

*Chlamydia trachomatis*에 대한 Fluoroquinolone CFC-222의 시험관내 약효시험

한양대학교 의과대학 임상병리학교실, 제일제당 종합연구소 약리연구팀*

최태열 · 안정열 · 최효선 · 박일규 · 강정옥 · 김제학*

= Abstract =

In Vitro Antimicrobial Activity of Fluoroquinolone CFC-222 against Chlamydia trachomatis

Tae Yeal Choi, M.D., Jung Yeal Ahn, M.D., Hyo Sun Choi, M.D.
Il Kyu Park, M.D., Jung Ok Kang, M.D. and Je Hak Kim, M.D.*

Department of Clinical Pathology, Hanyang University Medical College,
and R and D Center, Cheil Jedang Corporation*, Seoul Korea

Background : *Chlamydia trachomatis* is the most common sexually transmitted bacterial pathogen. Our purpose is to investigate the antimicrobial activity of new fluoroquinolone CFC-222 (CFC-222) to *C. trachomatis*.

Methods : *In vitro* antibacterial activity of CFC-222 against 15 control strains(A-L3) and 36 clinical strains of *C. trachomatis* were determined in 96-well microtiter cell culture plates, and compared with that of ciprofloxacin(CPFX), ofloxacin(OFLX) and minocycline(MC). The lowest concentration of antibiotic at which no inclusions could be observed was defined as the minimum inhibitory concentration(MIC).

Results : The MIC₉₀ of CFC-222, CPFX, OFLX, and MC against control strains were 0.15 μg/ml, 2.5 μg/ml, 0.6 μg/ml, and 0.008 μg/ml respectively. The MIC₉₀ of CFC-222, CPFX, OFLX, and MC against isolates were 0.3 μg/ml, 1.2 μg/ml, 0.6 μg/ml, 0.04 μg/ml, and 0.06 μg/ml, respectively.

Conclusion : The new fluoroquinolone CFC-222 was effective in vitro against *C. trachomatis*.

Key Words : *Chlamydia trachomatis*, minimum inhibitory concentration, fluoroquinolone CFC-222

서 론

*Chlamydia trachomatis*는 트라코마, 봉입체성 결막염등의 안과적 질환과, 신생아 폐렴, 성병(비임균성 노도염, 자궁경부염, 성병성 림프 육아종)등을 일으키고 부고환염, 난관염, 자궁내막염 등의 합병증이 유발되면 불임의 원인이 되고는 한다¹⁾. 특히 비임균성 요

도염의 50-60%정도가 *C. trachomatis*에 의한 것임 인데도 불구하고 경험적인 치료에만 의존, 항생제의 남용 및 저항균주의 출현을 도래시키고 있는 실정이다²⁻⁴⁾.

*C. trachomatis*에 주로 사용하였던 약제는 tetracycline이나 erythromycin였으나 소아 및 임산부 등에서 사용은 많은 제약을 받아왔다. 최근 *Chlamydia* 감염증에 quinolone약제가 많이 사용되고 있으나 약

제에 따라 *C. trachomatis*대한 최소억제 농도가 많은 차이를 나타내고 있다. 이에 연구자들은 fluoroquinolone계통의 새로운 약제인 CFC-222(제일제당, 한국)와 더불어 타종의 quinolone제제(ciprofloxacin, ofloxacin, 및 minocycline의 *C. trachomatis*에 대한 항균력을 측정하고자 각 약제의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration : MIC)를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 표준 균주

American Type Culture Collection(ATCC)와 Centers for Disease Control(CDC)에서 분양 받은 15가지 면역형은 각기 A/HAR-13, B/HAR-36, Ba/Aphache-2, C/CDC, D/UW-3/Cx, E/Bour, F/IC-Cal-3, G/UW-57/Cx, H/UW-43/Cx, I/UW-12/UR, J/UW-36/UR, K/UW-31/Cx, LGV type I/440, LGV type II/CDC 및 LGV type III/404 이였다.

2. Chlamydia 분리

임상검체를 면봉으로 채취하여 2SP(0.2M sucrose-0.02M phosphate) 수송배지에 넣어 -70°C 냉장고에 보관하였다가 실험 당일 해동하여 사용하였다. 검체를 해동하여 vortex mixer에 1분간 진탕하여 1,000rpm에서 10분 원심분리하고 상청액 0.2ml를 McCoy단층세포가 들어있는 shell vial에 접종하였다. Shell vial은 35°C centrifuge에서 3,000 rpm으로 1시간 원심한 후 cycloheximide (2μg/ml)가 함유된 성장 배지 1ml씩 넣은 후 35°C, 6% CO₂ 배양기에서 2일 간 배양하였다. 배양 후 McCoy단층세포가 덮여 있는 cover glass를 shell vial에서 꺼내 *C. trachomatis*에 대한 단클론 항체(indirect immunofluorescence : IIF)염색을 하였다. *C. trachomatis*양성인 검체와 표준균주는 계속 동일한 방법으로 McCoy단층세포에 계대 배양하여 Shell vial내 McCoy단층세포의 감염율이 100% 되게 한후 2SP에 보관 -70°C 냉동고에 보관하였다.

3. 항생제 희석

Fluoroquinolone CFC-222(CFC-222), ciproflo-

xacin(CPEX), ofloxacin(OFLX), 및 minocycline (MC)은 제일제당 종합연구소에서 공급받았다. CFC-222, CPFX 및 MC은 세포배양용 3차 종류수에 녹였고, OFLX은 phosphate buffer(pH 7.4)에 녹여 사용하였다. 항생제 희석 농도는 CFC-222, CPFX, OFLX은 0.01 μg/ml 10 μg/ml, MC은 0.001 μg/ml-0.1 μg/ml가 되게 2배수씩 희석하였다.

4. 검체 접종

96-Well microtiter cell culture plat의 각 well에 McCoy 세포를 항생제가 없는 배지 (RPMI 1640, 10% FCS)에 부유시켜 200 μl(2×10^5)씩 분주하여 35°C, 6% CO₂ 배양기에서 2일 배양하면 well 전면적에 균등하게 McCoy세포가 자라게 된다. 각 well에 배지를 제거하고 100%감염된 표준 균주및 환자에서 분리된 *C. trachomatis*를 희석하여 각 well 당 봉입체가 100-1,000개 정도 생길 수 있게끔 접종하였다.

접종된 plate는 35°C, 6% CO₂배양에 2시간 넣어 두고 30분 간격으로 흔들어 주어 접종이 골고루 되게 하였다. 배양 2시간 후에 cycloheximide(2 μg/ml)가 함유된 배지에 각종 항생제를 첨가 2배수씩 희석하여 원하는 항생제 농도를 맞추어 200 μl씩 분주하였다. 상기 plate는 35°C, 6% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 Jones' iodine용액으로 봉입체를 염색하였다.

5. Jones' iodine염색

배양이 끝난 plate는 배지를 제거하고 무수알콜로 2번 고정하고 Jones'iodine (iodine crystal 5g, potassium iodine 5g in 100ml methanol)로 10분 염색하여 역상 위상차 현미경으로 흑갈색의 봉입체를 관찰하였다.

6. 결과 판정

2명의 서로 다른 관찰자가 96-well microtiter cell culture plate의 각 well를 관찰하여 봉입체가 관찰되지 않기 시작하는 well의 항생제 농도를 항생제 최소억제 농도로 판단하였다.

결과

1. 표준균주에 대한 항생제 감수성

CFC-222의 MIC범위는 0.04-0.15 μg/ml였으며,

면역형 G가 $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 낮으며, 면역형 B, Ba, D, E, F, H, J 및 L1이 $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 높았다. 전체적인 MIC₅₀와 MIC₉₀은 $0.08 \mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. Ciprofloxacin의 MIC범위는 $0.3\text{--}2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이였고, 면역형 A, D 및 I가 $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 제일

낮고, 면역형 F 및 L1은 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 높았다. MIC₅₀와 MIC₉₀은 $1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. Ofloxacin의 MIC범위는 $0.15\text{--}0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 면역형 G가 $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 낮고, 면역형 A, B, Ba, C, F, H, I, J, K 및 L1이 $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 높았다. MIC₅₀와

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics to Control Strains of *C. trachomatis*

Drug	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Range	50%	90%
CFC-222	0.04 - 0.15	0.08	0.15
Ciprofloxacin	0.3 - 2.5	1.2	2.5
Ofloxacin	0.15 - 0.6	0.6	0.6
Minocycline	0.001 - 0.015	0.004	0.008

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics to 36 isolates of *C. trachomatis*

Drug	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Range	50%	90%
CFC-222	0.04 - 0.6	0.15	0.3
Ciprofloxacin	0.15 - 2.5	0.6	1.2
Ofloxacin	0.08 - 0.6	0.6	0.6
Minocycline	0.001 - 0.12	0.015	0.06

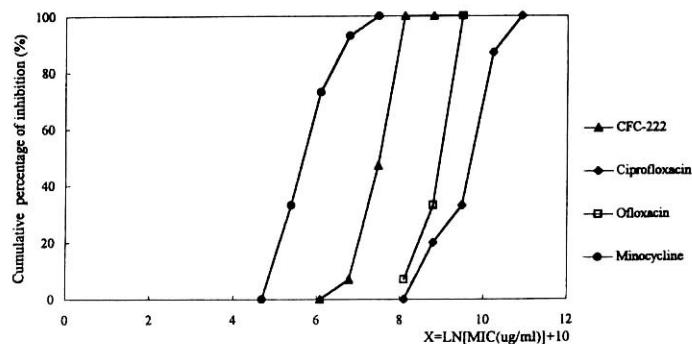


Fig. 1. Cumulative antimicrobial activities of several antibiotics against control strains of *C. trachomatis*.

* X value is a logarithmic transformation of the MICs of antimicrobial agents plus ten

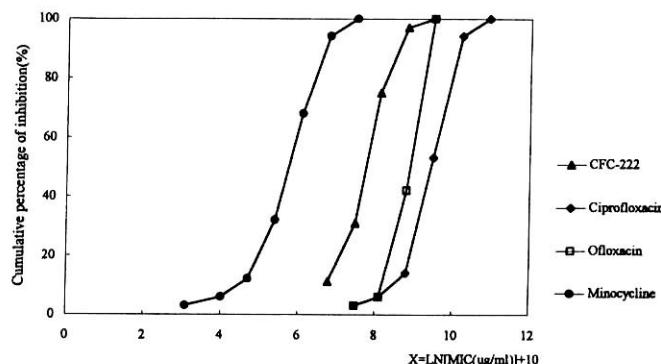


Fig. 2. Cumulative antimicrobial activities of several antibiotics against clinical isolates of *C. trachomatis*.

* X value a logarithmic transformation of the MICs of antimicrobial agents plus ten

MIC_{90} 는 각기 $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. Minocycline의 MIC 범위는 $0.001\text{-}0.015 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로, 면역형 A, B, 및 G가 $0.001 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 낮고, 면역형 Ba가 0.015 로 제일 높았다. MIC_{50} 와 MIC_{90} 는 $0.004 \mu\text{g}/\text{ml}$, $0.008 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다 (Table 1, 및 Fig. 1).

2. 분리균주에 대한 항생제 감수성

CFC-222의 MIC 범위는 $0.04\text{-}0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였으며, MIC_{50} 과 MIC_{90} 은 $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$, $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. Ciprofloxacin의 MIC 범위는 $0.15\text{-}2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였으며, MIC_{50} 과 MIC_{90} 은 $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$, $1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. Ofloxacin의 MIC 범위는 $0.08\text{-}0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였으며, MIC_{50} 과 MIC_{90} 은 각기 $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. Minocycline의 MIC 범위는 $0.001\text{-}0.12 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였으며 MIC_{50} 과 MIC_{90} 은 $0.015 \mu\text{g}/\text{ml}$, $0.06 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다 (Table 2, 및 Fig. 2).

고 찰

*C. trachomatis*는 obligatory intracytoplasmic organism으로 특유의 생활사를 갖고 있기 때문에 균체분리가 어려울 뿐만 아니라 이균에 대한 항균제의 항균력 측정방법이 표준화 되어 있지 않다⁵⁾. Shiao 등⁶⁾이 처음으로 난황란에 *C. trachomatis*를 배양하여 일부 항생제에 대하여 감수성 검사를 실시하였다. 그러나 이 당시 균체 배양은 *in vivo*에서만 이루어져 방법상의 어려움 뿐만 아니라, 검사결과의 재현성도 좋지 않았다. Kuo 등⁷⁾은 McCoy세포에 각종 면역형의 *C. trachomatis*를 감염시킨 후 여러 항생제의 항균력을 측정하였다. 그러나 이 방법도 많은 shell vial을 사용하여야 하기 때문에 많은 검체를 검사하기는 불가능하다. Segreti 등⁸⁾ 및 Endtz 등⁹⁾은 96-well microtiter cell culture plate에 McCoy세포를 배양하여 8가지 약제를 12단계 희석하여 보다 정확한 항균력을 측정을 할 수 있게 되었다. 국내에서는 최 등¹⁰⁾이 처음으로 이 방법을 이용하여 *C. trachomatis*에 대한 기본 항생제 (erythromycin, doxycycline 등)의 항균력을 측정하였다. 이 방법은 세포에 손상을 주지 않게 고속 원침을 시킬 필요가 없는 것이 특징이다. 단점으로는 접종 균수를 많이 하여야 하기 때문에 *C. trachomatis* 양성검체는 계속 계대 배양하여 shell vial내 cover glass위의 McCoy Cell단층세포의 50% 이상이 봉입

체를 갖고 있어야 한다. 검체 접종후 1 well당 100~1,000개의 봉입체가 생기도록 검체량을 조정하였는데 이는 Hammerschlag 등¹¹⁾의 $10^2\text{-}10^4$ 봉입체수보다 재현성이 좋았다. 항생제 농도에 따른 봉입체수 계산은 실시되지 않았으나, 최 등¹⁰⁾의 실험과 마찬가지로 MIC농도보다 3~4단계 앞에서 봉입체수가 감소하기 시작하여 2단계 전에서 급작히 감소하고 1단계 전에서는 1 well당 1~2개의 pyknotic한 봉입체를 눈여겨 보아야만 관찰할 수 있었다. 표준균주의 면역형에 따른 MIC변화는 CFC-222에서 G가 $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 가장 낮고, B, Ba, D, E, F, H, J 및 L1 면역형이 $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 높다. CPFX는 면역형 A, D 및 I가 $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 낮고 면역형 F 및 L1이 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 높다. OFLX는 면역형 G가 $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 낮고, 면역형 A, B, Ba, C, F, H, I, J, K 및 L1의 MIC가 $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 높다. MC은 면역형 A, B, 및 G가 $0.001 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 낮고 면역형 Ba가 $0.015 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제일 높다. 이번 연구에서 면역형에 따른 각종 항생제의 MIC는 상당한 차이가 있었으나, 각 면역형의 실험 숫자가 각 면역형에 한개씩인 것을 고려하면, 국내 분리균주의 면역형을 결정하여 보다 많은 숫자를 실험하여야 면역형에 따른 MIC변화를 알 수 있을 것이다. 그러나 Kuo 등⁷⁾은 면역형에 따른 MIC변화는 관찰하지 못한 것으로 보아, 상기 변화는 표준균주의 면역형에 따른 MIC 변화 라기보다는 균주자체에 의한 개개의 변화로 간주하여야 옳을 것이다. 국내 분리균주의 MIC범위는 CFC-222가 $0.04\text{-}0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$, CPFX은 $0.15\text{-}2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, OFLX은 $0.08\text{-}0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$, 및 MC는 $0.001\text{-}0.12 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이다. CFC-222는 국내 개발된 broad spectrum의 fluoroquinolone계 신항생제로¹²⁻¹⁴⁾ 국내분리된 균주와 표준균주에 대한 MIC_{90} 가 같았으며, 분리된 균주 전부에 탁월한 약효가 있었다. CPFX도 국내분리 균주와 표준균주에 대한 MIC_{90} 가 차이가 없었으나 국내 분리균주에서 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 가 2예, $1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 가 15예로 이미 저항균주가 나타난 것으로 사료된다. 외국의 경우도 CPFX의 MIC가 $1.0\text{-}4.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 Chlamydial infection에 무효한 것으로 나타났다. OFLX도 국내분리균주나 표준균주에 대한 MIC_{90} 가 동일하며, 대부분 균주가 $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에 집중되어 있다. 그러나 외국에서 OFLX의 MIC가 $0.5\text{-}2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 국내보다 높은 것으로 보아 국내에서도 OFLX에 저항하는 균주가 곧

나타날 것으로 추측된다^{15, 16)}. 이외에 fluoroquinolone 제제중 fleroxacin, lomefloxacin, pefloxacin, norfloxacin, enoxacin등은 chlamydial infection에 무효한 것으로 보고되고 있다^{15, 16)}. MC의 MIC는 국내 분리균주가 표준 균주보다 3단계 높으나, MIC자체가 위낙 낮아 아직까지 제일 좋은 약제로 남아있다¹⁷⁾. 그러나 여러 장기에 부작용이 많아 소아나 임산부등에서 장기 치료시는 많은 문제점을 갖고 있다.

상기 내용을 총괄하면 CFC-222는 *C. trachomatis*에 대하여 강력한 항균력이 있는 것으로 나타났다.

요약

목적 : *Chlamydia trachomatis*는 비임균성뇨도 염, 영유아 폐염 등 여러 질환의 중요 원인균이다. 새로운 fluoroquinolone제제중의 하나인 CFC-222와 다른 quinolone제제와 함께 *C. trachomatis*에 대한 항균력을 측정하였다.

방법 : 96-well microtiter cell culture plate에 McCoy을 키운 후 균접종을 하였고, 15개 표준균주(A-L₃)와 36개 국내 분리 균주를 사용하였다. CFC-222, ciprofloxacin(CPFX), ofloxacin(OPLX), 및 minocycline(MC)을 2배수 희석하여 각 항균제의 최소억제 농도를 측정하였다.

결과 : 표준균주의 MIC₉₀는 CFC-222 0.15 μg/ml, CPFX 2.5 μg/ml, OFLX 0.6 μg/ml 및 MC 0.08 μg/ml였다. 국내 분리 균주의 MIC₉₀는 CFC-222 0.3 μg/ml, CPFX 1.2 μg/ml, OFLX 0.6 μg/ml 및 MC은 및 MC은 0.06 μg/ml였다.

결론 : 새로운 fluoroquinolone CFC-222는 *Chlamydia trachomatis*에 탁월한 감수성을 나타내었다.

REFERENCES

- 1) 최태열, 손향은, 김상경, 김춘원: McCoy 세포배양법으로 분리된 *Chlamydia trachomatis* 60예 분석. 대한성병학회지 1:51-56, 1991
- 2) 금동극, 최영식, 김신규, 최태열, 김춘원, 김기홍: 세포 배양법을 이용한 *Chlamydia trachomatis*봉입체 검출에 관한 고찰. 대한임상병리학회지 6:429-432, 1986
- 3) 최태열, 김춘원, 김중환: 비임균성 뇌도염 환자에서 *Chlamydia trachomatis*검출방법에 관한 연구. 대한미생물학회지 21:393-397, 1986
- 4) 서일혜, 최태열: 중합효소 연쇄반응을 이용한 *Chlamydia trachomatis*의 검출. 대한미생물학회지 29: 169-175, 1994
- 5) NCCLS: Performances standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS Document M100-S5, Vol. 14, No. 16, 1994
- 6) Shiao LS, Wang SP, Graystone JT: Sensitivity and resistance of TRIC agent to penicillin, tetracycline and sulfa drug. Am J Ophthalmol 63:1558-1568, 1967
- 7) Kuo CC, Wang SP, Grayston JT: Antimicrobial activity of several antibiotics and a sulfonamide against *Chlamydia trachomatis* organisms in cell culture. Antimicrob Agent and Chemother 12:80-83, 1977
- 8) Segreto J, Kessler HA, Kapell KS: In vitro activity of lomefloxacin against *Chlamydia trachomatis*. Rev of Infect Dis 11(Suppl):1285, 1985
- 9) Endtz HP, Ossewaarde JM: In vitro activity of eight quinolones against *Chlamydia trachomatis*. Rev of Infect Dis 11(Suppl):1278, 1989
- 10) 최태열, 우영남, 김동한: Erythromycin, doxycycline, pipemidic acid enoxacine *C. trachomatis*에 대한 항균력 측정. 감염 24:99-105, 1992
- 11) Hammerschlag MR: Activities of trimethoprime - sulfamethoxazole against *Chlamydia* in vitro. Rev of Infect Dis 4:500-505, 1982
- 12) Jung YH, Lee KS, Yeon KJ, Kim DH, Lee KH, Kim JW, Park KH: Pharmacokinetics of CFC-222 in animals. Drug 49(Suppl 2):321-322, 1995
- 13) Park KH, Cho IH, Lee JM, Kang JA, Kim YG, Hong KH: In vitro and in vivo antibacterial activities of CFC-222, a novel broad spectrum fluoroquinolone. Drug 49(Suppl 2):241-242, 1995
- 14) 장명웅, 김광혁, 김형진, 이신영, 김제학: Fluoroquinolone CFC-222와 macrolides의 mycoplasmas에 대한 감수성. 대한미생물학회지 31:205-213, 1996
- 15) Orniel JD: Use of quinolones in *Chlamydia* infection. Rev of Infect Dis 11(Suppl):1273-1286, 1989
- 16) Lefevre JC, Escaffre MC, Courdil M, Lareng MB: In vitro evaluation of activities of azithromycin, clarithromycin and sparfloxacin against *Chlamydia trachomatis*. Pathol Biol Paris 41:313-315, 1993
- 17) Ridgway GL, Owen JM, Oriell JD: The antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in cell culture. Br J Vener Dis 54:103-106, 1978