

Screening of Antibiotics that Selectively Inhibit a Bacterial Species Associated with a Recurrent Aphthous Stomatitis Risk

Ahreum Lee, Yunji Kim and Youngnim Choi*

Department of Immunology and Molecular Microbiology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University, Korea

(received July 20, 2017; revised August 10, 2017; accepted August 11, 2017)

Recurrent aphthous stomatitis (RAS) is a common oral mucosal disorder for which no curative treatment is available. We previously reported that decreased *Streptococcus salivarius* and increased *Acinetobacter johnsonii* on the oral mucosa are associated with RAS risk. The purpose of this study was to identify antibiotics that selectively inhibit *A. johnsonii* but minimally inhibit oral mucosal commensals. *S. salivarius* KCTC 5512, *S. salivarius* KCTC 3960, *A. johnsonii* KCTC 12405, *Rothia mucilaginosa* KCTC 19862, and *Veillonella dispar* KCOM 1864 were subjected to antibiotic susceptibility test using amoxicillin, cefotaxime, gentamicin, clindamycin, and metronidazole in liquid culture. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the concentration that inhibits 90% of growth. Only gentamicin presented a higher MIC for *A. johnsonii* than MICs for *S. salivarius* and several oral mucosal commensals. Interestingly, the growth of *S. salivarius* increased 10~200% in the presence of sub-MIC concentrations of gentamicin, which was independent of development of resistance to gentamicin. In conclusion, gentamicin may be useful to restore RAS-

associated imbalance in oral microbiota by selectively inhibiting the growth of *A. johnsonii* but enhancing the growth of *S. salivarius*.

Key words: Antibiotics, Recurrent aphthous stomatitis, oral bacteria, minimal inhibitory concentration

서론

재발성 아프타성 구내염(Recurrent aphthous stomatitis; RAS)은 흔히 발생하는 구강 점막 질환으로 심한 통증과 발적, 궤양을 수반한다[1]. 재발성 아프타성 구내염은 전세계에서 발병하며 유병률은 연구집단에 따라 21% - 28%에 이른다[2-4]. 발병에 기여하는 위험인자로 유전적 요인, 미생물 감염, 전신질환, 영양상태 불균형, 기계적 자극, 스트레스 등 다양한 인자가 거론되고 있으나 발병원인은 명확하게 밝혀지지 않았다[5-6]. 전신질환 없이 단독으로 발병하는 경우가 많으나, 베체트 증후군, 후천성 면역 결핍 증후군, 염증성 장 질환 등 면역결핍 혹은 자가면역질환의 특징적인 증상으로 수반될 수도 있다[1]. 현재 사용되는 대표적인 치료법은 국소적 스테로이드제를 이용한 염증조절과 국소도포 마취제나 진통제를 이용한 통증조절 등이다[7]. 이들은 모두 대증치료법으로 근본치료가 되지 않기 때문에 다시 재발하게 된다.

재발성 아프타성 구내염의 병인에서 미생물이 미치는 영향에 대한 많은 연구들이 이루어졌다. 구강 내 존재하는 streptococci 등 세균뿐만 아니라 바이러스도 구내염의 발병에 관련 있다고 의심되었지만 명확한 연관성은 밝혀지

*Correspondence to: Youngnim Choi, D.D.S., Ph.D., Department of Immunology and Molecular Microbiology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University 101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03080, Republic of Korea
Tel: 82-2-740-8643, Fax: 82-2-743-0311
E-mail: youngnim@snu.ac.kr
ORCID : 0000-0002-6496-5560

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

지 않았다[2, 6, 8]. 우리는 선행연구에서 재발성 아프타성 구내염의 발병과 관련된 세균 종을 보고하였다[9]. 대조군과 재발성 아프타성 구내염 환자군의 구강점막과 타액 세균총을 16S 라이보솜 RNA 유전자의 pyrosequencing을 통해 동정했으며, 그 결과 구강점막 세균총에서 *Acinetobacter johnsonii*의 증가와 *Streptococcus salivarius*의 감소가 재발성 아프타성 구내염의 발병위험과 유의한 연관이 있음을 확인하였다. *A. johnsonii*가 배양접시에서 구강상피세포의 증식을 억제하고 세포독성을 보였기 때문에[9], *A. johnsonii*를 유해균으로 정의하였고, 타액과 구강점막에 존재하는 대표적인 상주균인 *S. salivarius*는 유익균으로 정의하였다.

본 연구의 목적은 항생제 민감성 검사를 통해 재발성 아프타성 구내염 위험과 연관된 유해균인 *A. johnsonii*의 성장은 억제하면서 유익균인 *S. salivarius*와 구강 상주균의 성장에는 최소 영향을 주는 항생제와 그 농도를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

세균 배양

S. salivarius KCTC 5512, *S. salivarius* KCTC 3960, *A. johnsonii* KCTC 12405과 *Rothia mucilaginosa* KCTC 19862는 한국생명공학연구원 미생물자원센터 (KCTC/BRC, Daejeon, Korea)에서 구입하였다. *Veillonella dispar* KCOM 1864는 한국구강미생물자원은행 (KCOM, Gwangju, Korea)에서 구입하였다.

*S. salivarius*는 10 µg/ml의 비타민K (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 5 µg/ml의 hemin (Sigma, USA)을 보충한 BHI (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 액체배지에, *A. johnsonii*와 *R. mucilaginosa*는 BHI 액체배지에 배양하였다. *V. dispar*는 *Veillonella* 액체배지 (0.5% Trypticase peptone, 0.3% Yeast extract, 80 mM Sodium lactate, Sodium 6.57 mM thioglycollate, 0.1% Tween 80, 5.56 mM Glucose, pH7.5)에 배양하였다. *S. salivarius*와 *V. dispar*는 37°C의 혐기조건 (CO₂ 10%, H₂ 10%, N₂ 80%)에서 배양했으며, *A. johnsonii*와 *R. mucilaginosa*는 각기 30°C와 37°C 호기조건에서 배양하였다.

최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

여러 종류의 항생제 중에서 치과 임상에서 자주 사용되는 항생제를 선별하였다[10-12]. Gentamicin은 대부분의 구강 상주균이 그람양성인데 반해, *A. johnsonii*가 그람 음성균이며 구강점막에 외용으로 적용할 수 있기 때문에 선택하였다.

Metronidazole (TCI, Tokyo, Japan)은 1 M dimethyl sulfoxide (Sigma, USA) 용액에 용해했으며, cefotaxime (Calibochem, La Jolla, CA, USA)과 clindamycin (TCI, Japan)은 증류수, amoxicillin (Sigma, USA)은 1 M ammonium water (Sigma, USA)에 용해하여 0.2 µm 크기의 필터에 거른 후 사용하였다. Gentamicin (Gibco, Grand Island, NY, USA)은 액체형태로 나온 것을 구매하였다.

항생제에 대한 민감도 검사를 위해, 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 µg/ml 농도의 항생제를 포함하는 액체배지에 세균을 5x10⁶ CFU/ml로 부유시켜, 96 well plate에 100 µl씩 분주하고 각 세균 별 배양 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 최소억제농도는 맨 눈으로 관찰해 세균의 성장을 완전히 억제하는 최소농도이나 일관성이 떨어지는 단점이 있다. 따라서, 600 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 세균의 성장 정도를 측정하고, 다른 연구를 참고해 항생제를 포함하지 않은 배지에 배양한 대조군과 비교해 세균의 성장을 90% 이상 억제하는 농도를 최소억제농도로 결정하였다[13-14].

Gentamicin의 최소억제농도 이하에서 과성장한 *S. salivarius*의 항생제 내성 획득 평가

최소억제농도보다 낮은 농도의 gentamicin이 있을 때 항생제가 없는 조건에서보다 더 많이 성장한 *S. salivarius* KCTC 5512를 항생제가 없는 액체배지에서 24시간 배양한 후, 0.25 - 4 µg/ml의 gentamicin에 대해 항생제 민감도를 다시 측정하였다. 이 후 최소억제농도보다 낮은 농도에서 과성장한 세균을 이용해 위와 같은 실험을 반복함으로써 최소억제농도의 변화가 있는지 관찰하였다.

결 과

베타-락탐계 항생제인 amoxicillin과 cefotaxime이 최대 4 µg/ml의 농도에서 *A. johnsonii*와 *S. salivarius* KCTC 5512의 성장을 90% 이상 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. 링크사마이드계 항생제인 clindamycin도 최대 16 µg/ml의 농도에서 *A. johnsonii*와 *S. salivarius* KCTC 5512의 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 이들 항생제의 경우 유해균인 *A. johnsonii*의 최소억제농도가 *S. salivarius* KCTC 5512에 대한 최소억제농도보다 높았다. 니트로이미다졸계 항생제인 metronidazole은 *A. johnsonii*와 *S. salivarius* KCTC 5512에 대해 사용한 농도 범위에서는 성장억제효과를 보이지 않았다. 아미노글리코사이드계 항생제인 gentamicin은 최대 4 µg/ml의 농도에서 *A. johnsonii*와 *S. salivarius* KCTC 5512의 성장을 모두 억제 하였고, 유해

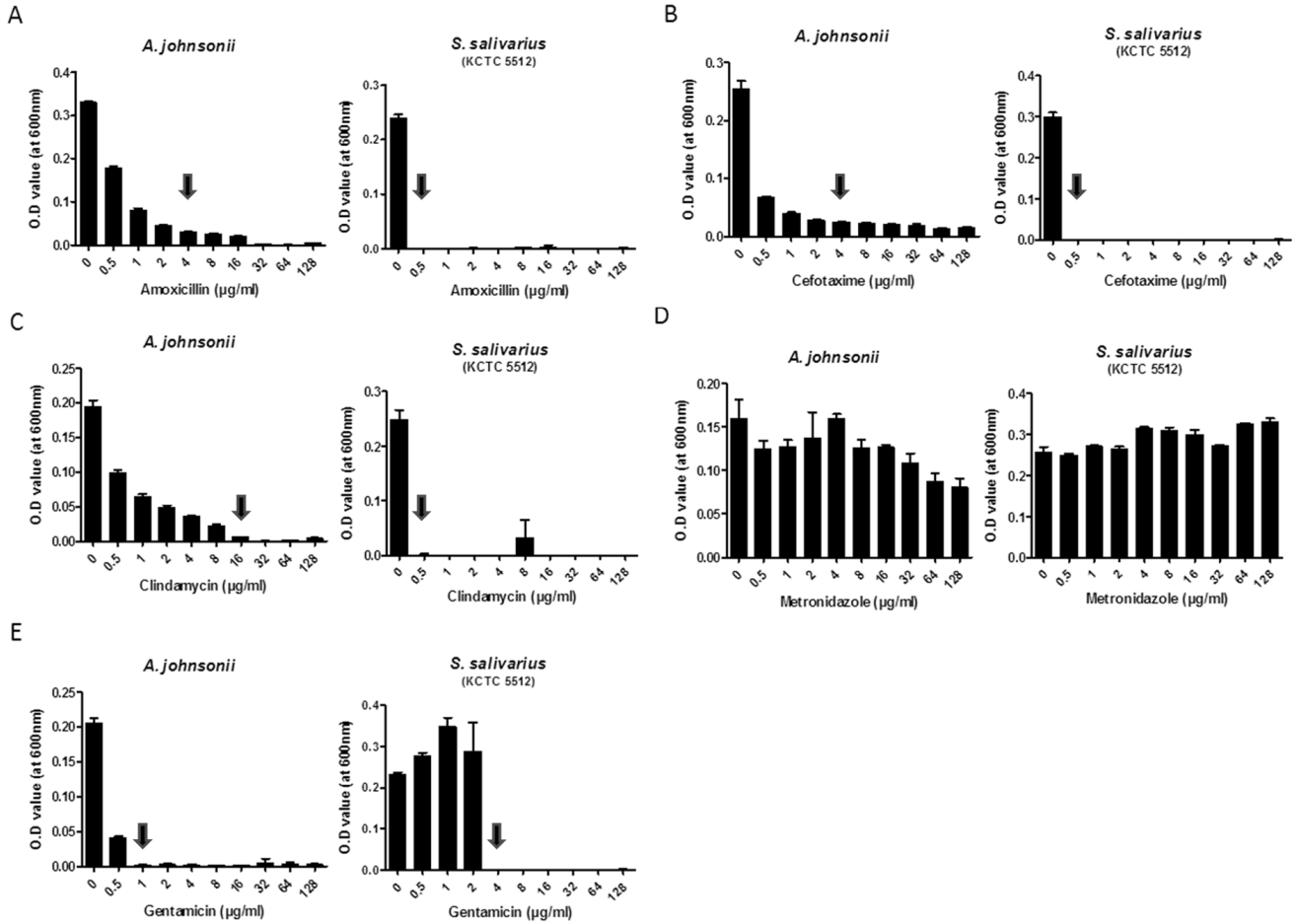


Fig. 1. Antibiotic susceptibility of *A. johnsonii* and *S. salivarius* KCTC 5512. Bacteria in liquid medium (5×10^6 /ml) were cultured in the presence of various concentrations of amoxicillin (A), cefotaxime (B), clindamycin (C), metronidazole (D), and gentamicin (E) for 24 hours. The biomass of cultured bacteria were measured by optical absorbance at 600 nm, and the minimal inhibitory concentration of antibiotics (marked with arrow) was determined as a dose that inhibits more than 90% of growth. Representative of two to three similar results are presented.

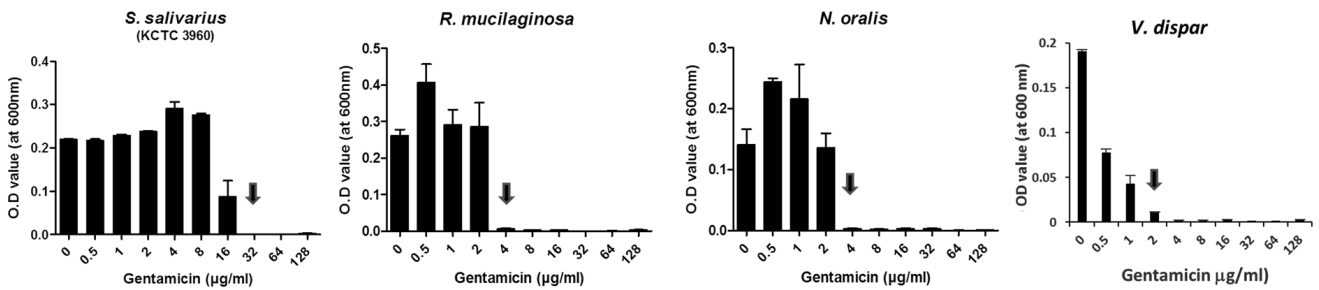


Fig. 2. Susceptibility of several oral commensals to gentamicin. The minimal inhibitory concentration (marked with arrow) of gentamicin for *S. salivarius* KCTC 3960, *R. mucilaginosa*, *N. oralis*, and *V. dispar* was determined as in Figure 1. Representative of two to three similar results are presented.

균인 *A. johnsonii*를 저농도에서 더욱 효과적으로 억제하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 1).

이를 바탕으로 다른 *S. salivarius* 균주인 KCTC 3960과 구강 점막 상주균인 *R. mucilaginosa*, *N. oralis*, *V. dispar*에

대한 gentamicin의 최소억제농도를 확인하였다. *S. salivarius* KCTC 3960과 *R. mucilaginosa*, *N. oralis*, *V. dispar* 모든 균에서 *A. johnsonii*의 최소억제농도보다 높은 농도에서 성장이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 따라서, gentamicin 1 µ

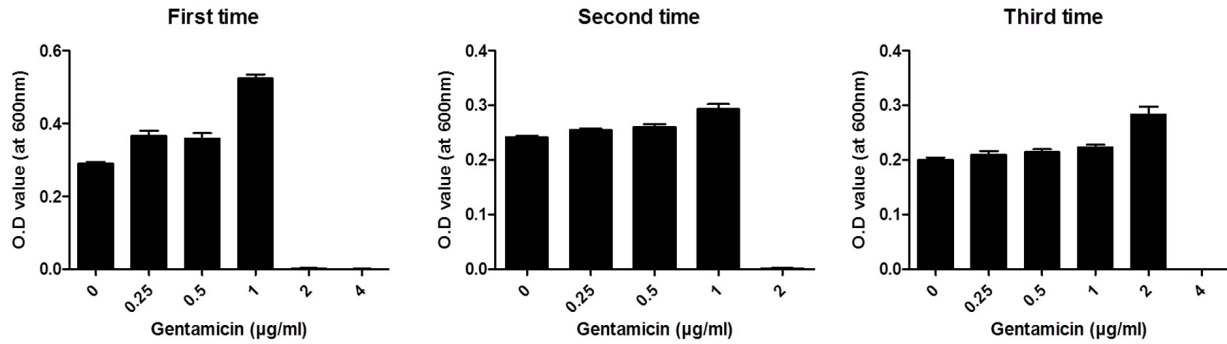


Fig. 3. Effect of sub-minimal inhibitory concentrations of gentamicin on the overgrowth of *S. salivarius* KCTC 5512. *S. salivarius* KCTC 5512 that overgrew in the presence of sub-minimal inhibitory concentrations of gentamicin was cultured with BHI medium in the absence of gentamicin for 24 hours. Subsequently, the cultured bacteria again subjected to susceptibility test using 0.25 to 4 µg/ml of gentamicin. This process was repeated three times.

g/ml의 농도에서 재발성 아프타성 구내염 관련 유해균인 *A. johnsonii*의 성장을 90% 이상 억제하면서, 시험해 본 다른 구강 점막 상주균의 성장은 억제 하지 않는 것을 확인하였다.

흥미롭게도 *S. salivarius*를 비롯 몇 가지 구강 상주균이 최소억제농도보다 낮은 농도 중 특정 농도의 gentamicin이 포함된 배양액에서 항생제가 없는 배양에서 보다 더 잘 자라는 현상을 보였다. 일반적으로 최소억제농도보다 낮은 농도의 항생제에 노출된 세균은 그 항생제에 대한 저항을 획득하게 된다. *S. salivarius* KCTC 5512 균주를 이용해 최소억제농도보다 낮은 gentamicin 존재 하에 과성장한 세균이 gentamicin에 대한 저항을 획득했는지 확인하기 위해 다시 항생제 민감성 검사를 수행하였다. 세 번에 걸친 연속실험에서 최소억제농도에서 과성장한 세균은 gentamicin에 대한 민감성을 상실하지 않았고, 여전히 최소억제농도보다 낮은 농도에서는 항생제가 없는 조건보다 더 잘 자라는 특성을 유지하였다 (Fig. 3).

고 찰

본 연구에서는 재발성 아프타성 구내염과 연관된 세균 *A. johnsonii*의 성장을 선택적으로 억제하는 항생제를 검색한 결과, 1 - 2 µg/ml gentamicin이 *A. johnsonii*의 성장을 억제하는 반면 유익균인 *S. salivarius*를 포함한 몇 가지 구강점막 상주균의 성장은 오히려 촉진할 수 있음을 발견하였다.

일반적으로 최소억제농도보다 낮은 농도의 항생제는 세균의 형태나 부착능을 변화시키거나 항생제 저항을 유발하는 것으로 알려져 있다[15]. 특히 아미노글리코사이드계 항생제는 최소억제농도 이하에서 *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium abscessus* 등의 바이오필름 형성을 촉진 하는

것이 잘 알려져 있다[16-18]. 그러나 최소억제농도보다 낮은 농도의 항생제가 부유상태로 자라는 세균의 성장을 증가시킨다는 보고는 찾을 수 없었다. 저농도 gentamicin에 의한 *S. salivarius*의 과성장은 항생제 저항성과는 연관이 없었으며, 동일한 아미노글리코사이드계인 tobramycin에 의해서는 관찰되지 않았다 (발표하지 않은 실험결과). 정확한 기전은 알 수 없으나, Linares 등이 제안한 것과 같이 항생제를 세균에 대한 무기가 아닌 세균집단의 항상성을 조절하는 신호물질로 설명해 볼 수 있다[19]. 즉, 자연생태에서 경쟁을 위해 다른 세균을 죽이기도 하지만 자신 또는 자신에게 이로운 세균의 성장을 도울 가능성이 있다. 이에 대해서는 앞으로 추가 연구가 필요하다.

사람의 인체에는 다양한 균들이 공생 또는 상생하며 균형을 이루고 있지만, 이 균형이 깨져 불균형 상태가 되면 상주균의 성장은 저해되고 병원균이 과증식하게 된다[20]. 이러한 인간 세균총의 불균형이 당뇨, 대장염, 암, 자가면역질환 등 다양한 질병의 병인에 관여한다는 보고가 증가하고 있다[21-23]. 마찬가지로 구강 내 세균총의 균형이 깨지면 치주염과 같은 구강질환뿐 아니라 암이나 염증성 전신질환의 발병 가능성이 높아진다는 보고가 있다[24-25]. 재발성 아프타성 구내염 환자의 구강세균총은 *S. salivarius*, *S. parasanguinis*, *V. dispar*, *R. dentocariosa*와 같은 대표적인 구강세균은 감소하는 반면, *A. johnsonii*, *Myxococcus*, *Blautia*와 같이 구강의 상주세균이 아닌 세균이 증가하여 전형적인 불균형 양상을 보였다[9]. 재발성 아프타성 구내염 환자에서 관찰된 구강세균총 불균형이 질병의 원인이라는 증거는 아직 부족하나, 구강세균총 불균형을 회복시켜 주면 아프타성 구내염의 재발을 막고 근원치료를 제공할 수 있을지도 모른다.

본 연구는 구강에 존재하는 다양한 세균을 모두 검색하지 않았고 균주에 따라 항생제 감수성이 다를 수 있다는 큰

한계가 존재 한다. 그러나, 구강 내에 존재하는 수많은 세균을 모두 검색하는 것은 불가능하기 때문에 파일럿 임상시험을 통해 저농도 gentamicin의 국소적용이 구강점막 세균총 구조에 미치는 영향을 high throughput sequencing으로 분석하는 것이 현실적인 접근법이라고 생각된다.

결론적으로 본 연구는 한계는 있으나 재발성 아프타성 구내염 환자에서 관찰된 구강세균 불균형 회복에 저농도 gentamicin을 활용할 가능성을 제시하였다.

Acknowledgements

This research was supported by the National Research Foundation of Korea grant 2016-929358.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Scully C. Aphthous Ulceration. *N Engl J Med.* 2006;355:165-172. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMcp054630>.
2. Scully C, Porter SR. Oral mucosal disease: Recurrent aphthous stomatitis. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008;46:198-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2007.07.201>
3. Mustafa JA. Prevalence of recurrent aphthous ulceration experience in patients attending Piramird dental speciality in Sulaimani City. *J Clin Exp Dent.* 2013;5:e89-e94. <http://dx.doi.org/10.4317/jced.51042>
4. Patil S, Reddy SN, Maheshwari S, Khandelwal S, Shruthi D, Doni B. Prevalence of recurrent aphthous ulceration in the Indian Population. *J Clin Exp Dent.* 2014;6:e36-e40. <http://dx.doi.org/10.4317/jced.51227>
5. Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis.* 2006;12:1-21. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2005.01143.x>
6. Slebioda Z, Szponar E, Kowalska A. Etiopathogenesis of Recurrent Aphthous Stomatitis and the Role of Immunologic Aspects: Literature Review. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62:205-215. <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-013-0261-y>
7. Irene BG, Yolanda JS, Ariadna CL. Treatment of recurrent aphthous stomatitis. *J Clin Exp Dent.* 2014;6:e168-e174. <http://dx.doi.org/10.4317/jced.51401>
8. Preeti L, Magesh KT, Rajkumar K, Raghavendhar K. Recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011;15:252-256. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-029X.86669>
9. Kim YJ, Choi YS, Baek KJ, Yoon SH, Park HK, Choi Y. Mucosal and salivary microbiota associated with recurrent aphthous stomatitis. *BMC Microbiol.* 2016;16:57. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0673-z>
10. Epstein JB, Chong S, Le ND. A survey of antibiotic use in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2000;131:1600-1609. <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0090>
11. Verhaaren H, Claeys G, Verschraegen G, De Niel C, Leroy J, Clement D. Endocarditis from a dental focus. Importance of oral hygiene in valvar heart disease. *Int J Cardiol.* 1989;23:343-347. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5273\(89\)90194-0](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5273(89)90194-0)
12. Bohnen JMA, Solomkin JS, Dellinger EP, Bjornson HS, Page CP. Guidelines for Clinical Care: Anti-infective Agents for Intra-abdominal Infection. *Arch Surg.* 1992;127:83-89. <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.1992.01420010097015>
13. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol.* 2005;99:69-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>
14. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48 Suppl 1:5-16.
15. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 2005;436:1171-1175. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03912>
16. Jones C, Allsopp L, Horlick J, Kulasekara H, Filloux A. Subinhibitory Concentration of Kanamycin Induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI Secretion System. *PLoS One.* 2013;8:e81132. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081132>
17. Tsai SH, Lai HC, Hu S. Subinhibitory Doses of Aminoglycoside Antibiotics Induce Changes in the Phenotype of *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:6161-6169. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01132-15>.
18. Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:19484-19489. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608949103>
19. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.* 2014;16:1024-1033. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12308>
20. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis RE, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444:1027-1031. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05414>
21. Turnbaugh JP, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel LB, Duncan A, Ley RE, Sogin LM, Jones JW, Roe AB, Affourtit PJ, Egholm M, Henrissat B, Heath CA, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457:480-484. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07540>
22. Castellarin M, Warren LR, Freeman DJ, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA, Holt RA. *Fusobacterium nucleatum* infection

- is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012;22:299-306. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.126516.111>
23. Hajishengallis G, Lambris DJ. Complement and dysbiosis in periodontal disease. *Immunobiology.* 2012;217:1111-1116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.07.007>
24. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral Bacteria and Cancer. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1003933. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003933>
25. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med.* 2015; 21:172-183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.004>