

***Bifidobacterium longum* HY8001 균주의 *Escherichia coli* O157:H7과 *Salmonella typhimurium* DT104 장관 내 감염 예방효과 및 Vero Cytotoxin 중화효과**

양수진* · 윤장원 · 서근석 · 구혜정 · 김소현 · 배형석¹ · 백영진¹ · 박용호
서울대학교 수의과대학 미생물학교실, ¹한국야쿠르트 중앙연구소

Prophylactic Effects of *Bifidobacterium longum* HY8001 against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 Enteric Infection and Evaluation of Vero Cytotoxin Neutralizing Effects. Yang, Soo-Jin*, Jang-Won Yoon, Keun-Seok Seo, Hye-Cheong Koo, So-Hyun Kim, Hyoung-Suk Bae¹, Young-Jin Baek¹, and Yong-Ho Park. Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, KOREA; ¹Research and Development Center, Han-kook Yakult Milk Products Co. - Prophylactic effects of *Bifidobacterium longum* HY8001, Korean isolate, against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 enteric infection were examined at four groups of specific pathogen free (SPF)-ICR mouse for each pathogen. *B. longum* HY8001+S. *typhimurium* DT104+B. *longum* HY8001(BL+ST+BL) group and *B. longum* HY8001+E. *coli* O157:H7+B. *longum* HY8001(BL+E+BL) group were fed with *B. longum* HY8001 before and after *E. coli* O157:H7 or *S. typhimurium* DT104 challenge, while *B. longum* HY8001+S. *typhimurium* DT104(BL+ST) and *B. longum* HY8001+E. *coli* O157:H7(BL+E) groups were fed with *B. longum* HY8001 only before *E. coli* O157:H7 or *S. typhimurium* DT104 challenge. *E. coli* O157:H7(E) and *S. typhimurium* DT104(ST) groups were challenged with each pathogen without *B. longum* HY8001 administration and control groups were administered with phosphate buffered solution (PBS). After the oral administration with *B. longum* HY8001 (10^9 cfu), the mice were challenged with *E. coli* O157:H7 (2×10^{10} cfu) or *S. typhimurium* DT104 (10^8 cfu) and the mortality rate and the fecal shedding of challenged pathogen were also examined to define the reactivity of the *B. longum* HY8001. Production of toxin neutralizing substance(s) of *B. longum* HY8001 was determined by cell cytotoxicity assay using Vero cells. Fecal shedding of the *S. typhimurium* DT104 was significantly decreased in BL+ST+BL group fed with *B. longum* HY8001 before and after challenge ($p < 0.05$), while the fecal sheddings of *S. typhimurium* DT104 in BL+ST and ST groups remained more than 10^6 cfu. The protective effect of the *B. longum* HY8001 against *E. coli* O157:H7 was significantly high only in BL+E+BL group fed with *B. longum* HY8001 before and after *E. coli* O157:H7 challenge from the result of fecal *E. coli* O157:H7 isolation rate, mortality rate, and intestinal contents culture to detect *E. coli* O157:H7. The mortality rate of the BL+E and E groups was 20% and 30% respectively, when that of the BL+E+BL group was 0%. The isolation rates of *E. coli* O157:H7 from the intestinal contents in BL+E+BL, BL+E, and E group resulted in 50%, 87.5%, and 86%, respectively. However, the *E. coli* O157:H7 isolation rate from the feces of BL+E+BL group was not lower than those of BL+E and E groups. The cytopathic effect (CPE) of the Vero cytotoxin (Shiga like toxin I & II) in Vero cell was neutralized in *B. longum* HY8001 culture supernatant added wells which indicate the presence of soluble Vero cytotoxin neutralizing substance(s) in *B. longum* HY8001 culture supernatant.

Key words : *Bifidobacterium longum* HY8001, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* DT104, prophylactic effects

Salmonella typhimurium DT104는 기존의 *Salmonella* 균과는 달리 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides와 tetracycline(ACSSuT)에 대한 multiple antimicrobial resistance pattern(R-Type)을 보이며 이미 미국, 영국, 캐나다, 독일, 프랑스, 오스트리아, 덴마크 등의 선진

국을 포함하여 세계 여러 나라에서 보고되고 있다[6, 8]. 이 균은 감염증에 대한 항생제 치료의 어려움 외에 transformation 등을 통해 다른 균들로 항생제 내성에 관여하는 유전자의 전파를 일으킬 위험성이 있으며[16], 영국에서는 이미 trimethoprim과 ciprofloxacin에 대한 additional resistance를 가지는 *S. typhimurium* DT104가 보고되었다[8]. 또한 *Escherichia coli* O157:H7은 미국과 일본에서 대량 식중독 사태를 일으킨 바 있으며, 감염시 출혈성 신증후군

*Corresponding author
Tel. 82-331-290-2735, Fax. 82-331-295-7524
E-mail: soojinjj@doum.net.

(hemolytic uremic syndrome) 및 출혈성 장염(hemolytic colitis) 등의 증상을 나타내고 특히 유아나 노약자의 경우에는 치명적인 균으로 알려져 있다. 이러한 균들의 감염 시 항생제의 치료가 추가 되지만 항생제 남용으로 인한 각종 항생제에 대한 내성이 증가되고 있어 probiotics에 대한 새로운 인식이 이루어지고 있으며, 이러한 probiotic 균주를 이용하여 유익한 세균총의 장내 조성을 조절함으로써 잠재적으로 중요한 예방효과를 획득하려는 시도가 이루어지고 있는 실정이다[1, 4, 11, 12, 17]. 지금까지 주로 연구 보고된 probiotic 균주들로는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus* 등이 있으며 그 작용기전과 효용성에 대한 연구가 보고되고 있다[1, 3, 11, 12, 17]. 본 연구는 한국 야쿠르트 중앙연구소가 한국인 유아의 장내 세균총으로부터 분리한 *Bifidobacterium longum* HY8001 균주를 사용하여 *E. coli* O157:H7 및 *S. typhimurium* DT104 감염증에 대한 예방효과를 결정하고 probiotic 균주로서의 이용 가능성을 평가하기 위하여 3주령의 specific pathogen free-ICR 마우스에 일정량의 *B. longum* HY8001 균주를 급이한 후 일정 간격을 두고 *S. typhimurium* DT104와 *E. coli* O157:H7의 배양액을 각각 투여하였다. 투여 후 2차로 *B. longum* HY8001을 급이한 후 마우스의 폐사율 및 분변을 통한 *S. typhimurium* DT104와 *E. coli* O157:H7의 배출을 분리 동정을 통하여 확인함으로써 prophylactic effect를 측정하였다. 또한 *B. longum* HY8001 균주의 생산물질 중에 *E. coli* O157:H7의 주요 병원성 요소인 Shiga like toxins (SLTs) 중화능을 가지는 물질이 있는지 확인하기 위하여 Vero cell에 *E. coli* O157:H7 배양상층 여과액(Vero cytotoxin)과 함께 *B. longum* HY8001 배양 상층액을 넣고 Vero cell에 나타나는 세포변성인 cytopathic effects(CPE)의 변화를 관찰함으로써, *B. longum* HY8001 균주의 병원성 독소 중화능을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

특정 병원체가 없는(Specific Pathogen Free:SPF) 3주령의 암·수동수 ICR 마우스 40마리를 본 실험에 사용하였으며, SPF임을 확인하기 위하여 분변, 사료, 음수 등에 대한 미생물학적 검사를 실시하였다. 또한 마우스의 SPF 상태를 유지하기 위하여 음수, 사료, 깔짚 등은 모두 멸균 후(121 °C, 1.2 kgf/cm², 15분) 사용되었으며, 온도, 습도, 조명, 환기가 자동으로 조절되는 실험동물사육장치(MJ-721CS, MYUNG-JIN)에서 사육되었다.

균주의 배양

본 실험에서 사용된 균주들은 한국야쿠르트 중앙연구소

로부터 제공된 *B. longum* HY8001과 미국 펜실바니아 주립대 *E. coli* Reference Laboratory로부터 분양된 Shiga like toxin I & II(SLT I & II) 생산성 *E. coli* O157:H7, 미국 Washington State University에서 분양된 *S. typhimurium* DT104 R-Type ACSSuT이며, *B. longum* HY8001은 실험균주를 liquid paraffin oil이 중층된 blood-glucose-liver(BL) broth를 사용하여 37°C에서 2회 계대배양 하여 활력을 높인 후 BL broth에 2%의 균체량을 접종하여 37°C에서 16시간 배양한 후 30,000×g에서 20분간 원심분리(UNION 32R, HANIL SCIENCE)하여 균체를 회수하고, 인산염 완충용액(PBS)에 washing한 후 재현탁하였고, *E. coli* O157:H7과 *S. typhimurium* DT104는 trypticase soy broth(TSB, DIFCO)를 이용하여 37°C에서 24시간 진탕배양(DSK512, DAEIL ENGINEERING) 후 사용하였다[15].

B. longum HY8001의 Prophylactic effect 평가

LD50의 결정 37°C에서 24시간 동안 전배양한 *E. coli* O157:H7과 *S. typhimurium* DT104를 spectrometer(spectronic 20D⁺, MILTON ROY)를 이용하여 630 nm 파장에서 배양액의 농도를 측정하고, 이 수치와 plate count agar (PCA, DIFCO)를 사용한 평판 계산법과의 상관관계를 구하여 이후 실험에서 균수측정에 적용하였다. 마우스 개체당 10¹⁰~10⁵ cfu로 십진희석된 각각의 균 배양액(0.5 mL)을 stainless steel tube(Zonde, 18G)를 사용하여 구강접종 후, 마우스들의 치사율 및 임상증상의 발현 유·무를 접종 후 7일간 관찰하여 50%의 치사율(LD₅₀)을 나타내는 균액의 농도를 결정하였다.

균점종 및 폐사율 *B. longum* HY8001은 PBS에 부유된 상태로 각각의 마우스에 0.5 mL(2.0×10⁹ cfu/mL)을 접종하였으며, *S. typhimurium* DT104는 LD₅₀ 농도인 10⁸ cfu/mL을 각각의 마우스에 0.5 mL(2×10⁸ cfu/mL)씩 접종하였다. 다른 균주에 비하여 LD₅₀의 기복이 심한 *E. coli* O157:H7은 확실한 감염이 가능한 농도인 2.0×10¹⁰ cfu/mL (1 mL/mouse)을 구강접종 하였으며, 접종 후 14일간 폐사율 및 마우스의 임상증상 발현 유·무를 관찰하였고, 폐사 개체에 대해서는 장(십이지장, 공장, 회장, 결장) 내용물로부터 균배양을 실시하고, 병리학적 검사를 위해서 부검을 실시하였다(Table 1, 2).

분변검사

분변에서의 *S. typhimurium* DT104 검출 분변으로 배출되는 *S. typhimurium* DT104의 양상을 분석하기 위하여, 마우스의 분변을 0.85% 식염수에 십진 희석한 후 xylose lysine desoxycholate agar(XLD, DIFCO)를 사용하여 37 °C에서 24시간 배양(Low Temperature Incubator 815, Pre-cision Scientific)후 균수를 측정하고 cfu/g으로 환산하였다.

Table 1. Experimental design for the determination of prophylactic effect of *B. longum* HY8001 against *S. typhimurium* DT104

Treatment	No. of heads	Administration schedule
Control	5	PBS treatment only
ST only ¹	8	Challenge with ST
BL*+ST ^{2**}	8	BL treatment
BL+ST+BL ³	8	BL treatment 2 times before and 7 times after challenge

*BL: *B. longum* HY8001(10⁹ cfu), **ST(challenge strain): *S. typhimurium* DT104(10⁸ cfu). ¹ST only: Administration of ST at day 3. ²BL+ST: Administration of BL for 2 days followed by ST challenge at day 3. ³BL+ST+BL: Administration of BL for 2 days followed by ST challenge and readministration of BL every other day until day 14.

Table 2. Experimental design for the determination of prophylactic effect of *B. longum* HY8001 against *E. coli* O157:H7

Group	No. of heads	Treatment	Challenge dose of <i>E. coli</i> O157:H7 ¹
Control	5	PBS	-
E ²	10	-	2 × 10 ¹⁰ cfu
BL+E ³	10	<i>B. longum</i> HY8001 2 × 10 ⁹ cfu, 5 days before challenge	2 × 10 ¹⁰ cfu
BL+E+BL ⁴	10	<i>B. longum</i> HY8001 2 × 10 ⁹ cfu, 5 days before and 14 days after challenge	2 × 10 ¹⁰ cfu

¹Challenge strain of *E. coli* O157:H7: SLT I & SLT II producing *E. coli* O157:H7 obtained from Pennsylvania state university *E. coli* Reference Laboratory. ²E: Challenge with *E. coli* O157:H7 only. ³BL+E: Pretreatment of *B. longum* HY8001 for 5 days before challenge with *E. coli* O157:H7. ⁴BL+E+BL: Pretreatment of *B. longum* HY8001 for 5 days before and 14 days after challenge with *E. coli* O157:H7.

분변에서의 *E. coli* O157:H7 검출

3주령의 SPF-ICR마우스를 4개의 군(Control, E, BL+E, BL+E+BL)으로 나누어 아래 Table 2의 계획에 따라 *B. longum* HY8001과 *E. coli* O157:H7을 stainless steel tube (Zonde, 18G)를 사용하여 식도, 횡격막, 내장장기 등에 손상이 없도록 조심스럽게 구강접종 하였다. Challenge 이후 2일 간격으로 Broth enrichment method[10] 분변검사를 이용하여 *E. coli* O157:H7이 분변을 통하여 배출되는 마우스 개체수를 검사하였다. 즉, Cefixim(50 mg/L), Tellurite (2.5 mg/L), Vancomycin(40 mg/L)이 함유된 TSB(TSB-CTV, SIGMA) 10 mL에 마우스의 분변을 넣고 vortex mixing(MAXI MIX II, Barnstead Thermolyne) 후에 37°C incubator(Low Temperature Incubator 815, Precision Scientific)에서 24시간 동안 증균하였다. 증균된 TSB-CTV

를 Cefixim and Tellu-rite sorbitol MacConkey agar(CT-SMAC, DIFCO)와 Fluo-roculat agar(MERCK)에 멸균된 유리막대를 이용하여 각각 0.5 mL씩 도포한 후, 42°C에서 24시간 배양(DSK512, DAEIL ENGINEERING)하여 *E. coli* O157:H7의 집락형성을 관찰하였다. 3회째 분변검사 후, 각 group의 1/2에 해당하는 마우스를 부검하고 5회째 분변 검사 이후 나머지 1/2의 마우스를 부검하여 구강접종에 따른 내장 장기 및 식도, 횡격막 등의 손상여부를 조사하고 장 내용물은 *E. coli* O157:H7의 검출을 위하여 Broth enrichment method[10]에 따라 배양하고, 장 조직은 포르말린에 고정 후 hemato-xilyn and eosin(HE)로 염색하여 장조직(음모, 점막 등)의 파괴정도와 염증반응 형성여부를 현미경(Microscope series 150, American Optical)을 이용하여 400배율로 관찰하였다.

Vero cytotoxin에 대한 *B. longum* HY8001의 중화능 분석

Vero cell Minimum essential medium(MEM, SIGMA)에 10% fetal bovine serum(FBS, SIGMA)과 25 g/mL gentamicin(SIGMA)을 첨가하여 Vero cell을 37°C, 10% CO₂ incubator(NAPCO, Precision Scientific)에서 48시간 동안 배양하고, inverted microscope(DMIRB/E, LEICA)를 사용하여 Vero cell의 monolayer형성을 확인한 후 사용하였다.

Cell cytotoxicity의 결정 100 µl의 Vero cell(4 × 10⁵ cells/ml)을 96 well plate(U bottom, COSTA)에 접종하고 10% CO₂ incubator(NAPCO, Precision Scientific)에서 48시간 배양하였다. 배양 후 각각 10진 또는 2진법으로 희석된 Vero cytotoxin과 배지성분(VT(20 µl), VT(20 µl)+ BL supernatant(w/o dilution, 80 µl), TSB(50 µl), BL broth (50 µl))들을 첨가하고 total volume이 200 µl가 되도록 MEM을 첨가하였다. 이후, 37°C에서 48~72시간 동안 10% CO₂ incubator(NAPCO, Precision Scientific)에 배양 하면서 cell cytotoxicity(CPE형성여부)를 결정하였다. Vero cytotoxin은 *E. coli* O157:H7을 TSB를 사용하여 37°C에서 24시간 진탕배양(DSK512, DAEIL ENGINEERING)하고 30,000×g에서 30분간 원심분리(UNION 32R, HANIL SCIENCE)하여 준비하였다.

통계처리

B. longum HY8001의 분변으로 배출되는 *S. typhimurium* DT104에 대한 억제효과는 Microcal Origin 4.10을 이용하여 t-test로 결정하였다.

결 과

분변으로 배출되는 *S. typhimurium* DT104에 대한 *B. longum* HY8001의 억제효과

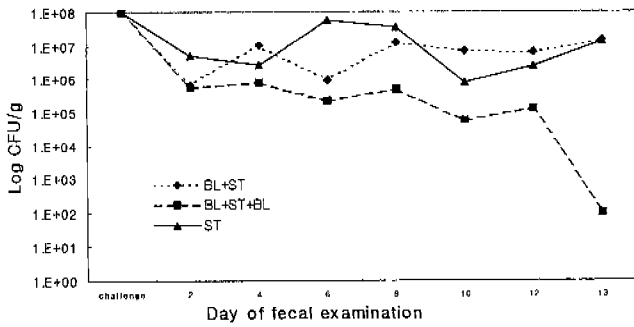


Fig. 1. Fecal shedding of *S. typhimurium* DT104 (cfu/g) after challenge with this strain.

총 8회의 분변검사 중 Fig. 1에서 보는 바와 같이, challenge(*S. typhimurium* DT104)이후 약 7일 쯤 이후인 4회, 5회, 6회 분변검사 결과에서 challenge 전 후에 계속 *B. longum* HY8001을 구강접종한 BL+ST+BL군의 분변에 배출되는 *S. typhimurium* DT104의 수(cfu/g)가 *B. longum* HY8001을 challenge이전에만 접종한 BL+ST군과 *B. longum* HY8001의 접종 없이 challenge만 실시한 ST군에 비하여 효과적으로 감소하였다(p<0.05, Microcal Origin 4.10).

B. longum HY8001의 *E. coli* O157:H7에 대한 Fecal shedding 및 폐사를 억제효과

분변으로 배출되는 *E. coli* O157:H7의 분리결과, Table 3에서와 같이 *E. coli* O157:H7 challenge 전 후에 *B. longum* HY8001을 구강 접종한 BL+E+BL군의 분리율이 80%로 challenge이전에만 *B. longum* HY8001을 접종한 BL+E군과 *B. longum* HY8001을 접종하지 않은 E군의 분리율 100%에 비하여 *E. coli* O157:H7 challenge 이후 5일까지는 낮았다. 그러나, challenge 후 7일과 9일에 실시한 분변 검사결과, BL+E+BL군에서의 *E. coli* O157:H7 분리율과 E군에서의 분리율은 각각 60%와 50%로 분변으로 배출되는 *E. coli* O157:H7에 대한 감소효과는 인정되지 않았다.

Table 4에서 *E. coli* O157:H7 challenge 전 후에 *B. longum* HY8001을 구강 접종한 BL+E+BL군에서는 폐사된

Table 4. Mortality rate after *E. coli* O157:H7 challenge

Group	Mortality rate [No. of mice died / No. of mice total (%)]			
	Control ¹	E ²	BL+E ³	BL+E+BL ⁴
Mortality	0/5(0)	3/10(30)	2/10(20)	0/10(0)

¹Control: PBS treatment only. ²E: Challenge with *E. coli* O157:H7 without *B. longum* HY8001 treatment. ³BL+E: Pretreatment of *B. longum* HY8001 for 5 days before challenge with *E. coli* O157:H7. ⁴BL+E+BL: Pretreatment of *B. longum* HY8001 for 5 days before and 14 days after challenge with *E. coli* O157:H7.

Table 5. Detection of *E. coli* O157:H7 from intestinal contents after necropsy

Group	Detection rate [No. of mice detected/No. of mice total (%)]			
	Control ¹	E ²	BL+E ³	BL+E+BL ⁴
5 days after challenge	0/2(0)	3/3(100)	4/4(100)	2/5(40)
10 days after challenge	0/2(0)	3/4(75)	3/4(75)	3/5(60)
Total detection rate	0/4(0)	7/7(86)	7/8(87.5)	5/10(50)

¹Control : PBS treatment only. ²E: Challenge with *E. coli* O157:H7 without *B. longum* HY8001 treatment. ³BL+E: Pretreatment of *B. longum* HY8001 for 5 days before challenge with *E. coli* O157:H7. ⁴BL+E+BL: Pretreatment of *B. longum* HY8001 for 5 days before and 14 days after challenge with *E. coli* O157:H7.

개체가 없었고, challenge이전에만 *B. longum* HY8001을 구강 접종한 BL+E군과 접종하지 않은 E군에서 각각 2마리, 3마리의 마우스가 폐사하였다. 폐사 마우스에 대한 부검결과, 구강접종에 의한 식도 및 내장장기의 손상은 없었으며 폐사된 모든 마우스의 장(십이지장, 공장, 회장, 결장) 내용물로부터 *E. coli* O157:H7을 분리할 수 있었다.

Table 5에서 보는 바와 같이 *E. coli* O157:H7 challenge 이후 5일과 10일 쯤에 마우스의 장 내용물로부터 *E. coli* O157:H7을 분리한 결과, *E. coli* O157:H7 challenge 전 후에 *B. longum* HY8001을 구강 접종한 BL+E+BL군에서의 *E. coli* O157:H7 분리율이 50%로 *E. coli* O157:H7 challenge이전에만 *B. longum* HY8001을 구강 접종한

Table 3. Examination of fecal shedding of SLT I and SLT II producing *E. coli* O157:H7 after challenge with this strain

Group	Days after challenge with 2 × 10 ¹⁰ cfu of <i>E. coli</i> O157:H7				
	1	3	5	7	9
	[No. of mice <i>E. coli</i> O157:H7 positive / No. of mice total (%)]				
Control ¹ (5)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/3(0)	0/3(0)
E ² (10)	8/8(100)	7/7(100)	7/7(100)	2/4(50)	0/4(0)
BL+E ³ (10)	8/8(100)	8/8(100)	8/8(100)	4/4(100)	1/4(25)
BL+E+BL ⁴ (10)	10/10(100)	7/10(70)	8/10(80)	3/5(60)	0/5(0)

¹Control : PBS treatment only. ²E : Challenge with *E. coli* O157:H7 without *B. longum* HY8001 treatment. ³BL+E : Pretreatment of *B. longum* HY8001 for 5 days before challenge with *E. coli* O157:H7. ⁴BL+E+BL: Pretreatment of *B. longum* HY8001 for 5 days before and 14 days after challenge with *E. coli* O157:H7.

Table 6. Cytopathic effect of Vero cytotoxin at different dilutions against Vero cells

CPE/VT ¹	VT (× 10)							VT (× 2)								
	0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6	7	8
CPE ²	+	+	+	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	±	-

¹VT: Vero cytotoxin, ²CPE: Cytopathic effect

Table 7. Inhibitory effect of *B. longum* HY8001 against CPE of Vero cytotoxin

BL ¹	<i>B. longum</i> HY8001 supernatant(80 µl)																
	VT ²	VT (× 10)						VT (× 2)									
CPE ³		0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6	7	8
CPE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹BL: *Bifidobacterium longum* HY8001. ²VT: Vero cytotoxin, ³CPE: Cytopathic effect.

BL+E균과 *B. longum* HY8001을 접종하지 않은 E균의 분리율 87.5%와 86% 보다 낮았다.

E. coli O157:H7로부터 생산된 Vero cytotoxin I과 II에 대한 *B. longum* HY8001의 중화효과

E. coli O157:H7의 배양상층액을 이용한 Vero cytotoxin의 cytopathic effects 측정결과, Table 6에서와 같이 Vero cytotoxin을 10진 희석한 well과 2진 희석한 well에서 각각 10³, 2⁷의 CPE₅₀(cytopathic effects)이 결정되었다. Control로서 사용된 TSB와 BL broth의 희석액에서는 cytopathic effects가 관찰되지 않았다.

B. longum HY8001의 배양상층액(37°C, 16시간)을 사용한 Vero cytotoxin의 cytopathic effects 측정결과, Table 7에서와 같이 *B. longum* HY8001의 배양상층액을 가한 경

우 Vero cytotoxin이 첨가된 well의 cytopathic effects가 Vero cytotoxin을 10진 희석한 well과 2진 희석한 well에서 모두 관찰되지 않았다. 즉, *B. longum* HY8001 배양상층액의 Vero cytotoxin 중화능을 확인할 수 있었다. Control로 TSB와 BL broth가 가해진 well에서도 cytopathic effects가 나타나지 않았다. Vero cytotoxin만을 접종한 well(A)과 *B. longum* HY8001의 배양상층액이 Vero cytotoxin과 함께 가해진 well(B), control로 사용된 TSB와 BL broth가 각각 가해진 well(C, D)의 48시간 배양 후 Vero cell의 형태를 inverted microscope(DMIRB/E, LEICA)으로 관찰한 결과, Vero cytotoxin만을 접종한 well에서는 cell death로 인하여 배양액 내의 부유물로서 관찰되었고, Vero cytotoxin과 *B. longum* HY8001의 배양상층액이 함께 가해진 well에서는 TSB와 BL broth가 가해진 control well과 같이 방추형태의 건강한 cell로서 관찰되었다(Fig. 2).

고 찰

기존의 보고에 따르면, 유산균을 급여한 닭에 포도상구균과 *Salmonella*균을 인공감염 시켰을 때, 유산균을 급여하지 않은 닭에 비해 폐사율이 현저히 감소하여, 유산균을 먹이게 되면 이러한 질병에 대한 예방효과가 있음이 알려져 있다[17]. 또한 Zhao 등[18]은 Probiotic bacteria를 먹인 소에서 분변을 통한 *E. coli* O157:H7의 배출이 유의적으로 감소함을 보고하였으며, 사람이나 다른 실험동물의 연구결과에서도 이러한 probiotic bacteria의 효과가 보고된 바 있다[5, 14]. 본 연구의 결과, *B. longum* HY8001이 장내에서 *E. coli* O157:H7과 *Salmonella typhimurium* DT104의 감염을 억제할 수 있으며, 특히 *B. longum* HY8001에 의해 분비되는 물질이 *E. coli* O157:H7에 의해 생산되는 Vero cytotoxin을 중화시킬 수 있음을 Vero cell을 이용한 Vero toxin neutralizing assay를 통하여 확인할 수 있었다.

특히 *B. longum* HY8001을 *E. coli* O157:H7 challenge

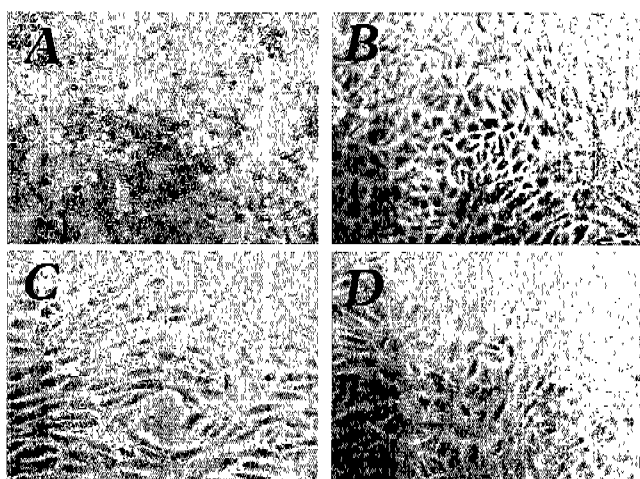


Fig. 2. Cell toxicity of the Vero cytotoxin and Vero cytotoxin neutralizing effect of the supernatant of the *B. longum* HY8001.

A: Vero cytotoxin treated, B: Vero cytotoxin and the supernatant of the *B. longum* HY8001 treated, C: TSB treated control, D: BL broth treated control.

전후에 지속적으로 투여한 마우스군(BL+E+BL)의 폐사율이 다른 군(BL+E, E)에 비하여 낮은 결과는 *in vivo*에서의 *B. longum* HY8001의 Vero cytotoxin 중화능을 시사하고 있다. 이러한 Vero cytotoxin 중화능에 대한 구체적인 작용 기전은 아직 밝혀지지 않은 것이지만, Vero cytotoxin의 *in vivo*에서의 병원성 발현 기전이 최근 보고[2, 9, 13]되었으며, *Bifidobacteria*가 생산하는 proteinaceous factor가 enterotoxigenic *E. coli*의 장 상피세포에 존재하는 ganglioside(GA1)에 대한 결합을 억제한다고 보고[3]된 바에 비추어 이 부분에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 마우스에서 *E. coli* O157:H7의 감염을 위해서는 고농도($>10^9$ cfu)의 균 접종이 필요하며, 고농도(2×10^{10} cfu/mL)의 *E. coli* O157:H7으로 감염이 확립된 후에 분변을 통해 배출되는 *E. coli* O157:H7의 분리율은 challenge 3일과 5일까지의 분변검사 결과, *E. coli* O157:H7 challenge 전 후에 *B. longum* HY8001을 구강 접종한 BL+E+BL군에서 각각 70%와 80%로 나타나 BL+E군과 E군의 100%보다 낮았지만, 4번째 분변검사(challenge 후 7일) 이후로는 *B. longum* HY8001을 접종하지 않은 E군의 분리율 50%보다 *E. coli* O157:H7의 분리율이 60%로 오히려 높아 분변으로 배출되는 *E. coli* O157:H7의 분리율은 *B. longum* HY8001의 *E. coli* O157:H7에 대한 유의적인 억제효과를 평가할 수 없었다. 이는 같은 실험동물에서도 분변으로 배출되는 *E. coli* O157:H7의 수가 하루 중에도 1,000배 이상의 차이가 난다는 보고[7]에 비추어, *E. coli* O157:H7의 감염에도 불구하고 분변 검사에서는 *E. coli* O157:H7이 검출되지 않았음을 생각할 수 있다. 그러므로 2회에 걸쳐 마우스 부검 후 장 내용물을 *E. coli* O157:H7의 검출을 위하여 배양하였으며, 그 결과 지속적으로 *B. longum* HY8001을 투여한 BL+E+BL군의 *E. coli* O157:H7의 검출율이 50%로 BL+E군과 E군의 검출율 87.5%와 86%에 비해 낮았다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, *B. longum* HY8001을 *E. coli* O157:H7 challenge 전후에 지속적으로 투여한 군(BL+E+BL)에서만 유의성 있게 *E. coli* O157:H7에 대한 방어효과를 나타냄을 알 수 있다. 따라서 *B. longum* HY8001에 의한 *E. coli* O157:H7에 대한 예방을 위해서는 host가 감염되기 전부터 지속적으로 섭취되어야 하며 이미 감염된 후의 *B. longum* HY8001의 효과, 즉 치료효과의 기대는 매우 낮거나 어려울 것으로 추정된다. *In vivo*에서의 *B. longum* HY8001의 *E. coli* O157:H7에 대한 보다 구체적인 방어효과를 평가하기 위해서는 *E. coli* O157:H7의 감염시 주요 임상증상과 병변을 초래하는 Vero cytotoxin의 혈액과 분변에서의 검출 및 Vero cytotoxin 농도 변화에 관한 연구와 주요 기관에 대한 병리 조직학적 연구가 병행되어야 하며 Vero cytotoxin의 중화능을 보이는 *B. longum* HY8001의 대사산물에 대한 추적적과 구체적인 작용기전에 대한 추가적인 연구가 필

요하다. 결론적으로 *B. longum* HY8001이 최근 문제되고 있는 치명적인 식중독 원인균인 *E. coli* O157:H7과 *S. typhimurium* DT104의 감염을 예방할 수 있으며, 특히 *E. coli* O157:H7에 의하여 생산되는 Vero cytotoxin을 중화시킬 수 있는 물질의 생성을 유도하는 것으로 확인되었다. 추후 이와 같은 비병원성 유효미생물에 의한 병원체 중화물질에 대한 구체적인 성분 및 기능에 관한 연구가 수행됨으로써 비항균성 물질에 의한 숙주감염 예방효과를 기대할 수 있을 것이다.

요 약

한국인 유아의 장에서 분리된 *Bifidobacterium longum* HY8001의 *Salmonella typhimurium* DT104와 *Escherichia coli* O157:H7에 대한 장내감염 억제효과를 특정 병원체가 없는 4군의 ICR 마우스를 이용하여 연구하였다. *B. longum* HY8001+S. typhimurium DT104+B. longum HY8001(BL+ST+BL)군과 *B. longum* HY8001+E. coli O157:H7+B. longum HY8001(BL+E+BL)군은 *S. typhimurium* DT104 또는 *E. coli* O157:H7으로 challenge하기 전 후에 *B. longum* HY8001을 구강접종 하였고, *B. longum* HY8001+S. typhimurium DT104(BL+ST)군과 *B. longum* HY8001+E. coli O157:H7(BL+E)군은 각각의 병원균 challenge 전에만 *B. longum* HY8001을 투여하였으며, *E. coli* O157:H7(E)군과 *S. typhimurium* DT104(ST)군은 *B. longum* HY8001의 투여없이 challenge를 실시하였다. 대조군으로 사용된 각각의 마우스에는 인산염 완충용액(PBS)만이 구강 접종되었다. *B. longum* HY8001 배양상층액의 Vero cytotoxin 중화효과는 Vero cell을 이용한 세포변성효과(cell cytopathic effect)를 평가하여 결정되었다. 10^9 cfu의 *B. longum* HY8001을 10^8 cfu의 *S. typhimurium* DT104 challenge 전후에 투여한 BL+ST+BL군에서 분변으로 배출되는 *S. typhimurium* DT104의 수는 10^6 cfu 이상을 유지한 BL+ST군과 ST군에 비하여 효과적으로 감소하였다($p < 0.05$). *E. coli* O157:H7에 대한 *B. longum* HY8001의 억제효과 실험결과, challenge 이후 3일과 5일에 분변으로 배출되는 BL+E+BL군의 *E. coli* O157:H7 분리율은 BL+E군과 E군의 분리율은 각각 70%, 80%로 100%를 유지한 BL+E군과 E군에 비하여 낮았지만, challenge 이후 7일과 8일의 BL+E+BL군의 분리율은 각각 60%, 0%로 E군의 분리율 50%, 0%와 별 차이를 보이지 않았다. 그러나, 장내용물의 배양 후 *E. coli* O157:H7의 분리율을 조사한 결과, BL+E+BL군은 50%로 BL+E군과 E군의 87.5%와 86%보다 낮았으며, 폐사율의 조사결과도 BL+E+BL군에서는 폐사된 마우스가 없었으나 BL+E군과 E군에서는 각각 20%와 30%의 폐사율을 보였다. Vero cytotoxin과 *B. longum* HY8001 배양상층액을 이용한 독소중화시험결과, *B.*

longum HY8001의 배양상층액이 첨가된 well들에서 Vero cytotoxin의 중화효과를 보여, *B. longum* HY8001 배양상층액내의 soluble Vero cytotoxin neutralizing substance(s)의 존재를 암시하였다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 서울대학교 부속 수의과학연구소 학술연구비의 일부 지원으로 이루어졌습니다.

REFERENCES

1. Berg, R. D. 1998. Probiotics, prebiotics or conbiotics. *Trends in Microbiol.* **6**(3): 89–92.
2. Cray, W. C., Jr., T. A. Casey, B. T. Bosworth, and M. A. Rasmussen. 1998. Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(5): 1975–1979.
3. Fujiwara, S., H. Hashiba, T. Hirota, and J. F. Forstner. 1997. Proteinaceous factors in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to ganglioside GM1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(2): 506–512.
4. Greene, W. A., A. M. Gano, K. L. Smith, J. S. Hogan, and D. A. Todhunter. 1991. Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with evaluated somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* **74**: 2976–2981.
5. Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Am. J. Clin. Nutr. Review* **125**:1401–1412.
6. Gosek, G., D. Leschinsky, S. Irons, and *et als.* 1996. Multi-drug resistant *Salmonella* serotype. *MMWR* **46**: 308–310.
7. Grau, F. H., L. E. Brownlie, and M. G. Smith. 1969. Effects of food intake on numbers of *Salmonella* and *Escherichia coli* in rumen and feces of sheep. *J. Appl. Bacteriol.* **32**: 112–117.
8. Hogue, A., J. Akkina, F. Angulo, and *et als.* 1997. *Salmonella typhimurium* DT104. Situation Assessment. USA, Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service.
9. Kurioka, T., Y. Yunou, and E. Kita. 1998. Enhancement of susceptibility to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice. *Infect Immun.* **66**(4): 1726–1734.
10. Kudva, I. T., P. G. Hatfield, and C. J. Hovda. 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 431–433.
11. Midolo, P. D., J. R. Lambert, R. Hull, F. Luo, and M. L. Grayson. 1995. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acid and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 475–479.
12. Patridge, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero, and N. Gobato. 1996. Symposium: Probiotic bacteria for humans: Clinical systems for evaluation of effectiveness. *J. Dairy Sci.* **78**: 1597–1606.
13. Paton, J. C. and A. W. Paton. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews* **11**(3): 450–479.
14. Ramare, F., J. Nicoli, J. Dabard, T. Corring, M. Ladire, A. M. Gueugneau, and P. Raibaud. 1993. Trypsin-dependent production of an antibacterial substance by human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and *in vitro*. *Appl. Environ. Microb.* **59**(9): 2876–2883.
15. Scardovi, V. Genus *Bifidobacterium*, pp. 1418–1431. *Bergey's Manual*, section 15.
16. Snyder, L. and W. Champness. 1997. *Molecular Genetics of Bacteria*, pp. 7–10. American Society of Microbiology.
17. Watkins, B. A. and B. F. Miller. 1983. Competitive gut exclusion of Avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poultry Science* **62**: 1772–1779.
18. Zhao, T., M. P. Doyle, B. G. Harmon, C. A. Brown, P. O. Eric Mueller, and A. H. Parks. 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J. Clinical Microbiol.* **36**(3): 641–647.

(Received July 2, 1999)