

Vibrio vulnificus cytolysin의 흰쥐 혈소판 응집 기전

김현철 · 채수완* · 이병창** · 은재순#

우석대학교 약학대학, *전북대학교 의과대학 약리학교실, **원광대학교 의과대학

(Received August 31, 1999)

Mechanism of *Vibrio vulnificus* Cytolysin on Rat Platelet Aggregation

Hyun-Chul Kim, Soo-Wan Chae*, Byung-Chang Lee** and Jae-Soon Eun#

College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

*Departments of Pharmacology, Chonbuk National University Medical School, Chonju 560-182, Korea

**Wonkwang University Medical School, Iksan 570-749, Korea

Abstract — *Vibrio vulnificus* cytolysin has been incriminated as one of the important virulence determinants in *V. vulnificus* infection. In the present study, the effects of *Vibrio vulnificus* cytolysin on platelets were examined. *Vibrio vulnificus* cytolysin induced platelet aggregation and increased intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of rat platelets. These effects were abolished in Ca^{2+} -free buffer (2 mM EGTA). Cytolysin also potentiated ADP- and collagen-induced platelet aggregation. Lanthanum (2 mM) inhibited cytolysin-induced platelet aggregation. However, another Ca^{2+} channel blockers, verapamil (20 μ M) or mefenamic acid (20 μ M) did not block cytolysin-induced platelet aggregation. Osmotic protectants, sucrose (50 mM) and raffinose (50 mM) suppressed platelet aggregation by 35.9% and 63.4%, respectively. *V. vulnificus* cytolysin increased membrane conductances of platelet membranes. These results suggest that cytolysin-induced platelet aggregation is mediated via lanthanum sensitive-calcium influx which resulted from the pore formation by *V. vulnificus* cytolysin

Keywords □ *Vibrio vulnificus* cytolysin, platelet aggregation, calcium influx.

*Vibrio vulnificus*는 Hollis¹⁾가 생화학적 검사를 통하여 *Vibrio parahaemolyticus*나 *Vibrio alginolyticus*와 성상이 비슷하나 lactose를 분해하는 균들을 lactose-positive *Vibrio*라고 명명함으로써 알려지게 되었다. 이후 Farmer 등²⁾이 *Vibrio* 속과의 유전적 관계, 표현형의 유사성에 근거를 두고 *Vibrio vulnificus*라고 부를 것을 제안하여 현재의 공식 균명으로 사용되어지고 있다. 이 균은 G(-), 호염성간균으로 우리의 식생활과 밀접한 관련이 있는 어패류와 바닷물에 의해 감염되며 감염시 임상증상에 따라 상처 감염균과 원발성 패혈증균으로 구분된다.³⁾ 이중 특히 원발성 패혈증균의 경우

간경변이나 hemochromatosis와 같이 면역반응이 저하되어 있는 환자에서 높은 발병율을 보인다. 그러나, 현재까지 균 감염시의 발병기전에 대해서는 알려진 바가 없으며 균 감염시의 임상증상으로 미루어 그 exotoxin이 관여되어 있을 것으로 생각되고 있다.^{4,5)} *V. vulnificus*가 분비하는 exotoxin으로는 cytolysin,^{6,7)} protease,⁸⁾ collagenase,⁹⁾ antiphagocytic surface antigen,¹⁰⁾ lipase,¹¹⁾ siderophore¹²⁾ 및 phospholipase¹³⁾ 등이 알려져 있으며, cytolysin과 protease가 그 중 중요한 치사인자로 밝혀지고 있다.⁸⁾ 그러나 현재까지 *V. vulnificus*가 분비하는 cytolysin의 병리학적 기능에 대해서는 논란이 제기되어 왔다.^{4,14)}

포유동물의 순환 혈액을 이루는 구성 성분 중 가장 작은 세포인 혈소판은 지혈 작용 및 혈전 형성에 중요

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0652-290-1569 (팩스) 0652-290-1567

한 역할을 하는 cell fragment로서, 동맥경화증이나 심맥관계 및 뇌혈관 질환과 같은 성인병의 발병과도 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ *V. vulnificus* 감염시의 임상증상은 혈관 폐쇄를 일으키는 조직괴사를 유발하며, 또다른 *V. vulnificus* 감염시의 임상소견으로 thrombocytopenia가 보고되기도 하였다.¹⁶⁾ 아울러 Khoo 등¹⁷⁾은 *Synanceja horrida*의 stonustoxin에 의한 platelet aggregation과 세포내 calcium 농도($[Ca^{2+}]_i$) 증가를 보고한 바 있고, *staphylococcus* α -toxin에 의한 혈액응고 촉진¹⁸⁾ 그리고 zooxanthelatoxin-A에 의한 platelet aggregation 유발¹⁹⁾ 등 여러가지 독소에 의한 혈소판 기능조절이 알려져 왔다.

그러나, 현재까지 *V. vulnificus* cytolysin의 생체 내에서의 표적조직 특히 혈소판에 대한 영향에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 *V. vulnificus* cytolysin이 혈소판에 미치는 영향을 규명하고자 cytolysin에 의한 혈소판 응집, 혈소판 $[Ca^{2+}]_i$ 변화 그리고 혈소판 세포막의 전도도 변화를 조사하였다.

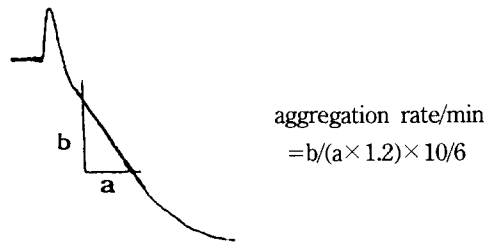
실험방법

실험동물 및 시험물질 - 실험 동물로는 대한실험동물센터에서 구입한 웅성 백서(Sprague-Dawley, 250-350g)를 실험실에서 5일 이상 적응시켜 사용하였다. 혈소판의 준비는 Rho 등¹⁹⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 흰쥐의 복대동맥에서 2.2% sodium citrate를 미리 채운 주사기에 혈액과 sodium citrate의 비율 9:1(v/v) 되도록 채혈하고 110g에서 10분간 원심분리한 상층액을(25°C) PRP(platelet-rich plasma)로, 침전물을 다시 4°C에서 1000g로 20분간 원심분리한 상층액을 PPP (platelet-poor plasma)로 이용하였다.

실험에 사용한 *Vibrio vulnificus* 균주는 미국 M. H. Kothary(FDA, Washington D.C., 미국) 박사로부터 분주받은 HNCC를, 균은 Kreger 등⁷⁾의 방법에 따라 heart infusion diffusate broth에 접종하여 사용하였다. *V. vulnificus*가 분비하는 cytolysin은 Kim 등²⁰⁾의 방법에 따라 정제하고, cytolysin의 활성은 마우스 적혈구의 용혈정도를 이용한 Bernheimer 등²¹⁾의 방법에 준하여 유리된 hemoglobin 농도를 545 nm에서의 흡광도로 측정하여 50%의 hemoglobin 유리를 일으킨 cytolysin의 양을 1 hemolytic unit(HU)로 정의하였다.

ADP(adenosine diphosphate), collagen등과 같은 혈소판 응집인자는 Chrono-Log사(USA), Fura-2 AM은 Molecular Probe사(USA)에서 그리고 영양액 조제 및 기타 약물은 모두 Sigma사(USA)에서 구입하여 사용하였다.

혈소판 응집능 측정 - 혈소판 응집능 측정에는 aggregometer (Chrono-Log, 미국)를 이용하였으며 응집정도는 aggregation rate/min으로 표시하였다.



전기생리화학적 기록 - 혈소판 세포막의 전도도를 측정하기 위하여 patch-clamp technique²²⁾을 이용하였다. Sodium salicylate(1 mM)를 처리하여 자발적 응집을 방지한 혈소판을 silicon으로 coating한 bath에 두고, 미세전극과 혈소판 사이에 giga-seal이 형성되면 약 3-5 분 후 bath에 cytolysin(3 HU)을 가하고 전류의 변화를 관찰하였다.

미세전극(5~10 M Ω)은 borosilicate유리관 (1.5~1.8 \times 100 mm, Kimble, 미국)을 이용하여 미세전극제작기(Narishige PP-83, 일본)에서 준비하였다. Bath(1 ml) solution과 미세전극 solution은 모두 pH 7.2, K-5 solution(140 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES)을 사용하였다. 기록되는 전류는 신호 증폭기(Axopatch-1D, Axon Instruments, 미국), 디지털 신호변환장치(PCM-501ES, Sony, 일본)를 거쳐 비디오(Gold star, 한국) 테이프에 저장하였다. 저장된 자료는 A/D converter(Digidata 1200, Axon Instruments)를 거쳐 컴퓨터에 입력하고 pClamp(Ver 5.7.2, Axon Instruments)를 이용하여 분석하였다.

세포내 calcium 측정법 - Grynkiewicz,²³⁾ Rho 등¹⁹⁾의 방법에 따라 $[Ca^{2+}]_i$ 를 측정하였다. 먼저, sodium salicylate(1 mM)를 처리한 혈소판 현탁액(5 \times 10⁸ 개/ml)에 Fura-2 AM(4 μ M)을 가하여 37°C에서 40분간 반응시킨 후 Tyrode-HEPES(pH 7.36) solution으로 2~3번 세척하고 혈소판 수를 3 \times 10⁸ 개/ml로 재조정하였다. $[Ca^{2+}]_i$ 는 340 nm와 380 nm의 dual excitation

wave length에 의한 형광의 비를 emission wavelength 510 nm에서 기록하여 나타내었다.

통계처리 - 실험결과는 mean ± s.e.m.으로 나타내었고 약물반응에 대한 통계학적 처리에는 Student's t-test를 이용하였다.

실험결과 및 고찰

혈소판 응집에 미치는 *V. vulnificus* cytolyisin의 영향 - *V. vulnificus* cytolyisin은 농도 의존적으로(1-30 HU) 비가역적인 혈소판의 응집을 유도하였다 (n=5, Fig. 1A). *V. vulnificus* cytolyisin 처리후 응집이 시작되기 전까지 lag time이 관찰되었으며, lag time동안 투과도의 감소가 관찰되었다. *V. vulnificus* cytolyisin의 농도 증가에 따라 lag time은 감소하였으며, aggregation rate는 증가되었다(Fig. 1B). Aggregation rate는 실험방법에서 기술한 바와 같다. 한편, *V. vulnificus* cytolyisin의 혈소판에 대한 영향은 2 HU 이상에서 급격히 나타남을 알 수 있었다. 실제 현

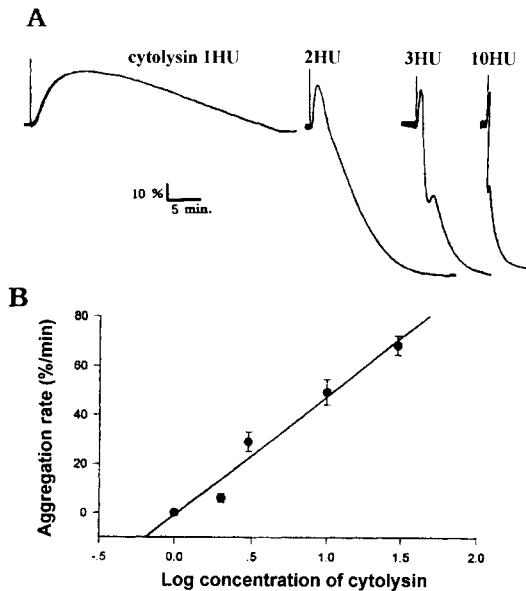


Fig. 1 - Effects of *Vibrio vulnificus* cytolyisin on platelet aggregation. Panel A shows typical recordings of aggregation in platelet-rich plasma induced by the cytolyisin. Platelet-rich plasma was preincubated for 5 min at 37°C before addition of the cytolyisin. Panel B shows dose-dependent increase of aggregation rates induced by the cytolyisin. Values are given as mean ± s.e.m. of five independent experiments.

미경을 이용한 관찰에서도 1 및 1.5 HU cytolyisin에 의한 혈소판 응집은 관찰되지 않았다.

***V. vulnificus* cytolyisin이 혈소판 [Ca²⁺]_i에 미치는 영향** - [Ca²⁺]_i는 혈소판 응집에 중요한 역할을 하는 인자의 하나로 알려져 왔다.^{17,24-26} 혈소판 응집능의 증가와 함께 *V. vulnificus* cytolyisin(1~30 HU)은 백색 혈소판의 [Ca²⁺]_i를 농도 의존적으로 증가시켰으며(Fig. 2A), 이는 혈소판 [Ca²⁺]_i의 증가가 혈소판 응집의 중요 인자임을 시사하였다. 한편 1 HU *V. vulnificus* cytolyisin은 혈소판 [Ca²⁺]_i을 증가시켰으나(Fig. 2B) 응집을 일으키지는 못하였다. 이는 혈소판 응집을 유도하는 [Ca²⁺]_i의 증가가 임계점을 가지고 있어서 그 이하의 미세한 [Ca²⁺]_i의 변화에서는 응집을 유도하지 않음을 보여주었다.

***V. vulnificus* cytolyisin에 의한 [Ca²⁺]_i 증가기전** - [Ca²⁺]_i의 증가는 세포 외부로부터의 Ca²⁺ 유입 증가

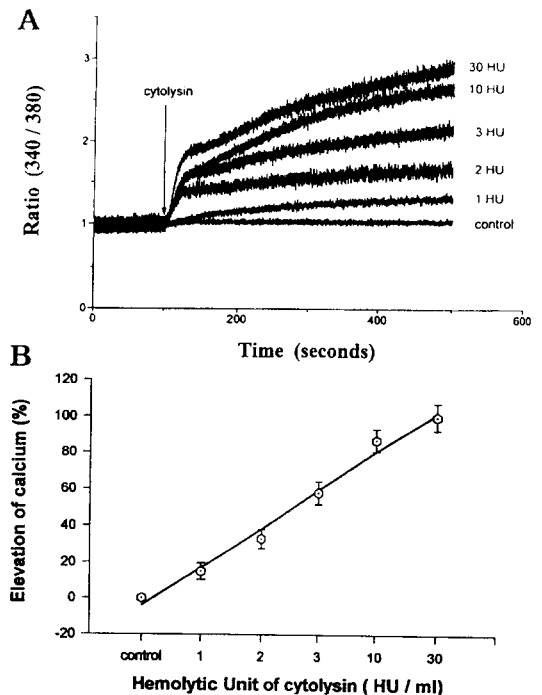


Fig. 2 - Effects of *V. vulnificus* cytolyisin on intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i). Panel A shows typical traces of [Ca²⁺]_i change recorded in platelets loaded with fura-2. Platelet suspensions were treated as described in Fig. 1. Panel B shows dose-dependent increase of [Ca²⁺]_i. [Ca²⁺]_i change in response to 30 HU cytolyisin was taken as 100%. Values are given as mean ± s.e.m. of four independent experiments.

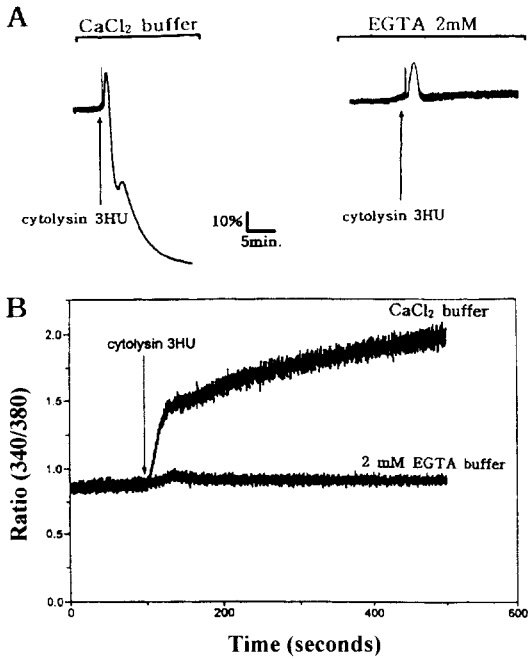


Fig. 3—Effects of extracellular Ca^{2+} on platelet aggregation (A) and $[Ca^{2+}]_i$ increase (B) induced by cytolyisin (3 HU). *V. vulnificus* cytolyisin-induced platelet aggregation and $[Ca^{2+}]_i$ increase were monitored in the presence of extracellular Ca^{2+} or in the 2 mM EGTA buffer.

와 세포 내 저장소에서의 유리 증가로 크게 대별해 볼 수 있다.²⁵⁾ *V. vulnificus* cytolyisin에 의한 혈소판의 응집은 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가에 따라 농도 의존적으로 일어남을 확인하였기에, 이후의 실험에서는 혈소판의 응집에 관여하는 $[Ca^{2+}]_i$ 증가에 동원되는 Ca^{2+} 의 원천을 조사하였다. EGTA(2 mM)를 포함한 Ca^{2+} -free 용액에서 3 HU *V. vulnificus* cytolyisin에 의한 혈소판의 응집은 완전히 차단되었으며, 혈소판의 $[Ca^{2+}]_i$ 에도 거의 변화가 나타나지 않았다 (Fig. 3A). 이는 *V. vulnificus* cytolyisin에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가 및 혈소판 응집이 세포외부로부터의 Ca^{2+} 유입에 의한 것임을 보여주었다. 아울러 혈소판응집 억제와 함께 $[Ca^{2+}]_i$ 증가억제가 관찰됨으로써 $[Ca^{2+}]_i$ 증가가 혈소판 응집의 중요 인자로 작용하고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

한편 EGTA 처리 즉시 $[Ca^{2+}]_i$ 의 미세한 증가가 관찰되었다(Fig. 3B). 이는 세포 내 저장소에서 Ca^{2+} 유리에 의한 것이라고 생각되어지며 추후의 연구가 필요

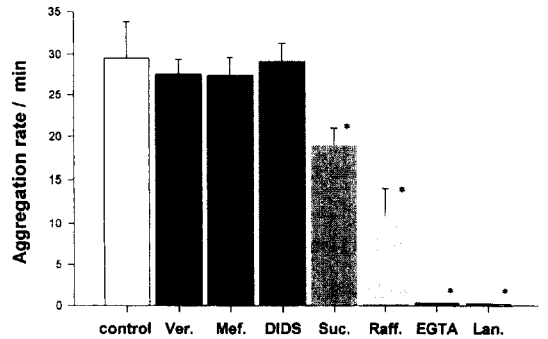


Fig. 4—Effects of various agents on cytolyisin-induced platelet aggregation rate. The following drugs were applied 2–5 min before addition of cytolyisin (3 HU): cyt (cytolyisin 3 HU), Ver. (verapamil 20 μ M), Mef. (mefenamic acid 20 μ M), DIDS (100 μ M), Suc. (sucrose 50 mM), Raff. (raffinose 50 mM), EGTA 2 mM, Lan. (lanthanum 2 mM). Values are given as mean \pm s.e.m. of five independent experiments. *: Significantly different from control group($p < 0.05$).

하다고 생각된다. 그러나 앞의 실험결과에서 보는 바와 같이 세포질 내의 미세한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화는 혈소판의 응집에는 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰한 바가 있다. 따라서 세포 내 저장소에서의 미세한 Ca^{2+} 의 유리는 혈소판 응집에 영향을 주지 않을 것으로 사료된다.

Ca^{2+} channel 및 삼투압 조절물질이 cytolyisin의 작용에 미치는 영향—*V. vulnificus* cytolyisin에 의한 세포 내 Ca^{2+} 유입 경로를 확인하기 위하여 여러가지 Ca^{2+} 통로 차단제를 사용하여 그 효과를 관찰하였다 (Fig. 4). Voltage-dependent Ca^{2+} channel blocker인 verapamil(20 μ M)은 cytolyisin의 혈소판 응집능에 영향이 없었으며, 이는 cytolyisin에 의한 세포내 Ca^{2+} 유입이 voltage-dependent Ca^{2+} channel과 무관함을 보여주었다. 또한 organic Ca^{2+} antagonist인 mefenamic acid(20 μ M)도 cytolyisin에 의한 혈소판의 응집을 차단하지 못하였다. 그러나 inorganic Ca^{2+} channel blocker인 lanthanum(2 mM)의 전처리에 의해 *V. vulnificus* cytolyisin에 의한 혈소판응집은 거의 차단됨을 관찰할 수 있었다. 한편 chloride 통로 차단제인 DIDS 역시 cytolyisin에 의한 혈소판 응집에 영향을 주지 않았다. 이는 *V. vulnificus* cytolyisin에 의한 세포내 Ca^{2+} 유입이 기존의 세포막 Ca^{2+} 통로와는 다른 lanthanum 감수성 경로에 의한 것임을 보여주었다.

기존의 *Vibrio* toxin들은 세포막에 oligomer를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 세포막에 선택성이 없는 pore가 형성되게 되면 삼투압의 불균형이 일어나 세포의 기능변화가 발생하게 된다. *V. vulnificus* cytolysin에 의한 혈소판의 응집이 cytolysin의 pore형성과 관계되어 있는지를 알아보기 위하여 osmotic protectants가 cytolysin의 혈소판 응집능에 미치는 영향을 관찰하였다. Sucrose 및 raffinose를 각각 50 mM씩 5분간 전처치한 후 *V. vulnificus* cytolysin(3 HU)에 의한 aggregation rate/min는 대조군의 29.5 ± 4.3 에서 각각 18.9 ± 2.0 과 10.8 ± 3.2 로 유의하게 감소되었다. 이러한 결과는 cytolysin에 의한 혈소판 응집에 삼투압의 변화 즉, *V. vulnificus* cytolysin에 의한 세포막 pore 형성이 관여하고 있음을 보여주었다.

Cytolysin의 혈소판응집능에 미치는 온도의 영향 - *V. vulnificus* cytolysin에 의한 혈소판 응집에 관여하는 cytolysin의 세포막 결합 및 oligomerization 과정을 알아보기 위하여, 온도변화에 따른 cytolysin의 혈소판 응집능 변화를 조사하였다. 4°C에서 *V. vulnificus* cytolysin에 의한 혈소판의 응집이나 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 관찰되지 않았다. 한편 4°C에서 3 HU cytolysin 처리에 의해 혈소판 응집이 나타나지 않은 시료를 원심 분리하여 cytolysin을 제거하고 다시 37°C에서 배양하면 혈소판 응집과 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 *V. vulnificus* cytolysin의 세포막 결합에 온도가 영향을 미치지 않음을 보여주었고, *V. vulnificus* cytolysin에 의한 혈소판 응집 및 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 cytolysin monomer의 세포막 결합 이후 적절한 온도 이상에서 진행되는 oligomerization에 의해 유도됨을 보여주었다.

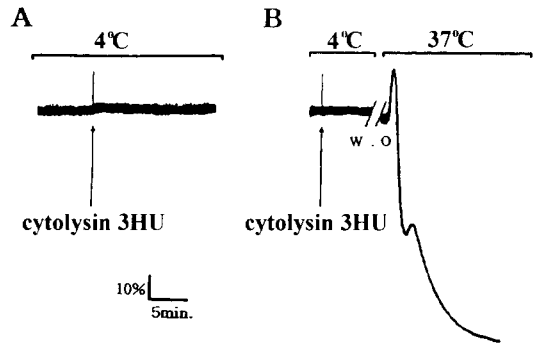


Fig. 5 - Effect of temperature on *V. vulnificus* cytolysin-induced platelet aggregation. Platelet suspensions were preincubated at 4°C for more than 5 min before addition of *V. vulnificus* cytolysin (3 HU/ml). In panel B, platelets were resuspended in fresh buffer to remove *V. vulnificus* cytolysin and incubated at 37°C.

혈소판 세포막 전도도에 미치는 cytolysin의 영향 - *V. vulnificus* cytolysin oligomer에 의한 혈소판 세포막의 이온투과성 변화가 나타나는지를 확인하기 위하여 *V. vulnificus* cytolysin에 의한 혈소판 세포막의 전도도 변화를 조사하였다. Patch clamp technique의 whole cell mode에서 *V. vulnificus* cytolysin은 혈소판 세포막을 통한 전류를 생성하였다. 미세전극과 bath내 용액을 동일한 buffer(K-5 용액)로 채우고 막전압을 -60 mV로 고정한 상태에서, bath내에 첨가한 *V. vulnificus* cytolysin(3 HU/ml) 투여 후 2~5 분에 전류의 증가가 관찰되었으며 전류의 크기는 시간에 비례하여 증가되었다(Fig. 6). 이때 기록된 단위 전류의 전도도는 34.1 pS이었다. 이러한 결과는 혈소판 세포막에 형성된 *V. vulnificus* cytolysin oligomer를 통하

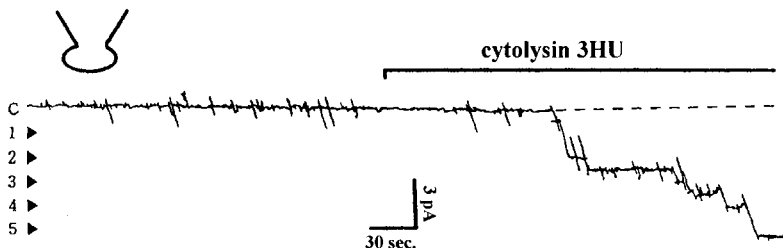


Fig. 6 - Effect of *V. vulnificus* cytolysin on platelet membrane. Trace shows the current obtained from rat platelet membrane after incubation with 3 HU *V. vulnificus* cytolysin. The bath and pipette solutions were K-5 solution which did not contained $CaCl_2$. Membrane potential was held at -60 mV and the filter for tracing reproduction was set at 300 Hz. The number beside the current trace indicates the number of the unit currents. Dot-line indicated in C (control) shows the base line current.

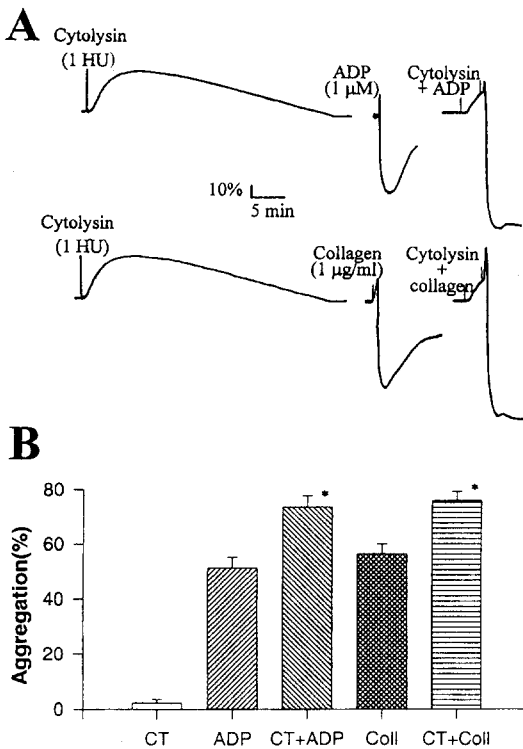


Fig. 7—Effects of *V. vulnificus* cytolysin (1 HU) on ADP- and collagen-induced platelet aggregation in platelet-rich plasma. ADP (1 μM) and collagen (coll, 1 μg/ml) was added after preincubation with cytolysin (CT, 1 HU) for 3 min. *V. vulnificus* cytolysin (1 HU) potentiated ADP- and collagen-induced platelet aggregation. Values in panel B are given as mean ± s.e.m. of four independent experiments. *: Significantly different from ADP or collagen treated group(p<0.05).

여 이온 이동이 가능하게 함을 보여 주었다. 그러나 이러한 pore를 통한 Ca²⁺의 이동이 [Ca²⁺]_i 증가의 직접 경로가 되는지는 확실하지 않으며 이를 위하여 *V. vulnificus* cytolysin이 생성하는 pore의 이온선택성 연구를 비롯한 추후의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Cytolysin이 ADP, collagen의 응집능에 미치는 영향—*V. vulnificus* cytolysin의 혈소판 응집능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈소판 응집 인자 ADP와 collagen의 혈소판 응집능에 미치는 *V. vulnificus* cytolysin의 영향을 조사하였다. 응집을 일으키지 않는 cytolysin의 농도인 1 HU/ml을 전처리하고, ADP(1 μM) 또는 collagen(1 μg/ml)을 처리한 결과, 대조군에 비하여 최대응집능(%)의 증가와 응집시간 단축이 관

찰되었다(Fig. 7). 또한, ADP와 collagen에 의한 자체 응집반응은 가역적이었으나 *V. vulnificus* cytolysin 존재하에서는 비가역적응집이 관찰되었다.

결론

1. *Vibrio vulnificus* cytolysin은 농도 의존적으로 혈소판응집을 유도하였으며 아울러 ADP나 collagen의 응집능에 상승효과를 나타내었다.

2. *V. vulnificus* cytolysin은 농도 의존적으로 혈소판 [Ca²⁺]_i를 증가시켰으며, 세포외부의 Ca²⁺을 제거하면 *V. vulnificus* cytolysin에 의한 [Ca²⁺]_i 증가와 함께 혈소판응집도 관찰되지 않았다.

3. Lanthanum(2 mM)은 *V. vulnificus* cytolysin에 의한 혈소판의 응집과 [Ca²⁺]_i 증가를 차단하였으나 verapamil(20 μM) 및 mefenamic acid(20 μM)는 cytolysin에 의한 혈소판 응집을 차단하지 못하였다.

4. Osmotic protectant인 raffinose(50 mM)와 sucrose (50 mM)는 *V. vulnificus* cytolysin에 의한 혈소판 응집을 일부 억제하였다.

5. *V. vulnificus* cytolysin은 온도에 의존적으로 혈소판 응집과 [Ca²⁺]_i 증가를 유도하며 혈소판 세포막의 전도도를 증가시켰다.

이상의 실험 결과는 *V. vulnificus* cytolysin이 lanthanum에 감수성을 보이는 경로를 통하여 세포 밖의 Ca²⁺을 세포 내로 유입시키며, 이를 통하여 혈소판 응집을 유도함을 보여 주었다. 아울러 *V. vulnificus* cytolysin의 혈소판 응집은 cytolysin의 세포막 pore 형성에 연관된 것으로 사료된다.

문헌

- Hollis, D. G., Weaver, R.E., Baker, C. N. and Thornberry, C.: Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 3(4), 425 (1976).
- Farmer J. J. 3d.: *Vibrio* ("Benecke") *vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septisemia, and the sea. *Lancet* 2, 903 (1979).
- Blakes, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G. and Heublein, P. C.: Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *N. Eng. J. Med.* 300(1), 1 (1979).
- Oliver, J. D., Warner, R.A. and Cleland D. R.:

- Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios in coastal waters of the southeastern United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**(6), 1404 (1982).
- 5) Wickboldt, L. G. and Sanders, C. V. : *Vibrio vulnificus* infection. Case report and update since 1970. *J. Am. Acad. Dermatol.* **9**(2), 243 (1983).
 - 6) Gray, L. D. and Kreger, A. S. : Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **48**(1), 62 (1985).
 - 7) Kreger, A. and Lockwood, D. : Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **33**(2), 583 (1981).
 - 8) Miyoshi, S. and Shinoda, S. : Role of the protease in the permeability enhancement by *Vibrio vulnificus*. *Microbiol. Immunol.* **32**(10), 1025 (1988).
 - 9) Smith, G. C. and Merkel, J. R. : Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*: potential contribution to its invasiveness. *Infect. Immun.* **35**(3), 1155 (1982).
 - 10) Kreger, A., DeChatelet, L. and Shirley, P. : Interaction of *Vibrio vulnificus* with human polymorphonuclear leukocytes: association of virulence with resistance to phagocytosis. *J. Infect. Dis.* **144**(3), 244 (1981).
 - 11) Desmond, E. P., Janda, J. M., Adams, F. I. and Bottone E. J. : Comparative studies and laboratory diagnosis of *Vibrio vulnificus*, an invasive *Vibrio* Sp. *J. Clin. Microbiol.* **19**(2), 122 (1984).
 - 12) Simpson, L. M. and Oliver, J. D. : Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **41**(2), 644 (1983).
 - 13) Testa, J., Daniel, L. W. and Kreger, A. S. : Extracellular phospholipase A₂ and lysophospholipase produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **45**(2), 458 (1984).
 - 14) Wright, A. C. and Morris, J. G. Jr. : The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus* : inactivation and relationship to virulence in mice. *Infect. Immun.* **59**(1), 192 (1991).
 - 15) Uemura Y., Sakon, M., Kawasaki, T., Shiba, E., Kambayashi, J. and Mori, T. : The correlation between Ca²⁺ influx and inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) formation in platelets stimulated by various agonists. *Biochem. Int.* **20**(5), 853 (1990).
 - 16) Park, S. D., Shon, H. S. and Joh, N. J. : *Vibrio vulnificus* septicemia in Korea : clinical and epidemiological findings in seventy patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**(3), 397 (1991).
 - 17) Khoo, H. E., Hon, W. M., Lee, S.H. and Yuen, R. : Effects of Stenostoxin (lethal factor from *Synanceja horrida* venom) on platelet aggregation. *Toxicon* **33**(8), 1033 (1995).
 - 18) Bhakdi, S., Muhly, M., Mannhardt, U., Hugo, F., Klapettek, K., Mueller-Eckhardt, C. and Roka, L. : Staphylococcal -toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J. Exp. Med.* **168**(2), 527 (1988).
 - 19) Rho, M. C., Nakahata, N., Nakamura, H., Murai, A. and Ohizumi, Y. : Activation of rabbit platelets by Ca²⁺ influx and thromboxane A₂ release in an external Ca²⁺-dependent manner by zooxanthella-toxin-A, a novel polyol. *Br. J. Pharmacol.* **115**(3), 433 (1995).
 - 20) Kim, H. R., Park, S. D., Park, J. W., Jeong, M. H., Kim, J. S. and Park, B. H. : Purification and characterization of cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Kor. J. Biochem.* **24**, 7 (1992).
 - 21) Bernheimer, A. W. and Schwartz, L. L. : Isolation and composition of staphylococcal α-toxin. *J. Gen. Microbiol.* **30**, 455 (1963).
 - 22) Hamil, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. : Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**(2), 85 (1981).
 - 23) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. : A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**(6), 3440 (1985).
 - 24) Kinlough-Rathbone, R. L., Packham, M. A., Reimers, H. J., Cazenave, J. P. and Mustard, J. F. : Mechanisms of platelet shape change, aggregation and release induced by collagen, thrombin, or A23187. *J. Lab. Clin. Med.* **90**(4), 707 (1977).
 - 25) Rink, T. J. and Sage, S. O. : Calcium signaling in human platelets. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 431 (1990).
 - 26) Miyamae, T., Oshima, K., Morikawa, T. and Hagiwara, M. : Calcium-induced platelet aggregation in washed platelets from Guinea pigs. *Pharmacol.* **51**(3), 180 (1995).