

原 著

非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性

VI. サルファ剤とその合剤の試験管内
制菌効果について

桜井信男・久世文幸

京都大学結核胸部疾患研究所内科学 I

受付 昭和 58 年 1 月 26 日

SENSITIVITIES OF ATYPICAL MYCOBACTERIA TO VARIOUS DRUGS

VI. Sensitivities to Sulfonamides and the Combination
of Sulfamethoxazole and Trimethoprim

Nobuo SAKURAI* and Fumiyuki KUZE

The sensitivities of atypical mycobacterial strains to sulfonamides and a combination of Sulfamethoxazole (SMX) and Trimethoprim (TMP) were studied *in vitro* using Dubos Tween albumin liquid medium. The atypical mycobacterial strains were chosen from 35 strains, including 4 of *M. kansasii*, 4 of *M. scrofulaceum*, 19 of *M. avium-M. intracellulare* complex, 4 of *M. fortuitum* and 4 of *M. chelonae*, and, in addition, one strain of *M. tuberculosis* (H37Rv) was also included for comparison.

Among the sulfonamides, Sulfisoxazole (SIZ), Diaphenylsulfone (DDS), Sulfamethoxazole (SMX) were studied and also a combination of SMX and TMP (SMX-TMP, 5:1) as well as TMP alone were included in the study. Among them, the SMX-TMP (S-T) showed the most potent activity to almost all strains tested. This combination inhibited the growth of more than 70% of *M. avium-M. intracellulare* strains in the concentration of 31.3 $\mu\text{g/ml}$ (concentration as SMX), while none were inhibited in 31.3 $\mu\text{g/ml}$ by SIZ, SMX and DDS. The activity of S-T parallels that of Kanamycin in our previous study.

The activity of S-T was evaluated in the combination with Kanamycin (KM) and Rifampicin (RFP). KM, RFP, S-T, and three combinations of these drugs, S-T•RFP, S-T•KM, S-T•RFP•KM were tested using the same strains and methods. The ratio of combining drugs in this study was uniformly 1:1:1 except Trimethoprim, which was 0.2.

As a whole, the combination, S-T•RFP•KM was more potent in its inhibitory activity than S-T•KM, RFP or KM. The concentrations which were necessary to inhibit the growth of more than 80% of *M. avium-M. intracellulare* strains were 50-100 $\mu\text{g/ml}$ in S-T; 3.13 $\mu\text{g/ml}$ in RFP; 12.5-25 $\mu\text{g/ml}$ in KM; 0.39-0.78 $\mu\text{g/ml}$ in S-T•RFP; 1.56-3.13 $\mu\text{g/ml}$ in S-T•KM; 0.2-0.39 $\mu\text{g/ml}$ in S-T•RFP•KM, respectively.

The combined regimens of S-T•RFP and S-T•RFP•KM seem to be worthy of further investigations.

* From the First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

Keywords: Atypical mycobacteria, In vitro drug susceptibility, *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex, Sulfamethoxazole, Trimethoprim

キーワード: 非定型抗酸菌, 試験管内薬剤感受性, *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* サルファメトキサゾール, トリメトプリム

序 論

Dubos Tween albumin 液体培地 (培地量2.0ml) を用い接種菌量を可及的に0.01mgに統一した同一実験手技での諸種薬剤に対する非定型抗酸菌 (以下AM) の試験管内感受性の成績^{1)~5)} は既に5回にわたり本誌に報告している。対象薬剤としては、抗結核薬、一般抗生物質の他、抗レプラ剤、抗腫瘍剤の一部を既に検討しているが、*M. avium-M. intracellulare* complex に対して卓効を示す薬剤には残念ながら遭遇していない。ことに抗結核薬に関しては数多くの報告が本菌種 (群) に対して *M. tuberculosis* との比較の上で格段に効果の弱いことを報告しているし、本邦で繁用されている1%小川培地を用いた個々の薬剤の感受性検査 (耐性検査) の成績をみても明らかなことである。となれば私どものとるべき方法は、1)早急に効果のある化学療法剤の開発に努力すること、2)抗結核薬として使用されている薬剤以外にも広く目を向けてAMに対する制菌力の評価に努めること、3)多年使用され薬理作用、副作用、投与方法が確立されている抗結核薬を用い種々の組み合わせを工夫した投与術式の探索から“併用効果”を期待する、などの方策以外に他なからうと考えられる。私どもの現在までの報告はすべて2)と3)の範ちゅうに属する模索であり、今回報告する成績も同様サルファ剤とその合剤の再評価であり、加えてRFPとKMとの併用術式の試験管内制菌効果検討の試みである。

I. 実験材料と実験方法

1) 使用菌株

研究室で1%小川培地で継代し、-20°Cで保存しているAM35株 (*M. kansasii* 4株, *M. scrofulaceum* 4株, *M. avium-M. intracellulare* complex 19株, *M. fortuitum* 4株, *M. chelonae* 4株) を適宜使用し、これに加え *M. tuberculosis* 1株 (H37Rv) を比較対照のため用いた。このうち *M. kansasii* 1株, *M. scrofulaceum* 2株, *M. avium-M. intracellulare* complex 13株, *M. fortuitum* 1株は本邦AM症患者喀痰からの分離株で、他はTMC (Trudeau Mycobacterial Collection) に含まれ、1975年にTrudeau Instituteより著者の1人に供与されたものである。これらの菌株も全てAM症患者よりの分離株である。

2) 実験方法

1%小川培地に3週間37°Cで培養した菌 (*M. fortuitum* と *M. chelonae* は1週間前後) をDubos Tween albumin 液体培地に移し、2代継代した1週間培養菌液 (*M. fortuitum* と *M. chelonae* は3日培養菌液) を用い、肉眼的な比濁 (硫酸バリウム溶液を対照とする) で約1.0mg/mlの菌液を作成し、その10倍希釈菌液の0.1ml (菌量にして約0.01mg) を接種した。判定培地には同様Dubos Tween albumin 液体培地を用い、薬剤を含有した倍数希釈系列を作成し、判定は37°Cで菌接種後2週間 (*M. fortuitum* と *M. chelonae* では1週間) 培養後に実施し、成績はMinimal Inhibitory Concentration (MIC) をもって示した。

今回検討した薬剤はサルファ剤のSulfisoxazole (SIZ), Diphenylsulfone (DDS), Sulfamethoxazole (SMX) の3剤に加え、Trimethoprim (TMP), 抗結核薬であるRifampicin (RFP), Kanamycin (KM) の計6薬剤で、それぞれの単独制菌力ならびにSMX-TMP (以下S-Tと略す), S-T-RFP, S-T-KM, S-T-RFP-KMの組み合わせによる総合制菌効果を検討した。S-Tは重量にしてSMXとTMPを5:1の比率で混合したものを用い、その他の組み合わせでは、S-T (SMXとして), RFP, KMは3剤ともいずれも等 (重) 量混合したものを用いた。サルファ剤, TMP, RFPは原末の50mg前後を秤量し、dimethylsulfoxide (DMSO) にて10mg/mlの溶液を作成、KMは注射用バイアル (1g) を滅菌生理的食塩水に溶解してそれぞれ所定の濃度まで希釈した。

実験は、SIZ, DDS, SMX, TMP, S-Tを対象とした検討と、S-T, RFP, KM, S-T-RFP, S-T-KM, S-T-RFP-KMの検討とに分けて実施し、いずれも薬剤倍数希釈系列は20管作成し、第20管は対照培地とした。培地量はいずれも2.0mlで前者では初管濃度はいずれの薬剤も1,000 μ g/ml (ただし、S-TではSMX 1,000 μ g/ml, TMP 200 μ g/ml), 後者では同様全薬剤とも100 μ g/ml (ただし、S-TではSMX 100 μ g/ml, TMP 20 μ g/ml) とした。

II. 実験成績

表1に各菌種 (群) ごとにSIZ, DDS, SMX, TMP, S-TのMIC (S-TにおいてはSMXとしてのMIC) を記載した。これらの薬剤はいずれも制菌力は弱い、相互の比較ではS-Tが最もMICが低く、今回検討した *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. avium-M. in*

Table 1. Susceptibilities of Atypical Mycobacteria to Sulfonamides Dubos Tween albumin Medium (Inoculum: 0.01 mg)

Species & Complex	No. of Strains	Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$)														
			≤ 0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	3.9	7.8	15.6	31.3	62.5	125	250	≥ 500		
<i>M. kansasii</i>	4	SIZ			1												3
		DDS									1				1		2 Δ
		SMX			1											Δ	3
		TMP									1	1	1				Δ
		S-T ¹⁾	1 ²⁾		1		1				1	Δ					
<i>M. scrofulaceum</i>	4	SIZ				1					1	1				1	
		DDS					1				1	1				1	
		SMX		1	1						1					1	
		TMP												1		3	
		S-T	3			1											
<i>M. avium-M. intracellulare</i> Complex (TMC)	4	SIZ							1				1			1	1
		DDS							1							2	1
		SMX									1					2	1
		TMP								1	1			1		1	
		S-T	2			1						1					
<i>M. avium-M. intracellulare</i> Complex (Japan)	11	SIZ														2	9
		DDS											2	1		1	8
		SMX														2	9
		TMP											4	2	3	3	2
		S-T				2	1			1	1	3	3				
<i>M. fortuitum</i> & <i>M. chelonae</i>	8	SIZ									1					1 (1)	6 (3)
		DDS														1 (1)	6 (3)
		SMX															8 (4)
		TMP												1			7 (4)
		S-T				1	1 (1) ³⁾			1		1 (1)	1 (1)	1 (1)			2

Notes 1) Combination of SMX and TMP in 5:1.
2) MIC as SMX.

3) Numbers in the parentheses denote *M. fortuitum*.
 Δ *M. tuberculosis* (H₃₇Rv).

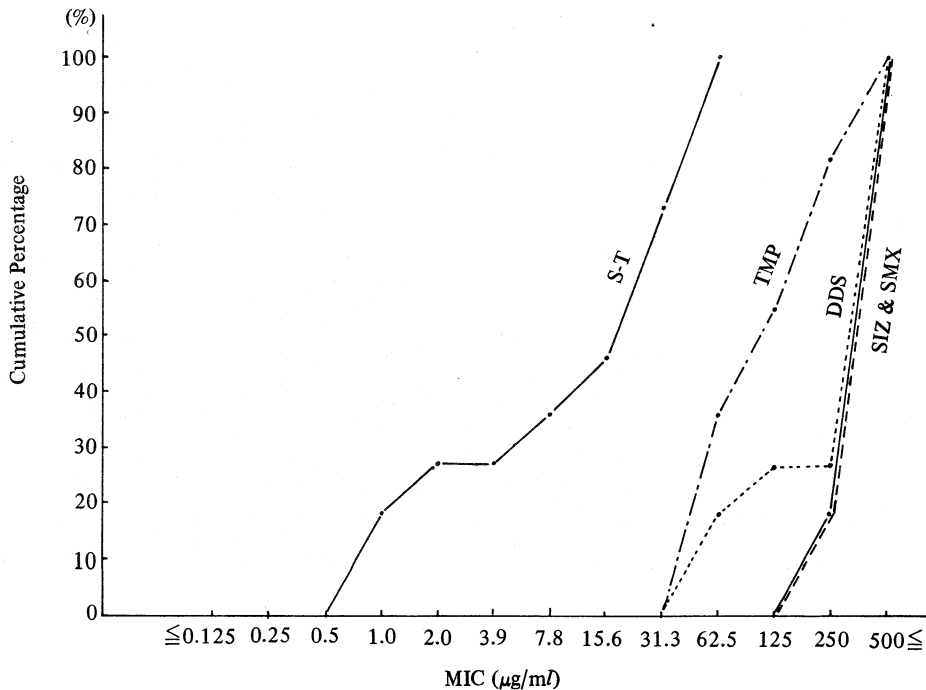


Fig. 1. Cumulative Percentage of *M. avium-M. intracellulare* Complex inhibited by Sulfonamides (11 strains).

tracellulare complex, *M. fortuitum*, *M. Chelonei* の全てにこの傾向がうかがわれる。対照として検討した *M. tuberculosis* (H37Rv) も同様であるが, SIZ と S-T が同じ MIC を示しているのが注目された。AM 諸菌種との比較では MIC で明らかな差はない。また S-T に関しては *M. fortuitum*, *M. chelonei* などにも比較的感受性の強い菌株もみられたのが印象づけられた。図1に本邦分離の *M. avium-M. intracellulare* Complex 11 株について各薬剤濃度で感受性を示す菌株数の累積 % を示した。これによると S-T と他の 4 薬剤との差は明らかであり, SIZ, DDS, SMX, TMP では 31.3 μ g/ml 以下で発育の阻止された菌株は 1 株も認められなかったのに対して, S-T は 31.3 μ g/ml で既に 70% 以上の菌株の発育を阻止している。したがって

M. avium-M. intracellulare complex においても SMX-TMP の併用効果は認められたと考えられる。

以上, SIZ, DDS, SMX, TMP, S-T の中では S-T のみが *in vitro* で検討継続の価値があると考えられた。

表 2 に S-T を主剤としてこれに RFP, KM を等量 (S-T の SMX と等量) に組み合わせせた, S-T·KM, S-T·RFP, S-T·RFP·KM の 3 種の混合の総合制菌力 (含まれている各薬剤 [S-T では SMX] としての MIC で表示) を RFP, KM, S-T の MIC と比較して各菌種 (群) ごとに示した。今回の成績では *M. kansasii*, 本邦分離の *M. avium-M. intracellulare* complex に S-T·RFP, S-T·KM, S-T·RFP·KM などの組み合わせによる制菌効果の増強がみられるようである。

Table 2. Susceptibilities of Atypical Mycobacteria to Various Combinations Including S-T

Dubos Tween albumin Medium (Inoculum: 0.01 mg)

Species & Complex	No. of Strain	Drugs	MIC (μ g/ml)																
			≤ 0.003	0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100 \leq	
<i>M. kansasii</i>	4	S-T																	
		RFP	3 Δ			1							1	Δ				3	
		KM				Δ							1				1	2	
		S-T·RFP	3 Δ	1															
		S-T·KM	Δ										3						
S-T·RFP·KM	4 Δ									1									
<i>M. scrofulaceum</i>	4	S-T																	
		RFP	3					1								1	2	1	
		KM	1								1			1					
		S-T·RFP	3								1								
		S-T·KM	1					1					1						
S-T·RFP·KM	3									1									
<i>M. avium-M. intracellulare</i> Complex (Japan)	13	S-T																	
		RFP	1	1			1		3			1	2	3	2	2	3	5	
		KM					1					2	1	2	1	2	3		1
		S-T·RFP	1	1	1				1	1	1	6	1						
		S-T·KM		1								2	3	5	2				
S-T·RFP·KM	2		2			3	1	2		2	1								
<i>M. avium-M. intracellulare</i> Complex (TMC)	6	S-T					2												
		RFP	5			1						1			1	1	1		
		KM	4						1	1									
		S-T·RFP	5			1													
		S-T·KM	3	1			1	1											
S-T·RFP·KM	5		1																
<i>M. fortuitum</i> & <i>M. chelonei</i>	7	S-T																	
		RFP																1 (1)	6 (3)
		KM													2 (2)	1 (1)		2 (1)	2
		S-T·RFP													1 (1)	1 (1)	3 (2)	1	3 (2)
		S-T·KM																3 (2)	2
S-T·RFP·KM								1 (1)*			1 (1)					1	1		

Notes Δ : *M. tuberculosis* (H37Rv).

*: Numbers in the parentheses denote *M. fortuitum*.

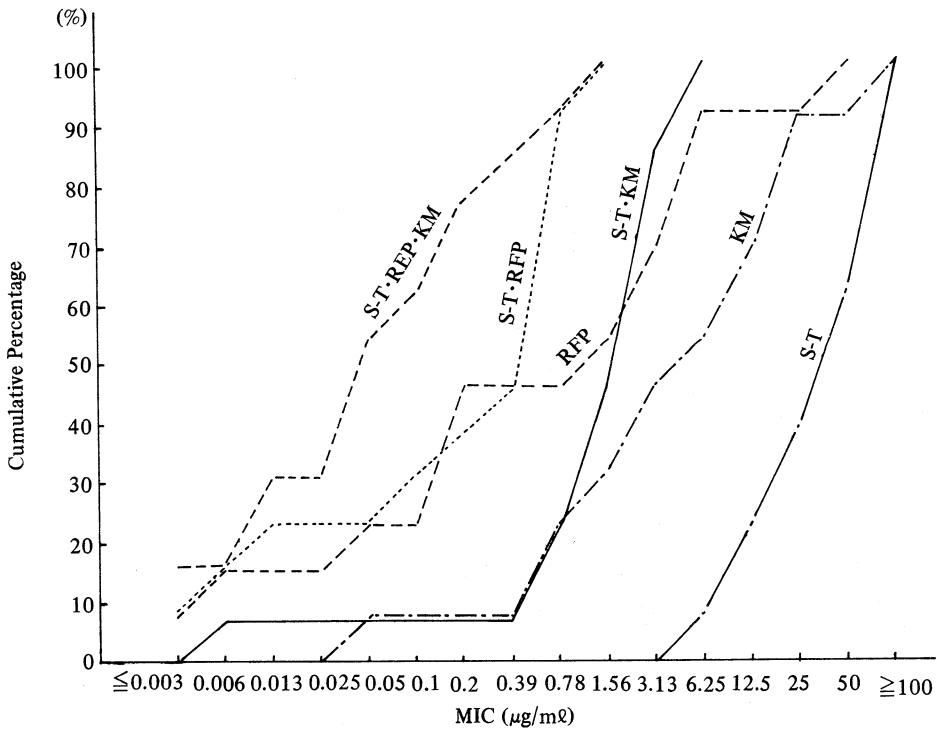


Fig. 2. Cumulative Percentage of *M. avium-M. intracellulare* Complex inhibited by Various Combinations including S-T (13 strains).

表2ではMIC 0.003µg/ml以下の欄は省略したが、*M. tuberculosis* (H37Rv)で、KM単独の制菌力とS-T・KMの制菌力は試験管倍数希釈系列にして3管の差でS-T・KMの方が優れていた。なお、米国分離の*M. avium-M. intracellulare* complex (TMC株)は本邦分離の*M. avium-M. intracellulare* complexと比較して、S-T, RFP, KM, S-T・RFP, S-T・KM, S-T・RFP・KMのすべてに対してより感受性が強い傾向にあった。

図2に本邦分離の*M. avium-M. intracellulare* complex 13株について各術式別に感受性を示した菌株数の累積%を示した。80%以上の菌株の発育が阻止される薬剤濃度 (S-TにおいてはSMXの濃度)はそれぞれS-Tで50~100µg/ml, RFPで3.13~6.25µg/ml, KMで12.5~25µg/ml, S-T・RFPで0.39~0.78µg/ml, S-T・KMで1.56~3.13µg/ml, S-T・RFP・KMで0.2~0.39µg/mlの範囲にあり、S-T・RFP・KMの組み合わせにおいて最も制菌力が強いが、この組み合わせとS-T・RFPとの間に顕著な差はない。また今回の成績では、RFP単独とS-T・KMは比較的近い制菌効果を示した。

III. 考 案

今回検討したSIZ, SMXなどのサルファ剤は現在抗結核薬としては使用されていないが、以前二次薬の1つとして比較的多用されていたことは記憶に新しい。一般細菌感染症に対する抗菌薬としてこれらの薬剤は

現在では使用頻度は極めて少ないものと考えられるが、最近SMXとTMPの合剤(ST)が注目され、抗菌力の増大と対象スペクトルムの拡大により、細菌感染症、*Pneumocystis carinii* 症などに使用されている。Bushby⁶⁾は*Mycobacterium tuberculosis*に対するMICとして、SMXは1,000µg/ml以上、TMPは250µg/ml (Peizer and Schechter medium)と記載しているがその併用効果は明らかでない。私どもの成績ではH37Rv株でSMXは500µg/ml以上、TMPは250µg/mlであった。今回検討した11株の本邦分離*M. avium-M. intracellulare* complexについてのMICも上述の*M. tuberculosis*の成績と大差ないようでSMXはいずれも250µg/mlもしくはそれ以上で、またTMPでは80%以上の株が62.5µg/mlから250µg/mlで発育を阻止されている。これに対してSMXとTMPの組み合わせ(5:1)ではSMXとしての濃度で0.5µg/mlから31.3µg/mlの間で全11株の発育を阻止しており、併用効果は明らかであると考えられた。MICからみるとKM程度の成績³⁾であった。したがってS-Tは更に検討の価値があると考え、S-T・RFP, S-T・KM, S-T・RFP・KMの等量組み合わせ(ただし、S-TではSMXのみが等量)の総合制菌力を検討したわけである。実験成績の項で述べたように、80%以上の菌株数の発育阻止がみられた薬剤濃度と比較するとS-T・RFP・KMの組み合わせが0.2~0.39µg/mlを示し、上述の成績³⁾のRFP・KM・EB, RFP・VM・THなどの成績をかなり上まわっており、今後臨床的にも検討の価値があると考

えられる。私どもの今回使用した組み合わせは SMX・RFP・KM は等量ずつであるが臨床投与量は 4 : 1 : 2 程度であり、なおいくばくかの効果増強は期待できるかも知れない。しかし、今回の成績では S-T・RFP と S-T・RFP・KM との差は明らかでなく、今後実験感染症の治療実験で詳細に検討すべき問題であろう。

本邦ではサルファ剤に関して既に 2, 3 の基礎的検討^{7,8)}があり、外間⁷⁾は *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. avium* に対してサルファ剤 (SMX, SIZ, SMX-TMP) が *in vitro* で 25 μ g/ml から 50 μ g/ml の MIC (1% 小川培地使用) を示したとし、更にマウスを用いた実験的 *M. marinum* 症で DDS も含んだ薬剤の治療効果の成績⁸⁾を報告している。

臨床においても吉本⁹⁾¹⁰⁾が RFP, ST 合剤を含む検討を開始しているのでその成績を期待したい。同じ吉本⁹⁾のセファロsporin系薬剤、並びに下出¹¹⁾の抗結核薬多剤 (4~5 剤) 併用療法の今後の臨床成績もともに期待したい。後者は *M. avium*-*M. intracellulare* 症に対する抗結核薬併用の価値ならびにその限界を明らかにする価値あるものとして期待している。

全身播種性の *M. chelonae* 感染症の 1 例に SIZ, SMX-TMP 合剤などを使用して有効であったと Tice¹²⁾らが報告している。これと関連して今回検討した *M. chelonae* の 1 株で S-T (SMX として) で 1.0 μ g/ml の MIC がみられたのが印象的であった。

IV. 結 論

35 株の AM を用い、*in vitro* における SIZ, DDS, SMX, TMP, SMX-TMP (5 : 1) の制菌効果ならびに SMX-TMP (S-T) を含む組み合わせ、S-T・KM, S-T・RFP, S-T・RFP・KM の総合制菌効果の検討を行なった。Dubos Tween albumin 液体培地における成績は次のごとくである。

- 1) SIZ, DDS, SMX, TMP 4 薬剤の制菌効果は極めて弱い。本邦分離の *M. avium*-*M. intracellulare* complex 11 株は 31.3 μ g/ml で全て発育が認められた。
- 2) S-T は 31.3 μ g/ml (SMX として) で本邦分離の *M. avium*-*M. intracellulare* complex の 70% 以上の発育を阻止し、本菌種 (群) に対する SMX と TMP の併用効果がみとめられた。
- 3) 本邦分離の *M. avium*-*M. intracellulare* complex を対象とした S-T と RFP, KM との 3 種の組み合わせ、S-T・RFP, S-T・KM, S-T・RFP・KM の成績では 80% の菌株が感受性を示す薬剤濃度で比較したとき、S-T・RFP・KM の組み合わせが最も制菌力が強かったが、S-T・RFP との差は明らかではなかった。また S-T・KM は RFP とほぼ同じ制菌効果を示した。

本実験に使用した DDS は正井秀雄氏よりいただいた。深謝いたします。

文 献

- 1) 久世文幸他：非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性 I. 抗結核剤に対する感受性, 結核, 49 : 151, 1974.
- 2) 久世文幸他：非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性 II. 一般抗生物質, 抗腫瘍剤, 抗レプラ剤 (B 663) 等に対する感受性, 結核, 49 : 189, 1974.
- 3) 久世文幸他：非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性 III. *Mycobacterium intracellulare* に対する抗結核剤の併用効果について, 結核, 52 : 231, 1977.
- 4) 久世文幸他：非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性 IV. 抗結核剤の試験管内併用効果について (米国株についての検討), 結核, 52 : 505, 1977.
- 5) 内藤祐子他：非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性 V. *Mycobacterium intracellulare* に対する主としてアミノグリコシッド系抗生物質の試験管内制菌作用, 結核, 54 : 423, 1979.
- 6) Bushby, S.R.M.: Trimethoprim-sulfamethoxazole : *In vitro* microbiological aspects, J Inf Dis 128 (supplement) : 442, 1973.
- 7) 外間政哲：非定型抗酸菌に対するサルファ剤の抗菌作用について—*in vitro* の実験成績—, 結核, 51 : 287, 1976.
- 8) Hokama, S. et al.: Systemic chemotherapy in mice experimentally infected with *Mycobacterium marinum*, Jap J Tuberc Chest Dis, 17 : 62, 1971.
- 9) 吉本録一：非定型抗酸菌症に対するセファロsporin系化学療法を試みについて, 結核, 55 : 185, 1980. (第55回日本結核病学会総会講演集).
- 10) 吉本録一：非定型抗酸菌症に対する Cephalosporin系抗生剤を主とした化学療法を試みについて—*M. kansasii* および *M. intracellulare* による重症肺感染症 2 例の治療を出発点として—, 結核, 55 : 515, 1980 (日本結核病学会東海支部学会第55回学会演説抄録).
- 11) 下出久雄：非定型抗酸菌症の臨床的研究—第13報多剤 (4~5 剤) 併用療法による *M. intracellulare* 肺感染症の治療成績—, 日胸, 40 : 669, 1981.
- 12) Tice, A.D. and Solomon, R.J.: Disseminated *Mycobacterium chelonae* infection: Response to sulfonamides, Am Rev Resp Dis, 120 : 197, 1979.