

## Miconazole과 Amphotericin B의 항진균 활성에 대한 Anethole의 선택적 병용 효과

이상화 · 김창진<sup>#</sup>

생명공학연구소

(Received February 5, 1999)

### Selective Combination Effect of Anethole to the Antifungal Activities of Miconazole and Amphotericin B

Sang-Hwa Lee and Chang-Jin Kim<sup>#</sup>

Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Taejon 305-306, Korea

**Abstract**—The combination effect of anethole with amphotericin B, fluconazole, miconazole, or 5-fluorocytosine was investigated against *Saccharomyces cerevisiae*. When combined with  $\frac{1}{2}$  minimum inhibitory concentration (MIC) or  $\frac{1}{2}$  minimum fungicidal concentration (MFC) of anethole, the antifungal activities of fluconazole and 5-fluorocytosine were not changed, but the fungistatic and the fungicidal activities of miconazole were increased 64- and 4-fold, respectively. In the case of amphotericin B, the fungistatic activity was increased 2-fold, while the fungicidal activity was decreased 2-fold. The combination effect of anethole with miconazole or amphotericin B was also investigated at the various concentrations using the macrobroth dilution checkerboard method. The fractional inhibitory concentration (FIC) and the fractional fungicidal concentration (FFC) index between anethole and miconazole were 0.28 and 0.50, whereas the combination of anethole with amphotericin B exhibited the FIC index of 8.25 and the FFC of 32.06, respectively. Thus, it is analyzed that the combination of anethole with miconazole or amphotericin B on the antifungal action shows synergism and antagonism, respectively.

**Keywords** □ Anethole, miconazole, amphotericin B, synergism, antagonism.

진균은 주로 무좀 또는 백선과 같은 성가신 피부 감염 질환을 야기하는 것으로 알려졌으나, 최근 사회적으로 HIV 감염 등으로 인한 면역 결핍 환자들의 수가 급증함에 따라 진균에 의한 기회성 감염은 높은 이환율과 사망율의 원인이 되고 있다.<sup>1-3)</sup> 기회성 진균증에 대한 전신성 항진균 약제로서는 amphotericin B로 대표되는 polyene계와 fluconazole 등의 azole계 화합물이 사용되고 있다. 그러나 이들은 안전성, 항균 활성, 약물 동태학적 특성 등에 있어서 큰 취약점을 나타내고 있다.<sup>4,6)</sup> 그 예로서, amphotericin B는 비록 여러 진균증에 대해 매우 효과적이나 신장 독성 등의 강한 부작용으로 인해 그

사용이 매우 제한되고 있다.<sup>7)</sup> Azole계 항진균제는 amphotericin B에 비해서는 상대적으로 안전하나 여전히 독성이 강하며<sup>8)</sup> 특히 현재 가장 널리 사용되고 있는 fluconazole에 대한 내성균주의 출현은 실제적인 문제가 되고 있다.<sup>9,10)</sup> 또한 azole계 화합물 중 초기에 개발된 miconazole은 나중에 개발된 fluconazole 등에 비해 강한 독성 등의 단점으로 인하여 현재 전신성 항진균제로서는 거의 사용되지 않고 있다.<sup>5)</sup>

*Pimpinella anisum*의 열매(anise seed)는 세계적인 식품 향료로 사용되고 있으며 그 주성분은 anethole(1-Methoxy-4-(1-propenyl)benzene)로 보고되었다.<sup>11)</sup> 현재 anethole은 미국 FDA(Food and Drug Administration)로부터 식품 첨가 허용된 화합물이며 수의(veterinary) 약물학적으로는 구풍(carminative)제로

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-860-4332 (팩스) 042-860-4595

서 사용되고 있다. 최근의 보고에 의하면,<sup>11,12)</sup> anethole은 비교적 항진균 활성이 약하나 천연물 polygodial과 병용시 polygodial의 항진균 활성을 크게 증가시키는 것으로 조사되었다. 따라서 본 연구에서는 기존 항진균 약제의 활성을 증가시키고 그에 따른 실제적인 사용량을 줄여 독성 문제를 개선할 목적으로 천연물 anethole과 항진균 약제들간의 병용 효과를 조사하였다.

## 실험방법

### 균주, 배지 및 배양

본 실험에 사용된 균주 *Saccharomyces cerevisiae* 7754는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)로부터 분양받아 Sabouraud Dextrose Agar(SDA) (Bactopeptone 1%, Dextrose 4%, Bacto-agar 1.8%) 배지를 이용하여 30°C에서 계대 배양하였다. 항진균 활성 측정을 위한 종균은 Malt Extract (ME) (BBL, Cockeysville, MD) 액체 배지에서 30°C, 24시간 동안 진탕 배양한 후 새로운 배지상에서 5시간 더 배양하여 사용하였다.

### 항진균 물질

항진균 약제들 amphotericin B, miconazole, 5-fluorocytosine은 Sigma Co. (St. Louis, MO)로부터 구입하였으며 fluconazole은 제조사인 Pfizer, Inc. (New York, NY)로부터 제공받았다. 항진균성 phytochemical인 trans-anethole은 Sigma Co.로부터 구입하였다. 실험에 사용된 화합물은 dimethylformamide(EM Science, Gibbstown, NJ) 용매를 이용하여 최고 조사 농도의 100배로 조절한 다음 순차적으로 2배 희석하고 ME 액체 배지로 다시 10배 희석하였다.

### MIC 및 MFC 측정

각 화합물의 항진균 활성은 기본적으로 macrobroth dilution법<sup>13)</sup>에 준하여 결정하였다. 즉, 화합물의 희석액 0.3 ml을 종균( $1 \times 10^5$  CFU/ml)이 포함된 ME 액체 배지 2.7 ml와 혼합한 다음 30°C에서 48시간 동안 정지 배양하였다. MIC(minimum inhibitory concentration)는 육안상 균 생육이 없는 화합물의 최저 농도로 결정하였다. MFC(minimum fungicidal concentration)는 다음과 같이 조사되었다. MIC를 결정한 후 균 생육이 없는 각 시험관들로부터 30  $\mu$ l를 취하여 새로운 YPD

(Yeast extract 0.5%, Polypeptone 0.5%, Dextrose 1.0%) 액체 배지 3 ml에 가한 다음 30°C에서 48시간 동안 정지 배양하였다. MFC는 균 생육이 회복되지 않은 화합물의 최저 농도로 결정하였다. 모든 항진균 시험은 3 반복하여 중간 값을 취하였다.

### 병용효과

두 화합물간의 병용 효과는 한 화합물의  $\frac{1}{2}$  MIC 또는  $\frac{1}{2}$  MFC 농도와 다른 화합물을 일정 농도를 혼합하여 MIC 및 MFC를 측정한 다음 화합물 단독의 MIC 및 MFC와 서로 비교하였다. 또한 두 화합물간의 병용 효과는 macrobroth dilution checkerboard 법<sup>14,15)</sup>을 이용하여 여러 농도에서도 조사하였다. 두 화합물의 순차적 2배 희석액을 checkerboard 형으로 혼합한 다음 MIC 및 MFC를 측정하고 그 결과로부터 fractional inhibitory concentration(FIC) 및 fractional fungicidal concentration(FFC) 지수를 구하여 그들의 병용 효과를 판정하였다.

### FIC 및 FFC 지수 결정

FIC 지수는 macrobroth dilution checkerboard 법에 의한 MIC 결과로부터 다음의 식을 이용하여 계산되었다.<sup>14,15)</sup>

$$\text{FIC index} = \frac{\text{MICa combined with b/MICa alone} + \text{MICb combined with a/MICb alone}}{2}$$

이때 a와 b는 사용된 각 화합물이며 FIC 지수 값이 0.5 이하, 0.5초과 4미만, 4이상일 때 각각 상승적, 추가적, 길항적이라고 판정하였다. 또한 FFC 지수는 MFC 결과를 이용하여 FIC 지수와 같은 방법으로 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### Anethole과 병용된 항진균 약제의 MIC 및 MFC

항진균 약제 amphotericin B, fluconazole, miconazole, 5-fluorocytosine에 대한 천연물 anethole의 병용 효과를 알아보기 위해 먼저 *Saccharomyces cerevisiae*를 시험 균주로 하여 정균(MIC) 및 살균(MFC) 활성을 조사하였다. 그 결과 amphotericin B의 MIC 및 MFC는 각각 1.56  $\mu$ g/ml와 3.13  $\mu$ g/ml로 나타났으며 miconazole의 MIC 및 MFC는 각각 6.25  $\mu$ g/ml와 50  $\mu$ g/ml

**Table I**—Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* to the antifungal drugs in combination with anethole

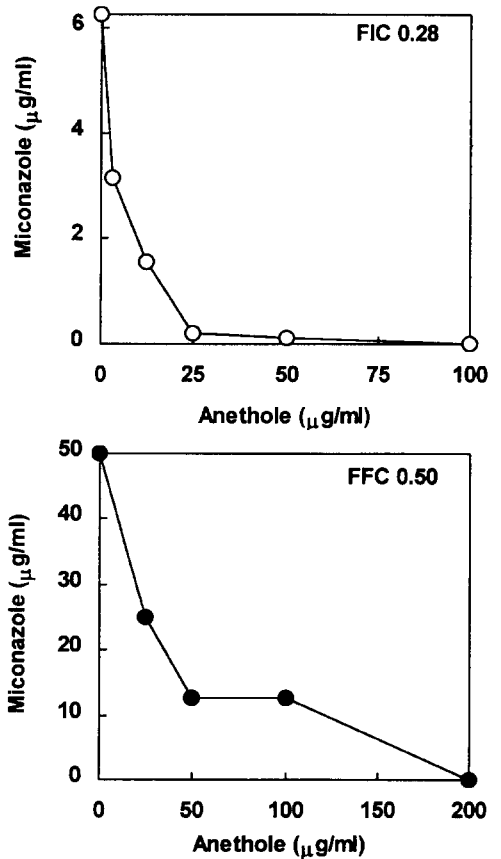
Antifungal drugs	Alone		With anethole	
	MIC <sup>a)</sup>	MFC <sup>b)</sup>	MIC <sup>c)</sup>	MFC <sup>d)</sup>
Amphotericin B	1.56	3.13	0.78	6.25
Fluconazole	6.25	>100	6.25	>100
Miconazole	6.25	50	0.10	12.5
5-Fluorocytosine	3.13	>100	3.13	>100

<sup>a)</sup> Minimum inhibitory concentration (μg/ml).  
<sup>b)</sup> Minimum fungicidal concentration (μg/ml).  
<sup>c)</sup> MIC of drug in combination with ½ MIC of anethole.  
<sup>d)</sup> MFC of drug in combination with ½ MFC of anethole.

이었다. 또한 천연물 anethole은 100 μg/ml의 MIC와 200 μg/ml의 MFC를 나타내었다(미 제시 결과). 다음은 anethole의 ½ MIC 또는 ½ MFC 농도와 항진균 약제의 일정 농도를 혼합하여 항진균 활성을 측정 한 후 항진균 약제 단독의 MIC 및 MFC와 서로 비교하였다. Fluconazole과 5-fluorocytosine의 항진균 활성은 차이가 없었으며 amphotericin B의 경우 정균 활성은 2배 증가하였으나 살균 활성은 오히려 ½로 감소하였다. Miconazole의 경우 항진균 활성은 anethole에 의해 상승되는 것으로 나타났다. 즉 anethole의 ½ MIC와 병용하였을 때, miconazole의 MIC는 6.25 μg/ml로부터 0.10 μg/ml로 크게 감소하였다. 또한 anethole의 ½ MFC와 병용하였을 때, miconazole의 MFC는 50 μg/ml로부터 12.5 μg/ml로 감소하였다(Table I). 따라서 천연물 anethole은 조사된 항진균 약제들 중 amphotericin B와 miconazole에 대해 선택적인 병용 효과를 나타내며 특히 miconazole의 정균 활성을 64배 증가시키는 것으로 판단된다. 한편, anethole은 천연물 polygodial과의 병용에서도 polygodial의 정균 및 살균적 항진균 활성을 크게 증가시키는 것으로 보고된 바 있다.<sup>11,12)</sup>

**Anethole과 miconazole의 농도에 따른 병용 효과**

*Saccharomyces cerevisiae*에 대한 anethole과 miconazole의 병용 효과는 macrobroth dilution checkerboard 법을 이용하여 여러가지 농도에서 자세히 조사해 보았다. 그 결과 정균적 항진균 작용에서 FIC 지수 0.28을 나타내었으며 살균적 항진균 작용에서는 FFC 지수 0.50을 나타내었다(Fig. 1). 즉, anethole은 ¼ MIC 농도인 25 μg/ml에서 miconazole의 MIC를 6.25 μg/ml로부터 0.20 μg/ml로 낮추었으며 ¼ MFC 농도



**Fig. 1**—Resulting isobolograms of the MICs (○) and MFCs (●) obtained with checkerboard combinations of anethole and miconazole against *Saccharomyces cerevisiae*. The fractional inhibitory concentration (FIC) or the fractional fungicidal concentration (FFC) index were calculated with the MICs or MFCs of the combined compounds which exhibited the best synergistic antifungal effect, respectively.

인 50 μg/ml에서는 miconazole의 MFC를 50 μg/ml로부터 12.5 μg/ml로 낮추었다. 따라서 anethole과 miconazole간의 병용은 정균 및 살균 작용에서 상호 상승적인 것으로 판단되며 특히 정균 작용에서 병용은 매우 효과적인 것으로 생각된다. 한편, 앞서 인용한 바와 같이 anethole과 polygodial은 상호 상승적인 항진균성 병용 효과를 나타내었으며,<sup>11,12)</sup> 또한 polygodial은 miconazole과 상호 상승적인 것으로 조사되었다.<sup>16)</sup> 따라서 anethole, polygodial, miconazole로 구성된 "triple combination"의 항진균 효과는 앞으로 조사할 의의가 있는 것으로 생각된다.

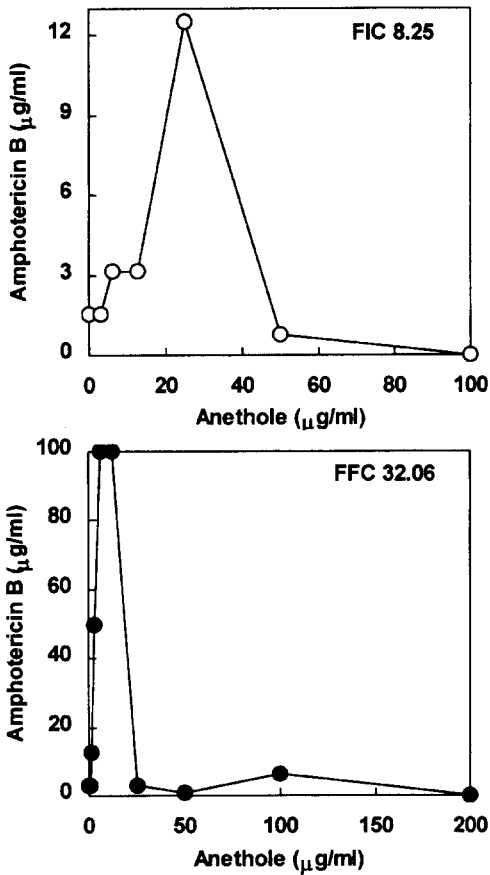


Fig. 2—Resulting isobolograms of the MICs (○) and MFCs (●) obtained with checkerboard combinations of anethole and amphotericin B against *Saccharomyces cerevisiae*. The fractional inhibitory concentration (FIC) or the fractional fungicidal concentration (FFC) index were calculated with the MICs or MFCs of the combined compounds which exhibited the most antagonistic antifungal effect, respectively.

**Anethole과 amphotericin B의 농도에 따른 병용 효과**

*Saccharomyces cerevisiae*에 대한 anethole과 amphotericin B간의 병용 효과는 macrobroth dilution checkerboard 법을 이용하여 여러가지 농도에서 자세히 조사해 보았다. 그 결과 정균적 항진균 작용에서 FIC 지수 8.25를 나타내었으며 살균적 항진균 작용에서는 FFC 지수 32.06을 나타내었다(Fig. 2). 즉, anethole은 ¼ MIC 농도인 25 μg/ml에서 amphotericin B의 MIC를 1.56 μg/ml로부터 12.5 μg/ml로 증가시켰으며 ⅓ MFC 농도인 12.5 μg/ml에서는 amphotericin B의 MFC를 3.13 μg/ml로부터 100 μg/ml로 증가시켰다.

따라서 amphotericin B의 정균 및 살균 작용에서 anethole의 병용은 매우 길항적인 것으로 판단된다. 현재 anethole의 항진균 작용 기구에 대해서는 알려진 바가 없어 항진균 약제들에 대한 anethole의 선택적 병용 효과는 작용 기구적으로 추론될 수 없었다. 그러나 지금까지 연구된 독특한 병용 효과를 고려할 때, anethole, polygodial, miconazole, amphotericin B의 항진균 작용 기구는 상호 연계되어 있을 것으로 생각된다.

**결 론**

*Saccharomyces cerevisiae*를 시험 균주로 하여 천연물 anethole과 항진균 약제 amphotericin B, fluconazole, miconazole, 5-fluorocytosine 간의 병용 효과를 조사하였다. Anethole의 ½ MIC 또는 ½ MFC 농도에서 fluconazole과 5-fluorocytosine의 활성은 변화가 없었으나 miconazole의 정균 및 살균 활성은 각각 64배, 4배 증가하였다. 또한 amphotericin B의 경우 정균 활성은 2배 증가하였으나 살균 활성은 오히려 ½로 감소하였다. 항진균 약제에 대한 anethole의 이러한 병용 효과는 macrobroth dilution checkerboard 방법을 이용하여 더 자세히 조사하였다. Anethole과 miconazole의 병용에서 FIC 및 FFC 지수는 각각 0.28과 0.50으로 나타났으며 anethole과 amphotericin B의 병용에서는 8.25의 FIC와 32.06의 FFC 지수를 나타내었다. 따라서 anethole은 miconazole과는 상승적이나 반면 amphotericin B와는 길항적인 것으로 판단된다.

**문 헌**

- 1) American Thoracic Society. : Fungal infection in HIV-infected persons. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 816 (1995).
- 2) Dixon, D. M., McNeil, M. M., Cohen, M. L., Gellin, B. G. and La Montagne, J. R. : Emerging fungal infections. *Public Health Rep.* **111**, 226 (1996).
- 3) Sternberg, S. : The emerging fungal threat. *Science* **266**, 1632 (1994).
- 4) Cartwright, R. Y. : Antifungal drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **1**, 141 (1975).
- 5) Fromtling, R. A. : Overview of medically im-

- portant antifungal azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 187 (1988).
- 6) Georgopapadakou, N. H. and Walsh, T. J. : Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **264**, 371 (1994).
  - 7) Warnock, D. W. : Amphotericin B: an introduction. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**, 27 (1991).
  - 8) Como, J. A., Pharm, D. and Dismukes, W. E. : Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N. Engl. J. Med.* **330**, 263 (1994).
  - 9) Denning, D. W. : Can we prevent azole resistance in fungi? *The Lancet* **346**, 454 (1995).
  - 10) Rex, J. H., Rinaldi, M. G. and Pfaller, M. A. : Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1 (1995).
  - 11) Kubo, I. and Himejima, M. : Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 2290 (1991).
  - 12) Himejima, M. and Kubo, I. : Fungicidal activity of polygodial in combination with anethole and indole against *Candida albicans*. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1776 (1993).
  - 13) Lee, S. H. : Antifungal activity and action of polygodial, a new antifungal agent. *Proc. KSAM Spring Meeting, Seoul, Korea.* **32**, 158 (1998).
  - 14) Hallander, H., Dornbusch, K., Gezelius, L., Jacobson, K. and Karlsson, I. : Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: Interaction index and killing curve method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 743 (1982).
  - 15) Neu, H. C. and Chin, N. : *In vitro* activity of fleroxacin in combination with other antimicrobial agents. *Am. J. Med.* **94**, 9 (1993).
  - 16) 이상화, 김창진 : 천연물 polygodial 과 imidazole계 화합물간의 병용에 의한 항진균 활성 의 증진. *약학회지* **43**(2), 221 (1999).