

렙토스피라용혈소의 검색과 성질

서울대학교 의과대학 미생물학교실

장우현·강재승

= Abstract =

Detection and Property of Leptospiral Hemolysin

Woo-Hyun Chang and Jae-Seung Kang

Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University

To detect leptospiral strains which produce hemolysin and determine the optimal condition for assaying hemolysin, we screened reference strains and observed some property of hemolysin. Hemolysin activity was assayed with cell free culture liquids and erythrocyte suspension. The production of hemolysin by local strains isolated in Korea was assayed and compared with that of reference strains.

The hemolysin was produced by 18 strains among 38 reference strains and 3 local strains isolated in Korea.

The production of hemolysin began with growth of *Leptospira* cultured in EMJH medium and reached maximum at stationary phase.

The optimum temperature for hemolytic activity was 37°C. At lower temperature the activity of hemolysin was decreased progressively.

The hemolytic activity was completely inactivated after 30 minutes' exposure at 56°C. Hemolysis pattern was "hot-cold type" which showed increased hemolysis after cold incubation.

The hemolysin was most active on sheep erythrocyte and less active on ox, goat, human and guinea pig erythrocyte with the decreasing order.

Key Words: *Leptospira interrogans*, hemolysin

서 론

렙토스피라증은 *Leptospira interrogans*에 의한 급성열병으로 전세계적으로 발생되고 있다^{10, 11, 20, 23}. 우리나라에서도 1975년 이후부터 소위 유행성 폐렴양질환이라 불리운 병이 다수 발생되어¹ 그 원인을 밝혀내지 못하던 중, 1984년 9월 부터 강원도, 전라남도 지방에서 같은 양상의 질병이 다수 발생하여, 이 환자들중에서 조동⁴⁾과 이동¹⁰⁾이 *Leptospira interrogans*를 분리함으로써 국내에도 렙토스피라증이 존재함이 처음으로 증명되었다.

렙토스피라증은 매우 다양한 임상증상을 나타내며, 우리나라에서 발생하는 렙토스피라증의 임상증상은 심한 폐출혈을 동반하면서 호흡기 장애를 동

*본 연구는 1986년도 문교부학술연구 조성비에 의하여 이루어졌음.

반하는 특징을 가지고 있다^{2, 10)}. 이러한 병의 양상은 감염된 균의 혈청형, 균의 병독성, 감염량 및 숙주의 면역기능에 따라 다르다²⁰⁾.

렙토스피라가 질병을 일으키는 기전에 관하여는 오래전부터 연구되어 왔으나 아직 확실히 알려진바가 없다. 많은 연구자들은 렙토스피라의 병인으로 균의 직접 작용보다는 렙토스피라가 생산하는 독성 대사산물이 중요한 역할을 하리라 추정하고 있다^{7, 12, 16, 17, 21, 25)}. 그러나 아직 이러한 독성물질의 정확한 성상은 밝혀지지 않고 있다.

렙토스피라 독소의 하나로 용혈소가 알려져 있다. Russell²²⁾은 면양 혈액한천배지에 배양된 *Leptospira interrogans* serovar *pomona*가 용혈작용을 일으키는 것을 발견하였다. Alexander 등⁹⁾은 병원성 렙토스피라의 일부 균주의 배양액에 수용성 이열성 용혈소가 생성됨을 관찰하고, 이 용혈소는 투석되지 않으며 산소에 안정하고 면양, 소, 염소의 적혈

구에 작용한다고 보고하였다. 이후 여러 연구자들이 용혈소의 성질, 검색조건등을 연구하여 보고하였으며^{11, 15, 26, 30}, 용혈소의 생체내에서의 병원성 인

자로서의 역할에 대한 연구가 진행되었다^{6, 9}. 용혈소의 작용으로 직접 예상되는 용혈성빈혈은 동물에서는 잘 나타나고 있으나²⁴ 인체감염의 경우에 그 역

Table 1. Reference strains

Serogroup	Serovar	Strain
Australis	<i>australis</i>	Ballico
Autumnalis	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
Ballum	<i>ballum</i>	Mus 127
Bataviae	<i>bataviae</i>	Van Tienen
Cynopteri	<i>cynopteri</i>	3522 C
Gryppotyphosa	<i>gryppotyphosa</i>	Moskva V
Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis
Javanica	<i>javanica</i>	Veldrat
		Bataviae 46
Pomona	<i>pomona</i>	Pomona
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Salinem
Shermani	<i>shermani</i>	LT 821
Sejroe	<i>balcanica</i>	1627 Burgas
	<i>hardjo</i>	Prajtno
	<i>nyanza</i>	Kibos
Tarassovi	<i>tarassovi</i>	Perepelicin
Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
	<i>birkini</i>	
	<i>mwogolo</i>	Mwogolo
	<i>naam</i>	
	<i>budapest</i>	
	<i>nadahambukuje</i>	
	<i>copenhageni</i>	M-20
	<i>sarmin</i>	
	<i>gem</i>	
	<i>mankarso</i>	
	<i>weaveri</i>	
	<i>monymusk</i>	
Canicola	<i>bafani</i>	Bafani
	<i>jonsis</i>	Jonsis
	<i>benzamin</i>	Benzamin
	<i>kamituga</i>	Kamituga
	<i>bindjei</i>	Bindjei
	<i>portland-vere</i>	1039 (63-69)
	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
	<i>schueffneri</i>	Vleermuis 90 C
	<i>galtoni</i>	1014
	<i>sumneri</i>	Sumneri
	<i>kuwaitt</i>	Kon-7-157

활이 확실히 알려져 있지 않다. Trowbridge등²⁷⁾은 심한 용혈성빈혈을 보이는 렙토스피라증 환자에서 적혈구의 형태 변화와 적혈구 막의 sphingomyelin 이 감소함을 phospholipidase 작용임을 시사하였고 국내에서도 렙토스피라증 환자의 혈액학적 소견을 관찰하며 주된 소견으로 빈혈이 생김이 보고된 예가 있어 부분적으로 병적기전에 어떤 역할을 하리라 추정되고 있다.

또한 용혈소는 특정 균주에서만 생산되므로⁶⁾ 용혈소를 검색하므로써 균주의 혈청형 구분의 보조적인 자료로도 이용이 가능하다.

그러나 많은 연구자들이 공통적으로 배양상징을 용혈소 연구의 재료로 사용하고 있지만, 각 실험실에서 사용하는 배지가 다르고, 균주가 다르므로 많은 점에서 다른 성적을 제시하고 있다. 또한 렙토스피라증의 임상소견의 차이와 지역에 따라 병의 양상이 다를 때 각기 다른 질병기전이 존재할수 있다고 사료된다. 특히 우리나라의 렙토스피라증은 전형적인 Weil씨 병과는 임상증세가 다르며, 중공에서 발생하는 병¹⁾과 유사하게 폐출혈을 나타냄을 생각할때, 우리나라 지역의 균주에 대한 연구와 병원성인자에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

따라서 본 연구에서는 렙토스피라 독소의 병원성 인자로서의 역할에 관한 연구의 일환으로 렙토스피라 용혈소의 생성 여부를 측정하는 조건과 용혈소 생산의 최적조건을 검토하고 용혈소의 기본성질을 조사하고자 하였다. 또한 이를 토대로 우리나라에서 분리된 렙토스피라의 용혈소 생성여부를 검색하고 혈청형결정에 도움을 주고저 하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

실험에 사용한 균주는 한국에서 분리된 *Leptospira interrogans* 19주와 reference strain 38주를 사용하였다 (표 1, 2).

2. 배 양

각 균주를 EMJH배지¹⁴⁾에 식균주 30°C에서 진탕배양하였다. 분광광도계(Bausch Lomb, Spectronic 20)로 발육정도를 측정하고 (파장 400nm) 10,000g에서 30분간 원침하여 상청액을 분리하였다. 분리된 상청액은 -60°C에서 냉동보관하여 실험직전에 녹여 사용하였다.

3. 적혈구 부유액

실험에 사용한 적혈구는 사람, 면양, 소, 염소,

Table 2. Local strains isolated in Korea

Serogroup	Strain	Source
Canicola	HS-7	Human
Icterohaemorrhagiae	HM-3	Human
	HV-8	Human
	AP-2	Human
	AP-3	Rat
	AP-4	Rat
	HM-4	
	WH-20	Human
	HY-1	Human
	HY-2	Human
	16H	Human
	17H	Human
	18R	Rat
	19R	Rat
	20R	Rat
21R	Rat	
22R	Rat	
W-7R	Rat	
L4H	Human	

기니피 적혈구 등이다. 각 동물에서 채혈하여 동량의 Alsever's solution과 혼합 후 4°C 냉장고에 보관하여 3주 이내에 사용하였다. 실험 직전 적혈구를 등장 인산완충식염수(pH 7.2)로 3회 세척후 1% 부유액을 만들어 사용하였다.

4. 용혈작용 측정

용혈작용을 측정하기 위하여 Alexander¹⁾ 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 배양상청액 1ml에 10% NaCl 용액 84μl을 가하여 등장액을 만든후 1% 적혈구 부유액 1ml을 screw cap tube에 넣어 혼합한 뒤 항온수조에서 일정 온도로 반응시켰다. 일정시간이 지난후 즉시 PBS 2.5ml을 가하고 450g에서 10분간 원침하여 상청액을 분리하였다. 용혈의 정도는 분리된 상청액의 흡광도를 분광광도계(Bausch Lomb, Spectronic 20)로 파장 540nm에서 측정하여 정하였다. 매 실험마다 같은 배양상청액을 56°C에서 30분간 열처리하여 용혈작용을 비동화시킨 것을 대조군으로 사용하였다. 또한 각 실험시마다 사용한 적혈구 부유액에 증류수를 가하여 용혈시킨후 100% 용혈액과 50% 용혈액을 만들어 흡광도를 측정하고 이를 기초로 용혈의 백분율(percent hemolysis)을 계산하였다.

성 적

Table 3. Hemolysis of sheep RBC by cell free culture liquids of various serovar strains of *Leptospira*

Serogroup	Serovar	Strain	Culture absorbance	Persent Hemolysis
Australis	<i>australis</i>	Ballico	0.18	0
Autumnalis	<i>autumnalis</i>	Akiyami A	0.150	0
Ballum	<i>ballum</i>	Mus 127	0.172	69
Bataviae	<i>bataviae</i>	Van Tienen	0.180	0
Cynopteri	<i>cynopteri</i>	3522 C	0.130	64
Gryppotyphosa	<i>gryppotyphosa</i>	Moskva V	0.175	40
Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis	0.148	0
Javanica	<i>javanica</i>	Veldrat	0.092	0
		Bataviae 46		
Pomona	<i>pomona</i>	Pomona	0.085	0
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Salinem	0.170	0
Shermani	<i>shermani</i>	LT 821	0.160	70
Sejroe	<i>balcanica</i>	1627 Burgas	0.170	33
	<i>hardjo</i>	Prajtno	0.140	0
	<i>nyanza</i>	Kibos	0.130	0
Tarassovi	<i>tarassovi</i>	Perepelicin	0.190	0
Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA	0.150	0
	<i>birkini</i>		0.380	0
	<i>mwogolo</i>	Mwogolo	0.270	0
	<i>naam</i>		0.310	0
	<i>budapest</i>		0.310	0
	<i>nadahambukuje</i>			0
	<i>copenhageni</i>	M-20	0.310	0
	<i>sarmin</i>		0.270	10
	<i>gem</i>			0
	<i>mankarso</i>		0.300	0
	<i>weaveri</i>		0.170	80
	<i>monymusk</i>		0.280	0
Canicola	<i>bafani</i>	Bafani	0.375	100
	<i>jonsis</i>	Jonsis	0.250	15
	<i>benzamin</i>	Benzamin	0.310	11
	<i>kamituga</i>	Kamituga	0.265	24
	<i>bindjei</i>	Bindjei	0.372	0
	<i>portland-vere</i>	1039 (63-69)	0.134	100
	<i>canicola</i>	Hond Utrecht	0.310	24
		IV		
	<i>schueffneri</i>	Vleermuis	0.294	100
		90 C		
	<i>galtoni</i>	1014	0.345	20
	<i>sumneri</i>	Sumneri	0.205	13
	<i>kuwaitt</i>	Kon-7-157	0.05	31

1. Reference strain 의 용혈소 생산

용혈소를 생산하는 균주를 검색하기 위하여 15혈

청균에 속하는 균주의 배양상청액의 면양적혈구에 대한 용혈작용을 37°C 항온수조에서 12시간 작용시

켜 검사하였다.

검사한 균주중 *Leptospira interrogans* serovar *ballum* Mus127이 69%, serovar *cynopteri* 3522 C가 64%, serovar *grippotyphosa* Moskva V가 40%, serovar *balkanica* 1627 Burgas가 33%, serovar *shermani* LT 821이 70%의 용혈을 일으켰다. 혈청균 *Icterohemorrhagiae*에 속하는 12개 균주중 serovar *sarmin*이 10%, serovar *weaveri*가 80%의 용혈을 나타내었고 다른 serovar에서는 용혈을 일으키지 않았다. 혈청균 *canicola*에 속하는 11개의 serovar 균주는 serovar *bindjei* bindjei를 제외하고는 모든 균주가 용혈을 일으켰다(표 3).

2. 균의 증식에 따른 용혈소의 생산

Leptospira interrogans serovar *cynopteri* 3522 C와 serovar *grippotyphosa* Moskva V를 16일간 배양하면서 매일 검체를 채취하여 면양적혈구와 사람적혈구에 대한 용혈작용을 측정하였다. 면양적혈구는 37°C에서 6시간, 사람적혈구는 37°C에서 24시간 반응시켰다.

균의 증식은 배양 1일째 부터 시작되어 serovar *cynopteri* 3522 C는 8일에 흡광도가 0.33에 달한후 감소하여 16일째는 흡광도가 0.23이 되었다. Serovar *grippotyphosa* Moskva V는 배양 6일째 흡광도가 0.27에 이른후 같은 정도로 유지되었다. 면양적혈구에 대한 용혈작용은 serovar *cynopteri* 3522

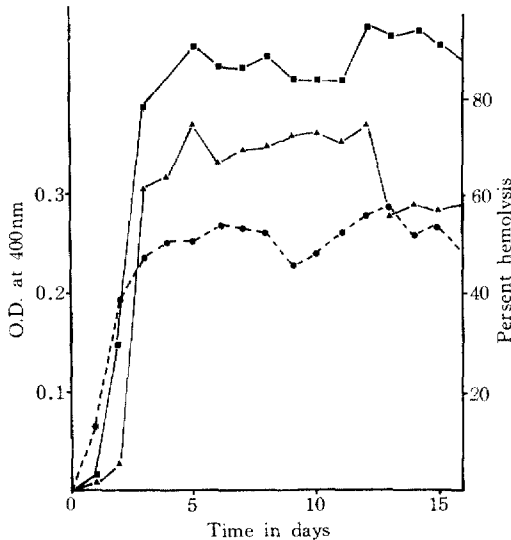


Fig. 1. The growth of *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* and hemolytic activity.

- Absorbance of *Leptospira* at 400 nm
- Hemolysis of sheep RBC
- ▲-----▲ Hemolysis of human RBC

C는 배양 2일째 4%, 3일 48%, 4일 74%, 5일 77%, 6일 78%, 7일 80%로 나타나 그후 16일까지 비슷한 정도의 용혈을 보이고 serovar *grippotyphosa* Moskva V는 배양 1일째 3%, 2일 30%, 3일 78%, 4일 84%, 5일에 91%의 용혈을 보이고 그후 같은 정도의 용혈작용을 보였다.

사람 적혈구에 대한 용혈작용은 serovar *cynopteri* 3522 C는 배양 2일째 5%, 3일 34%, 4일에 39%에 달한후, 배양 11일째부터 감소하여 11일에 25%, 12일 19%, 13일 20%, 14일 12%, 15일 11%, 16일 15%의 용혈을 보였다. 사람적혈구에 대해 serovar *grippotyphosa* Moskva V는 배양 2일째 6%, 3일 61%, 4일 64%, 5일에 75%에 이른후 배양 13일부터 감소하여 13일에 55%, 14일 58%, 15일 57%, 16일에는 58%의 용혈을 나타냈다(그림 1, 2). 두 균주가 배양 5일 이후에는 검출할 수 있는 충분한 용혈소를 생산하고 있었다.

3. 온도가 용혈소 활성에 미치는 영향

반응온도가 용혈소 활성에 미치는 영향을 알아보고, 최적 반응온도를 정하기 위하여 *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri* 3522 C, serovar *grippotyphosa* Moskva V의 용혈작용을 4°C, 25°C, 30°C, 37°C의 반응온도에서 각기 2, 4, 6, 12, 24시간에 관찰하였다.

Leptospira interrogans serovar *cynopteri* 3522 C의 용혈소는 면양적혈구에 대해 37°C에서는 2시간에 27%, 4시간 70%, 6시간 88%, 12시간 91%,

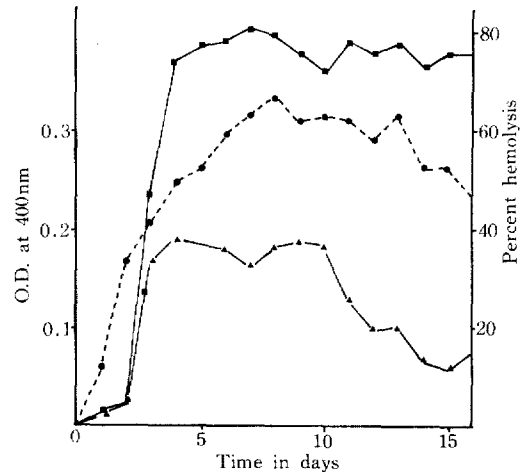


Fig. 2. The growth of *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri* and hemolytic activity.

- Absorbance of *Leptospira* at 400 nm
- Hemolysis of sheep RBC
- ▲-----▲ Hemolysis of human RBC

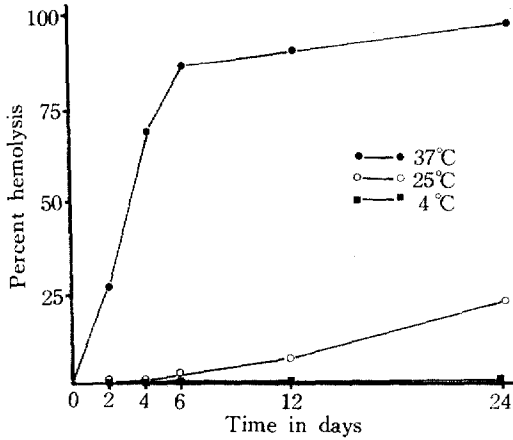


Fig. 3. Effect of temperature on the hemolysis of sheep RBC by the cell free culture liquid of *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri*.

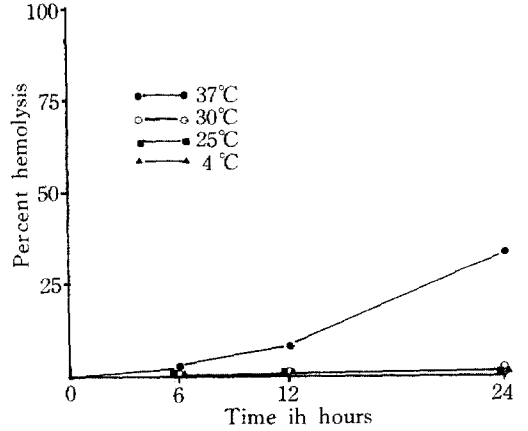


Fig. 4. Effect of temperature on the hemolysis of human RBC by the cell free culture liquid of *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri*.

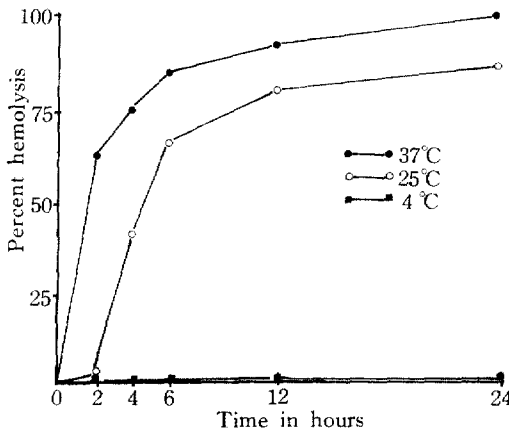


Fig. 5. Effect of temperature on the hemolysis of sheep RBC by the cell free culture liquid of *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa*.

24시간후 100%의 용혈을 일으키고 25°C에서는 6시간 5%, 12시간 8%, 24시간 23%의 용혈을 일으켰다(그림 3). 사람적혈구에 대한 작용은 37°C에서 6시간에 3%, 12시간 8%, 24시간에는 33%의 용혈이 일어났으며 30°C, 25°C, 4°C에서는 용혈이 일어나지 않았다(그림 4).

Leptospira interrogans serovar *grippotyphosa* Moskva V의 용혈소는 면양적혈구에 대해 37°C에서 2시간후 63%, 4시간 74%, 6시간 84%, 12시간 90%, 24시간에는 100%의 용혈을 일으키고 25°C에서는 각각 3%, 40%, 66%, 80%, 84%의 용혈을 일으켰다. 4°C에서는 용혈이 일어나지 않았다(그림 5). 사람적혈구에 대해서는 37°C에서 6시간에 11%, 12시간에 62%, 24시간에는 70%의 용혈을, 30°C에서는 각각 10%, 23%, 38%의 용혈을, 25°C

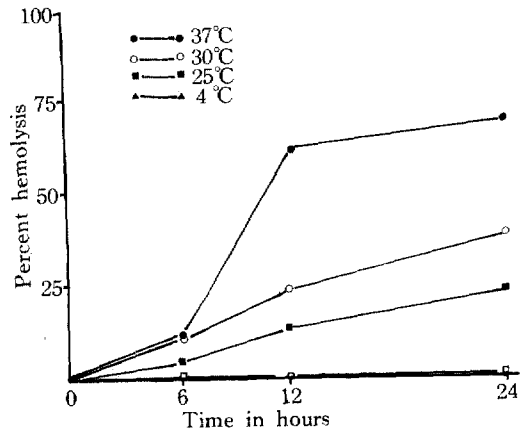


Fig. 6. Effect of temperature on the hemolysis of human RBC by the cell free culture liquid of *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa*.

에서는 4%, 16%, 23%의 용혈을 일으켰다. 4°C에서는 용혈이 일어나지 않았다(그림 6).

4. 열처리가 용혈소 활성에 미치는 영향

렙토스피라 용혈소를 56°C의 온도에서 각각 5분, 10분, 30분 가온하여, 가온처리하지 않은 용혈소와 용혈의 정도를 비교하여 상대적 활성(relative activity)을 구하였다.

Leptospira interrogans serovar *cynopteri*의 용혈소는 5분 가온하여 상대적 활성이 1% 이하로 감소하였고 *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa*의 용혈소는 면양적혈구에 대해서는 5분 가온하여 32.9%, 10분이상 가열시에는 용혈작용이 소실되었으며, 사람적혈구에 대해서는 5분 가온시 15.8%, 10분 가열시 9.6%, 15분 가온시 8.0%의

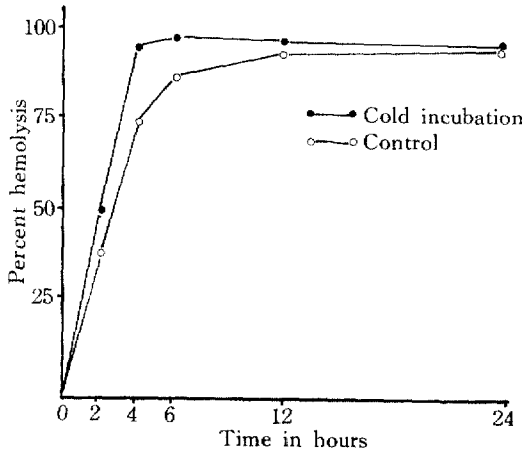


Fig. 7. Effect of cold incubation on the hemolysis of sheep RBC by the cell free culture liquid of *Leptospira interrogans* serovar *grippityphosa*.

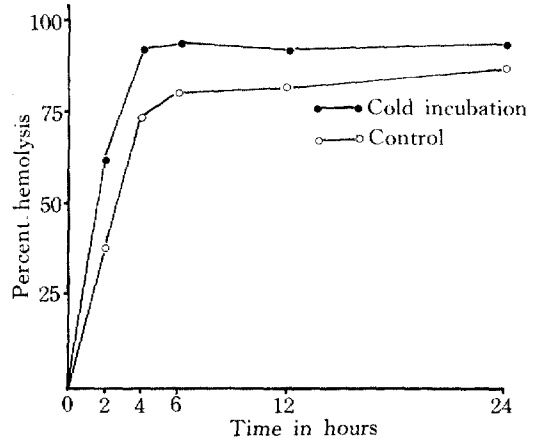


Fig. 8. Effect of cold incubation on the hemolysis of sheep RBC by the cell free culture liquid *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri*.

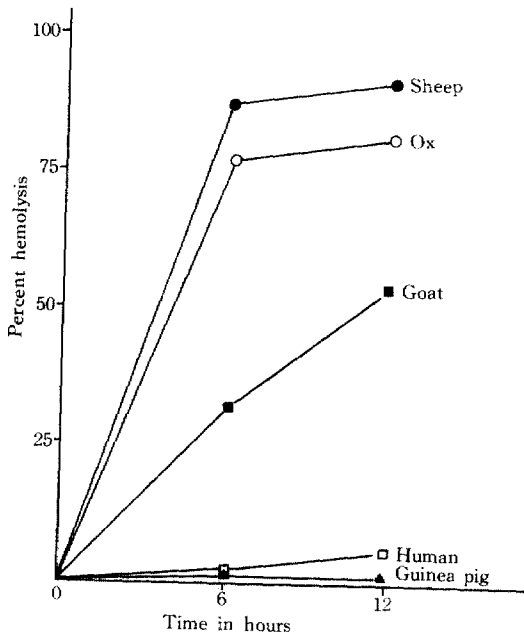


Fig. 9. The hemolysis of various animal RBC by the cell free culture liquid of *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri*.

상대적 활성을 나타냈다. 30분 가열시에는 용혈작용이 완전히 소실되었다.

5. 냉온처리의 영향

반응후 냉온처리가 용혈의 정도에 미치는 영향을 알기위하여 *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri*와 serovar *grippityphosa*의 배양상청액과 편양적혈구를 37°C에서 반응시킨후 4°C에서 30분간 정지하여 용혈을 측정하고, 냉온처리하지 않은 대조

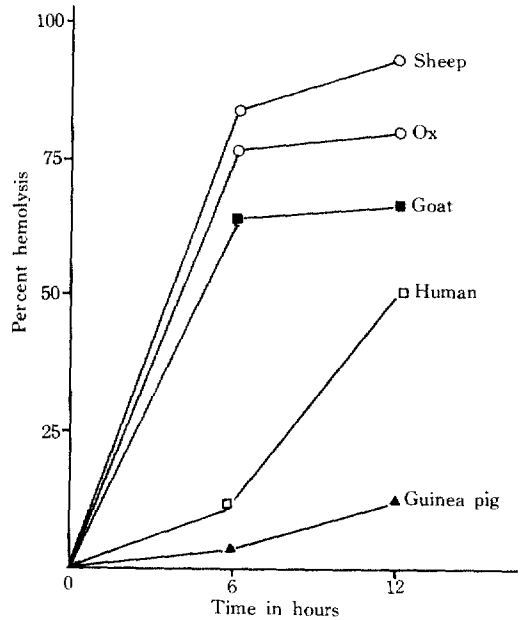


Fig. 10. The hemolysis of various animal RBC by the cell free culture liquid of *Leptospira interrogans* serovar *grippityphosa*.

군과 비교하였다.

용혈은 냉온처리를 하여 증가되어 *Leptospira interrogans* serovar *grippityphosa*의 용혈소는 2, 4, 6, 12, 24시간후 각각 35%, 74%, 86%, 92%, 94%의 용혈을 보이고, 반응후 냉온처리한 경우에는 각각 50%, 94%, 95%, 95%, 94%로 배양 2시간째부터 거의 최대의 용혈작용을 나타냈다(그림 7). *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri*의 경우 2, 4, 6, 12, 24시간에 각각 39%, 75%, 82%, 83%,

Table 4. Hemolysis of sheep RBC by cell free culture liquids of *Leptospira* isolated in Korea

<i>Leptospira interrogans</i>		Culture Absorbance	Percent Hemolysis
Serogroup	Strain		
Canicola	HS-7	0.250	54
Icterohaemorrhagiae	HM-3	0.280	0
	HV-8	0.195	0
	AP-2	0.255	0
	AP-3	0.310	0
	AP-4	0.310	0
	HM-4	0.190	0
	WH-20	0.290	0
	HY-1	0.120	0
	HY-2	0.200	0
	16H	0.250	0
	17H	0.195	0
	18R	0.185	0
	19R	0.310	0
	20R	0.255	0
	21R	0.201	0
	22R	0.214	0
	W-7R	0.300	23
	L4H	0.380	9

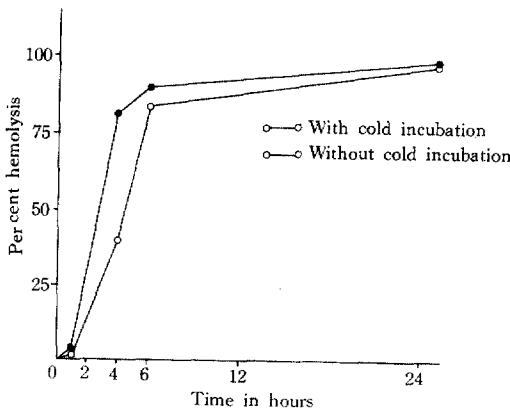


Fig. 11. Hemolysis of sheep RBC by the cell free culture liquid of *Leptospira* HS-7.

88%의 용혈을 보이나, 냉온처리시에는 각각 60% 91%, 93%, 90%, 93%로 용혈작용이 증가되었다 (그림 8).

6. 각종 동물 적혈구에 대한 작용

Leptospira interrogans serovar *cynopteri*와 serovar *grippotyphosa* 용혈소의 사람, 면양, 소, 염소 기니피의 적혈구에 대한 작용을 37°C에서 6시간, 12시간 반응시켜 관찰하였다.

Leptospira interrogans serovar *cynopteri*의 용혈소는 면양, 소, 염소의 적혈구에 대해 12시간에 각각 96%, 81%, 55%의 용혈을 일으키고, 사람적혈구는 7%, 기니피적혈구는 용혈시키지 않았다.

Leptospira interrogans serovar *grippotyphosa*의 용혈소는 면양, 소, 염소의 적혈구를 급격히 용혈시켜 6시간에 84%, 77%, 65%의 용혈을 일으키고 그후 완만히 증가하였다. 사람과 기니피의 적혈구에 대해서는 완만한 용혈작용을 나타내 12시간에 52%, 13%의 용혈을 나타냈다(그림 9, 10).

7. 한국분리균주의 용혈소생산

검색한 균주중 혈청군 Canicola에 속하는 HS-7 균주가 54%의 용혈을 나타냈으며 혈청군 Icterohaemorrhagiae에 속하는 W-7R이 23%, L4H가 9%로 약하게 용혈을 일으켰으며 그외 HM-3, HV-8, AP-2등의 16균주는 용혈을 나타내지 않았다(표 4). 이 중 HS-7 균주 용혈소의 면양적혈구에 대한 용혈작용을 37°C에서 반응시킨 결과는 그림 11과 같이 반응 6시간까지 급격히 용혈이 일어나 거의 최대치에 이르렀다.

고 찰

렙토스피라 용혈소의 검색에는 배양상청액과 적혈구 부유액을 시험관내에서 반응시키는 방법과 혈액천배지에 균을 키워 일정시간 후에 나타나는 용혈을 보는 방법이 있다²³⁾. 많은 연구자들이 상청액과 면양적혈구 부유액을 반응시키어 용혈작용을 측정하고 있으나, 균의 배양에 사용한 배지와 반응 시간에는 차이가 있다. Russell²⁴⁾은 Korthof's medium에 배양하여 37°C에서 4시간 반응한후, 다시 4°C에서 12시간 정치시킨후 측정하였다. Kasarov²⁵⁾은 Korthof's medium에 배양하여 관찰하였고, Hathaway와 Marshall¹¹⁾은 EMJH배지에 배양하여 18시간후에 측정하였다. Yanagihara 등²⁶⁾은 protein free medium에 배양하여 90분 후에 관찰하였다. 본 실험에서는 균을 EMJH배지에 배양하여 배양상청액을 사용하였다. 용혈은 37°C에서 6시간까지 급격히 일어나고 그후 완만히 진행되어 24시간에 100%의 용혈이 일어났다. 이러한 반응시간의 차이는 렙토스피라를 배양한 배지의 차이와 렙토스피라 균주의 차이에서 생기기라 사료된다.

일반적으로 세균 독소생산은 그 배지의 구성성분에 크게 좌우됨을 고려할 때 다른 배지에서 용혈소 생성과 활성을 비교 연구함이 필요하리라 사료된다.

렙토스피라의 용혈소 생산은 균속(genera)의 공통된 특성이 아니며 특정 혈청형에서만 생산되며 같은 혈청형내에서도 균주에 따라 생성이 다르다^{6, 11)}. 본 실험에서도 같은 혈청군인 Sejroe군에 속한 serovar *balcanica*, *nyanza*, *hardjo*의 용혈작용이 다르게 나타나 용혈소의 생산은 혈청군의 공통된 성질이 아님도 알 수 있었으며 같은 혈청형의 균주에서도 균주가 다를 때에는 용혈소의 생성유무가 다름을 다른 연구자의 보고를 비교하므로써 알 수 있었다^{6, 11)}.

배양날짜에 다른 용혈소의 생산을 관찰한 결과 균의 증식이 최대일때 최대의 용혈작용을 나타냈다. 사람적혈구에 대한 용혈작용은 면양적혈구와는 달리 배양 후기에 용혈작용이 감소하였다. 이는 균의 증식이 정지되고, 생산된 용혈소의 활성이 약해져도 용혈소에 예민한 면양적혈구는 같은 정도의 용혈을 일으키나 사람적혈구에 대한 작용은 용혈소의 생산감소, 활성의 약화등을 반영하는 것이라 사료된다. 이는 Alexander 등²⁷⁾이 면양적혈구에 대한, 배양날짜별 용혈소의 역가를 측정하여 배양후기에 역가가 감소한다고 보고한 것과 일치한다.

반응온도는 37°C가 최적 온도이며, 온도가 낮아짐에 따라 용혈작용도 감소하였다. 특히 *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri*의 용혈소는 그 작용이 현저하게 감소 되었다. 또한 56°C에 가열한

후에도 *Leptospira interrogans* serovar *gryppotyphosa*의 용혈소 보다 활성이 더욱 크게 감소되었다. 이는 이 균주가 내는 용혈소의 역가가 낮거나 용혈소의 성질이 다를 수 있다는 가능성을 생각할 수 있다. 본 실험에서는 용혈소의 역가를 구하지 않았으므로 이를 확인하지는 못하였다.

렙토스피라의 용혈소는 37°C에서 반응후 4°C에 정치하므로 용혈작용이 증가되는 "hot-cold type"의 용혈상을 나타내었다. 특히 면양적혈구에 대한 용혈작용은 37°C에서 반응시킨후 측정하면 24시간까지 계속 용혈작용이 증가하나, 반응후 4°C에서 정치하면 4시간째에 거의 최대 용혈작용을 나타냈다. 이러한 결과를 볼때 앞으로 용혈소 검색에 있어서 37°C에서 반응시킨후 4°C에서 일정시간 정치한후 용혈작용을 측정하여 검사의 민감도와 반응시간을 단축할 수 있으리라 사료된다. 이러한 "hot-cold type"의 용혈작용은 포도상구균의 beta-toxin 이나 *Clostridium*의 alpha-toxin에서 보이는 용혈상과 일치한다. 이러한 "hot-cold hemolysis"의 기전은 아직 밝혀져 있지 않지만, 이는 적혈구막의 phospholipid을 분해함으로써 용혈을 나타내는 독소에서 특징적으로 나타난다.

렙토스피라 용혈소의 작용기전으로는 Kasarov¹⁵⁾가 렙토스피라를 lecithin과 sphingomyelin을 분해하는 균주와 둘 다 분해하지 못하는 균주로 나누고 이를 분해하는 효소의 존재 여부가 균주의 용혈작용을 결정한다고 보고하였다. 또한 각 동물종의 적혈구 막의 phospholipid의 성분에 따라 용혈소의 작용에 대한 감수성이 결정된다고 하였다. Yanagihara 등²⁶⁾은 렙토스피라 용혈소가 phospholipase C임을 제시하였고, Kojima 등¹⁸⁾은 용혈소의 활성이 phosphatidylcholine과 sphingomyelin에 의해 억제되며, 배양상청액에서 phospholipase C의 활성을 보고하였다.

렙토스피라의 용혈소는 56°C 가온처리하여 활성을 상실하여 이열성임을 확인할 수 있었다. 이는 이 용혈소가 단백질성분임을 시사하고 있다.

용혈작용은 면양적혈구에서 가장 강하게 일어났으며 소, 염소, 기니피크 적혈구의 순서로 용혈이 일어났다.

한국에서 분리된 균주의 용혈소 생성여부를 검색한 결과 *Icterohemorrhagiae* 혈청군에 속한 대개의 균주가 용혈소를 생성하지 않음을 볼때 용혈소의 생성여부를 혈청군 혹은 혈청형의 구분시 일차적인 보조적 자료로 이용할 수 있으리라 사료된다. 더우기 혈청형결정이 교차흡수시험을 거쳐야 하는등 많은 시간이 소요되므로 앞으로 더많은 균주가 분리됨에

따라 이 균주에 대한 혈청형과 이들의 용혈소 생성에 대한 연구가 계속 필요하리라 사료된다.

앞으로 렙토스피라 용혈소 연구에 중요한 과제는 이의 정제라 생각한다. Yam 등¹⁰⁾은 부분정제한 배양상청액을 시료로하여 마우스 섬유아세포에 대한 독성과 면양적혈구에 대한 용혈작용의 상관관계를 연구하여, 두작용이 서로 관계가 없다고 보고하였다. 그러나 그들이 지적하였듯이 표적세포의 동물 종이 다르므로 조심스런 해석이 요구된다. 더구나 그들이 부분정제한 같은 분획에서 세포독성과 용혈작용을 동시에 일으키고 있다. 그러므로 순수정제한 용혈소가 세포독성을 나타내는지의 여부와 이를 실험동물에 투여했을때의 생체작용을 연구하는 것이 중요하다고 생각한다.

또한 지금까지의 연구자들이 임상적 병리학적 연구를 통하여 추정한 독소와의 상관관계를 밝히는 연구도 필요하리라 사료된다.

결 론

용혈소의 생성여부를 측정하는 조건과 용혈소의 기본 성질을 조사하고, 여러 혈청형의 reference strain과 한국에서 분리된 균주의 용혈소를 측정하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 검색한 38주의 reference strain 중 serovar *ballum* Mus 127, serovar *cynopteri* 3522 C, serovar *gripptypthosa* Moskva V, serovar *shermani* LT 821 serovar *balcanica* 1627 Burgas, serovar *sarmin*, serovar *weaveri*, serovar *bafani* Bafani, serovar *jonsis* Jonsis, serovar *benzamin* Benzamin, serovar *kamituga* Kamituga, serovar *portland-vere* 1039(63-69), serovar *canicola* Hond Utrecht IV, serovar *schueffneri* vleermuis 90 C, serovar *galtoni* 1014, serovar *summeri* Sumneri, serovar *kuwaitt* kon-7-157이 용혈소를 생성하였다.

2. 용혈소의 생산은 균의 증식과 함께 시작되어 정지기에 최고에 이르렀으며 그후 감소되었다.

3. 용혈작용은 37°C에서 가장 강하게 나타났으며 온도가 낮아짐에 따라 감소하였다. 배양상청액을 56°C에 30분간 가열하면 용혈소는 활성을 상실하였다.

4. 용혈작용은 4°C에서 정지하면 증가하는 "hot-cold type"의 양상을 나타내었으며, 반응에 필요한 시간도 단축되었다.

5. 용혈작용은 면양적혈구에서 가장 강하게 나타났으며 소, 염소, 사람, 기니픽 적혈구의 순으로 나타났다.

6. 한국에서 분리된 19균주중 *Canicola* 혈청군에 속한 HS-7주가 용혈소를 생성하였으며 *Icterohaemorrhagiae* 혈청군에 속한 2주가 용혈소를 형성하였다.

참 고 문 헌

- 1) 남상덕: 유행성 호흡기 질환의 역학적 양상. 대한의학협회지, **19**:269, 1976.
- 2) 석호봉, 김배정, 이현수, 서익수: 돼지 렙토스피라 속균에 대한 혈청학적 및 균분리조사연구 73 시험연구보고서(가축위생연구소), **49**:1973.
- 3) 이정상, 안규리, 오하영, 김성권, 최장원, 이문호, 지계근, 김용일, 설동섭, 박정문, 박영호: 혈청학적 방법으로 확인된 렙토스피라병의 임상상. 대한의학협회지, **29**:537, 1986.
- 4) 장우현, 김익상, 이우곤, 이재호, 지계근, 이정빈: 실험적으로 기니픽에 유발시킨 렙토스피라병에 대한 미생물학적 및 병리학적 연구. 대한미생물학회지, **21**:211, 1986.
- 5) 조민기, 백승복, 오희복, 송철: 한국에서 유행한 *Leptospira*의 세균학적 연구. 한국역학회지, **6**:16, 1984.
- 5) Alexander AD, Smith OH, Hiatt CW and Gleiser CA: Presence of hemolysin in cultures of pathogenic leptospire. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **91**:205, 1956.
- 7) Aren VM, Sarasin G and Green JH: The pathogenesis of leptospiraosis: Toxin production by *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *J. Vet. Res.*, **25**:836, 1964.
- 8) Bauer DC, Eames LN, Sleight SD and Ferguson LC: The significance of leptospiral hemolysin in the pathogenesis of *Leptospira pomona* Infection. *J. Infect. Dis.*, **108**:229, 1961.
- 9) Bauer DC and Morse EV: Variation and hemolysin production in relation to virulence of *Leptospira Pomona*. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **98**:505, 1958.
- 10) Chung H, Chiu F, Wu H, Hou T and Kuan C: Leptospirosis. A clinical and statistical study of 182 cases. *Chin. Med. J.* **77**:207, 1958.
- 11) Hathaway SC and Marshall RB: Hemolysis as a means of distinguishing between *Leptospira interrogans* serovars *balcanica* and *hardjo*. *J. Med. Microbiol.* **13**:477, 1980.
- 12) Heath CW, Alexander AD and Galton MM:

- Leptospirosis in the United States. Analysis of 483 cases in Man, 1948-1961. *N. Eng. J. Med.*, **273**:857, 1965.
- 13) Higgins R: A mini review of the pathogenesis of acute leptospirosis *Can. Vet. J.* **22**:277, 1981.
 - 14) Johnson RC and Harris VG: Differentiation of pathogenic and saprophytic Leptospirae. I. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* **94**:27, 1967.
 - 15) Kasarov LB: Degradation of the erythrocyte phospholipids and hemolysis of the erythrocytes of different animal species by Leptospirae. *J. Med. Microbiol.* **3**:29, 1970.
 - 16) Keenan KP, Alexander AD and Montgomery CA: Pathogenesis of experimental *Leptospira interrogans* serovar *bataviae* infection in the dog. Microbiological, clinical, hematologic, and biochemical studies. *Am. J. Vet. Res.*, **39**:449, 1978.
 - 17) Knight LL, Miller NG and White RJ: Cytotoxic factor in the blood and plasma of animals during leptospirosis. *Infect. Immun.* **8**:401, 1973.
 - 18) Kojima T, Yanagihara Y and Mifuchi I: Characterization of inhibitor to leptospiral hemolysin present in bovine serum. *Microbiol. Immunol.* **28**:291, 1984.
 - 19) Lee JS, Kim SG, Yun SC, Choi KW, Han Y C, Chi JG and Kim SY: An autopsy cases of leptospirosis, in Korea. *J. of Korean Med. Assoc.* **28**:373, 1985.
 - 20) McCrumb FR, Stockard JL, Robinson CR, Turner LH, Levis DG, Mamaisey CW, Kelleher MF, Gleiser CA and Smadel JE: Leptospirosis in Malaya I. Sporadic cases among military and civilian personnel. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, **6**:238, 1957.
 - 21) Miller NG, Allen JE and Wilson RB: The pathogenesis of hemorrhage in the lung of the hamster during acute leptospirosis. *Med. Microbiol. Immunol.* **160**:269, 1974.
 - 22) Milner AR, Wilks CR, Morgan IR and Rosen NE: *Leptospira* serogroup Hebdomadis infection as an Australian zoonosis. *Aus. Vet. J.* **56**:70, 1980.
 - 23) Russell CM: A "hemolysin" associated with Leptospirae. *J. Immunol.* **77**:405, 1956.
 - 24) Smith BP and Armstrong JM: Fatal hemolytic anemia attributed to leptospirosis in lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **167**:739, 1975.
 - 25) Stalheim OHV: A toxic factor in *Leptospira pomona*. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **126**:412, 1967.
 - 26) Stamm LV and Charon NW: Plate assay for detection of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* hemolysin. *J. Clin. Microbiol.* **10**:590, 1979.
 - 27) Trowbridge AA, Green JB, Bonnett JD, Shohet SB, Ponnappa BD and McCombs WB: Hemolytic anemia associated with leptospirosis. Morphologic and lipid studies. *Am. J. Clin. Path.* **76**:493, 1981.
 - 28) Turner LH: Leptospirosis. I. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, **61**:842, 1967.
 - 29) Yam PA, Miller NG and White RJ: A leptospiral factor producing a cytopathic effect on L cells. *J. Infect. Dis.* **122**:310, 1970.
 - 30) Yanagihara Y, Kojima T and Mifuchi I: Hemolytic activity of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* cultured in protein-free medium. *Microbiol. Immunol.* **26**:547, 1982.