최 종
보 고 서

돼지의 생산성 향상을 위한
세균성 질병 방역대책

Preventive program for porcine
bacterial disease to improve production

연구기관

서울대학교

농 림 부

최 종
보 고 서

돼지의 생산성 향상을 위한 세균성 질병 방역대책

Preventive program for porcine bacterial disease to improve production

연구기관

서울대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "돼지의 생산성 향상을 위한 세균성 질병 방역대책에 관한 연구" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. 26.

주관연구기관명 : 서울대 수의학과

총괄연구책임자 : 박 재 학 (조교수)

협동연구기관명 : 서울여대 생물학과

협동연구책임자 : 이 연 희

협동연구기관명 : 제일 화학

협동연구책임자 : 강 구 환 (연구소 소장)

요 약 문

I. 제 목

돼지의 생산성향상을 위한 돼지 세균성 질병의 방역대책

II. 연구개발의 목적 및 중요성

세계 선진 각국이 자국의 이익을 위하여 한국을 포함한 개발도상국들에게 수출입자유화 정책을 강력하게 요구하고 있으며, 많은 부분에서 수출입 자유화가 이루어지고 있는 현 시점에서 우리의 축산업을 보호하기 위하여는 축산물의 생산원가를 절감하여 국제경쟁력을 높이는 일만이 최선의 방책이라 사료된다. 축산업의 생산원가는 인건비, 육종 연구비, 토지 및 시설 투자비, 사료비 및 질병예방 방역비 등으로 구성되는데 이를 절감시키기 위하여는 질병예방 방역비를 제외한 모든 비용은 축산업을 경영하는 사람이 조절하기가 매우 어려운 부분들이다. 물론 인건비를 줄이기 위하여 시설을 자동화해야 하고 사료비를 줄이기 위하여 사료효율을 최대한으로 올리는 연구가 이루어져야 하며, 좋은 품종을 개발하여 최소의 사료급여로 최대의 증체효과를 올려야 하며, 토지 및 시설 투자비를 낮추기 위하여 값싸고 고품질의 시설물을 개발하는 것 등이 필요하다. 그러나 이러한 부분들은 매우 어려운 부분이지만 질병예방 방역비 부분은 질병의 발생, 진단, 치료 및 예방에 대하여 잘 이해한다면 상당부분의 방역비를 줄이고 생산성을 높일 수 있는 부분이다.

국민 식생활에 직접 관련이 있는 축산동물에서 전염성 질병은 심각한 상태이며, 최근 수입 개방에 따라 외래성 질병의 우려가 높아지고 있고,

특히 축산동물의 질병 피해는 매년 축산 총생산액의 약 20%로써 그 손실액은 축산업 기반 자체를 위협하고 있는 실정이다. 그런데 이러한 질병의 예방, 진단, 치료에 이용되는 시약 및 기술은 외국에 거의 의존하고 있어 경제적 부담은 매우 크다.

현재 우리나라는 질병의 진단 및 예방에 관해서는 많은 문제점을 안고 있다. 매년 질병으로 인한 양돈 산업의 손해는 약 4,000억원에 달하고 있다. 양돈 산업이 발전 할수록 많은 양돈가들은 질병에 관심을 가지게 된다. 현재 양돈가들에게서 문제가 되는 질병중 바이러스성 질병에 관하여는 많은 연구가 이루어지고 있지만 세균성 질병에 대한 연구는 아주 미흡한 실정이다. 특히 외국에서는 아주 활발하게 연구되고 있는 Helicobacter에 관한 연구는 국내에서 전무한 실정이다. 이러한 질병에 의한 피해는 양돈돈가의 생산비를 증가시키는 원인으로 작용하고 있을 뿐만아니라, 일반 소비자들에게도 적지 않은 부담이 되고 있으며 수출전선에도 가격 경쟁적인 측면에서 부정적으로 작용하고 있다. 또한 이러한 질병이 인수공통전염병으로서의 위험성에 관한 조사도 미흡한 실정이다. 이러한 이유등으로 인하여 돼지 축산 시장에 많은 피해를 야기시키는 이와같은 질병을 방역함으로써 양돈산업을 발전시키는 중요한 역할을 할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 돼지의 질병을 예방하기 위한 포괄적인 프로그램을 작성함에 있어서 돼지에서 위질병을 야기하는 세균을 분리 동정하고 병리학적인 진단법을 확립하며, 나아가서는 신속한 진단법을 개발하고, 백신을 이용한 치료 및 예방프로그램을 작성하고자 하는데 그 목적이 있다.

국내의 돼지에 있어서 위염이나 위궤양을 유발시키는 세균성 질병에 대하여 지금까지 원인 세균에 대한 체계적인 진단, 치료 및 예방에 대한 연구가 이루어지지 않아 위염이 계속하여 발생함은 물론 눈에 보이지 않는 많은 경제적 피해를 가져다 주고 있다. 따라서 본연구에서는 국내 돼지의 세균성 질병에 대하여 분포상황, 진단, 치료 및 예방대책에 대하여 종합적으로 연구하고 이에 대한 방역 프로그램을 작성하여 모든 양돈가에 보급함

으로써 양돈가의 생산성 향상은 물론 국제경쟁력을 높이고자 하였다. 현재 인체에서 위장병(위염, 위궤양과 위암)을 일으키는 원인균으로 Helicobacer pylori가 분리되어 활발하게 연구가 진행되고 있다. 하지만 이에 대한 연구는 1980년대 중반이후 밝혀진 것으로 아직 그연구가 매우 초보 단계이다. 그 이유의 하나는 이의 배양이 극히 까다롭기 때문으로 돼지의 경우는 이에 대한 연구가 전세계적으로 전무한 형편이다.

돼지에서 급만성 위염 또는 증식성 위염, 위궤양에 의한 경제적 피해는 정확히 파악조차 되어있지 않다. 외국의 문헌상으로는 위에서 분리되는 병원성 세균으로는 Campylobacter, Arcobacter, Gastrospirillum등이 있으며, 사람의 위염과 위궤양의 원인균인 Helicobacter pylory는 동물중에서는 유일하게 돼지에서 감염이 성립하는 세균이다. Helicobacter pylory는 사람에게 만성위장염과 위궤양 및 위암까지 유발시키는 세균으로 잘 알려져 있는데 외국에서는 이러한 세균을 돼지의 위에 인공적으로 감염시켜 질환 모델 동물로도 이용하고 있는 실정이다. 돼지에서 아직 Helicobacter pylori로 동정된 예는 없지만, Helicobacter pylory와 유사한세균이 분리되고 있으며 제왕절개하여 무균적으로 사육한 돼지에 Helicobacter pylori를 감염시켰을때 감염이 성립하는 것을 보면 돼지가 숙주일 가능성도 배제하기어렵다.

이러한 질병으로인한 만성위염이나 위궤양이 발생하면 사료의 소화흡수율의 저하와 그에 따른 체중증가 저하 및 사료효율감소등으로 인하여 경제적 손실은 대단히 커진다. 따라서 본연구 결과를 활용하여 위장병을 일으키는 세균의 방역을 적절히 수행한다면 경제적 이익은 대단히 막대해질 것이다.

또한 돼지에서 위염을 일으키는 원인균을 분리하여 방역체계를 확립한다면 양질의 축산물을 공급하게되어 소비자들이 안심하고 우리의 축산물을 이용할 수 있게 될 것이며, 사회전반에 퍼져있는 우리의 축산물에 대한 불신감을 불식시키는 데에도 기여할 것이다. 이와 더불어 인수공통 기

생충성 질병을 사전에 퇴치함으로써 사람에게 감염될 수 있는 경로를 차단할 수 있다.

요약하면 본 연구의 목적은 1) 효과적인 검역 프로그램 작성 2) 세균성 질환의 예방 프로그램 작성 3) 우리나라에서 Helicobacter를 포함하여 돼지의 소화기질병의 원인균 수집, 분리, 항균제 감수성 검사, 이의 발병억제제 검색 에 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

돼지의 자연발생위염에 대한 역학조사를 하기 위하여 경기도의 도축장에서 1146마리의 돼지위를 육안적 및 조직학적으로 관찰하였다. 병변의 분포를 확인한후 경기도 수원 도축장에서 돼지위 50개를 구입하였다. 도축후 곧바로 위조직을 4℃ ice box에 담아서 실험실로 운반하였고, 식도부에서부터 대만부를 따라 십이지장의 기시부까지 절개한 후 위내용물을 조심스럽게 제거하였다. 육안소견을 관찰한후, 식도부, 분문부, 위저부, 유문부의 일부를 10% 중성 포르말린에 고정하였고, 위저부와 유문부 일부는 점막을 슬라이드 글라스에 도말하여 Carbol-fuscin 염색을 통해 tightly spiral bacteria의 감염을 확인하였다. 또한 Histopathological examination을 하기 위하여 위조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 이상 고정한 후에 alcohol-xylene으로 processing하여 파라핀 포매하였고, 2 ㎛의 슬라이드 절편을 만들어 HE 염색과 Steiner's silver 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 은염색 조직절편에서 tightly spiral bacteria에 대한 감염여부를 판정한후, 감염군과 비감염군으로 나누어 조직병리학적 검사를 수행하였다. 분문부와 위저부, 유문부에서 고유점막층의 염증세포 침윤에 따라 위염을 평가하였다.

Modified Steiner's silver 염색을 하기 위하여, 슬라이드 절편의 조직을 탈파라핀한 다음 1% uranyl nitrate에 60℃에서 15분간 침적하였고,

증류수로 3회 세정한 후 1% silver nitrate에 60℃에서 90분간 침적하였다. 이후 증류수로 3회 세정하였고 95%, 100% 알코올에 2회 침적한후, 2.5% gum mastic 용액에 실온에서 5분간 침적하였다. 이후 조직을 공기중에서 건조시켰고, 2.5% gum mastic 10㎖ 와 2% hydroquinone 25㎖, 100% 알코올 5㎖, 1% silver nitrate 0.2㎖ 을 섞은 reducing 용액에 45℃에서 25분간 조직을 침적한 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Gastrospirilum의 돼지에서의 병원성을 확인하기 위하여 돼지 감염실험을 수행하였다. 동물은 강원도 횡성에서 4주령의 웅성돈 11마리를 구입하였다. 시멘트 바닥으로 물청소가 가능한 사육장에서 1주일간 순화기간을 두었으며 사료와 음수는 멸균하지 않고 자유급식시켰다. 9마리의 실험군과 2마리의 대조군은 각기 다른 사육장에서 사육하였다.

접종균을 준비하기 위하여 경기도 수원 도축장에서 구입한 10개의 돼지위의 위저부와 유문부 조직을 슬라이드에 도말하여 자연 건조한후 Methanol 에 10분간 고정하였고 Carbol fuscin염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 현미경상에서 tightly spiral bacteria가 관찰된 위저부와 유문부의 점막을 멸균한 가위로 잘게 세절하여 멸균 Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2) 에 넣고 균질화하여 멸균가제로 거른후 이를 5㎖ 씩 9마리의 돼지에 경구투여하였다. 대조군 2마리에는 tightly sprial bacteria에 감염되지 않은 돼지 위조직을 위와 같은 방법으로 하여 동량투여하였다. 감염후 7, 17, 24, 39일에 각각 2마리를 부검하였고, 감염후 46일에는 감염군 1마리와 대조군 2마리를 부검하였다. 부검후 식도부 말단과 십이지장의 기시부를 잘라 위를 적출하였다. 식도부 말단으로부터 대만부를 따라 위를 절개한후 위내용물을 흐르는 물에 조심스럽게 제거하였고, 육안소견을 관찰한 후 식도부, 분문부, 위저부, 유문부 조직을 10% 중성포르말린에 고정하였다. 24시간 이상 고정한 후에 alcohol-xylene으로 processing하여 파라핀 포매하였고, 2 ㎛의 슬라이드 절편을 만들어 HE 염색과 Steiner's silver 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 분문부와

위저부, 유문부에서 고유점막층의 염증세포 침윤에 따라 위염을 평가하였다.

Ttightly sprial bacteria는 배지에서 인공 증식을 하지 못하였으므로 항균제나 백신을 개발하기 위하여는 실험동물이 필요하다. 그러나 돼지는 실험감염에 사용하기에는 사육 및 관리가 불편한 점이 있어서 마우스에 대한 실험감염의 성립을 알아보고자 하였다. 대한실험동물로부터 4주령의 수컷 SPF ICR 마우스를 34마리 구입하였다. 이들은 마우스용 케이지(Polycarbonate, 22 ×27 ×13Cm, 명지기계상사)에 4마리씩 넣어 Hepafilter가 부착된 Clean rack(삼광, 국산)에서 22℃의 실내온도하에서 사육하였으며, 사료(Charles river CRF-1, Japan)와 음수, 깔짚은 멸균하여 공급하였다. 구입후 1주일간 순화기간을 둔후 실험에 사용하였다.

Inocula는 도축장에서 구입한 돼지위의 위저부와 유문부 조직을 슬라이드에 도말하여 자연 건조한후 Methanol에 10분간 고정하였고 Carbol-fuscin염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 현미경상에서 tightly spiral bacteria가 관찰된 위저부와 유문부의 점막을 멸균한 가위로 잘게 세절하여 멸균 Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 넣고 균질화하여 멸균가제로 거른후 이를 0.5㎖씩 24마리의 마우스에 경구투여하였고, 10마리의 대조군에는 tightly spiral bacteria가 감염되지 않은 돼지의 위조직을 위와 동일한 방법으로 동량 투여하였다.

감염군은 투여후 3, 7, 10, 17, 21, 24, 28일과 8, 12, 16, 20, 50주에 각각 2마리씩 부검하였고, 대조군은 7, 17, 28일 그리고 12, 20주에 각각 2마리씩 부검하였다. 마우스를 부검후 식도부 말단과 십이지장의 기시부를 멸균한 가위로 자른후, 식도부 말단부터 대만부를 따라 위를 절개하였다. 곧바로 멸균한 PBS에서 위내용물을 제거하였고 위점막에 대한 육안소견을 관찰한후 유문부와 위저부 일부를 PCR과 urease test, 균분리를 하기위해 떼내었고 나머지는 전장기와 함께 10% 중성포르말린에 24시간 고정하였다. 고정후 Alcohol-xylene으로 processing하여 파라핀 포매한 후, 2

μm로 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색과 Steiner's silver 염색을 하였다. 세균의 집락화 정도와 위염의 판정을 하였다. 한편 감염이 성립한 것을 신속히 진단하기 위하여 Urease test를 수행하였다. Urease test를 위한 시약을 다음과 같이 제조하였다. 0.5%(w/v) phenol red를 1N NaOH에 녹인후, pH를 7.0으로 맞추고, 10㎖까지 DW를 채웠다. Urea 2g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 157㎎, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 80㎎, NaN_3 20㎎을 첨가한후 pH를 6.2로 맞추고 DW를 이용하여 100㎖까지 채웠다. 부검한 마우스의 위저부와 유문부 일부를 이 시약에 담근후 1시간 정도 반응시켜 urease 산생여부를 판정하였다.

위조직에서의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. 감염후 8주부터 마우스를 부검후 위저부와 유문부 일부조직을 -70℃에 보관하고 약 0.1g의 조직을 liquid nitrogen 용액에 얼린후 무균적으로 마쇄하였으며, 500 μl의 TNE solution (10mM Tris, pH 7.5 ; 150mM NaCl ; 2mM EDTA ; 0.5% Sodium dodecyl sulfate)에 넣고 잘 섞은후 분쇄하였다. 여기에 20㎎/㎖의 proteinase K를 20 μl 첨가하여 vortex mix한후 55℃에서 3시간 incubaton 하였다. 이후 phenol 250 μl와 chloroform과 isoamyl alcohol이 24:1로 혼합된 chloroform 용액을 250 μl 첨가하여 vortex mix 한후 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였고 상층액을 새로운 tube에 옮겨 이과정을 2회 반복하였다. 다시 chloroform 400 μl를 첨가하고, 12,000rpm에서 10분간 원심분리한후 상층액만을 수집하였다. 여기에 약 1/10 volume의 3M sodium acetate를 더하고 absolute alcohol을 1㎖ 첨가하여 상하로 잘 섞은후 하얀색 응고물질을 확인하면서 이를 pellet down 하기위해 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 80% ethanol을 이용하여 2회 washing하였고, 12,000rpm에서 원심분리후 pellet이 떨어져나가지 않도록 조심하여 alcohol을 버린후 공기중에서 건조하였다. TE buffer(10mM Tris, pH 8.0 ; 1mM EDTA)를 이용하여 용해시킨후 4℃에서 냉장보관하였다.

PCR을 위한 primers는 Helico pylori의 ureaA gene을 사용하였다.

PCR mixture는 각 DNA samples 2 μg과 각 primer 100pmol, 1 ×PCR buffer, 2.5U Taq polymerase, 200 μM deoxyribonucleoside triphosphates(PCR Core Kit, Boehringer mannheim, Germany)를 섞어 총 100 μl의 volume이 되게 하였다. PCR은 95℃에서 3분을 1 cycle로, 94℃에서 1분, 51 57℃에서 1분, 72℃에서 2분을 35 cycle로 하고 마지막으로 72℃에서 10분을 1 cycle(Gene CyclerTM, Bio-Rad, USA)로 반응시켰으며 반응물을 1.5% agarose gel에서 전기영동(Power PAC 300, Bio-Rad, USA)하여 PCR product band를 관찰하였다. 각각의 molecular weight (MW) marker로는 ψX174/Hae III marker(Promega, USA)를 사용하였다.

Bacterial culture를 하기위하여 부검후 위저부와 유문부 일부를 멸균한 가위로 절제한후 멸균한 칼로 잘게 분쇄하였다. 이를 5% horse serum이 첨가된 chocolate agar(BBL®, USA), 10% horse serum과 항생제(amphotericin B, trimethoprim, polymyxin B, vancomycin)가 함유된 GC modified chocholate agar(DIFCO, USA), brain heart infusion agar(BBL®, USA) plate에 접종후 Gaspak(GasPakPlusTM, BBL®, USA}을 넣은 세균배양기에서 37℃상태로 4-7일간 배양하였다.

Tightly sprial bacteria의 미세구조를 확인하여 외국에서 확이된 균이나 개에서 확인된 균과 비교하기 위하여 전자현미경을 이용한 연구를 수행하였다. 수원도축장에서 구입한 돼지의 유문부 조직에서 carbol-fuscin 염색을 통해 tightly spiral bacteria의 감염을 확인하였으며, 감염이 확인된 돼지의 유문부 점막을 본 연구에 이용하였다. 한편, tightly spiral bacteria는 일반배지에서 배양이 되지 않기 때문에 마우스(4주령 웅성 ICR)를 이용하여 생체내에서 균을 계대하였는데, 감염후 1개월이 지난 1마리의 마우스 위조직을 전자현미경학적 관찰을 위해 이용하였다. Tightly spiral bacteria의 감염이 확인된 돼지와 마우스 위조직을 포르말린에 고정한후 1mm3으로 세절하여 1% OsO4(Sigma, USA)로 100분간 후고정하였다. 0.1M sodium cacodylate buffer(pH 7.2)를 이용하여 30분간 3회 세정하였

고, 이후 70%, 80%, 90%, 100% alcohol을 이용하여 각각 4℃에서 10분간 3회 탈수과정을 거쳤다. 그리고 100% alcohol과 propylene oxide를 1:1로 섞은 용액으로 실온에서 10분간 반응시킨후, propylene oxide만을 이용하여 또다시 실온에서 10분간 3회 반응하였다. Epon mixture(Quetol 812, DDSA, MNA)와 propylene oxide를 1:1로 섞은 용액에 실온에서 잘 흔들어주면서 overnight 반응하였다. 이후 DMP30을 첨가한 epon mixture에 넣고 embedding tray의 양 끝에 조직을 놓은후 35℃, 45℃에서 각각 하루씩 반응하였고, 60℃에서 3일간 incubation하였다. 이를 다이아몬드 칼로 70nm씩 박절하여 1% uranyl acetate와 1% lead citrate로 이중염색한후 전자현미경(JEM 100c ×II, Jeol Japan)으로 80KV에서 관찰하였다.

Tightly sprial bacteriarkaduadp 대한 유산균의 증식 저항효과를 보고자 마우스를 이용하여 L. salivarius와 L. acidophilus의 효과를 평가하였다. 대한실험동물로부터 4주령의 수컷 SPF ICR 마우스를 36마리 구입하였다. 이들은 마우스용 케이지(Polycarbonate, 22×27×13Cm, 명지기계상사)에 6마리씩 넣어 Hepafilter가 부착된 Clean rack(삼광, 국산)에서 22℃의 실내온도하에서 사육하였으며, 사료(Charles river CRF-1, Japan)와 음수, 깔짚은 멸균하여 공급하였다. 구입후 1주일간 순화기간을 둔후 실험에 사용하였다.

Inocula로서는 Tightly spiral bacteria에 감염된 돼지 위조직을 멸균 phosphate buffered saline(pH 7.2)에 넣고 갈아서 마우스에 경구투여하였다. 감염후 3개월이 지난 마우스 4마리를 부검하여 위조직을 떼내었고, 위저부와 유문부조직을 멸균 PBS에 넣고 갈아서 0,5ml씩 30마리의 실험군에 투여하였다. 6마리의 음성대조군에는 동일한 주령의 tightly spiral bacteria가 감염되지 않은 마우스위조직을 갈아서 동량 투여하였다. 유산균으로서 Lactobacillus acidophilus(HY0404)는 한국야쿠르트에서, Lactobacillus salivarius(ATCC 11741)은 American Type Culture Collection에서 분양받았다. 각 유산균은 Bactoagar(Difco, USA)에 37℃에

서 배양한 후, Lactobacilli MRS broth(Difco, USA)로 옮겨 수시간 증식시킨후 tightly spiral bacteria 감염후 4주부터 유산균과 lactic acid를 투여하였다. 유산균은 마리당 1 ×109 CFU를 4주에 걸쳐서 3일간 연속 투여하였고, lactic acid는 4주간 매일 0.5㎖씩 경구투여하였다. 투여종료 1주일후에 모든 마우스를 부검하였다. 부검후 group 3, 4의 위조직 일부를 떼내어 lactate kit(Sigma, USA)를 이용하여 lactic acid의 농도를 측정하였고, 평판계수법을 이용하여 증식한 유산균의 수를 계산하였다. 마우스 위조직을 부검후 10% 중성포르말린에 24시간 고정하였다. 고정후 Alcohol-xylene으로 processing하여 파라핀 포매한 후, 2 ㎛로 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색과 Steiner's silver 염색을 하였다.

인공배지에서 증식된 Camphylobacterdml 성상을 동정하였다. Campylobacter는 사람과 동물에게 감염을 일으키는 병원균으로 동물에서 사람으로 전이된다. 돼지 위 점막에서부터 얻어진 5-10% 항온기에서 배양되며 작고 반투명한 콜로니를 형성하는 Campylobacter를 다양한 방법으로 그 특성을 조사하였다.

Bactotransport medium Stuart와 Brucella medium은 Difco (Detroit M. U.S.A) 에서 구입하였다. GC medium base, Isovital 와 horse serum은 BBL (Cockeyswill, MD, U.S.A) 에서 구입하였다. Fungizone, amphotericin B, polymyxin B, vancomycin와 trimethoprim 은 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였고, Taq polymerase from Takara (Shiga, Japan)에서 구입하였다.

위궤양 및 각화와 같은 증세를 보이는 병변을 잘라내어 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)에 세척 후 transport medium 담아, 얼음에 2시간 거리의 실험실로 이동하였다. 실험실에서 채취된 위조직을 멸균한 razor blade로 잘게 조각내고, 10% horse serum이 첨가된 Brucella medium [Brucella broth, fungizone (2.5 g/㎖ amphotericin B), Skirrow's supplement (0.016 ㎎/㎖ polymyxin B, 0.5 ㎎/㎖ vancomycin, 0.25 mg/ml trimethoprim)] 와 modified chocholate agar medium (GC medium base, 1% hemoglobin, fungizone, skirrow's supplement, 1% isovitalex)에 접종하였다. 이를 5-10% CO_2 항온기와 37oC anaerobic jar에서 4-7 일동안 혐기적으로 배양하였다. 작고 투명한 모양을 가지는 colony들을 순수분리하기 위하여 새 배지에 접종하였다. 본 실험에서 사용되어진 C. jejuni subsp. jenuni (LMG 8841T), C. jejuni subsp. doylei (LMG 8843T), C. lari (LMG 8846T), and C. coli (LMG 6640T) 는 BCCM LMG (Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent)로부터 KCTC (Korea Collection of Type Culture)를 통해 구입하였다.

Campylobacter SSP primer를 이용한 PCR을 수행하였다. Genomic DNA는 Genomic DNA isolation kit (Promega, Madison, WI, U.S.A)을 이용하여 추출하였다. PCR은 Campylobacter의 16S rRNA gene에 특이적인 증폭을 일으키는primer 1 (5'-GGAGGATGACACTTT TCGGAGC-3')과 primer 2 (5'-ATTACTGAGA

TGACTAGCACCCCG-3')는 Giesendorf(Giesendorf et al., 1992)가 제작한 것을 따랐고, PCR mixture는 2 μg의 genomic DNA, 20 μM의 primer1, 2는 각각 2.5 μl, 5 μl 의 10 × buffer, 4 μl 의 dNTP 그리고, 1 unit of Taq polymerase를 넣어 총 50 μl 되게 D.W로 맞추었다. PCR 조건은 94oC에서 5 min, 50oC 에서 1 min, and 72oC 에서 1 min 1회, 94oC에서 1 min, 50oC 에서 1 min, 72oC 에서 1 min을 39회, 마지막으로 94oC에서 1min, 50oC에서 1 min, 72oC에서 5 분 1 회 순환되었다. PCR products는 0.8% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide staing 하여 확인하였다. 분리한 박테리아 세포를 negative staining한 후 전자현미경 (JEM 100CX II, JEOL, Japan) 상에서 관찰하였다.

박테리아의 생화학적 검사 는 다음과 같은 항목을 검사하였다. 즉, Motility, Gram staining, oxidase, catalase, urease, esterase, nitrate reduction, hippurate hydrolysis, indoxyl acetate hydrolysis, γ

-glutamyl transpeptidase, reduction of chloride to triphenyl tetrazolium (TTC), pyrrolidonyl arylamidase, L-arginine arylamidase, L-asparate arylamidase, alkaline phosphatase, H2S production, glucose assimilation, succinate assimilation, acetate assimilation, propionate assimilation, malate assimilation, ,citrate assimilation assay는 Bergy's Manual과 API CAMPY (API, Marcy-I'Etoile, France)에서 설명된 방법을 따라 수행하였다. Nalidixic acid, cephalotin, cefoperazone, carbenicillin 의 감수성은 NCCLS의 지침에 따라 disk test 로 결정하였다.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)를 수행하여 균의 유전학적 성상을 관찰하였다. PCR mixture는 60 ng of genomic DNA, 4 µl의 5 pmole/µl RAPD analysis primer (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden), 2 µl dNTP, 2.5 µl의 10× buffer, 1 unit of Taq polymerase를 넣은 후 D.W로 총 25 µl되게 하였다. 사용된 RAPD primers는 RP3 (5'-GTAGACCCGT-3'), RP4 (5'-AAGAGCCCGT-3'), and RP5 (5'-AACGCGAAC-3')였다. PCR 조건은 94oC에서 5 분, 34oC에서 5 분, 72oC에서 5 분간 3 회, 94oC에서 1 분, 34oC에서 1 분, 72oC에서 2 분 동안 29회, 마지막으로 72oC에서 10 분동안 1 회 순환시켰다. PCR products는 2% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 확인하였다. RAPD는 Bio-profile image analysis system (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 분석하였다.

분리균에 대한 antiserum의 preparation을 작제하여 항원성의 차이를 확인하였다. 박테리아 세포를 sonication으로 파쇄하고 total protein을 10% formalin에 고정하였다. 이를 (1 mg/kg)을 4주 간격으로 3회 토끼 (NewZealand White Rabbit, male)의 근육 내에 주사하였다. 토끼를 sodium penthobarbitone로 진정시킨 후, 경동맥으로부터 전혈을 채취하였다. antiserum은 분주하여 -20oC에 저장하였다.

위에서 준비된 박테리아 세포에 2% SDS가한 후 10분간 100℃에서 중

탕하여 total protein을 용출하였다. 용출된 단백질을 10% SDS denaturing gel에 전기영동한 후, nitrocellulose membrane에 blotting하였다. 10% BSA/PBS로 blocking한 후 antiserum을 membrane에 첨가하였다. Second antibody는 anti-rabbit IgG conjugated alkaline phosphatase를 사용하였고, 발색을 위해 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT)을 사용하였다.

Lactobacillus acidophilus는 Helicobacter pylori의 성장을 억제한다고 알려져 있다. 이러한 활성은 Lactobacillus.가 생성하는 lactic acid 와 antibacterial agents에서 기인한다고 생각되어져 왔다. 대부분의 Lactobacilli는 lactic acid를 생성하고, L. acidophilus는 H pylori growth를 억제하는 또 다른 factor를 가지는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 H pylori adherence에 대한 L. acidophilus의 억제활성를 연구하였다. 이를 위해 TLC plate를 사용한 immunoabsorbent assay를 개발하고 이를 이용하여 H pylori adherence에 대한 Lactobacilli의 억제활성을 검색하였다. O형 적혈구에서 H pylori가 부착되는 Glycolipid를 분리하여, TLC plate에 점적하였다.

돼지의 위궤양을 일으키는 원인균으로는 효모와 박테리아가 있다고 생각된다. 박테리아로는 특히 Campylobacter와 Helicobacter가 원인균으로 생각되고 있다. 현재 돼지의 장관에서 분리된 Helicobacter로 Helicobacter hyointestinalis가 있으며 Helicobacter gastrospillium도 보고 된 바 있다. 본 연구에서는 병변을 보이는 부위에서 원인균을 분리하고 이를 Koch의 가설에 맞는 지 감염실험으로 확인하고 이들 균의 total vaccine에 의한 예방 실험을 수행하였다. Yeast 분리 및 배양조건을 확립하고 분리된 Yeast의 재 감염 여부를 확인 하였으며 Candiada 와 Isolate 8 (Helicobacter) 백신을 준비하여 Candiada와 Isolate 8 (Helicobacter) 백신에 의한 감염 억제 실험을 수행하였다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

돼지의 자연발생위염에 대한 역학조사를 하기 위하여 경기도의 도축장에서 1146마리의 돼지위를 육안적 및 조직학적으로 관찰하였다. 그결과 육안 소견에서는 다음과 같은 병변을 확인 할수 있었다.

1) 위저부 점막의 미만성 충혈
2) 위저부 점막의 국소성 충혈
3) Par esophagus의 각화
4) Par esophagus 부분의 궤양
5) 위저부 점막의 미란

육안적으로 병변을 나타낸 비율은 다음과 같다.

	검사한 마리 수	채취한마리 수	병변이 나타난 비율 (%)
제1차	50	50	병변에 관계 없이 전부 채취
제2차	45	2	중증의 병변만 채취
제3차	45	25	55
제4차	50	8	16
제5차	107	32	30
제6차	112	13	11
제7차	57	12	21
제8차	430	134	30
제9차	250	95	38

조직학적 검사 결과다음과 같은 병변이 관찰 되었다.

1) 표재성 위염

점막고유층에 림파구와 소수의 마크로파지의 침윤

2) 충혈

점막 고유층의 혈관확장

3) Pars esophagus 부분의 각화상피 화생

4) Pars esophagus 부분의 궤양

결합조직층까지 괴사가 진전 되었고 저부에는 결합조직층에 의한 반흔 형성

5) 위저부의 미란

위점막층의 붕괴가 점막층에만 국한 되었음

Tightly spiral bacteria와 위염과의 관계를 명확히 하고자 50개의 위조직에 대하여 병리학적 및 미생물학적 검사를 시도하였다. 육안적으로 5례의 위저부에서 gastric fold의 비후가 관찰되었고, gastric fold의 소상괴사도 2례에서 관찰되었다. 고유위선의 충혈은 6례에서 관찰되었고, pars esophagus에서는 2례에서 고도의 각화가, 1례에서 경도의 충혈이 관찰되었다.

은염색표본에서 식도부와 분문부, 위저부에서는 tightly spiral bacteria가 관찰되지 않았으며, 4례(8.0%)의 유문부에서 균체가 관찰되었다. 균체는 주로 점막표면의 점액과 gastric pits, gastric glands 내강에서 관찰되었다. 식도부에서는 21례에서 점막층에 parakeratosis가 11례에서 hyperkeratosis가 관찰되었는데, tightly spiral bacteria가 감염된 1례에서도 이러한 변화가 관찰되었다. 그러나 염증세포의 침윤으로 인한 육아종이나 궤양의 소견은 관찰되지 않았다. 분문부는 거의 전례(47/50, 94.0%)에서 경도부터 고도의 림프구, 형질세포, 호산구의 침윤이 관찰되었는데, 50례의 평균 gastritis score는 2.860(±0.090, SEM)이었다. 이중 3례에서는 고유점막층 상피세포의 hyperplasia가 관찰되었다. 위저부의 염증반응은 매우 경미하였는데, 주로 gastric pits에 경도에서 중도의 림프구와 형질세포 침윤이 관찰되었다. 2례에서는 cystic dilatation이 관찰되었고, 상피세포의 변성은 8례에서 관찰되었으며, 평균 gastritis score는 0.75(±0.081, SEM)였다. Tightly spiral bacteria가 감염된 4례에서는 모두 고유점막층에 고도의 단핵구 침윤이 관찰되었다. 감염군의 유문부 평균

gastritis score는 3.250(±0.250, SEM)였고, 감염되지 않은 46례의 평균 gastritis score는 2.370(±0.114, SEM)이었다. Tightly spiral bacteria의 감염과 유문부의 만성위염 사이에는 $p<0.05$에서 유의적으로 관련성이 있음이 확인되었다(Fig 1). 유문부 고유점막층의 림프여포는 tightly spiral bacteria가 감염된 전례(100%)에서 관찰되었고, 감염되지 않은 46례중 19(41.3%)례에서 확인되었다. 전례의 돼지 위조직에 대하여 여러 가지 배지와 배양조건하에서 tightly spiral bacteria의 균분리를 시도하였으나 성공하지 못하였다.

돼지에 Tightly spiral bacteria를 감염시킨 결과 육안적으로 경도의 식도부 각화가 감염여부에 관계없이 실험군과 대조군에서 산발적으로 발생하였으며, 미란이나 궤양같은 소견은 어느 조직에서도 관찰되지 않았다. 조직학적으로 감염후 7일에는 각각 1례에서 위저부와 유문부의 고유점막층에 경도의 섬유화가 관찰되었으며, 위저부에서는 림프구가 점막표층에 국소적으로 소수 침윤하였는데, 실험전례에서 위저부에 병변이 심한 것은 관찰되지 않았다. 한편, 유문부에서는 림프구와 형질세포가 다소 중도로 미만성으로 침윤하였다. 식도부에서는 감염후 7일에 hyperkeratosis와 parakeratosis가 2례에서 모두 고도로 관찰되었는데 감염군과 대조군 모두에서 이러한 변화는 경도에서 중도로 산발적으로 발생하였다. 분문부에서는 감염 초기에 경도의 림프구와 호산구 침윤이 고유점막층에서 관찰되었는데, 감염기간이 경과할수록 고유점막층에 림프구, 형질세포, 호산구 침윤이 고도로 관찰되었으며, 감염후 17일과 39일에 각각 1례에서 림프여포가 형성된 것이 관찰되었다. 실험 마지막날에 부검한 대조군에서도 분문부의 염증반응은 고도로 관찰되었다. 또 감염후 17일에 부검한 위조직의 분문부에서는 점막표면 상피세포의 국소괴사 및 변성, mucus neck cell의 hyperplasia 그리고 점막의 erosion이 관찰되었다. 은염색표본에서 tightly spiral bacteria의 감염은 유문부에 국한되어 있는 것을 확인하였다. 감염후 7일에는 1례에서 점액 내부와 gastric pits에서 소수의 균체(

< 15/field)가 관찰되었다. 감염후 17일에는 gastric glands 내강에서 균체가 집락을 이룬 것이 관찰되었고, Gastric pits에서도 균체가 이전보다 수적(15-50/field)으로 증가하여 관찰되었다. 감염후 24일에는 gastric pits(> 50/field)에 균이 더욱 증가하여 관찰되었고, gastric glands 내강에 균체의 집락도 더욱 증가하였다. 감염후 39일과 46일에 부검한 개체에서는 감염후 24일에 관찰된 것과 유사한 정도의 균체가 관찰되었다. 유문부에서 감염후 17일에는 균체가 증식한 곳에서 점막상피세포의 변성과 국소괴사가 관찰되었고, 감염후 24일에 부검한 1례에서는 고유점막층에 림프여포가 형성되었다. 그러나 림프여포 내부에서 균체는 관찰되지 않았다. 감염후 39일에는 1례에서 점막층에서 부종이 관찰되었고 또다른 1례에서는 점막표면 상피세포의 변성이 관찰되었다. 감염후 7, 17, 24, 39일에는 부검한 것중 각 1례씩, 총 4례에서 고유점막층에 경도의 섬유화가 일어난 것이 관찰되었다. 대조군에서는 유문부의 염증반응이 경도 내지는 중도로 관찰되었는데, 은염색표본에서 균체는 관찰되지 않았다.

마우스에 tightly spiral bacteria를 감염시켰을 때 실험군과 대조군 전례에서 육안적으로 위궤양이나 미란의 소견은 관찰되지 않았다. 조직학적으로 위염소견을 관찰한 바, 위저부와 유문부에서 감염후 17일까지는 고유점막층에 경도의 림프구와 형질세포 침윤이 관찰되었다. 감염후 21일과 24일에 부검한 4마리의 마우스에서는 각각 위저부와 유문부에서 중도의 단핵구 침윤이 관찰되었으며, 28일 사이에 부검한 2마리의 마우스에서는 위저부와 유문부 모두에서 림프구와 형질세포의 침윤이 중도로 관찰되었다. 이러한 염증세포의 침윤은 감염후 8주부터 더욱 심해져 위저부와 유문부의 고유점막층에는 림프여포가 형성되었고, 점막표면의 상피세포는 다발성으로 괴사 또는 변성되었다. 감염후 12주에는 실험 전기간중 가장 심한 위염소견이 관찰되었는데, 상피세포의 변성은 감염후 8주에 비해 경미하였다. 감염후 20주에 부검한 2마리의 마우스에서는 림프구의 침윤이 다소 감소하였으나 1마리에서는 crypt epithelial cell의 hyperplasia가 관찰되었다.

감염후 50주에 부검한 2마리의 마우스에서는 위저선 세포의 위축, mucus neck cell의 hyperplasia가 관찰되었으며 균체가 감염되어 있는 glands의 내강은 확장되어 있었고 주위의 상피세포는 위축되었다. 또 균체가 감염되어 있는 부위는 재생성이 강하였으나, collagen fiber가 증식한 곳이나 이형성이 강하게 나타난 곳에서는 균체의 증식이 관찰되지 않았다. 한편, gastric glands의 cystic dilatation은 고도로 관찰되었는데, 이러한 변화는 12주에 부검한 대조군에서도 관찰되었다. 은염색표본을 관찰한 결과 감염후 3일에는 위점막표면과 gastric pit에서 균체가 주로 관찰되었으나 감염후 7일부터는 gastric glands의 내강과 parietal cells의 세포질내에서도 관찰되었다. 감염후 21일째부터는 균체가 gastric glands의 내강에 고도의 집락을 이루면서 증식한 것이 관찰되었고, gastric pits와 parietal cells내에서도 보다 많은 수의 균체가 관찰되었다. 이후의 시기에 gastric pits와 gastric gland의 내강, parietal cell의 세포질에서 균체의 숫적변화는 뚜렷이 관찰되지 않았으나 점막표면의 균체는 숫적으로 다소 감소하였다. 각 시기별로 부검한 대조군 마우스에서는 위저부와 유문부의 고유점막층에 염증세포의 침윤이 없거나 경도의 림프구 침윤이 산발적으로 관찰되었으며, 은염색에서 균체는 관찰되지 않았다. urease test를 수행한 결과 감염후 3일에 부검한 1례를 제외하고는 모든 감염군에서 urease 양성 반응이 나타났으나 대조군에서는 모두 음성으로 나타났다. 3가지의 primers를 이용하여 PCR을 수행한 바, 580bp, 1.5kb, 0.8kb에서의 밴드는 형성되지 않았다. 또 다양한 방법으로 균분리를 시도하였지만 rod형의 gram negative 균체만 증식할 뿐, tightly spiral bacteria는 배양하지 못하였다. 전자현미경으로 관찰한 결과, 균체는 주고 점액내에서 증식하고 있었으며, 2-6회 꼬여있었다. 길이는 약 2-6 ㎛정도였고, 폭은 약 0.4-0.8 ㎛였으며, cells의 양극에서 직경 약 40 nm의 flagella가 2-5까지 관찰되었다. Cells의 끝부위는 다소 평평하거나 둥글게 관찰되었으며, electro-lucent한 부위가 관찰되었다. 그러나 본 실험에서 관찰된 tightly spiral bacteria는 periplasmic fibrils를 형성하지는 않았다.

Tightly spiral bacteria가 감염된 돼지와 마우스의 유문부 점막 표층을 전자현미경학적으로 관찰한 바, 점막표면의 점액내부에서 다수의 균체가 관찰되었으며, 두 개체에서 관찰된 균체는 동일하였다. 균체는 나선형으로 관찰되었는데, 2-6회까지 꼬여 있었고, 길이는 2.0 6.0 μm, 폭은 0.5 0.8 μm였으며, 균체의 양 극은 둥글거나 다소 평평하게 관찰되었다. 고배율에서 관찰하였을 때, 균체의 세포질은 그람음성균의 특징인 안쪽과 바깥쪽에 세겹으로 이루어진 membrane과 cell wall로 둘러싸여 있었다. Cell wall은 두께가 약 10nm였는데, 두 개의 electron-dense한 부분이 다소 electron-lucent한 부분에 의해 나뉘어져 있었다. Flagella가 발생하는 균체 양 극의 근처에는 electron-lucent하며 상대적으로 ribosome이 적은 곳이 관찰되었다. 이 부위와 plasma membrane 사이에는 매우 electron-dense한 polar membrane이 존재하였다. 균체의 양 극에서는 직경 약 40nm의 flagella가 2 5까지 발생한 것이 관찰되었으나, H felis등에서 보이는 periplasmic fibrils은 관찰되지 않았다.

유산균이 tightly spiral bacteria의 증식을 억제하는지여부를 검색하였다. 조직학적으로 위저부와 유문부의 위염소견을 관찰한 결과, tightly spiral bacteria를 감염시킨 양성대조군과 유산균을 투여한 군, 그리고 lactic acid를 투여한 군사이에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다 ($p<0.05$). 음성 대조군에서는 대체적으로 위저부와 유문부에 염증반응이 없거나 경도의 단핵구 침윤만이 관찰되었다. 그러나 tightly spiral bacteria를 감염시킨 5개의 군에서는 유산균과 lactic acid의 투여 여부에 관계없이 전례에서 중도이상의 림프구와 형질세포의 침윤이 관찰되었으며, 상피세포의 국소괴사와 변성도 산발적으로 관찰되었다.

균체의 증식에 있어서도 5개의 군(group 2-6)에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p<0.05$). 균체는 fundic glands 내강에서 고도로 증식하였으며, 유문부에서는 주로 gastric pits에서 많이 관찰되었다. 특히 유문

부중에서도 십이지장으로 연결되는 부위보다는 위저부에 가까운 쪽에서 균체가 고도로 증식한 것이 관찰되었다.

위조직에 증식한 유산균의 평균수치와 lactic acid의 농도를 측정한 바, L salivarius에서 다소 높게 관찰되었다. L salivarius로 처치한 군에서는 유산균수가 7.343±0.332 log10CFU/g tissue로 나타났으며, L acidophilus로 처치한 군의 유산균수는 6.812±0.143 log10CFU/g tissue로 측정되었다. 또 lactic acid의 농도는 L salivarius로 처치한 군에서 4.026±1.050 μmol/g tissue, L acidophilus로 처치한 군에서 2.851±0.279로 측정되었다.

균분리를 시도한 결과 작고 투명한 colony의 균주 네가지를 돼지 위점막에서 분리되어 성공적으로 2차 배양되었다. Campylobacter SSP specific 16S rRNA gene 특이적인 primer로 PCR한 결과 네가지 분리균 모두 462 bp의 fragment를 생산하였다. 모든 분리균은 운동성을 가졌고, gram-negative였으며, 나선형 모양을 가졌다. 각 박테리아는 양 끝에 하나 혹은 두 개의 non-sheathed 편모를 가졌으며, 편모의 끝은 둥글지 않았다. 분리주 21-1, 21-2, 31은 길이가 2.5-3 μm, 폭이 5-6 μm으로 2-4 번 꼬였다. 분리주 48번은 길이가 3-4 μm, 폭이 2 μm으로 4-6번 꼬였다. 장시간 배양에서는 구형의 세포 모양이 관찰되었다. Endospores는 생성하지 않았다. 장시간 배양된 몇몇 sample의 경우 세균 주위에 주름(ruffle)이 관찰되어진다. 이러한 모든 표현형적 특징은 보고되어진 다른 Campylobacters의 특징과 일치한다.

분리균주 모두 미호기성균주이며, glucose, mannitol, lactose, ribose, and D-xylose를 발효하지 못하는 asaccharolytic이다. 분리균과 다른 Campylobacter와 구별되는 차이점은 표 1에서 보여준다. 차이점으로는 nitrate를 nitrite로 환원시키는 능력, alkaline phosphatase가 없으며, cephalotin에 대한 내성, 42oC에서 배양된다는 점이다. 분리균주 모두가 37oC 와 42oC, 에서 자랐으나, 25oC에서는 자라지 않았다. Oxidase and catalase activities는 양성인 반면, rapid urease 활성은 음성이었다. Hippurate는 가수분해되지 않았고, γ-glutamyl transpeptidase 활성은 음성이었으며, Indoxyl acetate hydrolysis는 양성이었다. 네 개의 분리균주는 esterase activity, TTC reduction, succinate assimilation, acetate assimilation, propionate assimilation, citrate assimilation와 nalidixic acid에 대한 감수성에 대해서는 다른 결과를 보였다. 이러한 생화학적, 생리학적 data를 기초로 네 개의 분리 균주중 21-1과 21-2 분리균의 nalidixic acid 내성을 제외하고는 C. coli 와 매우 유사하였다. C. jejuni and C. coli는 hippurate hydrolysis와 tetrazolium chloride와 nalidixic acid에 대한 내성에서 두드러진 차이점을 보였다 (Hebert, 1982). jejuni는 모든 Campylobcter species와 같이 hippurate에 양성이었으며 몇몇 Campylobacter-like organisms는 hippurate에 음성이다. 네 개의 분리균주가 hippurate 음성이었으므로, C. coli에 속한다고 생각된다.. 그러나 No. 21-1 와 48 는 TTC에 대하여 음성이었던데 반해 C. coli는 양성이다. Nalidixic acid 내성 여부를 검사한 결과 21-1와 21-2은 내성을 가지는 반면, C. jejuni 와 C. coli는 감수성을 가진다. 따라서 생화학적, 생리적 data들은 네 개의 분리균주가 C. jejuni 와 C. coli와는 다르다는 것을 보여준다. 48번 분리주에 대한 antiserum을 가지고 행한 Western blot analysis는 분리주와 공시주 사이의 차이점을 보여준다 Wesstern blot의 결과로 그린 dendrogram으로 분석해보면 네 개의 분리균주는 공시주와 연관이 적음을 알 수 있었다.

분리주와 공시균주 사이의 차이점을 확실히 하기 위하여 다양한 random primer를 가지고RAPD를 수행하였다. RAPD는 동물과 사람의 Campylobacter spp.를 포함한 다양한 박테리아의 sub-typing에 성공적으로 사용되어져 왔다. RP3에 의한 RAPD의 경우 C. coli와 네 개의 분리주가 동일한 pattern을 보여주었으나, RP4와 RP5를 사용한 RAPD는 C. coli 다른 pattern을 보여주었다 . Dendrogram을 그렸을 때, 새로 분리된 균주들은

서로 유사하였으나, 다른 공시균주와의 유사성은 적었다 이러한 분리균주의 더욱 자세한 특징조사를 위하여 실시한 total 16S rRNA sequencing의 결과를 보았을 때 C. coli와 근접한 유연관계를 가지나 똑같은 group에는 속하지 않았다.

이러한 생화학/ 생리 검사 결과, RAPD결과, Western blot analysis, 16S rRNA 염기 서열의 결과, 네 개의 분리균주는 서로 달랐고, C. jejuni, C. doley, C. lari, and C. coli를 포함한 다른 Campylobacter들과는 다른 신종으로 보여진다.

Adherence는 상피세포의 표면에 bacterial colonization하는 필수적인 요인이며, 진핵세포의 표면에 있는 protein이나 glycoconjugates를 인식하는 adhesine이라는 bacterial surface molecule에 의해 매개된다. 위점막에 부착된 H. pylori를 assay하는 가장 좋은 방법은 H. pylori에 대한 항균능력을 가지는 chemical을 assay하기 위해 개발되어진 위 조직을 사용하는 것일 것이다. 그러나 사람의 위 점막을 얻는 것은 불가능하고 심지어 돼지의 위를 구하는 것도 어렵다. 또한 위 조직배양은 비용도 높으며 결과를 도출하는데 며칠이 소요되며 또한 매번 신선하게 준비해야만 한다.

H. pylori의 부착정도를 assay하는 더 쉬운 assay 방법을 개발하기 위해 O형 적혈구로부터 glycolipid를 분리하여 사용하였다. H. pylori의 attachment site는 일반적으로 O형 적혈구 표면에 발현된 Lewis antigen B로 알려져 있으며, 단 H. pylori attachment에 대해 ABO blood group antigen의 발현에 영향을 준다는 논쟁도 있다.

다른 양의 glycolipid를 TLC plate에 점적하였을때, 점적한 gycolipid의 양이 증가할수록 H. pylori의 binding양도 증가하였다. 많은 양의 glycolipid는 spot을 번지게 하므로 5 ㎕를 점적하여 실험하였다. 여러가지 Lactobacilli 첨가시 L. casei를 제외한 L. acidophillus종은 매우 억제효과가 좋았다. 그림에서 H. pylori만 부착한 것이 양성대조군이며 반면 glycolipid에 Lactobacillus만 붙인 것은 음성 대조군이다. 다양한

L. acidophilus를 순차적으로 희석하여 H pylori부착을 억제한 경우, Lactobacillus의 수가 증가하면 H pylori adherence는 반비례적으로 감소하였다. 즉, 이 결과는 Lactobacillus가 H pylori의 adherence에 억제활성을 가짐을 보여주는 것이다. 그리고 H pylori의 생장을 다양한 Lactobacillus의 억제활성의 차이는 H pylori adherence를 억제하는 억제활성의 차이에서 기인한다고 생각된다. L. acidophilus는 lactic acid를 생성하고 H pylori adherence를 억제하는 activity를 동시에 가지기 때문에 H pylori에 대한 생약재제로 가능하다고 생각된다.

본 연구에서 개발한 immunoabsorbent assay는다음과 같은 이유로 돼지의 위 조직을 사용하는 binding assay보다 많은 종류의 Lactobacilli를 검색하는 데에 더 쉽고 좋다.(1) glycolipid는 쉽게 준비되어질 수 있고 오랜기간 보관이 가능하다. 반면 신선한 돼지의 위와 특히 사람의 위는 각 실험 때 마다 얻기 힘들다. (2) 이 실험에서 H pylori와 Lactobacillus는 생균 상태를 유지할 필요가 없다. 왜냐하면 L. acidophilus는 얼려져 있는 상태에서도 inhibitory activity를 유지학기 때문이다. 이것은 얼리거나 동결건조한 L. acidophilus를 H pylori에 대한 생균제재로서 사용되어질 수 있다는 것을 제시한다.

위궤양을 일으키는 Gastrospirillum은 H pylori에서 분리되어진 Helicobacter felis와 매매우 유사한 gram negative cork screw모양의 3에서 8회 coiling된 간균이다. 그람염색으로 관찰 하였을 때 조직내에 감염된 Gastrospirillum으로 전형적인 3-8회 꼬인 cork screw의 모양을 보여주고 있다. 이러한 돼지의 위궤양을 야기하는 Gastrospirillum 배양이 까다롭다. 이것은 Campylobacter 종들이 열악한 환경에서 생존을 연장하기 위해 살아있으나 증식키 어려운 cocoid form등을 취하여 subculture를 어렵게 하는 특징 때문으로 생각된다. 따라서 돼지의 Gastrospirillum 감염위조직을 직접 mouse에 감염시킴으로 도축장에서 실험실로 이동하는 시간을 단축하고, 본 실험실에서 신속히 병원균을 접종하여 배양하는 방법을

선택하였다. 특히 재료 및 방법에서 기술한 대로 위 점막과 유사한 상태를 만들고자 사용한 반 고체배지를 배지에 조직을 덮어 배양했을 때 10% blood columbia 배지와 10% blood BHI 배지에서 다른 세균들과 함께 Gastrospirillum이 배양되었다. 앞으로 배지의 항생제 조건을 바꾸어 다른 균의 증식은 억제하고 Gastrospirillum이 선택적으로 잘 자랄 수 있는 위 점막과 같은 배양조건은 앞으로 더욱 개발되어야 하겠다.

Gastrospirillum은 그 특징이 oxidase, catalase, nitrite, nitrate, urease 양성으로 보고되어 있으며, 특히 urease를 생성함으로 강산의 위에 서식할 수 있는 것으로 보인다. 여기에 착안하여 Gastrospirillum 감염 위 조직에서 DNA를 분리하여 urease A gene에 대한 primer를 사용하여 PCR을 수행했을 때, 411 bp 크기의 DNA 조각을 얻었다. 이 411 bp의 염기서열은 H. pylori의 urease와 같은 염기서열을 지니고 있다. 따라서 H. pylori의 urease를 Gastrospirillum의 urease백신으로 사용할 수 있는 것으로 생각되어졌다. 그래서 H. pylori ureA-ureH gene이 cloned된 E. coli BL21로부터 urease를 순수 분리하였다. 순수분리한 urease 5 μg와 mucosal adjuvant 10 μg을 함께 mouse에 경구 투여하여 면역시켜 Gastrospirillum 감염을 막는 것을 확인하고 있는 중이다.

돼지의 위궤양을 일으키는 bacteria 및 fungi를 찾는 과정에서 궤양보다는 각화된 위 조직에서 Candida를 분리하게 되었다. 돼지 위에서 분리된 Candida중 campylobacter 가 분리되었던 위에서 함께 분리된 Candida를 mouse에 경구 투여한 후 2 뒤, 위 조직에서 감염 여부가 확인되었다. 또한 위장병균을 분리하기 위해 다양한 modified blood agar배지를 사용하여 37℃ 10% 항온기에서 배양했을 때 H. pylori의 대표적인 특징인 urease catalase oxidase 가 양성인 균주를 columbia blood agar 배지에서 얻을수 있었다. 그러나 일반적으로 Helicobacter ssp.로 보고된 굽은 모양의 rod나 나선형 rod균은 아니었다. 그러나 H. pylori urease A gene을 증폭하는 primer를 이용하여 분리균을 PCR 하였을 때 411bp fragment를 얻었

다 또한 분리균의 증폭된 urease A fragment의 염기서열을를 H pylori의 염기서열과 비교했을 때, 거의 유사하였다(약 95%유사). 또한 장내 세균 중 urease 양성인 Yersinia와 Proteus의 urease A와 비교했을 때 urease 염기서열이 다름을 확인하였다.

또한 분리균을 Helicobacter SSP PCR을 하여 확인했을 때 297 bp의 H pylori fragment는 없으나, 4개의 fragment를 증폭한 것을 보여준다

이상의 돼지 병변에서 분리한 Candida와 Gastrospirillum 감염조직에서 분리한 분리균 8번을 각각 107과 109 CFU/0.5 ㎖ 경구 투여하여 감염하였을 때 각각 위 조직에 감염된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 감염된 위조직을 slide glass에 도말하여 관찰할 때, 감염시킨 균들이 위궤양을 야기할 정도로 빠르게 군집을 이루는 것 같지 않다. 그러나 Gastrospirillum이 많이 감염되어있는 mouse 위 조직에서는 Candida만 감염시킨 경우 보다 Candida가 군집을 잘 이룰뿐더러 활발히 출아하는 것이 보여진다. 즉 Candida가 분리된 곳도 각화된 병변이었고, Gastrospilillum 감염이 되어있는 위 조직에서 활발히 증식하는 것을 볼 때, 2차 감염에 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.

또한 Candida와 분리균주 8번을 French Press에 3회 통과한 후 10% formalin에 고정하여 total cell을 경구 백신으로 3주간 2회 1 ㎎/ 0.5 ㎖ 투여한 후. 각각 Candiada와 분리균주 8번을 2 × 107 CFU/ 0.5 ㎖ 과 1.5 × 109 CFU/ 0.5 ㎖ 되게 경구 투여하여 감염시킴으로 3주후, 감염 억제 여부를 확인했으나, Candida 와 분리균주 8 번이 경구백신을 투여치 않은 정상 위에서도 활발히 자라주지 않음으로 유의적 결과를 도출하지 못하였다.

SUMMARY

Tightly spiralled bacteria were observed in the pyloric mucosa of the stomach of 4(8.0%) of 50 pigs. mainly surface of epithelia, gastric pits and the lumen of gastric glands. The presence of the spiral bacteria was significantly associated with chronic pyloric gastritis($p<0.05$). Mean gastritis score of 4 pigs infected with bacteria was 3.250($\pm$0.250) and that of 46 pigs uninfected was 2.370 ($\pm$0.114). Parakeratosis and hyperkeratosis were spontaneously seen in the mucosa layer of pars oesophagea regadless of bacterial infection, but no granulomatous lesion and ulcer. Marked infiltration of mononuclear cells and granulocytes were seen in the cardiac mucosa of the majority of pigs(gastritis score = 2. 860$\pm$0.090). Inflammatory response in the fundic mucosa was not serious. Infiltration of a small number of mononuclear cells was seen in the gastric pits of fundic mucosa(gastritis score = 0.75$\pm$0.081). Tightly spiralled bacteria could not be cultured from any pigs.

To investigate the association between infection of tightly spiralled bacteria and gastritis in the pig stomachs. Nine male pigs were inoculated with gastric homogenate of pigs infected with tightly spiral bacteria and two control pigs were given mucus taken from bacterium-negative pig. One or two test pigs were sacrified 7, 17, 24, 39 and 46 Postinoculation days(PID). Two control pigs were killed 46 days after inoculation. Tightly spiral bacteria were found in the pyloric mucosa of all test pigs except one killed 7 PID, but not in the gastric mucosa of any control pigs. The number of bacteria

continuously increased from the beginning of infection to the last day in the gastric pits and gastric glands. With Steiner's silver staining, the bacteria were observed mainly in the surface of epithelia, gastric pits and the lumen of gastric glands. At 7 PID, there was the mild lymphoplasmocytic inflammatory response in the pyloric mucosa of test pigs. At 17, 24, 39, 46 PID, more increased infiltration of mononuclear cell was observed in the pylori mucosa of test pigs and lymphoid follicles were seen in the pyloric mucosa of one killed 24 PID. Mild to moderate inflammatory response was seen in the pyloric mucosa of control pigs.

To find out the pathogenesis of tightly spiral bacteria colonized in the pig stomachs, and establish a new animal model for these bacteria infection. Twenty-four male SPF ICR mice were inoculated with gastric homogenate of pigs infected with tightly spiral bacteria and ten control mice were given mucus taken from bacterium-negative pig. Two test mice were sacrified 3, 7, 10, 17, 21, 24, 28days and 8, 12, 16, 20 and 50weeks postinoculation(PI) and two control mice were killed 7, 17, 28days and 12, 20weeks. Tightly spiral bacteria were found in the fundic and pyloric mucosa of all test mice but not in the gastric mucosa of any control mice. With Steiner's silver staining, the bacteria were observed in the surface of epithelia, gastric pits, the cytoplasm of parietal cells and the lumen of gastric glands. The lymphoplasmocytic inflammatory response continuously increased from the beginning of infection to the last day in the lamina propria of gastric mucosa of test mice. Lymphoid aggregates were observed in the fundic and pyloric mucosa from seven of eight animals killed 8, 12, 16, 20 and 50 weeks PI. Several methods of PCR and bacterial culture were applied, but the results were unsuccessful. Electronmicroscopically, the bacteria had two to six spiral turns, and was approximately 2-6 μm long and 0.4-0.8 μm wide. The cells had two to five flagella arising from each pole , about 40nm in diameter, but no periplasmic fibrils. Mice infected with spiral bacteria will be useful in studying the pathogenesis of gastric lesions associated with Helicobacter.

The ultrastructure of tightly spiralled bacteria infected in the gastric mucosa of pigs and mice were examined. The bacterial cell had two to six spiral turns, truncated or round ends and was 2.0-6.0 μm long and 0.4-0.8 μm wide. Two to five flagella, about 40nm in diameter, were seen arising from each pole. At higher magnification, the cytoplasm was seen to be enclosed by an inner trilaminar unit membrane and an outer three-layered cell wall characteristic of gram-negative bacteria. Adjacent to the polar ends, at the region of insertion of the flagella, the cytoplasm had a less dense area. On either side of this region, beneath the plasma membrane, there was a highly electron-dense "polar membrane". The bacterium described in this study was very similar to one reported by Mendes et al.

We examined whether or not the lactobacilli administered to treat tightly spiralled bacteria colonized in the pyloric mucosa of pigs can suppress the colonization of this bacteria. Male ICR mice infected with tightly spiralled bacteria were challenged with L salivarius, L acidophilus, 10mM lactic acid and 100mM lactic acid for 4 weeks. Histopathologically, there was no evidence of inhibition of bacterial colonization and gastritis induced by tightly spiral bacterial infection. Highly infiltration of lymphocytes and plasma cell were seen in the fundic and pyloric mucosa of all mice infected tightly spiral bacteriaIt regardless of challenging with Lactobacilli or lacitic acid. And there was moderate to severe colonization of tightly spiral bacteria in the gastric pits and the lumen of gastric glands of gastric mucosa of all mice except negative control. It is necessary to develop other theraputic methods to inhibit colonization of tightly spiral bacteria

Campylobacter is a pathogen for both humans and animals that can be transferred from animals to humans. Four isolates, which grew under 5-10% CO_2 and had small and translucent colonies, were obtained from swine gastric mucosa characterized using various methods. These bacteria were gram negative, spirally shaped with round ends. One or two non-sheathed polar flagella were observed under an electron microscope. A PCR with species-specific protein (SSP) primers for 16S rRNA gene in Campylobacter produced a typical 462 bp fragment. The isolates had various biochemical and molecular characteristics which differentiated them from other Campylobacters. The isolates were catalase and oxidase positive, urease (rapid) negative, nitrate reduction positive, indoxyl acetate hydrolysis positive, γ-glutamyl transpeptidase negative, and alkaline phosphatase negative. All four isolates showed growth at 37oC and 42oC but yet at 25oC. All isolates were resistant to cephalotin and cefoperazone, and susceptible to carbenicillin. The isolates showed various results in the reduction of chloride to triphenyl tetrazolium (TTC) and a susceptibility to nalidixic acid. Western blot analysis of these isolates with antiserum raised against one isolate showed different patterns from those of reference strains. A dendrogram drawn with the RAPD results showed that these isolates belonged to a different group from those of C. jejuni, C. doylei, C. lari, and C. coli. It would appear that these isolates belong to a new Campylobacter spp.

Lactobacillus acidophilus is known to have an inhibitory activity on Helicobacter pylori growth. And this activity has been considered to be due to the lactic acid and antibacterial agents produced by Lactobacillus. Since every Lactobacilli produce lactic acid, another factor must exist for L. acidophilus to inhibit H. pylori growth. In this work, the inhibitory activity of L. acidophilus on H. pylori adherence was studied. An immunoabsorbent assay using a TLC plate was developed and used for screening of the inhibitory activity of various Lactobacilli on H. pylori adherence. Glycolipid, the attachment site for H. pylori, was isolated from blood type O red blood cells and spotted on a TLC plate. The H. pylori adherence increased linearly with increasing amounts of glycolipid spotted on the TLC plate. Various L. acidophilus strains yet no L. casei appeared to inhibit H. pylori adherence to glycolipid, plus the adherence was decreased linearly as the concentration of the Lactobacillus increased. The results show that the inhibitory activity of L. acidophilus on H. pylori adherence is another factor for L. acidophilus to inhibit H. pylori growth.

Several strains of Candida and Helicobacter-like bacteria were isolated from the region of gastritis and keratinization of swine stomach. Helicobacter-like bacteria produces colonies with the transparent and small appearance which is typical to H. pylori. This bacterial strain showed the same result of H. pylori in various biochemical test such as urease, catalase, and oxidase tests. One strain of Candida and one strain of helicobacter-like bacteria were cultured, collected with centrifugation, broken with sonication, and fixed in 10% formalin. Each group of five mice was fed twice with the fixed total proteins. After two weeks, mice in each group were challenged with Candida and Helicobacter-like bacterium, respectively. The control group showed the infection from Candida and Helicobacter-like bacterium while some of the experiment group with gastroimmunization showed the infection too.

When a PCR specific to urease A in Helicobacter pylori was performed using DNA isolated from Gastrospirillum infected tissue, a DNA band with the typical 411 bp was obtained. DNA sequence of this PCR product coincided with the urease A of Helicobacter pylori. This result shows that Gastrospillium produces the same urease of H. pylori. Based on this, urease of H. pylori was purified from urease cloned E. coli B21/pHU1013. Bacterial cells were grown in LB with ampicillin and collected with centrifugation. Cells were broken in a French pressurized cell. Urease were purified with DEAE anion exchange column chromatography, Sephacryl S-200, and MonoQ column chromatography. With this purified protein, infection experiment is under way.

CONTENTS

Chapter 11. References

목 차

제 3 절 돼지 위점막에서 증식하는 tightly spiral bacteria**의 돼지실험 감염**

제 4 절 마우스 위점막에서 tightly spiral bacteria**의 증식에 미치는 유산균의 효과에 관한 연구**

제 5 절 돼지 위점막에 증식하는 tightly spiral bacteria**의 전자현미경학적 관찰**

제 6 절 국내 돼지에서 위내에 증식하는 Campylobacter sp**의 감염에 대한 혈청학적 조사**

제 7 절 위 점막으로부터 새로 분리해 낸 Campylobacter**의 특성조사**

제 8 절 돼지 위장병균의 분리, 감염 및 예방 실험

제 9 절 Lactobacillus acidophilus**에 의한** Helicobacter pylori Adherence**억제 검색**

제 10 절 Helicobacter pylori urease**에 의한** Helicobacter gastrospillium **감염방지 실험**

제 1 장 Tightly spiral bacteria에 감염된 돼지 위의 병리학적 연구

제 1 절 서론

1983년 Warren과 Marshall이 사람에서 위염과 위궤양을 일으키는 원인체인 H pylori를 보고(Warren, 1983 ; Marshall, 1983)한 이래 gastric bacteria에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 gastric bacteria는 여러종의 동물에서 분리되었는데, 고양이, 원숭이와 같은 몇 종의 동물에서는 위염을 일으키지 않으면서 위저선에 이러한 나선균들이 감염되어 있으며(Lee 등, 1988 ; Sato 등, 1982), 개는 애완견과 실험동물등에서 80-100%까지의 감염이 보고되고 있다.(Hermanns 등, 1995; Henry 등, 1987) 이러한 spiral bacteria는 사람에서 chronic active gastritis와 peptic ulcer를 유발하며(Warren 등, 1983), 개와 고양이에서는 lymphofollicular gastritis(Henry 등, 1987; Handt 등, 1994; Otto 등, 1994), 페렛(Fox 등, 1990; Fox 등, 1991), 이나 치타(Eaton 등, 1993), 영장류(Baskerville 등, 1988), 돼지(Queiroz 등, 1990)에서는 chronic gastritis와 관련되어 왔다. 1990년 Queiroz와 Mendes등은 돼지의 위점막에서 증식하는 tightly spiral bacteria를 최초로 보고하였다(Queiroz 등, 1990). 이들 균체는 전자현미경으로 관찰하였을 때, 형태학적으로 사람의 위점막에 감염되어 만성위염을 야기하는 H heilmannii와 유사하였고(Mendes 등, 1990), 16S rRNA gene sequence가 H. heilmannii와 99.5% 유사하여(Queiroz 등, 1995) 이 균을 Gastrospirillum suis라고 하였다. 현재까지 돼지에서 이러한 tightly spiral bacteria의 감염은 브라질에서 10.8%(Mendes 등, 1991), 이탈리아에서 9.4%(Grasso 등, 1996)정도 감염되어 있다.

본 연구에서는 국내 비육돈의 위에서 tightly spiral bacteria의 감염을 확인하고, 이 균의 감염과 위에서 발생하는 병변과의 관계를 규명하는데 그 목적이 있다.

제 2 절 재료 및 방법

1. Animals

경기도 수원 도축장에서 돼지위 50개를 구입하였다. 도축후 곧바로 위조직을 4℃ ice box에 담아서 실험실로 운반하였고, 식도부에서부터 대만부를 따라 십이지장의 기시부까지 절개한 후 위내용물을 조심스럽게 제거하였다. 육안소견을 관찰한후, 식도부, 분문부, 위저부, 유문부의 일부를 10% 중성 포르말린에 고정하였고, 위저부와 유문부 일부는 점막을 슬라이드 글라스에 도말하여 Carbol-fuscin 염색을 통해 tightly spiral bacteria의 감염을 확인하였다.

2. Histopathological examination

10% 중성 포르말린에 24시간 이상 고정한 후에 alcohol-xylene으로 processing하여 파라핀 포매하였고, 2 ㎛의 슬라이드 절편을 만들어 HE 염색과 Steiner's silver 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 은염색 조직절편에서 tightly spiral bacteria에 대한 감염여부를 판정한후, 감염군과 비감염군으로 나누어 조직병리학적 검사를 수행하였다. 분문부와 위저부, 유문부에서 고유점막층의 염증세포 침윤에 따라 위염을 평가하였는데, 평가 기준은 Table 1과 같이 하였다.

Table 1. Evaluation of gastritis of cardiac, fundic, pyloric mucosa

Gastritis score	Histopathologic findings
0	no infiltration of inflammatory cells in the gastric mucosa
1	mild infiltration of lymphocytes, plasma cells and some eosinophils in the gastric mucosa
2	moderately dense infiltration of lymphocytes, plasma cells in the gastric mucosa but no lymphoid follicle
3	moderately dense infiltration of lymphocytes, plasma cells and presence of lymphoid follicles in the gastric mucosa
4	very dense infiltration of lymphoplasmo-cells and presence of lymphoid follicles in the gastric mucosa

Modified Steiner's silver 염색을 하기 위하여, 슬라이드 절편의 조직을 탈파라핀한 다음 1% uranyl nitrate에 60℃에서 15분간 침적하였고, 증류수로 3회 세정한 후 1% silver nitrate에 60℃에서 90분간 침적하였다. 이후 증류수로 3회 세정하였고 95%, 100% 알코올에 2회 침적한후, 2.5% gum mastic 용액에 실온에서 5분간 침적하였다. 이후 조직을 공기중에서 건조시켰고, 2.5% gum mastic 10㎖와 2% hydroquinone 25㎖, 100% 알코올 5㎖, 1% silver nitrate 0.2㎖을 섞은 reducing 용액에 45℃에서 25분간 조직을 침적한 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3. Bacterial culture

부검후 위저부와 유문부 점막 일부를 멸균한 가위로 절제한후 멸균한 칼로 잘게 분쇄하였다. 이를 5% horse serum이 첨가된 chocolate agar(BBL®, USA), 10% horse serum과 항생제(amphotericin B, trimethoprim, polymyxin B, vancomycin)가 함유된 GC modified chocholate agar(DIFCO, USA), brain heart infusion agar(BBL®, USA) plate에 접종후 Gaspak(GasPakPlusTM, BBL®, USA)을 넣은 세균배양기에서 37℃상태로 4-7일간 배양하였다.

4. Statistics

Anova test를 이용하였다.

제 3 절 결과

육안적으로 5례의 위저부에서 gastric fold의 비후와 고도의 충혈이 관찰되었고, gastric fold의 소상괴사도 2례에서 관찰되었다. 고유위선의 충혈은 6례에서 관찰되었고, pars esophagus에서는 2례에서 고도의 각화가, 1례에서 경도의 충혈이 관찰되었다(Fig 1).

은염색표본에서 식도부와 분문부, 위저부에서는 tightly spiral bacteria가 관찰되지 않았으며, 4례(8.0%)의 유문부에서 균체가 관찰되었다. 균체는 주로 점막표면의 점액과 gastric pits, gastric glands 내강에서 관찰되었다(fig 2). 식도부에서는 21례에서 점막층에 parakeratosis가 11례에서 hyperkeratosis가 관찰되었는데, tightly spiral bacteria가 감염된 1례에서도 이러한 변화가 관찰되었다(Fig 3). 그러나 염증세포의 침윤으로 인한 육아종이나 궤양의 소견은 관찰되지 않았다. 분문부는 거의 전례(47/50, 94.0%)에서 경도부터 고도의 림프구, 형질세포, 호산구의 침윤이 관찰되었는데, 50례의 평균 gastritis score는 2.860(±0.090, SEM)이었다(Fig 4). 이중 3례에서는 고유점막층 상피세포의 hyperplasia가 관찰되었다. 위저부의 염증반응은 매우 경미하였는데, 주로 gastric pits에 경도에서 중도의 림프구와 형질세포 침윤이 관찰되었다. 2례에서는 cystic dilatation이 관찰되었고, 상피세포의 변성은 8례에서 관찰되었으며, 평균 gastritis score는 0.75(±0.081, SEM)였다. Tightly spiral bacteria가 감염된 4례에서는 모두 고유점막층에 고도의 단핵구 침윤이 관찰되었다

(Fig 5). 감염군의 유문부 평균 gastritis score는 3.250(±0.250, SEM)였고, 감염되지 않은 46례의 평균 gastritis score는 2.370(±0.114, SEM)이었다. Tightly spiral bacteria의 감염과 유문부의 만성위염 사이에는 $p<0.05$에서 유의적으로 관련성이 있음이 확인되었다(Fig 6). 유문부 고유점막층의 림프여포는 tightly spiral bacteria가 감염된 전례(100%)에서 관찰되었고, 감염되지 않은 46례중 19(41.3%)례에서 확인되었다(Fig 7).

전례의 돼지 위조직에 대하여 여러 가지 배지와 배양조건하에서 tightly spiral bacteria의 균분리를 시도하였으나 성공하지 못하였다.

Table 2. Histopathological findings of pig stomachs infected with and without tightly spiral bacteria.

Histopathologic findings	Number of pigs: Not infected with tightly spiral bacteria(46)	Number of pigs: Infected with tightly spiral bacteria(4)
Pars esophagus		
Hyperkeratinization	**10**	**1**
Parakeratosis	**20**	**1**
Submucosa		
Lymphocytes	**19**	**0**
Eosinophils	**12**	**0**
Lymphoid follicles	**8**	**0**
Cardia		
Epithelial degeneration	**14**	**1**
Erosion	**10**	**0**
Lamina propria		
Lymphocytes	**43**	**4**
Eosinophils	**40**	**2**
Lymphoid follicles	**34**	**2**
Epithelial hyperplasia	**3**	**0**
Submucosa		
Eosinophils	**2**	**1**
Mucularis		
Lymphocytes	**1**	**0**
Eosinophils	**1**	**0**
Fundus		
Epithelial degeneration	**7**	**1**
Erosion	**2**	**1**
Lamina propria		
Lymphocytes	**27**	**1**
Eosinophils	**7**	**0**
Lymphoid follicles	**3**	**0**
Cystic dilatation	**1**	**1**
Submucosa		
Eosinophils	**10**	**0**
Mucularis		
Lymphocytes	**2**	**0**
Eosinophils	**5**	**0**
Pylorus		
Epithelial degeneration	**26**	**3**
Erosion	**8**	**1**
Lamina propria		
Lymphocytes	**41**	**4**
Eosinophils	**36**	**3**
Lymphoid follicles	**20**	**4**
Submucosa		
Eosinophils	**3**	**0**
Mucularis		
Lymphocytes	**0**	**0**
Eosinophils	**0**	**0**

제 4 절 고찰

여러 동물에서 자연적으로 발생하는 위염의 보고는 간혹 있으나 (Baskerville 등, 1988, Eaton 등, 1993, Henry 등, 1987; Handt 등, 1994), 돼지에서 위의 병변과 관련된 조직학적 기술은 매우 드물다. 돼지에서 식도부와 분문부의 만성위염에 대한 보고는 가끔 있으나 그 원인에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다. (Jubb 등, 1985). Spiral bacteria의 감염은 여러종의 동물에서 보고되어 있으나 유일하게 ferrets에서의 H mustelae의 감염만이 위염과 관련되어 있다(Fox 등, 1988).

돼지에서 tightly spiral bacteria의 감염과 위점막에 발생하는 병변과의 관계를 알아위해 실시한 본 연구에서 tightly spiral bacteria는 총 50례의 위조직중 4(8.0%)례의 유문부에서 감염되어 있는 것이 확인되었다. 이러한 tightly spiral bacteria의 감염은 유문부의 만성위염과 유의적인 관련성이 있었는데($p<0.05$), Mendes 등도 돼지위에 감염되어 있는 spiral bacteria의 일종인 G suis의 감염과 유문부의 만성위염사이에 유의적인 관련성($p=0.013$)이 있다고 하였다(Mendes 등, 1991). Tightly spiral bacteri가 감염된 조직에서 관찰된 림프구와 형질세포 위주의 염증반응은 H pylori에 감염된 사람에서 나타나는 병변과 유사하였다(Queiroz 등, 1988). 위저부에서는 tightly spiral bacteria의 감염이 관찰되지 않았는데, Mendes 등의 실험에서는 유문부(10.8%)보다는 적지만 위저부(5.0%)에서도 이러한 tightly spiral bacteria의 감염이 성립하였다(Mendes, 1991). 본 연구에서 tightly spiral bacteria가 감염된 4례 모두에서 유문부의 고유점막층에 림프여포가 형성되었는데, 감염되지 않은 개체에서는 46례중 20례(43.5%)만이 림프여포가 관찰되었다. 한편, Tightly spiral bacteria가 감염된 위조직(7/13, 53.8%)과 감염되지 않은 것(22/107, 20.6%) 사이에는 림프여포의 발생에 유의적인 차이($p=0.014$)가 있었다 (Mendes 등, 1991).

Tightly spiral bacteria가 감염되지 않은 개체에서도 유문부에서 위염소견이 관찰되었는데, 이러한 원인으로는 사료에 관련된 문제(Guizzardi F 등, 1982 ; Krakowka S 등, 1998)나 Hyostrongylus rubidus, Ascarops spp., Physocephalus spp. 그리고 Simondsia spp.같은 기생충(Jubb KVF, 1985) 등이 알려져 있다.

다양한 배지와 배양조건하에서 tightly spiral bacteria의 균분리는 성공하지 못하였다. 이는 균이 위점막의 외부 조건에 매우 민감하거나, 성장에 필수적인 성분이 배지중에 제외되었기 때문이라 생각된다.

돼지의 위점막에서 증식하는 tightly spiral bacteria는 16S rRNA sequencing 결과 사람에서 감염되는 H heilmannii type 1과 99.5% 유사하다고 하였다(Queiroz 등, 1995). 이러한 결과는 이균이 인수공통감염원이라는 사실을 강하게 증명하고 있다. Tightly spiral bacteria가 사람과 동물사이에서 감염이 성립하는지에 대한 보다 세밀한 연구가 이루어지기를 기대한다.

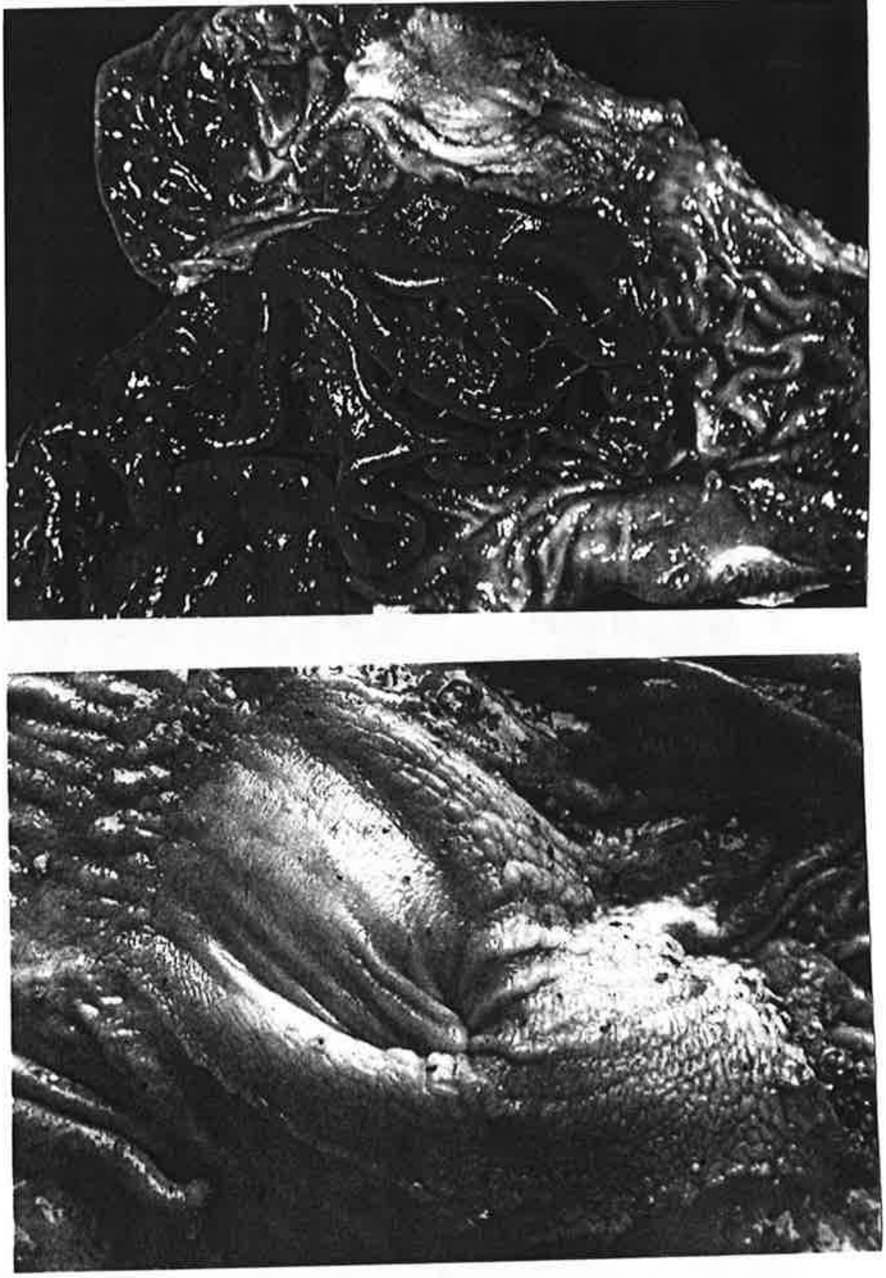


Fig 1. Severe congetion of fundic mucosa and and keratinization of pars esophagus.

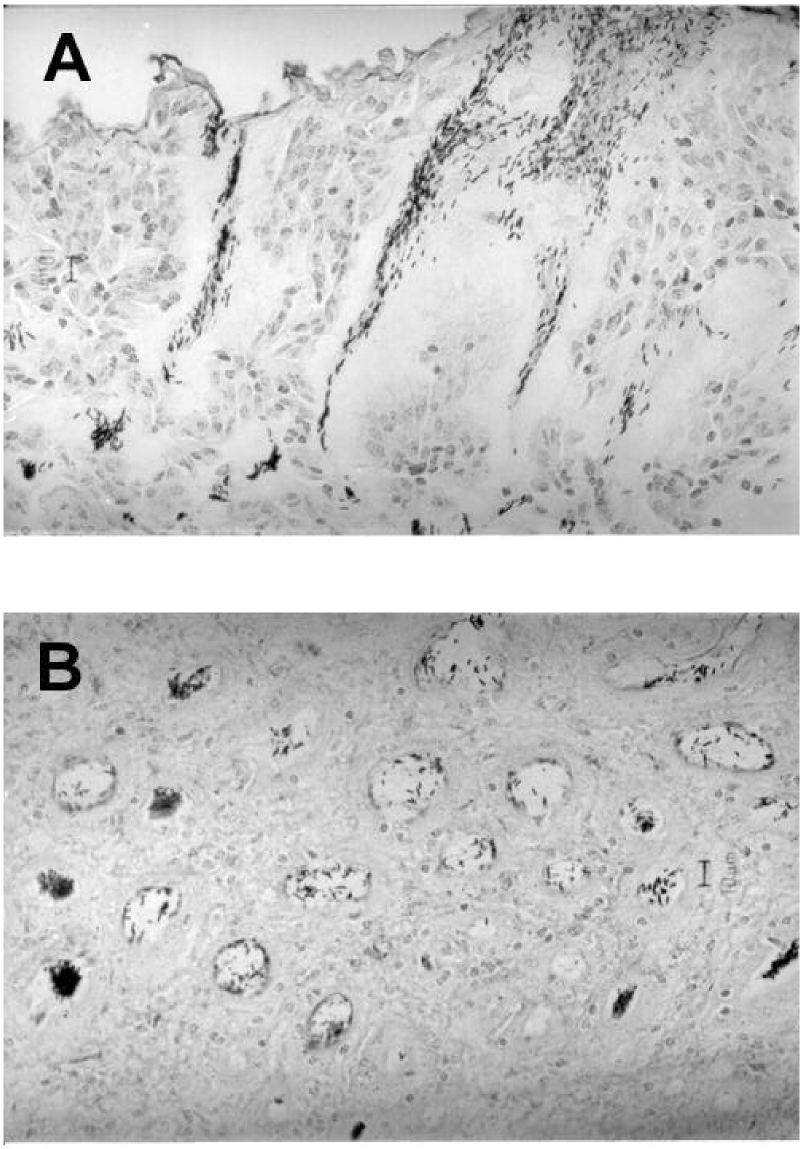


Fig 2. Tightly spiral bacteria of the gastric pits(A) and the lumen of gastric glands(B), Steiner's silver stain.

Fig 3. Hyperkeratosis and parakeratosis of mucosa and lymphoid follicles of submucosa of pars esophagus, H&E stain.

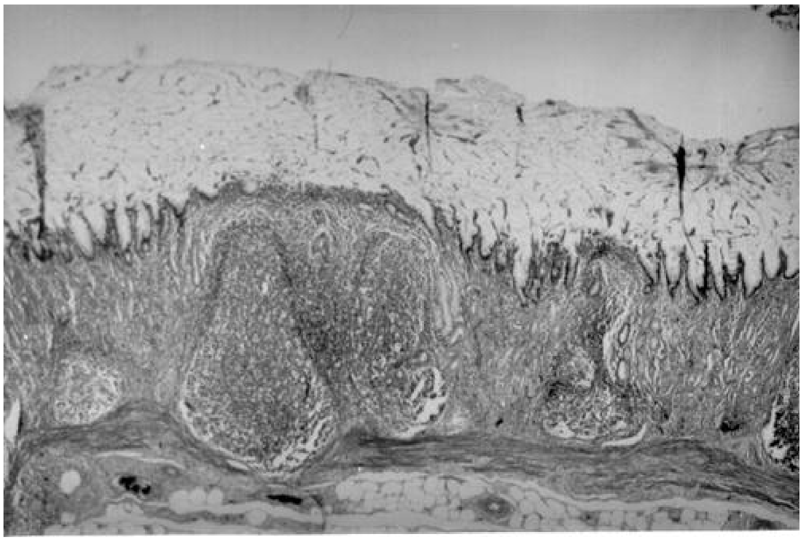


Fig 4. Severe dense infiltration of mononuclear cells and eosinophils and lymphoid follicles of cardiac mucosa, H&E stain.

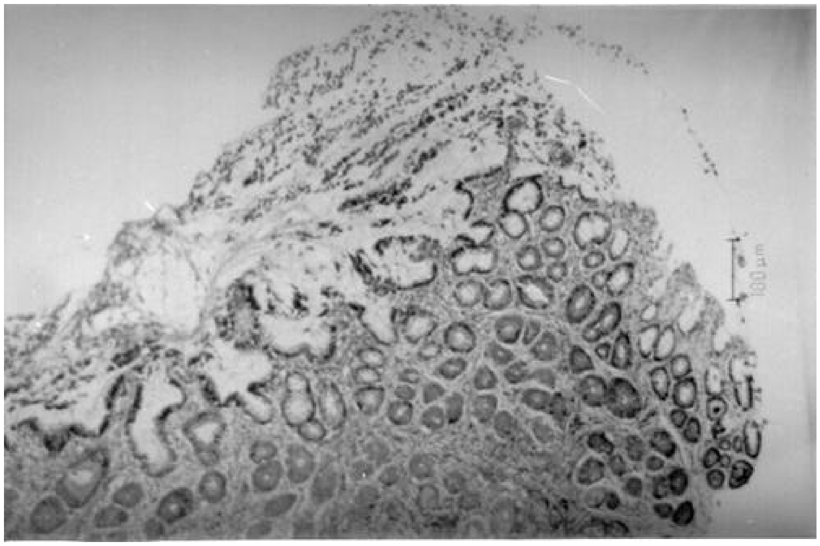


Fig 5. Moderate infiltration of mononuclear cells and focal necrosis of surface epithelia of pyloric mucosa of pig infected with tightly spiralled bacteria, H&E stain.

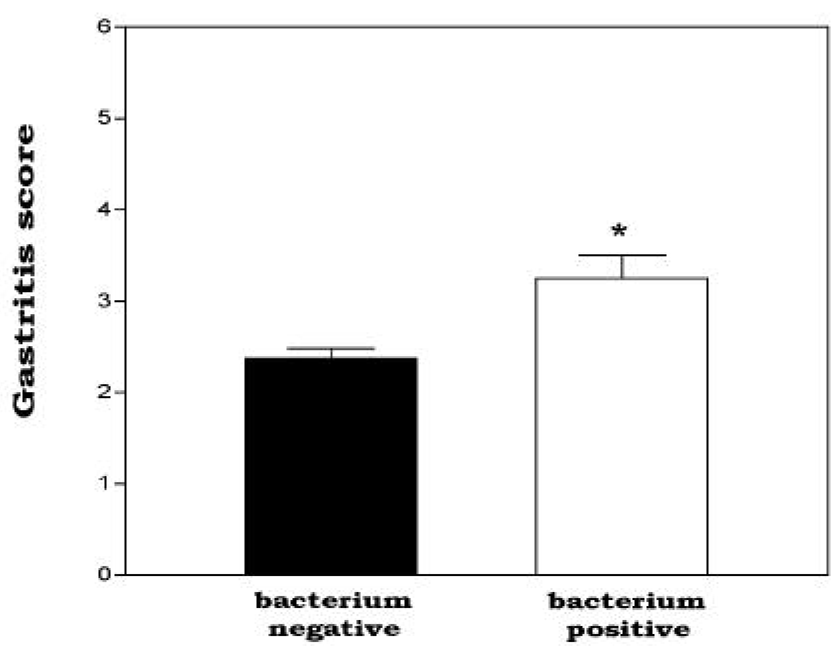


Fig 6. Gastritis score of pyloric mucosa of pigs infected with and without tightly spiralled bacteria.

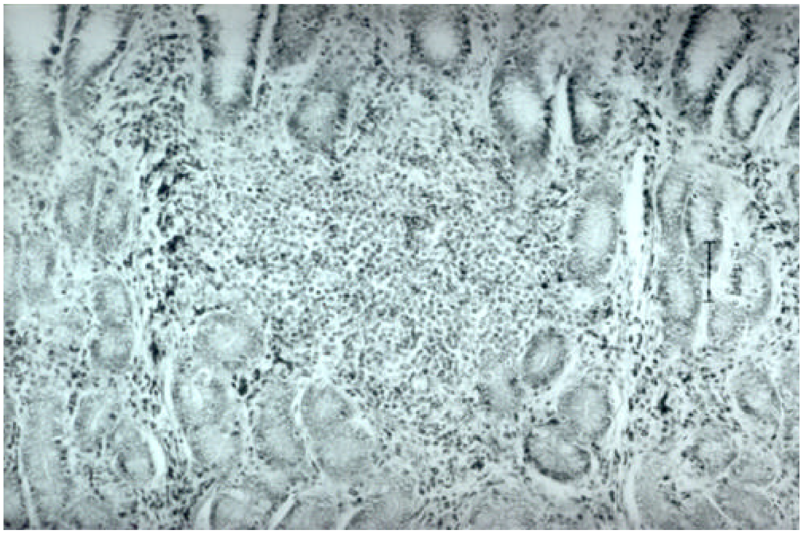


Fig 7. Lymphoid follicle in the pyloric mucosa of pigs infected with tightly spiralled bacteria, H&E stain.

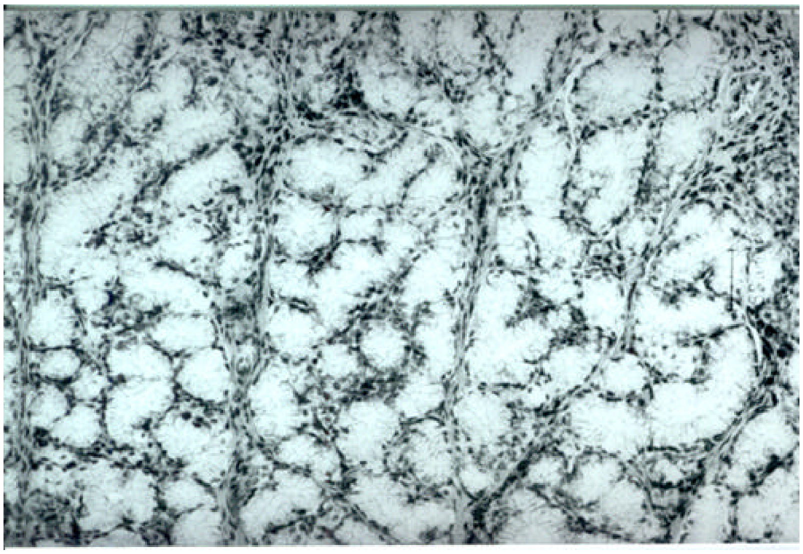


Fig 8. Normal pyloric mucosa, H&E stain.

제 2 장 돼지 위에서 발견된 tightly spiral bacteria의 마우스 실험감염

제 1 절 서론

Gastrospirillum과 Helicobacter와 같은 gastric bacteria는 지금까지 사람(Marshall 등, 1984)뿐만 아니라 개(Henry 등, 1987), 고양이(Hant 등, 1994 ; Otto 등, 1994), 치타(Eaton 등, 1993), 페렛(Fox 등, 1990, 1991), 영장류(Baskerville 등, 1988), 그리고 돼지(Queiroz 등, 1990)와 같은 여러종의 동물에서 발견되었다. 이러한 bacteria는 사람에서 chronic active gastritis와 peptic ulcer를 유발하며(Warren 등, 1983), 개와 고양이에서는 lymphofollicular gastritis(Henry 등, 1987, Hant 등, 1994 ; Otto 등, 1994), 페렛(Fox 등, 1990, 1991)이나 치타(Eaton 등, 1993), 영장류(Baskerville 등, 1988), 돼지(Queiroz 등, 1990)에서는 chronic gastritis와 관련되어 왔다. Helicobacter pylori는 1983년 Warren과 Marshall에 의해 발견되었으며 사람에서 peptic ulcer(Warren 등, 1983)와 gastric adenocarcinoma(Parsonnet 등, 1991)를 일으키는 주요한 원인체로 알려져 있다. 1990년 브라질에서 Mendes 등은 돼지의 위에서 증식하는 tightly spiral bacteria를 최초로 보고하였다.(Queiroz 등, 1990) 이 tightly spiral bacteria를 전자현미경으로 관찰한 바, 형태학적으로 H heilmannii와 유사하였으며(Mendes 등, 1990), 16S rRNA gene sequence가 H. heilmannii와 99.5% 유사하여(Quieroz 등, 1995) 이 균을 일시적으로 Gastrospirillum suis라고 명명하였다. 이후 1991년에는 이러한 나선균이 감염된 것과 감염되지 않은 돼지위에 대한 조직병리학적 연구를 수행하였는데 돼지위에서 spiral bacteria의 감염과 chronic pyloric gastritis는

매우 밀접한 관계가 있었고, lymphoid follicle을 형성하는 것을 특징으로 하였다(Mendes 등, 1991). 또한 1993년과 1996년에는 각각 CFW mice와 Wistar rats을 이용한 감염실험을 하였는데 관찰된 조직학적 소견은 spiral bacteria에 감염된 돼지에서 관찰된 것과 유사하였다(Moura 등, 1993 ; Mendes 등, 1996). 현재까지 이 균은 in vitro에서 배양이 되지 않기 때문에 감염모델동물을 확립하는데 많은 어려움이 있다(Mendes 등, 1991 ; Moura 등, 1993 ; Mendes 등, 1996).

우리는 최근에 국내 돼지의 위에서 tightly spiral bacteria의 감염을 확인하였다. 본 연구는 이 균을 마우스에 감염시켜 in vivo에서 유지하며, tightly spiral bacteria의 감염과 위염과의 관계를 조직병리학적으로 규명하는데 그 목적이 있다.

제 2 절 재료 및 방법

1. animals

대한실험동물로부터 4주령의 수컷 SPF ICR 마우스를 34마리 구입하였다. 이들은 마우스용 케이지(Polycarbonate, 22 ×27 ×13Cm, 명지기계상사)에 4마리씩 넣어 Hepafilter가 부착된 Clean rack(삼광, 국산)에서 22℃의 실내온도하에서 사육하였으며, 사료(Charles river CRF-1, Japan)와 음수, 깔짚은 멸균하여 공급하였다. 구입후 1주일간 순화기간을 둔후 실험에 사용하였다.

2. Inocula

도축장에서 구입한 돼지위의 위저부와 유문부 조직을 슬라이드에 도

말하여 자연 건조한후 Methanol에 10분간 고정하였고 Carbol-fuscin염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 현미경상에서 tightly spiral bacteria가 관찰된 위저부와 유문부의 점막을 멸균한 가위로 잘게 세절하여 멸균 Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 넣고 균질화하여 멸균가제로 거른후 이를 0.5㎖씩 24마리의 마우스에 경구투여하였고, 10마리의 대조군에는 tightly spiral bacteria가 감염되지 않은 돼지의 위조직을 위와 동일한 방법으로 동량 투여하였다.

3. Experimental design

감염군은 투여후 3, 7, 10, 17, 21, 24, 28일과 8, 12, 16, 20, 50주에 각각 2마리씩 부검하였고, 대조군은 7, 17, 28일 그리고 12, 20주에 각각 2마리씩 부검하였다.

4. Pathological examination

마우스를 부검후 식도부 말단과 십이지장의 기시부를 멸균한 가위로 자른후, 식도부 말단부터 대만부를 따라 위를 절개하였다. 곧바로 멸균한 PBS에서 위내용물을 제거하였고 위점막에 대한 육안소견을 관찰한후 유문부와 위저부 일부를 PCR과 urease test, 균분리를 하기위해 떼내었고 나머지는 전장기와 함께 10% 중성포르말린에 24시간 고정하였다. 고정후 Alcohol-xylene으로 processing하여 파라핀 포매한 후, 2 ㎛로 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색과 Steiner's silver 염색을 하였다. 세균의 집락화 정도와 위염의 판정은 Table 1.과 같이 하였다.

Table 1. Evaluation of bacterial colonisation and gastritis of fundic and pyloric mucosa.

Grade	***Bacterial colonisation***	***gastritis***
+	1-20 / field	mild infiltration of lymphocytes, plasma cells in the lamina propria
++	20-50 / field	moderately dense infiltration of lymphocytes, plasma cells in the lamina propria
+++	> 50 / field	marked dense infiltration of lymphocytes, plasma cells in the lamina propria

5. Urease test

Urease test를 위한 시약을 다음과 같이 제조하였다. 0.5%(w/v) phenol red를 1N NaOH에 녹인후, pH를 7.0으로 맞추고, 10ml까지 DW를 채웠다. Urea 2g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 157mg, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 80mg, NaN_3 20mg을 첨가한후 pH를 6.2로 맞추고 DW를 이용하여 100ml까지 채웠다. 부검한 마우스의 위저부와 유문부 일부를 이 시약에 담근후 1시간 정도 반응시켜 urease 산생여부를 판정하였다.

6. DNA extraction and PCR amplification

위조직에서의 genomic DNA를 추출하기 위해 감염후 8주부터 마우스를 부검후 위저부와 유문부 일부조직을 -70℃에 보관하였다. 약 0.1g의 조직을 liquid nitrogen 용액에 얼린후 무균적으로 마쇄하였으며, 500 μl의 TNE solution (10mM Tris, pH 7.5 ; 150mM NaCl ; 2mM EDTA ; 0.5% Sodium dodecyl sulfate)에 넣고 잘 섞은후 분쇄하였다. 여기에 20mg/ml의 proteinase K를 20 μl 첨가하여 vortex mix한후 55℃에서 3시간 incubaton 하였다. 이후 phenol 250 μl와 chloroform과 isoamyl alcohol이 24:1로 혼합된 chloroform 용액을 250 μl 첨가하여 vortex mix 한후 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였고 상층액을 새로운 tube에 옮겨 이과정을 2회 반복하였다. 다시 chloroform 400 μl를 첨가하고, 12,000rpm에서 10분간 원심분리한후 상층액만을 수집하였다. 여기에 약 1/10 volume의 3M sodium acetate를 더하고 absolute alcohol을 1ml 첨가하여 상하로 잘 섞은후 하얀색 응고물질을 확인하면서 이를 pellet down 하기위해 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 80% ethanol을 이용하여 2회 washing하였고, 12,000rpm에서 원심분리후 pellet이 떨어져나가지 않도록 조심하여 alcohol을 버린후 공기중에서 건조하였다. TE buffer(10mM Tris, pH 8.0 ; 1mM EDTA)를 이용하여 용해시킨후 4℃에서 냉장보관하였다.

PCR을 위한 primers는 Table 1.과 같다. PCR mixture는 각 DNA samples 2 μg과 각 primer 100pmol, 1 ×PCR buffer, 2.5U Taq polymerase, 200 μM deoxyribonucleoside triphosphates(PCR Core Kit, Boehringer mannheim, Germany)를 섞어 총 100 μl의 volume이 되게 하였다. PCR은 95℃에서 3분을 1 cycle로, 94℃에서 1분, 51 57℃에서 1분, 72℃에서 2분을 35 cycle로 하고 마지막으로 72℃에서 10분을 1 cycle(Gene CyclerTM, Bio-Rad, USA)로 반응시켰으며 반응물을 1.5% agarose gel에서 전기영동(Power PAC 300, Bio-Rad, USA)하여 PCR product band를 관찰하였다. 각각의 molecular weight (MW) marker로는 ψX174/Hae Ⅲ marker(Promega, USA)를 사용하였다.

Table 2. Primers used for amplification of Helicobacter urease genes.

Source of sequence	Primer direction and sequence	Product size(bp)
H. heilmannii	F, 5'-GGGCGATAAAGTGCGCTTG-3' R, 5'-CTGGTCAATGAGAGCAGG-3'	580
H. pylori	F, 5'-GCATCCGCGGCGGCTTTGATTAGTGCCCATATTATGGAAG-3' R, 5'-GCATCCGCGGCCGCTGGTGGCACACCATAAGCATGTC-3'	1,500
H. heilmannii H. pylori	F, 5'-GCATCCGCGGCCGCGAGGCACCATCCACACCTTC-3' R, 5'-GCATCCGCGGCCGCTTTAGAAGTTACTTCTTTGCCATC-3'	800

7. Bacterial culture

부검후 위저부와 유문부 일부를 멸균한 가위로 절제한후 멸균한 칼로 잘게 분쇄하였다. 이를 5% horse serum이 첨가된 chocolate agar(BBL®, USA), 10% horse serum과 항생제(amphotericin B, trimethoprim, polymyxin B, vancomycin)가 함유된 GC modified chocholate agar(DIFCO, USA), brain heart infusion agar(BBL®, USA) plate에 접종후 Gaspak(GasPakPlusTM, BBL®, USA)을 넣은 세균배양기에서 37℃상태로 4-7일간 배양하였다.

8. Electronmicroscopic examination

포르말린에 고정된 위조직을 1㎣으로 세절하여 1% OsO_4로 100분간 후고정하였고 Epon 812에 포매하였다. 이후 다이아몬드 칼로 70nm씩 박절하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한후 전자현미경(JEM 100c ×II, Jeol Japan)으로 80KV로 관찰하였다.

제 3 절 결과

1. Histopathologic findings

감염후 20주까지는 실험군과 대조군에서 육안적으로 위궤양이나 미란의 소견은 관찰되지 않았으나, 감염후 50주에 부검한 1례에서 위저부에 경도의 발적과 부종이 관찰되었다(Fig 1). 조직학적으로 위염소견을 관찰한바, 위저부와 유문부에서 감염후 17일까지는 고유점막층에 경도의 림프구와 형질세포 침윤이 관찰되었다. 감염후 21일과 24일에 부검한 4마리의 마우스에서는 각각 위저부와 유문부에서 중도의 단핵구 침윤이 관찰되었으며, 28일 사이에 부검한 2마리의 마우스에서는 위저부와 유문부 모두에서 림프구와 형질세포의 침윤이 중도로 관찰되었다. 이러한 염증세포의 침윤은 감염후 8주부터 더욱 심해져 위저부와 유문부의 고유점막층에는 림프여포가 형성되었고(Fig 2), 점막표면의 상피세포는 다발성으로 괴사 또는 변성되었다(Fig 3). 감염후 12주에는 실험 전기간중 가장 심한 위염소견이 관찰되었는데, 상피세포의 변성은 감염후 8주에 비해 경미하였다. 감염후 20주에 부검한 2마리의 마우스에서는 림프구의 침윤이 다소 감소하였으나 1마리에서는 crypt epithelial cell의 hyperplasia가 관찰되었다(Fig 4). 감염후 50주에 부검한 2마리의 마우스에서는 위저선 세포의 위축, mucus neck cell의 hyperplasia가 관찰되었으며 균체가 감염되어 있는 glands의 내강은 확장되어 있었고 주위의 상피세포는 위축되었다(Fig 5). 또 균체가 감염되어 있는 부위는 재생성이 강하였으나, collagen fiber가 증식한 곳이나 이형성이 강하게 나타난 곳에서는 균체의 증식이 관찰되지 않았다. 한편, gastric glands의 cystic dilatation은 고도로 관찰되었는데, 이러한 변화는 12주에 부검한 대조군에서도 관찰되었다. 은염색표본을 관찰한 결과 감염후 3일에는 위점막표면과 gastric pit에서 균체가 주로 관찰되었으나 감염후 7일부터는 gastric glands의 내강과 parietal cells의 세포질

내에서도 관찰되었다. 감염후 21일째부터는 균체가 gastric glands의 내강에 고도의 집락을 이루면서 증식한 것이 관찰되었고, gastric pits와 parietal cells내에서도 보다 많은 수의 균체가 관찰되었다(Fig 6). 이후의 시기에 gastric pits와 gastric gland의 내강, parietal cell의 세포질에서 균체의 숫적변화는 뚜렷이 관찰되지 않았으나 점막표면의 균체는 숫적으로 다소 감소하였다. 각 시기별로 부검한 대조군 마우스에서는 위저부와 유문부의 고유점막층에 염증세포의 침윤이 없거나 경도의 림프구 침윤이 산발적으로 관찰되었으며, 은염색에서 균체는 관찰되지 않았다(Fig 7).

Table 2. Colonisation of tightly spiral bacteria in the stomach of infected and uninfected mice

	Distribution of bacteria					
	Surface of epithelia		Gastric pits		Gastric glands	
	F	P	F	P	F	P
3d-1	++	+	+			
3d-2	+	+	+	+	+	
7d-1	++	++	++	++	++	++
7d-2	++	**ND**	+	**ND**	++	**ND**
7d-c1						
7d-c2						
10d-1	++	++	+	++	++	++
10d-2	+	++	+	++	++	+
17d-1	+	+	+	+	+	++
17d-2	+	+	+	+	++	+
17d-c1						
17d-c2						
21d-1	+	+	+	++	++	++
21d-2	++	++	++	++	+++	+++
24d-1	+	+	++	+++	+++	+++
24d-2	+	+	+	++	++	++
28d-1	+	+	+	++	+++	+++
28d-2	++	++	++	+++	+++	++
28d-c1						
28d-c2						
8w-1	+	+	++	+++	+++	+++
8w-2	++	++	+++	+++	+++	+++
12w-1	+	+	++	++	+++	+++
12w-2	+	+	++	+++	+++	+++
12w-c1						
12w-c2						
16w-1	+	**ND**	++	**ND**	+++	**ND**
16w-2	+	+	++	+++	+++	+++
20w-1	+	+	++	++	+++	++
20w-2	+	+	++	++	+++	+++
20w-c1						
20w-c2						
50W-1	+	+	+	++	+++	+++
50w-2	+	+	+	++	+	++

F ; Fundus, P ; Pylorus, d ; day, w ; week, c ; control, ND ; Not done

Table 3. Histopathological findings of the fundic and pyloric mucosa of mice infected and uninfected with tightly spiral bacteria.

	Histopathological findings				
	Grade of gastritis		Presence of lymphoid follicles		
	F	P	F	P	
3d-1		+			
3d-2					**CD**
7d-1		+			
7d-2	+	**ND**			
7d-c1					
7d-c2		+			
10d-1	+	+			
10d-2	+	+			**CD**
17d-1	+	+			**CD**
17d-2	+	+			**FE**
17d-c1	+				
17d-c2		+			
21d-1	++	+			
21d-2	+	++			**FE**
24d-1	+	++			**CD**
24d-2	++	++			
28d-1	++	++			
28d-2	++	++			**FE**
28d-c1		+			
28d-c2		+			
8w-1	+++	++	+		**FE**
8w-2	++	++	+		**FE, CEH**
12w-1	+++	+++	+		**FE**
12w-2	+++	+++	+	+	
12w-c1	+	+			**CD**
12w-c2	+	+			
16w-1	++	**ND**	+		**FE**
16w-2	++	++	+		**FE**
20w-1	++	++	+		
20w-2	++	++	+		**FE, CEH**
20w-c1	+				
20w-c2	+	+			
50W-1	++	+++	+	+	**CD, MA, HN**
50w-2	+	+++	+	+	**FE, MA, IC**

F ; *fundus*

P ; pylorus

ND ; not done

CD ; cystic dilatation of fundic glands

FE ; focal necrosis and erosion of surface epithelia of fundic and pyloric mucosa

CEH ; crypt epithelial hyperplasia

MA ; marked atropy of gastric glands

HN ; hyperplasia of mucus neck cells

IC ; increased collagen fiber of lamina propria of fundic mucosa

2. Urease test

Urease test를 수행한 결과 감염후 3일에 부검한 1례를 제외하고는 모든 감염군에서 urease 양성 반응이 나타났으나 대조군에서는 모두 음성으로 나타났다(Fig 8).

3. PCR and bacterial culture

3가지의 primers를 이용하여 PCR을 수행한 바, 580bp, 1.5kb, 0.8kb 에서의 밴드는 형성되지 않았다. 또 다양한 방법으로 균분리를 시도하였지만 rod형의 gram negative 균체만 증식할 뿐, tightly spiral bacteria는 배양하지 못하였다.

4. Electronmicroscopic examination

전자현미경으로 관찰한 결과, 균체는 주고 점액내에서 증식하고 있었으며, 2-6회 꼬여있었다. 길이는 약 2-6 ㎛정도였고, 폭은 약 0.4-0.8 ㎛

였으며, cells의 양극에서 직경 약 40 nm의 flagella가 2-5까지 관찰되었다(Fig 9). Cells의 끝부위는 다소 평평하거나 둥글게 관찰되었으며, electro-lucent한 부위가 관찰되었다. 그러나 본 실험에서 관찰된 tightly spiral bacteria는 periplasmic fibrils를 형성하지는 않았다.

제 4 절 고찰

돼지의 위에서 증식하면서 현재까지 일반 배지에서 배양이 되지 않고 있는 tightly spiral bacteria를 마우스에 감염시킴으로써 in vivo상에서 쉽게 유지할수 있었고 이 나선균에 대한 감염모델동물을 작제할수 있었다. tightly spiral bacteria가 감염된 돼지의 위조직을 갈아서 마우스에 경구투여한 결과 약 3주의 단기간내에 균은 마우스의 위저부와 유문부의 점막에 대량으로 증식하였다. 균은 주로 gastric glands의 내강에서 가장 많이 관찰되었으며, 이외에도 parietal cells의 세포질내, 점막표면, gastric pits등에서 고르게 관찰되었다. 균은 감염기간이 경과함에 따라 점막표면보다는 gastric gland내강에서 많이 증식하였다. 감염군에서 균체가 고도로 증식함에 따라 고유점막층에 림프구와 형질세포의 침윤이 증가한 사실을 미루어 볼때, tightly spiral bacteria의 감염과 관련된 병변은 위저부와 유문부의 만성위염이라 할수 있었다.

Mendes등이 wistar rats을 이용하여 tightly spiral bacteria의 감염실험을 수행한 결과, 감염후 6개월에 부검한 6마리중 5마리와 1년후 부검한 5마리중 2마리에서 이러한 림프여포가 생성되었다(Mendes 등, 1996). 또, 돼지의 유문부 조직에서 tightly spiral bacteria의 감염과 림프여포의 발생과는 중요한 관련성(p=0.014)이 있었다(Mendes 등, 1991). 본 실험에서도 감염후 8주부터 50주까지 부검한 10마리중 9마리의 위저부 혹은 유문부 고유점막층에 림프여포가 형성되어 이들과 유사한 결과를 나타내었다. 감염군에서 위저부와 유문부의 고유점막층에 호중구 침윤은 관찰되지

않거나 매우 경도로 산발적으로 침윤하였으며, 이는 대조군에서도 유사하게 관찰되었기 때문에, tightly spiral bacteria의 감염은 호중구의 침윤과는 관계없다고 할수 있었다. 한편 1990년 Mendes 등은 돼지의 위에 증식하는 tightly spiral bacteria("Gastrospirillum suis")를 전자현미경으로 관찰한 바, 균체는 3-8회 꼬여있었고, 길이는 1.5-5.2(mean 4.0) μm, 폭은 0.4-0.7(mean 0.6) μm였으며, 균체의 양 끝에서는 직경 약 22nm의 flagella가 6개까지 관찰되었다(Mendes, 1990). 본 연구에서 관찰된 균체는 길이가 2-6 μm였고, 폭은 0.4-0.8 μm였으며, 나선은 2-6회 감겨있었다. 그리고 직경 약 40nm의 flagella가 cells의 양극으로부터 2-5개가 관찰되어 Mendes 등이 보고한 것과 매우 유사하였다.

현재까지 돼지에서 위궤양을 일으키는 원인으로는 사료(Guizzardi 등, 1981 ; Krakowka 등, 1998)와 Hyostrongylus rubidus, Ascaris spp, Physocephalus spp 그리고 Simondsia spp 와 같은 기생충이 알려져 있다. 또한 candidiasis가 pars osopagea에서 가끔 발생하며 이들은 pre-ulcerative epithelial hyperplasia와 parakeratosis와 관련되어 있다고 한다(Jubb 등, 1985). 본 실험을 통해 돼지의 위에 증식하는 tightly spiral bacteria를 mouse에 감염시켰을 때 림프구와 형질세포의 침윤을 주로하는 고도의 만성위염을 형성하는 것을 알수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, tightly spiral bacteria의 감염이 돼지에서 gastric disease를 일으킬수 있는 가능성은 충분히 있다.

돼지에서 tightly piral bacteria와 위염과의 관계에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 이번 mouse model은 tightly spiral bacteria와 위염과의 관계를 규명하고 치료제의 효력을 평가하는데 효과적으로 이용될수 있을 것이다. 한편 국내 돼지에서는 아직까지 tightly spiral bacteria가 어느 정도 감염되어 있는지, 또 감염되었을 때 증체율에는 어떠한 영향을 미치는지등에 관한 연구가 이루어지지 않고 있다. 국내 산업동물로서 가장 중요시되는 돼지의 생산성 향상을 위해 이러한 연구

들이 속히 이루어지기를 기대한다.

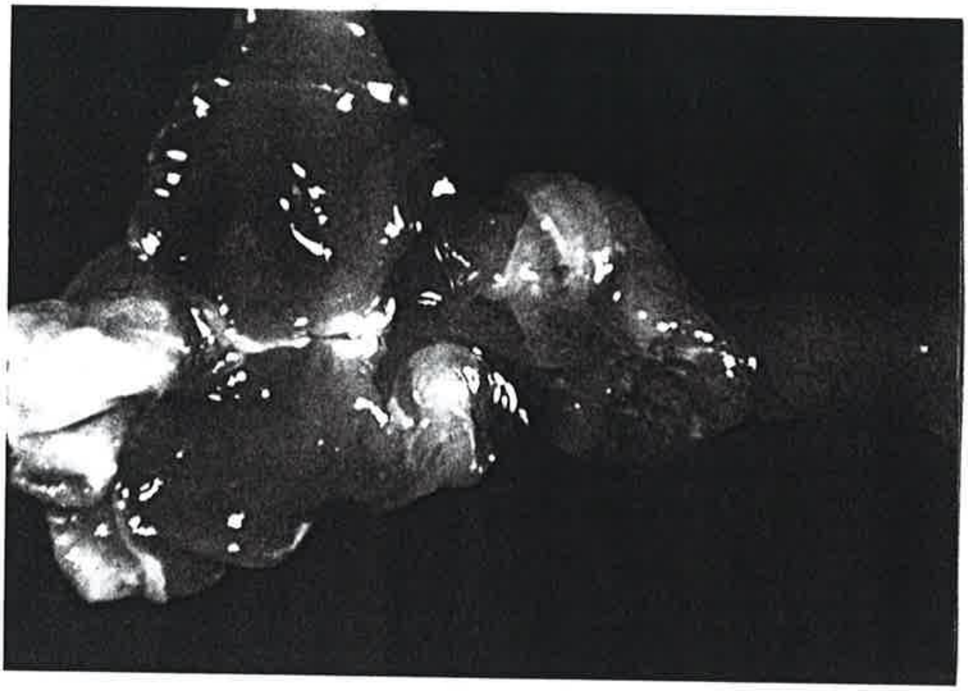


Fig 1. A test mouse (PI 50weeks) ; Mild redness and edema of fundic mucosa.

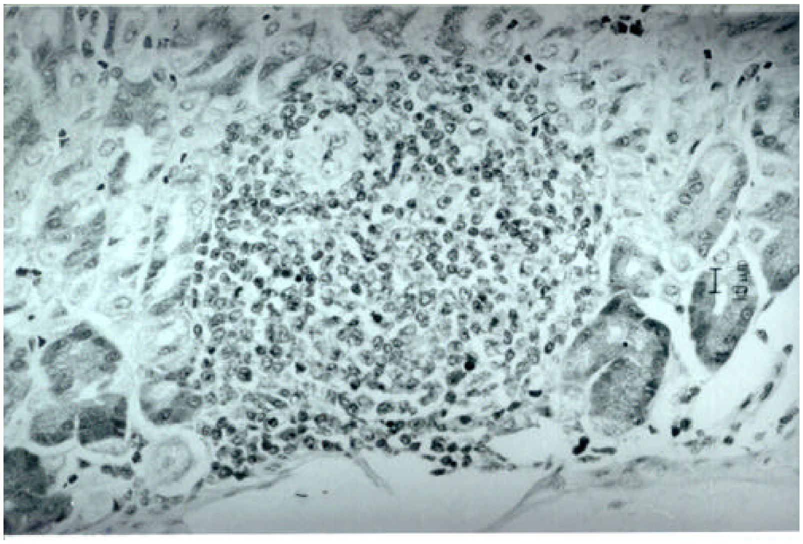
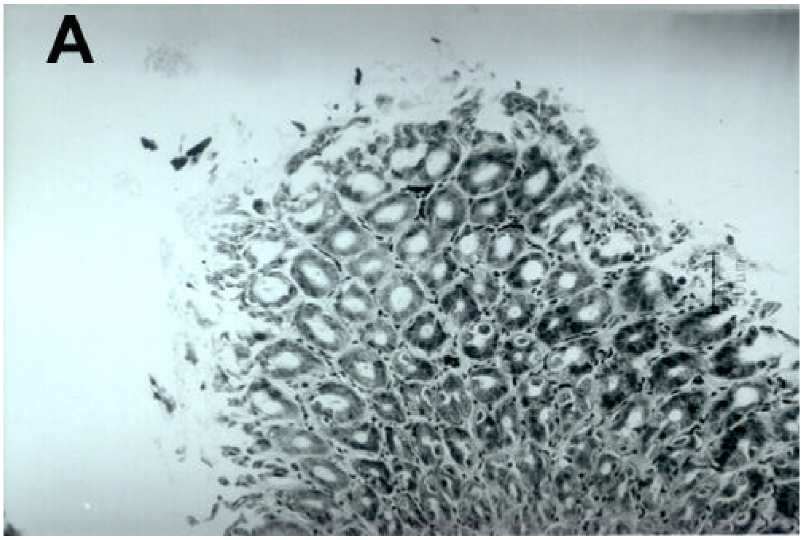


Fig 2. A test mouse (PI 8weeks) ; Lymphoid follicle of fundic mucosa, H&E stain.



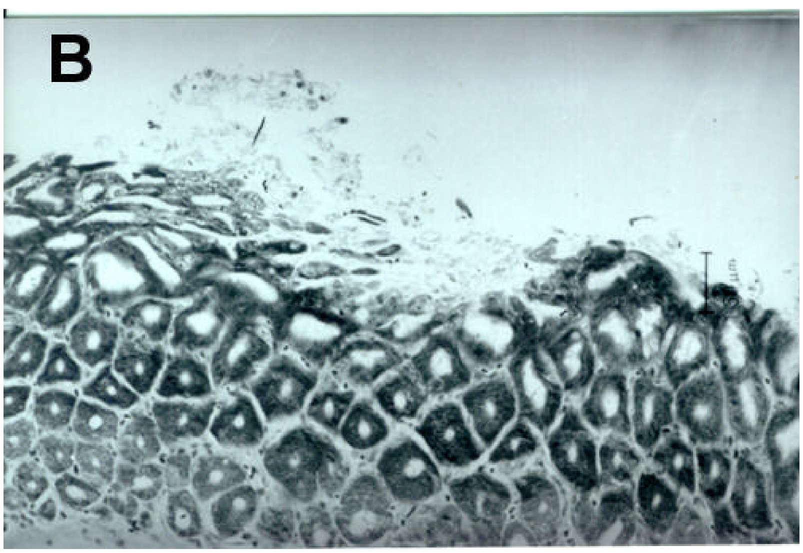


Fig 3. A test mouse (PI 8weeks) ; Infiltration of mononuclear cells in the lamina propria and focal necrosis of surface epithelia of the fundic(A) and pyloric(B) mucosa.

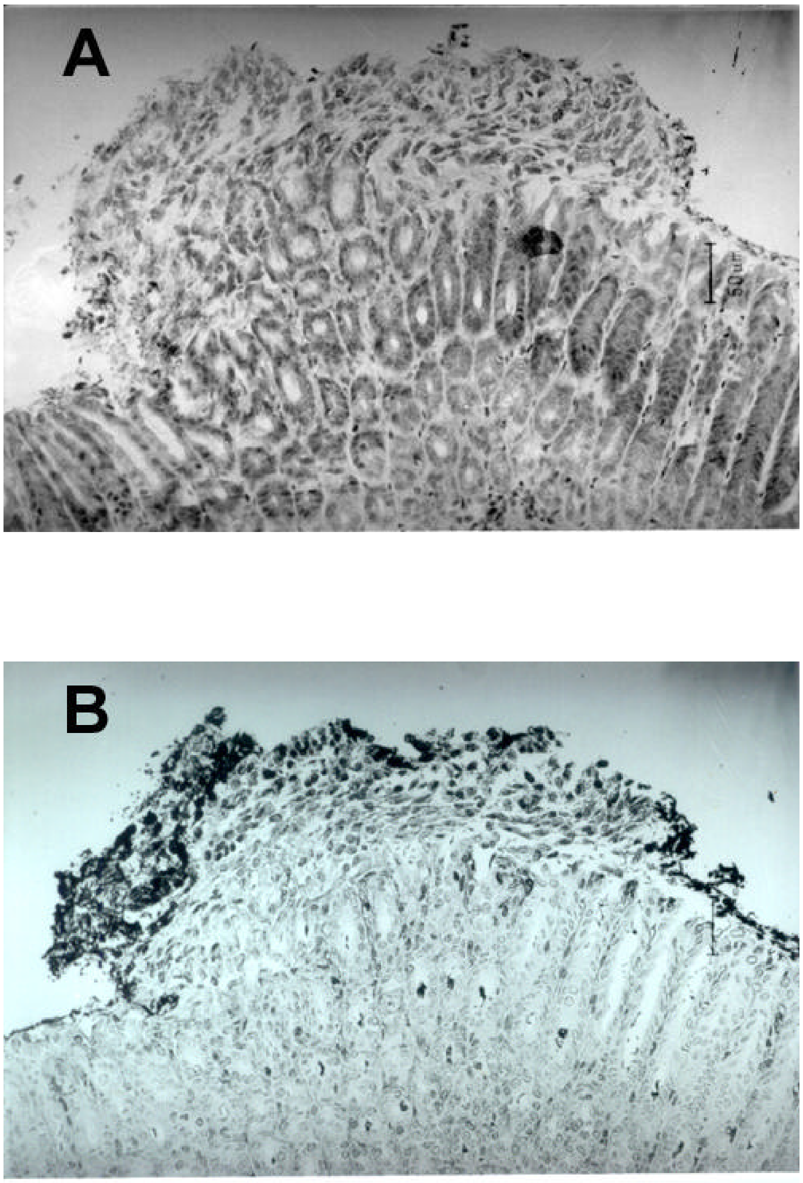


Fig 4. A test mouse (PI 20 weeks) ; Hyperplasia of crypt epithelia of pyloric mucosa(A:H&E stain) and tightly spiral bacteria in the position(B:Steiner's silver stain).

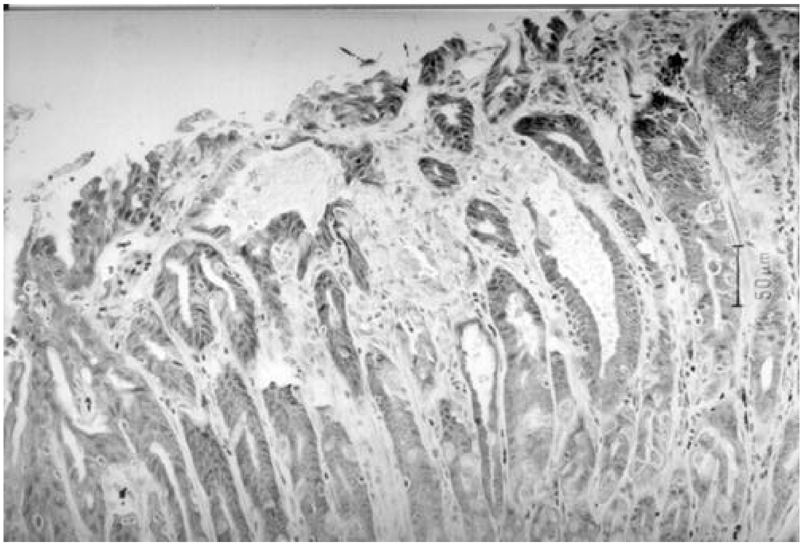


Fig 5. A test mouse (PI 50 weeks) ; Hyperplasia of mucus neck cells, cystic dilatation of fundic glands and atropy of crypt epithelia, H&E stain.

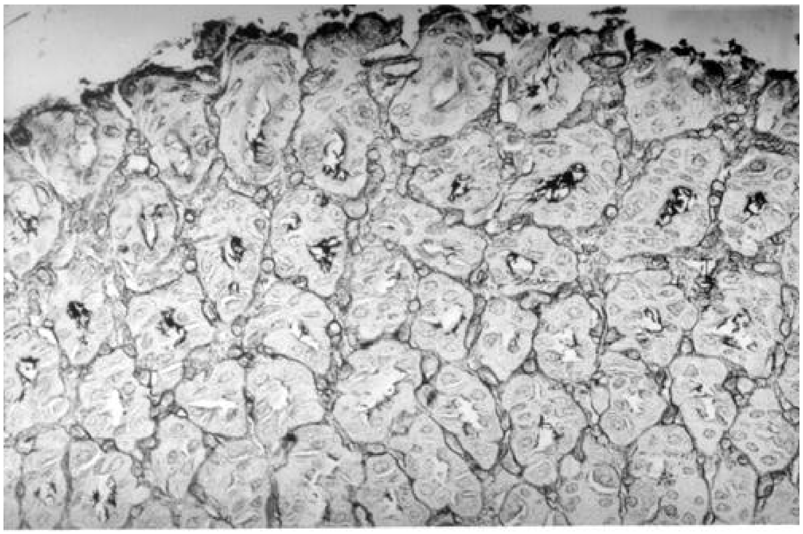


Fig 6. A test mouse (PI 21days) ; Tightly spiral bacteria in the lumen of fundic glands, Steiner's silver stain.

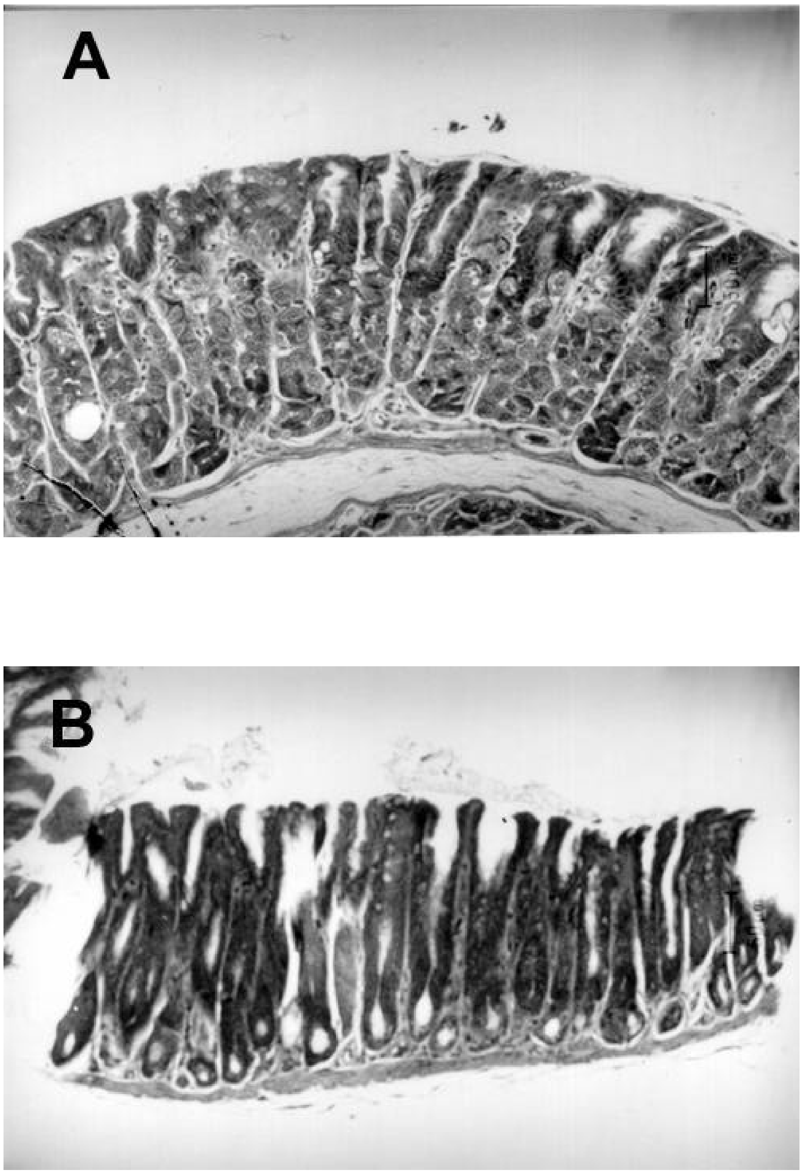


Fig 7. A control mouse ; Normal fundic(A) and pyloric mucosa(B), H&E stain.

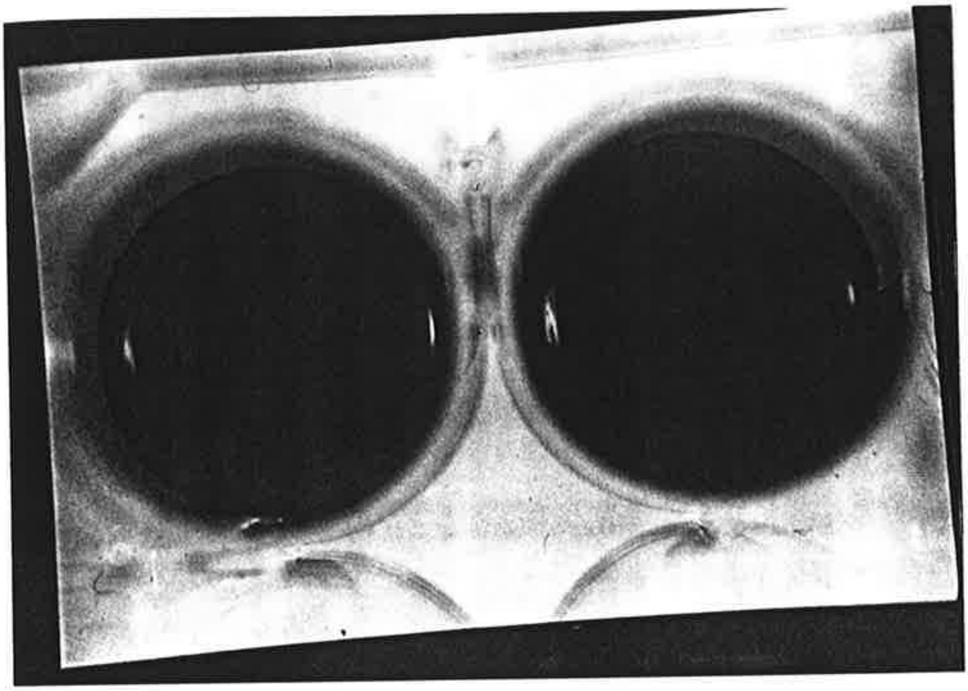


Fig 8. Urease test : A control mouse(left) and test mouse(right).

Fig 9. A test mouse (PI 12 weeks) ; Ultrastructure of tightly spiral bacteria, flagella is indicated by arrowhead. ×27.500

제 3 장 돼지 위점막에서 증식하는 tightly spiral bacteria의 돼지 실험감염

제 1 절 서론

Helicobacter pylori는 1983년 Warren과 Marshall에 의해 처음으로 분리되었으며 사람에서 peptic ulcer(Warren, 1983 ; Marshall, 1983))와 gastric adenocarcinoma (Parsonnet 등, 1991 ; Graham, 1989)를 일으키는 주요한 원인체로 알려져 있다. 1990년대 초반까지는 H pylori에 대한 실험모델동물이 영장류, gnotobiotic pigs, 개에 국한되어 있었으며, 이들은 값이 비싸고, 유지하기가 어려웠기 때문에 H pylori와 사람의 gastric mucosal disease와의 관계를 규명하기 위한 연구가 활발히 이루어지지 못하였다. 1990년대 중반이후 Mongolian gerbile(Matsumoto 등, 1997; Hirayama 등, 1996)과 마우스(Konturek 등, 1999; Sheu 등, 1999)등의 설치류가 H pylori에 대한 감염모델동물로 확립되면서 H pylori 감염시 위점막에 나타나는 병리학적 변화의 관찰(Sawada 등, 1998; Shomer 등, 1998; Sturegard 등, 1998)이나 백신, 위궤양 치료제의 효력시험(Keto 등, 1999)등의 연구가 많이 수행되고 있다.

Active chronic gastritis가 있는 환자의 antral mucosa에서 H. pylori와는 다른 spiral bactria가 발견되었다(Dent 등, 1987). 이 spiral bacteria는 이전에는 McNulty등에 의해 Gastrospirillum hominis (McNulty 등, 1989)라고 명명되었으나 Solnick등이 사람의 biopsy specimens에서 16S rRNA gene의 PCR 증폭을 통해 G. hominis의 16S sequence를 결정함으로써 지금은 Helicobacter heilmannii(Solnick 등, 1993, 1994)라고 부르고 있다. 1990년에 Queiroz와 Mendes등은 돼지의 위에서 이와 유사한

tightly spiral bacteria를 최초로 보고하였다(Queiroz 등, 1990). 일반 배지에서 배양이 되지 않고 있는 이러한 나선균의 감염은 chronic pyloric gastritis의 발생과 매우 관계가 깊었고(p=0.013), 조직학적으로는 고유점막층에 lymphoid follicle을 형성하는 것을 특징으로 하였다(Mendes 등, 1991).

우리는 최근에 국내 돼지의 위에서 tightly spiral bacteria의 감염을 확인하였다. 이 나선균의 감염과 돼지 위점막에 발생하는 병변과의 관계를 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. Animals

강원도 횡성에서 4주령의 웅성돈 11마리를 구입하였다. 시멘트 바닥으로 물청소가 가능한 사육장에서 1주일간 순화기간을 두었으며 사료와 음수는 멸균하지 않고 자유급식시켰다. 9마리의 실험군과 2마리의 대조군은 각기 다른 사육장에서 사육하였다.

2. Inocula

경기도 수원 도축장에서 구입한 10개의 돼지위의 위저부와 유문부 조직을 슬라이드에 도말하여 자연 건조한후 Methanol에 10분간 고정하였고 Carbol fuscin염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 현미경상에서 tightly spiral bacteria가 관찰된 위저부와 유문부의 점막을 멸균한 가위로 잘게 세절하여 멸균 Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 넣고 균질화하여 멸균가제로 거른후 이를 5㎖씩 9마리의 돼지에 경구투여하였다. 대조군 2마리에는 tightly sprial bacteria에 감염되지 않은 돼지 위

조직을 위와 같은 방법으로 하여 동량 투여하였다.

3. Experimental design

감염후 7, 17, 24, 39일에 각각 2마리를 부검하였고, 감염후 46일에는 감염군 1마리와 대조군 2마리를 부검하였다.

4. Histopathological findings

부검후 식도부 말단과 십이지장의 기시부를 잘라 위를 적출하였다. 식도부 말단으로부터 대만부를 따라 위를 절개한후 위내용물을 흐르는 물에 조심스럽게 제거하였고, 육안소견을 관찰한 후 식도부, 분문부, 위저부, 유문부 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 24시간 이상 고정한 후에 alcohol-xylene으로 processing하여 파라핀 포매하였고, 2 ㎛의 슬라이드 절편을 만들어 HE 염색과 Steiner's silver 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 분문부와 위저부, 유문부에서 고유점막층의 염증세포 침윤에 따라 위염을 평가하였는데, 평가 기준은 Table 1과 같이 하였다.

Table 1. Evaluation of bacterial colonisation and gastritis in the gastric mucosa of test and control pigs.

Grade	*Bacterial colonisation*	*gastritis*
+	1-15 / field	mild infiltration of lymphocytes, plasma cells in the lamina propria
++	15-30 / field	moderately dense infiltration of lymphocytes, plasma cells in the lamina propria
+++	> 30 / field	marked dense infiltration of lymphocytes, plasma cells in the lamina propria

제 3 절 결과

육안적으로 경도의 식도부 각화가 감염여부에 관계없이 실험군과 대조군에서 산발적으로 발생하였으며, 미란이나 궤양같은 소견은 어느 조직에서도 관찰되지 않았다. 조직학적으로 감염후 7일에는 각각 1례에서 위저부와 유문부의 고유점막층에 경도의 섬유화가 관찰되었으며, 위저부에서는 림프구가 점막표층에 국소적으로 소수 침윤하였는데, 실험전례에서 위저부에 병변이 심한 것은 관찰되지 않았다. 한편, 유문부에서는 림프구와 형질세포가 다소 중도로 미만성으로 침윤하였다. 식도부에서는 감염후 7일에 hyperkeratosis와 parakeratosis가 2례에서 모두 고도로 관찰되었는데 감염군과 대조군 모두에서 이러한 변화는 경도에서 중도로 산발적으로 발생하였다(Fig 1). 분문부에서는 감염 초기에 경도의 림프구와 호산구 침윤이 고유점막층에서 관찰되었는데, 감염기간이 경과할수록 고유점막층에 림프구, 형질세포, 호산구 침윤이 고도로 관찰되었으며, 감염후 17일과 39일에 각각 1례에서 림프여포가 형성된 것이 관찰되었다(Fig 2). 실험 마지막날에 부검한 대조군에서도 분문부의 염증반응은 고도로 관찰되었다. 또 감염후 17일에 부검한 위조직의 분문부에서는 점막표면 상피세포의 국소괴사 및 변성, mucus neck cell의 hyperplasia 그리고 점막의 erosion이 관찰되었다(Fig 3). 은염색표본에서 tightly spiral bacteria의 감염은 유문부에 국한되어 있는 것을 확인하였다. 감염후 7일에는 1례에서 점액 내부와 gastric pits에서 소수의 균체(< 15/field)가 관찰되었다(Fig 4). 감염후 17일에는 gastric glands 내강에서 균체가 집락을 이룬 것이 관찰되었고, Gastric pits에서도 균체가 이전보다 수적(15-50/field)으로 증가하여 관찰되었다. 감염후 24일에는 gastric pits(> 50/field)에 균이 더욱 증가하여 관찰되었고, gastric glands 내강에 균체의 집락도 더욱 증가하였다(Fig 5). 감염후 39일과 46일에 부검한 개체에서는 감염후 24일에 관찰된 것과 유사한 정도의 균체가 관찰되었다. 유문부에서 감염후 17일에는 균체

가 증식한 곳에서 점막상피세포의 변성과 국소괴사가 관찰되었고, 감염후 24일에 부검한 1례에서는 고유점막층에 림프여포가 형성되었다(Fig 6A). 그러나 림프여포 내부에서 균체는 관찰되지 않았다(Fig 6B). 감염후 39일에는 1례에서 점막층에서 부종이 관찰되었고 또다른 1례에서는 점막표면 상피세포의 변성이 관찰되었다. 감염후 7, 17, 24, 39일에는 부검한 것중 각 1례씩, 총 4례에서 고유점막층에 경도의 섬유화가 일어난 것이 관찰되었다. 대조군에서는 유문부의 염증반응이 경도 내지는 중도로 관찰되었는데, 은염색표본에서 균체는 관찰되지 않았다(Fig 7).

Table 2. Evaluation of bacterial colonisation and gastritis in the gastric mucosa of test and control pigs.

	Gastritis and bacteria colonisation			
	Cardia	*Fundus*	*Pylorus*	
			gastritis	*BC*
p7-1	+	+	++	**N**
p7-2	+	+	++	+
p17-1	++	+	+++	+++
p17-2	++	+	+++	+++
p24-1	++	++	++	++
p24-2	+++	+	++	+++
p39-1	++	+	++	++
p39-2	+++	+	++	+++
p46-1	+++	+	++	+++
con-1	++	+	+	**N**
con-2	++	+	+	**N**

BC ; bacterial colonisation

N ; negative

Table 3. Histopathological findings of gastric mucosa of test and control pigs.

	Histopathological findings			
	Par oesophagus	Cardia	Fundus	Pylorus
P7-1	HK, PK	N	N	F
P7-2	PK	N	F	N
P17-1	HK, PK,	HM, FN, LF	ED	ED, FN
P17-2	PK	ED, FN	N	F, ED
P24-1	N	N	N	F, LF
P24-2	N	ED	N	N
P39-1	PK	N	N	F
P39-2	PK	LF	N	E
P46	HK,PK	N	N	ED
Con-1	PK	N	N	ED
Con-2	PK	ED	N	N

HK ; hyperkeratosis,

PK ; parakeratosis

N ; normal

HM; hyperplasia of mucus neck cells

FN ; focal necrosis of surface epithelial cells

ED ; surface epithelial degeneration

LF ; lymphoid follicles

F ; fibrosis

E ; Edema

제 4 절 고찰

Tightly spiral bacteria에 감염된 위조직을 갈아서 돼지에 경구투여한 바 감염후 7일부터 유문부의 위점막에 균체가 증식하는 것을 확인하였

다. 이 나선균은 오직 유문부에서만 증식하였는데, 이는 국내 비육돈의 위조직에서 tightly spiral bacteria의 감염이 유문부에만 제한되어 있다는 이전의 결과와 일치하였으나(unpublished data), Mendes 등은 유문부에서의 감염율(10.8%)보다는 적다고 할지라도 위저부에서도 이러한 나선균의 감염이(5.0%) 성립한다고 하였다(Mendes 등, 1991). 이 나선균은 감염후 17일부터 gastric glands의 내강에 증식하였으며, 감염후 24일부터는 gastric pits와 gastric glands 내강에 고도의 집락을 이루고 있는 것이 확인되었다. 국내 비육돈의 유문부에서도 이러한 tightly spiral bacteria는 점막의 표층과 gastric pits, 그리고 gastric glands의 내강에서 증식하여, 본 실험에서의 결과와 일치하였다. Mendes등은 이러한 균체가 점막표면의 점액내부와 gastric pits에서만 관찰될뿐, 림프여포 내부나 마크로파지, 고유점막층에서는 관찰되지 않았다고 하였다(Mendes 등, 1991). 본 실험에서 tightly spiral bacteria의 감염은 유문부의 만성 위염을 일으키는 것으로 나타났다. 분문부와 위저부에서는 균체의 감염이 성립되지 않았을 뿐만 아니라 염증반응도 감염군과 대조군에서 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다. 반면 유문부에서는 균체의 감염이 고도로 진행되는 시기에 고유점막층에 단핵구와 호산구의 침윤이 고도로 증가하였고, 대조군에서는 경도의 염증반응만이 관찰되었다. 국내 비육돈에서는 $p<0.05$에서 tightly spiral bacteria의 감염이 만성 유문부 위염과 유의적으로 중요한 관련성이 있었으며, Mendes등의 실험에서도 유문부의 만성위염과 나선균과의 상관관계가 유의성($p=0.013$)이 있음이 밝혀졌다(Mendes 등, 1991). 대조군에서도 유문부에 경도 또는 중도의 위염소견이 관찰되었는데, 국내 비육돈의 위조직에 대한 연구나 Mendes 등의 실험에서도 tightly spiral bacteria가 감염되어 있지 않은 개체에서 유문부의 만성 위염은 관찰되었다. 그리고 이러한 원인에는 사료에 관련된 문제(Guizzardi F 등, 1982 ; Krakowka S 등, 1998)나 Hyostrongylus rubidus, Ascarops spp., Physocephalus spp. 그리고 Simondsia spp. 같은 기생충(Jubb KVF, 1985)등이 알려져 있다.

본 연구를 통해 돼지에서 tightly spiral bacteria의 경구를 통한 감염이 감염후 7일의 단기간에 성립함을 확인할수 있었다. 1990년 Quieroz등은 돼지의 위점막에 증식하는 Gastrospirillum suis를 보고하였는데 (Quieroz, 1990), 이는 국내 돼지에서 관찰되는 tightly spiral bacteria와 형태학적으로 유사한 것이다. G suis는 현재 16s rRNA sequencing이 확립되어 사람의 위점막에 증식하는 Helicobacter heilmannii type 1과 동일함이 밝혀졌다(Queiroz 등, 1995). 때문에 이 균은 인수공통감염원으로 생각되어지고 있는데, 국내에서 관찰된 tightly spiral bacteria를 분리, 배양하여 보다 폭넓은 연구가 이루어져야 할 것이다.

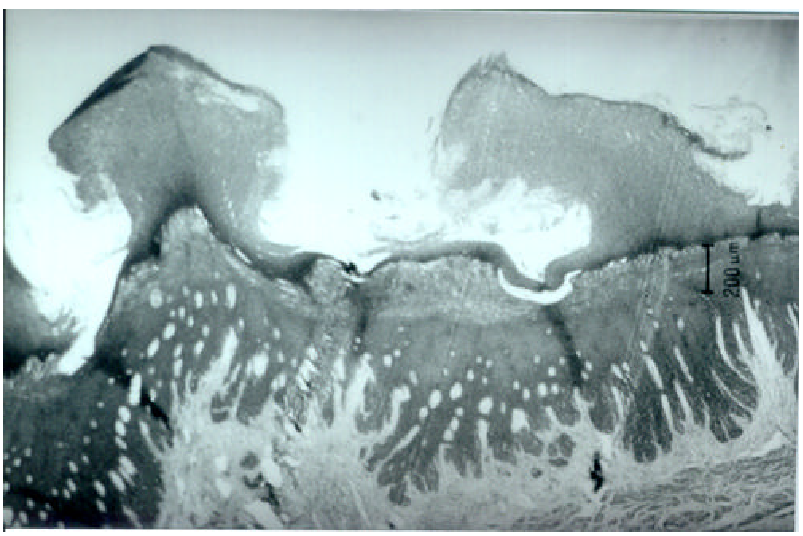


Fig 1. A test pig (PID 7) ; Irregular mucosal surface with hyperkeratosis and parakeratosis, H&E stain.

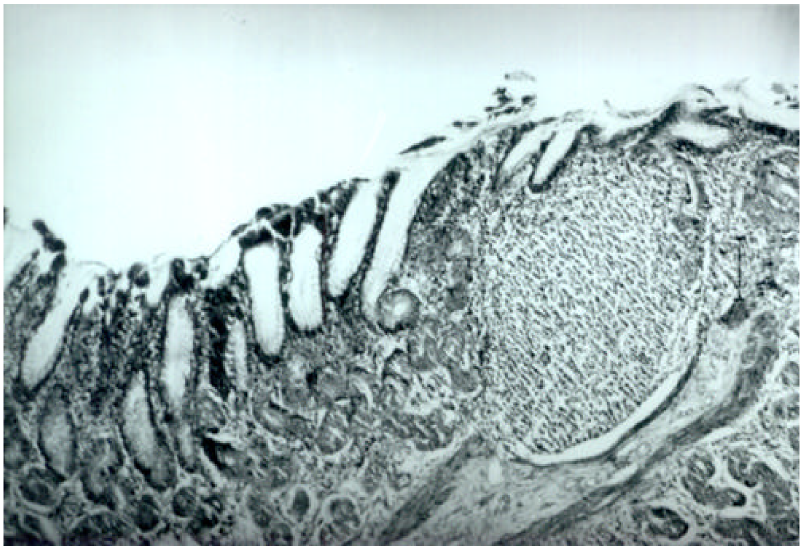


Fig 2. A test pig (PID 17) ; Lymphoid follicle of the cardiac mucosa, H&E stain.

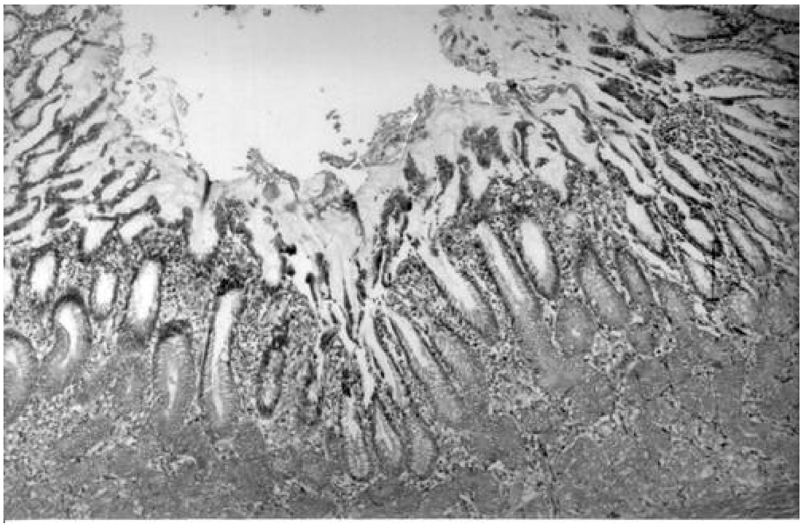


Fig 3. A cardiac mucosa of a test pig (PID17) ; Marked infiltration of mononuclear cells and granulocytes, focal necrosis of surface epithelia and increase of mucus secretion, H&E stain.

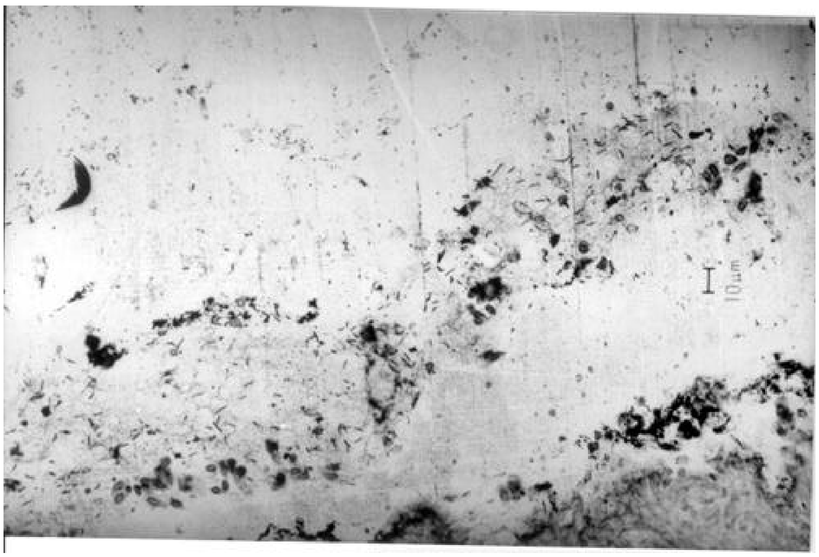


Fig 4. A test pig (PID 7) ; tightly spiral bacteria in mucus of surface of pyloric mucosa, Steiner's silver stain.

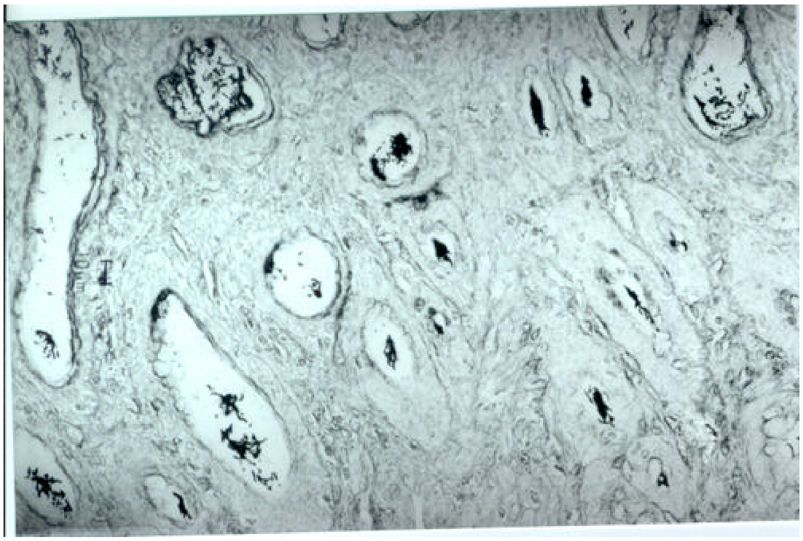
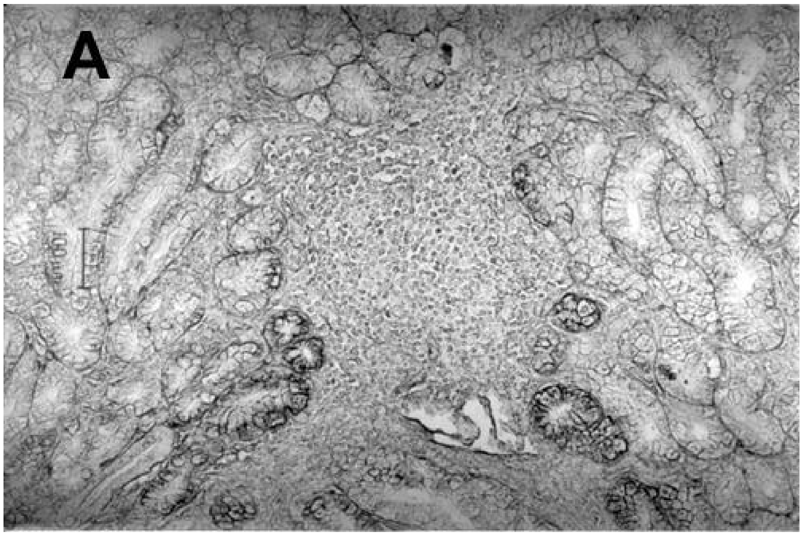


Fig 5. A test pig (PID 24) ; tightly spiral bacteria in the lumen of gastric glands of pyloric mucosa, Steiner's silver stain.



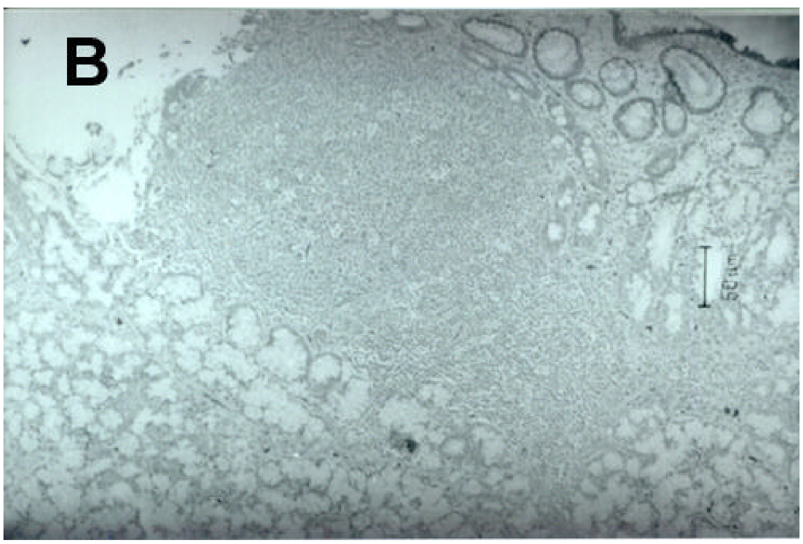


Fig 6. A test pig (PID24) ; A: Lymphoid follicle in the lamina propria of pyloric mucosa, H&E. B: No tightly spiral bacteria in lymphoid follicle, Steiner's silver stain.

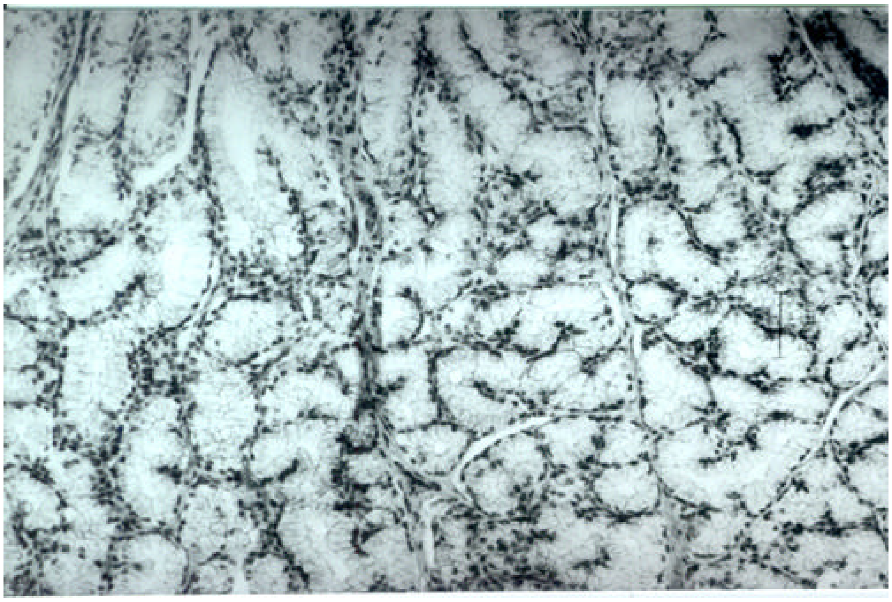


Fig 7. A control pig ; Normal pyloric mucosa, H&E stain.

제 4 장 마우스 위점막에서 tightly spiral bacteria의 증식에 미치는 유산균의 효과에 관한 연구

제 1 절 서론

Helicobacter pylori는 미호기성의 그람 음성균으로 Warren(Warren, 1983)과 Marshall(Marshall, 1984)에 의해 분리되어 peptic ulcer(Warren 등, 1983)와 gastric adenocarcinoma(Parsonnet 등, 1991 ; Graham, 1989)를 일으키는 주요한 원인체 알려져 있다. H pylori의 감염은 대개 생후 수년내에 발생하며 만성적으로 균을 보유하게 된다. 개발도상국가에서는 20세의 연령까지 약 인구의 80%가 감염되어 있으리라 추정된다(Graham 등, 1991). 이러한 국가에서는 젊은 연령층 사람들의 H pylori감염을 억제하기 위해 효과적인 백신의 투여가 필요하다. 그러나 이 균에 대한 백신의 효과는 아직까지 불확실하며, H pylori의 일부 protein이 heat shock protein과 같은 eukaryotic proteins과 매우 유사한 homology를 갖기 때문에 자가면역성 염증반응을 일으킬수도 있다(Dunn 등, 1992 ; Negrini 등, 1991). 또한 H pylori의 치료를 위해 여러 가지 항생제 치료법이 적용되어 왔으나 항생제를 이용한 H pylori의 치료가 항상 성공적이지는 않으며, 때로는 심한 부작용을 수반하기도 한다. 게다가 항생제에 대한 내성이 생겨 이후에 적용되는 치료법에 많은 문제점을 발생시키기도 한다.

Probiotics은 위장관계 미생물의 균형을 이룸으로써 숙주에 이로운 효과를 나타내는 미생물이다(Fuller, 1989). Gnotobiotic murine model을 이용한 이전의 연구에서, 유산균을 투여한 gnotobiotic BALB/c mice에서는 H pylori가 증식하지 않았으나, 유산균의 많은 숫적 증가로 인해

germ-free mice에서는 active gastritis를 일으키기도 하였다(Kabir 등, 1997). 또 다른 실험에서는 유산균에 의해 생성되는 lactic acid에 의해 H pylori의 증식이 억제되기도 하였다(Yuji 등, 1998).

1990년에 돼지위점막에서 tightly spiral bacteria의 감염이 보고되었는데, 이 균은 사람의 위점막에 증식하는 Helicobacter heilmannii와 형태학적으로 매우 유사하였다(Queiroz 등, 1990). 이 나선균의 감염은 돼지 위점막에서 유문부의 만성위염의 발생과 유의적인 관련성이 있었다(Mendes 등, 1991). 우리는 국내 돼지의 위에서 발생하는 세균성위염에 대해 연구하던중 이와 동일한 spiral bacteria를 관찰하였으며, 마우스의 실험감염을 통해 이 균이 만성위염을 야기하는 것을 확인할수 있었다.

본 연구에서는 돼지 위점막에 증식하는 tightly spiral bacteria를 마우스에 감염시키고 유산균을 투여하여 유산균이 이 나선균의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. animals

대한실험동물로부터 4주령의 수컷 SPF ICR 마우스를 36마리 구입하였다. 이들은 마우스용 케이지(Polycarbonate, 22 ×27 ×13Cm, 명지기계상사)에 6마리씩 넣어 Hepafilter가 부착된 Clean rack(삼광, 국산)에서 22℃의 실내온도하에서 사육하였으며, 사료(Charles river CRF-1, Japan)와 음수, 깔짚은 멸균하여 공급하였다. 구입후 1주일간 순화기간을 둔후 실험에 사용하였다.

2. Inocula

Tightly spiral bacteria에 감염된 돼지 위조직을 멸균 phosphate buffered saline(pH 7.2)에 넣고 갈아서 마우스에 경구투여하였다. 감염후 3개월이 지난 마우스 4마리를 부검하여 위조직을 떼내었고, 위저부와 유문부조직을 멸균 PBS에 넣고 갈아서 0,5㎖씩 30마리의 실험군에 투여하였다. 6마리의 음성대조군에는 동일한 주령의 tightly spiral bacteria가 감염되지 않은 마우스위조직을 갈아서 동량 투여하였다.

3. Bacterial strains

Lactobacillus acidophilus(HY0404)는 한국야쿠르트에서, Lactobacillus salivarius(ATCC 11741)은 American Type Culture Collection에서 분양받았다. 각 유산균은 Bactoagar(Difco, USA)에 37℃에서 배양한 후, Lactobacilli MRS broth(Difco, USA)로 옮겨 수시간 증식시킨후 사용하였다.

4. Experimental design

각 group은 Table 1과 같이 하였다.

Table 1. Classification of group based on treatmental difference.

Group	No of animals	Treatment
1	6	-
2	6	tightly spiralled bacterial infection
3	6	tightly spiralled bacterial infection + *Lactobacillus salivarius*
4	6	tightly spiralled bacterial infection + *Lactobacillus acidophilus*
5	6	tightly spiralled bacterial infection + 100ml Lactic acid
6	6	tightly spiralled bacterial infection + 10ml Lactic acid

Tightly spiral bacteria 감염후 4주부터 유산균과 lactic acid를 투여하였다. 유산균은 마리당 1 ×109 CFU를 4주에 걸쳐서 3일간 연속 투여하였고, lactic acid는 4주간 매일 0.5㎖씩 경구투여하였다. 투여종료 1주일 후에 모든 마우스를 부검하였다.

5. Measurement of lactic acid concentration and Lactobacillus

부검후 group 3, 4의 위조직 일부를 떼내어 lactate kit(Sigma, USA)를 이용하여 lactic acid의 농도를 측정하였고, 평판계수법을 이용하여 증식한 유산균의 수를 계산하였다.

6. Histopathological examination

마우스 위조직을 부검후 10% 중성포르말린에 24시간 고정하였다. 고정후 Alcohol-xylene으로 processing하여 파라핀 포매한 후, 2 ㎛로 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색과 Steiner's silver 염색을 하였다. 세균의

집락화 정도와 위염의 판정은 Table 2와 같이 하였다.

Table 2. Evaluation of bacterial colonisation and gastritis of fundic and pyloric mucosa.

Grade	*Bacterial colonisation*	*gastritis*
+	1-20 / field	mild infiltration of lymphocytes, plasma cells in the lamina propria
++	20-50 / field	moderately dense infiltration of lymphocytes, plasma cells in the lamina propria
+++	> 50 / field	marked dense infiltration of lymphocytes, plasma cells in the lamina propria

7. Statistics

Anova test를 이용하였다.

제 3 절 결과

조직학적으로 위저부와 유문부의 위염소견을 관찰한 결과, tightly spiral bacteria를 감염시킨 양성대조군(group 2)과 유산균을 투여한 군(group 3,4), 그리고 lactic acid를 투여한 군(group 5,6)사이에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다($p<0.05$)(Fig 1). 음성 대조군에서는 대체적으로 위저부와 유문부에 염증반응이 없거나 경도의 단핵구 침윤만이 관찰되었다. 그러나 tightly spiral bacteria를 감염시킨 5개의 군에서는 유산균과 lactic acid의 투여 여부에 관계없이 전례에서 중도이상의 림프구와 형질세포의 침윤이 관찰되었으며, 림프여포의 출현이나 상피세포의 국소괴사, 변성도 산발적으로 관찰되었다(Fig 2, 3, 4).

균체의 증식에 있어서도 5개의 군(group 2-6)에서 유의적인 차이는 나타나

지 않았다($p<0.05$)(Fig 5). 균체는 fundic glands 내강에서 고도로 증식하였으며, 유문부에서는 주로 gastric pits에서 많이 관찰되었다(Fig 6, 7). 특히 유문부중에서도 십이지장으로 연결되는 부위보다는 위저부에 가까운 쪽에서 균체가 고도로 증식한 것이 관찰되었다.

위조직에 증식한 유산균의 평균수치와 lactic acid의 농도를 측정한 바, L salivarius에서 다소 높게 관찰되었다. L salivarius로 처치한 군에서는 유산균수가 7.343 ±0.332 log10CFU/g tissue로 나타났으며, L acidophilus로 처치한 군의 유산균수는 6.812 ±0.143 log10CFU/g tissue로 측정되었다. 또 lactic acid의 농도는 L salivarius로 처치한 군에서 4.026 ±1.050 µmol/g tissue, L acidophilus로 처치한 군에서 2.851 ±0.279로 측정되었다.

제 4 절 고찰

Probiotics에 의해 생산되는 억제성 물질에는 bacteriocins외에 lactic acid, volatile acid등이 있다(Fuller 등, 1989 ; Tagg 등, 1976). Bhatia등의 in vitro 실험에서는, L acidophilus에 의해 생산되는 lactic acid가 H pylori의 증식을 억제하였다(Bhatia 등, 1989). 그러나 Bazzoli 등이 H pylori의 감염에 의해 위염이 발생한 환자에 8주동안 L acidophilus를 경구투여한 바, H pylori를 억제하거나 병변을 감소시키지는 않았다(Bazzoli 등, 1992). 또 Yuji등이 in vitro와 in vivo에서 L salivarius와 L acidophilus, L casei가 H pylori의 감염에 미치는 영향에 대하여 연구한바, L salivarius로 challenge한 군에서는 H pylori의 증식이 현저하게 억제되었으며, 위염도 감소하였으나 L acidophilus와 L casei는 그렇지 못하였다. 그리고, L salivarius를 투여한 군에서는 lactic acid의 농도가 다른 두 개의 유산균에 비해 현저하게 높게 나왔는데, 10mMol과 100mMol의 lactic acid를 투여한 군에서 H pylori의 증식이 현저

하게 억제된 것으로 미루어 보아 결국 H pylori는 유산균에서 분비하는 lactic acid에 의해 증식이 억제된다는 결론을 내릴수 있었다(Yuji 등, 1998).

Tightly spiral bacteria는 돼지의 위점막에 감염되어 유문부의 만성 위염을 일으킨다(Mendes 1991). 그리고 마우스와 랫드에 경구로 감염시켰을 때, 위저부와 유문부에 고도의 림프구와 형질세포의 침윤을 수반하는 염증반응이 나타난다고 하였다(Moura 등, 1993 ; Mendes 등, 1996). 본 연구에서 유산균과 lactic acid의 투여는 마우스의 위점막에서 tightly spiral bacteria가 일으키는 병변을 감소시키지 못하였고, 균체의 증식 또한 억제하지 못하였다. 아마도 돼지 위점막에 증식하는 나선균이 lactic acid에 강하게 저항할수 있는 어떠한 기전이 있으리라 생각된다. 본 실험에서는 위점막에 L salivarius가 L acidophilus보다 다소 많이 증식하였고, lactic acid도 보다 많이 산생하였는데, 이는 Yuji등이 보고한 결과와도 일치하였다(Yuji 등, 1998).

돼지의 위점막에서 증식하는 tightly spiral bacteria는 전자현미경학적 관찰(Mendes 등, 1990)과 16S rRNA sequencing을 통해 사람의 위점막에 증식하는 H heilmannii type 1과 거의 일치하였다(Queiroz 등, 1995). 이러한 결과는 이균이 인수공통감염원이라는 사실을 강하게 증명하고 있는데, probiotics이외에 이 균을 효과적으로 억제할수 있는 치료법이 개발되어야 할 것이다.

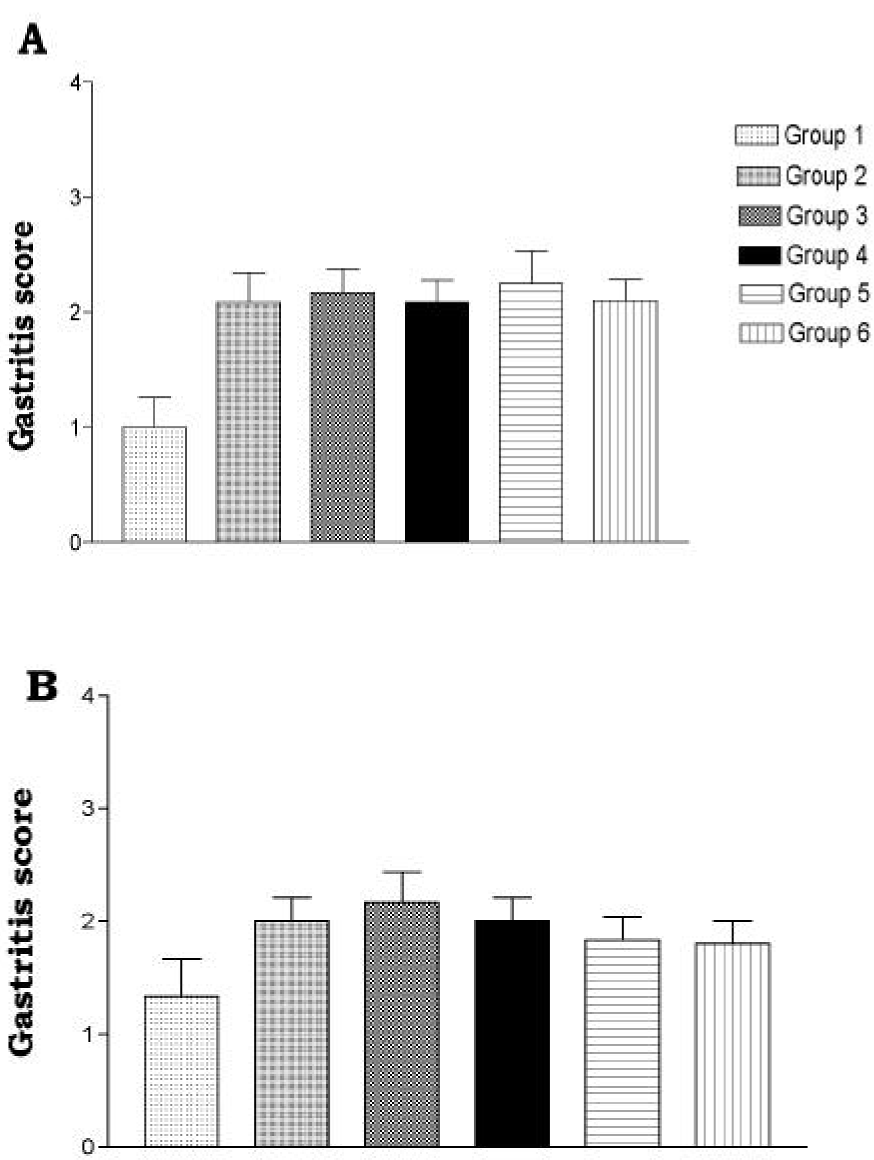


Fig 1. Gastritis score of the fundic(A) and pyloric mucosa(B) of each group.

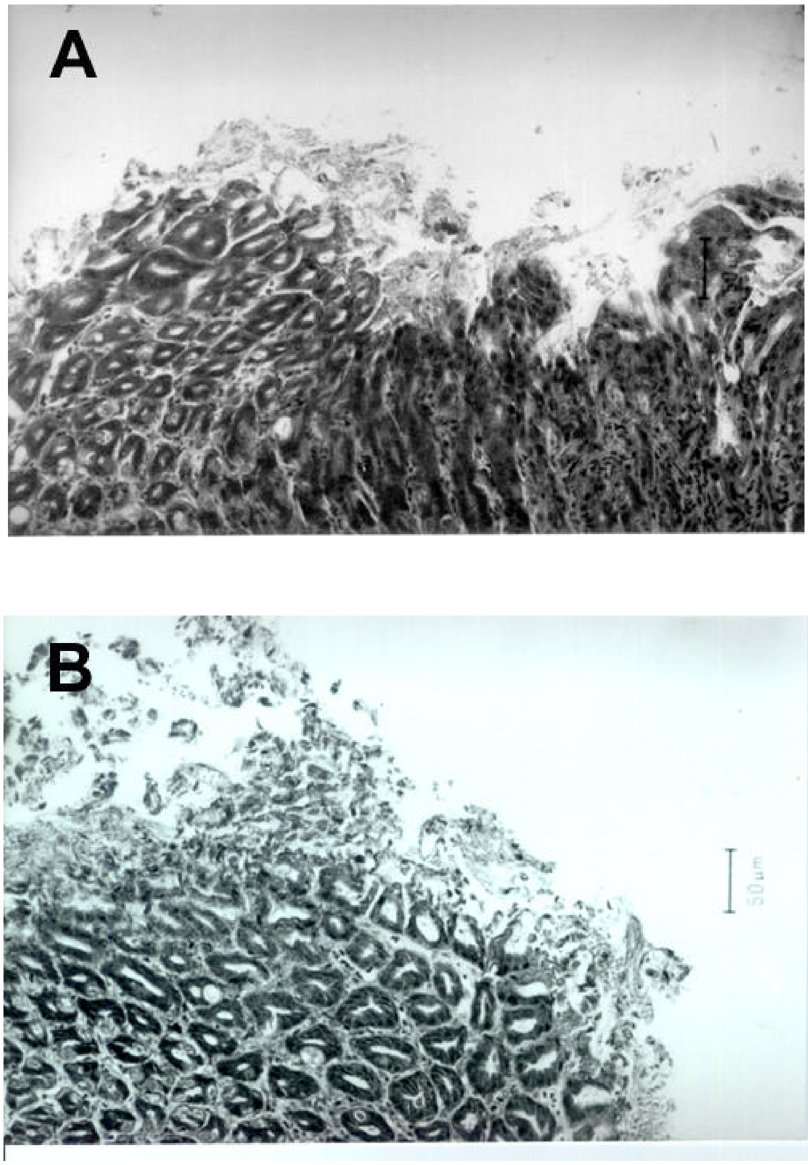


Fig 2. Fundic mucosa of a mouse of group 2(A) and 3(B) ; Infiltration of mononuclear cells and focal necrosis of epithelia of gastric glands, H&E stain.

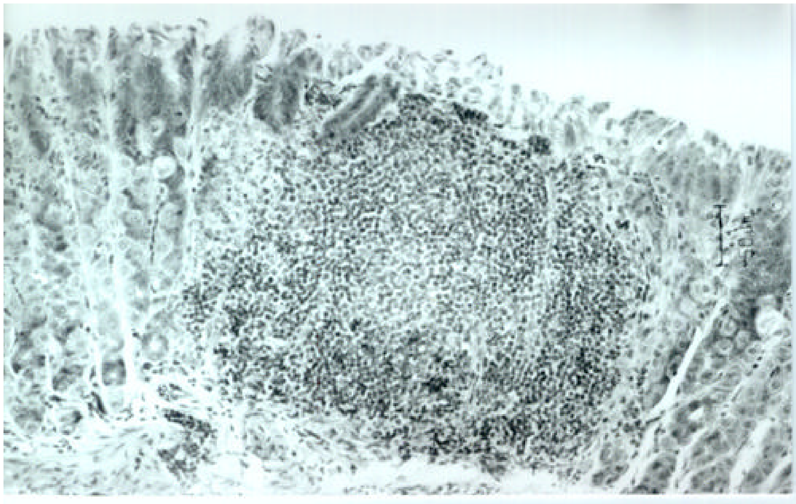
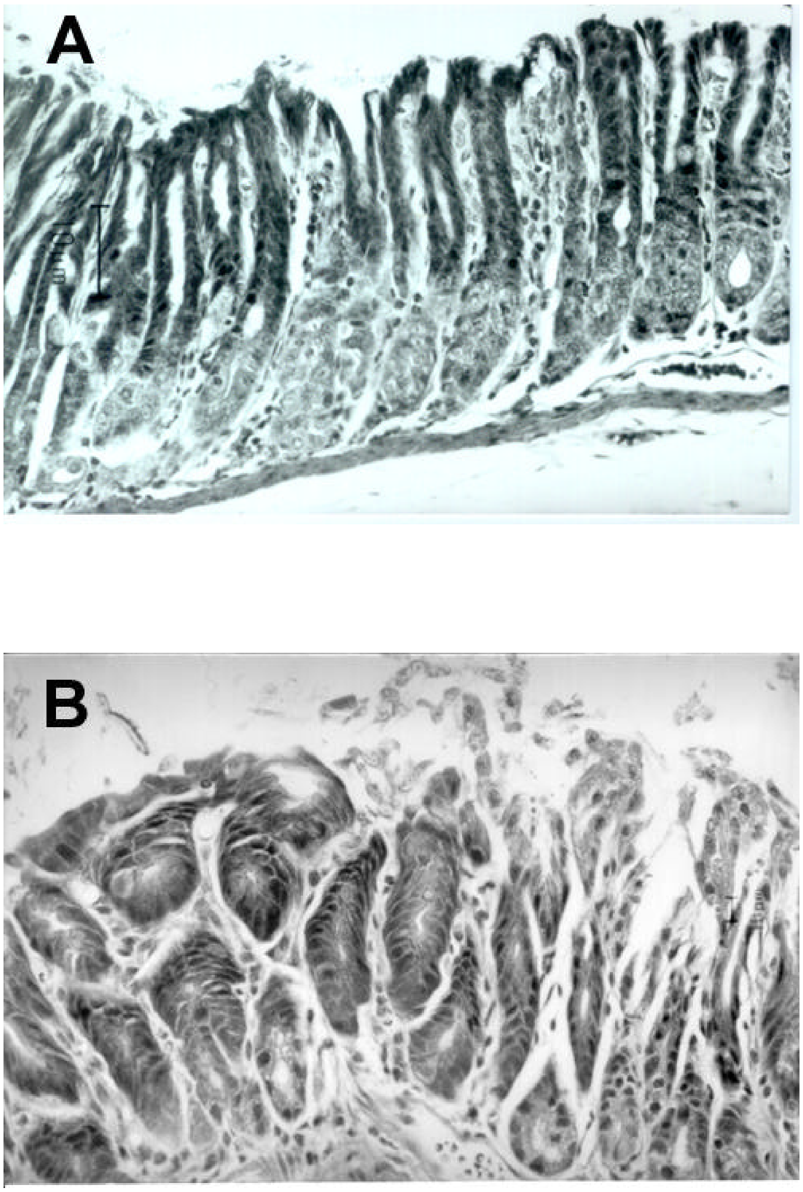


Fig 3. Fundic mucosa of a mouse of group 5 ; Presence of lymphoid follicle in the mucosal layer, H&E stain.


A
B

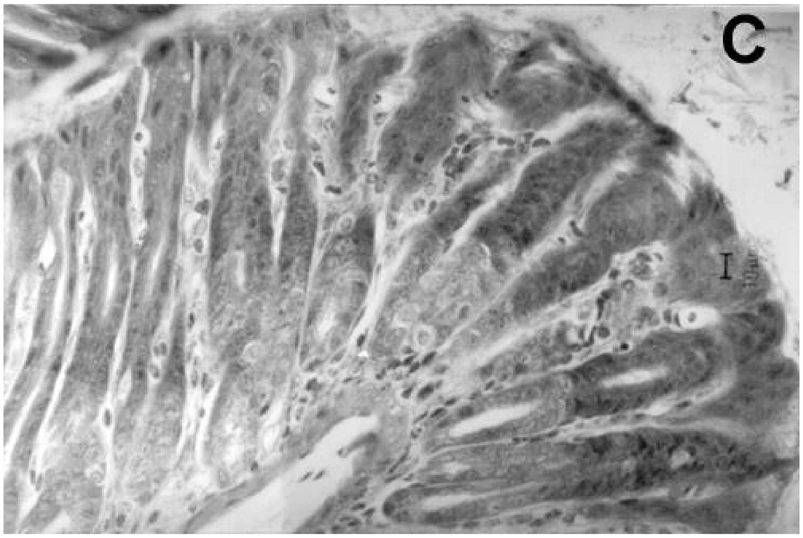


Fig 4. Pyloric mucosa of a mouse of group 2(A), 4(B), 6(C) ; Moderate infiltration of lymphocytes and neutrophils in the lamina propria, H&E stain.

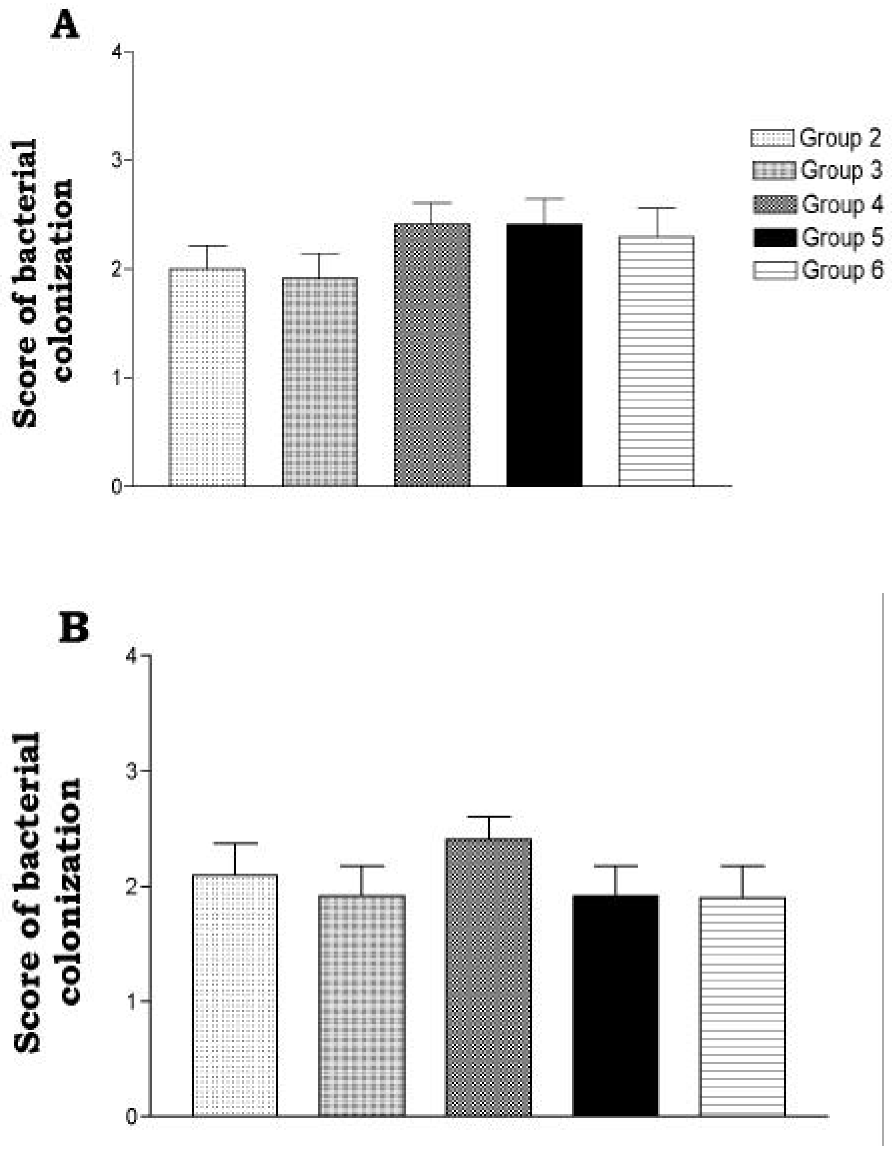


Fig 5. Score of colonization of tightly spiral bacteria in the fundic(A) and pyloric mucosa(B).

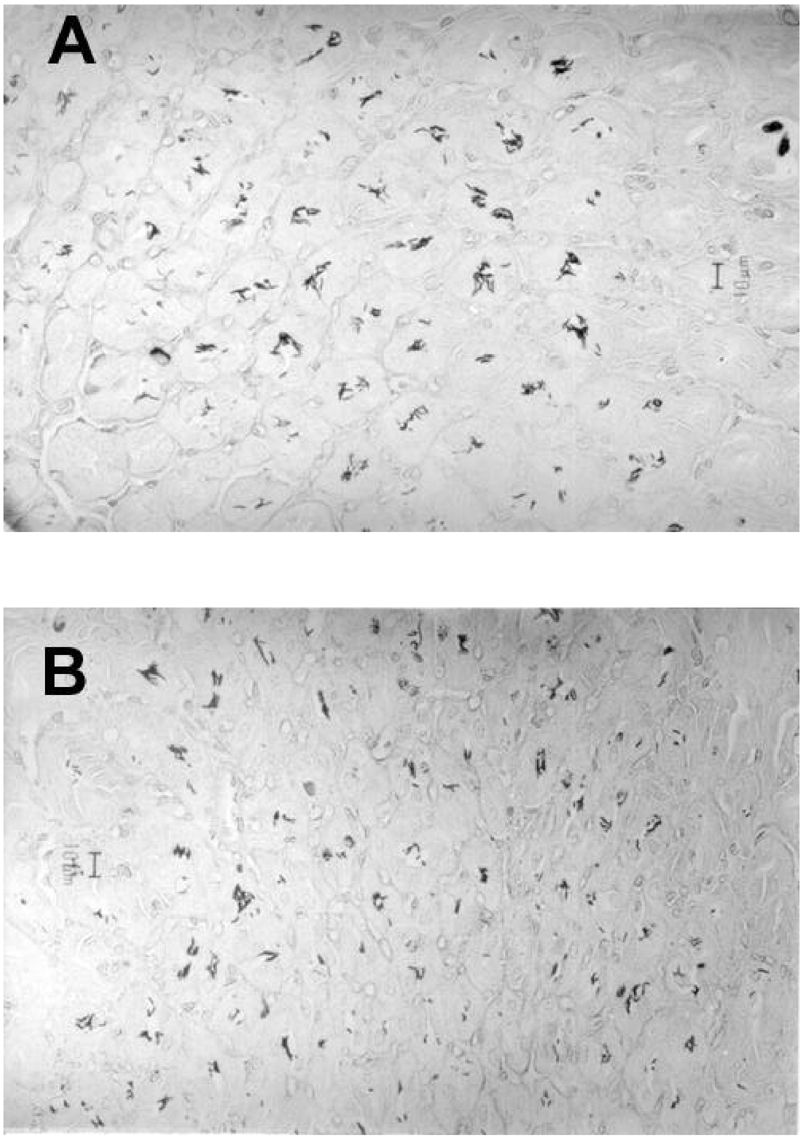


Fig 6. Fundic mucosa of a mouse of group 3(A) and 4(B) ; Tightly spiral bacteria in the lumen of gastric glands, Steiner' silver stain.

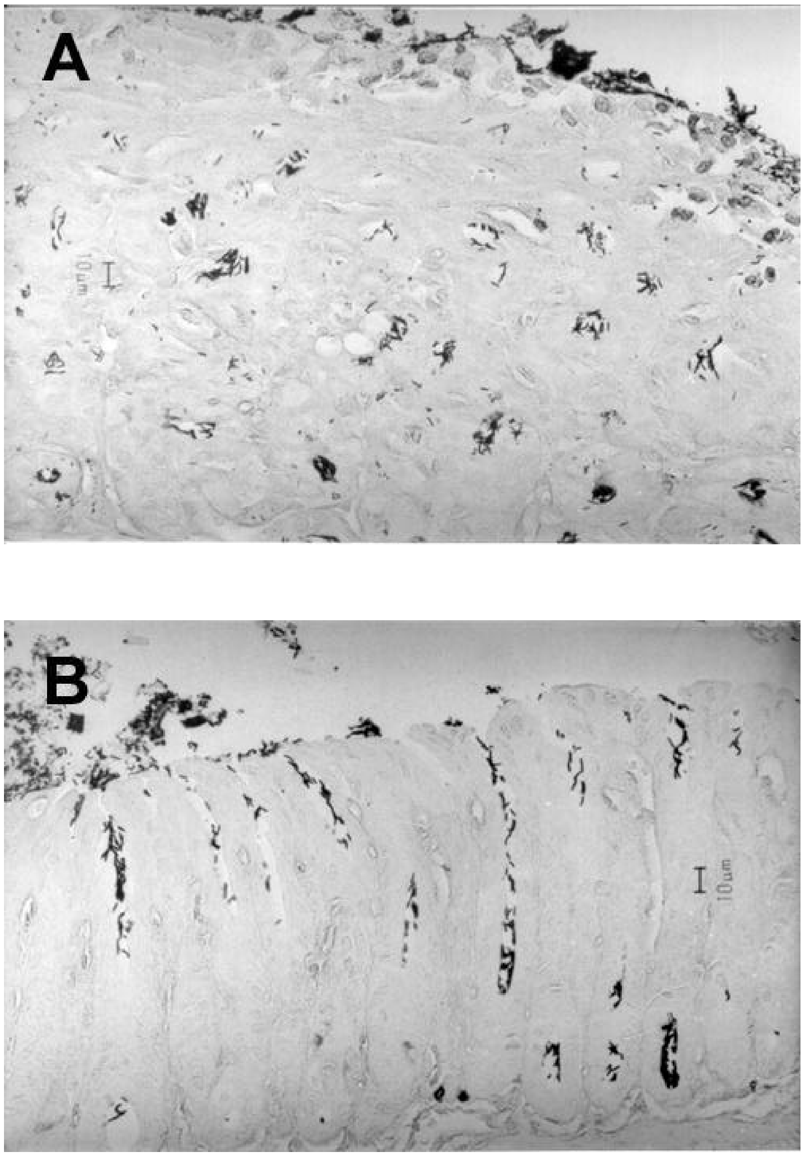


Fig 7. Pyloric mucosa of a mouse of group 2(A) and (B) ; Tightly spiral bacteria in the lumen of gastric glands or gastric pits, Steiner' silver stain.

제 5 장 돼지 위점막에 증식하는 tightly spiral bacteria의 전자현미경학적 관찰

제 1 절 서론

사람의 위에서 증식하는 H pylori가 최초로 분리된(Marshall 등, 1984)지 15년동안 사람과 동물의 위에서 증식하는 spiral organism에 대한 많은 연구가 수행되어왔다(Blaser, 1993 ; Fox 등, 1993 ; Lee, 1989 ; Lee 등, 1993). H pylori와는 다른 spiral bacteria("Helicobacter heilmannii")가 active chronic gastritis가 있는 환자의 antral mucosa에서 발견되었는데(Dent 등, 1987), Warthin-Starry 은염색에서 이 균은 H pylori보다 2-3배 더 길었으며 매우 꼬여있었고, non-selected gastric biopsy samples을 조사한 결과 사람에서는 약 0.08%에서 1%가 이 균에 감염되어 있었다(Dent 등, 1987; Wegmann 등, 1991; Stolte 등, 1990; Heilmann 등, 1991). H heilmannii는 사람의 위점막에 감염되어 chronic gastritis, gastric ulcer, adenocarcinoma를 일으킨다고 알려져 있는데(Stolte 등, 1994; Morgner 등, 1995; Debongnie 등 1995), H pylori 비해 발생되는 병변의 정도는 경미하였고(Tanaka 등, 1994), 균의 증식형태는 H pylori가 주로 유문부에 미만성으로 증식하는 반면, H heilmannii는 다발성 소상의 증식형태를 나타내었다.

한편, Queiroz와 Mendes등은 돼지의 위에서 증식하는 tightly spiral bacteria를 최초로 보고하였는데(Queiroz 등, 1990), 16S rRNA gene sequencing 결과 이 균은 사람의 위점막에 증식하는 H heilmannii type 1과 99.5% 일치하였다(Queiroz 등, 1995). 이 균은 돼지 위점막에 감염되

어 고도의 림프구와 형질세포의 침윤을 수반하는 만성 유문부 위염을 야기하였고(Mendes 등, 1991), 고유점막층에 림프여포를 형성하는 것을 특징으로 하였다.

우리는 돼지의 위점막에 발생하는 병변에 관하여 연구하던 중, 유문부 점막에서 일반배지에서는 배양이 되지않는 tightly spiral bacteria를 발견하였다. 전자현미경학적 관찰을 통해 이 균체의 형태학적인 특징을 밝혀내고자 본 연구를 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. Animal

수원도축장에서 구입한 돼지의 유문부 조직에서 carbol-fuscin 염색을 통해 tightly spiral bacteria의 감염을 확인하였으며, 감염이 확인된 돼지의 유문부 점막을 본 연구에 이용하였다. 한편, tightly spiral bacteria는 일반배지에서 배양이 되지 않기 때문에 마우스(4주령 웅성 ICR)를 이용하여 생체내에서 균을 계대하였는데, 감염후 1개월이 지난 1마리의 마우스 위조직을 전자현미경학적 관찰을 위해 이용하였다.

2. Preparation for electronmicroscopy

Tightly spiral bacteria의 감염이 확인된 돼지와 마우스 위조직을 포르말린에 고정한후 1㎣으로 세절하여 1% OsO_4(Sigma, USA)로 100분간 후고정하였다. 0.1M sodium cacodylate buffer(pH 7.2)를 이용하여 30분간 3회 세정하였고, 이후 70%, 80%, 90%, 100% alcohol을 이용하여 각각 4℃에서 10분간 3회 탈수과정을 거쳤다. 그리고 100% alcohol과 propylene oxide를 1:1로 섞은 용액으로 실온에서 10분간 반응시킨후, propylene oxide만을 이용하여 또다시 실온에서 10분간 3회 반응하였다. Epon mixture(Quetol 812, DDSA, MNA)와 propylene oxide를 1:1로 섞은 용액에 실온에서 잘 흔들어주면서 overnight 반응하였다. 이후 DMP30을 첨가한 epon mixture에 넣고 embedding tray의 양 끝에 조직을 놓은후 35℃, 45℃에서 각각 하루씩 반응하였고, 60℃에서 3일간 incubation하였다. 이를 다이아몬드 칼로 70nm씩 박절하여 1% uranyl acetate와 1% lead citrate로 이중염색한후 전자현미경(JEM 100c ×II, Jeol Japan)으로 80KV에서 관찰하였다.

제 3 절 결과

Tightly spiral bacteria가 감염된 돼지와 마우스의 유문부 점막 표층을 전자현미경학적으로 관찰한 바, 점막표면의 점액내부에서 다수의 균체가 관찰되었으며(Fig 1), 두 개체에서 관찰된 균체는 동일하였다. 균체는 나선형으로 관찰되었는데, 2-6회까지 꼬여 있었고, 길이는 2.0 6.0 μm, 폭은 0.5 0.8 μm였으며, 균체의 양 극은 둥글거나 다소 평평하게 관찰되었다. 고배율에서 관찰하였을 때, 균체의 세포질은 그람음성균의 특징인 안쪽과 바깥쪽에 세겹으로 이루어진 membrane과 cell wall로 둘러싸여 있었다. Cell wall은 두께가 약 10nm였는데, 두 개의 electron-dense한 부분이 다소 electron-lucent한 부분에 의해 나뉘어져 있었다(Fig 2). Flagella가 발생하는 균체 양 극의 근처에는 electron-lucent하며 상대적으로 ribosome이 적은 곳이 관찰되었다. 이 부위와 plasma membrane 사이에는 매우 electron-dense한 polar membrane이 존재하였다. 균체의 양 극에서는 직경 약 40nm의 flagella가 2 5까지 발생한 것이 관찰되었으나(Fig 3), H felis등에서 보이는 periplasmic fibrils은 관찰되지 않았다.

제 4 절 고찰

돼지의 유문부 점막에 증식하는 tightly spiral bacteria를 전자현미경학적으로 관찰한 바, 균체는 점막표면의 점액속에 다수가 증식하고 있었고, 길이는 2.0 6.0 ㎛, 폭은 0.5 0.8 ㎛였으며, 양쪽 극에서 직경 약 40nm의 flagella가 2 5개 발생하였다. Mendes 등이 돼지의 위에 증식하는 tightly spiral bacteria ("Gastrospirillum suis")를 전자현미경으로 관찰한 바, 균체는 3-8회 꼬여있었고, 길이는 1.5-5.2(mean 4.0) ㎛, 폭은 0.4-0.7(mean 0.6) ㎛였으며, 균체의 양 끝에서는 직경 약 22nm의 flagella가 6개까지 관찰되었고(Mendes, 1990). 이는 본 연구에서 관찰한 소견과 매우 유사한 것으로 국내 돼지 위점막에 증식하는 tightly spiral bacteria가 G suis일 가능성이 매우 크다.

1999년에 Andersen 등은 사람의 위점막에 증식하는 H heilmannii를 분리하는데 성공하였는데, 이 균은 전자현미경상에서 길이가 3-8 ㎛였고, 폭은 0.4-0.7 ㎛였다. Electron-lucent한 cytoplasmic zone을 갖는 한쪽극으로부터 14개까지의 flagella가 발생하였으며, periplasmic fibrils은 관찰되지 않았다(Andersen 등, 1999).

개의 위점막에서도 H heilmannii의 감염이 보고되어 있는데, 형태학적으로 3가지로 분류할수 있다. 그들중 하나는 직선의 원통형으로 periplasmic fibrils 가 균체를 감고 있고 다른하나는 large spiral균이며 각각의 나선의 릉에 균체를 감고있는 periplasmic fibrils이 있으며 또 다른하나는 tightly spiral bacteria로서 periplasmic fibrils는 없는 것으로 보고되었다(Weber 등, 1962).

본 연구를 통해 국내 돼지의 위점막에 증식하는 tightly spiral bacteria는 형태학적으로 Gastrospirillum sp(Helicobacter heilmannii)와 유사함을 알수 있었다. 이러한 균은 최근에 인수공통감염원으로 주목받고 있는데, 국내 돼지에서의 발생상황과 균체의 감염에 의한 병리학적 연구,

균분리를 통한 균체의 생화학, 분자생물학적 특성등이 깊이 있게 연구되어야 할 것이다.

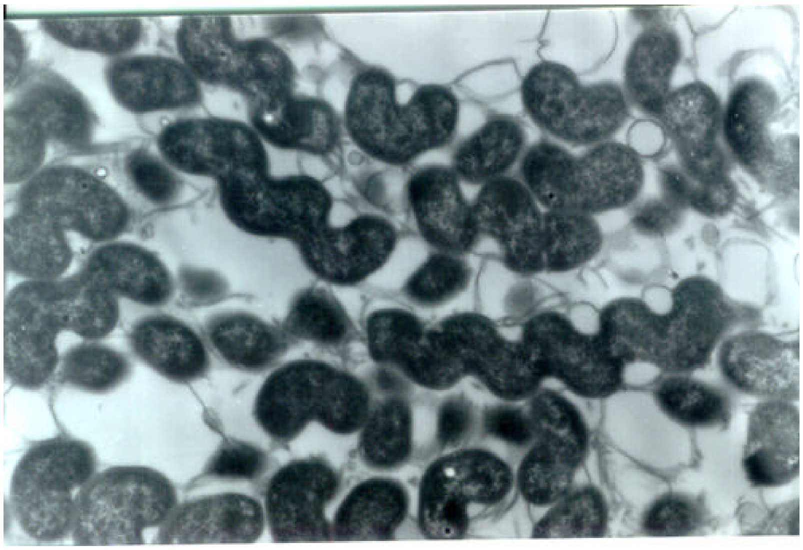


Fig 1. Ultrastructure of numerous sections of tightly spiralled bacteria of gastric mucosa of a mouse. ×15,000

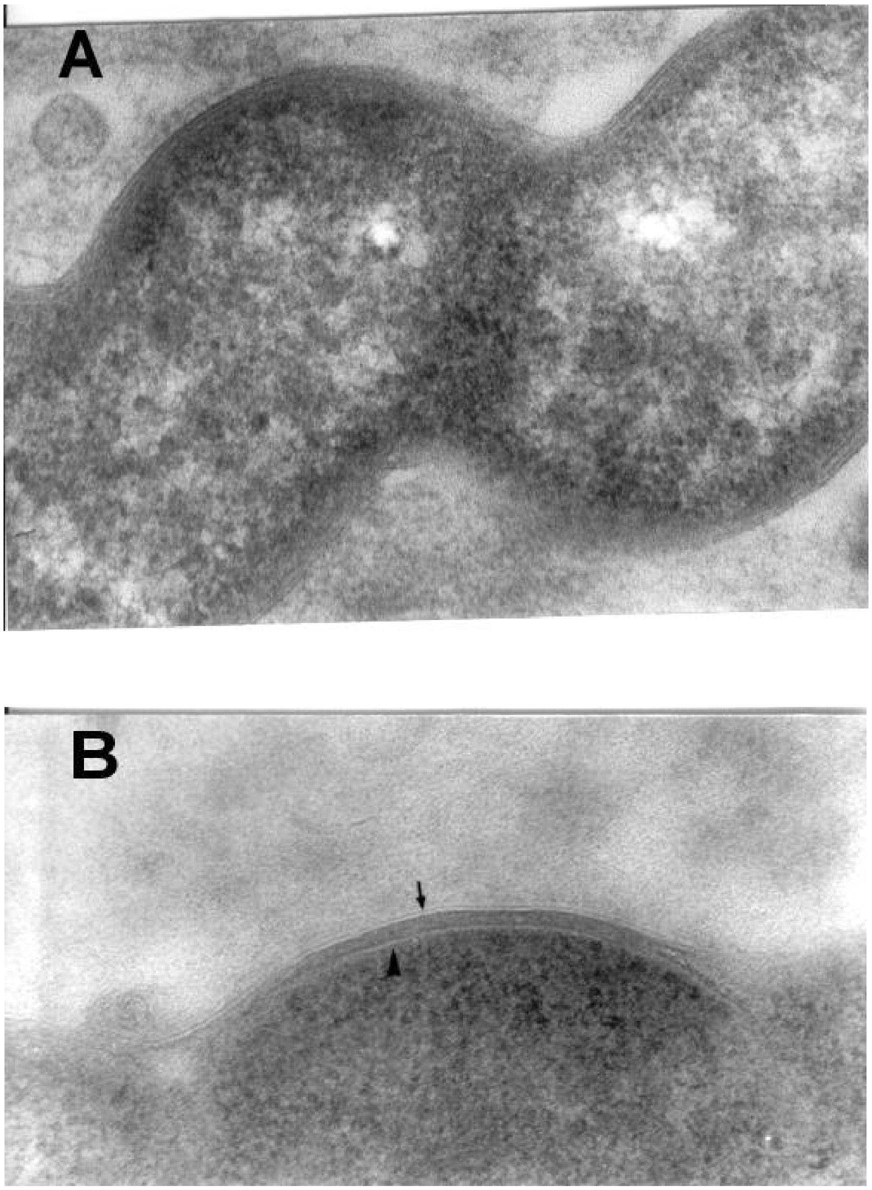


Fig 2. Ultrastructure of tightly spiralled bacterium of gastric mucosa of a mouse(A) and pig(B), arrow ; plasma membrane, arrowhead ; cell wall, ×66,250(A), ×100,000(B).

Fig 3. Ultrastructure of tightly spiralled bacteria, arrowhead ; flagella . ×27. 500.

제 5 장 국내 돼지에서 위내에 증식하는 *Campylobacter* sp의 감염에 대한 혈청학적 조사

제 1 절 서론

Campylobacter는 1963년에 Sebald(Seblad 등, 1963)등에 의해 보고된 이래 지금까지 15개의 species와 4개의 subspecies가 밝혀졌으며 최근에는 Campylobacter hyoilei가 Alderton등에 의해 보고되었다(Ursig 등, 1994 ; Alderton 등, 1995). Campylobacters는 사람과 돼지에서 위장관계의 질병을 야기하는 주요원인체로 알려져 있으며 특히 돼지에 감염되어서는 proliferative hemorrhagic enteritis, porcine intestinal adenomatosis, terminal ileitis, terminal enteritis, regional ileitis, necrotic enteritis로 대표되는 porcine proliferative enteritis를 야기한다(Chu 등, 1973 ; Dodd 등, 1968 ; Love 등, 1977 ; 삐'neill 등, 1970 ; Rowland 등, 1972). 이중 C hyointestinalis와 C sputorum subspecies mucosalis가 주요 원인체로 알려지고 있으며, 이 균에 대한 병원성을 확인하고자 지금까지 많은 감염실험이 수행되어 왔다(Alderton 등, 1992 ; Lomax 등, 1982 ; Lomax 등, 1982 ; Rowland 등, 1975). 1995년에 Stephen 등이 돼지의 위에서는 처음으로 C hyointestinalis의 subspecies를 분리하였다(On 등, 1995). 이 균은 catalase activity는 양성이었으나 hippurate hydrolysis와 indoxyl acetate hydrolysis는 음성이었고, 대부분이 25℃에서는 배양되지 않았으나 42℃에서는 배양되었으며 G+C content는 31-33 mol%로 나타났다. 그러나 이 균의 병원성 확인을 위한 돼지에서의 감염실

험은 아직까지 이루어지지 않고 있다. 우리는 돼지의 위염을 일으키는 원인을 연구하던 중 국내 최초로 Campylobacter spp(21-1, 21-2, 31, 48)를 돼지의 위에서 분리하였다. 분리한 균은 oxidase와 catalase activity 및 indoxyl acetate hydrolysis는 positive반응을 나타내었고, urease activity와 hippurate hydrolysis는 각각 negative 반응을 나타내었다. 또한 이 균은 25℃에서는 배양되지 않았으나 37℃와 42℃에서는 잘 배양되었고 기존의 다른 균들과 16S rRNA sequence를 비교한 결과 C jejuni, C coli 등과 유사하게 나타났으나 생화학적 성질이 뚜렷이 다르게 나타나는등 새로운 Campylobacter spp로 판명되었다(not published yet data, paper in preparation). 돼지의 위에서 새롭게 분리된 Campylobacter spp에 대한 국내 돼지의 감염율을 확인하고자 본 실험을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. Samples

안양 및 화성도축장에서 총 462마리(안양도축장; 356, 화성도축장; 106)의 돼지혈액을 수집하였다. 수집한 혈액을 실온에서 2시간 이상 방치한후, 3,000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 따내고 이를 56℃에서 30분간 불활화하여 본 실험에 이용하였다.

2. Antigens

5 10% CO_2 배양기(37℃)에서 Brucella와 GC modified chocholate agar(Difco, Detroit, USA)에 계대배양한 Campylobacter sp(48)를 멸균 Phosphate buffered saline(pH 7.2, PBS)으로 8,000rpm에서 10분간 3회 원

심분리로 세척한 후 20초 간격으로 20회 sonication하고 이를 PBS에 희석하여 항원으로 이용하였다.

3. Negative control serum

SPF 돼지의 혈청에서 분리한 Campylobacter sp(48) 항원을 1/10 volume 첨가하여 잘 섞었고, 이를 실온에서 2시간 반응시킨 후 8,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 음성 표준혈청으로 이용하였다.

4. Positive control serum

Western botting에 사용할 양성 표준혈청을 작제하기 위해 대한실험동물에서 2마리의 white rabbit을 구입하였다. 위와 동일한 방법으로 계대배양한 Campylobacter sp(48, 31)를 1 mM EDTA, 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 8,000 rpm 조건에서 10분간 2회 세척한 후 0.3% formalin에 부유하여 3시간 동안 고정시켰다. 이를 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 다시 위와 같은 방법으로 2회 세척한 후 65℃에서 1시간 재고정하였다. 다시 buffer를 이용하여 2회 세척한 후 1mg/ml의 항원을 토끼에 근육주사하였고 한달후 동량으로 추가항원자극을 실시하였다. 매 4일간격으로 ELISA법을 통해 항체가의 상승을 측정하였으며, 추가항원자극 실시후 8일째 돼지의 전혈을 채취하였다. 이후 혈액을 실온에서 2시간 이상 방치후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 양성 표준항체로 사용하였다.

5. ELISA optimization

96well ELISA plate 세로열에 항원을 100 ㎍부터 2배수로 희석하여

분주한후 37℃ oven에서 30분간 incubation하였고, 4℃ 냉장상태로 overnight 하였다. PBS를 이용하여 minishaker에서 5분간 3회 세척한후, PBS로 희석한 0.5% bovine serum albumin(SIGMA, USA)으로 4℃ 냉장상태에서 blocking을 하였다. 돼지에서 작제한 양성표준혈청을 1:10부터 1:20,480배까지 serial로 희석하여 실온에서 2시간 이상 반응하였고, 0.05% Tween-PBS로 3회 세척후 1: 10,000으로 희석한 peroxidase labelled anti-swine IgG를 분주하여 실온에서 2시간 반응하였다. 5회 세척후 OPD로 20분간 발색한후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 항원 μg을 96well ELISA plate에 분주하였고, 양성혈청과 음성혈청을 1:10부터 1:20,480배까지 serial로 희석하여 위와 동일한 방법으로 실험하였다.

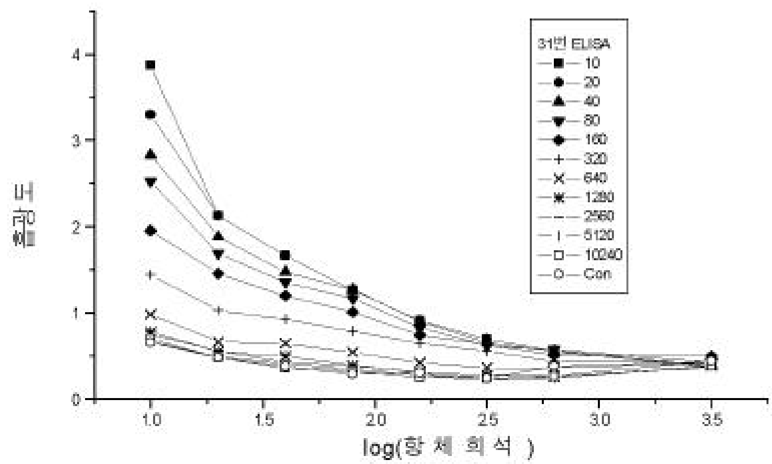
6. ELISA evaluation

450nm에서 흡광도가 음성표준혈청보다 0.3이상일 때, 이를 양성으로 간주하였다.

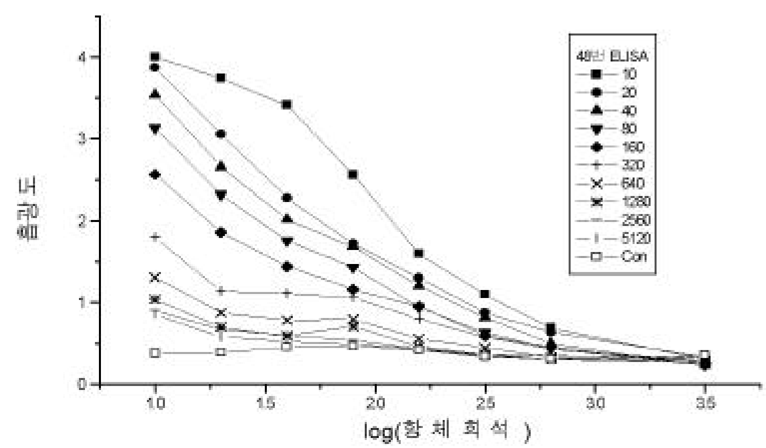
7. Western blotting

위와 같이 준비한 항원에 2% SDS를 첨가하여 10분간 boiling을 하였고 이후 β-mercaptoethanol이 첨가된 sample buffer와 1:1로 섞어 다시 10분간 boiling하였다. 이를 polyacrylamide gel에 100 μl loading하여 constant 200V로 전기영동한 후(Biorad, USA), nitrocellulose membrane에 100V에서 1시간 transfer하였다. 그다음 nitrocellulose membrane을 5% skim milk로 냉장상태에서 2시간 blocking을 하였고 PBS로 세척한후 양성표준혈청과 음성표준혈청을 1:20으로 희석하여 2시간 실온에서 반응시켰다. 이후 1:1000으로 희석한 Peroxidase-conjugated Rabbit IgG fraction to Swine IgG(CAPPEL 55826, Promega, USA)에 2시간 반응시켰으며 3,3'-diaminobenzidine (Vector, USA)에 발색하였다.

제 3 절 결과



31번 균주 ELISA



48번 균주 ELISA

1. Western blotting

Campylobacter spp(21-1, 21-2, 31, 48)중 31과 48의 양성표준혈청을 이용하여 다른 Campylobacter spp와의 교차반응을 관찰하였다. 21-1, 21-2, 31, 48균과 C jejuni subsp jejuni 그리고 C coli에 대하여 작제한 31과 48번 균의 양성혈청을 각각 반응시켰다. 31번의 양성혈청으로 반응시켰을 때, 21-1과 21-2는 거의 동일한 위치에 밴드를 형성하였으나 이외의 네 균주는 51-78kD 사이에서 각기 다른 밴드를 나타내었다(Fig 1). 48번의 항체로 반응하였을 때는 21-1과 21-2 그리고 48번 균이 동일한 위치에 밴드를 형성하였고, 31번과 C jejuni, C coli는 51-78kD 사이에서 서로 다른 양상의 밴드를 나타내었다. 또 C jejuni의 경우 16.5-23kD 사이에 다른 균에서는 모두 관찰되는 위치에서 밴드를 형성하지 않았다(Fig 2).

2. ELISA

총 462개의 혈청에 대한 ELISA결과 187개(40.48%)의 samples에서 양성을 나타내었다. 안양도축장의 경우 총 356 samples중 184개(51.69%)가, 화성도축장에서는 106 samples중 3개(2.8%)가 양성을 나타내었다.

제 4 절 고찰

돼지의 위에서 분리한 Campylobacter sp에 대한 국내 돼지의 감염율을 확인하고자 수행한 본 실험결과 총 462개의 혈청중 187개(40.48%)의 samples에서 양성을 나타내었다. 이중 안양도축장에서는 총 356 samples중 양성이 184개(51.69%)로 비교적 높은 비율로 감염되었으나, 화성도축장에서는 106 samples중 3개(2.8%)만이 양성을 나타내었다. 이처럼 두 도축장에서 감염율의 차이가 큰 이유를 정확히 말할 수는 없지만, 아마도 이 균

이 지역적으로 감염되었든지 아니면 사료나 사육환경에 따라 감염율에 차이가 있었을 것으로 추정해 볼수 있다.

이번에 분리한 Campylobacter sp는 oxidase와 catalase activity 및 indoxyl acetate hydrolysis는 positive반응을 나타내었고, urease activity와 hippurate hydrolysis는 각각 negative 반응을 나타내었다. 또한 이 균은 25℃에서는 배양되지 않았으나 37℃와 42℃에서는 잘 배양되었고 기존의 다른 균들과 16S rRNA sequence를 비교한 결과 C jejuni, C coli 등과 유사하게 나타났으나 생화학적 성질이 뚜렷이 다르게 나타났다. 본 실험에서 western blotting 결과는 이번에 분리한 네 균주와 C jejuni, C coli에 사이에서 cross reactivity가 관찰되었으나 일부 위치에서 다른 밴드를 형성하여 동일한 균이 아님을 확인할수 있었다. 그리고 각 균 사이의 교차반응으로 인해 돼지의 Campylobacter 감염에 있어서 ELISA를 이용한 방법으로는 정확한 subspecies를 확인하기는 어려울 것이라고 생각된다.

현재까지 돼지에서 위궤양을 일으키는 원인으로는 탄수화물이 풍부한 사료를 급여하였거나(Krakowka 등, 1998) 지속적인 스트레스를 주었을 때와 같은 환경적인 요인과 세균성위염이 알려져 있다. 그중 Gastrospirillum suis에 의한 세균성위염에 대한 보고는 있으나(Mendes 등, 1991 ; Quieroz 등, 1990), Campylobacter spp에 의한 위염이나 위궤양등의 병변에 대한 연구는 아직까지 보고되어 있지 않다. 따라서 돼지에서의 위염 및 위궤양과 Campylobacter sp와의 관계에 대한 병리학적, 미생물학적, 분자생물학적 연구가 수행되어야 할 필요가 있다.

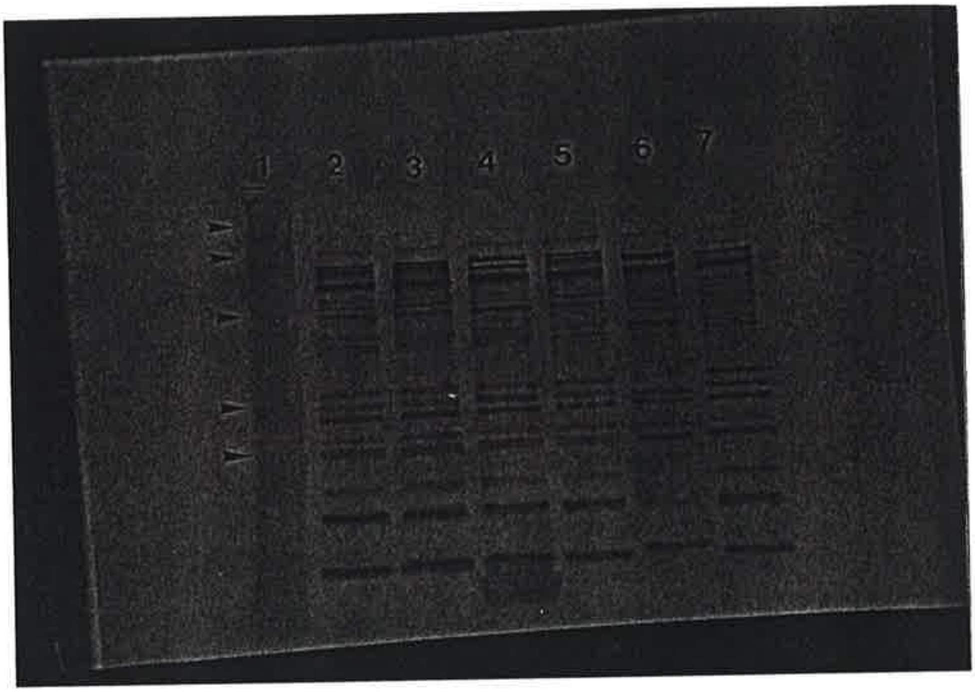


Fig 1. Western blot using antibody of Campylobacter sp(31), lane 1:marker(125, 78, 51, 30, 23 kD), lane 2:21-1, lane 3:21-2, lane 4:31, lane 5:48, lane 6: C jejuni, Lane 7: C coli.

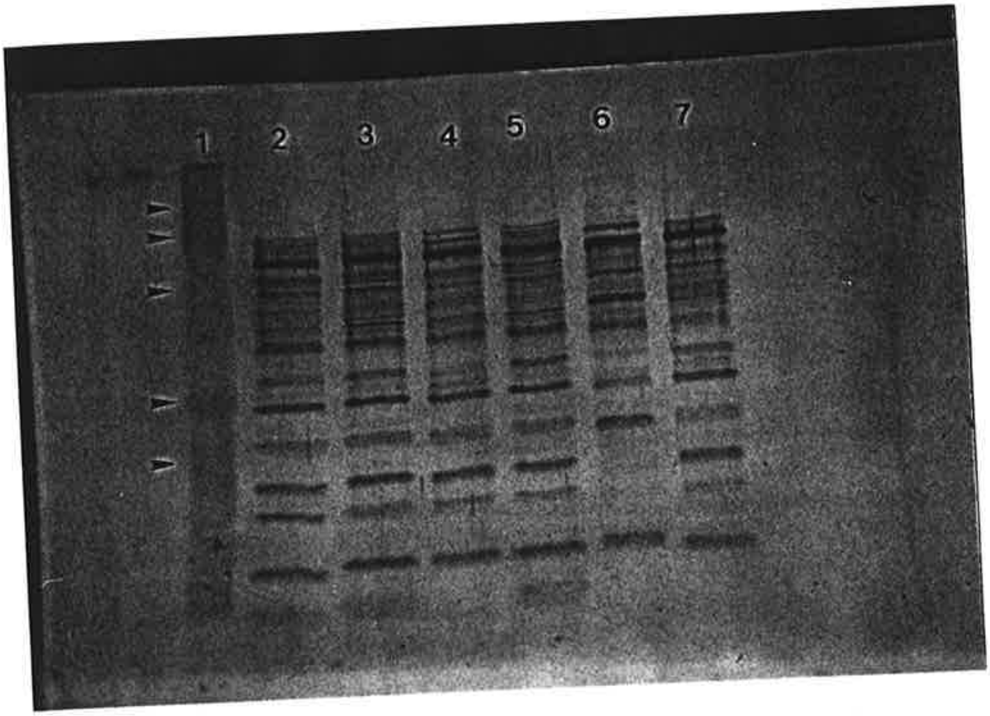


Fig 2. Western blot using antibody of Campylobacter sp(48), lane 1:marker(125, 78, 51, 30, 23 kD), lane 2:21-1, lane 3:21-2, lane 4:31, lane 5:48, lane 6: C jejuni, Lane 7: C coli.

제 7 장 돼지 위 점막으로부터 새로 분리해 낸 Campylobacter의 특성조사

제 1 절 서론

*Campylobacter jejuni/coli*는 가장 흔한 식중독균이며, 개발도상국에서 식중독을 야기한다(Butzler and Oosterom, 1991). 더욱이 이 균주는 영아에 장내 병원균이며 설사, 발열, 구역질, 복통등의 증세를 야기한다. 이러한 질병은 종종 개인차가 있으며, 증세를 치료하는 과정에서 해결되어진다. 비록 대부분의 경우 설사증세에 국한되지만, 심한 경우 통풍과 Guillain-Barre syndrom 및 어린이와 성인에 모두 급성경련을 일으킨다(Nachamkin et al., 1998). 이러한 Campylobacter의 감염경로는 불결한 음식 및 음료의 섭취를 통한다고 실증되어왔다(Borch and Christensen, 1996). 다양한 Areromonas hydrophila, Campylobacter coli/jejuni, Listeria monocytogens, Salmonella spp. Staphylococcus aureus 그리고 Yersinia 등이 몇몇의 도살된 동물의 장내균총중에 있어, 이들이 상품화된 고기산물을 통해 감염을 야기 시킬 수 있다(Fransen et al., 1996). 따라서 고기를 만드는 과정이나 가정에서 요리를 날 고기를 다루는 과정에서 주의하여 병원균을 감소시키는 것이 병을 예방하는데 있어 필요하다(Borch et al., 1996; Fransen et al., 1996). 열악한 환경에서 Campylobacter는 생존을 연장하기 위해 증식하지 않는 형태 혹은 그리고 coccal cell의 형태로 생리적 적응을 하게 된다(Harvey and Leach, 1998; Krieg and Holt, 1984). 이러한 특징은 Campylobacter의 subculture와 분리를 매우 어렵게 한다. 최근 새로운 Campylobacter들이 다양한 동물에서 동정되어졌고, 새로운 배양 방법 및 진단방법에 의해서 특징이 밝혀져 왔다(Alderton et al., 1995; Weijtens. et al., 1996; On, 1996). 본 실험에서는 네 개의 Campylobacter 유사종이 돼지 위 점막으로부터 분리되어졌다. 본 연구에서 생화학적, 형태학적, 면역학적, 분자생물학적 결과들은 이러한 박테리아가 새로운 Camplybacter spp.에 속함을 보여주었다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 시약

Bactotransport medium Stuart와 Brucella medium은 Difco (Detroit M. U.S.A) 에서 구입하였다. GC medium base, Isovital 와 horse serum은 BBL (Cockeyswill, MD, U.S.A) 에서 구입하였다. Fungizone, amphotericin B, polymyxin B, vancomycin와 trimethoprim 은 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A) 에서 구입하였고, Taq polymerase from Takara (Shiga, Japan) 에서 구입하였다.

2. 분리 및 배양 조건

위궤양 및 각화와 같은 증세를 보이는 병변을 잘라내어 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)에 세척 후 transport medium 담아, 얼음에 2시간 거리의 실험실로 이동하였다. 실험실에서 채취된 위조직을 멸균한 razor blade로 잘게 조각내고, 10% horse serum이 첨가된 Brucella medium [Brucella broth, fungizone (2.5 g/ml amphotericin B), Skirrow's supplement (0.016 mg/ml polymyxin B, 0.5 mg/ml vancomycin, 0.25 mg/ml trimethoprim)] 와 modified chocholate agar medium (GC medium base, 1% hemoglobin, fungizone, skirrow's supplement, 1% isovitalex)에 접종하였다. 이를 5-10% CO2 항온기와 37oC anaerobic jar

에서 4-7 일동안 혐기적으로 배양하였다. 작고 투명한 모양을 가지는 colony들을 순수분리하기 위하여 새 배지에 접종하였다. 본 실험에서 사용되어진 C. jejuni subsp. jenuni (LMG 8841T), C. jejuni subsp. doylei (LMG 8843T), C. lari (LMG 8846T), and C. coli (LMG 6640T) 는 BCCM LMG (Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent)로부터 KCTC (Korea Collection of Type Culture)를 통해 구입하였다.

3. *Campylobacter* SSP primer를 이용한 PCR

Genomic DNA 는 Genomic DNA isolation kit (Promega, Madison, WI, U.S.A)을 이용하여 추출하였다. PCR은 Campylobacter의 16S rRNA gene에 특이적인 증폭을 일으키는primer 1 (5'-GGAGGATGACACTTT TCGGAGC-3')과 primer 2 (5'-ATTACTGAGATGACTAGCACCCCG-3')는 Giesendorf(Giesendorf et al., 1992)가 제작한 것을 따랐고, PCR mixture는 2 μg의 genomic DNA, 20 μM의 primer1, 2는 각각 2.5 μl, 5 μl 의 10 × buffer, 4 μl 의 dNTP 그리고, 1 unit of Taq polymerase를 넣어 총 50 μl 되게 D.W로 맞추었다. PCR 조건은 94℃에서 5 min, 50℃ 에서 1 min, and 72oC 에서 1 min 1회, 94℃에서 1 min, 50oC 에서 1 min, 72℃ 에서 1 min을 39회, 마지막으로 94℃에서 1min, 50oC에서 1 min, 72℃에서 5 분 1 회 순환되었다. PCR products는 0.8% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide staing 하여 확인하였다.

4. 전자현미경(TEM)을 이용한 박테리아 세포의 관찰

위에서 준비된 박테리아 세포를 negative staining한 후 전자현미경 (JEM 100CX II, JEOL, Japan) 상에서 관찰하였다.

5. 박테리아의 생화학적 검사

Motility, Gram staining, oxidase, catalase, urease, esterase, nitrate reduction, hippurate hydrolysis, indoxyl acetate hydrolysis, γ-glutamyl transpeptidase, reduction of chloride to triphenyl tetrazolium (TTC), pyrrolidonyl arylamidase, L-arginine arylamidase, L-asparate arylamidase, alkaline phosphatase, H_2S production, glucose assimilation, succinate assimilation, acetate assimilation, propionate assimilation, malate assimilation, ,citrate assimilation assay는 Bergy's Manual과 API CAMPY (API, Marcy-I'Etoile, France)에서 설명된 방법을 따라 수행하였다. Nalidixic acid, cephalotin, cefoperazone, carbenicillin 의 감수성은 NCCLS의 지침에 따라 disk test로 결정하였다.

6. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

PCR mixture는 60 ng of genomic DNA, 4 μl의 5 pmole/μl RAPD analysis primer (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden), 2 μl dNTP, 2.5 μl의 10 × buffer, 1 unit of Taq polymerase를 넣은 후 D.W로 총 25 μl 되게 하였다. 사용된 RAPD primers는 RP3 (5'-GTAGACCCGT-3'), RP4 (5'-AAGAGCCCGT-3'), and RP5 (5'-AACGCGAAC-3')였다. PCR 조건은 94oC에서 5 분, 34oC에서 5 분, 72oC에서 5 분간 3 회, 94oC에서 1 분, 34oC에서 1 분, 72oC에서 2 분 동안 29회, 마지막으로 72oC에서 10 분동안 1 회 순환시켰다. PCR products는 2% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 확인하였다. RAPD는 Bio-profile image analysis system (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 분석하였다.

7. 분리균에 대한 antiserum의 preparation

박테리아 세포를 sonication으로 파쇄하고 total protein을 10% formalin에 고정하였다. 이를 (1 mg/kg)을 4주 간격으로 3회 토끼(NewZealand White Rabbit, male)의 근육 내에 주사하였다. 토끼를 sodium penthobarbitone로 진정시킨 후, 경동맥으로부터 전혈을 채취하였다. antiserum은 분주하여 -20oC에 저장하였다.

8. Western Blot Analysis

위에서 준비된 박테리아 세포에 2% SDS가한 후 10분간 100℃에서 중탕하여 total protein을 용출하였다. 용출된 단백질을 10% SDS denaturing gel에 전기영동한 후, nitrocellulose membrane에 blotting하였다. 10% BSA/PBS로 blocking한 후 antiserum을 membrane에 첨가하였다. Second antibody는 anti-rabbit IgG conjugated alkaline phosphatase를 사용하였고, 발색을 위해 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT)을 사용하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

작고 투명한 colony의 균주 네가지를 돼지 위 점막에서 분리되어 성공적으로 2차 배양되었다. Campylobacter SSP specific 16S rRNA gene 특이적인 primer로 PCR한 결과 네가지 분리균 모두 462 bp의 fragment를 생산하였다(Fig 1.).(Giesendorf et al., 1992). 모든 분리균은 운동성을 가졌고, gram-negative였으며, 나선형 모양을 가졌다 (Fig. 2). 각 박테리아는 양 끝에 하나 혹은 두 개의 non-sheathed 편모를 가졌으며, 편모의 끝은 둥글지 않았다. 분리주 21-1, 21-2, 31은 길이가 2.5-3 ㎛, 폭이 5-6 ㎛으로 2-4 번 꼬였다. 분리주 48번은 길이가 3-4 ㎛, 폭이 2 ㎛으로 4-6번

꼬였다. 장시간 배양에서는 구형의 세포 모양이 관찰되었다. Endospores는 생성하지 않았다. 장시간 배양된 몇몇 sample의 경우 세균 주위에 주름(ruffle)이 관찰되어진다(Krieg and Holt. 1984). 이러한 모든 표현형적 특징은 보고되어진 다른 Campylobacters 의 특징과 일치한다(Harvey, P. and S. Leach., 1998).

분리균주 모두 미호기성균주이며, glucose, mannitol, lactose, ribose, and D-xylose를 발효하지 못하는 asaccharolytic이다. 분리균과 다른 Campylobacter와 구별되는 차이점은 표 1에서 보여준다. 차이점으로는 nitrate를 nitrite로 환원시키는 능력, alkaline phosphatase가 없으며, cephalotin에 대한 내성, 42oC에서 배양된다는 점이다. 분리균주 모두가 37oC 와 42oC, 에서 자랐으나, 25oC에서는 자라지 않았다. Oxidase and catalase activities는 양성인 반면, rapid urease 활성은 음성이었다. Hippurate는 가수분해되지 않았고, γ-glutamyl transpeptidase 활성은 음성이었으며, Indoxyl acetate hydrolysis는 양성이었다. 네 개의 분리균주는 esterase activity, TTC reduction, succinate assimilation, acetate assimilation, propionate assimilation, citrate assimilation와 nalidixic acid에 대한 감수성에 대해서는 다른 결과를 보였다. 이러한 생화학적, 생리학적 data를 기초로 네 개의 분리 균주중 21-1과 21-2 분리균의 nalidixic acid 내성을 제외하고는 C. coli 와 매우 유사하였다. C. jejuni and C. coli는 hippurate hydrolysis와 tetrazolium chloride와 nalidixic acid에 대한 내성에서 두드러진 차이점을 보였다 (Hebert, 1982). jejuni는 모든 Campylobcter species와 같이 hippurate에 양성이었으며 몇몇 Campylobacter-like organisms는 hippurate에 음성이다. 네 개의 분리균주가 hippurate 음성이었으므로, C. coli에 속한다고 생각된다.. 그러나 No. 21-1 와 48 는 TTC에 대하여 음성이었던데 반해 C. coli는 양성이다. Nalidixic acid 내성 여부를 검사한 결과 21-1와 21-2은 내성을 가지는 반면, C. jejuni 와 C. coli는 감수성을 가진다. 따라서 생화학적,

생리적 data들은 네 개의 분리균주가 C. jejuni 와 C. coli와는 다르다는 것을 보여준다. 48번 분리주에 대한 antiserum을 가지고 행한 Western blot analysis는 분리주와 공시주 사이의 차이점을 보여준다 (Fig. 3). Western blot의 결과로 그린 dendrogram으로 분석해보면 네 개의 분리균주는 공시주와 연관이 적음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

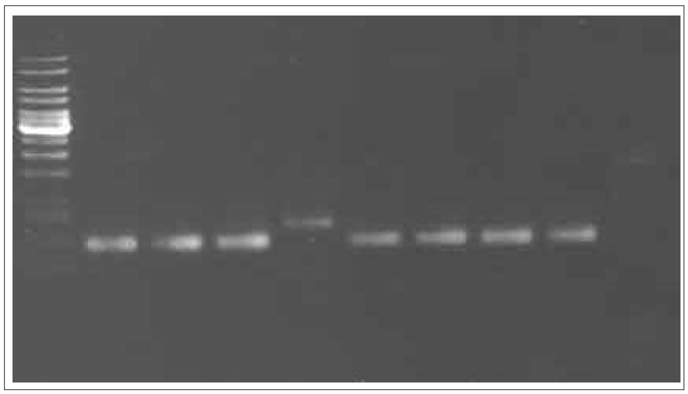
분리주와 공시균주 사이의 차이점을 확실히 하기 위하여 다양한 random primer를 가지고RAPD를 수행하였다(Fig. 5). RAPD는 동물과 사람의 Campylobacter spp.를 포함한 다양한 박테리아의 sub-typing에 성공적으로 사용되어져 왔다. RP3에 의한 RAPD의 경우 C. coli와 네 개의 분리주가 동일한 pattern을 보여주었으나, RP4와 RP5를 사용한 RAPD는 C. coli 다른 pattern을 보여주었다 (Fig. 5). Dendrogram을 그렸을 때, 새로 분리된 균주들은 서로 유사하였으나, 다른 공시균주와의 유사성은 적었다 (Fig. 6). 이러한 분리균주의 더욱 자세한 특징조사를 위하여 실시한 total 16S rRNA sequencing의 결과를 보았을 때 C. coli와 근접한 유연관계를 가지나 똑같은 group에는 속하지 않았다(Fig. 7).

이러한 생화학/ 생리 검사 결과, RAPD결과, Western blot analysis, 16S rRNA 염기 서열의 결과, 네 개의 분리균주는 서로 달랐고, C. jejuni, C. doley, C. lari, and C. coli를 포함한 다른 Campylobacter들과는 다른 신종으로 보여진다.

표1. Characteristics which differentiate Helicobacer, sp. nov. isolated from pig from other Helicobacter and Campylobacter species

	21-1	21-2	31	48	*C.jejuni subsp. jejuni*	*C.jejuni subsp. doylei*	*C. lari*	*C.coli*	*H.pylori*
α-hemolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pitting on BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease activity (rapid)	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Hippurate hydrolysis	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Indoxyl acetate hydroysis	+	+	+	+	+	+	-	+	-
γ-glutamyl transpeptidase activity	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TTC	-	+	+	-	-	+	-	+	+
Growth at									
25 ℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 ℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Susceptibility to									
Nalidixic acid(30㎍ disk)	R	R	S	S	S	S	S	S	R
Cephalotin(30㎍ disk)	R	R	R	R	R	S	R	R	S
Cefoperazone(BA)	R	R	R	R	R	NT	R	R	S
Carbenicillin(BA)	S	S	S	S	S	NT	I	S	S

(Helicobacter bilis sp. nov., a novel helicobacter species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice; Helicobacter mudarum sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents; Helicobacter bizzozeronii, a new canine gastric Helicobacter sp.)



M a b c d e f g h i

FIG. 1. *Campylobacter* SSP primer을 **이용한** PCR. PCR은 *Campylobacter* ssp. primer을 **사용하여 수행했으며**, EtBr로 **확인하였다**. (M, 1 kb DNA ladder; a, *C. jejuni* subsp. *jejuni*; b, *C. jejuni* subsp. *doylei*; c, *C. lari*; d, *C. coli*; e, No. 21-1; f, No. 21-2; g, No. 31; h, No. 48; I, *H. pylori*)

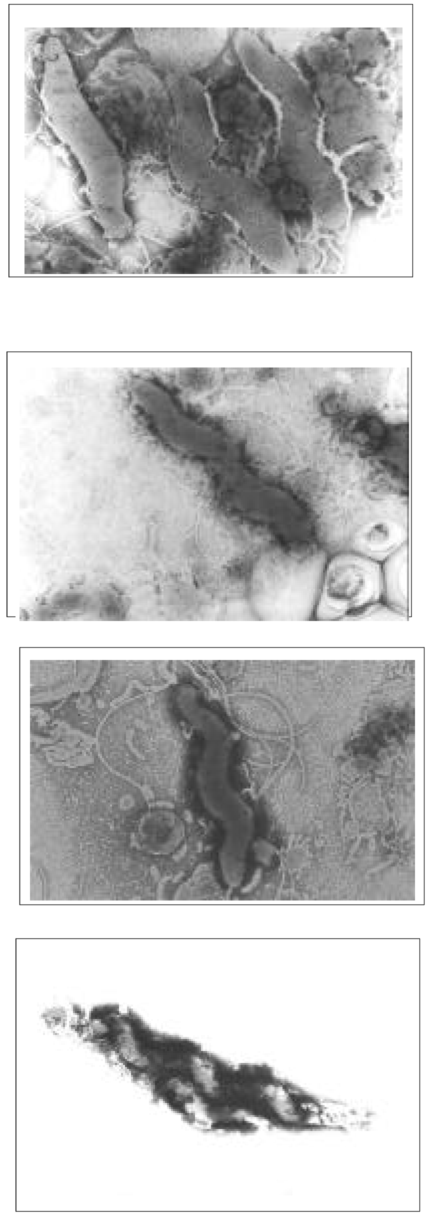


FIG. 2. **분리균의 전자현미경 사진**. (a), No. 21-1 (X 20,000, Bar: 0.5 um); (b), No. 21-2 (X 20,000, Bar: 0.5 um); (c), No. 31 (X 17,500, Bar: 0.55 um); (d), No. 48 (X 17,500, Bar: 0.55 um)

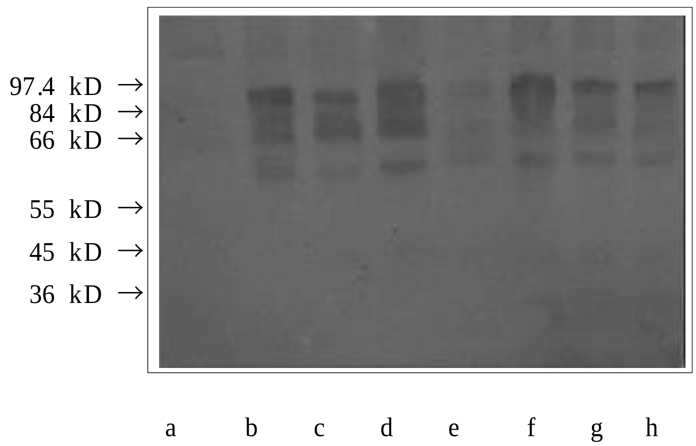


FIG 3. **분리균의** Western blot analysis. Total protein**을** 10% SDS denaturing gel**에 전기영동한 후** nitrocellulose membrane**에** blotting**하였다**. Proteins**에** 48**번 분리주에 대한** antiserum**을 붙여서 재료 및 방법의 설명대로 확인하였다**. (a, *C. lari*; b, *C. coli*; c, *C. jejuni* subsp. *doylei*; d, *C. jejuni* subsp. *jejuni*; e, No. 31; f, No. 21-2; g, No. 48; h, No. 21-1)

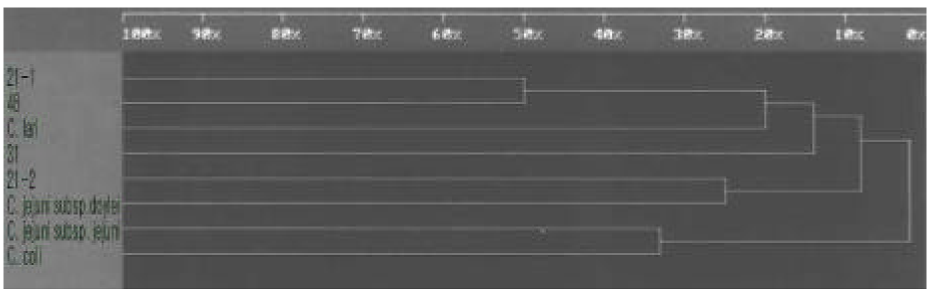


FIG 4. Western blot analysis의 dendrogram Western blot analysis는 Bio-profile image analysis system으로 분석되어졌다.

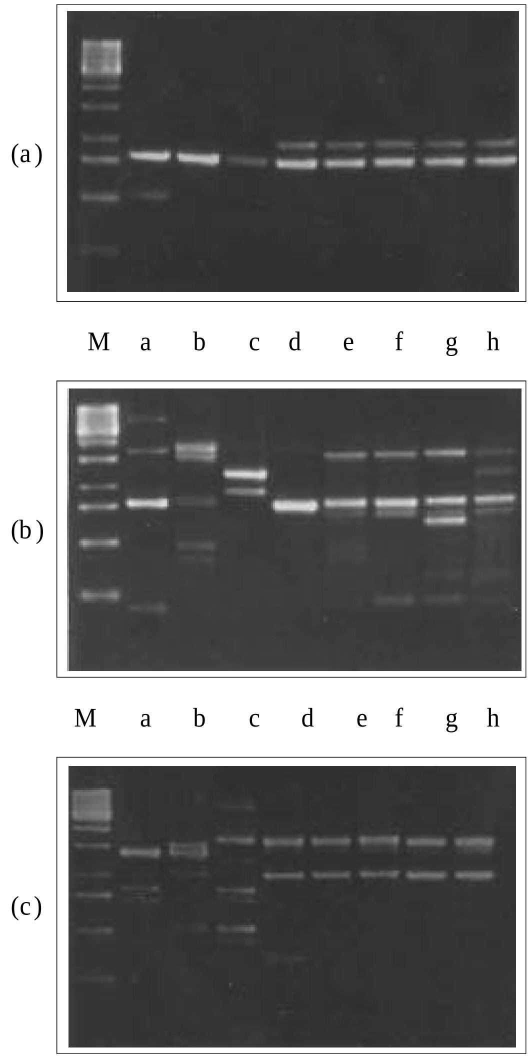


FIG 5. **분리주의** RAPD. RAPD**는** RP3 (a), RP4 (b), and RP5 (c)**으로 수행되어졌으며** products**는** EtBr**로 가시화 했다**. (M, 1 kb DNA ladder; a, *C. jejuni* subsp. *jejuni*; b, *C. jejuni* subsp. *doylei*; c, *C. lari*; d, *C. coli*; e, No. 21-1; f, No. 21-2; g, No. 31; h, No. 48)

a b c

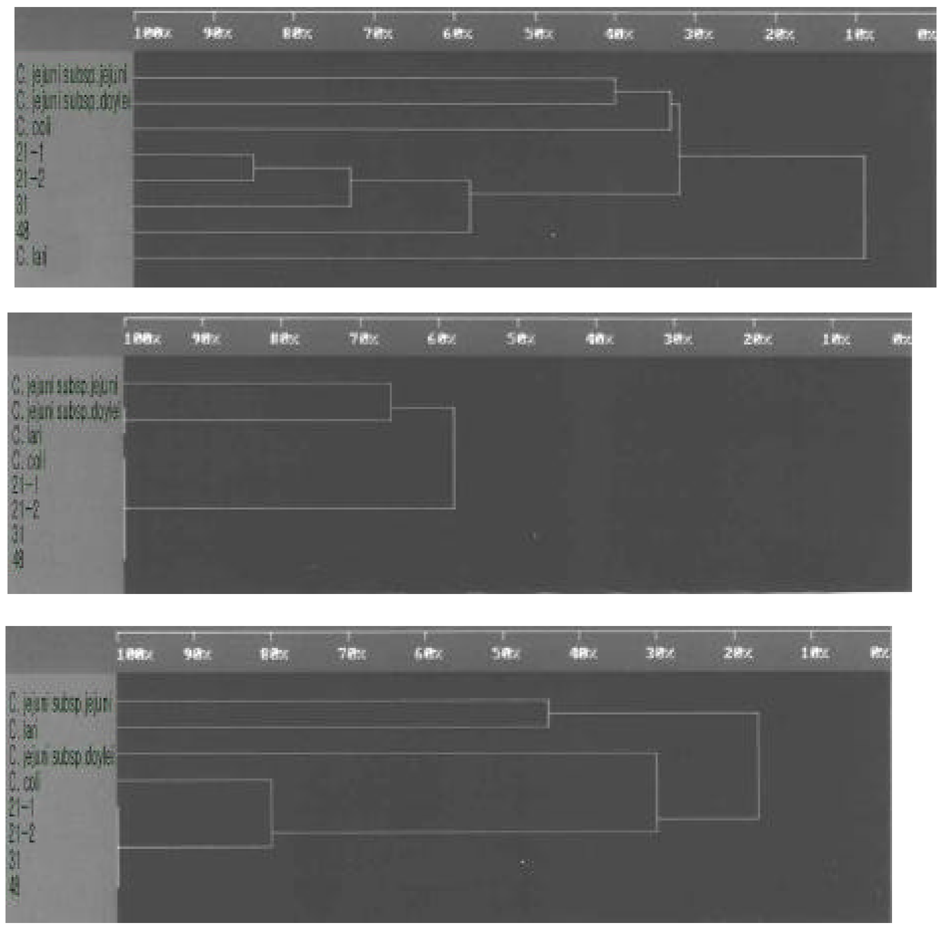


FIG 6. RAPD의 Dendrogram. The RAPD 결과는 Bio-profile image analysis system으로 분석하였다.

```
hel21-1      ----------------TGGC-GGC-G-TGC-CT--AATACATGCAA-GTC-GAACG--AT
hel21-2      ----------------TGGC-GGC-G-TGC-CT--AATACATGCAA-GTC-GAACG--AT
hel31        ----------------TGGC-GGC-G-TGC-CT--AATACATGCAA-GTC-GAACG--AT
hel48        ----------------TGGC-GGC-G-TGC-CT--AATACATGCAA-GTC-GAACG--AT

hel21-1      ------------GAA---------------------------------------------
hel21-2      ------------GAA---------------------------------------------
hel31        ------------GAA---------------------------------------------
hel48        ------------GAA---------------------------------------------

hel21-1      ---------------AGCTTCTAGCT---------------------------------T
hel21-2      ----------------GCTTCTAGCT---------------------------------T
hel31        ----------------GCTTCTAGCT---------------------------------T
hel48        ---------------AGCTTCTAGCT---------------------------------T

hel21-1      G-CTAGAAAGT-------------------------------------------------
hel21-2      G-CTAGNAAGT-------------------------------------------------
hel31        G-CTAGAAAGT-------------------------------------------------
hel48        G-CTAGAAAGT-------------------------------------------------

hel21-1      -----------------------GG---------AT--TAGTGGCGC--A-CG-GGTGAGT
hel21-2      -----------------------GG---------AT--TAGTGGCGC--A-CG-GGTGAGT
hel31        -----------------------GG---------AT--TAGTGGCGC--A-CG-GGTGAGT
hel48        -----------------------GG---------AT--TAGTGGCGC--A-CG-GGTGAGT

hel21-1      ---AAG-GT-ATAGTTAA--TCT-GC-CCTA---C-ACAA-G-AGGAC-AA-CAG-----
hel21-2      ---AAG-GT-ATAGTTAA--TCT-GC-CCTA---C-ACAA-G-AGGAC-AA-CAG-----
hel31        ---AAG-GT-ATAGTTAA--TCT-GC-CCTA---C-ACAA-G-AGGAC-AA-CAG-----
hel48        ---AAG-GT-ATAGTTAA--TCT-GC-CCTA---C-ACAA-G-AGGAC-AA-CAG-----

hel21-1      ---------------------TT-G-GAAA-C-GACT-G-CTAATACT-CT-AT-ACT--
hel21-2      ---------------------TT-G-GAAA-C-GACT-G-CTAATACT-CT-AT-ACT--
hel31        ---------------------TT-G-GAAA-C-GACT-G-CTAATACT-CT-AT-ACT--
hel48        ---------------------TT-G-GAAA-C-GACT-G-CTAATACT-CT-AT-ACT--

hel21-1      CCTGC--T-T---AAC---ACAA----GTT----GA-GT---------AGG--GAAA---
hel21-2      CCTGC--T-T---AAC---ACAA----GTT----GA-GT---------AGG--GAAA---
hel31        CCTGC--T-T---AAC---ACAA----GTT----GA-GT---------AGG--GAAA---
hel48        CCTGC--T-T---AAC---ACAA----GTT----GA-GT---------AGG--GAAA---

hel21-1      ---G------------------TTTTT----------------C-G--GTG--------T
hel21-2      ---G------------------TTTTT----------------C-G--GTG--------T
hel31        ---G------------------TTTTT----------------C-G--GTG--------T
hel48        ---G------------------TTTTT----------------C-G--GTG--------T

hel21-1      AGG--ATG---AGACTAT------AT-----AGT--ATCA-G-CTA-G---TTGG-TA-A
hel21-2      AGG--ATG---AGACTAT------AT-----AGT--ATCA-G-CTA-G---TTGG-TA-A
hel31        AGG--ATG---AGACTAT------AT-----AGT--ATCA-G-CTA-G---TTGG-TA-A
hel48        AGG--ATG---AGACTAT------AT-----AGT--ATCA-G-CTA-G---TTGG-TA-A

hel21-1      G-GTAAT-GG-CTTACC-AA-GGC-TA-TGA------------CG-CTT-AA-CTGG-TC
hel21-2      G-GTAAT-GG-CTTACC-AA-GGC-TA-TGA------------CG-CTT-AA-CTGG-TC
hel31        G-GTAAT-GG-CTTACC-AA-GGC-TA-TGA------------CG-CTT-AA-CTGG-TC
hel48        G-GTAAT-GG-CTTACC-AA-GGC-TA-TGA------------CG-CTT-AA-CTGG-TC

hel21-1      T-G-AGA-GGAT----------------------GATCAG-TCAC-A-CTGG-A-ACTGA-G
hel21-2      T-G-AGA-GGAT----------------------GATCAG-TCAC-A-CTGG-A-ACTGA-G
hel31        T-G-AGA-GGAT----------------------GATCAG-TCAC-A-CTGG-A-ACTGA-G
```

```
hel21-1      A-CACG--GTCCAG-A--CTCC-TACG--GGAG--GC-AGC-A-GT-AGGG-AATATTGC
hel21-2      A-CACG--GTCCAG-A--CTCC-TACG--GGAG--GC-AGC-A-GT-AGGG-AATATTGC
hel31        A-CACG--GTCCAG-A--CTCC-TACG--GGAG--GC-AGC-A-GT-AGGG-AATATTGC
hel48        A-CACG--GTCCAG-A--CTCC-TACG--GGAG--GC-AGC-A-GT-AGGG-AATATTGC

hel21-1      GCAAT--GGGG-GAAA-CCC-TGACGCA--GCAACGCCGC-GTG-G-AG-GATGAC--AC
hel21-2      GCAAT--GGGG-GAAA-CCC-TGACGCA--GCAACGCCGC-GTG-G-AG-GATGAC--AC
hel31        GCAAT--GGGG-GAAA-CCC-TGACGCA--GCAACGCCGC-GTG-G-AG-GATGAC--AC
hel48        GCAAT--GGGG-GAAA-CCC-TGACGCA--GCAACGCCGC-GTG-G-AG-GATGAC--AC

hel21-1      TT--TT-CG--GA-GCGTAAA---------------------CTCCTTTT-CT-TAGG-GA
hel21-2      TT--TT-CG--GA-GCGTAAA---------------------CTCCTTTT-CT-TAGG-GA
hel31        TT--TT-CG--GA-GCGTAAA---------------------CTCCTTTT-CT-TAGG-GA
hel48        TT--TT-CG--GA-GCGTAAA---------------------CTCCTTTT-CT-TAGG-GA

hel21-1      A--G---------------------AATTC------------------------------
hel21-2      A--G---------------------AATTC------------------------------
hel31        A--G---------------------AATTC------------------------------
hel48        A--G---------------------AATTC------------------------------

hel21-1      ------T-GA-CGGT-A-CCT-A-AGG-AATAA-G----------C-ACC-GGCT-AACTC
hel21-2      ------T-GA-CGGT-A-CCT-A-AGG-AATAA-G----------C-ACC-GGCT-AACTC
hel31        ------T-GA-CGGT-A-CCT-A-AGG-AATAA-G----------C-ACC-GGCT-AACTC
hel48        ------T-GA-CGGT-A-CCT-A-AGG-AATAA-G----------C-ACC-GGCT-AACTC

hel21-1      C-GTGCCA--GCAGCCGCGGTAAT-ACGGAG-GGTGC--AAGCGTTACTC-GGAATCACT
hel21-2      C-GTGCCA--GCAGCCGCGGTAAT-ACGGAG-GGTGC--AAGCGTTACTC-GGAATCACT
hel31        C-GTGCCA--GCAGCCGCGGTAAT-ACGGAG-GGTGC--AAGCGTTACTC-GGAATCACT
hel48        C-GTGCCA--GCAGCCGCGGTAAT-ACGGAG-GGTGC--AAGCGTTACTC-GGAATCACT

hel21-1      -GGGCGTAAAGGGC-GCG-TAG-GCG---GATT-ATC-AAGTCTC---TTGTG-AAATC-
hel21-2      -GGGCGTAAAGGGC-GCG-TAG-GCG---GATT-ATC-AAGTCTC---TTGTG-AAATC-
hel31        -GGGCGTAAAGGGC-GCG-TAG-GCG---GATT-ATC-AAGTCTC---TTGTG-AAATC-
hel48        -GGGCGTAAAGGGC-GCG-TAG-GCG---GATT-ATC-AAGTCTC---TTGTG-AAATC-

hel21-1      TAATGGC-TTAA-CCA-TTA-AAC--TGCT-TGGGA-AAC-TGATA-GTC-TA-G-AGTG
hel21-2      TAATGGC-TTAA-CCA-TTA-AAC--TGCT-TGGGA-AAC-TGATA-GTC-TA-G-AGTG
hel31        TAATGGC-TTAA-CCA-TTA-AAC--TGCT-TGGGA-AAC-TGATA-GTC-TA-G-AGTG
hel48        TAATGGC-TTAA-CCA-TTA-AAC--TGCT-TGGGA-AAC-TGATA-GTC-TA-G-AGTG

hel21-1      -----AGGGA-GAGGCAGA-TGGAATT-GGTGGTGTA-GGG-GTAAAA-TCC-GT-AGAT
hel21-2      -----AGGGA-GAGGCAGA-TGGAATT-GGTGGTGTA-GGG-GTAAAA-TCC-GT-AGAT
hel31        -----AGGGA-GAGGCAGA-TGGAATT-GGTGGTGTA-GGG-GTAAAA-TCC-GT-AGAT
hel48        -----AGGGA-GAGGCAGA-TGGAATT-GGTGGTGTA-GGG-GTAAAA-TCC-GT-AGAT

hel21-1      -ATC-ACCAAG-AATA-CCCA--T-T-GC-GAAGGCGA--TCTGCTG-------------
hel21-2      -ATC-ACCAAG-AATA-CCCA--T-T-GC-GAAGGCGA--TCTGCTG-------------
hel31        -ATC-ACCAAG-AATA-CCCA--T-T-GC-GAAGGCGA--TCTGCTG-------------
hel48        -ATC-ACCAAG-AATA-CCCA--T-T-GC-GAAGGCGA--TCTGCTG-------------

hel21-1      ------------------GAACTCAACTGACG-CTAAG-G-------------CG-CGAA
hel21-2      ------------------GAACTCAACTGACG-CTAAG-G-------------CG-CGAA
hel31        ------------------GAACTCAACTGACG-CTAAG-G-------------CG-CGAA
hel48        ------------------GAACTCAACTGACG-CTAAG-G-------------CG-CGAA

hel21-1      A---GC-GTGGG-GAGC-AAA-CA--GGATTA-GATAC-CCT-----GGTA-GTC-CACG
hel21-2      A---GC-GTGGG-GAGC-AAA-CA--GGATTA-GATAC-CCT-----GGTA-GTCCCACG
hel31        A---GC-GTGGG-GAGC-AAA-CA--GGATTA-GATAC-CCT-----GGTA-GTC-CACG
hel48        A---GC-GTGGG-GAGC-AAA-CA--GGATTA-GATAC-CCT-----GGTA-GTC-CACG
```

```
hel21-1    C--C-CTAAAC-GATGTA--CA-CT---------AG-TTGT-TGGGG-TG------CTAG
hel21-2    C--C-CTAAAC-GATGTA--CA-CT---------AG-TTGT-TGGGG-TG------CTAG
hel31      C--C-CTAAAC-GATGTA--CA-CT---------AG-TTGT-TGGGG-TG------CTAG
hel48      C--C-CTAAAC-GATCTA--CA-CT---------AG-TTGT-TGGGG-TG------CTAG

hel21-1    T---------------------------------CATNTCAG-TAATGCA------GCTA
hel21-2    T---------------------------------CATNTCAG-TAATGCA------GCTA
hel31      T---------------------------------CATCTCAG-TAATGCA-------CTA
hel48      T---------------------------------TATTTCAG-TAATGCA------GCTA

hel21-1    ACGCA-TTAA-GTGTACCGCCT-G-GGGACTAC-GGTC-GCAA-GATT--AAAACTC-AA
hel21-2    ACGCA-TTAA-GTGTACCGCCT-G-GGGACTAC-GGTC-GCAA-GATT--AAAACTC-AA
hel31      ACGCA-TTAA-GTGTACCGCCT-G-GGGAGTAC-GGTC-GCAA-GATT--AAAACTC-AA
hel48      ACGCA-TTAA-GTGTACCGCCT-G-GGGAGTAC-GGTC-GCAA-GATT--AAAATTC-AA

hel21-1    A-GGAATAG-ACGGG-GA-CCC--GC-A--CA-AGCGGTGG-AGCA-T-GT-GGT-TTAA
hel21-2    A-GGAATAG-ACGGG-GA-CCC--GC-A--CA-AGCGGTGG-AGCA-T-GT-GGT-TTAA
hel31      A-GGAATAG-ACGGG-GA-CCC--GC-A--CA-AGCGGTGG-AGCA-T-GT-GGT-TTAA
hel48      A-GGAATAG-ACGGG-GA-CCC--GC-A--CA-AGCGGTGG-AGCA-T-GT-GGT-TTAA

hel21-1    -TT-CG-AGGATACG--CGAA-GAA-CCTTA-CCTGGGC-TTGATA---TC---------
hel21-2    -TT-CG-AGGATACG--CGAA-GAA-CCTTA-CCTGGGC-TTGATA---TC---------
hel31      -TT-CG-AAGATACG--CGAA-GAA-CCTTA-CCTGGGC-TTGATA---TC---------
hel48      -TT-TG-AGGATACG--CGAA-GAA-CCTTA-CCTGGGC-TTGATA---TC---------

hel21-1    ---C---TAAG----AACCT-TTTA--GAGA--TAA-G-AGGG----TG---------CT
hel21-2    ---C---TAAG----AACCT-TTTA--GAGA--TAA-G-AGGG----TG---------CT
hel31      ---C---TAAG----AACCT-TTTA--GAGA--TAA-G-AGGG----TG---------CT
hel48      ---C---TAAG----AACCT-TTTA--GAGA--TAA-G-AGGG----TG---------CT

hel21-1    AAG-CT------------------------------------------------------
hel21-2    AG--CT------------------------------------------------------
hel31      AAG-CT------------------------------------------------------
hel48      AAG-CT------------------------------------------------------

hel21-1    --------------------TG--CTAG----------AA---CTTAG-AGA--------
hel21-2    --------------------TG--CTAG----------AA---CTTAG-AGA--------
hel31      --------------------TG--CTAG----------AA---CTTAG-AGA--------
hel48      --------------------TG--GTAG----------AA---ATTAG-AGA--------

hel21-1    -------------------------------------------CA--GGT-GCTGCACGG
hel21-2    -------------------------------------------CA--GGT-GCTGCACGG
hel31      -------------------------------------------CA--GGT-GCTGCACGG
hel48      -------------------------------------------CA--GGT-GCTGCACGG

hel21-1    CTGTCG-TCA-GCT---CG-TGTC-GTGA-GATGT-TGGG-TTAA-GT-CCCGCAA----
hel21-2    CTGTCG-TCA-GCT---CG-TGTC-GTNA-GATGT-TGGG-TTAA-GT-CCCGCAA----
hel31      CTGTCG-TCA-GCT---CG-TGTC-GTGA-GATGT-TGGG-TTAA-GT-CCCGCAA----
hel48      CTGTCG-TCA-GCT---CG-TGTC-GTGA-GATGT-TGGG-TTAA-GT-CCCGCAA----

hel21-1    -----CGAGC-GCAAACCCAG-TA--TTTAG--TTGC-TAA-CGG---------------
hel21-2    -----CGAGC-GCAAACCAAG-TT--TTTAG--TTGC-TAA-CGG---------------
hel31      -----CGAGC-GCAACCCACG-TA--TTTAG--TTGC-TAA-CGG---------------
hel48      -----CGAGC-GCAACCCACG-TA--TTTAG--TTGC-TAA-CGG---------------

hel21-1    ------------TTCGG-------------------------------------------
hel21-2    ------------TTCGG-------------------------------------------
hel31      ------------TTCGG-------------------------------------------
hel48      ------------TTCGG-------------------------------------------
```

```
hel21-1   -------------CCGAG-CA-CT-C-T-AAA-TA-GACTGCCTTC-G--TAA-GGAG--
hel21-2   -------------CCGAG-CA-CT-C-T-AAA-TA-GACTGCCTTC-G--TAA-GGAG--
hel31     -------------CCGAG-CA-CT-C-T-AAA-TA-GACTGCCTTC-G--TAA-GGAG--
hel48     -------------CCGAG-CA-CT-C-T-AAA-TA-GACTGCCTTC-G--TAA-GGAG--

hel21-1   G-AGG-A-AGG-TG-TGG-ACG-ACG--TC-AAGTC-ATCAT-G-GC-CCTTATG-CC-C
hel21-2   G-AGG-A-AGG-TG-TGG-ACG-ACG--TC-AAGTC-ATCAT-G-GC-CCTTATG-CC-C
hel31     G-AGG-A-AGG-TG-TGG-ACG-ACG--TC-AAGTC-ATCAT-G-GC-CCTTATG-CC-C
hel48     G-AGG-A-AGG-TG-TGG-ACG-ACG--TC-AAGTC-ATCAT-G-GC-CCTTATG-CC-C

hel21-1   A-GGGC-G-ACA-CACGTG--CTACAAT--GGCA-TATA--CAATGAGA-C-GC-AA-TA
hel21-2   A-GGGC-G-ACA-CACGTG--CTACAAT--GGCA-TATA--CAATGAGA-C-GC-AA-TA
hel31     A-GGGC-G-ACA-CACGTG--CTACAAT--GGCA-TATA--CAATGAGA-C-GC-AA-TA
hel48     A-GGGC-G-ACA-CACCTG--CTACAAT--GGCA-TATA--CAATGAGA-C-GC-AA-TA

hel21-1   C-CG-CGAGGTG------------GA-GCAAT-TCTAT--AAA-ATAT-GTC-CCAGTTCG
hel21-2   C-CG-CGAGGTG------------GA-GCAAA-TCTAT--AAA-ATAT-GTG-CCAGTTCG
hel31     C-CG-CGAGGTG------------GA-GCAAA-TCTAT--AAA-ATAT-GTC-CCAGTTCG
hel48     C-CG-CGAGGTG------------GA-GCAAA-TCTAT--AAA-ATAT-GTC-CCAGTTCG

hel21-1   GATTGTTCTC-TGCAACTC-GAGAGCA-TGAAGC-CGGAAT-CGC--TAGTA-AT-CGT-
hel21-2   GATTGTTCTC-TGCAACTC-GAGAGCA-TGAAGC-CGGAAT-CGC--TAGTA-AT-CGT-
hel31     GATTGTTCTC-TGCAACTC-GAGAGCA-TGAAGC-CGGAAT-CGC--TAGTA-AT-CGT-
hel48     GATTGTTCTC-TGCAACTC-GAATGCA-T-AAGC-CGGAAT-CGC--TAGTA-AT-CGT-

hel21-1   AGA-TC-A-GCCAT-GCTA-CGGTG-AATAC-GTTCCCGGGTCTTGTA-----CTCACC--
hel21-2   AGA-TC-A-GCCAT-GCTA-CGGTG-AATAC-GTTCCCGGGTCTTGTA-----CTCACC--
hel31     AGA-TC-A-GCCAT-GCTA-CGGTG-AATAC-GTTCCCGGGTCTTGTA-----CTCACC--
hel48     AGA-TC-A-GCCAT-GCTA-CGGTG-AATAC-GTTCCCGGGTCTTGTA-----CTCACC--

hel21-1   GCCC-GTC-ACA-----CCA-TGGGA--GTTGA-TTTCACTC-GAAG-CCGG-AAT-A-C
hel21-2   GCCC-GTC-ACA-----CCA-TGGGA--GTTGA-TTTCACTC-GAAG-CCGG-AAT-A-C
hel31     GCCC-GTC-ACA-----CCA-TGGGA--GTTGA-TTTCACTC-GAAG-CCGG-AAT-A-C
hel48     ACCC-GTC-ACA-----CCA-TGGGA--GTTGA-TTTCACTC-GAAG-CCGG-AAT-A-C

hel21-1   T----A--------------------------------------AAC------------------
hel21-2   T----A--------------------------------------AAC------------------
hel31     T----A--------------------------------------AAC------------------
hel48     T----A--------------------------------------AAC------------------

hel21-1   ----------------------------T-AG-T-TA-CC-GT-CCACAG-----------------
hel21-2   ----------------------------T-AG-T-TA-CC-GT-CCACAG-----------------
hel31     ----------------------------T-AG-T-TA-CC-GT-CCACAG-----------------
hel48     ----------------------------T-AG-T-TA-CC-GT-CCACAG-----------------
```

Fig 7. 분리균의 16S rRNA 염기서열 비교

제 8 장 돼지 위장병균의 분리, 감염 및 예방 실험

제 1 절 서론

돼지의 위궤양을 일으키는 원인균으로는 효모와 박테리아가 있다고 생각된다. 박테리아로는 특히 Campylobacter와 Helicobacter가 원인균으로 생각되고 있다. 현재 돼지의 장관에서 분리된 Helicobacter로 Helicobacter hyointestinalis가 있으며 Helicobacter gastrospillium도 보고 된 바 있다. 본 연구에서는 병변을 보이는 부위에서 원인균을 분리하고 이를 Koch의 가설에 맞는 지 감염실험으로 확인하고 이들 균의 total vaccine에 의한 예방 실험을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. Yeast 분리 및 배양조건

도축장에서 갓 도살된 돼지 (6개월)의 위에서 병변을 보이는 부분을 transport medium (tr-ansport medium stuart or saline)에 넣어 냉장상태로 보관하여 두 시간 거리의 실험실로 옮겼다. 이를 소독된 razor blade로 유리 슬라이드에서 잘게 썰은 후 이스트와 곰팡이를 분항리하기 위해서는 PDA(Difco) 배지에 접종한 후 25℃에서 배양하였다. 2주간 배양하면서 생성된 colony를 현미경과 생화학 검사를 통하여 Candida를 분리하였다.

2. 분리된 Yeast의 재 감염 여부 확인

돼지 위에서 분리해 낸 Candida가 쥐에서 위궤양을 야기하는지 확인하기 위해, 분리된 Candida를 PDA 배지에서 배양한 후, Candida 2 × 107 CFU/ 0.5 ml PBS를 SCR mouse에 경구 투여하였다. 2 주후, mouse 위 조직을 slide glass에 문지른 후, gram staining하여 광학현미경(1000 배)으로 감염여부를 확인했다.

3. Bacteria 분리 및 배양 조건

돼지 위장병균이 감염된 mouse의 위를 소독된 razor blade로 유리 슬라이드에서 잘게 썰은 후, 각각 fungizone (2.5 g/ml amphotericin B), Skirrow's supplement (0.016 mg/ml polymyxin B, 0.5 mg/ml vancomycin, 0.25 mg/ml trimethoprim)]을 함유하는 Brucella medium with 10% horse serum, Modified chocolate medium(GC medium base, 1% hemoglobin, 1% isovitalex), BHI medium with 10% sheep blood, columbia medium with 10% sheep blood 등에 도말하여 37℃, 10% CO_2 항온기에서 배양하였다. 또한 위 점막 상태를 만들기 위해 BHI medium with 10% human O-type blood와 columbia medium with 10% human O-type blood 에 감염조직을 문지른 후, 동일한 조성의 배지에 0.3 % agar를 넣어 만든 반 고체배지로 덮어 37℃, 10 % CO_2 항온기에서 배양하였다.

4. 분리 균주의 Chracterization

분리된 균주는 gram negative 균으로 urease, oxidase, catalase 모두 양성 이었다. 이 균으로 Helicobacter SSP. PCR을 수행하였다. Helicobacter SSP. PCR은 Helicobacter pylori species-specific antigen sequence를 기초로 만들어진 forward primer는 5'-TGGCGTGT CTATTGACAGCGAGC-3' 와 reverse primer는 5'-CCTGCTGGGCATACTTCACCA TG-3' 를 사용하였다. PCR reaction mixture는 분리해낸 균을 PCR tube에 소량 넣어 104초간 microwave를 조사한 후, 10 × buffer 5 ㎕, dNTP 4 ㎕, 100 pmol/㎕ primer를 각각 0.5 ㎕, 1 U Taq polymerase을 넣어 총 50 ㎕가 되게 하여 PCR을 수행했다.

PCR 조건은 94℃에서 5분간 1회, 94℃에서 1분, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분을 39회, 72℃에서 5분간 1회 순환하는 것이다. PCR produt는 0.8 % agarose gel에 전기영동 되어, EtBr로 가시화 하였다.

5. *Candiada* 와 Isolate 8 (*Helicobacter*) 백신 준비

돼지위로부터 분리한 Candida를 PDA 배지에서 배양한 후 모아 PBS buffer로 세척 후 3 회 French Press를 통과하여 파쇄하였다. Candida의 total protein을 10% formalin에 48 시간 고정한 후, PBS buffer로 3 회(10000rpm에서 10min 원심 분리함으로) 세척하였다. Isolate 8 또한 위와 같은 방법으로 고정하여 mouse 한 마리 당 약 1 ㎎/㎖ 되게 경구 투여하였다.

6. *Candiada*와 Isolate 8 (*Helicobacter*) 백신에 의한 감염 억제 실험

고정한 Candiada와 Isolate 8의 total protein 경구 투여는 3주 간격으로 2회 실시하였고, 각각 Candiada와 Isolate 8을 2 × 107 CFU/ 0.5 ㎖ 과 1.5 × 109 CFU/ 0.5 ㎖ 되게 경구 투여하여 감염시킴으로 감염 억제 여부를 확인했다. 또한 *Candida*와 분리균주 8번을 French Press에 3회 통과한 후 10% formalin에 고정하여 total cell을 경구 백신으로 3주간 2

회 1 mg/ 0.5 ml 투여한 후. 각각 *Candiada*와 분리균주 8번을 2 × 10^7 CFU/ 0.5 ml 과 1.5 × 10^9 CFU/ 0.5 ml 되게 경구 투여하여 감염시킴으로 감염 억제 여부를 확인하고자 한다..

제 3절 결과 및 고찰

돼지의 위궤양을 일으키는 bacteria 및 fungi를 찾는 과정에서 궤양보다는 각화된 위 조직에서 Candida를 분리하게 되었다. 그림 1은 돼지 위에서 분리된 Candida중 campylobacter 가 분리되었던 위에서 함께 분리된 Candida를 mouse에 경구 투여한 후 2 뒤, 위 조직에서 감염 여부가 확인되었다. 또한 위장병균을 분리하기 위해 다양한 modified blood agar배지를 사용하여 37℃ 10% 항온기에서 배양했을 때 H. pylori의 대표적인 특징인 urease catalase oxidase 가 양성인 균주를 columbia blood agar 배지에서 얻을수 있었다. 그러나 일반적으로 Helicobacter ssp.로 보고된 굽은 모양의 rod나 나선형 rod균은 아니었다. 그러나 H. pylori urease A gene을 증폭하는 primer를 이용하여 분리균을 PCR 하였을 때 411bp fragment를 얻었다(그림 2.) 또한 분리균의 증폭된 urease A fragment의 염기서열을를 H. pylori의 염기서열과 비교했을 때,(그림 3.) 거의 유사하였다(약 95%유사). 또한 장내 세균 중 urease 양성인 Yersinia와 Proteus의 urease A와 비교했을 때 urease 염기서열이 다름을 확인하였다. 또한 분리균을 Helicobacter SSP PCR을 하여 확인했을 때 297 bp의 H. pylori fragment는 없으나, 4개의 fragment를 증폭한 것을 보여준다(그림 4.)

이상의 돼지 병변에서 분리한 Candida와 Gastrospirillum 감염조직에서 분리한 분리균 8번을 각각 107 과 109 CFU/0.5 ml 경구 투여하여 감염하였을 때 각각 위 조직에 감염된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 감염된 위조직을 slide glass에 도말하여 관찰할 때, 감염시킨 균들이 위궤양을 야기할 정도로 빠르게 군집을 이루는 것 같지 않다. 그러나

Gastrospirillum이 많이 감염되어있는 mouse 위 조직에서는 Candida만 감염시킨 경우 보다 Candida가 군집을 잘 이룰뿐더러 활발히 출아하는 것이 보여진다. 즉 Candida가 분리된 곳도 각화된 병변이었고, Gastrospilillum 감염이 되어있는 위 조직에서 활발히 증식하는 것을 볼 때, 2차 감염에 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.

또한 Candida와 분리균주 8번을 French Press에 3회 통과한 후 10% formalin에 고정하여 total cell을 경구 백신으로 3주간 2회 1 ㎎/ 0.5 ㎖ 투여한 후. 각각 Candiada와 분리균주 8번을 2 × 107 CFU/ 0.5 ㎖ 과 1.5 × 109 CFU/ 0.5 ㎖ 되게 경구 투여하여 감염시킴으로 3주후, 감염 억제 여부를 확인했으나, Candida 와 분리균주 8 번이 경구백신을 투여치 않은 정상 위에서도 활발히 자라주지 않음으로 유의적 결과를 도출하지 못하였다.

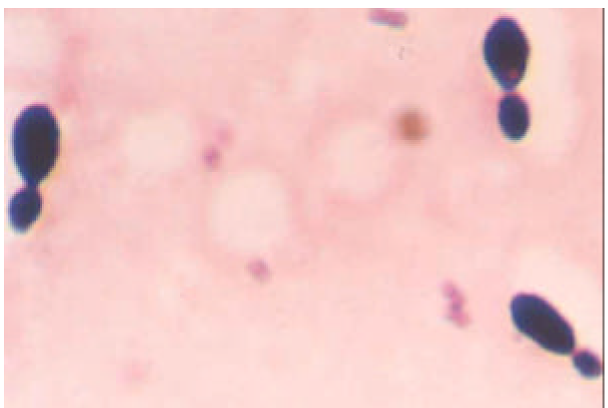


그림 1. Candida 현미경 사진

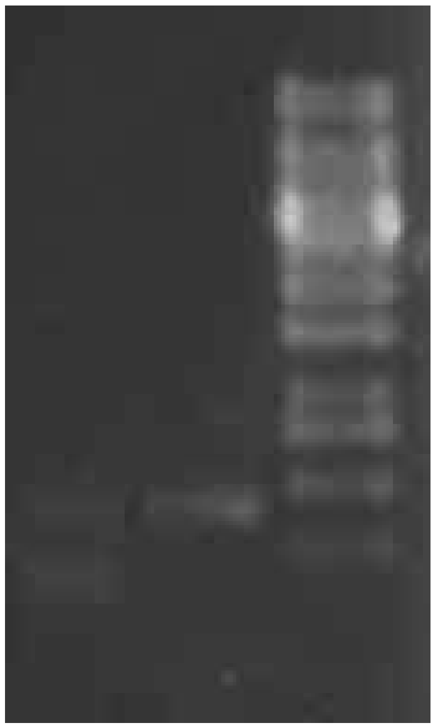


그림 2. Isolate 8 의 Urease PCR

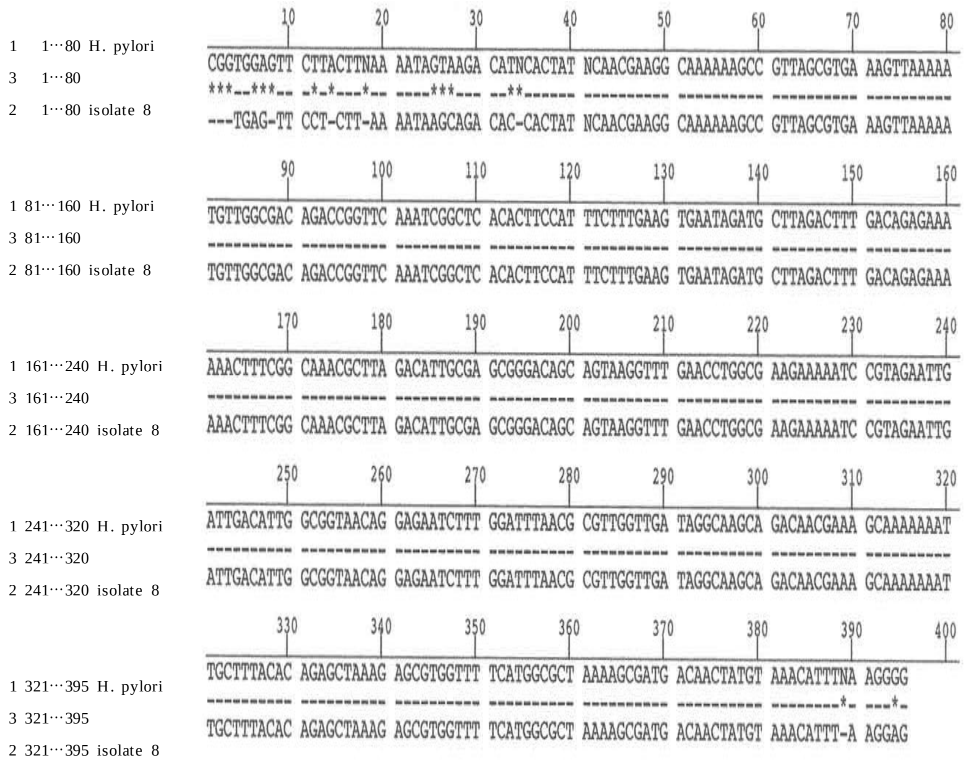


그림 3. 분리된 8번 과 H. pylori Urease sequence 비교

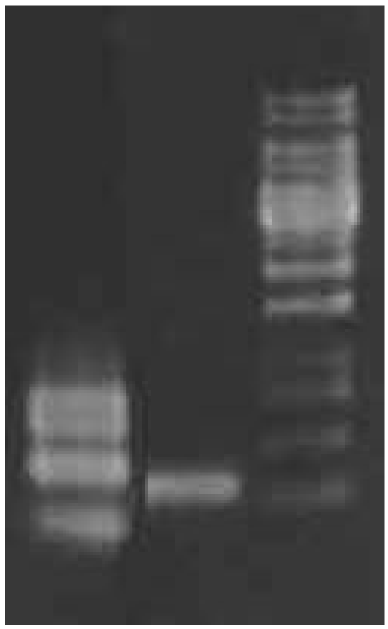


그림 4. Isolate 8 의 *Helicobacter* SSP. PCR

제 9 장 *Lactobacillus acidophilus*에 의한 *Helicobacter pylori* Adherence억제 검색

제 1 절 서론

Helicobacter spp.는 일반적으로 인간과 동물의 위장관에서 서식한다. Helicobacter pylori속은 사람에게 있어 만성위염과 위궤양을 유발하고 최근에는 위암과 gastric mucosa associated lymphoma로 발전한다고 보고되고 있다(Dubois, 1995).

최근 Lactobacilli가 H pylori.를 포함한 병원균에 대한 생균제재로 보고되어졌다. Lactobacilli는 in vitro상에서 H pylori의 성장을 억제할 수 있고, 체내에서 H pylori에 대한 antagonistic activity를 가지고 있다(Coconnier et al., 1998). 예를 들어 L. salivarius는 H pylori에 대한 생균제재로 제안되어져왔으며, 그 이유는 L. salivarius는 많은 양의 lactic acid를 생산하기 때문으로 생각되어 졌다. H pylori의 성장을 억제하고 염증 반응을 감소시키는 생균제재로서의 L. salivarius의 효능은 H pylori-infected gnotobiotic murine model을 사용한 in vivo 실험에서 증명되었다(Aiba et al., 1998). H pylori의 감염 후 L. salivarius를 투여하면 H pylori의 colonization을 감소시킬 수 있다. 게다가 이러한 결과를 통해 Lactobacillus가 H pylori의 재감염을 감소시킨다는 것이 보고되어져 왔다(Kabir et al.,1997). H pylori가 감염된 환자가 살아있는 L. acidophilus가 함유된 acidophilus milk를 섭취하였을 때, H pylori의 재감염이 감소한다는 것이 보고되어졌다(Coconnier et al., 1998). L. acidophilus의 배양액(SCS) 역시 H pylori의 viabilty를 감소시킨다는

것이 밝혀졌다. 또한 이러한 배양액은 H felis의 감염을 감소시키고, H pylori와 H felis urease activiy 또한 억제하였다. 더욱이 L. acidopilus strain LA1의 배양액(SCS)은 H pylori에 대항한 활성을 가지고 있다. 이 결과는 사람에 있어 H pylori에 대항한 생균재제로서 Lactobacillus의 가능성을 제시하는 것이다. Lactic acid 와 antibacterial agents를 만드는 것 외에도 lactobacillus의 점막 흡착 가능성이 제기 되었으며, 이 성질이 gastric 위점막에의 H pylori adherence를 억제하는 요인이 있을는지 모른다(Midolo et al., 1995).

본 연구에서는 O형 적혈구와 위 점막사이에서 동시에 발현되는 H pylori에 대한 recepter인 glycolipid를 점적한 enzyme-linked immunoabsorbent assay method를 개발하여(Alkout er al., 1997; Boren et al., 1993; Heneghan et al., 1998; Kobayashi et al., 1991; Kobayashi et al., 1993). 다양한 한국인에서 분리한 L. acidophilus 와 L. casei의 H pylori의 부착 억제활성여부를 측정하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 균주 및 시약

Helicobacter pylori ATCC43504는 10% horse serum Brucella 고체배지[fungizone (2.5 g/ml amphotericin B), Skirrow's supplement (0.016 mg/ml polymyxin B, 0.5 mg/ml vancomycin, 0.25 mg/ml trimethoprim)]에 접종하여, 5-10% CO_2 항온기에서 48 시간 배양하였다. 박테리아를 긁어서 모은 후 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 두 번 세척하고 실험에 사용할 때까지 -20oC에 보관한다. L. acidophilus HY0404, HY2104, HY7001, HY7007, L. casei HY2782는 한국요구르트에서 제공되었고, Lactobacillus는 MRS broth에서 배양한 후 원심분리로 cell을 모아 PBS에

두 번 세척한 후 사용할 때까지 -20oC에 보관하였다. 배지는 Difco (Detroit, MCH, U.S.A)에서 구입하였고, TLC plates는 Merck (Kieselgel 60, EM Separations, Gibbstown, NJ, U.S.A)에서 구입하였으며, second antibody conjugated with alkaline phosphatase, amphotericin B, and Skirrow's supplement를 포함한 다른 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다.

2. *H. pylori*에 대한 antiserum 준비

H. pylori cells은 10% formalin에 고정하여, 토끼에 (NewZealand White Rabbit, male) 두 번 boost하였다. Blood는 토끼의 귀로부터 bleeding하여 얻었다. Serum은 분주하여 -20oC에 보관하였다.

3. 적혈구로부터 glycolipid 분리

Glycolipid는 사람의 O형 적혈구에서 분리하였다(Boren et al., 1993). 사람의 O형 적혈구를 소량의 물에 풀은 후 20배의 chloroform-methanol mixture (2:1, v/v)를 가하여 추출하였다. 지방층(아래층)을 모아서 rotary vacuum evaporator로 건조하였다. 잔여물을 2% methanol을 함유한 chloroform에 용해시후, silicic acid로 평형시킨 column에 얹었다. (bed volume = 20 ml) chloroform, acetone-methanol (3:1, v/v)과 methanol 순으로 각각 10 bed vilume으로 용출하였다. methanol 분획을 rotary vacuum evaporator로 건조하여 최소량의 methanol에 용해시켜 -70℃에 저장하였다.

4. TLC plate에서 *Helicobacter* attachment Assay

추출한 glycolipid (200 ng in 5 μl)를 thin layer chromatography (TLC) plate에 점적하였다. plate는 비 특이적 결합을 막기 위해 3% gelatin를 함유한 100 mM Tris (pH 7.6)에 37℃에서 두시간동안 담궜다. plate는 동일 완충용액으로 2회 세척하고, Lactobacillus (2.4 X 108 CFU)를 함유한 동일 buffe에 37℃에서 2 시간 incubation 시켰다. 동일 buffer로 3회 w세척후 plate는 H pylori (7.5 x 108 CFU)가 들어있는 10 ml buffer로 옮겨 37℃에서 2시간 부드럽게 흔들었다. 2 시간 후 동일 buffer로 10분씩 3번 세척한 후 H pylori에 대한 rabbit antiserum을 buffer에 1: 600으로 희석되게 첨가 후 상온에서 2시간동안 부드럽게 흔들어주었다. 1 st antibody를 제거한 후 antirabbit IgG conjugated alkaline phosphatase를 1: 1000으로 희석되게 첨가한 후 상온에서 1 시간동안 incubation 하였다. 발색반응은 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT)를 첨가하여 수행하였다.

5. TLC plate에서의 발색 측정

발색되어진 부위의 silica를 TLC plate에서 razor blade를 이용하여 긁어낸 후 2% SDS에 혼탁액을 만들고, water bath에서 boiling하여 resin에서 color를 추출하였다. 발색정도는 pectrophotomete로 405 nm에서 측정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

Adherence는 상피세포의 표면에 bacterial colonization하는 필수적

인 요인이며, 진핵세포의 표면에 있는 protein이나 glycoconjugates를 인식하는 adhesine이라는 bacterial surface molecule에 의해 매개된다(Alkout et al., 1997; Kamisago et al., 1996; Lingwood et al., 1993; Slomiany. and Slomiany. 1992). 위점막에 부착된 H pylori를 assay하는 가장 좋은 방법은 H pylori에 대한 항균능력을 가지는 chemical을 assay하기 위해 개발되어진 위 조직을 사용하는 것일 것이다(Meyer-Rosenberg and Berglindh., 1996). 그러나 사람의 위 점막을 얻는 것은 불가능하고 심지어 돼지의 위를 구하는 것도 어렵다. 또한 위 조직배양은 비용도 높으며 결과를 도출하는데 며칠이 소요되며 또한 매번 신선하게 준비해야만 한다.

H pylori의 부착정도를 assay하는 더 쉬운 assay 방법을 개발하기 위해 O형 적혈구로부터 glycolipid를 분리하여 사용하였다. H pylori의 attachment site는 일반적으로 O형 적혈구 표면에 발현된 Lewis antigen B로 알려져 있으며(Clyne and Drumm, 1997; Hemalatha et al., 1991; Heneghan et al., 1991; Kobayashi et al., 1991; Kobayashi, et al., 1993). 단 H pylori attachment에 대해 ABO blood group antigen의 발현에 영향을 준다는 논쟁도 있다(Niv et al., 1996).

다른 양의 glycolipid를 TLC plate에 점적하였을때, 점적한 gycolipid의 양이 증가할수록 H pylori의 binding양도 증가하였다(Fig. 1). 많은 양의 glycolipid는 spot을 번지게 하므로 5 μl를 점적하여 실험하였다. 여러가지 Lactobacilli 첨가시 L. casei를 제외한 L. acidophillus종은 매우 억제효과가 좋았다(Fig. 2). 그림에서 H pylori만 부착한 것이 양성대조군이며 반면 glycolipid에 Lactobacillus만 붙인 것은 음성 대조군이다. 다양한 L. acidophilus를 순차적으로 희석하여 H pylori부착을 억제한 경우, Lactobacillus의 수가 증가하면 H pylori adherence는 반비례적으로 감소하였다(Fig. 3). 즉, 이 결과는 Lactobacillus가 H pylori의 adherence에 억제활성을 가짐을 보여주는 것

이다. 그리고 H pylori의 생장을 다양한 Lactobacillus의 억제활성의 차이는 H pylori adherence를 억제하는 억제활성의 차이에서 기인한다고 생각된다(Coconnie. et al, 1998). L. acidophilus는 lactic acid를 생성하고 H pylori adherence를 억제하는 activity를 동시에 가지기 때문에 H pylori에 대한 생약재제로 가능하다고 생각된다.

본 연구에서 개발한 immunoabsorbent assay는다음과 같은 이유로 돼지의 위 조직을 사용하는 binding assay보다 많은 종류의 Lactobacilli를 검색하는 데에 더 쉽고 좋다.(1) glycolipid는 쉽게 준비되어질 수 있고 오랜기간 보관이 가능하다. 반면 신선한 돼지의 위와 특히 사람의 위는 각 실험 때 마다 얻기 힘들다. (2) 이 실험에서 H pylori와 Lactobacillus 는 생균 상태를 유지할 필요가 없다. 왜냐하면 L. acidophilus는 얼려져있는 상태에서도 inhibitory activity를 유지학기 때문이다. 이것은 얼리거나 동결건조한 L. acidophilus를 H pylori에 대한 생균제재로서 사용되어질 수 있다는 것을 제시한다.

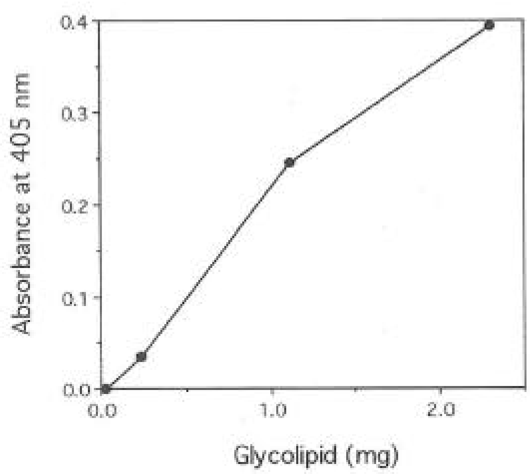


그림 1. TLC plate에 glycolipid에 *Helicobacter*를 부착하였다. glycolipid를 TLC plate에 점적한 후, 7.5 X 10^7 CFU/ml의 *H. pylori*.를 부착시키고 incubation 하였다.

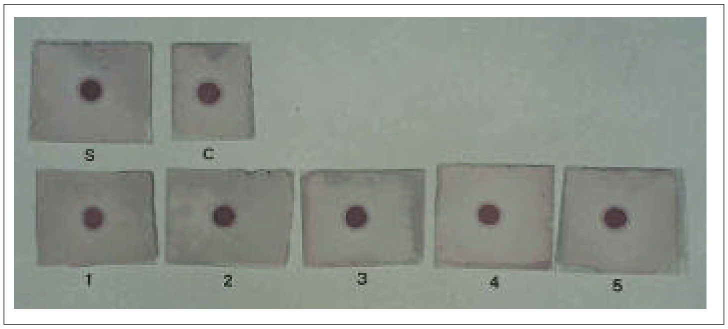


그림 2. **다양한** *L. acidophilus* **가 있을 때** glycolipid **에 부착하는** *Helicobacter*. TLC plates**에** glycolipid**를 점적한 후**, *L. acidophilus* (2.4 X 10^8 CFU/10 ㎖)**에** incubation**한 후**, *H pylori* (7.5 X 10^8 CFU/10 ㎖)**를** incubation**한다**. TLC plates **에 붙은** *H pylori* **의 양은 발색반응을 거쳐 측정한다**.

각각 *H pylori* **만** incubation (H), *L. acidophilus* HY0404**만** incubation(C), *H pylori* **와** *L. acidophilus* HY0404**를 같이** incubation(1), *H pylori* **와** *L. acidophilus* HY2104**를 같이** incubation(2), *H pylori* **와** *L. acidophilus* HY7001**를 같이** incubation(3), *H pylori* **와** *L. acidophilus* HY7007**를 같이** incubation (4), *H pylori* **와** *L. casei* HY2782**를 같이** incubation(5)**한 결과이다**.

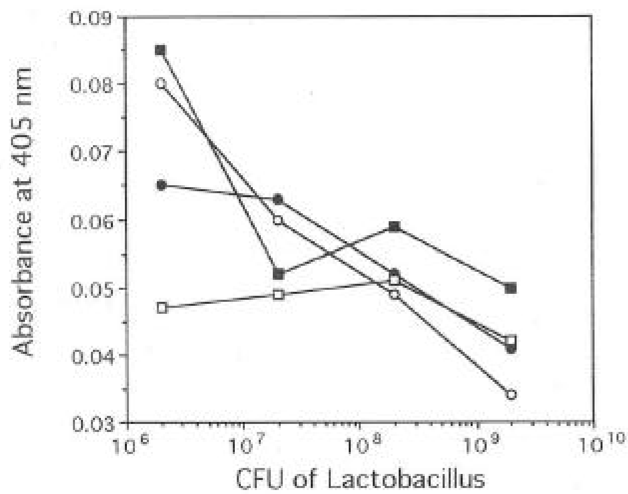


그림 3. 다양한 농도의 *L. acidophilus* **에** *Helicobacter* **부착하였다**. TLC plate**는** *H pylori* (7.5 X 10^7 CFU/ml)**와** incubation **하였다**. **사용된** Symbol**은** ●: *L. acidophilus* HY0404; ○, *L. acidophilus* HY2104; ■, *L. acidophilus* HY7001; □, *L. acidophilus* HY7007**이다**.

제 10 장 Helicobacter pylori urease에 의한 *Helicobacter gastrospillium* 감염 방지 실험

제 1 절 서론

돼지의 위궤양을 일으키는 원인균으로는 효모와 박테리아가 생각된다. 이중 박테리아로는 특히 Campylobacter와 Helicobacter가 의심이 된다. 현재 돼지의 장관에서 분리된 것으로 Helicobacter hyointestinalis(On et al., 1995)가 있으며 Helicobacter gastrospillium (Hänninen et al., 1995)도 보고 된 바 있다. 본 연구에서는 병변을 보이는 부위에서 원인균을 분리하고 이를 Koch's 가설에 맞는 지 감염실험으로 확인하고 이들 균의 total vaccine에 의한 예방 실험을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 병변 조직내 감염균 확인

Mouse의 병변을 보이는 위 조직을 slide glass에 문지른 후, 불꽃에 고정하여 gram staining한 후 유침하여 광학 현미경 (1000배)으로 bacteria 감염를 확인하였다(그림 1).

2. Bacteria 분리 및 배양 조건

돼지 위장병균이 감염된 mouse의 위를 소독된 razor blade로 유리 슬라이드에서 잘게 썰은 후, fungizone (2.5 g/ml amphotericin B), Skirrow's supplement (0.016 mg/ml polymyxin B, 0.5 mg/ml vancomycin, 0.25 mg/ml trimethoprim)와 10% horse serum이 들어있는 Brucella medium, Modified chocolate medium (GC medium base, 1% hemoglobin, 1% isovitalex), BHI (Brain Heart Infusion) medium with 10% sheep blood, Columbia medium with 10% sheep blood 등에 도말하여 37℃, 10% CO_2 항온기에서 배양하였다. gram negative bacteria로 urease · oxidase · catalase에 양성반응을 나타내는 균을 찾아내었다. 또한 점막과 같은 상태를 만들어 주기 위해 BHI medium (with 10% human O-type blood)와 columbia medium (with 10% human O-type blood) 에 감염조직을 문지른 후, 0.3% agar가 첨가된 동일한 조성의 배지(반 고체배지)로 덮어 37℃, 10% CO_2 항온기에서 배양하였다.

3. *Gastrosprillum* 감염 조직의 urease PCR

Mouse의 병변이 보이는 위 조직을 절제하여 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 0.5 ml을 첨가하고 microhomogenizer로 파쇄한 후, 1000 rpm에서 3 분간 2회 원심 분리하여 파쇄되지 않은 조직을 제거하고, 상등액은 8000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 bacterial pellet을 얻었다. Pellet으로부터 genomic DNA추출은 Wizard genomic DNA purification kit (Promega)을 사용하여 얻었으며, Helicobacter pylori의 urease gene A (nt 304-715)에 해당하는 forward primer (5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3')와 reverse primer (5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3')를 사용하였다(그림 2).

PCR 반응용액은 10 ×buffer 5 μl, dNTP 4 μl, 100 pmol/ μl primer를 각각 0.5 μl, genomic DNA 1 μg, Taq polymerase one unit을 넣어 총 50 μl가 되게 하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 DNA 변성을 위하여 먼저 94℃에서 4분간 1회, 94℃에서 30초, 40℃에서 30초, 72℃에서 30초를 30회, final elongation으로 72℃에서 7분간 1회 순환하였다.

4. *Gastrosprillum* 감염 조직의 urease sequencing

병변이 있는 위 조직으로부터 얻은 411 bp의 urease PCR fragment 와 H. pylori의 urease PCR fragment를 gel에서 추출하여(Bio101, BMS, U.S.A), urease sequencing PCR의 template로 사용하였다. Sequencing PCR 반응용액은 terminator ready reaction mix 8 μl(ABI prism big dye terminator cycle sequencing ready reaction kit, PE Applied Biosystems, U.S.A), template 80 ng, urease forward primer (5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3')를 3.2 pmole 되게 넣은 후, D.W로 총 20 μl 되게 하여 sequencing PCR을 수행했다(그림 4). sequencing PCR 조건은 96℃에서 10초, 40℃에서 5초, 60℃에서 4분을 25회 순환하였다. sequencing PCR product는 ethanol precipitation 과정을 거친 후, template suppression reagent 25 μl에 희석하여 95℃에서 2분간 denaturation 과정 후 얼음에 냉장하여 준비했다. DNA 염기서열 분석은 ABI prism 310 genetic analyzer를 사용했으며, capillary (47 cm, 50 μm i.d.)에 POP-6 polymer를 충진하여 사용하였다.

5. *H. pylori* recombinant urease 분리

H. pylori ureA-ureH gene이 cloned된 E. coli BL 21을 1 mM NiCl2와 100 μg/ml ampcilline을 함유한 LB broth에서 late exponential phase까지

2 ℓ를 배양하였다. 배양된 균을 8000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전된 균을 차가운 20 mM potassium phosphate (pH 7.2), 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol (PEB) buffer로 두 번 세척한 후, 1 mM PMSF를 함유한 PEB buffer에 혼탁시키고 이를 French Press를 이용하여 bacteria를 파쇄했다. 파쇄된 용액을 4℃, 24000 rpm, 90 분간 원심 분리하였다. 상등액을 DEAE-Sepharose CL-6B column (5 ×12 cm)에 얹어 PEB buffer와 1 M KCl in PEB buffer의 linear gradient로 용출시켰고, 각 분획의 효소 활성을 phenol red로 spot assay를 하여 발색을 보인 분획만 모아 (그림 5) YM10 ultrafiltration membrane을 사용하여 Concentrator (Amicon, U.S.A.)으로 농축했다. 이를 Sephacryl S-200 gel filtration column (2.5 × 48 cm)에 첨가하고 0.15 M KCl/PEB buffer로 용출하였다. Phenol red에 발색을 보인 분획을 모아 (그림 6) amicon을 이용하여 염을 제거 한 후 FPLC(Waters, U.S.A.)를 이용 mono Q column으로 PEB buffer와 1 M KCl/PEB buffer의 linear gradient로 용출하였다(그림 7).

6. 전기영동에 의한 Urease purification

SDS-PAGE는 10% running gel 과 3.75% stacking gel을 사용하여 전기영동을 수행하였으며, Coomassie brilliant blue R250으로 염색하였다(그림 8).

7. Urease assay

Urease activity를 측정하기 위해 alkali reagent(Weatherburn, 1967)를 이용한 assay를 수행하였다. HEPES buffer (0.05 M HEPES, 0.5 mM EDTA, pH 7.5) 1 ml, urea solution (100 mM urea) 1 ml에 sample 10 μl

첨가 후, 37℃에서 2분간 방치하였다. 시료 100 μl에 phenol reagent (5% phenol, 0.025% sodium nitroprusside) 1 ml에 첨가한 후, 상온에서 10분간 방치하고, 여기에 alkali reagent (2.5% NaOH, 0.21% NaOCl, 2.5% $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 1 ml을 넣어 30분간 반응시켰다. 30분 경과 후, spectrophotometer를 사용하여 625 nm에서 발색정도를 측정하였다(Table 1).

8. Urease 백신에 의한 감염 억제 실험

분리된 urease 5 μg과 mucosal adjuvant 10 μg를 pathogen free female Swiss Webster mice 1주 간격으로 4회 경구 투여하여 immunization 시킨 후, Gastrosprillum이 감염된 mouse 위 조직을 4 ml PBS와 막자사발에서 간 용액 0.5 ml을 경구 투여한 뒤 4주 후 감염 여부를 확인하였다.

9. 분리 균의 *Helicobacter* SSP.(Species Specific Protein) PCR

Helicobacter SSP. PCR은 Helicobacter pylori species-specific antigen sequence를 기초로 만들어진 forward primer (5'-TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC-3')와 reverse primer (5'-CCTGCTGGGCATACTTCACCATG-3')를 사용하였다. PCR 반응을 위해 균을 PCR tube에 소량 넣어 104초간 microwave를 조사한 후, 10× buffer 5 μl, dNTP 4 μl, 100 pmol/μl primer를 각각 0.5 μl, 1 U Taq polymerase을 넣어 총 50 μl가 되게 하여 PCR을 수행했다. PCR은 94℃에서 5분간 1회, 94℃에서 1분, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분을 39회, final elongation으로 72℃에서 5분을 1회 순환하였다. PCR product는 0.8% agarose gel에 전기영동하여, EtBr staining으로 확인하였다(그림 3).

제 3 절 결과 및 고찰

위궤양을 일으키는 Gastrospirillum은 H pylori에서 분리되어진 Helicobacter felis와 매우 유사한 gram negative cork screw모양의 3에서 8회 coiling된 간균이다(Andersen et al., 1999). 그림 1은 조직내에 감염된 Gastrospirillum으로 전형적인 3-8회 꼬인 cork screw의 모양을 보여주고 있다. 이러한 돼지의 위궤양을 야기하는 Gastrospirillum 배양이 까다롭다. 이것은 Campylobacter 종들이 열악한 환경에서 생존을 연장하기 위해 살아있으나 증식키 어려운 cocoid form등을 취하여 subculture를 어렵게 하는 특징 때문으로 생각된다(Harvey and Leanch, 1998; Kreig and Holt, 1984). 따라서 돼지의 Gastrospirillum 감염 위조직을 직접 mouse에 감염시킴으로 도축장에서 실험실로 이동하는 시간을 단축하고, 본 실험실에서 신속히 병원균을 접종하여 배양하는 방법을 선택하였다. 특히 재료 및 방법에서 기술한 대로 위 점막과 유사한 상태를 만들고자 사용한 반 고체배지를 배지에 조직을 덮어 배양했을 때 10% blood columbia 배지와 10% blood BHI 배지에서 다른 세균들과 함께 Gastrospirillum이 배양되었다. 앞으로 배지의 항생제 조건을 바꾸어 다른 균의 증식은 억제하고 Gastrospirillum이 선택적으로 잘 자랄 수 있는 위 점막과 같은 배양조건은 앞으로 더욱 개발되어야 하겠다.

Gastrospirillum은 그 특징이 oxidase, catalase, nitrite, nitrate, urease 양성으로 보고되어 있으며(Andersen et al., 1999), 특히 urease를 생성함으로 강산의 위에 서식할 수 있는 것으로 보인다. 여기에 착안하여 Gastrospirillum 감염 위 조직에서 DNA를 분리하여 urease A gene에 대한 primer를 사용하여 PCR을 수행했을 때, 411 bp 크기의 DNA 조각을 얻었다(그림 2). 이 411 bp의 염기서열은 H pylori의 urease와 같은 염기서열을 지니고 있다(그림 3). 따라서 H pylori의 urease를 Gastrospirillum의 urease백신으로 사용할 수 있는 것으로 생각되어졌다. 그래서 H pylori ureA-ureH gene이 cloned된 E. coli BL21로부터 urease를 순수 분리하였다 (그림 4). 순수분리한 urease 5 μg와 mucosal adjuvant 10 μg을 함께 mouse에 경구 투여하여 면역시켜 Gastrospirillum감염을 막는 것을 확인하고 있는 중이다.

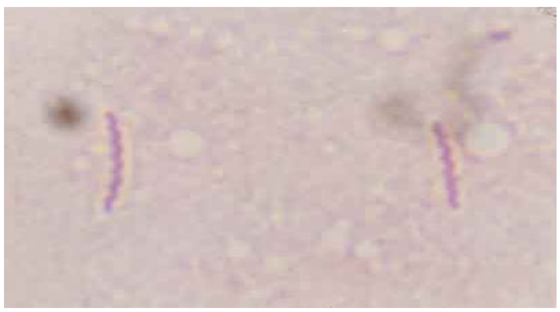


그림 1. 감염 조직내의 *Gastrospillium*의 확인

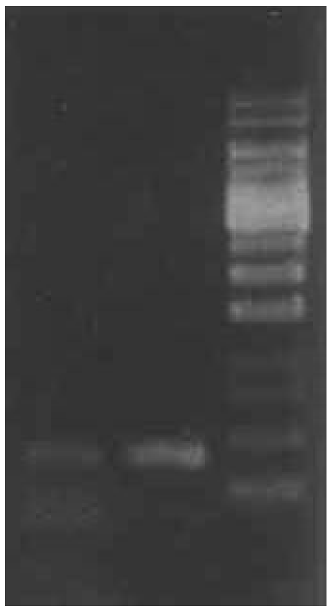


그림 2. *Gastrospillium*의 urease PCR

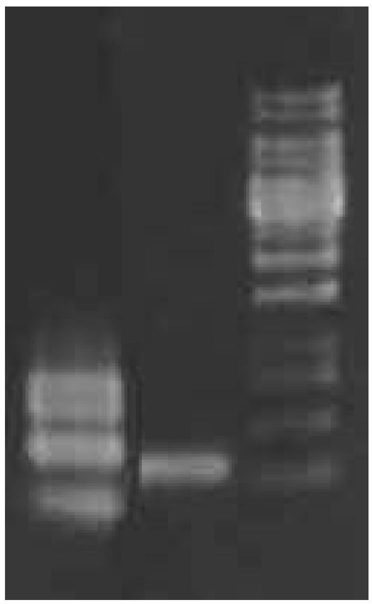


그림 3. *Gastrospillium*의 *Helicobacter* SSP PCR

1 1…50 43504
3 1…50
2 1…50 Tissue

1 51… 100 43504
3 51… 100
2 51… 100 Tissue

1 101… 150 43504
3 101… 150
2 101… 150 Tissue

1 151…200 43504
3 151…200
2 151…200 Tissue

1 201…250 43504
3 201…250
2 201…250 Tissue

1 251…300 43504
3 251…300
2 251…300 Tissue

1 301…350 43504
3 301…350
2 301…350 Tissue

1 351…396 43504
3 351…396
2 351…396 Tissue

그림 4.*H. pylori* 와 *Gastrospillium* 감염조직의 urease 의 Sequence 비교

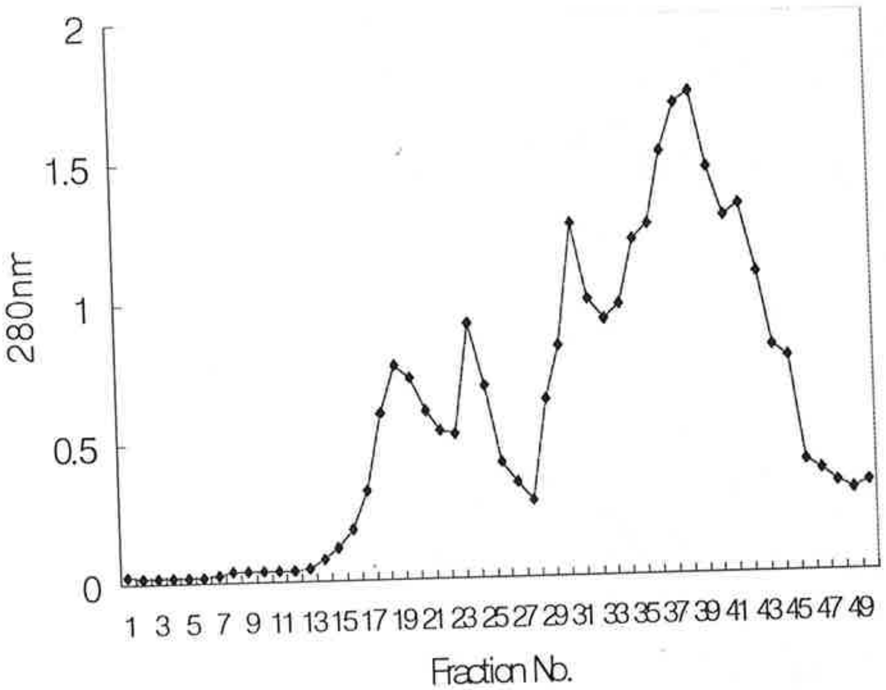


그림 5. DEAE column chromatography

collected fraction NO. : 23-28

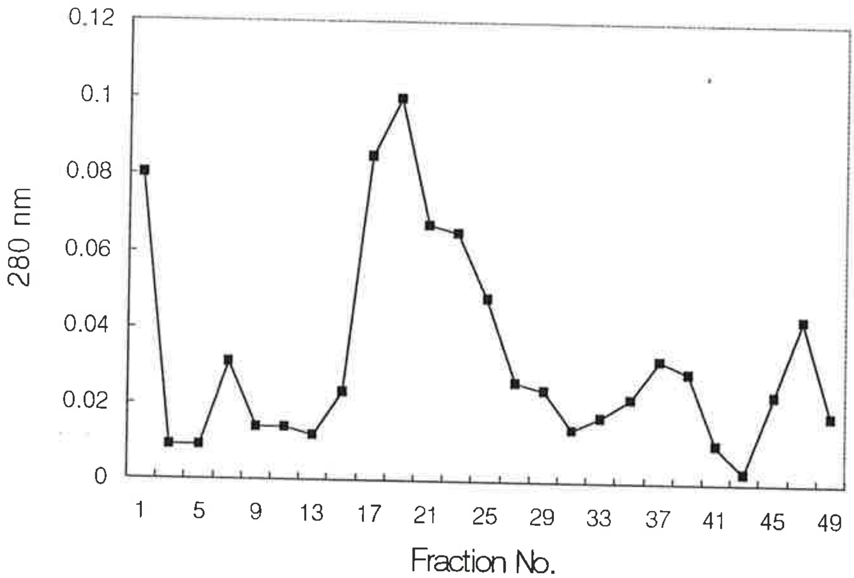


그림 6. Chromatography of Sephacryl S-200

collcted fraction No. : 10-14

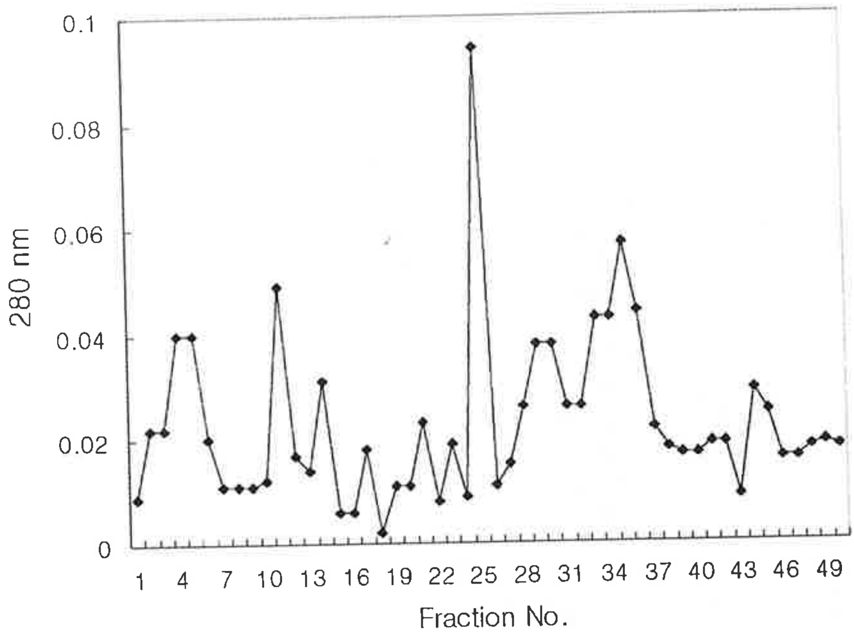


그림 7. Chromatography of Mono Q

Collected Fractin No. : 29-34

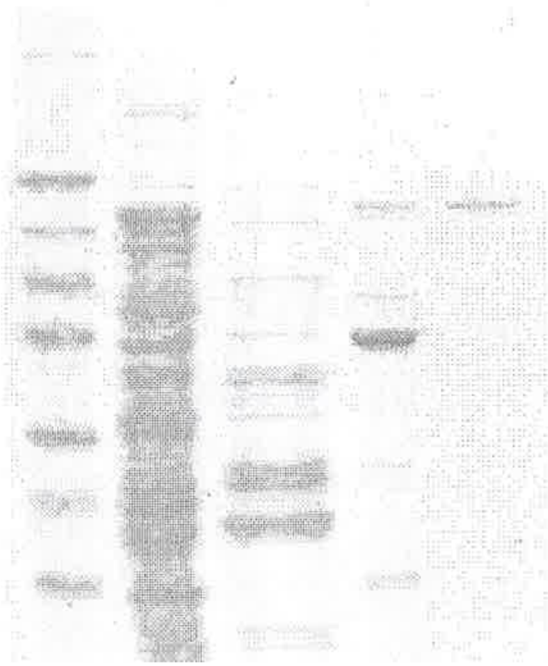


그림 8. *Helicobacter pylori* urease 전기영동 사진

Purification step	Total protein(mg)	Specific activity	Purification(fold)	Yield(%)
Crude extract	2100	5.7	1	100
DEAE	168.56	41.5	7.28	8
Sephacryl S-200	1.235	4,625.3	811.46	0.051
FPLC	1.081	16,194.3	2841.11	0.058

Table 1. *Helicobacter pylori* Urease 분리

제 10 장 인용문헌

제 1 절 Tightly spiral bacteria에 감염된 돼지 위의 병리학적 연구

Baskerville A, Newell DG (1988): Naturally occuring chronic gastritis and C. pylori infection in the Rhesus monkey: a potential model for gastritis in man. Gut, 29:465-472.

Eaton KA, Radin MJ, Kramer L, Wack R, Sherding R, Krakowka S, Morgan DR (1993): Epizootic gastritis in cheetahs associated with gastric spiral bacilli. Vet pathol, 30:55-63.

Fox JG, Cabot EB, Taylor NS, Laraway R (1988): Gastric colonization by Campylobacter pylori subsp. mustelae in ferrets. Infect Immun, 56:2994-2996.

Fox JG, Correa P, Taylor NS, Lee A, Otto G, Murphy JC, Rose R (1990): Helicobacter mustelae-associated gastritis in ferrets. Gastroenterology, 99:352-361.

Fox JG, Otto G, Murphy JC, Taylor NS, Lee A (1991): Gastric colonization of the ferret with Helicobacter species: natural and experimental infection.. Rev Infect Dis, 13(Suppl 8):S671-S680.

Grasso GM, Ripabelli G, Sammarco ML, Ruberto A, Iannitto G (1996): Prevalence of Helicobacter-like organisms in porcine gastric mucosa : a study of swine slaughtered in Italy. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, Jun;19(3):213-7.

Guizzardi F, Cabassi E, Fredii M (1981): Gastrite da alimentazione con insilato di mais nel maiale. Suinicoltura, 22:47-52.

Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, Rozmiarek H, Rufo R, Stalis IH (1994): Helicobacter pylori isolated from the domestic cat: public health implication. Infect Immun, 62:2367-2374.

Henry GA, Long PH, Burns JL, Charbonneu DL (1987): Gastric spirillosis in Beagles. Am J Vet Res, 48:831-836.

Hermanns W, Kregel K, Breuer W, Lechner J (1995): Helicobacter-like organisms: Histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. J Com Pathol, 112:307-318.

Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (1985): The lower alimentary system. In : Pathology of domestic animals, 3rd edn, vol 2. London, Academic Press. 42-49.

Krakowka S, Eaton KA, Rings DM, Argenzio RA (1998): Production of gastroesophageal erosions and ulcers (GEU) in gnotobiotic swine monoinfected with fermentative commensal bacteria and fed high-carbohydrate diet. Vet Pathol, 35:274-282.

Lee A, Hazell SL, O'Rourke J, Kouprach S (1988): Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. Infect Immun, 56;2843-2850.

Marshall B (1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, 1:1273-1275.

Mendes EN, Queiroz DMM, Rocha GA, Nogueira AMMF, Carvalho ACT, Lage AP, Barbosa AJA (1991): Histopathological study of porcine gastric mucosa with and without a spiral bacterium("Gastrospirillum suis"). J Med Microbiol, 35: 345-348.

Otto G, Hazell SH, Fox JG, Howlett CR, Murphy JC, O'Rourke JL, Lee A (1994): Animal and public health implications of gastric colonization of cats by Helicobacter like organisms. J Clin Microbiol, 32:1043-1049.

Quieroz DMM, Barbosa AJA, Mendes EN et al (1988): Distribution of Campylobacter pylori and gastritis in the stomach of patients with and without duodenal ulcer. Am J Gastroenterol, 83:1368-1370.

Queiroz DMM, Dewhirst FE, Paster BJ, Carvalho SD, Magnago AGP, Moura SB, Rocha GA, Oliveira AMR (1995): Reservoir hosts for human "Gastrospirillum" infection. In: VIIIth International Workshop on Gastro-duodenal Pathology and Helicobacter pylori, July, (European

Helicobacter pylori Study Group, Gut), 103.

Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN, Lage AP, Carvalho ACT, Barbosa AJA(1990): A spiral microorganism in the stomach of pigs. Vet Microbiol, 24: 199-204.

Sato T, Takeuchi A (1982): Infection by spirilla in the stomach of rhesus monkey. Vet Pathol, 19[Suppl 7];17-25.

Warren JR (1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, 1:1273.

제 2 절 돼지 위에서 발견된 tightly spiral bacteria의 마우스 실험감염

Baskerville A, Newell DG (1988): Naturally occuring chronic gastritis and C. pylori infection in the Rhesus monkey: a potential model for gastritis in man. Gut, 29:465-472.

Eaton KA, Radin MJ, Kramer L, et al (1993): Epizootic gastritis in cheetahs associated with gastric spiral bacilli. Vet pathol, 30:55-63.

Fox JG, Correa P, Taylor NS, et al (1990): Helicobacter mustelae-associated gastritis in ferrets. Gastroenterology, 99:352-361.

Fox JG, Otto G, Murphy JC, et al (1991): Gastric colonization of the ferret with Helicobacter species: natural and experimental infection.. Rev Infect Dis, 13(Suppl 8):S671-S680.

Guizzardi F, Cabassi E, Fredi M(1981): Gastrite da alimentazione con insilato di mais nel maiale. Suinicoltura, 22:47-52.

Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, et al (1994): Helicobacter pylori isolated from the domestic cat: public health implication. Infect Immun, 62:2367-2374.

Henry GA, Long PH, Burns JL, et al (1987): Gastric spirillosis in Beagles. Am J Vet Res, 48:831-836.

Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (1985): The lower alimentary system. In: Pathology of dimestic animals, 3rd edn, London, Academic Press, 2:42-49.

Krakowka S, Eaton KA, Rings DM, et al (1998): Production of gastroesophageal erosions and ulcers (GEU) in gnotobiotic swine monoinfected with fermentative commensal bacteria and fed high-carbohydrate diet. Vet Pathol, 35:274-282.

Marshall BJ, Warren JR (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet, I: 1311-1314.

Mendes EN, Queiroz DMM, Coimbra RS, et al (1996): Experimental infection of Wistar rats with 'Gastrospirillum suis'. J Med Microbiol, 44:105-109.

Mendes EN, Queiroz DMM, Rocha GA, et al (1991): Histopathological study of porcine gastric mucosa with and without a spiral bacterium("Gastrospirillum suis"). J Med Microbiol, 35: 345-348.

Mendes EN, Queiroz DMM, Rocha GA, et al (1990): Ultrastructure of a spiral micro-organism from pig gastric mucosa("Gastrospirillum suis"), J Med Microbiol, 33:61-66.

Moura SB, Queiroz DMM, Mendes EN, et al (1993): The inflammatory response of the gastric mucosa of mice experimentally infected with "Gastrospirillum suis". J Med Microbiol, 39: 64-68.

Otto G, Hazell SH, Fox JG, et al (1994): Animal and public health implications of gastric colonization of cats by Helicobacter like organisms. J Clin Microbiol, 32:1043-1049.

Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, et al(1991): Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst, 83:640-643.

Queiroz DMM, Dewhirst FE, Paster BJ et al (1995): Reservoir hosts for human "Gastrospirillum" infection. In: VIIIth International Workshop on Gastro-duodenal Pathology and Helicobacter pylori, July, (European Helicobacter pylori Study Group, Gut), 103.

Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN, et al (1990): A spiral microorganism in the stomach of pigs. Vet Microbiol, 24: 199-204.

Warren JR, Marshall BJ (1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, I: 1273-1275.

제 3 절 돼지 위점막에서 증식하는 tightly spiral bacteria의 돼지 실험감염

Dent JC, McNulty CAM, Uff JC, Wilkinson SP, Gear MWL (1987): Spiral organisms in the gastric antrum. Lancet, 2:96.

Guizzardi F, Cabassi E, Fredii M (1981): Gastrite da alimentazione con insilato di mais nel maiale. Suinicoltura, 22:47-52.

Graham DY (1989): Campylobacter pylori and peptic ulcer disease. Gastroenterol, 96:615-625.

Hirayama F, Takagi S, Yokoyama Y, Iwao E, Ikeda Y (1996): Establishment of gastric Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils. J Gastroenterol, 31[Suppl IX]:24-28.

Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N(1985): The lower alimentary system. In : Pathology of domestic animals, 3rd edn, vol 2. London, Academic Press. 42-49.

Keto Y, Takahashi S, Okabe S (1999): Healing of Helicobacter pylori-induced gastric ulcers in Mongolian gerbils : combined treatment with omeprazole and clarithromycin. Dig Dis Sci, 44(2):257-265.

Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Stachura J, Karczewska E, Pajdo R, Ghiara P, Hahn EG (1999): Mouse model of Helicobacter pylori infection : studies of gastric function and ulcer healing. Aliment Pharmacol Ther, 13(3):333-346.

Krakowka S, Morgan DR, Kraft WG, Leunk RD (1987): Establishment of gastric Campylobacter pylori infection in the neonatal gnotobiotic piglet. Infect immun, 55:2789-2796.

Marshall B (1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, 1:1273-1275.

Matsumoto S, Washizuka Y, Matsumoto Y, Tawara S, Ikeda F, Yokota Y, Karita M (1997): Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by Helicobacter pylori infection. J Med Microbiol, 46(5):391-397.

McNulty CAM, Dent JC, Curry A(1989): New spiral bacterium in gastric mucosa. J Clin Pathol, 42:585-591.

Mendes EN, Queiroz DMM, Rocha GA, Nogueira AMMF, Carvalho ACT, Lage AP, Barbosa AJA (1991): Histopathological study of porcine gastric mucosa with and without a spiral bacterium("Gastrospirillum suis"). J Med Microbiol, 35: 345-348.

Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, Sibley RK, Pritiken J, Chang Y (1991): Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst, 83:640-643.

Queiroz DMM, Dewhirst FE, Paster BJ, Carvalho SD, Magnago AGP, Moura SB, Rocha GA, Oliveira AMR (1995): Reservoir hosts for human "Gastrospirillum" infection. In: VIIIth International Workshop on Gastro-duodenal Pathology and Helicobacter pylori, July, (European Helicobacter pylori Study Group, Gut), 103.

Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN, Lage AP, Carvalho ACT, Barbosa AJA(1990): A spiral microorganism in the stomach of pigs. Vet Microbiol, 24: 199-204.

Sawada Y, Kuroda Y, Sahio H, Yamamoto N, Tonokatsu Y, Sakagami T, Fukuda Y, Shimoyama T, Nishigami T, Uematsu K (1998): Pathological changes in glandular stomach of Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbil model. J Gastroenterol, 33; Suppl 10:22-25.

Sheu BS, Yang HB, Wu JJ, Huang AH, Lin XZ, Su IJ (1999): Development of Helicobacter pylori infection model in BALB/c mice with domestic cagA-positive and -negative strains in Taiwan. Dig Dis Sci, 44(5):868-875.

Shomer NH, Dangler CA, Whary MT, Fox JG (1998): Experimental Helicobacter pylori infection induces antral gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue in guinea pigs. Infect Immun, 66(6):2614-2618.

Solnick JV, O'Rourke J, Lee A, Paster BJ, Dewhirst FE, Tompkins LS

(1993): An uncultured gastric spiral organism is a newly identified Helicobacter in humans. J Infect Dis, 168:379-385.

Solnick JV, O'Rourke J, Lee A, Tompkins LS (1994): Molecular analysis of urease genes from newly identified uncultured species of Helicobacter. Infect Immun, 62:1631-1638.

Sturegard E, Sjunnesson H, Ho B, Willen R, Aleljung P, Ng HC, Wadstrom T (1998): Severe gastritis in guinea-pigs infected with Helicobacter pylori. J Med Microbiol, 47(12):1123-1129.

Warren JR (1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, 1:1273.

제 4 절 마우스 위점막에서 tightly spiral bacteria의 증식에 미치는 유산균의 효과에 관한 연구

Bazzoli Em Zagari RM, Fossi S, et al (1992): In vivo Helicobacter pylori clearance failure with Lactobacillus acidophilus. Gastroenterol, 102:A38.

Bhatia SJ, Kochar N, Abraham P, et al (1989): Lactobacillus acidophilus inhibits growth of Campylobacter pylori in vitro. J Clin Microbiol, 27:2328-30.

Dunn BE, Roop RM, Sung C-C, Sharma SA, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1992): Identification and purification of a cpn60 heatshock protein homolg from Helicobacter pylori. Infect Immun 60:1946-51.

Fuller R (1989): Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol, 66:365-378.

Graham DY (1989): Campylobacter pylori and peptic ulcer disease. Gastroenterol, 96:615-625.

Graham DY, Adam E, Reddy GT, Agarwal JP, Agarwal R, Evancs DG et al (1991): Seroepidemiology of Helicobacter pylori infection in India. Comparison of developing and developed countries. Dig Dis Sci, 36:1084-8.

Kabir AMA, Aiba Y, Koga Y et al (1997): Prevention of Helicobacter pylori infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. Gut, 41:49-55.

Marshall BJ, Warren JR (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet I: 1311-1314.

Mendes EN, Queiroz DMM, Coimbra RS, Moura SB, Barbosa AJA, Rocha GA (1996): Experimental infection of Wistar rats with 'Gastrospirillum suis'. J Med Microbiol, 44:105-109.

Mendes EN, Queiroz DMM, Rocha GA, Nogueira AMMF, Carvalho ACT, Lage AP, Barbosa AJA (1991): Histopathological study of porcine gastric mucosa with and without a spiral bacterium("Gastrospirillum suis"). J Med Microbiol, 35: 345-348.

Mendes EN, Queiroz DMM, Rocha GA, et al (1990): Ultrastructure of a spiral micro-organism from pig gastric mucosa("Gastrospirillum suis"), J Med Microbiol, 33:61-66.

Moura SB, Queiroz DMM, Mendes EN, Nogueira AMMF, Rocha GA(1993): The inflammatory response of the gastric mucosa of mice experimentally infected with "Gastrospirillum suis". J Med Microbiol, 39: 64-68.

Negrini R, Lisato L, Zanella I, Cavazzini L, Vallanacci S, Ghielmi S et al (1991): Helicobacter pylori infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. Gastroenterol, 101:437-445.

Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, Sibley RK, Pritiken J, Chang Y (1991): Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst, 83:640-643.

Queiroz DMM, Dewhirst FE, Paster BJ, Carvalho SD, Magnago AGP, Moura SB, Rocha GA, Oliveira AMR (1995): Reservoir hosts for human "Gastrospirillum" infection. In: VIIIth International Workshop on Gastro-duodenal Pathology and Helicobacter pylori, July, (European Helicobacter pylori Study Group, Gut), 103.

Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN, Lage AP, Carvalho ACT, Barbosa AJA(1990): A spiral microorganism in the stomach of pigs. Vet MIcrobiol, 24: 199-204.

Tagg JT, Dajani AS, Wannamaker LW (1976): Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol Rev, 40:722-56.

Warren JR, Marshall BJ (1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, I: 1273-1275.

Yufi Aiba MT, Nobuyuki suzuki MSc, Abu MA, Kabir MD, Atushi Takagi MD, Yasuhiro Koga MD (1998): Lactic acid-mediated suppression of Helicobacter pylori by the oral administration of Lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model. Am J

Gastroenterol, 93:1097-2101.

제 5 절 돼지 위점막에 증식하는 tightly spiral bacteria의 전자현미경학적 관찰

Andesen LP, Boye K, Blom J, Holck S, Norgaard A, Elsborg L (1999): Characterization of a culturable "Gastrospirillum hominis"(Helicobacter heilmannii) strain isolated from human gastric mucosa. J Clin Microbiol, Vol 37:1069-1076.

Blaser MJ(1993): Helicobacter pylori:microbiology of a 'slow' bacterial infection. Trends, Microbiol. 1:255 260.

Debongnie JC, Donnay M, Mairesse J (1995): Gastrospirillum hominis ("Helicobacter heilmannii") : A cause of gastritis, sometimes transient, better diagnosed by touch cytology? Am J Gastroenterol, 90:411-416.

Dent JC, McNulty CAM, Uff JC, Wilkinson SP, Gear MWL (1987): Spiral organisms in the gastric antrum Lancet, 2:96.

Fox JG & Lee A(1993): Gastric Helicobacter infection in animals:natural and experimental infection. pp.407 430. in:Helicobacter pylori:biology and clinical practice, ed Goodwin CS & Worsley BW CRC Press, Boca Raton, Fla.

Heilmann KL, Borchard F (1991): Gastritis due to spiral shaped bacteria other than Helicobacter pylori: clinical, histological and ultrastructural findings. Gut, 32:137-140.

Lee A(1989): Human gastric spirilla other than C.pylori. pp.222 240. in:Campylobacter pylori in gastritis and peptic ulcer disease, ed Blaser MJ. Igaku-Shoin Medical Publisher, New York.

Lee A, Fox JG & Hazell SL(1993): The pathogenicity of Helicobacter pylori:a perspective. Infect, Immun. 61:1601 1610..

Marshall BJ & Warren JR (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet I: 1311-1314.

Mendes EN, Queiroz DMM, Rocha GA, et al (1990): Ultrastructure of a spiral micro-organism from pig gastric mucosa("Gastrospirillum suis"), J Med Microbiol, 33:61-66.

Mendes EN, Queiroz DMM, Rocha GA, Nogueira AMMF, Carvalho ACT, Lage AP, Barbosa AJA (1991): Histopathological study of porcine gastric mucosa with and without a spiral bacterium("Gastrospirillum suis"). J Med Microbiol, 35: 345-348.

Morgner A, Bayerdorffer E, Meining A, Stolte M, Kroher G (1995): Helicobacter heilmannii and gastric cancer. Lancet, 346:511-512.

Queiroz DMM, Dewhirst FE, Paster BJ, Carvalho SD, Magnago AGP, Moura SB, Rocha GA, Oliveira AMR (1995): Reservoir hosts for human

"Gastrospirillum" infection. In: VIIIth International Workshop on Gastro-duodenal Pathology and Helicobacter pylori, July, (European Helicobacter pylori Study Group, Gut), 103.

Stolte M, Bethke B, Ritter M, Lauer E, Eidt H (1990): Praxis der gastritis-klassifikation. Endoskopie Heute, 4:229-130.

Stolte M, Wellens E, Bethke B, Ritter M, Eidt H (1994): Helicobacter heilmannii (formerly Gastrospirillum hominis) gastritis : an infection transmitted by animals? Scand J Gastroenterol, 29:1061-1064.

Tanaka M, Saitoh A, Narita T, Hizawa Y, Nakazawa H, Narita N (1994): Gastrospirillum hominis-associated gastritis: the first reported case in Japan. J Gastroenterol, 29:199-202.

Weber AF & Schmittdiel (1962): Electron microscopic and bacteriologic studies of spirilla isolated from the fundic stomachs of cats and dogs. Am J Vet Res, 23:422 427.

Wegmann W, Aschwanden M, Schaub N, Aenishanslin W, Gyr K (1991): Gastrospirillum-hominis-assoziierte gastritis-eine zoonose? Schweiz Med Wochenschr, 121:245-254.

제 6 절 국내 돼지에서 위내에 증식하는 Campylobacter sp의 감염에 대한 혈청학적 조사

Alderton MR, Borland R, Coloe PJ. Experimental reproduction of porcine proliferative enteritis. J Comp Path, 106:159-167, 1992.

Alderton MR, Korolik V, Coloe PJ, Dewhirst FE, Paster BJ (1995): Campylobacter hyoilei sp. nov., associated with porcine proliferative enteritis. Int J Syst Bacteriol, 45(1):61-6.

Chu RME, Hong CB. Haemorrhagic bowel syndrom in pigs in Taiwan. Vet Rec, 93:562-63, 1973.

Dodd DC. Adenomatous intestinal hyperplasia(proliferative ileitis) of swine. Pathol Vet, 5:333-341, 1968.

Krakowka S, Eaton KA, Rings DM, et al. Production of gastroesophageal erosions and ulcers (GEU) in gnotobiotic swine monoinfected with fermentative commensal bacteria and fed high-carbohydrate diet. Vet Pathol, 35:274-282, 1998.

Lomax LG, Glock RD, Hogan JE. Experimentally induced porcine proliferative enteritis in specific-pathogen-free pigs. Am J Vet Res, 43:1615-1621, 1982.

Lomax LG, Glock RD, Hogan JE et al. Porcine proliferative enteritis: Experimentally induced disease in cesarean-derived colostrum-deprived pigs. Am J Vet Res, 43:1622-1630, 1982.

Love RJ, Love DN, Edwards MJ. Proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. Vet Rec, 100:65-68, 1977.

Mendes EN, Queiroz DMM, Rocha GA, et al. Histopathological study of porcine gastric mucosa with and without a spiral bacterium("Gastrospirillum suis"). J Med Microbiol, 35: 345-348, 1991.

On SL, Buchardt B, Barry H, et al. Campylobacter hyointestinalis subsp. lawsonii subsp. nov., Isolated from the porcine stomach, and an emended description of Campylobacter hyointestinalis. Int J Syst Bacteriol, Oct:767-774, 1995.

O'Neill PA. Observations on haemorrhagic bowel syndrom involving pigs on three associated premises. Vet Rec, 87:742-747, 1970.

Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN et al. A spiral microorganism in the stomach of pigs. Vet Microbiol, 24: 199-204, 1990.

Rowland AC, Lawson GHL. Porcine intestinal adenomatosis: a possible relationship with necrotic enteritis, regional ileitis and proliferative haemorrhagic enteropathy. Vet Rec, 97:178-180, 1975.

Rowland AC, Rowntree PG. A haemorrhagic bowel syndrom associated with adenomatosis in the pig. Vet Rec, 91:235-241, 1972.

Ursing JB, Lior H, Owen RJ. Proposal of minimal standards for describing new species of the family Campylobacteraceae. Int J Syst Bacteriol, 44:842-845, 1994.

Sebald M, Veron M. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. Ann Inst Pasteur, 105:897-910, 1963.

제 7 절 위 점막으로부터 새로 분리해 낸 Campylobacter의 특성 조사

Alderton, M. R., V. Korolik, P. J. Coloe, F. E. Dewhirst, and B. J. Paster. 1995. Campylobacter hyoilei sp. nov. associated with porcine proliferative enteritis. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 61-6.

Borch, E., T. Nesbakken, and H. Christensen. 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. Int. J. Food Microbiol. 30: 9-25.

Butzler, J. P. and J. Oosterom 1991. Campylobacter: pathogenicity and significance in foods. Int. J. Food Microbiol. 12: 1-8.

Delong, WJ., M. D. Jaworski, and A. C. Ward. 1996. Antigenic and restriction enzyme analysis of Campylobacter spp. associated with abortion in sheep. Am. J. Vet. Res. 57: 163-7.

Fransen, N. G., A. M. van den Elzen, B. A. Urlings, and P. G. Bijker. 1996. Pathogenic microorganism in slaughterhouse sludge. Int. J. Food Microbiol. 33: 2-3.

Giesendorf, B. A. J., W. G. V. Quint, M. G. V. Henkens, H. Stegeman, F. A. Huf, and H. G. M. Niesters. 1992. Rapid and sensitive detection of Campylobacter spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbio. 58: 3804-3808.

Harvey, P. and S. Leach. 1998. Analysis of coccal cell formation by Campylobacter jejuni using continuous culture techniques, and the importance of oxidative stress. J. Appl. Microbiol. 85: 398-404.

Hebert G. A., D. G. Hollis, R. E. Weaver, M. A. Lambert, M. J. Blaser, and C. W. Moss. 1982. 30 Years of Campylobacters: biochemical characteristics and a biotyping proposal for Campylobacter jejuni. J. Clin. Microbiol. 15: 1065-1073.

Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1984. Vol 1. Williams & Wilkins, Baltimore, MA, U.S.A.

Madden, R. H., L. Moran, and P. Scates. 1996. Sub-typing of animal and human Campylobacter spp. using RAPD. Letters in Appl. Microbiol. 23: 167-170.

Nachamkin, I. and B. M. Allos, and T. Ho. 1998. Campylobacter species and Guillain-Barré syndrome. Clin. Microbiol. Rev. 11: 555-67.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Performance standards for antimicrobial testing; eight informational supplement. NCCLS document M100-S8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

On, S. L. W. 1996. Identification methods for Campylobacter, Helicobacter, and related organisms. Clin. Microbiol. Rev. 9: 405-422.

Weijtens, M. J., R. D. Teinders, H. A. Urlings, and J. Van der Plas 1999. Campylobacter infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. J. Appl. Microbiol. 86: 63-70.

제 8 절 돼지 위장병균의 분리, 감염 및 예방 실험

Abbott S.E., J. van den Ende, R. Hickman, and J. Terblanche. 1976. Gastric mucormycosis and moniliasis in an unimmunosuppressed pig following renal transplantation. J. S. Afr. Vet. .Assoc.47(1):47-48.

Ghannoum M.A., I. Okogbule-Wonodi, N. Bhat, and H. Sanati. 1999. Antifungal activity of voriconazole (UK-109,496), fluconazole and amphotericin B against hematogenous Candida krusei infection in neutropenic guinea pig model. J. Chemother. 11(1):34-39.

Gibson L.A, 1980. Gastric ulceration in pigs. Vet Rec. 106(5):109-110.

Hanichen T., 1975. Stomach ulcers in swine. Tierarztl. Prax. 3(2):191-197.

Kadel W.L., D.C. Kelley, and E.H. Coles. 1969. Survey of yeastlike fungi and tissue changes in esophagogastric region of stomachs of swine. Am. J. Vet. res.30:401-408.

Karhan J. and E. Weigl, 1986. Candida-induced keratomycosis in guinea pig experiment. Acta. Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med. 114:165-170.

Mall A.S., R. Hickman, J. Terblanche, and D. Kahn. 1997. The pig as an ulcer model. Gastroenterology. 113(1):366-367.

Petranyi G., J.G. Meingassner, and H. Mieth. 1987. Activity of terbinafine in experimental fungal infections of laboratory animals. Antimicro. Chemother. 31(10):1558-1561.

Poulain D., M. Deveaux, J.C. Cailliez, C. Hossein-Foucher, E. Dutoit, J. Van Cutsem, and X. Marchandise. 1991. Imaging of systemic Candida albicans infections with a radioiodinated monoclonal antibody: experimental study in the guinea pig. Int.. J. Rad.. Appl. Instrum 18(7):677-686.

Riggle P.J., K.A. Andrutis, X. Chen, S.R. Tzipori, and C.A. Kumamoto. 1999. Ivasive lesions containing filamentous forms produced by a Candida albicans mutant that is defective in filamentous growth in culture. Infect Immun 67(7):3649-3652.

Tannock G.W and J.M Smith. 1970. The microflora of the pig stomach and its possible relationship to ulceration of the pars oesophagea. J. Comp. Pathol.80(3):359-367.

Abbott S. E., J. van den Ende, R. Hickman, J. Terblanche, 1976 Gastric mucormycosis and moniliasis in an unimmunosuppressed pig following renal transplantation. J S Afr Vet Assoc 47(1):47-8

제 9 절 *Lactobacillus acidophilus*에 의한 *Helicobacter pylori* Adherence 억제 검색

Aiba, Y., N. Suzuki, A. M. Kabir, A. Takagi, and Y. Koga. 1998. Lactic acid-mediated suppression of Helicobacter pylori by the oral administration of Lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model. Am. J. Gastroenterol. 93: 2097-2101.

Alkout, A. M., C. C. Blackwell, D. M. Weir, I. R. Poxton, R. A. Elton, W. Luman, and K. Palmer. 1997. Isolation of a cell surface component of Helicobacter pylori that binds H type 2, Lewis(a), and Lewis(b) antigens. Gastroenterol. 112: 1179-1187.

Boren, T., P. Flak, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark. 1993. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science 262: 1892-1895.

Clyne, M. and B. Drumm. 1997. Absence of effect of Lewis A and Lewis B expression on adherence of Helicobacter pylori to human gastric cells. Gastroenterol. 113: 72-80.

Coconnier, M. H., V. Lievin, E. Hemery, and A. L. Servin. 1998. Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4573-4580.

Dubois, A. 1995. Spiral bacteria in the human stomach: the gastric Helicobacters. Emerg. Infect. Dis. 1: 79-85.

Hemalatha, S. G., B. Drumm, and P. Sherman. 1991. Adherence of Helicobacter pylori to human gastric epithelial cells in vitro. J. Med. Microbiol. 35: 197-202.

Heneghan, M. A., A. P. Moran, K. M. Feeley, E. L. Egan, J. Goulding J, C. E. Connolly, and C. F. McCarthy. 1998. Effect of host Lewis and ABO blood group antigen expression on Helicobacter pylori colonization density and the consequent inflammatory response. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 20: 257-266.

Kabir, A. M., Y. Aiba, A. Takagi, S. Kamiya, T. Miwa, and Y. Koga. 1997. Prevention of Helicobacter pylori infection by lactobacilli in gnotobiotic murine model. Gut 41: 49-55.

Kamisago, S., M. Iwamori, T. Tai, K. Mitamura, Y. Yazaki, and K. Sugano. 1996. Role of sulfatides in adhesion of Helicobacter pylori to gastric cancer cells. Infect. Immun. 64: 624-628.

Kobayashi, K., J. Sakamoto, Y. Yamamura, T. Kito, H. Inagaki, T. Watanabe, and H. Nakazato. 1991. The expression of the blood related antigens in intestinal metaplasia of the stomach in gastric cancer. Nippon Geka Gakkai Zasshi 92: 813-819.

Kobayashi, K., J. Sakamoto, Y. Kito, Y. Yamamura, T. Koshikawa, M.

Fugita, T. Watanabe, and H. Nakazato. 1993. Lewis blood group-related antigen expression in normal gastric epithelium, intestinal metaplasia, gastric adenoma, and gastric carcinoma. Am. J. Gastroenterol. 88: 919-924.

Lingwood, C. A., G. Wasfy, H. Han, and M. Huesca. 1993. Receptor affinity purification of a lipid-binding adhesin from Helicobacter pylori. Infect. Immun. 61: 2474-2478.

Meyer-Rosenberg, K. and T. Berglindh. 1996. Refinement of and new applications for Helicobacter pylori colonization in pig gastric biopsy specimens cultured in vitro. Scand. J. Gastroenterol. 31: 541-545.

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 acids and lactic acid bacteria. J. Appl. Bacteriol. 79: 475-479.

Niv, Y., G. Fraser, G. Delpre, A. Neeman, A. Leiser, Z. Samra, E. Scapa, E. Gilon, and S. Bar-Shany. 1996. Helicobacter pylori infection and blood groups. Am. J. Gastroenterol. 91: 101-104.

Slomiany, B. L. and A. Slomiany. 1992. Mechanism of Helicobacter pylori pathogenesis: focus on mucus. J. Clin. Gastroenterol. 14 Suppl 1 S114-21.

제 10 절 Helicobacter pylori urease에 의한 *Helicobacter gastrospillium* 감염방지 실험

Clayton, C., K. Kleanthous, and S. Tabaqchali. 1991. Detection and identification of Helicobacter pylori by the polymerase chain reaction. J. Clin. Pathol. 44:515-516.

Cussac, V., R.L. Ferrero, and A. Labigne. 1992. Expression of Helicobacter pylori urease genes in Escherichia coli grown under nitrogen-limiting conditions. J. Bacteriol. 174:2466-2473.

Dieterich, C., P. Wiesel, and A. Blum. 1998. Presence of multiple "Helicobacter heilmannii" strains in an individual suffering from ulcers and in his tow cats. J. Clin. Microbiol. 36:1366-1370.

Dunn, B.E., G.P. Campbell, R.L. Ferrero, and A. Labigne. 1992. Expression of Helicobacter pylori urease genes in Escherichia coli grown under nitrogen-limiting conditions. J. Bacteriol. 174:2466-2473.

Kong, L., J.G. Smith, J. Bramhill, G.K. Abruzzo, C. Bonfiglio, C. Cioffe, L. Lync, M. Scott, L. Silver, C. Thompson, H. Kropp, and K. Bartizal. 1996. A sensitive and specific PCR method to detect Helicobacter felis in a conventional mouse model. Clin. Diagno. Lab. Imm. 3:73-79.

Lee, C.K., R. Weltzin, W.D. Thomas, H. Kleanthous, T.H Ermask, G. Soman, J.E. Hill, S.K Ackerman, and T.P. Monath. 1995. Oral immunization with recombinant Helicobacter pylori urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with Helicobacter felis. J. Infect. dis. 172:161-172.

Lee, J.Q., M Corazon De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, and M R. Dixon. 1997. A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the sydeny strain. Gastroenterology. 112:1386-1397.

Lim, Y.M., J.Y Sung, and M.H Lee. 1998. Polyclonal antibody against the active recombinant Helicobacter pylori urease expressed in Escherichia coli. J. Biochem Mol. Biol. 31:240-244.

Michett, P., G. Dorta, P.H Wiesel, D. Brassart, E. Verdu, M Herranz, C. Felley, N Porta, M Rouvet, A.L. Blum, and I. Corthesy-Theulaz. 1998. Effect of whey-based infection in humans. Digestion 60:203-209.

Turbett, G., R. Horne, and B.R. Mee. 1992. Purification and characterizat1ion of the urease enzyme of Helicobacter species from humans and animals. Infect. Imm 60:5259-5266.

References

1. Abbott S.E., J. van den Ende, R. Hickman, and J. Terblanche. 1976. Gastric mucormycosis and moniliasis in an unimmunosuppressed pig following renal transplantation. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **47**(1):47-48.
2. Ghannoum M.A., I. Okogbule-Wonodi, N. Bhat, and H. Sanati. 1999. Antifungal activity of voriconazole (UK-109,496), fluconazole and amphotericin B against hematogenous Candida krusei infection in neutropenic guinea pig model. *J. Chemother.* **11**(1):34-39.
3. Gibson L.A., 1980. Gastric ulceration in pigs. *Vet Rec.* **106**(5):109-110.
4. Hanichen T., 1975. Stomach ulcers in swine. *Tierarztl. Prax.* **3**(2):191-197.
5. Kadel W.L., D.C. Kelley, and E.H. Coles. 1969. Survey of yeastlike fungi and tissue changes in esophagogastric region of stomachs of swine. *Am. J. Vet. res.* **30**:401-408.

주 의

1. **이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구 보고서입니다.**

2. **이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업 의 연구결과임을 밝혀야 합니다.**

3. **국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.**

7. Karhan J. and E. Weigl, 1986. Candida-induced keratomycosis in guinea pig experiment. *Acta. Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med.* **114**:165-170.

8. Mall A.S., R. Hickman, J. Terblanche, and D. Kahn. 1997. The pig as an ulcer model. *Gastroenterology*. **113**(1):366-367.

9. Petranyi G., J.G. Meingassner, and H. Mieth. 1987. Activity of terbinafine in experimental fungal infections of laboratory animals. *Antimicro. Chemother.* **31**(10):1558-1561.

10. Poulain D., M. Deveaux, J.C. Cailliez, C. Hossein-Foucher, E. Dutoit, J. Van Cutsem, and X. Marchandise. 1991. Imaging of systemic Candida albicans infections with a radioiodinated monoclonal antibody: experimental study in the guinea pig. *Int.. J. Rad.. Appl. Instrum.* **18**(7):677-686.

11. Riggle P.J., K.A. Andrutis, X. Chen, S.R. Tzipori, and C.A. Kumamoto. 1999. Ivasive lesions containing filamentous forms produced by a Candida albicans mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun.* **67**(7):3649-3652.

12. Tannock G.W. and J.M. Smith. 1970. The microflora of the pig stomach and its possible relationship to ulceration of the pars oesophagea. *J. Comp. Pathol.* **80**(3):359-367.

References

1. Clayton, C., K. Kleanthous, and S. Tabaqchali. 1991. Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* **44**:515-516.

2. Cussac, V., R.L. Ferrero, and A. Labigne. 1992. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* **174**:2466-2473.

3. Dieterich, C., P. Wiesel, and A. Blum. 1998. Presence of multiple "*Helicobacter heilmannii*" strains in an individual suffering from ulcers and in his tow cats. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1366-1370.

4. Dunn, B.E., G.P. Campbell, R.L. Ferrero, and A. Labigne. 1992. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* **174**:2466-2473.

5. Kong, L., J.G. Smith, J. Bramhill, G.K. Abruzzo, C. Bonfiglio, C. Cioffe, L. Lync, M. Scott, L. Silver, C. Thompson, H. Kropp, and K. Bartizal. 1996. A sensitive and specific PCR method to detect *Helicobacter felis* in a conventional mouse model. *Clin. Diagno. Lab. Imm.* **3**:73-79.

6. Lee, C.K., R. Weltzin, W.D. Thomas, H. Kleanthous, T.H Ermask, G. Soman, J.E.

Hill, S.K. Ackerman, and T.P. Monath. 1995. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J. Infect. dis.* **172**:161-172.

7. Lee, J.O,, M. Corazon De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, and M. R. Dixon. 1997. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the sydeny strain. *Gastroenterology*. **112**:1386-1397.

8. Lim, Y.M., J.Y Sung, and M.H. Lee. 1998. Polyclonal antibody against the active recombinant *Helicobacter pylori* urease

expressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **31**:240-244.

9. Michett, P., G. Dorta, P.H. Wiesel, D. Brassart, E. Verdu, M. Herranz, C. Felley, N. Porta, M. Rouvet, A.L. Blum, and I. Corthesy-Theulaz. 1998. Effect of whey-based infection in humans. *Digestion* **60**:203-209.

10. Turbett, G,, R. Horne, and B.R. Mee. 1992. Purification and characterizat1ion of the urease enzyme of *Helicobacter* species from humans and animals. *Infect. Imm.* **60**:5259-5266.

또한 *Candida***와 분리균주** 8**번을** French Press**에** 3**회 통과한 후** 10% formalin**에 고정하여** total cell**을 경구 백신으로** 3**주간** 2**회** 1 mg/ 0.5 ml **투여한 후**. **각각** *Candiada***와 분리균주** 8**번을** 2×10^7 CFU/ 0.5 ml **과** 1.5×10^9 CFU/ 0.5 ml **되게 경구 투여하여 감염시킴으로 감염 억제 여부를 확인하고자 한다**..