

非特異性刺戟에 의한 마우스腹腔 및 血液內 白血球分布의 變動

Changes of the Composition of Leucocytes in the Peritoneal Cavity and Blood Following non-specific stimuli

서울大學校 醫科大學 微生物學教室
車 昌 龍

緒 論

實驗動物의 腹腔內 浮遊細胞(free cells)中에 巨噬細胞와 림프구는 比較的 높은 比率로 分布된 細胞成分으로(Padawer, 1956; Mims, 1964; Pearsall, 1970; Stuart, 1975) 특히 巨噬細胞는 그 機能을 探究하기 위하여 腹腔으로부터 採取되어 生體外實驗에 많이 利用되는 細胞이다(Pearsall, 1970; Nelson, 1975).

따라서 이 巨噬細胞를 보다 많이 腹腔으로부터 얻기 위하여 glycogen(Suter, 1952), mineral oil(Cohn, et al, 1963), new-born calf serum(van Furth, et al, 1968), thioglycollate broth(Stuart, 1973), sodium casinate(Simmons, et al, 1973) 등을 動物의 腹腔內로 注入하는 試圖가 많은 研究者들에 의하여 開發되었다. 그러나 이들 刺戟物質이 腹腔內 巨噬細胞의 分布를 높이는 機轉은 Suter(1952)가 시사하였듯이 炎症反應에 起困되는 것으로 추측되고 있으나 이 炎症反應이 誘發되는 機轉 및 이에 따르는 巨噬細胞의 反應性에 對한 實驗的 報告는 아주 드물다. 誘發物質에 의한 炎症部位에 巨噬細胞의 數的 增加는 骨髓에서 細胞生成이 增加되어 血液을 通하여 炎症部位로 移動되는 巨噬細胞의 增加에 起困되는 것으로 解釋되고 있다(van Furth, 1968; & van Furth, et al, 1973). 이러한 刺戟物質로 誘發되는 炎症部位에 나타나는 細胞成分들의 分布比率는 動物의 種類, 刺戟物質의 種類 및 投與量, 刺戟後 經過時間에 따라 差異가 많다(Fruhman, 1964; Cohn, 1965). 이런 點을 勘案하여 著者는 刺戟物質로 fluid thioglycollate medium 및 fetal calf serum을 마우스 腹腔內에 注入한 後 腹腔 및 血液內의 巨噬細胞, 림프구 및 中性球의 分布變動을 알기 爲하여 本實驗을 試圖하였다.

材料 및 實驗方法

1. 腹腔液細胞의 收集

마우스의 腹腔液細胞를 收集하기 위하여 Hoskins(1967)에 따라 製造한 Earle's balanced salt solution(BSS)에 van Furth (1973) 등의 方法에 따라 sodium heparin (Rinker laboratory) (75 unit)를 添加한 細胞收集液을 使用하였다.

Earle's BSS에 sodium heparin (1 unit)를 添加한 細胞洗滌液은 收集한 細胞를 洗滌하는데 使用하였다. 細胞收集 및 細胞洗滌液의 pH는 4.4% NaHCO₃ 溶液으로 7.2-7.3으로 測定 使用하였다. 또한 細胞維持液은 Wu (1963) 등의 方法에 따라 Earle's BSS에 5% lactalbumin hydrolysate를 10%로 添加한 溶液이며 添加時의 pH는 0.1N-NaOH 溶液으로 測定하여 7.2-7.3 이 되도록 하였다.

巨噬細胞를 비롯한 腹腔液細胞를 採取하는 方法으로는 Stuart(1973) 및 van Furth(1973) 등의 方法에 따라 마우스頸部를 가위로 잘라 血液을 採取한 後에 多孔 18G 주사바늘로 通하여 4 ml의 細胞收集液을 마우스 腹腔內로 서서히 注入하였다. 1 分間 가볍게 腹部를 주무른 後 細胞收集液을 注入했던 注射器로 腹腔液을 採取하였다. 이 採取한 腹腔液中에 0.1 ml를 파내어 總細胞數를 測定하였고 나머지는 siliclad (Clay-Adam Co.)로 실리콘 處理한 원추시험관에 넣고 110Xg로 5분간 원심 沈澱시켰다. 上清液은 버리고 침사부위는 細胞洗滌液으로 2 회에 걸쳐 洗滌한 後 細胞維持液을 약간 넣고 멸균된 bovine serum을 同量 넣어 細胞浮遊液을 만들어 細胞의 鑑別計算時에 使用하였다.

2. 非特異性 刺戟物質 및 刺戟方法

非特異性 刺戟을 하기 위하여 使用한 物質로는 fluid thioglycollate medium(Difco Laboratories)을 0.3% (w/v)로 使用하였고, fetal calf serum, desicated(Difco Laboratories)을 멸균된 증류수에 溶解하여 血清으로 還元하여 使用하였다.

Stuart(1973)의 方法에 따라 0.3(w/v) fluid thiogly-

collate medium은 2 ml씩 fetal calf serum은 0.5 ml씩을 對照群으로 saline을 1 ml씩을 각각 마우스腹腔內에 注入하였다. 注入한 後 每日 마우스腹腔으로부터 腹腔液을 採取하여 細胞成分의 分布比率를 測定하였고 同時에 血液을 採取하여 細胞成分의 分布比率를 測定하였다.

3. 總細胞數의 測定 및 鑑別計算

總細胞數는 白血球를 測定時와 同一한 方法으로 Türk 溶液(3% acetic acid 함유)으로 細胞를 收集한 浮遊液 0.1ml를 1 : 20으로 稀釋하여 hemocytometer로 測定 計算하였다.

腹腔에서 採取하여 洗滌한 後 細胞維持液으로 浮遊시킨 細胞浮遊液을 슬라이드 글라스위에 한방울 떨어 뜨려 直接 塗抹하였다. 空氣中에서 말린 後 無水 methanol로 固定시키고 Wright染色하여 油沈렌즈로 視野를 無作爲하게 바꾸워 200개의 細胞를 세어 鑑別 計算하였다.

한편 採取한 血液은 直接塗抹하여 Wright 染色하여 鑑別 計算하였다.

4. 統計處理

腹腔內 白血球의 變動은 t-test를 하고 全體 7日間의 變動은 分散分析하여 統計學的 有意性을 檢定하였다. 날짜別로 細胞成分의 分布比率 統計的인 entropy 概念을 適用하여 分析하였다.

實驗成績

1. 腹腔內 白血球分布의 變動

마우스腹腔으로부터 腹腔液을 採取時 hemocytometer

로 測定한 總細胞數를 非特異的 物質인 fluid thioglycollate medium, fetal calf serum과 더불어 saline을 注射한 後 每日間隔으로 7日間 觀察 測定하여 Fig. 1. 및 Table 1. 에 表示하였다. 아무런 刺戟도 받지 않은 마우스에서 總細胞數는 2.64×10^6 cells/ml이었다. 對照群인 saline으로 注射한 마우스에서는 第1日에 2.24×10^6 cell/ml이었으나 第2日, 3日, 4日, 5日 및 7日에 各各 2.51×10^6 cell/ml, 2.63×10^6 cells/ml, 2.33×10^6 cells/ml, 2.52×10^6 cell/ml, 및 3.11×10^6 cells/ml으로 日間의 細胞數의 變動이 없었다($p > 0.05$). 그러나 fluid thioglycollate medium으로 注射한 마우스는 第1日에 4.82×10^6 cell/ml으로 刺戟받지 않은 마우스에서 보다 약간 增加되었고 ($p < 0.05$), 第2日에는 약간 감소하다가 第3日에는 가장 細胞數가 增加하여 9.34×10^6 cells/ml에 達하였다가 ($p < 0.05$) 그후 次次 減少하여 第7日에는 3.24×10^6 cell/ml로 原來狀態의 細胞數로 回復되었다. 反面에 fetal calf serum으로 注射한 마우스에서는 第2日까지는 減少하는 樣相을 나타내다가 第5日째에 5.04×10^6 cell/ml으로 顯著히 增加하였고($p < 0.01$), 그후 減少하여 第7日째에는 1.96×10^6 cell/ml으로 注射前의 細胞數와 有意差가 없을 程度로 ($p > 0.05$) 回復되었다. 이에 따라 7日間 腹腔內 總細胞數의 變動은 對照群에 比하여 fluid thioglycollate medium이나 fetal calf serum으로 刺戟한 마우스에서는 統計的으로 有意한 變動을 보였다($p < 0.05$).

細胞浮遊液을 直接塗抹하여 Wright染色한 後 鑑別 計算하였는데 이때에 巨噬細胞, 림프구 및 中性球에 限하여 鑑別觀察하였으며 各 細胞의 形態學的 特徵은

Table 1. Total leucocyte counts of peritoneal exudate after i.p. injection of thioglycollate medium, fetal calf serum and saline

Days after i. p. injection	Total leucocyte counts		
	Thioglycollate medium	Fetal calf serum	Saline
0	$2.64 \pm 0.099 \times 10^6$	$2.64 \pm 0.099 \times 10^6$	$2.64 \pm 0.099 \times 10^6$
1	$4.82 \pm 1.980 \times 10^6$	$2.00 \pm 1.163 \times 10^6$	$2.24 \pm 0.348 \times 10^6$
2	$3.20 \pm 1.239 \times 10^6$	$1.76 \pm 0.619 \times 10^6$	$2.51 \pm 0.350 \times 10^6$
3	$9.34 \pm 2.712 \times 10^6$	$4.06 \pm 1.302 \times 10^6$	$2.66 \pm 0.887 \times 10^6$
4	$7.93 \pm 1.124 \times 10^6$	$2.97 \pm 0.919 \times 10^6$	$2.33 \pm 0.648 \times 10^6$
5	$5.44 \pm 0.919 \times 10^6$	$5.04 \pm 1.421 \times 10^6$	$2.44 \pm 0.395 \times 10^6$
6	$5.86 \pm 3.737 \times 10^6$	$2.74 \pm 1.339 \times 10^6$	$2.52 \pm 0.715 \times 10^6$
7	$3.24 \pm 1.543 \times 10^6$	$1.96 \pm 0.445 \times 10^6$	$3.11 \pm 0.955 \times 10^6$

The above data could be analyzed to be significant by variance analysis;

F value in thioglycollate broth treated group: $F(7, 72) = 16.14^{**}$

F value in fetal calf serum treated group: $F(7, 72) = 2.47^*$

F value in normal saline treated group: $F(7, 72) = 1.26$

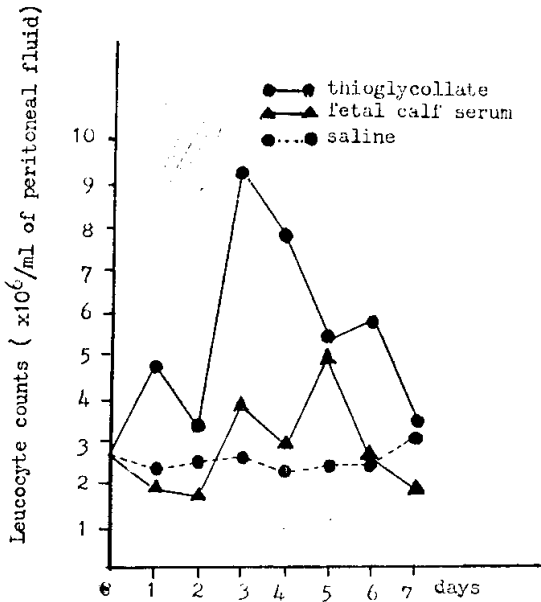


Fig. 1. Daily changes in total leucocyte count of peritoneal fluid following i.p. injection of thioglycollate medium, fetal calf serum and saline.

Hirsch(1970), van Furth(1970), 및 Thompson(1970) 등이 記述한 基準에 따라 鑑別하였다. 이와같이 鑑別 計算하여 刺戟한 物質別로 巨噬細胞, 림프구 및 中性球의 日間變動比率을 Table 2에 表示하였다.

다시 이들 變動을 刺戟한 物質(fluid thioglycollate medium, fetal fetal calf serum 및 saline)에 따라 圖示한 것이 각각 Fig. 2, Fig. 3, 및 Fig. 4에 나타나 있다.

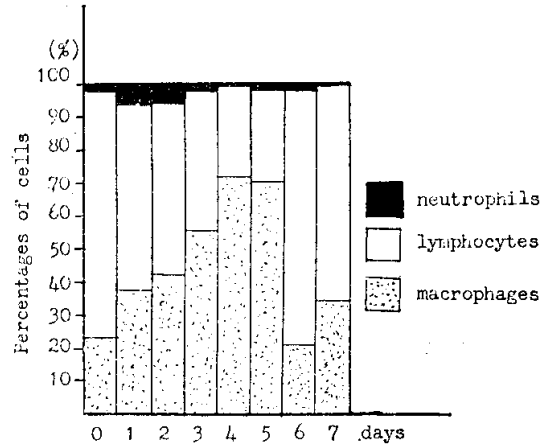


Fig. 2. Daily changes in percentages of peritoneal macrophages, lymphocytes and neutrophils following i.p. injection of thioglycollate medium.

Table 2 및 Fig. 2에 나타나 있는 바와 같이 fluid thioglycollate medium으로 刺戟한 마우스에서 刺戟하기 前에는 巨噬細胞, 림프구 및 中性球의 比率이 각각 22.8%, 76.8% 및 0.4%의 分布를 나타냈으나 巨噬細胞는 漸次로 增加하여 第1日, 第2日 및 第3日에 各各 38.0%, 42.3%, 56%에 達하다가 第4日째에는 73.2%로 最高로 增加하다가 第5日까지 71%까지 維持하다가 급격히 減少하여 第6日 및 7日째에는 刺戟하기 前 상태로 回復되었다. 이때에 림프구의 變動은 巨噬細胞의 變動과 反對의 樣相을 보여서 第4日째에는 26.8%로 가장 낮은 比率에 達했다.

中性球는 第1日에 5.1%로 增加되었으나 서서히 減少하여 곧 原狀態로 回復되었다.

Table 2. Differential cell counts of peritoneal exudate on macrophage, lymphocyte and neutrophil after i. p. injection of thioglycollate medium, fetal calf serum and saline

Days after i.p. injection	Differential cell count								
	Thioglycollate broth			Fetal calf serum			Saline		
	MA	LP	NP	MA	LP	NP	MA	LP	NP
0	22.8±3.40	76.8±3.50	0.4±0.37	22.8±3.40	76.8±3.50	0.4±0.37	22.8±3.40	76.8±3.40	0.4±0.37
1	38.0±11.39	56.9±13.62	5.1±3.44	29.7±5.77	69.0±7.75	1.3±1.60	15.9±9.52	83.0±9.27	1.1±0.86
2	42.3±7.35	52.8±7.74	4.9±2.24	55.8±7.53	41.3±11.61	2.9±1.91	23.5±7.40	75.2±7.63	1.3±1.44
3	56.0±10.98	43.0±10.59	1.0±0.55	47.1±12.19	51.2±13.67	0.7±0.75	20.1±6.91	79.8±7.14	0.1±0.20
4	73.2±22.00	26.8±22.00	—	51.8±17.53	47.4±17.74	0.8±1.03	26.9±6.86	72.6±7.40	0.5±0.77
5	71.0±5.92	28.9±15.98	0.1±0.20	42.7±14.05	57.2±14.14	0.1±0.20	27.2±6.88	72.0±6.70	0.8±0.40
6	20.8±10.45	78.9±10.54	0.3±0.42	33.7±12.1	66.1±14.83	1.2±1.3	25.2±5.44	74.5±4.25	0.3±0.24
7	34.5±7.98	65.5±7.98	—	34.8±10.09	65.3±10.09	—	25.4±3.52	74.1±3.31	0.5±0.54

MA=macrophage LP=lymphocyte NP=neutrophil

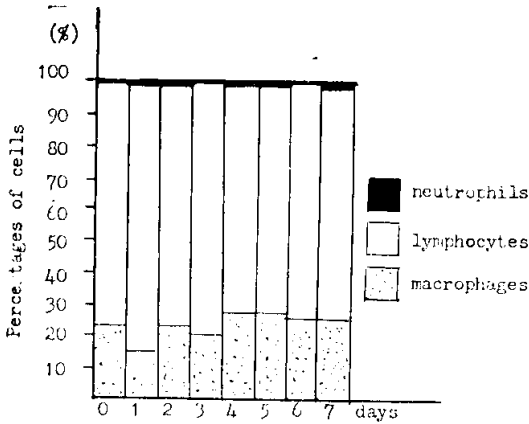


Fig. 3. Daily changes in percentages of peritoneal macrophages, lymphocytes and neutrophils following i.p. injection of fetal calf serum.

fetal calf serum으로 刺戟한 마우스에서는 Table 2 및 Fig. 3에 나타나 있는 바와 같이 巨噬細胞는 第1日에 는 약간 增加되어 29.7%에 達하다가 第2日째에 55.8%로 最高比率로 增加하여 第3日, 第4日까지 비슷한 比率를 維持하다가 서서히 減少하여 刺戟하기 前 狀態로 回復하는 樣相을 보였다. 림프구는 巨噬細胞의 變動과 는 反對로 第2日째에 가장 림프구의 比率가 낮아서 41.3%에 그後 서서히 增加하여 注射前의 狀態로 되돌아왔다. 中性球는 第1日에 1.3%, 第2日에 2.7%에 達했으나 곧 原狀態로 되돌아왔다.

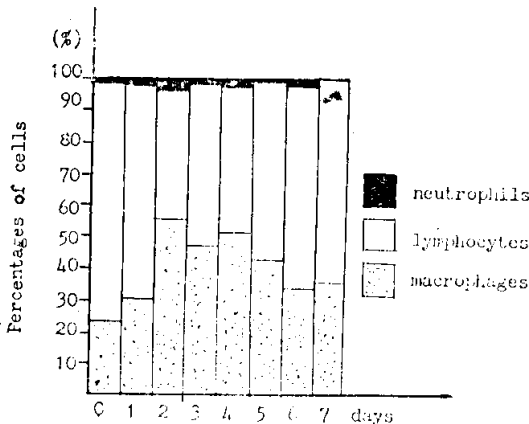


Fig. 4. Daily changes in percentages of peritoneal macrophages, lymphocytes and neutrophils following i.p. injection of saline.

그러나 saline으로 刺戟한 마우스에서는 Table 2 및 Fig. 4에 나타나 있는 바와 같이 巨噬細胞의 比率는 統計적으로 日間的 差異가 없으며 ($p > 0.05$) 따라서 림프

구의 比率도 變動이 없어서 刺戟하지 않는 마우스와 類似한 樣相을 보였다.

腹腔內 總細胞數로부터 巨噬細胞 및 림프구의 比率에 따라 날짜별로 刺戟한 物質에 따라 Fig. 5 및 Fig. 6에 圖示하였다.

Fig. 5는 巨噬細胞數를 刺戟群별로 圖示한 것으로 saline으로 刺戟한 마우스에서는 Table 2에와 같이 날짜별로 增減의 變動을 관찰할 수 없었다 ($p > 0.05$). 그러나 fluid thioglycollate medium으로 刺戟한 마우스에서는 Fig. 2 및 Table 2에서와 같이 第3日째에 5.33×10^6 cell/ml, 第4日에 5.39×10^6 cell/ml로 最高值에 達하였고 ($p < 0.01$), 그後 減少하여 第6日부터는 刺戟前의 狀態로 回復되었다. 反面에 fetal calf serum으로 刺戟한 마우스에서는 saline으로 刺戟時보다는 日間變動이 있어서 第3~5日째에 巨噬細胞가 $1.54 \sim 2.15 \times 10^6$ cell/ml로 增加하여 維持되었으나 ($p < 0.01$) 第6日부터는 原狀態로 回復되었다.

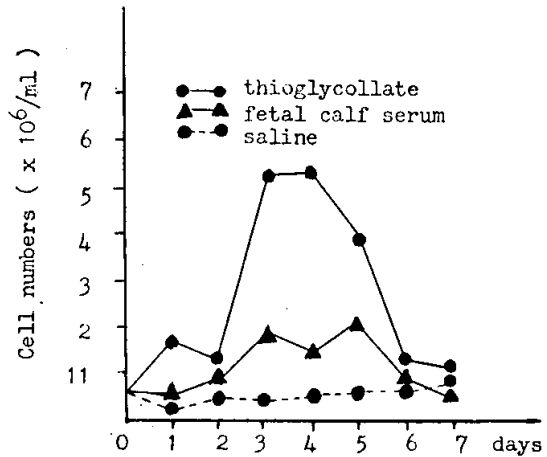


Fig. 5. Daily changes in counts of peritoneal macrophages following i.p. injection of thioglycollate medium, fetal calf serum and saline.

림프구數의 變動을 날짜별로 圖示한 것이 Fig. 6인데 saline으로 刺戟한 마우스에는 日間變動이 없었다 ($p > 0.05$).

그러나 fluid thioglycollate medium으로 刺戟한 마우스에서는 第3日째에 4.01×10^6 cell/ml로 刺戟前보다는 顯著히 增加하였고, 第6日째에 4.62×10^6 cell/ml로 가장 細胞數가 높았고 ($p < 0.01$) 그외의 날에는 對照群과 差異가 없는 細胞數를 나타내었다. ($p > 0.05$).

反面에 fetal calf serum으로 刺戟한 마우스의 경우에는 처음엔 對照群에 比하여 도리혀 減少하다가 第5日째에는 增加하여 2.88×10^6 cell/ml로 가장 높았고

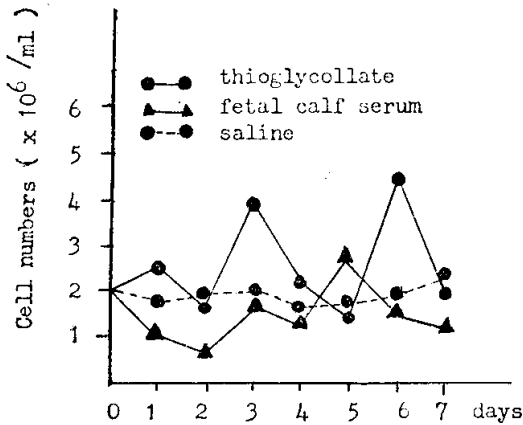


Fig. 6. Daily changes in counts of peritoneal lymphocytes following i.p. injection of thioglyllate medium, fetal calf serum and saline

($p < 0.05$), 그 후에는 漸次로 減少하였다.

以上の結果로 보아 fetal calf serum으로 刺戟한 마우스에 比하여 fluid thioglycollate medium으로 刺戟한 마우스에서 總細胞數를 비롯한 巨噬細胞數 및 림프구數의 變動樣相이 顯著하였고 兩群에서 모두 巨噬細胞의 變動이 림프구變動보다 先行하였다. 또한 fluid thioglycollate medium이 fetal calf serum보다 白血球의 變動을 크게 刺戟하였다.

2. 血液內 白血球分布의 變動

마우스腹腔에서 腹腔液을 採取하기 前에 얻은 血液을 直接 塗抹하여 Wright 染色한 後 單核球, 림프구 및 中性球에 對해서 鑑別計算하여 Table 3에 表示 하

였으며 이것을 다시 細胞別로 單核球는 Fig.7에, 림프구는 Fig.8에 또한 中性球는 Fig.9에 圖示하였다.

巨噬細胞의 前驅細胞(precursor cells)인 單核球의 各 其物質로 刺戟 後에 日別 變動樣相은 Table 3 및 Fig. 7에 나타나 있는 바와 같다.

즉 對照群인 saline으로 刺戟한 마우스에서는 刺戟後 血液內 單核球의 比率은 變化가 없으나($P > 0.05$), fluid thioglycollate medium으로 刺戟한 마우스에서는 第2日까지 급격히 增加하여 16%에 達하였다가($P <$

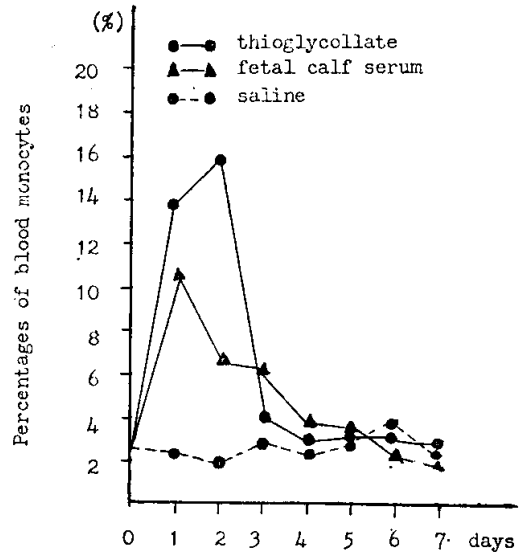


Fig. 7. Daily changes in percentages of blood monocytes following i.p. injection of thioglycollate medium, fetal calf serum and saline.

Table 3. Differential cell counts of peripheral blood on monocyte, lymphocyte and neutrophil after i.p. injection of thioglycollate medium, fetal calf serum and saline

Days after i.p. injection	Differential cell count								
	Thioglycollate medium			Fetal calf serum			Saline		
	MA	LP	NP	MA	LP	NP	MA	LP	NP
0	2.6±1.02	61.4±1.85	36.0±1.41	2.6±1.02	61.4±1.85	36.0±1.41	2.6±1.02	61.4±1.85	61.4±1.85
1	13.8±4.87	55.8±4.31	30.4±5.46	10.6±5.16	53.8±16.70	35.6±15.97	2.4±2.04	69.2±10.57	28.4±10.21
2	16.0±5.18	55.6±5.08	28.4±1.55	6.6±3.14	57.4±6.28	36.0±7.51	1.8±0.98	68.2±7.57	30.0±7.35
3	4.0±1.67	58.4±10.78	37.6±12.08	6.2±1.72	54.0±5.90	39.8±5.15	3.0±1.55	66.8±8.26	30.2±8.13
4	2.8±0.75	53.8±15.20	43.4±15.51	3.8±0.75	55.6±9.52	40.6±8.87	2.0±1.26	68.6±6.50	29.4±6.37
5	3.0±0.63	53.8±6.85	43.2±7.17	3.4±1.36	65.0±6.10	31.6±6.71	2.8±0.75	61.6±2.87	35.6±3.14
6	3.0±2.10	63.8±4.87	33.2±6.24	2.2±1.60	49.4±6.31	48.4±6.47	3.8±1.60	62.8±8.84	33.4±8.06
7	2.6±0.80	47.6±6.41	49.8±6.82	1.8±0.44	65.5±5.94	32.7±5.97	3.2±0.40	64.4±7.81	32.4±7.63

MA=macrophage

LP=lymphocyte

NP=neutrophil

0.01) 第3日後에는 原狀態로 돌아왔다. 그러나 fetal calf serum으로 刺戟한 마우스에서는 第1日에 單核球比率이 10.6%로 가장 높았다가 ($P < 0.01$) 漸次로 減少하여 第7日에는 原狀態로 돌아왔다.

Table 3 및 Fig. 8에 表示되어 있는바와 같이 對照群에 比하여 fluid thioglycollate medium이나 fetal calf serum으로 刺戟時 림프구의 比率이 전체적으로 낮았으며 날짜別로 增減의 變動이 없었다. ($P > 0.05$)

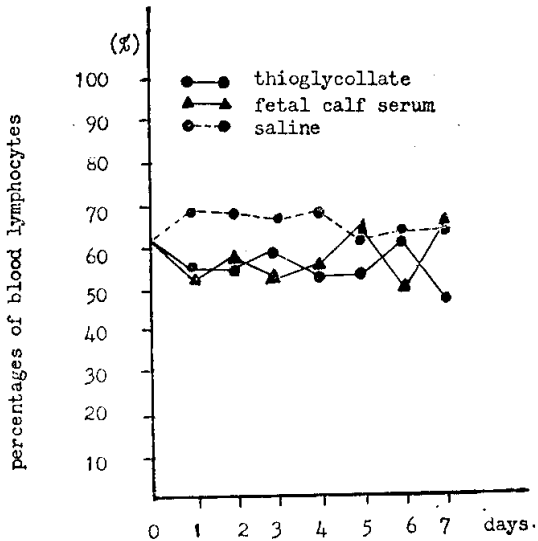


Fig. 8. Daily changes in percentages of blood lymphocytes following i.p. injection of thioglycollate medium, fetal calf serum and saline.

Table 3 및 Fig. 9에 表示되어 있는 바와 같이 中性球比率은 各群에 있어서 對照群에와 같이 날짜別로 有意味한 差異를 나타내지 않았다. ($P > 0.05$)

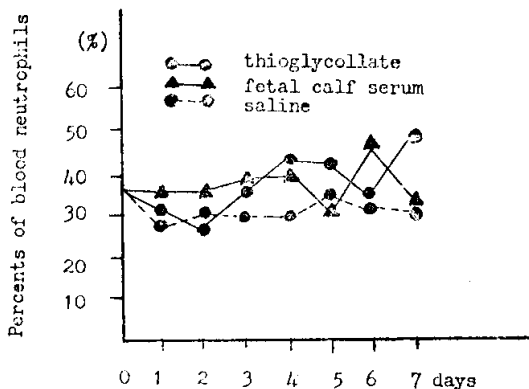


Fig. 9. Daily changes in percentages of blood neutrophils following i.p. injection of thioglycollate medium, fetal calf serum and saline.

따라서 fluid thioglycollate medium이나 fetal calf serum으로 刺戟時 血液內의 單核球는 腹腔內 巨噬細胞보다 빨리 增加하고 또 빨리 原狀態의 分布比率을 나타내었으나 림프구와 中性球는 有意한 變動은 없었다.

考 察

巨噬細胞는 食作用(phagocytosis)을 通하여 림프구와 더불어 免疫反應을 비롯한 宿主防禦機能에 重要한 役割을 하므로(van Furth, 1970; Pearsall, 1970; Carr, 1973; Nelson, 1975), 이들 細胞의 機能을 探究하기 爲하여 動物腹腔에 比較的 높은 比率로 分布된 巨噬細胞와 림프구(Padawer, 1956; Mims, 1964)를 腹腔으로부터 採取하여 生體外實驗에 많이 利用되어 왔다(Pearsall, 1970; Nelson, 1976)

이에 따라 細胞를 보다 많이 얻기 爲하여 刺戟物質을 動物腹腔에 注入한 後 各其 細胞分布가 높은 時期를 擇하여 腹腔으로부터 採取하는 試圖가 많은 研究者들에 依하여 開發되었다(Stuart, 1973). 그러나 刺戟物質을 注入한 後 腹腔內 細胞分布比率의 變動에 關한 報告는 아주 드물다.

本實驗에서 刺戟物質을 마우스腹腔에 注入하지 않은 狀態에서 細胞分布를 보면 巨噬細胞는 22.8% (0.6×10^6 cells/ml)이었고 림프구는 70%에 達하였다. 그러나 雜種마우스에서 巨噬細胞가 30% 정도(Mims, 1964)이었고 Swiss마우스에서는 1.5×10^6 cells/ml (Thompson, 1969), ICR마우스에서는 35%로 1×10^6 cells/ml (Strauss, 1975)이며 C_57H/HeN 마우스에서 30%에 達하여 (Boetche, 1975) 著者의 結果와 相異하였다. 이와같은 差異는 마우스系統(strain) 및 採取方法의 差異에 依한 것으로 解釋되었다.

神經性因子(neurological factor)에 依한 細胞分布의 變動이 있는가를 알아보기 爲하여 van Waarde (1975)와 같이 생리식염수를 注入, 刺戟하였지만 전혀 細胞分布의 變動이 없어서 fluid thioglycollate medium 및 fetal calf serum으로 刺戟한 群과 對照를 이루었다.

本實驗에서는 fluid thioglycollate (0.3%) 2 ml을 注射한 後 第4日에 73.2%의 巨噬細胞의 分布를 보였으며 실제로 細胞數도 약 5.3×10^6 cells/ml에 達하였으나 이에 比較 Strauss(1975)는 thioglycollate broth 0.5 ml을 注射한지 48 時間만에 85%가 巨噬細胞이었다고 報告하여 李實驗의 結果와 相異하였다. 이것은 thioglycollate broth을 注射한 投與量 및 마우스系統의 差異에 因한 것으로 解釋되었다. 腹腔에서 採取한 巨

喰細胞는 Hirsch (1970)가 記述한 形態와 類似하여 光學顯微鏡上에서 괴상한 形態를 띠었고 消化안된 汗液成分을 그대로 細胞質內에 含有하는 細胞가 많았다. 그러나 림프구는 特異한 形態學的 變形을 관찰할 수 없었다.

fluid thioglycollate medium을 注射한 後 第1日 및 第2日까지 液血內 單核球分布가 增加되었다가 그 後에 急激히 減少하면서 腹腔內에는 第3日 및 第4日에 巨喰細胞가 數的增加를 하였기 때문에 van Furth(1973)가 시사하였듯이 血液內 單核球가 巨喰細胞로 轉換, 移轉하는 現象으로 解釋되었다. 이와같이 巨喰細胞를 腹腔內로 誘因하는 現象은 thioglycollate broth에 刺戟받은 巨喰細胞가 分泌하는 plasminogen activator(Unkeless, 1974)에 의하여 plasminogen이 plasmin으로 變化하여 plasmin에 의하여 補體系(complement)가 活性化되어 生成되는 化學主成(chemotaxis)에 起因되는 것으로 解釋되었으며 이로 因하여 炎症反應이 誘發되는 것으로 推측되었다. 이러한 plasminogen activator가 thioglycollate broth에 刺戟받은 巨喰細胞에서 分泌되는 機轉은 알려져 있지 않지만(Unkeless, 1974), endotoxin 단독으로 刺戟時에도 少量이나마 plasminogen activator가 분비되거나 latex particle을 同時에 注入하면 多量의 plasminogen activator가 分泌되므로(Gordon, et al, 1974) 巨喰細胞가 消化시킬 수 없는 物質을 細胞內에 含有하는 것과 關係있는 것 같다.

한편 fetal calf serum으로 刺戟한 마우스에서 腹腔內 巨喰細胞의 分布는 刺戟 後 第2日째에 가장 높아서 55.8%이어서 new-born calf serum으로 刺戟時(van Waarde, 1975)의 結果와 類似하나 fetal calf serum을 刺戟物質로 使用한 것이 처음이기 때문에 比較할 수 있는 報告가 없었다. 또한 fetal calf serum으로 刺戟時 血液內의 單核球는 第1日에 가장 높은 分布를 보이다가 漸次로 減少하면서 腹腔內에는 第2日부터 急激히 增加된 巨喰細胞의 分布를 보여 van Furth(1973)가 시사하였듯이 血液으로부터 腹腔內로 巨喰細胞가 轉移되는 現象으로 解釋되었다. 이와같은 現象이 誘發되는 것이 new-born calf serum으로 刺戟時에는 血液內에 "monocytosis inducing factor"가 生成된 것에 依한 것으로 解釋하나 (van Waarde, 1975), fetal calf serum으로 刺戟時에도 이러한 因子가 生成되는지는 더 追求해 보아야 할 것이다.

그러나 fetal calf serum과 接觸한 巨喰細胞도 new-born calf serum과 接觸時와 類似하게 整度의 差異는 있지만 "pinocytosis inducing factor"을 誘發하므로

(Cohn, 1967), 이 pinocytosis에 依하여 巨喰細胞의 lysosome活性이 增強되고 acid phosphatase, β -glucuronidase, lysozyme等 細胞內酵素의 分泌가 增加되어 結局은 炎症反應을 일으켜서 炎症細胞를 誘因하는 것이 아닌가 推측되었다.

림프구는 巨喰細胞의 增加보다 時間的으로 遅따라 增加되는 樣相을 보였는데 이 結果는 巨喰細胞의 分布比率이 減少함에 따라 分布比率이 相對的으로 增加하였는지 아니면 實際로 時間的으로 遲게 炎症部位에 나타나기 때문에 생기는지는 本實驗의 結果로써는 結論지을 수 없었다.

中性球는 腹腔內로 初期에 약간 增加된 印象을 주나 有意한 差異는 없었다. 또한 血液內의 中性球分布의 變動도 一定치 않으나 전반적으로 對照群에 比하여 增加된 印象을 주었다. 中性球分布의 變動은 24시간 以內에서 時間간격으로 觀察해야만(Fruhman, 1964) 特異한 分布變化를 알 수 있을 것 같다.

끝으로 이러한 刺戟物質이 血液 및 腹腔內 白血球에 어떻게 作用하며 이에 따라 그 分布變動이 생기는 機轉을 계속 研究할 必要가 있다고 思料되었다.

結 論

著者는 刺戟物質로 fluid thioglycollate medium 및 fetal calf serum을 마우스腹腔內 注入한 後 腹腔 및 血液內의 巨喰細胞, 림프구 및 中性球의 分布變動을 알기 爲하여 本實驗을 試圖하였다. 즉 fluid thioglycollate medium(3%) 2 ml, fetal calf serum 0.5 ml 및 對照群으로 saline 1ml을 各各 따로 마우스腹腔에 注射하고 每日 7日間 腹腔內 總細胞數 및 그 構成細胞比率과 血液內 白血球分布의 變動을 追跡하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Fluid thioglycollate medium으로 刺戟한 群;

腹腔內 總細胞數는 刺戟後 第3日에 가장 높아서 9.34×10^6 cell/ml이었고 그후 漸次 減少되어 第7日에는 原狀態로 回復되었다. 腹腔內 巨喰細胞分布는 刺戟後 第4 및 5日에 가장 높아서 70% 以上에 達하였다가 곧 原狀態로 되돌아갔다. 반면에 림프구분포는 腹腔內에서 刺戟前에는 76.8%이었으나 刺戟後 漸次로 減少하다가 第6日에 78.9%로 다시 增加되었다. 血液內 單核球比率은 刺戟後 第1~2日에 16%에 까지 達했다가 곧 原狀態로 되돌아 갔다.

2. Fetal calf serum으로 刺戟한 群;

腹腔內 總細胞數는 刺戟後 第5日에 5.04×10^6 cells

/ml에達했고 곧 刺戟前 상태로 되돌아갔다. 腹腔內 巨噬細胞比率은 刺戟後 第2日째 55.8%에達하여 第5日까지 그대로 持續되었다가 곧 원상태로 되돌아갔다. 腹腔內 림프구比率은 刺戟後 계속 減少하다가 第6日째에 원상태로 回復되었다. 血液內 單核球은 刺戟後 第1日에 10.6%로 가장 높았다가 그후 減少하여 원상태로 돌아갔다.

3. fluid thioglycollate medium과 fetal calf serum으로 刺戟時 細胞移轉時期, 移轉樣相에 있어서 顯著的 差異를 觀察할 수 있었고 이에 對하여 考察하였다.

fluid thioglycollate medium 또는 fetal calf serum으로 誘發한 炎症反應에서 血液單核球의 增加가 腹腔 巨噬細胞의 增加보다 先行하며 炎症部位에 巨噬細胞를 뒤따라 림프구가 침윤하는 것으로 結論되었다.

—ABSTRACT—

Changes of the composition of leucocytes in the peritoneal cavity and blood following non-specific stimuli

Chang Yong Cha

Department of Microbiology, College of Medicine,
Seoul National University

During an acute inflammation, the number of leucocytes increases at the site of the lesion, and also the composition of the inflammatory exudates is dependent on the time elapsed since the onset of the reaction and on the kind of the inflammatory stimulus. However, there are few reports concerning changes in the number and composition of leucocytes in the peritoneal cavity depending on the time elapsed after i.p. injection of the non-specific stimulants which is expected to induce the inflammatory reaction.

Therefore, an experiment was conducted to know changes in the number and composition of the peritoneal exudate induced by i.p. injection of fluid thioglycollate medium and fetal calf serum as non-specific stimulants. Mice of wild strain were divided into three groups which were intraperitoneally injected with 2 ml of fluid thioglycollate medium(3%), 0.5 ml of fetal calf serum and 1 ml of saline, separately. The peritoneal washings were performed to obtain the

peritoneal exudate daily for 7 days after injection of the non-specific stimulants. The total cell counts as well as the differential cell counts of the peritoneal exudates were performed, and also the differential cell counts were conducted on the blood. In the differential cell counts the proportions of macrophage, lymphocytes and neutrophils were limited to be checked.

The results obtained were summarized as follows:

1. In mice stimulated by fluid thioglycollate medium; The total cell number of the peritoneal exudate increased to 9.34×10^6 /ml at the maximum level on the third day after stimulation, but gradually reduced to the normal level. The proportion of the peritoneal macrophage came up to 71~73% on the fourth and fifth day after stimulation, but the peritoneal lymphocyte continued to decrease in the proportion till the fifth day and restored the normal proportion on the sixth day. The proportion of the blood monocyte abruptly increased to 16% on the first and second day after stimulation and thereafter rapidly dropped to the normal level.

2. In mice stimulated by fetal calf serum;

On the fifth day after stimulation the total cell number of the peritoneal exudate reached 5.04×10^6 /ml and went straight to the normal level. The proportion of the peritoneal macrophages abruptly increased to 55.8% on the second day and maintained the similar level till the fifth day after stimulation. But the peritoneal lymphocyte continued to decrease in the proportion till it restored the normal proportion on the sixth day. The proportion of the blood monocyte abruptly increased to 10.6% on the first after stimulation and thereafter rapidly dropped to the normal level.

3. Significant differences between fluid thioglycollate medium and fetal calf serum were observed and discussed on the onset and type of mobilization of the leucocytes to the inflammatory site.

It was concluded that during inflammation, induced by fluid thioglycollate medium and fetal calf serum, increase in blood monocytes precedes increase in peritoneal macrophages, and peritoneal lymphocytes are mobilized following peritoneal macrophages at the site of the inflammatory reaction,

REFERENCES

- Boetcher, D.A. and M.S. Meltzer: *Mouse mononuclear cell chemotaxis; description of system*, *J. Natl. Cancer Inst.* 54:795, 1975.
- Carr, I.: *The macrophage, A Review of Ultrastructure and Function*, 1st ed., Academic Press, London, 1973.
- Cohn, Z.A. and B. Benson: *The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes, II. the influences of serum on granule formation, hydrolyase production and pinocytosis*, *J. Exp. Med.* 121:835, 1965.
- Cohn, Z.A. and E. Parks: *The regulation of pinocytosis in mouse macrophages, IV. The immunological induction of pinocytic vesicle, secondary lysosome, and hydrolytic enzymes*, *J. Exp. Med.* 125:1091, 1967.
- Fruhman, G.J.: *Extravascular mobilization of neutrophils*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 113:968, 1964.
- Gordon, S., J.C. Unkeless and Z.A. Cohn: *Induction of macrophages plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis*, *J. Exp. Med.* 140:995, 1974.
- Hirsch, J.G. and M.E. Fedorko: *Morphology of mouse mononuclear phagocytes, p.7 in Mononuclear Phagocytes edited by R. van Furth, 1st ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.*
- Hoskin, J.M.: *Appendix, p. 303 in Virological Procedures, Butterworths, London, 1967.*
- Mims, C.A.: *The peritoneal macrophages of mice*, *Brit. J. Exp. Path.* 45:37, 1964.
- Nelson, D.S.: *Immunobiology of Macrophages, 1st ed., Academic Press, New York, 1976.*
- Padawer, J. and A.S. Gordon: *Cellular element in peritoneal fluid of some mammals*, *Anat. Rec.* 124:209, 1956.
- Pearsall, N.N. and R.S. Weiser: *The Macrophages, 1st ed., Lea & Fabiger, 1970.*
- Simmons, S.R. and M.L. Karnovsky: *Iodinating ability of various leucocytes and their bactericidal activity*, *J. Exp. Med.* 136:44, 1973.
- Strauss, R.R. H. Frieman, L. Mills and G. Zayon: *Suppression of murine virus leucomogenesis by thio-glycollate culture medium that affects macrophage peroxidase*, *Nature* 255:343, 1975.
- Stuart, A.E.: *The reticuloendothelial system, p.365 in Clinical Aspect of Immunology edited by Gell, P.G.H., R.R.A. Coombs and P.G. Lachmann, 3rd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.*
- Stuart, A.E., J.A. Habsshas and A.E. Davidson: *The phagocytic cell in vitro, p.24 in Handbook of Experimental Immunology edited by D.M. Weir, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973.*
- Suter, E.: *The multiplication of tubercle bacilli within normal phagocytes in tissue culture*, *J. Exp. Med.* 96:137, 1952.
- Thompson, J. and R. van Furth: *The effect of glucocorticoid on the kinetics of mononuclear phagocytes*, *J. Exp. Med.* 131:429, 1970.
- Unkeless, J.C., S. Gordon and E. Reich: *Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages*, *J. Exp. Med.* 139:834, 1974.
- van Furth, R. and Z.A. Cohn: *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*, *J. Exp. Med.* 128:415, 1968.
- van Furth, R., J.G. Hirsch, and M.E. Fedorko: *Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocyte, monocyte, and macrophages*, *J. Exp. Med.* 132:794, 1970.
- van Furth, R., M.M.C. Diesselhoff-Den and H. Mattie: *Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction*, *J. Exp. Med.* 138:1314, 1973.
- van Furth, R., and T.L. Zwet: *In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes, p.36. in Handbook of Experimental Immunology edited by D.M. Weir, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.*
- van Waarde, D., E.H. Hesslink and R. van Furth: *Humoral regulation of monocytosis during acute inflammatory reaction, p.205 in Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology edited by R. van Furth, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.*
- Wu, W.G., and S. Marcuss: *Humoral factor in cellular resistance, I. the effect of heated and unheated homologous and heterologous sera on phagocytosis and cytopepsis by normal and immune macrophages*, *J. Immunol.* 91:313, 1963,