大韓微生物學會誌 第 6 卷 第 1 號 1971
J. Kor. Soc. Microbiol., Vol. 6, No. 1, 1971

菌體物質이 赤血球 活性에 미치는 影響*

全南大學校 醫科大學 細菌學教室

朴 寶 漢 · 鄭 善 植

—Abstract—

Effect of Bacterial Substance on the Activity of Red Cells*

Bohan Park, M.D. and Sun Sik Chung, M.D.

Dept. of Bacteriology, Chonnam University Medical School

The bacterial substance inhibited the methylene blue-uptaking activity of red cells.

On keeping at room temperature the methylene blue-uptaking activity of red cells sensitized with bacterial substance was more rapidly destroyed than that of normal cells.

The methylene blue-uptaking activity of red cells was more inhibited by the supernatant fraction than sediment of bacterial substance.

菌體物質은 赤血球에 吸着하여 各種 免疫反應을 일으키며[1-4] 赤血球에 吸着한 菌體物質의 本態는 血球表面의 性狀에 따라 다르다.[3,4]

只今까지의 文獻報告에 依하면 赤血球에 吸着한 菌體物의 免疫學的 態度[1-4] 또는 對 phage 作用[5,6]等을 取扱한 文獻은 相當히 볼 수 있으나 赤血球 自體에 어떤 影響을 미치는가에 對하여는 文獻報告가 거의 없다.

Sass 等[7]은 赤血球가 酵素的 作用을 하여 methylene blue를 攝取한다고 報告하였는데 本 實驗에서는 赤血球에 吸着한 菌體物이 血球活性에 어떤 影響을 미치는가를 調査하였으므로 그 結果를 報告한다.

赤血球(以下 血球라 略記) : 山羊의 血球를 使用하였으며 實驗할 때마다 血球를 새로이 分離 洗滌하여 供試하였다.

菌體抽出物(以下 菌體物이라 略記) : 供試菌은 肺炎桿菌 2 型이었으며 普通寒天平板에서 37°C 一晝夜 培養시킨다음 2 枚의 平板菌을 生理的食鹽水(以下 食鹽水라 略記) 10 ml에 集菌하여 100°C 1 時間 加熱하였다. 그後 遠心하여 菌沈査物을 除去한 上層液을 菌體物原液으로서 供試하였다.

菌體物의 血球感作 : 菌體物을 食鹽水에 2~5 倍 稀釋한 다음 2.5%의 血球液을 同量 加하여 37°C의 水槽에서 各種 時間 感作하였다. 그後 感作血球液에서 菌體物의 存在를 肉眼的으로 認定할 수 없을 때까지 血球를 食鹽水로 充分히 洗滌하여 使用하였다.

血球의 methylene blue(以下 MB라 略記) **攝取力檢査** : Sass 等[7]의 報告에 따라 血球의 活性狀況을 알기爲하여 血球의 MB 攝取力을 調査하였다.

이때 供試한 方法은 Sass 等[7]이 記述한 方法을 若干變更하여 使用하였다. 于先 以上 全實驗에 供試한 稀釋液은 蒸溜水 1000 ml에 食鹽 9.0 g 및 葡萄糖 2.0 g을 溶解하여 製造하였으며 MB 液은 앞의 稀釋液에 MB을 0.01% 용해가 되게 供試하였다.

그리하여 血球液을 于先 稀釋液에 6.0%가 되게 浮游하였으며 이의 25.0 ml에 MB 液을 2.5 ml 加하여 主로 23°C에 保存 하였다. 그리하여 各 可檢時間에 血球液을 少量씩 採取 遠心하여 血球를 除去한 다음 上層液의 optical density (以下 OD라 記略)를 spectrophotometer (Baush & Lomb, Thomas Co.)에 依하여 615 mμ 下에서 各各 調査하면서 血球의 MB 攝取狀況을 檢査하였다.

* 本研究는 1970年度 東亞自然科學獎勵金에 依하여 이루어 졌음

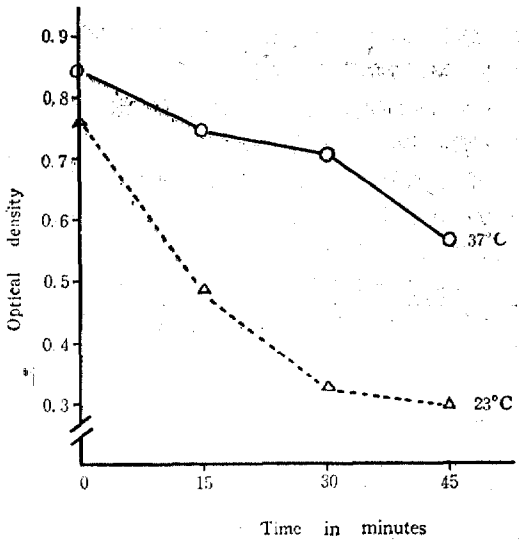

Fig. 1. Influence of temperature on absorption of methylene blue to normal red cell.
The optical density was examined by spectrophotometer under 615mμ.

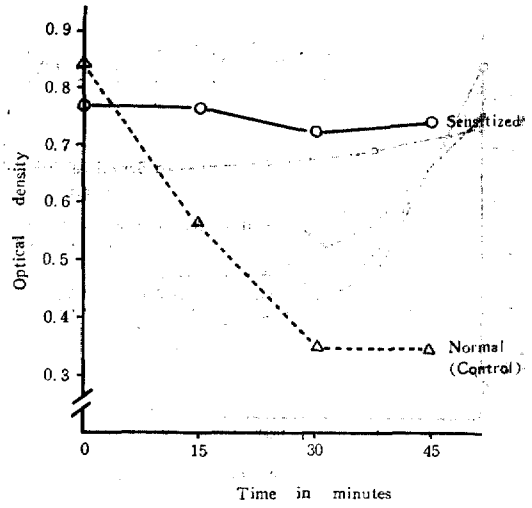

Fig. 2. Absorption of methylene blue to the red cells sensitized with bacterial substance.
The red cell sensitization was done for 90 minutes at 37°C. Then, the red cells were washed with diluent and the experiments were done in diluent at 23°C.

其他 各 實驗에 必要한 手技는 그때 그때 記述하였다.

實驗成績

溫度가 正常血球의 MB 攝取에 미치는 影響：正常血球加 MB 液을 二區分하여 一部分은 37°C에 그리고 남어지 部分은 23°C에 45分間씩 保存하면서 各 溫度에서 나타내는 血球의 MB 攝取狀況을 調査하였다.

第1圖와 같이 保存時間이 지남에 따라 23°C에서의 OD 低下率은 37°C에서 보다 더 커서 結局 37°C에서 보다 23°C에서 MB가 더 많이 攝取된다는 것을 알 수 있었다. 그리고 第1圖와 같이 23°C 30分 및 45分 例의 OD는 거의 비슷하여 本實驗條件下에서는 23°C에 約 30分間 保存하면 血球의 MB 攝取力은 거의 最高에 達하였는데 이는 Sass 等[7]의 結果와 비슷하였으며 以下의 모든 實驗에서는 供試溫度를 全部 23°C로 하였다.

또한 葡萄糖이 없는 食鹽水內에 正常血球 및 MB를 稀釋混合할때 血球의 MB 攝取力이 어떠한가를 23°C에서 參考로 調査하면 MB는 거의 攝取되지 아니하여 (圖表省略) 亦是 Sass 等[7]의 報告와 비슷하였으며 따라서 以下의 모든 實驗에서는 材料 및 方法 項目에 記述한 것과 같은 葡萄糖含有 稀釋液만을 全部 使用하였다.

菌體物感作 血球의 MB 攝取力：于先 菌體物原液을 食鹽水에 2倍 稀釋한 다음 血球를 90分間 感作하였다. 그후 이를 稀釋液으로 充分히 洗滌한 다음 稀釋液에 6.0%가 되게 다시 浮游하여 MB 攝取狀況을 調査하였는데 이때 對照하기 爲하여 菌體感作을 하지 아니한 正常血球의 MB 攝取狀況도 같이 檢査하였다.

第2圖와 같이 正常血球는 保存時間이 지나면 OD가 顯著히 減少하여져서 MB가 血球에 攝取된데 反하여 菌體物感作血球는 45分間 保存하여도 OD는 特別히 變化하지 아니하여 뚜렷한 MB 攝取를 認定할 수 없었다.

따라서 菌體物은 血球의 MB 攝取를 明確히 방해함을 알수 있었다.

血球의 菌體物感作度가 MB 攝取에 미치는 影響：血球의 感作을 爲한 菌體物의 濃度 및 血球濃度等 여러가지 條件을 一定하게 維持하면서 우선 血球를 10分, 30分 및 90分間 感作하였는데 李[6]의 報告를 參考할때 感作時間이 길면 짧을 때보다 菌體物이 血球에 더 많이 吸着되리라는 것은 容易하게 推測할 수 있었다.

23°C에서 調査한 各感作血球 및 對照인 正常血球의 MB 攝取力은 第3圖와 같다.

即 10分間 感作한 血球의 MB 攝取力은 對照인 正常血球의 그것과 비슷하였으나 感作時間이 길면길수록 血球의 MB 攝取力은 점점 더 弱化되어서 菌體物이 血球의 MB 攝取力을 明確히 妨害하였다.

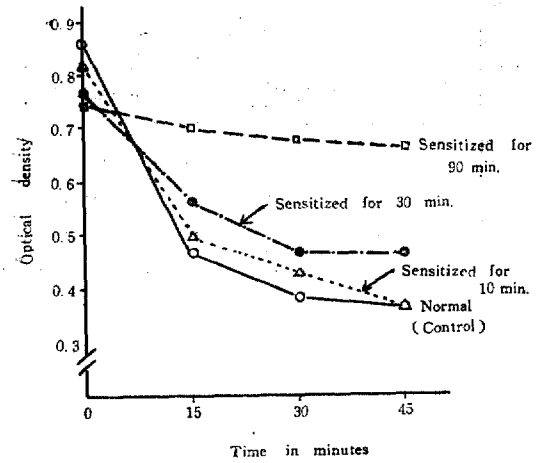

Fig. 3. Inbluence of sensitizing degree of red cells on absorption of methylene blue.
The same conditions, except the sensitizing time, were applied for each sensitization of red cells.

室溫에 各種 期間 保存한 感作血球의 MB 攝取力：感作血球의 MB 攝取力 破壞狀況을 調査하였는데 이에 앞서 于先 對照하기 爲하여 正常血球의 MB 攝取力 破壞狀況을 調査하였다.

即 正常血球液을 室溫에 各種 期間 保存하면서 各 保存 血球의 MB 攝取力을 23°C에서 調査하였는데 第4圖(A)와 같이 2日間 保存한 血球의 MB 攝取力은 0時間

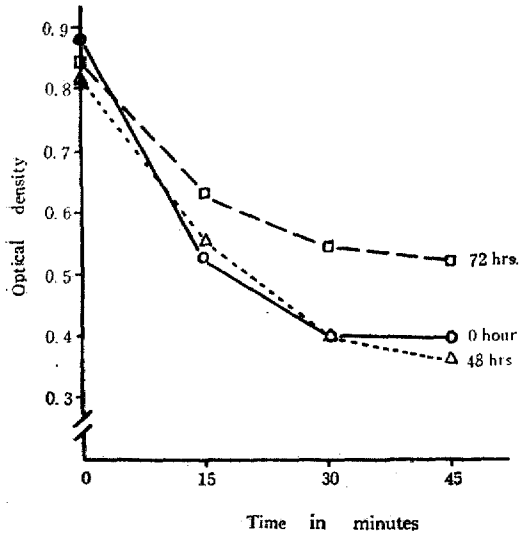

Fig. 4 (A) Absorption of methylene blue to the normal red cells kept at room temperature for various periods.

保存血球의 그것과 비슷하였으나 血球를 室溫에 3日間 保存하면 MB 攝取力은 多少 弱化되었다.

그러나 第4圖(A)와 같이 3日間 保存血球도 MB 를 아직 相當히 攝取할 수 있었다.

다음은 本 實驗을 하였는데 供試感作血球는 第3圖 結果를 參考하여 比較的 低度의 感作血球를 使用하였다. 即 第3圖 實驗때와 같은 條件下에서 血球의 菌體物感作을 30分間만 實施하여 供試하였다. 그리하여 第4圖(A)때와 같이 感作血球液을 室溫에 各種 期間 保存하면

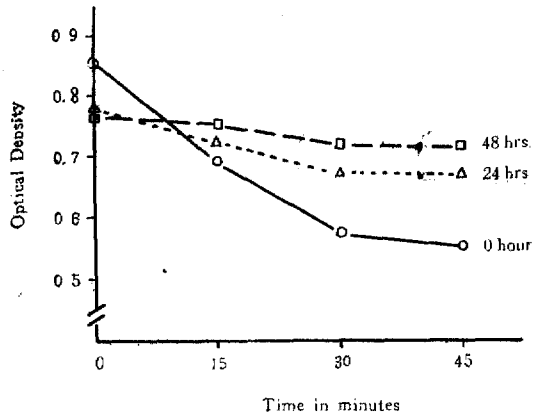

Fig. 4 (B) Absorption of methylene blue to the sensitized red cells kept at room temperature for various periods.
The red cells sensitized for 30 minutes were used.

서 各 保存血球의 MB 攝取力을 調査하였다.

第4圖(B)와 같이 保存時間이 길면 感作血球의 MB 攝取力도 亦是 점점 더 弱化 되었는데 이때 2日間 保存血球의 MB 攝取力은 正常血球때와는 달리 거의 破壞되었다.

따라서 이 結果를 第2圖(A)와 比較할때 室溫保存에 따른 感作血球의 MB 攝取力 破壞速度는 正常血球의 그것보다 多少 더 빠른 것 같았다.

菌體物의 上層液 및 沈査物로 各各 感作한 血球의 MB 攝取力：供試菌을 普通平板에서 37°C 一晝夜 培養시킨다음 食鹽水 15 ml에 1枚의 平板菌을 集菌浮游하여 100°C 1時間 加熱하였다. 그後 遠心하여 上層液 및 沈査物을 分離하였으며 上層液은 그대로 그리고 沈査物에는 總量이 遠心前의 그것이 되게 食鹽水를 注加하여 沈査物을 다시 浮游시킨 다음 血球感作에 各各 供試하였다. 그리하여 血球를 各 菌體物로 60分間씩 感作한 다음 같은 條件下에서 各 感作血球의 MB 攝取力을

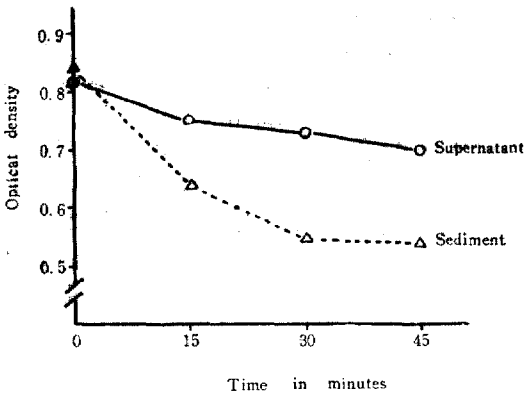

Fig. 5. Absorption of methylene blue to the red cells sensitized with supernatant and sediment of bacterial substance.
The sensitizing time of red cells was equally 60 minutes.

調査하였다.

第5圖와 같이 沈査物로서 感作한 血球의 MB 攝取力은 上層液으로 感作한 血球의 그것보다 相當히 더强하였다.

考　　案

本 實驗을 通하여 菌體物이 血球에 吸着되면 血球의 MB 攝取力이 低下되며 結局 血球活性이 弱化된다는 것을 알았는데 本 實驗만으로서는 그 機轉을 알수 없었다.

Sass 等[7]은 MB가 血球內에 攝取貯藏된 것은 血球의 酵素的作用 때문이라고 報告하였는데 本 實驗에서 菌體物이 血球의 MB 攝取力을 妨害하는 것은 菌體物이 血球의 이와같은 酵素的作用 自體에 亦是 어떤 影響을 미치기 때문인지 또는 菌體物이 血球表面에 吸着됨으로서 단지 MB의 血球膜 通過를 機械的으로 妨害하기 때문인지는 큰 問題點이었다.

그러나 第4圖 (A) 및 (B) 成績은 菌體物이 血球의 MB 攝取力을 妨害하는 機轉의 一面을 說明하여 주는 것 같았다.

即 우선 正常血球를 室溫에 48時間 保存하여도 血球의 MB 攝取力이 별로 變化하지 아니한다는 것은 室溫 48時間 處置에 依하여서는 血球活性이 별다른 影響을 받지 아니한다는 것을 意味한다.

따라서 萬一 菌體物이 MB의 血球膜通過만을 機械的으로 방해할뿐 血球의 다른 酵素的活性에는 아무런 影響을 미치지 아니한다면 菌體物感作血球를 室溫에 48時間 保存하여도 血球의 酵素的作用은 正常血球때와 같이 별로 變化하지 아니할 것이며 그 結果 이 感作血球의 MB 攝取力은 室溫에 全然 保存하지 아니한 血球의 그것과 비슷하리라고 推測될 수 있을것 같았는데 第4圖(B)와 같이 感作血球를 室溫에 48時間 保存하면 血球의 MB 攝取力이 第4圖(A)의 正常血球때와는 달리 거의 없어진다는 것은 結局 血球의 MB 攝取力을 菌體物이 妨害하는 것은 單純한 MB의 血球膜 通過 阻害만이 아닌 다른 여러 複雜한 機轉이 干與하리라는 것을 暗示한 點인것 같았다.

本 實驗에서 供試溫度가 37°C 일때보다 23°C일때 MB가 血球에 더 많이 攝取되는 것은 Sass 等[7]의 報告에서 低溫 長時間 保存때와 같이 37°C에서는 일단 攝取한 MB가 다시 遊離하기 때문인지 알 수 없었으며 MB의 血球攝取에 미치는 各種 溫度의 影響은 더 追試되어야 할 點이었다.

本 實驗에서는 血球活性을 아는 方法으로서 MB 攝取力檢査法을 選擇 供試하였는데 萬一 다른 血球活性檢査法을 使用하였을때 菌體物의 影響이 어떠하며 또한 本 實驗에서 菌體物이 MB 攝取力 以前의 다른 血球活性도 MB 攝取力破壞와 같은 程度로 亦是 破壞하는 가는 한 問題點이었다.

要　　約

菌體物質은 赤血球의 methylene blue 攝取力을 弱化시켰다.

室溫保存에 따른 菌體物 感作血球의 methylene blue 攝取力 破壞度는 正常血球의 그것보다 더 심하였다.

菌體抽出物의 上層液은 沈査物보다 血球의 methylene blue 攝取力을 顯著히 더 弱化시켰다.

(研究費를 支給하여준 東亞日報社에 感謝를 드리며 本 實驗을 爲하여 spectrophotometer의 使用을 許可하여주신 臨床病理科 曺圭赫 教授 그리고 여러가지로 助力하여준 生化學教室 李民化 教授께 感謝를 드린다.)

參 考 文 獻

1) Chun, D. and Park, B.: *Demonstration of Shigella flexneri antigens by means of hemagglutination test. J. Infect. Dis., 98:82-87, 1956.*

2) Middlebrock, G. and Dubos, R.J.: *Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with*

extracts of tubercle bacilli. J. Exptl. Med., 88:521-528, 1948.

3) Chun, D., Yang, Y. and Park, H.: *A study of the tannic acid hemagglutination test with antigenic substances of Shigella flexneri. J. Infect. Dis., 100:241-248, 1957.*

4) Boyden, S.V.: *The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J. Exptl. Med., 93:107-120, 1951.*

5) Kozinski, A.W. and Opara, Z.: *Experiments with substrates of bacterial viruses. III. Haemagglutination of erythrocytes sensitized with substrate in the presence of phage and antiphage serum. Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II. 3:83-88, 1955.*

6) 李賢擇：*Bacteriophage*와 抗 *phage* 血清과의 作用에 依한 血球凝集反應에 關한 硏究. I. 溫度 및 赤血球感作度의 影響. 現代醫學, *5:221-228, 1966.*

7) Sass, M.D., Caruso, C.J. and Axelrod, D.R:. *Accumulation of methylene blue by metabolizing erythrocytes. J. Lab. & Clin. Med., 69:447-455, 1967.*