

Mycobacterium bovis 感染이 化學的으로 誘發된 遲延型 皮膚過敏症에 미치는 影響

李採琿 · 李政吉 · 朴永竣
全南大學校 農科大學 獸醫學科
(1986. 7. 23 接受)

Chemically-Induced Delayed Cutaneous Hypersensitivity in Guinea Pigs and Rabbits Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*

Chai-yong Lee, Chung-gil Lee and Young-jun Park

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

(Received July 23th, 1986)

Abstract: In order to evaluate the effects of the cell-mediated immunity of the animal in the chronic diseases the guinea pigs and rabbits were inoculated with *Mycobacterium bovis*. After 6 weeks these animals were sensitized and challenged with 2,4-dinitrochlorobenzene.

The cutaneous reactions observed in these animal species were similar each other. Macroscopic and microscopic responses in the animal experimentally infected with *M. bovis* were markedly reduced compared to those in the control animals. The results indicated that the cell-mediated immunity of the animals was depressed by infection of *M. bovis*.

緒 論

細胞性 免疫의 機轉을 밝히기 위한 研究에 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)이 자주 利用되고 있다(Ti-wary와 Goel, 1985; Awadhiya 등, 1982; Rajan 등, 1982; Schultz와 Maguire, 1982; Raddi 등, 1981; Jennings, 1979; Catalona와 Chretien, 1973; 李採琿 등, 1986, 1984). DNCB에 의한 遲延型 皮膚過敏症은 患畜의 免疫狀態를 測定할 수 있게 해 주며, 惡性疾病에 걸린 患畜의 豫後判定에 指針이 된다.

本 研究에서는 慢性疾患이 動物의 免疫能에 미치는 影響을 調査하기 위하여 기니픽과 토끼에 *Mycobacterium bovis*를 接種하여 結核을 유발시킨 다음 DNCB로 遲延型 皮膚過敏症을 일으켰다.

材料 및 方法

菌株 : 使用된 菌株는 *Mycobacterium bovis* strain

AN5이었다.

菌培養 : Dorset-Henley 合成液體培地(Jawetz 등, 1976)를 사용하여 37°C에서 6~8週 培養한 다음 다시 sauton 培地에서 4週間 培養한 것을 사용하였다.

接種 : 培養된 菌을 生理食鹽水에 부유시키고 잔여 덩어리는 5초간 sonic vibration시켜 균질화(Collinins와 Auclair, 1984; Gillespie와 Timoney, 1981; Jawetz 등, 1976; Collinins 등, 1974)한 것을 菌量이 10mg/ml되도록(宮川 등, 1967) 生理食鹽水에 稀釋하여 즉시 實驗動物의 肩胛部 皮下와 腹腔內로 各各 0.1ml (1mg/ml)씩 接種하였다.

感染確認 및 豫備實驗 : 菌接種 4週後에 通常의 方法에 準하여 感染與否를 確認하였다(Gillespie와 Timoney 1981; Jawetz 등, 1976). 本實驗에 앞서 感染된 動物에서 反應이 顯著하게 減少되는 時期를 알아보기 위하여 18마리의 기니픽으로 豫備實驗을 實施하였는데, 接種後 2週間隔으로 反應을 觀察하였던 바 6週째부터 反應

이 減少하기 始作하였다.

抗原 : 이미 報告된 기니픽(李採琿 등, 1984)이나 오리 및 닭(李採琿 등, 1986)에서와 같은 抗原을 사용하였다.

實驗動物 : 1年生 Hartley guinea pig 11마리와 1年生 재래종 토끼 10마리를 사용하였다.

感作 : 接種시킨 8週後에 이미 報告된 기니픽(李採琿 등, 1984)에서와 같은 方法으로 實施하였다.

그밖에 攻擊, 皮膚測定 그리고 病理組織學的 檢査도 이미 報告된 기니픽(李採琿 등, 1984)이나 오리 및 닭(李採琿 등, 1986)에서와 같은 方法으로 DNCB를 適用하여 實施하였다. 病理學的 檢査에 있어 上部眞皮層과 深部眞皮層에 存在하는 細胞의 數는 各各 高倍率($\times 100$)下에서 10個의 視野에 나타난 數를 계산한 다음 한 視野의 平均値를 求하였다.

結 果

기니픽에 人工的으로 *M. bovis*를 接種하고 4週後에 ophthalmic test로 感染을 確認하였다(Fig. 1). 그 2週後에 DNCB로 感作시키고 14日後에 攻擊한 다음 皮膚의 反應을 檢査한 結果 *M. bovis*를 接種하지 않은 對照群에서는 顯著한 反應이 나타난 反面 實驗群에서는 매우 輕微한 反應이 觀察되었다. 皮膚反應의 크기는 Table 1에 나타내었다. 攻擊당한 部位의 皮膚直徑 增加는 平均 15.12 \pm 3.04mm(24時間後)와 3.72 \pm 2.24mm(48時間

後)이었으며, 두께의 增加는 平均 0.30 \pm 0.09mm(24時間後)와 0.04 \pm 0.06mm(48時間後)이었다. 이러한 反應은 48時間後부터 급격히 줄어들어 3~5日後에는 거의 正常으로 回復하였다.

攻擊 24時間後에 採取된 皮膚生檢材料를 病理組織學的으로 觀察하여 본 結果 對照群에 比하여 매우 輕微한 炎症細胞의 浸潤이 觀察되었는데(Fig. 2), 單核細胞(淋巴球)와 好中球가 거의 같은 比率로 存在하였다. 浸潤細胞를 分別計算하여 본 結果 攻擊 24時間後에 上部眞皮層에서 觀察된 單核細胞(淋巴球)는 平均 34.80 \pm 1.37개이었으며, 好中球는 平均 32.90 \pm 1.85개이었다. 深部眞皮層에는 單核細胞가 平均 9.57 \pm 1.01개이었으며, 好中球는 平均 9.05 \pm 0.69개가 存在하였다(Table 2).

攻擊 48時間後의 組織學的 所見도 24時間後의 所見과 크게 다르지는 않았으나 炎症細胞 浸潤의 程度가 顯著하게 減少하였다(Fig. 3). 한편 病理組織學的 檢査를 위하여 組織을 摘出한 部位의 創傷治癒도 對照群에 比하여 實驗群에서는 遲延되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

토끼에도 人工的으로 *M. bovis*를 接種하여 4週後에 感染을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 皮膚反應은 Table 3에서와 같이 對照群에서는 甚한 反應이 나타난 反面 實驗群에서는 매우 輕微한 反應이 觀察되었다. 皮膚反應의 直徑 增加는 平均 0.29 \pm 0.20mm(24時間後)와

Table 1. Size of the Skin Reaction Before and After Sensitization with DNCB in the Guinea Pigs Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis* (AN5) at 8 Weeks Post-Infection

No. of Guinea pig	Before challenge		24 Hours after challenge		48 Hours after challenge	
	Diameter(mm)	Thickness(mm)	Diameter(mm)	Thickness(mm)	Diameter(mm)	Thickness(mm)
10	30.00*	0.60*	48.30	1.08	36.38	0.68
11	30.00	0.68	45.35	0.98	31.15	0.65
12	30.00	0.73	47.55	1.00	37.28	0.70
13	30.00	0.58	44.75	0.98	34.65	0.68
14	30.00	0.82	50.15	1.10	29.50	0.97
15	30.00	0.55	43.60	0.84	33.50	0.65
16	30.00	0.73	43.80	0.95	33.70	0.75
17	30.00	0.80	39.25	1.03	34.00	0.88
18	30.00	0.70	43.30	0.93	33.30	0.76
Mean(\pm SE) increase after challenge			15.12 \pm 3.04	0.30 \pm 0.09	3.72 \pm 2.24	0.04 \pm 0.06
Control						
19	30.00	0.78	54.15	1.93	44.15	1.24
20	30.00	0.82	56.25	2.24	48.20	1.92

* Each value represents the mean of determinations at 2 sites.

Table 2. Tissue Mononuclear Cell and Neutrophil Response in DNCB-Treated Guinea Pig Skin Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*

No. 05 Guinea pig	24 hours after challenge				48 Hours after challenge			
	Superficial dermis		Deep dermis		Superficial dermis		Deep dermis	
	MNC	NP	MNC	NP	MNC	NP	MNC	NP
1	32.85*	29.85*	10.95	9.85	15.35	14.35	8.05	7.45
2	35.70	34.20	9.20	8.80	15.45	15.80	7.65	6.80
3	35.85	34.65	8.55	8.50	15.25	14.60	8.60	7.60
Mean(\pm SE)	34.80 \pm 1.37	32.90 \pm 1.85	9.57 \pm 1.01	9.05 \pm 0.69	15.35 \pm 0.08	14.25 \pm 0.33	8.10 \pm 0.39	7.28 \pm 0.35
Control	168.03	168.03	47.28	47.28	92.80	92.80	26.40	26.40

* Mean(\pm SE) number of mononuclear cells(MNC) and neutrophils(NP) per one microscopic field (\times 1000).

Table 3. Biometry of the Skin Reaction Before and After Sensitization with DNCB in the Rabbit Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis* at 8 Weeks Post-Infection

No. of Rabbit	Before challenge		24 Hours after challenge		48 Hours after challenge	
	Diameter(mm)	Thickness(mm)	Diameter(mm)	Thickness(mm)	Diameter(mm)	Thickness(mm)
1	30.00*	0.35*	30.50	0.38	30.23	0.35
2	30.00	0.55	30.00	0.57	30.00	0.55
3	30.00	0.48	30.00	0.50	30.00	0.48
4	30.00	0.44	30.75	0.53	30.24	0.46
5	30.00	0.48	30.30	0.55	30.08	0.50
6	30.00	0.43	30.05	0.48	30.05	0.43
7	30.00	0.50	30.35	0.55	30.08	0.52
8	30.00	0.20	30.35	0.31	30.08	0.25
Mean(\pm SE) increase after challenge			0.29 \pm 0.20	0.06 \pm 0.03	0.10 \pm 0.08	0.01 \pm 0.02
Control						
1	30.00	0.43	51.60	0.75	49.75	0.65
2	30.00	0.63	60.65	1.33	53.35	0.87

* Each value represents the mean of determinations at 2 sites.

Table 4. Tissue Mononuclear Cell and Neutrophil Response in DNCB-Treated Rabbit Skin Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*

No. of Rabbit	24 Hours after challenge				48 Hours after challenge			
	Superficial dermis		Deep dermis		Superficial dermis		Deep dermis	
	MNC	NP	MNC	NP	MNC	NP	MNC	NP
1	37.40*	32.10*	9.40	5.80	15.10	10.20	9.00	7.80
2	39.00	33.80	8.05	4.95	15.60	10.40	7.25	5.65
3	17.00	12.20	7.85	5.05	15.20	10.20	7.75	5.85
Mean(\pm SE)	31.17 \pm 9.30	26.03 \pm 9.81	8.43 \pm 0.69	5.27 \pm 0.38	15.30 \pm 0.22	10.27 \pm 0.08	7.98 \pm 0.73	6.43 \pm 0.97
Control	37.00	37.00	15.40	15.40	16.00	16.00	9.50	9.50

* Mean(\pm SE) number of mononuclear cells(MNC) and neutrophils(NP) per one microscopic field (\times 1000).

0.10±0.08mm(48時間後)로 輕微한 增加를 보였다. 두께의 增加는 平均 0.06±0.03mm(24時間後)와 0.01±0.02mm(48時間後)이었다. 이러한 反應은 48時間後부터 급격히 줄어들어 3~5日後에는 거의 正常으로 回復하였다.

攻擊 24時間後에 採取된 皮膚生檢材料를 病理組織學的으로 觀察한 바, 對照群에 比하여 輕微한 炎症細胞의 浸潤이 觀察되었는데, 主로 單核細胞와 好中球이었다 (Fig. 6). 浸潤細胞를 分別計算하여 본 結果 攻擊 24時間後의 上部眞皮層에서 觀察된 單核細胞(淋巴球)는 平均 31.17±9.30개이었으며, 好中球은 平均 26.03±9.81개로서 對照群과 큰 差異는 없었다. 深部眞皮層에서는 單核細胞(淋巴球)가 平均 8.43±0.69개, 好中球은 平均 5.27±0.38개이었다 (Table 4). 攻擊後 48時間의 組織學的 所見은 炎症細胞數의 減少가 있었을 뿐 24時間後의 所見과 類似하였다 (Fig. 7). 한편 기니픽에서와 마찬가지로 組織을 摘出した 部位의 創傷治癒가 實驗群에서는 顯著하게 遲延되었다 (Fig. 8).

考 察

기니픽과 토끼를 *M. bovis*로 感染시킨 다음 DNCB를 適用하여 アレルギー性 皮膚炎을 惹起시키고 그 病變을 肉眼的 및 病理組織學的으로 觀察하였다. 皮膚의 變化는 기니픽과 토끼에서 서로 類似하였으며, 實驗의 結果를 綜合하면 菌에 感染된 動物에서 나타난 反應은 對照群에서 나타난 反應에 比하여 顯著하게 줄어든 것이었다.

기니픽이나 토끼에서 다 같이 *M. bovis*에 의한 感染은 接種 4週後에 ophthalmic test (Gillespie와 Timoney, 1981; 宮川 등, 1967)로 確認하였는데 眼粘膜의 뚜렷한 發赤現象이 觀察되었다. 感染은 그후 皮膚反應의 減少로 다시 確認되었으며, 病理組織學的 檢查를 위하여 摘出した 皮膚創傷의 治癒가 對照群에 比하여 遲延된 現象도 感染의 한 症狀으로 생각된다.

免疫系가 正常인 個體와는 달리 惡性腫瘍이나 結核, 假性結核 또는 真菌感染症에 罹患된 個體에서는 細胞性 免疫反應이 侵害를 받아서 DNCB를 適用하게 되면 皮膚過敏反應이 顯著하게 減少된다 (Wells, 1984; Lee 등, 1975; Catalona 등, 1973; Catalona와 Chretien, 1973; 이용구, 1982). 따라서 皮膚過敏症의 測定은 곧 慢性疾病에 罹患된 動物의 細胞免疫能을 測定할 수 있으므로 그 疾病의 豫後判定에 하나의 指針이 된다. 그러나 지금까지 DNCB를 特定の 動物疾病

에 適用한 예는 찾아보기 어려운 실정이며, 사람의 경우에는 結核과 腫瘍患者에 가끔 適用되고 있다 (Lee 등, 1975; Catalona 등, 1973; Catalona와 Chretien, 1973; 이용구, 1982).

本實驗에서 나타난 肉眼的인 皮膚變化를 보면 기니픽과 토끼에서 다같이 對照群에 比하여 實驗群에서는 反應의 程度가 顯著하게 減少되었는데 그 減少의 幅이 病變部의 直徑에 있어서는 기니픽보다 토끼에서 큰 反面 두께에 있어서는 그 反對의 現象을 나타냈다. 이러한 現象은 攻擊後 24時間과 48時間에 똑같이 나타났다. 이와 같은 直徑의 差異는 皮膚의 構造, 즉 기니픽의 皮膚에 비해서 토끼의 皮膚가 얇은 것과 관계가 있는 것 같다. 한편 두께의 差異를 浸潤된 細胞數와 관련지어 볼 때 對照群과 實驗群間의 減少幅이 큰 기니픽에서는 浸潤細胞數에도 差異가 많은 反面 減少幅이 비교적 작은 토끼에서는 浸潤되어 있는 細胞의 數에 差異가 적음을 알 수 있다. 이러한 現象은 炎症部位의 腫脹이 水腫과 細胞浸潤에 의하여 나타난다는 것을 시사해 주는 것으로 水腫現象이 甚하지 않은 炎症反應의 경우에는 腫脹, 즉 두께의 增加와 浸潤되는 細胞數 사이의 關係를 밝혀낼 수 있는 資料가 될 수 있어 앞으로의 組織計量學的 研究가 기대된다.

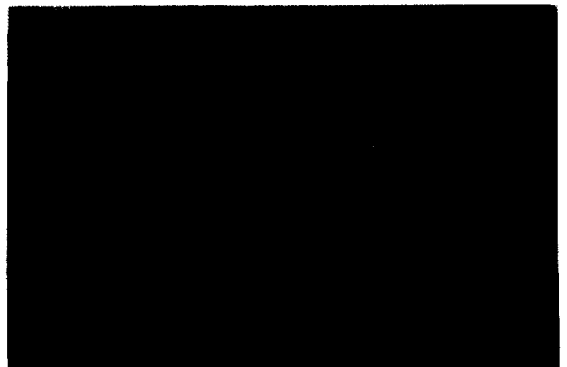
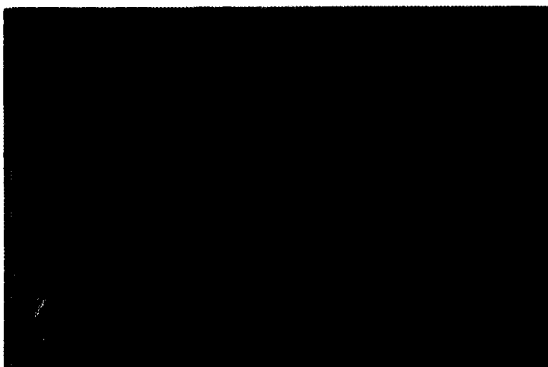
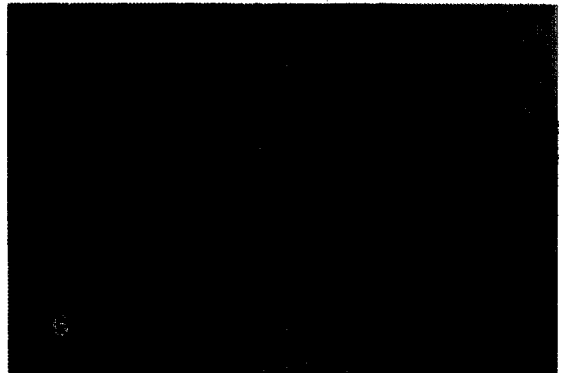
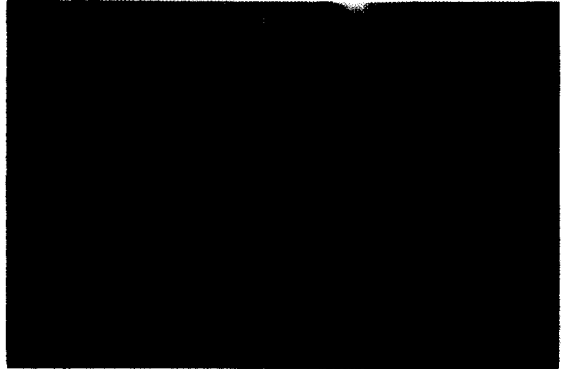
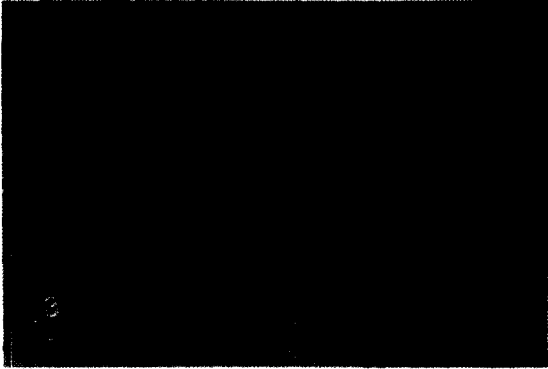
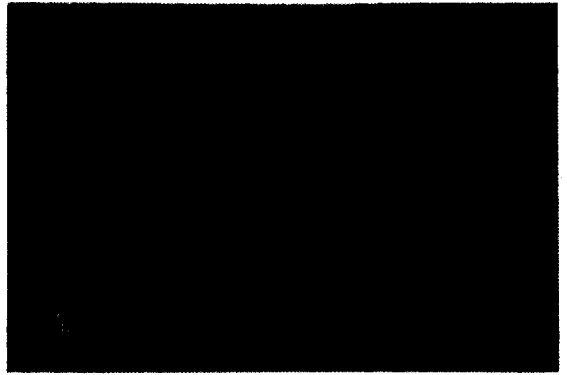
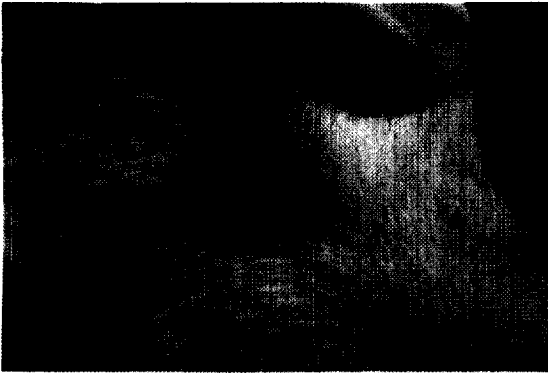
皮膚過敏症은 臨床에서 疾病의 豫後判定에 利用되는 것이며 (Catalona 등, 1973; Catalona와 Chretien, 1973; 이용구, 1982), 豫後の 判定은 所要時間이 짧을수록 좋은 것이다. 本實驗에서는 DNCB로 感作하고 14日後에 攻擊을 實施하였는데 이 14日是 臨床에 適用하기는 좀 긴 時間이라 생각되며 앞으로의 研究는 感作回數를 增加시키는 등 實驗方法을 변경하여 攻擊에 必要한 日數를 단축시키는 方向으로 試圖되는 것이 바람직하다 하겠다.

結 論

慢性疾患이 細胞性 免疫에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 기니픽과 토끼에 *Mycobacterium bovis*를 實驗的으로 感染시킨 후 DNCB를 適用하여 皮膚의 反應을 觀察하였다. 皮膚의 變化는 두 가지 動物에서 類似하였으며, 菌에 感染된 動物에서 나타난 肉眼的 및 病理組織學的 反應은 對照群에서 나타난 反應에 比하여 顯著하게 줄어든 것이었다. 이러한 現象은 기니픽과 토끼에서 *M. bovis*의 感染으로 細胞性 免疫系가 抑壓된 것으로 推測되었다.

Legends for Figures

- Fig. 1.** The ophthalmic test in the guinea pig experimentally infected with *Mycobacterium bovis* strain AN5. Hyperemia on the conjunctiva and eye wax were noted 4 hours after the application of Koch's OT.
- Fig. 2.** The skin of the guinea pig experimentally infected with *M. bovis*. Note the moderate infiltration of inflammatory cells in the dermis 24 hours after challenge with DNCB. H-E stain. $\times 200$.
- Fig. 3.** Guinea pig skin experimentally infected with *M. bovis* 48 hours after challenge with DNCB. Cell infiltrations are severe than those noted at 24 hours after challenge. H-E stain. $\times 200$.
- Fig. 4.** The skin of the guinea pig experimentally infected with *M. bovis*. Unlike in the normal guinea pig, the wound is not healed until 7 days after skin biopsy.
- Fig. 5.** The ophthalmic test in the rabbit experimentally infected with *Mycobacterium bovis* strain AN5. Hyperemia on the conjunctiva and eye wax were noted 4 hours after the application Koch's OT.
- Fig. 6.** The skin of the rabbit experimentally infected with *M. bovis*. Note the moderate infiltration of inflammatory cells in the dermis 24 hours after challenge. H-E stain. $\times 200$.
- Fig. 7.** Rabbit skin experimentally infected with *M. bovis* 48 hours after challenge with DNCB. Cell infiltrations are less severe than those noted 24 hours after challenge. H-E stain. $\times 200$.
- Fig. 8.** The skin of the rabbit experimentally infected with *M. bovis*. Unlike in the normal guinea pig, the wound is not healed until 7 days after skin biopsy.



參 考 文 獻

- Awadhiya, R.P., Vegad, J.L. and Kolte, G.N. (1982) Eosinophil leukocytic response in dinitrochlorobenzene skin hypersensitivity reaction in the chicken. *Avian Path.*, 11:187~194.
- Catalona, W.J., Sample, W.F. and Chretien, P.B. (1973) Lymphocyte reactivity in cancer patients: Correlation with tumor histology and clinical stage. *Cancer*, 31:65~71.
- Catalona, W.J. and Chretien, P.B. (1973) Abnormalities of quantitative dinitrochlorobenzene sensitization in cancer patients: Correlation with tumor stage and histology. *Cancer*, 31:353~356.
- Collinins, F.M., Wayne, L.C. and Montalbino, V. (1974) The effect of cultural conditions on the distribution of *M. tuberculosis* in the spleens and lungs of specific pathogen-free mice. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 110:147.
- Collinins, F.M. and Auclair, L.K. (1984) Effect of *Mycobacterium bovis* (BCG) infection on the kinetics of the mononuclear cell response within the lung. *J. Leukocyte Biol.*, 36:321~333.
- Gillespie, J.H. and Timoney, J.F. (1981) Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic Animals. 7th ed., Cornell Univ., pp.247~267.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. (1976) *Mycobacteria*. Review of Medical Microbiology. 13th ed., Lange, California, pp. 202~206.
- Jennings, P.A. (1979) Leucocyte adherence inhibition: A microassay demonstrating antigen recognition in cattle: *Res. Vet. Sci.*, 26:111~113.
- Lee, Y.N., Sparks, F.C., Eilber, F.R. and Morton, D.L. (1975) Delayed cutaneous hypersensitivity and peripheral lymphocyte counts in patients with advanced cancer. *Cancer*, 35:748.
- Rajan, A., Vikramreddy, M., Sreekumaran, T., Valsas, K.V. and Vikayan, N. (1982) Evaluation of the cell-mediated immune response in pigs using 2, 4-dinitrochlorobenzene. *Vet. Rec.*, 110:173~174.
- Reddi, M.V., Rajan, A. and Sulochana, S. (1981) Evaluation of the cell mediated immune response in cattle induced by 2, 4-dinitrochlorobenzene. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 2:483~489.
- Schultz, K.T. and Maguire, H.C. (1982) Chemically-induced delayed hypersensitivity in the cat. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 3:585~590.
- Tiwary, B.K. and Goel, M.C. (1985) Contact sensitivity to DNCB in normal and cell-mediated immunity deficient chickens: In vivo detection and correlation with lymphocyte transformation and graft-versus-host reaction. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 8:329~339.
- Wells, J.V. (1984) Immune Mechanisms in Tissue Damage. In *Basic and Clinical Immunology* edited by Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H. and Wells, J.V., 5th ed. Lange, California, pp.132~151.
- 이용구(1982) 약성종양, 폐결핵, 늑막결핵 환자간의 세포성 면역 비교. 전북의대 잡지, 7:1~18.
- 李探琿, 李政吉, 李周默(1984) 기니픽에 있어서 實驗的 앨러지性 接觸性皮膚炎. 大韓獸醫學會誌, 24:169~171.
- 李探琿, 李政吉, 李周默(1986) 2, 4-dinitrochlorobenzene으로 誘發된 오리와 닭의 遲延型皮膚過敏症. 大韓獸醫學會誌, 26:149~156.
- 宮川正登, 三橋進, 石田名香雄(1967) 實驗動物にわりろ感染實驗. 實驗感染學, 朝倉書店, 日本, pp. 389~405.