

Photodynamic Therapy for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with High-level Mupirocin Resistance using 630 nm Light-emitting Diode

Pil Seung Kwon^{1,†} and Jin-Kyung Kim²

¹Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea

²Department of Microbiology & Vestibulocochlear Research Center, Wonkwang University College of Medicine, Iksan 570-749, Korea

This study aims to evaluate the effect of Photodynamic Therapy (PDT) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level mupirocin resistance (Hi-Mup MRSA). To examine the antimicrobial effect of photogem-mediated PDT against Hi-Mup MRSA, CFU quantifications, bacteria cell viability tests, and disk diffusion antimicrobial susceptibility tests were evaluated. In addition, one of PDT mechanisms was investigated by accumulating photogem (10 µg/ml) in Hi-Mup MRSA. Photogem-mediated PDT properly inhibited the colony formation of Hi-Mup MRSA. Viable bacteria decreased greatly after a PDT application with photogem 10 µg/ml at energy density 15 J/cm². The diameter of the inhibition zone around susceptible disks increased after PDT. In addition, we confirmed the accumulation of photogem in bacteria through fluorescent images. These results demonstrated that excellent photosensitization of Hi-Mup MRSA can be achieved using photogem with 630 nm LED irradiation. Thus, PDT may make survival Hi-Mup MRSA inactive.

Key Words: Mupirocin, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Photodynamic therapy

서 론

뮤피로신은 그람양성 병원성균에 대한 활성에 선택적이며 임상적으로 메치실린 내성 포도알균을 포함한 포도알균과 사슬알균에 대한 피부에 바르는 항균제로 사용되었다 (Sutherland et al., 1985). 따라서 1985년부터 뮤피로신 감염의 치료에 광범위하게 이용되기 시작되었고, 1987년에 뮤피로신 내성 포도알균의 임상분리균주가 처음 보고되었으며 두 가지 표현형인 뮤피로신 고도내성 (≥512 µg/ml)과 저도내성 (8~256 µg/ml)인 균주의 감염이 나타났다 (Schmitz and Jones, 1997). 저도내성은 염색체성 isoleucyl-tRNA 합성효소 유전자 안에서의 변이원간의 접촉 부위와 밀접한 관계가 있으며, 고도내성은 저도내성에 추가적으로 새로운 isoleucyl-tRNA 합성효소가 암호화되어 숙주세균의 플라스미드에서 *mup-A* 유전자를 측

정하는 것이 일반적이며 고도내성균은 뮤피로신에 의해서 포도알균이 억제되지 않는다 (Udo et al., 2001). 한국에서는 1994년부터 뮤피로신 연고가 사용된 이래로 2003년에 4.7%의 뮤피로신 고도내성 메치실린 내성 포도알균이 처음 보고되었고, 그 이후 2006년에 6.1% 뮤피로신 고도내성과 5.2%의 저도내성 메치실린 내성 포도알균 분리율이 보고되었다 (Yun et al., 2003; Yoo et al., 2006).

우리나라 환자에서 분리되는 황색포도알균의 70% 정도가 메치실린 내성균이다 (Hong et al., 2004; Kim et al., 2004; Lee et al., 2005). 메치실린 내성 포도알균 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)의 내성 기전은 세균이 선천적으로 염색체 내에 *mec A* 유전자를 획득하여 약제에 친화성이 적은 세포벽합성단백인 penicillin bindingprotein (PBP) 2a에 의하여 생긴다 (Chambers, 1997; Georgopapadakou et al., 1999). 황색포도알균은 메치실린 내성을 보인 것은 이미 오래 전부터 나타났고, 이런 내성기전 뿐만 아니라 뮤피로신에도 고도내성을 보이는 균이 증가하고 있다. 그래서 광역학 치료를 이용하여 뮤피로신 고도내성균을 완전 사멸을 시킬 수 있는지를 실험하였다.

*접수일: 2010년 11월 5일 / 수정일: 2010년 12월 26일
채택일: 2010년 12월 30일

†교신저자: 권필승, (우) 570-750 전북 익산시 신용동 344-2, 원광보건대학 임상병리과
Tel: 063-840-1212, e-mail: pskwon@wkhc.ac.kr

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 단일항산소에 의하여 암세포가 파괴되는 원리를 이용한 암치료법이다 (Weishaupt et al., 1976).

표재성 피부질환들은 빛을 조직에 직접 조사하여 치료를 하고 체내에 있는 심재성 질환들은 파이프 카테터를 이용하여 치료하고자 하는 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 (Machado, 2000; Mang, 2004). 광역학 치료는 암치료 방법 중 하나이지만 세균과 곰팡이류 등의 치료 효과에는 활발한 연구가 이루어지지 않고 있는 상태이다 (Wainwright, 1998; Phoenix et al., 2003).

본 연구에서는 630 nm에서 최대흡수파장을 보이는 1세대 광감작제인 포토젬과 630 nm LED array를 자체 제작하여 뮤피로신 고도내성과 매치실린 내성을 갖고 있는 포도알균에 대한 광역학 치료를 시도해 보았다.

재료 및 방법

사용균주

중합효소연쇄반응으로 뮤피로신 고도내성 (*mup-A gene*) MRSA를 확인한 균주를 질병관리본부로부터 분양받아 사용하였고, 이 균주를 KCDC-mu라 표기하였다. 그리고 단국대학교병원 미생물검사실에서 VITEK II system (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)으로 동정된 임상균주 중 중합효소연쇄반응을 실시하여 뮤피로신 고도내성 (*mup-A gene*)을 가진 MRSA를 본 실험에 사용하였으며, MRSA-mu균이라 표기하였다.

균주배양

균주를 혈액천배지에 도달한 후 37°C 배양기에서 24 시간 동안 배양하여 생성된 집락을 취하여 trypticase soy

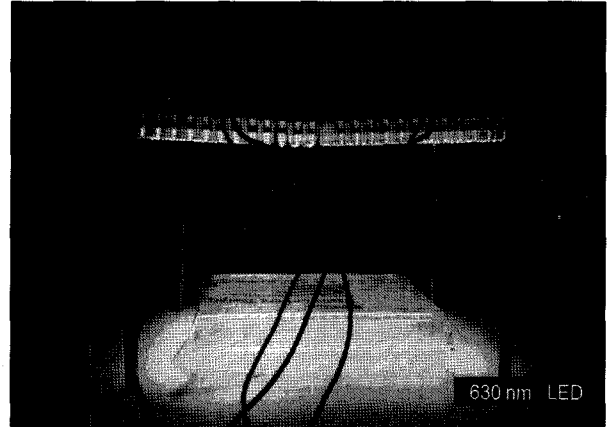


Fig. 1. LED set-up for *in vitro* PDT treatment. The LED wavelength 630 nm and LED array was composed with 384 LED in 120 × 180 mm size. The interval of distance of LED light bulb and the plate was 100 mm and energy density application of power supply became the 8.3 mW/cm² with 12.1 V and 0.4 A.

broth (Difco, MI, USA) 2 ml에 현탁시킨 다음 1.5 × 10⁸ cells/ml가 되는 0.5 McFarland 표준값을 VITEK사의 탁도계 (bioMerieux, densiCHECK, France)로 측정 후 실험균주를 1.5 × 10⁴ cells/ml로 희석하여 사용하였다. 그리고 박테리아 세포생명력을 알아보기 위한 형광현미경적 실험에는 1.5 × 10⁵ cells/ml로 희석하여 사용하였다.

광감작제와 광원 및 광역학 치료 방법

본 연구에 사용된 광감작제 포토젬 (Lomonisov institute of Fine Chemical, Russia)는 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Hyclone, USA)에 10 mg/ml로 녹여 만든 뒤 0.2 μm filter로 여과하여 사용하였다.

광원은 LED를 자체 제작하여 사용하였다. 사용된 LED는 5Φ의 원통모양으로 2,000 mcd의 광도를 가지며, 24 well plate에 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 150 Ω으로 하였으며 LED array의 광량은 전원 공급장치 (Hanil, Korea)의 전류를 조절하여 8.3 mW/cm²가 되도록 하였다 (Fig. 1).

LED array와 조사받는 24 well plate 사이의 거리를 100 mm로 하고 12.1 V, 0.4 A의 전압과 에너지 밀도 8.3 mW/cm²의 630 nm LED를 10분 동안 조사하였다. 최종 에너지는 15 J/cm²이었다.

CFU (Colony Forming Units) 측정과 통계분석

광감작제인 포토젼의 농도를 멸균된 시험관을 사용하여 두 종류 뮤피로신 고도내성 MRSA를 1.5×10^4 cells/ml의 균주회석액을 만들고 포토젼 최종농도 10, 5, 2.5, 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 희석한 후 24 well plate에 혼합하였다. 그 후 알루미늄 호일을 이용하여 빛을 차단시키고 37°C 배양기 (Thermo Forma, 47502-3362)에서 3시간 동안 반응시간을 시켰다. 그 후 630 nm의 LED 광원 출력장비를 사용하여 8.3 mW/cm²로 30분 동안 빛을 조사하였다. 빛 조사가 끝난 후 마이크로플레이트 혼합기 (Labnet, international Inc, USA)를 분당 회전수 100회로 3분 동안 혼합하였다. 그 후 혈액한천배지에 각 군별로 20 μl 씩 분주 후 스프레더를 이용하여 접종한 후 18시간 배양시킨 후 생성된 집락의 수를 세었다. 3회에 걸쳐 측정하였으며, 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.

Bacterial cell viability 실험

이 실험에서는 표준균주인 KCDC-mu만을 이용하여 실험하였다. 시험관에 KCDC-mu 균주회석액을 1.5×10^5 cells/ml의 농도로 trypticase soy broth 1ml에 희석하여 조제하였다. 그 후 포토젼의 최종농도가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 희석한 후 혼합하였다. 3시간 동안 37°C 배양기에서 배양 후 LED를 15 J/cm²로 조사하였다. 조사가 끝난 세균회석액을 바로 DPBS로 1회 세척 후 500 μl 의 균주회석액에 Bacterial viability kit (BD Biosciences, San Jose, CA) 내의 thiazole orange (T.O)와 propidium iodide (PI) 염색시약을 5 μl 씩 첨가하여 vortex mixer를 이용하여 혼합 후 실온에서 10분간 염색시킨 후 20 μl 를 취하여 형광형미경을 통해 관찰하였다. 대조군은 1.5×10^5 cells/ml의 균주회석액을 바로 DPBS로 1회 세척 후 500 μl 의 균주회석액에 광역학 치료군과 동일하게 염색하였다. T.O 색소는 살아있는 세균과 죽어있는 세균 모두에 염색이 되고, PI 색소는 죽어있는 세균에만 염색이 된다. 그러나 본 실험에서는 Bacterial cell viability kit 내의 염색원충액을 사용하지 않고 DPBS로 대신 사용하였으며, 염색원충액에는 1 mmol/L EDTA (ethylene diaminetetraacetic acid)가 포함되어 있어 세포벽을 약화시키고 세포막에 형광색소를 침투

시키는 작용을 한다 (Malamy and Horecker, 1964).

세균의 T.O 형광관찰은 방출파장 465~495 nm의 필터로 관찰하였고, PI는 방출파장 510~560 nm 필터에서 형광을 형광현미경 (BX-51, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

포토젼의 세포내 축적관찰

표준균주인 KCDC-mu만을 이용하여 실험하였다. 시험관에 KCDC-mu 균주회석액을 1.5×10^5 cells/ml의 농도로 trypticase soy broth 1 ml에 희석하여 만들었다. 그 후 포토젼의 최종농도가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 희석한 후 혼합하였다. 3시간 동안 37°C 배양기에서 배양 후 방출파장 510~560 nm 필터에서 형광을 관찰하였다.

광역학 치료 전·후의 항균제 억제대 비교

광역학 치료 전·후의 두 종류 실험균주에 대한 항균제 감수성은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 가이드라인에 따라 디스크 확산법을 시행하였으며 (CLSI, 2007), 디스크 확산법에는 amikacin (30 μg), ciprofloxacin (5 μg), clindamycin (5 μg), erythromycin (15 μg), gentamicin (10 μg), vancomycin (30 μg) 및 teicoplanin (30 μg) 디스크 (BBL Microbiology System, Cockeysville, MD, USA)와 mupirocin (20 μg) 디스크 (Oxoid, Hampshire, UK)를 사용하였다. Trypticase soy broth (Difco)에 부유하여 탁도계를 McFarland의 No. 0.5에 맞추고 대조군은 바로 멸균된 면봉으로 Mueller-Hinton agar (Difco, MI, USA)에 고루 바른 후 디스펜서를 이용하여 디스크를 올려놓았으며, 광역학 치료군은 McFarland의 No. 0.5에 맞춘 균주회석액에 포토젼의 최종농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 혼합 후 37°C 배양기에서 3시간 동안 반응시간을 주었다. 그 후 630 nm의 LED 광원 출력장비를 사용하여 8.3 mW/cm²로 30분 동안 15 J/cm²를 조사하였다. 광역학 치료가 끝난 치료군은 바로 멸균된 면봉으로 Mueller-Hinton agar (Difco, MI, USA)에 고루 바른 후 디스펜서를 이용하여 디스크를 올려놓았으며 접종된 평판은 하룻동안 배양기에서 배양시킨 후 디스크 주변의 억제대의 지름을 측정하였다.

결 과

CFU (Colony Forming Units) 측정결과

630 nm LED를 에너지 밀도별로 각각 다르게 광감작

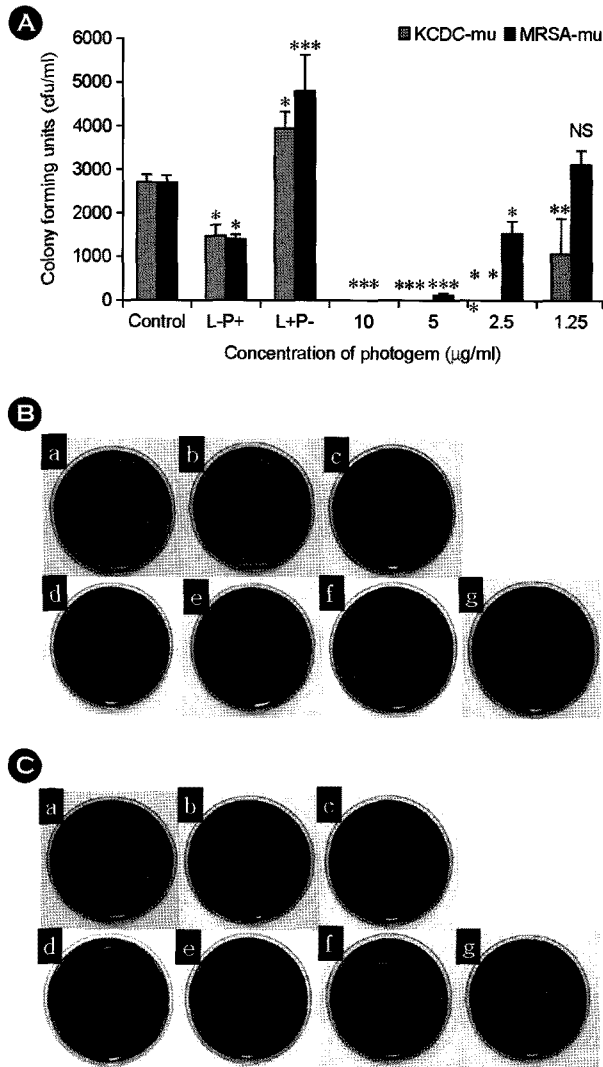


Fig. 2. Survival bacteria (KCDC-mu, MRSA-mu) was evaluated by colony forming unit test after PDT with the light dose of 15 J/cm². The photography shows KCDC-mu (B) and MRSA-mu (C) onto blood agar plate after PDT. Control (a): without sensitizer and LED light, L-P+(b): KCDC-mu and MRSA-mu treated solely with photogem (10 µg/ml), L+P-(c): KCDC-mu and MRSA-mu treated solely with LED light, PDT-treated at the final photogem concentrations of 10 µg/ml (d), 5 µg/ml (e), 2.5 µg/ml (f) and 1.25 µg/ml (g). Values are expressed in mean ± SD. Significant differences were observed between the treatment groups and the control. **P*<0.05, ***P*<0.001, ****P*<0.001, NS: non-significant. Significant differences were observed between the treatment groups and the control. **P*<0.05, ***P*<0.001, ****P*<0.001, NS: non-significant.

제인 포토젼을 처리하여 체외적으로 광역학 치료를 실시 하였을 때 두 종류의 뮤피로신 고도내성 MRSA의 살균 능을 측정하였다. 각 세균의 대조군은 광감작제와 LED 조사 없이 1.5×10^4 cells/ml의 균주희석액을 37°C 배양기 (Thermo Forma, 47502-3362)에서 3시간 동안 반응시간을 시킨 것이다. KCDC-mu균의 대조군은 평균 2,642

CFU/ml의 세균이 자랐으며, 병원에서 분리된 임상균주인 MRSA-mu의 대조군은 평균 2,639 CFU/ml의 세균이 자랐다. 이 결과로 대조군의 편차가 없는 것을 확인하였다 (Fig. 2Ba and Ca). 포토젼의 최종농도 10 µg/ml만 처리한 군에서의 KCDC-mu균은 평균 1,420 CFU/ml의 세균이 자랐으며, 병원에서 분리된 임상균주인 MRSA-mu은 평균 1,368 CFU/ml의 세균이 자랐다 (Fig. 2Bb and Cb). 15 J/cm²의 에너지만을 조사한 군에서는 KCDC-mu균은 평균 3,927 CFU/ml의 세균이 자랐으며, 병원에서 분리된 임상균주인 MRSA-mu에서는 평균 4,764 CFU/ml의 세균이 자랐다 (Fig. 2Bc and Cc). 광역학 치료 효과를 확인한 결과는 15 J/cm²의 에너지와 함께 포토젼의 최종농도 10 µg/ml의 농도에서는 두 가지 군 모두 완전 사멸하였다 (*P*<0.001) (Fig. 2Bd and Cd). 포토젼의 최종농도 5 µg/ml에서는 KCDC-mu균은 평균 2 CFU/ml의 세균이 자랐으며, 병원에서 분리된 임상균주인 MRSA-mu에서는 평균 59개의 CFU/ml의 집락이 형성되어 완전한 살균 효과를 보이지 않았다 (*P*<0.001) (Fig. 2Be and 2Ce). 포토젼의 최종농도 2.5 µg/ml에서는 KCDC-mu균은 평균 15.7 CFU/ml의 세균이 자랐으며 (*P*<0.001) (Fig. 2Bf), 병원에서 분리된 임상균주인 MRSA-mu에서는 평균 1,482개의 CFU/ml의 집락이 형성되었다 (*P*<0.05) (Fig. 2Cf). 마지막 포토젼의 최종농도 1.25 µg/ml에서는 KCDC-mu균은 평균 1,007개의 CFU/ml의 세균이 자랐으며 (*P*<0.01) (Fig. 2Bg), 병원에서 분리된 임상균주인 MRSA-mu에서는 평균 3,051개의 CFU/ml의 집락이 형성되었으며, 통계분석으로 유의한 결과는 나오지 않았다 (Fig. 2Cg) (Fig. 2A).

Bacterial cell viability 실험결과

대조군의 결과는 T.O와 PI 모두에서 형광을 관찰할 수 없었다. 그 이유는 광역학 치료를 하지 않아서 세포막의 손상이 없었기 때문에 형광염색색소들이 세포내에 침투 못한 것이라 생각된다. 그러나 광역학 치료군에서는 T.O균과 PI균에서 강한 형광의 세균 이미지를 관찰할 수 있었다. T.O균은 여기파장 465~495 nm의 필터로 관찰시 세균 균체에서 강한 녹색형광이 관찰되었고, PI균은 여기파장 510~560 nm 필터에서 세균의 균체에서 강한 적색형광이 관찰되었다.

관찰된 세균들 중에서 T.O균에 염색된 세균들보다 PI균에 염색된 세균들을 비교해 보면 PI균에 염색된 세균이 더 적은 것을 볼 수 있다. 그 이유는 치료군의 균수가 1.5×10^5 cells/ml로 치료를 하였기 때문에 일부 사멸하지

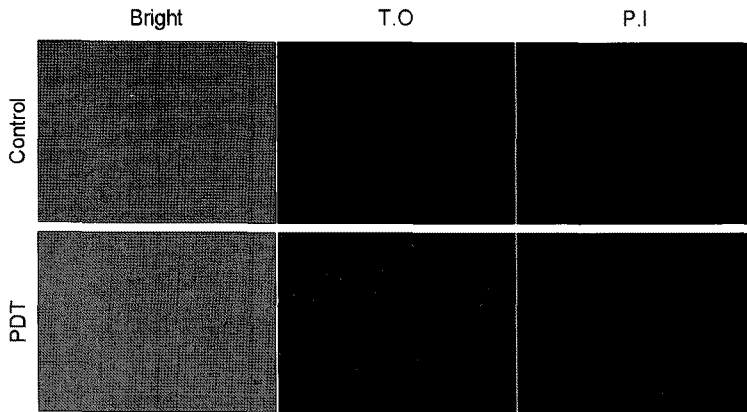


Fig. 3. Viability of KCDC-mu with high-mupirocin resistance using the bacterial viability kit. LED with 15 J/cm^2 was irradiated on a suspension with bacteria (1.5×10^5 cells/ml) and photogem ($10 \mu\text{g/ml}$), on which we then added a fluorescent dye mixture of $5 \mu\text{l}$ and incubated for 10 min. The pictures show the excitation maxima about 465/495 nm for green fluorescent stain (T.O) and 510/560 nm for red fluorescent stain (P.I) ($\times 400$ field).

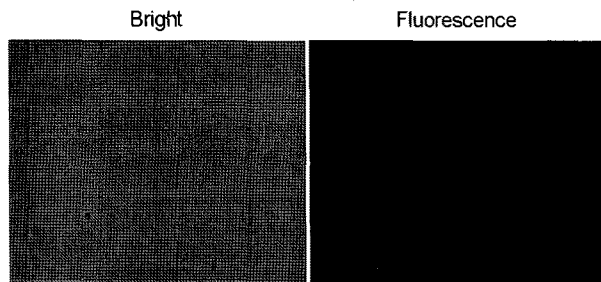


Fig. 4. Fluorescence images of photogem in KCDC-mu with high-mupirocin resistance. Bacterial suspension (1.5×10^5 cells/ml) was treated by photogem ($10 \mu\text{g/ml}$). Then, a microscopic examination of fluorescent image was conducted after 3 h incubation. The pictures show the excitation maxima about 510/560 nm for red fluorescent stain ($\times 400$ field).

못한 균들이 있었기 때문이다. 이로서 광역학 치료 후 P.I에 염색된 대부분의 세균들이 광역학 치료 효과로 인한 사멸되었음을 알 수 있었고, 광역학 치료는 뮤피로신 고도내성 포도알균을 사멸시키는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3).

포토젬의 세포내 축적관찰 결과

광감작제의 여러 종류 중 헤마토포피린 계열의 약제들은 형광을 지니고 있고 본 실험에 사용된 포토젬도 형광을 지닌 광감작제이다. 포토젬이 세포내에 축적이 되어 빛이 쬐어지면 광역학 치료가 효과를 보이게 된다. 그래서 표준균주인 KCDC-mu만을 이용하여 실험하였으며, KCDC-mu에 포토젬의 축적을 확인하기 위하여 최종 여기파장 510~560 nm 필터에서 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 관찰결과 균체내의 적색형광을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

광역학 치료 전후의 항균제 감수성시험 억제대 비교

광역학 치료 전과 후의 항균제 억제대를 비교해 보았다. 그 결과는 KCDC-mu균은 광역학 치료 전의 항균제 감수성을 나타낸 항균제는 ciprofloxacin ($5 \mu\text{g}$), clindamycin ($5 \mu\text{g}$), vancomycin ($30 \mu\text{g}$) 3종이었으며, 각각의 억제대 지름은 25, 25, 16 mm이었다. 중등도 내성을 나타낸 것은 amikacin ($30 \mu\text{g}$)이었으며, 억제대 지름은 15 mm로 나왔다. 내성을 나타낸 항균제는 erythromycin ($15 \mu\text{g}$), gentamicin ($10 \mu\text{g}$), teicoplanin ($30 \mu\text{g}$) 및 mupirocin ($5 \mu\text{g}$) 5종이었다. 광역학 치료 후의 KCDC-mu균은 항균제내성을 나타낸 5종은 억제대가 변동이 없었지만, 감수성을 나타낸 항균제는 ciprofloxacin ($5 \mu\text{g}$), clindamycin ($5 \mu\text{g}$) 및 vancomycin ($30 \mu\text{g}$) 억제대가 치료 후에는 36, 31, 19 mm로 나왔으며, 치료 전 보다 각각 11, 6, 3 mm의 억제대 지름이 더 커졌다. 광역학 치료 전 중등도 내성을 보이던 amikacin ($30 \mu\text{g}$)은 광역학 치료 후 18 mm로 나와 감수성을 보여 3 mm의 억제대 지름이 더 커졌다.

MRSA-mu균은 광역학 치료 전의 항균제 감수성을 나타낸 항균제는 amikacin ($30 \mu\text{g}$), vancomycin ($30 \mu\text{g}$) 2종이었으며, 억제대 지름은 17, 16 mm이었다. 내성을 나타낸 항균제는 erythromycin ($15 \mu\text{g}$), gentamicin ($10 \mu\text{g}$), teicoplanin ($30 \mu\text{g}$), ciprofloxacin ($5 \mu\text{g}$), clindamycin ($5 \mu\text{g}$) 및 mupirocin ($5 \mu\text{g}$) 7종이었다. 광역학 치료 후의 MRSA-mu균은 항균제내성을 나타낸 7종은 억제대가 변동이 없었지만 감수성을 나타낸 항균제는 vancomycin ($30 \mu\text{g}$) 억제대가 치료 후에는 19 mm로 나왔다. 치료 전 보다 3 mm의 억제대가 더 커진 것으로 측정되었다. Amikacin ($30 \mu\text{g}$)은 치료 전 17 mm로 치료 후 감수성의 억제대 지름 18 mm로 측정되었다. MRSA-mu균은 항균제 다제내성을 지녔으며, 두 균 모두 치료 후의 항균제 억제대가 더 커

Table 1. Antimicrobial susceptibility test before and after PDT for high-level mupirocin MRSA

Antimicrobial agents	CIP	AN	CC	E	Mu	GM	Tei	VA
Interpretive Standards (mm)	R: ≤15	R: ≤14	R: ≤14	R: ≤13	R:	R: ≤12	R: ≤10	R:
	I: 16~20	I: 15~16	I: 15~20	I: 14~22	I:	I: 13~14	I: 11~13	I:
	S: ≥21	S: ≥17	S: ≥21	S: ≥23	S: ≥14	S: ≥15	S: ≥14	S: ≥15
KCDC Control	S (25)	I (15)	S (25)	R	R	R	R	S (16)
KCDC PDT	S (36)	S (18)	S (31)	R	R	R	R	S (19)
MRSA Control	R	S (17)	R	R	R	R	R	S (18)
MRSA PDT	R	S (18)	R	R	R	R	R	S (19)

CIP=ciprofloxacin, AN=amikacin, CC=clindamycin, E=erythromycin, Mu=mupirocin, GM=gentamicin, Tei=teicoplanin, VA=vancomycin, R= resistant, I=intermediate, S=susceptible.

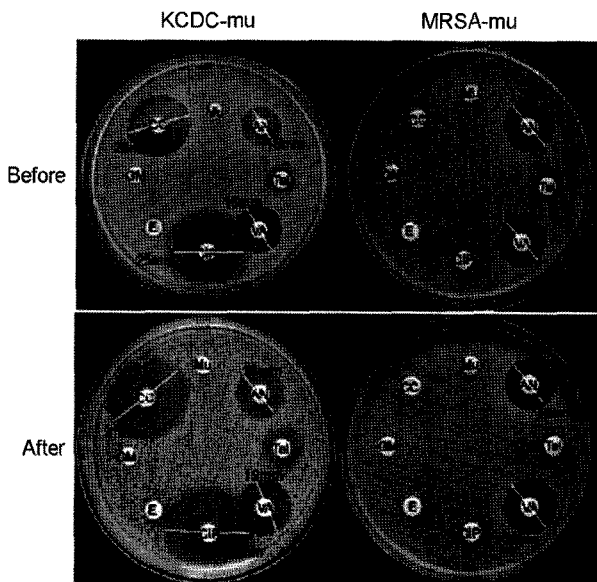


Fig. 5. Disk diffusion test on KCDC-mu and MRSA-mu with high-mupirocin resistance before and after PDT. Photogem-mediated photodynamic therapy using photogem concentration 100 µg/ml with the light dose of 15 J/cm². The antibiotic summarized with amikacin (30 µg, AN), ciprofloxacin (5 µg, CIP), clindamycin (5 µg, CC), erythromycin (15 µg, E), gentamicin (10 µg, GM), vancomycin (30 µg, VA), teicoplanin (30 µg, Tei) and mupirocin (20 µg, Mu). Numbers present the diameters of zones of growth inhibition in mm.

지는 것을 알 수 있었다 (Table 1, Fig. 5).

고 찰

현재 피부에 생긴 경미한 황색포도알균성 감염은 주로 외용 항생제치료를 통하여 일반적으로 이루어지고 있고 효과 또한 우수하다고 여겨져 왔다. 그러나 국내에도 항생제 오남용으로 인한 류피로신 고도내성균이 분리가 되면서 심각성이 부각되고 있다 (Yun et al., 2003). 이런

항생제 내성균에 대한 대안이 시급한 실정에서 광역학 치료법이 하나의 대안으로 떠오르고 있다. 광역학 치료는 암치료에 많이 이용되고 있으며, 박테리아를 사멸시키는 데도 이용되고 있다고 보고되었다 (Barr et al., 1987; Bedwell et al., 1990). 박테리아 PDT는 1900년, Raab에 의해 체외적인 방법으로 시도를 시작하여 오늘날까지 다양한 광감작제를 이용한 연구들이 많이 이루어지고 있다 (Raab, 1900; Hamblin and Hasan, 2004).

광역학 치료에 의한 세포내 작용기전의 시작은 광·물리현상으로 이해되고 있는데 바닥 상태의 광감작제를 특정 파장의 빛으로 활성화시켜 단일항 상태나 삼중항 상태로 되고 여기서 바닥 상태로 될 때 방출되는 에너지가 산소와 반응하여 활성산소 (O₂)를 생성시키거나 (Type II 반응) 감작제가 전자전달계에 관여하는 경우 자유라디칼이 형성되어 (Type I 반응) 세포파괴가 일어난다 (Foote, 1987; Tomio et al., 1980; Ochsner, 1997). 광역학 치료는 광감작제를 전신 혹은 국소적인 방법으로 주입하여 축적시킨 뒤 특정 파장의 광감작 광선을 조사하는 방식으로 원하는 표적을 선택적으로 파괴하여 신체의 손상을 최소화하기 위한 치료법이다. 광역학 치료는 각종암세포 치료뿐만 아니라 항생제 내성균주 그리고 항암제와 병행치료연구에도 활발한 연구가 진행되고 있다 (Webber et al., 1999; Maisch, 2007; Kim et al., 2009).

현재 우리나라에서 식약청 임상허가 광감작제로는 1세대인 5-aminolevulinic acid (ALA), 포르피머 나트륨 (porfimer sodium, 포토프린), 헤마토포피린 유도체 (Hematoporphyrin Derivate, 포토젠) 등이 있으며 이들은 대부분 630 nm의 파장에서 에너지 흡수가 극대화되는 특징을 가지고 있다 (Stranadko et al., 1996; Dougherty et al., 1998).

국내의 류피로신 내성균은 Yoon 등 (2003)의 연구에서 보면 류피로신 내성 황색포도알균과 코이콜라제 음성

황색포도알균의 뮤피로신 내성비율을 보았을 때 분리된 5% MRSA 중에서 모두가 뮤피로신 고도내성이었으며, 코아를라제 음성 황색포도알균 중 메치실린 내성균은 27% 중 10% 가량이 뮤피로신 고도내성으로 나왔다. 국내에서도 이미 뮤피로신 고도내성이 점차로 늘어나고 있는 실정이며 이런 내성박테리아의 문제를 해결해 줄 광역학 치료법을 이용하여 MRSA에 대한 시도가 여러 연구자에 의해 시도되었다. 체외적으로 이루어졌던 광감작제별 광역학 치료를 보면, Wainwright 등 (1998)에 의해 메틸렌블루를 이용한 연구가 있었으며 메치실린에 내성이 없는 포도알균에 대해서는 Golding 등 (1998)이 malachite green isothiocyanate를 이용하였고, Kubin 등 (1999)은 photofrin과 m-THPC, hypericin을 이용하였다. Tolstyk 등 (2001)은 photosens이라는 물질을 이용하였다. 많은 연구자들의 다양한 광감작제 사용이 있었으며, 그리고 최근 Kwon and Jo (2009)은 다양한 광감작제를 사용하여 MRSA의 광역학 치료 효과를 포토젬 5 µg/ml에서 광원은 다이오드레이저를 사용하여 100% 사멸 효과를 입증하였다. 그러나 본 연구에서 MRSA-mu균은 이와 다른 결과로서 10 µg/ml의 사용과 15 J/cm²의 에너지를 조사하여야만 완전 사멸을 보였으며, KCDC-mu균은 Kwon and Jo (2009)의 결과와 똑같은 농도와 에너지에서 사멸 효과를 보였다. 이 결과로 균의 종류별로 포토젬의 농도가 차이가 있었으며, 레이저나 LED와 같은 광원의 차이는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 LED 조사만을 한 군에서는 대조군과 비교하여 유의할 정도의 세균수가 증가한 것을 관찰할 수 있었는데 이것은 30분간의 LED 조사시간 동안 균 성장이 이루어진 것이라 생각되고 Grinholc 등 (2007)의 연구에서도 포도알균에 빛만을 조사한 군이 광감작제만 처리한 군보다 더 증가한 결과를 보여서 본 연구와 비슷한 결과를 보였다.

사용이 용이하고 가격면에서 저가인 LED를 이용한 연구들은 최근, Peloi 등 (2008)에 의하면 메틸렌 블루와 663 nm LED를 이용하여 황색포도알균에서의 광역학 치료 효과를 보았는데 균희석액의 농도가 1×10^8 cells/ml로 시행하여 93% 감소하는 효과를 입증하였으며, Rodnei 등 (2010)에 의하면 장내세균에 광감작제인 Rose Bengal과 항균제인 erythrosin의 복합 치료를 비교하였는데 여기에서 사용된 광원도 Blue light LED였으며, 뚜렷한 감소 효과를 증명하였다. 본 실험에서 사용된 LED와는 파장과 광감작제는 서로 다르지만 LED를 이용한 박테리아에 대한 광역학 치료의 효과를 입증하였으며, 본 연구에

사용된 뮤피로신 고도내성 MRSA를 대상으로 한 연구는 아직까지 없었으며, 본 실험결과는 포토젬 10 µg/ml에서 자체개발한 LED를 사용하여 완전한 살균효과를 입증하였다 (Fig. 2). Chabrier-Roselló 등 (2005)은 같은 계열의 광감작제인 포토프린이 캔디다의 후막포자에 축적되어 일어나는 광역학적 효과를 입증하였다. 본 연구에서도 포토젬 10 µg/ml에서 박테리아내의 형광을 관찰하였다. 이 결과로서 이미 알려진 것처럼 광역학 치료기전의 광감작제가 세포내 축적 후 광원의 조사로 인한 세포막의 손상으로 인한 세포사멸을 예상할 수 있었다 (Bertoloni et al., 2000; Grinholc et al., 2007; Gois et al., 2010).

Grinholc 등 (2007)은 합성된 protoporphyrin diarginate를 이용하여 광역학적 치료 후의 항균제 억제대 비교시험에서 광역학 치료 후에 18시간 배양된 집락을 무작위로 5개를 취하여 디스크 확산법으로 비교하였는데 결과는 치료 전후가 변화가 없는 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 광역학 치료를 시행한 균주희석액을 배양하지 않고 바로 디스크 확산법으로 비교하였는데 결과는 감수성을 가진 항균제에 대해서는 유효성 있게 억제대 지름이 커진 것을 볼 수 있었고 내성을 갖는 항균제에 대해서는 억제대가 변화가 없었다 (Table 1), (Fig. 3). Fuchs 등 (2007)과 같이 광역학 치료 과정에서 광감작제가 단일항산소와 활성산소 같은 라디칼이 생성되어 세균의 세포벽에 반응을 일으킨 후 세포벽에 침투와 최종적으로 세포사멸을 일으키는 것과 같이 본 연구에서도 치료 과정 중에 세포사멸로 인하여 억제대 지름이 커진 것으로 해석되며, Grinholc 등 (2007)과 같이 내성기전에는 영향이 없는 것으로 생각된다.

본 연구에 사용된 포토젬은 Hematoporphyrin 계열의 광감작제로서 광과민성이 길다는 단점을 지니고 있지만, 뮤피로신 고도내성 MRSA에 대한 광역학 치료 시엔 치료 효과가 뛰어난 것을 볼 수 있었으며, 외용약으로 사용되는 뮤피로신 연고 대신 피부에 적용시키기에 용이하고, 고가의 레이저보다 저가인 LED를 사용하기 때문에 치료비용도 절감할 수 있으며 항생제 내성에도 자유로울 수 있는 장점을 지닌다. 박테리아는 완전 살균이 이루어지지 않으면 임상적으로 신체의 각 부위에서 재증식이 일어나고 다시 병변이 재발하기 쉬운 점이 있기 때문에 본 연구에서는 완전 사멸을 목적으로 하였다. 광역학적 치료가 세균에 미치는 효과와 기전을 알아보기 위한 전자현미경적 관찰과 더 많은 연구가 필요하고 임상적 적용을 위한 체내실험도 추가되어야 할 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 원광보건대학 교내연구비 지원에 의해서 수행됨.

REFERENCES

- Barr H, Tralau CJ, MacRobert AJ, Krasner N, Boulos PB, Clark CG, Bown SG. photodynamic therapy in the normal rat colon with phthalocyanine sensitisation. *Br J Cancer*. 1987. 56: 111-118.
- Bedwell J, Holton J, Varia D, MacRobert AJ, Bown SG. *In vitro* killing of helicobacter pylori with photodynamic therapy. *The Lancet*. 1990. 335: 1287.
- Bertoloni G, Lauro FM, Cortella G, Merchat M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000. 1475: 169-174.
- Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005. 49: 4288-4295.
- Chambers HF. Methicillin resistance in *Staphylococci*: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1997. 10: 781-791.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth informational supplement. 2007. M100-S17. Wayne, PA, CLSI.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998. 90: 889-905.
- Foote CS. Type I and Type II mechanism of photodynamic action, in heitz JR and Dow-num KR (eds), *Light-activates Pesticides*. American Chemical Society, Washinton DC. 2. 1987. 2-38.
- Fuchs BB, Tegos GP, Hamblin MR, Mylonakis E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007. 51: 2929-2936.
- Georgopapadakou NH, Smith SA, Bonner DP. Penicillin binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strains resistant to specific beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999. 43: 15-22.
- Gois MM, Kurachi C, Santana EJ, Mima EG, Spolidório DM, Pelino JE, Salvador Bagnato V. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an *in vitro* study. *Lasers Med Sci*. 2010. 25: 391-395.
- Golding PS, King TA, Maddocks L, Drucker DB, Blinkhorn AS. Photosensitization of *Staphylococcus aureus* with malachite green isothiocyanate: inactivation efficiency and spectroscopic analysis. *J Photochem Photobiol B*. 1998. 47: 202-210.
- Grinholc M, Szramka B, Kurlenda J, Graczyk A, Bielawski KP. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *J Photochem Photobiol B*. 2008. 90: 57-63.
- Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *J Photochem Photobiol B*. 2004. 3: 436-450.
- Hong SG, Lee J, Yong D, Kim EC, Jeong SH, Park YJ, Choi TY, Uh Y, Shin JH, Lee WK, Ahn JY, Lee SH, Woo GJ, Lee K. Antimicrobial resistance of clinically important bacteria isolated from 12 hospitals in Korea. *Korean J Clin Microbiol*. 2004. 7: 171-177.
- Kim JS, Kim HS, Song WK, Cho HC, Lee KM, Kim EC. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated in 13 Korean hospitals. *Korean J Lab Med* 2004. 24: 223-229.
- Kim SG, Hong JW, Boo SH, Kim MG, Lee KD, Ahn JC, Hwang HJ, Shin JJ, Lee SJ, Oh JK, Chung PS. Combination treatment of Cetuximab and photodynamic therapy in SNU-1041 squamous cancer cell line. *Oncology Reports*. 2009. 22: 701-708.
- Kubin A, Wierrani F, Jindra RH, Loew HG, Grünberger W, Ebermann R, Alth G. Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and photofrin II on *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp Clin Res*. 1999. 25: 13-21.
- Kwon PS, Jo YK. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using various photosensitizer. *J Exp Biomed Sci*. 2009. 15: 233-239.
- Lee HM, Yong DE, Lee KW, Hong SG, Kim EC, Jeong SH, Park YJ, Choi TY, Uh Y, Shin JH, Lee WK, Lee J, Ahn JY, Lee SH, Woo GH. Antimicrobial resistance of clinically important bacteria isolated from 12 hospitals in Korea in 2004. *Korean J Clin Microbiol*. 2005. 8: 66-73.
- Machado AEH. Photodynamic therapy: principles, potential of application and perspectives. *Quimica Nova*. 2000. 23: 237-243.
- Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future. *Laser Med Sci*. 2007. 22: 83-91.

- Malamy MH, Horecker BL. Release of alkaline phosphatase from cells of *Escherichia coli* upon lysozyme spheroplast formation. *Biochemistry*. 1964. 3: 1889-1893.
- Mang TS. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*. 2004. 1: 43-48.
- Ochsner M. New trends in photo biology of photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol*. 1997. 39: 1-18.
- Peloi LS, Soares RRS, Biondo CEG, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci*. 2008. 33: 231-237.
- Phoenix DA, Sayed Z, Hussain S, Harris F, Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003. 39: 17-22.
- Raab O. Ueber die wirkung fluorizierender stoffe auf infusorien. *Z Biol*. 1900. 39: 524-646.
- Rodnei RD, Juliana JC, Santos EL, Costa AC, Jorge AO. Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. *Lasers Med Sci*. 2010. 25: 581-586.
- Tolstykh PI, Stranadko EF, Koraboev UM, Urinov AIa, Tolstykh MP, Terekhova RP, Volkova NN, Duvanskiĭ VA. Experimental study of photodynamic effect on bacterial wound microflora. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2001. 2: 85-87.
- Tomio L, Redi G, Joli PL, Zorat GB. Hematoporphyrin as a sensitizer in tumor photo therapy: effect of medium polarity on the photo sensitizing efficiency and role of the administration pathway on the distribution in normal and tumor bearing rats, in R. Pratesi and CA sacchi (eds), *Lasers in photoedicine and photobiology*, pringer-Verlag, Berlin. 1980. 76-82.
- Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DR, Wright PA. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1998. 15: 177-181.
- Schmitz FJ, Jones ME. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices?. *Int J Antimicrobial Agents*. 1997. 9: 1-19.
- Stranadko EF, Skobelkin OK, Litvin GD, Astrakhankina TA. Photodynamic therapy of human malignant tumors: a comparative study between photohem and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine. *Proc SPIE*. 1996. 2625: 440-448.
- Sutherland R, Boon RJ, Griffin KE, Masters PJ, Slocombe B, White AR. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985. 27: 495-498.
- Yun HJ, Lee HW, Yoon GM, Kim SY, Choi S, Lee YS, Choi EC, Kim S. Prevalence and mechanisms of low- and high-level mupirocin resistance in staphylococci isolated from a Korean hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2003. 51: 619-623.
- Yoo JI, Shin ES, Cha JO, Lee JK, Jung YH, Lee KM, Kim BS, Lee YS. Clonal dissemination and mupA gene polymorphism of mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from long-term-care facilities in South Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006. 50: 365-267.
- Udo EE, Jacob LE, Mathew B. Genetic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing high- and low-level mupirocin resistance. *J Med Microbiol*. 2001. 50: 909-915.
- Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998. 42: 13-28.
- Webber J, Herman M, Kessel D, Fromm D. Current concepts in gastrointestinal photodynamic therapy. *Ann Surg*. 1999. 230: 12-23.
- Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res*. 1976. 36: 2326-2329.