

Sulfamethoxazole-Trimethoprim 合剤に関する細菌学的評価

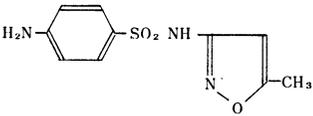
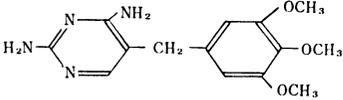
中澤昭三・小野尚子・大槻雅子・黒川ゆかり
橋本和子・橋本克己・田之上耕也・遠矢皆子
京都薬科大学微生物学教室

Sulfamethoxazole-trimethoprim 合剤は、わが国で開発された持続性サルファ剤 sulfamethoxazole(SMX) 5 とアミノピリミジン系の誘導体である trimethoprim (TMP) 1 を配合した新しい内服用の化学療法合剤である。

さて、サルファ剤 SMX の作用機序は、細菌細胞内の代謝過程における *p*-aminobenzoic acid (PABA) と 2 水素プテリジンから 2 水素葉酸合成酵素を阻害すると考えられており、一方、TMP は 2 水素葉酸脱水素酵素を阻害して 2 水素葉酸から 4 水素葉酸への代謝経路をプロ

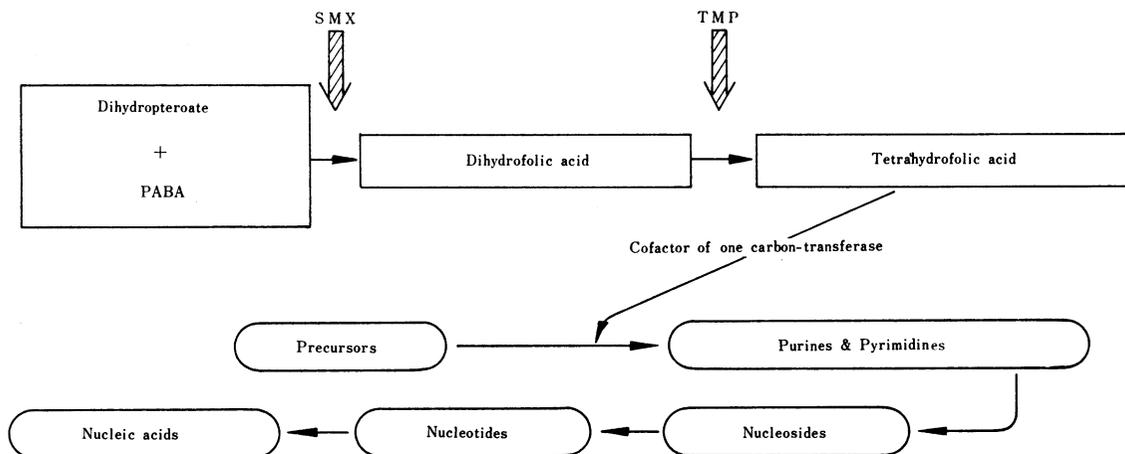
ックする作用点を示すといわれている。そのためこの両剤の配合による 2 カ所の連続的な阻害作用により核酸合成阻害が行なわれ相乗的な抗菌力の増強が期待されるわけである。そして、これらに関する基礎的、臨床的評価についてはすでに多くの報告が認められる。

今回、私どもは日本化学療法学会を中心としてこの合理的な合剤が、*in vitro*, *in vivo* における抗菌作用にどのように反映してくるか、細菌学的評価を加えたのでその成績について報告する。

Sulfamethoxazole (SMX)		Trimethoprim (TMP)
	構造式	
$C_{10}H_{11}O_3N_3S$	分子式	$C_{14}H_{18}O_3N_4$
253.28	分子量	290.33

Sulfamethoxazole-Trimethoprim 合剤 1 錠中の成分

SMX TMP
400mg + 80mg



実験材料

(1) 使用薬剤

sulfamethoxazole (SMX) : 1/8N NaOH の少量を用いて溶解した。

trimethoprim (TMP) : N-N-dimethylformamide の少量を用いて溶解した。

(2) *in vitro* における協力作用の証明 (Box 法)

使用菌種 菌株 :

Staphylococcus aureus 209-P JC

Staphylococcus aureus 90124 (臨床分離 SMX 耐性株)

Staphylococcus aureus 90125 (臨床分離 SMX 耐性株)

Escherichia coli NIHJ JC

Escherichia coli 10-1 (臨床分離 SMX 耐性株)

前培養培地 : 感性ディスク用培地の寒天を除いたもの。

本試験培地 : 同培地を使用し接種菌量は前培養培地で 37°C 18 時間培養の菌液を希釈せず 1 白金耳移植した液体希釈法によつた。

(3) *in vitro* における両薬剤の配合比の検討

使用菌種, 菌株 : *Staphylococcus aureus* 209-P JC

Staphylococcus aureus 90124

Escherichia coli NIHJ JC

Escherichia coli 10-1

前培養培地 : 感性ディスク用培地の寒天を除いたもの。

本試験培地 : 同培地を使用し, 接種菌量は上記(2)と同様で液体希釈法によつた。

(4) 抗菌スペクトラム

使用菌株 : 本教室保存のグラム陽性菌群 15 株およびグラム陰性菌群 21 株, 18 時間培養したものを生理食塩水でグラム陽性菌については 100 倍, グラム陰性菌については 1000 倍に希釈したものを使用。

前培養培地 : MUELLER-HINTON broth "Difco"

本試験培地 : 感性ディスク用培地 (ニッサン) に溶血性馬血液を 7.5% 加えた寒天平板希釈法によつた。

(5) 臨床分離株に対する感受性分布

使用菌株 : 1970 年 12 月全国各地の病院にて臨床的に分離された *Staphylococcus aureus* 50 株, *Escherichia coli* 37 株。感受性測定には *Staphylococcus aureus* は 100 倍,

Escherichia coli は 1000 倍に希釈して使用した。

前培養培地 : MUELLER-HINTON broth "Difco"

本試験培地 : 感性ディスク用培地 (ニッサン) に *Escherichia coli* の試験のみ溶血性馬血液を 7.5% 加えた寒天平板希釈法によつた。

(6) 抗菌力におよぼす諸因子の影響

使用菌種, 菌株 : *Staphylococcus aureus* 209-P JC を 100 倍に希釈

Escherichia coli NIHJ JC-2 を 1000 倍に希釈

前培養培地 : MUELLER-HINTON broth "Difco"

本試験培地 : 感性ディスク用培地 (ニッサン) より寒天を除いたものでの液体希釈法を用いた。

(7) 増殖曲線におよぼす薬剤の影響

使用菌種, 菌株 : *Staphylococcus aureus* 209-P JC

Staphylococcus aureus 90124 (臨床分離 SMX 耐性株)

前培養培地 : 感性ディスク用培地の寒天を除いたもの。

本試験培地 : 同培地を使用し, 培養 3 時間後に各薬剤濃度を添加した。

(8) マウス実験的感染症に対する治療効果

使用菌種, 菌株 :

Staphylococcus aureus No. 50774 (臨床分離 SMX 感受性株)

Staphylococcus aureus 90124 (臨床分離 SMX 耐性株)

Escherichia coli NIHJ (SMX 感受性株)

Escherichia coli 10-1 (臨床分離 SMX 耐性株)

Salmonella enteritidis (SMX 感受性株)

前培養培地 : 普通寒天培地

使用菌液 : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* は生理食塩水に浮遊させて使用し, *Escherichia coli* は生理食塩水に浮遊させたものに 6% ムチンを等量混合して使用した。

使用マウス : 体重 18~20 g dd YS (静岡実験動物)

実験方法および成績

(1) *in vitro* における SMX と TMP との協力作用の証明

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* の SMX 感受性株ならびに耐性株を用いて, 両薬剤間の協力作用

表3 Chequer board titration method による SMX, TMP の協力作用
Staph. aureus 90125 (SMX-R)

SMX \ TMP	3.12	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	0.025	0.012	0.006	SMX alone
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
62.5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
31.2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
15.6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7.8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3.9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2.0	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
1.0	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
TMP alone	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

表4 Chequer board titration method による SMX, TMP の協力作用
E. coli NIHJ JC

SMX \ TMP	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	0.025	0.012	0.006	0.003	SMX alone
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
0.10	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+
TMP alone	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

結果は SMX 感受性 *Staphylococcus aureus* (209-P JC) においてみられたほどではないが、両薬剤間に協力作用が認められた。

表4は SMX 感受性 *Escherichia coli* NIHJ JC の場合である。SMX に 6.25 mcg/ml, TMP に 0.2 mcg/ml

の MIC を示している。この場合にも両薬剤間にかなり明瞭な協力作用が認められた。

表5は SMX > 500 mcg/ml の耐性を示す臨床分離大腸菌の場合である。TMP には 0.39 mcg/ml の MIC を示している。SMX 感受性 *Escherichia coli* NIHJ JC

表5 Chequer board titration method による SMX, TMP の協力作用
E. coli 10-1 (SMX-R)

SMX \ TMP	TMP										SMX alone
	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	0.025	0.012	
500	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+
250	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
125	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
62.5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
31.2	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+
15.6	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+
7.8	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+
3.9	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+
2.0	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
1.0	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+
TMP alone	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

に比べかなりその協力作用は弱くなっている。

(2) *in vitro* における SMX と TMP の配合比の検討

In vitro において、SMX と TMP との間に協力作用が認められたので両剤の配合比を検討した。表6~9において縦は配合比を、横は各配合比における MIC を示

表6 SMX, TMP の各種配合比率における MIC
Staph. aureus 209-P JC

(配合比) TMP : SMX		6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09
1	0	-	-	-	+	+	+	+
1	1	-	-	-	-	+	+	+
1	2	-	-	-	-	+	+	+
1	5	-	-	-	+	+	+	+
1	10	-	-	-	+	+	+	+
1	15	-	-	-	+	+	+	+
1	20	-	-	-	+	+	+	+
1	25	-	-	±	+	+	+	+
1	30	-	-	+	+	+	+	+
1	35	-	-	+	+	+	+	+
1	40	-	-	+	+	+	+	+
1	45	-	-	+	+	+	+	+
1	50	-	-	+	+	+	+	+
1	75	-	+	+	+	+	+	+
1	100	-	+	+	+	+	+	+
0	1	+	+	+	+	+	+	+

(mcg/ml)

している。

表6は SMX 感受性 *Staphylococcus aureus* の場合であるが、SMX : TMP=1 : 1 あるいは 2 : 1 (以下、ST (1 : 1), ST(2 : 1) と略す) で、TMP 単独より1段階すぐれた協力的な感受性を示し、さらに SMX : TMP=20 : 1 の配合まで TMP 単独と同じ MIC、すなわち、1.56mcg/ml を示した。すなわち、この組み合わせまで協力的であると考えられる。

表7は SMX 耐性を *Staphylococcus aureus* を用いて行なつた結果である。ST(1 : 1) で TMP 単独と同じ3.12mcg/ml を示したが、SMX の配合が多くなるにしたがつて段階的に感受性の低下が認められた。

次に *Escherichia coli* について実験を行なつた。SMX 感受性菌の場合は、*Staphylococcus aureus* 感受性株の場合とまったく同様、表8に示されるとおり、ST (1 : 1) あるいは ST(2 : 1) において TMP 単独に比べ1段階優れた MIC を示し、ST(20 : 1) まで TMP 単独と同じ MIC を示した。しかしながら、表9に示すとおり、SMX 耐性 *Escherichia coli* を用いた時においては、ST(1 : 1) において TMP 単独と同じ 0.39 mcg/ml の MIC を示したが、前述の SMX 耐性 *Staphylococcus aureus* の場合、同様に SMX の配合比が増加するにつれて段階的に感受性の低下が認められた。

(3) 抗菌スペクトラム

以上述べて来たように、感受性菌の場合、TMP と SMX との薬剤の間に、ほぼ ST (20 : 1) まで併用効果が

表7 SMX, TMP の各種配合比率における MIC
Staph. aureus 90124 (SMX-R)

配合比 TMP : SMX	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56
1 0	-	-	-	-	-	-	+
1 1	-	-	-	-	-	-	+
1 2	-	-	-	-	-	+	+
1 5	-	-	-	-	-	+	+
1 7	-	-	-	-	+	+	+
1 10	-	-	-	-	+	+	+
1 15	-	-	-	-	+	+	+
1 20	-	-	-	-	+	+	+
1 25	-	-	-	-	+	+	+
1 30	-	-	-	+	+	+	+
1 35	-	-	+	+	+	+	+
1 40	-	-	+	+	+	+	+
1 45	-	-	+	+	+	+	+
1 50	-	-	+	+	+	+	+
1 75	-	+	+	+	+	+	+
1 100	-	+	+	+	+	+	+
0 1	+	+	+	+	+	+	+

(mcg/ml)

表9 SMX, TMP の各種配合比率における MIC
E. coli 10-1 (SMX-R)

配合比 TMP : SMX	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09
1 0	-	-	-	-	-	-	+
1 1	-	-	-	-	-	-	+
1 2	-	-	-	-	-	+	+
1 5	-	-	-	-	+	+	+
1 7	-	-	-	+	+	+	+
1 10	-	-	+	+	+	+	+
1 15	-	-	+	+	+	+	+
1 20	-	+	+	+	+	+	+
1 25	-	+	+	+	+	+	+
1 30	-	+	+	+	+	+	+
1 35	-	+	+	+	+	+	+
1 40	-	+	+	+	+	+	+
1 45	-	+	+	+	+	+	+
1 50	-	+	+	+	+	+	+
1 75	-	+	+	+	+	+	+
1 100	+	+	+	+	+	+	+
0 1	+	+	+	+	+	+	+

(mcg/ml)

表8 SMX, TMP の各種配合比率における MIC
E. coli NIHJ JC

配合比 TMP : SMX	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09
1 0	-	-	-	-	-	-	+
1 1	-	-	-	-	-	-	+
1 2	-	-	-	-	-	-	+
1 5	-	-	-	-	-	+	+
1 7	-	-	-	-	-	+	+
1 10	-	-	-	-	-	+	+
1 15	-	-	-	-	-	+	+
1 20	-	-	-	-	-	+	+
1 25	-	-	-	-	±	+	+
1 30	-	-	-	-	±	+	+
1 35	-	-	-	-	±	+	+
1 40	-	-	-	-	±	+	+
1 45	-	-	-	±	+	+	+
1 50	-	-	-	±	+	+	+
1 75	-	-	-	±	+	+	+
1 100	-	-	-	+	+	+	+
0 1	+	+	+	+	+	+	+

(mcg/ml)

認められた事実と、SMX 5 と TMP 1 の合剤を経口投与した場合の体液内での割合が20対1に近い割合になるとの報告から、私どもは教室保存のグラム陽性菌群、陰性菌群に対する抗菌スペクトラム、抗菌力を SMX, TMP 各々単独および ST(20:1) について同一条件により比較検討した。その成績は表10に示されるとおりである。すなわち、SMX, TMP および ST(20:1) はグラム陽性菌群、グラム陰性菌群のほとんどの菌種に対し広範囲な抗菌スペクトラムを有している。その抗菌力を3薬剤間で比較すると、例えばグラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* では SMX に 6.25~50 mcg/ml, TMP に 0.2~0.78 mcg/ml, ST(20:1) 1.56 mcg/ml, *Streptococcus hemolyticus* では SMX 25 mcg/ml, TMP 0.39 mcg/ml, ST(20:1) 1.56 mcg/ml, グラム陰性桿菌の *Escherichia coli* では SMX 1.56~3.12 mcg/ml, TMP 0.025~0.2 mcg/ml, ST(20:1) に 0.1~0.39 mcg/ml と各菌種とも ST(20:1) は SMX, TMP のほぼ中間的な MIC 値を示した。しかし、ST(20:1) の示す MIC 中に含まれている SMX, TMP のそれぞれの量は表の右欄に示すように、各々単独の示す MIC 値に比較してかなり少なく、ST(20:1) の配合により広範囲な菌種において併用効果が認められた。しかしながら、*Pseudomonas* のように SMX, TMP とともに >100 mcg/ml の MIC の菌株に対しては ST(20:1) においても

表 10 Antibacterial spectrum

a) Gram-positive bacteria

Organisms	SMX alone	TMP alone	ST (20 : 1) (SMX+TMP)
<i>Staph. aureus</i> 209P JC	25	0.39	0.78 (0.743+0.037)
"	6.25	0.39	0.78 (0.743+0.037)
"	12.5	0.78	1.56 (1.486+0.074)
" E-46	50	0.39	1.56 (1.486+0.074)
" No. 50774	12.5	0.20	0.78 (0.743+0.037)
"	>100	0.20	6.25 (5.95+0.300)
<i>Staph. citreus</i>	3.12	0.78	0.78 (0.743+0.037)
<i>Staph. epidermidis</i>	12.5	1.56	3.12 (2.97+0.150)
<i>Strept. hemolyticus</i> S 23	25	0.39	1.56 (1.486+0.074)
<i>Strept. viridans</i>	>100	0.78	12.5 (11.9+0.600)
<i>Strept. faecalis</i>	>100	0.78	6.25 (5.95+0.300)
<i>Diplococcus pneumoniae</i> III	6.25	0.78	3.12 (2.97+0.150)
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	1.56	0.10	0.39 (0.371+0.019)
<i>Bacillus anthracis</i>	25	100	25 (23.8+1.200)
<i>Sarcina lutea</i> PCI-1001	0.78	0.78	0.39 (0.371+0.019)
<i>Cory. diphtheriae</i>	12.5	0.20	0.78 (0.743+0.037)

(mcg/ml)

b) Gram-negative bacteria

Organisms	SMX alone	TMP alone	ST (20 : 1) (SMX+TMP)
<i>E. coli</i> NIHJ	1.56	0.025	0.10 (0.095+0.0048)
" NIHJ JC 1	3.12	0.10	0.39 (0.371+0.019)
" NIHJ JC 2	3.12	0.05	0.39 (0.371+0.019)
" K-12	1.56	0.20	0.39 (0.371+0.019)
<i>Enter. aerogenes</i>	3.12	0.78	0.78 (0.743+0.037)
<i>Sal. enteritidis</i>	12.5	0.10	0.78 (0.743+0.037)
<i>Sal. paratyphi</i> A	12.5	0.05	0.39 (0.371+0.019)
" B	12.5	0.05	0.39 (0.371+0.019)
<i>Sal. typhi</i> T-30 ROMA	6.25	0.05	0.39 (0.371+0.019)
" T-287	6.25	0.025	0.39 (0.371+0.019)
" O-901	3.12	0.006	0.10 (0.095+0.0048)
<i>Shige. sonnei</i> EW-33	0.39	0.006	0.10 (0.095+0.0048)
<i>Shige. flexneri</i>	3.12	0.05	0.78 (0.743+0.037)
" 2aEW-10	>100	0.05	1.56 (1.486+0.074)
<i>Shige. dysenteriae</i> EW-7	3.12	0.05	0.39 (0.371+0.019)
<i>Shige. boydii</i> EW-28	0.78	0.05	0.10 (0.095+0.0048)
<i>Proteus morgnii</i>	1.56	0.78	0.39 (0.371+0.019)
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	0.78	0.20	0.39 (0.371+0.019)
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	3.12	0.39	0.39 (0.371+0.019)
<i>Kleb. pneumoniae</i>	3.12	0.20	0.78 (0.743+0.037)
<i>Pseud. aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100 (>95.2+>4.8)

(mcg/ml)

>100mcg/ml の値を示し、無効であった。

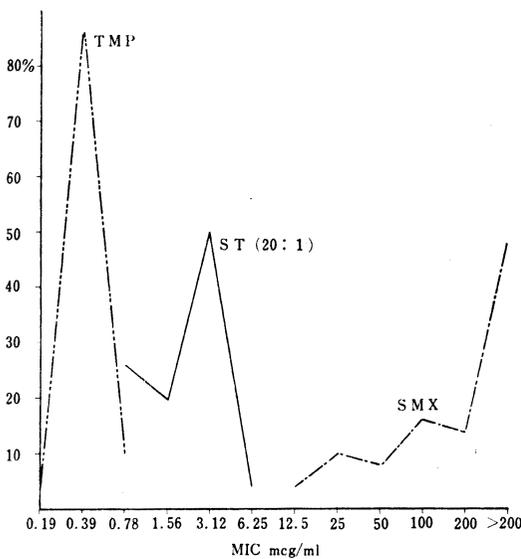
(4) 臨床分離株に対する感受性分布

a) *Staphylococcus aureus*

臨床分離 *Staphylococcus aureus* 50 株に対する SMX, TMP, ST (20:1) の感受性分布を検討した。その結果は図1に示されるとおり、SMX 単独では 12.5 mcg/ml

図1 Sensitivity distribution of clinical isolates

Staph. aureus (50 strains)



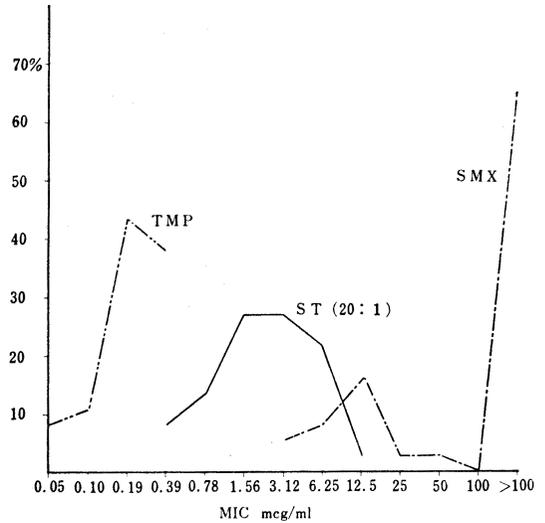
から ≥ 200 mcg/ml にかけて分布し、 ≥ 200 mcg/ml 以上の耐性を示す株が 62% 認められた。TMP 単独では 0.19~0.78 mcg/ml に分布し、0.39 mcg/ml に鋭いピークを持ち、全株標準株と同じ MIC を示していた。ST (20:1) の併用では 0.78~6.25 mcg/ml に分布を示し、3.12 mcg/ml にピークを持っていた。この結果から、ST (20:1) の併用において、SMX 耐性株が、かなり感受性化されていることがわかった。

b) *Escherichia coli*

臨床分離 *Escherichia coli* に対する感受性分布を検討した。その結果は図2に示されるように、SMX 単独では約 65% の株が >100 mcg/ml の耐性を示した。TMP 単独では全株 0.05~0.39 mcg/ml にあり、ほぼ標準株の示す感受性範囲に存在した。一方、ST (20:1) の併用においては 0.39~12.5 mcg/ml に全株存在し、SMX 単独において存在した >100 mcg/ml 耐性菌は認められなかった。

図2 Sensitivity distribution of clinical isolates

E. coli (37 strains)



(5) 抗菌力におよぼす諸因子の影響

a) 培地 pH

感性ディスク用培地より寒天を除いた培地の pH を 5, 6, 7, 8, 9 とし、*Staphylococcus aureus* 209P JC 株、*Escherichia coli* NIHJ JC-2 株を用いて抗菌力におよぼす培地 pH の影響を検討した。その結果は表 11 に示されるように、*Staphylococcus aureus* 209P JC 株、*Escherichia coli* NIHJ JC-2 株を用いた場合、いずれも SMX は酸性側において著明に抗菌力が増強したが、TMP ではその変動は少なく、ST (20:1) の併用では TMP の影響が見られた。

表 11 Influence of pH on MIC of SMX, TMP and ST(20:1)

		SMX	TMP	ST((20:1)
<i>Staph. aureus</i> 209P JC	5			
	6	6.25	1.56	1.56
	7	25	0.78	0.78
	8	100	0.78	6.25
	9			
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	5	0.78	0.39	0.78
	6	0.78	0.05	0.2
	7	3.125	0.05	0.39
	8	3.125	0.05	0.39
	9			

MIC (mcg/ml)

b) 人血清

感性ディスク用培地より寒天を除いた培地を使用し、これに人血清を50%, 25%, 10%に含むように加え、人血清を含まない系列を対照に *Staphylococcus aureus* 209-P JC株, *Escherichia coli* NIHJ JC-2株を用いて液体希釈法により抗菌力におよぼす人血清の影響を検討した。その成績は表12に示されるように、*Staphylococcus aureus* 209P JC, *Escherichia coli* NIHJ JC-2を用いた実験、いずれも3薬剤ともに人血清添加により抗菌力の減弱が認められたが、SMX 単独においては人血清50%~10%添加においては同じ値を示し、TMP 単独および ST=(20:1)においては人血清の添加量増加にともない段階的に抗菌力の減弱がみられた。

表12 Influence of human serum on MIC of SMX, TMP and ST (20:1)

		SMX	TMP	ST(20:1)
<i>Staph. aureus</i> 209P JC	50%	100	3.12	25
	25	100	1.56	12.5
	10	100	1.56	3.12
	0	12.5	0.39	0.78
MIC (mcg/ml)				
<th>SMX</th> <th>TMP</th> <th>ST(20:1)</th>		SMX	TMP	ST(20:1)
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	50%	25	6.25	6.25
	25	25	0.2	3.12
	10	25	0.2	0.78
	0	3.12	0.05	0.39

c) 接種菌量

Staphylococcus aureus 209P JC株, *Escherichia coli*

表13 Influence of inoculum size on MIC of SMX, TMP and ST (20:1)

		SMX	TMP	ST(20:1)
<i>Staph. aureus</i> 209P JC	原液	>100	>100	100
	×10	>100	6.25	50
	×100	25	0.78	0.78
	×1000	12.5	0.39	0.78
	×10000	3.13	0.39	0.39
MIC (mcg/ml)				
<th>SMX</th> <th>TMP</th> <th>ST(20:1)</th>		SMX	TMP	ST(20:1)
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	原液	>100	>100	>100
	×10	>100	>100	>100
	×100	>100	25	100
	×1000	12.5	0.2	1.56
	×10000	1.56	0.1	0.78

NIHJ JC-2株を MUELLER-HINTON broth "Difco"にて37°C 18時間培養を行ない、これを原液として、順次生理食塩水にて10倍希釈を行ない、10000倍までの菌液を調製した(なお、37°C 18時間培養後の菌数は、*Staphylococcus aureus*では 10^8 コ/ml, *Escherichia coli*では 10^9 コ/mlであった。)液体希釈法により、これらの菌液を1白金耳ずつ移殖をし、接種菌量におよぼす抗菌力の影響を検討した。その結果は表13に示されるように、2種の菌株を用いたいずれも3薬剤接種菌量の増加により抗菌力の減弱がみられた。

(6) 細菌の増殖曲線におよぼす影響

a) SMX 感受性 *Staphylococcus aureus* の場合

Staphylococcus aureus 209P JC株約 10^4 コ/mlを感性ディスク用培地の寒天を除いた培地に接種し、37°C 3時間培養後、SMX 25, 50, 100, 200 mcg/ml, TMP 1.56, 3.12, 6.25 mcg/ml, ST(5:1)の併用添加群は3.12, 6.25, 12.5 mcg/mlを添加した。その成績は図3~6に示されるとおりである。すなわち、SMX 単独添加においては、各濃度とも殺菌的な効果はまったくみられず、

図3 *Staph. aureus* 209P JCの増殖曲線におよぼす SMX の作用

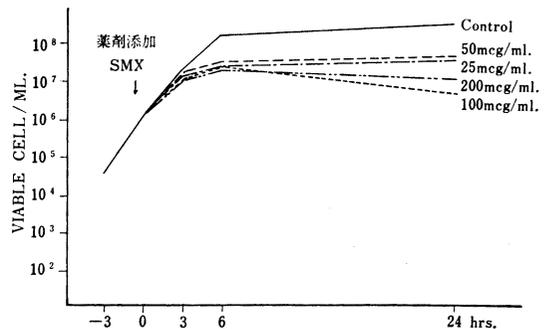


図4 *Staph. aureus* 209P JCの増殖曲線におよぼす TMP の作用

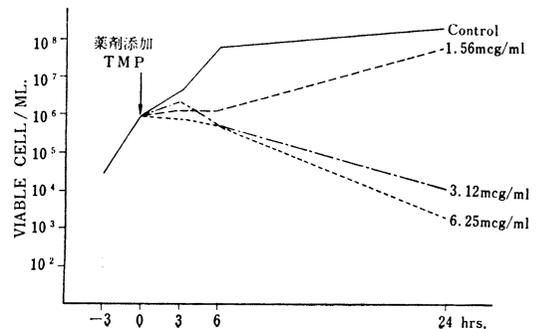


図5 *Staph. aureus* 209P JC の増殖曲線におよぼす ST (5:1) の作用

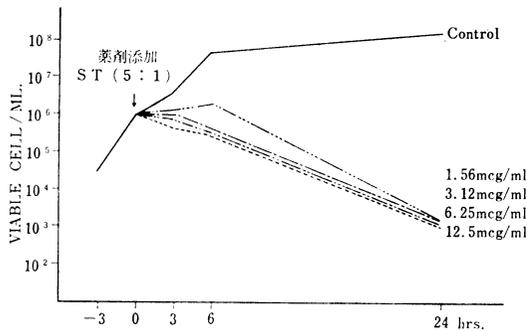


図6 *Staph. aureus* 209-P JC の増殖曲線におよぼす ST (20:1) の作用

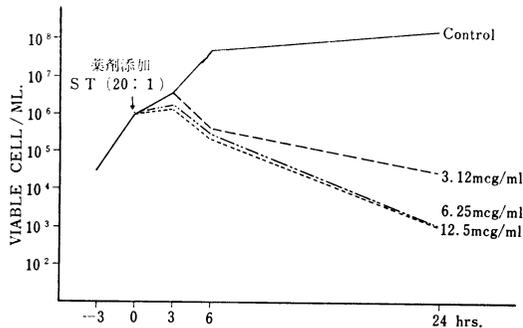


図7 *Staph. aureus* 90124 (SMX-R) の増殖曲線におよぼす SMX の作用

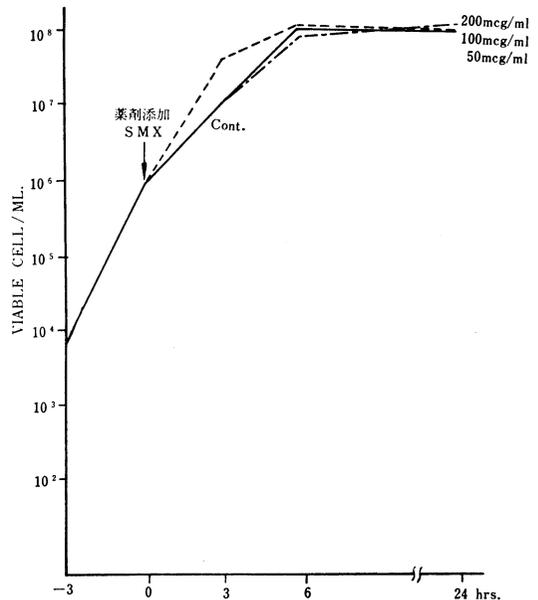
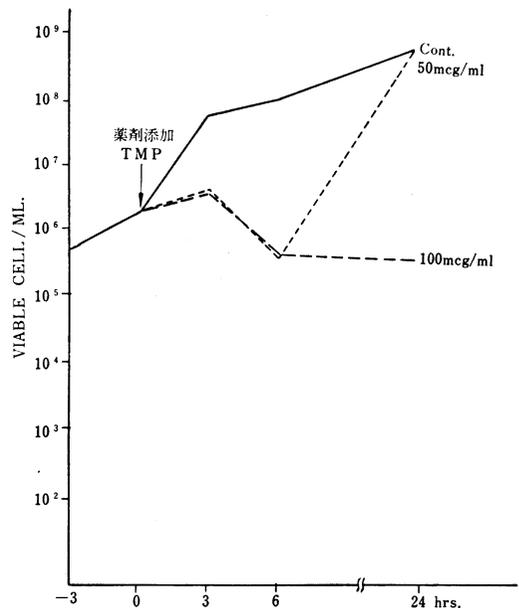


図8 *Staph. aureus* 90124 (SMX-R) の増殖曲線におよぼす TMP の作用



静菌的な作用のみが認められた。TMP 単独添加においては 3.12 mcg/ml および 6.25 mcg/ml で時間の経過とともに生菌数の減少が認められ、両剤間の協力効果が本実験においても証明出来た。

b) SMX 耐性 *Staphylococcus aureus* の場合

SMX 耐性 *Staphylococcus aureus* 90124 株を用いてその対数期の途上で、SMX 200 mcg/ml, 100 mcg/ml, 50 mcg/ml, TMP 50 mcg/ml, 100 mcg/ml, ST(20:1) あるいは ST(5:1) の 50 mcg/ml, 100 mcg/ml を添加し、以後 3 時間、6 時間、24 時間後における生菌数を求めた。その結果は図 7~10 に示されるとおりである。

SMX 単独添加の場合には、いずれの濃度においても耐性 *Staphylococcus aureus* の増殖を阻止することが出来ず、対照とまったく同じような生菌数の増加を示した。TMP 単独添加の場合には、100 mcg/ml で 24 時間まで菌数の増殖の抑制がみられ、50 mcg/ml では 6 時間まで生菌数減少、ついで 24 時間にかけて著しい菌数の増加が認められた。一方、併用群においては 5:1, 20:1 の配合比における傾向は、ほとんど同じようであり、50 mcg/ml, 100 mcg/ml の添加により対照と比べ生菌数の抑制傾向がみられた。

図9 *Staph. aureus* 90124 (SMX-R) の増殖曲線におよぼす ST (5:1) の作用

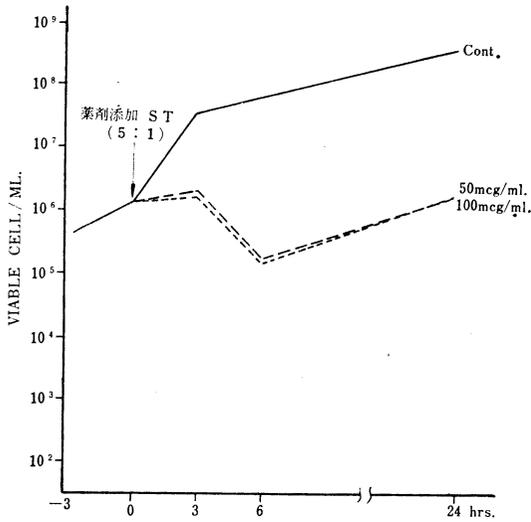
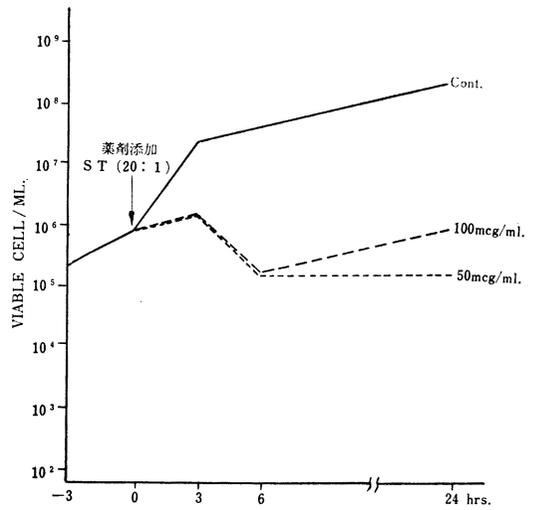


図10 *Staph. aureus* 90124 (SMX-R) の増殖曲線におよぼす ST (20:1) の作用



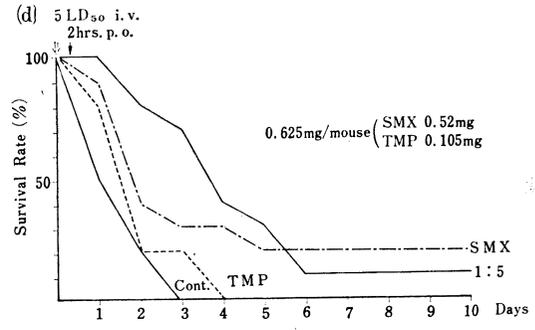
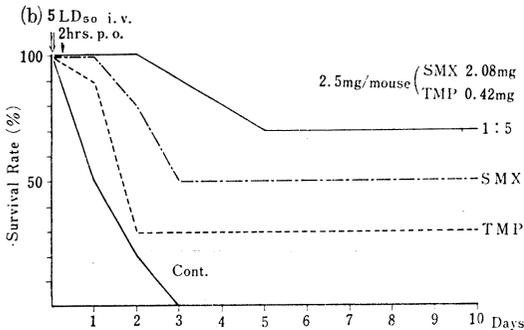
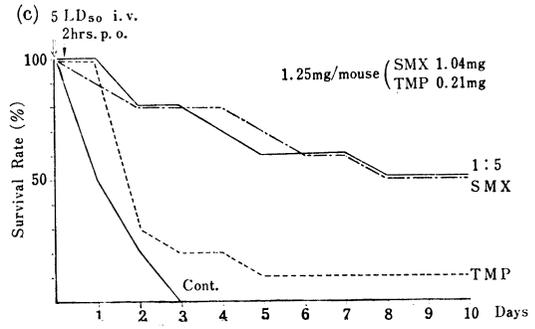
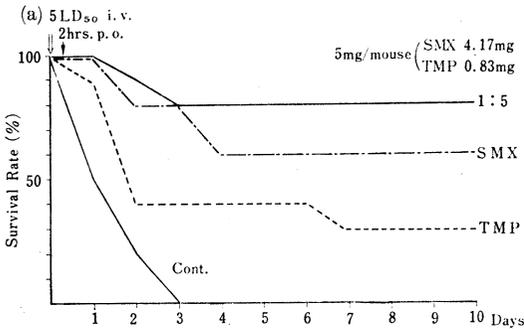
(7) *in vivo* における SMX と TMP の協力作用の証明

i) マウス実験的 *Staphylococcus aureus* 感染症に対する治療効果

a) SMX 感受性 *Staphylococcus aureus* の場合
臨床分離 *Staphylococcus aureus* No. 50774 株をマウ

ス尾静脈に 5LD₅₀ 感染させ、2 時間後に 1 回薬剤を 0.5% CMC に懸濁させて、経口投与を行なった。投与量は SMX, TMP, ST (5:1) とともに 5 mg/mouse, 2.5 mg/mouse, 1.25 mg/mouse, 0.625 mg/mouse の各群である。なお、ST 合剤中に含まれている SMX, TMP の各々の量は図中に示されるとおりである。その結果は図 11

図 11 Protective effect for experimental infection in mice (*Staph. aureus* 50774)



(a, b, c, d) に示されるように 5 mg/mouse, 2.5 mg/mouse 投与群においては SMX, TMP 各々単独治療に比べて, ST (5:1) 群の治療効果がすぐれていた。1.25 mg/mouse 投与群では, SMX と併用群の治療効果はまったく等しく, 感染10日後における生存率は共に50%であった。しかし, TMP 単独治療群は10%の治療効果しか得ることが出来なかつた。0.625 mg/mouse 投与群においては, 感染10日後において SMX 20%, ST(5:1) で10%の効果が得られたが, 観察中における延命の様子を考えると併用効果があるのではないかと思う。

b) SMX 耐性 *Staphylococcus aureus* の場合

SMX 高度耐性 *Staphylococcus aureus* 90124 株を 8LD₅₀ マウス尾静脈に感染させ, 2 時間後に 1 回薬剤を 0.5% CMC に懸濁させて経口投与を行なつた。薬剤の投与量は SMX 単独および ST (5:1) においては 30 mg/mouse, 15 mg/mouse, 7.5 mg/mouse, 3.75 mg/mouse を使用し, TMP 単独投与群では ST(5:1) の併用群中に含まれている TMP の量を考慮に入れて, 5 mg/mouse, 2.5 mg/mouse, 1.25 mg/mouse, 0.625 mg/mouse を使用した。その成績は図12 (a, b, c, d) に示されるように, 例えば SMX 30 mg 投与では 5 日以内に全マウス死亡したが, ST (5:1) においては10日目においても 50% 生存率を示した。また, SMX 15 mg 投与では 3 日以内に全マウス死亡し, ST (5:1) において

は10日目においても 30% のマウスが生存を示した。いずれの投与群においても ST (5:1) の治療効果, 延命効果が SMX, TMP 単独に比べてすぐれていた。

ii) マウス実験的 *Escherichia coli* 感染症に対する治療効果

a) SMX 感受性 *Escherichia coli* の場合

Escherichia coli NIHJ 株をムチンを使用して 3LD₅₀ マウス腹腔内に感染させ, 感染 2 時間後に, SMX 4 mg/mouse, 2 mg/mouse, 1 mg/mouse, 0.5 mg/mouse, TMP 0.2 mg/mouse, 0.1 mg/mouse, 0.05 mg/mouse, 0.025 mg/mouse, ST (5:1) 0.5 mg/mouse, 0.25 mg/mouse, 0.125 mg/mouse, 0.06 mg/mouse を 0.5% CMC に懸濁させて経口投与を行なつた。その成績は図 13 (a, b, c) に示されるとおりである。

併用群中に含まれている SMX, TMP の量は表 14 に示されるように, 0.5 mg/mouse では SMX 0.417 mg, TMP 0.083 mg である。SMX 単独投与群では 4 mg で 80%, 2 mg で 70%, 1 mg で 60%, 0.5 mg で 10% の治療効果が得られた。一方, 併用の ST (5:1) においては 0.5 mg, 0.25 mg で 100%, 0.125 mg で 90%, 0.06 mg で 80% の治療効果が得られ, ST (5:1) の併用群中に含まれている SMX, TMP 量の各々単独における治療効果と考え合わせると, 併用群において著しい協力作用を認めることが出来た。

図 12 Protective effect for experimental infection in mice (*Staph. aureus* 90124 (SMX-R))

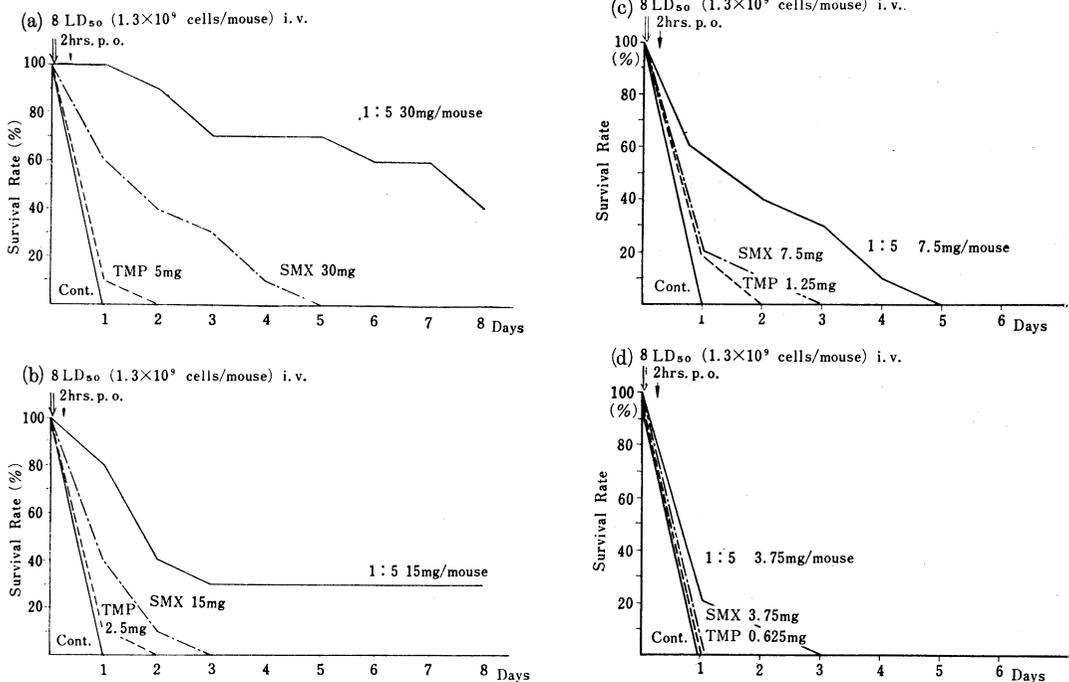


図13 Protective effect for experimental infection in mice
(*E. coli* NIHJ)

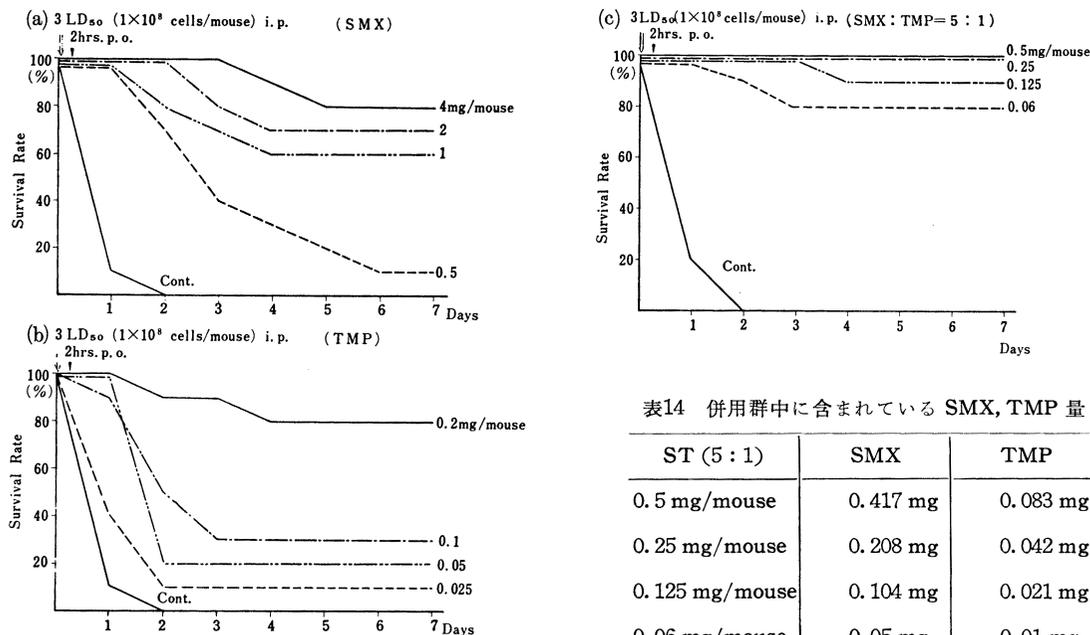


表14 併用群中に含まれている SMX, TMP 量

ST (5 : 1)	SMX	TMP
0.5 mg/mouse	0.417 mg	0.083 mg
0.25 mg/mouse	0.208 mg	0.042 mg
0.125 mg/mouse	0.104 mg	0.021 mg
0.06 mg/mouse	0.05 mg	0.01 mg

b) SMX 耐性 *Escherichia coli* の場合

Escherichia coli 10-I 株を 5LD₅₀ ムチンを使用して、マウス腹腔内に感染させ、2 時間後に 1 回 SMX および ST(5 : 1) では 30 mg/mouse, 15 mg/mouse, 7.5 mg/mouse, 3.75 mg/mouse, TMP の 5 mg/mouse, 2.5 mg/mouse, 1.25 mg/mouse, 0.625 mg/mouse を 0.5% CMC に懸濁させて経口投与を行なった。その成績は図 14 (a, b, c, d) に示されるように、SMX 投与群においては 30 mg/mouse 投与で 10% の治療効果しか得られなかった。これに対し、TMP 5 mg で 90%、2.5 mg で 60%、1.25 mg で 40%、0.625 mg で 20% の治療効果を、また ST(5 : 1) 併用群においては 30 mg で 100%、15 mg で 90%、7.5 mg で 80%、3.75 mg で 70% と各投与群において、TMP 単独に比較して、併用群の治療効果がすぐれていた。

iii) マウス実験的 *Salmonella enteritidis* 感染症 に対する治療効果

Salmonella enteritidis を >50 LD₅₀ をマウス腹腔内に感染させ、感染直後および、2 時間後の 2 回にわたり、SMX, ST(5 : 1) の 30 mg/mouse, 15 mg/mouse, 7.5 mg/mouse, 3.75 mg/mouse, TMP 5 mg/mouse, 2.5 mg/mouse, 1.25 mg/mouse, 0.625 mg/mouse を 0.5% CMC に懸濁させて経口投与を行なった。その成績は図 15 (a, b, c, d) に示されるように、ST (5 : 1) 30 mg/

mouse×2, 15 mg/mouse×2 の高濃度投与群においては SMX, TMP 単独に比べ併用群の治療効果、延命効果を認めることが出来たが、低濃度投与群においては併用群の延命効果がわずかに見られたが、著明な協力作用を認めることは出来なかつた。

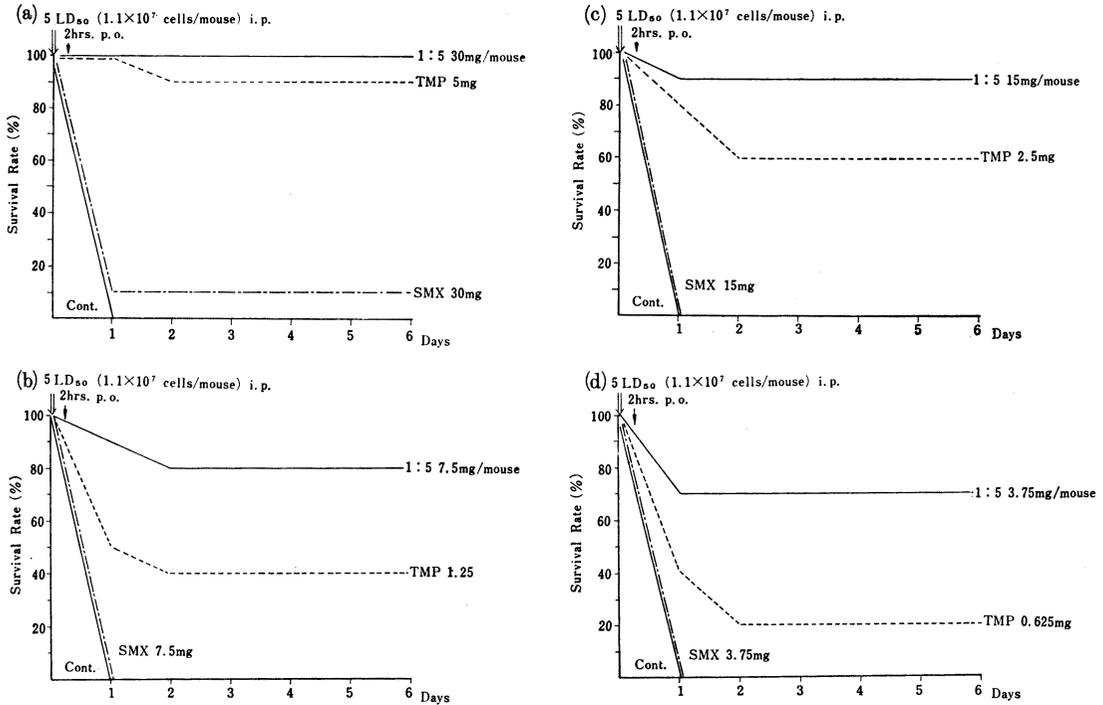
総括ならびに考察

Sulfamethoxazole-trimethoprim 合剤の *in vitro*, *in vivo* における細菌学的評価を行なった結果、次のような成績が得られた。ただし、*in vitro* での配合比は本剤の体液内濃度を考慮して sulfamethoxazole (SMX) 20 : trimethoprim (TMP) 1 を用い、また *in vivo* のマウス実験的感染症の治療実験においては臨床的に使用される ST (5 : 1) の合剤を使用した。

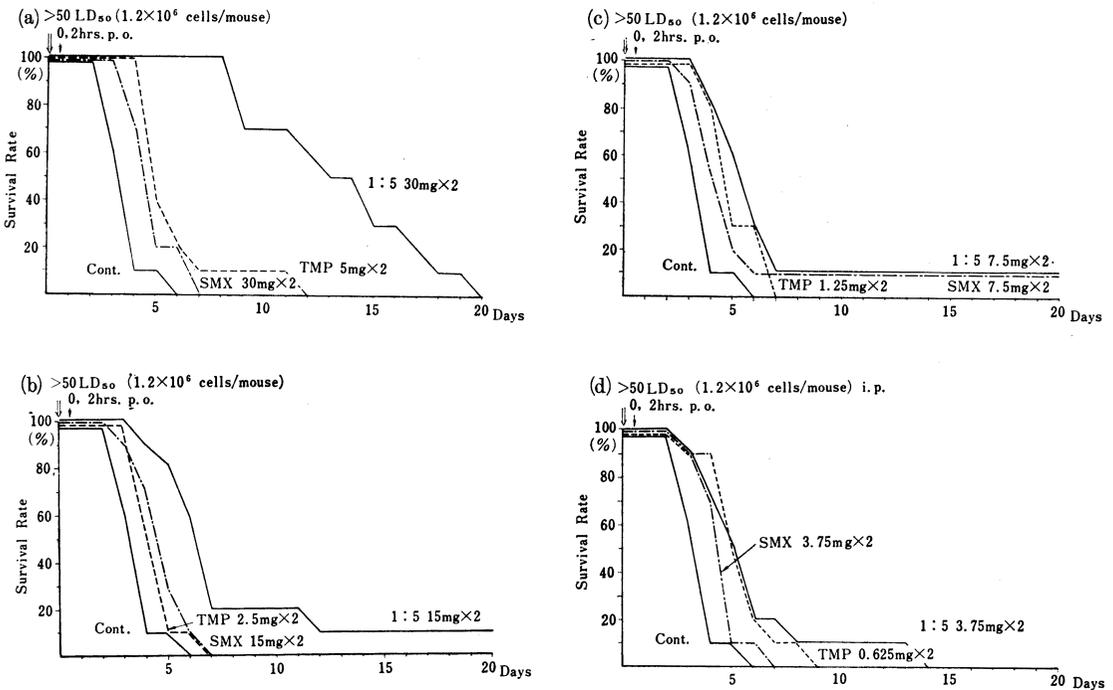
1) *in vitro* における SMX と TMP との協力作用の証明

液体希釈法による Box 法により *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* の SMX 感受性株、ならびに高度耐性株を用いて二剤間の協力作用の有無を検討した結果、*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* とともに感受性株においては極めて明瞭に、また SMX 高度耐性株については *Staphylococcus aureus* ではかなりの協力効果が認められたが、*Escherichia coli* については残念ながらその協力効果は余り強力ではなかつた。

14 Protective effect for experimental infection in mice
(*E. coli* 10-1 (SMX-R))



15 Protecting effect for experimental infection in mice
(*Sal. enteritidis*)



2) *in vitro* における SMX と TMP の配合比の検討

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* ともに感受性株の場合、SMX : TMP = 1 : 1 ~ 2 : 1 では SMX および TMP それぞれの単独より抗菌力 (MIC) は増強し、SMX : TMP = 20 : 1 の配合まで TMP 単独と同じ MIC を示し協力的であつた。しかしながら、上記実験同様に SMX 高度耐性株については 1 : 1 の組み合わせで TMP 単独と同一であるが SMX の配合比が増加するにつれて段階的に感受性の低下が認められた。

3) ST (20 : 1) の抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性菌、陰性菌群に対する SMX, TMP それぞれ単独と ST (20 : 1) の MIC (mcg/ml) を日本化学療法学会感受性測定法により検討した結果、*Pseudomonas* を除く広い菌種に対しサルファ剤である SMX よりかなり強い協力的な抗菌力 (MIC) を示し、その MIC は多くの抗生物質の示す抗菌力に匹敵すると思う。

4) 臨床分離株に対する感受性

臨床分離の *Staphylococcus aureus* 50株, *Escherichia coli* 37株に対する SMX, TMP それぞれ単独および SMX, TMP 配合による MIC を ST 合剤感受性測定小委員会にて定められた方法により求めたところ、標準菌と同様、明らかに合剤の協力効果を認めることが出来た。とくにサルファ剤高度耐性株が協力作用の結果、かなり感受性化されていることが証明された。

5) 細菌の増殖曲線におよぼす影響

SMX 感受性 *Staphylococcus aureus* ならびに SMX 高度耐性 *Staphylococcus aureus* を用い、その増殖曲線におよぼす影響を生菌数で測定し検討した結果、感受性菌においては明らかに協力効果を認めることが出来たがやはり SMX 耐性株ではその協力効果は弱かつた。

6) *in vivo* における SMX と TMP との協力作用の証明

マウス実験的 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 感染症に対する治療効果を SMX 感受性菌の場合と SMX 耐性菌について検討し、SMX と TMP の配合による協力効果を *in vivo* においても確認することができた。しかしながら、*in vitro* の場合と同様、サルファ剤高度耐性菌感染マウスの治療量は *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* いずれの場合においても、サルファ剤感受性菌感染マウスの治療量よりも多量を必要とした。またマウス実験的 *Salmonella enteritidis* 感染症に対する治療効果についても多量の投与により明らかな延命効果を示し併用の意義を確認することが出来た。

以上、Sulfamethoxazole-trimethoprim 合剤の細菌

学的評価を *in vitro*, *in vivo* 試験により実施した結果、SMX, TMP 両剤の配合による抗菌力の増強はサルファ剤感受性菌に対しては極めて顕著に認めることが出来たが、サルファ剤耐性菌に対する合剤の協力効果は感受性菌で得られたほど強力ではなく、現在、実施されているサルファ剤耐性菌感染症に対する本剤の臨床効果に期待したいと思う。

文 献

- 1) WARNER, P. & A. C. MANIAR : Combined action of Sulfadiazine and trimethoprim. *Applied Microbiology Mar.* : 299~300, 1966
- 2) REISBERG, B.; J. HERZOG & L. WEINSTEIN : *In vitro* antibacterial activity of trimethoprim alone and combined with sulfonamides. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* : 424~429, 1966
- 3) GRUNBERG, E. & W. F. DELORENZO : Potentiation of sulfonamides and antibiotics by trimethoprim [2, 4-diamino-5-(3, 4, 5-trimethoxy benzyl) pyrimidine]. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* : 430~433, 1966
- 4) CSONKA, G. W. & G. J. KNIGHT : Therapeutic trial of trimethoprim as a potentiator of sulphonamides in gonorrhoea. *Brit. J. Vener. Dis.* 43 : 161~165, 1967
- 5) HOEPRICH, P. D. : Susceptibility of staphylococci to new antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* : 679~704, 1967
- 6) DARRELL, J. H.; L. P. GARROD & P. M. WATERTON : Trimethoprim : laboratory and clinical studies. *J. Clin. Path.* 21 : 202~209, 1968
- 7) BUSHBY, S. R. M. & G. H. HITCHINGS : Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. *Brit. J. Pharm. Chemoth.* 33 : 72~90, 1968
- 8) 酒井克治, 羽野義博, 岸和田康二, 楠本博一 : Sulfisomezole と Sulfisoxazole の蛋白結合に関する 2, 3 の問題. *最新医学* 14 : 3139, 1959
- 9) 岡本三郎 : Sulfisomezole と Sulfadimethoxine との比較研究. *最新医学* 15 : 1890, 1960
- 10) 金沢裕, 倉又利夫 : サルファ剤の生物学的活性濃度測定法ならびに 2, 3 サルファ剤についての測定成績. *Chemotherapy* 8(5) : 478~485, 1960

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON THE COMBINATION OF SULFAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM

SHOZO NAKAZAWA, HISAKO ONO, MASAO OTSUKI, YUKARI KUROKAWA,
KAZUKO HASHIMOTO, KATSUMI HASHIMOTO, KOYA TANOUÉ and MINAKO ENYA
Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical College

In vitro and *in vivo* bacteriological studies on the combination of sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) revealed the following results :

1. Antimicrobial activities of SMX and TMP, alone and in combination, were investigated employing the broth dilution method and a checkerboard technic. Activities of the combination of SMX and TMP were markedly enhanced by potentiation against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* originally sensitive to SMX alone. The growth of *Staphylococci* highly resistant to SMX alone was also inhibited by SMX-TMP combination through potentiation, however, the degree of potentiation by the combination was not too impressive in *Escherichia coli* strains highly resistant to SMX alone.
2. Evaluation of the changes of minimal inhibitory concentrations (MICs) of the combination of SMX and TMP in various combination ratios indicated that MICs of the combination mixed in ratios of 1 : 1 to 20 : 1 (SMX : TMP) were enhanced by potentiation or synergism in strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* originally sensitive to SMX. MICs of SMX-TMP combination in a ratio of 1 : 1 against strains highly resistant to SMX were identical with those of TMP alone but MICs of the combination tended toward increase as the ratio of SMX increased.
3. MICs of SMX and TMP alone and 20 : 1 combination were investigated in a number of gram-positive and negative laboratory strains according to the method as recommended by an expert group of the Japan Society of Chemotherapy. MICs of the combination were found to be more significantly potentiated than that of SMX alone in all strains but for *Pseudomonas*. These MICs were comparable to those of currently available antibiotics.
4. Potentiation of the antimicrobial activities by SMX-TMP combination was clearly demonstrated also in a test of 50 strains of *Staphylococcus aureus* and 37 strains of *Escherichia coli* isolated from clinical materials. Activities against strains highly resistant to sulfonamide were significantly improved by potentiation.
5. Studies of the influence of SMX-TMP combination on growth curves of *Staphylococci* revealed that potentiation by the combination was evident in staphylococcal strains sensitive to SMX alone. But the degree of potentiation was to a lesser extent in SMX-resistant strains.
6. *In vivo* studies on experimented infection of mice with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* confirmed potentiation of activities by SMX-TMP combination in strains both sensitive and resistant to SMX alone. The doses of combination required to treat mice infected with sulfonamide resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were more than those required to treat animals with sulfonamide sensitive bacterial infection. The survival of mice experimentally infected with *Salmonella* was also improved by the combination of SMX and TMP.