

Candida 균주에 대한 항진균제 Amphotericin B, Clotrimazole 및 5-Fluorocytosine의 단독 및 복합처리에 따른 항균력 검사

연세대학교 원주의과대학 미생물학교실

고춘명 · 주혜정 · 박형식

= Abstract =

In Vitro Antifungal Activity of Amphotericin B, Clotrimazole and 5-Fluorocytosine in Alone and in Combination against Candida Species

Choon Myung Koh, Hye Jung Joo and Hyoung Sik Park

Department of Microbiology, Wonju Medical College, Yonsei University, Wonju Korea

The effectiveness of three antifungal antibiotics amphotericin B, clotrimazole and 5-fluorocytosine was tested against 120 clinical isolated Candida species.

The minimum inhibitory concentrations of amphotericin B was considerably lower than those of clotrimazole and 5-fluorocytosine. High-level resistance to 5-fluorocytosine was present in 50% of the isolates.

The combination of clotrimazole and 5-fluorocytosine produced synergistic inhibition against all 20 strains of *Candida albicans* tested that were relatively resistant to both antifungal agents.

서 론

대부분의 Candida 감염은 그 원인이 내인성 (endogeneous)이며 여러 종류의 Candida species가 그 원인균으로 밝혀지고 있다. 이들은 주로 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* 등이며 사람에게서 가장 내생적인 균은 장관이나 질, 피부 등에 상주균총으로 존재하는 *C. albicans*나 *C. parapsilosis*이다¹⁾. 이들에 의한 감염은 주로 oral, vulvo-vagina, pericardial infection, meningial infection, cutaneous infection 등으로 나타나며, 전신감염 증은 주로 다른 질병으로 인하여 항균제나 steroid 등 면역억제제를 오래동안 사용하여 신체의 정상 방어기전이나 대사 변화가 생길 경우 뒤이어 일어난다. 또 호흡기나 위장기관을 통하여, 혹은 catheter나 cannula를 통하여 환자에게서 2차 감염을 일으켜 이로 인한 패혈증은 전신감염을 일으키게 된다²⁾.

그런데 세균감염증을 위한 치료제에 비해 진균증 치료를 위한 약제는 많지 않다. 효과적인 항진균제는 주로 지난 30년간에 개발되었던 이 기간에

효과적인 치료법과 약제의 작용기전에 대한 연구가 이루어졌다. 개발된 항균력을 나타내는 약제중에서도 polyene 중에서 nystatin과 amphotericin B, 몇 가지 imidazole제의 항진균제, 5-fluorocytosine 등 소수만이 임상에 사용되고 있으나, 이들 역시 강한 독성과 좁은 효과범위, 흡수성 혹은 치료용의 내생균 출현 등으로 많은 문제점을 갖는다. 1970년대에 보다 효과적인 진균증 치료를 위하여 약제의 복합사용이 제시되었다³⁾. Amphotericin B가 균의 세포막 투과성을 변화시킴으로써 다른 약제의 세포내 투과를 용이하게 한다는 점에서 주로 amphotericin B와 다른 항균제 5-fluorocytosine, rifampin, tetracyclin, polymyxin 등과의 복합사용이 *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *H. capsulatum*, *Aspergillus* 등 여러 Yeast와 mold에서 상승효과를 나타냄이 연구 보고되었으며^{1, 2, 5, 6, 14, 15, 16)}, 임상에서도 좋은 결과를 얻을 수 있었다¹¹⁾. 그러나 amphotericin B와 antifungal imidazole제인 miconazole과 clotrimazole, econazole의 복합사용에서는 오히려 저해 효과가 나타났다⁸⁾. 또 새로운 imidazole제인 ketoconazole과 amphotericin B의 복합사용에서는 상승효과가 ketoconazole과 5-fluorocytosine

sine의 복합사용에서는 상승효과가 없음이 보고되었다¹⁹⁾.

이에 저자 등은 효과적인 진균증 치료를 위한 기초적 연구로서 임상 가검물에서 *Candida species*를 분리동정하여 이들에 대해 현재 사용되고 있는 세가지 항진균제 amphotericin B와 clotrimazole, 5-fluorocytosine의 *in vitro*에서의 항균력을 조사하였으며, 그 작용기전은 다르나 amphotericin B처럼 세포막의 투과성을 변화시키는 clotrimazole과 5-fluorocytosine의 복합처리 효과를 실험하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1). 균 주: 연세대학교 원주의과대학 부속 원주기독병원 치과의 외래 환자의 구강으로부터 *Candida species*를 분리하여 실험균주로 사용하였다.

배지 및 시약: Kimming agar, rice agar, peptone nitrate assimilation media, Carbohydrate assimilation media carbohydrate fermentation media²¹⁾ Sabouraud's glucose media(Difco). 기타 사용된 시약은 시판되는 일급 시약을 사용하였다.

2). 항진균제: amphotericin B(Fungizohe, Squibb and Sons), clotrimazole(Bayer), 5-fluorocytosine(Hoffman-La Roche)

2. 실험 방법

1). *Candida species*의 분리 및 동정: 임상 가검물로부터 분리된 균주 중 집락형태, 냄새, 현미경 하에서의 형태 등에 의해 선택 분리하여, chlamydospore, peptone nitrate assimilation test, carbohydrate fermentation, carbohydrate assimilation 등 생화학적 검사를 통하여 *Candida species*를 동정하였다^{20, 21)}.

Table 1. Isolates of *Candida species* from oral specimens

Strain Identified	No.	(%)
<i>C. albicans</i>	79	(65.8)
<i>C. tropicalis</i>	7	(5.8)
<i>C. parapsilosis</i>	9	(7.5)
<i>C. stellatoidea</i>	2	(1.7)
<i>C. krusei</i>	1	(0.8)
<i>C. membranaefaciens</i>	1	(0.8)
<i>C. boidinii</i>	1	(0.8)
<i>C. ciferrii</i>	2	(1.7)
unidentified	8	(6.7)

2) 항진균제의 최저발육억제농도 검사: Agar dilution method에 의해 각 항진균제의 최저발육억제농도를 조사하였다⁴⁾. 각 항진균제를 증류수나 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시킨 후 일정농도로 희석하여 Sabouraud's glucose 평판배지에 0.05 μ g/ml에서 100 μ g/ml까지 두 배 계단희석되도록 함유하게 하여 항균력을 검사하였다.

균 접종량은 Sabouraud's glucose액체배지에 일정량을 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 생리식염수로 $\sim 10^6$ /ml 정도로 조정하여 항진균제가 함유된 평판배지에 한 백금이 접종하였다.

최저발육억제농도의 판정은 접종 후 37 $^{\circ}$ C와 28 $^{\circ}$ C(5-FC)에서 24시간 배양한 후 육안으로 균의 발육이 완전히 억제된 배지의 가장 낮은 항진균제농도를 최저발육억제농도로 결정하였다.

3. Clotrimazole과 5-fluorocytosine의 복합처리에 따른 항균력 검사: Checker board법에 의해 두가지 약제를 각각 0.05 μ g/ml에서 100 μ g/ml까지 checker board의 단계적으로 복합 함유한 배지에 위와같은 방법으로 균을 접종하여 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 균의 발육억제를 관찰하였다.

성 적

임상 가검물로부터 120주의 *Candida species*를 분리하여 동정한 결과 *C. albicans*가 79주(65.8%) *C. tropicalis*가 7주(5.8%), *C. parapsilosis*가 9주(7.5%)이며, *C. krusei*, *C. membranaefaciens*, *C. boidinii*가 각 1주(0.8%)이며 나머지 8주는 동정할 수 없었다(Table 1).

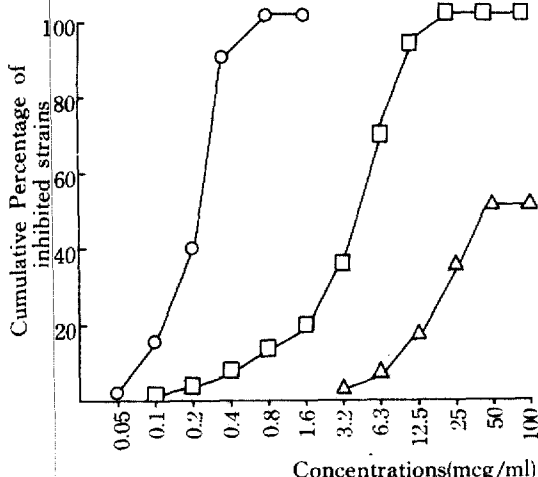


Fig. 1. Activities of three antifungal agents amphotericin B(\circ), clotrimazole(\square) and 5-fluorocytosine(\triangle) against 120 *Candida species*.

Table 2. Distribution of MIC (minimum inhibitory concentration) of three antifungal agents against 120 *Candida* species

Antifungal Antibiotics	Concentration (mcg/ml)										
	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50100
Amphotericin B	4	10	36	60	9	1					
Clotrimazole			1	4	9	9	22	33	35	6	
5-Flucytosine							1	18	22	15	60

Table 3. MIC (minimum inhibitory concentration) ranges of experimental strains

Strain identified	MIC range (mcg/ml)		
	Amphotericin B	Clotrimazole	5-Flucytosine
<i>C. albicans</i>	0.2 - 0.4	1.6 - 25	12.5 - > 100
<i>C. tropicalis</i>	0.2 - 0.8	6.3 - 25	25 - > 100
<i>C. parapsilosis</i>	0.05 - 1.6	0.05 - 3.2	25 - > 100
<i>C. stellatoidea</i>	0.2 - 0.8	3.2	> 100
<i>C. krusei</i>	0.4	1.6	25
<i>C. membranaefaciens</i>	0.4	0.8	6.3
<i>C. boidinii</i>	0.8	0.4	50
<i>C. ciferrii</i>	0.05 - 0.4	0.2 - 6.3	6.3 - 25
unidentified	0.1 - 0.4	0.4 - 12.5	3.2 - 12.5

이 120 주의 *Candida* species에 대해 세가지 항진균제 amphotericin B, clotrimazole, 5-fluorocytosine의 항균력을 검사한 결과 amphotericin B의 항균력이 가장 강하였으며, clotrimazole, 5-fluorocytosine 순이었다. 5-fluorocytosine에 대해서는 분리된 균주의 50%가 100 µg/ml 이상에서도 내성을 나타내었다(Fig. 1).

각 항진균제의 MIC(minimum inhibitory concentration) 분포를 보면 amphotericin B는 MIC가 0.05 µg/ml-1.6 µg/ml의 범위에서 나타났으나 대부분(96 주)이 0.2 µg/ml-0.4 µg/ml에서 발육이 억제되었다. clotrimazole은 0.2 µg/ml에서 25 µg/ml까지 넓은 범위에 걸쳐 MIC가 나타났는데 대부분(90 주)은 3.2 µg/ml에서 12.5 µg/ml 사이에 발육이 억제되었다. 5-fluorocytosine은 60 주가 3.2 µg/ml에서 50 µg/ml의 높은 농도에서 억제되었으나, 나머지 60 주(50%)는 100 µg/ml에서도 내성을 나타내었다(Table 2).

Candida species에 따라 MIC 범위를 살펴 보면 amphotericin B는 각 species에 대해 별 차이없이 0.05 µg/ml-0.8 µg/ml에서 발육이 억제되었으나 *C. parapsilosis*에서는 약간 높은(1.6 µg/ml) MIC 범위를 나타내었다. Clotrimazole은 *C. albicans*와 *C.*

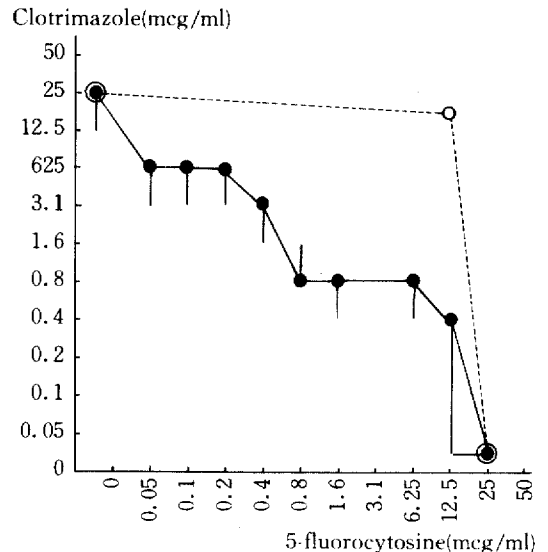


Fig. 2. Synergistic action of clotrimazole and 5-fluorocytosine.

--- ○ ---; expected MIC of additive effect.
 — ● —; MICs of 20 *Candida albicans* treated with clotrimazole and 5-FC in combination.
 ● ; MICs of *Candida albicans* treated with clotrimazole and 5-FC in alone.
 vertical bar; MIC range(●; MIC of most strains)

tropicalis (1.6–25 $\mu\text{g/ml}$)가 다른 species (0.05–6.3 $\mu\text{g/ml}$)에 비해 높은 MIC를 나타내었다. 5-fluorocytosine은 대부분 높은 MIC (6.3–50 $\mu\text{g/ml}$)을 나타내었으며, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 많은 균주가 내성을 나타내었다 (Table 3).

*C. albicans*로 동정된 79주 중 clotrimazole과 5-fluorocytosine에 대해 비교적 높은 MIC를 나타내는 20주를 선택하여 이들에 대해 clotrimazole과 5-fluorocytosine의 *in vitro*에서의 복합처리 효과를 검사한 결과 20주에서 모두 우수한 상승작용 (synergism)을 관찰할 수 있었다. 단독처리시의 clotrimazole의 MIC는 12.5–25 $\mu\text{g/ml}$ 이며 5-fluorocytosine의 MIC가 12.5–25 $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 복합처리에는 MIC가 1.6–3.2 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다 (Fig. 2).

고 찰

polyene antibiotics인 amphotericin B는 현재까지 가장 많이 쓰이는 항진균제로서, 그 작용기전은 세포막의 sterol과 결합하여 막의 투과성을 변화시킴으로써 항균작용을 나타내게 된다¹¹. amphotericin B는 진균 세포막의 주요 sterol인 ergosterol과 가장 특이적으로 반응하여 세포내 물질의 소실을 초래하게 된다. 그러나 amphotericin B는 동물세포의 cholesterol과도 반응하기 때문에 숙주세포에 독성을 나타내게 되는 것이다^{11, 17}. clotrimazole은 imidazole계의 합성약제로서 *in vitro*에서 광범위한 항균력을 나타낸다²⁸. 생체에서는 소화관에서 흡수된 후 간 효소에 의해 파괴됨으로써^{13, 22} 전신감염증 치료에는 적합하지 않으나 다른 진균증에 대해서는 매우 효과적이다²⁸. clotrimazole의 작용기전은 확실히 밝혀지지 않았으나 imidazole계의 항균력은 세포막을 변형시켜 세포내 물질의 소실을 초래한다고 보고되었으며, amphotericin B와는 달리 sterol과는 관계없이 세포내 glucose 대사변화와 아미노산 흡수를 저해시키는 작용을 한다고 하였다^{3, 17}. 5-fluorocytosine은 비교적 좁은 범위의 항균력을 나타내는 약제로 permease가 있는 진균에서 세포내로 들어가 pyrimidine의 생합성을 방해함으로써 결국 핵산과 단백질합성을 저해하는 작용으로 항균력을 나타낸다^{3, 5, 15}. 기전 보고에 따르면, amphotericin의 *Candida* species에 대한 MIC는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 3.7 $\mu\text{g/ml}$ 범위이며, 대부분이 1 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 발육이 억제되었다고 보고하였으며^{3, 15}, clotrimazole의 경우 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 에서 16 $\mu\text{g/ml}$ ^{3, 20}, 5-FC는 0.13 $\mu\text{g/ml}$ 에서 16 $\mu\text{g/ml}$ ^{3, 20}로서 본 실험 결과와 비교해 보면 am-

photericin B의 경우 0.05–1.6 $\mu\text{g/ml}$, clotrimazole은 0.2–25 $\mu\text{g/ml}$, 5-FC는 3.2–50 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나, clotrimazole과 5-FC에서는 비교적 높은 MIC를 나타내었다. amphotericin B에서는 보고와 일치하나 *C. parapsilosis*가 다른 species에 비해 약간 높은 MIC (1.6 μg)를 나타내었는데 이것은 Amphotericin B에 *C. parapsilosis*가 tolerance를 나타낸다는 Seidenfeld²⁹의 결과 (1.56–12.5 $\mu\text{g/ml}$)와 일치하였다. 5-FC에서 Kobayashi 등은 분리된 *Candida* 중 4–67%가 내성균으로 나타난다고 보고하였으며, 다른 대부분의 보고에는 80–90%가 감수성이라고 하였다⁴. 본 실험 결과는 50%가 내성균으로 Kobayashi 등의 보고와 일치하였다.

amphotericin B와 다른 약제의 복합사용은 amphotericin B가 원래는 항진균력이 없던 제2의 약제의 투과를 용이하게 함으로써 그 약제 특유의 작용으로 상승효과를 나타낸다. amphotericin B와 5-fluorocytosine의 병용은 amphotericin에 의해 5-FC의 투과가 용이해지며, amphotericin B가 5-FC에 대한 내성균의 출현을 억제해 줌으로서 상당히 좋은 상승효과로 평가되고 있다. 그러나 이러한 병용요법에도 불구하고 amphotericin의 과민반응은 여전히 문제가 되고 있다.

본 실험에서는 clotrimazole과 5-FC를 복합처리함으로써 단독사용시 MIC가 12.5–25 $\mu\text{g/ml}$ 인 것이 복합처리에서 1.6–3.2 $\mu\text{g/ml}$ 까지 낮게 나타냄으로서 뚜렷한 상승효과를 볼 수 있었다. 이는 clotrimazole에 의한 세포막의 변형이 5-FC의 투과를 용이하게 하여 항균력의 상승효과를 나타낸 것으로 추측된다.

이 실험 결과는 *in vitro*에서의 연구가 뒷받침되어야 하겠으나, clotrimazole과 5-FC의 복합사용은 임상에서도 좋은 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

결 론

임상 가검물에서 120주의 *Candida* species를 분리하여 동정한 결과 이들은 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. ciferrii*, *C. membranefaciens*, *C. boidinii* 등이었다.

이들 120주의 *Candida* species에 대해 세가지 항진균제 amphotericin B, clotrimazole, 5-FC의 *in vitro*에서의 항균력은 amphotericin B, clotrimazole 5-FC 순이었으며, 5-FC에 대해서는 50%가 내성을 나타내었다.

*Candida albicans*로 동정된 균주 중 clotrimazole

과 5-FC에 동시에 비교적 내성을 갖는 20주를 선택하여 clotrimazole과 5-FC의 복합처리 효과를 실험한 결과 20주에서 모두 상승효과(synergism)를 나타내었다.

참 고 문 헌

- 1) Beggs WH, G A Sarosi and Walker M : Synergistic action of amphotericin B and rifampin against *Candida* species. *J. Infect. Dis.* **133**:206-209, 1976.
- 2) Beggs WH, GA Sarosi and Steele NM : Inhibition of potentially pathogenic yeast like fungi by clotrimazole in combination with 5-fluorocytosine or amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**:863-865, 1976.
- 3) Bennett J E : Chemotherapy of systemic mycoses. *N. Engl. J. Med.* **290**:320-324, 1974.
- 4) Chmel H and Louria D : Antifungal antibiotics in Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorian, V. Ed., Williams & Wilkin Co., 1980.
- 5) Collins MS and Papagianis : Inhibition of *Coccidioides immitis* in vitro and enhancement of anticoccidioidal effects of amphotericin B by polymyxin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**:781-787, 1975.
- 6) Cosgrove RF : Beezer A E and Miles R J : In vitro studies of amphotericin B combination with the imidazole antifungal compounds clotrimazole and miconazole. *J. Infect. Dis.* **138**:681-685, 1978.
- 7) DeNollin S and Bangers M : The ultrastructure of *Candida albicans* after in vitro treatment with miconazole. *Sabouraudia* **12**:341-351, 1974.
- 8) Dupont B and Drouhet E : In vitro synergy and antagonism of antifungal agents against yeast-like fungi. *Postgrad. Med. J.* **55**:683-686, 1979.
- 9) Emmons GW, Binford CH, Utz J P and Kwon-Chung K J : *Candidiasis in Medical Mycology* 3rd Ed. Lea & Febiger
- 10) Gale EF, Johnson AM, Kerridge D and Miles EA : Phenotypic resistance to amphotericin B in *Candida albicans* ; the role of reduction. *J. Gene. Microb.* **109**:191-204, 1978.
- 11) Hamilton-Miller, J.M.T. : Chemistry and biology of polyene macrolide antibiotics. *Bacteriol. Rev.* **37**:166-196, 1973.
- 12) Holt RJ and Newman RL Laboratory assessment of the antimycotic drug clotrimazole. *J. Clin. Pathol.* **25**:1089-1097, 1972.
- 13) Perfect JR and Durack DT : Treatment of experimental Cryptococcal meningitis with amphotericin B, 5-fluorocytosine, and ketoconazole. *J. Infect. Dis.* **146**:429-435, 1982.
- 14) Kitahara M, Seth V K, Medoff G and Kobayashi G S : Activity of amphotericin B, 5-fluorocytosine, rifampin against six clinical isolates of *Aspergillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**:915-919, 1976.
- 15) Kobayashi GS and Medoff G : Antifungal agents recent developments. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**:291-308, 1977.
- 16) Krogstedt DJ and Moellering RC : Combinations of antibiotics, in Antibiotics in Laboratory Medicine. Lorian, V. Ed., Williams & Wilkin Co., 1980.
- 17) Kuroda S Uno J and Arai T : Target substances of some antifungal agents in the cell membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**:454-459 1978.
- 18) Medoff G, Comfort M and Kobayashi G S : Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosins against Yeast-like organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**:571-574, 1971.
- 19) Montgomerie JZ, Edwards JE and Guze LB : Synergism of amphotericin B and 5-fluorocytosine for *Candida* species. *J. Infect. Dis* **132**:82-86, 1975.
- 20) Moore GS and Jaciow DM : *Mycology for the clinical Laboratory.* reston publishing Co. inc. 1979.
- 21) Rieth H : Hefediagnostik im Labor Hefe-Mykosen U & S Taschen bucher 64.
- 22) Robert DT : The current status of systemic antifungal agents. *Br. J. Dermatol.* **106**(5):597-602, 1982.
- 23) Seidenfeld SM, Cooper BH, Smith JW, Luby JP and Mackowiak P A : Amphotericin B tolerance : A characteristic of *Candida parapsilosis* not shared by other *Candida* species. *J. Infect Dis.* **147**:116-119, 1983.
- 24) Shadomy S, Shadomy JJ and Gerald EWagner : Fungicides in medicine in Antifungal compounds Vol 2, M R. Siegel and H.D. Sisler, Marcel Dekker, Inc.
- 25) Sud IJ and Feingold DS : Mechanisms of action of the antimycotic imidazole. *J. Invert Dermatol.* **76**:438-441, 1981.
- 26) Shadomy S, G Wagner, A Espinel-Ingroff and B A Davis : In vitro studies with combinations of 5-fluorocytosine and amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**:117-121 1975.

27) Sud IJ and Feingold DS : Effect of ketoconazole on the fungicidal action of amphotericin B in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**:185-187, 1983.

28) Waitz J A, Moss E L and Weinstein M J : Chemotherapeutic evaluation of clotrimazole, *Appl. Microbiol.* **22**:891-898, 1971.