大韓獸醫學會誌(2010) 第50卷 第3號
Korean J Vet Res(2010) 50(3) : 213~220

<원 저>

Bacteriophage의 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 효능 평가

차승빈[1] · Nabin Rayamajhi[1] · 이원정[1] · 신민경[1] · 노유미[1] · 정명환[1] · 명길선[2]
안영태[2] · 허철성[2] · 유한상[1,*]

[1]서울대학교 수의과대학, BK21 수의과학인력양성 사업단, 중점연구소
[2]한국 야쿠르트 R&D Center
(게재승인: 2010년 6월 29일)

Evaluation of *in vitro* and *in vivo* bacteriophage efficacy against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection

Seung-Bin Cha[1], Nabin Rayamajhi[1], Won-Jung Lee[1], Min-Kyoung Shin[1], Yu-Mi Roh[1], Myung-Hwan Jung[1], Kil-Sun Myoung[2], Young-Tae Ahn[2], Chul-Sung Huh[2], Han Sang Yoo[1,*]

[1]*College of Veterinary Medicine, BK 21 for Veterinary Science and KRF Zoonotic Priority Research Institute, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*
[2]*R&D center, Korea Yakult, Yongin 449-901, Korea*
(Accepted: June 29, 2010)

Abstract : *Salmonella* (*S.*) Enterica infection ranks among the most common food borne bacterial infections worldwide. Although there are six subspecies of *S.* Enterica, the vast majority of human and animal infections are caused by strains belonging to subspecies 1 serovar Typhimurium and Enteritidis. Recent reports on antibiotic resistance of *Salmonella* spp. are rising steadily. The increasing problem of antibiotic resistance has rekindled interest in bacteriophage to therapy. Therefore, we investigated the efficacy of bacteriophage in *S. enterica* serovar Enteritidis infected mice and pigs by measuring of body condition, body weight, bacterial colonization and weight of organs based on the *in vitro* analysis. *In vitro* experiment, phage cultured with *S.* Enteritidis showed clear lysis pattern, the plaque forming unit (PFU) of our phage culture was 1.5×10^{11} PFU/mL, and phage showed its maximum activity at 4 h post inoculation. In mouse experiment, there was no significant difference among experimental groups in the general body conditions and body weight of mice. However, there was difference in weight of liver and spleen depending on the experimental group ($p < 0.05$). The weight of liver and spleen were reduced by the phage treatment. Also bacterial colonization in spleen and liver were significantly reduced by the phage treatment. In pig experiment, the general body conditions and body temperature exhibited not much difference among the pigs except few pigs in group 3 which showed poor body conditions. From the feces in each group, we could isolate the *S.* Enteritidis only from group 3. Bacterial enrichment culture was necessary for isolating the bacteria from 5 dpi and 10 dpi, however direct isolation was possible from 15 dpi feces. In phage treated group, postmortem lesion was better than non-phage treated group. Recently, antibiotic resistance concerns on the food-borne bacterial pathogens have been increasing because of the wide spread of the antibiotics resistance genes. This concern is widely transmitted to the human related public health. As one of the alternative treatments on the bacterial pathogens, attempt using phages have been made to control the bacterial diseases. The positive possibility of the trail using phage was observed to control the *S. enterica* serovar Enteritidis in this study even though the further analysis has been remained.

Keywords : bacteriophage, efficacy, *in vivo* and *in vitro*, *Salmonella* Enteritidis

*Corresponding author: Han Sang Yoo
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: +82-2-880-1263, Fax: +82-2-874-2738, E-mail: yoohs@snu.ac.kr]

서 론

최근 축산업에서 항생제 내성균의 출현 및 증가에 관한 문제는 여러 측면에서 매우 중요시되고 있고 가장 많은 관심이 집중되는 분야 중 하나이다. 항생제 내성에 대한 다양한 연구가 진행되면서, 최근 항생제를 대체할 수 있는 새로운 예방, 치료기술개발에 초점을 맞춘 많은 연구가 진행되고 있다 [16, 17]. 이러한 연구 중 하나가 bacteriophage(phage)를 이용하는 기법이다. Bacteriophage를 이용한 전염성 질병치료에 관한 연구는 1915년 Twort가 처음 bacteriophage를 발견한 직후인 1917년 D'Herelle가 가금티푸스(avian typhoid)의 원인체인 *Salmonella* (*S.*) Gallinarum에 적용함으로서 시작되었다 [7]. 이후 1930-1940년대에는 동물에서 뿐만 아니라 사람에서도 여러 나라에서 적용하여왔다 [15]. 그러나 항생제의 발견으로 bacteriophage의 이용이 급감하였으나, 항생제의 지속적인 사용, 오남용 등으로 항생제 내성균의 출현으로 이를 제어하기 위한 방법 중 하나로 bacteriophage를 이용하는 기법이 매우 유용한 것으로 나타나 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다 [3, 22]. Bacteriophage는 자연계에 널리 존재하고 있고, 그들의 숙주인 세균들과 공동의 환경을 공유하면서 존재하고 있다 [4]. 즉, 이러한 bacteriophage는 사람과 동물의 장관, 음식물, 토양, 물, 습지등과 관련된 여러 환경에 존재하고 있다. Bacteriophage의 다양한 곳에 분포, 초기 사람에의 적용 및 최근 동물 및 사람에서의 연구결과를 볼 때에 bacteriophage는 매우 안전한 것으로 생각된다 [18, 24, 29-32].

Bacteriophage 는 life cycle에 따라서 virulent(lytic)과 temperate로 구분할 수 있으며, 이중 lytic life cycle을 가지는 phage를 치료 목적으로 사용할 수 있다. 이는 lytic life cycle을 가지는 phage만이 host cell 및 DNA 에 손상을 주고 phage가 복제되어 progeny phage로 될 수 있기 때문이다 [11]. Temperate life cycle을 가지는 phage는 prophage 상태로 숙주세포의 DNA에 삽입되어 숙주세포의 lysis 없이 숙주세포의 DNA와 같이 복제된다. 이러한 prophage도 lytic phage로 변환될 수 있으나, 숙주세포로부터 불필요한 DNA를 다른 세포로 전달할 수 있기 때문에 치료 목적으로 사용하지 않고 있다 [2, 15]. 또한, Bacteriophage를 치료 목적으로 사용하기 위해서는 숙주세포와 phage 간에 적절한 감염률을 나타내어야 하며 또한 숙주세포와 phage 간에 특이성(specificity)을 나타내어야한다 [8, 12, 23]. 이처럼 phage를 치료목적으로 사용하기 위해서는 많은 세균숙주에서 lytic cycle을 가져야 하며, phage-resistant variant인 세균숙주를 lysis 또는 killing 할 수 있어야 한다.

*Salmonella*는 사람과 동물의 장관 내 급성 감염을 유발하는 균으로, 오염된 식품을 통하여 사람에 전염될 수 있는 인수공통전염병의 주요한 원인체중 하나이다 [9]. 돼지에 감염 시 급성패혈증, 또는 장염을 유발하여 폐사하거나 만성적인 설사 등으로 성장지연에 따라 양돈 산업에 막대한 경제적인 피해를 주는 질병이다. 뿐만 아니라 돼지에 감염되어 있던 *Salmonella* 균이 돈육 등에 오염되어 사람에 전파될 수 있는 매우 높은 위험성을 가진 균이다 [6, 14]. 지금까지는 이 *Salmonella* 균을 제거하기 위하여 대부분 항생제를 사용하여 왔다. 그러나, 양축농가에서 항생제 오용 및 남용에 따라 다양한 형태의 항생제 내성균이 출현 및 항생제 잔류 등으로 인한 안전축산물 생산에 문제점으로 부각되고 있어, 항생제를 사용한 치료가 매우 어려운 상태에 직면하고 있어서 대체 치료법이 요구되고 있고 또한 다양한 시도들이 진행되고 있다 [1, 15-17]. 이 중 하나가 bacteriophage를 이용한 phage 치료법이다.

이에 이 연구에서는 양돈 산업에 막대한 경제적인 피해를 주는 돼지 설사병의 효율적인 치료 대책을 수립할 목적으로 돼지 설사병 원인체중 하나인 *Salmonella* 감염증을 치료 목적으로, 국내 양돈장 주변에서 분리한 bacteriophage 중 *S. enterica* serovar Enteritidis에 특이성을 나타내는 bacteriophage를 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 국내 분리 bacteriophage의 치료제로서의 사용 가능성에 대하여 조사하였다. 즉 실험실내에서 숙주 세포인 *S.* Enteritidis에서의 증식능, 마우스와 돼지에서 *S.* Enteritidis 감염과 phage의 투여에 따른 일반적인 body condition의 변화와 임상증상, 그리고 간, 비장, 소장, 분변 등에서의 *Salmonella* 균의 검출 여부 등을 측정하여 생체 내에서 bacteriophage가 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

Phage의 분리, 배양 및 정량

홍성의 양돈 농장에서 오수를 채취하여 saline에 적정량 희석 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 수거한 상층액을 0.45 μL filter에 filtering 한 후 미리 배양한 살모넬라증의 임상증상을 보인 돼지의 분변에서 분리한 특이 숙주인 *S. enterica* serovar Enteritidis 385 배양액 100 μL와 1 : 1로 혼합하여 37°C에서 20분간 반응 시킨 후 top agar(nutrient agar 0.7% agar) 7 mL에 섞어 nutrient agar 배지위에 도말하고, 이 plate를 37°C에서 1일 배양한 다음 plaque 생성 유무를 확인하고 끝을 자른 yellow tip으로 plaque를 선택하여 다시 숙주와 반응시켜 phage를 순수 분리하였다.

순수 분리한 phage(HY9001BP)의 계대배양을 위하여

phage 배양액 100 μL를 37°C에서 overnight culture 한 숙주 배양액 1 mL와 같이 100 mL의 tryptic soy broth(Difco, USA)에 넣고 37°C에서 24 시간 배양하였다. 그 후 배양액을 4,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여, 0.2 μL filter를 이용하여 여과한 후 여과액을 실험에 사용하였다. 배양된 phage의 plaque 형성정도는 tryptic soy agar(Difco, USA) plate에 *S.* Enteritidis 385를 도말한 후, 그 위에 5 μL의 phage로 도포하고 37°C에서 24시간 배양하여 plaque의 형성을 확인 하였다. 배양된 phage의 plaque forming unit(PFU)을 측정하여 phage를 정량하였다. 정량을 위하여 반고체 배지를 이용하여 *S.* Enteritidis 385와 단계별로 희석된 phage를 혼합하여 굳힌 후, 이를 37°C에서 24시간 배양하여 생성된 plaque의 개수를 측정하여 PFU/mL 값을 계산하였다. 각 희석배수마다 3개의 plate를 측정하였으며, 이의 평균값을 측정하여 사용하였다.

*In vitro*에서 phage의 성장도 측정

공시 phage의 성장정도를 측정하기 위하여, phage(1.5×10^{11} PFU/mL)와 숙주세균인 *S.* Enteritidis 385(1.5×10^{8} CFU/mL)를 각각 50 μL, 100 μL, 150 μL, 200 μL, 300 μL 씩을 혼합하여 배양하면서, 매 2시간 마다 배양액을 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 숙주세균의 생균수를(colony forming unit, CFU/mL) 측정하여 phage의 성장정도를 비교하였다.

Mouse 생체 내에서의 phage의 효능 실험

S. Enteritidis 385의 mouse에서의 병원성을 측정하기 위해 6주령의 *Balb/c* mouse에 Table 1과 같이 실험군을 설정하여 균수와 phage 용량(multiplicity of infection; MOI)을 달리하여 경구 투여한 후, 3 일간 사료, 음수 섭취상태, 체모의 상태, 분변의 상태 등의 임상증상을 관찰하여 그 심각한 정도에 따라 정상 1점, 약간 안좋음 2점, 안좋음 3점, 매우 안좋음 4점, 폐사 5점으로 평가하였고, 평가 수치의 합산을 각 실험군당 마우스의 마리수로 나누어 평균치를 구하였다. 분변을 채취하여 XLD agar(Difco, USA)를 이용하여 분변에서의 *Salmonella* 검출을 확인하였으며, 마지막 날 안락사 시킨 후, 간 · 비장 · 소장 등 장기를 채취하여 병변을 관찰하였으며, 장기와 분변 등을 XLD agar에 접종하여 균의 존재여부를 확인하였다.

돼지 생체 내에서의 phage의 효능 실험

공시 동물로는 국내 양돈장에서 구입한 교잡종으로, 5~6 주령의 돼지 9마리를 사용하였다. 실험군 설정은 아래의 Table 2와 같고 각 군에 3두씩 배정하였다.

Table 1. Experimental groups for *in vivo* efficacy of bacteriophage in mice

Groups	No. of heads	CFU of bacteria	MOI (PFU/CFU)
1	5	10^{9}	1
2	5	10^{9}	10
3	5	10^{9}	–
4	5	10^{10}	1
5	5	–	–
6	3	10^{11}	0.01
7	3	10^{11}	–

MOI: multiplicity of infection.

Table 2. Experimental groups for *in vivo* efficacy of bacteriophage in pigs

Groups	Inoculum
1	PBS (5 mL)
2	Phage* (5 mL) + *Salmonella* (5 mL)
3	PBS (5 mL) + *Salmonella* (5 mL)

*Phage: 1.5×10^{11} PFU/mL, *Salmonella*: 1.5×10^{8} CFU/mL.

위의 Table 2에서와 같이 투여 후 5일, 10일, 15일째 되는 날에 각 돼지의 체온측정, 육안적 임상증상, 사료 및 음수 섭취현황을 관찰하여 그 심각한 정도에 따라 정상 1점, 약간 안좋음 2점, 안좋음 3점, 매우 안좋음 4점, 폐사 5점으로 평가하였고, 평가 수치의 합산을 각 실험군당 돼지의 마리수로 나누어 평균치를 구하였다. 또한, 각 개체로부터 분변을 채취하여 buffered peptone water, RVR10 배지에서 enrichment 시킨 후 MacConkey(Difco, USA)와 XLD agar를 이용하여 *Salmonella* 균의 배설 여부를 확인 하였다. 투여 후 15일째 되는 날 돼지를 안락사 시킨 후 폐, 장, 림프절 등 장기를 채취하여 균 검색을 위한 공시재료로 사용하였고, 또한 육안적인 병변 검사를 통하여 phage의 효능 평가를 위한 자료로 사용 하였다.

통계학적 분석

실험에서 얻어진 데이터는 통계처리 프로그램인 SPSS Statistics 17.0(SPSS, USA)을 이용하여 독립표본 T 검정법에 의해 phage 투여군과 비투여군 간의 상관관계를 조사하였다.

결 과

Phage의 정량 및 *in vitro*에서의 증식능 평가

선발된 phage의 *in vitro* 성장능을 측정하기 위하여

phage HY9001BP와 *S.* Enteritidis 385를 동시에 접종한 후 시간대별로 600 nm에서의 optical density(OD) 값과 colony forming unit(CFU)을 측정한 결과 OD값 상으로는 미약한 차이를 보였으나, 접종 배양 후 4시간 이후부터는 phage의 작용으로 인하여 균의 증식이 억제된 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$) (Fig. 1).

*Salmonella*와 phage 투여량에 따른 mouse의 임상증상 변화

각 그룹(Table 1)에 균과 bacteriophage를 투여한 후 5일간 임상증상을 관찰한 결과를 scoring하여 도식화한 결과는 다음과 같다(Fig. 2). 1×10^9 CFU의 균을 투여한 군(Group 3)에서는 접종 후 4일째 되는 날 미약한 임상증상을 보였으나, MOI 10의 비율의 phage를 함께 투여한 군(Group 2)에서는 아무것도 투여하지 않은 군(Group 5)과 같이 아무런 증상도 관찰할 수 없었다. 1×10^{11} CFU의 균을 투여한 군(Group 7)에서 mouse의 임상증상이나 body condition은 더 심각했으며 투여 후 5일째 되는 날 한 마리가 폐사하였으며, 이와 함께 MOI 0.01의 phage를 투여한 군(Group 6)의 상태도 비슷하였으나 폐사한 개체는 없었다.

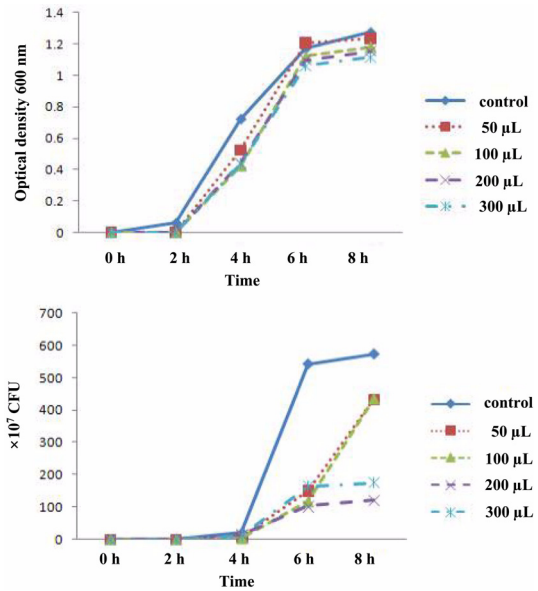

Fig. 1. Growth curve (upper pannel) and the colony number of live bacteria (lower pannel) cultured with different concentration of phage.

*Salmonella*와 phage 투여 후 mouse 분변에서의 *Salmonella* 균의 배출여부

각 그룹(Table 1)에 균과 bacteriophage를 투여한 후 5일간 분변을 채취하여 분변으로부터 균의 배출 여부를 확인한 결과는 Table 3과 같다. 1×10^9 CFU, 1×10^{10} CFU의 균을 투여한 군에서는 phage 투여의 여부 및 용량에 상관없이 분변에서 *Salmonella*를 검출할 수 없었다. 하지만, 1×10^{11} CFU의 균을 투여한 군(Groups 6, 7)에서는 투여 후 2일째부터 균이 검출되었으며, 특히 MOI 0.01의 phage를 함께 투여한 군(Group 6)에서는 균만 투여한 군(Group 7)에서 보다 적은 개체에서 적은 양의 균이 검출되어, phage 투여 후 2일째에는 3.747×10^2 CFU/g of feces, 3일째에는 1.19×10^2 CFU/g of feces 만큼의 장내 균 감소효과를 나타내었다.

*Salmonella*와 phage 투여 후 mouse의 체중 및 간, 비장의 무게 변화

각 그룹(Table 1)에 균과 bacteriophage를 투여한 후 5일째에 mouse를 안락사 시켜 체중을 측정하고, 부검하여 간, 비장의 무게를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 체중을 비교한바 1×10^9 CFU의 균을 투여한 군 에서는 phage 투여 여부나 용량에 따른 체중 변화를 관찰할 수

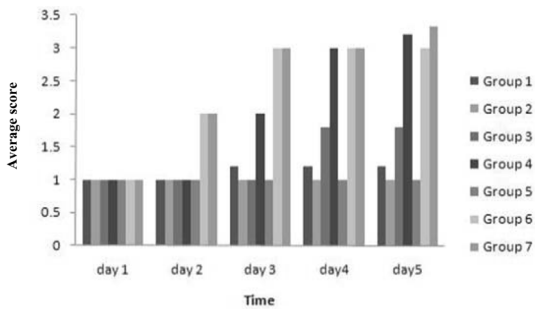

Fig. 2. Average body score of mice administrated with *Salmonella* Enteritidis and/or bacteriophage (HY9001BP) based on the general body condition and clinical signs.

Table 3. Number of *Salmonella* colonies isolated from feces of mice. No *Salmonella* was detected in other groups

Group	Mean CFU ($\times 10^2$) ± SD				
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
6	0	7.493 ± 1.524	0.006 ± 0.011	0.003 ± 0.005	3.233 ± 3.814
7	0	5.363 ± 0.706	3.753 ± 0.648	1.193 ± 0.915	3.940 ± 0.569

Table 4. Comparison of body, liver and spleen weight

Group	Mean weight (g) ± SD		
	Body	Liver	Spleen
Group 1	18.634 ± 0.651	1.212 ± 0.193	0.134 ± 0.051
Group 2	20.602 ± 1.283	1.180 ± 0.075	0.108 ± 0.013
Group 3	20.834 ± 0.844	1.156 ± 0.056	0.112 ± 0.019
Group 4	19.286 ± 2.974	1.286 ± 0.103	0.150 ± 0.038
Group 5	19.822 ± 1.205	1.150 ± 0.016	0.110 ± 0.010
Group 6	16.467 ± 0.686	1.363 ± 0.278	0.190 ± 0.010
Group 7	14.417 ± 1.926	1.183 ± 0.365	0.170 ± 0.044

없었으나, 1×10^{11} CFU의 균만을 투여한 군(Group 7)에서는 음성대조군(Group 5)에 비해 체중감소를 보였으며, MOI 0.01로 phage를 함께 투여한 군(Group 6)에서는 균만을 투여한 군에서 보다는 낮은 체중감소를 보였다($p < 0.05$). 또한 간장, 비장의 무게도 투여균수 및 phage의 양과 밀접한 관계를 나타내었다.

*Salmonella*와 phage 투여 후 mouse의 간, 비장, 장에서의 균 검출

채취한 비장, 간장 및 소장에서 균 분리를 시도하였으며 그 결과는 Fig. 3과 같다. 각 그룹별 비장과 간장에서의 균 검출은 비슷한 양상을 보였다. 1×10^9 CFU의 균을 투여한 그룹들을 비교했을 때 투여한 phage의 양에 비례하여 적은양의 균이 검출되었으며, 1×10^{11} CFU의 균을 투여한 그룹을 비교했을 시에도 phage를 함께 투여한 그룹에서 적은양의 균이 검출되었다($p < 0.05$). 소장에서는 높은 농도의 균을 투여한 그룹에서만 균을 검출할 수 있었다.

*Salmonella*와 phage 투여량에 따른 돼지의 임상증상 변화

각 그룹(Table 2)에 균과 bacteriophage를 투여한 후 5일 간격으로 투여 후 15일째 되는 날까지의 각 개체의 체온, 육안적 임상증상과 피모상태, 사료 및 음수 섭취 정도, 분변 상태를 관찰하여 점수를 부여한 후, 그 평균값을 도식화한 결과는 다음과 같았다(Fig. 4). *Salmonella* 만을 투여한 실험군에서는 투여 5일째부터 외형 및 분변의 상태에서 변화를 보이기 시작하여 투여 15일째에서는 증상이 더욱 악화되었다. 특히 1두의 돼지에서는 거친 피모와 설사 증상을 나타내었다. 그러나, *Salmonella*와 phage를 동시에 투여한 실험군에서는 투여 15일째에 피모가 다소 거칠어지는 것을 확인할 수 있었다. 실험기간동안 PBS 만을 투여한 실험군에서는 어떠한 증상도 관찰되지 않았다.

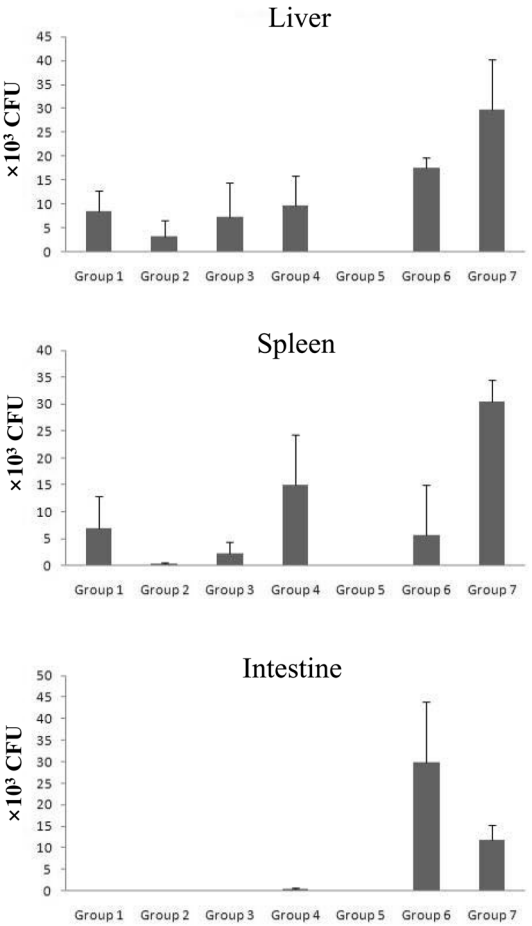

Fig. 3. Number of *Salmonella* isolated from liver, spleen and intestine.

*Salmonella*와 phage투여량에 따른 돼지의 분변에서의 *Salmonella*검출 및 부검 후 장기의 육안적 병리학 검사 소견

각 그룹(Table 2)에 균과 bacteriophage를 투여한 후 5일 간격으로 분변을 채취하여 *Salmonella*를 검출한 결

과, *Salmonella*만을 투여한 시험군의 모든 돼지에서 5일 후부터 균을 회수할 수 있었고, *Salmonella*와 phage를 동시에 투여한 실험군에서는 균을 회수할 수 없었다. *Salmonella* 만을 투여한 시험군에서 투여 후 5일과 10일째에 채취한 분변에서는 48시간 증균 배양에 의해서 검출할 수 있었으나, 투여 15일째에 채취한 분변에서는 증균 없이도 분리할 수 있었다. 또한, 투여 후 15일째에 부검을 실시하여 육안적 병리학 검사를 실시하여 점수를 부여하여 그 평균값을 도식화한 결과는 Fig. 5와 같다. PBS 만을 투여한 음성 대조군에서는 1두에서만 장간막 림파절의 약한 증대가 관찰되었고, 모든 장기는 정상적이었다. *Salmonella*와 phage를 동시에 투여한 실험군에서는 2두의 돼지에서 장간막 림프절의 약한 증대가 관찰되었고, 1두는 임프절이 좀 더 증대되어 염증반응을 나타내었다. 그러나 폐장 등의 다른 장기에서는 어떠한 변화도 관찰할 수 없었다. *Salmonella* 만을 접종한 실험군에서는 모든 돼지의 장간막 임프절이 크게 증대되었고 염증반응이 진행되고 있었으며, 특히 1두의 돼지에서는 심한 수심막염(hydropericarditis)과 심한 폐렴을 나타내었다(Fig. 6). 또한 폐로부터 *Salmonella*를 재분리 할 수 있었다.

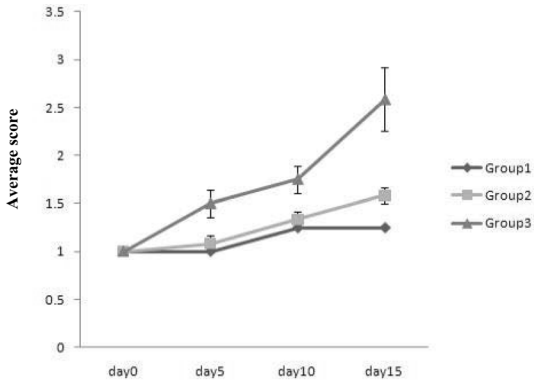

Fig. 4. Average scores of the general body condition and body temperature of infected pigs.

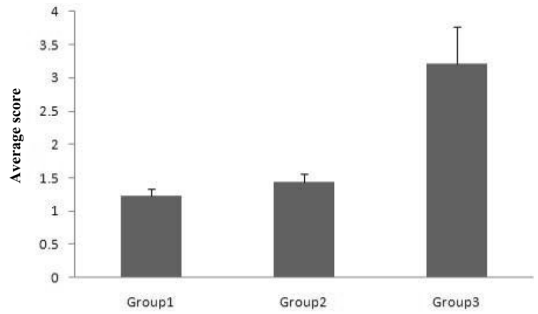

Fig. 5. Average scores of postmortem lesions (Score 1 to 5 indicates normal to severe).

고 찰

Phage를 이용한 치료는 항생제를 이용한 치료와 비교하였을 때 다음과 같은 장점이 있다. 이는 매우 특이해서 보통 한 종류의 bacteria 종에만 작용하여 장내에의 정상 세균총에는 영향을 미치지 않는다 [5]. 그리고 host bacteria가 감염된 부위에서만 증식하며 [28], 별다른 부작용이 보고된 바 없다. 또한, 한 phage에 저항성이 생긴 bacteria는 다른 phage에 감수성을 보이며 새로운 phage를 선별하는 것은 새로운 항생제를 개발하는 것 보다 훨씬 더 용이하다 [28].

이러한 이유로 phage를 이용한 치료는 여러 산업국가에서 급격히 부흥하고 있다 [21]. 특히, 음식을 부패시키는 세균이나 식중독을 일으키는 세균을 phage를 이용하여 제어하는 연구가 많이 진행되고 있다 [10, 13, 19]. 하지만 phage를 이용한 치료가 축산 동물에 적용되기 위해서는 비슷한 여건, 즉 대상 동물의 생채 내에서의

Fig. 6. Severe hydropericarditis (left) and pneumoniae (right) from pigs in group 3.

연구가 필요하며 [1, 26], *Salmonella*에 의한 피해가 가장 막심한 가금류 및 양계장을 대상으로 수행된 phage를 이용한 치료에 대한 연구가 많이 진행되고 있는 상태이다 [1, 20, 27].

이에 이 실험에서는 국내 양돈장 주변에서 분리한 *S.* Enteritidis에 특이한 phage의 생체 내 효능에 대하여 평가하였다. 마우스에 *Salmonella*와 phage를 투여한 결과, 임상증상, 분변 및 장기에서 검출된 균의 양 등에서 접종한 phage의 MOI에 따라 다양한 결과를 보였는데, 이는 phage가 그 host인 bacteria에서 가장 효과적으로 증식하기 위해서는 최적화된 비율, 즉 MOI로 감염되어야 한다는 것을 시사한다. 실제로, 높은 MOI 값을 접종할 경우 한 개의 host에 여러 개의 phage가 부착되어 phage가 host 내에서 증식이 이루어지기 전에 host가 lysis 되는 연구결과가 보고되고 있다 [25]. 돼지에서 *Salmonella*와 phage를 투여한 결과에서도 phage를 투여한 군에서 *Salmonella* 감염증으로 인한 병변 및 임상증상이 적게 나타남을 확인할 수 있었다.

Phage를 치료제로 이용하는 동물 실험을 수행할 시에는 여러 가지 고려해야할 사항이 있다. 보통 phage는 숙주 특이성이 매우 높아서 동물 실험 시 음성 결과가 나오는 경우가 많은데 [7], 이 실험에서는 이를 해결하기 위해서 먼저 *in vitro* 실험을 통해서 phage의 숙주 특이성을 확인하였다. 또한 phage의 purity가 실험에 많은 영향을 미칠 수 있는바 [29], 이 연구에서는 사용할 phage의 배양 시 phage의 활성도에 영향을 미칠 수 있는 host bacteria의 lysate나 endotoxin 등의 부산물을 원심분리 및 filtering을 통하여 최대한 제거하여 phage의 purity를 높였으며, 실험 직전에 배양하여 사용하였다. 하지만 이 연구에서는 phage만을 접종하여 이로 인한 생체내의 부작용에 대해서는 실시하지 못하였다. 비록 실험동물에 인체에 접종량 보다 3,500배 높은 농도의 phage를 비강, 복강, 정맥 투여를 하였을때도, 육안적조직적 병변을 관찰할 수 없었던 보고가 있지만 [29], 이 연구에서 사용된 phage를 수의학 임상 분야에 사용하기 위해서는 phage의 안전성 연구가 추가적으로 필요하다고 사료된다.

결 론

최근 축산업에서 항생제 내성의 문제를 해결하기 위한 대안의 하나로 bacteriophage를 이용하는 방법이 대두되고 있다. 이에 국내 양돈장에서 분리한 bacteriophage를 이용하여 돼지 *Salmonella* 균증을 예방 또는 치료할 수 있는 지에 대한 가능성을 조사하기 위하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 실험을 실시하였다. *In vitro*에서는 국내 양돈장 주변에서 분리한 bacteriophage 가 *S.* Enteritidis 385주에 특이적으로 증식하면서 균의 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었고, 또한 mouse model에서도 *S.* Enteritidis을 투여한 후 bacteriophage를 투여한 것이 이번 연구에서 사용한 다양한 parameter에서 양호하게 나타났다. 이러한 실험을 돼지에 적용한 결과 돼지에서도 mouse에서와 유사한 경향의 결과를 얻을 수 있었다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때에 bacteriophage를 이용하여 축산업에 막대한 피해를 주는 다양한 세균성 질병을 예방 또는 치료에 적용할 수 있는 가능성을 제시하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구과제는 한국 야쿠르트 중앙 연구소, BK 21 수의인력양성사업단, 서울대학교 수의과학연구소의 지원에 의해 연구되었습니다.

참고문헌

1. **Atterbury RJ, Van Bergen MA, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, Wagenaar JA, Allen VM, Barrow PA.** Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol 2007, **73**, 4543-4549.
2. **Bertani G.** Lysogenic versus lytic cycle of phage multiplication. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1953, **18**, 65-70.
3. **Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merril CR.** Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect Immun 2002, **70**, 204-210.
4. **Brüssow H, Kutter E.** Phage ecology. In: Kutter E, Sulakvelidze A (eds.). Bacteriophages: Biology and Applications. pp. 129-163, CRC Press, Boca Raton, 2005.
5. **Chernomordik AB.** Bacteriophages and their therapeutic-prophylactic use. Med Sestra 1989, **48**, 44-47.
6. **Delpech V, McAnulty J, Morgan K.** A salmonellosis outbreak linked to internally contaminated pork meat. Aust N Z J Public Health 1998, **22**, 243-246.
7. **d'Herelle F.** Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections. Bull N Y Acad Med 1931, **7**, 329-348.
8. **Fiorentin L, Vieira ND, Barioni W Jr.** Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of

broilers. Avian Pathol 2005, **34**, 258-263.

9. **Foley SL, Lynne AM.** Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci 2008, **86** (Suppl), E173-187.
10. **Greer GG.** Bacteriophage control of foodborne bacteria. J Food Prot 2005, **68**, 1102-1111.
11. **Guttman B, Raya R, Kutter E.** Basic phage biology. In: Kutter E, Sulakvelidze A (eds.). Bacteriophages: Biology and Applications. pp. 29-66, CRC Press, Boca Raton, 2005.
12. **Higgins JP, Higgins SE, Guenther KL, Huff W, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM.** Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. Poult Sci 2005, **84**, 1141-1145.
13. **Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G, Greening G.** Bacteriophages as biocontrol agents in food. J Food Prot 2005, **68**, 426-437.
14. **Jansen A, Frank C, Stark K.** Pork and pork products as a source for human salmonellosis in Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2007, **120**, 340-346.
15. **Johnson RP, Gyles CL, Huff WE, Ojha S, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM.** Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. Anim Health Res Rev 2008, **9**, 201-215.
16. **Jung BG, Toan NT, Cho SJ, Ko JH, Jung YK, Lee BJ.** Dietary aluminosilicate supplement enhances immune activity in mice and reinforces clearance of porcine circovirus type 2 in experimentally infected pigs. Vet Microbiol 2010, **143**, 117-125.
17. **Kodama M, Oyama A, Takagi H.** Control of interstitial pneumonia by drip infusion of megadose vitamin C, dehydroepiandrosterone and cortisol. A short review of our experience. In Vivo 2008, **22**, 263-267.
18. **Kropinski AM.** Phage therapy - Everything old is new again. Can J Infect Dis Med Microbiol 2006, **17**, 297-306.
19. **Kudva IT, Jelacic S, Tarr PI, Youderian P, Hovde CJ.** Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. Appl Environ Microbiol 1999, **65**, 3767-3773.
20. **Kwon HJ, Cho SH, Kim TE, Won YJ, Jeong J, Park SC, Kim JH, Yoo HS, Park YH, Kim SJ.** Characterization of a T7-like lytic bacteriophage (phiSG-JL2) of *Salmonella enterica* serovar gallinarum biovar gallinarum. Appl Environ Microbiol 2008, **74**, 6970-6979.
21. **Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S.** Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. J Infect Chemother 2005, **11**, 211-219.
22. **Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T, Shen Y, Jin Z, Fujimoto S, Nasimuzzaman MD, Wakiguchi H, Sugihara S, Sugiura T, Koda S, Muraoka A, Imai S.** Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. J Infect Dis 2003, **187**, 613-624.
23. **O'Flynn G, Coffey A, Fitzgerald GF, Ross RP.** The newly isolated lytic bacteriophages st104a and st104b are highly virulent against *Salmonella enterica*. J Appl Microbiol 2006, **101**, 251-259.
24. **Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CQ.** Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. J Appl Microbiol 2008, **104**, 1-13.
25. **Payne RJ, Jansen VA.** Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. Clin Pharmacokinet 2003, **42**, 315-325.
26. **Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ.** Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. Appl Environ Microbiol 2006, **72**, 5359-5366.
27. **Sillankorva S, Pleteneva E, Shaburova O, Santos S, Carvalho C, Azeredo J, Krylov V.** *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. J Appl Microbiol 2010, **108**, 1175-1186.
28. **Smith HW, Huggins MB.** Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. J Gen Microbiol 1982, **128**, 307-318.
29. **Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr.** Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents Chemother 2001, **45**, 649-659.
30. **Sulakvelidze A, Barrow P.** Phage therapy in animals and agribusiness. In: Kutter E, Sulakvelidze A (eds.). Bacteriophages: Biology and Applications. pp. 335-380, CRC Press, Boca Raton, 2005.
31. **Summers W.** Bacteriophage research: early history. In: Kutter E, Sulakvelidze A (eds.). Bacteriophages: Biology and Applications. pp. 5-27, CRC Press, Boca Raton, 2005.
32. **Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Grski A.** Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2000, **48**, 547-551.