

光動力治療在微生物防治上的應用

黃慶臻/臺灣大學微生物與生化學研究所副教授

陳英琮/臺灣大學微生物與生化學研究所研究生

蔣佩芳/臺灣大學微生物與生化學研究所研究生

前言

當微生物細胞吸附在天然或人為系統的固體表面，微生物會利用周遭的水分及養分繁殖複製並分泌胞外的聚合物，這個現象會導致輸送阻力的增加，吸附材質的腐蝕，以及造成醫療器材的感染，不僅影響系統的性能，也對人體健康造成莫大的危害。而微生物吸附在固體表面與胞外聚合物形成的一層薄膜，就是所謂的生物膜。因此，微生物的防治事實上指的就是生物膜的防治。和懸浮狀態的微生物不同，生物膜具有極高的抗藥性，一般對懸浮細胞極為有效的殺菌劑對生物膜卻成效不彰。過去幾十年，研究人員積極地探討生物膜的抗藥機制，並研擬各式各樣的防治策略，其中光動力治療是最近興起，同時被認為極具潛力的一種方式。

一、生物膜及其抗藥性機制

(一) 生物膜

當微生物細胞吸附在含有水分的固體表面時，微生物會繼續生長複製，同時也會製造胞外的聚合物，這種由細胞及其胞外聚合物所組成且具有生物活性的薄膜就是所謂的生物膜 (biofilms)。生物膜一般具有下列特性：1. 生物膜係自然環境中微生物活性存在的主要形式；2. 生物膜的結構與活性具有高度的非均質性；3. 生物膜的非均質性會隨時間而變化。在許多人工 (engineered) 的系統中，生物膜的生成會造成一些負面的影響包括：1. 增加質量、熱量及動量輸送的阻力；2. 與吸附的表面起生物或化學反應，造成腐蝕的現象；3. 感染醫療器材，危害人體的健康。一般而言，生物膜的生成會導致系統操作不便、效率降低、使用年限減短及威脅生命健康等複雜情況。但另一方面，生物膜也是一種天然的固定化細胞，具有下列優點：1. 加速生質與產物的分離；2. 增加系統生質濃度；3. 提升整體產率。生物膜形成對人工

系統常見的影響請參見表一。

(二) 生物膜生成機制

生物膜係由微生物細胞及其分泌的胞外聚合物所組成。生物膜生成的機制，如圖一所示，是懸浮的微生物細胞吸附於固體表面，吸附的微生物細胞生長代謝，以及部分生物膜因外力而脫離 (detachment) 等三種程序綜合而成。細胞吸附於固體表面又可細分成：大分子有機質溶解並附著在固體表面上；細胞由液相輸送至固體表面，進行可逆或不可逆的吸附。細胞生長代謝則包括細胞生長、基質轉換及產生胞外聚合物。生物膜生成後也會因剪力 (shear force) 作用或化學逆境 (stress) 而脫離。

(三) 生物膜抗藥性機制

生物膜防治係微生物在人為系統造成危害中最困擾人們的一個問題。利用外力清除或使用抑制微生物生長的化學物質是生物膜防治時最常用的方法。用外力清除牽涉設備的停機，往往造成極大的損失，一般在大規模應用上並不實際。因此，生物膜防治的主要策略還是靠化學殺菌劑 (chemical biocides) 或抗生素將生物膜細胞殺死或將其由固體表面清除。可是，微生物一旦形成生物膜後，對生物抑制劑的抗藥性即大幅增強。一般而言，大致要 500 到 1000 倍的濃度才能達到跟懸浮細胞同樣的殺菌程度 (5)，而這種高劑量在實際應用上卻窒礙難行。對生物膜抗藥性機制的解釋，一般可分為三種：1. 輸送限制；2. 生理適應 (adaptation)；3. 細胞與細胞間聯繫。輸送限制係指微生物抑制劑在生物膜中被胞外聚合物中和或吸附 (adsorption) 較其擴散為快，實際與生物膜細胞起作用的微生物抑制劑遠低於原先的劑量 (35)。另一種解釋則是認為生物膜抗藥性是因為生物膜細胞的生理和懸浮狀態不同，生物膜細胞會為了適應環境而調整 (5)。最後則是細胞與細胞間聯繫，由於微生物細胞在高細胞濃度時會產生定額感應 (quorum sensing)

表一 常見生物膜影響之程序

程 序	影 響
生物膜生成於熱交換器	增加熱傳阻力，能量損失，效率降低
生物膜生成於溝渠、船體	增加摩擦阻力，能量損失，效率降低
生物膜生成於生物感應器	材料劣質化，減少使用壽命，效率降低
生物膜生成於飲用水管線	影響水質，危害公眾健康
生物膜生成於牙齒、肺部、尿道及其他生物醫學器材	影響健康，嚴重時導致死亡
從水及廢水中抽取及氧化有機、無機污染物	減少污染
礦物萃取	增進產率
生物科技產業固定化細胞	改善生產力及穩定性

的現象，進而啟動一些在濃度較低時不會表現的基因，而這些基因的表現又與抗藥性相關 (32)。

二、生物膜目前防治策略

以化學殺菌劑或抗生素處理是目前最主要的生物膜防治途徑，這方法雖然簡單，但仍有許多缺失。除了生物膜具有高度的抗藥性須使用較高劑量的殺菌劑或抗生素外，一旦停止使用，未完全殺死的微生物又會重新生長並生成生物膜。此外，長期使用化學物質或抗生素會增加微生物誘導產生新的抗藥菌株的機會。以物理或化學方法輔助增進殺菌效果是另一個努力的方向。以超音波 (12) 或低電壓 (14) 輔助增進抗生素輸送的效率，可改善生物膜防治的功效，目前仍在研發階段。以化學物質，2,4-dinitrophenol 或含鉍化合物抑制生物膜胞外聚合物的生成 (6, 13)，再以殺菌劑或抗生素處理，可提升殺菌的效果。

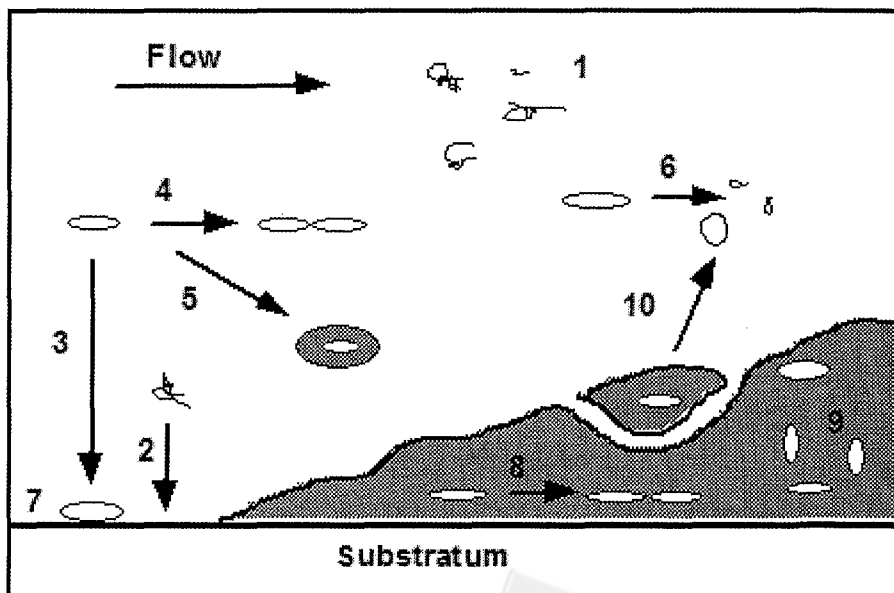
另外的一個策略是以定額感應訊號分子類似物阻斷細胞對細胞間的聯繫。定額感應是指細菌在生長過程中，當細胞密度達到一定閾值時，藉由細菌釋放至外界的自誘導物 (autoinducer) 濃度隨之增加而促使各細胞同時大量地表現某特定基因之現

象。大部分生物膜研究學者相信，細胞與細胞間的聯繫對生物膜抗藥性的機制扮演極為重要的角色 (32)。因此，研發以定額感應訊號分子類似物阻斷細胞對細胞間的聯繫以防治生物膜生成也是目前熱門的研究主題。

三、光動力治療 (Photodynamic therapy)

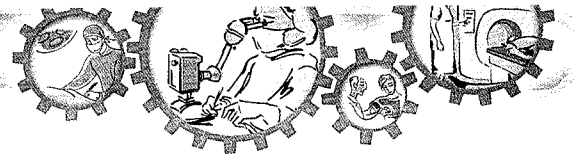
(一) 光感效應

光感效應 (photosensitization) 最早是二十世紀初



1. 有機大分子分解; 2. 大分子吸附; 3. 輸送; 4. 複製; 5. 產生胞外聚合物;
6. 微生物分解; 7. 吸附; 8. 複製; 9. 產生胞外聚合物; 10. 脫離。

圖一 生物膜形成的機制



期，由德國慕尼黑大學的研究人員以原生蟲為實驗材料所發現，這現象是指對生物體添加某些物質後（初期大多為細胞染劑，如 acridine, eosin），在沒有光線照射的情況下，這些物質對生物並無影響；但在特定波長的光線下（特別是這些物質的最大吸收波長），生物體則會因毒害死亡。此一發現為光化學療法科學實證之首例。

（二）光動力治療機制

光動力治療之基本作用原理是利用一種可與菌體或細胞作用之光感物質，藉由特定波長光源之照射，產生一連串光化學反應而造成細胞死亡。光動力處理作用詳細機制目前仍不清楚，一般分成兩種作用方式（Type I 與 Type II 反應）：Type I 為光感物質受光激發後到達單重激發態（singlet state），經過系統間能量轉移（intersystem crossover）形成能量較低但穩定度較高之三重激發態，最後將電子轉移至細胞周圍之氧分子、水分子或生物分子，而產生自由基以造成周圍分子傷害（19）。Type II 為光感物質受光激發後到達單重激發態，經過系統間能量轉移形成能量較低但穩定度較高之三重激發態（triplet state），最後將能量轉移至細胞周圍之氧分子，使成為高能量之單重激發態氧（singlet oxygen），單重激發態氧會毒殺周圍之生物分子。然而，單態氧是一種高度反應性物質，其存活週期短（life-time: ≤ 200 ns）（2）、移動距離小（ $\leq 0.02 \mu\text{m}$ ）、擴散距離短（ ≤ 45 nm）（22），在光動力治療過程中能夠只破壞有聚集光感物質的組織，引起目標組織受傷與細胞凋亡，而不會傷及周圍的正常組織。

（三）影響光動力治療的因子

光動力治療的基本原理是，當外加在細胞中的光感物質受到特定波長的光源激發後，能將光能轉移給細胞內的其他物質，如氧氣而發生光化學作用，進而產生對細胞有毒性的自由基，因此在光感物質所積聚的位置受到光照後會造成細胞的毒性。構成光動力療法的三個基本要素是光感物質、照射光和細胞內的氧氣。

1. 光感物質

光動力治療若應用在臨床醫療上，所選用的光感物質須不具毒性、於光動力作用後能快速從體內清除、對目標細胞具有高親和性，亦即有高光動力產率（photodynamic yield），能在短時間內於目標細胞周圍累積足夠量，經光源照射後產生大量自由基或單態氧，且適用的吸收波長需在光源能提供之範圍內。

自光感效應發現到現在，已有數十種具光感效應之化合物陸續被發現，例如：苯二酮類（quinines）衍生物、紫質類衍生物（Hematoporphyrin derivative, HpD）、賽安寧類（cyanine）染劑等。而其中血紫質及其衍生物是最早也是目前最被廣泛應用的光感物質。若以光感物質的作用機制分類，上述之光感物質可分為外生型（exogenous）及內生型（endogenous）兩種。外生型藥物係指對生物體外加具光感效應特性之光感物質，如部花青素（merocyanine 540, MC-540）。MC-540最重要的結構是將二個雜環以 methine chain 的方式連接，此結構在光照的環境下能夠很快速地分解。在 70 年代光動力處理發展後，因為 MC-540 具有嵌入細胞膜之特性，同時能產生光感效應之現象，故被應用於光動力處理之研究。內生型則是藥物本身並不具光感效應之特性，但經細胞代謝而產生具有光感效應之物質，如五胺基酮戊酸（5-aminolevulinic acid, δ -ALA）。由於在真核細胞原血紅素形成的代謝過程中，原本就會存在紫質類化合物，如 Protoporphyrins、Uroporphyrins、Coproporphyrins 等，添加其前趨物 δ -ALA 會造成真核細胞內紫質類化合物的累積，進而提供光動力治療所須的光感物質（16）。

2. 照射光

以光感效應為基礎的光動力治療，必須以一特定波長的光來激發細胞內累積的光感物質，目前大多選用 600 ~ 1000 nm 之可見光 - 紅外光範圍。早期的實驗大多以波長範圍甚寬的日光燈來進行，隨著光源的發展，雷射、鹵素燈及發光二極體（light emitting diodes, LED）等波長範圍較窄的光源漸被應用在光動力治療的領域。

3. 細胞內的氧氣

在光動力治療過程中，被激發至高能態之光感物質會將能量轉移至周圍的氧分子，使氧分子形成單重激發態，此激發態氧分子會對周圍生物分子產生毒殺作用，達到光動力治療效果。因此，氧氣是光動力作用不可或缺的要素，氧氣量的多寡會影響光動力治療的效果。當組織中的氧氣被消耗而減少，則會降低光動力治療的效果。

四、光動力治療

目前在原核微生物感染治療的應用

光動力治療應用於微生物感染的治療最早始於 1983 年，當時 Marshall 研究由 *Helicobacter pylori* 所感

染之慢性胃炎治療，可惜的是成功例子均為 *in vitro* (20)。直到 1996 年，由 Millson 等人所研究出於 *ex vivo* 中可利用光動力治療有效控制 *Helicobacter mustelae* 所感染之胃炎 (21)。另外，最近的報導顯示由病毒所感染之皮膚癌 (vulval intraepithelial neoplasia) 也可藉光動力治療達到控制效果 (1)。以下將過去十年來光動力治療應用於微生物防治作一整理：

(一) 內生型光感物質

1997 年 van der Meulen 等人以 δ -ALA 配合不同波長的 Argon dye laser (617nm, 630nm) 所進行的實驗顯示，光動力處理對懸浮培養的 *Haemophilus parainfluenzae* (108 cfu/mL) 具有 4 個 log 的抑菌效果 (39)；而 Szocs 等人 (36) 以 *Escherichia coli* B (107 cfu/mL) 所得的抑菌效果則為 2 個 log；2004 年，Lee 等人以 7.5 mM δ -ALA 抑制 108 cfu/mL *Pseudomonas aeruginosa* (17)；另外，亦有研究發現，以 δ -ALA 所進行之光動力治療可有效抑制感染人類皮膚的 Human papilloma virus (HPV) (15)。

(二) 外生型光感物質

由於以內生型光感物質所進行之光動力處理受限於菌體內累積紫質類的能力，因此外加本身具光感效應之外生型光感物質是目前較為廣泛應用的方式，主要有苯二酮類衍生物、紫質類衍生物、賽安寧類染劑等。

1990 年代，紫質類衍生物—hematoporphyrin 被證實對 *Bacillus subtilis* 及 *Streptococcus faecalis* 有 3~5 個 log 的抑制效果 (31)；之後許多紫質類衍生物相繼被應用在抑菌效果的測試，2000 年 Rovaldi 等人以不同電荷之紫質類衍生物分別對十二株菌進行實驗，發現帶正電的 poly-L-lysine Chlorine6 抑菌效果較 Chlorine6 顯著，有 6.2~7.5 個 log (29)。

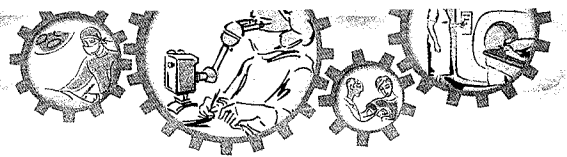
而部花青素 (MC 540) 則對 *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma hyorhinitis*, *M. fermentans*, *M. arginini* 等菌株具 3~7 個 log 的抑菌效果。對某些革蘭氏陽性菌 (如 *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *En. faecium*, *Streptococcus pneumoniae* 等) 及革蘭氏陰性菌 (如 *Moraxella catarrhalis*)，則有 2~5 個 log 的殺菌效果 (10)。大約 10 μ g/mL MC 540 即可抑制 108 cfu/mL *S. aureus* (18)。

原核生物形成的生物膜在上個世紀已經被大量的研究 (24, 40)，而真菌生物膜方面的研究這幾年也越來越受到重視，如 *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Rhodotorula rubra*, 及 *Cryptococcus uniguttulatus* (38)，其中以 *C. albicans* 最為重要。真核微生物除了構造及生理與原核微生物不同外，真核微生物由於具有不同生活史，當形成生物膜時，其生成及抗藥性機制較原核微生物複雜。目前念珠菌血症在世界各地的醫院都在逐年增加，然而白色念珠菌所形成的生物膜，即使是消毒劑、酒精、次氯酸鈉、甜菜鹼等，對於 *C. albicans* 生物膜也不起任何作用 (38)；若改善醫療器材，如尿管的材質，亦只抑制部份原核生物生物膜之形成，依然無法抑制白色念珠菌生物膜之形成 (8)。因此防制念珠菌的問題變得相當棘手。茲以念珠菌屬之酵母菌為例，概述光動力治療在真核微生物生物膜防治的可行性。

光動力治療對於哺乳類腫瘤細胞的應用已經被廣泛的研究 (9)，但是對於醫療相關的真菌光動力治療研究目前並沒有受到太多的重視。Friedberg 發現光動力治療對 *Aspergillus fumigatus* 的影響主要來自於光強度及菌種差異 (11)。部份研究以光動力療法對抗皮膚真菌 *Trichophyton rubrum* (33, 34)。而部份研究比較不同光感物質對於 *Candida albicans* 的影響 (3, 41, 42)。利用 methylene blue 及雷射光去治療 SCID 小鼠的口腔念珠病時，當提高 methylene blue 的用量及以 664 nm 的雷射光照射 687.5 秒之後，可以完全根除掉念珠菌所造成的感染 (37)。

Bliss 等人認為 Photofrin 是一種較容易對白色念珠菌產生光毒性的光感物質，而這種物質也已應用在臨床治療上面。因為不同種之念珠菌都有其獨特之抗性，因此以往的治療必須針對不同的菌種而採取不同的治療方式。他們發現白色念珠菌在不同的環境之下，對於 Photofrin 會有不同的吸收能力：在 Medium 199 的培養條件下，mycelial form 的菌體較容易吸收 Photofrin；但若是 YPD 培養出的 yeast form 之菌體，則無任何吸收 Photofrin 的現象。目前尚不清楚是養份改變菌體生理特性，而造成 Photofrin 吸收上之差異，或者是培養條件的不同，造成細胞壁成份差異而影響 Photofrin 的滲透能力 (4)。若以疊氮化鈉 (sodium azide) 前處理菌體，對實驗結果亦無影響。因此 Photofrin-PDT 應走 Type II 路徑。以不同菌株的白色念珠菌進行光動力治療及 XTT 活性

五、光動力治療 應用於真核微生物防治的可行性



測試時發現，不同菌株在光動力作用之後，對於代謝 XTT 的活性均呈下降的趨勢，一方面可能是菌體因為光動力作用而導致死亡，另外一方面則可能是粒線體的功能受損，因此造成代謝活性的下降 (4)。而 Photofrin-PDT 抑制白色念珠菌生殖管與生物膜實驗中，抑可發現相似結果 (7)。若以不同菌種進行光動力抑菌比較，*C. albicans*、*C. krusei* 之生理活性會隨著 Photofrin 濃度提高而降到 20% 以下，而 *C. glabrata* 的影響則較不明顯。

六、光動力治療 應用於生物膜防治的可行性

由上述的研究可知，以內生型或外生型的光感物質為材料的光動力處理，確實對某些懸浮培養的微生物有抑菌效果。雖然目前已發表的結果大多侷限於懸浮培養的微生物細胞，但基於以下原因我們相信光動力治療對生物膜防治將有極大的潛力。生物膜的抗藥性機制其中之一，是生物膜胞外聚合物會將微生物抑制劑中和或吸附而影響殺菌效果。光感物質一般而言，分子量並不大 (如 δ -ALA M.W. = 167.6 g/mol)，在生物膜結構中的傳輸相對容易，因此便有更多機會與細胞接觸，進而使菌體內累積大量具光感效應之物質。而選用的光源，綠光 (410~450 nm) 可穿透 2 mm 厚度，而紅光 (610~650 nm) 更可穿透一公分皮膚組織 (30)，普遍大於自然生成之生物膜厚度，即生物膜內部細胞所累積之光感物質將可順利地被光源所激發。

而從一些先期實驗的結果，也顯示以光動力治療應用於生物膜防治確實可行。以 δ -ALA 分別作用懸浮及生物膜培養的 *Pseudomonas aeruginosa*，再照光處理，相同的光動力治療條件對懸浮及生物膜 *P. aeruginosa* 皆有明顯的殺菌效果 (17)。雖然殺菌的程度有些差異，但仍顯示以光動力治療用於生物膜防治應極為可行 (17, 18, 44)。而從光動力治療機制而言，如何使細胞內光感物質被激發才是能否殺菌的關鍵。也就是說，光感物質濃度、作用時間會影響光動力治療的效果，但真正的因數應為細胞體內所累積的光感物質濃度，以及足以激發光

感物質的照射光壓。

七、光動力治療應用的瓶頸

有效的光動力作用乃結合光源、光感物質此兩大要素，自 20 世紀初期至今，隨著雷射的發明和光感物質合成技術的發展，過去十年光動力作用已經成為癌症治療的一種療法。然而，針對特定癌細胞開發光感物質不易，成本相對提高；在臨床層面，因光感物質必須先行靜脈注射植入病患，療程會有一段光敏期，病患必須避光以防正常細胞被光動力作用毒殺 (23)，此等問題必須仰賴研究人員開發新的光感物質或進行人為修飾達到改善。此外，光照部位仍侷限於身體表層，如皮膚、食道或膀胱等，若要處理深層的病變細胞，都將受限於光源的穿透性與深入人體的程度。而雷射雖然可以提供高能量激發光感物質，但因為波長的選擇性少，只能搭配特定種類的光感物質，且雷射裝置成本昂貴且維修不易，都將是光源必須克服的難題。

光動力作為癌症治療日益純熟的同時，應用此原理進行微生物抑制，也遭遇與癌症治療相同的問題。在光照方面，發揮國內光電長才，利用 LED 開發成光源，除了具備價格低廉、輕便與壽命長等優點，更能設計符合臨床應用的規格，目前已有相當發展。在光感物質方面，如何提升光感物質對於目標微生物的專一性與親合性是一大挑戰。因此，想要拓展光動力作用在微生物防治上，光感物質的取得、毒性與成本都將是關鍵，若能進一步在投藥過程鑑別微生物與細胞，配合 LED 光源進行光動力抑菌，將是一種極具潛力，得以彌補抗藥性困境的微生物防治療法。目前光感物質均為化學合成，多數因毒性太高而無法應用於臨床試驗。開發天然光感物質雖不一定能解決上述的瓶頸，但卻可提供安全廉價的光感物質供光動力治療使用。

八、藻藍素作為光感物質的可行性

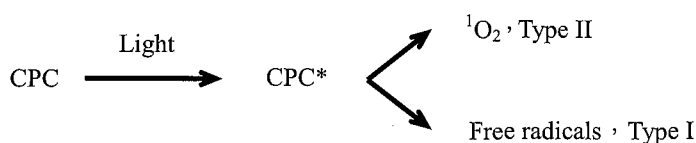
藻藍素 (phycocyanin) 普遍存在於螺旋藻中，為藻

表二 C- 藻藍素 (CPC) 與異藻藍素 (APC) 之比較

Phycobiliprotein	C-phycocyanin	Allophycocyanin
Molecular Weight (kD)	232	104
Absorption Max (nm)	620	651
Emission Max (nm)	642	662

膽蛋白 (phycobiliprotein) 的一種，分為 C-藻藍素 (C-phycocyanin, CPC) 及異藻藍素 (allophycocyanin, APC)。在藻體中，藻藍素與葉綠體結合，成為光合作用中補光系統的一部分，能吸收可見光並進行能量傳遞。研究指出藻藍素具有抗氧化及抗發炎的功效 (28)，且能保護肝臟酵素不受肝毒素的侵害 (27)，對於抑制癌細胞生長和促進人體細胞新生有重要的作用。藻藍素的螢光物質特性及高水溶性使其成為一種良好的螢光標定物質，並已廣泛應用於分子探針及電泳分析技術等。

近年有研究指出，C-藻藍素經由可見光 (> 470 nm) 照射後，可產生單態氧 (singlet oxygen, 1O_2)，進行 Type II 路徑；或是生成自由基 (如 $\cdot OH$)，進行 Type I 路徑，顯示藻藍素具有光動力治療之潛力 (43)。兩者關係如下：



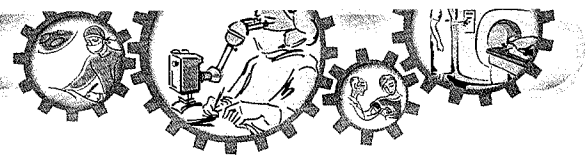
但也有研究認為，藻藍素的光感性質是由結構內部之四比咯環提供，當其進行 Type II 路徑時，所產生的 singlet oxygen 會被外部的脫輔基蛋白 (apoprotein) 削弱 (28)；雖然藻藍素之光動力治療機制仍不確定，但結合藻藍素及可見光照射，已確定可造成革蘭氏陽性菌死亡 (26) 及酵母菌 DNA 單股斷裂 (25)。

結語

雖然近年來對生物膜結構與功能的研究已有長足的進步，但目前對生物膜的防治仍然沒有一個經濟有效的方法。以定額感應訊號分子類似物阻斷細胞對細胞間的聯繫以達到生物膜防治的目的雖然極具潛力，但離實際應用仍有一段距離。以光動力治療應用於生物膜防治，主要關鍵在光感物質可以與細胞結合以及具有足夠的能量激發光感物質。就目前已知的資訊來看，光動力治療的機制似乎與生物膜抗藥性機制無關。雖然目前可應用於光動力治療的光感物質種類不多，與其他抑菌劑相比價錢也較高，但隨著光動力治療的發展，我們相信會有更多的光感物質被發現或合成，光動力治療在微生物，特別是生物膜防治上的應用正是方興未艾。

參考文獻

1. Abdel-Hady, E. S., P. Martin-Hirsch, M. Duggan-Keen, P. L. Stern, J. V. Moore, G. Corbitt, H. C. Kitchenner, and I. N. Hampson. 2001. Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. *Cancer Res* 61:192-6.
2. Baker, A., and J. R. Kanofsky. 1992. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells. *Photochem Photobiol* 55:523-8.
3. Bertoloni, G., E. Reddi, M. Gatta, C. Burlini, and G. Jori. 1989. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 135: 957-66.
4. Bliss, J. M., C. E. Bigelow, T. H. Foster, and C. G. Haidaris. 2004. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2000-6.
5. Brown, M. R., and P. Gilbert. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol* 74 Suppl:87S-97S.
6. Cammarota, M. C., and G. L. Sant'Anna. 1998. Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. *Biotechnology Letters* 20:1-4.
7. Chabrier-Rosello, Y., T. H. Foster, N. Perez-Nazario, S. Mitra, and C. G. Haidaris. 2005. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4288-95.
8. Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881-90.
9. Dougherty, T. J., C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbek, J. Moan, and Q. Peng. 1998. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90:889-905.
10. Dunne, W. M., Jr., and W. A. Slater. 1998. Antimicrobial activity of merocyanine 540: a photosensitizing dye. *Diagn Microbiol Infect Dis* 32:101-5.
11. Friedberg, J. S., C. Skema, E. D. Baum, J. Burdick, S. A. Vinogradov, D. F. Wilson, A. D. Horan, and I. Nachamkin. 2001. In vitro effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 48:105-7.
12. Huang, C. T., G. James, W. G. Pitt, and P. S. Stewart. 1996. Effects of ultrasonic treatment on the efficacy of gentamicin against established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 6:235-



- 242.
13. Huang, C. T., and P. S. Stewart. 1999. Reduction of polysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by bismuth dimercaprol (BisBAL) treatment. *J Antimicrob Chemother* 44:601-5.
14. Jass, J., J. W. Costerton, and H. M. Lappin-Scott. 1995. The effect of electrical currents and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Ind Microbiol* 15:234-42.
15. Karrer, S., R. M. Szeimies, C. Abels, U. Wlotzke, W. Stolz, and M. Landthaler. 1999. Epidermodysplasia verruciformis treated using topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 140:935-8.
16. Kennedy, J. C., and R. H. Pottier. 1992. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 14:275-92.
17. Lee, C. F., C. J. Lee, C. T. Chen, and C. T. Huang. 2004. delta-Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures. *J Photochem Photobiol B* 75: 21-5.
18. Lin, H. Y., C. T. Chen, and C. T. Huang. 2004. Use of merocyanine 540 for photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cells. *Appl Environ Microbiol* 70:6453-8.
19. Malik, Z., J. Hanania, and Y. Nitzan. 1990. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 5: 281-93.
20. Marshall, B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1:1273-5.
21. Millson, C. E., M. Wilson, A. J. MacRobert, and S. G. Bown. 1996. Ex-vivo treatment of gastric *Helicobacter* infection by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 32:59-65.
22. Moan, J., and K. Berg. 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 53:549-53.
23. Moriwaki, S. I., J. Misawa, Y. Yoshinari, I. Yamada, M. Takigawa, and Y. Tokura. 2001. Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin). *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17:241-3.
24. O'Toole, G., H. B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49-79.
25. Padula, M., and S. Boiteux. 1999. Photodynamic DNA damage induced by phycocyanin and its repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Med Biol Res* 32:1063-71.
26. Padula, M., S. Boiteux, I. Felzenszwalb, and S. Menezes. 1996. Photodynamic action of phycocyanin: damage and repair. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 32:19-26.
27. Romay, C., J. Armesto, D. Ramirez, R. Gonzalez, N. Ledon, and I. Garcia. 1998. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflamm Res* 47:36-41.
28. Romay, C., N. Ledon, and R. Gonzalez. 1998. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm Res* 47: 334-8.
29. Rovaldi, C. R., A. Pievsky, N. A. Sole, P. M. Friden, D. M. Rothstein, and P. Spacciapoli. 2000. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *In vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3364-7.
30. Sharman, W. M., C. M. Allen, and J. E. van Lier. 1999. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 4:507-517.
31. Shawar, R., and B. H. Cooper. 1990. Comparative kinetics of hematoporphyrin derivative uptake and susceptibility of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus faecalis* to photodynamic action. *Photochem Photobiol* 52:825-30.
32. Shih, P. C., and C. T. Huang. 2002. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 49:309-14.
33. Smijs, T. G., and H. J. Schuitmaker. 2003. Photodynamic inactivation of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Photochem Photobiol* 77:556-60.
34. Smijs, T. G., R. N. van der Haas, J. Lugtenburg, Y. Liu, R. L. de Jong, and H. J. Schuitmaker. 2004. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. *Photochem Photobiol* 80:197-202.
35. Stewart, P. S. 1996. Theoretical aspects of antibiotic dif-

- fusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2517-22.
36. Szocs, K., F. Gabor, G. Csik, and J. Fidy. 1999. delta-Aminolaevulinic acid-induced porphyrin synthesis and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* B. *J Photochem Photobiol B* 50:8-17.
 37. Teichert, M. C., J. W. Jones, M. N. Usacheva, and M. A. Biel. 2002. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93:155-60.
 38. Theraud, M., Y. Bedouin, C. Guiguen, and J. P. Gangneux. 2004. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. *J Med Microbiol* 53:1013-8.
 39. van der Meulen, F. W., K. Ibrahim, H. J. Sterenborg, L. V. Alphen, A. Maikoe, and J. Dankert. 1997. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins. *J Photochem Photobiol B* 40:204-8.
 40. Watnick, P., and R. Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182:2675-9.
 41. Wilson, M., and N. Mia. 1993. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med* 22:354-7.
 42. Zeina, B., J. Greenman, W. M. Purcell, and B. Das. 2001. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 144:274-8.
 43. Zhang, S., J. Xie, J. Zhang, J. Zhao, and L. Jiang. 1999. Electron spin resonance studies on photosensitized formation of hydroxyl radical by C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochim Biophys Acta* 1426:205-11.
 44. 塗雅屏. 2005. 以螺旋藻萃取之C-藻藍素對細菌懸浮細胞與生物膜之光動力抑制作用. 台灣大學, 臺北.

