

결핵세균학 및 결핵균검사

—편 집 부—

3. 항산성 염색성

Koch는 Weigert염색법에 따라 methylene blue로 결핵균을 염색해서 관찰했지만 Ehrlich(1882)가 aniline유를 매염제로 사용하여 fuchsin으로 염색한 다음 산으로 탈색하는 항산성 염색법을 창안하였다.

같은 해에 Ziehl(1882)이 매염제로 석탄산을 썼고 Neelsen(1883)이 다시 carbol-fuchsin 혼합액을 염색액으로 사용하는 방법을 개발해 오늘날까지 사용해오고 있다.

Mycobacteria는 iodine을 요하지 않는 Gram양성 염색성을 띠지만 두드러진 특성은 물론 항산성 염색성이다.

약 60%가 지방화합물인 세포벽은 소수성이라 염색하기가 어렵다. 석탄산과 같은 매염제를 가해야만 염료가 침투할 수 있고, 일단 염색된 균은 acid-alcohol과 같은 강한 탈색제로서도 탈색이 되지 않는다.

이러한 항산성 염색성과 깊이 관련된 화합물은 mycolic acid(MA)로 보고 있는

데 그 이유는 생활사의 어느 시기이든 항산성 염색성을 띠는 균은 MA를 함유하고 있고, MA의 탄소수가 많을수록 더 강한 항산성 염색성을 띤다는 점이다. Mycobacteria MA의 탄소수는 대개 60-90개인데 항산성이 강한 결핵균은 85개 이상이다.

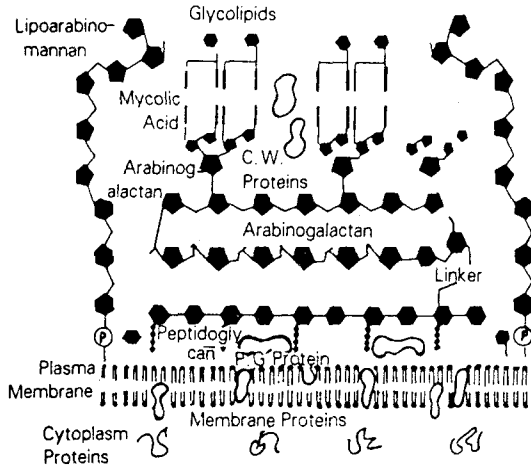
세포벽의 지방과 MA를 추출하거나 물리적 손상을 주면 항산성 염색성을 잃는 것으로 보아 MA를 포함한 지방화합물이 많으면서 손상이 없는 완벽한 세포벽에 의해 항산성 염색성을 나타낸다고 본다.

휴면상태의 어떤 균은 염색이 되지 않고 신속발육균에서 보면 생활사의 어떤 시기에만 항산성 염색성을 띠어 염색해보면 비항산성균이 많이 섞여있다.

결핵균은 굵기가 0.2~0.3 μ , 길이가 2~5 μ 정도 되는 막대균으로 병변 조직내에 있는 균은 대개 직간균이지만 간혹 구상(球狀) 또는 사상(絲狀)인 균도 볼 수 있다.

Much(1907)는 비항산성 과립단계를 포함하는 일종의 생활환이 있을 것으로

그림 1-1 결핵균 세포벽의 화학적 구조



보고 있고 “persisters”와 관련하여 중요한 의미를 가지고 있을 것으로 추측하고 있는 학자도 있다.

4. 세포벽

균의 각종 생물학적 특성 즉, 항산성 염색성, 유해한 물리화학적 환경이나 숙주방어수단에 대한 저항력 및 adjuvant activity 등이 세포벽에 의해 나타난다.

세포벽은 여러 개의 분자가 공유결합으로 이루어진 복합 고분자화합물로 구성된 딱딱한 골격이 60%를 차지하고 나머지는 그와 관계없이 세포벽을 이루고 있다.

원형질막에 접해 있는 세포벽 내면은 다른 세균류에서도 볼 수 있는 murein층

으로서 여러 개의 tetrapeptides가 내부로 인접한 분자들 중 D-alanine과 diaminopimelic acid 사이에 교차결합으로 연결되고 또 L-alanine이 N-acetylglucosamine과 muramic acid가 교차로 결합해 이루어진 muramyl layer에 연결되어 있다(그림 1-1).

그물처럼 생긴 murein층은 세포의 모양과 경직성을 갖게 해주며 그리고 adjuvant activity를 나타낸다.

N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamat(muramyl dipeptide, MDP)가 상품화되어 시판되고 있다.

Murein층 바깥은 분지한 다당류인 arabinogalactan이 덮고 있고 다당류 끝에 있는 arabinose에 긴 사슬의 지방산인 MA가 연결되어 있다.

약 10mm 두께의 새끼줄처럼 생긴 이 내면층은 구조적 투과장벽으로서 항산성 염색성을 띠게 한다. 약 10mm 두께의 표층은 peptidoglycolipids나 phenolic glycolipids와 같은 mycosides, 황지질(黃脂質), cord-factor 등 다양한 화합물로 구성되어 있고 소수성이다.

유해한 환경에 저항력을 나타낼 뿐 아니라 숙주의 저항력을 극복하는데 중요한 역할을 한다. 바깥으로 노출된 당질류는 친수성이다. 세포벽 지방화합물의 약 25%가 표층의 유리지방이다.

세포벽의 지방화합물로는 긴 사슬의 tuberculostearic acid(TA), mycoserosic acid(MSA), phthienoic acid 및 MA등이다. TA가 여러 mycobacteria에서 발견되지만 다른 세균류에서는 볼 수 없기 때문에 병리 가검물로부터 이를 검출하여 균유무를 알아내는 방법으로 이용되고 있다.

MA는 corynebacteria와 nocardiae에서도 발견되지만 탄소수가 28~60개로 mycobacteria보다 적으며 INH가 결핵균의 MA합성을 방해하는 것으로 알려져 있다.

MA가 결합된 trehalose는 균색(菌素)형성과 관련이 있다고 보아 균색인자(cord-factor)라고 부르지만 관련성이 없는 것으로 보고 있다.

흰 쥐에 강한 독성을 나타내어 발병력과 관련이 있는 것으로 추측했지만 병원성이 없는 균종들도 균색인자를 함유하고 있다.

Trehalose sulfate에 MSA가 결합된 강

산성의 황지질도 독성이 강한데 특히 균색인자와 결합이 되면 독성이 크게 증강된다.

황지질도 독성이 강한데 특히 중성적(中性赤, neutral red)과 결합해 끓는 물에서도 탈색되지 않아 이를 균의 발병력 여부를 가리는 방안으로 제안했지만 발병력이 큰 일부 균주는 소량 함유하고 있고, 병변조직내에서 증식한 균은 중성적과 결합하지 않아 발병력과 관련된성이 의문시 되었다.

그럼에도 불구하고 식포-lysosome용합억제, lysosome효소 중화 및 균색인자와 결합해 강한 독성을 나타내는 점등을 고려해 볼 때 발병력을 나타내는데 기여할 것으로 추측한다.

병원성 균주의 표층화합물 가운데서 poly-L-glutamic acids를 볼 수 있는데 이 역시 대식구내 식포-lysosome용합을 억제할 뿐 아니라 탄소, 질소원으로 도 이용될 것으로 보고 있다.

생물학적으로 중요한 표층지방인 mycosides는 응집반응에 의한 혈청형, 균집락형태 및 발병력 등에 관련되어 있을 뿐 아니라 mycobacteriophage 수용체 역할도 한다. 따라서 이들을 대외관계화합물이라고 부른다.

두가지 주요 mycosides로 peptidoglycolipids와 phenolic glycolipids가 있는데 이들은 특이한 당을 가지고 있어 독특한 항원결정기를 이루고 있다.

그리고 당이 없는 mycoside로 감독화 표지지방(減毒化 標識脂肪, attenuation indicator lipid)이 있는데 Guinea Pig에

대해 발병력이 낮은 남부 인도 결핵균에서 관찰되는 특이한 지방이다.

그러나 그러한 관련은 우연한 일치일 따름이다. 발병력을 잃은 변이주에서 phthiocerol dimycolate가 감소했다고 해서 이를 발병력과 관련지우는 것도 마찬가지다.

Phenolic glycolipids 중 가장 많이 함유된 mycoside A는 methyl기를 가진 rhamnose나 fucose가 phenol ring을 통해 palmitic acid에 연결되어 있고, mycoside B는 mycocerosic acid에 연결되어 있다.

Mycoside C라 부르는 peptidoglycolipids는 모든 mycobacteria에서 검출되지만 구조와 항원성 당질부가 서로 다르며, *M. avium*군에서 혈청형을 결정한다.

그리고 이들 mycosides들은 대식구의 lysosome 효소로부터 균체를 보호하는 역할을 할 것으로 추측한다.

lipoarabinomannan은 대식구내에서 종양괴사인자 생산을 유도한다는 보고가 있다.

인지질(磷脂質, phospholipids)은 주로 세포막에 함유되어 있으며 항원성이 있어서 혈청학적 진단에 이용되기도 한다.

5. 영양과 발육

결핵균의 두가지 주요 발육상의 특징은 다음과 같다.

첫째, 일반배지상에서는 잘 발육하지 않고 계란, 감자 또는 혈청 등이 함유된

배지에서 잘 증식한다.

둘째, 발육속도가 매우 느려 가장 좋은 조건아래서도 세대시간이 17~18시간이라 적어도 2~4주간 배양해야 균집락의 육안 관찰이 가능하다.

다당류나 단백질과 같은 고분자 화합물은 이용하지 못하고 단순한 탄수화물의 산화로 energy를 얻기 때문에 glycerol, pyruvate, glucose 등을 잘 이용하고 질소원으로는 alanine, glutamine, glutamate, asparagine 등을 잘 이용하는 것이다.

Aliphatic acids와 같은 일부 지방산을 잘 이용하는데 다만 소량이어야 하고 많은 양은 오히려 유해하다.

초자기구 표면이나 먼 또는 Tween 80 가수 분해로 유리되는 oleic acid가 균발육을 억제하는데 혈청 albumin을 첨가하면 그러한 지방산을 흡착해 독작용을 없앨뿐 아니라 오히려 소수로 있는 균의 발육을 촉진시켜 준다.

결핵균은 절대 호기균이라 배지를 회전진탕시켜 산소공급을 증가시키면 3~10배의 균발육이 증가하고 거기다 CO₂ 분압을 6%로 해주면 균량이 18배 증가한다. 대체로 산소분압이 50%에 이를 때까지는 균발육이 증가하나 그 이상은 오히려 유해하고 CO₂ 분압은 8%까지는 균분리배양에 큰 도움을 준다.

NaHCO₃나 Na₂CO₃를 CO₂ 대신 써도 좋다. (계속) †