

Sulfamethoxazole と Trimethoprim の研究

基礎的検討 IV

感染動物実験における作用

片桐 謙・島岡 登・松浦真三・砂川則雄・坂東 孝・田中 融

塩野義製薬株式会社研究所

栗田口重美・川野嘉滋・吉田弘嗣

田辺製薬株式会社生物研究所

試験管内の sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP) 2 剤による相乗作用が報告されると同時に動物実験において BÖEHNI^{1),2)} GRUNBERG 等³⁾ および BUSHBY 等⁴⁾ によりその作用が確認された。今回我々はマウス感染症に対する併用効果を追究する目的をもって、まず各薬剤のマウス血中濃度を測定し、ついでムチンを加えた感染とムチンを加えない感染についてグラム陽陰各 2 種の病原菌を用いて合剤の作用を追究した。さらに大腸菌の SMX 耐性菌および肺炎桿菌の局所感染症についても検討を行なつたのでその成績を報告する。

1. 血中濃度の測定 (SMX または TMP 単剤経口投与の場合)

a) 材料：使用した動物は DS 系マウス 5 週令 (19±2g) の雌、薬剤は 100メッシュ篩過の粉末を 5%アラビアゴム末溶液をテフロン製ボッターで乳剤化して経口投与した。脱脊髄を行なつたマウスを開胸し、心臓よりヘパリン処理した注射筒を用い 0.3 ml 採血し、5 匹分をプールして試料とした。この血液を 8 倍以上、生理食塩水にて希釈すれば測定値におよぼす血液の影響をなくすることができる。

b) 測定法 (pulp disc diffusion 法)：被検菌としては、大腸菌 K-2 株を使用した。すなわち、37°C 18 時間培養し、コールマン比色計 OD₆₅₅=0.100 (約 5×10⁸/ml) に調製した菌液を作り菌層用培地に 10⁴/ml になるように接種した。使用した培地は SR 培地 (Difco) で寒天 0.8% 添加した径 9 cm のシャーレに 14 ml の基底層用培地を分注して固つたところに菌液ならびに感受性増大用薬剤 (ST 合剤の相乗効果を利用する) を含有する培地 7 ml を重層した。パルプは東洋濾紙 NO. 26 の直径 10 mm のディスクを使用した。37°C、18 時間培養して阻止円径を測定し、常法どおり力価を計算した。

c) SMX の測定には、菌層用培地に TMP を添加して 0.027 mcg/ml とする。これによつて感度は 17 倍増加する。SMX の標準希釈液には 86~5.5 mcg/ml の薬剤を用いる。ただし、血液中に SMX が 30 mcg/ml 以

上ある場合に測定可能である。

d) TMP の測定には菌層用培地に SMX-Na を添加して 0.56 mcg/ml とする。この方法により、感度は 12 倍増強される。TMP の標準希釈液には 0.7~0.04 mcg/ml の薬剤を用いる。ただし、血中に TMP が 0.2 mcg/ml 以上あれば測定可能である。

e) 成績：TMP 1g/kg 投与時のマウス個体間の血中濃度値のばらつきについて、各 5 匹の 30 分、60 分における測定値は 114.0±17.7 mcg/ml, 93.0±28.5 mcg/ml と割合に安定した成績が得られたので時間経過の検定は 1 群 5 匹の血液をプールして測定した (図 1, 2)。各薬剤の血中濃度の最高値は 30 分から 2 時間の間に到達し、その濃度はよく dose に response している。表 1 に明らかなように 500 mg/kg の投与によつて 2 時間値は SMX が 380 mcg/ml であるのに対して TMP はわずか

図 1 Blood concentrations of TMP after oral administration in mice

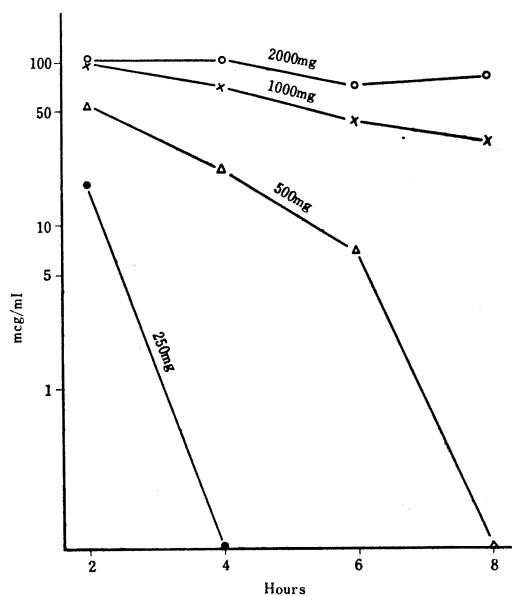


図2 Blood concentrations of SMX after oral administration in mice

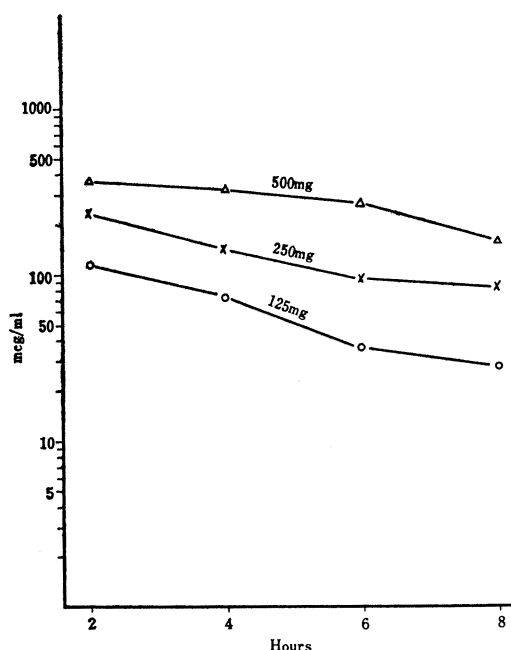


表1 Blood concentrations of SMX and TMP after oral administration in mice (Single dose of 500 mg/kg, separately)

	SMX (mcg/ml)	TMP (mcg/ml)	SMX/TMP
2	385.0	56.0	6.9
4	315.0	22.4	14.0
6	272.0	7.3	37.3
8	166.0	—	—

に 56 mcg/ml であった。しかし、血中濃度の推移は両者に大差を認めず、かなり長時間血中に残存している。

2. 実験感染症の材料と方法

A) ムチンを用いない実験感染症

使用菌株とその試験管内感受性を示すと次のとおりになる。

	MIC (mcg/ml)		min. FIC index
	SMX	TMP	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (シオノギ株)	6.25	0.78	0.31
<i>Diplococcus pneumoniae</i> (I型, シオノギ株)	50.0	1.56	0.25

供試マウスは ICR-JCL系, 4週令 (20±2 g) 雌を1群10匹使用した。ただし、足趾感染症には DS系4週令

(18±2g) 雌を用いた。

a) 肺炎球菌感染症: Heart infusion broth (Difco) 寒天斜面で18時間培養し heart infusion broth にて希釈し, 0.1 ml (400 LD₅₀, 1.2×10³/mouse) を腹腔内に接種した。

b) 肺炎桿菌感染症 (敗血症): 肺炎球菌と同様な手技により菌液を調製し, その0.1 ml (50 LD₅₀, 7.7×10⁴/mouse) を腹腔内に接種した。

c) 肺炎桿菌足趾感染症: 菌液0.05 ml (10³/mouse) を0.5 mlの注射筒1/5針にて右後肢足趾内に注射した。

d) 薬剤の投与: 接種と同時に, 4時間, 8時間の3回経口的に行ない, 判定は腹腔内感染の場合は感染後4日目にその生死を観察し, 実験はすべて3回繰り返した。足趾感染に対する効果の判定は感染48時間後にマウスを屠殺後両足の跗関節より切断し, 右後肢と左後肢の重量差をもつて炎症浮腫の重量とする。対照群と処置群の浮腫重量比より阻止率を計算した。

e) 薬剤の調製: すべて血中濃度の測定の場合と同様である。併用効果を試験する場合には両薬剤をあらかじめ所定の比率で混合しておき, 用いるのぞみ秤量した。ED₅₀はプロビット法により推定した。すなわち, 反応百分率 (生存率, 浮腫阻止率) を C. I. BLISS のプロビット変換を行なうと, その変換値と対数用量の関係は直線で表現される。この直線を最大法を用いて推定し, その直線性の検定は χ^2 検定により確かめた。その後に ED₅₀とその信頼限界 (95%) を算出した。なお, ED₅₀値は分割投与した薬剤の1回投与量で表現している。

B) ムチンを用いる実験感染症

使用菌株とその試験管内感受性を示すと次のとおりになる。

	MIC (mcg/ml)		min. FIC index
	SMX	TMP	
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH株(diffuse type)	12.5	0.39	0.29
<i>Escherichia coli</i> 1346株	3.12	0.02	0.25
<i>Escherichia coli</i> 0-126株	>200*	0.19	—

* 200 mcg/ml において不完全阻止

供試マウスは ddN系5週令 (体重20±1 g) の雌で1群10匹を使用した。

a) ブドウ球菌感染症: Heart infusion broth (Difco) 処方の2倍濃度のものにて18~20時間培養の菌液を heart infusion broth にて希釈し, 10% hog gastric mucin (和光純薬) と等量混合し, その0.5 ml (100LD₅₀, 2.2×10²/mouse) を腹腔内に接種した。

b) 大腸菌感染症: Heart infusion broth (栄研)

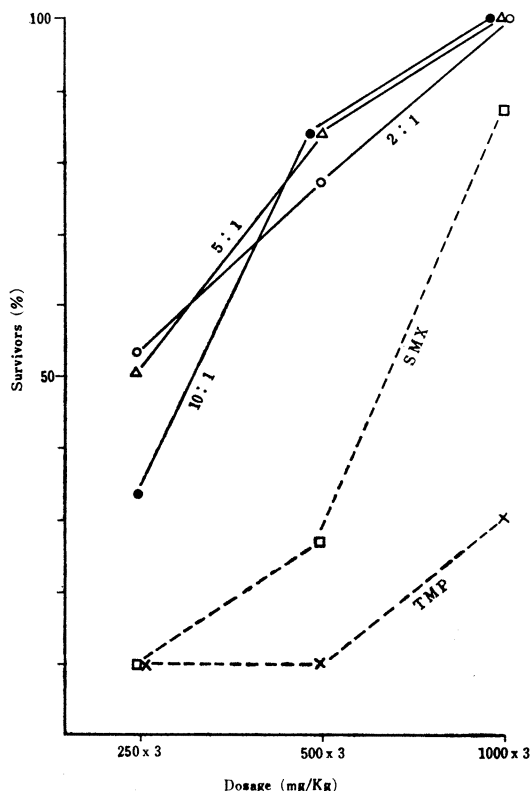
に接種し、37°C、18~20時間培養した菌液を希釈し、10% hog gastric mucin と等量混合する。その 0.5 ml (*Escherichia coli* 1346 は 100LD₅₀, 4.8×10^2 /mouse, *Escherichia coli* 0-126 は 100LD₅₀, 7.4×10^2 /mouse) を腹腔内に接種した。

c) 薬剤: 接種後 30 分、2 時間および 6 時間の 3 回、経口的に投与した効果の判定はブドウ球菌では感染後 5 日、大腸菌では感染後 7 日でマウスの生死をもつて終了点とした。実験は数回繰返し、その平均値を求めた。なお、観察期間中に死亡したマウスは菌培養を行なつて感染死の確認をしている。

3. 実験成績

a) 肺炎球菌感染症: 今回の動物実験中で耐性菌の特殊例を除き最も感受性の低い菌であり投与薬剤量として大量を必要とした。成績は図 3、表 2 に示した。特に TMP 単独では高濃度では毒性が出るために正確な ED₅₀ が求められなかった。しかし、併用成績は用いた 2:1, 5:1, 10:1 のいずれの組み合わせにおいても、その ED₅₀ は SMX 単独の ED₅₀ より低値であり、その信頼限

図 3 Dose effect curves of various combination and their components against *Diplococcus pneumoniae* infections in the mouse



界値は SMX のそれと交叉することなく、有意の相乗効果が認められた。ただし、用いた組み合わせ相互の ED₅₀ には有意の差を見出すことはできなかった。

b) 肺炎桿菌感染症 (敗血症): この成績は図 4、

図 4 Dose effect curves of various combination and their components against *Klebsiella pneumoniae* infections in the mouse.

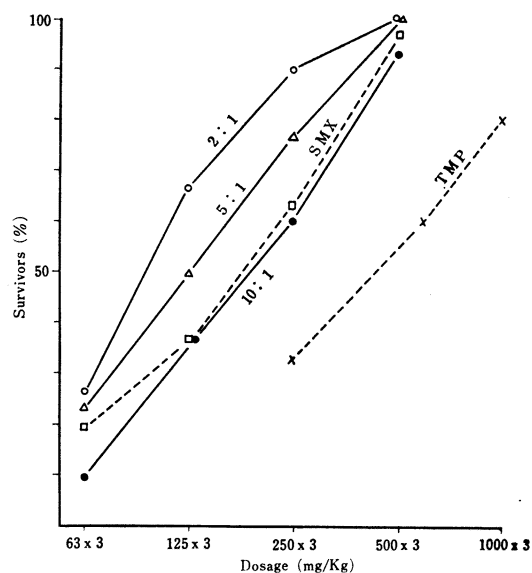


図 5 Dose effect curves of various combination and their components against *Klebsiella pneumoniae* infections in the foot pad of mouse

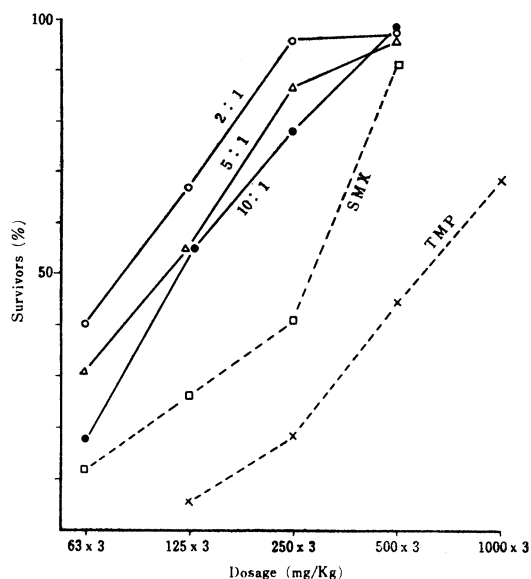


表2 The enhancement of activity of various combination on the experimental infections of the mouse

Drug	ED ₅₀	a+b	Confidence limits	increase in activity index	
				$\frac{a}{a_0} + \frac{b}{b_0}$	Effect
<i>Diplococcus pneumoniae</i>					
SMX (a ₀)	596.4		501.5~715.9		
TMP (b ₀)	2710.3		1160 ~∞		
SMX+TMP 2+1	250.5	(167.0+83.5)	85.3~327.0	0.31	+
5+1	257.7	(214.7+43.0)	142.8~319.0	0.38	+
10+1	310.7	(282.5+28.2)	246.8~367.7	0.48	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (sepsis)					
SMX	153.3		121.4~193.0		
TMP	395.2		276.5~540.2		
SMX+TMP 2+1	95.3	(63.5+31.8)	76.3~117.1	0.49	+
5+1	121.5	(101.2+20.3)	97.4~150.4	0.71	+
10+1	176.5	(160.4+16.1)	142.5~218.6	1.09	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (foot pad)					
SMX	218.6		163.4~307.3		
TMP	592.0		430.3~955.3		
SMX+TMP 2+1	79.1	(52.7+26.4)	47.1~106.4	0.29	+
5+1	102.0	(85.0+17.0)	67.2~135.9	0.42	+
10+1	123.1	(111.9+11.2)	90.2~160.0	0.53	+
<i>Staphylococcus aureus</i>					
SMX	24.2		19.7~ 28.7		
TMP	90.0		72.7~110.1		
SMX+TMP 2+1	6.9	(4.6+2.3)	5.4~ 8.6	0.31	+
5+1	5.2	(4.3+0.9)	4.0* 6.5	0.19	+
10+1	8.8	(8.0+0.8)	5.9~ 11.6	0.34	+
<i>Escherichia coli</i> (SMX-sensitive)					
SMX	10.0		7.9~ 13.0		
TMP	22.4		11.6~ 29.7		
SMX+TMP 2+1	1.9	(1.3+0.6)	1.5~ 2.3	0.16	+
5+1	2.9	(2.4+0.5)	2.3~ 3.5	0.26	+
10+1	2.8	(2.5+0.3)	1.9~ 3.9	0.26	+
<i>Escherichia coli</i> (SMX-resistant)					
SMX	>400				
TMP	47.9		39.4~ 57.9		
SMX+TMP 2+1	19.7	(13.1+6.6)	15.5~ 24.3		+
5+1	42.4	(35.3+7.1)	31.8~ 58.9		—
10+1	62.3	(56.6+5.7)	44.9~106.9		—

表2に示す。単剤で共に治療効果を示す薬物であるが、10:1の併用では相乗作用を認めることができなかった。ただし、2:1、5:1ではやや相乗効果を認めた。なお、この菌に対して試験管内では min. FIC 値 0.31 で十分に相乗効果が認められている。

c)肺炎桿菌感染症(足趾浮腫):使用したマウスの系統が異なるので、直接の比較考察はむずかしいが、図5、表2の成績について考察すると、単独のED₅₀は足趾浮腫に対する作用の方が敗血症の場合よりやや劣っているが、相乗効果は用いられた3種の組み合わせすべてにおいて認められている。

d)ブドウ球菌感染症:実験成績は図6、表2に示

図6 Dose effect curves of various combination and their components against *Staphylococcus aureus* infections in the mouse

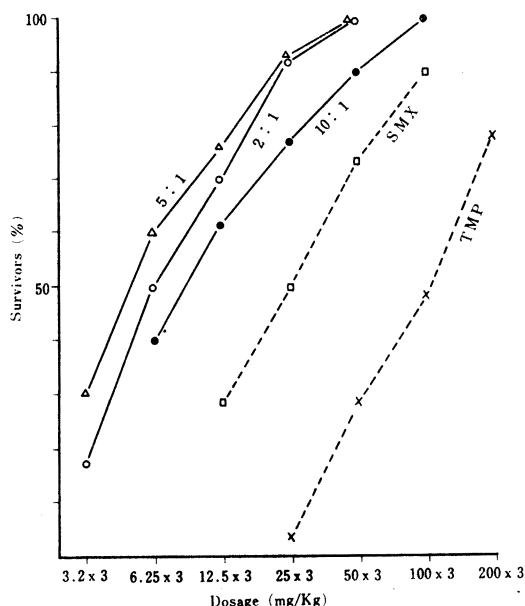
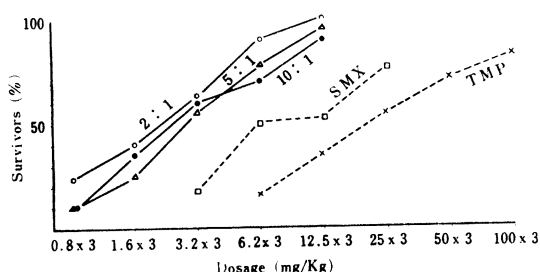


図7 Dose effect curves of various combination and their components against *Escherichia coli* (SMX sensitive strain) infection in the mouse

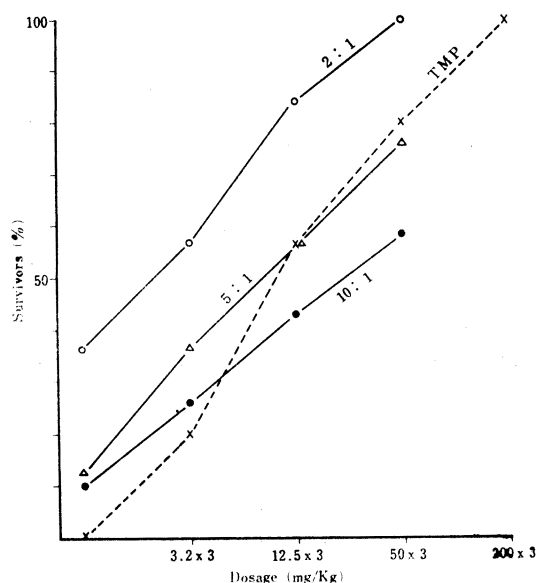


した。mucin を使わない感染症に比較すると、mucin を使用した感染症においては攻撃菌量の少ないことも関係してか、ED₅₀は約1/10と低くなっている。併用効果もいずれの組み合わせにおいても単剤のED₅₀より小さくなっている。

e)大腸菌感染症:今回の動物実験の中で、最も感受性の高い実験系であるとともに相乗効果も著明であることが図7、表2に示されている。2:1の併用においてはそのED₅₀がSMX単剤の約1/5に減量されている。

f)大腸菌感染症(SMX耐性菌):SMXに200mg/mlにて不完全耐性を示す大腸菌の実験においては当然のことながらSMX 400mg/kg 3回投与によってもED₅₀の効果を認めることができなかった(図8、表2)。さらにTMPに対してもこの菌はSMX感受性1346株よりわずかながら強い抵抗性を示している。2:1の併用を行なうとそのED₅₀はTMP単剤のED₅₀よりはるかに低い用量を示し、明らかに相乗効果が認められた。5:1の併用においても相乗効果は認められるが有意の差とは考えられない。10:1になると、相乗効果は認められなかった。

図8 Dose effect curves of various combination and their components against *Escherichia coli* (SMX resistant strain) in the mouse



4. 考 察

SMX, TMPは共にその作用機作が静菌的であるために、殺菌の化学療法剤よりも動物実験が困難なことは容易に類推されるところである。今回、相乗効果を動物実

験によつて確認するにあつては、第1に実験結果の再現性を高めることに努力した。すなわち、単剤の作用量を正確に求めることができれば、それらの相乗効果を論ずることが不可能になるからである。このために病原菌の LD₅₀ および実験条件の規制をきびしくした。また、投与する薬剤の粒子の大きさ、乳剤の作り方を統一し、かつ投与方法も1回投与より3回投与のほうがより安定した結果が得られることを確認した後に本実験を実施した。さらに、すべて同一の実験系を数回繰返し、その成績について解析を行なつた。相乗効果の検討は2:1, 5:1, および 10:1 の3種の組み合わせについて行なつた。BÖHNI¹⁾ 等はこの他に TMP の比率の高い投与による *Proteus vulgaris* の実験を行ない 1:2 でもつとも高い効果を示している。我々は *in vitro* において FIC を算出できる程の精度の高い広範な実験は実施することが困難であつた。また、単剤投与より併用投与の場合、統計的に有意に優れている相乗作用を認めることができたが、いかなる配合比が優れているかについては有意差を認めなかつた。

4種の病原菌を用いて、通常行なわれている全身感染症(敗血症)の検討を行なつたが、さらに肺炎桿菌による足趾局所炎症についても効果を追究し敗血症と相似た成績を得ることができた。

BÖHNI¹⁾ がラットの腎臓瘍に対する作用を報告しているが、マウス敗血症の成績と大差なかつた。したがつてこの相乗効果は全身感染症にも局所感染症にも共に発揮されるようである。耐性菌を用いた動物実験については GRUNBERG 等³⁾ の3種の菌に関する報告がある。すなわち2種の菌には相乗効果を認めたが SMX 耐性肺炎桿菌には相乗効果が認められない。今回の大腸菌 SMX 耐性菌の成績では 2:1 の併用には相乗効果が認められたが 5:1, 10:1 の併用ではその相乗効果を明らかにすることはできなかつた。

動物実験の成績を試験管内の成績と比較すると1つの細菌に対する SMX と TMP の効力比が常に試験管内と動物実験とでは逆転していることは文献の成績とも一致した。このくい違いを解明する1つの試みとして今回の感染実験系が一次敗血症を主とすることを考慮してまず SMX または TMP の単独経口投与による血中濃度の測定を行なつた。この結果血中へのとりこみは SMX が TMP より高いことを知り単剤で TMP の動物実験成績が SMX 成績より劣ることの1つの理解ができた。動物

における吸収排泄の成績⁵⁾からして、併用した場合の各々の血中濃度はお互いに干渉することが少ないこと、2:1 の投与で血中濃度は 20:1 の前後の濃度比を維持できることから考えて動物実験において SMX/TMP の併用による相乗作用は期待されるものと考ええる。

5. 結 論

1) SMX感受性の4種の病原菌を用いたマウス実験感染症において、ST合剤の相乗効果を確認することができた。特に SMX と TMP の混合比が 2:1, 5:1 の組み合わせでは、すべての実験系において相乗効果が認められた。

2) SMX 耐性大腸菌に対しては 2:1 の併用により相乗効果が認められた。

3) 肺炎桿菌を用いて全身性および局所性感染症に対する合剤の作用を比較し、両者に大差なく相乗効果が示された。

(この研究はシオノギ、田辺、日本ロシュ3社共同実験計画に基づいて実施されたものである)。

文 献

- 1) BÖHNI, E.: Über antibakterielle Eigenschaften der Kombination Trimethoprim-Sulfamethoxazole in Vergleich mit Antibiotika. Schwitz. Med. Wschr. 99 (42): 1505~1510, 1969
- 2) BÖHNI, E.: Chemotherapeutic activity of the combination of trimethoprim and sulfamethoxazole in infections of mice. Postgrad. Med. J. Suppl. 45: 16~21, 1969
- 3) GRUNBERG, E. & W. F. DELORENZO: Potentiation of sulfonamides and antibiotics by trimethoprim [2, 4-Diamino-5-(3, 4, 5-trimethoxybenzyl) pyrimidine]. Antimicrobial agents and chemotherapy 1966: 430~435, 1967.
- 4) BUSHBY, S. R. M. & G. H. HITCHINGS: Trimethoprim, a sulfonamide potentiator. Br. J. Pharmac. Chemoth. 33: 72~90, 1968
- 5) 小川保直ほか: Sulfamethoxazole と trimethoprim の研究——Sulfamethoxazole trimethoprim mixture のラットにおける吸収、分布、排泄、代謝に関する検討; Sulfamethoxazole について。Chemotherapy 投稿中

STUDIES ON SULFAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM

Fundamental Research IV

Antibacterial activities of SMX, TMP
and combinations of SMX-TMP *in vivo*

KEN KATAGIRI, NOBORU SHIMAOKA, SHINZO MATSUURA,

NORIO SUNAGAWA, TAKASHI BANDO and YU TANAKA

Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

SHIGEMI AWATAGUCHI, YOSHISHIGE KAWANO and HIROTSUGU YOSHIDA

Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

- 1) The combination of SMX and TMP in the four experimental infections of mice proved more effective than either SMX or TMP alone. Especially in combinations of SMX and TMP in the proportion of 2+1 and 5+1 are proved synergistic in these four experimental infections.
- 2) When tested against sulfamethoxazole resistant strain of *Escherichia coli*, 2+1 combination showed a synergistic effect.
- 3) The synergistic effects were similarly observed both on the experimental sepsis and on the experimental foot-pads infections caused by *Klebsiella pneumoniae* in mice.