研 究

薬剤耐性菌に対するブロー液抗菌効果の基礎的検討

兵 行義¹⁾²⁾・山田 作夫²⁾³⁾・石松 昌己⁴⁾・原田 保¹⁾

Fundamental Study of the Antibacterial Effect of Burow's Solution on Antibiotic Resistant Bacterial Isolates

Yukiyoshi Hyo, Masaki Ishimatsu and Tamotsu Harada

(Kawasaki Medical School)

Sakuo Yamada

(Kawasaki Medical School, Kawasaki University of Medical Welfare)

Burow's solution has long been used as a local otological preparation in the treatment of otitis externa and otitis media.

To ascertain the antibacterial effect of Burow's solution on antibiotic resistant bacteria, it was examined using the disk method to determine whether the solution has a bactericidal effect and/or a bacteriostatic effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the patients. In addition, we examined the effectiveness of diluted Burow's solution on these isolates.

The results showed that Burow's solution had larger average zones of inhibition than the other two antibacterial agents, levofloxacin and povidone-iodine. There was a difference in the susceptibilities of the antibiotic-sensitive bacteria and antibiotic-resistant bacteria to Burow's solution. The effective bactericidal dilutions of Burow's solution were found to be a 1:2 dilution and a 1:4 dilution for MRSA and antibiotics-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, respectively.

This study suggests that Burow's solution is an effective antibacterial agent, not only for antibiotic resistant bacteria but also for antibiotic-sensitive bacteria. Therefore, Burow's solution is considered to be useful for the treatment of otitis. The antibacterial effective dilution of Burow's solution depends on the bacterial species. Further study is required to demonstrate whether diluted Burow's solution is effective in a clinical setting.

Key words : antibacterial effect, Burow's solution, otological preparation, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

はじめに

ブロー液は、19 世紀にドイツの医師 Karl August von Burow (1804 ~ 1874) によりはじめて使用された 13% 酢

酸アルミニウム溶液で、近年 Thorp ら¹⁾ により慢性中耳炎 56 症例に使用して 81% の耳漏が治癒したとの報告がなされたのをはじめ、本邦では寺山ら²⁾ によって難治性

1) 川崎医科大学耳鼻咽喉科

3) 川崎医療福祉大学臨床栄養学科

2) 川崎医科大学微生物学

4) 川崎医科大学附属病院中央検査部微生物検査室

外耳炎や中耳手術術後症の治療薬として好成績が発表され、現在臨床の現場で頻繁に用いられるようになった抗菌性薬剤である。

耳鼻咽喉科領域においても薬剤耐性細菌の出現は深刻³⁾であり、黄色ブドウ球菌では MRSA⁴⁾ (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) や緑膿菌においてもメタロ β ラクターマーゼ産生菌 (MBL)⁵⁾ や MDRP⁶⁾ (Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*) など難治性外耳炎などの原因菌として問題になることが多い。このような耐性菌には有効な薬剤も少なく治療に難渋することから、臨床上大きな問題になっていることは周知の通りである。

本研究では、薬剤耐性菌に対するブロー液の有効性、さらに希釈したブロー液の有効性について検討したので報告する。

対象と方法

1. 材料

本学附属病院中央検査部から譲渡された臨床由来の黄色ブドウ球菌 20 菌株 (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: MSSA10 菌株, MRSA10 菌株) および緑膿菌 20 菌株 (感受性菌 10 菌株, 薬剤耐性菌 10 菌株) を対象とした。微量液体希釈法にて得られた各菌株に対する各種抗菌薬の MIC (minimum inhibitory concentration) を表 1, 2 に示す。

2. 薬剤

本学附属病院薬剤部で寺山ら²⁾ の報告 (表 3) に従って調整した 13%ブロー液 (pH2.9) を用いた。同時に对照薬剤として、10%ポピドンヨード (PVP-I) およびレボフロキサシン点眼液 (LVFX) を用い、さらにブロー液を蒸留水で希釈し、1/2 希釈液 (pH3.4), 1/4 希釈液 (pH3.6), 1/8 希釈液 (pH3.8) を作製し実験に供した。

3. 方法

各菌液を Mueller-Hinton 平板培地上に全面にいきわたるように一白金量を塗布し、各薬剤を 50 μ l 含有した滅菌ディスク (8 mm, アドバンテック東洋社製) を置き、

表 1 黄色ブドウ球菌 20 菌株の由来および抗菌薬感受性 (MIC; 上段: メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA), 下段: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA))

	材料	MPIPC	CEZ	EM	LVFX	GM	VCM
MSKN	咽頭	2	<1	<1	<1	<1	<2
MS908	喀痰	<0.25	<1	<1	<1	<1	<2
MS913	喀痰	<0.25	<1	<1	<1	<1	<2
MS915	膿	<0.25	<1	<1	<1	<1	<2
MS916	耳漏	<0.25	<1	<1	<1	<1	<2
MS922	ガーゼ	<0.25	<1	<1	<1	<1	<2
MS923	血液	<0.25	<1	<1	<1	<1	<2
MS927	咽頭	<0.25	<1	<1	<1	<1	<2
MS929	ガーゼ	<0.25	<1	<1	<1	<1	<2
MS1030	浸出液	<0.25	<1	<1	<1	<1	<2
	材料	MPIPC	CEZ	EM	LVFX	GM	VCM
MAR908	喀痰	>2	>8	>4	<1	>8	$\leq$ 2
MR904	喀痰	>2	>8	>4	>4	>8	$\leq$ 2
MR912	血液	>2	>8	>4	>4	$\leq$ 1	$\leq$ 2
MR913	喀痰	>2	>8	>4	>4	>8	$\leq$ 2
MR914	喀痰	>2	>8	>4	>4	>8	$\leq$ 2
MR915	尿	>2	>8	>4	>4	>8	$\leq$ 2
MR919	ガーゼ	>2	>8	>4	>4	$\leq$ 1	$\leq$ 2
MR921	喀痰	>2	>8	>4	>4	$\leq$ 1	$\leq$ 2
MRFT	ガーゼ	>2	>8	>4	>4	>8	$\leq$ 2
MRKU	浸出液	>2	>8	0.25	>4	$\leq$ 1	$\leq$ 2

μ g/mL

表2 緑膿菌 20 菌株の由来および抗菌薬感受性 (MIC; 上段: 感受性緑膿菌, 下段: 耐性緑膿菌)

材料名	CZOP	CAZ	IPM	MEPM	AZT	AMK	GM	LVFX	CPFX
PA1 喀痰	≤2	≤2	>8	4	4	8	4	≤0.5	≤0.5
PA2 尿	≤2	≤2	≤1	≤1	4	8	4	≤0.5	≤0.5
PA3 ガーゼ	≤2	≤2	≤1	≤1	4	8	8	≤0.5	≤0.5
PA4 膿	≤2	4	4	4	4	≤4	4	≤0.5	≤0.5
PA5 喀痰 (膿性)	≤2	≤2	4	2	4	≤4	2	≤0.5	≤0.5
PA6 咽頭	≤2	≤2	≤1	4	8	≤4	4	≤0.5	≤0.5
PA7 喀痰 (膿性)	≤2	≤2	≤1	≤1	4	≤4	≤1	≤0.5	≤0.5
PA8 喀痰 (膿性)	16	8	>8	>8	>16	16	8	4	≤0.5
PA9 ガーゼ	≤2	4	≤1	≤1	4	≤4	2	≤0.5	≤0.5
PA10 喀痰 (膿性)	≤2	≤2	≤1	≤1	≤2	8	4	≤0.5	≤0.5
材料名	CZOP	CAZ	IPM	MEPM	AZT	AMK	GM	LVFX	CPFX
PR11 カテーテル先端	>16	>16	2	8	≤2	>32	>8	≤0.5	≤0.5
PR12 カテーテル先端	>16	>16	>8	>8	≤2	>32	>8	≤0.5	≤0.5
PR13 膿	>16	>16	2	2	≤2	>32	>8	≤0.5	2
PR14 喀痰 (膿性)	>16	>16	≤1	8	≤2	>32	>8	≤0.5	>2
PR15 尿	>16	>16	>8	>8	16	>32	>8	>4	>2
PR16 尿	>16	>16	>8	>8	>16	>32	>8	>4	>2
PR17 尿	>16	>16	>8	>8	>16	>32	>8	>4	>2
PR18 尿	>16	>16	>8	>8	>16	>32	>8	>4	>2
PR19 尿	>16	>16	>8	>8	8	>32	>8	>4	>2
PR20 カテーテル先端	>16	>16	>8	>8	>16	>32	>8	>4	>2

μg/mL

表3 ブロー液作製法²⁾

- 1) 無水硫酸アルミニウム 22.5 g をガーゼで包み、一昼夜かけて精製水 65 ml に溶出させる。これをさらに濾過し、ろ液に精製水を加え全量 65 ml とする。
- 2) 炭酸カルシウム 10 g を乳鉢上で精製水 10 ml にて研和する。
- 3) 2) を攪拌しながら 1) を徐々に加える。
- 4) 3) に酢酸 25 ml を加え、ときどき攪拌しながら 2 日間放置する。
- 5) 発泡が停止したのを確認し、上澄み液を濾過する。ろ液に酒石酸 4.5 g を加える。

37°C で 18 時間以上培養後、得られた阻止円の大きさを下記の判定基準に基づいて測定した。それぞれの菌株につき 10 菌株に対しディスク法を遂行し、得られた結果を集計した。

判定基準

黄色ブドウ球菌標準株 209 P を用いて得られた阻止円の例を図1に示す。ディスクのすぐ周辺に生じた透明ゾーン (A) さらに A ゾーンの周囲に生じた半透明なゾーン

図1 判定基準 (A: 殺菌効果 B: 静菌効果)

ディスクの周囲に二層性の阻止円ができ、細菌の増殖がまったく認められない A ゾーンを殺菌ゾーン、細菌の増殖を抑制している B ゾーンを静菌ゾーンと判定した。

(B) の二層性の阻止円が生じた。そこで A ゾーンから一白金耳を採り、新たな培地で 18 時間培養したところ、黄色ブドウ球菌は増殖せず、B ゾーンから得られた材料を

同様に培養したところ, 黄色ブドウ球菌の増殖が認められた. そのため A ゾーンは殺菌効果を示す領域とし, B ゾーンを細菌の増殖が抑制された静菌効果を示す領域として阻止円を測定した.

結 果

1. 黄色ブドウ球菌に対する 3 薬剤の効果

図 2 に示すように MSSA に対しブロー液は静菌効果: 24.3 mm, 殺菌効果: 13.7 mm, PVP-I は静菌効果: 18.1 mm, 殺菌効果: 13.9 mm, LVFX は静菌効果: 33.6 mm, 殺菌効果: 17.0 mm を示し (図 2), MSSA に対して LVFX が最も有効であったが, ブロー液と PVP-I とは同程度の殺菌効果を示し, 静菌効果では PVP-I よりもブロー液が有効であることが認められた.

また MRSA に対し, ブロー液は静菌効果: 25.9 mm, 殺菌効果: 13.8 mm, PVP-I は静菌効果: 13.5 mm, 殺菌効果: 9.1 mm, LVFX は静菌効果: 17.7 mm, 殺菌効果: 9.2 mm を示した (図 3). MRSA に対しては PVP-I ならび LVFX は有効性が低かったのに比べ, ブロー液は 3 剤のなかで最も有効であることが判明した.

MSSA および MRSA に対するブロー液の静菌効果ならびに殺菌効果を示す阻止円の大きさは同程度であり, ブロー液は MRSA に対し MSSA と同程度に有効であることが判明した.

2. 緑膿菌に対する 3 薬剤の効果

図 2 3 薬剤間における抗 MSSA 効果の比較

MSSA に対し LVFX が最も有効であった. 13%ブロー液は静菌効果は PVP-I よりも有効であり, 殺菌効果では同程度有効であった. ブロー液との有意差検定: * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (t 検定)

薬剤感受性緑膿菌に対して, ブロー液は静菌効果: 24.8 mm, 殺菌効果: 22.0 mm, PVP-I は静菌効果: 11.8 mm, 殺菌効果: 11.8 mm, LVFX は静菌効果: 40.3 mm, 殺菌効果: 32.1 mm を示し (図 4), LVFX が殺菌効果・静菌効果とも最も有効で, 次いでブロー液, PVP-I の順に有効であった.

また薬剤耐性緑膿菌に対して, ブロー液は静菌効果: 33.3 mm, 殺菌効果: 27.8 mm, PVP-I は静菌効果: 13.6 mm, 殺菌効果: 13.6 mm, LVFX は静菌効果: 17.8 mm, 殺菌効果: 17.6 mm であった (図 5). このように PVP-I

図 3 3 薬剤間における抗 MRSA 効果の比較

MRSA に対しブロー液が他の 2 剤よりも静菌・殺菌効果が高かった. ブロー液との有意差検定: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (t 検定)

図 4 3 薬剤間における抗感受性緑膿菌効果の比較

感受性緑膿菌に対しては LVFX が最も有効であった. しかしブロー液は PVP-I よりも静菌・殺菌効果が高かった. ブロー液との有意差検定: * $p < 0.001$ (t 検定)

図5 3薬剤間における抗耐性緑膿菌効果の比較

耐性緑膿菌に対し LVFX や PVP-I に比べブロー液が最も有効であった。ブロー液との有意差検定：* $p < 0.001$ (t 検定)

図7 耐性緑膿菌に対する希釈ブロー液の効果

緑膿菌に対し 1/4 希釈液まで十分な殺菌効果が期待できることが判明した。ブロー液原液との有意差検定：* $p < 0.001$ (t 検定)

図6 MRSA に対する希釈ブロー液の効果

1/4 希釈液では殺菌効果がなく、1/2 希釈液まで殺菌効果のあることが確かめられた。ブロー液原液との有意差検定：* $p < 0.001$ (t 検定)

と LVFX の薬剤耐性緑膿菌に対する殺菌・静菌効果はともに低く、ブロー液が耐性緑膿菌に有効であることが判明した。したがって緑膿菌においてもブロー液は耐性菌ならびに感受性菌に対して同等の殺菌・静菌効果を有することが認められた。

3. 希釈ブロー液の殺菌・静菌効果に関する検討

1/2 ～ 1/8 までに倍数希釈したブロー液の MRSA に対する静菌・殺菌効果を同様にディスク法で検索した結果、静菌効果についてみると 1/8 希釈でも若干効果はあるも

の、殺菌効果については 1/4 希釈液での阻止円は MRSA では 8.5 mm を示し、1/4 希釈液は MRSA にほとんど効果のないことが判明した (図 6)。したがって MRSA に対しては 1/2 希釈液は殺菌効果が期待できることが示唆された。

一方、図 7 に示したように薬剤耐性緑膿菌に対しては MRSA と異なり、1/8 希釈液でも静菌効果は残存しており、1/4 希釈液は耐性緑膿菌には 15.1 mm の殺菌阻止円を呈し、1/4 希釈液でも殺菌効果のあることが判明した。

考 察

薬剤耐性菌は臨床でさまざまな領域において遭遇し、治療に難渋することが多く、新たな治療戦略が必要となる。そのため今回薬剤耐性菌に対する新たな治療戦略の一つとして用いられているブロー液の有用性を細菌学的に検討した。耳科疾患においては糖尿病などの易感染性の患者が MRSA や緑膿菌による耳漏で難渋することが多いことから両菌種を対象菌種として選択した。入院患者、外来患者を問わず得られた菌株から、微量液体希釈法によりオキサシリン耐性と判断された黄色ブドウ球菌を MRSA とした。一方、薬剤耐性緑膿菌はカルバペネム系薬のイミペネム、ニューキノロン系のシプロフロキサシンならびにアミノグリコシド系のアミカシンの 3 剤に耐性を示す MDRP⁶⁾ が今回用いた 10 菌株中 6 菌株含まれていた。MDRP に対する治療は現在非常に難渋しており、

抗緑膿菌活性を有する抗菌剤の併用療法が試みられ⁷⁾たり, さらに未承認のコリスチン (ポリミキシン E) の使用が期待されている⁸⁾。

ブロー液は 19 世紀に酢酸アルミニウムとして誕生した⁹⁾。近年 2000 年に Thorp ら¹⁾ が, 2003 年に寺山ら²⁾ が著効を示す症例を報告して以来, 本邦では臨床の場で頻用されるようになり, ブロー液の臨床的効果についてしだいに報告されるようになってきている^{10)~12)}。

今回の検討においてブロー液は静菌効果と殺菌効果の双方を持つことが明らかになった。上記臨床的報告の中で, 数日間で治癒するものと週 2, 3 回使用することにより徐々に改善しているものが存在している。前者は殺菌効果により治癒したもの, 後者は静菌効果により徐々に改善していったものが考えられる。臨床的検討と本研究が合致しているものと考ええる。

しかしながら, 上記の報告では臨床上耳漏や難治性湿疹が改善したことを治癒判定基準としている場合が多く, ブロー液の作用メカニズムについてはいまだに明らかにされていないことから, 細菌学的な検討が展開され始めている。Thorp ら¹³⁾ はブロー液および酢酸液 (1 ~ 3%) の効果をディスク法を用いて比較検討し, ブロー液がより有効であることを報告した。また Kashiwamura ら¹⁴⁾ は 1%PVP-I および生理食塩水を対照にブロー液の時間経過による殺菌効果への影響について報告している。石橋ら¹⁵⁾ は迅速調整法により作製された 1.7%アルミニウム液がブロー液と安定性の点で相違がないことを報告した。本研究では臨床で頻用されている抗菌剤ならびに消毒剤を対照薬剤としてブロー液と比較検討し, その結果, 感受性菌には LVFX がより有効であったが, 薬剤耐性菌にはブロー液が有効であることを明らかにした (図 3, 5)。さらに希釈ブロー液の殺菌効果を検討した結果, 黄色ブドウ球菌に対して 1/2 希釈液で, 緑膿菌に対しては 1/4 希釈液でも耐性菌株, 感受性菌株を問わず有効であることが判明した (図 6, 7)。すでに Thorp らは¹⁶⁾ 黄色ブドウ球菌, 肺炎球菌, 化膿性連鎖球菌, 緑膿菌, インフルエンザ菌に対し, 13%ブロー液の希釈効果について寒天平板希釈法を用いて検討し, 黄色ブドウ球菌や緑膿菌に対して 1/80 希釈でも有効と報告しているが, 今回われわれのディスク法によって得られた結果ではさらに臨床的に有効な希釈濃度が示されたものと考えられる。

一方, ブロー液の副作用として内耳毒性の有無が議論

されている。Ikeda ら¹⁷⁾ は 2%, pH2 の酢酸液では耳毒性があるが, 4%, pH4 では毒性がないことを報告した。今回, われわれが用いたブロー液は原液では pH2.9 を示し, 4 倍希釈により約 pH4 に上昇し, 希釈液使用により耳毒性の軽減が期待できることが示唆された。また黄色ブドウ球菌に対して 1/2 希釈液, 緑膿菌に対しては 1/4 希釈液でも殺菌的に有効なことが本研究により実証されたことから, 副作用の点からもこれら希釈ブロー液の使用が推奨されるべきであり, 今後希釈ブロー液の臨床上の効果について検索したいと考えている。さらに菌種間で希釈液の有効性が異なる結果が得られたことから, 耳科感染症を引き起こす黄色ブドウ球菌や緑膿菌以外の菌種についても検討する予定である。

ま と め

今回われわれは薬剤耐性黄色ブドウ球菌および緑膿菌に対するブロー液の殺菌・静菌効果を検討したところ, 抗菌薬耐性菌にも静菌作用とともに殺菌効果があることが実証された。また希釈ブロー液でも両菌種に有用であることが確認でき, その有用性は菌種間で異なることが認められた。今後希釈ブロー液の臨床的有用性について検討する予定である。

謝 辞

本研究を施行するに当たり, ブロー液の作製の労をお取りくださった本院薬剤部清水寛治先生, また菌株提供にご尽力いただいた本学中央検査部微生物検査室河川豊先生ならびに微生物検査室関係者, また実験遂行にあたって補助をいただいた川崎医科大学微生物学大森幸代研究補助員, 川崎医療福祉大学臨床栄養学科山田実香・荒沢綾子両女史に深謝いたします。

本論文の要旨は第18回岡山耳鼻咽喉科感染症治療研究会にて発表した。

参考文献

- 1) Thorp MA, Gardiner IB and Prescott CA : Burow's solution in the treatment of active mucosal chronic suppurative otitis media: determining an effective dilution. *J Laryngol Otol* 114 : 432 ~ 436, 2000.
- 2) 寺山吉彦, 滝沢昌彦, 後藤田裕之, 他 : 難治性の外耳道および中耳の化膿性炎に対するブロー液の使用経験. *日耳鼻会報* 106 : 28 ~ 33, 2003.
- 3) Suzuki K, Nishimura T and Baba S : Current status of bacterial resistance in the otolaryngology field: results from the Second Nationwide Survey in Japan. *J infect chemother* 9 : 46 ~ 52,

- 2003.
- 4) 菅井基行, 小松澤均 : MRSA, VISA, VRSA. 化療の領域 21 : 1275 ~ 1281, 2005.
 - 5) 井田孝志 : 緑膿菌におけるメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の最近の動向. 化療の領域 21 : 227 ~ 233, 2005.
 - 6) 松本哲郎 : 薬剤耐性緑膿菌による尿路感染の治療戦略. 化療の領域 23 : 247 ~ 252, 2007.
 - 7) Yamada S, Hyo Y, Ohmori S, et al. : Role of ciprofloxacin in its synergistic effect with fosfomycin on drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Chemotherapy 53 : 202 ~ 209, 2007.
 - 8) 館田一博 : 多剤耐性緑膿菌に対する新しい治療戦略—ブレイクポイント・チェッカーボード法からコリスチンの臨床効果まで—. 化療の領域 23 : 259 ~ 264, 2007.
 - 9) 寺山吉彦 : ブロー液の不思議. 耳鼻・頭頸外科 76 : 622 ~ 623, 2004.
 - 10) 酒井 昇 : 難知性慢性耳漏に対する一治療法の試み. 耳鼻と臨 51 : 11 ~ 15, 2005.
 - 11) 榎本仁司 : 難知性の外耳道炎・鼓膜炎の検出菌種と点字薬としてのブロー液 (酢酸アルミニウム液) の治療効果について—優れた有効性とその製法—. 耳鼻展望 48 : 246 ~ 252, 2005.
 - 12) Shimizu T, Ishinaga H, Seno S, et al. : Malignant external otitis: treatment with prolonged usage of antibiotics and Burow's solution. Auris Nasus Larynx 32 : 403 ~ 406, 2005.
 - 13) Thorp MA, Kruger J, Oliver S, et al. : The antibacterial activity of acetic acid and Burow's solution as topical otological preparations. J Laryngol Otol 112 : 925 ~ 928, 1998.
 - 14) Kashiwamura M, Chida E, Matsumura M, et al. : The efficacy of Burow's solution as an ear preparation for the treatment of chronic ear infections. Otol Neurotol 25 : 9 ~ 13, 2004.
 - 15) 石橋祐子, 村上照夫, 湯元良子, 他 : 院内製剤ブロー氏液 (酢酸アルミニウム溶液) の製剤学的, 薬理学的評価, 迅速調整法の開発. 薬誌 124 : 833 ~ 840, 2004.
 - 16) Thorp MA, Oliver SP, Kruger J, et al. : Determination of the lowest dilution of aluminium acetate solution able to inhibit in vitro growth of organisms commonly found in chronic suppurative otitis media. J Laryngol Otol 114 : 830 ~ 831, 2000.
 - 17) Ikeda K and Morizono T : The preparation of acetic acid for use in otic drops and its effect on endocochlear potential and pH in inner ear fluid. Am J Otolaryngol 10 : 382 ~ 385, 1989.
-
- 原稿受付 : 平成19年 9 月 4 日
原稿採択 : 平成19年11月 1 日
別刷請求先 : 兵 行義
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学耳鼻咽喉科