

Enterococcus Faecalis에 의한 Clostridium Perfringens의 증식 억제 효과

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

신 완 식 · 유 진 홍 · 강 문 원

= Abstract =

Inhibition Effect of Growth of Clostridium perfringens by Enterococcus faecalis

Wan Shik Shin, M.D., Jin Hong Yoo, M.D. and Moon Won Kang, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Sydney M. Finegold, M.D.

Department of Internal Medicine, University of California, Los Angeles, U.S.A.

It has known that some strains of Enterococcus faecalis inhibit some strains of enterococci and group D streptococcal species by production of enterocin. We found that Clostridium perfringens did not grow in our previous report of 'In vivo efficacy of cefotetan and cefoxitin in an intraabdominal abscess model in the mouse'. So we designed our experiments in vivo and in vitro to find out what bacteria inhibit the growth of C. perfringens.

The results were as follows;

- 1) C. perfringens from the intraabdominal and the subcutaneous abscess model using 5 bacterial isolates and autoclaved cecal content were not found. In vitro studies with various combination of organisms, C. perfringens did not grow in the groups of the co-culture with E. faecalis.
- 2) In vivo models using E. faecalis (10^5 /ml) and C. perfringens (10^5 /ml), we couldn't find any colonies of C. perfringens although we used a more concentration of C. perfringens than E. faecalis.
- 3) In direct and deferred antagonism test, inhibition zone to C. perfringens by E. faecalis was found, and more concentration of E. faecalis was necessary for inhibition of C. perfringens.
- 4) The inhibition zone by E. faecalis filtrates using 0.22um filter was also found, but we couldn't see any inhibition when we diluted the E. faecalis filtrates.
- 5) C. septicum, C. cadaveris, and C. subterminale were inhibited by E. faecalis, whereas C. difficile, and C. sporogenes were not inhibited.

머 리 말

Enterococcus faecalis는 인체내 정상적으로 존재하는 장내 세균종의 하나로 복강내 농양형성에 중요한 역할을 하고 있다. 저자들은 Bacteroids fragilis, Peptos-

treptococcus anaerobius, Clostridium perfringens, Escherichia coli, Enterococcus faecalis의 5가지 균주를 사용하여 유도한 생쥐의 복강내 농양형성 모형으로 cefoxitin과 sulperazone의 치료효과를 보기위한 실험을 하던 중 대조군과 항생제 투여군 모두에서 C. perfringens가 전혀 배양되지 않았고, C. perfringens에 의해 유발 되었을 것으로 생각되는 장포상기증(pneumatois cystoides intestinalis)병변에서도 C. perfrin-

*본 논문은 1992년도 가톨릭 중앙의료원 학술연구비로 이루어 졌음.

gens를 제외한 다른 주입균들만 나타나는 현상을 발견하였다¹⁾.

이에 저자들은 *C. perfringens*가 억제된 원인이 되는 균주와 이에 관련된 병태생리를 보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 실험동물

체중 25~30그램의 생후 8~10주 된 한국산 생쥐 암컷을 사용하였으며 실험기간동안 먹이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였고 외견상 건강한 동물만 사용하였다.

2) 세균

세균은 ATCC (American Type Culture Collection)의 표준균주를 사용하였다. 혐기세균으로는 *Bacteroids fragilis* (ATCC 23716; 10^8 /ml; 이하 *B. fragilis*) *peptostrepto coccus anaerobius* (ATCC 27337; 10^5 /ml; 이하 *P. anaerobius*), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124; 10^5 /ml; 이하 *C. perfringens*)를 사용하였고, 통성 혐기세균으로는 *Escherichia coli* (ATCC 25922; 10^6 /ml; 이하 *E. coli*), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212; 10^5 /ml; 이하 *E. faecalis*) 등 모두 5종을 사용하였다. 각 세균은 $10^9 \sim 10^{10}$ /ml의 농도로 -70°C 냉장고에 보관한 후 yeast extract로 희석하여 사용하였다.

3) 멸균 맹장 내용물(Autoclaved Cecal Content : 이하 ACC)

ACC를 25마리의 생쥐에서 채취하여 여기에 동량의 peptone yeast glucose (PYG)배지를 넣어 혼합한 후 두 겹의 거어즈로 거르고 121°C 에서 1시간 동안 멸균하여 냉장고에 보관한 후 사용할 때에는 진탕하여 침전되지 않도록 하였다²⁾.

2. 방 법

1) 복강내 및 피하농양

생쥐를 ketamine(유한양행)으로 마취시켜 5종의 세균혼합액과 멸균 맹장 내용물을 혼합하여 피하에 주입하거나 젤라틴 캡슐에 넣어 복강내 주입하였다. 복강내 농양군은 실험 10일째에, 피하 농양군은 실험 3일째에 경추탈구에 의해 희생시킨 뒤 농양의 농을 가능한 많이

떼어내어 yeast extract가 0.5 ml씩 들어있는 튜브에 넣고 진탕후 10~100배식 연속 희석하여 hemin과 vitamin K₁이 포함된 혈액 한천배지에 심었다. 집락의 감별을 쉽게하기 위하여 호기성 상태와 혐기성 상태에서 모두 배양하였으며, 호기성 상태에서 배양한 배지는 24시간 후, 혐기성 체임버에서 배양한 배지는 48시간 후에 각 세균의 집락수를 관찰하였다. 실험중 사망하거나 희생시킬 때 장포상기증이 생긴 병변은 절제하여 세균 배양검사와 함께 즉시 10% formalin 용액에 고정 후 H & E 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다^{3~5)}.

2) 생체의 실험

실험군은 다음과 같이 3군으로 나누어 액체배지에 심어 혐기성 체임버에서 48시간 동안 배양한 후 각 세균의 집락수를 관찰하였다.

1군 : *C. perfringens*를 포함한 다른 세 균주 혼합군.

2군 : *C. perfringens*를 포함한 다른 두 균주 혼합군.

3군 : *C. perfringens*를 포함한 다른 한 균주 혼합군.

3) 길항 실험

표준 길항검사인 직접 또는 지연 길항검사⁶⁾를 *C. perfringens* 이외에, *C. cadavarum*, *C. difficile*, *C. subterminale*, *C. sporogenes* 등에 대해서도 실시하였다.

(1) 직접검사(Simultaneous or Direct Test)

Gratia의 방법을 변형하여 시행하였으며 *C. perfringens* 10^5 /ml와 *E. faecalis* 10^6 /ml를 같은 평판배지 표면에 동시에 자라도록 하였다. 37°C 에서 48시간 동안의 혐기성 상태에서 배양 후 *C. perfringens*가 혈액한천배지에서 억제되는지 여부를 관찰하였다. 또한 *E. faecalis*의 추출물에 의한 현상인가를 보기 위하여 0.22 um의 filter를 통하여 얻은 추출물을 10^7 /ml의 집락을 형성한 *C. perfringens*의 배지 위에 떨어뜨려 억제 여부를 관찰하였다.

(2) 지연길항검사(Deferred Antagonism Test)

Frederique의 방법을 변형하여 시행하였으며 성장배지 표면에 *E. faecalis*를 37°C 에서 48시간동안 혐기성 또는 통기성으로 점적중(spot-inoculation)시킨 다음 혐기성 체임버에서 배지를 꺼낸 후 30분간 chloroform 증기에 노출시키고 혐기성 체임버에 3시간 동안 두었다. 그 후 *C. perfringens*를 포함한 한천배지를 녹여 끓고루 위에 붓고 37°C 에서 48시간동안 혐기성 상태에서 보존 후 억제 여부를 관찰하였다.

결 과

1. 세균 혼합액에 의한 복강내 및 피하농양

Table 1에서 보여주는 바와 같이 5종의 균주를 생쥐와 복강내 및 피하에 넣은 다음 세균의 집락수를 관찰한 결과 모든 실험에서 *C. perfringens*는 관찰할 수 없었다.

2. 생체의 실험

여러가지 조합으로 심은 액체배지에서도 *E. faecalis*가 포함된 조합에서는 *C. perfringens*가 발견되지 않았다(Table 2).

3. *E. Faecalis*와 *C. Perfringens*에 의한 복강내 및 피하농양

생체의 실험과 같은 현상이 생체내에서 일어나는가를 보기위해 *E. faecalis* (10^5 /ml)와 *C. perfringens* (10^5 /ml)로 복강내 농양과 피하농양을 유도한 결과 *C. perfringens*는 나타나지 않았다(Table 3). 이와 같은 소견은 생체내 실험과 동일 하였으나 *C. perfringens*의 농도는

Table 1. Results of Intraabdominal and Subcutaneous Abscess Model Using 5 Organisms

Group		B. frag.	E. coli	E. faec.	P. anae.	C. perf.
Intraabdominal abscess		7.9*	6.9	7.3	4.8	0
Subcutaneous abscess						
I	R**	8.2	7.2	7.0	6.3	0
	L	8.5	7.6	7.7	6.8	0
II	R	8.4	7.3	7.6	6.3	0
	L	8.1	7.9	7.6	6.6	0

* : Organisms are expressed as log colony forming units/ml

** : R and L indicates right and left sided subcutaneous abscess

B. frag. : *Bacteroides fragilis*

E. coli : *Escherichia coli*

E. faec. : *Enterococcus faecalis*

P. anae. : *Peptostreptococcus anaerobius*

C. perf. : *Clostridium perfringens*

를 10^{6-7} /ml 이상으로 높인 경우에는 억제현상을 나타내지 않았다.

4. 장포상기증의 세균배양 소견

장포상기증이 생긴 부위를 여러가지 방법으로 배양하

Table 2. Results of Culture in Variable Combinations of Organisms Including *C. perfringens*

Combination of organisms	Log CFU/ml of <i>C. perfringens</i>
1. 4 organisms	
a. B. frag. + E. coli + E. faec. + C. perf.	0
b. B. frag. + E. coli + P. anae. + C. perf.	6.5
c. E. faec. + E. coli + P. anae. + C. perf.	0
d. E. faec. + B. frag. + P. anae. + C. perf.	0
2. 3 organisms	
a. B. frag. + P. anae. + C. perf.	4.5
b. E. coli + E. faec. + C. perf.	0
c. B. frag. + E. coli + C. perf.	6.6
d. E. coli + P. anae. + C. perf.	5.3
e. B. frag. + E. faec. + C. perf.	0
f. P. anae. + E. faec. + C. perf.	0
3. 2 organisms	
a. B. frag. + C. perf.	6.7
b. E. coli + C. perf.	6.6
c. E. faec. + C. perf.	0
d. P. anae. + C. perf.	6.7

Table 3. Results of Abscess Model Using *E. faecalis* and *C. perfringens*

Intraabdominal abscess			Subcutaneous abscess			
	E. faec.	C. perf.		E. faec.	C. perf.	
I	5.9*	0	I	R**	7.2	0
II	5.5	0		L	7.3	0
III	5.4	0	II	R	7.7	0
IV	5.1	0		L	7.8	0
V	5.5	0	III	R	7.1	0
				L	7.7	0

* : Organisms are expressed as log colony forming units/ml

** : R and L indicates right and left sided subcutaneous abscess

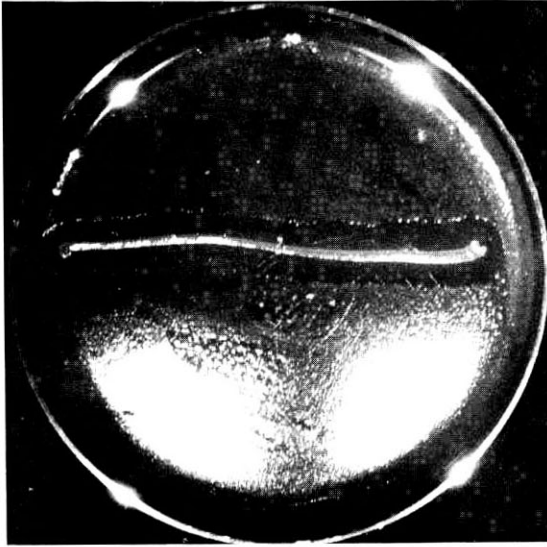


Fig. 1. Inhibition of *C. perfringens* by *E. faecalis* as detected by the simultaneous antagonism test procedure.

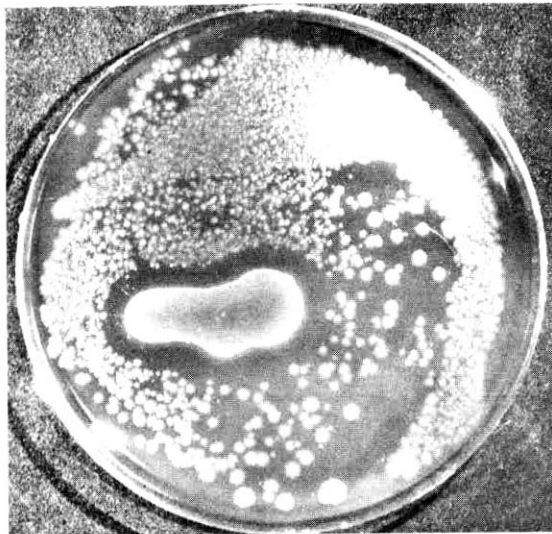


Fig. 2. Inhibition of *C. perfringens* by *E. faecalis* filtrates after filtering through 0.22 μ m filter.

여 보았으나 원인균으로 생각되는 *C. perfringens*를 발견할 수 없었다.

5. 길항 실험

1) 직접 길항검사

E. faecalis 주변으로 *C. perfringens*의 성장이 억제

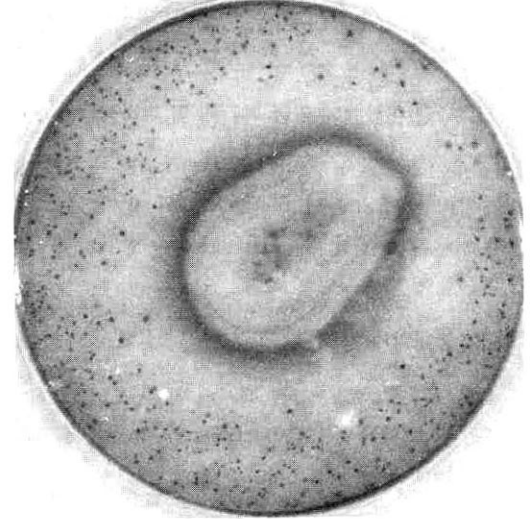


Fig. 3. Inhibition of *C. perfringens* by *E. faecalis* as detected by the deferred antagonism test procedure.

된 영역을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 그러나 같은 농도로 배양하였을 때에는 억제되지 않았고, 억제조건을 보려면 *C. perfringens*보다 더 많은 농도의 *E. faecalis*가 필요하였다. *E. faecalis* 대신 0.22 μ m filter로 거른 추출물로 같은 실험을 한 결과 동일한 조건을 보였다(Fig. 2). 그러나 이 추출물을 희석시켜 실험한 경우에는 억제조건을 보이지 않았다.

2) 지연 길항검사

Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 중량의 *E. faecalis*가 있는 부위에서는 *C. perfringens*의 집락들이 관찰되지 않았다.

고 찰

상술한 바와 같이 *E. faecalis*와 *C. perfringens*를 포함한 5가지 조합의 세균 혼합액을 사용하여 복강 및 피하 농양을 유도한 실험과 생체의 실험 모두에서 공통적으로 *E. faecalis*가 포함된 조합인 경우에는 *C. perfringens*가 관찰되지 않았다. 따라서 *C. perfringens*를 억제시킨 요인이 *E. faecalis*에 있다고 생각되어 *E. faecalis*로 범위를 좁혀 *E. faecalis*와 *C. perfringens*의 두가지 세균혼합액으로 유도한 농양형성 모형에서도 *C. perfringens*는 나타나지 않았다.

이러한 억제현상을 일으킬 수 있는 요인으로서는 bacteriocin 혹은 bacteriocin 유사물질, 세균의 대사성 부산물, bacteriophage 등으로 대별해 볼 수 있다⁶⁾.

bacteriocin은 항균작용을 한다는 면에서는 항생제와 유사하지만 작용범위가 대개는 같은 종(species)내로 국한된다는 점에서 다르며 특히 그람 양성균의 경우 물리화학적 특성이 명확하게 규명되어 있지는 못하다⁷⁻⁸⁾. *E. faecalis* E1의 경우, E_{1A}와 E_{1B}라는 bacteriocin을 내는 것으로 알려졌으며⁹⁻¹⁰⁾, 일부의 enterococci와 *S. salivarius*를 억제한다고 알려져 있으나, clostridia에 작용하는 것에 대한 보고는 아직까지 없다.

그 밖에 항균작용을 갖고 있으나 bacteriocin의 범주에 넣기에는 그 기준에 부합되지는 않고 구조적으로 뚜렷이 규명이 안 되는 물질들로 여러 용해효소, 저분자량의 항균물질, 그리고 대사성 부산물 등에 bacteriocin까지 포함하여 bacteriocin 유사물질이라고 하며 이는 넓은 의미에서의 bacteriocin으로 간주되기도 한다⁶⁾.

대사성 부산물로는 암모니아, 젖산, 지방산, 과산화수소 등이 알려져 있는데 이 실험이 혐기성 조건하에서 행해졌기 때문에 과산화수소는 일단 요인에서 제외시킬 수 있으나 나머지 물질은 배제를 할 수 없을 것이다.

bacteriophage는 bacteriocin과 작용이 매우 유사하기 때문에 감별이 어려우나 그 자체가 확산능력은 없는 것으로 알려져 있다. *C. perfringens*에 대한 *E. faecalis*의 억제작용이 bacteriocin 유사물질이 매개해서 생긴다는 것을 증명하기 위해서는 표준 길항검사가 필요하다. 직접 길항검사는 두 균주를 동시에 배양해서 억제효과를 보는 것이고, 지연 길항검사는 bacteriocin 등의 물질 이외의 요인을 배제하기 위하여 억제작용을 하는 균주를 죽인 상태에서 이 균주가 내는 물질만 대상균주에 작용하도록 하는 것이다.

표준 길항실험 중에서 특히 *E. faecalis*의 추출물을 사용한 길항검사와 지연 길항검사 결과가 양성으로 나온 점으로 보아 bacteriocin이 억제작용의 매개 물질일 가능성이 높다고 생각되지만 *E. faecalis*에 의한 어느 한가지 특정한 물질로 생각하기는 어렵다. 농양유도 실험에서 *C. perfringens* 농도가 *E. faecalis* 보다 상대적으로 높은 경우엔 억제되지 않았고, 직접 길항검사에서 *C. perfringens*가 *E. faecalis*의 농도와 같거나 높을 때는 억제되지 않는 소견을 보였는데, 이러한 점에서 억제작용에는 양적인 관계가 있음을 알 수 있었다. *E. faecalis*

추출물을 사용한 실험에서도 추출물을 희석했을 때에는 억제작용이 나타나지 않은 점 또한 이를 뒷받침한다.

*C. perfringens*에 의해 유발되었을 것으로 생각되는 장포상기증 병변에서도 *C. perfringens*가 발견 안 된 이유는 세균 주입 후 상당히 빠른 시간 내에 *C. perfringens*가 장포상기증을 일으키고 곧 이어서 *E. faecalis*에서 생산된 bacteriocin 유사물질이 *C. perfringens*를 제거한 것으로 추정된다.

저자들이 모든 clostridium 종을 대상으로 실험을 실시하지는 못하였지만 *E. faecalis*가 *C. perfringens* 이외의 일부 다른 Clostridium 종에도 억제효과를 나타내는 현상을 볼 수 있었는데 *C. septicum*, *C. cadaveris*, *C. subterminale*는 억제되지만, *C. difficile*, *C. sporogenes*는 억제되지 않아 같은 clostridia 중에서도 차이가 있는 것을 관찰할 수 있었다.

결론적으로 *E. faecalis*는 *C. perfringens*에 대해 억제관계를 갖고 있으며, 이는 *E. faecalis*가 분비하는 bacteriocin 유사물질이 매개하는 것으로 믿어진다. 또한 *C. perfringens* 이외에 다른 일부 clostridia에 대해서도 억제작용이 있음을 알 수 있었다. 앞으로 *E. faecalis*의 *C. perfringens*에 대한 억제작용의 기전과 매개물질의 구체적인 규명, 그리고 다른 clostridia균들 중에서 *E. faecalis*에 의해 억제되는 종류에 대해서는 더 연구해야 할 과제로 사료된다.

결 론

저자들의 실험에서 *C. perfringens*가 억제되는 현상을 관찰하여 *C. perfringens*가 억제된 요인이 나머지 4개의 균주중 어떤 균주에 의한 것인지 여부와 이에 관련된 병태생리를 보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

1) 5종류의 균주와 멸균 맹장 내용물(ACC)을 혼합하여 복강내 농양 및 피하농양 형성을 유도한 실험에서 전혀 *C. perfringens*의 집락을 관찰할 수 없었다. 또한 5종류의 균주를 여러가지로 조합하여 배양한 생체와 실험에서도 *E. faecalis*를 포함한 군에서는 항상 *C. perfringens*가 자라지 않았다.

2) 10^5 /ml의 *E. faecalis*와 10^5 /ml의 *C. perfringens*로 복강 내 및 피하농양을 유도한 실험에서도 *C. perfringens*가 나타나지 않았으나, *C. perfringens*의 농도를 10^6-7 /ml로 높인 경우에는 억제되지 않았다.

3) 직접 길항검사에서 E. faecalis에 의해 C. perfringens가 억제되는 영역을 관찰하였지만 같은 농도의 균을 각각 사용했을 때에는 이러한 억제영역을 발견할 수 없어 억제를 위하여는 C. perfringens보다 더 많은 농도의 E. faecalis 균주가 필요함을 알 수 있었고 자연 길항 검사에서도 C. perfringens에 대한 억제영역을 관찰할 수 있었다.

4) 0.22 um의 여과기를 통하여 E. faecalis를 거른 추출물에 의하여 C. perfringens가 억제되는 것을 관찰하였지만 이 물질을 희석했을 때에는 억제되지 않았다.

5) 다른 clostridia 종에 대한 영향은 C. septicum, C. cadaveris, C. subterminale의 경우 E. faecalis에 의해 억제되었으나, C. difficile, C. sporogenes는 억제되지 않았다.

REFERENCES

- 1) 신완식, 정희영: 실험적 생쥐 복강내 농양 형성 모형을 이용한 cefoxitin과 sulperazone의 치료효과. 가톨릭대학 의학부 논문집 42:4 9111, 1989
- 2) Weinstein WM, Onderdonk AB, Bartlett JG, Gorbach SL: *Experimental intra-abdominal abscess in rats; development of an experimental model. Infect Immun* 10:1250, 1974
- 3) Onderdonk AB, Weinstein WM, Sullivan NM, Bartlett JG, Gorbach SL: *Experimental intraabdominal abscess in rats; Quantitative bacteriology of infected animals. Infect Immun* 10:1256, 1974
- 4) Bartlett JG, Onderdonk AB, Louie TJ, Kasper DJ, Gorbach SL: *A review; Lessons from an animal model of intraabdominal sepsis. Arch Surg* 113:853, 1978
- 5) Bartlett JG, Louie TJ, Gorbach SL, Onderdonk AB: *Therapeutic efficacy of 29 antimicrobial regimen in experimental intraabdominal sepsis. Rev Infect Dis* 3:535, 1981
- 6) Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW: *Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol Rev* 40:722, 1976
- 7) Brock TD, Peacher B, Pierson D: *Survey of the bacteriocins of the enterococci. J Bact* 86:703, 1963
- 8) Konisky J: *Colicins and other bacteriocin with established mode of action. Rev Microbiol* 36:125, 1982
- 9) Kramer J, Brandis H: *Mode of action of two streptococcus faecium bacteriocins. Antimicrob Agents Chemother* 7:117, 1976
- 10) Kramer J, Brandis H: *Purification and characterization of two bacteriocins from streptococcus faecium. J Gen Microbiol* 88:93, 1975