

## 한국에서 분리된 *Leptospira*의 배양조건에 따른 형태변화

연세대학교 의과대학 미생물학교실<sup>1</sup>·전자현미경실<sup>2</sup>

이태윤·박전한·엄정란·이봉기·이원영·김주덕·윤정구<sup>1</sup>·한규웅<sup>2</sup>

=Abstract=

### Effects of Culture Temperatures and Media on Morphological Changes of *Leptospira interrogans* Isolated in Korea

Tae-Yoon Lee, Jeon-Han Park, Jeong-Ran Uhm, Bong-Ki Lee, Won-Young Lee,  
Joo-Deuk Kim, Jung-Koo Youn<sup>1</sup> and Kyu-Woung Hahn<sup>2</sup>

Department of Microbiology<sup>1</sup> and Electron Microscopy Laboratory<sup>2</sup>, College of Medicine,  
Yonsei University

*Leptospira interrogans*, the causative organism of leptospirosis, is characterized by a fine helical morphology, and the helix is almost always right-handed.

However, one of the striking features of recent isolates of *L. interrogans* in Korea was the heterogeneity in their morphology. Even under optimal culture conditions (30°C, EMJH medium), rods, spiral forms with right or left-handed helices, and even spherical forms of *L. interrogans* were present.

Although the literature notes the presence of left-handed helices, long rods, and spherical forms in cultures of *L. interrogans* isolates, little is known about the cause of this morphologic heterogeneity.

In an attempt to answer this question, this study was initiated to examine the effects of culture conditions, especially temperature and medium, on the morphology of *L. interrogans*.

Four temperatures (5°C, 15°C, 30°C, and 37°C) and two types of media (Fletcher and EMJH) were used; one strain from Korean isolates and *L. interrogans* serovar *canicola* obtained from the Pasteur Institute (Paris, France) were employed throughout the study.

The findings are as follows:

1. The *L. interrogans* isolated in Korea (UM-19) had a larger cell diameter (0.25~0.30 μm: 0.10~0.15 μm), and helix diameter (0.10~0.60 μm: 0.10~0.15 μm) than that obtained from the Pasteur Institute, but they varied in their distances between the helices (0.31~1.00 μm: 0.50~0.70 μm).
2. When UM-19 was grown at 37°C after months or longer preincubation at 5°C or 15°C, the majority of the organisms were spiral forms; however, they became rods when subcultured at 30°C or 37°C. No significant morphological differences were found between Fletcher and EMJH media.
3. When *L. interrogans* serovar *canicola* was subcultured more than ten times at 37°C, some of the organism lost their motility as well as the hooks at either one or both ends, but only in Fletcher medium. The number of variants increased with the frequency of subculturing.

These findings suggested that *L. interrogans* strain (UM-19) is different, in their morphology, from that of the Pasteur Institute, and its various morphologies may represent stages of the life cycle and vary with incubation temperature.

**Key Words:** *Leptospira interrogans*, morphologic heterogeneity, culture temperatures and media, life cycle.

일반적으로 Weil 씨 병으로 알려진 leptospirosis는 출혈성 황달(hemorrhagic jaundice), spirocheta 병, 출혈성 간염(hemorrhagic hepatitis) 등으로 불리우기도<sup>1)</sup> 하였으며 그 원인균인 *Leptospira interrogans* (이하 *L. interrogans*로 약함)는 가토의 혈청이나 bovine serum albumin(BSA)이 함유된 배지를 사용하여 배양하고<sup>17, 18)</sup>, 28~30°C가 배양에 적합한 온도로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 가토의 혈청을 사용한 배지로는 Fletcher 배지<sup>27)</sup>와 Stuart 배지<sup>28)</sup> 등이 있고, BSA를 사용한 배지에는 EMJH(Ellinghausen and McCullough modified by Johnson and Harris) 배지<sup>16)</sup>가 그 대표적 인 것으로써 널리 사용되고 있다.

*L. interrogans*는 오른쪽 방향의 가는 나선형 세균으로써 그 직경이 0.1µm이고 길이는 6µm에서 15µm 이상으로 긴 나선형까지 다양하며, 한 세균당 나선의 수는 18개 혹은 그 이상이고, 나선간의 거리는 0.5µm인 것으로 알려져 있다<sup>14)</sup>. 또한 고장성(hypertonicity)이나 장기간의 배양등 좋지 않은 조건에 처할 경우 구형(spherical form)의 세균이 형성될 수 있으며 이들은 생존능(viability)이 없는 것으로 보고되어 있다<sup>19)</sup>.

한국에서 1975년 이전부터 주로 농부나 군인들에게서 유행한 유행성 출혈형 폐염양 질환(epidemic hemorrhagic pulmonary disease), 유행성 폐출혈열(epidemic pulmonary hemorrhagic fever), 출혈성 간염 등의 질병은 원인균이 불명한 채로 임상증상의 특성만으로 병명이 기술되어 오다가 이원영등<sup>4)</sup>이 그 원인체로써 *Leptospira interrogans*를 분리하여 이들 질병은 leptospirosis라는 세균 감염성 질환으로 밝혀졌다. 원인균에 대한 연구에서 김주덕등<sup>5)</sup>과 이봉기등<sup>6)</sup>은 형태에 관한 기술중 원인균의 단일집락 내에서 오른쪽 방향의 나선형외에도 단간형, 장간형, 왼쪽 방향의 나선형 및 구형등의 형태가 존재함을 보고한 바 있다.

그러나 김주덕등<sup>5)</sup>의 연구에서는 정상 가토 혈청이 함유된 Fletcher 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였는데, 이는 CO<sub>2</sub>없이<sup>14)</sup> *Leptospira* 배양에 호적온도로 알려진 28~30°C에서 가토의 혈청이 포함되지 않고 구성성분이 화학적으로 정의된 배지(chemically defined media)를 사용하였을 때에 비하여 불확실한 배양조건이었다. 구성성분이 화학적으로 정의된 배지에 관하여는 Shenberg<sup>23)</sup>의 보고 이후 EMJH 배지가 널리 사용되고 있다.

본 연구에서는 한국에서 분리된 *Leptospira*가 배

양온도를 달리하였을 때와 Fletcher 및 EMJH 배지에서 배양하였을 때 어떠한 형태의 변화를 나타내는가를 규명하고자 실험을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균 주

한국에서 유행성 폐출혈열의 증세를 보인 환자로부터 분리되어 *L. interrogans*로 보고된 UM-19 균주<sup>3)</sup> (이하 분리균주로 약함)와 Pasteur 연구소(Paris, France)에서 분양받은 *L. interrogans* (혈청형 *canicola*; 이하 참조균주로 약함)를 사용하였다.

### 2. 배 지

#### 1) Fletcher 배지

8%의 정상 가토 혈청이 함유된 Fletcher(Difco) 고체 및 반고체배지를 사용하였다<sup>27)</sup>.

#### 2) EMJH 배지

1%의 BSA(Sigma)가 함유된 EMJH 고체 및 반고체배지를 사용하였다<sup>16)</sup>.

각 고체배지는 1.5%의 한천(Difco)을 함유한 평판배지로 만들었고, 반고체배지는 0.2%의 한천을 함유하였으며, 각 배지에는 150µg/ml의 농도로 5-fluorouracil(5-FU; 중의제약)을 첨가하였다<sup>20, 21)</sup>.

### 3. 항혈청

#### 1) 분리균주에 대한 가토의 항혈청

World Health Organization<sup>22)</sup>(WHO)의 방법에 의거하여 10<sup>6</sup>의 생균을 매주 1회씩 5주간 정상 가토에 정맥내로 주사하여 제조하였고, 동일균주에 대한 역가는 현미경적 응집검사(microscopic agglutination test: MAT)상 1:2,560이었다.

#### 2) 참조균주에 대한 가토의 항혈청

Difco의 *L. interrogans* (혈청형 *canicola*)에 대한 항혈청을 사용하였고 동일균주에 대한 역가는 MAT상 1:12,800이었다.

### 4. 단일집락의 분리

각 균주는 단일집락을 분리하기 위하여 Fletcher 혹은 EMJH 한천평판배지에 선상도말하여 37°C에서 배양하였다.

### 5. 분리된 단일집락의 대량배양

분리된 단일집락들은 1×10<sup>6</sup>/ml의 농도로 무균 생리식염수 균부유액으로 만들어 각 13장의 Fletcher 혹은 EMJH 한천평판배지에서 37°C로 배양하여 집락의 형성 및 세균의 형태를 관찰하였다. 집

락이 형성된 각 배지들은 5°C, 15°C, 30°C 및 37°C의 온도에서 각 3장씩 배양하면서 일정기간의 간격을 두고 그 형태를 관찰하였고, 각 시기마다 37°C에 계대배양하여 10일까지 매일 그 형태를 관찰하였다. 한편 오염의 가능성을 배제하기 위하여 각 균주들은 각 배지중 한장씩을 선택하여 전술한 항혈청을 사용 MAT를 실시하였다<sup>8)</sup>.

## 6. 세균의 형태와 운동성 관찰

1) 세균의 형태는 silver 염색후 광학현미경으로 관찰하거나 암시야현미경(DIALUX 20, Leitz)으로 관찰하였고, 형태의 변화를 보이는 경우와 보다 세밀한 형태의 관찰을 위하여는 주사전자현미경(scanning electron microscope: SEM)적 관찰을 시행하였다.

(1) Silver 염색: 슬라이드 글라스에 도말하여 실온에서 건조시킨 균 도말표본의 silver 염색을 위하여는 다음의 세단계를 거치었다.

Ruge 용액으로 1분간 반응시켜 고정시킨 후, tannic acid 용액을 알코올 램프로 30초간 가온하면서 반응시키고, silver nitrate 용액을 반응시켜 20초간 알코올 램프로 가온하였다.

각 단계 사이에는 증류수로 세척하였고, 마지막 세척후 실온에서 건조시켜 광학현미경으로 관찰하

였다<sup>9)</sup>.

(2) 주사전자현미경적 관찰: 관찰을 위한 생리식염수 균부유액은 동량의 3%(v/v) glutaraldehyde (0.1M phosphate buffered saline, pH7.4)를 넣어 고정하였고, 고정된 균액은 다시 membrane filter (Millipore, 0.2μm)에 올려 0.1M phosphate buffered saline으로 2회 세척한 후 1% osmium tetroxide로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다.

탈수는 60, 70, 80, 90 및 95% ethanol을 순서대로 사용하여 20분 간격으로 처리한 후, absolute alcohol에서 2회 반복 탈수하였다. 탈수 후에는 isoamyl acetate로 치환하여 액체 CO<sub>2</sub>를 사용, critical point dryer(Hitachi HCP-2)로 건조시킨 후 aluminium stub에 올려 40mm의 두께로 도금(Eiko 1B-3)하여 Hitachi S-450형 주사전자현미경으로 20KV에서 그 형태를 관찰하였다.

2) 세균의 운동성 관찰을 위하여는 생리식염수 균부유액을 만들거나 반고체배지에서 배양된 균액 자체를 사용하여 암시야현미경으로 관찰하였다<sup>8, 10)</sup>.

## 7. 37°C 계대배양의 영향

분리균주와 참조균주는 Fletcher와 EMJH 반고체배지에서 매 2일마다 20회까지 계대배양하여 실시하여 37°C 계대배양이 세균의 형태 및 운동성에

**Table 1.** Morphologic characteristics of *L. interrogans* isolated in Korea (UM-19) compared with those of the strain from the Pasteur Institute

	UM-19 (Korean isolate)	Reference <i>L. interrogans</i> (Pasteur Institute)
Culture at :		
5°C	rod(long and short) spiral spherical	spiral
15°C	mostly spiral	spiral
30°C	spiral and rod(long)	spiral
37°C	rod(short)	spiral
Spiral forms :		
Cell diameter	0.25-0.30 μm	0.10-0.15 μm
Left-handed helix	+	+
Right-handed helix	+	+
Number of coils	7 or more	18 or more
Coil amplification	0.10-0.60 μm	0.10-0.15 μm
Wave length	0.30-1.00 μm	0.50-0.70 μm
Hooked end(s)	+(-)	+(-)
Old culture*	mostly rod(short) few spherical	mostly spiral few spherical

\*Culture older than 6 months at the various temperatures.

**Fig. 1.** UM-19균주의 주사전자현미경 사진: 오른쪽 방향의 느슨한 나선형 세균이 관찰됨.

미치는 영향을 상기방법으로 관찰하였다.

## 성 적

### 1. 단일집락의 분리

EMJH 반고체배지에서 보관해 온 분리균주 및 참조균주는 37°C 배양시 Fletcher 배지에서나 EMJH 배지에서 모두 5일 이내에 집락을 형성하였다. 집락은 옅은 유백색의 가장자리가 매끈한 원형으로 배지표면 상부에 모두 걸쳐 있었다. 직경은 1mm에서 7mm에 이르기까지 다양하였고, 크기가 큰 집락에서는 가운데 짙은 농도의 점과 이를 둘러싼 원형의 반투명한 구역을 관찰할 수 있었다. 집락의 색깔, 모양 및 크기에 있어서 육안상으로는 분리균주와 참조균주 사이에 차이를 관찰할 수 없었다.

### 2. 분리된 단일집락의 대량배양

분리된 단일집락의 대량배양을 위하여 각 균주마다 13장의 Fletcher 혹은 EMJH 한천평판배지에서 37°C로 5일간 배양한 결과, 평판배지의 전면에 산재한 집락을 얻을 수 있었다. 분리균주나 참조균주에서 집락의 모양, 색깔 및 투명도는 13장 모두에서 동일하였으며, 이중 한장씩을 선택하여 생리식염수 균부유액을 만들어 분리균주 혹은 참조균주에 특이한 가토의 항혈청과의 반응을 MAT로 본 결과

**Fig. 2.** *L. interrogans* serovar *canicola*의 주사현미경 사진: 오른쪽 방향의 가늘고 조밀한 나선형세균이 관찰됨.

분리균주의 경우 1:2,560, 참조균주의 경우는 1:12,800의 항혈청 희석농도에서 검사에 사용된 전체 세균중 75% 이상의 세균들이 응집괴를 형성하고 운동성을 상실하는 강한 양성반응으로 판정되었다.

### 3. 배양온도에 따른 세균의 형태변화 관찰

#### 1) 분리균주

단일집락을 대량 배양했을 때에는 silver 열색상 단간형, 장간형 및 나선형균이 혼재해 있었다. SEM상 각 형태의 세균들은 그 직경이 0.25~0.30µm이었으며, 길이는 5µm부터 16µm까지 다양하였다. 나선형 세균의 경우 세균의 직경이 더 굵고, 나선의 직경은 더 크고, 나선간의 거리는 더욱 다양하였으며, 나선의 숫자는 더 적었다(Table 1, Fig. 1, 2 및 3 참조). 분리균주는 참조균주와는 달리 광학현미경하에서도 습윤표본(wet preparation)으로 그 형태의 관찰이 가능하였는데 spring과 같은 나선의 형태를 보이었다. 분리균주를 5°C에서 계속 배양한 경우에는 6개월까지 형태의 변화를 보이지 않았다. 5°C에서 2개월간 배양한 후 이를 37°C로 계대배양한 경우에는 단간형 균이 그 주종을 이루었고, 5°C에서 3개월이상 배양한 후 이를 37°C로 계대배양한 경우에는 나선형 균과 장간형 균

**Fig. 3.** UM-19균주의 주사전자현미경 사진 : 오른쪽 방향의 조밀한 나선형 세균이 관찰됨.

이 차지하는 비율이 높아졌으며, 5°C에서 6개월간 배양한 후 이를 37°C로 계대배양한 경우는 나선형 및 장간형 균이 대부분이고 단간형 균은 거의 찾아볼 수 없었다(Fig. 4 참조). 15°C에서 20일간 배양한 경우에는 느슨하고 긴 나선형 균이 증가함을 알 수 있었으나, 30일 이후 6개월까지는 처음 단일 집락을 대량배양할 때와 마찬가지로 상기한 여러 형태들이 혼합되어 있었다. 15°C 배양균주를 37°C에서 계대배양한 경우, 제 7일까지는 길고 느슨한 나선형 균이 관찰되었으나 그 이후에는 단간형 균이 주종을 이루었고, 다른 형태의 세균은 거의 찾아볼 수 없었다. 30°C 및 37°C 배양시에는 1개월 까지 관찰한 결과 모두 전술한 여러 형태들이 혼합되어 있었으나 단간형이 그 주종을 이루고 있었고, 37°C로 계대배양한 경우에도 형태에 있어서 계대배양 이전과 비교하여 차이를 보이지 않았다.

## 2) 참조균주

단일집락을 대량배양했을 때에는 silver 염색 및 SEM상 오른쪽 방향의 나선형 균만이 관찰되었고, 나선형 균의 직경은 0.1µm, 길이는 8µm에서 15µm 이상이었다(Fig. 2 참조). 암시야현미경하에서는 세균의 양끝에서 *L. interrogans*에 전형적인 hook가 관찰되었으며, 활발한 운동성을 보이었는데 spinning movement가 그 주된 운동 형태이었다. 참조균주의 경우 상기한 여러가지 배양온도에서 배양

**Fig. 4.** 5°C에서 6개월간 보관한 후 37°C로 계대하여 5일간 배양한 UM-19균주의 silver 염색 사진 : 조밀한 나선형 세균이 주종을 이루고 있음 (×1,000).

하였을 때 나선형 균을 지속적으로 관찰할 수 있었다.

## 4. 배지의 종류에 따른 세균의 형태변화 관찰

분리균주나 참조균주에서 모두 동일 배양온도 및 배양기간에서는 배지의 종류(Fletcher 및 EMJH배지)에 따른 형태의 차이를 관찰할 수 없었다.

## 5. 배양온도에 따른 세균의 운동성 관찰

배양온도가 5°C인 경우를 제외하고는 분리균주나 참조균주 모두 활발한 운동성을 보이었으며, 5°C 배양의 경우에도, 처음에는 운동성이 미약하였으나, 균부유액을 37°C에서 2시간이상 배양한 후에는 다시 활발한 운동성을 갖는 것을 볼 수 있었다. 분리균주에서는 단간형 균이 나선형 균보다는 더욱 빠른 운동성을 가지고 있어서, 400배의 배율로 관찰하였을 때 고정된 한 시야내에 머물러 있지 않고, 부유액의 흐름에 역행하여 운동하는 것을 관찰할 수 있었다. 분리균주의 나선형 균에서는 참조균주에서와 유사하게 spinning movement가 주로 관찰되었다.

## 6. 37°C 계대배양이 세균의 형태 및 운동성 변화에 미치는 영향

### 1) 분리균주

계대배양을 20회까지 실시하였을 때 계대배양이

전과 비교하여 형태 및 운동성에 있어서 차이를 발견할 수 없었고, 30°C 및 37°C 배양시와 같이 단간형 균이 주종을 이루었다.

## 2) 참조군주

(1) 세균의 형태변화: 근본적으로 세균의 형태는 변하지 않아서 나선형 이외의 세균은 찾아볼 수 없었고, 분열하는 모습의 나선형 균들이 서로 연결되어 있는 것을 많이 볼 수 있었는데, EMJH 배지에서보다 Fletcher 배지에서 분열하는 각각의 나선형 균의 길이가 더욱 긴 양상을 보였다. 한편 *L. interrogans*의 특징적인 형태로 알려진 세균 양끝에 위치한 hook는 EMJH 배지에서 배양한 경우에는 계속 관찰할 수 있었던 반면에, Fletcher 배지에서는 10회 이상 계대시에 한쪽 혹은 양쪽의 hook가 소실되는 세균들이 관찰되었다.

(2) 세균의 운동성 변화: EMJH 배지에서 계대하였을 때는 계대횟수에 관계없이 매우 활발한 운동성을 보인 반면, Fletcher 배지에서 계대할 경우에는 계대의 회수가 많아질수록 운동성이 있는 세균의 숫자가 줄어들었고, 15회 이상 계대할 경우부터는 암시야현미경하에서 400배의 배율로 20개의 시야를 관찰하였을 때 50% 이상의 세균이 운동성을 상실하였다.

Fletcher 배지에는 계대배양한 경우 hook나 운동성을 상실하는 세균의 수효는 계대를 거듭함에 따라 증가하였다.

## 고 찰

Leptospirosis는 1886년 Weil 등<sup>41)</sup>에 의해 황달의 증세를 보이는 4명의 환자가 다른 황달환자들과는 다른 감염성 원인체에 의한 감염성 황달이라는 따로 독립된 질환으로 보고되면서 처음으로 알려졌으며, 1970년에는 Stimson 등<sup>39)</sup>이 황열(yellow fever) 환자의 신장조직에서 나선균의 존재를 보고하였다. 그후 1915년과 1916년에는 Hübener 등<sup>15)</sup>과 Inada 등<sup>16)</sup>이 자기 독일과 일본에서 독립적으로 원인균체를 분리, 배양하는데 성공하였고, *Spirocheta icterohaemorrhagiae*로 명명하였으며, Noguchi 등<sup>20)</sup>에 의하여 *Leptospira*속으로 분류되었다. 1940년대에 이르러서는 세계 각처에서 동물과 사람으로부터 분리된 세균들이 혈청학적으로 약간씩의 차이를 보이는 이른바 serogroup이 있음이 알려졌으며, 각 serogroup 내에는 여러 serovar들이 있어 1984년 현재 18개 serogroup에 180여 serovar가 보고되었다<sup>5, 17-19)</sup>. Leptospirosis는 전세계에 걸쳐 가축이나 야생동물들(dogs, foxes, opossums, racoons, rats 및

skunks 등)을 숙주로 하며 사람에게는 우연히 노출되었을 때 감염을 일으키는 인수공통질환(zoonosis)으로 알려져 있다.

상기한 보균상태의 동물들은 노를 통하여 *Leptospira*를 배설함으로써 자연환경을 오염시키며, 오염된 물, 흙 및 채소등에 직접 혹은 간접적으로 접촉함으로써 인체감염이 유발되는 것으로 보고있는데, 사람에서의 주된 침입구(portal of entry)는 손상된 피부(특히 발 근처), 노출된 결막, 비강 혹은 구강의 점막 등인 것으로 보고되어 있다<sup>21)</sup>. Leptospirosis의 임상증상은 매우 다양하여 증상이 없는 경우부터 황달을 동반하는 간신장 질환(hepatorenal disease)에 이르는 것으로 알려져 있다. 이 질환은 10~20일의 잠복기를 거친 후, 갑자기 그 증상을 나타내는데 이때의 증상 및 증세들은 비특이적인 것으로 발열, 오한, 두통, 근육통 그리고 결막삼일(conjunctival suffusion)등이며 세균이 혈중에 존재하는 시기는 발병 6일에서 10일이상에 이룰수 있으며, 이 시기에는 척수액에서도 세균이 발견될수 있다고 한다. 발병후 2~3주에 이르면 패혈증기(septicemic period)가 끝나고, 항체가 혈중에 나타나는 면역기(immune period)로 넘어가는데, 이 때 짧은 발열과 함께 뇌막증상(meningeal symptom)을 나타낼 수도 있으며, 발병 1주후부터는 3개월 혹은 그 이상까지 뇨중에서 *Leptospira*를 관찰할 수 있다고 보고되어 있다<sup>6)</sup>.

한국에서 소위 유행성 출혈형 폐염양 질환 혹은 유행성 폐출혈열등으로 불려온 질환은 leptospirosis와 유사한 증상을 보였으며, 1975년 가을 경기, 강원 및 충청지방을 중심으로 대유행한 이래 원인을 알 수 없는 새로운 질병으로 대두되었었다<sup>4)</sup>. 그 후 1975년과 같은 대규모의 유행은 감퇴되고 소규모의 유행만이 산발적으로 지속되어 오다가, 1984년 9월에는 상기 지방들 이외에도 경북, 전남, 전북, 충남지방에 이르는 전국 규모의 대유행으로 많은 환자가 발생하였으며, 이를 계기로 각 연구기관의 관심과 노력으로 1984년 이원영 등<sup>22)</sup>에 의하여 처음으로 그 병인체가 분리되어 *Leptospira interrogans*로 보고되었다.

이 분리균주를 대상으로 한 연구에서 이봉기 등<sup>23)</sup>은 형태학적으로 단간형, 장간형, 오른쪽방향의 나선형, 왼쪽 방향의 나선형 및 구형등 다양한 형태를 보고하였고, 1986년 김주덕 등<sup>1)</sup>은 이 균주를 배양한 후 시간별로 관찰한 실험에서 이 형태들 사이의 연관성을 제시하였다.

*L. interrogans*는 유연성 있는 나선형 세균으로 직경이 0.10-0.15 μm에 불과하며, 광학현미경하에서

습윤표본으로는 그 형태의 관찰이 어렵고, silver 염색 후에도 각각의 나선을 관찰하기가 용이하지 않으며<sup>13, 37)</sup>, 세균의 길이는 6 $\mu$ m에서 12 $\mu$ m 이상에 이르고, 나선의 방향은 오른쪽인 것으로 알려져 있다<sup>19, 27, 30, 31, 34-36, 39, 40, 43)</sup>. 그러나 Czekalowski와 Eaves<sup>13)</sup> 및 Czekalowski<sup>11)</sup>는 *Leptospira*의 형태중 오른쪽 방향의 나선형 이외에도 장간형, 구형 등의 형태가 존재함을 보고한 바 있고, Carleton 등<sup>1)</sup>은 *Leptospira* 나선의 방향에 관하여 적은 비율이기는 하지만 왼쪽 방향의 나선형 균의 존재를 인정하고 있어서 *Leptospira*에 있어서 다양한 형태의 존재는 새로운 사실은 아니다. 본 연구에서는 이러한 다양한 형태들이 실험방법에서 전술한 여러가지 배양조건과 어떠한 연관성을 가지고 있는가를 규명하고자 실험을 시행하였다.

실험에 사용한 가토의 항혈청은, *Leptospira*에 있어서는 1:12,800 이상의 역가를 지녀야 특이 항혈청이라 부를 수 있다고 하나<sup>42)</sup>, 분리균주의 경우에는 같은 면역방법을 사용하였는데도 그 역가가 1:2,560 밖에 안되었다. 그럼에도 불구하고 이 항혈청을 사용한 것은 다른 세균이 오염되었을 가능성을 배제하기 위한 수단으로써는 상기 역가만으로도, 충분하다고 판단되었기 때문이었으며, 분리균주의 경우 WHO<sup>42)</sup>의 방법과는 다른 면역방법이 보다 효과적인 가능성도 배제할 수 없었다. MAT상 분리균주 혹은 참조균주는 각기 전술한 항혈청과 강한 반응을 보여 대량배양 과정에서의 오염 가능성은 극히 적은 것으로 판단되었다.

Fletcher 및 EMJH 한천평판배지에서 형성된 분리균주 및 참조균주 집락의 형태는 육안상으로 배지나 균주의 종류에 따른 차이를 보이지 않았고, Cox와 Larson<sup>8)</sup>의 *Leptospira* 집락형태에 관한 기술과 일치하였다. 상기 평판배지에서 형성된 분리균주의 단일집락을 대량배양한 후, 온도별로 배양했을 때는 여러 형태들이 혼합되어 있었는데 반하여, 참조균주의 경우에는 지속적으로 나선형균만이 관찰되어 우선은 두 균주 사이의 공통된 형태라고 볼 수 있는 나선형에 관심을 두고 그 형태를 관찰하였다. 그 결과, 분리균주에서는 세균 및 나선의 직경이 참조균주에서 보다 크고, 나선간 거리는 느슨한 나선형에서부터 참조균주의 나선형보다 짧은 조밀한 나선형균까지 다양하여서, 다음의 관심사는 분리균주만이 갖는 특징인 다양한 형태들이 배양조건에 따라서 어떻게 변화하는가와, 배양조건이 변할 때 참조균주에서도 형태의 변화가 일어나는지에 모아졌다.

온도에 따른 분리균주의 형태변화를 보기 위하여

는 5°C, 15°C, 30°C 및 37°C 등의 여러가지 온도에서 Fletcher 및 EMJH 배지등으로 가토혈청 함유여부에 따라 배지를 달리하여 배양 또는 계대배양하였고, 참조균주의 형태변화 여부를 보기 위하여는 분리균주들이 처음에 분리될 때의 배양온도인 37°C에서 참조균주를 계속 계대배양하면서 그 형태의 변화를 관찰하였다. 분리균주를 여러 온도에서 배양 혹은 계대배양한 경우, 참조균주를 28~30°C로 배양할 때 볼 수 있는 오른쪽 방향의 나선형 균이 나타나는 배양조건에 관심을 두고 그 형태의 변화를 관찰하였다. 5°C에서 3개월 이상 배양한 후 37°C로 계대배양하였을 때, 전체 세균중 나선형 및 장간형 균이 차지하는 비율이 높아진 것은 이 세균의 특징이었으며, 일반적으로 세균의 증식에 불리한 조건인 5°C에서 증식이 빨리되는 37°C로 계대배양한 것이 세균에 어떠한 영향을 주어 위와 같은 결과를 나타내는지 알 수 없었으나, 사면배지에 배양하여 냉장실에서 1년이상 보관하였다가 다시 30°C 및 37°C로 계대배양한 경우에도 실험결과와 같이 나선형 및 장간형 균이 많이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 사실은 Fletcher 및 EMJH 배지에서 모두 관찰되어 배지의 종류에 따른 차이는 보이지 않았다. 이러한 나선형 균은 37°C 계대배양 제 7일 이후부터는 점차 줄어들어 배양 10일째에 이르러서는 오히려 단간형 균이 그 주종을 이루었고 이와 같은 현상은 단일집락내에서도 관찰되어서 이들 여러 형태를 갖는 세균들 사이에 연관성이 있다는 김주덕 등<sup>7)</sup>의 보고를 뒷받침하는 것이었다. 30°C 및 37°C 배양의 경우에는 단간형 균들이 주종을 이루어 이 온도가 세균의 분열 및 증식에 적합한 배양온도임을 알 수 있었다. 한편 참조균주에서는 배양온도에 따른 형태의 변화없이 나선형 균만이 관찰되어 분리균주와 차이를 보였다. 참조균주는 37°C에서 20회까지 계대배양하였을 때에 나선형 이외의 다른 형태를 보이지는 않았고, Fletcher 배지에서 계대의 횟수가 많아질수록 운동성 세균의 수가 줄어들었는데 이는 Fletcher 배지에 첨가한 가토혈청의 영향인 것으로 생각된다. 이 설명을 뒷받침하는 Lawrence<sup>26)</sup>와 Muschel<sup>28)</sup> 등의 보고에 뒤이어 Johnson과 Muschel<sup>21, 22)</sup>은 정상 포유동물 혈청이 antileptospiral activity를 가지고 있으며, 이는 암시야현미경으로 보아 운동성을 상실하는 것과 배지내에서의 성장을 억제하는 두가지 기준으로 알 수 있다고 하였다. 37°C 계대배양시에 분리균주에서는 이러한 현상을 볼 수 없었는데 반하여, 참조균주를 Fletcher 배지에서 계대배양하였을 때에는 계대의 횟수가 늘수록 운동성을 상실한 세균의 수가 증가하

였고, 일반적으로 반고체배지에서 배양할 때 관찰되는 세균증식대의 농도가 EMJH배지에서의 경우보다 낮은 것으로 세균의 증식이 억제됨을 알수 있었다.

이제까지 보고된 나선형 세균중 분리균주와 유사한 형태를 갖는 것으로는 *Aquaspirillum*, *Bdellovibrio*, *Spirosoma* 및 *Flectobacillus* 등<sup>25)</sup>이 있으나 모두 비병원성 세균이어서 분리균주와는 감별되었다. 분리균주는 동물접종을 통하여 분리되었을 당시에도 다양한 형태를 가지고 있었던 것<sup>26)</sup>으로 보아 자연체내에서 *Bdellovibrio*에서 제시된 것<sup>27)</sup>과 유사하게 여러 형태들이 생활환(life cycle)을 이루고 있을 가능성이 충분히 있으며, 본 실험에서 얻은 결과는 이를 밝히는데 도움을 줄 수 있다고 본다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 분리균주는 생물학적 성상<sup>28)</sup>과 형태학적 특징상 온도에 따라 형태가 변하는 생활환을 가지고 있는 병원성 세균이라고 추정되며, 이를 명확히 하기 위하여는 동일한 세균의 재분리와 동물실험을 통한 형태학적 연구등이 추가되어야 할 것이다.

## 결 론

한국에서 분리된 *Leptospira interrogans* (UM-19) 및 Pasteur 연구소(Paris, France)에서 얻은 *L. interrogans* (혈청형 *canicola*)를 사용, 온도 및 배지를 달리하여 세균의 형태를 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 한국에서 분리된 UM-19 균주는 Pasteur 연구소의 *L. interrogans*보다 세균의 직경(0.25~0.30  $\mu\text{m}$ : 0.10~0.15  $\mu\text{m}$ ) 및 나선의 직경(0.10~0.60  $\mu\text{m}$ : 0.10~0.15  $\mu\text{m}$ )이 더 크고, 나선간의 거리도 더욱 다양(0.30~1.00  $\mu\text{m}$ : 0.50~0.70  $\mu\text{m}$ )하였다.

2. UM-19 균주의 형태는 단간형, 장간형, 왼쪽 혹은 오른쪽 방향의 나선형 및 구형등으로 다양하였는데, 5°C 및 15°C에서 3개월이상 보관한 배양균주를 다시 37°C로 계대배양한 경우에는 나선형 및 장간형 균이 현저히 증식하였다. 30°C 및 37°C에서만 배양 혹은 계대배양한 경우에는 단간형 균이 주종을 이루었으며, 배지의 종류에 따른 차이는 발견할 수 없었다.

3. Pasteur 연구소의 *L. interrogans*를 37°C로 15회이상 계대배양하였을 때, 가토 혈청이 함유된 Fletcher 배지의 경우에는 세균의 양쪽 혹은 한쪽 끝의 hook가 소실되고 운동성을 상실하는 것이 관찰되었고, 그 빈도는 계대횟수에 따라 증가하였다.

한국에서 분리된 UM-19 균주는 30°C 및 37°C의 온도에서는 빨리 분열하는 단간형의 형태를 보이고, 이 세균이 자연계에서 존재할 때의 온도와 근접한 15°C에서는 주로 나선형을 취하여 5°C 및 15°C에 존재하던 세균이 우발숙주(accidental host)인 인체의 감염시 숙주의 체온과 유사한 37°C로 계대배양하였을 때에는 나선형 및 장간형 균이 주종을 이루는 것으로 보아, 이 균주는 자연계 및 숙주의 체내에서 온도에 따라 상기한 여러가지 다른 형태를 취하는 생활환(life cycle)을 지니고 있다고 추정되며 이를 확실히 입증하기 위하여는 동일한 원인균의 재분리 및 동정 그리고 이 세균에 감수성을 가진 동물을 사용한 형태학적 연구가 추가되어야 할 것으로 사려된다.

## 참 고 문 헌

- 1) 김주덕, 이태운, 이원영, 이봉기: 유행성 출혈형 폐염양 질환의 병원체에 관한 연구. 대한미생물학회지, 21:191, 1986.
- 2) 이봉기, 유주현, 이원영, 김주덕: 유행성 출혈형 폐염양 질환의 병원균 분리와 세균학적 특성. 한국미생물학회지, 23:223, 1985.
- 3) 이원영, 이봉기, 김주덕, 김정순, 김상욱: 폐염양 출혈열 환자로부터 분리된 *Leptospira* 의 세균학적 특성과 병인론적 증명. 한국역학회지, 6:36, 1984.
- 4) 최강원: 출혈성 폐염양 질환의 임상적 특성. 한국역학회지, 6:3, 1984.
- 5) Alexander AD: *Leptospira*, In Lennette EH, Balows A, Haesler WH Jr, Traunt JP (eds.), *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. 376, American Society for Microbiology, Washington DC, 1980.
- 6) Bartholomew JW: Stains for microorganisms in smears. In Clark G (ed.), *Staining Procedures*. 4th ed. 407, Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, 1981.
- 7) Carleton O, Charon NW, Allender P and O'Brien S: Helix handedness of *Leptospira interrogans* as determined by scanning electron microscopy. *J. Bacteriol.*, 137:3, 1979.
- 8) Center for Disease Control: Darkfield microscopy for the detection and identification of *Treponema pallidum*, Reprinted from Center for Disease Control. Atlanta, 1974.
- 9) Cox CD and Larson AD: Colonial growth of



- Leptospirae*. *J. Bacteriol.*, **73**:587, 1957.
- 10) Cox PJ and Twigg GI: Leptospiral motility. *Nature*, **250**:260, 1974.
  - 11) Czekalowski JW: Electron microscope study of *Leptospira*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **29**:29, 1963.
  - 12) Czekalowski JW and Eaves G: Formation of granular structures by leptospirae as revealed by the electron microscope. *J. Bacteriol.*, **69**: 129, 1954.
  - 13) Hampp EG: Comparative study of dark-field and stained smear techniques for identification of oral spirochetes on the basis of morphologic characteristics. *J. Am. Dent. A.*, **32**: 318, 1945.
  - 14) Holt SC: Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol. Rev.*, **42**:114, 1978.
  - 15) Hübener and Reiter: Beiträge zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. *Deutsche med. Wchschr.*, **41**:1275, **42**:1 and 131, 1915 and 1916.
  - 16) Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R and Ito H: The etiology, mode of infection and specific therapy in Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *J. Exp. Med.*, **23**: 377, 1916.
  - 17) Johnson RC: The spirochetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**:89, 1977.
  - 18) Johnson RC: Aerobic spirochetes: The genus *Leptospira*, In Starr, Stolp, Truper, Balows, Schlegel(eds.), *Prokaryotes, a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria*, 582, Springer Verlag, New York, 1981.
  - 19) Johnson RC and Faine S: Genus I. *Leptospira Noguchi* 1917, In Krieg NR, John GH (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1st ed. 62, Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, 1984.
  - 20) Johnson RC and Harris VG: Purine analogue sensitivity and lipase activity of leptospires. *Appl. Microbiol.*, **16**:1584, 1968.
  - 21) Johnson RC and Muschel LH: Antileptospiral activity of normal serum. *J. Bacteriol.*, **89**: 1625, 1965.
  - 22) Johnson RC and Muschel LH: Antileptospiral activity of serum, *J. Bacteriol.*, **91**: 1403, 1966.
  - 23) Johnson RC and Rogers P: Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. *J. Bacteriol.*, **88**:1618, 1964.
  - 24) Johnson RC and Rogers P: 5-Fluorouracil as a selective agent for the growth of leptospires. *J. Bacteriol.*, **87**:422, 1964.
  - 25) Krieg NR: Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid gram-negative bacteria, In Krieg NR, John GH(eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1st ed. 71, Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, 1984.
  - 26) Lawrence JJ: The lysis of leptospires by antiserum. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **33**:91, 1955.
  - 27) Miller NG and Wilson RB: *In vivo* and *in vitro* observations of *Leptospira pomona* by electron-microscopy. *J. Bacteriol.*, **84**:569, 1962.
  - 28) Muschel LH: Serum bactericidal action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **88**:1265, 1960.
  - 29) Noguchi H: Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira(Spirochaeta) icterohaemorrhagiae*(Inada and Ido). *J. Exp. Med.*, **27**:575, 1918.
  - 30) Ritchie AE: Morphology of leptospires, The biology of parasitic spirochetes, 19. Academic Press Inc., New York, 1976.
  - 31) Ritchie AE and Ellinghausen HC: Electron microscopy of leptospires. *J. Bacteriol.*, **89**: 223, 1965.
  - 32) Sanford JP: Leptospirosis. In Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS(eds.), *Harrison's principles of internal medicine*, 11th ed. 652, McGraw-Hill Book Co., New York, 1987.
  - 33) Shenberg E: Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. *J. Bacteriol.*, **93**: 1598, 1967.
  - 34) Simbert RM: Spirochaetales, a review. *Crit. Rev. Microbiol.*, **2**:491, 1973.
  - 35) Simpson CF and White FH: Electron microscope studies and staining reactions of leptospires. *J. Inf. Dis.*, **109**:243, 1961.
  - 36) Simpson CF and White FH: Ultrastructural variations between hooked and nonhooked leptospires. *J. Inf. Dis.*, **114**:69, 1964.
  - 37) Sonnenwirth AC: The spirochetes, In Sonnenwirth AC, Jarett A(eds.), *Gradwohl's clinical*

- cal laboratory method and diagnosis. 8th ed. 1862. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
- 38) Stimson AM: A note on an organism found in yellow fever tissues, *Pub. Health Rep.*, **22**: 541, 1907.
- 39) Swain RAH: The electron-microscopical anatomy of *Leptospira canicola*. *J. Path. Bact.*, **73**:155, 1957.
- 40) Swain RAH: Electron microscopic studies of the morphology of pathogenic spirochaetes. *J. Path. Bact.*, **69**:117, 1955.
- 41) Weil A: Über eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende acute Infektionskrankheit. *Deutsches Arch. klin. Med.*, **39**:209, 1886.
- 42) World Health Organization: Guidelines for the control of leptospirosis, Faine S(ed.) WHO offprint, Geneva, 1982.
- 43) Yanagawa R and Faine S: Morphological and serological analysis of leptospiral structure. *Nature*, **211**:823, 1966.
- 44) Yanagawa R, Hiramune T and Akaike Y: Growth of saprophytic and pathogenic leptospirae on solid medium in carbon dioxide-free air. *J. Bacteriol.*, **85**:953, 1963.