

## Sulfamethoxazole と Trimethoprim の研究

## 基礎的検討 I

## 試験管内抗菌作用に関する基礎的検討

粟田口重美・白根千賀子

田辺製薬株式会社生物研究所

真山三賀雄・永田 弘・金沢喜代治・吉田 正・片桐 謙

塩野義製薬株式会社研究所

試験管内抗菌力試験および動物実験で sulfamethoxazole (SMX=5-methyl-3-sulfanilamido isoxazole) と trimethoprim (TMP=2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-pyrimidine) との間で著しい併用効果があることが BUSHBY & HITCHINGS<sup>1)</sup>(1968), BÖHN<sup>2)</sup>(1969), WATERWORTH<sup>3)</sup>(1969) 等により報告されたが、臨床でも SMX と TMP の合剤が呼吸器系、泌尿器系感染症ならびに敗血症などに著しい治療効果があることが諸家<sup>4,5,6,7)</sup>により報告され、このものの臨床効果が最近注目されるに至った。

著者等は SMX, TMP について試験管内抗菌力試験を実施し、特に SMX と TMP の併用効果について基礎的条件の検討を行ない、若干の知見を得たので報告する。

## 実験材料と方法

## 供試薬剤：

SMX は塩野義製薬(株)製、TMP は Wellcome 社製(英国)のものを使用した。

SMX は滅菌した 1/8 N NaOH 溶液で、TMP は滅菌した 4/100 N HCl 溶液で溶解後滅菌蒸留水を用いて、倍数希釈して各種濃度段階溶液を作製し、使用した。

## 供試培地：

供試菌の増菌用培地として、主として MUELLER-HINTON broth (Difco) を使用したが、比較検討する意味で、trypto soy broth (栄研), trypto soya broth (ニッサン), trypticase soy broth (BBL), heart infusion broth (栄研) および brain heart infusion broth (栄研) も使用した。

SMX, TMP の感受性測定用培地としては MUELLER-HINTON agar (栄研) および感性ディスク用培地(modified MUELLER-HINTON medium (ニッサン)) に市販馬血液を凍結融解して溶血させた溶血性馬血液を 7.5% に添加した培地を使用した。なお、その他に diagnostic sensitivity test agar (Oxoid) および SR-medium base (Difco) を使用した。また菌液希釈用として一部 SR-medium diluent (Difco) を使用した。

## 供試菌株：

田辺製薬(株)生物研究所ならびに塩野義製薬(株)研究所にて保存している菌株を使用した。菌種、菌株については、実験成績の表に記載した。

## 抗菌力試験法：

寒天平板希釈法によつて検討した。MUELLER-HINTON broth (pH 7.4±0.2) に供試菌株を接種し 37°C, 18~20 時間培養した菌液(菌数約 10<sup>9</sup>~10<sup>8</sup>コ/ml) を滅菌生理食塩水あるいは MUELLER-HINTON broth で 10<sup>6</sup>コ/ml になるように希釈し、その 1 白金耳(白金耳は内径約 1 mm, 湿菌量約 2 mg の大きさのもの) を SMX, TMP および SMX と TMP を併用したものを種々の濃度に含有させた 7.5% 溶血性馬血液加 MUELLER-HINTON 培地に約 2 cm 程度に画線塗抹し、37°C, 18~20 時間培養後菌の増殖の有無を肉眼により判定した。SMX および TMP の最小発育阻止濃度(Minimal Inhibitory Concentration=MIC) は、菌の発育が完全に阻止される最低発育阻止濃度をとつた。なお判定にあたり 1 個でも集落が発育した場合、または極めてうすい菌苔が認められた場合は菌増殖とみなした。

## 実験結果

## 1. 増菌用培地の検討

SMX, TMP の抗菌力試験を実施するにあたり増菌用培地としては、MUELLER-HINTON broth, trypto soy broth, trypto soya broth, trypticase soy broth, heart infusion broth および brain heart infusion broth を使い、これに各種の細菌を接種し、37°C, 18~20 時間培養後の生菌数を測定、比較検討した。

表 1 に示すとおり、MUELLER-HINTON broth は各種の細菌に対して十分な生菌数を与え、かつ SMX, TMP の抗菌力に対して拮抗物質の含有が少ないと考えられることから、最も優れた培地であることが認められた。

## 2. 抗菌力測定用培地の検討

現在、わが国で sulfonamide 剤の抗菌力試験用培地として繁用されている市販 MUELLER-HINTON 培地(栄

表1 Viable cell counts of bacteria incubated various liquid media at 37°C for 18~20 hrs.

Organisms	Viable Cell Number (bact/ml) Media*					
	MH-D	TS-E	TS-N	TS-B	HI	BHI
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	$6.4 \times 10^8$	$7.0 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$	$2.4 \times 10^9$	$3.2 \times 10^8$	$8.7 \times 10^8$
<i>Staphylococcus aureus</i> 60658	$4.8 \times 10^8$	$5.6 \times 10^8$	$6.9 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	$6.0 \times 10^8$	$5.6 \times 10^8$
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	$2.4 \times 10^8$	$2.2 \times 10^7$	$2.0 \times 10^7$	$8.3 \times 10^6$	$2.1 \times 10^7$	$3.6 \times 10^6$
<i>Diplococcus pneumoniae</i> type 1	$1.6 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	$7.0 \times 10^7$	$7.1 \times 10^7$	$<10^5$	$3.5 \times 10^7$
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	$9.8 \times 10^6$	$9.3 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	$2.1 \times 10^7$	$9.3 \times 10^6$
<i>Streptococcus faecalis</i> CN-478	$6.3 \times 10^8$	$4.2 \times 10^8$	$6.7 \times 10^8$	$1.0 \times 10^9$	$3.8 \times 10^8$	$9.8 \times 10^8$
<i>Bacillus anthracis</i>	$4.3 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7$	$1.7 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$	Not done	Not done
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	$2.0 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9$	$2.6 \times 10^9$	$3.6 \times 10^9$	$7.5 \times 10^8$	$1.4 \times 10^9$
<i>E. coli</i> 60658	$1.1 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$	$3.2 \times 10^9$	Not done	Not done
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$1.2 \times 10^9$	$3.7 \times 10^7$	$4.9 \times 10^7$	$4.1 \times 10^8$	"	"
<i>Salmonella typhimurium</i>	$1.8 \times 10^8$	$8.8 \times 10^8$	$2.1 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9$	"	"
<i>Proteus vulgaris</i> CN-329	$7.8 \times 10^8$	$5.5 \times 10^8$	$9.7 \times 10^8$	$4.8 \times 10^9$	"	"
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1.4 \times 10^9$	$1.1 \times 10^9$	$1.6 \times 10^6$	$8.9 \times 10^8$	"	"

\* MH-D: MUELLER-HINTON broth (Difco), TS-E: Trypto soy broth (Eiken), TS-N: Trypto soya broth (Nissan), TS-B: Trypticase soy broth (BBL), HI: Heart infusion broth (Eiken), BHI: Brain heart infusion broth (Eiken)

表2 Antibacterial activity of TMP and SMX in MUELLER-HINTON agar (Eiken, Lot. No. TG000T) and modified MUELLER-HINTON medium (Nissan, Lot. OI1177) with and without 7.5% lysed horse blood in agar dilution test MIC (mcg/ml)

Organisms	TG000T		TG000T+HB*		OI1177		OI1177+HB*	
	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	50	>800	0.39	50	6.25	>800	0.39	50
<i>Staphylococcus aureus</i> 60658	>100	>800	0.39	800	>100	>800	0.2	800
<i>Staphylococcus aureus</i>	>100	800	0.39	6.25	100	>800	0.39	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	>800	0.78	25	100	>800	0.78	50
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0.39	800	0.012	400	100	400	0.025	800
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.1	400	0.1	25	0.2	>800	0.2	25
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	3.13	25	0.2	6.25	100	>800	0.1	3.12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5	100	0.2	12.5	25	>800	0.39	6.25
<i>Salmonella typhosa</i>	0.78	400	0.05	12.5	1.56	>800	0.1	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	>800	>100	>800	>100	>800	>100	>800

+HB\*.....with 7.5% lysed horse blood

研)および感性ディスク用培地(ニッサン)の2種を用い、これに7.5%の割合に溶血性馬血液を添加した培地と添加しない培地を用いて、SMX、TMPの抗菌力試験を実施するとともに、溶血性馬血液添加の影響についてあわせて検討した。

表2に示したとおり、両社のMUELLER-HINTON培地とも、本lotでは溶血性馬血液を添加しない場合には、SMX、TMPの抗菌活性は菌種、菌株により著しく異なるが、溶血性馬血液を添加することによりSMX、TMPの抗菌活性は高まり、かつ両社の培地ともほぼ等

表3 Minimal inhibitory concentration (mcg/ml) of TMP and SMX in MUELLER-HINTON agar with 7.5% lysed horse blood, Diagnostic sensitivity test medium with 7.5% lysed horse blood and SR-medium

Organisms	Minimal inhibitory concentration (mcg/ml)					
	MUELLER-HINTON agar		D. S. T. medium		SR-medium	
	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
<i>Staph. aureus</i>	0.78	6.25	0.78	12.5	0.78	25
"	0.78	3.25	0.39	6.25	1.56	12.5
" B-100(R)	0.39	>100	0.39	>100	0.78	>100
<i>St. hemolyticus</i>	0.39	25	0.78	12.5	0.78	6.25
<i>St. viridans</i>	25	50	25	50	50	100
<i>St. faecalis</i> CN 478	0.09	100	0.78	100	0.39	100
<i>D. pneumoniae</i> Type I	3.12	12.5	1.56	6.25	6.25	12.5
<i>C. diphtheriae</i> No. 8	0.19	3.12	0.19	6.25	0.19	3.12
<i>E. coli</i> K-12	0.19	3.12	0.19	6.25	0.19	3.12
" O-136(R)	0.19	>100	0.19	>100	0.19	>100
<i>Sh. sonnei</i>	0.19	3.12	0.19	6.25	0.39	3.12
<i>S. typhi</i>	0.19	12.5	0.19	12.5	0.19	12.5
<i>K. pneumoniae</i>	0.19	12.5	0.09	12.5	0.09	6.25
<i>Pr. vulgaris</i>	0.78	3.12	0.19	1.56	0.19	1.56
<i>N. gonorrhoeae</i> T-1	50	0.39	50	0.09	—	—
<i>N. meningitidis</i>	25	0.09	12.5	0.09	—	—

Note: D. S. T. medium.....Diagnostic sensitivity test medium

R.....SMX resistant

—.....No growth in SR-medium with an addition of horse blood

しい抗菌価を示すことを認めた。なお、両社のMUELLER-HINTON 培地について数 lot を用いて同様の実験を試みたが、lot により SMX, TMP の抗菌価が異なることを認めている。

また抗菌価におよぼす lot 間の変動は、溶血性馬血液を添加することにより防止することが可能であり、SMX, TMP の抗菌力試験には、溶血性馬血液を添加した MUELLER-HINTON 培地が適当であることを認めた。

次に各種細菌を用い溶血性馬血液加 MUELLER-HINTON 培地における抗菌作用を diagnostic sensitivity test agar ならびに SR-medium における抗菌作用と比較検討した。

溶血性馬血液加 MUELLER-HINTON 培地および diagnostic sensitivity test agar を用いての抗菌力試験は前記寒天平板希釈法によつたが、SR-medium を用いる抗菌力試験は供試菌株を SR-medium に接種し、37°C, 18~20時間培養した菌液を SR-medium diluent を用いて、約 $10^4$ コ/mlの菌液を作り、その0.1 ml (接種菌量約 $3.0 \times 10^3 \sim 10^4$ コ/ml)を SMX, TMP を所定濃度に含有させた SR-medium に接種する液体希釈法にて実施した。ただし、溶連菌、腸球菌、肺炎球菌、ジフ

テリア菌、ナイセリア属菌以外の菌については、血清を添加しないで使用した。

上記3種の培地における SMX, TMP の抗菌作用の成績は表3に示したとおり、総体的にはほぼ一致することを認めた。

### 3. SMX と TMP の抗菌作用と接種菌量について

7.5%溶血性馬血液加 MUELLER-HINTON 培地、SMX, TMP の抗菌力試験に使用できることを認めたので、本培地を用い、接種菌量が SMX, TMP の抗菌作用におよぼす影響を寒天平板希釈法により各種の菌株について検討した。

表4に示したとおり、SMX の抗菌作用は接種菌量により著しい影響を受けることを認めたが、その影響は $10^7$ コ/ml以上の接種菌量の場合が著しく、 $10^6 \sim 10^5$ コ/mlの接種菌量においてはほとんど一定した MIC 値が得られることが認められた。TMP の抗菌作用は、接種菌量によりあまり影響をうけないことを認めた。したがって、SMX, TMP の抗菌力試験には $10^6 \sim 10^5$ コ/mlの菌液、1白金耳を接種することが至適と考えられ、この種実験には、接種菌量を規定する必要を認めた。

表4 Effect of inoculum size on *in vitro* antibacterial activity of SMX and TMP

Inoculum size (bact./ml) Organisms	Minimal inhibitory concentration(mcg/ml)									
	TMP					SMX				
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
<i>Staph. aureus</i> CN 491	0.78	0.39	0.39	0.39	0.19	25	12.5	6.25	3.12	3.12
<i>Staph. aureus</i>	0.78	0.78	0.39	0.39		3.12	1.56	1.56		
<i>St. faecalis</i> CN 478	0.39	0.19	0.09	0.09	0.09	>100	>100	>100	>100	>100
<i>D. pneumoniae</i> Type 1		3.12	1.56	1.56	1.56		25	12.5	12.5	12.5
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.39	0.39	0.39	0.39		25	12.5	6.25	6.25	
<i>E. coli</i> CN 314	0.19	0.19	0.09	0.09	0.09	25	12.5	6.25	6.25	3.12
<i>Pr. vulgaris</i> CN 329	1.56	1.56	0.78	0.78	0.39	50	25	6.25	3.12	3.12
<i>N. meningitidis</i> 69480		12.5	12.5	12.5	12.5		0.39	0.39	0.39	0.39
<i>Ps. aeruginosa</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>800	>800	>800	>800	>800

表5 Effect of medium pH on *in vitro* antibacterial activities of combinations of SMX and TMP in MUELLER-HINTON agar with 7.5% lysed horse blood

pH	Organisms	MIC (mcg/ml)		
		SMX alone	TMP alone	SMX-TMP combination
6.0	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	6.25	1.25	0.2 /0.039
	<i>Staphylococcus aureus</i> CN 491	1.56	0.625	0.2 /0.039
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	3.13	0.156	0.39/0.078
	<i>E. coli</i> CN 314	3.13	0.156	0.2 /0.039
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.56	0.625	0.39/0.078
	<i>Proteus vulgaris</i> CN 329	1.56	5	0.2 /0.039
7.0	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	12.5	0.625	0.39/0.078
	<i>Staphylococcus aureus</i> CN 491	3.13	0.313	0.2 /0.039
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	3.13	0.156	0.2 /0.039
	<i>E. coli</i> CN 314	3.13	0.156	0.2 /0.039
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.13	0.313	0.39/0.078
	<i>Proteus vulgaris</i> CN 329	3.13	2.5	0.39/0.078
7.4	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	25	0.625	0.39/0.078
	<i>Staphylococcus aureus</i> CN 491	6.25	0.313	0.2 /0.039
	<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	6.25	0.156	0.1 /0.02
	<i>E. coli</i> CN 314	6.25	0.156	0.1 /0.02
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.25	0.156	0.2 /0.039
	<i>Proteus vulgaris</i> CN 329	6.25	1.25	0.2 /0.039

#### 4. SMX, TMP 単独および SMX-TMP 併用の抗菌力におよぼす培地 pH の影響について

MUELLER-HINTON 培地(栄研)を用い、常法にしたがつて作製した培地(pH 7.4)とこれに 1/10N 塩酸を用い pH 6.0, pH 7.0 とした MUELLER-HINTON 培地を作り、これら培地に溶血性馬血液を 7.5% になるように加えたのち、SMX, TMP の混合比を 5:1 ならびに種類の割合に含有させるいわゆる "chequer board titra-

tion method" により、SMX, TMP 単独ならびに SMX-TMP 併用の場合の抗菌力試験を行ない、表 5 (混合比 5:1) および 表 6 (chequer board titration method) に示すような成績を得た。すなわち、表 5 に示すとおり酸性側では TMP は若干抗菌力が低下し、SMX は逆に抗菌力が増強する傾向を認めたが、一方、SMX-TMP 併用ではこれらの菌株に対しては培地 pH 6.0~7.4 の範囲内で pH に関係なく著しい相乗効果が認められ、抗菌

表6 Effect of medium pH on *in vitro* antibacterial activities of combinations of TMP and SMX against *Staph. aureus* CN 491

## a) pH 6.0

SMX (mcg/ml)	25	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.12	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	+	-	-	-	-	-	-	-
	0.78	+	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	+	+	-	-	-	-	-	-
	0.19	+	+	-	-	-	-	-	-
	0	+	+	+	+	+	+	+	-
			0	0.019	0.039	0.078	0.156	0.31	0.62
TMP (mcg/ml)									

## b) pH 7.0

SMX (mcg/ml)	25	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.12	+	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	+	-	-	-	-	-	-	-
	0.78	+	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	+	+	-	-	-	-	-	-
	0.19	+	+	+	-	-	-	-	-
	0	+	+	+	+	+	-	-	-
			0	0.019	0.039	0.078	0.156	0.31	0.62
TMP (mcg/ml)									

## c) pH 7.4

SMX (mcg/ml)	25	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.12	+	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	+	-	-	-	-	-	-	-
	0.78	+	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	+	+	-	-	-	-	-	-
	0.19	+	+	+	-	-	-	-	-
	0	+	+	+	+	+	-	-	-
			0	0.019	0.039	0.078	0.156	0.31	0.62
TMP (mcg/ml)									

Note: - ..... No growth, + ..... Growth

表7 Enhancement of activity against *Staphylococcus aureus* FDA 209-P JC-1 by various combinations of SMX and TMP

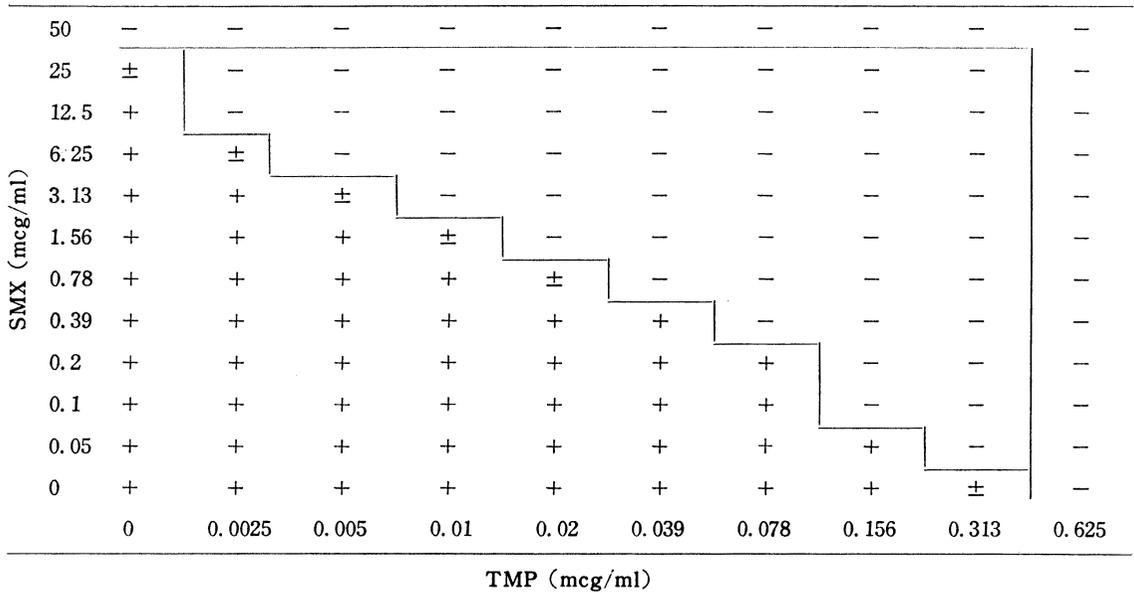
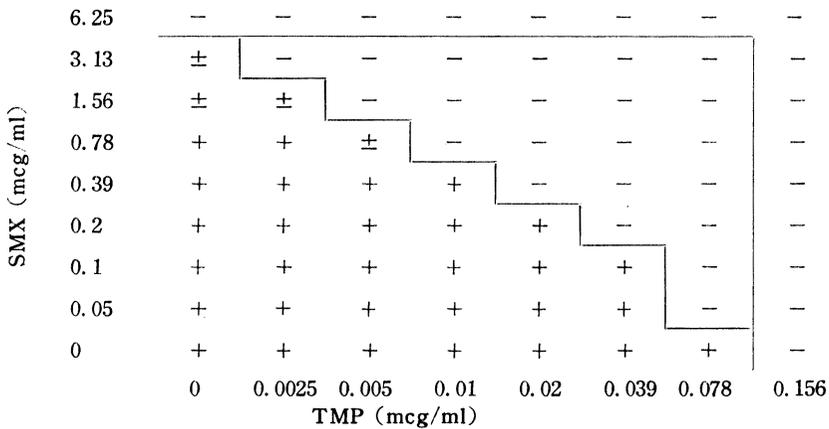


表8 Enhancement of activity against *Escherichia coli* NIHJ JC-2 by various combinations of SMX and TMP



力におよぼす pH の有意の影響はみられなかつた。また表6の成績においてもまったく同様の結果が認められた。

5. SMX と TMP の併用効果について

7.5%溶血性馬血加 MUELLER-HINTON 培地を用い、chequer board titration method にて、*Staphylococcus aureus* FDA 209-P JC-1 株および *Escherichia coli* NIHJ JC-2 株に対する SMX と TMP の併用効果について検討した。*Staphylococcus aureus* FDA 209-P JC-1 株に対する SMX, TMP 単独および SMX-TMP 併用における抗菌作用は表7に示すとおり SMX, TMP の単独での MIC は 50 mcg/ml, 0.625 mcg/ml であ

るが、SMX-TMP 併用では SMX 1.56 mcg/ml, TMP 0.02mcg/ml という低濃度の併用でもその発育が阻止され両者間での相乗作用が認められた。また、*Escherichia coli* NIHJ JC-2 株でも表8に示すとおり前記 *Staphylococcus aureus* と同様の傾向の成績が得られ、SMX-TMP 併用での相乗作用が認められた。ついで表7, 8の実験成績をもとに、ELION *et al.*<sup>8)</sup> (1954) の fractional inhibitory concentration (FIC) index の概念をとり入れて計算した結果は表9, 表10に示した。

また、SMX の FIC を横軸に TMP の FIC を縦軸にとり図示すると、図1, 2のようになる。

表9 Calculation of FIC index

Organism	MIC (mcg/ml)				
	SMX alone $a_0$	TMP alone $b_0$	SMX-TMP combination $a/b$	FIC index $\frac{a}{a_0} + \frac{b}{b_0}$	Mixed ratio SMX: TMP
<i>Staph. aureus</i> FDA 209P JC-1	50	0.625	12.5/0.0025	$0.25 + 0.004 = 0.254$	5000: 1
			6.25/0.005	$0.125 + 0.008 = 0.133$	1250: 1
			3.13/0.01	$0.062 + 0.016 = 0.078$	313: 1
			1.56/0.02	$0.031 + 0.032 = 0.063$	78: 1
			0.78/0.039	$0.016 + 0.062 = 0.078$	20: 1
			0.39/0.078	$0.007 + 0.125 = 0.132$	5: 1
			0.1/0.156	$0.002 + 0.250 = 0.252$	1: 1.56
			0.05/0.313	$0.001 + 0.500 = 0.501$	1: 6.25

表10 Calculation of FIC index

Organism	MIC(mcg/ml)				
	SMX alone $a_0$	TMP alone $b_0$	SMX-TMP combination $a/b$	FIC index $\frac{a}{a_0} + \frac{b}{b_0}$	Mixed ratio SMX: TMP
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	6.25	0.156	3.13/0.0025	$0.5 + 0.016 = 0.516$	1252: 1
			1.56/0.005	$0.25 + 0.032 = 0.287$	312: 1
			0.78/0.01	$0.125 + 0.064 = 0.189$	78: 1
			0.39/0.02	$0.0624 + 0.128 = 0.190$	20: 1
			0.2 /0.039	$0.0320 + 0.250 = 0.282$	5: 1
			0.05/0.078	$0.008 + 0.500 = 0.508$	1: 1.56

图1 Graphical representation of the enhancement of activity against *Staphylococcus aureus* FDA 209-P JC-1 by various combinations of SMX and TM<sup>2</sup>

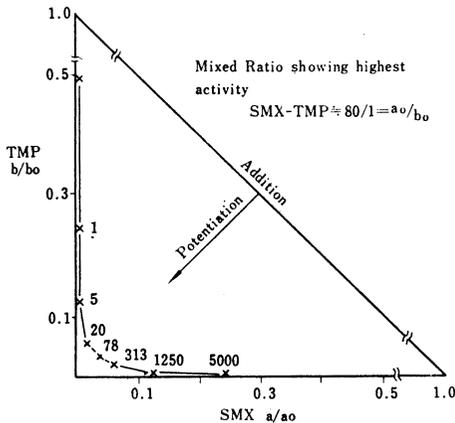


图2 Graphical representation of the enhancement of activity against *E. coli* NIHJ JC-2 by various combinations of SMX and TMP

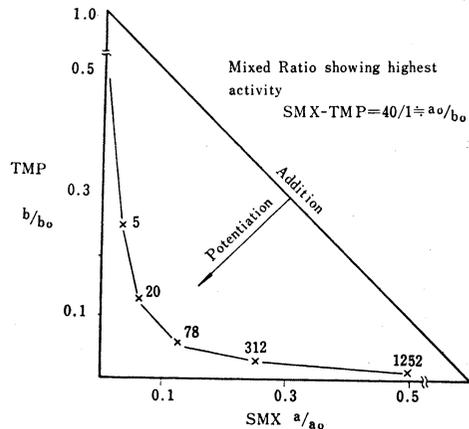


表9, 10に示すとおり, *Staphylococcus aureus* では, SMX 1.56 mcg/ml, TMP 0.02 mcg/ml の併用で FIC index は 0.063 と最小の値を示し, *Escherichia coli* では SMX 0.78 mcg/ml, TMP 0.01 mcg/ml の併用で FIC index は 0.189 と最小の値を示した。また図1, 2に示すとおり, SMX, TMP の FIC をプロットするとその curve は FIC index が最小の値を示す点を軸とし, ほぼ対称的な曲線(isobole)を示し, 両者間で相乗的な併用効果を示すことを認めた。以上のような結果から試験管内における SMX-TMP 併用による相乗作用が最も強く発揮される場合, すなわち FIC index の値が最小の値を示す時 (Min. FIC index) の SMX : TMP の混合比は, *Staphylococcus aureus* FDA 209-P JC-1 株の場合は, 表9に示すとおり 1.56 : 0.02 (a : b) = 80 : 1 となり, その比は SMX 単体の MIC ( $a_0=50$ ) に対する TMP 単体の MIC ( $b_0=0.625$ ) の比, すなわち,  $50 : 0.625 (a_0 : b_0) = 80 : 1$  に一致することが認められ, 図1の成績からも確認された。*Escherichia coli* NIHJ JC-2 株においても表10および図2の成績から極めて近似した同様の関係が成立することが確認され, さらにまた, その他の20数種の菌株についても検討した結果, SMX および TMP 単剤の MIC が求められるものについては, まったく同様の関係が成立することが認められた。

(注)

FIC とは, 2つの薬剤を併用した場合, 最小発育阻止濃度を示したそれぞれの薬剤の濃度をその薬剤を単独で使用した場合の最小発育阻止濃度で割った値である。その和を FIC index という。本例では SMX, TMP の単独での最小発育阻止濃度 (SMX  $a_0$ , TMP  $b_0$ ) で SMX-TMP 併用での最小発育阻止濃度 (SMX  $a$ , TMP  $b$ ) を割り  $(\frac{a}{a_0}, \frac{b}{b_0})$  が FIC で, その和  $\frac{a}{a_0} + \frac{b}{b_0}$  を FIC index という。FIC index が 1.0 以下であれば, 両者間に併用効果があり, 1.0 以上であれば両者間で拮抗作用がある。FIC index が小さい程, 併用効果が強いものと考えられ, その最小の値を Min. FIC index とする。

ついで SMX および TMP の両者に感受性を示す菌, SMX に耐性, TMP に感受性を示す菌, SMX に感受性, TMP に耐性を示す菌ならびに SMX, TMP の両者に耐性を示す菌を対象として, 前記 chequer board titration method で SMX, TMP および SMX-TMP 併用に対する感受性を測定した。

表11に示すとおり, SMX, TMP に感受性を示した菌では, SMX-TMP の併用にてすべて相乗作用が認めら

れ, SMX-TMP の FIC index は 0.063~0.5 の値を示した。SMX 耐性 (MIC : 200~800 mcg/ml), TMP 感受性を示す *Staphylococcus aureus* では, SMX-TMP の併用にて相乗作用が認められ SMX-TMP の FIC index は 0.095~0.189 を示した。SMX 耐性 (MIC : >800 mcg/ml), TMP 感受性を示す *Escherichia coli* では SMX-TMP 併用に対して感受性を示す菌とまったく感受性が認められない菌があることを認めた。SMX 感受性, TMP 耐性 (MIC : >160 mcg/ml) の *Bacillus anthracis* では SMX-TMP 併用に感受性を示した。SMX 耐性 (MIC : >800 mcg/ml), TMP 耐性 (MIC : >160 mcg/ml) の *Pseudomonas aeruginosa* に対しては, SMX-TMP 併用により感受性を示す菌と感受性が認められない菌があることを認めた。

#### 考 察

SMX, TMP について, 主として市販 MUELLER-HINTON 培地を用いて, その抗菌力を寒天平板希釈法によつて検討した結果, MUELLER-HINTON 培地(栄研), 感性ディスク用培地(ニッサン)とも SMX, TMP の抗菌価が lot により著しい差があることを認め, 市販 MUELLER-HINTON の培地中には, lot により SMX および TMP の抗菌作用に対する拮抗物質が存在し, かつその含有量が異なるものと考えられた。一方, HARPER & CAWSTON<sup>9)</sup> (1945), WALKER *et al.*<sup>10)</sup> (1947) は, 培地中の sulfonamide inhibitor は, 溶血した馬血液により中和されることを報告しているので, 上記培地に溶血した馬血液を添加し, SMX, TMP の抗菌力試験を実施した結果, 両社の MUELLER-HINTON 培地とも, SMX, TMP の抗菌力試験実施可能となり, かつ lot 間の抗菌価の差もなくなることを認めた。BUSHBY & HITCHINGS<sup>11)</sup> (1968), BÖHNI<sup>2)</sup> (1969), WATERWORTH<sup>9)</sup> (1969)等は, SMX, TMP の抗菌力試験に diagnostic sensitivity test agar (Oxoid) に溶血した馬血液を添加した培地を使用することを推奨しているのとおり, MUELLER-HINTON 培地に溶血した馬血液を加える必要性を認めた。

ついで SMX, TMP の抗菌力試験の実施にあたり, SMX, TMP の抗菌価に及ぼす実験条件, すなわち, 接種菌量, 培地 pH の影響について検討し, TMP の抗菌作用は, 接種菌量による影響は少ないが, SMX の抗菌力は接種菌量により, 著しい影響を受けることが認められ, したがつて, この種の薬剤の抗菌力試験には, 接種菌量を規定する必要を認め, 実験成績より, 接種菌量は  $10^5 \sim 10^6$  コ/ml 菌液 1 白金耳とするのが妥当と考えられた。培地 pH の影響については, pH 6.0~7.4 の間で, SMX は酸性側で, TMP はアルカリ側で抗菌力が若干強くな

表 11 Synergistic effects *in vitro* of SMX and TMP against various bacteria strains

Organisms	MIC (mcg/ml)			FIC index $\frac{a}{a_0} + \frac{b}{b_0}$
	SMX alone $a_0$	TMP alone $b_0$	SMX-TMP combination $a/b$	
<i>Staph. aureus</i> FDA 209-P JC-1	50	0.625	1.56/0.02	0.063
<i>Staph. aureus</i> CN 491	12.5	0.156	0.39/0.02	0.156
<i>Strept. pyogenes</i> C-203	25	0.625	1.56/0.039	0.124
<i>D. pneumoniae</i> Type I	25	0.625	1.56/0.078	0.187
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	6.25	0.156	0.78/0.01	0.189
<i>E. coli</i> CN 314	6.25	0.156	0.78/0.11	0.189
<i>Enterobacter cloaca</i> TL-5	3.12	0.39	0.39/0.05	0.24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5	0.156	1.56/0.02	0.253
<i>Pr. vulgaris</i> CN 329	6.25	1.25	0.39/0.039	0.094
<i>Salmonella typhi</i>	12.5	0.078	0.78/0.005	0.126
<i>Salmonella paratyphi</i> A	100	0.156	6.25/0.01	0.126
<i>Shigella flexneri</i> VY TMH-10	6.25	0.156	0.39/0.02	0.190
<i>Shigella sonnei</i>	25	0.625	0.78/0.02	0.063
<i>Vibrio parahemolyticus</i> T-3030	25	3.12	1.56/0.2	0.124
<i>Neisseria meningitidis</i> 69480	1.56	40	0.05/5.0	0.156
<i>Haemophilus influenza</i> H-88562	0.2	0.05	0.05/0.0125	0.5
<i>Staph. aureus</i> 80285	200	0.39	25/0.025	0.189
<i>Staph. aureus</i> 60658	400	0.39	25/0.025	0.127
<i>Staph. aureus</i> 80029	800	0.39	50/0.0125	0.095
<i>E. coli</i> 90917	>800	3.13	800/0.2	+*
<i>E. coli</i> 80024	>800	0.39	800/0.1	+
<i>E. coli</i> 90804	>800	0.78	800/0.2	+
<i>E. coli</i> 60368	>800	0.39	800/0.2	-**
<i>E. coli</i> 80012	>800	0.2	800/0.1	-
<i>Bacillus anthracis</i>	50	>160	0.78/160	+
<i>Ps. aeruginosa</i> D	>800	>160	200/40	+
<i>Ps. aeruginosa</i> PS-20	>800	>160	200/40	+
<i>Ps. aeruginosa</i> PS-47	>800	>160	200/40	+
<i>Ps. aeruginosa</i> UK	>800	>160	>800/160	-
<i>Ps. aeruginosa</i> UO	>800	>160	>800/160	-

Note: +\* .....Increase in activity with combination

-\*\*.....No increase in activity with combination

る傾向を認めたが、SMX, TMP の併用試験では、pH 6.0~7.4 の間で、その相乗効果に差はみられなかつた。したがって、市販の MUELLER-HINTON 培地 (栄研 pH 7.4±0.2) および感性ディスク用培地 (ニッサン pH 7.4±0.1) は pH を修正する必要はなく、そのまま使用して差支えないことを認めた。

7.5%溶血性馬血液加 MUELLER-HINTON 培地 (栄研), diagnostic sensitivity test agar ならびに SR-medium を用い、SMX, TMP の抗菌作用を比較検討した結果、3 者間でほぼ同様の抗菌作用が認められた。

そして、SMX および TMP は代表的なグラム陽性菌およびグラム陰性菌の両者に対し、活性を示し、いわゆる 'broad spectrum' を示すことが認められ、かつ TMP のほうが SMX より抗菌作用が優れていることを認めた。しかし、ナイセリア属の菌に対してのみ SMX のほうが TMP より抗菌作用が優れていることは甚だ注目に値する。

Chequer board titration method を用い、SMX, TMP の併用実験を行ない、ELION *et al.*<sup>8)</sup>(1954) の FIC index の概念をとり入れて検討した結果、SMX と

TMP との間に著しい相乗作用があることを認めるとともに、この相乗効果の強さは、SMX:TMPの混合比と密接な関係があることを認め、BUSHBY<sup>11)</sup>(1969)が指摘しているとおり、SMX:TMPの混合比がそれぞれ単独で示す最小発育阻止濃度の比であるとき、最も相乗作用が強いことを認めた。したがって試験管内では、まずSMX および TMP の各単独の MIC を求めることにより、相乗作用が最も強く発揮される混合比を予め知ることが可能である(付録参照)。

SMX および TMP に対して耐性を示す菌に対しても、一部の菌を除いて、SMX-TMP 併用により相乗作用が認められ、かつ DAREEL *et al*<sup>17)</sup>(1968)が報告しているとおおり、SMX, TMP の両者に耐性を示す *Pseudomonas aeruginosa* に対しても、SMX-TMP 併用は、相乗作用を有することを認めた。

SMX と TMP の併用効果について、その作用機序の面から考察すると、両者とも微生物の葉酸代謝系に作用するものであり、SMX は p-aminobenzoic acid と dihydropteridine から dihydrofolic acid への合成を阻害し、TMP は dihydrofolic acid から tetrahydrofolic acid の生成に関与する dihydrofolic acid reductase の作用に拮抗する作用を有するといわれている<sup>12)</sup>。このように SMX, TMP の作用により、葉酸代謝系が double block 的に阻害されることを考慮すると、前述の SMX, TMP の間の併用効果は、その作用機序の面から相乗作用であることは当然と考えられる。

最後に上述の実験成績をもとに、SMX, TMP の抗菌力試験方法(3社共同試案)を次のとおり作製した。

1) 抗菌力測定法は、寒天平板希釈法(agar plate dilution method)を用い最小発育阻止濃度(MIC:完全に菌の発育が阻止された最低濃度)をもつて感受性をあらわす。

#### 2) 増菌用培地

MUELLER-HINTON broth (Difco) pH 無修正(7.4±0.2)を用いる。ただし、発育不良の菌に対しては、適当な培地を使用する。

#### 3) 被検菌液の調製

菌液希釈には MUELLER-HINTON broth または滅菌生理食塩水を使用する。

#### 4) 感受性測定用培地

MUELLER-HINTON agar(榮研)に7.5%溶血性馬血液を加える。

#### 5) 被検菌の接種法

新鮮斜面寒天培養菌を軽く1白金耳量(白金耳の内径約1mm前後、湿菌量約2mg)を掻き取り、2)の増菌用培地10mlに接種し、37°C、18~20時間培養した菌液

( $10^9 \sim 10^8$ コ/ml)を $10^6$ コ/mlに希釈し、感受性試験用菌液とする。これらの菌液の前記1白金耳量を約2cm程度、感受性測定用培地に画線塗抹する。

#### 6) 判定

感受性測定用培地に菌接種後37°C、18~20時間培養した後、肉眼的観察所見により、菌の発育が完全に阻止された最低濃度をもって MIC とする。ただし、1個でも集落が発育した場合、または極めてうすい菌苔が発育した場合も発育とみなす。(ただし、上記時間内で、発育不十分な菌では、40~48時間培養後に判定する。)

#### 7) 薬剤の濃度段階

濃度段階は下記のとおり行ない、2倍希釈液を用いる。  
100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mcg/ml とする。100 mcg/ml以上の濃度を使用する場合は、100, 200, 400, 800 mcg/ml とする。

#### 8) SMX および TMP の標準液の調製

SMX 10 mg を可及的少量の1/8 N NaOH に溶解し、滅菌蒸留水にて全量10 ml とする。TMP 10 mg を可及的少量の4/100 N HCl に溶解し、滅菌蒸留水にて全量10 ml とする。

#### 9) 感受性平板の作り方

培地を溶解し、その温度が60°C~50°Cになつたところで、7.5%になるように溶血性馬血液を加え、薬剤の一定量をシャーレに分注し、それに9倍量の培地を加え、よく混和した後平板とする。

#### 10) 試験菌株(臨床分離株)と対照菌株

試験菌株は新鮮にして、なるべく分離後継代2, 3代以内のものを使用する。また抗菌力(MIC)測定に際しては、この薬剤の場合は、特に対照菌株として日本化学療法学会の指定する下記のブドウ球菌および大腸菌株を用いる。

*Staphylococcus aureus* FDA 209-P JC-1

*Escherichia coli* NIHJ JC-2

#### 11) 評価基準

- I. 初めに、両薬剤単独に対する MIC を求める ( $a_0$ ,  $b_0$ )。
  - II. a. 両薬剤に感受性の場合 (SMX $\leq$ 800 mcg/ml, TMP $\leq$ 100 mcg/ml)
    - i) 両薬剤の MIC の比をもつて、混合比に当てる。
    - ii) この混合比により、MIC(a, b)を求めて、FIC index ( $a/a_0 + b/b_0$ )を求める。
    - iii) FIC index が1.0以下の場合に、併用効果ありと判定する。
  - b. 一方の薬剤にのみ感受性の場合
    - i) SMX $>$ 800 mcg/ml, TMP $\leq$ 100 mcg/ml ま

たは ii) SMX $\leq$ 800 mcg/ml, TMP $>$ 100 mcg/ml)

i) の場合においては, SMX 800 mcg/ml と TMP 100, 50, 25……, 0.025 mcg/ml の組合せをつくり MIC を求める。TMP 単独 MIC より 2 段階以下の濃度域に MIC が得られた場合は, 併用効果ありと判定する。

ii) の場合においては, i) に準じて実施し判定する。

c. 両薬剤に耐性の場合 (SMX  $>$  800 mcg/ml, TMP $>$ 100 mcg/ml)

SMX 800, 400, 200 mcg/ml と TMP 100, 50, 25 mcg/ml の各組み合わせ (9 種) をつくり, MIC が得られた場合は併用効果がありと判定する。

### 結 論

SMX-TMP の試験管内抗菌力試験法について検討し, SMX-TMP の抗菌力試験方法 (3 社共同試案) を作製した。なお SMX と TMP の間に併用効果があり, その作用は相乗的であることを認めた。

本研究は塩野義製薬株式会社, 日本ロシユ株式会社および田辺製薬株式会社の 3 社の共同企画によつて行なわれたものである。

### 文 献

- 1) BUSHBY, S.R.M. & G.H. HITCHINGS: Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. Brit. J. Pharmacol. 33: 72~90, 1968
- 2) BOHNI, E.: Vergleichende bakteriologische Untersuchungen mit der Kombination Trimethoprim/Sulfamethoxazole *in Vitro* and *in Vivo*. Chemotherapy. Suppl. ad. 14: 1~21, 1969
- 3) WATERWORTH, P.M.: Practical aspects of testing sensitivity to trimethoprim and sulphonamide. Postgraduate Med. J. Suppl. 45: 21~27, 1969
- 4) PECHERE, J. C.: Combination of trimethoprim with sulfamethoxazole: Study of antibacterial activity *in vivo* and comparison with gentamycin in the treatment of urinary tract infections. Prog. in antimicrobial and anti-cancer chemotherapy-Proc. 6th International Cong. of Chemotherapy. 959~965. Univ. of Tokyo Press. 1970
- 5) MÖSSER, G.: Klinische Ergebniss mit dem Kombinationspreparat Sulfamethoxazole + Trimethoprim. *ibid.* 966~970.
- 6) BRUMFIT, W.: Trimethoprim-Sulfamethoxa-

zole combinations in treatment of urinary infections in hospital and domiciliary patients. *ibid.* 981~985.

- 7) DARREL, J. H.; L.P. GARROD & P. M. WATERWORTH: Trimethoprim: laboratory and clinical studies. J. Clin. Path. 21: 202~209, 1968
- 8) ELION, G. B.; S. SINGER & G. H. HITCHINGS: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. J. Biol. Chem. 208: 477~488, 1954
- 9) HARPER, G.J. & W.C. CAWSTON: The *in vitro* determination of the sulphonamide sensitivity of bacteria. J. Path. Bact. 57:59~66, 1945
- 10) WALKER, N.; R. P. PHILIP, M. W. SNYTH & J. W. MACLEOD: Observations on the prevention of bacterial growth by sulphonamides with special reference to the Harper & Cawston effect. J. Path. Bact. 59: 631~645, 1947
- 11) BUSHBY, S. R. M.: Combined antibacterial action *in vitro* of trimethoprim and sulphonamide. The *in vitro* nature of synergy. Postgraduate Med. J. Suppl. 45: 10~18, 1969
- 12) HITCHINGS, G. H.: Species differences among dihydrofolate reductase as a basis for chemotherapy. *ibid.* 45: 7~10, 1969

### 〔付〕 SMX と TMP の併用効果と両者の混合比に関する考察

吉谷 直大

塩野義製薬解析センター

基礎的検討 (I) において SMX と TMP の併用効果の強さは FIC index の値が最小値のときに最も強く, しかもそのときの両者の混合比は, SMX, TMP それぞれが単独で示す MIC (TMP $\rightarrow$ a<sub>0</sub>, SMX $\rightarrow$ b<sub>0</sub>) の比に一致することを指摘した。

このことは, 両者の combination における isobologram がいろいろの bacteria strain に対して一様に, 45度線に対して対称性を示したという観測事実により導かれる。

一般に

$$\text{FIC index} = \frac{a}{a_0} + \frac{b}{b_0} \dots\dots\dots (1)$$

は, その定義より (図 1) のように規準化された標示に

おいては、左辺の FIC index の値を一定としたとき、これは相加作用を示す直線 PQ に平行な直線を意味する。したがって、この直線上の点はすべて直線 PQ より等しい距離にある。いま直線 PQ より最も離れた isobole 上の点を M (a<sub>M</sub>, b<sub>M</sub>) とすれば、この点での FIC index の値は最小となる。

これを、

$$\text{Min. FIC index} = \frac{a_M}{a_0} + \frac{b_M}{b_0} \dots\dots\dots(2)$$

で表わす。

もし、isobole が図のように単調な曲線であれば、Min. FIC index を与える点 M は1点しか存在しない。

さて、原点と点 M を結ぶ直線が直線 PQ と交わる点を N(a<sub>N</sub>, b<sub>N</sub>) とすれば、簡単な代数計算により

$$\frac{a_M}{a_0} + \frac{b_M}{b_0} = \frac{a_M}{a_N} + \frac{b_M}{b_N} = \frac{OM}{ON} \dots\dots\dots(3)$$

となることがわかる。このことより Min. FIC index は、もし2薬物 A, B が相加作用を示すとしたときの濃度に対する、実際に最大の併用効果を示す濃度の比率を意味することになる。したがって、効力(potency)という観点からすれば Min. FIC index の逆数が併用効果の測定と考えられる。

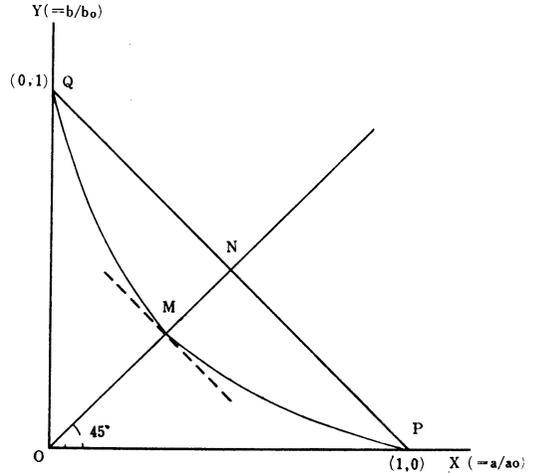
さて、isobole が対称であるということは点 N が PQ の中点にくることであり、このとき直線 ON 上のすべての点で a/a<sub>0</sub>=b/b<sub>0</sub> が成立する。

したがって

$$\frac{a_M}{b_M} = \frac{a_0}{b_0} \dots\dots\dots(4)$$

が成り立つ。すなわち、対称な isobole をもつような2薬物の組み合わせにおいて、併用効果が最も強くなる両者の混合比は、それぞれが単独で示す MIC の比となる。

図1 Isobologram と FIC index



文 献

HEWLETT, P. S. : Measurement of potencies of drug mixtures. Biometrics 477~487, 1969

STUDIES ON SULFAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM  
Fundamental Research I  
Antibacterial Activities of Sulfamethoxazole and  
Trimethoprim Alone and in Combination *In Vitro*

SHIGEMI AWATAGUCHI and CHIKAKO SHIRANE  
Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.  
MIKAO MAYAMA, HIROSHI NAGATA, KIYOJI KANAZAWA,  
TADASHI YOSHIDA and KEN KATAGIRI  
Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

This study was undertaken to investigate the antibacterial activities of sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP), alone and in combination *in vitro*.

Activities of the 2 drugs, alone and in combination, were found to be dependent on the composition of culture medium, medium pH and inoculum size of the organisms to be tested. SMX and TMP were active against a wide range of gram-positive and gram-negative organisms. The potentiation of the antibacterial activity of SMX by TMP was confirmed. The maximum potentiation by the combination was achieved when the 2 components were combined at the ratio of their respective minimal inhibitory concentrations acting alone. A guiding manual for sensitivity testing was established as follows:

1. *In vitro* antibacterial activity is determined according to the agar dilution method. The sensitivity is expressed as minimal inhibitory concentration (MIC).
2. MUELLER-HINTON broth (Difco) is recommended for culturing test organisms and MUELLER-HINTON agar (Eiken) with hemolyzed (freeze-thaw) horse blood (7.5% v/v) is recommended as a medium for sensitivity testing.
3. Test organisms are inoculated in MUELLER HINTON broth and incubated at 37°C for 18~20 hours.
4. The inoculum size is one loopful (inner diameter 1 mm: weight of wet bacteria ca. 2 mg) of a  $10^{-2}$  dilution of a gram-positive broth culture or  $10^{-3}$  dilution of a gram-negative broth culture; the inoculum is streaked over 2 cm in length on the plate.
5. The interpretation is made macroscopically after 18~20 hours of incubation at 37°C and the lowest concentration at which bacterial growth is completely inhibited is designated as MIC.
6. Bacterial strains isolated from clinical materials should be tested while they remain fresh within 2-3 culture generations. For reference strains, *Staphylococcus aureus* FDA 209-P JC-1 and *Escherichia coli* NIHJ JC-2 are used.

The following guidelines have been proposed for estimation of potentiation of activities by SMX and TMP.

- a) When organisms are sensitive to both SMX ( $MIC \leq 800$  mcg/ml) and TMP ( $MIC \leq 100$  mcg/ml):  
Potentiation is estimated by calculating FIC (fractional inhibitory concentration) index. FIC values can be calculated by dividing the MICs of SMX and TMP in the combination by the MICs of SMX and TMP when used alone. FIC index is the sum of FIC values. When this index is below 1.0, potentiation is indicated.
- b) When organisms are resistant to either SMX ( $>800$  mcg/ml) or TMP ( $>100$  mcg/ml):  
If the MIC of SMX or TMP in the combination against a test organism is less than one fourth that of SMX or TMP when used alone, potentiation is indicated.
- c) When organisms are resistant to both SMX ( $>800$  mcg/ml) and TMP ( $>100$  mcg/ml):  
If the growth of a test organism is completely inhibited by the combination of SMX-TMP (the range of their combination concentrations: SMX 800, 400, 200 mcg/ml and TMP 100, 50, 25 mcg/ml, respectively), potentiation is indicated.