

最近の臨床材料から分離された *Serratia marcescens* および *Proteus* 属に対する Sulfamethoxazole, Trimethoprim およびその合剤の *in vitro* 抗菌作用

那 須 勝・猿 渡 勝 彦

長崎大学医学部附属病院検査部 (主任: 糸賀 敬教授)

中富昌夫・森 信興・斉藤 厚・藤原恒夫

長崎大学医学部第2内科 (主任: 原 耕平教授)

(昭和 52 年 10 月 13 日受付)

はじめに

サルファ剤をジアミノピリミジン系の誘導体である Trimethoprim (TMP と略) と併用した場合, その抗菌作用は著しく増大することが報告されている^{1,2,3)}。これは, TMP およびサルファ剤はともに細菌の葉酸代謝経路に作用し, サルファ剤は P-aminobenzoic acid と dihydropteroate から dihydrofolic acid への合成を, TMP は dihydrofolic acid から tetrahydrofolic acid への還元を阻害して, 同一代謝経路の相隣る 2カ所を同時に阻害するものとされている⁴⁾。

私達は, 最近臨床材料からの分離頻度が増加しつつある *Serratia marcescens* (*S. marcescens* と略) および *Proteus* 属に対して, TMP および Sulfamethoxazole (SMX と略) の単独作用時と, SMX と TMP を 20:1 に併用した場合 (以下 ST と略) の抗菌力を測定して若干の知見を得たので, その成績を報告する。

材料および方法

1) 被験菌株

長崎大学医学部附属病院検査部において, 1974 年から 1975 年の間に各種の臨床材料から分離された *S. marcescens* 216 株および *Proteus* 属 141 株 (*P. mirabilis* 52, *P. vulgaris* 20, *P. rettgeri* 16, *P. morgani* 42, *P. inconstans* 11) の計 357 株を用いた。*S. marcescens* のうち色素産生株は 72 株, 非産生株は 144 株であった。

2) 抗菌力測定法

日本化学療法学会 ST 合剤研究会の MIC 測定小委員会によって定められた方法⁵⁾ によった。すなわち, 前培養培地として MUELLER-HINTON Broth (Difco) を用

い 37°C 1 夜培養した菌液を生理食塩水で 1,000 倍に希釈し, その 1 白金耳量を馬溶血血液を 7.5% に加えた各薬剤含有の MUELLER-HINTON agar (Eiken) に画線塗抹して, 37°C 18~20 時間培養後菌の発育の有無を判定した。ただし, SMX は D. S. T. 寒天培地 (Oxoid, 馬溶血血液不含) を用いた。

TMP は, なるべく少量の 4/100 N·HCl に溶解し, SMX は 1/8 N·NaOH に溶解して, 蒸留水を加え 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の母液を作成した。これを 2 倍希釈を行なって, 測定用平板培地中の薬剤濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$ から 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 含有するようにした。また, TMP と SMX 併用の場合には, 前述の TMP 母液 1: SMX 母液 20 の割合で混合したのち, 培地中の TMP+SMX の濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$ から 0.1 $\mu\text{g/ml}$ になるように調整した。従って, 併用時の濃度系列は Table 1 のとおりである。

実験成績

S. marcescens 216 株および *Proteus* 属 141 株の TMP および ST の各濃度における MIC 分布を Table 1 から算出して Fig. 1~6 に累積%で示した。

SMX 単独作用時の抗菌力は, 供試した全株に対して >100 $\mu\text{g/ml}$ であった。ただし, SMX の抗菌力測定には, 前述のように馬溶血血液を含まない D. S. T. 寒天培地を用いている。

以下, 各菌種に対する成績について述べる。

1. *Serratia marcescens* 216 株に対する抗菌力 (Fig. 1)

TMP 単独作用時には, 0.39 $\mu\text{g/ml}$ から 25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC に全株が分布し, そのピークは 3.13 $\mu\text{g/ml}$ にあった。ST では 0.78 $\mu\text{g/ml}$ から >100 $\mu\text{g/ml}$ の MIC (ST

Table 1 Concentration of TMP and SMX combined

($\mu\text{g/ml}$)

TMP+SMX	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10
TMP	4.8	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
SMX	95.2	47.6	23.8	11.9	5.95	2.97	1.48	0.74	0.37	0.19	0.095

Fig.1 Cumulative distribution of MICs of TMP, SMX and ST combination to 216 strains of clinically isolated *Serratia marcescens*

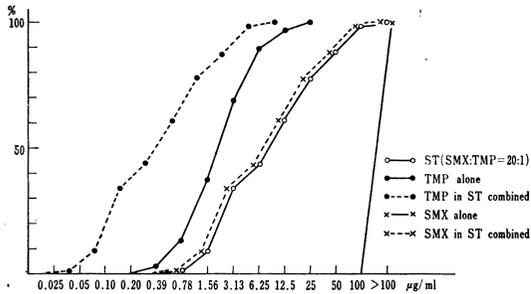


Fig.2 Cumulative distribution of MICs of TMP alone and ST combination to 72 strains of clinically isolated pigment producing *Serratia marcescens*, and 144 strains of pigment nonproducing *Serratia marcescens*

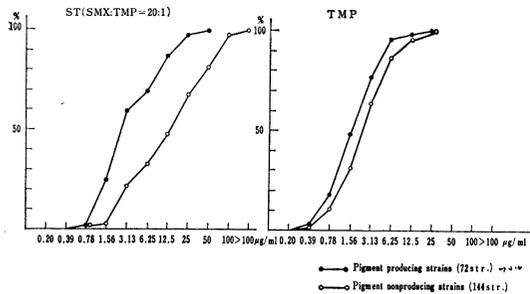
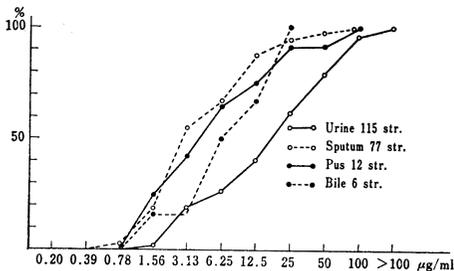


Fig.3 Cumulative distribution of MICs of ST combination to *Serratia marcescens* strains isolated from various clinical materials



の TMP 濃度は 0.04 µg/ml から 4.8 µg/ml) に分布し、そのピークは 3.13 µg/ml にあって 51 株 (23.6%) が分布した。

TMP 単独に比べて ST の MIC は高い値を示しているが、TMP 濃度としてその分布をみると、SMX 併用によってかなりの相乗作用が現れている。供試した S.

Fig.4 Cumulative distribution of MICs of TMP, SMX and ST combination to 52 strains of clinically isolated *Proteus mirabilis*

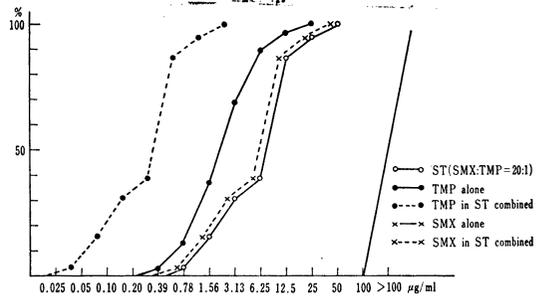


Fig.5 Cumulative distribution of MICs of TMP, SMX and ST combination to 20 strains of clinically isolated *Proteus vulgaris*

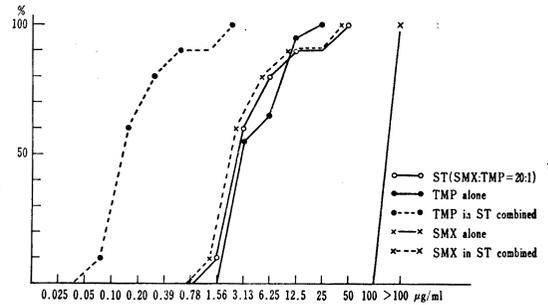
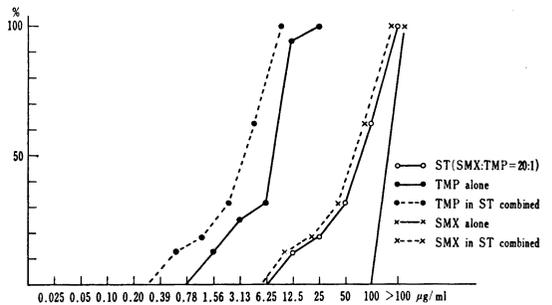


Fig.6 Cumulative distribution of MICs of TMP, SMX and ST combination to 16 strains clinically isolated *Proteus rettgeri*



marcescens の 70% の株は、ST ≤ 25 µg/ml, TMP ≤ 6.25 µg/ml の MIC でその発育は阻止された。

本菌を色素産生能別に分けてみた ST および TMP の活性分布を Fig.2 に示した。他の化学療法剤と同様に^{6,7)}、本剤も色素非産生株に対して大きい MIC を示したが、TMP では、その差は ST ほど著明ではなかった。

臨床材料由来別にみた MIC 分布を Fig.3 に示したが、他の化学療法剤と同様に喀痰由来株よりも尿由来株に耐性を示す株が多い傾向にあった^{6,7)}。

Fig. 7 Cumulative distribution of MICs of TMP, SMX and ST combination to 42 strains of clinically isolated *Proteus morganii*

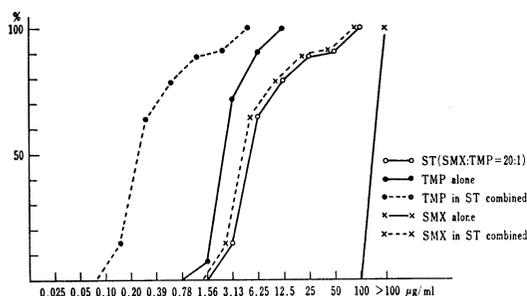
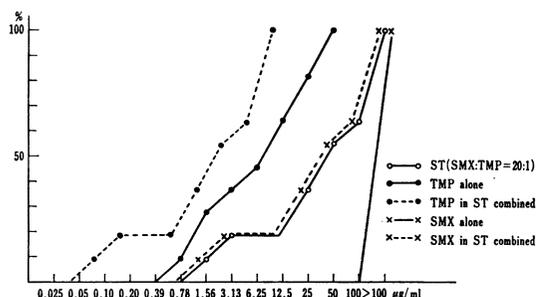


Fig. 8 Cumulative distribution of MICs of TMP, SMX and ST combination to 11 strains of clinically isolated *Proteus inconstans*



2. *Proteus* 属 141 株に対する抗菌力 (Fig. 4~8)

Proteus mirabilis 50 株の成績は、Fig. 4 に示すとおり、TMP 単独では 0.78 から 12.5 µg/ml、ST では 0.78 µg/ml から 50 µg/ml (ST 中の TMP 濃度は 0.04 µg/ml から 2.4 µg/ml) に全株が分布した。70% の株は TMP ≤ 3.13 µg/ml、ST ≤ 6.25 µg/ml (ST 中の TMP 濃度は 0.3 µg/ml) の MIC でその発育が阻止された。

同様に、*Proteus vulgaris* 20 株は (Fig. 5)、TMP 3.13 µg/ml から 25 µg/ml、ST 1.56 µg/ml から 50 µg/ml (ST 中の TMP 濃度は 0.08 µg/ml から 2.4 µg/ml) の MIC に全株が分布した。TMP 単独の場合と ST との間にはほとんど抗菌力の差はみられず、TMP と SMX との相乗作用が顕著であった。

Proteus rettgeri 16 株は (Fig. 6)、TMP 1.56 µg/ml から 25 µg/ml、ST 12.5 µg/ml から >100 µg/ml (ST 中の TMP 濃度は 0.6 µg/ml から >4.8 µg/ml) の MIC に分布した。

Proteus morganii 42 株は (Fig. 7)、TMP 1.56 µg/ml から 12.5 µg/ml、ST 3.13 µg/ml から >100 µg/ml (ST 中の TMP 濃度は 0.15 µg/ml から >4.8 µg/ml) の MIC に分布し、その 70% の株は、TMP ≤ 3.13 µg/ml、ST ≤ 12.5 µg/ml (ST 中の TMP 濃度は 0.6 µg/ml)

ml) の MIC で発育が阻止された。

Proteus inconstans 11 株は (Fig. 8)、TMP 0.78 µg/ml から 50 µg/ml、ST 1.56 µg/ml から >100 µg/ml (ST 中の TMP 濃度は 0.08 µg/ml から >4.8 µg/ml) の MIC でその発育が阻止された。

これら供試した *Proteus* 属に対して、*S. marcescens* と同様に SMX と TMP との併用は、かなり低い濃度でその発育を阻止した。

考 察

Sulfa 剤と TMP の併用による抗菌力の増強が証明され、外国ではこれに関する多くの研究報告がなされている。本邦では、日本化学療法学会において SMX と TMP 併用の場合の基礎的、臨床的研究がなされ、機関紙 *Chemotherapy* (21(2) : 67~530, 1973) に「Sulfamethoxazole-Trimethoprim 合剤論文特集号」として掲載された。

SMX と TMP の合剤 (ST 合剤と略、SMX : TMP = 5 : 1 に配合) は、すでに広く細菌感染症に使用されていて、これを内服した場合の血中濃度比は 20~40 : 1、尿中では 2~3 : 1 とされている⁹⁾。

SMX と TMP との協働作用は TMP によって規定されている傾向があり、菌種あるいは耐性の程度によって異なり、SMX 耐性菌については感性菌のそれより当然劣るが、中沢ら⁹⁾は、*in vitro* における 2 剤の配合比の検討では、感性の *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* の場合 20 : 1 の配合までは TMP と同じ MIC で阻止され、協力的であったと述べている。

Sulfa 剤の抗菌力測定に関しては、測定培地中の拮抗物質と接種菌量に注意しなければならない。通常、Sulfa 剤の拮抗物質としてメチオニン、グリシン、プリン、チミン、PABA (P-aminobenzoic acid) などが知られていて、一般の臨床細菌検査室における感受性検査には、ペプトンを含まない MUELLER-HINTON 培地、感受性ディスク用培地、D. S. T. 寒天培地が使用されている。また、馬溶血血液を添加すると抗菌力は上昇し、接種菌量は少ないほど安定した測定値が得られる。

私達は、最近の臨床材料から多く分離されるようになった *S. marcescens* および多剤に耐性の *Proteus* 属について、ST 合剤研究会によって定められた方法により TMP, SMX および ST (SMX : TMP = 20 : 1) の抗菌力を測定したが、TMP および ST の抗菌力はかなり良好な結果が得られた。SMX の MIC は、供試菌株全てに対して >100 µg/ml であったが、これは測定用培地として馬溶血血液不含有の D. S. T. 寒天培地を用いた影響が十分に考えられた。

S. marcescens 216 株は、ST ≤ 25 µg/ml、TMP ≤ 6.25

$\mu\text{g/ml}$ の MIC でその 70% の株の発育が阻止された。色素産生株は、 $\text{ST} \leq 12.5 \mu\text{g/ml}$, $\text{TMP} \leq 3.13 \mu\text{g/ml}$, 色素非産生株は $\text{ST} \leq 50 \mu\text{g/ml}$, $\text{TMP} \leq 6.25 \mu\text{g/ml}$ の濃度でそれぞれ 70% の株が阻止され、私達がすでに報告した本菌に対する各種の化学療法剤の抗菌力成績⁶⁾と比較すると(70%の株の阻止濃度から), ST は Tobramycin, Minocycline とほぼ同様の抗菌力で, TMP は Furatrizine とほぼ同様の抗菌力を有するものと考えられた。しかし, ST, TMP とともに Gentamicin よりその抗菌力は劣った。臨床材料由来別にみた抗菌力の比較では, 他の化学療法剤と同様に, 尿由来菌に耐性株が多い傾向にあった。

Proteus 属のうち, 通常インドール陰性菌 (*Proteus mirabilis*) は化学療法剤に感性で, インドール陽性の *Proteus* は多剤に耐性である⁷⁾。本菌属に対する ST, TMP の抗菌力はかなり優れていて, 感受性の面からは *Proteus* 感染症にも期待される結果が得られた。

細菌感染症の治療剤として, ST 合剤は腸管系感染症や尿路感染症, 呼吸器感染症(とくに慢性気道感染症^{11,12)})に使用されているが, 重症基礎疾患を有する症例など免疫不全状態に発症する *Pneumocystis carinii* 肺炎に対する治療効果も報告されていて^{13,14,15)}, 今後この面での検討も必要であろうと考える。

ま と め

1974 年から 1975 年に長崎大学付属病院で各種の臨床材料から分離された菌株のうち, *Serratia marcescens* 216 株, *Proteus* 属 141 株, (*P. mirabilis* 52, *P. vulgaris* 20, *P. rettgeri* 16, *P. morgani* 42, *P. inconstans* 11) に対する SMX, TMP および両剤併用 (SMX : TMP = 20 : 1) の MIC 分布を ST 合剤研究会の定めた方法 (SMX だけは馬溶血血液不含の D. S. T. 寒天培地 (oxid) を使用した平板希釈法) で測定し, 若干の考察を加えた。

SMX は全株 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示した。

TMP 単独では *S. marcescens* のうち 70% の株が $\leq 3.13 \mu\text{g/ml}$ で, *Proteus* 属のうち 70% の株が, 菌種によってやや異なるが $3.13 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ で阻止された。

両剤の併用により明かな協力作作用が認められ, *S. marcescens* のうち 70% の株が $\leq 25 \mu\text{g/ml}$ (ST 中の TMP 濃度では $\leq 1.2 \mu\text{g/ml}$) で阻止された。*Proteus* 属においても菌種により多少の差はあるが $6.25 \mu\text{g/ml} \sim 25 \mu\text{g/ml}$ (ST 中の TMP 濃度では $0.3 \mu\text{g/ml} \sim 1.2 \mu\text{g/ml}$) で発育が阻止されたが, *P. rettgeri* および *P. inconstans* の感受性は他の *Proteus* に比べ劣っていた。

S. marcescens のうち, 色素非産生株の感受性が色素

産生株よりも劣る傾向を示した。

分離材料別には, 尿由来株に耐性菌が多い傾向を示した。

本論文の要旨は, 第 23 回日本化学療法学会西日本支部総会 (1975, 12, 於長崎) で発表した。稿を終るに当たって, 御指導, 御校閲戴いた本学第 2 内科 原 耕平教授に深謝する。

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/Sulfamethoxazole *in vitro* und *in vivo*. Chemotherapy (Basel) Suppl. 14 : 1~12, 1969
- 3) WATERWORTH, P. M. : Practical aspects of testing sensitivity to trimethoprim and sulphonamide. Postgraduate Med. J. Suppl. 45 : 21~27, 1969
- 4) HITCHINGS, G. H. : Species differences among dihydrofolate reductases as a basis for chemotherapy. Postgraduate Med. J. Suppl. 45 : 7~10, 1969
- 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 21 : 67~76, 1973
- 6) 那須 勝, 猿渡勝彦, 中富昌夫, 森 信興, 齊藤厚, 原 耕平 : 最近の臨床材料から分離された *Serratia marcescens* の化学療法剤感受性. Chemotherapy 25 : 397~404, 1977
- 7) 小栗豊子, 村瀬光春, 小酒井 望 : 臨床材料からの *Enterobacter-Serratia* 群の多剤耐性. Jap. J. Antibiotics 28 : 137~142, 1975
- 8) 松本文夫, 柴 孝也 : 化学療法剤の現況一特性と問題点. 合成抗菌剤. 化学療法ハンドブック (上田泰, 清水喜八郎編), 永井書店, 大阪, p.241~248, 1975
- 9) 中沢昭三, 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, 遠天皆子 : Sulfamethoxazole-Trimethoprim 合剤に関する細菌学的評価. Chemotherapy 21 : 88~103, 1973
- 10) 原 耕平, 那須 勝 : 細菌感染症と化学療法剤. 現代医療 8 : 11~18, 1976
- 11) JORDAN, G. W. ; S. F. KRAJIDEN, P. D. HOEPRICH, G. A. WONG, T. H. PEIRCE & D. C. RAUSCH : Trimethoprim-sulfamethoxazole in chronic bronchitis. CMA Journal 112 : 91~95, 1975
- 12) WILLIAM, J. D. & J. ANDREWS : Sensitivity of *Haemophilus influenzae* to antibiotics. Brit. Med. J. 26 : 134~137, 1974
- 13) HUGHES, W. T. ; S. FELDMAN & S. K. SANYAL : Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with trimethoprim-sulfamethoxazole.

- CMA Journal 112 : 47~50, 1975
- 14) HUGES, W. T. ; P. C. MCNABB & T. D. MAKERS: Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. Antimicrob. Agents & Chemoth. 5 : 289~293, 1974
- 15) LAU, W. K. & L. S. YOUNG : Trimethoprim-sulfamethoxazole treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in adults. New Engl. J. Med. 295 : 716~718, 1976

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SULFAMETHOXAZOLE,
TRIMETHOPRIM AND SULFAMETHOXAZOLE-TRIMETHOPRIM
AGAINST *SERRATIA MARCESCENS* AND *PROTEUS* SPECIES
RECENTLY ISOLATED FROM VARIOUS CLINICAL MATERIALS

MASARU NASU, KATSUHIKO SAWATARI, MASAO NAKATOMI*,
NOBUOKI MORI*, ATSUSHI SAITO* and TSUENO FUJIWARA*

Department of Clinical Laboratory, and Second Department of Internal Medicine*,
Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan

Minimal inhibitory concentrations (MIC) of Sulfamethoxazole (SMX), Trimethoprim (TMP) and Sulfamethoxazole-Trimethoprim (SMX-TMP 20 : 1) were determined using 216 strains of *Serratia marcescens*, 141 strains of *Proteus* species (*Proteus mirabilis* 52, *Proteus vulgaris* 20, *Proteus rettgeri* 16, *Proteus morgani* 42 and *Proteus inconstans* 11) isolated from various clinical materials submitted to our Laboratory during the period 1974 to 1975.

Methods of susceptibility testing for SMX-TMP recommended by the *Ad Hoc* committee of the Japan Society of Chemotherapy for MIC testing methods for SMX and TMP were applied to the determinations of MIC of TMP and SMX-TMP. MIC of SMX was tested using D. S. T. agar (Oxoid) without adding lysed horse blood. The results were as follows.

- 1) MICs of SMX against all strains tested were more than 100 $\mu\text{g/ml}$.
- 2) Seventy percent of 216 *S. marcescens* strains was inhibited by TMP at concentrations of less than 3.13 $\mu\text{g/ml}$. Also 70 percent of 141 *Proteus* species was inhibited at MICs ranging from 3.13 to 25 $\mu\text{g/ml}$ with only slight differences according to species.
- 3) Synergic action was found in SMX-TMP ; 70 percent of 216 *S. marcescens* strains was inhibited by an MIC of less than 25 $\mu\text{g/ml}$ of SMX-TMP (concentration of TMP was less than 1.2 $\mu\text{g/ml}$). *Proteus* species were inhibited by MIC ranging from 6.25 to 25 $\mu\text{g/ml}$ (concentration of TMP was from 0.3 to 1.2 $\mu\text{g/ml}$) except that *Proteus rettgeri* and *Pr. inconstans* were more resistant to SMX-TMP.
- 4) MICs of SMX-TMP and TMP alone against pigment producing *Serratia marcescens* strains were lower than those of pigment negative strains.
- 5) The resistant strains tended to be isolated frequently from urine specimens.