

*Moraxella catarrhalis*의 광역학적 비활성화

동남보건대학 임상병리과¹, 단국대학교병원 진단검사의학과²

홍성노¹ · 권필승² · 김대식¹

Photodynamic Inactivation of *Moraxella catarrhalis*

Seong-No Hong¹, Pil-Seung Kwon², and Dae-Sik Kim¹

Department of Clinical Laboratory Sciences, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea¹

Department of Laboratory Medicine, Dankook University Hospital, Cheonan 330-715, Korea²

The aim of this study was to evaluate the bacterial effects of *Moraxella catarrhalis* in otitis media with effusion (OME) by photodynamic therapy (PDT). Bacterial suspensions (10000 CFU/mL) were prepared. The colony forming units (CFU) of *Moraxella catarrhalis* have been measured after an application of photogem plus 632 nm diode laser irradiation. One ml of the bacterial suspensions have been incubated in the dark for 3h with various concentrations of photogem (0.625~5.0 µg/mL) and then irradiated with 632 nm diode laser (15 J/cm²). After, the PDT *Moraxella catarrhalis* suspensions (50 µL) were inoculated on chocolate agar plate and cultured in the dark at 37°C, 5% CO₂ condition for 18h. The colony forming units of the bacteria were measured. Also transmission electron microscopy (TEM) was employed to evaluate the effect of otitis media pathogens by PDT. The nucleus of *Moraxella catarrhalis* was stained using green fluorescent nucleic acid dye thiazole orange and the fluorescence intensity of the nucleus was measured by flow cytometry. The PDT was effective in killing *Moraxella catarrhalis* at the photogem dose of 5.0 µg/mL, respectively. As assessed by flow cytometry analysis the fluorescence intensity of the nucleus got lower after PDT. TEM result appeared to be able to cause damage to the bacterial membranes. On the basis of these findings, bacterial photodynamic therapy with photogem can be considered to be a promising new therapeutic approach for OME.

Key words : Photodynamic therapy, Photogem, Otitis media, *Moraxella catarrhalis*

I. 서 론

*Moraxella catarrhalis*의 감염은 삼출성 중이염, 상악동염, 폐렴, 노인의 만성 기관지염 등을 악화시키는 세균으

로 알려져 있다(Marrs 등, 2001; Daines 등, 2003; Murphy 등, 2004). 이런 병변들의 치료는 항생제를 사용하는 치료 가 대부분이며, 현재 항생제 오남용으로 인한 항생제 내성세균이 큰 문제로 여겨지고 있다. 특히 한국에서 분리되는 대부분의 *M. catarrhalis* 균주가 β-lactamase를 생성하는 균이기 때문에 *M. catarrhalis* 감염이 문제가 되고 있고 삼출성 중이염의 환자에게서 검출되는 대표적인 균

교신저자: 권필승 (우)330-715 충남 천안시 안서동 산16-5,
단국대학교병원 진단검사의학과
Tel : 041-550-6666
E-mail : k-250@hanmail.net

이다.

최근 암 치료에 사용하던 광역학 치료법을 세균 감염의 치료에 사용하려는 시도가 일부에서 진행되었다 (Martinetto 등, 1986; Bertoloni 등, 1992; Wilson, 1993; Desimone 등, 1999). 광역학 치료란 광감각제와 레이저를 이용하여 대상 특성세포나 세균을 사멸시키는 치료법으로 이런 원리균을 광역학 치료를 이용하여 병원성 세균을 완전히 박멸시킨다면 병원성 세균의 감염환자의 치료에 매우 효과적인 치료방법 중에 하나가 될 것이다. 현재 광역학 치료를 이용한 병원성 세균치료는 전 세계적으로 시작단계이고 일부 연구자들은 체외와 체내실험으로 세균을 사멸시키는 것이 가능하다고 보고하였다 (Martinetto 등, 1986; Bertoloni 등, 1992; Wilson, 1993; Desimone 등, 1999). 그러나 또 다른 저자들은 그람음성 세균들은 특별한 세포벽 때문에 광역학 치료에 효과가 없다고 지적했다. Willson(1993)은 그람양성, 그람음성균들에서 cyanide 광감각제의 효과를 입증했다. 그런 반면에 Bertolini 등(1984)은 그람음성세균으로부터 포피린 (porphyrin)이 함유된 광감각제의 활성화에는 제한적이라고 보고되었다.

이 연구에 사용된 *M. catarrhalis*은 그람음성쌍구균이며 β -lactamase를 생성하는 균이다. 본 연구에서는 hematoporphyrin 계열의 Photogem™(Lomonosov Institute of Fine Chemical, Russia)과 632 nm의 파장을 내는 다이오드 레이저를 사용하여 *M. catarrhalis*의 광역학 치료효과를 보고자 하였으며, 세균의 특성상 하나의 집락이 있어도 빠른 복제와 성장이 일어나는 것을 감안하여 완전히 사멸시키는 것에 역점을 두었다. 지금까지의 박테리아 광역학 치료에서는 완전사멸을 목적으로 하는 연구는 없었으며 광역학 치료를 이용한 그람음성균인 *M. catarrhalis*의 살균능을 알아보려 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용된 균주

*M. catarrhalis*는 ATCC43617 표준균주로써 β -lactamase를 생성하는 균주를 사용하였다.

2. 광원과 광감각제

광원은 광감각제가 최대 광독성능을 나타내는 632 nm diode laser(Ceralas, Biolitec, Jena, Germany)를 사용하였고, 0.5 W의 세기로 1 cm cylindrical diffuser tip을 메탈 박스 안에 설치하여 단위면적당 에너지세기를 power meter로 측정하여 0.83 mW/cm²이 되도록 조정하였다. 이 에너지의 빛을 30분간 총 15 J/cm²의 에너지를 조사하였다.

광감각제로써 사용된 Photogem™(Lomonosov Institute of Fine Chemical, Russia)을 사용하였고 멸균된 PBS (phosphate buffered saline)에 녹여서 -20℃의 냉동실에서 고농도(1000 mg/mL)로 보관하였다.

3. 살균능 측정과 분석

1) 광역학 처리 효과 분석

냉동보관된 Photogem™을 암실에서 실온으로 15분정도 녹인 후 최대한 빛을 차단하면서 10 µg/mL가 되게 멸균된 PBS를 사용하여 희석하였다. 표준균주를 Mueller-Hinton broth를 사용하여 1.5×10⁴ CFU/mL가 되게 세균희석액을 만들어 사용하였다. 7개의 멸균시험관을 준비하고, 동일 부피의 세균희석액을 분주하였다. 하나의 세균액을 10 µg/mL Photogem™과 1:1로 혼합한 후 다른 3개의 세균액에 2배 계단 희석하여 최종 Photogem™ 농도가 각각 5, 2.5, 1.25, 0.625 µg/mL이 되도록 하였다. 하나의 세균액은 아무런 처리를 하지 않은 대조군으로 하였고, 하나의 세균액은 광감각제만, 그리고 나머지 한 시험관은 레이저 조사만을 실시하였다. 각 세균액을 5% CO₂와 37℃의 온도가 유지되는 배양기(ThermoForma, Ohio, USA)에서 3시간 배양하였다. 광역학 처리는 632 nm diode 레이저로 15 J/cm²의 에너지를 조사하였고, 4개의 실험군은 모두 각 처리가 끝나는 즉시 chocolate agar plate에 50 µL씩 분주하고 유리재질 spreader를 이용하여 접종하였다. 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양한 후 집락을 계산하여 살균능을 판정하였다.

(2) 투과전자현미경

광역학 처리에 의한 세균의 형태변화를 관찰하기 위하

여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 살균효과를 보인 광감작제 농도(5.0 µg/mL)에서 세균희석액을 광역학 처리한 다음, 대조 세균희석액과 함께 동량의 5% glutaraldehyde(pH7.4)로 4°C에서 12시간 동안 전 고정하였다. ×5000 g에 20분간 원심분리하고 상층액은 버린 후 얻어진 침사에 2% osmium tetroxide 용액 1 mL을 첨가하고 1시간 동안 후 고정을 실시하였다. DPBS용액으로 2회 세척하고 그 후 에탄올로 탈수시키고 Eponate로 포매하였다. 60°C 오븐에서 40시간 경화시켰다. Block을 ultramicrotome을 이용하여 0.4 µm 두께로 준초박절편을 만들고 이를 toluidine blue로 염색 후 광학현미경으로 정확한 부위를 확인한 다음 50 nm 두께의 초박절편을 만들었다. Uranyl acetate와 lead acetate로 이중염색을 하였다. 투과전자현미경(H-7000B, HITACHI, Tokyo, JAPAN) 75 KV로 광역학 처리한 것과 대조군의 세균 형태를 비교 관찰하였다.

(3) Bacterial flow cytometry analysis

광역학 처리에 대한 세균 DNA의 손상정도를 측정하기 위하여 광독성 시험과 동일하게 처리된 7개 조건의 세균을 유세포분석을 실시하였다. 각 세균액을 원심하여 균 침사를 만든 후 stain buffer를 이용하여 세균의 농도를 1.5×10⁶ CFU/mL가 되게 맞추었다. 이렇게 준비된 각 시험관을 다시 한 번 stain buffer 1 mL씩 첨가한 후 가볍게 혼합 후 1300 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버린 후 침사층에 stain buffer 0.2 mL 씩 각 균주에 분주한 후 염색시약 Thiazole orange solution을 5 µL씩 분주하고 vortex 한 후 5분 동안 실온에서 항온시켜서 염색하였다. 그 후 flow cytometry(FACSCAN, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)으로 분석하였다. 사용된 레이저 파장은 488 nm의 laser excitation이었으며 분석기의 초기 instrument setting은 threshold-SSC, FSC-E01, SSC-375V, FL1-600V, FL3-800V이었다. 분석프로그램은 BD사 CellQuest-pro를 사용하였다.

III. 결 과

1. 광역학 처리 효과

대조와 광조사만 실시한 것, 그리고 광감작제만 처리한 것에서는 10⁴ 이상의 colony가 형성되어 차이를 볼 수 없었다. 그러나 광역학 처리를 한 균주 희석액들은 PhotogemTM의 농도 5 µg/mL에서는 완전히 사멸되어 colony형성이 없었다. 2.5 µg/mL 농도에서는 15개의 colony가 나왔고, 1.25 µg/mL PhotogemTM의 농도에서는 2.4×10²의 colony가 측정되었고 0.625 µg/mL에서는 10⁴ 이상의 colony가 측정되었다(Fig. 1).

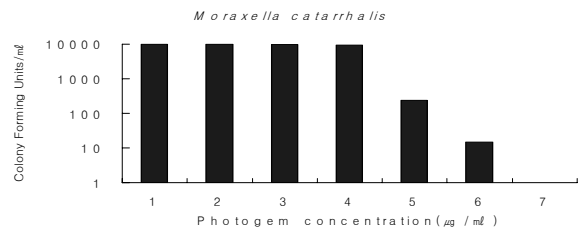


Fig. 1. Photodynamic effects on the viability of *M. catarrhalis*. The *M. catarrhalis* suspensions with various concentrations of photogem and then irradiated with 632nm diode laser (15 J/cm²). 1. Untreated bacteria suspensions; 2. Irradiated alone; 3. Photosensitizer alone (photogem concentration of 5 µg/mL), 4. PDT with 0.625 µg/mL photogem; 5. 1.25 µg/mL; 6. 2.5 µg/mL; 7. 5.0 µg/mL.

2. 투과전자현미경의 형태분석

광역학 처리 전의 *M. catarrhalis* 모습은 세포막이 선명하게 관찰되었으나(Fig. 2A) 광역학 치료가 끝난 *M. catarrhalis*는 분열되는 모양이 보였고, 대부분의 세균들은 세포막의 일부분이나 대부분이 파괴되었다(Fig. 2B). 그리고 염색상이 얇게 보이며 세포질 내의 구조물이 비어 있는 것처럼 보이는 경우도 일부 있었다(Fig. 2C).

3. Bacterial flow cytometry analysis

Fig. 3.에 대조군과 저농도(0.625 µg/mL) 광감작제로 광역학처리를 한 세균과 고농도(5.0 µg/mL) 광감작제 광역학 처리를 한 세균군의 유세포 분석 결과를 염색강도와 계산수로 나타내었다. X축은 thiazole orange solution에 염색된 세균 DNA의 염색강도로서 강도가 셀수록 생명력이 뛰어나다고 생각할 수 있다. Y축은 세균의 개체

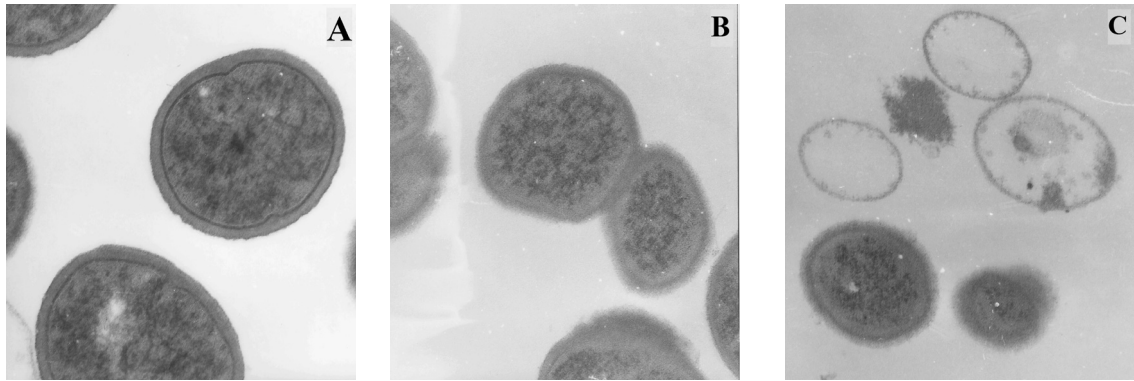


Fig. 2. Ultrastructural changes in otitis media effusion pathogens treated with photodynamic therapy (A, B:×40000, C:×30000). A, Untreated control group; B and C, PDT was treated with photogem 5 µg/mL following 632 nm diode laser irradiation for 30minutes.

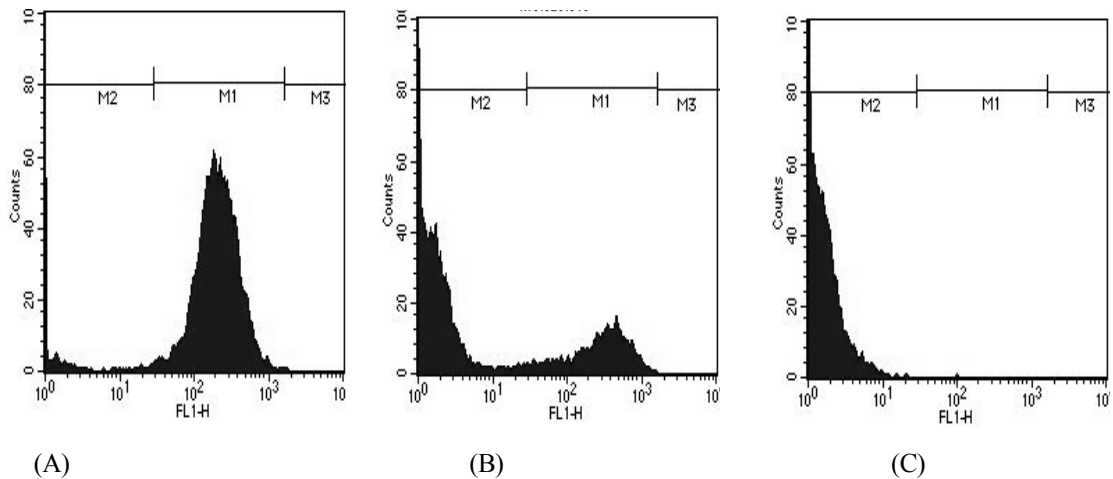


Fig. 3. Flow cytometry in *M. catarrhalis* treated with PDT. A, Untreated control group; B, PDT with 0.625 µg/mL photogem; C: PDT with 5 µg/mL photogem.

수를 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. 대조군의 분석 분획에서 정상적으로 집락을 형성하는 살아있는 영역을 M1으로 표시하였고, M2는 염색강도가 약하고 생명력이 떨어진 것을 선택하였다.

대조군 분석에서 M1이 92.3%, M2는 7.62%, 그리고 M3는 0.12%로 분포하였으며(Fig. 3A), 이는 광감작제만 처리한 균의 분석결과(M1, 93.5%; M2, 6.40%; M3, 0.1%)

나 레이저 빛만을 조사한 균의 분석결과(M1, 95.75%; M2, 4.22%; M3, 0.03%)와 큰 차이를 보이지 않았다.

광역학 처리에 따른 CFU 시험에서 광독성을 보여 집락수가 감소하기 시작한 광감작제 농도 0.625 µg/mL에서는 M1이 24.2%를 차지하고 M2는 75.63%를 차지하고 M3는 0%를 나타내어 대조군의 M1과 M3에 분포하던 세균이 M2로 변화된 결과를 보였다(Fig. 3B). 집락형성이 되지 않은 농도인 5 µg/mL에서는 M1이 0.15%를 차지하고 M2 99.84%를 차지하고 M3는 0.01%를 나타내어 대부분의 세균이 M2 상태로 변화된 것을 알 수 있었다(Fig. 3C).

IV. 고 찰

현재까지 이해되고 있는 중이염의 원인은 크게 3가지이다. 첫 번째는 바이러스와 미생물의 감염이고 두 번째는 중이와 상기도를 연결시키는 이관의 기능 부전이다. 다음 세 번째는 알레르기나 만성염증의 결과로 중이강내 과다한 분비물이 생성되는 경우이다. 현재까지 중이염의 치료로는 항생제 등의 약물치료와 환기튜브 삽입술 등이 있다. 이런 항생제 및 수술방법의 발달에 힘입어 화농성 중이염의 빈도는 감소추세에 있으나, 삼출성 중이염의 경우 오히려 증가하는 성향이 있어 소아 난청 및 언어장애의 중요한 원인이 되고 있다. 우리나라 소아의 삼출성 만성중이염 환자에서 세균의 검출 비율은 14%이고, 14% 중에 *Haemophilus influenzae* 29.1%, *M. catarrhalis* 10.8%, *Streptococcus pneumoniae* 4.7%가 검출되어 높은 검출률을 나타내고 있다(Park 등, 2004). 이런 세균이 광역학 치료로 인해 사멸되는 두 가지의 과정은 첫 번째는 DNA 손상이고 두 번째는 세포막 이동계통과 효소의 비활성으로 인한 세포성분의 약화에 따른 세포막의 손상이다(Michael 등, 2004). 그것은 다양한 광감작제와 광원이 DNA 손상을 일으켜서 세균의 비활성화에 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다. 단사슬이나 이중사슬 DNA의 파괴 그리고 그람음성균과 그람양성균이 여러 종류의 광범위한 구조형태를 지닌 광감작제와 광역학적 비활성 후에는 plasmid supercoiled fraction이 나타나지 않는 것이 발견되었다(Fiel 등, 1981; Menezes 등, 1990; Capella 등, 1996; Bertoloni 등, 2000). 그리고 Valduga 등(1999)과 Bertoloni 등(1990)은 세균의 사멸이 세포막단백의 변화 때문임을 보여주고 있다. 이들이 세균의 비활성화 기전이라 할 수 있는데 본 연구에서도 치료 후 투과전자현미경적 형태관찰은 세포막이 조금이라도 형태가 소실된 것이 대부분인 것이 나타났는데 이것은 세균에 치명적 손상을 주는 두 번째 기전인 세포막의 손상으로 사멸된 것으로 사료된다. 또한 TEM 관찰에서 세포막에 액포가 보이는 것으로 봐서 DNA 손상이 있었다고 사료되며 유세포분석 결과에서도 핵산의 염색강도가 약화된 것들이 이를 뒷받침해주고 있다. 지금까지 세균의 광역학 치료에는 1990년대에는 그람양성균과 그람음성균 사이에는 광역학 치료의 감수성이 기본적으로 틀리다는 것이 관찰되었다. 그람

양성균은 일반적인 중성이나 음성 광감작제 분자와 효과적으로 결합하고 광역학적 비활성이 일어나는 반면에 그람음성세균의 외막은 거의 대부분이 적은 범위에 결합하기 때문에 그람양성보다 광역학적 치료가 어려운 것으로 알려져 있다. 그람양성균종의 높은 감수성은 생리적이거나 세포막의 peptidoglycan이나 lipoteichoic acid와 같은 비교적 투과성이 좋은 층으로 둘러싸여있어서 감수성이 높은 것으로 설명된다(Nitzan 등, 1992). 삼출성 중이염을 일으키는 중요 세 가지 균주에 대해서는 연구 보고는 많지 않다. *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*는 methylene blue와 toluidine blue를 사용하여 광역학 치료를 시도하였다. 이 연구에서는 광감작제 toluidine blue와 methylene blue를 사용하고 광원은 Argon pumped-dye와 diode laser를 사용하여 여러 균종들의 광역학 효과를 실험하였다. 그 결과 methylene blue보다 toluidine blue가 1.5~7배의 저농도에서 광역학 효과가 있다고 보고했다(Usacheva 등, 2001). 본 연구에서는 PhotogemTM의 세균의 완전사멸의 농도를 결정할 수 있었으며 삼출성 중이염 원인균들에 대한 보다 광범위한 적용이 필요할 것으로 사료된다. 또한 여러 종류의 광감작제를 사용하여 이들 세균에 대한 살균능의 정도를 비교 평가하는 것이 필요하다고 생각되며 지속적인 연구가 진행될 것으로 평가되었다.

참 고 문 헌

1. Bertoloni G, Lauro FM, Cortella G, Merchat M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. *Biochem Biophys* 1475:169-174, 2000.
2. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, van Lier J. Photosensitizing activity of water and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 59:149-155, 1990.
3. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, van Lier JE. Photosensitizing activity of water-and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios* 71:33-46, 1992.
4. Bertoloni G, Salvato B, Dall-Acqua M, Vazzoler M,

- Jori G. Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. *J Photochem Photobiol* 39:811-816, 1984.
5. Capella AM, Coelho M, Menezes S. Effect of glucose on photodynamic action of methylene blue in *Escherichia coli* cells. *J Photochem Photobiol* 64:205-210, 1996.
 6. Daines DA, Cohn LA, Coleman HN, Kim KS, Smith AL. *Haemophilus influenzae* Rd KW20 has virulence properties. *J Med Microbiol* 52:277-282, 2003.
 7. Desimone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effects of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Phys Ther* 79:839-846, 1999.
 8. Fiel RJ, Datta-Gupta N, Mark EH, Howard JC. Introduction of DNA damage by porphyrin photosensitizers. *Cancer Res* 5:3543-3545, 1981.
 9. Marrs CF, Krasan GP, McCrea KW, Clemans DL, Gilsdorf JR. *Haemophilus influenzae*-human specific bacteria. *Front Biosci* 6:E41-E60, 2001.
 10. Martinetto P, Gariglio M, Lombard GF, Ficella B, Boggio F. Bactericidal effects induced by laser irradiation and hematoporphyrin against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *Drugs Exp Clin Res* 12:335-342, 1986.
 11. Menezes S, Capella A, Caldas LR. Photodynamic action of methylene blue: repair and mutation in *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol* 50:505-517, 1990.
 12. Michael R, Hamblin TH. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *J Photochem Photobiol* 3:436-450, 2004.
 13. Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 170:266-272, 2004.
 14. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *J Photochem Photobiol* 55:89-96, 1992.
 15. Park CW, Han JH, Jeong JH, Cho SH, Kang MJ, Lim KT, Lee SH. Detection rates of bacteria in chronic otitis media with effusion in children. *J Korean Med Sci* 19:735-738, 2004.
 16. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobacteriocidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg. Med* 29:165-173, 2001.
 17. Valduga G, Breda B, Giacometti GM, Jori G, Reddi E. Photosensitization of wild and mutant strains of *Escherichia coli* by meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl) porphine. *Biochem Biophys Res Commun* 256:84-88, 1999.
 18. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol* 75:299-306, 1993.