

Sulfamethoxazole と Trimethoprim の研究

基礎的検討 II

細菌の増殖におよぼす作用

吉田 正・元川清司・片桐 謙

塩野義製薬株式会社研究所

栗田口重美・白根千賀子

田辺製薬株式会社生物研究所

細菌の発育阻止作用について、SMXとTMPが相乗的に作用することは、前報¹⁾で明らかにされた。本報では、大腸菌、ブドウ球菌の感受性株について、殺菌作用に関する併用効果を評価した。まず殺菌作用を生存率の低下ということで規定した。SMXとTMPを併用して作用させた場合の生存率を測定し、単独に与えたときの作用と比較した。それによつて、併用による殺菌濃度の低下という基準に加えて殺菌作用の増大という意味からも、相乗効果を判定することにし、若干の知見を得たので報告する。

実験材料と方法

1. 供試菌株: *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Escherichia coli* CN 314, *Staphylococcus aureus* FDA 209-P JC-1, *Staphylococcus aureus* SMITH, *Staphylococcus aureus* TERASHIMA。

2. 培地の調製: a) MUELLER-HINTON broth 培地: MUELLER-HINTON 培地 (栄研) の規定量を水に懸濁後、自然滲過して寒天を除いて滅菌、冷後、溶血性馬血液 5% (v/v) を添加してから無菌的に滲過した。

b) SR medium base (Difco)

c) パラアミノ安息香酸 0.05%, 酵母エキス 0.5% を含む普通寒天

d) Heart infusion broth

3. 生存率の測定

MUELLER-HINTON 培地に 37°C, 20 時間培養した菌液を希釈して最終菌数で $10^4 \sim 10^5$ 個/ml になるように接種して、液体希釈法によつて a) または b) の培地中に、薬剤と共に、37°C 静置培養し経時的にサンプリングした。菌は、無菌食塩水で 2 回洗滌するか、あるいは、そのまま希釈後、c) または d) の培地を用いて生菌数を測定した。ここで得られた生菌数の接種菌数に対する百分率を計算して、生存率とした。

4. Chequer board titration method

SMX および TMP の各 2 倍希釈系列を作り、SMX を横に、TMP を縦にして並べ、これを方角に組み合わせる用いた濃度範囲であらゆる組合せの SMX-TMP を含む培地溶液を用意した。

菌を接種して、37°C, 24 時間おいて濁りの有無から、各希釈系列の最小発育阻止濃度を判定した。この結果は、図 2 および図 3 に示したように、各濃度の対数で、目盛りされたグラフに、プロットして MIC 曲線を得た。菌の発育陰性の培養は、すべて 3) の方法にしたがつて、生存率を求めた。生存率が 10% から 1% の間にある試験管のうち、最小濃度の組合せを判定して、10% 生存率曲線を描いた。1%, 0.1% の生存率曲線も同様に求められた。

実験結果

SMX および TMP を単独に与えたとき、大腸菌、ブドウ球菌の増殖に及ぼす作用をみるために、37°C, 20 時間作用後、生菌数を測定した。

図 1 Antibacterial activities of SMX and TMP against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in MHB medium
MHB: MUELLER-HINTON medium with 5% lysed horse blood
Open symbols (○, △) represent MIC value.

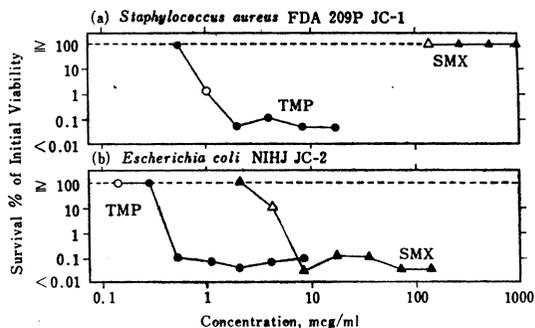
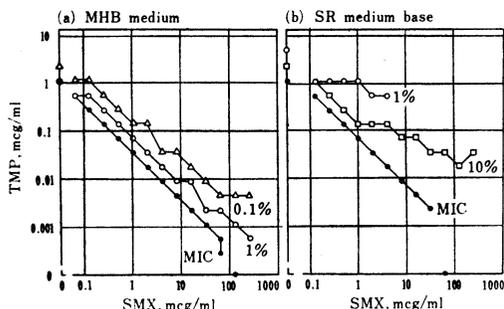


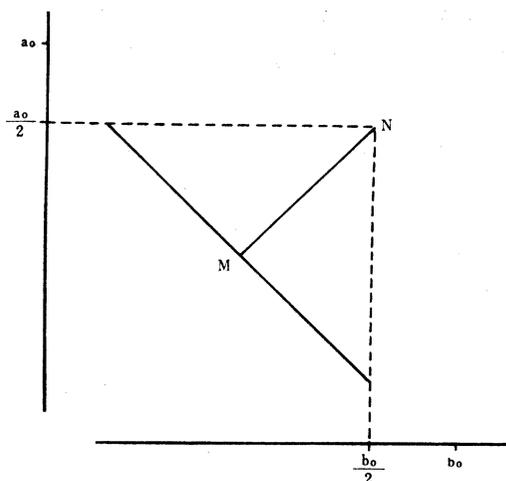
図1に示したとおり、大腸菌, *Escherichia coli* NIHJ JC-2株の生存率は、著しく減少し、0.1%になる濃度は、SMXでMICの2倍、TMPではMICの4倍であった。しかしながら、高濃度を作用させても生存率は、それより低下せず、なお生存菌が認められた。ブドウ球菌, *Staphylococcus aureus* 209-P JC-1株でも、TMPは、生存率を0.1%に低下させる濃度はMICの4倍であった。これに比してSMXは静菌的であり、1000 mcg/mlでも生菌数を減少させなかつた。

このようにして、生存率の低下から殺菌作用をみることにすると、TMPは、これらの供試菌に同様に殺菌的である。SMXは、大腸菌には、殺菌的といえるが、ブドウ球菌には静菌的である。次に、SMXとTMP併用の殺菌作用をみるために、chequer board titration methodに準じて、種々の濃度を組み合わせたSMX-TMPが、生存率に及ぼす影響を調べた。ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 209-P JC-1株は、MHB培地で測定すると図2aに示したようになり、MICのプロットは直線になった。これより発育阻止作用における併用効果が相乗的であり、両剤のMIC比で最も強い相乗作用を示すことが認められた。

図2 Synergism of SMX and TMP on the loss of viability of *S. aureus* FDA 209P JC-1 in MHB medium and SR medium base
 (●) MIC, (□) $0.1N > n \geq 0.01N$,
 (○) $0.01N > n \geq 0.001N$, (△) $n < 0.001N$
 N: Inoculum size (a) 2.6×10^4 /ml,
 (b) 6.5×10^4 /ml
 n: Viability after 24 hrs incubation



相乗効果の判定は以下のとおりに行つた。図2および図3に示したグラフは、縦軸、横軸がそれぞれTMP、SMXの濃度の対数で目盛りされており、各プロットは、指定された反応を起させる組合せ濃度の最小値を表わしている。いま、右上の図においてMICを基準にとると、両剤の単独のときのMICを、あらわす点 a_0 , b_0 が軸上



にプロットされる。薬剤は2倍希釈されているから、併用効果は、 $a_0/2$ および $b_0/2$ の濃度の組合せを示す点Nに、MICがくるとき、相加作用となる。点線内のNを除く点にあるときは、すべて相乗作用と判定される。実験値より、TMPとSMXを組合せたときのMICは、図2に示したとおり、45°線に直交する直線上にあらわれている。両剤の組合せ濃度を、

$$\text{TMPの濃度 } a_m = a_0 \left(\frac{1}{2}\right)^m, \quad m=0, 1, 2, 3, \dots$$

$$\text{SMXの濃度 } b_n = b_0 \left(\frac{1}{2}\right)^n, \quad n=0, 1, 2, 3, \dots$$

とすると、FIC index は

$$\text{FIC index} = \left(\frac{1}{2}\right)^m + \left(\frac{1}{2}\right)^n$$

と表わされ、組合せ濃度のMICが左上から右下への直線上にあるということは、対数変換によつて

$$m+n=k, \quad k: \text{constant}$$

ということであり、 $m=n$ のときFIC indexが最小の値を示すことになる。このときのTMPとSMXの濃度比は、単独のときのMIC比に等しくなる。なお、MNの距離がながくなる程、 k の値が大きくなるから相乗効果は強いと判定される。

すなわち、両剤のMICのそれぞれ1/64濃度を併用しても発育阻止されることが示された。

次に、生存率1%にまで殺菌する組合せ濃度をプロットすると、MIC曲線によく平行した直線を画くことができ、殺菌作用についても同じ理由から相乗作用が認められた。生存率0.1%の曲線についても、同様に相乗作用は著しい。前述のとおり、SMX単独では、1000 mcg/mlでも菌数減少がないにもかかわらず、TMPを併用させると、低濃度でも殺菌的にかわる。相乗効果は、両剤のMIC比で最も強く、各MICの1/32濃度、すなわち、SMX 4.3 mcg/mlとTMP 0.035 mcg/mlを併用すれ

ば生存率は、0.1%に低下し殺菌的に作用するようになることを示した。SR培地で、同様の実験を行ったところ、図2bに示したとおり、生存率は1%にとどまり、相乗効果も弱くなった。

大腸菌 *Escherichia coli* NIHJ JC-2 株について、同様の検討をした。図3に示したとおり、MIC曲線と、0.1%曲線とは、ほとんど直線を示し相乗効果が強いことが認められた。そこで、この大腸菌株に対するSMX、TMPおよびその併用の作用経過を追跡して、増殖曲線を描いた。

図4に示したように、SMXもTMPも、MICに近い濃度を作用させると生菌数は一時的に減少した後、再び増加することが認められた。SMXは、2~3時間後に初

図3 Synergism of SMX and TMP on the loss of viability of *E. coli* NIHJ JC-2 in MHB medium
(●) MIC, (△) n<0.001N
N: Inoculum size (1.1×10⁴/ml)
n: Viability after 24 hrs incubation

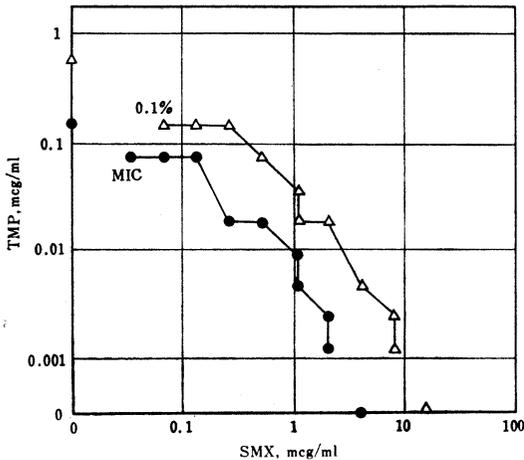
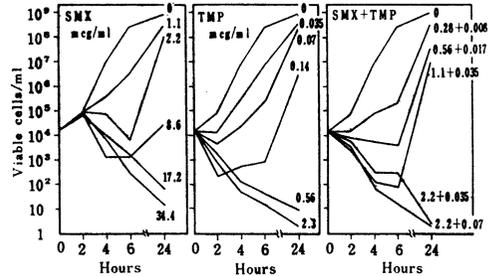


表1 Stimulation of bactericidal action by the combination of SMX and TMP against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Test organism	Medium	Minimal bactericidal concentration (mcg/ml)		Bactericidal concentration (mcg/ml)
		SMX	TMP	SMX+TMP
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	SR	>1100	2.2	1.1 +0.14
<i>S. aureus</i> FDA 209P JC-1	MHB	>275	1.1	2.2 +0.035
<i>S. aureus</i>	SR	>50	>1.56	1.56+0.19
<i>S. aureus</i>	SR	>200	6.25	3.12+0.39
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	SR	12.5	0.39	6.25+0.19
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	MHB	4.4	0.56	0.56+0.017
<i>E. coli</i> CN-314	SR	25	1.56	6.25+0.19

図4 Effect of SMX, TMP and the combinations of the growth curve of *E. coli* NIHJ JC-2 in MHB medium



めて生菌数が減少することが特徴的であり、17.2 mcg/ml以上になると菌増殖は回復しなくなる。一方、TMPは、すぐに生菌数の減少が始まり、0.56 mcg/mlで生菌数の減少がそのまま続いた。併用したときは、SMX単独にみられた初期の増加が認められなくなり、両剤の特徴を兼ねた作用の経過が観察された。最小殺菌濃度の組合せは、SMX 2.2 mcg/mlとTMP 0.035 mcg/mlとなった。さらに高濃度の併用についても調べたが完全に死滅させる濃度組合せは得られなかった。

2, 3の感受性株について同様の実験を行い生菌数が、接種時よりも低下したときの濃度を求めて、表1に示した。

ブドウ球菌は、実施した濃度範囲では、SMXによる殺菌効果は全く認められなかったが、TMPの併用によって、殺菌効果は著しく高くなることが認められた。

考 察

薬剤の殺菌作用を調べるには簡便法としてELEK等²⁾によるレプリカ法、またはCHABBERT³⁾によるCellophan transfer法を応用することが出来る。しかしながら、これらの方法は、殺菌濃度の終末点の定量的評価には困難を伴う。とくにSMXおよびTMPは、いずれも

生菌数を低減させるが、完全に殺菌しない(図1(a), (b))。この種の薬剤では、殺菌作用に異なつた評価法が必要と考えられた。薬剤を作用させてから、生菌数が接種菌数より、どれ位減少するか測定して、これを生存率として計算して、殺菌作用の度合を判定することにした。すなわち、生存率10%, 1%, 0.1%等の終末点を基準として、生存率曲線を描き、定量的な裏付けを試みた。

そこで、すでにPECHERRE等⁴⁾が行つたように、図2および図3に示したような生存率曲線から、併用による殺菌効果の判定を容易にすることができた。

殺菌作用における相乗効果には、2つの意味が考えられる。まず殺菌作用、正確にいうと、単独に作用させたときと同程度の生存率を示す組合せ濃度が、単剤に比して低くなることである。第2には、いずれの単剤に比べても生存率が低減するか、あるいは静菌的作用の薬剤を併用したとき殺菌的になることである。図2および図3の結果は、これら2つの定義について評価するのに都合がよい。大腸菌に対して、SMX-TMP併用は濃度を低下させても、殺菌率は99.9%を維持されているので、第1の定義から相乗的であるといえる。一方、ブドウ球菌に対しては、殺菌的濃度を著しく低下させ、静菌作用のSMXを殺菌的にかえる、つまり第1および第2の定義ともに充たす点でとくに顕著な相乗効果が認められた。これによって従来報告された⁵⁾ように、単剤よりも、併用では、殺菌濃度が低下するという評価に加えて殺菌作用の程度についても検討することが出来た。

結 論

供試の大腸菌、ブドウ球菌の感受性株に対して、SMX, TMP 両剤は、完全に殺菌させる濃度は認められなかつたが、両剤を併用すると、低濃度の組合せで殺菌的に作用するようになり、しかもMIC比で最もたかい相乗効果が得られた。

文 献

- 1) Sulfamethoxazole と Trimethoprim の研究。栗田口重実, 他: I. 試験管内抗菌作用に関する研究。Chemotherapy 投稿中
- 2) ELEK, S. D. *et al.*: Laboratory aspects of combined antibiotic treatment. Brit. Med. J. 2: 1298, 1953
- 3) CHABBERT, Y. A. & J. C. PATTE: Cellophan transfer. Application to the study of activity of combinations of antibiotics. Appl. Microbiol. 8: 193, 1960
- 4) PECHERE, J. C. *et al.*: Etude *in vitro* de l'effet bactéricide de l'association sulfamethoxazole-trimethoprim sur 59 souches microbiennes hospitalières. Thérapie 25: 13, 1970
- 5) BUSHBY, S. R. M.: Combined antibacterial action *in vitro* of trimethoprim and sulfonamides. Postgraduate Med. J. Suppl. 45: 10~18, 1969

STUDIES ON SULFAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM

Fundamental Research II

Effects of SMX, TMP and Combination of SMX-TMP on Bacterial Growth

TADASHI YOSHIDA, KIYOSHI MOTOKAWA and KEN KATAGIRI

Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

SHIGEMI AWATAGUCHI and CHIKAKO SHIRANE

Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

Bactericidal activities of SMX, TMP and combinations of SMX-TMP *in vitro* were investigated with several strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Complete viable counts were performed in cultures containing the drugs singly and together according to the chequer-board titration method and bactericidal action was estimated by a decreased rate of survived bacteria.

In the combination, significant bactericidal effects were exerted by the far lower concentrations than the MIC of each drug alone, although they, when acting singly, did not totally eliminate viability. The synergism on bactericidal effect was found to be most pronounced with the combination equal to the ratio of MIC of either drug alone.