

임상분리균주에 대한 은 나노입자(NANOVER)의 생체의 항균력 시험

허운보¹, 이상훈², 이원길¹

경북대학교 의과대학 임상병리학교실¹, 이비인후과학교실²

배 경 : 은은 광범위하고 강력한 항균효과를 가진 것으로 잘 알려져 있으며 다양한 목적으로 의료분야에서 이용되고 있다. 최근 나노입자 크기의 은 입자가 개발되었고 항균력이나 세포독성 면에서 이전의 형태보다 우수한 성질을 가지고 있다. 흔한 임상 병원체에 대해 은 나노입자의 감수성을 연구한 국내 보고가 거의 없어 저자들은 임상분리균주에 대한 NANOVER의 항균력을 조사하였다.

방 법 : 대상 균주에 대한 NANOVER의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 CLSI 기준에 따라 한천희석법으로 구하였다. 임상분리균주는 모두 본원에서 분리된 것으로 *Staphylococcus aureus* 12주[methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 5주, methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) 7주], *Escherichia coli* 14주, *Pseudomonas aeruginosa* 15주였고 표준균주가 4주(*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212)로 총 45주를 실험하였다.

결 과 : *S. aureus*에 대한 MIC는 methicillin 내성 여부에 상관없이 모두 12.5 µg/mL이었고 나머지 균주들도 12.5에서 6.25 µg/mL 이하의 MIC를 보여주었다.

결 론 : 임상분리균주에 대한 NANOVER의 항균력은 강력하고 다른 항균제에 내성을 보이는 균주를 포함하여 광범위함을 알 수 있었다.

서 론

은은 강력한 항균효과를 가진 것으로 잘 알려져 있다. 또 그 항균력의 범위가 여러 종류의 세균에서부터 바이러스, 진균에 이르기까지 광범위하여[1,2] 오래전부터 은을 포함한 드레싱, 국소연고 등을 이용한 창상치료가 화상치료에서부터[3,4] 은을 입힌 기계적 밸브[5], 은을 주입한 요도 카테터[6], 중심정맥 카테터[7] 및 고막천공 튜브[8] 등과 같이 다양한 목적으로 의료분야에서 이용되고 있다. 또 은은 다양한 형태로 이용되고 있는데 그중에서도 나노입자 크기의 은 입자(silver nanoparticles)가 가장 최신 형태이며[9] 다른 형태와는 달리 세포독성이 없는 등 우수한 성질을 가지고 있다[10]. 흔한 임상 병원체에 대해 은 나노입자의 감수성을 연구한 국내 보고가 거의 없어 저자들은 임상분리균주에 대한 NANOVER

(BioPlus Co. Ltd., 포항, 대한민국)의 항균력을 조사하였다.

재료 및 방법

표준균주 4주와 임상분리균주 41주 총 45주를 대상으로 실험하였다. 임상분리균주는 모두 경북대학교병원에서 분리된 것으로 혈액, 객담, 농, 상처, 소변 등 다양한 검체를 대상으로 하였다. *Staphylococcus aureus*가 12주 [methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 5주, methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) 7주], *Escherichia coli* 14주 [extended spectrum β-lactamase (ESBL) 생성 균주 1주 포함], *Pseudomonas aeruginosa* 15주였다. 표준균주는 *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 각 1주를 사용하였다.

각각의 시험균주에 대해 NANOVER의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 기준에 따라 한천희석법으로 구하였다. Mueller-Hinton agar (아산제약, 서울, 대한민국)에 각각 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20,

접 수 일 : 06 / 8 / 17 게재승인일 : 06 / 9 / 18

교신저자 : 이원길

(700-721) 대구시 중구 삼덕동2가50번지

경북의대 임상병리학교실

TEL : (053)420-5292 FAX : (053)426-3367

E-mail : leewk@knu.ac.kr

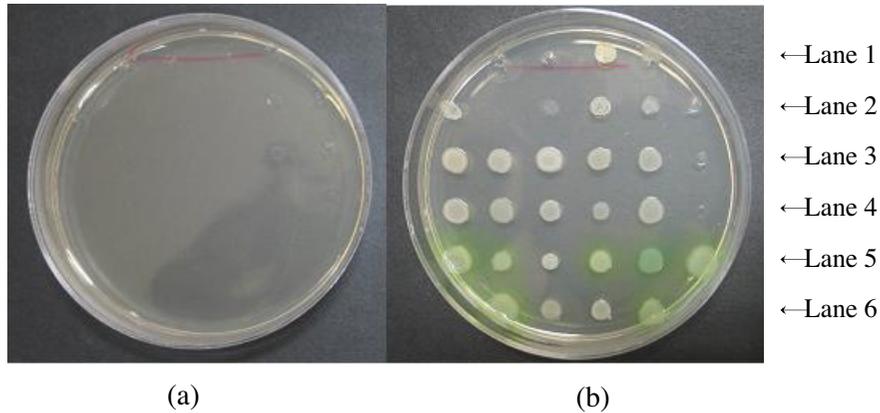


Fig. 1. Colonies of each strain at 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (a) and 6.25 $\mu\text{g/mL}$ (b) of NANOVER in susceptibility testing by agar dilution method. Lanes 1 and 2, *S. aureus* (7 strains); lanes 3 and 4, *E. coli* (10 strains); lanes 5 and 6, *P. aeruginosa* (10 strains).

0.10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 배수 희석한 NANOVER를 9:1 (배지:항균제)의 비율로 첨가하여 잘 교반하여 평판에 부은 후 균희서 감수성 검사를 위한 배지를 제조하였다. 각 균주를 Mueller-Hinton broth (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA)에 접종하여 McFarland No. 0.5의 농도로 맞추고 multiple inoculator를 사용하여 준비한 각각의 농도의 Mueller-Hinton 한천 배지에 동시 접종하였다. 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양한 후에 육안으로 집락이 관찰되지 않는 가장 낮은 농도를 MIC로 구하였다.

결 과

먼저 표준균주를 보면 *P. aeruginosa*에 대한 NANOVER의 MIC가 6.25 $\mu\text{g/mL}$, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*에 대해서는 모두 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 보여주었다.

임상분리균주에서는 *S. aureus*에 대한 MIC가 검체 종류와 methicillin 내성 여부에 상관없이 모두 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. *E. coli*의 경우는 4주에서 6.25 $\mu\text{g/mL}$, ESBL 생성 균주를 포함한 나머지 9주는 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 *P. aeruginosa*는 8주에서 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 나머지 7주는 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 보여주었다(Fig. 1). 그중에서 객담 검체로부터 얻은 *P. aeruginosa* 1 균주는 디스크 확산법에 의한 통상의 항균제 감수성 검사에서 tobramycin (MIC 4 $\mu\text{g/mL}$)을 제외한 모든 약제에 대하여 내성을 보인 균주였다. 내성을 보인 시험 약제의 MIC는 ciprofloxacin 4 $\mu\text{g/mL}$, gentamicin, imipenem 16 $\mu\text{g/mL}$, ampicillin, ampicillin/ sulbactam, aztreonam, cefepime, ceftazidime 32 $\mu\text{g/mL}$, amikacin, ceftriaxone 64 $\mu\text{g/mL}$, piperacillin/ tazobactam 128 $\mu\text{g/mL}$, piperacillin, ticarcillin/clavulanic acid 256 $\mu\text{g/mL}$, trimethoprim/sulfa-methoxazole 320 $\mu\text{g/mL}$ 으로 NANOVER의 MIC 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 보다 대부분 높았다. 환자는 폐의 소세포암으로 항암화학요법 치료 중 폐렴 발생하여 항생제 투여 중이었다. 이후 tobramycin 투여에도 불

구하고 패혈성 쇼크로 사망하였다.

고 찰

역사적으로 이미 6000년 전 이집트인들이 물을 오랜기간 보관할 때 은을 도금한 관을 이용하는 등 수천년 전부터 은은 항균력과 소독력이 있는 것으로 알려져 왔다 [11]. 은의 항균력은 유리되는 은 이온 때문인데 이것이 thiols, carboxylates, amides, imidazoles, indoles, hydroxyls 등과 같은 전자공여그룹과 작용하여 세포의 효소와 DNA를 불활성화 시키는 것으로 알려져 있다 [12]. 은은 또 세균의 세포벽과 세포막, 핵막에 구멍을 내는 등의 구조적 변화를 야기하여 투과도를 증가시키고 결국 세포를 죽게 한다 [9,13]. 또 은은 포유류 세포에 대해 독성이 낮고 세균 내성을 쉽게 일으키지 않는 것으로 알려져 있다 [14]. 그러나 비록 영구 손상이나 기능 장애를 일으키는 정도는 아니라 할지라도 상처부위나 간, 신장, 다른 장기 등에 색소 침착을 일으키는 등의 부작용도 보고되어 있다 [15].

은은 기본적인 은 원소나 은염, 은 복합물 등으로 구성된 중합체 형태로 주로 이용되어 왔는데 최근에는 5-50 nm의 나노입자 크기의 은 입자를 합성해내는 기술이 개발되었고 [16] 국내에서도 최근 질산은 용액으로부터 제조한 은 나노입자의 콜로이드 분산물질 NANOVER가 개발되었다. 은 나노입자의 항균력은 표면적과 밀접한 관련이 있으며 부피에 비해 상대적으로 큰 표면적을 가진 작은 입자일수록 항균력이 더 크다 [16]. 은 나노입자를 만드는 기술은 아직까지 보편적으로 널리 이용되는 기술이 아니어서 이를 이용한 연구가 아직 많이 보고되어 있지 않다. 하지만 화상 치료에서 nanocrystalline silver를 침착시킨 드레싱 법인 Acticoat (Smith & Nephew, Hull, UK)가 상품화되어 있고 이전의 silver sulfadiazine보다 화상부

위 감염이 적고 통증이 적어 더 오래 사용할 수 있는 것으로 보고되어 있다[17,18]. 또 은 나노입자로 만든 bone cement로 인공관절 성형술을 시도한 보고에 의하면 이전의 silver salt cement에 비해 세포독성은 낮고 통상의 항생제(gentamycin)를 포함한 bone cement보다는 항균력과 세포독성 모두에서 더 우수한 결과를 보여주었다[10]. 따라서 화상환자나 만성궤양, 당뇨병 궤양 등과 같이 혈액순환에 장애가 있는 환자들에서 우려되었던 색소 침착 등의 부작용을 비롯한 이전의 은 중합체들이 가지고 있었던 단점들도 은 나노입자 기술에서는 많이 보완될 것으로 생각된다.

은의 항균력에 대한 연구는 이와 같이 주로 인체의 국소 부위에 대한 실험이 대부분이고 임상분리균주에 대해 은의 감수성을 연구한 보고는 아주 드물어서 *Malassezia pachydermatis*에 대한 silver-sulphadiazine의 MIC가 0.25 µg/mL에서 64 µg/mL 이상(평균 16 µg/mL)으로 함께 실험한 clotrimazole, clotrimazole의 MIC(각 평균 0.06 µg/mL, 4 µg/mL)보다 높아 생체의 항균력이 이들 약제보다 낮은 것으로 보고된 정도이다[19]. 이번 실험에서는 *P. aeruginosa*가 분리된 1례의 객담 검체의 경우 NANOVER의 MIC가 12.5 µg/mL로 16 µg/mL 이상의 결과를 보인 통상의 대부분의 약제들의 MIC보다 낮았다. 이에 대해 다제내성 균주에 대한 NANOVER의 적용 가능성을 고려해 볼 수도 있겠으나 항균제의 MIC와 임상적 임계점은 서로 다르고 국소 투여가 아닌 혈액을 통한 전신적인 투여 시 항균력의 유지 여부를 알 수 없기 때문에 단정짓기는 어려울 것으로 보인다. 향후 임상분리균주를 대상으로 NANOVER의 MIC를 구한 자료들이 축적되고 국소 부위 뿐만 아니라 생체 내에서의 전신적인 항균력에 대한 연구가 잇따라야 할 것으로 생각된다.

흔한 임상분리균주에 대해 은 나노입자의 감수성을 연구한 국내 보고가 거의 없어 저자들은 임상분리균주에 대한 NANOVER의 항균력을 조사하였다. 실험한 모든 균주가 12.5 µg/mL 이하의 MIC를 보여 임상분리균주에 대한 NANOVER의 강력한 항균력을 확인하였다. 항균범위 또한 특정 균주에 국한되지 않고 다른 항균제에 강한 내성을 보이는 균주를 포함하여 광범위함을 알 수 있었다. NANOVER가 다양한 의료분야에서 이용될 수 있을 것으로 기대되며 진균을 비롯하여 더 많은 미생물에 대해 연구가 이루어지고 임상적 적용을 위한 다양한 시도가 있어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Fox CL Jr. Pharmacology and clinical use of silver sulfadiazine and related topical antimicrobial agents. *Phalavi Med J* 1977;8:45-64.
2. Russell AD and Hugo WB. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem* 1994;31:351-70.
3. Wright JB, Lam K, Hansen D, Burrell RE. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am J Infect Contr* 1999;27:344-50.
4. Adams AP, Santschi EM, Mellencamp MA. Antibacterial properties of a silver chloride-coated nylon wound dressing. *Vet Surg* 1999;28:219-2.
5. Cook G, Costerton JW, Darouiche RO. Direct confocal microscopy studies of the bacterial colonization in vitro of a silver-coated heart valve sewing cuff. *Int J Antimicrob Agents* 2000;13:169-7.
6. Rosch W and Lugauer S. Catheter-associated infections in urology: possible use of silver-impregnated catheters and the Erlanger silver catheter. *Infection* 1999;27:S74-7.
7. Jansen B, Rinck M, Wolbring P, Strohmeier A, Jahns. In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy and biocompatibility of a silver-coated central venous catheter. *J Biomater Appl* 1994;9:55-70.
8. Chole RA and Hubbell RN. Antimicrobial activity of silastic tympanostomy tubes impregnated with silver oxide. A double-blind randomized multicenter trial. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:562-5.
9. Ovington LG. Nanocrystalline silver: where the old and familiar meets a new frontier. *Wounds* 2001;13:5-10.
10. Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 2004;25:4383-91.
11. Loertzer H, Soukup J, Hamza A, Wicht A, Rettkowski O, Koch E, et al. Use of catheters with the AgION antimicrobial system in kidney transplant recipients to reduce infection risk. *Transplant Proc* 2006;38:707-10.
12. Holt KB and Bard AJ. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry* 2005;44:13214-23.
13. Sondi I and Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004;275:177-82.
14. Lansdown AB. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care* 2002;11:125-30.
15. Lansdown AB and Williams A. How safe is silver in wound care? *J Wound Care* 2004;13:131-6.
16. Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ, Shah SI. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2005;5:244-9.
17. Muangman P, Chuntrasakul C, Silthram S, Suvanchote S,

- Benjathanung R, Kittidacha S, et al. Comparison of efficacy of 1% silver sulfadiazine and Acticoat for treatment of partial-thickness burn wounds. *J Med Assoc Thai* 2006;89:953-8.
18. Ulkur E, Oncul O, Karagoz H, Yeniz E, Celikoz B. Comparison of silver-coated dressing (Acticoat), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass), and fusidic acid 2% (Fucidin) for topical antibacterial effect in methicillin-resistant staphylococci-contaminated, full-skin thickness rat burn wounds. *Burns* 2005;31:874-7.
19. Schmidt A. In vitro activity of climbazole, clotrimazole and silver-sulphadiazine against isolates of *Malassezia pachydermatis*. *Zentralbl Veterinarmed B* 1997;44:193-7.

In Vitro Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles (NANOVER) against Clinical Isolates

Woon Bo Heo¹, Sang Heun Lee², and Won Kil Lee¹

*Departments of Clinical Pathology¹, and Otorhinolaryngology², School of Medicine,
Kyungpook National University, Daegu, Korea*

Background: Silver has extensive and powerful antimicrobial activities and silver-containing materials have been widely used in many medical fields. Recently nanoparticulate silver was developed and it is superior to other types of silver in the antimicrobial activity and cytotoxicity. There have been no data from Korea on its antimicrobial activity, and we evaluated the antimicrobial activity of NANOVER against common clinical isolates.

Methods: Minimum inhibitory concentrations (MICs) of NANOVER for clinical isolates were determined using the agar dilution method of Clinical and Laboratory Standard Institute. A total of 45 isolates were tested including 4 reference strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), 5 strains of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), 7 strains of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), 14 strains of *E. coli*, and 15 strains of *P. aeruginosa*.

Results: The MICs of *S. aureus* to NANOVER were under 12.5 µg/mL regardless of the methicillin sensitivity or resistance. The other isolates showed the MICs under 12.5 to 6.25 µg/mL.

Conclusion: NANOVER has strong and extensive antimicrobial activities to common clinical isolates including those resistant to other antimicrobials.

(Korean J Clin Microbiol 2006;9(2):110-114)

Keywords: Silver nanoparticles, Antimicrobial activity, Minimum inhibitory concentrations

Address reprint requests to : Won Kil Lee, M.D., Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Kyungpook National University, 50 Samduk-dong 2-ga, Chung-gu, Daegu 700-721, Korea.
TEL. +82-53-420-5292 FAX. +82-53-426-3367 E-mail: leewk@knu.ac.kr