

## Sulfamethoxazole と Trimethoprim の研究

—臨床分離株に対する抗菌力についての分析—

吉田弘嗣・春日 修・白根千賀子・粟田口重美

田辺製薬株式会社生物研究所

吉村幹夫・南出和喜夫・飯沼房恵・西村治雄

塩野義製薬株式会社臨床検査部

Sulfamethoxazole (SMX) と trimethoprim (TMP)

の抗菌力は両者を併用することにより著しく増強されることが BUSHBY & HITCHINGS<sup>1)</sup>(1968), BÖHNI<sup>2)</sup>(1969), WATERWORTH<sup>3)</sup>(1969) 等により報告されている。著者等のうち、粟田口等は、SMX, TMP の試験管内抗菌力について標準菌株ならびに保存菌株の各種細菌を用いて検討した成績をすでに報告した<sup>4)</sup>。

今回、SMX-TMP 合剤の臨床治験症例より分離された新鮮臨床分離株を用い、SMX, TMP 単独ならびに両剤の各種濃度を組合せた場合の抗菌作用について検討し、その成績を種々の角度から分析し、若干の知見を得たので報告する。

表1 Test organisms

Test organisms	Numbers of strains
<i>Staph. aureus</i>	72
<i>Staph. epidermidis</i>	44
<i>Strept. hemolyticus</i>	11
<i>Strept. viridans</i>	33
<i>Strept. faecalis</i>	15
<i>D. pneumoniae</i>	6
<i>Serratia</i>	1
<i>E. coli</i>	159
<i>Enterobacter</i>	9
<i>Citrobacter</i>	8
<i>Achromobacter</i>	1
<i>Klebsiella</i>	17
<i>Shigella</i>	10
<i>Salmonella</i>	10
<i>Proteus</i>	24
<i>Pseudomonas</i>	9
<i>B. amitratum</i>	1
<i>Neisseria</i>	16
<i>Haemophilus</i>	3
Total	449

## 実験材料、実験方法および分析方法

## 1) 供試菌株

SMX-TMP 合剤の臨床治験症例のうち、昭和45年11月から昭和46年6月の期間内に分離された患者由来の各種細菌で、田辺製薬および塩野義製薬が提供を受けたものである。表1に示すとおり、*Staphylococcus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Diplococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Neisseria* など広範囲にわたるグラム陽性および陰性菌など449株である。

## 2) 抗菌力測定法

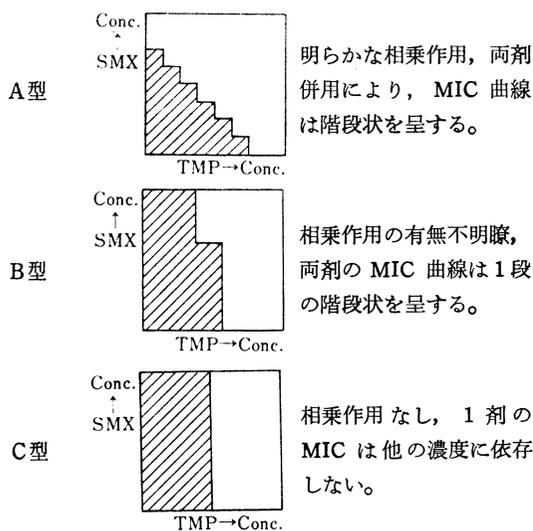
SMX-TMP 合剤（以下 ST 合剤と略す）小委員会が定めた SMX, TMP の試験管内抗菌力測定法<sup>5)</sup>により、最小発育阻止濃度、Minimal Inhibitory Concentration（以下 MIC と略す）を測定した。すなわち、寒天平板希釈法（Agar plate dilution method）で、増菌用培地として MUELLER-HINTON 液体培地（Difco）、感受性測定用培地として溶血性馬血液を7.5%の割合に MUELLER-HINTON 培地（栄研）に添加した培地を使用した。

接種菌量は上記の増菌用培地に1昼夜37°Cに培養後、グラム陽性菌は100倍、グラム陰性菌は1,000倍にそれぞれ滅菌生理食塩水で希釈したものを1白金耳ずつ塗布した。

なお、両剤併用による抗菌力の増減を確認するためには、いわゆる chequer board titration method を用いた。両薬剤の濃度段階は SMX, TMP とともに100, 50, 25, 12.5, 6.25, ……、0.025 mcg/ml の倍数段階希釈を用いるとともに、SMX, TMP の各濃度段階を種々組み合わせで検討した。

## 3) 分析方法

SMX, TMP 併用による抗菌作用の相乗効果の分析は chequer board titration method によつた。すなわち、chequer board titration により得られた成績を次のように3つのタイプに分類した。



(注) 斜線部分は菌が増殖を示した部分

### 実験結果

#### 1) 臨床分離菌の SMX および TMP に対する感受性について

供試菌株の SMX および TMP に対する感受性は表 2 および表 3 に示すとおりである。すなわち，SMX の MIC をみると  $SMX \leq 100$  mcg/ml の MIC を示した株数は供試菌 449 株中 181 株で，そのうち大部分の株は SMX 12.5~25 mcg/ml の MIC を示した。 $SMX > 100$  mcg/ml の MIC を示した株数は 449 株中 268 株(60%)であつた。

一方，TMP の MIC では供試菌株中 321 株(71.4%)は TMP 0.2~0.78 mcg/ml に MIC を示した。TMP に感受性の低い菌株は，すでに報告されているとおり，*Pseudomonas*, *Neisseria* 属菌であつた。なお *Achromobacter* は TMP 12.5 mcg/ml の MIC を示し，*Pseudomonas* 属菌以外のグラム陰性桿菌の TMP に対する MIC が通常 0.2~0.78 mcg/ml を示すのに対して比較的高濃度であつた。

#### 2) SMX, TMP の相乗作用について

SMX, TMP の相乗作用を chequer board titration method によりタイプ別に分類し検討した成績は表 4 のとおりである。この表は被検菌の SMX に対する MIC を  $SMX \leq 100$  mcg/ml と  $> 100$  mcg/ml の 2 群にわけ，TMP に対しては  $TMP \leq 3.12$  mcg/ml と 6.25~50 mcg/ml,  $\geq 100$  mcg/ml の 3 群にわけて分類したものである。

この結果，明らかに相乗効果を認めた A 型の菌株は 299 株(66.6%)，相乗効果不明瞭の B 型の菌株は 104 株(23.2%)，まったく相乗効果を示さなかつた C 型の菌株はわずかに 46 株(10.2%)であつた。

$SMX \leq 100$  mcg/ml の MIC を示した菌群を SMX 感受性菌群とした場合，これらの菌群では，すべての菌株に TMP との間で相乗効果が認められた。 $SMX > 100$  mcg/ml の耐性菌群では 269 株中 119 株(44.2%)に明らかな相乗効果を認めたのは注目すべき点である。

なお，特に注目すべきは，SMX, TMP の両剤に耐性を示した *Pseudomonas* 菌群でも両剤の間で相乗効果が認められたことである。すなわち，9 株中 7 株が A 型で，2 株が C 型を示した。

### 考 察

臨床検査的にサルファ剤の抗菌力を測定する場合，測定培地中には可及的にサルファ剤の抗菌力に拮抗する物質を含有せず，かつ広範囲にグラム陽性菌および陰性菌が生育しうる培地を使用しなければならない。

ST 合剤小委員会<sup>6)</sup> および桑原教授<sup>7)</sup> はサルファ剤の MIC 測定には 7.5% 溶血性馬血液添加の MUELLER-HINTON 培地を使用すべきであると提唱した。著者等も今回の検討には上記の提唱案の培地と手技によつて SMX, TMP 単独ならびに両剤併用による抗菌力について検討した。

臨床分離株に対する SMX の MIC は近年，ほとんど  $> 100$  mcg/ml にあると報告されているが，今回の著者等の測定では，供試菌株 449 株中，SMX に対する感受性が  $\leq 100$  mcg/ml の株は 181 株(40%)で，このうち， $\leq 12.5$  mcg/ml のものが 52 株，25 mcg/ml のものが 49 株であつた。

ST 合剤小委員会による測定法を使用した場合，サルファ剤に対する感受性が上記の濃度を示したことは興味ある知見と考えられる。

一方，TMP についてみると，供試菌株中すでに TMP 耐性菌として報告されている *Neisseria*, *Pseudomonas* を除いて大部分が TMP 感受性であつた。

ついで，SMX, TMP の相乗作用について，chequer board titration method により A, B, C の 3 つのタイプに分類して検討した。明らかに相乗作用ありと認められる A 型の菌株は供試菌株 449 株中 299 株で 66.6% を占めた。なお， $SMX > 100$  mcg/ml の MIC を示した大腸菌について，合成培地を用い液体希釈法で相乗作用につき検討した結果，SMX, TMP の配合比を約 500:1 にするとき明らかな相乗作用が認められている<sup>7)</sup>。したがつて，SMX 耐性菌株に対する SMX と TMP の併用による相乗作用については，合成培地を用いた液体希釈法で今後，さらに検討する必要があると考えられる。

### 結 論

患者より分離した 449 株の新鮮分離菌株について SMX, TMP 単独および両剤併用における抗菌力を検討

表2 Susceptibility of the freshly isolated bacterial strains to SMX

Test organisms	Concentration of SMX (mcg/ml)									Total
	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	>100	
<i>Staph. aureus</i>				2	15	23	9	2	21	72
<i>Staph. epidermidis</i>	1			5	6	6	3	10	13	44
<i>Strept. hemolyticus</i>	1		1					3	6	11
<i>Strept. viridans</i>	1		1		1	1		2	27	33
<i>Strept. faecalis</i>									15	15
<i>D. pneumoniae</i>									6	6
<i>E. coli</i>		1	4	7	15	11	3	1	117	159
<i>Enterobacter</i>				1	3	2		1	2	9
<i>Citrobacter</i>			1		1	1			5	8
<i>Klebsiella</i>		1	1		2	3	1		9	17
<i>Proteus</i>			3	3	4	1			13	24
<i>Shigella</i>			1						9	10
<i>Salmonella</i>				3	4	1			2	10
<i>Pseudomonas</i>									9	9
<i>Neisseria</i>		2		2				1	11	16
<i>Haemophilus</i>								1	2	3
<i>Serratia</i>					1					1
<i>Achromobacter</i>									1	1
<i>B. anitratum</i>							1			1
Total	3	4	12	23	52	49	17	21	268	449

表3 Susceptibility of the freshly isolated bacterial strains to TMP

Test organisms	Concentration of TMP (mcg/ml)														Total
	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	>100	
<i>Staph. aureus</i>			1	4	44	22	1								72
<i>Staph. epidermidis</i>	1		8	8	14	9		3	1						44
<i>Strept. hemolyticus</i>	1		2	1	2	3		2							11
<i>Strept. viridans</i>				1	4	2	12	4	1	2	5	2			33
<i>Strept. faecalis</i>			5	4	3	3									15
<i>D. pneumoniae</i>					1		4	1							6
<i>E. coli</i>		1	15	70	46	22	5								159
<i>Enterobacter</i>			1	1	4	1	2								9
<i>Citrobacter</i>				6	1		1								8
<i>Klebsiella</i>				1	4	8	1	3							17
<i>Proteus</i>				1	1	11	5	3	3						24
<i>Shigella</i>				2	8										10
<i>Salmonella</i>		2	1	2	5										10
<i>Pseudomonas</i>													1	8	9
<i>Neisseria</i>						1	4	1			1	1	1	7	16
<i>Haemophilus</i>	1	2													3
<i>Serratia</i>						1									1
<i>Achromobacter</i>										1					1
<i>B. anitratum</i>							1								1
Total	3	5	33	101	137	83	36	17	5	3	6	3	2	15	449

表4 Susceptibility pattern by chequer board titration method

Type pattern	A			B			C			Total			
	SMX-MIC (mcg/ml)			SMX-MIC (mcg/ml)			SMX-MIC (mcg/ml)						
	≤ 100	> 100	> 100	≤ 100	> 100	> 100	≤ 100	> 100	> 100				
	≤3.12	6.25~50	≥100	≤3.12	6.25~50	≥100	≤3.12	6.25~50	≥100	≤3.12	6.25~50	≥100	
<i>Staph. aureus</i>	51	19											72
<i>Staph. epidermidis</i>	31	12			1								44
<i>Strept. hemolyticus</i>	5	4			1					1			11
<i>Strept. viridans</i>	5	18	9										33
<i>Strept. faecalis</i>		5								5			15
<i>D. pneumoniae</i>	42	27								27			6
<i>E. coli</i>							63						159
<i>Enterobacter</i>	6				2					1			9
<i>Citrobacter</i>	3	1			2					2			8
<i>Klebsiella</i>	8	2			6					1			17
<i>Proteus</i>	11	1	2							2		1	24
<i>Shigella</i>	1	1								2			10
<i>Salmonella</i>	8	1			6					2			10
<i>Haemophilus</i>	1				1								3
<i>Pseudomonas</i>						7							9
<i>Neisseria</i>	2	2	1			6				2			16
<i>Serratia</i>	1	1											1
<i>Achromobacter</i>			1										1
<i>B. anitratum</i>	1												1
	176	2	93	13	13								
Total	180	2	299	119	104	104	46	46	46	46	46	46	449

し、つぎの結果を得た。

1) 供試菌株449株中、約60%はSMX>100 mcg/mlのMICを示したが、TMPに対しては約71%の株が0.2~0.78mcg/mlにMICを示した。

2) SMXとTMPの併用効果を checker board titration method により分類し検討したところ、これら分離株の66.6%が明らかな相乗効果を示し、特にSMXのMIC>100 mcg/mlの耐性菌に対してもその44.2%に両剤の併用による明らかな相乗効果が認められたことは注目すべきことと考えられる。

本研究は、塩野義製薬株式会社、田辺製薬株式会社、日本ロシュ株式会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) BÖHNI, E. : Vergleichende bakteriologische Untersuchungen mit der Kombination Trimethoprim / Sulfamethoxazol *in vitro* und *in vivo*. Chemotherapy Suppl. ad. 14 : 1~21, 1969
- 3) WATERWORTH, P.M. : Practical aspects of testing sensitivity to trimethoprim and sulfonamide. Postgraduate Med. J. Suppl. 45 : 21~27, 1969
- 4) 粟田口重美ほか : 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。Chemotherapy 投稿中
- 5) ST合剤研究会, MIC測定法のための小委員会 (代表 藤井良知) : Sulfamethoxazole と Trimethoprim の感受性測定法。Chemotherapy 投稿中
- 6) 桑原章吾 : 抗菌薬の試験管内抗菌力と感染防禦効果の関連性について。Chemotherapy 19 : 1094~1095, 1971
- 7) 川上, 吉田ほか : 未発表データ

## STUDIES ON SULFAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM: INVESTIGATION OF *IN VITRO* ANTIBACTERIAL ACTIVITIES AGAINST CLINICALLY ISOLATED MICROORGANISMS

HIROTSUGU YOSHIDA, OSAMU KASUGA,  
CHIKAKO SHIRANE and SHIGEMI AWATAGUCHI  
Biological Research Laboratory Tanabe Seiyaku Co, Ltd.

MIKIO YOSHIMURA, WAKIO NANDE,  
FUSAE INUMA and HARUO NISHIMURA  
Department of Clinical Laboratory Shionogi & Co., Ltd.

The antimicrobial activities of sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP), alone and in combination, were tested in 449 strains of micro-organisms freshly isolated from clinical materials. The following results were obtained:

1. Of the 449 strains investigated, approximately 60% of the organisms were found to have MIC of SMX greater than 100 mcg/ml, whereas MIC of TMP was found to be between 0.2 and 0.78 mcg/ml in 71% of the strains.
2. Antimicrobial activities by the combination of SMX and TMP as assessed by checker board titration method were demonstrated potentiation in 66.6% of the materials. Of particular interest was the evidence of potentiation in 44.2% of those microorganisms which were found to have MIC greater than 100 mcg/ml of SMX alone.