

Exploitation of Culture Medium for *Mycobacterium tuberculosis*

Hyejin Kim and Sungweon Ryoo*

Korean Institute of Tuberculosis, Osong, Chungcheongbuk-do, Korea

The culture media for *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) were contrived from both egg-based and agar based ingredients. In 1903, Dorset introduced the first egg-based medium. It was followed by the invention of Löwenstein-Jensen and Ogawa media that contain whole eggs as nutrient and malachite green to inhibit the growth of contaminants. These media have been used worldwide for their usefulness and inexpensiveness. However they have a fundamental disadvantage that the cultivation time for mycobacterial growth takes more than 4 weeks. In 1947, Dubos introduced the first agar medium and followed by the invention of the 7H10 by Middlebrook and Cohn. A powder base of these media contains agar, combination of seven salts, L-glutamic acid, pyridoxine, biotin, and malachite green. This requires the addition of the oleic acid, albumin, dextrose, and catalase (OADC) growth supplement. BACTEC MGIT960 has recently been introduced for rapid cultivation of MTB, which is fully automated liquid culture system with modified 7H9 broth. Agar-based medium developed by Middlebrook has a number of advantages over egg-based medium. One of them is transparency, which enables earlier detection of growing colonies. The major disadvantages of agar media are the high cost of OADC and the need for a CO₂ incubator. In conclusion, there is a need for a new agar medium, which can be produced at a lower cost and earlier growth detection. In this review, we introduced the growth promoting factors which can be used as an alternative new growth supplement, cAMP and resuscitation-promoting factor (Rpf). These factors may abrogate a lag in adaption of the bacilli in culture media.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Löwenstein-Jensen, Ogawa, 7H10, Growth promoting factor

서 론

세계적으로, 결핵은 감염성 질환 중 AIDS에 이어 성인 사망 원인의 두 번째를 차지하고 있는 심각한 질환 중 하나이다. 2010년 세계보건기구(WHO)의 보고에 따르면 2009년 한 해 동안 200여개 국가로부터 신고된 결핵환자 중 신환자가 약 450만 명이며 이 중 전염성이 높은 도말 양성 신환자는 약 200만 명에 달하고 있다 (1). 이 수치는

세계보건기구에 신고된 수치만을 기준으로 산정한 것이므로 실제 신고되지 않았거나, 결핵환자의 파악이 어려운 저개발 국가들의 상황을 고려한다면, 그 수치는 더 높을 것으로 추정된다. 2009년, OECD에 가입한 30개 국가의 결핵발생률 및 사망률(10만 명당) 자료를 보면, 우리나라는 OECD 가입국 중 인구 10만 명당 발생률 90명, 사망률 8.3명으로 가장 높은 수치를 보이고 있다 (1).

2009년 1월 1일부터 12월 31일까지 1년간 전국의 보건소와 민간 병·의원에서 결핵정보감시체계에 신고된 결핵 사례를 보면, 결핵환자는 총 47,302명(인구 10만 명당 97.0명)으로 전년 대비 3,128명이 증가하였고, 이 중 폐결핵환자는 38,950명(인구 10만 명당 79.9명)으로 전체 신고환자의 82.3%를 차지하였으며, 폐외결핵환자는 8,352명(인구 10만 명당 17.1명)으로 전체 신고환자의 17.7%였다. 폐결핵환자 중 도말양성 환자는 15,763명(인구 10만 명당 32.3명)으로 전체 신고환자의 33.3%였고, 환자유형별로

Received: November 25, 2011/ Revised: December 3, 2011

Accepted: December 5, 2011

*Corresponding author: Sungweon Ryoo, Korean Institute of Tuberculosis, Mansu-ri 482, Gangoe-myeon, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do, 363-954, Korea.

Phone: +82-43-249-4948, Fax: +82-43-249-4989

e-mail: scientist1@empal.com

**This research was supported by Basic Science Research Program through NRF funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2011-0027094).

신환 35,845명(75.8%), 재발 5,624명(11.9%), 기타 2,802명(5.9%), 전입 1,775명(3.8%), 중단 후 재등록 869명(1.9%) 등 이었다. 환자 등록 유형별 추이를 보면 2009년 신고 신환자는 10만 명당 73.5명으로 2001년 72.1명보다 증가하였으며, 재발, 초기치료 실패, 중단 후 재등록, 전입은 2001년에 비해 감소하는 추세를 보이고 있다 (2).

이와 같은 우리나라의 결핵실태를 조기에 개선하기 위해 기존의 '2030 결핵퇴치 계획'을 10년 앞당겨 2020년 선진국 수준으로 결핵 발병률을 낮추기 위한 정부의 '결핵퇴치 2020 계획'이 발표되었으며 이 계획을 성공적으로 완수하기 위해 결핵예방접종, 적절한 약제 치료 등은 강화되었지만, 효과적인 결핵관리를 위한 가장 필수적인 노력은 결핵의 정확한 진단이라고 할 수 있다. 미생물학 실험실에서의 결핵진단의 핵심은 임상분리 검체에서 결핵균을 직접 발견하는 것이라고 할 수 있는데, 가장 저렴한 비용으로 광범위하게 사용되고 있는 객담도말 검사의 경우 민감도(30~85%)가 검사자의 숙련도에 따라 차이가 있고, 결핵균 배양검사의 경우 6주 이상의 시간이 소요되기 때문에 조기진단에 어려움이 많다. 특히 모든 결핵진단의 기본이 되는 결핵균 배양을 신속하게 진행하기 위해서는 현재 사용하고 있는 결핵균용 고체 및 액체배지의 성능을 획기적으로 개선시킬 수 있는 방안이 마련되어야 한다는 요구가 지속적으로 제시되고 있다. 본 논문에서는 현재 사용하고 있는 결핵균 전용배지들의 개발 역사와 각 배지의 특성에 대해 알아보고, 향후 결핵균 전용배지의 개발 방향에 대해 살펴보고자 한다.

본 론

1. 결핵균 전용배지의 개발 역사와 특성

1) 배지 개발 초기단계

1882년 Robert Koch가 세계 최초로 슬라이드 글라스 위에 혈액을 응고시켜 결핵균 순수 배양에 성공하였고, 그 후 peptone, salts, glycerol 등을 포함시킨 petri-dish를 사용하여 편의성과 안전성을 증가시킨 "plate technique"이라고 명명된 배양방법을 개발하였다 (3). 약 20년 후인 1902년 미국농림부(US Department of Agriculture) 소속의 과학자인 Dorset에 의해 결핵균의 성장에 필요한 beef extract, organic phosphate, 달걀 등을 주성분으로 하는 Dorset's egg medium이 개발되었다 (4). 1908년부터는 소(牛)의 폐하에 Tuberculin을 접종하여 가축용 소의 결핵 감염 여부를 판

정하는 우결핵 관리가 시작되었는데, 당시 개발되어 있는 배지들은 우결핵 진단 시 비특이적 반응이 나타나는 큰 문제점을 안고 있었다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 1934년 Dorset은 결핵균이 증식하는데 필요한 질소원으로 사용되는 beef extract 대신 asparagine을 첨가하여 비특이적 반응을 최소화한 배지를 개발하여 사용하였다 (5). 그 후에도 egg-based 배지는 지속적으로 개량되어 현재 널리 사용되고 있는 Löwenstein-Jensen (L-J) 배지, Ogawa 배지에까지 이르게 되었다. 현재 우리나라에서는 결핵균의 배양과 약제감수성검사에 Ogawa 배지와 L-J 배지를 널리 사용하고 있다.

2) Egg-based 배지

L-J 배지와 Ogawa 배지의 개발 배경을 살펴보면, Löwenstein, Sonnenschein, Hohn 등의 미생물학자들은 결핵균 이외의 다른 미생물의 성장을 억제하기 위해 Dorset's 배지에 Congo red와 malachite green 등을 첨가하여 사용하였다 (6~8). 1932년 Jensen은 기존의 Löwenstein 배지 성분에 citrate와 phosphate 함량을 늘리고, Congo red를 첨가하지 않는 대신 malachite green 성분 함량을 추가하는 방식으로 배지를 개량하였는데 (9), 이러한 과정을 거쳐 현재 우리나라뿐만 아니라 전세계적으로 널리 사용되고 있는 L-J 배지가 탄생하게 되었다. L-J 배지의 주성분은 Table 1과 같다 (10). 그 후 1949년 일본의 Ogawa 박사는 L-J 배지에서 탄소원으로 사용되는 성분인 asparagine 대신에 가격이 저렴한 sodium glutamate를 첨가한 Ogawa 배지를 개발하였다. Ogawa 배지의 주성분은 whole egg와 탄소원인 sodium glutamate, 그리고 잡균의 오염을 제거하기 위한 2% malachite green 등으로 이루어져 있고, KH_2PO_4 를 이용하여 배지의 pH를 6.8로 조정하였다. 현재 결핵 환자의 객담 검체에서 결핵균을 분리 배양하는 과정에서는 L-J 배지보다 개량된 Ogawa 배지를 주로 사용하고 있는데, 그 이유는 개량형 Ogawa 배지나 Acid-buffered Ogawa 배지의 경우 강염기로 탈오염 처리된 객담 검체를 바로 사용할 수 있기 때문이다. 개량형 Ogawa 배지는 탄소원인 sodium glutamate와 malachite green 함량을 높였으며, 배지의 최종 pH는 6.2로 조정하였다. Acid-buffered Ogawa 배지는 magnesium citrate를 추가적으로 첨가하였는데 배지내의 Mg^{2+} 이온은 결핵균이 산에 대한 스트레스를 극복하는데 꼭 필요한 요소로 작용하게 된다 (11). L-J 배지와 마찬가지로 Ogawa 배지도 80℃ 이상의 inspissator에서 45분간 가열하여 배지를 응고시키는

Table 1. Composition of both Löwenstein-Jensen and Ogawa medium

Löwenstein-Jensen medium	Ogawa medium
Potassium dihydrogen phosphate anhydrous	Potassium dihydrogen phosphate anhydrous
Asparagine	Sodium glutamate
Magnesium citrate	Malachite green
Magnesium sulfate	Homogenized whole eggs
Glycerol	
Malachite green	
Homogenized whole eggs	

데, 가열 온도가 배지의 품질을 결정하는 주요 요인으로 작용하게 된다 (10). Ogawa 배지의 주성분은 Table 1과 같다.

3) *Mycobacteria* 종별 배양용 배지

결핵균 이외에 *Mycobacterium* 속에 포함되는 여러 종이 밝혀짐에 따라 각각의 종의 성장조건에 맞는 배지의 개발이 이어졌다. 한 예로, 대부분의 *mycobacteria*는 L-J 배지에서 탄소원으로 glycerol을 사용하는데, *M. tuberculosis* complex (*M. microti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. tuberculosis*) 중에서 *M. tuberculosis*를 제외한 나머지 3종은 glycerol을 pyruvate로 전환시키는데 필요한 pyruvate kinase가 결여되어 있어 탄소원으로 pyruvate를 첨가해 줄 경우 더 높은 성장률을 보인다. 실험 목적으로 사용되고 있는 *M. bovis* 표준 균주는 glycerol이 있는 배지에서 *in vitro* passage를 통해 적응하여 일반적인 L-J 배지에서도 배양되지만, 우 결핵 발병률이 높은 나라에서는 검체를 L-J 배지에 바로 접종하면 *M. bovis*를 배양할 수 없는 경우가 종종 발생한다는 보고가 있다 (10). 이와 같은 단점을 보완하고 *M. bovis*를 정확하게 배양하기 위해 glycerol 대신 0.5% sodium pyruvate를 첨가하여 *M. bovis* 등이 잘 자랄 수 있는 Stonebrink 배지가 개발되었다 (12).

그 외에도 *M. fortuitum*, *M. abscessus* 등이 염성분을 좋아하는 성질을 이용하여 L-J 배지에 sodium chloride를 첨가한 배지가 개발되었다 (13). NTM (Non tuberculous mycobacteria) 감염이 늘어나고 있는 세계적인 추세를 감안할 때 결핵균을 포함하는 다양한 *mycobacteria* 종에 특이적으로 사용할 수 있는 전용배지의 개발이 요구되고 있다.

4) Agar-based 배지

Egg-based 배지 개발 이후, 1945년 Dubos와 Middlebrook은 결핵균의 집락 형태 관찰을 위해 agar-based 고체배지인 'Dubos Oleic Acid Albumin Agar'를 개발하였는데, 이 배지는 1958년에 Middlebrook과 Cohn에 의해 개발된 7H10 한천배지의 모체가 되었다 (14). 'Dubos Oleic acid albumin agar'의 주성분은 질소원으로 사용되는 peptone과 asparagine으로 구성되어 있으며, 배지의 pH는 disodium phosphate와 monopotassium phosphate를 이용하여 조절한다. 그 외에 성장촉진 인자로 Tween 80, oleic acid ester, bovine albumin 등을 첨가하는데, Tween 80는 계면활성제로 작용하여 결핵균을 확산시켜 성장을 증가시키는 동시에 탄소원으로서의 역할을 하고 (15), bovine albumin은 Tween 80에서 생성되는 독성물질인 free fatty acid 등을 중화하는 역할을 한다 (16, 17).

우무배지는 투명하여, 접종 후 2주 정도가 지나면 집락을 관찰할 수 있어서 기존의 egg-based 배지에 비해 획기적으로 결핵균의 배양기간을 단축시킬 수 있다. 기존의 배지는 배양기간이 6주 정도로 길기 때문에 배지에는 늙은 세포와 젊은 세포, 심지어 죽은 세포까지 섞여 있을 가능성이 높았지만, 'Dubos Oleic acid albumin agar' 배지는 접종 후 이 배지에서 자라는 균의 평균나이를 가늠할 수 있다는 장점이 있다.

이후 'Dubos Oleic acid albumin agar'는 BCG 백신 균주의 생존능력 측정이나 마우스 감염모델 실험 등에 널리 사용되었다. 이 배지가 개발될 당시 결핵균의 성장을 2주 만에 관찰할 수 있다는 사실은 획기적인 사건이었고, 이 배지가 개발된 몇 주 후에 *Time*지에 'The greatest contribution to TB research since Robert Koch first isolated the germ itself in 1882' 라는 제목으로 기사가 실리기도 하였다 (18).

5) Middlebrook 7H10과 7H11 agar

7H10 우무배지는 Middlebrook과 Cohn에 의해 결핵균의 성장을 촉진시키고 독성물질을 중화시켜주는 oleic acid와 albumin을 보강하여 개량한 배지다 (19). 이 배지는 결핵균이 자라는데 필요한 일곱 가지의 salts와 L-glutamic acid, pyridoxine, biotin, sodium citrate, malachite green이 포함되어 있고, sodium citrate를 첨가하여 salts의 흡수를 용이하게 하였다(Table 2). 그 이외에 탄소원인 glycerol과 결핵균 성장촉진 인자를 첨가한다. 현재 시판되고 있는 결핵균 성장촉진 인자는 sodium oleate, albumin (bovine,

Table 2. Composition of 7H11, 7H11 agar, and growth supplement

7H10 agar medium	7H11 agar medium	Growth supplement (OADC)
Ammonium sulfate	Pancreatic Digest of casein	Oleic acid
L-glutamic acid	L-Glutamic acid	Bovine albumin
Disodium phosphate	Disodium phosphate	Dextrose
Sodium citrate	Sodium citrate	Catalase
Monopotassium phosphate	Monopotassium phosphate	
Ferric ammonium citrate	Ferric ammonium citrate	
Magnesium sulfate	Magnesium sulfate	
Pyridoxine hydrochloride	Pyridoxine	
Biotin	Biotin	
Malachite Green	Malachite Green	
Glycerol	Glycerol	
Agar	Agar	
Calcium chloride		
Copper sulfate		
Zinc sulfate		

fraction V), dextrose, catalase (OADC) 등을 주성분으로 하고 있다 (20). 주성분 각각의 역할을 살펴보면, oleic acid는 결핵균의 대사작용에 이용되고, albumin은 독성물질로부터 결핵균을 보호하는 역할을 하며 dextrose는 에너지원으로 사용되고 catalase는 배지의 독성 peroxide를 분해하는 역할을 한다. 7H10 한천배지와 비슷한 시기에 7H9 액체배지가 개발되었는데, 7H9 액체배지는 7H10 한천배지의 성분 중 한천을 제외하고 대신에 결핵균 성장을 증진시키기 위해 polysorbate 80을 추가하였다 (21). 이어서 1968년에는, 성장조건이 까다로운 결핵균을 배양하기 위해 casein을 pancreatic digestion한 7H11 배지가 개발되었다 (22).

6) 자동 배양 시스템

최근 국내외적으로 사용이 급격히 증가하고 있는 BD (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD., USA)사의 결핵균 자동 배양 시스템인 BACTEC MGIT960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube)의 경우 개량된 7H9 액체배지를 기본으로 사용하고 있으며, L-J와 Ogawa 배지에 비해 배양기간을 단축시킬 수 있다는 장점이 있다. MGIT960에 사용된 배지는 7H9 broth base에 결핵균 성장촉진제인 oleic acid, albumin, dextrose, catalase, polyoxyethylene stearate (POES) 등을 첨가하였다. MGIT tube

속의 배지에는 10% CO₂가 함유되어 있으며, 항생물질 복합체인 PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Naladixic acid, Trimethoprim, Azolcillin)를 사용 전에 첨가하여 결핵균이 아닌 잡균의 성장을 억제한다. 이 시스템의 검출 원리는 호기성 세균인 결핵균이 자라면서 산소를 소비하게 되고, fluorescent indicator와 결합된 산소가 소모되어 quenching되면서 발색반응이 나타나며 이 발색반응이 자동 모니터링 장치에 전달된다 (23).

7) Agar-based 배지의 단점

7H10과 같은 고체배지를 이용하여 결핵균을 배양하면 전통적인 L-J 배지나 Ogawa 배지에서 보다 결핵균의 생육속도를 증가시킬 수 있다는 장점이 있지만, 7H10 배지를 사용할 경우 배양과정에서 CO₂를 공급해야 한다는 번거로움이 있다 (24). 7H10 배지는 pH 값이 6.6으로서 결핵균의 최적 성장 pH인 6.2보다 높은 편이다. 그리고 결핵균은 자라면서 암모니아를 생성하게 되는데 이로 인하여 배지 성분의 알칼리화가 더욱 심해지게 된다 (20). 7H10 배지에 접종된 결핵균의 성장을 극대화하기 위해서는 최적의 결핵균 성장 pH인 6.2를 유지시켜야 하는데, 이를 위해서 5~10%의 CO₂가 지속적으로 공급되어야 한다. 결핵균 배양 시험의 특성상 대부분 격리된 다수의 공간을 필요로 하는데, 현재의 결핵균 배양시설에 CO₂를

지속적으로 공급할 경우 적지 않은 시험비용의 증가가 우려된다.

2. 결핵균 성장촉진 인자 탐색

결핵균의 평균 세대기간은 12~24시간으로, 대장균과 같은 일반세균의 15분에 비해 훨씬 길다. 결핵균의 성장촉진을 위해 배지에 여러 영양분을 첨가하는 방법에는 한계가 있을 수 밖에 없다. 결핵균의 doubling time이 긴 이유는 다양한데, 그 중 몇 가지 주요 요인을 살펴보면, 첫 번째로 결핵균의 세포벽 성분을 들 수 있다. 결핵균의 세포벽은 대부분 지방 성분으로 구성되어 있어 세포벽을 통해서 영양물질을 받아들이는데 많은 제약을 받는다 (25). 두 번째는 결핵균의 전사과정 중 RNA chain 합성속도인데, 결핵균의 성장속도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 결핵균은 다른 세균에 비해 promoter 부분에 G+C 함량이 높아 결핵균의 전사속도는 대장균보다 보통 10배 정도 느리다 (26, 27). 전사시작 단계부터 나타나는 느린 반응은 결국 전체적인 전사과정에 영향을 주고 결과적으로 필요한 단백질의 합성도 지연되어 결핵균의 성장속도에 영향을 주게 된다 (28). 이와 같이 결핵균의 세대기간을 고려할 때, 균 성장을 촉진시키기 위해 기존의 배지에 여러 영양성분을 첨가하여 배양기간을 획기적으로 단축시키는 데는 한계가 있을 수 밖에 없다. 결핵균의 성장을 촉진시키기 위해서는 영양 성분의 첨가보다는 접종 초기에 결핵균의 배지에 대한 적응력이 더 중요하다. 결핵균이 새로운 배지 환경에 잘 적응하고 회복되어 안정된 상태로 얼마나 빨리 들어가는가가 중요하다. 따라서 영양성분의 공급뿐만 아니라 성장과정에서 최대한 유도기를 단축시킬 수 있는 성장촉진 인자를 발굴하는데 중점을 둘 필요가 있다. 한 예로, 기존의 성장촉진 인자 중에서 7H9 액체배지에 첨가되는 catalase는 배지의 독성 peroxide를 분해하여 결핵균 유도기를 단축시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 향후 발굴 가능한 성장촉진 인자 중 결핵균 전사조절 물질과 재활성화 인자에 대해 살펴보는 것도 중요하다.

1) 결핵균 전사조절물질

결핵균의 성장촉진을 위한 후보물질을 발굴하기 위해서는 스트레스 극복, 전사속도 조절 등과 관련된 물질에 관한 탐색이 필요하다. 결핵환자의 객담에서 결핵균을 분리 배양하기 위해서는 탈오염 제거과정을 거치는데 이때 결핵균은 강한 염기에 노출된다. 이러한 외부의 강한 스

트레스에 노출된 결핵균이 배양 초기에 안정화되어 성공적인 적응기에 접어들 수 있도록 하는 성장촉진 인자의 탐색이 필요하다. 개인적인 견해이지만, 결핵균이 세포 내에서 생존하는데 필요한 유전자 조절뿐만 아니라, starvation, 산성조건 등과 같은 극한 환경에 처해있을 때, 생존에 필요한 유전자 발현을 유도하는 전사조절인자의 작용을 유도하면 결핵균의 생존율을 높일 수 있고 생육에도 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다. 또한 이러한 전사조절인자는 결핵균의 전사초기단계에 영향을 줄 수 있는 물질로서 단백질의 합성이 촉진되고 외부의 영양물질을 최대한 흡수할 수 있게 되어 배지 상에서 결핵균의 성장속도를 촉진시킬 것으로 예상된다.

세포에서 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)는 pH, 산소농도 등 환경적인 변화를 인식하여 유전자 발현을 조절하는 second messenger로서 작용한다. 결핵균에서 cAMP의 역할을 알아보기 위해 배지에 dibutyryl cAMP를 첨가하고 glucose, albumin 등을 제한하여 배양했을 때, 영양결핍상태를 극복하기 위해 결핵균은 다량의 cAMP를 분비하여 결핵균의 전체적인 유전자 발현을 조절하는 것으로 밝혀졌다 (29). 특히 큰포식세포 내에서 결핵균은 저산소, 산성조건 (pH <4.5), 영양물질 부족 등의 극한 환경에 직면하게 되고 이를 극복하기 위해 결핵균은 cAMP 경로를 활성화하여 유전자를 조절함으로써 큰포식세포 내에서 생존할 수 있음이 보고되었다 (29~33).

이와 같이 cAMP는 결핵균이 큰포식세포 내에서 생존하는데 필요한 유전자 조절뿐만 아니라, starvation, hypoxia와 같은 극한 환경에 처했을 때 생존에 필요한 유전자들의 발현을 유도한다. 앞서도 언급했듯이 객담에서 분리된 결핵균은 탈오염 제거과정을 거치면서 강한 염기 등 여러 스트레스 상황에 직면하게 된다. 이러한 스트레스에 노출된 결핵균을 성공적으로 배양하기 위해서는 스트레스에 반응하는 유전자들이 즉각적으로 발현되어야 할 것이다. 연구결과들을 고려해보았을 때 cAMP는 결핵균이 처한 스트레스 상황에 맞게 효과적으로 유전자 발현을 조절할 것으로 생각된다. 따라서 결핵균의 성장촉진을 위한 후보물질로서 cAMP는 배양 초기 스트레스 상황에 있는 결핵균의 전사조절인자로 작용하여 단백질의 합성을 촉진하고, 초기 유도기를 단축하여 결핵균 성장을 촉진시킬 것 이라고 예상된다.

2) 결핵균 재활성화 인자

영양부족 등의 환경적인 스트레스를 받게 되면, 결핵균

은 nonreplication 상태인 잠복기에 들어가 성장을 멈추게 된다. Wayne 등은 산소와 영양분이 부족한 환경에서 결핵균이 nonreplication 상태로 들어가는 것을 증명하였고, 이 상황에서 결핵균은 단백질 합성을 중단하고 즉시 성장을 멈추는 것이 관찰되었다 (34, 35). 결핵균 이외의 다른 세균 중에서, *Actinomycetales* (*Micrococcus luteus*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Mycobacterium tuberculosis*)에 속하는 *Micrococcus luteus*는 제자리성장기나 영양분이 부족 상황일 경우 잠복기 상태로 들어가게 된다. 잠복기 상태의 *M. luteus*를 배양했을 때 집락을 형성하지 않는데 보통 *M. luteus*는 대수증식기에서의 생존율이 100%라고 가정했을 때, 제자리성장기에서는 4~10%의 생존율을 보인다.

그런데, 이런 잠복기 상태에서 *M. luteus*는 대수증식기의 상층액을 첨가했을 경우 성장이 재활성화가 일어나 집락을 형성하고 정상적인 성장을 계속하는 것이 관찰되었다 (36, 37). 이 실험에서 *M. luteus*의 Rpf (resuscitation-promoting factor)라는 단백질이 잠복기의 균을 활성화시키는 성장촉진 인자임이 밝혀졌는데, Rpf는 *M. luteus*뿐만 아니라 *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*에서도 picomolar 농도로 활성을 보여 잠복결핵을 재활성 시킬 수 있는 것으로 알려졌다 (38). 영양분의 결핍과 스트레스 환경에서 잠복기로 들어가는 전형적인 세균인 결핵균에서 *M. luteus*의 Rpf는 5개월 정도 성장이 정지한 결핵균을 재활성시켰으며, 고체뿐만 아니라 액체배지에서도 결핵균의 성장을 촉진시킬 수 있다는 보고가 있다 (39, 40). Rpf는 약 16~17 kDa 단백질로 G+C 함량이 높은 그람양성균, *streptomyces*, *corynebacteria*, *mycobacteria* 등에 널리 존재한다. Rpf는 muralytic 활성을 가지고 있어서 세포벽의 NAG (tri-N-acetylglucosamine)에 결합하여 분해한다 (41). Rpf는 결핵균 세포벽의 펩티도글리칸층에 결합해 NAG를 분해하여 세포벽의 remodeling을 유도하고 외부의 영양물질 이용을 용이하게 할 것으로 추정된다. 결핵균의 성장속도가 느린 이유 중 하나는 지방질로 둘러싸인 세포벽이 외부 영양물질의 uptake에 장애물로 작용하기 때문으로 추정되는데, Rpf 단백질을 첨가할 경우 원활한 영양공급이 이루어져 성장을 촉진시킬 것으로 예상된다. 실제로, Rpf 단백질에서 muralytic 활성을 가진 domain이 제거된 돌연변이 균주의 경우, Rpf의 성장촉진 능력이 사라진다는 사실은 (42) Rpf가 이 같은 활성을 갖고 있다는 것을 시사한다. 또한 Rpf 단백질을 성장촉진 인자로 첨가할 경우, 결핵균 중에서도 특별히 늦게 자라는 균들의

성장을 촉진시킬 수 있을 것이다. 복약중인 결핵환자에서 분리된 결핵균은 항결핵약제에 노출되어 생존능력이 떨어져 있을 가능성이 높기 때문에 이 경우에도 Rpf를 첨가하면 결핵균의 성장속도를 효과적으로 촉진시킬 수 있을 것이다. 결론적으로, Rpf의 기능을 고려해볼 때 잠복기로 들어가기 전의 결핵균뿐만 아니라, 일반배지에서 잘 자라지 않는 성장이 까다로운 결핵균을 다시 활성화할 수 있는 Rpf를 배지에 첨가할 경우, 결핵균이 스스로 배지 내 영양분을 충분히 이용할 수 있어 결핵균의 성장속도를 증가시킬 것으로 기대된다.

결론

1982년 Robert Koch가 처음으로 결핵균을 순수분리 배양한 이후 결핵균 배지는 egg-based 배지와 agar-based 배지로 개발 및 개량되어 왔다. Dorset이 배지를 개발한 이후 지속적인 개량이 이루어져 현재 우리나라를 비롯한 전세계에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 결핵균 전용 egg-based 배지인 L-J와 Ogawa 배지는 비용 면에서 매우 저렴하고 안정적으로 결핵균을 배양할 수 있다는 장점이 있다. Agar-based 배지는 1945년 Dubos와 Middlebrook에 의해 7H9, 7H10, 7H11 배지 등이 개발되었다. 이 배지는 성장촉진 인자로 oleic acid, bovine albumin, dextrose, catalase를 첨가하는데, 최근에 사용이 증가하고 있는 자동화 배양기인 MGIT960 시스템도 개량된 7H9 액체배지를 사용한다. MGIT960 시스템은 기존의 egg-based 배지에 비해 결핵균의 배양기간을 획기적으로 단축시킨 배지이지만, 고가의 장비비용과 100% 수입품으로 구성되어 있는 소모품을 사용해야 하는 단점이 있다. 국가차원의 결핵관리대책에서 중요한 부분을 차지하는 신속한 배양을 통한 결핵진단을 위해서는 1882년 Robert Koch에 의해 처음으로 결핵균의 분리 배양이 가능해진 이후 지금까지의 결핵균 배지 개발 역사로부터 새로운 아이디어를 얻어 보다 실용적인 결핵균 전용배지의 개발이 시급하다. 또한 현재 사용되고 있는 결핵균 전용배지의 단점들을 보완할 수 있는 경제적이고 신속한 결핵균 배양방법을 개발하기 위해서는 결핵균 성장촉진 인자의 탐색과 관련된 연구가 필요하며, 결핵균의 성장속도를 촉진시키기 위한 배양조건 개선 및 유도기를 최대한 단축시킬 수 있는 인자의 발굴을 위한 연구도 계속되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Getahun H, Gunneberg C, Granich R, Nunn P. HIV infection-associated tuberculosis: the epidemiology and the response. *Clin Infect Dis* 2010;50:S201-7.
- 2) Korea centers for disease control & prevention. Analysis of notified tuberculosis cases in Korea, 2009. Public health weekly report, KCDC 2010;14:621-7.
- 3) Gradmann C. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. *Med Hist* 2001;45:1-32.
- 4) Dorset M. The use of eggs as a medium for the cultivation of *Bacillus tuberculosis*. *Am Med* 1902;3:555-6.
- 5) Lepper AW, Newton-Tabrett DA, Corner LA, Carpenter MT, Scanlan WA, Williams OJ, *et al.* The use of bovine PPD tuberculin the single caudal fold test to detect tuberculosis in beef cattle. *Aust Vet J* 1977;53:208-13.
- 6) Christensen WB, Leach RE. Egg agar medium for the primary isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Health Lab Sci* 1966; 3:39-43.
- 7) Saito H. Laboratory media for the cultivation of tubercle bacillus. *Kekkaku* 1998;73:329-37.
- 8) Parish T, Stoker NG. *Mycobacterium tuberculosis* protocols. New Jersey: Humana Press, 2001.
- 9) Hirsch JG. Studies on egg-yolk growth factors for tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc* 1954;70:977-88.
- 10) Isabel NDK, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval P-Y, *et al.* Laboratory services in Tuberculosis control culture part III: For the global Tuberculosis program. Geneva: World Health Organization, (WHO/TB/98.258) 1998.
- 11) Piddington DL, Kashkouli A, Buchmeier NA. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg^{2+} levels. *Infect Immun* 2000; 68:4518-22.
- 12) Keating LA, Wheeler PR, Mansoor H, Inwald JK, Dale J, Hewinson RG, *et al.* The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for *in vivo* growth. *Mol Microbiol* 2005;56:163-74.
- 13) Silcox VA, Good RC, Floyd MM. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. *J Clin Microbiol* 1981;14:686-91.
- 14) Dubos RJ, Davis BD. Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media. *J Exp Med* 1946;83:409-23.
- 15) Dubos RJ. The effect of lipids and serum albumin on bacterial growth. *J Exp Med* 1947;85:9-22.
- 16) Dubos RJ, Middlebrook G. The effect of wetting agents on the growth of tubercle bacilli. *J Exp Med* 1948;88:81-8.
- 17) Fenner F, Dubos RJ. Production of BCG vaccine in a liquid medium containing tween 80 and a soluble fraction of heated human serum: II. Antigenicity of the Culture after Various Periods of Storage. *J Exp Med* 1950;91:269-84.
- 18) Moberg C, Rene Dubos. Friend of the good earth. Washington D.C.: ASM press, 2005.
- 19) Dubos RJ, Middlebrook G. Media for tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc* 1947;56:334-45.
- 20) Middlebrook G, Cohn ML. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am J Public Health Nations Health* 1958; 48:844-53.
- 21) Middlebrook G, Cohn ML, Schaefer WB. Studies on isoniazid and tubercle bacilli. III. The isolation, drug-susceptibility, and catalase-testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients. *Am Rev Tuberc* 1954;70:852-72.
- 22) Cohn ML, Waggoner RF, McClatchy JK. The 7H11 medium for the cultivation of *mycobacteria*. *Am Rev Respir Dis* 1968; 98:295-6.
- 23) Lin SY, Desmond E, Bonato D, Gross W, Siddiqi S. Multicenter evaluation of bactec MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 2009;47:3630-4.
- 24) Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Shaw CH, Gilchrist MJ. Timely culture for *mycobacteria* which utilizes a microcolony method. *J Clin Microbiol* 1993;31:2178-84.
- 25) Besra GS, Chatterjee D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. Washington D.C.: ASM Press, 1994.
- 26) Chauhan A, Madiraju MV, Fol M, Lofton H, Maloney E, Reynolds R, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *J Bacteriol* 2006;188:1856-65.
- 27) Bashyam MD, Kaushal D, Dasgupta SK, Tyagi AK. A study of *mycobacterial* transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *J Bacteriol* 1996;178:4847-53.
- 28) Winder FG. Mole of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the *mycobacteria*, New York.: Academic Press, 1982.
- 29) Gazdik MA, McDonough KA. Identification of cyclic AMP-

- regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria under low-oxygen conditions. *J Bacteriol* 2005;187: 2681-92.
- 30) Botsford JL. Cyclic nucleotides in procaryotes. *Microbiol Rev* 1981;45:620-42.
- 31) Rickman L, Scott C, Hunt DM, Hutchinson T, Menéndez MC, Whalan R, *et al.* A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol* 2005;56:1274-86.
- 32) Bai G, McCue LA, McDonough KA. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3676 (CRPMt), a cyclic AMP receptor protein-like DNA binding protein. *J Bacteriol* 2005; 187:7795-804.
- 33) Barba J, Alvarez AH, Flores-Valdez MA. Modulation of cAMP metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* and its effect on host infection. *Tuberculosis* 2010;90:208-12.
- 34) Wayne LG, Sohaskey CD. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol* 2001;55: 139-63.
- 35) Hu YM, Butcher PD, Sole K, Mitchison DA, Coates AR. Protein synthesis is shut down in dormant *Mycobacterium tuberculosis* and is reversed by oxygen or heat shock. *FEMS Microbiol Lett* 1998;158:139-45.
- 36) Kaprelyants AS, Gottschal JC, Kell DB. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993;10:271-85.
- 37) Kaprelyants AS, Mukamolova GV, Kell DB. Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution. *FEMS Microbiol Lett* 1994;115:347-52.
- 38) Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB. A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 8916-21.
- 39) Shleeve MO, Bagramyan K, Telkov MV, Mukamolova GV, Young M, Kell DB, *et al.* Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology* 2002;148:1581-91.
- 40) Wu X, Yang Y, Han Y, Zhang J, Liang Y, Li H, *et al.* Effect of recombinant Rv1009 protein on promoting the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Appl Microbiol* 2008;105:1121-7.
- 41) Mukamolova GV, Murzin AG, Salina EG, Demina GR, Kell DB, Kaprelyants AS, *et al.* Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Mol Microbiol* 2006;59:84-98.
- 42) Keep NH, Ward JM, Cohen-Gonsaud M, Henderson B. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends Microbiol* 2006;14:271-6.