

실험적으로 감염시킨 토끼에서 *Borrelia burgdorferi* 분포 및 면역반응 양상

김종배 · 박성언 · 송혜원 · 박상욱 · 김영미

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과
(1998년 10월 7일 접수)

Dissemination of *Borrelia burgdorferi* and immunological responses after experimental infection in rabbits

Jong-bae Kim, Sung-un Park, Hye-wone Song, Sang-wook Park, Young-mi Kim

Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University

(Received Oct 7, 1998)

Abstract : The visceral dissemination of *Borrelia burgdorferi* in New Zealand White rabbits was evaluated following intradermal inoculation of 1×10^8 spirochetes. We inoculated *Borrelia burgdorferi* B31, *B. garinii* KW1 and *B. afzelii* S13, respectively, and monitored the dissemination in the experimentally infected rabbits for 28 days. In the *B. burgdorferi* B31-challenged group, the spirochetes were completely cleared in rabbits at day 1 and visceral dissemination was not demonstrated. However, *B. garinii* KW1 and *B. afzelii* S13 were found to successfully disseminate in visceral organs of rabbits during the experiment period of 28 days. And experimentally infection-derived immunological responses in rabbits were identified with enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis. Based on these results, the differences in the virulence of Lyme borreliosis strains were proved in rabbit model.

Key words : *Borrelia burgdorferi*, Lyme borreliosis, dissemination, immunological response.

서 론

라임병(Lyme borreliosis)은 *Borrelia burgdorferi* 라 명명된 나선균에 의하여 사람, 개 및 기타 동물 등에서 발생

하는 열성질환으로서 미국에서 가장 발생빈도가 높은 절지동물 매개성 질병의 하나이며 유럽 및 아시아에서도 그 발생이 많은 것으로 보고되고 있다¹⁻⁶.

라임병의 원인균으로 알려진 *Borrelia burgdorferi* 는 그람 음성 미호기성 세균으로 진드기의 중장에서 서식하다

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Jong-bae Kim, College of Health Science, Yonsei University, Wonju, 220-710, Republic of Korea.

가 진드기가 포유동물에 기생, 흡혈하는 과정에서 옮겨 지게 된다. 라임병을 전파하는 진드기는 나라마다 달라 미국에서는 *Ixodes damini* 와 *I pacificus*^{7,8}, 유럽에서는 *I ricinus*⁷, 일본에서는 *I ovatus* 와 *I persulcatus* 로 알려져 있고⁹ 러시아와 중국에서는 *I persulcatus* 등으로 보고되고 있다¹⁰. 우리나라에서는 이와같은 진드기로서 *I persulcatus*, *I ricinus*, *I nipponensis* 가 서식하고 있는 것으로 알려져 있다^{11,12}. 한편 Baranton *et al*¹³은 라임병을 일으키는 *Borrelia spp.*를 *B burgdorferi sensu stricto*, *B garii*, *B afzelii* 의 3종으로 분류하였다. 우리나라의 경우 1992년 국내에서 채집한 *I persulcatus* 로부터 *B burgdorferi* 를 분리 동정함으로써 국내에서도 라임병의 발생 가능성을 시사하였으며¹⁴ 그후 *B afzelii* 및 *B garinii* 에 속하는 균종이 국내에서 분리된 바 있다¹⁵.

그러나 우리나라에서는 아직까지 사람이나 동물에서 라임병 원인균이 성공적으로 분리보고된 바가 없어 이 질병의 존재여부가 확인되고 있지는 않다. 그럼에도 불구하고 최근 *B burgdorferi* 의 매개체로 의심되어지는 *I persulcatus* 가 주로 분포하는 강원도 영동지방 주민을 대상으로 *B burgdorferi* 에 대한 항체 보유여부를 측정할 결과 양성반응을 나타내는 사람이 상당수 있음이 증명되었다^{16,17}.

라임병은 증상의 발현시기나 발현빈도가 매우 다양하기 때문에 임상적인 진단과 함께 실험실 진단이 필수적으로 수행되어야만 한다. 일반적으로 라임병은 초기 피부병변으로 만성 유주성 홍반(erythema chronicum migrans, ECM)이 특징적으로 나타나는데 그 발현빈도가 20~40% 정도이며¹⁸ 증상이 없이 진행되어 질병후기에 두통, 근육통, 입파선 통증 등의 전신증상으로 나타나거나 심장, 신경계 혹은 관절 등에 증상이 나타나기도 하는 것으로 알려졌다. 따라서 초기증상이 나타나지 않을 경우 그 진단이 매우 어렵다. 또한 *B burgdorferi* 로 인한 면역반응 양상에 있어서도 대부분의 경우 원인세균이 관절, 신경계, 심장 등에 도달하기 전에는 면역반응이 나타나지 않거나 또한 면역반응의 양상이 다양하여 해석에 어려움이 따른다^{19,20}.

현재 라임병의 진단은 주로 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)나 indirect immunofluorescent assay(IFA) 등을 통하여 항체형성을 확인하는 혈청학적인 방법²¹과 ECM의 피부병변 확인에 의존하고 있는데 혈청학적 진단법의 경우 다른 나선균과의 교차반응을 배제할 수 없

으며²² 실험결과를 확진하기 위해서 immunoblotting 분석을 수행해야 하는 번거로움이 있다. 최근에는 좀더 신속한 진단을 위하여 증합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하고 있다. Lebech *et al*²³의 실험에 의하면 증합효소 연쇄반응은 특이도나 민감도에 있어 원인균의 분리성적과 큰 차이는 없지만 원인균의 분리 배양을 시도할 경우 2주에서 길게는 8주까지의 배양기간의 소요되는데 비해 단시일에 결과를 알 수 있는 장점이 있다.

본 실험에서는 우리나라에서도 라임병을 매개하는 진드기가 서식하고 있으며 그러한 진드기에서 라임병의 원인균인 *B burgdorferi*, *B afzelii* 및 *B garinii* 가 분리됨에 따라 이에 대한 연구가 필요하다고 사료되어 라임병 원인균의 표준주인 *B burgdorferi sensu stricto* B31 균주와 국내분리균주인 *B garinii*, *B afzelii* 를 각각 토끼의 피내에 실험적으로 감염시키고 각 시기별로 각 장기조직에 원인균이 분포하는 정도를 증합효소 연쇄반응(PCR)과 southern blotting을 이용하여 확인하였으며 동시에 각 장기조직에 대한 세균배양을 병행하였다. 또한 효소결합면역측정법(ELISA)를 사용하여 감염시기별 항체역가의 변화를 조사하였으며 이를 immunoblotting을 통해 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주 : *B burgdorferi* B31(ATCC35210) 균주와 *B garinii* KW1주는 건국대학교 의과대학 미생물학교실에서 *B afzelii* S13주는 국립보건원 특수세균과에서 각각 분양받아 본 실험에 사용하였다. 분양받은 각각의 라임병 원인균주의 배양은 Barbour-Stoenner-Kelly(BSK II) 배지²⁴에 접종하여 34°C CO₂ incubator에서 1주간 배양한 후 각각의 세균수를 확인하였다. 이들 시험균주의 병원성을 증강시키기 위하여 각각의 균주를 1×10⁸/ml로 희석한 세균부유액 200μl씩을 3주령의 mouse(ICR)에 피하 주사하였다. Mouse 접종후 1일, 3일, 5일째에 접종부위를 biopsy punch를 이용하여 생검한 후 생검조직을 BSK II 배지에 다시 2주간 배양하고 암시야 현미경을 통해 운동성이 좋은 세균을 확인한 다음 원심분리하여 세균수를 1×10⁸/ml로 조종하여 토끼를 이용한 실험적 감염 실험에 이용하였다.

라임병균의 실험적 감염실험 : 실험용 토끼는 생후

1개월령의 뉴질랜드산 흰토끼(New Zealand White rabbit)를 사용하였으며 각 세균에 대한 실험을 위하여 각각 4마리를 사용하였다. 세균접종 2시간 전에 면역억제제로서 dexamethasone 1ml를 근육주사한 다음 mouse에 계대배양하여 병원성이 증강된 세균주를 1×10^8 /ml로 조정된 다음 세균부유액 1ml씩을 실험용 토끼에 피내주사하였다. 이후 접종 1일, 1주, 2주, 4주 간격으로 각각 1마리의 토끼를 황산마그네슘(MgSO₄) 용액을 이용하여 안락사 시킨 다음 부검을 실시하고 좌우 피부조직, 각 관절 부위의 활액낭 막(synovial membrane), 근막(fascia), 림프절(lymph node), 심낭(pericardium), 척수 경막(meningeal dura mater) 등의 시료를 무균적으로 채취하였다. 채취한 각 장기시료를 양분하여 그중 받은 멸균한 micropestle를 이용하여 파쇄한 다음 BSK II 배지에 접종배양하여 34°C CO₂ incubator에서 배양하여 라임병균의 분리를 시도하였으며 나머지 반 정도의 각 장기조직을 PCR 검사를 위한 DNA를 추출하는 시료로 이용하였다.

한편 라임병 세균접종전과 조직생검전에 채혈하여 혈청을 분리하여 -20°C에 보관하였다가 ELISA와 immunoblotting을 이용한 면역학적인 반응양상을 조사하는 실험에 이용하였다.

각 장기조직에서 DNA 추출 : 중합효소 연쇄반응을 위하여 검출된 조직에서 Appel *et al*²⁵의 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 동결된 조직을 micropestle로 잘게 으갠 후 digestion buffer(100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 25mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1mg/ml proteinase K) 500 µl를 넣고 50°C에서 하룻밤(12~18시간)동안 분해시켰다. 이와같이 소화시킨 생검조직 부유액을 5분간 12,000rpm에서 원심분리한 후 얻은 상층액을 이용하여 통상적인 방법으로 phenol : chloroform : iso-amyl alcohol(25 : 24 : 1) 혼합물 500µl를 넣고 DNA 추출을 시행하였다. 이와같이 처리하여 얻은 상층액을 ethanol을 가하여 원심침전시키

고 다시 70% ethanol로 세척한 다음 건조시켰다. 이렇게 추출한 DNA를 TE 완충액(10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 8.0) 25µl로 재부유시켜 PCR용 template DNA로 사용하였다.

중합효소 연쇄반응 : 라임병 원인균의 DNA 증폭을 위해 사용한 primer set는 Marconi와 Garon²⁶이 사용한 것을 참고로 하여 주문제작한 것을 사용하였다. 중합효소 연쇄반응은 앞서 각 장기조직에서 추출한 DNA 2µl에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5mM이 되도록 혼합한 dNTP를 2µl 넣은 후 10X buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂) 2.5µl, primer set(20pmol/µl)를 각각 2.5µl, Taq DNA polymerase 0.3125U)를 첨가하고 멸균중류수로 최종 반응하는 양이 25µl이 되도록 한 후 thermal cycler (Hybaid Limited, U.K.)에서 표적 DNA 증폭을 시도하였다. 반응은 총 35 cycle로 시행하였으며 첫 cycle이 시작하기 전에 94°C에서 2분 30초동안 가온한 후 매cycle당 94°C에서 45초동안 변성반응, 47°C에서 45초동안 결합반응, 72°C에서 1분 30초동안 중합반응을 시행하였다. 또한 마지막 중합반응은 72°C에서 15분간 지속하여 유지함으로써 완전한 중합이 이루어지도록 하였다. 반응이 끝난 후 1.5% agarose gel electrophoresis를 실시하여 target sequence의 증폭여부를 확인하였다.

Southern blotting : PCR 결과 증폭된 DNA band 중 target이 되는 *B burgdorferi* sensu lato 16S rRNA sequence에 해당하는 band를 특이적으로 확인하기 위하여 southern blotting을 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel을 depurination 용액(0.2M HCl)에 10분, 변성용액(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에 10분, 중화용액(0.5M Tris pH 7.0, 3.0M NaCl)에 10분 처리한 후 transfer solution(20X SSC)에 90분 반응시켜 nylon paper에 전사하였다. 이 membrane을 80°C 진공오븐에 2시간 정치하였다. 이후 자체 design한 B16S oligonucleotide probe(5'-GAACGGGTGAGTAACGCG-3')를 ECL kit

Table 1. Nucleotide sequences of primers for PCR used in this study*

Primer set	Plus strand primer(5'-3')	Minus strand primer(5'-3')
<i>B burgdorferi</i> B31(BB)	GGGATGTAGCAATACATTC	ATATAGTTTCCAACATAGG
<i>B garinii</i> (BG)	GGGATGTAGCAATACATCT	ATATAGTTTCCAACATAGT
<i>B afzelli</i> (BA)	GCATGCAAGTCAAACGGA	ATATAGTTTCCAACATAGC

*From Marconi and Garona²⁶ with corrections of errors in published sequences in two of six primers.

(Amersham, RPN 2131)을 이용하여 제작회사의 권장술식에 따라 labelling 한 다음 hybridization, membrane washing 과정을 거친 후 detection 용액을 처리하여 X-ray film에 25분 노출시킨 다음 특이 band가 나타나는 것을 확인하였다.

ELISA : 토끼에 접종한 각각의 라임병균 세균주를 BSK II 배지에 접종하여 1주일간 배양하고 충분히 증식한 각 세균의 배양액을 8,000rpm으로 30분동안 원심분리한 후 그 침사를 1ml 증류수에 다시 부유하였다. 이 부유액을 sonicator(Vira Cell™, Sonics & Materials Inc., Danbury, USA)를 이용하여 60W에서 10초 간격으로 10회 초음파분쇄 처리하였다. 처리한 용액은 Lowry 법²⁷을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 이와같이 준비한 각각의 단백질 항원을 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 1µg/ml 농도로 희석하여 96-microtiter plate에 well당 50µl씩 분주하여 4℃에서 하룻밤동안 방치하였다. 항원을 부착시킨 plate를 PBS-0.05% Tween 20 용액으로 5분간 3번 세척하고 3% bovine serum albumin(BSA) 용액을 200µl씩 분주하여 37℃에서 1시간동안 blocking을 실시하였다. 다시 PBS-0.05% Tween 20 용액으로 5분간 3번 세척한 후 1:400으로 희석한 대조균과 실험균 혈청을 각각 50µl/well 분주하여 37℃에서 1시간동안 항원-항체 반응을 진행시켰다. 이것을 PBS-0.05% Tween 20 용액으로 5분간 3번 세척한 후 1:4,000으로 희석한 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG를 첨가한 후 37℃에서 1시간동안 반응시키고 PBS-0.05% Tween 20 용액으로 세 번 세척하였다. 기질액(0.1M phosphate-citrate buffer, pH 5.0 25ml, 30% H₂O₂ 10µl, σ -nitrophenylenediamine 10mg)를 50µl씩 분주하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 2.5M H₂SO₄를 50µl/well 분주하여 반응을 정지시키고 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sodium dedecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) : 라임병 원인균에 대한 immunoblotting을 실시하기 위해 Laemmli²⁸의 discontinuous buffer system을 이용한 SDS-PAGE를 실시하였다. 본 실험에 사용한 gel(100×100×0.4mm)은 12% polyacrylamide gel을 이용하였다. 라임병 원인균 항원과 sample 완충액(0.1M Tris-HCl, 2% SDS, 20% glycerol, 1% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue, pH 6.8)을 혼합하여 100℃ 항온 수조에서 5분간 처리하고 각각의 시료를 bromophenol blue의 색소가 gel의 바닥에 이를 때까지 20mA로 전기영

동한 후 단백질 분석을 위해 Coomassie 염색을 하거나 immunoblotting을 실시하였다.

Immunoblot : 실험적으로 라임병균을 감염시킨 토끼에서의 면역반응 양상을 조사하기 위하여 접종세균을 SDS-PAGE한 후 Towbin *et al*²⁹의 방법에 따라 전기영동한 gel의 단백질 시료를 140mA로 1시간동안 nitrocellulose membrane에 전기적 전사를 실시하였다. Nitrocellulose membrane의 단백질 항원분획과 각 시기별로 채혈한 가토혈청을 반응시켜 항원-항체 반응을 유도한 다음 alkaline phosphatase가 결합된 anti-rabbit IgG(Promega)를 1:7,500으로 희석하여 반응시킨 후 기질성분인 nitroblue tetrazolium(NBT)과 5'-bromo-4-chloro-3'-indoyl-phosphate(BCIP)를 추가하여 발색반응을 유도함으로써 항원-항체 반응 양상을 확인하였다.

결 과

토끼 조직내에서 라임병균 분포 : 각각의 라임병균을 피내 접종하여 실험적으로 감염시킨 토끼에서 감염기간에 따른 라임병균의 분포를 조사하였다. *B burgdorferi* B 31(ATCC35210) 균주를 실험적으로 감염시킨 실험군에서는 접종 1일후에 접종부위의 피부조직에서 접종한 균주가 관찰되었으나 이후 4주간의 실험기간에 걸쳐 접종세균은 원인균의 분리배양 및 PCR 방법 모두에서 확인되지 않았다.

B garinii KW1 균주를 감염시킨 실험군에서는 접종 1일후에는 접종부위 피부조직에서 1주일후에는 접종부위 피부조직과 세균접종부위와 같은 쪽은 좌측 액와림프절(left axillary lymph node)에서 분리되었으며, 접종 2주후에는 접종부위 피부조직, 우측 슬관절(stifle joint)과 주관절(elbow joint)의 활액낭 막(synovial membrane), 좌측 및 우측 천경림프절(left and right superficial cervical lymph node), 우측 액와림프절(right axillary lymph node), 우측 슬와림프절(right popliteal lymph node), 우측 전지 및 후지근막(right front and hind fascia) 및 척수경막(meningeal dura mater) 등의 거의 대부분의 장기시료에서 라임병균을 확인할 수 있었다. 이에 비하여 접종 4주후에는 접종균주가 실험동물 체내에서 확인되지 않았다.

B afzelli S13주를 실험감염시킨 실험군에서는 접종 1일후 및 1주일 시료에서 접종부위 피부조직에서만 접종세균이 관찰되었고 접종 2주후에는 접종부위 피부조

직, 활액낭막(좌우견관절, 우측 슬관절 및 우측 주관절), 좌측 천경립프절, 좌측 전지근막에서 접종균주가 PCR 및 southern blot analysis에서 확인되어(Fig 1), 실험적으로 접종한 *B afzelii* S13주가 전신을 통해 감염이 성립이 되었음을 알 수 있었다. 그러나 접종 4주일 후에는 *B garinii* KW1 균주를 감염시킨 실험군에서와 마찬가지로 접종균주가 전혀 확인되지 않았다.

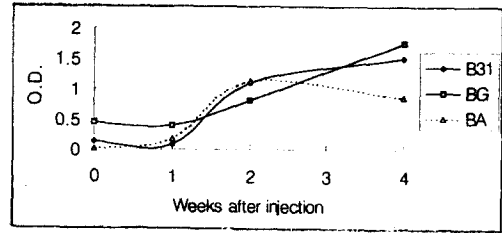


Fig 2. Determination of immunological responses of rabbits against experimentally infected *B burgdorferi* B31(B31), *B garinii* KW1(BG), and *B afzelii* S13(BA) strains in ELISA.

실험군에서 접종균주에 대하여 1주일 후부터 항체가 급격히 상승하기 시작하여 접종 2~4주까지 계속적으로 면역반응이 증가하는 추세를 보였으며 이 시기에 최고의 역가를 나타내는 전형적인 면역반응 양상을 나타내었다. 또한 각 시기별 혈청을 대상으로 immunoblotting을 수행하여 Fig 3과 같은 결과를 얻었다. 토끼에 감염이 성립되지 않았던 *B burgdorferi* B31을 접종받은 실험군의 경우 감염초기 31kDa(OspA) 항원에 대한 항체반응이 나타나다가 감염후기에 21kDa(OspC) 항원에 대한 항체반응이 유도되었다. 한편 *B garinii* KW1을 접종한 실험에서는 감염초기부터 41kDa(fragellin), 34kDa(OspB), 31kDa(OspA), 21kDa(OspC)의 주요항원에 대한 항체반응이 강하게 나타나 후기까지 지속되는 양상을 보였다. *B afzelii*

Fig 1. DNAs extracted from rabbit tissue samples infected with *B afzelii* S13 strain were tested for specific amplification in PCR and southern blot analysis. Lane M, pBH20 marker; lane 1, positive control of reference strain(*B afzelii* Y18); lane 2, skin; lanes 3 to 5, synovial membrane(left, right shoulder and left stifle joint); lane 6, left superficial cervical lymph node; lane 7, left front fascia; lanes 8 and 9, synovial membranes(left and right elbow joint); lanes 10 to 12, lymph nodes(right superficial cervical, left axillary and right axillary lymph node). Specific amplified products of 590-bp fragments were observed in PCR reactions and were specific to the B16S oligonucleotide probe in southern blot analysis.

라임병균 접종에 대한 가토의 면역반응 양상 : 라임병균 접종전과 조직생검 또는 부검직전에 채혈하여 얻은 각각의 혈청을 이용하여 ELISA를 시행한 결과 Fig 2에서와 같이 본 실험에서 사용한 *B burgdorferi* B31(ATCC 35210), *B garinii* KW1 및 *B afzelii* S13주를 접종한 모든

Fig 3. Seroreactivity patterns of rabbits in immunoblot analysis after experimental infections of *B burgdorferi*. Above sera were collected at day 7, day 14, day 21 and day 28 after experimental infection, respectively. Lane 1 to 4, sera against *B burgdorferi* B31; lane 5 to 8, sera against *B garinii* KW1; and lanes 9 to 12, sera against *B afzelii* S13.

S13 접종군은 감염초기 34kDa(OspB), 31kDa(OspA) 항원에 대한 항체반응이 나타났고, 41kDa(fragellin)과 21kDa(OspC) 항원에 대한 반응도 약하게 나타났으며 시간이 지날수록 면역반응이 강해지는 결과를 나타내었다.

고 찰

라임병의 진단은 역학적 조사와 함께 피부병변 및 발열 등 전신증상을 검진하는 임상적 진단을 바탕으로 이루어지고 있다. Steere⁶는 사람의 라임병 환자중 60~80%에서 유주성 홍반의 증상이 나타나며 나머지는 발열이나 감기와 같은 전신증상을 동반한다고 하였으며 Shrestha *et al*³⁰은 라임병으로 확진된 환자의 60% 정도에서 발열이 동반되며 신경계, 관절 등에 증상이 나타나는 전신적 감염으로 진행될 경우 빈번하게 나타난다고 하였다. 이와같이 라임병의 증상은 발현시기나 발현형태 및 빈도가 다양하기 때문에 신속하고 정확한 진단을 위해서는 실험실 진단이 필수적이라 할 수 있다.

본 연구에서는 *B burgdorferi sensu lato*의 대표적인 세균류의 라임병 균주를 실험동물에 접종하고 일정시간별로 접종세균의 실험동물 체내에서의 전파 및 증식정도를 원인균을 분리배양하는 미생물학적 방법과 조직에서 추출한 DNA를 이용한 PCR 법을 사용하여 비교 검토함으로써 라임병의 진단시 좀더 효과적이고 신속한 진단법을 제시하고자 하였다.

B burgdorferi B31(ATCC35210) 균주를 피내접종한 실험군에서는 접종 1일후의 피부조직에서만 접종한 세균이 관찰되었으며 그 이후 4주간의 실험기간에 걸쳐 접종세균의 존재를 확인할 수 없었다. 본 실험의 결과는 실험에 사용한 균주(ATCC35210)가 지속적인 실험실 계대배양에 따른 동물에 대한 병원성이 저하된 비병원성 균주로서 토끼에서 실험적 감염을 일으키지 않았다는 Foley *et al*³¹의 실험결과와 일치하였다. 국내에서 진드기로부터 분리한 *B garinii* KW1 균주를 감염시킨 실험군에서는 접종 1주일 후에 접종부위 피부조직과 좌측 액와림프절에서 접종균주가 확인되어 림프관을 통한 라임병균의 전파를 인정할 수 있었으며 감염이 진행됨에 따라 접종 2주후에는 사지관절의 활액막 낭, 표피 및 심부의 각 림프절, 근막 등에서 모두 접종한 세균이 확인되었다. 특히 척수경막에서도 접종한 균주가 검출되어 라임병균의 전신감염시 중추신경계로도 라임병균이 전파됨을 입증할

수 있었다. 이와같은 실험결과는 사람에서 라임병의 주요한 임상증상의 하나로 중추신경계 증상을 들 수 있으며 그와 같은 라임병균의 전파과정을 본 실험을 통하여 실험적으로 확인하였다. 그러나 세균접종후 4주가 경과한 경우에는 접종한 균주가 실험동물 체내에서 완전히 제거되는 것으로 나타났다. 한편 국내분리주 *B afzelii* S13주를 이용한 실험감염의 경우에도 *B garinii* KW1 균주의 실험감염시 접종세균이 실험동물의 체내에서 전파되는 양상과 비슷하였으나 *B garinii* KW1 균주에 비하여 실험동물에 대한 병원성이 다소 미약하여 미생물이 전파된 장기재료의 수가 적었다.

이상과 같은 *B burgdorferi sensu lato*에 속하는 3종의 라임병균을 이용한 동물실험의 결과는 접종하는 세균의 실험실내 계대배양(*in vitro* passage) 횟수와 실험동물의 종류별로 감염성적이 차이가 크며³³ 특히 같은 실험동물 종간에도 품종(*breed*) 간의 차이에 따라 Lyme arthritis가 유발되는 정도에 큰 차이가 있다고 보고³⁴되고 있는 것과 유사한 결과라고 판단된다. Bush *et al*³⁵은 36명의 neuroborreliosis 환자에서 원인균의 종류를 조사한 결과 *B garinii* 58%, *B afzelii* 28%, *B burgdorferi sensu stricto* 11%의 순이었다고 보고한 바 있으며 이는 본 실험에서 *B garinii* 감염실험시 척수경막에서 접종한 세균이 확인된 사실과도 밀접한 관련이 있을 것으로 추정된다.

한편 전통적인 방법에 따라 조직으로부터 라임병균을 분리한 성적과 조직에서 추출한 DNA를 이용한 PCR 성적 모두 접종세균의 검출률은 50% 내외로 나타났다. 이와같이 저조한 라임병균 검출률은 Schwarts *et al*³⁶이 초기 라임환자의 피부조직으로부터 얻어진 검체에서 PCR 법을 통한 *B burgdorferi*의 분리율이 59% 정도로 미생물 배양시의 57%와 비슷한 결과를 얻었다고 보고한 것이나 Chang *et al*³⁷이 동물실험을 통해 원인균 분리배양시와 PCR 결과에 원인균 검출률에서 차이가 없음을 보고한 결과 등과 유사한 것으로 나타났다. PCR을 통한 진단법이 원인균의 분리배양을 통한 방법에 비해 더 신속한 진단을 할 수 있음에도 불구하고 그 검출율에 있어서 차이가 없는 이유는 무엇보다 적출된 조직의 DNA로 인하여 세균의 target DNA가 효과적으로 증폭되지 않았기 때문으로 생각된다. Cogwell *et al*³⁸은 500ng 이상의 숙주조직 DNA가 PCR mixture에 혼합되었을 때 borrelia target DNA의 검출이 불가능하다고 보고하였다. 또한 Schmitz *et al*²⁰은 borrelial DNA의 변화로 인한 target gene의 sequence

차이로 인하여 위음성으로 판독될 수도 있다고 하였다.

실험적 감염후 시기별로 효소결합면역측정법(ELISA)를 통해 확인한 항체가 변화양상은 개체마다 약간의 차이는 있었으나 모두 접종후 4주까지 항체가가 증가하는 추세를 보였으며 실험적인 감염이 성립되지 않은 *B burgdorferi* B31을 접종한 실험군에 비하여 실험적 감염이 성립되었던 *B garinii* 및 *B afzelii* 접종군에서 훨씬 강한 면역반응을 나타내었다(Fig 3). 한편 immunoblotting을 통해 *Borrelia* spp.의 어떤 항원에 대한 항체가 형성되었는지를 확인한 결과 초기에는 주로 fragellin(41kDa), OspA(31kDa), OspB(34kDa) 항원에 대하여 반응을 나타내었으며 감염후기에 OspC(21kDa) 항원에 대해서도 반응이 나타났다. Norman *et al*³⁹은 *Borrelia* spp.에 대한 혈청학적인 분석을 통해 라임병 원인균의 주요 항원들 중에 적어도 4가지 이상에 대해서 band가 형성되어야 한다고 보고한 바 있다. 또한 Schwan *et al*⁴⁰은 OspA 항원이 척추동물에 감염이후 발현되지 않는다고 하였으며 Denise *et al*⁴¹은 OspA 항원으로 면역시킨 토끼에 *Borrelia* spp.를 재접종한 결과 OspA에 대해 낮은 항체가가 나왔으며 따라서 감염이후에 다른 종류의 항원이 면역반응에 관여하고 있을 것으로 보고하였다. 이에 근거할 때 본 실험 결과 OspA 항원은 주로 접종후 초기에만 면역반응에 관여하며 감염이후 OspC 항원이 발현되어 항원-항체 반응을 유도한 것으로 유추할 수 있다. 따라서 본 실험의 결과 라임병 환자혈청의 항체반응 양상을 분석함으로써 라임병의 감염시기 등을 추정할 수 있을 것으로 예상된다.

결 론

라임병 원인균인 *B burgdorferi* B31, *B garinii* KW1 및 *B afzelii* S13 균주를 토끼 측복부 피부에 각각 접종한 후 접종군중 및 접종후 경과시간에 따른 조직생검 및 부검을 통하여 얻은 검체를 이용하여 접종한 세균에 대한 분리배양과 PCR을 수행함으로써 라임병균의 토끼체내에서의 분포양상을 조사하였다. *B burgdorferi* B31을 접종한 실험군의 경우 접종 1일후 피부조직에서만 원인균 분리가 되었으며 이후에는 접종한 세균이 검출되지 않았다. 그러나 *B garinii* 및 *B afzelii* 접종군에서는 접종후 21일 후까지도 각 장기에서 접종한 세균이 검출되어 라임병균의 균종별로 토끼에 대한 병원성이 차이가 있었

다. 한편 ELISA와 immunoblotting을 통해 라임병균에 대한 면역반응 양상을 살펴본 결과 모든 실험군에서 실험 관찰기간 4주까지 항체가가 모두 상승하는 경향을 보였으며 감염초기에는 주로 OspA 항원에 대한 반응이 시간이 경과할수록 OspC 등에 대한 면역반응이 강하게 나타났다. 이와같은 현상은 *B burgdorferi* B31을 접종한 실험군에 비하여 *B garinii* 및 *B afzelii* 접종군에서 훨씬 뚜렷하였다.

참 고 문 헌

1. Anderson KF. Epizootology of *Borrelia* in *Ixodes* tick vectors and reservoir hosts. *Rev Infect Dis*, 11:1451-1459, 1989.
2. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, *et al*. Lyme disease-a tickborne spirochetosis? *Science*, 216:1317-1319, 1982.
3. Margnarelli LA, Anderson JF. Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*, 26:1482-1486, 1988.
4. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, *et al*. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med*, 308:733-740, 1983.
5. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, *et al*. Lyme arthritis; and epidemic of oligo-arthrocellular arthritis in children and adults in three connection communities. *Arthritis Rheum*, 20:7-17, 1977.
6. Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med*, 321:586-596, 1989.
7. Burgdorfer W. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med*, 57:515-520, 1984.
8. Schmid GP. The global distribution of Lyme disease. *Yale J Biol Med*, 57:617-618, 1984.
9. Masuzawa T, Okada Y, Beppy Y, *et al*. Immunological properties of *Borrelia burgdorferi* isolated from the *Ixodes ovatus* in Shizuoka. *Japan Microbiol Immunol*, 35:913-919, 1991.
10. Dekonenko EJ, Steere AC, Berardi VP, *et al*. Lyme borreliosis in the Soviet Union, A cooperative US-

- USSR report, *J Inf Dis*, 158:748-753, 1988.
11. 백승철, 오영진, 김사용 등. *Ixodes nipponensis* 에 의한 참진드기 교상 1례. 대한피부학회지, 27:83-88, 1989.
 12. 이순형, 채종일, 고원규 등. 진드기에 의한 인체 두피감염 1례. 기행충학잡지, 27:67-69, 1989.
 13. Baranton G, Postic D, Saint-Girons I, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS 461 associated with Lyme boreliosis. *Int J Syst Bacteriol*, 42:378-383, 1992.
 14. 박경희, 이승현, 원용재 등. 진드기에서 라임병의 원인균인 *B burgdorferi* 의 분리. 대한미생물학회지, 27:307-312, 1992.
 15. Park KH, Chang WH, Schwan TG. Identification and characterization of Lyme disease spirochetes. *Borrelia burgdorferi sensu lato*, isolated in Korea. *J Clin Microbiol*, 31:1831-1937, 1993.
 16. 이형환, 강현, 정운섭 등. *Borrelia burgdorferi* 에 대한 등줄쥐의 혈청 간접면역형과 항체가. 대한미생물학회지, 27:163-171, 1992.
 17. 조상래, 김주덕, 정운섭 등. 강원도 영동지역 주민에 있어서 라임병균 *B burgdorferi*에 대한 항체가. 대한미생물학회지, 25:163-169, 1990.
 18. Rahn DW, Malawista SE. Lyme disease: Recommendations for diagnosis and treatment. *Ann Intern Med*, 114:472-481, 1991.
 19. Krause A, Burmester GR, Rensing A, et al. Cellular immune reactivity of recombinant OspA and Flagellin from *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis: Complexity of humoral and cellular immune responses. *J Clin Invest*, 90:1077-1084, 1992.
 20. Schmitz JL, Powell CS, Folds JD, Comparison of seven commercial kits for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 12:419-424, 1993.
 21. Crafr JE, Grodwichi R, Steere AC. The antibody response in Lyme disease: Evaluation of diagnostic tests. *J Infect Dis*, 149:789-795, 1984.
 22. Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JF, et al. Cross-reactivity of non-specific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J Clin Microbiol*, 28:1276-1279, 1990.
 23. Lebech AM, Hindersson P, Vuuse J, et al. Comparison of *in vitro* culture and polymerase chain reaction for detection of *B burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. *J Clin Microbiol*, 29:731-737, 1991.
 24. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med*, 57:521-525, 1984.
 25. Appel MJG, Allan S, Jacobson RH, et al. Experimental Lyme borreliosis in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis*. 167:651-664, 1993.
 26. Marconi RT, Garon CF. Development of Polymerase Chain Reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and species-specific identification of Lyme disease isolates by 16SrRNA signature nucleotide analysis. *J Clin Microbiol*, 30:2830-2834, 1992.
 27. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951.
 28. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
 29. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and applications. *Proc Nat'l Acad Sci USA*, 76:4350-4353, 1979.
 30. Shresta M, Grodzichi RI, Steere AC. Diagnosing Early Lyme Disease. *m J Med*, 78:235-240, 1995.
 31. Foley DM, Gayek RJ, Skare JT, et al. Rabbit model of lyme borreliosis: erythema migrans, infection-derived immunity and identification of *Borrelia burgdorferi* proteins associated with virulence and protective immunity. *J Clin Invest*, 96:965-975, 1995.
 32. Luft BJ, Steinman CR, Neimark HC, et al. Invasion of central nervous system by *Borrelia burgdorferi* in acute disseminated infection. *JAMA*, 267:1364-1367, 1992.
 33. Moody KD, Barthold SW, Terwilliger GA. Lyme borreliosis in laboratory animals: Effects of host species and *in vitro* passage of *Borrelia burgdorferi*. *Am J*

- Trop Med Hyg* , 43:87-92, 1990.
34. Brown CR, Reiner SL, Clearance of *Borrelia burgdorferi* may not be required for resistance to experimental Lyme arthritis. *Infect Immun* 66:2065-2071, 1998.
 35. Busch U, Hizo-Teufel C, Boehmer R, *et al.* Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B burgdorferi* sensu stricto, *B afzelii*, *B garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulse-field gel electrophoresis and PCR. *J Clin Microbiol* , 34:1072-1078, 1996.
 36. Schwartz IRA, Wormser GP, Cooper D, *et al.* Diagnosis of Early Lyme Disease by polymerase Chain Reaction Amplification and culture of skin biopsies from Erythema Migrans Lesions. *J Clin Microbiol* , 30:3082-3088, 1992.
 37. Chang YF, Straubinger RK, Jacobson RH, *et al.* Dissemination of *Borrelia* After Experimental Infection in Dogs. *J Spiro Tick-borne Dis* , 3:80-86, 1996.
 38. Cogwell FB, Bantar CE, Huges TG, *et al.* Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. *J Clin Microbiol* , 34: 980-982, 1996.
 39. Narman GL, Antig JM, Bigaignon G, *et al.* Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B garinii* and *B afzelii* Western Blots (Immunoblots). *J Clin Microbiol* , 34:1732-1738, 1996.
 40. Schwan TG, Piesman WT, Golde MC, *et al.* Induction of an outer surface protein *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Nat'l Acad Sci USA* , 92: 2909-2913, 1995.
 41. Foley DM, Wang YP, Wu XY, *et al.* Acquired Resistance to *Borrelia burgdorferi* Infection in the Rabbit. *J Clin Invest* , 99(8):2030-2035. 1997.
-