콜레스테롤 (Cholesterol) 및 히알유론산 (Hyaluronic acid) 첨가에 의한 수종 항산균의 시험관내 증식 비교

연세대학교 의과대학 미생물학교실

김 창 휘 · 김 주 덕 · 유 준

= Abstract =

Growth of Various Mycobacteria in Dubos Liquid Medium, Hyaluronic Acid Supplemented Medium and Cholesterol Supplemented Medium

Chang Hee KIM, Joo Deuk KIM, and Joon LEW

Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul (120), Korea

In order to compare the growth of various cultivable Mycobacteria in cholesterol or hyaluronic acid supplemented media with that in ordinary Dubos liquid medium, some species of Mycobacteria, including human pathogens and non-pathogens (*M. tuberculosis*, B.C.G., *M. vaccae*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*) were cultivated in three different media: Dubos liquid medium, KI-1 medium containing 100 µg/ml cholesterol and 10% sheep serum (Kato & Ishaque, 1978), and modified LA-3 medium containing 0.1% hyaluronic acid and 1% bovine serum albumin (Skinsnes, 1974). The cultivation of Mycobacteria in the three different media were compared by measurement of dry weight of bacterial growth. The effects of bovine serum albumin on cholesterol utilization by Mycobacteria were also examined by modifying the constituents of KI-1 medium.

The results are summarized as follows:

1. All of above Mycobacteria examined in this study grew better in KI-1 medium than in others. This was especially true when bacterial growth in KI-1 medium was compared with that in Dubos medium: 4 and 3 fold increases in *M. tuberculosis* were observed in KI-1 medium within 4 to 6 weeks, 10 and 6 fold in B.C.G., 1.5 and 1.2 fold in *M. vaccae*, 2.4 and 2.1 fold in *M. kansasii*, and 5.2 and 3.5 fold in *M. scrofulaceum*.

2. The various Mycobacteria grew better in cholesterol supplemented Dubos medium than in ordinary Dubos medium: 1.5-2.1 fold increases bacterial growth in *M. tuberculosis* were observed in cholesterol supplemented Dubos medium compared with that in Dubos medium within 1-4 weeks, 1.5-1.8 fold in B.C.G., 1.6-1.8 fold in *M. kansasii*, 1.3-1.6 fold in *M. vaccae*, 1.3-1.5 fold in *M. scrofulaceum*.

3. In the requirement of the additional effects of bovine serum albumin on cholesterol supplemented medium, there was a 1.5-3 fold increases of bacterial growth in KI basal medium enriched by both cholesterol and bovine serum albumin when compared with that in KI basal medium itself or enriched by cholesterol or bovine serum albumin alone.

Therefore, mycobacterial growth appeared to be increased by adding cholesterol or hyaluronic acid to the medium, especially, cholesterol with bovine serum albumin.

I, 서 론

나환자로부터 인나균(*Mycobacterium leprae*)을 발견한 이래 (Hansen, 1874) 백여년간 이 균의 시험관내 배양 또는 동물접종이 끊임없이 시도되어 왔다. 또한 인나균과 그 성상이 비슷한 서라균의 시험관내 배양도 꾸준히 연구되어왔으나 이들 균의 인공적인 배양은 아직도 만족할만한 성적을 얻지 못하고 있다. 한편 인나균의 동물접종에 의한 증식은 Shepard의 마우스 족저내접종법 (Mouche foot pad 1960, 1962), Kirchheimer 및 Storrs의 nine-banded Armadillo (*Dasypus novemcinctus*)의 피내접종법 (1972), Lew등의 한국산 야생다람쥐 (Korean chipmunk: *Eutamias sibiricus asiaticus*)의 족저내접종법 (1974), Kohsaka의 nude 마우스를 이용한 접종법 (1976) 등에 의하여 어느 정도 성공적으로 인나균의 증식을 얻을 수 있었다. 그러나 이들 인나균 및 서라균의 인공배지를 이용한 배양은 많은 연구가 계속되고 있지만 아직도 만족할만한 보고가 없다. Skinsnes등 (1974)은 히알루론산 (Hyaluronic acid)을 성분으로 하는 배지에서, 그리고 Kato등 (1978)은 콜레스테롤 (cholesterol)을 성분으로 하는 배지에 인나균결절에서 얻은 인나균을 접종한 바 배양가능한 항산균을 배양하였다고 보고 하였다. Skinsnes등 (1974)은 나환자 피부결절의 병리조직학적 소견에서 인나균 주위에 히알루론산이 다량 침착된 것에 착안하여 인나균이 이 히알루론산을 균의 성장에 이용한다는 가설을 내었으며 또한 그들은 히알루론산 함유배지를 개발하여 그 배지에서 인나균의 성공적인 배양을 보고 하였다. 이러한 히알루론산은 Acid Mucopolysaccharide로써 N-acetylated hexosamine이 2당류단위 (Disaccharide unit)로 반복되어 있고, D-glucuronic acid와 N-acetyl-glucosaminic acid가 $\beta 1 \rightarrow 3$, $\beta 1 \rightarrow 4$ 의 연결을 이루고 있다. (White, 1964) 또한 Kato (1977, 1978)은 인나균이 숙주조직중 잘 침범하는 피부나 신경조직에서 콜레스테롤이 다량 존재하는 것을 보아서 인나균이 콜레스테롤을 발육소 (Growth factor)로 이용하여 세포막 구성 성분에 관여할 것이라고 보고하였다. 그들은 콜레스테롤이 함유된 배지를 만들어서 인나균과 서라균의 배양을 시도한 바 항산균을 분리 배양할 수 있음을 보고하였다. 그러나 아직도 인나균의 인공배양, 균의 동정, 전염성 또는 대사과정 등에 대한 연구는 초보적인 단계에 있다고 하여도 과언은 아니다. 따라서 본 연구에서는 Kato 및 Ishaque (1977a) 등이 개발한 콜레스테롤 함유배지 (Kato &

Ishaque Medium No. 1: 이하KI-1배지)와 Skinsnes등 (1975 a,b)가 개발하여 사용한 히알루론산 함유배지 (Leprosy Atelier Culture medium No.3: 이하LA-3배지)를 약간 변형한 배지에서 현재 시험관내 배양이 가능한 병원성 및 비병원성 항산균을 배양하여 콜레스테롤 및 히알루론산이 인나균 및 서라균 이외의 타항산균의 증식에 어떠한 영향을 미치는가를 관찰코저 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 균주선정

본 실험에서 사용된 병원성 및 비병원성 항산균주는 *Mycobacterium tuberculosis*: H37 Rv (Hiroshima Univ. Japan), B.C.G. (Pasteur Institute, France), *Mycobacterium vaccae* (ATCC 13483, Hiroshima Univ. Japan), *Mycobacterium kansasii* (P-I 844, Prinsleopold Institute, Belgium), *Mycobacterium scrofulaceum* (ATCC 19981, Hiroshima Univ. Japan) 등 5종으로서 본 교실에서 계속 Ogawa 난사면 배지에 계대 배양되어 온 균주들이다. 본 실험실시전 이들 균주는 Dubos 액체배지에서 1주간 배양한 후에 사용하였다.

2. 사용배지

Dubos 액체배지, Skinsnes의 LA-3배지 및 Kato의 KI-1배지의 성분은 Table 1과 같다.

이때 LA-3 배지성분중 우혈청알부민 (Bovine serum albumin, Cohn fraction V, Sigma chemical Co.)은 Skinsnes가 주장한 6%대신 Lee등 (1977)의 보고에 따라서 1%만 첨가한 것이다. 또한 Dubos 액체배지를 기초배지로 하여 이 배지에 콜레스테롤 (Lot. No. 2487, Pfanstiehl Chemical Co.) 100 μ g/ml를 첨가한 배지, KI-1 배지에서 편양혈청 및 콜레스테롤을 뺀 KI기초배지 (basal medium), 이 KI기초배지에 우혈청알부민 5%를 첨가한 배지, KI기초배지에 콜레스테롤을 100 μ g/ml 첨가한 배지, KI기초 배지에 우혈청알부민 5%와 콜레스테롤 100 μ g/ml를 동시에 첨가한 각기의 배지를 만든 후 Screw cap 시험관에 각기 5ml씩 분주하여 이들을 섭씨 37도 항온기에서 24시간 동안 멸균도 시험을 한 후에 사용하였으며 각 실험균은 3개의 시험관을 한 군으로 하여 실험하였다.

3. 배양균부유액 제조 및 접종

Dubos 액체배지에 각 균주를 1주간 배양한 후 2,000

Table 1. Formulations of Medium Used

(/1,000ml)

Dubos Liquid Medium		LA-3 Medium		KI-1 Medium	
Asparagin	2.0gm	Hyaluronic acid	1gm	Na ₂ HPO ₄	82gm
Casitone	0.5gm	Bovine serum albumin	10gm	KH ₂ PO ₄	5gm
Disodium phosphate	2.5gm	0.066M phosphate buffer	810ml	Glycerol	300ml
Monopotassium phosphate	1.0gm	Penicillin G	200,000 unit	Yeast extract	40gm
Ferric ammonium citrate	50.0gm	Yeast extract	160mg	Sheep serum	100ml
Magnesium sulfate	10.0gm	Glycerol	30ml	Penicillin G	200,000unit
Calcium chloride	0.5gm	pH	6.24	Cholesterol	100mg
Zinc Sulfate	0.1gm			pH	6.5
Tween 80	0.2gm				
Bovine serum albumin	50.0gm				
pH	6.5				

LA-1 medium: Modified Leprosy Atelier Culture Medium No.3 (Hyaluronic acid supplemented medium)

KI-1: Kato and Ishaque Medium No. 1 (Cholesterol supplemented medium)

rpm에서 30분간 원심분리기(International portable refrigerated equipment Co.)에서 원심분리하여 침전된 균괴를 인산완충액(pH6.5 0.1M KH₂PO₄—Na₂HPO₄ buffer)으로 3번 세척한 다음 원심분리하여 얻어진 균괴에 1ml의 인산완충액으로 희석하여 균부유액을 만들었다. 이 균부유액을 0.1ml씩 각기의 실험배지에 접종한 후 섭씨 37도 항온기에서 배양하였으며 배양기간중 1일 1회씩 배양기를 흔들어 주었다.

4. 균증식측정

각배지에서 배양된 균증식을 측정하는 방법으로 균의 건조 중량(Dry weight)를 측정하여 각 배지간의 균증식을 비교 하였다. 균건조중량 측정은 배양균액(5ml)을 2,000rpm에서 30분간 원심분리하여 그 상층액을 버리고 침전된 균괴를 인산완충액(0.1M pH7.5)으로 2회 반복 세척하고 다시 증류수로 1회 세척한 후 원심하여 그 침전된 균괴를 건조기(Drying oven)에서 섭씨 70도로 수시간동안 육안적으로 보아서 완전히 건조시킨 후 균괴의 중량을 Chemical balance (Mettler, AI-3721)로 측정하였다. 균증식량을 측정하기 위하여 처음 접종양과 동일량을 열처리에 의해 죽인 후에 각각의 배지에 접종하고 이를 대조로 하였다. 각 관찰 기간에 측정되는 균의 건조중량에서 대조균의 건조중량을 제외한 양을 균의 건조중량으로 산정하였다.

Ⅲ. 실험 성적

1. Dubos 액체배지, LA-3 배지, KI-1배지에서의 항산균 증식 비교

기본배지로 사용된 Dubos 액체배지, LA-3배지 및 KI-1 배지에 항산균을 접종한 후 4주 및 6주의 균증식 양상의 성적은 Table 2와 같다.

일반적으로 각 균주는 Dubos 배지에서 보다 LA-3 배지, KI-1 배지에서 균증식이 보다 신속히 증가됨을 관찰할 수 있었으며 특히 KI-1 배지에서 가장 우수한 성적을 얻을 수 있었다. *M. tuberculosis*의 경우는 Dubos 배지보다 LA-3배지에서 4주, 6주 관찰시 약 2배의 균증식 양상을 보였으며 KI-1배지에서는 4주에서 약 4배, 6주에서 약 3배의 균증식양상을 나타내었다. (Fig. 1 참조)

B.C.G. 균주는 Dubos 배지에서보다 LA-3 배지에서 4주에 약 3배, 6주에 약 2배의 균증식양상을 보였고, KI-1배지에서는 약 10배 및 약 6배의 균증식양상을 나타내었다. (Fig. 2 참조)

*M. vaccae*는 Dubos 배지보다 LA-3배지에서 4주 및 6주 관찰시 1.3배, 1.1배의 균증식 양상을 보였고 KI-1배지에서는 1.5배 및 1.2배의 균증식양상을 나타내었다. *M. kansasii*의 경우는 LA-3배지에서 4주 및 6주관찰시 약 2배, KI-1배지에서는 2.4배 및 2.1배의

Table 2. Growth Yield of Various Mycobacteria in Dubos, LA-3, and KI-1 Medium (Dry weigh; mg)

Strain	Wks of cultivation	Medium		
		Dubos	LA-3	KI-1
<i>M. tuberculosis</i>	4	11.5	20.6	64.8
	6	15.5	31.7	46.6
B.C.G.	4	6.3	19.4	63.0
	6	9.6	17.5	55.2
<i>M. vaccae</i>	4	31.0	39.5	47.7
	6	43.9	49.7	51.0
<i>M. kansasii</i>	4	30.6	60.8	74.2
	6	32.5	64.4	68.8
<i>M. scrofulaceum</i>	4	2.0	5.4	11.1
	6	2.7	6.2	9.5

Dubos: Dubos Liquid Medium

LA-3: Modified Leprosy Atelier Culture Medium No. 3 (Hyaluronic acid supplemented medium)

KI-1 medium: Kato & Ishaque Medium No. 1 (Cholesterol supplemented medium)

Fig. 1. Growth Curve of *M. tuberculosis* in Dubos, LA-3, and KI-1 Medium

균증식양상을 나타내었다. (Fig. 3 참조)

*M. scrofulaceum*은 LA-3 배지에서 Dubos 배지보다 4주 및 6주 관찰시 2.7배 및 2.3배의 균증식양상이 제측되었고 KI-1배지에서는 5.2배 및 3.5배의 균증식 양상이 관찰되었다.

2. Dubos 배지에서 콜레스테롤 첨가에 의한 균증식의 비교

항산균증식에 있어서 콜레스테롤이 미치는 영향을

Table 3. Growth of Various Mycobacteria in Dubos Medium and Cholesterol-Supplemented Dubos Medium (Dry weigh; mg)

Strain	Wks of cultivation	Medium	
		Dubos	Dubos & Cholesterol
<i>M. tuberculosis</i>	1	2.0	3.2
	4	14.6	30.2
B.C.G.	1	1.6	2.4
	4	12.1	21.2
<i>M. vaccae</i>	1	2.9	3.6
	4	12.4	20.0
<i>M. kansasii</i>	1	2.2	3.5
	4	20.9	37.2
<i>M. scrofulaceum</i>	1	1.6	2.1
	4	7.9	11.8

Dubos: Dubos liquid medium

Dubos & Cholesterol: Dubos liquid medium supplemented with cholesterol 100 μ g/ml

Fig. 2. Growth Curve of B.C.G. in Dubos LA-3, and KI-1 Medium

관찰하기 위하여 Dubos 배지 및 콜레스테롤 첨가 Dubos 배지에서 각 균주의 증식양상을 관찰한 바 Table 3와 같다.

콜레스테롤 100 μ g/ml를 첨가한 Dubos 배지에서 대조배지인 Dubos 배지보다 1주 및 4주 배양시 더 우수한 균증식 양상이 제측되었다. *M. tuberculosis*의 경우는 1주, 4주 배양시 콜레스테롤을 첨가 Dubos 배지가 대조배지인 Dubos 배지보다 약 1.5배 및 2.1배의 균증식 양상을 보였다. (Fig. 4 참조)

B.C.G.의 경우는 1주, 4주에서 약 1.5배 및 1.8배의

Fig. 3. Growth Curve of *M. kansasii* in Dubos, LA-3, and KI-1 Medium

Fig. 5. Growth Curve of B.C.G. in Dubos and Cholesterol Supplemented Dubos Medium

균증식양상이 제측되었다. (Fig. 5 참조)

*M. kansasii*의 경우는 약 1.6배 및 약 1.8배의 균증

Table 4. Effects of BSA & Cholesterol on Mycobacterial Growth (Dry weight: mg)

Strain \ Medium	KI	KI+CH	KI+BSA	KI+BSA+CH
<i>M. tuberculosis</i>	0.9	1.2	1.2	1.5
B.C.G.	0.7	1.2	1.2	1.7
<i>M. vaccae</i>	1.4	1.8	1.6	2.7
<i>M. kansasii</i>	3.5	3.6	3.7	6.2
<i>M. scrofulaceum</i>	1.4	1.0	1.5	2.1

KI: K-I basal medium

KI+BSA: K-I basal medium+bovine serum albumin 5%

KI+CH: K-I basal medium+cholesterol 100μg/ml

KI+BSA+CH: K-I basal medium+bovine serum albumin 5%+cholesterol 100μg/ml

Fig. 4. Growth Curve of *M. tuberculosis* in Dubos and Cholesterol Supplemented Dubos Medium

Fig. 6. Growth Curve of *M. kansasii* in Dubos and Cholesterol Supplemented Dubos Medium

식 양상이 제측되었으며 (Fig. 6 참조) *M. scrofulaceum*은 약 1.3배, 1.5배, *M. vaccae*는 약 1.3배, 1.6배의 균건조 중량의 증식치를 나타내었다.

한편 KI기초 배지와 콜레스테롤 100μg/ml를 첨가한 KI배지, 우혈청알부민 5%를 첨가한 KI배지 콜레스테롤 100μg/ml와 우혈청알부민 5%를 동시에 첨가한 KI배지 상의 균증식양상을 배양 1주에 관찰한 결과는 Table 4와 같다.

KI기초배지나 우혈청알부민을 첨가한 KI배지, 콜레스테롤을 첨가한 KI기초배지 사이에는 균증식양상의 큰 차이를 발견하기 어려우나 콜레스테롤과 우혈청알부민을 함께 첨가한 배지는 KI기초배지 및 타배지에 비해 *M. tuberculosis*시 1주관찰에서 약 1.7배, B.C.G.는 약 3배, *M. vaccae*는 약 2배, *M. kansasii* 및

*M. scrofulaceum*에서는 약 1.8배 및 1.6배의 균증식 양상이 계속되었다.

IV. 고 찰

항산균증 결핵균 또는 인나균 이외에도 많은 항산균이 인간에게서 항산균증을 야기시킨다는 보고가 있다. (Barkdale & Kim, 1977), 항산균의 조직내 감염에서 볼때 세포나 조직의 구성성분 가운데 히알유론산이나 콜레스테롤이 아마도 항산균의 생체내 증식에 관여 할지도 모른다는 추측은 오래전부터 있었다. 이러한 추측은 항산균의 세포내 기생에서 히알유론산이나 콜레스테롤이 다량 침착되어 있다는 데에 근거를 두며 따라서 Skinsnes & Matsuo (1974 a,b)와 Kato (1978)은 히알유론산이나 콜레스테롤이 함유된 배지에서 인나균 또는 서라균의 배양을 시도하였다. (Kato & Ishaque, 1976, Skinsnes et al 1975 a,b) 이에 본 저자는 인나균이나 서라균과 같은 속(Genus)에 속하는 항산균증 인체에 감염을 일으키는 *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* 및 비병원성인 *B.C.G.*와 *M. vaccae*를 사용하여 이들 균들이 콜레스테롤이나 히알유론산 첨가배지에서 균증식의 증가여부를 관찰하고자 하였다. 본 실험에서는 각종 항산균의 배양에 널리 이용되고 있는 Dubos 액체배지를 중심으로 하여 히알유론산이 첨가된 Skinsnes의 LA-3배지와 콜레스테롤이 첨가된 Kato의 KI-1 배지를 기본으로 하고 Dubos 배지에 콜레스테롤이나 우혈청알부민을 첨가하여 균의 증식을 비교 관찰하였으며 세균증식의 측정방법으로는 흡광밀도(Optical density) 또는 Klett unit에 의한 균농도를 측정하는 방법등 여러가지 방법이 있으나 본 실험에서는 수기가 간편한 균건조중량(Dry weight) 측정방법을 사용하였다. 사용된 항산균주 모두가 Dubos 배지에서 보다 LA-3배지나 KI-1 배지에서 균증식의 증가를 관찰할 수 있었으며 특히 KI-1 배지에서 Dubos 배지에 비해 2배 내지 10배 가량의 좋은 균증식양상을 나타낼을 미루어보아 KI-1 배지의 주성분인 콜레스테롤과 면양혈청이 이들 균주의 증식을 촉진하였으리라고 예지 되었다. 본 실험에서와 같이 Lee 등(1977)의 보고서에서도 히알유론산 첨가배지에서 각종 항산균의 증식이 증가되었음이 보고되어 있다. 따라서, KI-1배지의 특징인 콜레스테롤과 면양 혈청이 항산균의 발육에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 KI기초배지에 콜레스테롤 및 혈청성분의 하나인 우혈청알부민을 함께 첨가한 배지에서 각종 항산균의 증식상을 비교하였다. KI기초배지, 콜레스테롤을 첨가한 KI 기초배지, 우혈청알부민을 첨가한 KI 기초

배지상에서 각종 항산균의 증식정도는 큰 차이를 나타내지 않으나 콜레스테롤과 우혈청알부민을 동시에 첨가한 KI 기초 배지에서는 균증식이 보다 증가되었음이 관찰되었다. 콜레스테롤의 포유 동물내대사기전에 관한 여러 연구자들의 보고에 의하면 인체내에서의 콜레스테롤의 공급은 간이나 소장에서 합성되거나 음식점으로부터 직접 공급된다. (White, 1964) 이러한 콜레스테롤은 세포막이나 기타 조직에서 세포막을 지지하는 역할을 하며 (White, 1964), 거식세포 내에서는 콜레스테롤이 다량 함유되어 있음이 알려져 있고 인나균이나 서라균은 이러한 거식세포내에서 자란다고 알려져 있다. (Werb & Cohn, 1971ab) 특히 인나균이 생체내 기생하는 부위인 결체조직, 임파선, 혈액, 신경세포(Schwann cell)에는 콜레스테롤이 다량 함유되어 있다. 콜레스테롤은 유리(free) 또는 ester화한 Sterol로써 거식세포내에 흡수되어 거식세포안에 있는 인나균은 이 콜레스테롤을 세포의 구성성분으로 이용한다는 보고도 있다(Kondo & Kanai, 1974, 1976ab, Werb, Z. 1971, Werb & Cohn 1972, Rothblat et al 1967) 이와 더불어 콜레스테롤은 인나균에 있어서 에너지원 또는 탄소원의 공급에 쓰이지 않는다는 보고가 있다. (Kato & Ishaque 1978). 이와 같이 거식세포가 콜레스테롤을 흡수하는 것과 인나균이 콜레스테롤을 필요로 하는 것엔 많은 동질성이 관찰된다고 한다(Day A.J. 1967, Werb & Cohn 1971, Kato 1979) 또한 콜레스테롤은 생체내에서 단백질 및 인산지질과 복합체(cholesterol-protein-phospholipid complex)를 형성한다고 알려져 있으며 유리 콜레스테롤이 세포내에 들어갈때 운반체(carrier)로써 혈청이 필요하게 되며 특히 혈청알부민의 영향을 받는다는 보고가 있다. (Rothblat & Kritchevsky, 1967, 1968) Kato et al (1978)은 콜레스테롤이 인나균이나 서라균의 발육소(Growth factor)로 작용하며 이때에 혈청알부민이 운반체의 역할을 한다고 보고하였다. 본 실험결과도 우혈청알부민을 첨가하지 않고 콜레스테롤만 단독 첨가한 배지에서는 균증식상에서 별다른 차이를 관찰할 수 없었으나 우혈 청알부민과 콜레스테롤을 동시에 첨가한 배지에서 균증식이 증가되었음을 보아 아마도 콜레스테롤은 면양혈청이나 알부민의 존재하에서 항산균의 증식을 증가시키는 것으로 사료된다. 콜레스테롤이나 혈청알부민이 생체내 기생세포들의 발육 및 증식에 있어서 발육소로서의 역할을 한다는 것에 대한 생리학적 생화학적 기전규명과 콜레스테롤이 타항산균의 증식에 미치는 적정양 등에 대한것은 더욱 추시되어야 할 것이나 배양조건이 까다로운 항산균의 배양에 있어서 콜레스테롤 및 면양혈청 또는 우혈청알부민의

첨가는 항산균의 증식을 더욱 증가시키는 것으로 사료된다.

V. 결 론

콜레스테롤과 히알유론산의 첨가가 수종 항산균의 증식에 미치는 영향을 관찰하고자 콜레스테롤 및 히알유론산 첨가배지에서 항산균을 배양하여 이들 균의 증식영향을 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Dubos액체 배지, 히알유론산 함유 LA-3 배지, 콜레스테롤 함유 KI-1배지에 있어서의 항산균의 증식은 KI-1 배지가 가장 우수하였으며 결핵균의 경우 KI-1 배지에서 Dubos 배지보다 4주, 6주 관찰시 약 4배, 3배의 균증식양상을 나타내었으며, B.C.G.의 경우는 약 10배, 6배, *M. vaccae*는 약 1.5배, 1.2배, *M. kansasii*는 약 2.4배, 2.1배, *M. scrofulaceum*은 약 5.2배, 3.5배의 균증식양상을 나타내었다.

2. 항산균의 증식에 미치는 콜레스테롤의 영향을 관찰한 바 Dubos 배지에 비해 콜레스테롤을 첨가한 Dubos 배지에서 1주, 4주 관찰시 결핵균의 경우는 약 1.5배, 2.1배, B.C.G.는 약 1.5배, 1.8배, *M. kansasii*는 약 1.6배 1.8배, *M. vaccae*는 약 1.3배, 1.6배, *M. scrofulaceum*은 약 1.3배, 1.5배의 균건조증량치의 증식양상을 나타내었다.

3. 콜레스테롤의 이용에 있어서 우혈청알부민이 미치는 영향을 관찰한 바 KI 기초배지에 비해 콜레스테롤과 우혈청알부민을 동시에 첨가한 배지에서 1주 관찰시 결핵균의 경우는 약 1.7배, B.C.G.는 약 3배, *M. kansasii*는 약 1.8배, *M. scrofulaceum*은 약 1.6배의 균증식을 나타내었다.

이상의 결과로 미루어 보아 시험관내에서 배양이 가능한 각종 항산균의 배양에 있어서 히알유론산 및 콜레스테롤은 항산균의 증식을 증가시키며 특히 콜레스테롤 첨가에 의한 항산균의 증식은 우혈청알부민에 의하여 더욱 증가되는 것으로 사료된다.

References

Barksdale L., Kim SH: *Mycobacterium*. Bacteriological Review 41:217-372, 1977.
 Day AJ.: Lipid metabolism by macophages and its relationship to atherosclerosis. In "Advance in Lipid Research", (Paoletti R., Kritchevsky D., eds.), 185-207, Academic Press, New York, 1967.
 Kanai K., Kondo E.: Chemistry and biology of

Mycobacteria grown in vivo. Japan. J. Med. Sci. Biol. 27:135-160, 1974.
 Kato L.: Cholesterol a factor which is required for growth of *Mycobacteria* from leprous tissues. Internat. J. Leprosy, 46(2):133-143, 1978.
 Kato L., Ishaque M. *In vitro* cultivation of *Mycobacteria* from human lepromas and from an armadillo infected with *Mycobacterium leprea*. Internat. J. Leprosy 45:107-113, 1977 (a).
 Kato L., Ishaque M.: A scotochromogenic slow growing *Mycobacterium* probably the etiologic agent of rat leprosy. Internat. J. Leprosy 45:139-149, 1977 (b).
 Kato L., Kim SJ and Ishaque M.: *In vitro* cultivation of *Mycobacteria* in cholesterol-lecithin media from lepromas of rats inoculated with *Mycobacterium lepraemurium*. Internat. J. Leprosy, 46(4):376-385, 1978.
 Kato L.: Cholesterol dynamic in macrophages: Implication for the bacteriology and pathology of leprosy. Acta Leprologica (In press), 1979.
 Kato L.: The Janus-Face of *Mycobacterium leprae*, characteristics of *in vivo* grown *M. leprae* are not predicable. Internat. J. Leprosy 45(2):175-182, 1977
 Kato L., Ishaque M.: A simplified hyaluronic acid culture medium for *Mycobacterium* isolated from human lepromata. Internat. J. Leprosy 44:431-436, 1976.
 Kirchheimer WF., Storrs EE.: Leprosy in experimentally infected Armadillo, Abstract in Internat. J. Leprosy 40:212, 1972
 Kondo E., Kanai K.: An attempt to ultivate *Mycobacteria* in simple synthetic liquid medium, containing lecithin-cholesterol liposome. Japan J. Med. Sci. Biol. 29:109-121, 1976 (a).
 Kondo E., Kanai K.: Accumulation of cholesterol esters in macrophages incubated with *Mycobacteria in vitro*. Japan J. Med. Sci. Biol. 29:123-137, 1976 (b).
 Lee YN, Kim JD. and Lew J.: Comparison of *Mycobacterial* growth in Dubos medium, hyaluronate supplemented medium and umbilical cord extract based medium. Yonsei Med. J. 18:130-135, 1977.

- Lew J., Byun WS. and Yang YT. : Experimental infection of Korean chipmunk (*Tamias sibiricus asiaticus*, Gmelin) with *M. leprae*. Internat. J. Leprosy 42:410-419, 1974.
- Matsuo E., Skinsnes OK. : *Acid Mucopolysaccharide Metabolism* in leprosy 2. Subcellular localization of hyaluronic acid and β -glucuronidase in leprosy infiltrates suggestive of a *Host-Myobacterium leprae* metabolic relationship. Internat. J. Leprosy 42(4):399-411, 1974(b).
- Matsuo E., Skinsnes OK. and Chang PHC. : *Acid Mucopolysaccharide Metabolism* in leprosy 3. Hyaluronic acid Mycobacterial growth enhancement and growth suppression by saccharic acid and vitamin C as inhibitors of β -glucuronidase. Internat. J. Leprosy 43:1-13, 1975 (b).
- Rothblat GH., Hartzell R., Harzell R., Miahle H. and Kritchevsky D. : Cholesterol metabolism in tissue culture cells. In "Lipid metabolism in tissue culture cells", (Rothblat GH., Kritchevsky, eds.), Sympos. Monogr. 6:129-146, Wistar Institute Press, Philadelphia, 1967.
- Rothblat GH., Kritchevsky D. : Uptake of cholesterol by L5178 tissue culture cells : Studies with delipidized serum. (Abstract) Circulation 36:35, 1967.
- Rothblat GH., Kritchevsky D. : The metabolism of free and esterified cholesterol in tissue culture cells: A review, Wistar Institute of anatomy and biology Philadelphia, Experimental and molecular pathology 8:314-329, 1968.
- Shepard CC. : The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. J. Exp. Med. 112:445-454, 1960.
- Shepard CC. : Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. Internat. J. Leprosy 30:291-306, 1962.
- Skinsnes OK., Matsuo E. : *Acid Mucopolysaccharide Metabolism* in leprosy 1. Storage of hyaluronic acid and its possible significance in the pathogenesis of leprosy. Internat. J. Leprosy 42:392-398, 1974 (a).
- Skinsnes OK., Matsuo E., Chang PHC. and Anderson B. : *In vitro* cultivation of leprosy bacilli on hyaluronic acid based medium 1. Preliminary report. Internat. J. Leprosy 43:193-203, 1975 (a).
- Werb Z. : Dynamics of macrophage membrane cholesterol. Ph. D. Thesis. The Rockefeller Univ., New York, 1971.
- Werb Z., Cohn ZA. : Cholesterol metabolism in the macrophage. I. The regulation of cholesterol exchange. J. Exp. Med. 134:1545-1569, 1971(a).
- Werb Z., Cohn ZA. : Cholesterol metabolism in the macrophage II. Alteration of subcellular exchangeable cholesterol compartments and exchange in other cell types. J. Exp. Med. 134:1570-1590, 1971 (b).
- Werb Z., Cohn ZA. : Cholesterol metabolism in the macrophage III. Ingestion and intracellular fate of cholesterol esters. J. Exp. Med. 135:21-42, 1972.
- White : Principles of biochemistry; 4th ed., 517-530, 1964.