

Postantibiotic Effects and Postantibiotic Sub-MIC Effects of Antibiotics on *Treponema Denticola*

Si Young Lee

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

(received September 8, 2009 ; revised September 11, 2009 ; accepted September 14, 2009)

Postantibiotic effect (PAE) is defined as the length of time that bacterial growth is suppressed following brief exposure to an antibiotic. In this study, the *in vitro* PAE, postantibiotic sub-MIC effect (PA SME) and sub-MIC effect (SME) of antibiotics on *Treponema denticola* ATCC 35405 were investigated. The PAE of doxycycline and metronidazole were 20.3 h and 25.0 h, respectively. The PA SMEs examined by addition of 0.1, 0.2 and 0.3X MICs during the postantibiotic phase of the bacteria for metronidazole were longer than those for doxycycline. In contrast, the SMEs for doxycycline were longer than those for metronidazole. The PA SME and SME values increased as the concentration of antibiotics increased. The present study illustrates the existence of PAE, PA-SME and SME for several antibiotics against *T. denticola*, thereby extending the pharmacodynamic advantages of these antibiotics.

Key words: postantibiotic effect, *Treponema denticola*, minimal inhibitory concentration

서 론

세균을 항생제로 짧은 시간 동안 처리하고 난 후 항생제를 제거하여 항생제 농도가 떨어지더라도 세균이 정상적인 세균 증식속도로 회복되기까지는 많은 시간이 소요되어 항생제 처리 후 세균 증식이 억제되는 효과를 보이게 된다(Cars and Odenholt, 1993). 이러한 현상을 pos-

tantibiotic effect (PAE)라고 하며(Zhanel et al., 1991) 여러 종류의 세균들이 다양한 항생제에 대하여 PAE를 보임이 알려져 왔다(Odenholt, 2001). 이 뿐만 아니라 충분히 높은 농도의 항생제 (suprainhibitory antibiotic concentration)에 노출된 경험이 있는 세균을 다시 sub-MIC의 항생제에 노출시키면 그 항생제에 노출된 적이 없는 균에 비해 증식에 필요한 시간이 늘어나는 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).

구강내에서 발견되는 세균들의 항생제에 대한 PAE 연구는 많이 이루어져 있지 않다. *Streptococcus gordonii*와 *Streptococcus sanguis*에 대한 amoxicillin의 PAE, PASME가 Lee에 의하여 알려졌으며(Lee, 2000), 최근에는 또 다른 구강세균인 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*가 metronidazole과 tetracycline 등에 의하여 PAE 및 PASME를 보인다고 보고 되었다(Hong and Lee, 2005).

Spirochetes는 나선형 형태를 가진 혐기성 세균으로, 구강내에 존재하는 spirochetes중 하나인 *Treponema*는 치주질환의 원인세균 중 하나로 알려져 있으며, 비뇨기계의 *Treponema pallidum*은 매독을 일으킨다. 그러나 이들은 증식 속도가 다른 세균에 비하여 느리며 특히 *T. pallidum*은 배양이 쉽지 않아 연구에 여러가지 어려움이 많은 것으로 알려져 있다(Paster et al., 2001). 특히 구강 *Treponema*는 치주 병소에서 *Porphyromonas gingivalis*와 *Tannerella forsythia*와 같은 그람 음성균과 함께 치주조직의 파괴를 일으켜 심각한 치주질환을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Socransky et al., 1998).

지금까지의 연구에 의하여 많은 종류의 세균들이 다양한 항생제들에 의하여 PAE가 유발됨이 밝혀졌으며 몇가

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

지 구강 세균의 PAE에 대하여 알려졌지만 *Treponema*에 대한 PAE는 아직 알려져 있지 않은 상태다. 본 연구에서는 치주질환의 치료에 일반적으로 사용되는 항생제들인 amoxicillin, doxycycline, metronidazole, penicillin 그리고 tetracycline에 의한 *Treponema denticola*에 대한 PAE, PASME, SME를 조사하였다.

재료 및 방법

세균과 배양조건

본 실험에서는 구강 spirochetes인 *T. denticola* ATCC 35405를 사용하였다. 세균 배양을 위하여 0.2% thiamine pyrophosphate, 10% sodium bicarbonate, 1% serum 그리고 0.2% fatty acid가 첨가된 NOS (new oral spirochete) 배지(Haapasalo et al., 1991)를 사용하였으며 세균의 배양은 혐기성 배양기 (Bactron Anaerobic Chamber, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, Oregon, USA, 90% N₂, 5% CO₂, 5% H₂)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 µm 여과지로 여과한 후 사용하였다. 최소억제농도(MIC)는 유리 시험관을 이용한 macro-dilution 법으로 측정하였다. 즉 혐기성세균 배양기에 2일 이상 prereduce 시킨 NOS 배지에 항생제를 첨가하고 1/2 연속 희석하여 세균을 5 × 10⁵ cells/ml 되게 접종하고 48시간 후 육안으로 세균 성장이 억제된 최소항생제 농도를 측정하였다. 각 항생제의 측정 범위는 0.002 µg/ml에서 1024 µg/ml 이었다.

Postantibiotic phase의 유발 및 Postantibiotic effect (PAE)

PAE, PA SME와 SME의 측정은 Lowdin 등(1991)과 Hong 등의 방법(2005)을 이용하였다. 각각의 세균을 최대 증식 단계에서 얻어 NOS 배지로 OD₆₆₀ = 0.1 되게 현탁하고, 각각의 항생제를 10 × MIC 농도로 첨가하여 37 °C에서 2시간 동안 혐기성 세균 배양기에서 배양하였다. 대조군으로는 항생제가 없는 NOS 배지에서 같은 조건으로 배양하였다. 항생제 처리 후 PBS로 3회 세정하여 항생제를 완전히 제거하였다. PAE 측정을 위하여 항생제 전 처리된 세균과 항생제 처리되지 않은 세균을 새로운 NOS 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.

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 0.1x, 0.2x, 0.3x MIC 농도로 첨가된 새로운 배지에 PAE 측정방법에서와 같이 배양하며 성장 곡선을 그려 PA SME를 측정하였다. SME는 항생제의 전처리 없이, 0.1x, 0.2x, 0.3x MIC 농도의 항생제 존재 하에 세균을 배양하며 성장 곡선을 그려 측정하였으며, PA SME와 SME는 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

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

T_{PA}는 항생제를 10x MIC로 처리한 후 항생제를 제거하고 다시 0.1x, 0.2x, 0.3x 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_s는 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

T. denticola ATCC 35405의 macro-dilution 법에 의한 MIC는 Table 1에 나타내었다. Amoxicillin과 metronidazole에 대한 MIC는 실험에 사용한 다른 항생제 보다 높았고, penicillin에 대한 MIC가 가장 낮게 관찰되었다. 항생제 처리 후 세균 성장이 지연되는 효과인 PAE는 metronidazole이 25시간 정도 세균 성장이 지연되는 효과를 보였고 doxycycline은 20.3시간 지연되는 효과를 보였다 (Table 2). MIC가 가장 낮았던 penicillin은 10.5시간의 효과를 보였으며 amoxicillin과 tetracycline은 12시간 정도의 효과를 보였다. 가장 큰 PAE를 보인 metronidazole과 doxycycline를 대상으로 *T. denticola*에 대한 PA SME와 SME를 측정하였다 (Table 3). Metronidazole에 의한

Table 1. Minimal inhibitory concentration of antibiotics for *T. denticola* ATCC 35405 determined by macro-dilution method

Antibiotics	MIC
Amoxicillin	0.0625 ^a
Doxycycline	0.03125
Metronidazole	0.0625
Penicillin	0.0079
Tetracycline	0.03125

^aµg/ml.

Table 2. PAE (hour) of antibiotics with *T. denticola* ATCC 35405

Antibiotics	PAE
Amoxicillin	12.0 ± 3.5 ^a
Doxycycline	20.3 ± 1.1
Metronidazole	25.0 ± 0
Penicillin	10.5 ± 0.7
Tetracycline	12.5 ± 3.5

^aDuration (h) of effect. Values are averages from three experiments.

Table 3. PA SME and SME of metronidazole with *T. denticola* ATCC 35405

	Doxycycline	Metronidazole
PA SME		
0.1X	24.8 ± 0.4 ^a	37.0 ± 0
0.2X	26.3 ± 0.4	38.0 ± 0
0.3X	26.5 ± 0.7	41.5 ± 0.7
SME		
0.1X	4.0 ± 0	1.3 ± 0
0.2X	14.8 ± 1.8	2.8 ± 0
0.3X	20.5 ± 0.7	3.5 ± 2.1

^aDuration (h) of effect. Values are averages from three experiments.

PA SME는 doxycycline에 의한 PA SME 보다 크게 관찰되었으며 SME의 경우에는 그 반대였다. Metronidazole 과 doxycycline 모두 PA SME가 SME보다 상대적으로 큰 효과를 보였으며, 배지에 포함된 항생제 농도가 높을 수록 PA SME 및 SME도 크게 관찰되었다.

고 찰

본 연구를 통하여 치주질환 원인 세균 중 한 가지로 알려져 있는 *T. denticola*의 항생제에 대한 PAE, PA SME 그리고 SME를 관찰할 수 있었다. *Treponema*는 느린 성장 속도 때문에 PAE와 PA SME를 가지는 것으로 알려져 있는 다른 구강세균들인 *S. gordonii*, *S. sanguis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*에 비교하여 훨씬 더 긴 PAE와 PA SME를

보였다 (Hong and Lee, 2005; Lee, 2000).

이전의 연구들에 의하면 충분히 높은 농도의 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 효과인 SME 보다 훨씬 더 크게 나타나는 것으로 보고되고 있다(Odenholt et al., 1992). 본 연구에서도 doxycycline과 metronidazole 둘 다 PA SME가 SME 보다 훨씬 더 크게 관찰 되었으며, *S. gordonii*와 *S. sanguis*를 대상으로 한 amoxicillin에 대한 이전 연구에서도 두 균종 모두 PA SME가 SME보다 더 크게 나타났다(Lee, 2000). 다른 혐기성 구강세균을 이용한 이전 연구에서의 실험결과도 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum* 모두 PA SME가 SME보다 상대적으로 크게 나타났다 (Hong and Lee, 2005). 몇몇 연구에 의하면 여러 종류의 항생제를 혼합하여 사용하는 경우에는 PAE에 다양한 양상으로 영향을 미친다고 보고하고 있다(Gudmundsson et al., 1993). 구강세균을 이용한 연구에서, Lee 등은 *Streptococcus rattii*에 치사 효과를 가지는 Platelet Microbicidal Proteins (PMP)이 penicillin에 의하여 유발된 PAE를 더 증진 시킨다고 보고하였지만(Lee and Choe, 2004) 구강 혐기성 세균에서도 항생제 혼합에 의한 PAE 증진 효과가 있는 지는 연구가 필요할 것이다.

여러종류의 항생제들이 다양한 세균 중에 PAE를 유발하는 것으로 알려져 있지만 항생제 처리 후 세균 증식 억제를 유발하는 정확한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 예상하기로는 항생제가 결합한 세포 수용기로부터의 확산되는데 걸리는 시간, 항생제에 의해 손상된 세포가 정상적으로 회복되는데 요구되는 시간, 세균 내 성장 억제 물질의 생산, DNA 합성에의 영향 등이 원인으로 제시되고 있다(Li et al., 1997).

PAE나 PASME같은 약력학(pharmacodynamics)적인 정보들은 항생제의 선택이나 항생제의 적절한 용량을 결정하는데 있어서 점점 더 중요한 역할을 할 것이다. 본 연구 및 이전의 연구를 통하여 치주질환과 연관이 있는 *T. denticola*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* 등이 PAE, PA SME를 지니는 것으로 알려졌으나, 치주질환 치료시 사용되는 항생제의 투여빈도 및 투여량의 결정에 PAE 및 PASME를 활용하기 위하여서는 더 광범위한 연구 결과가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Gudmundsson S, Einarsson S, Erlendsdottir H, Moffat J, Bayer W, Craig WA. The post-antibiotic effect of antimicrobial combinations in a neutropenic murine thigh infection model.

- J Antimicrob Chemother. 1993;31 Suppl D:177-91.:177-91.
- Haapasalo M, Singh U, McBride BC, and Uitto VJ. Sulfhydryl-dependent attachment of *Treponema denticola* to laminin and other proteins. Infect Immun. 1991;59:4230-7.
- Hong J, Lee SY. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of antibiotics on *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. Int J of Oral Biol. 2005;30:59-63.
- Lee SY. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of amoxicillin on *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguis*. J Chemother. 2000;12:379-84.
- Lee SY, Choe SJ. Penicillin-induced killing and postantibiotic effect in oral streptococci are enhanced by platelet microbicidal proteins. Int J Antimicrob Agents. 2004;23:457-61.
- Li RC, Lee SW, Kong CH. Correlation between bactericidal activity and postantibiotic effect for five antibiotics with different mechanisms of action. J Antimicrob Chemother. 1997;40:39-45.
- Lowdin E, Odenholt TI, Bengtsson S, Cars O. A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37:2200-5.
- Odenholt I, Holm SE, Cars O. An *in vivo* model for evaluation of the postantibiotic effect. Scand J Infect Dis. 1988;20:97-103.
- Odenholt TI, Lowdin E, Cars O. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin, and amikacin. Antimicrob Agents Chemother. 1992;36:1852-8.
- Odenholt I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. Int J Antimicrob Agents. 2001;17:1-8.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001;183:3770-83.
- Page RC, Engel LD, Narayanan AS, Clagett JA. Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. JAMA. 1978;240:545-50.
- Sela MN. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. Crit Rev Oral Biol Med. 2001;12:399-413.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25:134-44.
- Zhanel GG, Hoban DJ, Harding GK. The postantibiotic effect: a review of *in vitro* and *in vivo* data. DICP. 1991;25:153-63.