

# 第一章 緒論

## 1.1 研究緣起

在過去數十年間，格蘭式陽性菌（包括腸球菌及金黃色葡萄球菌）不僅出現對抗生素具抗藥性且不斷的升高。而在醫院的環境中，金黃色葡萄球菌對大部分的抗生素如具  $\beta$ -lactams 類，含 Quinolones（奎寧）及 Macrolides（大分子類）的抗生素具有抗藥性，進而導致具危及生命（life-threatening）疾病。而由抗美錫西林金黃色葡萄球菌（*MRSA*）所導致的疾病，大多由縮氨酸（glycopeptides）類抗生素來治療，而通常拿萬古黴素（Vancomycin）當第一線來控制病情。但因使用頻率過多，已陸續在北美、日本和歐洲在臨床實驗上出現對萬古黴素具中度抗藥性的金黃色葡萄球菌產生，且經由動物實驗也證實有這樣有這樣的風險產生。

本實驗所使用的新一代抗生素：Quinupristin-dalfopristin (Q-D)以重量比 30:70(Q:D)合成，是一水溶性（water-soluble）鏈陽黴素（Streptogramin）而在臨床治療常由靜脈注射進入人體，對大部分的 *MRSA* 和具多重抗藥性的腸球菌有很好的抑制能力新藥是作用在細菌的 Ribosome，即是抑制蛋白質合成，Dalfopristin 是抑制蛋白質合成的早期階段，Quinupristin 則抑制在後期的階段，當他們併用時會表現出協同的作用，僅在 Quinupristin 與 Dalfopristin 以 30 比 70 的比率組成是有益的，兩種藥劑轉變成活性代謝物，有助於抗微生物的作用。除此之外，有多篇文獻指出當 RP59500 和作用機制不同的抗生素混合效應大多呈現協同效應（synergism），如 RP59500 和  $\beta$ -lactam 類（抑制細胞

壁合成) 抗生素或和 glycopeptide (縮氨酸) 類抗生素 (抑制細胞壁合成)<sup>[17,18,20,22,23]</sup>, 同樣的情形也出現在對抗萬古黴素腸球菌 (Vancomycin-Resistant Enterococcus Faecium, *VREF*) , RP59500 和 Ampicillin-Sulbactam (抑制細胞壁合成) 以及 RP59500 和萬古黴素(抑制細胞壁合成) 在 Time-kill curve 下混合效應也出現協同效應<sup>[29,31,32]</sup>, 除此之外, RP59500 和 amoxicillin(抑制細胞壁合成) 對乳酸球菌 (Enterococcus Faecium, *E. Faecalis*) 及腸球菌 (Enterococcus Faecium, *E. Faecium*) 其混合效應呈現相加 (addictive) 作用<sup>[26,32]</sup>。而且 RP59500 和 teicoplanin(抑制細胞壁合成) 或 RP59500 和萬古黴素(抑制細胞壁合成) 對 *E. faecalis* 也呈現協同效應<sup>[28]</sup>。而 RP59500 和 Rifampin (抑制核酸合成, inhibition of nucleic acid synthesis), 對 *MRSA* 混和效應多呈現協同效應<sup>[19,20,23]</sup>, 而 Ciprofloxacin (抑制核酸合成) 和 RP59500 對抗萬古黴素及健大黴素腸球菌 (Vancomycin- and Gentamicin-Resistant Enterococcus Faecium, *VGREF*) 也有試驗出具協同效應<sup>[28]</sup>; 在對 *VRSA*, 混合 sparfloxacin(抑制核酸合成) 和 RP59500 也出現相加效應。除此之外, 仍有少部分和 RP59500 相同作用機制也呈現良好的混合效應, 如 doxycycline 和 RP59500 對 *VREF* 也出現協同效應<sup>[30,31]</sup>; 再者, RP59500 和 tetracycline 對 *VGREF* 也出現協同效應<sup>[28]</sup>, 綜合以上, 可看出雖然出現高度抗藥性的病菌, 但只要 RP59500 和既有的抗生素適當的混合以達協同效應即能有效抑制病菌的滋長也能降低病菌的抗藥性。

從過去, 針對有機毒物之混合毒性進行研究(以螢光菌進行試驗), 根據有機毒物的劑量-反應曲線之斜率及致毒機制為主要分類工具, 對於混合之協力作用 (joint action), 如拮抗效應 (antagonism) 及相加效應 (addition) 和協

同效應 (synergism)，對於相加效應，和拮抗效應，大多毒性物質致毒機制相同，而劑量-反應曲線之斜率較陡峭大多呈現拮抗效應 (antagonism)；而協同效應 (synergism)：大多出現在兩化學物質致毒機制不同，及劑量-反應曲線之斜率比較平緩。而這些在過去本實驗室對螢光菌 (luminescent bacteria) 及大腸桿菌 (E. coli) 的文獻上都有相似結果出現，且對於混合效應出現協同效應在更有相當不錯的預測機率。

藥理學視藥物和毒理學看毒性物質的角度一樣，如藥物對致病菌而言就是一種毒性物質，故上述之預測準則在藥理學上亦有應用價值，例如，應如何選擇混合新一代抗生素和既有抗生素之混合療效有 synergistic 之效果(使療效增大抑制病菌)，即是一個極富研究價值之應用。而且因著不同作用機制抗生素的混合療效，也可降低對病菌的抗藥性能力。因著療效增加，也可降低用藥量，也使得藥物對人體的副作用降低。

本研究之主要目的為將抗生素視為一種毒性物質，而以混合毒性理論為基礎，進行一系列混合毒性研究，藉以進一步探討預測混合毒性之方法，同時，亦可了解前述根據有機毒物對藻類和螢光菌試驗所得之預測準則是否可應用於另一類完全不同之毒性物質 (抗生素) 對 MRSA。若兩者都可得到相同的預測準則，則毒理學則可運到藥理學上，且本研究之成果如能更有效地預測混合效應或 synergistic effect，亦有可能在藥理學方面有些許之貢獻。

## 1.2 研究目的及重要性

毒性物質混合毒性效應對生物物種所造成的作用機制具有很大的影響，由以往的研究發現，毒性物質的作用機制與劑量-反應曲線之斜率間，不同的組合所產生的混合毒性效應也不同，而產生協同效應在藥理學的應用上，即產生藥性增強，對抗藥性強的菌株達到良好抑制效果，是本研究最終的目的。使其在環境及藥理學上都是重大的價值。

在本研究中以 *MRSA* 為測試物種，選定 RP59500 與其他 5 種抗生素做為合併用，其對 *MRSA* 的抑制作用相當於毒性效應，以此試驗來進行混合毒性之研究。



本研究之目的為：

1. 藉抗生素作用機制及劑量-反應曲線斜率關係分類，進行混合毒性研究。
2. 對抗藥性強的菌株，探討 RP59500 與其他抗生素對 *MRSA* 之混合效應，混合療效將是一個值得探討的的課題。
3. 從文獻上討論混合療效的結果，大都採用不同的機制討論，本實驗再加入劑量-反應曲線斜率的關係，增加預測的準確性。
4. 將本實驗結果與 Mtox7 Model 所預測結果相比較，找出彼此的相關性，建立預測混合毒性變化準則
5. 探討抗生素對不同菌株的混合效應研究成果，應用在藥理學上之可能。

### 1-3 研究流程

首先對金黃素葡萄球菌及 MRSA 在目前既有的抗生素抗藥性情形作一個簡單的瞭解，再針對 RPRP59500 對這兩菌株抑制能力和菌株產生抗藥性的情形做一調查。再選擇在文獻上曾和 RP59500 做混合效應的抗生素，選擇五種抗生素參與實驗。

而本研究在做單一毒性試驗之前，先做吸光度和菌種密度關係圖，而後再將吸光度換算成菌種密度求得劑量-反應曲線，再依 Probit Model 求得斜率，截距，EC50 等；同時做單一抗生素的 MIC 值。而混合效應以 Time-kill curve 作反應結果，預測混合效應模式以 Mtox7 Model 為代表，用兩不同抗生素的斜率，截距，EC50 值代入求得。

經以上的試驗結果討論 RP59500 的混合效應，及混合效應與斜率的關係，建立預測協同效應的原則，及討論是否適用於藥理學。

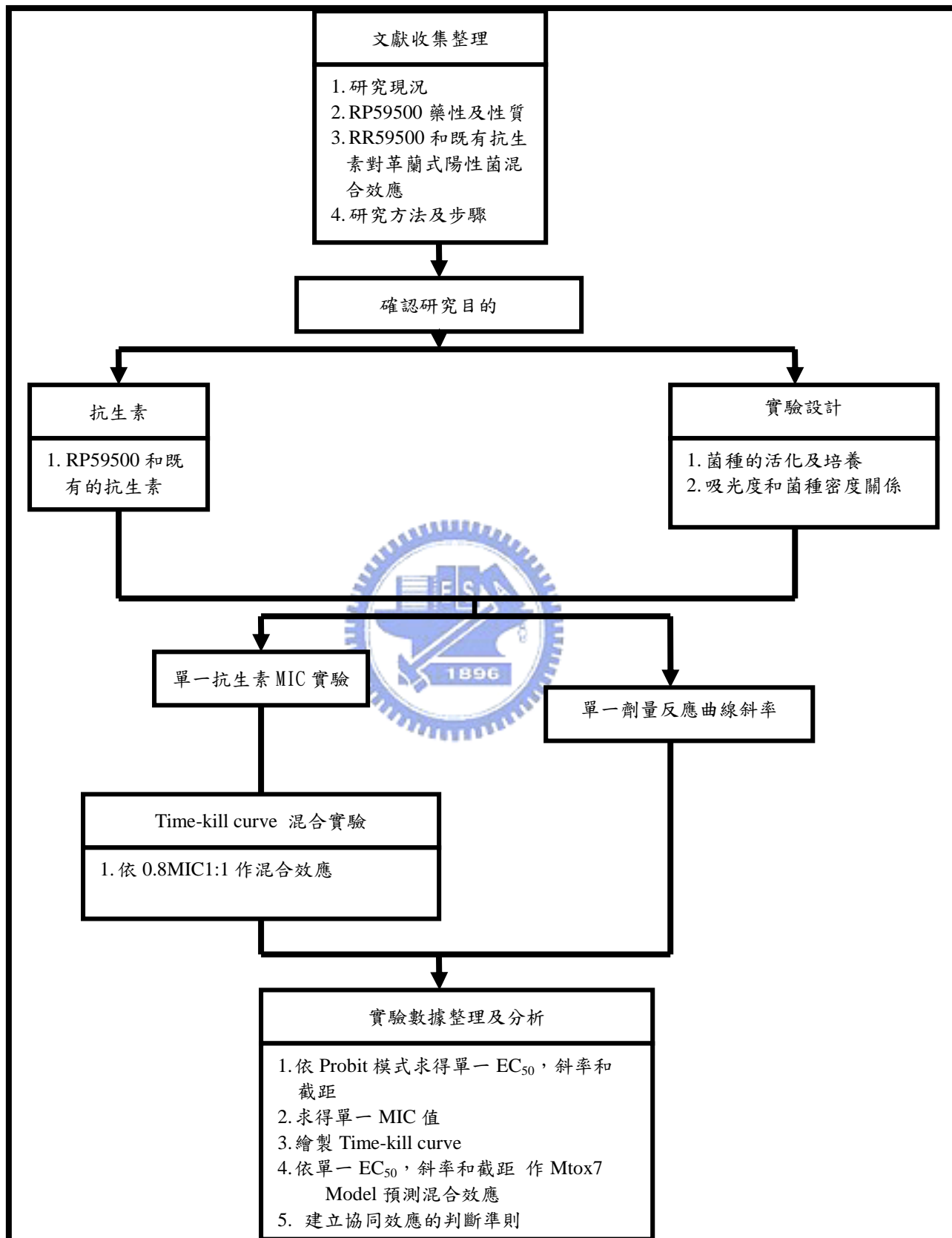


圖 1.1 研究流程圖

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*) 簡介

MRSA (抗青黴素金黃葡萄球菌) 最早發現於 1961 年，為抗 Methicillin 的金黃色葡萄球菌，屬於革蘭氏陽性菌，對許多抗生素有不同的敏感性。依抗藥性機制而分為下面幾類：

1. 合成酵素來破壞抗生素，這是最普遍的抗藥性機轉（如 $\beta$ -lactamase 的存在，使細菌能夠分解盤尼西林 penicillin 或頭芽孢菌素 cephalosporin 的 $\beta$ -lactam(乙型-內醯胺) 環而有抗藥性)。
2. 微生物改變其細胞壁，使藥物不具穿透性，達不到菌體的接受器（在 acet yltransferase 催化下，將氯黴素 chloramphenicol 醯化。
3. 微生物發展出一種改變過的代謝過程，繞過易受藥物攻擊的代謝路徑（改變細菌的 RNA polymerase  $\beta$ 次單元，而阻止 Rifampin 的鍵結。
4. 對美錫西林 (met hicillin) 有抗藥性，與 $\beta$ -lactamase 之產生無關。引起抗藥性基因可能存在於染色體基因。抗藥性機轉為 het eroresistant，主要為 Penicillin-binding protein 改變。

其中 MRSA 即屬於第 (4) 類，金黃色葡萄球菌之抗 Met hicillin 基因經由轉移子 (transposons) 攜帶，進而存在於質體 (plasmid) 上或嵌入細菌染色體中而造成抗藥性。目前國內教學醫院從臨床上可分離出大約六成的 MRSA，其抗藥率很高。所可能引起感染 MRSA 之途徑有外傷之傷口、心內膜炎、膿泡症、肺炎、敗血症等。

### 2.1.1 MRSA 抗藥性之發展

MRSA 抗藥性之發展最早緣起於金黃色葡萄球菌的治療。最早利用抗生素治療金黃色葡萄球菌為 1941 年，利用 Penicillin 治療英國的一位感染金黃色葡萄球菌的警察。因此 Penicillin 有效被利用於治療金黃色葡萄球菌及蜂窩組織炎。十年後，1951 對 Penicillin 具有抗藥性的金黃色葡萄球菌大量產生，Penicillin 從此不在具有良好的治療效果。在 1960 年及 1964 年發現 Methicillin 及 Oxacillin 這兩種抗生素用來取代 Penicillin。但是，在 1961 年對 Methicillin 具有抗藥性的金黃色葡萄球菌首次被報告後的幾年內，MRSA 以成為醫院內感染常見的致病菌，90 年代醫院內感染的金黃色葡萄球菌幾乎是 MRSA。Vancomycin 早於 1956 年已上市，對抗金黃色葡萄球菌極為有效，但因副作用太大，令人聞之卻步。直到 MRSA 的出現，不得不使量，且使用量遽增。但隨著 Vancomycin 的大量使用，Vancomycin 的抗藥性問題與逐漸的浮出表面。



Hiramatsu et al (1997)<sup>[1]</sup>和 Hanaki et al(1998)<sup>[2-5]</sup>宣布首次由病人身上分離出 VRSA，這個 4 個月大的男嬰，1996 年 6 月，因外科傷口感染 MRSA 接受治療，但在使用最後一道防線 Vancomycin 效果也不好，經由更進一步的確認，才發現為 VRSA。隨後，在美國的新澤西州及密西根州也傳出病例。1998 年 3 月紐約州傳出一 70 歲病人感染 VRSA，後來死亡。而在台灣自第一株抗萬古黴素腸球菌(Vancomycin-Resistant Enterococcus, VRE)於 1995 年被發現至今，全島皆有 VRE 之病例傳出。但 VRE 中 VanA phenotype 具有可將 resistance gene transferable 能力，所以在對 Antibiotic 抗藥性的領域裡，這還是大家研究探討及目光注意的焦點，且目前當務之急不僅是發明新一代的抗生素更是能試驗出更多具良好混合效應呈現協同效應 (synergism) 而對其有殺菌的果效。



## 2.2 混合毒性理論與指標之研究發展

最早研究混合毒性實驗係為 Southgate (1932)所發現 trout 對 KCN 和 p-Cresol 的毒性反應不同，而 Xylenol 和 p-Cresol 則具有部分反應相似。而混合毒性理論最早是由 Bliss(1939)<sup>[6]</sup>提出混合毒性作用的量化方程式，並以常態分佈函數（Probit 模式的開端）作為單一毒性物質的劑量-反應曲線，他認為反應相似作用（Similar joint action），具有平行的劑量-反應曲線及全相關（ $\rho = 1$ ）的毒性容忍度，反應獨立作用（Independent joint action）則否，但毒性容忍相關度  $\rho$  介於 0 到 1 之間。

Plackett and Hawlett (1948) 擴充 Bliss 毒性容忍相關度  $\rho$  的範圍使  $\rho$  可為負值。同時以二為常態分佈函數計算毒性反應及  $\rho$ 。Plackett and Hawlett (1959)<sup>[7]</sup>提出非交互作用形式混合毒性理論，此理論基礎乃限制二種毒性物質能同時進行混合毒性試驗，並對於此受體此二種毒性物質無相互影響，即毒性物質單獨對受體作用，二種毒性物質間不可能發生互相反應或彼此競爭受體之鍵結位置，且也假設反應-劑量曲線關係呈一常態分佈更以相似係數（similarity coefficient）綜合討論毒性化學反應的相似性（similarity）和獨立性（independence），當相似係數等於 1，表示反應為相似性，毒性反應的位址完全相同；當相似係數等於零，反應為獨立作用，彼此間的反應位址完全不同。Hawlett and Plackett (1964) 亦就分子運動的原則，提出基於競爭行為的混合毒性模式。Christensen and Chen (1985, 1991)<sup>[8,9]</sup> 擴展 Hewlett and Plackett 的模式，可以任意的使用毒性容忍分佈，不再限於常態分佈，且不再限於兩毒性物質，經由 mapping 可涵蓋任何毒性物質所有的容忍度分佈模式，如 Probit、Weibull 及 Logit 模式。

混合毒性效應指標之發展，最早由 Loewe and Muischnek (1926)<sup>[10]</sup>提出 Isobologram 的概念，而 Sprague and Ramsay (1965)<sup>[11]</sup>則發展出以混合毒性單位 (toxic unit, TU) 來做為判斷混合毒性指標，之後 Marking (1977)<sup>[12]</sup>與 Konemann (1981a, b)<sup>[13,14]</sup> 以此為基礎而分別提出 Additive Index (AI) 和 Multiple Toxicity Index (MTI)兩個指標來做為混合毒性效應的類別。

## 2.3 抗生素之研究發展

### 2.3.1 抗生素 (Antibiotic) 之定義

“抗生素”這個名詞起源於 1942 年，由發明 Streptomycin 之 Waksman 所提議。意指“抗生素為微生物所生產之微量物質，能對他種微生物之生育、生存等呈阻害作用”之稱謂。在自然界裡微生物為了要生育、生存，必須防止他種微生物之侵犯，如真菌、放射菌 (actinomycetes) 的自然代謝產物，它可殺死或抑制微生物的增長。在臨床上所使用的抗菌劑和抗真菌劑都是衍自天然物的發酵，而後用化學方法加以修飾改良使成具有抗細菌或藥理學性質，對病原菌具有特殊效力，而且應對人體本身無害為必須條件。有些藥物則是用合成方法製成 (如奎諾龍 Quinolones)。因此“抗細菌”或“抗微生物”藥物常喜用“抗生素”為詞。

### 2.3.2 化學治療之歷史

自 17 世紀以來，雖然瘧疾原蟲、阿米巴和螺旋原蟲等寄生蟲感染都已能有有效的治療，凡此種種都顯示 Ehrlich 所提出的“化學治療法” (chemotherapy) 的觀念相當合理。化學療法是用化學藥品來治療疾病的方法，目前應用來治療微生物感染性疾病的抗微生物藥劑，有天然抗生素、半合成抗生素及化學

合成藥物等，這些藥物與消毒劑或防腐劑最大的差別是具有選毒性 (selectivetoxicity)，能殺死微生物或抑制其生長，對人體組織毒性較弱，因此可以全身性使用(口服或注射)。Ehrlich 在二十世紀最初十年間所做的實驗導致阿斯凡那明 (Asphenamine) 的發現，是計畫性化學療法首次重大的勝利。

1935 年，Domagk 發現了磺胺劑(Slfonamides)，自此抗微生物化學療法快速發展，邁入了新紀元。Fleming 在 1928 年所發現的青黴素(Penicillin)也在 1940 年由 Chain 和 Florey 證明能做為一種有效的化學治療物質。此後 25 年間，對於化學療藥的研究幾乎全部集中於來自微生物的抗生素(antibiotics)這種抗微生物物質。當青黴素被分離、濃縮、純化、大量生產之後，鏈黴素 (Streptomycin)、四環素(Tetracycline)、氯黴素(Chloramphenicol)及其他種種藥劑也發展起來，雖然這些藥物最初都是從黴菌或鏈絲菌(Sreptomycetes)所生長過的培養基過濾物中分離而得，但後來有些可用人工合成而製得。近年來，利用生物合成法(biosynthesis)來修改化學分子已經成為發展新藥的主要方法。

而本篇這新一代的抗生素 RP 59500 的介紹如下:Quinupristin 和 Dalfopristin (Synercid-Rhone-Poulenc Rorer) 是 Pristinamycin(普那黴素)的半合成衍生物，在美國市場是 Streptogramins(鏈陽黴素)第一個使用在人體上的半合成新的抗菌劑，Quinupristin (喹努普汀)是由三個 Peptide Macrolactones(醯胺巨環內脂)所結合，而 Dalfopristin(達福普汀)是一種單一組成的藥劑。此新藥是作用在細菌的 Ribosome，Dalfopristin 是抑制蛋白質合成的早期階段，Quinupristin 則抑制在後期的階段，當他們併用時會表現出協同的作用，僅在 Quinupristin 與 Dalfopristin 以重量比 30 比 70 的比率組成是有益的。Quinupristin /Dalfopristin 化合物主要對格蘭式陽性菌有很好的抑制效果，格蘭式陽性菌主要的菌種為金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、鏈球菌 (*Streptococcus*)，腸球菌(*Enterococci*)等。

其發展過程，簡示如下：

⊙1495 年：已知最早使用化學物質治療之疾病為梅毒，其於 1495 年最先採用汞為治劑(直至 1910 年，Paul Ehrlich 製成 Salvarsan，而為治療梅毒之用)。

⊙19 世紀

Lister、Koch 最先研究化學治療法。

1908 年，Gelmo 首先製成 Sulfonamides。

1910 年，Paul Ehrlich 製成 arsenical compound—Salvarson 治療梅毒。

1928 年，Fleming 分出青黴素(Penicillin)但產量少且時值 sulfonamide 盛行時期，故未被廣泛採行。

1935 年，Domagk 提出 sulfonamides 的療效。

1939 年，Waksman 發現 actinomycetes 這一類黴菌能夠有效抑制細菌生長。

1941 年，Waksman 將 actinomycetes 這一類黴菌的有效成份 actinomycin 分離純化作為治療肺結核的藥物。然而 actinomycin 的毒性過大，無法作為臨床之用。

1944 年，Waksman 再從 *Streptomyces griseus* 將 streptomycin 純化分離，由動物實驗發現能夠有效地抑制肺結核菌的生長，首度的人體臨床試驗結果證實，streptomycin 能夠治療肺結核病人。

1947 年，Ehrlich 首先發現第一種廣效性抗生物質—chloramphenicol。

重要抗生素的發現者與年代如表 2.1 所示

表 2.1 抗生素之發現者與年代<sup>[38]</sup>

抗生素	發現者	年代
Sulfonamides 磺胺劑	Gelmo	1908
Penicillin 盤尼西林	Fleming	1928
Tyrothricin 短桿菌素	Duboss	1939
Griseofulvin 灰帚黴素	Oxford	1939
Actinomycin A 放線菌素 A	Waksman	1940
Streptothricin 鏈絲菌素	Waksman	1942
Streptomycin 鏈黴素	Waksman	1944
Bacitracin 枯草桿菌素	Johnson	1945
Polymyxin 黏桿菌素 B	Benedict	1947
Chloramphenicol 氯黴素	Ehrlich	1947
Colistin 多黏菌素 E	小山康夫	1947
Aureomycin 金黴素	Duggar	1948
Actinomycin C 放線菌素 C	Brockman	1950
Terramycin 土黴素	Finlay	1950
Carbomycin 碳黴素	Tanner	1952
Erythromycin 紅黴素	Mac Guire	1952
Tet racycline 四環素	Gourevith	1953
Cycloserine 環絲胺酸	Haris	1955
Vancomycin 萬古黴素	McCormick	1956

### 2.3.3 微生物的抗藥性

自從 1961 年，第一株 *MRSA* 在英國被發現以後，幾年內此類抗藥菌株陸續在世界各地散佈，盛行率有與日俱增的趨勢，尤其近年來的相關報告中，由國外一些文獻中，也可得知菌株的抗藥性有慢慢增加的趨勢，Scheel(1996)<sup>[15]</sup> 探討 1988-1993 年間，對 *MRSA* 做測試，以測量 MIC 值來判斷菌株的抗藥性；結果由 MIC 值觀察得知，隨著年代的增加，MIC 值逐年增加，菌株對抗生素抗藥性的百分比也逐年增加。Berger-Bachi & Rohrer(2002)<sup>[16]</sup> 紛紛指出社區型 *MRSA* 所導致的各種感染有漸增的趨勢，而根據美國疾病管制中心全國院內感染調查系統(Center for Disease Control, National Nosocomial Infections Surveillance System)的報告中也顯示，*MRSA* 院內感染率由 1975 年的 2.4% 上升到 1991 年的 29%，到了 1999 年更升高至 52.3%。反觀台灣，根據台大醫院的資料顯示，其院內感染金黃色葡萄球菌的案例中，在 1981 年有 10.6% 是 *MRSA*，至 1992 年已增加到 51.4%。另外，三軍總醫院在 1995 至 1998 年的資料也顯示，其院內感染中 *MRSA* 佔 82.2%，而加護病房的平均比例更高達 91.3%。在台北榮民總醫院的調查報告中，*MRSA* 感染之比率已由 1989 年的 41% 俱增至 1994 年的 86.3%。這些結果說明了 *MRSA* 的感染已成為目前臨床上一個嚴重且值得關注的問題<sup>[40]</sup>。

細菌抗藥性主要可分為非遺傳性 (nongenetic origin) 與遺傳性 (genetic origin) 兩大類：

1. 非遺傳性之抗藥性是由於細菌形狀上之差異或改變所引起的，往往只是暫時性，故只要在給予細菌適當之環境或變回原狀，即可在恢復其對抗生素之感受性。
2. 遺傳性之抗藥性是細菌本來的染色體就有的，或者由染色體外的胞

漿體(plasmids)來傳遞,染色體的抗藥性是由自發性突變(spontaneous mutation)的所造成,此改變往往無法回復,故對抗生素治療感染病之影響甚遠。又可分為下列兩種:

- ◆ 染色體抗藥性:由主宰藥物感受性的基因(locus)發生了自然突變,結果使藥物只抑制感受性細菌,而有利於抗藥性菌種的生長。
- ◆ 染色體外的抗藥性:細菌通常具有染色體以外的遺傳物質,稱為”質體”(plasmid),帶有可造成抗藥性的基因,可生成破壞正常酵素及決定細胞是否主動運輸四環黴素等等。

#### 2.3.4 抗生素的混合併用

合併服用抗生素可能有以下諸原因:



1. 治療混合感染(mixed infection),尤其是對於巨大的創傷(massive trauma)或涉及血管組織的感染,常針對每一種病源而給予各種藥物。
2. 欲獲得協同效應(synergism)來延緩抗藥性(resistant)的產生並提升藥效。但難預測混合作用是否達成協同效應,且配合的藥物有時僅對否菌種產生協同效應。

在對 *MRSA* 之抗生素混合使用上,近年在醫學及學術臨床上,對於 RP59500 和既有抗生素有下列報告。Kang et al., (1995)<sup>[17]</sup> 模擬生物體內受感染的情形,使用 RP5900 與 Vancomycin 對 *MRSA* 及 *MSSA* 做其單獨及混合毒性試驗。結果發現 RP5900 與 Vancomycin 不管針對 *MRSA* 或 *MSSA* 皆能產生毒性加強效應。Kang et al., (1998)<sup>[18]</sup> 使用 RP5900 與 Vancomycin、Gentamycin

和 Ofloxacin 針對金黃色葡萄球菌及腸球菌做其單獨及混合毒性試驗，由 Time-kill curves 顯示對 *MRSA* 或 *MSSA* 皆能產生毒性加強效應，而和 Gentamycin、Ofloxacin 混合為相加效應，由 FIC index 顯示 RP5900 和這 3 種抗生素對 *MRSA* 或 *MSSA* 皆產生相加效應。Sanbatakou et al., (1998)<sup>[19]</sup> 針對 *MRSA* 及 *MSSA* 利用新混合而成的抗生素 RP59500 與其他兩種抗生素 rifampicin, ciprofloxacin 加以混合，用以判斷在生物體中的混合毒性效應，研究結果顯示 RP59500 和 Rifampicin, Ciprofloxacin 混合在 24 小時內，則呈現毒性加強的效應。且產生協同效應的比例 *MSSA* 會大於 *MRSA*。。

Vouillamozet al., (2000)<sup>[20]</sup> 對 8 株 *MSSA* (4 株具  $MLS_B$  敏感型態, 4 株具  $MLS_B$  抗藥型態), 10 株 *MRSA* (5 株具  $MLS_B$  敏感型態, 5 株具  $MLS_B$  抗藥型態) 進行 Quinupristin-Dalfopristin (RP59500) 和其他 12 種抗生素 (Vancomycin、cefepime、Imipenem、Gentamycin、Imipenem、rifampicin、Cefuroxime、Amoxicillin、Flucloxacillin、Cefamandole、Ciprofloxacin、Tetracycline) 混合，由 FIC index 指出大部分對 *MRSA* 及 *MSSA* 的混合結果為相加效應，而有些抗生素 (Cefuroxime, Cefamandole、Cefepime) 對 *MSSA* 混合結果為協同效應。

Fuchs et al., (2001)<sup>[21]</sup> 對十株具  $MLS_B$  抗藥型態的金黃色葡萄球菌 (8 株 *MRSA* 和 2 株 *MSSA*) 進行 Quinupristin-Dalfopristin (RP59500) 和其他 8 種抗生素 (Vancomycin、Cefepime、Ceftazidime、Imipenem、Piperacillin-Tazobactam、Ciprofloxacin、Gentamycin、Rifampin) 混合，大部分的混合結果為相加效應，而有些抗生素 (如 Vancomycin, Gentamycin,  $\beta$ -lactam) 單一時具有明顯殺菌力，但和 RP59500 混合卻會抑制其殺菌活性，表示出拮抗作用。Grif et al., (2001)<sup>[22]</sup> 用 Fosfomycin 與其他 7 種抗生素 (linezolid, Quinupristin-Dalfopristin, Vancomycin, Rifampin, Cefazolin, Meropenem, Moxifloxacin) 對金黃色葡萄球菌和表皮葡萄球菌作混合效應試驗，也發現 Fosfomycin 和 Quinupristin-Dalfopristin 對 *MRSA* 呈現協同效應。Allen et al., (2002)<sup>[23]</sup> 在臨床藥效學模式 (Pharmacodynamic model) 對 *MRSA*、*MSSA* 進行



quinupristin-dalfopristin (RP59500) 和其他 5 種抗生素(Cefepime、linezolid、Ampicillin、Doxycycline、Vancomycin)混合，結果由 Time-kill curves 顯示，針對 *MRSA* 而言 RP59500 和 Vancomycin、linezolid 混合結果為加強效應，而和 Ampicillin 混合結果為相加效應。Saleh-Mghir et al. (2002)<sup>[24]</sup> 從感染 *MRSA* 兔子，以 Rifampin 混合 Vancomycin 或 RP59500 進行混合療效，可看出混合 RP59500 和 Rifampin 有明顯的殺菌力且產生協同效應。Batard et al. (2002)<sup>[25]</sup> 由感染 *MRSA* 兔子心內膜炎試驗中，混合 RP59500 和 Gentamycin 從 Time-kill curves 指出其混合作用為相加效應且可有效抑制 *MRSA* 成長。



表 2.2 為近幾年 RP59500 和既有抗生素混合使用對 MRSA 之研究

Antibiotics	Mode / %effect	Reference
RP59500 + Vancomycin	Synergism / 100%	Kang et al. (1995) <sup>[17]</sup>
RP59500 + Vancomycin ,	Synergism / 100%	Kang et al. (1997) <sup>[26]</sup>
RP59500 +Rifampicin	Synergism / 50~83%	Sambatakou et al. (1998) <sup>[19]</sup>
RP59500 +Vancomycin ,	Additive / 13%	Fuchs et al.
Imipenem ,	Additive / 63%	(2000) <sup>[21]</sup>
Rifampin	Additive / 63%	
+Vancomycin ,	Antagonism / 75%	
RP59500 + Vancomycin	Addition / 50%	Vouillamoz et .al.
Imipenem	Addition / 33%	(2000) <sup>[20]</sup>
Rifampicin	Addition / 50%	
+Cefuroxime	Synergism / 100%	
RP59500 +Fosformycin	Synergism / 100%	Grif et al. (2001) <sup>[22]</sup>
RP59500 + Vancomycin	Synergism / 100%	Allen et al.,
+ Ampicillin	Addition / 100%	(2002) <sup>[23]</sup>
RP59500 + Rifampin	Synergism / 100%	Batard et al., (2002) <sup>[25]</sup>

## 第三章 基本理論

### 3.1 毒性物質劑量-反應模式

當受測試生物受毒性物質作用時，所受影響或死亡的百分率，會隨著毒性物質濃度成 S 曲線關係(圖 3.1)，稱為劑量-反應曲線圖；而 EC50，係指在毒性試驗過程中，造成受測生物 50% 受抑制(或死亡)所需要的毒性物質濃度，在毒性評估方面是相當重要的一個參數。

由於 S 型曲線求取 EC50 (半數致死濃度) 並不易。所以有一些模式則將 S 型曲線轉換成直線形式以利求取。常見的毒性物質劑量-反應模式為 Probit、Weibull 及 Logit 三種模式，Christensen(1984) 曾對這三種模式做比較；發現此三種模式係依據不同的假設發展而成；(1) Probit 模式為假設受體生物對於毒性物質的容忍度為一常態分布，(2) Weibull 模式則是符合毒性物質與受體生物間產生化學鍵結的假設，至於(3) Logit 模式則與 Monod Equation 相似，假設毒性反應形式如同某種酵素反應<sup>[37]</sup>。此種模式在有機毒性物質對 *Microtox bacterica* 之劑量-反應關係的適用上，有文獻<sup>[35,37]</sup>曾對其做過研究，結果顯示在 Probit 模式在三者中無論對反應性有機物或非反應性有機物，均有不錯的適用性。本研究根據過去文獻<sup>[38,43]</sup>所做結果，而以 Probit 模式來選擇使用。

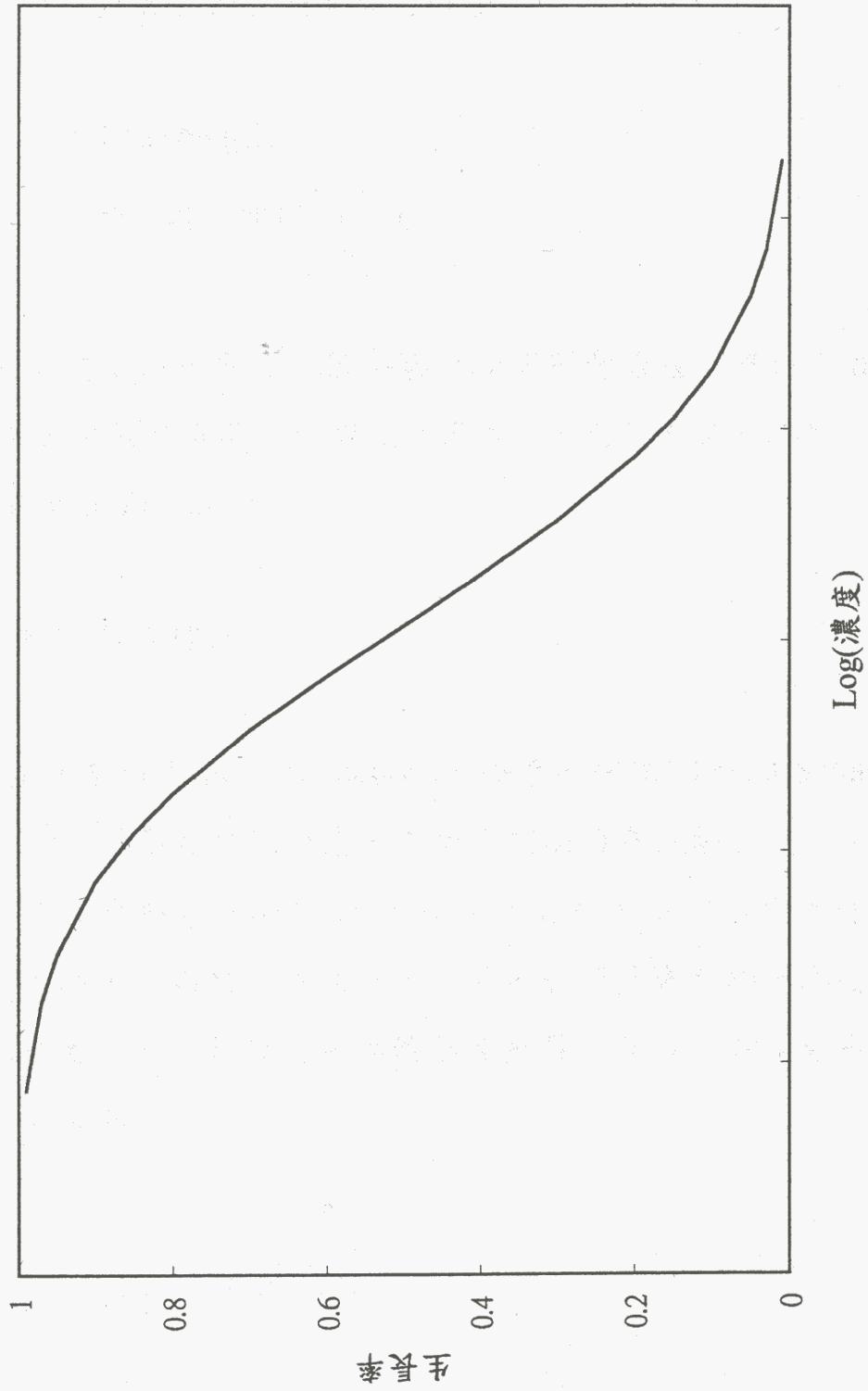


圖3.1 劑量-反應曲線關係圖

Probit 模式，為最常用的劑量-反應模式，除了一些理論基礎外，主要是由實驗經驗所得的一個模式，其係假設生物對毒性物質的容忍度分布為常態分布(Log-normal distribution)，其主要以毒性物質濃度之 log 值與反應率之 NED(Normal equivalent deviation)具有線性關係為基礎，其中反應率即測試生物對毒性物質之反應比率（如死亡率等）。此模式將劑量-反應模式之 S 型曲線，轉換成 NED 尺度上的一直線，原來劑量-反應曲線 50%。

$$Y=A+B\log Z \quad (1)$$

$$P=0.5\left[1+\operatorname{erf}\left(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}\right)\right] \quad (2)$$

其中 Y 為 Probit 單位，A、B 為劑量-反應曲線之截距與斜率，Z 為毒性物質劑量濃度（單位：mg/l），P 為測試物種對毒性物質之反應率（如死亡率等，單位：%），erf 為 error function。

## 3.2 混合毒性理論

### 3.2.1 非交互作用 (non-interaction)

非交互作用混合毒性模式最早由 Hewlett & Plackett (1959) 所提出，為一二維的模式，其限制條件為毒性物質之混合，假設生物反應為非死即生 (quantal)，且毒性物質間不能有交互作用產生。

當生物反應與毒性物質劑量，呈一常態分佈，其毒性試驗之不反應率

(non-response- fraction) 為：

$$Q = \Pr\left(\delta_1 \frac{1}{\lambda_{12}} + \delta_2 \frac{1}{\lambda_{12}} \leq 1\right) \quad (3)$$

$$\delta_i = \frac{Z_i}{\bar{Z}_i} \quad (4)$$

其中，

Q：毒性試驗中，生物不反應部份分率(non-response fraction)，由機率分布函數內的積分區間決定其大小；

Pr：機率分布函數(可能是常態分布函數，或其他分布函數)；生物體對兩毒性物質的容忍度分布，這兩組不同的容忍度分布，有一個相關係數ρ存在；

$Z_i$ ：毒性物質 I 的濃度；

$\bar{Z}_i$ ：單一生物體對毒性物質 I 的毒性容忍濃度；

$\lambda_{12}$ ：相似係數(similarity)，在混合毒性理論中，假設為兩者毒性作用系統相似程度的度量指標，且  $0 < \lambda_{12} < 1$ 。相似係數越接近 1，表示兩毒性物質的作用系統越相近。

Christensen and Chen(1985)<sup>[3]</sup>擴充此二維理論，至涵括多為數學模式，以描述多種毒性物質的混合情況，並將原來的常態分布模式，擴展到容許不同分布模式的一個多維非交互作用混合毒性理論。

以多維常態的生物毒性分布為例，其機率分布函數為：

$$\Pr(\bar{U}) = \frac{1}{(2\pi)^{\frac{n}{2}} [A]^{\frac{1}{2}}} \exp\left(-\frac{1}{2} U * A^{-1} U\right) \quad (5)$$

其中，

$A$  是相關係數矩陣， $A = \begin{bmatrix} 1 & \rho_{12} & \dots & \dots & \rho_{1n} \\ \rho_{21} & 1 & \dots & \dots & \rho_{2n} \\ \dots & \dots & 1 & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & 1 & \dots \\ \rho_{n1} & \rho_{n2} & \dots & \dots & 1 \end{bmatrix}_{n \times n}$

$U^*$  是毒性容忍度經對數轉換後，在 NED 尺度上的向量， $U^* = [U_1, U_2, \dots, U_n]$ ； $A^{-1}$  是  $A$  矩陣的反矩陣， $U^*$  是  $U$  矩陣的轉置矩陣， $|A|$  是  $A$  矩陣的行列式。

將  $A$  矩陣斜角化(diagonalized)後，得到的 eigenvalues  $\lambda_i'$  作旋轉後新的座標軸，可以得到簡化的積分式如下，

$$Q = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{(2\pi)^{\frac{n}{2}}} \exp\left(-\frac{1}{2} \sum_i V_i'^2\right) dV_1' dV_2' \dots dV_n' \quad (6)$$

其中，

$$V_i' = \frac{V_i}{\sqrt{\lambda_i'}} \quad (\text{NEDs}) \quad (7)$$

$V_i$ ：旋轉後的座標軸。

以上的計算可以經由電腦程式 MULTOX(Chen and Christensen, 1984, 1986a, 1986b)<sup>[42,43,44]</sup> 求得。

### 3.2.2 交互作用混合毒性模式

非交互作用混合毒性模式只能描述毒性相加及毒性減弱作用兩種混合毒性效應，Hewlett (1969)提出交互作用混合毒性模式用以描述混合毒性效應的毒性增強作用，以彌補此一缺陷。交互作用及非交互作用混合毒性模式唯一不同的在於相似係數 $\lambda$ 的範圍。在某些情形下，不同毒性物質間的交互作用造成毒性的增加，將非交互作用模式 $\lambda$ 的限制消去， $\lambda$ 可為0到無限大， $\lambda$ 介於0與1之間為毒性減弱作用， $\lambda$ 等於1為毒性相加，即為這些混合毒性效應強弱的度量。

交互作用混合毒性模式積分區間定義式為：

$$\delta_1^{1/\lambda} + \delta_2^{1/\lambda} \leq 1, \lambda > 1 \quad (10)$$

### 3.2.3 混合毒性效應與 $\rho$ 、 $\lambda$ 的關係

而在相似係數 $\lambda$ 與相關係數 $\rho$ 這兩種參數相互配對之下，混合效應模式的 action mode 主要有四種，Response multiplication(RM)、No addition(NA)、Concentration addition(CA)、Response addition(RA)，這四種不同的組合分別可從表 3.1 觀察得知，包括各種 action mode 的 response；兩毒性物質彼此間與相關係數的表現上，如圖 3.2 所示， $Z_1$ 、 $Z_2$  分別代表兩種不同毒性物質之容忍分布，(a)、(b)、(c) 分別是兩毒性物質之相關係數 $\rho = 1$ 、 $-1$ 、 $0$  的情況( $\rho = 1$  表示兩毒性物質容忍分布為正相關， $\rho = -1$  表示兩毒性物質之容忍分布為負相關， $\rho = 0$  表示兩毒性物質之容忍分布為不相關)。

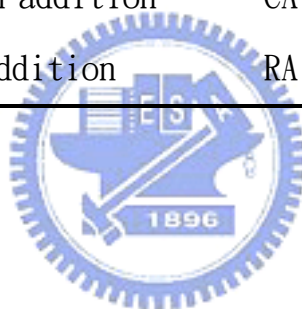
經由以上的理論數學模式推導，可知在相關係數 $\rho$  值趨近於 $-1$  時，亦即在兩毒性物質呈現負相關的情況，且同時劑量-反應曲線之斜率同樣很小，方能有毒性加強之協同效應產生，在模式分析上，則其 action mode 為 Response



addition ◦

表 3.1 Definitions of basic modes of action

Parameter values		Type of action	Abbreviation	Response
$\rho$	$\lambda$			
0	0	Response multiplication	RM	$1-(1-P_1)(1-P_2)$
1	0	No addition	NA	$\max (P_1, P_2)$
1	1	Concentration addition	CA	-
-1	0	Response addition	RA	$\min (1, P_1+P_2)$



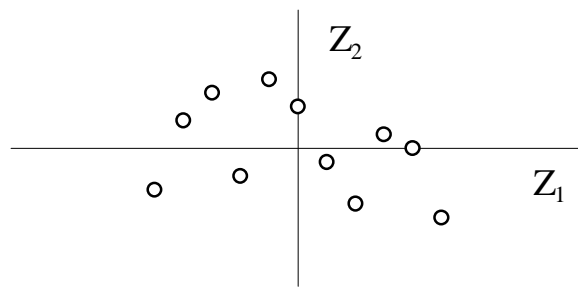
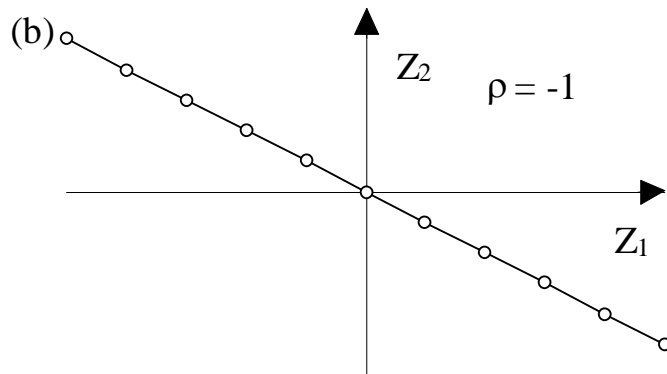
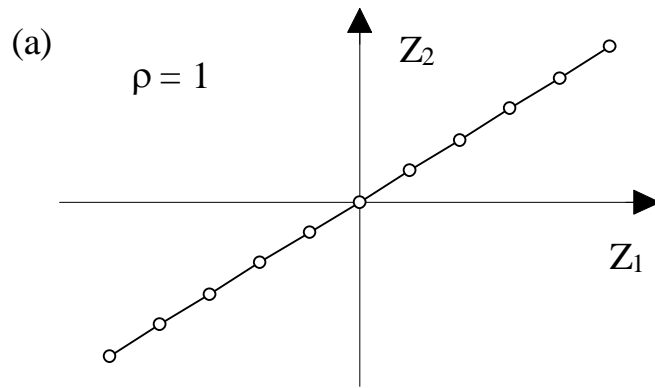


圖 3.2 兩毒性物質相關度之關係圖(a)正相關， $\rho = 1$  (b)負相關， $\rho = -1$  (c)不相關， $\rho = 0$

### 3.3 混合毒性指標

1.一般研究常用來判斷毒性物質之混合毒性效應的指標有混合毒性單位(toxic unit, TU)、加成指標 (additive index, AI)。以下就本研究中可能使用到的指標做一介紹。

混合毒性單位的定義如下：

$$TU = \sum_{i=1}^n \frac{Z_i}{\bar{Z}_i} \quad (11)$$

其中

$\bar{Z}_i$  代表受體生物對於混合毒性試驗中之某一種毒性物質在單一試驗中的 EC50(LC50)值；

$Z_i$  為混合毒性試驗中各個組成的毒性物質之濃度；

$n$  則代表在混合毒性試驗中所選取之單一毒性物質的數目。

當混合毒性單位若大於一 ( $TU > 1$ )，代表混合毒性效應為毒性減弱 (antagonistic)；若混合毒性單位等於一 ( $TU = 1$ )，代表混合毒性效應為毒性相加 (additive)；若混合毒性單位小於一 ( $TU < 1$ )，代表混合毒性效應為毒性加強 (synergistic)。

#### 2.加成指標

Marking & Dawson(1975)以 isobole 觀念為基礎，同時引進毒性單位理念，提出加成指標值(additive index, AI)，將混合毒性以一定量指標值表示：

$$S = \frac{Am}{Ai} + \frac{Bm}{Bi} + \frac{Cm}{Ci} + \dots \quad (12)$$

其中

C, ... 為毒性物質

i, m 分別代表毒物混合前及混合後之 EC50 值，

其判斷方式為當指標值 S 小於一時，表示毒性加強現象，而等於一和大於一，分別表示毒性加成與毒性減弱現象。



### 3.4 抗生素的作用機制

理想的抗微生物劑應具有選擇性毒性，亦即該藥只對微生物有害而無傷宿主。理想的藥物應在宿主可忍受的濃度下便可殺死寄生物。選擇性毒性可能是結合藥物的專一性接受器的函數，也可能取決於藥物只對寄生物基本生化反應所具有的抑制作用。而目前大多數抗微生物藥物可用五種作用機制加以區分，分別為：

1. 抑制細胞壁合成：抑制細胞壁的合成時，細菌必須處於生長及產生新細胞的階段，因細菌不能合成正常細胞壁，最後將造成死亡，已形成細胞壁之細菌或處於靜止生長其將不受此類抗生素之影響。此類抗生素常見有 Pencillin(青黴素類) 類、Cephalosporin(頭孢菌類) 、Vancomycin 和其他  $\beta$ -lactam 抗生素等。
2. 抑制細胞膜合成：細胞膜是一種選擇性通透膜具有主動運輸的功能，故能控制胞內的成分。如果細胞膜失去功能的完整性，則一些大分子及離子便會溢出細胞，細胞也就會被傷害致死。此類抗生素如多黏桿菌素 (Polymyxins)。
3. 抑制蛋白質合成：此類抗生素會與細菌內之核糖體(ribosome)結合，抑制蛋白質的合成，而無法維持細胞的正常功能。若此類結合為不可逆性，細菌將會死亡，若為可逆性，則此藥物為抑菌劑非為殺菌劑。一旦把抑菌劑去除，細菌即可回復蛋白質之合成而恢復細菌之正常功能，並開始生長；此類藥物有四環黴素 (Tetracycline) 、氯黴素 (Chloramphenicol ) 、林可黴素

(Lincomycin)、克林達黴素(Clindmycin)。

4. 抑制核酸合成：有些抗生素能嵌入 DNA 分子，使其結構改變或使其交連 (cross-linking) 造成雙股 DNA 無法分開，以致無法複製或轉錄。此類抗生素有立放平 (Rifampin)、拿利底喜克酸 (Nalidixic Acid)，必利滅殺 (Pyrimethamine)、磺胺劑 (Sulfonamides) 等。
5. 抑制細菌之主要代謝：有的物質能干擾菌體之合成代謝，譬如氨苯磺胺 (Sulfanilamide) 可阻止葉酸之合成。對安息香酸 (p-aminobenzoic acid, PABA) 為合成葉酸之重要成分，但氨苯磺胺之分子構造與 PABA 甚為類似，即可與之發生拮抗效應，而與某一合成酶結合，使得葉酸之生成受阻。葉酸為細菌生長所必需，若無此物質，即趨死亡。此類藥物另有對氨基柳酸 (p-Aminosalicylicacid, PAS)，對結核病有療效。

表 3-2 常用抗生物質之作用機轉

作用機轉	常用抗生物質
抑制細胞壁合成	Penicillin <sup>[38]</sup>
	Cephalosporins <sup>[38]</sup>
	Vancomycin <sup>[38]</sup>
	Ampicillin <sup>[39]</sup>
	Imipenem*
	Cefuroxime <sup>[39]</sup>
改變細胞質膜	Polymyxin B <sup>[38]</sup>
	Amphotericin B <sup>[38]</sup>
	Nystain <sup>[38]</sup>
抑制蛋白質合成	RP59500 <sup>[26]</sup>
	Tetracycline <sup>[39]</sup>
	Gentamycin <sup>[38]</sup>
	Kanamycin <sup>[38]</sup>
	Ethionamide <sup>[38]</sup>
抗代謝能力	Sulfonamide <sup>[38]</sup>
	Novobiocin <sup>[39]</sup>
抑制核酸合成	Rifampin <sup>[39]</sup>
	Nalidixicacid <sup>[39]</sup>

\* : <http://www.tzuchi.com.tw/file/DivIntro/drug/med36/m3.htm>

表 3.3 抑制細胞壁合成抗生素之作用機轉<sup>[38][39]</sup>

抗 生 素	作 用 機 轉
Penicillin Cephalosporin C	不阻害細菌細胞壁 Glycopeptide 之直鏈狀聚合物之形成。但阻害 Peptide 轉移反應，亦即阻害由 Peptide 之 Cross-link 反應，直鏈狀 Peptide 變成立體的網狀構造。
Cycloserine	因構造類似 D-alanine，所以成為 D-alanine 拮抗物質，阻害 D-alanine-D-alanine 合成酵素及 Alaninerase-mase 兩合成機構。
Bactracin	作用在細胞壁合成的第二階段-能抑制磷脂焦磷酸（Phospholipid pyrophosphate）轉化成磷脂，而這個反應是細胞壁合成過程中再生脂質攜帶者所必須的。



表 3.4 改變細胞質膜抗生素之作用機轉<sup>[38][39]</sup>

抗 生 素	作 用 機 轉
Polymyxin B	它是陽離子清潔劑，會破壞細胞膜的脂蛋白。
Amphotericin B	它們較易與 ergosterol 結合，而 ergosterol 是真
Nystatin	菌細胞膜的主要固醇 (sterol)，然而，它們對 動物細胞膜的固醇-膽固醇親和力非常低，結果 造成細胞膜破裂。

表 3.5 抑制蛋白質合成抗生素之作用機轉<sup>[38][39]</sup>

抗 生 素	作 用 機 轉
Chloramphenicol	在不阻害細菌之核酸合成系條件下，僅特異的阻 害蛋白質之合成。亦即不阻害 Aminoacyl t-RNA 之 形成，而阻害在 Ribosome 上合成 Peptide 之初期 反應。
Tet racyclines	抑制胺基醯-Trna (aminoacyl-tRNA)與 30S 核糖體 次單元結合，目前已知道它們多價陽離子有高親 和力，因而使它們能夠阻斷蛋白質的合成。
Aminoglycosides	這類藥物會與 30S 核糖體次單元結合，其詳細的 作用機轉尚不清楚。
Fusidic acid	直接與 translocase 產生交互作用，而此酵素參與轉
Cyloheximide	位反應。

表 3.6 抗代謝能力抗生素之作用機轉<sup>[38][39]</sup>

抗 生 素	作 用 機 轉
Asaserine	係一種 L-麩氨酸之拮抗物質，阻害與麩氨酸有關連之三個反應，尤其對從 N-Formylglycine-amine 合成 N-Formyl-glycine amydine 之反應。
Hadacydine	阻害由 IMP 合成 Adenyl-succinic-ribotide 之反應。

表 3.7 抑制核酸合成抗生素之作用機轉<sup>[38][39]</sup>

抗 生 素	作 用 機 轉
Actinomycin D	特異的阻害 RNA 之合成，因而阻害誘導酵素之生合成，雖能於 DNA 結合，但在高濃度時能阻害 DNA 之生合成。
Nalidixic acid	抑制細菌 DNA gyrase，此酶與 DNA 複製和轉譯 (transcription) 有關連。
Rifampin	抑制原核細菌依賴 DNA 的 RNA 聚合酶 (polymerase)。
Novobiocin	抑制 DNA gyrase

### 3.5 抗微生物作用效力的測定

抗微生物作用效力(Antimicrobial activity)的大小可從其抑制菌體之生長所需之最低劑量濃度測量上得知，其數值稱為最低抑制濃度(Minimum inhibitory concentration，簡稱為 MIC)。可用以下兩種方法：稀釋法或擴散法。利用適當的、標準的試驗性微生物，以及一種已知的藥物樣品作為比較，則這兩種方法均可用於評估樣品中藥物的功效以及微生物的感受性。

1. 稀釋法 (Dilution method)：在各個液體或固態的培養基中加入稀釋成不同濃度的藥物，然後將菌種加入其中，經定溫培養後觀察結果。能抑制細菌生長的最低濃度，稱為最低抑菌濃度 (Minimal inhibitory concentration, MIC)，能殺死細菌的最低殺菌濃度 (Minimal bactericidal concentration, MBC)。本研究採用此種方法。
2. 擴散法 (Diffusion method)：將待測的細菌以種菌環均勻塗在瓊脂培養基上，然後將含有定量濃度藥物的濾紙盤 (Filter paper disk) 放在此塗滿細菌之固體培養基上，然後將含有定量濃度藥物的濾紙盤 (Filter paper disk) 放在此塗滿細菌之固體培養基上，定溫培養後，濾紙盤上的藥物會擴散出去，觀察濾紙盤周圍是否有澄清的抑制環出現，其直徑大小可做為藥物對該菌抑制力大小的指標。若細菌對該藥物有抗藥性，則無抑制環的出現。

影響抗微生物作用效力的因素有因為其影響因素有很多，包括有環境中的酸鹼度、培養基的成分、藥物的安定性、接種量、定溫培養時間的長短、微生物的代謝活性等。微生物會因為這些因素而改變其對抗生素的作用效力。

如果所有條件全都嚴格予以標準化，則可就不同的抗生素判斷其對於細菌的抑制力，因此而能評估出某種抗生素劑在抑制各種菌體上的能力。

### 3.6 抗生素的併用

臨床上用來治療病原菌的感染，大部分使用單一抗生素來作為治療。不過除了單一抗生素治療外，還有使用混合用藥的方法，係利用兩種以上的抗生素來作為治療。

兩種抗生素同時作用於同一種微生物族群時，可能有以下各種效應（圖 3.9）：（1）不相關（indifference），即聯合作用效果未大於單獨使用一種有效藥物；（2）相加效應（addition），聯合作用等與每一種藥物單獨使用時的總和；（3）協同效應（synergism），即聯合作用的效果大於單獨用藥的總和；（4）拮抗效應（antagonism），聯合用藥的效果反而低於單獨使用有效藥物。以上這些作用效應（尤其是在殺菌速率方面）在活體外及活體內皆可觀察到。

抗生素混合使用的好處有：

- (1) 治療多種微生物的感染。
- (2) 為了使藥物產生協同效應而使用，以求獲得加強的抗菌活性。
- (3) 防止具抗藥性細菌的出現。
- (4) 允許抗生素併用時使用較低劑量的濃度，避免副作用的產生。

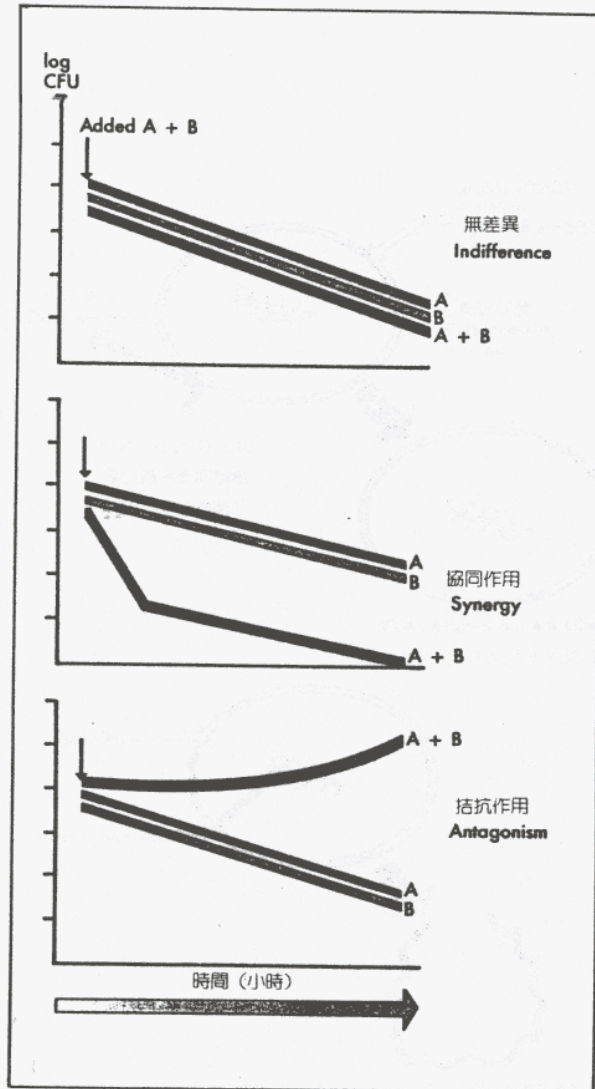


圖 3.3 抗生素 A 和 B 混合併用可能產生之反應型式

### 3.7 抗生素混合併用效應模式之判定

在藥理學及文獻上，比較廣泛使用作為判定抗生素之混合效應模式的參數有兩個，一是 FIC index，二是 Time-kill curve，以下就這兩個參數做個說明。

#### (1) FIC index

FIC index 為一種以 MIC(最小抑菌濃度)為依據的指標，意指 fractional inhibitory concentration index，其表示方法如下，

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = [A]/\text{MIC}_A + [B]/\text{MIC}_B$$

[A]和[B]分別為 A、B 兩種抗生素混合時之濃度，而  $\text{MIC}_A$  及  $\text{MIC}_B$  則為兩種抗生素之最低抑菌濃度，計算所得出之 FIC index 值若是  $\leq 0.5$ ，其混合效應模式很明顯地判斷為協同效應(synergism)，也就是毒性加強現象；若 FIC index 值落在 0.5 到 1 之間，其混合效應模式則為毒性相加；若在 FIC index 值落在到 1 到 4 之間，其混合效應則為無差異 (indifferent)；在  $\text{FIC} \geq 4$  的情況，此種混合效應模式則判定為拮抗效應(antagonism)，或是毒性減弱的現象。

#### (2) Time-kill curve

Time-kill curve 的研究主要是觀察菌種隨時間的變化，其實際生長的情況，以菌液密度對時間作圖，經過 24 小時的培養之後，觀察混合併用與單一作用下所造成生長的差異情形，以抗生素混合併用下的生長密度與最有效之單一抗生素作用的生長密度作比較，兩者 Log CFU/ml 的差值來對混合併用的混合效應模式作評估，若兩者的差值減少 2 個 log 單位以上的話，則為協同效

應(synergism)，即毒性加強現象；若兩者的差值增加 2 個 log 單位以上，則是拮抗效應(antagonism)，即毒性減弱；若兩者差值落在 $\pm 1$  個 log 單位，其混合效應模式為無差異(indifferent)，亦或是毒性相加效應。



## 第四章 實驗設備與方法

### 4.1 實驗材料與設備

#### 4.1.1 實驗菌種及培養

本研究使用之菌株為具有 *MRSA* 有 9 株 (0101, 0213, 0322, 0406, 0509, 0611, 0729, 0829, 0922) 由高雄醫學大學檢驗科取得，和五株金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，菌株購自新竹市食品科學研究所，菌株 ATCC(美國型培養菌收集中心)編號分別 12112, 12354, 12443, 12692, 12993。

#### 4.1.2 細菌培養基



在本實驗中所使用之培養基(growth medium)，依照國際臨床實驗委員會 (NCCL)所建議，met hicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*MRSA*)所使用的液態培養基為 Difco 的 Mueller Hinton Broth 培養基(MHB medium)，每升純水中含有 2 克的牛肉萃取液(Beef Extract)，以及 17.5 克的 Casein，澱粉 1.5 克，pH 值為  $7.3 \pm 0.1$ ；而至於固態培養基方面，採用由 Difco 所提供之血瓊脂(Blood agar)，每升純水中所含成分有酪蛋白消化胰酵素 14.5 克、Papaio digest of soybean meal 5 克、氯化鈉 5.0 克、瓊脂 14 克、成長因子 1.5 克、羊血 5%。

#### 4.1.3 實驗所使用之抗生素

實驗使用之抗生素由六和公司並默克(Merck)公司所購得試藥級化學藥品，總共有 6 種抗生素。依據其對微生物的作用機制不同將其分類，表 4.1



列出實驗所使用之抗生素其作用機制，表中有 4 種的抗生素作用機制為抑制細胞壁合成，有 1 種抗生素作用機制為抑制蛋白質合成，而作用機制為抑制核酸合成的則有 1 種。

表 4.1 實驗所使用之抗生素及作用機制

作用機制	抗生素
抑制細胞壁合成	Ampicillin
	Imipenem
	Cefuroxime
	Vancomycin
抑制蛋白質合成	RP59500
抑制核酸合成	Rifampin

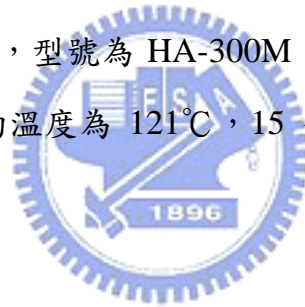
#### 4.1.4 實驗設備儀器

##### (1) 蒸餾水製造器

在培養基質以及藥品配製所使用之純水及最後玻璃器皿之清洗，均由純水製造機所提供。其製造過程如下：自來水經過濾、離子交換、細過濾後，再以石英管加熱蒸餾，經冷卻後儲存於蒸餾水儲存筒內（60 Liter Container），使用時在經過逆滲透設備（Mill-Q Plus, Millipore）處理，其導電度符合純水標準，以避免水質影響而造成實驗誤差。

##### (2) 高壓滅菌釜（autoclave）

實驗所用之玻璃器皿，以及配好之培養基必須置於滅菌釜中滅菌；為HIRAYAMA 公司所製造，型號為 HA-300M 之滅菌設備，為一種濕熱滅菌法。一般而言，滅菌的溫度為 121°C，15 分鐘，1.1kg/cm<sup>2</sup>，以確保無細菌污染。



##### (3) 紫外可視光分光光譜儀(Spectrophotometer)

用來作為測定菌種的 OD 值（Optical Density），以此作為瞭解細菌數目的依據。Hitachi U-2000 型分光光譜儀。

##### (4) 無菌無塵操作台(Laminar Flow)

需具有紫外光燈可殺菌，不論是細菌的接種，或是實驗之進行均在此無菌式的操作台下完成，避免其他因素的污染。為造鑫公司所製造，並具有紫外線燈裝置，為使空氣中微生物密度保持最低菌量，於使用前 1 小時打開開關，已確保實驗在無菌的狀態下操作。

##### (6) 迴轉式振盪培養箱

具有自動控溫的功能，同時具備有溫度、光照，以及控溫轉速的自動調節系統，為 FIRSTTEK 的 Orbital Shaking Incubator。

#### (7)化學天平

做為藥品配置之用，廠牌為 Presica 205A。

#### (8)烘箱

作為烘乾實驗玻璃器皿之用，廠牌為 Memmet。

#### (9)冷藏箱

做為藥品及菌種保存之用。

## 4.2 實驗方法



### 4.2.1 MRSA 的培養

本研究實驗的進行，主要是以 MRSA 為測試物種，以 6 種抗生素進行一系列單一以及混合之試驗；而在實驗進行之前必須先做培養工作，菌種自取得之後，先予以指定之液態培養基進行活化、培養，再將之做連續兩次的移植(Transfer)，以確定此菌株保持在高活性的狀態下，最後以固態培養基保存在 4°C 的冰箱中，提供往後批次試驗之使用，而此固態培養基中的菌株每二個星期即移植至新的培養基上，以保持其良好的活性狀態。

### 4.2.2 抗生素之試驗方法

在本研究中，所進行之抗生素試驗主要有兩項，分別為混濁度法(Turbidity

test)及 MIC，先就單一抗生素做毒性試驗，再以單一之試驗結果為依據進行混合試驗 Time-kill curve，觀察混合之後的效果，以及這兩種試驗方法彼此相關性之比較。此三種抗生素試驗方法的進行步驟詳述如下。

### (1) 混濁度法(Turbidity test)

#### A 單一效應試驗方面

在進行所有試驗之前，實驗所必須用到之玻璃容器(錐形瓶、試管等)、培養基質(Growth medium)、以及其他可能受到污染之器具皆先經過高溫高壓滅菌釜予以滅菌，接著將冰箱中以 4°C 保存在固態培養基下的 *MRSA* 菌株取出，移植到液態培養基下培養，在恆溫震盪培養箱內，以轉速 100 rpm、溫度控制在 35°C 下培養約 24 小時後，再以新鮮之液態培養基在分光光度計 620nm 下，稀釋初始植種量為  $10^6$ CFU/mL，此為 *MRSA* 的菌種接種液。於各試管中加入生長基質 MHB medium 9 ml，分別加入 0.1 ml 之接種液，單一抗生素以五種不同測試濃度之稀釋抗生素加入 1 ml 於試管內，其中每一次毒性試驗包括有一個控制組及五個處理組(即五種不同稀釋濃度)，而每一組有三個重複試管做試驗，放置於 35°C 控溫培養箱內以 100 rpm 震盪，培養 4 小時後，以分光光度計於 620nm 分別測其吸光度，在此之前我們經實驗繪出吸光度-菌種密度關係圖，求其吸光度之平均值的菌種密度與控制組的菌種密度相比較，可得其比抑制率。以其生長率用 Probit model 下去做分析，可得其單一抗生素之 EC50 值、EC90 值以及斜率、截距等。

### (2) Minimum Inhibitory concentration<sup>(33)</sup>

一般以使用 Muller-Hinton 液體培養基，受驗細菌之菌落，以白金耳鈎取

移植於增菌用液態肉羹培養基，培養一夜，再取菌液0.1ml加入MHB液態培養基裡，使接種菌之濃度以 $10^6$  CFU/ml 之程度為適宜使用，抗生素濃度以2倍稀釋法次第稀釋，將試管編號1-6，依次由第一號試管二倍稀釋至第六號試管， $37^\circ\text{C}$  16–20 小時，靜置培養。再以肉眼觀看，溶液澄清的最小濃度，明顯之發育被阻止之最小藥劑濃度，判定其MIC值。而金黃色葡萄球菌參考National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>[41]</sup>裡金黃色葡萄球菌編號ATCC 29213對抗生素的敏感性判斷標準。

## B. 混合毒性試驗

### (1) Time-kill curve

在進行 Time-kill curve 實驗之前，所有會使用到之玻璃器具，以及培養基等，都必須經過高溫高壓滅菌，以避免可能的污染。同時將 MRSA 從固態培養基上移植到液態培養基，在恆溫培養箱中進行  $35^\circ\text{C}$ 、轉速 100 rpm、24 小時的事先培養工作。經過 24 小時培養之後的菌液，調整其菌液密度，使其初始植種濃度約為  $10^6$  CFU/ml 左右。並以平板法所得到的 MIC 值為依據，分別以不同倍率 MIC 的濃度以及兩兩相混合，分開進行培養觀察。

在培養觀察的期間，分別在時間為 0、2、8、及 24 小時將其菌液取出若干，進行平板計數的工作，觀察在不同時間其生長的情況。最後以吸光度對照圖 4.3 所得到的菌數，以 Log CFU/ml 對時間作圖，再予以判斷其混合效應。

## 4.3 實驗數據整理

### 4.3.1 Probit Model

在混濁度法的毒性測試結果方面，以 Probit model 分析劑量與反應之間的關係，求取 EC<sub>50</sub> 值以及其劑量-反應曲線之斜率，而 EC<sub>50</sub> 為半影響濃度，為抑制 50% 測試物種生長或使受測試物種產生行為或生理上影響之化學物濃度。分析方法為將每組試驗之濃度及各濃度下之生長率代入 Probit model 中，即可得到 EC<sub>50</sub> 及劑量-反應曲線斜率、截距等相關參數。

#### 4.3.2 Mtox7 Model

由混濁度法之單一毒性試驗所求得之 EC<sub>50</sub>，抗生素之斜率、截距代入 Mtox7 Model 分析，可判斷兩種抗生素之混合毒性效應。經由 Mtox7 Model 預測結果所得到的值，若小於 0.90 時，則判定為混合毒性加強；若預測所得的值介於 0.9 與 1.1 之間則判定為混合毒性相加；若預測所得的值大於 1.1 則判定為混合毒性減弱。並和 Time-kill curve 所判斷之混合毒性結果作一比較。而以 Model 分析之目的在於證明是否如混合毒性理論中所預估的，協同效應的產生主要是由負相關 (negative correlation) 的兩毒性物質造成，也就是所謂的 response addition 現象，其中相似係數  $\lambda$  為 0、相關係數  $\rho$  為 -1 的情況。

#### 4.3.3 混合毒性效應

在本研究中，以 Time-kill curve 對於混合毒性效應的判斷。

##### a. Time-kill curve

混合效應在 Time-kill curve 的判定方面，則是在 24 小時的 end point，觀

察在兩兩混合下所得吸光度對照圖 4.3 後所得菌數，與最有效之單一抗生素作用下其菌數做比較，以 Log CFU/ml 的差值做判斷，若混合與單一的 Log CFU/ml 差值減少 2 以上的話，則判定為毒性加強；在差值落在±1 之間，則為相加效應或無差異效應；而在混合跟單一的差值為增加 2 以上的情況下，則為拮抗效應。

#### 4.4 吸光度和菌種密度關係

本研究進行在不同的吸光度下，評估 OD 值和菌種密度的關係，是否 OD 值和菌種密度呈現線性的關係，而可以直接讀取 OD 值來代表實驗參數。根據實驗後得知在 OD 值為 0.02---0.25 呈現另一線性關係( $\text{Cell density} = 9\text{E}+08(\text{OD})-3\text{E}+07, R^2>0.995$ )。故可將讀取的 OD 值，直接換算成菌種密度，在代入 Probit 模式，求得斜率，截距， $\text{EC}_{50}$  等。而菌種範圍在代入 Probit 模式，求得斜率，截距， $\text{EC}_{50}$  等。其吸光度菌種密度的關係圖如圖 4.3 所示。

# 混濁度法（單一效應試驗）

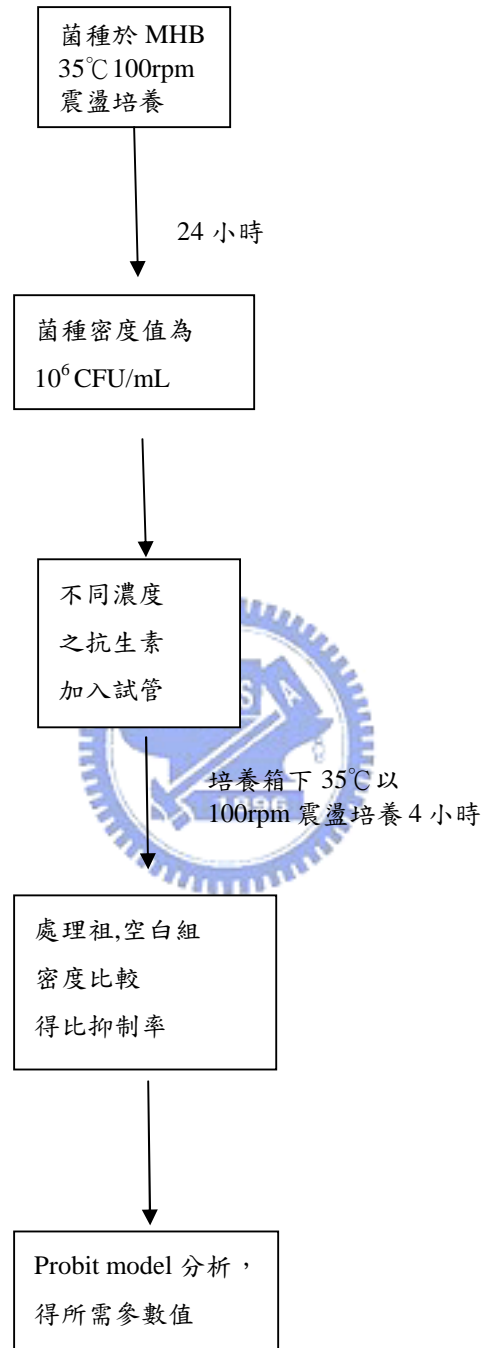


圖 4.1. 混濁度法（單一效應試驗）流程圖



# Time -kill curve

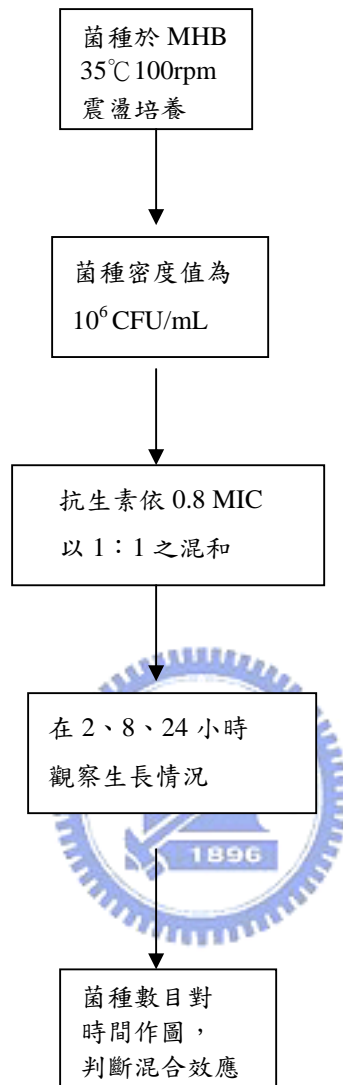


圖 4.2 Time-Kill curve 流程圖

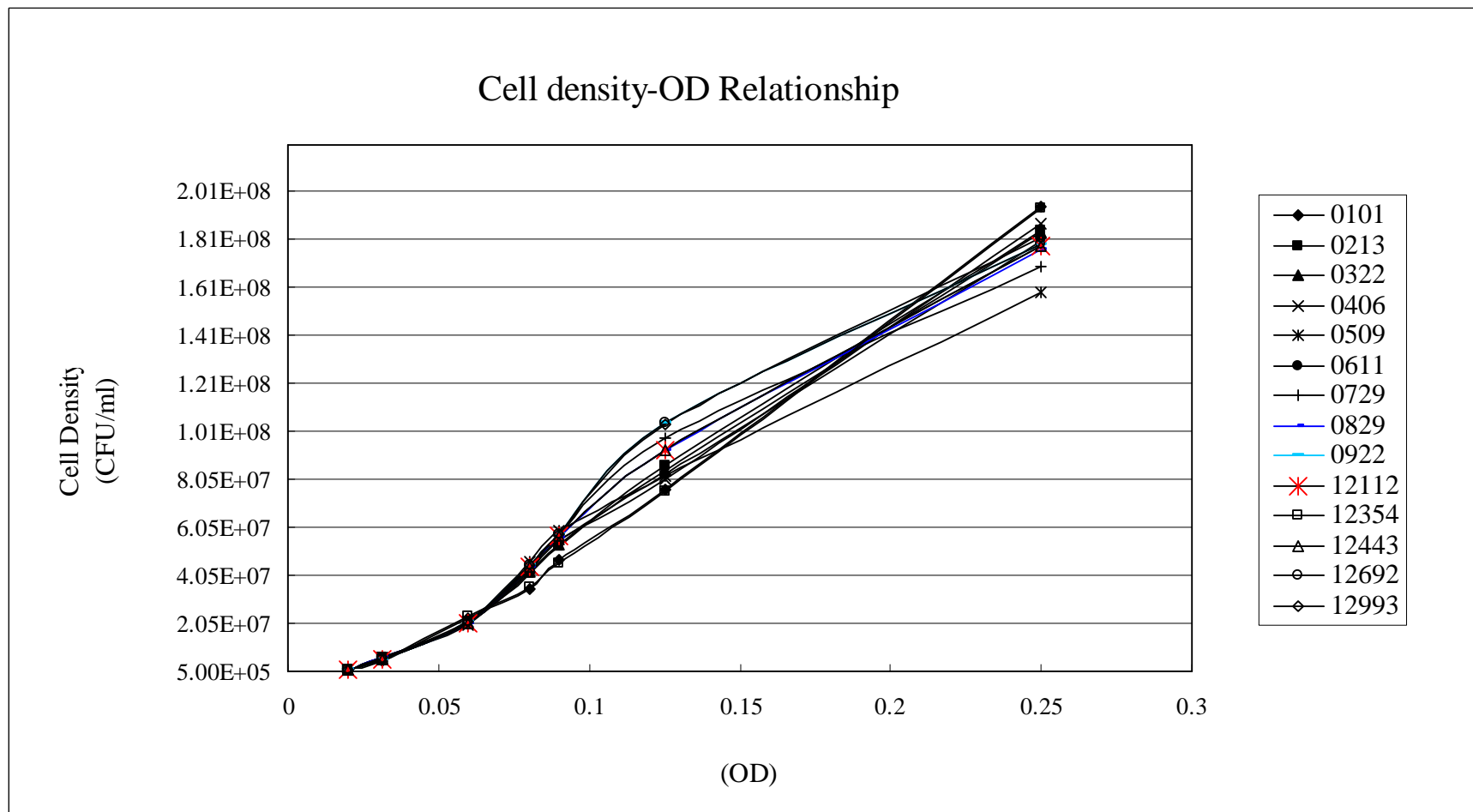


圖 4.3 14 株菌種吸光度和菌種密度