

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 感染局所治療剤としての 各種色素剤の抗菌効果に関する検討

田口 桜子¹⁾・佐 治 守¹⁾・向坂 元秀²⁾・葉山 修陽³⁾
大 藪 英一³⁾・内山喜一郎⁴⁾・星 健 二⁵⁾・大 国 寿士⁶⁾

¹⁾ 日本医科大学付属第一病院薬剤科*, ²⁾ 同 中央検査室

³⁾ 日本医科大学内科学第二講座, ⁴⁾ 同 外科学第二講座

⁵⁾ 同 皮膚科学講座, ⁶⁾ 同 老人病研究所免疫部門

(平成 5 年 3 月 3 日受付・平成 5 年 6 月 2 日受理)

褥瘡などの皮膚感染病巣からの methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 除菌を目的として、6 種類の色素剤をその薬剤として選択し、まず 3 種の標準菌 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*) を用いてその抗菌活性につき検討した。その結果、triphenylmethane 系の 3 種類の色素剤は *P. aeruginosa*, *E. coli* に対して他系の色素剤に比し、際立った抗菌作用は認められないものの、*S. aureus* はいずれにも高い感受性を示し、なかでも gentian violet は最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration; MBC) が 0.0025% と、もっとも強い殺菌効果が認められた。さらに臨床分離菌を用いた感受性の測定においても、gentian violet は MRSA を含む *S. aureus* に対して MBC が $\leq 0.0025\% \sim 0.08\%$ の値を示した。また gentian violet を最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) 0.00032% \sim 0.00064% 含み、ヒト血清を 5% の割合で添加した培地にて、54 時間継続培養しても MRSA の発育は認められず、持続した抗菌効果が認められた。以上のことより gentian violet は MRSA に対して低濃度で臨床使用が可能であることが想定され、褥瘡などの MRSA 感染皮膚病巣に有効な薬剤となりうることが示唆された。

Key words: 色素剤, MRSA, gentian violet

最近、褥瘡からの methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の分離頻度は増加傾向にあり、MRSA による褥瘡感染創が直接的、間接的に院内感染源になることが示唆されている^{1,2)}。しかし、褥瘡などの MRSA 感染病巣に対して、抗生物質による治療は必ずしも満足すべき効果を上げていない。一方、色素剤の抗菌効果は深達性で、血清蛋白の存在下においても、その効果の減弱は少なく、さらに収斂作用と生体組織に対し刺激が少ないなどの特徴を有することから、これまでにある種の感染症において、臨床的に使用されてきた。

我々は MRSA 感染病巣治療剤の検索を目的として、過去に、あるいは現在でも臨床上使用されている triphenylmethane, phenothiazine, azo または acridine 系に属する 6 種類の塩基性色素を選択し、その抗菌活性についての基礎的検討を行ったので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

gentian violet (Pyoktanin blue, 試薬特級), brilliant green (試薬特級), malachite green (試薬特級), chrysoidin (試薬特級) ならびに methylene blue (試薬特級) はそれぞれ和光純薬より購入した。また ethacridine (Acrinol, 日本薬局方) は日本新薬から、povidone-iodine は明治製薬よりそれぞれ購入した。

2. 使用菌株

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) NCTC 10490, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 2716 をそれぞれ抗生物質の検定用標準菌株として用い、また 1989 年 5 月から 1992 年 6 月における日本医科大学付属第一病院細菌検査室において各種臨床材料から分離

した臨床分離株 *S. aureus* 115 株, そのうち methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) 45 株, MRSA 70 株, *P. aeruginosa* 25 株, *E. coli* 52 株をそれぞれ実験に供した。

3. 使用培地

ミュラーヒントン液体培地 (Difco) およびミュラーヒントン寒天培地 (Difco) を増菌ならびに薬剤感受性測定用培地に使用した。また, per ml 4 μ g の oxacillin と 2% の NaCl を含有するミュラーヒントン液体培地を MRSA 検出培地として使用した^{3,4)}。

4. 各色素剤の抗菌活性

1) Minimum bactericidal concentration (MBC):

gentian violet, brilliant green, malachite green, chrysoidin, methylene blue, ethacridine の抗菌活性を標準菌 *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (NCTC 10490) および *E. coli* (ATCC 2716) ならびに上記の臨床分離株を用いて, 液体培地希釈法⁵⁾ に準じ MBC を測定することにより検討した。各色素剤を秤量後, ごく少量の滅菌精製水で完全に溶解後, 滅菌ミュラーヒントン液体培地を用いて 2 倍希釈系列を作り, これを被験液とした。各被験菌株は液体培地に接種し, 37°C 18 時間培養後, これを菌液として用いた。2 倍希釈系列の被験液 9 ml に per ml 10⁸ colony forming unit (CFU) の菌液 1 ml (10⁸ CFU) を加えて, 37°C, 18 時間培養後, その培養液より各々 100 μ l を採取し, ミュラーヒントン寒天培地に接種し 37°C, 18 時間培養後, 菌の発育がまったく認められない薬剤の最小濃度を MBC とした。

2) gentian violet および povidone-iodine の MRSA に対する Minimum inhibitory concentration (MIC):

MIC の測定は薬剤の色による影響から, 液体培地希釈法による測定が困難であったため, 寒天平板希釈法⁶⁾ を用いた。すなわち gentian violet, povidone-iodine を各々秤量後, 滅菌精製水で 2 倍希釈系列を作成し, その 2 ml を普通寒天培地 18 ml に混釈して, 平板を作り, その平板に MRSA の 18 時間培養液 (10⁸ CFU/ml) 100 μ l を接種し, 37°C, 18 時間培養, 菌の発育がまったく見られなかった最小薬剤濃度を MIC とした。

3) gentian violet および povidone-iodine の MIC におけるヒト血清の影響:

MIC 測定後, gentian violet, povidone-iodine を培地中で, 各々最終濃度が最小発育阻止濃度含有するように調製した被験液 (1 ml) と, 非働化 (56°C, 30

分) ヒト血清 (1 ml) をミュラーヒントン寒天培地 18 ml に混釈 (血清濃度 5%) し, 平板培地を作製した。その平板に MRSA の被験菌液 100 μ l (10⁸ CFU/ml) を接種し, 37°C, 18 時間培養後, 血清による抗菌効果におよぼす影響を検討した。18 時間後においても菌の発育が認められない場合, さらに継続培養を行い, 36 時間後, 54 時間後, 72 時間後における菌の発育の有無を経時的に観察した。

II. 結 果

1) 標準菌株に対する色素剤の MBC

Table 1 に示すごとく, Triphenylmethane 系色素である gentian violet, brilliant green, malachite green の, *E. coli* (ATCC 2716), *P. aeruginosa* (NCTC 10490) に対する MBC は各々 0.02~0.04%, 0.08%~0.16% であった。

S. aureus (ATCC 6538) に対する MBC は, 0.0025%~0.0050% であり, これら色素剤に対し顕著な感受性を示した。azo 系色素である chrysoidin は 3 種類の菌種株に対して, その MBC は 0.16%~0.32% であり, 3 菌種とも同程度の感受性を示した。phenothiazine 系の methylene blue は *S. aureus* (ATCC 6538) に対し 0.16% 濃度で殺菌効果が認められたが, *P. aeruginosa* (NCTC 10490), *E. coli* (ATCC 2716) は, 0.32% 濃度でも殺菌効果は認められなかった。一方 acridine 系の ethacridine は *P. aeruginosa* (NCTC 10490) に対する MBC は, 0.04% 濃度で全被験色素剤中でもっとも高い感受性を示したものの, *E. coli* (ATCC 2716) に対する MBC は 0.08% 濃度であり, *S. aureus* (ATCC 6538) に対しては 0.32% 濃度においても殺菌効果は観察されなかった。

2) gentian violet の臨床分離菌に対する MBC

gentian violet は 0.0025% 濃度以下で MSSA の 51%, MRSA の 47% を殺菌し (Fig. 1), 0.08% ないしはそれ以下の濃度において, MRSA 70 菌株を含む *S. aureus* の全被験菌株を殺菌した。また, gentian violet の 0.08% 濃度では, *P. aeruginosa* は全被験菌株の 20% (5/25), *E. coli* は全被験菌株の 7.7% (4/52) が殺菌されたが, gentian violet の 0.32% 濃度において, *P. aeruginosa* の全被験株の 44% (11/25) は殺菌されず, また, *E. coli* の全被験株の 25% (13/52) は殺菌されなかった (Fig. 1)。

3) gentian violet と povidone-iodine の MIC とその持続性におよぼすヒト血清の影響

被験菌として, MRSA 臨床分離株 4 株を選び, これらの菌に対する gentian violet, povidone-iodine の MIC を測定し, あわせて MIC における菌の発育

Table 1. Minimum bactericidal concentration (MBC) of various dyes on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*

Dyes	MBC (%)		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>P. aeruginosa</i> (NCTC 10490)	<i>E. coli</i> (ATCC 2716)
gentian violet	0.0025	0.16	0.02
brilliant green	0.0050	0.16	0.04
malachite green	0.0050	0.08	0.04
chrysoidin	0.16	0.32	0.32
methylene blue	0.16	>0.32	>0.32
ethacridine	>0.32	0.04	0.08

A two-fold dilute solution (9 ml) of each dye was incubated with 1 ml of bacterial suspension (10^8 CFU/ml) for 18 h at 37°C. Then, 100 μ l of this solution was mixed with Mueller-Hinton agar on a plate.

The plate was incubated for 18 h at 37°C, and the number of colonies was counted. The respective reference strains of *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (NCTC 10490) and *E. coli* (ATCC 2716) were tested.

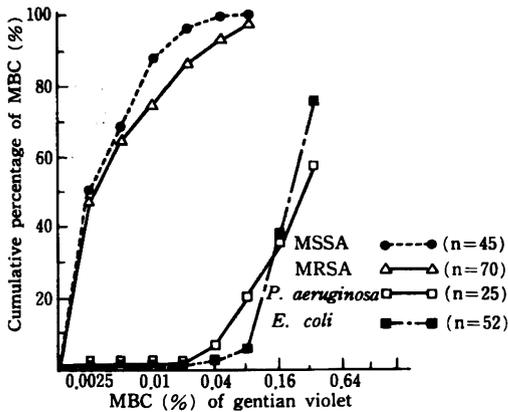


Fig. 1. The minimum bactericidal concentrations (MBCs) of gentian violet against *Staphylococcus aureus* (MRSA, MSSA), *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. A two-fold dilute solution (9 ml) of gentian violet was incubated with 1 ml of bacterial suspension (10^8 CFU/ml) for 18 h at 37°C. Then 100 μ l of this solution was mixed with Mueller-Hinton agar on a plate. The plate was incubated for 18 h at 37°C, and the number of colonies was counted. MRSA (70 strains), MSSA (45 strains), *P. aeruginosa* (25 strains) and *E. coli* (52 strains) were tested.

阻止作用の持続性に対するヒト血清添加による影響についても検討した。Table 2が示すごとく、gentian violet に対して4菌株とも異なった値を示し、そのMICは0.00032%~0.00064%を示した。また、gentian violetを最小発育阻止濃度を含み、5%のヒト血清を含有するミュラー-ヒントン寒天平板培地に4菌株を接種後、37°C、18時間の培養においても菌の発育は観察されなかったけれども、さらに培養を継続し、36時間、52時間、72時間後における菌の発育を観察したところ、MRSA-2、MRSA-16には菌の発育は認められなかったが、54時間後にMRSA-8、72時間後にMRSA-12に菌の発育が認められた。一方、povidone-iodineにおいては全被験菌株ともMICは0.5%濃度と一定値を示し、またpovidone-iodineを最小発育阻止濃度含有し、5%のヒト血清を含む培地においては、菌接種後、37°C、18時間の培養で、全被験菌株とも発育が認められた。

III. 考 察

近年、入院患者の褥瘡からのMRSA分離頻度は増加する傾向にあり、褥瘡が長引くとともにその検出頻度は著しく高まる。一方MRSA局所感染に対し、抗生物質による治療は、必ずしも満足すべき効果をあげていない。現在、抗生物質以外ではpovidone-iodineがMRSA感染病巣に消毒剤および治療剤として広く使用されている⁷⁾。我々はいくつかの色素剤が抗菌効果を持ち、深達性で、血清蛋白の存在においてもその効果の減弱が少なく、さらに収斂作用と生体組織に刺激性が少ないなどの特徴を有することに注目し、色素

Table 2. Influence of whole human serum on the anti-bacterial effect of gentian violet and povidone-iodine on MRSA

Strains (Clinical isolates)	gentian violet		povidone-iodine	
	MIC (%)	Duration (h) of MIC in the presence of serum ¹⁾	MIC (%)	Duration (h) of MIC in the presence of serum ²⁾
MRSA-2	0.00032	>72	0.5	≤18
MRSA-8	0.00064	54	0.5	≤18
MRSA-12	0.00064	72	0.5	≤18
MRSA-16	0.00032	>72	0.5	≤18

Four strains of MRSA were selected at random from clinical isolates.

A solution (1 ml) of the MIC of gentian violet and whole human inactivated serum (1 ml) were added to 18 ml of Mueller-Hinton agar on plates.

Agar plates were inoculated with 100 μ l of bacterial suspension (10^8 CFU/ml), and the plates were incubated at 37°C for 18 h, 36 h, 54 h and 72 h.

Colonies on the agar plate were counted.

¹⁾ Duration of the MIC shows that bacteria did not grow when the agar plate containing the MIC of gentian violet with serum was incubated for ≥ 54 h.

²⁾ Duration of the MIC shows that bacteria grew when the agar plate containing the MIC of povidone-iodine with serum was incubated for ≤ 18 h.

系薬剤の中から MRSA に対し局所治療剤としての効果を持つものを検索することを目的として、基礎的検討を行った。いくつかの色素剤は古くから臨床的に使用されているものの、近年その抗菌効果に関する報告は少ない。我々は過去に、あるいは現在においても臨床的に使用されている 6 種類の色素剤を選択し、褥瘡部より分離頻度の高い *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* の 3 種類の標準菌株を用いて、まずそれら色素剤の抗菌活性を検討した。その結果、acridine 系の ethacridine が *P. aeruginosa* に対しては MBC が 0.04% を示し、この色素剤に対し本菌は高い感受性を示したが、*S. aureus* は MBC が 0.32% 以上であり、この色素剤に対し感受性はきわめて低かった。3 種類の triphenylmethane 系色素剤は *S. aureus* に対し MBC が 0.0025%~0.0050% であり、これら 3 種類の色素剤に対し、いずれも *S. aureus* は高い感受性を示した。特に gentian violet は *S. aureus* に対し MBC が 0.0025% であり、全被験色素剤のうち gentian violet に対し *S. aureus* がもっとも高い感受性を示した。gentian violet は古くから塩化メチルロザニリンとして日本薬局方に記載されているが、最近の臨床分離菌に対する効果に関しては十分な検討がなされていない。

我々は臨床分離菌 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* の菌株を用いて、gentian violet の抗菌活性につき検討した。MRSA を含む *S. aureus* (115 株) は菌株間

に相違はあるものの、MBC は $\leq 0.0025\% \sim 0.08\%$ を示した。しかし *P. aeruginosa* においては、0.32% 濃度においても全被験菌株の 44% (11/25) は殺菌されず、*E. coli* においても 0.32% 濃度において、全被験菌株の 25% (13/52) は殺菌されなかった。日本薬局方⁸⁾によれば、gentian violet はグラム陽性菌、特にブドウ球菌、ジフテリア菌および緑膿菌に対して殺菌作用があるが、グラム陰性菌に対して無効であるとしている。しかし我々の *in vitro* での実験において *S. aureus* に対しては著効な殺菌作用を示すものの、*P. aeruginosa* に対してはグラム陰性菌である *E. coli* よりむしろ弱い殺菌作用しか示さず、日本薬局方の記載とは異なった結果を得た。

gentian violet が低濃度において、MRSA を含む *S. aureus* に殺菌効果を有することが明らかにされたが、次に gentian violet の抗菌効果に対するヒト血清の影響とその効果の持続性を povidone-iodine を対照に検討した。

MRSA 臨床分離菌 4 株を用いて povidone-iodine の抗菌活性を検討すると、MIC は 0.5% であり 4 株共変わらぬ値を示したが、ヒト血清を 5% の割合で加えた場合では、37°C, 18 時間培養において菌の発育が認められ、血清による抗菌効果に減弱が認められた。一方 gentian violet の MRSA の被験菌 4 株に対する MIC は、0.00032%~0.00064% と菌株により多

少異なった値を示したが、ヒト血清を5%の割合で加えた場合において、54時間継続培養後も菌の発育が認められなかったことは、gentian violet が血清存在下における抗菌効果の発揮の上でそれほど減弱せず、その効果が比較的持続することを示している。しかし72時間以上さらに培養を継続していくと、菌の発育が観察されるようになった。

一般に gentian violet は、きわめて毒性の低い消毒剤と考えられているが、0.5%~1%液で口腔内潰瘍が生じたという報告⁹⁾や0.5%~1%液で陰囊や外陰部に壊死を伴う潰瘍が生じたという報告¹⁰⁾がある。しかし1% gentian violet 水溶液を用いたパッチテストの結果、皮膚障害はほとんどないとの報告¹¹⁾もなされているが、一応その安全域濃度は、含油性軟膏で0.1%、水溶液では、皮膚で0.5%、粘膜で0.2%~0.3%である報告がされている¹²⁾。

我々は gentian violet を MRSA 感染局所(褥瘡, 熱傷)治療剤として臨床的に用いる場合には、安全域濃度より低濃度で有効であることを経験しており、また今回の実験から gentian violet の最小発育阻止濃度を含む培地にヒト血清(5%)を加えた場合においても抗菌効果が54時間持続することが明らかにされ、したがって浸出液のある MRSA 感染病巣においても、1日1回の単純塗布で十分な治療効果が発揮されるのではないと思われる。

生体消毒剤を MRSA 感染局所治療剤として用いる場合には、手指の消毒および含嗽を目的とした使用とは異なり、短時間での殺菌効果より、むしろ病巣からの浸出液で減弱されにくく、かつ持続した抗菌効果が必要であると思われる。

gentian violet は、ごく短時間での殺菌効果^{13,14)}と抗菌スペクトルの範囲¹⁵⁾においては povidone-iodine に劣るものの、MRSA は povidone-iodine¹⁶⁾より gentian violet に対し強力な感受性を示し、さらに血清存在下においても povidone-iodine より抗菌効果がより持続するように思われる。また、Moats¹⁷⁾によれば、gentian violet の *S. aureus* に対する抗菌効果はグラム陰性菌である *Salmonella anatum* あるいは *Enterobacter aerogenes* に対する抗菌効果に比べ、pH による影響を受けにくく、安定であるとしている。これらの結果は gentian violet が MRSA 局所感染治療剤としてきわめて有用な治療剤となりえることを示唆している。

謝 辞

稿を終わるにあたり、御指導御校閲を賜りました日本医科大学内科学第二講座、赫 彰郎教授に深謝いた

します。

文 献

- 1) 永武 毅, 松本慶蔵, 矢野春美, 宇塚善雄, 山本真志, 田口幹雄, 力富直人, 吉田俊昭, 降杉正和, 高橋淳, 大石和徳, 坂本 増, 屋富祖夏樹, 鈴木 寛, ムバキ・ンシアラ, 渡辺貴和雄: 老人病院における細菌性肺炎と褥瘡感染の起炎菌に関する検討(第1報)一院内感染菌としての MRSA 一。Chemotherapy 34: 240~249, 1986
- 2) 巨島文子, 増田義重, 深山牧子, 稲松孝思, 畑山勤, 柴崎公子: 褥瘡感染における MRSA の意義。感染症誌 66: 211, 1992
- 3) 抗菌薬感受性測定法検討委員会: 微量液体希釈による MIC 測定法(微量液体希釈法)。Chemotherapy 38: 103~105, 1990
- 4) 菅野治重: 細菌検査における MRSA の判定基準。最新医学 44: 2510~2514, 1989
- 5) 五島瑛智子, 金子康子: 薬剤感受性測定法。臨床検査 27: 1403, 1983
- 6) 日本化学療法学会 MIC 小委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法(改訂)。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 7) 新谷洋三: MRSA の院内感染防止対策と消毒剤。医薬ジャーナル 26: 262~283, 1990
- 8) 日本公定書協会: 塩化メチルロザニリン。第十二改正 日本薬局方解説書: 375~379, 廣川書店, 東京, 1991
- 9) Horsfield P, Logan F A, Newey J A: Oral irritation with gentian violet. Br. Med. J. 2: 529, 1976
- 10) Björnberg A, Mobacken H: Necrotic skin reaction caused by 1% gentian violet and brilliant green. Acta Derm. Venereol. (Stockholm) 52: 55~60, 1972
- 11) Dukes M N G: Dermatological drugs and cosmetics. Meyler's side effect of Drugs 11 ed: 286~296 Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 1988
- 12) 湖山里美, 高木 修, 岩崎 隆, 服部怜美, 本田光芳: ピオクタンニンによる皮膚障害-Irritant reaction from pyoktanin 一。皮膚科の臨床 17: 385~389, 1975
- 13) 小林寛伊, 都築正和, 細渕和成: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する消毒剤の効果。手術医学会誌 8: 477~480, 1987
- 14) Haley C E, Cason M M, Smith J W, Luby J P, Mackowiak P A: Bactericidal activity of antiseptic against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 21: 991~992, 1985
- 15) Larson E: Guideline for use of topical antimicrobial agents. Am. J. Infect. Control 16: 253~266, 1988
- 16) Mycock G: Meticillin/antiseptic resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 26: 949~950, 1985
- 17) Moats W A, Maddox S E: Effect of pH on the

antimicrobial activity of some triphenylmethane

dyes. *Can. J. Microbiol* 24: 658~661, 1978

Studies of the selective bactericidal effects of various dye preparations on MRSA

Sakurako Taguchi¹⁾, Mamoru Saji¹⁾, Motohide Sakisaka²⁾,
Naoaki Hayama³⁾, Eiichi Ohzono³⁾, Kiichiro Uchiyama⁴⁾,
Kenji Hoshi⁵⁾ and Hisashi Ohkuni⁶⁾

¹⁾ Pharmaceutical section and ²⁾ Clinical Laboratory Section, the First Hospital of Nippon Medical School, Tokyo, Japan

³⁾ The Second Department of Internal Medicine, ⁴⁾ The Second Department of Surgery,

⁵⁾ Department of Dermatology, and ⁶⁾ Division of Immunology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is frequently isolated from skin lesions, such as decubitus ulcers and burns. There is the possibility that MRSA spreads widely throughout a hospital via such lesions. However, local treatment with most antibiotics and antiseptics does not eradicate MRSA from infected wounds. We studied the bactericidal effects of 4 different dye series, including 6 dye preparations, against 3 different bacterial species. The dye preparations of the triphenylmethane series were more effective against *S. aureus* than those of the other series. Gentian violet, a member of the triphenylmethane series, possessed a significant bactericidal effect on MRSA isolated from clinical specimens. The minimum bactericidal concentration (MBC) of gentian violet on MRSA was between 0.0025% and 0.08%. The minimum inhibitory concentration (MIC) of gentian violet on MRSA was between 0.00032% and 0.00064%, and the MIC was uninfluenced by the addition of whole human serum (5%) to the medium. Inhibitory activity was not destroyed even by incubating gentian violet for 54 h at 37°C in medium containing serum (5%). This suggests that gentian violet may be a useful drug in the treatment of skin lesions infected with MRSA.