

유행성 폐출혈열 환자에서 분리된 병원체에서 관찰된 다양한 형태들간의 연관성

연세대학교 의과대학 미생물학교실

이태윤 · 김경원 · 김계성

= Abstract =

Relatedness Between Different Morphologies of *L. interrogans* Isolated from a Patient with Epidemic Pulmonary Hemorrhagic Fever

Tae-Yoon Lee, Kyung-Won Kim and Gye-Sung Kim

Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

A strain of *Leptospira interrogans*(UM-19) was isolated in 1984 from a patient with epidemic pulmonary hemorrhagic fever.

The bacteria has been characterized morphologically by a polymorphism showing spiral forms, short and long rods in culture.

In order to study the biological relatedness among these forms of the bacteria, the short rods were separated from others by means of continuous sucrose density gradient centrifugation, and cultured at various temperatures such as 10°C, 15°C, 30°C and 37°C.

It was revealed that cultivation or subcultivation of the short rods has resulted in morphological changes observed by darkfield examination, silver stain, and scanning electron microscope showing spiral forms as well as short and long rods.

Key Words: *Leptospira interrogans*, polymorphism, continuous sucrose density gradient centrifugation.

서 론

1975년 가을 경기, 강원 및 충청지방을 중심으로 대유행한 급성 고열성 질환인 유행성 폐출혈열(epidemic pulmonary hemorrhagic fever)은 고열, 오한, 전신쇠약감, 심한 근육통, 각혈 및 호흡곤란 등을 주증상으로 하는 임상상과 현저히 높은 사망율을 특징으로 하며, 그 원인은 물론 이러한 질병의 존재 여부조차 알려지지 않은 새로운 질병으로써 대두되었다^{1,4-7}.

그후 1975년과 같은 대규모의 유행은 감퇴되고 소규모의 유행만이 산발적으로 지속되어 오다가, 1984년 9월에는 상기 지방이외에도 전남북, 경북, 충남에 이르기까지 전국적으로 대유행이 발생하여 많은 환자수를 내었으며⁸, 이를 계기로 각 연구기

* 본 연구는 1986년도 유한조교연구비로 이루어졌음.

관의 관심과 노력으로 1984년 10월에 그 병원체가 분리되기에 이르렀다¹⁰.

분리된 병원균은 생물학적 및 혈청학적특성이 모두 *Leptospira interrogans*와 일치하는 것으로 나타났으나, 형태학적으로는 다양하여 단간형, 장간형 이외에 왼쪽 혹은 오른쪽 방향의 나선형 및 구형등의 형태를 보이었으며^{8,9}, 배양하여 시간별로 관찰한 연구에서는 이 형태들간의 연관성이 제시되었다¹¹.

그러나 당시의 실험¹¹은 순수하게 한가지 형태의 균만을 분리하여 배양, 관찰한 것이 아니었으므로 이들 형태간의 연관성을 입증하기에는 불충분하였다.

이에 본 연구자들은 sucrose 밀도차 원침법(sucrose density gradient centrifugation)을 이용하여 상기 병원체의 여러 형태들중에서 한가지 형태만을 분리하여 이 형태로부터 배양을 시작하여 이를 시간별로 관찰함으로써 다양한 형태들간의 연관성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

유행성 폐출혈열로 진단된 환자의 노에서 1984년 본 교실에서 분리, 배양하여 계대하여온 균주인 UM-19¹⁸⁾를 사용하였다.

2. 배 지

균주의 배양을 위하여 한천이 1.5% 함유된 Fletcher 평판배지를 사용하였으며, 각 배지에는 150 µg/ml의 농도로 5-fluorouracil (5-FU; 중의제약)을 첨가하였으며^{18), 19)}, 56°C에서 30분간 열처리하여 비동화시킨 정상 가토혈청을 여과멸균하여 8%의 농도가 되도록 첨가하였다²⁰⁾.

3. Sucrose 밀도차

Sucrose (Sigma)를 세포배양배지인 MEM(modified Eagle's medium; Hazleton)에 녹여 10% 및 40%의 sucrose 용액을 만들어 density former (Hitachi)를 사용하여 10%에서 40%까지 직선상 밀도차를 만들었다²¹⁾.

4. UM-19 균주에 대한 가토의 항혈청

World Health Organization(WHO)²²⁾의 방법에 의거하여 10⁸의 생균을 매주 1회씩 5주간 정상 가토에 정맥내로 주사하여 제조하였고, 동일균주에 대한 항체역가는 현미경적 응집검사(microscopic agglutination test: MAT) 상 1:2,560이었다.

5. 단간형균의 분리

사용된 균주(UM-19)의 전술한 다양한 형태들간의 연관성을 보기 위하여는 어느 한 형태로부터 다른 형태로의 변형을 관찰하여야 하므로, 본 실험에서는 John 등¹⁷⁾의 방법에 착안하여 10~40%의 직선상 sucrose 밀도차를 이용하여 단간형균만의 분리를 시도하였다.

Sucrose 밀도차용액 35ml를 50ml의 원침관에 넣고, 그 위에 1×10⁷/ml의 농도로 생리식염수에 부유한 균액 5ml를 점층(overlay)하여, swing-bucket sorval refrigerated superspeed centrifuge로 1,500g에서 30분간 원침하였다.

분리된 단간형균을 MEM에 재부유하여, 1,500g에서 30분간 원심세척을 3회 실시하였다.

6. 분리된 단간형균의 혈청학적 동정

분리된 단간형균은 오염의 가능성을 배제하기 위

하여 UM-19 균주에 대한 가토의 항혈청을 사용하여 WHO²²⁾의 방법에 준하여 현미경적 응집검사를 시행하였다.

Sucrose 밀도차 원침법으로 분리된 단간형균을 1×10⁸/ml의 농도가 되도록 생리식염수에 부유한 생균 항원액 및 계대희석한 가토 항혈청 희석액을 시험관내에서 각각 동량 혼합하여 실온에서 3시간 반응시킨 후, 각 시험관에서 micropipette으로 소량씩 취하여 slide glass에 놓고 cover glass로 덮은 후 암시야현미경(DIALUX 20: Leitz)으로 관찰하여 응집과 형성 정도 또는 운동성이 상실되는 정도를 판독하였다.

7. 분리된 단간형균의 배양

Sucrose 밀도차 원침법으로 분리된 단간형균을 Fletcher 한천평판배지에 접종하여 10°C, 15°C, 30°C

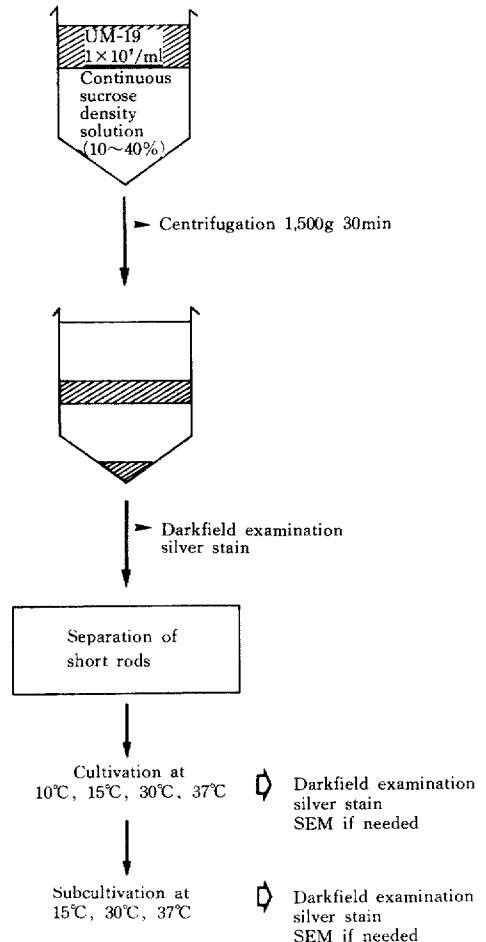


Fig. 1. Scheme for separation of short rods and morphological study at various culture temperatures.

Fig. 2. UM-19 균주의 sucrose 밀도차 원심분리 후에 형성된 중간층의 silver 염색 사진: 단간형 균들만이 관찰되고 있다.

°C 및 37°C 에서 배양하였다.

8. 배양한 단간형균의 계대배양 및 시간별 형태학적 관찰

각 배양온도에 따라 집락이 형성되면서부터 단일 집락을 백금으로 취하여 습윤표본(wet preparation)을 만들어 암시야현미경으로 세균의 운동성 및 형태를 관찰하거나^{11, 13}, Clark¹²의 방법에 의거하여 Ruge-용액, tannic acid 및 silver nitrate-용액을 제조하여 silver 염색을 시행하여 광학현미경으로 형태를 관찰하였다. Slide glass에 도달하여 실온에서 건조시킨 균 도말표본을 Ruge 용액으로 1분간 반응시켜 고정시킨 후, slide glass를 알코올 램프로 30초간 가열하면서 tannic acid-용액과 반응시키고, silver nitrate 용액을 20초간 가온하면서 반응시켰다.

각 배양온도에 따라 형성된 집락을 각각 10°C, 15°C, 30°C 및 37°C로 계대배양하여 각 온도마다 매일 그 형태를 관찰하였다.

이때 형태의 변화를 보이는 경우에는 김 주덕동⁸의 방법에 의거하여 주사전자현미경(scanning electron microscope : SEM)으로 균의 형태를 관찰하였다. 주사전미경적 관찰은 3% glutaraldehyde (phosphate buffered saline : PBS pH 7.4)로 고정하고 1% osmium tetroxide로 후고정한 후, 탈수 건조시켜 aluminium stub에 gold coating(Eiko 1B-3)하여 Hitachi S-450형 주사전자현미경으로 15-20 KV에서 관찰하였다(Fig. 1 참조).

성 적

1. 단간형균의 분리 및 혈청학적 동정

Sucrose 밀도차 원침후 점층했던 균액은 돌로 분

Fig. 3. UM-19 균주의 sucrose 밀도차 원심분리 후에 형성된 압착결정의 silver 염색 사진: 혼재되어 있는 나선형, 장간형 및 단간형균들이 관찰되고 있다.

리되어 50 ml 원침관의 중간에 약 10 mm 두께의 층을 형성하고 바닥에는 압착결정(pellet)을 이루었다.

중간층의 균액을 23G 주사침으로 분리하였다. 중간층의 균액 및 압착결정을 MEM으로 재부유하여 silver 염색으로 그 형태를 관찰한 결과, 중간층에서는 나선형이나 장간형균 없이 단간형균만이 관찰되어(Fig. 2 참조) 단간형균만의 분리가 가능하였으며 압착결정부유액에서는 나선형, 장간형 및 단간형들이 서로 혼재되어 있었다(Fig. 3 참조).

모든 형태의 세균들은 운동성을 가지고 있었고, 현미경적 응집검사상 UM-19 균주에 대한 가토의 항혈청과 반응하여 75% 이상의 균들이 응집괴를 형성하거나 또는 운동성을 상실하였다.

2. 배양 또는 계대배양한 세균의 형태

10°C 배양에서는 16주까지 관찰하였으나 세균집락이 형성되지 않았다.

15°C 배양에서는 10일째에 단간형균만으로 구성된 집락이 형성되었고, 이를 다시 각 온도에서 계대배양한 결과, 15°C, 30°C 및 37°C 모두에서 나선형으로 그 형태가 변형된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4 참조). 나선형균이 출현한 시기는 배양온도에 따라 달라서 15°C에서는 12일째, 30°C에서는 7일째, 37°C에서는 4일째에 나선형으로 변형되는 것을 관찰할 수 있었다.

30°C 배양에서는 배양 5일째에는 단간형균뿐이던 것이 배양 10일째에는 나선형과 단간형균이 혼재해 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 배양 10일째의 집락을 각 온도에서 계대배양한 결과 15°C, 30°C 및 37°C에서 모두 원래의 형태인 단간형균만이 관찰되었다.

37°C 배양에서는 5일째에 단간형, 장간형 및 나

Fig. 4. UM-19 균주를 sucrose 밀도차 원심분리법을 이용, 단간형균만을 분리하여 15°C에서 10일간 배양한 후 단간형균들만으로 구성된 집락을 30°C에서 7일간 배양했을 때의 silver 염색 사진: 원래 단간형이던 것이 나선형균으로 변형되었다.

선형이 거의 비슷한 비율로 혼재되어 있는 집락이 형성되었고, 이때 세균의 한쪽 끝에서 단간형균들이 분열하는 나선형균을 주사전자현미경으로 관찰할 수 있었다(Fig. 5 참조). 계대배양 결과 15°C, 30°C, 37°C에서 모두 단간형균만이 관찰되었다.

고 찰

1975년부터 우리나라에서 새로운 질환으로 인식되어 왔으며^{1,4,5,6,7}, 1984년 가을 중부지방을 중심으로 전남북, 경북, 충남지방등 전국에서 산발적으로 주로 논농사에 종사하는 사람에게서 많은 환자가 발생되어 문제를 일으킨 유행성 폐출혈열은 1985년 *Leptospira*에 의한 감염일 가능성이 높다고 제시된 바 있다².

그후 이 질환의 병원체를 분리하고자 하는 시도가 계속되어 1984년 이원영등¹⁰이 유행성 폐출혈열 증세를 보이는 환자에서 그 병원체를 분리하였던바 그 생물학적 및 혈청학적 특성이 *Leptospira interrogans*와 일치함을 규명하게 되었다^{3,8,9}.

*Leptospira*는 일반적으로 나선 방향이 오른쪽인 나선형세균으로써 직경이 0.10-0.15 μ m이며 길이는 6 μ m에서 12 μ m이상인 것으로 알려져 있으나¹⁶ 오른쪽 나선형이외에도 장간형, 구형등의 형태가 존재함이 보고된 바 있다^{14,15}.

이원영등¹⁰이 분리한 세균의 형태는 분리 당시에는 왼쪽 방향의 나선형이었다고 보고하였으나, 동일 균주를 대상으로 한 연구에서 이봉기등³과 김주덕등⁸은 왼쪽 방향의 나선형이외에도 단간형, 장간형, 구형 및 오른쪽 방향의 나선형이 존재함을 보고하였고, 1986년 김주덕등⁸은 배양 후 시간별 관

Fig. 5. UM-19 균주를 sucrose 밀도차 원심분리법을 이용, 단간형균만을 분리하여 37°C에서 5일간 배양했을 때의 주사전자현미경 사진: 한쪽끝에서 단간형균들이 분열되는 나선형균이 관찰되고 있다.

찰을 통하여 이들 형태 사이에 연관성이 있음을 제시하였으나 당시의 실험은 단일집락으로부터 시작한 것이며, 단일 형태만을 분리하여 시행한 것은 아니었다.

본 실험에서는 단간형균만을 분리하기 위하여 sucrose 밀도차 원심분리법을 사용하였는데, 이는 *Bacillus subtilis*에서 돌연변이에 의하여 출현하는 minicells¹⁷의 분리 방법에 착안한 것이며, UM-19 균부유액을 sucrose 밀도차 용액에서 1,500g에서 30분간 원침하였을 때 균부유액은 sucrose 밀도차 용액에서 중간층 및 압착결정으로 나뉘어졌으며 중간층의 균부유액 및 압착결정의 균부유액을 암시야 현미경 및 silver 염색법으로 그 형태를 관찰한 결과 중간층의 균부유액은 단간형균이어서 단간형균만의 분리가 가능하였다.

분리된 단간형균은 5-FU가 함유된 배지에 접종하여 온도별로 10°C, 15°C, 30°C 및 37°C에서 배양하였고, 현미경적 응집반응으로 원래 실험에 사용한 균주(UM-19)에서 기원한 것이 확인되어 오염의 가능성을 배제할 수 있었다.

이들 단간형균을 Fletcher 환천평판배지에 접종

하여 10°C, 15°C, 30°C 및 37°C에서 배양한 결과 10°C에서는 16주간 배양하였어도 세균증식을 관찰할 수 없었으며, 김주덕⁸⁾은 본 분리균주의 특성에 관한 보고에서 13°C 이하에서는 증식되지 않는다 하였는데, 분리된 단간형균은 10°C에서 16주간 배양한 결과 집락이 형성되지 않아 이는 원래 분리균주의 특성과 일치하였다.

단간형균을 15°C에서 배양한 결과, 배양 10일째에 단간형균만으로 형성된 집락을 관찰할 수 있었고, 이를 다시 각 온도별로 계대배양한 결과 15°C, 30°C, 37°C 모두에서 나선형 및 장간형으로 그 형태가 변한 것을 관찰할 수 있어 이는 단간형 균과 다른 형태의 균들—나선형 및 장간형—과의 연관성이 있음을 시사하는 바라고 사려되며, 나선형균이 출현한 시기는 배양온도에 따라 달라서 15°C에서는 배양 12일째, 30°C에서는 7일째, 37°C에서는 4일째에 나선형으로 그 형태가 변하는 것을 관찰할 수 있었다. 한편 15°C나 30°C에 비해 37°C에서 배양했을 때 나선이 더 조밀하게 꼬이는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 이봉기⁹⁾ 등의 보고와 일치하는 바이다.

30°C에서의 배양시 배양 5일째에는 단간형균뿐이던 것이 10일째에는 단간형과 나선형균이 혼재해 있는 것을 관찰할 수 있었으며 이는 배양초기에 0.5-1×1-2μm 크기의 단간형균이 관찰되던 것이 배양시일이 경과함에 따라 장간형과 나선형균을 관찰할 수 있었다는 이봉기⁹⁾의 보고와 일치하는 바이며, 30°C에서 10일간 배양한 집락을 15°C, 30°C 및 37°C에서 계대배양한 결과 모두 본래의 형태인 단간형균으로 환원되는 것을 관찰할 수 있었다.

37°C에서의 배양시 생존능(viability)에 영향을 줄 수 있기 때문에 일반적으로 *Leptospira* 배양의 최적 온도는 28-30°C로 알려져 있으나¹⁰⁾, 30°C 보다는 37°C에서 보다 빨리 집락이 형성되었으며, 37°C에서의 계대배양에서도 생존능에는 별 문제가 없었다.

그러나 37°C에서의 계대배양시 5일째에 단간형 장간형 및 나선형균이 거의 동등한 비율로 혼재되어 있었으며, 특히 나선형균의 한쪽 끝에서 단간형 균들이 분열하는 현상을 주사전자현미경으로 관찰할 수 있었으며, 이로써 단간형균과 나선형균과의 연관성을 확인할 수 있게 되었다. 37°C에서 배양한 집락을 15°C, 30°C 및 37°C에서 계대배양한 결과, 30°C에서의 계대배양한 결과와 마찬가지로 모두 단간형균만이 관찰되었다.

다양한 형태를 가지고 있는 UM-19 균주중 단간형균만을 분리한 후 온도를 달리하여 배양한 결과 UM-19 균주는 온도에 따라 그 형태가 변하는 생

활환(life cycle)을 가지고 있는 병원성 세균이라고 추정되며, 이러한 생활환을 보다 자세히 규명하기 위해서는 분리 또는 배양조건을 다양하게 달리하였을 때 동일한 생물학적 특성 및 혈청학적 특성을 가지는 병원성 세균을 반복하여 분리하여 그 형태학적 특성을 보다 자세히 규명해야 할 것이라고 사려된다.

결 론

유행성 폐출혈열의 증세를 보인 환자에서 분리된 병원균(UM-19) 부유액을 sucrose 밀도차를 이용한 원심분리로 단간형균만을 분리하여 배양온도를 달리하여 배양하여 세균의 형태를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 유행성 폐출혈열 환자로부터 분리된 다양한 형태들을 가지고 있는 원인균주(UM-19)를 10-40%의 sucrose 밀도차에서 1,500g로 30분간 원침하였을 때 단간형균만의 분리가 가능하였다.

2. 분리된 단간형균은 10°C에서 자라지 않았고, 혈청학적으로 원래의 원인균주 UM-19로 제조한 가토의 항혈청과 강하게 반응한 것으로 보아 원래의 균주에서 분리된 세균임을 알 수 있었다.

3. 분리된 단간형균을 15°C, 30°C 및 37°C에서 배양 및 계대배양하였을 때, 원래의 원인균주 UM-19가 가지고 있던 형태인 장간형 및 나선형의 세균이 출현하였다.

이상의 결과를 종합하여 보면 UM-19 균주는 오른쪽 방향의 나선형 세균이외에도 단간균, 장간균 등의 다양한 형태를 취하는 것은 각 형태의 균사이에 연관성이 있어 단일 형태의 세균이 배양조건에 따라 그 형태가 변한 것이라고 사려된다.

참 고 문 헌

- 1) 김기호, 홍순조, 이효식, 강문원, 김호연, 정규원, 정희영, 전종휘, 김선무, 이종무, 김성진: 폐염양 질환의 임상적 관찰. 대한의학협회지, 19:274, 1976.
- 2) 김정순, 이주원, 오대규, 인선동, 이용호, 조우현: 폐염양 질환(유행성 폐출혈열)의 원인구명을 위한 역학적 연구. 대한의학협회지, 28:77, 1985.
- 3) 김주덕, 이태윤, 이원영, 이봉기: 유행성출혈형 폐염양 질환의 병원체에 관한 연구. 대한미생물학회지, 21:191, 1986.
- 4) 노영무, 윤순재, 윤홍진, 최정수, 조환구, 한

- 봉섭, 김근상, 박찬일, 한홍식 : 급성폐출혈열. 대한의학협회지, **19**:315, 1976.
- 5) 박승철, 이정희, 김복현, 박한철, 민수홍 : 폐염양 질환의 역학적 조사. 대한의학협회지, **19**:263, 1976.
 - 6) 박용휘, 김춘열, 박석희, 석영관 : 폐염양 질환의 X선 소견. 대한의학협회지, **19**:293, 1976.
 - 7) 심영학, 심봉섭, 최경훈, 김두식, 신계철, 이강용, 이용우, 김영중, 진춘조, 이종태, 채일석 : 폐염양 질환 : 유행성 폐출혈열(가칭). 대한의학협회지, **23**:131, 1980.
 - 8) 이봉기, 유주현, 이원영, 김주덕 : 유행성 출혈형 폐염양 질환의 병원균 분리와 세균학적 특성. 한국미생물학회지, **23**:223, 1985.
 - 9) 이봉기, 유주현, 이태운, 박전환, 이원영, 김주덕 : *Leptospira* (Korea)의 병원성 및 leptospirosis 환자 조직과의 특이성. 한국미생물학회지, **23**:291, 1985.
 - 10) 이원영, 이봉기, 김주덕, 김정순, 김상옥 : 폐염양 출혈열 환자로부터 분리된 *Leptospira*의 세균학적 특성과 병인론적 증명. 한국역학회지, **6**:1, 1984.
 - 11) Center for Disease Control: Darkfield microscopy for the detection and identification of *Treponema pallidum*. Reprinted from Center for Disease Control, Atlanta, 1974.
 - 12) Clark G: Stains for microorganisms in smears, 407, Clark G, Staining procedures, 4th edition, Williams and Wilkins, Baltimore/London, 1981.
 - 13) Cox PJ and Twigg GI: Leptospiral motility. *Nature* **250**:260, 1974.
 - 14) Czekalowski JW: Electron microscope Study of *Leptospira*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **29**:29, 1963.
 - 15) Czekalowski JW and Eaves G: Formation of granular structure by leptospirae as revealed by electron microscope. *J. Bacteriol.* **69**:129, 1954.
 - 16) Holt SC: Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol. Rev.* **42**:114, 1978.
 - 17) John NR, Neil HM, Sheila IC, Linda LH and Roger MC: Minicells of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **114**:860, 1973.
 - 18) Johnson RC and Harris VG: Purine analogue sensitivity and lipase activity of leptospirae. *Appl. Microbiol.* **16**:1584, 1968.
 - 19) Johnson RC and Rogers P: 5-Fluorouracil as a selective agent for the growth of leptospirae. *J. Bacteriol.* **87**:422, 1964.
 - 20) Sonnenwirth AC: The Spirochetes, In Sonnenwirth AC, Jarett A(eds.) *Gradwohl's clinical laboratory method and diagnosis*. 8th ed. 1862, The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
 - 21) Weir DW: Immunologic methods in bacteriology, 39. 1, Weir DW, *Handbook of experimental immunology*, 3rd edition, Blackwell Scientific Publications, London, 1978.
 - 22) World Health Organization: Guidelines for the control of leptospirosis. Faine S(ed.) WHO offprint, Geneva, 1982.