

プロトクリンパルシャット*の 殺菌作用

田島 朋子

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 獣医学専攻

プロトクリンパルシャットの殺菌作用

■ 使用した菌とその説明

黄色ブドウ球菌

ヒトや動物の皮膚、消化管に常在する菌であるが、膿瘍を起こすほか、多量に増殖した食品を摂取することで食中毒を起こすこともある。大規模な食中毒発生例としては 2000 年の雪印乳業食中毒事件がある。

大腸菌

ヒトや動物の腸管に常在する菌で、多くは病原性がない。病原性を示すものは総称して下痢原性大腸菌（または病原大腸菌）と呼ばれる。中でも生肉の摂食による腸管出血性大腸菌食中毒が多発する。

緑膿菌

自然環境中に常在する菌で、健康者には病原性はほとんど無い。免疫力の低下した病人や高齢者に感染して重篤な病気を引き起こすことがある。

サルモネラ菌

ヒトや動物の消化管に生息する菌で、一部は病原性を示す。腸チフスやパラチフスを起こすものと食中毒を起こすものがあり、特に卵からの感染による食中毒が問題となる。

■ 方法

各菌を LB 培地で一晩振とう培養し、純水で 4 倍希釈したパルシャットで 10 倍希釈した。室温で 1 分、5 分、30 分、時々振とうしながら反応させた。対照は純水で 10 倍希釈した。反応後、 10^9 倍まで階段希釈を行い、黄色ブドウ球菌と緑膿菌はトリプトソイ寒天培地に、大腸菌とサルモネラは DHL 寒天培地に $10\mu\text{L}$ ずつ接種して 37°C で一晩培養した。培養後、コロニー数をカウントして生菌数を求めた。

■ 結果

パルシャット処理した各菌の生菌数を表に示す。サルモネラと大腸菌は、1 分の処理で完全に殺菌された。黄色ブドウ球菌は 1 分の処理でわずかに生菌が残っていたが、5 分の処理で完全に殺菌された。緑膿菌は 1 分の処理では $1/100$ 程度の菌が生存していたが、5 分の処理で完全に殺菌された。4 倍希釈したパルシャットに 5 分間浸漬することで、大抵の菌が死滅するものと思われる。

表 パルシャット処理後の生菌数

細菌の種類	反応時間	処理	
		プロトクリン パルシャット	純水
サルモネラ	1 分	< 100/mL	$12.5 \times 10^7/\text{mL}$
	5 分	< 100/mL	$9.5 \times 10^7/\text{mL}$
	30 分	< 100/mL	$11.0 \times 10^7/\text{mL}$
黄色ブドウ球菌	1 分	100/mL	$11.3 \times 10^6/\text{mL}$
	5 分	< 100/mL	$8.8 \times 10^6/\text{mL}$
	30 分	< 100/mL	$10.5 \times 10^6/\text{mL}$
大腸菌	1 分	< 100/mL	$11.8 \times 10^7/\text{mL}$
	5 分	< 100/mL	$11.0 \times 10^7/\text{mL}$
	30 分	< 100/mL	$8.8 \times 10^7/\text{mL}$
緑膿菌	1 分	$7.5 \times 10^4/\text{mL}$	$19.5 \times 10^6/\text{mL}$
	5 分	< 100/mL	$16.8 \times 10^6/\text{mL}$
	30 分	< 100/mL	$19.5 \times 10^6/\text{mL}$

プロトクリンパルシャットの*の 抗ウイルス作用

田島朋子

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 獣医学専攻

はじめに

小動物臨床の分野では殺菌やウイルス不活化のためにさまざまな消毒剤が用いられている。もっとも広く用いられるエタノールは、ほとんどの細菌には有効であるが、エンベロープを持たないウイルスには効果が無い。塩化ベンザルコニウムを有効成分とする逆性石鹼やクロルヘキシジングルコン酸塩は、多くの細菌に有効であるが、結核菌やほとんどのウイルスには効果が無い。また、ポビドンヨードは、エンベロープを持たないアデノウイルスなどにも有効であるが、金属器具を腐食させることがある。次亜塩素酸ナトリウムやグルタルアルデヒドはほとんどの細菌やウイルスに有効である。しかし、次亜塩素酸ナトリウムは金属器具を腐食させる、蛋白質が多く含まれる検体では効力が失われるなどの欠点がある。さらに、グルタルアルデヒドは刺激が強いため、取扱いには注意が必要である。また、これらの多くの消毒剤が蛋白質の存在下で効力を失う。

これらの消毒剤よりも取扱いが容易で、パルボウイルスな

どのエンベロープを持たないウイルスに効果のある消毒剤が、臨床の場では望まれる。今回、(株)ティーエムシーが販売するプロトクリンパルシャット（以下、パルシャットとする）について、抗ウイルス作用を検討した。

■ 材料と方法

① ウイルスおよび細胞

ネコパルボウイルス (FPV) PLI-IV株、ネコカリシウイルス (FCV) F9株、ネコヘルペスウイルス (FHV) F2株を用いた。ウイルスは、ネコ腎由来株化細胞 CRFK で増殖させた。

② 抗ウイルス作用の検討

パルシャットを使用法に従って水道水で4倍に希釈した。ウイルス液 100 μL に対して希釈したパルシャットを 900 μL 加え、室温で1分間、5分間あるいは30分間反応させた。対照として1%に希釈した次亜塩素酸ナトリウムを加えたウイルス液を1分間と5分間、滅菌純水を加えたウイルス液を1分間、5分間あるいは30分間、同様に反応させた。

また、蛋白質がパルシャットの抗ウイルス作用に与える影響を調べるため、1%、5%、10%、20%濃度で牛胎仔血清を

表1 プロトクリンパルシャットの抗ウイルス効果

細菌の種類	反応時間	処理		
		プロトクリンパルシャット	1%次亜塩素酸ナトリウム	純水
ネコパルボウイルス	1分	<10 ^{2.0} *	<10 ^{2.0}	10 ^{5.5}
	5分	<10 ^{2.0}	<10 ^{2.0}	10 ^{5.5}
	30分	<10 ^{2.0}	NT**	10 ^{5.5}
ネコカリシウイルス	1分	<10 ^{2.0}	<10 ^{2.0}	10 ^{6.5}
	5分	<10 ^{2.0}	<10 ^{2.0}	10 ^{6.0}
	30分	<10 ^{2.0}	NT	10 ^{6.5}
ネコヘルペスウイルス	1分	<10 ^{2.0}	<10 ^{2.0}	10 ^{6.5}
	5分	<10 ^{2.0}	<10 ^{2.0}	10 ^{6.5}
	30分	<10 ^{2.0}	NT	10 ^{6.0}

* 50% 組織培養感染濃度 (TCID₅₀/mL)

** 試験せず

加えたFCV液100 μ Lと、4倍希釈したパルシャット900 μ Lを室温で5分間反応させた。対照として、パルシャットの代わりに1%次亜塩素酸ナトリウムを加えたものを同様に反応させた。

③ ウイルス感染価の測定

4倍希釈のパルシャット、1%希釈の次亜塩素酸ナトリウムともに10倍希釈してCRFK細胞に接種した場合に細胞が変性した。そのため、反応後のウイルス検体は100倍から10倍階段希釈を行ない、CRFK細胞に接種した。FCV、FHVについては、2日間培養後、ウイルスによる細胞変性効果でウイルス感染の有無を判定し、ウイルス感染価として50%組織培養感染濃度(TCID₅₀/mL)を求めた。FPVについては、4日間培養後、細胞をトリプシンで剥離し、PBSで洗浄した。PBSに再浮遊後、12穴高撥水性印刷スライドグラスに塗抹し、アセトン固定を行なった。その後、一次血清としてFPVワクチン接種ネコ血清を、二次血清として、FITC標識抗ネコIgGヤギ血清を用いた間接蛍光抗体法で感染の有無を判定し、TCID₅₀/mLを求めた。

④ 金属に対する反応

ステンレスワッシャー、銅ワッシャー、真鍮釘、ユニクロ釘、アルミニウム線を6ウェルマイクロプレートに入れ、水道水で4倍希釈したパルシャットあるいは1%に希釈した次亜塩素酸ナトリウムを1ウェル当たり9mLずつ分注した。室温に48時間静置し、反応を調べた。

■ 結果

① 抗ウイルス作用

各ウイルスとパルシャット、滅菌蒸留水、1%次亜塩素酸

ナトリウムを混合し、継時的に回収したウイルスの感染価を表1に示す。

パルシャットで処理したFPV、FCV、FHVすべてでウイルスの増殖は認められず、不活化されていることが明らかとなった。不活化は、パルシャットとの混合後1分で回収した検体から認められ、速やかに不活化されていた。この不活化は、1%次亜塩素酸ナトリウムと同程度のものであった。

なお、ウイルス回収後は速やかに100倍から階段希釈して細胞に接種しており、パルシャットと1%次亜塩素酸ナトリウムの影響がウイルス回収後も継続している可能性は低いと考える。

② 蛋白質の影響

FCVに種々の濃度で牛胎仔血清を加えてパルシャット、あるいは1%次亜塩素酸ナトリウムと反応させた場合のウイルス感染価を表2に示す。

FCVは、20%にまで牛胎仔血清が混じった状態でもパルシャットで完全に増殖が阻止された。一方、消毒剤としてよく用いられる1%次亜塩素酸ナトリウムでは、牛胎仔血清を1%の濃度で加えただけで、抗ウイルス作用が阻害された。

③ 金属に対する反応

各種金属をパルシャットと1%次亜塩素酸ナトリウムに浸け、24時間静置後の状態を図に示す。パルシャットに浸漬した金属はいずれも変化がみられなかった。一方、1%次亜塩素酸ナトリウムに浸漬した金属のうち、銅は部分的に変色し、緑色の生成物をみた。真鍮釘も同様に緑色の生成物をみた。また、ユニクロ釘では白色の生成物をみた。

さらに24時間浸漬しても、結果は変わらず、パルシャットに浸漬した金属には変化は見られなかった。

表2 プロトクリンパルシャットの抗ウイルス効果に蛋白質の及ぼす影響

処理	牛胎仔血清濃度 (%)	FCV 感染価 (TCID ₅₀ /mL)
プロトクリンパルシャット	0	10 ^{2.0}
	1	10 ^{2.0}
	5	10 ^{2.0}
	10	10 ^{2.0}
	20	10 ^{2.0}
1%次亜塩素酸ナトリウム	0	10 ^{2.0}
	1	10 ^{5.5}
	5	10 ^{5.5}
	10	10 ^{6.5}
	20	10 ^{6.0}

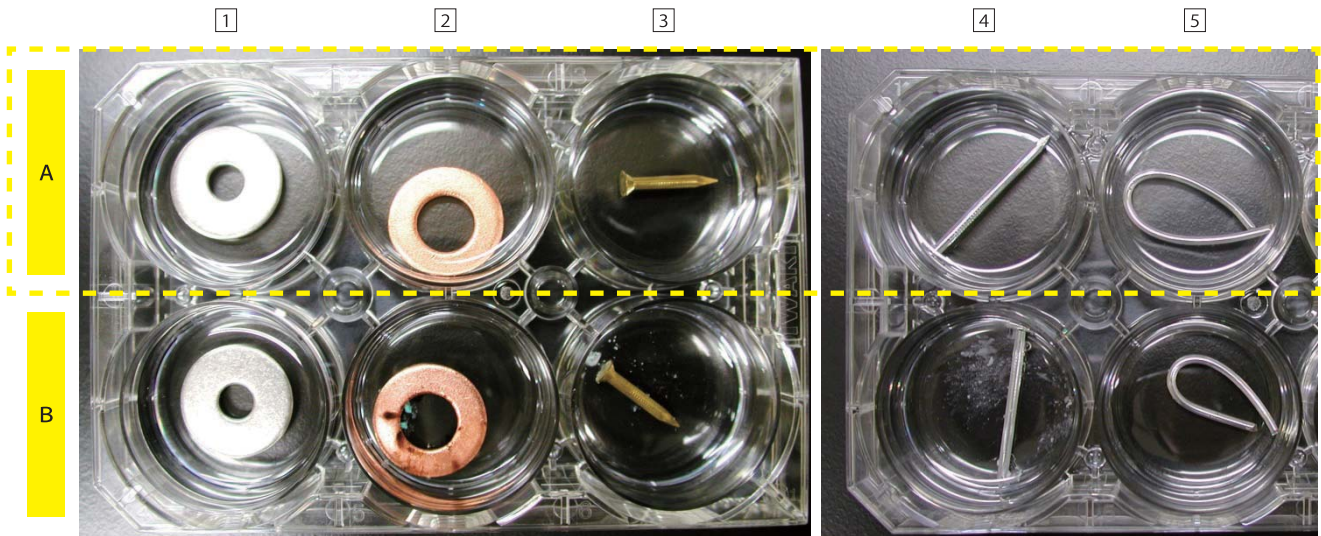


図1 プロトクリンパルシャットと1%次亜塩素酸ナトリウムの金属への影響

A: プロトクリンパルシャット B: 1%次亜塩素酸ナトリウム

1: ステンレスワッシャー 2: 銅ワッシャー 3: 真鍮釘 4: ユニクロ釘 5: アルミニウムワイヤー

24時間室温に静置後、次亜塩素酸ナトリウム溶液では銅ワッシャー、真鍮釘、ユニクロ釘で変化が認められたがプロトクリンパルシャット液では変化は認められなかった。

考察

パルシャットは塩素を含まない消毒剤として開発されたものである。塩素を含まないため、次亜塩素酸ナトリウムのような刺激臭はなく、衣服についても脱色することはない。また、仮に酸性洗浄剤と混ざったとしても塩素が発生する危険性はない。

パルシャットを使用 방법에準じて4倍希釈し、猫の代表的な病原ウイルス3種と反応させたところ、すべてのウイルスが短時間で不活化された。とくに、物理化学的に抵抗性が強く、消毒剤としては次亜塩素酸ナトリウムとグルタルアルデヒドが有効とされるFPVに対しても、1%次亜塩素酸ナトリウムと同程度の殺ウイルス作用を示した。

さらに、蛋白質を加えた場合について調べたところ、牛胎仔血清を20%の濃度で加えても効力の低下は認められなかった。一方、1%次亜塩素酸ナトリウムでは、1%濃度の牛胎仔血清においても効力が認められなくなった。実際に臨床の場で血液などの蛋白質が付着したままの器具を滅菌することもあることを考えると、蛋白質の影響を受けないことは消毒剤として望ましい点である。

種々の金属を浸漬した場合、1%次亜塩素酸ナトリウムで

は銅、真鍮、ユニクロで変化が認められた。真鍮は銅と亜鉛の合金であり、ユニクロは鉄に亜鉛メッキを施した上にクロム酸塩をコートしたものであることから、銅と亜鉛に反応したものであると思われる。一方、パルシャットに浸漬した金属は48時間後も変化が認められなかった。ハサミやピンセットといった器具は現在ではほとんどがステンレス製であり、また、24時間も浸漬することはないが、なんらかの事情で放置してしまうことが無いとは言い切れない。金属に対して安定であることも消毒剤としては望ましい。

まとめ

パルシャットは、1%次亜塩素酸ナトリウムと同程度の抗ウイルス効果を示すことが明らかになった。しかも、蛋白質によってその効果が失われることはなく、金属を変化させることもない。安全で有効な消毒剤として、臨床の場で有用であろう。

謝辞

プロトクリンパルシャットをご提供いただいた㈱ティーエムシーに深謝します。