

Silver sulfadiazine に関する細菌学的検討

由良二郎・品川長夫・石川周
松垣啓司・花井拓美

名古屋市立大学第一外科

安藤正英

佐久総合病院形成外科

(昭和55年4月24日受付)

Silver sulfadiazine の細菌学的検討を行ない、次の結果を得た。

- (1) 緑膿菌、大腸菌、*Klebsiella* に対して本剤は全て 200 µg/ml 以下の MIC を示し、そのピークは 50 µg/ml ないし 100 µg/ml であった。また、*Staphylococcus* に対しては、これより 1~2 管高い MIC のピークを示したが、いずれも 200 µg/ml 以下の MIC であった。
- (2) 本剤は緑膿菌、大腸菌に対して1時間ないし2時間で殺菌作用を示した。
- (3) 緑膿菌を用いた耐性獲得試験において、本剤に対する耐性獲得は認めなかった。
- (4) 位相差顕微鏡において本剤による緑膿菌の形態変化を観察したが、2時間で全く分裂増殖は認めず、4時間で細胞内に斑状の濃淡を認めたが、フィラメント化や溶菌像は全く認めなかった。

近年、重症熱傷に対する輸液療法の進歩により、1次性ショックによる死亡は著しく減少しているが、その後長く感染期において burn wound sepsis 等の治療および予防に対しては、種々の問題点が残っている。そして、これら熱傷感染症においては、全身投与された抗生物質の熱傷創への移行が低率¹⁾であることから、種々の局所療法剤²⁾が用いられているが、それぞれ長所短所があり、まだ一定していないのが現状である。

今回、われわれは、1967年に、Columbia大学のCHARLES L. FOX Jr.³⁾が初めて合成に成功した Silver sulfadiazine の提供を受け、本剤についての細菌学的検討を行ない若干の成績を得たので報告する。Fig. 1 に本剤の構造式を示した。

実験材料および方法

(1) 使用菌株

1977年1月から1979年2月までの期間に名古屋市立第一外科入院の外科的感染症から分離された緑膿菌48株、大腸菌25株、*Klebsiella* 23株、*Staphylococcus aureus* 8株、*S. epidermidis* 3株、および佐久総合病院形成外科入院の熱傷患者から分離された緑膿菌10株の臨床分離株について検討し、さらに各種保存株5株についても検討を加えた。

(2) 薬剤感受性測定法

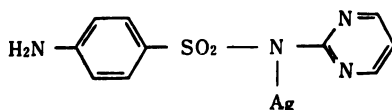
日本化学療法学会標準法⁴⁾に準じて最小発育阻止濃度

(以下、MIC と略) を測定した。すなわちハートインフュージョン寒天培地(栄研 pH 7.4)を用いた平板希釈法による MIC を測定し、接種菌量はハートインフュージョンブイヨンにて、37°C overnight culture した菌液を 10⁸ cell/ml および 10⁹ cell/ml に調整して各1白金耳を接種した。判定は 37°C 24 時間培養後に菌の発育を認めなかった最小の濃度にて行った。ただし、silver sulfadiazine (以下、AgSD) は水、その他の溶液に対していっさい不溶性なため、測定培地作製にあたっては振盪器にて攪拌した懸濁液を速やかに希釈し、培地と混合させて平板とした。

(3) 感受性測定薬剤

Silver sulfadiazine (東京田辺製薬 K. K. から提供)、gentamicin (GM) について測定し、また緑膿菌 22 株についてはこれ以外に carbenicillin (CBPC)、sulbeni-

Fig. 1 Silver sulfadiazine



cillin (SBPC), dibekacin (DKB), tobramycin (TOB), amikacin (AMK) についてもあわせて測定し比較検討した。

(4) 殺菌能測定

生理的食塩水にて適当な濃度に希釈した AgSD 懸濁液 9ml に 37°C にて HI ブイヨンを用いて, overnight culture した菌液 1ml を加え 37°C にて振盪培養し, 経時的に被検液から 1 白金耳づつ採取してブイヨン 5ml に接種し, 同時に塗抹, 染色して検鏡した。ブイヨンは 37°C 48 時間観察し, 混濁の有無にて判定した。

(5) 試験管内耐性獲得試験

各種濃度に AgSD を含んだ HI ブイヨン (栄研 pH 7.2) に試験菌を 1 白金耳接種し, 37°C 24 時間振盪培養

し, 明らかに混濁の認められた最大濃度の菌液を同様にして次の各種濃度を含んだブイヨンに 1 白金耳接種して継代培養をくり返し, 混濁のみられない最小濃度 (MIC) の変化について観察した。

(6) 位相差顕微鏡による形態変化

スライドガラス上に薬剤を含ませたフィルム寒天を作製し, 一方, 約 3 時間振盪培養を行なった対数期途上の菌液をカバーガラスに塗抹し, これを寒天上にかぶせてパラフィンで封入した。これを 37°C 恒温装置付の位相差顕微鏡 (オリンパス) により観察した。

結 果

(1) 抗菌作用

教室保存の 5 菌種に対する AgSD の MIC について

Table 1 Antibacterial spectrum of silver sulfadiazine

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

Organism	AgSD		GM	
	10^8 cells/ml	10^6 cells/ml	10^8 cells/ml	10^6 cells/ml
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	50	50	6.3	3.2
<i>E. coli</i> NIHJ	50	50	1.6	0.8
<i>K. pneumoniae</i> ST 101	50	50	3.2	1.6
<i>S. aureus</i> 209-P	100	100	0.2	0.2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	100	100	0.2	0.2

Table 2 Sensitivity distribution of clinical isolates

Inoculum size: 10^8 cells/ml

Drug	Organism	$\mu\text{g/ml}$											
		0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200	≥ 400
AgSD	<i>P. aeruginosa</i> 58 str.								1	39	16	2	
	<i>E. coli</i> 25 str.									23	2		
	<i>Klebsiella</i> 23 str.									2	19	2	
Drug	Organism	$\mu\text{g/ml}$											
		0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	>100	
GM	<i>P. aeruginosa</i> 33 str.			3	16	6	2			1		5	
	<i>E. coli</i> 25 str.	1	9	9	3			2		1			
	<i>Klebsiella</i> 23 str.	4	15	1	3								

Table 3 Sensitivity distribution of clinical isolates

Inoculum size: 10^8 cells/ml

Drug	Organism	$\mu\text{g/ml}$											
		0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200	≥ 400
AgSD	<i>P. aeruginosa</i> 58 str.									22	32	4	
	<i>E. coli</i> 25 str.									19	6		
	<i>Klebsiella</i> 23 str.									1	19	3	
Drug	Organism	$\mu\text{g/ml}$											
		0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	>100	
GM	<i>P. aeruginosa</i> 33 str.				4	14	8	1			1	5	
	<i>E. coli</i> 25 str.		2	11	7	1	1		2	1			
	<i>Klebsiella</i> 23 str.		12	7	1	3							

検討した結果は Table 1 に示すとおりである。グラム陰性桿菌 (GNR) である緑膿菌、大腸菌、*Klebsiella* に対しては 50 µg/ml と良好な MIC を示し、また接種菌量による差を認めなかった。グラム陽性の *S. aureus* や *Bacillus subtilis* では 100 µg/ml と GNR と比べ1管ほど高い MIC を示した。

次に臨床分離株の感受性分布について検討した。

Table 2, 3 は緑膿菌、大腸菌、*Klebsiella* の AgSD および GM についての MIC の分布である。10⁸ cell/ml 接種では AgSD の MIC 分布は、緑膿菌では 25 µg/ml から 200 µg/ml でピークは 50 µg/ml、大腸菌では 50 µg/ml から 200 µg/ml でピークは 100 µg/ml であった。GM における MIC のピークは緑膿菌では 1.6 µg/ml、大腸菌では 0.4~0.8 µg/ml、*Klebsiella* では 0.4 µg/ml であった。

10⁸ cell/ml 接種時においては AgSD の MIC のピークは緑膿菌で 100 µg/ml、大腸菌で 50 µg/ml、*Klebsiella* で 100 µg/ml であり、これらの菌株はいずれも 200 µg/ml 以下の MIC であった。GM における MIC のピークは緑膿菌 3.2 µg/ml、大腸菌 0.8 µg/ml、*Klebsiella* 0.4 µg/ml であった。

次にグラム陽性の *Staphylococcus aureus*, *S. epider-*

midis について検討すると Table 4 の結果となった。すなわち、*S. aureus* に対する AgSD の MIC は、10⁶ cell/ml, 10⁸ cell/ml とともに 100 µg/ml から 200 µg/ml にあり、各々のピークは 100 µg/ml と 200 µg/ml であった。また *S. epidermidis* では菌株が少ないが、AgSD の MIC は 10⁶ cell/ml で 50 µg/ml から 100 µg/ml, 10⁸ cell/ml で 200 µg/ml に分布していた。これらの菌種に対する GM の MIC にはバラツキがあり高度耐性株もみられている。

次に緑膿菌 22 株について AgSD と同時にアミノ配糖体抗生剤として GM, DKB, TOB, AMK, ペニシリン系抗生剤として CBPC, SBPC について MIC も同時に測定して比較検討した。その成績を Table 5, 6, Fig. 2, 3 に示した。すなわち、10⁸ cell/ml 接種では各薬剤の MIC のピークは AgSD 50 µg/ml, GM 1.6 µg/ml, DKB 1.6 µg/ml, TOB 0.8 µg/ml, AMK 3.2 µg/ml, CBPC 100 µg/ml, SBPC 50 µg/ml であった。GM, DKB, TOB では 3 株 (13.6%) に 100 µg/ml 以上の高度耐性株を認めた。同様に 10⁸ cell/ml 接種における MIC のピークは AgSD 50 µg/ml, GM 3.2 µg/ml, DKB 3.2 µg/ml, TOB 1.6 µg/ml, AMK 6.3~12.5 µg/ml, CBPC 100 µg/ml, SBPC 100 µg/ml であった。

Table 4 Sensitivity distribution of clinical isolates

Organism	Drug	Inoculum size	≤0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200*	≥400	
<i>S. aureus</i> 8 str.	AgSD	10 ⁸										3	5		
		10 ⁶										6	2		
	GM	10 ⁸	1		2	2			1					2	
		10 ⁶	1	3	1			1						2	
<i>S. epidermidis</i> 3 str.	AgSD	10 ⁸												3	
		10 ⁶									2	1			
	GM	10 ⁸		1							1			1	
		10 ⁶	1						1				1		

(*GM : >100)

Table 5 Sensitivity distribution of *Pseudomonas aeruginosa* (22 str.)

Inoculum size : 10⁸ cells/ml

Drug	MIC											
	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200*	≥400	
AgSD								14	7	1		
CBPC							1	8	9	4		
SBPC							5	13	2	2		
GM		1	14	3	1					3		
DKB	1	2	14	2						3		
TOB	1	11	7						2	1		
AMK			1	10	8	3						

(*GM, DKB, TOB, AMK : >100)

Table 6 Sensitivity distribution of *Pseudomonas aeruginosa* (22 str.) Inoculum size: 10^8 cells/ml

MIC	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200*	≥400
Drug											
AgSD								10	9	3	
CBPC								1	15	5	1
SBPC							1	6	12	3	
GM			2	12	5					3	
DKB		1	6	10	2					3	
TOB		4	12	3					2	1	
AMK				1	10	10	1				

(*GM, DKB, TOB, AMK : >100)

Fig. 2 Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* (22 strains) Inoculum size: 10^8 cells/ml

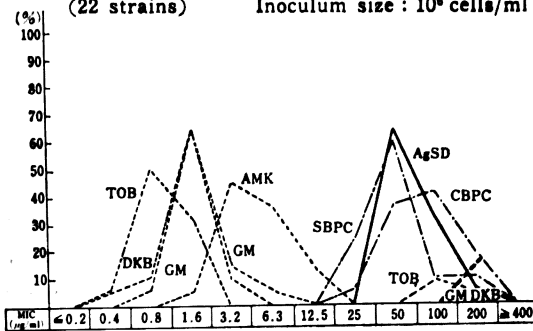


Fig. 3 Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* (22 strains) Inoculum size: 10^8 cells/ml

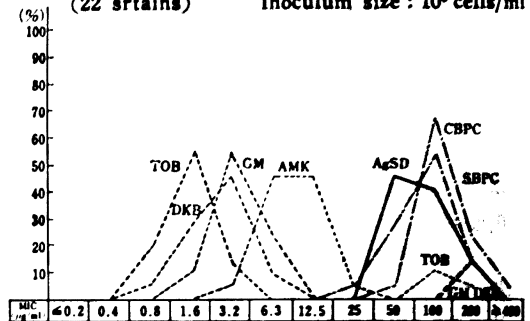


Table 7 Bactericidal effect of silver sulfadiazine (*E. coli* NIHJ)

Time	5'	15'	30'	1 ^h	2 ^h	4 ^h	6 ^h	18 ^h	24 ^h
Concent.									
25 μg/ml	+	+	+	+	-	-	-	-	-
200 μg/ml	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1,600 μg/ml	+	+	+	-	-	-	-	-	-

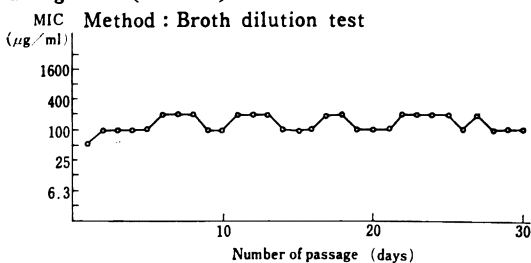
(+) growth (-) no growth

Table 8 Bactericidal effect of silver sulfadiazine (*Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490)

Time	5'	15'	30'	1 ^h	2 ^h	4 ^h	6 ^h	18 ^h	24 ^h
Concent.									
25 μg/ml	+	+	+	+	-	-	-	-	-
200 μg/ml	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1,600 μg/ml	+	+	+	-	-	-	-	-	-

(+) growth (-) no growth

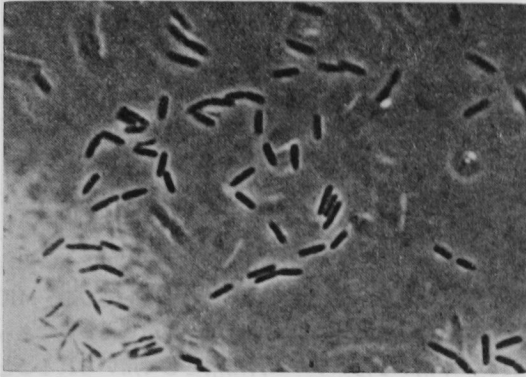
Fig. 4 Development of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* (in vitro)



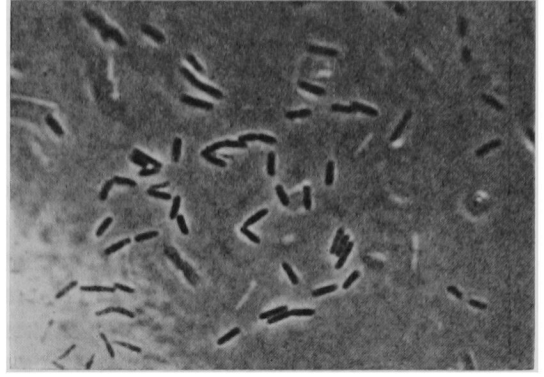
(2) 殺菌能試験

E. coli NIHJ 株, および *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 株に対する AgSD の殺菌能の成績を Table 7.8 に示した。すなわち, 25 μg/ml では2時間までに, また 200 μg/ml, 1,600 μg/ml ではいずれも1時間までに殺菌されることが判明した。しかしながら同時に施行した各時点での塗抹標本においては, 若干の形態的変化を認めるが, いずれも菌の存在を認めており本剤においては溶菌することなしに殺菌されるものと考えられ

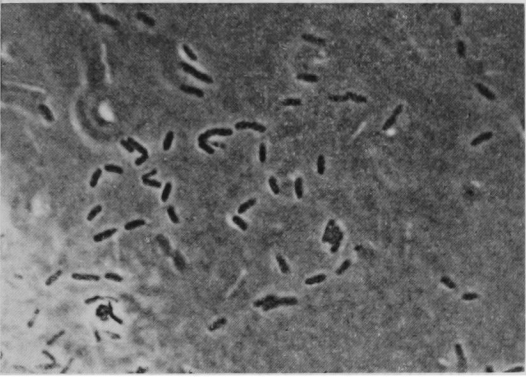
Fig.5 Phase contrast micrographs of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ silver sulfadiazine



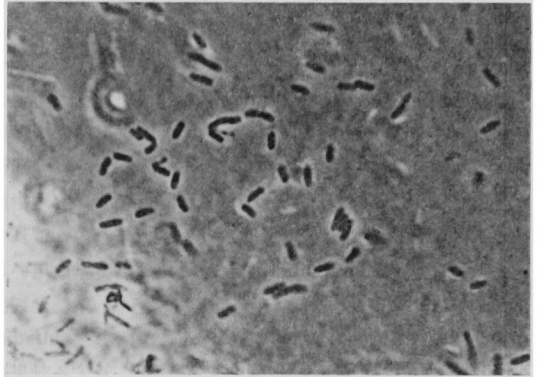
(a) 0 hour



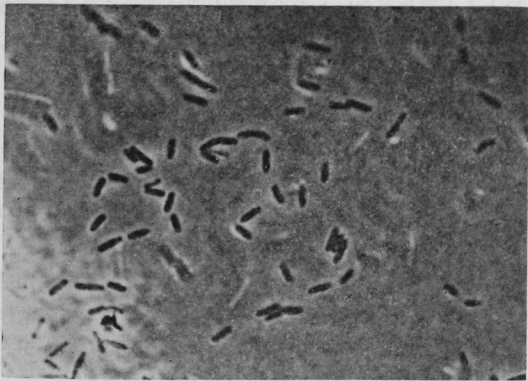
(b) 2 hours



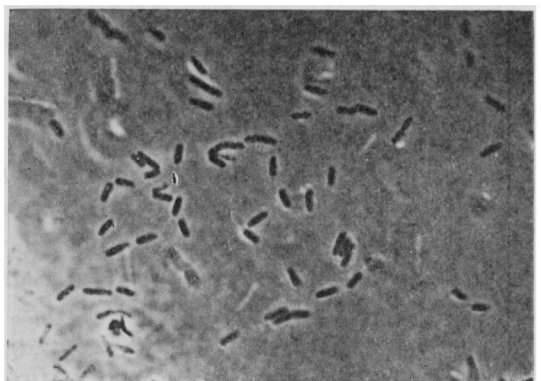
(c) 4 hours



(d) 6 hours



(e) 9 hours



(f) 12 hours

た。これらの変化は *E. coli*, *Pseudomonas* 両株とも同様であった。

(3) 試験管内耐性獲得試験

P. aeruginosa NCTC 10490 株を用いて AgSD に対する試験管内耐性獲得試験を行なった結果、Fig. 4 に示すとおり 30 代継代培養においても MIC は 50 $\mu\text{g/ml}$ から 100 $\mu\text{g/ml}$ に 1 管の上昇を認めたにすぎなかった。

(4) 位相差顕微鏡による抗菌像

P. aeruginosa NCTC 10490 株に対する AgSD の作用を観察した。100 $\mu\text{g/ml}$ の AgSD を作用させた際の変化を Fig. 5 に示した。すなわち、2 時間後においては形態的には変化はないが明らかに分裂増殖は抑制され、4 時間後から外形はほとんど変化しないものの、細胞内部に斑点状に濃淡を認めるようになる。以後 12 時間まで観察したが形態的变化はこれ以上進まず、また全く溶菌像は認めなかった。1,000 $\mu\text{g/ml}$ の AgSD を作用させた場合の変化もほぼ同様の変化を認めたにすぎなかった。

考 察

熱傷の局所療法⁹⁾としては 0.5% 硝酸銀液、ゲンタマイシン軟膏、DKB 軟膏、Sulfamylon 軟膏¹⁰⁾などが使用されているが、これらはいずれも緑膿菌による熱傷創感染に対するものであり、いずれも一長一短がある。今回検討した AgSD は 10% Sodium Sulfadiazine 溶液中に 10% AgNO_3 を反応させて合成したものであり、これを 1% 含有した Silver sulfadiazine cream が実際に用いられている。本剤は AgNO_3 液の欠点である Ag^+ と細胞外液中の Cl^- との結合を防ぐために Ag^+ を sulfadiazine と結合させ安定したもので緑膿菌に対する効果は著明であるといわれている。米国、英国において本剤は広く熱傷感染に用いられ、その有用性が報告⁸⁻¹⁰⁾されているが、本邦においては未だ一般的に使用されていない。そこで今回は本剤の本剤の細菌学的評価に関する基礎的検討を行った。

AgSD の抗菌力を測定した結果、教室保存株では緑膿菌、大腸菌、*Klebsiella* の GNR に対しては 50 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し、本剤が 1% 含有の外用剤として使用されることから考えて良好な抗菌力であった。またこれらは接種菌量による差を認めなかった。これに対して *B. subtilis* や *S. aureus* などのグラム陽性菌では MIC は 100 $\mu\text{g/ml}$ で GNR より 1 管ほど高くなっていた。

臨床分離の緑膿菌、大腸菌、*Klebsiella* についても同様に検討したが、緑膿菌に対する AgSD の MIC の分布はいずれも 200 $\mu\text{g/ml}$ 以下でピークは 50 $\mu\text{g/ml}$ であった。また大腸菌においてもそのピークは 50 $\mu\text{g/ml}$ 、*Klebsiella* では 100 $\mu\text{g/ml}$ であり、これらはいずれも全株 200 $\mu\text{g/ml}$ 以下の MIC と良好な感受性を示した。な

お、これらは接種菌量による影響は少なく 10⁸ cell/ml, 10⁹ cell/ml 接種時における MIC のピーク値に差はほとんど認めなかった。また重症熱傷感染に頻度の高い緑膿菌¹¹⁾において各種抗生剤との MIC を比較検討したが、GM, DKB, TOB には高度耐性株が 22 株中 3 株認められ、いずれも交叉耐性を示したが、これらの 3 株に対しても AgSD は一定した良好な抗菌力を示した。したがって AgSD は GNR の各種菌株に対しては、他のアミノ配糖体抗生剤やペニシリン系抗生剤などと交叉耐性を示さず、全体にはほぼ一定した抗菌力¹²⁾を示すものと考えられた。しかしながら *Staphylococcus* などのグラム陽性菌に対しては GNR と比較して 1~2 管ほど高い MIC を示し 10⁸ cell/ml 接種で、200 $\mu\text{g/ml}$ がピーク値であったが、本剤が 1% クリーム外用剤として用いられることを考慮すると、これらにも充分抗菌力を示すものと考えられた。

次に本剤の殺菌力について検討したが、*P. aeruginosa*, *E. coli* とも 25 $\mu\text{g/ml}$ では 2 時間で、200 $\mu\text{g/ml}$, 1,600 $\mu\text{g/ml}$ ではいずれも 1 時間以内に殺菌されることが判明したが、これら殺菌後も両株とも溶菌することはなかった。

試験管内耐性獲得について 30 代継代培養を施行したが、緑膿菌において AgSD に対する耐性菌出現は認めず、本剤は耐性が出現しにくい薬剤であると考えられた。しかしながら外国では、緑膿菌¹³⁾や *Enterobacter cloacae*¹⁴⁾ などに本剤耐性菌が出現しており、本邦においても今後とも検討を続ける必要があると考えられる。

AgSD の緑膿菌に対する形態学的変化を位相差顕微鏡を用いて観察した結果、100 $\mu\text{g/ml}$ 作用にて 2 時間後において既に全く分裂増殖を認めず 4 時間後から外形はほとんど変化がないものの細胞内部に斑点状に濃淡を認めるようになっていく。この変化は 12 時間後まで観察したがこれ以上進まず、本剤により緑膿菌はフィラメントを形成したり溶菌したりすることは全く認められず、これは 1,000 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた場合もほぼ同様であった。本剤の抗菌作用機序については細菌により本剤が急速に分解されると、Ag は菌体内に取り込まれ細胞中の DNA と直接に結合して菌の増殖を抑制するという Fox ら¹⁵⁾の報告や、これとは逆に AgSD は核酸に作用するのではなくて細胞膜および細胞壁に作用して殺菌作用を示すという ROSENKRANZ ら¹⁶⁾の報告があるが、未だ定説はなく、今後の研究課題と考えられた。

以上、AgSD の細菌学的検討を行なったが、本剤は優れた抗菌力を示し、そのスペクトラムも広く、今後本邦においても熱傷感染の治療および予防に用いられるべきものと考えられる。

文 献

- 1) 吉田哲憲, 大浦武彦, 沖本雄一郎, 飯田和典, 斎藤 玲: 抗生物質の投与速度と皮膚および熱傷組織内濃度の動態について。熱傷 1(3): 195~201, 1976
- 2) 小川 豊, 富士森良輔: 熱傷の局所療法。外科治療 35(5): 498~506, 1976
- 3) FOX, C. L., Jr.: Silver sulfadiazine, a new topical therapy for *Pseudomonas* in burns. Arch. Surg. 96: 184~188, 1968
- 4) MIC 測定法改訂委員会: Chemotherapy 22: 1126~1128, 1974
- 5) 辻 明良, 高橋邦子: Mafenide acetate の *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 24 (8): 1603~1613, 1976
- 6) GROSSMAN, A. R.: Silver sulfadiazine in the management of burns. AFP/GP 1: 69, 1970
- 7) STANFORD, W. B.; B. W. RAPPOLE & C. L. FOX: Clinical experience with silver sulfadiazine, A new topical agent for control of *Pseudomonas* infections in burns. J. Trauma. 9: 377, 1969
- 8) DICKINSON, S. J.: Topical therapy of burns in children with silver sulfadiazine. N. Y. J. Med. 73: 2045, 1973
- 9) BALLIN, J. C.: Evaluation of a new topical agent for burn therapy silver sulfadiazine (Silvadene). JAMA 230 (8): 1184, 1974
- 10) LOWBURY. E. J. L.; J. R. BABB, K. BRIDGES & D. M. JACKSON: Topical chemoprophylaxis with silver sulfadiazine and silver nitrate chlorhexidine cream: Emergence of sulfonamide-resistant Gram negative bacilli Brit. Med. J. 1: 493, 1976
- 11) 石川 周, 水野 章, 西 秀樹, 品川長夫, 由良二郎, 柴田清人, 井沢洋平, 白田俊和: 熱傷と角膜菌感染症。熱傷 2(3): 273~277, 1977
- 12) CARR, H. S.; T. J. WLODKOWSKI & H. S. ROSENKRANZ: Silver sulfadiazine: *In vitro* antibacterial activity. Antimicrob. Agents & Chemother. 4: 585~587, 1973
- 13) HEGGERS, J. P. & M. C. ROBSON: The emergence of silver sulfadiazine resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Burns 5 (2): 184~187, 1978
- 14) ROSENKRANZ, H. S.; J. E. COWARD, T. J. WLODKOWSKI & H. S. CARR: Properties of silver sulfadiazine-resistant *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents & Chemother. 5(2): 199~201, 1974
- 15) FOX, C. L.; B. W. RAPPOLE & W. STANFORD: Control of *Pseudomonas* infection in burns by silver sulfadiazine. Surg. Gynecol. Obstet. 128: 1021, 1969
- 16) ROSENKRANZ, H. S. & H. S. CARR: Silver sulfadiazine: Effect on the growth and metabolism of bacteria. Antimicrob. Agents & Chemother. 2: 367~372, 1972

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER SULFADIAZINE

**JIRO YURA, NAGAO SHINAGAWA, SHU ISHIKAWA, KEIJI MATSUGAKI
and TAKUMI HANAI**

First Department of Surgery, Nagoya City University Medical School

MASAHIDE ANDO

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Saku Central Hospital

The *in vitro* antibacterial activity of silver sulfadiazine (AgSD) was studied, and following results were obtained.

(1) Antibacterial activity of AgSD against clinical isolates, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella* and *Staphylococcus* was done and the pe_k MIC levels were 50 $\mu\text{g/ml}$ or 100 $\mu\text{g/ml}$.

And all isolates were inhibited by the concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$ of AgSD.

(2) Against *Pseudomonas aeruginosa* or *E. coli*, AgSD had bactericidal activity within one or two hours.

(3) The *in vitro* development of resistance to AgSD was studied on *Pseudomonas aeruginosa* by 30 passages, and no significant increased resistance was observed.

(4) The effect of AgSD on the morphology of *Pseudomonas aeruginosa* was examined with the phase contrast microscope. Only the formation of filamentous cells but also the spheroplast-like structures could not be observed by the treatment with AgSD.