

마우스巨噬細胞의 *Mycobacterium fortuitum*에 對한 反應樣相

Interaction between *Mycobacterium fortuitum* and Macrophages from the mouse peritoneal exudate

서울大學校 醫科大學 微生物學教室

車 昌 龍 · 李 承 薰

結 論

巨噬細胞系列(Macrophage series)에 屬하는 細胞群은 生體의 全身장기 및 組織에 分布하며(Van Furth, 1970; Pearsall et al., 1970; Carr, 1973; Stuart, 1975), 免疫反應에 重要な 役割(Pearsall et al., 1970; Carr, 1973; Nelson, 1976)을 할 뿐만 아니라 宿主防禦機能에 主軸을 이루는 噴喰作用(Hirsch, 1965; Davis, 1973; Wilson, 1975)에 關係하는 細胞임은 잘 알려져 있다.

특히 *Mycobacterium* 菌種(Lurie, 1942; Suter, 1952; Mackaness, 1954; Fong et al., 1956; Berthrong, 1968; 차등, 1971; 김, 1972), *Brucella* 菌種(Elberg et al., 1957; Freemann et al., 1961), *Salmonella* 菌種(Jenkin et al., 1960) 및 *Listeria monocytogenes*(Mackaness, 1962)와 같은 細菌과 巨噬細胞와의 相互反應에 關한 研究는 比較的 많이 進行되어, 이들 細菌의 噴喰 및 細胞內 處理의 程度가 宿主細胞의 防禦機能 및 免疫性을 좌우하는 것으로 알려져 있다(Mackaness et al., 1970 a; Mackaness, 1970b; Pearsall et al., 1970). 그중에서 *Mycobacterium* 菌種에 對한 巨噬細胞의 反應樣相은 Berthrong(1968) 및 Dannenberg(1968)가 *Mycobacterium* 症에 重要的 因子로 시사하기 전에 이미 巨噬細胞에 依한 *Mycobacteria*의 噴喰 및 細胞內增殖程度에 關한 研究는 血清因子(Suter, 1953; Fong et al., 1956) 및 菌側毒性因子(Mackaness, 1954)를 中心으로 이미 報告되었다. 그 後에 免疫血清因子는 特異抗體 및 補體를 제공하는 源泉으로 巨噬細胞가 細菌을 보다 쉽게 接觸, 噴喰하도록 할 뿐만 아니라 細胞內에서 쉽게 消化하도록 하리라고 시사하는 報告(Lurie, 1942; Suter, 1953; Fong et al., 1956; Whiteby et al., 1959; Jenkin et al., 1960; Mackaness,

1960)가 많으나, *Mycobacteria*에 對한 免疫血清因자의 噴喰作用에 關여정도는 다른 細菌에서와 같은 樣相은 아닌듯 함이 Berthrong(1959 및 1968)의 보고가 시사하고 있다. 그러나 *in vitro* 噴喰실험에서 同種正常血清이나 異種正常血清인 fetal calf serum, 馬血清, 토끼血清을 培地에 첨가함을 시사한 Stuart(1973) 및 van Furth(1973)의 제안은 일반적인 조직배양에 營養條件으로 血清을 제공하는 Eagle(1955)의 보고와 相應하나, 한편으로는 Ravinovitch(1970)가 시사한 血清成分에는 噴喰에 關與하는 "recognition factors"가 存在하기 때문에 *in vitro*의 條件과 類似的한 環境을 제공하는 目的으로 使用될 수 있겠으나 아직도 理由가 確實치 않다. 이에 對해서 실제로 *in vitro* 實驗을 通하여 實驗培地內에 血清成分을 完全히 배제한 경우와 첨가한 경우를 比較觀察함으로 血清成分의 關與機轉을 理解하는데 도움을 받을 수 있으리라 추측되었다.

이에 따라 著者들은 *Mycobacterium fortuitum*(Gordon, 1955; Well et al., 1955; Kushner, 1957; Fregnar, 1961; Hartwig, 1962; Stanford et al., 1969; Paffyn et al., 1974)이 마우스감염시 초기에 發現되리라 추측되는 細菌과 巨噬細胞와의 接觸으로 야기되는 相互反應을 *in vitro*에서 血清이 배제된 경우와 血清을 첨가한 경우로 나누어서 *Mycobacterium fortuitum*과 마우스의 복강에서 採取한 巨噬細胞와 Leighton管에서 接觸, 배양시킨 후 30분, 60분, 90분 및 120분 간격으로 세균의 消長 및 抗酸菌을 함유하는 巨噬세포의 出現도를 比較觀察하여 報告하는 바이다.

材料 및 實驗方法

1. 培地

菌浮遊液에 使用된 增殖用培地로는 bovine serum이 10% 含有된 Dubos serum broth(pH 6.8)을, 生菌數를 側定하기 위하여 soybean-casein digest agar로 평판培

*本 研究는 1976년도 文敎部學術研究助成費에 依하여 進行되었음.

<1977年 5月 27日 接受>

地를 製造하여 使用하였다.

細胞收集液(Cell-Collecting Fluid, CCF)는 Marcus et al. (1963), 차등(1970) 및 van Farth(1973)의 方法을 참조하여 Earle's Balanced Salt溶液에 ml當 75單位의 sodium heparin이 含有된 溶液을 使用하였다. 細胞세척액(Cell-Washing Fluid, CWF)은 Earle's BSS에 ml當 1單位의 sodium heparin이 含有된 溶液을 使用하였다.

細胞維持液(Cell-Maintaining Fluid, CMF)은 Earle's BSS에 lactalbumin hydrolysate을 5% 첨가 유동시킨 lactalbumin hydrolysate 溶液을 10% 정도 함유한 용액을 製造하여 本 實驗에서 두 種類의 CMF을 使用하였다. 즉 여기에 10%의 열처리하지 않은 bovine serum을 첨가한 경우와 배제한 경우로 나누어 使用하였고 Marcus(1963) 및 차등(1970)의 方法에 따라 4.4% NaHCO₃ 溶液으로 CCF, CWF, 및 CMF의 pH를 7.2~7.3으로 測定하여 使用하였다.

2. 細菌

서울大學校 醫科大學 微生物學教室에 保管菌株인 *Mycobacterium fortuitum*을 37°C에서 72時間 Dubos serum broth에서 發育増殖시킨 후 1500G로 20분간 원심침전시킨 후 上層液을 버리고 침전을 血清이 함유되지 않은 CMF로 2회 세척한 後에 220G에 10분간 원심침전시켜 上層浮遊液을 實驗에 使用하였다. Fenner(1951), 차등(1971) 및 김(1972)의 方法에 따라 菌數를 1.0×10^7 /ml되게 미리 測定하여 實驗에 使用되는 $5.9 \sim 6.0 \times 10^5$ /ml정도로 되게 CMF로 희석한 菌浮遊液을 使用하였다. 이 菌浮遊液은 巨噬細胞가 원심침전되는 110 G에서는 침전부위에 含有되지 않고 上層位에 그대로 存在하는 特徵을 가졌다.

3. 腹腔滲出液 및 細胞

대체로 van Furth(1973), Chang et al.(1976) 및 Shin et al.(1976)의 方法에 따라 마우스의 腹腔으로부터 腹腔滲出細胞(peritoneal exudate cell)을 採取하였다. 즉 van Furth et al. (1973) 및 Stuart(1973)의 方法에 따라 마우스의 경부를 눌러 마우스를 죽인후 Chang et al.(1976) 및 Shin et al.(1976)이 使用한 multiperforated, 18-gauged 주사바늘을 통하여 腹腔에 3ml정도의 CCF를 注入한後 마우스腹腔을 가볍게 2-3分間 massage하였다. 다시 multiperforated, 18-gauged 주사바늘이 附着된 10ml 주사기로 腹腔液을 採取하였는데 대개 10~12마리의 마우스의 腹腔液을 어름가루(4°C)가 함유된 상자에 있는 siliconized시원관(van Furth et al., 1973; Chang et al., 1976; Shin et al., 1976)에 모았다.

이렇게 收集한 腹腔液을 110G로 5분간 원심침전시켜 上層液을 버리고 침전물을 CWF로 2회 계속 원심침전하여 세척하였다. 마지막으로 침전된 細胞는 血清이 함유되지 않은 CMF에 浮遊시켰고 그 一部를 채취하여 Türk溶液으로 稀釋하여 hemocytometer로 細胞數를 測定하여 ml當 10^7 정도되게 CMF로 測定하였다.

4. 菌-細胞 混合 및 觀察

細胞浮遊液과 菌浮遊液을 混合한후에 一群은 10% bovine serum이 함유되도록 하였고 또 다른 群은 血清이 含有되지 않도록 하여 van Furth (1973)가 사사하였듯이 細菌:細胞數의 比率이 대개 1:1이 되게 測定 混合하였다. 이들 混合液을 어름가루가 들어 있는 용기내에서 가볍게 진탕한 後에 cover-slip이 들어 있는 siliconized된 Leighton tube에 약 2ml씩 分注하여 편평한 面이 아래쪽에 向하도록 기울여 놓고 37°C 부란기에 放置하였다. 對照群으로는 4°C의 어름가루가 있는 容器에 그대로 放置한 群을 零時間分으로 定하였고 또 한 열처리가 없는 CMF에 細胞를 混合하지 않은 群을 역시 37°C에 放置하였다. 培養時間에 따라 30分, 60分, 90分 및 120分마다 Leighton管으로부터 cover-slip을 꺼내었고 그에 남아 있는 細菌-細胞浮遊液을 110G에 5분간 원심침전시킨 후 上層液內의 生菌數를 決定하였다.

Cover-slip은 無水 methanol로 20분간 固定한 後에 Suter(1952)의 方法을 變形하여 carbolfuchsin용액을 1시간동안 處理 染色시킨 후 3% acid-alcohol로 탈색시키고 Giemsa染色溶液으로 20分間 Counterstaining 하였다. 染色된 cover-slip을 slide-glass에 canda turpentine를 固定한 後에 현미경으로 視野를 무작위하게 바꾸면서 대개 200개의 일과구를 세는 동안에 나타나는 전체 巨噬細胞數를 세었고 그중에 抗酸菌(acid-fast bacilli, AFB)을 細胞內에 가지는 巨噬細胞數도 同時에 관찰하여 全體 巨噬細胞에 對한 抗酸菌을 함유한 巨噬細胞數의 百分率을 決定하여 噴喉程度를 時間別로 도시하였다.

한편 Leighton管內의 菌-細胞浮遊液을 원심침전시킨 후, 上層液을 0.5ml를 採取하여 4.5ml의 生理식염수에 10배 계단희석하였다. 이 稀釋된 上層液을 0.2ml pipette을 使用하여 soybean-casein digest agar plate에 一滴씩 떨어뜨린후에 37°C부란기에 72時間 培養한 후 plate表面에 形成된 集落數로 生菌數를 算出하였다.

實驗成績

巨噬細胞가 *Mycobacterium fortuitum*을 噴喉 處理하

는데 血清成分의 存在여부가 어떠한 影響을 미치는가 를 觀察하기 爲하여 마우스腹腔細胞와 *Mycobacterium fortuitum*을 接觸시킬때 培地內에 血清成分을 첨가한 群과 배제한 群間에 一定한 時間간격을 두고 菌一細胞 浮遊液上에서 生菌數의 消長을 觀察하였고 이에 따라 噴喰指數(phagocytic index)를 決定하였다.

1. 菌一細胞浮遊液內에서의 噴喰樣相

本 實驗에서는 菌一細胞浮遊液에서 巨噬細胞와 *Mycobacterium fortuitum*이 接觸後, 時間經過에 따라 巨噬細胞에 依하여 噴喰되던 점차로 浮遊液培地內에 細菌數는 감소되리라 推測되어서 浮遊液을 110G로 5分間 원심침전시켜 巨噬細胞와 細菌을 分離하였다. 즉 원심침전한 結果, 腹腔細胞 및 細菌을 噴喰한 巨噬細胞는 침전물中에 存在하고 細菌은 上層液內에 存在하여 이들 細菌은 巨噬細胞에 依하여 噴喰되지 않은 部分으로 van Furth et al. (1973)이 시사하였듯이 噴喰作用의 計測值가 상층액內의 生菌數로 간접적으로 算出될 수 있겠다.

이와같은 方法으로 著者들은 圖:1에 表示 하였다. 즉 腹腔細胞를 함유하지 않은 菌浮遊液內의 生菌數는 120분간 培養하는 동안에 거의 變化 無었다.

그러나 菌一細胞浮遊液內에서는 生菌數의 變化가 통계적으로 有意한 差異를 보였다. 즉 培養時間이 30分間 경과후에 血清이 함유된 群에서는 급격한 生菌數의 減

소가 있었으나 血清이 배제된 群에서는 完만히 감소되어서 血清이 함유된 群이 배제된 群에 비하여 통계적으로 有意한 差異를 두고 生菌數가 감소하였다(P value < 0.01). 30분이 지나면서도 계속적으로 生菌數가 감소하는데 혈청이 함유된 群이 배제된 群에 比하여 역시 급격한 감소가 지속되어서 兩群間에는 有意한 差異를 두고 生菌數가 60분까지 變化했다(P value < 0.01). 120분에 이르러서는 兩群間에 生菌數는 통계적으로 有意한 差異가 없어서 (P value > 0.05) 거의 비슷한 生菌數를 維持하였다. 즉 90분부터 120분까지는 生菌數의 감소속도는 血清이 배제된 群이 더 크게 나타났다.

한편 表1에 表示된 生菌數의 消長을 時間에 따르는 噴喰速度로 數值化하려면 van Furth(1973)이 제시한바와 같이 배양시작時的 生菌數를 N_0 라 하고 適當한 時間經過後의 生菌數를 N_t 라 하면 噴喰指數인 $F_t = \log N_0 - \log N_t$ 로 計算하여 各己 觀察時의 F_t 로 表示한 것이 表 1에 나타나 있다.

Table 1. Phagocytic index of *Mycobacterium fortuitum* by mouse peritoneal macrophages during incubation period

Phagocytic index (F_t)*	Bacteria-macrophage suspension	
	without serum	with serum
F_{30}	0.0755	0.1790
F_{60}	0.1075	0.2529
F_{90}	0.2148	0.3075
F_{120}	0.4282	0.4698

*Phagocytic index: $F_t = \log N_0 - \log N_t$

N_0 : Number of viable bacteria in the supernatant at the start

N_t : Number of viable bacteria in the supernatant at time t (min.)

菌一細胞浮遊液에 bovine serum이 함유되지 않은 群은 F_{30}, F_{60}, F_{90} 및 F_{120} 이 各各 0.0755, 0.1075, 0.2148 및 0.4282로 噴喰指數가 增加하였는데 60분까지는 生菌數의 變化에서 觀察되었듯이 完만한 增加가 있었는데 그 後부터는 거의 2배씩 指數가 增加하였다. 反面에 菌一細胞浮遊液에 bovine serum이 함유된 群에서는 F_{30}, F_{60}, F_{90} , 및 F_{120} 이 各各 0.1790, 0.2529, 0.3075, 및 0.4698로 30분까지 급속한 速度의 增加를 보이다가 점차로 完만한 增加를 보이다가 90分후에는 약간 급속한 增加를 보였다. 血清을 배제한 群과 比較하면 60분후까지는 거의 2倍以上의 噴喰指數의 差異를 보였으나 차차 간격이 좁아져 120분에는 거의 有似한 指數를 보였다.

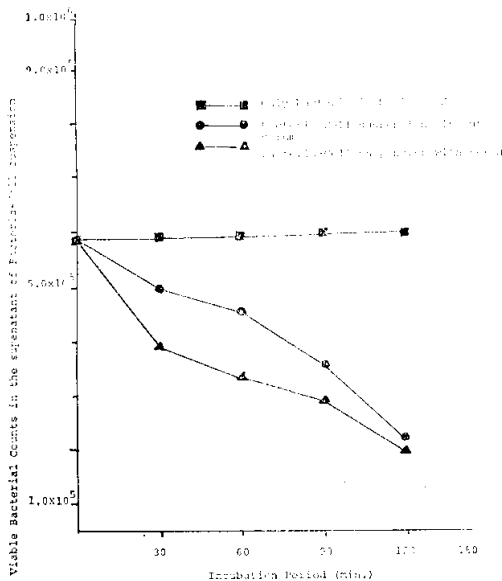


Fig. 1. Phagocytosis of *Mycobacterium fortuitum* by mouse peritoneal macrophages (means of five experiments).

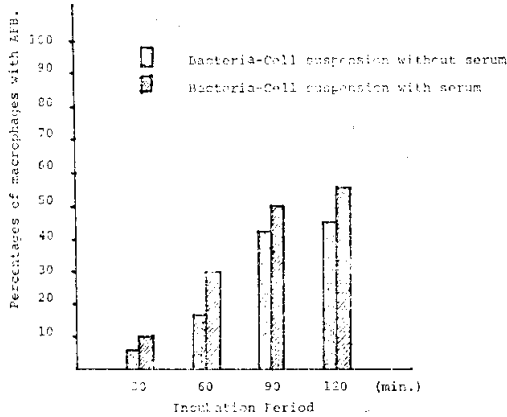


Fig. 2. Percentages of macrophages with AFB on stained cover-slip in bacterial-cell suspension at 37°C (mean of five experiments).

2. Cover-slip에附着된巨喰細胞의噴喰様相

siliconized되지 않은 cover-slip에附着된巨喰細胞가接觸한細菌인 *Mycobacterium fortuitum*을 어느 정도噴喰하는가를 Suter(1952)의方法을變形하여抗酸染色을行하여抗酸菌을細胞內에가지는巨喰細胞數를무작위하게選擇한顯微鏡視野에서觀察되는全體의巨喰細胞數에對한百分率로表示하여圖:2에나타내었다

Cover-slip을 siliconized된 Leighton管에菌-細胞浮遊液과 함께培養時間동안共存하므로 cover-slip에接觸된細菌 및細胞의分布는浮遊液과類似하리라추측되며,形態學的인觀察을할수있는利點下에實驗을進行하였다.

菌-細胞浮遊液에 bovine serum을 함유하지 않은群에서는 30분, 60분, 90분 및 120분이經過하는 동안에各各 60%, 16%, 43% 및 45%로抗酸菌을 가진巨喰細胞가觀察되는分布를 보였다. 즉 60분까지는 완만히增加하다가 그後부터는 급격히 증가하여 120분에는 45%에達하였다. 反面에 bovine serum을 함유한群에서는 30分, 60分, 90分 및 120分에各各 10%, 30%, 50%, 및 56%로抗酸菌을 가진巨喰細胞가發見되는빈도가增加하였는데 60分 및 90分까지 급격하게增加하다가 그後에는 약간 완만해져서 56%에達하였다.

兩實驗群을 시간別로比較해 보면血清을 함유한群인 배제된群에比하여統計的으로 현저하게 60분까지有意한差異(P value < 0.025)을 보이는噴喰率의差가보였으나 그 후에는 약간 간격이 좁아져 서로有意한差異(P value < 0.05)는 있으나 증가분 자체가 상당히 완

만하였다.

Cover-slip을染色하여形態學的觀察을行한후에 사진을 찍었는데 사진:1은腹腔細胞의正常的인形態 및分布된細胞의種類를 나타내어 입파구 및巨喰細胞가 보이는데巨喰細胞는 입파구보다 크며細胞質도 많고核은 ovoid하거나 horse-shoe shaped인 것이特徵이고細胞質內에는 vacuole이 많다. 사진:2은 배양시간에 어느 정도經過한後의巨喰細胞가抗酸菌을細胞質 및 vacuole內에 가지고 있는 모양으로桿菌인 *Mycobacterium fortuitum*이 많이 세포질內에存在하는 것을觀察할 수 있었다.

考 察

巨喰細胞와細菌이接觸時細胞 및細菌의各種生物學的性狀과環境의物理化學的性狀等 여러因子가關係하여噴喰作用에影響을미치지알려졌다.(Dubos et al., 1965; Cohn et al., 1965; Davies et al., 1973; Wilson, 1975). 그中에서免疫血清의影響에 관한研究는 많이進行되어서噴喰作用에重要的因子로 간주되어(Suter, 1953; Fong et al., 1956; Whiteby, et al., 1959; Jenkin et al. 1960; Mackaness, 1960) Ravinovitch (1970)가 시사하였듯이 "Phagocytic Recognition"에關與하는因子를 제공하는 것으로 알려져 있다.

그러나 Stuart(1973) 및 van Furth(1973)가 시사하였듯이 fetal calf serum을 비롯한異種血清을噴喰實驗에使用하는理由 및作用機轉에對해서確實한證據가 없다.

著者들은 *Mycobacterium fortuitum*이宿主인 마우스에 도입시 일어나는現象인噴喰作用을生體外에서 bovine serum을加한培地에서 시도하여 관찰코져 하였다. 즉, 正常마우스腹腔으로부터收集한巨喰細胞와 *Mycobacteria*를接觸시킨後 30分, 60分, 90分 및 120分 간격으로菌-細胞浮遊液內의生菌數의消長과 더불어抗酸菌을 함유한巨喰細胞가 나타나는 빈도를血清을 첨가한群과 배제한群을區別하여觀察하였다.

菌-細胞浮遊液內에서血清을 함유한群은 배제한群에比하여圖:1에서와 같이 60분까지 빨리 급속히生菌數가 감소하였기 때문에 이時期에 보다 빨리噴喰한 것으로 사료되었으며 이와 같은結果는 표:1에서 보는바와 같이噴喰指數도 2倍以上으로 큰數値를 보이는 것으로도理解할 수 있었다. 그러나 그後의生菌數의變化는血清을 함유한群과 배제한群에도有意한差가 있게끔 서로 감소하였으나 120분에 이르러서

는 서로 有意한 差가 없었다. 이와같은 結果는 표:1에서도 유사한 樣相을 보였기 때문에 이같은 樣相에 對해서 血清을 함유한 培地에서는 배제된 경우에 比하여 巨噬細胞와 細菌이 접촉하는 時間을 短縮시켜 주며 따라서 正常血清에서도 免疫血清에서 같이 Ravinovitch (1970)가 시사하였듯이 “nonimmunological phagocytosis”을 도와주는 因子가 제공되며, Eagle(1955)이 제안한 組織細胞培養에 血清은 營養因子를 제공하기 때문에 細菌을 보다 빨리 噴噬시켰으리라 추측되었다. 本實驗에서 유사한 結果는 抗酸菌을 함유한 巨噬細胞의 出現度에서도 60분까지는 血清을 함유한 群이 배제한 群에 比하여 有意한 差를 보인것도 이 時期에 그 만큼 噴噬作用이 보다 活潑하게, 빨리 進行되었음을 시사하는 結果로 사료되었다.

특히 本實驗에서 제시한 噴噬指數는 表:2에서 보는바와 같이 다른 研究者(van Furth et al., 1973)들에 依해서 제시된 다른 菌種에 對한 巨噬細胞의 噴噬指數를 比較하였다.

Table 2. Phagocytic index and half-time of phagocytosis ($T_{1/2}$) of various bacteria by mouse peritoneal macrophages in the medium containing serum (at 120 minutes)

	Mycobacterium fortuitum (1)	Staphylococcus aureus (2)	Staphylococcus albus (2)	Pseudomonas aeruginosa (2)
Phagocytic index (F_{120})	0.4698	0.4469	1.1248	1.1162
$T_{1/2}$ Phagocytosis (min.)	71.4	80.75	28.75	21.86

* $T_{1/2}$ phagocytosis = $\frac{\log 2}{F/60} \times 60$ (min.)

(1) Data from author

(2) Data from Reference (van Furth, 1973.)

아직까지 차등(1971)이 報告한 가토의 巨噬細胞의 *Mycobacterium fortuitum*에 對한 反應양상에 對한 研究以外에는 전혀 巨噬細胞와 *Mycobacterium fortuitum*에 相互반응에 關한 研究는 없기 때문에, 最近에 점차적으로 問題되고 있는 *Mycobacterium fortuitum*에 依한 감염의 病因에 對한 知識은 아주 빈곤한 實情이다. 따라서 表2에 제시된 比較值들은 巨噬細胞에 對한 *Mycobacterium fortuitum*의 態度는 *Staphylococcus aureus*와 마우스腹腔巨噬細胞를 中心으로 觀察하였을때 유사한 性狀을 나타내는 인상을 주고 있었다. *Mycobacterium fortuitum*은 分類學的 位置 및 生物學的 性狀에 關해서는 어느 정도 研究가 되어 있으나(Gordon, 1955; Well

et al., 1955; Kashner, 1957; Fregnan, 1961; Hartwig, 1962; Standford et al., 1969; Pattyn et al., 1974), 그중에 Well et al.(1955) 및 Kushner et al.(1957)가 마우스에 접촉감염시 농양(abscess)形成을 관찰하였을 정도로 감염樣相에 對한 研究報告는 드물다. 그러나 Dross et al.(1964)가 人體感染에 對한 報告를 비롯하여 Beck (1965)의 피하농양, Corper et al.(1961)의 *Mycobacterium fortuitum*에 의한 死亡例가 드물게 있으나 最近에 와서 Hand et al.(1970)의 報告와 같이 뇌막염, 폐 감염, 角膜炎, Stich abscess등 어느 부위에나 쉽게 感染된 例를 觀察 報告하므로써 *Mycobacterium fortuitum* 感染時의 感染成立 機轉에 對한 知識이 점차로 요구하게 되었다. 現在에 이르기까지 *Mycobacterium fortuitum*은 마우스에 病原性菌種으로 마우스에 感染時 head-rolling이나 multiple renal abscess(Kushner, 1957; Wilson, 1975)을 야기시킨다는 기술이 되어있으나, PPD와 交叉反應을 일으키고 granulomatous 염증반응을 나타내므로 (Wells, 1955; Kashner, 1957; Joklik et al., 1972) *Mycobacterium tuberculosis*와 유사한 病因을 나타내리라 추측되어 本實驗에서 나타난 結果는 앞으로 *Mycobacterium fortuitum*에 感染을 理解하는데 아주 初步的인 知識을 제공할 수 있을 것 같다. 즉 本實驗에서는 마우스巨噬細胞는 *Mycobacterium fortuitum*을 *Staphylococcus aureus*와 비슷한 反應樣相을 取하여 *Mycobacterium fortuitum*을 쉽게 噴噬 處理하지 못하며 차등(1972)의 實驗結果와 比較할때에 가토보다는 마우스에 對해서 보다 쉽게 感染을 야기시킨 것으로 추측되었다. 그러나 이에 對해서 實驗條件이 좀 다르기 때문에 確實한 結論을 내릴수는 없으나, 將次 마우스에 接種 感染시키는 in vivo反應과 in vitro실험을 結合한 實驗을 進行함으로써 보다 確實한 病因을 究明할 수 있으리라 사료되었다.

總 括

著者들은 *Mycobacterium fortuitum*이 마우스 感染時 初期에 發現되리라 추측되는 巨噬細胞와 接觸으로 야기되는 相互反應을 in vitro에서 血清이 첨가된 경우와 배제한 경우로 나누워 *Mycobacterium fortuitum*과 마우스腹腔에서 採取한 巨噬細胞를 Leighton管에 접촉시킨후 30分, 60分, 90分 및 120分간격으로 生菌數의 消長과 抗酸菌을 함유하는 巨噬細胞의 出現빈도를 比較 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 血清成分에 依하여 噴噬作用이 亢진되어 보다 빨

리 시작되었고 噴食속도도 增加되었다.

2. 血清이 첨가한 群과 배제한 群간에 噴食作用이 60分까지 약 2배이상 差異가 있었으나, 침차로 差異가 적어져 120분에 이르러서는 有意한 差가 없었다.

3. 血清이 함유된 培地內에서 마우스巨噬細胞의 *Mycobacterium fortuitum*에 對한 噴食指數는 120분에서 0.4698이었으며, 生菌數의 反感期는 71.4분이었다.

4. 90분이후부터 50% 이상의 巨噬細胞가 세포질내에 抗酸菌을 함유하고 있었다.

ABSTRACT

Interaction between *Mycobacterium fortuitum* and Macrophages from the mouse peritoneal exudate

Chang-Yong Cha and Seung-Hoon Lee

Department of Microbiology, College of Medicine,
Seoul National University

Numerous studies on the interactions between microorganisms and phagocytes have suggested that the phagocytosis may be influenced by the nature of microorganisms, the metabolic states of the phagocytes and the physico-chemical nature of environment, etc. Especially, it has been well known that the attachment phase of phagocytosis may be enhanced by the immune sera containing specific antibodies and complements. But information is incomplete or missing on the mode of action of normal homologous and heterologous serum mixed in the medium of in vitro experiments on phagocytosis.

Therefore, an experiment was performed to understand the influences of normal heterologous serum on the interaction between mouse macrophages and *Mycobacterium fortuitum* which are pathogenic to mice, in the medium with bovine serum as heterologous serum and as a control in the medium without serum components. Thus, normal mouse macrophages were collected from the peritoneal cavity, pooled, suspended in the cell-maintenance medium, and mixed with suspension of *Mycobacterium fortuitum* both in the medium with serum and in the medium without serum. The bacteria-macrophages suspensions in the Leighton tubes with cover-slip were incubated at 37°C. for 120 minu-

tes, and the ratio of macrophages containing AFB to the total macrophages observed in the stained cover-slip and viable bacterial counts in the supernatants of the medium in this experimental condition were checked at zero time(as a control), 30 min., 60 min., 90 min., and 120 min. during incubation.

The results obtained in this experiment were summarized as follows;

1. The rate of phagocytosis was more heightened in the medium with serum than that in the medium without serum, i.e. serum made an enhancing effect on phagocytosis of *Mycobacterium fortuitum* by mouse macrophages.

2. Until 60 minutes of incubation the macrophages in the medium with serum phagocytosed *Mycobacterium fortuitum* twice more rapidly than those in the medium without serum, but no significant difference in the rate of phagocytosis were found at 120 minutes.

3. The phagocytic index at 120 minutes in the medium with serum amounted to 0.4698 when calculated from the viable bacterial counts checked, and half-life of the viable bacterial counts in the supernatant was 71.4 minutes.

4. After 90 minutes of incubation, more than 50% of macrophages in the stained cover-slip from the medium with serum contained AFB in the cytoplasm.

REFERENCES

- 김동순: 항산균에 대한 거식세포의 식균작용에 면역조각이 미치는 영향. 最新醫學, 15(12): 1259, 1972
차창용·박원철·이승달·이승훈: 세포내 세균의 생태에 관한 연구(I), 포도구균과 거식세포. 最新醫學, 13(3): 533, 1970
차창용·김동순·이승훈: 항산균과 거식세포의 반응양상에 대한연구. 결핵 및 호흡기 질환, 18(1): 12, 1971
Berthrong, M. and M.A. Hamilton: *Monocyte from normal and immunized guinea-pig infected virulent human tubercle bacilli*. Am. Rev. Tuberc. & Pul. Dis., 79: 221, 1959.
Berthrong, M.; *The macrophages-tubercle bacillus relationship and resistance to tuberculosis*. Ann. N.Y.

- Acad. Sci.*, 154(1) : 157, 1968.
- Carr, I: *Ingestion by macrophage—Phagocytosis*(p. 61—72), in *The Macrophage, A review of ultrastructure and function. 1st edition, Academic Press, London, 1973.*
- Chang, W.H. and K.H. Rhee: *Studies on the cellular immunity and enhancing factors in MCA-induced sarcoma in C3H/HeN mice, Seoul J. Med.*, 17(14): 369, 1976.
- Cohn, Z.A. and J.G. Hirsch: *Phagocytic cells; In Bacterial and Mycotic Infections of Man, edited by Dubos, R.J. and J.G. Hirsch, 4th edition, J.B. Lippincott, Co., 1965.*
- Corpe, R.F., C.D. Smith, and I. Stergus: *Death due to Mycobacterium fortuitum. J.A.M.A.*, 177 : 262, 1961.
- Dannenberg, A.M.: *Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis; specificity, systemic and local nature, and associated macrophage enzymes, Bact. Rev.*, 28 : 85, 1968.
- Davis, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood, and M. McCarty: *Microbiology, 2nd edition, Harper & Row Publishers, New York, 1973.*
- Dross, I.C., A. Abbatiello, F.S. Jenney, and A.C. Cohen; *Pulmonary infections due to M. fortuitum. Am. Rev. Resp. Dis.*, 89 : 923, 1964.
- Elberg, S.S., P. Schneider, and J. Fong: *Cross-immunity between Brucella melitensis and Mycobacterium tuberculosis, Intracellular behaviour of Brucella melitensis in monocyte from vaccinated animals, J. Exp. Med.* 106 : 545, 1958.
- Eagle, H. *Nutritional needs of mammalian cell in tissue culture. Science*, 122 : 501, 1955.
- Fenner, F.: *The enumeration of viable tubercle bacilli by surface drop counts. Am. Rev. Tuberc.*, 64 : 353, 1951.
- Fong, J., P. Schneider, and S.S. Elberg: *Studies on tubercle bacilli monocyte relationships, I, Quantitative analysis of the effect of serum of animals vaccinated with BCG upon bacterium monocyte system. J. Exp. Med.*, 104 : 455, 1956.
- Freemann, B.A., Kross, D.J. and R. Circo: *I. Host-parasite relationships in Brucellosis, II. Destruction of macrophage culture by brucella of different virulence' J. Inf. Dis.*, 108 : 333, 1961.
- Fregnan, G.B., D.W. Smith, and H.M. Randall: *Biological and chemical studies on Mycobacterium; relationship of colony morphology to mycosidic content for Mycobacterium kansasii and Mycobacterium fortuitum, J. Bact.*, 82 : 517, 1961.
- Gordon, R.E. and M.M. Smith: *Rapidly growing acid-fast bacteria, II. Species description of Mycobacterium fortuitum Cruz. J. Bact.*, 69 : 502, 1955.
- Hand, W.L., and J.P. Standford: *Mycobacterium fortuitum—A human pathogen, Ann. Intern. Med.*, 73 : 971, 1970.
- Hartwig, E.C., R. Cacciatore and F.P. Dunbar: *M. fortuitum; Its identification, incidence and significance in Florida, Am. Rev. Resp. Dis.*, 85 : 84, 1962.
- Hirsch, J.G.: *Phagocytosis. Ann. Rev. Microbiol.*, 19 : 339, 1965.
- Hsu, H.S.: *In vitro Studies on the interactions between macrophages of rabbit and tubercle bacilli; II. Cellular and humoral aspects of acquired resistance. Am. Rev. Resp. Dis.*, 91 : 499, 1965.
- Jenkin, C., and D.L. Palmer: *Changes in the titer of serum opsonins and phagocytic properties of mouse peritoneal macrophages following injection of endotoxin, J. Exp. Med.*, 112 : 418, 1960.
- Jokik, W.K. and D.T. Smith; *Zinsser Microbiology, 15th edition, Appleton-Century-Crofts, New York, 1972.*
- Kushner, D.S., S. McMillen and M. Sender: *Atypical acid-fast bacilli, II. Mycobacterium fortuitum; Bacteriological characteristics and pathogenicity for laboratory animals. Am. Rev. Tuberc.*, 76 : 108, 1957.
- Lurie, M.B.: *Studies on the mechanisms of immunity in tuberculosis, The fate tubercle bacilli ingested by mononuclear phagocytes derived from normal and immunized animals. J. Exp. Med.*, 75 : 247, 1942.
- Mackness, G.B.: *Growth of tubercle bacilli in monocyte from normal and vaccinated rabbits. Am. Rev. Tuberc.*, 69 : 495, 1954.
- Mackness, G.B.: *The phagocytosis and inactivation of staphylococci by macrophages of normal rabbits, J. Exp. Med.*, 112 : 419, 1960.
- Mackness, G.B.: *Cellular resistance to infection, J. Exp. Med.*, 116 : 381, 1962.

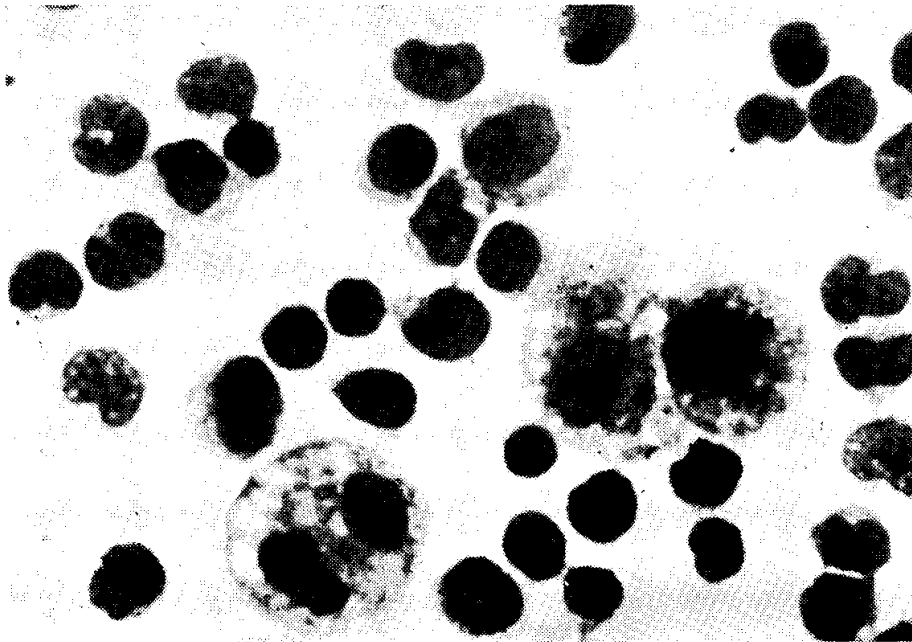


Fig. 1. Mouse peritoneal exudate cells including macrophages (center) surrounded by lymphocytes (periphery). No AFB is seen in the cytoplasm of macrophages.

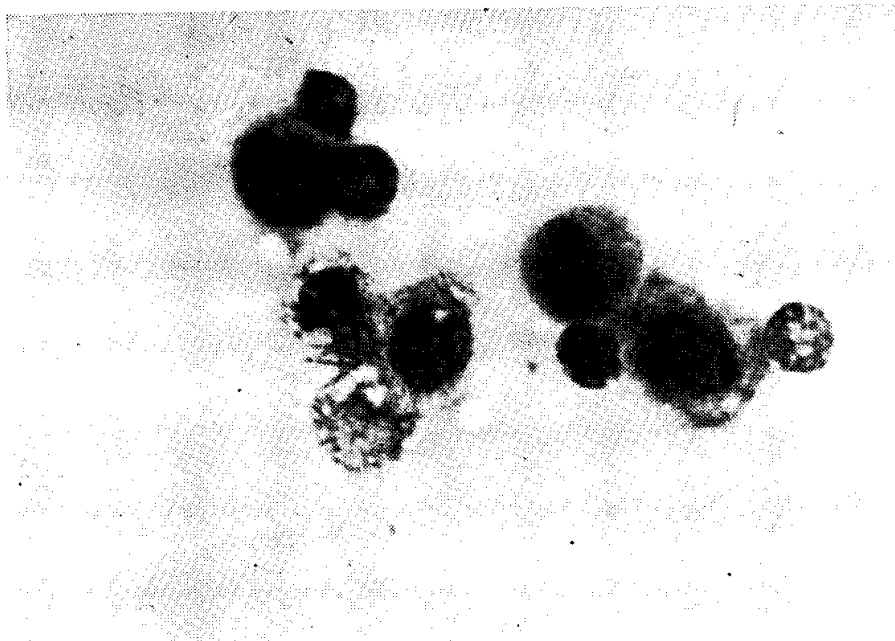


Fig. 2. Macrophages in the mouse peritoneal exudate containing AFB in the cytoplasm.

- Mackness, G.B.: *Cellular immunity; In Infectious Agents and Host Reaction. edited by S. Mudd, 1st edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1970 a.*
- Mackness, G.B.: *Cellular immunity; In Mononuclear Phagocyte, edited by R. van Furth, F.A. Davis Company, Philadelphia 1970 b.*
- Marcus, S. and W.G. Wu: *Humoral factors in cellular resistance, I. The effect of heated and unheated homologous and heterologous sera on phagocytosis by cytopesis by normal immune macrophages. J. Immunol., 91 : 313, 1963.*
- Nelson, D.S.: *Immunobiology of the Macrophages, 1st edition, Academic Press, New York, 1976.*
- Pattyn, S.R. M. Magnusson, J.L. Stanford and J.M. Grange; *A study of Mycobacterium fortuitum(ranae). J. Med. Microbiol., 7 : 67, 1974.*
- Pearsall, N.N. and R.S. Weiser: *The macrophage. 1st edition, Lea & Fabiger, Philadelphia, 1970.*
- Ravinovitch, M: *Phagocytic recognition; In Mononuclear Phagocytes, edited by R. van Furth, 1st edition, F.A. Davies Company, Philadelphia, 1970.*
- Shin, H.S., K.H. Rhee, I.S. Kim, W.H. Chang, and S.H. Lee: *Immunological studies on the MCA-induced sarcoma using the MIF technique. Seoul J. Med., 17(4) : 383, 1976.*
- Sturt, A.E.: *The Phagocyte in vitro; In Handbook of Experimental Immunology, edited by D.M. Weir, 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973.*
- Stuart, A.E.: *The Reticuloendothelial System; In Clinical Aspect of Immunology, edited by Gell, P.G.H., R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann, 3rd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.*
- Suter, E.: *The multiplication of tubercle bacilli within normal phagocytes in tissue culture. J. Exp. Med., 96 : 137, 1952.*
- Suter, E.: *Multiplication of tubercle bacilli within mononuclear phagocytes in tissue culture derived from normal animals and animals vaccinated with BCG. J. Exp. Med., 97, 235 1953.*
- van Furth, R.: *Mononuclear Phagocytes, 1st edition, F.A. Davies Company, Philadelphia, 1970.*
- van Furth, R., and T.L. van Zweit: *In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes, In Handbook of Experimental Immunology, edited by D.M. Weir, 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973.*
- Wells, A.Q., A.E. Aquis and N. Smith: *Mycobacterium fortuitum. Am. Rev. Tuberc., 72 : 53, 1955.*
- White-by, J.L. and D. Rowley: *The role of macrophages in the elimination of bacteria from the mouse peritoneum. Brit. J. Exp. Path., 40 : 358, 1959.*
- Wilson, G.S. and A.A. Miles: *Topley and Wilson's Principle of Bacteriology, Virology, and Immunity, 6th edition, Arnold, Oxford, 1975.*