

포토프린을 이용한 황색포도알균과 표피포도알균에 대한 광역학 치료의 항균효과

Antimicrobial Effects of Photodynamic Therapy using Photofrin Against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*

권필승

원광보건대학교 임상병리과

Pil-Seung Kwon(pskwon@wu.ac.kr)

요약

광역학 치료는 미생물의 감염을 포함한 다양한 질병을 위한 대안치료로 권장된다. 이 연구의 목적은 포도알균속에 대한 직접제작한 630 nm 발광다이오드와 포토프린을 사용하여 광역학 치료의 항균효과를 평가하고자 하였다. 포토프린을 이용한 광역학 치료는 황색포도알균과 표피포도알균에 대한 항균효과를 집락형성수 정량법과 세균 생육능은 유세포분석기를 이용하여 시험하였다. 황색포도알균과 표피포도알균의 집락형성수 결과는 포토프린 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 630 nm 발광다이오드로 에너지밀도 18 J/cm^2 조건으로 광역학 치료 적용 후 각각 평균 1 cfu/ml와 평균16 cfu/ml이다. 추가로 광역학 치료 후 황색포도알균과 표피포도알균을 유세포분석기로 세포의 크기와 형광강도를 측정하였다. 황색포도알균과 표피포도알균의 세포크기는 광역학 치료 후 평균 8.96% 5.55%씩 각각 증가하였고, 세균의 죽은세포는 각각 39%와 61%로 증가하였다. 이 결과로 포토프린을 이용한 광역학 치료는 항균치료의 방법으로 효과적인 방법이 될 수 있음을 제의한다.

■ 중심어 : | 광역학 치료 | 황색포도알균 | 표피포도알균 |

Abstract

Photodynamic therapy(PDT) has been recommended as an alternative therapy for various diseases including microbial infection. The aim of the present study is to evaluate the antimicrobial effect of PDT using a photofrin and home made 630 nm Light emitting diode(LED) against *Staphylococci*.

To examine the antimicrobial effect of photofrin-mediated PDT against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* colony forming units(CFU) quantification, and bacterial viability using flow cytometry were formed. The CFU quantification results of *S. aureus* and *S. epidermidis* were 1 cfu/ml and 16 cfu/ml of average, respectively, after PDT application with photofrin of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 630 nm LED and energy density of 18 J/cm^2 . In addition, *S. aureus* and *S. epidermidis* isolates yielded forward-scatter (FSC) and fluorescence intensity (FI) differences on flow cytometry (FCM) after PDT. *S. aureus* and *S. epidermidis* cell size(FSC) increased 8.96% and 5.55% respectively, after PDT. Also the numbers of dead cell of *S. aureus* and *S. epidermidis* were a 39% and 61% increased. These results suggest that photofrin-mediated PDT can be an effective alternative treatment for antibacterial therapy.

■ keyword : | Photodynamic Therapy | *Staphylococcus aureus* | *Staphylococcus epidermidis* |

* 본 논문은 2012년도 원광보건대학교 교내연구비 지원에 의해서 수행됨

접수번호 : #121115-001

접수일자 : 2012년 11월 15일

심사완료일 : 2012년 12월 18일

교신저자 : 권필승, e-mail : pskwon@wu.ac.kr

I. 서론

Staphylococcus aureus(황색포도알균)는 임상환자에서 가장 빈번히 분리되는 세균이며 항생제 내성 빈도가 증가하고 있다[1]. 황색포도알균의 피부 및 연조직 감염증은 지역사회 및 병원에서 흔히 접하게 되는 질환이다. 피부 및 연조직 감염증은 특별한 치료를 요하지 않는 피부 표층부의 감염증에서부터 적극적으로 치료하지 않으면 환자가 사망에 이를 수 있는 심부 조직 감염증까지 매우 다양하다. 다양한 종류의 미생물이 지역사회획득 피부 및 연조직 감염증의 원인이 되지만, 가장 흔한 원인 미생물은 A군 베타용혈 사슬알균(group A *streptococcus*)과 황색포도알균이다. 포도알균 열상 피부 증후군(staphylococcal scalded skin syndrome)은 피부감염의 주 원인균인 황색포도알균의 외독소에 의해 전신의 피부에 수포성 발진과 피부박탈이 일어나는 질환이다. 대부분 5세 미만 소아에서 호발하며, 피부의 압통성 홍반과 수포, 낙설을 동반하고[2], 국소적인 수포성 농가진에서부터 전신 피부의 수포성 박탈성 질환까지 다양하다[3].

Staphylococcus epidermidis(표피포도알균)는 혈장응고효소 음성 포도알균(coagulase - negative *Staphylococcus*, CNS) 중 가장 흔히 감염을 일으키며, CNS와 *S. aureus*는 사람의 원내감염에 주요 원인이며, CNS 중에는 표피포도알균이 가장 많이 분리 되었다[4].

광역학 치료는 환자에게 광감작제를 투여하고 어느 정도의 시간이 지나게 되면 정상조직과 암조직의 광감작제 농도차가 최대가 되는 시기에 광감작제가 흡수하는 특정 파장의 빛을 암세포에 조사하여 광화학반응을 일으키고 이때 발생하는 단일항 산소에 의하여 암세포가 파괴되는 원리를 이용한 암치료법이다[5].

광역학 치료에 의한 세포내 작용기전의 시작은 광물리현상으로 이해되고 있는데 바닥상태의 광감작제를 특정파장의 빛으로 활성화시켜 단일항 상태나 삼중항 상태로 되고 여기서 바닥상태로 될 때 방출되는 에너지가 산소와 반응하여 활성산소(O₂)를 생성시키거나 (Type II 반응) 감작제가 전자전달계에 관여하는 경우

자유라디칼이 형성되어(Type I 반응) 세포파괴가 일어난다[6].

표재성 피부질환들은 빛을 조직에 직접 조사하여 치료를 하고 체내에 있는 심재성 질환들은 파이프 카테터를 이용하여 치료하고자하는 장기까지 도달시킨 후 빛을 조사하여 치료를 하고 있다. 여기에 사용되는 레이저는 치료 효과 면에서는 탁월하고 좋은 재료로서 손색이 없지만 레이저 기기가 고가이기 때문에 사용하기가 쉽지는 않은 실정이다. 그래서 많은 연구자들은 다이오드 기술을 기반으로 하는 저가의 Light emitting diode(LED)에 많은 관심을 가지게 되었고 국소적 부위에 조사할 수 있는 레이저보다 넓은 부위의 병소에 조사할 수 있고 빛의 단위 면적당 세기도 적게 받는다는 장점을 가지고 있어서 광역학 치료를 위해 광원으로써 많이 사용되고 있다[7]. 광역학 치료는 암치료방법중 하나이지만 세균과 곰팡이류 등의 치료효과에는 활발한 연구가 이루어지지 않고 있는 상태이다[5]. 박테리아 PDT는 1900년, 독일 뮌헨에서 의대생이던 Oscar Raab이 acridine dye를 실험하던 중 acridine red에 착색된 짙은벌레가 빛에 노출되어 죽게 되는 것을 발견한 후 체외적인 방법으로 시도를 시작하여 오늘날까지 많은 연구들이 다양한 광감작제를 이용한 연구들이 이루어지고 있다[8]. 그러나 국내에는 아직까지 박테리아 PDT가 시초단계이며, 많은 연구들이 이루어지지 않은 상태이다. 현재 많이 사용되고 있는 광감작제는 헤마토포르피린(Hematoporphyrin) 유도체로서 광민감물질이며, Porfimer sodium인 포토프린이 미국의 FDA가 1996년 1월 식도암 치료에 임상 허가와 1997년 9월 초기 폐암치료에 대해 승인을 한 바있다. 현재 우리나라에도 수입되어 실제 적용되고 있다.

본 연구에서는 표재성감염균으로 널리 알려져 있고 분리율이 높은 포도알균 두 가지 종을 대상으로 포토프린(포토프린) 과 630 nm LED array를 자체 개발하여 광역학적 살균효과를 관찰하고, 광역학 치료 후의 박테리아 세포손상을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상균주

표준균주 *S. aureus*(ATCC 25923) 와 *S. epidermidis* (ATCC 12228)을 50% glycerol-brain heart infusion broth에 접종하여 -70°C 냉동고에 보관하였고, 혈액한천배지에 계대하여 37°C 배양기에서 하루 동안 배양하여 사용하였다.

2. 광원과 광감작제

본 연구에 사용된 광감작제 포토프린(Axcan Pharma Inc, Canada)은 Dulbecco's phosphate buffered saline (Hyclone, USA)에 1,000 mg/ml로 녹여 만든 뒤 0.2µm filter로 여과하여 사용하였다.

광원은 LED를 자체 제작하여 사용하였다. 사용된 LED는 5φ의 원통모양으로 시험관에 조사하기 위해 LED array를 제작하였다. 630 nm LED array는 가로 120×세로 180 mm로, 총 384 (16×24)개의 LED가 장착되었다. LED의 회로 연결은 직렬과 병렬을 병합하여 사용하였고, 직류 전원을 사용하였다. LED의 수명 연장과 손상을 방지하기 위하여 안정적으로 저항을 150Ω으로 하였으며 LED array의 광량은 전원 공급장치(Hanil, Korea)의 전류를 조절하여 10.0 mW/cm²가 되도록 하였다. LED array와 조사받는 테스트 튜브와의 거리를 100 mm로 하고 12.0 V, 0.4 A의 전압과 에너지 밀도 10.0 mW/cm²의 630 nm LED를 30분 동안 조사하였다. 최종 에너지는 18 J/cm²이었다.

3. 집락형성수(Colony Forming Units)측정

광감작제인 포토프린의 농도를 멸균된 시험관을 사용하여 황색포도알균과 표피포도알균을 Muller hintone broth로 균주부유액을 만든 후 탁도계(Densicheck plus, biomeriex, USA)를 이용하여 McFarland No. 0.5로 맞춘 후 1.5×10⁵ cells/ml가 되도록 12×75 mm Polyethylene cap tube(SPL Life Sciences, Korea)에 계단 희석하였다. 포토프린은 균주부유액과 함께 희석되어 최종농도 50, 25, 12.5, 6.25 µg/ml가 되도록 한 후 혼합하였다. 그 후 알루미늄 호일을 이용하여 빛을 차단

시키고 37°C 배양기(Thermo Forma, 47502-3362)에서 4시간 동안 반응 시켰다. 그 후 630nm의 LED 광원 출력장비를 사용하여 10 mW/cm²로 30분 동안 빛을 조사하였다. LED 조사가 끝난 후 혼합기로 혼합 후 혈액한천배지에 각 군별로 20 µl씩 분주 후 스프레더를 이용하여 접종한 후 18시간 배양시킨 후 생성된 집락의 수를 세었다. 각 그룹별로 대조군은 control, L+P-은 LED 빛만 조사한 군, L+P+(50)은 포토프린 50 µg/ml만 처리한 군, L+P+50은 포토프린 50 µg/ml와 LED를 조사한 광역학 치료군이며, 또한 L+P+25, L+P+12.5, L+P+6.25는 포토프린을 2배씩 희석하여 LED를 조사한 광역학 치료군이다. 각 그룹 당 6회 측정하였으며, 100개 이상되는 집락에 대해서는 멸균된 식염수로 희석하여 집락수를 세었다.

4. 유세포분석

유세포분석을 위하여 광역학 치료가 끝난 tube를 다시 한 번 stain buffer 1ml씩 첨가한 후 가볍게 혼합 후 1300 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버린 후 침사층에 stain buffer 0.5 ml씩 각 균주에 분주한 후 염색시약 propidium iodide (PI, BD, catalog No. 349483)를 5 µl씩 분주하고 vortex mixer 한 후 5분 동안 실온에서 항온 시켜서 염색시켰다. 그 후 flow cytometry(BD, FACSCAN)으로 30,000개의 Cell을 세어 분석하였다. 이때 사용된 레이저 파장은 488nm의 laser excitation이었으며 분석기의 초기 instrument setting은 threshold-SSC, FSC-E01, SSC-375V, FL1-600V, FL3-800V이었다. 분석프로그램은 BD사 CellQuest-pro를 사용하였다. 각 그룹의 표시는 각 그룹별로 대조군은 control, L+P-은 LED 빛만 조사한 군, L+P+50은 포토프린 50 µg/ml와 LED를 조사한 광역학 치료군이며, 또한 L+P+25, L+P+12.5, L+P+6.25는 포토프린을 2배씩 희석하여 LED를 조사한 광역학 치료군이다.

5. 통계분석

대조군과 실험군들과의 생성집락수를 비교하기 위하여 일원분산분석(one-way ANOVA test)을 하였으며,

유의한 차이가 있을 경우 Turkey's multiple range test로 사후검정하였다. 통계학적 유의 수준은 0.05로 하였으며, 통계분석에는 SPSS ver 10.0 프로그램을 사용하였다. 대조군(Control)과 각 군과 비교하여 유의수준정도를 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 와 NS는 유의성 없는 것으로 표시하였다.

III. 결 과

1. 집락형성수 측정결과

황색포도알균은 control 과 LED만 조사한 것, 포토프린만 처리한 것에서는 평균 1.5×10^5 , 1.4×10^5 , 1.1×10^5 이상의 colony가 형성되었고 통계학적 검증결과는 대조군과의 비교시 LED만을 조사한 군은 유의하지 않은 것으로 나왔고($P < 1.0$), 포토프린만 처리한 것에서는 매우 유의한 것으로 나왔다($P < 0.001$). 그러나 광역학 치료를 시행한 회색액들은 포토프린의 농도 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 완전히 사멸된 군과 더불어 평균 1 colony형성이 있었고, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 80개의 colony가 나왔고, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도 에서는 평균 432개의 colony가 측정되었다. 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 농도 에서는 평균 5,933개의 colony가 측정되었다. 치료군 모두 검증결과는 $P < 0.001$ 로 매우 유의한 결과를 보였다[그림 1].

표피포도알균은 control과 LED만 조사한 것, 포토프린만 처리한 것에서는 평균 42083, 49000, 42283개의 colony가 형성되었고 검증결과는 LED만 조사한 것과 포토프린만 처리한 것 모두 유의하지 않은 결과로 나타났다($P < 0.5$, $P < 1.0$). 그러나 집락형성의 결과는 광역학 치료를 하지 않고 laser만 조사하거나 포토프린만이 처리 했을 때는 대조군과 비교했을 시에 colony의 변화를 볼 수 없었다. 그러나 광역학 치료를 한 군주 회색액들은 포토프린의 농도 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 평균 16개의 colony가 나왔고, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 평균 73개의 colony가 나왔고, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 189개의 colony가 측정되었고 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 1,240개의 colony가 측정되었다 치료군 모두 검증결과 매우 유의한 결과인 $P < 0.001$ 를 보였다[그림 1].

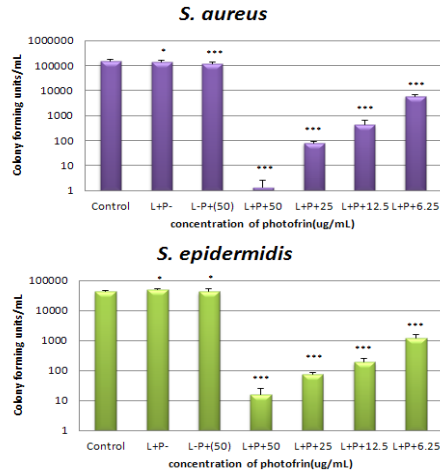


그림 1. 광역학 치료 후의 집락형성수 측정의 통계분석결과.

2. 유세포분석결과

유세포 분석 결과는 X축은 PI(BD, catalog No349483)에 염색 된 세균의 염색강도는 세포막이 손상받아 염색액이 안으로 침투하기 때문에 죽은 세포만 염색이 된다. Y축은 세균의 개체수를 나타낸다.

먼저 X축 FSC(Forward Scatter)와 Y축 SSC(Side scatter)를 지정하고 대조군을 분석하여 집락을 형성하는 부위를 확인하였다. 그 다음 histogram을 그려서 분석하였다. 분석한 그래프에서 Marker를 표시하여 정량적으로 분석하였다. M1은 대조군에서 정상적으로 살아있는 영역을 M1으로 표시하였고, M2는 염색강도가 강한 것을 선택하였다. 황색포도알균은 정상 대조군 분석결과는 Events수를 30,000개 일 때 M1이 93.49%를 차지하고 M2는 6.57%를 차지했다. 광감작제 LED만 처리한 군의 분석결과는 Events수를 30,000개 일 때 M1이 92.66%를 차지하고 M2는 7.44%를 차지했다. CFU test에서 광효과를 보인 농도인 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 분석결과는 Events수를 30,000개 일 때 M1이 54.63%를 차지하고 M2는 45.61%를 나타냈다. 이것은 광독성을 나타내어 대조군과 양상이 완전히 다르고 histogram상 상이한 모양이 나타났다. 나머지 광역학 치료군인 CFU TEST에서 광독성을 보인 농도인 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 M2가 31.59, 18.12, 16.48%로 분석되어 포토프린의 농도가 낮을수록 사멸하는 수가 줄어드는 것으로 나타났다[그림 2].

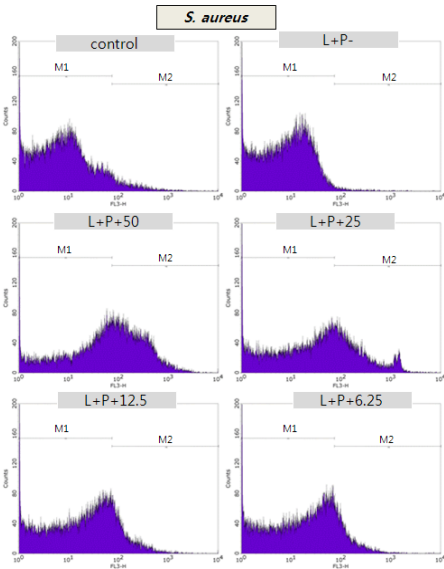


그림 2. 황색포도알균의 광역학 치료 후 propidium iodide염색의 유세포분석 히스토그램.

표피포도알균은 유세포분석 결과는 정상 대조군 분석결과를 Events수를 30,000개 일 때 M1이 95.78%를 차지하고 M2는 4.27%를 차지했다. 광감작제 LED만 처리한 군의 분석결과를 Events수를 30,000개 일 때 M1이 98.96%를 차지하고 M2는 1.06%를 차지했다.

CFU test에서 광효과를 보인 농도인 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 분석결과를 Events수를 30,000개 일 때 M1이 34.72%를 차지하고 M2는 65.4%를 나타냈다. 이것은 광독성을 나타내어 대조군과 양상이 완전히 다르고 histogram상 상이한 모양이 나타났다. 나머지 광역학 치료군인 CFU TEST에서 광독성을 보인 농도인 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 M2가 57.73, 55.36, 53.71% 로 분석되어 포토프린의 농도가 낮을수록 사멸하는 수가 조금씩 줄어드는 것으로 나왔다[그림 3].

추가적으로 광역학 치료 후의 세포의 크기변화는 *S. aureus*는 사이즈가 변화한 M2영역만을 비교할 때 정상군은 1.12%이었고, LED조사군은 2.31%, 포토프린의 농도 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 분석결과를 11.78, 16.51, 11.25, 9.98% 로 평균 10.08%로 정상군과 비교하면 증가율이 8.96%로 나왔다[그림 4].

*S. epidermidis*는 사이즈가 변화한 M2영역만을 비교

할 때 정상군은 0.17%이었고, LED조사군은 4.35% 포토프린의 농도 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 분석결과를 6.5, 5.51, 6.43, 6.31% 로 평균 5.72%로 정상군과 비교하면 증가율이 5.55%로 나왔다[그림 5].

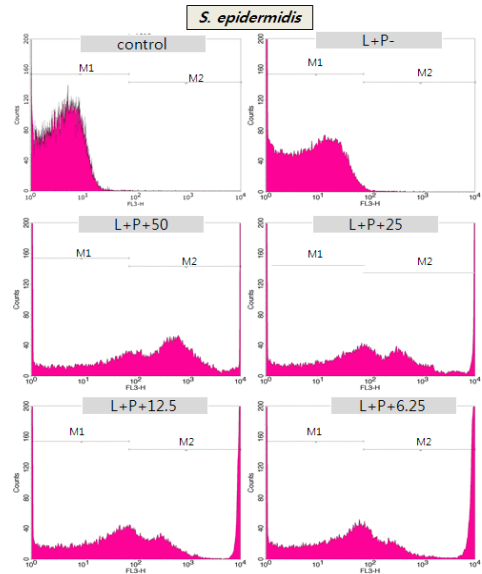


그림 3. 표피포도알균의 광역학 치료 후 propidium iodide염색의 유세포분석 히스토그램.

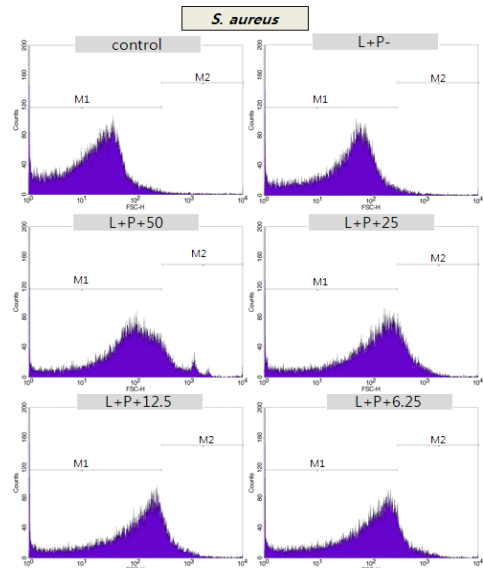


그림 4. 황색포도알균의 광역학 치료 후 세포크기의 유세포 분석 히스토그램

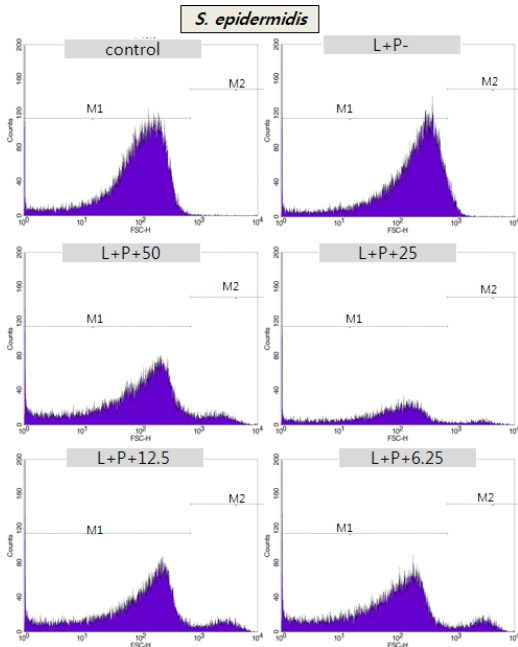


그림 5. 포도알균의 광역학 치료 후 세포크기의 유세포분석 히스토그램.

IV. 고찰 및 결론

PDT는 처음 Raab[9]에 의해 광에너지에 의한 세포 독성이 확인되고, 피부암의 치료과정에 광감작제를 국소요법으로 사용하면서 광역학(photodynamic)이란 용어가 사용되었으며, 1940년대 헤마토포르피린(hematoporphyrin)의 종양에 대한 친화성(affinity)을 보고하면서 임상적 이용이 모색되었다[10]. 이후 광감작제에 맞는 파장의 광원을 레이저를 사용함으로써 임상적 이용이 가능하게 되었다[11]. 광선요법은 LED 광원의 광자(photon)가 세포조직내 색소포(chromophore)나 광수용기(photoacceptor)에 흡수되고 세포의 대사활동을 촉진시키는 것에 기초를 둔다[12]. 현재 사용되고 있는 광감작제로는 1세대인 aminolaevulinic acid (ALA), 포르피머 소듐(porphimer sodium, photofrin[®]), 헤마토포르피린 유도체(Hpd, Photogem[®]) 등이 있으며 이들은 대부분 630 nm의 파장에서 에너지 흡수가 극대화되는 특징을 가지고 있다[11][13]. 그러나 이들은 체

내에서 약 한 달 이상 피부에 남아 햇빛에 노출될 경우 피부화상의 위험이 있으며 광독성의 깊이가 3~15 mm에 불과하여 커다란 종양에서는 치료효과가 적다는 단점이 있다[14]. 본 연구에서는 국내에서 시판되고 있는 1세대인 포르피머 소듐(porphimer sodium, photofrin[®])을 사용하여 대표적 피부감염균을 뛰어난 광역학 치료효과를 발휘할 수 있는 조건을 찾고자 하였다. 현재 피부과 영역에서 쓰이는 LED 파란색과 빨간색의 광원은 여드름과 다른 피지질환의 광역학 치료를 증진시키는 것으로 알려져 있으며, 빨간색광원의 파장 630 nm는 피지선까지 도달할 수 있고, 파란색광원의 파장 405 nm는 표피안의 잔여 프로토포르피린 IX의 광조사를 할 수 있으며, LED는 치료후의 광과민성 부작용을 감소시킨다. LED광원은 광감작제의 광활성의 증진, 넓은 면적의 광선조사, 통증의 감소와 다양한 파장이 가능함으로서 광역학 치료의 임상적 효과를 증진시킨다.

지금까지 이루어진 메치실린 내성 포도알균에 대한 시도되었던 성체 외 광역학 치료를 보면 1998년 Wainwright M 등[5]에 의해 메틸렌블루를 이용한 연구가 있었으며 메치실린에 내성이 없는 포도알균에 대해서는 1998년 Golding PS 등[15]은 malachite green isothiocyanate를 이용하였고, 1999년 Kubin A 등[16]은 photofrin과 m-THPC, hypericin을 이용하였고, 2001년 Tolstyh PI 등[17]은 photosensin이라는 물질을 이용하였다. 이와 같은 연구들은 광감작제의 주입량과 사용균주의 농도, 광역학 치료 조건들이 각기 다르며 치료 후의 감소효과를 나타내었지만 완전 살균효과를 볼 수는 없었다.

본 연구는 헤마토포르피린 유도체인 photofrin이라는 광감작제에서 빛을 조사하여 미생물의 생명력을 없앨 수 있는 농도를 얻었다. 자체 개발한 630 nm 파장의 LED 빛으로 18 J/cm² 에너지를 조사하여 *S. aureus* 1.5 × 10⁵ cfu/ml 균액을 photofrin 50 µg/ml에 완전사멸에 가까운 농도를 밝혀내었다. 이 결과는 2010년, Gois MM 등[18]의 연구결과와 매우 다른 결과를 나타내었다. Gois MM 등은 본 실험의 photofrin 계열인 헤마토포르피린 유도체인 photogem 으로 628 nm LED와 Laser로 20, 40, 60 J/cm²의 에너지밀도 조건과

Photogem의 농도 12, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 으로 조사하였고, 균 회석액은 본 실험보다 많은 10^{10} cfu/ml이며 이와 같은 조건과 LED 20 J/cm^2 와 Photogem 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 10^7 cfu/ml를 나타나 완전살균효과는 없었다. 이로서 본 실험의 결과가 *S. aureus* 살균에 더 효과적인 광역학 치료조건을 확립하였다. Gois MM 등의 연구결과에 사용된 LED의 에너지 세기는 50 mW/cm^2 이었으며, 광감작제 처리후에 균내에 축적될 수 있는 충분한 시간이 아닌 2분 후 빛을 조사한 것이어서, 본 연구와 상이한 결과가 나온 것으로 추정된다. 유세포분석기를 이용한 Cell viability test에서 *S. aureus*균과 *S. epidermidis* 균의 FSC결과에서 *S. aureus*균은 평균 10%정도가 커진 것으로 나왔고, *S. epidermidis* 균은 평균 5.5% 커진 것으로 확인되어 광역학 치료기전은 세균을 크기를 변화시키는 것으로 추정되었고, *S. aureus*균이 *S. epidermidis* 보다 크기변화가 더 큰 것으로 나왔으며, 이는 CFU TEST 결과가 *S. aureus*균이 더 효과적인 것과 일치성이 보인다. 이것은 PDT의 메커니즘이 일중항 산소가 균체를 손상시키거나 부풀게 만드는 작용이 있어서 나타난 것이라 추정되며, 확실한 증명을 위해서는 광역학 치료 후의 전자현미경적 세균관찰이 필요할 것으로 사료된다.

CFU TEST결과와 유세포분석의 PI영역 결과가 일치 할 수 없었던 것은 박테리아의 크기가 작아 log-Scale로 해야 검출할 수 있고, 이것은 불순물과 혼동될 수 있는 단점 때문이고, 본 실험의 세균회석액의 농도가 낮은 것도 이유가 될 수 있다. *S. epidermidis*는 피부감염에 가장 많이 검출되는 coagulase negative staphylococci로서 광역학 치료 효과는 *S. aureus* 보다 못하였지만, 탁월한 살균효과는 증명되었다. 그리고 2009년 윤인숙[19]의 항균효과 연구방법에 의하면 디스크 확산법으로만 입증하였지만, 본 실험에서는 집락형성수 실험과 형광염색에 의한 유세포 분석까지 분석하므로 정확도를 높이고 정량화하였다. 또한 PDT의 메커니즘의 규명을 위한 전자현미경적 세균형태 변화나 ROS 생성능 등 더 많은 조사를 해야 할 것으로 사료된다.

결론적으로, 자체 제작한 630nm LED와 photofrin를 이용하여 *S. aureus*, *S. epidermidis* 의 광역학 치료는

50 $\mu\text{g/ml}$ 의 photofrin 과 18 J/cm^2 에너지 조사가 효과적으로 살균될 수 있음을 증명하였다.

참고 문헌

- [1] F. D. Lowy, *Staphylococcus aureus* infections, N Engl J Med, Vol.339, No.8, pp.520-532, 1998.
- [2] N. H. Youn, S. W. Lee, J. H. Park, S. H. Cha, and S. D. Park, Two cases of staphylococcal scalded skin syndrome, Korean J Dermatol, Vol.38, No.2, pp.1531-1535, 2000.
- [3] S. Ladhani, C. L. Joannou, D. P. Lochrie, R. W. Evans, and S. M. Poston, Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome, Clin Microbiol Rev, Vol.12, No.2, pp.224-242, 1999.
- [4] C. Vuong and M. Otto, *Staphylococcus epidermidis* infections, Microbes Infect, Vol.4, No.4, pp.481-489, 2002.
- [5] M. Wainwright, D. A. Phoenix, S. L. Laycock, D. R. Wareing, and P. A. Wright, Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, FEMS Microbiol Lett, Vol.160, No.2, pp.177-181, 1998.
- [6] M. Ochsner, New trends in photo biology of photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors, Photochem Photobiol, Vol.39, No.1, pp.1-18, 1997.
- [7] T. S. Mang, Lasers and light sources for PDT: past, present and future, Photodiagnosis Photodynamic Therapy, Vol.1, No.1, pp.43-48, 2004.
- [8] M. R. Hamblin and T. Hasan, Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, J Photochem Photobiol B,

- Vol.3, No.5, pp.436-450, 2004.
- [9] C. Raab, Ber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusoria, Z Biol, Vol.39, No.3, pp.524-646, 1900.
- [10] R. van Hillegersberg, W. J. Kort, and J. H. Wilson, Current status of photodynamic therapy in oncology, Drugs, Vol.48, No.4, pp.510-527, 1994.
- [11] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbek, J. Moan, and Q. Peng, Photodynamic therapy, J Natl Cancer Inst, Vol.90, No.12, pp.889-905, 1998.
- [12] K. Kalka, H. Merk, and H. Mukhtar, Photodynamic Therapy in Dermatology, J Am Acad Dermatol, Vol.42, No.3, pp.389-413, 2000.
- [13] E. F. Stranadko, O. K. Skobelkin, G. D. Litvin, and T. A. Astrakhankina, Photodynamic therapy of human malignant tumors: a comparative study between photohem and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine, Proc SPIE, Vol.2625, No.1, pp.440-448, 1996.
- [14] J. Webber, M. Herman, D. Kessel, and D. Fromm, Current concepts in gastrointestinal photodynamic therapy, Ann Surg, Vol.230, No.1, pp.12-23, 1999.
- [15] P. S. Golding, T. A. King, L. Maddocks, D. B. Drucker, and A. S. Blinkhorn, Photosensitization of *Staphylococcus aureus* with malachite green isothiocyanate: inactivation efficiency and spectroscopic analysis, J Photochem Photobiol B, Vol.47, No.2, pp.202-210, 1998.
- [16] A. Kubin, F. Wierrani, R. H. Jindra, H. G. Loew, W. Grünberger, R. Ebermann, and G. Alth, Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and photofrin II on *Staphylococcus aureus*, Drugs Exp Clin Res, Vol.25, No.1, pp.13-21, 1999.
- [17] P. I. Tolstykh, E. F. Stranadko, U. M. Koraboev, A. Urinov, M. P. Tolstykh, R. P. Terekhova, N. N. Volkova, and V. A. Duvanskii, Experimental study of photodynamic effect on bacterial wound microflora. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, Vol.2, No.2, pp.85-87, 2001.
- [18] M. M. Gois, C. Kurachi, E. J. Santana, E. G. Mima, D. M. Spolidório, J. E. Pelino, and W. Salvador Bagnato, Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study, Lasers Med Sci, Vol.25, No.3, pp.391-395, 2010.
- [19] 윤인숙, "마늘추출물의 식중독균에 대한 항균검사", 한국콘텐츠학회, 한국콘텐츠학회논문지, 제9권, 제2호, pp.339-349, 2009.

저 자 소 개

권 필 승(Pil-Seung Kwon)

정회원



- 2006년 2월 : 단국대학교 의학레 이저 미생물전공(이학석사)
- 2009년 2월 : 단국대학교 의학 레 이저 의학전공(의학박사)
- 2009년 9월 ~ 현재 : 원광보건 대학교 임상병리과 교수

<관심분야> : 임상세균학, 의학레이저, 임상병리학