-test)

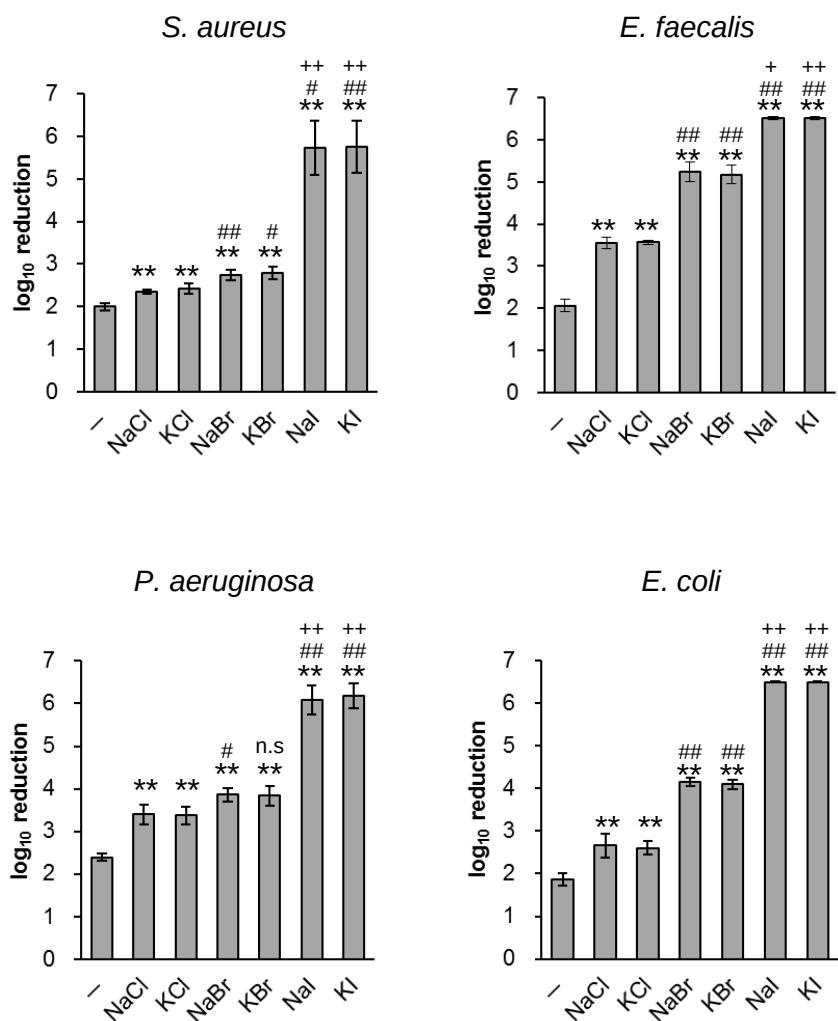


図8. CHGの殺菌活性に対する各種の塩類の影響

精製水(—)、各種の塩類(NaCl~KI)を添加した0.5%(作用時0.45%)CHGの殺菌活性を検討した。

作用時間は、*S. aureus*:2分、*E. faecalis*:5分、*P. aeruginosa*:15秒、*E. coli*:15秒

n=3、平均値±標準偏差、

精製水添加との有意差 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (by Student's *t*-test)

塩化物添加との有意差 # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (by Student's *t*-test)

臭化物添加との有意差 + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ (by Student's *t*-test)

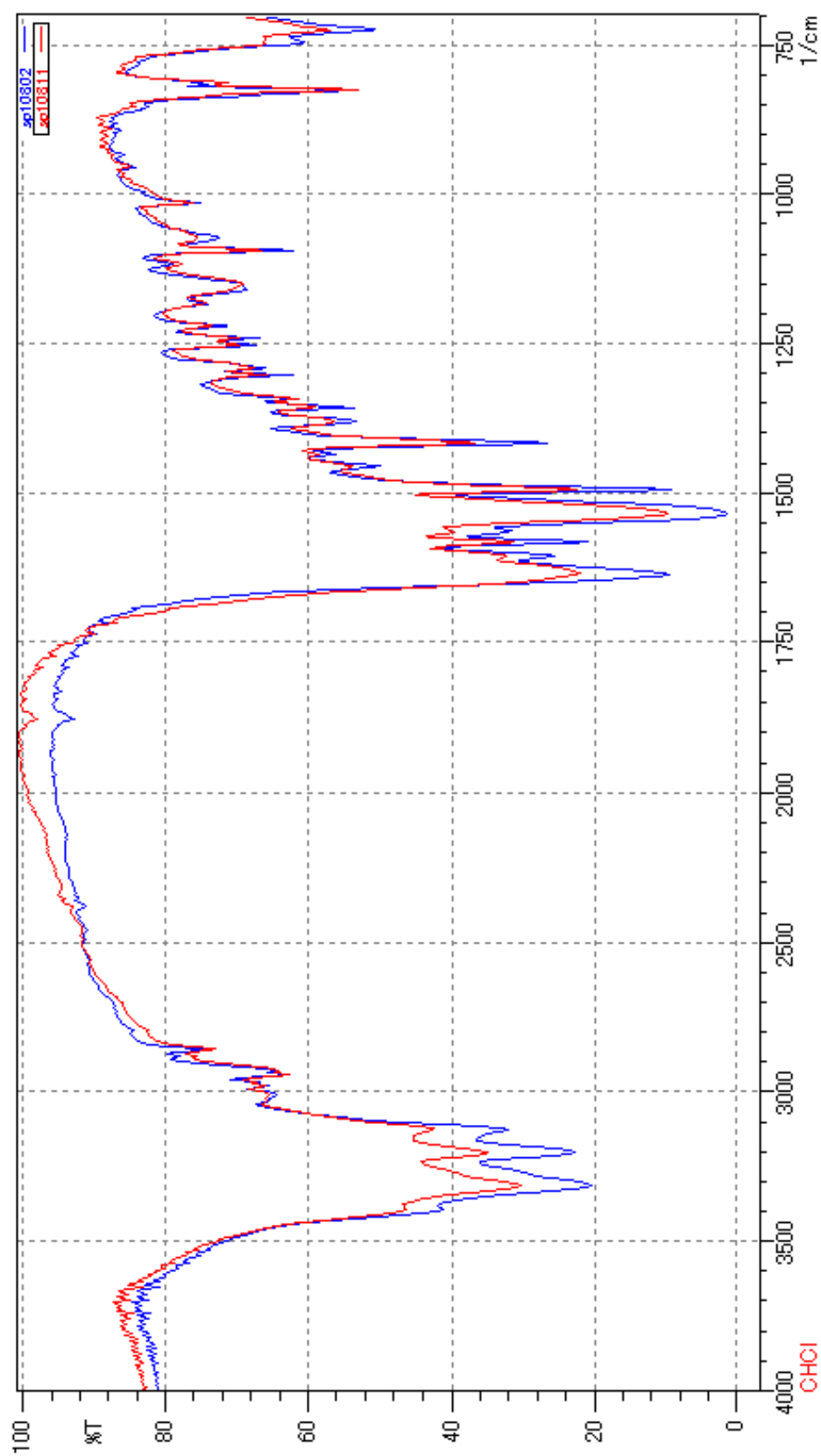
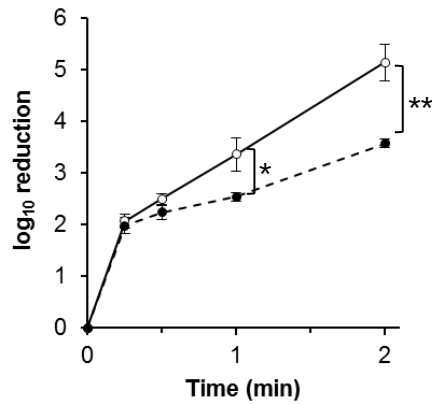


図9. CHGへのNaClの添加により析出した物質のIRスペクトル

青線:CHGへのNaClの添加による析出物、赤線:クロルヘキシジン塩酸塩

A.



B.

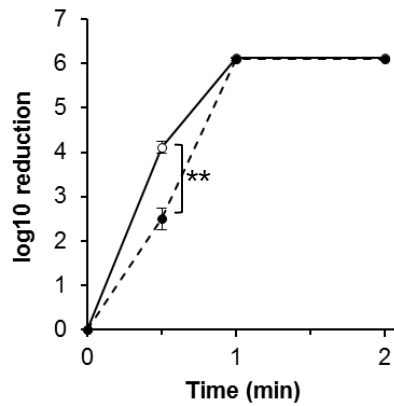


図10. 乾燥前の菌液の塗り広げが消毒薬の殺菌活性に与える影響

キャリア当たり約 10^7 CFUの菌液を滴下し、一方はそのまま、もう一方はキャリア上に菌液を塗り広げた後に乾燥させた。それぞれの乾燥菌体上に消毒薬(70w/w% EtOH(A)、0.2% BAC(B))を滴下し、作用させた場合の殺菌活性を検討した。

○(実線)は塗り広げた場合、●(破線)は塗り広げなかった場合をそれぞれ表す。

n=3、平均値±標準偏差、* $p<0.05$, ** $p<0.01$ (by Student's *t*-test)

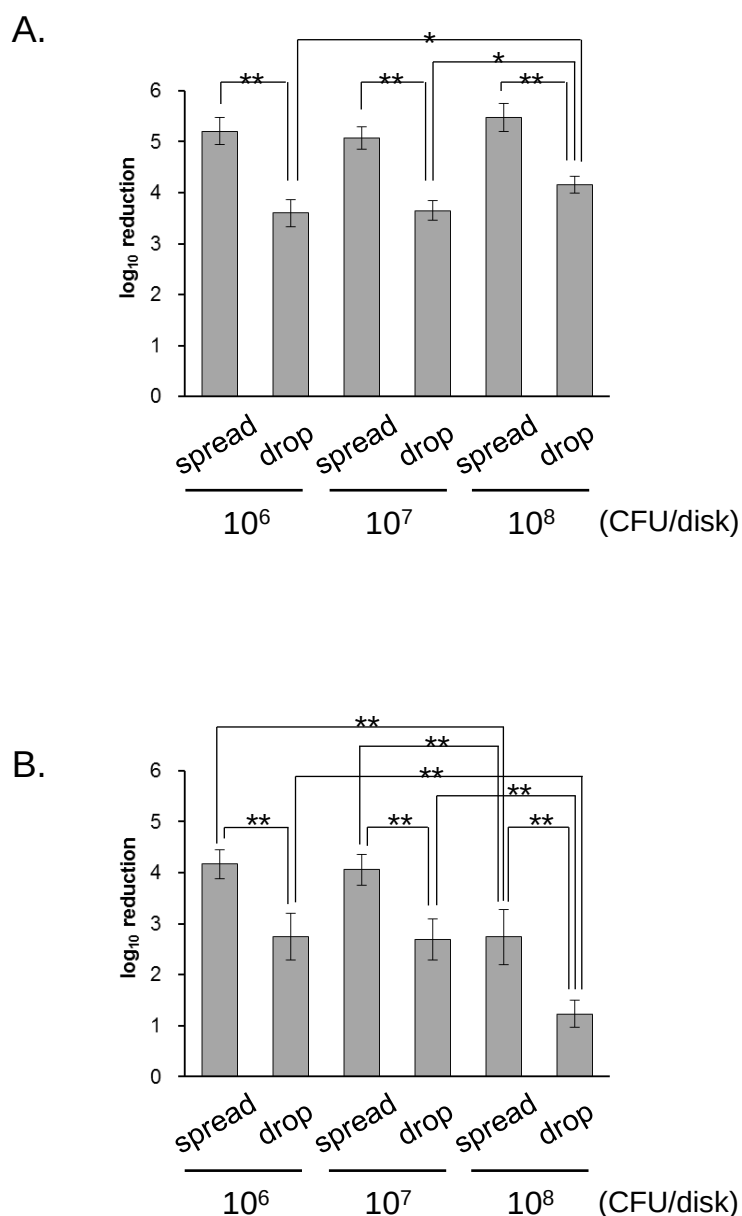


図11. 接種菌数を増減させた条件における塗り広げの影響

キャリア当たり約 10^6 , 10^7 , 10^8 CFUの菌液を滴下し、一方はそのまま、もう一方はキャリア上に菌液を塗り広げた後に乾燥させた。それぞれの乾燥菌体上に消毒薬を滴下し、作用させた場合の殺菌活性を検討した。

spreadは塗り広げた場合、dropは塗り広げなかった場合をそれぞれ表す。

(A) 70w/w% EtOH、2分作用、 $n=3$ (B) 0.2% BAC、30秒作用、 $n=5$

平均値±標準偏差、* $p<0.05$, ** $p<0.01$ (by Student's *t*-test)

用語

本稿では、複数の定義（意味）が存在するなどの理由により、本論文における定義を特記しておく必要があると思われる用語についてまとめた。

消毒薬

狭義には、微生物を殺傷する能力（殺菌効果）を有した物質（化合物）を表し、広義には、狭義の「消毒薬」を溶解・希釈したもの、また、それに添加物を加えたり、剤型を変更したりしたものも表す。このため、殺菌効果を評価する対象は全て広義の「消毒薬」と言える。

本論文においては、広義の「消毒薬」を表している。

消毒薬製剤

狭義には、殺菌効果を有する製品（市販品）のみを表し、広義には、広義の「消毒薬」と同義であり、狭義の「消毒薬」を溶解・希釈したもの、また、それに添加物を加えたり、剤型を変更したりしたものも表す。

本論文においては、消毒薬を含む市販製品（狭義の「消毒薬製剤」）及び承認申請に近い開発段階の処方（物質の組み合わせ）」を表している。

広義の「消毒薬」を表記する際、「消毒薬の使用や開発」という視点で捉えた場合には「消毒薬製剤」を、特別な視点を設けない場合には「消毒薬」をそれぞれ用いた。

殺菌効果

本論文においては、増殖可能な菌体の数（生菌数）を減少させる能力（効果）を表す。「殺菌活性」と表されることもあるが、本論文では下述の「殺菌活性」との区別のためにこの語を用いた。

殺菌活性

一般的には上記の「殺菌効果」と生菌数の減少度（減少値）の両方を表す。

本論文においては、後者のみを表し、減菌率や生菌数の対数減少値などの数値で表記される値を意味する。

除菌

対象物に存在する菌体の殺傷に加え、対象物から菌体を（物理的に）除去すること（生死は問わない）も意味し、洗剤・石けん公正取引協議会は「対象物から増殖可能な細菌数（生菌数）を、有効数減少させること」と定義している⁸⁾。

Points of attention in evaluating disinfectants using European Norm (EN) test method - Solution to prepare bacterial suspension in suspension test and preparation method of dried bacterial cells in surface test

Tomofumi Ueda

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

BACKGROUND: In the evaluation of the ability of disinfectant to reduce the number of viable bacteria (bactericidal effect), standardized test standards such as the European Norm (EN) test method are frequently used overseas. Although it has been reported that the bactericidal effect of disinfectants is influenced by various conditions, in the EN test method, there are two options for the mixing ratio of the disinfectant and the bacterial suspension in the suspension test (evaluation method of bactericidal effect against suspended bacterial cells), and it is not described whether the bacterial solution should be spread before drying in the surface test (evaluation method of bactericidal effect against dried bacterial cells).

OBJECTIVE: To clarify the influence on the bactericidal effect of the mixing ratio of the disinfectant and the bacterial suspension in suspension test and the spreading of the bacterial suspension before drying in surface test, respectively.

METHODS: In suspension test, working solution was prepared in which the proportion of the bacterial suspension was 10% and 1%, and bactericidal activities of each disinfectants (chlorhexidine digluconate (CHG), benzalkonium chloride (BAC), povidone iodine (PVP-I), sodium hypochlorite (NaOCl), and ethanol (EtOH)) in both working solutions were compared. In the surface test, about 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU of bacterial suspension was dropped per carrier (stainless steel disk), one was dried without spreading and the other was spread on the carrier before drying. Each disinfectant (70w/w% EtOH and 0.2% BAC) was dropped on dried bacterial cells and the bactericidal activity at an arbitrary time was compared.

RESULTS: In suspension test, when the proportion of bacterial suspension in the working solution was high, the bactericidal activity of CHG was high and that of BAC, PVP-I and NaOCl was low. That of EtOH was also high in some bacterial species. In surface test, spreading the bacterial suspension on the carrier increased the bactericidal activity of both disinfectants at any inoculated bacterial count.

CONCLUSIONS: In suspension test, the proportion of bacterial suspension in the working solution affects the bactericidal activity in suspension test. In evaluation of disinfectant by suspension test, it is preferable to lower the proportion of the bacterial solution in the working solution. In surface test, it was suggested that spreading the bacterial suspension increases the bactericidal activity. In the evaluation of disinfectants by surface test, it is preferable to dry the bacterial solution without spreading, since it can be evaluated more strictly.