

## 리팜피신과 플로로퀴놀론계 항균제에 내성인 *Bifidobacterium infantis* OFR-525 균주

장현아 · 권애란 · 오태권 · 김동현\* · 최응칠\*

서울대학교 약학대학, \*경희대학교 약학대학

(Received November 20, 1998)

### *Bifidobacterium infantis* OFR-525 Strain Resistant to Rifampicin and Fluoroquinolones

Hyun-Ah Chang, Ae-Ran Kwon, Tae-Kwon Oh,  
Dong-Hyun Kim\* and Eung-Chil Choi\*

\*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea and

\*College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea

**Abstract**—*Bifidobacterium infantis* K-525 isolated from healthy Korean was susceptible to rifampicin and fluoroquinolones and resistant to other antituberculosis agents. When the preparation of this strain is taken as a therapeutics for human intestinal disorders with rifampicin or fluoroquinolones, its therapeutic effect can not be expected. So, *B. infantis* RFR-525 resistant to rifampicin was obtained by treating the parent *B. infantis* 525 with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *B. infantis* OFR-525 was produced by serial passage of *B. infantis* RFR-525 on agar with 2-fold minimal inhibitory concentration of ofloxacin. *B. infantis* OFR-525 was resistant to antituberculosis agents and fluoroquinolones up to 4~128 fold higher than that for the original strain. The resistance of *B. infantis* OFR-525 against rifampicin and ofloxacin was maintained *in vivo* and *in vitro*. Conclusively, *B. infantis* OFR-525 can be regarded as a promising strain which can be developed as the preparation for the treatment of the intestinal disorders of the tuberculosis patients under rifampicin and ofloxacin therapy.

**Keywords** □ *Bifidobacterium infantis* OFR-525, rifampicin, fluoroquinolones, multi-step mutation, resistance.

유산을 생성하는 *Bifidobacterium* spp. *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus bifidus*, *Lac acidophilus*,<sup>1)</sup> 낙산을 생성하는 *Clostridium butyricum*,<sup>2)</sup> 그리고 *Bacillus mesentericus* 등은 소장이나 대장에서 유해균의 증식을 억제할 뿐만 아니라 유해균이 생성하는 유해물질(부패산물, 독소 등)을 감소시켜 정상효과를 나타냄으로써 장내 건강을 유지시켜 준다.

한편 결핵환자 및 나병환자가 항결핵제 또는 항나병제를 장기복용하는 경우에는 장내 정상 세균총이 파괴되어 흡수부진, 소화불량 등의 장질환을 일으킬수 있으

므로 위의 약물과 정상용 생균제제를 병용하는 것이 바람직하다고 Gordon<sup>3)</sup> 등이 보고한 바 있다. 그런데 이 때 사용되는 약물들이 정상용 균주를 사멸시키거나, 반대로 정상균주가 약물을 불활성화시키게 되면 정상제로서 유용하지 않게 된다.

많은 연구자들이 사람의 장내세균인 *Bifidobacterium* spp.를 분리해내었다.<sup>4)</sup> 사람의 장내세균 일부가 대장암, 변비등을 비롯한 여러 장관질환을 유발할 수 있는 효소를 생성하여 인체에 유해하기 때문에<sup>5-7)</sup> 최근 김<sup>8)</sup> 등은 건강한 우리나라 사람의 분변에서 유해효소의 활성을 저해할 수 있는 3종의 *Bifidobacterium* spp.속 세균을 분리하였다. 본 실험에 앞서 김 등이 분리한 유해효소 억제효과를 보이는 *Bifidobacterium breve* K-110,

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802

*B. breve* K-111과 *B. infantis* K-525등에 대한 11종의 항결핵제 및 항나병제의 최소저지농도(MIC)를 측정할 결과 모균주가 rifampicin과 ofloxacin에 대해 감수성을 갖고 있음이 밝혀졌다.<sup>9)</sup>

본 실험에서는 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 처리로 얻은 rifampicin 내성균주 *B. infantis* RFR-525를 다단계 자연돌연변이 방법으로 처리하여 fluoroquinolone계 항생제에도 내성을 나타내는 이중 내성균주인 *B. infantis* OFR-525를 얻었다. 이 균주에 대하여 정상용 생균제제로서의 개발 가능성을 검토하기 위하여 *in vitro* 및 *in vivo* 내성유지 실험을 실시하였다.

### 실험방법

**실험균주** - 본 실험에서는 김 등이 분리한 *B. infantis* K-525 균주를 사용하였다.<sup>8)</sup>

**배지** - *Bifidobacterium*속 세균의 생육배지로는 blood liver(BL) broth(Difco Co. USA)를 사용하였고 보관용배지로는 skim milk broth(Becton Dickinson, Cockeysville, USA)를 사용하였다. 혐기성 배양은 Gas Pak Plus(Becton Dickinson)와 anaerobic indicator(Becton Dickinson)을 사용하였다.

**최소 저지 농도(MIC)의 측정** - MIC 측정대상으로 kanamycin, pyrazinamide, rifampicin, D-cycloserine, ethambutol, INAH, sparfloxacin, ciprofloxacin, rufloxacin, levofloxacin, ofloxacin등의 항결핵제 및 항나병제로 사용중이거나 개발중인 항생, 항균제를 사용하였다. 균주들에 대한 항균제의 최소저지농도측정은 NCCLS<sup>10)</sup>(National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 액체배지 희석법에 의하여 실시하였다. BL broth에 전 배양한 균액을  $10^6$  CFU/ml로 희석하여 2배 액체희석법으로 만든 항생물질 희석계열에 최종농도가  $5 \times 10^0$  CFU/ml로 되도록 접종하였다. 37°C에서 36시간 혐기배양한 후 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 MIC로 하였다.

**MNNG 처리와 rifampicin에 내성 균주의 선별** - Skim milk broth에 보관하고 있는 *B. infantis* K-525 모균주를 37°C에서 하룻밤 전배양한 후 새 배지에 접종하여 37°C에서 8시간 배양하였다(mid-log phase). 배양액을 5,000×g에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 버리고 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.8)로 세척한 후, 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.8)에 현탁시

켰다. 사용시 제조한 MNNG 용액을 50 µg/ml과 100 µg/ml이 되도록 가하였다. 이 때, 대조군에는 MNNG를 가하지 않고 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.8)에 현탁시켰다. 37°C에서 30분, 60분 그리고 120분 배양하여 돌연변이 반응을 일으켰다. 5,000×g에서 5분간 원심 분리하고 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.8)로 세척한 후, 새로운 BL-broth에 현탁시켰다. 현탁한 균액을 rifampicin이 10 µg/ml 함유된 BL-medium에 가하고 petri dish에 부은 후, 37°C에서 3일간 혐기성 배양하여 돌연변이 집락의 형성을 관찰하였다.

**Ofloxacin에 대한 자연돌연변이 유발과 이중내성 균주의 선별** - Skim milk에 보관하고 있는 rifampicin에 내성인 균주 *B. infantis* RFR-525를 37°C에서 전 배양한 후 다시 BL-broth에 mid-log phase까지 배양하고 6,000×g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고  $10^{10}$  CFU/ml로 모아 10 µg/ml의 rifampicin과 2-fold MIC 농도의 ofloxacin을 함유한 고체배지에 100 µl( $10^9$  CFU)씩 가하여 37°C에서 36~48시간 혐기성 배양하고 돌연변이 집락을 선발하였다. 선발된 돌연변이 균주를 ofloxacin의 농도가 단계별로 높은 배지로 점차 옮기면서 배양하였다.

**내성 돌연변이 균주의 *in vitro* 내성 유지 실험** - 약 2주에 한 번씩 4개월간 계대하여 각 항생물질의 MIC를 측정하여 내성이 소실되는지의 여부와 초기의 MIC가 그대로 유지되는지 여부를 확인하였다.

**내성 돌연변이 균주의 *in vivo* 내성 유지 실험** - 각 균은 1균은 정상대조군, 2균은 항생제(상용량의 5배)와 모균주 투여군, 3균은 항생제(상용량의 5배)와 내성균주 투여군으로 분류하였다. 실험균주와 항생제의 투여방법은 1일 1회로 유산균액 100 µl/ml( $4 \times 10^8$  CFU), 항생제는 rifampicin과 ofloxacin 각각을 일일 상용량의 5배인 100 mg/kg을 oral zonde needle을 사용하여 경구로 투여하였다. 균 투여 후 24시간 후에 배변을 시행하고 배변 직후의 분변을, 0°C를 유지한 상태에서 미리 무게를 칭량한 0.9 ml의 멸균 혐기성 희석액이 담긴 tube에 0.05~0.1 g을 채취한 후, 희석 비율이  $10^{-1}$ 이 되도록 희석하고, 완전히 균질화 하였다. 균질된 시료를 10배 연속 희석을 한 후 연속 4개의 희석액을 선택하여 각 균의 선택배지에 50 µl씩 분취한 후 top agar와 혼합하고 plate에 부었다. 혐기 배양 jar에 plate를 거꾸로 쌓은 후 anaerobic indicator와 gas pack을 넣은 후 신속하게 밀봉하고, 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 각

plate에 출현하는 집락수로 생균수를 산정하였으며, 균수에 대한 통계적 유의성은 Student's T-test를 이용하여 분석하였다.

**실험결과**

**이중내성균주의 분리** - MNNG를 50 µg/ml과 100 µg/ml의 농도로 30분, 60분 처리한 6개의 plate에서 내성 colony가 형성되었다. 이중 Rifampicin에 MIC가 128배 상승한 균주 중에서 안정된 내성을 보이는 균주를 선발하고 *B. infantis* RFR-525라고 명명하였다. *B. infantis* RFR-525 균주에 대하여 다단계 자연돌이방법을 사용하여 rifampicin과 ofloxacin에 이중 내성인 균주를 선발하고 *B. infantis* OFR-525라 명명하였다. 이 균은 ofloxacin에 대한 MIC가 32 µg/ml였으며 fluoroquinolone에 대한 MIC를 측정된 결과 OFLX는 16배, RFLX는 16배, LVFX는 2배, CPFX는 8배, SPFX는 4배 상승하였다(Table I, II).

**내성 돌연변이 균주의 in vitro 내성 유지** - Rifampicin과 fluoroquinolone계에 내성인 *B. infantis* OFR-525 균주를 4개월 동안 2주에 한 번씩 계대하여 MIC를 측정된 결과, MIC가 rifampicin이 256 µg/ml, ofloxacin이 32 µg/ml로 내성이 유지되었다.

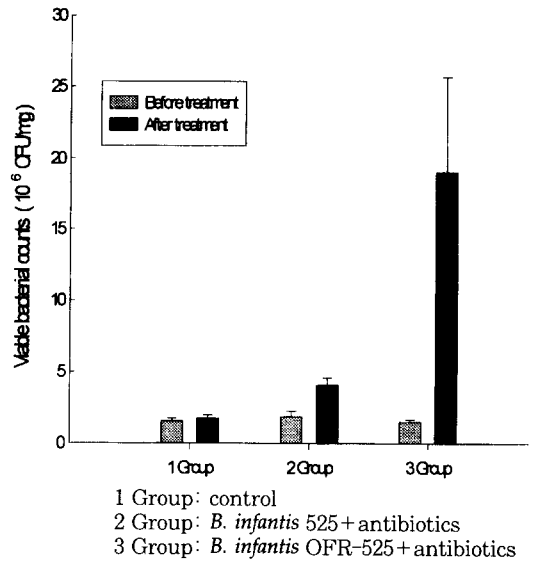
**내성 돌연변이 균주의 in vivo 내성 유지** - 정상 마우

**Table I**—MICs of *Bifidobacterium* spp. strain against antituberculosis agents

| Drugs         | MIC (µg/ml) |         |         |
|---------------|-------------|---------|---------|
|               | Parent      | RFR-525 | OFR-525 |
| Kanamycin     | 128         | 128     | 128     |
| Pyrazinamide  | >512        | >512    | >512    |
| Rifampicin    | 2           | 256     | 256     |
| D-Cycloserine | 256         | 512     | 512     |
| Ethambutol    | >512        | >512    | >512    |
| INH           | >512        | >512    | >512    |

**Table II**—MICs of *Bifidobacterium* spp. strain against fluoroquinolones

| Drugs         | MIC (µg/ml) |         |         |
|---------------|-------------|---------|---------|
|               | Parent      | RFR-525 | OFR-525 |
| Sparfloxacin  | 2           | 2       | 8       |
| Ciprofloxacin | 2           | 2       | 16      |
| Rufloxacin    | 8           | 8       | 32      |
| Levofloxacin  | 4           | 4       | 8       |
| Ofloxacin     | 2           | 2       | 32      |



**Fig. 1**—*In vivo* resistance maintenance of *B. infantis* OFR-525.

스균의 *Bifidobacterium*은 분변 1 g(Wet weight)당  $1.4 \times 10^6$  CFU/g 정도로 존재하였으나, 항생제와 모균주를 함께 투여한 군에서는  $4.1 \times 10^6$  CFU/g, 항생제와 내성균주를 함께 투여한 군에서는  $1.7 \times 10^7$  CFU/g로 증가하였다(Fig. 1). 따라서 *B. infantis* OFR-525는 *in vivo*에서도 rifampicin과 ofloxacin에 대하여 내성이 유지됨을 알 수 있다.

**고 찰**

정상균 *B. infantis* K-525는 높은 지방의 섭취로 활성화되는 장내 대장균의 유해한 효소의 활성을 저해하는, 인체의 장내세균총을 구성하는 아주 유익한 균으로서 김등이 건강한 한국인의 장으로부터 분리해 내었다.<sup>8)</sup>

본 연구에서는 김등이 분리한 *B. infantis* K-525를 항결핵제 및 항나병제에 내성을 갖는 돌연변이 균주로 개발하여 이들 항생제와 함께 투여할 수 있는 정상용 균주로 만들고자 하였다. *B. infantis* K-525의 항결핵제 및 항나병제 11종의 최소저지농도를 측정된 결과 다른 항결핵제에 대해서는 이미 높은 내성을 보였으나 rifampicin에 대해서는 MIC가 2 µg/ml로 높은 감수성을 나타냈고, 최근 임상에서 널리 사용되는 fluoroquinolone계 항생제에 대해서도 2~8 µg/ml로 비교적 높은 감수성을 나타내었다.<sup>9)</sup> 따라서 rifampicin과 fluoroquino-

lone제에 동시에 내성인 균주의 개발이 필요하였다.

모균주를 MNNG처리로 돌연변이시켜 항결핵제인 rifampicin에 내성인 *B. infantis* RFR-525 균주를 선발하고, 다시 다단계 자연돌연변이법으로 ofloxacin에 내성인 *B. infantis* OFR-525 균주를 선발하였다. RFR-525는 모균주에 비하여 128배 높은 MIC인 256 µg/ml을, OFR-525는 ofloxacin에 대하여 16배 높아진 32 µg/ml의 MIC를 나타내었다. 또한 다른 fluoroquinolone계에 대한 MIC도 4~16배 높아졌다.

선발된 이중 내성 돌연변이 균주인 *B. infantis* OFR-525의 rifampicin과 ofloxacin에 대한 내성유지 시험에서 4개월이 경과한 후에도 MIC가 >256 µg/ml(RFP), 32 µg/ml(OFLX)로 내성이 유지되어 복귀 돌연변이의 가능성은 없었다. 마우스를 이용한 동물실험을 통하여, *Bifidobacterium* 총 균수의 변화를 비교하였을 때, *B. infantis* OFR-525 내성균주를 RFP, OFLX과 병용 투여한 경우, 총 *B. infantis* OFR-525는 거의 정상 마우스군의 균수보다 10배나 높았고, *B. infantis* K-525 모균주와 위 항생제의 병용 투여시 3배의 증가도 보였는데 이는 항생제에 살아남은 몇 개의 균이 장까지 도달하여 번식한 것으로 생각된다. 따라서 *B. infantis* OFR-525는 *in vivo*에서도 RFP, OFLX에 대하여 내성 유지를 보임을 알 수 있었다.

현재 식품에서 한국형 유산균이 상품화되고 있으나 항균제와 병용시 사멸될 가능성이 높으므로 본 연구에서 개발한 균주로 정장용 생균제제로 만든다면 일반 식품과는 차별되는 우수한 의약품이 될 것으로 여겨진다.

### 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술 연구개발사업에 의한 지원에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사드립니다.

### 문 헌

1) Choi, S. S. : Development of *Clostridium bu-*

*tyricum* resistant to rifampicin. M. Sc. Thesis, Seoul Natl. Univ (1988).

- 2) Kim, H. S., Choi, S. S. Choi, E. C. *et al* : Development of *Latobacillus sporogenes* resistant to rifampicin, an antituberculosis agent. *Kor. J. Microbiol.* **27**, 155 (1989).
- 3) Gordon, D., Marcræ, J. and Wheeler, D. M. : Lactobacillus preparation for use with antibiotics I-II-III. *Lancet* **1**, 899 (1987).
- 4) Mitsuoka, T, Segal, T., Yamamoto, S. : Eine Vergesserte Methodik der qualitativ und quantitativ Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. *Zblt. Bak. I. Orig.*, **195**, 455 (1965).
- 5) Burkitt, D. P., Large bowel cancer : an epidemiologic jigsaw puzzle. *J. Natl Cancer Inst.*, **54**, 3 (1975).
- 6) Finegold, S. M. and Flora, D. J. A. : Fecal bacteriology of colonic polyp patients and control patients. *Cancer Res.*, **35**, 3407 (1975).
- 7) Salminen, S., Deighton, M. and Groblich, S., Lactic acid bacteria in health and disease. In Salminen, S. and von Wright, A. (Eds). *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker, Inc., New York, 199 (1974).
- 8) Park, H. Y., Choi, E. C., Kim, D. H. *et al* : Inhibitory effects of *Bifidobacterium* spp. isolated from a healthy Korean on harmful enzymes of human intestinal microflora. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 54 (1998).
- 9) Chang, H. A., Choi, K. H., Oh, T. G., Kwon, A. R., Kim, D. H., Choi, E. C. : Antibiotic susceptibility of *Bifidobacterium* spp. strains isolated from healthy Korean. *Yakhak Hoeji* **42**, 639 (1998).
- 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards : Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-third edition : approved standard M7-A3 NCCLS, Villanova, PA (1993).