咯痰에서 분리된 未分類抗酸菌에 관한 연구

大韓結核協會 結核研究院 細菌部

金 成 鎮 · 金 尚 材

—Abstract—

A Study on Unclassified Mycobacteria Isolated from Human Sputa.

Sung Chin Kim, M. D. and Sang Chae Kim, M. P. H.

Department of Bacteriology, The Institute of Tuberculosis, The Korean National TB Association

Disease due to anonymous mycobacteria is not rare in other countries, although a few years ago it was thought to be almost a curiosity. Authors summarized the results of identification and classification of mycobacteria isolated from 22,123 sputa which were collected from the patients at Health Center in Seoul and Kyung-Ki province in 1968. Those cultures were identified according to the Runyon's classification and the other methods.

The results obtained are as followings:

- 1) Total strains of acid fast bacilli isolated from 22,123 sputa were 3,646 or 16.5%.
- 2) The Strains of *M. tuberculosis* among the total strains of acid fast bacilli were 3,549 or 97.3%.
- 3) The strains of unclassified mycobacteria among the total strains of acid fast bacilli were 97 or 2.7%
- 4) All strains of unclassified mycobacteria were identified according to the Runyon's classification as followings:

Number of st strains included in Runyon's Group II were 43 or 44.3%.

Number of strains included in Runyon's Group III were 49 or 50.6%.

Number of strains included in Runyon's Group IV were 5 or 5.1%.

But we could not find out any strain of Photochromogens.

- 5) Forty three strains of Runyon's Group I were subdivided into 5 groups according to the Enzymatic activities. Among them 11 strains were indentified as "Sclofulaceum" type Scotochromogens.
- 6) Forty nine strains of Runyon's Group III were subdivided into 8groups according to the Enzymatic activities. Among them 31 st:ains were identified as "Radish" type Nonphotochromogens and 2 strains, as "V" type Nonphotochromogens.
- 7) Five strains of Runyo's Group IV were subdivided into 2 groups according to the Enzymatic activities. Among them 1 strain was idntified as *M. fortuitum*.

緒 論

Pinner(1935)¹⁾가 白色海狸에 病原性이 없는 人體 起源의 抗酸菌을 非定型抗酸菌(Atypical Mycobacteria)이라 稱한 이후 Timpe & Runyon²⁾, Buhler & Pollack³⁾ 등을 비롯한 여러학자들에 의해 그러한 非定型抗酸菌이

人體에 病原性을 가지고 있다는 사실을 관찰함으로써 전 세계학자들의 관심을 모으게 된 것이다. Runyon (1965)⁴⁾은 人型, 牛型 및 鳥型結核菌 이외의 모든 人體 起源 抗酸菌을 非定型抗酸菌이라 稱 함은 矛盾이라 지적하고 既分類된 기타 抗酸菌이라도 病原性이 인정되면 定型抗酸菌의 範疇內에 위치 시킬 수 있으므로 그러

한 非定型抗酸菌을 未分類抗酸菌이라 稱할 것을 제안했으며 제15회 國際學會에서 이를 정식으로 택하게 된 것이다. 그리고 Weber & Taute(1905)⁵⁾은 非病原性的 雜菌性抗酸菌이 Transmutation 되어 有毒結核菌으로 변화해 갔을 것이라고 주장하는데 반해 Runyon(1959)⁶⁾은 臨床적으로 有意한 未分類抗酸菌이 雜菌性抗酸菌과 有毒抗酸菌 사이의 一定群으로 있다가 우연한 기회에 人體에 침입하여 適應한 菌群이라고 하며 또 Xalabarder (1961)⁷⁾는 그와 달리 定型抗酸菌이 抗結核劑의 사용과 같은 여러가지 영향으로 인하여 非定型抗酸菌으로 변했다고 하고 어떤 條件下에서는 또 그 반대 방향으로도 변할 수 있다고 논하고 있다.

현재 세계각지에서 특히 結核菌과 같은 有毒抗酸菌의 有病率이 減小하고 있는 국가에서는 이러한 人體 起源의 未分類抗酸菌에 대한 臨床 및 疫學的 有意성에 대해 크나큰 관심을 모으고 있는 것이다.

Palmer & Edwards(1956)⁸⁾ 등이 미국의 海軍新兵을 대상으로 皮膚反應을 통해 조사한 결과 20~70%의 未分類抗酸菌 感染率을 나타내었고 인도에서는 70~80%, Philippine, Vietnam에서는 90% 이상의 높은 感染率을 나타내었다고 한다. 우리나라의 경우는 李·申(1967)⁹⁾ 등이 調査報告한 바에 의하면 물론 연령 및 성별에 따라 차이는 있으나 평균 31.7%로 밝혀졌다.

未分類抗酸菌의 檢出率은 먼저 Tacquet et al(1966)¹⁰⁾ 등이 13,420명의 結核患者를 대상으로 조사한 결과를 보

면 그 가운데 3.21%(448名)가 未分類抗酸菌에 의해 感染되어 있음을 밝히고 있다. 우리나라의 경우 李(1962)¹¹⁾가 729명의 結核患者를 대상으로 조사한 결과 3.8%(28株)의 未分類抗酸菌이 檢出되었다는 報告가 있다.

著者들은 1968년도 上半期에 서울 및 京畿道內 保健所로부터 檢査 依頼된 喀痰 22,123건을 대상으로 各種抗酸菌을 분리하여 同定함과 동시에 그들의 여러가지 生物化學的 性狀을 관찰한 결과를 報告하고자 한다.

재료 및 방법

供試菌株 :

參考菌株 : 美國 Trudeau Laboratory(金賢奎)와 英國 Tuberculosis Reference Laboratory(J. Marks)로 부터 分讓받은 各種 菌株를 參考菌株로 本實驗에 이용하였다. (Table 1)

試驗菌株 : 1968년 1월부터 6월까지 서울 및 京畿道內 各 保健所로부터 檢査依頼된 喀痰 22,123건을 4%NaOH로 前處置하여 3%小川培養基에 接種한후 37°C 孵卵器에 8週間 培養하면서 形成된 菌集落을 취해 Niehl-Neelsen 染色法에 따라 抗酸性을 확인한 다음 Löwenstein-Jensen 培養基에 繼代培養하였다. 繼代培養된 균은 먼저 Niacin test를 실시하여 反應陽性인 菌株은 人型結核菌으로 判定하고 反應陰性인 菌株은 다시 稀석培養法에 따라 純粹繼代培養한 후에 各種 實驗에 이용하였다.

Table 1. List of Reference Strains

Received as(Species)	Received form(Adress)	Number or Special Name	Received Date
M. tuberculosis	Trudeau Lab. USA	H ₃₇ Rv	Nov., 1967
M. bovis	Trudeau Lab. USA	D-4	Nov., 1967
M. bovis	Trudeau Lab. USA	4228-2	Nov., 1967
M. bovis	NIH Korea	BCG	June, 1966
M. avium	Trudeau Lab. USA		Nov., 1967
M. kansasii	TS Reference Lab. UK	28930	Feb., 1968
M. xenopei	TS Reference Lab. UK	13026	Feb., 1968
M. platypoecilous	Trudeau Lab. USA		Nov., 1967
M. acapulcensis	Trudeau Lab. USA		Nov., 1967
M. thamnopheos	Trudeau Lab. USA		Nov., 1967
M. vaccae	Trudeau Lab. USA		Nov., 1967
M. phlei	TB Reference Lab. UK	8151	Nov., 1967
M. smegmatis	TB Reference Lab. UK	8158	Feb., 1968
Scotochromogen	Trudeau Lab. USA	T-14	Nov., 1967
Scotochromogen	TB Reference Lab. UK	30705	Feb., 1968
Scotochromogen	TB Reference Lab. UK	27943	Feb., 1968
Nonphotochromogen	Trudeau Lab. USA	T-31	Nov., 1967

Ruyon's Gropuing^{12, 13)} :

發育速度 觀察: 純粹培養된 균의 集落을 1白金耳(22 SWG, 2cu. mm) 취해 滅菌生理食鹽水 1ml에懸濁시킨 다음 다시 10배 稀釋한 菌浮遊液을 Löwenstein-Jensen 斜面培養基에 接種하여 2本은 22°C, 6本은 37°C(但 4本은 黑紙로 封함), 2本은 42°C 孵卵器에 각각 培養하면서 接種後 3일부터 2일 간격으로 發育與否를 관찰하였다. 本實驗에서 7일 이내에 顯著한 發育을 나타내는 菌株을 Runyon Group IV로 判定하였다.

觸光呈色 試驗: 37°C에 培養한 菌가운데 黑紙로 封하지 않은 2本을 觀察하여 顯著한 發育相을 나타내면 그로부터 3~4일 이내에 黑紙로 封한 4本の 培養物 중 2本을 觀察하여 非色素性인 균을 電球(60W/100V)로부터 30cm 거리에 놓고 1시간 照射한 다음 다시 37°C 孵卵器에 24시간 처리하여 黑紙로 封한 對照群과 비교하여 呈色 與否를 觀察하였다. 本實驗을 통해 黃色의 觸光呈色 反應을 나타내는 균은 Runyon Group I (Photochromogen)으로 光의 照射과 관계없이 원래 色素를 가지고 있는 균을 Runyon Group II (Scotochromogen)로 光의 照射에도 色素를 띄지 않는 균을 Runyon Group III (Nonphotochromogen)로 각각 判定하였다.

菌集落의 形態觀察: 7H10寒天 培養基上에 稀釋法에 따라 繼代培養한 균의 集落을 觀察하였다.

Para Nitrobenzoic acid(PNB) 및 Furfuroyl-2-hydrazin(BSH)에 대한 感受性²⁵⁾ :

PNB를 500 μ g/ml로 BSH를 25 μ g/ml로 각각 含有시킨 Löwenstein-Jensen 培養基에 菌浮遊液을 接種하여 37°C 孵卵器에 4週間 배양한 다음 發育與否를 觀察하였다.

抗結核劑에 대한 感受性 檢査¹⁴⁾ :

INH, 0.2, 1, 5 μ g/ml, PAS, 2 μ g/ml, SM, 2, 10 μ g/ml로 각각 含有시킨 Löwenstein-Jensen 斜面培養基에 菌浮遊液을 각각 1白金耳(27SWG, 3mm) 接種하여 37°C 孵卵器에 4週間 培養한 다음 發育與否를 觀察하여 判定했다.

Urease Activity test^{15, 16)} :

Löwenstein-Jensen 培養基에 繼代培養한 균의 集落을 對照緩衝液(1M NaH₂PO₄ 10ml+1M K₂HPO₄ 10ml+Dist. Water 80ml)과 尿素緩衝液(對照緩衝液 100ml+urea 3gm)이 각각 4ml 든 시험관에 3白金耳(22SWG, 2cu. mm) 接種한 다음 0.1% Phenol red 1滴을 加해 37°C 孵卵器에 3일간 처리하면서 色調變化를 觀察하여 判定했다.

Nitrate Reductase test^{17, 18)} :

Löwenstein-Jensen 培養基에 繼代培養한 균의 集落을

基質(0.01M NaNO₃ in M/45 phosphate Buffer pH7.0) 2ml가 든 시험관에 3白金耳 넣고 37°C의 恒温槽에 2시간 처리한 다음 Conc. HCl 1滴, 0.2% sulfanilamide 2滴, 0.1% N-1-naphthylethylene diamine dihydrochloride 2滴을 각각 滴下하여 發色되는 色調變化를 觀察하여 判定했다.

Catalase activity test¹⁹⁾ :

室温處理: Löwenstein-Jensen 培養基에 배양한 균의 集落을 小試驗管(1.1 $\times$ 10.0cm)에 3白金耳 넣고 基質(10% Tween 80, 100ml+30% H₂O₂, 100ml) 1ml를 加하여 형성된 氣泡層을 측정하였다.

pH7.0/68°C 처리: M/15 磷酸緩衝液(pH7.0) 0.5ml가 든 小試驗管(1.1 $\times$ 10.0cm)에 균의 集落을 3白金耳 넣고 68°C 恒温槽에 20분간 처리한 후 基質(10% Tween 80-30% H₂O₂, 1:1混合液)을 0.5ml씩 加하여 형성된 氣泡層을 측정하였다.

Tween80 加水分解 시험^{20), 21)} :

基質(M/15 磷酸緩衝液 pH 7.0, 100ml+Tween 80, 0.5ml+0.1% Neutral Red, 2ml) 4ml를 Screw Cap 시험관에 分注한 다음 高壓滅菌하여 Löwenstein-Jensen 培養基에 배양한 菌集落을 2白金耳 接種한 후 21일간 37°C 孵卵器에 처리하면서 色調變化와 濁度를 觀察하여 判定 했다.

Arylsulfatase test^{22, 23, 24)} :

Dubos Broth Medium에 Tripotassium Phenolphthalein disulfate를 0.001M 및 0.003M 含有시킨 다음 2ml씩 分注하여 純粹培養된 균의 集落을 2白金耳 接種한 후 37°C에서 3일 및 2주간 처리하여 2NNa₂CO₃를 6滴 滴下하여 色調變化를 觀察하였다. 但 0.001M 基質이 含有된 것은 3일 후 判定하고 0.003M 基質이 含有된 것은 2주 후 判定하였다.

實驗 成績

서울 및 京畿道內 保健所로부터 檢査依頼된 22,123件의 喀痰을 대상으로 각종 균을 分離培養하여 抗酸性染色을 실시한 結果 抗酸菌의 檢出率이 약 16.5%(3646株)였다. (Table 2) 그가운데 Niacin test에 陽性反應을 나

Table 2. Acid Fast Bacilli Isolated from Sputum Specimens

	Number of cases	Percentage (%)
Sputum specimens	22,123	100
Acid fast bacilli	3,646	16.5

Table 3. Frequency of TB bacilli and the other Acid Fast Bacilli among the Total strains of Acid Fast Bacilli.

Name of strains	Number of strains	Percentage (%)
Total strains of Acid Fast bacilli	3,646	100
M. tuberculosis	3,549	97.3
Unclassified Mycobacteria	97	2.7

타내고 PNB에 感受性を 나타내어 人型結核菌으로 判明된 菌株가 3,549株(97.4%)였고 그와 반대되는 반응을 나타내어 未分類抗酸菌으로 判明된 菌株가 97株(2.7%)였다.(Table 3) 全檢査件 數에 대한 未分類抗酸菌의 檢出率은 약 0.44%였다.

未分類抗酸菌 97株를 Löwenstein-Jensen 培養基와 7H10寒天培養基 上에 稀析法에 따라 繼代培養하여 형성된 集落의 色調를 관찰한 結果 色素를 띄지 않거나 cream color를 나타내는 菌株가 54株, 黃色 또는 橙色을 띄는 菌株가 33株, 얼은 粉紅色을 띄는 菌株가 10株였다.(Table 4)

Table 4. Classification by Colony Colour

Nonpigmented (smooth or rough surface)	Yellow or Orange (smooth or rough surface)	Pale pinky cream (smooth surface)
54	33	10

Löwenstein-Jensen 培養基에 接種하여 黑紙로 封해 37°C 孵卵器에 培養한 菌으로 觸光呈色 試驗을 실시한 結果 全菌株 共히 陰性反應을 나타 내었다.

다음 Löwenstein-Jensen 培養基 上에서의 發育速度를 比較觀察한 結果를 보면 97株中 5株가 7일 이내에 24株가 8~10일에 46株가 11~13일에 22株가 14~17일에 각각 顯著한 發育相을 나타내었다.(Table 5) 各種 參考菌

Table 5. Comparison of Growth Rate

Name of Strains	Number of strains	Period of colony appearance (days)				
		7 or less	8-10	11-13	14-17	18 or more
Test strains	97	5	24	46	22	
Reference strains						
H ₃₇ Rv	1				1	
BCG	1					1
M. bovis	3					3
M. avium	1			1		
Runyon G-I	1			1		
Runyon G-II	2			2		
Runyon G-III	1				1	
M. fortuitum	1	1				
M. smegmatis	1	1				
M. phlei	1	1				

Table 6. Classification of Unclassified Mycobacteria (97strains)

Runyon groups	Number of strains	Percentage (%)
Runyon Group—I (Photochromogen)	0	0.0
Runyon Group—II (Scotochromogen)	43	44.3
Runyon Group—III (Nonphotochromogen)	49	50.6
Runyon Group—IV	5	5.1

株들의 發育速度는 Table 5에서 보는 바와 같다.

이상의 實驗結果를 綜合하여 Runyon Grouping 을 실시한 結果 Runyon Group I (Photochromogen)의 分離는 전혀 없었고 Runyon Group II (Scotochromogen)가 43株, Runyon Group III (Nonphotochromogen)가 49株, Runyon Group IV (Rapid grower)가 5株로 각각 判明되었다.

一次抗結核劑에 대한 未分類抗酸菌 97株의 感受性檢査

Table 7. Drug Sensitivity of Unclassified Mycobacteria

(Number of resistant strains/Number of test strains)

Anti TB drugs Concentrations	INH (μg/ml)			PAS (μg/ml)	SM (μg/ml)		Number of drug susceptible strains
	0.2	1	5	2	2	10	
Runyon Group II	43/43	43/43	42/43	36/43	43/43	8/43	43
Runyon Group III	49/49	49/49	46/49	41/49	49/49	39/49	21
Runyon Group IV	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	3
Number of drug susceptible strains			4	15		48	67

결과를 보면 Runyon Group II에 속하는菌株들은 INH 5 μ g/ml에 1株, PAS, 2 μ g/ml에 7株, SM, 10 μ g/ml에 35株가 각각 感受性を 나타내었고 Runyon Group III에 속하는菌株들은 INH 5 μ g/ml에 3株, PAS, 2 μ g/ml에 8株, SM 10 μ g/ml에 10株가 각각 感受性を 나타내었으며 Runyon Group IV에 속하는菌株 5株中 3株가 SM, 10 μ g/ml에만 感受性を 나타내었다.(Table 7)

다음은 Paranitrobenzoic acid(PNB)와 Furfuroyl-2-hydrazin(BSH)에 대한 未分類抗酸菌 97株와 參考菌株 58株의 感受性檢査 결과를 보면 PNB에 대해서는 Runyon Group II 3株, Runyon Group III 7株가 感受性を 나타내었고 人型 및 牛型結核菌인 參考菌株는 57株가 感受性を 나타내었다. BSH에 대해서는 시험된 未分類抗酸菌 全株가 耐性を 나타내었고 參考菌株는 그中 牛型結核菌은 全株 共히 感受性を 나타내었는데 人型結核菌은 54株中 52株가 耐性を 나타내었다.(Table 8)

Table 8. PNB & BSH Susceptibility of Mycobacteria
(Number of Resistant Strains/Number of test strains)

Strains	Paranitro-benzoic acid (PNB) 500 μ g/ml	Furfuroyl-2-hydrazin (BSH) 25 μ g/ml
Test strains		
Runyon Group II	40/43	43/43
Runyon Group III	42/49	49/49
Runyon Group IV	5/5	5/5
Reference strains		
H ₃₇ Rv	0/1	1/1
BCG	0/1	0/1
M. bovis	0/3	0/3
M. tuberculosis (from TB patients)	1/53	51/53

過酸化水素를 基質로 사용하여 未分類抗酸菌 97株와 각종 參考菌株 65株의 Catalase 活性를 比較 觀察한 결과를 보면 정도의 차이는 있으나 시험된 未分類抗酸菌 全菌株가 共히 室温과 68°C處理에서 陽性反應을 나타내었다. 그러나 參考菌株 中 人型 및 牛型結核菌은 68°C 처리에서 모두 陰性反應을 나타내었으며 특히 人型結核菌 中 3株가 室温에서 陰性反應을 나타내었는데 이菌株들은 INH에 대해 10 μ g/ml 이상의 耐性を 나타내는菌株들이다.(Table 9)

다음은 Tripotassium phenolphthalein disulfate를 基質로 사용하여 실시한 Arylsulfatase 活性의 比較實驗成績을 살펴보면 Runyon Group II에 속하는菌株들은 3일

작용에서 모두 陰性反應을 나타내었고 2주작용에서 모두 陽性反應을 나타내었다. Runyon Group III에 속하는菌株들은 3일작용에서 15株가 陽性反應을 나타내었고 2주작용에서 39株가 陽性反應을 나타내었다. 3일작용에서 陽性反應을 나타내는菌株는 Runyon Group III 中

Table 9. Catalase Activity of Mycobacteria

Strains	Number of strains	Room temperature		pH7.0/68°C	
		+	-	+	-
Test strains					
Runyon Group II	43	43		43	
Runyon Group III	49	49		49	
Runyon Group IV	5	5		5	
Reference strains					
H ₃₇ Rv	1	1			1
BCG	1	1			1
M. bovis	3	3	※		3
M. tuberculosis (isolated from TB patients)	53	50	3		53
M. kansasii	1	1		1	
M. smegmatis	1	1		1	
M. fortuitum	1	1		1	
M. phlei	1	1		1	
Scotochromogen	2	2		2	
Nonchromogen	1	1		1	

※ INH resistant strains

Table 10. Arylsulfatase Activity of Mycobacteria

Strains	Number of Strains	3days incubation at 37°C		2weeks incubation at 37°C	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Test strains					
Runyon Group II	43	0	43	43	0
Runyon Group III	49	15	34	39	10
Runyon Group IV	5	1	4	5	0
Reference strains					
H ₃₇ Rv	1		1		1
M. bovis	3		3		3
M. avium	1		1	1	
M. kansasii	1		1	1	
M. smegmatis	1		1	1	
M. fortuitum	1	1		1	
M. phlei	1		1	1	
Scotochromogen	3		3	3	
Nonphotochromogen	1		1	1	

"V" type Nonchromogen 이라고 생각한다. Runyon Group IV에 속하는 5菌株은 3일 작용에서 1株가 양성反應을 나타내었고 2週作用에서는 全菌株 共히 양성反應을 나타내었다.(Table 10)

다음은 參考菌株 16株와 試驗菌株 97株로 Tween 80 加水分解力을 관찰한 결과 試驗菌株 中 Runyon Group II에 속하는 菌株들은 5일作用에서 14株가 陰性, 29株가 양성反應을 나타내었고 16일作用에서는 全菌株가 정도의 차이는 있으나 양성反應을 나타내었다. Runyon Group III에 속하는 菌株들은 5일作用에서 12株가 陰性反應, 37株가 양성反應을 나타내었고 16일作用에서는 全菌株 共히 정도의 차이는 있으나 양성反應을 나타내었다. Runyon Group IV에 속하는 5菌株는 5일作用에서 4株가 陰性反應, 1株가 양성反應을 나타내었고 16일作用에서는 5株 共히 양성反應을 나타내었다. 參考菌株들은 Table 11에서 보는 바와 같이 菌種에 따라 多樣하나 人型, 牛型 및 鳥型은 5일作用에서 陰性反應을 나타내고 Rapid grower에 속하는 菌種 中 M. fortuitum 외의 모든 菌株가 5일作用에서 양성反應을 나타내었다.(Table 11)

Table 11. Tween 80 hydrolysis of Mycobacteria

Strains	Number of strains	5days incubation at 37°C		16days incubation at 37°C	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Test strains					
Runyon G-Ⅱ	43	29	14	43	0
Runyon G-Ⅲ	49	37	12	49	0
Runyon G-Ⅳ	5	1	4	5	0
Reference strains					
H ₃₇ Rv	1		1	1	
BCG	1		1	1	
M. bovis	3		3	3	
M. avium	1		1		1
M. kansasii	1	1		1	
M. smegmatis	1	1		1	
M. fortuitum	1		1	1	
M. phlei	1	1			
M. thamnophaeus	1		1	1	
M. platypocilus	1		1	1	
Scotochromogen	3	2	1	2	1
Nonphotochromogen	1		1		1

尿素를 基質로 이용하여 관찰한 urease 活性을 비교해 보면 먼저 試驗菌株 中 Runyon Group II에 속하는

菌株들은 43株 中 18株가 양성反應을 나타내었고 Runyon Group III에 속하는 菌株들은 49株 中 3株가 양성反應을 나타내었으며 Runyon Group IV에 속하는 5菌株는 모두 양성反應을 나타내었다. 그리고 參考菌株는 역시 菌種에 따라 多樣하서 人型 및 牛型結核菌은 양성反應을 나타내고 鳥型結核菌은 陰性反應을 나타내었다.(Table 12)

Table 12. Urease Activity of Mycobacteria

Strains	Number of strains	Urease activity 3days incubation at 37°C	
		Positive	Negative
Test strains			
Runyon G-Ⅱ	43	18	25
Runyon G-Ⅲ	49	3	46
Runyon G-Ⅳ	5	5	0
Reference strains			
H ₃₇ Rv	1	1	
BCG	1	1	
M. bovis	3	3	
M. avium	1		1
M. peregrinum	1		1
M. kansasii	1	1	
M. acapulcensis	1		1
M. platypocilus	1	1	
M. vaccae	1		1
M. phlei	1	1	
M. fortuitum	1	1	
M. smegmatis	1	1	
M. xenopei	1		1
Scotochromogen	4	1	3
Nonphotochromogen	1		1

다음은 Sodium Nitrate(NaNO₃)를 基質로 사용하여 관찰한 Nitrate reductase 活性을 보면 Runyon Group II에 속하는 菌株 43株 中 17株가 陰性反應을 나타내었고 Runyon Group III에 속하는 菌株 49株 中 39株가 양성反應을 나타내었으며 Runyon Group IV에 속하는 菌株 5株는 全菌株 共히 양성反應을 나타내었다. 參考菌株는 菌種에 따라 多樣하나 人型 및 牛型結核菌에 있어서는 人型은 양성 牛型은 陰性反應을 각각 나타내었다.

(Table 13)

이상에서 관찰한 各種 酵素活性을 綜合하여 보면 Table 14에서 보는 바와 같이 Runyon Group II는 5群으로 나눌 수 있었고 Runyon Group III는 8群으로 나눌 수 있었으며 Runyon Group IV는 2群으로 나눌 수 있었다. 即 Runyon Group II의 A群 11株는 Arylsulfatase 活性이 3일作用에서 陰性이고 2週作用에서 양성이며 Tween 80

Table 13. Nitrate Reductase of Mycobacteria

Strains	Number of strains	Nitrate reductase activity	
		Positive	Negative
Test strains			
Runyon G-Ⅱ	43	17	26
Runyon G-Ⅲ	49	39	13
Runyon G-Ⅳ	5	5	
Reference strains			
H ₃₇ Rv	1	1	
BCG	1		1
M. bovis	3		3
M. kansasii	1	1	
M. xenopei	1	1	
M. acapulcensis	1		1
M. ulcerance	1		1
M. patlypocilus	1	1	
M. avium	1		1
M. fortuitum	1	1	
M. smegmatis	1	1	
M. phlei	1	1	
M. vaccae	1	1	
M. thamnopheus	1	1	
M. peregrinum	1	1	
Scotochromogen	4		4
Nonphotochromogen	1		1

가수분해력은 5일 작용에서 양성이고 urease 활성 및 Nitrate reductase 활성은 모두 음성반응을 나타내었다. B群 14株는 Nitrate reductase 활성이 양성이라는 점이 A群과 상이하며 C群 11株는 Tween 80가수분해력이 16일 작용에서 음성이거나 미약하고 그리고 urease 활성이 양성이라는 점이 A群 및 B群과 상이하다. D群 4株와 E群 3株는 urease 활성이 양성이라는 점이 他群과 상이하며 D群과 E群의 차이는 Tween 80가수분해력과 Nitrate reductase 활성이 각각 다르다는 점이다. 다음 Runyon Group Ⅲ의 A群 20株는 Arylsulfatase 활성이 3일 작용에서 음성이고 2週 작용에서 양성이며 Tween 80가수분해력은 5일 작용에서 양성이고 urease 활성은 음성이며 Nitrate reductase 활성은 양성반응을 나타내었다. B群 10株는 Arylsulfatase 활성이 2週 작용에서도 음성이라는 점이 A群과 다르다. C群 9株와 D群 4株는 Arylsulfatase 활성이 3일 작용에서 양성이고 Nitrate reductase 활성이 음성이라는 점이 A·B群과 다르며 C·D群의 차이는 Tween 80가수분해력이 다르다는 점이다. E群 2株는 D群과 Nitrate reductase 활성

이 상이하며 F群 2株와 G群 1株는 urease 및 Nitrate reductase 활성이 양성이라는 점이 他群과 다르며 F·G群의 차이는 Tween 80가수분해력이 다르다는 점이다. H群 1株는 F群과 urease 활성만 다르다. 다음 Runyon Group Ⅳ의 A群 4株와 B群 1株는 Arylsulfatase 활성과 Tween 80가수분해력이 서로 다르다. (Table 14)

考察

人體 起源의 未分類抗酸菌이 人體에 대해 病原性を 나타낼 수 있다는 사실은 이미 많은 학자들에 의해 밝혀졌다.^{1, 2, 3)} 1930년 Hasting²⁶⁾이 소에서 Tuberculin 양성인대 臟器에 아무런 病巢가 없는 소위 no lesion reactor를 발견하여 관찰하므로서 人體에도 結核菌 이외의 抗酸菌에 의한 感染을 추측할 수 있었고 Pinner¹⁾는 이를 충분히 증명해 주었던 것이다. 뿐만아니라 low grade tuberculin Sensitivity라 하여 이미 여러 학자들에 의해 그러한 未分類抗酸菌의 人體感染例를 tuberculin反應으로 관찰했던 것이다.

현재 이러한 未分類抗酸菌은 有毒結核菌의 有病率이 감소하고 있는 국가에서 특히 깊은 관심을 가지고 그들의 臨床 및 疫學的 研究와 더불어 分類學的 研究도 많이 이루어 졌다.

本實驗을 통해 밝혀진 未分類抗酸菌의 檢出率이 全可檢物 件數에 대해서는 0.44%이고 分離된 全抗酸菌에 대해서는 2.7% 였는데 이는 Tacquet et al¹⁰⁾ 등이 1961년부터 1965년 사이에 13,420명의 結核患者를 대상으로 하여 分離한 全抗酸菌(25,213株)의 2.53%(660株)와 近似的 檢出率이 었다. 그리고 李(1962)¹¹⁾는 729名の 結核患者를 대상으로 실시한 결과 2.8%의 未分類抗酸菌을 檢出하였고 또 Chaves²⁹⁾는 0.48%의 未分類抗酸菌이 全對象者에서 檢出되었다고 報告하였다.

本實驗을 통해 分離된 未分類抗酸菌을 Runyon의 分類法에 따라 同定한 결과 그 대부분이 Runyon Group Ⅱ와 Ⅲ였으며 Runyon Group Ⅳ는 全未分類抗酸菌의 5.1%에 불과하고 더욱이 Runyon Group Ⅰ은 전혀 分離되지 않았다. 특히 本實驗을 통해 菌集落의 色素着色이 培養基의 種類와 培養條件에 따라 多樣하다는 사실을 알 수 있었다.

다음은 未分類抗酸菌 同定鑑別의 一環으로 Jones¹⁴⁾ 등은 102株의 未分類抗酸菌에 대해 各種 抗結核劑의 感受性 檢査를 실시한 결과 Runyon Group Ⅲ 및 Ⅳ에 속하는 全菌株(60株)가 PAS에 耐性を 나타내고 Runyon Group Ⅲ의 全菌株(30株)가 SM에 耐性を 나타내고 있어 Group

Table 14. Classification of Unclassified Mycobacteria Isolated from Korean TB Patients by the Various Enzyme Activities.

Runyon Groups	Subgrupo (No. of strains)	Catalase		Arylsulfatase		Tween 80 degr- adation(days)		Urease	Nitrate Reductase
		room temp.	68°C	3days	2wks	5	16		
Runyon Group II (43 strains)	A (11)	+	+	-	+	+	+	-	-
	B (14)	+	+	-	+	+	+	-	+
	C (11)	+	+	-	+	-	+	+	-
	D (4)	+	+	-	+	+	+	+	-
	E (3)	+	+	-	+	-	+	+	+
Runyon Group III (49 strains)	A (20)	+	+	-	+	+	+	-	+
	B (10)	+	+	-	-	+	+	-	+
	C (9)	+	+	+	+	-	+	-	-
	D (4)	+	+	+	+	+	+	-	-
	E (2)	+	+	+	+	+	+	-	+
	F (2)	+	+	-	+	-	+	+	+
	G (1)	+	+	-	+	+	+	+	+
	H (1)	+	+	-	+	-	+	-	+
Runyon Group IV (5 strains)	A (4)	+	+	-	+	-	+	+	+
	B (1)	+	+	+	+	+	+	+	+

鑑別에 有用한 同定方法이라고 하였다. 그러나 本實驗의 결과로는 특히 一次抗結核劑의 사용이 많은 것을 감안할 때 有用한 Group 鑑別의 補助實驗이라고 할 수 없었다.

Bönicke²⁵⁾가 人型結核菌과 牛型結核菌의 鑑別에 이용한 Furfuroyl-2-hydrazin 感受性 檢査는 本實驗의 결과를 통해서도 有用한 牛型結核菌 鑑別法임을 알 수 있었다.

다음은 Kubica & Pool에 의해서 試圖된 Calase test, Kubica et al²³⁾ 및 Tarshis et al²⁴⁾ 등에 의해 改善된 Arylsulfatase test, Wayne²⁰⁾에 의해 試圖된 Tween 80 加水分解力 檢査, Toda et al¹⁶⁾ 등에 의해 研究된 Urease test, Virtanen¹⁷⁾에 의해 研究된 Nitrate reductase 등의 各種 酵素活性의 比較觀察이 Runyon의 Group 鑑別을 비롯해서 各 Group의 subgrouping에 대단히 有用한 鑑別法임을 本實驗을 통해 알 수 있었다. 그러한 各種 酵素의

活性을 檢査하여 종합한 결과 Table 14와 같이 各 Group의 군을 細分類 할 수 있었다. 그中 Runyon Group II의 C群 11株는 Tween 80 加水分解力이 16日 作用에서도陰性이거나 微弱하여 Wayne²⁰⁾에 의하면 "Scrofulaceum" type scotochromogen임을 알 수 있었다.¹³⁾ 그리고 Runyon Group III의 A, B, G群 31株는 Nitrate reductase 活性이 陽性이고 Arylsulfatase 活性이 3일 作用에陰性이며 Tween 80 加水分解力이 5일 作用에서 陽性이라는 점이 他群과 區別되며 Wayne²⁰⁾ Kubica¹⁸⁾ 등²³⁾에 의하면 "Radish" type Nonphotochromogen임을 알 수 있었다. 그리고 E群 2株는 Arylsulfatase 活性이 3일 作用에 陽性이고 Nitrate reductase 活性이 陽性이므로 "V" type Nonphotochromogen임을 알 수 있었다.¹³⁾ 다음 Runyon Group IV의 B群 1株는 Arylsulfatase 活性이 3일 作用에서 陽性이므로 Kubica²³⁾ 및 Tarshis²⁴⁾ 등에 의

하면 *M. fortuitum* 이었다.¹³⁾ 그외의菌群들은 既報의 subtyping 法으로서 그들의 分類學的 位置를 결정할 수 없었다.

이상의 실험성적을 감안 할 때 앞으로 이러한 人體起源의 未分類抗酸菌에 대한 分類學的 研究가 더욱 더 이루어져야 할 것으로 思料된다.

結 論

1968년 1월부터 8월말까지 서울 및 京畿道內 保健所로 부터 檢査依頼된 喀痰 22,123件을 대상으로 抗酸菌을 分離하여 同定한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

- 1) 喀痰 22,123件 中 抗酸菌 檢出率은 약 16.5%였다.
- 2) 分離된 全抗酸菌 中 人型結核菌 檢出率은 약 97.3%였고 未分類抗酸菌 檢出率은 약 2.7%였다.
- 3) 未分類抗酸菌 中 Runyon Group II에 속하는 菌株가 43株로 약 44.3%였고 Runyon Group III에 속하는 菌株가 49株로 약 50.6% 였으며 Runyon Group IV에 속하는 菌株는 5株로 약 5.1% 였으나 Runyon Group I에 속하는 菌株는 分離되지 않았다.
- 4) Runyon Group II에 속하는 菌株 43株로 Arysulfatase, Tween 80加水分解, Urease, 및 Nitrate reductase 活性을 관찰한 결과 性狀이 서로다른 5群으로 나뉘어졌고 그중 11株는 "Scrofulaceum" type Scotochrome 이었다.
- 5) Runyon Group III에 속하는 菌株 49株로 역시 上記 各種酵素活性을 比較觀察한 결과 8群으로 나뉘어졌고 그중 31株는 "Radish" type Nonchromogen이었고 다른 2株는 "V" type Nonchromogen이였다.
- 6) Runyon Group IV에 속하는 菌株 5株로 역시 上記 各種酵素活性을 관찰한 결과 그 中 1株가 *M. fortuitum* 이였다.

References:

- 1) Pinner, M.: *Atypical acid fast organisms, III. Chromogenic acid fast bacilli from human beings*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 32:424, 1935.
- 2) Timpe, A. & Runyon, E.H.: *The relationship of atypical acid fast bacteria to human disease*, *J. Lab. & Clin. Med.*, 44:202, 1954.
- 3) Buhler, V.B., & Pollak, A.: *Human infection with Atypical acid fast organisms*, *Am. J. Clin. Path.*, 23:363, 1953.
- 4) Runyon, E.H.: *Typical Mycobacteria: their clas-*

- sification*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 91:288, 1965.
- 5) Willis, M.S., & Cummings, M.M.: *Diagnostic and experimental methods in Tuberculosis*, C.C. Thomas, Publisher, 1952.
- 6) Runyon, E.H.: *Anonymous mycobacteria in pulmonary diseases*, *Med. Clin. North Am.*, 43:273, 1959.
- 7) Xalarbarder, C.: *The so-called problem of unclassified mycobacteria*, review. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 83:1, 1961.
- 8) Edwards, L.A., et al.: *Sources of tuberculin sensitivity in human populations: A summing up of recent epidemiologic research*, *Acta Tuberc Scand*, 47:76, 1959.
- 9) 李性寬, 申龍達, 非定型抗酸菌感染의 疫學的 研究, 結核 및 呼吸器疾患, 28:12, 1967.
- 10) Tacquet, F., et al.: *Functioning of the central Laboratory for the identification of mycobacteria of the Pasteur Institute of Lille(France)-1961~65*, *Bull Int. Un Tuberc*, 39:28, 1966.
- 11) 李元基, 非定型抗酸菌의 生物學的 性狀에 關한 研究, 結核, 12:1, 1966.
- 12) Runyon, E.H.: *Distinguishing mycobacteria by the Niacin test, a modified procedure*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 79:663, 1959.
- 13) "Laboratory Methods in Medical Mycobacteriology", : *Laboratory Consultation and Development Section and Bacteriology Section, Communicable Disease Center, Department of Health, Education and welfare public health service*. 1965.
- 14) Jones, W. D., & Kubica, G.P.: *The differential typing of certain rapidly growing mycobacteria based on their susceptibility to various dyes*. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:355, 1963.
- 15) Urabe, L.: *The urease activity of mycobacteria*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 90:266, 1964.
- 16) Toda, T., et al.: *A simple urease test for the classification of mycobacteria*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 83:757, 1961.
- 17) Virtanen, S.: *Acta Tuberc Scand*, 1960. suppl. 48.
- 18) Kubica, G.P.: *Diagnostic Aspects of tuberculosis*, *The Public Health Laboratory*, 1965.
- 19) Kubica, G.P. and Pool, G.L.: *Studies on the catalase activity of acid-fast-bacilli. I. An*

- attempt to subgroup these organisms on the basis of their catalase activities at different temperatures and pH. Am. Rev. Resp. Dis. 81:387, 1960.*
- 20) Wayne, L.G.: *Differentiation of mycobacteria by their on Tween 80, Am. Rev. Resp. Dis., 86:579, 1962.*
- 21) Wayne, K.G., et al.: *Classification and identification of mycobacteria, I. Tests employing tween as substrate, Am. Rev. Resp., 90:588, 1964.*
- 22) Whitehead, T., et al.: *Bacterial Arylsulfatase, J. Path Bact, 65:451, 1953.*
- 23) Kubica, G.G., et al.: *The Arylsulfatase activity of acid fast bacilli. Am. Rev. Resp. Dis., 83: 728, 733, 737, 1961.*
- 24) Tarshis, M.S., et al.: *Further investigation on the Arylsulfatase activity of mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis., 88:847, 852, 854, 1963.*
- 25) Bönicke, R.: *Über die tuberkulostatische, Wirksamkeit Pentoheterocyclischer Carbon Säurehydrazide. Zeitscher, f. Hygiene, Bd. 145, 9, 236-275, 1958.*
- 26) Hasting, E.G., Beach, B.A., & Thompson, I.: *The Sensitization of cattle to tuberculin by after than tubercle bacilli, Am. Rev. Tuberc, 22:218, 1930.*
- 27) Griffiths, A.H., Marks, J., & Richards, M.: *Low grade Sensitivity to tuberculin in school children. Tubercle, 44:135, 1965.*
- 28) Hsu, K.H.K & Jenkins, D.E.: *The significance of low grade tuberculin sensitivity, Canada, J. pub. Health, 53:313, 1962.*
- 29) Chaves, A.D.: *Am. Rev. Resp. Dis. 81:428, 1960.*
-