大韓微生物學會誌: 第21卷 第2號 1986
J. Korea Soc. Microbiol., Vol. 21, No. 2, 1986

*Candida albicans*에 대한 Amphotericin B, 5-Fluorocytosine 및 Rifampin 복합처리에 의한 항균력 상승효과

연세대학교 원주의과대학 미생물학교실

고 춘 명·박 전 한

=Abstract=

Synergistic Action of Amphotericin B in Combination with 5-Fluorocytosine and Rifampin against *Candida albicans*

Choon-Myung Koh and Jeon-Han Park

Department of Microbiology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Kangwondo, Korea

Amphotericin B and rifampin or 5-fluorocytosine were tested for synergism against *Candida albicans* in a synthetic mdium. The test was based on viability studies in which fungicidal activity was determined during the incubation hours of drug exposure.

Concentration of amphotericin B(0.2ug per ml and 0.4ug per ml)in combination with inactive concentration of rifampin(12.5ug per ml) or 5-fluorocytosine(25ug per ml) resulted in rapid decrease of colony froming unit(CFU).

On the basis of these and earlier studies, it is concluded that amphotericin B and rifampin or 5-fluorocytosine are synergistic against various yeasts and yeast-like fungi under widely differing experimental conditions.

Key Words: *Candida albicans*, synergism, amphotericin B, rifampin, 5-fluorocytosine, colony forming unit

서 론

수년전 부터 Medoff등에 의하여 심재성 진균증의 치료에 항진균제의 복합처리에 대한 관심을 보이기 시작한 뒤 여러 학자들에 의하여 항균제중 항진균제들의 복합사용이 효모나 진균들에 대하여 시험관내 실험에서 항진균력의 상승효과가 있음을 관찰 발표하였으며[1, 5, 7, 9, 14, 15, 22], 특히 Candida sp. 에 대한 실험들은 많은 학자들에 의하여 연구가 실시되어 Montgomerie등[22] Hamilton-Miller[10], Medoff등[20], Rabinovich등[24], Shadomy등[28] 그리고 Titsworth 및 Grunberg[29]등은 amphotericin B와 5-fluorocytosine의 복합처리로서, Hamilton-Miller[10], Hoepric 및 Huston[11, 12]등은 5-fluorocytosine과 imidazole유도체 및 amphotericin B를 복합처리한 실험결과를 조사 발표한 바 있다. 더욱 Beggs등[4, 5]은 amphotericin B와 rifampin을 복합처리한 Cadida의 항진력 성적을 발표하였으며 Kobayashi등[16, 17]은 *Histoplasma capsulatum*을 사용하여, Rifkind등[31]은 *Coccidioides immitis*를 이용하여 그리고 Kitahara등[15], Ribner등[25], Arroyo등[3]은 Aspergillus sp. 이용하여 rifampin과 amphotericin B 혹은 5-fluorocytosine의 복합처리에 의해 항균력을 조사한 바이다.

Rifamycin은 1959년 Sensi등에 의하여 토양 미생물의 일종인 *Nocardia meditenanea*에서 분리되어 paper chromatography상에서의 이동차로서 rifamycin A~E로 분리되었고 이중 rifampin은 3-formyl rifamycin SV형의 hydrazone으로 알려져있다. 이 rifampin의 작용기전을 보면 DNA-dependent RNA polymerase의 작용을 억제하는 것으로 비교적 광범위한 Gram-양성 및 Gram-음성균에 대하여 항균력을 나타내며 동물에 대하여 낮은 독성을 나타낸다고 발표되었고[18, 27] 특히 결핵균에 대하여서는 타 결핵제와 복합치료시 우수한 항균력을 나타낸다고 알려진 약제이다[8, 13, 19].

이에 저자들은 본 교실에 계대배양중인 *Candida*

albicans ATCC7491주를 이용하여 rifampin과 amphotericin B 혹은 5-fluorocytosine을 복합처리하였을 경우의 항균력 상승여부를 조사하여 보았던 바 그 결과를 얻을 수 있었기에 여기 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1). 실험균주

본 실험에 사용한 *Candida albicans*는 본 교실에서 계대배양중인 *Candida albicans* ATCC7491주이었다.

2). 배지 및 시약

실험에 사용된 배지는 미국 Difco회사제품을 사용하였고 시약은 시판되고 있는 일급시약을 사용하였다.

3). 항균제

실험에 사용된 항균제 amphotericin B는 Squibb and Son회사제품, 5-fluorocytosine은 Roche회사제품 그리고 rifampin은 국제약품주식회사로 부터 직접 분양받아 사용하였다.

2. 실험 방법

1). 실험배지 작성방법

배지는 Yeest Nitrogen Base(YNB)에 L-asparagine과 glucose를 함유한 배지를 만들어 pH 7.0으로 조절 사용하였다[4,28].

2). 실험균주 부유액 제조방법

실험배지(액체배지)에 균주를 접종, 37℃ 항온기에서 24시간 진탕배양(150rpm)한 뒤 세포수가 1ml당 4.0×10^6으로 조정하여 이를 접종균주의 부유액으로 사용하였다.

3). 약제함유배지 제조방법

실험약제인 amphotericin B, 5-fluorocytosine 및 rifampin을 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹여 사용하였으며 이때 배지내의 DMSO 함유농도가 1% 이하가 되게 조정하였고 실험약제의 농도는 amphotericin B; 0.2 μg/ml 및 0.4 μg/ml, 5-fluorocytosine; 25 μg/ml 그리고 rifampin; 12.5 μg/ml이었다.

4). 균주의 접종방법

실험약제 함유배지 및 약제비함유배지(액체배지)를 각각 50ml Erlenmyer flask에 20ml씩 분주하고 여기에 0.1ml씩의 실험균주 부유액을 접종하여 접종초기의 접종량이 1ml당 2.0×10^5세포가 되게 하였다.

5). 성장곡선 측정방법

(1) 약제비함유 배지상에서의 균성장곡선 측정방법: YNB합성배지에 균을 접종한 뒤 37℃ 항온기에서 24시간, 48시간 및 72시간 배양하면서 이중 0.1ml씩을 채취하여 Sabouraud's glucose 평판배지에 재접종 집락형성유닛(colony forming unit; CFU)을 계산하므로서 성장곡선을 측정하였으며 균수의 측정은 평판배지당 25개~400개 이내의 수가 자란 배지만을 취하였고 5개의 평판배지를 사용하여 평균치를 취하였다(이하 실험에서는 이 방법을 적용하였다).

(2) 약제함유배지상에서의 균성장곡선 측정방법: 실험항균제를 각 농도별로(amphotericin B; 0.2 μg/ml 및 0.4 μg/ml, 5-fluorocytosine 25 μg/ml, rifampin; 12.5 μg/ml) 함유된 배지내에 상기 실험방법과 동일하게 *Candida albicans* ATCC7491주를 접종하고 37℃ 항온기에서 24시간, 48시간 및 72시간 동안 배양하면서 시간별로 0.1ml씩의 배양액을 채취하여 Sabouraud's glucose평판 배지상에 재접종 집락형성유닛을 계산하여 측정하였다.

6). 항진균력 상승효과 측정방법

항진균력 상승효과를 관찰하기 위하여 실험항균제를 복합사용하는 방법으로서 ① amphotericim B 0.2 μg/ml 및 0.4 μg/ml에 5-fluorocytosme 25 μg/ml ml를 각각 혼합하고 ② amphotericin B 0.2 μg/ml 및 0.4 μg/ml에 rifampin 12.5 μg/ml을 혼합하는 방법으로서 두 항균제의 혼합배지를 만든 뒤 이 혼합배지상에 실험균주를 접종 37℃ 항온기에서 24시간, 48시간 및 72시간동안 배양하면서 시간별로 0.1ml씩의 배양액을 채취 Sabouraud's glucose 평판배지에 재접종 집락형성유닛을 계산하여 타배지에서 측정된 집락형성유닛과 비교 상승효과를 측정하였다.

성 적

1. 항진균제 비함유배지상에서의 균성장성적

항균제를 함유치 않은 정상 YNB액체배지에 균을 접종한 뒤 배양시간에 따른 균성장 변화를 보면 접종 24시간의 집락형성유닛(CFU)은 2.7×10^7세포로 접종시 2.0×10^5세포에 비하여 균의 증식을 관찰하였으나 접종 48시간 및 72시간 때의 집락형성유닛(CFU)은 4.6×10^7세포 및 4.9×10^7세포로서 별다른 균 증식현상을 관찰할 수 없었다(Table 1).

2. 항진균제 함유배지상에서의 균생장 성장

1). **Amphotericin B** 함유배지내의 성적: Amphotericin B 0.2 μg/ml과 0.4 μg/ml 함유배지내에서의 균생장성적을 보면 농도차에 따른 커다란 변화는

볼 수 없어 amphotericin B 0.2㎍/ml로 처리한 경우 배양시간에 따른 집락형성유닛은 2.9×10^{6}세포, 4.2×10^{7}세포 및 4.7×10^{7}세포이었고 0.4㎍/ml로 처리한 균에서는 1.0×10^{6}세포, 3.5×10^{7}세포 및 4.7×10^{7}세포로서 농도간 차이나 정상균 성장성적과도 큰 차이를 볼 수 없었다(Table 1).

2). **5-fluorocytosine 함유배지내의 성적**: 5-fluorocytosine 25㎍/ml를 함유한 배지상에서의 균성장성적을 보면 시간경과에 따라 2.9×10^{7}세포, 4.4×10^{7}세포 및 4.9×10^{7}세포로서 배양 24시간 경과후 부터는 별다른 균성장현상을 발견할 수 없었다(Table 1).

Table 1. Colony forming unit(CFU) of amphotericin B, 5-fluorocytosine and rifampin against *Candida albicans*

Drug(mcg/ml)	Incubation time(hrs)		
	24	48	72
None	2.7×10^{7}**	4.6×10^{7}	4.9×10^{7}
AMB(0.2)*	2.9×10^{6}	4.2×10^{7}	4.7×10^{7}
AMB(0.4)	1.0×10^{6}	3.5×10^{7}	4.7×10^{7}
5-FC(25)@	2.9×10^{7}	4.4×10^{7}	4.9×10^{7}
RFM(12.5) ¢	3.0×10^{7}	4.4×10^{7}	4.9×10^{7}

*AMB: amphotericin B @5-FC: 5-fluorocytosine ¢ RFM: rifampin
**: Indicate the number of colony forming unit(CFU)
Incoulum size of Candida albicans: 4.0×10^{6} CFU

Table 2. Synergism of amphotericin B and 5-fluorocytosine or rifampin against *Candida albicans*

Drug(mcg/ml)	Incubation time(hrs)		
	24	48	72
AMB(0.2)*+5-FC(25)@	$6.\times10^{1}$**	3.2×10^{4}	9.1×10^{3}
AMB(0.4) +5-FC(25)	$4.\times10^{3}$	5.0×10^{3}	8.2×10^{3}
AMB(0.2) +RFM(12.5) ¢	$9.\times10^{5}$	8.5×10^{4}	1.6×10^{4}
AMB(0.4) +RFM(12.5)	$5.\times10^{5}$	1.6×10^{4}	4.2×10^{3}

Inoculum size of Candida albicans: 4.0×10^{6} CFU
*AMB: amphotericin B @5-FC: 5-fluorocytosine ¢ RFM: rifampin
**Indicate the number colony forming unit(CFU)

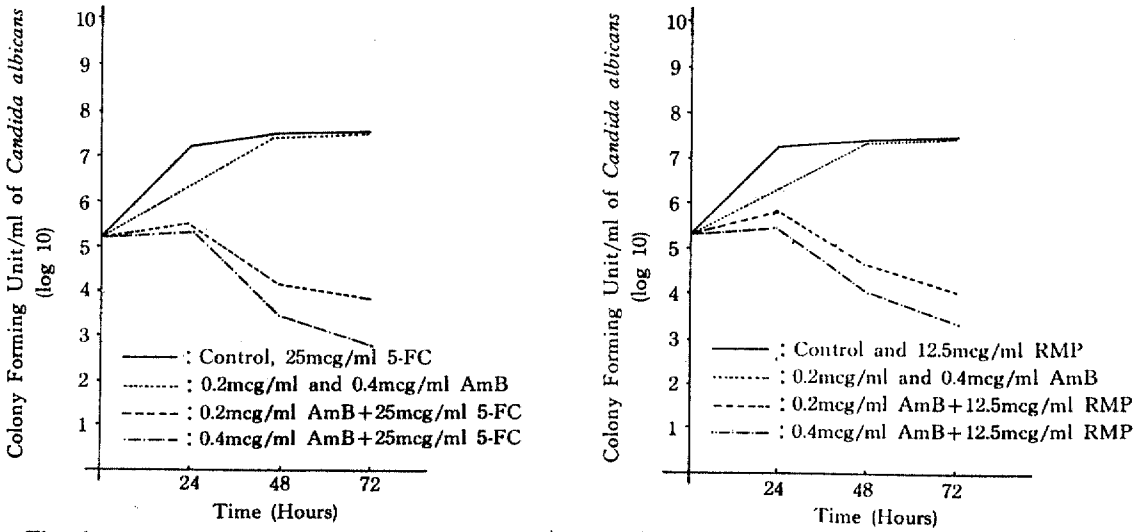

Fig. 1. Dose-response curves showing the potentiating effect at 24, 48 and 72 hours of amphotericin B (AmB), 5-fluorocytosine(5-FC) and rifampin(RMP) against *Candida albicans* ATCC 7491.

3). **Rifampin 함유배지상에서의 성적**: Rifampin 12.5μg/ml함유배지상의 균성장성적 역시 타 항진균제 함유배지상에서의 균성장성적과 별다른 차이를 볼 수 없었으며 24시간, 48시간 및 72시간의 배양시간에 따른 집락형성유닛 역시 3.0×10^7세포,4.4×10^7세포 및 4.9×10^7세포이었다(Table 1).

3. 항진균제 복합처리에 따른 균성장 성적

1). **Amphoteriein B와 5-fluorocytosine 복합처리성적**: Amphotericin B 0.2μg/ml와 5-fluorocytosine 25μg/ml를 복합처리한 배지내에서의 균성장성적은 배양시간에 따라 점차 감소현상을 나타내어 배양 24시간때의 집락형성유닛은 6.1×10^5세포 48시간때는 3.2×10^4세포 그리고 72시간때에는 9.1×10^3세포이었고 amphotericin B 0.4μg/ml와 5-fluorocytosin 25μg/ml로 처리한 경우에서는 4.8×10^5세포 5.0×10^3세포 및 8.2×10^2세포로 현저한 집락형성유닛의 감소현상을 관찰하였다(Table 2).

2). **Amphotericin B와 rifampin 복합처리 성적**: Amphotericin B 0.2μg/ml와 rifampin 12.5μg/ml를 복합처리한 경우에서의 배양시간에 따른 집락형성유닛을 보면 9.0×10^5세포, 8.5×10^4세포 및 1.6×10^4세포로 점차 감소하였고 amphotericin B 0.4μg/ml와 rifampin 12.5μg/ml를 복합처리한 경우에서는 5.0×10^5세포, 1.6×10^4세포 및 4.2×10^3세포의 집락형성유닛을 나타내어 전자보다 더욱 감소한 결과를 얻었다(Table 2), (Fig. 1).

고 찰

Medoff등에 의하여 항진균제의 복합처리가 단독처리보다 단독처리보다 진균들에 대하여 항진력이 이 높다고 발표된 뒤 Beggs등[5]은 clotrimazole과 5-fluorocytosine혹은 amphotericin B를 복합처리하여 그 결과를 발표하고 Cosgrove등[7]은 amphotericin B와 imidazole 유도체들과의 복합처리 결과를 Montgomerie등[22], Shadomy등[28], 高등[1] 그리고 Medoff등[20]은 amphotericin B와 5-fluorocytosine을 복합처리 하여 Candida sp.에 대한 항균력을 검사 단독투여시 보다 복합투여시의 항진균력이 상승효과가 있다고 발표한 바 있다. 한편 그 이외의 학자들[2, 3, 6, 15, 16]은 Candida sp. 이외의 진균들(*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergrllus sp.*, *Histoplasma capsulatum*등)을 대상으로 항진균제의 복합처리에 의한 항진균력을 검사하고 이결과 역시 상승효과가 있음을 발표하였다. Beggs등[4, 5]은 *Candida albicans*와 타 Candida sp.에 대하여 amphotericin B와 항결핵제로서 알려져 있는 rifampin을 복합처리하여 항진균력을 검사하고 amphotericin B 0.2μg/ml와 rifampin 25μg/ml를 복합처리할 경우 균주의 차이는 있으나 항균력을 나타내는 것이 접종량에 비하여 1ml당 1~4배의 집락형성유닛의 감소현상을 볼 수 있어 상승효과가 있음을 주장하였고 Hughes등[14]은 Aspergillus sp.에 대한 실험에서 역시 amphotericin B 1.5μg/ml~6.25μg/ml와 rifampin 25μg/ml를 복합처리한 경우 우수한 항진균력을 나타내었는데 이것 역시 상승작용에 의하여 나타나는 결과라고 주장하였다. 이들 실험을 본 실험결과와 비교하여 보면 amphotericin B 0.2μg/ml 및 0.4μg/ml과 5-fluorocytosine 25μg/ml 그리고 rifampin 12.5μg/ml를 단독처리하였을 경우에는 전혀 항진균력을 발견할 수 없었으나 복합처리 하였을 경우 집락형성유닛의 3~4배의 감소현상을 나타내고 있음을 관찰할 수 있어 이는 역시 복합처리에 의한 항균작용의 상승효과임을 알 수 있으며 아울러 타 연구자들의 연구결과와 일치하는 것이라 하겠다.

이상 실험을 종합하여 볼 때 좀더 여러 가지 항균제와 많은 균주를 대상으로 실험이 계속 실시되어야 할 것으로 생각되며 아울러 실험동물을 통한 생체실험(in vivo test)이 계속되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

항진균제의 일종인 amphotericin B, 5-fluorocytosine과 항결핵제인 rifampin을 사용하여 *Candida albicans* ATCC7491주에 대한 항균제 복합처리에 의한 상승효과를 측정하여 보았던 바 각 항균제의 단독투여시에 비하여 복합처리시 항균력의 상승효과를 나타내어 접종시 보다 3~4배의 집락형성유닛(colony forming unit)의 감소현상을 관찰할 수 있었다.

참 고 문 헌

1) 고춘명, 주혜정, 박형식: Candida균주에 대한 항균제 Amphoteriein B, Clotrimazole 및 5-fluorocytosine의 단독 및 복합처리에 따른 항균력검사. 대한미생물학지, **19**: 35, 1984.

2) Arroyo J, Medoff G and Kobayashi GS: Therapy of murine aspergillosis with amphotericin B in combination with rifampin or 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **11**: 21, 1977.

3) Battaner E and Vijaya Kumar B: Rifampin: Inhibition of ribonucleic acid synthesis after potentiation by amphotericin B in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5**: 371, 1974.

4) Beggs WH, Sarosi GA 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, 1974.

5) Beggs WH, Sarosi GA and Walker M: Synergistic action of amphotericin B and rifampin against *Candida* species. *J. Infect. Dis.*, **133**: 206, 1976.

6) Collins MS and Papagianis P: Inhibition of *Coccidioides immitis* in vitro and enhancement of anticoccidioidal effects of amphotericin B by polymyxin B. Antimicrob. *Agents Chemother.*, **7**: 78, 1975. *Antimicrob.*

7) Cosgrove RF, Beezer AE and Miles RJ: In vitro studies of amphotericin B combination with the imidazole antifungal compounds clotrimazole and miconazole. *J. Infect. Dis.*, **138**: 681, 1978.

8) Dickinson JM and Mitchison DA: Bactericidal activity in vitro and in the guinea-pig of isoniazid, rifampicin and ethambutol. *Tubercle*, **57**: 251, 1976.

9) Dupont B and Drouhet E : In vitro synergy and antagonism of antifungal agents against yeast-like fungi. *Postgrad, Med. J.*, **55**: 683, 1979.

10) Hamilton-Miller JMT: Chemistry and biology of polyene macrolide antibiotics, *Bacteriol. Rev.*, **37**: 166, 1973.

11) Hoeprich PD and Huston AC: Susceptibility of *Coccidioides immitis, Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, fluorocytosine and clotrimazole, J. Infect. Dis., **132**: 133, 1975.

12) Hoeprich PD and Huston AC: Effect of culture media on the antifungal activity of miconazole and amphotericin B methyl ester. *J. Infect. Dis.*, **134**: 336, 1976.

13) Hobby GL and Lenert TF: The antimycobacterial activity of rifampin. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **97**: 713, 1968.

14) Hughes CE, Harris C, Moody JA, Peterson LR and Gerding DN : In vitro activities of amphotericin B in in combination with four antifungal agents and rifampin against *Aspergillus* spp., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**: 560, 1984.

15) Kitahara M, Seth VK, Medoff G and Kobayashi GS: Activity of amphotericin B, 5-fluorocytosine and rifampin against six clinical isolates of *Aspergillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **9**: 915, 1976.

16) Kobayashi GS, Cheung SC, Schlessinger D and Medoff G : Effects of rifamycin derivatives, alone and in combination with amphotericin B againt *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5**: 16, 1974.

17) Kobayashi GS, Medoff G, Schlessinger D, Kwan CN and Musser WE : Amphotericin B potentiation of rifampicin as an antifungal agent against the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *Science*, **177**: 709, 1972.

18) Lester W: Rifampin : A semisynthetic derivative of rifamycin-a prototype for the future. *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**:85, 1972.

19) Lorian V and Finland M: In vitro effect of rifampin on mycobacteria. *Appl. Microbiol.*, **17**: 202, 1969.

20) Medoff G, Comfort M and Kobayashi GS: Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against yeast-like organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **138**: 571, 1971.

21) Medoff G, Kobayashi GS, Kwan CN, Schlessinger D and Venkov P: Potentiation of rifampicin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by amphotericin B. *Proc. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 196, 1972.

22) Montgomerie JZ, Edwards JE Jr and Guze LB: Synergism of amphotericin B and 5-fluorocytosine for *Candida* species. *J. Infect. Dis.*, **132**: 82, 1975.

23) Rabinovich S, Shaw BD, Bryant T and Donta ST: Effect of 5-fluorocytosine and amphotericin B against *Candida albicans* in mice. *J. Infect. Dis.*, **130**: 28, 1974.

25) Ribner B, Kensch BT, Hanna BA and Perloff M: Combibation amphotericin B, rifampin therapy for pulmonary aspergillosis in leukemic

patients. *Chest*, **70**: 681, 1976. 681,

26) Rifkind D, Crowder ED and Hyland RN: In vitro inhibition of *Coccidioides immitis* strains with amphotericin B plus rifampin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **6**: 783, 1974.

27) River S and Silvestri LG: Rifamycins: A general view. *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**: 199, 1972.

28) Shadomy S, Wagner G, Espinel-Ingroff A and Davis BA: In vitro studies with combinations of 5-fluorocytosine and amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**: 117, 1975.

29) Titsworth E and Grunberg E: Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine and amphotericin B against *Candida albicans* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**: 306, 1973.