

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-Associated Diseases and Detection

Sun-Yeong Gwon¹, In-Ho Jang², and Ki-Jong Rhee¹

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University at Wonju, Wonju 26493, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju 18950, Korea

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*에 의한 질환과 검출

권선영¹, 장인호², 이기종¹

¹연세대학교 보건과학대학 임상병리학과, ²상지대학교 보건과학대학 임상병리학과

These commensal intestinal bacteria can enhance the immune system and aid in nutrient absorption but can also act as opportunistic pathogens. Among these intestinal bacteria, the anaerobic *Bacteroides fragilis* are divided into enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF) which secrete the *B. fragilis* toxin (BFT) and non-enterotoxigenic *B. fragilis* (NTBF) which do not secrete BFT. ETBF can cause diarrhea and colitis in both humans and livestock but can also be found in asymptomatic individuals. ETBF is predominantly found in patients with inflammatory diarrheal diseases and traveller's diarrhea. Several clinical studies have also reported an increased prevalence of ETBF in human patients with inflammatory bowel disease (IBD), colitis and colorectal cancer. In small animal models (C57BL/6 wild-type mice, germ-free mice, multiple intestinal neoplasia (Min) mice, rabbits and Mongolian gerbils), ETBF have been found to initiate and/or aggravate IBD, colitis and colorectal cancer. BFT induces E-cadherin cleavage in intestinal epithelial cells resulting in loss of epithelial cell integrity. Subsequent activation of the β -catenin pathway leads to increased cellular proliferation. In addition, ETBF causes acute and chronic colitis in wild-type mice as well as enhances tumorigenesis in Min mice via activation of the Stat3/Th17 pathway. Currently, ETBF can be detected using a BFT toxin bioassay and by PCR. Advances in molecular biological techniques such as real-time PCR have allowed both researchers as well as clinicians to rapidly detect ETBF in clinical samples. The emergence of more sensitive techniques will likely advance molecular insight into the role of ETBF in colitis and cancer.

Keywords: *Bacteroides fragilis* toxin, Colorectal cancer, Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, Inflammatory diarrhea, T helper 17

Corresponding author: Ki-Jong Rhee
 Department of Biomedical Laboratory Science,
 College of Health Sciences, Yonsei University at
 Wonju, Wonju 26493, Korea
 Tel: 82-33-760-2445
 E-mail: kjrhee@yonsei.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Received: November 12, 2015
 Revised: November 21, 2015
 Accepted: November 21, 2015

Copyright © 2015 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

사람의 장내에는 1조개의 미생물이 서식한다(Turnbaugh 등, 2007). 이런 미생물 군은 사람의 생활과 긴밀한 상호작용을 이룬다. 장내세균이 면역이나 영양 흡수 등에 긍정적인 도움을 준다는 사실이 현재 많은 연구자들에 의해 밝혀지고 있다. 하지만, 이런 미

생물 군이 사람의 질병을 유발한다는 연구도 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 위장관의 *Helicobacter pylori*가 전위암병변을 일으킬 수 있다는 사실은 이제 대다수의 대중들에게 알려졌다. 사람의 장내세균 중 가장 많이 존재하는 절대혐기성 세균총의 하나로 Bacteroidetes가 있다. 여기에 속하는 *Bacteroides* spp.는 사람의 장내에 20가지 종이 서식한다(Wexler, 2007). *Bacteroides* spp.

또한 양면성을 가진 세균이다. *Bacteroides* spp.는 사람의 면역이나 영양 상태에 긍정적인 도움을 제공하지만 때로는 기회감염균으로 작용하기도 한다(Neish, 2009). 특히 *Bacteroides fragilis*는 복부의 농양이나 균혈증 등을 유발할 수 있는 세균이다(Polk와 Kasper, 1977; Redondo 등, 1995; Lassmann 등, 2007).

*B. fragilis*는 장독소(enterotoxin)을 분비하는 strain과 그렇지 않은 strain으로 나눌 수 있는데, 전자는 enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF), 후자는 non-enterotoxigenic *B. fragilis* (NTBF)로 구분한다. NTBF는 기회감염균으로 polysaccharide 대사와 사람을 보호하기 위한 면역반응을 활성화시키는데 관여한다(Troy와 Kasper, 2010). ETBF는 병원성 인자인 *Bacteroides fragilis* toxin (BFT 또는 fragilysin)을 분비하는 균이지만, ETBF를 보유한 사람이라도 염증 등의 증상을 나타내지 않을 수도 있다(Basset 등, 2004). BFT는 현재까지 *B. fragilis*의 유일한 병원성 인자로 알려진, 20 kDa 크기의 zinc-dependent metalloprotease이다(Moncrief 등, 1995; Franco 등, 1999; Vines 등, 2000). 3개의 isotype이 밝혀져 있으며(BFT-1, BFT-2, BFT-3) 각각의 생물학적 활성도는 유사하다(Franco 등, 1997; Kling 등, 1997; Chung 등, 1999). ETBF는 동물이나 사람에게 설사 질환을 일으킨다. 특히 활동성 inflammatory bowel diseases (IBD)나 대장염, 대장암을 유발하는데 기여한다는 보고가 있다(Prindiville 등, 2000; Basset 등, 2004).

본 론

1. ETBF와 질환

ETBF는 1984년에 처음 설사 질환을 앓는 면역에서 분리 및 동정했다(Myers 등, 1984). 그 이후 1987, 1992년에 설사 질환을 가진 사람에서 검출했다(Myers 등, 1987; Sack 등, 1992). ETBF는 5세 미만의 어린이에게 설사 질환을 일으킨다. 1세 미만의 어린이는 아무 증상 없이 ETBF를 가지고 있다가, 1세 이후에 ETBF에 의한 설사 질환이 발병한다(Sack 등, 1994). 성인에서도 ETBF가 유발하는 설사 질환은 중요하다. 스웨덴의 한 연구에서, 급성 설사 질환으로 입원한 성인 환자와 건강한 성인의 ETBF 분리율을 조사했다. 782명의 환자 중 27%, 194명의 건강한 성인 중 12% ($p < 0.01$)에서 ETBF를 검출했다. 이들 중 일부는 ETBF를 가지고 있지만 다른 증상은 보이지 않았다. 특히 30세 미만인 사람에서 증상 없이 세균을 보유하는 경향이 두드러졌다. 나이가 적은 사람은 설사의 유무와 관계없이 ETBF의 검출 비율이 유사했던 반면에, 나이가 많은 사람은 설사 질환이 있으면 ETBF를 가질 확률이 높았다(Zhang 등, 1999). ETBF 감염에 의한 설사는 어린이나 성인에서 장염과 전신

또는 장내 항체 반응을 유도한다. 그리고 복통이나 비열성 염증성 설사를 동반한다. 대변 내 백혈구, 락토페린(lactoferrin), 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine; interleukin-8, tumor necrosis factor- α)와 anti-BFT 반응(IgA, IgG)도 증가했다(Sears 등, 2008). 또한 ETBF는 여행자 설사를 일으킬 수 있는 가능성을 가진 것으로 알려졌다. 미국과 유럽을 여행하는 사람 중 장내세균에 의한 급성 설사 질환이 발병한 사람에게서 ETBF를 단독 또는 다른 균과 함께 분리했다(Jiang 등, 2010).

임상 검체를 이용한 연구에서 ETBF의 감염은 건강한 정상인에 비해 활동성 inflammatory bowel diseases (IBD)와 대장염 및 대장암을 가진 환자에서 더 많다는 사실이 보고되었다(Prindiville 등, 2000; Basset 등, 2004; Toprak 등, 2006). Toprak 등(2006)이 대장암 환자 73명과 정상인 59명의 대변 검체에서 ETBF의 유병률을 검사했다. *Bacteroides bile esculin* agar를 이용하여 *Bacteroides* spp.를 선별한 뒤 DNA를 추출하였다. 그 후 PCR을 통해 BFT 유전자를 가지고 있는지 조사했을 때, *Bacteroides* spp.의 보균율은 대장암 환자에서 77%, 정상인에서 68%로 두 집단 간의 유의성은 없었다. 그러나 대장암 환자의 38%가 ETBF를 보유한 반면, 정상인 중 12%만이 ETBF를 보유했다($p=0.009$). 이는 ETBF가 대장암 환자에서 증가한다는 것을 증명하는 첫 실험이 되었다. ETBF가 IBD나 대장암을 유발한다는 것을 실험적으로 증명하기 위해 여러 동물 모델이 고안되었다. 실험실에서 흔히 사용하는 마우스 모델인 C57BL/6에 ETBF를 구강 접종하면 급성 대장염뿐만 아니라 지속적인 만성 대장염과 장상피세포의 hyperplasia가 일어났다(Rhee 등, 2009). ETBF를 접종한 마우스의 장점막은 두꺼워졌고 염증 세포들의 침윤이 증가했다. 또한 crypt의 농양과 상피세포의 탈락과 미란, 궤양이 관찰되었다. 특히 NTBF에 BFT 유전자를 삽입한 recombinant ETBF (rETBF)를 마우스에 접종했을 때도 유사한 증상을 보였다. 이러한 증상들은 NTBF를 접종하거나, NTBF에 생물학적 활성을 제거한 BFT (H352Y) 유전자를 삽입한 recombinant NTBF (rNTBF)를 접종했을 때는 나타나지 않았다. 한편, germ-free 마우스에 *B. fragilis*를 접종하면, NTBF를 접종했을 때와는 달리, ETBF를 접종한 경우에만 치명적인 대장염이 일어났다. 이는 일반 마우스의 장내세균이 ETBF의 작용을 약화시킬 수 있으며, ETBF가 단독으로도 대장염을 일으킬 수 있다는 것을 제시한다.

Multiple intestinal neoplasia (Min) 마우스란 이형의 adenomatous polyposis coli (*APC*) 유전자를 가진 마우스를 말한다. 한 쌍의 *APC* 유전자 중 한쪽의 돌연변이를 가진 이 마우스에서는 장암이 발생한다. 이는 대장암으로 발전하게 되는 가족성 용종증과 유사한 형태를 보인다. 3개월 된 Min 마우스에는 자연적으로 작은 용종이 생긴다. 그리고 3개월 뒤에는 5개 이상의 대장암을 관찰할

수 있다. 이런 Min 마우스에 ETBF를 접종했을 때 만성적인 무증상의 대장염에서부터 상피 내 대장종양까지, 접종 후 1주일 만에 관찰했다(Wu 등, 2009). Rabizadeh 등(2007)은 IBD와 유사한 증상을 일으키는 마우스의 dextran sodium sulfate (DSS) 모델에서 ETBF가 대장염을 심화시키는지 연구하였다. NTBF나 ETBF 모두 마우스의 대장에 colonization하는 정도는 유사했다. 그리고 DSS 제공 여부와 관계없이 ETBF를 접종한 마우스에서 대장염이 일어났다. 그러나 ETBF만 접종한 마우스보다, DSS를 제공한 마우스에 ETBF를 접종하면 마우스 체중의 감소가 더 오래 지속되고, 대장의 염증이 더 증가했다. 이는 DSS를 제공한 마우스에 ETBF를 접종하면 ETBF 접종만 시행한 마우스보다 심한 대장염이 일어남을 보여준다.

마우스 모델 외에도, 토끼에서 ETBF의 감염이 일어날 경우, 혈액을 동반한 설사나 사망을 일으킴이 알려졌다(Myers 등, 1987; Myers 등, 1989; Sears 등, 1995). Mongolian gerbil 동물 모델에 NTBF와 ETBF를 접종했을 때 대변에서 각각 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ CFU/gram의 세균이 검출되었다(Yim 등, 2013). Gerbil에서도 NTBF를 접종하면 아무 증상이 없었으나, ETBF를 접종했을 경우 체중이 급격히 감소하며, 대장에서 심한 상피세포 탈락을 보였다. ETBF는 gerbil에서 치명적인 대장염을 일으켜 세균 접종 후 3일 만에 집단 내 모든 개체가 사망했다. 여러 연구의 결과를 토대로 ETBF가 대장염을 일으키는 것은 이견이 없어 보인다. 또한 ETBF에 의한 IBD, 대장염 및 대장암의 심화가 일어나는 것은 사실이나 그 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았다.

2. ETBF와 기전

앞서 언급했듯이 BFT는 ETBF의 유일한 병원성 인자이다. BFT 유전자는 *B. fragilis* pathogenicity island (BfPAI)라고 부르는 6 kb 크기의 deoxyribonucleic acid (DNA)에 MPII 유전자와 같이 encoding되어 있다. BFT 유전자와 달리 MPII 유전자의 역할은 아직 밝혀지지 않았다. 이 6 kb의 DNA는 오직 ETBF에만 존재한다(Moncrief 등, 1998; Franco 등, 1999; Sears, 2001). BFT 유전자는 약 397개의 아미노산으로 구성되어 있고, 각 부분은 proprotein 부분과 mature protein으로 크게 나눌 수 있다. BFT가 생물학적 활성을 가지기 위해서는 proprotein과 mature protein 사이의 arginine (Arg)과 alanine (Ala) 사이가 분절되어야 한다. 이후 mature protein 부분이 효소로 작용한다. Mature protein에는 HEXXH motif가 포함되어 있다. 이는 BFT에 zinc가 결합하는 부위로, BFT가 zinc에 의한 단백질 분해 활성이 있는 것을 여러 연구자들이 확인하였다(Moncrief 등, 1995; Obiso 등, 1995; Koshy 등, 1996).

BFT가 장상피세포의 어떤 단백질과 결합하여 독성을 유도한다는 것은 알고 있지만, 그것이 어떤 단백질인지는 아직 밝혀지지 않았다(Wu 등, 2006). 지금 제시되는 가설은 직접적인 분절과 간접적인 분절 2가지 이다(Fig. 1). 전자는 BFT가 직접 E-cadherin이라는 장상피결합단백질과 다른 단백질의 분절을 유도한다는 가정이다. 후자는 BFT가 세포 내 다른 protease를 활성화하여 E-cadherin 및 다른 단백질의 분절을 유도한다는 가정이다. 하지만 아직 BFT와 직접 결합하는 ligand가 무엇인지는 발표된 바 없다. 지금까

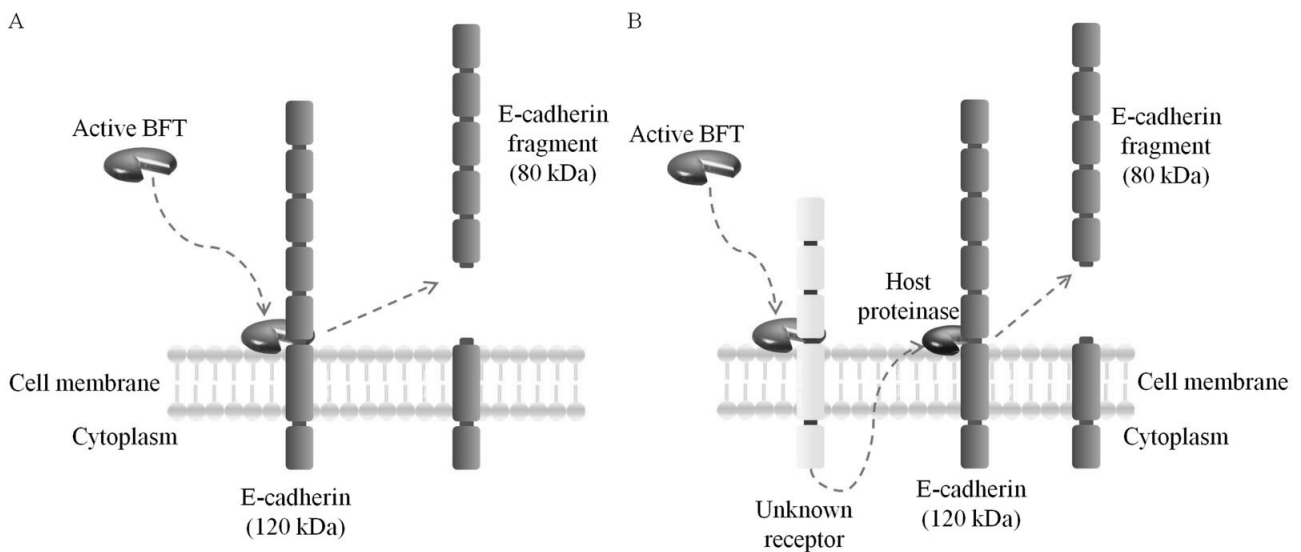


Fig. 1. Two hypotheses of BFT mediated E-cadherin cleavage. (A) BFT directly binds and cleaves E-cadherin. (B) BFT induces E-cadherin cleavage by binding to a cellular receptor present on epithelial cells and activating a host proteinase which in turn cleaves E-cadherin.

지 보고된 바에 의하면 사람의 장암세포인 HT29/C1 cell line이나 마우스의 장조직에 BFT를 처리하였을 때, 120 kDa의 E-cadherin이 분절된다. E-cadherin은 80 kDa의 extracellular domain과 33 kDa의 cytoplasmic domain으로 나뉘고, 잘려진 cytoplasmic domain은 γ -secretase 등에 의해서 분해된다(Wu 등, 1998; Wu 등, 2007; Rhee 등, 2009). BFT가 E-cadherin의 분절을 유도함으로써 장상피세포가 가진 막 기능을 저하시키고 투과성을 높게 된다. 이로 인해 β -catenin 신호전달계가 활성화되어 c-myc의 전사와 발현이 증가하고, 이로써 장상피세포의 증식이 증가한다. 그리고 BFT는 NF- κ B 신호전달계도 활성화한다(Wu 등, 1998; Wu 등, 2003; Wu 등, 2004; Sears, 2009).

이 밖에도 마우스를 이용한 동물 모델에서 ETBF가 어떤 신호전달 작용을 일으키는지에 대한 연구가 이루어졌다(Wu 등, 2009). 마우스에 NTBF와 ETBF를 접종하여 만성적으로 colonization하도록 만들고 그들의 상태를 관찰했다. NTBF를 접종한 마우스와 달리, ETBF를 접종한 마우스에서는 IL-17을 생산하는 CD3⁺CD4⁺ $\alpha\beta$ -T-세포와 CD3⁺CD4⁺ $\gamma\delta$ -T-세포의 대장 고유관 침투(infiltration)가 발생했다. 즉, ETBF의 감염이 T helper 17 (T_H17)의 반응을 촉진하였다. ETBF는 Min 마우스에서도 대장의 종양 형성을 빠르게 촉진시켰다. 이러한 질환의 심화는 ETBF의 감염이 대장의 signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3)를 활성화함으로써 유도되었다. T_H17 반응을 증폭하는데 중요한, IL-17에 대한 항체로 IL-17을 blocking 하였을 때, ETBF로 인한 대장염과 대장의 hyperplasia, 종양 형성 또한 억제되었다. 이는 ETBF로 인한 대장염 및 종양의 형성이 Stat3와 T_H17에 의존적인 전달체계에 의해 발생함을 암시한다. 따라서 사람의 장내 세균이 염증과 증에 의한 암을 일으킬 수 있다는 새로운 시각을 제시할 수 있다.

Rhee 등(2009)은 BFT가 또 다른 면역 기전을 활성화하는지 알기 위한 연구를 진행하였다. Germ-free 마우스에 ETBF를 감염시켰을 때, germ-free 마우스가 매우 빠르게 사망하였으므로 그들은 BFT가 혹시 초항원으로써 작용한 것은 아닌지 의심했다. 그러나 마우스에서 얻은 비장세포에 정제한 BFT (5 nM)를 처리한 결과, 비장세포의 증식은 발생하지 않았다. 한편, Toll-like receptor (TLR)-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-9를 과다 발현시킨 HEK 293 세포에 정제한 BFT를 처리한 경우에도, TLR 각각에 대한 양성 대조군을 처리한 집단에 비해 interleukin-8 (IL-8)의 분비가 증가하지 않았다. 이를 통해 BFT가 직접적으로 TLR을 활성화하지 않음을 알아냈다. 그리고 마우스에서 유래한 bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs)에 정제한 BFT를 처리한 결과, BMDCs가 활성화할 경우 증가하는 MHC-II, CD80, CD86이 증가하는 모습을 볼 수 없었다. 즉, 정제한 BFT는 직접적으로 림프구의 증식을 유

도하지 않았다. 이 결과들은 BFT의 기전 연구에 있어 좀 더 세부적인 방향을 제시한다. 차후 더 심화한 연구를 통해, ETBF에 의한 대장염이나 대장암이 동물 모델에서만 아니라, 사람에서는 어떻게 일어나는지, 발생역학과 기전을 밝힐 필요가 있다.

3. ETBF의 검출

현재, ETBF만을 바로 검출하는 진단 기법은 존재하지 않는다. ETBF는 세균 동정과 생물학적 활성을 가진 BFT에 대한 유전자의 검출을 같이 시행함으로써 검출할 수 있다. 즉, 먼저 미생물학적 기법들을 통해 *B. fragilis*의 단일 strain을 분리한 뒤 그 특성을 다시 조사해야 한다. *B. fragilis*가 절대 혐기성 세균이기 때문에 검체가 공기 중에 노출되는 시간이 길수록 검출할 수 있는 세균수가 줄어들는다(Rolfe 등, 1978; Kim 등, 1990). 따라서 검체의 공기 노출 시간을 줄이는 것이 중요하다. 이를 위해 혐기성 jar나 운송배지를 이용하는 것이 ETBF의 검출에 도움을 준다. 검출한 *B. fragilis*가 ETBF인지를 알아보기 위해서는 BFT의 생물학적 활성을 검사하는 방법이 있다. 초기에는 BFT의 생물학적 활성을 알기 위해, reversible ileal tie adult rabbit diarrhea (RITARD) assay를 사용했다(Myers 등, 1984; Myers 등, 1987). 이는 많은 비용과 노동력을 필요로 했다. 이후 사람의 장암세포인 HT29/C1을 배양하여 BFT를 처리했을 때, 세포의 모양이 변하는지 확인하는 방법, BFT toxin assay가 등장했다. 이 방법은 0.5 pM이라는 적은 양의 BFT로도 세포의 모양 변화를 확인할 수 있다(Weikel 등, 1992; Saidi와 Sears, 1996). 많은 연구자들이 이 방법을 통해 임상 검체에서 분리한 *B. fragilis*의 특성과 독소의 분비량을 조사해왔다. 또한, BFT가 장상피세포에 미치는 영향을 조사할 때도 이 방법을 사용했다(Mundy와 Sears, 1996; Wu 등, 1998; Wu 등, 2003; Wu 등, 2004; Ni Van 등, 2012).

ETBF를 검출하는 방법으로 분자진단학적 방법인 polymerase chain reaction (PCR)도 빼놓을 수 없다. 특히 이는 BFT toxin assay에 비해 빠르고 생균을 필요로 하지 않는다는 점에서 더 편리하다. 먼저 *B. fragilis*를 검출하는데 사용하는 PCR 방법은 크게 3가지로 보고되었다(Sears, 2009). 일반적인 PCR과 nested PCR, multiplex PCR 3가지이다. Multiplex PCR은 *B. fragilis*종 간의 차이를 구분할 수 있는 좀 더 특이적인 방법이다(Liu 등, 2003). PCR에 비해 Real-time PCR (RT-PCR)을 이용하여 *B. fragilis*의 16S rDNA를 검출하는 방법은, 더 적은 양의 세균 DNA만 있어도 가능하다(Tong 등, 2011). PCR의 대상으로는 16S rDNA외에도 leucine의 생합성에 사용되는 β -isopropylmalate dehydrogenase (*leuB*) 유전자, 또는 DNA gyrase (*gyrB*)의 B-subunit을 사용한다(Miki 등, 2005; Lee와 Lee, 2010; Lee 등, 2011). RT-PCR

로 PCR을 진행하면 일반적인 PCR에 비해 더 빠르게 *B. fragilis*의 특징을 알 수 있다. ETBF를 검출할 때, 일반적인 PCR로는 BFT를 발현하는 BFT 유전자를 증폭한다. Isotype의 구분 없이 BFT 유전자만 검출하는 방법으로 분리 배양된 세균의 DNA를 추출하기만 하면 된다(Sears 등, 2008). Multiplex PCR은 BFT의 isotype을 구분할 수 있게 개발되었다(Avila-Campos 등, 2007). 이 두 방법을 통하면 빠른 시간 내 임상 검체 내의 ETBF를 확인할 수 있지만, 이는 분리 동정된 세균에 한해서만 가능하다. RT-PCR은 임상 검체 내 다른 균과 섞여 있는 *B. fragilis*를 검출하는데 유용하며 RT-PCR로도 BFT의 isotype을 구분할 수 있다. RT-PCR에서 사용한 primer는 Table 1에 제시하였다(Merino 등, 2011). 특히 기술의 발달로 환자의 대변에서 DNA를 추출하여 바로 RT-PCR이 가능하다. 한 연구에서 peptone yeast glucose with bile (PYGB) broth에 대변 검체를 먼저 배양하게 되면 검출 민감도를 높일 수 있다는 내용이 발표되었다(Chen 등, 2015). 각각 검사법을 비교했을 때 RT-PCR이 일반적인 PCR보다 더 민감하며, 증폭에서 확인까지 걸리는 시간은 별차이가 없어 ETBF 검출에 큰 도움을 줄 것으로 보인다(Papaparaskevas 등, 2013).

결론

사람이 가진 세포 수보다 많은 수의 미생물이 사람과 함께 공존하고 있다. 이러한 미생물이 사람에게 영향을 끼치지 않기란 쉽지 않다. 그렇기 때문에 장내미생물에 대한 연구가 활발히 이뤄지는 것은 필연적이다. 사람의 장내세균에 대한 연구는 설사 질환이나 대장 질환뿐만 아니라, 비만 등의 다른 대사질환이나 식습관 등의 생활습관에 까지 매우 다양하다. 이런 연구는 인간의 기대수명이 증가함에 따라 그 필요성이 더욱 두드러진다. 여기서는 대장의 정상균 무리인 Bacteroidetes의 *Bacteroides* spp.에 속하는 *B. fragilis*를 논했다. 특히 병원성 인자인 BFT를 분비하는 ETBF는 장상피세포의 E-cadherin의 분절을 유도한다. 이는 세포 실험에서는 물론, 동물 실험에서도 같은 결과가 나타났다. 하지만 아직 BFT의 정확한 ligand가 밝혀지지 않았다. BFT에 대한 항체가 없기 때문에 이는 더 어려움을 겪고 있다. 동물 모델에서 ETBF가 급성 또는

만성 대장염을 일으키고, 대장 용종의 발생을 촉진시킨 점을 고려하면, ETBF가 염증성 설사나 IBD만이 아닌, 대장염, 대장암을 일으키는 원인 균으로 가정할 수 있게 만든다. 특히 사람의 성숙에 따라 ETBF의 감수성이 달라진다는 점은 흥미로운 이야기이다. 성장에 따른 발현의 차이가 ETBF의 염증 기전에 중요하다면, 이와 관련한 연구를 진행하여 기전을 밝히는데 도움을 줄 수 있다. 현재까지의 연구로 동물모델이나 세포실험에서 ETBF에 의한 대장염이 TH17 면역반응을 증가시키는 것이 밝혀졌다. 그러나 이 발견이 바로 사람의 IBD나 대장암 유발과 연결되지 않는다. 지속적인 실험도 중요하며, 임상에서 ETBF의 검출을 높여 해당 환자에서의 ETBF와 면역작용을 검사할 필요성이 여기서 대두된다. 또한 이를 통해 ETBF와 면역반응의 상관관계를 조사하여 이를 질병의 치료에 사용할 수 있다. 한편 임상에서는 항생제 내성에 대한 *B. fragilis*에 대한 관심도 커지고 있다. 이는 ETBF를 연구를 저해할 수 있기 때문에 임상에서 ETBF를 검출할 때 충분히 고려되어야 한다. 장내의 많은 미생물 때문에 ETBF의 작용 규명이 어려울 수 있지만, 이를 극복함으로써 장내 미생물과 인체의 상호작용 원리와 질환의 예방 및 치료에 한 발짝 더 다가갈 수 있을 것이다. 이 종설을 통해 ETBF와 설사 질환 및 대장 질환과의 연관성, ETBF에 대한 직접적인 진단법 개발의 중요성이 충분히 제시되기를 바란다.

요약

정상인에서 장내세균은 숙주의 면역이나 영양 흡수를 돕지만, 때로는 기회감염균으로서 그들을 위협하기도 한다. 그 중 절대 혐기성 세균인 *Bacteroides fragilis*는 분비되는 장독소(enterotoxin)인 *Bacteroides fragilis* toxin (BFT)의 유무에 따라 non-enterotoxigenic *B. fragilis*(NTBF)와 enterotoxigenic *B. fragilis*(ETBF)로 나뉜다. ETBF는 가축 및 사람에서 설사 질환 및 대장 질환을 유발한다 그러나 때때로 ETBF를 가지고 있으나 증상이 없는 사람도 존재한다. ETBF는 염증성 설사 질환, 여행자 설사 환자의 대변에서 검출되어 주목 받고 있다. 또한, 몇몇 연구를 통해 inflammatory bowel disease (IBD)나 대장염 및 대장암 환자에서 ETBF가 증가한다는 것이 밝혀졌다. 일반 C57BL/6 마우스 및

Table 1. Target genes and sequences of primer and probe in real-time PCR

Gene	Sequences (Annealing temperature : 58°)		
	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Probe (5'→3')
<i>bft</i>	GGG ACA AGG ATT CTA CCA GCT TTA TA	ATT CGG CAA TCT CAT TCA TCA TT	CGC AAT GGC GAA TCC ATC AGC TAC A
<i>bft-1</i>	GGG ATG TCC TGG TTC A	AAT TAT CCG TAT GCT CAG CG	CTT CGG ATT TTR AAG CCA GTG GGA TGT C
<i>bft-2</i>	CTT AGG CAT ATC TTG GCT TG	GCG ATT CTA TAC ATG TTC TC	CTT CGG ATT TTR AAG CCA GTG GGA TGT C
<i>bft-3</i>	TTT GGG CAT ATC TTG GCT CA	ATC ATC CGC ATG GTT AGC A	CTT CGG ATT TTR AAG CCA GTG GGA TGT C

germ-free 마우스, multiple intestinal neoplasia (Min) 마우스, 토끼, Mongolian gerbil 등 여러 동물 모델에서 ETBF가 IBD나 대장염, 대장암을 유발 또는 촉진한다는 것이 발표되었다. ETBF의 유일한 병원성 인자인 BFT는 E-cadherin의 분절을 유도하여 장상피 세포의 투과성을 높인다. 이어서 β -catenin 신호전달계가 활성화하여 장상피세포의 증식이 증가한다. 또한 ETBF의 감염은 일반 마우스에서 급성이나 만성 대장염을 일으키고 Min 마우스에서 종양 형성을 촉진한다. 이는 Stat3에 의존한 T_H17 면역반응의 활성화를 통해 일어난다. 현재 ETBF의 검출 방법에는 크게 BFT toxin assay와 몇 가지 PCR 방법이 있다. 최근 real-time PCR과 같은 분자진단학적 기법의 발달로 일반적인 PCR보다 더 정확한 ETBF의 검출이 가능하게 되었다. 이것을 이용하여 앞으로 실제 임상에서 ETBF와 대장염 및 대장암의 발달 관계에 대한 심도 깊은 연구가 이뤄질 것으로 본다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

References

- Avila-Campos MJ, Liu C, Song Y, Rowlinson MC, Finegold SM. Determination of bft gene subtypes in *Bacteroides fragilis* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1336-1338.
- Basset C, Holton J, Bazeos A, Vaira D, Bloom S. Are *Helicobacter* species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease? *Dig Dis Sci*. 2004;49:1425-1432.
- Chen LA, Van Meerbeke S, Albesiano E, Goodwin A, Wu S, Yu H, et al. Fecal detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:1871-1877.
- Chung GT, Franco AA, Wu S, Rhie GE, Cheng R, Oh HB, et al. Identification of a third metalloprotease toxin gene in extra-intestinal isolates of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun*. 1999;67:4945-4949.
- Franco AA, Mundy LM, Trucksis M, Wu S, Kaper JB, Sears CL. Cloning and characterization of the *Bacteroides fragilis* metalloprotease toxin gene. *Infect Immun*. 1997;65:1007-1013.
- Franco AA, Cheng RK, Chung GT, Wu S, Oh HB, Sears CL. Molecular evolution of the pathogenicity island of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains. *J Bacteriol*. 1999;181:6623-6633.
- Jiang ZD, Dupont HL, Brown EL, Nandy RK, Ramamurthy T, Sinha A, et al. Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1417-1419.
- Kim KH, Lee KY, Jang IH, Lee HH. Isolation and transfer for R-plasmid of *Bacteroides fragilis*. *Korean Journal of Medical Technologists*. 1990;22:53-60.
- Kling JJ, Wright RL, Moncrief JS, Wilkins TD. Cloning and characterization of the gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;146:279-284.
- Koshy SS, Montrose MH, Sears CL. Human intestinal epithelial cells swell and demonstrate actin rearrangement in response to the metalloprotease toxin of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun*. 1996;64:5022-5028.
- Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE. Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2007;44:895-900.
- Lee CS, Lee J. Evaluation of new gyrB-based real-time PCR system for the detection of *B. fragilis* as an indicator of human-specific fecal contamination. *J Microbiol Methods*. 2010;82:311-318.
- Lee CS, Marion JW, Lee J. A novel genetic marker for the rapid detection of *Bacteroides fragilis* in recreational water as a human-specific faecal indicator. *J Water Health*. 2011;9:253-264.
- Liu C, Song Y, McTeague M, Vu AW, Wexler H, Finegold SM. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;222:9-16.
- Merino VR, Nakano V, Liu C, Song Y, Finegold SM, Avila-Campos MJ. Quantitative detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* subtypes isolated from children with and without diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2011;49:416-418.
- Miki T, Kuwahara T, Nakayama H, Okada N, Kataoka K, Arimochi H, et al. Simultaneous detection of *Bacteroides fragilis* group species by *leuB*-directed PCR. *J Med Invest*. 2005;52:101-108.
- Moncrief JS, Obiso R, Jr., Barroso LA, Kling JJ, Wright RL, Van Tassel RL, et al. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. *Infect Immun*. 1995;63:175-181.
- Moncrief JS, Duncan AJ, Wright RL, Barroso LA, Wilkins TD. Molecular characterization of the fragilysin pathogenicity island of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun*. 1998;66:1735-1739.
- Mundy LM, Sears CL. Detection of toxin production by *Bacteroides fragilis*: assay development and screening of extra-intestinal clinical isolates. *Clin Infect Dis*. 1996;23:269-276.
- Myers LL, Firehammer BD, Shoop DS, Border MM. *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. *Infect Immun*. 1984;44:241-244.
- Myers LL, Shoop DS, Stackhouse LL, Newman FS, Flaherty RJ, Letson GW, et al. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol*. 1987;25:2330-2333.
- Myers LL, Shoop DS, Collins JE, Bradbury WC. Diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in infant rabbits. *J Clin Microbiol*. 1989;27:2025-2030.
- Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009;136:65-80.
- Ni Van, Ned Ahlberg, Byung Chul Jung, Min Ho Lee, Seung Ju Ahn, In-soo Lee, et al. Evaluation of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from colonic washings from patients undergoing colonoscopy. *J Exp Biomed Sci*. 2012;18:362-368.
- Obiso RJ, Jr., Iyerly DM, Van Tassel RL, Wilkins TD. Proteolytic activity of the *Bacteroides fragilis* enterotoxin causes fluid se-

- cretion and intestinal damage in vivo. *Infect Immun.* 1995, 63:3820-3826.
26. Papaparaskevas J, Mela V, Houhoula DP, Pantazatou A, Petrikos GL, Tsakris A. Comparative evaluation of conventional and real-time PCR assays for detecting *Bacteroides fragilis* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2013,51:1593-1595.
 27. Polk BF, Kasper DL. *Bacteroides fragilis* subspecies in clinical isolates. *Ann Intern Med.* 1977,86:569-571.
 28. Prindiville TP, Sheikh RA, Cohen SH, Tang YJ, Cantrell MC, Silva J, Jr. *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerg Infect Dis.* 2000,6:171-174.
 29. Rabizadeh S, Rhee KJ, Wu S, Huso D, Gan CM, Golub JE, et al. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007,13:1475-1483.
 30. Redondo MC, Arbo MD, Grindlinger J, Snyderman DR. Attributable mortality of bacteremia associated with the *Bacteroides fragilis* group. *Clin Infect Dis.* 1995,20:1492-1496.
 31. Rhee KJ, Wu S, Wu X, Huso DL, Karim B, Franco AA, et al. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 2009,77:1708-1718.
 32. Rolfe RD, Hentges DJ, Campbell BJ, Barrett JT. Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1978,36:306-313.
 33. Sack RB, Myers LL, Almeida-Hill J, Shoop DS, Bradbury WC, Reid R, et al. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: epidemiologic studies of its role as a human diarrhoeal pathogen. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1992,10:4-9.
 34. Sack RB, Albert MJ, Alam K, Neogi PK, Akbar MS. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi children with diarrhea: a controlled study. *J Clin Microbiol.* 1994,32:960-963.
 35. Saidi RF, Sears CL. *Bacteroides fragilis* toxin rapidly intoxicates human intestinal epithelial cells (HT29/C1) in vitro. *Infect Immun.* 1996,64:5029-5034.
 36. Sears CL, Myers LL, Lazenby A, Van Tassel RL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Clin Infect Dis.* 1995,20 Suppl 2:S142-148.
 37. Sears CL. The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon.* 2001,39:1737-1746.
 38. Sears CL, Islam S, Saha A, Arjumand M, Alam NH, Faruque AS, et al. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. *Clin Infect Dis.* 2008,47:797-803.
 39. Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clin Microbiol Rev.* 2009,22:349-369.
 40. Tong J, Liu C, Summanen P, Xu H, Finegold SM. Application of quantitative real-time PCR for rapid identification of *Bacteroides fragilis* group and related organisms in human wound samples. *Anaerobe.* 2011,17:64-68.
 41. Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, et al. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect.* 2006,12:782-786.
 42. Troy EB, Kasper DL. Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. *Front Biosci.* 2010,15:25-34.
 43. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007,449:804-810.
 44. Vines RR, Perdue SS, Moncrief JS, Sentz DR, Barroso LA, Wright RL, et al. Fragilysin, the enterotoxin from *Bacteroides fragilis*, enhances the serum antibody response to antigen co-administered by the intranasal route. *Vaccine.* 2000,19:655-660.
 45. Weikel CS, Grieco FD, Reuben J, Myers LL, Sack RB. Human colonic epithelial cells, HT29/C1, treated with crude *Bacteroides fragilis* enterotoxin dramatically alter their morphology. *Infect Immun.* 1992,60:321-327.
 46. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* 2007,20:593-621.
 47. Wu S, Lim KC, Huang J, Saidi RF, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998,95:14979-14984.
 48. Wu S, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology.* 2003,124:392-400.
 49. Wu S, Powell J, Mathioudakis N, Kane S, Fernandez E, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through mitogen-activated protein kinases and a tyrosine kinase-regulated nuclear factor- κ B pathway. *Infect Immun.* 2004,72:5832-5839.
 50. Wu S, Shin J, Zhang G, Cohen M, Franco A, Sears CL. The *Bacteroides fragilis* toxin binds to a specific intestinal epithelial cell receptor. *Infect Immun.* 2006,74:5382-5390.
 51. Wu S, Rhee KJ, Zhang M, Franco A, Sears CL. *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and gamma-secretase-dependent E-cadherin cleavage. *J Cell Sci.* 2007, 120:1944-1952.
 52. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009, 15:1016-1022.
 53. Yim S, Gwon SY, Hwang S, Kim NH, Jung BD, Rhee KJ. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* causes lethal colitis in Mongolian gerbils. *Anaerobe.* 2013,21:64-66.
 54. Zhang G, Svenungsson B, Karnell A, Weintraub A. Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in adult patients with diarrhea and healthy controls. *Clin Infect Dis.* 1999,29:590-594.