



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類病原細菌に対するサルファ剤とピリミジン誘導体との協力作用について：サルファモノメトキシンとオルメトプリムの協力作用
Author(s)	吉水, 守; YOSHIMIZU, Mamoru; 木村, 喬久 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 37(1), 38-49
Issue Date	1986-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23903
Type	departmental bulletin paper
File Information	37(1)_P38-49.pdf



魚類病原細菌に対するサルファ剤と
ピリミジン誘導体との協力作用について
——サルファモノメトキシシとオルメトプリムの協力作用——

吉水 守*・木村 喬久*

In Vitro Antibacterial Activity of the Combination of
Sulphamonometoxin and Ormethoprim on
Bacterial Fish Pathogens

Mamoru YOSHIMIZU* and Takahisa KIMURA*

Abstract

The in vitro bacteriostatic activity of a combination of sulphamonometoxin (SMM) and ormethoprim (OMP) against representative bacterial fish pathogens was studied. In general, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of OMP were much smaller than comparable values for SMM. When SMM and OMP were combined, the bacteriostatic effect was enhanced in a synergistic manner for all bacteria tested except *Pseudomonas fluorescens*. The synergism was most remarkable in the case of bacterial strains that were sensitive to the action of SMM alone. This degree of synergism was observed when the ratios of SMM and OMP in combination were in the range 1:1 to 5:1. The MIC of SMM plus OMP combined was less than 3.13 $\mu\text{g/ml}$ for SMM resistant strains and also low as 0.2 to 0.78 $\mu\text{g/ml}$ for SMM sensitive strains. The positive usefulness of a combination of these two compounds for therapy or control of bacterial fish disease is discussed.

緒 言

サルファ剤は多くの細菌性魚病のすぐれた治療剤として古くから利用され (BULLOCK *et al.*, 1974), 我が国においても水産増養殖の急速な発展に伴い問題化してきた細菌性疾病の治療剤として広く利用されている。しかし近年その乱用に起因すると考えられるサルファ剤耐性魚類病原細菌が高頻度に検出されるようになり, 魚病対策上の大きな問題となっている (青木ら, 1980)。

サルファ剤の作用機序は細菌細胞内の代謝過程における p-アミノ安息香酸と 2 水素プテリジンから 2 水素葉酸を合成する酵素の作用を阻害すると考えられており, 一方ピリミジン誘導体のトリメトプリムやオルメトプリムは 2 水素葉酸から 4 水素葉酸への代謝経路をブロックすると考えられるために, これら 2 剤の併用により抗菌作用の増強が認められ (五島ら; 1973, 中沢ら; 1973, 小酒井・小栗; 1973, 神谷ら; 1973), 医学, 獣医学, 水産学の領域において注目を浴び, 2 剤の併用効果が検討されている (McCARTHY *et al.*, 1974a, b)。

* 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, 041 JAPAN)

著者らも魚病治療剤の効果の利用やサルファ剤耐性魚類病原細菌制圧のための基礎的研究を目的に, サルファダイアジンとトリメトプリムの協力作用を検討し, 両剤の併用により抗菌作用の増強が認められることを報告した (KIMURA *et al.*; 1983)。本報ではサルファ剤としてサルファモノメトキシンを, ピリミジン誘導体としてオルメトプリムを使用し, 両薬剤の単剤および種々の濃度で両薬剤を併用したものについて教室保存の魚類病原細菌に対する試験管内抗菌力試験を実施したので, 得られた知見について報告する。

材料および方法

供試菌: 教室保存の魚類病原細菌より *Aeromonas salmonicida* および *Vibrio anguillarum* を主体にサルファ剤耐性菌を含め Table 1 に示す 32 株を本実験に供した。

供試薬剤および薬剤希釈液列の調製法: サルファモノメトキシ (SMM, 第 1 製薬), サルファダイアジン (SDZ, 共立商事) およびオルメトプリム (OMP, 第 1 製薬) を供試し, SMM および SDZ は 1/8 N-NaOH 少量, OMP はジメチルスルホキシド少量にて溶解後, SMM および SDZ はミリポアフィルター-HA (0.45 μ) にて濾過し, 薬剤原液とした。次にこれらを滅菌蒸留水にて適宜希釈し薬剤希釈液列を調製した。

供試培地: 接種用前培養培地には淡水培地 (吉水ら, 1976) を用い, 感受性測定用培地にはミューラーヒントン培地 (Difco), 7.5% ウマ血液加ミューラーヒントン培地, 感性ディスク用培地-N (日本) および Table 2 に示す組成の半合成学研赤痢培地を用いた。なお *Vibrio* 属供試菌 13 株の感受性測定には, これらの培地の NaCl 濃度を 1.5% に増強して供試した。

Table 1. List of the strains employed

No.	Organisms	No.	Organisms
	<i>Aeromonas</i> (17 strain)		<i>Vibrio</i> (13 strain)
1.	<i>A. hydrophila</i> IAM 1018	18.	<i>V. anguillarum</i> NCMB 6
2.	<i>A. punctata</i> IAM 1646	19.	<i>V. anguillarum</i> NCMB 828
3.	<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	20.	<i>V. anguillarum</i> KAY-2
4.	<i>A. salmonicida</i> EFDL	21.	<i>V. anguillarum</i> VU-7601
5.	<i>A. liquefaciens</i> EFDL	22.	<i>V. anguillarum</i> VCS-7601
6.	<i>A. punctata</i> TUF 1	23.	<i>V. anguillarum</i> VG-7601
7.	<i>A. punctata</i> TUF 2	24.	<i>V. anguillarum</i> VN-7601
8.	<i>A. salmonicida</i> NCMB 833	25.	<i>V. anguillarum</i> Y-3
9.	<i>A. salmonicida</i> NCMB 834	26.	<i>V. anguillarum</i> Y-4
10.	<i>A. salmonicida</i> NCMB 1102	27.	<i>V. anguillarum</i> Y-5
11.	<i>A. salmonicida</i> NCMB 1103	28.	<i>V. anguillarum</i> Y-6
12.	<i>A. salmonicida</i> Tochigi	29.	<i>V. anguillarum</i> NS-744
13.	<i>A. salmonicida</i> Tokyo	30.	<i>V. anguillarum</i> NA-7418
14.	<i>A. salmonicida</i> Gifu		
15.	<i>A. salmonicida</i> Shiga (Ar-32)	31.	<i>Escherichia coli</i> 0-26*
16.	<i>A. salmonicida</i> Shiga (Ar-33)	32.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL
17.	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> NCMB 2020 (1-a-1)		

*: Non fish pathogenic bacteria

感受性測定法: 日本化学療法学会の ST 合剤研究会の MIC 測定法 (1973) に準拠して行なったが、まず代表株を対象に前述の 4 種の感受性測定用培地および培養温度 (15, 20, 25, 30, 37°C) について SDZ に対する MIC を測定して比較検討し、水圏微生物用に若干改めた。

すなわち感受性の測定は寒天平板希釈法を用い、供試菌の接種は前述の淡水培地に 25°C, 24 時間培養後、学研赤痢液体培地に接種して 25°C, 20 時間培養した菌液を滅菌生理的食塩水にて 1,000 倍に希釈して感受性測定用接種菌液とした。この接種菌液をスタンプ法により所定濃度の薬剤を含む学研赤痢寒天培地表面に接種し、判定は 25°C, 48 時間培養後肉眼的観察により菌の発育が完全に阻止された培地の含有薬剤の最低濃度をもって MIC とした。なお試験はいずれも 3 回反復して行なった。

Table 2. Composition of the Gakken Sekiri Agar

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.5 g.
KH ₂ PO ₄	0.4 g.
NaCl	5.0 g. (15.0 g)*
Casamino Acid	2.0 g.
Glucose	1.0 g.
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g.
DL-Tryptophan	10 mg.
Thiamin	10 mg.
Nicotinic Acid	10 mg.
Agar	15.0 g.
Dist. Water	1000 ml

*: Used for *Vibrio*

結 果

感受性測定用培地および培養温度の MIC に及ぼす影響: 供試菌 32 株より選出した代表 5 株を対象にミュラーヒントン培地, 7.5% ウマ血液加ミュラーヒントン培地, 感性ディスク用培地-N および学研赤痢培地の 4 種の感受性測定用培地を用い、培養温度 20°C で測定した SDZ に対する MIC を Table 3 に示した。供試した 4 種の培地のうち学研赤痢培地にて測定された MIC は他の培地での MIC に比し明らかに低かった。他の 3 種の培地における MIC はほぼ同程度であったが、7.5% ウマ血液加ミュラーヒントン培地で *A. salmonicida* および *E. coli* の MIC が若干低かった。

Table 4 に学研赤痢培地を用い代表 8 株について、培養温度を 15, 20, 25, 30, 37°C として求めた MIC を示した。*A. salmonicida* および *V. anguillarum* は 37°C で発育不可能で MIC も測定できなかったが、各温度での MIC 測定値は *A. punctata* の 30, 37°C を除き 25°C が最も高い値を示した。

SMM および OMP の単剤時の抗菌力ならびに両薬剤間の協力作用: SMM および OMP 単剤時の各供試菌に対する MIC ならびに Box 法による SMM と OMP の協力作用の観察結果を Table 5~Table 9 に示した。

Table 5 は SMM 感受性菌 *A. salmonicida* ATCC14174 の観察結果を示したものであるが、本菌株に対する SMM 単剤時の MIC は 3.13 mcg/ml, OMP 単剤時の MIC は 0.39 mcg/ml を示し、両薬剤間に全く協力作用の認められない場合は本表の実線内で示した範囲内で菌の増殖が認められるはずであるが、結果は全て陰性で明瞭な協力作用が認められた。

この観察結果をもとに ELION ら (1954) の FIC (fractional inhibitory concentration) の計算を行なった例を Table 6 に示した。*A. salmonicida* の場合、SMM 0.05 mcg/ml + OMP 0.05 mcg/ml の併用で FIC index は 0.144 と最小の値を示し、この時の混合比は 1:1 であった。

なお FIC とは 2 種の薬剤を併用した場合、発育阻止を示したそれぞれの薬剤濃度を、その薬剤を単独で使用した場合の最小発育阻止濃度で割った値であり、その和を FIC index と称する。すなわち FIC index が 1.0 以下であれば両者間に併用効果があり、FIC index が小さい程併用効果

Table 3. Effect of basal medium composition on antibacterial activity of SDZ by agar dilution test

Organisms	Muller-Hinton Agar	Muller-Hinton + HB* ¹	Sensitivity Disk Agar-N	Gakken-Sekiri Agar
<i>Aeromonas hydrophila</i> IAM 1018	>800	>800	400	6.25
<i>Aeromonas punctata</i> IAM 1646	>800	>800	>800	6.25
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	400	100	200	1.56
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 6	100	100	100	3.13
<i>Escherichia coli</i> O-26	25	12.5	25	3.13

cf. *¹: with 7.5% horse blood

Table 4. Effect of incubation temperature on antibacterial activities of SDZ

Organisms	Minimal inhibitory concentration (MIC/ml)				
	Incubation temperature (°C)				
	15	20	25	30	37
<i>Aeromonas hydrophila</i> IAM 1018	1.56	3.13	6.25	3.13	3.13
<i>Aeromonas punctata</i> IAM 1646	6.25	6.25	6.25	25	≥25
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	≤0.78	1.56	1.56	≤0.78	—
<i>Aeromonas salmonicida</i> EFDL	1.56	3.13	3.13	≤0.78	—
<i>Aeromonas salmonicida</i> Shiga (Ar-32)	6.25	6.25	≥25	≥25	—
<i>Aeromonas salmonicida</i> Shiga (Ar-33)	1.56	12.5	≥25	≥25	—
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 6	≤0.78	1.56	1.56	≤0.78	—
<i>Escherichia coli</i> O-26	≤0.78	3.13	3.13	≤0.78	≤0.78

— Indicates no bacterial growth

が大きいことを意味する。

次に SMM 耐性の *A. salmonicida* Shiga (Ar-32), SMM 単独時の MIC=400 mcg/ml, の結果を Table 7 に示した。本菌株の場合も高濃度の SMM 添加域で協力作用が認められ, Table 8 にみられるように SMM 25 mcg/ml+OMP 0.20 mcg/ml 併用時に FIC index は最小となり, 両薬剤の協力作用が認められた。この時の混合比は 125:1 であった。

以上のようにして求めた供試菌 32 株に対する SMM および OMP 単剤時の MIC, FIC index が最小となる SMM と OMP の組み合わせ, その時の FIC index ならびに混合比を Table 9 に示した。SMM および OMP 単剤時の各供試菌株に対する MIC は SMM 感受性菌の場合 0.20~3.13

Table 5 Enhancement of bacteriostatic activity against *Aeromonas salmonicida* ATCC 14174 by various combinations of SMM and OMP

SMM (mcg./ml)	12.5	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	+	-	-	-	-	-	-
	0.78	+	-	-	-	-	-	-
	0.39	+	-	-	-	-	-	-
	0.20	+	-	-	-	-	-	-
	0.10	+	-	-	-	-	-	-
	0.05	+	-	-	-	-	-	-
	0.00	+	+	+	+	-	-	-
		0.00	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56
		OMP (mcg./ml)						

+ Indicates bacterial growth
 - Indicates no bacterial growth

Table 6. Calculation of FIC index against *Aeromonas salmonicida* ATCC 14174 by various combinations of SMM and OMP

Organisms	SMM alone	OMP alone	SMM-OMP combination	FIC index* a/a ₀ + b/b ₀	Mixed ratio SMM : OMP
<i>Aeromonas salmonicida</i>	3.13	0.39	0.10-0.05	0.160	2 : 1
ATCC 14174			0.05-0.05	0.144	1 : 1
			0.05-0.10	0.272	1 : 2

*: Fractional inhibitory concentration

mcg/ml の範囲で測定され、SMM 耐性菌の場合でも OMP の MIC は 0.39~3.13 mcg/ml であった。これらの FIC index は *Pseudomonas fluorescens* EFDL (Ps-1) を除く全ての供試菌において 0.375 以下となり、明らかに両薬剤間の協力作用が認められた。特に SMM 感受性菌においてその作用は顕著であり、その場合混合比の多くは 1:1~8:1 であった。一方、SMM 耐性菌においても協力作用は認められたが、OMP 依存性が強くその混合比は 63:1~1,000:1 であった。

SMM と OMP の配合比の検討: 以上のように SMM と OMP の間に協力作用が認められたので、次に SMM と OMP の最適混合比の検討を行なった。その結果を Table 10~12 に示す。

Table 10 は SMM 感受性菌 *A. salmonicida* ATCC14174 の観察結果で縦軸に配合比を、横軸に MIC を示した。本菌株の場合、SMM : OMP = 1 : 1~2 : 1 で OMP 単独時の MIC より 1 段優れた協力的な抗菌作用を示し、3 : 1~10 : 1 の配合比まで OMP 単独時と同じ MIC すなわち 0.39 mcg/ml を示し、この組み合わせまで協力的であることが認められた。

次に SMM 耐性菌 *A. salmonicida* (Ar-32) の結果を Table 11 に示した。SMM : OMP = 1 : 1~1 : 2 で OMP 単独時と同一の MIC すなわち 1.56 mcg/ml を示した。しかしこの場合は SMM の配合比が高くなるにつれ、段階的に感受性の低下が認められた。

以上のようにして求めた各供試菌株の協力的配合比の検討結果をその時の MIC と共に Table

Table 7. Enhancement of bacteriostatic activity against *Aeromonas salmonicida* Shiga (Ar-32) by various combinations of SMM and OMP

SMM (mcg./ml)	400	-	-	-	-	-	-	-	-	
	200	+	-	-	-	-	-	-	-	
	100	+	+	-	-	-	-	-	-	
	50	+	+	+	-	-	-	-	-	
	25	+	+	+	-	-	-	-	-	
	12.5	+	+	+	+	-	-	-	-	
	6.25	+	+	+	+	+	-	-	-	
	3.13	+	+	+	+	+	+	-	-	
	1.56	+	+	+	+	+	+	-	-	
	0.78	+	+	+	+	+	+	-	-	
	0.39	+	+	+	+	+	+	-	-	
	0.20	+	+	+	+	+	+	-	-	
	0.10	+	+	+	+	+	+	-	-	
	0.05	+	+	+	+	+	+	-	-	
0.00	+	+	+	+	+	+	-	-		
		0.00	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	
		OMP (mcg./ml)								

+ Indicates bacterial growth
 - Indicates no bacterial growth

Table 8. Calculation of FIC index against *Aeromonas salmonicida* Shiga (Ar-32) by various combination of SMM and OMP

Organisms	SMM alone a_0	OMP alone b_0	SMM-OMP combination a-b	FIC index* $a/a_0 + b/b_0$	Mixed ratio SMM : OMP
<i>Aeromonas salmonicida</i>	400	1.56	200-0.05	0.532	4000 : 1
Shiga (Ar-32)			100-0.10	0.314	1000 : 1
			25-0.20	0.190	125 : 1
			12.5-0.39	0.281	32 : 1
			6.25-0.78	0.515	8 : 1

*: Fractional Inhibitory Concentration

12に示した。SMM感受性菌の多くは1:1~2:1あるいは1:1~5:1, またSMM耐性菌の多くは0:1~2:1の範囲で協力的な作用を示し, その時のMICは高いもので1.56 mcg/ml, 多くは0.10~0.20 mcg/mlと顕著な抗菌作用が認められた。

SO合剤の抗菌力: 上述のごとくSMMとOMPは1:1~5:1前後の混合比において強い抗菌力を示すことから, SMMとOMPを3:1および5:1に配合したSO合剤のMICをSMMおよびOMP単剤時のMICと比較した。SO(3:1)およびSO(5:1)合剤のMICはTable 13にみられる

Table 9. Synergistic bacteriostatic effects against fish pathogens demonstrated with various combinations of SMM and OMP

Organisms	MIC (mcg./ml)				
	SMM alone a ₀	OMP alone b ₀	SMM/OMP combination	FIC* index	Mixed ratio SMM : OMP
<i>Aeromonas hydrophila</i> IAM 1018	0.78	1.56	0.10/0.05	0.160	2 : 1
<i>A. punctata</i> IAM 1646	3.13	0.78	0.39/0.05	0.189	8 : 1
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	3.13	0.39	0.05/0.05	0.144	1 : 1
<i>A. salmonicida</i> EFDL	3.13	0.39	0.10/0.05	0.157	2 : 1
<i>A. liquefaciens</i> EFDL	12.50	3.13	0.78/0.10	0.070	8 : 1
<i>A. punctata</i> TUF 1	0.78	0.78	0.10/0.05	0.192	2 : 1
<i>A. punctata</i> TUF 2	3.13	0.39	0.20/0.05	0.189	4 : 1
<i>A. salmonicida</i> NCMB 833	800.00	1.56	50.00/0.10	0.126	500 : 1
<i>A. salmonicida</i> NCMB 834	3.13	0.78	0.10/0.05	0.095	2 : 1
<i>A. salmonicida</i> NCMB 1102	6.25	0.78	0.39/0.05	0.126	8 : 1
<i>A. salmonicida</i> NCMB 1103	3.13	0.78	0.20/0.05	0.126	4 : 1
<i>A. salmonicida</i> Tochigi	6.25	0.39	0.10/0.05	0.144	2 : 1
<i>A. salmonicida</i> Tokyo	12.50	0.39	0.10/0.05	0.136	2 : 1
<i>A. salmonicida</i> Gifu	12.50	0.39	0.20/0.05	0.144	4 : 1
<i>A. salmonicida</i> Shiga (Ar-32)	400.00	1.56	25.00/0.20	0.190	125 : 1
<i>A. salmonicida</i> Shiga (Ar-33)	400.00	1.56	12.50/0.20	0.159	63 : 1
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> NCMB 2020 1-a-1	6.25	1.56	0.39/0.10	0.124	4 : 1
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 6	1.56	0.20	0.05/0.05	0.282	1 : 1
<i>V. anguillarum</i> NCMB 828	0.78	0.39	0.05/0.05	0.256	1 : 1
<i>V. anguillarum</i> KAY-2	1.56	0.39	0.05/0.05	0.160	1 : 1
<i>V. anguillarum</i> VU-7601	400.00	0.39	50.00/0.10	0.253	1000 : 1
<i>V. anguillarum</i> VCS-7601	1.56	0.39	0.05/0.05	0.160	1 : 1
<i>V. anguillarum</i> VG 7601	100.00	0.39	25.00/0.05	0.375	500 : 1
<i>V. anguillarum</i> VN-7601	400.00	0.39	50.00/0.05	0.253	1000 : 1
<i>V. anguillarum</i> Y-3	0.78	0.39	0.05/0.05	0.192	1 : 1
<i>V. anguillarum</i> Y-4	0.78	0.20	0.05/0.05	0.314	1 : 1
<i>V. anguillarum</i> Y-5	0.78	0.39	0.05/0.05	0.192	1 : 1
<i>V. anguillarum</i> Y-6	0.78	0.39	0.05/0.05	0.192	1 : 1
<i>V. anguillarum</i> NS-744	100.00	0.39	25.00/0.10	0.319	63 : 1
<i>V. anguillarum</i> NA-7418	0.20	0.78	0.05/0.05	0.314	1 : 1
<i>Escherichia coli</i> O-26	3.13	0.39	0.05/0.05	0.144	1 : 1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL	>800.00	>50.00	ND**	ND**	ND**

* Fractionary Inhibitory Concentration

** Not determined

ごとく, 両者ともに *P. fluorescence* を除く全ての菌株において優れた抗菌力を示し, SMM 耐性菌において 1.56~6.25 mcg/ml, 多くは 0.10~0.39 mcg/ml であった。

考 察

サルファ剤のスルファモノメトキシシ (SMM) とピリミジン誘導体のオルメトプリム (OMP) について両薬剤間の併用効果を日本化学療法学会の S-T 合剤研究会の MIC 測定法に準拠し, Box 法を用いて検討したが, まず測定に先だち感受性測定用培地の検討とともに, 供試菌が魚類病原

Table 10. Synergism of SMM and OMP by the combinations against *Aeromonas salmonicida* ATCC 14174

Combination SMM:OMP	MIC (mcg./ml)							
	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25
1:0	+	+	+	+	+	+	-	-
100:1	+	+	+	+	-	-	-	-
50:1	+	+	+	+	-	-	-	-
25:1	+	+	+	+	-	-	-	-
10:1	+	+	+	-	-	-	-	-
5:1	+	+	+	-	-	-	-	-
3:1	+	+	+	-	-	-	-	-
2:1	+	+	-	-	-	-	-	-
1:1	+	+	-	-	-	-	-	-
0:1	+	+	+	-	-	-	-	-

+ Indicates bacterial growth
- Indicates no bacterial growth

Table 11. Synergism of SMM and OMP by the combinations against *Aeromonas salmonicida* Shiga (Ar-32)

Combination SMM:OMP	MIC (mcg./ml)										
	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50
1:0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100:1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
50:1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
25:1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10:1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5:1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3:1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2:1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1:1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0:1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+ Indicates bacterial growth
- Indicates no bacterial growth

細菌であるために培養温度の検討を行なった。今回供試したミューラーヒントン培地、ウマ血液加同培地、感性ディスク用培地ならびに学研赤痢培地のうち、学研赤痢培地における MIC 値が他の 3 者に較べ明らかに低い値を示し (Table 3), 本培地がサルファ剤に対する拮抗作用の最も少ない培地と考えられた。そこで学研赤痢培地を用い、15~37°C の範囲で培養温度の検討を行なったところ、*A. punctata* では培養温度が高くなるにつれ MIC も高い値を示したが、今回供試した *A. salmonicida* および *V. anguillarum* では 20~25°C で最も高い値を示し、全般的には 25°C で最も高い値が得られた (Table 4)。

Table 12. Antibacterial activity of optimal combinations of SMM and OMP against various organisms

Organisms	Suitable combination SMM : OMP	MIC (mcg./ml) suitable combination
<i>Aeromonas hydrophila</i> IAM 1018	1 : 1~10 : 1	0.20
<i>A. punctata</i> IAM 1646	1 : 1~ 5 : 1	0.39
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	1 : 1~ 2 : 1	0.20
<i>A. salmonicida</i> EFDL	1 : 1~ 5 : 1	0.20
<i>A. liquefaciens</i> EFDL	1 : 1~10 : 1	0.78
<i>A. punctata</i> TUE 1	1 : 1~ 5 : 1	0.20
<i>A. punctata</i> TUF 2	1 : 1~ 5 : 1	0.20
<i>A. salmonicida</i> NCMB 833	0 : 1~ 2 : 1	1.56
<i>A. salmonicida</i> NCMB 834	1 : 1~ 2 : 1	0.20
<i>A. salmonicida</i> NCMB 1102	1 : 1~ 5 : 1	0.39
<i>A. salmonicida</i> NCMB 1103	1 : 1~ 2 : 1	0.20
<i>A. salmonicida</i> Tochihi	1 : 1~ 2 : 1	0.20
<i>A. salmonicida</i> Tokyo	1 : 1~ 5 : 1	0.20
<i>A. salmonicida</i> Gifu	1 : 1~ 2 : 1	0.20
<i>A. salmonicida</i> Shiga (Ar-32)	0 : 1~ 2 : 1	1.56
<i>A. salmonicida</i> Shiga (Ar-33)	0 : 1~ 2 : 1	1.56
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> NCMB 2020 1-a-1	2 : 1~ 3 : 1	0.39
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 6	1 : 1~ 2 : 1	0.10
<i>V. anguillarum</i> NCMB 828	1 : 1~ 2 : 1	0.10
<i>V. anguillarum</i> KAY-2	1 : 1~50 : 1	0.20
<i>V. anguillarum</i> VCS-7601	1 : 1~ 5 : 1	0.20
<i>V. anguillarum</i> Y-3	1 : 1~ 2 : 1	0.10
<i>V. anguillarum</i> Y-4	1 : 1~10 : 1	0.10
<i>V. anguillarum</i> Y-5	1 : 1~10 : 1	0.20
<i>V. anguillarum</i> Y-6	1 : 1~ 5 : 1	0.20
<i>V. anguillarum</i> NS-744	0 : 1~ 2 : 1	0.78
<i>V. anguillarum</i> NA-7418	1 : 1~25 : 1	0.10
<i>Escherichia coli</i> O-26	1 : 1~ 3 : 1	0.20
<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL	ND*	ND*

* Not determined

Table 13. Enhancement of antibacterial activity by the combinations of SMM and OMP

Organisms	MIC (mcg./ml)			
	SMM alone	OMP alone	SO (SMM+OMP)	
			(3:1)	(5:1)
<i>Aeromonas hydrophila</i> IAM 1013	0.78	1.56	0.20	0.39
<i>A. punctata</i> IAM 1646	3.13	0.78	0.39	0.39
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	3.13	0.39	0.20	0.20
<i>A. salmonicida</i> EFDL	3.13	0.39	0.20	0.20
<i>A. liquefaciens</i> EFDL	12.50	3.13	0.78	0.78
<i>A. punctata</i> TUF 1	0.78	0.78	0.20	0.39
<i>A. punctata</i> TUF 2	3.13	0.39	0.20	0.20
<i>A. salmonicida</i> NCMB 833	800.00	1.56	3.13	3.13
<i>A. salmonicida</i> NCMB 834	3.13	0.78	0.20	0.39
<i>A. salmonicida</i> NCMB 1102	6.25	0.78	0.39	0.39
<i>A. salmonicida</i> NCMB 1103	3.13	0.78	0.39	0.39
<i>A. salmonicida</i> Tochigi	6.25	0.39	0.39	ND*
<i>A. salmonicida</i> Tokyo	12.50	0.39	0.20	0.20
<i>A. salmonicida</i> Gifu	12.50	0.39	0.39	0.39
<i>A. salmonicida</i> Shiga (Ar-32)	400.00	1.56	6.25	6.25
<i>A. salmonicida</i> Shiga (Ar-33)	400.00	1.56	6.25	6.25
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> NCMB 2020 1-a-1	6.25	1.56	0.39	0.78
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 6	1.56	0.20	0.20	0.20
<i>V. anguillarum</i> NCMB 828	0.78	0.39	0.20	0.20
<i>V. anguillarum</i> KAY-2	1.56	0.39	0.20	0.20
<i>V. anguillarum</i> VU-7601	400.00	0.39	1.56	3.13
<i>V. anguillarum</i> VCS-7601	1.56	0.39	0.20	0.20
<i>V. anguillarum</i> VG-7601	100.00	0.39	1.56	1.56
<i>V. anguillarum</i> Y-3	0.78	0.39	0.20	0.20
<i>V. anguillarum</i> Y-4	0.78	0.20	0.10	0.10
<i>V. anguillarum</i> Y-5	0.78	0.39	0.20	0.20
<i>V. anguillarum</i> Y-6	0.78	0.39	0.20	0.20
<i>V. anguillarum</i> NS-744	100.00	0.39	1.56	1.56
<i>V. anguillarum</i> NA-7418	0.20	0.78	0.10	0.10
<i>Eacherichia coli</i> O-26	3.13	0.39	0.39	0.39
<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL	>800.00	>50.00	ND*	ND*

*Not determined

以上の結果をもとに感受性測定用培地に学研赤痢培地を, 培養温度を25°CとしてBox法によりSMMとOMP両薬剤間の併用効果を検討したところ, *P. fluorescens*を除く全供試菌株において協力作用が認められ, その効果はSMM感受性菌において顕著であった(Table 9)。SMM耐性菌においても協力作用は観察されたが, OMP依存性が強くその作用は感受性菌ほど明瞭でなかつ

た。

この SMM と OMP 両薬剤間の併用効果の観察結果に ELION ら (1954) の FIC index の概念をとり入れ検討した結果, SMM と OMP の協力作用は相乗作用であることが明らかとなった。この相乗作用の強さは SMM と OMP の混合比とも密接な関係を有していた (Table 9)。

以上の結果をさらに実験的に確かめるため SMM と OMP の配合比を 1:1~100:1 にした場合の抗菌力を測定したが, その結果はサルファ剤感受性菌の場合 SMM:OMP=1:1~2:1 あるいは 1:1~5:1 の混合において最も明瞭な相乗作用が認められ (Table 12), 前述の FIC index の概念による計算結果とよく一致した。

これらの結果は前報 (KIMURA *et al.*, 1983) における SDZ と TMP の併用効果の検討結果ともよく一致し, SMM および OMP が共に細菌の葉酸代謝系に作用するものであり, この代謝系が両薬剤により 2 点で阻害されることを考えると SMM と OMP 間の併用効果がその作用機序の面からも相乗的となるのは当然と考えられる。しかし SMM 耐性菌の場合は主として OMP の葉酸代謝系の 1 点における阻害と考えられ, SMM との併用においても OMP の配合割合が少なくなるにつれ, 段階的に抗菌力が低下することも妥当なことと考えられる。

このように SMM と OMP の配合比が 1:1~2:1 あるいは 1:1~5:1 において明瞭な協力作用が認められたため SO (SMM と OMP を 3:1 および 5:1 に配合) 合剤を調製し, その抗菌力を測定したが, MIC は SMM 耐性菌の場合でも両合剤共に 6.25 mcg/ml 以下であり, 供試菌の大部分は 0.10~0.39 mcg/ml ときわめて低く, すぐれた抗菌力を示し (Table 13), 十分実用に供しうる結果を示し, 今後適切な使用がなされるならば水産領域への応用も可能なことが示唆された。

要 約

サルファ剤としてサルファモノメトキシ (SMM) を, ピリミジン誘導体としてオルメトプリム (OMP) を用い, 両薬剤の単剤および種々の濃度で両薬剤を併用したものについて, 魚類病原細菌に対する試験管内抗菌力試験を実施し, 以下のような結論を得た。

1. 単剤時の MIC は一般にサルファ剤の SMM に比し, ピリミジン誘導体の OMP の方が低く優れた抗菌力を示した。
2. SMM と OMP 両薬剤間の併用効果は *P. fluorescens* EFDL を除く全ての供試菌株において認められ, その効果は SMM 感受性菌において顕著かつ相乗的であった。
3. 相乗作用の強い混合比は SMM:OMP=1:1~5:1 であり, 最適混合比の検討結果においてもこの配合割合で最も強い抗菌力を示した。
4. SO (3:1 および 5:1) 合剤の供試菌株に対する MIC は SMM 耐性菌で 6.25 mcg/ml 以下, 他の菌株では 0.10~0.39 mcg/ml ときわめて低く, すぐれた抗菌力を示した。

謝 辞

本研究の遂行に当たり貴重なる薬剤の分与を頂いた第一製薬株式会社・井上進一氏および共立商事株式会社・岡本雄平氏に厚く感謝申し上げる。

文 献

- 青木 宙・城 泰彦・江草周三 (1980). アユ養殖場における薬剤耐性菌の増加について, 魚病研究, 15, 1-6.

- BULLOCK, G.L., H.M. STUCKEY, D. COLLIS, R.L. HERMAN and G. MAESTRONE (1974). *In vitro* and *in vivo* efficacy of a potentiated sulfonamide in control of furunculosis in salmonids. *J. Fish. Res. Bd. Canada* **31**, 75-82.
- ELION, G.B., S. STINGER and G.H. HITCHINGS (1954). Antagonists of nucleic acid derivatives-VIII. Synergisms in combinations of biochemically related antimetabolites. *J. Biol. Chem.*, **208**, 477-488.
- 五島 瑛智子・金子 康子・原田 公子・桑原 章吾 (1973). サルファ剤とTMPの協力作用, *Chemotherapy*, **21**, 77-86.
- 神谷 春子・渡辺 邦友・二宮 敬字・上野 一恵・鈴木 祥一郎 (1973). Salfamethoxazole-Trimethoprim 合剤の嫌気性菌に対する抗菌作用, 同誌, **21**, 128-136.
- KIMURA, T., M. YOSHIMIZU and M. WADA (1983). *In vitro* antibacterial activity of the combination of sulphadiazine and trimethoprim on bacterial fish pathogens. *J. Fish Disease*, **6**, 525-532.
- 小酒 井望・小栗 豊子 (1973). 臨床材料より最近分離した病原細菌の Salfamethoxazole および Trimethoprim 感受性と両剤の併用効果に関する試験管内実験, 同誌, **21**, 110-116.
- MCCARTHY, D.H., J.P. STEVENSON and A.W. SALSBUURY (1974a). Combined *in vitro* activity of trimethoprim and sulphonamides on fish-pathogenic bacteria. *Aquaculture*, **3**, 87-91.
- MCCARTHY, D.Y., J.P. STEVENSON and A.W. SALSBUURY (1974b). A comparative pharmacokinetics study of seven sulphonamides and a sulphonamide potentiator, trimethoprim, in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). *ibid.*, **4**, 299-303.
- 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・遠野 皆子 (1973). Salfamethoxazole-Trimethoprim 合剤に関する細菌学的評価, *Chemotherapy*, **21**, 88-103.
- ST 合剤研究会, MIC 測定のための小委員会 (1973). Salfamethoxazole と Trimethoprim の感受性測定法, 同誌, **21**, 67-76.
- 吉水 守・木村 喬久・坂井 稔 (1976). サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-I. 飼育魚の腸内細菌数と細菌叢, 日水誌, **42**, 91-99.