

양만장에서 분리한 *Edwardsiella tarda*균에 대한 new quinolone계 약물의 항균작용

최민순 · 김경호 · 서영호 · 최상훈 · 박관하

군산대학교 해양산업대학 수족병리학과

지금까지 사용해온 많은 항균제들에 대한 내성의 획득은 어병세균의 박멸을 어렵게 만드는 심각한 문제를 야기하고 있다. 이 연구에서는 최근 인간의 세균성 질병치료 목적으로 사용하기 시작하거나 개발중인 new quinolone계 약물 14종을 대상으로 군산근교의 뱀장어(*Anguilla japonica*) 양만장 사육수에서 분리한 75종의 *Edwardsiella tarda*균에 대한 항균활성을 측정함으로써 장래의 신규 수산용 항균제 개발에 필요한 정보를 얻고자 시도하였다. Broth dilution assay에 의해 측정된 *in vitro* 항균활성시험에서 DU-6859는 MIC₅₀ 값 0.05 µg/ml로 가장 강력한 약효를 보여주었다. MIC₅₀ 값 0.2-0.78 µg/ml의 범위에 드는 약물들인 T-3762, Bay-y3118, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin 및 tosufloxacin은 그 다음으로 강력한 약물군을 형성하였다. 한편 difloxacin, sparfloxacin, fleroxacin, Q-35, amifloxacin, lomefloxacin 및 enoxacin 등은 약효가 약한 약물들로서 MIC₅₀값이 1.56-3.13 µg/ml 범위에 속하였다. 이들 항균제에 대해서 내성(MIC 값이 6.25 µg/ml 이상으로 정하였을 때)을 가지고 있는 균주는 T-3762 및 Bay-y3118은 3주, norfloxacin은 5주, tosufloxacin 12주, ciprofloxacin 및 ofloxacin 13주, sparfloxacin 16주, fleroxacin 19주, amifloxacin 및 lomefloxacin 31주, Q-35 36주, enoxacin 41주, difloxacin 44주로 각각 나타났다. DU-6859의 경우에는 내성이 있는 균주가 전혀 발견되지 않았다. 이 연구 결과들은 new quinolone계 약물들 사이에도 *Edwardsiella tarda*균에 대한 항균활성이 다양함을 시사하며 또한 향후 항균제 도입에 중요한 참고자료로 이용될 수 있을 것이다.

Key words : *Edwardsiella tarda*, New quinolones, Minimum inhibitory concentration

양식산업에서 어병은 막대한 경제적 손실을 초래하는 요인으로서 그 중에서도 세균성질병은 가장 빈번히 그리고 대량으로 폐사를 유발하는 원인으로 알려져 있다. 특히 뱀장어 양식에서 *E. tarda*균이 유발하는 Edward병의 발병은 경우에 따라 아주 심각한 결과를 초래하나 각종 약제에 대한 내성의 획득이 자주 일어나서 치료에 많은 어려움을 겪고 있다.

소위 "old quinolone"이라고 칭하는 oxolinic acid, nalidixic acid나 flumequine등은 오래전 부터 어

류양식에서 세균성질병의 예방 및 치료에 이용되어 왔다. 이들 약제들은 Gram 양성균뿐만 아니라 음성균에도 유효하여 대부분의 어병세균에 다소 남용되어 왔었기 때문에 다른 항생·항균제의 경우에서와 같이 내성균의 발생이 큰 문제로 부각되기 시작하였다(최 등, 1995). 1980년대에 들어서 기존의 old quinolone들을 기본으로 한 다양한 화학적 구조변경의 결과 이전의 약물들 보다 약효 및 독성의 측면에서 뛰어난 fluoroquinolone계 약물들이 합성되기 시작하여 "new quinolone"이라는 이름으로

블리게 되었다(Mitcher *et al.*, 1993). 특히 이들 새로운 quinolone들은 다양한 인간의 병원성 세균들에 있어서 내성균의 발생빈도가 낮고 old quinolone과 교차내성이 거의 없다는 장점을 지니고 있는 것으로 평가되고 있다. 따라서 광범위한 내성의 획득이 문제로 대두되고 있는 수산양식산업상의 어려움을 해결할 수 있는 하나의 방안으로서 new quinolone계 약물의 실용화는 고려해 볼만한 상황이다.

이 연구는 세계적으로 거의 수산용 약제로 아직 이용되고 있지 않은 new quinolone계 항균제들이 뱀장어의 Edward병을 치료하는 데에 유효할 것인가를 검토하는 목적을 가지고 수행하였다. 그 첫 단계의 검토로 전북 군산인근지역의 양만장 사육조에서 *E. tarda*균을 분리, 동정하고 14종의 new quinolone계 약물에 대한 *in vitro*상에서의 약효를 측정하였다.

재료 및 방법

공시균주의 분리 및 동정

1995년 4월 부터 10월 사이 서해안지역 군산일원의 대단위 가온 양만장의 사육조에서 간이 동정법(Wyatt *et al.*, 1979)에 준하여 총 75균주의 *Edwardsiella tarda* 균을 분리 동정하여 시험에 사용하였다. 분리한 균주는 천자배양을 실시하여 냉장상태로 보존하였다.

공시항균제 및 항균용액의 조제

공시한 quinolone제로는 ciprofloxacin(Bayer), norfloxacin(Kyorin), enoxacin(大日本製藥), ofloxacin(日本 第一製藥), lomefloxacin(Searle), DU-6859(日本 第一製藥) sparfloxacin(大日本製藥), fleroxacin(Kyorin), difloxacin(Abbot), Q-35(Chugai), tosufloxacin(Abbot), Bay-y3118(Bayer) 및 amifloxacin(Sterling), T-3762(Toyama) 등의

14종을 사용하였다. 각각의 항균용액은 10 mg를 0.1 N-NaOH 0.5 mL에 용해한 후 멸균증류수를 9.5 mL 첨가 희석한 다음 Mueller-Hinton broth (MHB; Difco Lab. pH 7.2)에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다(Martinsen *et al.*, 1991).

최소억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC) 측정시험

공시한 약제에 대한 최소억제농도(MIC)의 측정은 Gravan *et al.*(1980)과 Franklin과 Wierup(1982)의 방법을 다소 보완하여 액체배지 희석법으로 실시하였다. 즉 U-type의 96 well microtiter plates(Gibco)의 각 well에 각각의 항균제 용액(100 µg/ml)을 넣고 2배 연속 계열희석하였다. 그 후 각각의 well에 MHB(Difco Lab. pH 7.2)에서 18 시간 배양한 대수증식기의 균액을 10 µl 접종하여 10⁶cell/ml 되게 한 다음 35°C에서 약 48시간 배양하였다. 최소억제농도는 균의 증식을 완전히 억제한 최소의 약제 농도로 정하였다. 이때 항균제를 첨가하지 않고 배양한 균을 대조군으로 이용하였다. MIC₅₀ 값은 총 75균주의 50%에 해당하는 38균주 이상의 증식을 저지하는 최소농도로 정하였다.

결과 및 고찰

군산근교의 4개 양만장에서 분리·동정한 75균주의 *Edwardsiella tarda*에 대한 new quinolone계 항균제 14종의 *in vitro*상의 항균력 시험 결과 중 MIC(minimum inhibitory concentration)별 분포도를 Fig. 1-4에 나타내었다. 14개 약제중 가장 항균력이 강한 물질은 DU-6859로서 MIC값이 3.13 µg/ml 이상인 균주는 전혀 관찰되지 않았으며, 시험균주 75종 중 27%에 해당하는 20균주는 MIC 값이 0.0125 µg/ml 이하의 우수한 약효를 발휘하였다(Fig. 4). 약효가 비교적 미약한 group에 속하는 difloxacin, sparfloxacin, fleroxacin, Q-35, amifloxacin, lomefloxacin, enoxacin 등에서는 최고시험농도인 12.5 µg/ml이

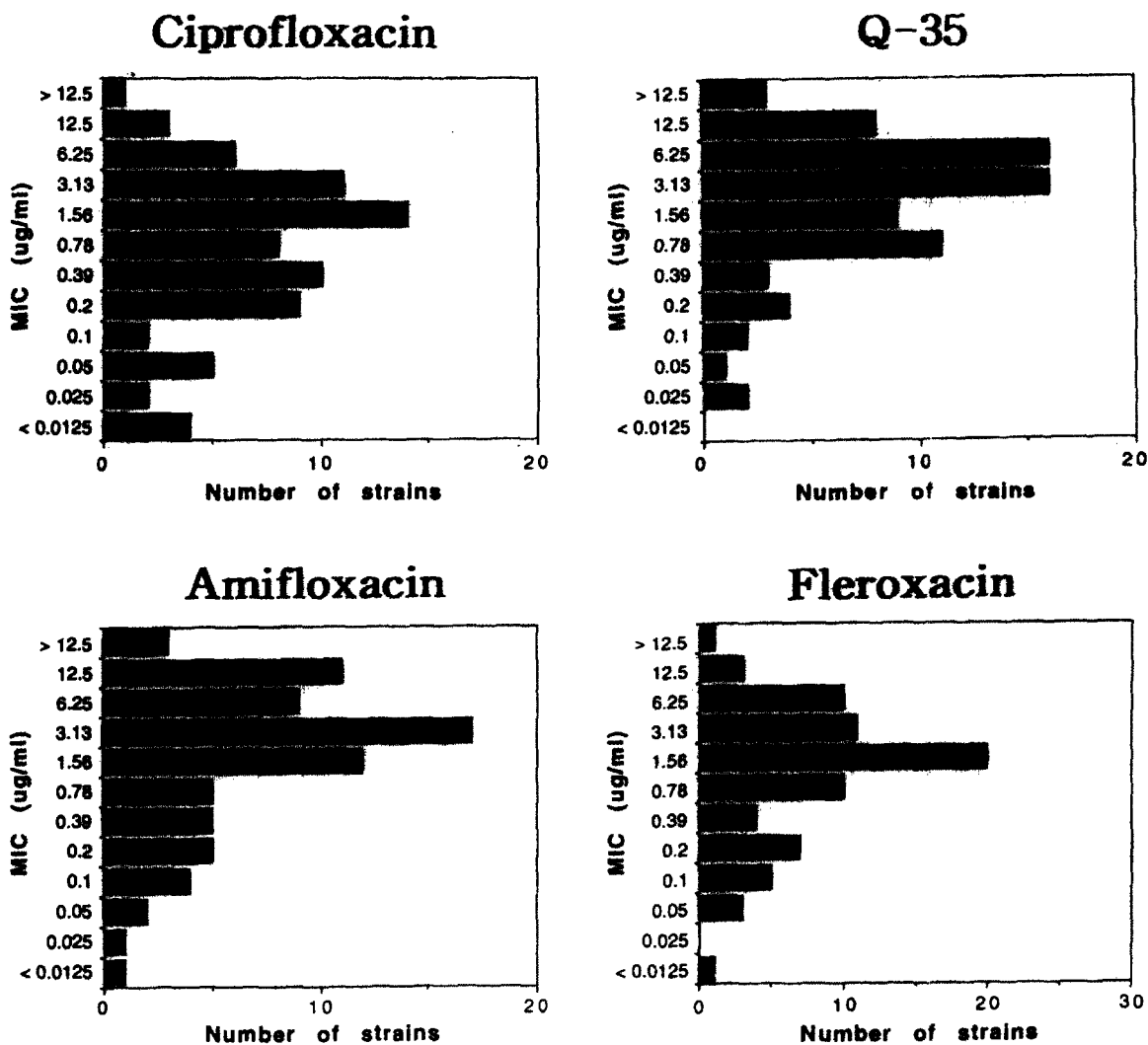


Fig. 1. MIC value distribution of ciprofloxacin, Q-35, amifloxacin, and fleroxacin against 75 strains of *E. tarda*.

상의 MIC값을 가진 균주가 최소한 1균주 이상 발견되었으나 enoxacin의 경우에는 무려 13%에 해당하는 10균주가 저항성을 보유함이 발견되었다. 효력이 중등도인 T-3762, Bay-y3118, norfloxacin, ofloxain, tosufloxacin 등에서는 MIC가 12.5 µg/ml 이상인 균주는 별로 발견되지 않았으며 단지 ciprofloxacin에서만 1개의 균주가 관찰되었다. 이들 약물들의 MIC는 0.2-1.56 µg/ml 부근에서 가장 빈도가 높게 나타

나는 경향을 보여주었다. 이들 각각에 대한 효력을 비교하기 위하여 75개 균주의 50%에 해당하는 38균주 이상에서 결정된 MIC₅₀ 값에 따라 분류한 결과를 Table 1에 나타내었다.

*E. tarda*균은 *Aeromonas* 및 *Pseudomonas* 등과 함께 중요한 어병세균의 하나이다. 주로 이 세균에 의한 질병을 치료하기 위해서 tetracycline류, chloramphenicol류, nitrofurantoin류, aminoglycoside류, sulfa제와

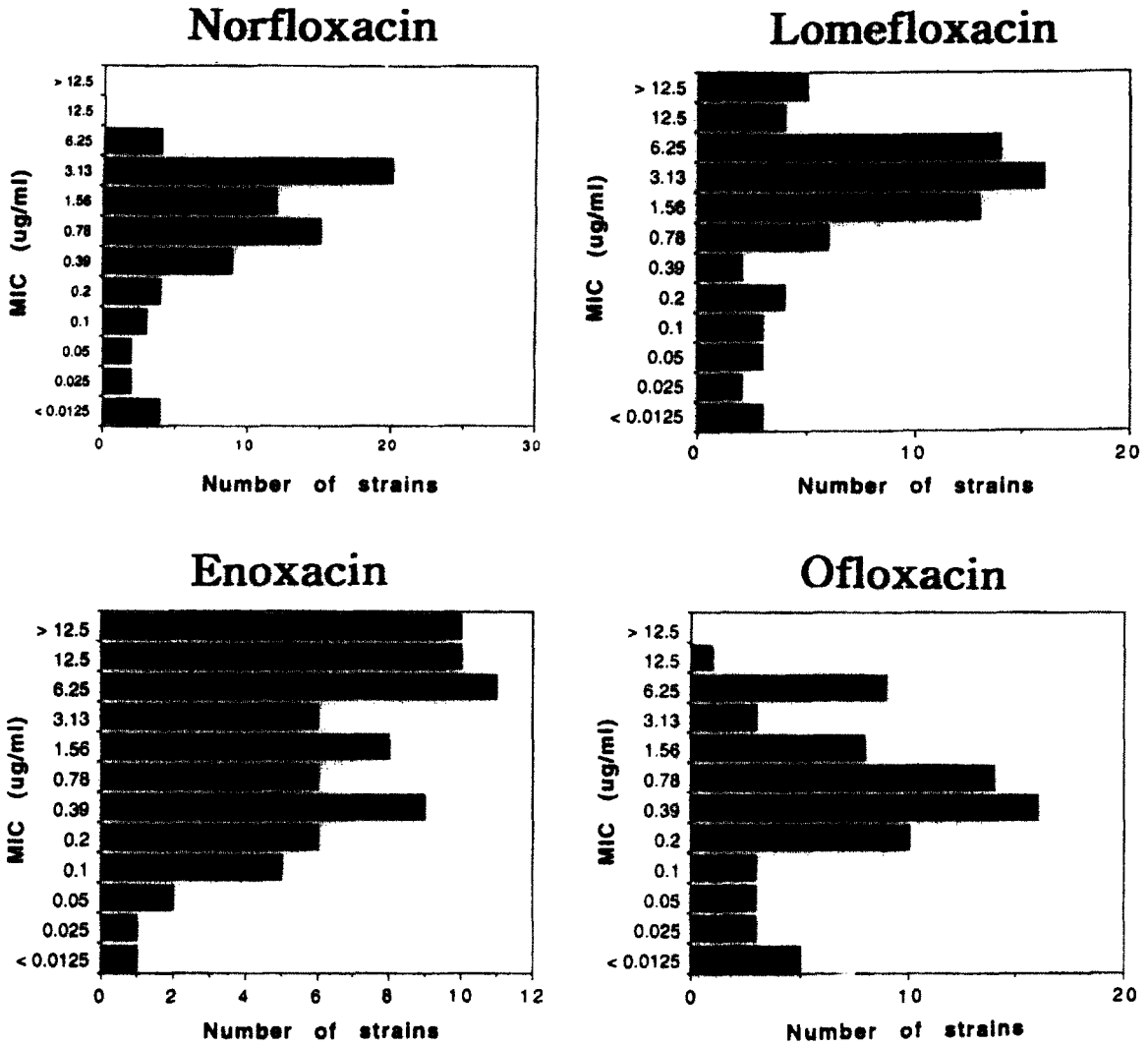


Fig. 2. MIC value distribution of norfloxacin, lomefloxacin, enoxacin, and ofloxacin against 75 strains of *E. tarda*.

trimethoprim계 항균제 등이 국내에서나 세계적으로 널리 사용되어 왔다. Tetracycline계 중 가장 빈번하게 사용되는 oxytetracycline은 비교적 어류에 대해서 독성이 약하고 항균 spectrum이 광범위하기 때문에 많이 사용되고 있으나 경구 투여후 흡수가 불량하고 비경구적 투여시에는 면역기능을 억제하는 부작용이 있는 것으로 알려져 있다(Grondel, 1987). Amonoglycoside류도 경구투여에 의해 흡수가 거의 되지 않으며,

nitrofuran계는 물속에서 화학적으로 불안정하고 태양광선에 의해서도 쉽게 파괴되는 단점을 지니고 있다. 또한 복합제제로 많이 사용되는 sulfa제는 내성균의 발달이 너무 빠르다는 문제점을 안고 있다(尾崎, 1980).

Ciprofloxacin과 같은 소위 제3세대 fluoroquinolone류인 new quinolone계 약물 약물들은 *Aeromonas*, *Pseudomonas* 등 중요한 어병세균에 대하여

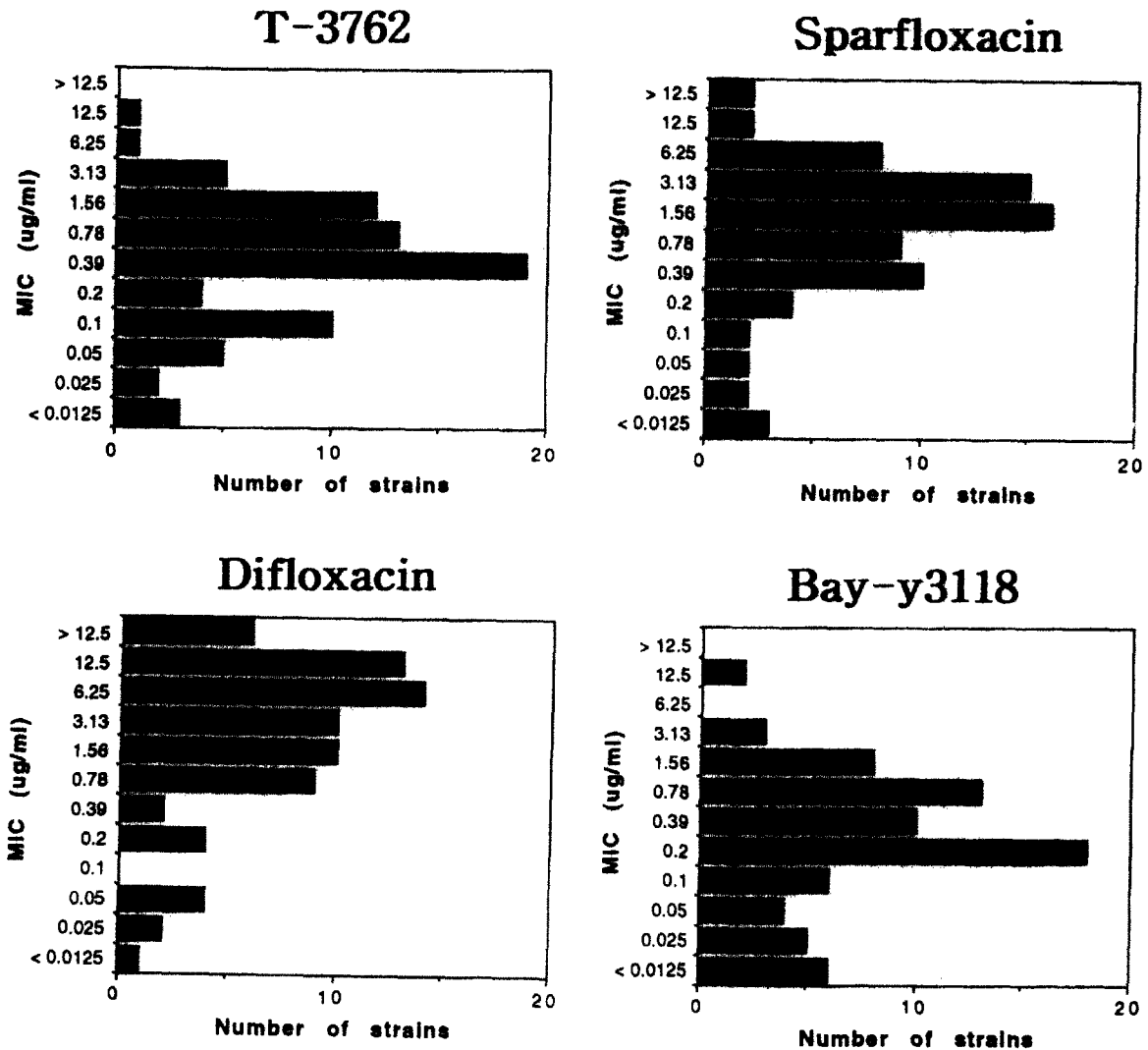


Fig. 3. MIC value distribution of T-3762, sparfloxacin, difloxacin, and Bay-y3118 against 75 strains of *E. tarda*.

탁월한 효력을 발휘하는 반면 Gram 양성균에 대해서는 다소 약한 활성을 지니고 있다(Nouws *et al.*, 1988a). 이들 new quinolone계 약물의 어체내 경구 흡수도는 아직 잘 연구된 바가 없으나 최근 국내에서 수산용으로 출시되기도한 ciprofloxacin의 경우 실험적으로 약효가 탁월하고, 어류에 단회 투여 후에도 유효농도 level이 2-5일 간 유지되는 점(Nouws *et al.*, 1988b)에서 약동력학적으로 바람직한 약물로

간주될 수 있을 것이다. Ciprofloxacin 이외의 대부분의 fluoroquinolone들도 인체 투여시 경구흡수도가 양호하기 때문에(Karabalut and Drusano, 1993) 어류에서도 사료와 혼합하여 투여하는 등 경구적인 투여 경로가 매우 유효할 것으로 생각된다. 이와 같이 신규 fluoroquinolone계 약물은 양식어의 세균성 질병치료에 매우 효과적일 것으로 전망되고 있어서 최근 이 분야의 연구가 활발하게 진행되고

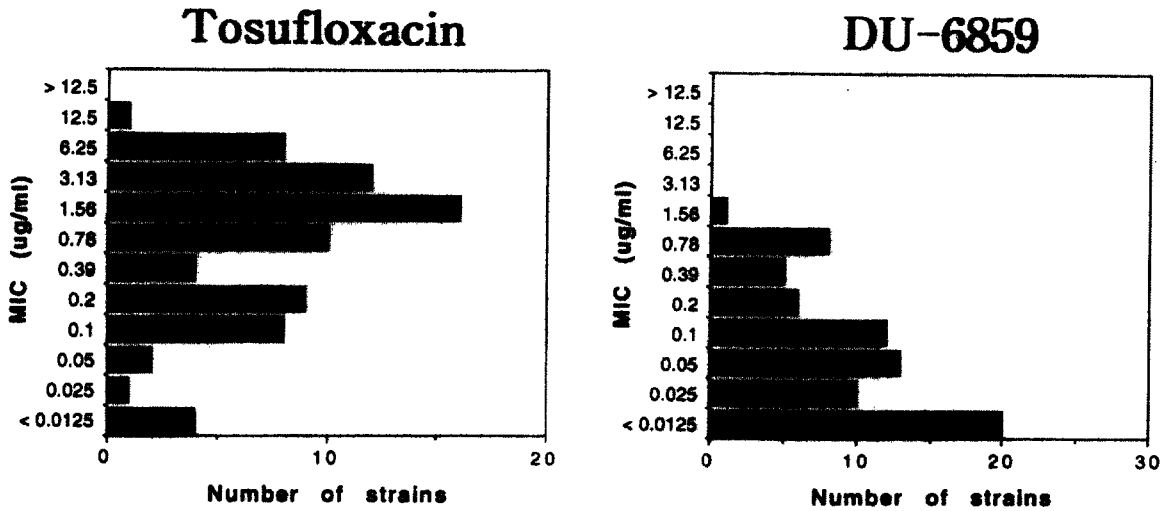


Fig. 4. MIC value distribution of tosufloxacin and DU-6859 against 75 strains of *E. tarda*.

Table 1. Potency of *in vitro* antibacterial activity (MIC₅₀) of new quinolones against 75 isolates of *E. tarda*

Drugs	MIC ₅₀ (μg/ml)
DU-6859	0.05
Bay-y3118	0.2
Ofloxacin	0.39
T-3762	0.39
Bay-y3118	0.78
Ciprofloxacin	0.78
Norfloxacin	0.78
Tosufloxacin	0.78
Sparfloxacin	1.56
Fleroxacin	1.56
Enoxacin	1.56
Difloxacin	3.13
Q-35	3.13
Amifloxacin	3.13
Lomefloxacin	3.13

있는 실정이다(Bowser and Babish, 1991).

이들 약물은 old quinolone계의 항균기전과 마찬가지로 세균의 DNA합성에 필수적인 효소계인 DNA-

gyrase를 차단하여 살균작용을 발휘하는 것이 약리기전으로 알려져 있다. 최근에 등장한 이들 fluoroquinolone들은 지금까지 널리 사용되어온 oxolinic acid 등과 같은 과거의 quinolone계 물질들 보다 항균활성이 뛰어난 것으로 보고되고 있다(Smith and Lewin, 1988). 그러나 아직까지는 국내의 수산용으로의 사용 승인은 거의 이루어지지 않고 있지만 외국에서는 다양한 어병세균에 대한 시험결과 상당히 유효할 것으로 전망하고 있어서 장래에는 사용이 예상되고 있다(Barnes *et al.*, 1991).

이 연구에서는 *E. tarda*균만을 대상으로 시험을 실시하였으나 new quinolone계 약물은 다른 어병세균에 대해서도 탁월한 항균력을 지닌 것으로 추정된다. 즉, 이 계통의 약물중 하나인 enrofloxacin은 Kirby-Bauer disk diffusion 방법을 이용한 감수성 시험에서 Romet®(sulfadimethoxine-ormethoprim)나 oxytetracycline에 비하여 *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas* spp. 등에 대하여 뛰어난 항균력을 보여주었다(Plumb *et al.*, 1995). 이와 유사하게 difloxacin도 old quinolone계인 flumequine보다 낮은 용량으로 Atlantic salmon에서 furunculosis를 완벽하

게 치료하는 효과를 나타내었다(Elston and Drum, 1995). 또한 chinook salmon에 감염된 *Aeromonas salmonicida*에 대한 sarafloxacin의 약육법도 매우 유효함이 증명되었다(Markwardt and Klontz, 1989).

본 연구의 결과 new quinolone계의 약제가 *E. tarda*에 미치는 항균활성도 약물의 종류에 따라 매우 변화가 있는 것으로 밝혀졌다. 이 시험에 사용된 균주들이 이미 new quinolone계 약물에 노출되었을 가능성이 희박하고 old quinolone계에 이미 노출되었다 하더라도 양 부류의 약제간에는 교차내성이 거의 발견되지 않는다는 사실(Crumplin and Odell, 1987; Smith and Lewin, 1988)로 미루어 볼때 이때 나타난 다양한 항균능은 균주자체가 가지고 있는 서로 다른 수준의 자연내성(natural resistance)에 의한 것일 가능성이 크다. 그러나 이 연구에서는 각각의 균주별 new quinolone계 약물에 대한 내성의 분포를 분석하지는 않았기 때문에 모든 내성균이 자연내성에 의한다고 단언하기는 어렵다. 아무튼 본 연구결과 많은 시험약제들에서 우수한 항균력이 발견되었으므로 이 부류의 약제들에 대한 수산용 약제로서의 개발전망은 매우 밝다고 볼 수가 있다. 특히 DU-6859와 같은 아직 개발단계에 있는 항균제는 다른 fluoroquinolone계 물질에 내성(natural resistance)을 가진 *Edwardsiella tarda* 균주에 대해서조차 강력한 항균력을 발휘하였으므로 매우 유망한 물질로 평가된다.

참 고 문 헌

Barnes, A. C., Ames, S. G. B., Hastings, T. S. and Lewin, C. S.: Fluoroquinolones display rapid bactericidal activity and low mutation frequencies against *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis., 14 : 661-667, 1991.
 Bowser, P. R., Babish, J. G.: Clinical pharmacology and efficacy of fluoroquinolones in fish. Ann. Rev. Fish Dis., 1 : 63-66, 1991.

Crumplin, G. C. and Odell, M.: Development of resistance to ofloxacin. Drugs, 34 (suppl. 1) : 1-8, 1987.
 Elston, R. and Drum, A. S.: Efficacy of orally administered difloxacin for the treatment of furunculosis in Atlantic salmon held in seawater. J. Aquat. Anim. Health, 7 : 22-28, 1995.
 Franklin, A. and Wierup, M.: Evaluation of the sensitive method adapted for antimicrobial drug susceptibility testing. Vet. Microbiol., 7 : 447-454, 1982.
 Gravan, T. L., Jones, R. N. and Barry, A. L.: Evaluation of the sensitive system for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing: A collaborative story. Antimicrob. Agents Chemother., 17 : 464-469, 1980.
 Grondel, J. L., Nouws, J. F. M. and Muiswinkel, W. B. van: The influence of antibiotics on the immune system IV: Immuno-pharmacokinetic investigation on the primary anti-SRBC response in carp (*Cyprinus carpio*) after oxytetracycline injection. J. Fish Dis., 10 : 35-44, 1987.
 Karabalut, N. and Drusano, G. L.: Pharmacokinetics of the quinolone antimicrobial agents. In: Quinolone Antimicrobial Agents, eds. Hooper, D. C. and Wolfson J. S., pp.195-223, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1993.
 Markwardt, M. N. and Klontz, G. W.: A method to eliminate the asymptomatic carrier state of *Aeromonas salmonicida* in salmonids. J. Fish Dis., 12 : 317-322, 1989.
 Martinsen, B., Myhr, E., Reed, E. and Hastein, T.: *In vitro* antimicrobial activity of sarafloxacin against clinical isolates of bacteria pathogenic to fish. J. Aquat. Anim. Health, 3 : 235-

- 241, 1991.
- Mitscher, L. A., Devasthale, P. and Zavod, R. : Structure-activity relationships. In : Quinolone Antimicrobial Agents, eds. Hooper, D. C. and Wolfson, J. S., pp. 3-50, American Society for Microbiology, Washington D. C., 1993.
- Nakano, S., Aoki, T. and Kitao, T. : *In vitro* antimicrobial activity of pyridonecarboxylic acids against fish pathogens. J. Aquat. Anim. Health, 1 : 43-50, 1989.
- Nouws, J. M. F., Grondel, J. L., Schutte, A. R. and Laurensen, J. : Pharmacokinetics of ciprofloxacin in carp, African catfish and rainbow trout. Vet. Quart., 10 : 211-216, 1988a.
- Nouws, J. M. F., Mevius, D. J., Vree, T. B., Baars, A. M. and Laurensen, J. : Pharmacokinetics, renal clearance and metabolism of ciprofloxacin following intravenous and oral administration to calves and pigs. Vet. Quart., 10, 1988b.
- Palmer, R., Kawai, K. and Kusuda, R. : *In vitro* activity of quinolone antibacterials against selected fish pathogens. Fish Pathol., 27 : 131-1423, 1992.
- Plumb, J. A., Sheifinger, C. C. and Shryock, T. R. : Susceptibility of six bacterial pathogens of channel catfish to six antibiotics. J. Aquat. Anim. Health, 7 : 211-217, 1995.
- Smith, J. T. and Lewin, C. S. : Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. In : The Quinolones, pp. 23-82, eds. Andriole, V.T., Academic Press, New York, 1988.
- Stamm, J. M. : *In vitro* resistance by fish pathogen to aquacultural antibacterials, including the quinolones difloxacin (A-56619) and sarafloxacin (A-56620). J. Aquat. Anim. Health, 1989.
- Wyatt, L. E., Nickelson, R. I. I. and Vanderzant, C. : *Edwardsiella tarda* in fresh water catfish and their environment. Appl. Environ. Microbiol., 39 : 710-714, 1979.
- 최민순, 박관하, 최상훈 : 양식뱀장어에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제내성과 R plasmid. 수산과학연구, 11 : 141-150, 1995.
- 尾崎久雄 : 魚類藥理學 I, IV, 綠書房, 東京, 1980.

Antibacterial activity of new quinolones against *Edwardsiella tarda* isolated from eel tanks

Min-Soon Choi, Kyong Ho Kim, Young Ho Seo,
Sang-Hoon Choi and Kwan Ha Park

*Department of Fish Pathology, College of Ocean Sciences and Technology,
Kunsan National University, Korea*

Extensive acquirement of drug resistance to traditional antibacterial agents poses a serious problem to eel aquaculturists. To collect the basic information for new drug development in the future, we assessed the *in vitro* antibacterial efficacy of 14 new quinolones with 75 isolates of *Edwardsiella tarda* from local aquaculture tanks of *Anguilla japonica*. Of all tested quinolones under development or marketed for human use, DU-6859 was most potent with its MIC₅₀ value of 0.05 µg/ml in broth microdilution assay. The drugs whose MIC₅₀ values ranged from 0.2 to 0.78 µg/ml were T-3762, Bay-y3118, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin and tosufloxacin. The weakest group of drugs, with their MIC₅₀ being 1.56–3.13 µg/ml, were difloxacin, sparfloxacin, fleroxacin, Q-35, amifloxacin, lomefloxacin and enoxacin. The number of resistant strains, when arbitrarily defined with their MICs of ≥6.25 µg/ml, was : 3 to T-3762, 3 to Bay-y3118, 44 to difloxacin, 16 to sparfloxacin, 13 to ciprofloxacin, 19 to fleroxacin, 36 to Q-35, 31 to amifloxacin, 5 to norfloxacin, 13 to ofloxacin, 31 to lomefloxacin, 41 to enoxacin, 12 to tosufloxacin and 0% to DU-6859, respectively. This information can be taken into consideration for the future development of fisheries antibacterial quinolones.

Key words : *Edwardsiella tarda*, New quinolones, Minimum inhibitory concentration