

In vitro에서의 *Malassezia pachydermatis*의 성장에 대한 혈청과 Transferrin의 억제효과

김진영

런던 왕립 수의과대학 피부과교실

The Effect of Serum and Transferrin on the Growth of *Malassezia pachydermatis in vitro*

Jin-young Kim

Dermatology Unit, Department of Small Animal Medicine and Surgery,
Royal Veterinary College University of London, North Mymms, Hertfordshire, AL9TA, UK

Abstract : The inhibitory effect of pooled canine serum on the growth of ten strains of *Malassezia pachydermatis in vitro* was investigated. Studies were also carried out to observe the effect of different concentrations of unsaturated bovine transferrin on *Malassezia* growth in vitro. Ten strains of *Malassezia pachydermatis* in normal canine serum (11.1%, 44.4%) were found to significantly inhibit the growth ($p < 0.0005$) not only in a dose dependent but also in a time dependent manner. The same strains of yeast treated with 1, 2, 4 and 8 times the normal value of serum transferrin (3.0 mg/ml, 6.0 mg/ml, 12.0 mg/ml, 24.0 mg/ml), were shown to have significantly lower OD readings ($p < 0.05$) when compared to yeast treated in lower concentrations of transferrin (1.5 mg/ml). The optical density (OD) of the ten strains of yeast were significantly lower ($p < 0.005$) when treated with various concentrations of transferrin than with the saline control except at 72 hours post incubation. These results indicate that serum has inhibitory effects on *Malassezia pachydermatis* growth in vitro, and transferrin is one of the components that contribute towards this inhibitory role. The inhibitions are dose and time dependent.

Key words : *Malassezia pachydermatis*, serum, transferrin

서론

*Malassezia pachydermatis*가 개에서 피부염을 일으키는 원인으로 처음 인식된 것은 20여년 전이다. *M. pachydermatis*는 비침습성 지질 비의존성 진균류로, 각질층의 표면에 존재한다¹⁰. 또한 정상견과 고양이의 피부와 이도, 항문낭, 직장 그리고 질 내에서 발견된다^{14,15}. *M. pachydermatis*는 개와 고양이에서 *Malassezia dermatitis*의 원인균으로 피부과민증과도 밀접한 관계가 있다^{8,15}. 따라서 지금까지의 대부분의 연구는 주로 *M. dermatitis*의 진단이나 치료에 초점을 두고 이루어져 왔다^{3,4,5,16}. 그러나 *Malassezia*와 숙주인 개의 피부의 상호작용에 대한 연구는 미미한 편이다.

이전에 이루어진 연구에서는 혈청이 세균과 진균에 대하여 강력한 성장 억제력과 살진균력이 있다²¹는 것을 보여주고 있다. 진균류에 대해서는 혈청은 각질층 아래로 침투해 들어가는 것을 억제하며 *Candida albicans*에 대해서는 응결시킨다는 것이 알려졌다¹³.

Transferrin은 혈청 내와 땀속에 존재하는 철분을 운반하는 분자²로 난백이 세균의 성장을 억제하고 그런 억제력은 철분을 첨가하면 없어진다는 것이 알려지면서 발견되었다¹⁸. 그리

고 혈청 transferrin은 주로 항candida 기능을 가지고 있다는 것이 이전의 연구에서 밝혀졌다²⁰. 또한 β -globulin class에 속하는 혈청단백질인 transferrin이 다양한 미생물에 대해 미치는 성장 억제 효과에 관여한다는 것이 잘 알려져 있다. 어떤 진균들에 대해서는 억제 인자의 역할을 하는 것으로 추측되고 있다¹¹. Transferrin은 쉽게 철이온(ferrous ions)과 결합하며 이로 인해 미생물의 성장에 필수인 철을 제거한다⁶.

이 연구의 목적은 혈청과 transferrin이 dermatophyte와 *Candida albicans*의 성장을 억제한 것처럼 *Malassezia*에 대해서도 같은 효과를 보이는지 평가하고자 하는 것이었으며, *in vitro*에서 접종되었을 때 개 혈청이 *M. pachydermatis*의 성장에 미치는 영향에 대하여 밝혀 각질층에만 존재하는 이유와의 연관성을 살피고자 하였다. 이를 위하여 혈청의 *M. pachydermatis* 성장 억제 효과의 정도를 결정하기 위해 실험을 수행하였다. 또한 혈청이 효모에 대한 성장의 억제에 관여했다는 것이 입증되면 혈청 내에서 발견되는 단백질인 transferrin이 이러한 억제역할에 기여하는 구성 성분인지 아닌지를 정립함으로써 *in vivo* 실험에 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

효모균주 및 배지

The Royal Veterinary College, University of London의

¹Corresponding author.
E-mail : kjunk215@hanmail.net

Queen Mother Animal Hospital에 피부병으로 내원한 서로 다른 10마리의 개에서 동정된 *M. pachydermatis*를 실험에 공여 하였다. 각각의 균주는 Malt extract agar(Oxoid CM59)에 접종하여³ 32°C에서 72시간동안 배양하고 일주일 간격으로 계대 배양하여 유지 하였다^{4,5}. 배양된 효모 세포를 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.2)로 희석시켜 멸균된 비주병에 넣고 혼탁도를 McFarland turbidity standard Kit (BIO MEREUXA/69280 Marcy l'Etoile/France)를 이용하여 McF 1에 맞추어 실험에 사용하였다. 배지의 선택, 접종물의 크기, 배양 온도, pH 등은 Rex 등¹⁶이 제시한 바와 같은 방법을 적용하였으며 실험에 사용될 효모의 초기농도는 또한 Rex 등¹⁶이 제시한 바와 같은 농도를 적용하였다.

혈 청

임상적으로 건강한 9마리의 개에서 채혈한 혈청을 모아 실험에 공여하였다. 채혈에 이용된 개들은 채혈 전 최소한 30일 동안 어떠한 전신적 항진균제를 투여 받은 적이 없는 개를 대상으로 하였다.

Transferrin

Unsaturated bovine transferrin(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA)을 사용하였다¹². transferrin은 멸균된 PBS에 용해시켜 실험에 사용하였으며 transferrin의 농도는 정상견에서 transferrin의 혈청농도인 3.0 mg/ml을 기준으로 하였다². 멸균 PBS를 이용하여 transferrin의 농도를 배수로 희석하여 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 mg/ml의 농도로 만들어 실험에 사용하였다.

혼탁도(Optical Density(OD))측정

Optical Density(OD)는 electronic plate reader(Multiscan MCC/340P, Version 2.20)를 이용하여 550 nm에서 측정하였다. 측정된 OD값은 균주가 접종되지 않은 기준 대조군의 OD값으로 보정하여 분석에 이용하였다.

예비실험

만들어진 효모 부유액은 실험에 공시하기에 적정한가를 확인하기 위하여 각각의 효모균주들을 25 µl씩 200 µl의 Sabouraud dextrose broth(SDB)에 접종하였다. Nunclon plate wells에 3배수 접종을 하였고 32°C에서 72시간동안 배양한 후 pellet 형성여부를 확인하고 Malta extract agar에 2차 배양하여 *M. pachydermatis*만이 자라는가를 확인하였다⁵.

실험(A). 개 혈청이 *M. pachydermatis* 성장에 미치는 영향: 10종의 효모균주를 각각 PBS를 이용하여 멸균된 비주병(bijju bottle)에 McFarland standard 1.0의 optical density(OD)값이 되도록 희석하여 부유액을 만들었다.

실험군 1은 Nunclon plate에 175 µl의 SDB를 3배수 분주하고 각각의 well에 동일하게 25 µl씩의 개 혈청과 25 µl씩의 효모 부유액을 접종하여 각 well내의 최종혈청농도가 11.1%가 되도록 하였다. 또한 동일한 양(175 µl)의 SDB를

3배수 분주한 well에는 혈청 대신 동량(25 µl)의 PBS를 분주하여 대조군 1로 배치하였다. 실험군 2는 100 µl의 SDB를 3배수 분주하고 각각의 well에 동일하게 100 µl씩의 개혈청과 25 µl씩의 효모 부유액을 접종하여 각 well내의 최종혈청농도가 44.4%가 되도록 하였다. 다시 동일한 양(100 µl)의 SDB를 well에 3배수 분주하고 혈청 대신 동량(100 µl)의 PBS를 분주하여 대조군 2로 배치하였다.

OD값을 보정하기 위하여 효모를 첨가하지 않은 군과 효모와 혈청을 첨가하지 않은 군을 well에 3배수로 각각 배치하였다. 그후 plate를 32°C에서 배양하여 72시간, 144시간, 240시간째 각각의 OD값을 측정하였다.

실험(B). Unsaturated bovine transferrin의 농도차이에 따른 *M. pachydermatis*에 대한 효과: 10종의 효모 부유액을 전 실험에서와 동일한 방법으로 McFarland standard 1.0의 OD값이 되도록 만들었다. 100 µl의 SDB를 60 Nunclon Plate well에 분주하였다.

Transferrin은 PBS로 희석하여 각각 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 mg/ml 농도 용액으로 만들어 100 µl씩 SDB가 분주된 Nunclon plate well에 각 농도별로 3배수 분주한 후 10종의 효모 부유액을 25 µl씩 접종하였다. 대조군에는 transferrin대신 PBS를 100 µl(transferrin 0 mg/ml)씩 3배수 분주한 후 10종의 효모 부유액을 각각의 well에 접종하였다. 효모를 접종하지 않은 군과 효모와 transferrin 모두 접종하지 않은 군을 각각 배치 하였다. OD값은 32°C에서 72, 96, 120, 144, 216시간째에 측정하였다.

통계분석

측정된 OD값은 Microsoft Excel Software와 UNISTAT version 3.0 statistical software package (Unistat Ltd., London, UK)를 이용하여 분석하였다. 데이터는 효모를 접종하지 않은 대조군의 OD값으로 보정하여 분석에 사용하였다. Pooled Variance *t*-Test와 ANOVA를 사용하여 검증하였다. 최대허용 표본오차는 95% 신뢰수준에서 $p < 0.05$ 인 것을 채택하였다.

결과 및 고찰

실험(A). 개 혈청이 *M. Pachydermatis* 성장에 미치는 영향: OD값을 측정하기 전에 육안으로 pellet 형성을 확인하여 비교하였다(Table 1). 72시간 배양 후의 혈청농도 11.1% (25 µl)군은 대조군(PBS 25 µl)과 비슷하게 pellet을 형성한 것을 볼 수 있었다. 그러나 혈청농도 44.4%(100 µl)군의 경우에는 모든 well에서 전혀 pellet이 형성되지 않았다. 144시간, 240시간 배양 후의 혈청농도 11.1%(25 µl)군은 모든 well에서 pellet이 형성되었으나 대조군(PBS 25 µl)과 육안적으로는 구분할 수 없었다. 그러나 혈청농도 44.4%(100 µl)군은 소수의 well에서 약간의 pellet이 형성된 것을 볼 수 있었으나 대조군(PBS 100 µl)에 비교하여 현저하게 pellet 형성이 억제되어 있는 것을 볼 수 있었다.

Table 1. Visual comparisons of *M. pachydermatis* inoculated with 25 μ l (11.1%) and 100 μ l (44.4%) of serum

Well	Visual comparison of <i>M. pachydermatis</i> growth ^a											
	25 μ l serum(11.1%) ^b			25 μ l PBS ^c			100 μ l serum(44.4%) ^d			100 μ l PBS ^e		
	72 hrs											
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Strain A	-/+	-/+	-/+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Strain B	-/+	-/+	-/+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Strain C	++	++	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain D	-/+	-/+	-/+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Strain E	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Strain F	-/+	-/+	-/+	+	+++	++	-	-	-	++	+	+
Strain G	-/+	-/+	-/+	++	++	++	-	-	-	++	+	+
Strain H	-/+	-	-/+	+	++	++	-	-	-	++	++	++
Strain I	++	++	++	+	+++	+++	-	-	-	++	++	+
Strain J	-	-/+	-	+	++	++	-	-	-	+	+	+
144 hrs												
Strain A	++	++	+++	++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	++
Strain B	+	++	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain C	++	++	++	++	+++	++	-	-	-	+++	++	+++
Strain D	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-/+	+++	+++	+++
Strain E	++	++	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain F	++	++	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain G	++	++	+	++	+++	++	-	-	-/+	++	+++	+++
Strain H	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain I	++	+++	++	+++	+++	+++	-	-/+	-	+++	+++	+++
Strain J	++	++	+++	++	+++	+++	-	-	-	++	++	+++
240 hrs												
Strain A	++	++	++	+++	+++	+++	-/+	-	-	+++	+++	+++
Strain B	+	+	+	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain C	++	++	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-/+	-/+	+++	+++	+++
Strain E	++	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain F	+++	++	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain G	++	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-/+	+++	+++	+++
Strain H	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Strain I	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-/+	-	+++	+++	+++
Strain J	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++

^aYeast growth in wells:- : No growth -/+ : Very slight growth + : Mild growth
++ : Moderate growth +++ : Marked growth^{b,c}Wells inoculated with 175 μ l SDB.^{d,e}Wells inoculated with 100 μ l SDB.^{c,e}Control with yeast in PBS

Plate reader를 이용하여 측정된 OD값을 이용하여 그림 1과 같은 결과를 얻었다. 72시간 배양후의 혈청농도 11.1% (25 μ l)군은 대조군(PBS 25 μ l)과 유의한 차이가 없어 육안 비교와 같은 결과를 보였다. 그러나 혈청농도 44.4%

(100 μ l)군의 경우에는 대조군(PBS 100 μ l)에 비해 유의하게 낮은 OD값을 나타내 이 농도에서 효모의 성장이 억제되고 있음을 알 수 있었다($p < 0.05$). 그러나 144시간 배양 후의 혈청농도 11.1%(25 μ l)군의 OD값은 대조군(PBS 25 μ l)에

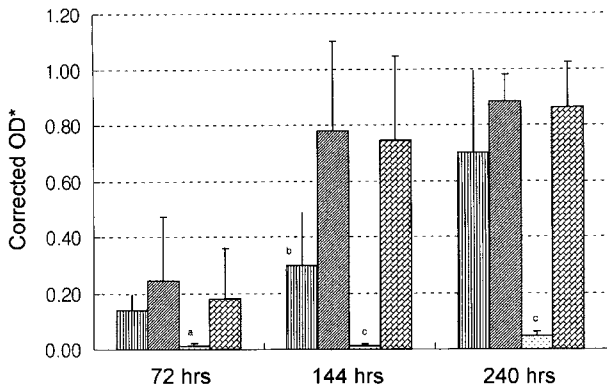


Fig 1. Mean Optical density(OD) *M. pachydermatis* inoculated with 25 µl (11.1%) and 100 µl (44.4%) serum.
 ||| 25 µl yeast inoculated with 25 µl serum and 175 µl SDB,
 // 25 µl yeast inoculated with 25 µl PBS and 175 µl SDB,
 ⊞ 25 µl yeast inoculated with 100 µl serum and 100 µl SDB,
 ▨ 25 µl yeast inoculated with 100 µl PBS and 100 µl SDB
 *Mean OD readings of triplicate culture of 10 strains±SD N = 30
 Comparison with PBS at each time point ^aP<0.05, ^bP<0.005, ^cP<0.0005

비하여 유의하게 낮게(p<0.005) 나타나 효모의 성장 억제가 이루어지고 있음을 알 수 있다. 혈청농도 44.4%(100 µl)에서는 여전히 현저히 낮은 OD값을 나타냈다(p<0.0005). 240시간 배양 후의 혈청농도 11.1%(25 µl)군의 OD값은 다시 증가해서 대조군(PBS 25 µl)과 유의한 차이가 없었다. 그러나 혈청농도 44.4%(100 µl)군은 계속해서 대조군(PBS 100 µl)

에 비하여 현저하게 낮은(p<0.0005) OD값을 나타내 효모의 성장을 억제하고 있음을 나타내었다.

혈청농도 11.1%(25 µl)군의 경우에 시간의 경과에 따라 일시적으로 효모의 성장억제를 보였다가 다시 성장이 가속되는 것으로 나타났다. 이 실험의 결과로 볼 때 혈청은 농도의 존성 효모 억제효과와 시간의존성 성장 억제 효과를 동시에 가지고 있는 것을 알 수 있었다. 이것은 혈청 내에 억제인자에 대한 부(negative)효과를 증가함으로써 *Malassezia*의 성장을 쉽게 만드는 성장을 촉진하는 인자나 포도당과 같은 영양분이 요구되고 있다는 것을 암시한다. 혈청으로부터 탄수화물과 같은 성분을 제거하거나 더 다양한 혈청농도를 적용하는 방법을 통하여 이 인자를 확인하는 연구가 추후에 이루어져야 할 것이다.

또한 *Malassezia*성 피부염이 있는 개와 정상 개체가 같은 수준의 혈청억제 인자를 가지고 있는지 여부도 연구해야할 문제이다.

실험(B). Unsaturated bovine transferrin의 농도차이에 따른 *M. pachydermatis*에 대한 효과: Transferrin의 농도(0, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 mg/ml)에 따른 효모에 대한 성장 억제 효과를 배양 후 각각 72, 96, 120, 144, 216시간째에 OD를 측정하여 얻은 결과는 그림 2와 같다.

각 시간별 transferrin의 농도차이가 효모의 성장에 미치는 효과는 배양후 72시간째에는 각 군간의 OD값의 차이가 없어(p>0.5) 성장억제 효과가 나타나지 않았다. 배양후 96시간째에는 전 실험군이 대조군(0 mg/ml; PBS)에 비해 낮은 OD값을 나타냈으나 3.0 mg/ml, 12.0 mg/ml, 24.0 mg/ml군만이 대조군(0 mg/ml; PBS)과 유의한 차이를 나타냈다

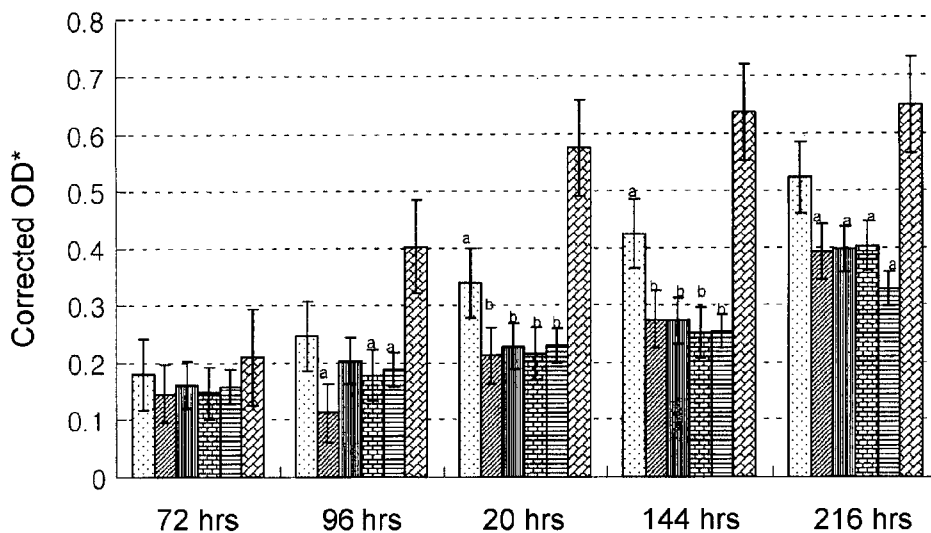


Fig 2. Mean optical density measured in *M. pachydermatis* inoculated into 0 mg/ml, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 mg/ml of transferrin at 72, 96, 120, 144, 216 hrs post incubation. ||| 1.5 mg/ml transferrin with 25 µl yeast in 100 SDB, // 3.0 mg/ml transferrin with 25 µl yeast in 100 SDB, ⊞ 6.0 mg/ml transferrin with 25 µl yeast in 100 SDB, ▨ 12.0 mg/ml transferrin with 25 µl yeast in 100 SDB, ▩ 24.0 mg/ml transferrin with 25 µl yeast in 100 SDB
 *Mean OD readings of triplicate culture of 10 strains±SD N = 30
 Comparison with PBS at each time point ^aP<0.05, ^bP<0.005.

($p < 0.05$). 그러나 120, 144시간째의 모든 농도군과 대조군(0 mg/ml; PBS)간의 OD값은 현저한 차이를 나타냈다($p < 0.005$). 240시간째에는 1.5 mg/ml군을 제외한 모든 군이 대조군(0 mg/ml; PBS)에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 이 결과에서 볼 때 transferrin의 혈청내 정상농도(3.0 mg/ml) 이상의 농도에서는 yeast의 성장에 대한 억제효과가 있음을 알 수 있다. 이것은 transferrin도 용량 의존성 작용을 한다는 것을 암시한다.

Transferrin은 용량 의존성 작용이외에도 시간 의존성 패턴을 나타내었다. 1.5 mg/ml군의 경우 배양 후 144시간까지는 대조군(0 mg/ml; PBS)에 비하여 유의하게 낮은($p < 0.05$) OD값을 나타내었으나 216시간째에는 다시 대조군(0 mg/ml; PBS)과의 차이가 없었다($p > 0.5$). 이것은 저농도의 혈청(11.1% 혈청)이 배양 후 144시간째엔 효모의 성장 억제 효과를 보이다가 이후에 다시 억제효과가 감소된 것과 같은 결과이다. 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 mg/ml군의 경우에는 비록 대조군(0 mg/ml; PBS)에 비하여 현저하게 낮기($p < 0.005$)는 하지만 전체적으로 서서히 증가하는 경향을 보였다. 특히 대조군(0 mg/ml; PBS)의 OD값은 시간의 경과에 따라 성장곡선이 완만해지는 경향을 보인 반면 3.0 mg/ml 이상 농도의 실험군에서는 미미하지만 계속해서 OD값이 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 *Malassezia*의 적응을 의미하며 transferrin이 시간 의존성 효과를 가지고 있다는 것을 암시한다고 볼 수 있다.

Transferrin의 억제효과는 효모 세포와 유한한 transferrin 분자의 수 사이의 상호작용에 의존하고 있다. 이것은 Artis 등¹이 transferrin과 혈청의 진균에 대한 정균력은 희석 될 수 있으며 정균력이 없어지는 희석농도는 활력을 가진 진균 포자가 얼마나 집중 배양되었는가에 따라 달라진다는 것을 관찰한 것과 일치하는 것이다.

Esterly 등⁹은 *Candida albicans*에 대한 transferrin의 억제 효과는 transferrin 단독으로 이루어지지 않는다고 했고 또 다른 연구에서는 혈청 내에 transferrin이 억제 효과를 나타내는 transferrin자극 인자가 존재하는 것 같다고 제시하였다¹⁷, 본 실험에서도 배양 후 72시간의 각 군간의 차이는 없었던 것을 제외하고는 96시간 이후의 결과에서는 *M. pachydermatis*에 대하여 transferrin이 단독으로 성장 억제 효과를 보이는 것으로 나타났다. *In vitro*에서 사람의 혈청은 정진균 특성이 있고 이것은 transferrin의 역할이라는 보고가 있다¹. 또 Shiraishi와 Arai²⁰는 transferrin의 항진균 활성이 사람의 transferrin이 토끼의 것보다 더 억제하는 것으로 나타났다고 하였다. 이것은 transferrin의 종에 따른 억제능의 차이가 있음을 암시하는 것으로 여러 가지 동물의 transferrin에 대한 평가가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 *in vitro* 연구는 혈청의 *M. pachydermatis*에 대한 억제효과에 관한 연구의 중요한 첫 번째 단계이다. *in vivo*에서의 혈청의 *M. pachydermatis*에 대한 활력과 비교해 봄으로써 숙주의 *M. pachydermatis*에 대한 상호 작용을 밝히고 효과적인 치료방법을 제시할 수도 있을 것이다. 혈청을 이용

한 접근은 보다 생체의 조건과 유사한 상태에서 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 그러나 철결합 당단백질이 존재하는 *in vitro*에서 완벽하게 성장하는 세균²¹ 때문에 생체내 혈청에서 이루어지는 것과 똑같은 결과를 얻기는 불가능한 것이 가장 큰 문제이다. 혈청 내에서 성장이 불가능한 이유는 아마도 효모가 transferrin으로부터 철을 분리해내지 못하기 때문일 것이다. *In vivo*에서 비세균성 병원체의 철을 획득하는 능력에 대해 알려진 것은 거의 없다. 또한 획득할 수 있는 철이 제한적인 환경에서 그들의 구조와 습성에 어떤 효과를 미치느냐 하는 것에 대한 연구도 미미하다⁶. 본 연구의 결과는 *Malassezia pachydermatis*가 각질층과 표피의 상층부에만 제한적으로 존재하는 이유를 설명하는 단초가 될 것이라고 생각한다. 또한 앞으로 이루어질 숙주인 개와 *M. pachydermatis* 사이의 상호작용에 대한 *in vivo*연구의 기초가 될 수 있을 것이라고 생각한다.

결론

혈청과 transferrin이 피부사상균과 *Candida albicans*의 성장을 억제한 것처럼 *Malassezia*에 대해서도 같은 효과를 나타내는지를 평가하고, *in vitro*에서 접종되었을 때 개 혈청이 *M. pachydermatis*의 성장에 미치는 영향에 대하여 밝히고자 혈청이 *M. pachydermatis* 성장 억제 효과의 정도를 확인하고, 혈청 내에서 발견되는 transferrin이 억제효과에 기여하는 구성 성분인지 아닌지를 확인한 실험의 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

고농도의 혈청(44.4%)은 실험 기간 내내 대조군(PBS)에 비하여 현저하게 낮은 OD값을 나타내어($p < 0.0005$) 효모의 성장을 억제하였고, 저농도의 혈청(11.1%)의 경우에는 시간의 경과에 따라 일시적으로 효모의 성장억제를 보였다가 다시 성장이 가속되는 것으로 나타나 혈청은 농도의존성 성장 억제 효과와 시간의존성 성장 억제효과를 동시에 가지고 있었다. 각 시간별 transferrin의 농도차이가 효모의 성장에 미치는 효과는 transferrin이 혈청내 정상농도(3.0 mg/ml) 이상의 농도에서는 효모의 성장에 대한 억제효과를 나타내어 transferrin도 용량의존성 작용이 있었다.

저농도(1.5 mg/ml)의 transferrin군은 배양 후 일정기간까지는 성장 억제효과를 나타내었으나($p < 0.05$) 216시간째부터는 다시 증식이 가속되어 저농도의 혈청(11.1% 혈청)에서 배양 후 144시간까지 효모의 성장 억제효과를 보이다가 이후에 다시 억제효과가 감소된 것과 같은 결과를 나타내었다. 특히 대조군(0 mg/ml; PBS)에서는 시간의 경과에 따라 성장곡선이 완만해지는 경향을 보인 반면 모든 농도(1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 mg/ml)의 실험군에서는 미미하였지만 계속해서 OD값이 증가하는 것으로 보아 효모에 대한 transferrin의 억제 성장 억제효과가 시간 의존성을 암시한다고 볼 수 있다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 혈청은 *in vitro*에서 *Malassezia pachydermatis*의 정상적인 성장을 억제하였으며

이것은 혈청의 억제효과 때문이라는 것을 알 수 있었다. 그리고 그 억제역할을 하는 성분중의 하나가 transferrin이며 정상 혈중 농도인 3.0 mg/ml 이상에서는 억제효과가 있다는 것을 알 수 있었으며, 이들의 효모에 대한 억제 효과는 농도의존적인 동시에 시간의존적이었다.

감사의 글

본 실험을 위하여 열성적으로 지도해 주신 영국 왕립 수 의과대학 피부과교실의 David H. Lloyd 교수와 Loss Bond 교수에게 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Artis WM, Patrusky E, Rastinejad F, Duncun RL Jr, Fungistatic mechanism of human transferrin for *Rhizopus oryzae* and *Trichophyton mentagrophytes*: Alternative to simple iron deprivation. *Infect Immun* 1983; 41: 1269-1278.
2. Bezkorovainy A, Biochemistry of Nonheme Iron. New York: Plenum Press, 1980.
3. Bond R, Collin NS, Lloyd DH, Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *J Small Anim Prac* 1994; 35: 68-72.
4. Bond R, Ferguson EA, Harvey RG, Chronic dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 5 dogs. *BSAVA Congress Proceedings* 1992: 238.
5. Bond R, Lloyd DH, Comparison of media and conditions of incubation for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *Res Vet Sci* 1996; 61: 273-274.
6. Bullen JL, Rogers HJ, Griffiths E, Iron binding protein and Infection. *Bri J Haematol* 1972; 23: 389-392.
7. Caroline L, Taschdijian CL, Kozinn PJ, Shade AL, Reversal of serum fungistasis by addition of iron. *J Investig Dermatol Sym Proc* 1964; 42: 415-419.
8. Dufait R, *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. *Veterinary Medicine SmallAnimal Clinician* 1983; 78: 1055.
9. Esterly NB, Brammer SR, Croonse RG, Relationship of transferrin and iron to serum inhibition of *Candida albicans*. *J Investig Dermatol Sym Proc* 1967; 49: 437-442.
10. Faergemann J, Lipophilic yeasts in skin disease. *Seminars in Dermatology* 1985; 4: 173-184
11. Hay RJ, Fungi and fungal infections of the skin. In: *Skin Microflora and Microbial Skin disease* 7th ed Cambridge: Cambridge University Press, 1992: 232-263.
12. King RD, Khan HA, Foye JC, Greenberg JH, Jones HE, Transferrin, iron, and dermatophytes. 1. Serum dematophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin. *J Lab Clin Med* 1975; 86: 204-12.
13. Louri DB, Smith JK, Brayton RG, Buse M, Anticandida factors in serum and their inhibitors: 1 Clinical and laboratory observations. *J Infect Dis* 1972; 125: 102-14.
14. Mason KV, Cutaneous *Malassezia*. In: *Current Veterinary Dermatology*, Griffin CE, Kwochka KW, MacDonald JM, ed St Louis: Mosby Year Book Inc, 1993: 44-48.
15. Muller WH, Scott DW, Griffin CE *Malassezia dermatitis*. In: *Muller & Kirk's Small animal dermatology* 6th ed Philadelphia: Saunders, 2000: 364-374.
16. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN, Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 367-381.
17. Rogers HJ, Bullen JJ, Cushrie GH, Iron compounds and resistance to infection. *Immunology*. 1970; 19: 521-538.
18. Schade AL, Caroline L, Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Sacharomyces cerevisiae*. *Science* 1944; 100: 14-15.
19. Scott DW, Miller WH, Epidermal dysplasia and *Malassezia pachydermatis* infection in West Highland White Terriers. *Vet Dermatol* 1989; 1: 25-36.
20. Shiraishi A, Arai T, Antifungal activity of transferrin. *Sabouraudia* 1979: 177-983.
21. Taylor PW, Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram-negative bacteria. *Microbiological Reviews* 1983; 47: 46-83.