

東京医療保健大学大学院

医療保健学研究科 医療保健学専攻 博士課程

殺菌・抗ウイルス効果に及ぼすエタノール濃度の影響

2014年度入学

2019年3月11日 博士

医療保健学研究科 医療保健学専攻 感染制御学領域

学籍番号 HD014002 氏名 神明 朱美

論文題目 殺菌・抗ウイルス効果に及ぼすエタノール濃度の影響

氏名 神明 朱美

所属 東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻 博士課程
感染制御学領域

〒283-8555

千葉県東金市求名1番地

連絡先 TEL:0475-53-4705

FAX

E-mail:hd014002@thcu.ac.jp

助成金

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻

博士課程論文 要旨

殺菌・抗ウイルス効果に及ぼすエタノール濃度の影響

東京医療保健大学大学院

医療保健学専攻

博士課程

領域名 感染制御学

学籍番号 HD014002

氏名 神明 朱美

背景 (Background)

消毒に用いるエタノールの殺菌効果は古くから検討されている。その至適濃度範囲は、日本薬局方(局方)では 76.9~81.4 v/v%、米国薬局方である USP-NF (The United States Pharmacopeia-National Formulary) では 68.5~71.5 v/v%、World Healthcare Organization (WHO) ガイドラインでは 60~80 v/v%とされている。これらの至適濃度を支持する報告は 2000 年以前のもが多く、実験方法や供試微生物、エタノールと菌種との混合比率や作用時間等の実験条件が異なる。

目的 (Objective)

医療関連感染で重要な細菌、真菌、抗酸菌の殺菌効果、および抗ウイルス効果に対するエタノール濃度の影響を検討することで有効最小濃度を確認し、エタノールの殺菌・抗ウイルスのスペクトルを明らかにすることとした。

方法 (Methods)

エタノール濃度は 0~90 v/v%(25℃) の 10%刻みとし、菌液の添加により供試エタノール濃度が 90%に低下するため作用時の最終濃度で記載した。一般細菌、真菌、抗酸菌に対する殺菌効果試験方法は、供試エタノール 900 μ L に滅菌リン酸緩衝液で調整した菌液 100 μ L を添加混合して 10 秒後の生菌数を測定した。抗ウイルス効果試験は、保存ウイルス液を使用し、供試エタノール 900 μ L にウイルス液 100 μ L を混和 10 秒後と 60 秒後に感受性細胞に感作し、細胞変性効果を観察することで、ウイルス量を測定した。評価の判定基準は、一般細菌が、5 log 低下、真菌と抗酸菌が 4 log 低下、ノンエンベロープウイルスが 3 log 低下、エンベロープウイルスは検出限界以下とした。

結果 (Results)

作用時間 10 秒において、供試したグラム陰性菌(8 種 10 株)は 54 v/v%以上のエタノール濃度で、グラム陽性菌(7 種 9 株)では 63 v/v%以上の濃度ですべて判定基準値以下の殺菌効果を示した。酵母状真菌(3 種 4 株)は 54 v/v%以上の濃度で、糸状菌(3 種 3 株)は 63 v/v%以上の濃度で、抗酸菌(7 種 7 株)は 72 v/v%以上の濃度ですべて判定基準値以下となった。エンベロープウイルス(2 種 7 株)は、ウイルス株により 36 v/v% または 45 v/v%以上の濃度で判定基準値以下となった。一方、ノンエンベロープウイルスでは、54 v/v%で判定基準値以下を示したのは *Adenovirus* 2 型、5 型、7 型、37 型のみで、*Adenovirus* 3 型と 8 型、供試したすべての *Coxsackievirus* (A7、A16、B5)、*Feline calicivirus* は抗ウイルス効果を示さなかった。作用時間を 1 分と長くすると、より低濃度で多くのウイルス株に抗ウイルス効果が認められた。さらに、ノンエンベロープウイルスにおいて、エタノール濃度の上昇とともにウイルス感染価が低下した後、再度上昇する挙動を示したウイルス株が存在した。

結論 (Conclusions)

多くの微生物に対して局方で規定されるエタノールの至適濃度は有効であるものの、一部の抗酸菌とノンエンベロープウイルスに対して有効でないことが明らかとなった。

キーワード (Key Words) :

エタノール、細菌、真菌、抗酸菌、ウイルス、殺菌効果、抗ウイルス効果

目次

1 はじめに	1
2 材料および方法	3
2.1 エタノール製剤	3
2.2 供試微生物	3
2.2.1 グラム陰性菌（8種10株）	3
2.2.2 グラム陽性菌（7種9株）	3
2.2.3 真菌	3
2.2.4 抗酸菌（7種7株）	3
2.2.5 ウイルスと感受性細胞	4
3.1 殺菌効果と抗ウイルス効果試験方法	4
3.1.1 一般細菌の殺菌効果試験方法	4
3.1.2 真菌の殺菌効果試験方法	4
3.1.3 抗酸菌の殺菌効果試験方法	5
3.1.4 抗ウイルス効果試験方法	5
4 結果	6
4.1 一般細菌に対する殺菌効果試験結果	6
4.2 真菌に対する殺菌効果試験結果	6
4.3 抗酸菌に対する殺菌効果試験結果	6
4.4 抗ウイルス効果試験結果	6
5 考察	8
引用文献	13
図表	15
Abstract	26

1 はじめに

エタノール製剤は、エタノールを主成分とする消毒薬であり、細菌芽胞を除く広範囲の微生物に対して迅速な殺菌作用を示し、即乾性があることから、水道の無い場所での手指衛生に適しているといわれている¹⁾。医療施設では、採血部位や注射部位の皮膚消毒に用いられる他、体温計や聴診器等の消毒、包交車や作業台、ドアノブ等の頻繁接触部位に対する清拭にもエタノール製剤が用いられている。

消毒に使用するエタノールの至適濃度範囲は、日本薬局方(局方)では 15℃で 76.9～81.4 v/v%²⁾、米国薬局方である USP-NF (the United States Pharmacopeia -National Formulary)の Rubbing Alcohol では 68.5～71.5 v/v%³⁾、World Healthcare Organization (WHO) ガイドラインでは 60～80 %⁴⁾ と定められている。エタノールの殺菌効果および抗ウイルス効果に関する代表的な先行研究を表 1 にまとめた。1903 年、Harrington C, Walker⁵⁾により、60～70 v/v%のエタノール濃度で乾燥状態である 4 種類の一般細菌に対する殺菌効果が最も高いことが報告されて以降、様々な細菌、真菌、抗酸菌に対する殺菌効果や抗ウイルス効果の検討が行われている。特に、Price は外科領域での消毒に用いるエタノールの殺菌効果について *Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*、*Staphylococcus albus* の 3 菌種を用いてエタノール濃度を変化させ、スプーン上でエタノールと菌液を混和する *in vitro* 試験系と、手と腕の皮膚上での殺菌を行う *in vivo* 試験系で詳細に検討を行い、60～90 wt% (68～93 v/v% (15℃))で迅速で高い殺菌効果があること、60 wt% (68 v/v% (15℃))以上の濃度で皮膚の殺菌に効果的であることを報告している^{6,7)}。また、遠心分離した菌塊 0.5 mL に各種濃度のエタノール 5 mL を攪拌下で作用させると、*S. aureus* は Price の報告と同程度のエタノール濃度で殺菌効果を示すのに対し、*E. coli* は 33 wt% (40 v/v% (温度不明))以上の濃度で殺菌効果を示すことが報告されている⁸⁾。同じ菌種が供試されているのにも関わらず、菌種により攪拌の有無で殺菌効果を示す有効エタノール濃度が異なる。さらに、抗酸菌である *Mycobacterium tuberculosis* に対するエタノールの至適殺菌条件は、乾燥喀痰中の菌では 50 v/v% で 15 秒間の作用であるのに対し、濡れている喀痰中の菌では 95 v/v% で 15 秒間の作用であることが Smith (1945 年)により報告⁹⁾されている一方、同様の *M. tuberculosis* に対する浮遊試験では、70 v/v% で 1 分間作用することで殺菌効果を示すことが Best M ら (1990 年)により報告¹⁰⁾されている。以上のように、供試微生物の状態やエタノールの作用条件により殺菌効果を呈するエタノール濃度が異なることから、消毒に使用するエタノールの至適濃度範囲の決定には、同一実験条件下での殺菌スペクトルを明らかにすることが重要であるものと考えられる。

真菌に対するエタノールの至適濃度は、5 つの素材表面に塗布した 4 種類の真菌にエタノールを噴霧することで評価され、70 v/v%であるとの報告があるのみである¹¹⁾。エタノールの抗ウイルス効果では乾燥血清フィルム中の *Adenovirus* 3 型に対して 50 v/v%で 15 分間作用することで抗ウイルス効果が認められたとの報告¹²⁾や *Adenovirus* 3 型、4 型、8 型、19 型、37 型を用いて 80 v/v% で 10 分間作用することで抗ウイルス効果が認められたとの報告¹³⁾があり、負荷の有無で抗ウイルス効果の評価が異なる。さらに、病原ウイルスに対するエタノールの抗ウイルス効果に関する報告は必ずしも多くない。

そこで本研究では、医療関連感染で重要な細菌、真菌、抗酸菌に対する殺菌効果とノ

ンエンベロープウイルスとエンベロープウイルスに対する抗ウイルス効果について、エタノール濃度の影響を詳細に検討することで菌種およびウイルス株ごとの有効最小濃度を確認し、エタノールの殺菌・抗ウイルスのスペクトルを明らかにすることとした。

2 材料および方法

2.1 エタノール製剤

試験に供したエタノール溶液は、エタノール(99.5) (試薬特級、和光純薬株式会社)から滅菌精製水(吉田製薬株式会社)を用いて、室温で 0~90 v/v%の範囲で 10 v/v%刻みで調製した。エタノールの最終濃度は、菌液等の添加により供試エタノール濃度の 9 割に低下するため、作用時の濃度で表記した。なお、局方では 15℃における体積パーセント濃度(v/v%)で表記されているが、先行論文では重量パーセント濃度(wt%)または室温での体積パーセント濃度(v/v%)での表記が主流であるため、本論文でも室温における体積パーセント濃度(v/v%)で表記した。

2.2 供試微生物

2.2.1 グラム陰性菌 (8 種 10 株)

Achromobacter xylosoxidans JCM9659、*Burkholderia cepacia* NBRC15124、*Escherichia coli* ATCC10536、ATCC25922、*Klebsiella pneumoniae* NBRC14940、*Proteus mirabilis* NBRC105697、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442、ATCC27853、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* JCM1652、*Serratia marcescens* JCM1239 を用いた。

2.2.2 グラム陽性菌 (7 種 9 株)

Enterococcus faecalis JCM5803、*Enterococcus faecium* JCM5804、*Micrococcus luteus* NBRC3333、*Staphylococcus aureus* ATCC6538、ATCC25923、Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, 臨床分離株)、*Staphylococcus epidermidis* JCM2414、*Staphylococcus hemolyticus* NBRC 109768、*Streptococcus pyogenes* JCM5674 を用いた。

2.2.3 真菌

2.2.3.1 酵母状真菌 (3 種 4 株)

Candida albicans NBRC1393、NBRC1594、*Candida glabrata* 臨床分離株、*Candida orthopsilosis* NBRC585 を用いた。

2.2.3.2 糸状菌 (3 種 3 株)

Aspergillus flavus NBRC5324、*Aspergillus brasiliensis* NBRC9455、*Aspergillus niger* NBRC105649 を用いた。

2.2.4 抗酸菌 (7 種 7 株)

Mycobacterium abscessus ATCC19977、*Mycobacterium aurum* ATCC23366、*Mycobacterium avium* ATCC19421、*Mycobacterium chelonae* ATCC19235、*Mycobacterium intracellulare* 臨床分離株、*Mycobacterium kansasii* 臨床分離株、*Mycobacterium terrae* JCM12143 を用いた。

2.2.5 ウイルスと感受性細胞

2.2.5.1 ノンエンベロープウイルス（3種10株）

Adenovirus（Ad）2型、3型、5型、7型、8型、37型は感受性細胞としてA549細胞（JCRB0076 ヒト肺ガン由来）を、*Coxsackievirus A7*（CVA7）、*Coxsackievirus A16*（CVA16）、*Coxsackievirus B5*（CVB5）はVero細胞（アフリカミドリサル腎由来 DSファーマ）を、*Feline calicivirus F9*（FCV/F9）はCRFK細胞（JCRB9035、ネコ腎由来）を用いた。

2.2.5.2 エンベロープウイルス（2種7株）

Influenzavirus A A.pdm.2009No.48、A/FM/1/47、A/PR8、A/Tokyo/2/75、A/USSR/92/97はMDCK細胞（JCRB9035 イヌ腎由来）を、*Human herpesvirus 1* HF株（HSV-HF）、*Human herpesvirus 2* UW株（HSV-UW）はVero細胞（アフリカミドリサル腎由来 DSファーマ）を用いた。

3.1 殺菌効果と抗ウイルス効果試験方法

3.1.1 一般細菌の殺菌効果試験方法

供試菌は、Soybean-casein digest agar（SCD寒天培地、栄研化学）で、30℃ 24時間培養した。培養後、リン酸緩衝液（栄研化学）で約 10^8 CFU/mLに調整したものを供試菌液とした。供試菌液100 μLを、閉鎖系25℃で1時間温調した後、エタノール溶液900 μLに添加し、10秒間ボルテックスで攪拌した。作用液20 μLをリン酸緩衝液180 μLに添加混合した後、10倍希釈系列を作成し、10 μLをSCD寒天培地に塗布した。30℃ 24~48時間培養し、生菌数を計測した。これら一連の操作をエタノール濃度ごとに実施し、試験は2回実施した。得られた各菌数は対数変換し「作用前の生菌数」から「作用後の生菌数（平均値）」を差し引いて指数減少値（log₁₀ reduction：LR）とした。殺菌効果は、LR \geq 5を満たすことで評価した。

3.1.2 真菌の殺菌効果試験方法

サブロー寒天培地（自家調整：ペプトン（Becton, Dickinson and Company: BD）10 g、D(+)-グルコース（試薬特級、和光純薬株式会社）20 g、培地（BD）20 gを純水1 Lに溶解し、121℃ 15分高圧蒸気滅菌）で、酵母状真菌は30℃ 48時間、糸状菌は25℃ 3~7日培養した。培養後、酵母状真菌はリン酸緩衝液で約 10^7 CFU/mLに、糸状菌は0.05%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート（分子生物学用、和光純薬株式会社）加生理食塩水（大塚製薬株式会社）で菌液を約 $10^{6\sim7}$ CFU/mLに調整した。供試菌液100 μLを、25℃に静置したエタノール溶液900 μLに添加し、10秒後20 μLをリン酸緩衝液180 μLに添加混合した。10倍希釈系列を作成し、10 μLをサブロー寒天培地に塗布した。酵母状真菌は、30℃ 24~48時間、糸状菌は、25℃ 4~5日培養し、生菌数を計測した。これら一連の操作をエタノール濃度ごとに2回実施した。得られた各菌数は3.1.1と同様に指数減少値を算出し、殺菌効果はLR \geq 4を満たすことで評価した。

3.1.3 抗酸菌の殺菌効果試験方法

供試菌は、Middlebrook 7H10 ager (BD) で、36 °C 4~7 日培養した。培養後、リン酸緩衝液で約 $10^{7\sim 8}$ CFU/mL に調整し、超音波処理をすることで菌液を均一化した。供試菌液 100 μ L を、25 °C に静置したエタノール溶液 900 μ L に添加し、10 秒後 20 μ L をリン酸緩衝液 180 μ L に添加混合した。10 倍希釈系列を作成し、10 μ L を Middlebrook 7H10 培地に塗布した。36 °C 4~21 日培養し、生菌数を計測した。これら一連の操作をエタノール濃度ごとに 2 回実施した。得られた菌数は 3.1.1. と同様に指数減少値を算出し、殺菌効果は $LR \geq 4$ を満たすことで評価した。

3.1.4 抗ウイルス効果試験方法

感受性細胞としての Vero 細胞と MDCK 細胞の増殖培地は、Eagle's minimal essential medium (MEM) (日水製薬) に 5% fetal bovine serum (FBS, CELLect®, MP Biomedicals LLC, France) を添加したもの、CRFK 細胞と A549 細胞は、Eagle's MEM に non-essential amino acid (細胞培養用、和光純薬株式会社) と 10% FBS を添加した培地を使用した。細胞の継代は、定法に従って行った。ウイルス感染後の維持培地は、Vero 細胞、CRFK 細胞、A549 細胞は、増殖培地の FBS 濃度を 1% とした。MDCK 細胞は、Eagle's MEM に 7.5 w/v% アルブミン-D-PBS(-) 水溶液 (細胞培養用、和光純薬株式会社) と結晶トリプシン (SIGMA) を添加したものをを使用した。

ウイルスに対する不活化効果は、保存ウイルス液を使用し、供試エタノール 900 μ L にウイルス液 100 μ L を混和し、作用時間は殺菌効果試験と同様の 10 秒に加えて 1 分とした。作用後直ちにウイルス感染価を測定した。対照として、リン酸緩衝液を使用した。ウイルス感染価の測定は、ウイルス液と供試液の混合液を維持用培地で 10 倍希釈系列を作製、その 10 μ L をあらかじめ感受性細胞を培養した 96 well plate の所定の well に接種した。37 °C で 1 時間、ウイルスを吸着させ、維持用培地 100 μ L を添加し 37 °C の CO₂ インキュベーターで培養した。CVA7、CVA16、CVB5、FCV/F9、HSV-HF、HSV-UW、*Influenzavirus A* は 3~5 日後に、Ad は 7~10 日後に出現した細胞変性効果を観察し、ウイルス感染価 (TCID₅₀/10 μ L) を求めた。これら一連の操作をエタノール濃度ごとに 2 回実施した。ウイルス不活化効果の評価は、ウイルス感染価より 3.1.1. と同様に指数減少値を算出し、 $LR \geq 3$ を満たすことで評価した。

4 結果

4.1 一般細菌に対する殺菌効果試験結果

グラム陰性菌に対する作用時間 10 秒でのエタノールの殺菌効果を表 2 に示す。36 v/v% のエタノール濃度で $LR \geq 5$ となる菌種は *K. pneumoniae*、*P. aeruginosa* ATCC15442、*S. enterica* subsp. *enterica*、*S. marcescens* の 4 菌種であった。45 v/v% ではさらに *A. xylosoxidans*、*B. cepacia*、*E. coli* ATCC10536、*P. mirabilis*、*P. aeruginosa* ATCC27853 の 5 菌種で評価基準値を満たし、54 v/v% で供試したすべてのグラム陰性菌で $LR \geq 5$ となった。

グラム陽性菌に対する作用時間 10 秒でのエタノールの殺菌効果を表 3 に示す。45 v/v% のエタノール濃度で $LR \geq 5$ となる菌種は *E. faecalis*、*M. luteus*、*S. aureus* ATCC6538、*S. pyogenes* の 4 菌種であった。54 v/v% ではさらに *E. faecium*、*S. aureus* ATCC25923、MRSA、*S. hemolyticus* の 4 菌種で $LR \geq 5$ となった。*S. epidermidis* では $LR \geq 5$ となるのに 63 v/v% のエタノール濃度を要した。

4.2 真菌に対する殺菌効果試験結果

真菌に対する作用時間 10 秒でのエタノールの殺菌効果を表 4 に示す。45 v/v% のエタノール濃度で $LR \geq 4$ となる菌種は *C. albicans* NBRC1393 のみであり、54 v/v% ではさらに *C. glabrata* と *C. orthopsilosis* が $LR \geq 4$ となった。*A. flavus*、*A. brasiliensis* および *A. niger* では $LR \geq 4$ となるのに 63 v/v% のエタノール濃度を要した。なお、*C. albicans* NBRC1594 は、初期菌数が低く、 $LR \geq 4$ の評価基準では殺菌効果を評価できなかったが、45 v/v% 以上のエタノール濃度で検出限界以下 ($LR > 3.45$) を示した。

4.3 抗酸菌に対する殺菌効果試験結果

抗酸菌に対する作用時間 10 秒でのエタノールの殺菌効果を表 5 に示す。45 v/v% のエタノール濃度で $LR \geq 4$ となる菌種は、*M. avium* と *M. kansasii* であり、54 v/v% ではさらに *M. abscessus*、*M. aurum*、*M. terrae* が $LR \geq 4$ となった。*M. intracellulare* では $LR \geq 4$ となるのに 72 v/v% のエタノール濃度を要した。

4.4 抗ウイルス効果試験結果

ウイルスに対する作用時間 10 秒でのエタノールの抗ウイルス効果を表 6 に示す。ノンエンベロープウイルスで、45 v/v% のエタノール濃度で $LR \geq 3$ となるウイルス株は Ad 2 型と Ad 37 型であり、54 v/v% ではさらに Ad 5 型と Ad 7 型が $LR \geq 3$ となった。FCV/F9、Ad 3 型、Ad 8 型、CVA7、CVA16、CVB5 はどのエタノール濃度においても $LR \geq 3$ とはならなかった。一方、エンベロープウイルスでは、36 v/v% のエタノール濃度で検出限界以下を示すウイルス株は HSV-HF と HSV-UW であり、45 v/v% ですべての *Influenzavirus A* に対しても検出限界以下となった。作用時間 1 分では表 7 に示すように、ノンエンベロープウイルスでは作用時間 10 秒の結果より低濃度の 45 v/v% でも CVA7 と CVA16 を除くすべてのウイルス株で $LR \geq 3$ を示した。エンベロープウイルスでも、10 秒の作用時間の結果より低濃度領域で検出限界以下を示し 27 v/v% で HSV-HF と HSV-UV が、36 v/v% では *Influenzavirus A* A.pdm.2009 No.48、A/PR8、A/Tokyo/2/75 が、45 v/v% では *Influenzavirus A* A/FM/1/47 と A/USSR/92/97 が検出限界以下

を示した。

ノンエンベロープウイルスのエタノール濃度に対するウイルス感染価の挙動を図 1 と図 2 に示す。Ad 2 型では、エタノール濃度が高くなるほどウイルス感染価が低値を示したのに対し、Ad 3 型、Ad 8 型、Ad 37 型ではエタノール濃度が高くなると、ある濃度でウイルス感染価の急激な低下が認められ、最小となった後、同値を示す、あるいは緩やかな上昇を示した。さらに高いエタノール濃度領域で、再度ウイルス感染価の低下を示した。この挙動は Ad 5 型と Ad 7 型の作用時間 10 秒及び図 2 に示す FCV/F9 でも認められた。

5 考察

医療関連感染で重要な細菌、真菌、抗酸菌、ノンエンベロープウイルス、そしてエンベロープウイルスの殺菌・抗ウイルス効果に対するエタノール濃度の影響を検討し、消毒用エタノールとしての至適濃度範囲を再検証した。

今回検証した一連の細菌のうち、グラム陰性菌とグラム陽性菌において、表 2 と表 3 に示すように、本論文で評価基準としている $LR \geq 5$ を示すエタノールの最小濃度範囲の低値は、グラム陰性菌が 36 v/v% とグラム陽性菌の 45 v/v% より低い濃度で殺菌効果が認められた。一方、最小濃度範囲の高値は、グラム陰性菌では 54 v/v%、グラム陽性菌では 63 v/v% となった。グラム陰性菌の方がグラム陽性菌より殺菌効果を示し始めるエタノール濃度範囲が約 10 v/v% 低く、グラム陽性菌の方がエタノールに対して抵抗性を示すことが示唆される。これまでに、エタノールの微生物に対する殺菌メカニズムとして、エタノールで殺菌後の菌体の電子顕微鏡観察から、20% 以下の低濃度では外観上の変化がないのに対し、40% 以上の濃度で細胞膜の破壊と細胞内容物の漏出が観察され、エタノール濃度により異なる殺菌メカニズムであると推定されている¹⁴⁾。グラム陰性菌とグラム陽性菌とでは、細胞壁の化学組成と構造が著しく異なっている¹⁵⁾。グラム陽性菌では、細胞壁全体の 70% ほどを占めるペプチドグリカンとリンを含んだ多糖様高分子であるタイコ酸などから構成されており、電子顕微鏡では細胞膜の外側に黒く厚い層として観察される。一方、グラム陰性菌では、リン脂質からなる内膜の外側に細胞壁全体の数% を占めるペプチドグリカンが存在し、さらにリポ多糖が外側に向かってのびる構造である外膜より構成されており、電子顕微鏡では、最外層に細胞膜と同じように見える膜構造が観察される。この構造上の違いと構成成分の違いが、本研究におけるグラム陽性菌とグラム陰性菌とのエタノール抵抗性の違いであると推察される。

真菌と抗酸菌において、表 4 と表 5 に示すように、本論文で評価基準としている $LR \geq 4$ を示すエタノールの最小濃度範囲の低値は、酵母状真菌と抗酸菌が 45 v/v% と糸状菌の 54 v/v% より低い濃度であった。一方、最小濃度範囲の高値は酵母状真菌で 54 v/v%、糸状菌で 63 v/v%、抗酸菌で 72 v/v% と、菌種によりエタノール抵抗性が異なった。真菌では糸状菌の方が酵母状真菌よりエタノールに対する抵抗性が高く、抗酸菌は菌種によりエタノール抵抗性が異なることが明らかとなった。真菌の細胞壁は、多糖体とタンパク質と脂質を構成成分とし、細菌とは異なる組成であり、エタノールにより変性されるタンパク質の含有量が少ない¹⁶⁾。また、抗酸菌はミコール酸等の脂質を含む厚い細胞壁を有しており、代表的な抗酸菌である *M. tuberculosis* において脂質の総重量が菌体総重量の 25% 以上を占めることが知られている³¹⁾。このように、真菌と抗酸菌はいずれも細胞壁の構成成分が細菌とは異なるため、エタノールに対して抵抗性を示したものと推察される。特に、抗酸菌において殺菌効果を示し始めるエタノール濃度範囲が広く、*M. avium* では 45 v/v% 以上のエタノール濃度で殺菌効果が認められるのに対し、*M. intracellulare* では 72 v/v% 以上と、殺菌効果が認められる最小エタノール濃度が菌種による異なる。*Mycobacterium avium complex* は、細胞壁の脂質抗原により 1~28 型に分類され、1 型~6 型、8 型および 9 型は *M. avium* subsp. *avium* に、7 型、12 型~20 型、および 25 型は *M. intracellulare* に分類されること¹⁶⁾から、エタノールに対する抵抗性の違いは、脂質抗原の違いによるものと推察される。

ノンエンベロープウイルスにおいて、表 6 に示すように、本論文で評価基準としている $LR \geq 3$

を示すエタノールの最小濃度範囲の低値は 45 v/v% であるものの、抗ウイルス効果を示さないウイルス株が認められた。作用時間を 1 分とすると、表 7 に示すように、供試したすべてのウイルス株で抗ウイルス効果が認められたが、そのエタノール濃度は異なり、図 1 および図 2 に示すように、エタノール濃度により抗ウイルス効果が異なる興味深い挙動を示した。一方、エンベロープウイルスでは、表 6 に示すように、評価基準としている検出限界以下となるエタノールの最小濃度範囲の低値は 36 v/v% であり、45 v/v% 以上のエタノール濃度では、すべてのウイルス株に対して抗ウイルス効果を示した。1 分間の作用では、表 7 に示すように、最小濃度範囲の低値は 27 v/v% とより低濃度で抗ウイルス効果を示し、ノンエンベロープウイルスとエンベロープウイルスでは異なる挙動を示した。ノンエンベロープウイルスは、核酸とそれを取り囲むカプシドと総称されるタンパク質の殻で取り囲まれた構造である¹⁶⁾。エンベロープウイルスは、さらに、脂肪、タンパク質、糖タンパク質からなる脂質膜であるエンベロープを有する構造となっている。カプシドはリン酸脂質含有量が少ないため、アルコールに抵抗性を示すことが報告されており^{17,18)}、当該ウイルス感染症の消毒にアルコールが選択されないことが多い。本検討におけるエタノール濃度に対するウイルス感染価の推移の違いは、ウイルスの構造の違いによるものと考えられる。また、ウイルスの不活化にはエタノール濃度との量的反応が関係することが Klein により報告されている¹⁷⁾。検証結果がウイルス量とエタノールとの比率に影響されることを考慮して、本研究の試験系のように、各種微生物に対して同一条件でエタノールを供試することに意義があると考えられる。さらに、エタノール消毒薬に対する一般的な認識を覆すようなウイルスの挙動は興味深く、今後の解明が待たれる。

消毒用エタノールは、局方、USP-NF、およびガイドラインにより、殺菌に有効とされる至適濃度が異なる。局方²⁾では、消毒用エタノールは 15°C で 76.9~81.4 v/v% の濃度と規定している。1903 年に Harrington C. ら⁵⁾により 60~70 v/v% のエタノールに殺菌効果が見出されて以降、さまざまな実験方法でエタノール濃度と殺菌効果との関係が検討されている。その中で、エタノールは 60~90 wt% の濃度範囲において、*E. coli*、*S. aureus*、*S. albus* に対する殺菌効果が高いことが Price により報告された^{6,7)}。消毒用エタノールに関する医薬品インタビューフォーム¹⁹⁾では、薬効薬理に関する項目でこの報告を引用している。Price の実験方法はスプーン上で菌液と各濃度のエタノール溶液を接触させるものであり、攪拌を伴う均一系での評価とはなっていない。本論文では、各濃度のエタノール溶液に菌液またはウイルス液を混合後、すみやかに攪拌することで均一系とし、作用中攪拌を継続することで殺菌効果および抗ウイルス効果の評価を行った。*S. aureus* に着目すると、ATCC6538 では 45 v/v% 以上の濃度で、ATCC25923 と MRSA では 54 v/v% 以上の濃度で殺菌効果を示し、株の違いにより殺菌効果を示す最小エタノール濃度は異なるものの、Price の結果より低濃度で殺菌効果が認められた。両者の実験条件の違いは、作用させる量が異なるものの菌液とエタノールを作用させる際の攪拌の有無が大きな相違点である。従って、この最小エタノール濃度の違いは、エタノール作用時の攪拌によるものであることが推察される。消毒薬の評価方法である欧州標準規格 (European normalization) EN13727 の浮遊試験²⁰⁾では、作用液に菌液を滴下後ボルテックスを使用して混和する指示があり、混和後の攪拌が殺菌効果に影響を及ぼすことが示唆される。混和後の攪拌によりエタノール溶液が菌塊を取り囲むことで殺菌効果が得られるものと考えられることから、本

研究では、54 v/v%という低濃度でも殺菌効果が出現したと考える。以上より、エタノールの至適濃度の決定には、菌液とエタノール溶液の混和直後に攪拌を行っている試験系を採用することが必須であることが明らかとなった。

消毒用エタノールとしての至適濃度範囲について考察すると、45 v/v% のエタノール濃度では、供試した 19 菌株の一般細菌うち 13 菌株で、54 v/v% では *S. epidermidis* を除く全ての菌株で、63 v/v% 以上のエタノール濃度では供試した 19 菌株全てに殺菌効果が認められた。このことから、至適エタノール濃度を 76.9～81.4 v/v% (15°C) とする局方²⁾と 68.5～71.5%とする USP-NF の基準³⁾は、ほぼ全ての一般細菌に有効な濃度であり、60～80% とする WHO ガイドライン⁴⁾ではエタノール濃度の表記方法が明確でないことも勘案すると、一部の菌種に対して有効でない可能性が示唆された。

真菌および抗酸菌に着目すると、45 v/v% のエタノール濃度では、供試した 7 菌株の真菌のうち酵母状真菌である *C. albicans* 2 株で、供試した 7 菌株の抗酸菌のうち 2 菌株で殺菌効果が認められ、54 v/v% では 4 菌株全ての酵母状真菌と糸状菌である *A. flavus* で、供試した 7 菌株の抗酸菌のうち 5 菌株で殺菌効果が認められた。さらにエタノール濃度の高い 63 v/v% では、供試した 7 菌株全ての真菌と 6 菌株の抗酸菌に、72 v/v% では供試したすべての真菌および抗酸菌に対する殺菌効果が認められ、局方の基準²⁾がほぼすべての真菌および抗酸菌に有効な濃度であるものの、USP-NF の基準³⁾および WHO ガイドライン⁴⁾では多くの菌種に対して有効でない可能性が示唆された。

ウイルスに着目すると、36 v/v%のエタノール濃度では供試した 7 株のエンベロープウイルスのうち 2 株で抗ウイルス効果が認められた。45 v/v% 以上のエタノール濃度では、供試した 7 株すべてのエンベロープウイルス株に対して抗ウイルス効果が認められ、局方、USP-NF、WHO のガイドラインで規定されるエタノール濃度範囲は、エンベロープウイルスに有効であることが示唆された。しかし、エンベロープウイルスとは異なりノンエンベロープウイルスでは、ウイルス株によりエタノール濃度に対して異なる挙動を示した。45～63 v/v% の濃度範囲で一旦 $LR \geq 3$ となり、エタノール濃度が高くなるにつれてウイルス感染価が上昇するウイルス株が存在することから、局方²⁾、USP-NF³⁾、WHO ガイドライン⁴⁾で規定されるエタノール濃度範囲では、多くのノンエンベロープウイルスに対して有効ではないものと考えられる。以上のように、局方で規定されるエタノールの至適濃度が、多くの微生物に対して有効であり一部の抗酸菌とノンエンベロープウイルスに対して有効でないことが明らかとなった。

最後に、エタノール濃度に対して異なるウイルス感染価の挙動を呈した *Adenovirus* に着目する。わが国のアデノウイルス年別検出報告数は²¹⁾、表 8 に示すように、今回供試した Ad 2 型、3 型、5 型、8 型、37 型が原因の代表的な疾患を示している。その中でも、小児から成人まで罹患し医療関連感染でもしばしば問題となる流行性角結膜炎は、最近では Ad 37 型が多く報告されている。また Ad 8 型も同疾患の原因ウイルスとして知られている。今回検証したエタノール濃度範囲内において、これら両者に最も効果のあるエタノール濃度は約 45 v/v% のみと、エタノール濃度が低くその濃度範囲が狭いこと、さらに 1 分の作用時間も必要であることが示された。

現在わが国の医療現場で汎用されているエタノール製剤の濃度は概ね 80 v/v% であるため、ノンエンベロープウイルスに対する対応が困難となる。今後、対応の難しいノン

エンベロープウイルスに対しても、抗ウイルス効果を有するエタノール製剤の開発が待たれる。以上、本論文の結果は、感染制御における新たな選択肢を提供するものであり、ウイルス不活化のメカニズムに関する課題を提示するものとなった。

謝辞

本研究を遂行し、学位論文を執筆する上で多くの皆様にご指導、ご助力を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科の木村哲学長、梶浦工教授、岩澤篤郎教授、菅原えりさ教授、松村有里子講師には、先生方の知識や見解を基にした多くのご指導とご助言をいただき、本研究及び感染制御に対する私の視野を広げていただきました。心より御礼申し上げます。

また、在学時、東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科の小林寛伊名誉学長(2017年8月逝去)のご指導により得たエタノール消毒に関する知識を基礎として議論を展開し、ご指導を受けたこと心より感謝申し上げます。

感染制御学コースの修了生の皆様、学友の皆様には、研究に関する議論・交流を通して研究生生活を実りあるものにしていただきました。深く感謝申し上げます。

皆様のお力添えがなければ、私の研究は学位論文にまで至らなかったと思います。重ねて感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 神谷晃、尾家重治. 消毒剤の選び方と使用上の留意点. 株式会社じほう. 2006.
- 2) 医薬品各条 化学薬品あ～さ行、第 17 改正. 日本薬局方解説書. 廣川書店 2016; 832
- 3) The United States Pharmacopoeia 41 - National Formulary 36 (USP 41-NF 36) USB edition. *United States Pharmacopoeial* 2018; 1: 108.
- 4) World Healthcare Organization. Guidelines on Hand Hygiene in Health Care, First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care. 2009
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70126/1/WHO_IER_PSP_2009.07_eng.pdf
- 5) Harrington C, Walker H. The germicidal action of alcohol. *Boston Med. Surg J* 1903; 148: 548-552.
- 6) Price PB. Ethyl alcohol as a germicide. *Arch Surg* 1939; 38: 528-542.
- 7) Price PB. Reevaluation of ethyl alcohol as a germicide. *Arch Surg* 1950; 60: 492-502.
- 8) Harry E. Morton. The relationship of concentration and germicidal efficiency of ethyl alcohol. *Annals New York Academy of Sciences*. 1950; 191-196.
- 9) Smith CR. Alcohol as a disinfectant against the tubercle bacillus. *Public health Rep.* 1947; 62: 1285 -1295.
- 10) Best M, Satter SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Efficacies of selected disinfectants against mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 10: 2234-2239.
- 11) Kruse RH, Green TD, Chambers RC, Jones MW. Disinfection of aerosolized pathogenic fungi on laboratory surfaces, tissue phase. *Apple.Microbiol* 1963;11:436-45 Garrison RF. Acute poisoning from use of isopropyl alcohol in tepid sponging. *JAMA*.1953; 152(4): 317-318.
- 12) 渡辺実, 野田伸司, 山田不二造, 藤本進. アルコール類のウイルス不活化作用に関する研究. *感染症学雑誌* 1981; 55(5): 367-372.
- 13) 赤沼正堂. Real-time PCR 法を用いたアデノウイルスに対する消毒薬の評価. *日眼会誌*. 2006; 111 (5): 384-390.
- 14) 山下勝. アルコール類の微生物に対する作用. *防菌防黴*. 1996; 24(3): 195-219.
- 15) 天兒 和暢, 南嶋 洋一. 『戸田細菌学 第 31 版』 1999.
- 16) 新居志郎、倉田毅、林英生、本田武司、小田紘、松本明編. 「病原細菌・ウイルス図鑑」 2107. 北海道大学出版会
- 17) Klein M, Deforest A. Antiviral action of germicides. *Soap&Chemical Specialisties*. 1963(39): 70-72: 95-97.
- 18) 野田伸司, 渡辺実, 山田不二造, 藤本進. アルコール類のウイルス不活化作用に関する研究, ウイルスに対する各種アルコールの不活化効果について. *感染症学雑誌*. 1981; 55 (5): 355-366.
- 19) 医薬品インタビューフォーム、日本薬局方 消毒用エタノール 2008年12月改定(第5版)
- 20) EN 13727:2012+A1:2013 Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants

and antiseptics-test method and requirements (phase 2, step1)

- 21) 国立感染症研究所, アデノウイルス年別検出報告数、2008～2017
file:///C:/Users/shimmei/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/IE/M76YEG1L/449tt02.pdf
- 22) Bayer. Alkoholdesinfektion, Ztschr, F, Hyg, u. *Infektion* 1911;70:225.
- 23) 白石正、丘龍祥、仲川義人. エタノール、イソプロパノール、メタノール変性アルコール製剤に関する殺菌効力の検討. *環境感染* 1998;13(2): 108-112.
- 24) 古賀俊彦、野田哲寛、中村昌弘. 気管支鏡の抗酸菌汚染とその除去対策. *気管支学* 2001; 23(4): 386-392.
- 25) 小川みどり、野本摩利、福田和正、宮本比呂志、谷口初美. 病院および一般住居の水場環境における非結核性抗酸菌. *産業医科大学雑誌* 2011; 33(4): 319-327.
- 26) Mbithi JN, Springthorpe VS, Sattar SA. Chemical disinfection of hepatitis A virus on environment surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990; 56: 3601-3604.
- 27) Satter SA, Makonnen A, Angela J et al. Activity of alcohol-based hand gel against Human Adeno-, Rhino-, and Rotaviruses using the fingerpad method. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21(8): 516-519.
- 28) Satter SA et al. Preventing the spread of hepatitis B and C viruses, where are germicides relevant? *Am J of Infect Control* 2001; 29: 187-197.

表1 エタノールの殺菌効果および抗ウイルス効果に関する代表的な先行研究

細菌					
報告年	試験方法	菌液/エタノール	菌種	至適濃度	文献
1903	菌を糸に付着させ乾燥・湿潤状態で評価	—	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	乾燥: 60~70 v/v%	5
1911	菌液を絹糸に付着乾燥後、湿潤状態で評価	—	<i>S. aureus</i>	76.9 v/v%	22
1937 1950	浮遊試験	0.02 mL/2 mL	<i>E. coli</i> <i>S. albus</i> <i>S. aureus</i>	60~90 wt%	6,7
1950	浮遊試験	0.5 mL/5 mL	<i>B. anthracis</i> <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. typhosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i>	50 v/v%	8
1998	浮遊試験	0.01 mL/1 mL	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. marcescens</i> <i>E. coli</i>	39~51.9 v/v% (20°C)	23
	皮膚上の清拭	—	<i>E. faecalis</i> <i>S. epidermidis</i> MRSA MSSA	51.9 v/v% (20°C)	
真菌					
報告年	試験方法	菌液/エタノール	菌種	至適濃度	文献
1963	表面試験	—	<i>B. dermatitidis</i> <i>C. neoformans</i> <i>C. immitis</i> <i>H. capsulatum</i>	70 v/v%	11
抗酸菌					
報告年	試験方法	菌液/エタノール	菌種	至適濃度	文献
1947	喀痰をガラス上に塗り拡げて、乾燥・湿潤状態で評価	1 mL/99 mL	<i>M. tuberculosis</i>	ともに 70 v/v%	9
1990	浮遊試験	1/9	<i>M. tuberculosis</i>	70 v/v%	10
2001	浮遊試験	1/1	<i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>	80 v/v% 1 分間 30 v/v% 15 分間	24
2011	浮遊試験 (5 分間作用)	1 mL/9 mL	<i>M. avium</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. goodii</i>	80 v/v%	25

ウイルス					
報告年	試験方法	菌液/エタノール	菌種	至適濃度	文献
1981	浮遊試験	0.1mL/0.9 mL	PV1 ECHO7 CVB5 CVA16 EV70 Ad 3 型 <i>Vaccinia virus</i> <i>Influenzavirus A</i> <i>Herpes simplex 1</i> NDV	多くのウイルス に対して効果 なし。 CVB5とPV1 は90% (20℃) EV70のみ 70% (20℃)	18
1981	浮遊試験 (液性の生体試料)	0.1mL/0.9 mL	PV1 EV70 NDV <i>Vaccinia virus</i>	90 % 以上	12
1990	表面試験	—	<i>Hepatitis A virus</i>	効果なし	26
2000	Fingerpad 試験	—	Ad 4 型 <i>Rhinovirus 14</i> <i>Rotavirus</i>	75 v/v%	27
2001	表面試験	—	<i>Hepatitis B virus</i> <i>Hepatitis C virus</i>	70~80v/v%	28
2006	浮遊試験	1:9	Ad 3 型、4 型、8 型、 19 型、37 型	80 v/v% 10 分間	13

細菌:

Bacillus anthracis: *B. anthracis*、*Enterococcus faecalis*: *E. faecalis*、*Escherichia coli*: *E. coli*、
Pseudomonas aeruginosa: *P. aeruginosa*、*Salmonella typhosa*: *S. typhosa*、
Serratia marcescens: *S. marcescens*、*Staphylococcus albus*: *S. albus*、
Staphylococcus aureus: *S. aureus*、*Staphylococcus epidermidis*: *S. epidermidis*、
Streptococcus pyogenes: *S. pyogenes*、
Methicillin-susceptible *S. aureus*: MSSA、Methicillin resistance *S. aureus*: MRSA

真菌:

Blastomyces dermatitidis: *B. dermatitidis*、*Coccidioides immitis*: *C. immitis*、
Cryptococcus neoformans: *C. neoformans*、*Histoplasma capsulatum*: *H. capsulatum*

抗酸菌:

Mycobacterium abscessus: *M. abscessus*、*Mycobacterium avium*: *M. avium*、
Mycobacterium chelonae: *M. chelonae*、*Mycobacterium gordonae*: *M. gordonae*、
Mycobacterium nonchromogenicum: *M. nonchromogenicum*、
Mycobacterium tuberculosis: *M. tuberculosis*

ウイルス:

Adenovirus: Ad、*Coxsackievirus A16*: CVA16、*Coxsackievirus B5*: CVB5、*Echovirus 7*: ECHO7、
Enterovirus 70: EV70、*Newcastle disease virus*: NDV、*Poliovirus 1*: PV1

表 2 グラム陰性菌に対するエタノールの殺菌効果(作用時間 10 秒、n=2)

濃度 v/v %	<i>A. xylosoxidans</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>
	JCM9659	NBRC15124	ATCC10536	ATCC25922	NBRC14940
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.2	0.1	0.1	0.8	0.0
18	0.1	0.3	0.4	0.0	0.1
27	0.4	0.3	0.0	0.1	0.0
36	3.8	4.7	4.1	0.7	>5.4
45	>6.3	>5.8	>5.6	4.0	>5.4
54	>6.3	>5.8	>5.6	>5.8	>5.4
63	>6.3	>5.8	>5.6	>5.8	>5.4
72	>6.3	>5.8	>5.6	>5.8	>5.4
81	>6.3	>5.8	>5.6	>5.8	>5.4

濃度 v/v %	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. enterica</i>	<i>S. marcescens</i>
	NBRC105697	ATCC15442	ATCC27853	JCM1652	JCM1239
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.6	0.2	0.1	0.1	0.3
18	0.6	0.2	0.1	0.1	0.0
27	0.8	0.2	0.1	0.2	0.3
36	4.5	>5.2	3.8	>5.6	>5.3
45	>5.1	>5.2	>5.1	>5.6	>5.3
54	>5.1	>5.2	>5.1	>5.6	>5.3
63	>5.1	>5.2	>5.1	>5.6	>5.3
72	>5.1	>5.2	>5.1	>5.6	>5.3
81	>5.1	>5.2	>5.1	>5.6	>5.3

供試菌液(約 10^8 CFU/mL) 100 μ L を 0~90 v/v% の間 10 v/v% 刻みのエタノール溶液 900 μ L に添加した。10 秒後、生菌数を測定し、作用前後の生菌数より指数減少値を求め示した。細菌に対する殺菌効果は、LR \geq 5 を満たすことで評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

エタノール濃度は作用時の濃度で、室温における体積パーセント濃度(v/v%)で表記した。

表3 エタノールのグラム陽性菌に対する殺菌効果（作用時間 10 秒、n=2）

濃度 v/v%	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	
	JCM5803	JCM5804	NBRC3333	ATCC25923	ATCC6538
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.1	0.0	0.3	0.0	0.2
18	0.2	0.0	0.4	0.1	0.0
27	0.5	0.0	0.4	0.1	0.1
36	0.3	0.1	0.6	0.1	0.6
45	>5.4	3.6	>5.9	1.5	>5.3
54	>5.4	>5.4	>5.9	>5.2	>5.3
63	>5.4	>5.4	>5.9	>5.2	>5.3
72	>5.4	>5.4	>5.9	>5.2	>5.3
81	>5.4	>5.4	>5.9	>5.2	>5.3

濃度 v/v%	MRSA	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hemolyticus</i>	<i>S. pyogenes</i>
	臨床分離株	JCM2414	NBRC109768	JCM5674
0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.2	0.2	0.1	0.0
18	0.8	0.3	0.2	0.0
27	0.7	0.3	0.2	0.6
36	0.5	0.5	1.2	2.8
45	2.2	1.3	3.4	>5.1
54	>5.1	4.7	>5.3	>5.1
63	>5.1	>5.8	>5.3	>5.1
72	>5.1	>5.8	>5.3	>5.1
81	>5.1	>5.8	>5.3	>5.1

供試菌液(約 10^8 CFU/mL) 100 μ L を 0~90 v/v% の間 10 v/v% 刻みのエタノール溶液 900 μ L に添加した。10 秒後、生菌数を測定し、作用前後の生菌数より指数減少値を求め示した。

細菌に対する殺菌効果は、 $LR \geq 5$ を満たすことで評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

エタノール濃度は作用時の濃度で、室温における体積パーセント濃度(v/v%)で表記した。

表4 エタノールの真菌に対する殺菌効果（作用時間 10 秒、n=2）

濃度 v/v%	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
	NBRC1393	NBRC1594	臨床分離菌	NBRC585
0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.1	0.0	0.0	0.1
18	0.1	0.0	0.1	0.2
27	0.2	0.5	0.2	0.5
36	0.7	1.2	0.3	0.0
45	>4.3	>3.5	3.5	2.8
54	>4.3	>3.5	>5.6	>5.0
63	>4.3	>3.5	>5.6	>5.0
72	>4.3	>3.5	>5.6	>5.0
81	>4.3	>3.5	>5.6	>5.0

濃度 v/v%	<i>A. flavus</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. niger</i>
	NBRC5324	NBRC9455	NBRC105649
0	0.2	0.1	0.1
9	0.3	0.2	0.4
18	0.0	0.1	0.7
27	0.3	0.2	0.2
36	0.7	0.4	0.3
45	3.8	2.1	1.3
54	4.5	3.7	3.2
63	>5.3	>5.0	>4.8
72	>5.3	>5.0	>4.8
81	>5.3	>5.0	>4.8

供試菌液(約 10⁸ CFU/mL) 100 μL を 0~90 v/v% の間 10 v/v% 刻みのエタノール溶液 900 μL に添加した。10 秒後、生菌数を測定し、作用前後の生菌数より指数減少値を求め示した。

真菌に対する殺菌効果は、LR \geq 4 を満たすことで評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。*C. albicans* NBRC1594 では、初期菌数が低く LR \geq 4 では殺菌効果を評価できなかったが検出限界 (LR>3.45) を示した。

エタノール濃度は作用時の濃度で、室温における体積パーセント濃度 (v/v%) で表記した。

表5 エタノールの抗酸菌に対する殺菌効果（作用時間 10 秒、n=2）

濃度 v/v%	<i>M. abscessus</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. chelonae</i>
	ATCC19977	ATCC23366	ATCC19421	ATCC19235
0	0.2	0.3	0.1	0.2
9	0.1	0.3	0.1	0.4
18	0.1	0.1	0.2	0.1
27	0.1	0.2	0.1	0.1
36	0.2	0.3	0.1	0.4
45	2.4	3.3	4.5	3.0
54	>5.5	>5.5	>5.9	3.9
63	>5.5	>5.5	>5.9	>5.6
72	>5.5	>5.5	>5.9	>5.6
81	>5.5	>5.5	>5.9	>5.6

濃度 v/v%	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. terrae</i>
	臨床分離株	臨床分離株	JCM12143
0	0.3	0.2	0.1
9	0.5	0.1	0.0
18	0.3	0.2	0.0
27	0.3	0.0	0.0
36	0.2	0.2	0.1
45	0.3	4.5	2.8
54	0.1	>5.0	>5.3
63	2.0	>5.0	>5.3
72	>4.8	>5.0	>5.3
81	>4.8	>5.0	>5.3

供試菌液（約 10^8 CFU/mL）100 μ L を 0～90 v/v% の間 10 v/v% 刻みのエタノール溶液 900 μ L に添加した。10 秒後、生菌数を測定し、作用前後の生菌数より指数減少値を求め示した。

抗酸菌に対する殺菌効果は、LR \geq 4 を満たすことで評価した。網掛け部分が殺菌効果を示すことを意味する。

エタノール濃度は作用時の濃度で、室温における体積パーセント濃度(v/v%)で表記した。

表 6 エタノールの抗ウイルス効果(作用時間 10 秒、n=2)

ノンエンベロープウイルス										
濃度 v/v%	FCV/F9	Ad						CVA7	CVA16	CVB5
		2	3	5	7	8	37			
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.1	0.0	0.3	0.0	0.0
18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	0.3	0.2	0.0
27	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2
36	0.1	0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
45	0.7	3.8	0.5	1.0	1.4	0.6	3.6	0.0	0.0	0.0
54	1.2	4.6	1.5	4.6	3.8	0.8	4.3	0.1	0.0	0.0
63	1.3	4.5	2.0	5.5	3.8	0.3	3.0	0.3	0.8	0.1
72	1.0	4.5	0.8	5.3	1.8	0.1	0.9	0.3	0.0	0.1
81	0.3	4.6	0.5	3.9	1.5	0.0	1.8	0.4	0.3	0.0

エンベロープウイルス							
濃度 v/v%	Influenzavirus A					HSV	
	A.pdm.2009No.48	A/FM/1/47	A/PR8	A/Tokyo/2/75	A/USSR/92/97	HF	UW
0	0.3	0.0	0.0	0.9	0.4	0.6	0.2
9	0.3	0.0	0.0	0.9	0.1	0.2	0.2
18	0.8	0.3	0.1	0.8	0.4	0.6	0.2
27	0.6	0.7	0.0	1.4	0.4	0.9	1.6
36	2.6	1.1	1.3	1.7	1.4	>3.9	>3.9
45	>3.1	>2.1	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9
54	>3.1	>2.1	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9
63	>3.1	>2.1	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9
72	>3.1	>2.1	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9
81	>3.1	>2.1	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9

供試ウイルス保存液 100 μL を 0~90 v/v% の間 10 v/v% 刻みのエタノール溶液 900 μL に添加した。10 秒作用前後のウイルス感染価より指数減少値を求め示した。

ノンエンベロープウイルスの評価基準は LR \geq 3 とし、エンベロープウイルスは検出限界以下と定めた。網掛け部分が抗ウイルス効果を示すことを意味する。

エタノール濃度は作用時の濃度で、室温における体積パーセント濃度(v/v%)で表記した。

表7 エタノールの抗ウイルス効果(作用時間 1分、n=2)

ノンエンベロープウイルス										
濃度 v/v%	FCV/F9	Ad						CVA7	CVA16	CVB5
		2	3	5	7	8	37			
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.3	0.0	0.2	0.0	0.0
27	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0
36	1.4	3.8	0.6	0.0	1.7	0.4	3.0	0.3	0.0	1.0
45	3.4	>4.7	>3.8	>5.6	>4.3	3.5	>4.3	0.5	0.0	3.9
54	3.9	>4.7	>3.8	>5.6	>4.3	2.7	>4.3	0.3	0.1	>4.9
63	4.3	>4.7	>3.8	>5.6	>4.3	0.8	4.3	0.7	0.6	4.7
72	3.3	>4.7	2.0	>5.6	>4.3	0.2	2.7	2.8	3.6	>4.9
81	1.3	>4.7	3.2	>5.6	>4.3	2.0	4.3	>5.3	>3.7	>4.9

エンベロープウイルス							
濃度 v/v%	Influenzavirus A					HSV	
	A.pdm.2009No.48	A/FM/1/47	A/PR8	A/Tokyo/2/75	A/USSR/92/97	HF	UW
0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.4	0.3	0.0
9	0.2	0.0	0.0	0.8	0.3	0.8	0.1
18	0.4	0.4	0.3	0.8	0.6	0.7	0.5
27	2.4	1.0	0.0	1.6	0.8	3.7	>3.9
36	>3.1	2.1	>2.1	>2.0	2.6	>3.9	>3.9
45	>3.1	>2.2	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9
54	>3.1	>2.2	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9
63	>3.1	>2.2	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9
72	>3.1	>2.2	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9
81	>3.1	>2.2	>2.1	>2.0	>2.8	>3.9	>3.9

供試ウイルス保存液 100 μ L を 0~90 v/v% の間 10 v/v% 刻みのエタノール溶液 900 μ L に添加した。10 秒作用前後のウイルス感染価より指数減少値を求め示した。

ノンエンベロープウイルスの評価基準は LR \geq 3 とし、エンベロープウイルスは検出限界以下と定めた。網掛け部分が抗ウイルス効果を示すことを意味する。

エタノール濃度は作用時の濃度で、室温における体積パーセント濃度(v/v%)で表記した。

表 8 アデノウイルス年別検出報告数、2013～2017年 6月²¹⁾

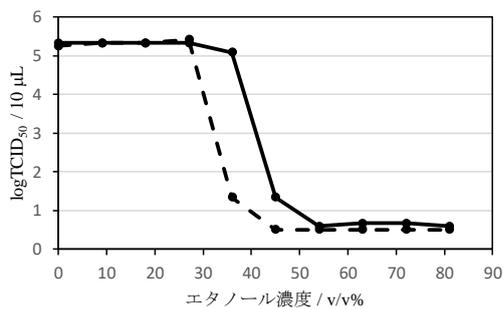
ウイルス 血清型	分類	年					合計
		2013	2014	2015	2016	2017	
1	C	252	237	213	192	82	976
2	C	447	399	387	441	153	1827
3	B	238	397	322	352	85	1394
4	E	154	101	101	79	8	443
5	C	107	90	105	93	42	437
6	C	32	60	24	29	9	154
7	B	1	0	0	0	0	1
8	D	17	14	9	4	1	45
9	D	0	0	0	1	0	1
11	B	2	4	2	3	2	13
12	A	1	1	0	0	0	2
13	D	0	0	0	0	0	0
15	D	0	0	0	0	0	0
19/64	D	2	4	5	25	2	38
21	B	0	0	0	1	1	2
31	A	29	16	11	11	4	71
33	D	0	0	1	0	0	1
34	B	0	0	0	0	0	0
35	B	0	1	0	1	0	2
37	D	12	66	44	19	2	143
40	F	0	0	0	0	0	0
41	F	70	74	91	109	36	380
40/41*	F	34	34	60	25	15	168
46	D	0	0	0	1	0	1
53	D	3	5	8	9	2	27
54	D	14	15	103	98	18	248
56	D	32	33	17	12	3	97
others		0	6	2	2	0	10
NT		190	254	257	121	28	850

NT:型不明

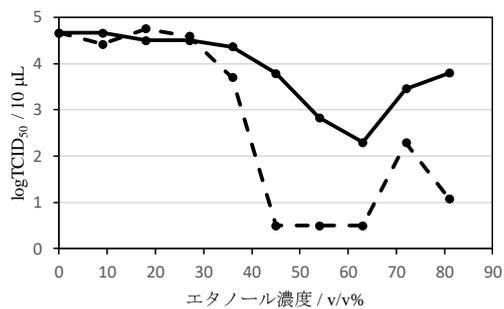
*Ad 40/41と判定された検体は、糞便から直接 Ad 40/41 の抗原を検出する ELISA キット(Ad 40と41が区別できない)による検出と考えられる。

・アデノウイルス年別検出報告数、2013～2017年6月の表の一部を改編²¹⁾

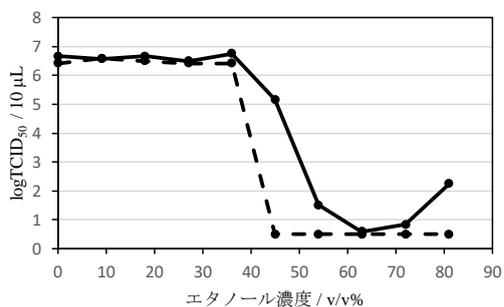
Ad 2 型



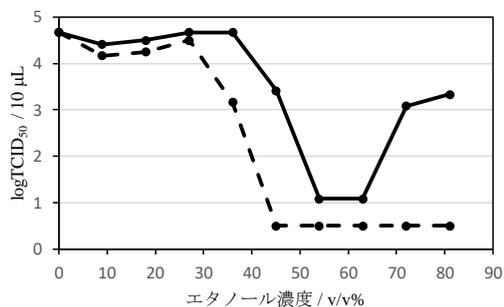
Ad 3 型



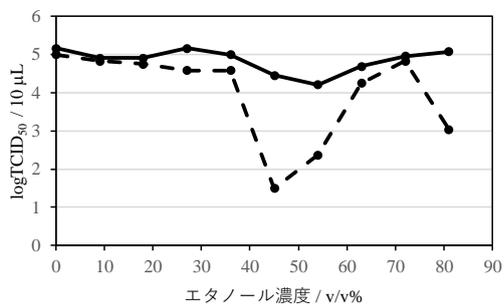
Ad 5 型



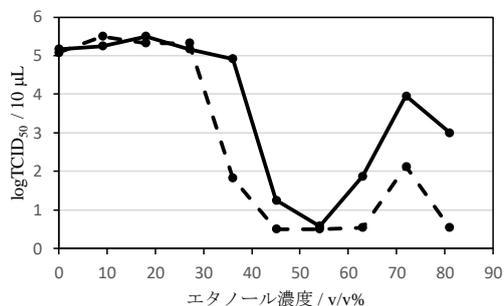
Ad 7 型



Ad 8 型



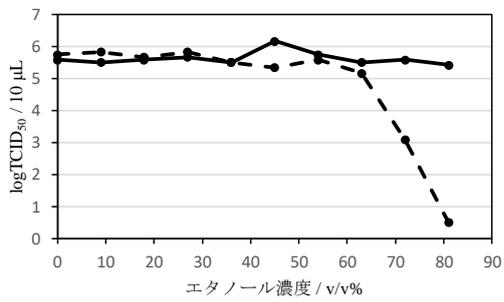
Ad 37 型

図 1 *Adenovirus* (Ad)のエタノール濃度に対するウイルス感染価の挙動(n=2)

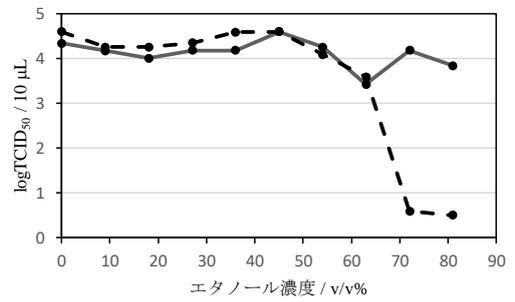
直線:作用時間 10 秒、点線:作用時間 1 分

TCID (tissue culture infectious dose) : ウイルス感染価

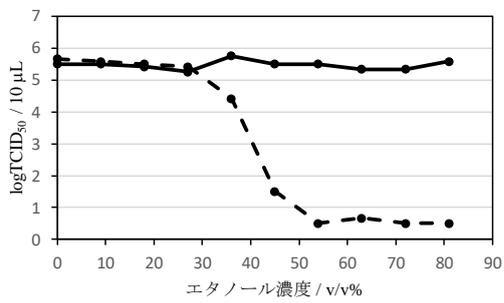
CVA7



CVA16



CVB5



FCV/F9

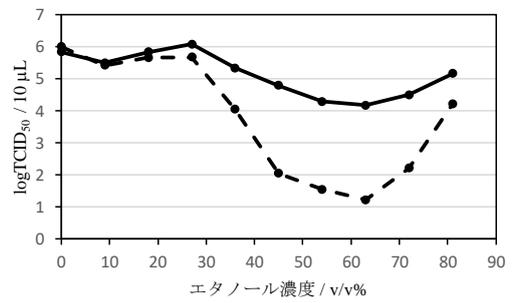


図2 3種の *Coxsackievirus* と *Feline calicivirus* のエタノール濃度に対するウイルス感染価の挙動 (n=2)

直線: 作用時間 10 秒、点線: 作用時間 1 分

CVA7: *Coxsackievirus A7*

CVA16: *Coxsackievirus A16*

CVB5: *Coxsackievirus B5*

FCV/F9: *Feline calicivirus F9*

TCID (tissue culture infectious dose) : ウイルス感染価

Influence of ethanol concentration on bactericidal and virucidal activities

Akemi shimmei

Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University

Postgraduate School, Faculty of Healthcare, Department of Healthcare

OBJECTIVE. The bactericidal and virucidal activities on bacteria, fungi, acid-fast bacteria, and viruses are investigated under various ethanol concentrations, and the optimal minimum concentration for the disinfection are re-verified.

BACKGROUND. The bactericidal effects of ethanol for disinfection have been widely investigated. The optimal concentration range is 68.5 to 71.5 v/v% at 15°C, 76.9 to 85.4 v/v%, and 60 to 80 v/v% according to the United States Pharmacopeia National Formulary (USP-NF), the Japanese Pharmacopoeia (JP), and World Healthcare Organization (WHO), respectively. There have been numerous reports that supported these optimal concentrations before 2000s. However, the experimental methods such as kinds of bacteria and viruses, reaction time, the mixing ratio were differed.

METHODS. The ethanol concentrations were verified at room temperature from 0 to 90 v/v% in 10% increments. The bactericidal and fungicidal activities for gram-negative and gram-positive bacteria, fungi, and acid-fast bacteria were evaluated by means of colony-forming unit assay. The virucidal activities for enveloped and non-enveloped virus were evaluated by means of virus infectivity titer.

RESULTS. All gram-negative bacteria (8 species, 10 strains) were below the reference value (5 log reduction) at a minimum concentration (MC) of 54 v/v%, and all gram-positive bacteria (7 species, 9 strains) were below the reference value at an MC of 63 v/v%. For fungi, all *Saccharomyces* (3 species, 4 strains) were below the reference value at an MC of 54 v/v%, and all filamentous fungi, i.e. *Aspergillus* family (3 species, 3 strains), were below the reference value (4 log reduction) at an MC of 63 v/v%. All acid-fast bacteria (7 species, 7 strains) were below the reference value (4 log reduction) at an MC of 72 v/v%. Enveloped viruses (2 species, 7 strains) were below or equal the detection limit reference value (3 log reduction) at an MC of 36 - 45 v/v% after reaction time of 10 sec, and the non-enveloped virus strains *adenovirus* 2, 5, 7, and 37 were below or equal the detection limit reference value (3 log reduction) at an MC of 36 - 45 v/v% after the same reaction time. Virtually no effects were observed for *adenovirus* 8, all *coxsackievirus* strains (A7, A16, and B5), and *Feline calicivirus*. However, after a reaction time of 1 min at a concentration of 45 v/v%, *Feline calicivirus*, all *adenovirus* strains (2, 3, 5, 7, 8, and 37) and *coxsackievirus* B5 were all below the reference values. Meanwhile, there was a phenomenon observed for more than two *adenovirus* strains

and *Feline calicivirus* that entailed decreasing virucidal effects at higher concentrations and longer reaction times.

CONCLUSION. A more effective extent was observed than the optimal minimum concentration of 76.9 v/v% in the JP and 68.5 v/v% in the USP-NF. However, effects on some non-enveloped virus were observed at a concentration of 54 v/v%, while effects decreased as the concentrations increased, which may indicate that the minimum concentration in the JP may be ineffective for the viruses in question. These are non-enveloped viruses, which are said to be alcohol-resistant, although it shows that effects may be obtained by varying the concentration and reaction time.