

Sulfamethoxazole-Trimethoprim の感受性ディスク法に関する検討

金 沢 裕

豊栄病院内科

倉 又 利 夫

新潟鉄道病院薬剤科

松 本 清 幸

昭和薬品化工株式会社研究所

(昭和 56 年 9 月 3 日受付)

SMX-TMP の感受性測定法として、すでに金沢により基準化されている single-disc 法が適用されるかを検討した。

1) 現行の SMX 400 μ g 含有ディスクと SMX-TMP (20:1) 合剤 400 μ g 含有ディスクを同時に使用することにより synergy を後者による阻止円の増大から簡単に観察することができた。

2) SMX-TMP (20:1) 合剤 400 μ g 含有ディスクからの薬剤開始点であるディスク直下の培地中の SMX, TMP の濃度比は 20:1 に近い値を示した。

3) SMX 400 μ g 含有ディスク, TMP 20 μ g 含有ディスク, SMX-TMP (20:1) 合剤 400 μ g 含有ディスクからの各薬剤の培地中での拡散係数は近似した値を示した。したがって SMX-TMP (20:1) 合剤 400 μ g 含有ディスクを用いることが合理的と考えられた。

4) SMX-TMP (20:1) 合剤について、19 種 124 株の菌を用い MIC 値と 400 μ g 含有ディスクで阻止円直径を測定した。その結果、普通法 (1 夜—16 時間培養後判定)、遅延判定 (24 時間程度培養) のおのおのについて MIC 値と阻止円直径との関係を示す 1 次回帰曲線を求めることができ、single-disc 法の成立することがたしかめられた。その際、普通法の 1 次回帰式は Diameter (mm) = 40.6 - 12.5 log MIC であり、遅延法 (24 時間培養) の 1 次回帰式は Diameter (mm) = 50.8 - 16.7 log MIC であった。

次いでディスク法の阻止円の直径から推定 MIC 値の幅を、寒天平板 2 倍希釈法による MIC 値の変動幅と比較して求め、本ディスク法による推定 MIC 値に対する実験誤差の参考とした。

Sulfamethoxazole と Trimethoprim の合剤 (以下 ST 合剤) は選択的に細菌の葉酸代謝過程を連続的に 2 箇所ブロックして、これら 2 つの薬剤の相乗作用の結果として広い抗菌スペクトラムを発揮する薬剤として、多くの基礎的・臨床的検討が加えられ^{1,2)}、臨床的に用いられている。

これらの検討の結果として、Sulfamethoxazole と Trimethoprim の混合比が 5:1 の製剤が導入一般化され、生体内では内服後の時間により、また体液によりその割合が変動するが、臨床効果推定の指標としての *in vitro* 抗菌力測定は、その比が 20:1 の条件で行なうことがすでに定着している。その理由は、本合剤を服用した場合の体内での両薬剤の活性型 (蛋白非結合型) の濃度比が平均してほぼ 20:1 になるという Bushby³⁾、Grüneberg⁴⁾ の報告によるものと考えられる。また著

者ら⁷⁾ はさきに本剤の基礎的検討として、著者らが従来から一濃度ディスク法設立のため行なってきた Mueller-Hinton 変法培地 (感性ディスク用培地) を用いる寒天平板希釈法は本剤の不活化が少なく、また接種菌量が適当に薄いので、Harper ら⁸⁾、Walker ら⁹⁾ による溶血馬血液添加培地とほぼ一致する MIC が得られることを報告した。

これらの経歴を参考にして、すでに金沢^{3,4)} により基準化され、他の薬剤ディスクについても検討された一濃度ディスク (single-disc) 法を試みた。

ST 合剤のように比較的新しく出現した薬剤の臨床的な感受性、耐性に相当する MIC 値の基準は全く不明で、暫定的には推定される体液中有効濃度との関連から一応の基準が論ぜられたとしても、最終的には多くの起炎菌について得た MIC 値と薬剤投与による臨床効果と

の集計のうえに、将来定められるべきものであり、したがって現時点においては適当に規定された実験条件でのMICを推定することが、臨床的感受性検査の目的と考えられる。この目的に沿うようにわれわれ^{3,4)}は、単一ディスク (single-disc) を用いる MIC 測定を含めた化学療法剤の感受性測定法についてたびたび報告した。今回は ST 合剤について本法が適用されるかどうかを検討した。

I. 実験材料

培地：次のような組成の Mueller-Hinton 変法培地 (感性ディスク用培地, ユー・ハイ) を用いた。

Heart infusion	200.0 ml
Casamino acid	16.5 g
Soluble starch	1.5 g
Glucose	2.0 g
L-Tryptophane	0.05 g
L-Cystine	0.05 g
Biotin	0.005 mg

Agar 15.0g
Distilled water 1.000 ml
pH 7.4 ± 0.1, NaCl 濃度 0.8%, 5% メン羊血液添加または非添加

供試菌種(株)は Fig. 1 に示すように、臨床検査の対象になることが多いと考えられる 19 種 110~124 株を用いた。

II. 実験方法および実験成績

1. 希釈法による MIC 値測定

ST 合剤 (SMX 20 : TMP 1), SMX 単独は 800 μg/ml を最高とする 2 倍希釈系列, TMP は 40 μg/ml を最高とする 2 倍希釈系列濃度含有の寒天平板培地に、発育がよくコロニー形成の比較的早い菌 (腸内細菌, 緑膿菌を含む非発酵グラム陰性桿菌, ブドウ球菌など) は、1 白金耳鼠を 1 ml の滅菌生理食塩液または Mueller-Hinton Broth に浮遊し、その 400 倍希釈液をマイクロランター (佐久間製) などで寒天平板培地上に接種した。このさいの接種菌浮遊液濃度は 1 ml 中 10⁸ CFU 程

Fig. 1 Microorganisms employed for constructing regression lines and their sensitivities to sulfamethoxazole, to trimethoprim and to sulfamethoxazole-trimethoprim combination (20 : 1) in terms of MIC

Confidential MIC value : $\left(\frac{\text{Geometrical mean}}{\sqrt{2}} \right)$ of so-called MIC obtained by 2-fold agar dilution method repeated 6 times) μg/ml

Agar medium used : Modified MUELLER-HINTON agar pH 7.4

* Modified MUELLER-HINTON agar pH 7.4 with 5% sheep blood

** Chocolate agar with 5% sheep blood

Inoculum size : Approximately 10⁸~10⁹ CFU/cm²

† Approximately 10⁴~10⁵ CFU/cm²

Fig. 1-1 Sulfamethoxazole

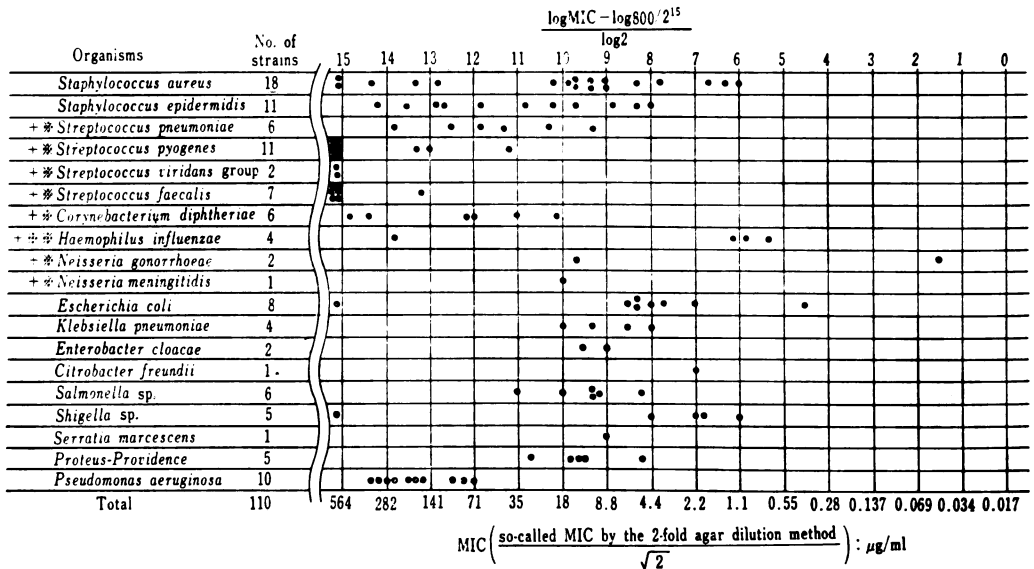


Fig. 1-2 Trimethoprim

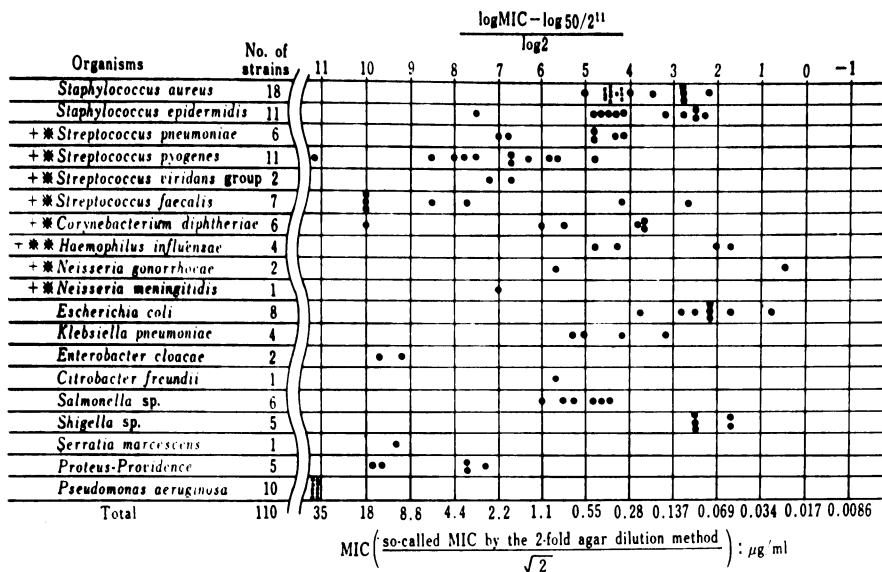
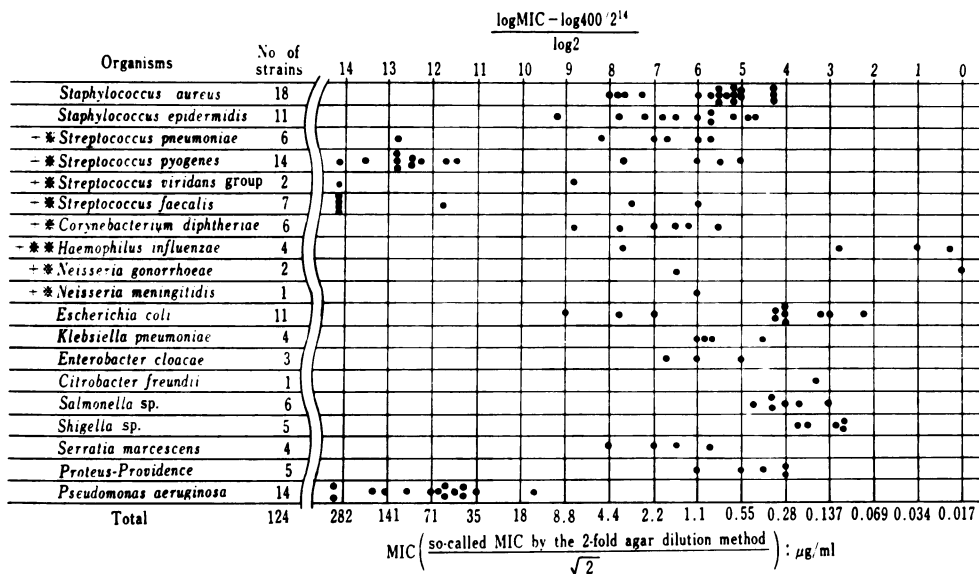


Fig. 1-3 Sulfamethoxazole-trimethoprim combination (20 : 1)



度で、ほぼ日本化学療法学会の改訂法¹¹⁾に一致し、また寒天平板培地上に置かれた最終接種菌量は $10^8 \sim 10^4$ CFU/cm²にあたること、たびたびの実験でたしかめられている^{12,13)}。またコロニー形成の多少ともおそい *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* などはその10倍濃い菌浮遊液を接種した。次いで37°Cに16~24時間培養し、肉眼的にMIC値を測定した。これを6回繰り返して得た値の幾何平均の $1/\sqrt{2}$ を最も信頼すべきMIC値とした。

2. 血液添加の影響

Table 1 に示すような8種76株を用いて、メン羊血液5%添加、非添加のさいのMIC値の変動を検討した。その結果は表示のように平均1.16程度であることから、5%メン羊血液添加の影響は必ずしも著しくないものと考えられた。

3. ディスク法の実施

直径85~90mmの規格型ペトリ皿に培地を20mlずつ分注し、水平に固めた。供試菌コロニーの1白金耳量

Table 1 Influence of adding 5% sheep blood to the test medium on the MIC values obtained by the agar dilution method

Basal medium used: Sensitivity disc medium (Nissui) (Modified MUELLER-HINTON agar, pH7.4)	
Bacterial strains employed:	
<i>Staphylococcus aureus</i>	32
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
<i>Citrobacter freundii</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	4
<i>Salmonella enteritidis</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
<i>Streptococcus faecalis</i>	1
Total	76

Ratio of MIC (with blood/without blood)	Number of data obtained
4	1
2	19
1	43
1/2	10
1/4	3

Geometrical mean = 1.16

程度を 1 ml の滅菌生理食塩液、または Mueller-Hinton Broth に懸濁し、*Staphylococcus*、腸内細菌の場合はその 1 白金耳量を、*Streptococcus*、*Haemophilus* などはその 1 滴 (0.03 ml 程度) を 1 枚の寒天平板培地地上におとし、20 個程度の小ガラス玉 (直径 3~4 mm) を入れ、ゆり動かして均等に拡げる。このさい接種菌量は、前者で 1 cm² 当り 10³~10⁴CFU 程度、後者では 10⁴~10⁵ CFU 程度であることがたしかめられている。

ディスクを置いて直ちに 37°C で培養し、16 時間程度後に阻止円の直径を計測した (普通法)。

普通法と同様に菌を接種し、ディスクを置き、直ちに 10°C 前後に 12 時間程度放置、つづいて 37°C で培養、合計 16 時間 (37°C、4 時間) 後に充分な阻止円形成がみられず、24 時間程度 (37°C、12 時間) 後に充分な阻止円が出現した菌株についてだけ阻止円を計測した (遅延判定)。

4. ディスク薬剤含有量の検討

本合剤の濃度比は、その協力作用の増強、生体内活性濃度比などの点から種々検討された結果、前述のように SMX, TMP (5:1) の合剤が最適として経口投与され、またその際の血中活性濃度比は 20:1 に近く、体液の *in vitro* 効果を推定するには、SMX 20:TMP 1 の抗菌力を参考とすることが一般化している。

1) SMX 単独と SMX-TMP 合剤の MIC とディス

ク法阻止円直径の検討: 著者¹⁾はまた、さきに SMX を含めて、サルファ剤の感受性ディスク法としては 400 μg 含有、8 mm ディスクを用いて現在までほぼ満足すべき成績を得ている。したがって SMX-TMP (20:1) 合剤 400 μg 含有ディスクを、すでに市販され容易に入手可能な SMX 400 μg 含有ディスクと同時に適用すれば、TMP による SMX の抗菌力の増強も阻止円の増大から簡単に観察することのできる可能性が考えられた。

そこで、19 種 110 株の菌株を用い、市販の 400 μg 含有 SMX ディスクと、SMX-TMP 合剤 20:1 (400 μg 含有) を用いるディスク法を希釈法 MIC 測定と並行して行なった。その成績は Fig. 2 に示すようで、検したすべての菌株で TMP 添加により MIC の低下、すなわち抗菌力増強がみられ、それにほぼ相当して阻止円直径の増大がみられた。すなわち 400 μg 含有 SMX ディスクと、400 μg 含有 SMX-TMP 合剤ディスクを同時に使用することによる TMP 添加による協力作用が極めて簡単に観察できることが判明した。

また、この際のディスク含有量は比較的大きいので測定範囲も広く、したがって臨床的感性耐性に相当する MIC が将来学会により、または MIC と臨床効果の集計の結果として定められても、連続的な値の得られる一濃度法の長所を利して、そのいずれとも対応できると考えられる。

上記の理由から ST 合剤ディスクとしては、400 μg 含有ディスクを用いることにした。

2) 培地中拡散開始部位の薬剤の濃度比: 前記合剤 400 μg 含有ディスク直下の培地中の各薬剤濃度を、TMP は REEVES-CHILDE¹⁰⁾ の PABA 添加による分離定量法で、SMX は著者⁷⁾の TMP 耐性、サルファ剤感受性 *Mycobacterium fortuitum* 238 を用いる分離定量法で測定した。その成績は Table 2 に示すようで、ディスク設置 4 時間後に両薬剤ともに高濃度を示し、時間の経過につれ漸次低下する傾向がみられたが、両薬剤の比はいずれも 20:1 にある程度近い成績であり、したがって一濃度ディスク法成立の可能性がうかがわれた。

3) SMX, TMP 各単独と ST 合剤含有ディスクによる阻止円と MIC の関係: ST 合剤, SMX, TMP についてはディスク法、希釈法ともに 6 回ずつ繰り返して行ない、それぞれの菌株に対する阻止円直径と MIC 平均との関係を求めた。次いで、おのおの実験条件下での MIC 値と阻止円直径の関係を示す 1 次回帰式を求めた。

実験結果として求められた各薬剤の各菌株に対する MIC 値は、Fig. 1 に示すようであった。また各薬剤ディスクごとに阻止円直径と MIC の関係を示す 1 次回帰

Fig. 2 MICs to SMX or to SMX-TMP combination and diameter of inhibition zones produced by SMX disc containing 400 μg or by SMX-TMP combination (20 : 1) disc containing 400 μg respectively

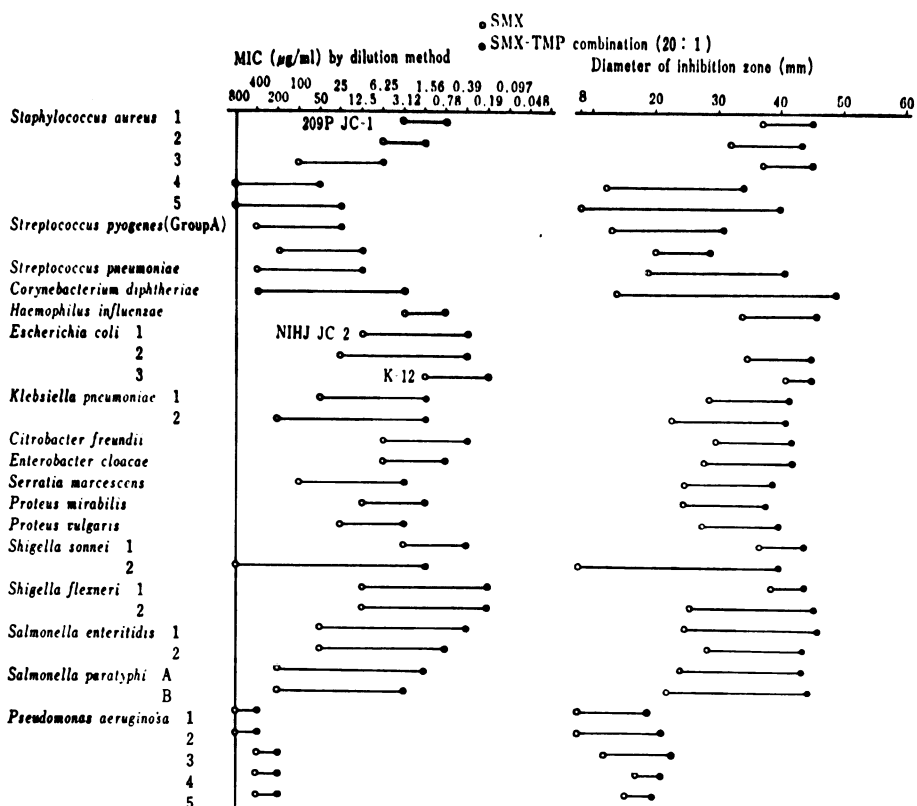


Table 2 Drug concentration in the agar just under the sulfamethoxazole-trimethoprim(20:1) disc following disc application

(Disc : 8 mm in diameter ; Content in a disc : 400 μg)

Drug	Time in hour			
	4	8	12	16
Trimethoprim ($\mu\text{g/ml}$)	60.4	48.0	38.6	20.2
Sulfamethoxazole ($\mu\text{g/ml}$)	980	1,120	826	422
Ratio of Trimethoprim Sulfamethoxazole	$\frac{1}{16.1}$	$\frac{1}{23.3}$	$\frac{1}{21.3}$	$\frac{1}{20.8}$

Table 3 Equation of the first degree expressing the relationship between MICs and diameters of inhibition zone

Drug	Disc content (μg)	No. of data obtained	Equation of the first degree*
Sulfamethoxazole	400	540	$D=42.0-12.6 \log \text{MIC}$
Trimethoprim	20	600	$D=29.0-13.2 \log \text{MIC}$
Sulfamethoxazole-Trimethoprim(20 : 1)	400	696	$D=42.0-12.5 \log \text{MIC}$

* Diameter of inhibition zone

Fig. 3 Standard curve representing the relationship between the MIC and the diameter of inhibition zone.

Sulfamethoxazole-trimethoprim combination(20 : 1) : 400 μ g/disc.

Disc : 8 mm in diameter, water absorption 0.027 ± 0.004 ml

Conventional method :

Usual determination (over-night : approx. 16 hour incubation) 1

Delayed determination (approx. 24 hour incubation) 2

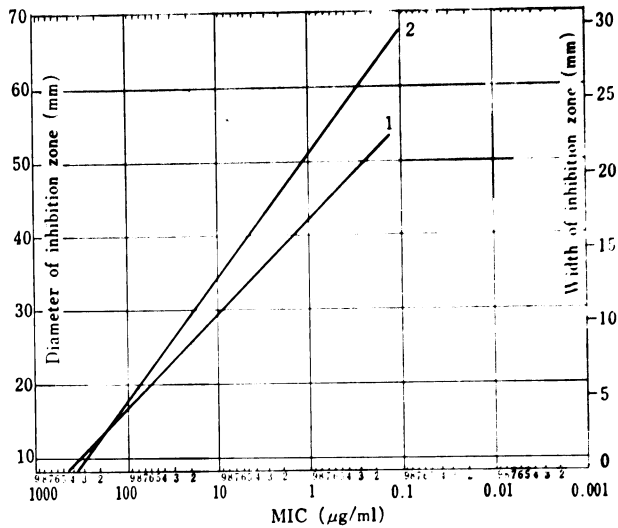


Table 4 Regression equation representing the relationship between MIC and diameter of inhibition zone SMX-TMP combination (20 : 1)

Content of disc	Incubation time in hours	Number of data employed	Correlation coefficient (r)	Regression equation
400 μ g	Approx. 16	696	0.912*	$D = 42.0 - 12.5 \log \text{MIC}$
	Approx. 24 (delayed assay)	230	0.861*	$D = 51.3 - 16.7 \log \text{MIC}$

* Highly significant correlation ($P < 0.001$)

式を求めると、Table 3 の成績が得られた。その結果として3種の薬剤の培地中拡散を表現すると考えられる1次項の係数は、ST 合剤、SMX、TMP ともに表のようになりかなり接近した値を示し、したがって合剤の抗菌力を阻止円の大きさからある程度推定する一濃度ディスク法成立の可能性が推定された。次いで、さらに16~24時間に阻止円の出現する遅延判定にも応用できるよう実験を追加し1次回帰式を求めた。

5. 感受性測定法

普通法において、16時間程度の培養で測定に十分な阻止円が出現した場合は普通法、16時間程度で十分な阻止円が出現せず、24時間程度で出現した場合は遅延判定とおおのこの曲線を適用すれば近似MIC値が推定できるわけである。

6. 実験誤差について

本ディスク法の実験誤差を検討するために、普通法に

ついて行なったすべての成績について、標準曲線からのへだたりの存在範囲を棄却限界式 ($\alpha = 0.05$) を適用して計算し、Table 5 の値が得られた。一方、参考として寒天平板2倍希釈法によるMIC値を同一菌株について6回ずつ行ない、その各菌株ごとの成績を総合して、MIC値の存在範囲について棄却限界幅を求め、Table 6 の成績が得られた。

またディスク法評価の基準となるMIC値が寒天平板2倍希釈法の実験誤差を必然的に含んでいるので厳密な比較がやや困難と思われるが、測定の存在範囲の幅から推定すると、本ディスク法の精度は、寒天平板2倍希釈法のそれに劣るが、ある程度これに近く、臨床的感受性測定法としてはある程度用いられるものと推定された。

しかし、ST合剤ではディスク法、希釈法ともに従来検討した他の薬剤に比べて、棄却限界の幅の広い傾向がみられたが、これは著者の検討によっても、希釈法でも

Table 5 Range of deviation of MIC obtained by the disc method from the MIC by the dilution method expressed in terms of rejection limit

Determination method	Incubation time in hour	Range of deviation of MIC expressed in terms of rejection limit ($\alpha=0.05$)*,†										
		Diameter of inhibition zone in mm										
		8	~	20	~	30	~	40	~	50	~	60
Conventional method	Approx. 16	4.2	~	0.21		4.2	~	0.23		4.3	~	0.23
						4.2	~	0.23		4.3	~	0.23
	Approx. 24 (delayed assay)	4.3	~	0.23		4.3	~	0.23		4.4	~	0.22
						4.3	~	0.23		4.4	~	0.23

* Rejection limit was obtained by the formula: $t_{0.05} \sqrt{S^2_{yx} \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(X-\bar{X})^2}{S_{x^2}}\right)}$

where, X =diameter of inhibition zone $Y = \frac{\log \text{MIC} - \log 200/2^{18}}{\log 2}$

S^2_{yx} =variance from regression line

S_{x^2} =sum of squares of deviation of X

† Where MIC obtained by the agar dilution method is taken 1.0

M : sample mean, t : distribution coefficient of STUDENT

Table 6 Range of MIC values of SMX-TMP combination obtained by the 2-fold agar dilution method

No. of organisms employed (n)	No. of data employed ($n \times 6$)	Rejection limit* ($\alpha=0.05$)
106	636 (106×6)	2.9~0.34

* Where sample means is taken as 1.0, Rejection limit: $\pm St_{0.05} \sqrt{\frac{n+1}{n}}$

S : Sample standard deviation $\sqrt{\frac{\sum R^2}{n}}$

R : $\sqrt{\frac{\sum (X-\bar{X})^2}{N-1}}$

(Sample mean deviation in $N(6)$ times repeated experiment for each organism)

測定値の変動の大きいサルファ剤を含む合剤であることが影響しているものと推定された。

III. 考 案

2つの合剤の感受性ディスク法の成立には、ディスクから寒天平板培地での薬剤の拡散の状態に大差のないことが前提と考えられる。

1) 培地中における薬剤の拡散開始の部位、すなわちディスク直下の薬剤濃度が体液中における両薬剤の活性濃度の比に近いこと。

2) 両薬剤の培地中拡散速度、すなわち拡散を表わす1次回帰式の1次項の係数が近い値を示すこと、をたしかめたくて一濃度ディスク法の調製を試みた。

その結果として成立したST合剤ディスク法では、測定値の変動が従来の薬剤に比べてやや広い傾向がみられたが、さきに著者は³⁾、サルファ剤はディスク法でも希釈法でも測定値の変動の幅が比較的広い成績を得ており、今回もまたST合剤の希釈法でのMICも変動の大きいことが認められているので、これらの現象はST合

剤の特性の一面であり、ある程度さけることはできないと考えられる。

ST合剤のディスク法の阻止円は発育阻止開始点と、完全発育阻止点との間に幅のある傾向があるが、ST合剤の2倍希釈法でも同様な傾向がみられるので、希釈法と一致するMICを論ずるには共通のend-pointを判定基準とする配慮が必要であろう。特に緑膿菌の一部菌株では、発育阻止開始点と最内側の完全発育阻止円の幅が広い傾向がみられるので、測定にあたってはこの点の注意が必要である。

ディスク含有量は、1) 測定域が低すぎず、広い範囲にわたれば将来学会などで臨床的感性耐性判定区分が設定された場合には、そのいずれにも対応できるわけであり、2) 現行のサルファ剤(特にSMX)ディスクと同一含有量であれば、TMPによる併用効果が直ちに観察しうるとの観点から、400 μg (SMX 20 : TMP1) 含有ディスクを使用したのは現段階で合理的であると考えられる。

文 献

- 1) Sulfamethoxazole-Trimethoprim 論文特集号。Chemotherapy 21 : 67~530, 1973
- 2) The synergy of trimethoprim and sulphonamides. Postgrad. Med. J. Supplement 45 : 7 104, 1969
- 3) KANAZAWA, Y.: Clinical use of the disc sensitivity test. Antimicrob. Agent & Chemother. 1961 : 926~942, 1961
- 4) KANAZAWA, Y.: Single-disc method for minimum inhibitory concentration (MIC) determination. J. Antibiotics, Ser. A 19 : 175~189, 1966
- 5) BUSHBY, S. R. M. & G. H. HITCHINGS : Trimethoprim, a sulfonamide potentiator, Brit. J. Pharm. Chemother. 33 : 72~90, 1968
- 6) GRÜNEBERG, R. N.: Trimethoprim in the treatment of urinary infections in hospital. Brit. Med. J. 5643 : 545~554, 1969
- 7) 金沢 裕, 倉又利夫 : Sulfamethoxazole-Trimethoprim 合剤の基礎的検討。Chemotherapy 21 : 317~323, 1973
- 8) HARPER, G. J. & W. C. CAUSTON : The *in vitro* determination of the sulfonamide sensitivity of bacteria. J. Path. Bact. 57 : 59~66, 1945
- 9) WALKER, N.; R. P. PHILIP, M. W. SNYTH & J. W. MACLEOP : Observation on the prevention of bacterial growth by sulfonamides with special reference to the Harper & Causton effect. J. Path. Bact. 59 : 631~645, 1947
- 10) REEVES, D. S. & M. W. CHILDE : Secretion of the antibacterial substance trimethoprim in the prostatic fluid of dogs. Brit. J. Urol. 42 : 66~72, 1970
- 11) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (日本化学療法学会標準法) 改訂について。Chemotherapy 22 : 1126~1128, 1974
- 12) 金沢 裕 : 希釈法による化学療法剤感受性測定法。検査と技術 7 : 727~736, 1979
- 13) 金沢 裕, 倉又利夫 : 臨床応用を目的とした感受性ディスク法の研究, 続報 : とくに接種菌量ならびに直接法に関する検討。J. Antibiot. Ser. B. 17 : 256~263, 1964

A STUDY ON THE DISC SENSITIVITY TEST FOR SULFAMETHOXAZOLE-TRIMETHOPRIM COMBINATION

YUTAKA KANAZAWA

Department of Internal Medicine, Toyosaka Hospital

TOSHIO KURAMATA

Department of Pharmacy, Niigata Railway Hospital

KIYOYUKI MATSUMOTO

Research Laboratory, Showa Yakuhin Kako Co.,Ltd.

A study on the disc sensitivity test for sulfamethoxazole-trimethoprim combination(20:1) was performed under the experimental condition already standardized by KANAZAWA.

Discs containing 400 μg of SMX, 20 μg of TMP and 400 μg of SMX-TMP combination(20:1) were used and the following results were obtained.

1) Synergy between SMX and TMP could be simply detected by the comparison of inhibition zone around discs containing 400 μg of SMX and of SMX-TMP combination.

2) The two components diffused from discs into agar plate, maintaining an approximate 20:1 ratio of concentration.

3) The primary regression equations representing relationship between MICs and diameters(D) of inhibition zones were as follows:

$D(\text{mm})=42.0-12.6 \log \text{MIC}(\mu\text{g}/\text{ml})$ in SMX and $D=29.0-13.2 \log \text{MIC}$ in TMP, indicating that the diffusion-rates of the two components in agar plate were approximately near.

4) Susceptibilities to SMX-TMP combination(20:1) of 124 strains of 19 species were determined by the 2-fold agar dilution method in parallel with the single-disc method using SMX-TMP discs containing 400 μg .

The experiments demonstrated significant correlation between MICs by the dilution method and diameters of inhibition zones by the disc method in each of conventional assay of the over-night (about 16 hours) incubation and delayed assay of 24 hour incubation.

Analysis of the data obtained revealed the primary regression equation to be $D=42.0-12.5 \log \text{MIC}$ in conventional assay and $D=51.3-16.7 \log \text{MIC}$ in delayed assay, respectively.

The range of variations in MICs estimated from the diameters of inhibition zone by the disc test was then calculated in comparison with that in MICs determined by the two-fold agar dilution method, as a reference for the experimental errors which may be involved in the estimation of MIC by the disc method.