1968年 全國 咯痰檢診에서 분리된 결핵균의 對 Mouse Virulence에 관한 研究

李在珪* · 邊海元** · 丁洛珍*** · 金成鎮****

—Abstract—

The Virulence of *M. tuberculosis* Isolated in Korea, 1968.

Jay Q Lee, M. D. * · Hae Won Byun, M. D. ** · Nak Chin Chung, M. D. *** Sung Chin Kim, M. D. ****

Mycobacterium tuberculosis collected during the first nationwide case finding campaign by sputum examination in Korea in 1968 was tested for virulence using mice.

Fifty four isolations were made from newly discovered tuberculosis patients with a history of no previous chemotherapy. Thirty nine isolations were sensitive to antimicrobials, and 15 were resistant to INH, PAS, or Streptomycin.

The reference strains of *M. tuberculosis* used for the study were H₃₇R_v from the Trudeau Institute, British and Japanese strains from the national institute of health, Japan, and Indian strains from the Madras chemotherapy center.

0.1 mcg. of a bacterial suspension from each isolation was injected intravenously. The average viable unit of bacilli injected per dose was 26.7×10^6 .

The mortality rate was observed for eight weeks. The extent of pulmonary lesions was measured by Aoki's standard. Weight ratios of body and lung were recorded.

The findings were:

- 1) The mortality rates of mice inoculated by the 39 isolations ranged from 100% for 9 isolations or 23.1% to 0% for 8 isolations or 20.5%. The average mortality rate was 52.9% for the 39 isolations. This was markedly higher than the rate of 24.7% previously reported in Japan.
- 2) The degree of macroscopic lesions in the lungs measured from 2.1 to 7.0 (Aoki's standard). The mean was 4.7.
- 3) The weight ratios between body and lung ranged from 100 to 314 (Lung wt. mgms/Body wt. gms. $\times 10$).
- 4) The majority of the 15 INH resistant isolations was lower in virulence than the sensitive isolations. 11 had negative catalase activity.

* 大韓結核協會長(Korean National Tuberculosis Association)

** 가톨릭醫大內科(Dept. of Internal Medicine, Catholic Medical College)

*** 保健社會部 結核豫防課(TB Control Section, Ministry of Health & Social Affairs ROK).

**** 結協 結核研究院(Dept. of Bacteriology, Institute of TB, KNTA)

序 言

결핵의 감염과 발병 그리고 병의 진전은 宿主와 寄生體間の 상관관계의 성립이 크게 관여하며 특히 그중에서도 균의 virulence는 主要因子라고 볼 수 있고 또 virulence의 문제 역시 균의 환경조건에 따라 변화할 수 있다. 얼마전까지는 인형결핵균의 生體에 대한 virulence는 일반적으로 强毒한것으로 알려졌으며 특히 guinea pig에 대한 근육 및 腹腔內接種과 Mouse에 대한 尾靜脈內接種은 數週(4~8週) 이내에 動物을 斃死시킨다고 하였다. 그러나 1948年 인도의 Dhayagude¹⁾等 및 1956年 Frimodt Möller²⁾等은 인도결핵환자로부터 분리한 결핵균은 guinea pig에 대하여 全身의 進行性病變보다 局所的病變을 일으킨다는 보고에 着眼한 D. A. Mitchison³⁾等은 1960年 인도결핵환자로부터 분리한 결핵균과 영국 결핵환자로부터 분리한 결핵균의 對 guinea pig virulence를 비교실험한 결과 인도의 결핵균이 영국의 결핵균보다 virulence가 약한 것을 알아냈다. 그래서 지구상에 유행되고 있는 동일한 인형결핵균일지라도 각 유행지역에 따라 그 virulence가 相異하다는 것을 보고하였다. 1964年 日本에서 岩崎等⁴⁾이 全日本結核實態調査에서 분리된 결핵균의 對 Mouse 및 guinea pig virulence를 관찰한 결과 그 virulence는 다양하여 일정치 않고 그 差가 심하다고 보고하였다.

著者 등은 우리나라에 유포되고 있는 결핵균의 virulence를 파악함으로써 우리나라 결핵의 疫學 및 臨床의 인 면에 중요한 기초자료가 될 것으로 생각되어 1968年 第1次 全國咯痰檢診時에 初發見患者들에게서 분리된 인형결핵균에 대하여 對 mouse virulence를 試驗하였다.

재료 및 방법

1) 재 료

1968년에 정부에서 실시한 제1차년도 全國咯痰檢診에서 과거 화확요법을 받지않은 肺結核患者로부터 분리한 인형결핵균 54株(INH耐性菌포함)를 사용했으며 재료의 sampling은 1968年 4월부터 9月 사이에 전국 보건소에서 수집된 객담이 각道 檢査所에 운송되어 배양된 균주를 중앙검사소로 집합시킨 373株中 54株를 random sampling한 것이다. 여기에 참고 및 대조용 의국결핵균주으로써 H₃₇Rv(미국 Trudeau Culture Bank 分與)영국菌株 二株(London 대학원, D. A. Mitchison 分與) India株 二株(인도 Madras Chemotherapy Center 分與) 日本株 二株(국립豫防衛生研究所 分與)計 7株를 동시에 試驗하였다.

2) 방 법

① 결핵균 분리배양

객담은 동량의 NaOH (4%)로 前 처리하여 3% KH₂PO₄ 小川培地에 접종 37°C부란기에 배양 매주 판정 8주간 관찰하였다.

② 인형결핵균의 동정

형태학적으로 먼저 colony를 screening하여 Niacin test로 인형균임을 확인하였다.

③ 약제 감수성 검사

모든 감수성검사는 간접법으로 Löwenstein-Jensen배지를 사용하였고 각 약제 함유 농도는 다음과 같다.

ISONIAZID 0.2, 0.4, 1.0, 5.0 mcg/ml

PAS 1.0, 5.0, 10.0 mcg/ml

*Streptomycin 10.0, 20.0, 200 mcg/ml

*약제의 농도는 배지용고멸균전 농도임.

④ 접종균량

본 연구에 사용한 균주는 卵培地에 계대배양 3代 이내의 균이며 Dubos 原法培地에 2代 계대배양한 균액을 Kleff Summerson Photometer에 Filter No.54, 파장180m μ 으로 균등균액을 제작하여 이것을 4mg/ml으로 推定 0.5 mg/ml의 균액을 만들어 이것을 0.2ml (0.1mg해당)을 Mouse 尾靜脈에 감염시켰다.

⑤ 사용 Mouse

SM계 雌性 Mouse (國立保健研究院分與 體重14gm $\pm$ 1gm)을 각 균주 모두 15首式을 사용하였다.

⑥ 관찰

ㄱ) 접종균액의 生菌單位測定

ㄴ) 每週 體重을 秤量하여 體重曲線을 관찰함.

ㄷ) 사망을

ㄹ) 8週까지 생존한 mouse는 出血死시켜 剖殺하여剖檢하고 mice체중對肺重 즉 比肺重을 산출하였다. 肺의 肉眼的인 病變度를 靑木等の 分類法⁵⁾에 의해 그 정도를 구분하였으며 기타 각 臟器의 변화 등을 관찰하였다.

成 績

1) 接種生菌單位 (感染菌數)의 분포

각 접종균주의 mouse당 接種生菌單位의 평균치는 267 $\times 10^5$ 이며 이의 분포상태는 그림1과 같다. 최하 8부터 최고 55 $\times 10^5$ 이며 대체로 30 $\times 10^5$ 이하에 집중되어 있다.

2) INH感性菌 39株의 Mouse사망을 및 剖檢所見

試驗菌株 54株中 INH感性菌인 39株의 8週間の 對

表 I, INH感性菌의 對 Mouse死亡率 및 剖檢所見

Table 1. Death Rate and Autopsy Findings of Mice

Strain No.	Infected dose in viable Unit(10^5)	Death rate	Aoki's degree (average)	Autopsied mice (8 wks after) L-ungwt/Body wtx10
299	25	100.0	7.0	
298	24	100.0	7.0	
346	8	100.0	7.0	
311	52	100.0	6.8	
106	16	100.0	6.2	
331	25	100.0	6.2	
310	50	100.0	6.1	
72	55	100.0	5.9	
Ind. -H	13	100.0	5.6	
151	52	93.3	6.5	314
152	50	86.7	6.5	261
H ₃₇ Rv	52	80.0	6.3	272
267	11	80.0	5.5	238
Jap. -I	26	80.0	5.3	296
154	39	73.3	6.3	239
323	11	73.3	5.1	232
202	30	73.3	4.7	195
Brit. -I	15	66.7	5.1	175
306	18	66.7	5.2	303
275	32	60.0	4.5	185
98	32	60.0	4.5	290
288	18	53.3	6.3	291
460	9	53.3	5.1	163
185	42	53.3	3.5	178
263	21	53.3	3.7	218
301	30	46.7	4.4	251
264	13	46.7	3.9	219
281	19	46.7	3.5	164
155	42	40.0	3.8	225
280	31	40.0	3.7	155
258	10	40.0	3.7	182
251	31	33.3	4.9	237
277	8	33.3	3.8	181
273	21	26.7	4.1	114
Brit. -II	29	26.7	3.8	123
278	26	20.0	4.0	192
254	17	20.0	2.7	125
274	15	6.7	4.6	224
Jap. -II	38	0	3.5	107
150	23	0	3.0	143
184	31	0	2.9	140
295	43	0	2.5	193
1148	28	0	2.5	125
265	11	0	2.5	104
296	27	0	2.3	100
Ind. -L	10	0	2.1	145

Fig. 1. Distributions of Infection dose in viable Units of Bacilli Inoculated

mouse 사망율 및 靑木氏 病變度 그리고 8週까지 생존 mouse의 比肺重을 종합하여 나타낸 것이 表 I이다. 本 表에서 보는 바와같이 사망율은 0~100%로써 각 군주에 따라 差가 심하고 100%全首 死亡한 군주는 8株로 20.5 %이고 반면에 1首도 사망하지 않은 군주는 6株로 15.6 %이며 평균 사망율은 52.9%이다.

靑木氏 病變度는 最下 2.3에서 最高 7.0으로써 사망 율과 상관관계가 깊었다. 8週후에 剖殺한 mouse의 比肺重은 最下 100 最高 314 로써 이것 역시 사망율과 꼭 全例에 있어서 일치되지는 않으나 그 경향에 있어서는 virulence를 측정하는데 참고가 되었다.

3) INH耐性菌 14株의 Mouse 致死率 및 剖檢所見

試驗菌株 54株 中 INH 0.2 mcg/ml이상 내성군 15株 의 成績을 表 II에 나타냈다. 여기에서 보는 바와같이 INH 高度耐性 catalase 活性陰性菌株는 그 virulence가 低下되어 있는 것을 관찰할 수 있다.

4) Virulence와 病變度 比肺重 및 接種生菌單位

그림 II는 INH感性菌 各 株와 외국 참고군주의 病變度 를 사망율 순으로 나열하여 그의 標準偏差의 幅을 관찰 한 것이다. 여기에서 보는 바와같이 사망율과 病變度 는 virulence를 측정하는데 매우 가까운 상관관계를 가 지고 있다.

그림 III은 病變度와 肺重 그리고 比肺重과의 상관관계 를 그림으로 나타낸 것이다. 그림에 나타난 바와같이 肺重量이 무거울 수록 病變度가 높고 매우 有意的인 상 관관계를 가지고 있다.

한편 接種菌의 生菌單位와 病變度 및 사망율과의 관 계는 表 III에 나타낸 바와 같이 45~54, 그리고 55~

表Ⅱ. INH 耐性菌株의 對 Mouse 死亡率 및 剖檢所見.

Table 2. Mortality & Autopsy Findings of Mice Infected with Tubercle Bacilli Resistant to INH

No. of strain	Infected dose in viable unit (10^6)	Death rate	Aokis' degree		Autopsied mice (8 wks after) Lung 'st / Body wt'	Drug sensitivity INH				Catalase activity
			Average	S. D.		>0.2	0.4	1	5<	
P-R347	16	0	2.2	1.4629	180				R	—
342	15	0	2.4	1.1212	196				R	—
302	32	0	2.5	1.5526	188				R	—
303	28	0	3.1	1.1003	178				R	—
348	8	6.7	2.4	0.5070	153			R		—
293	29	26.7	3.7	1.3977	190	R				—
329	12	20.0	2.6	0.8280	136			R		—
308	19	26.7	5.0	1.0000	244			R		—
313	9	46.7	4.0	0.5345	185			R		—
300	19	100.0	6.7	0.4590	—		R			—
287	12	6.7	2.7	1.2233	198			R		+
312	26	40.0	2.9	0.9618	146	R				+
465	17	46.7	3.7	1.8390	180			R		++
283	51	73.3	3.6	1.1832	125	R				+++
292	49	60.0	4.7	0.7996	306				R	—
Total		30.2	3.48		173.7					

圖Ⅱ. INH 感性菌株의 病變度 및 그의 標準偏差

Fig. 2. Aokis degree of Mice Infected with Various Strains of Tubercle Bacilli.

그이상接種群에 있어서 다소 差가 있는듯하다. 表Ⅰ의 viable unit와 사망을 病變度等の 관계를 보면 아무런 연관성을 찾아볼 수 없다. 특히 약간의 菌數의 差도는 有意의 差를 인정하기 어렵다.

考 察

우리나라 결핵환자로부터 분리한 인형결핵균의 對

mice virulence는 各菌株에 따라 強弱의 差가 크게 나타났다.

원래 인형결핵균은 사람에게 매우 毒力이 強한 것으로 인정되어 왔는데 1934年 Stempel⁶⁾은 인형 및 우형결핵균의 1mg mice 靜脈內感染으로 2個月以內에 斃死시킨다고 보고했고, 1947年 Dubos等⁷⁾은 guinea pig에 대한 결핵균의 virulence와 그 程度가 同等하다고 하였다. 그러나 Mitchison等⁸⁾의 報告와 같이 결핵균의 virulence는 地域的으로 差가 있으나 같은 西太平洋地域에 있어서도 人型結核菌의 毒力이 日本, 대만에 비하여 香港 싱가폴의 菌力이 弱한 것을 佐藤⁹⁾ 등은 報

告했다. 이들 地域의인 virulence의 差는 寒帶 및 亞熱帶地方의 결핵균보다 熱帶地方의 결핵균의 virulence가 약한 것을 暗示해 주고 있으며 우리나라의 virulence를 다른나라와 比較하는 문제는 매우 어렵다. 특히 virulence의 測定技術에 있어서 다음 몇가지 條件에 따라 virulence는 變하기 때문에 주의를 요한다. 먼저 virulence의 변화는 分離菌株의 계대배지의 종류가 문제된다. 계대배지상에 자주 오랫동안 계대배양하면 결핵균의 vir-

圖 Ⅲ. 病變度와 肺重 및 比肺重의 相關關係

Fig. 3. Correlation between Aokis degree and Lung weight or and Lung weight/Body weight $\times 10$
表 Ⅲ. 接種生菌單位와 病變度 및 死亡率의 關係

Table 3. Distribution of Aokis degree according to Infection dose in Viable Unit(10^6)

Infection dose in viable units (10^6)	Strain No. used	Aokis degree (average)	Death rate (average)
8~14	8	4.6	53.3
15~24	10	4.6	47.3
25~34	12	4.3	44.4
35~44	4	4.0	41.7
45~54	4	6.5	95.0
55~or more	1	5.9	100.0

ulence가 弱해진다는 金井⁹⁾의 實驗結果에 對하여 同氏는 virulence維持를 위해 sauton 合成培地に 계대할 것과 또는 계대를 制限하고 -20°C 에 保存한 다음 使用時 sauton 培地に 배양하여 使用할 것과 同時에 原株의 凍結 乾燥 保存이 要望된다고 하였다. 水之江¹⁰⁾은 결핵균을 尾靜內에 感染시켰을 경우 mouse에 對한 virulence는 菌塊가 많은 균액은 肺에 定着하는 菌數가 많고 따라서 增殖도 빠르고 mouse를 早期에 斃死시킨다고 報告했고 또한 同氏等은 接種菌의 培養日數 即 菌의 年齡이 virulence에 영향을 줌으로 young culture (10日培養)를 使用하도록 권하고 있다. 그리고 生體쪽의 조건으로써 使用動物에 따라 virulence의 差가 생기는 것은 물론이나 同一 mouse라도 그 계통(strain)에 따라 또 그의 purification에 따라 결핵균의 virulence는 다르다는 것을 報告^{7, 12, 13, 14)}하고 있다. 勿論 結核菌의 virulence의 測

定에 使用되는 動物로써는 guinea pig와 mouse가 많이 使用되는데 이들 動物間에 virulence의 強弱이 同等하다는 報告^{7, 15)}도 있으나 Mitchison等¹⁷⁾은 이들間에 多少의 差를 認定했으며 양 動物間에서 얻어진 virulence의 強弱이 相互 同等하지 못했다고 報告^{8, 16, 17)}한 것을 보면 각 動物間에 差가 있는 것을 考慮해야 할 것이며 특히 사람에게는 어느 程度의 差가 나타나는지 등 앞으로 흥미있는 문제로 남아있다. Dubos¹⁸⁾等은 結核菌尾靜肺內感染은 mouse肺 及 脾臟內에 있어서 菌의 增殖은 곧 그 菌株의 virulence를 表示하는 것이라고 하였고, 金

15)은 結核菌의 virulence의 強弱은 mouse肺에 菌增殖力의 強弱과 並行관계가 있다고 하고 mouse는 結核菌의 virulence의 比較研究에 使用될 수 있다고 하였다.

結核菌의 動物에 對한 virulence는 사람의 임상소견과의 관련 즉 分離培養時의 排菌數, X線소견 등과 一定한 關係를 발견치 못했다고 青木¹⁶⁾는 말하고 있으며 또 임상경과 및 치료효과 등도 별 관련성이 없다고 보고했다. 그러나 結核菌의 virulence와 사람에게 傳染하는 傳染性, 역학적인 相關성 및 발병과의 關係 등은 앞으로 흥미있는 문제라 생각된다.

本 實驗結果 表 I에 보면 사망율에 있어서 39株중 8주(20.5%)는 8주 이내에 100% 사망율을 나타내는 强毒株가 있는 반면에 6株(15.6%)는 1首의 사망도 없는 弱한 군주도 볼 수 있어 결핵균의 virulence의 強弱은 매우 폭이 넓은 것을 알 수 있다. 기타 25株는 8주간에 1首 이상 사망한 예로써 역시 mouse를 斃死시킬 수 있는 强한 virulence群으로 岩崎 等은 구분하고 있는데 전 체적인 우리나라 결핵균의 virulence는 엄격히 말하면 문젯점은 많으나 mice 평균사망율 52.9%로써 日本의 24%에 비해 매우 强하다고 할 수 있다.

표 I에 mouse肺의 病變度を 青木¹⁵⁾의 기준으로 區分해 보면 역시 사망율과 대개 일치하는 상관關係를 가지고 있다 比肺重 역시 全例는 아니지만 대체적인 경향에 있어서는 사망율 및 病變도와 비등한 相關성을 나타내 주고 있다.

接種菌數와 virulence의 相關성에 관하여는 水之江¹⁰⁾ 등의 실험에서도 균액농도의 약간의 差는 mouse에 對한 virulence를 크게 좌우하지 못한다고 보고한 바와 같이 본 실험에서도 表 I 및 表 III에서 보는 바와 같이 약간의 接種生菌單位의 差는 mouse 사망율 및 病變도에

큰 영향을 미치지 않는 것을 관찰할 수 있었다.

INH耐性結核菌이 guinea pig에 對한 virulence가 떨어져 있는 사실은 많은 실험적 근거가 있으며^{19, 20, 21)} mouse에 대해서도 약해져 있는 것을 岩崎⁴⁾ 등은 보고한 바 있다. 本實驗에서도 表 I에 나타난 바와 같이 表 I의 감수성균에 비해 사망율에 있어서($\chi^2 7.24$ $P < 0.001$)로써 有意的 差를 나타내고 있다. 특히 高濃度耐性 catalase活性 陰性인 균에 있어서 매우 약한 것을 觀察할 수 있으나 INH耐性으로써는 아직 상당한 virulence를 유지하고 있다고 볼 수 있다. 한편 Narayaman nair²²⁾ 등은 南인도에서 분리한 결핵균은 高peroxide 감수성인 균의 대다수가 virulence가 약하며 반면에 약한 peroxide 감수성인 균주도 virulence가 높은 것도 少數 있다고 보고했다. 이로 보아 결핵균의 virulence는 반드시 catalase活性度에 따라 強弱의 指標가 되는 것은 아닌 듯 하다.

結 論

1968年 全國 保健所를 통하여 새로히 발견된 과거 치료력이없는 결핵환자들로부터 분리한 결핵균 54株의 對 mouse virulence를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 8週間の mouse 사망율은 평균 52.9%이며 100% 사망群은 8株(20.5%) 그리고 0% 死亡群은 6株(15.6%)이며 나머지는 각각 그 중간에 위치하여 본 실험균주의 virulence의 強弱의 差는 매우 심하였다.

2) mouse肺臟의 肉眼的 病變의 정도를 青木氏 등의 病變度를 기준으로 하여 산출해 보면 2.1~7.0이며 mean으로 나타났다. 사망율과 病變度는 서로 상관관계가 깊었다.

3) mouse肺臟 對 體重의 比(肺重(mg)/體重(gm)×10)는 100~314이었고 이것은 mouse 사망율 및 病變度와도 약간의 상관관계가 인정 되었다.

4) 接種生菌單位의 약간의 差에 따라 死亡率 및 病變度의 상관관계를 인정할 수 없었다.

5) INH耐性菌株 15주는 感性菌株에 比하여 그 virulence가 弱해져 있다. 15株 中 11株는 catalase 活性度 陰性이었다.

References:

1) Dhayagude, R.G., and Shah, B.R.: *Indian F.*

Med. Res., 36, 79, 1948

2) Frimodt-Møller, J. C. Mathew, K. T., and Barton, R. M.: *In Proceeding of the Thirteenth Tuberculosis Workers' Conference, P. 157, Tuberculosis association of India, New Delhi, 1956.*

3) Mitchison D. A. and Wallace J. G. Bhatia A. L., Selkon J. B., Subbaiah T. V., Lancaster M. C.: *Tubercle Vol. XLI, No. 1, pp. 1-22. 1960*

4) 岩崎童郎, 續本正大, 青木正和, 工藤賢治, 室橋豐穂, 佐藤直行, 染谷四郎: *Kekkaku, Vol. 40, No. 9, pp. 359~365 pp. 427. 1965.*

5) 青木正初: *KEKKAK Vol. 36, pp. 355, 1961*

6) Strempel, W.: *Zschr. f. Tuberk., 71:62-67, 1943*

7) Dubos, R. J., Pierce C. H. & Schaefer, W. B.: *J. Exper. Med.*, 86, 159-174, 1947

8) 佐藤直行: *Kekkaku Vol. 42, No. 3, pp. 31, 1967*

9) 金井興美: *Kekkaku, Vol. 41, No. 10 467, 1966.*

10) 水之江公英, 金容鉉, 他: *Kekkaku Vol. 31. No. 6, 344, 1956.*

11) Raleigh, G. W. et al.: *J. inf. Dis. 1948, 82. 197*

12) Mckee, C. M. et al: *Am. Rev. Tuberc. 1949, 60, 90*

13) 齊藤博; 慶應醫學 第37卷 第5號 843, 1960

14) 金容鉉; 日本細菌學 雜誌 第13卷 第1號 pp. 15, 1957

15) 青木正和: *Kekkaku Vol. 42, No. 3, pp. 34. 1967*

16) Wallace J. G., Mitchison D. A.: *Tubercle Vol. 42, No. 2 1961.*

17) Pierce, C. H. Dubos et al: *J. Exper. Med.*, 97: 189-206, 1953

18) Middle Brook: *Am. Rev. Tub. Resp. Dis.*, Vol. 69. 471. 1954

19) Peozer L. R. et al: *Am. Rev. Tub. Resp. Dis. Vol. 72, 246, 1955.*

20) J. Marks: *Tubercle Vol. 42. No. 3, 308, 1961*

21) Narayaman Nair, Mitchison D. A.: *Tubercle Vol. 45. No. 4, 345, 1964.*