[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
一般論文
19(4) 265 - 269 (1993)]

点眼・点耳・点鼻薬に配合されている防腐剤のメチシリン耐性
黄色ブドウ球菌に対する防腐効果について

早崎孝則^{†1}, 森 健^{†1}, 植村 攻^{†2}, 吉田和夫^{†2}

愛知医科大学附属病院薬剤部^{†1}

参天製薬株式会社品質管理室^{†2}

Antiseptic Effects of Antiseptics Compounded in Medicines
for Eyes, Ears and Nose against MRSA and *S. aureus*

TAKANORI HAYAZAKI^{†1}, TAKESHI MORI^{†1},

OSAMU UEMURA^{†2}, KAZUO YOSHIDA^{†2}

Department of Pharmacy, Aichi Medical University^{†1}

Quality Control Department, Santen Pharmaceutical Co., Ltd.^{†2}

(Received January 27, 1993)
(Accepted March 9, 1993)

A comparative study on the antiseptic effects of external medicines for eyes, ears, and nose was conducted using clinically isolated methicillin-resistant *S. aphyllococcus aureus* (MRSA) and *staphylococcus aureus* ATCC No.6538 (*S. aureus*), one of the index bacteria employed in antiseptic tests. The efficacies of these external medicines against MRSA and *S. aureus* mainly depend on the antiseptics compounded in them. The effects of medicines incorporating benzalkonium chloride (BAC) against MRSA were not significantly different from those against *S. aureus*; neither MRSA nor *S. aureus* grew much within 6 hours after inoculation. The results obtained 6 hours after the inoculation by the use of medicines with chlorobutanol (CB), those with than admixture of paraoxylbenzonates (AP) such as methylparaben (MP) and propylparaben (PP), those with a mixture of MP and CB, and those with a mixture of AP and CB were 58 to 71% for MRSA and 63 to 78% for *S. aureus*. The bacteria were completely eliminated 7 days later. Their efficacies against MRSA, however, were slightly weaker than those against *S. aureus*. The minimum inhibitory concentration values of eye drops were measured; the values of BAC against MRSA were slightly higher than those of *S. aureus*. No significant differences, however, were observed between the AP and CB values.

Keywords—antiseptic; MRSA; *S. aureus*; eye drops; otic solution; nasal solution

緒 言

^{†1} 愛知県愛知郡長久手町岩作21; 21, Yazako, Naga-kute-cho, Aichi-gun, Aichi, 480-11 Japan

^{†2} 大阪市東淀川区下新庄3-9-19; 3-9-19, Shimo-shinjo, Higashi Yodogawa-ku, Osaka, 533 Japan

点眼・点耳・点鼻薬（以下、点眼薬等）には使用中の二次汚染¹⁾に対処するために種々の防腐剤が配合されているが、防腐剤の選択には石関の方

法²⁾や U.S. Pharmacopeia National Formulary の防腐効果試験³⁾ が用いられ、指標菌である *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* および *Aspergillus niger* に対する効果から防腐剤の配合を決定している。

著者らは既に愛知医科大学附属病院の臨床材料から得た Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (以下, MRSA), *Serratia marcescens* などの院内感染惹起菌種に関する各種消毒剤の殺菌効果についての検討を行い, MRSA は 0.5w/v %のグルコン酸クロルヘキシジンに対して強い抵抗性を示すが, 塩化ベンザルコニウム (以下, BAC), ポビドンヨード, 塩酸アルキルジアミノエチルグリシンには低濃度でも顕著な感受性のあることを報告した⁴⁾。

近年 MRSA は眼科および耳鼻科領域でも感染原因菌としての分離頻度が増加している傾向にあることから⁵⁻⁷⁾, 著者らは MRSA と指標菌の一つである *Staphylococcus aureus* ATCC No. 6538 (以下, *S. aureus*) を用いて繁用している点眼薬等に配合されている各種防腐剤の防腐効果を比較し, 若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料

1) 使用点眼薬等

BAC 配合製品としてインター点鼻液 (Lot. AEK431B; 藤沢薬品, 0.1mg/ml 含有) およびサンコバ点眼液 (Lot. SK665; 参天製薬, 0.1mg/ml 含有), クロロブタノール (以下, CB) 配合製品としてジクロード点眼液 (Lot. 1226; わかもと製薬, 5mg/ml 含有), パラオキシン安息香酸メチル (以下, MP) とパラオキシン安息香酸プロピル (以下, PP) の配合 (以下, AP) 製品としてリンデロン液 (Lot. 2018; 塩野義製薬, MP 0.5mg, PP 2mg/ml), MP と CB の配合製品としてカタリン K 点眼用 (顆粒: Lot. R069, 溶解液: Lot. A091; 千寿製薬, MP 0.1mg, CB 2mg/ml) 溶液, AP と CB の 3 種配合点眼製品としてサンピロ 1% (Lot. 1SN280; 参天製薬, MP 0.26mg,

PP 0.14mg, CB 2mg/ml) の 6 医薬品を用いた。

2) 最小発育阻止濃度 (以下, MIC) 測定のための使用防腐剤

BAC (参天製薬製), MP と PP (和光純薬特級) 及び CB (メルク社) の 4 例の各種濃度のもを用いた (表 3 参照)。

3) 使用菌株及び感受性テスト

MRSA は (財) 阪大微生物病研究会から臨床分離株 (尿由来) の分与を受け, *S. aureus* (ATCC No. 6538) 菌は (財) 発酵研究所より購入した。MRSA 株の薬剤感受性は ATB システムのグラム陽性感受性テスト (以下, JRG+プレート: api 社) を用いて行った。

4) 使用培地

(1) 防腐効果試験用

増菌用培地は SCD 培地 (日本製薬), 生菌数測定用培地は SCDLP 寒天培地 (日本製薬: 防腐剤の不活化剤として 0.7% トウイン 80 および 0.1% レシチンを含む) を用いた。

(2) MIC 値測定用

寒天平板希釈法の培地は感受性測定用の変法ミューラー・ヒントン寒天培地 (ニッスイ) を用いた。

2. 実験方法

1) 点眼薬等の防腐効果の測定

防腐効果試験は USP の Preservatives effectiness³⁾ に準じて行った。

(1) 試験菌の調製

SCD 培地に菌を接種して 37°C, 18 時間振とう培養した後, 滅菌生理食塩液で約 10⁷cfu/ml に希釈し, 試験菌液とした。

(2) 生菌数の測定

100ml の点眼薬等に試験菌液 1ml を接種し, 20°C で 0, 6, 24, 72 時間および 1, 2 週間保存した後, 平板混釈法⁸⁾ によって SCDLP 寒天培地で 37°C, 24~48 時間培養して点眼薬等中の生菌数を 3 回測定した。

2) MRSA と *S. aureus* の防腐剤に対する MIC の測定

日本化学療法学会標準法⁹⁾ に準じ, 変法ミューラー・ヒントン寒天培地を用いた平板希釈法によっ

て MRSA と *S. aureus* の各種濃度防腐剤に対する MIC 値を接種菌量約 10^6 cfu/ml, 37°C で 18 時間培養した後, 測定した.

実 験 結 果

1. MRSA の薬剤感受性

試験に用いた MRSA 株は表 1 に示したように JR G + プレート中の各薬剤のほとんどに対して

耐性を示し, オキサシリンナトリウムに対しては $1.080\mu\text{g/ml}$ 濃度でも耐性を示した.

2. 点眼薬等の MRSA 及び *S. aureus* に対する防腐効果

製品毎の 20°C での 6, 24, 72 時間及び 1, 2 週間保存後の接種菌の減少率を表 2 に示した.

BAC 配合製品のインター点鼻液は接種 6 時間後において MRSA と *S. aureus* に対し, 99.7%

表 1. MRSA の JR G + プレートによる薬剤感受性試験

薬 剤	低 濃 度 (結果)	高 濃 度 (結果)
ペニシリン G	$0.016\mu\text{g} : (+)$	$1.080\mu\text{g} : (+)$
オキサシリンナトリウム	$0.27\mu\text{g} : (+)$	$1.080\mu\text{g} : (+)$
アンピシリン	$0.54\mu\text{g} : (+)$	$2.16\mu\text{g} : (+)$
クラバン酸カリウム・ アモキシシリン	$1.08\mu\text{g} : (+)$	$4.32\mu\text{g} : (-)$
セファロチンナトリウム	$1.080\mu\text{g} : (+)$	$2.160\mu\text{g} : (+)$
セファゾリンナトリウム	$1.08\mu\text{g} : (+)$	$4.32\mu\text{g} : (+)$
セフメタゾールナトリウム	$0.54\mu\text{g} : (+)$	$2.16\mu\text{g} : (+)$
ラタモキシセフナトリウム	$1.08\mu\text{g} : (+)$	$8.64\mu\text{g} : (+)$
硫酸ゲンタマイシン	$0.54\mu\text{g} : (+)$	$1.08\mu\text{g} : (+)$
エリスロマイシン	$0.27\mu\text{g} : (+)$	$1.08\mu\text{g} : (+)$
塩酸クリンダマイシン	$0.135\mu\text{g} : (+)$	$0.27\mu\text{g} : (+)$
塩酸ミノサイクリン	$0.54\mu\text{g} : (-)$	$2.16\mu\text{g} : (-)$
オフロキサシン	$0.135\mu\text{g} : (+)$	$0.540\mu\text{g} : (+)$

(+) : 耐性

(-) : 感受性

表 2. 製品別の保存期間における防腐効果 (20°C 保存下の接種菌減少率 : %)

製 品	接 種 菌	6 時間後	24 時間後	72 時間後	1 週間後	2 週間後
インター点鼻液 (BAC 0.1mg/ml 含有)	MRSA	99.7	発育せず	発育せず	発育せず	発育せず
	<i>S. aureus</i>	99.9	発育せず	発育せず	発育せず	発育せず
サンコバ点眼液 (BAC 0.1mg/ml 含有)	MRSA	発育せず	発育せず	発育せず	発育せず	発育せず
	<i>S. aureus</i>	発育せず	発育せず	発育せず	発育せず	発育せず
ジクロード点眼液 (CB 5mg/ml 含有)	MRSA	58.3	72.9	96.0	発育せず	発育せず
	<i>S. aureus</i>	63.7	78.3	98.5	発育せず	発育せず
リンデロン液 (MP 0.5mg/ml, PP 2mg/ml 含有)	MRSA	68.5	86.1	99.7	発育せず	発育せず
	<i>S. aureus</i>	72.7	99.3	発育せず	発育せず	発育せず
カタリン K 点眼用 (MP 0.1mg/ml, CB 2mg/ml 含有)	MRSA	71.9	89.5	98.9	発育せず	発育せず
	<i>S. aureus</i>	74.3	91.5	99.0	発育せず	発育せず
サンピロ 1 % (MP 0.26mg/ml, PP 0.14mg/ml, CB 2mg/ml)	MRSA	67.2	85.5	99.7	発育せず	発育せず
	<i>S. aureus</i>	78.4	99.4	発育せず	発育せず	発育せず

表中の数字は 3 回測定の平均である.

以上の減少率を示し、24時間後の結果で菌の発育を認めなかった。またサンコバ点眼液でも6時間後の結果で菌の発育を認めず、BACの両接種菌に対する防腐効果に差は認められなかった。CB配合製品のジクロード点眼液のMRSAと*S. aureus*に対する6時間後の結果では、58.3%と63.7%の減少率を示し、MRSAに対する防腐効果は*S. aureus*に比べて弱かった。しかし72時間後に両接種菌に対して96.0%の減少率を示し、1週間後には菌の発育は認められなかった。AP配合製品であるリンデロン液のMRSAと*S. aureus*に対する6時間後の結果は、それぞれ68.5%と72.7%の減少率を示した。MRSAは接種1週間後、*S. aureus*では3日後の結果において発育が認められず、MRSAへの防腐効果は*S. aureus*より幾分弱い結果であった。MPとCBの配合製品であるカタリンK点眼用ではMRSAに対し、6時間後で71.9%の接種菌減少率であり、1週間後には発育が認められなかった。*S. aureus*に対しては6時間後に74.3%の減少率を示したが、1週間後には発育が認められなかった。AP及びCBの混合系配合製品であるサンピロ1%はMRSAと*S.*

aureus に対し、6時間後には67.2%と78.4%の減少率を示し、MRSA に対する効果は *S. aureus* よりも低い³が、72時間後には両接種菌は99.7%以上の減少率を示した。

3. 防腐剤別の MRSA と *S. aureus* に対する MIC 値の測定結果

BAC, 各種混合比率の AP 及び CB の MRSA と *S. aureus* に対する MIC 値測定の結果を表 3 に示した。BAC では MRSA に対する MIC 値は $6.25\mu\text{g/ml}$, *S. aureus* に対する MIC 値は $3.13\mu\text{g/ml}$ と両接種菌に差が認められた。AP の MRSA と *S. aureus* に対する MIC 値はいずれも MP が $100\mu\text{g/ml}$, PP が $54\mu\text{g/ml}$ の混合の場合であった。CB の両接種菌に対する値は $1600\mu\text{g/ml}$ であり, BAC で認められた MRSA と *S. aureus* の MIC 値に差はなかったが, BAC よりも極めて高い濃度を必要とした。

考 察

MRSA による感染症が増加しているが⁵⁻⁷⁾、眼科領域で検出される *Staphylococcus aureus* の約 20%、耳鼻科領域では 10~80%が MRSA である

表 3. 防腐剤別の MRSA と *S. aureus* に対する MIC 値測定

1. BAC	(μg/ml)											
濃 度	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	Blank
MRSA	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+

[illegible][illegible]

と報告されている¹⁰⁾。

著者らは点眼薬等に配合されている防腐剤が MRSA に対してどのような挙動を示すかを防腐剤の選択指標菌の一つである *S. aureus* を用いて比較検討した。BAC 配合のインターナル点鼻液とサンコバ点眼液では MRSA と *S. aureus* への防腐効果に差は認められず、接種 6 時間後に菌のほとんどが発育していなかった。一方、防腐効果は劣るものの製剤安定化などの理由から使用されている CB 配合のジクロード点眼液、AP 配合のリンデロン液、MP と CB 配合のカタリン K 点眼用また AP と CB の混合系であるサンピロ 1 % では菌接種 6 時間後の MRSA に対する効果は *S. aureus* に比べてやや劣る傾向を示した。これらの減少率は MRSA で 58~71 % 台、*S. aureus* では 63~78 % 台であり、1 週間後の結果では両接種菌とも発育を認めなかったが、BAC 配合製品に比較して明かに劣っていた。すなわち防腐効果を発現時間からみた場合、ジクロード点眼液 (CB 5 mg/ml) が両接種菌に対して最も劣り、次が MRSA に対してはサンピロ 1 %, *S. aureus* に対してはリンデロン液 (MP 0.5 mg/ml, PP 0.2 mg/ml) であった。

このように BAC 配合製品は他配合製品よりも MRSA や *S. aureus* に早期から優れた防腐効果を発現した。製品の防腐効果は組成中に含まれる無機塩類にも影響されるが、主たる原因は MIC 値の 16 倍以上の BAC を含有していることにあると考えられる。これに対して CB, AP, MP と CB 配合など製品の防腐効果が遅延したのは MP, PP の水への溶解性が低く、また CB が防腐効果

を発揮するためには高濃度を要することもある。結果的には MIC 値の 1.25~3 倍程度しか配合できなかったためと考える。しかし、本試験で接種した MRSA の菌数は臨床適用に際しての二次汚染菌数に比べて遙かに大きいものであることから、各製品の実験面での MRSA に対する防腐効果は十分期待できると考えられる。

謝辞 本研究の実施に際して臨床分離株の分与並びに貴重なご助言を賜った(財)阪大微生物病研究会の東堤稔氏に深謝の意を表する。

文 献

- 1) 山岡桂子, 佐々木真理子, 松井正輝, 沖永公江, 土屋 勝, 吉田和夫, 米田剛治, 峯本正彦, 植村攻, 病院薬学, 17(3), 149-156 (1991).
- 2) 石関忠一, 防菌防黴, 12(6), 293-303 (1983).
- 3) U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP XXII, 1478-1479, 1990.
- 4) 早崎孝則, 森 健, 富田明夫, 浅沼春樹, 吉増幹生, 医学と薬学, 27(1), 213-221 (1992).
- 5) 本山まり子, 大石正夫, 田沢 博, 宮尾益也, あたらしい眼科, 6, 901-904 (1989).
- 6) 横田 健, “MRSA 感染症の現状と対策”, メジカルビュー社, 1990.
- 7) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 鈴木由美子, 中根 豊, 深山成美, 石原理加, 基礎と臨床, 25(6), 1979-1987 (1991).
- 8) 倉田 浩, 石関忠一, 宇田川俊一, “医薬品・化粧品微生物試験法”, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1977. pp. 69-70.
- 9) 五島瑳智子, 除慶一郎, 河喜多龍祥, 小酒井望, 三橋 進, 西野武志, 大沢伸孝, 田波 洋, *Chemotherapy*, 29, 76-79 (1981).
- 10) 横田 健, 松本慶蔵, “MRSA 感染症”, ライフサイエンス社, 東京, 1986, pp. 1-10.