

Clostridioides (旧名 *Clostridium*) *difficile* の芽胞に対する殺芽胞性環境清拭ワイプのしづり液の消毒効果

尾家 重治・松本 翔太

Sporicidal Effects of Excess Liquid from Sporicidal Wipes against Clostridioides Difficile Spores

Shigeharu OIE and Shota MATSUMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sanyo-onoda City University

(2019年4月3日受付・2019年7月19日受理)

要 旨

Clostridioides difficile の芽胞に対する殺芽胞性環境清拭ワイプのしづり液の消毒効果について、汚濁条件（0.3% 羊血球含有 0.3% ウシ血清アルブミン存在下）で検討した。このワイプ1枚に注射用蒸留水20mLを含浸させて4分間放置後にそのしづり液を実験に供した。*C. difficile* の計3株の芽胞に対して、対照薬剤として用いた0.1% (1,000ppm) 次亜塩素酸ナトリウムでは10分間接触であっても十分な殺芽胞効果を示さなかったが、殺芽胞性環境清拭ワイプのしづり液では5分間接触で十分な殺芽胞効果を示した。*C. difficile* の芽胞で汚染された環境の消毒に殺芽胞性環境清拭ワイプは有用と考えられる。

Key words : *Clostridioides difficile*, 芽胞, 消毒, 殺芽胞性環境清拭ワイプ

Clostridioides difficile 感染症（CDI）患者の周辺環境には、本菌の芽胞が存在することが報告されている^{1,2)}。また本菌の芽胞は環境で長期間生存できるうえに¹⁾、その経口感染菌量は動物実験で1~2個と非常に少ないことが判明している³⁾。さらに、CDI患者の周辺環境の消毒を行うことによりCDIが減少したとの報告があることなどから^{4,5)}、CDI発症のおもな原因として環境の*C. difficile*汚染が推定されている。したがって、CDI患者の周辺環境の消毒は重要である。

*C. difficile*に対する環境消毒剤としては、強力な殺芽胞効果を示す次亜塩素酸ナトリウムが汎用されている。しかし、本剤は汚れ（有機物）の存在下で急激な効力低下を示す欠点がある⁶⁾。また、本剤は金属腐食性を示すのみならず、その塩素臭が眼や呼吸器系の粘膜を刺激するなどの欠点もある。このため次亜塩素酸ナトリウムに代わる殺芽胞性の環境消毒剤が本邦で求められているのが現状である。英国では殺芽胞性環境清拭ワイプの使用によりCDIを有意に減少できたとの報告があり、本ワイプは英国において汎用されている⁵⁾。最近、本ワイプ

が本邦にも導入されたが、本ワイプの殺芽胞効果に関するin vitroデータは乏しい。そこで、*C. difficile*の芽胞に対する本ワイプのしづり液の汚濁条件下での効果について調べた。なお、本ワイプは過酢酸製剤であるものの、内視鏡消毒に汎用されている過酢酸製剤とは異なり、清拭使用であっても過酢酸が大気中に検出されないこと（検出限界2 ppm w/v）や、ステンレスやプラスチック材質を傷めにくいことが判明している⁷⁾。

殺芽胞性環境清拭ワイプとしてスロリサイダル®（過酢酸および過酸化水素含有、（株）モレーンコーポレーション、東京）、対照薬として次亜塩素酸ナトリウム（ミルトン®、杏林製薬（株）、東京）を用いた。ここで、殺芽胞性環境清拭ワイプの試験では、実験の再現性のためにそのしづり液を実際の使用方法とは異なる方法で調製した。すなわち、ワイプ1枚に注射用蒸留水20mLを含浸させて4分間放置後にそのしづり液を実験に供した。また、汚濁条件の作成には、羊脱纖維血液（日本バイオテスト研究所、東京）およびウシ血清アルブミン（SIGMA-ALDRICH、USA）を用いた。一方、殺芽胞性環境清拭ワイプおよび次亜塩素酸ナトリウムの不活剤として0.5% チオ硫酸ナトリウム（和光純薬（株）、大阪）

表1 汚濁条件下^{*1}での*Clostridioides difficile*に対する殺芽胞性環境清拭ワイプ^{*2}および次亜塩素酸ナトリウムの殺芽胞効果 (20±2°C)

用いた株	消毒剤	接触後の芽胞数 (生存率)				
		0	1分	2分	5分	10分
ATCC9689	殺芽胞性環境清拭ワイプ	4.1×10 ⁴ (66.1%)	213 (0.34%)	<5 (<0.01%)	<5 (<0.01%)	<5 (<0.01%)
	0.1% (1,000ppm)	6.2×10 ⁴	6.6×10 ⁴ (106.5%)	6.1×10 ⁴ (98.4%)	7.1×10 ⁴ (114.5%)	5.5×10 ⁴ (88.7%)
	次亜塩素酸ナトリウム					
臨床分離株 (Y-S 株)	殺芽胞性環境清拭ワイプ	9.4×10 ⁴	1.2×10 ⁴ (12.8%)	15 (0.16%)	<5 (<0.01%)	<5 (<0.01%)
	0.1% (1,000ppm)		7.5×10 ⁴ (79.8%)	7.9×10 ⁴ (84.0%)	7.7×10 ⁴ (81.9%)	8.4×10 ⁴ (89.4%)
	次亜塩素酸ナトリウム					
臨床分離株 (Y-T 株)	殺芽胞性環境清拭ワイプ	2.2×10 ⁵	6.8×10 ⁴ (30.9%)	787 (0.36%)	<5 (<0.01%)	<5 (<0.01%)
	0.1% (1,000ppm)		2.3×10 ⁵ (104.5%)	2.2×10 ⁵ (100%)	1.9×10 ⁵ (86.4%)	1.9×10 ⁵ (86.4%)
	次亜塩素酸ナトリウム					

*1 0.3% 羊血球および0.3% ウシ血清アルブミンを含有

*2 ワイプ1枚に注射用蒸留水20mLを含浸させて4分間放置後のしぶり液を用いた

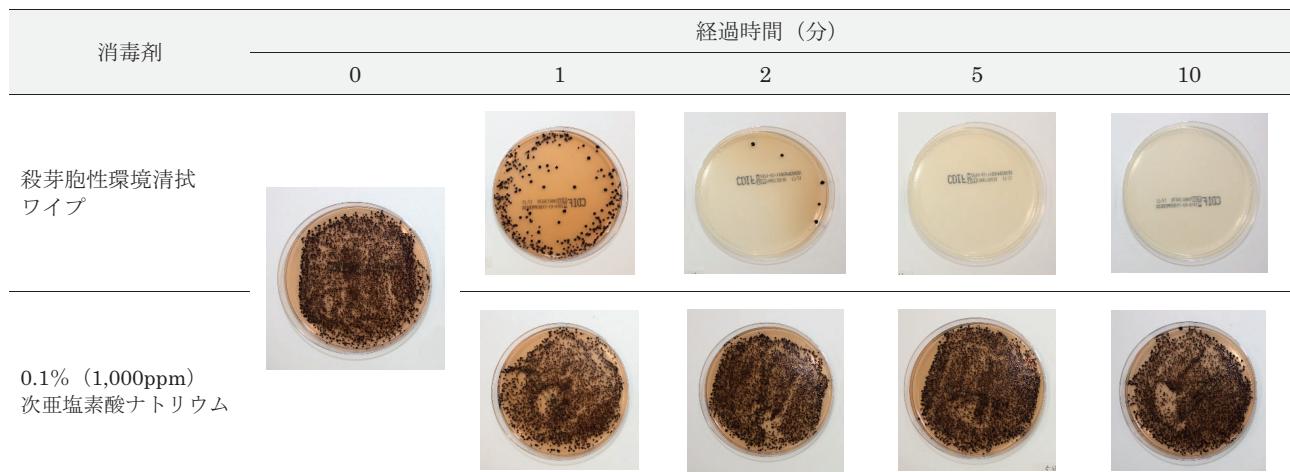


図1 汚濁条件下での*Clostridioides difficile*の臨床分離株 (Y-S 株)に対する殺芽胞性環境清拭ワイプおよび次亜塩素酸ナトリウムの殺芽胞効果 (培地上の生菌数)

含有ブイヨン液（栄研化学（株），東京）を用いた⁸⁾。

試験に供した株は、標準株の1株 (*C. difficile* ATCC 9689) および山口大学病院での臨床分離の2株 (Y-S 株, Y-T 株) の計3株である。*C. difficile* の芽胞の調製は次のように行った。すなわち、0.2%NaHPO₄ 添加のブレインハートインフュージョン寒天培地で37°C・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°C・10分間の加温処理をしてmL当たり10⁵~10⁶ colony forming units (cfu) オーダーの芽胞液を得た⁹⁾。

殺芽胞効果の検討は、室温 (20±2°C) 下でサスペンション試験により行った。すなわち、試験液8mLに3%

羊血球含有3% ウシ血清アルブミン1mLを加えて、その後に芽胞液1mLを注加し、5秒間攪拌後に経時的に1mLずつを採取して、ただちに0.5% チオ硫酸ナトリウム含有ブイヨン液9mL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、chrom ID® *C. difficile* 培地（ビオメリュー・ジャパン（株），東京）で37°C・72時間嫌気培養して行った。なお、殺芽胞性環境清拭ワイプのしぶり液および次亜塩素酸ナトリウムは、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に、汚濁条件下での*C. difficile* 計3株に対する

殺芽胞性環境清拭ワイプのしづり液および次亜塩素酸ナトリウムの殺芽胞効果を示した。*C. difficile* の計 3 株に対して、0.1% 次亜塩素酸ナトリウムでは 10 分間接触であっても芽胞生残率が 86.4–89.4% であったが、殺芽胞性環境清拭ワイプのしづり液では 5 分間接触で芽胞生残率が 0.01% 以下となった。また、図 1 には臨床分離 1 株 (Y-S 株) に対する殺芽胞性環境清拭ワイプおよび次亜塩素酸ナトリウムの殺芽胞効果を培地上の生残菌で示した。*C. difficile* の芽胞に対して、0.1% 次亜塩素酸ナトリウムは 10 分間接触であっても殺芽胞効果を示さなかったものの、殺芽胞性環境清拭ワイプのしづり液は 5 分間接触で殺芽胞効果を示した (表 1, 図 1)。

医療関連施設内の環境消毒では、汚れ (有機物) を除去後に消毒を行うのが原則ではある。しかし、汚れが存在するか否かについて判断をしかねる場面も少なくなく、汚れの存在下で著しい効力低下を示す次亜塩素酸ナトリウムでは十分な消毒効果が得られない可能性があった。今回の実験では、殺芽胞性環境清拭ワイプのしづり液はすぐれた殺芽胞効果を示すことが判明した。わが国で内視鏡消毒剤として汎用されている過酢酸 (エタンペルオキソ酸) は pH が酸性で過酢酸が遊離の状態で存在するため粘膜刺激性を示す。一方、今回の実験に供した殺芽胞性環境清拭ワイプは pH が中性付近で、過酢酸が過酢酸塩として存在するため、ヘッドスペース GC-MS 分析でも過酢酸は検出されなかったことが報告されている¹⁰⁾。すなわち、本ワイプは刺激臭がほとんどないのみならず金属腐食性が小さいので、*C. difficile* 汚染の環境消毒に有用と考えられる。

利益相反自己申告: 本研究は（株）モーレンコーポレーションの資金提供を受けた。利益相反はない。

文 献

- 1) Gerding DN, Muto CA, Owens RC Jr: Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2008; 46(Suppl 1): S43-9.
- 2) Blakney R, Gudnadottir U, Warrack S, O'Horo JC, Anderson M, Sethi A, et al.: The relationship between patient functional status and environmental contamination by *Clostridium difficile*: a pilot study. Infection 2015; 43: 483-7.
- 3) 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.
- 4) Donskey CJ: Does improving surface cleaning and disinfection reduce health care-associated infections? Am J Infect Control 2013; 41(Suppl 5): S12-9.
- 5) Carter Y, Barry D: Tacking *C. difficile* with environmental cleaning. Nursing Times 2011; 107(36): 22-5.
- 6) Coates D: Comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate disinfectants: neutralization by serum. J Hosp Infect 1988; 11: 60-7.
- 7) 社内資料 : Testing of medical wipes on a variety of materials. GAMA Healthcare Ltd., 23 April 2009.
- 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) 社内資料 : Atmospheric tests on Sporicidal Wipes. Report number: M433a, Dharmit Mistry-Gama Healthcare Ltd., 5th October 2016.

〔連絡先 : 〒756-0884 山口県山陽小野田市大学通 1-1-1
山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部薬学科 尾家重治
E-mail: oie@rs.soku.ac.jp〕

Sporicidal Effects of Excess Liquid from Sporicidal Wipes against *Clostridioides difficile* Spores

Shigeharu OIE and Shota MATSUMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sanyo-onoda City University

Abstract

The sporicidal effect of excess liquid from sporicidal wipes was evaluated in comparison to sodium hypochlorite against the spores of three strains of *Clostridioides difficile* under dirty (3.0 g/L albumin plus 3.0mL/L sheep erythrocytes) conditions. The wipes were soaked in 20 mL distilled water for 4 min. The excess liquid from the soaked wipes was subsequently used in the experiment. Sodium hypochlorite of 0.1% (1,000 ppm) did not exhibit adequate sporicidal activity even after 10 min of contact, whereas sporicidal wipes killed the spores within 5 min. Our results suggest that using sporicidal wipes is effective for disinfecting environments contaminated with *C. difficile* spores.

Key words: *Clostridioides difficile*, spore, disinfection, sporicidal wipes