

감기환자의 구강에서 분리된 *Streptococcus pneumoniae* 59에 대한 官桂附子理中湯의 효과

이상윤¹, 서부일^{1*}, 박지하¹, 노성수¹, 이은숙², 김용현³

1: 대구한의대학교 한의학과 본초학교실 2: 대구한의대학교 한방피부미용학과
3: 대구한의대학교 어학교육원

The Antimicrobial Activity of *Gwankeibujalijung-tang* Against *Streptococcus pneumoniae* 59 Isolated from the Mouth of a Common Cold Patient

Sang-yun Lee¹, Bu-il Seo^{1*}, Ji-ha Park¹, Seong-soo Roh¹, Eun-sook Lee², Yong-hyun Kim³

1: Department of Oriental Herbology, Daegu Haany University 2: Department of Herbal Skin Care, Daegu Haany University 3: Department of Language Education, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : I want to examine the antimicrobial activity of *Gwankeibujalijung-tang* against *Streptococcus pneumoniae* 59 isolated from the mouth of a common cold patient.

Methods : Antimicrobial activity was assayed through the hot water extract from *Gwankeibujalijung-tang* against *Streptococcus pneumoniae* 59 isolated from the mouth of a common cold patient.

Results : The size of inhibition zone of *Gwankeibujalijung-tang* extract was 9.83 ± 0.11 mm. The optimal pH and temperature for the growth of isolated *Streptococcus pneumoniae* 59 were 7.0 and 37°C, respectively. The minimum inhibitory concentration of *Gwankeibujalijung-tang* extract was 12 μ l and the antimicrobial activity of *Gwankeibujalijung-tang* extract was not destroyed by the heat (121°C for 15 min) and not affected by pH.

Conclusions : Reviewing this experimental result, it appeared that *Gwankeibujalijung-tang* had efficacy against *Streptococcus pneumoniae* 59 isolated from the mouth of a common cold patient.

Key words : *Gwankeibujalijung-tang*, *Streptococcus pneumoniae*, cold patient

서론

1881년 처음으로 *Streptococcus pneumoniae*가 분리된 이래로 *Streptococcus pneumoniae*에 대한 연구

가 많이 이루어져 왔다¹⁾. *Streptococcus pneumoniae*는 발생률과 사망률이 가장 높게 일어나는 감염성 질환의 하나인 폐렴의 주 원인균으로서, 정상인의 인두 호흡기에 5-10% 상재해 있으며 호흡기 감염증이 있

* 교신저자 : 서부일, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의학과 본초학교실
· Tel : 053-770-2246 · E-mail : jangsan@dhu.ac.kr
· 접수 : 2009년 2월 9일 · 수정 : 2009년 3월 18일 · 채택 : 2009년 3월 20일

는 만성 폐렴환자의 객담에서 약 50%, 인두에서 약 20%로 약 70% 정도가 호흡기에서 발견된다. 또한 눈, 코, 귀 등의 분비물에서도 검출되며 척추액에서도 약 1% 정도가 분리된다. 이렇게 정상인의 인두 호흡기에常在한 *Streptococcus pneumoniae*는 influenza virus의 감염에 의해 기관지 점막세포가 손상이 되면 自家 감염을 일으킨다²⁾. 또한 이러한 *Streptococcus pneumoniae*에 의한 폐렴의 발병은 3세 이하의 영아와 60세 이상의 노인층에서처럼 면역능이 결여되어 있거나 저하되어 있는 연령층에서 발병 빈도가 높으며 높은 치사율을 보이고 있다. 실례로 미국의 경우 폐렴구균질화에 의한 사망률은 15% (매년 6,000-7,000명 사망)에 이르며 특히 65세 이상의 노인들에서는 30% (매년 5,000명 사망)에 이르는 것으로 보고되고 있다³⁾. 이러한 *Streptococcus pneumoniae*에 의한 감염은 폐렴 이외에 폐농양, 심낭염, 농흉(empyema), 흉막유출(pleural effusions) 등의 질병을 일으키고, 어린아이에게서 중이염(otitis media), 균혈증(bacteremia), 세균성 수막염(meningitis)을 일으키기도 한다. 또한 부비강염(sinusitis), 유양돌기염(mastoiditis), 관절염(arthritis), 복막염(peritonitis), 심내막염(endocarditis)도 일으키며, 여성의 질 속에서 골반염(pelvic infection)을 일으키기도 한다. 특히 영아나 취학 전후의 소아에게서 급성화농성 감염의 원인균으로 *Haemophilus influenzae*와 함께 검출되는 빈도가 높다고 알려져 있다⁴⁾.

최근 들어 이러한 *Streptococcus pneumoniae*의 감염증에 의한 합병증으로 사망하는 경우는 항생제의 개발로 많이 감소하였다. 그러나 이러한 항생제의 남용으로 인하여 항생제에 내성을 가지는 *Streptococcus pneumoniae*가 발견되기 시작하였고 이러한 내성균에 의한 감염으로 인한 사망이 증가하고 있는 추세이다.

官桂附子理中湯은 李濟馬의 《東醫壽世保元》⁵⁾ 少陰人胃受寒裏寒病論에 등장하는 처방으로, 少陰證에 清穀을 下利하는 경우나, 少陰證의 傷寒에 활용되고 있는 처방이다. 본 실험에서는 이러한 여러 가지 병을 일으키는 *Streptococcus pneumoniae*를 한약재를 이용하여 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있는지를 연구해 보고자 하였다. 이에 저자는 감기환자로부터 *Streptococcus pneumoniae*를 분리 동정하여 *Streptococcus pneumoniae* 59라 命名하였으며 그 특성을 조사하였다. 또한 少陰人의 傷寒을 치료하는 데 쓰는 한의학 처방인 官桂附子理中湯의 추출물을 이용하여 *Streptococcus pneumoniae*에 대한 항균활성의 효과에 대하여 조사하였다.

실 험

1. 재료

1) 官桂附子理中湯의 조성

본 실험에 사용된 약제는 少陰人의 陽虛를 겸한 傷寒證에 사용되는 처방인 官桂附子理中湯을 이용하였으며⁵⁾, 그 처방 구성은 아래의 Table 1과 같다.

Table 1. Medicinal Stuff Composition of Gwankeibujilijung-tang

Medical stuffs	Herbal name	Capacity
인삼(人蔘) (한국산)	Ginseng Radlx	12g
백출(白朮) (중국산)	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	8g
건강포(乾薑炮) (중국산)	Zingiberis Siccatum Rhizoma Preparat	8g
육계(肉桂) (중국산)	Cinnamomi Cortex	8g
백작약(白芍藥) (한국산)	Paeoniae Radix Alba	4g
진피(陳皮) (중국산)	Citri Pericarpium	4g
감초(甘草) (중국산)	Glycyrrhizae Radix	4g
부자포(附子炮) (중국산)	Aconiti lateral Preparata Radix Preparat	4g
합 계		52g

2) 官桂附子理中湯 추출물의 제조

2차 증류수 1 L에 官桂附子理中湯의 2첩 분량을 넣고 약탕기(DWP 5000-M, 대웅(주), 한국)로 2시간 30분 가량 추출한 후 이 추출액을 filter paper (whatman No1 England)로 여과한 후 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R-144, Germany)에서 100 ml로 농축하여 냉동실과 냉장실에 보관하면서 항균 활성을 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 또한 pH가 항균 활성에 어떤 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 열수 추출한 후의 pH를 측정하였다.

3) 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 2005년 2월에서 12월까지 대구한의대학교 부속한방병원에 내원한 감기 환자

Table 2. Usage of Media Used Inthis Study

Media	Usage
Blood agar	isolation of <i>Streptococcus pneumoniae</i> 59
Thioglycollate broth	proliferation of <i>Streptococcus pneumoniae</i> 59
Brain heart infusion broth	culture of <i>Streptococcus pneumoniae</i> 59
Mueller Hinton(broth)agar	antifungal test of <i>Streptococcus pneumoniae</i> 59

의 구강부위를 면봉으로 도말하여 샘플을 수집하여 *Streptococcus pneumoniae* 59로 순수분리 동정된 균주를 사용하였다.

4) 사용배지

균의 분리를 위해서는 5% Blood agar plate (Difco, USA)를 사용하였고, 균의 증식을 위해서는 Thioglycollate broth (Difco, USA)를 사용하였으며 균주를 보관하였다. 실험에 사용할 때에는 Brain heart infusion broth (Difco, USA)에 증식하여 사용하였다. *Streptococcus pneumoniae* 59에 대한 항균력 실험을 위해서는 Mueller Hinton agar와 Mueller Hinton broth (Difco, USA)를 사용하였다.

5) 균주의 보관

순수 분리된 *Streptococcus pneumoniae* 59는 Brain heart infusion agar plate에 접종하여 37 °C에서 30시간 배양한 다음 냉장실에 보관하면서 실험에 사용하였으며 4일에 한 번씩 Blood agar plate에 배양한 다음 배양된 *Streptococcus pneumoniae* 59 colony를 새로운 Brain heart infusion agar plate에 계대 하면서 균주를 보관 관리하였다.

2. 방법

1) *Streptococcus pneumoniae* 59의 동정

(1) Direct smear

균의 분리를 위해 멸균면봉으로 감기환자의 구강에서 채취한 검체를 5% Blood agar plate에 도말한 다음 37°C에서 30시간 배양한 후 집락 주위에 녹색의 불투명한 용혈이 있는 집락을 선택하였다.

(2) Gram staining

분리된 균은 Brain heart infusion agar plate에 배양한 다음 Hucker 등의 방법⁶⁾을 변형하여 염색하여

현미경으로 관찰하였다.

(3) catalase test

Brain heart infusion agar plate에 배양한 분리된 균체 소량은 10% H₂O₂ 용액에 넣어 거품의 발생 여부를 catalase 생성능을 조사하였다⁷⁾.

(4) Optochin susceptibility test

Blood agar plate 배지에 분리된 균을 고르게 펴 바른 다음 그 위에 optochin disc를 놓고 24시간 배양하였다. 그후 disk 주위에 발육억제대가 생성이 된 균주를 optochin에 감수성이 있는 것으로 확인하여 감수성이 있으면 일단 분리된 균을 1차적으로 *Streptococcus pneumoniae*로 추정을 하였다⁸⁾.

(5) Bile solubility test

분리된 균을 Brain hear infusion broth에 배양한 다음, 균이 배양된 Brain heart infusion broth에 10% sodium deoxcholate를 1-2방울 떨어뜨려 탁도를 관찰하였다. 배양액이 맑게 변하면 담즙에 균이 용해된 것으로 확인을 하였다⁸⁾.

(6) Inulin fermentation test

분리된 균을 Brain hear infusion broth에 Inulin을 1%가 되게 첨가한 다음 37°C에서 5일간 배양한 다음 산성도를 측정하였다. acid 생성물은 Inulin fermentation을 의미한다⁹⁾.

(7) Neufeild quellung test

배양관 균액을 슬라이드글라스에 놓고 *Streptococcus pneumoniae*의 항혈청과 methylene blue 용액을 한 두 방울 떨어뜨려 혼합한 후에 현미경으로 관찰을 하였다.

폐렴구균과 항혈청이 일치하여 반응하는 경우 협막이 심하게 팽화되는 것을 관찰할 수 있다¹⁰⁾.

2) *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육곡선 조사

500 ml의 삼각 플라스크에 Brain hear infusion broth를 100 ml를 넣고 고압증기 멸균한 다음 배지를 식힌 후 미리 배양해 놓은 *Streptococcus pneumoniae* 59를 1 cc 접종하여 37°C shaking incubator에서 160 stroke/min으로 진탕배양하면서 각 시간대 별로 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)을 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 확인하였다.

3) *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육최적 pH 조사

Brain hear infusion broth 배지의 pH를 각각 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 9.5로 조정된 다음 100 ml의 삼각 플라스크에 pH가 조정된 배지를 각각 20 ml씩 분주하여 고압증기 멸균한 후 식힌 다음 미리 배양해 둔 균체를 400 μ l 접종하여 shaking incubator에서 160 stroke/min으로 30시간 배양한 후 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)을 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육 최적 pH를 확인하였다.

4) *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육최적온도 조사

Brain hear infusion broth 배지를 100 ml의 삼각 플라스크에 20 ml씩 분주하여 고압증기 멸균한 후 식힌 다음 전 배양한 균체를 400 μ l 접종하여 26°C, 30°C, 37°C, 45°C shaking incubator에서 160 stroke/min으로 30시간 배양한 후 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육최적온도를 확인하였다.

5) *Streptococcus pneumoniae* 59에 대한 官桂附子理中湯 추출물의 항균활성 측정

官桂附子理中湯 추출물의 *Streptococcus pneumoniae* 59에 대한 항균활성 측정은 Zaika의 방법¹¹⁾을 변형하여 한천배지 확산법(disc-agar plate diffusion method)으로 측정을 하였다. 항균활성을 측정하기 위하여 Macfarland tube No. 0.5의 탁도로 맞춘 전배양한 *Streptococcus pneumoniae* 59균액을 멸균된 면봉으로 Mueller-Hinton agar plate에 얇게 도말한 다음 官桂附子理中

湯 추출물을 50 μ l loading 해서 미리 건조시켜 놓은 paper disk (ϕ 8mm, Do910606 Toyo Roshi Kaisha. Ltd. Japan)를 올려놓은 다음 37°C incubator에서 30 시간 배양하여 paper disk 주위에 형성된 inhibition zone을 Autocaliper (CD-20체, Absolute Digimatic Mitutoyo corp, Japan)로 직경을 mm단위로 측정하여 항균력을 확인하였다.

6) 官桂附子理中湯 추출물의 MIC (Minimal Inhibitory Concentration)검색

MIC는 오 등의 방법¹²⁾을 이용하여 검색하였다. 10 ml의 Mueller-hinton broth가 들어있는 6개의 시험관에 미리 배양한 *Streptococcus pneumoniae* 59를 105 cfu/ml의 농도로 분주한 후 官桂附子理中湯추출물을 각각의 시험관에 4, 8, 12, 16, 20, 24 μ l의 양만큼 첨가한 후 37°C에서 30시간 배양하여 탁도를 나타내지 않는 최소저해농도를 MIC (Minimal Inhibitory Concentration)로 나타내었다.

7) 官桂附子理中湯 추출물의 열 안정성 조사

官桂附子理中湯 추출물의 열 안정성을 조사하기 위하여 官桂附子理中湯추출물과 이 官桂附子理中湯추출물을 121°C, 1.5기압에서 15분간 멸균한 추출물을 60 μ l씩 분주하여 건조시켜 놓은 disk paper를 *Streptococcus pneumoniae* 59를 MacFarland tube No 0.5의 탁도로 맞추어 얇게 도말한 Mueller Hinton agar 배지 위에 올려놓은 다음 37°C에서 30시간 배양하여 두 가지 시료의 inhibition zone 크기를 비교하여 열에 대한 안전성을 조사하였다.

8) 官桂附子理中湯 추출물의 pH 안정성 조사

官桂附子理中湯 추출물의 pH 안정성을 조사하기 위하여 추출한 시료를 각각 10 cc 취하여 염산 또는 수산화나트륨으로 pH를 3, 5, 7, 9, 11로 조절한 후 상온에서 1시간 가량 방치 하였다. 이후 다시 최적 pH인 7로 중화시켜서 추출물을 60 μ l씩 분주하여 건조시켜 놓은 disk paper를 *Streptococcus pneumoniae* 59를 MacFarland tube No 0.5의 탁도로 맞추어 얇게 도말한 Mueller Hinton agar 배지위에 올려놓은 다음 37°C에서 30시간 배양하여 각 시료의 inhibition zone 크기를 비교하여 pH에 대한 안전성을 조사하였다.

성 적

1. 분리한 균주의 동정과 특성

분리한 *Streptococcus pneumoniae* 59 균주의 형태 학적인 특성을 조사한 결과 Blood agar plate에 30시간 배양하였을 때 직경 1 mm 정도의 투명하고 원반형의 납작한 집락주위에 적혈구를 부분적으로 용혈하여 α-용혈(녹색)을 생성하였으며 시간이 경과함에 따라 자가분해 효소에 의해 집락의 중앙부가 함몰되어 배꼽 모양을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 *Streptococcus pneumoniae* 59의 집락은 투명한 원반형의 평편(plate), 배형(umblicoid), 기름방울(oil droplets), 점초성(mucoid)의 모양이 관찰되었다. 분리한 *Streptococcus pneumoniae* 59 균주를 Gram staining 하였을 때 Gram 양성의 lancet모양 쌍구균으로, 0.8 μm 정도의 크기로 관찰되었다. 또한 구강에서 채취한 가검물을 직접 도말한 표본에서는 협막이 확인되었다(Table 3).

분리한 *Streptococcus pneumoniae* 59 균주의 생화 학적인 특성을 조사한 결과 catalase test에서는 양성 반응을 보였으며 optochin susceptibility test에서 감수성이 있었으며 bile solubility test에서 양성반응을 보였으며 Neufeild Quellung test에서도 양성반응을 보였다(Table 3). 최종적으로 API Strepto Kit system (Bio Merieux)을 이용하여 동정해 본 결과도 *Streptococcus pneumoniae*로 확인되었다.

2. *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육곡선

Brain heart infusion broth 배지에 *Streptococcus pneumoniae* 59를 37°C에서 배양하며 생육곡선을 조사한 결과 분리된 *Streptococcus pneumoniae* 59는 약 30시간 가까이 배양하였을 때 log phase에 도달하는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

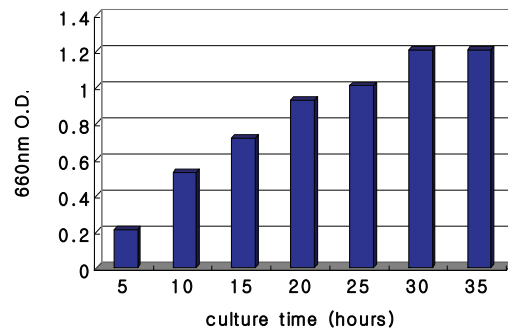


Fig. 1. Time course of selected *Streptococcus pneumoniae* 59

3. *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육최적 pH

pH가 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5로 조정된 Brain heart infusion broth 배지에 *Streptococcus pneumoniae* 59를 배양하여 *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육최적 pH를 조사한 결과 생육을 위한 최적의 pH는 7.5로 나타났으며 산성 쪽의 pH보다는 약 알칼리 쪽에서 균의 생육이 왕성한 것으로 나타났다(Fig. 2).

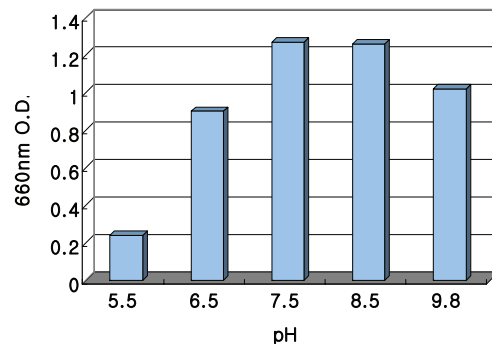


Fig. 2. Optimum pH of selected *Streptococcus pneumoniae* 59

4. *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육 최적온도

Brain heart infusion broth 배지에 *Streptococcus*

Table 3. Morphological and Biochemical Characteristics of Selected *Streptococcus pneumoniae* 59

Morphological characteristic		Biochemical characteristic	
Direct smear	lanceolate diplococci	Catalase test	positive
		Optochin susceptibility test	susceptible
		Bile solubility test	soluble
Gram stain	positive	Inulin fermentation test	positive
		Neufeild Quellung test	positive

pneumoniae 59를 각 26°C, 30°C, 37°C, 45°C에서 배양하여 *Streptococcus pneumoniae* 59의 생육 최적온도를 조사한 결과 생육을 위한 최적의 온도는 37°C로 나타났으며 45°C에서 배양한 경우 생육도는 약 50%가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

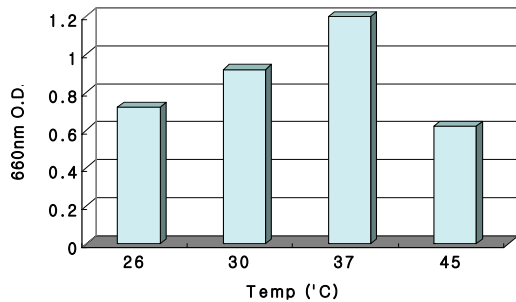


Fig. 3. Optimum temperature of selected *Streptococcus pneumoniae* 59

5. 官桂附子理中湯 추출물의 *Streptococcus pneumoniae* 59에 대한 항균활성

Zaika의 방법¹¹⁾을 변형하여 *Streptococcus pneumoniae* 59의 항균활성을 측정하였다. 5회 이상 실험하여 inhibition zone의 크기를 측정한 결과를 sigma plot 5.0 program을 이용하여 평균 ± 표준편차로 나타내었을 때 inhibition zone의 크기는 9.83 ± 0.01로 나타났다(Table 4).

Table 4. Antimicrobial Activity of Extract from *Gwankeibujalijung-tang*

Extract	Inhibition zone (mm)
<i>Gwankeibujalijung-tang</i>	9.83 ± 0.11

6. 官桂附子理中湯 추출물의 MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 검색

항생제에 대한 세균의 감수성 측정에 가장 널리 사용되는 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)검색을 오등의 방법¹²⁾을 이용하여 검색한 결과 官桂附子理中湯 추출물의 MIC는 12 μl로 확인 되었다(Table 5).

7. 官桂附子理中湯 추출물의 열 안정성

官桂附子理中湯 추출물과 그 추출물을 고압증기로

Table 5. Minimal Inhibitory Concentration of *Gwankeibujalijung-tang* Extract Against Selected *Streptococcus pneumoniae* 59

Extract	± MIC (μl)
<i>Gwankeibujalijung-tang</i>	12 ± 0.70

Table 6. Effect of Heat Treatment on the Growth Inhibitory Activity of *Gwankeibujalijung-tang* Extract Against Selected *Streptococcus pneumoniae* 59

Extract	Inhibition zone (mm)	
	100°C 2.5 hr	121°C 15 min
<i>Gwankeibujalijung-tang</i>	9.83 ± 0.11	10.4 ± 0.11

멸균한 두 시료를 가지고 재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 5회 이상 실험하여 inhibition zone의 크기를 측정한 결과를 sigma plot 5.0 program을 이용하여 평균 ± 표준편차로 나타내었을 때 고압증기로 멸균한 시료가 더 큰 inhibition zone을 가지는 것으로 보아 이 추출물은 열에 매우 안정하다는 것을 확인할 수 있었다(Table 6).

8. 官桂附子理中湯 추출물의 pH 안정성

官桂附子理中湯 추출물의 pH 안정성을 재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 5회 이상 실험하여 inhibition zone의 크기를 측정한 결과를 sigma plot 5.0 program을 이용하여 평균 ± 표준편차로 나타내었을 때, 그 결과가 pH 3, 5, 7, 9, 11 등의 다양한 pH에서도 inhibition zone의 크기에 변화가 없는 것으로 보아 이 추출물은 다양한 범위의 pH에서 안정성을 가지는 것으로 확인 되었다(Table 7).

Table 7. Effect of pH Treatment on the Growth Inhibitory Activity of *Gwankeibujalijung-tang* Extract Against Selected *Streptococcus pneumoniae* 59

Extract	Inhibition zone (mm)				
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11
<i>Gwankeibujalijung-tang</i>	9.81±0.01	9.81±0.02	9.81±0.02	9.81±0.01	9.81±0.01

고찰

官桂附子理中湯은 李濟馬가 저술한 《東醫壽世保元》⁵⁾의 少陰人胃受寒裏寒病論에 등장하는 처방으로,

少陰證에 淸穀을 下利하는 데에 健脾하면서 降陰하는 처방으로 활용되었다. 또한 少陰病에 다만 厥冷하고 땀이 없는 경우에 麻黃을 써서 發汗하지 말고, 官桂附子理中湯을 사용하기도 하였으며, 少陰病 傷寒으로 吐하려고 해도 吐하지 못하며, 心煩하고, 다만 자고만 싶어하는 증상에도 官桂附子理中湯을 사용하였고, 또한 傷寒의 陰盛隔陽에도 사용하였다⁵⁾.

官桂附子理中湯에 관한 연구는 매우 드문 편인데, 김¹³⁾은 Hydrocortisone acetate를 투여하여 陽虛證을 유발한 실험동물에 대하여 官桂附子理中湯이 회복효과가 있음을 밝혔다.

*Streptococcus pneumoniae*에 의한 질병의 발생빈도는 두 살 이하의 유아 또는 육십 살 이상의 노년층에서 가장 높게 나타나고 있다³⁾. *Streptococcus pneumoniae*는 구형이나 계란형의 그람 양성균으로 액체배지에서 배양 했을 때에는 사슬모양을 이루고 고체배지에서 배양 했을 때에는 쌍구균을 이룬다. 이 *Streptococcus pneumoniae*는 어린이들에게서 세균성 수막염²⁾과 중이염¹⁴⁾을 일으키는 주된 요인으로 알려져 있다. 또한 폐농양, 심낭염, 농흉(empyema), 흉막 유출(pleural effusions) 등의 질병을 일으키고, 어린이에게서 균혈증(bacteremia)을 일으키기도 한다. 또한 부비강염(sinusitis), 유양돌기염(mastoiditis), 관절염(arthritis), 복막염(peritonitis), 심내막염(endocarditis)도 일으키며, 여성의 질 속에서 골반염(pelvic infection)을 일으키기도 한다. 특히 영아나 취학 전후의 소아에게서 급성 화농성 감염의 원인균으로 *Haemophilus influenzae*와 함께 검출되는 빈도가 높다고 알려져 있다⁴⁾.

*Streptococcus pneumoniae*은 그람염색에 의해 양성으로 염색되며 란세트(lancet)형의 쌍구균 배열을 하고 있으며 통성 혐기성 세균으로 분류가 된다. 크기는 직경 0.5 μm 에서 1.25 μm 정도이며, 균체 주위에 협막(capsule)을 가지고 있는 것이 특징이다¹⁵⁾. 특히 폐렴구균은 신선한 배양액 중에서는 전형적인 그람 양성균의 쌍구균을 볼 수 있으나 오래되면 신속히 그람음성이 되어 자발적으로 용해되는 경향이 있다. 이러한 폐렴구균의 자가 용해는 계면활성제로 강하게 촉진되는데 우담즙(10%)이나 sodium deoxycholate (3%)를 가하게 되면 폐렴구균은 몇 분 사이에 용해된다. 고형 배지에 optochin (ethylhydrocuprein HCl, 1 : 4,000)을 가했을 경우 역시 동일하게 용해되는데 이러한 성질은 폐렴구균과 다른 연쇄상 구균을 감별하는 데 이용된다. 그리하여 폐렴구균의 분리 동정에는 혈액 한천

배지에서의 용혈성 및 집락 성상, 그람 염색, optochin 감수성 시험, 담즙용해 시험, catalase 시험, latex 응집반응, 협막팽화 시험 등을 주로 이용한다¹⁶⁾.

*Streptococcus pneumoniae*가 어떻게 병을 일으키는지에 대한 연구가 많이 진행되어 왔으나 아직까지 그 명확한 원인은 모두 다 알려져 있지 않다. 그러나 그 요인의 하나로서, 협막과 최근에 발견된 여러 가지 단백질들이 알려져 있다. 이러한 단백질들은 인체의 食菌作用으로부터 자신을 보호할 수 있는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 또한 *Streptococcus pneumoniae*가 여러 가지 염증을 유발하는 물질을 세포외로 분비하는 것으로도 알려져 있다¹⁸⁾.

이러한 *Streptococcus pneumoniae*는 인체의 상기도에서 주로 발견되며 정상시에 이 *Streptococcus pneumoniae*는 주기적으로 집락화하거나 또는 하기도로 일부가 침투하기도 한다. 이렇게 기도로 침투한 *Streptococcus pneumoniae*는 기도의 점막에 의해 갇힌 후 섬모운동으로 제거되거나 인체의 대식세포에 의해 식작용된다. 그러나 호흡기에 바이러스의 침투, 또는 물리적 손상, 흡연, 화학약품에 의해 섬모상피가 손상이 되거나 알콜 중독, 또는 당뇨와 같은 병이 있는 경우 인체의 대식세포 활동이 감소되고 손상된 섬모상피에서 *Streptococcus pneumoniae*의 생장이 촉진된다.

폐렴이라고 알려진 호흡기 질환의 60-80 %가 이 *Streptococcus pneumoniae*에 야기되며 미국에서는 매년 대략 150,000-300,000명의 사람들이 감염되며 13,000-66,000명이 사망한다고 알려져 있다³⁾. *Streptococcus pneumoniae*의 병원성은 대부분 이 *Streptococcus pneumoniae*의 표면에 기인한다고 알려져 있으나 아직까지 명확한 독성의 요소의 목록은 알려져 있지 않다. 그러나 이 독성 요소들 중의 하나는 *Streptococcus pneumoniae*를 둘러싸고 있는 협막과 최근에 발견된 몇 가지 단백질들이다¹⁷⁾. 이 협막은 히알루론산(hyaluronic acid)으로 구성된 다당질(capsular polysaccharide)이며 이 협막의 다당질은 대식세포에 의해 잡아먹혀 죽는 것으로부터 자신을 보호하는 것으로 알려져 있다. 그리하여 인체의 면역방어 시스템으로부터 자신을 방어할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또 다른 세포벽 성분과 세포내의 독소인 뉴모라이신(pneumilysin)을 포함한 다른 요소들은 주로 *Streptococcus pneumoniae*의 감염에 의한 염증을 일으키는 원인으로 작용한다고 알려져 있다¹⁸⁾. 염증을 일으키는 과정은 autolysin에 의해 *Streptococcus pneumoniae*가 분해된 후에

완전히 완성된다. *Streptococcus pneumoniae*에 의해 발생하는 질병들의 대부분의 증상들로 염증이 생성되는 것으로 보아 이 뉴모라이신과 또 다른 세포벽 성분을 포함한 이 요소들은 *Streptococcus pneumoniae*가 숙주 세포에 감염되었을 때 숙주세포를 죽이는 데 직접적인 영향을 주는 것으로 생각할 수 있다⁴⁾. *Streptococcus pneumoniae*가 폐포에 감염되어 혈액세포와 액체가 폐에 차면 이러한 요소들에 의해 염증이 유발되며 가래가 녹색의 색을 띠는데, 이는 기침할 때 폐에서 나온 혈액 때문이라고 알려져 있다.

이러한 염증의 생성이 다른 조직이나 기관으로 *Streptococcus pneumoniae*의 감염의 전이를 아주 용이하게 하지만 이들 두 요소 즉 뉴모라이신과 또 다른 세포벽 성분만이 질병을 일으키는 절대적 요소인지는 명확하지 않다. 또한 *Streptococcus pneumoniae*에 의한 hydrogen peroxide의 생성과 이 hydrogen peroxide의 독성이 쥐 폐포의 상피세포에 영향을 준다는 결과가 알려져 있다. 그리하여 이 hydrogen peroxide는 *Streptococcus pneumoniae*가 폐의 감염을 일으켜 질병을 발생시키는 또 다른 경로가 있다는 것을 생각할 수 있게 하였다¹⁹⁾.

이렇게 *Streptococcus pneumoniae*의 감염에 의한 질병은 penicillin G, cefotaxime, ceftriaxone, 오프로사신 등의 항생제로 치료를 하여 사망률을 현저히 줄여왔다. 또한 페니실린에 민감한 환자는 erythromycin이나 tetracycline을 사용하여 치료를 하여 왔다. 그러나 최근 들어 penicillin과 tetracycline에 저항성을 가지는 *Streptococcus pneumoniae*가 발견되면서 이러한 내성균에 의한 감염으로 인한 사망이 증가하고 있는 추세여서 사회적인 문제로 대두되고 있다.

최근까지 한의학계에서는 한약재에 대한 항균활성의 검색은 많이 이루어져 왔으나 한약제제에 대한 항균활성의 검색에 대해서는 연구가 미진한 편이었다. 그리하여 본 연구에서는 이러한 여러 가지 질병을 일으키는 *Streptococcus pneumoniae*를 한약재를 이용하여 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있는지를 조사하고자 하였으며, 감기환자로부터 *Streptococcus pneumoniae*를 분리 동정하여 *Streptococcus pneumoniae* 59라命名하였고, 그 특성을 조사 하였다. 또한 少陰人이 中風으로, 대·소변을 보지 못하고 惡心, 咳嗽하는 등의 증상을 치료하는 데 사용하는 한의학 처방인 官桂附子理中湯의 추출물을 이용하여 *Streptococcus pneumoniae*에 대한 항균효과에 대하여 조사하였다.

분리 동정된 *Streptococcus pneumoniae* 59는 37℃

에서 약 30시간 가까이 배양하였을 때 log phase에 도달하는 것으로 확인되었으며 생육최적 pH를 조사한 결과 생육을 위한 최적의 pH는 7.5로 나타났다. 또한 생육을 위한 최적의 온도는 37℃로 나타났다. 官桂附子理中湯의 MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 검색한 결과 官桂附子理中湯 추출물의 MIC는 12 μ l로 확인되었으며 이 추출물은 열에 매우 안정하다는 것을 확인할 수 있었고 또한 다양한 범위의 pH에서 안정성을 가지는 것으로 확인되었다.

본 연구 결과로 보아 감기환자의 구강에서 분리된 *Streptococcus pneumoniae* 59에 대하여 官桂附子理中湯의 추출물은 높은 항균활성을 보였으며 적은 농도에서도 항균 활성이 강한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 연구결과를 바탕으로 官桂附子理中湯의 항균활성에 대하여 임상에서 직접 활용할 수 있도록 더 많은 연구가 필요하리라고 본다.

결론

감기환자의 구강에서 분리한 *Streptococcus pneumoniae* 59에 대한 官桂附子理中湯의 항균효과를 구명하기 위하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 항균활성의 측정결과 官桂附子理中湯 추출물의 inhibition zone은 9.83 ± 0.11 mm 였다.
2. 官桂附子理中湯 추출물의 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)는 12 μ l 였다.
3. 고압 증기 멸균한 시료가 더 큰 inhibition zone (10.4 ± 0.11 mm)을 가지는 것으로 보아 이 추출물은 열에 매우 안정하다는 것을 확인할 수 있었다.
4. 다양한 pH에서도 inhibition zone의 크기에 변화가 없는 것으로 보아 이 추출물은 다양한 범위의 pH에서 안정성을 가지는 것으로 확인 되었다.

이상과 같은 결론으로 감기환자의 구강에서 분리 동정된 *Streptococcus pneumoniae* 59에 대한 官桂附子理中湯의 추출물은 높은 항균효과를 보여 주었다.

참고문헌

1. Watson, DA, Musher, DM, Jacobson JW and Verhoef J. A brief history of the pneumococcus

- in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin Infect Dis*. 1993. Nov ; 17(5) : 913-24.
2. Dagan R, Isaachson M, Lang R, Karpuch J, Block C and Amir J. For the Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. Epidemiology of pediatric meningitis caused by Haemophilus influenzae type b, Streptococcus pneumoniae, and Neisseria meningitidis in Israel: a 3-year nationwide prospective study. *J Infect Dis*. 1994 ; 169 : 912-6.
 3. Gray BM, Converse GM and Dillon HC Jr. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. *J Infect Dis*. 1979 ; 140 : 979-83.
 4. Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis*. 1992 ; 14 : 801-9.
 5. 이제마 원저. 동의학연구소 역. 原文對譯 東醫壽世保元. 서울 : 여강출판사. 2002 : 96-7, 102-3, 106-9, 148.
 6. Snibert RM and Krieg NR. General characterization, In Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR and Phillips GB (ed.). Manual of methods for general bacteriology. Washington DC : American Society for Microbiology. 1981 ; 409-43.
 7. Facklam R and Elliott JA. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin Microbiol Rev*. 1995 ; 8 : 479-95.
 8. Burdash NM and West ME. Identification of *Streptococcus pneumoniae* by the Phadebact coagglutination test. *J Clin Microbiol*. 1982 March ; 15(3) : 391-4.
 9. Sottile MI. and Rytel MW. Application of counterimmunoelectrophoresis in the identification of *Streptococcus pneumoniae* in clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 1975 Sep ; 2(3) : 173-7.
 10. Browne K, Miegel J and Stottmeier KD. Detection of pneumococci in blood cultures by latex agglutination. *J Clin Microbiol*. 1984 May ; 19(5) : 649 - 50.
 11. Zaika LL. Spices and herbs: their antibacterial activity and its determination. *J Food Saf*. 1988 ; 23 : 97-118.
 12. 오덕환, 함홍시, 박부길, 안철, 유진영. 식품부패 및 병원미생물에 대한 천연약용식물 추출물의 항균효과. 한국식품과학회지. 1998 ; 30(4) : 957-63.
 13. 김진상. 소음인 升陽益氣附子湯과 官桂附子理中湯이 陽虛證에 미치는 影響에 관한 실험적 연구. 사상의학회지 1989 ; 1(1) : 87-112.
 14. Bluestone CD, Stephenson JS and Martín LM. Ten-year review of otitis media pathogens. *Pediatr. Infect Dis J*. 1992 ; 11(Suppl. 8) : 7-11.
 15. Sorensen UBS, Blom J, Birch-Andersen A and Henrichsen J. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect Immun*. 1988 ; 56 : 1890-1896.
 16. Mundy L S, Janoff EN, Schwebke KE, Shanholtzer CJ and Willard KE. Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Optochin, bile solubility, quellung, and the AccuProbe DNA probe tests. *Am J Clin Pathol*. 1998 ; 109 : 55-61.
 17. Neeleman C, S Geelen, P Aerts, M Van Tilburg, D Watson, J Verhoef, A Fleer and H Van Dijk. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* is associated with a regulator factor H. In Program and abstracts of the 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993 : 219. abstr. 548.
 18. Johnston RB Jr. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev. Infect Dis*. 1991 ; 13(Suppl. 6) : S509-S17.
 19. Duane PG, Rubins JB, Weisel HR and Janoff EN. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun*. 1993 ; 61 : 4392-7.