

## エタノールを添加した両性界面活性剤の結核菌に対する殺菌効果

<sup>1)</sup>神戸市環境保健研究所, <sup>2)</sup>西神戸医療センター

佐藤 明正<sup>1)</sup> 大石 英明<sup>1)</sup> 阪下 哲司<sup>2)</sup>

(平成6年7月18日受付)

(平成6年10月11日受理)

---

Key words: disinfectant, amphoteric surfactant,  
ethanol, *Mycobacterium tuberculosis*

---

### 要 旨

両性界面活性剤アルキルジアミノエチルグリシン(ニッサンアノン#300<sup>®</sup>, ADG と略記)の結核菌に対する殺菌効果を高める目的で, ADG にエタノールを添加した溶液(Et-ADG と略記)を調製し殺菌効果を検討した。

培養結核菌を ADG の100倍希釈溶液(1/100ADG)で1分間および10分間処理した場合, その生存菌数はそれぞれ500cfu/0.1ml および25cfu/0.1mlであった。一方, エタノールを23v/v%添加した溶液(23% Et-1/100ADG)では各々7cfu/0.1ml および0 cfu/0.1mlとなった。

喀痰中の結核菌に対しては, ADG の50倍希釈溶液(1/50ADG) およびエタノールを23v/v%添加した溶液(23%Et-1/50ADG)を用いてその殺菌効果を比較した。この場合においても ADG の殺菌効果はエタノール添加で高まった。

30%Et-1/50ADG および1/50ADG で処理した結核菌の形態を走査電子顕微鏡を用いて観察した。両者に菌体の粘着化・融解化が観察されたが, その程度は前者でより強かった。

ADG の殺菌作用は結核菌を粘着化・融解化させて発育不能に導くことにあると推察されたが, ADG へのエタノール添加はその作用を高めることが観察された。

### 序 文

最近の医療従事者の結核罹患率は一般人口のそれと比較すると2~5倍高い。特に, 検体を取り扱う病理担当者<sup>1)</sup>や検査技師<sup>2)</sup>に高い。

検査室での細菌感染防止には安全キャビネットの使用と流水による手洗いが一般に奨励されているが, 病原菌の拡散防止と感染源を断つためには, 安全キャビネット内での迅速な検体・器具の消毒と, 流水による手洗い前の手指消毒が必要と思われる。

かつて病院で汎用されていたクレゾール石鹼液は結核菌に対しても強い消毒効果を有しているが, その臭気とフェノール類の排水規制によりあまり使用されなくなった。代わりに登場してきた

グルコン酸クロロヘキシジンや塩化ベンザルコニウム等の消毒剤は結核菌にはほとんど効力が無い<sup>3)</sup>。このような状況から結核菌病棟や検査室等から結核菌に対しても有効な消毒剤の開発が望まれている。

両性界面活性剤アルキルジアミノエチルグリシン(ニッサンアノン#300<sup>®</sup>, ADG)は結核菌に対する消毒効果は不十分であるが<sup>6)</sup><sup>7)</sup>, 比較的広範囲な微生物に対して消毒効力を有している<sup>5)</sup>。結核菌に対する消毒効果の低い理由としては, 菌の細胞壁が脂質に富んでいることが関連していると思われる<sup>8)</sup>。そこで, ADG に添加剤を加え結核菌に対する消毒剤の膜透過性を高める方法を検討した。添加剤には親油性と親水性を兼ね備えているエタノールを選択した。

---

別刷請求先: (〒650) 神戸市中央区港島中町4-6  
神戸市環境保健研究所 佐藤 明正

平成7年1月20日

## 材料と方法

1. 供試菌株：結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

2. 供試喀痰：結核患者の喀痰

3. 供試消毒剤

1) 両性界面活性剤アルキルジアミノエチルグリシン (12w/v% Alkyl diaminoethylglycine, 3w/v% Alkyl diethyltri aminoglycole, ニッサンアノン#300®, 常用濃度は50~100倍希釈, 乾商事, ADG と略記)

2) クレゾール石鹼液 (クレゾール: 50w/v%, カリ石鹼: 50w/v%, 原液有効成分含有量50w/v%, 常用濃度は50~100倍希釈, 健栄製薬)

4. 実験方法

1) クレゾール石鹼液及び ADG の結核菌に対する殺菌効果：1%小川培地で3~4週間培養した *M. tuberculosis* H37Rv の発育菌苔に滅菌水を添加して McFarland #4の濃度の菌液を調製した。消毒剤の試験濃度は常用濃度の近傍とし、所定濃度の1.11倍濃いクレゾール石鹼液および ADG 溶液の0.9ml に調製菌液0.1ml を加え20°C で作用させた。一定時間後に0.1ml を回収して100倍希釈し、その0.1ml を1%小川培地に接種、37°C で30日間培養、生存菌数を測定した。対照菌液は試験区と等量の薬剤持込み量になるように調製した。

2) ADG, エタノールおよびエタノールを添加した ADG 溶液 (Et-ADG と略記) の結核菌に対する殺菌効果：1%小川培地で3~4週間培養した *M. tuberculosis* H37Rv の発育菌を用いて1)と同様な方法で殺菌効果を測定した。

3) 喀痰中の結核菌に対する殺菌効果：ガフキー9号の結核患者喀痰に等量の滅菌水を加え二分し、消毒試験と菌数測定に供試した。殺菌効果の測定方法は調製喀痰液0.1ml に50倍希釈の ADG 溶液 (1/50ADG) および各種濃度のエタノールを添加した50倍希釈の ADG 溶液 (Et-1/50ADG) 0.9ml を添加、一定時間作用させた後に滅菌水で10倍希釈、その0.1ml を1%小川培地に接種、生存菌数を測定した。対照の菌数測定には抗酸菌の分離培養法の常法に従ってアルカリ処理を

施し、滅菌水を加えて試験区と等量の試料濃度にし、発育菌数を測定した。

4) 消毒した結核菌の走査電子顕微鏡像：Bact-Middlebrook 7H10 Agar (Difco, USA) で25日間培養した *M. tuberculosis* H37Rv の菌苔20mg に滅菌水を加え、ガラスホモジナイザーを用いて懸濁液を調製、四分して遠心し洗浄菌体を得た。各洗浄菌体に次の4種の溶液1ml を添加した。(1) エタノールを30v/v%添加した ADG の50倍希釈液 (30%Et-1/50ADG), (2) ADG の50倍希釈液 (1/50ADG), (3) 30v/v%エタノール溶液, (4) 蒸留水 (対照)。30°C で20分間作用させたのち遠心分離し、沈渣を0.1%食塩水で2回、蒸留水で1回洗浄、沈渣に蒸留水50 $\mu$ l を添加、その5 $\mu$ l を電顕用ガラス板上に塗抹、自然乾燥後100°C で30分間固定した。金蒸着を施し、走査電子顕微鏡 (JEOL/日本電子 JSM-35CF 型) で菌体の形態変化を観察した。

## 成績

1) クレゾール石鹼液および ADG の結核菌に対する殺菌効果：試験結果は他の研究者の成績と共に Table 1 に示す。McFarland #4の濃度の菌液 (約  $5 \times 10^6$  cfu/ml) に10倍容量の試験消毒液を作用させ、その100倍希釈液の0.1ml を還元培養して殺菌効果を求めた試験では、0.63%クレゾール石鹼液の1分間処理では不十分であったが1.25%および2.5%溶液では殺菌効果が認められた。10分間処理では0.63%溶液でも発育菌は認められず、クレゾール石鹼液の強い殺菌効果が観察された。

ADG (通常使用濃度は50~100倍) の20倍希釈溶液の1分間処理では全く効果がなかった。十分な殺菌効果は10分間処理後でも得られず、30分間処理を要した。すなわち、ADG の殺菌効力はクレゾール石鹼液のそれと比較すると弱いことが観察された。

2) ADG, エタノールおよびエタノールを添加した ADG 溶液 (Et-ADG) の結核菌に対する殺菌効果：1/100ADG, 各種濃度のエタノール, および1/100ADG に各種濃度のエタノールを添加した溶液 (Et-1/100ADG) で処理した時の *M. tuberculosis* H37Rv の生存菌数を Table 2 に示す。

Table 1 Bactericidal effects of cresol soap and an amphoteric surfactant (ADG) against *M. tuberculosis* H37Rv

Author (method)	Present study (test tube)							Lee (SSC) <sup>7)</sup>	Uratsuji et al. (SSC) <sup>9)</sup>			
Bactericide	Cresol soap				ADG		Control	ADG		ADG		
Dilution	1/80	1/40	1/20	1/100	1/80	1/20	—	1/100	1/25	1/80	1/20	
Concentration (%)	0.63	1.25	2.50	0.15	0.19	0.75	—	0.15	0.60	0.19	0.75	
Exposed time in minutes	No. of the survived cells (cfu/0.1 ml)											
1	71	0	0	##	##	##	##	##	##	##	0	0
10	0	0	0	25	25	1	##	##	##	0	0	
30	0	0	0	0	0	0	##	8	18	0	0	
60	0	0	0	0	0	0	##	3	0	0	0	

##: The numbers of the survived cells were 500 cfu/0.1 ml.

Table 2 Bactericidal effects of an amphoteric surfactant (ADG), ADG containing ethanol (Et-ADG) and ethanol against *M. tuberculosis* H37Rv

Bactericide	ADG		Et-ADG				Ethanol				Control
Dilution of ADG	1/100		1/100				—				—
Conc. of ethanol (%)	—		20	23	26	30	20	23	26	30	—
Exposed time in minutes	No. of the survived cells (cfu/0.1 ml)										
1	##		##	7	2	0	##	##	31	0	##
10	25		0	0	0	0	##	2	0	0	##
30	0		0	0	0	0	##	0	0	0	##

##: The numbers of the survived cells were 500 cfu/0.1 ml.

1/100 ADG の殺菌効果は 1 分間処理では無処理の対照群と差がなかった。10分間処理でも不十分で、30分間処理でようやく生存菌が認められなくなった。一方、エタノール単独の20%溶液では対照群と差がなかった。23%溶液の1分間処理でも対照と差が認められず、10分間処理でかなりの殺菌効果が認められるものの不完全であった。エタノール単独では殺菌効果が認められない20%溶液を1/100ADGに添加した溶液(20%Et-1/100ADG)では10分間処理で生存菌数をゼロ(0)にした。また23%Et-1/100ADGでは1分間処理でもかなりの殺菌効果が観察された。エタノールの添加はADGの殺菌効果を著しく高めるものであった。

3) 喀痰中の結核菌に対する殺菌効果: 50倍希釈のADG溶液(1/50ADG), および各種濃度のエタノールを添加した1/50ADG溶液(Et-1/50ADG)の喀痰中の結核菌に対する殺菌効果をTable 3に示す。1%NaOH処理法で調製した対

Table 3 Bactericidal effects of an amphoteric surfactant (ADG), ADG containing ethanol (Et-ADG) and ethanol against tubercle bacilli in sputum samples

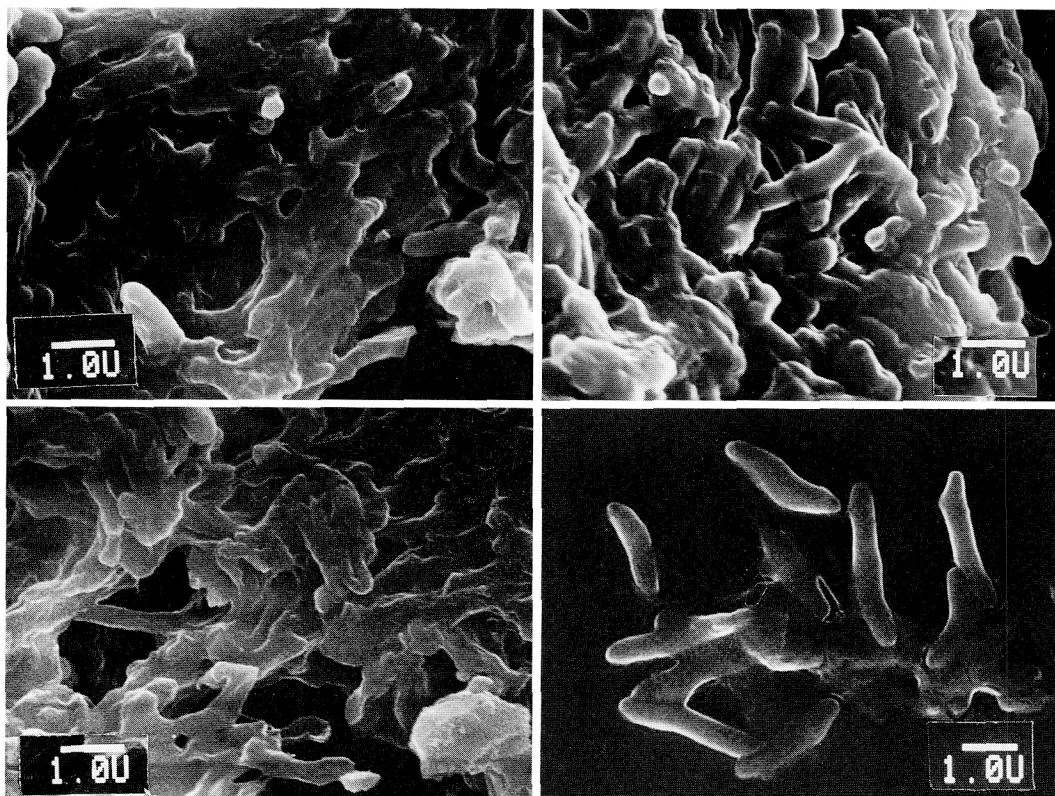
Bactericide	ADG		Et-ADG			
Dilution of ADG	1/50		1/50			
Conc. of ethanol (%)	0	20	23	26	30	
Exposed time in minutes	No. of the survived cells (cfu/0.1 ml)					
1	25	27	26	17	12	
3	9	7	2	0	0	
5	2	1	0	0	0	
10	1	0	0	0	0	
30	0	0	0	0	0	

The numbers of the control-cells were 165 cfu/0.1 ml.

照菌数は165cfu/0.1mlであった。ADGの殺菌効果は処理時間に比例して高まったが、10分間処理でも生存菌の存在が認められ、30分間処理で生存菌数をゼロにした。培養菌に対しては十分な殺菌効果を示した20v/v%エタノール添加のEt-ADG

Fig. 1 Scanning electron microscopic findings of *M. tuberculosis* H37Rv treated with four different disinfectants.

Top-left: Strong stickiness and/or fusion among cells treated with 30v/v% ethanol-1/50ADG. Top-right: Some stickiness and/or fusion among cells treated with 1/50ADG. Bottom-left: A little stickiness and/or fusion among cells treated with 30v/v% ethanol. Bottom-right: No stickiness and/or fusion among untreated cells.



の効果は、喀痰中の結核菌に対しては僅かであった。しかし23v/v%エタノールを添加したADG溶液(23%Et-1/50ADG)では、5分間処理で生存菌数をゼロにした。また25v/v%エタノールを添加した溶液(26%Et-1/50ADG)では3分間処理で同様な効果が観察された。

4) 消毒した結核菌の走査電子顕微鏡像：電顕像をFig. 1に示す。Et-ADGで処理した菌(上段左の写真)では、菌体表面の粘性化・変形化に伴って多数の菌が互いに融合し、個々の菌の形態が不明になったものが多く観察された。ADGで処理した菌(上段右の写真)でも菌体表面の粘性化・変形化が観察されたが、菌体の融合の程度はEt-

ADGで処理した場合より若干少なかった。エタノールで処理した菌(下段左の写真)でも菌体表面の粘性化が観察されたが、菌体の融合の程度はADGで処理した場合よりさらに少なかった。対照の蒸留水処理菌(下段右の写真)では菌体の融合は観察されなかった。

#### 考 察

クレゾール石鹼液はその臭気とフェノール類の排水規制により、ほとんど使用されなくなっている。そこで、結核菌に対して比較的殺菌効力を有する消毒剤について文献的に調べた。その中で最も有望な消毒剤は両性界面活性剤を主成分とする消毒剤であった<sup>4)~7)</sup>。

両性界面活性剤のアルキルジアミノエチルグリシンを主成分とする ADG の殺菌効力については、2つの異なる成績が報告されていた (Table 1)。私達の実験方法は李<sup>7)</sup>の方法と異なるし、試験薬剤濃度も一致しているわけではないが、ADG の作用が濃度よりも処理時間に大きく影響されることやクレゾール石鹼液より弱力であった点ではほぼ一致した成績であった。裏辻ら<sup>9)</sup>は ADG の殺菌効力はクレゾール石鹼液より強力であったとしている。李も裏辻らも SSC 法<sup>10)11)</sup>で試験したが、詳しく調べてみると微妙に異なるものであった。

李の実験は次のような手順であった。石油ベンジン結核菌浮遊液作製→スライド表面に菌を付着→キルヒナー培地で予備培養→消毒液に浸漬→生理的食塩水で洗浄後キルヒナー培地で培養→スライド表面の発育菌数測定。裏辻らのそれは、これらの過程のうち3番目の予備培養の過程が省略されていた。李と裏辻らの成績の違いは予備培養の過程の有無に関係していると思われる。結核菌の細胞壁は脂質に富んでいるので消毒液が浸透しにくい状態にあるが、石油ベンジン中に浮遊させた結核菌は、細胞壁から脂質が取り除かれた状態であると推察される。李は予備培養の過程を入れて細胞壁の回復後に消毒剤の真の殺菌効果を測定したが、裏辻らは脱脂剤あるいは石油ベンジンの作用によって何らかの作用を受けた菌に対する見かけの殺菌効果を測定したことになる。

予備培養の有無で殺菌効果に差が生じさせたと思わせる上記の二つの論文は、結核菌に対して ADG の膜透過性を高める方法を検討していた私達には大いに参考になるものであった。また私たちは、グルタラルに抵抗性を示す *M. fortuitum* を殺菌するのに、グルタラルにエタノールを20~25%添加するとその消毒効果が高まることを報告してきた<sup>12)</sup>。Frobisher と Sommermeyer<sup>13)</sup> は高濃度のエタノールが喀痰中の結核菌や他の菌種に対しても殺菌効力を示すことを報告している。これらの事例を参考にしながら、ADG の膜透過性を高めるための添加剤としては、親油性と親水性を兼ね備えており、ADG とよく混合し、高濃度ではそれ自体でも殺菌効果を示し、かつ毒性

の少ない有機溶媒としてエタノールを選択した。ブタノールなども膜透過性を高められると思われるが、その臭気から一般の消毒剤としては使用に耐えないだろうと推察されたので検討材料に含めなかった。

エタノール添加の ADG は、培養結核菌に対しても喀痰中の結核菌に対しても、期待通りの強い殺菌効力を発揮することが観察された。

殺菌効果の表示方法には石炭酸係数を用いなかった。対象とする菌種によって消毒剤の殺菌効力は異なってくるのが一般的であり、川上ら<sup>14)</sup>も指摘しているようにチフス菌に対する殺菌効力の比較 (石炭酸係数) は今日的ではなくなってきていると考えたからである。

Et-ADG 処理した結核菌の走査電顕像には、菌体表面の融合化が観察され、菌体表面の構造あるいは膜成分の変化を示唆するものであった。荒明ら<sup>15)</sup>は isoniazid 耐性、kanamycin 耐性、para-aminosalicylic acid 耐性の結核菌には菌体の融合、変形、菌形不明が生じていることを走査電顕で観察している。私たちは Et-ADG 処理した結核菌に同様な形態変化を観察した。Takeya ら<sup>8)</sup>は *Mycobacterium* spp. Jucho 株を用いて、KOH 処理では除去されない“Paired fibrous structure”が、KOH-alcohol 処理によって除去されることを電顕で観察している。私たちは、Et-ADG で処理した結核菌の融合化は ADG だけで処理したものより促進されることを観察した。

ADG の殺菌作用は結核菌の菌体構造に変化をもたらして菌体の粘着化・融合化を生じさせ、菌を発育不能に導くことであると推察されたが、ADG にエタノールを添加すると菌体の構造変化を大きくし、ADG の殺菌効果を高めると推察された。

## 文 献

- 1) 九州結核予防会議・結核予防会結核研究所：九州結核死亡調査。呼吸器疾患・結核文献の抄録速報，32：857-876，1981。
- 2) 鈴木公典，新島結花，安田順一，山岸文雄，庵原昭一，志村昭光：医療従事者からの結核，(第65回日本結核学会総会ワークショップ)。結核，65：677-679，1990。

- 3) 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: 臨床菌に対する消毒剤の検討. 医療ジャーナル, 20: 97-107, 1984.
- 4) 市川意子, 美譽志康: 各種消毒薬の結核菌に対する殺菌効果の検討. 防菌防黴, 8: 143-147, 1980.
- 5) 久米 光, 阿部美智子, 高宮春男, 大谷秀樹: 新しい消毒薬ビスタ#300の細菌学的評価. 臨床と細菌, 5: 253-257, 1978.
- 6) 原田七寛, 奥村由喜子, 藤富洋子, 山本千春, 姜栄子, 屋敷律子: 常用消毒薬の抗酸菌に対する殺菌効果の検討. 大阪府立公衛研所報(公衆衛生編), 20: 33-36, 1982.
- 7) 李 英徹: 諸種消毒剤の結核菌に対する殺菌効果. 結核, 56: 567-576, 1981.
- 8) Takeya, K., Mori, R., Tokunaga, T., Koike, M. & Hisatune, K.: Further studies of the paired fibrous structure of mycobacterial cell wall. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 496-501, 1961.
- 9) 裏辻康秀, 前川暢夫: VISTA # 300 の結核菌に対する殺菌効果について. 乾商事パンフレット, 1974.
- 10) 東向一郎: 結核菌の Silicone-Coated Slide Culture Method (SSC) — (第1編) Silicone-Coated Slide の作成法及び作成条件が結核菌の吸着・発育に及ぼす影響の検討. 京大結研紀要, 7: 461-467, 1959.
- 11) 東向一郎: 結核菌の Silicone-Coated Slide Culture Method (SSC) — (第2編) Silicone-Coated Slide への結核菌の吸着及び SSC に於ける結核菌の発育. 京大結研紀要, 7: 468-472, 1959.
- 12) 佐藤明正, 園部俊明, 貫名正文, 仲西寿男, 下田清司, 小平幸子, 坂下 操, 大城徳成, 姫井 成, 田村 亮, 松田良夫: 内視鏡洗浄消毒装置の抗酸菌汚染. 環境管理技術, 11: 82-89, 1993.
- 13) Frobisher, M. & Sommermeyer, L.: A study of the effect of alcohols on tubercle bacilli & other bacteria in sputum. Am. Rev. Tuberc., 68: 419-424, 1953.
- 14) 川上由行, 宮本秀雄, 金井正光, 早松京子: Opportunistic pathogen に対する各種消毒薬の殺菌効果. 臨床と細菌, 10: 427-434, 1983.
- 15) 荒明美奈子, 須子田キヨ: 抗結核剤耐性結核菌の走査電子顕微鏡的観察. 結核, 54: 325-330, 1979.

The Bactericidal Effects of an Amphoteric Surfactant with Ethanol  
against *Mycobacterium tuberculosis*

Akimasa SATO<sup>1)</sup>, Hideaki OHISHI<sup>1)</sup> & Tetsuji SAKASHITA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Public Health Research Institute of Kobe City

<sup>2)</sup>Nishi Kobe Medical Center

Bactericidal activities of an amphoteric surfactant (12 w/v% Alkyl diaminoethylglycine hydrochloride, 3 w/v% Alkyl diethylenetriaminoglycole hydrochloride, Nissan Anon #300®, Inui Shouji Co., ADG) against *Mycobacterium tuberculosis* were examined independently or in cooperation with ethanol. The results obtained in the study are as follows:

1. In the treatment with the surfactant diluted with distilled water in one hundredth, the numbers of tubercle bacilli which survived were 500 cfu/0.1 ml after one minute-treatment, and 25 cfu/0.1 ml after ten minutes-treatment. On the other hand, the surfactant containing 23 v/v% ethanol decreased the bacterial numbers to seven cfu/0.1 ml after one minute and less than one cfu/0.1 ml after ten minutes. The numbers of the survived bacilli treated with the surfactant containing 20 v/v% ethanol were 500 cfu/0.1 ml after one minute-treatment, and less than one cfu/0.1 ml after ten minutes though 20 v/v% ethanol alone was ineffective in ten minutes-treatment.

2. The bactericidal activities of the surfactant against tubercle bacilli in sputum samples in which  $1.65 \times 10^4$  cfu/0.1 ml of the organism were contained were also investigated. The numbers of tubercle bacilli which survived were 25 cfu/0.1 ml after one minute-treatment with the surfactant in one fiftieth, two cfu/0.1 ml after five minutes-treatment and one cfu/0.1 ml after ten minutes-treatment. The numbers of the organism treated with the surfactant containing 23 v/v% ethanol were less than one cfu/0.1 ml after five minutes.

3. When the scanning electron microscopies were performed, it was observed that the cell-surface of the organisms exposed to the surfactant in one fiftieth and the surfactant containing 23 v/v% ethanol became to sticky and fusible. The morphological change was greater in the former than in the later.

Those findings indicate that the bactericidal activity of the surfactant against *M. tuberculosis* is enhanced by cooperation with ethanol.