Mycobacterium Fortuitum의 마우스巨噬細胞에 對한 反應樣相

—細胞內 生態에 關하여—

서울大學校 醫科大學 微生物學教室

車 昌 龍

=Abstract=

Interaction between *Mycobacterium Fortuitum* and Macrophages from the Mouse Peritoneal Exudate

—Concerning Intracellular Ecology—

Chang-Yong Cha

Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University

Numerous studies on the interaction between phagocytes and pathogen were reported; however, informations on the infection-establishing mechanisms by *M. fortuitum* is incomplete. It would be worthwhile to learn mechanisms involved *M. fortuitum* infections as a consequence of the relationship between host and parasite.

Thus, an experiment was performed to study the mode of interactions between mouse peritoneal macrophages and *M. fortuitum* in vitro condition. Normal mouse peritoneal exudate collected, was pooled, suspended in the cell maintenance medium and mixed with the suspension of *M. fortuitum*. The bacteriamacrophages suspension in the Leighton tube with cover-slip were incubated at 37°C. for 120 minutes. After 30 minutes' interval of incubation period the ratios of the macrophages associated with bacteria to the total ones and the distribution of the macrophages laden with bacteria by the bacterial number were measured from the stained cover-slip.

The results obtained were summerized as follows:

1. Ratios of macrophages associated or containing *M. fortuitum* rapidly increased to 52% until 90 minutes' incubation and thereafter, graually increased to 57.8% at 120 minutes.
2. During incubation period, continuation of increase in the number of macrophage contaning many bacilli resulted in increase of total number of *M. fortuitum*.

I. 緒 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^{1,2,3,4)}, 免疫反應에 重要な 役割을 할 뿐만 아니라 宿主防禦機能에

主軸을 이루는 食作用^{5,6,7,9)}에 關與하는 細胞임은 잘 알려져 있다. 즉 細菌이 巨噬細胞와 接觸時 嚥食되어 細胞內 處理되는 樣相은 菌種에 따라 多樣하며 感染成立을 決定하는 重要な 因子로 作用한다^{4,8)}.

특히 *Mycobacterium* 菌種中에 結核菌과 巨噬細胞와의 反應樣相에 關한 知識은 비교적 많이 알려져 있지 만^{9,10,11,12,13,14,15)}, 아직도 이 菌種의 細胞內 生態에 關해서는 論難이 많다. *Mycobacterium* 菌種中에

*本 研究을 爲한 經費의 一部은 1977년 大韓結核學會 研究補助費에 의하여 充當되었음.

Rapid grower이며 PPD와 交叉反應을 일으키며 人體에 病原性이 없는 것으로 알려져 있는 *Mycobacterium fortuitum*^{8,16,17)}은 最近에 와서 人體感染例가 점차로 增加하고 있으며 樣相도 多樣하나¹⁸⁾ 이 菌種에 依한 感染成立機轉은 잘 알려져 있지 않다.

이런 點을 勘案하여 著者는 *Mycobacterium fortuitum*의 宿主인 마우스에 導入時 나타나는 食作用에 手반되는 細胞內의 菌數의 變化를 觀察하기 爲하여 本實驗을 試圖하였다.

II. 材料 및 實驗方法

1. 腹腔滲出細胞의 收集

마우스의 腹腔滲出細胞를 收集하기 爲하여 Hoskins에 따라¹⁹⁾ 製造한 Earle's balanced salt (BSS)에 van Furth 등의 方法에 따라²⁰⁾ sodium heparins (Rinker Laboratories) (75 unit)를 첨가한 細胞收集液을 使用하였다.

Earle's BSS에 sodium heparins (1unit)을 첨가한 細胞洗滌液은 收集한 細胞를 洗滌하는데 使用하였다. 細胞收集液 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 등의 方法에 따라²¹⁾ Earle's BSS에 5% lactalbumin hydrolysate 및 태생우혈청 (fetal calf serum) (Difco, Laboratories)을 각각 10%씩 첨가한 溶液이며 첨가時의 pH는 0.1N-NaOH 溶液으로 測定하여 7.2~7.3이 되도록 하였다.

巨噬細胞를 採取하는 方法으로 Stuart²²⁾ Van nuth²⁰⁾ 등의 方法에 따라 生後 7~8週의 DDO 系의 마우스의 脛部를 눌러 마우스를 죽이고 다공 18 gauge 주사바늘을 통하여 3ml의 細胞收集液을 腹腔內로 注入한 後 가볍게 腹部를 문지른 다음 그 주사바늘을 통하여 腹腔滲出液을 採取하였으며 보통 5~6마리로부터 採取된 腹腔滲出液을 siliclad (Clay Adan Co.)로 실리콘 처리한 원추시험관에 모아 빙수조(cold bath)에 保管하였다. 이렇게 收集한 腹腔滲出液을 110×g로 5分間 遠心沈澱시켜 上清液을 버리고 沈澱된 細胞를 細胞洗滌液으로 2回 洗滌한 後에 細胞維持液에 浮遊시켜 細胞數를 ml 당 1~2×10⁶ 개에 達하도록 細胞維持液으로 測定하였다.

2. 細菌과 細胞의 混合 및 觀察

가. 細菌

서울大學校 醫科大學 微生物教室에 保管菌株인 *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 1681)을 使用하였는데 이 菌種을 培養하는데 使用한 培地는 bovine serum 이

10% 含有된 Dubos serum broth 이었다. 이 菌株을 72시간동안 Dubos serum broth에서 發育增殖시킨 後 1,500×g로 20分間 遠心沈澱하여 上清部位를 버리고 細胞維持液으로 2回 洗滌한 後에 220×g로 10分間 원심沈澱시켜 上清部位를 實驗에 使用하였다. Fenner의 方法에 따라²³⁾ 菌數를 1.0×10⁷/ml 되게 미리 測定하여 實驗에 使用하였다.

나. 細胞와의 接觸 및 觀察

Van Furth²⁰⁾이 시사하였듯이 細菌:細胞數의 比率이 대개 1:1이 되게끔 測定하여 混合接觸시켰다. 이들 混合液을 가볍게 진탕한 後에 cover-slip이 들어 있는 실리콘 처리한 Leighton管에 약 2ml씩 分注하여 轉환한 面이 아래쪽에 向하도록 기울여 놓고 37°C 부란기에 방치하였다. 培養時間에 따라 30分, 60分, 90分 및 120分마다 cover-slip을 꺼냈다. Cover-slip을 無水 methanol로 20分間 固定한 後에 Suter의 方法¹⁶⁾을 변형하여 Carbol-fuchsin 染色液을 1時間동안 處理하고 3% acid-alcohol로 탈색시키고 Giensa 染色液으로 20分間 counter 染色하였다.

染色된 cover-slip을 슬라이드글라스에 Canda balsam으로 固定시킨 後 顯微鏡으로 視野를 無作爲하게 바꾸면서 대개 200개의 림프구를 세는 동안 나타나는 巨噬細胞數를 세었고 그 중에 抗酸菌을 가지는 細胞도 同時에 세었는데 이 때에 抗酸菌을 함유하는 整度에 따라 10개 이상, 5~9개, 1~4개로 區分하여 觀察하였다.

巨噬細胞內에 含有되어 있지 않지만 細胞에 부착단계 (attachment stage)에 있는 狀態로 이 群에 屬하는 細菌을 "cell associated bacteria"로 區別하였다. 따라서 이들 4群은 巨噬細胞內에 存在하는 細菌으로 이들 間의 分布를 百分率로 表示하였다.

III. 實驗成績

실리콘으로 처리하지 않은 cover-slip에 附着된 巨噬細胞가 接觸한 *Mycobacterium fortuitum*을 어느 정도 嚥食하여 細胞內에 所有하고 있는가를 Suter의 方法¹⁶⁾을 변형하여 觀察한 結果는 Table 1에 表示하였고 이를 좀더 具體적으로 Fig. 1 및 Fig. 2에 表示하였다.

培養時間이 30分 抗過하였을 때 9.8%의 巨噬細胞가 抗酸菌을 所有하고 있었는데 대개 "Cell-associated bacteria"의 형태로 抑酸菌을 가지고 있었다.

그러나 培養時間이 60분이 經過하였을 때에는 抗酸菌인 *Mycobacterium fortuitum*을 가지는 巨噬細胞數는 急激히 增加하여 약 30%에 達하였으며 1~4개의

Table 1. Percentages of macrophages containing or attached with *M. fortuitum* in the stained cover-slip from bacteria-macrophage suspension.

Incubation period (mie)	30	60	90	120
Macrophages laden With				
cell-associated	6.8±1.2	10.4±2.7	12.8±2.5	6.2±1.8
1-4 bacilli	2.6±1.2	18.4±3.9	25.0±3.8	17.2±2.3
5-9 bacilli	0.4±0.2	4.0±1.6	11.0±2.6	27.6±5.0
10 bacilli	0	0.4±0.2	3.6±0.5	6.8±2.3
Total	9.8±1.8	29.6±2.2	52.4±3.0	57.8±2.1

Fig. 1. Normal peritoneal exudate cells including macrophage (center) with oval nucleus and vacuolated cytoplasm.

Fig. 2. Peritoneal macrophage containing acid-fast bacilli (*M. fortuitum*) arrowed in the figure.

Fig. 3. Peritoneal macrophage associated with acid-fast bacilli (arrowed 1) and 1~2 bacilli within cytoplasm (arrowed 2)

Fig. 4. Peritoneal macrophages squeezing acid-fast bacilli (arrowed) to be phagocytosed.

細菌을 가지는 巨噬細胞數가 그 中에 49%이었고 5~9 개의 細菌을 가지는 巨噬細胞數는 14%에 達하였다.

培養時間이 90분에 達하였을 때 抗酸菌을 所有하는 巨噬細胞는 더욱 增加하여 52.4%에 達하였으며 60분 때 보다 1~4의 細菌을 가지는 群의 比率는 별로 差異가 없으나 cell-associated bacteria를 가지는 巨噬細胞群의 比率가 감소하였고 反面에 5~9의 細菌을 가지는 群과 10 이상을 가지는 群이 急激히 增加하여 細胞

内の 菌數의 顯著한 增加를 보였다.

120분에 達하였을 때에는 抗酸菌을 所有하는 全體巨噬細胞는 57.8%로 90분 때와 거의 差異가 없으나 各期 細菌을 含有하는 程度에는 상당히 큰 變化가 있었다.

즉 1~4개의 細菌을 가지는 群은 30%로 減少하면서 反面에 5~9의 細菌을 가지는 群이 48%까지 達하였고 10개 이상 群도 12%에까지 達하여 실제로 巨噬細胞內에 存在하는 細菌數는 계속의 急激한 增加를 보였

다.

계속적으로 증가하였다.

IV. 考 察

巨噬細胞와 細菌이 接觸時 細菌 및 細胞의 各種 生物學的 性狀과 環境의 物理 學的 狀態等 여러 因子가 關與하여 食菌作用 및 細胞內의 菌生態에 影響을 미치며^{7,8,24,25)}, 이에 따라 感染成立如否가 決定되며 感染樣相에도 差異가 생기는 것이다^{7,8)}.

著者は *Mycobacterium fortuitum* 이 宿主인 마우스에 導入時 일어나는 現象을 관찰할 目的으로 本 實驗을 試圖하여 나타나는 結果는 Table 1, Fig. 1, 2, 3 및 4에 表示되어 있다. 그러나 이와 같은 樣相에 對한 다른 研究者의 報告가 없기 때문에 比較할 수 없지만 結核菌의 態도와 유사성을 나타내어^{10,11,12)} 巨噬細胞內에 棲息處를 삼으려는 印象을 주고 있었다. 차등¹⁴⁾의 가토巨噬細胞에 대한 結果와 유사하나 動物의 種類와 培養觀察時間이 相異하여 적절히 比較할 수 없었다.

그러나 本 實驗을 통해서 *Mycobacterium fortuitum* 은 巨噬細胞에 喰食되기 보다는 오히려 巨噬細胞에도 感染을 일으켜서 細胞內로 存在하려는 印象을 주었다.

따라서 *Mycobacterium fortuitum* 은 PPD와 交叉反應을 일으키고 granulomatous 염증반응을 일으킨다는 것은^{16,17)}이 細菌이 巨噬細胞와 反應하리라는 간접적인 證明이되지만 本 實驗을 통해서 *Mycobacterium fortuitum* 은 活潑히 巨噬細胞에 침입하는 印象을 주었다. 本 實驗에서 제시한 結果는 *Mycobacterium fortuitum* 感染症을 이해하는 아주 初步적인 知識을 제공할 수 있을 것 같다.

V. 總 括

著者들은 *Mycobacterium fortuitum* 이 마우스에 感染時 初期에 發現되는 反應樣相을 觀察하기 然하여 *Mycobacterium fortuitum* 과 마우스腹腔에서 採取한 巨噬細胞를 cover slip 이 들어 있는 Leighton 管에서 培養시킨後 細胞內菌數 및 *M. fortuitum* 을 所有하는 巨噬細胞의 出現빈도를 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. *Mycobacterium fortuitum* 을 함유하는 巨噬細胞의 出現率은 90분까지 急激히 增加하여 52%에 達하였으나 그 後에는 완만해져 120분에는 57.8%에 達하였다.

2. 培養時間이 經過함에 따라 多數의 細菌을 가지는 巨噬細胞數가 增加하는 경향을 띄워서 細胞內菌數는

References

- 1) Van Furth, R: Mononuclear Phagocytes, 1st edition, F.A. Davies Company, Philadelphia, 1970.
- 2) Pearsall, N.N. and R.S. Weiser: The macrophage, 1st edition, Lea & Fabiger, Philadelphia, 1970.
- 3) Carr, I.: Ingestion by macrophage-phagocytosis (p. 61-72), in The Macrophage, A Review of Ultrastructure and Function, 1st edition, Academic Press, London, 1973.
- 4) Stuart, A.E.: The Reticuloendothelial System; In Clinical Aspect of Immurology, edited by Gell, P.G.H., R.R.A. Combs and R.J. Laichmann, 3rd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.
- 5) Nelson, D.S.: Immunobiology of Macrophages, 1st edition, Academic Press, New York, 1976.
- 6) Hirsch, J.G.: Phagocytosis, Ann. Review. Microbio. 19:339, 1965.
- 7) Davis, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood, and M. Macarthy: Microbiology, 2nd edition, Harper & Row Publishers, New York, 1973.
- 8) Wilson, G.S. and A.A. Miles: Topley and Wilson's Principle of Bacteriobgy, Virology and Immunity, 6th edition, Arnold Oxford, 1975.
- 9) Lurie, M.B.: Studies on the mechanism of immunity in tuberculosis, The fate of tubercle bacilli ingested by Mononuclear Phagocytes dervied from normal and immunized animals, J. Exp. Med. 75:247, 1942.
- 10) Suter, E.: The Multiplication of tubercle bacilli within normal phagocytes in tissue culture, J. Exp. Med. 96:137, 1952.
- 11) Mackaness, G.B.: Growth of tubercle bacilli in monocyte from normal and vaccinated rabbits, Am. Rev. Tuberc. 69: 495, 1954.
- 12) Fong, J. p. Schneider, and s.s. Elberg: Studies on tubercle bacillic-Monocyte relationships I. Quantative analysis of the effect of serum of animals vaccinated with BCG upon bactrium-

- monocyte system, J. Exp. Med. 104:455, 1956.
- 13) Berthrong, M. and M. A. Hamilton: Monocyt from normal and immunized guinea-pig infected with virulent human tubercle bacilli, Am. Rev. Tuberc. & Pul. Dis. 79:221, 1959.
 - 14) 차창용 · 김동순 · 이승훈 : 항산균과 거식세포와의 반응양상에 대한 연구, 결핵 및 호흡기질환, 18 (1):1971.
 - 15) 김동순 : 항산균에 대한 거식세포의 식균작용에 면역조작이 미치는 영향, 最新醫學, 15(12):1259, 1972.
 - 16) 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.
 - 17) Joklik, W.K. and D.T. Smith: Zinsser's Microbiology, 15th edition, Appleton-Century-Crofts, New York, 1972.
 - 18) Hand, W.L. and J.P. Stanford: Mycobacterium fortuitum — A human Pathogen, Ann. Intern Med. 73:971, 1970.
 - 19) Hoskins, J.M: Appendices p. 303. in Virological Procedure, Butterworths, London, 1967.
 - 20) Van Furth, R., and T.L. Van Zee: In Vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear phagocytes, In: Handbook of Experimental Immunology, edited by D.M. Weir, 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973.
 - 21) Wu, W.G. and Marcus, S.: Humoral factors in Cellular resistance, I. The effect of heated and unheated homologous and heterologous sera on phagocytosis and cytophagocytosis by normal and immune macrophage, J. Immunol. 91:313, 1963.
 - 22) Stuart, A.E.: The phagocyte in Vitro: In Handbook of Experimental Immunology, edited by D.M. Weir, 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973.
 - 23) Fenner, F: The enumeration of viable tubercle bacilli by surface drop counts, Am. Rev. Tuberc. 64:353, 1951.
 - 24) Dubos, R.J. and J.G. Hirsch: Bacterial and Mycotic Infections of Man, 4th edition, J.B. Lippincott, Co. Philadelphia, 1965.
 - 25) 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.