



鶏由来黄色ブドウ球菌に対するクロールテトラサイクリンと3-スルファニールアミドイソキサゾールの試験管内における効果, 特に併用効果と耐性について (畜産学)

清水, 晃

---

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 12(2):333-339

(Issue Date)

1977

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00228549>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00228549>



# 鶏由来黄色ブドウ球菌に対するクロールテトラサイクリンと 3-スルファニールアミドイソキサゾールの試験管内に おける効果, 特に併用効果と耐性について

清水 晃\*

(昭和51年8月10日受理)

## EFFECTS *IN VITRO* OF CHLORTETRACYCLINE AND 3-SULFANIL- AMIDOISOXAZOLE UPON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* OF CHICKEN ORIGIN WITH SPECIAL REFERENCE TO COMBINATION EFFECT AND RESISTANCE

Akira SHIMIZU

### Abstract

The synergistic or antagonistic actions between chlortetracycline (CTC) and 3-sulfanilamidoisoxazole (3SI) were investigated *in vitro* as a study of combined antibiotics. A total of 69 strains of *Staphylococcus aureus* were used for the investigation. They were isolated from diseased or apparently healthy chickens and from air samples in chicken houses. The results obtained are summarized as follows.

1. The minimum inhibitory concentrations (MIC) against the 69 strains of *S. aureus* ranged from 0.20 to 25 mcg/ml for CTC and from 25 to 100 mcg/ml for 3SI. Two strains were considered as organisms naturally resistant to CTC.

2. Five antibiotic combinations (whose ratios of CTC and 3SI were made to be 1:1, 1:2, 1:4, 2:1 and 4:1) were prepared in order to compare antibacterial activity with that of each drug alone. The range of MIC against the 67 strains of *S. aureus* was from 0.78 to 3.13 mcg/ml for CTC-3SI combination (1:1), from 1.56 to 3.13 mcg/ml for (1:2), from 1.56 to 6.25 mcg/ml for (1:4), from 0.39 to 3.13 mcg/ml for (2:1) and from 0.78 to 1.56 mcg/ml for (4:1).

3. To examine the CTC-3SI combinations for the effect of preventing the drug-resistance of *S. aureus*, three strains were subjected to 20 serial passages in media which contained increasing concentrations of CTC, 3SI, or CTC-3SI combinations. A rise in the drug-resistance of *S. aureus* was rapid to CTC, but slow to 3SI and the CTC-3SI combinations. CTC-3SI combinations (2:1) and (4:1) especially showed a marked ability to retard the emergence of drug-resistant variants of *S. aureus*.

4. It was clarified that a combination of CTC with 3SI had synergistic activity against staphylococci. In addition, these combinations also demonstrated a retarding effect on the emergence of resistance of staphylococci on serial culture passage.

### 緒 言

鶏のブドウ球菌症は、古くからわが国の鶏群の間に広く蔓延し、これまでもかなりの被害を与えてきた。最

近に至っても本症は各地で集団発生し、養鶏産業の発展に大きな障害となっていることが報告されている<sup>6,12,13</sup>。

これまで本病の治療には、テトラサイクリン系抗生物質が広く用いられ、かなりの効果をあげてきた。いっぽう、本病から分離される黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の薬剤耐性菌の検出頻度は高まっており、

\* 家畜衛生学研究室

なかでもペニシリンとテトラサイクリン系抗生物質に対する低感受性株が目立っていることが注目されるようになった<sup>4,8,10,11)</sup>。このような抗生物質の投与と耐性菌の増加との関係は、本病の撲滅対策上きわめて重要なことからであり、したがって本菌の薬剤耐性化を防止する方策を講ずることは緊急の課題である。

細菌の薬剤耐性化を阻止する手段として、一般に二種類以上の薬剤を合剤として用いられている。したがって、各種薬剤の組合せた合剤の効果を検討しておくことは、本病の予防・治療をおこなう上からも必要なことであると考える。

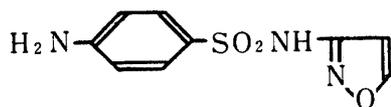
そこで今回は、クロールテトラサイクリンとサルファ剤3-スルファニールアミドイソキサゾールを組合せ、この合剤が、どの程度の併用効果をあげることができるかについて検討をおこなった。その大要について報告する。

### 材料および方法

**供試菌株：**供試菌株は、一部を除き兵庫県下の3養鶏場の病鶏、健康鶏および鶏舎内落下菌から分離された黄色ブドウ球菌計69株である。

**供試薬剤：**薬剤はテトラサイクリン系抗生物質のクロールテトラサイクリン (CTC) とサルファ剤の3-スルファニールアミドイソキサゾール (3SI, 一般名スルフィソゾール) を用いた。合剤はCTCと3SIを1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1の比率で混合したものである。

なお、3SIの化学構造式はつきのごとくである。



**使用培地：**被検菌の増殖には、トリプトソーヤブイヨン培地 (ニッサン) を用い、感受性試験用培地には、CTCに対してはハートインフュージョン(HI)寒天培地(栄研)、3SIおよびCTC-3SI合剤に対してはミューラーヒントン寒天培地(栄研)を用いた。

**感受性試験法：**感受性の測定は、日本化学療法学会標準法<sup>2)</sup>にほぼ準拠した寒天平板希釈法によった。単剤および合剤は滅菌蒸留水で希釈原液を作製した。これらをさらに滅菌蒸留水で2倍階段希釈した後、薬剤の最終濃度が実験に必要な所定濃度となるようにHI寒天培地に加えて平板とした。CTCと3SIの併用効果を調べるために、上記と同様の方法でCTCと3SIの各薬剤2倍希釈系列を作り、これを互いに二次元に組合せたいわゆるボックス型でもって測定した。サルファ剤に対する感受性試験測定値は、接種菌量により大きく影響される

ので、予備実験で菌量などの規定をおこなった。すなわち、接種菌は増菌培地に37°C・18時間培養後、滅菌生理食塩水で1,000倍に希釈し、各平板に1標準白金耳面積塗抹した。そして37°C・24時間培養後、最小発育阻止濃度(MIC)を求めた。

**耐性獲得試験：**各薬剤添加寒天培地に被検菌を接種し、その発育の認められた最高薬剤濃度平板から、次代の薬剤含有培地に菌を移植した。その後漸次薬剤濃度を高めた培地に植継ぎ、その耐性上昇の推移を観察した。なお、各継代における使用薬剤添加培地系列の濃度は、前代で発育した最高濃度を境とした前後4段階の濃度の薬剤添加培地である。

### 実験成績

#### 1. CTCと3SIの併用効果

供試菌16株に対するCTCと3SIの併用効果はFig.

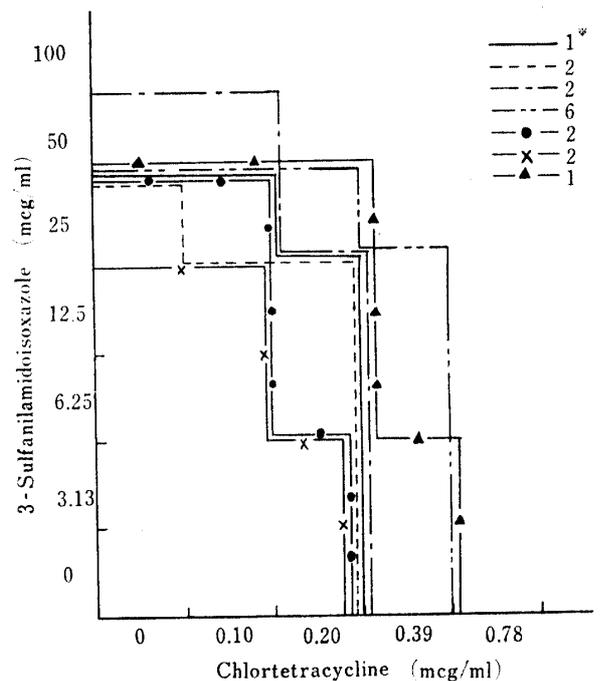


Fig. 1. Combination effect of CTC and 3SI on staphylococcal strains of chicken origin.

#### Remarks.

1. The numbers on ordinate and abscissa indicate drug concentration in mcg/ml potency of medium.
2. The solid line and various broken lines indicate demarcations between the minimal inhibitory concentration (outside) and no inhibitory concentration (inside) of CTC, 3SI and their combination to bacterial growth.

※ Number of strains.

Table 1. Sensitivity of 69 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from chickens to CTC-3SI combinations

Antibiotic*1	Minimum inhibitory concentration (mcg/ml)									
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
CTC	16*2	33	18				1	1		
3SI								54	14	1
CTC-3SI	1:1		18	38	11			1		1
	1:2			32	35			1		1
	1:4			9	55	3		1		1
	2:1		45	2	15	5		1	1	
	4:1			46	21			1	1	

Remarks. \*1. CTC : chlortetracycline, 3SI : 3-sulfanilamidoisoxazole and CTC-3SI : combination of CTC and 3SI at the rate of 1:1, 1:2, 1:4, 2:1 and 4:1.  
\*2. Number of strains.

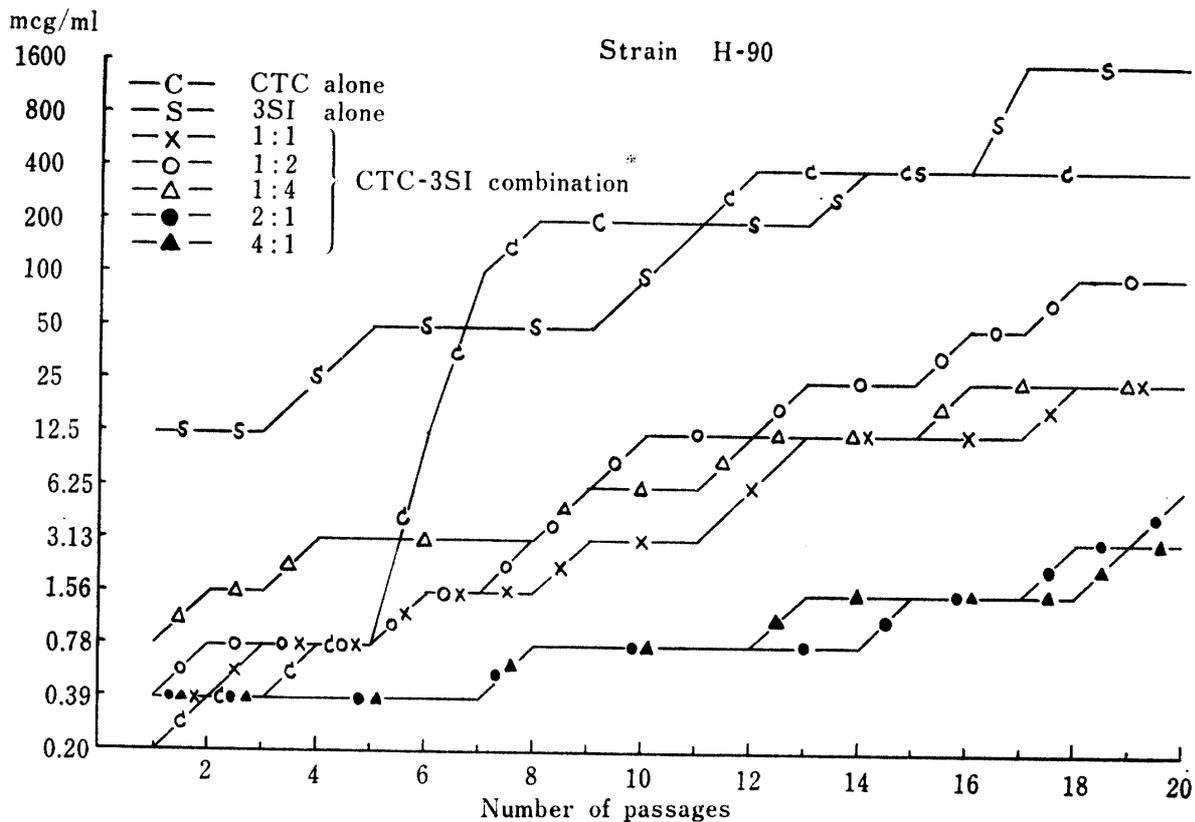


Fig. 2. Effect of chlortetracycline-3-sulfanilamidoisoxazole combination on the development of resistance.  
\* See the footnote of Table 1.

1に示したとおりである。この図の縦横の両軸の数値は、3SIとCTCのそれぞれの濃度を示し、縦軸、横軸の第1列目はいっぽうの薬剤が加わっていない単剤の場合であり、第2列目以降が両剤の組合せを示したものであ

る。また図内に、実線や破線などで階段状に示してある線は、各供試菌株の発育阻止限界(MIC)を示すものである。区画線と縦軸、横軸に囲まれた内側の濃度の組合せでは、菌が発育したことを示し、また区画線の外側

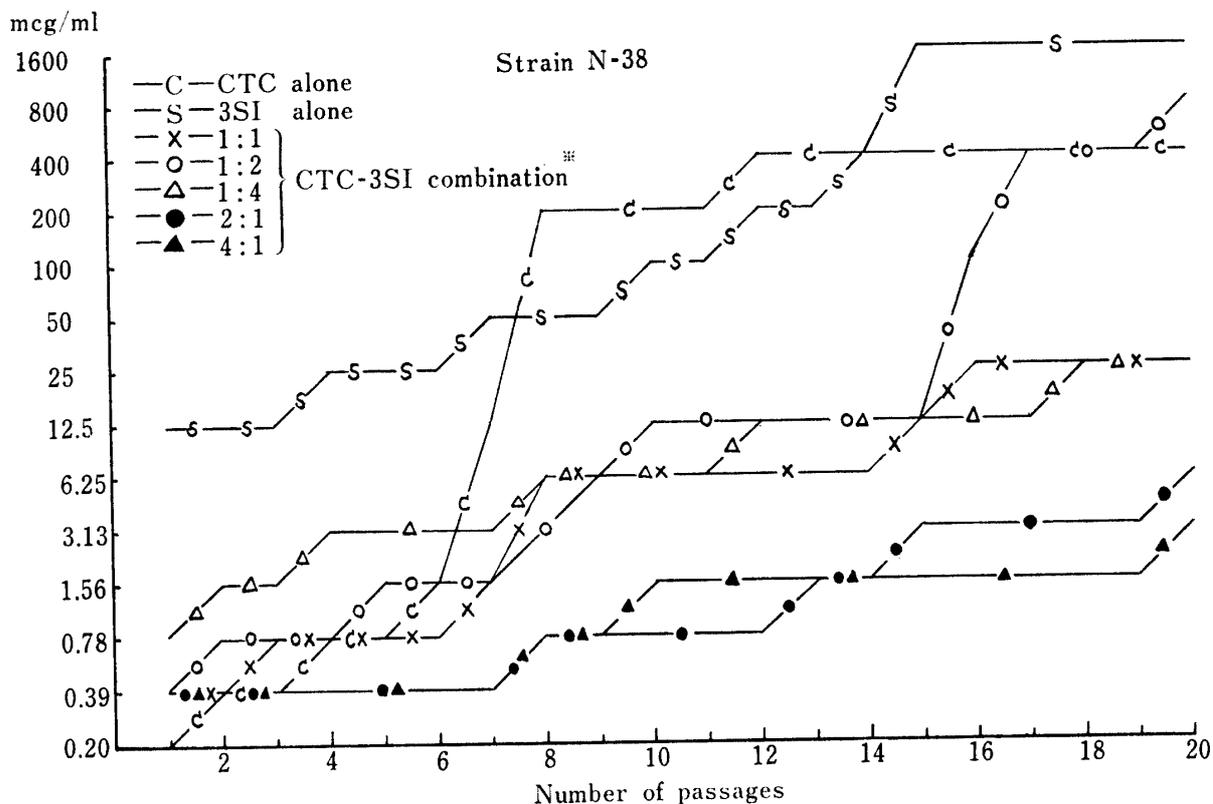


Fig. 3. Effect of chlortetracycline-3-sulfanilamidoisoxazole combination on the development of resistance.  
 ※ See the footnote of Table 1.

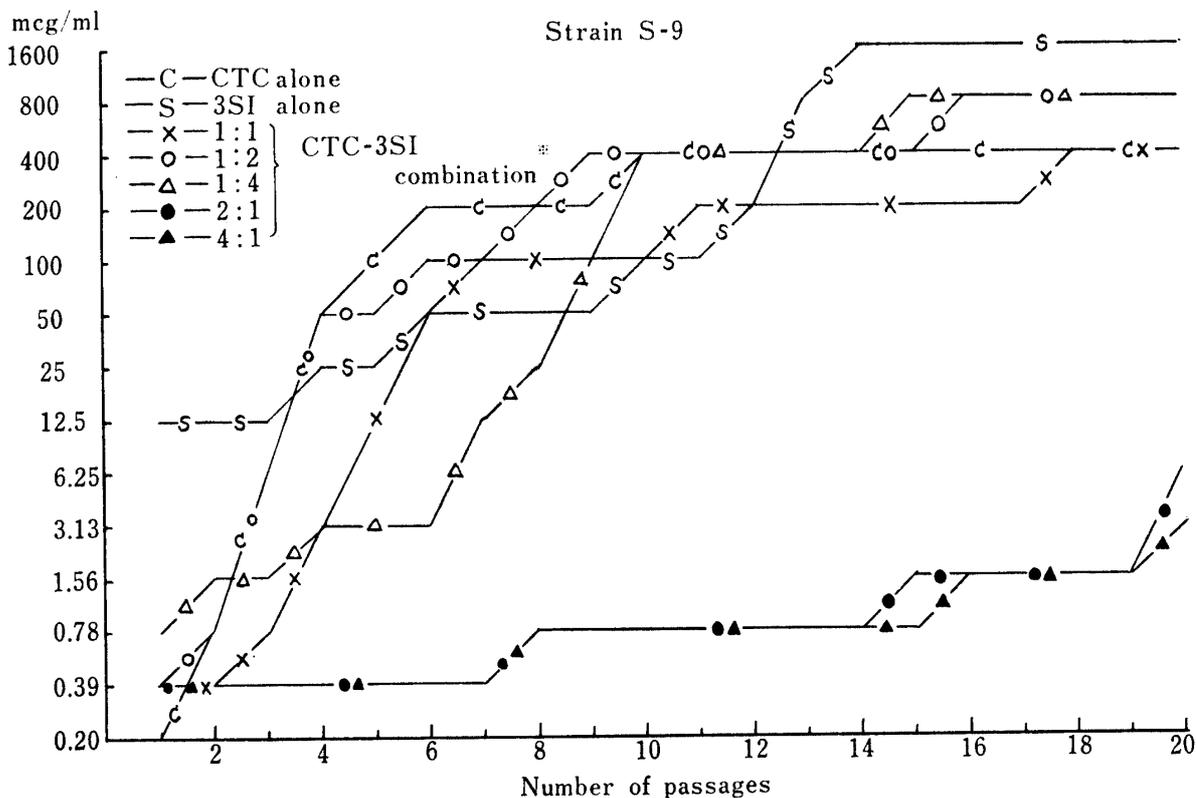


Fig. 4. Effect of chlortetracycline-3-sulfanilamidoisoxazole combination on the development of resistance.  
 ※ See the footnote of Table 1.

Table 2. Retardation of the emergence of resistant variants

Strain	Antibiotic*2	Original strain (MIC,*3 mcg/ml)	Resistant strain*1 (MIC,*3 mcg/ml)		
H-90	CTC	0.20	400	2048*4	
		3 S I	12.5	128	
	CTC-3SI	1 : 1	0.39	25	64
		1 : 2	0.39	100	256
		1 : 4	0.78	25	32
		2 : 1	0.39	6.25	16
		4 : 1	0.39	3.13	8
		CTC	0.20	400	2048
	N-38	CTC	0.20	400	2048
			3 S I	12.5	128
CTC-3SI		1 : 1	0.39	25	64
		1 : 2	0.39	800	2048
		1 : 4	0.78	25	32
		2 : 1	0.39	6.25	16
		4 : 1	0.39	3.13	8
		CTC	0.20	400	2048
S-9		CTC	0.20	400	2048
			3 S I	12.5	128
	CTC-3SI	1 : 1	0.39	400	1024
		1 : 2	0.39	800	2048
		1 : 4	0.78	800	1024
		2 : 1	0.39	6.25	16
		4 : 1	0.39	3.13	8
		CTC	0.20	400	2048

Remarks. \*1 Strain at the 20th passage level in media containing increasing concentration of drugs.

\*2 See the footnote of Table 1.

\*3 Minimum inhibitory concentration.

\*4 Ratio of MIC of the resistant strain to that of the original strain.

の濃度の組合せでは、すべて菌の発育が阻止されている。

Fig. 1 からあきらかなように、供試菌株中6株に対する単剤のMICは、CTCが0.78 mcg/ml、3 S I では50mcg/mlであった。両剤を併用した場合、各単用時のMICよりもそれぞれ1段階低い濃度の組合せ (CTC 0.39mcg/ml+3SI 25mcg/ml) によって菌の発育阻止がみられた。残り10株においても、CTC単剤より1~2段階、3 S I よりも1~3段階低い濃度のいずれかの組合せにおいて菌の発育が阻止され、両者の併用効果が認められた。

## 2. CTC, 3 S I 単剤と合剤の抗菌力の比較

CTCと3 S Iを種々の比率で配合した5種類の合剤を作製し、これら合剤と単剤の抗菌力を同一条件下で比較をおこなった。すなわち、CTCにおけるMICは0.20~25mcg/mlの範囲内であって、供試菌69株の97.1

%が0.78mcg/ml以下で発育が抑制された。3 S Iでは25~100mcg/mlの間にMICがあり、25mcg/mlで約78%が発育阻止された。CTC-3 S I合剤の抗菌力は、1:1の配合剤では0.78~3.13mcg/ml、1:2では1.56~3.13mcg/ml、1:4では1.56~6.25mcg/mlの範囲内においてそれぞれMICが認められ、全供試菌株の97.1%を占めた。また、CTC含有量の多い配合剤のMICは、2:1では0.39~3.13mcg/ml、4:1では0.78~1.56mcg/mlであった。

## 3. CTCと3 S Iの単剤および合剤の試験管内耐性獲得試験

供試菌計3株をCTC, 3 S I各単剤および合剤添加寒天培地に20代累代培養し、人工培地上でのそれぞれの耐性の進展状況を検討した。各菌株ごと区分して示したFig. 2~4からあきらかなように、耐性上昇の推移は、2株(H-90株とN-38株)はほぼ同様の傾向を示したが

他の1株はわずかに耐性上昇の状態が異なっていた。

すなわち、H-90株では、CTCに対する耐性化はきわめて急速であって、継代開始時原株のMICが0.20 mcg/mlであったものが、6代にいたって12.5mcg/ml(原株の64倍)、8代で200 mcg/ml(1024倍)、12代で400mcg/ml(2048倍)となり、以後同様の状態を保持した。また、該株の3SIに対する耐性上昇の度合は12.5 mcg/mlから始まり、5代で50mcg/ml(4倍)、11代で200mcg/ml(16倍)、14代で400mcg/ml(32倍)、最終継代20代目では1600mcg/ml(128倍)と漸次上昇する階段的曲線を描いた。いっぽう、5種の合剤に対する耐性化の様相は、1:1, 1:2, 1:4の配合剤では5代で2~4倍、10代で8~32倍、15代で16~64倍、20代ではそれぞれ64倍、256倍、32倍を示した。この状態は3SIの耐性化とほぼ同様の傾向を呈し、比較的緩徐であった。また、2:1と4:1の配合剤では、ともに耐性化はきわめて緩徐であり、7代まで耐性上昇が認められなかったが、8代目にいたってはじめて2倍となり、最終継代20代目でも16倍、8倍を示したにすぎなかった。N-38株では、1:2の配合剤以外はH-90株とほぼ同様の傾向を示した。

S-9株の耐性獲得状況は、CTC, 3SIおよび配合剤(2:1と4:1)に対しては、前記2株と差異は認められなかった。しかし、1:1, 1:2, 1:4の配合剤では、CTC単剤の場合に類似した上昇曲線を描き、最終継代時では、1024倍、2048倍、1024倍と高度の耐性を獲得していた。

供試菌計3株について、原株とCTC, 3SIおよび合剤加培地に継代させた20代目の株のMICを検査した結果を一括してTable 2に示した。

## 考 察

抗生物質は、単独使用よりも併用した場合のほうが、抗菌スペクトルの拡大、抗菌力の増強、併用剤のうちいっぽうの薬剤に耐性化した場合にも有効、耐性発現の延引あるいは防止、薬剤相互間の毒性・副作用の防止もしくは軽減などに効果があるといわれている<sup>1,5,7)</sup>。また、抗生物質を組合せるとき、その配合が適当でない場合には拮抗作用の現われることも、よく知られているところであり、併用にあたっては、特に薬剤の選択、配合比については十分な考慮が必要である。

今回、CTCと3SI両薬剤の階段希釈を組合せてボックスを組んだ実験において、CTCと3SIとを組合せた場合には、著しい相乗的効果が認められず、相加的作用というべき態度を示した(Fig. 1)。JAWETZ *et al.*<sup>3)</sup>はテトラサイクリンとスルフォアミドの組合せでは、相乗作用をのぞめない組合せであるとのべている。

前述したように、薬剤を併用する場合、その配合比を決定することは、重要な条件のひとつである。このようなことから、今回の実験では、CTCと3SIをできるかぎり多くの割合で配合した合剤を作り、抗菌力および耐性防止効果を検討し、さらに単剤の場合とも比較した。その結果、特にCTC含有量の多い配合剤(CTCと3SIの割合比が4:1, 2:1)では、抗菌性の点においてCTC単剤とほぼ同程度の抗菌力を示した。また、これらの配合剤は、供試菌3株ともに20代継代後にいたっても、原株の8~16倍の耐性を呈したにすぎず、CTC, 3SI単剤に比較して耐性獲得が著しく遅延することがあきらかにされた。しかし、他の配合剤(1:1, 1:2, 1:4)にあつては、各単剤よりも強い耐性抑制効果を示す場合と、3SIあるいはCTC単剤に類似した耐性値を示す場合とがあり、供試菌株によって耐性化の程度が異なっていた。

ところで、今回の実験において、CTCに対するブドウ球菌の耐性獲得状態は、きわめて急速であった。しかし、同一の菌株に対し、先に報告した<sup>9)</sup>テトラサイクリン系におけるオキシテトラサイクリンでは、耐性獲得がきわめて緩慢であった。このように、同一系統の薬剤に対して、菌の耐性獲得状態が異なっていたことは興味深い。

以上のとおり、ブドウ球菌はCTCに対し感受性が高い反面、耐性を獲得しやすく、また3SIの感受性は、CTCに比較して低くかったが、耐性を獲得しにくい傾向が認められた。さらに2:1と4:1の合剤に対しては、CTCに近似した感受性を示し、しかも耐性化がかなり抑制されるという傾向が認められた。このことから、CTCと3SIの併用は、ブドウ球菌に対して、すぐれた抗菌力があり、同時に耐性抑制効果があることが判明した。

## 結 論

鶏由来黄色ブドウ球菌計69株を用いて、これらに対するクロールテトラサイクリン(CTC)と3-スルフェニールアミドイソキサゾール(3SI)の併用効果ならびにCTC-3SI合剤の耐性防止効果について検討し、以下の成績を得た。

1. 供試菌69株の両薬剤に対する最小発育阻止濃度は、CTCでは0.20~25 mcg/ml, 3SIでは25~100 mcg/mlの間であった。

2. CTCと3SIを併用した場合、CTC含有量の多い配合剤(CTCと3SIの比率が2:1と4:1)が、等量(1:1)ないし少ない配合剤(1:2と1:4)に比較して

抗菌力はすぐれていた。

3. 供試菌計3株をCTC, 3SI各単剤および合剤添加寒天培地に20代累代培養し, 人工培地上でのそれぞれの耐性の進展状況を検討した。CTCに対する耐性化はきわめて急速であり, 3SIに対するそれは比較的緩徐であった。合剤に対する耐性化は, CTC含有量の多い配合剤 (CTCと3SIの比率が2:1と4:1) では, 供試菌3株ともに, 20代継代後にいたっても原株の8~16倍の耐性を呈したにすぎず, 耐性獲得が著しく遅延した。他の配合剤 (1:1, 1:2, 1:4) にあっては, 供試菌株によって各単剤よりも強い耐性抑制効果を示す場合と, CTCあるいは3SI単剤に類似した耐性進行状態を示す場合とがあった。

4. CTCと3SIを合剤とした場合, 特に配合比2:1と4:1ではブドウ球菌に対してすぐれた抗菌力を発揮し, また耐性の発現が著しく抑制された。

### 謝 辞

稿を終るに臨み, 種々のご助言を賜わった帯広畜産大学佐藤儀平教授ならびに薬剤の提供を受けた日本レダリー株式会社に感謝致します。

### 引用文献

- 1) 石山俊次: 日本医師会雑誌, **30**, 513-520, 1953.
- 2) 石山俊次, 上田 泰, 桑原章吾, 小酒井望, 古屋暁

- 一, 紺野昌俊, 藤井良知: *Chemotherapy*, **16**, 98-99, 1968.
- 3) JAWETZ, E., J. B. GUNNISON, V. R. COLEMAN and H.C. KEMPE: *Amer. J. clin. Path.*, **25**, 1016-1031, 1955.
- 4) 喜多英治, 岩田明敏: 家畜衛試研究報告, 第55号, 14-20, 1967.
- 5) 真下啓明: 化学療法必携, 改訂第2版, 30-33, 東京・京都, 金原出版, 1971.
- 6) 森脇稔幸, 青木克弥: 鶏病研究会報, **8**, 110-113, 1972.
- 7) 中沢昭三: 抗生物質の基礎知識, 第6版, 72-75, 東京, 南山堂, 1972.
- 8) SATO, G., S. MIURA and N. TERAKADO: *Jap. J. vet. Res.*, **20**, 91-110, 1972.
- 9) 清水 晃: 神大農研報, **12**, 325-331, 1977.
- 10) 清水 健, 柴田重孝: 日細菌誌, **22**, 256-258, 1967.
- 11) SHIMIZU, T., T. TAKIZAWA and S. SHIBATA: *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*, **4**, 214-221, 1964.
- 12) 杉山 明, 長門芳一郎, 今西禎雄: 鶏病研究会報, **11**, 71-77, 1975.
- 13) 屋木敏郁, 黒田博之, 浜忠兵衛, 石川邦生, 佐々木弘, 藪内哲夫: 鶏病研究会報, **9**, 174-179, 1973.