

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

消毒用エタノールの代替アルコールの探索と
細胞形態変化による偏性細胞内寄生細菌の
新規判別法の検討

2021 年度入学

2025 年 3 月 12 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 HD021001 氏名 小武海 麻衣

研究指導教員 松村 有里子

副研究指導教員 岩澤 篤郎、森屋 恭爾

論文題目	消毒用エタノールの代替アルコールの探索と細胞形態変化による偏性細胞内寄生細菌の新規判別法の検討
氏名	小武海 麻衣
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 感染制御学
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

消毒用エタノールの代替アルコールの探索と細胞形態変化による偏性細胞内寄生細菌の新規判別法の検討

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 HD021001

氏名 小武海 麻衣

背景 (Background)

新興・再興感染症の世界的な流行によりアルコール消毒薬が逼迫したことから、エタノール (Ethanol: EtOH) やイソプロパノール (2-Propanol: 2-PrOH) に代替可能なアルコールの探索と、感染源の同定を早期に行い、薬剤耐性菌の同時検出も可能となる新たな判定方法が望まれる。

目的 (Objective)

細菌、酵母様真菌、非結核性抗酸菌、細菌芽胞、およびウイルスを用いてアルコールの効果を網羅的に検討し、アルコール消毒薬に代替可能なアルコールを探索した。また、実験的研究におけるクラミジア感染の判定を簡素化、およびクラミジア耐性菌の検出方法の検討を行った。

方法 (Methods)

常温で保管できる 14 種のアルコールと一般細菌 8 種 9 株、酵母様真菌 1 株、皮膚糸状菌 2 株、非結核性抗酸菌 2 株、細菌芽胞 1 株、およびノンエンベロープウイルス 3 種 3 株、エンベロープウイルス 2 種 4 株を用いて *in vitro* 殺菌・ウイルス不活化試験を実施し、生菌数およびウイルス感染価を算出した。一般細菌は $LR \geq 5$ 、ウイルスは $LR \geq 3$ を満たすことで殺菌および抗ウイルス効果を判定した。クラミジア感染細胞をギムザ染色し、時系列で形態の変化を比較しクラミジア感染の有無を判定した。

結果 (Results)

殺菌試験に用いたアルコール濃度の中で最も低い終濃度である 18 w/w%と 10 秒間の作用時間で、1-ブタノール (1-Butanol: 1-BuOH) が微生物種 9 株すべてに対して殺菌効果を示した。次いで 2-ブタノール (2-Butanol: 2-BuOH) がグラム陽性菌 2 株を除く 7 株、1-プロパノール (1-Propanol: 1-PrOH) が *E. faecalis* とグラム陰性菌および酵母様真菌 4 株、2-PrOH が *E. hirae* の 1 株、*tert*-Butanol (*t*-BuOH)

が *E. coli* の 1 株に対して、それぞれ殺菌効果を示した。ノンエンベロープウイルスは 10 秒間の作用時間で炭素原子数が 1-3 つの MeOH、EtOH および 1-PrOH のみが不活化効果を示し、1 分間の作用時間になると *t*-BuOH 以外のアルコールで $LR \geq 3$ を満たす不活化効果が認められた。エンベロープウイルスは 10 秒間の作用時間ですべてのアルコールに対し $LR \geq 3$ を満たす不活化効果を示した。1-PrOH は MRSA に対して、殺菌を示すアルコール濃度が異なることが明らかとなった。クラミジア感染細胞の形態変化とクラミジア増殖環と比較し、目視にて判別可能な細胞の形態学的変化は 72 時間後に起こることが明らかとなり、感染の判定に顕微鏡画像の活用が可能であることが明らかとなった。また培養系内に抗菌薬を共存することでクラミジア耐性菌の検出が可能となることが示唆された。

結論 (Conclusions)

殺菌およびウイルス不活化効果が認められた 1-PrOH は、薬剤耐性菌に対する殺菌効果のさらなる検討を要するため、EtOH と 2-PrOH の代替として提案するには至らなかった。クラミジア検出の簡便な方法を明らかにしたことに加えて、薬剤耐性菌の検出への応用はクラミジア感染症蔓延の抑止となることが期待される。

キーワード (Key Words)

アルコール (Alcohols)、殺菌作用 (Bactericidal action)、ウイルス不活性化 (Virus inactivation)、クラミジア感染症 (*Chlamydia trachomatis* infection)、薬剤耐性菌 (Antimicrobial resistant bacteria)

目次

第1章 序章.....	1
第2章 微生物に対する各種アルコールの効果.....	2
2.1 背景.....	2
2.2 実験方法.....	2
2.2.1 供試アルコール.....	2
2.2.2 供試微生物.....	3
2.2.3 一般細菌に対する殺菌試験法.....	3
2.2.4 真菌に対する殺菌試験法.....	3
2.2.5 非結核性抗酸菌に対する殺菌試験法.....	3
2.2.6 細菌芽胞に対する殺菌試験法.....	4
2.2.7 MRSA に対する殺菌試験法.....	4
2.2.8 ウイルス不活化試験法.....	4
2.2.9 判定基準.....	4
2.3 結果.....	5
2.3.1 MeOH の殺菌結果.....	5
2.3.2 EtOH の殺菌結果.....	5
2.3.3 1-PrOH の殺菌結果.....	5
2.3.4 2-PrOH の殺菌結果.....	5
2.3.5 1-BuOH の殺菌・殺芽胞結果.....	5
2.3.6 2-BuOH の殺菌結果.....	6
2.3.7 <i>t</i> -BuOH の殺菌結果.....	6
2.3.8 各種アルコールの <i>S. aureus</i> に対する殺菌結果.....	6
2.3.9 MRSA の殺菌結果.....	7
2.3.10 MeOH のウイルス不活化結果.....	7
2.3.11 EtOH のウイルス不活化結果.....	7
2.3.12 1-PrOH のウイルス不活化結果.....	7
2.3.13 2-PrOH のウイルス不活化結果.....	8
2.3.14 1-BuOH のウイルス不活化結果.....	8
2.3.15 2-BuOH のウイルス不活化結果.....	8

2.3.16 <i>t</i> -BuOH のウイルス不活化結果.....	8
2.4 考察.....	9
2.5 表	13
2.6 図	24
第3章 <i>Chlamydia trachomatis</i> の細胞形態変化による感染の判定と耐性菌検出に関する検討.....	24
3.1 方法.....	37
3.1.1 供試菌株と宿主細胞.....	37
3.1.2 実験方法.....	37
3.2 結果.....	37
3.2.1 各培養時間における顕微鏡画像.....	37
3.2.2 各培養時間における細胞の面積.....	38
3.2.3 各培養時間における細胞の長辺と短辺	38
3.3 考察.....	38
3.4 図	42
第4章 結論.....	48
謝辞.....	49
引用文献	50
Abstract.....	53

第1章 序章

感染症は、感染経路、感染源、宿主の3つの要因が揃うことで成立することから、これらのうち少なくともひとつを無効にする感染対策と、宿主となる感染症患者に対する治療を迅速に開始するため起因微生物の同定を早期に行うことが重要である。感染経路のうち、接触感染は院内感染の最も主要な感染経路の一つである。医療従事者の手指は患者のケアや処置により病原体に汚染される機会が多く、手指や高頻度接触面を介して病原体を伝播させてしまうため、手指衛生と環境整備を適切に行う必要がある。アルコール消毒薬を用いた手指衛生は安価で簡便に行うことが出来るため、日常生活や病院内の感染対策に広く用いられている。手指消毒には、主にエタノール (Ethanol: EtOH) を主成分とする消毒用エタノールや、イソプロパノール (2-Propanol: 2-PrOH) の消毒薬が使用されている。日本薬局方では消毒用エタノール[®]の有効濃度は76.9 - 81.4 w/v%¹⁾、2-PrOHの有効濃度は50 - 70%²⁾と定められている。これまでにアルコールによる殺菌の先行研究では、EtOH と 2-PrOH に加えて60 - 70%濃度の1-プロパノール (1-Propanol: 1-PrOH) が殺菌の有効成分であることが European Chemicals Agency (ECHA) の化学物質に関するデータベースに記載され³⁾、1-ブタノール (1-Butanol: 1-BuOH) が *Staphylococcus aureus*⁴⁾ と *Escherichia coli*⁴⁾ および9種類の酵母⁵⁾ に対して殺菌効果を有することが報告されている。アルコールは、構成元素である炭素原子の数とヒドロキシ基の結合位置の違いにより多くの種類が存在し、常温で保存できる液体のアルコールは約20種類あり、これまでにごく一部のアルコールの殺菌効果しか明らかにされていない。2019年から世界的に流行した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) により、医療関連施設に加えて日常生活においても消毒用エタノールが使用され、市場では消毒用エタノールが逼迫する事態に陥った。日本でも消毒薬メーカーに加えて酒造メーカーが臨時的かつ時限的にアルコール消毒薬を製造販売する事態となった。新興感染症や再興感染症の流行時に備え、EtOH や 2-PrOH に代替可能なアルコールの探索が求められる。そこで、常温で保管が可能な液体のアルコールの殺菌スペクトルを明らかにすることが必要であると考えられる。

一方、起因微生物の早期同定について、質量分析装置による微生物同定が普及したことで多くの病原菌に対して迅速同定が行われている。近年、増加傾向にあるクラミジア感染検査は、安価で1日以内に判別可能な抗原検査や、核酸増幅法 (Polymerase Chain Reaction: PCR 検査) が用いられている。*Chlamydia trachomatis* (以下、クラミジア) によるクラミジア感染症は、無症候感染者を発見することが感染拡大を防止する上で重要であるが、薬剤耐性菌の存在が懸念されており、簡便に薬剤感受性試験が行える新たな検査方法が望まれる。クラミジアは細胞内寄生菌であり、宿主細胞に感染すると増殖とともにその形態を変化させ、クラミジア特有の封入体の観察により細胞内寄生菌の有無を判別することが可能である。

第2章では感染の伝播を遮断するため14種類のアルコールと病原微生物である細菌、酵母様真菌、非結核性抗酸菌、細菌芽胞、およびウイルスを用いてアルコールの効果を明らかにすることで、病原微生物に対するアルコールの効果を網羅的に検討した。そして、新興・再興感染症の世界的な流行によるアルコール消毒薬の逼迫に備えるため、アルコール消毒薬に代替可能なアルコールを探索した。さらに、アルコールの親疎水性や、炭素原子数およびヒドロキシ基の結合位置とその数に関するアルコールの化学的性質が殺菌、殺芽胞およびウイルス不活性化効果 (以下、ウイルス不活化効果) に及ぼす影響を検討した。第3章では、感染源の同定を簡便に行う方法として、実験的研究におけるクラミジア感染の判定を簡素化と、クラミジア耐性菌の検出方法の探索を行った。第4章では以上の内容を総括し、今後の感染対策における展望を述べた。

第2章 微生物に対する各種アルコールの効果

2.1 背景

感染症の要因である感染経路、感染源、宿主のうち、感染経路の遮断に関する検討としてアルコールによる殺菌に着目した。アルコールの殺菌効果に関する先行研究は、1980 年から 1990 年代にかけて EtOH の抗菌作用や塩化ベンザルコニウムの添加された手指消毒薬の効果などについて活発に研究され、原著論文⁶⁻¹⁰⁾としての報告も多く存在している。アメリカ疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) より 2002 年に出された医療機関における手指衛生のガイドラインによると、目に見えて手指が汚れていない場合はアルコールベースの消毒薬を用いた殺菌を行うことが勧告され¹¹⁾、医療現場では積極的にアルコールを用いた手指衛生が行われるようになった。アルコールとは脂肪族炭化水素の水素原子がヒドロキシ基で置換された化合物のことであり、現在、EtOH と 2-PrOH がアルコール消毒薬の主成分として使用されている。その殺菌メカニズムは、アルコールが脱水剤として作用し、細胞膜内の脂質と相互作用して微生物を溶解させ、細胞内容物を漏出することで細菌が死滅に至ることが報告されている¹²⁾。アルコールは炭素原子数が多くなるほど殺菌効果が高くなることが報告されている¹³⁾ものの、その効果が明らかにされているアルコールは、EtOH と 2-PrOH に加え、1-PrOH³⁾と 1-BuOH⁴⁵⁾のみである。そこで、本章では常温で保管できる液体のアルコール 14 種について、殺菌効果およびウイルス不活化効果を明らかにし、EtOH や 2-PrOH に代替可能なアルコールを検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 供試アルコール

一価アルコールは Methanol (MeOH、純度 99.8%)、EtOH (純度 99.5%)、1-PrOH (純度 99.5%)、2-PrOH (純度 99.7%)、Butan-1-ol (1-Butanol: 1-BuOH、純度 99.0%)、Butan-2-ol (2-Butanol: 2-BuOH、純度 99.0%)、2-Methylpropan-2-ol (*tert*-Butanol: *t*-BuOH、純度 99.0%)、2-Methylpropan-1-ol (Isobutyl alcohol: IBA、純度 99.0%)、Pentan-1-ol (1-Pentanol、純度 98.0%)、Pentan-2-ol (2-Pentanol、純度 97.0%)、2-Methylbutan-2-ol (*tert*-Amyl alcohol: *t*-Amyl alcohol、純度 98.0%) の 11 種を用いた。二価アルコールは Ethane-1,2 - diol (Ethylene Glycol、純度 99.5%) および Propane-1, 3-diol (1, 3-Propylene Glycol、純度 98.0%) を用いた。三価アルコールは Propane-1, 2, 3-triol (Glycerin、純度 99.5%) を用いた。全てのアルコールは富士フィルム和光純薬株式会社のもを使用し、原液のアルコール濃度を 100 w/w %として実験に用いる直前に MilliQ 水 (超純水製造装置 Direct-Q[®]3UV、メルク社製) で適宜希釈して供試した。アルコールの希釈は温度の影響を受けない重量パーセント (w/w%) にて行い、結果は作用後の終濃度で記載した。アルコール製品の表記は容量パーセント (v/v%) が用いられていることが多く、概算値で w/w%を v/v%に変換すると、エタノール水溶液は 18 w/w% (22.07 v/v%)、36 w/w% (42.94 v/v%)、54 w/w% (61.85 v/v%)、72 w/w% (78.67 v/v%)、90 w/w% (93.25 v/v%) である。これらはアルコールの温度を測定していないため、体積濃度を関数とした 15°Cにおける密度が記載されている国際アルコール表¹⁴⁾を参考に算出した。アルコールの名称と化学構造を表 2-1、アルコールの化学的性質を表 2-2 に示す。

2.2.2 供試微生物

グラム陽性菌には、*S. aureus* ATCC 25923、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228、*Enterococcus faecalis* ATCC 29212、*E. faecalis* NBRC 100450、*E. faecium* NBRC 100485、および *E. hirae* NBRC 3187 を用いた。グラム陰性菌には、*E. coli* ATCC 25922 と *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 を用いた。酵母様真菌には、*Candida albicans* ATCC 10231、皮膚糸状菌 *Trichophyton rubrum* NBRC 5467、および *T. mentagrophytes* NBRC 5466 を用いた。非結核性抗酸菌には、*Mycobacterium abscessus* ATCC 1997 と *M. avium* ATCC 19421 を用いた。細菌芽胞には *Bacillus subtilis* NBRC 9455 を用いた。

ノンエンベロープウイルスには、Feline calicivirus F9 (FCV/F9)、Coxsackievirus B5 (CVB5)、および Adenovirus 5 型 (Ad.5) を用いた。エンベロープウイルスには、Influenzavirus A PR8 (A/PR8)、Influenzavirus A. pdm.2009 No.48 (A/pdm.2009 No.48)、Human herpesvirus 1 HF 株 (HSV-HF)、および Human herpesvirus 2 UW 株 (HSV-UW) を用いた。

Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 臨床分離株は 1998 年に神奈川県内の病院で分離され、-80℃ で保管されていたもののうち POT 法で院内感染型であることが確認された 6 株と、2019 年に千葉県内の病院で分離され POT 法で同定された院内感染型 6 株を用いた。

2.2.3 一般細菌に対する殺菌試験法

供試菌は、Soybean-casein digest agar (SCD 寒天培地、栄研化学) を用い、37℃ で約 24 時間培養した。供試懸濁液は滅菌リン酸緩衝液 (ダルベッコ PBS(-); D-PBS(-)、日水製薬株式会社) で約 10^8 CFU/mL に調整した。供試アルコール 900 μ L に供試菌液 100 μ L を添加し、10 秒間および 1 分間ボルテックスで攪拌した。あらかじめ 96 Well plate に D-PBS(-) を 180 μ L 入れたものに 10 秒間および 1 分間後の作用液 20 μ L を添加し、10 倍希釈系列を作成した。希釈した作用液 10 μ L を SCD 寒天培地に塗布し、36-37℃ の好気条件下で 24-48 時間培養し、コロニーカウント法で生菌数を計測した。

2.2.4 真菌に対する殺菌試験法

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 (試薬特級、和光純薬株式会社) 20 g、培地 (BD) 20 g を純水 1 L に溶解し、121℃、15 分高圧蒸気滅菌し、シャーレに分注し自家調整した。供試懸濁液は、酵母状真菌は D-PBS(-) で約 10^{5-7} CFU/mL に調製し、皮膚糸状菌は 0.05% ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート (分子生物学用、和光純薬株式会社) ペプトン加生理食塩水 (大塚製薬株式会社) で約 10^{5-7} CFU/mL に調整した。供試アルコール 900 μ L に供試懸濁液 100 μ L を添加し、10 秒間および 1 分間ボルテックスで攪拌した。あらかじめ 96 Well plate に D-PBS(-) を 180 μ L 入れたものに 10 秒間および 1 分間後の作用液 20 μ L を添加し、10 倍希釈系列を作成した。希釈した作用液 10 μ L をサブロー寒天培地に塗布した。酵母状真菌は 30℃ で 24-48 時間、糸状菌は室温で 4-5 日間培養し、コロニーカウント法で生菌数を計測した。

2.2.5 非結核性抗酸菌に対する殺菌試験法

供試菌は SCD 寒天培地で 37℃ 4-7 日培養した。培養後、D-PBS(-) で約 10^{7-8} CFU/mL に調整し、超音波処理により菌液を均一化した。供試アルコール 900 μ L に供試懸濁液 100 μ L を添加し、96 Well plate に D-PBS(-) を 180 μ L 入れたものに 10 秒間および 1 分間後の作用液 20 μ L を添加し、10 倍希釈系列を作成した。希釈した 10 μ L を SCD 寒天培地に塗布した。36℃ で 4-21 日培養し、コロニーカウント法で生菌数を計測した。

2.2.6 細菌芽胞に対する殺菌試験法

供試芽胞液は SCD 寒天培地で 10 日間培養し、滅菌蒸留水に懸濁し、56°C で 30 分間処理することで作成、4°C で保存し、D-PBS(-) で約 10^{6-7} CFU/mL に調整した。供試アルコール 900 μ L に供試芽胞液を 100 μ L を添加し、10 秒間および 1 分間ボルテックスで攪拌した。あらかじめ 96 Well plate に D-PBS(-) を 180 μ L 入れたものに 10 秒間および 1 分間後の作用液 20 μ L を添加し、10 倍希釈系列を作成した。希釈した作用液 10 μ L を SCD 寒天培地に塗布し、36 - 37°C の好気条件下で 24 - 48 時間培養し、コロニーカウント法で生菌数を計測した。

2.2.7 MRSA に対する殺菌試験法

2.1.3 の一般細菌に対する殺菌試験法に準じて実施した。1-PrOH または EtOH を 0 - 50 w/w% の間で 10 w/w% 刻みで MilliQ 水を用いて希釈し、供試した。

2.2.8 ウイルス不活化試験法

感受性細胞は、Ad.5 には A549 細胞 (JCRB0076 ヒト肺ガン由来) を、CVB5、HSV-HF および HSV-UW には Vero 細胞 (アフリカミドリサル腎由来 DS ファーマ) を、FCV/F9 には CRFK 細胞 (JCRB9035、ネコ腎由来) を、A/PR8 と A/pdm.2009 No.48 には MDCK 細胞 (JCRB9035 イヌ腎由来) を用いた。ウイルス液は、ウイルスを細胞に感染、増殖させた後、凍結融解を 3 回行い、遠心分離した上清をウイルス液として -80°C で保存した。実験に使用する前に室温で融解し、供試ウイルス液とした。細胞の維持培地は、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 1% 添加した培地を使用し、細胞は定法に従い継代維持した。感受性細胞は CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) ので 96 Well plate に単層培養したものを用いた。供試アルコール 900 μ L に供試ウイルス液 100 μ L を混和して 10 秒間および 1 分間ボルテックスで攪拌した作用液 20 μ L を、D-PBS(-) 180 μ L に添加し、10 倍希釈系列を作成した。希釈した作用液 10 μ L を感受性細胞に接種して 37°C の CO₂ インキュベーターで CVB5、FCV/F9、HSV-HF、HSV-UW、A/PR8 および A/pdm.2009 No.48 は 3 - 5 日間、Ad.5 は 7 - 10 日間培養し、出現した細胞変性効果 (Cytopathic effect: CPE) を観察した。

2.2.9 判定基準

菌数が元の 10 分の 1 に減少する対数減少を示す LR (log10 reduction) を用いて判定を行った。10 秒間および 1 分間後のコロニー数を計測し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を引き、指数変換した。一般細菌、酵母様真菌、皮膚糸状菌、非結核性抗酸菌、および細菌芽胞は作用前後で LR $\geq$ 5 以上認められた際に殺菌効果ありと判定した。また、その時のアルコール濃度またはコロニーの発育が認められなかったアルコール濃度を殺菌に必要なアルコール濃度とした。ネガティブコントロールには D-PBS(-) を供試した。コロニー数の検出限界値は 100 CFU/mL である。*C. albicans*、*T. rubrum* および *T. mentagrophytes* は初期菌数が 10^{5-6} CFU/mL と低値であるため、コロニーの発育が認められなかった場合に殺菌効果ありと判定し、その時のアルコール濃度を殺菌に必要なアルコール濃度とした。

ウイルスは、Behrens-Karber 法によりウイルス感染価を算出し、10 秒間および 1 分間後の「作用前のウイルス感染価」から「作用後のウイルス感染価」を差し引いた値を LR とした。ネガティブコントロールには D-PBS(-) を供試した。ウイルス感染価の検出限界値は 0.67 である。作用前後で LR $\geq$ 3

以上認められた際にウイルス不活化効果ありと判定し、その時のアルコール濃度をウイルスの不活化に必要なアルコール濃度とした。

2.3 結果

2.3.1 MeOH の殺菌結果

MeOH の一般細菌および酵母様真菌に対する作用時間 10 秒間の殺菌効果を表 2-3 に示す。終濃度 54 w/w% で 10 秒間作用した時に $LR \geq 5$ を満たす菌種は *S. aureus* ATCC 25923、*S. epidermidis* ATCC 12228、*E. coli* ATCC 25922、*P. aeruginosa* ATCC 27853、*C. albicans* ATCC 10231 の 5 株であり、1 分間の作用ですべての菌株に対して $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果があった。10 秒間の作用ですべての菌株に対して殺菌効果が認められたのは終濃度 72 w/w% であった。

2.3.2 EtOH の殺菌結果

EtOH の一般細菌および酵母様真菌に対する作用時間 10 秒間の殺菌効果を表 2-4 に示す。10 秒間作用した時に $LR \geq 5$ を満たす菌種は、終濃度 36 w/w% のときグラム陰性菌の *E. coli* ATCC 25922 と *P. aeruginosa* ATCC 27853、および酵母様真菌の *C. albicans* ATCC 10231 であり、終濃度 54 w/w% では *E. hirae* NBRC 3187 を除く 8 株であった。終濃度 72 w/w% ですべての菌株に対して $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果があった。1 分間の作用では、終濃度 36 w/w% のときに *E. faecium* NBRC 100485 を除く 8 株で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果があり、終濃度 54 w/w% ですべての菌株に対して $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果が認められた。

2.3.3 1-PrOH の殺菌結果

1-PrOH の一般細菌および酵母様真菌に対する作用時間 10 秒間の殺菌効果を表 2-5 に示す。終濃度 18 w/w% で 10 秒間作用した時に $LR \geq 5$ を満たす菌種は *E. faecalis* NBRC 100450、*E. coli* ATCC 25922、*P. aeruginosa* ATCC 27853、*C. albicans* ATCC 10231 の 4 菌種であり、その他 5 菌種は終濃度 36 w/w% で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果が認められた。1 分間の作用では終濃度 18 w/w% ですべての菌種に対して殺菌効果が認められた。

2.3.4 2-PrOH の殺菌結果

2-PrOH の一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果を表 2-6 に示す。10 秒間作用した時に $LR \geq 5$ を満たす菌種は、終濃度 18 w/w% で *E. hirae* NBRC 3187 のみであったが、終濃度 36 w/w% では *E. faecium* NBRC 100485、*E. faecalis* ATCC 29212、および NBRC 100450、*E. coli* ATCC 25922、*P. aeruginosa* ATCC 27853、および *C. albicans* ATCC 10231 であった。終濃度 54 w/w% ですべての菌株に対して $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果があった。1 分間の作用では、終濃度 18 w/w% で *E. hirae* NBRC 3187 と *E. coli* ATCC 25922 に対して $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果があり、終濃度 36 w/w% 全ての菌株に対して $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果があった。

2.3.5 1-BuOH の殺菌・殺芽胞結果

1-BuOH の殺菌効果を表 2-7 および表 2-8 に示す。グラム陽性菌、グラム陰性菌、酵母様真菌の 8

種 9 株に対して、作用時間 10 秒間、および 1 分間と終濃度 18 w/w% で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果が認められた (表 2 - 7)。 *B. subtilis* NBRC 13722 の細菌芽胞には 1-BuOH を終濃度 90 w/w% で 1 分間作用しても $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果は認められなかった (表 2 - 8)。皮膚糸状菌の *T. mentagrophytes* NBRC 5466 は終濃度 18 w/w% で 10 秒間作用するとコロニーの発育が認められず殺菌効果を示したが、 *T. rubrum* NBRC 5467 は 1 分間の作用時間を要した (表 2 - 8)。非結核性抗酸菌の *M. abscesses* ATCC 1997 は終濃度 18 w/w% で 10 秒間作用すると $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果があったが、 *M. avium* ATCC 19421 は 1 分間の作用時間を要した (表 2 - 8)。

S. aureus ATCC 25923、 *E. faecalis* ATCC 29212 および *E. coli* ATCC 25922 に対して 0 - 20 w/w% の範囲で 1% 濃度刻みの 1-BuOH を作用した時の殺菌効果を図 2 - 1 に示す。 *S. aureus* ATCC 25923 に対して 10 秒間作用させた時に終濃度 17.1 w/w% では $LR 3.19$ であったが、終濃度 18.0 w/w% で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示した。1 分間の作用では、終濃度 0.9 w/w% で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示した。1-BuOH の作用時間によらず、 *E. faecalis* ATCC 29212 は終濃度 14.4 w/w% で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示し、 *E. coli* ATCC 25922 は終濃度 9.0 w/w% で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示した。

2.3.6 2-BuOH の殺菌結果

2-BuOH 一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果を表 2 - 9 に示す。10 秒間の作用では、終濃度 18 w/w% で *S. aureus* ATCC 25923 と *S. epidermidis* ATCC 12228 を除く 6 菌種 7 株に対して $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示した。 $LR \geq 5$ を満たすのに *S. aureus* ATCC 25923 は終濃度 72 w/w% を要し、 *S. epidermidis* ATCC 12228 は 90 w/w% を要した。1 分間の作用では、 *S. epidermidis* ATCC 12228 のみ終濃度 36 w/w% で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示したが、他の 7 菌種 8 株は終濃度 18 w/w% で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示した。

2.3.7 t-BuOH の殺菌結果

t-BuOH の一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果を表 2 - 10 に示す。終濃度 18 w/w% で 10 秒間作用した時に $LR \geq 5$ を満たす菌種は供試した菌株のうち *E. coli* ATCC 25922 のみであったが、終濃度 36 w/w% ではさらに *E. faecium* NBRC 100485、 *E. hirae* NBRC 3187、 *E. faecalis* ATCC 29212 と NBRC 100450、 *P. aeruginosa* ATCC 27853 が $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示した。 *S. aureus* ATCC 25923、 *S. epidermidis* ATCC 12228、 および *C. albicans* ATCC 10231 は、 $LR \geq 5$ を満たすのに終濃度 54 w/w% を要した。1 分間の作用では、終濃度 18 w/w% で *E. coli* ATCC 25922 と *P. aeruginosa* ATCC 27853 が $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示し、終濃度 36 w/w% では *S. aureus* ATCC 25923 を除く 5 菌種 6 株で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示した。 *S. aureus* ATCC 25923 は $LR \geq 5$ を満たすのに終濃度 54 w/w% を要した。

2.3.8 各種アルコールの *S. aureus* に対する殺菌結果

S. aureus に対する炭素原子数およびヒドロキシ基が異なるアルコール 7 種の殺菌効果を MeOH、 EtOH、 1-PrOH、 2-PrOH、 1-BuOH、 2-BuOH、 および t-BuOH の結果とともに表 2 - 11 に示す。10 秒間の作用では、IBA は終濃度 18 w/w% で $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示したが、その他 6 種の 1-Pentanol、 2-Pentanol、 t-Amyl alcohol、 Ethylene Glycol、 1,3-Propanediol、 Glycerin はいずれのアルコール濃度でも $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示さなかった。1 分間の作用では、終濃度 18 w/w% で IBA に加えて 1-Pentanol と 2-Pentanol が $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示し、終濃度 36 w/w% で t-Amyl alcohol が、終濃度 90 w/w% で Ethylene Glycol が $LR \geq 5$ を満たす殺菌効果を示した。

2.3.9 MRSA の殺菌結果

MRSA と標準菌株との比較のため *S. aureus* ATCC 25923 の 1-PrOH と EtOH のに対する殺菌結果を図 2-2 に示す。1-PrOH の殺菌結果は (図 2-2(a))、1998 年の 6 株のうち、LR $\geq$ 5 を満たしたのは終濃度 27 w/w% で 2 株、終濃度 36 w/w% で 2 株、終濃度 45 w/w% で 1 株、終濃度 45 w/w% 以上を要するものは 1 株であり、2019 年も同様の結果となった。*S. aureus* ATCC 25923 は、終濃度 27 w/w% で LR $\geq$ 5 を満たし、殺菌効果が認められた (図 2-2(a))。一方の EtOH の殺菌結果は (図 2-2(b))、1998 年、2019 年および *S. aureus* ATCC 25923 のすべての株に対して終濃度 54 w/w% で LR $\geq$ 5 を満たし、殺菌効果が認められた。

2.3.10 MeOH のウイルス不活化結果

ノンエンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2-3(a), (b), (c) に示す。10 秒間の作用で、FCV/F9 はすべての濃度において LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果が認められなかった。CVB5 は終濃度 36 w/w% で LR 3.4 を満たすウイルス不活化効果を示した。Ad.5 は終濃度 54 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。1 分間の作用時間では、FCV/F9 は終濃度 72 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示し、CVB5 は終濃度 36 w/w% で LR 5.1 を示し、Ad.5 は終濃度 54 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。

エンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2-3(d), (e), (f), (g) に示す。10 秒間の作用ですべてのウイルス株に対して終濃度 54 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。1 分間の作用時間では、A/PR8 は終濃度 54 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たし、A/pdm.2009 No.48 は終濃度 36 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。HSV-UW と HSV-HF は終濃度 36 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。

2.3.11 EtOH のウイルス不活化結果

ノンエンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2-4(a), (b), (c) に示す。10 秒間の作用では FCV/F9 と CVB5 に対して、すべての濃度で LR $\geq$ 3 を満たさず、ウイルス不活化効果は認められなかった。Ad.5 に対しては終濃度 54 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。1 分間の作用時間では、FCV/F9 に対して、すべての濃度で LR $\geq$ 3 を満たさず、ウイルス不活化効果が認められなかった。CVB5 は終濃度 36 w/w% で LR 3.5 を満たすウイルス不活化効果を示し、Ad.5 に対しては終濃度 54 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。

エンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2-4(d), (e), (f), (g) に示す。A/PR8 を除く 3 種のウイルス株に対して終濃度 36 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。A/PR8 は終濃度 54 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。1 分間の作用時間では、4 種すべてのウイルス株に対して終濃度 36 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果を示した。

2.3.12 1-PrOH のウイルス不活化結果

ノンエンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2-5(a), (b), (c) に示す。10 秒間の作用では、FCV/F9 と CVB5 は LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果が認められなかった。Ad.5 に対して、終濃度 36 w/w% で LR 4.7 を満たすウイルス不活化効果を示した。1 分間の作用では、FCV/F9 は終濃度 18 w/w% から 54 w/w% の間で LR 3.2 - 5.3 減少し、ウイルス不活化効果が認められた。CVB5 は LR $\geq$ 3 を満たすウイルス不活化効果が認められなかった。Ad.5 は終濃度 36 w/w% で LR $\geq$ 3 を満たすウイル

ス不活化効果を示した。

エンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2 - 5(d), (e), (f), (g)に示す。10 秒間および 1 分間の作用ではすべてのウイルス株に対して終濃度 18 w/w%で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。

2.3.13 2-PrOH のウイルス不活化結果

ノンエンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2 - 6(a), (b), (c)に示す。10 秒間の作用ではすべてのウイルス株に対して $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果は認められなかった。1 分間の作用では、Ad.5 を除く 2 株に対して、 $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果は認められなかった。Ad.5 は終濃度 54 w/w%で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。

エンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2 - 6(d), (e), (f), (g)に示す。10 秒間の作用で HSV-HF を除く 3 種のウイルス株に対して、終濃度 36 w/w%で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。HSV-HF に対して終濃度 18 w/w%で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。1 分間の作用では、HSV-HF と HSV-UW は終濃度 18 w/w%で $LR \geq 3$ を満たし、A/PR8 と A/pdm. 2009 No.48 は終濃度 36 w/w%で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。

2.3.14 1-BuOH のウイルス不活化結果

ノンエンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2 - 7(a), (b), (c)に示す。10 秒間の作用では、3 種すべてのウイルス株に対して $LR \geq 3$ とはならなかった。1 分間の作用では、FCV/F9 に対して終濃度 36 w/w%で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。CVB5 に対してすべての濃度で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果は認められなかった。Ad.5 は終濃度 54 w/w%で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。

エンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2 - 7(d), (e), (f), (g)に示す。10 秒間および 1 分間の作用ですべてのウイルス株に対して $LR \geq 3$ を満たし、ウイルス不活化効果が認められた。

2.3.15 2-BuOH のウイルス不活化結果

ノンエンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2 - 8(a), (b), (c)に示す。10 秒間の作用では、3 種すべてのウイルス株に対して $LR \geq 3$ を満たさず、ウイルス不活化効果は認められなかった。1 分間の作用では、CVB5 を除く 2 種のウイルス株に対して $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。CVB5 に対してすべての濃度で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果は認められなかった。

エンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2 - 8(d), (e), (f), (g)に示す。10 秒間および 1 分間の作用ですべてのウイルス株に対して終濃度 18 w/w%で $LR \geq 3$ を満たし、ウイルス不活化効果を示した。

2.3.16 *t*-BuOH のウイルス不活化結果

ノンエンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2 - 9(a), (b), (c)に示す。10 秒間および 1 分間の作用では、3 種すべてのウイルス株に対して $LR \geq 3$ とはならなかった。

エンベロープウイルスのウイルス不活化効果を図 2 - 9(d), (e), (f), (g)に示す。10 秒間の作用では、A/PR8 を除く 3 種のウイルス株に対して終濃度 18 w/w%で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。A/PR8 は終濃度 36 w/w%で $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果を示した。1 分間の作用では、

4 種すべてのウイルス株に対して終濃度 18 w/w%で $LR \geq 3$ となった。

2.4 考察

病原微生物に対するアルコールの作用を明らかにし、アルコールの親疎水性や、炭素原子数およびヒドロキシ基の結合位置とその数のアルコールの化学的性質が殺菌、殺芽胞およびウイルス不活化効果に及ぼす影響を検討した。

10 秒間の作用時間と終濃度 18 w/w%で、微生物種 9 株すべてに対し $LR \geq 5$ を満たしたアルコールは 1-BuOH であった。次いで 2-BuOH がグラム陽性菌 2 株を除く 7 株に対して $LR \geq 5$ を満たし、1-PrOH が *E. faecalis* NBRC 100450 とグラム陰性菌および酵母様真菌 4 株に対して $LR \geq 5$ を満たし、殺菌効果を示した。2-PrOH が *E. hirae* の 1 株に対して $LR \geq 5$ を満たし、*t*-BuOH が *E. coli* の 1 株に対して $LR \geq 5$ を満たし、それぞれ殺菌効果を示した。一方、終濃度 18 w/w%では $LR \geq 5$ を満たさなかったアルコールは MeOH と EtOH であった。殺菌を示すアルコール濃度を明らかにするため *S. aureus* ATCC 25923、*E. faecalis* ATCC29212 および *E. coli* ATCC 25922 の 1%刻みの結果 (図 2-1) をみると、一般細菌に対するアルコールの作用は徐々に殺菌効果が現れるのではなく、ある濃度に達すると殺菌効果が発現され、10 秒間より 1 分間という長時間の作用において低濃度で殺菌効果を示すことが明らかとなった。

供試した微生物の中で多くの微生物種に対する殺菌効果が認められた 1-BuOH はヒドロキシ基の結合位置の違いにより 2-BuOH と *t*-BuOH の構造異性体が存在する (表 2 - 1)。1-BuOH は主鎖の 1 位にヒドロキシ基が結合し、2-BuOH は主鎖の 2 位にヒドロキシ基が結合し、*t*-BuOH は主鎖の 2 位が分岐し、ヒドロキシ基と炭化水素基が結合している。これら 3 種の終濃度 18 w/w%と 10 秒間の作用時間の殺菌効果を比較すると、1-BuOH は微生物種 9 株すべてに対して殺菌効果が認められ、2-BuOH はグラム陽性菌 2 株を除く 7 株に対して殺菌効果が認められているのに対し、*t*-BuOH は *E. coli* にのみ殺菌効果を示したにとどまっている。さらに、ブタノール以外の構造異性体の 1-PrOH と 2-PrOH の構造 (表 2 - 1) と殺菌効果をみると、1-PrOH の構造は主鎖の 1 位にヒドロキシ基が結合しており、*E. faecalis* NBRC 100450 とグラム陰性菌および酵母様真菌 4 株に対して殺菌効果を示している。2-PrOH は主鎖の 2 位にヒドロキシ基が結合しており、*E. hirae* の 1 株のみ殺菌効果を示している。これらのことから、ブタノールとプロパノールのヒドロキシ基の結合位置と殺菌効果の比較により、ヒドロキシ基の結合位置が主鎖の 2 位に結合しているアルコールより、主鎖の 1 位に結合しているアルコールの方が、多くの微生物種に対する殺菌効果が認められた。

ウイルス不活化効果は、ノンエンベロープウイルスの FCV/F9 は作用時間 10 秒間ですべてのアルコールに対して $LR \geq 3$ は認められなかったが、1 分間の作用時間では MeOH、1-PrOH、1-BuOH および 2-BuOH が $LR \geq 3$ を満たし、ウイルス不活化効果を示した。CBV5 は 10 秒間の作用時間で MeOH のみ $LR \geq 3$ を満たし、1 分間の作用時間では MeOH に加えて EtOH も $LR \geq 3$ を満たしウイルス不活化効果を示した。Ad.5 は、10 秒間の作用時間で MeOH、EtOH および 1-PrOH の 3 種で $LR \geq 3$ を満たし、1 分間の作用時間では MeOH、EtOH、1-PrOH、2-PrOH、1-BuOH および 2-BuOH の 6 種で $LR \geq 3$ を満たした。これらのことから、ノンエンベロープウイルスは 10 秒間の作用時間で炭素原子数が 1-3 つの MeOH、EtOH および 1-PrOH のみがウイルス不活化効果を示し、1 分間の作用時間になると *t*-BuOH 以外のアルコールで $LR \geq 3$ を満たすウイルス不活化効果が認められた。エンベロープウイルスは 10 秒間の作用時間で炭素原子の数に関係なくすべてのアルコールに対し $LR \geq 3$ を満た

すウイルス不活化効果を示し、10 秒間より 1 分間の作用時間の方が $LR \geq 3$ を満たす微生物種が増加した。ウイルス不活化効果とウイルスの構造を比較すると、エンベロープをもたないウイルスに対してアルコールは効果が低いことが明らかとなっているが¹⁵⁾、Ad.5 は 10 秒間の作用時間で MeOH、EtOH および 1-PrOH が $LR \geq 3$ を満たし、1 分間の作用時間になると、*t*-BuOH 以外のアルコール 6 種で $LR \geq 3$ を満たし、不活化効果が認められた。Ad.5 の構造は、252 個のカプソメアから構成される正 20 面体のカプシドを形成し、内部には塩基性タンパク質からなるコアと、それを囲う直鎖二本鎖 DNA がゲノムとして存在している (図 2 - 10)。ウイルスの側面には 12 個のファイバーが突出しており、ファイバーの土台となるようにペントンベースが存在している。このペントンベースは、疎水性の物性をもつことでウイルスの安定性を維持していることが明らかになっている¹⁶⁾。この疎水性のペントンベースに対して炭素原子数が 1-3 までの親水性のアルコールが作用すると、ウイルスの構造を保てずに崩壊することが推察され、ノンエンベロープウイルスの中でも特に Ad.5 に対するアルコール不活化作用の要因であることが示唆された。しかし、アデノウイルスは約 50 種類あり、特に Ad.5 はアルコールに対して感受性が高いが、Ad.2 や Ad.8 は非常に感受性が低い¹⁷⁾という報告がある。先行研究では¹⁸⁾、EtOH 45 v/v% (約 37.87 w/w%¹⁴⁾) 以上で Ad.2, 5, 7, 37 に対し、 $LR \geq 3$ 以上の減少がみられたが、Ad.3、Ad.8 は EtOH 81 v/v% (約 74.68 w/w%¹⁴⁾) でも不活化効果はみられず、同じアデノウイルスでも異なる株を用いるとウイルス不活化効果には相違があることが明らかとなっている。本論文の結果のみではアデノウイルスの不活化効果の解明には至らなかった点が研究の限界として挙げられるが、ノンエンベロープウイルスに対してアルコールが特異的に反応するポイントがあることが示唆された。

殺菌のメカニズムを示すものとして、アルコールの炭素原子数や水に対する溶解性^{13,19)}が関係していることが明らかとなっている。水に対する溶解性を詳細に検討するため、化学物質の疎水性を表すオクタノール／水分配係数 ($\log P_{ow}$) を用いてアルコールの疎水性の化学的性質と殺菌効果を比較した (表 2-2)。 $\log P_{ow}$ は、数値が高くなると疎水性を示し水和しにくく、数値が低くなると親水性を示し水和しやすくなることを示している。1-BuOH の $\log P_{ow}$ は 0.9、2-BuOH は 0.61、1-PrOH は 0.25、2-PrOH は 0.05、*t*-BuOH は 0.37 である。一方、終濃度 18 w/w% と 10 秒間の作用時間では $LR \geq 5$ を示さなかった MeOH の $\log P_{ow}$ は -0.66、EtOH は -0.3 であった。 $\log P_{ow}$ が高いアルコールが多くの微生物種で $LR \geq 5$ を示し、殺菌効果を示す傾向にあった。*t*-BuOH に関しては $\log P_{ow}$ が 2-BuOH の次に高い 0.37 となっているが、主鎖の 2 位が分岐し、ヒドロキシ基と炭化水素基が結合する分岐鎖をもっているため、 $LR \geq 5$ を示す微生物の数は 1 株のみであり、1-BuOH と 2-BuOH とは異なる殺菌の傾向を示した。これは別府らが⁴⁾、炭素数の多いブタノールは炭素鎖の疎水性が細菌への殺菌力発現に影響することを報告しており、本論文でも $\log P_{ow}$ の比較からアルコールの疎水性が殺菌に関係していることが明らかとなった。また、多くの報告で殺菌効果が明らかになっている *S. aureus* を対象に炭素原子数とヒドロキシ基の数および結合位置の異なるアルコール 14 種の殺菌効果を比較 (表 2-11) すると、ヒドロキシ基が 1 つから 2 つに増えたことにより親水性の化学的性質が強くなり、 $\log P_{ow}$ がマイナスを示す多価アルコールは 10 秒間および 1 分間の作用時間で $LR \geq 5$ を満たさず、殺菌効果が認められなかった。別府らは⁴⁾、炭素数の少ないエタノールのようなアルコールは相対的にヒドロキシ基の性質がつよく、水分子との相互作用の結果生じた水・アルコールの状態が殺菌力発現に影響することを報告している。以上のことからアルコールのヒドロキシ基の数と結合位置が殺菌に関係していることが明らかとなった。

次にグラム陽性菌とグラム陰性菌の構造と殺菌効果を比較した。グラム陽性菌の細胞壁は、ペプチ

ドグリカン層が 30 - 70%を占め厚く丈夫な性質をもち、これは細菌の形状を維持するために強固な構造をもっている (図 2 - 11)。一方のグラム陰性菌の細胞壁を構成する外膜は、グラム陽性菌には存在しない極性を持った薄いリン脂質が二層になった脂質二重層となっている²⁰⁾。しかしながら、このリン脂質が存在するのは外膜の内側の小葉に限定されごく一部しか存在しておらず。外膜の外葉の大部分 (約 75%) を占めるのが、糖脂質であるリポ多糖 (LPS) である²¹⁾。LPS 分子は細胞壁の最外層にあり糖質と脂質で構成された物質で、リポド A (Lipid-A) が構成成分として含まれる (図 2 - 11)。微生物細胞の最外層は、消毒薬に対する感受性に大きな影響を与える可能性がある²¹⁾ことが報告されている。このことから、グラム陰性菌に対してアルコールを作用させた際、最外層にある疎水性の性質の LPS および Lipid A に接触することが推察され、アルコールの親疎水性の化学的性質がこれらに反応し、死滅に至ることが示唆された。グラム陽性菌とグラム陰性菌に共通している構造は、表面に長さや径の異なる絨毛や鞭毛をもち、その化学的性質は、疎水性アミノ酸残基を多く含むため疎水性が強いことが報告されており²²⁾、絨毛や鞭毛に対してもアルコールが作用し、細菌構造の変化の一因となっていることが示唆される。また、酵母様真菌は、細胞壁にはペプチドグリカンはなく多糖成分を含む微細繊維の網状構造で形成されている²³⁾。構造上、細胞壁の内側にある細胞膜がところどころくさび状に嵌入しており細胞壁との間に空洞をもち、その細胞膜に包まれている核の周りには核膜が存在し、核膜孔という核の内外を連絡する穴がある²³⁾。このようにペプチドグリカンを持たず、細胞壁と細胞膜の間に空洞を持っていることや、核膜孔の存在が、アルコールが接触した際に酵母様真菌に浸透しやすいことが推測され、殺菌効果が現れやすい因子のひとつであることが示唆された。

新興・再興感染症の世界的な流行によるアルコール消毒薬の逼迫に備えるために、アルコール消毒薬に代替可能となることが考えられる 1-PrOH に着目した。1-PrOH は米国や日本では殺菌を目的とした使用は認められていないが、欧州では手指消毒薬として 1-PrOH 60-70%濃度が有効成分として認められており、消毒薬として用いられている報告^{24,25)}がある。本論文の殺菌効果からも、終濃度 18 w/w%と 10 秒間の作用時間で LR $\geq$ 5 を満たす微生物は 2-PrOH は 1 株のみであり (表 2 - 6)、EtOH では LR $\geq$ 5 を満たす微生物は認められなかった (表 2 - 4)。一方で 1-PrOH は LR $\geq$ 5 を満たす微生物は 4 株あり (表 2 - 5)、消毒薬として用いられている EtOH と 2-PrOH より 1-PrOH の方が多くの微生物に対して殺菌効果が認められた。また、ノロウイルスの代替ウイルスとして実験研究に用いられている FCV/F9 に対する 1-PrOH の不活化効果は (図 2 - 5(a))、作用時間 1 分、終濃度 18 w/w%で LR 3.9、終濃度 36 w/w%で LR 5.3、終濃度 54 w/w%で LR 3.2 を示し、ウイルス不活化効果が認められた。ノロウイルスは、加熱処理、もしくは次亜塩素酸ナトリウムを用いて不活化する必要があるため人体に使用することができないという課題を抱えているが、1 分間の作用時間を要したとしても手指衛生や環境清拭に用いることが可能となれば、簡便な不活化が可能となる。*in vitro* ではウイルス不活化効果が認められた FCV/F9 とノロウイルスは厳密には異なるウイルスであるため、さらなる検討を要するが、ノロウイルスは発症すると抵抗力が弱い乳幼児や高齢者、基礎疾患のある人などでは重症化しやすいためノロウイルス感染症を抑止できる方法の一つとなることが期待される。加えて、手指衛生に 1-PrOH を使用した場合に薬剤耐性菌である MRSA に対する殺菌効果を検討した。1998 年と 2019 年の MRSA 株に対して 10 秒間の作用時間で、1-PrOH は、終濃度 27 w/w%で LR $\geq$ 5 を満たす株もあれば、LR $\geq$ 5 を満たすために終濃度 45 w/w%以上を要するものもあった (図 2 - 2(a))。そして MRSA と *S. aureus* ATCC 25923 の殺菌効果を示すアルコール濃度にも違いが認められ、一方の EtOH はすべての MRSA と *S. aureus* ATCC 25923 に対して終濃度 54 w/w%で LR $\geq$ 5 を満たし、殺菌効果が認められた (図 2 - 2(b))。これらのことから、標準菌株と薬剤耐性菌に対して、EtOH と 1-PrOH では

殺菌を示すアルコール濃度が異なることが明らかとなった。殺菌試験に用いた MRSA の遺伝子型は不明であるが、年代別の MRSA の遺伝子型に関する先行研究²⁶⁾では、東京都の MRSA の SCC *mec type* の推移は、2010 年までは院内感染型 MRSA に主流の SCC *mec type* II 株が約 8 割を占めていたが、その割合は年々減少し、2014 年には市中感染型 MRSA に主流の SCC *mec type* IV 株が逆転しており、時代とともに変化していることが示されている。今回、薬剤耐性菌と殺菌の関係を明らかにするまでには至らなかったが、1-PrOH は標準菌株と薬剤耐性菌に対して殺菌を示すアルコール濃度が異なり、アルコール消毒の代替として提案するにはさらなる検討を要することが明らかとなった。

アルコールの人体への影響を「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」(The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals : GHS) を用いて殺菌効果と比較した。表 2-2 の項目に示した GHS はラットの LD 50 値から急性毒性(経口)の区分が定められている指標である。区分 1,2 は<飲み込むと生命に危険を及ぼす>、区分 3,4 は<飲み込むと有害>、区分 5 は<飲み込むと有害の恐れ>を示している。使用したアルコールの中では区分 4 の MeOH と *t*-Amyl alcohol が最も有害性の高いアルコールとなっている一方で、EtOH は区分外、2-PrOH は区分 5 であった。今回、殺菌効果が明らかとなった 1-BuOH および 1-PrOH は区分外とされており、GHS の指標では有害性は低いことが示唆されるが、人体への使用は皮膚・呼吸器感作性、生殖毒性、眼刺激性および発がん性などの多角的視点から、さらなる安全性の検討を要する。

2.5 表

表 2-1. アルコールの名称と化学構造

IUPAC 名 慣用名 (略語)	炭素 原子数	アルコール 級数	ヒドロキシ 基の数	構造式
Methanol (MeOH)	1	1	1	$\text{CH}_3 - \text{OH}$
Ethanol (EtOH)	2			$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$
1-Propanol <i>n</i> -Propanol (1-PrOH)	3			$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$
2-Propanol <i>iso</i> -Propanol (2-PrOH)	3	2		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Butan-1-ol 1-Butanol (1-BuOH)	4	1		$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$
Butan-2-ol 2-Butanol (2-BuOH)	4	2		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
2-Methylpropan-2-ol <i>tert</i> -Butanol (<i>t</i> -BuOH)	4	3		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
2-Methylpropan-1-ol <i>iso</i> -Butanol (IBA)	4	2		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Pentan-1-ol 1-Pentanol	5	1		$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$
Pentan-2-ol 2-Pentanol	5	2		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
2-Methylbutan-2-ol <i>tert</i> -Amyl alcohol (<i>t</i> -Amyl alcohol)	5	3		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Ethane-1,2-diol Ethylene Glycol	2	—	2	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$
Propane-1,3-diol 1,3-Propanediol	3			$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Propane-1,2,3-triol Glycerin	3		3	$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$

表 2-2. アルコールの化学的性質

	重量%	分子量	性状	臭い	融点/凝固点	沸点	引火点	自然発火温度	水に対する溶解度	n-オクタノール/ 水分分配係数	蒸気圧	GHS分類
MeOH ¹⁾	99.8	32.04	液体	特異臭	-98℃	64℃	11℃	464℃	極めて溶けやすい	-0.66	95.2 mmHg (20℃)	区分4
EtOH ²⁾	99.5	46.07	液体	特異臭	-130℃	78℃	13℃	363℃	極めて溶けやすい	-0.3	59.3 mmHg (25℃)	区分外
1-PrOH ³⁾	99.5	60.1	液体	特異臭	-127℃	97℃	15℃	371℃	極めて溶けやすい	0.25	21mmHg (25℃)	区分外
2-PrOH ⁴⁾	99.7	60.1	液体	特異臭	-88.5℃	82℃	12℃	460℃	極めて溶けやすい	0.05	33 mmHg (25℃)	区分5
1-BuOH ⁵⁾	99.0	74.12	液体	特異臭	-90℃	117℃	37℃	365℃	やや溶けにくい	0.9	50 mmHg (20℃)	区分外
2-BuOH ⁶⁾	99.0	74.12	液体	特異臭	-114.7℃	100℃	24℃	390℃	溶けやすい	0.61	12 mmHg (20℃)	区分外
t-BuOH ⁷⁾	99.0	74.12	塊または 液体	特異臭	25.6℃	83℃	11.1℃	478℃	極めて溶けやすい	0.37	45 mmHg (20℃)	区分外
IBA ⁸⁾	99.0	74.12	液体	特異臭	-108℃	108℃	28℃	430℃	やや溶けやすい	0.76	12.2 mmHg (20℃)	区分5
1-Pentanol ⁹⁾	98.0	88.15	液体	特異臭	-79℃	138℃	51℃	300℃	溶けにくい	1.5	22.2 mmHg (25℃)	区分5
2-Pentanol ¹⁰⁾	97.0	88.15	液体	特異臭	-50℃	118℃	40℃	343℃	溶けやすい	1.25	4.12 mmHg (20℃)	区分5
t-Amyl alcohol ¹¹⁾	98.0	88.15	液体	特異臭	-8.6℃	102℃	21℃	435℃	溶ける	0.89	16.8 mmHg (25℃)	区分4
Ethylene Glycol ¹²⁾	99.5	62.07	粘稠	無臭	-13℃	198℃	116℃	402℃	極めて溶けやすい	-1.36	52.5 mmHg (20℃)	区分外
1,3-Propanediol ¹³⁾	98.0	76.09	液体	データなし	-27℃	214℃	74℃	データなし	極めて溶けやすい	-1.04	0.07 mmHg (20℃)	区分外
Glycerin ¹⁴⁾	99.5	92.09	粘稠	無臭	18-20℃	290℃	177℃	400℃	極めて溶けやすい	-1.76	0.07 mmHg (20℃)	区分外

下記の化学物質等安全データシートを参照

- 1) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、富士フィルム和光純薬株式会社
- 2) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、キシダ化学株式会社、三協化学株式会
- 3) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、国産化学株式会社
- 4) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、関東化学株式会社
- 5) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、キシダ化学株式会社、富士フィルム和光純薬株式会社
- 6) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、富士フィルム和光純薬株式会社
- 7) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、富士フィルム和光純薬株式会社
- 8) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、富士フィルム和光純薬株式会社
- 9) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、三協化学株式会社、国際化学物質安全性カード (ICSCs)
- 10) 富士フィルム和光純薬株式会社、東京化成工業株式会社、国際化学物質安全性カード (ICSCs)
- 11) 富士フィルム和光純薬株式会社、キシダ化学株式会社、国際化学物質安全性カード (ICSCs)
- 12) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、富士フィルム和光純薬株式会社
- 13) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、富士フィルム和光純薬株式会社
- 14) 厚生労働省＜職業のあんぜんサイト＞、純正化学株式会社、富士フィルム和光純薬株式会社

表 2-3. MeOH の一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果

作用時間	終濃度 [w/w%]	グラム陽性菌						グラム陰性菌		酵母様真菌
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 25923	ATCC 12228	NBRC 100485	NBRC 3187	ATCC 29212	NBRC 100450	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 10231
10秒間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	-0.37	-0.08	0.14	-0.13	-0.22	-0.15	0.12	-0.28	-0.04
	36	-0.15	-0.11	0.09	-0.13	-0.03	0.09	0.15	0.04	0.82
	54	>6.23	>6.10	2.34	1.34	1.37	3.05	>6.77	>6.66	>5.22
	72	>6.23	>6.10	>6.04	>6.04	>6.35	>6.13	>6.77	>6.66	>5.22
	90	>6.23	>6.10	>6.04	>6.04	>6.35	>6.13	>6.77	>6.66	>5.22
1分間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	-0.26	0.19	0.44	-0.16	-0.41	0.02	0.04	0.11	0.01
	36	0.69	0.19	0.09	-0.13	0.36	-0.12	2.72	2.17	1.54
	54	>6.23	>6.10	>6.04	>6.04	>6.35	>6.13	>6.77	>6.66	>5.22
	72	>6.23	>6.10	>6.04	>6.04	>6.35	>6.13	>6.77	>6.66	>5.22
	90	>6.23	>6.10	>6.04	>6.04	>6.35	>6.13	>6.77	>6.66	>5.22
試験回数		n=2	n=2	n=2	n=2	n=4	n=2	n=2	n=2	n=2

MeOH を 0 - 100 w/w%の間で 20 w/w%刻みで MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を添加して 10 秒間および 1 分間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値（ $\log_{10}$ reduction : LR）を算出した。作用前後で $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

表 2-4. EtOH の一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果

作用時間	終濃度 [w/w%]	グラム陽性菌						グラム陰性菌		酵母様真菌
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 25923	ATCC 12228	NBRC 100485	NBRC 3187	ATCC 29212	NBRC 100450	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 10231
10秒間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	-0.21	-0.47	0.20	-0.30	0.06	-0.37	0.22	-0.10	0.08
	36	1.57	0.34	1.58	0.54	1.02	0.98	>6.68	>6.41	>5.20
	54	>6.04	>6.00	>6.04	1.34	>6.28	>6.13	>6.68	>6.41	>5.20
	72	>6.04	>6.00	>6.04	>6.04	>6.28	>6.13	>6.68	>6.41	>5.20
	90	>6.04	>6.00	>6.04	>6.04	>6.28	>6.13	>6.68	>6.41	>5.20
1分間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	-0.33	-0.28	0.14	-0.19	-0.08	-0.25	0.19	0.06	0.16
	36	>6.04	>6.00	4.74	>6.04	5.77	>6.13	>6.68	>6.41	>5.20
	54	>6.04	>6.00	>6.04	>6.04	>6.28	>6.13	>6.68	>6.41	>5.20
	72	>6.04	>6.00	>6.04	>6.04	>6.28	>6.13	>6.68	>6.41	>5.20
	90	>6.04	>6.00	>6.04	>6.04	>6.28	>6.13	>6.68	>6.41	>5.20
試験回数		n=4	n=4	n=2	n=2	n=6	n=2	n=2	n=4	n=4

EtOH を 0 - 100 w/w%の間で 20 w/w%刻みで MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を添加して 10 秒間および 1 分間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値（ $\log_{10}$ reduction : LR）を算出した。作用前後で $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

表 2-5. 1-PrOH の一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果

作用時間	終濃度 [w/w%]	グラム陽性菌						グラム陰性菌		酵母様真菌
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 25923	ATCC 12228	NBRC 100485	NBRC 3187	ATCC 29212	NBRC 100450	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 10231
10秒間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	2.10	2.64	3.39	1.65	4.67	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
	36	>6.10	>6.24	>6.04	>6.32	>6.39	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
	54	>6.10	>6.24	>6.04	>6.32	>6.39	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
	72	>6.10	>6.24	>6.04	>6.32	>6.39	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
	90	>6.10	>6.24	>6.04	>6.32	>6.39	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
1分間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	>6.10	>6.24	>6.04	5.62	>6.39	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
	36	>6.10	>6.24	>6.04	>6.32	>6.39	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
	54	>6.10	>6.24	>6.04	>6.32	>6.39	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
	72	>6.10	>6.24	>6.04	>6.32	>6.39	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
	90	>6.10	>6.24	>6.04	>6.32	>6.39	>6.13	>6.11	>6.13	>5.08
試験回数		n=4	n=4-8	n=2	n=2	n=4-6	n=2	n=4	n=4	n=4-6

1-PrOH を 0 - 100 w/w%の間で 20 w/w%刻みで MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を添加して 10 秒間および 1 分間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値（ $\log_{10}$ reduction : LR）を算出した。作用前後で $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

表 2-6. 2-PrOH の一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果

作用時間	終濃度 [w/w%]	グラム陽性菌						グラム陰性菌		酵母様真菌
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 25923	ATCC 12228	NBRC 100485	NBRC 3187	ATCC 29212	NBRC 100450	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 10231
10秒間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	0.06	-0.08	0.09	>6.04	-0.17	0.12	0.51	0.71	0.08
	36	3.12	1.97	>6.04	>6.04	>6.28	>6.08	>6.01	>6.32	>5.10
	54	>6.43	>5.98	>6.04	>6.04	>6.28	>6.08	>6.01	>6.32	>5.10
	72	>6.43	>5.98	>6.04	>6.04	>6.28	>6.08	>6.01	>6.32	>5.10
	90	>6.43	>5.98	>6.04	>6.04	>6.28	>6.08	>6.01	>6.32	>5.10
1分間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	0.34	-0.12	0.14	>6.04	-0.01	-0.07	>6.01	4.28	1.01
	36	>6.43	>5.98	>6.04	>6.04	>6.28	>6.08	>6.01	>6.32	>5.10
	54	>6.43	>5.98	>6.04	>6.04	>6.28	>6.08	>6.01	>6.32	>5.10
	72	>6.43	>5.98	>6.04	>6.04	>6.28	>6.08	>6.01	>6.32	>5.10
	90	>6.43	>5.98	>6.04	>6.04	>6.28	>6.08	>6.01	>6.32	>5.10
試験回数		n=6-8	n=4	n=2	n=2	n=4	n=2	n=4-8	n=4-8	n=4

2-PrOH を 0 - 100 w/w%の間で 20 w/w%刻みで MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を添加して 10 秒間および 1 分間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値（ $\log_{10}$ reduction : LR）を算出した。作用前後で $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

表 2-7. 1-BuOH の一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果

作用時間	終濃度 [w/w%]	グラム陽性菌						グラム陰性菌		酵母様真菌
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 25923	ATCC 12228	NBRC 100485	NBRC 3187	ATCC 29212	NBRC 100450	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 10231
10秒間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
	36	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
	54	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
	72	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
	90	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
1分間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
	36	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
	54	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
	72	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
	90	>6.70	>5.92	>5.78	>6.04	>6.28	>6.08	>5.94	>5.86	>5.07
試験回数		n=4	n=4	n=2	n=2	n=4	n=2	n=4	n=2	n=4

1-BuOH を 0 - 100 w/w%の間で 20 w/w%刻みで MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を添加して 10 秒間および 1 分間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値（ $\log_{10}$ reduction : LR）を算出した。作用前後で $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

表 2-8. 1-BuOH の細菌芽胞、皮膚糸状菌および非結核性抗酸菌に対する殺菌効果

作用時間	終濃度 [w/w%]	細菌芽胞	皮膚糸状菌		非結核性抗酸菌	
		<i>B. subtilis</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. avium</i>
		NBRC 13722	NBRC 5466	NBRC 5467	ATCC 1997	ATCC 19421
10秒間	0%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18%	0.21	>3.40	2.06	>6.04	2.68
	90%	1.41	Not tested	Not tested	Not tested	Not tested
1分間	0%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18%	0.27	>3.40	>3.71	>6.04	>6.28
	90%	2.00	Not tested	Not tested	Not tested	Not tested
試験回数		n=2	n=2	n=2	n=2	n=2

1-BuOH を 20 w/w% と 90 w/w% とし MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を添加して 10 秒間および 1 分間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値（ $\log_{10}$ reduction : LR）を算出した。作用前後で $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。*T. mentagrophytes* と *T. rubrum* は初期菌数が 10^5 CFU/mL と低値であったため、コロニーの発育が認められなかった場合に殺菌効果ありと判定し、その時のアルコール濃度を殺菌に必要なアルコール濃度とした。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

表 2-9. 2-BuOH の一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果

作用時間	終濃度 [w/w%]	グラム陽性菌						グラム陰性菌		酵母様真菌
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 25923	ATCC 12228	NBRC 100485	NBRC 3187	ATCC 29212	NBRC 100450	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 10231
10秒間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	4.93	2.71	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
	36	4.95	3.08	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
	54	5.45	3.62	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
	72	>6.21	3.84	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
	90	>6.21	>5.89	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
1分間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	>6.21	4.65	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
	36	>6.21	>5.89	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
	54	>6.21	>5.89	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
	72	>6.21	>5.89	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
	90	>6.21	>5.89	>5.78	>6.32	>6.28	>6.08	>6.11	>6.27	>5.27
試験回数		n=6	n=6	n=2	n=2	n=4	n=2	n=6	n=4	n=4

2-BuOH を 0 - 100 w/w% の間で 20 w/w% 刻みで MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を添加して 10 秒間および 1 分間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値（ $\log_{10}$ reduction : LR）を算出した。作用前後で $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

表 2-10. *t*-BuOH の一般細菌および酵母様真菌に対する殺菌効果

作用時間	終濃度 [w/w%]	グラム陽性菌						グラム陰性菌		酵母様真菌
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 25923	ATCC 12228	NBRC 100485	NBRC 3187	ATCC 29212	NBRC 100450	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 10231
10秒間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	0.51	0.48	-0.07	1.32	-0.11	-0.20	>6.36	3.15	0.17
	36	2.96	3.57	>5.78	>6.28	5.50	>6.39	>6.36	>6.63	4.78
	54	>6.22	5.00	>5.78	>6.28	>6.25	>6.39	>6.36	>6.63	>5.29
	72	>6.22	>6.11	>5.78	>6.28	>6.25	>6.39	>6.36	>6.63	>5.29
	90	>6.22	>6.11	>5.78	>6.28	>6.25	>6.39	>6.36	>6.63	>5.29
1分間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	0.51	1.56	0.82	4.43	2.61	1.79	>6.36	>6.63	0.19
	36	2.96	>6.11	>5.78	>6.28	>6.25	>6.39	>6.36	>6.63	>5.29
	54	>6.22	>6.11	>5.78	>6.28	>6.25	>6.39	>6.36	>6.63	>5.29
	72	>6.22	>6.11	>5.78	>6.28	>6.25	>6.39	>6.36	>6.63	>5.29
	90	>6.22	>6.11	>5.78	>6.28	>6.25	>6.39	>6.36	>6.63	>5.29
試験回数		n=4-10	n=4-10	n=2	n=2	n=4-8	n=2	n=4-8	n=6-8	n=4-8

t-BuOH を 0 - 100 w/w%の間で 20 w/w%刻みで MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を添加して 10 秒間および 1 分間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値（ $\log_{10}$ reduction : LR）を算出した。作用前後で $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

表 2-11. *S. aureus* ATCC 25923 に対するアルコール 14 種類の殺菌効果

作用時間	濃度 [w/w%]	IBA	1-Pentanol	2-Pentanol	<i>t</i> -Amyl alcohol	Ethylene Glycol	1,3-Propanediol	Glycerin
10秒間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	>6.43	0.73	1.95	2.69	0.09	-0.12	-0.05
	36	>6.43	0.79	1.97	2.39	0.09	0.03	-0.22
	54	>6.43	1.93	2.03	2.69	-0.03	-0.11	-0.01
	72	>6.43	2.03	1.68	3.81	0.03	-0.12	-0.07
	90	>6.43	1.98	2.70	2.69	2.06	0.21	-0.05
1分間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	>6.43	>5.63	>5.88	4.69	-0.21	0.06	-0.22
	36	>6.43	>5.63	>5.88	5.29	0.09	0.25	-0.17
	54	>6.43	>5.63	>5.88	>6.29	0.20	0.03	0.01
	72	>6.43	>5.63	>5.88	>6.29	0.16	0.34	-0.11
	90	>6.43	>5.63	>5.88	>6.29	5.03	0.59	0.11
試験回数		n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2

(結果再掲)

作用時間	濃度 [w/w%]	MeOH	EtOH	1-PrOH	2-PrOH	1-BuOH	2-BuOH	<i>t</i> -BuOH
10秒間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	-0.37	-0.21	2.10	0.06	>6.70	4.93	0.51
	36	-0.15	1.57	>6.10	3.12	>6.70	4.95	2.96
	54	>6.23	>6.04	>6.10	>6.43	>6.70	5.45	>6.22
	72	>6.23	>6.04	>6.10	>6.43	>6.70	>6.21	>6.22
	90	>6.23	>6.04	>6.10	>6.43	>6.70	>6.21	>6.22
1分間	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	18	-0.26	-0.33	>6.10	0.34	>6.70	>6.21	0.51
	36	0.69	>6.04	>6.10	>6.43	>6.70	>6.21	2.96
	54	>6.23	>6.04	>6.10	>6.43	>6.70	>6.21	>6.22
	72	>6.23	>6.04	>6.10	>6.43	>6.70	>6.21	>6.22
	90	>6.23	>6.04	>6.10	>6.43	>6.70	>6.21	>6.22
試験回数		n=2	n=4	n=4	n=6-8	n=4	n=6	n=4-10

S. aureus ATCC 25923 に対してアルコールの 14 種類別の結果を表示する。追加したアルコールは IBA、1-Pentanol、2-Pentanol、*t*-Amyl alcohol、Ethylene Glycol、1,3-Propanediol、Glycerin であり、これら以外のアルコールの結果は再掲となる。これらを 0 - 100 w/w%の間で 20 w/w%刻みで MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を添加して 10 秒間および 1 分間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値（ $\log_{10}$ reduction : LR）を算出した。作用前後で $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

2.6 図

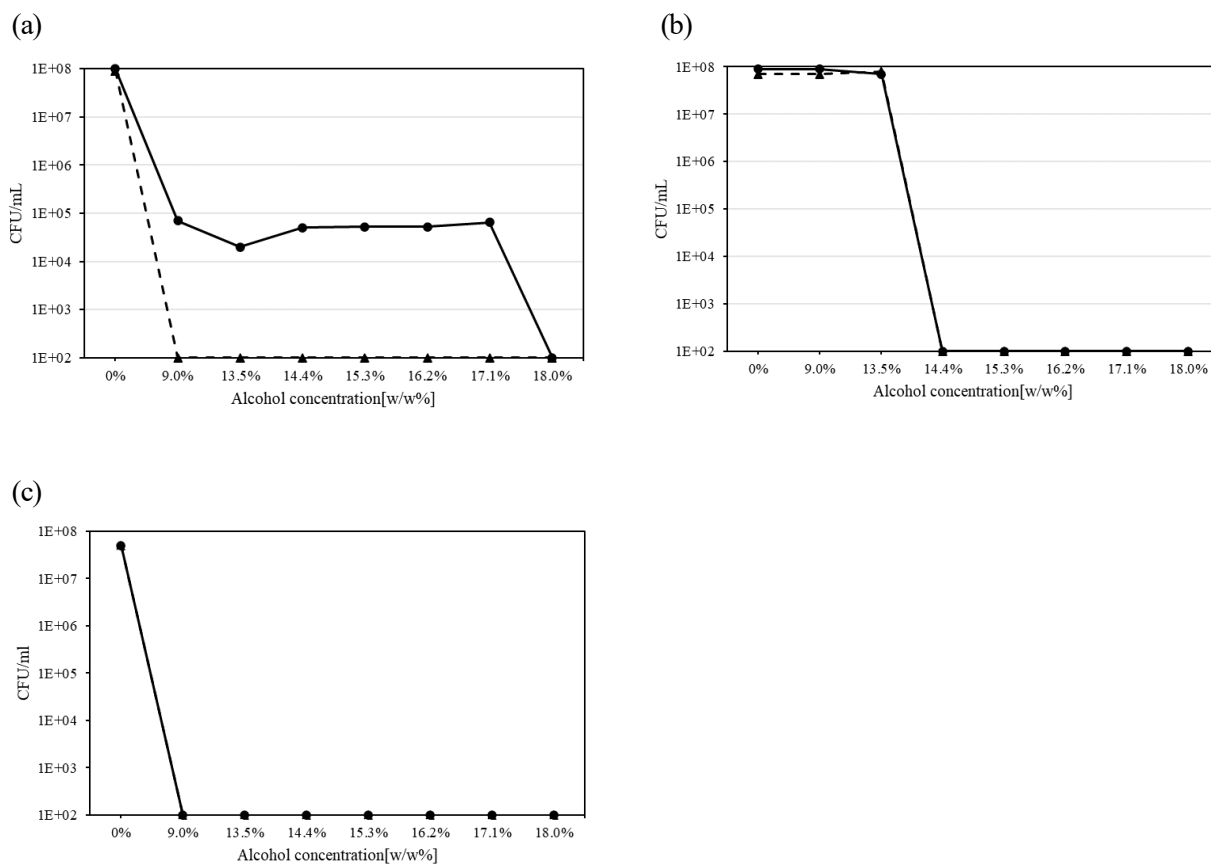


図 2 - 1. 1-BuOH に対する殺菌アルコール濃度 (n=2)

直線：作用時間 10 秒間、点線：作用時間 1 分間

(a) *S. aureus* ATCC 25923

(b) *E. faecalis* ATCC 29212

(c) *E. coli* ATCC 25922

1-BuOH の終濃度と供試アルコールは、それぞれ終濃度 9.0 w/w% (供試アルコール 10 w/w%)、終濃度 13.5 w/w% (供試アルコール 15 w/w%)、終濃度 14.4 w/w% (供試アルコール 16 w/w%)、終濃度 15.3 w/w% (供試アルコール 17 w/w%)、終濃度 16.2 w/w% (供試アルコール 18 w/w%)、終濃度 17.1 w/w% (供試アルコール 19 w/w%)、終濃度 18 w/w% (供試アルコール 20 w/w%) とし、MilliQ 水を用いて希釈した。供試アルコール 900 μ L に、供試菌液 (約 10^8 CFU/mL) 100 μ L を添加して 10 秒間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値 ($\log_{10}$ reduction: LR) を算出した。作用前後、 $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。

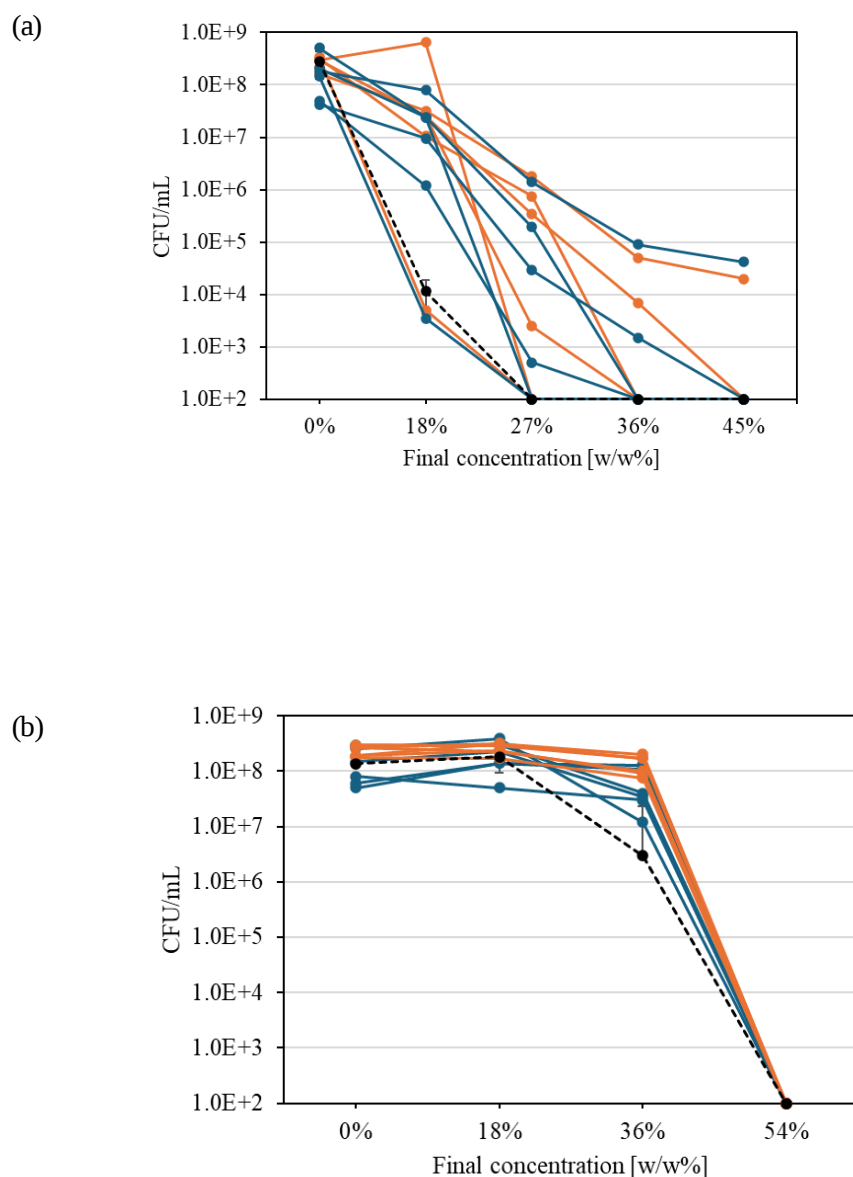


図 2 - 2. MRSA に対する作用時間 10 秒間の殺菌効果 (n=2)

(a) 1-PrOH (b) EtOH

—●— 1998 年

—●— 2019 年

点線 : *S. aureus* ATCC 25923

1-PrOH または EtOH を 0 - 50 w/w%の間で 10 w/w%刻みで MilliQ 水を用いて希釈した供試アルコール 900 μ L に、供試菌液 (約 10^8 CFU/mL) 100 μ L を添加して 10 秒間後の生菌数を指数変換し、「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数」を差し引いて対数減少値 ($\log_{10}$ reduction : LR) を算出した。作用前後、 $LR \geq 5$ を満たすことで殺菌効果を評価した。

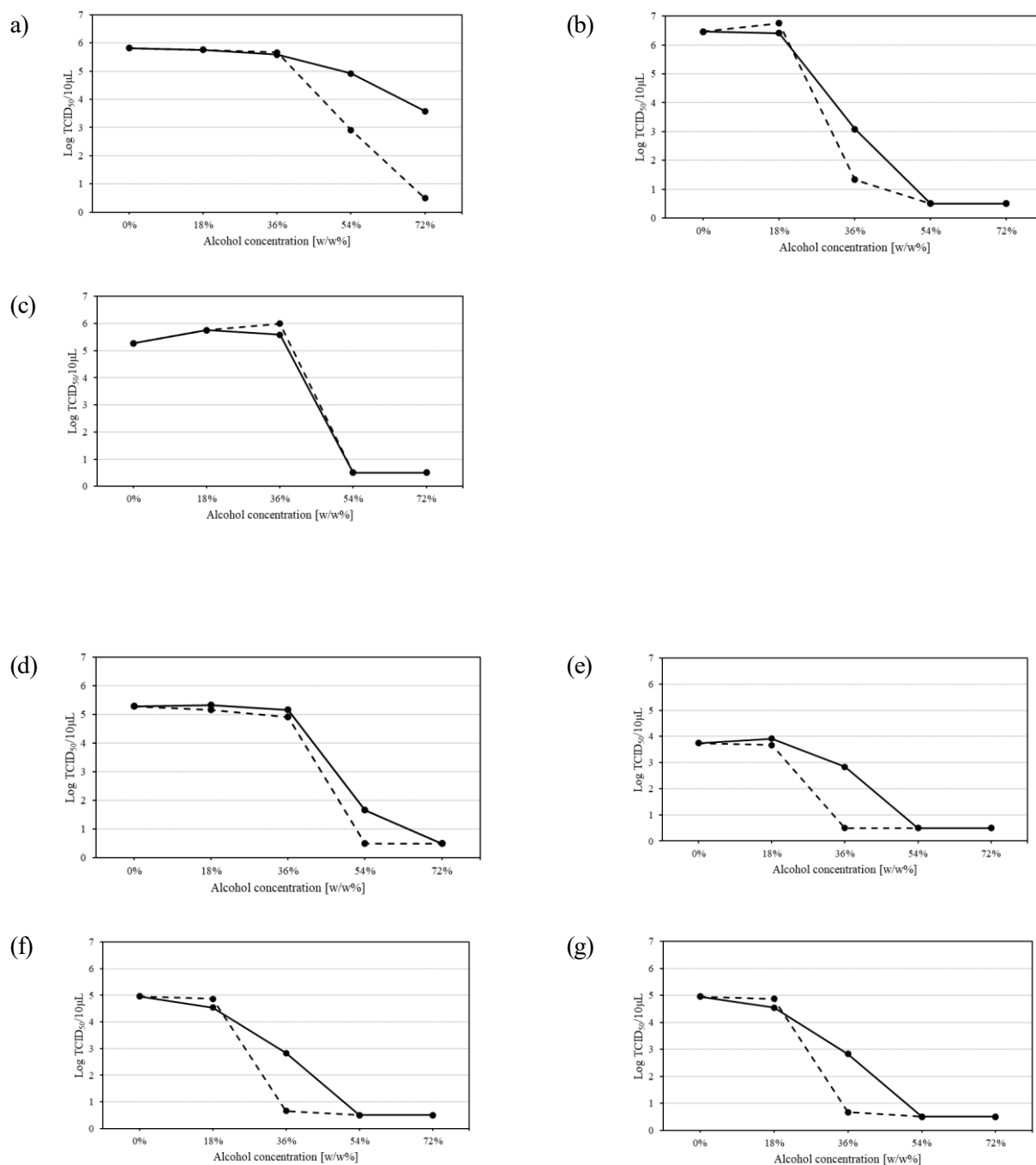


図2-3. MeOH のウイルス不活化効果

ノンエンベロープウイルス (a) FCV/F9 (b) CBV5 (c) Ad.5

エンベロープウイルス (d) A/PR8 (e) A/pdm.2009 No.48 (f) HSV-UW (g) HSV/HF

直線：作用時間 10 秒間、点線：作用時間 1 分間 Detection limit 0.67

MeOH 0 - 80 w/w%の間、20 w/w%刻みとした供試アルコール 900 µL に、供試ウイルス液（約 10^{5-6} TCID₅₀/10 µL）100 µL を添加し、10 秒間後および1 分間後のウイルス感染価を求め、「作用前のウイルス感染価」から「作用後のウイルス感染価」を差し引いた値を $\log_{10}$ reduction : LR とした。作用前後で LR ≥ 3 以上認められた際のアルコール濃度、および CPE が認められなかったアルコール濃度をウイルス不活化効果の有無の基準とした。

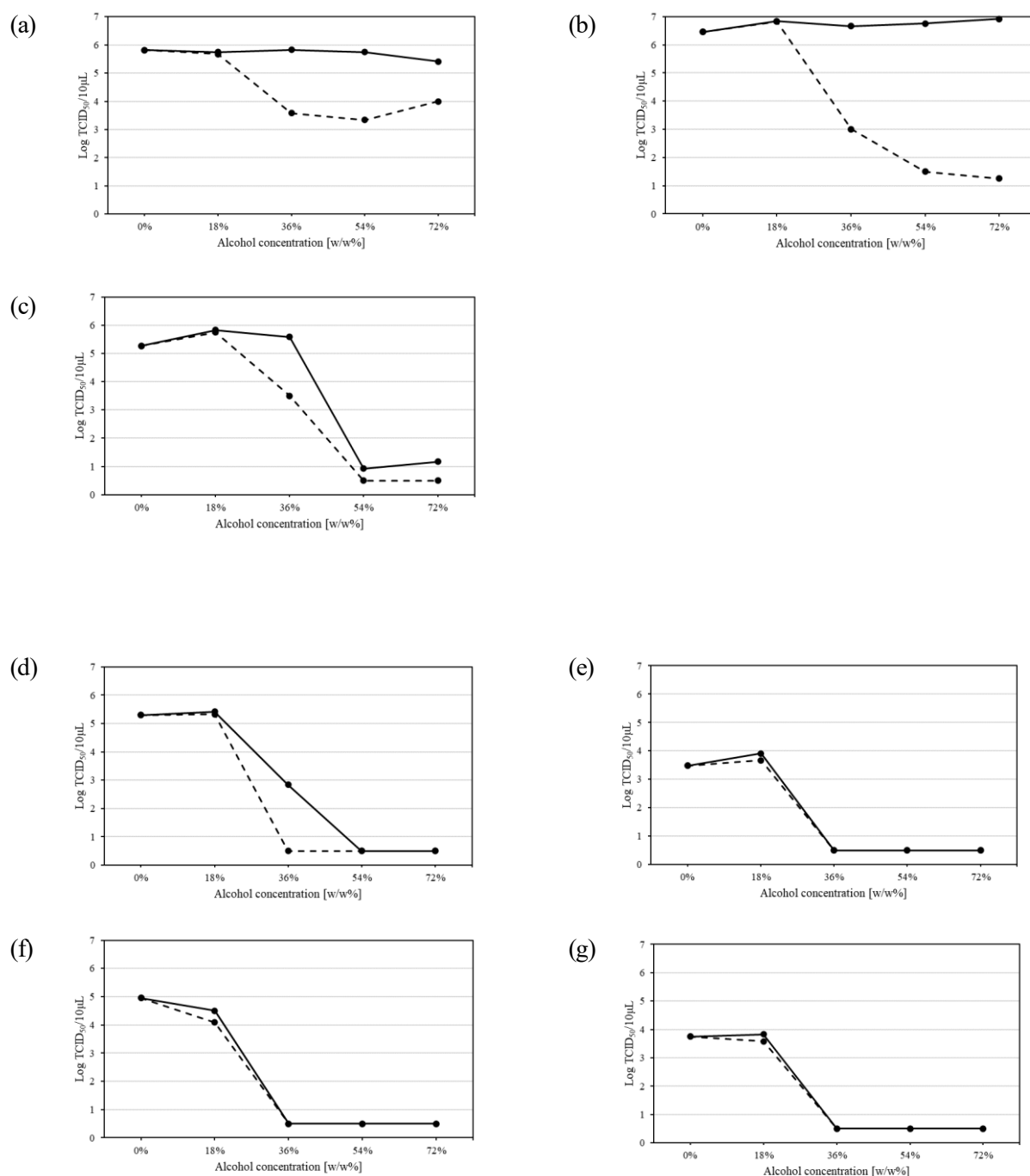


図2-4. EtOH のウイルス不活化効果

ノンエンベロープウイルス (a) FCV/F9 (b) CBV5 (c) Ad.5

エンベロープウイルス (d) A/PR8 (e) A/pdm.2009 No.48 (f) HSV-UW (g) HSV/HF

直線：作用時間 10 秒間、点線：作用時間 1 分間 Detection limit 0.67

EtOH 0 - 80 w/w%の間、20 w/w%刻みとした供試アルコール 900 µL に、供試ウイルス液（約 $10^{-5.6}$ TCID₅₀/10 µL）100 µL を添加し、10 秒間後および1 分間後のウイルス感染価を求め、「作用前のウイルス感染価」から「作用後のウイルス感染価」を差し引いた値を $\log_{10}$ reduction : LR とした。作用前後で $LR \geq 3$ 以上認められた際のアルコール濃度、および CPE が認められなかったアルコール濃度をウイルス不活化効果の有無の基準とした。

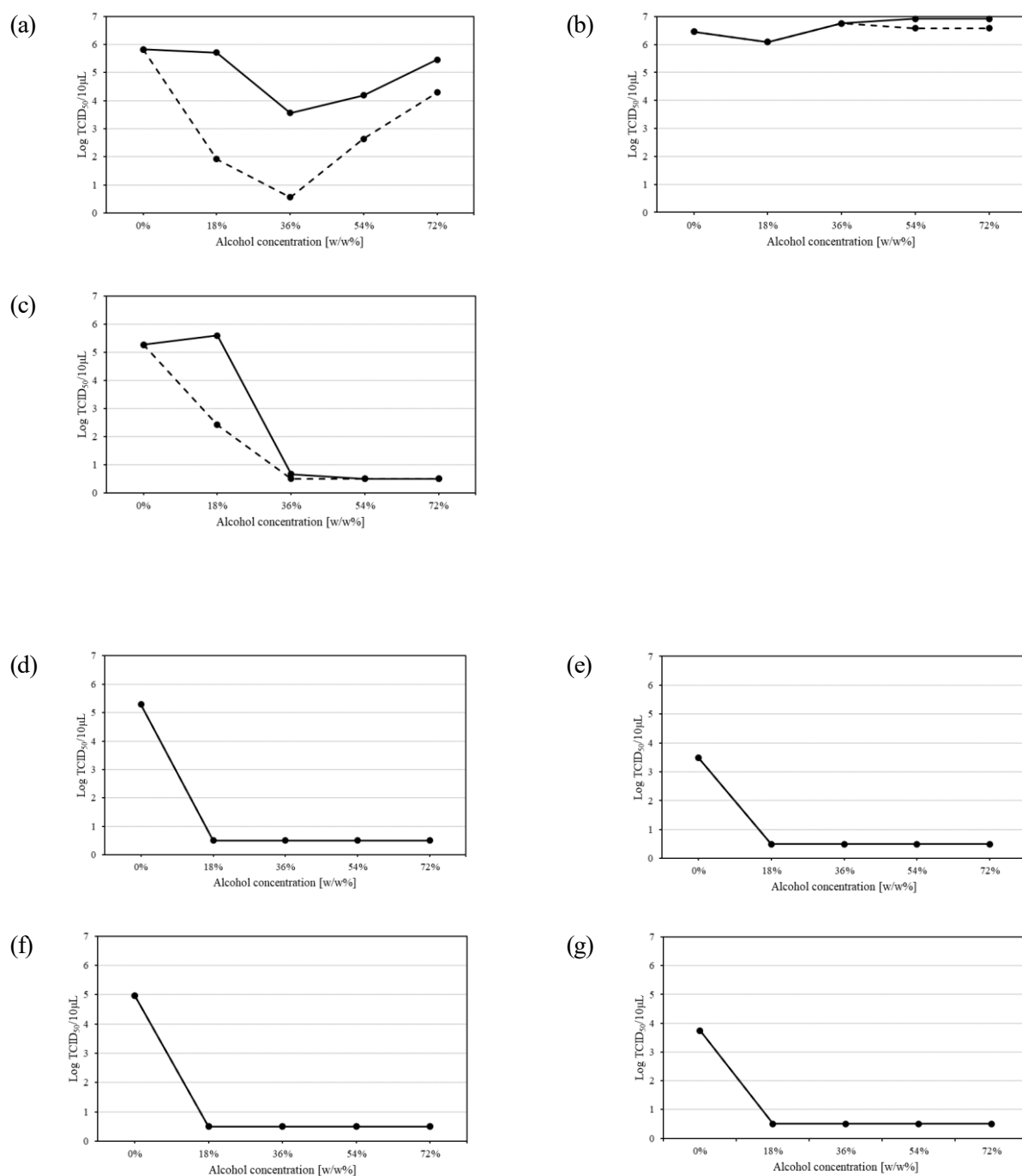


図2-5. 1-PrOH のウイルス不活化効果

ノンエンベロップウイルス (a) FCV/F9 (b) CBV5 (c) Ad.5

エンベロップウイルス (d) A/PR8 (e) A/pdm.2009 No.48 (f) HSV-UW (g) HSV/HF

直線：作用時間 10 秒間、点線：作用時間 1 分間 Detection limit 0.67

1-PrOH 0 - 80 w/w%の間、20 w/w%刻みとした供試アルコール 900 µL に、供試ウイルス液（約 $10^{-5.6}$ TCID₅₀/10µL）100 µL を添加し、10 秒間後および1 分間後のウイルス感染価を求め、「作用前のウイルス感染価」から「作用後のウイルス感染価」を差し引いた値を $\log_{10}$ reduction : LR とした。作用前後で $LR \geq 3$ 以上認められた際のアルコール濃度、および CPE が認められなかったアルコール濃度をウイルス不活化効果の有無の基準とした。

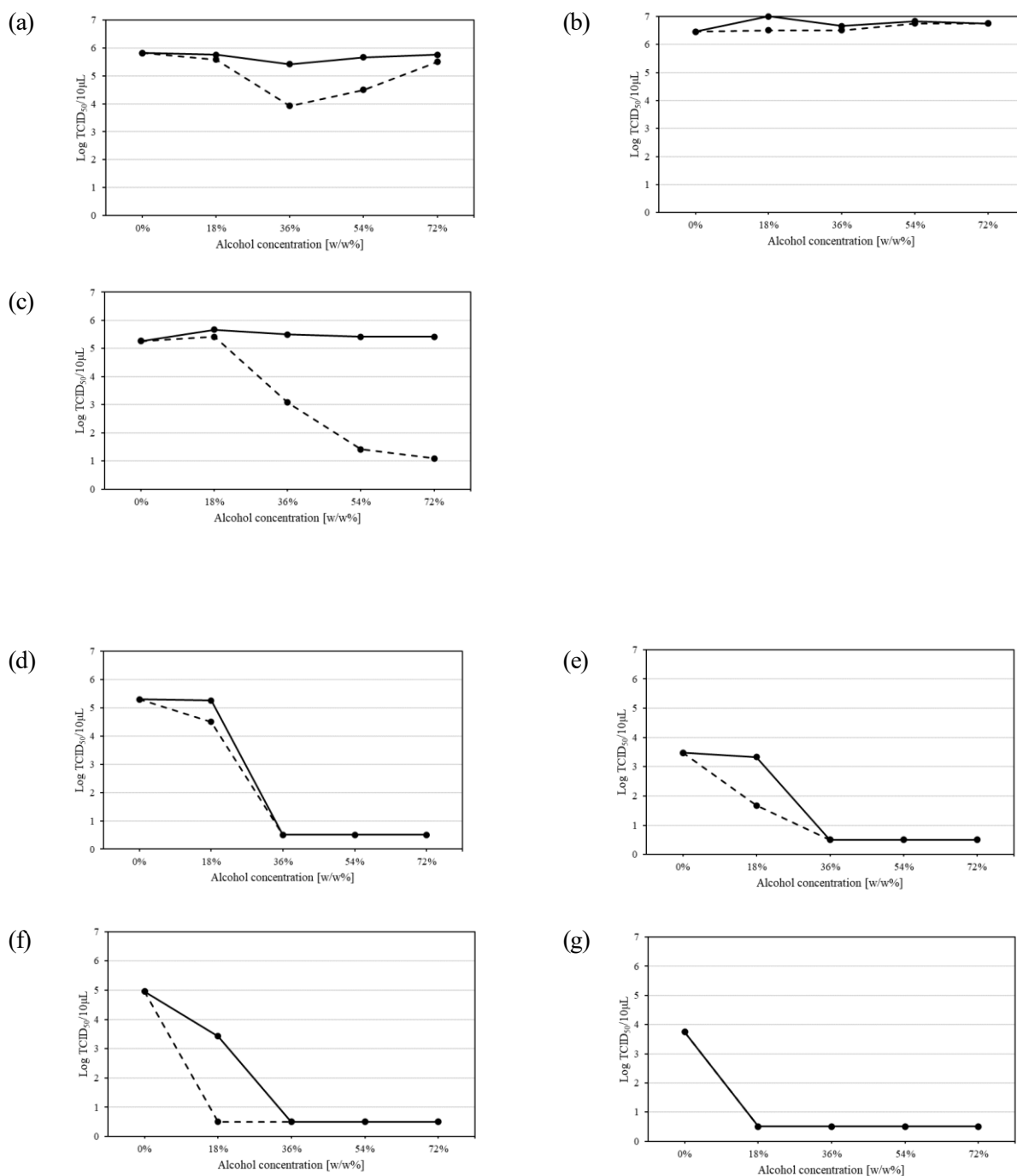


図2-6. 2-PrOH のウイルス不活化効果

ノンエンベロップウイルス (a) FCV/F9 (b) CBV5 (c) Ad.5

エンベロップウイルス (d) A/PR8 (e) A/pdm.2009 No.48 (f) HSV-UW (g) HSV/HF

直線：作用時間 10 秒間、点線：作用時間 1 分間 Detection limit 0.67

2-PrOH 0 - 80 w/w%の間、20 w/w%刻みとした供試アルコール 900 µL に、供試ウイルス液（約 10^{-5-6} TCID₅₀/10µL）100 µL を添加し、10 秒間後および1 分間後のウイルス感染価を求め、「作用前のウイルス感染価」から「作用後のウイルス感染価」を差し引いた値を $\log_{10}$ reduction : LR とした。作用前後で $LR \geq 3$ 以上認められた際のアルコール濃度、および CPE が認められなかったアルコール濃度をウイルス不活化効果の有無の基準とした。

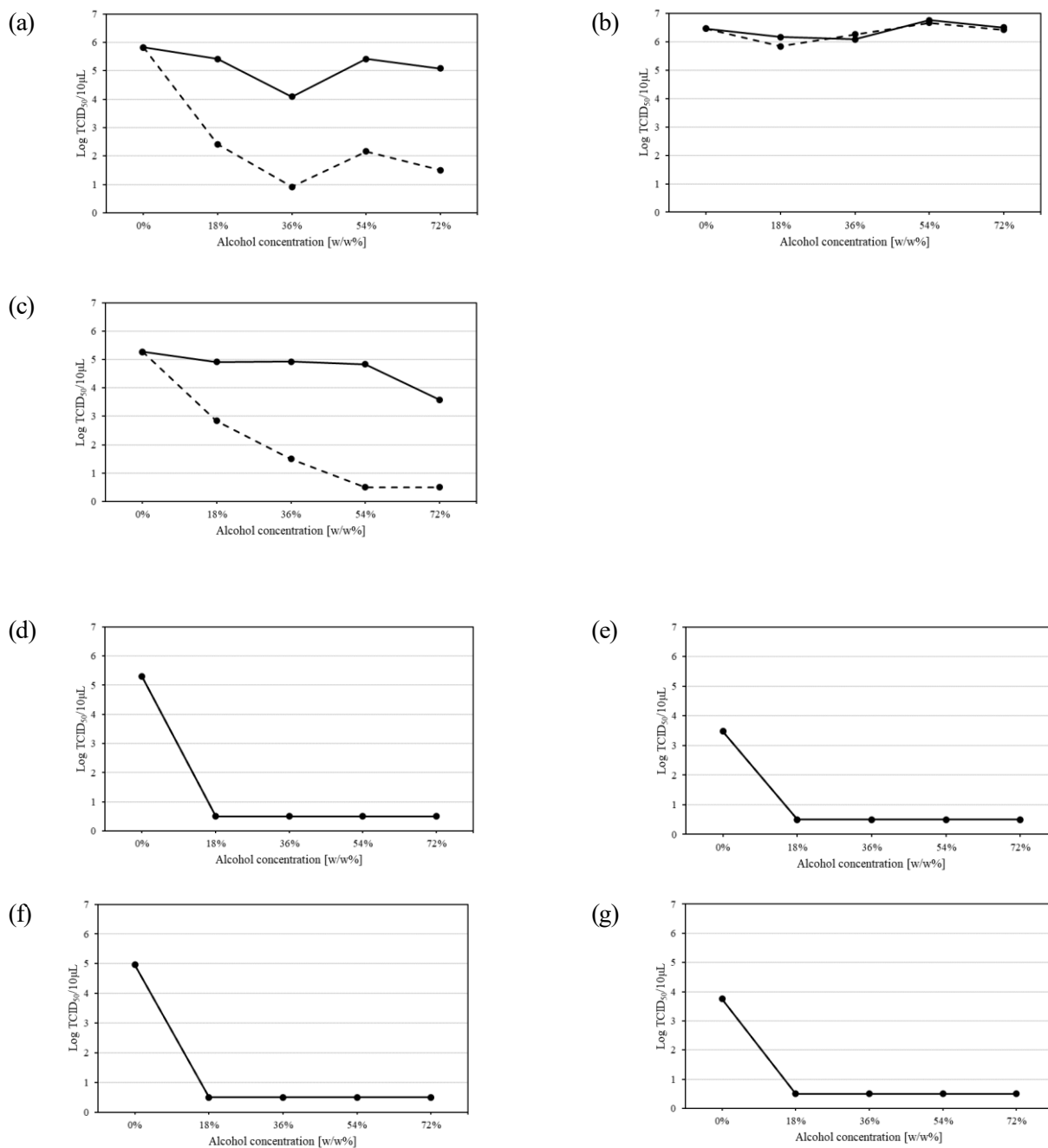


図2-7. 1-BuOH のウイルス不活化効果

ノンエンベロープウイルス (a) FCV/F9 (b) CBV5 (c) Ad.5

エンベロープウイルス (d) A/PR8 (e) A/pdm.2009 No.48 (f) HSV-UW (g) HSV/HF

直線：作用時間 10 秒間、点線：作用時間 1 分間 Detection limit 0.67

1-BuOH 0 - 80 w/w%の間、20 w/w%刻みとした供試アルコール 900 µL に、供試ウイルス液（約 $10^{-5.6}$ TCID₅₀/10 µL）100 µL を添加し、10 秒間後および1 分間後のウイルス感染価を求め、「作用前のウイルス感染価」から「作用後のウイルス感染価」を差し引いた値を $\log_{10}$ reduction : LR とした。作用前後で LR ≥ 3 以上認められた際のアルコール濃度、および CPE が認められなかったアルコール濃度をウイルス不活化効果の有無の基準とした。

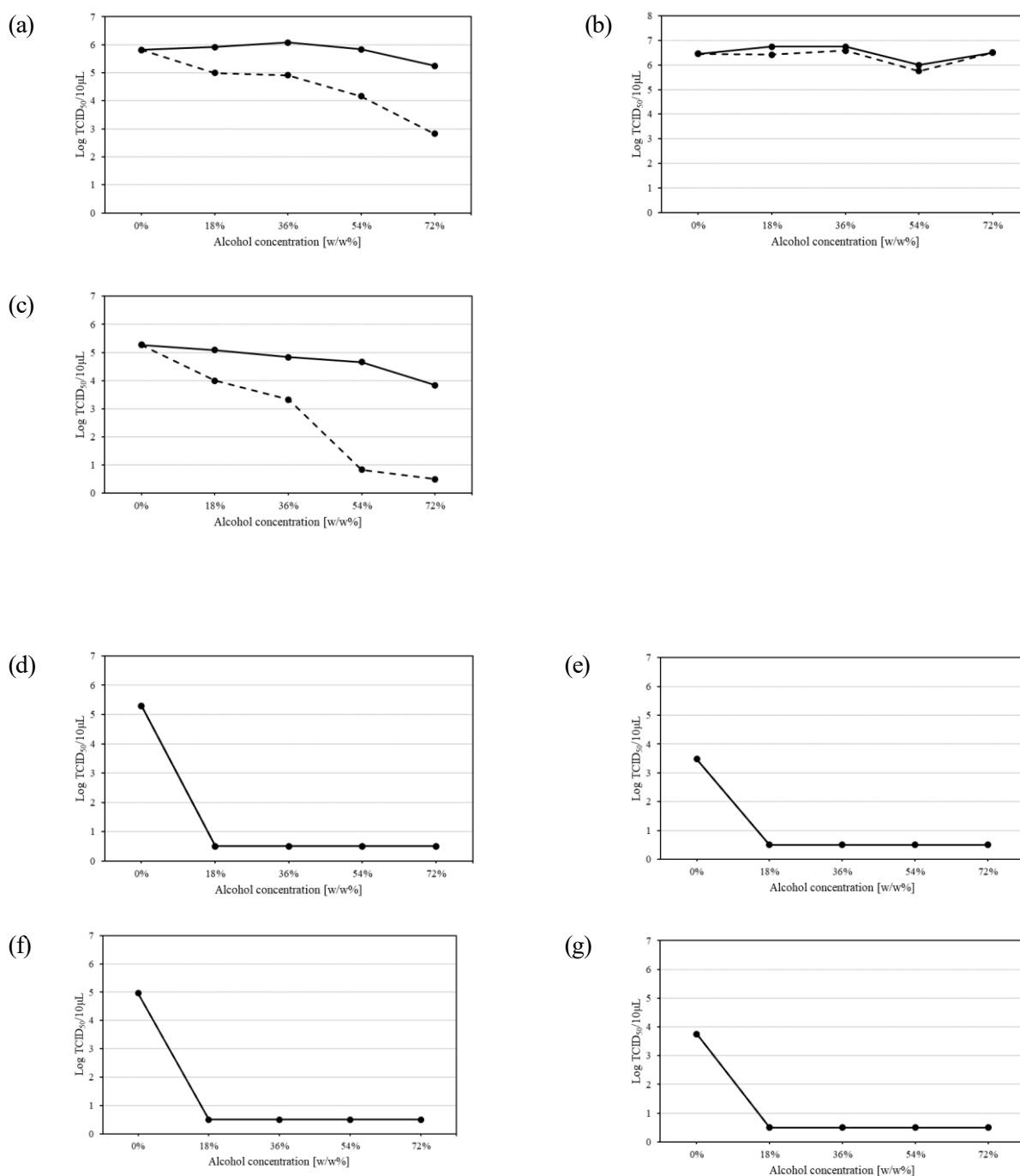


図2-8. 2-BuOH のウイルス不活化効果

ノンエンベロップウイルス (a) FCV/F9 (b) CBV5 (c) Ad.5

エンベロップウイルス (d) A/PR8 (e) A/pdm.2009 No.48 (f) HSV-UW (g) HSV/HF

直線：作用時間 10 秒間、点線：作用時間 1 分間 Detection limit 0.67

2-BuOH 0 - 80 w/w%の間、20 w/w%刻みとした供試アルコール 900 µL に、供試ウイルス液（約 $10^{-5.6}$ TCID₅₀/10µL）100 µL を添加し、10 秒間後および1 分間後のウイルス感染価を求め、「作用前のウイルス感染価」から「作用後のウイルス感染価」を差し引いた値を $\log_{10}$ reduction : LR とした。作用前後で $LR \geq 3$ 以上認められた際のアルコール濃度、および CPE が認められなかったアルコール濃度をウイルス不活化効果の有無の基準とした。

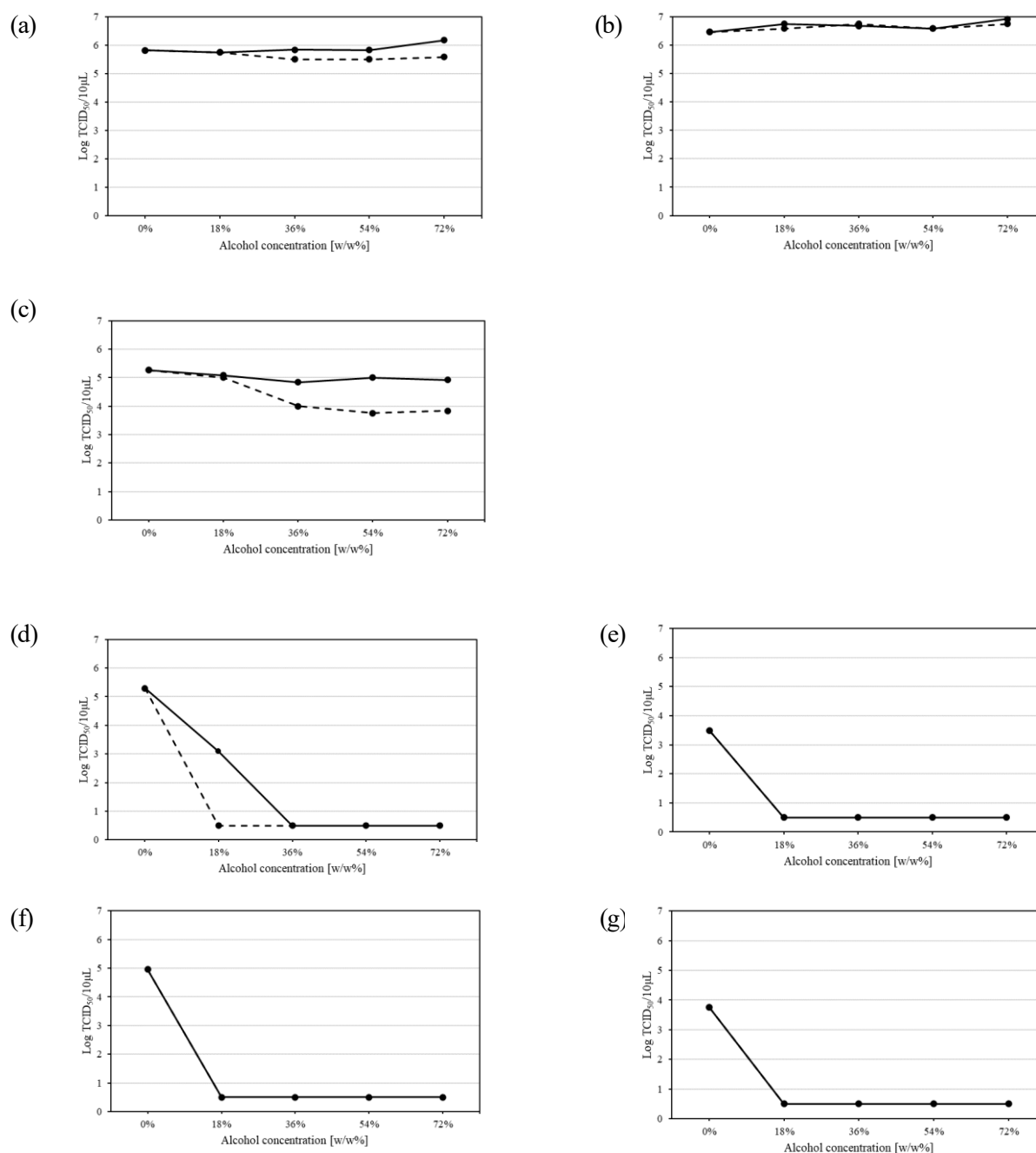


図2-9. *t*-BuOH のウイルス不活化効果

ノンエンベロープウイルス (a) FCV/F9 (b) CBV5 (c) Ad.5

エンベロープウイルス (d) A/PR8 (e) A/pdm.2009 No.48 (f) HSV-UW (g) HSV/HF

直線：作用時間 10 秒間、点線：作用時間 1 分間 Detection limit 0.67

t-BuOH 0 - 80 w/w%の間、20 w/w%刻みとした供試アルコール 900 µL に、供試ウイルス液（約 10^{-5.6} TCID₅₀/10µL）100 µL を添加し、10 秒間後および1 分間後のウイルス感染価を求め、「作用前のウイルス感染価」から「作用後のウイルス感染価」を差し引いた値を log₁₀ reduction : LR とした。作用前後で LR ≥ 3 以上認められた際のアルコール濃度、および CPE が認められなかったアルコール濃度をウイルス不活化効果の有無の基準とした。

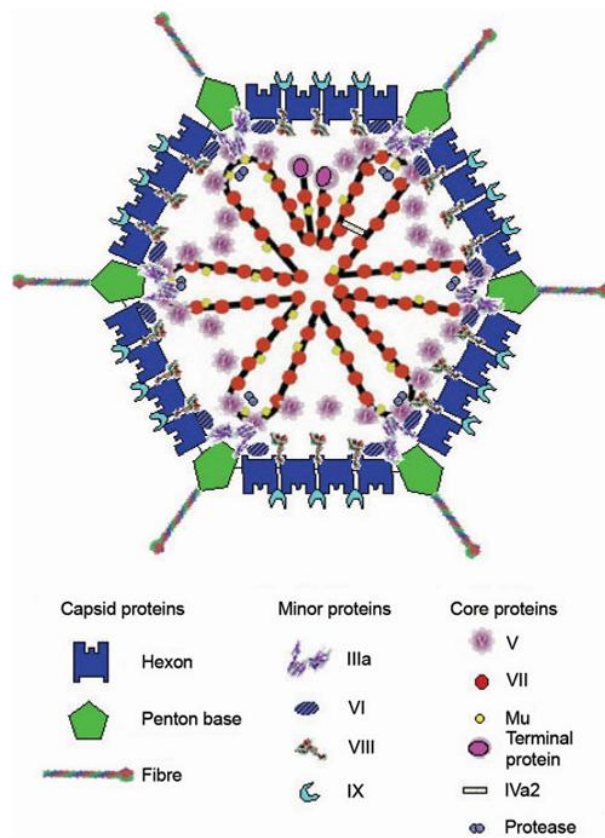


図 2-10. アデノウイルスの構造¹⁴⁾

<クライオ電子顕微鏡と結晶構造解析に基づく構造の概略図>

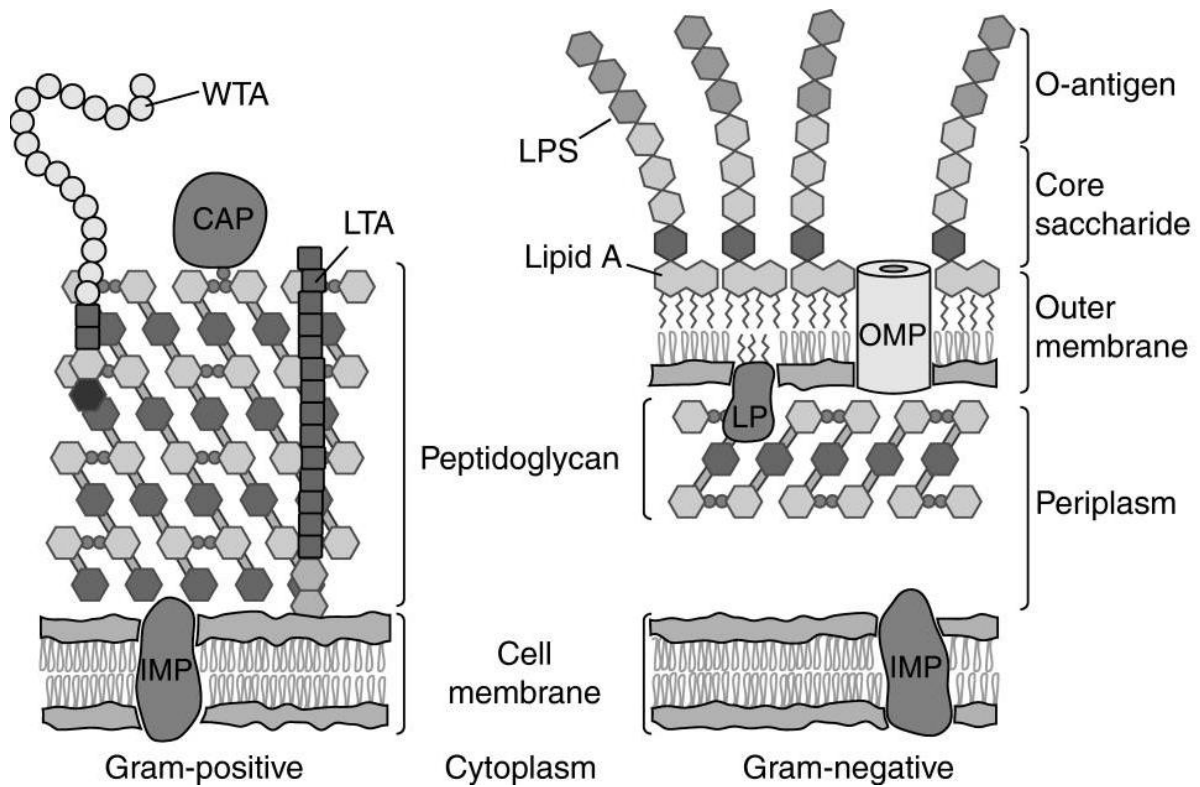


図 2-11. グラム陽性菌とグラム陰性菌の構造¹⁸⁾

WTA : 壁タイコ酸

LTA : リポタイコ酸 (ペプチドグリカン)

CAP : 共有結合タンパク質

IMP : 内在性膜タンパク質

Lipid A-LPS : リポ多糖 (O 抗原)

OMP : 外膜タンパク質 (外膜)

LP : リポタンパク質 (ペリプラズム)

著者が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 修士課程「アルコール類における殺菌効果と化学的性質に関する研究」で検討した微生物を以下に示す。*S.aureus* ATCC25923、*S. epidermidis* ATCC12228、*E. faecalis* ATCC29212、*E. ATCC25922* と *P. aeruginosa* ATCC27853 および *C. albicans* ATCC10231 の 6 種、*S. aureus* ATCC 25923、*E. faecalis* ATCC29212 および *E. coli* ATCC 25922 の 3 種に対する 1-BuOH の 1%刻みの殺菌結果、1-Pentanol、2-Pentanol、*t*-Amy alcohol、Ethylene Glycol、1,3-Propanediol、Glycerin の 6 種のアルコールの殺菌結果、さらに「炭素数の異なるアルコール 11 種を用いた殺菌効果の検討」として、*E. faecium* NBRC100485 と *E. hirae* NBRC3187 を加えた原著論文が日本防菌防黴学会誌へ掲載されている。

以下は博士課程で検討を加えた微生物である。*E. faecalis* NBRC100450 の 3 種、*T. rubrum* NBRC 5467、*T. mentagrophytes* NBRC 5466 の 2 種、*M. abcessus* ATCC 1997 と *M. avium* ATCC 19421 の 2 種、MRSA 臨床分離株 65 株、*B. subtilis* NBRC 9455、FCV/F9、CVB5、Ad.5、A/PR8、A/pdm.2009No.48、HSV-HF、HSV-UW の 7 種、以上。

第3章 *Chlamydia trachomatis* の細胞形態変化による感染の判定と耐性菌検出に関する検討

感染症の要因である感染経路、感染源、宿主のうち、感染源の同定に関する検討として *Chlamydia trachomatis* に着目した。性感染症の中で最も患者数が多い性器クラミジア感染症は、*Chlamydia trachomatis* による感染症である。我が国での感染症発生動向調査における定点当たりの報告数は、男女ともに2002年をピークに減少傾向にあったが、2016年には増加に転じ、それ以降ゆるやかな増加傾向が続いている²⁷⁾。クラミジアに感染して1-3週間経過すると、男性では尿道炎と精巣上体炎を、女性では子宮頸管炎と骨盤内炎症性疾患を発症するが、男女ともに無症状または無症候の保菌者が多数存在する。さらに女性への重大な後遺症として、骨盤内炎症性疾患により不妊症になることや、妊娠中に感染することで流産および早産のリスクがあることが知られている²⁸⁾。こうした影響は現代の少子化の進行を助長する深刻な社会問題となりうることから、クラミジア感染を拡大させないためにも、医療機関において無症候感染者を発見することが重要である。

性器クラミジア感染症の診断方法には、分離培養法、遺伝子検査法（核酸増幅法）、抗原検出法、血清診断法などがある²⁹⁾。日本性感染症学会の性感染症診断・治療ガイドライン（2016）³⁰⁾では、男性のクラミジア検出法には検体として初尿を用い、女性のクラミジア検査法には子宮頸部の分泌液または擦過検体を用いて、感度と特異度が高いPCRにより検査することが記載されている。この方法は2010年に発行されたCDCのガイドライン³¹⁾でも推奨されている信頼性の高い検出法である。現在、妊娠30週までに実施される性器クラミジアスクリーニング検査³²⁾ではPCR法が用いられていることが多い。クラミジアの治療には、マクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシン（Azithromycin: AZM）1,000mgの1回経口投与、または妊婦には投与しないのが原則とされるがニューキノロン系抗菌薬であるレボフロキサシン（Levofloxacin: LVFX）500mgの経口投与を1日1回7日間行うことが推奨され、治療の判定には、投薬開始2週間後の病原体の陰転化の確認により行われる³⁰⁾。しかし、近年、クラミジア性尿道炎に対するAZMの臨床効果が低下しているとの報告が散見される^{33,34)}。Manhartらの報告³²⁾では治療効果の判定が2-5週間であり、PCRを用いた2週間での判定では偽陽性の症例が含まれる可能性があること、Kissingerらの報告³⁴⁾でも再感染の可能性があることが示唆されており、AZMの臨床効果の低下がマクロライド耐性菌によるものか不明である。実際、AZMによる投薬治療後の検査における陽性者は、マクロライド耐性菌によるものかパートナーからの再感染か判別することは困難である。これまでにマクロライド耐性クラミジアは、他の細菌と同様にマクロライド耐性を示す23S rRNA遺伝子の変異を有することが示されていることから³⁵⁾、遺伝子変異の有無により耐性菌であるかどうかを判定することが可能である。しかし、遺伝子変異の有無による耐性化の判定は現実的ではなく、簡便に薬剤感受性試験が行える新たな検査方法が望まれる。

クラミジアは真核生物の円柱上皮細胞内でのみ増殖可能である偏性細胞内寄生性細菌であることから、実験的研究における感染の判定には、宿主細胞を蛍光抗体染色（Direct Fluorescent Antibody: DFA）して封入体数を計測する方法が採用されている³⁶⁾。しかし、DFAによる判定には蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡が必要であり、高価な研究設備の整備が求められることに加えて、染色した標本の保存期間が限られている欠点を有する。さらに、DFAによる判定は視覚的同定に依存しており、菌体の非特異的な発色を区別して個々の粒子の確認を行うため熟練が必要となる。そこで、DFAを行わずにクラミジア感染細胞の形態変化から判定を行う簡便な方法を見出し、さらには薬剤感受性試験への応用によるクラミジア耐性菌検出方法の探索を行うこととした。

3.1 方法

3.1.1 供試菌株と宿主細胞

供試菌株にはクラミジア Serovar E VR-348BTMを用いた。宿主細胞には McCoy 細胞 ATCC CRL-1696TMまたは HeLa 229 細胞 ATCC CCL-2.1TMを用いた。細胞培養の培地には、10% Fetal Bovine Serum (FBS、ニチレイバイオサイエンス株式会社) を添加したイーグル MEM 培地「ニッスイ」(E-MEM、日水製薬株式会社) を使用した。クラミジアを McCoy 細胞にて培養・増殖を行い、培養上清を 4°C、3000 rpm で 10 分間遠心分離した上清を -80°C で保存し、このクラミジア保存液を実験前に解凍して供試した。

3.1.2 実験方法

CO₂ インキュベーター内で 3-5 日間培養した細胞から 10⁴ cells/mL の細胞懸濁液を調整した後、12 Well 組織培養用マイクロプレート (付着性細胞用、IWAKI) の各 Well に 1 mL 入れ、CO₂ インキュベーターで 3-5 日間培養した。30 - 40% コンフルエント状態であることを確認後、培養上清を除去して E-MEM 培地 1 mL とクラミジア保存液 100 μ L を接種し、CO₂ インキュベーターで培養した。ネガティブコントロールには何も添加せず、クラミジア保存液添加群と同時間培養した細胞を用いた。各培養時間においてギムザ染色した観察標本を、200 倍または 630 倍の倒立顕微鏡 (DMIL LED Fluoro、Leica 社製) 下で観察し、顕微鏡画像を取得した。

ギムザ染色は、Well 内の培地を除去して冷風で乾燥した後、メタノール (LC/MS 用、富士フィルム和光純薬株式会社) を適量添加し、乾燥させ固定した。そこにギムザ染色液 (顕微鏡用、メルク株式会社) を MilliQ 水で 15 - 20 倍に希釈したものを、十分浸るように添加して 2 分間染色した。染色液を除去して水道水中で優しく振盪洗浄した後、冷風で乾燥して観察標本作製した。

クラミジア感染の有無は、CPE の観察、細胞の長辺と短辺の計測、および面積を計測して判定を行った。CPE は、非感染細胞と比較して細胞の球状化や収縮などの形態変化が認められた場合は CPE (+)、細胞の形態変化が認められなかった場合は CPE (-) とした。細胞のサイズ計測には、画像解析ソフト Image J[®] (アメリカ国立衛生研究所) を使用し、倍率 630 倍で観察した顕微鏡画像の中から全容が確認できる細胞を無作為に 10 サンプル選択し、細胞の面積および細胞の長辺と短辺をピクセル値として計測した (図 3-1)。有意差検定は、Student t 検定にて行った。

3.2 結果

3.2.1 各培養時間における顕微鏡画像

クラミジア存在の有無で McCoy 細胞を 72 時間培養してギムザ染色後、倍率 200 倍で観察した時の顕微鏡画像を図 3-2 に示す。クラミジア非共存下で培養した非感染細胞は、核が濃紫色に染色され、細胞質が繊維状に伸びているのが観察された (図 3-2(a))。一方、クラミジア共存下で培養した感染細胞は、核は濃紫色に染色されるものの、繊維状に伸びた細胞質を持つ細胞はほとんど認められず、染色されないまたは薄紫色に染色される小さな粒子が多数観察された (図 3-2(b))。HeLa 229 細胞を用いた場合は、ギムザ染色後の染色液を洗浄除去しきれず、解析可能な観察標本が得られなかったため、以降の実験では宿主細胞として McCoy 細胞を用いることとした。

培養時間を変化させた時の、倍率 630 倍で観察した顕微鏡画像を図 3-3 に示す。非感染細胞では、

培養時間によらず濃紫色に染色された核が観察された。また、培養 24 時間後では細胞質がわずかに繊維状に伸びた状態の細胞が観察され、その長さは培養時間が長くなるとともに伸長し、培養 72 時間後ではほとんどの細胞で長く繊維状に伸びた細胞質が観察された。一方、感染細胞では、いずれの培養時間でも濃紫色に染色された核が観察されたものの、培養 24 時間後には核と細胞質の間に薄紫色に染色される細胞質内顆粒を有する細胞が観察された。さらに培養時間が長くなると、細胞質内顆粒を有する細胞数が増えるのに対し、繊維状に伸びた細胞質をもつ細胞はほとんど観察されず、肥大した細胞も認められた。培養 96 時間後では、融合した細胞や細胞質内顆粒を有する細胞に加えて、細胞外にも顆粒が多数観察された (図 3-3)。

非感染細胞では観察した全ての培養時間で CPE は認められなかったのに対し (図 3-3)、感染細胞では培養 24 時間と 48 時間で CPE が認められなかったものの、培養 72 時間以上で CPE が認められた (図 3-3)。

3.2.2 各培養時間における細胞の面積

ImageJ[®]画像解析ソフトで計測した細胞の面積を図 3 - 4 に示す。非感染細胞は培養時間によらず、 17729 ± 3648 (平均値 $\pm$ SD, $n=10$) ピクセルであったが、感染細胞は培養 24 時間後が 45180 ± 52412 (平均値 $\pm$ SD) ピクセルで最大であった。この時、2 個の細胞が 100,000 ピクセル以上で、その平均値は 146202 ピクセルであったのに対し、それ以外の 8 個の細胞の面積は、 19924 ± 3807 (平均値 $\pm$ SD) ピクセルであり、細胞の面積は 2 群存在した。培養時間が長くなると、培養時間依存的に面積は小さくなるものの、培養 72 時間を境に再度大きくなった。

3.2.3 各培養時間における細胞の長辺と短辺

ImageJ[®]画像解析ソフトで計測した細胞の長辺と短辺の長さを図 3 - 5 に示す。観察した全細胞の長辺の平均値は、非感染細胞では 432 ± 105 (平均値 $\pm$ SD, $n=10$) ピクセル、感染細胞では 392 ± 337 (平均値 $\pm$ SD, $n=10$) ピクセルとなり、感染細胞にばらつきを認めた。全細胞の短辺の平均値は、非感染細胞で 104 ± 61 (平均値 $\pm$ SD, $n=10$) ピクセル、感染細胞で 125 ± 68 ((平均値 $\pm$ SD, $n=10$) ピクセルとなり、それぞれ培養時間によらず同程度の値を示した。感染細胞の長辺は、培養時間 24 時間で 744 ± 468 (平均値 $\pm$ SD) ピクセルで最長となるものの細胞によるばらつきがあり、1500 ピクセル以上を示す細胞が 2 個、500 ピクセル以下を示す細胞が 3 個あった。培養時間が長くなると、培養 48 時間で 387 ± 103 (平均値 $\pm$ SD) ピクセル、培養 72 時間で 135 ± 90 ピクセルと短くなったが、培養 96 時間では 301 ± 134 (平均値 $\pm$ SD, $n=10$) ピクセルとなり、培養 72 時間を境に再度長くなった。

長辺と短辺の比をとると、図 6 に示すように、非感染細胞は培養時間によらず 5.2 ± 0.8 (平均値 $\pm$ SD, $n=10$) となる一方、感染細胞は培養 24 時間では 7.5 ± 3.2 (平均値 $\pm$ SD, $n=10$) で最大となったが、48 時間以上の培養では 2.2 ± 0.5 (平均値 $\pm$ SD, $n=10$) と小さくなった。また、培養 48 時間以上でその比は感染細胞の方が非感染細胞より小さくなり、培養 72 時間および 96 時間で有意差を認めた ($p<0.01$)。

3.3 考察

クラミジアによる宿主細胞の形態変化からクラミジア感染の有無を検討し、クラミジア耐性菌の検出方法の探索を行うこととした。クラミジアの増殖過程は、(1) Elementary Body (EB) 期に宿主細胞に

吸着・侵入して宿主細胞の細胞質内に封入体を形成する、(2) その封入体内で Intermediate Form (IF) 期を経て Reticulate Body (RB) 期となり、分裂・増殖を繰り返す、(3) 再び IF 期から EB 期にもどり、宿主細胞を破壊して放出され新たな感染が起こり(1) から(3) の過程を繰り返す増殖環である³⁶⁾。この増殖環においてクラミジアは宿主細胞内に封入体を形成することから、細胞の形態変化からクラミジア感染の有無を判別できるものと予想される。

クラミジア感染後 24 時間では、宿主細胞内で基本小体が二分分裂を繰り返し、封入体は宿主細胞の半ばを占める状態である³⁷⁾。本論文においてギムザ染色した感染細胞の顕微鏡画像には、核と細胞質の間に薄紫色に染色される細胞質内顆粒を有する細胞や細胞の辺縁が不均一になっている細胞が観察された。辺縁の不均一性は非感染細胞でも観察されたことから、細胞質内顆粒の存在はクラミジア感染によるものと推定されるが、辺縁の不均一性は感染細胞に特異的に見られる現象ではないと考える。感染細胞の細胞面積は、観察した培養時間中で最大値を示し(図 3-4)、感染細胞の長辺が非感染細胞より長く、短辺は非感染細胞と同程度の長さであることから(図 3-5)、細胞面積の増大は長辺の伸長によるものである。これまでに、クラミジアが EB 期で宿主細胞に侵入後、12 時間後に RB の増殖が始まり、24 時間以降に RB は封入体嚢胞の限界膜に近接することが報告³⁷⁾されていることを勘案すると、細胞面積の増大は RB の増殖によるものと考えられた。

感染後 48 時間は、宿主細胞内で基本小体が網様体へと変化し、再び基本小体に戻り、細胞内でクラミジアが増殖を繰り返す状態である³⁷⁾。感染 48 時間後の感染細胞の顕微鏡画像には、細胞質内顆粒を有する細胞が感染 24 時間後より多く確認された(図 3-3)。これまでに McCoy 細胞にクラミジアを感染させて 48 時間後の位相差顕微鏡観察において、McCoy 細胞の細胞質内に封入体が多数形成されていることが報告³⁸⁾されていることから、感染 24 時間後と同様に細胞質内顆粒はクラミジアの封入体であるものと推定された。細胞面積は感染 24 時間後より小さくなった(図 3-4)。これは細胞の長辺が短くなったこと(図 3-5)に由来し、長辺と短辺の比が培養 48 時間で急激に減少して 2.8 ± 1.5 となることから(図 3-6)、増殖環の完成に向けて細胞の形態が円形に近づいていることが示唆された。

感染後 48-72 時間後には細胞破壊と共にクラミジアの細胞外への放出がおこり増殖環が完了する状態である³⁶⁾。感染 72 時間後の感染細胞の顕微鏡画像では、24 時間および 48 時間後には観察されなかった細胞の球状化や縮小、宿主細胞に吸着する構造物の出現が観察された(図 3-2、3-3)。また、細胞面積と細胞の長辺が観察した培養時間の中で最小値を示した(図 3-5)。クラミジアの増殖過程で発生する基本小体は $0.36 \pm 0.02 \mu\text{m}$ であり、その後成熟した基本小体は封入体へと変化するとともに約 $10 - 15 \mu\text{m}$ と大なる³⁹⁾。クラミジア自体を光学顕微鏡で観察することは出来ないが、成熟した基本小体は観察可能であることから、宿主細胞に吸着する構造物は、増殖した基本小体が再構成した封入体、または細胞外に放出された基本小体が凝集したものであると推測される。

感染 96 時間後は増殖環が完了していることから、多数のクラミジアが細胞外に存在する状態である。感染 96 時間後の感染細胞で観察された細胞外に存在する多数の顆粒は、感染 72 時間後と同様の細胞外に放出された基本小体の凝集体であると推測される。以上より、細胞の形態変化の中でも、長辺と短辺の比がクラミジアの増殖環と関係していることから、DFA を行わない顕微鏡画像が有用であることが示唆された。

クラミジアはウイルスと同様に生きた細胞内でしか増殖することが出来ないことから、ウイルス感染の判定と同様の方法で感染の有無を判定できるものと考えられる。ウイルス感染により細胞に生じる変化には、球状化 (rounding)、収縮 (shrinkage)、屈折性の増加 (increased refractivity)、融合 (fusion)、

凝集 (aggregation)、接着性の喪失 (loss of adherence)、溶解 (lysis)⁴⁰⁾が挙げられ、これらの現象が同時に発生するため、比較対象として同条件にて培養した非感染細胞と比較して CPE で評価した。結果として、感染 72 時間後に CPE(+)となったことが認められたことから、目視にて判別可能な細胞の形態学的変化は 72 時間後に起こることが示唆された。これは、長辺と短辺の比において感染細胞と非感染細胞を $p<0.01$ で有意差が認められ始めた培養時間と同じであることから、顕微鏡画像で感染の判定に長辺と短辺の比を活用可能であることが示唆された。クラミジア感染 72 時間後で感染の有無が判別可能であるが、有意差は認められないものの、感染後 48 時間に短辺が長くなる現象が認められていることから (図 3-5(b))、感染後 48 時間の画像でも判別可能である可能性が考えられる。今回採用した細胞はそれぞれ 10 細胞であるため、判別の精度は高いとは言えない。さらに感染力価が不明なクラミジア保存液を使用していること、感染後の細胞の DFA による観察を行っていないため感染細胞内の封入体の有無が不明なこと、および観察画像における感染率が不明な点が本論文の限界としてあげられる。

本論文の細胞の形態変化による感染の判定は、近年、多くの分野において研究が進められている人工知能 (Artificial Intelligence: AI) への応用が可能であると考えられる。我が国では 2017 年に厚生労働省が設置した「保健医療分野における AI 活用推進懇談会」において、開発を進めるべき領域に「画像診断支援」が選定され⁴¹⁾、開発が急務となっている分野である。この AI 技術を駆使することにより、クラミジア感染した宿主細胞の判別にも活用することが可能であると考えられる。深層学習には膨大な画像データが必要となるが⁴²⁾DFA による画像データを収集するより、本論文で示した通常の光学顕微鏡画像でデータを蓄積できれば、深層学習に用いる画像データの取得段階のハードルが下がるものと考えられる。

これまでに、クラミジア性尿道炎に対する AZM の臨床効果の低下が報告されており^{33,34)}、AZM の臨床効果の低下がマクロライド耐性菌によるものかどうか不明であることが問題点として挙げられている。2016 年に日本化学療法学会、日本感染症学会、日本臨床微生物学会、日本環境感染学会の四学会合同で行われた抗菌薬感受性サーベイランスにおいてクラミジアに対して Hela 細胞を用いた 9 薬剤の薬剤感受性試験が実施され、この報告も DFA により判定されている⁴³⁾。本論文では、クラミジア感染の有無を宿主細胞である McCoy 細胞の形態変化から判別しており、培養系内に抗菌薬を共存することで薬剤感受性試験の判定、およびクラミジア耐性菌の検出へ応用することが可能であると考えられる。その方法は、予備試験として MIC 値の 2 倍、4 倍、8 倍の抗菌薬の共存下で、McCoy 細胞が生存可能となる境界を明らかにする必要がある。抗菌薬感受性サーベイランスでは⁴³⁾クラミジア臨床分離株に対する MIC は、フルオロキノロン系薬剤のレボフロキサシンは、MIC 0.25-0.5 μ g/mL、テトラサイクリン系薬剤のミノサイクリンと、マクロライド系薬剤の AZM は MIC 0.031-0.125 μ g/mL であり、各濃度に調製し添加する。クラミジアに感染していない McCoy 細胞が、抗菌薬の影響によって形態変化を起こして死滅する場合の細胞変化のデータを取った上で、McCoy 細胞にクラミジア陽性患者の検体を接種して、抗菌薬の共存下で 48 - 72 時間培養後にネガティブコントロールと比較をして判定をする。クラミジア耐性菌(+)の場合は、抗菌薬の効果が認められず、クラミジアは増殖しているのに対し、クラミジア耐性菌(-)の場合は抗菌薬の効果が認められ、MIC の濃度でクラミジアは死滅することが考えられる。さらに抗菌薬をクラミジアに加えるタイミングについても検討が必要である。クラミジアが細胞内に侵入する際に、宿主細胞外に抗菌薬が存在するか否かでは、クラミジアの増殖感度に影響することが考えられる。比較対象として先行研究⁴³⁾では、宿主細胞にクラミジアを接種したのち、遠心分離後、上清を除去し、所定の濃度の抗菌薬を増殖培地に添加し培養しているが、

クラミジアを接種して感染を確認してから抗菌薬を投与するのか、宿主細胞にクラミジア感染させる前か同時か後かについても精査を要する。

本論文では、細胞形態の観察を優先としたため、感染力価が不明な供試クラミジア液を用いたが、培養細胞を用いた実験では、宿主細胞にクラミジアを接種させても、全ての宿主細胞に感染しないことが多い。薬剤感受性試験を実施するためには、感染力価を明らかにした供試クラミジア液を用いた検討が必要である。また宿主細胞の長辺、短辺ならびに細胞面積の縮小から感染の有無を判定したが、エビデンスをより確実なものとするためには DFA による観察と比較することが必要である。

3.4 図

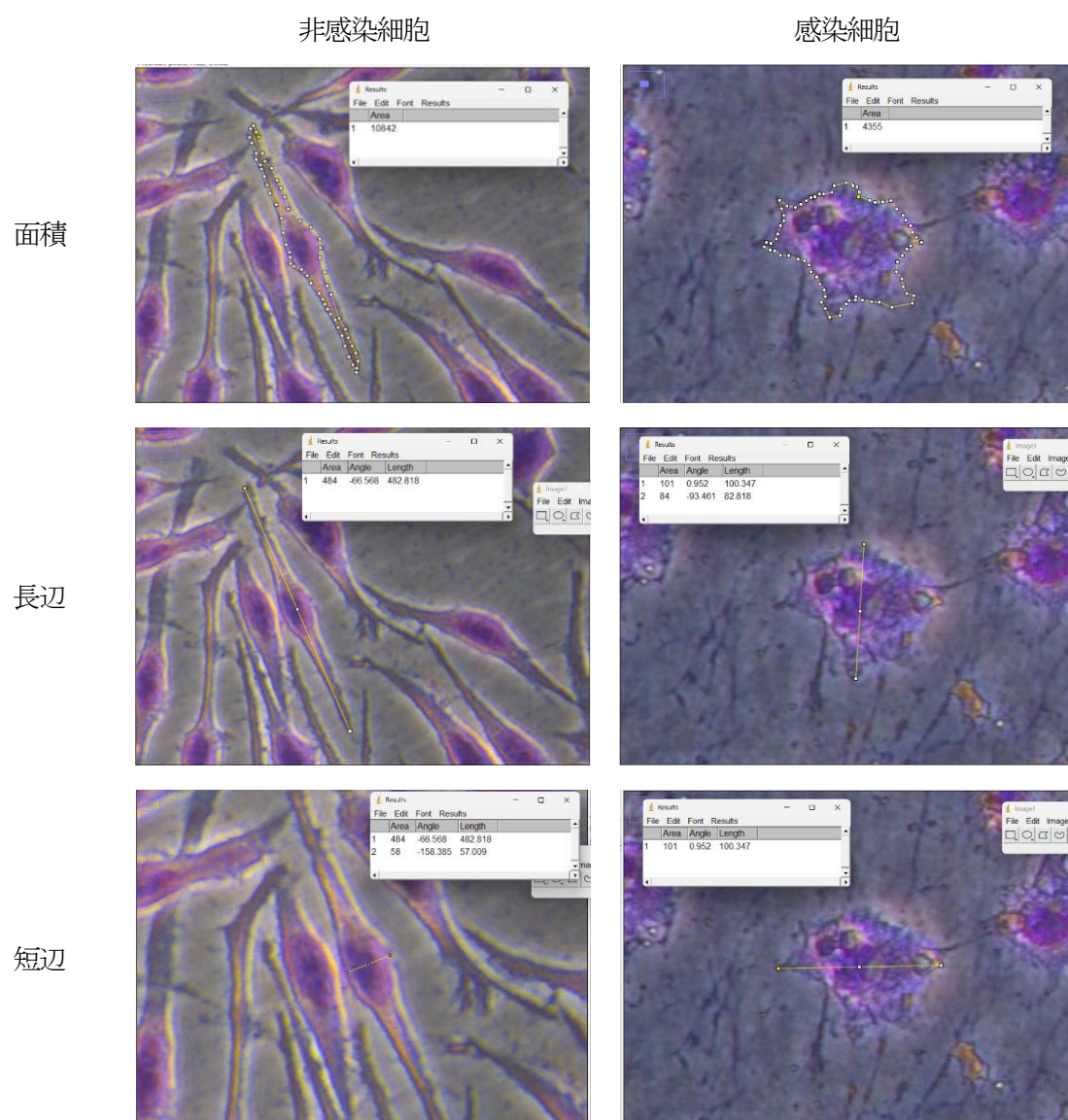
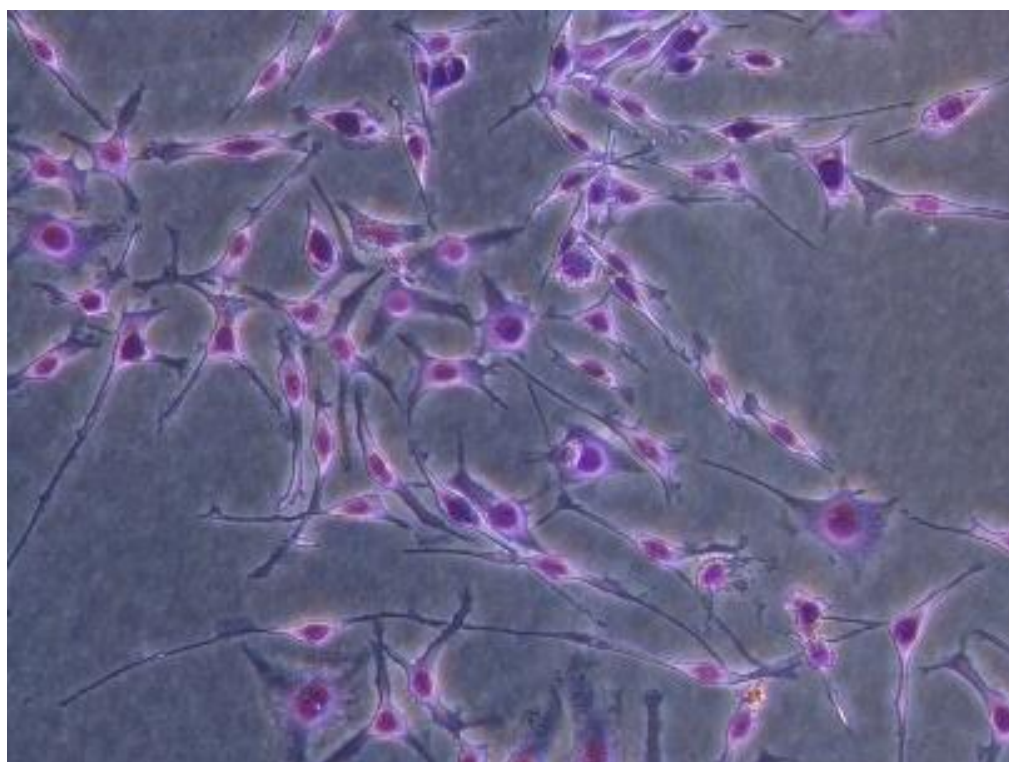


図 3-1. 細胞の面積、長辺、および短辺の計測

培養 72 時間後にギムザ染色を行ったときの顕微鏡画像（観察倍率 630 倍）を用い、ImageJ[®] 画像解析ソフトで細胞の面積、長辺および短辺の長さをピクセル値にて計測した。

(a)



(b)

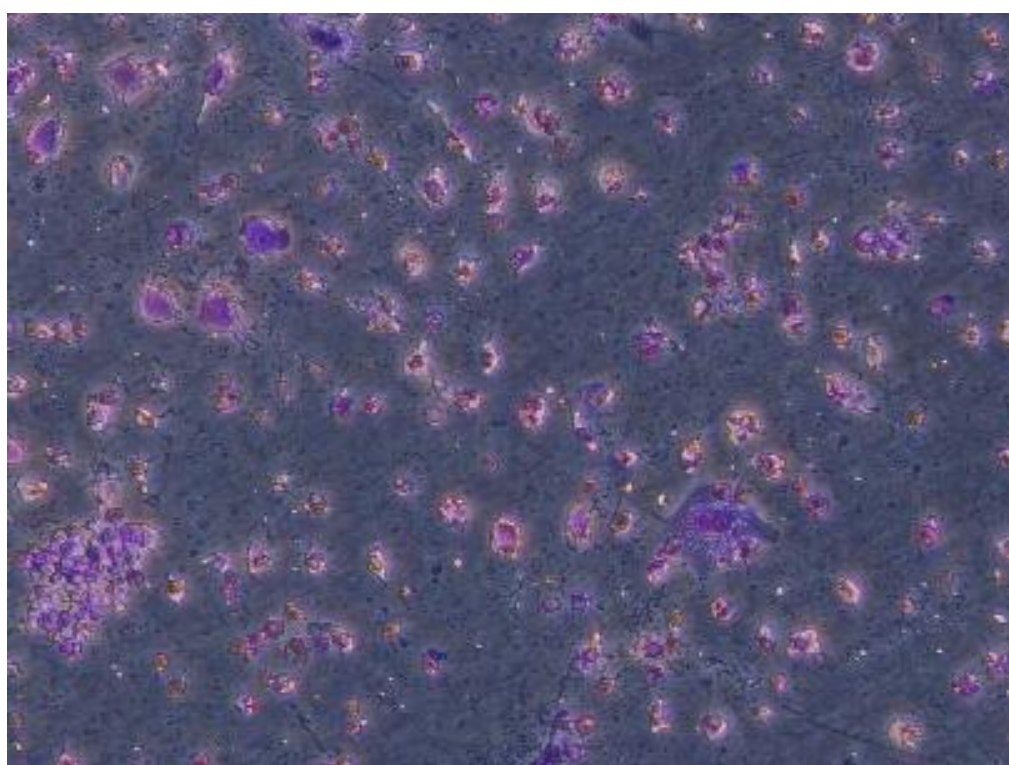


図 3-2. 培養 72 時間後にギムザ染色を行ったときの顕微鏡像（観察倍率 200 倍）

(a) 非感染細胞 (b)感染細胞

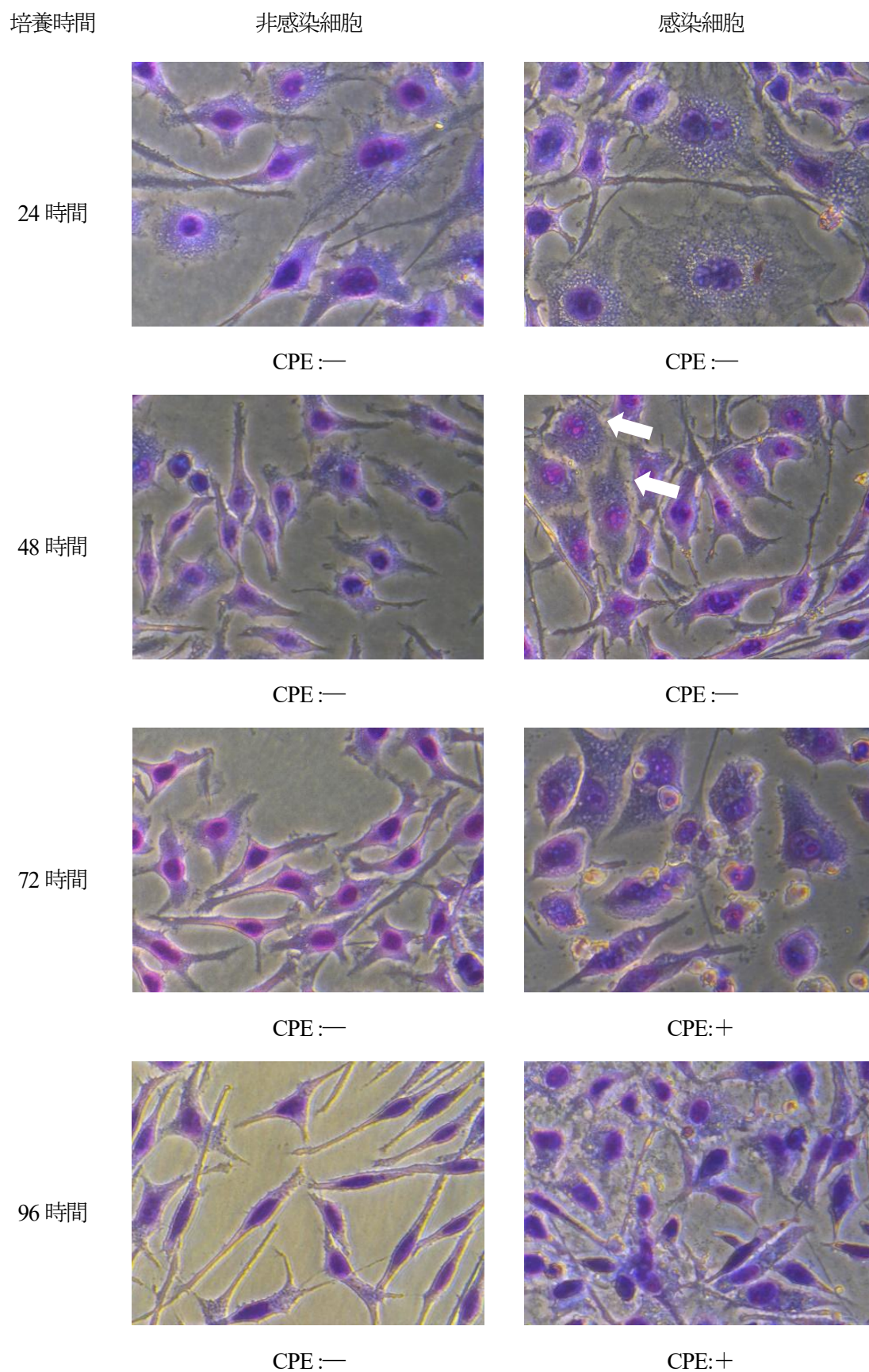


図 3-3. ギムザ染色後の細胞の顕微鏡像（観察倍率 630 倍）矢印は細胞質内顆粒を示す。
CPE: Cytopathic effect、CPE が認められない場合：—、CPE が認められた場合：+

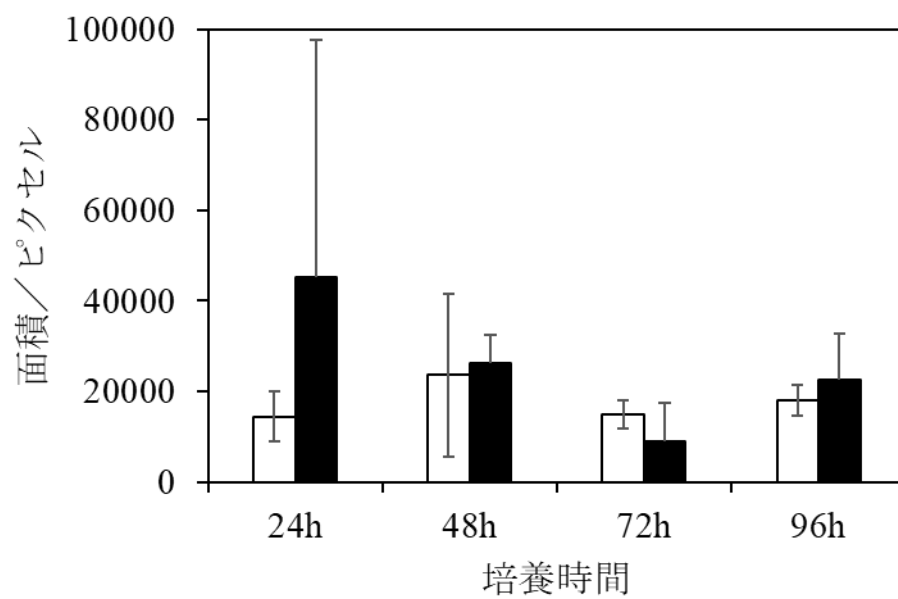
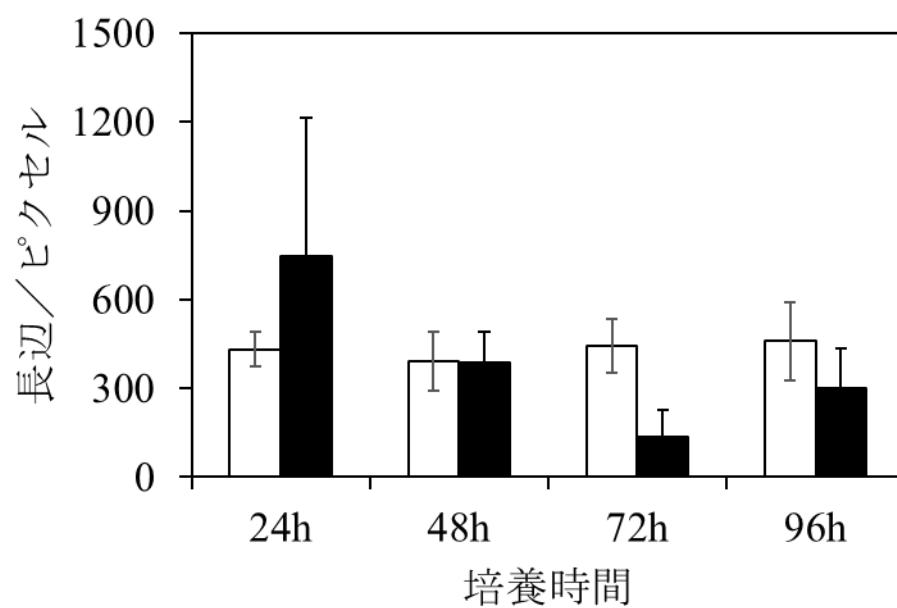


図3-4. 各培養時間における細胞面積 (n=10)

□ : 非感染細胞、■ : 感染細胞

(a)



(b)

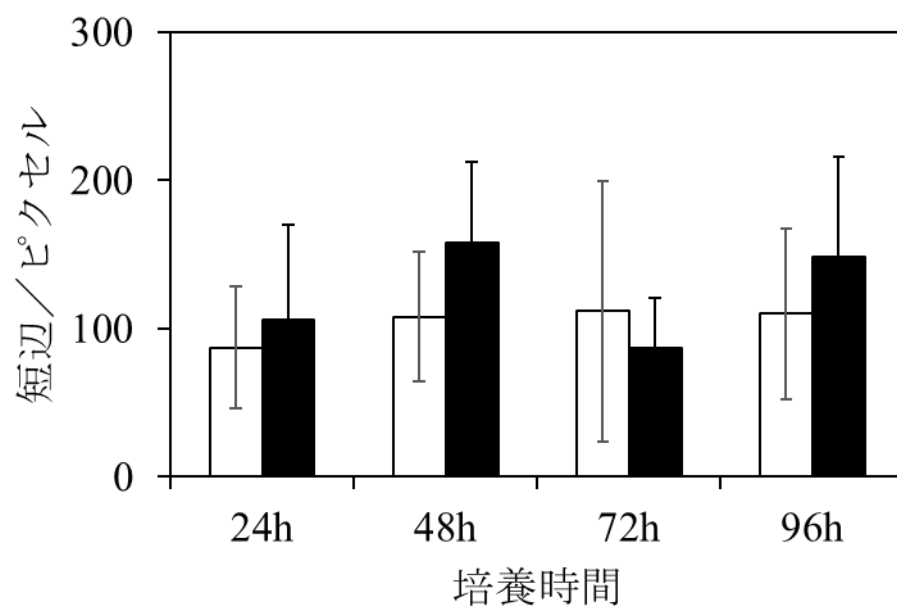


図 3-5. 各培養時間における細胞の長辺および短辺 (n=10)

(a) 長辺 (b) 短辺

□ : 非感染細胞、■ : 感染細胞

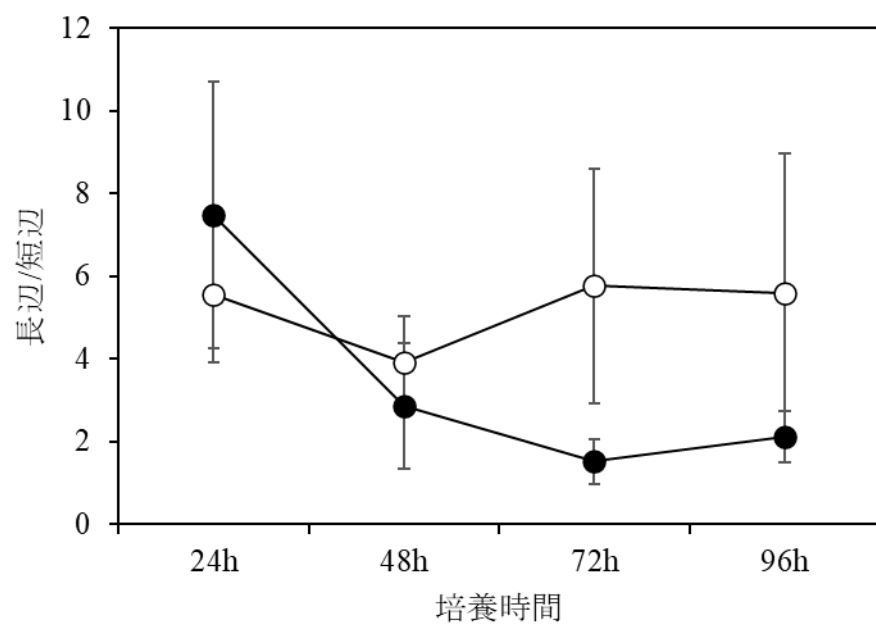


図 3-6. 各培養時間における McCoy 細胞の長辺と短辺の比 (n=10)

○ : 非感染細胞、● : 感染細胞

第4章 結論

炭素原子数の異なる 14 種類のアルコールと病原微生物である細菌、酵母様真菌、非結核性抗酸菌およびウイルスを用いてアルコールの効果を明らかにするとともに、新興・再興感染症の世界的な流行によるアルコール消毒薬の逼迫に備えるために、アルコール消毒薬に代替可能なアルコールを探索した。さらにアルコールの親疎水性や、炭素原子数およびヒドロキシ基の結合位置とその数に関するアルコールの化学的性質が殺菌、殺芽胞およびウイルス不活化効果に及ぼす影響を検討した。

殺菌およびウイルス不活化効果が認められた 1-PrOH は、薬剤耐性菌に対する殺菌効果のさらなる検討を要するため、EtOH と 2-PrOH の代替として提案するには至らなかった。

一般細菌に対するアルコールの作用は徐々に殺菌効果が現れるのではなく、ある濃度に達すると殺菌効果が発現され、10 秒間より 1 分間という長時間の作用において低濃度で殺菌効果を示すことが明らかとなった。また、ヒドロキシ基の結合位置が主鎖の 2 位に結合しているアルコールより、主鎖の 1 位に結合しているアルコールの方が多くの微生物種に対して殺菌効果を今回の検討では認められた。既に明らかとなっている殺菌効果とアルコールの水への溶解性をより詳細に検討し、殺菌解明の一助となることで感染症対策や安全性の向上に貢献されることが期待される。

グラム陰性菌に対するアルコールの効果は、脂質成分を含む Lipid-A にアルコールの親疎水性の化学的性質が反応し、死滅に至ることが示唆された。酵母様真菌は構造上、ペプチドグリカンを持たず、細胞壁の内側にある細胞膜がところどころくさび状に嵌入しており細胞壁との間に空洞をもち、核膜孔という核の内外を連絡する穴に対して、アルコールが接触した際に浸透しやすいことが推測され、殺菌効果が現れやすい因子のひとつであることが示唆された。

ノンエンベロープウイルスの Ad.5 に対するウイルス不活化効果は、Ad.5 の構造上、ウイルスの安定性を維持する機能をもつペントンベースが疎水性の物性をもち、そこに炭素原子数が 1-3 までの親水性のアルコールが接触すると、ペントンベースにアルコールが作用することで結果として、ウイルスの構造を保つことができなくなることでウイルス不活化効果が現れていることが推察される。

今回検討した新たなクラミジア耐性菌の検出法は、クラミジア感染の有無を宿主細胞である McCoy 細胞の形態変化から判別しており、培養系内に抗菌薬を共存することで薬剤感受性試験の判定、およびクラミジア耐性菌の検出へ応用することが可能であると考えられる。さらに AI の画像判別が実現すれば感染細胞を自動で計測し、クラミジア耐性菌の鑑別をすることが出来る。クラミジアの宿主細胞形態変化からクラミジア感染の有無の判別の可能性を示したことは、AI を用いたクラミジア感染の判別方法を構築するための礎となり、AI 画像判別によるクラミジア感染の判定に必要な深層学習データの取得を可能とすることが推察される。本論文で検討したクラミジア感染細胞の形態変化による感染の判定は、薬剤感受性試験の判定、およびクラミジア耐性菌の検出が可能となることが示唆された。さらに PCR 検査では安価、容易には検出することができない薬剤耐性 *Chlamydia* の発見が培養系では検出検査と同時に可能となることが示唆された。

本論文では、消毒用エタノールの代替アルコールに関する検討と、クラミジアの細胞形態変化による判別方法およびクラミジア薬剤耐性菌の検出を探索したことにより、感染症蔓延の抑止の一助となり、将来的な感染制御に貢献することが期待される。

謝辞

本論文の作成にあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りましたことを感謝いたします。

東京医療保健大学大学院名誉学長の木村 哲 教授には丁寧な指導と適切な助言をいただきましたことを深く御礼申し上げます。

森屋 恭爾 教授には、研究の方向性を熱心にご指導いただき、新たな知見の発想をいただきました。私の理解が追いつかず、何度もわかりやすくご指導していただいたお陰で、本論文を完成することができました。深く御礼申し上げます。

岩澤 篤郎 教授には一から実験手技をご指導していただき、ご多忙の中いつでも快く相談に乗っていただきご指導していただいたことを心より感謝申し上げます。実験手技を習得し、データについて岩澤教授と話ができるようになった時はとても嬉しく感じたことが印象的です。

松村 有里子 准教授には、研究に対する姿勢や論文の書き方など多くの時間を割いていただいたことを心より感謝申し上げます。多くの学びを繰り返しご指導いただいたことを深く感謝いたします。

菅原 えりさ 教授、吉田 理香 教授には、研究に対する多くのご助言をいただき知識の幅を広げていただきました。心より感謝申し上げます。

博士課程で共に学んだ諸先輩方、同輩の皆様には、仕事と研究を両立する同士として、研究の面白さや難しさを議論し、とても心強い存在でした。感謝申し上げます。

また聖路加国際病院 手術室スタッフの皆様には大学院進学を支援していただいたことを深く感謝いたします。

最後に、大学院事務の皆様に変にお世話になりました。深く感謝いたします。ありがとうございました。

引用文献

- 1) 第十八改正日本薬局方. 医薬品各条 化学薬品等 (ア～ソ). 消毒用エタノール
<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000788360.pdf> (閲覧日 2025.3.5)
- 2) 外用殺菌消毒剤. 日本薬局方 イソプロパノール「ニッコー」
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/530090_2615700X1295_1_06
(閲覧日 2025.3.5)
- 3) ECHA Propan-1-ol
<https://echa.europa.eu/documents/10162/e32d60c6-4061-e465-607c-cd9b64cf07a3> (閲覧日 2024.9.1)
- 4) 別府道子, 中島雅子, 片平理子. アルコール水溶液の示差走査熱量計による融解サーモグラムと殺菌作用. *食衛誌* 1990; 31(5): 414-419.
- 5) Oana-Arina Antoce, Vasile Antoce, Katsutada Takahashi, Nicolai Pomohaci, Ion Namolosanu. Calorimetric determination of the inhibitory effect of C1-C4 n-alcohols on growth of some yeast species. *Thermochim. Acta* 1997; 297(1-2): 33-42.
- 6) 伊藤トモ子, 牧ゆかり, 藤原悦子, 山本りえ, 下大迫祐子, 井上悦子 et al. 塩化ベンザルコニウム・エタノールローションによる手指消毒効果の検討. *日環感* 1988; 3(1): 83-86.
- 7) 山本泰, 東和男, 好井久雄. エタノールの抗菌作用. *日食工会誌* 1984; 31(8): 531-535.
- 8) 渡辺実, 野田伸司, 山田不二造, 藤本進. アルコール類のウイルス不活性化作用に関する研究 エタノール消毒における生体試料の影響. *感染症学会誌* 1981; 55(5): 367-372.
- 9) 大ヶ瀬浩史, 武智誠, 大塚壽, 柴田大法, 菊池幸, 土手健太郎. 速乾性擦式アルコール手指消毒剤による指先・指間の消毒効果. *日環感* 1995; 10(2): 31-35.
- 10) 東順子. エタノール皮膚障害とエタノールによる 20 分間密封貼付試験. *皮膚* 1986; 28(1): 11-16
- 11) CDC Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings
<https://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5116.pdf> (閲覧日 2024.9.1)
- 12) Gerald McDonnell, A. Denver Russell. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *ASM Journals* 1999; 12(1): 147-179.
- 13) 戸田忠雄. 戸田新細菌学. 改訂 34 版. 南山堂. 2007; 151.
- 14) 国際アルコール表
<https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/legalmetman/doc/international-alchol.pdf> (閲覧日 2025.1.29)
- 15) Axel Kramer, Mardjan Arvand, Bärbel Christiansen, Stephanie Dancer, Maren Eggers, Martin Exner. et al. Ethanol is indispensable for virucidal hand antisepsis: memorandum from the alcohol-based hand rub (ABHR) Task Force, WHO Collaborating Centre on Patient Safety, and the Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention (KRINKO), Robert Koch Institute, Berlin, Germany. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2022; 11(1): 1-13.
- 16) W. C. Russell. Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* 2009; 90: 1-20.
- 17) Sifang Steve Zhou. Variability and Relative Order of Susceptibility of Non-Enveloped Viruses to Chemical Inactivation. *Disinfection of Viruses*. 2022; 22.
- 18) 神明朱美. 2019. 殺菌・ウイルス効果に及ぼすエタノール濃度の影響. 医療保健学研究科 医療保健学専攻 感染制御学領域 博士論文.
- 19) Thomas J Silhavy, Daniel Kahne, Suzanne Walker. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(5)

- 20) Ståhle Jonas, Widmalm Göran. グラム陰性菌のリボ多糖：生合成と化学構造. *TIGG*.2019; 31(184): 157–168.
- 21) McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(1): 147-179.
- 22) 磯部賢治. 微生物の生存戦略-固体表面への付着-. *表面科学* 2001; 22(10)652-662.
- 23) 戸田忠雄. 戸田新細菌学. 南山堂. 改訂 34 版. 2007.725
- 24) Carlos Martin-Villa, Ricardo Becerro-de-Bengoa-Vallejo, Luis Alou, Natalia González, Marta Losa-Iglesias, María Luisa Gómez-Lus. Comparing rubbing and scrubbing surgical hand antisepsis with propan-1-ol 60% in accordance with European regulation UNE-EN 12791:2016+A1:2018. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2021; 42(11): 1382-1384.
- 25) Nils-Olaf Hübner, Günter Kampf, Harald Löffler, Axel Kramer. Effect of a 1 min hand wash on the bactericidal efficacy of consecutive surgical hand disinfection with standard alcohols and on skin hydration. *Int J Hyg Environ Health* 2006; 209(3):285-291.
- 26) Nakaminami H, Noguchi N, Ito A, Ikeda M, Utsumi K, Maruyama H, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from tertiary care hospitals in Tokyo, Japan. *J Infect Chemother*. 2014; 20(8): 512-515.
- 27) 国立感染症研究所, 「性器クラミジア感染症の発生動向」 2023 年 6 月 19 日
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/chlamydia-std-m/chlamydia-std-idwrs/12086-chlamydia-16jun.html>
(閲覧日 2024.1.20)
- 28) World Health Organization, 「 Treatment of Chlamydia trachomatis 」 2016.
<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/246165/9789241549714-eng.pdf?sequence=1> (閲覧日 2024.1.10)
- 29) 岩破一博. 性器クラミジア感染症. *京府医大誌* 2013; 122; 433-446.
- 30) 「性感染症 診断・治療 ガイドライン 2016」 *日本性感染症学会誌* 2016;27. Supplement.
<https://jssti.jp/pdf/guideline-2016.pdf> (閲覧日 2024.1.31)
- 31) CDC, 「 Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 」 MMWR 2010.
<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5912a1.htm> (閲覧日 2024.1.31)
- 32) 妊婦に対する健康診査についての望ましい基準(平成 27 年 03 月 31 日厚生労働省告示第 226 号
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=82ab4662&dataType=0&pageNo=1 (閲覧日 2024.9.27)
- 33) Manhart L E, Gillespie C W, Lowens M S, Khosropour C M, Colombara D V, Golden M R, et al: Standard treatment regimens for nongonococcal urethritis have similar but declining cure rates: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 934-42.
- 34) Kissinger P J, White S, Manhart L E, Schwebke J, Taylor S N, Mena L, et al: Azithromycin Treatment Failure for Chlamydia trachomatis Among Heterosexual Men with Nongonococcal Urethritis. *Sex Transm Dis* 2016; 43: 599-602.
- 35) Misyurina O Y, Chipitsyna E V, Finashutina Y P, Lazarev V N, Akopian T A, Savicheva A M, et al: Mutations in a 23S rRNA gene of Chlamydia trachomatis associated with resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1347-49.
- 36) 高橋聡. *Chlamydia trachomatis* とその診断法. *日臨微生物誌* 2018; 28:77-82.
- 37) 石井英昭. McCoy 細胞における生殖器由来 *Chlamydia trachomatis* 増殖環の超微形態学的研究. *感染症誌* 1988; 62: 85-96.

- 38) 細村泰夫. McCoy 細胞における生殖器由来 *Chlamydia trachomatis* 増殖環に対する Minocycline の阻害効果に関する研究. *感染症誌* 1990; 64: 310-320.
- 39) 計良恵治、堀内文男、武田敏、椎名義雄、橋爪壮、吉沢花子. *Chlamydia* 感染症の形態的研究—*Chlamydia* 感染培養細胞の超微形態—. *日臨細胞誌* 1987; 26(1): 49-56.
- 40) P.M.Howley , D.M.Knipe (eds.) *Fields Virology*, 7th ed., Vol.4. WOLTERS KLUWER. 2024; 21-49.
- 41) 厚生労働省.第1回 保健医療分野における AI 活用推進懇談会 資料
<https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000148680.html> (閲覧日 2024.1.31)
- 42) Amitojdeep Singh, Sourya Sengupta, Vasudevan Lakshminarayanan. Explainable Deep Learning Models in Medical Image Analysis. *J. Imaging* 2020; 6(52): 1-19.
- 43) Takahashi S, Hamasuna R, Yasuda M, et al., Nationwide surveillance of the antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* from male urethritis in Japan. *J. Infect. Chemothera.* 2016; 22: 581-586

Abstract

A study on the search for alternative alcohols to ethanol for disinfection and investigation of a new method for distinguishing obligate intracellular parasitic bacteria by cell morphological changes.

Mai Kobukai

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

BACKGROUND.

In preparation for the shortage of alcohol products during outbreaks of emerging or re-emerging infectious diseases, it is desirable to find alternative alcohols to ethanol (EtOH) and iso-propanol (2-Propanol: 2-PrOH), as well as to develop new methods for identifying the source of infection early and for detecting drug-resistant bacteria.

OBJECTIVE.

This study comprehensively examined the effects of alcohol on bacteria, yeast-like fungi, nontuberculous mycobacteria, bacterial spores, and viruses, and searched for alternative alcohols to alcohol disinfectants. As a method to easily identify the source of infection, This study examines simplified the determination of chlamydia infection in experimental studies and searched for a method to detect chlamydia-resistant bacteria.

METHODS.

In vitro bactericidal and virucidal tests were performed using 14 types of alcohols with different numbers of carbon atoms and hydroxyl group bonding positions, 9 strains of 8 bacteria, 1 strain of yeast-like fungi, 2 strains of dermatophytes, 2 strains of nontuberculous mycobacteria, 1 strain of bacterial spores, 3 types of nonenveloped viruses, and 4 strains of 2 types of enveloped viruses, and the viable bacterial count and viral infectivity were calculated. Chlamydia-infected cells were stained with Giemsa stain, and morphological changes were compared over time to determine the presence or absence of chlamydia infection and to examine the application to drug susceptibility testing.

RESULTS.

At the 18 w/w% concentration and 10 second exposure time used in the bactericidal test, 1-butanol (1-BuOH) showed a bactericidal effect against all nine microbial strains. Next, 2-butanol (2-BuOH) showed a bactericidal effect against seven strains except for two gram-positive bacteria, and 1-propanol (1-PrOH) showed a bactericidal effect against *E. faecalis*, gram-negative bacteria, and four yeast-like fungi. 2-PrOH showed a bactericidal effect against one strain of *E. hirae*, and *tert*-Butanol (*t*-BuOH) showed a bactericidal effect against one strain of *E. coli*. For non-enveloped viruses, only MeOH, EtOH, and 1-PrOH, which have 1-3 carbon atoms, were found to inactivate the virus after 10 seconds of exposure, and after 1 minute of exposure, all alcohols except *t*-BuOH were found to inactivate the virus with log reduction (LR) of 3 or higher. For enveloped viruses, all alcohols were found to inactivate the virus with an LR of 3 or higher after 10 seconds of exposure, and the number

of microbial species that met the LR of 3 was increased after 1 minute of exposure compared to 10 seconds. Comparing *Chlamydia trachomatis* -infected cells and chlamydia growth rings, it was suggested that visually discernible morphological changes in cells occurred after 72 hours, and it is believed that the presence of antibiotics in the culture system may enable the detection of chlamydia-resistant bacteria.

CONCLUSIONS.

1-PrOH was found to have bactericidal and virucidal effects, however, it could not be proposed as an alternative to EtOH and 2-PrOH. It was required the further investigation using drug-resistant bacteria. In addition, a simple method for detecting chlamydia was established. These findings were expected to help prevent the spread of chlamydia infection.