항산균에 의한 만성감염 질환의 세균학적 조기진단 및 배양법 개량에 관한 연구

연세대학교 의과대학 미생물학교실

柳 駿 · 李 泳 南 · 金 聖 光

=Abstract=

A Study on Newly Formulated Mycobacterial Media and Their Application in Rapid Diagnosis of Chronic Mycobacterial Diseases.

Joon LEW, Young Nam LEE and Sung Kwang KIM

Dept. of Microbiology, Yonsei Univ., College of Medicine, Seoul 120, Korea

We made attempts to formulate simple media supporting better growth of mycobacterial species and to evaluate feasibility of the media using in rapid diagnosis of the chronic mycobacterial diseases. One of the media formulated is a phosphate buffered medium with 0.1% hyaluronic acid and 6.0% bovine serum albumin in addition to 3.0% glycerol.

This medium was originally formulated by Skinsnes' group, but we made slight modification. The other is a semisynthetic medium made of umbilical cord extract supplemented with 10% sheep serum as a final concentration. Mycobacterial species employed in the experiments gave better growth yield in the newly formulated media than the conventional Dubos liquid medium. We also checked pathogenicity of *M. tuberculosis* H₃₇Rv grown in the different media to mouse. Tubercle bacilli grown in the Dubos liquid medium showed more potent pathogenicity to mouse than those grown in the newly formulated media.

I. 머 리 말

항산균에 의한 감염성 질환은 다른 감염성 질환에 비해 병원성의 발현 및 병의 진전이 완만한 것이 특징이라 하겠다. 근래에는 결핵이나 나병처럼 널리 알려진 항산균의 질환 이외에, 비정형 항산균(atypical mycobacteria)에 의한 질환, 예를 들면 *Mycobacterium kansasii*에 의한 호흡기 질환^{1,2)}, *Mycobacterium intracellulare*에 의한 결핵양의 질환의 발병율이 증가하고 있다.³⁾ 이외에도 병원성 균의 확실한 동정이 되지 못한 항산균에 의한 질환도 종종 보고되고 있다.^{4,5)} 이렇듯

비정형 항산균에 의한 질환의 유병율이 점차 증가하기에, 이런 항산균증에 대한 기초적 전염병적 연구가 절실히 요구되는데, 실제 비정형 항산균 질환에 대한 원인균의 규명 및 등증 등 세균학적 감별 진단법이 체계화되지 못한 상태이므로 이를 체계화시킴이 우선적으로 요청되고 있다.

비정형 항산균증의 세균학적 감별 진단이 체계화되지 못한데에는 시험관에서 항산균의 배양속도가 완만하고, 영양 및 기타 배양조건이 까다로운데 그 원인이 있기도 하다. 이에 저자들은 성장속도가 완만하고 배지제조 및 영양조건이 까다로운 단점을 보완할 수 있는 새로운 배지의 개발을 시도, 이로써 항산균증의 임상적 세균학적 진단 및 병증 원인 기전의 연구에 수반되는 현재의 애로점을 줄이고자 하였다.

* 본 연구는 1977년 문교부 학술조성 연구비로 이루어졌음.

새로운 항산균 배지의 개발시도는 수년전 Skinsnes 연구진이 사람의 나결결조직의 표본을 특수 염색하여 살펴본바, 상당량의 히아누론산이 조직에 축적되어 있다는 보고와, 히아누론산이 나균의 조직내에서 발육과 밀접한 관계가 있지 않나 하는 추측에 기초를 두었다.⁶⁾ 한때 Skinsnes 연구진은 히아누론산과 소혈청알부민이 첨가된 인산완충액 배지에서 나균의 인공 배양을 보고한 바 있으나⁷⁾ 이 보고에 대한 추시 및 확인이 분명치 못하기에 나균의 인공배양의 성공 여부를 알아 드릴 수 없지만, 히아누론산이 항산균 발육에 일종의 기질로써 필요될지도 모른다는 가정하에 히아누론산과 소혈청알부민이 첨가된 인산완충액 배지에서 병원성 항산균의 성장을 살피고 이 배지에서의 균의 성장도와 기존 항산균 배지에서의 성장도를 비교해 보았다. 한편 상품화된 히아누론산이 비싸기에 히아누론산이 비교적 많이 함유되어 있는 신생아 제대(umbilical cord)를 추출, 그 추출액을 기제로 한 배지의 개발을 시도, 이 배지에서의 항산균 발육도를 관찰했다. 한편 Skinsnes 연구진이 처음 제조한 히아누론산과 소혈청알부민이 첨가된 배지에서, 소혈청알부민이 항산균 성장에 미치는 효과를 살펴 보았다.

항산균 발육을 촉진 시킬 수 있는 새로운 배지가 항산균 질환의 조기 세균학적 진단에 사용될 수 있는지 보기위해, 우선 개발된 배지에서의 배양된 항산균의 독력(virulence)을 살펴 보았다. 이에 그 결과를 보고한다.

II. 재료 및 방법

균주: 병원성 항산균 중 日本의 廣島大學 醫學部에서 분양받은 *M. intracellulare* 13950, *M. kansasii* 765 및 *M. tuberculosis* H₃₇Rv 을 사용했다.

배지제조: 항산균배양에 널리 쓰이고 있는 듀브 액체배지와, Skinsnes 氏가 고안한 것을 다소 변형시킨 히아누론산-소혈청알부민첨가 배지(HAS 배지), 제대추출액을 기제로 한 배지(UCE 배지)를 제조하였다. 듀브액체배지는 Difco manual에 지시된대로 만들었다. 히아누론산-소혈청알부민첨가 배지는 66mM의 Na-K-Phosphate 완충액(pH=6.24)에 0.1%(W/V)의 히아누론산과 0.6%의 이스트추출분말, 3%의 그리세린을 가한후 고압멸균시킨 뒤, 이에 여과멸균된 소혈청알부민용액을 최종농도 6.0%가 되도록 넣어 배지를

만들었는데 이는 Skinsnes 연구진이 처음 고안한 배지와 주요 성분이 대체로 같으나⁷⁾ 첨가재료, 배지 만드는 세부방법 및 페니실린 G의 생략등 Skinsnes 것과 다소 변형된 배지다. 0.1%히아누론산과 자기 다른량의 소혈청알부민이 첨가된 배지도 만들었다. 제대추출용액기조배지는 신생아 제대 약 50g을 1cm 정도의 크기로 잘라 66mM의 Na-K-Phosphate 완충액(pH=7.24)에 넣고 이에 1:250트립신분말을 최종농도 1.0%가 되도록 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 분해시킨 뒤 나이론망사로 여과하여 여과액을 얻었다. 이추출여과액의 pH를 6.24로 조절한 후, 고압멸균을 했다. 뜨거운 멸균여과액을 다시 Whatman 여과지를 통해 여과한 후 여과액에 0.6%(W/V)의 이스트추출분말, 3%의 그리세린을 넣은 뒤 다시 고압멸균하였다. 이에 영양혈청을 10%(V/V)되게끔 첨가함으로 제대추출액 기조배지를 만들었다. 제대추출액속의 히아누론산의량은 광학비색법으로 측정했다.⁸⁾

균의 배양 및 성장도 측정: 오가와(Ogawa) 사면배지에 왕성히 자라고 있는 균주의 집락을 모아 3ml의 듀브액체배지에 약 1주일간 배양한 뒤, 균배양액 0.3 ml을 上記한 각 배지가 5ml 담긴 시험관에 접종한 후 37°C에서 배양했다. 균의 성장도는 일정한 배양기간이 지난 뒤 균체를 2,000 rpm에서 약 30분간 원심분리하여 모은 뒤, 66mM Na-K-Phosphate 완충액으로 두번 세척했다. 세척한 균체를 70°C에서 건조, 균체의 건조량을 점으로 각각의 균주의 여러 배지에서의 성장도를 측정했다.

동물접종 및 동물실험성적의 판정: 듀브 액체배지, 6.0% 소혈청알부민과 히아누론산첨가 배지, 소혈청알부민이 함유되지 않고 히아누론산만 첨가된 배지에서 자란 *M. tuberculosis* H₃₇Rv을 원심분리하여 모은 뒤 균체를 멸균 증류수로 세척하고 세척된 균체에 멸균 생리식염수를 가해 충분히 잘아 균일한 균부유액을 균농도 10⁵ 균/ml이 되게 한 후 각각의 균부유액의 0.1ml(=10⁴ 균)을 백색 마우스에 꼬리 정맥주사로 접종했다 한 실험군에 16마리의 마우스를 사용했다. 접종후 2, 3, 4, 5주에 각각 4마리씩 희생시켜 체중을 재고, 비장, 간장, 신장, 폐, 임파결의 각장기의 부검 결과의 육안적 소견을 기록했다. 각장기의 조직표본 및 항산균 염색 표본을 만들어 조직의 병변 및 병소 부분의 항산균의 존재 유무를 관찰했다. 또 조직의 집균도말표본을 만들어 장기 속의 항산균 수를 측정하고저 했다.

Table 1. Comparison of Mycobacterial Growth in Different Media

Strain	Cultivation Period	Media		
		Dubos ¹	HAS ²	UCE ³
<i>M. intracellulare</i> 13950	3week	23.3*	69.3	51.5
	6week	25.6	83.1	54.0
<i>M. kansasii</i> 765	3week	24.6	96.5	43.5
	6week	25.6	90.3	46.0
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	3week	21.9	43.1	43.0
	6week	24.0	72.4	48.5

1. Dubos liquid medium, 2. Hyaluronic acid supplemented medium plus 6.0% bovine serum albumin and 3.0% glycerol, 3. Umbilical cord extract based medium.

*: Dry weight in milligram (mg)

Fig. 1. Growth of *M. intracellulare* in Dubos, HAS and UCE Media

IV. 성 적

항산균의 성장도: 듀보 액체배지, 0.1%의 히아누론산과 6.0%의 소혈청알부민이 첨가된 배지, 제대추출액 기조 배지에서의 항산균의 성장도는 Table 1에서 보는 바와 같이 현저한 차이가 있는데 히아누론산-소혈청알부민이 들어간 배지에서 같은 배양기간후에 얻은 균체량은 듀보액체배지에서 얻은 균체량보다 2-3배 많다. 제대추출액 기조 배지에서 얻은 균체량은 대체적으로 히아누론산-소혈청알부민 첨가배지 보다는 열세하지만 듀보액체배지에서 얻은 균체량보다는 약 2

배쯤 된다. 이 실험에 쓰인 제대추출액 속에 함유된 히아누론산은 700~800μg/ml 정도로, 이는 히아누론산-소혈청첨가 배지속에 함유된 량(1,000μg/ml)의 약 70~80%인 것이다. Fig. 1은 *M. intracellulare*를 듀보액체 배지, 히아누론산-소혈청알부민첨가 배지 및 제대추출액 기조 배지에서 배양하여 얻은 균체량의 차이를 쉽게 비교하기 위해 도시한 것이다.

소혈청알부민이 항산균 성장에 미치는 영향: 히아누론산-소혈청알부민 첨가 배지속의 소혈청알부민이 항산균 성장에 미치는 효과를 보기 위해 0.1%의 히아누론산이 첨가된 배지에 0.0%, 0.6%, 1.0%, 3.0%와 6.0%의 각기 다른 량의 소혈청 알부민이 들어 있는 배지를 제조, 이 배지에서의 항산균의 발육도를 비교해 본 결과 Table 2에서 볼 수 있는것 같이, 항산균의 성장은 소혈청알부민의 량에 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.

육안적 및 부검 소견: 듀보액체배지, 히아누론산-소혈청알부민 첨가 배지 및 히아누론산 첨가 배지에서 배양된 *M. tuberculosis* H₃₇Rv을 마우스에 꼬리정맥주사한 후 희생시키기까지 각 실험군의 발육 및 건강상태를 살펴 본 바 각 실험군 사이에 별다른 변화를 볼 수 없었다. 접종후 2,3,4,5주에 걸쳐 각군의 동물을 부검하여 각장기의 이상을 살펴 본 바 듀보액체배지에서 자란 결핵균을 접종받은 실험군의 마우스에서는 4주째부터 현저한 수의 폐결절을 볼 수 있었고, 히아누론산-소혈청알부민첨가 배지에서 배양된 결핵균을 접종받은 실험군에서는 5주째에 이르러 다수의 폐결절을 볼 수 있었다. 히아누론산만이 첨가된 배지에서 자란 균을 접종 받은 실험군의 마우스는 다른 두군에 비해 폐결절은 볼 수 없었으나 주로 간에 미약한 이상을 보였다. (Table

Table 2. Mycobacterial Growth Yield in Hyaluronic Acid Based Media Containing Various Amount of Bovine Serum Albumin

Strain	Cultivation Period	BSA Conc. (%)				
		0.0	0.6	1.0	3.0	6.0
<i>M. intracellulare</i> 13950	1week	37.7*	34.7	30.9	36.5	39.3
	2week	51.4	53.6	43.7	40.8	46.9
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	1week	19.8	23.2	21.8	18.6	24.6
	2week	34.0	30.6	38.3	35.1	36.7

*: Dry weight in milligram (mg)

Table 3. Pathogenicity of *M. tuberculosis* H₃₇Rv Grown in Different Media to Mouse

Cells grown in Medium	Period after Inoculation (Weeks)	Gross Examination in Autopsy				
		Liver	Spleen	Lymphoid	Lung	Kidney
Dubos liquid Medium	2	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	Nodule(1/4)*	—
	4	—	—	—	Nodule(4/4)	—
	5	—	—	—	Nodule(4/4)	—
HAS+no BSA	2	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—
	4	abscess(1/4)	—	—	—	—
	5	abscess(3/4)	—	—	—	—
HAS+6.0% BSA	2	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—
	4	abscess(1/4)	nodule(1/4)	—	—	—
	5	—	—	—	Nodule(4/4)	—

*: No. of head showed such an anomaly among 4 heads of each group.

3)

병리학적 소견 및 항산균의 검출: 시기별로 희생시킨 각 실험군의 동물의 여러 장기조직의 병리학적 변화를 관찰하니, 실험군에 따라 시기별 및 병증 정도에 뚜렷한 차이가 있었다(Table 4). 듀보액체배지에서 자란 결핵균을 접종받은 군은 접종 2주후부터 간장, 비장등에 병변이 나타나, 3,4,5주째는 검사한 장기의 대부분에서 고도의 병변을 볼 수 있었는데 비해, 히아누론산만이 첨가된 배지에서 자란 균을 접종받은 실험군은 주로 간장에 미약한 병변을, 히아누론산-소혈청알부민첨가 배지에서 자란 결핵균을 받은 실험군은 접종 4주 후부터 간장, 비장, 폐 등에서 병변을 볼 수 있었다. 각 장기조직의 항산균의 존재 유무를 살펴 본 바, 조직표본에서의 병변의 관찰과 병소부위에 항산균의 존

재는 대체적으로 일치했다. 이로써 듀보액체배지에서 자란 결핵균이 마우스에 병증을 일으키는데 가장 강력하며, 히아누론산-소혈청알부민첨가 배지에서 자란 결핵균은 듀보배지에서 자란 균에 비해 다소 약한 病毒力을 지니고 있음을 알 수 있다. 히아누론산만 첨가된 배지에서 자란 결핵균은 매우 약한 病毒力을 지니고 있는 듯 하다.

IV. 고 안

지난 수년동안 비정형 항산균(atypical mycobacterium)에 의한 새로운 질환에 관한 보고는 대단히 많지만^{9,10,11,12)} 질환 보고의 빈번도나 질환 원인체의 다양성에 비해 이러한 병원체에 대한 생리학적 성질, 감염

Table 4. Pathogenicity of *M. tuberculosis* H₃₇Rv Grown in Different Media to Mouse

Cells grown in Medium	Period after Inoculation (Weeks)	Histopathology									
		H-E Stain					Presence of AFB				
		LI	SP	LN	LU	KI	LI	SP	LN	LU	KI
Dubos liquid Medium	2	4/4*	4/4*	—	—	—	3/4	1/4	—	—	—
	3	4/4*°	3/4*°	3/4*°	2/4*°	1/4*°	4/4	3/4	3/4	2/4	—
	4	4/4°	4/4°	4/4°	4/4°	—	4/4	4/4	4/4	4/4	—
	5	3/4°	3/4°	3/4°	3/4°	—	3/4	4/4	4/4	3/4	—
HAS+no BSA	2	2/4*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	2/4*	—	—	—	—	1/4	—	—	—	—
	4	2/4*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
HAS+6.0% BSA	2	2/4*	—	1/4*	—	—	—	—	—	—	—
	3	2/4*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	2/4*	2/4*	—	—	—	—	2/4	—	—	—
	5	4/4*	2/4*	2/4*	3/4*	—	1/4	2/4	2/4	—	—

LI: Liver, SP: Spleen, LN: Lymphnoid, LU: Lung, KI: Kidney. Numbers mean No. of animal head shown pathological signs or presence of acid-fast bacilli among four animals of each group. °: Multiple foci of granulomatous inflammation seen. *: Multiple foci of inflammation seen.

성, 항원성 및 기타 제반 성질에 관한 연구 발표는 드물다. 뿐만아니라 비정형 항산균종의 원인균의 규명 및 동정 등, 감별 진단법이 체계화 되지 못해 비정형 항산균종에 대한 역학적 연구의 기초가 미약하다. 증가일로에 있는 비정형 항산균종에 대한 적절한 대책을 마련하기 위해서는 우선적으로 원인균에 대한 규명 및 동정 등 세균학적 감별 진단의 체계화가 이루어져야 한다.

대부분의 병원성 항산균은 세포내기생균(intracellular parasites)로 시험관내 배양시, 영양 및 기타의 배양조건이 비교적 까다롭고 성장속도가 느려 항산균종의 세균학적 진단에 긴 시일이 소요된다. 질환의 원인체를 조속히 밝히기 위해서는 균의 신속한 배양과 동정이 요구되며 이를 위해서, 높은 성장을 촉진하는 배양배지가 개발되어야 한다.

Skinsnes 연구진이 나균(*Mycobacterium leprae*)의 배양배지로 제조했던 히아누론산-소혈청알부민 첨가 배지는 항산균 배양에 널리 사용되고 있는 듀보액체배지보다 병원성 및 비병원성 항산균의 빠른 발육을 보여준다. 히아누론산이 어떤 기전작용에 의해 항산균의 신속한 발육을 도모하는지 알 수 없지만 히아누론산이 결체조직의 한 성분으로 특히 나결절(leproma) 속의 나균주위나 매독결절(syphiloma) 속의 매독균(*Trepon-*

ma pallidum)위에 상당량 발견되는 것으로 미루어 볼 때 절대세포내기생균(obligate intracellular-parasites)의 발육과 히아누론산 존재와 상관 관계가 있는 듯 하다. 제대추출액을 기주로 하여 만든 배지 역시 항산균의 좋은 성장도를 보여주며, 이 배지에서 항산균의 성장율은 함유된 히아누론산의 양에 직접적 관계가 있는 것 같다. 히아누론산-소혈청 알부민 첨가 배지의 소혈청알부민은 항산균의 성장율에 별 영향을 주지 않기에, 항산균의 히아누론산 대사작용을 연구, 규명할 때 소혈청 알부민으로 부터 야기될 수 있는 애로점을 줄일 수 있다.

항산균의 성장율이 듀보액체배지에서 보다 히아누론산 첨가 배지나 제대추출액배지에서 큰 것으로 보아, 항산균종의 세균학적 조기 진단에 히아누론산 첨가배지나 제대추출액배지를 사용할 수 있어 진단 시간을 단축할 수 있다. 또 제대추출액배지는 제조과정에 경제적이 있다.

히아누론산 첨가배지에서 자란 결핵균이 듀보액체 배지에서 배양된 결핵균보다 마우스에 대한 毒力이 약한 점으로 보아 히아누론산-소혈청알부민 첨가 배지를 사용해 결핵환자의 가검물에서 직접 분리 동정한 결핵균의 마우스에 대한 병원성을 검토하기에는 미흡한 점이

있다. 병원성 비정형 항산균에 대한 이와 같은 실험은 현재 진행중이다.

항산균증의 조속한 세균학적 진단 및 병원성의 재검토를 위해서는 히아누론산 첨가 배지나 제대 추출액기조 배지를 사용해 짧은 시일안에 다량의 균체를 얻은 뒤, 이균체를 튜브액체 배지에 잠시 제대하여 제대된 균주로 병원성을 검토할 수 있다.

히아누론산이 어떻게 항산균의 성장을 도모하는지 균체와 히아누론산과의 생리대사 작용을 규명해 볼지도 하다. 이로써 나균등 아직 인공배양이 확실치 않은 항산균의 성질을 연구, 이해하는데 간접적으로 도움을 받을 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Chapman, JS, Dyerly, M and Spohn, S. Epidemiological notes on *Mycobacterium kansasii* disease. *Arch. Environ. Health*, **16**:673, 1968
- 2) Back, WA, and Tries, H. Severe *Mycobacterium kansasii* infection of the lung. *Can. J. Public Health*, **63**:523, 1972
- 3) Saito, H, Tasaka, H, Osasa, S, Yamura, T, Fukahara, T, and Yamada, A. Disseminated *Mycobacterium intracellulare* infection. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **109**:572, 1974
- 4) Lester, W. Unclassified mycobacterial diseases. *Ann. Rev. Med.* **17**:351, 1966
- 5) Lincoln, EM, and Gilbert, LA. Disease in children due to mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **105**:683, 1972
- 6) Skinsnes, OK, and Matsuo, E. Acid mucopolysaccharide metabolism in leprosy. 1. Storage of hyaluronic acid and its possible significance in the pathogenesis of leprosy. *Int. Journal of Leprosy*, **42**:392, 1974
- 7) Skinsnes, OK, Matsuo, E., Chang, PHC., and Anderson, B. *In vitro* cultivation of leprosy bacilli on hyaluronic acid based medium. 1. Preliminary report. *Int. J. of Leprosy*, **43**:193, 1975
- 8) Greiling, H. Hyaluronic acid, Methods of enzymatic analysis, 2nd edition, edited by HU Hergmeyer, Academic Press, New York, 1965, p.87-90
- 9) Pust, RE, Onubogu, HON, Egornu, LI, and Smithwick, R. Pulmonary disease due to *Mycobacterium fortuitum* in a Nigerian. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **108**:1416, 1973
- 10) Clansey, JK. Mycobacterial skin ulcers in Uganda: Description of a new mycobacterium. (*Mycobacterium buruli*). *J. Pathol. Bacteriol.*, **88**:175, 1964
- 11) Gould, WM, McMeekin, DR, and Bright, RD, *Mycobacterium marinum* (balnei) infection. Report of a case with cutaneous and laryngeal lesions. *Arch. Dermatol.*, **97**:159, 1968
- 12) Barksdale, L, and Kim, KS, *Mycobacterium*. *Bact. Rev.*, **41**:217, 1977