〈短 報〉

Clostridium difficile の芽胞に対する次亜塩素酸ナトリウムおよび ジクロロイソシアヌール酸ナトリウムの消毒効果

尾家 重治・小林 晃子・古川 裕之

Effects of Sodium Hypochlorite and Dichloroisocyanurate against Clostridium difficile Spores

Shigeharu OIE, Akiko OBAYASHI and Hiroyuki FURUKAWA

Department of Pharmacy, Yamaguchi University Hospital

(2011 年 9 月 20 日 受付・2011 年 11 月 29 日 受理)

要 旨

Clostridium difficile の芽胞に対して、アルブミン非添加時では、0.0125～0.1% (125～1,000 ppm) 次亜塩素酸ナトリウムや 0.012% (120 ppm) ジクロロイソシアヌール酸ナトリウムは 5 分以内に殺滅効果を示した。一方、0.1% アルブミン添加時では、0.0125～0.02% 次亜塩素酸ナトリウムや 0.012% ジクロロイソシアヌール酸ナトリウムは 60 分間接触でも十分な殺滅効果を示さなかったものの、0.05～0.1% 次亜塩素酸ナトリウムは 5 分以内に殺滅効果を示した。十分に洗浄がなされた状態では、0.0125～0.1% 次亜塩素酸ナトリウムは、*C. difficile* の芽胞に有効である。また、0.05～0.1% 次亜塩素酸ナトリウムは、汚れ(有機物)の存在下でも、*C. difficile* の芽胞の殺滅にすぐれた効果を示すことが推定できた。

Key words : *Clostridium difficile*, 芽胞, 消毒, 次亜塩素酸ナトリウム

Clostridium difficile 関連疾患患者の周辺環境には、本菌の芽胞が大量に存在することが判明しており、これらの患者の環境消毒の重要性が認識されてきている¹⁻⁴⁾。しかし、本菌の芽胞に対する消毒薬の効果に関するデータは少ないのが現状である^{5,6)}。とくに、環境消毒用の消毒薬に関するデータは乏しい⁷⁾。そこで、環境消毒薬としても汎用される次亜塩素酸ナトリウムやジクロロイソシアヌール酸ナトリウムの効果について検討した。

次亜塩素酸ナトリウムとしてミルトン®(1.1%次亜塩素酸ナトリウム含有)、ジクロロイソシアヌール酸ナトリウムとして Milton CP(1錠〈1.0g〉中にジクロロイソシアヌール酸ナトリウムを 500 mg 含有) [いずれも杏林製薬㈱, 東京], 対照の消毒薬として消毒用エタノール(76.9～81.4 vol%エタノール含有; 健栄製薬㈱, 大阪)を用いた。また、次亜塩素酸ナトリウムおよびジクロロイソシアヌール酸ナトリウムの不活化剤として 0.5%チオ硫酸ナトリウム(関東化学㈱, 東京)含有のブ

イオン液(栄研化学㈱, 東京)を用いた⁸⁾。一方、消毒用エタノールの不活化はブイオン液での 100 倍希釈により行った。なお、有機物汚染モデルとしてウシ血清アルブミン(ナカライテスク㈱, 京都)を用いた。

C. difficile の芽胞の調製は次のように行った。すなわち、0.2%Na₂HPO₄ 添加のブレインハートインフュージョン寒天培地⁹⁾で 37℃・5 日間嫌気培養した菌体を白金耳でかき取って生理食塩水に懸濁し、この懸濁液を遠心沈殿法により生理食塩水で 2 回洗浄後に、70℃・10 分間の加温処理をして mL 当たり 10⁶ colony forming units (cfu) オーダーの芽胞液を得た。

次亜塩素酸ナトリウムおよびジクロロイソシアヌール酸ナトリウムの殺芽胞効果の検討は、室温(22±2℃)下で次のように行った。すなわち、芽胞液 0.1 mL を 0.1% アルブミン添加または非添加の次亜塩素酸ナトリウムまたはジクロロイソシアヌール酸ナトリウム 0.9 mL へ注加し、5 秒間攪拌後に経時的に 0.1 mL ずつを採取して、ただちに 0.5%チオ硫酸ナトリウム含有のブイオン液 0.9 mL に加えた。そして 5 秒間攪拌して 10

分間放置後に生菌数の測定を行った。生菌数測定は、滅菌生理食塩水を用いる10倍段階希釈法により、CCMA寒天培地(0.03%タウロコール酸ナトリウム添加, コージンバイオ株, 埼玉県坂戸市)で37°C・72時間嫌気培養して行った。

一方, 消毒用エタノールの殺芽胞効果の検討では, 室温(22±2°C)下で次のように行った。すなわち, 芽胞液0.1 mLを消毒用エタノール0.9 mLへ注加し, 5秒間攪拌後に経時的に0.05 mLずつを採取して, ただちにブイヨン液4.95 mLに加えた。その後は, 前述の次亜塩素酸ナトリウムおよびジクロロイソシアヌール酸ナトリウムの場合と同様の操作を行った。

なお, 0.0125%~0.1%次亜塩素酸ナトリウムや0.012%ジクロロイソシアヌール酸ナトリウムは0.5%チオ硫酸ナトリウム含有ブイヨン液での10倍希釈で不活化されることを, 消毒用エタノールはブイヨン液での100倍希釈で不活化されることを確認した。また, 実験は2回くり返して, それらの平均値を算出した。

表1の1)に, アルブミン非添加時での*C. difficile*の芽胞に対する各種消毒薬の効果を示した。10⁵ cfu/mLオーダーの芽胞を0.012%ジクロロイソシアヌール酸ナトリウムは5分以内に, 0.0125%および0.02%次亜塩素酸ナトリウムは2分以内に, 0.05%次亜塩素酸ナトリウムは1分以内に, 0.1%次亜塩素酸ナトリウムは30秒以内に殺滅した。一方, 消毒用エタノールは20分間接触でも殺滅効果は示さなかった。

表1の2)には, 0.1%アルブミン添加時での*C. difficile*の芽胞に対する消毒薬の効果を示した。10⁵ cfu/mLオーダーの芽胞に対して, 0.012%ジクロロイソシアヌール酸ナトリウムや0.0125%および0.02%次亜塩素酸ナトリウムは60分間接触でも殺滅効果を示さなかったものの, 0.05%次亜塩素酸ナトリウムは5分以内に, また0.1%次亜塩素酸ナトリウムは1分以内に殺滅効果を示した。

*C. difficile*の芽胞に対しては, グルタラルやフタラルがすぐれた殺滅効果を示すことがすでに判明して

表1 *Clostridium difficile*の芽胞に対する消毒薬の殺滅効果(22±2°C)

1) アルブミン非添加時											
contact time		spore counts (cfu/mL) at									
disinfectants		0	15 sec	30 sec	1 min	2 min	5 min	10 min	20 min		
0.1% (1,000 ppm) sodium hypochlorite	1.9×10 ⁵		1.5×10 ²	<10	<10	<10	<10	<10	<10		
0.05% (500 ppm) sodium hypochlorite			3.9×10 ³	1.9×10 ³	<10	<10	<10	<10	<10		
0.02% (200 ppm) sodium hypochlorite			2.8×10 ⁴	2.5×10 ³	7.5×10 ²	<10	<10	<10	<10		
0.0125% (125 ppm) sodium hypochlorite			1.9×10 ⁵	8.2×10 ⁴	1.2×10 ³	<10	<10	<10	<10		
0.012% (120 ppm) sodium dichloroisocyanurate			1.1×10 ⁵	3.8×10 ⁴	2.1×10 ⁴	2.1×10 ³	<10	<10	<10		
ethanol for disinfection		3.8×10 ⁴	7.0×10 ⁴	1.0×10 ⁴	4.5×10 ⁴	3.0×10 ⁴	5.5×10 ⁴	1.5×10 ⁴	6.0×10 ⁴		
2) 0.1%アルブミン添加時											
contact time		spore counts (cfu/mL) at									
disinfectants		0	15 sec	30 sec	1 min	2 min	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min
0.1% (1,000 ppm) sodium hypochlorite	1.8×10 ⁵		8.5×10 ⁴	2.3×10 ⁴	<10	<10	<10	<10	<10	NT*	NT
0.05% (500 ppm) sodium hypochlorite			1.7×10 ⁵	8.8×10 ⁴	1.7×10 ⁴	3.6×10 ³	<10	<10	<10	NT	NT
0.02% (200 ppm) sodium hypochlorite	6.6×10 ⁵		NT	NT	NT	NT	1.0×10 ⁵	9.5×10 ⁴	5.5×10 ⁴	2.3×10 ⁴	2.8×10 ⁴
0.0125% (125 ppm) sodium hypochlorite			NT	NT	NT	NT	1.3×10 ⁵	1.6×10 ⁵	8.0×10 ⁴	1.6×10 ⁵	9.1×10 ⁴
0.012% (120 ppm) sodium dichloroisocyanurate			NT	NT	NT	NT	2.0×10 ⁵	1.3×10 ⁵	1.3×10 ⁵	4.7×10 ⁵	2.3×10 ⁵
ethanol for disinfection			3.8×10 ⁴	NT	NT	NT	NT	1.6×10 ⁴	1.2×10 ⁴	1.0×10 ⁴	1.6×10 ⁴

* NT: not tested

いる^{5,6)}。しかし、グルタラールやフタラールなどの高水準消毒薬は、蒸気毒性の観点から環境消毒には適さない¹⁰⁾。そこで、環境消毒薬としても使用可能な次亜塩素酸ナトリウムやジクロロイソシアヌール酸ナトリウムを用いて *C. difficile* の芽胞に対する効果を検討した。十分に洗浄がなされた状態を想定したアルブミン非添加時では、0.012%ジクロロイソシアヌール酸ナトリウムや0.0125~0.1%次亜塩素酸ナトリウムは、*C. difficile* の芽胞に有効であった。また、有機物汚染を受けた状態を想定した0.1%アルブミン添加時であっても、0.05~0.1%次亜塩素酸ナトリウムはすぐれた殺滅効果を示すことが判明した。なお、筆者らはすでに酢添加の0.5%次亜塩素酸ナトリウムが炭疽菌の芽胞の消毒に有用なことを報告¹¹⁾したが、今回の調査では *C. difficile* の芽胞の消毒には酢非添加でかつより低濃度の次亜塩素酸ナトリウムで十分な効果が得られることが判明した。

病室の床、ベッド周り、トイレおよび浴室などの *C. difficile* 関連疾患患者の周辺環境には、本菌の芽胞が存在することが判明している^{1~3)}。また、本菌の芽胞は環境で長期間生存できるうえに、動物実験で本菌の経口感染菌量は1~2個と非常に少ない¹²⁾。したがって、*C. difficile* 関連疾患の感染は、病院内の汚染環境からが生じやすいと推定される。また実際、*C. difficile* は重篤な腸炎を引き起こすのみならず、院内感染で生じる下痢のおもな原因であるとの指摘がある。したがって、院内感染防止の観点から、*C. difficile* 関連疾患患者の周辺環境の消毒は重要であり、その消毒には、0.05~0.1%次亜塩素酸ナトリウムが推奨される。

利益相反について：本研究は杏林製薬株式会社の資金提供を受けた。利益相反はない。

文 献

- 1) Worsley MA: Infection control and prevention of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother
- 2) Wilcox MH, Fawley WN, Wigglesworth N, Parnell P, Verity P, Freeman J: Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 2003; 54: 109-14.
- 3) Gerding DN, Muto CA, Owens RC Jr.: Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2008; 46 (Suppl 1): S43-9.
- 4) Hacek DM, Ogle AM, Fisher A, Robicsek A, Peterson LR: Significant impact of terminal room cleaning with bleach on reducing nosocomial *Clostridium difficile*. Am J Infect Control 2010; 38: 350-3.
- 5) Wullt M, Odenholt I, Walder M: Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24: 765-8.
- 6) 尾家重治, 神谷 晃: アルデヒド系消毒薬の殺芽胞効果. 環境感染誌 2003; 18: 401-3.
- 7) Omidbakhsh N: Evaluation of sporicidal activities of selected environmental surface disinfectants: carrier tests with the spores of *Clostridium difficile* and its surrogates. Am J Infect Control 2010; 38: 718-22.
- 8) Russell AD, Ahonkhai I, Rogers DT: Microbiological applications of the inactivation of antibiotics and other antimicrobial agents. J Appl Bacteriol 1979; 46: 207-45.
- 9) Nakamura S, Yamakawa K, Izumi J, Nakashio S, Nishida S: Germinability and heat resistance of spores of *Clostridium difficile* strains. Microbiol Immunol 1985; 29: 113-8.
- 10) 尾家重治, 足立タツ子, 神谷 晃, 宮野直之, 長野恵子, 辻野 晃, 他: 2%グルタラールの暴露による医療従事者の副作用. 日手術学会誌 1995; 16: 615-7.
- 11) Oie S, Obayashi A, Yamasaki H, Furukawa H, Kenri T, Takahashi M, et al.: Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. Biol Pharm Bull 2011; 34: 1325-9.
- 12) Kaatz GW, Gitlin SD, Schaberg DR, Wilson KH, Kauffman CA, Seo SM, et al.: Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. Am J Epidemiol 1988; 127: 1289-94.

〔連絡先〕〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1
山口大学医学部附属病院薬剤部 尾家重治
E-mail: oie-ygc@umin.ac.jp

Effects of Sodium Hypochlorite and Dichloroisocyanurate against Clostridium difficile Spores

Shigeharu OIE, Akiko OBAYASHI and Hiroyuki FURUKAWA

Department of Pharmacy, Yamaguchi University Hospital

Abstract

Without the addition of albumin, 0.0125–0.1% (125–1,000 ppm) sodium hypochlorite and 0.012% (120 ppm) dichloroisocyanurate killed *Clostridium difficile* spores within 5 min. In the presence of 0.1% albumin, 0.0125–0.02% sodium hypochlorite and 0.012% dichloroisocyanurate did not show adequate sporicidal activity even after 60-min contact, whereas 0.05–0.1% sodium hypochlorite killed the spores within 5 min. These results indicate the excellent sporicidal effects of 0.0125–0.1% sodium hypochlorite and 0.012% dichloroisocyanurate on *C. difficile* spores in the absence of soil (organic matter). These results also show the excellent sporicidal effects of 0.05–0.1% sodium hypochlorite on *C. difficile* spores even in the presence of soil.

Key words : *Clostridium difficile*, spore, disinfection, sodium hypochlorite