

Migration Inhibition Test 에 의한 病原性 및 非定型抗酸菌과의 鑑別에 관한 研究

金 鍾 冕

全北大學校 農科大學

緒 論

非定型抗酸菌으로부터 精製 tuberculin 을 製造하여 그 菌으로 感作된 動物에게 皮膚反應에 의한 特異性으로 非定型抗酸菌의 分類를 시도하고자 한 Magnusson¹²⁾의 報告가 있으나 非定型抗酸菌 感作動物 또는 사람 하나하나에 대하여 各菌의 精製 tuberculin test 를 實施하여 그 特異性에 의하여 感作된 菌의 菌型을 鑑別한다는 것은 상당히 곤란한 문제이다.

이와같이 生體診斷의 어려움으로 인하여 tuberculin 陽性牛의 70% 진후가 無病巢牛라는 結果를 초래하여 어찌할 수 없는 經濟的損失을 면할 길이 없다. 近年 免疫生物學의 발달과 더불어 結核의 補助的診斷의 새로운 개발이 수많이 이루어지고 있다. 즉 抗原에 대한 感作細胞의 變形에 대한 研究를 비롯하여^{4,5,9,19,21)} 遲延型過敏狀態의 macrophage 나 循環淋巴球 그리고 脾臟細胞의 抗原에 대한 migration inhibition factor (MIF)에 관한 研究 등이^{1,6-8,10,12,14-18,20)} 활발히 이루어지고 있으며, 특히 結核病에 있어서 tuberculin test 및 MI 시험의 비교실험에서^{6,7,13,20,22)} 그 의의를 찾아 볼 수 있었다.

이 실험은 非定型抗酸菌인 *Mycobacterium smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. intracellulare* 와 *M. avium* 및 BCG 를 家兔와 guinea pig 에 접종하여 tuberculin 反應을 관찰함과 동시에 上記 各菌株를 생쥐에 접종, 培養 chamber 內에서 腹腔內 macrophage 의 migration 阻止程度를 관찰하여 非定型抗酸菌과 定型菌과를 비교 검토하였다.

材料 및 方法

菌株 및 接種菌의 調製: *M. avium*, BCG, *M. sme-*

gmatis, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. intracellulare* 를 家畜衛生研究所(安養)에서 분양 받았으며 小川培地에서 14日間 培養하여 生理食鹽水로 일단 50mg/ml 농도로 되게 한 다음 5mg/ml 菌液과 0.5mg/ml 菌液으로 調製하였으며 熱處理 殺菌하였다.

實驗動物 및 菌接種: 3kg 전후의 家兔 28마리와 400~450g의 guinea pig 21마리는 PPD 皮內反應을 위하여 菌接種 1個月前부터 실험실에서 사육하였다. 家兔는 菌株當 4마리씩 그리고 guinea pig 는 3마리씩 5mg/ml 菌液 0.2ml 를 頸背部皮下에 각각 접종하였으며, 생쥐는 菌株當 6마리씩 耳根部皮下에 0.5 mg/ml 菌液 0.2ml 를 각각 주입하였다.

PPD 皮內反應: PPD 反應檢査는 菌接種 7週만에 실시하였다. 家兔와 guinea pig 의 PPD (bovin type AN 5株로 製造) 접종량은 PPD 20 µg/ml 가 함유된 0.5% 石炭酸水溶液 0.1 ml 를 側腹部皮內에 注射하고, 24시간과 48시간 후에 注射部位의 硬結을 測定하여 硬結直徑의 平均이 10 mm 이상일 때 陽性으로 判定하였으며 5 mm 이상을 凝陽性으로 일단 간주 조사하였다.

Migration Inhibition Test: 家兔나 guinea pig 에 접종했던 동일 菌들로서 免疫시킨 생쥐의 腹腔內 macrophage 를 migration inhibition test 에 사용했으며 주로 金²²⁾, Kaltreider 등⁶⁾ 그리고 Kuhner 및 David⁸⁾의 方法을 補完하여 실시하였다. 생쥐 腹腔內 macrophage 를 얻기 위하여 處理 4日前에 2 ml 의 thioglycollate 溶液(29.3 g/liter)을 생쥐의 腹腔內에 서서히 注入하고 處理 1日前에 다시 2 ml 를 注入하였다. 腹腔內 滲出液中的 macrophage 를 收穫함에 있어서는 3 ml 의 Fisher's medium(日水製藥)을 생쥐 腹腔內로 注入, 조용히 膨腹部를 波動시켜 滲出液과 충분히 混合시킨 다음, 약 2.5 ml 정도를 다시 回收하였다. 이 混合液은 1,200 rpm 으로 3分間 遠心하여 上清液은 버리고 다시 Fisher's medium 으로 1回 洗滌한 다음 上清液을 버리고

凝塊된 細胞를 각기 분리시켰다. 이濃厚한 細胞浮游液을 毛細유리관(I.D. 1.1~1.2 mm, L. 75 mm)에 吸引하여 一端을 火염으로 封하고 1,200 rpm으로 5分間 遠心하여 細胞단을 채운 다음 細胞層 약간 윗 부위를 절단하였다. 길이 2~3 mm의 細胞가 채워진 毛細유리관을 培養 chamber (I.D. 16~20 mm, H. 20 mm)의 底面에 silicon grease로 固定하였다. 培養液은 56°C에서 30分間 非動化된 guinea pig 血清이 10%가 함유된 Fisher's medium에 penicillin 150 unit/ml와 streptomycin 15 µg/ml를 첨가하여 각각의 培養 chamber마다 2 ml씩을 조용히 分注하였다. PPD는 均일하게 35 µg/ml씩을 滴下하고 cover glass로 密封한 뒤 37°C에서 24시간 培養한 다음 관찰하였다.

Migration Inhibition Test의 評價: 각 實驗群마다 1마리당 2개씩 培養 chamber를 만들어 이들 가운데 PPD를 첨가한 것과 첨가하지 않은 것으로 나누어 배양하였다. migration의 面積은 일차 16倍로 현미경 촬영한 후 方眼紙에 투영하여 산출하였다. migration의 百分率은 다음과 같은 式으로 하였다.

$$\text{Migration의 百分率} = \frac{\text{抗原인 PPD 35}\mu\text{g/ml 첨가 對照群의 migration 에 의한 migration 面積}}{\text{面積}} \times 100$$

結 果

PPD皮內反應은 第1表에서 보여주는 바와 같이 抗 酸菌種에 따라서 그리고 실험동물의 種類나 個體에 따라 皮膚反應에 큰 차이를 가져오지만, 이 실험의 경우 家兔나 guinea pig가 모두 陰性인 *M. gordonae*를 제

외하고는 弱한 陽轉의 경우가 존재하기는 하나 대체적으로 陽性反應을 보였다. 즉 家兔에 있어서 *M. fortuitum* 接種群中 3마리가 凝陽性으로 나타났으며 1마리는 陰性反應이었다. 그리고 guinea pig에서도 3마리 중 2마리가 凝陽性, 1마리가 陰性反應이었다. *M. intracellulare*의 경우 家兔에서는 모두 弱한 陽轉이며, guinea pig에서는 3마리 중 1마리만이 陰性이며 2마리

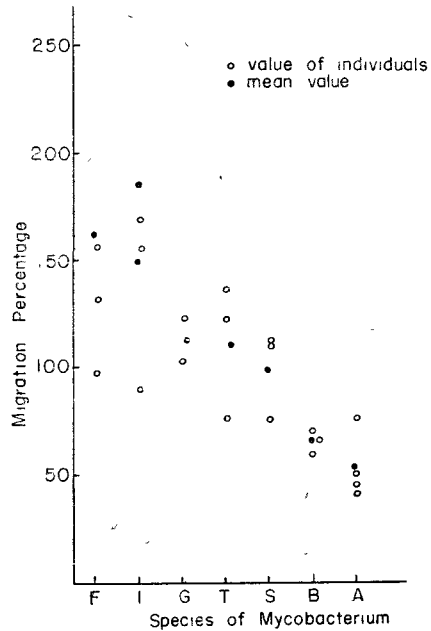


Fig. 1. Percentage of macrophage migration with PPD to without PPD in different species of mycobacteria.

Table 1. PPD Skin Test in Rabbit and Guinea Pig Immunized with BCG, *M. avium* and Five Atypical Mycobacteria

Species of Mycobacteria	Rabbit			Guinea Pig		
	Number of Case	Reaction		Number of Case	Reaction	
		Positive	Negative		Positive	Negative
<i>M. fortuitum</i>	4	*3	1	3	*2	1
<i>M. intracellulare</i>	4	*4	0	3	*2	1
<i>M. gordonae</i>	4	0	4	3	0	3
<i>M. terrae</i>	4	3	1	3	2	1
<i>M. smegmatis</i>	4	4	0	3	3	0
B C G	4	4	0	3	3	0
<i>M. avium</i>	4	3	1	3	2	1

* Slightly positive reaction.

는 家兎에서와 같이 瀰陽性이었다. *M. terrae*와 *M. avium*은 家兎나 guinea pig에서 1마리씩의 陰性反應 외에는 모두 陽性反應이며, *M. Smegmatis*와 BCG는 家兎에서나 guinea pig에서 모두 陽性反應이었다.

各種抗酸菌에 의해서 免疫된 생쥐의 腹腔內 macrophage가 PPD 抗原에 대하여 어느 정도의 阻止를 나타냈는가에 대한 比較관찰의 結果는 第1圖에서 보여 주는 바와 같다. 즉 BCG 接種군과 *M. avium* 接種군 그리고 *M. smegmatis*를 除外하고는 하등의 migration의 阻止가 없었을뿐 아니라 오히려 對照群보다 월등히 migration을 일으키고 있음을 알 수 있었다. 즉 非定型抗酸菌인 *M. fortuitum*은 對照群의 平均値에 대한 百分率의 최고치가 264.6%, 최저치가 96.6%로서 平均은 162.4%였으며, *M. smegmatis*는 최고치가 112%, 최저치가 76.2%로서 平均은 99%로서 非定型抗酸菌으로서는 100%를 약간 下廻하였다. 기타 非定型抗酸菌인 *M. intracellulare*의 平均은 149.9%, *M. gordonae*가 112.6%, *M. terrae*가 111.4%로써 모두 100%線을 上廻하여 對照群보다는 더 많은 migration을 일으킨 結果로 나타났다. BCG의 경우에 있어서는 모두 PPD 抗原에 대하여 阻止現象이 뚜렷하게 나타나 있음을 알 수 있었다. 즉 對照群의 平均値에 대한 百分率의 최고치는 69.9%, 최저치는 60.2%로서 그 幅이 아주 작았으며, 平均 65.5%로 抗原 PPD에 대하여 상당한 정도의 migration의 阻止現象이 보였으며, 특히 *M. avium*의 경우는 최고치 76.8%와 최저치 41.2%로서 抗原 PPD에 대한 migration의 阻止現象이 가장 뚜렷하였음을 이 실험에서 볼 수 있었다.

전연 抗酸菌을 接種하지 않는 正常群의 migration의 넓이와 非定型抗酸菌의 接種에 의한 넓이를 比較하여 보면 전자의 경우보다 후자의 경우가 월등히 넓게 migration되어 있음을 볼 수 있었다. 즉 免疫되지 않은 正常群은 5마리의 平均 넓이가 333 mm²인데 비하여 非定型菌의 接種群에서는 위의 넓이를 훨씬 上廻하는 例를 자주 볼 수 있었다.

考 察

PPD 皮內反應은 각종 抗酸菌種에 免疫된 실험동물이 bovine AN 5株에 의해서 製造된 PPD 抗原에 대하여 어느 정도의 特異的反應을 나타낼 수 있는가를 관찰하기 위하여 이루어졌으며, migration inhibition test에 사용한 실험동물이 相異하기는 하되 MI test와 皮膚反應과의 連關性을 찾기 위하여 시도되었다. 使用된

家兎나 guinea pig는 系統이 없는 雜系로서 역시 一律的인 結果를 초래하지 못하였다. Lurie¹¹⁾는 結核菌에 대하여 感受性이 높은 家兎는 結核菌接種에 의해서 tuberculin反應은 낮고 弱한 陽性反應을 나타내며 接種局所의 潰瘍도 용이하게 治癒되지 않으나 結核菌感染에 대한 抵抗性을 가진 家兎는 tuberculin反應도 強하며 조속하게 陽轉한다고 말하고 있는데, 이 실험에 있어서도 雜種家兎와 雜系 guinea pig의 사용이 그 原因이었다고 본다.

結果의으로 bovine type AN 5株 由來 PPD에 대하여 家兎나 guinea pig에서 陽性反應과 陰性反應이 나타났음에도 不拘하고, 免疫細胞의 同一抗原에 대한 시험관내 反應은 이들 皮膚反應과 어떤 關聯性이 있는가를 관찰하기 위하여 이 실험이 시도된 것이다.

家兎나 guinea pig에 接種된 同一菌種에 의해서 免疫된 생쥐의 腹腔內 macrophage의 PPD 抗原에 대한 migration의 阻止程度는 第1圖에서 나타난 바와 같이 非定型抗酸菌의 경우 *M. smegmatis*의 99%를 除外하고는 모두 對照群과의 比較에서 陰性, 즉 100%線을 훨씬 上廻하는 結果로 나타났으며 BCG와 *M. avium*은 50% 전후의 migration의 阻止現象을 보여주었다.

즉 同一抗原인 PPD에 대하여 tuberculin反應에 있어서는 일반적으로 陽性反應의 傾向인데 반하여, migration inhibition test에 있어서는 tuberculin에서 사용된 同一抗原에 대하여 BCG 및 *M. avium*과 非定型抗酸菌과는 거의 뚜렷한 差異를 나타내 주었다. Migration의 阻止作用은 細胞가 特異抗原에 접촉하여 產生된 factor에 의해서 시험관내에서 이루어지는 반면, 皮膚反應은 복잡한 요인으로 生體內에서 이루어지는 것이기 때문에 그 程度를 同一視할 수는 없다는 보고나¹³⁾ 폐지의 循環淋巴球를 이용한 *M. smegmatis*의 MI 시험은 同一抗原에 대하여 皮膚反應과 무관계라는 보고²²⁾들을 감안할 때, 이 실험의 結果를 特異性에 그 理由를 說明할 것인지, 生體內에서의 反應보다 비교적 단순한 시험관내 반응이 도리어 그 特異性을 나타내는데 意義가 있다고 할 것인지 많은 追試의 필요성을 느끼는 바이다.

이 migration의 阻止試驗에서 PPD 사용량을 35 μg/ml로 일정하게 한 것은 David²⁰⁾, Kostiala⁷⁾ 그리고 Feinstone 등³⁾에 의해서 밝혀진 바와 같이 어느정도 差異의 PPD 첨가량은 migration 阻止作用에 큰 영향을 미치지 못하는 반면, 過量은 오히려 免疫處理되지 않은 상태에서 역제작용을 초래할 수 있어, 몇 차례의 예비적 실험을 통하여 알맞은 기준량을 결정하였으며 金²³⁾이 이룩한 실험과 그 量에 있어서 거의 일치됨을

알 수 있었다. 이 실험에서 사용된 PPD는 0.5% 石炭酸液으로 희석되어 있는 바 과량은 細胞에 손상을 줄 염려도 고려하지 않을 수 없었다. 이 실험에서 tuberculin에 사용된 動物을 MI 시험에 같이 사용함이나 바람직하였으나 技術的인 면에서 생쥐의 腹腔內 macrophage의 이용이 훨씬 正確하고 편리하여 同一菌種으로 접종된 생쥐를 사용하였다. 생쥐의 macrophage의 수확이 생쥐 個體에 따라 다르기 때문에 毛細유리관에 充填하지 못할 경우가 가끔 발생하여 한두예가 除外된 것은 어찌할 수가 없었다.

非定型抗酸菌과 哺乳動物 혹은 鳥類의 各種抗酸菌에 의해서 製造된 여러 PPD와 同一抗酸菌에 免疫된 動物의 細胞를 이용 상호교차반응에 의해서 그 特異성이 비교검토되었으면 하며 나아가서는 실제로 사람이나 大家畜, 특히 牛結核 診斷에 이 실험을 應用함이 바람직하나. 生體에서 macrophage를 얻어 내리는 시도는 거의 불가능하며 循環血液內 淋巴球를 이용함이 요구된다. 金²², Ortiz-ortiz 등¹⁵, Mitchell 등¹⁸, Lomnitzer 등¹⁰ 그리고 Teelken 및 Mindeshous²⁰에 의해서 感染된 淋巴球를 이용한 MI 시험의 技術적 문제가 이루어져 tuberculin 陽性牛에 대한 MI 시험의 應用과 病巢의 確認 그리고 結核菌의 分離同定 등으로 이들의 實際的 診斷的 價值的 評價가 이룩되었으면 한다.

結 論

病原性 및 非定型抗酸菌의 鑑別에 관한 많은 報告들이 있으나 乳牛의 結核診斷에 널리 이용되고 있는 tuberculin 皮內反應은 結核診斷에 아직도 문제를 내포하고 있어 더욱 特異的인 診斷法이 요구되고 있는 실정이다.

白血球나 macrophage의 migration inhibition은 遲延性過敏狀態와 관계가 깊어 있는 것으로 인정되고 있으며 사람이나 動物의 細胞免疫學에서 널리 이용되고 있다.

이 實驗에 있어서 家兔 28마리와 guinea pig 21마리에 *Mycobacterium avium*과 BCG 외에 5種의 非定型抗酸菌을 각각 接種하여 PPD에 의한 皮內反應을 관찰함과 동시에 생쥐에 同一菌種을 접종하여 7週後에 腹腔內 macrophage의 PPD에 대한 migration의 阻止程度를 對照群과 비교한 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 家兔와 guinea pig에 있어서 PPD 皮內反應은 全例 陰性으로 나타난 *M. gordonae*를 除外한 나머지 실험군은 거의 陽性反應을 나타내었으나 *M. intrace-*

*llulare*가 guinea pig에서 1例, *M. fortuitum*이 家兔에서 1例 그리고 *M. terrae*와 *M. avium*이 家兔와 guinea pig에 있어서 각각 1例씩 陽性으로 나타났다.

2. BCG 및 非定型抗酸菌으로 免疫된 생쥐의 腹腔內 macrophage에 PPD를 첨가하여 migration 阻止現象을 관찰하였던 바 BCG와 *M. avium*을 除外한 나머지 4例에서 migration의 百分率 平均이 모두 100%를 上廻하였으며, *M. smergnatis*는 99%로 100%를 약간 下廻하였다. BCG와 *M. avium*의 경우 65.6%와 53.2%로 對照群과 뚜렷한 차이를 나타내어 bovine type AN 5株 由來 PPD에 대한 特異的反應을 나타냈다.

參 考 文 獻

1. Calder, E.A., Mcleman, D., Barnes, E.W. and Irvine, W.J.: The effect of thyroid antigens on the in vitro migration of leucocytes from patients with hashim to thyroiditis. Clin. Exp. Immunol. (1972) 12 : 429.
2. David, J.R.: Suppression of delayed by persensitivity in vitro by inhibition of protein synthesis. (1965) 94 : 1125.
3. Feinstone, S.M., Beachey, E.H. and Rytel, M. W.: Induction of delayed hypersensitivity to influenza and mumps viruses in mice. J. Immunol. (1969) 103 : 844.
4. Han, T. and pauly, J.: Simplified whole blood method for evaluating in vitro lymphocyte reactivity of laboratory animals. Clin. Exp. Immunol. (1972) 111 : 137.
5. Jensen, B., Kurpysz, M. and Rubin, B.: Antigen specific lymphocyte activity in vitro by peripheral blood leucocytes from Mantoux positive and negative human beings. Clin. Exp. Immunol. (1977) 27 : 303.
6. Kaltreider, H.B., Soghor, D., Taylor, J.B. and Decker, J.L.: Capillary tube migration for detection of human delayed hypersensitivity: Difficulties encountered with buffy coat cells and tuberculin antigen. J. Immunol. (1969) 103 : 179.
7. Kostiala, A.A.I.: Delayed hyper-sensitivity in the guinea pig immunized With killed tubercle bacilli in adjuvant. Acta path. Microbiol. Scand. Section B. (1971) 79 : 275.

8. Kuhner, A.L. and David, J.R.: Partial characterization of murine migration inhibitory factor (MIF). *J. Immunol.* (1976) 116 : 140.
9. Kurpisz, J.M. and Rubin, B.: Antigen specific lymphocyte activity in vitro by peripheral blood leucocytes from Mantoux positive and negative human beings. *Clin. Exp. Immunol.* (1977) 27 : 303.
10. Lomitzer, R., Ralison, A.R. and Koornhof, H. T.: The effect of cyclic AMP on leucocyte inhibitory factor (LIF) production and on the inhibition of leucocyte migration. *Clin. Exp. Immunol.* (1976) 24 : 42.
11. Lurie, M.B.: Heredity, constitution and tuberculosis: An experimental study. *Supp to Am. Rev. Tuberc.* (1941) 44 : 1.
12. Magnusson, M., Engbaeck, H.C. and Bentzon, M.W.: Specificity of mycobacterial. I. Studies in guinea pigs with purified "Tuberculin" prepared from mammalian and avian tubercle bacilli. *Mycobacterium Balnia and other acid-fast bacilli.* *Am. Rev. Resp. Dis.* (1961) 83 : 57.
13. Mitchell, C.G., Smith, M.G.M. Golding, P.L., Eddleston, A.L.W.F. and Williams, R.: Evaluation of the leucocyte migration test as a measure of delayed hypersensitivity in man. *Clin. Exp. Immunol.* (1972) 2 : 535.
14. Nékám, K., Kalmár, L., Gergely, P., Kelemen, G., Fekete, B., Láng, I., and Petranyi, II G.: In vitro effect of transfer factor on active rosettes and leucocyte migration of patients with cancer. *Clin. Exp. Immunol.* (1977) 27 : 416.
15. Ortiz-ortiz, L.O., Zamacona, G., Garmilla, C. and Arellano, M.T.: Migration inhibition test in leukocyte from patients allergic to penicillin. *J. Immunol.* (1974) 113 : 993.
16. Remold, H.G.: Chemical treatment of macrophages increases their responsiveness to migration inhibitory factor (MIF). *J. Immunol.* (1977) 118 : 1.
17. Renloy, P. and Hardt, F.: In vitro evaluation of cell-mediated immunology in mice. *Clin. Exp. Immunol.* (1971) 8 : 163.
18. Rosenberg, S.A. and David, J.R.: Inhibition of leukocyte migration: An evaluation of this in vitro assay of delayed hypersensitivity in man to a soluble antigen. *J. Immunol.* (1970) 105 : 1147.
19. Schellekens, P. Th. A. and Eijvoogel, V.P.: Lymphocyte transformation in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* (1971) 8 : 187.
20. Teelken, A.W. and Minderhoud, T.M.: A direct macrophage migration inhibition test applied in man. *Clin. Exp. Immunol.* (1976) 24 : 26.
21. Thilsted, J.P.: Lymphocyte Transformation in the dog: Response of lymphocytes from normal and immune dogs to phytohemagglutinin, concidioidin, and purified-protein derivative. (1977) *Am. J. Vet. Res.* 38 : 81.
22. 金鍾冕 : Tuberculin 陽性無病巢乳牛의 鑑別診斷에 관한 實驗的研究. 大韓獸醫學會誌 (1976) 16 : 151.
23. 金鍾冕, 李正鎬 : BCG 와 *M. smergmatis* 로 感染을 일으킨 돼지에 있어서의 試驗管内 淋巴球의 反應. 全北大學校 農大論文集 (1974) 5 : 37.

Experimental Studies on Differentiation of Typical and Atypical Mycobacterium by Migration Inhibition Test

Jong Myeon Kim, D.V.M. Ph.D.

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Jeonbuk National University

Abstract

The studies on differentiation of pathological and atypical acid fast bacteria were reported by many authors. The tuberculin skin test that is widely utilized to diagnose tuberculosis of the

dairy cattle was of smaller significance for the certification of true tuberculosis. So the studies on the specific method to diagnose tuberculosis of cattle is really needed.

Leukocyte and macrophage migration inhibition is accepted as an in vitro correlate of delayed type hypersensitivity and is widely used in the study of cellular immunity in man and animal.

In this experiment, the tuberculin skin test results in that the rabbits and guinea pig sensitized with BCG, *Mycobacterium avium* and five atypical mycobacteria were almost positive reaction except the only *Mycobacterium gordonae*, but one of several cases which sensitized with *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. terrae* and *M. avium* in guinea pig and which sensitized with *M. fortuitum*, *M. terrae* and *M. avium* in rabbits were negative reaction.

Cells from the mice sensitized with BCG and *M. avium* are significantly inhibited from migrating when challenged with PPD 35mg/ml. The other cells from the mice sensitized with *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, and *M. gordonae* do not inhibit the migrating when challenged with PPD 35 mg/ml.

There was very slight inhibition of migration of sensitized cells with *M. smegmatis*, even though this is not different significantly from the above four species.