□ 원 저 □

인형결핵균을 접종한 기니퓰과 토끼간의 세포성면역반응의 비교*

가톨릭대학 의학부 내과학교실

문화식 · 송정섭 · 박성학 · 변해원

= Abstract =

The Comparison of Cellular Immune Reactions in Mycobacterium Tuberculosis-Inoculated Guinea Pigs and Rabbits

Hwa Sik Moon, M.D., Jeong Sup Song, M.D., Sung Hak Park, M.D.
and Hae Won Pyun, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic Medical College

This experiment was conducted to investigate the immunological mechanism of the difference of susceptibility between guinea pigs and rabbits to Mycobacterium tuberculosis. Authors measured the PHA and PPD lymphocyte stimulation indices in controls(guinea pigs, n=13; rabbits, n=12), Mycobacterium tuberculosis-inoculated guinea pigs(n=27) and rabbits(n=26) at a week intervals.

The results were as follows:

1) There was no difference in PHA stimulation indices between control guinea pigs and rabbits($p>0.05$). In inoculated guinea pigs, the values were significantly lower than controls from the 1st week to the 4th week after inoculation($p<0.01$). But there was no difference in rabbits between control group and inoculated groups($p>0.05$).

2) There was no difference in PPD stimulation indices between control guinea pigs and rabbits($p>0.05$). In inoculated guinea pigs, the values were significantly higher than controls from the 1st week to the 4th week after inoculation($p<0.01$). But there was no difference in rabbits between controls and inoculated rabbits($p>0.05$).

These results indicate that there is striking difference of cellular immune reactions between guinea pigs and rabbits to Mycobacterium tuberculosis.

서 론

결핵은 세포성면역반응이 관여하는 대표적 질환으로 많은 연구의 대상이 되었으며, 결핵환자에서는 세포성면역능이 저하되어 있음이 여러 보고자들에 의해 확인된 바 있다^{1~8)}. 이와 아울러 세포성면역능의 저하요

인으로 억제세포(suppressor cells)와 억제인자(suppressor factor)의 존재 가능성이 논의되고 있다^{9~13)}. 또한 일부 동물실험에서는 유전적 소인이 결핵발병과 밀접한 관계가 있음이 관찰되었다^{14, 15)}.

그러나 결핵환자에서의 이러한 세포성면역능의 저하가 결핵발병의 원인인지 혹은 단순히 결핵균 감염의 결과로 나타난 면역반응의 변화인지에 관하여 정설이 확립되어 있지 않으며, 동물에서 관찰되고 있는 결핵발병의 유전적 소인이 사람에서도 적용될 수 있는지는

* 이 논문은 1985년 가톨릭 중앙의료원학술연구비의 보조로 이루어 졌음.

불확실하다.

저자들은 결핵발병의 면역학적 기전을 알기 위하여 인형결핵균 감염시 결핵발병율이 높은 기니피과 저항력이 강한 토끼를 대상으로¹⁶⁾, 인형결핵균 접종군과 대조군에서 phytohemagglutinin(PHA)과 purified protein derivatives(PPD) 임파구 자극시험을 실시하여 양자간의 차이 유무를 관찰하였다.

실험동물 및 방법

1. 실험동물

기니피과 40마리(생후 5~6개월, 체중 450~500 g)와 New Zealand White 혈통의 토끼 38마리(생후 6~7개월, 체중 3.0~3.5 kg)중 기니피과 13마리, 토끼 12마리는 대조군으로, 기니피과 27마리, 토끼 26마리는 인형결핵균 접종군으로 하였으며 PPD 피내반응점사상 음성으로 판정된 숫컷만을 실험에 사용하였다.

2. 방 법

1) PPD 피내반응검사

PPD(50,000 TU/ml, 1 mg PPD/ml; national serum institute, Copenhagen, Denmark)를 phosphate-buffered saline 으로 100배 희석한 것을 0.1 ml 피내 주사하여 72시간 후 관찰하였으며 직경 3 mm 이하를 음성으로 판정하였다.

2) 결핵균 접종

병독성이 확인된 인형결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*; 대한결핵연구원 세균부로부터 분양받음)을 배지로부터 세균집락(colony)을 배어 무게를 측정 한 후 희석하여 0.5 ml(wet colony weight 0.2 mg/ml, 1.46×10^5 colony forming units/ml)씩 기니피과 토끼의 복강내에 주사하였다.

3) Phytohemagglutinin(PHA) 임파구 자극시험

(1) 임파구 분리 : 결핵균 접종 후 1주, 2주, 3주, 4주에 각각 방부제가 없는 heparin 으로 처리된 주사기로 토끼는 귀에 있는 동맥에서 15~20 ml의 말초혈액을 채취하였으며 기니피과는 ether 로 흡입마취 시킨 후 개복하여 대동맥에서 10~15 ml의 혈액을 무균적으로 채혈하였다. 이를 동량의 RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute 1640; Difco, Mich, U.S.A.)으로 희석한 후 ficoll-hypaque 가 들어있는 시험관에 혼합되지 않도록 올려놓고 20°C에서 400×g로 40분간 원심분리(Beckman Model TJ-6 Centrifuge Model U-R Refrigeration Unit)하여 형성된 임파구층을 채

집하였다. 채집된 임파구를 RPMI 1640으로 3회 세척 후, RPMI 1640 및 우태혈청(fetal calf serum, FCS; Difco, Mich, U.S.A.)의 혼합액인 RPMI 1640-10% FCS에 재부유시켜 세포수가 3×10^6 /ml 되게 하였다.

(2) 임파구 배양 : 세포부유액에서 100 μ l를 취하여 microplate(Limbro Scientific No. 76-013-05, Hamdon, Conn, U.S.A.)의 well에 넣고, 여기에 phytohemagglutinin-P(PHA-P; Difco Laboratories, Detroit, Mich, U.S.A.) 3 μ g(PHA-P 3 μ g/100 μ l)을 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기(VIP IMPERIAL II CO₂ incubator with dual chambers dual controls)에서 72시간 배양한 후 꺼내어 Tritiated thymidine(methyl-³H-thymidine; specific activity 5 Ci/mmol, concentration 1 mCi/ml, Amersham International p/c, Amersham UK) 1 μ Ci를 가하고 다시 18시간 배양하였다.

배양액은 RPMI 1640-10% FCS에 penicillin(100 U/ml)과 streptomycin(10 μ g/ml)을 첨가한 것을 여과하여 사용하였다.

(3) 배양된 임파구 수집 및 방사능 측정 : 자동 microharvester(Titertek, Flow, U.S.A.)로 임파구를 수집한 후 이것을 scintillation cocktail [2,5-diphenyloxazole 4 g과 dimethyl-1,4-bis-(5-phenyloxazole) benzene 100 mg을 1 l의 toluene에 녹인 것] 8 ml가 들어있는 방사능 계측병에 넣어 30분간 방치한 후 beta liquid scintillation spectrometer(Model LSC-651, Japan)에서 방사능을 측정하였다.

(4) PHA 자극지수(stimulation index) 산출 : 각 실험은 3중복으로 하였으며 PHA를 넣고 배양한 임파구의 방사능 계수(c.p.m.)를 PHA를 넣지 않고 임파구에 배양액만 가하여 배양 후 측정 한 방사능 계수로 나누어 다음과 같이 자극지수를 산출하였다.

Stimulation Index(S.I.)

$$= \frac{\text{c.p.m. of stimulated cultures}}{\text{c.p.m. of control cultures}}$$

4) PPD 임파구 자극시험

결핵균 접종 후 1주, 2주, 3주, 4주에 전기한 방법으로 기니피과 토끼의 혈액으로부터 분리한 임파구에 배양액을 가하여 만든 세포부유액(임파구수, 3×10^6 /ml)으로부터 100 μ l를 취하여 microplate well에 넣고 여기에 PPD 2 μ g(PPD 2 μ g/100 μ l)을 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기에서 96시간 배양 후 Tritiated thymidine 1 μ Ci를 가하고 다시 18시간 배양 후 꺼내어 PHA 임파구 자극시험과 같은 방법으로 PPD 자극지수를 산출하였다.

Fig. 1. The changes of PHA stimulation index(S. I.) after the inoculation of Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs and rabbits. Means±standard error.

5) 통계적 처리방법

각각의 유의성 결정은 student t test 로 하였다.

결 과

1. 결핵균 접종에 의한 PHA 자극지수의 변동

결핵균을 접종하지 않은 기니픽 대조군의 PHA 자극지수는 29.7 ± 13.2 (n=13), 기니픽 접종군에서는 1주에 8.6 ± 3.6 (n=5), 2주에 10.3 ± 4.2 (n=7), 3주에 9.9 ± 4.7 (n=7), 4주에 6.7 ± 2.1 (n=8)이고 토끼는 대조군이 25.5 ± 7.7 (n=12), 접종군에서는 1주에 24.0 ± 7.8 (n=6), 2주에 20.6 ± 8.5 (n=6), 3주에 25.9 ± 8.4 (n=7), 4주에 24.9 ± 12.1 (n=7)로 기니픽 대조군과 토끼 대조군의 PHA 자극지수는 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 ($p > 0.05$), 기니픽은 접종 1주부터 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였고 ($p < 0.01$), 토끼는 접종군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$) (Fig. 1).

2. 결핵균 접종에 의한 PPD 자극지수의 변동

기니픽 대조군의 PPD 자극지수는 1.8 ± 0.9 (n=13), 접종군에서는 1주에 6.0 ± 1.5 (n=5), 2주에 9.4 ± 4.5 (n=7), 3주에 16.8 ± 13.5 (n=7), 4주에 20.6 ± 14.7 (n=8)이고 토끼는 대조군이 1.4 ± 0.5 (n=12), 접종군에서는 1주에 1.4 ± 0.7 (n=6), 2주에 1.3 ± 0.6 (n=6), 3주에 1.4 ± 0.6 (n=7), 4주에 1.5 ± 0.7 (n=7)로 기니

Fig. 2. The changes of PPD stimulation index(S. I.) after the inoculation of Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs and rabbits. Means±standard error.

픽 대조군과 토끼 대조군의 PPD 자극지수는 유의한 차이가 없었으나 ($p > 0.05$), 기니픽은 접종 1주부터 대조군에 비하여 자극지수의 유의한 증가를 보였고 ($p < 0.01$), 토끼는 접종군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$) (Fig. 2).

고 찰

인체가 결핵균에 감염되면 결핵균에 대하여 저항력을 갖게되어 대부분 자연 치유되며 그들중 일부만이 치료를 요하는 활동성 결핵으로 진전하는 것은 잘 알려진 사실이다. 이렇게 일부만이 활동성 결핵으로 진전하는 이유는 불명하며, 그 기전을 규명하기 위하여 면역학적 및 유전학적 측면에서 그동안 많은 연구가 있었으며, 결핵환자에서 세포성면역능의 저하는 여러 보고자들에 의해 보고된 바 있다. 김정규¹⁾, 최응규등²⁾과 채장성등³⁾은 결핵환자의 말초혈액에서 흉선의존 임파구(T 세포)의 숫적 감소를 관찰하였고, 변해원등⁴⁾은 T세포의 기능적 저하를 보고하였다. 또한 결핵환자에서는 자연살해세포(natural killer cell)와 살해세포(killer cell)의 세포파괴능도 감소되어 있음이 확인되었다^{5,6)}.

결핵환자의 세포성면역능 저하요인을 규명하기 위하여 많은 연구가 있었으며 Rook 등¹⁷⁾은 세포성면역반응에 관여하는 세포들이 결핵병소에만 밀집되기 때문에 전신적 세포성면역반응이 저하된다고 보고하였다. 그후 억제세포(suppressor cell)의 존재가 논의되었

고^{9,10,18}), IgG의 Fc 수용체를 갖는 억제 T세포(suppressor T cell, Ts 세포)의 관여가 발표되었다^{11,19~21}). Wade 등^{12,13})은 비특이 억제세포로 작용하는 단핵구—대식구(monocyte-macrophage)로부터 유리되는 억압인자(suppressor factor)가 Ts 세포를 선택적으로 분열증식시키고 활성화함으로써 세포성면역반응이 억제된다고 하였다. 또한 이들은 식작용(phagocytosis)에 의해 대식구내로 들어간 결핵균이 파괴된 후 다시 대식구로부터 유리된 군체의 인지질(phospholipid)이 억압인자로 작용한다고 발표하였다²²).

또한 prostaglandin(PG)이 세포성면역반응에 대한 조절기능을 갖고 있음이 여러 보고자들에 의하여 관찰되었으며, 이는 단핵구 세포막 수용체의 활성화에 의하여 생성되고 T세포 유약화반응을 억제한다고 하였다^{23~27}). 최근 Kleihenz 등²⁸)은 결핵균항원을 첨가하여 정상인의 단핵구와 임파구를 혼합배양한 결과 T세포의 기능저하를 관찰하였으며 이는 단핵구로부터 생성된 PG에 의한 것이라고 보고하므로써, PG이 억압인자로 작용할 수 있음을 시사하였다.

저자들은 인형결핵균에 대해 감수성이 다른 두 종(species)의 동물에 인형결핵균을 접종시킨 후 세포성면역반응의 차이 유무를 알기 위하여 기니피과 토끼의 접종군과 대조군에서 임파구 자극시험을 실시하였다. 그 결과 기니피 대조군과 토끼 대조군사이에는 PPD 및 PHA 자극지수의 유의한 차이가 없었으나, 인형결핵균 접종시 결핵발병율이 높은 기니피에서는 대조군에 비하여 접종후에 PPD 자극지수는 증가되고 PHA 자극지수는 감소되었다. 그러나 인형결핵균에 대하여 저항력이 강한 토끼에서는 대조군과 비교하여 PPD 및 PHA 자극지수의 변화를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과로 인형결핵균에 대해 감수성이 다른 기니피과 토끼 간에는 결핵균 감염후 세포성면역반응에 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다. 즉 기니피에서 PPD 임파구 자극지수의 증가는 결핵균 감염에 대한 특이 세포성면역반응의 출현을 의미하며, PHA 임파구 자극지수의 감소는 결핵균 감염시 비특이 세포성면역반응이 억제됨을 나타내는 것으로 이는 결핵균 감염의 결과로“suppressive factor”가 출현하는 것으로 해석된다. 그러나 선천적으로 인형결핵균에 대하여 저항력이 강한 토끼에서는 이러한 특이 및 비특이 세포성면역반응의 변동이 관찰되지 않았다. 기니피과 토끼에서 인형결핵균 감염시 상이한 세포성면역반응을 보이는 이유는 불명하나, 선천적으로 감수성이 다른 종(species)에서는 병원균 감염시 면역학적 방어기전에 현저한 차

이가 있을 것으로 추측된다.

여러 보고자들은 인형결핵균에 대하여 감수성이 높은 생쥐와 저항력이 강한 생쥐를 대상으로 실시한 동물실험에서, 결핵균 감염시 결핵발병과 유전인자사이에 밀접한 관계가 있음을 관찰하였으며, 조직적합항원(H-2계)과 관계없는 유전인자에 의하여 결핵균에 대한 저항력이 결정된다고 보고하였다^{29~32}). 또한 Gros 등¹⁴)과 Skamene 등¹⁵)은 1번 염색체에 위치하는 한개의 대립유전인자에 의하여 생쥐의 선천적 감수성이 결정되며, 멘델법칙에 따라 우성으로 유전된다고 하였다.

이로 미루어 기니피과 토끼의 인형결핵균에 대한 감수성 차이는 선천적 자연방어기전(natural defense mechanism)의 차이에 기인한 것으로 생각되며, 이를 입증하기 위한 방법의 하나로 결핵균과 단핵구—대식구(monocyte-macrophage)간에 일어나는 현상을 알아 보아야 할 것으로 생각된다.

결 론

기니피과 토끼의 인형결핵균에 대한 감수성 차이의 면역학적 기전을 알아보기 위하여 인형결핵균 접종 후 각각 PHA와 PPD 임파구 자극시험을 실시하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 기니피 대조군과 토끼 대조군간에 PHA 자극지수는 통계적으로 유의한 차이가 없었으나($p>0.05$), 기니피는 접종 1주부터 대조군에 비해 유의한 감소를 보였고($p<0.01$), 토끼는 접종군과 대조군사이에 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

2) 기니피 대조군과 토끼 대조군간에 PPD 자극지수는 유의한 차이가 없었으나($p>0.05$), 기니피는 접종 1주부터 대조군에 비해 자극지수의 유의한 증가를 보였고($p<0.01$), 토끼는 접종군과 대조군사이에 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

이상의 결과로 인형결핵균에 대하여 감수성이 다른 기니피과 토끼에서는 결핵균 감염시 나타나는 세포성면역반응에 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다.

(본 실험을 도와주신 가톨릭대학 의학부 병리학교실 최진 교수님, 김주성 교수님, 김상호 조교수님, 그리고 대한결핵연구원 홍영표 원장님, 김상재 선생님, 이승호씨께 감사드립니다.)

REFERENCES

- 1) 김정규 : 결핵환자의 말초혈액내의 T cell. 가톨릭 대학 의학부 논문집 26:83-94, 1974

- 2) 최응규, 변해원, 박태수, 김희숙 : 폐결핵환자에서의 Rosette-Forming Lymphocytes 수에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 **24**:85-91, 1977
- 3) Arbouys SO, Poupon MF: Active suppression of in vitro reactivity of spleen cells after BCG treatment. *Immunology* **34**:431-437, 1977
- 4) 변해원, 박성학, 김동집 : 결핵환자의 임상적 변형과 면역반응에 관한 연구. 대한내과학회잡지 **22**:18-21, 1979
- 5) 박성학 : 결핵환자 임프구의 Purified Protein Derivatives 자극반응. 가톨릭대학 의학부 논문집 **33**:59-64, 1980
- 6) 문화식 : 폐결핵 환자에서의 자연살해세포 매개 세포파괴능. 가톨릭대학 의학부 논문집 **35**:383-389, 1982
- 7) 채장성, 김동집 : 결핵환자의 세포성면역. 2-Amino Ethylisothiuronium Bromide 처리. E-로젯형성능 및 자연살해세포 매개 세포파괴능에 의한 평가. 가톨릭대학 의학부 논문집 **36**:139-146, 1983
- 8) 이진창 : 폐결핵 환자에서의 K 세포와 자연살해세포의 세포파괴능. 가톨릭대학 의학부 논문집 **36**:147-154, 1983
- 9) Klimpel GR, Henney CS: BCG-induced suppressor cells. I. Demonstration of a macrophage-like suppressor cell that inhibits cytotoxic T cell generation in vitro. *J Immunol* **120**:563-569, 1978
- 10) Ellner JJ: Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J Immunol* **121**:2573-2579, 1978
- 11) Sultzzer BM: Infection with Bacillus Calmette-Guérin activates murine thymus-independent (B) lymphocytes. *J Immunol* **120**:254-261, 1978
- 12) Wadee AA, Sher R, Rabson AR: Production of a suppressor factor by human adherent cells treated with mycobacteria. *J Immunol* **125**:1380-1386, 1980
- 13) Wadee AA, Mendelsohn D, Rabson AR: Characterization of a suppressor cell-activating factor(SCAF) released by adherent cells treated with M. tuberculosis. *J Immunol* **130**:2266-2270, 1983
- 14) Gros P, Skamene E, Forget A: Genetic control of natural resistance to Mycobacterium bovis(BCG) in mice. *J Immunol* **127**:2417-2421, 1981
- 15) Skamene E, Gros P, Forget A, Kongshavn PAL, Charles CS, Tayler BA: Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* **297**:506-509, 1982
- 16) Darzins E: The bacteriology of tuberculosis. p 327-339, Minneapolis, University of Minnesota Press 1958
- 17) Rook GAW, Carwell JW, Stanford JL: Preliminary evidence for the trapping of antigen-specific lymphocytes in the lymphoid tissue of 'anergic' tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* **26**:129-132, 1976
- 18) Stobo JD: Immunosuppression in man: Suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T cells. *J Immunol* **119**:918-924, 1977
- 19) Watson SR, Collins FM: Development of suppressor T cells in mice heavily infected with mycobacteria. *Immunology* **39**:367-373, 1980
- 20) Tsuyuguchi I, Shiratsuchi H, Teraoka O, Hirano T: Increase in T cells bearing IgG Fc receptors in peripheral blood of patients with tuberculosis by in vitro stimulation with purified protein derivatives. *Am Rev Respir Dis* **121**:951-957, 1980
- 21) Joffe MI, Rabson AR: Suppression of LIF production but not blastogenesis in patients with tuberculous meningitis. *Clin Immunol Immunopathol* **18**:245-253, 1981
- 22) Wadee AA, Rabson AR: Binding of phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol to OKT8⁺ lymphocytes activates suppressor cell activity. *J Immunol* **130**:2271-2276, 1983
- 23) Henney CS, Bourne HR, Lichtenstein LM: The role of cyclic 3',5' adenosine monophosphate in the specific cytolytic activity of lymphocytes. *J Immunol* **108**:1526-1534, 1972
- 24) Goodwin JS, Bankhurst AD, Messner RP: Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. *J Exp Med* **146**:1719-1734, 1977
- 25) Ellner JJ, Spagnuolo PJ: Suppression of anti-

- gen and mitogen induced human T lymphocyte DNA synthesis by bacterial lipopolysaccharide: Mediation by monocyte activation and production of prostaglandins. *J Immunol* **123**:2689-2695, 1979
- 26) Passwell JH, Dayer JM, Merier E: Increased prostaglandin production by human monocytes after membrane receptor activation. *J Immunol* **123**:115-120, 1979
- 27) Tracey DE, Adkinson NF: Prostaglandin synthesis inhibitors potentiate the BCG-induced augmentation of natural killer cell activity. *J Immunol* **125**:136-141, 1980
- 28) Kleihenz ME, Ellner JJ, Spagnuolo PJ, Daniel TM: Suppression of lymphocyte responses by tuberculous plasma and mycobacterial arabinogalactan. *Clin Invest* **68**:153-162, 1981
- 29) Allen EM, Moore VL, Stevens JO: Strain variation in BCG-induced chronic pulmonary inflammation in mice. I. Basic model and possible genetic control by non-H-2 genes. *J Immunol* **119**:343-347, 1977
- 30) Cheers C, McKenzie IFC: Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: Genetics of listeriosis. *Infect Immun* **19**:755-762, 1978
- 31) Skamene E, Kongshavn, PAL: Phenotypic expression of genetically controlled host resistance to *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **25**:345-351, 1979
- 32) Pelletier M, Forget A, Bourassa D, Gros P, Skamene E: Immunopathology of BCG infection in genetically resistant and susceptible mouse strains. *J Immunol* **129**:2179-2185, 1982
-