

## BCG 感染마우스 血清에 의한 遲延性 過敏反應 抑制

全北大學校 醫科大學 微生物學敎室

李憲九·金台坤·河大有

= Abstract =

### Suppression of the Development of Delayed-Type Hypersensitivity to Sheep Erythrocytes by Serum from BCG-Infected Mice

Hern-Ku Lee, M.D., Tae-Gon Kim, M.D. and Tai-You Ha, M.D.

Department of Microbiology and Immunology, Jeonbug National University, Medical School  
Jeonbug, Korea

The immunosuppressive effect of serum from mice heavily infected with BCG (BCG-serum) was evaluated. The delayed-type hypersensitivity reaction to sheep erythrocytes was depressed when BCG-serum was administered both systemically and locally at the same time of challenge. This study shows that serum of animal infected with mycobacteria contains a factor responsible for immunosuppression and factor may be important in understanding the mechanisms of allergy in mycobacterial infections.

#### 緒 論

사람의 抗酸性 細菌의 感染症에는 多様な 免疫學的 樣狀을 觀察할 수 있다. 結節樣 癩(tuberculoid leprosy) 患者는 正常的인 細胞性 免疫機能을 保有한 反面, 癩癩型 癩(lepromatous leprosy) 患者 및 甚한 肺結核 患者에서는 顯著하게 細胞性 免疫反應이 損傷되어 있다<sup>1,2</sup>. 이와 같이 抗酸性 細菌 感染症 때 細胞性 免疫反應의 減少現象은 抗酸性 細菌 感染에 의해 suppressor cell이 誘導되며<sup>3-5</sup> 이 suppressor cell에서 免疫抑制因子(suppressor factor)가 遊離되어<sup>6,17</sup> 나타난다는 事實이 最近에 이르러 報告되고 있다.

實驗動物에 있어서 抗酸性 細菌을 感染시켰을 때는 緬羊赤血球(SRBC)에 對한 遲延性 過敏反應(DTH)의 低下<sup>7,8</sup> 脾臟細胞의 mitogen에 對한 增殖抑制<sup>9-12</sup> 等 細胞性 免疫反應이 低下되며 이러한 現象도 사람에서와 같이 suppressor cell에 依한 것으로 알려져 있다.

李<sup>8</sup>는 마우스를 多量의 BCG(10 mg)로 感染시켰을 때 感染 2週 後에 SRBC에 對한 細胞性 免疫反應이 顯著히 低下됨을 報告한 바 있는 데 著者는 이러한 마우스의 血清에 免疫反應을 抑制하는 suppressor factor의 存在有無를 알아보기 爲하여 本 實驗을 試圖하였다.

#### 實驗材料 및 方法

實驗動物: 本 敎室에서 繁殖飼育한 生後 8~10週된 體重 20~25 g인 健康한 ICR 마우스를 雌雄 區別없이 使用하였다.

BCG 感染: BCG는 粉末化한 形態로 國立保健研究院으로 부터 分讓받아 李<sup>8</sup>가 使用한 培地에 3週間 增殖시켰다. 菌液을 3,000 r.p.m.에서 30分間 遠沈시켜 沈澱된 BCG의 무게를 測定한 後 滅菌生理食鹽水에 浮遊시켰다.

BCG 感染은 菌液 0.2 ml(10 mg)을 마우스의 尾靜脈을 通하여 感染시켰다. BCG는 4°C에 保管하면서 1個月 以內에 使用하였다.

抗原 및 免疫: 抗原으로는 SRBC를 使用하였다. SRBC는 本 敎室에서 飼育하고 있는 緬羊의 頸靜脈으로부터 採血한 後 同量의 Alsever 氏 液(pH 6.1)을 加하여 4°C에 保管하면서 2週 以內에 使用하였다. SRBC는 使用直前에 生理食鹽水로 3回 遠心洗滌하였으며 免疫은 SRBC 浮遊液 0.2 ml( $10^7$  細胞)을 腹腔內 注射하여 免疫하였다.

足腫脹檢査(footpad swelling test, FPR): 足腫脹檢査는 吳等<sup>14</sup>이 記述한 方法과 同一하게 實施하

었다. 簡記하면 免疫 4日 後에 마우스의 左側後肢足蹠의 皮內에 SRBC 浮遊液 0.05 ml( $10^8$  細胞)을 惹起注射(challenge)하고 24時間 後에 足蹠腫脹程度를 micro-meter caliper(Matheson Scientific Co., Chicago, Illinois)를 利用하여 測定하였으며, DTH의 評價는 惹起注射하기 前後의 足蹠腫脹程度를 比較하여 實施하였다.

**BCG 血清:** 마우스를 1 mg의 BCG로 感染시켜 感染 2週後<sup>9)</sup>에 Pasteur pipette을 利用하여 採血하고 血清을 分離(以下 BCG 血清이라 約함)하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 保管하면서 實驗에 使用하였다.

마우스의 BCG 血清 處理는 免疫 2日前, 免疫과 同時, 免疫 2日後 및 免疫 4日後(惹起注射과 同時) 各各 다른 群의 마우스의 腹腔內에 0.5 ml의 BCG 血清을 1回 注射하였다. 또한 BCG 血清을 局所의 注射했을 때 DTH 發現에 미치는 影響을 알아보기 爲해서는 惹起注射할 때 SRBC를 BCG 血清에 浮遊시켜 左側後肢足蹠에 注射하였다. 對照群은 正常마우스의 血清을 같은 時期에 同一하게 處理하였다.

**統計處理:** 實驗群과 對照群間의 測定值의 有意性은 Student's t-test에 依하여 分析하였다.

## 成 績

BCG 血清이 SRBC에 對한 DTH의 發現에 미치는 影響: BCG 血清은 免疫 2日前, 免疫과 同時, 免疫 2日後 그리고 惹起注射과 同時에 腹腔內로 注入하였다. 그 結果, 第1圖에서 보는 바와 같이 BCG 血清은 免疫 4日後(惹起注射과 同時)에 處理했을 때만 正常마우스 血清으로 處理한 對照群의 DTH 發現值에 比하여 約 50% 減少되어 有意하게 DTH를 抑制하였다( $p < 0.05$ ). 또한 BCG 血清의 DTH 發現에 對한 局所效果(local effect)를 알아보기 爲하여 BCG 血清을 惹起注射 當時 SRBC와 함께 後肢足蹠에 注射하였다. 그 結果, 第2圖에서 보는 바와 같이 BCG 血清을 注射했을 때의 DTH는 對照群에 比하여 約 40%에 該當하여 BCG 血清을 局所의 處理했을 境遇에는 免疫反應을 有意하게 抑制하였다( $p < 0.05$ ). 이와 같이 BCG 血清을 惹起注射과 同時에 注射했을 때만이 免疫反應이 抑制된 結果로 미루어 BCG 血清 內에는 suppressor factor가 存在하며 이 suppressor factor는 다른 免疫調節 細胞에 影響을 주지 않고 그 自體로서 免疫反應의 抑制에 關與하는 것으로 推測되었다.

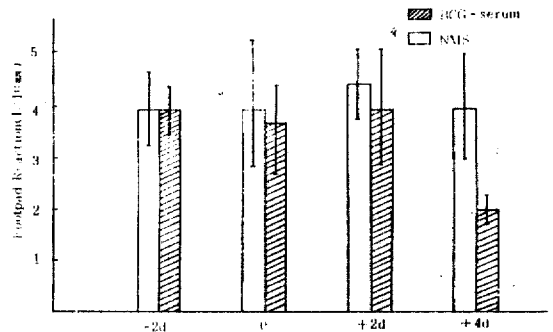


Figure 1. Effect of systemic administration of BCG-Serum Before or After Immunization

Fig. 1. Effect of systemic administration of serum from mice heavily infected with BCG(BCG-serum) on the development of DTH reaction to SRBC. Mice were immunized i.p. with  $10^7$  SRBC 4 days before footpad challenge and injected i.p. with BCG-serum (0.5ml) before(-) or after(+) immunization. Control groups received i.p. normal mouse serum (NMS). Footpad thicknesses were assayed 24 hr after challenge. Each bar represents mean  $\pm$  S.D. from 5 mice.

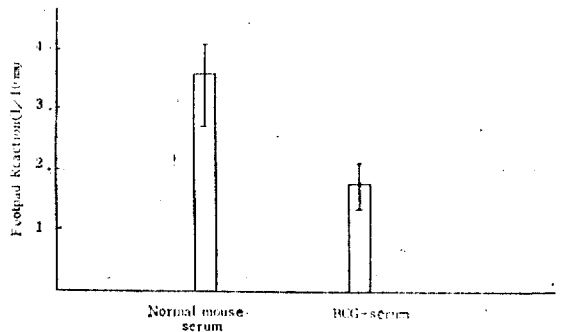


Fig. 2. Effect of local administration of BCG-serum on the development of DTH reaction to SRBC. At the time of challenge, BCG-serum(0.05 ml) was injected into footpad with  $10^8$  SRBC. Control group received normal mouse serum. Footpad thickness were assayed 24 hr after challenge. Each bar represents mean  $\pm$  S.D. from 5 mice

## 考 按

本 實驗結果, BCG 感染에 依해 細胞性 免疫反應이 抑制된 마우스의 血清 內에는 SBBC에 對한 免疫反應

을 抑制하는 suppressor factor가 存在함을 알 수 있었다.

著者の 境遇와 같이 抗酸性 細菌으로 感染시킨 動物의 血清을 對象으로 實施한 生體內 實驗은 찾아볼 수 없으나 Wadee 等<sup>6)</sup>은 사람의 血液內 單核細胞를 抗酸性 細菌과 함께 培養했을 때 adherent cell로부터 suppressor factor가 遊離되어 淋巴球의 blastogenesis를 抑制하며 또한 suppressor T cell을 活性化시켜 活性化된 suppressor T cell에 依해서도 免疫反應이 抑制된다고 報告하였다. Allen 等<sup>7)</sup>은 BCG로 感染시킨 마우스의 脾臟細胞를 培養했을 때 adherent cell로부터 正常마우스 脾臟細胞의 phytohemagglutinin에 對한 反應 및 마우스의 SRBC에 對한 DTH 發現을 抑制하는 物質이 遊離된다고 報告하였다. 以上の 報告로 미루어 本 實驗에서 BCG 血清의 免疫抑制는 BCG 感染에 依해 誘導된 suppressor cell에서 遊離된 suppressor factor에 依한 것으로 判斷되었으며 이 suppressor cell은 本 實驗만으로는 알 수 없으나 上記한 研究者들의 報告와 glass-adherent cell이 SRBC에 對한 DTH 發現을 抑制하였다는 李<sup>8)</sup>의 報告로 미루어 adherent cell로 생각되나 이에 關係서는 앞으로 더욱 追究해야 할 것이다.

BCG 血清의 免疫抑制作用은 免疫後 惹起注射와 同時에 投與했을 때만 觀察된 事實로 미루어 血清內의 suppressor factor가 Wadee 等<sup>6)</sup>의 報告와 같이 suppressor T cell을 活性化시켜 이루어진 것이 아니라 suppressor factor 自體에 依한 것으로 생각된다. 그러나 BCG 感染 마우스의 脾臟細胞를 培養하여 얻은 上 清液을 SRBC 免疫後 4日間 마우스의 靜脈內 注射하여 SRBC에 對한 DTH 發現이 抑制되었다는 Allen 等<sup>7)</sup>의 報告로 미루어 BCG 血清의 量, 投與回數 및 投與 時期를 달리 함으로써 다른 結果가 나올 수 있으리라 생각되었다.

이 suppressor factor의 性狀에 關係서는 거의 알려져 있지 않다. 다만, Kleinhenz 等<sup>14)</sup>이 結核患者의 血漿이 phytohemagglutinin 刺戟下에서 사람의 末梢血液 單核細胞의 blastogenesis를 抑制하는 데 이 抑制作用은 indomethacin에 依해 逆轉된다고 報告하여 suppressor factor와 prostaglandin과 密接한 關聯性이 있음을 示唆하였다. 그러나 李<sup>8)</sup>는 BCG 感染에 係해 抑制된 細菌性 免疫反應에 indomethacin이 影響을 미치지 못함을 報告하여 相反된 結果를 보여 주고 있다.

아래는 suppressor factor의 性狀 및 作用機轉은 本 實驗만으로는 알 수 없으나 이를 研究함으로써 抗酸性 細菌에 依한 感染症에 볼 수 있는 免疫抑制現象을 理

解하는 데 도움이 되리라 믿어진다.

## 結 論

多量의 BCG 感染에 依해 細胞性 免疫反應이 抑制된 마우스의 血清內에 suppressor factor의 存在有無를 알아보기 爲하여 本 實驗을 實施한 結果 다음과 같은 成績을 얻었다.

BCG 血清을 緬羊赤血球(SRBC)로 免疫 2日前, 免疫과 同時, 免疫 2日後 그리고 免疫 4日後(惹起注射와 同時)에 各各 다른 群의 마우스 腹腔內에 注射하였다. 그 結果, BCG 血清을 免疫 4日後에 처리했을 때만 SRBC 對한 DTH 發現을 有意하게 ( $p < 0.05$ ) 抑制하였다. 또한 BCG 血清의 局所의 效果를 알아보기 爲하여 BCG 血清을 惹起注射當時 SRBC와 함께 後肢足蹠에 注射했던 境遇에도 免疫反應을 有意하게 ( $p < 0.05$ ) 抑制하였다.

以上の 實驗으로 BCG 感染 마우스 血清內에는 免疫反應을 抑制시키는 suppressor factor가 存在함을 알 수 있었다.

## 參 考 文 獻

- 1) Ridley, D.S. and Jopling, W.H.: *Classification of leprosy according to immunity. A five group system. Int. J. Lepr.* 34 : 255, 1966.
- 2) Lenzini, L., Rottoli, P. and Rottoli, L.: *The spectrum of human tuberculosis. Clin. Exp. Immunol.* 27 : 230, 1977.
- 3) Mehra, V., Mason, L.H., Fielas, J.P. and Bloom, B.R.: *Lepromin-induced suppressor cells in patients with leprosy. J. Immunol.* 123 : 1813, 1979.
- 4) Mehra, V., Mason, L.H., Rothman, W., Reinherz, E., Schlossman, S.F. and Bloom, B.R.: *Delineation of a human T cell subset responsible for lepromin induced suppression in leprosy patients. J. Immunol.* 125 : 1183, 1980.
- 5) Ellner, J.J.: *Suppressor adherent cells in human tuberculosis. J. Immunol.* 121 : 2573, 1978.
- 6) Wadee, A.A., Sher, R. and Rabson, A.R.: *Production of a suppressor factor by human adherent cells treated with mycobacteria. J. Immunol.* 125 : 1380, 1980.
- 7) Allen, E.M., Sternick, J.L., Schrier, D.J. and

- Moore, V.L.: *BCG-induced chronic pulmonary inflammation and splenomegaly in mice: Suppression of PHA induced proliferation, delayed hypersensitivity to sheep erythrocytes, and chronic pulmonary inflammation by soluble factors from adherent spleen cells.* *Cell. Immunol.* 58: 61, 1981.
- 8) 李憲九: 免疫調節劑가 BCG 感染動物의 細胞性 免疫反應에 미치는 影響. 全北醫大論文集 7: 1, 1983.
- 9) Rook, G.A.W.: *The potentiating mitogenic and inhibitory effects of lymphocytes in vitro of macrophages in the lymph nodes of mice "overloaded" with mycobacterial products.* *Clin. Exp. Immunol.* 21: 163, 1975.
- 10) Bennett, J.A., Rao, V.S. and Mitchell, M.S.: *Systemic Bacillus Calmette-Guerin (BCG) activates natural suppressor cells.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 5, 142, 1978.
- 11) Orbach-Arbouys, S. and Poupon, M.F.: *Active suppression of in vitro reactivity of spleen cells after BCG treatment.* *Immunology.* 34: 431, 1978.
- 12) Watson, S.R. and Collins, F.M.: *Development of suppressor T cells in mice heavily infected with mycobacteria.* *Immunology.* 34: 431, 1978.
- 13) 吳鍾鉉, 李憲九, 河大有: *Corynebacterium parvum*이 緬羊赤血球에 對한 免疫反應에 미치는 影響, 大韓微生物學會誌. 15: 63, 1980.
- 14) Kleinhenz, M.E., Ellner, J.J., Spagnuolo, P.J. and Daniel, T.M.: *Suppression of lymphocyte responses by tuberculous plasma and mycobacterial arabinogalactan.* *J. Clin. Invest.* 68: 153, 1981.