(Jpn. J. Hosp. Pharm.)
資 料
22(4) 390 — 396 (1996)

滅菌クロルヘキシジン製剤の開封後の安定性および効力^{†1}

黒田今日子, 藤下 修, 小坪一哉, 中尾泰史*, 大石了三

九州大学医学部附属病院薬剤部^{†2}

Stability and Potency of Sterilized Chlorhexidine Gluconate Solutions after Unsealing the Container^{†1}

KYOKO KURODA, OSAMU FUJISHITA, KAZUYA KOTSUBO,

YASUSHI NAKAO* and RYOZO OISHI

Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, Kyushu University^{†2}

(Received November 20, 1995)
(Accepted May 28, 1996)

Sterilized chlorhexidine gluconate solutions (GCH) in 500 ml polypropylene containers are prepared in our hospital pharmacy. To determine the expiration period after unsealing the container, the stability and potency of 0.02% GCH were examined by high-performance liquid chromatography and cultivation tests, respectively. The main ingredient of 0.02% GCH which had been used partially for more than 6 months, was maintained at over 95% of its initial concentration at room temperature. No bacterium nor fungus was evident in the 0.02% GCH partially used at several sections for 2–15 months, when examined by three different cultivation tests. Under the conditions of excess microbe contamination such as falling microbial test and sticking fingers test, 0.02% GCH prevented the growth of microbes. These results suggest that there is only a minor possibility of microbial contamination in the sterilized 0.02% GCH after the container has been unsealed.

In general, this preparation may be usable for at least one month after unsealing although the existence of microbes resistant to GCH has been reported.

Key words — sterilized chlorhexidine gluconate solution, expiration period, microbe contamination, falling microbial test, sticking fingers test, stability

緒 言

病院で用いられている消毒剤の多くは、長い間

病院薬剤部で滅菌され供給されてきたが、滅菌消毒剤の有用性が広く認められてくるとともに多くの市販品が見られるようになった。そのうち、滅菌した市販のグルコン酸クロルヘキシジン液（以下 GCH）の添付文書には『開封後は直ちに使用し、一部を使用した残液は再使用しないこと』¹⁾、あるいは『中栓を取り除いた場合には、改めて滅

^{†1} 本論文は第 5 回日本病院薬学会年会（東京，1995 年 7 月）で発表。

^{†2} 福岡市東区馬出 3-1-1；3-1-1，Maidashi，Higashi-ku, Fukuoka, 812-82 Japan

菌すること』²⁾などと記載されている。しかし、これらの滅菌消毒剤の開封後の安定性および効力の持続については、臨床上重要であるにもかかわらず、それらに関するデータは見当たらない。そこで、当院薬剤部で調製し、滅菌している500ml ポリプロピレン製容器入り0.02%GCHについて、開封後の使用期限の設定を目的として、その安定性および効力について検討した。

実験の部

1. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法による安定性の検討

1) 試料および試薬

当院薬剤部では、20% GCH (ゼネカ株) 100ml を蒸留水100L で希釈し500ml ポリプロピレン製容器に充填後、110℃40分間高圧蒸気滅菌を行い、1回の操作により滅菌0.02% GCH500ml を200本調製している。上記のように調製したもののうち薬剤部で使いかけのもの(室温保存)を回収し試料とした。

過塩素酸ナトリウム一水和物、リン酸、アセトニトリル、パラクロロアニリン(いずれも和光純薬株)、リン酸二水素ナトリウム二水和物(半井化学株)はいずれも特級以上のものを用いた。

2) 装置および条件

a) 装置

ポンプ: LKB BROMMA 2150 HPLC PUMP, 検出器: Shimadzu SPD-2A SPECTRO PHOTOMETRIC DETECTOR, データ処理装置: TOYO SODA CHROMATO PROCESSOR CP-800をそれぞれ用いた。

b) 条件³⁾

カラム: TSKgel ODS-120T, 移動相: 0.1M 過塩素酸ナトリウム-0.01M リン酸緩衝液: アセトニトリル混液(55:45, v/v), 流速: 1.0ml/min, 検出波長: 197nm の条件下で測定した。

2. 培養法による効力の検討

1) 試料

上記のように調製した滅菌0.02%GCHのう

ち、病棟で使いかけのもの(室温保存)を回収し、下記の方法①~③についてはこれを試料とした。方法④および⑤については滅菌後未開封のものを試料とした。

2) 培地

チオグリコール酸培地(以下TG), ブドウ糖ペプトン培地(以下GP), ブレインハートインフュージョン寒天培地(以下BHIA), ハートインフュージョン寒天培地(以下HIA), チオグリコール酸培地(いずれも栄研化学株)に1.5%の割合で寒天(和光純薬株)を加えたもの(以下TGA), ブドウ糖ペプトン培地に1.5%の割合で寒天を加えたもの(以下GPA)を用いた。

3) 方法

①直接法

GCHを含んだままの試料約1mlを培地に添加して培養した。

②中和法^{4,5)}

GCHの影響を除去するために、試料0.5mlにヒビテン中和剤(住友製薬株)0.5mlを加え培地に添加して培養した。

③メンブランフィルター法⁶⁾

GCHの影響を完全に除去するために、病棟から回収した使いかけの0.02%GCHのうち、上記の直接法および中和法で用いた数mlの試料を除くすべての試料(約100-400ml)を孔径0.22μmのメンブランフィルター(ミリポア株)でろ過を行い、0.1%滅菌ポリペプトン(和光純薬株)水100mlで3回洗浄した後、そのフィルターを2分割しTGおよびGPに入れ培養した。

④落下菌試験法

a) 0.02%GCH容器を開放した落下菌試験: 滅菌0.02%GCH容器のふたを24時間開放した後、その中のGCH1mlを試料として培地に添加して培養した。

b) 0.02%GCHを表面塗布または混和した培地による落下菌試験: 0.02%GCH約1mlを表面塗布、または培地作製に0.02%GCHを用いてあらかじめ培地全体にGCHを混和した固形培地を

1時間開放して落下菌試験を行った。

c) 試料開放場所：試料の開放は、製剤管理室（面積：55m²，人員：2名），調剤室（面積：264m²，人員：19名）および分室（面積：104m²，人員：7名）で行った。なお、いずれも病棟と同様の空調設備である。

Table 1. HPLC 法による0.02%グルコン酸クロルヘキシジン開封後の安定性

調製後の期間	主成分(%)
1カ月	97.2±0.5
3カ月	99.7±0.8
6カ月	96.4±1.2

(mean±S.D., n=3)

Fig. 1. 0.001%グルコン酸クロルヘキシジン (GCH) および0.001%パラクロロアニリン (p-CA) の吸収ピーク

⑤手指付着菌試験法

a) 0.02%GCH に指を直接接触させた手指付着菌試験：0.02%GCH500ml 容器に人差し指を入れ，中の GCH に第一関節までを1-5回接触さ

Fig. 2. 0.02%グルコン酸クロルヘキシジン (GCH) および0.001%パラクロロアニリン (p-CA) のHPLCクロマトグラム

せ、その液 1 ml を試料として培地に添加して培養した。

b) 0.02%GCH を表面塗布または混和した培地による手指付着菌試験：④の b) と同様に作製した培地に、人差し指、中指、薬指の 2 本の第一関節の内側を接触させ培養した。

結果および考察

1. HPLC 法による安定性の検討

ポリプロピレン製容器入り 0.02%GCH は開封後も、室温保存で主成分は 3 試料とも 96-99% 強の割合で検出された (Table 1)。なお調製した 0.02 GCH で高圧蒸気滅菌前のものを 100% とした。GCH の主な分解物であるパラクロロアニリン (以下 p-CA) は波長 197nm 付近に吸収極大を示し、この吸光度は同濃度の GCH の約 2 倍である (Fig. 1)。また、分解物 p-CA が GCH 濃度の 5 % と仮定した場合のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。滅菌前、滅菌後および開封約半年後の試料いずれにも p-CA に該当するピークは見られなかった。この結果は、GCH 滅菌後の p-CA 濃度がわずかに 0.3% であるとする GOODALL ら⁷⁾ と一致する。また、調製後 1 カ月と 3 カ月の主成分の値が逆転しているが、製造ロット間の調製誤差や、開封の回数あるいは残存量の差などの使用条件の

違いが影響していると思われる。

2. 培養法による効力の検討

1) 直接法による 0.02%GCH 開封後の効力試験

調製後 2 ～ 9 カ月を経た試料のいずれにも菌の発育は見られなかった。

2) 中和法による 0.02%GCH 開封後の効力試験

中和法で GCH の影響を除去して培養した場合でも、調製後 2 カ月～ 1 年 3 カ月を経た試料のいずれにも菌の発育は見られなかった (Table 2)。

3) メンブランフィルター法による 0.02% GCH 開封後の効力試験

メンブランフィルター法で残りすべての GCH をろ過し、その影響を完全に除去した場合でも菌の発育は見られなかった (Table 3)。GCH の影響を除去した中和法およびメンブランフィルター法によるこれらの結果から、滅菌 0.02%GCH を開封し使用中に容器内に微生物が混入したとしても、十分な作用時間のために容器内で微生物は死滅すると考えられる。このことは GCH 濃度と作用時間との関係について述べられた報告⁸⁻¹⁰⁾ によっても推察される。

4) 落下菌試験法

① 0.02%GCH 容器を開放した落下菌試験

Table 2. 中和法による 0.02% グルコン酸クロロヘキシジン開封後の効力試験

使用場所	調製後の期間	TG	GP	TGA	GPA
耳 鼻 科	2 カ 月	—	—	—	—
循環器内科	2 カ 月	—	—	—	—
小 児 科	2 カ 月	—	—	—	—
婦 人 科	2 カ 月	—	—	—	—
小児外科	3 カ 月	—	—	—	—
泌尿器科	5 カ 月	—	—	—	—
内 科	6 カ 月	—	—	—	—
心臓外科	9 カ 月	—	—	—	—
放射線科	1 年 3 カ月	—	—	—	—

—：菌の発育なし，試料：0.5ml，中和剤：0.5ml。

TG：チオグリコール酸培地，GP：ブドウ糖ペプトン培地，TGA：チオグリコール酸寒天培地，GPA：ブドウ糖ペプトン寒天培地

Table 3. メンブランフィルター法による0.02%グルコン酸クロルヘキシジン開封後の効力試験

使用場所	調製後の期間	TG	GP
循環器内科	2 カ 月	—	—
小 児 科	2 カ 月	—	—
婦 人 科	2 カ 月	—	—
小児外科	3 カ 月	—	—
泌尿器科	5 カ 月	—	—
内 科	6 カ 月	—	—
放射線科	1年3カ月	—	—

—：菌の発育なし。

試料：(約100-400ml)をろ過したフィルターを培養。

TG：チオグリコール酸培地，GP：ブドウ糖ペプトン培地。

滅菌消毒剤の開封後汚染の主な原因の一つは、使用時に容器の開口部より落下菌が混入することである。実際の小分けによる使用時の開放時間、容器のふたをあけて他の容器に移すまでの時間であるから、長くて1回に30秒程度であると考えられる。500mlの場合、10mlずつ50回に分けて使用したとしても開放時間の累計は1500秒、すなわち25分程度である。著者らは苛酷試験の一つとして、その約50倍以上の時間である24時間、滅菌0.02%GCHの容器を製剤管理室、調剤室および分室（病棟部門の調剤室）で開放してその試料を直接培養したが、いずれにも菌の発育は見られなかった（Table 4）。

②0.02%GCHを表面塗布または混和した培地による落下菌試験

著者らは更に苛酷試験の一つとして、0.02%

GCHを表面塗布または混和させた固形培地のシャーレを、製剤管理室、調剤室および分室（病棟部門の調剤室）で1時間開放して落下菌試験を行った。500ml容器開口部の直径は18mmと狭く、例えば長時間（24時間）ふたを開放しても微生物が落下し混入する確率は低いと考えたからである。シャーレの直径は90mmであるので、開放面積はポリ容器の約25倍である。しかし、この場合のいずれにも菌の発育は見られなかった。なお、プランクとして0.02%GCHを含まない培地を1時間開放した落下菌試験では、29-47個のコロニーを確認した。これらの結果から、滅菌0.02%GCH使用時に微生物が落下混入しても増殖は抑制され、十分な静菌作用を示すと考えられる。

5) 手指付着菌試験法

①0.02%GCHに指を直接接触させた手指付着菌試験

滅菌消毒剤の開封後汚染のもう一つの主な原因は、使用時に容器の開口部に手指が接触し手指に付着している微生物が混入することである。実際の小分けによる使用時には、よほど不注意な取り扱いをしない限り直径18mmの容器の開口部に指を入れることはあり得ず、せいぜい開口部の端に手指が接触する程度であると思われる。そこで著者らは苛酷試験の一つとして、容器内の0.02%GCHに指を接触させそれを試料として培養したが、いずれも菌の発育は見られなかった。

②0.02%GCHを表面塗布または混和した培地

Table 4. 0.02%グルコン酸クロルヘキシジンを表面塗布または混和した培地による落下菌試験

開放時間 (時間)	開放場所	BHIA		HIA		GPA	
		塗布 ¹⁾	混和 ²⁾	塗布 ¹⁾	混和 ²⁾	塗布 ¹⁾	混和 ²⁾
1	調 剤 室	—	—	—	—	—	—
1	製 剤 管 理 室	—	—	—	—	—	—
1	分 室	—	—	—	—	—	—

—：菌の発育なし。

*0.02%GCH無添加培地で1時間開放した場合、コロニー数は29-47個であった。

1) 培地の表面に0.02%GCHを塗布したもの、2) 培地全体に0.02%GCHを混和したもの。

分室：病棟部門の調剤室，BHIA：ブレインハートインフュージョン寒天培地，HIA：ハートインフュージョン寒天培地，GPA：ブドウ糖ペプトン寒天培地

による手指付着菌試験

著者らはもう一つの苛酷試験として、0.02% GCH を表面塗布または混和させたシャーレ上の固形培地に手指を直接接触させて培養した。GCH を表面塗布した培地の中に1個と3個のコロニーの発育がみられたものがあった。同定を試みたところ表皮ブドウ球菌と糸状菌と思われるものであった。これらの菌のMICは0.02%以下である¹¹⁾ことが知られていることから、コロニーの発育がみられたことについては0.02% GCH が抗菌力を示す菌量以上の菌が被験者の手指に付着していたこと、あるいは培地に表面塗布したGCH量が少なかったために手指を接触させた際に接触部の培地のGCH量が減少してコロニーが発育した可能性などが考えられる。

一方、あらかじめ0.02% GCH を混和した培地ではいずれにも菌の発育は見られなかった。なお、ブランクとして0.02% GCH を含まない培地で手指付着菌試験を行ったところ、2個から密集による計数不能までコロニーの数に幅が見られた

Table 5. 0.02% グルコン酸クロヘキシジン を表面塗布または混和した培地による手指付着菌試験

被験者	BHIA	HIA	GPA
	表面 ¹⁾ 混和 ²⁾	表面 ¹⁾ 混和 ²⁾	表面 ¹⁾ 混和 ²⁾
a	—	—	+(3)
b	—	—	+(1)
c	—	—	—
d	—	—	—
e	—	—	—
f	—	—	—
g	—	—	—
h	—	—	—
i	—	—	—

—: 菌の発育なし。+: 菌の発育あり; ()内はコロニー数。
*0.02% GCH 無添加培地で付着菌試験を行った場合、コロニー数は2個から密集による計数不能まで幅があった。1) 培地の表面に0.02% GCH を塗布したもの、2) 培地全体に0.02% GCH を混和したもの。

BHIA: プレインハートインフュージョン寒天培地, HIA: ハートインフュージョン寒天培地, GPA: ブドウ糖ペプトン寒天培地。

(Table 5)。

これらの結果から、滅菌0.02% GCH 使用時に容器の開口部に手指が接触し、わずかに手指付着菌が混入しても増殖は抑制され、十分な静菌作用を示すと考えられる。

培地には様々な用途のものがあるが、日本薬局方収載のメンブランフィルター法においては規定の液体培地⁶⁾を用い、中和法においてはこれに加えて液体培地での判定をコロニーによる確認で容易にするため、液体培地に寒天を加え固形培地としたもの¹²⁾も用いた。また他の方法では、栄養要求の厳しい菌の生育に適しており広く用いられている¹²⁾培地も用いた。このように、病棟から回収した使いかけのGCHに混入する可能性のある多種類にわたる菌の発育に適するように、それぞれ特性のある培地を数種類用いた。

GCH の添付文書には『*Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* 属等には、まれにGCHに抵抗する菌株もある』¹³⁾との記載がある。これらの引用文献のうち、*Alcaligenes faecalis* の一部の株にBHIA培地では最小発育阻止濃度(MIC)が0.02–0.05%, BHI broth培地では最小殺菌濃度(MBC)が0.0125%のものがある¹⁴⁾との報告があるが、同一菌株でMICに0.02–0.05%と幅があること、また培地が若干異なるもののMBCよりMICが大きいことにもやや疑問が残る。また、いくつかの菌種についてGCHのMICに関する報告があるが¹⁵⁾、0.02%を上回っているのはわずかに*Flavobacterium meningosepticum*の中の一株のみである。*Pseudomonas cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*の一部は常用濃度で死滅しないとの報告があるが¹⁶⁾、接種菌量が 10^8 /mlであり、この菌量は滅菌GCH開封後に混入する可能性のある菌量としてははるかに多い量である。

他にも、*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*などの一部の株を0.02% GCHと15–60分間作用させた場合、殺菌されなかったという報告があるが^{10, 17)}、作用時間を30分–24時間としたものでは

コロニーは確認されていない^{8,9)}。また、*Pseudomonas cepacia* の GCH 抵抗菌に関する別の報告¹⁸⁾もあるが、それは接種菌量が 10^7 – 10^{10} /ml と多く、他にこの菌の MIC は 0.0156% 以下であるとの報告¹⁹⁾もある。0.02% GCH 中に *Alcaligenes faecalis* が認められたという報告²⁰⁾があるが、滅菌製剤のものである。また、検出された30件は同一菌種であり、1–2 個/ml のみのものが10件もあることから、GCH 内で増殖は抑制され、静菌状態を示していると考えられる。

以上のことを総合的に考察すると、実験結果から滅菌 GCH 開封後に微生物汚染の起きる可能性は低いと考えられ、また汚染が起きたとしても、文献的には通常の小分けによる使用方法での汚染菌量では、GCH 容器内で静菌状態が保たれていると考えられる。

本研究は冒頭で述べたように、滅菌 GCH 開封後の使用期限の設定を目的として行ったものである。著者らの実験結果では、数カ月間の使用の可能性を示唆している。しかし、文献上の抵抗菌による汚染の可能性とその危険性も考慮する必要がある。したがって、最終的には個々の使用環境と使用目的等によって判断せざるを得ないが、通常の小分けによる使用方法では開封後、室温保存で1カ月程度は問題ないと思われる。

引用文献

- 1) 0.05%ヘキサック水添付文書、吉田製薬株式会社 (1994)。
- 2) 0.05%マスキ水添付文書、丸石製薬株式会社 (1995)。
- 3) 健栄製薬株式会社社内資料。
- 4) 横手千秋, 住田薫, 船岡恒陽, 医薬ジャーナル, 20, 691–694 (1984)。
- 5) 吉原なみ子, 東海林寿子, 飯島肇, 浦田和樹, 臨床病理, 36, 842–846 (1988)。
- 6) 日本公定書協会監修, “第十二改正日本薬局方解説書”, 廣川書店, 東京, 1991, B–391–397。
- 7) R. R. GOODALL, J. GOLDMAN and J. WOODS, *Pharm J*, 200, 33–34 (1986)。
- 8) 小池早苗, 小泉美智子, 宮脇真弓, 佐藤薫, 原一寿, 中平法子, 高野みどり, 山田喜紹, 看護技術, 33, 1069–1074 (1987)。
- 9) 岩田寿男, 安江慶二, 網岡克雄, 水野宗道, 伊藤一弘, 小菅邦義, 薬局, 44, 187–191 (1993)。
- 10) 森下憲一, 榊原雅代, 竹内美恵子, 原久美子, 稲生泰子, 杉江紀信, 重田勝美, 大橋昭任, 榊原文孝, 医療ジャーナル, 20, 97–107 (1984)。
- 11) 高杉益充編, “改訂版 消毒剤”, 医療ジャーナル社, 東京, 1990, pp. 228–229。
- 12) 三瀬勝利, 川村邦夫, 石関忠一編, “GMP 微生物試験法”, 講談社, 東京, 1993, pp. 219, pp. 391。
- 13) ヒビテン・グルコネート液添付文書, ゼネカ株式会社 (1993)。
- 14) 金兌貞, 近野聖子, 感染症学雑誌, 52, 10–15 (1978)。
- 15) 西岡きよ, 荒井澄夫, 本田一陽, 滝島任, 臨床病理, 26, 721–725 (1977)。
- 16) 全田浩, 太田伸, 臨床泌尿器, 35, 627–636 (1981)。
- 17) 大月千祐, 佐藤玲子, 勝野陽子, 竹中千里, 早田道治, 吉村正一郎, 医薬ジャーナル, 20, 1297–1304 (1984)。
- 18) 小林順子, 柳沢節子, 松田佳苗, 中平法子, 清水妙子, 鈴木順子, 近藤千枝子, 山田喜紹, 看護技術, 28, 2071–2077 (1982)。
- 19) 西山泰暢, 小山真理子, 伊藤満子, 臨床病理, 25, 209–216 (1977)。
- 20) 風間馨, 黒田健, 九州薬学会会報, 23–26; 27–30 (1976)。