

한국인에서 처음 분리된 *Chlamydia pneumoniae*

강원대학교 의과대학 내과학교실, 강원대병원 임상의학연구소*,
한림대학교 의과대학 내과학교실**

이승준, 정해혁, 김숙경, 최대희, 한선숙,
남의철, 원준연, 박원서, 이명구, 정기석**

=Abstract=

The First Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a Korean Patient

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kangwon National University,
Clinical Research Center of Kangwon National University Hospital*,
Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hallym University**

Seung-Joon Lee, M.D., He-Hyeok Jung, M.D., Suk Kyeong Kim, M.D.,
Dae-Hee Choi, M.D., Seon-Suk Han, M.D., Eui-Cheol Nam, M.D.,
Jun Yeon Won, M.D., Weon-Seo Park, M.D.,
Myung-Goo Lee, M.D., Ki-Suck Jung, M.D.**

Background : *Chlamydia pneumoniae* is one of common causes in upper and lower respiratory infections. Isolating *C. pneumoniae* from clinical specimens is very difficult due to the characteristics of the organism. Recently, we succeeded in isolating *C. pneumoniae* from a Korean patient, who suffered from acute pharyngitis. This is the first isolate from a clinical specimen in Korea.

Method : We attained a nasopharyngeal swab from a 22-year-old female patient, and inoculated it on a monolayer of the Hep-2 cell line. After 8 passages, we found the inclusion bodies of *C. pneumoniae* by an immunofluorescence(IF) test. The species-specific monoclonal antibody IF staining and species-specific PCR were done to confirm the species of the isolate, and electron microscopy was used to characterize the morphology.

Result : The isolate was confirmed to be *C. pneumoniae* by species-specific IF and PCR, and the strain was named LKK-1. The shape of the elementary body was round and with a narrow periplasmic space, as shown by electron microscopy, which is similar to the Japanese strain, but not the Western strain.

Address for correspondence :

Seung-Joon Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Kangwon National University Hospital,
17-1 Hyoja-3-Dong, Chunchon-Si, Kangwon-Do, 200-947, Korea

Phone : +82-33-258-2377 FAX +82-33-258-2455 E-mail : medfman@knuh.or.kr

Conclusion : We succeeded in isolating *C. pneumoniae* from a 22-year-old patient with acute pharyngitis, which is the first isolate in Korea. In the future, this Korean strain will be useful to the study of *C. pneumoniae*. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 53:569-576)

Key words : *Chlamydia pneumoniae*, Isolation, Korea.

서 론

*C. pneumoniae*는 1986년 처음 동정되어 보고된 균으로, 세포내에서만 생존과 증식이 가능하며, 균체의 배양이 매우 어려운 것으로 알려져 있다¹.

Chlamydia 속에 속하는 *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum* 등 4개 종은 매우 독특한 생활사를 가지고 있는데, 에너지가 풍부한 숙주 세포내에서 성장하고 증식할 때에는 reticulate body(RB) 형태로 증식하다가, 감염력을 가진 elementary body(EB) 형태로 바뀌어 세포막을 뚫고 세포 밖으로 나가게 되고, EB는 세포 밖에서 존재하다가 특별한 수용체를 가진 세포에 부착하게 되면 세포내로 들어와서 다시 증식하게 된다².

*C. pneumoniae*는 폐렴, 기관지염, 인두염, 부비동염의 원인균으로서, 특히 지역사회획득 폐렴의 원인균으로 중요한 위치를 차지하는데, 외국의 보고에 의하면 10-20%를 차지(원인균 중 두 번째)하는 중요한 원인균이다³⁻⁵. 국내의 경우 이 등⁶의 보고에 의하면 혈청학적 진단기준을 적용했을 때 지역사회획득폐렴환자의 약 12%에서 원인균이어서, 매우 중요한 비중을 차지함을 알 수 있다.

*C. pneumoniae*에 의한 폐렴은 대개 경증이나, 개발도상국의 소아나 기저질환이 있는 고령층에는 치명적인 폐렴을 유발할 수도 있음이 보고^{7,8}되었고, 최근에는 폐질환 이외에도 동맥경화증과의 관련성이 제기 되어 활발한 연구가 진행되고 있다⁹.

*C. pneumoniae*의 연구 및 진단에 필수적인 임상검체로부터의 균의 분리 및 배양은 매우 어려운 것으로 알려져 있어, 외국에서도 소수의 센터에서

만 분리에 성공했으며¹⁰, 국내에서도 최 등¹¹에 의해 474개 이상의 검체에 대한 분리 시도가 실패로 돌아갔다고 보고된 바가 있다.

연구자들은 22세 여자 환자로, 이비인후과 외래를 방문하여 급성 인두염으로 진단 받은 환자로부터 채취한 비인두 스왑에서 국내 최초로 *C. pneumoniae*를 분리, 배양하는데 성공하여 *C. pneumoniae* LKK-1으로 명명하였고, 그 방법 및 의의를 기술하고자 한다.

대상 및 방법

1. 검체의 채취

강원대병원에서 이비인후과 및 내과 외래를 방문한 상하기도 감염증 환자를 대상으로, *C. pneumoniae*의 배양에 가장 좋은 효율을 가진 것으로 보고된 비인두 스왑을 통해 검체를 얻었다¹⁰. 이를 세포배양배지(cycloheximide 1 μ g/mL, heat-inactivated fetal calf serum 10%, gentamicin 100 μ g/mL, vancomycin 100 μ g/mL을 첨가한 Minimum Essential Medium, Sigma Cat No. M0769) 2cc에 담아 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관한 뒤 1~3일내에 배양을 시작하였다.

2. 분리 및 배양

균의 숙주로 사용된 세포주는 Hep-2(한국세포주은행, KCLB No. 10023)로서, MEM 배지(heat-inactivated fetal calf serum 10%, gentamicin 100

$\mu\text{g/mL}$ 및 vancomycin $100\ \mu\text{g/mL}$ 을 첨가한 Minimum Essential Medium)에 세포주를 배양플라스크에서 키워 바닥을 완전히 덮게 되면(3~4일 경과 후), 수분간 trypsin-EDTA 처리를 하여 세포를 부유시켜 2.5×10^5 cells/mL로 만든 뒤, 이를 유리 cover slip을 미리 넣은 24-well culture plate에 well 당 1cc씩 넣고, $37\ ^\circ\text{C}$ 에서 하루 동안 배양하여, well의 바닥에 놓인 cover slip 위로 세포가 자라 단일층을 형성한 것을 확인하였다¹².

환자에게서 얻어 배지에 넣어 보관한 비인두스왑 검체를 1분간 진탕(vortexing) 한 뒤, 이중 절반인 1cc를 위에서 하루동안 세포를 배양한 24well culture plate의 각 well에 넣고, 900g에서 한시간 동안 원침하였다. Well의 상층액을 흡인하여 버리고, PBS로 세척한 뒤, MEM 배지(cycloheximide $1\ \mu\text{g/mL}$, heat-inactivated fetal calf serum 10%, gentamicin $100\ \mu\text{g/mL}$, vancomycin $100\ \mu\text{g/mL}$ 을 첨가한 Minimum Essential Medium)를 1cc/well 넣고 $37\ ^\circ\text{C}$, 72시간 배양하였다. 유리 cover slip을 well로부터 들어내고, 이를 15분간 acetone으로 고정시킨 후, FITC-conjugated Chlamydia genus-specific monoclonal antibody(Chlamydia FA[®], Denka Seiken, Japan)로 염색하여 형광현미경하에서 봉입체의 형성을 관찰하였다. 음성인 경우, 이를 최대 10대까지 계대 배양하여 같은 염색 방법으로 확인하였다.

3. *C. pneumoniae*의 동정

본 환자에서 채취한 검체를 상기한 방법으로 8대째 계대배양에서 최초로 봉입체를 확인할 수 있었고, 여기서 얻은 균을 증식시켜 *C. pneumoniae*임을 확인하였다.

1) Wright-Giemsa 염색

감염된 세포를 공기중에 말린 뒤, 100% 에탄올로

고정하고, Wright-Giemsa 염색을 하였다¹³.

2) 속(屬)특이 직접 면역형광염색

FITC가 붙은 Chlamydia 속(屬) 특이 항체(Chlamydia FA[®], Denka Seiken, Japan)를 이용하여 면역형광 염색을 하였다. 형광 염색 후 형광 현미경과 공초점현미경(Radiance 2000, Bio-Rad)을 이용하여 관찰하였다.

3) 종(種)특이 간접 면역형광염색

Chlamydia-Cel Pn antigen test kit[®](Cellabs, Australia)를 사용하여 염색을 하였다. 속(屬)특이 직접 면역형광염색과 같은 현미경에서 관찰하였다.

4) 전자현미경 검사

72시간 동안 배양하여 감염된 세포를 300g에서 5분간 원침하여 모은 뒤, 2.0% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide에 고정하여 Epon812에 포매한 다음, uranyl acetate와 lead acetate로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

5) 종(種)특이 PCR

Kubota 등이 보고¹⁴한 *C. pneumoniae* 종(種)특이 primer를 이용하여 *C. pneumoniae* LKK-1(본 연구 배양균주), TW-183, *C. trachomatis* L2/434/Bu(일본국립감염증연구소 분양)를 24 well plate에서 72시간 배양하여 증식시킨 균을 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Cat. No A1120, Promega)를 이용하여 DNA를 추출하였다. PCR은 AccuPower[®] PCR PreMix(Bioneer, Korea)를 사용하여, 추출된 균의 DNA $1\ \mu\text{L}$ 를 넣고 총 $20\ \mu\text{L}$ 로 하여 반응시켰다. 사용된 primer는 5'-ATGATCGCGGTTTC-TGTTGCCA-3', 5'-GAGCGACGTTTTGTTGC-ATCTC-3'였고, 40 cycle(첫 cycle $95\ ^\circ\text{C}$ 1분, 이후 38회의 cycle은 $95\ ^\circ\text{C}$ 60초, $56\ ^\circ\text{C}$ 30초, $72\ ^\circ\text{C}$ 60초, 마지막 cycle은 $72\ ^\circ\text{C}$ 5분)로 PCR을 시행한 뒤, 1.5% agarose gel에서 499 bp의 밴드를 확인하였다.

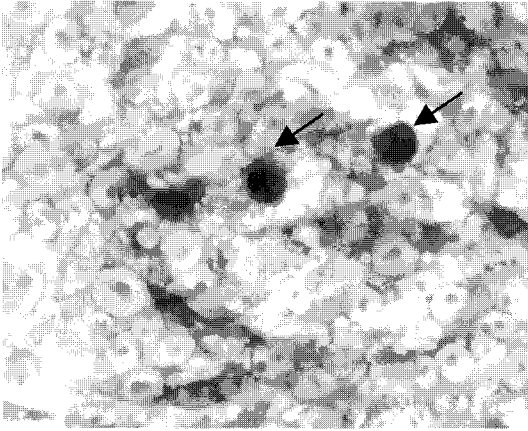


Fig. 1. Photomicrograph of *C. pneumoniae* LKK-1 in Hep-2 cell culture stained with Wright-Giemsa. The arrows indicate intracytoplasmic inclusion bodies of *C. pneumoniae*. ($\times 400$)

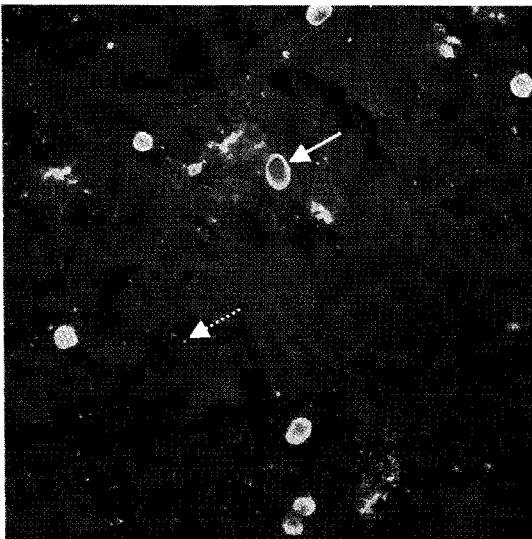


Fig. 2. Genus-specific FITC-conjugated anti-chlamydia antibody staining. Solid arrow indicates inclusion body and dotted arrow indicates single elementary body. ($\times 400$)

결 과

1. Wright-Giemsa 염색

감염된 세포에서는 검보라색의 *C. pneumoniae* 봉입체가 세포질 속에서 관찰되었다(그림 1)

2. 속(屬)특이 직접 면역형광염색

Chlamydia 속(屬) 특이 항체로 면역형광 염색을 하여, 다양한 크기 및 형태의 봉입체를 관찰할 수

있었으며, 세포 밖에서도 작은 점 모양의 EB를 관찰할 수 있었다(그림 2).

3. 종(種)특이 간접 면역형광염색

Chlamydia 종(種) 특이 항체로 면역형광 염색을 통해서도, 다양한 크기 및 형태의 봉입체를 관찰할 수 있었으며, 세포 밖에서도 작은 점 모양의 EB(elementary body)를 관찰할 수 있었다(그림 3). 이 결과로 분리된 균주가 *C. pneumoniae*임을 알 수 있었다.

4. 전자현미경 검사

전자 현미경 검사 소견은, 두꺼운 이중막을 가졌으며, 핵이 진한 EB가 관찰되었으며, 크기가 조금 더 크고 핵이 연한 RB(reticulate body)를 관찰할 수 있었다. EB의 형태는 미국의 균주와는 다르고, 일본 보고와는 같은 양상으로 세포질 공간이 좁고 형태상 원형을 띠고 있었다. 이는 동양의 균주가 서양의 균주와는 형태적으로 다름을 나타낸다(그림 4).

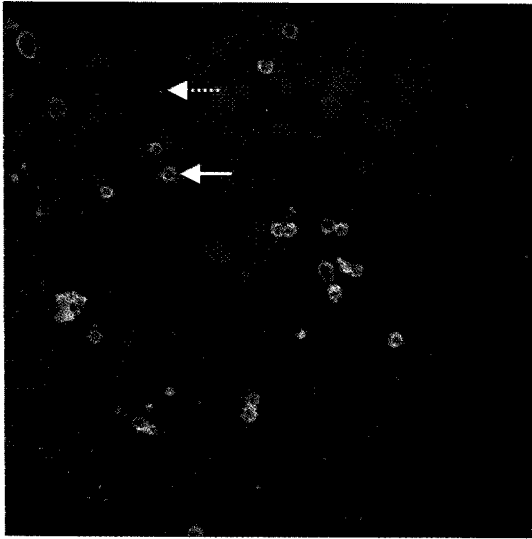


Fig. 3. Species-specific FITC-conjugated anti-*Chlamydia pneumoniae* antibody staining. Solid arrow indicates inclusion body and dotted arrow indicates single elementary body. ($\times 200$)

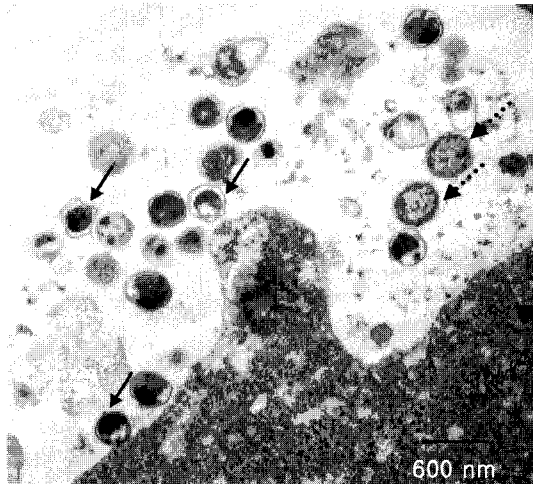


Fig. 4. Ultramicrograph illustrating round-shaped elementary body(solid arrow) and reticulate body(dotted arrow)($\times 12,000$). EBs have narrow periplasmic space and round-shaped cell membrane.

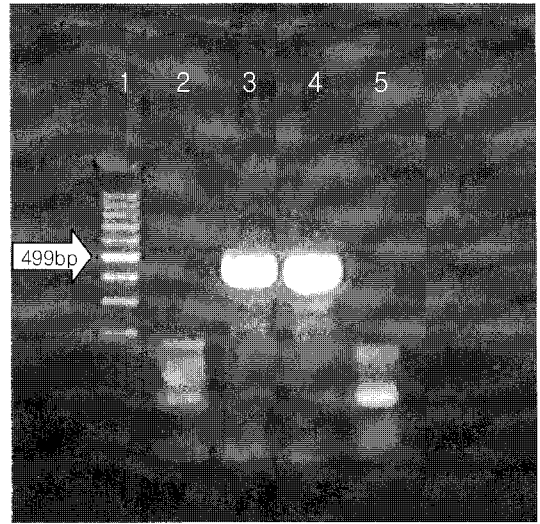


Fig. 5. Photograph of PCR under UV illumination. *C. pneumoniae* TW-183 and LKK-1 showed 499bp products, whereas *C. trachomatis* did not amplified.
 Lane 1 : molecular size marker(100bp DNA Ladder[®], Promega, Cat No G2101)
 Lane 2 : negative control (no template)
 Lane 3 : *C. pneumoniae* TW-183
 Lane 4 : *C. pneumoniae* LKK-1
 Lane 5 : *C. trachomatis* L2/434/Bu

5. 종(種)특이 PCR

C. pneumoniae TW-183 균주와 *C. pneumoniae* LKK-1(본 연구에서 분리된 균주)에서는 499bp의 밴드가 뚜렷이 관찰되었으나, *C. trachomatis* 균주에서는 밴드를 관찰할 수 없어, 본 연구에서 분리된 균주가 *C. pneumoniae*임을 알 수 있었다(그림 5).

고 찰

본 연구는 22세의 급성인두염 여자 환자에서, 국내 처음으로 분리된 *C. pneumoniae*의 분리 과정, 형태학적 특징, 종(種)의 확인에 대한 것이다. *C.*

*pneumoniae*는 상하기도 감염의 중요한 원인균이며¹⁰, 최근에는 동맥경화증의 유발인자로 제기되고 있어 활발한 연구가 이루어지고 있는 균이다⁹.

*C. pneumoniae*는 임상검체로부터 분리가 매우 어려워서 세계적으로 소수의 실험실에서만 성공한 것으로 알려져 있다¹⁰. 그 이유로는 검체의 운송과정에서 쉽게 균이 활성을 잃는 점, 검체의 채취 장소가 균의 증식 장소에서 벗어나 있을 가능성이 높은 점, *C. pneumoniae* 균이 수차례의 계대배양이 지나야 봉입체가 보일 정도로 성장속도가 느리다는 점 등이 제기되고 있다¹⁰.

Pubmed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>)를 통해 검색어 'Chlamydia pneumoniae'와 'Korea'를 입력하여 검색한 결과, 국내에서 배양된 보고를 확인할 수 없었으며, 국내의 검색엔진인 보건연구정보센터(<http://www.richis.org/>)를 통해 검색을 했지만 역시 국내에서 분리된 보고는 찾을 수 없어, 본 연구자의 분리가 국내 최초임을 알 수 있다.

본 연구에서 분리 및 배양되어 *C. pneumoniae* LKK-1으로 명명된 균주는, 종(種)특이 항체를 이용한 면역형광 염색과 종(種)특이 PCR을 통해 *C. pneumoniae*로 동정되었다. 향후 DNA sequencing 등을 통한 외국 균주 유전자와의 상동성 연구가 이를 더 뒷받침할 수 있을 것이다.

국내에서 최초로 분리된 *C. pneumoniae* LKK-1의 전자현미경 소견은 본 연구를 통해 볼 때, 기존에 보고된 바와 같은 세포질 공간이 넓고 세포막이 구불구불한 배모양(pear-shaped)²이 아니고, 세포질 공간이 좁고 원형이었다(그림 4). 서양에서 표준균주로 사용되는 *C. pneumoniae* TW-183이나 AR-39는 최초 보고서부터 배모양으로 알려졌으나, 이후에 일본에서 배양된 균주는 세포질 공간이 좁고 세포막이 둥근 원형이었다². 이에 대한 차이는 아직 설명되고 있지 않은데, Melagosa 등은¹⁵ major outer membrane protein(MOMP)중에서

95-kDa의 cysteine이 풍부한 단백질이 disulfide-bond를 강화하여, 좀더 강한 배모양의 세포막을 이루는 것으로 제시한 바 있으나, 그 이후의 원형의 일본 균주를 대상으로 한 MOMP 분석에서도 95-kDa의 단백질이 서양균주와 비슷한 양상으로 관찰되어 위 가설이 설득력을 갖지는 못했다². 국내의 균주가 일본의 균주와 같이 원형임은 서양 균주와의 뚜렷한 차이점이며, 형태학적 차이를 보이는 기전에 대한 규명은 향후 연구과제로 남는다.

*C. pneumoniae*가 국내 환자에서 최초로 분리 및 배양이 성공한 점은 국내에서 향후 *C. pneumoniae* 연구에 중요한 출발점임을 의미한다고 할 수 있다. 본 균주는 항생제 감수성 검사, *C. pneumoniae* 진단의 기준이 되는 micro-immunofluorescence test를 위한 항원 추출, 그밖에 다양한 *C. pneumoniae* 연구에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

*C. pneumoniae*는 상하기도 감염을 일으키는 주요 균으로, 균의 임상검체로부터의 분리는 균이 가진 몇가지 특성으로 매우 어려운 것으로 보고되었다. 최근 연구자들은 급성 인두염으로 내원한 22세 여자환자에서 채취한 비인두 스왑으로부터 국내 최초로 *C. pneumoniae*를 분리, 배양하는데 성공하였다.

방 법 :

Hep-2 세포주를 24시간 배양한 뒤, 환자로 부터 얻은 비인두 스왑 검체를 넣어, 900g에서 한시간 동안 원심분리한 뒤, 72시간 동안 배양하였다. 본 환자의 검체는 8대째 계대배양에서 처음으로 봉입체가 관찰되었고, 이를 동정하기 위해 종특이 직접면역형광 검사와 종특이 PCR을 시행하였다. 그 밖에 전자현미경 소견도 관찰하였다.

결 과 :

종특이 면역형광염색과 PCR은 모두 *C. pneumoniae*에 합당한 소견을 보여, 본 분리 균주가 *C. pneumoniae*임을 알 수 있었다. 전자현미경 소견은 서양의 표준 균주가 배모양임에 비해, 일본 균주와 유사한 원형을 나타내었다.

결 론 :

국내 최초로 연구자들은 22세 여자 급성인두염 환자로부터, *C. pneumoniae* 분리에 성공하였다. 형태학적으로 일본 균주와 같은 원형임은 서양의 보고와는 다르다. 향후 본 균주는 국내 *C. pneumoniae* 다양한 연구에 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 강원대학교 기성회일반연구과제 연구비(과제번호 3002093-1-1, 연구책임자 남의철)의 지원으로 이루어졌다. 본 연구를 위해 끊임없는 조언을 준 일본 국립감염병연구소의 Toshio Kishimoto 선생에게 감사의 뜻을 전한다.

참 고 문 헌

1. Garyston JT, Kuo C-C, Wang S-P, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Eng J Med* 1986;315:161-8.
2. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4): 451-61.
3. Thom DH, Grayston JT. Infections with *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Clin Chest Med* 1991;12:245-56.
4. Almirall J, Morato I, Riera F. Incidence of community-acquired pneumonia and *Chlamydia*

pneumoniae infection : a prospective multi-centre study. *Eur Respir J* 1993;6:14-18.

5. Steinhoff D, Lode H, Ruckdeschel G. *Chlamydia pneumoniae* as a cause of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in Berlin. *Clin Infect Dis* 1996;22: 958-64.
6. Lee SJ, Lee MG, Jeon MJ, Jung KS, Lee HK, Kishimoto T. Atypical pathogens in adult patients with community-acquired pneumonia in Korea. *Japan J Infect Dis* 2002;55(5) (in press)
7. Marik PE, Iglesias J. Severe community-acquired pneumonia, shock and multiorgan dysfunction syndrome caused by *Chlamydia pneumoniae*. *J Intern Med* 1997;241:441-4.
8. Troy CJ, Peeling RW, Ellis AG, Hockin JC, Bennett DA, Murphy MR, Spika JS. *Chlamydia pneumoniae* as a new source of infectious outbreaks in nursing homes. *JAMA* 1997;277:1214-8.
9. Gupta S. Chronic infection in the aetiology of atherosclerosis-focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Atherosclerosis* 1999;143:1-6.
10. Allegra L, Blasi F. *Chlamydia pneumoniae*, The lung and heart. 1st ed. Milano : Springer ; 1999.
11. 최태열. 1997년 보건의료 기술 연구개발 사업 최종보고서 : “*Chlamydia pneumoniae* 진단방법 개발”. 서울, 한국: 보건의료기술연구기획평가단, <http://www.hpeb.re.kr>; 2002
12. Miyashita N, Kanamoto Y, Matsumoto A. The morphology of *Chlamydia pneumoniae*. *J Med Microbiol* 1993;38:418-25.
13. 이소라, 금동국, 최태열. *Chlamydia pneu-*

- moniae*의 전자현미경적 관찰. 대한임상병리학
회지 1997;17(1):146-54.
14. Kubota Y. A new primer pair for detection
of *Chlamydia pneumoniae* by PCR. Microbiol
Immunol 1996;40:27-32.
15. Melgosa, MP, Kuo CC., Campbell LA. Outer
membrane complex proteins of *Chlamydia
pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett 1993;112:
199-204.