

蛇床子洗方の *Gardnerella vaginalis*에 대한 시험관 내 항균력 및 Metronidazole과 병용효과

대구한의대학교 한의과대학 부인과 교실

성현아, 박영선, 김동철

ABSTRACT

Antibacterial Effects of *Sasangjasaebang* Aqueous Extracts Against *Gardnerella Vaginalis* ATCC14018, and Combination Effects with Metronidazole

Hyun-Ah Sung, Young-Sun Park, Dong-Chul Kim

Dept. of Oriental Obstetric & Gynecology, college of Oriental Medicine,
DaeguHaany University

Purpose: The objective of this study was to observe the antibacterial effects of *Sasangjasaebang* (SSJSB) aqueous extracts, traditionally used for treating various gynecological diseases including vaginitis in Korea and their individual components - Cnidi Fructus(CF), Zanthoxyli Fructus(ZF) and Alumen(AL) against *Gardnerella vaginalis* ATCC14018, and combination effects of SSJSB extracts and Metronidazole were also monitored in this study.

Methods: Antibacterial activities against *Gardnerella vaginalis* ATCC14018 of SSJSB (CF : ZF : AL = 10 : 3 : 3) aqueous extracts and their individual components were detected using standard agar microdilution methods. In addition, the effects on the bacterial growth curve were also monitored at MIC and MIC×2 levels. The combination effects of SSJSB aqueous extracts and Metronidazole were observed by Checkboard Microtiter Assay and effects on bacterial growth curve treated with SSJSB aqueous extracts MIC + Metronidazole MIC, 1/2MIC and 1/4MIC, respectively. In the present study, *Gardnerella vaginalis* ATCC14018 were incubated under 37 °C, 10% CO₂ and bacterial growth curves were calculated at 24, 48, 72, 96 and 120 hrs after incubations.

Results: MIC of CF aqueous extracts, ZF aqueous extracts, AL powders and SSJSB aqueous extracts against *Gardnerella vaginalis* ATCC14018 were detected as $27.5 \pm 13.693(12.5 \sim 50)$, $6.875 \pm 3.423(3.125 \sim 12.5)$, $4.375 \pm 1.713(3.125 \sim 6.25)$ and $2.188 \pm 0.856(1.563 \sim 3.125)$ mg/ml, respectively. MIC of Metronidazole was detected as $7.6 \pm 5.367(2 \sim 16)$ µg/ml at same conditions. In addition, Metronidazole, CF aqueous extracts, ZF aqueous extracts, AL powders, and SSJSB aqueous extracts showed marked dosage-dependent inhibition of bacterial growth, and more dramatical inhibitions were detected in Metronidazole 1/2 MIC + SSJSB aqueous extracts MIC treatment as compared with each of single Metronidazole MIC and SSJSB aqueous extracts MIC treatments, respectively. Especially, quite similar inhibitory effects on bacterial growth were detected in Metronidazole 1/4 MIC + SSJSB aqueous extracts MIC treatment as compared with single Metronidazole MIC treatment in the present study. FIC index were detected as $0.475 \pm 0.137(0.375 \sim 0.625)$ at Checkboard Microtiter Assay.

Conclusion: The results obtained in this study suggest that CF aqueous extracts, ZF aqueous extracts, AL powders, and SSJSB aqueous extracts showed antibacterial effects against *Gardnerella vaginalis* ATCC14018, and they also showed dosage-dependent inhibitory effects on the bacterial growth. More potent antibacterial effects were detected in SSJSB aqueous extract as compared with individual components, respectively. In addition, combination treatment of SSJSB aqueous extract and Metronidazole showed more potent inhibitory effects on the growth of *Gardnerella vaginalis* with FIC index $0.475 \pm 0.137(0.375 \sim 0.625)$. According to these results, the combination of SSJSB aqueous extract and Metronidazole is synergistic, and it is expected that effective dosages of Metronidazole could be reduced to 1/4 levels in combination with SSJSB extracts. And it might be needed to make further studies to seek the herbs which have antibacterial effects on the *Gardnerella vaginalis* ATCC14018.

Key Words: Cnidi Fructus, Zanthoxyli Fructus, Alumen, *Sasangjasaebang*, Metronidazole, *Gardnerella vaginalis*

교신저자(김동철) : 경북 포항시 남구 대잠동 907-8번지 대구한의대 부속 포항한방병원

전화 : 054-271-8002 이메일 : kdc072@dhu.ac.kr

I. 서 론

세균성 질증은 질염의 흔한 원인 중 하나로 그람 다양성 다형태 단간균인 *Gardnerella vaginalis*가 주요 원인균이다¹⁾. 세균성 질증은 비염증성으로 질내의 정상세균총인 *Lactobacillus*가 *Gardnerella vaginalis*, 혐기성균, *Mycoplasma hominis* 등으로 대체되어¹⁾ 균질한 백색 질 분비물이 출현하는 것이 특징으로, 특히 질 분비물에 10% KOH를 첨가하면 독특한 amine 냄새가 난다²⁾. 세균성 질증은 방치하면 산부인과적인 합병증으로 조산, 산후자궁내막증, 골반내 염증과 자궁 및 질 주위의 염증³⁾, human immunodeficiency virus(HIV)의 감염율을 증가시키기도 한다⁴⁾. 또한 양막염, 제왕절개술 후 자궁내막염, 유산 후 골반염, 자궁적출술 후 봉와직염 등의 발생 빈도를 증가시키는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

세균성 질증을 나타내는 여성 중 98% 이상에서 발견되는 *Gardnerella vaginalis*^{6,7)}는 주요 원인균으로 여러 연구자들에 의해 세균성 질증 연구와 더불어 *Gardnerella vaginalis*에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다⁸⁾.

한의학에서 질염은 발현되는 증상에 의거하여 ‘帶下’, ‘陰痒’ 등의 병증에 속하는 것으로 볼 수 있으며⁹⁾, 陰部搔痒, 陰門搔痒, 陰癩, 陰部搔痒症, 陰蝕 등을 말한다¹⁰⁻¹⁶⁾.

일반적으로 세균성 질증의 치료는 Metronidazole을 질내 주입하거나 경구로 투여하는 방법을 많이 사용하는데¹⁷⁾ 내성과 부작용, 지속적인 재발성 등¹⁸⁻²²⁾이 문제점으로 대두되고 있어 보다 효과

적이고 안전한 외용약의 필요성이 절실한 실정이다²³⁾.

본 연구에 사용된 사상자세방은 殺蟲, 除濕痒하는 蛇床子, 溫中散寒, 止痛, 殺蟲하는 花椒, 외용시에 解毒, 燥濕止痒하는 白礬으로 구성되어진 복합처방으로 婦人前陰病 陰痒症에 사용되는 외용제 처방이다^{24,25)}. 본 연구는 상기의 3가지 약재를 복합적으로 처방하여 세균성 질증에 대한 항균력의 정도를 규명하기 위하여 계획하였다.

이에 본 연구에서는 세균성 질증의 주요 원인균으로 알려져 있는 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018 세균주를 이용하여 사상자세방 물 추출물 및 구성 약제 각각의 물 추출물의 항균력을 평가하였으며, Metronidazole과 사상자세방 물 추출물의 병용효과 및 시간대별 균 성장 곡선을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 약재 및 시료

본 실험에 사용된 사상자(*Chidi Fructus*; fruit part of *Torilis japonica*(Houtt.) D.C.), 화초(*Zanthoxyli Fructus*; fruit cortex parts of *Zanthoxylum planispinum* Sieb. et Zucc.) 및 백반(*Alumen*; grinded powder)은 효성약품사(대구, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 배지 및 시약으로 사용된 Brain Heart Infusion (BHI)과 말 혈청(heat inactivated horse serum)은 Difco(MI, USA)에서, agar는 Junsei(Japan)에서 각각 구입하였으며, 대

조약물인 Metronidazole은 Aldrich-Sigma (MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 96 well-plate는 Greiner(Germany)에서 구입하였으며, 이외 시약은 Aldrich-

Sigma(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

본 실험에 사용된 사상자세방 1첩 분량의 조성은 <Table 1>과 같다.

Table 1. Composition of Sasangjasaebang used in this study

藥物名	生藥名	學名	用量(g)
蛇床子	<i>Cnidi Fructus</i>	Torilis japonica (Houtt.) DC.	40
花 椒	<i>Zanthoxyli Fructus</i>	Zanthoxylum planispinum Sieb. et Zucc.	12
白 礬	<i>Alumen</i>	Alumen	12
Total			64

2. 추출방법

시중에서 구입한 사상자 및 화초 각 10 g을 취하여, 정제수 100 ml로 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator(N-N type; LAB Camp, Dajeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer(PVTFD10A; Ilshin Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜, 연갈색의 사상자 물 추출물 1.523 g(수율 15.23%)과 진갈색의 화초 물 추출물 2.13 g(수율 21.32%)을 얻어 실험에 사용하였으며, 백반은 전기 미세분쇄기(Sungchang Machine Co., Sungnam, Korea)에 세말하여, 회갈색의 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

선정된 약재 1첩 분량 64 g을 취하여 정제수 640 ml로 가열 추출한 후, 동결 건조시켜, 총 11.92 g(수율 약 18.63%)의 연갈색 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 각각의 사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물은 -20 °C의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 구입한 Metronidazole은 4 °C의 냉장고에 보관한 후 사용하였다. 사상자 물 추출물, 화

초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물은 사용한 용매인 증류수에 50 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었고, Metronidazole은 128 µg/ml까지 비교적 잘 용해되었다.

3. 균주 및 배지

본 실험에 사용된 Gardnerella vaginalis ATCC14018는 American Type Culture Collection Center(VA, USA)에서 동결 건조 상태로 구입하여 modified BHI 배지에 녹인 후 modified BHI agar에 2~3회 계대배양한 후 사용하였다. Modified BHI media는 이전의 방법²³⁾에 따라, 3.7%의 BHI powder와 20% 말의 혈청을 포함하며, 10% NaOH로 최종 pH를 7.4로 설정하였다. 이때 열처리된 말의 혈청(heat inactivated horse serum)은 BHI 용액과 별도로 멸균하여 혼합하였다. Modified BHI agar는 상기한 Modified BHI media 이외에 1.5% agar를 추가하여 제조한 후 87×15 mm의 조직배양접시에 평판배지로 만들어 사용직전까지 냉장 보관 후 사용하였다.

4. 균수의 측정

비교적 정확한 흡광도(Optical Density; OD)와 세균수의 상관관계를 알아보기 위하여, 정량 평판법(Quantitative Plating Methods, Standard Plate Count)을 이용하여 균수를 측정하였다²⁶⁻⁷⁾. Gardnerella vaginalis ATCC1401을 spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 20D Milton Roy Company, PA, USA)를 이용하여, 600 nm (OD600)에서의 흡광도를 0.5 Mcfarland standard와 같은 탁도로 조정된 다음, 균액을 10, 100, 1000 및 10,000배로 단계 희석하여 균의 농도가 1×10^4 CFU/ml이 되도록 만들어 modified BHI agar에 접종하여, 37 °C, 10% CO₂ 조건에서 24시간 배양한 다음 조직배양접시에 형성된 집락(colony) 수를 희석된 순서대로 OD와 비교하였다. 0.5 Mcfarland standard 탁도는 1.175% barium chloride dihydrate (BaCl₂ · 2H₂O) 0.05 ml과 1% sulfuric acid(H₂SO₄) 9.95 ml을 혼합하여 준비하였다²⁸⁾.

5. 항균활성도 측정

사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 최소저지농도를 표준액체배지희석법²⁹⁾을 이용하여 측정하였다. 즉, 각각의 단일 추출물과 사상자세방 물 추출물을 50 mg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195 및 0 mg/ml의 총 10개의 농도를 준비하고, 각각 멸균된 96 well plate에 100 µl씩 분주한 다음, 여기에 Gardnerella vaginalis의 단일 집락을 modified BHI 액체배지에 접종한 지

48 시간 후 OD600을 spectrophotometer로 측정하여, 2×10^6 cell 들어가도록 준비한 cell suspension 100 µl를 분주하였다. 이후 37 °C, 10% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다. Metronidazole 역시 128 µg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 및 0 µg/ml의 총 10개의 농도를 준비하고, 동일한 방법으로 cell suspension (2×10^6 cell)을 첨가한 다음 48시간 동안 37 °C, 10% CO₂ 조건하에 배양하였다. 표준액체배지희석법²⁹⁾으로 각각의 growth control well(시료를 첨가하지 않고 균만 배양한 well)과 시료가 함유된 well의 Gardnerella vaginalis의 성장을 육안적으로 비교 관찰하여, 균의 성장 억제가 나타나는 최소저지농도(Minimal Inhibition Concentration; MIC)를 측정하였으며, 모든 실험은 5회 반복하여 실시하였다.

6. 시간대별 Gardnerella vaginalis 성장곡선

각각 단일 물질의 균 성장 저해능을 평가하기 위해, 시간대별 균 성장 곡선³⁰⁾에 미치는 영향에 따라, Modified BHI 액체 배지에 Gardnerella vaginalis를 접종한 후, OD600을 spectrophotometer로 측정하여, Mcfarland 0.5 standard(1.5×10^8 CFU/ml)로 각 균의 탁도를 조절한 다음 100배 희석 하였다. 사상자 물 추출물(27.5 및 55 mg/ml), 화초 물 추출물(6.875 및 13.75 mg/ml), 백반 미세분말(4.373 및 8.746 mg/ml), Metronidazole(7.6 및 15.2 µg/ml) 및 사상자세방 물 추출물(2.188 및 4.373 mg/ml)을 각각 MIC 및 MIC×2 농도로 준비한 cell suspension과 혼합한 다음 37 °C, 10% CO₂ 조건하에 배양하면서 24,

48, 72, 96 및 120 시간 마다 OD를 측정하여, 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군의 균 성장과 실험군에서의 균 성장 억제 정도를 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하여 실시하였다.

또한 Metronidazole과 사상자세방 물 추출물의 균 성장에 미치는 병용효과를 평가하기 위해, 동일한 방법으로 준비된 cell suspension에 Metronidazole MIC (7.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 사상자세방 물 추출물 MIC (2.188 mg/ml), Metronidazole MIC(7.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + 사상자세방 물 추출물 MIC(2.188 mg/ml), Metronidazole 1/2 MIC(3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + 사상자세방 물 추출물 MIC(2.188 mg/ml) 및 Metronidazole 1/4 MIC(1.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + 사상자세방 물 추출물 MIC(2.188 mg/ml) 농도를 첨가한 다음, 37 °C, 10% CO₂ 조건하에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120 시간마다 OD를 측정하여, 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군과 균의 성장과 실험군에서의 균 성장 억제를 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하여 실시하였다.

7. Checkboard Microtiter Assay

Checkboard Microtiter Assay^{31,32)}법을 이용해 사상자세방 물 추출물과 Metronidazole의 병용에 따른 효과를 관찰하였다. Checkboard 검사는 96 well microtiter plate(Greiner, Frickenhausen, Germany)에 modified BHI 배지에 혼합된 균액 140 μl 와 시험할 두 가지 물질을 30 μl 씩 각각 첨가하였고, 균액은 0.5 McFarland 탁도의 균액을 희석하여, 최종 농도가 2×10^6 CFU/ml이 되게 하였다. 각 항균제 농도는 MIC의 0.06배에서 4배정도 범위에서 2배씩 희석하여(10단계 배수 희석), 96 well plate에 직각으로 분주하여, 100가지의 다양

한 농도 조합이 이루어지도록 하였다. 이후 37 °C, 10% CO₂ 조건하에 48 시간 배양한 후 각 well의 균 성장을 육안적으로 판독하였다. 병합효과는 이전의 방법들^{31,32)}에 따라, Fractional inhibitory concentration(FIC) index를 다음과 같이 계산하여 평가하였다.

$$\text{FIC A} = (\text{MIC of Drug A}^\dagger \text{ in combination}) / (\text{MIC of Drug A}^\dagger \text{ alone})$$

$$\text{FIC B} = (\text{MIC of Drug B}^\ddagger \text{ in combination}) / (\text{MIC of Drug B}^\ddagger \text{ alone})$$

$$\text{FIC index} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$$

† : Drug A = Metronidazole

‡ : Drug B = *Sasangjasaebang* aqueous extracts

판독은 FIC index 0.5 이하일 경우에는 상승(synergistic), 0.5에서 1 사이일 경우에는 부분상승(partially synergistic), 1에서 4 사이일 경우에는 무관(indifferent), 4 이상일 경우에는 길항(antagonistic)으로 해석하였다^{31,32)}. 모든 실험은 5회 반복하여 실시하였다.

8. 통계처리

모든 수치는 5회 반복실험의 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 균 성장 곡선에 미치는 영향은 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산 동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우에는 one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다.

모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하였으며, *P*-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. 항균 활성도(MIC)

사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물, Metronidazole의 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018에 대한 MIC를 표준액체배지희석법으로 평가하였다.

그 결과 사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물의 MIC는 각각 $27.5 \pm 13.693(12.5 \sim 50.0)$, $6.875 \pm 3.423(3.125 \sim 12.5)$, $4.375 \pm 1.713(3.125 \sim 6.25)$ 및 $2.188 \pm 0.856(1.563 \sim 3.125)$ mg/ml로 관찰되어, 사상자세방 물 추출물, 백반 미세분말, 화초 물 추출물 및 사상자 물 추출물 순으로 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018에 대한 항균력을 나타내었다. 한편 Metronidazole의 MIC는 $7.6 \pm 5.367(2.0 \sim 16.0)$ µg/ml로 관찰되었다.

Table 2. Minimal Inhibition Concentration (MIC) against *Gardnerella vaginalis* Detected in This Study by Agar Microdilution Method

Test materials	MIC	Ranges
<i>Cnidi Fructus</i> extracts (mg/ml)	27.500±13.693	12.500~50.000
<i>Zanthoxyli Fructus</i> extracts (mg/ml)	6.875±3.423	3.125~12.500
<i>Alumen</i> powders (mg/ml)	4.375±1.713	3.125~6.250
<i>Sasangiasaebang</i> extracts (mg/ml)	2.188±0.856	1.563~3.125
Metronidazole (µg/ml)	7.600±5.367	2.000~16.000

2. 시간별 *Gardnerella vaginalis* 성장 곡선

1) 사상자 물 추출물의 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향
시료를 첨가하지 않은 대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 101.20 ± 8.41 , 115.20 ± 12.87 , 134.80 ± 6.46 , 144.20 ± 8.26 및 $149.80 \pm 9.52 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

사상자 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 87.60 ± 8.35 , 95.80 ± 9.36 , 114.40 ± 13.24 , 127.20 ± 10.33 및 $127.20 \pm 10.33 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

사상자 물 추출물 MIC×2 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 80.80 ± 9.01 , 88.20 ± 12.17 , 101.80 ± 6.83 , 108.80 ± 8.44 및 $119.80 \pm 8.07 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

결과적으로 사상자 단독 물 추출물 처리군에서 배양 24시간 후부터 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 처리 용량 의존적인 균 수의 감소가 관찰되어 유의성이 인정되었다($P < 0.01$ 또는 $P < 0.05$).

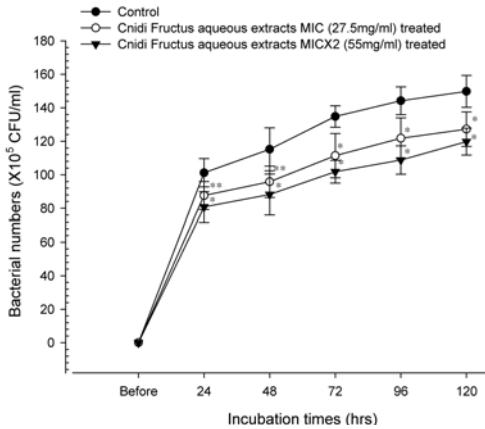


Fig. 1. Effects of *Cnidi Fructus* Aqueous Extracts on the Growth of *Gardnerella vaginalis* with Incubation Times (*: $P < 0.01$, **: $P < 0.05$).

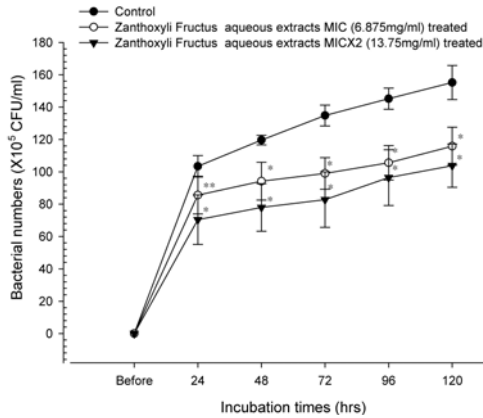


Fig. 2. Effects of *Zanthoxyli Fructus* Aqueous Extracts on the Growth of *Gardnerella vaginalis* with Incubation Times (*: $P < 0.01$, **: $P < 0.05$).

2) 화초 물 추출물의 시간대별 균 성장 곡선에 미치는 영향

시료를 첨가하지 않은 대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 103.40 ± 6.66 , 119.60 ± 2.97 , 134.80 ± 6.46 , 145.20 ± 6.53 및 $155.20 \pm 10.55 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

화초 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 85.60 ± 11.63 , 94.20 ± 11.69 , 99.00 ± 9.80 , 105.60 ± 10.67 및 $115.80 \pm 11.73 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

화초 물 추출물 MICx2 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 70.40 ± 15.27 , 78.00 ± 14.70 , 82.80 ± 17.17 , 96.40 ± 17.23 및 $103.80 \pm 13.33 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

결과적으로 화초 단독 물 추출물 처리군에서 배양 24시간 후부터 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 처리 용량 의존적인 균 수의 감소가 관찰되어 각각 유의성이 인정되었다($P < 0.01$ 또는 $P < 0.05$).

3) 백반 미세분말의 시간대별 균 성장 곡선에 미치는 영향

시료를 첨가하지 않은 대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 101.80 ± 11.80 , 117.40 ± 12.30 , 131.80 ± 11.78 , 143.80 ± 14.52 및 $150.00 \pm 16.23 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

백반 미세분말 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 76.40 ± 8.65 , 86.80 ± 9.04 , 93.20 ± 9.28 , 99.60 ± 12.84 및 $109.20 \pm 14.06 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

백반 미세분말 MICx2 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 60.00 ± 6.32 , 70.20 ± 9.23 , 76.60 ± 10.06 , 82.40 ± 13.39 및 $92.60 \pm 13.18 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

결과적으로 백반 미세분말 처리군에서 배양 24시간 후부터 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 처리 용량 의존적인 균 수의 감소가 관찰되어 각각 유의성이 인정되었다($P < 0.01$).

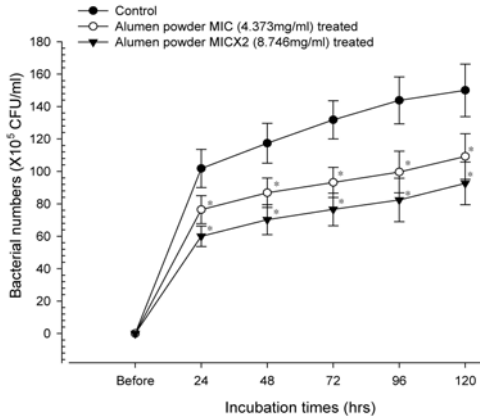


Fig. 3. Effects of *Alumen* Powders on the Growth of *Gardnerella vaginalis* with Incubation Times (*: $P < 0.01$).

4) Metronidazole의 시간대별 균 성장 곡선에 미치는 영향

시료를 첨가하지 않은 대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 113.60 ± 3.97 , 125.20 ± 4.97 , 138.20 ± 6.72 , 146.80 ± 8.14 및 $153.00 \pm 9.62 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

Metronidazole MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 56.60 ± 8.99 , 58.00 ± 8.94 , 65.80 ± 8.93 , 68.60 ± 9.45 및 $73.80 \pm 10.57 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

Metronidazole MICx2 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 49.40 ± 10.21 , 52.00 ± 14.28 , 52.40 ± 15.95 , 54.00 ± 15.33 및 $58.20 \pm 18.02 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

결과적으로 Metronidazole 단독 처리군에서 배양 24시간 후부터 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 처리 용량의존적인 균 수의 감소가 관찰되어 각각 유의성이 인정되었다($P < 0.01$).

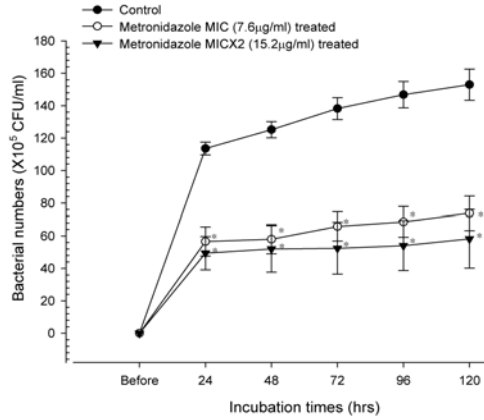


Fig. 4. Effects of Metronidazole on the Growth of *Gardnerella vaginalis* with Incubation Times (*: $P < 0.01$).

5) 사상자세방 물 추출물의 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향

시료를 첨가하지 않은 대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 112.40 ± 8.29 , 127.40 ± 10.55 , 138.80 ± 9.55 , 149.60 ± 9.66 및 $154.60 \pm 9.53 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 71.60 ± 7.23 , 81.00 ± 8.37 , 87.40 ± 8.91 , 98.20 ± 6.46 및 $103.80 \pm 8.23 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

사상자세방 물 추출물 MICx2 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 64.60 ± 5.03 , 68.80 ± 5.72 , 77.20 ± 2.28 , 84.60 ± 5.32 및 $90.00 \pm 7.48 \times 10^5$ CFU/ml로 관찰되었다.

결과적으로 사상자세방 물 추출물 처리군에서 배양 24시간 후부터 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 처리 용량의존적인 균 수의 감소가 관찰되어 각각 유의성이 인정되었다($P < 0.01$).

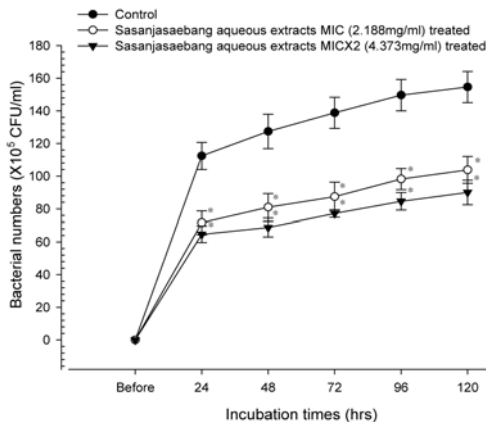


Fig. 5. Effects of *Sasangjasaebang* Aqueous Extracts on the Growth of *Gardnerella vaginalis* with Incubation Times(*:P<0.01)

6) Metronidazole과 사상자세방 물 추출물의 병용 처리가 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향

시료를 첨가하지 않은 대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 107.80 ± 9.15, 119.00 ± 9.03, 130.60 ± 8.38, 139.20 ± 11.99 및 149.60 ± 13.20 × 10⁵ CFU/ml로 관찰되었다.

Metronidazole 단독 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 59.00 ± 2.74, 62.00 ± 2.74, 66.60 ± 2.70, 70.20 ± 4.44 및 75.00 ± 5.79 × 10⁵ CFU/ml로 관찰되었다.

사상자세방 물 추출물 단독 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 74.80 ± 5.12, 81.00 ± 6.89, 88.40 ± 9.37, 94.40 ± 8.11 및 105.20 ± 13.66 × 10⁵ CFU/ml로 관찰되었다.

Metronidazole MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 34.40 ± 9.18, 35.80 ± 8.87, 41.60 ± 13.13, 54.00 ± 16.09 및 59.40 ± 17.64 × 10⁵ CFU/ml로 관찰되었다.

Metronidazole 1/2 MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 41.20 ± 9.04, 46.00 ± 11.87, 51.00 ± 12.69, 63.20 ± 13.07 및 67.40 ± 11.67 × 10⁵ CFU/ml로 관찰되었다.

Metronidazole 1/4 MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 59.40 ± 4.34, 64.20 ± 7.29, 67.40 ± 6.02, 70.60 ± 7.92 및 75.20 ± 9.73 × 10⁵ CFU/ml로 관찰되었다.

결과적으로 Metronidazole MIC 농도 처리군, 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군, Metronidazole MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군, Metronidazole 1/2 MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군 및 Metronidazole 1/4 MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군에서 배양 24시간 후부터 대조군에 비해 처리 용량 의존적인 균 수의 감소가 관찰되어 각각 유의성이 인정되었다 (P<0.01).

한편 각각의 단독 처리군에 비해 Metronidazole 1/2 MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군에서 우수한 시간대별 균 성장 억제 효과가 인정되었으며, Metronidazole 1/4 MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군에서는 Metronidazole MIC 농도 처리군과 유사한 시간대별 균 성장 억제 효과를 나타내었다.

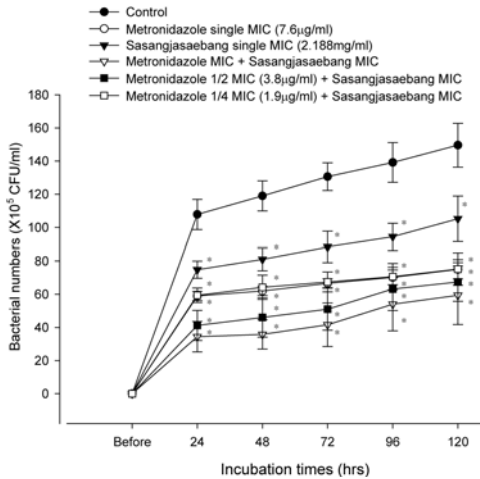


Fig. 6. Effects of *Sasangjasaebang* Aqueous Extracts and Metronidazole Combination on the Growth of *Gardnerella vaginalis* with Incubation Times (*:P<0.01).

3. Checkboard Microtiter Assay에 의한 병용효과

Checkboard Microtiter Assay법을 이용한 사상자세방 물 추출물과 Metronidazole의 병용에 따른 효과를 관찰하였다.

그 결과 *Gardnerella vaginalis*에 대한 Metronidazole의 MIC는 단독 처리 시 $8.000 \pm 4.899 \mu\text{g/ml}$ 에서 사상자세방 물 추출물과 병용 처리 시 $1.400 \pm 1.475 \mu\text{g/ml}$ 으로 낮아졌으며, 사상자세방 물 추출물 단독 처리 시 MIC가 $3.438 \pm 1.711 \text{ mg/ml}$ 에서 Metronidazole과 병용 시 $0.938 \pm 0.349 \text{ mg/ml}$ 로 낮아졌다. 따라서 FIC index는 $0.475 \pm 0.137(0.375 \sim 0.625)$ 로 나타나 상승작용이 있는 것으로 관찰되었다.

Table 3. Activity of Antimicrobial Combination on *Gardnerella vaginalis* by Checkboard Method

Test materials	Single treatment		Combination treatment		FIC index	
	MIC	Range	MIC	Range	FIC	Range
<i>Sasangjasaebang</i> extracts	3.438 ± 1.711	1.563~ 6.250	0.938 ± 0.349	0.782~ 1.563	0.475 ± 0.137	0.375~ 0.625
Metronidazole	8.000 ± 4.899	4.000~ 16.000	1.400 ± 1.475	0.500~ 4.000		

IV. 고 찰

질염은 산부인과 외래를 찾는 흔한 원인 중 하나로 원인에 따라 세균성, 곰팡이성, 원충류성 및 바이러스성으로 구분하며, 세균성 질증의 주요 원인균으로 알려져 있는 *Gardnerella vaginalis*는 그람 양성 또는 다양성의 비운동성 혐기성 간균이다¹⁾. 세균성 질증은 비염증성으로 질내의 정상세균총인 *Lactobacillus*가 *Gardnerella vaginalis*, 혐기성균, *Mycoplasma hominis* 등으로 대체되는 특징을 나타내며¹⁾, 유

산을 생성하는 유산간균의 수가 감소하면서 질의 pH가 4.5이상으로 증가하고, 질 상피세포 중 clue cell이 20%이상이며, 균질한 백색 질 분비물이 출현하는 것이 특징이며, 특히 질 분비물에 10% KOH를 첨가하면 독특한 amine 냄새가 난다²⁾.

특히 *Gardnerella vaginalis*는 세균성 질증을 나타내는 여성 중 98%이상에서 발견되는 등^{6,7)} 주요 원인균으로 대두되어 여러 연구자들에 의해 세균성 질증 연구와 더불어 *Gardnerella vaginalis*에

대한 연구도 활발히 이루어지고 있다⁸⁾.

세균성 질증의 치료는 Metronidazole을 질내 주입하거나 경구로 투여하는 방법을 많이 사용하는데 많은 임상 의사들은 적은 부작용 때문에 질 내에 주입하는 방법을 더 선호한다¹⁷⁾.

Metronidazole은 혐기성 세균 및 원충 감염증의 치료에 주로 사용되는 nitroimidazole 계열의 항감염제로^{42,43)} Trichomonas vaginalis, Gardnerella 또는 Mycoplasma hominis 감염에 의한 질염에 사용되고 있으며, 원충인 Entamoeba histolytica 감염에 의한 아메바성 이질 또는 간농양 및 Giardia lamblia 감염증에 사용되고 있다. 또한 혐기성 세균인 Bacteroides fragilis, Fusobacterium, Clostridium, Peptostreptococcus, Prevotella 속 감염증에 이용되며, 혐기성 세균 감염에 의한 복강내 농양, 복막염, 기종, 폐렴, 폐 농양, 당뇨병성 족부 궤양, 뇌수막염, 뇌농양, 골관절 감염증, 패혈증, 자궁내막염, 난관-난소 농양 또는 심장내막염에 사용되고 있고, Clostridium difficile 감염에 의한 위막성 결장염, Helicobacter pylori 감염증, 급성 치은염 및 Crohn's disease와 같은 소화기 질환에도 이용되고 있다⁴²⁻⁴⁵⁾.

Metronidazole은 다른 항생제에 비해 내성 발현율이 낮다고 하지만 여러 실험적 보고에 따르면 Metronidazole에 대한 Gardnerella vaginalis 내성 균주의 출현 등이 문제시되고 있으며^{18,19)}, 트리코모나스의 경우 투여빈도가 증가할수록 내성이 강해지는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 또한 말초신경증환자의 경우 금기로 되어 있고, 임신초기의 산모는 신중히 고려하여야 하며 분만 후 수유를 하는 여성의 경우 치료 중에는 수유를 중지하는 것이

좋다²¹⁾. 경구용 Metronidazole의 가장 흔한 부작용은 오심이며, 두통, 구강건조, 식욕부진, 설사 하복통 등이 있다. 고용량을 사용하여 젖산균을 떨어트리면 칸디다증과 같은 질염이 발생하거나 악화될 수 있다²²⁾. 이처럼 약제의 부작용과 지속적인 재발성이 문제점으로 대두되고 있어 보다 효과적이고 안전한 외용약의 필요성이 절실하다²³⁾.

한의학 문헌에서 질염과 일치하는 구체적인 병명에 대한 언급은 없으며 발현되는 증상에 의거하여 ‘帶下’, ‘陰痒’ 등의 병증에 속하는 것으로 볼 수 있다⁹⁾.

陰痒은 葛의 《肘後備急方·卷五》에서 “陰痒汗出 嚼生大豆黃塗之亦療尿灰瘡”과 “姚療陰痒生瘡嚼胡麻塗之”라 하여 처음 언급하였으며¹⁰⁾ 陰部搔痒, 陰門搔痒, 陰腫이라고 부르는 것으로 음부소양증을 말한다¹¹⁻¹³⁾. 이는 여성의 외음부나 질이 가려운 것을 말하는데 심한 경우는 동통이 있으며 수액이 흘러나오고 가려움과 통증이 참을 수 없을 정도가 되고 또 가려움을 못 참고 긁어서 상처가 나면 감염되어 환부가 짓무르게 되는데 이것을 陰蝕이라고한다^{14,15)}. 巢의 《諸病源候論》에서는 “婦人陰痒, 是虫食所爲…….”라고 하여 그 원인이 외부의 인자에 의한 것이라고 하였다¹⁶⁾.

한의학에서는 근래 산부인과 영역의 원발성 세균과 진균에 대한 항염·항진균 작용에 관한 단미약물 및 처방의 실험연구가 활발히 이루어지고 있어 側柏 樗皮丸, 完帶湯 등 내복약에 대한 보고^{33,34)}와 艾葉, 五倍子, 苦蓼, 蜀椒, 黃柏, 蛇床子, 百部根, 枯白礬, 硼砂 등 외용약에 대한 보고^{35,37)}가 있었으나 부인과 주요 질환인 질염을 유발시킬 수 있는 주

요 균주에 대한 구체적 연구는 부족한 실정이다.

사상자세방은 사상자, 화초, 백반으로 구성되어진 복합처방으로 婦人前陰病 陰痒症에 사용되는 외용제 처방^{24,25)}이다. 그 구성약물 중 사상자는 辛, 苦, 溫, 無毒하고 귀경은 腎, 脾에 작용하고 효능은 내복으로 쓰일 경우 溫腎壯陽하며 외용으로 쓰일 경우는 燥濕殺蟲하여 陰部濕痒, 疥瘡에 사용한다²⁵⁾. 박³⁹⁾의 연구에 따르면 사상자는 다른 약물에 비해 혼세요법으로 여성의 음부질환의 국소적인 증상에 외과적 치법으로 다용하며 하초의 冷濕을 제거하는 효능이 탁월한 동시에 外邪에 대한 살충작용을 겸하고 있다고 하였다. 또한 별사상자(*Cnidium Monnieri Fructus*)는 수렴성 소염약으로서 부인의 陰腫에 쓰이는 것으로 보고되었다²⁵⁾. 화초의 성미는 辛溫, 有毒하고 脾, 肺, 腎에 귀경하며, 효능은 溫中散寒, 止痛, 殺蟲하여 胃寒腹痛을 치료하고 燥濕 작용이 강하여 피부습진으로 인한 소양증을 치료한다²⁵⁾. 백반은 명반석광물을 가공 제련하여 만든 결정체로 성미는 酸, 澁, 寒, 有少毒 혹은 無毒하며 肝, 脾, 胃, 大腸에 귀경하고, 효능은 내복할 경우 止血止瀉, 祛痰開閉, 清熱退黃 한다. 외용할 경우 解毒燥濕 하는 효능이 있어 癰疽瘡毒, 口舌生瘡, 濕疹瘙痒 등에 사용한다²⁵⁾.

이에 본 연구에서는 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018 세균주를 이용하여 한의학적으로 陰痒의 치료에 활용되는 사상자, 화초 및 백반^{24,25)}으로 구성된 사상자세방물 추출물 및 구성 약제 각각의 물 추출물을 표준액배배지희석법²⁹⁾으로 MIC를 측정하고, 시간대별 균 성장곡선³⁰⁾에 미치는 영향을 관찰하여 *Gardnerella vaginalis* 에

대한 항균력을 평가하였으며, Metronidazole 과 사상자세방 물 추출물의 병용효과를 Checkboard Microtiter Assay^{31,32)} 및 Metronidazole(MIC, 1/2MIC, 1/4MIC)에 사상자세방 물 추출물의 MIC를 첨가한 병용물의 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향을 이용하여 각각 평가하였다.

본 실험 연구에서 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018에 대한 사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물의 항균활성도(MIC)는 각각 $27.5 \pm 13.693(12.5 \sim 50)$, $6.875 \pm 3.423(3.125 \sim 12.5)$, $4.375 \pm 1.713(3.125 \sim 6.25)$ 및 $2.188 \pm 0.856(1.563 \sim 3.125)$ mg/ml로 관찰되어, 사상자세방 물 추출물, 백반 미세분말, 화초 물 추출물 및 사상자 물 추출물 순으로 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018에 대한 항균력을 나타내었다. 한편 Metronidazole의 MIC는 $7.6 \pm 5.367(2 \sim 16)$ $\mu\text{g/ml}$ 로 관찰되어 사상자세방 물 추출물, 백반 미세분말, 화초 물 추출물에서 Metronidazole보다 우수한 항균력이 나타났다.

또한 시간대별 균 성장곡선을 관찰한 결과에서 사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말, 사상자세방 물 추출물 및 Metronidazole은 MIC 및 MIC×2에서 각각 처리 용량 의존적으로 유의성 있는 시간대별 균 성장 억제 효과를 나타내었는데, 각각의 단독 처리군에 비해 Metronidazole 1/2 MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군에서 우수한 시간대별 균 성장 억제 효과가 인정되었다. 또한, Metronidazole 1/4 MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군에서는 Metronidazole MIC 농도 처리군과 유사한 시간대별 균 성장 억제 효과를 나타내었다.

Checkboard Microtiter Assay법을 이용

한 사상자세방 물 추출물과 Metronidazole의 병용에 따른 효과를 관찰한 결과, FIC index는 $0.475 \pm 0.137(0.375 \sim 0.625)$ 로 나와 상승작용이 있는 것으로 관찰되었다.

표준액체배지희석법에 의한 MIC 측정은 세균 및 다양한 감염증에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 가장 기본적인 방법으로²³⁾ Gardnerella vaginalis ATCC14018에 대한 Metronidazole의 MIC는 10% CO₂ 조건하에서 대략 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 알려져 있으며, 혐기성 상태에서는 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 전후로 알려져 있다⁴⁴⁾. 또한 질염 유래 병원성 Gardnerella vaginalis 임상분리 균주에서는 대략 $0.03 \sim 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 알려져 있다⁴⁵⁾. 본 실험의 결과에서도 10% CO₂ 조건하에서 $7.6 \pm 5.367(2 \sim 16) \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 관찰되어, 이전의 연구들과 유사한 항균활성이 표준액체배지희석법에 의해 인정되었다. 또한 사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물의 MIC는 각각 $27.5 \pm 13.693(12.5 \sim 50)$, $6.875 \pm 3.423(3.125 \sim 12.5)$, $4.375 \pm 1.713(3.125 \sim 6.25)$ 및 $2.188 \pm 0.856(1.563 \sim 3.125) \text{ mg}/\text{ml}$ 로 관찰되어, 사상자, 화초 및 백반²⁵⁾이 모두 Gardnerella vaginalis ATCC14018에 대한 항균활성을 나타내었는데, 각각의 단일 추출물보다 복합처방인 사상자세방 물 추출물에서 더 우수한 항균력이 나타나 임상적으로 사용되고 있는 복합처방이 더 우수한 항균활성을 나타내는 것으로 판단된다.

사상자의 항균 및 항원충 효과는 비교적 잘 알려져 있으나⁴⁶⁻⁴⁹⁾, 김 등의 연구²³⁾에서는 사상자 추출물이 Gardnerella vaginalis ATCC49145에 대해 별 다른 항균력을 나타내지 않는다고 보고하였는데, 이 경우 최대 농도를 $20 \text{ mg}/\text{ml}$ 으로

설정하고 disk 확산법으로 항균력을 검사였으므로, 본 실험의 결과와 차이가 나타난 것으로 판단된다. 즉, 항균활성은 측정 방법에 따라 다소 차이가 날 수 있으며⁴⁴⁾, 본 실험의 결과에서도 사상자 단독 물 추출물의 MIC가 표준액체배지희석법에 의해 $27.5 \pm 13.693(12.5 \sim 50) \text{ mg}/\text{ml}$ 로 관찰되어, 이전의 김 등의 연구²³⁾에서 설정한 최대 농도 $20 \text{ mg}/\text{ml}$ 가 너무 낮게 설정된 것으로 생각된다. 화초 역시 자체의 항균력이 잘 알려져 있고⁵⁰⁻⁵⁴⁾, 월경통 및 냉대하 등 부인과 질환에 응용되는 백반의 항균력⁵⁵⁻⁵⁶⁾에 대한 효과 역시 알려져 있으나, 이들의 Gardnerella vaginalis에 대한 직접적인 항균력은 아직까지 보고된 바 없고, 사상자세방의 항균력 역시 아직까지 실험적으로 밝혀진 바가 없다.

시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향 역시 세균 및 다양한 감염증에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 가장 기본적인 방법으로^{30,57)}, 본 실험의 결과에서는 Metronidazole, 사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물은 MIC 및 MIC×2에서 각각 처리 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제를 나타내는 것으로 나타났다. 또한 Metronidazole과 사상자세방 물 추출물 병용 처리군에서 각각의 단독 처리군에 비해 현저히 우수한 시간대별 균 성장 억제 효과가 인정되어, 사상자세방 물 추출물과 Metronidazole의 병용은 현저한 상승 효과를 나타내므로 향후 Metronidazole의 사용량을 줄일 수 있을 것으로 기대되는 결과를 보여주었다. 특히 Metronidazole 1/4 MIC + 사상자세방 물 추출물 MIC 농도 처리군에서는 Metronidazole MIC

농도 처리군과 유사한 시간대별 균 성장 저해 효과를 나타내어 세균성 질증에서 Metronidazole의 사용량을 1/4까지 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

Checkboard Microtiter Assay법을 이용한 FIC index는 약물의 병용에 따른 항균력을 평가하는 가장 일반적인 방법으로^{31,32)}, 판독은 FIC index 0.5 이하일 경우에는 상승(synergistic), 0.5에서 1 사이일 경우에는 부분상승(partially synergistic), 1에서 4 사이일 경우에는 무관(indifferent), 4 이상일 경우에는 길항(antagonistic)으로 해석한다. 일반적으로 화학요법제인 항생제와 천연물 추출물의 병용 효과 역시 Checkboard Microtiter Assay법을 이용해 평가되어 왔다⁵⁸⁻⁵⁹⁾. 본 실험의 결과, 사상자세방 물 추출물과 Metronidazole의 병용에 따른 효과를 관찰한 결과, FIC index는 $0.475 \pm 0.137(0.375 \sim 0.625)$ 로 산출되어, 사상자세방 물 추출물과 Metronidazole은 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018에 대해 서로 상승작용이 있는 것이 관찰되었다.

이상의 결과에서, 사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물은 각각 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018에 대한 항균력을 나타내었으며, 처리 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제를 나타내었는데, 사상자세방 추출물이 각각의 단일 추출물에 비해 더 우수한 항균활성 및 시간대별 균 성장 억제를 나타내어, 복합 처방이 더욱 가치가 높을 것으로 판단되었다. 사상자세방 추출물은 Metronidazole과 병용시 각각의 단독 처리군보다 더 우수한 시간대별 균 성장 억제를 나타내었고, Checkboard Microtiter Assay에서

사상자세방 물 추출물과 Metronidazole은 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018에 대해 서로 상승작용이 있는 것으로 관찰되어, Metronidazole의 사용량을 대략 1/4까지 낮출 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

세균성 질증의 주요 원인균으로 알려져 있는 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018 세균주를 이용하여 사상자, 화초 및 백반으로 구성된 사상자세방 물 추출물 및 구성 약제 각각의 물 추출물의 항균력을 평가하였으며, Metronidazole과 사상자세방 물 추출물의 병용효과 및 Metronidazole (MIC, 1/2MIC, 1/4MIC)에 사상자세방 물 추출물의 MIC를 첨가한 병용물의 시간대별 균성장 곡선을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물은 각각 *Gardnerella vaginalis* ATCC14018에 대한 MIC를 표준액체배지희석법으로 평가한 결과 사상자세방 물 추출물, 백반 미세분말, 화초 물 추출물 및 사상자물 추출물 순으로 항균력을 나타내었다.
2. 사상자 물 추출물, 화초 물 추출물, 백반 미세분말 및 사상자세방 물 추출물은 시간대별 균 성장곡선에 처리 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제를 나타내었고, 사상자세방 추출물이 각각의 단일 추출물에 비해 더 우수한 항균활성 및 시간대별 균 성장 억제를 나타내었다.

3. 사상자세방 추출물은 Metronidazole과 병용시 각각의 단독 처리군보다 더 우수한 시간대별 균 성장 억제력을 나타내었다.
4. Checkboard Microtiter Assay법을 이용한 사상자세방 물 추출물과 Metronidazole의 병용효과를 관찰한 결과 FIC index가 $0.475 \pm 0.137(0.375 \sim 0.625)$ 로 산출되어, 사상자세방 물 추출물과 Metronidazole은 Gardnerella vaginalis ATCC14018에 대해 서로 상승작용이 있는 것으로 나타났다.

이상의 실험 결과로 볼 때 사상자세방 물 추출물은 Gardnerella vaginalis에 대해 우수한 항균력을 나타내며, Metronidazole과 병용 시에 서로 상승작용이 있는 것으로 관찰되어 Metronidazole의 사용량을 대략 1/4까지 낮출 수 있을 것으로 기대되므로 Gardnerella vaginalis 치료에 있어 사상자세방과 Metronidazole의 병용이 임상에서 유효하리라 생각된다.

- 투 고 일 : 2010년 4월 28일
- 심 사 일 : 2010년 5월 4일
- 심사완료일 : 2010년 5월 12일

참고문헌

1. Aroutcheva AA et al. Gardnerella vaginalis isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. Clin Infect Dis. 2001;33:1022-7.
2. Eschenbach DA et al. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol. 1988; 158:819-28.
3. 김경태. 질염의 진단 및 치료. 대한산부인과학회. 2003;32:132-9.
4. Mayaud R. Tackling bacterial vaginosis in developing countries. Lancet. 1997; 350:530-1.
5. Hillier SL. Clindamycin treatment of bacterial vaginosis. Rev Contemp Pharmacother. 1992;3:263-8.
6. Catlin BW. Gardnerella vaginalis characteristics, clinical considerations and controversies. Clin Microbiol Rev. 1992;5:213-37.
7. Eschenbach DA. History and review of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol. 1993;169:441-5.
8. 정 혁, 장하중. 세균성 질증에서 Gardnerella vaginalis의 분리배양 및 임상진단법의 적용. 대한산부인과학회지. 1991;34(12):1725-31.
9. 임성민, 이동녕, 김형준. 질염에 대한 가자, 차전자, 천궁, 포공영, 황금의 효과. 대한한방부인과학회지. 2004;17(4):34-45.
10. 葛洪. 肘後備急方. 北京:人民衛生出版社. 1996:108.
11. 宋炳基. 漢方婦人科學 1. 서울:행림출판사. 1994:264.
12. 肖承悰. 中醫婦科學 1. 貴陽:貴州人民出版社. 1989:355-9.
13. 叢春雨. 女科證治歌括 1. 北京:中醫古籍出版社. 1991:121.
14. 한방부인과학편찬위원회. 한방부인과학 1. 서울:도서출판 정담. 2002:292.
15. 肖淑春 著, 洪喜鐸 譯. 東醫臨床婦人科學 1. 서울:법인문화사. 1999:526.

16. 巢元方. 南京中醫學院校譯. 諸病源候論校譯(下). 北京:人民衛生出版社. 1982:1129.
17. 조성남. 질염. 대한산부인과학회. 2004;33:77-85.
18. Askienazy EM. The bacteriologic diagnosis of bacterial vaginosis in an urban practice. Rev Fr Gynecol Obstet. 1993;88:203-6.
19. McLean NW, McGroarty JA. Growth inhibition of metronidazole-susceptible and metronidazole-resistant strains of *Gardnerella vaginalis* by *Lactobacilli* in vitro. Appl Environ Microbiol. 1996;62:1089-92.
20. De CI, Trane F. In vivo resistance to metronidazole induced on four recently isolated strain of *Trichomonas vaginalis*. Arzneimittelforschung. 1971;21(3):377-81.
21. Dykers JR. Single-dose metronidazole for trichomonal vaginitis :patient and consort. Am J Obstet Gynecol. 1975;132(5):579-80.
22. 고재환, 김용수. 트리코모나스 질염에서 메트로니다졸 1.5 mg 단일 요법의 치료효과. 인제대학교. 1999;20(1):337-47.
23. 김연희, 이홍식. *Gardnerella vaginalis*에 대한 한약재의 항균활성. 한국미생물생명공학회지. 2006;34:70-3.
24. 羅元愷. 中醫婦科學. 北京:人民衛生出版社. 1988:353-9.
25. 辛民教. 臨床本草學. 서울:영림사. 1994:197, 271, 590.
26. Pfaller MA et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34:1648-54.
27. Pfaller MA et al. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. Antimicrob Agents Chemother. 1992;36:1805-9.
28. Tenover FC et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol. 1998;36:1020-7.
29. Pfaller MA et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. J Clin Microbiol. 1988;26:1437-41.
30. Janssen AM, Scheffer JJ, Baerheim Svendsen A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. Planta Med. 1987;53:395-8.
31. Isenberg HD. Synergism testing: Broth microdilution checkboard and broth macrodilution methods. In: Clin Microbiol procedure manual, vol. 1. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1992:1-28.
32. 윤정숙, 문희원, 이미애. 다체내성 *Pseudomonas aeruginosa* 균주의 항균제 병합효과. 대한임상미생물학회지. 2006;9:1-6.
33. 정진홍, 박병열. 側柏樗皮丸煎湯이 實驗動物의 鎮痛消炎 및 抗菌效果에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 1991;4(1):7-22.
34. 송석호. 完帶湯이 利尿, 消炎 및 抗菌에 미치는 影響. 경희대학교 대학원 한의학과 석사학위논문. 1987.

35. 양수열, 이경섭, 송병기. 부인전염병과 대하여 응용되는 艾葉의 항균작용에 관한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 1989;3(1):48-52.
36. 장준복. 음호병의 외용약으로 응용되는 오배자, 애엽, 고삼, 축초 및 황백의 항균과 소염 효과. 경희대학교 대학원 한의학과 석사학위논문. 1993.
37. 김형준. 음호병의 외용약으로 응용되는 蛇床子, 百部根, 枯白礬, 硼砂의 항균과 소염 효과. 경희대학교 대학원 한의학과 석사학위논문. 1995.
38. 전국한외과대학 본초학교수 공편저. 本草學. 서울:영림사. 2007:627-8, 693-4.
39. 박선민. 부인과에 있어 혼세요법이 다용된 병증과 약물에 대한 문헌적 고찰. 경산대학교 대학원 한의학과 석사학위논문. 2002.
40. Nigwekar SU, Casey KJ. Metronidazole-induced pancreatitis. A case report and review of literature. JOP. 2004; 5:516-9.
41. Rossi S. Australian Medicines Handbook 2006. Australian Medicines Handbook Pty Ltd. Adelaide. 2006.
42. Lamont RF. Can antibiotics prevent preterm birth-the pro and con debate. BJOG. 2005;112:67-73.
43. Shennan A et al. A randomised controlled trial of metronidazole for the prevention of preterm birth in women positive for cervicovaginal fetal fibronectin: the PREMETS Study. BJOG. 2006;113:65-74.
44. Muli F, Struthers JK. Use of a continuous-culture biofilm system to study the antimicrobial susceptibilities of Gardnerella vaginalis and Lactobacillus acidophilus. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:1428-32.
45. Jones BM et al. Comparison of the in vitro activities of fenticonazole, other imidazoles, metronidazole, and tetracycline against organisms associated with bacterial vaginosis and skin infections. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33:970-2.
46. Youn HJ, Noh JW. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against Eimeria tenella. Vet Parasitol. 2001;96:257-63.
47. Youn HJ et al. Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against Toxoplasma gondii and Neospora caninum. Vet Parasitol. 2003;116:7-14.
48. Youn HJ et al. Anti-protozoal efficacy of high performance liquid chromatography fractions of Torilis japonica and Sophora flavescens extracts on Neospora caninum and Toxoplasma gondii. Vet Parasitol. 2004;125:409-14.
49. Cho WI et al. Antimicrobial activity of torilin isolated from Torilis japonica fruit against Bacillus subtilis. J Food Sci. 2008;73:37-46.
50. 임상빈 등. 초피 추출물의 수율 및 항균활성. 첨단기술연구소논문집. 1995;6 :1-6.
51. 손병구 등. 초피(Zanthoxylum piperitum) 용매추출물의 항균활성. 농업기술개발연구소보. 1998;2:58-64.
52. 서기림, 이현주, 고경희. 초피(Zanthoxylum piperitum DC) 과피의 휘발 성분의 항균작용. 산업미생물학회지. 1999;27

- :179-83.
53. 김용두 등. 초피(*Zanthoxylum piperitum* A.P. DC.) 추출물의 항균활성. 한국 식품영양과학회지. 2000;29:1116-22.
54. 박해선 등. *Zanthoxylum piperitum* 종자의 치아우식균 *Streptococcus mutans*에 대한 항균활성. 생명과학회지. 2008;18:167-74.
55. 조선화, 정진홍. 月經痛 및 冷帶下에 活用된 外治法에 對한 文獻的 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2000;9:319-35.
56. 김형준, 이경섭, 송병기. 陰戶病의 外用藥으로 應用되는 蛇床子, 百部 根, 枯白礬, 硼砂의 抗菌과 消炎效果. 慶熙醫學. 1994;10:290-7.
57. Frimodt MN. Correlation of in vitro activity and pharmacokinetic parameters with effect in vivo for antibiotics. Observations from experimental pneumococcus infection. Dan Med Bull. 1988;35:422-37.
58. Choi JG et al. Antibacterial activity of methyl gallate isolated from *Galla Rhois* or carvacrol combined with nalidixic acid against nalidixic acid resistant bacteria. Molecules. 2009;14:1773-80.
59. Zhang L et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:4606-11.