

## 塩化メチルロザニリン(ゲンチアナ紫)の血液由来真菌(カンジダ属, トリコスポロン属)に対する *in vitro* 抗菌作用

<sup>1)</sup> 順天堂大学医学部臨床病理学教室, <sup>2)</sup> 順天堂大学医学部附属順天堂医院臨床検査部, <sup>3)</sup> 市川市介護老人保健施設ゆうゆう,

<sup>4)</sup> 順天堂大学東京江東高齢者医療センター臨床検査科, <sup>5)</sup> 防衛医科大学校検査部

近藤 成美<sup>1)</sup> 山田 俊彦<sup>1)3)</sup> 佐藤 尚武<sup>1)4)</sup>

西園寺 克<sup>1)5)</sup> 小栗 豊子<sup>2)</sup> 猪狩 淳<sup>1)</sup>

(平成 18 年 1 月 23 日受付)

(平成 18 年 6 月 20 日受理)

Key words: methylosaniline chloride, fungus, drug susceptibility

### 要 旨

目的: 血液由来検体より分離される病原菌のうち, 黄色ブドウ球菌, 緑膿菌, カンジダが 3 大起炎菌とされる。これまで我々は, 塩化メチルロザニリンの有効性を主に MRSA を対象に報告してきた。今回はカンジダ属を中心に真菌への MIC から見た有効性の基礎的検討を行った。

対象と方法: 血液由来の *Candida albicans* 40 株, *Candida parapsilosis* 32 株, *Candida glabrata* 10 株, *Candida tropicalis* 13 株, *Candida guilliermondii* 5 株, *Candida krusei* 1 株, *Candida lusitaniae* 1 株, *Trichosporon* spp. 4 株を対象とし, 菌株に対する MIC 測定は, 塩化メチルロザニリンを加えたサブロー培地を用いた寒天平板希釈法によった。

結果: 塩化メチルロザニリンの *C. albicans* および *C. tropicalis* に対する MIC は, 全て 1 $\mu$ g/mL 以下であった。一方, *C. glabrata* に対する MIC<sub>90</sub> は 10 $\mu$ g/mL, *C. parapsilosis*, *Trichosporon* spp. に対する MIC は, 100  $\mu$ g/mL であった。

考察: 真菌とくにカンジダ属は主に表在的感染症として口内炎, 食道炎, 膣炎, おむつかぶれなどの原因菌として知られ, ときに全身感染症を来し重篤化することがある。今回, 塩化メチルロザニリンのカンジダ属に対する MIC が極めて低い濃度を示したことから, 使用にあたっての安全性のみならず臨床の有効性もさらに検討する必要がある。なお MRSA との同時検出例もしばしば報告されており, MRSA に対する塩化メチルロザニリンの MIC も極めて低値であることから, 塩化メチルロザニリンは, 院内感染対策の有効な薬剤の一つと考えられる。

[感染症誌 80: 651~655, 2006]

### はじめに

塩化メチルロザニリン (ピオクタニン, ゲンチアナ紫, クリスタル・バイオレット) は, トリフェニルメタン系色素として 1860 年代に合成され, グラム染色に用いられる青色の色素としてよく知られており, また 100 年以上にわたって抗菌薬・抗寄生虫薬としても用いられてきた<sup>1)</sup>。塩化メチルロザニリンは, グラム陽性菌および緑膿菌には殺菌的に作用するが, その他のグラム陰性菌には無効である。また, 真菌に対しては静菌的に作用し, 糞線虫や蟻虫にも有効である。こ

のため, 抗生物質誕生以前のブドウ球菌性敗血症の治療や, 真菌感染症の治療, 新生児の臍帯の消毒, 火傷の治療, さらには *Trypanosoma cruzi* 感染であるシャーガス病予防のための輸血用血液への添加<sup>2)</sup>などに, 用いられてきた。

今日にいたるまで, 外用薬としては重篤な副作用の報告はない。また, 多量の経口投与による消化器症状や経静脈投与による白血球減少などの報告はあるものの, シャーガス病の予防のために, 保存血に添加されているにもかかわらず, 大量輸血された場合も含め, これまで急性毒性の報告はない<sup>1)</sup>。

このことから, 安価で安全な抗菌薬として, WHO

別刷請求先: (〒113-8421) 東京都文京区本郷 2-1-1

順天堂大学医学部臨床病理学教室 近藤 成美

Table 1 *In vitro* susceptibilities of 106 clinical isolates of fungi to Methylrosaniline Chloride, under aerobic conditions. (35°C, 48hr)

Organism	No. tested	Cumulative % susceptible at :			
		1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL
<i>Candida albicans</i>	40	100	100	100	100
<i>C. parapsilosis</i>	32	16	47	100	100
<i>C. tropicalis</i>	13	100	100	100	100
<i>C. glabrata</i>	10	0	80	100	100
<i>C. guilliermondii</i>	5	100	100	100	100
<i>C. lusitaniae</i>	1	100	100	100	100
<i>C. krusei</i>	1	0	100	100	100
<i>Trichosporon</i> spp.	4	0	0	100	100
Total	106	60	78	100	100

(100 µg/mL = 0.01%)

の Essential Medicines<sup>3)</sup>にも記載されている。日本薬局方<sup>4)</sup>では殺菌薬として0.1~10%濃度で記載されトビヒや口内炎の治療に用いられ、2%塩化メチルロザニリン、1%中性アクリフラビン、1%プリリアントグリンの混合液である“三色素”として<sup>4)</sup>重症熱傷治療に(1960年代)、また最近では、MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)に対する強い抗菌力から、感染人工血管<sup>5)</sup>や術後の皮下膿瘍<sup>6)</sup>、褥瘡<sup>7)</sup>の治療にも用いられ、その有効性が再認識されつつある。

血液(カテーテル先端を含む)より分離される病原菌のうち、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、カンジダが3大起炎菌とされるが、これまで我々は、塩化メチルロザニリンの抗菌作用について、MRSAおよび緑膿菌を対象に報告<sup>8)~10)</sup>してきた。今回は、血液由来のカンジダ属、トリコスポロン属を対象に塩化メチルロザニリンのMICから見た有効性の基礎的検討を行ったので報告する。

#### 対象と方法

1995年6月より2004年6月の期間に、順天堂大学医学部附属順天堂医院で血液由来の臨床検体より分離された、*Candida albicans* 40株、*Candida parapsilosis* 32株、*Candida glabrata* 10株、*Candida tropicalis* 13株、*Candida guilliermondii* 5株、*Candida krusei* 1株、*Candida lusitaniae* 1株、*Trichosporon* spp. 4株、計106株を対象とした。

また、*C. albicans* ATCC34433, ATCC70028, *C. parapsilosis* ATCC22019, を対照菌株として用いた。

使用薬剤は、塩化メチルロザニリン(Crystal Violet, Merck社)を用いた。また、サブロー寒天培地(栄研)を増菌ならびに薬剤感受性測定用培地に用いた。

菌株に対するMIC(Minimum inhibitory concentration)測定は、液体培地希釈法では薬剤の色による影響を受け測定が困難であるため、寒天平板希釈法を用いた。すなわち、塩化メチルロザニリンを秤量し、滅

菌精製水で希釈系列を作成、その2mLをサブロー寒天培地に混釈し、それぞれ1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL, 500µg/mL濃度、厚さ5mmの平板を作成した(Table 1, 2)。試験菌株は35°C, 24時間培養後にMcFarland 0.5に希釈し、最終濃度10<sup>6</sup>cfu/mLに調整、マイクロプランターを用いて平板に各5µL接種した。35°C, 48時間好気培養後の菌の発育の有無を観察し、菌の発育が見られなかった最小薬剤濃度をMICと判定した。さらにダイア嫌気パック(ダイアヤトロン社)を使用し、35°C, 96時間嫌気培養し、MIC測定した。また、標準株についても同様の判定を行った。

#### 結 果

##### 1. 好気培養(48時間)[Table 1]

塩化メチルロザニリンの、*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*に対するMICは、全て1µg/mL以下であった。*C. krusei*に対するMICは10µg/mL、*C. glabrata*のMIC<sub>90</sub>は10µg/mLであった。一方、*C. parapsilosis*, *Trichosporon* spp.に対するMICは100µg/mLと、*C. albicans*に比して高いMIC値を示した。

##### 2. 嫌気培養(96時間)[Table 2]

塩化メチルロザニリンの、*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*に対するMICは、全て1µg/mL以下であった。*C. krusei*, *C. lusitaniae*に対するMICは10µg/mLであった。一方、*C. glabrata*, *C. parapsilosis*に対するMIC<sub>90</sub>は100µg/mLと、*C. albicans*に比して高いMIC値を示した。また、*Trichosporon* spp.に対するMICは500µg/mLであった。

3. なお、標準株(*C. albicans* ATCC34433, ATCC70028, *C. parapsilosis* ATCC22019)については、好気培養、嫌気培養でのMICは、いずれも1µg/mL以下であった。

#### 考 察

真菌とくにカンジダ属は主に表在的感染症として口

Table 2 *In vitro* susceptibilities of 106 clinical isolates of fungi toMethylrosaniline Chloride, under anaerobic conditions. (35°C, 96hr)

Organism	No. tested	Cumulative % susceptible at :			
		1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL
<i>Candida albicans</i>	40	100	100	100	100
<i>C. parapsilosis</i>	32	13	38	91	100
<i>C. tropicalis</i>	13	100	100	100	100
<i>C. glabrata</i>	10	0	50	90	100
<i>C. guilliermondii</i>	5	100	100	100	100
<i>C. lusitanae</i>	1	0	100	100	100
<i>C. krusei</i>	1	0	100	100	100
<i>Trichosporon spp.</i>	4	0	0	75	100
Total	106	58	73	95	100

内炎, 食道炎, 膈炎, おむつかぶれなどの原因菌として知られているが, ときに全身感染症を来し重篤化する。また, トリコスポロン属は頭部白癬など, 主に表在性感染の起炎菌として知られているが, 最近では, 白血病などの免疫不全患者における深在性真菌症の起炎菌として取り上げられるようになってきている<sup>11)</sup>。

これら深在性真菌症の感染経路としては, 消化管を介した内因性感染およびカテーテル関連感染症 (bloodstream infection) が多いとされ, とくにカンジダ属は血液培養の分離菌の中でも上位を占めている。なお, *C. albicans* 以外の Non-albicans *Candida* では表在性真菌症は稀であるが, *C. parapsilosis* などは, 血液培養分離菌の多くがカテーテル関連感染症の起炎菌と言われており, カテーテル刺入部からの感染を考慮すべきものと考えられる。このため今回は, 血液由来の検体から分離された, これらの真菌を対象として検討を行った。

抗真菌薬の MIC 測定では, 通常は液体培地を用いた希釈法が用いられる。しかし塩化メチルロザニリンについては, MIC 測定についての規定がなく, また塩化メチルロザニリンが青色の色素であり液体培地での濁度の測定が困難であることなどを考慮し, 本研究では真菌培養の標準的な培地である, サブロー培地を用いた寒天平板希釈法により, MIC 測定を行った。

本実験の MIC 成績においては, 塩化メチルロザニリンのカンジダ属とくに *C. albicans*, *C. tropicalis* に対する MIC はいずれも 1µg/mL 以下と極めて低い濃度を示した。一方, *C. glabrata* の MIC<sub>50</sub> は 10µg/mL, *C. parapsilosis* に対する MIC は 100µg/mL と, *C. albicans* や *C. tropicalis* に比して高い MIC 値を示した。しかしこれらは, いずれも日本薬局方に示される 0.1%~10% (1,000µg/mL~100,000µg/mL) 濃度よりはきわめて低値である。

また, 嫌気条件においては, 抗真菌薬 (アムホテリシン B, アゾール系抗真菌薬など) の抗菌力が著明に

減弱する<sup>12)</sup>という報告もあり, 嫌気条件での塩化メチルロザニリンの MIC 測定を行ったが, MIC の変化はわずかであった。むしろ, 塩化メチルロザニリンが, 真菌に対して静菌的に作用することを考慮すれば, 96時間嫌気培養の結果は, 48時間好気培養と, ほぼ同様の結果と考えられる。

日本薬局方では, 塩化メチルロザニリンは殺菌薬として 0.1~10% 濃度で記載されており, このため我が国では, 外用薬として 1~3% 程度の高濃度での使用が行われてきた。しかし, 1% 以上の濃度では皮膚や粘膜の障害を起こすという報告<sup>13)14)</sup>が 70年代にあり, それ以降, 日本での使用が差し控えられるようになったという経緯がある。しかしその後, おもに MRSA を対象として至適濃度についての検討が行われており<sup>15)16)</sup>, 外用薬としては 0.1% 程度が適当<sup>7)</sup>と考えられるようになってきている。また, 欧米ではすでに, 0.25%~0.5% (AHFS Drug Information)<sup>17)</sup>ないし, 0.1%~0.5% (NRF; *Neue Rezeptformularium*)<sup>18)</sup>が推奨されており, 日本薬局方の記載は再検討を要するものと考えられる。

また, 塩化メチルロザニリンはポピドンヨードと異なり, 血清存在化でも作用の減弱は認められない<sup>16)</sup>ことから, 浸出液の多い創面などに対しても安定した効果が期待できる。

さらに, 塩化メチルロザニリンの皮膚・粘膜障害は, 濃度依存性の一次刺激作用による障害がほとんどで, アレルギー性皮膚障害は稀とされ<sup>14)</sup>, しかも低濃度では上皮の再生に問題がないという報告がある<sup>1)19)</sup>。また, 色素による着色の問題についても, 0.001% 程度の低濃度では, ほとんど着色は見られない。さらには, 水溶性軟膏基剤であるマクロゴール軟膏を用いる<sup>20)</sup>などの工夫により, 水で洗い流すことも容易である。ただし, トリフェニルメタン系色素には, 動物実験で発癌性が指摘<sup>1)</sup>されているものもあり, 漫然とした長期使用は避けるべきであろう。

なお、臨床検体においては、カンジダとMRSAの同時検出例がしばしば認められるが、MRSAに対するMICも極めて低値(1 $\mu$ g/mL以下)である<sup>8)15)</sup>ことから、塩化メチルロザニリンの100 $\mu$ g/mL(0.01%)の希釈濃度による予防・治療は、MRSAおよび真菌による院内感染対策に有効ではないかと考えられる。

#### 文 献

- 1) Docampo R, Moreno SN: The Metabolism and Mode of Action of Gentian Violet. *Drug Metabolism Reviews* 1990; 22: 161—78.
- 2) Ramirez LE, Lages-Silva E, Pianetti GM, Rabelo RMC, Bordin JO, Moraes-Souza H: Prevention of transfusion-associated Chagas' disease by sterilization of *Trypanosoma cruzi*-infected blood with gentian violet, ascorbic acid, and light. *Transfusion* 1995; 35: 226—30.
- 3) Essential Medicines WHO Model List, 13<sup>th</sup> edition, 2003.
- 4) 第14回改正 日本薬局方一条文と解釈一. 廣川書店, 2001; p. 741—3.
- 5) 東 茂樹, 宮本 隆, 橋詰賢一: 胸部大動脈瘤術後の縦隔炎, 人工血管感染に対するpyoktanin洗浄の経験. *胸部外科* 2002; 55: 379—81.
- 6) 大石直樹, 武井康彦, 清田拓子, 矢部はる奈: MRSA感染創へのピオクタニンの効果. *耳鼻臨床* 2004; 97: 1021—5.
- 7) 梅本泰孝, 鳥居修平, 大口春雄, 福田慶三, 中尾 誠: MRSA局所感染創に対するピオクタニンの使用経験. *形成外科* 1995; 38: 1023—7.
- 8) 荻野 純, 村上嘉彦, 山田俊彦: 鼻前庭MRSA保菌者に対する塩化メチルロザニリンの除菌効果. *感染症誌* 1992; 66: 376—81.
- 9) 山田俊彦, 小原康治, 中村昭夫, 澤井哲夫, 平尾良雄, 中原英臣: MRSAが示す塩化メチルロザニリンに対する強い感受性. *医学のあゆみ* 2000; 192: 317—8.
- 10) 近藤成美, 山田俊彦, 佐藤尚武, 西園寺克, 小栗豊子, 猪狩 淳: 緑膿菌, MRSAに対するgentian violet(ピオクタニン)およびオキシドール(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)の短時間消毒効果. 第38回緑膿菌感染症研究会講演記録 2004, 63—5.
- 11) Pfaller MA, Diekema DJ: Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4419—31.
- 12) Dumitru R, Hornby JM, Nickerson KW: Defined Anaerobic Growth Medium for Studying *Candida albicans* Basic Biology and Resistance to Eight Antifungal Drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2350—4.
- 13) Bjornberg A, Mobacken H: Necrotic skin reactions caused by 1% gentian violet and brilliant green. *Acta Dermatovenerol* 1972; 52: 55—60.
- 14) 湖山里美, 高木 修, 岩崎 隆, 服部怜美, 本田光芳: ピオクタニンによる皮膚障害. *皮膚臨床* 1975; 17: 385—9.
- 15) 佐治 守: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 感染病巣に対する有機色素剤 gentiana violet の局所治療剤としての検討. *感染症誌* 1992; 66: 914—22.
- 16) 田口桜子, 佐治 守, 向坂元秀, 葉山修陽, 大藪英一, 内山喜一郎, 他: 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. *Chemotherapy* 1993; 41: 935—40.
- 17) AHFS Drug Information. American Society for Hospital Pharmacists: Bethesda, 1990; 2002.
- 18) Bakker P, Doorne H: Activity of gentian violet and brilliant green against some microorganisms associated with skin infections. *Pharmacology and Therapeutics* 1992; 31: 210—3.
- 19) Gloor M, Wolnicki D: Anti-Irritative Effect of Methylrosaniline Chloride (Gentian Violet). *Dermatology* 2001; 203: 325—8.
- 20) 佐藤綾子, 山本 崇, 稲富 徹: MRSA感染を伴う褥瘡に対する, ピオクタニン・ソルベース軟膏(GVS軟膏)の有用性の検討. *褥瘡会誌* 2005; 7: 132—5.

*In Vitro* Activity of Methylrosaniline Chloride (Gentian Violet) as Disinfectant Against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. Isolated from Blood Samples

Shigemi KONDO<sup>1)</sup>, Toshihiko YAMADA<sup>1)3)</sup>, Naotake SATOH<sup>1)4)</sup>,  
Katsu SAIONJI<sup>1)5)</sup>, Toyoko OGURI<sup>2)</sup> & Jun IGARI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Pathology, Juntendo University School of Medicine,

<sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory, Juntendo University Hospital,

<sup>3)</sup>Ichikawa City, Health Service Facility for the Aged,

<sup>4)</sup>Department of Clinical Laboratory, Juntendo Koto Geriatric Medical Center,

<sup>5)</sup>Department of Laboratory Medicine, National Defense Medical College

Objective: Methylrosaniline Chloride (MRC) is recognized as a disinfectant, but recently is rarely used in the clinic, because of its cytotoxicity when used continuously with conventional concentrations (1% MRC). We have reported the antibacterial activity of MRC with lower concentration against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In this study, we evaluated the antifungal activity of MRC with lower concentrations.

Material and Methods: Antifungal activities of MRC against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. were tested. All strains tested were isolated from 106 blood or intravenous catheter samples at Juntendo University Hospital from 1995 to 2004. Minimum inhibitory concentrations against fungi were assayed by agar dilution, under both aerobic and anaerobic conditions.

Results: A 0.01% or less concentration of MRC solutions showed marked antifungal activity against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. under aerobic or anaerobic conditions.

Conclusion: A 0.01% or less concentration of MRC should be reevaluated for the control of fungal infection and MRSA infection control.