Pyrazinamide 藥劑感受性檢査方法 改善에 關한 研究

大韓結核協會 結核研究院

裴 吉 漢 · 金 尙 材

=Abstract=

Study on the Pyrazinamide Susceptibility Testing of *Mycobacterium Tuberculosis*

Gill-Han Bai and Sang-Jae Kim

Korean Institute of Tuberculosis, KNTA

Pyrazinamide is an effective drug against slowly multiplying tubercle bacilli inside macrophages due to the acid environment. But it has been difficult to perform the susceptibility test of tubercle bacilli to this drug because pyrazinamide is inactive at the neutral pH of medium. Therefore, there still remain some problems to solve: how to determine an appropriate pH of the medium maintaining active state of pyrazinamide and avoiding growth inhibition of test strains as few as possible and how to overcome the growth retard of organisms on culture media owing to the acid environment.

Authors tried to examine all possible problems encountered with pyrazinamide susceptibility tests. We also compared the results of pyrazinamide susceptibility tests with simplified method of pyrazinamidase test recommended by Wayne, and both results obtained were analysed according to the history of chemotherapy. The results are summarized as follows;

1) The pH of medium greatly affected bacterial growth and most strains in logarithmic growth stage could usually grow on the media of preinspissation pH 4.8 (pH 5.2 after inspissation) after 5-6 weeks' cultivation.

2) Drug susceptibility patterns did not change any longer after 4 week-cultivation of H₃₇Rv strains. Bacterial growth were restricted only to drug-free media at preinspissation pH 4.8 or lower in inoculum size of 10⁻¹mg or at pH 5.0 or lower in 10⁻³mg, but organisms normally grew at pH 5.2 or more even in the presence of high concentrations of PZA.

3) In 176 strains from patients who have no history of previous antituberculous chemotherapy, 148 strains (84.1%) possessed pyrazinamidase activity while 28 strains (15.9%) were devoid of it. All strains possessing pyrazinamidase activity were also confirmed as sensitive in pyrazinamide susceptibility test, but in 28 strains of negative pyrazinamidase only 15 strains (53.6%) were resistant to pyrazinamide.

4) In 37 strains from patients with history of more than 6 months of pyrazinamide treatment, pyrazinamidase positives were 9 strains (24.3%) of which 8 strains were sensitive to pyrazinamide. Twenty eight (75.7%) of 37 strains were pyrazinamidase negative, but only 18 (64.8%) of 28 strains were resistant to pyrazinamide while the rest showed differences in resistance depending on pH of media used.

5) Three-hundred ten strains were compared their pyrazinamide susceptibility with pyrazinamidase activity simultaneously. One-hundred sixty-one strains grew at all preinspissation pH tested (pH 4.65, 4.85, and 5.05), but 64 strains grew at pH 4.85 or higher, 35 strains

grew at only pH 5.05, and the remaining could not grow at all pH used in susceptibility tests for pyrazinamide. Of 53 PZA sensitive strains at pH 4.85-5.05 among 141 acid untolerant strains, 45(84.9%) showed positive pyrazinamidase by the Wayne method while 16 strains(66.7%) of 24 grown at only pH 5.05 were positive and 27 strains(63.4%) of 42 which did not grow at all pHs tested showed negative pyrazinamidase. In 169 acid tolerant strains which grew at pH 4.65-5.05, 101(83.5%) of 121 PZA sensitive strains at pH 4.65-5.05 possessed pyrazinamidase while 24(80.0%) of 30 PZA resistant at all acid media containing pyrazinamide could not hydrolyse pyrazinamide. It was noted that the results of tests for the pyrazinamide susceptibility and pyrazinamidase activity tended to fairly well correlated in the cases showing the same susceptibility or resistance patterns at all acid pHs used in tests.

I. 緒 論

Pyrazinamide(PZA)는 酸性 pH에서 서서히 增殖하고 있는 細胞內 結核菌에 대해 높은 抗菌作用을 가지므로, 再發의 主된 要因이 되는 菌群을 效果的으로 除去할 수 있기 때문에 rifampicin과 함께 化學療法의 期間을 단축하는데 크게 寄與해온 藥劑이다.

PZA가 動物 및 人體實驗을 통해 그 抗菌作用이立證되던 當時^{1~4)}에는 試驗管內 抗菌作用이 缺如된 藥劑로 생각되었으나, 1954年 McDermott 등이 pH5.0~5.5인 酸性培地에서 抗菌作用이 크게 나타났음을 報告⁵⁾한 이래, 많은 學者들이 感受性檢査方法 改善을 위한 研究를 수행하여, 1970年代 以前에 一般的인 檢査上 理論이나 實技方法은 이미 정리된 단계에 이르렀다. 그러나 PZA 感受性檢査는 酸性培地에서 實施하기 때문에 菌發育이 不良하여 培養期間이 오래 걸리며, 때로는 菌이 자라지 않아서 檢査自體가 불가능한 경우도 많다. 또 菌株에 따라서는 發育可能 pH範圍가 多様하여 僅少한 pH差에도 耐性表現이 달라지기 때문에, 아직도 精確하고 신속한 PZA 感受性檢査를 실시하기가 어려운 것으로 알려져 있다. 그런데, Konno 등⁶⁾이 amidase에 의한 PZA의 amide分解產物인 pyrazinoic acid가 PZA 耐性인 人型結核菌이나 牛型結核菌에도 活性이 있음을 보인 이래, 이 pyrazinoic acid가 pyrazinamide의 抗菌作用을 나타내는 活性物質임이 여러 學者들에 의해 確認되었다^{7~9)}. 이로부터 PZA의 amide分解 可能性 여부를 알게 되면 간접적인 方法으로 感受性菌과 耐性菌의 區分이 가능하리라 생각되었다. McClatch 등¹⁰⁾이 실제로 感受性菌과 耐性菌 區分에 이 方法을 응용하여 그 可能性을 확인시켜 주었다. 이렇게 pyrazinamidase 活性여부를 측정하므로써 PZA 耐性 및 感受性菌 區分이 容易해진다면, 酸性培

地에 자라지 않는 菌에 대한 耐性여부의 判定이 가능해질 뿐 아니라, 檢査期間의 短縮과 pH 또는 接種菌量에 따른 耐性表現差等, 現 感受性檢査方法으로는 해결하기 어려운 점의 補完이 가능해지리라 생각되었다.

따라서 著者等은 現在 실시하고 있는 pyrazinamide 檢査에서 고려되어야 할 諸般條件, 즉 使用 培養基에 따른 pH, 接種用 菌株年齡, 接種菌量과 判定期間에 따른 感受性樣相을 관찰하고 各 試驗菌株의 pyrazinamidase 活性試驗¹¹⁾을 실시하여 그 結果를 從來의 感受性檢査 結果와 比較하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1) 使用菌株—M. tuberculosis H₃₇Rv와 1982年 1월부터 12月 사이에 結核研究院附屬醫院에 登錄 治療中에 있는 結核患者의 痰으로부터 分離 培養된 人型結核菌들을 使用하였다. 試驗前 모든 菌은 Löwenstein-Jensen 培地에 繼代培養하고, H₃₇Rv를 利用한 使用 菌株年齡에 따른 제한 影響을 파악하기 위한 試驗에서는 培養 2週, 4週, 또는 6週 되는 菌을 使用하였고, 그외 모든 試驗에서는 培養 4週된 菌을 使用하였다.

2) 使用培地와 pH調整—本 實驗에 使用된 培地는 Löwenstein-Jensen(L-J)이었다. pH에 따른 菌發育을 觀察하기 위한 試驗에서는 2N HCl로 凝固前 培地の pH를 各各 4.40, 4.60, 4.80, 5.0, 5.20, 5.40, 5.60, 5.80, 6.0, 6.40으로 調整하여(Corning pH meter Model 10 使用), 16×125 mm screw cap 시험관에 5 ml씩 分注한 다음, 85°C에서 50分間 加熱, 斜面 凝固시켰다. 응고후의 pH는 各各 4.75, 4.90, 5.20, 5.40, 5.70, 5.80, 6.10, 6.25, 6.50, 6.80이었다. Pyrazinamidase와 感受性檢査間 比較 試驗에서는 培地の pH를 4.65(응고후 4.96±0.04), 4.85(응고후 5.21±0.

04), 5.05(응고후 5.41±0.03)로 調整하였다.

3) 使用藥劑濃度—凝固前에 培地 ml當 PZA가 各 12.5, 25, 50, 100, 200, 500 mcg이 되도록 첨가했다.

4) 菌液調整과 接種方法—直徑 3 mm의 유리알이 6 개씩 들어 있는 1/2 ounce 병에 10% Tween 80을 1 drop을 滴下한 후에, nichrome wire loop(22 SWG)로 계대배양한 菌塊를 취해 넣고 約 1分間 Vortex mixer로 진탕한 후 Coleman 6/8 Junior III Spectrophotometer 560 nm에서 30% 透過率을 보이는 菌液이 되도록 稀释된 1/15 M phosphate buffer saline으로 희석하였다. 이 菌液은 약 10 mg/ml이 되며 27 SWG(外徑 3 mm) nichrome wire로 1 loopful 接種時는 10⁻¹mg의 菌이, 100倍 희석후 1 loopful 接種時는 10⁻³mg이 接種되는 셈이다. 接種時는 培地 상층부로부터 약 2 cm, 밑면에서 1 cm 정도 간격을 두고 中央部에 約 1×4 cm 넓이로 接種하되, 培地 表面이 傷하거나 試驗管壁 가까이에 接種하지 않도록 하였다.

5) 培養判讀—37°C에 培養하면서 2週부터 8~9週까지 每週 中性培地와 各 酸性培地上的 菌發育을 觀察하였다. 中性培地에서 100個 미만의 菌集落이 形成됐을 때는 다시 檢査하였으며, 各種 酸性培地上 培養菌이 50개 미만일 때는 實數를 記錄하였는데, 藥劑含有 酸性培地上 發育된 菌集落이 10個이상일 때를 該當藥劑濃度에서의 耐性으로, PZA 100 mcg/ml 以上 含有 培地에서 發育했을 때를 PZA 耐性菌으로 判定하였다.

6) Pyrazinamidase(PZase)試驗—Wayne¹¹⁾의 簡易法을 利用했다. 즉, Dubos broth base 6.5 g을 1 l의 D.W.에 용해한 후, PZA 100 mg과 pyruvate 2 g, agar 15 g을 첨가 加熱 溶解, 16×125 mm screw cap 시험관에 5 ml씩 分注한 다음 高壓滅菌하여 直立 凝固시켰다. 試驗菌의 菌塊를 2個의 培地 表面에 過量(5 mg 以上)接種하여 37°C에서 4日과 7日 處理한 다음 各各 PZase 活性試驗을 실시하였다. 즉, 菌이 培養中인 試驗管에 1% Ferrous ammonium sulfate 溶液 1 ml를 넣어 4時間 냉장 보관한 뒤, agar 上의 pink 帶生成有無를 觀察하였다. pink 帶가 생기면 PZA가 遊離 pyrazinoic acid와 ammonia로 加水分解되었음을 의미한다.

III. 實驗 結果

1) 使用菌株年齡·接種菌量 및 培養期間別 各酸性培地上的 菌發育—培養期間에 따른 菌의 對數増減 樣

Fig. 1. Comparison of pH tolerance range according to bacterial inoculum, age, and incubation periods (*H₃₇Rv*).

Fig. 2. Comparison of patterns of *H₃₇Rv* 2 week-old culture in various drug concentrations according to pHs at 6 week-incubation.

相을 고려, 2週, 4週, 6週 培養된 3個 菌群으로 區分하여 各己 10⁻¹mg, 10⁻³mg 되도록 接種, 培養 經過에 따른 酸性培地上 菌發育을 觀察하였다. *H₃₇Rv* 2週 培養菌 10⁻¹mg을 接種時는 培養 2週後부터 응고전 pH 4.8(응고후 pH 5.20)인 培地에서부터 發育, 培養 6週 後에는 pH 4.6(응고후 pH 4.90), 7週이후에는 pH 4.4

Table 1. Comparison of pH tolerance range between acid tolerant and intolerant strains according to the incubation periods

Classification	Incubation periods (weeks)	Preinspissaton pH							
		4.5	4.6	4.7	4.8	4.9	5.0	5.1	5.2
Acid tolerant	3	—	—	1	1	4	5	5	5
	4	1	2	3	3	5	5	5	5
	5	2	4	5	5	5	5	5	5
	6	4	5	5	5	5	5	5	5
	7	5	5	5	5	5	5	5	5
	8	5	5	5	5	5	5	5	5
	9	5	5	5	5	5	5	5	5
Acid intolerant	3	—	—	—	—	—	3	4	5
	4	—	—	—	—	3	6	7	7
	5	—	—	—	—	5	8	10	12
	6	—	—	—	—	7	8	11	12
	7	—	—	—	4	8	12	14	14
	8	—	—	—	4	9	14	15	15
	9	—	—	—	6	12	15	15	15

Acid tolerant strains; growth of these strains on acid media are as affluent as those on neutral pH media.

Acid intolerant strains; These strains do not grow on the medium of preinspissation pH 4.85 at 6 week-incubation although they grow normally on neutral pH media.

(응고후 pH 4.7)인 酸性培地까지 發育하였다. 2週 培養菌 10^{-3} mg 을 接種時는 4週 培養菌 10^{-1} mg 接種時와 비슷했는데, 培養 2週에는 pH 5.2인 培地에, 배양 5~6주에는 pH 4.80~5.0의 배지에서 발육하였다. 그러나 10^{-1} mg 接種된 6週 培養菌과 10^{-3} mg 接種된 4週 培養菌은 8週 培養後에도 pH 4.8 이하 培地에서는 發育하지 않았다(Fig. 1).

2) 培養期間 延長에 따른 各種 酸性培地上 菌發育—여러 結核患者들 由來 菌株들中, 응고전 pH 4.8인 培地에서 6週 培養時에도 發育치 않던 15株(發育不良菌)와 4~5週 培養으로 中性培地에서처럼 良好한 發育을 보여준 5株(發育良好菌)를 선택하여, 서로 다른 여러 pH 濃度の 培地에 10^{-3} mg 接種하고 培養期間에 따른 菌發育을 관찰하였다. 發育良好菌株들(5株)은 응고전 pH 4.5인 培地에서 7週에, pH 4.6이상에서는 6週이내에 모두 發育하였고 發育不良菌은 응고전 pH 5.0이상일 때도 8~9週 後에야 모두 發育하였으며, pH 4.8일때는 9週 培養에 6株(40.0%)만이 發育하였다(Table 1).

3) 接種菌量과 pH 에 따른 PZA 感受性樣相—Fig. 2. 에서와 같이 PZA 가 여러 濃度로 첨가된 各 酸性培地

Fig. 3. Growth patterns of H₃₇Rv in various PZA concentrations of different pHs according to incubation periods. (inoculum 10^{-3} mg, 2 week-old culture used)

Table 2. Growth at the various acid pHs of media

Strains tested	Numbers of growers on various pH media			
	Growth at neutral pH only	Growth at pH 5.05 or higher	Growth at pH 4.85 or higher	Growth at pH 4.65 or higher
310(100.0%)	42(13.5%)	35(11.3%)	64(20.6%)	169(54.5%)
				233(75.2%)

Table 3. Comparison of the results of pyrazinamide sensitivity tests with those of pyrazinamidase tests in acid tolerant strains

PZA sensitivity tests	Resistant at			Sensitive at	Total
	pH 4.65 or higher	pH 4.85 or higher (sensitive at pH 4.65)	pH 5.05 or higher (sensitive at pH 4.65, 4.85)	three pH (4.65~5.55)	
PZase tests					
Positive	6(20.0%)	6	4	101(83.5%)	117
Negative	24(80.0%)	5	3	20(16.5%)	52
Total	30(100.0%)	11	7	121(100.0%)	169

Table 4. Analysis of the results of pyrazinamide sensitivity tests in relation with pyrazinamidase tests in acid intolerant strains

PZA sensitivity tests	Strains(64) grown at prein-spissation pH 4.85 or higher			Strains(35) grown at prein-spissation pH 5.05 or higher		Strains not grown at three pHs	Total
	Resistant at pH 4.85 or higher	Resistant at pH 5.05 or higher	Sensitive at pH 4.85, 5.05	Resistant	Sensitive		
Pyrazinamidase tests							
Positive	1(14.3%)	2	45(84.9%)	4(36.4%)	16(66.7%)	15(35.7%)	83(58.9%)
Negative	6(85.7%)	2	8(15.1%)	7(63.6%)	8(33.3%)	27(64.3%)	58(41.1%)
Total	7(100.0%)	4	53(100.0%)	11(100.0%)	24(100.0%)	42(100.0%)	141(100.0%)

에 2週 培養한 菌을 接種, 6週 培養判定時 10^{-3} mg 接種했을 때는 pH 5.0까지는 全藥劑濃度에 感受性을 나타내었으나 pH 5.2 이상이면 高濃度로 PZA가 含有된 培地에서도 菌이 發育했다. 한편 10^{-1} mg을 接種時는 pH 4.8 이하에서는 藥劑非含有對照培地에서만 發育했음에 비해 pH 5.0 이상에서는 高濃度の PZA가 含有된 培地에서도 菌이 發育했다.

4) 培養期間에 따른 PZA 感受性 樣相— $H_{37}R_v$ 10^{-3} mg을 接種하여 培養하면서, 培養 2주, 4주, 6주, 8주에 PZA 含有 各種 酸性培地上 菌發育을 觀察해보면, pH 5.0수준까지는 培養期間을 延長하여도 藥劑含有 培地에서는 자라지 않았고, pH 5.2 이상인 酸性培地에서는 培養 2주부터 高濃度の 藥劑含有 培地까지 菌이 發育하였다(Fig. 3).

5) Pyrazinamidase(PZase) 試驗과 Pyrazinamide(P

ZA) 感受性檢査 結果와의 比較—凝固前 培地の pH를 4.65, 4.85, 5.05로 調整한 各기 다른 酸性培養基에서 PZA 感受性檢査를 實施하면서 PZase 試驗을 並行하였다. 試驗菌은 總 310株로서, 169株(54.0%)는 試驗된 모든 酸性 pH 培養基에서, 64株(20.6%)는 pH 4.85~5.05에서, 35株(11.3%)는 pH 5.05에서만 發育하였고 나머지 42株(13.5%)는 試驗된 酸性培養基에서 모두 자라지 않았다(Table 2). 3個 酸性培地에 모두 자란 菌을 對象으로, 各 pH別 PZase 試驗과 感受性檢査 結果를 比較해보면(Table 3), 6週 判定時 다른 3個 酸性培地에서 全部 感受性이었던 121個 菌中 101株(83.5%)가 PZase 陽性, 20株(16.5%)가 陰性이었고, 3個 酸性 pH에 耐性이었던 30個 菌中에 6株(20%)가 PZase 陽性, 24株(80%)가 陰性이었다. 낮은 pH 培地에서는 感受性이나 높은 pH에서 耐性이었던 菌中 PZase 陽性菌은 10株,

Table 5. Comparison of the results of pyrazinamide sensitivity tests with those of pyrazinamidase tests. The strains used are from patients who have chemotherapy history of PZA more than 6 months

Sensitivity test results	Number of patients tested	Pyrazinamidase test	
		Positive	Negative
Resistant at three pHs(4.65~5.05)	18	0	18
Resistant at pH 4.85 or higher(Sensitive at pH 4.65)	5	1	4
Resistant at pH5.05(Sensitive at pH 4.65~4.85)	2	0	2
Total	25(100.0%)	1(4.0%)	24(96.0%)
Sensitive at three pHs(4.65~5.05)	12(100.0%)	8(66.7%)	4(33.3%)

Table 6. Comparison of pyrazinamide sensitivity tests with pyrazinamidase activities on bacilli excreted from patients who have no previous chemotherapy

Pyrazinamidase test			
Sensitivity tests (preinspissation pH 4.85)	Positive	Negative	Total
Sensitive	148(91.9%)	13(8.1%)	161(100.0%)
Resistant	0	15(100.0%)	15(100.0%)
Total	148(84.1%)	28(15.9%)	176(100.0%)

陰性菌은 8株였다. Table 4에서 보는 바와 같이 試驗된 3個 酸性培地의 一部 또는 全培養基에서 菌이 發育되지 않았던 菌은 141株였다. 그中 pH 4.85~5.05에서의 發育菌은 64株로서 pH 4.85以上인 培養基에서 耐性이었던 菌의 85.7%는 PZase 陰性으로, pH 4.85以上에서 感受性이었던 菌의 84.9%는 PZase 陽性이었다. pH 5.05에만 發育했던 35株中 PZA 耐性인 11株 中 7株(63.6%)가 PZase 陰性으로, 感受性 24株中 66.7%(16株)는 PZase 陽性이었다. 한편 PZA를 6個月以上 服藥한 患者 37名에 대해, PZA 感受性檢査와 PZase 試驗을 실시한 結果, Table 5에서 보는 바와 같이 試驗된 3個의 酸性 pH 中 적어도 한 濃度以上에서 耐性으로 判讀되었던 25株中 96%가 PZase 陰性이었고 PZA 感受性이었던 12株中에서는 8株(66.7%)만이 PZase 陽性이었다. 服藥歴이 없던 患者로부터 分離된 176株에 대해 옹고전 pH 4.85의 培地에서 感受性檢査를 實施, 6週에 培養判定하고 그 結果를 PZase 試驗과 比較한 것이 Table 6인데, PZA 感受性인 161株中 148株(91.9%)가 PZase 陽性이었고 耐性이었던 15株는 모두 PZase 陰性으로 나타났다.

IV. 考 察

구조를 가진 化合物에 대한 研究過程에서 얻어진 것이 나^{3,12)}, 그 合成方法은 이미 1939年以前에 알려져 있었다¹³⁾. McDermott 等(1954年)¹³⁾에 의해 처음으로 PZA가 酸性培地에서 抗菌作用이 있음이 밝혀졌고, 이어 Mackaness(1956年)¹⁴⁾가 中性培地에서는 抗菌作用이 없던 PZA가 試驗管에 遊離된 monocytes 內 菌에 대해서는 抗菌力이 있음을 보임으로서 PZA 藥理機轉의 이해에 큰 도움을 주게 되었다. 또 Konno 等¹⁵⁾은 PZA 活性物質이 amide 分解產物인 pyrazinoic acid임을 증명하였으나 mouse 실험결과에서는 pyrazinoic acid가 PZA 投與時처럼 抗菌作用을 나타내지 않음을 觀察하였다. 이는 胃腸管內 吸收差와 動物體內에서의 不活化에 起因하는 것으로 보았는데, 즉 monocyte cell membrane 內로의 透過力은 pyrazinoic acid 보다 PZA

쪽이 높으며, 투여된 대부분의 pyrazinoic acid는 monocyte 外에만 머물게 되므로 細胞內菌(intracellular bacilli)에는 作用이 어려운 反面, PZA는 monocyte를 투과하게 되므로 細胞內菌의 amidase에 의해 deamidation이 일어나며, 이때 生成된 pyrazinoic acid가 菌에 直接 作用할 수 있게 되고, 한편으로는 monocyte 內의 낮은 pH가 pyrazinoic acid의 抗菌力 발휘에 좋은 조건을 제공하는 것으로 說明하였다. 잘 알려진 바와같이, macrophages의 phagolysosomes 內 환경은 pH 3.0수준의 酸性이기 때문이다¹⁵⁾. 한편, pH 7일 때의 시험균내 菌發育抑制濃度を 基準한다면, PZA 1人 1日 最大許容量(3g)의 約 5~8배는 투여해야만 有効血中濃度에 도달할 것으로 생각되나, pH가 5~6일 때를 基準한다면, 最大許容量內에서도 충분히 有効血中濃度에 도달할 수 있음도 밝혀졌다¹⁶⁾. 이와같은 事實들로부터 PZA는 酸性 pH에서만 活性를 가졌음을 알게 되었고 어느 범위의 酸性培地에서 PZA 藥劑感受性檢査를 실시해야 좋을지도 알게 된 셈이다. 그런데, 英國이나 南部인도 및 中國人(Hong-Kong) 結核患者들로부터 分離된 結核菌은 대부분이 凝固前 pH가 4.85인 培地에 잘 發育함에 비해, Africa의 Uganda 地域 患者들로부터 分離된 結核菌은 이보다 약간 높은 pH 4.95의 培地에서 發育이 잘 되었다는 보고가 있는데¹⁷⁾, 이것은 地域別로도 菌의 特性이 다르므로, 각 나라마다 적합한 酸性培地를 사용해야함을 示唆하는 것이라 하겠다. 母集團의 選定과 檢査方法의 標準化가 되어 있지 않으므로 直接 比較는 어려우나, McClatchy 等¹⁰⁾은 응고후 pH 5.5인 7H10 agar 培地에서 236株를 시험한 결과 46株(19.8%)가 發育하지 않았다고 報告했으며 Mitchison은 Löwenstein-Jensen 培地를 이용한 시험에서 시험균 1196株中 338株(28.3%)가 응고전 4.85 이하인 培地에서 자라지 않았음을 報告했는데¹⁸⁾, 韓國人結核患者由來菌은 pH 4.85인 L-J 培地에서 24.8%가 자라지 않아(Table 2), 後者の 報告와 大同小異했다. 試驗 結果에서 본 바대로 同一 菌에서도 使用菌의 年齡, 接種菌量, 培養期間에 따라 各種 酸性培地에서의 發育과 PZA 感受性 樣相이 달라지므로, 檢査對象인 모든 菌을 感受性 또는 耐性으로 再現可能하게 正確히 區分할 수 있는 單一한 方法은 없을 것이다. 그러나 現在 感受性檢査方法上 문제점들을 再檢討하므로서 더욱 精確도와 再現성이 높은 檢査 結果를 얻을 수 있도록 感受性檢査方法을 標準化하고 補定함은 가능하리라 보고한다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이, 여러 酸性 pH 培地上的의

菌發育樣相은 指數增殖期の 菌을 使用할 때가 대체로 發育이 良好한 편이었으며, 接種菌量도 菌發育에 다소 영향을 주었다. 接種菌量이 PZA 感受性樣相에 미치는 영향이 크다는 사실은 Fig. 2에서 잘 說明되고 있다. 응고전 培地의 pH가 5.0 이내이면 對照培地外에서는 菌이 자라지 않았으나, 응고전 pH 5.2이상(응고후 pH 5.7)인 藥劑含有培地는 그 pH에 따라 感受性樣相이 전혀 달라지는데, 이것은 응고전 pH 5.2이상인 培養基에서 感受性檢査를 실시할 수 없음을 의미한다. 이때문에 PZA 活性이 消失되지 않는 범위내에서 pH를 올리므로서 非發育菌數를 줄이고, 過多接種으로 인한 偽耐性이나 不分明한 耐性表現을 排除할 수 있도록 接種菌量도 調整함이 중요하다. 試驗 結果에 의하면, 응고전 pH 5.0범위의 培地에 10^{-3} mg을 接種한다면 그러한 目的에 잘 부합될 것으로 생각되었다. 또 Fig. 3에서 보듯이, 응고전 培地의 pH 5.0이내에서는 培養期間을 8週이후까지 연장하여도 感受性樣相에는 變함이 없음을 보아, 일단 酸性 對照培地에서만 菌이 자라면 耐性 또는 感受性 區分이 가능할 것으로 보였다. 絕對濃度法에 의해 判定基準을 設定한 PZA 外의 抗結核劑에 대한 感受性檢査時는 最終接種菌數가 $2 \times 10^3 \sim 10^4$ 이상 되도록 調整하여 基準濃度에서 菌集落이 20개이상 發育時 耐性으로 判定하는 것이 常例다²³⁾. 그런데, PZA 感受性檢査時에는 응고전 pH 5.0이내인 酸性培地에 菌을 接種하므로, 中性培地에 비해 적어도 1/2이상 菌集落數가 減少하고(pH 5.5의 1% Ogawa 培地는 pH 6.8인 1% Ogawa 培地를 쓸 경우에 비해 1/3~1/4¹⁹⁾ 혹은 1/3~1/10²⁰⁾로, 응고전 pH 4.85인 Löwenstein-Jensen 배지라면 約 1/2²¹⁾로 減少한다고 報告), 過量 接種하게 되면 培地의 alkali 化로 PZA의 活性이 떨어질뿐 아니라 自然耐性菌의 分布(1.1×10^3)²²⁾가 높아진다. 그러므로 10^{-3} mg을 接種하여 해당 약제농도에서 10개이상 菌集落이 形成되면 그 濃度에 耐性으로 判定하였다. 感受性檢査의 判定基準濃度는 本試驗 結果나 여러 資料들^{17, 18, 20~23)}을 고려, 凝固前 pH 5.0이내인 酸性培地에서 10^{-3} mg의 菌을 接種, 培養 6週에 PZA 100 mcg/ml 含有 培地에 菌集落이 10개이상 形成되면 耐性으로 判定함이 적합한 것으로 보았다. 그런데 Table 1에서와같이, 菌에 따라서는 比較의 낮은 酸性培地에서도 中性培地에서 培養될 때처럼 잘 자라는 菌과 反面에 發育되지 않는 菌이 있고, 僅少한 pH 差에 따라서도 耐性表現이 다른 菌들이 있기 때문에 未知의 菌에 대한 PZA 感受性檢査는 배양 6주면 대부분의 菌이 자랄 수 있는 pH로부터 PZA 活性이 維持되는 범위내의

pH 까지 몇 단계로 區分하여 菌發育樣相과 耐性傾向을 比較할 必要가 있었으므로, 응고전 pH 4.65(응고후 pH 4.96 $\pm$ 0.04), 4.85(응고후 pH 5.21 $\pm$ 0.04), 5.05(응고후 pH 5.41 $\pm$ 0.03)의 세가지 酸性培地에서 同時에 感受性檢査를 실시하였고 PZase 活性試驗도 並行하였다. McClatchy 等¹⁰⁾의 報告에 의하면, TLC(Thin layer chromatography)에 의한 PZase 活性試驗 結果, 服藥歴이 없었던 菌陽性 結核患者由來菌 52株中 48株(92.3%)가 PZase 陽性, 服藥歴이 있던자로부터 分離된 34個菌株中에서는 31株(91.2%)가 PZase 陰性이었다. 또 TLC 陽性 199株中 194株(97.5%)가 Wayne의 簡易法¹¹⁾에서 PZase 陽性으로, TLC 陰性이었던 63株中의 55株(87.3%)는 PZase 陰性이었다고 했다. Wayne 法은 接種菌量이 過多하므로, 대다수가 耐性인 菌集團內에 少數의 感受性菌만 포함되어도 陽性反應을 보일 가능성이 있겠으나 TLC와 Wayne 法間 一致率이 높고 患者의 服藥歴과도 잘 符合되었으므로, 두 檢査法이 모두 PZA의 耐性和 感受性菌의 區分에 間接적으로 쓰일 수 있는 좋은 方法으로 생각되었으며, TLC 法에 비해 Wayne 法이 매우 간편하므로 本試驗에서는 이 方法으로 PZase 活性를 측정하도록 하였다. Table 3, 4에 나타난 바와 같이, 藥劑感受性檢査 結果, 試驗된 全 pH에서 感受性이었거나 또는 耐性이었던 菌에서는 PZase 試驗 結果와의 一致率이 80%以上 높았다. Mitchison에 의하면 感受性檢査時 各기 다른 酸性培地에서의 耐性表現이 다를 때는 가장 낮은 pH 培地上 菌發育을 기준하여 耐性여부를 判定함이 타당하다고 했으나¹²⁾ 本研究 結果에 의하면 그럴 경우 PZase 試驗과 感受性檢査 結果가 一致되지 않는 경우가 많았는데, 어느쪽이 正確도가 더 높은지는 알 수 없다. 그러나 PZA 服藥歴이 6個月 이상되는 患者由來菌들을 대상으로 PZase 試驗과 感受性檢査 結果를 比較해 보면(Table 5) 試驗된 37株에 대한 感受性檢査에서 세가지 pH에서 모두 耐性인 菌이 18株이고, 모두 感受性인 菌은 12株였는데, Mitchison의 주장대로 높은 pH에서는 耐性이나 낮은 pH에서는 感受性인 菌 7株를 모두 感受性菌으로 간주한다면 治療歴으로 볼 때 모순이 많고, 오히려 PZase 結果로 보면 그중 6株를 耐性으로 分類함이 훨씬 더 타당함을 알 수 있다. 즉 높은 pH를 기준하여 그 7株를 耐性으로 判定하고 여기에 모든 pH에 耐性이었던 18株를 合한다면, 感受性檢査上 耐性菌과 PZase 試驗 結果間 一致率은 96%에 달하였다. 한편, Table 6에서 보는 바와 같이, 服藥歴이 없는 患者들로부터 分離한 菌 176株들에 대한 感受性檢査와 PZase 試驗結果를 比較

해보면, PZA 感受性이었던 161株中 148株(91.9%)가 PZase 陽性으로 나타나, 一致率이 매우 높았다. 患者의 服藥歴有無에 근거하여 두 檢査의 正確도를 比較한다면 感受性인 者를 感受性으로 判定해 주는 敏感度는 PZase 檢査가 84.1%인데 비해, 感受性檢査는 91.5%였고($p>0.01$) 耐性인 者를 耐性으로 區分하는 能力은 PZase 檢査가 75.7%인데 비해 感受性檢査는 67.6%($p>0.05$)로 服藥歴을 근거로 두 檢査方法間 優劣를 比較하면 統計學的인 有意한 差는 없었다. 그런데, 接種菌, pH 등에 따라 pyrazinoic acid 生産量이 달라질 수 있을 것이므로, 試驗管內 PZase 試驗結果의 해석도 單純하지만은 않은 것으로 본다. Toida에 의하면⁸⁾ PZA deamidation은 使用된 buffer의 pH에 따라서도 差가 생기나(phosphate buffer는 pH 7.3, Tris buffer에서는 pH 7.8이 最適), 항상 alkali 쪽에서 현저하다고 하였다. 그러므로 pyrazinoic acid의 活性는 酸性쪽에서 나타나지만, PZA deamidation은 alkali 쪽에서 유리하며 이 때문에 酸性培地를 使用하는 感受性檢査보다 中性상태에서 실시되는 PZase 試驗에서 더 많은 pyrazinoic acid가 生産될 가능성이 크다. 따라서 pyrazinoic acid의 活性가 維持되는 범위내라면 가능한 높은 pH의 培地에서 PZA 感受性檢査를 실시함이 PZA deamidation에 유리할 듯하며, 酸性培地에서 PZA 耐性인 菌株라도 PZase 試驗에서는 陽性일 가능성이 있다. 또 PZase 試驗時는 接種菌量이 過多하므로 耐性菌集團內 一部 感受性菌에 의해서도 陽性으로 나타날 수 있고, 또 소위 非定型抗酸菌中에서도 많은 菌이 PZase 活性는 있으나 PZA 感受性檢査時는 耐性을 나타냄을 보아, 菌種에 따라서는 pyrazinoic acid가 菌發育을 억제할 수 없음도 알 수 있다. 이상과 같은 조건 아래서는 耐性菌도 PZase 陽性으로 나타나게 될 것이다. 反對로 PZase 檢査時 活性가 저하된 菌의 使用, 接種量의 不足等, 주로 檢査 過程上 缺陷이나, PZase 反應을 보이지 않을만큼 少量 生産된 pyrazinoic acid에 의해서도 感受性인 菌, 感受性檢査用 酸性培地에서는 없던 어떤 PZA deamidase 抑制物質이 PZase 試驗時 作用하는 경우等에서는 PZA 感受性菌이라도 PZase 試驗에서는 陰性으로 될 것이다. 특히 근소한 pH 差에서도 민감하게 耐性變化를 보인 菌에서 感受性檢査와 PZase 檢査 結果사이에 不一致率이 높은 것도 이러한 여러 要因들때문인 것으로 생각된다. 따라서 PZA 感受性檢査나 PZase 試驗이 모두 缺點을 가진 試驗管內 成績이므로 生體內 菌에서도 그대로 적용될지는 미지이나, 두 檢査方法은 充分히 補完的 역할

을 할 수 있을 것으로 보였다.

V. 結 論

PZA 有効成分인 pyrazinoic acid의 活性은 菌이 자라기 힘든 酸性狀態에서만 維持되므로, PZA에 對한 感受性檢査는 酸性培養基에서 실시되어 왔으며 이 때문에 菌의 培養이 어려웠을 뿐아니라 培養期間을 延長하므로써 檢査結果를 얻기까지도 오랜 時間을 要하였다. 또한 菌에 따라서는 pH 別로도 耐性樣狀이 크게 달라고 結果의 해석이 곤란하였다. 이러한 短點 때문에 PZA 感受性檢査는 問題視되어 왔다. 이를 극복하기 위해, 현재까지 실시되어 오던 檢査方法上的 모든 문제점들을 再檢討하고 PZA deamidation 酵素의 活性을 測定하는 方法을 통해 現在 檢査方法의 補完이 가능한 方法을 檢討하였다. 結果를 要約하면 다음과 같다.

1) 指數增殖期の 發育이 旺盛한 菌을 接種에 使用했을 때에 酸性 pH에서의 發育이 良好한 편이었다. 試驗菌 310株中 pH 4.65, 4.85, 5.05의 酸性培地에서 모두 發育하지 않았던 菌은 13.5%(42株)였다.

2) 응고전 pH 4.8일 경우에는 接種菌量에 관계없이 感受性を 維持하였으나, pH 5.0에서는 接種菌量이 많으면 感受性菌도 PZA 含有培地에서 發育하였으며 pH가 그 이상으로 증가하면 接種菌量에 관계없이 PZA가 高濃도로 含有된 培地에서도 증식하였다. 또한 pH 5.0이하인 培養基에서는 培養 8週까지도 感受性 樣相에 變化가 없었으나, pH 5.2가 되면 感受性인 菌도 培養 2週부터 PZA가 高濃도로 含有된 培地에서 發育하였다.

3) PZA 服藥歴이 없는 患者들로부터 分離된 176株中 84.1%(148株)가 PZase 陽性이었고, 이들은 모두 응고전 pH 4.65, 4.85, 및 5.05인 培養基에서 실시된 PZA 感受性檢査에서도 感受性を 보였다. 한편, 感受性檢査에서 PZA 感受성이었던 菌은 161株(176株中 91.5%)로써 이중 148株(91.9%)는 PZase 陰性이었다. 服藥歴이 없는 患者들에 대한 PZase와 感受性檢査 方法間 有意한 差는 없었다($p>0.01$).

4) PZA를 6個月以上 使用한 37名の 結核患者로부터 分離한 菌中 PZase 陰性菌은 28株(75.7%)였고 感受性檢査結果 耐性菌은 25株(67.6%)로, 두 檢査方法間에도 有意한 差는 없었다($p>0.05$). 그러나 最低發育 pH를 基準하면 耐性이었던 25株中 7株가 感受性으로 判讀되므로 18株(48.6%)만이 耐性菌이 되어 服藥歴과의 一致率이 매우 낮아졌다. PZase 試驗을 基準으로 耐性

與否를 決定한다면, pH 差에 의한 耐性變動은 防止될 수 있을 것으로 보였다.

5) 응고전 pH 4.65, 4.85, 5.05의 酸性培地에 10^{-3} mg을 接種하여 6週 培養時, 一部 酸性培地에서 發育치 않던 發育不良菌 141株中 응고전 pH 4.85와 5.05에서 感受성이었던 53株의 84.9%(45株)는 PZase 陽性이었으며 耐性으로 判讀된 7株中에서는 6株가 PZase 陰性이었다. pH 5.05에서만 자랐고 感受성이었던 24株中 16株(66.7%)가 PZase 陽性이었으며, 試驗된 모든 酸性培地에서 자라지 않아 感受性檢査가 不可能했던 42株中 27株(64.3%)가 PZase 陰性이었다. 發育良好菌中 試驗된 3個 pH에서 모두 感受성이었던 121株의 83.5%(101株)가 PZase 陽性이었고 3個 pH에서 모두 耐성이었던 30個 菌中에서는 80.0%(24株)가 PZase 陰性이었다.

參 考 文 獻

- 1) Dessau FI, Yeager RL, Burger FJ, and Williams JH: Pyrazinamide(Aldinamide) in experimental tuberculosis of guinea pig. Amer. Rev. Tuberc. 65 : 519~522, 1952.
- 2) Yeager RC, Munroe WGC, and Dessau FI: Pyrazinamide(Aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. Amer Rev Tuberc 65 : 523~546, 1952.
- 3) Malone L, Schurr A, Lindh H, McKenzie D, Kiser JS, and Williams JH: The effect of pyrazinamide(alidinamide) on experimental tuberculosis of white mice. Amer Rev Tuberc 65 : 511, 1952.
- 4) Solotrovsky M, Gregory FJ, Ironson EJ, Bugie EJ, O'Neil RC, and Pfister K, 3rd: Pyrazinoic acid amide—an agent active against experimental murine tuberculosis. Proc Soc Exp Biol Med 79 : 563, 1952.
- 5) McDermott W and Tompsett R: Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro. Amer Rev Tuberc 700 : 748~754, 1954.
- 6) Konno K, Feldmann, FM, and McDermott W: Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Amer Rev Respir Dis 95 : 461~469, 1967.

- 7) Aoki T, Nishio K, and Ito F: Study on the metabolic fate of pyrazinamide: on the formation of pyrazinoic acid by liver homogenate. *Kekkaku* 32 : 469, 1957.
- 8) Toida I: Pyrazinamide deamidase in tuberculosis infection. *Amer Rev Resp Dis* 107 : 639, 1973.
- 9) Toida I: Metabolism of pyrazinamide: pyrazinamide deamidase of animal tissues. *Amer Rev Resp Dis* 107 : 630, 1973.
- 10) McClatchy JK, Tsang AY, and Cernich MS: Use of pyrazinamidase activity in *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 20(4) : 556~557, 1981.
- 11) Wayne LG: Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Amer Rev Respir Dis* 109 : 147~151, 1974.
- 12) Kushner S, Dalalian H, Sanjurjo JL, Bach FL, Jr, Safir SR, Suith VK Jr, and Williams JH: Experimental chemotherapy of tuberculosis. II. The synthesis of pyrazinamides and related compounds. *J Am Chem Soc* 74 : 3617, 1952.
- 13) Dalmer O and Walter E: Derivatives of pyrazine carboxylic acid and process for their production, German Patent 632257(1936); US Patent 2149279(1939)(Cited in Youman's Tuberculosis, 1979).
- 14) MacKanness GB: The intracellular activation of pyrazinamide and nicotinamide. *Amer Rev Tuberc* 74 : 718~728, 1956.
- 15) Grosset J: Bacteriological basis of short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine* 1(2) : 231~241, 1980.
- 16) Youman GP: Tuberculosis. WB Saunders Company, Philadelphia, p.440, 1979.
- 17) Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N, and Smelev NA: Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull Wld Hlth Org* 41 : 21~43, 1969.
- 18) Mitchison DA: Personal correspondence, September 11, 1979.
- 19) Sawai T: Examination for pyrazinamide-resistant tubercle bacilli. First report: Examination by usual media and media of pH 5.5, *Kekkaku* 34(7) : 493~497, 1959.
- 20) 小川辰次: 結核菌の耐性検査とその注意. 結核研究の進歩, 第30號別冊, p.9. 醫學書院, 東京, 1951.
- 21) Tripathy SP, Mitchison DA, Nair NGK, Radhakrishna S, and Subbammal S: A comparison of various measures of sensitivity of *M. tuberculosis* to pyrazinamide. *Tubercle* 51 : 373~387, 1970.
- 22) The committee on the treatment of the International Union Against Tuberculosis: The chemotherapy of tuberculosis: considerations on antituberculosis drugs and recommendations on chemotherapy regimens. IUAT, Mexico, September, 1975.
- 23) Canetti G, Froman S, Grosset S, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, Meissner G, Mitchison DA, and Sula L: Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull Wld Hlth Org* 29 : 565~578, 1963.
- 24) Kleeberg HH and Gatner EMS: A simplified standard method for testing the drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*: A report on a international collaborative study. IUAT Committee on Bacteriology and Immunology manuscript, Oct. 1979.
- 25) Stottmeier KD, Beam RE and Kubica GP: Determination of drug susceptibility of mycobacteria to pyrazinamide in 7H10 agar. *Amer Rev Respir Dis* 96 : 1072~1075, 1967.