

## Postantibiotic Effects and Postantibiotic Sub-MIC Effects of Antibiotics on *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*

Jin Hong and Si Young Lee\*

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Korea

(Received May 10, 2005 ; Accepted June 8, 2005)

Postantibiotic effects (PAE) refer to suppression of the bacterial growth following limited periods of exposure to an antibiotic and subsequent to the removal of the antibiotic agent. *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* are Gram-negative anaerobic bacteria associated with several periodontal diseases. In this study, postantibiotic effects (PAE), postantibiotic sub-MIC effect (PA SME) and sub-MIC effect (SME) of antibiotics on *F. nucleatum* ATCC 25586 and *P. gingivalis* W50 were investigated. The PAE was induced by 10X the MIC of antibiotic and antibiotic was eliminated by washing. The PA SMEs were studied by addition of 0.1, 0.2 and 0.3X MICs during the postantibiotic phase of the bacteria, and the SMEs were studied by exposition of the bacteria to antibiotic at the sub-MICs only. Amoxicillin, doxycycline and tetracycline induced PAE for *F. nucleatum* ATCC 25586 and *P. gingivalis* W50. But metronidazole and penicillin induced PAE for only *F. nucleatum* ATCC 25586. Metronidazole and doxycycline induced PA SME and SME for both species of anaerobic bacteria used in this study. The PA SME values for both strains were substantially longer than the SME values. The present study showed the existence of PAE, PA SME and SME for various antibiotics against *F. nucleatum* ATCC 25586 and *P. gingivalis* W50.

**Keywords:** postantibiotic effect, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*.

\*Corresponding author: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Korea. Tel.: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410, E-mail: siyoung@kangnung.ac.kr

### 서 론

세균을 항생제 처리 한 후 항생제를 제거하더라도 정상적인 세균 증식속도가 회복되기까지는 많은 시간이 소요된다고 알려져 있다(Cars and Odenholt, 1993). 이렇게 항생제 처리 후 세균 증식이 억제되는 효과를 postantibiotic effect (PAE)라고 하며 (Zhanet *et al.*, 1991) 이러한 현상은 penicillin에 노출된 포도구균과 연쇄구균에서 1940년대에 처음 관찰되었다(Bigger, 1944). 또한 충분히 높은 농도의 항생제(suprainhibitory antibiotic concentration)에 노출된 경험이 있는 세균을 다시 sub-MIC의 항생제에 노출시켰을 때 나타나는 효과인 postantibiotic sub-MIC effect (PA SME)와 항생제에 노출된 적이 없는 세균을 sub-MIC의 항생제에 노출시켰을 때 나타나는 효과인 sub-MIC effect (SME)도 보고되고 있다(Odenholt *et al.*, 1992).

PAE가 유발되는 기전은 항생제의 세균에의 부착부위에서 약물이 지속적으로 남아있음으로서 야기되는 것으로 보고되고 있다(Craig and Gudmundsson, 1991). 치명적이지 않게 손상을 입힌 후에 화학적인 작용을 회복하는데는 시간에 의존하여 일어나기 때문에 PAE가 나타난다고 알려져 있다(Craig and Gudmundsson, 1991).

최근에 이루어진 몇가지 연구의 예를 들면 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Enterococcus faecalis*의 sparfloxacin과 ciproxacin에 의한 PAE, 세균성 심내막염 환자에게서 분리된 *viridans streptococci*의 benzylpenicillin에 의한 PAE와 PA SME, SME 그리고 *Streptococcus pyogenes*와 *Streptococcus pneumoniae*의 vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin에 의한 PA SME, SME등이 보고 되고있다(Odenholt, 2001).

치주질환은 치아주위 조직에 존재하는 구강 혐기성 세균이 주원인이며, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*는 그람 음성균으로서 치주질환과 연관이 있는 병원균으로 알려져 있다(Socransky *et al.*, 1998). 지금까지의 연구에 의하면 많은 종류의 세균들이 다양한 항생제들에 의하여 PAE가 유발됨이 밝혀졌으나 치주질환의 원인세균에 대한 PAE의 연구는 전무한 상태다.

본 연구에서는 치주질환의 치료에 일반적으로 사용되는 항생제들인 amoxicillin, doxycycline, metronidazole, penicillin 그리고 tetracycline에 의한 이들 세균에 대한 PAE, PASME, SME를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 세균과 배양조건

*F. nucleatum* ATCC 25586의 배양에는 yeast extract 5 mg/ml (Difco, Detroit, MI, USA), hemin 5 µg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 menadione 10 µg/ml (Sigma Chemicals Co.)을 포함하는 Brain Heart Infusion broth (Difco)를 prereduce 시킨 후 사용하였다. *P. gingivalis* W50은 yeast extract 1 mg/ml, hemin 5 µg/ml과 menadione 1 µg/ml을 포함하는 pre-reduce된 trypticase soy broth (Difco)로 배양하였으며, 세균의 배양은 혐기성 배양기(Bactron Anaerobic Chamber, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, Oregon., USA, 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>)를 이용하였다.

### 항생제 최소 억제 농도(MIC)의 측정

Amoxicillin, doxycycline, metronidazole, penicillin 그리고 tetracycline (Sigma Chemical Co.)의 최소억제농도를 측정하기 위하여, 항생제 stock 용액은 pore size가 0.22 µm인 여과지 (Advantec MFS, Inc, Japan)에 여과하여 사용하였다. 최소억제농도는 항생제를 prereduce된 세균 배양 배지에 1/2 연속 희석하여 세균을 5×10<sup>5</sup> cells/ml 되게 접종한 후 유리 시험관을 이용한 macro-dilution 법으로 측정하였다. 각 항생제의 측정 범위는 0.002 µg/ml에서 1024 µg/ml이었다. MIC는 세균의 성장을 억제한 가장 낮은 농도로 하였다.

### Postantibiotic phase의 유발 및 Postantibiotic effect (PAE)

각각의 세균을 최대 증식 단계에서 얻어 세균 배양 배지로 OD<sub>660</sub>=0.1 되게 현탁하고, 각각의 항생제를 10× MIC 농도로 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 혐기성 세균 배양기에서 배양하였다. 대조군으로는 항생제가 없는 세균 배양 배지에서 같은 조건으로 배양하였다. 항생제 처리 후 PBS로 3회 세정하여 항생제를 완전히 제거하였

다. PAE 측정을 위하여 항생제 전 처리된 세균과 항생제 처리되지 않은 세균을 새로운 배양 배지에 접종하고 혐기성 세균 배양기에 배양하며 일정 시간 간격으로 세균 배양액의 현탁도를 660 nm에서 측정하였다. 세균의 성장 곡선을 그리고, 세균의 성장이 지연된 정도를 계산하여 PAE를 조사하였다.

$$PAE = T - C$$

T는 항생제에 미리 노출된 세균을 항생제가 처리되지 않은 새로운 배지에 배양했을 때의 세균 성장곡선에서 최대 흡광도 값의 50%에 도달하는데 걸리는 시간이며, C는 항생제를 처리하지 않은 세균의 성장곡선에서 최대 흡광도 값의 50%에 도달하는 시간으로 세균의 성장 지연 시간은 이 두 시간의 차이로 계산하였다(Lowdin *et al.*, 1993).

### Sub-MIC effect (SME), postantibiotic sub-MIC (PA SME)의 측정

PA SME를 결정하기 위하여 10× MIC 항생제로 전 처리한 세균을 배양 후 PBS로 3회 세정하여 항생제를 완전히 제거한 후 각각의 항생제가 0.1×, 0.2×, 0.3× MIC 농도로 첨가된 새로운 배지에 PAE 측정방법에서와 같이 배양하며 성장 곡선을 그려 PA SME를 측정하였다.

SME는 항생제의 전처리 없이, 0.1×, 0.2×, 0.3× MIC 농도의 항생제 존재 하에 세균을 배양하며 성장 곡선을 그려 측정하였으며, PA SME와 SME는 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$PA\ SME = T_{PA} - C$$

T<sub>PA</sub>는 항생제를 10× MIC로 처리한 후 항생제를 제거하고 다시 0.1×, 0.2×, 0.3× 농도의 항생제가 첨가된 새로운 배지에 배양했을 때의 세균 성장곡선에서 최대 흡광도 값의 50%에 도달하는데 걸리는 시간이며, C는 항생제를 처리하지 않은 세균의 성장곡선에서 최대 흡광도 값의 50%에 도달하는 시간으로 세균의 성장 지연 시간은 이 두 시간의 차이로 계산하였다

$$SME = T_s - C$$

T<sub>s</sub>는 항생제를 sub-MIC 항생제에만 처리한 세균성장 곡선에서 최대 흡광도 값의 50%에 도달하는데 걸리는 시간이며, C는 항생제를 처리하지 않은 세균의 성장곡선에서 최대 흡광도 값의 50%에 도달하는 시간으로 세균의 성장 지연 시간은 이 두 시간의 차이로 계산하였다.

## 결 과

### 최소억제농도 (MIC)

**Table 1.** Minimal inhibitory concentration determined by macro-dilution method

	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	<i>P. gingivalis</i> W50
Amoxicillin	0.03125 <sup>a</sup>	0.0158
Doxycycline	0.0158	0.0158
Metronidazole	0.00195	0.0625
Penicillin	0.0079	0.0079
Tetracycline	0.0158	0.03125

<sup>a</sup>µg/ml.

*F. nucleatum* ATCC 25586과 *P. gingivalis* W50는 위의 연구방법에서 설명한 각각의 배지를 사용하여 MIC를 측정하였고, macro-dilution 법에 의한 MIC는 Table 1에 나타내었다. *P. gingivalis* W50의 amoxicillin에 대한 MIC는 *F. nucleatum* ATCC 25586의 MIC 보다 낮게 관찰되었으며 *P. gingivalis* W50의 tetracycline과 metronidazole의 MIC는 *F. nucleatum* ATCC 25586의 MIC 보다 높게 나타났다. Doxycycline과 penicillin의 MIC는 두 균종에서 같게 관찰되었다.

**Postantibiotic phase의 유발 및 Postantibiotic effect (PAE), Sub-MIC effect (SME), postantibiotic sub-MIC (PA SME)**

항생제 처리 후 세균 성장이 일시적으로 지연되는 효과인 PAE는 실험에 사용된 세균 종에 따라 다양한 양상으로 관찰되었다. *F. nucleatum* ATCC 25586은 10x MIC의 항생제로 세균 처리한 경우 doxycycline에서 11.3 시간의 PAE를 관찰 할 수 있었으며 metronidazole은 9.6 시간의 PAE를 보였다. 반면 *F. nucleatum* ATCC 25586에서 penicillin은 단지 1.1시간의 PAE를 유발했다(Table 2). Doxycycline은 *P. gingivalis* W50에서 6.2시간의 PAE를 유발하였으며, metronidazole과 penicillin은 *P. gingivalis* W50에서는 PAE를 유발하지 않았다. *F. nucleatum* ATCC 25586에 대해 가장 큰 PAE를 보인 metronidazole과 doxycycline를 대상으로 각각의 세균에 대한 PA SME와 SME를 측정하였다(Table 3, 4). Metronidazole에 의한 PA SME와 SME는 *F. nucleatum* ATCC 25586이 *P. gingivalis* W50에 비하여 상대적으로 더 큰 효과를 보였다(Table 3). Metronidazole의 경우 *F. nucleatum* ATCC 25586이 0.3x MIC에서 15시간의 PA SME가 관찰되었으며, metronidazole에 대해 PAE를 나타내지 않은 *P. gingivalis* W50는 0.3x MIC에서 5.7시간의 PA SME를 보였다. PAE와 PA SME 그리고 SME는 *P. gingivalis* W50에 비하여 *F. nucleatum* ATCC 25586이 더 큰 효과를 나타내었다. Doxycycline은 PAE에서 *F. nucleatum* ATCC 25586이 더 긴 효과를 보인

**Table 2.** PAE (hour) of antibiotics with *F. nucleatum* ATCC 25586 and *P. gingivalis* W50

	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	<i>P. gingivalis</i> W50
Amoxicillin	7.0±0.3 <sup>a</sup>	3.8±0.8
Doxycycline	11.3±0.3	6.2±0.8
Metronidazole	9.6±0.6	0.0±0.0
Penicillin	1.1±0.1	0.0±0.0
Tetracycline	4.7±0.4	1.2±0.0

<sup>a</sup>Duration (h) of effect. Values are averages from three experiments.

**Table 3.** PA SME and SME of metronidazole with *F. nucleatum* ATCC 25586 and *P. gingivalis* W50

	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	<i>P. gingivalis</i> W50
PA SME		
0.1X	10.5±0.4 <sup>a</sup>	3.2±0.6
0.2X	12.1±1.0	5.3±0.7
0.3X	15.0±1.4	5.7±0.1
SME		
0.1X	1.8±0.8	3.0±0.8
0.2X	8.2±7.6	1.9±0.7
0.3X	11.8±7.1	3.7±0.1

<sup>a</sup>Duration (h) of effect. Values are averages from three experiments.

**Table 4.** PA SME and SME of doxycycline with *F. nucleatum* ATCC 25586 and *P. gingivalis* W50

	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	<i>P. gingivalis</i> W50
PA SME		
0.1X	9.4±0.2 <sup>a</sup>	14.0±0.4
0.2X	10.1±0.4	15.0±0.3
0.3X	10.5±0.2	18.0±3.4
SME		
0.1X	0.7±0.1	1.5±0.7
0.2X	1.2±0.3	2.1±0.7
0.3X	3.1±2.1	3.2±0.6

<sup>a</sup>Duration (h) of effect. Values are averages from three experiments.

반면 doxycycline에 대한 PA SME는 *P. gingivalis* W50에서 *F. nucleatum* ATCC 25586에 비하여 길게 관찰되었다(Table 4). Metronidazole과 doxycycline 모두 PA SME가 SME보다 상대적으로 큰 효과를 보였으며, 배지

에 포함한 항생제 농도가 높을수록 PA SME 및 SME 도 크게 관찰되었다.

## 고 찰

세균을 항생제 처리 한 뒤 항생제를 제거하더라도 정상적인 세균 증식속도가 회복되기까지는 많은 시간이 소요되는 것으로 알려져 있다. 이렇게 항생제 처리 후 세균증식이 억제되는 효과인 PAE는 항생제와 세균의 각각의 조합에 따라 특이한 양상으로 나타난다 (Zhanet *et al.*, 1991).

Odenholt-Tornqvist 등은 충분히 높은 농도 항생제 (suprainhibitory antibiotic concentration)에 노출된 경험이 있는 세균을 다시 sub-MIC의 항생제에 노출시켰을 때 나타나는 효과인 PA SME는 항생제에 노출된 적이 없는 세균을 다시 sub-MIC의 항생제에 노출시켰을 때 나타나는 효과 SME와 다르다고 보고하고 있다 (Odenholt *et al.*, 1992). 이들 연구에 의하면 PA SME는 SME 보다 훨씬 두드러지게 나타나는 것으로 보고되고 있다. *Streptococcus gordonii*와 *Streptococcus sanguis*를 대상으로 한 amoxicillin에 대한 연구에서도 두 균종 모두 PA SME가 SME보다 더 긴 효과를 나타내었다 (Lee, 2000). 본 연구의 실험결과도 *P. gingivalis* W50와 *F. nucleatum* ATCC 25586 모두 PA SME가 SME보다 상대적으로 큰 효과를 나타내었다. 몇몇 연구에 의하면 여러 종류의 항생제를 혼합하여 사용하는 경우에는 PAE에 다양한 양상으로 영향을 미친다고 보고하고 있다 (Gudmundsson *et al.*, 1993). 두개의 항생제를 혼합하였을 때, 개개의 항생제가 지니는 PAE를 단순히 산술적으로 합산한 정도로 PAE가 늘어나는 경우도 있었고, 어떤 항생제의 조합에서는 각각의 항생제가 지니는 PAE의 합산 보다도 더 증가된 PAE를 보이는 경우도 있었다 (Karlowsky *et al.*, 1994).

항생제 처리 후 세균 증식 억제를 유발하는 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 그러나 항생제가 결합한 세포 수용기로부터의 확산되는데 걸리는 시간, 항생제에 의해 손상된 세포가 정상적으로 회복되는데 요구되는 시간, 세균 내 성장 억제 물질의 생산, DNA 합성의 영향 등이 가능한 기전으로 제시되고 있다 (Li *et al.*, 1997). 예로 *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* 그리고 *P. aeruginosa*의 DNA 합성은 ciprofloxacin에 노출된 후에 회복되는 시기 동안 촉진된다고 보고하고 있다 (Gottfredsson *et al.*, 1995). 본 실험에서 amoxicillin, doxycycline, tetracycline은 *F. nucleatum* ATCC 25586, *P. gingivalis* W50에서 PAE를 유발하는 것으로 나타났다. 한편 metronidazole과 penicillin은 *F. nucleatum* ATCC 25586에서만 PAE를 유발하는 것으로 나타났다. Metronidazole과

doxycycline은 실험에 사용한 두 가지 두 균종 모두에서 PA SME와 SME를 유발하였다.

항생제의 내성균의 증가로 인해 치료 실패율이 높아짐에 따라 항생제 선택 및 투여 용량 결정에 약동학 (pharmacokinetics)과 약력학 (pharmacodynamics)에 관한 기본지식이 유용하게 사용되고 있다. 항생제에 따라 흡수, 분포 및 배설이 다를 뿐 아니라, 용법에 따라서 혈청 중 항생제의 시간별 농도가 달라지고, 이것은 조직과 체액 중의 농도에 영향을 준다 (Craig, 1998). 항생제가 다양한 종류의 세균에 영향을 미치는 것으로 보고됨에 따라, 이들 세균 감염의 치료 시 항생제 투여량, 투여빈도, 항생제의 선택에 있어서 이러한 연구 결과들이 직접적으로 활용되고 있다 (Odenholt, 2001). 즉 어떤 종류의 세균에 대하여 긴 PAE 또는 PASME를 유발하는 항생제는 이 전보다 약물투여 간격을 길게 함으로써, 약물의 효능은 그대로 지속하면서 부작용은 최소화 할 수 있을 것이다. 항생제를 간헐적으로 투여할 경우 혈중 항생제 농도가 sub-MIC 농도로 존재하는 기간이 빈번히 생기게 되므로, PA SME는 PAE 보다 더 in-vivo에 가까운 상황으로 여겨지고 있다 (Cars and Odenholt, 1993).

본 연구를 통하여 치주질환 원인 세균으로 알려지고 있는 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*의 항생제에 대한 PAE, PA SME 그리고 SME를 관찰할 수 있었다. 치주질환 치료 시 사용되는 항생제의 투여빈도 및 투여량의 결정에 PAE 및 PASME를 활용하기 위하여서는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 과학기술재단의 지원에 의하여 연구되었음 (R05-2002-000-00097-0).

## 참고문헌

- Bigger, J.W.: The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Ir. J. Med. Sci.* **227**:533-568, 1944.
- Cars, O. and Odenholt, T.I.: The postantibiotic sub-MIC effect in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**:159-166, 1993.
- Craig, W. A.: Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1-12, 1998
- Craig, W.A. and Gudmundsson, S: The postantibiotic effect. *Antibiotics in laboratory medicine*: 403-31, 1991.
- Gottfredsson, M., Erlendsdottir, H. and Gudmundsson, S.: Different patterns of bacterial DNA synthesis during the postantibiotic effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:

- 1314-1319, 1995.
- Gudmundsson, S., Einarsson, S., Erlendsdottir, H., Moffat, T., Bayer, W. and Craig, W.A.: The post-antibiotic effect of antimicrobial combinations in a neutropenic murine thigh infection model. *J. Antimicrob. Chemother.* **31(SupplD)**: 177-191, 1993.
- Karlowsky, J.A., Zhanel, G.G., Davidson, R.J. and Hoban, D.J.: Postantibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa* following single and multiple aminoglycoside exposures in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:937-947, 1994.
- Lee, S.Y.: Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of amoxicillin on *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguis*. *J. Chemother.* **12**:379-384, 2000.
- Li, R.C., Lee, S.W. and Kong, C.H.: Correlation between bactericidal activity and postantibiotic effect for five antibiotics with different mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**:39-45, 1997.
- Lowdin, E., Odenholt, T.I., Bengtsson, S. and Cars, O.: A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2200-2205, 1993.
- Odenholt, T.I.: Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int. J. Antimicrob. Agent.* **17**:1-8, 2001.
- Odenholt, T.I., Lowdin, E. and Cars, O.: Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin, and amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1852-1858, 1992.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. and Jr, K.R.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25**:134-144, 1998.
- Zhanel, G.G., Hoban, D.J. and Harding, G.K.: The postantibiotic effect. *DICP.* **25**:153-63, 1991.