

황색포도상구균에 대한 마우스의 지연성과민반응 발현

전북대학교 의과대학 미생물학교실

이헌구 · 최태훈 · 하대유

= Abstract =

Induction of Delayed-Type Hypersensitivity Reaction to *Staphylococcus aureus* in Mice

Hern-Ku Lee, Tai-Hoon Choi and Tai-You Ha

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

The development of delayed-type hypersensitivity(DTH) reaction to *Staphylococcus aureus* in mice was studied. Mice received 3 injections of 10^8 viable *S. aureus* subcutaneously showed a marked footpad swelling when mice were challenged with $10 \mu\text{g}$ staphylococcal protein antigen into footpad (The percent increase of footpad thickness at 24 h after challenge was 35% approximately). Histological observation of footpad of immunized mice showed a marked thickness of subcutaneous tissue due to edematous reaction and massive infiltration of lymphocytes and neutrophils which are characteristic cells in DTH reaction. Intensity of DTH reaction of mice immunized with viable bacteria was much higher than that of mice immunized with staphylococcal protein or heat-killed bacteria. The DTH reaction to *S. aureus* could be transferred to normal recipient mice by both spleen cells and lymph node cells.

서 론

세균에 대한 지연성 과민(delayed-type hypersensitivity, DTH) 반응은 항산성세균, 장티프스균, *Listeria monocytogenes* 및 부르셀라균 같은 세포내재성 세균(intracellular bacteria)에 대해서 잘 나타나며 이러한 세균의 감염으로부터 개체를 보호하는데 DTH 반응이 밀접한 관계가 있다는 사실도 잘 알려져 있다^{1,2}.

그러나 세균에 대한 DTH 반응은 비단 세포내재성 세균에 대해서 뿐만 아니라 세포외재성 세균(extracellular bacteria)인 황색포도상구균³ (*Staphylococcus aureus*)이나 *Streptococcus pyogenes*⁴에 대해서도 나타난다는 사실이 보고된 바 있다. 실험동물을 대상으로 황색포도상구균에 대한 DTH 반응을 발현시키기 위해서는 3회 이상 면역이 필요하며⁵ 이러한 동물의 비장세포를 황색포도상구균에서 유래한 항원으로 자극했을 때 유주억제인자(migration inhibition factor)가 유래되며 또한 비장세포를 동일항원 존재하에서 배양했을 때 비장세포의 blastogenesis가 항진되어 황색포도상구균에 의한 감염증에는 이 세균에 대한 특이적인 세포성면역반

응이 나타난다는 사실이 보고되었다⁶.

저자들은 포도상구균에 의해서 DTH 반응이 야기되는지를 확인하고자 본 실험을 실시하였으며 아울러 DTH 반응의 정도가 항원의 종류에 따라 어떻게 다르며 그리고 야기된 DTH 반응이 세포에 의해서 정상동물에 전달(transfer)되는가를 실험하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 8-10주된 C57BL/6마우스를 암수 구별없이 사용하였으나 실험군과 대조군은 항상 동성(sex-matched) 마우스를 사용하였다.

2. 균 주

본 실험에 사용한 균주로는 미국 University of California Los Angeles의 Grasmick, A.E. 교수로부터 분양받은 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 균주를 사용하였다.

3. 항 원

세균항원으로는 생균, 열처리균 및 단백질항원을 사용하였다. 생균항원으로는 황색포도상구균을 br-

ain-heart infusion broth (Difco Laboratories, Detroit, Michigan)에 증식시켜 멸균 생리식염수로 10,000 G에서 20분간 2회 원심분리하여 사용하였으며 열처리균은 위의 세균을 100°C에서 10분간 가열하여 사멸시켰다. 단백질 항원은 생균부유액을 Fisher sonifier (model 300)을 이용하여 얼음 위에서 30분간 초음파처리하여 균을 마쇄한 후 4°C에서 20,000 G로 20분간 원심분리 상층액을 단백질항원으로 사용하였다. 상층액은 여과멸균하여 -20°C에 보관하면서 사용하였고 단백질 농도는 Lowry방법¹⁰⁾에 의하여 측정하였다.

4. 면역

면역은 Tribble 등¹¹⁾의 보고를 참조하여 생균, 열처리균 및 단백질항원을 각각 1주 간격으로 3회에 걸쳐 실시하였다. 생균을 이용한 면역는 1×10^8 세포/ml의 생균부유액 0.1 ml을 마우스의 배정부 (dorsal neck) 피하에 주사, 면역하였으며 열처리균을 이용한 면역는 1×10^8 세포/ml의 균부유액 0.1 ml을 복강내 주사 면역하였다. 단백질항원을 이용한 면역는 단백질항원 (2mg/ml)과 동량의 complete Freund adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Michigan)을 혼합한 후 0.05 ml (50 µg 단백질/마우스)을 배정부 피하에 주사, 면역하였다.

5. DTH 반응 측정

황색포도상구균에 대한 DTH 반응의 측정은 Tribble 등¹¹⁾의 보고를 참조하여 족저종창반응 (footpad swelling reaction, FSR)으로 실시하였다. 즉 세 번째 면역 2주 후에 0.05 ml의 단백질항원 10 µg를 좌측후지족척 (left hind footpad) 피하에 야기 (elicitation) 주사하였다. FSR 정도는 야기 주사 직전 (T_0) 및 24시간 (T_{24}) 또는 48시간 (T_{48})에 mitutoyo engineer's micrometer를 이용하여 측정한 후 FSR 증가는 다음의 공식에 의하여 % increase로 표시하였다.

$$\% \text{ Increase} = \frac{(T_{24} \text{ or } T_{48} - T_0)/T_0}{T_0} \times 100$$

6. 세포전달

황색포도상구균에 대한 DTH 반응이 세포에 의해 전달되는지를 알아보기 위해 세포전달실험을 실시하였다. 생균으로 3차 면역하고 마지막 면역 2주 후에 마우스로부터 액와 및 세혜림파절 그리고 비장을 무균적으로 적출하여 세포부유액을 만들었다. Tris-ammonium chloride 완충액을 이용하여 적혈구를 제거시킨 후 3회 원심분리하여 5×10^8 세포/ml

로 재부유시켰다. 이 세포부유액 0.2 ml을 정상마우스의 尾정맥을 통하여 전달하고 전달 후 1시간 이내에 10 µg의 단백질항원으로 좌측후지피하에 주사하여 24시간 후에 DTH 반응을 측정하였다. 대조군으로서는 정상마우스의 임파절세포 또는 비장세포를 정상마우스에 전달하였다. 세포전달실험에 사용한 배지로는 penicillin 100 u/ml, streptomycin 100 µg/ml, L-glutamine 2mM 그리고 56°C에서 30분간 열처리한 fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY)이 5%되게 첨가한 RPMI 1640 배지 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan)를 사용하였다.

7. 조직표본

황색포도상구균에 대한 DTH 반응을 조직학적으로 확인하기 위하여 DTH 반응을 나타낸 마우스의 족척을 절단하여 중성 완충 포르말린액에 고정하였다. 이를 파라핀 包埋 후 3-5 µm 두께로 細切하여 hematoxylin-eosin (HE) 염색을 실시하여 현미경으로 관찰하였다.

성적

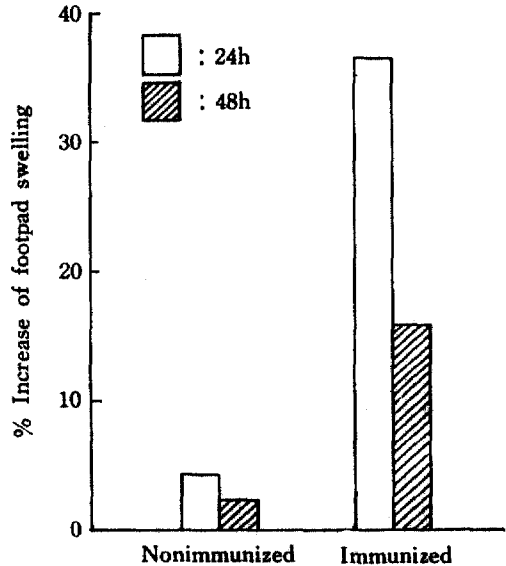


Fig. 1. Induction of DTH reactions to *S. aureus*. Mice were immunized 3 times weekly with 10^8 viable *S. aureus* subcutaneously and were challenged with 10 µg of staphylococcal protein antigen 2 weeks after the last immunization. Nonimmunized control group was only challenged with protein antigen. Footpad swelling was measured at 24 h (□) and 48 h (■) after challenge. Each column represents mean of 5 mice.

Fig. 2. Histological section of footpad from nonimmunized control mice(A) and mice immunized 3 times with 10^8 viable *S. aureus* (B). Figure A shows no histological abnormalities. Figure B shows edematous reaction and a massive infiltration of lymphocytes and neutrophils (H & E stain, x200).

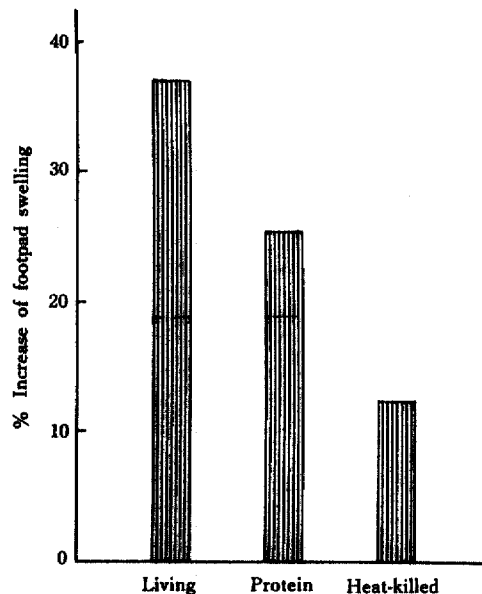


Fig. 3. DTH reactions to viable *S. aureus*, staphylococcal protein antigen and heat-killed *S. aureus*. Each group of mice was immunized 3 times weekly with 10^8 viable *S. aureus* subcutaneously, 50 μ g of protein antigen in complete Freund adjuvant subcutaneously and 10^8 heat-killed *S. aureus* intraperitoneally, respectively. Mice were challenged with 10 μ g protein antigen 2 weeks after the last immunization. Footpad swelling was measured at 24 h after challenge. Each column represents mean of 5 mice.

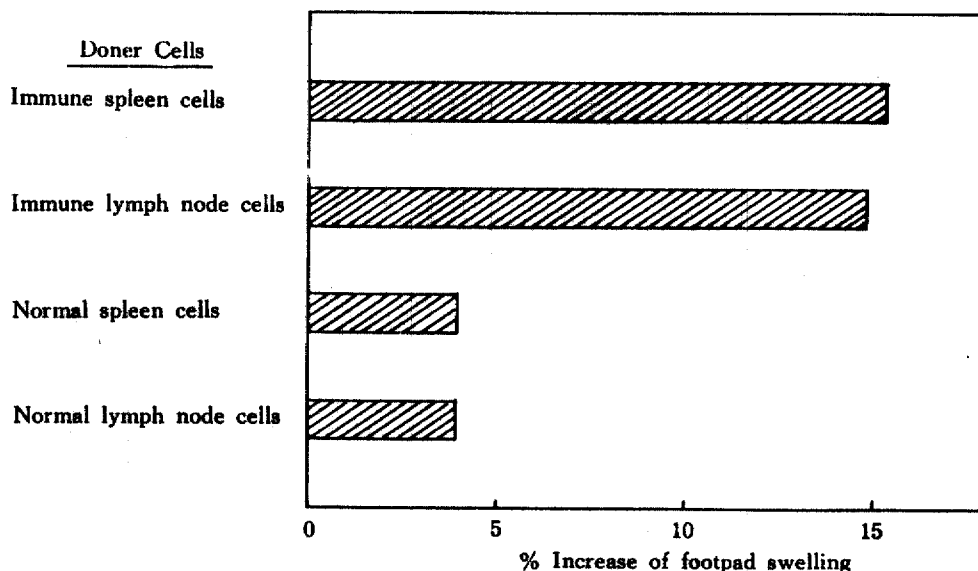


Fig. 4. Adoptive transfer of DTH reaction to *S. aureus* by both spleen and lymph node cells. Mice were immunized 3 times weekly with 10^8 viable *S. aureus* and 2 weeks after the last immunization, spleen and axillary and inguinal lymph node were collected. After single cell preparation 10^8 spleen cells or 10^8 lymph node cells were transferred to normal recipient mice. Normal control recipient mice were challenged with 10 μ g protein antigen within 1 h of cell transfer. Footpad swelling was measured 24 h after cell transfer. Each column represents mean of 4 mice.

1. 황색포도상구균에 대한 DTH 반응의 발현

세포외재성세균인 황색포도상구균에 대한 DTH 반응이 나타나는지를 알아보기 위하여 10⁸의 생균을 3회 면역을 실시하고 마지막 면역 2주후에 10 μg의 단백질항원으로 야기주사하였던바 제 1도에서와 같이 야기주사 24시간 후에는 약 35% 정도의 현저한 FSR의 증가를 보였으며 48시간 후에는 그 반응의 절반정도로 감소하였다. 이러한 반응이 DTH 반응이라는 사실을 확인하기 위하여 족척에 나타난 변화를 조직표본을 만들어 조직학적으로 관찰하였다. 그 결과 제 2도에서와 같이 면역하지 않고 단지 단백질항원만을 주사한 대조군의 족척(2-A)에서는 아무런 형태학적 변화를 관찰할 수 없었으나 생균으로 면역한 실험군의 족척(2-B)에서는 현저하게 피하조직의 두께가 증가하고 많은 세포의 침윤을 볼 수 있었는데 이 세포들은 대부분 임파구와 중성백혈구로서 황색포도상구균의 감염때 족척에 야기주사함으로써 나타나는 반응은 전형적인 DTH 반응이라는 사실을 알 수 있었다.

2. 항원의 종류 및 투여경로가 DTH 반응 발현에 미치는 영향

생균, 열처리균 및 단백질항원을 이용하여 투여 경로를 달리 면역한 결과 제 3도에서와 같이 생균을 피하로 면역했을 경우 DTH 반응이 가장 높았으며 열처리균을 복강내로 면역했을 때는 DTH 반응이 가장 낮아 생균으로 면역했을 경우에 비해 1/3에 불과하였다.

3. 세포에 의한 DTH 반응의 전달

생균으로 3회 면역한 마우스로부터 얻은 임파절세포 또는 비장세포를 각각 다른 군의 정상마우스에 전달하였을 때 제 4도에서와 같이 두 종류의 세포에 의해 동일한 정도의 DTH 반응이 전달되었다.

이상의 실험결과로 포도상구균에 의한 감염때 이 균에 대한 DTH 반응이 나타나며 이 반응은 세포에 의해 전달됨을 알 수 있었다.

고 찰

본 실험결과 10⁸의 살아있는 황색포도상구균으로 3회 면역을 실시했을 때 이 균에 대한 DTH 반응이 발현됨을 FSR(제 1도) 및 조직표본(제 2도)을 통하여 확인하였다. 즉 면역하지 않고 단백질항원만을 주사한 마우스의 족척에는 조직학적으로 아

무런 변화가 없는 반면 생균으로 면역한 마우스의 족척은 부종을 동반함과 아울러 DTH 반응에서 특징적으로 관찰할 수 있는 임파구 및 중성백혈구가 다량으로 침윤¹⁾된 사실로 미루어 포도상구균에 대한 FSR은 전형적인 DTH 반응이라는 사실을 확인할 수 있었다.

마우스에서 황색포도상구균에 대한 DTH 반응을 발현시키기 위해서는 10⁸의 생균으로 적어도 3회 이상 면역을 실시해야 하는 것으로 알려져 있다. Tribble 등²⁾은 10⁸의 살아있는 황색포도상구균으로 1회에서 8회까지 서로 다른 군의 마우스에 면역을 실시했을 때 면역 3회째에 이 균에 대한 DTH 반응이 높게 나타난 후 면역횟수가 다시 증가함에 따라 반응이 점차 감소하였다가 면역 7회째에 다시 2번째의 상승치를 나타내었다고 보고하였는데 면역을 3회만 실시한 본 실험에서는 FSR이 35% 정도 증가하여 현저한 DTH 반응의 발현을 관찰할 수 있었다.

또한 황색포도상구균에 대한 DTH 반응이 잘 나타나기 위해서는 죽은 균보다 살아있는 균으로 면역을 실시해야 하는데(제 3도) 그 이유에 대해서는 알 수 없지만 Tribble 등²⁾도 살아있는 균으로 면역했을 때는 열처리하여 죽은 균으로 면역했을 때보다 DTH 반응이 3배 정도 더 높게 나타나 본 실험성과 동일한 결과를 나타내었다.

세포성면역반응에서 관찰할 수 있는 특징중의 하나는 이 면역반응은 세포에 의해 정상 동물에 전달될 수 있다는 사실인데 본 실험에서도 면역한 마우스의 비장세포 및 임파절세포에 의해 동일한 정도의 DTH 반응이 정상 마우스에 전달됨을 관찰할 수 있었다(제 4도). Boren 등³⁾은 10⁸의 생균을 피하로 면역했을 때 면역횟수에 따라 비장세포 및 임파절세포가 황색포도상구균의 항원에 대한 반응도가 차이가 있음을 보고하였다. 즉 면역을 실시한 후 임파절세포 및 비장세포를 항원 존재하에서 배양했을 때 면역횟수가 증가함에 따라 임파절세포의 경우는 세포의 blastogenesis가 감소하는 반면 비장세포는 면역횟수가 3회까지 증가함에 따라 그 정도는 임파절세포의 반응에 비해 약하지만 blastogenesis가 증가됨을 보고하였다. 따라서 이러한 사실에 입각하여 본 실험에서 비장세포에 의한 DTH 반응이 임파절세포에 의한 DTH 반응과 동일한 정도로 전달된 사실은 3회까지 면역을 실시했을 경우 포도상구균에 대한 비장세포의 자극이 증가되었다는 사실을 알 수 있었다.

결 론

마우스에서 황색포도상구균에 대한 지연성 과민 반응(DTH 반응)에 관한 실험을 실시하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

마우스의 배정부 피하에 10^8 의 살아있는 황색포도상구균으로 일주일 간격으로 3회 면역을 실시한 후 마지막 면역 2주 후에 황색포도상구균의 단백질항원을 피하에 야기주사했을 때 DTH 반응은 약 35% 증가하였으며 이를 조직학적으로 관찰하였을 때 많은 임파구와 중성백혈구의 침윤을 볼 수 있었다.

항원의 종류 및 투여경로가 DTH 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 살아있는 균, 열처리균 및 단백질항원으로 면역을 실시한 결과 DTH 반응은 생균을 피하로 면역한 경우가 가장 높았으며 열처리균을 복강내로 면역한 경우가 가장 낮았다.

세포전달(cell transfer) 실험을 실시한 결과 황색포도상구균에 대한 DTH 반응은 면역을 실시한 마우스의 비장세포 및 임파절세포에 의해 정상 마우스에 전달되었다.

이상의 성적으로 황색포도상구균에 대한 DTH 반응이 마우스에서 발현된다는 사실과 이 반응은 세포에 의해 전달됨을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Bolen J B and Tribble J L: Delayed hypersensitivity to *Staphylococcus aureus* in mice: Kinetics of induction. *Immunology*. 48: 239, 1983.
- 2) Collins F M and Mackaness G B: Delayed hypersensitivity and arthus reactivity in relation to host resistance in salmonella-infected mice. *J. Immunol.* 101: 830, 1968.

- 3) Collins F M and Montalvine V: Relative immunogenicity of streptomycin-sensitive and -resistant strains of BCG. *Injec. Immun.* 8:381, 1973.
- 4) Fauve R M and Dekaris D: Macrophage spreading: inhibition in delayed hypersensitivity. *Science*. 160: 795, 1968.
- 5) Lau H S and Scherago M: Leukocyte hypersensitivity in experimental group A streptococcal infection. *J. Bacteriol.* 94:1722, 1967.
- 6) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L and Randall R J: Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
- 7) Sandok P L, Hinsdill R D and Albercht R M: Migration inhibition of mouse macrophage by Brucella antigens. *Injec. Immun.* 4:516, 1971.
- 8) Taubler, J H: Staphylococcal delayed hypersensitivity in mice. I Induction and *in vitro* demonstration of delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 101: 546, 1968.
- 9) Taubler J H and Mudd S: Staphylococcal hypersensitivity in mice. II. *In vitro* demonstration and specificity of delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 101: 550, 1968.
- 10) Tribble J L and Boren J B: Induction and specificity of delayed hypersensitivity to *Staphylococcus aureus* in mice. *Immunology* 35:21, 1978.
- 11) Tribble J L and Bolen J B: Delayed hypersensitivity to *Staphylococcus aureus* in mice: *in vitro* responses to isolated staphylococcal antigens. *Immunology* 38: 819, 1979.
- 12) Turk J L: Delaye Hypersensitivity, 2nd ed. Vol 4 in : Frontiers of Biology. North Holland, 1975.