クロルヘキシジンと低濃度エタノールとの併用による消毒効果

尾家重治, 神代 昭*

山口大学医学部附属病院薬剤部

Combined Bactericidal Effect of Chlorhexidine and Diluted Ethanol

SHIGEHARU OIE and AKIRA KOSHIRO*

Department of Pharmacy, Yamaguchi University Hospital,
1144, Kogushi, Ube, 755, Japan

(Received December 21, 1983)

The bactericidal actions of chlorhexidine alone and in combination with low concentration of ethanol were examined for several organisms already reported to be resistant to chlorhexidine.

Of the species tested, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Providencia stuartii* and *Proteus mirabilis* were completely killed by exposure, for 10 min at 20°C, of 0.02 or 0.5% chlorhexidine, but *Flavobacterium meningosepticum* and *Achromobacter xylosoxidans* were resistant to 0.02% chlorhexidine and *P. cepacia* showed the resistance to both 0.02% and 0.5% chlorhexidine. The concentration of 0.02 or 0.5% chlorhexidine in the presence of 10% ethanol, however, was sufficient to induce a complete loss of viability in the above-mentioned resistant species.

The combination of chlorhexidine and diluted ethanol might be useful for the disinfection in hospital practice as this acts synergistically with strong bactericidal activity.

Keywords—chlorhexidine; ethanol; combined effect; synergism; *Pseudomonas cepacia*; *Flavobacterium meningosepticum*; *Achromobacter xylosoxidans*

クロルヘキシジンはその速効性^{1,2)}の故に、消毒剤として広く用いられている。しかし近年、ある種のグラム陰性桿菌に対しては否定的な報告が散見される。たとえば、*Pseudomonas aeruginosa* や *Proteus* sp. に対する最小発育阻止濃度 (MIC) 値が高い;³⁻⁶⁾ 0.05—0.1% クロルヘキシジンが *P. cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Providencia stuartii* などに無効であった;⁷⁻¹⁰⁾ 0.02—0.5% 液中で *P. cepacia*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Acinetobacter calcoaceticus* が発見された;¹¹⁻¹³⁾ 0.02—0.1% 液中で *P. cepacia*, *Alcaligenes faecalis* の増殖が認められた^{14,15)} などである。

上記のグラム陰性桿菌は院内感染に関与することが知られているので、これらが院内で消毒剤として繁用されているクロルヘキシジンに抵抗性を有するとすれば、病院環境衛生上憂慮すべき問題である。そこでまずわれわれはこの事実を確認するためにクロルヘキシジンに対して感受性が低いと報告された菌種のうち、入手できなかった *A. faecalis* を除く 7 菌種について感受性を検討し、ついでクロルヘキシジンが無効であった菌に対し、エタノールを添加したクロルヘキシジンの抗菌力を検討した。すでに高濃度エタノール添加のクロルヘキシジンに強い消毒効果のあることは認められ、¹⁶⁻¹⁸⁾ 実用化もされているが、広範に使用する消毒剤として推奨することは皮膚刺激性、経済性などの見地から不適當である。われわれはこれらの欠点を除くため従来全く検討されていなかったエタノール含量の減少を考え実験を試みたところ、7—10% の低濃度エタノール添加によって著しい抗菌力の増強を認め、有用な消毒剤として使用可能と判断したので報告する。

実 験 の 部

使用菌株 *P. cepacia* の臨床分離の 5 株, *P. aeruginosa* IFO 3919 および臨床分離の 5 株, *Flavobacterium meningosepticum* IFO 12535 および臨床分離 5 株, *Achromobacter xylosoxidans* の臨床分離 5 株, *Acinetobacter calcoaceticus* IFO 13006 および臨床分離の 5 株, *Providencia stuartii* の臨床分離 5 株, *Proteus mirabilis* IFO

3849 および臨床分離 5 株の計 39 株.

対照菌は *Staphylococcus aureus* 209P および *Escherichia coli* NIHJ JC-2 を用いた. これらのうち標準菌は発酵研究所 (大阪) より購入し, 臨床分離株は順天堂大学中央検査部より分与された.

使用薬剤 クロルヘキシジンは 20% クロルヘキシジングルコネート (ICI ファーマ), クロルヘキシジン不活化剤は住友化学社製のヒビテン® 中和剤 (Tween 80® 5%, Lubrol W® 5%, soyalecithin 2.5% を含む), エタノールは片山化学の試薬特級, 培地は栄研化学社製をそれぞれ用いた.

クロルヘキシジンの最小発育阻止濃度 (MIC) の測定 普通ブイヨンで 30°C, 24 時間培養の菌液を, 生理食塩水で約 10^8 生菌数/ml に希釈し, この菌液 0.005 ml を, ミクロプランター (佐久間製作所) を用いて 2 倍希釈濃度のクロルヘキシジンを含む普通寒天培地上に植菌した. 判定は 30°C, 24 時間後に行い, コロニー形成がみられない最小のクロルヘキシジン濃度を MIC とした.

クロルヘキシジンおよびエタノール添加クロルヘキシジンの殺菌力の測定 普通寒天培地で 30°C, 24 時間培養の菌体を白金耳でかき取り, 生理食塩水に懸濁して約 10^8 生菌数/ml の菌液を調製した. この菌液の 0.1 ml を 20°C, 10 ml の各種試験液すなわち, 0.02% または 0.5% クロルヘキシジン, 3—10% エタノール, および 0.02% または 0.5% クロルヘキシジン中に 3—10% のエタノールを含む液それぞれにチャレンジし, 10 分間接触後, 試験液より 0.5 ml を取り, 4.5 ml の不活化剤入り普通ブイヨン (クロルヘキシジンの不活化剤として Tween 80®, 1%, Rubrol W®, 1%, soyalecithin, 0.5% を含む) に加え, 直ちに攪拌後 10 分間放置した. その後生菌数を普通寒天培地を用いて希釈法により測定した. また対照として, 試験液の代わりに生理食塩液を用い, 同様の操作で生菌数を求め, 試験液に 10 分間接触後の生菌数の減少を次式のように表わした.

$$\text{生菌数の減少} = \log_{10} \frac{(\text{生理食塩水に接触後の生菌数})}{(\text{試験液に接触後の生菌数})}$$

なお, 上述の不活化操作 (クロルヘキシジンは不活化剤で, またエタノールは 1% 濃度以下への希釈¹⁰⁾) で, クロルヘキシジンおよびエタノールは生菌数測定に影響を及ぼさなくなることを確認した.

また, すべての操作は 3 回行い, 生菌数の減少は 3 回の平均値を求め, MIC 値は 2 段階以上の違いを生じないことを確かめた.

結 果

クロルヘキシジンの抗菌力

9 種の細菌に対するクロルヘキシジンの MIC 値および, 0.02%, 0.5% クロルヘキシジン溶液へ 10 分間接触後の生菌数の減少を Table I に示した.

最も高い MIC 値を示したのは, *Flavobacterium* で 6 株中 5 株が 1600 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した. 次に高い MIC 値を示したのは *P. cepacia* で, すべて 400 $\mu\text{g/ml}$ の値を示した. *Proteus*, *Providencia* にも 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示す株が多くみられた. これに対し *Achromobacter* および *Acinetobacter* はすべて 25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の MIC 値であった.

0.02% クロルヘキシジンによって生菌数の減少率 99.999% 以上に到達しなかった菌株は, *P. cepacia* の全株, *Flavobacterium* 6 株中 4 株, *Achromobacter* の全株であり, 特に *P. cepacia* の 2 株はほとんど減少していない. また 0.5% クロルヘキシジン中では *P. cepacia* の 4 株のみであった. その他の菌種はすべて 0.02%, 0.5% クロルヘキシジン中で 99.999% 以上の減少を示した.

エタノール添加クロルヘキシジンの抗菌力

0.02% および 0.5% クロルヘキシジンのいずれにも抵抗性を示した *P. cepacia* 3 株, 0.02% クロルヘキシジンに抵抗性を示した *Flavobacterium*, *Achromobacter* それぞれ 2 株を用いて, エタノール添加クロルヘキシジンの抗菌効果を調べた (Table II, III).

P. cepacia (Table II) に対し, 3—10% エタノールのみ, または 0.02% クロルヘキシジンのみの 10 分間接触では生菌数はほとんど減少せず, また 0.5% クロルヘキシジンのみでは 90% 程度の減少であった. しかしクロルヘキシジンとエタノールとの併用では, エタノール濃度に比例してクロルヘキシジンの効果を増強しており, 0.5% クロルヘキシジン中にエタノールを 7—10% 含む液への 10 分間接触では, 99.999% 以上の生菌数の減少がみられた.

TABLE I. Antibacterial Activity of Chlorhexidine

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}	Reduction (log) when bacterial suspension exposed for 10 minutes at 20°C to chlorhexidine at ^{b)}	
		0.02%	0.5%
<i>Pseudomonas cepacia</i> 1	400	0.64	0.85
<i>Pseudomonas cepacia</i> 2	400	0.02	1.18
<i>Pseudomonas cepacia</i> 3	400	0.08	0.93
<i>Pseudomonas cepacia</i> T2	400	4.00	>5
<i>Pseudomonas cepacia</i> T3	400	2.45	3.01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T1	25	>5	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T2	100	>5	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T3	6.25	>5	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T4	12.5	>5	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T5	50	>5	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3919	6.25	>5	>5
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> 1115	1600	2.56	>5
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> 1127	>1600	3.39	>5
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> 1129	1600	2.76	>5
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> 1145	>1600	3.02	>5
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> 1148	>1600	>5	>5
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> IFO 12535	200	>5	>5
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> 719	12.5	2.77	>5
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> 974	6.25	2.61	>5
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> 1019	25	1.03	>5
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> 1024	12.5	2.36	>5
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> 1198	12.5	1.23	>5
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 22	12.5	>5	>5
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 23	1.56	>5	>5
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 24	12.5	>5	>5
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 25	6.25	>5	>5
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 26	12.5	>5	>5
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IFO 13006	12.5	>5	>5
<i>Providencia stuartii</i> 5	6.25	>5	>5
<i>Providencia stuartii</i> 6	100	>5	>5
<i>Providencia stuartii</i> 7	400	>5	>5
<i>Providencia stuartii</i> 9	100	>5	>5
<i>Providencia stuartii</i> 10	200	>5	>5
<i>Proteus mirabilis</i> 11	200	>5	>5
<i>Proteus mirabilis</i> 15	200	>5	>5
<i>Proteus mirabilis</i> 16	100	4.01	>5
<i>Proteus mirabilis</i> 18	200	>5	>5
<i>Proteus mirabilis</i> 20	200	>5	>5
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	100	>5	>5
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	1.56	>5	>5
<i>S. aureus</i> 209P	1.56	>5	>5

a) Media: Nutrient agar (Eiken K. K.), inoculum size: 10^6 cells/ml.b) Inoculum size: 10^6 cells/ml in test solution.

Table III には, *P. cepacia*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* それぞれ 2 株に対して, 10% エタノール, 0.02% または 0.5% クロルヘキシジン, および 0.02% または 0.5% クロルヘキシジン中にエタノールを 10% 含む液それぞれ 10 分間接触後の生菌数の減少率を示した. いずれの菌に対しても, 10% エタノールはほとんど効果を示さないが, クロルヘキシジンとエタノールの併用では強力な殺菌効果が得られた.

考 察

クロルヘキシジンとアルコールとの併用に関しては, クロルヘキシジンと, 高濃度アルコール(約70%以上) または低濃度アルコールとの併用が今までに報告されている.

まず, 高濃度アルコールとの併用では, 消毒用エタノール中クロルヘキシジン濃度 0.5—1% のいわゆる “クロルヘキシジンアルコール”¹⁶⁻¹⁹⁾ が広く用いられている. この “クロルヘキシジンアルコール” は手術器具や手術部位などの迅速消毒に用いられ,

強い抗菌力が期待できるものの, 本製剤を一般的な消毒の目的で用いるにはいくつかの問題点がある. すなわ

TABLE II. Combination Effect of Chlorhexidine and Ethanol against *Pseudomonas cepacia* 3

Concentration (%)		Reduction (log) when bacterial suspension exposed for 10 min at 20°C ^{a)}
Ethanol	Chlorhexidine	
3	0	0.01
5	0	0.02
7	0	0.09
10	0	0.13
0	0.02	0.07
3	0.02	0.12
5	0.02	0.17
7	0.02	0.75
10	0.02	2.20
0	0.5	1.18
3	0.5	2.13
5	0.5	3.60
7	0.5	>5
10	0.5	>5

a) Inoculum size: 10⁶ cells/ml in test solution.

TABLE III. Combination Effect of Chlorhexidine and Ethanol against *P. cepacia*, *Flavobacterium* and *Achromobacter*

Organism	Concentration (%)		Reduction (log) when bacterial suspension exposed for 10 min at 20°C ^{a)}
	Ethanol	Chlorhexidine	
<i>Pseudomonas cepacia</i> 1	10	0	0.01
	0	0.5	1.13
	10	0.5	>5
<i>Pseudomonas cepacia</i> 2	10	0	0.02
	0	0.5	1.22
	10	0.5	>5
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> 1115	10	0	0.40
	0	0.02	3.12
	10	0.02	>5
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> 1145	10	0	0.01
	0	0.02	2.81
	10	0.02	>5
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> 1019	10	0	0.10
	0	0.02	1.13
	10	0.02	>5
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> 1198	10	0	0.01
	0	0.02	1.48
	10	0.02	>5

a) Inoculum size: 10⁶ cells/ml in test solution.

ち、第一に高濃度エタノールの皮膚刺激の強さである。医療従事者にとって頻回の消毒は清潔保持のための最も日常のかつ基本的な行為であるので、皮膚刺激の有無、強弱は消毒薬選択の大きい理由となる。

第二に経済的理由である。病院、診療所で消費する消毒剤は膨大な量に及ぶので、できるだけ低廉な価格のものが望ましい。高価なエタノールを大量に使用することは病院経営上の大きい問題となる。さらに、高濃度エタノールの揮発による呼吸器への刺激、非飲酒者の嫌悪、引火の危険性などがあげられる。以上の問題点から、高濃度エタノールとクロルヘキシジンとの併用による消毒剤の用途は限局されざるを得ない。

一方、低濃度アルコールとクロルヘキシジンの併用については、4% イソプロピルアルコールまたは6% エタノールをクロルヘキシジンに添加する方法が Burdon ら²⁰⁾により、また5% エタノールを添加する方法が本郷ら²¹⁾によって報告されている。しかし彼等の報告において、低濃度エタノールの添加は専らクロルヘキシジン溶液の微生物汚染防止のためであり、添加による消毒効果への影響については全く関心を示しておらず、したがって何らの検討も行われていない。低濃度エタノール添加クロルヘキシジン溶液においては、皮膚刺激性、経済性、呼吸器刺激性、引火性など高濃度エタノール添加クロルヘキシジン溶液の欠点はほとんどとり除かれたものと考えられる。一方、消毒剤の分野では新しい消毒剤の登場は長らく途絶えており、既存の消毒剤の併用による活用をはかる必要に迫られている。このような状況下において院内感染に関与することが知られしかもクロルヘキシジンに抵抗性を有すると報告されているグラム陰性桿菌に対する本液の抗菌効果を検討することは極めて有意義である。

そこで、われわれは低濃度エタノールとクロルヘキシジンとの併用による消毒効果を、常用濃度のクロルヘキシジン単独では抗菌力を示さなかった数種の菌を用いて検討したところ、エタノール濃度7—10%のエタノール添加クロルヘキシジンは、これらの菌に対し相乗的に作用し、十分な消毒効果を示すことが判明した。7—10%エタノールの添加は、“クロルヘキシジンアルコール”のような高濃度アルコールの欠点がないことから、日常の消毒剤として用いるのに有用と推定される。

本実験でクロルヘキシジンに抵抗性を示した3菌種は、いずれもブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に属する。本菌群の臨床材料からの分離頻度は近年高まってきている²²⁻²⁶⁾が、この原因として、临床上繁用される抗生剤に耐性を示すこと^{22,23,26-29)} 蒸留水や注射液などの栄養分の非常に少ないところで増殖可能なこと³⁰⁻³⁷⁾などとともに、消毒剤に抵抗性を示すこと^{3-15,38-42)}が挙げられている。本菌群は病院内に広く存在している⁴³⁻⁴⁶⁾ので、本菌群の存在が予想される場合の消毒には、クロルヘキシジン単独ではなく低濃度エタノールとの併用が有用と思われる。なお、われわれはエタノール40%以上であれば単独でもブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に有効であることについて別に報告した。¹⁹⁾

謝辞 貴重な臨床分離株を分与していただいた順天堂大学病院中央検査部に深謝いたします。

引用文献

- 1) G. E. Davies, J. Francis, A. R. Martin, F. L. Rose, G. Swain, *Br. J. Pharmacol.*, **9**, 192 (1954).
- 2) T. D. Hennessey, *J. Periodont. Res.*, **8** (Suppl. 12), 61 (1973).
- 3) T. D. M. Martin, *J. Med. Microbiol.*, **2**, 101 (1969).
- 4) J. D. O'Flynn, D. J. Stickler, *Lancet*, **i**, 489 (1972).
- 5) D. J. Stickler, *J. Clin. Pathol.*, **27**, 284 (1974).
- 6) 小机弘之, 中原英臣, 甲斐田 博, 武山 浩, 田平勝郎, 帆足誠司, 渡辺一夫, 渡辺文時, 医学のあゆみ, **117**, 997 (1981).
- 7) 茂田士郎, 岡村弘子, 本泉 健, 安永吉男, 熊田六郎, 遠藤辰一郎, 診断と治療, **64**, 1872 (1976).
- 8) 富岡 一, 小林芳夫, 内田 博, 萩原 董, 臨床と細菌, **5**, 29 (1978).
- 9) B. Thomas, L. Sykes, D. J. Stickler, *J. Clin. Pathol.*, **31**, 929 (1978).
- 10) 林 英生, 平井義一, 和田百子, 金政泰弘, 河上靖登, 光岡利人, 富田校郎, 新太喜治, 吉沢圭子, 安井晃栄, 藤原 清, 岡山医学誌, **91**, 251 (1979).
- 11) D. C. E. Speller, M. E. Stephens, A. C. Viant, *Lancet*, **i**, 798 (1971).
- 12) D. C. J. Bassett, J. A. S. Dickson, G. H. Hunt, *Lancet*, **i**, 1263 (1973).
- 13) M. M. Coyle-Gilchrist, P. Crewe, G. Roberts, *J. Clin. Pathol.*, **29**, 824 (1976).

- 14) C. Dulake, E. Kidd, *Lancet*, **i**, 980 (1966).
- 15) D. C. J. Bassett, K. J. Stokes, W. R. G. Thomas, *Lancet*, **i**, 1188 (1970).
- 16) E. J. L. Lowbury, H. A. Lilly, J. P. Bull, *Br. Med. J.*, **2**, 531 (1964).
- 17) D. Raahave, *Acta Chir. Scand.*, **140**, 595 (1974).
- 18) J. Frazer, *Microbios Lett.*, **3**, 119 (1976).
- 19) A. Koshiro, S. Oie, *Microbios*, **40**, 33 (1984).
- 20) D. W. Burdon, J. L. Whitby, *Br. Med. J.*, **2**, 153 (1967).
- 21) 本郷俊治, 鈴木比佐子, 川西功躬, 高尾正義, 大浜 修, 柳原 博, 臨牀と研究, **58**, 3613 (1981).
- 22) P. Gardner, W. B. Griffin, M. N. Swartz, L. J. Kunz, *Am. J. Med.*, **48**, 735 (1970).
- 23) M. M. Pedersen, E. Marso, M. J. Pickett, *Am. J. Clin. Pathol.*, **54**, 178 (1970).
- 24) S. L. Rosenthal, *Am. J. Clin. Pathol.*, **62**, 807 (1974).
- 25) R. Ramphal, R. M. Kluge, *Am. J. Med. Sci.*, **277**, 57 (1979).
- 26) C. Peng, *J. Formosan Med. Assoc.*, **79**, 249 (1980).
- 27) 富岡 一, 小林芳夫, 内田 博, 亀岡百合子, 最新医学, **32**, 1454 (1977).
- 28) 小栗豊子, 最新医学, **32**, 2056 (1977).
- 29) T. R. Oberhofer, J. W. Rowen, G. F. Cunningham, *J. Clin. Microbiol.*, **5**, 208 (1977).
- 30) 萩原義郷, 石田正信, 三浦圭一郎, 久留米医誌, **33**, 1614 (1970).
- 31) M. S. Favero, L. A. Carson, W. W. Bond, N. J. Petersen, *Science*, **173**, 836 (1971).
- 32) L. A. Carson, M. S. Favero, W. W. Bond, N. J. Petersen, *Appl. Microbiol.*, **25**, 476 (1973).
- 33) S. M. Gelbart, G. F. Reinhardt, H. B. Greenlee, *J. Clin. Microbiol.*, **3**, 62 (1976).
- 34) E. P. Crichton, *Am. J. Clin. Pathol.*, **59**, 199 (1973).
- 35) H. A. Cabrera, M. A. Drake, *Am. J. Clin. Pathol.*, **64**, 700 (1975).
- 36) T. Kothari, M. P. Reyes, N. Brooks, W. J. Brown, A. M. Lerner, *Can. Med. Assoc. J.*, **116**, 1230 (1977).
- 37) C. J. Holmes, M. C. Allwood, *Int. J. Pharm.*, **2**, 325 (1979).
- 38) S. A. Plotkin, R. Austrian, *Am. J. Med. Sci.*, **235**, 621 (1958).
- 39) I. Phillips, S. Eykyn, M. A. Curtis, J. J. S. Snell, *Lancet*, **i**, 375 (1971).
- 40) R. E. Dixon, R. A. Kaslow, D. C. Mackel, C. C. Fulkerson, G. F. Mallison, *JAMA*, **236**, 2415 (1976).
- 41) M. J. Frank, W. Schaffner, *JAMA*, **236**, 2418 (1976).
- 42) R. L. Berkelman, S. Lewin, J. R. Allen, R. L. Anderson, L. D. Budnick, S. Shapiro, S. M. Friedman, P. Nicholas, R. S. Holzman, R. W. Haley, *Ann. Int. Med.*, **95**, 32 (1981).
- 43) E. M. Cooke, R. A. Shooter, S. M. O Farrell, D. R. Martin, *Lancet*, **ii**, 7682 (1970).
- 44) R. M. Baird, W. R. L. Brown, R. A. Shooter, *Br. Med. J.*, **1**, 511 (1976).
- 45) C. Randall, *Can. J. Public Health*, **71**, 119 (1980).
- 46) 山口恵三, 感染症誌, **57**, 59 (1983).