

녹농균 및 포도구균이 단독 또는 혼재할때의 식균양상에 대한 실험적 관찰

In vitro Observation of the Phagocytic Activities of Rabbit Macrophages on Ps. Aeruginosa and Staph. aureus in Single and mixed suspension

서울대학교 의과대학 정형외과학교실

<지도한 문 식 교수>

관 달 현

서 론

거식세포는 숙주내에 침입한 해롭거나 불필요한 인자 즉 사멸된 조직세포, 세균, 원생기생충 및 여러 종류의 색소와 먼지 등의 이물질들을 직접 또는 간접적으로 탐식 제거함으로써 숙주의 방어기전의 주축을 이루고 있다. (Wilson, 1964. Dubos, 1965. Anderson, 1966. Davis, 1970. Pearsall, 1970.) 더욱이 이러한 대상 혹은 그 구성 성분에 대하여 항체-과민성 즉 항체형성과 거식세포 자체의 활성화를 가져오으로써 소위 세포성 면역을 형성하여 후에 동종의 또는 유사한 대상이 침입할 때 신속히 반응함으로써 숙주의 방어기능은 더욱 촉진되는 것이다. (Pearsall, 1970. Cohn, 1970. Mackness 1970.)

Metchnikoff 에 의하여 식균 현상이 알려진 이후 많은 연구와 논의가 있었으나 현재로는 먼저 체액성분이 감염질환에 작용하여 일차적인 방어기능을 일으키는 것으로 해석되며 곧 이어서 식균 세포의 활동이 시작된다. (Wilson, 1964. Dubos, 1965. Davis, 1970. Cohn, 1970. Jawets.)

일반적으로 처음에 동원되는 식균세포는 다핵백혈구이나 염증 변화의 진행에 따라 거식세포가 나타나며 이들이 식균되지 않은 미생물과 그 산물, 식균한 백혈구 혹은 조직파괴 물질들을 탐식 처리하게 된다. (Wilson, 1964. Dubos, 1965. Anderson, 1965.)

거식세포의 식균작용 및 세포내 처리기전에 관하여 Hirsch, Cohn, Mackness 등이 많은 사실을 밝혀냈고 그밖에 staphylococcus, Mycobacterium 혹은 B. Subtilis 등에 대한 토끼 거식세포의 식균양상과 면역 조작이 미치는 영향등에 관한 관찰보고도 있었다. (Cha, 1970. Kim, D.S. 1972. Kim, K.W. 1974.)

Lee, E. Y. 는 토끼 거식세포의 일정 부유액에 Staph. albus, Staph. aureus, E. coli, Ps. aeruginosa 등의 제단회석액의 균액을 첨가 부유시켜 37°C에서 30분, 60분 및 120분간 접촉시킨후 식균세포의 출현도, 세포내 균수의 백분율 및 식균세포당 균수를 검사하여 세포수와 균수의 비가 1 : 100 전후, 관찰시간은 30분내에 합이 식균능력 관찰에 있어서 가장 적당하다는 점을 시사한바 있고 Park, W. C. 는 환경온도와 균세포부유액의 구성을 달리 하여 식균활동에 미치는 영향을 관찰한 바 균중에 관계없이 혈청이 포함된 Media에서는 혈청이 없는 Media에 비해서 식균세포 출현율이 높았고 실은보다 37°C에서 세포출현율이 높았고 세포당 세균수도 세포출현율에 비례하여 상승하였음을 보고하였다.

거식세포의 식균양상을 구명하는데 있어서는 일정수의 세포부유액에 일정수의 특정세균을 첨가하여 관찰하는데 (Cohn, 1970. Mackness, 1970. Cha, 1970. Kim, D.S. 1972.) 이러한 거식세포의 식균현상에는 여러가지 인자가 관여하는데 (Cha, 1970. Kim, K.W. 1974. Lee, E. Y. 1973. Park, H. 1973.) 특히 Kim, K.W. 는 병원성이 강한 포도구균과 병원성이 없는 고

초균이 거식세포와 접촉할 때 식균현상의 차이점을 관찰하여, 병원성이 강한 균에 대한 거식세포의 식균활동이 병원성이 없는 균에 대한 식균활동보다 높았으며, 위의 두가지 균액이 동시에 거식세포 부유액과 접촉되었을 경우에는 어느 한 균의 단독으로 접촉되었을 때 보다 거식세포의 식균활동이 저하됨을 보고하였고 이는 비병원성인 고초균에 대한 식균활동이 병원성이 강한 포도구균에 대한 것보다 훨씬 저하함을 동시에 보고하였다.

근래 각종 화학요법제 특히 광역항생제 및 Corticosteroids 등의 광범위한 대량 사용의 결과 그 병인균으로서의 중요성이 증가되는 녹농균과 또한 이 녹농균과의 혼합 감염 원인균으로 가장 중요한 포도구균이(Lee, S. H. 1967.) 거식세포와 접촉할 때는 식균현상에 차이가 있을 가능성이 있고 또 이 두 균종이 혼합할때의 식균현상에 차이가 있을 것이 추측되어 저자는 이러한 점을 실험적으로 검토하고자 세포부유액을 세포유지액과 정상토끼혈청 두가지로 조제하고 녹농균 및 포도구균액을 단독 또는 혼합하여 37°C에서 30분 및 60분간 접촉시킨 다음 거식세포 출현율과 균체의 세포내 존재율을 관찰한 바 있기에 이에 보고한다.

II. 실험재료 및 방법

A. 배 지

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

2. 세포수집액 (Cell-Collecting Fluid, C. C. F.): Marcus, Cha et al.의 방법에 따라서 Earle의 Balanced Salt Solution(B. S. S.)을 기본배지로 하고 이 B. S. S.에 5% Lactoalbumin hydrolysate를 첨가 유용시킨 용액(L. A. H.)을 조제하여 B. S. S.와 L. A. H.를 혼합한 후 Heparin을 첨가 혼합 사용하였는데 C. C. F.는 B. S. S.와 L. A. H.를 9:1의 비율로 혼합한 후 Heparin을 20 unit/c.c. 첨가하였다. pH는 7.2~7.3으로 하였다.

3. 균-세포부유액

1) 세포유지액(Cell-Maintenance Fluid, C. M. F.): B. S. S., L. A. H. 및 정상 토끼혈청을 7:1:2의 비율로 혼합 pH 7.2~7.3으로 맞추어 사용하였다.

2) 정상 토끼혈청: 실험실시 전일에 체중 약 2kg의 토끼 3마리에서 전혈을 뽑아 냉장 보관하여 얻은 혈청을 혼합한 후에 1000 r. p. m.에 10분간 원침하여 상청액을 채취 사용하였다.

B. 세균균액

서울대학교 의과대학 미생물학교실 보관 균주인 *Staphylococcus aureus* #19. 동교실에서 각종 병적재료로부터 분리 및 동정된 *Pseudomonas aeruginosa*를 B. H. I. B.에 20시간 37°C에서 배양하고 3000 r. p. m.에 30분간 원침한 다음 침사에 배지와 동량의 멸균식염수를 첨가하였다. 진탕한 다음 다시 1000 r. p. m.에 10분간 원침하였다. 이때의 상청부에 세균이 10⁸/c. c. 정도 있음을 예비실험으로 확인한 후 다시 멸균식염수로 10배 희석하여 10⁷/c. c.의 균수를 가진 균부유액을 조제하고 실험에 사용하였다.

C. 거식세포 부유액

대체로 Cha et al.의 방법에 따라 0.02 mg/c. c.의 glycogen 용액 100 c. c.를 체중 2kg 내외의 토끼 복강 내에 1회 주입하고 7-8일후 토끼 이정맥에 약 10 c. c.의 공기를 주입하여 죽인후 복부 정중선을 따라 3cm 정도의 절개를 가하고 약 150c. c.의 C. C. F.를 주입하였다. 토끼 복부를 가볍게 massage 하고 절개공을 통하여 멸균된 capillary pipette로 복강 삼출액을 무균적으로 채취하였는데 채취량은 약 120c. c.이었다. 삼출액을 1000 r. p. m.에 10분간 원침 후 상청액을 제거하였다. 대부분이 거식세포로 되어 있는 침사를 C. M. F.와 정상토끼혈청의 두가지로 거식세포 부유액을 조제하였는데 Hemocytometer를 사용하여 각기 c. c.당 10⁴의 세포가 포함되도록 부유시켜 실험 사용하였다.

D. 세포-세균 혼합 및 관찰

Lee, E. Y., Kim, K. W.의 방법에 따라 거식세포수는 10⁴/c. c. 균수는 10⁸/c. c.가 포함되도록 각각 3종류의 혼합부유액을 만들어 관찰하였다. 3종류의 거식세포 부유액을 cover slip이 들어 있는 Leighton 판에 분주하고 세균액을 첨가 혼합하였는데 이때 세포부유액과 균액의 비율을 10:1로 하였다. 가볍게 진탕한 후 Leighton 판의 편평한 면이 아래쪽을 향하고 약 30°정도로 경사지게 배열하여 37°C의 부란기에 넣고 30분 및 60분이 지난후 3가지의 세균부유액이 첨가된 Leighton 판에서 cover slip을 꺼내어 건조시킨 후 순 methanol로 3분간 고정하고 Giemsa 염색으로 45분간 처리한 후 건조시켜 slide glass에 옮기고 balsam으로 고정한 다음, 거식세포의 출현율과 세포내 균수의 총 균수에 대한 백분율을 검색하였다.

II. 실험 성적

A. 식균한 거식세포 출현을 관찰

1. *Pseudomonas aeruginosa* 균액이 단독으로 접촉된 경우.

Cover slip가 들어있는 Leighton 판에 2가지로 조제된 토끼거식세포부유액 즉 C. M. F.와 토끼혈청의 세포부유액 ($10^4/c.c.$)에 *Ps. aeruginosa* ($10^6/c.c.$)를 부유토록 첨가하여 만든 세포-세균 혼합액 2c.c.를 넣고 $37^\circ C$ 에서 30분 및 60분간 접촉시킨 후 cover slip를 꺼내어 건조 Gimsa 염색후에 경검하여 식균한 거식세포 출현율을 추구하여 도1에서 표시된 바와 같은 결과를 얻었다.

즉 도1에서 보는바와 같이 식균세포 출현율은 30분 경과후 정상토끼 혈청내에서는 15%, C. M. F.에서는 11.5%이었고 60분 후에는 정상토끼 혈청내에서 29%, C. M. F.에서는 46%였다.

*Ps. aeruginosa*를 식균한 거식세포의 출현율은 30분 경과후에는 정상토끼 혈청내에서 높았으나 60분 후에는 C. M. F.에서 훨씬 높았다. 30분에서 60분 경과후에 정상토끼 혈청내에서 거식세포 출현율이 15%에서 29%로 약 2배 정도 높았지만 C. M. F.에서는 11.5%에서 46%로서 거의 4배 정도의 증가를 보이고 있어 시간 경과에 따른 거식세포 출현율의 커다란 증가를 볼 수 있었다.

2. *Staphylococcus aureus* 균액이 단독으로 접촉된 경우

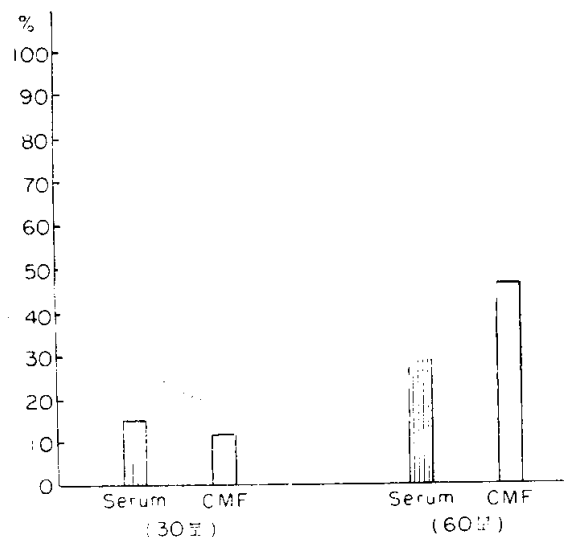


Fig. 1. 녹농균에 대한 식균한 거식세포 출현율

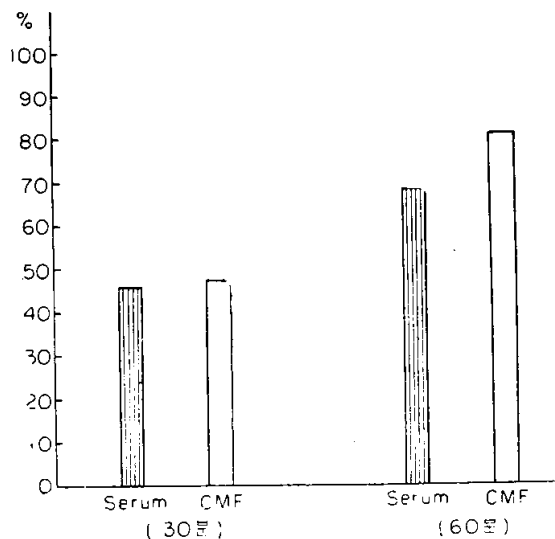


Fig. 2. 포도구균에 대한 식균한 거식세포 출현율

Ps. aeruginosa 때와 같은 방법으로 C. M. F.와 정상토끼 혈청액 균액을 접촉시켜 30분 및 60분 경과 후의 식균세포 출현율을 검색하여 도2에서와 같은 결과를 얻었다.

도2에서와 같이 30분 경과후의 식균한 세포의 백분율은 정상토끼 혈청내에서 45.5%. C. M. F.에서는 47%이었다.

60분 경과후의 식균세포의 백분율은 정상토끼 혈청에서 68%이었고 C. M. F.에서는 80.5%이었다.

즉 *Staph. aureus*를 식균한 거식세포의 출현율은 C. M. F.에서 약간 높았고 특히 60분 경과후의 C. M. F.에서 가장 높았음을 알 수 있었는데 30분 경과후의 식균세포 출현율은 정상토끼 혈청에서 45.5%, C. M. F.에서 47%로서 식균세포 출현율에 별로 큰 차이가 없었다.

또 30분에서 60분 경과후에 정상토끼 혈청내에서의 거식세포 출현율이 45.5%에서 68% 즉 22.5% 증가한 반면에 C. M. F.에서는 47%에서 80.5% 즉 33.5%의 증가를 보이고 있어 시간 경과에 따른 차이를 볼 수 있었다.

3. *Ps. aeruginosa*와 *Staph. aureus* 균액이 동시에 거식세포부유액과 접촉 되었을 경우.

Cover slip가 들어 있는 Leighton 판에 2가지로 조제된 즉 C. M. F. 및 정상토끼 혈청의 세포부유액 ($10^4/c.c.$)에 *Ps. aeruginosa*와 *Staph. aureus*의 동량 혼합액 ($10^6/c.c.$)을 부유토록 첨가하여 만든 세포-세균 혼합액 2c.c.씩을 넣고 $37^\circ C$ 에서 30분 및 60분간 접촉시킨 후 cover slip를 꺼내어 건조 Giemsa 염색후에 경검하

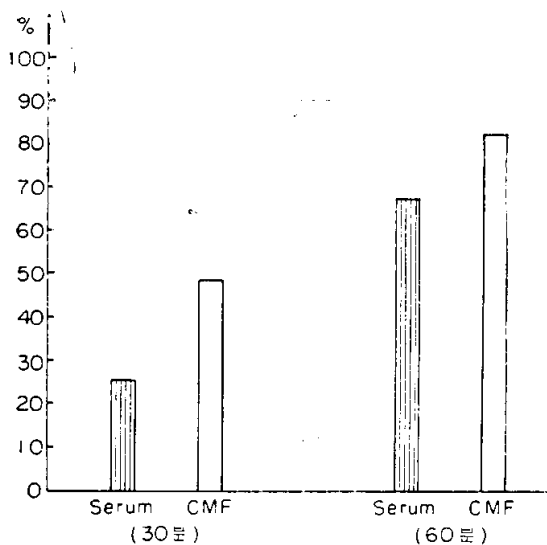


Fig. 3. 녹농균과 포도구균의 혼합균액과 접촉시 식균한 거식세포 출현율

여 식균한 거식세포 출현율을 추구하고 도3에서와 같은 결과를 얻었다.

즉 식균거식세포 출현율이 30분 후 정상토끼 혈청내에서 25.5% C.M.F.에서는 48.5%이었고 60분 후에는 정상토끼 혈청내에서 67.5%이었고 C.M.F.에서는 82.5%이었다.

30분에서의 거식세포 출현율이, C.M.F.에서 정상토끼 혈청내에의 것 보다 거의 2배가 높았지만 시간경과에 따른 증가도에 있어서는 거의 비슷한 성격을 보였다.

B. 세균의 세포내 균수에 대한 관찰

1. *Ps. aeruginosa*의 세포내 균수 백분율.

$10^6/c.c.$ 의 세포가 들어 있는 토끼거식세포 부유액 2종류에 *Ps. aeruginosa* $10^6/c.c.$ 씩을 첨가하여 $37^{\circ}C$ 에서 30분 및 60분간 접촉시킨 후 현미경하에 관찰되는 200개의 세균중 세포내 들어 있는 균수의 백분율을 검사하여 도4에서와 같은 결과를 얻었다.

즉 30분 접촉후 나타난 세포내 균수의 백분율은 정상토끼 혈청에서 97%, C.M.F.에서 92%이었고 60분 접촉후에 있어서는 정상토끼 혈청내에서 역시 97%, C.M.F.에서는 96%이었다.

처음 30분 접촉에서는 정상토끼 혈청에서 97%, C.M.F.에서 92%로서 정상토끼 혈청에서 5%정도 높았으나 60분 접촉 후에는 정상토끼 혈청에서 역시 97%, C.M.F.에서는 96%로서 정상토끼 혈청에서 1%정도 높았다.

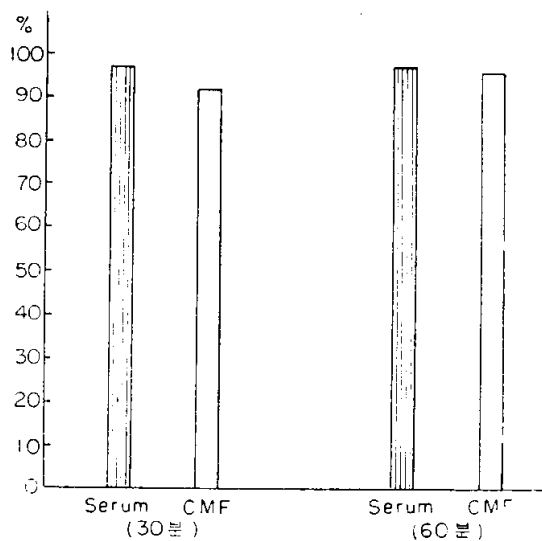


Fig. 4. 녹농균의 식균거식세포내 균수 백분율

시간경과에 따른 상승율은 정상토끼 혈청내에서는 없었고 다만 C.M.F.에서 4%정도 상승율을 보이기는 했지만 거의 무시할 정도였다.

2. *Staph aureus*의 세포내 균수 백분율.

Ps. aeruginosa 때와 마찬가지로 방법으로 $10^6/c.c.$ 의 거식세포 부유액에 *Staph. aureus*를 $10^6/c.c.$ 가 되도록 첨가하여 $37^{\circ}C$ 에서 30분 및 60분간 접촉시킨 후 현미경하에 관찰되는 세균 200개중 거식세포내 균수의 백분율을 조사하여 도5에서 결과를 얻었다.

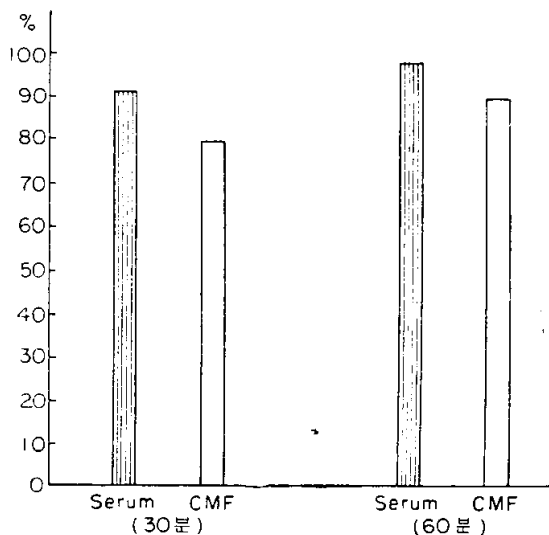


Fig. 5. 포도구균의 식균거식세포내 균수 백분율

즉 200개의 세균중 세포내에 들어있는 균수의 백분율은 혈청내에서는 30분 후 91%, 60분 후 97.5%이었고 C. M. F.에서 30분후 79.5% 60분후에는 89.5%이었다.

세포내 균수의 백분율로서는 정상토끼 혈청에서가 C. M. F.에서 보다 30분 및 60분치가 모두 높았으며 시간경과에 따라서는 정상토끼 혈청에서 6.5% C. M. F.에서 10% 상승함으로서 C. M. F.쪽에 증가율이 약간 높은 성적을 보여주었다.

3. Ps. aeruginosa와 Staph. aureus가 혼재할 때의 세포내 균수의 백분율

거식세포가 $10^4/c.c.$ 함유된 세포부유액에 Ps. aeruginosa와 Staph. aureus를 동량 혼합하여 균수가 $10^6/c.c.$ 가 되도록 첨가하여 $37^{\circ}C$ 에서 30분 및 60분간 접촉시킨후 현미경하에 관찰되는 세균 200개 중에서 거식세포내에 들어 있는 균수의 백분율을 조사하여 도 6, 도 7 및 도8에서와 같은 결과를 얻었다.

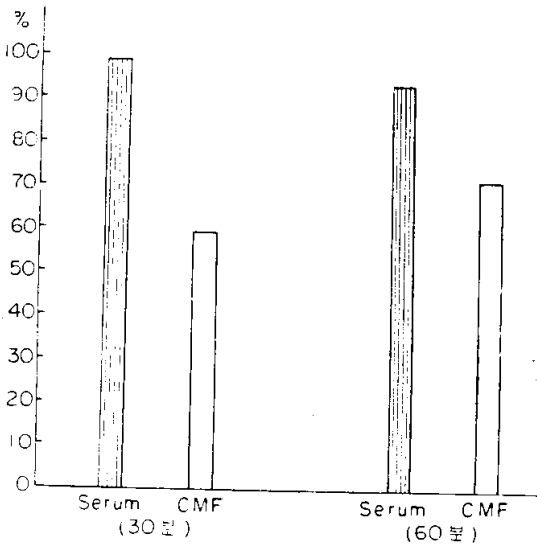


Fig. 6. 녹농균과 포도구균의 혼합균액과 접촉시 2종 세균의 식균거식세포내 균수의 백분율

즉 도 6을 보면 두가지 균의 종합적인 세포내 균수의 백분율은 30분 접촉후 정상토끼 혈청내에서 98.5%, C. M. F.에서 59%이었고 60분 접촉후에는 정상토끼 혈청에서는 93%이었고 C. M. F.에서는 71%이었다.

위에서 보는바와 같이 30분 성적이 있어서 정상토끼 혈청에서의 세포내 균수의 백분율이 98.5%로서 C. M. F.에서 보다 39.5%나 높았고 60분치에서 있어서는 22%나 높았다. 시간경과에 따른 상승율은 정상토끼 혈청에서는 오히려 5.5% 감소되었으나 C. M. F.에서는 12%나 상승되었다.

식균된 세포내 균중에서 그 백분율을 하나 하나씩 분리하여 보면,

첫째 Ps. aeruginosa에서는 도7에서의 결과와 같다.

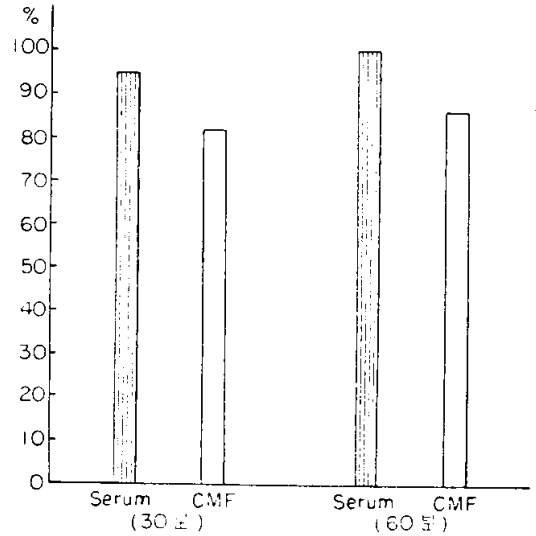


Fig. 7. 녹농균과 포도구균의 혼합균액과 접촉시 녹농균의 거식세포내 균수의 백분율

즉 30분 접촉후 정상토끼 혈청에서는 95% C. M. F.에서는 82%이었고 60분 접촉후에는 정상토끼 혈청에서는 100%, C. M. F.에서는 86%이었다.

두째 Staph aureus에서는 도 8과 같이 30분 접촉후 정상토끼 혈청에서는 100%, C. M. F.에서는 51%이었고

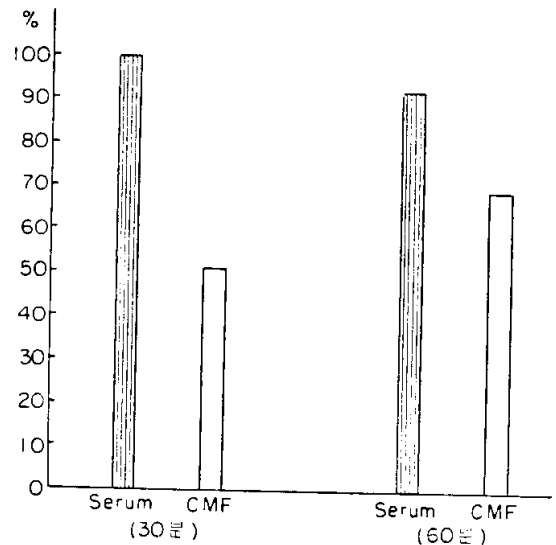


Fig. 8. 녹농균과 포도구균의 혼합균액과 접촉시 포도구균의 식균거식세포내 균수의 백분율

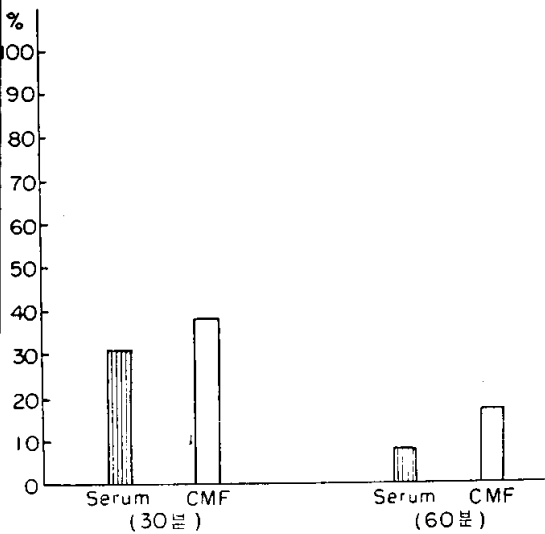


Fig. 9. 녹농균과 포도구균의 혼합균액과 접촉시 식균 거식세포내 균수중 녹농균의 백분율

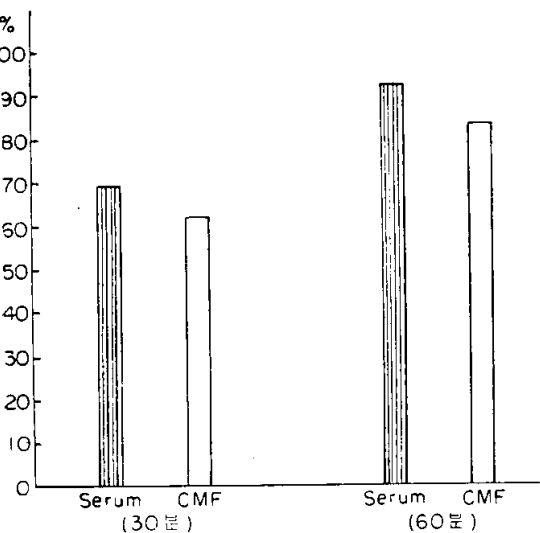


Fig. 10. 녹농균과 포도구균의 혼합균액과 접촉시 식균 거식세포내 균수중 포도구균의 백분율

60분 접촉후에는 정상토끼 혈청에서는 92%, C. M. F에서 83%이었다.

또 두가지 균이 혼재할때 식균거식 세포내의 균수중 *Ps. aeruginosa*와 *Staph aureus* 각각의 백분율을 조사하여 도 9와 도10을 얻었다.

즉 도 9를 보면 세포내균중 *Ps. aeruginosa*의 백분율은 정상토끼 혈청에서 30분후 31%, 60분후에 8%이었고 C. M. F에서 30분후 38%, 60분후 17%이었다.

도10에서 세포내균중 *Staph. aureus*의 백분율은 30분 접촉후 정상토끼 혈청에서 69% C. M. F에서 62%이었고 60분 접촉후 정상토끼혈청에서 92%, C. M. F에서 83%이었다.

IV. 고 안

세균 감염에 의한 생체(숙주)의 방어기능은 생체 보존의 정상적인 기능유지를 위한 것이며 오늘날까지 알려진 바로는 생체가 가진 거식세포가 그중 가장 중요한 역할을 하는 것으로 해석되어 왔다.

그러나 거식세포에 의한 숙주의 방어기전에 대하여는 아직도 일부 분명치 않은 점도 있으나 외부로 부터 침입한 미생물이나 이물질을 탐식하고 처리하는데 대해서는 논란의 여지가 없다. 물론 미생물의 종류에 따라 탐식은 하였으나 세포내에서 처리하지 못하여 탐식된 미생물이 세포내에서 증식하고 신체의 타부위로 이송되어 감염의 전파를 일으킬수도 있겠으나 대부분의 경우 거식세포가 생체의 방어기전에 있어 주축을 이루 있음은 인정되어 오고 또 일부 증명되어 왔다(Wilson, 1964. Dubos, 1965. Anderson, 1966. Davis 1970.)

최근에는 거식세포에 의한 세포면역학적인 방어기능도 강조되고 있으며(Mackness, 1970.) 암세포에 대한 저항(Anderson, 1966. Jawets) 내지 이식조직에 대한 거부반응도 상당한 주목을 끌고 있다(Mackness, 1970)

신체의 생리기능조절 내지 방어기능에 식균현상이 중요한 역할을 하여 이 거식세포의 식균현상에 각종인자가 관여함이 알려졌고(wilson, 1964. Dubos 1965.) 최근에 환경온도와 균세포부유액의 배지성분의 차이에 대한 연구와(Park, W.C. 1973.) 침입한 세균의 병원성 여부에 따른 단독 또는 혼합감염에 따른 식균현상의 차이도 보고되어 있다(Kim, K.W. 1974.)

저자는 정상가토로 부터 수집된 일정량의 거식세포에 단일균종의 세균이 도입되었을 때와 동시에 2종 이상의 세균이 도입되었을 때와는 각 균종에 대한 식균활동에 차이가 있을 것이 예측되었기에 이를 관찰하고자 하였다.

세균은 *Ps. aeruginosa*와 *Staph. aureus*를 선정하였는데 이는 전자가 근래 각종 화학요법제 특히 광역항생제 및 corticosteroids의 광범위한 대량사용의 결과 병인균으로서의 중요성이 증가된 반면 후자는 전자와의 가장 혼란 혼합감염균일뿐 아니라 *Ps. aeruginosa*가 분비하는 녹청색소인 Pyocyanin이 *Staph. aureus* 등의 Gram 양성균에 대하여 항생 항균작용이 있다는 사실때

문이다(Lee, S. H. 1967.) 특히 실온에서 보다 37°C에서 식균작용이 왕성하다는 것이 알려졌다(Park, W. C. 1973.) 관찰시기는 30분에 함이 가장 적당하며 세포와 균수의 비율이 1:100전후가 가장 적당한 것이 시사되었기에(Lee, E. Y. 1973) 본 실험에서 이를 참고하여 37°C에서 30분 및 60분간 접촉후 세포-균의 상호 관계를 추구하였다.

본 실험에서는 편의상 세포부유액을 정상토끼 혈청과 세포유지액(C. M. F.)의 두가지로 조제하여 *Ps. aeruginosa* 및 *Staph. aureus* 균액을 단독 또는 혼합하여 접촉시킨 후 식균세포 출현율과 균체의 세포내 존재율을 검토하였다.

*Ps. aeruginosa*는 도1에서와 같이 정상토끼 혈청에서 30분에 15%, 60분에 29%, C. M. F.에서 30분에 11.5% 60분에 46%로서 C. M. F.의 60분치에서 가장 높은 거식세포 출현율을 나타내고 있으나 전체적으로 *Ps. aeruginosa*에서의 거식세포 출현율은 도2에서의 *Staph. aureus*의 거식세포출현율 즉 정상토끼 혈청에서 30분에 45.5%, 60분에 68%, C. M. F.에서 30분에 47% 60분에 80.5%보다 거의 1/3(30분에서)~1/2(60분에서) 정도의 낮은율을 보였다.

또 *Ps. aeruginosa*에 대한 거식세포 출현율이 시간경과에 따라, 세포부유액에 따라 2배(혈청에서)~4배(C. M. F.에서)의 커다란 증가를 보였다.

*Ps. aeruginosa*와 *staph. aureus*를 혼합하여 동시에 거식세포 부유액과 접촉시킨 경우 도 3.에서 보는바와 같이 정상토끼 혈청에서 30분에 25.5%, 60분에 67.5% C. M. P.에서 30분에 43.5%, 60분에 80.5%로서 *Ps. aeruginosa* 단독 보다는 식균세포출현율이 월등상승하였으나 *Staph. aureus* 단독에 비해 다만 정상토끼 혈청에서의 30분 치에서 거의 1/2 정도의 저하를 보인 외에 거의 같은 율을 보여준다.

세포내의 균수의 백분율을 고찰하면 *Ps. aeruginosa*에 있어서는 도4에서와 같이 정상토끼 혈청내에서 30분이나 60분에 다같이 97%, C. M. F.에서 30분에 92%, 60분에 96%로서 균수의 비에 있어서 거의 차이가 없다.

*Staph. aureus*의 경우에는 도5에서 보는 바와 같이 정상토끼 혈청에서 30분에 91%, 60분에 97.5% C. M. F.에서는 30분에 79.5% 60분에 89.5%로서 역시 정상토끼 혈청에서 C. M. F.에서 보다 약간 높은 세포내 균수를 나타내며 또 시간 차이에 따른 균수의 차이도 60분에서 약간 높다.

종합하여 보면 *Ps. aeruginosa*의 경우 *Staph. aureus*보다 약간 높은 세포내 균수를 나타내고 있다.

*Ps. aeruginosa*와 *Staph. aureus*의 혼합 균액을 접촉시킨 경우에서의 세포내 균수의 백분율은 도6에서 보는바와 같이 먼저 2중세균의 세포내 존재율은 정상토끼 혈청에서 30분에 98.5% 60분에 93%로 약간의 감소를 보이나 C. M. F.에서는 30분에 59% 60분에 71%로서 약간증가 되었다. 여기에서 보는바와 같이 30분 성적에 있어서 정상토끼 혈청에서의 세포내 균수의 율이 98.5%로서 C. M. F.에서 보다 약 40%높았고 60분치에 있어서 22%정도 높았다.

식균된 거식세포내의 2종의 균종에서 그 존재율을 하나 하나씩 분리하여 보면 도 7. 도8에서와 같이 *Ps. aeruginosa*의 경우 정상토끼 혈청에서 30%분에 95% 60분에 100%. C. M. F.에서 30분에 82% 60분에 86%로서 균세포 부유액의 차이에 따라 *Ps. aeruginosa* 단독으로 접촉된 경우보다 정상토끼 혈청에서는 거의 변화가 없었던 정도이나 C. M. F.에서는 시간의 변화에 관계없이 똑 같은 10%정도의 떨어지는 성적을 보인 반면 *Staph. aureus*의 경우는 정상토끼 혈청에서 30분에 100% 60분에 92%, C. M. F.에서 30분에 51%. 60분에 69%로서 *Staph. aureus* 단독으로 접촉된 경우보다 균세포 부유액의 차이에 따라 30분에서 28.5% 60분에서 20.5%(C. M. F.에서) 정도 세포내 균수의 백분율이 저하된다. 즉 2종의 균이 동시에 거식세포 부유액에 접촉되었을 경우 거식세포 식균활동은 정상토끼 혈청에서는 별영향받음이 적으나 C. M. F.에서는 녹농균의 경우 10% 포도구균의 경우 20.5%~28.5%정도 저하되는데 식균세포 출현율이 높았던 *Staph. aureus*에서 20.5%~28.5%, 식균거식세포 출현율이 낮았던 *Ps. aeruginosa*에서는 10% 정도 감소된다.

결론적으로 *Ps. aeruginosa*에 대한 거식세포의 식균활동이 *Staph. aureus*에 대한 식균활동 보다 현저한 차이를 보여 주는데 이 두가지 균액이 동시에 거식세포 부유액과 접촉하였을 때 어느 한균 단독으로 접촉하였을때 보다 거식세포의 식균활동이 떨어지는데 이는 특히 30분에서의 *Ps. aeruginosa*에서 보다 *Staph. aureus*에서 심한 저하를 보여준 흥미 있는 일이라 하겠다.

V. 총괄 및 결론

토끼의 거식세포를 복강에서 수집하고 세포유지액(C. M. F.) 및 정상토끼 혈청에 세포수가 10⁴/c.c가 되도록 부유시키고 여기에 20시간 배양한 *Ps. aeruginosa*,

Staph. aureus 및 Ps. aeruginosa 와 Staph. aureus 의 혼합균액을 세균수가 $10^6/cc$ 가 되도록 첨가하였다. 이와 같이 조제한 균-세포부유액을 $37^{\circ}C$ 에서 30분 및 60분간 접촉시킨후에 식균한 거식세포 출현율과 세포내 균수의 총균수에 대한 백분율을 추구하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

A. 식균한 거식세포의 출현율

1. Ps. aeruginosa 나 Staph. aureus 가 단독으로 거식세포부유액과 접촉하였을 경우 :

Staph. aureus 에서의 거식세포 출현율이 Ps. aeruginosa 의 거식세포 출현율보다 약 30~40% 이상의 높은치를 보이고 있었다.

2. Ps. aeruginosa 와 Staph. aureus 가 혼재하여 거식세포부유액과 접촉하였을 경우 :

일반적으로 Ps. aeruginosa 단독 접촉시 보다는 많이 증가하였으나 Staph. aureus 단독 접촉시와는 거의 비슷 비슷한 수치를 보이나 정상토끼 혈청의 30분치에 있어 오히려 약 20% 저하하였다.

B. 세포내 균수의 백분율

1. Ps. aeruginosa 나 Staph. aureus 가 단독으로 거식세포부유액과 접촉하였을 경우

Ps. aeruginosa 나 Staph. aureus 가 거식세포부유액과 단독으로 접촉한 경우, 두균 공히 정상토끼 혈청과 C. M. F 에서 상당히 높은 수치를 보이었는데 시간 경과에 따른 세포내 균수의 비에는 큰 차이가 없었다. 정상토끼혈청에서의 60분치 이외에는 대체로 Ps. aeruginosa 가 Staph. aureus 에 비하여 세포내 균수의 백분율에 있어 약간 상승하였다.

2. Ps. aeruginosa 와 Staph. aureus 가 혼재하여 거식세포부유액과 접촉하였을 경우 :

두균이 혼재하여 접촉한 경우, Ps. aeruginosa 에서 단독 접촉시 보다 세포내 균수의 백분율이 약간 저하하나 Staph. aureus 의 경우 세포내 균수의 백분율이 현저하게 저하되었다.

3. Ps. aeruginosa 와 Staph. aureus 가 혼재하여 접촉시 식균거식세포내 균수중 Ps. aeruginosa 의 백분율은 시간이 지남에 따라 크게 감소되는 반면, Staph. aureus 가 압도적으로 많다.

ABSTRACT

In vitro observation of phagocytic activities of rabbit macrophages on Ps. aeruginosa and Staph. aureus in single and mixed suspension.

Kwak, Dal Hyun, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, College of Medicine, Seoul National University

(Director: Prof. Hahn, Moon Shik)

Bacterial suspension of Ps. aeruginosa, Staph. aureus and the mixture of the two were added to rabbit macrophage suspended in Cell Maintenance Fluid (CMF) and normal rabbit serum. After an incubation period of 30 and 60 minutes at $37^{\circ}C$, the bacteria-macrophage suspensions were investigated as regard to the percentages of macrophage with intracellular organisms and percentages of intracellular organisms.

Results of observation were summarized as follows;

1. In the Ps. aeruginosa-macrophage suspension; The percentages of macrophage with intracellular organisms were 15% after 30 minutes, 29% after 60 minutes in normal rabbit serum, and 11.5% after 30 minutes, 46% after 60minutes in CMF respectively. Percentages of intracellular organisms were 97% after 30 minutes, 97% after 60 minutes in normal rabbit serum, and 92% after 30 minutes, 96% after 60 minutes in CMF.

2. In the Staph. aureus-macrophage suspension; The percentages with intracellular organisms were 45.5% after 30 minutes, 68% after 60 minutes in normal rabbit serum, and 47% after 30 minutes, 80, 5% after 60 minutes in CMF respectively. Percentages of intracellular organisms were 91% after 30 minutes, 97.5% after 60 minutes in normal rabbit serum, and 79.5% after 30 minutes, 89.5% after 60 minutes in CMF.

3. In the bacterial mixture-macrophage suspension; The percentages of macrophage with intracellular organisms were 25.5% after 30 minutes, 67.5% after 60 minutes in normal rabbit serum, and 48.5% after 30 minutes, 82.5% after 60 minutes in CMF respectively. The percentages of intracellular organisms,

on the other hand, were 98.5% after 30 minutes, 93% after 60 minutes in normal rabbit serum, and 59% after 30 minutes, 71% after 60 minutes in CMF.

Staph. aureus vs. *Ps. aeruginosa* of intracellular organisms were 69%:31% after 30 minutes, 92%:8% after 60 minutes in normal rabbit serum, and 62%:38% after 30 minutes, 83%:17% after 60 minutes in CMF.

REFERENCES

1. Anderson, W. A. D.: *Pathology*. C. V. Mosby, Louis, La. 1966.
2. 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.
3. Cohn, M. A.: *Lysosomes in Mononuclear Phagocytes, in Mononuclear Phagocytes*. 1st Ed. by van Furth, P. F. A. Davis, Philadelphia, Pa. 1970.
4. Davis, B. D., Dulvoso, R., Eison, H. N. Ginsberg, H. S. and Wood, W. B.: *Microbiology*. Harper & Row, N. Y. 1970.
5. Dubos, R. J. and Hirsch, J. G.: *Bacterial and Mycotic infections of Man*, 4th Ed. Lippincott, Philadelphia, Pa. 1965.
6. Jawets, F., Nilnick, J. L. and Adelberg, E. A.: *Review of Medical Microbiology*, 10th Ed. Marzen. Japan.
7. Kim, D. S.: *Effect of Immunization on the phagocytosis of Mycobacterium by Macrophages of Rabbits*. *New Med. J. (Korea)*, 13:53. 1972.
8. Kim, K. W.: *Comparative study on phagocytic activities of rabbit macrophages on Staph. aureus and B. subtilis in single and mixed suspension*. *J. K. Ortho. Asso. Vol. 9, No. 2, 165-172. 1974.*
9. 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. K. Ortho. Asso. Vol. 8, No. 1, 85-94. 1973.*
10. Lee, S. H.: *Experimental Studies on Pseudomonas aeruginosa*. *Seoul university Journal of Medicine and Pharmacy Series(C)* 18:1-15, 1967.
11. Mackaness, G. B.: *Cellular Immunity, in Mononuclear Phagocytes*, 1st Ed. ep by van Furth, P. F. A. Davis, Philadelphia, Pa. 1970.
12. Metchnikoff, 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.
13. Park, H. and Chough, H.: *In vitro observation on the growth of Staph. aureus, Staph. albus, B. subtilis, and Es. coli in the peritoneal fluid from liver cirrhosis patients*. *Kor. Cent. J. Med.* 24: 377, 1973.
14. Park, W. C.: *Influence of temperature and media on the phagocytic activities of rabbit macrophage*. *Seoul Journal of Medicine.* 14:No. 4, 301-309, 1973.
15. Pearsall, N. N. and Weiser, R. S.: *The macrophage*. Lea & Febigar, Philadelphia, Pa. 1970.
16. Wilson, G. S. and Molles, A. A.: *Topley and Wilson's Principle of Bacteriology and Immunity*. 5th Ed. William & Wilkins, Baltimore Md. 1964.
17. Wu, W. G. and Marcus, S.: *Humoral factors in cellular resistance. 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.