

환경온도 및 배지성분의 차이가 거식세포 식균작용에 미치는 영향

Influence of temperature and media on the phagocytic activities of rabbit macrophage

서울대학교 의과대학 미생물학교실
<지도 이승훈 교수>

박원철

I. 서론

거식세포는 숙주내에 침입한 불필요하고 해로운 인자 를 직접 또는 간접적으로 탐식하여 제거 처리하는데 관여하므로써 숙주의 방어기능의 주축을 이루고 있다.¹⁾ ^{2), 3), 4), 5), 6)} 이 사실이 알려짐에 따라서 거식세포의 식균 현상에 관한 양상을 구명하려는 많은 연구와 보고가 이루어졌다.^{7), 8), 9), 10), 11), 12), 13), 14)}

식균현상이 Metchnikoff⁶⁾에 의하여 발견된 이래, 많은 연구와 논의가 있었으나 먼저 체액성분이 감염질환에 작용하여 일차적 방어기능을 일으키며 곧 이어서 식균세포의 활동이 시작된다.^{1), 2), 4), 7), 8)}

처음에 나타나는 식균세포는 단백체혈구이나 염증변화가 진행함에 따라 거식세포가 나타나며 식균되지 않는 미생물과 그 산물, 식균한 백혈구 혹은 조직과 물질 등을 탐식 처리하게 된다.^{1), 2), 3)}

거식세포의 식균작용과 세포내 처리의 기전에 관하여 Hirsch²⁾, Cohn⁷⁾, Mackaness⁸⁾ 등이 많은 사실을 밝혀냈다.

또 식균작용 및 그후의 세포내 처리에 있어서 균종 세포의 생리상태, 균력인자, 침입부위, 숙주의 종류, 일반건강상태 및 면역도등 각종인자가 영향을 미칠것이 추측되며, 또 실험적으로 증명, 보고되고 있다.^{1), 13), 14)}

즉 이러한 거식세포의 식균양상을 구명하는데 있어서 일정한 수의 세포부유액에 일정수의 특정 세균을 첨가하여 관찰되었다.^{7), 8), 12), 13), 14)}

Lee¹³⁾는 토끼 거식세포의 10⁴/cc 부유액에 Staph. albus, Staph. aureus, Es. coli, 또는 Ps. aeruginosa 등의 10⁸/cc, 10⁴/cc, 10⁶/cc, 10⁸/cc의 균액을 첨가 부

유시켜 37°C에서 30분, 60분 및 120분간 접촉시킨 후 식균세포의 출현도, 세포내 균수의 백분율 및 식균세포당 균수를 검색하여, 세포수와 균수의 비가 대체로 1:100전후, 관찰 시간은 30분내에 함이 균능력 관찰에 있어서 가장 적당하다는 점을 시사하였다.

저자는 환경온도와 균세포부유액의 구성이 달라지면 식균활동에 영향을 미칠 것이 예측되어, Staph. aureus 와 Es. coli의 두종의 균을 선정하여 양균의 10⁶/cc를 각각 첨가한 10⁴/cc 세포 보유액, 즉 세포-균혼합액 4종류씩을 제조 사용함으로서 37°C와 실온 24°C~26°C에 두어 그 식균양상을 관찰한바 있기에 이에 보고한다.

II. 실험재료 및 방법

A. 배지

1. 세균부유액 조제에 사용된 세균 중식용 배지로는 pH 7.4의 Brain Heart Infusion Broth(B.H.I.B.)를 사용하였다.

2. 세포수집액(Cell-Collecting Fluid, CCF); Marcus⁹⁾, Cha et al¹²⁾의 방법에 따라서 Earle의 Balanced Salt Solution(BSS)를 기본배지로 하고 이 BSS에 5% Lactoalbumine Hydrosylate를 첨가 유용시킨 용액(즉 L.A.H.)를 조제하여 BSS와 L.A.H.를 혼합한 후 Heparin을 첨가 혼합 사용하였다.

즉 CCF는 BSS와 LAH를 9:1의 비율로 혼합한 후 Heparin을 20unit/cc 첨가하였다. pH는 7.2~7.3으로 하였다.

3. 균-세포 부유액:

1) 세포유지액(Cell-Maintenance Fluid; CMF); BSS, LAH 및 정상토끼혈청을 7:1:2의 비율로 혼합, pH 7.2.

~7.3으로 마추어 사용하였다.

2) 생리식염수; 중유수에 0.85%의 NaCl를 가하여 멀균시킨 생리식염수를 조제 사용하였다.

3) Ringer 액; 시판된 중외제약제품의 Ringer 액을 사용하였다.

4) 정상토끼혈청; 실험 실시 전일에 체중 약 2kg의 토끼 세마리에서 전혈을 뽑아 냉장 보관하여 일은 혈청을 혼합한 다음 1000r. p. m.에 10분간 원침하여 그 상청부액을 채취하여 사용하였다.

B. 세균균액

서울대학교 의과대학 미생물학교실 보관균주인

Staphylococcus aureus #19

Escherichia coli #75

를 BHIB에 20시간 37°C에서 배양, 증진시켰고, 3000r. p. m.에서 30분간 원심 첨전한 다음 Lee¹³⁾의 방법에 따라 그 침사에 배지와 동량의 멀균식염수를 첨가하여 진탕한 후 다시 1000r. p. m.에 10분간 원침하였다.

이때의 상청부액에 세균이 10⁸/cc 정도 있음을 예비 실험으로 확인한 후 다시 멀균식염수로 10배 계단희석하여 10⁷/cc의 균수를 가진 균부유액을 조제하고 실험에 사용하였다.

C. 거식세포 부유액

대체로 Suter¹⁰⁾, Cha et al¹²⁾ 및 Lee¹³⁾의 방법에 따랐다.

0.02mg/cc의 glycogen 용액 100cc를 체중 2kg 정도의 토끼복강내에 1회 주입하였다. 7~8일 후에 토끼의 이정맥내에 약 10cc의 공기를 주입하여 죽인 후 즉시 약 150cc의 CCF를 토끼 복강내에 주입한 다음 가볍게 토끼의 복부를 massage하였다.

복부 정중선을 따라 2~3cm의 절개를 가하고 capillary pipette를 사용하여 복강내 삼출액을 무균적으로 채취하였는데 약 120cc가 되었다. Marcus⁹⁾에 따라서 삼출액을 1000r. p. m. 10분간 원심 첨전 시킨 후 상청액을 제거하였다. 대부분이 거식세포로 되어 있는 침사를 CMF, 생리식염수, Ringer 액 및 정상토끼혈청 등으로 4종류의 거식세포 부유액을 조제하였는데 Hemocytometer를 사용하여 각기 cc 당 10⁴의 세포가 포함되도록 부유시켜 실험에 사용하였다.

D. 세포-세균 혼합 및 관찰

Lee¹³⁾에 따라 거식세포수는 10⁴/cc로 균수는 10⁸/cc로 포함되도록 세균 종별로 각각 4종류의 혼합 부유액을 만들어 관찰하였다.

즉 4종류의 거식세포 부유액을 cover slip가 들어 있는 Leighton 판에 분주하고 세균 균액을 첨가 혼합하였

는데 이때의 세포 부유액과 균액의 비율을 10:1로 하였다.

이와같이 분주한 각 Leighton 판을 가볍게 진탕한 후 Leighton 판의 편편한 면이 아래쪽을 향하게 약 25도~30도 각도로 기울려 배열하여 37°C 와 실온(24°C~26°C)의 부란기에 두었다.

15분 및 30분이 경과한 후 각 Leighton 판으로부터 cover slip를 꺼내어 전조시킨 다음, 순 methanol로 3분간 고정후 Giemsa 염색을 45분간 실시하여 전조시켜 slide glass 위에 옮기고 balsam 고정한 다음, 식균한 거식세포의 출현율을 검색하였다.

이와같이 현미경으로 식균한 세포의 백분율(%), 세포내 균수의 총 균수에 대한 백분율(%) 및 세포내 균수의 세포당 평균치를 추구하였다.

III. 실험성적

A. 거식세포의 출현율 관찰

1. *Staphylococcus aureus*에 대한 식균거식세포 출현율

cover slip이 들어있는 Leighton 판 4개에 4종류로 조제된 즉 CMF, 생리식염수, Ringer 액 및 정상토끼혈청의 세포부유액(10⁴/cc)에 *Staph. aureus*(10⁸/cc)를 부유토록 첨가하여 만든 세포-세균 혼합액 2cc 씩을 넣고, 37°C 와 실온(24°C~26°C)에 두었다.

37°C에서 15분 및 30분간 접촉시킨 후 cover slip를 꺼내어 전조, Giemsa 염색후에 경검하여 식균한 거식세포의 출현율을 추구하여, 도 1에서 표시된 바와 같은 성격을 얻었다.

도 1에서 보는 바와 같이 15분 경과후에 식균한 세포의 백분율은 CMF 내에서 53%, 식염수내에서 34.5%, Ringer 액내에서 25% 및 정상토끼혈청내에서 43.5%였으며 CMF가 가장 높았고, 정상토끼혈청, 식염수, Ringer 액의 순위로 식균하고 있었다.

30분 경과후에 있어서의 식균세포의 백분율은 CMF 내에서 87.5%, 식염수가 49%, Ringer 액 26% 및 정상토끼혈청이 83.5%로 식균하고 있었으며 역시 CMF가 가장 높았고 정상토끼혈청, 식염수, Ringer 액의 순위로 식균하고 있었다.

즉 37°C에 있어서 *Staph. aureus*를 식균한 거식세포의 출현율은 CMF 내에서 가장 높았고 정상토끼혈청, 식염수, Ringer 액의 순위로 출현하였다.

15분에서 30분 경과후에 CMF 내에서 세포출현이 53%에서 87.5%로 약 30%가 증가하였고, 정상토끼혈청 내에서는 43.5%에서 83.5%로 40%의 증가율로서 현자;

의 순위로 식균세포가 나타났다.

30분간 *Staph. aureus*를 접촉시킨 후 나타난 식균세포의 백분율은 CMF 내에서 33%, 식염수내에서 27.5% Ringer 액내에서 28%, 정상토끼 혈청내에서 67%였으며, 역시 정상토끼 혈청내에서 가장 높은 출현율을 보였고, CMF, Ringer 액, 식염수의 순위로 나타났다.

즉 실온에 있어서는 15분과 30분간의 접촉결과 언제나 정상토끼 혈청내에서 가장 높은 세포출현율을 보였다.

2. *Es. coli*에 대한 식균거식세포 출현율

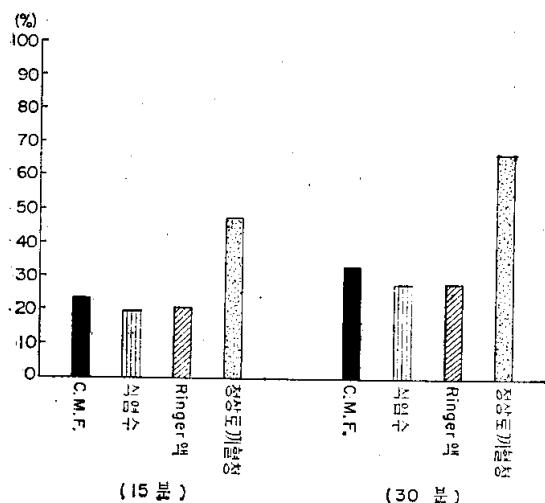
CMF, 생리식염수, Ringer 액 및 정상토끼 혈청 등에 각각 거식세포수가 10^4 /cc 포함도록 부유시킨 다음 *Es. coli*의 균액을 첨가하여 균수가 10^6 /cc가 되도록 10:1의 비율로 혼합한 다음, cover slip 가 들어 있는 Leighton 판에 분주하여 37°C 와 실온(24°C~26°C)에 두었다.

37°C에서 15분 및 30분간 접촉시킨 다음 cover slip 를 꺼내어 건조, 염색후 경검하여 식균한 세포의 출현율을 추구하여 도 3에 표시된 바와 같은 성적을 얻었다.

도 3에서와 같이 15분 경과후에 식균한 거식세포의 백분율은 CMF에서 37.5%였고, 식염수내에서 34%, Ringer 액내에서 12.5%, 정상토끼 혈청내에서 49.5%로 나타났으며, 정상토끼 혈청에서 가장 높았고, CMF, 식염수, Ringer 액의 순위로 나타났다.

30분 경과후에는 CMF 내에서 73%, 식염수내에 76.5%, Ringer 액내에서 13.5%였고 정상토끼 혈청내에서 76.5%였으며 15분 때와는 약간 달리 정상토끼 혈청과 식염수내에서 동일하게 가장 높았고 다음에 CMF 이며 Ringer 액내에서 가장 저조하였다.

도 1. 37°C에서 *Staph. aureus*에 대한 식균거식세포 출현율



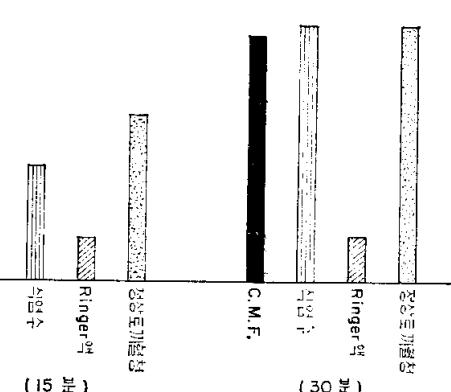
도 2. 24°C~26°C에서 *Staph. aureus*에 대한 식균거식세포 출현율

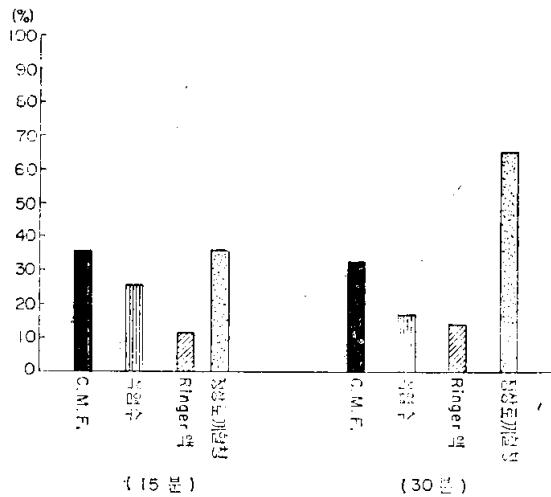
이 식균세포가 출현한데 비해서 Ringer 액내에서는 거의 상승하지 않았다.

실온(24°C~26°C)에서 15분과 30분간 접촉시켜 식균한 거식세포의 출현율을 추구하여 도 2에 표시된 바와 같은 성적을 얻었다.

즉 15분 경과후 식균세포의 백분율은 CMF 내에서 23%, 식염수내에서 19.5%, Ringer 액 내에서 20.5%, 정상토끼 혈청내에서 47.5%로 나타났으며, 이중 정상토끼 혈청내에서 가장 높았으며, CMF, Ringer 액, 식염수

도 3. 37°C에서 *Es. coli*에 대한 식균거식세포 출현율





도 4. 24°C~26°C에서 *Es. coli*에 대한 식균거식세포 출현율

15분에서 30분간 경과후 CMF, 식염수, 및 정상토끼혈청등은 현저한 상승율을 보였으나 오직 Ringer 액에서 만은 불과 1%의 성승율을 보였으며 그 출현율은 가장 낮았다. 특히 식염수내에서의 *Es. coli*에 대한 식균거식세포 출현율이 높은것은 주목할만 하였다.

24°C~26°C 실온에서 *Es. coli*를 식균한 세포의 출현율; 15분 및 30분 경과후 성적은 도 4에서 보는바와 같다.

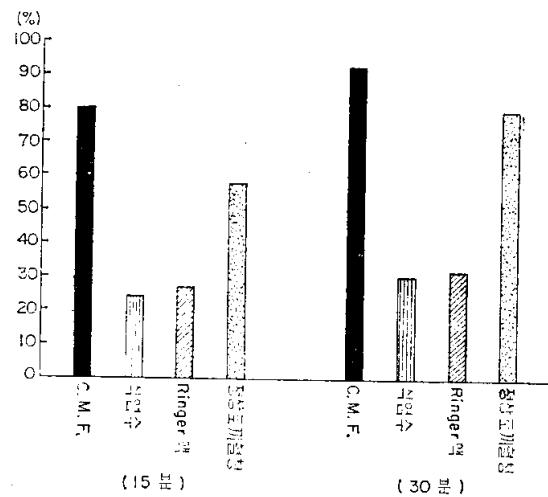
15분간 접촉후 식균세포의 빠분율은 CMF에서 36%였고, 식염수내에서 26%, Ringer 액 내에서 12%였고 정상토끼혈청내에서 36%였으며 CMF와 정상토끼혈청내에서는 동일한 출현율을 보였으며 제일 높고 식염수, Ringer 액의 순위로 나타났다.

30분간 *Es. coli*를 접촉시켜 얻은 식균세포 출현율은 CMF내에서 32.5%, 식염수내에서 17%, Ringer 액내에서 14% 그리고 정상토끼혈청내에서 65%로 나타났고 정상토끼혈청이 현저히 높고 CMF, 식염수, Ringer 액의 순위로 나타났다.

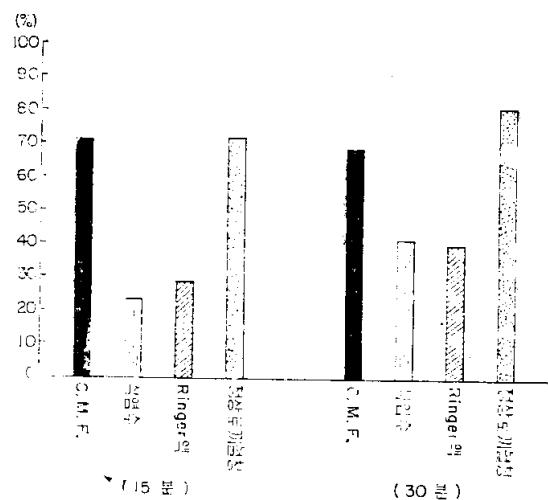
실온에서는 정상토끼혈청내를 제외하고 대체로 출현율이 낮았다. CMF 및 식염수내에서는 30분후가 15분 때보다 오히려 감소되었다.

B. 세균의 세포내 균수에 대한 관찰

1. *Staph. aureus*의 세포내 균수 백분율: $10^4/\text{cc}$ 의 세포가 들어있는 토끼거식세포 부유액 4종류에 각각 *Staph. aureus* $10^6/\text{cc}$ 를 첨가하여 37°C와 실온 24°C~26°C에서 15분 및 30분간 접촉시킨후 200개의 세균증



도 5. 37°C에서 *Staph. aureus*의 세포내균수 백분율



도 6. 24°C~26°C에서 *Staph. aureus*의 세포내균수 백분율

세포내에 들어있는 균수의 백분율을 조사하였다.

37°C에서, 도 5에서 보는바와 같이 15분간 거식세포에 접촉시킨 결과 CMF내에서 80%, 식염수내에서 24%, Ringer 액 내에서 26.5%, 정상토끼혈청내에서 58.5%였고, CMF 내에서 가장 높고, 정상토끼혈청, Ringer 액, 식염수의 순위로 거식세포에 식균되어 있었다.

30분간 접촉시킨 경우에는 CMF 내에서 92.5%, 식염수내에서 30%, Ringer 액 내에서 31.5%, 정상토끼혈

청내에서 80%로 나타났으며, CMF 내에서 92.5%의 높은 비율로 식균되어 있었다.

15분 경과후과 30분 경과후에서 다같이 CMF 내에서 가장 높았고, 정상토끼혈청, Ringer 액, 식염수의 순위로 세포내 균수는 감소되어 있었다.

24°C~26°C 실온에서, 도 6에서 보는바와 같이 15분간 접촉시킨 결과 *Staph. aureus*의 세포내 균수는 CMF 내에서 71%, 식염수내에서 23%, Ringer 액내에서 28.5%, 정상토끼혈청내에서 71.5%로 CMF 내에서와 거의 같은 울로 현저히 높았으나 식염수 및 Ringer 액 내에서는 아주 저조하였다.

30분 접촉시킨후 CMF 내에서 69%로 2%가 감소되었고, 식염수내에서 41.5%, Ringer 액 내에서 40%로 상승하였다. 정상토끼 혈청내에서 81%로 가장 높았다. 결과적으로 정상토끼 혈청내, CMF 내, 식염수내, Ringer 액내의 순위로 세포내 *Staph. aureus* 균이 나타났다.

2. *Es. coli*의 세포내 균수 백분율

거식세포가 10^4 /cc 함유된 4종류의 부유액에 각각 *Es. coli* 을 10^6 /cc 가 되도록 첨가하여 37°C 와 24°C~26°C 실온에서 15분간 또는 30분간 접촉시킨후 세균 200개중에서 거식세포내 들어있는 균수의 백분율을 경검 조사하였다.

37°C 에서는 도 7에서 보는 바와 같다.

15분 접촉후 나타난 세포내 균수의 백분율은 CMF 내에서 79.5%였고, 식염수내에서 72.5%, Ringer 액내에서 43.5%, 정상토끼 혈청내에서 78.5%였고, CMF 내에서 제일 높았고 정상토끼 혈청, 식염수, Ringer 액

내의 순위로 식균되어 있었다.

30분 경과후 나타난 식균세포내 균수는 CMF 내에서 92.5%로 가장 높았고 식염수 내에서 77%, Ringer 액 내에서 48.5%, 정상토끼혈청내에서 82%였으며, CMF, 정상토끼 혈청, 식염수, 및 Ringer 액의 순위로 나타났으며 대체로 균수 백분율의 순위는 15분때와 같다.

24°C~26°C 에서 *Es. coli*의 거식세포내 식균된 균수의 백분율을 조사하였으니, 도 8에 보는 바와 같았다.

15분 경과후 세포내 균수 백분율은 CMF 내에서 84.5%로 가장 높았고 식염수내서 61%, Ringer 액내에서 45%, 정상토끼 혈청내에서 약 70%였고, CMF 내, 정상토끼 혈청, 식염수, Ringer 액내의 순위로 식균된 균이 나타났다.

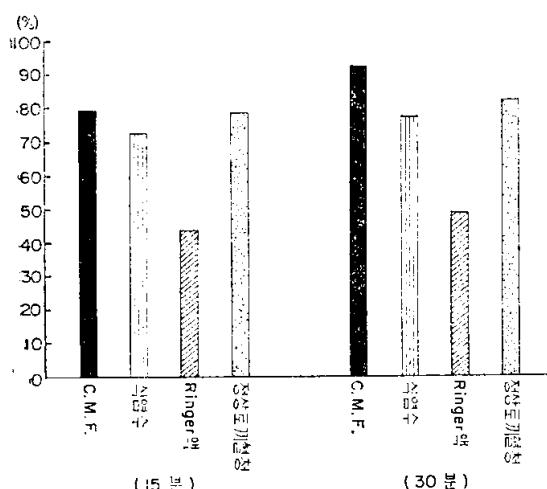
30분간 접촉시킨 후 세포내 균수는 CMF 내에서 1%가 감퇴되어 83.5%였고, 식염수내에서 67%로 약간의 상승율을 보였다. Ringer 액내에서 약 10%가 적은 34.5%로 감소했으나, 정상토끼 혈청내에서는 84%로 14.5%의 상승율을 보였다.

결과적으로 세포내 세균수는 정상토끼 혈청내, CMF 내, 식염수내, Ringer 액내의 순위로 나타났다.

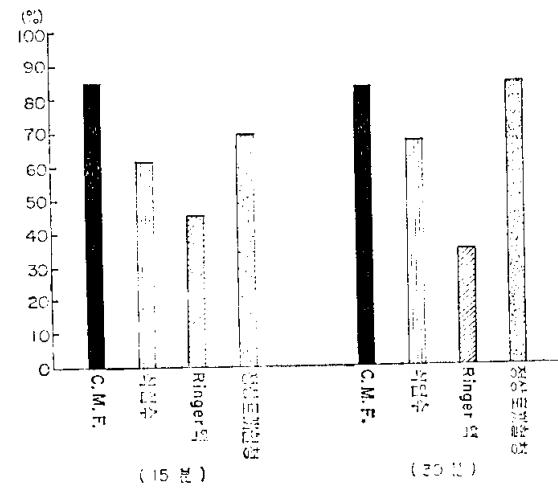
C. 식균 세포내 세균수 검색

10^4 /cc 의 토끼 거식세포가 들어있는 부유액 즉 CMF, 식염수, Ringer 액 및 정상토끼혈청등 4종의 배지에 10^6 /cc 의 균수가 되도록 *Staph. aureus* 와 *Es. coli* 를 각각 혼합하여 37°C 또는 실온 24°C~26°C에서 15분과 30분간 접촉시킨후 일은 식균세포내의 세포당 세균수를 검색하여 표 1와 같은 성적을 얻었다.

즉 세포수와 균수의 비가 1:100인데 *Staph. aureus*



도 7. 37°C에서 *Es. coli*의 세포내 균수 백분율



도 8. 24°C~26°C에서 *Es. coli*의 세포내 균수 백분율

표 1. 식균 세포 당균수

균종 접촉시간 환경온도 배지	Staph. aureus				Es. coli			
	15분		30분		15분		30분	
	37°C	24°C~26°C	37°C	24°C~26°C	37°C	24°C~26°C	37°C	24°C~26°C
C M F	5	3	11	5	2	1.5	3	1
식염수	3.5	2.5	6.5	3	2	2	3	1.5
Ringer 액	3	2	5	3	1.5	1.5	1.5	1.5
정상토끼혈청	3	4	8.5	6.5	2.5	2.5	3.5	2.5

의 경우 37°C에 있어서 15분간 접촉때보다 30분후에 2배 가량의 증가를 보였고 24°C~26°C에 있어서 30분후에 15분때 보다 대략 1.5배의 상승을 보였다.

배지의 종류별로는 CMF와 정상토끼혈청이 다른 2종보다 많은 균수가 나타났다. 또 24°C~26°C에서 보다 37°C에서 약 1.5배가 많은 균수가 나타났다.

Es. coli의 경우 37°C에서 15분때보다 30분 후가 약 1~1.5배로 상승하였으나 24°C~26°C에서는 같거나 오히려 감소되었다.

배지의 종류별 비교에서는 Ringer 액에 있어서 세균수가 변화없이 어느때나 동일하였으나, 다른 3종에 있어서는 37°C에서 상승하였는데, 실온에서는 같거나 감소되었다. 그리고 Staph. aureus의 세포당 균수는 일반적으로 Es. coli의 세포당 균수보다 많았다.

거식세포밖에 세균이 많을 때 세포자체가 자극되어 그식균활동이 더욱 활발해 진다. 따라서 식균된 세포당균수가 증가하는 것이 통예이라 하겠으나 Gram negative균인 Es. coli의 경우 그렇지 않는 것으로 해석되었다.

그러나 Gram positive균인 Staph. aureus의 경우는 증가되었다.

IV. 고 안

세균 감염에 인한 생체(숙주)의 방어기능은 생체보존의 정상적인 기능 유지를 위한 것이며 오늘날까지 알려진 바로는 생체가 가진 거식세포가 그중 가장 중요한 역할을 하는 것으로 해석되어 왔다. 거식세포의 중요한 기능중의 하나로서 외부로부터 침입한 미생물을 탐식하고 처리하는 일이다. 미쳐 처리치 못한 경우에는 거식세포내에서 증식하는 수도 있고, 다른 장기나 세균의 호발부위에 이송되는 수도 있으나 아무튼 거식세포가 생체의 방어기능 기전에 있어서 차지하는 위치가 대단히 중요함은 인정되어 왔고 일부 증명되었다.^{1, 2, 3, 4)}

거식세포의 식균활동을 관찰 실시된 바 특정 병원균에 대한 활동 및 면역과 같은 특수작용에 미치는 영향등도

알려졌고^{7, 8, 9)} 암세포에 대한 저항 내지 면역학적 방어기능이 시사되었었다.^{3, 15)}

거식세포의 이와같은 기능을 추구함에 있어서 식균세포와 세균의 동시 존재하에서 세포 및 세균의 각종 성장과 물리학적 환경상태등 각종인자가 관여하여 식균작용 및 식균세포내 균의 상태에 영향을 미치게 된다.^{1, 2)} 이러한 관점에서 거식세포의 식균작용을 보다 정밀히 관찰할 필요를 느끼게 된다.

저자는 정상가토로부터 수집된 일정량의 거식세포와 특정세균(즉 Gram positive인 Staph. aureus와 Gram negative인 Es. coli)을 선정하여 혼합 공존체 함으로서 환경온도와 배지구성이 달라지면 거식세포의 식균작용에 어떠한 영향을 미치는가를 관찰코자 하였다.

즉 세균은 Staph. aureus와 Es. coli를 선정하였는데 이 균들은 다른 균종보다 metabolic adaptation이 신속히 이루어지기 때문이다. 특히 37°C에서 보다 신속하게 일어난다는 것이 확인되었으며, 세포와 균수의 비가 대체로 1:100전후, 관찰시기는 30분에 함이 가장 적당한 것임을 시사하였음으로¹³⁾ 37°C와 실온에서 15분 및 30분간의 접촉후 세포-균의 상호관계를 추구하였다.

도 1, 도 2에서 Staph. aureus는 접촉시간에 관계없이 혈청이 함유된 CMF 및 정상토끼혈청이 식염수나 Ringer 액보다 세포출현율이 우세하였다. 또 15분때 보다 30분후가 현저히 출현율이 상승되었음은 접촉시간이 길수록 식균세포 출현율이 상승한다는 사실을 시사하였고, 실온보다 높은 37°C 때가 세포의 출현이 많았고 동시에 세포내, 식균된 균수도 증가하였다.

Es. coli에 대하여 도 3, 도 4에서와 같이 37°C에 있어서의 식염수의 경우를 제외하고 대체로 CMF와 정상토끼혈청에서 식염수나 Ringer 액보다 높았고, 실온보다 높은 온도에서 더 활발하였으며, 시간의 흐름에 따라 출현율은 상승하였다.

실온보다 37°C에서 즉 온도의 상승과 더부러 세포의

출현이 활발한 것은 *Staph. aureus* 경우와 같다. 그러나 37°C 식염수에서 현저히 높은 출현율을 보였는데 이 것은 *Es. coli* 가 혈청이 없는 식염수내에서도 균의 증식이 활발함을 시사한것으로 사료되었다. 이와 반대로 Ringer 액에서는 현저히 저조하였다.

*Staph. aureus*의 세포내 균수는 도 5, 도 6에서와 같이 혈청이 포함된 CMF 과 토끼혈청이 다른 2종의 배지보다 현저히 높았으나, 온도나 시간차이에도 불구하고 세포내 균수의 비는 별 차이가 없었다.

*Es. coli*의 세포내 균수는 도 7, 도 8에서 *Staph. aureus* 때와 같이 CMF 과 정상토끼혈청이 식염수나 Ringer 액 보다 많은 균이 나타났으며, 역시 장시간 또는 온도가 높을수록 다소 많아지기는 하나 대체로 시간과 온도변화에 무관하여 세포내 출현한 균수는 별 차이가 없었다. 이 사실은 *Es. coli* 가 어떤 종류의 medium에서나 metabolic adaptation이 잘 됨을 시사한 것으로 사료되었다.

세포당 균수에 대하여 표 1에서 혈청을 포함한 CMF 과 정상토끼혈청에서, 다른 식염수와 Ringer 액에서 보다 많은 균수가 나타났으며, 온도가 높을수록 증가하고 대체로 어느 배지에서나 시간의 경과에 따라 증가하였다. 다만 *Es. coli* 가 실온(24°C~26°C)에서 만은 시간 경과에 따라 감소 또는 동일한 상태에서 머물었다.

결론적으로 첫째 균종에 관계없이 혈청이 포함된 medium에서는 혈청이 없는 medium에 비해서 세포출현율이 높았다.

둘째 실온에서 보다 37°C에서 세포출현율이 높았고, 셋째 세포당 세균균수도 세포출현율에 비례하여 상승하였다.

즉 거식세포의 식균작용은 medium의 종유와 환경온도의 차이에 영향을 받음이 명백하였다.

V. 총괄 및 결론

토끼의 거식세포를 복강으로부터 수집하고 조직배양에 사용되는 세포유지액(CMF), 생리적식염수, Ringer 액 및 정상토끼혈청에 세포수가 cc 당 10⁴이 되도록 부유시키었다. 여기에 20시간 배양한 *Staph. aureus* 및 *Es. coli*의 균액을 세균수가 cc 당 10⁶이 되도록 첨가하였다.

이와같이 조제한 세포-균 부유액을 37°C 와 실온(24°C~26°C)에 두고 15분 및 30분이 경과한 후에 식균한 세포의 배분율, 세포내 균수의 총 균수에 대한 배분율 및 세포내 균수의 세포당 평균치를 추구하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

A. 식균 세포 배분율에 있어서

1. *Staph. aureus*에 대하여

37°C에서는 CMF 내에서 가장 높았고 토끼혈청, 식염수, Ringer 액의 순위였으나(도 1), 24°C~26°C에서는 토끼혈청내에서 가장 높았고 CMF, 식염수 및 Ringer 액에서는 낮았다.(도 2)

2. *Es. coli*에 대하여

37°C 및 24°C~26°C에서 토끼혈청내에서 가장 높았고 대체로 CMF, 식염수, Ringer 액의 순위였으나 다만 37°C 30분후에 있어서 식염수 내에서 CMF 보다 높았다.(도 3, 도 4)

3. 일반적으로 24°C~26°C에서 보다 37°C에서 식균 세포 출현이 활발하였으나 다만 토끼혈청내에서는 그리 큰 차이가 없었다.(도 1~도 4)

B. 세포내 균수의 총 균수에 대한 배분율에 있어서

1. *Staph. aureus*에 대하여

37°C에서는 CMF 내에서, 24°C~26°C에서는 토끼혈청내에서 가장 높았으나 양자간에 그리 큰 차이는 없었고, 식염수 및 Ringer 액내에서는 낮았다.(도 5, 도 6)

2. *Es. coli*에 대하여

CMF 내에서 가장 높았고 다음 토끼혈청내였으나 양자간에 그리 큰 차이는 없었다. 식염수내에서 CMF 및 토끼혈청내보다는 낮았으나 *Staph. aureus* 경우 보다는 현저히 높았다.(도 7, 도 8)

C. 식균 세포당 균수에 있어서,

Es. coli 보다 *Staph. aureus*의 경우에 균수가 현저히 많았고 특히 CMF 및 토끼혈청내에서 30분간 접촉한 경우에 차이가 현저하였다.(표 1)

ABSTRACT

Influences of temperature and media on the phagocytic activities of rabbit macrophage

Won-Chul Park, M.D.

Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University

Bacterial suspensions of *Staph. aureus* and *Es. coli* cultivated in Brain-Heart Infusion Broth were mixed with macrophages collected from rabbit peritoneal cavities in the Cell-Maintenance Fluid(C. M. F.), physiological saline solution, Ringer sol. and normal rabbit serum, so as to make bacterial number being about 10⁶/cc and macrophage number being 10⁴/cc.

The macrophage-bacterial suspensions were maintained at room temperature(24°C-26°C) and 37°C, then the percentages of macrophages with intracellular organisms and microbes located intracellularly and also the average number of intracellular organisms were investigated after 15 and 30 minutes.

Results were summarized as follows:

1) In the Staph. aureus-macrophage suspension;

The percentages of macrophages with intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 58%, 34.5%, 25% and 43.5% after 15 minutes, and 87.5%, 49%, 26% and 83.5% after 30 minutes, respectively at 37°C.

At room temperature(24°C-26°C), the percentages of macrophages with intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 23%, 19.5%, 20.5% and 47.5% after 15 minutes, and 33%, 27.5%, 28% and 67% after 30 minutes, respectively.

The percentages of intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 80%, 24%, 26.5% and 58.5% after 15 minutes, and 92.5%, 30%, 31.5% and 80% after 30 minutes, respectively at 37°C.

At room temperature, the percentages of intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 71%, 23%, 28.5% and 71.5% after 15 minutes, and 69%, 41.5%, 40% and 81% after 30 minutes, respectively.

Average number of intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 5, 3.5, 3 and 3 after 15 minutes, and 11, 6.5, 5 and 8.5 after 30 minutes, respectively at 37°C.

At room temperature, average number of intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 3, 2.5, 2 and 4 after 15 minutes, and 5, 3, 3 and 6.5 after 30 minutes, respectively.

2) In the Es. coli-Macrophages suspension;

The percentages of macrophages with intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 37.5%, 34%, 12.5% and 49.5% after 15 minutes, and 73%, 76.5%, 13.5% and 76.5% after 30 minutes, respectively at 37°C.

At room temperature, the percentages of macrophages with intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 36%, 26%, 12% and 36% after 15 minutes, and 32.5%, 17%, 14% and 65% after 30 minutes, respectively.

The percentages of intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 79.5%, 72.5%, 43.5% and 78.5% after 15 minutes, and 92.5%, 77%, 48.5% and 82% after 30 minutes, respectively at 37°C.

At room temperature, the percentages of intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 84.5%, 61%, 45% and 70% after 15 minutes, and 83.5%, 67%, 34.5% and 84% after 30 minutes, respectively.

Average number of intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 2, 2, 1.5 and 2.5 after 15 minutes, and 3, 3, 1.5 and 3.5 after 30 minutes, respectively at 37°C.

At room temperature, average number of intracellular organisms in CMF, saline, Ringer sol. and normal rabbit serum were 1.5, 2, 1.5 and 2.5 after 15 minutes, and 1, 1.5, 1.5 and 2.5 after 30 minutes, respectively.

REFERENCES

1. Wilson, G. S. and Molles, A. A. *Topley and Wilson's Principle of Bacteriology and Immunity*, 5th Ed. William & Wilkins, Baltimore Md. 1964.
2. Dubos, R. J. and Hirsch, J. G. *Bacterial and Mycotic Infections of Man*. 4th Ed. Lippincott, Philadelphia, Pa. 1965.
3. Anderson, W. A. D., *Pathology*, C. V. Mosby, Louis, La. 1966.
4. Davis, B. D., Dulveso, R., Eison, H. N. Ginsberg, H. S. and Wood, W. B., *Microbiology*: Haoper & Pow, N. Y. 1970.
5. Pearsall, N. N. and Weiser, R. S., *The macrophage lea & Febigar*, Philadelphia, Pa. 1970.
6. Metchikoff, E.; Quoted from Jenkin, C. P. and D. Pewley: *Basis for Immunity to typhoid in Mice and the Question of Cellular Immunity*: *Bact. Rev.* 27:391-402, 1963.
7. Cohn, M. A.; *Lysosomes in Mononuclear Phagocytes*: in *Mononuclear Phagocytes* 1st Ed. ed by van Furth, P. F. A. Davis, Philadelphia, Pa. 1970.
8. Mackaness, G. B.; *Cellular Immunity*; in *Mononuclear Phagocytes*, 1st Ed. ed by van Furth, P. F. A. Davis, Philadelphia, Pa 1970.
9. Wu, W. G. and Marcus, S.; *Humoral factors in cellular resistance. 1. The effect of heated and unheated homologous and heterologous sera on phagocytosis and cytopepsis by normal and immune*

- macrophage. *J. Immunol.* 91:313-392. 1963
10. Suter, E. ; *The multiplication of tubercle bacilli within normal phagocytes in tissue culture. J. Exp. Med.* 96, 137-150, 1951.
11. Hanks, J. H. ; *Competitive Aspects of Tissue Cell and Bacterial Physiology: in Host Parasite Relationships in Living Cell.* ed by Felton, H.M., Charles, C. Thomas, Springfield 111. 1957.
12. Cha, C. Y., Park, W.C., Lee, S.H: *A Study on the macrophage-Staphylococcus interactions in vitro. New Med. J. (Korea)* 13, 533-539 1970.
13. Lee, E. Y. ; *In vitro observation of the phagocytic activities of normal rabbit macrophages on the microbial cells of Staph. aureus, Staph. albus, B. subtilis, Es. coli and Ps. aeruginosa. J. Kor. Ortho. Asso Vol. 8 No. 1, 85-94, 1973.*
14. Park, H. and Chough, H. ; *In vitro observation on the growth of Staph. aureus Staph. albus, B. & ubtilis, and Es. coli in the peritoneal fluid from liver cirrhosis patients. Kor. Cent. J. Med.* 24, 377, 1973.
15. Jawets, F., Nilnick, J. L. and Adelberg, E. A. ; *Review of Medical Microbiology, 10th Ed. Marzen. Japan*
-