

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

環境清拭における微生物動態に関する実験的検討

2019 年度入学

2021 年 3 月 16 日 博士

医療保健学研究科 医療保健学専攻 感染制御学

学籍番号 HD019001 氏名 片渕 盛将

研究指導教員 木村 哲

副研究指導教員 岩澤 篤郎、松村 有里子

論文題目	環境清拭における微生物動態に関する実験的検討
氏名	片渕 盛将
所属	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
助成金	なし

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

環境清拭における微生物動態に関する実験的検討

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 HD019001
氏名 片淵 盛将

背景 (Background)

医療環境の清拭には、EPA 承認のベンザルコニウム塩化物を不織布等に含浸させたものが汎用されているが、クロス素材への薬剤吸着が問題として挙げられる。近年、マイクロファイバークロスに水のみを組み合わせた使用が注目されているが、菌を再付着させるとの報告がある。適正な環境清拭方法の詳細は明白ではなく、不明点が多いのが現状である。

目的 (Objective)

医療環境の病原微生物からヒトへの接触伝播を遮断するための適正な環境清拭方法を明らかにすることを目的に、清拭クロスの素材として汎用されている 3 種類の不織布とマイクロファイバークロスに塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium chloride: BZC) を用いて、一般細菌、真菌、芽胞、ウイルスに対する拭き取り効果と再付着について検証する。

方法 (Methods)

3 種類のクロスとマイクロファイバークロスに 0.2% BZC 水溶液を用いてクロスへの吸着と試験領域内の残存量を算出した。種々の一般細菌に対して *in vitro* での BZC の殺菌効果を検証すると共に、クロスの有無での影響を明らかにした。拭き取り効果と再付着試験では、血液含有菌懸濁液またはウイルス液を塗布・乾燥させた領域を掃引後、同クロスで別の清潔ステンレス板上を同様の方法で掃引し、生菌数を算出した。SEM 観察により、清拭クロスの表面構造および蛍光ミクロスフェアを用いて、ステンレス板の蛍光ミクロスフェアの残留状態と除去挙動を観察した。

結果 (Results)

BZC 水溶液は一般細菌及び真菌と接触直後に殺菌効果を示したが、その濃度は菌種

により異なった。血液存在下でも、0.2% BZC 水溶液で 10 秒間と短時間で殺菌効果を示した。薬剤吸着試験では、著しい薬剤濃度低下は認めず、BZC 水溶液含浸クロスでの殺菌効果試験では、クロスが菌体に接触する必要があることが示唆された。拭き取り試験では、水含浸クロスでは多くの菌が検出されたが、BZC 水溶液含浸クロスでは、菌の残存とクロスに付着した菌の塗り広げは少なかった。SEM 観察では、拭き取り方向に沿うようにクロス of 拭き取り面に蛍光ミクロスフェアからの蛍光が観察され、蛍光ミクロスフェアがクロス of 中央部に集積されていた。

結論 (Conclusions)

検討した範囲では、一般細菌、真菌、芽胞、ウイルスに対して、マイクロファイバークロスに BZC を組み合わせて使用することは、最も除去効果が高く再汚染が少ないことから、新しい環境清拭方法として有効であると考えられる。

キーワード (Key Words)

環境清拭クロス (Environmental cloth)、塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium chloride)、高頻度接触表面 (Frequently touched surfaces)、医療現場 (Medical field)、微生物動態 (Microbial dynamics)

内容

1. 序論.....	1
2. 実験方法.....	4
2.1 材料.....	4
2.2 BZC 濃度の測定.....	5
2.3 クロスへの BZC 吸着試験.....	5
2.4 試験領域上の BZC 残存量測定.....	5
2.5 菌懸濁液に対する BZC 水溶液の殺菌効果試験.....	5
2.6 乾燥菌体に対する BZC 水溶液の殺菌効果試験.....	5
2.7 乾燥菌体に対する BZC 水溶液含浸クロスの殺菌効果試験.....	5
2.7.1 試験方法 1.....	6
2.7.2 試験方法 2.....	6
2.8 クロスによる乾燥菌体の拭き取り効果と再付着の確認.....	6
2.9 拭き取り前後でのクロス表面およびステンレス表面の走査電子顕微鏡観察.....	6
2.10 拭き取りクロスの蛍光観察.....	6
3. 結果.....	7
3.1 BZC の検量線と濃度測定.....	7
3.2 クロスへの BZC の吸着.....	7
3.3 菌懸濁液に対する BZC の殺菌効果.....	7
3.4 乾燥菌体に対する BZC の殺菌効果.....	8
3.5 乾燥菌体に対する 0.2%BZC 水溶液含浸クロスの殺菌効果.....	8
3.6 血液含有乾燥菌体に対する拭き取り効果.....	9
3.6.1 乾燥クロスでの拭き取り効果.....	9
3.6.2 水含浸クロスでの拭き取り効果.....	9
3.6.3 BZC 水溶液含浸クロスでの拭き取り効果.....	10
3.7 拭き取りクロスを用いた再付着の確認.....	10
3.8 拭き取りクロスとステンレス円板の表面観察.....	11
3.8.1 クロスの表面構造.....	11
3.8.2 拭き取り後のクロス表面の SEM 観察.....	11
3.8.3 拭き取り前後のステンレス円板の表面観察.....	11
3.9 拭き取り後のクロスに付着した蛍光マイクロスフェアの蛍光観察.....	11
4. 考察.....	12
5. 結論.....	18
6. 謝辞.....	20
7. 引用文献.....	21
図.....	25
表.....	38
Abstract.....	51

1. 序論

医療関連感染（Healthcare-Associated Infection: HAI）は、患者が医療機関で治療期間中に感染症に罹患することを指す。感染を成立させないためには、病原微生物そのものを示す感染源、病原微生物を宿主に運ぶ「飛沫感染」・「接触感染」・「空気感染」の経路、感染する可能性がある感受性宿主の条件の少なくともひとつを満たさないようにすることが必要になる。これまでに、院内感染の伝播経路のなかで、医療機器が 11.9%、環境が 11.6 %、接触感染によるものが 45.3%であったとの結果が報告され¹⁾、医療関連感染を低減するための方策として、接触感染対策を確実に実施することの重要性が指摘されている^{2,3)}。

Joseph による文献レビューでは、医療環境からの病原微生物を介した感染はまれであり、主な原因は医療従事者の手を介するものであると考えられ⁴⁾、Dancer による文献レビューでは、感染予防として手指衛生に関する報告が多いことを述べている⁵⁾。また、医療従事者が手指衛生を順守すれば手指を介した接触感染を予防することができるが、仕事量がピークに達している時点での手指衛生順守率は 25%にすぎないとの報告があり、接触伝播のリスクが高い状況である⁶⁾。Rampling は、アウトブレイク発生時の対策として、隔離予防策を行っても感染伝播が終息しなかったが、療養環境の清掃を強化した結果、感染伝播が終息したと報告しており⁷⁾、病原微生物の伝播防止として環境清拭の役割の重要性が示されている。

環境清拭・消毒について、アメリカ疾病管理予防センター（Centers for Disease Control and Prevention : CDC）の Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities⁸⁾では、医療施設における感染制御対策として、日常的に療養環境を消毒する必要はないとされている。しかし、環境表面の汚染除去目的で消毒薬ではなく洗浄剤を使用した場合、患者や職員が頻繁に触れる表面、または患者に近い表面の病原微生物が、患者への暴露を招く可能性がある^{2,9-12)}。これまでに、患者環境の汚染除去の目的で消毒薬の代わりに殺菌力のない洗浄液を使用したことにより、血液腫瘍科で表面清拭用具の汚染に関連する緑膿菌アウトブレイクが報告されている¹³⁾。そのため、患者や医療従事者が頻繁に触れるベッド柵や医療機器などの高頻度接触表面において、汚れの種類やその存在が不明確な場合や、多剤耐性菌の存在が不明確な場合には、医療関連感染防止の観点において環境表面の清掃と消毒が重要となる¹⁴⁻¹⁷⁾。日本でも、医療機関等における院内感染対策に関する留意事項¹⁸⁾において、「院内感染は、人から人への直接接触、又は医療機器、環境等を介して発生する。特に免疫力の低下した患者、未熟児、高齢者等の易感染患者は、通常の病原微生物のみならず、感染力の弱い微生物によっても、院内感染を起こす可能性がある」との記述があり、定期的な環境清拭に低水準消毒薬を用いることが求められている。この定期的な環境表面の清掃と消毒には、米国環境保護庁（Environmental Protection Agency: EPA）承認の消毒薬を使用することと勧告しており⁸⁾、日本では EPA 承認の消毒薬には、ベンザルコニウム塩化物、ベンゼトニウム塩化物などの第 4 級アンモニウム塩、アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩などの両面界面活性剤が相当する。また、清掃頻度は、1 日 1 回、週 3 回など環境表面の清掃を行うことがガイドライン⁸⁾で推奨されている。

療養環境の消毒方法は、使用されていた患者の感染症の有無に応じて処理方法を決定するのではなく、機器および器具使用時の感染リスクの程度に応じて消毒方法を決定するこ

とが基本となっている。Earle H. Spaulding の提唱では、感染リスクの程度に応じて3つのカテゴリーに分類される。クリティカルでは、無菌組織に挿入する医療器具を指し、滅菌または高水準消毒が求められる。セミクリティカルでは、粘膜または傷のある皮膚に接触する医療器具を指し、中水準消毒が求められる。ノンクリティカルでは、無傷の皮膚と接触するが粘膜とは接触しない医療器具を指し、低水準消毒が求められており、感染リスクの程度に応じた消毒方法が明確に示され、環境清拭はノンクリティカルに分類される。

現在、日常的な環境清拭には、あらかじめ消毒薬を含浸させたクロスが使用されている。消毒薬には、アルコール、次亜塩素酸ナトリウム、クロルヘキシジン、フェノール類、第4級アンモニウム塩など、多くの消毒薬が使用されている。特に EPA 承認消毒薬である第4級アンモニウム塩は、低濃度でも広範な殺菌スペクトルを有していることから、皮膚や粘膜などの生体表面の消毒や、医療環境や物品の消毒などに広く使用されており、長い歴史を有する薬剤である。1935年 Domagk により第4級アンモニウム塩が細菌類に対して非常に高い殺菌効果を示すことが報告され¹⁹⁾、1940年 Kuhn により負電荷を帯びる細菌に陽電荷を帯びる逆性石鹼である第4級アンモニウム塩が吸着されることで、菌体表面に逆性石鹼が集積し、菌体タンパクが変性されることを報告した²⁰⁾。第4級アンモニウム塩は、一般的に図1に示す構造式で示される。アルキルアミノ基のN原子に結合している疎水基が殺菌力を発揮し、R置換基が $C_8H_{17} \sim C_{18}H_{37}$ のものが強い殺菌力と優れた洗浄力を有する。第4級アンモニウム塩で効果的に障害並びに殺菌処理を行うには、対象菌種に最も適した分配係数の化合物を選択することが重要である²¹⁾。1985年には、日和見感染症の原因菌となるグラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌等に対して塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium chloride: BZC) は殺菌速度が速く、殺菌消毒薬として効果が期待できることが世界で認められたが²²⁾、結核菌やウイルス、芽胞には効果が期待できないと報告されている²³⁾。一方、環境清拭用のクロス素材に対する消毒薬の吸着による薬剤濃度の低下により、環境清拭における病原体の消毒不十分に加えて、再汚染を招く可能性があることが指摘されている³⁰⁾。特に、第4級アンモニウム塩は陽電荷を帯びた化合物であるため、綿を含むセルロース・レーヨン素材のような負電荷を有するワイプは強いイオン相互作用により吸着され、結果として消毒薬濃度が低下することが報告された²⁴⁻²⁹⁾。この問題を改善できるクロス素材として、マイクロファイバーが注目されている。さらに、マイクロファイバーの繊維径は約 $2 \mu m$ と細く、マイクロポケットと呼ばれる多数の隙間が存在し、さらに一本一本の繊維が密に編み込まれている構造となっており、繊維の密度が高い素材である⁵³⁾。液体汚れや固形物汚れは、このマイクロポケットに吸い上げられクロス内部に保持される²⁸⁾と考えられており、レーヨン等を素材とする不織布、綿、ポリエステル、ポリプロピレンなどの素材と比べて、除去性能を発揮するとされている。マイクロファイバークロスには、微生物を拭き取ったあとの再汚染を防止できることが報告され^{33,34)}、さらに、消毒薬の代わりに水のみを使用した場合でも、菌の移動を減らすことができる³⁴⁾と示されている。そのため、マイクロファイバークロスには医療関連感染の防止の一助になるものとして注目されている。CDCガイドラインでは、使用中の幼児用ベッドや保育器を洗浄するときは消毒薬を使用しないように強く勧告しており⁸⁾、その代用としてマイクロファイバーが活用されている。その一方で、水とマイクロファイバークロスのみでの組み合わせでは、菌

を再付着させたとの報告³⁵⁾もあり、環境清拭効果の詳細は明白とは言えない。

環境清拭に関する研究では、アウトブレイク時の対策の一つとして環境清拭が実施され、結果的に終息したとの報告⁷⁾はあるが、環境清拭方法を検証した報告例は乏しい¹³⁾。また、効果的な清拭方法を詳細に記載した例はない。医療現場では様々な生体由来の有機物が微生物と混在して環境表面に存在しているが、この微生物の菌種や菌数を目視により同定、定量することはできない。さらに、実際に環境清拭を行うのは「ヒト」であり、拭き取り方法は清掃者に依存し、清浄度評価も個人の感覚にゆだねられる部分が多くを占めるため、拭き取り表面を清浄化したつもりが再汚染している可能性も否定できない。そのため、環境清拭には多くの不確定要素を勘案した、適切な環境清拭方法の提示が必要である。

そこで、本論文では、医療環境の病原微生物からヒトへの接触伝播を遮断するための適正な環境清拭方法を明らかにすることを目的に、環境清拭クロスに主に含浸されているBZCを用いて、殺菌効果を示すと報告されている日和見感染症の原因菌となるグラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌に対して殺菌効果を明らかにするとともに、消毒効果が期待できないとされているウイルス、芽胞に対しても検討した。

第一に、清拭クロスの素材として汎用されている3種類の不織布およびマイクロファイバークロスを用いて、BZC水溶液のクロスへの吸着を評価するとともに、一般細菌、真菌に対するBZC水溶液の有効濃度について検討した。

第二に、乾燥状態にある一般細菌、真菌に対するBZC水溶液の殺菌効果を明らかにするとともに、BZC水溶液を含浸したクロスを接触したときの殺菌効果について検討した。

第三に、BZC水溶液を含浸したクロスによる拭き取り効果と再付着に対するクロス素材の影響を検討するとともに、血液共存の影響について検討した。

第四に、蛍光ミクロスフェアを用いて、拭き取り操作後のクロスの表面とステンレス板表面の走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM) 観察とクロスの表面の蛍光観察から蛍光ミクロスフェアの残留状態と除去挙動について検討した。

以上の検討結果から、医療環境の病原微生物からヒトへの接触伝播を遮断するための適正な環境清拭方法について検討した。

2. 実験方法

2.1 材料

試験菌株として、*Staphylococcus aureus* ATCC25923、*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228、*Enterococcus faecalis* ATCC29212、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853、*Escherichia coli* ATCC25922、*Candida albicans* ATCC10231、*Clostridioides difficile* NCTC11209、*Feline calicivirus* F9 strain (FCV/F9) を用いた。Soybean-Casein Digest (SCD) 寒天培地は SCD 寒天培地「ダイゴ」、一般細菌用（富士フィルム和光純薬）を用い、サブロー寒天培地は、ペプトン（Becton, Dickinson and Company: BD）10 g、D（+）-グルコース（富士フィルム和光純薬株式会社）20 g、寒天（BD）20 g を Milli Q 水（Direct-Q® 3 UV、メルク株式会社）1 L に溶解して自家調整した。*S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. faecalis*、*P. aeruginosa*、*E. coli* は SCD 寒天培地を用いて 37°C で 20 時間好氣的に培養し、*C. albicans* はサブロー寒天培地を用いて 25°C で 48 時間培養した。培養後の菌体集落を掻き取り、実験に使用した。*C. difficile* は Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地（BD）を用いて嫌氣的条件下（アネロパック、三菱ガス化学株式会社）、37°C で 72~120 時間培養した菌を実験に使用した。

一般細菌、真菌、芽胞の菌懸濁液は、滅菌リン酸緩衝液（ダルベッコ PBS (-)、日水製薬株式会社）で約 10^8 CFU/mL に調整した。血液含有菌懸濁液は、約 10^9 CFU/mL に調整した菌懸濁液 10 μ L と緬羊無菌脱繊維血液（コージンバイオ株式会社）90 μ L を混合して作成した。FCV/F9 の感受性細胞には CRFK 細胞（JCRB9035、Crandell-Reese Feline Kidney Cell 由来）を用い、感染増殖させて凍結融解を 3 回行った後、遠心分離してウイルス液を作成し、使用時まで -80°C で保存した。CRFK 細胞の増殖用培地には、Eagles Minimal Essential Medium (EMEM、日水製薬株式会社) に MEM non-Essential Amino Acid Solution（富士フィルム和光純薬株式会社）と 10% Fetal Bovine Serum (FBS、CELLect®, MP Biomedicals LLC) を添加した培地を使用し、細胞の継代維持は定法に従って行った。ウイルス感染後の維持培地には、増殖用培地の FBS 濃度を 1% としたものを使用した。

試験担体にはステンレス板（30 cm×45 cm）を用い、試験担体上の 4 か所（1 か所：30 mm×30 mm）を試験領域とし、使用直前に消毒用エタノール（富士フィルム和光純薬株式会社）を含浸した脱脂綿で清拭して乾燥させた。4 か所の試験領域に菌懸濁液または血液含有菌懸濁液を 10 μ L 塗布して塗り広げ、クラス II バイオセーフティキャビネット内で自然乾燥させたものを乾燥菌体または血液含有乾燥菌体とした。乾燥菌体と同様にウイルス液 10 μ L を試験領域に塗布して乾燥させたものを乾燥ウイルスとした。乾燥に要した時間は、菌懸濁液またはウイルス液で 3~5 分、血液含有菌懸濁液で 8~10 分であった。

試験に供した BZC 水溶液は、10%塩化ベンザルコニウム溶液（10% BZC、富士フィルム和光純薬株式会社）から Milli Q 水を用いて適宜調整した。

拭き取りクロスには、レーヨン（以下クロス A：170 mm×300 mm）、レーヨン+ポリエチレン（以下クロス B：150 mm×300 mm）、マイクロファイバー（ポリエステル、以下クロス C：240 mm×240 mm）、パルプ+ポリエステル（以下クロス D：140 mm×260 mm）を用いた。各クロスに含浸させる 0.2%BZC 水溶液は、あらかじめ消毒薬が含浸されたクロスを模倣し、各クロスの厚みに応じた含浸量として、クロス A には単位面積あたり 0.03 mL、クロス B、C、D には単位面積あたり 0.02 mL 含浸して BZC 水溶液含浸クロスを作成した。

蛍光マイクロスフェアは、蛍光ポリスチレン（直径 1.00 μm 、FSPP004、Bangs Laboratories、Inc）から Milli Q 水を用いて約 10^7 beads/mL に調整して実験に供した。

2.2 BZC 濃度の測定

BZC 濃度は、紫外可視分光光度計（UV-2600、島津製作所）で 230~300 nm の範囲で紫外・可視吸収スペクトルを測定し、吸光度から検量線を用いて算出した。

2.3 クロスへの BZC 吸着試験

0.2% BZC 水溶液 20 mL に各種クロスを用いてそれぞれ 10 mm \times 10 mm に裁断したクロス在所定枚数（5 枚、10 枚、25 枚、50 枚）浸漬させ、遮光下閉鎖系で室温にて 3 か月間保管した。攪拌後の上清から BZC 水溶液の濃度を求め、クロスに吸着した BZC 量を算出した。

2.4 試験領域上の BZC 残存量測定

各種クロスに 50 mm \times 50 mm のサイズに裁断したクロス 10 枚に、10 分間 0.2% BZC 水溶液を含浸して BZC 水溶液含浸クロスを作成した。試験領域に BZC 水溶液含浸クロスを接触してクロスを取り除き、MilliQ 水 200 μL を塗布して満遍なく行き渡らせた。10 箇所の試験領域から回収した合計 2000 μL の水溶液の吸光度より BZC 濃度を算出し、試験領域に残存する BZC 量を求めた。

2.5 菌懸濁液に対する BZC 水溶液の殺菌効果試験

0.2%BZC 水溶液 900 μL に菌懸濁液 100 μL を混合して 10 秒、1 分、5 分、10 分間作用させた後、混合液 20 μL をレチシン・ポリソルベート含有 SCDLP 培地（SCDLP 培地、富士フイルム和光純薬株式会社）180 μL に添加して、10 倍希釈系列を作成した。その後、各増殖寒天培地に希釈系列からそれぞれ 10 μL を塗布し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 24~48 時間好気培養して生菌数を計測した。

2.6 乾燥菌体に対する BZC 水溶液の殺菌効果試験

ステンレス板の試験担体領域（30 mm \times 30 mm）に約 10^8 CFU/mL に調整した菌懸濁液または血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、0.2% BZC 水溶液 500 μL を接触後、試験担体より滅菌綿棒（メンティップ®病院用綿棒 1P1504、日本綿棒株式会社）で拭き取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。いずれも試験の繰り返し回数は 3 回とし、平均値と標準偏差を求めた。

2.7 乾燥菌体に対する BZC 水溶液含浸クロスの殺菌効果試験

ステンレス板の試験担体領域（30 mm \times 30 mm）に約 10^8 CFU/mL に調整した菌懸濁液または血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、以下に示す試験方法 1 または 2 でクロスに接触後、試験担体より滅菌綿棒で拭き取り、SCDLP 培地に回収して生菌数（ \log_{10} CFU/mL）を計測した。いずれも試験の繰り返し回数は 3 回とし、平均値と標準偏差（mean \pm SD）を求めた。

2.7.1 試験方法 1

乾燥菌体または血液含有乾燥菌体に 0.2%BZC 水溶液含浸クロスを 10 秒、30 秒、60 秒間接触させた後、クロスを取り除き、試験領域を綿棒で拭き取った後、SCDLP 培地 2mL 中で 2 分間ボルテックスした後、2.6 と同様の方法で生菌数を測定した。

2.7.2 試験方法 2

乾燥菌体または血液含有乾燥菌体に乾燥クロスを接触させた後 0.2%BZC 水溶液を塗布し、試験方法 1 と同様の方法で生菌数を測定した。

2.8 クロスによる乾燥菌体の拭き取り効果と再付着の確認

乾燥クロス、水含浸クロス、または BZC 水溶液含浸クロスに 500 g のおもりを固定し、血液含有乾燥菌体または乾燥ウイルス 4 か所を 2~3 秒間かけて掃引し (図 5 (a))、拭き取り後の試験領域の汚れの有無を目視下で観察した。引き続き、別に準備した清潔ステンレス板上を同様に掃引した (図 5 (b))。拭き取り箇所①、拭き終わり箇所②、拭き始め箇所③、拭き終わり箇所④の試験領域上の生菌数およびウイルス量を計測した。生菌数は 2.6 と同様の方法で計測した。*C. difficile* では、拭き取り箇所①に対してのみ、拭き取り効果を確認するため、拭き取り後の試験領域を目視下での観察と試験領域上の生菌数を計測した。ウイルスは、試験領域を滅菌綿棒で拭き取った後、SCDLP 培地で 2 分間ボルテックスし、感受性細胞を 96 ウェルプレートに単層培養し、そこに 10 倍希釈系列を作成した溶液 10 μ L を感受性細胞に接種し、炭酸ガス培養装置内 (37°C、5%CO₂) で細胞変性効果が明らかになるまで 3~5 日間培養した。ウイルス感染力価: 50% Tissue culture infective dose (TCID₅₀) は、Behrens-Karber 法を用いて求めた。作用前の生菌数またはウイルス感染力価と作用後の生菌数またはウイルス感染力価を差し引いて指数減少値 (\log_{10} reduction : LR) とした。

2.9 拭き取り前後でのクロス表面およびステンレス表面の走査電子顕微鏡観察

汚染物質として約 10⁷ beads/mL に調整した蛍光ミクロスフェア 3 μ L をステンレス円盤 (円盤状、直径 10 mm) 上に塗布後乾燥させ、水含浸クロスで一方向に一回、1 秒間かけて拭き取りした。拭き取り操作前後のクロス表面とステンレス円盤面を走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM、TM3030、日立テクノロジーズ) で観察した。クロス表面は、倍率 50~500 倍で観察し、ステンレス円板は倍率 100~4000 倍で観察した。

2.10 拭き取りクロスの蛍光観察

約 10⁷ beads/mL に調整した蛍光ミクロスフェア 3 μ L をステンレス板上の試験領域 (30 mm×30 mm) に塗布後乾燥させ、水含浸クロスで一方向に一回、1 秒間かけて拭き取りした。拭き取り後のクロス表面を、紫外線ランプ (波長: 352 nm、蛍光管、ブラックライト) で照射して、蛍光ミクロスフェアからの発光を観察した。

3. 結果

3.1 BZC の検量線と濃度測定

0.2%BZC 水溶液の吸収スペクトルを図 2 に示す。268 nm、262 nm、257 nm に吸収極大を、252 nm 付近にショルダーをもつスペクトルであった。各吸収極大波長における吸光度はそれぞれ 0.995 (268 nm)、0.995 (262 nm)、1.034 (257 nm) となった。各吸収極大波長における吸光度を BZC 水溶液の濃度に対してプロットすると、BZC 濃度が高くなるほど吸光度は増加し、0.0005 ~ 0.2 % の範囲で 1 次の相関が認められた (図 3)。吸光度を y 、濃度を x とすると、以下の相関関係が認められた。ここで r^2 は決定係数である。

$$257 \text{ nm のとき} \quad y=8.712x \quad (r^2 = 0.996) \quad \text{式 (1)}$$

$$262 \text{ nm のとき} \quad y=10.217x \quad (r^2 = 0.995) \quad \text{式 (2)}$$

$$268 \text{ nm のとき} \quad y=7.645x \quad (r^2 = 0.995) \quad \text{式 (3)}$$

より低濃度領域である 0.0001 ~ 0.05 % ではさらによい相関関係が認められた。

$$257 \text{ nm のとき} \quad y=8.291x \quad (r^2 = 0.998) \quad \text{式 (4)}$$

$$262 \text{ nm のとき} \quad y=10.312x \quad (r^2 = 1.0) \quad \text{式 (5)}$$

$$268 \text{ nm のとき} \quad y=7.756x \quad (r^2 = 0.999) \quad \text{式 (6)}$$

BZC の検量線には、低濃度領域で最もよい相関の認められた 262 nm での吸光度を用いることとした。BZC 濃度が 0.01 ~ 0.25% の検量線を図 (3-a) に、0.0005 ~ 0.2% の検量線を図 (3-b) に、0.0001 ~ 0.05% の検量線を図 (3-c) に示す。各 BZC 濃度領域のプロットに基づいた最小二乗法による検量線から得られた式 (7) ~ (9) を用いて、各試験系での BZC 濃度を算出した。

$$0.01\text{-}0.25\% \text{ のとき} \quad \text{BZC [\%]} = \text{Absorbance}/9.556 \quad \text{式 (7)}$$

$$0.0005\text{-}0.2\% \text{ のとき} \quad \text{BZC [\%]} = \text{Absorbance}/10.217 \quad \text{式 (8)}$$

$$0.0001\text{-}0.05\% \text{ のとき} \quad \text{BZC [\%]} = \text{Absorbance}/10.312 \quad \text{式 (9)}$$

3.2 クロスへの BZC の吸着

ファルコンチューブに 10 mm×10 mm に裁断したクロスと 0.2% BZC 水溶液 20 mL をいれて遮光下閉鎖系で 3 か月間保管すると、クロス A、B、D は浸漬するクロスの枚数が増えるほどファルコンチューブ内の BZC 水溶液濃度は低下し、50 枚の浸漬ではクロス A が 0.15v/v%、クロス B が 0.18v/v%、クロス D が 0.18v/v% となった。クロス C は、浸漬するクロスの枚数によらず BZC 濃度の低下は認められなかった (表 1)。一方、0.2%BZC 水溶液含浸クロス を 30 mm×30 mm 四方に接触して、クロスを取り除いた後、試験領域に残存する BZC 量は、クロス A は 1.5 mg、クロス B は 1.2 mg、クロス C は 2.8 mg、クロス D は 1.4 mg であり、クロスの材質により残存量は異なった (表 2)。

3.3 菌懸濁液に対する BZC の殺菌効果

供試したすべての試験菌株において、0.01%BZC 水溶液では、10 秒間と短時間での殺菌効果が認められた (図 4)。検出限界以下となった BZC 水溶液の濃度は菌種により異なり、*S. aureus*、*E. coli*、*P. aeruginosa* で 0.005%、*S. epidermidis*、*E. faecalis*、*C. albicans* では 0.01% であった (表 3)。また、BZC 水溶液と 10 分間接触しても十分な殺菌効果が認められない

BZC 最大濃度は、*S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. coli* で 0.0001%、*E. faecalis*、*P. aeruginosa* で 0.0005%、*C. albicans* で 0.001%であり（表 4）、菌種により殺菌効果を示す BZC の濃度や接触時間に違いが認められた。

3.4 乾燥菌体に対する BZC の殺菌効果

乾燥菌体に、0.2%BZC 水溶液を 10 秒、30 秒、60 秒作用させても菌は検出されなかった。また、血液共存下でも 0.2%BZC 水溶液との 10 秒間の接触で検出限界以下となった（表 5）

3.5 乾燥菌体に対する 0.2%BZC 水溶液含浸クロスでの殺菌効果

S. aureus に対して、試験方法 1 の乾燥菌体への接触ではいずれのクロスでも検出限界以下となったが、血液含有乾燥菌体への接触で検出された菌数 (\log_{10} CFU/mL、 $\text{mean}\pm\text{SD}$) は、接触時間が、10 秒、30 秒、60 秒の順にクロス A で 3.83 ± 0.05 、 3.41 ± 0.14 、 2.79 ± 0.09 、クロス B で 5.34 ± 0.07 、 5.18 ± 0.16 、 4.26 ± 0.19 、クロス C で 5.54 ± 0.05 、 5.34 ± 0.17 、 5.08 ± 0.06 、クロス D で 5.59 ± 0.06 、 5.34 ± 0.03 、 5.08 ± 0.06 の菌が検出された（表 6）。乾燥クロスで乾燥菌体を覆い BZC 水溶液を塗布した試験方法 2 では、血液の有無によらずいずれも検出限界以下となった。

S. epidermidis に対して、試験方法 1 の乾燥菌体への接触ではいずれのクロスでも 10 秒間接触させた場合、検出限界以下となったが、血液含有乾燥菌体への接触 10 秒では、クロス A で 4.28 ± 0.16 、クロス B で 2.30 ± 0.15 、クロス C、クロス D では 10 秒、30 秒、60 秒の順にクロス C で 2.60 ± 0.08 、 2.60 ± 0.06 、 2.12 ± 0.08 、クロス D で 5.45 ± 0.07 、 4.88 ± 0.06 、 4.04 ± 1.04 の菌が検出された（表 7）。乾燥クロスで乾燥菌体を覆い BZC 水溶液を塗布した試験方法 2 では、血液の有無によらずいずれも検出限界以下となった。*S. aureus* と類似した結果となったが、クロス A、クロス B では、血液共存下でも接触して 30 秒で検出限界以下を示した。

E. faecalis に対して、試験方法 1 の乾燥菌体への接触において、クロス A を 10 秒間接触、クロス B を 60 秒間接触、クロス D を 30 秒間接触した時に検出限界以下となったが、血液含有乾燥菌体への接触では、10 秒、30 秒、60 秒いずれも、すべてのクロスで 2.12 ± 0.09 ~ 5.71 ± 0.08 の菌が検出された。試験方法 2 の乾燥菌体への接触では、いずれのクロスでも 10 秒間接触させた場合、検出限界以下となり、血液含有乾燥菌体への接触においてクロス A とクロス D で検出限界以下となったのに対し、60 秒間の接触でクロス B で 4.68 ± 0.07 、クロス C で 4.26 ± 0.04 の菌が検出された（表 8）。

E. coli に対して、試験方法 1 の乾燥菌体への接触において、クロス A を 10 秒間接触、クロス B、クロス C、クロス D を 30 秒間接触した時に検出限界以下となったが、血液含有乾燥菌体への接触ではすべてのクロスで、 4.12 ± 1.08 ~ 5.65 ± 0.04 の菌が検出された。試験方法 2 の乾燥菌体への接触では、いずれのクロスでも 10 秒間接触させた場合、検出限界以下となり、血液含有乾燥菌体への接触において、クロス A で検出限界以下となったのに対し、60 秒間の接触後でも、クロス B で 2.58 ± 0.34 、クロス C で 2.30 ± 0.19 、クロス D で 2.88 ± 0.02 の菌が検出された（表 9）。

P. aeruginosa に対して、試験方法 1 の乾燥菌体への接触において、クロス A を 60 秒間

接触、クロス C、クロス D を 30 秒間接触した時に検出限界以下となったが、クロス B では、60 秒間接触させた場合でも、菌が検出された。血液含有乾燥菌体への接触では、全てのクロスで、 $4.08 \pm 1.06 \sim 5.73 \pm 1.24$ の菌が検出された。試験方法 2 の乾燥菌体への接触では、いずれのクロスも 10 秒間接触させた場合、検出限界以下となり、血液含有乾燥菌体への接触において、クロス A で検出限界以下となったのに対し、クロス B、クロス C では 60 秒間接触した時に検出限界以下となり、クロス D では、60 秒間接触させた場合でも、 2.22 ± 1.04 の菌が検出された (表 10)。

C. albicans に対して、試験方法 1 の乾燥菌体への接触において、クロス C を 60 秒間接触した時のみ検出限界以下となり、血液含有乾燥菌体への接触では、全てのクロスで $4.40 \pm 0.13 \sim 5.97 \pm 1.10$ の菌が検出された。試験方法 2 の血液含有乾燥菌体への接触において、いずれのクロスも接触しても検出限界以下となった。また、試験方法 2 の血液含有乾燥菌体にクロス C を 60 秒間接触した場合のみ検出限界以下となり、いずれのクロスも接触しても菌が検出された (表 11)。

3.6 血液含有乾燥菌体に対する拭き取り効果

3.6.1 乾燥クロスでの拭き取り効果

拭き取りに乾燥クロスを用いた場合、試験領域は目視下で汚れが確認され、拭き取り箇所① (図 5) で菌が検出された (図 7、■)。以下に詳細を記す。

初期菌量、約 10^7 CFU/mL の *S. aureus* では、全てのクロスで LR 0 であった (図 7 (a) ■)。

初期菌量、約 10^7 CFU/mL の *E. coli* では、クロス A、クロス B、クロス D は LR 1、クロス C は LR 0 であった (図 7 (b) ■)。

初期菌量、約 10^7 CFU/mL の *P. aeruginosa* では、全てのクロスで LR 0 であった (図 7 (c) ■)。

初期菌量、約 10^5 CFU/mL の *C. albicans* では、クロス D は LR 1、クロス A、クロス B、クロス C は LR 0 であった (図 7 (d) ■)。

初期菌量、約 10^5 TCID₅₀/mL の FCV/F9 では、全てのクロスで LR 0 であった (図 7 (f) ■)。

3.6.2 水含浸クロスでの拭き取り効果

水含浸クロスを用いた場合、試験領域は目視下で汚れは確認されなかったが、拭き取り箇所① (図 5) では菌が検出された (図 7、□)。

拭き取り箇所①では、初期菌量、約 10^7 CFU/mL の *S. aureus* では、クロス A は LR 2、クロス B、クロス C は LR 1、クロス D は LR 4 であった (図 7 (a) □)。

初期菌量、約 10^7 CFU/mL の *E. coli* では、クロス B は LR 5、クロス A、クロス C、クロス D は検出限界以下であった (図 7 (b) □)。

初期菌量、約 10^7 CFU/mL の *P. aeruginosa* では、クロス A は LR 2、クロス B とクロス D は LR 4 であった (図 7 (c) □)。クロス C は検出限界以下であった。

初期菌量、約 10^5 CFU/mL の *C. albicans* では、クロス A は LR 1 であった。クロス B、

クロス C、クロス D は検出限界以下であった (図 7 (d) □)。

初期菌量、約 10^6 CFU/mL の *C. difficile* では、クロス A は LR 2、クロス B は LR 1、クロス D では生菌数は初期菌数から変化はなかった。クロス C では LR 6 で、検出限界以下であった (図 7 (e) □)。

初期菌量、約 10^5 TCID₅₀/mL の FCV/F9 では、クロス A は LR 2、クロス D は LR 3 であった。クロス B とクロス C は検出限界以下であった (図 7 (f) □)。

3.6.3 BZC 水溶液含浸クロスでの拭き取り効果

BZC 水溶液含浸クロスを用いて血液含有乾燥菌体を掃引した場合、試験領域は目視下で汚れは確認されなかったが、拭き取り箇所① (図 5) で菌が検出された (図 7、≡)。

拭き取り箇所①では、初期菌量、約 10^7 CFU/mL の *S. aureus* では、クロス A は LR 6 であった。クロス B、クロス C、クロス D では検出限界以下であった (図 7 (a) ≡)。

初期菌量、約 10^7 CFU/mL の *E. coli* では、全てのクロスで検出限界以下であった (図 7 (b) ≡)。

初期菌量、約 10^7 CFU/mL の *P. aeruginosa* では、クロス A は LR 4、クロス D は LR 5 であった。クロス B、クロス C は検出限界以下であった (図 7 (c) ≡)。

初期菌量、約 10^5 CFU/mL の *C. albicans* では、全てのクロスで検出限界以下となった (図 7 (d) ≡)。

初期菌量、約 10^5 TCID₅₀/mL の FCV/F9 では、クロス A、クロス D は LR 5 であったが、クロス B とクロス C は検出限界以下であった (図 7 (f) ≡)。

3.7 拭き取りクロスを用いた再付着の確認

水含浸クロスの場合、クロス A、クロス B、クロス D では、多くの箇所で菌の再付着が確認された (図 8、表 12)。

拭き終わり箇所②では、*S. aureus* と *P. aeruginosa* で $10^{3.2\sim6.0}$ CFU/mL の菌が、FCV/F9 で $10^{3.4\sim3.9}$ TCID₅₀/mL のウイルスがクロス A、クロス B、クロス D で検出された。クロス C は *P. aeruginosa* で、 $10^{3.3}$ CFU/mL の菌が検出されたのに対して、その他の箇所は検出限界以下であった (図 8、表 12)。

拭き始め箇所③では、*S. aureus* で $10^{2.7\sim6.1}$ CFU/mL の菌が、約 $10^{2.9\sim3.4}$ TCID₅₀/mL のウイルスがクロス A、クロス B、クロス D で検出された。クロス C は、*E. coli*、*P. aeruginosa*、*C. albicans*、FCV/F9 に対して検出限界以下であった (図 8)。

拭き終わり箇所④では、*S. aureus* と *P. aeruginosa* で $10^{3.0\sim6.1}$ CFU/mL の菌が、FCV/F9 で約 $10^{3.7\sim4.4}$ TCID₅₀/mL のウイルスがクロス A、クロス B、クロス D で検出されたのに対して、クロス C は全ての箇所で検出限界以下であった (図 8)。

BZC 水溶液含浸クロスの場合、クロス B、クロス C、クロス D では、拭き終わり箇所②で菌が検出された。クロス B で $10^{2.7}$ CFU/mL、クロス C で $10^{3.2}$ CFU/mL の *S. aureus* が検出され、クロス D では $10^{2.7}$ CFU/mL の *P. aeruginosa* が検出された。その他の箇所では全て検出限界以下であった。FCV/F9 を用いた場合、拭き終わり箇所②ではクロス A で 10^4 TCID₅₀/mL、クロス B で $10^{3.2}$ TCID₅₀/mL、クロス D で $10^{4.3}$ TCID₅₀/mL のウイルスが検出

されたが、クロス C では検出限界以下を示した。クロス A、クロス B、クロス C では拭き始め箇所③、拭き終わり箇所④で検出限界以下であったが、クロス D では約 $10^{4.3\sim 5.0}$ TCID₅₀/mL のウイルスが検出された。(図 9、表 13)。

3.8 拭き取りクロスとステンレス円板の表面観察

3.8.1 クロスの表面構造

図 10 に拭き取りクロス表面の SEM 像を示す。クロス A、クロス B、クロス D の繊維の直径はいずれも約 10~20 μm であり、縦糸と横糸が交差して繊維が絡み合い粗になっており、繊維の隙間部分が多数観察された。クロス C の繊維の直径は約 2 μm であった。クロス A、クロス B、クロス D と比較して、一本一本の繊維が密に編み込まれている構造であり、繊維の密度が高いことが観察された。

3.8.2 拭き取り後のクロス表面の SEM 観察

図 11 に拭き取り後のクロス表面の SEM 像を示す。拭き取り前のクロスには蛍光ミクロスフェアの付着は確認されないが(図 10)、水含浸クロスで拭き取り操作を行うと、クロス繊維に蛍光ミクロスフェアの付着が観察された(図 11)。一方、繊維間の隙間には蛍光ミクロスフェアはほとんど観察されなかった。

3.8.3 拭き取り前後のステンレス円板の表面観察

水含浸クロスによる拭き取り後のステンレス円板表面の SEM 像を図 12 に示す。拭き取り前のステンレス円板上には、蛍光ミクロスフェアが観察された(図 12 (b))。一方、水含浸クロスで拭き取り操作を行い、倍率 100 倍で SEM 観察すると、全てのクロスで薄黒い箇所は観察されなかったが(図 12 (c))、倍率 4000 倍付近で観察すると 1 μm の蛍光ミクロスフェアが観察された(図 12 (d) 矢印先端部分)。クロス C は、クロス A、クロス B、クロス D と比較してステンレス円板上に付着している蛍光ミクロスフェアは少量であった。

3.9 拭き取り後のクロスに付着した蛍光ミクロスフェアの蛍光観察

図 13 に蛍光ミクロスフェアを拭き取った後のクロス表面の蛍光観察結果を示す。供試したすべての拭き取り方向に沿うようにクロスの拭き取り面に蛍光ミクロスフェアが残留していた(図 13 (b) (c) (d) (e))。

4. 考察

本論文では、適切な環境清拭方法を明らかにするために、日常環境清拭で汎用されている清拭クロスに薬剤として含浸されている BZC の殺菌効果を明らかにするとともに、清拭クロスとして汎用されている 3 種類のクロス素材とマイクロファイバークロス素材を用いて清拭した際の除去効果と保持能力について多角的に検討した。

クロスへの薬剤の吸着試験では、10 mm×10 mm に裁断したクロスに 0.2%BZC 水溶液に 3 ヶ月間浸漬すると、表 1 に示すように、BZC 濃度はクロス A のレーヨン素材で 0.15%、クロス B のレーヨンとポリエチレンの混合素材で 0.18%、クロス C のマイクロファイバークロスで 0.20%、クロス D のパルプとポリエステル混合素材で 0.18% となり、クロス A > クロス B = クロス D > クロス C の順に BZC がクロスに吸着されやすい結果であった。クロス A、クロス B の素材であるレーヨンは、木材パルプを主原料として作られた再生セルロース繊維である。セルロース系の繊維とパルプは漂白工程における酸化により生じるカルボキシレートアニオン (COO⁻) に起因して陰イオン性の表面電荷を有する。そのため、BZC などのカチオン性消毒薬はアニオン性消毒薬やノニオン性消毒薬に比べて繊維やパルプへの吸着が著しいことが報告されている^{24,28,37,38,40}。さらに、綿球、カット綿、ガーゼに対して BZC の薬剤吸着能力が評価されており、BZC 水溶液 100 mL に対して供試材綿製品 5 g となる 5 w/v% の重量体積比で浸漬すると BZC は速やかに吸着されることが報告されている¹⁷。しかし、今回の検討では、いずれのクロスでも著しい濃度低下は示さず (表 1)、その濃度は 10 秒間の接触で即効的な殺菌効果が認められる濃度以上 (表 3) を保持していた。本研究での重量体積比は、クロス A で 1.84 w/v%、クロス B で 0.84 w/v%、クロス C で 3.69 w/v%、クロス D で 1.15 w/v% としてクロスに浸漬しており、吸着の見られる 5 w/v% 以下であったため、いずれのクロスでも著しい濃度低下を示さなかったものと考えられた。一方、クロス C は、吸着が起こるとされている 5 w/v% に一番近い結果であったにもかかわらず、初期濃度が維持され濃度低下を示さなかった。クロス C のマイクロファイバークロス素材は、医療現場で使用される次亜塩素酸ナトリウムや第 4 級アンモニウム塩などの消毒薬に対して耐薬品性が確認されており⁵⁰、今回の結果でも、濃度低下を示さなかったと考える。

今回の検討より、BZC 水溶液をクロスへ含浸させる場合、クロス素材への薬剤吸着に伴う濃度低下により、病原体の除去不十分に加えて、再汚染を招くことが危惧されるため^{29,30}、実際の使用にあたっては、0.2% の BZC 水溶液濃度が担保されていることが推奨される。0.2%BZC 濃度を維持するためには、消毒薬のクロス素材への薬剤吸着を考慮して、使用するクロス素材の量と材質に適した十分な消毒薬の濃度と含浸量で使用する事が重要であることが示唆された。BZC 以外にも医療材料に含浸させて使用されている消毒薬に、グルコン酸クロルヘキシジン (Chlorhexidine Gluconate; CHX) があるが、BZC と同様に医療材料へ吸着することが問題とされ、BZC と同様に吸着がみられるのは 5 w/v% で急速に吸着が起こることが報告されており³⁸、使用時には注意が必要になる。

BZC の菌懸濁液に対する殺菌効果は、図 4、表 3、表 4 に示すように、使用した全ての試験菌株において、既報³⁹の 0.01%~0.2% の濃度範囲における殺菌効果と同様の殺菌効力が示された。しかし菌懸濁液と接触 10 秒後に検出限界以下となるのに必要な最小 BZC 濃度は、*S. epidermidis*、*E. faecalis*、*C. albicans* では 0.01% であるのに対して、*S. aureus*、*E. coli*、

P. aeruginosa では 0.005% とより低濃度であり、菌種により殺菌効果を示すのに必要な最小 BZC 濃度が異なることが明らかとなった。これらの結果より、今回使用した試験菌株においては、0.01% 以上の濃度を担保することが推奨される。菌懸濁液と 10 分間の接触で殺菌効果が認められない BZC の最大濃度では、*E. faecalis*、*P. aeruginosa* では、0.0005% であるのに対して、*S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. coli* では、0.0001% とより低濃度であり、*C. albicans* では、0.001% ともっとも消毒薬に抵抗を示し、菌種により、殺菌効果が認められない BZC 最大濃度が異なることが明らかになった。

臨床現場では、あらかじめクロス素材に BZC 水溶液の含浸されたものが汎用されている。レーヨン等の不織布に BZC 水溶液を含浸させると、有効成分が 10 分間とごく短時間でクロス素材に吸着し、有効成分である BZC の濃度が低下することにより、消毒・殺菌効果の期待ができなくなる場合がある¹⁵⁾。上述のように、クロス素材により BZC の吸着能が異なることに加え、BZC は菌種により殺菌に必要な最小濃度が異なる。BZC 水溶液含浸クロスでの殺菌効果は、表 6～表 11 に示すように、血液非共存下で 10 秒間接触すると乾燥菌体に BZC 水溶液含浸クロスを接触させた試験方法 1 では、*S. aureus* はすべてのクロスで検出限界以下となり、BZC 水溶液を菌懸濁液に 10 分間接触しても殺菌効果が認められない濃度が 0.0001% と他の菌より低濃度であったことから裏付けられると考えられた。しかし、*S. epidermidis* では、クロス A、クロス B、クロス C で検出限界以下を示したが、クロス D では検出された菌数 ($\log_{10}\text{CFU/mL}$, $\text{mean}\pm\text{SD}$) は、 2.30 ± 0.83 の菌が観察された。*E. coli* では、クロス A で検出限界以下を示したが、クロス B、クロス C、クロス D の順に、 2.40 ± 0.07 、 2.30 ± 0.04 、 2.48 ± 0.02 の菌が観察され、*S. aureus* と同様に BZC 水溶液を菌懸濁液に 10 分間接触しても十分な殺菌効果が認められない濃度が 0.0001% と低濃度であったが殺菌効果に違いが認められた。*E. faecalis*、*P. aeruginosa*、*C. albicans* はいずれのクロスでも菌が確認され、BZC 水溶液を菌懸濁液に 10 分間接触しても殺菌効果が認められない濃度が、*E. faecalis*、*P. aeruginosa* では 0.0005%、*C. albicans* では 0.01% と他の菌より最大の濃度が高いことから裏付けられると考えられた。以上より、消毒対象となる菌種に適した濃度以上で BZC を適用する必要があることを示唆している。

乾燥クロスで乾燥菌体を覆い BZC 水溶液を塗布する試験方法 2 では、全て検出限界以下となった。1 分間接触すると、試験方法 1 では、クロス B を *P. aeruginosa* に接触させた場合とクロス C を *E. faecalis* に接触した場合を除き検出限界以下となり、試験方法 2 では、10 秒間の接触と同様に全て検出限界以下となった。クロス D が他のクロスと比べて試験方法 1 では菌が検出される場合が多い結果となり、クロス素材により殺菌効力が異なることが示された。消毒薬を含浸させる前の乾燥したクロスの質感は、クロス A およびクロス D の方がクロス B およびクロス C と比較して「硬さ」があり、BZC 水溶液を含浸後もクロス D は「硬さ」が残った。クロスの接触面に凹凸がある場合、「硬さ」のあるクロスは凹凸にフィットしづらいものと推察される。また、菌体表面にクロスを接触させた場合、菌体表面とクロスの上に空気層が生じたため、菌体表面に十分に接触できなかったことも要因として考えられる。BZC 水溶液を含浸したクロス A とクロス C は、菌体表面に十分に接触できたことで、殺菌効果を発揮できたものと推察された。試験方法 1 と試験方法 2 の殺菌効果の違いは、試験方法 2 では BZC 水溶液とクロスの接触時間が試験方法 1 より

短いため、クロスに BZC が吸着される前に菌体に接触しているものと考えられ、殺菌に必要な BZC 濃度以上を保ったまま殺菌に必要な時間、菌体に BZC が作用できたためと推察された。また、乾燥クロスの上から BZC 水溶液を塗布する方法の方が、凹凸を有する乾燥菌体に BZC 水溶液が接触しやすい状況が生まれた可能性が考えられた。以上より、乾燥菌体に BZC 水溶液含浸クロスが確実に接触すれば BZC で殺菌可能な微生物に対して殺菌効果が発揮されることが示唆されたため、クロス内部に含まれている消毒薬が乾燥菌体表面に移動できる分量をクロスに含浸させる必要がある。

臨床現場における環境清拭の対象物である器具や環境表面は、すべてが平坦ではなく溝などの凹凸を有することが多く、菌体は乾燥した状態で存在している。そのため、清拭する対象物の形状や乾燥による減菌などを考慮した、臨床現場での適用可能な環境清拭方法を確立する必要がある。さらに、菌体を含む有機物質は、付着後に塗り広げられることなく、そのまま乾燥した状態であるものと考えられる。臨床現場で適用可能な環境清拭方法の確立には、乾燥による減菌の影響も考慮して、菌液を塗り広げた場合と塗り広げない場合等の現場に近い状態を再現して、さらなる検討を行う必要がある。

臨床現場の汚れは、さまざまな環境表面に体液や血液、膿汁などの有機物と共に病原微生物が乾燥した状態で存在している。これら有機物を確実に取り除くために、環境清拭が行われている。3 種類のクロスとマイクロファイバークロスを用いた乾燥クロスでの拭き取り試験では、拭き取り後の試験領域は、目視下で汚れが確認され、試験領域から菌を殆ど除去できなかった (図 7)。一方、水含浸クロスまたは BZC 水溶液含浸クロスを用いた場合では、全てのクロスで拭き取り後の試験領域は、目視下で汚れは確認されなかった。拭き取り操作において、湿式クロスの方が乾燥クロスに比べ 8.6~10 倍の拭き取り効果が発揮できることが報告⁴²⁾されており、今回行った実験でも同様の結果を示した。臨床現場における拭き取り操作には湿式クロスを選択することが望まれるが、湿式クロスとして水含浸クロスを用いると、拭き取り直後の試験領域からは多くの菌が検出されたが、(図 8) 芽胞を用いた水含浸クロスでの拭き取り評価を行った結果、クロス C では、検出限界以下を示し、除去能力の高いことが観察された。しかし、これまでに水だけでの使用は微生物の再汚染を引き起こすことが報告されており⁴³⁾、注意が必要である。また、今回の試験では、拭き取り後のクロスを用いた芽胞の再付着評価までは至っていないため、更なる検証が必要である。今回の実験結果同様に、汚れの除去の過程で、試験領域から微生物も除去することは関連づけられないことが示唆された。環境清拭を実施する場合には、対象表面から、汚れを除去するのか、微生物の殺菌効果を求めるのか目的を明確化する必要がある。汚れの除去が目的である場合は、洗浄剤の使用が求められ、殺菌の場合では、消毒薬を使う必要がある。しかし、臨床現場では、汚れと微生物が混在しており、除去能力と消毒効果を備えたクロスが必要になる。

蛍光ミクロスフェアを使用して拭き取り操作前後のクロスの拭き取り面とステンレス表面上を観察し、残留状態と除去挙動の評価を行った。ステンレス表面上を倍率 100 倍付近で観察した場合、見た目は綺麗だが、倍率 4000 倍範囲では蛍光ミクロスフェアが観察された。これは、水含浸クロスによる拭き取り試験で、目視下では汚れが確認されなかったが試験領域から菌が検出され (図 12)、同様の結果となった。拭き取り後のクロス表面の

蛍光観察を行うと、拭き取り方向に沿うようにクロスの拭き取り面に蛍光ミクロスフェアからの蛍光が観察され、蛍光ミクロスフェアがクロス中央部に集積されていた(図 13)。血液含有乾燥菌体を湿式クロスでふき取ると、拭き取り方向に沿うようにクロス表面に菌体が残留しているのが同様に観察された(図 6)。以上より、湿式クロスによる拭き取り操作では、クロス先頭部分で汚れを除去し、汚れを保持できる一定量を超えるとクロス後方箇所に着するものと推測された。さらに BZC 水溶液含浸クロスを用いた拭き取り試験では、多くの菌は検出されなかったため、環境表面の清拭に水だけを含浸した清拭クロスを使用する場合は、再汚染を招く可能性があるため、消毒薬の使用が重要であることが明らかになった。

実際の環境清拭では、拭き取りクロスで清拭箇所を一方向だけ清拭して拭き取りクロスを破棄することなく、往復拭きすることが一般的である。この往復拭き取り操作で問題になっていることが、拭き取りクロスからの菌の再付着であり、これまでに、消毒薬含浸クロスは、複数回の拭き取り操作後に微生物汚染物質をほかの表面に移すことが示されている¹¹⁾。これらを念頭に、拭き取り操作で使用したクロスにて、別の清潔な表面を清拭し評価した。往復拭き取り試験では、クロス A、クロス B、クロス D で、試験領域②と④での拭き終わり箇所でも多くの菌の検出が観察された。要因として、拭き取り操作を行う際に、拭き終わり箇所一旦クロスを止める操作が加わることで、クロスの上から重りにより圧力が加わり、クロスに取り込んだ汚れが試験領域に再付着することが考えられた。拭き取り操作での、菌の再付着を防止するためには、取り込んだ有機物などの保持力が高いクロスが求められる。クロス C は、*E. coli*、*C. albicans*、FCV/F9 に対して検出限界以下を示し、クロス A、クロス B、クロス D と比べて再付着を防ぐことができ、保持能力が高いことが示された。クロス A、クロス B、クロス D の繊維径は約 15 μm で、繊維が絡み合い粗になっており、繊維間が広く密度が小さい構造であった。一方、クロス C の繊維径は約 2 μm と細く、この繊維で構成されるマイクロポケットと呼ばれる多数の隙間が存在し(図 10)、さらに一本一本の細い繊維が密に編み込まれている構造となっており、繊維の密度が高いことが観察された。今回使用したマイクロファイバークロスが既報と同一のクロスではないが、既報と同様のことが観察された。このマイクロポケットに液体汚れや固形物汚れがクロス内部に吸い上げられ保持される^{32,44)}と考えられており、クロス C は、クロス A、クロス B、クロス D と比べて再付着しにくいことが明らかになった。一方で、マイクロファイバークロス素材は、水のみを使用した場合で菌の移動を減らすことができると示されているが^{32,34)}、本研究結果と同様に菌を再付着させたとの報告³⁶⁾もあり、水だけを用いたマイクロファイバークロスの使用には注意が必要になる。今回テストは行っていないが、水の代わりに洗浄剤を使用した場合でも、十分な効果が得られなかったとの報告¹⁰⁾もあり、使用にあたっては更なる検証が必要である。クロス素材に関係なく、今回用いた試験菌株では、全体的にグラム陽性菌がグラム陰性菌と比較して、表面に多く残った結果であった。原因として、グラム陽性菌がグラム陰性菌よりも乾燥に耐性がある^{45,46)}と報告があり、今回行った水含浸クロスでの拭き取り試験では、全体的にグラム陽性菌がグラム陰性菌と比較して、表面に多く残った結果であった。

CDC ガイドラインに沿った感染制御対策として、日常的な環境清拭にはあらかじめ BZC

などの低水準消毒薬が含浸された清拭クロスが用いられている。BZC 水溶液含浸クロスを用いた拭き取り試験では、すべてのクロスで多くの菌を除去することができた。これまでに、0.2%BZC 水溶液含浸クロスで塩化ビニル板上を清拭した後、清拭面に菌を接種し、消毒薬の残留活性を調べた研究⁴⁷⁾で、清拭直後では、*S. aureus*、*E. faecium*、*A. baumannii* で 3Log 以上の減菌を示しており、24 時間後では、2Log の減菌が示されている。0.2% BZC 水溶液を含浸したクロスを接触して取り除いた後の試験領域には、表 2 に示すように BZC 残存量はいずれのクロスを用いても著しい濃度低下を示さず、殺菌効果が認められる濃度であった。このことより、拭き取り操作時に加えられる圧力により、クロス内部に含まれている消毒薬が清拭表面に移動して、残留消毒薬による殺菌効果を発揮したことが示唆された。ウイルスに関しては、環境清拭で汎用されている低水準消毒薬の第 4 級アンモニウム塩の成分は、ノンエンペローブウイルスには効果的ではなく不活化は低い⁴⁹⁾とされているが、本検討で使用した 4 種類のクロス素材に第 4 級アンモニウム塩を組み合わせて使用した場合、再汚染のリスクを抑え、特にマイクロファイバークロスを用いた場合は、すべての試験領域に対して検出限界以下となり新たな知見を示し、消毒薬の使用が重要であることが明らかになった。今回の検討では、ステンレス板という平坦な試験領域を使用しており消毒薬含浸クロスが乾燥菌体に接触しやすい状態であったことも殺菌効果に影響したことが考えられ、臨床現場での適用には今後さらなる検討を行う必要がある。同時に、水だけを用いたクロスで環境清拭することは、病原微生物を拡散させるリスクが高いことも明らかになった。これまでも、表面清拭用具の汚染に関連する緑膿菌アウトブレイクが報告されており¹³⁾、Rampling⁷⁾は、アウトブレイク発生時の対策として、隔離予防策を行っても感染伝播が終息しなかったが、療養環境の清掃を強化した結果、感染伝播が終息したと報告しており、病原微生物の伝播防止として環境清拭の役割の重要性が高く、軽視できないと考える。適正な消毒薬の選択と拭き取り方法によっては、環境微生物からの感染伝播を広げるリスクを低減できると本論文の結果より考える。

実際の医療現場では、血液などの有機物が付着している場面が多く観察される。血液共存下の場合では、非血液共存下と比較して、殺菌効果を弱めることが今回の検討で明らかになった(図 6~11)。実際に BZC 水溶液含浸クロスを用いた再付着試験では、わずかな菌量であるが、拭き終わり箇所でも再付着が確認された。そのため、臨床において BZC 水溶液含浸クロスを用いて再汚染させないためには、連続した拭き取り操作ではなく、拭き取りは一方向とし、拭き終わり箇所を止めない操作方法を行う必要がある。また、環境清拭クロスを何度も繰り返して使用されることがあり、拭き取りクロスが汚染された場合には、クロスを早めに取り換えることが必要であると考えられる。

今回使用した 3 種類のクロスとマイクロファイバークロスに BZC 水溶液を含浸させた場合、殆どの菌、ウイルスは検出限界以下を示した。特に除去能力と保持能力が高いマイクロファイバークロスとの組み合わせでは、高い清浄度が期待できることが示唆された。しかし、実際に環境清拭を行うのは「ヒト」であり、清浄度評価も個人の感覚にゆだねられる部分が多くを占めるため、環境清拭には多くの不確定要素を勘案した、適切な環境清拭方法の提示が重要になるが、本研究では、拭き取り時のクロスに加える圧力、拭き取り時間、拭き取り許容範囲に関する検討までには至らなかった。さらに、菌体を含む有機物

質は、付着後に塗り広げられることなく、そのまま乾燥した状態であるものと考えられ、臨床現場で適用可能な環境清拭方法の確立には、菌液を塗り広げた場合と塗り広げない場合等の現場に近い状態を再現して、さらなる検討を行う必要がある。今後も、医療環境の病原微生物からヒトへの接触伝播を遮断するための様々な場面に応じた環境清拭方法をあきらかにするために研究を継続し、プロトコールを提示する必要がある。

5. 結論

本論文において、医療環境の病原微生物から人への接触伝播を遮断するための適正な環境清拭方法を明らかにするために、3種類のクロス素材およびマイクロファイバークロスとBZCを消毒薬として用いて一般細菌、真菌、芽胞、ウイルスに対する拭き取り効果と再付着について詳細に検討した。芽胞に対しては、水含浸クロスでの拭き取り効果について検討した。

第一の検討として、清拭クロス素材へのBZC水溶液の清拭クロス素材への吸着と一般細菌、真菌に対するBZC水溶液の有効濃度について検討した結果、全てのクロス素材で著しい濃度低下を示さなかった。各種菌に対するBZC水溶液の検出限界以下となる濃度は、*C. albicans*、*S. epidermidis*、*E. faecalis*では0.01%であるのに対して、*S. aureus*、*E. coli*、*P. aeruginosa*では0.005%とより低濃度で殺菌効果が認められ、菌懸濁液と10分間の接触で殺菌効果が認められないBZCの最大濃度では、*E. faecalis*、*P. aeruginosa*では、0.0005%であるのに対して、*S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. coli*では0.0001%とより低濃度であり、*C. albicans*では、0.001%ともっとも消毒薬に抵抗を示し、菌種により、殺菌効果が認められないBZC最大濃度が異なることが明らかになり、消毒効果が期待できる消毒薬のBZC濃度を適用する必要があることが示唆された。

第二の検討として、乾燥状態にある一般細菌、真菌に対するBZC水溶液の殺菌効果を明らかにするとともに、BZC水溶液含浸クロスを接触したときの殺菌効果について検証した結果、乾燥菌体表面に有効最小濃度以上のBZC水溶液が接触すれば、殺菌効果が得られることが明らかになった。

第三の検討として、一般細菌、真菌、芽胞、ウイルスに対する血液共存下での影響について、清拭クロスによる拭き取り効果と再付着に対するクロス素材での影響を検討した結果、臨床現場における拭き取り操作時には湿式クロスを選択することが望まれる。湿式クロスによる拭き取り操作では、クロスの先頭部分で汚れの除去に寄与し、汚れを保持できる一定量を超えた場合に、クロス後方箇所が付着するものと推測された。マイクロファイバークロスは、レーヨン、レーヨン+ポリエチレン、パルプ+ポリエステルクロス素材と比べて、最も汚れの除去効果が高く、再汚染が少ないことが明らかになったが、すべてのクロス素材で再付着が確認され、再汚染を招く可能性があり、使用には注意が必要であることが明らかになった。BZC水溶液含浸クロスでは、殆どの菌は検出されず、ウイルスを用いた検討でも検出限界以下となり、新しい知見を示したが、拭き終わり箇所で菌が残りやすいことが明らかになった。医療環境での環境清拭に、マイクロファイバークロスに低水準消毒薬を組み合わせるものを用いた拭き取り方法では、連続した拭き取り操作ではなく、拭き取りは一方向とし、拭き終わり箇所を止めない操作方法を行う必要があることが示された。また、環境清拭クロスの拭き取り面に汚染が確認される場合は、できる限り新しいクロスに取り換え、再汚染防止にも十分留意して環境清拭を行う必要が示された。

第四の検討として、蛍光ミクロスフェアを用いて、拭き取り操作後のクロスの表面とステンレス板表面の蛍光ミクロスフェアの残留状態と除去挙動を観察した結果、拭き取り後のクロス表面は拭き取り方向に沿うように蛍光ミクロスフェアがクロスの中央部に集積されているのが観察され、一定量を超えた場合にクロス後方箇所に付着するものと考えられ、

拭き取り面に汚れが確認される場合は、クロスを交換する必要があると示された。マイクロファイバークロスとは、他のクロスと比較して、一本一本の繊維が密に編み込まれており、繊維の密度が高く、この部分に液体汚れや固形物汚れがクロス内部に吸い上げられているのが観察され、保持力が高いことが示された。拭き取り後のステンレス表面上の見た目は綺麗だが、SEM観察では蛍光ミクロスフェアが観察され、菌を使った拭き取り試験同様、水だけを含浸したクロスを使用する場合、菌を有意に除去できないことが危惧された。

以上の検討結果から、医療環境の病原微生物からヒトへの接触伝播を遮断するための適正な環境清拭方法として、汚れの除去力と保持力が高く、再汚染が少ないマイクロファイバークロスに BZC を組み合わせて使用した場合、再汚染防止が期待できる。さらに、拭き取り方法として、連続した拭き取りではなく、拭き取りは一方向とし、拭き終わり箇所を止めずに、清拭クロスの拭き取り面に汚染が確認される場合は、新しいクロスに取り換える操作方法が望まれる。さらに、菌体を含む有機物質は、付着後に塗り広げられることなく、そのまま乾燥した状態であるものと考えられ、臨床現場で適用可能な環境清拭方法の確立には、乾燥による減菌の影響も考慮して、菌液を塗り広げた場合と塗り広げない場合等の現場に近い状態を再現して、さらなる検討を行う必要がある。

6. 謝辞

本論文は筆者が東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。

本論文の審査にあたっては、貴重なお時間を割いてご精読頂いた、東京医療保健大学大学院名誉学長の研究指導教員である木村哲 教授からは多大なご指導を賜り、論文作成にあたりひも解くヒントを直接、ご教示いただき感謝の念に堪えません。深く感謝いたします。

研究活動全般にわたり、研究を導いてくださった岩澤篤郎 教授、松村有里子 准教授に、心より感謝申し上げます。

岩澤篤郎 教授には、看護師である私が、微生物学の研究の面白さに目覚め、研究テーマについて多角的に検討する重要性、ならびに研究者としての姿勢など多岐にわたり学ばせていただきました。また、実験の結果がうまくいかない時には、最後まで温かく見守り、適切な指導を賜り感謝申し上げます。

松村有里子 准教授には、実験方法から論文作成、さらにプレゼンテーション方法など多岐にご指導いただきました。研究者としてのご助言を賜り、研究活動が続けるなかで足踏み状態となった時には根気よくお付き合いいただき、適切なご指導と助言、そして暖かい励ましを賜りました。感謝の意を表します。

菅原えりさ 教授、吉田理香 教授には、研究ゼミにて、先生方の知識や見解を基にご指導いただき、心より感謝の意を表します。

医療法人徳洲会 東京西徳洲会病院 渡部和巨 院長、鳩山悦子 看護部長、皆川孝雄 事務長には、東京医療保健大学大学院にて研究を行う機会を与えていただいたこと、経済面でもご支援賜りましたこと、厚く感謝申し上げます。

最後に、大学院進学に協力してくださったすべての方々に御礼を申し上げるとともに、長きに渡り暖かくサポートしてくれた家族に、深い敬意と感謝の意を表します。

7. 引用文献

- 1) Gastmeier P, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Nitzschke- Tiemann F, Zuschneid L, Groneberg K, Ruden henning. How outbreaks can contribute to prevention of nosocomial infection: Analysis of 1,022 outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015; 26(4): 357-361.
- 2) Facciola A, Pellicano G F, Visalli G F, visalli G I. A Paolucci I A, Venanzi R E, Ceccarelli M, Daleo F, Pietro DI A, Squeri R, Nunnari G, La Fauci V. The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 1266-1278.
- 3) David J, William A, Melissa B, Huslage K, Sickbert- Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, Clostridium difficile, and Acinetobacter species. *Am J Infect Control* 2010; 38: 25-33.
- 4) Joseph A, The Impact of the environment on infections in healthcare facilities. *The Center for Health Design* 2006; 1-19.
- 5) Stephanie J. Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(4): 665-690.
- 6) CDC: Guideline for Hand Hygiene in Health-care Settings Centers for Disease Control and Prevention. 2003;1: 10-12.
- 7) Rampling, A. Wiseman S, Davis, L, Hyett, A P Hyett A P, Walbridge A N, Payne G C, Cornaby A J. Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J hosp Infect* 2001; 49: 109-116.
- 8) CDC: Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. 2008; 29-31.
- 9) Sattar SA, Bradley C, Kibbee R, Wesgate R, Wilkinson M A C, Sharpe T, Maillard J-Y. Disinfectant wipes are appropriate to control microbial bioburden from surfaces: use of a new ASTM standard test protocol to demonstrate efficacy. *J Hosp Infect* 2015; 91: 319-325.
- 10) Bergen L K, Meyer M, Hog M, Rubenhagen B. Spread of bacteria on surfaces when cleaning with microfiber cloths. *J Hosp Infect.* 2009; 71: 132-137.
- 11) Gareth J W, Stephen P D, Ian K H, Dylan W H, Maillard J-Y. Limitations of the Efficacy of Surface disinfection in the healthcare setting. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2019; 30: 570-573.
- 12) Drees M, David R S, Christopher H S, Barefoot L, Hansjosten K, Padade M V, Cromin M, Stanley A N, Golan Y. Prior environmental contamination Increases the Risk of Acquisition of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinl Infect Dis.* 2008; 46: 678-685.
- 13) Engelhart S, Krizek L, Glasmachery A, Fischnallevr E, Markleinz G, Exner M. Pseudomonas aeruginosa outbreak in a haematology-oncology unit associated with contaminated surface cleaning equipment. *J Hosp Infect* 2002; 52: 93-98.
- 14) Willian A R, David J W. The benefits of surface disinfection. *Am J Infect Control* 2004; 27: 226-231.
- 15) Cozad Ann, Rhonda D J. Disinfection and the prevention of infectious disease. *Am J Infect Control* 2003; 31(4): 243-254.

- 16) Chowdhury D, Tahir S, Legge M, Hu H, Prvan T, Johani K, Whiteley G S, Glasbey T O, Deva A K, Viclery K. Transfer of dry surface biofilm in the healthcare environment: the role of healthcare workers' hands as vehicles. *J Hosp Infect* 2018; 100: e85- e90.
- 17) Brittany C E, Daniel A A, Elizabeth C E, Rao A, Ajay K S, Gopala K Y, Curtis J D. Reduction of clostridium difficile and vancomycin-resistant enterococcus contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 61.
- 18) 厚生労働省医政局指導課. 医療機関等における院内感染対策に関する留意事項. 2011年6月27日. http://www.kankyokansen.org/modules/news/index.php?content_id=22 (アクセス日: 2022年1月31日)
- 19) Domagk G, Wochenschr on chemotherapy of bacteria infections. *Deutsch Med* 1935; 61(21): 829-832.
- 20) Seymour S B. Disinfection, sterilization, and preservation. 4th edition. Lippincott Williams and Wilkins. 2001, 5th ed.
- 21) 高麗寛紀. 第四アンモニウム塩の抗菌活性. *防菌防黴* 1984; 12(8): 391-400.
- 22) Jono K, Uemura T, Kuno M, Higashide E. Bactericidal activity and killing rate of benzalkonium chloride and chlorhexidine gluconate. *J Pharm Soc Japan* 1985; 10(8) : 751-759.
- 23) 医薬品インタビューフォーム. 日本薬局方 (10W/V%) 塩化ベンザルコニウム塩化物液. 2010年5月改定(第4番). 日本標準商品分類番号: 872616.
- 24) 影向範昭. 塩化ベンザルコニウムの綿製品への吸着. *歯薬療法*. 1986; 5(2): 105-108.
- 25) 中村絵美, 高見貴之, 加藤頼子, 吉田葉子, 谷口暢. 環境清拭用クロスの微生物に対する性能評価. *環境感染誌* 2016; 31(2): 100-106.
- 26) Dennis K MacDougall, Morris C. Optimizing disinfectant application in healthcare facilities. *Infect Control Today* 2006; 62-67.
- 27) Boyce J M, Sullivan L, Booker A, Baker J. Quaternary ammonium disinfectant issues encountered in an environmental services department. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016; 37(3): 340-342.
- 28) Doug J H, Brian D C, Ryan P S, Reynolds M. The adsorption of alkyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride onto cotton nonwoven hydroentangled substrates at the solid-liquid interface is minimized by additive chemistries. *Text Res J* 2017; 87(1): 70-80.
- 29) Bloss R, Meyer G, Kampf G. Adsorption of active ingredients of surface disinfectants depends on the type of fabric used for surface treatment. *J hosp infect* 2010; 75(1) : 56-61.
- 30) E. Ramm, S. Siani, R. Wesgate, J.-Y. Maillard. Pathogen transfer and high variability in pathogen removal by detergent wipes. *Am J Infect Control* 2015; 43: 724-728.
- 31) 福地邦彦, 秋間悦子, 中根香織, 宇賀神和久, 田原佐知子, 二木芳人. 当院における *Clostridium difficile* 感染症発生の推移と感染対策の取り組み. *環境感染誌* 2017; 32: 364-368.
- 32) 東篠圭一, 野島康弘, 佐下橋信寧, 中村恭子, 佐藤南, 藤井正実, 宮地鑑. マイクロファイバークロスによるウイルス除去に関する検討. *Therapeutic Research* 2014; 35: 327-836.

- 33) Adriana N, Kanchana M, Michelle J. Microfiber cloths reduce the transfer of *Clostridium difficile* spores to environmental surfaces compared with cotton cloths. *Am J Infect Control* 2015; 43: 686-689.
- 34) Wren M W D, Rollins M, Jeanes A, Hall T J, Coen P G, Gant V A. Removing bacteria from hospital surfaces: a laboratory comparison of ultramicrofibre and standard cloths. *J Hosp Infect* 2008; 70: 265-271.
- 35) Willian A, Maria F, David J. Microbiologic evaluation of microfiber mops for surface disinfection. *Am J Infect Control*. 2007; 35: 569-573.
- 36) Robertson A, Barrell M, Maillard J-Y. Combining detergent/disinfectant with microfibre material provides a better control of microbial contaminants on surfaces than the use of water alone. *J Hosp Infect* 2019; 103: e101-e104.
- 37) 梶本晴彦, 綾田直美. キトサン表面処理綿の薬剤吸着特性. *J Hosp Pharm* 1997; 189-193.
- 38) 中田清三, 伏見了, 門田守人. 消毒薬の医療材料への吸着について. *手術医学* 2004 ; 25(2): 43-45.
- 39) 岩澤篤郎, 松村有里子. 生体消毒薬の抗微生物効果と細胞毒性. *Journal of Healthcare-associated Infection* 2016; 9: 1-13.
- 40) 梶本晴彦, 野口道子, 梶本光代. 薬剤吸着に配慮した脱脂綿製造工程中における漂白処理剤の選定. *病院薬学* 1999; 25(6): 614-620.
- 41) Moore G, Griffith C. A laboratory evaluation of the decontamination properties of microfibre cloths. *J Hosp Infect* 2006; 64: 379-385.
- 42) 東條圭一, 中村恭子, 佐藤恵莉奈, 早速慎吾, 藤井正実, 宮地鑑. マイクロファイバー素材クリーニングクロスによる医療機器清拭効果について. *Therapeutic Research* 2013; 34: 399-407.
- 43) Diab-Elschahawi M, Assadian O, Blacky A, Atadler M, Pernicka E, Berger J, Resch H, Koller W. Evaluation of the decontamination efficacy of new and reprocessed microfiber cleaning cloth compared with other commonly used cleaning cloths in the hospital. *Am J Infect Control* 2010; 38: 289-292.
- 44) 畠山拓也, 松田光喜, 大沢元和, 佐下橋信寧, 熊谷誠. Toraysee for CE の有用性についての検討. *日本臨床工学技士会誌* 2015; 53: 67-71.
- 45) Hirai Y. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *J Hosp Infect* 1991; 19: 191-200.
- 46) Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surface? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006; 130: 6.
- 47) 早川千亜紀, 梶浦工, 菅原えりさ, 木村哲. 医療施設等の環境清拭清浄化に適用される低水準消毒薬の清拭表面上の殺菌活性とその残留活性. *Journal of Healthcare-associated Infection* 2018; 11: 39-46.
- 48) 天内雅人, 宗万孝次, 平田哲, 伏見了, 岡本昇, 高橋遼平, 八木俊彦. ATP を指標とした三種類の清拭用材料 (素材) による拭き取り性能、転写および染み出し特性に関する研究. *Journal of Healthcare-associated Infection* 2016; 9: 42-51.

- 49) Gerald McDonnelle, Joyce H. Block's Disinfection, sterilization, and preservation. 6th edition. Wolters Kluwer. 2021, 6th ed.
- 50) 東レ株式会社. Toraysee for CE. <https://www.toraysee.toray/medical/> (アクセス日 : 2022年1月31日)

図

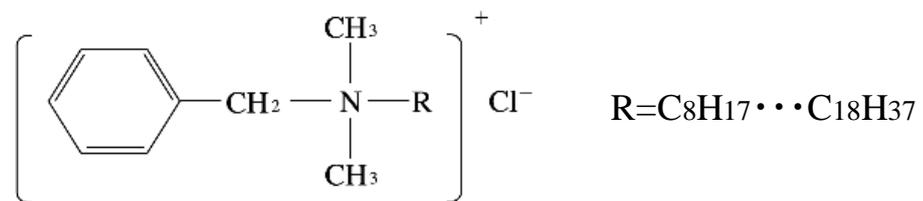


図 1 塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium chloride: BZC) の構造式

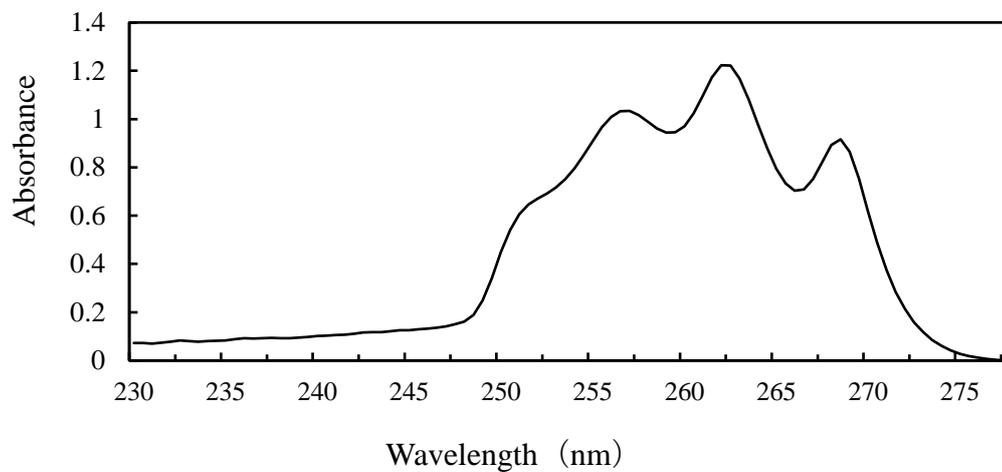


図 2 0.2% BZC 水溶液の吸収スペクトル

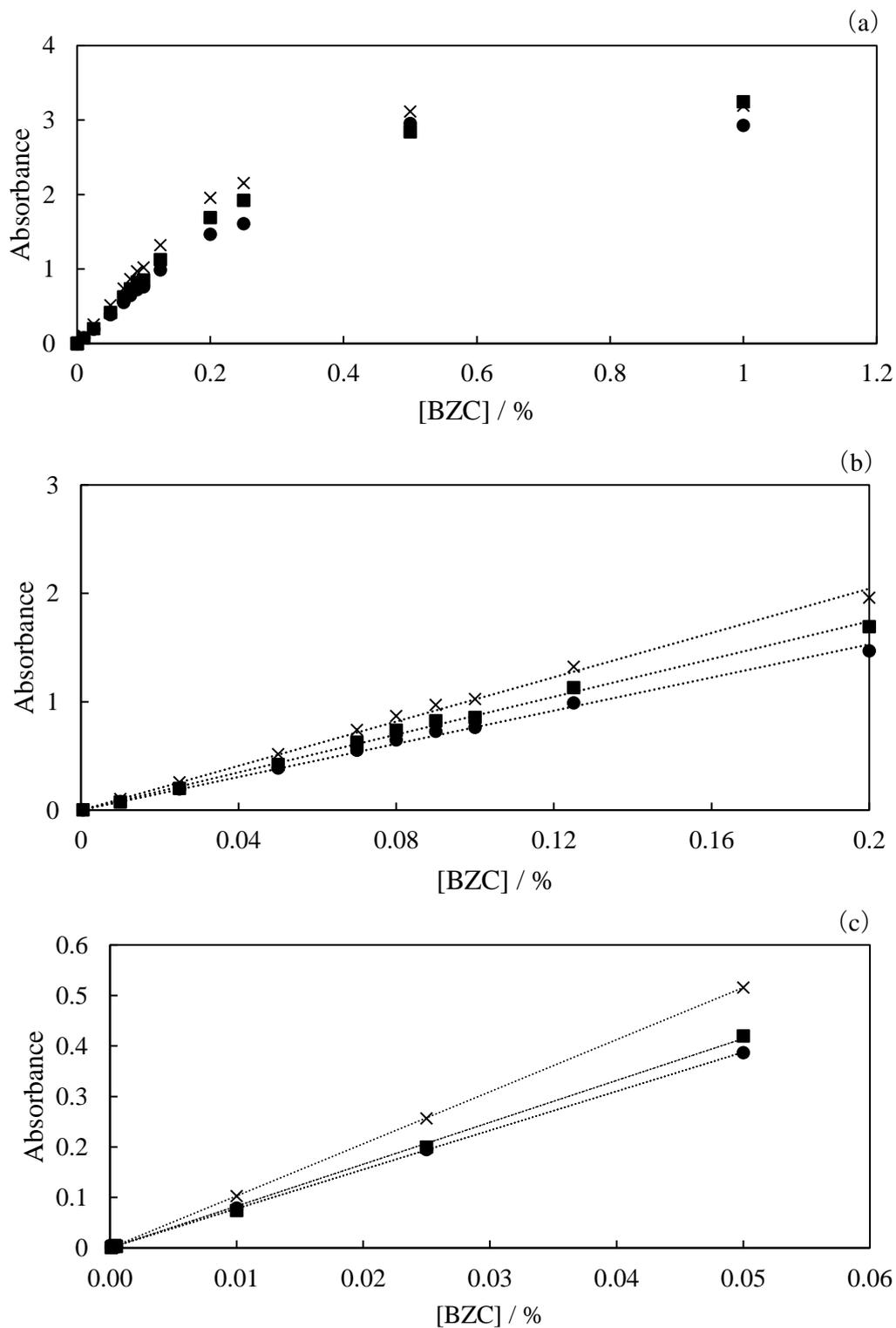


図3 BZC水溶液の濃度に対する吸光度の変化

(a) 0-1.0%BZC水溶液、(b) 0-0.2%BZC水溶液、(c) 0-0.05% BZC水溶液

●:269 nm、×:262 nm、■:257 nm

図中の点線は、近似直線を意味する

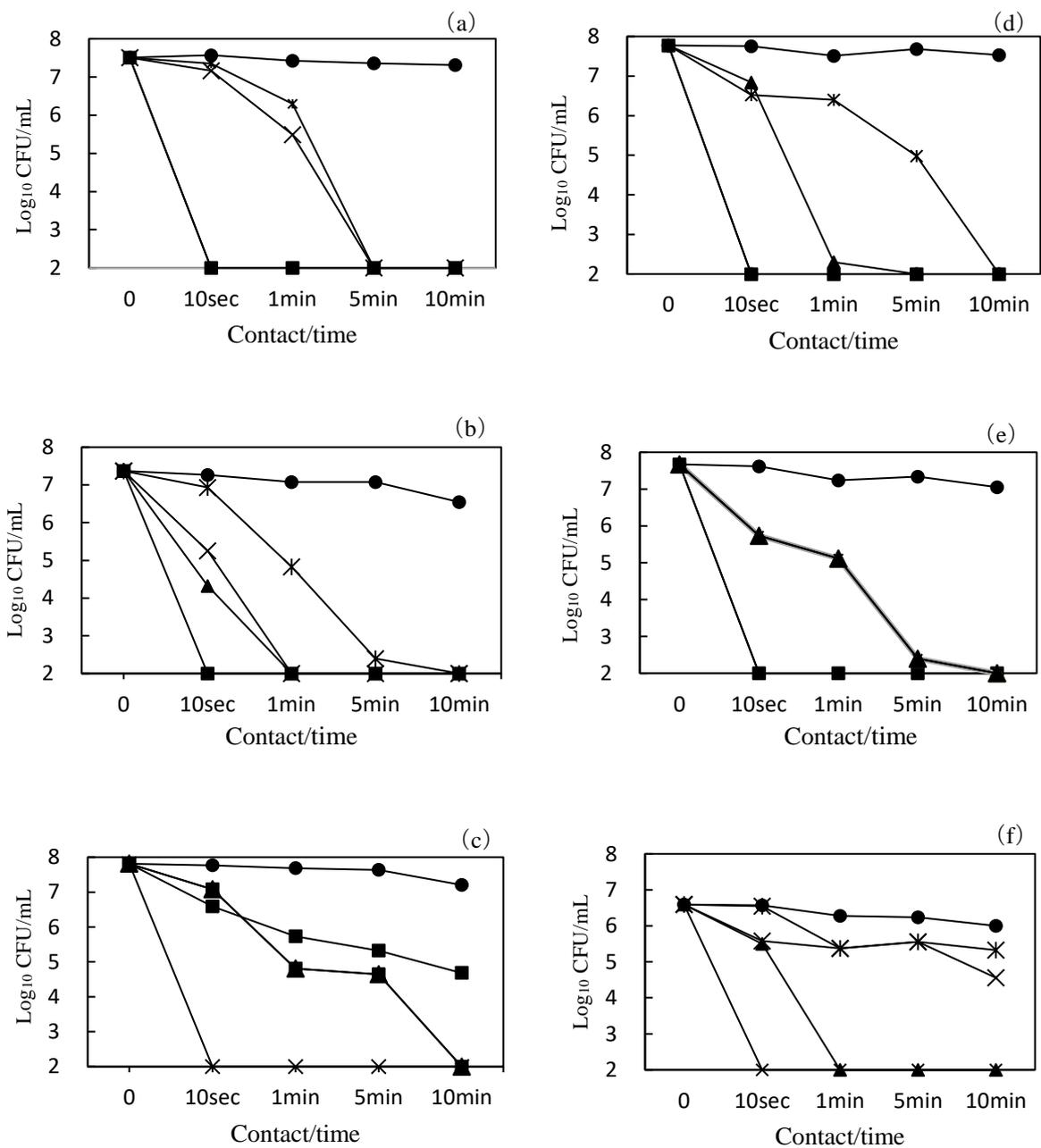


図4 菌懸濁液を用いた一般細菌に対するBZC水溶液の殺菌効果 (n=3)

約 10⁸ CFU/mL に調整した菌懸濁液 100 μL と BZC 水溶液 900 μL を混合して 10 秒、1 分、5 分、10 分間接触させ、中和剤を含む溶液で中和後、SCD 寒天培地またはサブロー寒天培地に塗布・培養して生菌数を求めた。(n=3)

(a) *S. aureus* ATCC25923 (b) *S. epidermidis* ATCC12228 (c) *E. faecalis* ATCC29212

(d) *P. aeruginosa* ATCC27853 (e) *E. coli* ATCC25922 (f) *C. albicans* ATCC10231

BZC 濃度(%): 0.0001% (●)、0.0005% (*), 0.001% (×)、0.005% (▲)、0.01% (■)

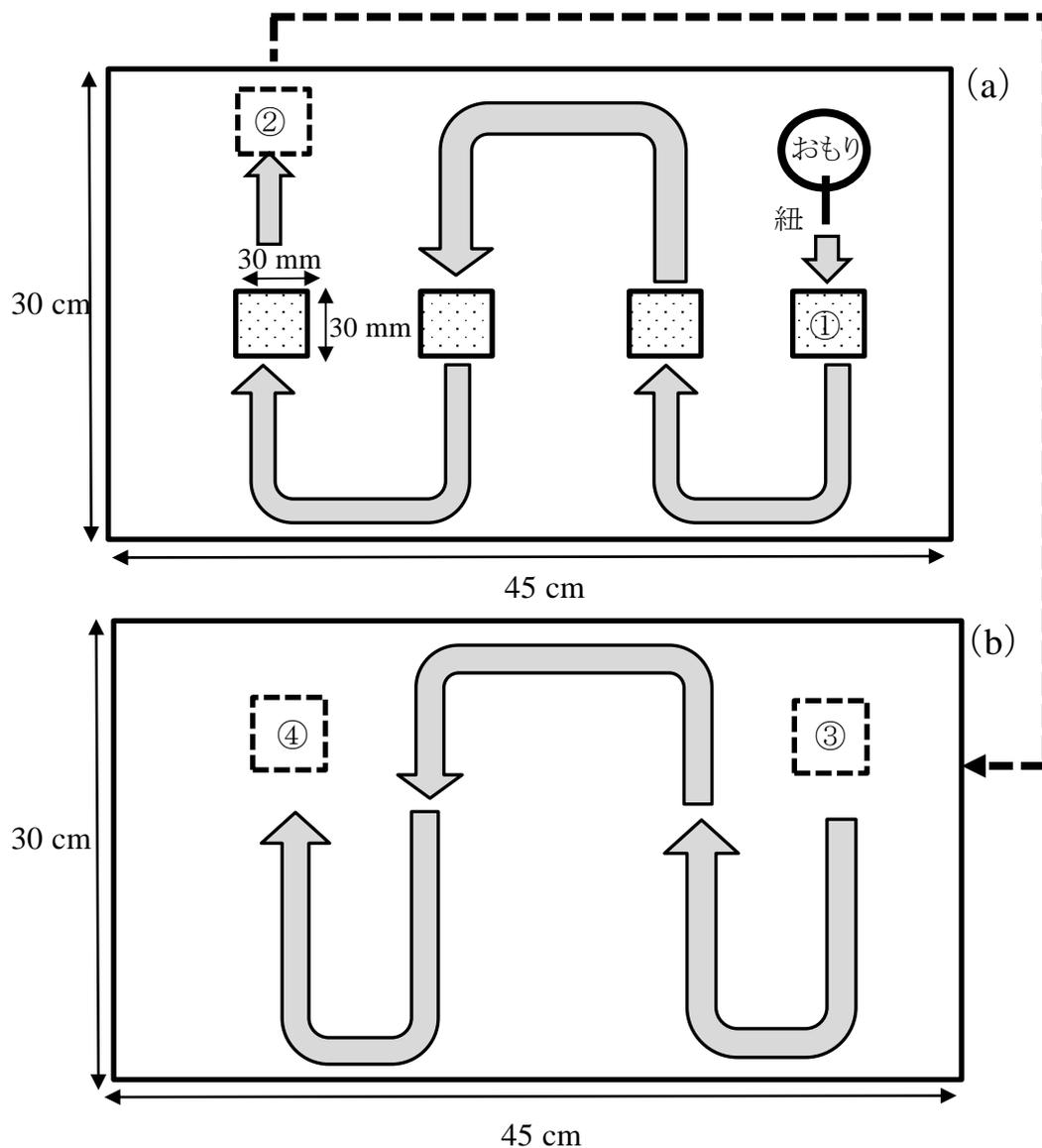


図5 クロスの素材別での拭き取り効果と再付着の確認方法

(a) 試験菌液 10 μ L を試験領域に塗布後、乾燥させた箇所の拭き取り試験
ステンレス板上 (30 cm \times 45 cm) の拭き取り経路

矢印：ステンレス板上での移動方向

四角形 (点)：試験菌液塗布範囲 4 か所 (30 mm \times 30 mm)

矢印 (点線)：拭き取り試験で使用したクロスの移動経路

①：拭き取り途中

(b) 拭き取り試験で使用したクロスを用いた再付着試験

ステンレス板上の拭き取り経路

矢印：ステンレス板上での移動方向

四角形：菌・ウイルス量計測箇所 (30 mm \times 30 mm)

②：拭き終わり箇所 ③：拭き始め箇所 ④：拭き終わり箇所



図6 拭き取りしたクロスの表面

クロスでの拭き取り方法は、①から②の方向（図5（a））の矢印に沿って約2秒間かけて移動した。

拭き取りクロス1枚の大きさ

クロスA：170 mm×300 mm

クロスB：150 mm×300 mm

クロスC：240 mm×240 mm

クロスD：140 mm×260 mm

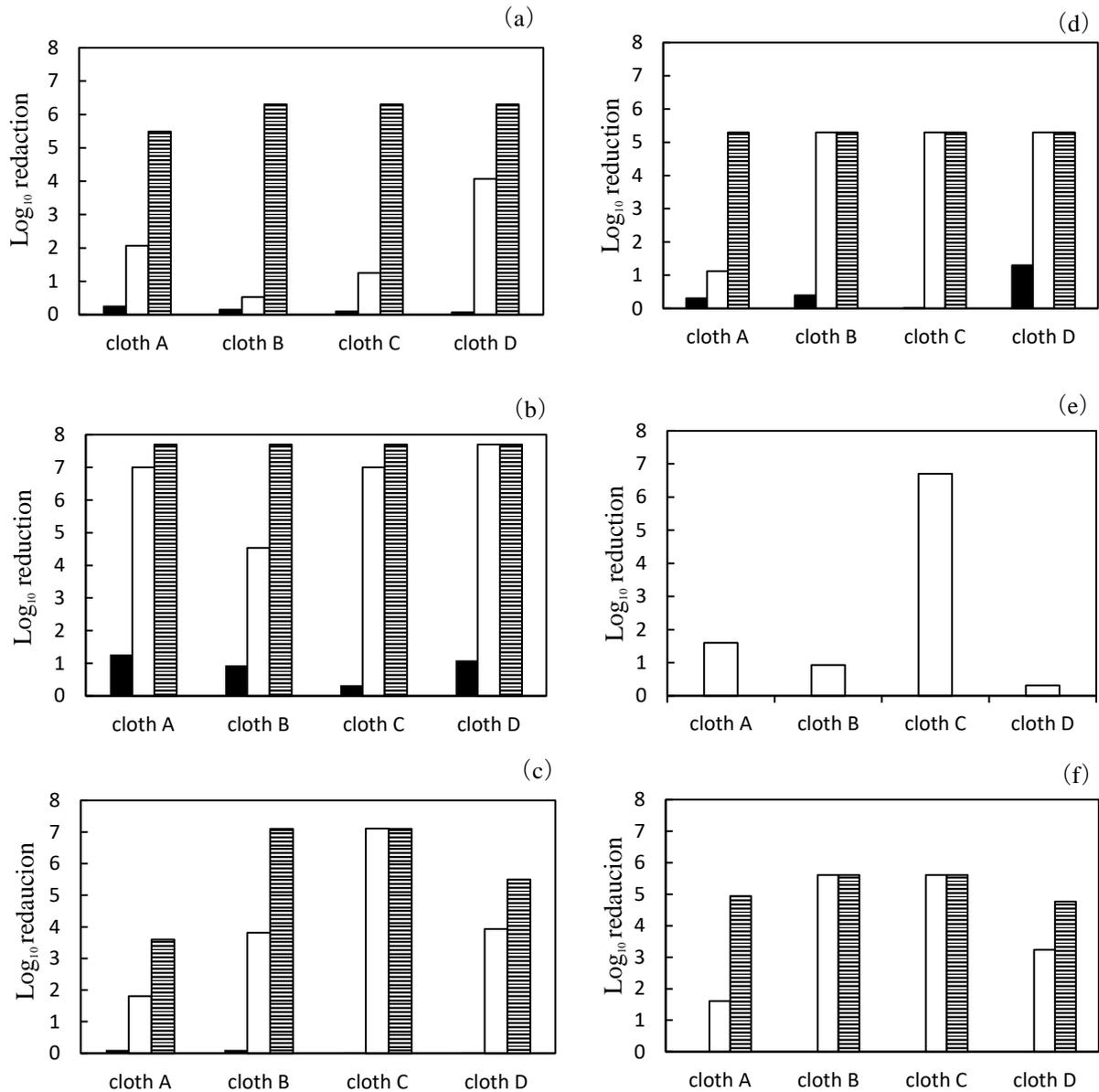


図7 乾燥菌体に対する乾燥クロス、水含浸クロスまたはBZC水溶液含浸クロスの拭き取り比較

ステンレス板上の試験領域 (30 mm×30 mm) に、約 10^8 CFU/mL に調整した血液含有菌懸濁液とウイルス感染価 $5.6 \text{LogTCID}_{50}/\text{mL}$ に調整したウイルス液 $10 \mu\text{L}$ を1か所に塗布、自然乾燥させた後、乾燥クロス、水含浸クロスまたはBZC水溶液含浸クロスで清拭後、拭き取り箇所①より滅菌綿棒で拭き取り、SCDLP培地に回収して生菌数を計測し、ウイルスはCRFK細胞に接種してウイルス感染価を決定した。*C. difficile* に対しては、水含浸クロスで清拭後、拭き取り箇所①より滅菌綿棒で拭き取り、SCDLP培地に回収して生菌数を計測した。(n=1)

(a) *S. aureus* ATCC25923 (b) *E. coli* ATCC25922 (c) *P. aeruginosa* ATCC27853

(d) *C. albicans* ATCC10231 (e) *C. difficile* NCTC11209 (f) Feline calicivirus (FCV/F9)

■ : 乾燥クロス □ : 水含浸クロス ▨ : BZC水溶液含浸クロス

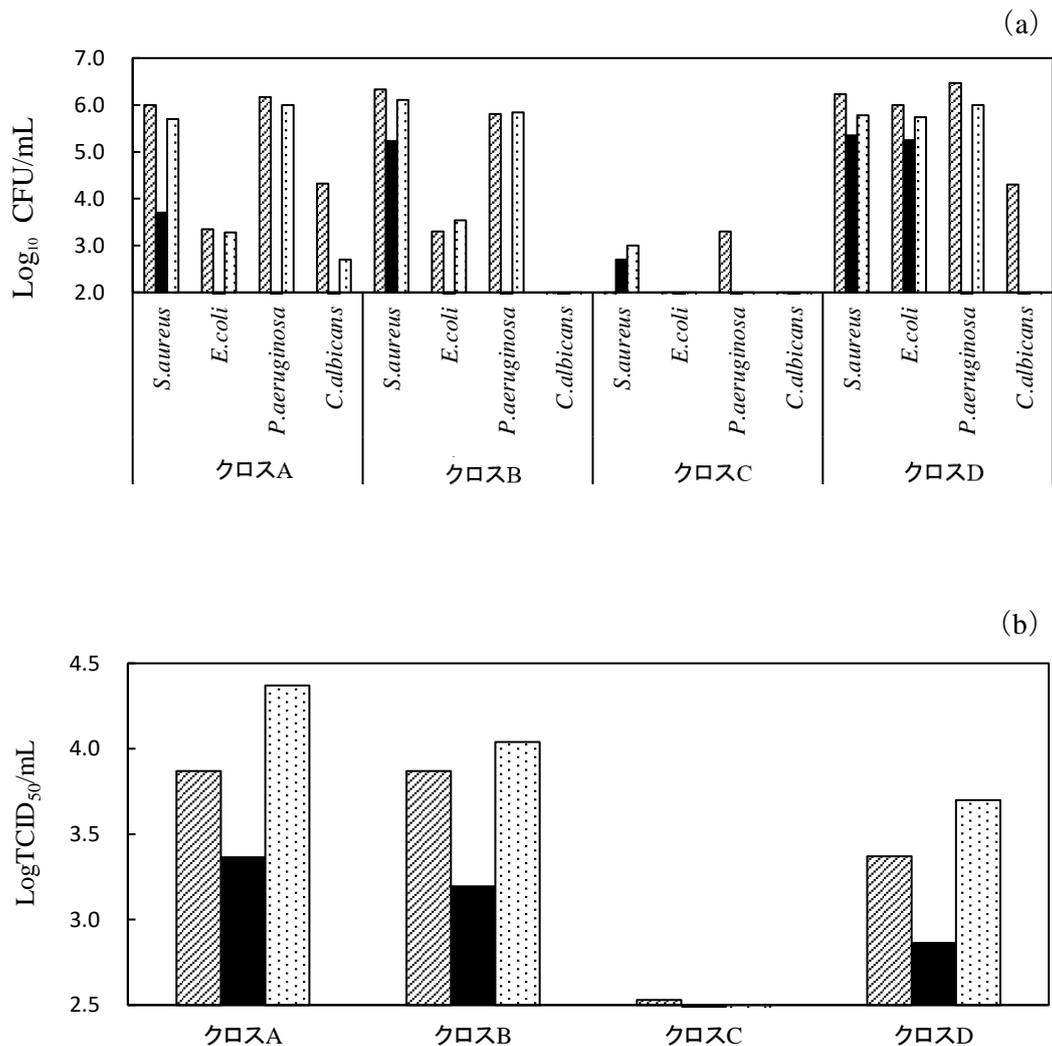


図8 水含浸クロスを用いた再付着の比較

(a) ステンレス板上の試験領域 (30 mm×30 mm) に約 10^8 CFU/mL に調整した血液含有菌懸濁液 10 μ L を 4 か所に塗布、自然乾燥させて作成した乾燥菌体に対して、水含浸クロスにて清拭後、拭き終わり箇所②と清潔ステンレス板の拭き始め箇所③、拭き終わり箇所④より滅菌綿棒で拭い取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。(n=1)

(b) FCV/F9

ステンレス板上の試験領域 (30 mm×30 mm) にウイルス感染価 5.6 LogTCID₅₀/mL に調整したウイルス液 10 μ L を 4 か所に塗布、自然乾燥させて、水含浸クロスにて清拭後、拭き終わり箇所②と清潔ステンレス板上の拭き始め箇所③、拭き終わり箇所④より滅菌綿棒で拭い取り、SCDLP 培地に回収後、CRFK 細胞に接種してウイルス感染価を決定した。(n=1)

▨ : 拭き終わり箇所② ■ : 拭き始め箇所③ ▩ : 拭き終わり箇所④

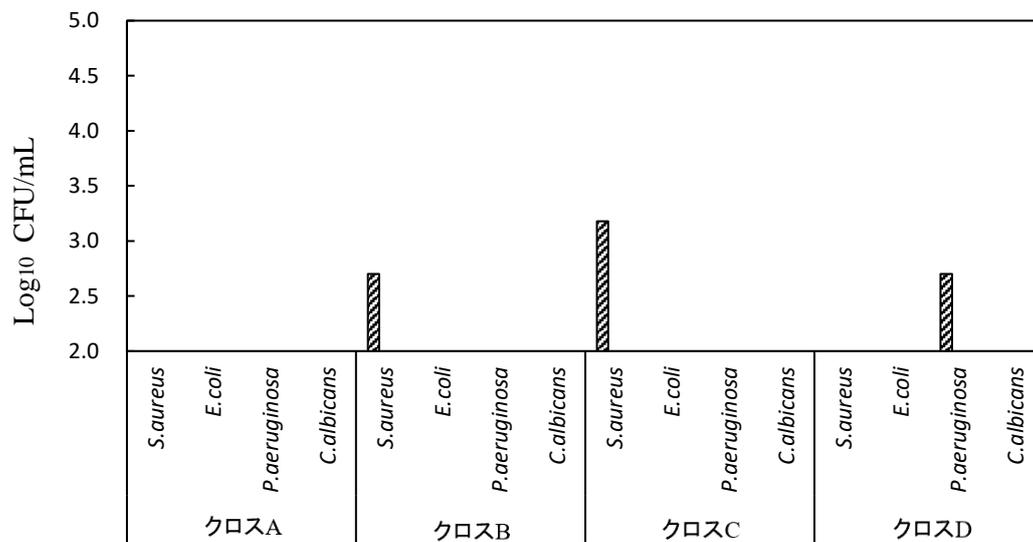


図9 BZC水溶液含浸クロスを用いた再付着の比較

ステンレス板上の試験領域（30 mm×30 mm）に約 10^8 CFU/mL に調整した血液含有菌懸濁液 10 μ L を 4 か所に塗布、自然乾燥させた後、水含浸クロスにて清拭後、拭き終わり箇所②と清潔ステンレス板の拭き始め箇所③、拭き終わり箇所④より滅菌綿棒で拭い取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。（n=1）

▨ : 拭き終わり箇所② ■ : 拭き始め箇所③ ▩ : 拭き終わり箇所④

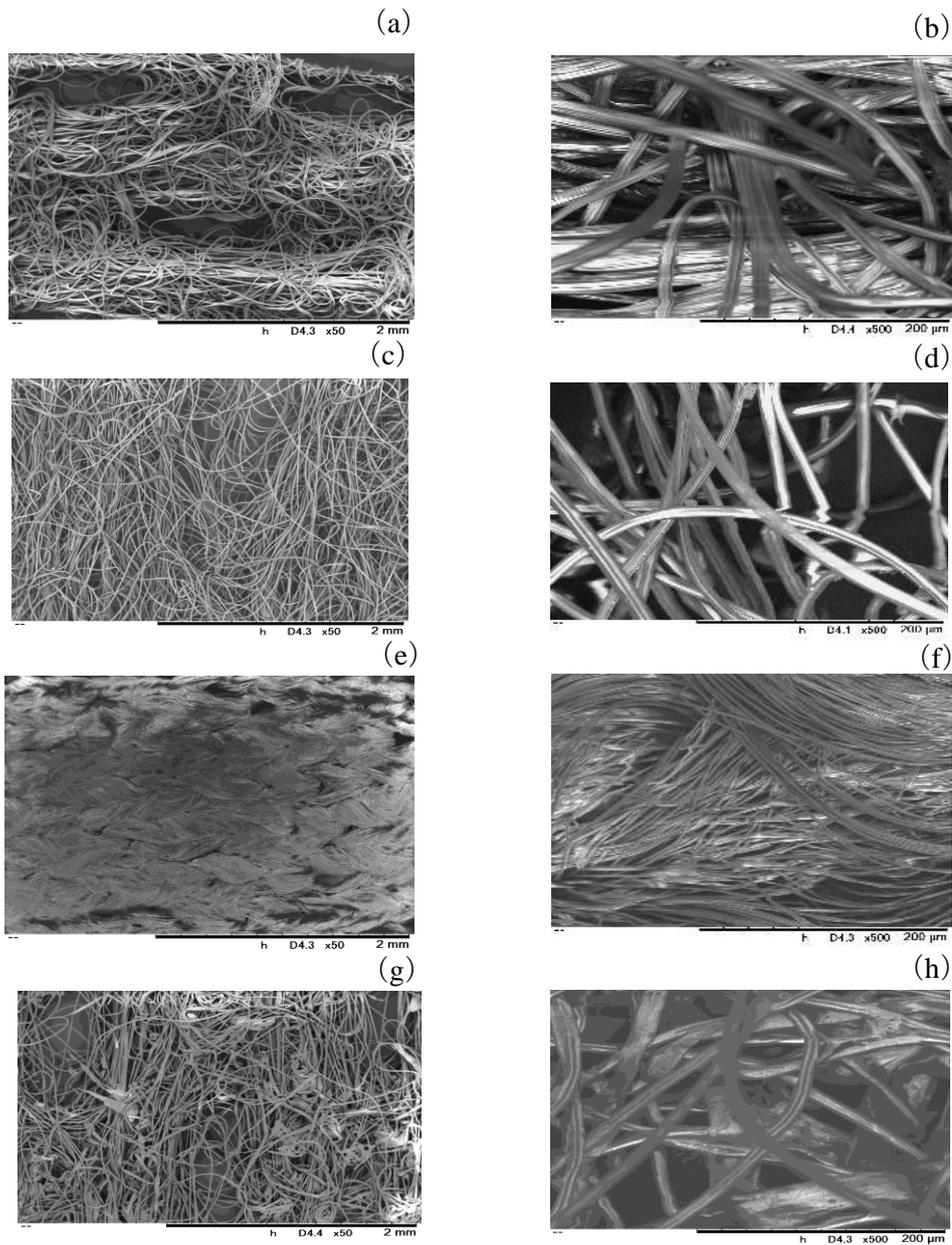


図 10 クロスの表面 SEM 画像

- (a) クロス A : レーヨン (50 倍)
- (b) クロス A : レーヨン (500 倍)
- (c) クロス B : レーヨン+ポリエチレン (50 倍)
- (d) クロス B : レーヨン+ポリエチレン (500 倍)
- (e) クロス C : マイクロファイバー (50 倍)
- (f) クロス C : マイクロファイバー (500 倍)
- (g) クロス D : パルプ+ポリエステル (50 倍)
- (h) クロス D : パルプ+ポリエステル (500 倍)

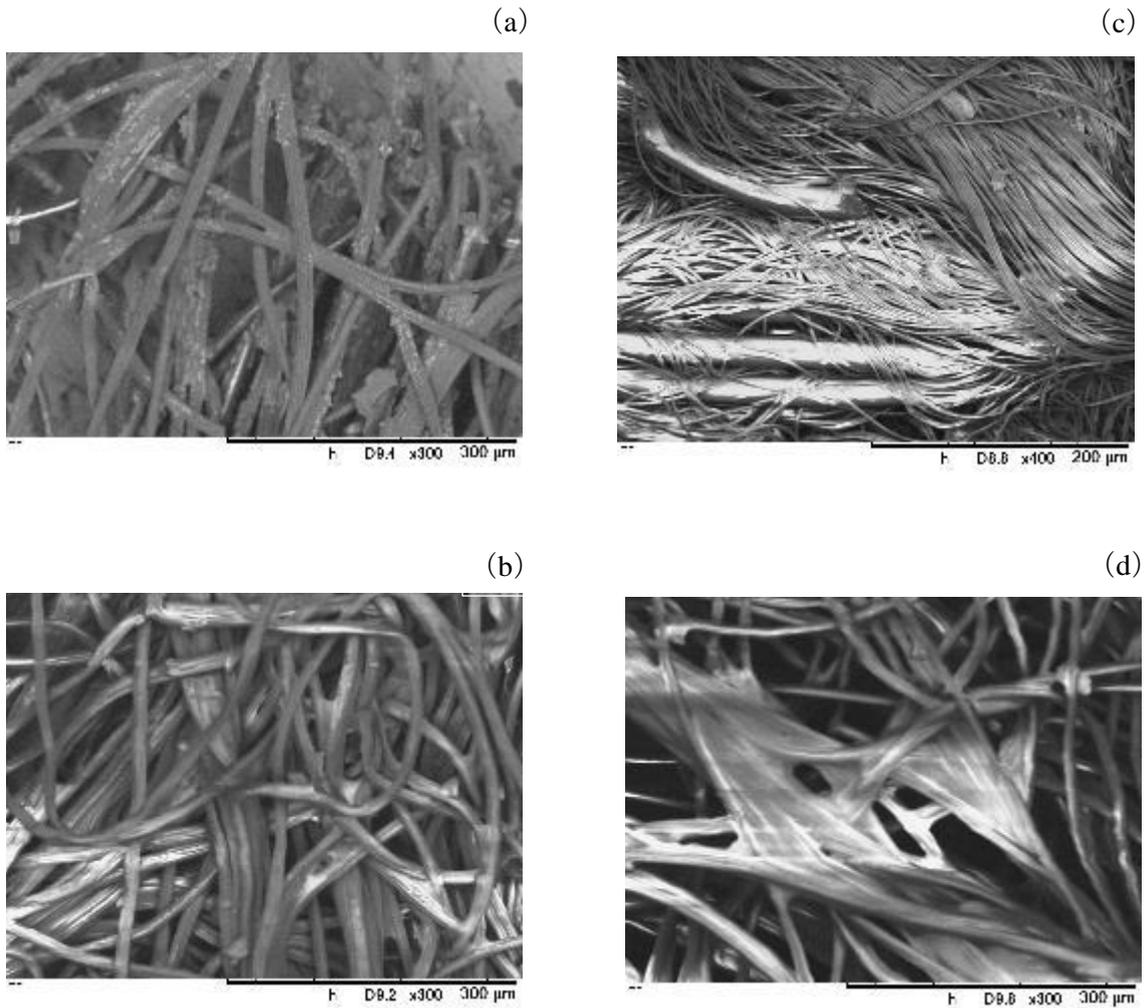


図 11 拭き取り後のクロス表面の SEM 画像

約 10^7 beads/mL に調整した蛍光マイクロスフェア液 $3 \mu\text{L}$ をステンレス円盤上に塗布・乾燥させた箇所を水含浸クロスで一方向に一回、1 秒間かけて拭き取りした。

24 時間乾燥させた後、クロス表面を SEM 観察した

- (a) クロス A : レーヨン (300 倍)
- (b) クロス B : レーヨン+ポリエチレン (300 倍)
- (c) クロス C : マイクロファイバー (200 倍)
- (d) クロス D : パルプ+ポリエステル (300 倍)

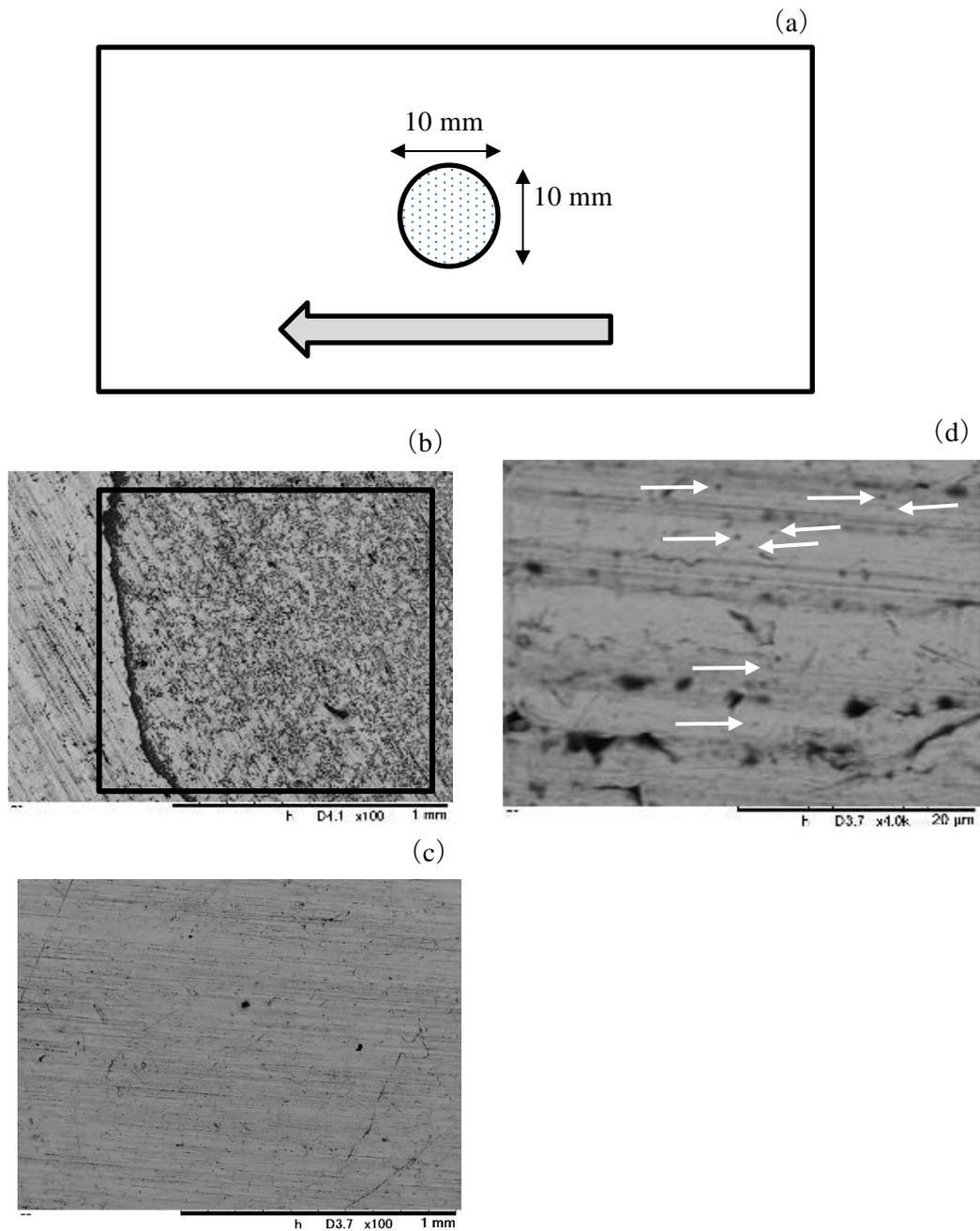


図 12 拭き取り前後でのステンレス円盤上の表面 SEM 画像

(a) ステンレス円盤上の拭き取り経路

約 10^7 beads/mL に調整した蛍光マイクロスフェア液 $3 \mu\text{L}$ をステンレス板上に塗布・乾燥させた箇所を水含浸クロスで一方向に一回、1 秒間かけて拭き取りした。

⊙: 蛍光マイクロスフェア塗布範囲

(b) 拭き取り前のステンレス円盤上表面の SEM 画像 (100 倍)

□: 蛍光マイクロスフェア画像

(c) 拭き取り後のステンレス円盤上表面の SEM 画像 (100 倍)

(d) 拭き取り後のステンレス円盤上表面の SEM 画像 (4000 倍)

⇒•: 蛍光マイクロスフェア画像

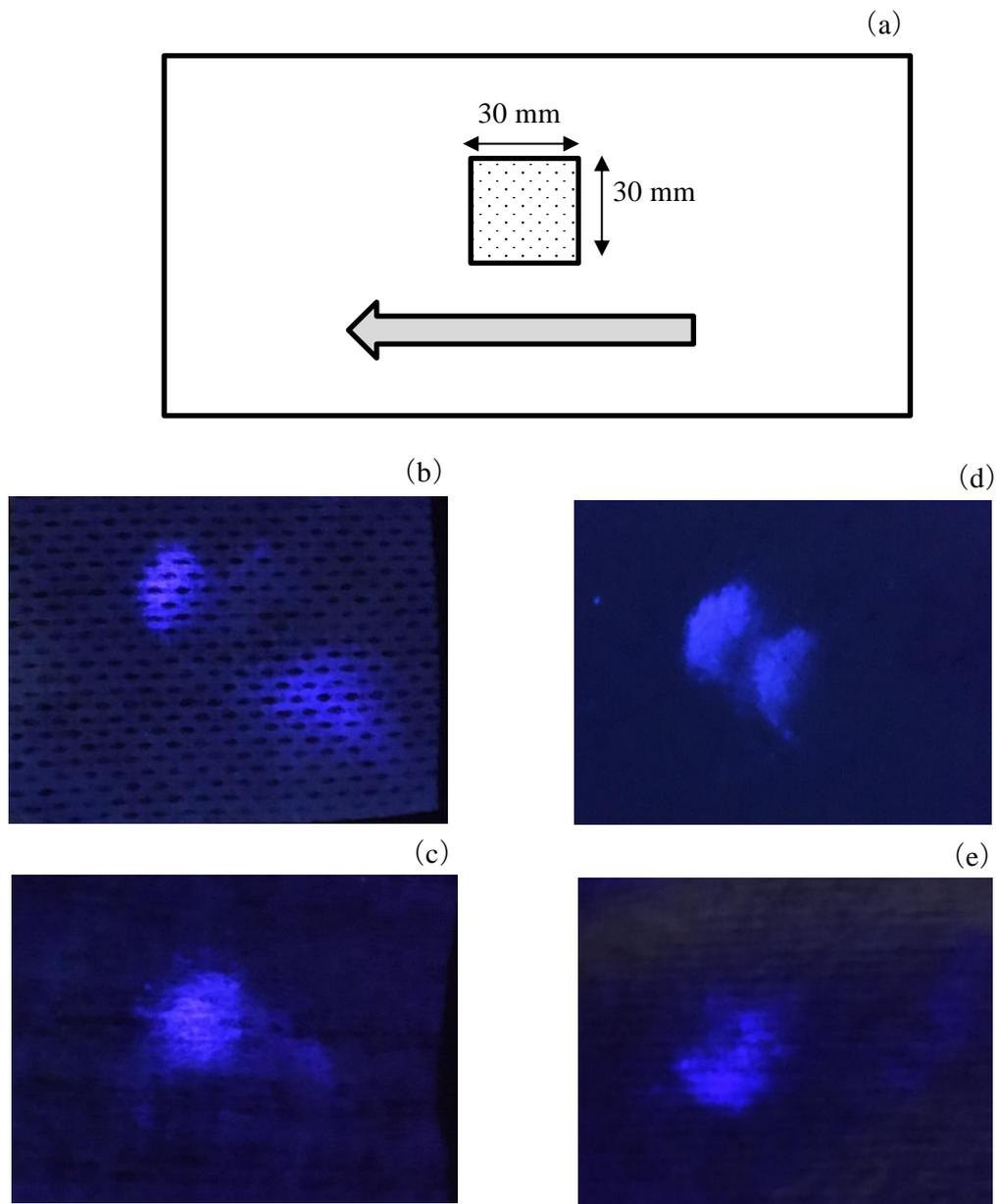


図 13 紫外線ランプを用いた拭き取り後のクロス表面写真

(a) 蛍光マイクロスフェアの拭き取り経路

約 10^7 beads/mL に調整した蛍光マイクロスフェア液 $10 \mu\text{L}$ を試験領域 ($30 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$) に塗布・乾燥させた箇所を水含浸クロスで一方向に一回、1 秒間かけて拭き取りした。

24 時間乾燥させた後、クロス表面を紫外線照射にて観察した。

矢印：拭き取り経路

四角形：蛍光マイクロスフェア塗布範囲 ($30 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$)

(b) クロス A：レーヨン

(c) クロス B：レーヨン+ポリエチレン

(d) クロス C：マイクロファイバー

(e) クロス D：パルプ+ポリエステル

表

表1 拭き取りクロス素材への薬剤吸着濃度変化

浸漬したクロスの枚数	クロス A	クロス B	クロス C	クロス D
5 枚	0.18% (92.3%)	0.19% (94.0%)	0.19% (97.2%)	0.19% (94.0%)
10 枚	0.18% (90.7%)	0.19% (94.0%)	0.19% (99.0%)	0.19% (93.6%)
25 枚	0.16% (84.3%)	0.18% (92.3%)	0.20% (100.0%)	0.18% (92.9%)
50 枚	0.15% (74.7%)	0.18% (90.4%)	0.20% (100.0%)	0.18% (88.9%)

()内は、初期濃度に対する残存率

0.2% BZC 水溶液 20 mL に 10 mm×10 mm のクロスを指定枚数浸漬させ、室温、遮光下閉鎖系で 3 か月間保管した。攪拌後の上清の吸光度から BZC 水溶液の濃度を算出した。

クロス A：レーヨン（10 mm×10 mm に裁断したクロス 1 枚の重さ：7.34 mg）

クロス B：レーヨン+ポリエチレン（10 mm×10 mm に裁断したクロス 1 枚の重さ：3.34 mg）

クロス C：マイクロファイバー（10 mm×10 mm に裁断したクロス 1 枚の重さ：14.90 mg）

クロス D：パルプ+ポリエステル（10 mm×10 mm に裁断したクロス 1 枚の重さ：4.62 mg）

表 2 試験担体上に残存する試験領域当たりの BZC 残存量

クロス	クロス A	クロス B	クロス C	クロス D
BZC 残存量	1.5 mg	1.2 mg	2.8 mg	1.4 mg

0.2% BZC 水溶液 500 μL を 50 mm \times 50 mm のクロスに含浸させ、ステンレス板上の試験領域 (30 mm \times 30 mm) に接触後、クロスを取り除き、MilliQ 水 200 μL で残存する BZC を回収した。この操作を 10 回行い、合計 2000 μL から BZC 濃度を求め、試験担体領域内の BZC 残存量を算出した。

クロス A : レーヨン (50 mm \times 50 mm に裁断したクロス 1 枚の重さ : 16.0 mg)

クロス B : レーヨン+ポリエチレン (50 mm \times 50 mm に裁断したクロス 1 枚の重さ : 86.0 mg)

クロス C : マイクロファイバー (50 mm \times 50 mm に裁断したクロス 1 枚の重さ : 469.0 mg)

クロス D : パルプ+ポリエステル (50 mm \times 50 mm に裁断したクロス 1 枚の重さ : 100.0 mg)

表 3 菌懸濁液と接触 10 秒後に検出限界以下となる BZC 最小濃度 (n=3)

	菌名	BZC 濃度 (%)
グラム陽性菌	<i>S. aureus</i> ATCC25923	0.005
	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	0.01
	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	0.01
グラム陰性菌	<i>E. coli</i> ATCC25922	0.005
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0.005
真菌	<i>C. albicans</i> ATCC10231	0.01

約 10^8 CFU/mL に調整した菌懸濁液 100 μ L を BZC 水溶液 900 μ L と混合して 10 秒後の生菌数を測定し、検出限界以下となった BZC 水溶液の濃度を示した。(n=3)

表 4 菌懸濁液と接触 10 分間で殺菌効果が認められない BZC 最大濃度

	菌名	BZC 濃度 (%)
グラム陽性菌	<i>S. aureus</i> ATCC25923	0.0001
	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	0.0001
	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	0.0005
グラム陰性菌	<i>E. coli</i> ATCC25922	0.0001
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0.0005
真菌	<i>C. albicans</i> ATCC10231	0.001

約 10^8 CFU/mL に調整した菌懸濁液 100 μ L を BZC 水溶液 900 μ L と混合して 10 分後の生菌数を測定し、検出限界以下とならなかった BZC 水溶液の最低濃度を示した。(n=3)

表 5 乾燥菌体に対する 0.2%BZC 水溶液の殺菌効果

血液	接触時間	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>C. albicans</i> ATCC10231
無	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
有	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00

(Log₁₀CFU/mL)

ステンレス板の試験担体領域 (30 mm×30 mm) に約 10⁸ CFU/mL に調整した菌懸濁液または血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、0.2 % BZC 水溶液 500 μL を接触後、試験担体より滅菌綿棒で拭い取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。(n=3)
<2.00 は検出限界以下を示す

表 6 *S. aureus* の乾燥菌体を用いた 0.2%BZC 水溶液含浸クロス of 殺菌効果

試験方法	血液	接触時間	クロス A	クロス B	クロス C	クロス D
1	無	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	有	10sec	3.83±0.05	5.34±0.07	5.54±0.05	5.59±0.06
		30sec	3.41±0.14	5.18±0.16	5.34±0.17	5.34±0.03
		60sec	2.79±0.09	4.26±0.19	5.08±0.06	5.08±0.06
2	無	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	有	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00

(Log₁₀ CFU/mL)

ステンレス板の試験担体領域 (30 mm×30 mm) に約 10⁷ CFU/mL に調整した菌懸濁液または血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、以下に示す試験方法 1 または 2 でクロスを接触後、試験担体より滅菌綿棒で拭い取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。(n=3)

試験の繰り返し回数は 3 回とし、平均値と標準偏差を求めた (mean±SD)

試験方法 1: 乾燥菌体に BZC 水溶液含浸クロスを接触させた

試験方法 2: 乾燥クロスで乾燥菌体を覆い BZC 水溶液を塗布した

<2.00 は検出限界以下を示す

クロス A: レーヨン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス B: レーヨン+ポリエチレン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス C: マイクロファイバー (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス D: パルプ+ポリエステル (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

表7 *S. epidermidis* の乾燥菌体を用いた 0.2%BZC 水溶液含浸クロスでの殺菌効果

試験方法	血液	接触時間	クロス A	クロス B	クロス C	クロス D
1	無	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	2.30±0.83
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	有	10sec	4.28±0.16	2.30±0.15	2.60±0.08	5.45±0.07
		30sec	<2.00	<2.00	2.60±0.06	4.88±0.06
		60sec	<2.00	<2.00	2.12±0.08	4.04±1.04
2	無	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	有	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00

(Log₁₀ CFU/mL)

ステンレス板の試験担体領域 (30 mm×30 mm) に約 10⁷ CFU/mL に調整した菌懸濁液または血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、以下に示す試験方法 1 または 2 でクロスに接触後、試験担体より滅菌綿棒で拭き取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。(n=3)

試験の繰り返し回数は 3 回とし、平均値と標準偏差を求めた (mean±SD)

試験方法 1: 乾燥菌体に BZC 水溶液含浸クロスに接触させた

試験方法 2: 乾燥クロスで乾燥菌体を覆い BZC 水溶液を塗布した

<2.00 は検出限界以下を示す

クロス A: レーヨン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス B: レーヨン+ポリエチレン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス C: マイクロファイバー (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス D: パルプ+ポリエステル (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

表 8 *E. faecalis* の乾燥菌体を用いた 0.2%BZC 水溶液含浸クロスでの殺菌効果

試験方法	血液	接触時間	クロス A	クロス B	クロス C	クロス D
1	無	10sec	<2.00	2.30±0.04	2.12±0.11	2.57±0.09
		30sec	<2.00	2.07±0.05	2.41±0.19	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	2.41±0.19	<2.00
	有	10sec	4.28±0.16	2.30±0.15	2.60±0.08	5.45±0.07
		30sec	5.64±0.05	5.71±0.08	5.51±0.12	4.04±1.04
		60sec	4.95±0.03	4.88±0.09	4.90±0.04	2.12±0.09
2	無	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	有	10sec	<2.00	5.38±0.08	5.85±0.05	<2.00
		30sec	<2.00	4.93±0.03	4.30±0.04	<2.00
		60sec	<2.00	4.68±0.07	4.26±0.04	<2.00

(Log₁₀ CFU/mL)

ステンレス板の試験担体領域 (30 mm×30 mm) に約 10⁷ CFU/mL に調整した菌懸濁液または血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、以下に示す試験方法 1 または 2 でクロスに接触後、試験担体より滅菌綿棒で拭き取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。(n=3)

試験の繰り返し回数は 3 回とし、平均値と標準偏差を求めた (mean±SD)

試験方法 1: 乾燥菌体に BZC 水溶液含浸クロスに接触させた

試験方法 2: 乾燥クロスで乾燥菌体を覆い BZC 水溶液を塗布した

<2.00 は検出限界以下を示す

クロス A: レーヨン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス B: レーヨン+ポリエチレン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス C: マイクロファイバー (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス D: パルプ+ポリエステル (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

表9 *E. coli* の乾燥菌体を用いた 0.2%BZC 水溶液含浸クロスでの殺菌効果

試験方法	血液	接触時間	クロス A	クロス B	クロス C	クロス D
1	無	10sec	<2.00	2.40±0.07	2.30±0.04	2.48±0.02
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	有	10sec	5.49±0.12	4.43±0.07	5.45±0.05	5.65±0.04
		30sec	4.36±0.08	4.36±0.06	4.43±0.07	5.45±0.13
		60sec	4.41±0.06	4.12±1.08	4.21±1.12	5.23±1.60
2	無	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	有	10sec	<2.00	2.85±0.03	4.49±0.17	4.74±0.10
		30sec	<2.00	2.12±0.06	3.35±0.72	3.32±0.08
		60sec	<2.00	2.58±0.34	2.30±0.19	2.88±0.02

(Log₁₀ CFU/mL)

ステンレス板の試験担体領域 (30 mm×30 mm) に約 10⁷ CFU/mL に調整した菌懸濁液または血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、以下に示す試験方法 1 または 2 でクロスに接触後、試験担体より滅菌綿棒で拭き取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。(n=3)

試験の繰り返し回数は 3 回とし、平均値と標準偏差を求めた (mean±SD)

試験方法 1: 乾燥菌体に BZC 水溶液含浸クロスに接触させた

試験方法 2: 乾燥クロスで乾燥菌体を覆い BZC 水溶液を塗布した

<2.00 は検出限界以下を示す

クロス A: レーヨン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス B: レーヨン+ポリエチレン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス C: マイクロファイバー (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス D: パルプ+ポリエステル (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

表 10 *P. aeruginosa* の乾燥菌体を用いた 0.2%BZC 水溶液含浸クロスの殺菌効果

試験方法	血液	接触時間	クロス A	クロス B	クロス C	クロス D
1	無	10sec	3.21±0.65	2.26±0.18	2.12±0.08	2.64±0.37
		30sec	2.73±0.41	2.34±0.31	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	2.22±0.22	<2.00	<2.00
	有	10sec	5.51±0.05	4.77±1.80	5.73±1.24	5.64±0.12
		30sec	5.29±1.63	4.65±0.04	5.72±1.50	5.43±0.08
		60sec	4.59±0.05	4.08±1.06	4.54±0.08	4.45±0.13
2	無	10sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		30sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	有	10sec	<2.00	4.40±0.07	3.65±0.23	3.65±0.24
		30sec	<2.00	2012±0.08	2.22±0.22	2.37±1.04
		60sec	<2.00	<2.00	<2.00	2.22±1.04

(Log₁₀ CFU/mL)

ステンレス板の試験担体領域 (30 mm×30 mm) に約 10⁷ CFU/mL に調整した菌懸濁液または血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、以下に示す試験方法 1 または 2 でクロスを接触後、試験担体より滅菌綿棒で拭い取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。(n=3)

試験の繰り返し回数は 3 回とし、平均値と標準偏差を求めた (mean±SD)

試験方法 1: 乾燥菌体に BZC 水溶液含浸クロスを接触させた

試験方法 2: 乾燥クロスで乾燥菌体を覆い BZC 水溶液を塗布した

<2.00 は検出限界以下を示す

クロス A: レーヨン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス B: レーヨン+ポリエチレン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス C: マイクロファイバー (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス D: パルプ+ポリエステル (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

表 11 *C. albicans* の乾燥菌体を用いた 0.2%BZC 水溶液含浸クロスでの殺菌効果

試験方法	血液	接触時間	クロス A	クロス B	クロス C	クロス D
1	無	10sec	3.78±0.03	4.49±0.17	4.34±0.04	4.49±1.18
		30sec	3.30±1.17	3.28±0.15	3.01±1.56	3.81±0.09
		60sec	2.63±0.33	4.26±1.20	< 2.00	2.48±0.07
	有	10sec	4.95±0.01	4.95±1.84	5.97±1.10	5.23±0.20
		30sec	4.90±1.02	4.94±1.14	4.81±0.81	4.41±0.06
		60sec	4.70±0.06	4.72±1.19	4.59±0.88	4.40±0.13
2	無	10sec	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00
		30sec	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00
		60sec	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00
	有	10sec	3.78±0.07	4.36±0.13	3.18±0.10	4.98±0.01
		30sec	3.45±0.88	4.36±1.13	2.22±1.22	4.54±0.10
		60sec	3.30±1.11	4.20±1.10	< 2.00	4.38±0.10

(Log₁₀ CFU/mL)

ステンレス板の試験担体領域 (30 mm×30 mm) に約 10⁷ CFU/mL に調整した菌懸濁液または血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、以下に示す試験方法 1 または 2 でクロスに接触後、試験担体より滅菌綿棒で拭き取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。(n=3)

試験の繰り返し回数は 3 回とし、平均値と標準偏差を求めた (mean±SD)

試験方法 1: 乾燥菌体に BZC 水溶液含浸クロスに接触させた

試験方法 2: 乾燥クロスで乾燥菌体を覆い BZC 水溶液を塗布した

< 2.00 は検出限界以下を示す

クロス A: レーヨン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス B: レーヨン+ポリエチレン (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス C: マイクロファイバー (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

クロス D: パルプ+ポリエステル (50 mm×50 mm に裁断したクロス)

表 12 血液含有乾燥菌体に対する水含浸クロスと BZC 水溶液含浸クロスの拭き取り比較

クロス	菌種	水	BZC
クロス A	<i>S. aureus</i> ATCC12228	3.17	<2.00
	<i>E. coli</i> ATCC25922	3.54	5.71
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	5.30	5.00
	<i>C. albicans</i> ATCC10231	4.17	<2.00
クロス B	<i>S. aureus</i> ATCC12228	5.70	<2.00
	<i>E. coli</i> ATCC25922	<2.00	<2.00
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	3.17	3.18
	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<2.00	<2.00
クロス C	<i>S. aureus</i> ATCC12228	5.25	<2.00
	<i>E. coli</i> ATCC25922	3.00	3.18
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<2.00	<2.00
	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<2.00	<2.00
クロス D	<i>S. aureus</i> ATCC12228	5.17	3.40
	<i>E. coli</i> ATCC25922	7.57	<2.00
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	5.40	2.70
	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<2.00	<2.00

(Log₁₀CFU/mL)

ステンレス板の試験領域 4 か所 (1 か所 : 30 mm×30 mm) に約 10⁸CFU/mL に調整した血液含有菌懸濁液 10 μL を塗布、自然乾燥させた後、水含浸クロスと BZC 水溶液含浸クロスにて清拭後、拭き終わり箇所②を滅菌綿棒で拭き取り、SCDLP 培地に回収して生菌数を計測した。(n=1)

< 2.00 は検出限界以下を示す

表 13 乾燥ウイルスに対する BZC 水溶液含浸クロスの拭き取り試験

	拭き終わり箇所②	拭き始め箇所③	拭き終わり箇所④
クロス A	4.0	<2.5	<2.5
クロス B	3.2	<2.5	<2.5
クロス C	<2.5	<2.5	<2.5
クロス D	4.3	5.0	4.3

(LogTCID₅₀/mL)

ステンレス板の試験担体領域 (30 mm×30 mm) にウイルス感染価 5.6 LogTCID₅₀/mL に調整したウイルス液 10 μL を 4 か所に塗布、自然乾燥させた後、BZC 水溶液含浸クロスにて清拭後、拭き終わり箇所②と清潔ステンレス板上の拭き始め箇所③、拭き終わり箇所④より滅菌綿棒で拭い取り、SCDLP 培地に回収後、CRFK 細胞に接種してウイルス感染価を決定した。(n=1)

<2.5 は検出限界以下を示す

Abstract

Experimental studies on microbial dynamics in environmental cleaning

Shigemasa Katafuchi

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

BACKGROUND

EPA-approved benzalkonium chloride impregnated non-woven cloths are widely used for wiping in medical environments. However, disinfectant adsorption to the cloth material is a problem. In recent years, the use of microfiber cloths combined with water only has been attracting attention, but it has been reported to reattach bacteria. Details of appropriate environmental cleaning methods remain unclear.

OBJECTIVE

The purpose of this study was to clarify an appropriate environmental cleaning method for blocking contact transmission from pathogenic microorganisms in the medical environment to humans. Three types of non-woven and microfiber cloths, which are commonly used as materials for cleaning cloths, and BZC will be used as disinfectants to verify the wiping effect and reattachment against common bacteria, fungi, spores, and viruses. For the transfer experiment, the used wipe was used to wipe a clean surface immediately after the initial wiping.

METHODS

Adsorption on the cloth and residual amount in the test area were calculated using 0.2% BZC solution on three types of nonwoven and microfiber cloths. We verified the bactericidal effect of BZC on bacteria *in vitro* and clarified the effect of the presence or absence of the cloth. In the wiping effect and reattachment test, the test area was swept after the blood bacterial suspension or virus solution was applied and dried. Using the surface structure of the cleaning cloth and the fluorescent microspheres, we observed the residual state and removal behavior of the fluorescent microspheres on the stainless-steel plate.

RESULT

Even in the presence of blood, 0.2% BZC solution showed an immediate bactericidal effect. No significant decrease in drug concentration was observed in the drug adsorption test. BZC-impregnated cloths showed a bactericidal effect suggesting that the clothes need to be in contact with the bacteria. In the wiping test, a large number of bacteria were detected on the water-impregnated cloths. BZC-impregnated cloths showed fewer residual

bacteria and fewer spreading of bacteria on the cloths. In SEM observation, fluorescence from fluorescent microspheres was observed on the wiped surface of the cloth along the wiping direction. Fluorescent microspheres were concentrated in the center of the cloth.

CONCLUSION

The use of microfiber cloths in combination with low-level disinfectants is effective as a new method of environmental cleaning because it has the highest removal effect and the least recontamination.