

비브리오 패혈증균의 균체내독소 정제 및 특성에 관하여

김영만[†] · 정현정 · 신일식*

동의대학교 식품영양학과
*강릉대학교 생명과학부

Purification and Characterization of Endotoxin from *Vibrio vulnificus*

Young-Man Kim[†], Hyun-Jeoung Jeoung and Il-Shik Shin*

Department of Food Science and Nutrition, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

*Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

Abstract

To determine the cause of *Vibrio* septicemia by understanding the characteristics of endotoxin from *Vibrio vulnificus*, lethal dose, heat resistance and vascular permeability enhancing activity were evaluated using vegetative cell and cell homogenate and the result is as follows :

1. *Vibrio vulnificus* CDC B3547 of patient origin did not exhibit any significant difference in toxicity compared to *Vibrio vulnificus* B57 of environment origin.
2. Strong toxicity was observed when viable cell count of *Vibrio vulnificus* CDC B3547 was more than 10^7 /ml.
3. Toxicity of cell homogenate was completely inactivated upon heating at 80°C for 20min.
4. Cell homogenate did not show hemolytic activity but was acknowledged to have cytotoxicity.
5. Major lethal toxin against mouse was existed in *Vibrio vulnificus* CDC B3547 ; however, separation of LPS and LPS-protein complex was not successful using the current technique.

Key words : *Vibrio vulnificus*, vibrio lethal toxin, endotoxin

서 론

*Vibrio vulnificus*는 굴, 대합 및 피조개 등의 조개류와 생선 뿐만 아니라 벨과 플랑크톤에서도 분리된 바 있으며, 소장염 환자의 혈액, 익사체의 허파와 자궁내막염 등의 환자에서도 분리되는 것으로 볼 때¹⁻⁶⁾ 해수와의 접촉, 수산물의 생식과 연관되어 소화기 뿐만 아니라 다른 신체 부위에도 감염증을 일으키는 병원성균으로 알려져 있다.⁷⁾

Blake 등은 식중독이나 패혈증 및 피부장애를 나타내는

환자의 혈액에서도 *V. vulnificus*를 분리하여 이 균에 의한 감염증을 감염 경로에 따라서 창상과 경구감염의 두 가지 형태가 있다고 보고하였다.⁸⁾ *V. vulnificus*에 의한 패혈증의 증상은 발열(94%), 오한(91%), 피부 병변(67%), 구역질(58%), 구토(46%) 및 설사(40%) 등이며 사망률은 창상감염이 7~22%이고, 경구감염은 50% 이상으로 치명적이다.^{9,10)}

이 균의 독성에 관한 연구로는 Kreger 등이 antiphagocytic capsule이 식세포의 식작용에 대한 저항력을 가진다고 보고한

¹¹⁾ 이래, hemolysin¹²⁾, protease^{13,14)}, phospholipase¹⁵⁾,

[†] Corresponding author

lipopolysaccharide 등^{16,17)}이 *V. vulnificus*의 독성에 관여하는 인자라고 보고되고 있다. 이 중 균체외독소인 hemolysin과 관련 인자인 protease, siderophore, phospholipase 등에 대해서는 많은 보고가 있으나, 균체내독소에 대하여서는 아직까지 확실히 밝혀져 있지 않으며, 균체내독소의 일종인 lipopolysaccharide(LPS)도 최근에 분리되어¹⁶⁾, rat에 대하여 발열성이 있고 심장 혈관에 손상을 일으켜 죽음에 이르게 한다는 보고¹⁷⁾가 있으나, LPS-protein 복합체의 단백질 부분에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

*V. vulnificus*에 의한 패혈증으로 사망한 환자가 매년 발생하는 우리 나라에서 *Vibrio* 패혈증의 병인을 정확히 구명하는 것은 시급한 실정이다. 그러므로 이 균의 치사작용에 대한 균체내 독소의 역할과 성질을 밝힘으로써 이 균의 발병 원인 구명과 새로운 치료 방법의 개발에 필요한 기초 자료를 제공하고저 한다.

재료 및 방법

1. 사용 균주

환자분리균인 *V. vulnificus* CDC B3547을 이용하여 독성 검사를 하였으며 환경분리균은 해수에서 분리된 *V. vulnificus* B57을 사용하였다.

2. 실험동물

V. vulnificus 균체내독소의 활성 측정에 사용한 mice는 ICR(Institute cancer research, Swiss)계로 체중 18~21g의 수컷을 사용하였다.

*V. vulnificus*의 피부혈관 투과성항진작용을 조사하기 위하여 사용한 rat는 중량 250~350g의 Wister계 rat 수컷을 사용하였다.

3. 독력 측정

*V. vulnificus*를 식염 0.9%를 가한 BHI(Brain Heart Infusion, Difco Co., USA)배지에서 37°C, 16시간 배양한 균액 1ml를 18~20g의 새앙쥐 수컷 10마리에 복강주사하여 사망 시간을 체중으로 나누어 g당 평균 치사시간으로 독력을 측정하였다. 균체내독소의 독력은 시료를 위와 동일한 방법으로 복강주사하여 측정하였다.

4. 균체내독소의 독력 시험

배양 균액, 균체 파쇄액, 균체 파쇄상청액 및 파괴된 균체 잔사의 독력은 새앙쥐에 복강주사하여 측정하였다. 즉, 독력의 측정과 같은 방법으로 18시간 배양한 균액 1ℓ를 10,000×g로 20분간 원심분리하여 생리식염수로 3회 씻은 후 균체를 생리식염수 50ml에 부유시켜 ultra soicator(N843, M.S.G., Scientific Co., Sussex, England)로 27KHz에서 60

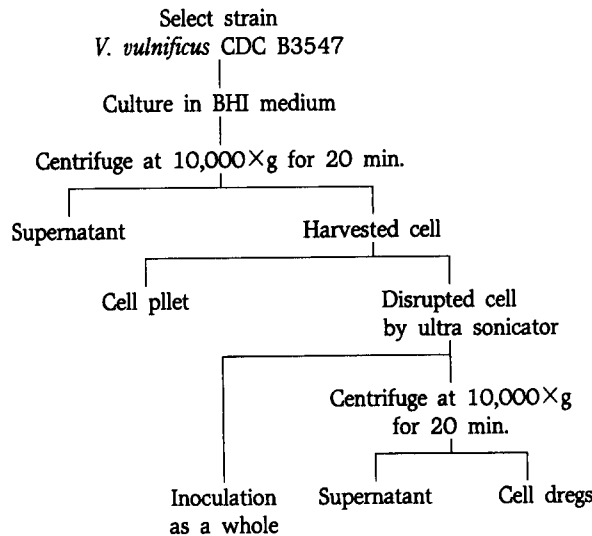


Fig. 1. Preparation of inoculation for mouse assay *V. vulnificus* toxins.

분간 파쇄한 다음 생잔여부를 확인하고, 그 중 20ml를 다시 10,000×g로 20분간 원심분리하여 상청액과 침전물로 분리하였고 침전된 잔사는 생리식염수 20ml로 정용하여 독력을 시험하였다 (Fig. 1).

5. 균체내독소의 내열성 시험

앞에서 설명한 방법으로 조제한 균체 파쇄액을 각기 미리 가온된 screw cap 시험관(1.5×210mm)에 10ml 씩 분주한 다음 60, 65, 70, 75 및 80°C의 항온수조에서 20분간 가열 처리한 다음 각각 10마리의 새앙쥐로 잔존 독력을 시험하였다.

6. 용혈성 시험

BHI 배지에 16시간 배양한 배지를 1% Human blood agar plate와 1% Sheep blood agar plate에 배양하여 37°C에서 24시간 배양한 후 투명환이 생성되는 것을 비교 확인하였다.

7. 피부 모세혈관 투과성항진활성

Rat에 evans blue(1ml/kg)를 귀정맥과 꼬리정맥에 사전 투여하고, 균과 균 파쇄액을 등피부 내에 주사하여 6시간 후 등피부를 벗기고 혈관투과성항진에 따른 spot를 관찰

하였다.

8. 단백질 함량 측정

단백질 함량 측정은 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 bicinchoninic acid(BCA) protein assay (Pierce, Rockford, IL) 방법으로 측정하였다.

9. 균체내독소의 분리

배양한 *V. vulnificus*를 NaCl 농도가 1.5% 되게 조정된 BHI 배지에 37°C에서 15시간 배양하여 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 균체를 모아 PBS로 2회 씻은 후 같은 양의 PBS에 현탁하여 초음파파쇄기로 균체를 파쇄한다. 이 균체파쇄액을 10,000×g에서 1시간 원심분리한 후 pellet을 취하여 0.01M EDTA 또는 1% triton X-100이나 1% n-octylglucoside를 함유한 tris-HCl(pH 8.0)에 현탁하고 얼음 속에서 1시간 반응시킨다. 이 반응액을 다시 10,000×g에서 1시간 초원심분리하여, 그 상청액을 sephadex G-100 column을 통과시키고, 독성이 있는 획분을 모아서 탈이온수에서 2~3일간 투석한다. 이 투석한 용액을 centriprep10으로 농축하여 그 농축액을 LPS-protein 복합체로 하였다 (Fig. 2).

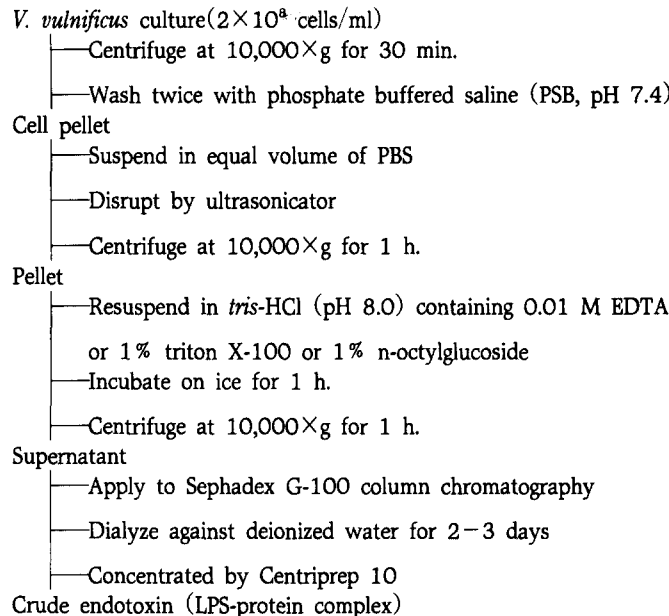


Fig. 2. Flow sheet for isolation of LPS-protein complex from *V. vulnificus*.

LPS를 분리하는 방법은 *V. vulnificus*를 NaCl 농도가 1.5 % 되게 조정된 BHI 배지에 37°C에서 15시간 배양하여 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 균체를 모은 후 PBS로 2회 씻고 acetone으로서 균체를 건조한 후 같은 양의 69°C의 물과 90%의 phenol 혼합 용액에 현탁한다. 이 현탁액을 얼음 속에서 15분간 잘 섞은 후 10,000×g에서 원심분리하여 수용액 층을 취한다. 이 과정을 3번 반복하여 모은 수용액 층을 탈이온수로서 3~5일간 투석한 후 동결건조한다. 동결 건조한 분말을 tris 완충용액(pH 7.0)에 녹인 후 RNase와 DNase I 으로 핵산관련물질 제거하고 proteinase K로서 RNase와 DNase I 을 제거한다. 이 용액을 10,000×g에서 2시간 초원심분리하여 pellet 을 취하여 탈이온수에 녹이고, 동결 건조하여 그 분말을 LPS로 하였다 (Fig. 3).

결과 및 고찰

1. 환자 분리균과 환경 분리균의 독력 비교

Vibrio 패혈증 환자에서 분리한 *V. vulnificus* CDC B35 47과 해수에서 분리한 *V. vulnificus* B57의 독력을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 두 균주 모두 균수가 10⁶/ml일 때 새앙쥐에 대한 치사독성이 확실히 나타났고, 10⁷/ml 이상에서 강한 치사독성이 있었다.

환경 분리균과 환자 분리균의 독력은 뚜렷한 차이가 없었으며 이는 김¹⁶⁾의 결과와 일치하였다.

2. 균체와 균체파쇄액의 독력 비교

살아 있는 균체와 파쇄된 균체의 독력을 비교한 결과는 Table 2와 같다. 살아있는 균체의 새앙쥐에 대한 치사독성

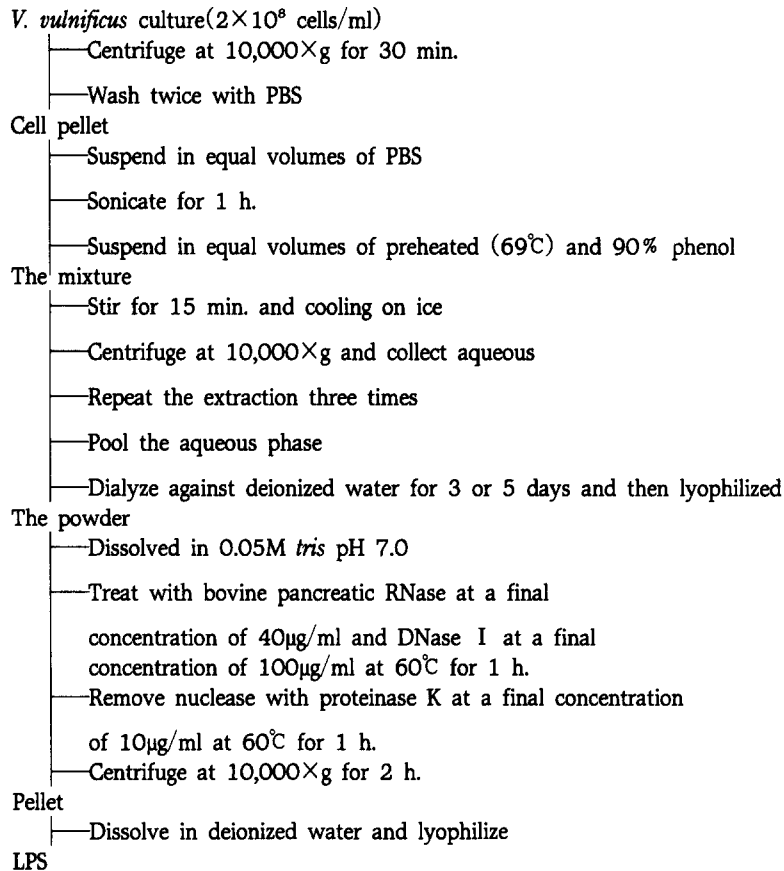


Fig. 3. Flow sheet for isolation of LPS from *V. vulnificus*.

Table 1. Comparison of toxicity of *V. vulnificus* isolated from patient and marine environment by mouse assay^a

Incubation time(hr.)	Death time(min.)/g		
	Patient origin	Marine origin	CFU/ml
4	21	21	1.3×10^6
6	18	18	7.5×10^7
8	19	17	6.1×10^8
12	17	16	9.5×10^8
24	16	16	6.7×10^9

^aThe strain was cultured at 37°C in BHI medium with 0.9% NaCl and 1ml of cultured suspension was injected intraperitoneally to 18~20g of male mouse.

Table 2. Comparison of toxicity of cultured suspension and cell destruction portions of *V. vulnificus* CDC B3547 by mouse assay

Sample code	Death time(min.)/g			
	Culted suspension	Disrupted Cell		
		Whole ^a	Supernatant ^b	Residue ^c
1	19	19	120	29
2	18	25	105	30
3	17	20	108	33
4	17	21	104	35
5	16	20	110	25
Average	17	21	109	36

^a30ml of cell suspension in 0.9% saline (10^8 CFU/ml) was disrupted by sonicator under 27 KHz for 60min.

^b20ml of disrupted cell suspension was centrifuged at $10,000 \times g$ for 20min. under 4°C, then filtered through 0.45µm millipore filter paper.

^cResidue was harvested from the disrupted cell suspension, then dilute to the same volume with 0.9% saline.

이 체중 g당 평균 17분일 때 균체파쇄액은 평균 21분, 균체파쇄액의 원심분리 상청액은 평균 109분, 원심분리 침전 잔사는 평균 36분으로서 생균보다 파쇄된 균체의 독력이 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 이는 균체파쇄과정에서 독성분이 약간 손상을 받을 수 있는 것을 감안할 때 뚜렷한 차이라고 보기는 어렵다. 그러나 균체파쇄액보다 균체파쇄액의 원심분리 침전 잔사의 독력이 낮은 결과는 균체잔사의 독소가 일부 용출되어 상청액에 이행된 것으로 사료된다. 이상의 결과로 볼 때 주 치사독소는 균체내에 존재한다는 것을 알 수 있었다. 균체파쇄액을 원심분리한 상청액에서 나타난 약간의 독력을 단순히 균체내독소가 용출된 것 외에 균체내부의 어떤 물질이 독성을 나타내는 것은 아닌가의

심이 되므로 이에 대한 연구가 요구된다.

3. 열처리에 따른 균체파쇄액의 독성 변화

V. vulnificus CDC B3547을 파쇄한 액을 60~80°C 사이에 20분간 처리한 후 잔류 독성을 시험한 결과는 Table 3과 같다. 이 균의 균체내독소는 65°C까지 안정하나 70°C 이상에서는 불안정하며 75°C 이상일 때 쉽게 불활성화되고 80°C에서 완전히 파괴됨을 알 수 있었다. 이는 80°C로 처리한 균을 주사하였을 때 새앙쥐에 대한 치사독성을 상실하였다는 Bowdre¹⁹⁾의 보고와 균의 파쇄액을 80°C에서 20분 처리하였을 때 독성을 상실하였다는 김의 보고¹⁸⁾와 일치하였다. 이와 같은 결과는 균체내독소가 열에 의하여 쉽게 불활성화된다는 측면에서 열에 약한 단백질일 가능성

Table 3. Heat stability of crude endotoxin of *V. vulnificus* CDC B3547 at various temperature^a

Heated temp.(°C)	Death rate(B/A) ^b	Residual toxicity(%)
Control	10/10	100
60	10/10	100
65	9/10	90
70	4/10	40
75	1/10	10
80	0/10	0

^aDestructed cell suspension was heated at given temperature for 20 min., then 1ml of prepared inoculum was injected intraperitoneally to 18~20g of male mouse.

^bB, number of dead mouse ; A, number of tested mouse.

이 높다는 것을 시사한다.

4. 생균과 파쇄된 균체의 용혈성

병원성 *Vibrio* 속은 대부분 hemolysin을 생산하고 이 hemolysin이 주병원성인자로 알려져 있으며, 특히 *V. vulnificus*는 분리된 전 균주가 hemolysin을 생성하며 이 hemolysin이 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. Hemolysin은 균체의독소이므로 균체내독소도 용혈인자를 갖고 있는지 확인하기 위하여 생균과 파쇄된 균체를 사람과 면양 혈액한천배지에 접종하여 본 결과는 Fig. 4와 5이다.

사람 혈액한천배지에서 *V. vulnificus*의 용혈성은 확실히 나타났으며(Fig. 4) 면양 혈액한천배지에서도 용혈성이 확인되었으나(Fig. 5) 사람 혈액한천배지보다 약하게 나타났다. 그러나 파쇄된 균체는 사람과 면양 혈액한천배지 모두 용혈성이 없는 것으로 볼 때 균체내에는 용혈성과 관계있는 물질이 없다는 것이 확인되었다.

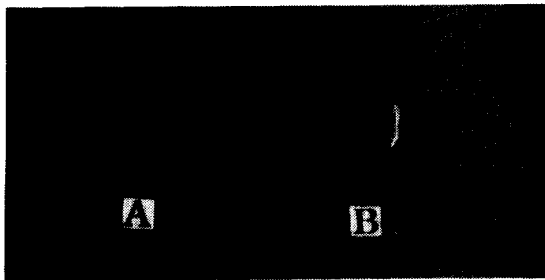


Fig. 4. Hemolysin activity of *V. vulnificus* on human blood agar plate. A, living cell ; B, disrupted cell

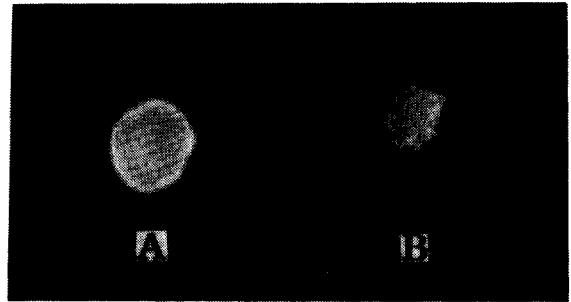


Fig. 5. Hemolysin activity of *V. vulnificus* on sheep blood agar plate. A, living cell ; B, disrupted cell

5. 파쇄된 균체의 혈관투과성 항진작용

Rat에 evans blue을 투여한 후 등피부에 생균과 파쇄된 균체를 투여한 결과(Fig. 6) 생균에서 혈장알부민의 유출이 강하게 나타난 반면 파쇄된 균체는 거의 나타나지 않은 것으로 볼 때 생균은 균체의독소인 hemolysin에 의한 혈관투과성항진작용이 나타나고 파쇄된 균체는 혈관투과성 항진작용은 없었다. 그러나 주사부위에 세포의 괴사성이 나타나는 것으로 볼 때 세포독성이 있는 것으로 추정된다.

6. LPS와 LPS-protein complex의 분리 과정에서 치사독성

LPS와 LPS-protein complex를 분리하기 위한 실험 과정 중간에 균체내 독소가 함유되어 있는지 확인하기 위한 치사독성 실험 결과는 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다. 치사독성 시험은 mouse assay를 실시했으며 주사한 후 17시간 내에 치사를 나타내었다.

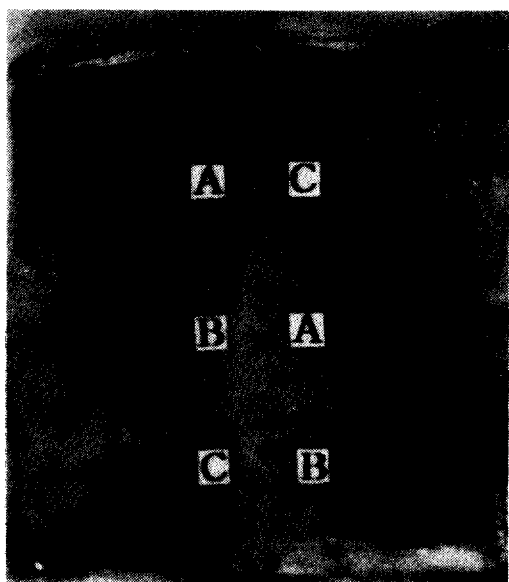


Fig. 6. Effect of *V. vulnificus* on the vascular permeability enhancing activity by living cell and disrupted cell in rat skin.

Spot A and B injected with *V. vulnificus*.
Spot C injected with disrupted *V. vulnificus*.

균체파쇄액을 원심분리한 잔사에서는 치사독성이 확실히 나타났으나 pellet을 0.01M EDTA와 1% tris-HCl(pH 8.0)에서 반응시킨 후에는 치사독성이 상실되어 LPS-protein complex를 분리할 수 없었다.

LPS를 분리하기 위하여 균체를 PBS로 세척한 후 acetone으로 건조한 후 69°C의 물과 90% phenol 혼합용액에 현탁하여 원심분리한 수용액층을 투석하여 건조한 분말에서는 치사독성이 나타났으나 핵산관련물질 제거하는 과정에서 독성이 실패되었다.

기존의 LPS와 LPS와 LPS-protein complex를 분리하는 방법으로 정제가 되지 않았으나 다른 방법을 연구하여 계속 진행한다면 분리 정제가 가능할 것으로 사료된다.

요 약

*Vibrio vulnificus*의 균체내독소의 특성을 파악하여 비브리오 패혈증의 발병원인 구명을 위한 자료를 제공하고자 생균과 균체파쇄액의 치사독성과 내열성 및 혈관투과성향 진작용을 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 환자분리균(*V. vulnificus* CDC B3547)과 환경분리균(*V. vulnificus* B57)의 독력은 차이가 없었다.

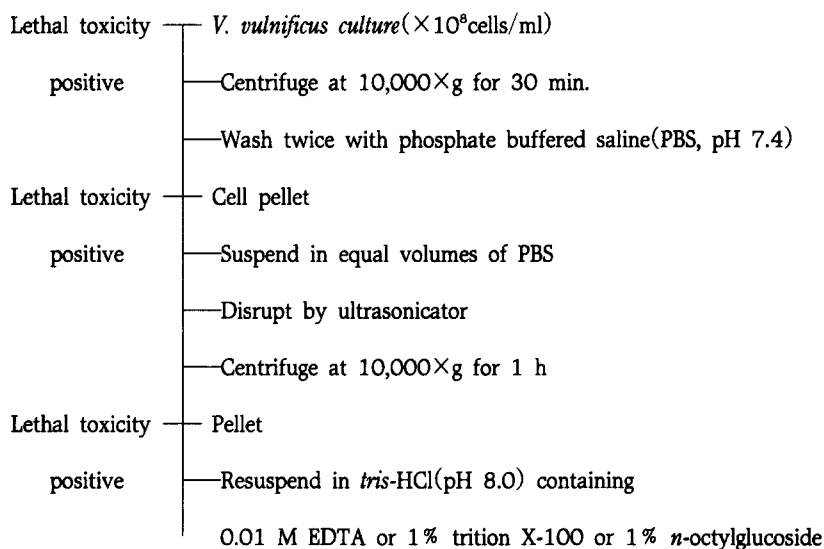


Fig. 7. Flow sheet of lethal toxicity test for isolation of LPS-protein complex from *V. vulnificus*.

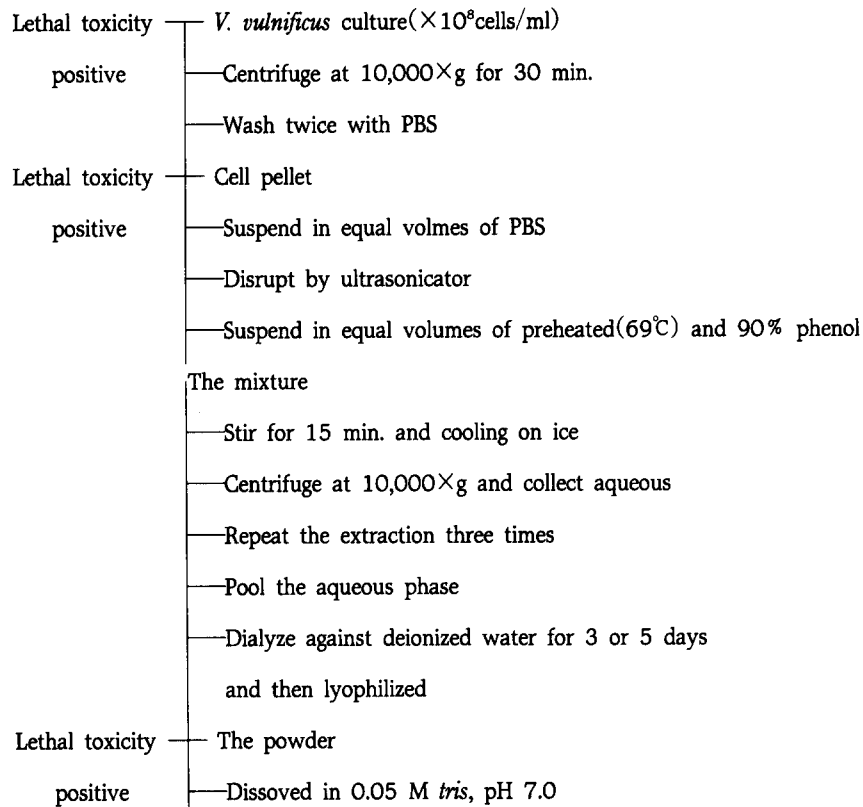


Fig. 8. Flow sheet of lethal toxicity test for isolation of LPS from *V. vulnificus*.

2. *V. vulnificus*의 균수가 10⁷/ml 이상일 때 강한 치사 독력이 나타났다.
3. 균체파쇄액의 독성은 80°C 20분에 완전히 불활성화되었다.
4. 균체파쇄액은 용혈성은 없었으나 세포독성은 인정되었다.
5. *V. vulnificus*의 새양쥐에 대한 주 치사독소는 균체 내에 존재했으나 LPS와 LPS-protein complex는 기존의 방법으로 분리할 수 없었다.

감사의 말씀

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 지방대육성과제(O2H 0052)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Oliver, J. D., Warner, R. A. and Cleland, D. R. : Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting *Vibrio* in coastal waters of the southeastern United States, *App. Environ. Microbiol.*, **44**, 1404-1414(1982).
2. Oliver, J. D., Warner, R. A. and Cleland, D. R. : Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting *Vibrios* in the marine environment, *App. Environ. Microbiol.*, **45**, 985-998(1983).
3. Tamplin, G., Rodrick, E., Blake N. J. and Cuba, T. : Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries, *App. Environ. Microbiol.*, **44**, 1466-1470(1982).
4. Kaysner, C. A., Abeyta, C. A., Wekell, M. M., De-PaoLa, A., Jr., Stott, R. F. and Leitch, J. M. : Virulent strain of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast, *App. Environ. Micro-*

- biol.*, 53, 1349-1351(1987).
5. O'Neil, K. R., Jones, S. H. and Grimes, D. J. : Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great bay estuary of New Hampshire and Maine, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3257-3262(1992).
 6. Mertens, A., Nagler, J., Hansen, W. and Gepts-Friedenreich, E. : Halophilic, lactose-positive *Vibrio* in a case of fatal septicemia, *J. Clin. Microbiol.*, 9, 233-235(1979).
 7. Tison, D. L. and Kelly, M. T. : *Vibrio* species of medical importance, *Digan. Microbiol. Infect. Dis.*, 2, 263-276(1984).
 8. Blake, P. A., Weaver, R. E. and Hollis, D. G. : Diseases of humans(other than cholerae) caused by *Vibrios*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 34, 341-367(1980).
 9. Baethge, B. A. and West, B. C. : *Vibrio vulnificus* Did Hippocrates describe a fatal case, *Rev. Infect. Dis.*, 10, 614-615(1988).
 10. Oliver, J. D., Guthrie, K., Preyer, J., Wright, A., Simpson, L. M. Siebling, R. and jr. Morris, J. G. : Use of colistin-polymixin B-cellose agar for *Vibrio vulnificus* from the environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 737-739(1992).
 11. Kreger, A., Dechatelet, L. and Shirley, P. : Interaction of *Vibrio vulnificus* with polymorphonuclear leukocytes(Asstiation of virulence with resistance to phagocytosis), *J. Infect. Dis.*, 144, 244-248(1981).
 12. Gray, L. D. and Kreger, A. S. : Purification and characterization of an extracellular cytolyisin produced by *Vibrio vulnificus*, *Infect. Immun.*, 48, 62-72(1985).
 13. Kreger, A. and Lockwood, D. : Detection of extracellular toxins produced by *Vibrio vulnificus*, *Infect. Immun.*, 32, 583-590(1981).
 14. Miyoshi, S. I., Sugiyama, K., Suzuki, Y., Furuta, F., Miyoshi, N. and Shinoda, S. : Enhancement of vascular permeability due to histamine-releasing effect of *Vibrio vulnificus* protease in rat skin, *FEMS Microbiology Letters*, 40, 95-98(1987).
 15. Testa, J., Daniel, L. W. and Kreger, A. S. : Extracellular phospholipase A₂ and lysophospholipase produced by *Vibrio vulnificus*, *Infect. Immun.*, 45, 458-463(1984).
 16. Bahrani, K. and Oliver, J. D. : Studies on the lipopolysaccharide of a virulent and an avirulent strain of *Vibrio vulnificus*, *Biochem. Cell Biol.*, 68, 547-551(1990).
 17. McPherson, V. L., Watts, J. A., Simpson, L. M. and Oliver, J. D. : *Microbios*, 67, 141-149(1991).
 18. 김영단 : *Vibrio vulnificus*의 치사독성에 관하여, 韓國營養食糧學會誌, 18(2), 175-180(1989).
 19. Bowdre, J. H., Poole, M. D. and Oliver, J. D. : Edema and hemoconcentration in mice experimentally infected with *Vibrio vulnificus*, *Infect. Immun.*, 32, 1193-1199(1981).