

電位測定による抗菌性物質の検定法

第 III 編

培養液内の発育電位測定による各種抗菌性物質の 併用効果検定

岡山大学医学部細菌学教室 (指導 村上 栄教授)

山 本 穰

〔昭和 29 年 2 月 22 日受稿〕

目 次

I 緒 言	と Terramycin との併用成績
II 実験材料及び実験方法	5. St. aureus に対する Sulfadiazine
III 実験成績	とその他の抗菌性物質との併用成績
1. St. aureus に対する Penicillin と その他の抗菌性物質との併用成績	6. Sal. typhi に対する各抗菌性物質 の併用成績
2. St. aureus に対する Streptomycin とその他の抗菌性物質との併用成績	7. Sal. typhi に対する Sulfadiazine と その他の抗菌性物質との併用成績
3. St. aureus に対する Aureomycin とその他の抗菌性物質との併用成績	IV 総括及び考按
4. St. aureus に対する Chloromycetin	V 結 論
	参 考 文 献

I 緒 言

化学療法剤は、単独にて用いる場合よりも、併用して用いた方がよりその効果の増加するものの在ることは、既に明らかにされて居る。各種抗菌性物質の発見と共に、各々の相互関係に関する研究が行はれ、1943年には、抗菌性物質の併用効果に対する最初の研究として、Ungar¹⁾が、Sulfonamide と Penicillin との併用効果の研究成績を発表して居る。その後 Armstrong²⁾は、Ps. Aeruginosa 及び Prot. vulgaris を用いて、Penicillin, Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin 5種の抗菌性物質の併用効果を、戸川³⁾は、St. aureus を用いて Penicillin, Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin の併用効果を、内藤⁴⁾は、E. Coli

81株を用いて Penicillin, Streptomycin, Aureomycin, Chloromycetin, Terramycin の併用効果を、日置⁵⁾は、St. aureus を用いて Penicillin と Sulfonamide の併用効果を、又、多田、川上⁶⁾は、St. aureus, 枯草菌 P. C. I. を用いて Penicillin と Streptomycin の併用効果を発表して居り、その他 2, 3 の文献がある。

而して、これまで抗菌性物質の併用効果検定には、色々の方法が用いられて居る。即ち、日置⁵⁾は稀釈法を、多田、川上⁶⁾は重層法を用いて居るが、その他検圧法、溶菌法等色々の方法が用いられて居る。然れども、細菌の発育電位測定によつて、薬物の併用効果を検定した報告はない。

そこで著者は、先に好氣的並びに嫌氣的培養液内の菌発育電位測定により、抗菌性物質の効果を検定することが出来ることを知つたので、今回は、この方法を用いて各種抗菌性物質の併用効果を検らべたところ、併用効果の検定に利用し得ることを明にすることが出来たので、報告する次第である。

II 実験材料及び実験方法

実験材料は当教室保存の *Staphylococcus aureus* (寺島株) と 57 *Salmonella typhi* (S型) を用いた。

実験材料の作り方は第I編と同様である。使用した抗菌性物質は、Crystalline Penicillin Potassium, Dihydro Streptomycin sulfate, Chloramphenicol, Aureomycin Hydrochloride, Terramycin Hydrochloride, Sulfadiazine の6種類を使用した。

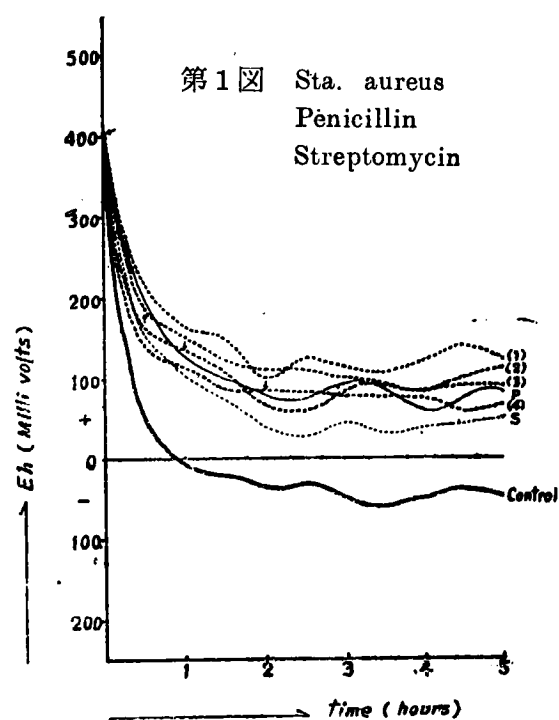
測定に用いる培養液は、第I編と同様、pH 7.2 のペプトン水を使用、容器に30c.c. 入れて用いた。

菌量は第I, II編と同様 7.5mg を使用したが、Sulfadiazine を添加する時のみ 5mg を用いた。

薬物の量はモル濃度にて、各抗菌性物質共に $M \times 10^{-4}$ を使用した。Foster⁸⁾ は、Penicillin の効果には一定の濃度の限界があり、これ以上では薬剤を増しても影響がなく、これ以下でも効果なく、その効果濃度範囲内に於ては、効果は濃度に比例することを述べ、又、吉川⁹⁾ も同様のことを言つて居る。著者は、第I及び第II編の実験成績より、この濃度を濃淡何れにも偏しない適量と考えた。但し、Sulfadiazine は $M \times 10^{-3}$ を使用した。

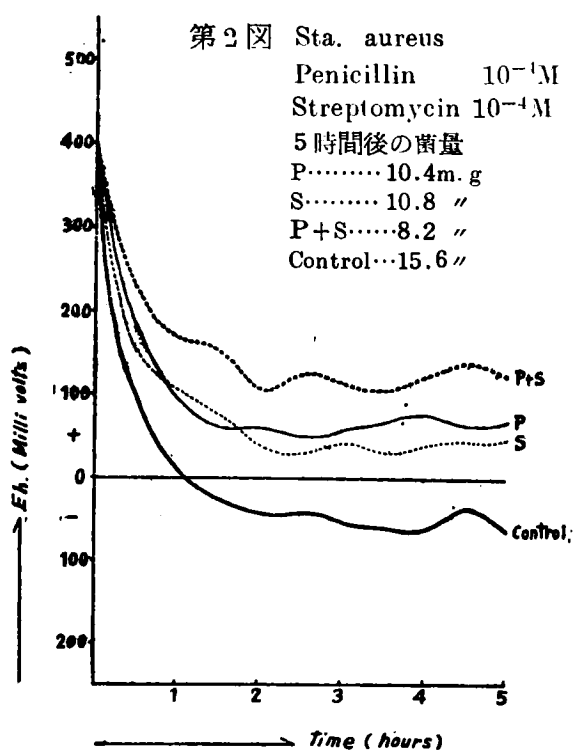
実験装置は、第I編(第1図)に述べたと同一の装置を用いて測定した。

尚、1, 2の予備実験を行つた。先づ、2種の薬物を添加すべき最適な時期的関係を知るため、次の実験を行つた。即ち、第1図に示す如く *St. aureus* 7.5mg に対し、Penicillin $10^{-4}M$ 濃度を菌と同時に添加し、Streptomycin $10^{-4}M$ 濃度を前者と同時、30分後、1時間後、

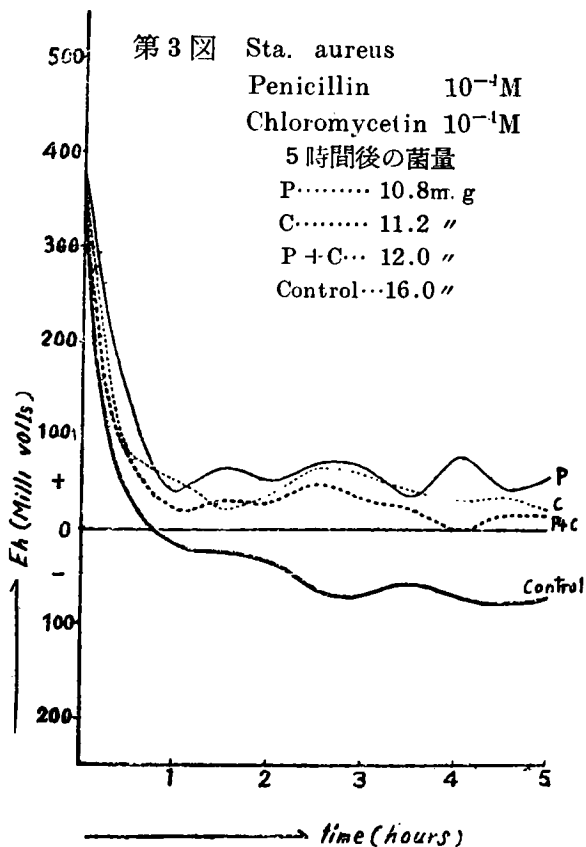


- 第1図 *St. aureus*
Penicillin
Streptomycin
- (1).....Penicillin と同時に Streptomycin を投入
(2)..... " より30分後に " "
(3)..... " 1時間後に " "
(4)..... " 2時間後に " "
P.....Penicillin $10^{-4}M$ のみ
S.....Streptomycin $10^{-4}M$ のみ
(矢印は Streptomycin を添加した時間)

2時間後に投入して測定したところ、菌と同時に2種の薬物を一度に添加した方が、両薬物を各々単独に使用した時より、電位一時間一曲線の下降阻止作用強く、即ち、相乘的に作用した電位一曲線を示し、その他の方法では、Penicillin 単独のものと同じ、又はより低い電位一曲線を示し、そのため判定が困難と考えられたので、薬物の添加時期は、2種共に菌と同時に投入するようにした。更に、電位一時間一曲線と菌の増殖阻止との関係を知るため、次の実験を行つた。即ち、第2図に示す如く、*St. aureus* 7.5mg に Penicillin $10^{-4}M$, Streptomycin $10^{-4}M$ 濃度を添加した場合、両者併用のものは、起始電位(+)395 m. v. より急速に下降して、2時間で(+)100 m. v. となるも一時、2時間半で稍々上昇し、又徐々に下降、4時間半で又稍々上昇するが5時間(+)125m. v. を示し、5時間後光電比色計にて菌量を測定したところ、8.2mgを示して居つた。而し、Streptomycin 単独のもの



は起始電位 (+) 365m. v. より急に下降し、2時間半 (+) 30m. v. を示し、後徐々に上昇し、5時間 (+) 50m. v. で菌量は 10.8mg, 又、Penicillin 単独のものは起始電位 (+) 380m. v. より急速に下降し、1時間半 (+) 60m. v. 後徐々に上昇、5時間 (+) 65m. v.



を示し菌量 10.4mg となり、又、対照は5時間で (-) 65m. v. を示し菌量も 15.6mg に増殖して居た。即ち、薬物を添加した場合に於ける菌の發育電位—時間—曲線と、菌量とが平行的關係を示すことを確認した。尚又、St. aureus 7.5mg に Penicillin $10^{-4}M$, Chloromycetin $10^{-4}M$ 濃度を添加した場合に於ても第3図に示す如く、同様の成績を得た。

以上の予備実験並びに第I及び第II編の実験成績よりして、本実験に於ては菌量 7.5mg, 薬物濃度 $10^{-4}M$ 濃度を用い、薬物添加時期は2種共に菌と同時に投入し、測定時間は30分毎に5時間とした。

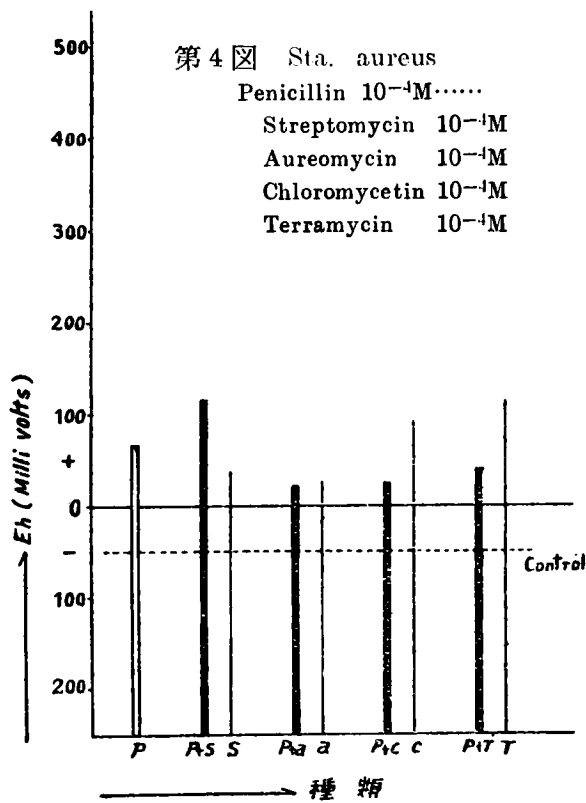
III 実験成績

第I, II編及び上述の予備実験より、可成り大量の菌を接種した場合に於ては、發育電位—時間—曲線は、2時間頃より安定して来ることを知り、更に、抗菌性物質を添加した場合に於ても同様の關係が見られ、而も、その薬物に対する特有の電位—曲線を示して来ることを知った。それで縦軸に電位を取り、横軸に薬物の種類を示して第4図以下に示す如く、薬物を添加してより2時間目から5時間目までの3時間の電位平均値を求め、これを「棒グラフ」により表すと、各薬物相互の關係を容易に比較して見ることが出来るので、以下この方法で実験成績をまとめた。

尚、薬剤の併用効果には、常に相乘的作用と相加的作用の區別が問題となり、試験管内で薬剤の併用効果を見るには、多く稀釈法が用いられて居るが、確定的なものにはなつて居ない。大島⁷⁾は光電比濁計を用いて、細菌の發育曲線が薬剤の添加によつて受ける変化から、薬剤の濃度と作用の關係を示す曲線を求めて、併用効果を量的に検討して居るが、而し、具体的に薬剤の作用の和とは何んであるかが分らなければ、相乘的、相加的を區別することは困難である。電位測定による電位—時間—曲線に於ても、相乘的と相加的を明確に區別することは出来ない故、この場合、抗菌性物質を単独に用いた場合より併用する

時、その作用が増強した場合は総べて相乘的作用として述べる。

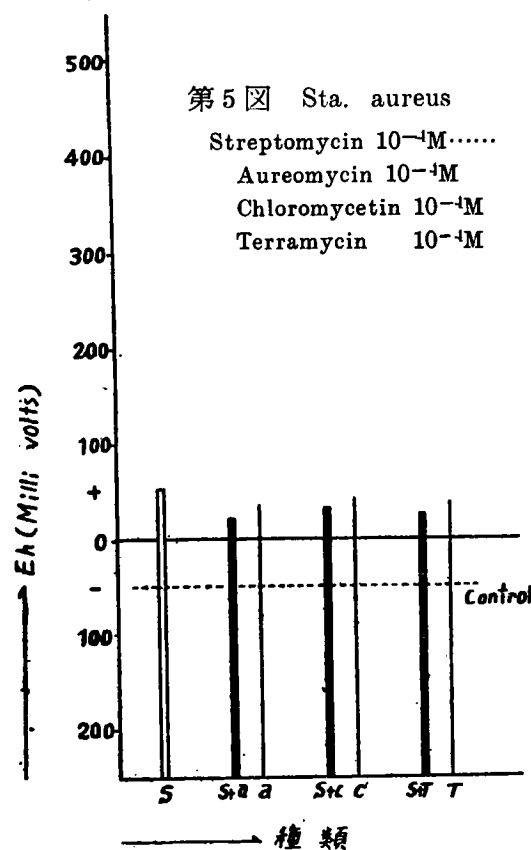
1. St. aureus に対する Penicillin と他の抗菌性物質との併用成績 (第4図)



St. aureus 7.5mg を接種した培養液に、Penicillin $10^{-4}M$, Streptomycin $10^{-4}M$ 濃度を同時に添加した場合の電位は、(+)119m. v. を示して居るが、Penicillin 単独のものは (+) 67m. v., Streptomycin 単独のものは (+) 38m. v. を示す。即ち、両者併用の場合が各単独の場合より菌の増殖阻止効果は大で、相乗作用がある。Penicillin $10^{-4}M$ と Aureomycin $10^{-4}M$ 濃度とを併用した場合の電位は、(+)23m. v. を示して居るが、Penicillin 単独は (+) 67m. v., Aureomycin 単独では (+) 27m. v. を示し、併用の場合が各単独の場合よりその効果は低下し、即ち、両者の併用は拮抗作用がある。Penicillin $10^{-4}M$ と Chloromycetin $10^{-4}M$ 濃度とを併用した場合の電位は、(+) 27m. v. を示して居るが、Penicillin 単独は (+) 67m. v., Chloromycetin 単独では (+) 94m. v. を示し、両者の併用は拮

抗作用を示す。Penicillin $10^{-4}M$ と Terramycin $10^{-4}M$ 濃度とを併用した場合の電位は、(+) 41m. v. を示し、Penicillin 単独 (+) 67m. v., Terramycin 単独 (+) 116m. v. の何れよりも遙かに低い。即ち、両者の併用は拮抗作用を示す。

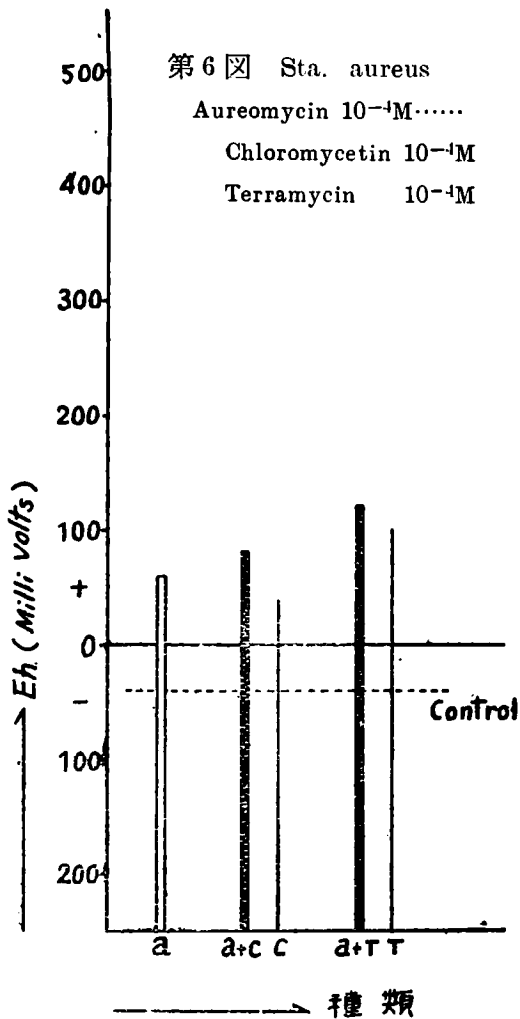
2. St. aureus に対する Streptomycin とその他の抗菌性物質との併用成績 (第5図)



上述の実験と同様の方法で、Streptomycin と Aureomycin, Chloromycetin, 及び Terramycin の併用効果を検した。先づ、Streptomycin と Aureomycin とを併用した場合の成績を見ると、併用の時の電位は (+) 23m. v., Streptomycin 単独 (+) 53m. v., Aureomycin 単独 (+) 37m. v. で、併用の方が各々単独の場合より可成り低い電位を示し、両者の間には拮抗作用がある。次に、Streptomycin と Chloromycetin との併用の場合の電位を見ると、併用 (+) 37m. v., Streptomycin 単独 (+) 53m. v., Chloromycetin 単独 (+) 42m. v. を示し、又、Streptomycin と Terramycin との併用の場合の電位を見ると、併用 (+) 27

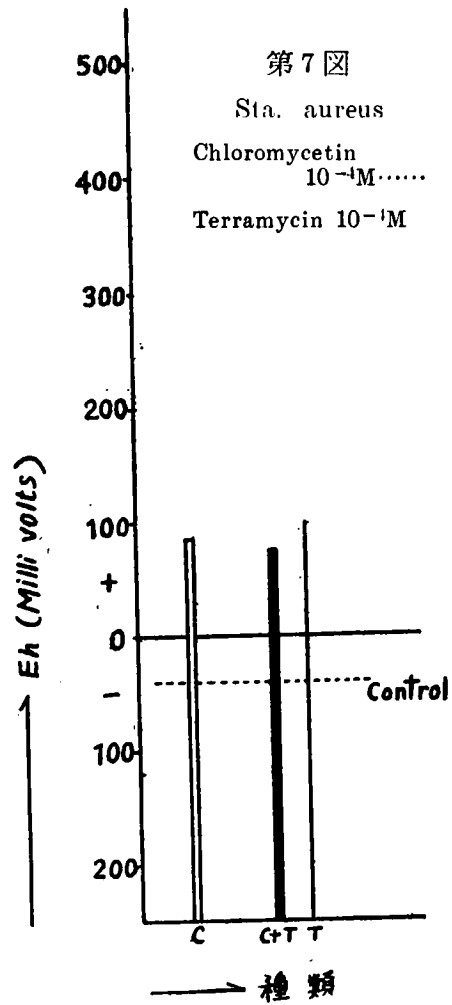
m. v., Streptomycin 単独 (+) 53m. v., Terramycin 単独 (+) 39m. v. で共に併用の方が各々単独の場合より可成り低い電位を示した。即ち、夫々の併用は拮抗作用を示す。

3. St. aureus に対する Aureomycin とその他の抗菌性物質との併用成績 (第6図)



上述と同様の方法で、Aureomycin と Chloromycetin 及び Terramycin との併用効果を検した。Aureomycin と Chloromycetin との併用試験では、併用の電位 (+) 82m. v., Aureomycin 単独 (+) 62m. v, Chloromycetin 単独 (+) 40m. v. を示し、又、Aureomycin と Terramycin との併用効果を見ると、併用の電位 (+) 124m. v., Aureomycin 単独 (+) 62m. v., Terramycin 単独 (+) 103m. v. で両組合せ共に相乗的に作用する。

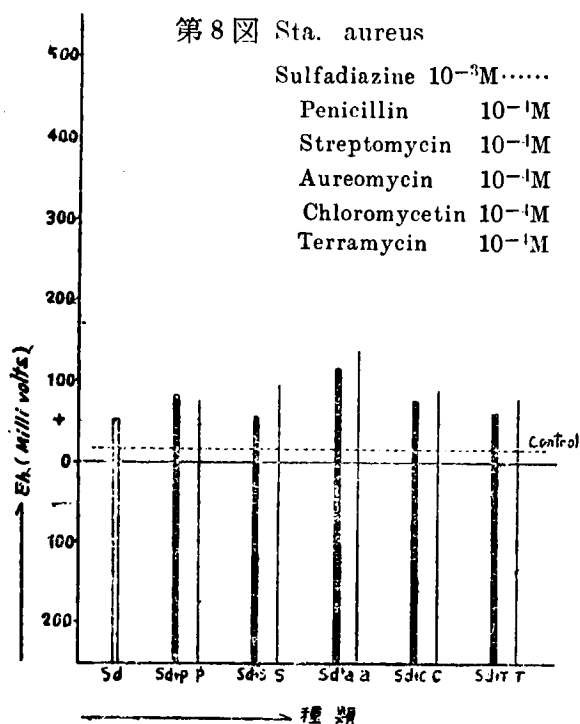
4. St. aureus に対する Chloromycetin と Terramycin との併用成績 (第7図)



Chloromycetin と Terramycin との併用効果は、併用の時の電位は (+) 77m. v., Chloromycetin 単独 (+) 85m. v., Terramycin 単独 (+) 101m. v. を示し、即ち、両者の併用は拮抗作用を示して居る。

5. St. aureus に対する Sulfadiazine とその他の抗菌性物質との併用成績 (第8図)

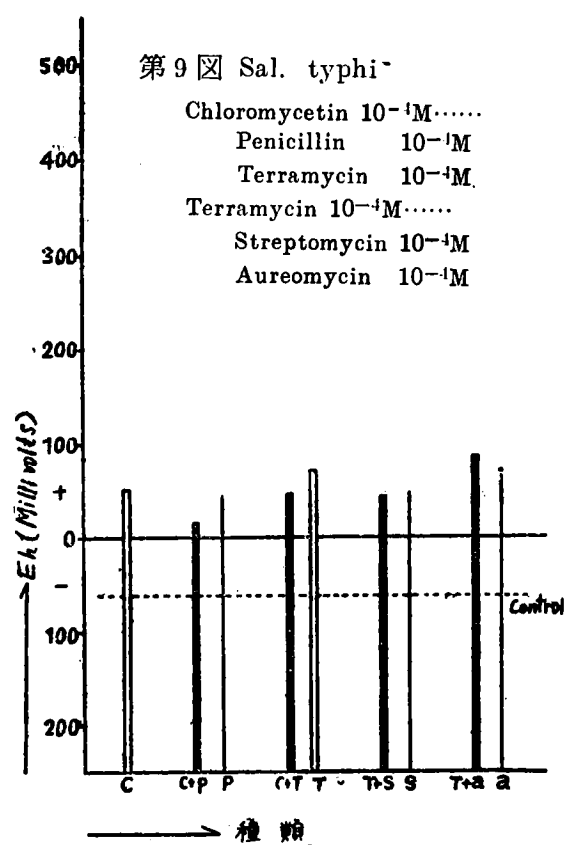
本実験に於ては、これ迄の実験成績に基づいて接種菌量を減じ、St. aureus 5mg を用い、Sulfadiazine も高濃度を用い $10^{-3}M$ 濃度とし、その他の併用抗菌性物質は同様 $10^{-4}M$ 濃度を用いて実験した。先づ、Sulfadiazine と Penicillin との併用効果を見ると、併用の電位は (+) 84m. v., Sulfadiazine 単独は (+) 54m. v., Penicillin 単独は (+) 78m. v. で相乗的に作用する。Sulfadiazine と Streptomycin 併用の場合、併用の電位は (+) 58m. v., Sulfadiazine 単独 (+) 54m. v., Streptomycin



単独 (+)96m. v. で拮抗的に作用する。Sulfadiazine と Aureomycin との併用の場合、併用の電位は (+)117m. v., Sulfadiazine 単独 (+)54m. v., Aureomycin 単独 (+)140m. v. で拮抗的に作用する。而して、前述の Sulfadiazine と Streptomycin 及びこの Sulfadiazine と Aureomycin との併用の場合、共に Sulfadiazine 単独の電位より高く、又、Aureomycin, Streptomycin 各々単独の電位より低い。次に、Sulfadiazine と Chloromycetin と併用した場合、両者併用したものの電位は (+)78m. v., Sulfadiazine 単独 (+)54m. v., Chloromycetin 単独 (+)91m. v. を示し、又、Sulfadiazine と Terramycin と併用した場合、両者併用の電位は (+)62m. v., Sulfadiazine 単独 (+)54m. v., Terramycin 単独 (+)78m. v. で共に併用すると拮抗的に作用する。

6. *Sal. typhi* に対する各抗菌性物質の併用成績 (第9図)

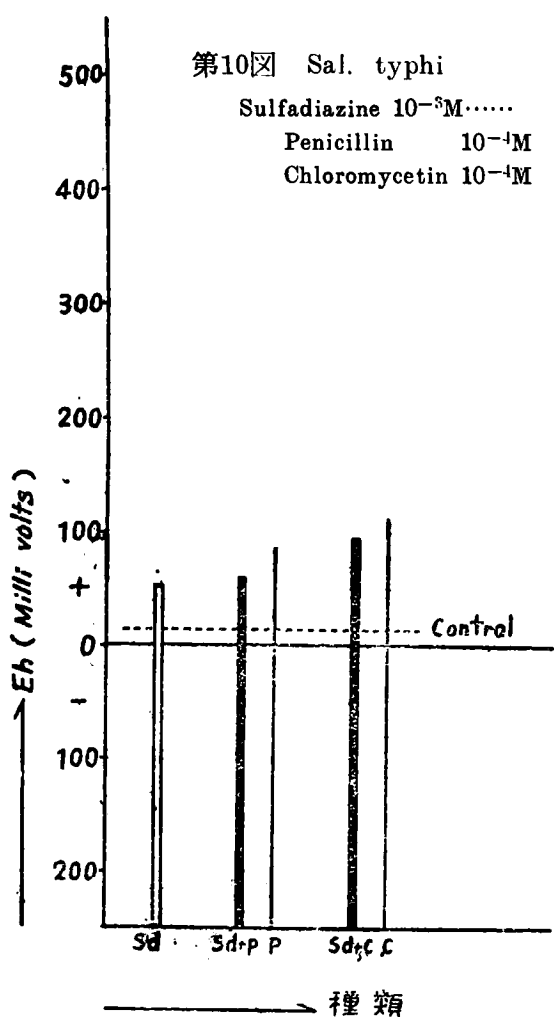
本実験に於ては、菌量及び抗菌性物質の添加量共にこれ迄一般に用いたと同量、即ち、*S. typhi* 7.5mg を接種し、抗菌性物質の添加濃度を $10^{-4}M$ 濃度にした。Penicillin と Chloromycetin との併用の場合、両者併用の電位は (+)16m. v., Penicillin 単独 (+)



45m. v., Chloromycetin 単独 (+)52m. v. を示し、又、Chloromycetin と Terramycin との併用の場合、両者併用の電位は (+)46m. v., Chloromycetin 単独 (+)52m. v., Terramycin 単独 (+)71m. v. を示し、又、Terramycin と Streptomycin との併用の場合、両者併用の電位は (+)44m. v., Terramycin 単独 (+)71m. v., Streptomycin 単独 (+)48m. v. を示し、以上の3者何れも併用すると拮抗的に作用して居る。而して、Terramycin と Aureomycin との併用の場合には、両者併用の電位は (+)86m. v., Terramycin 単独 (+)71m. v., Aureomycin 単独 (+)57m. v. を示し、相乗的に作用して居る。これは *St. aureus* の場合と同様である。

7. *Sal. typhi* に対する Sulfadiazine と他の抗菌性物質との併用成績 (第10図)

本実験に於ては、*S. typhi* 5mg を接種し、Sulfadiazine は $10^{-3}M$ 濃度を用い、他の併用した抗菌性物質は $10^{-4}M$ 濃度を用いた。Sulfadiazine と Penicillin とを併用した場合には、両者併用の電位は (+)61m. v. を示し、



Sulfadiazine 単独 (+) 52m. v., Penicillin 単独 (+) 86m. v. を示し、即ち、拮抗的に作用する。而して、*St. aureus* を用いた場合には、この成績とは反対に相乗的に作用して居る。又、Sulfadiazine と Chloromycetin とを併用した場合には、両者併用の電位は (+) 95m. v., Sulfadiazine 単独 (+) 52m. v., Chloromycetin 単独 (+) 111m. v. を示し、即ち、両者を併用すると拮抗的に作用する。而して、*St. aureus* を用いた場合に於ても同様拮抗的に作用したが、併用の電位が Sulfadiazine 単独のものより高いこともよく一致して居る。

IV 総括及び考按

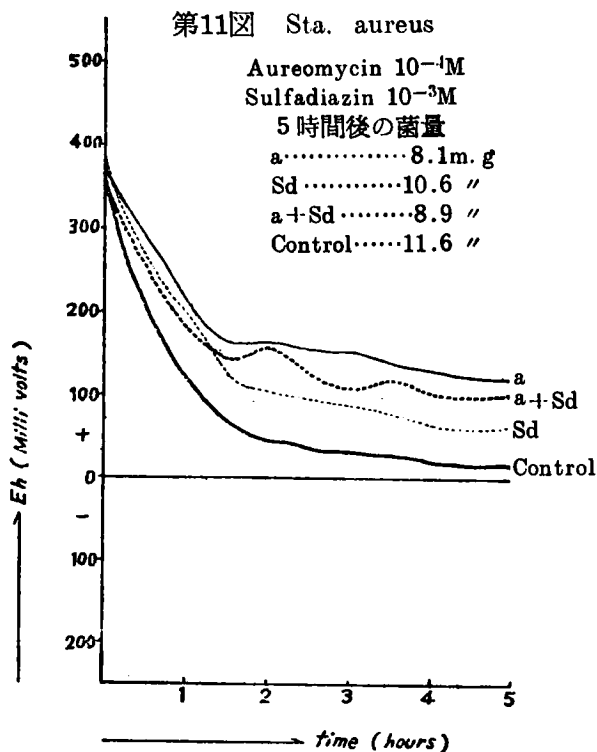
Armstrong²⁾ は抗菌性物質間で、併用による協同作用は、単独使用による菌発育阻止を著るしく強めたと言つて居るが、以上 6 種類の抗菌性物質相互の関係を見るのに、やはり、相乗的に作用するものは第 2 図に示す如く、

電位—時間—曲線に於ても明確に表されて居り、又、光電比色計による菌増殖の測定に於ても同様であつた。

内藤⁴⁾ は、*St. aureus* に対し Penicillin に他の抗菌性物質を併用した場合に於ては、いずれもその効果が著るしく、Streptomycin に他の抗菌性物質を併用した場合がこれに次ぎ、Chloromycetin, Aureomycin 及び Terramycin に他の抗菌性物質を併用した場合には、その効果は余り著明でないと言つて居るが、著者の実験では、Penicillin と Streptomycin, Aureomycin と Chloromycetin, Aureomycin と Terramycin が著明に相乗的に作用し、他は総べて拮抗的に作用した。

戸川³⁾ は、*St. aureus* に対し Penicillin と Streptomycin, Aureomycin と Chloromycetin, Chloromycetin と Terramycin, Terramycin と Aureomycin は協力作用を示したと述べて居るが、著者の実験は、*St. aureus* に於て Chloromycetin と Terramycin は拮抗作用を示した。

Sulfadiazine と Penicillin の併用効果は、多くの人が行つて居るが、吉川⁵⁾ は、Sulfanilamide と Penicillin の併用時に於ける作用増強は、著明なる相乗的増強か、単なる相加的増強か、或いは両剤が互いに牽制し合いつゝ併用の作用は増強されるのかわからないが、検圧法により、併用による作用は増強されると言つて居る。而し、著者の実験に於ては、Sulfadiazine と Penicillin は *St. aureus* に対しては相乗的に作用するが、*S. typhi* に於ては拮抗的に作用して居る。これは Sulfadiazine, Penicillin 共に *S. typhi* よりも *St. aureus* に対し良く作用することによると考えられる。又、Sulfadiazine と Streptomycin, Sulfadiazine と Aureomycin, Sulfadiazine と Chloromycetin, Sulfadiazine と Terramycin は拮抗的に作用するが、Sulfadiazine 単独の電位よりも高く、Streptomycin, Aureomycin, Chloromycetin, Terramycin よりも低い電位を示す。而し、第 11 図に示す如く、Sulfadiazine と Aureomycin 併用の場合、5 時間後



光電比色計にて菌量を測定して見ると、Aureomycin 単独のものは、8.1mg, Sulfadiazine 単独のものは 10.6mg, 2者併用したものは 8.9mg を示して居る如く、Sulfadiazine 自身のために電位に変化を来したものでなく、又、これは戸川³⁾の言う中間作用と同様のものでもなく、Streptomycin, Aureomycin, Chloromycetin, Terramycin の作用が非常に強く働くため、電位—時間—曲線が引き上げられて居るものと考えられる。

V 結 論

1), 第 I, II 編の菌発育培養液内の電位測

定による抗菌性物質の効果検定と同様に、電位測定によつて、抗菌性物質の併用効果を検定することが出来ることを知つた。

2), 好氣的培養液内に於て、*St. aureus* に対し相乘的に作用するものは、Penicillin と Streptomycin, Aureomycin と Chloromycetin, Aureomycin と Terramycin, Sulfadiazine と Penicillin のみであり、拮抗的に作用するものは、Penicillin と Aureomycin, Penicillin と Chloromycetin, Penicillin と Terramycin, Streptomycin と Aureomycin, Streptomycin と Chloromycetin, Streptomycin と Terramycin, Chloromycetin と Terramycin, Sulfadiazine と Streptomycin, Sulfadiazine と Aureomycin, Sulfadiazine と Chloromycetin, Sulfadiazine と Terramycin である。

3), Sulfadiazine と Penicillin は *St. aureus* には相乘的に作用し、*S. typhi* に対しては拮抗的に作用する。

4), *S. typhi* に対しては、Sulfadiazine と Penicillin の他は *St. aureus* と同様の作用を示す。

本論文の要旨は、1953年11月第6回日本細菌学会中国四国支部総会に於て、又、1954年4月第27回日本細菌学会総会で報告した。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲とを頂いた、恩師村上教授に深甚の謝意を表します。

尙、本研究は文部省科学研究費の補助を受けた。厚く感謝する次第であります。

参 考 文 献

- 1) Ungar, J., *Nature*, **152**; 245, 1943.
- 2) Armstrong, C. W. J. & A. E. Larner., *J. Lab. Clin.*, **37**; 584, 1951.
- 3) 戸川悟., *J. Antibiotics*, **4**, (8); 516, 1951.
- 4) 内藤 寛., *J. Antibiotics*, **5**, (8); 463, 1952.
- 5) 日置陸奥夫., *日本臨床*, **6**, 117, 1948.
- 6) 多田 勉, 川上保雄., *J. Antibiotics*, **3**, (10); 659, 1950.
- 7) 大島英義., *J. Antibiotics*, **3**, (6); 374, 1950.
- 8) Foster, J. W., *J. Biol. Chem.*, **144**, 285, 1942.
- 9) 吉川政己., *日新医学*, **34**; 205, 1947.