大韓獸醫學會誌(1996) 第36卷 第3號
Korean J Vet Res(1996) 36(3):647~655

건유기 유방염 감염우의 유방내 면역저하요인 규명에 관한 연구

II. 호중구에 의한 말초혈액 및 유즙 림프구의 mitogen 유도성 증식반응 억제작용

신동백 · 박용호* · 남향미** · 문진산** · 주이석** · 신종욱

경상대학교 수의과대학 · 서울대학교 수의과대학*
수의과학연구소**

(1996년 2월 6일 접수)

Characterization of immunosuppressive factors in the mastitis-infected mammary gland of non-lactating cows

II. Suppression of mitogen-induced lymphoblastogenesis by neutrophils from peripheral blood and mammary gland secretion

Dong-back Shin, Yong-ho Park*, Hyang-mi Nam**
Jin-san Moon**, Yi-seok Joo**, Jong-uk Shin

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
*College of Veterinary Medicine, Seoul National University**
*National Veterinary Research Institute***

(Received Feb 6, 1996)

Abstract : To establish the effective ways to prevent bovine mastitis, the study has been performed to investigate the attributable factors causing down-regulation of immune responses in mammary gland of non-lactating cows.

Lymphocytes from peripheral blood and mammary gland secretions(MGS) were obtained from normal healthy cows and mastitic cows, respectively. Lymphoblastogenesis were investigated carefully by adding different concentrations of supernatants collected from pure-cultures of neutrophils seperated from peripheral blood and MGS, respectively.

The results obtained are as follows ;

1. Lymphoblastogenesis activity stimulated by Con A, PWM and PHA were significantly reduced in MGS from mastitic cows.

2. Supernatants collected from pure-culture of neutrophils separated both from peripheral blood and MGS showed inhibitory effect on mitogenic lymphoblastogenesis.

3. Supernatants from mammary gland neutrophils have shown 7 times more inhibitory activity than those from peripheral blood and this inhibitory effect was increased in proportion to increasing concentrations of supernatants when those were added to

Address reprint requests to Dong-back Shin, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University. Jinjoo 660-701, Republic of Korea.

lymphoblast cells in culture.

Key Words : neutrophils, inhibitory activity, lymphoblastogenesis.

서 론

젖소에서 건유초기와 분만전후기 같은 생리적 이행기 중에는 새로운 유방내 감염증(new intramammary infection)의 발생율이 특히 높다[1-6]. 이 시기중에는 물리적, 생리적 변화 등에 따르는 여러가지 스트레스로 인해 젖소의 유선면역 기능이 저하되기 때문에 유방염 원인균 침입에 대한 유선의 감수성이 증가된다[6-9].

여러가지 유선 방어인자중 면역을 시작하고 유지하는 림프구의 역할은 매우 중요하다. 이 림프구에 의한 면역기능을 분석하는 방법의 하나로서 최근 단핵세포의 배양이 여러 동물종에서 이용되고 있으며, 림프구 증식반응에 미치는 스트레스, 호르몬, 약물 등의 영향에 대한 보고들도 많다[10]. 림프구의 기능을 측정하기 위해서는 흔히 mitogen을 이용하여 증식반응을 관찰하는데 이러한 mitogen에 대한 림프구 증식반응의 정도는 세포성 면역능의 지표로 알려져 있다[11,12].

림포카인과 항체를 분비하는 등 체액 및 세포성면역 전반에 걸쳐 유선방어에 중대한 역할을 하고 있는 림프구의 기능은 생리적 이행기에 저하된다. 즉, 건유초기나 말기에는 mitogen[13]이나 병원체[14]에 대한 림프구의 증식반응이 감소되고[15,16], 림프계 세포의 수도 감소된다[17]는 사실이 많은 연구결과 입증되었다. 또한 사람[18,19]이나 소[20-22]의 유즙내 림프구의 mitogen 유도성 증식반응은 동일 개체의 혈액 림프구에 비해 더 낮으며, 퇴축유선에서 채취한 유즙이 mitogen에 의한 림프구 증식반응을 억제했다는 보고[23]도 있다.

최근에는 주로 사람의 혈액내 호중구와 림프구간의 상호작용에 관한 연구들이 보고되었다. 즉, Hsu 등[24]은 정상적인 호중구가 PHA mitogen에 대한 림프구의 증식반응을 억제했다고 보고한 바 있으며, Katherine 등[25]에 의하면 정상인의 호중구가 IL-1의 특이적 억제제를 생산하고, 이러한 IL-1 억제제는 림프구의 사이토카인 생산을 하향조절(down-regulation) 한다. Staite 등[26]과 Aly와 Robert[27]의 보고에 의하면 사람의 단핵세포와 소수의 다형핵 백혈구를 함께 배양한 결과 T림프구에 의한 면양 RBC의 rosette형성이 다형핵 백혈구의 농도에 따라 억제되었으며, 염증부위에서 탐식세포에 의해 방출된 H_2O_2가 T세포 아집단의 생존력을 변화시켜 특정 림프구 아집단의 기능을 우세하게 함으로써 면역조절효과를 발휘할 수 있을 것이라 시사했다.

동물에서도 Gaikowska 등[28]은 개의 말초혈액내의 세포 아집단이 T림프구의 작용을 조절하였는데 이 세포집단은 주로 호중구였음을 밝힌 바 있다. 또한 Barta 등[17]에 의하면 젖소의 유청내에 mitogen 유도성 림프구 DNA 합성을 억제하는 인자가 함유되어 있으며, 이것은 유방염의 임상적 정도나 유방염 간접지표들의 수치가 증가함에 따라 증가했다. 이렇게 억제된 림프구 기능은 유선퇴축기간중 유방내 감염증의 동태에 영향을 미칠 수 있다. 즉, 침투한 세균에 대해 특이적 면역글로부린이나 세포독성 반응을 유도하는 림프구 능력의 저하는 퇴축중 특히 생리적 이행기중의 새로운 유방내 감염증에 대한 유선 감수성 증가의 원인이 될 수 있다[23].

본 실험은 건유기 유방염 감염우의 유방내 면역저하 요인을 규명하기 위한 일련의 연구로서 유방염 감염우와 정상우의 말초혈액 및 유즙내 림프구 아집단 분포율 비교에 이어, 최근에 밝혀지고 있는 호중구 분비물질에 의한 림프구 기능억제작용 여부를 조사하는데 그 목적이 있다. 이를 위하여 먼저 유방염 감염유무에 따라 두 집단으로 구분한 젖소에서 유즙 및 혈액 림프구를 분리한 후 *in vitro*상 mitogen 유도성 증식반응을 측정하였다. 그리고 건강한 건유기 젖소의 유즙 및 혈액에서 호중구를 분리 배양하여 얻은 상청액이 림프구 증식을 억제하는지 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

대상동물 및 시료채취 : 95년 1월에서 8월 사이에 경기도내 대단위 목장의 젖소 40여두를 무작위적으로 선발하여 비유단계 및 산차 등을 파악하고 착유전 혼합유를 무균적으로 채취하여 체세포수 및 세균학적 검사를 실시하였다. 동시에 미정맥에서 채취한 말초혈액을 heparin이 함유된 시험관에 주입하여 총 백혈구수와 백혈구 감별계수

를 측정하였다. 이러한 우유중의 체세포수와 세균검사 및 혈액검사 소견을 근거로 유방염 감염우와 비감염우를 구분하였고, 개체별 우유와 혈액을 이용하여 림프구 및 호중구를 분리하였다.

우유 검사 :

가. 체세포수 검사 : 멸균된 시험관에 무균적으로 우유시료를 채취하여 냉장운반한 다음 Somacount 300(Bentley Co. Minnesota, USA)기기를 이용하여 체세포수를 측정하였다.

나. 세균학적 검사 : 우유시료를 5% 면양혈액 한천배지 및 MacConkey agar에 심고 37℃에서 24~48시간 배양후 균집락의 성상과 용혈성 및 그람염색 소견 등에 의해 1차적으로 균을 선별한 다음, 분리된 균의 동정은 Cowan[29]의 방법에 준하였다.

혈액검사 : 미정맥에서 무균적으로 채취한 혈액의 총백혈구수를 blood cell counter(system-9018 ; Serono)를 사용하여 조사하였다. 백혈구 감별계수는 혈액을 slide glass에 도말하여 methanol로 5분간 고정한 뒤 30분간 Giemsa 염색하여 현미경하에서 조사하였다.

혈액 및 유즙 유래 림프구의 mitogen 유도성 증식반응 검사 :

가. 혈액중의 림프구 분리 : 말초혈액 백혈구의 분리는 Davis 등[30]의 방법으로 실시하였다. 즉, 미정맥으로부터 채혈한 혈액과 항응고제인 acid citrate dextrose(ACD ; sodium citrate 22.0gm, citric acid 7.3gm, dextrose 24.5gm, D.W 1,000ml) 용액을 3 : 1의 비율로 혼합하여 잘 섞은 다음, 1,500rpm에서 30분간 원심분리하였다. Buffy coat 층을 채취한 후 37℃로 가온한 0.87% tris-buffered ammonium chloride(tris-NH_4Cl ; 0.0lM tris, pH 7.2)용액과 혼합하여 37℃ 항온수조에 넣어 약 5분간 적혈구를 용혈시켰다. 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버린후 pellet을 phosphate buffered saline(PBS ; sodium chloride 7.6gm, disodium phosphate 1.2688g, monosodium phosphate 0.1g, monopotassium phosphate 0.2113g, pH 7.2)과 ACD용액을 9:1로 혼합한 PBS-ACD buffer로 2회 정도 원심세척하였다. 마지막 원심후 pellet은 RPMI 1640(Sigma)배지에 부유시킨 뒤 Histopaque(비중 1.083, Sigma)에 중층시킨 후 1,500rpm 으로 20분간 원심분리한 다음, Histopaque과 혈장과의 경계면에서 림프구를 채취하였다. 분리된 림프구는 PBS로 3회 세척하여 PBS에 부유시킨 다음, tryphan blue 염색하여 생존 세포수를 측정한 후 최종농도가 1×10^7/ml 정도로 조절하여 실험에 이용하였다.

나. 유즙중의 림프구 분리 : Park 등[31]의 방법에 따라 우유시료 약 200ml(건유기간에는 25~40ml)의 분비물을 20%의 ACD 및 20mM의 EDTA를 함유하고 있는 PBS (PAE, pH 7.2)와 동량으로 혼합하여 15 ℃, 400×g에 30분간 원심시켰다. Cell pellet은 50ml의 원심튜브에 PAE로 원심 세척한 다음 혈액에서와 마찬가지로 Histopaque(비중 1.083, Sigma)을 이용해 림프구를 분리한 다음, PAE로 여러차례 세척한 후 RPMI 1640 배지에 부유시켰다.

다. 림프구의 mitogen 유도성 증식반응 검사 : Davis 등[32]의 방법에 준해서 혈액과 유즙에서 분리한 림프구를 15% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640(Sigma) 배지가 들어있는 조직배양용 플라스틱 샤레에 5ml씩 분주한 다음, CO_2 항온기(37℃)에서 2시간 배양하였다. 그뒤 부유세포만을 선택하여 trypan blue 염색과 hematocytometer를 이용하여 현미경하에서 계산한 뒤 RPMI배지에 총세포를 10^4/well로 조절하여 96 well U-bottom microtiter plate에 분주한 다음, concanavalin A(Con A, Sigma) phytohemagglutinin(PHA, Sigma) 및 pokeweed mitogen (PWM, Sigma) 등 3종의 mitogen을 적정농도별로 100μl씩 가하여 실험실내에서 반응시켰다. 48시간 후 ^{3}H-thymidine 1μCi씩 첨가하여 다시 18시간 배양후 cell harvester에 의해 glass fiber filter paper에 흡착시켜 실온에서 건조시킨 다음, scintillation tube에 filter disc를 넣어 4ml의 scintillation cocktail로 용해시켰다. 모든 작업이 완료된 후 β-liquid scintillation counter(Packard Model 1,600 TCR)로 방사능 활성을 측정하였으며 모든 실험은 3개 well의 평균치를 구하였다.

혈액 및 유즙 유래 호중구 배양상청액이 림프구 증식반응에 미치는 영향 조사 :

가. 혈액 및 유즙에서의 호중구 분리 : Roth와 Kaeberle[33]의 방법에 따라 혈액시료 45ml 정도를 항응고제인 ACD 액이 5ml 정도 들어있는 50ml 플라스틱 원심관에 넣어 2,500rpm에 20분간 원심하여 buffy coat층을 채취하였다. 20ml의 lysing solution(sodium phosphate dibasic 1.5g, sodium phosphate monobasic 0.32g, D.W 1,000ml, pH 7.2)으로 40초간 용혈시키고 10ml의 restoring solution(sodium phosphate dibasic 1.5g, sodium phosphate monobasic 0.32g, sodium chloride 27g, D.W 1,000ml, pH 7.2)을 가하

여 등장액화 하였다. 이것을 1,500rpm으로 5분간 원심한 후 상청액을 제거하고 lysing solution과 restoring solution으로 다시 1회이상 반복처리한 다음 PBS(0.01M, pH 7.2)로 1회 원심세척하여 0.5ml의 RPMI 1640 배지(Sigma)에 부유하여 실험에 사용하였다. 무균적으로 채취한 건유기 유즙시료 약 40ml로 부터 Park 등[31]의 방법에 따라 백혈구를 분리한 다음 Histopaque를 이용한 density gradient centrifugation으로 호중구만을 분리하였다.

나. **호중구의 배양 및 상청액 분리** : Gaikowska 등[28]에 따라 penicillin(100μg/ml)과 streptomycin(100μg/ml)이 함유된 RPMI 1640배지 1ml당 5×10^6의 호중구를 24시간 배양한 후 600×g, 20분간 원심하여 상청액을 분리하였다.

다. **호중구 배양 상청액의 림프구증식 억제작용 검사** : Microtiter plate의 각 well에 림프구 현탁액 100μl씩과 10μg/ml 농도의 con A 20μl씩을 넣은 다음, 혈액 또는 우유에서 분리한 호중구의 배양 상청액을 각각 50μl, 100μl 또는 150μl씩 첨가하여 4일동안 배양시킨 후 호중구 상청액을 여과하여 각 여과액의 첨가량에 따른 mitogen 유도성 림프구 증식반응 억제정도를 측정 비교하였다.

통계분석 : 통계분석은 Student's test(unpaired t statistic)를 이용하였다.

결 과

유방염 감염우와 비감염우 말초혈액 및 유즙 림프구의 mitogen 유도성 증식반응 :

가. **말초혈액 림프구의 mitogen 유도성 증식반응** : 비유중기의 젖소 8두(비감염우 5두와 *Staphylococcus aureus* 감염우 3두)의 말초혈액에서 분리한 림프구를 Con A, PWM 및 PHA 등 주로 T세포의 증식을 유도하는 mitogen과 함께 배양하여 유약화 반응을 검사한 결과는 Table 1과 같다.

Con A, PWM 및 PHA 자극에 대한 혈액 림프구의 증식반응은 비감염우에서 각각 158,588, 143,960 및 114,598C.P.M이었고 감염우에서는 각각 86,035, 77,165 및 91,021C.P.M이었다. 즉, 감염우의 혈액 림프구는 비감염우의 혈액 림프구보다 세가지 mitogen 모두에 대한 증식반응이 약 2배정도 더 낮게 나타났다.

나. **유즙 림프구의 mitogen 유도성 증식반응** : 유즙 림프구 증식반응도 Table 2에 나타낸 바와 같이 감염우의 경우가 비감염우에서 보다 모든 mitogen에 대한 증식반응이 훨씬 더 낮은 경향을 보였다. Con A, PWM 및 PHA 자극에 대한 유즙 림프구의 증식반응은 감염우에서 각각 432, 448 및 352C.P.M이었고, 비감염우에서는 각각 1,519, 836 및 2,379C.P.M으로 나타나므로서 특히 T세포와 B세포 모두를 자극하는 PWM에 대해서 보다는 T세포만을 자극하는 Con A나 PHA에 대한 반응에 있어서 큰 차이를 보여주었다. Mitogen에 대한 증식반응을 말초혈액 림프구와 유즙 림프구간에 비교했을 때는 감염여부에 관계없이 모든 개체에서 혈액 림프구의 증식반응이 유즙에서의 것보다 훨씬 더 높게 나타났다.

건유기 유방염 비감염우의 말초혈액 및 유즙 호중구가 림프구 증식반응에 미치는 영향 : 유방염에 감염되지 않은 건강한 건유기 젖소 5두의 혈액과 유즙에서 각각 호중구를 분리 배양하여 상청액을 얻은 후, 이를 첨가하여 말초혈액 림프구의 Con A 유도성 증식반응을 검사하므로서 호중구가 림프구 기능에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다.

혈액이나 유즙 호중구는 공히 림프구의 Con A 유도성 증식반응을 억제하였으며 또한 첨가한 상청액의 양이 많을수록 림프구 증식반응에 대한 평균 억제율은 더 높아졌다. 또한 호중구 배양 상청액의 첨가량이 많아질수록 림프구 증식반응 억제율도 증가하여 90% 이상의 높은 증식억제 효과를 나타내었다.

한편 혈액과 유즙중 호중구가 존재하는 부위에 따라서도 호중구의 억제작용에는 현저한 차이가 있었다. 즉, 동일하게 50μl씩을 첨가했음에도 불구하고 혈액 호중구의 배양상청액보다는 유즙에서 분리한 호중구를 배양하여 얻은 상청액의 림프구 증식억제효과가 약 7배 정도 더 높게 나타났다.

고 찰

건유기에 발생한 유방염은 종종 차기 비유기까지 지속되므로서 비유초기의 임상형 유방염의 주된 원인이 되고 있으며[25] 또한 기능불능성 분방이나 산유량 감소를 초래하기 때문에[17] 심각한 문제가 된다. 건유기의 높은 유방염 발생율은 젖소 유방내 면역기능의 저하와 상관이 있다.

면역반응과 관련되는 어떤 종류의 세포의 기능장애도 부분적 또는 완전한 면역결핍상태를 야기하게 된다. 기능장애의 성질에 따라 다양한 면역결핍상태가 존재하는데

어떤 것은 유전적 결함이 원인일 수 있고 또 어떤 경우엔 T 세포의 불균형이 원인일 수 있다. 이러한 면역상태의 진단을 위해서는 림프구의 기능검사가 필요하게 된다.

본 연구는 건유기 젖소 유선의 세균감염에 대한 숙주반응에 있어서 말초혈액 및 유즙에 존재하는 림프구의 기능 그리고 림프구의 기능에 영향을 미치는 요인 등을 조사하기 위한 것이다. 먼저 비유중기의 젖소 집단에서 유방염의 지표가 될 수 있는 유즙내 체세포수와 혈액학적 소견 및 세균학적 검사결과를 바탕으로 유방염 감염여부를 판정하여 정상우 5두와 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)에 감염된 3두를 선발, 각 개체의 말초혈액과 유즙에서 림프구를 분리한 후 *in vitro*상 mitogen 유도성 증식반응을 조사하였다(Table 1, 2). 이로서 유방 감염우와 비감염우간의 말초혈액 및 유즙 림프구의 기능을 mitogen 유도성 증식반응을 통해 비교하였다. 또한 유방염에 걸리지 않은 건유기 젖소의 혈액과 유즙에서 각각 호중구를 분리하여 24시간동안 배양한 후 얻은 상청액을 첨가하여 건유기 젖소 3두의 림프구의 Con A 유도성 증식반응을 측정하므로서 림프구와 호중구간의 상호관계를 조사하였다(Table 3).

유선내 감염이 림프구의 기능에 미치는 영향 또는 관련성을 조사하고자 비유중기의 젖소중 정상우 5두와 황색포도상구균 감염우 3두에서 말초혈액 및 유즙 림프구를 분리하여 주로 T세포를 자극하는 Con A, PHA와 T와 B 세포를 자극하는 PWM을 이용한 증식반응을 측정하였다. 그 결과 이들 mitogen 유도성 림프구 증식반응은 감염우군과 비감염우군의 말초혈액과 유선 림프구에서 각각 다르게 나타났다. 감염우의 유선 림프구가 가장 낮은 증식반응을 나타냈으며 정상우의 혈액 림프구가 가장 반응이 높았다. 또한 감염여부나 mitogen의 종류에 관계없이 모든 개체에서 말초혈액 림프구는 유즙 림프구에 비해 증식반응이 훨씬 더 높게 나타났다. 동일개체의 혈액림프구에 비해 유즙 림프구의 mitogen에 대한 증식반응 저하는 많은 동물종에서 관찰된 바 있다[34]. 사람의 젖에 대한 연구들은 여러가지 항원에 대한 유선 림프구의 증식반응이 말초혈액과 다름을 시사하고 있으며[18,35], 젖소에서의 연구에서도 이와 유사한 결과들이 도출되고 있다. 즉, Park 등[36]은 비유주기중 유선분비물과 말초혈액간에 T림프구 아집단 구성이 차이가 있으며, 소의 유선 림프구의 반응성 저하는 유선에서의 이러한 림프구 아집단의 독특한 구성때문인 것으로 보인다고 했다. 또한 Nonnecke와 Kehrli[22]는 소의 유즙에서 분리한 림프구의 mitogen에 대한 반응실험 결과 말초혈액 림프구에 비해 우유림프구는 생존률이 더 낮았고 Con A나 PHA에 의한 자극에 대해 훨씬 더 반응이 낮았다고 보고하였다. Kehrli 등[37]도 분만전후기중의 소 림프구 기능변화에 대한 연구에서 유즙림프구는 동일개체의 혈액림프구에 비해 mitogen 자극에 대한 반응이 저조했다고 하였다. 또한 전신적인 림프구 증식반응억제가 있다면 유즙림프구의 반응은 더 심하게 저하될 것임을 시사했다. 유즙림프구의 이러한 증식반응 저하요인에 대해서는 우유내 용해성 성분들이 mitogen 유도성 증식반응에 관계가 있는 표면 receptor들을 차단하거나 mitogenesis를 위한 영양소적 요구에 영향을 미치므로서 림프구 증식반응을 억제할 수 있다는 보고[38]가 있다. 한편 Parmely 등[19]은 사람의 유즙림프구의 저반응성이 유즙내 용해성 인자들의 작용에 전적으로 기인하지는 않으며 그 차이는 아마도 혈액에는 풍부한 어떤 T림프구 아집단이 유즙내에서는 결여 되어있기 때문일 것이라 결론지었는데 이러한 견해는 소에서의 연구결과들을 토대로 했을때에도 타당성이 있는 것으로 사료된다.

본 연구결과 유선내 황색 포도상구균 감염우에서는 세가지 mitogen에 대한 혈액 및 유즙림프구의 증식반응이 모두 정상우에 비해 훨씬 저조하게 나타나므로서 감염상태가 숙주의 면역세포의 기능에 불리하게 작용했을 것으로 추정되었다. 이와같은 결과는 황색 포도상구균 감염우의 림프구는 정상우의 림프구에 비해 혈액과 유즙 모두 반응이 낮았다는 Nonnecke와 Harp[39]의 보고와 일치되었다. 또한 말초혈액과 유선에서의 림프구 기능이 유방염에 감염된 소에서 감소되며 더우기 황색 포도상구균에 의한 유방염우의 유즙에는 정상우에 비해 활성화된 $CD8^+$ 세포의 수가 증가되므로서 황색 포도상구균 항원에 대한 유선 $CD4^+$ 림프구의 반응을 저하시킬 수 있다는 보고들[22,23]과도 일치한다.

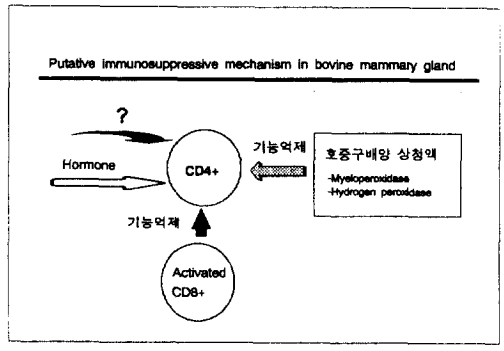
황색 포도상구균은 유방염을 일으키는 주된 원인체로서 이 균의 유선내 감염은 림프구 기능에 불리한 작용을 한다[34]. Nonnecke와 Harp[39]에 의하면 황색 포도상구균에 감염된 유즙 림프구는 비감염우의 림프구에 비해 기능장애를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 림프구는 체액성 면역에 관련되며 특이적 옵소닌의 생산을 통해 탐식작용을 증강시키므로 이러한 림프구의 기능은 감염된 유선의 생체내에서 호중구의 탐식작용에도 영향을 미칠 수 있다. 또한 감염유선의 우유내에 비감염유선의 우유에서 보다 더 많이 존재하는 호중구도 감염우 유선 림프구 기능저하의 원

인일 수 있다.

세가지 mitogen의 자극에 대한 혈액 및 유즙 림프구의 증식반응은 각기 다르게 나타났으며 특히 유즙 림프구는 주로 T세포 자극 mitogen인 Con A와 PHA에 대한 반응이 T와 B세포를 자극하는 PWM에 대한 반응보다 훨씬 더 높았고 감염우군과 비감염우군간의 반응에 더 큰 차이를 나타냈다. 이는 감염유선의 림프구 아집단 검사결과에서도 T세포 특히 $CD4^+/CD8^+$ 비율의 차이가 있음을 알 수 있듯이 세균에 의한 유선감염시 B세포 보다는 T세포 집단의 비율이나 기능이 더 많은 영향을 받기 때문인 것으로 사료된다. 한편, Torre와 Oliver[40]는 건유기 중의 혈액 단핵세포의 증식반응 변화에 대한 연구결과 본 연구에서와 마찬가지로 주로 T세포를 자극하는 Con A와 PHA가 가장 큰 반응을 일으켰다고 보고했다. 이들은 동일한 T세포 자극 mitogen에 대한 이러한 T세포 반응의 차이는 이들 mitogen의 동일한 세포집단 자극능력에 차이가 있거나 또는 Con A나 PHA가 각기 다른 T세포 아집단을 우선적으로 자극하기 때문일 수도 있을 것임을 시사하였다.

건유기 유즙은 T와 B세포 mitogen에 대한 말초혈액 림프구의 증식성을 억제하는 것으로 나타났으며[20] 또한 소의 단핵세포를 가장 크게 자극하는 것은 Con A였다는 보고가 있다[41]. 본 연구에서는 호중구의 림프구 증식반응에 대한 영향을 조사하기 위해 건유기 젖소 3마리를 이용하여 호중구나 대식세포 및 단핵구를 제거한 림프구 microtiter plate 각 well당 10^6에 Con A와 함께 말초혈액과 유즙에서 분리한 각 호중구를 24시간 배양하여 얻은 상청액들을 첨가한 후 4일 또는 8일동안 배양하여 림프구 증식반응을 비교하였던 바 호중구 상청액은 mitogen 자극성 림프구 증식반응을 억제시키는 작용이 있었다. 또한 혈액에서 보다 유즙에서 분리한 호중구의 상청액이 더 현저한 억제작용(약 7배 이상)을 발휘했고 이러한 억제작용은 상청액의 첨가량이 많아질수록 비례해서 높아졌다. 호중구의 이같은 림프구 증식 억제작용에 대해서는 Gaikowska 등[28]이 개의 혈액에 대한 연구결과 호중구가 PHA에 대한 말초혈액 림프구 반응에 대해 용량에 비례한 억제효과를 발휘했음을 예증한 바 있으며, 이 억제효과가 호중구로 부터 방출되는 용해성 인자들에 의한 것이라 보았다. Barta 등[17]은 mitogen 유도성 림프구 DNA의 합성억제가 유방염의 임상적인 정도나 유방염에 대한 간접적 지표들의 수치증가에 따라 증가되었으며, 임상형 유방염 분방과 체세포수 90만 이상인 분방에서 채취한 유청이 Con A, PHA, PWM 등으로 자극했던 림프구의 증식반응을 억제하였음을 보고하였다. 또한 Aly와 Robert[27]는 활성화된 호중구에 의한 림프구 기능의 억제기전에 대해 Halides와 반응하여 면역억압산물을 형성하는 myeloperoxidase(MPO), H_2O_2의 분비에 의한다고 보고하였다. Lincoln 등[42]은 최근 이러한 MPO의 호중구와 단핵구 살균작용에 대한 역할을 토대로 하여 외부적으로 가한 생리적 수준의 MPO가 *E. coli*에 대한 호중구의 탐식작용과 사멸능을 강화시켰음을 예증한 바 있다. 추후로 호중구의 이러한 여러가지 림프구 기능억제작용에 관한 기전들이 규명되어야 할 것이며, 더 나아가 이러한 기전들을 차단 또는 억제시키므로서 숙주의 면역기능을 증진시킬 수 있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

이상의 결과들을 종합적으로 고찰해 본 바, 아래의 그림에 표시한 바와 같이 면역저하의 요인에는 여러가지가 있으나 유선의 감염으로 인해 말초혈액 및 유즙내 면역세포인 림프구 아집단의 분포율 특히 활성화된 $CD8^+$ T림프구에 의한 면역억제기능이나 이들에 의한 T림프구 특히 $CD4^+$ T림프구의 증식반응 억제 등 숙주의 생체면역기전이 불리하게 변화할 뿐 아니라, 유선감염으로 인해 유즙내에 증가된 체세포의 주종을 이루고 있는 호중구에 의해 림프구의 기능억제가 증가되는 등 감염에 대한 유선의 세포성 면역에 의한 숙주의 국소적 방어기전이 여러가지 요인들에 의해 효과적으로 작동할 수 없음이 드러났다. 따라서 앞으로의 연구방향은 호중구와 림프구간의 상호작용 등 숙주면역 저하기전들에 대한 *in vivo* 상태의 연구들과 아울러, 건유기 젖소 유선내 항원에 대한 림프구 증식반응이나 면역증강 세포집단의 활성화를 촉진시키는 등 숙주의 면역능을 강화시키므로 유선감염의 예방이나 자발적 치유율을 높이기 위한 방법들이 연구되어야 할 것으로 사료된다.



결 론

감염유무에 따른 젖소의 말초혈액 및 유즙내 림프구의 mitogen 자극에 대한 증식반응을 조사한 결과 유선감염이 없는 정상적인 젖소에서 유선 림프구의 기능은 혈액보다 훨씬 더 저조한 상태에 있으며, 유선감염이 있는 젖소에서는 혈액이나 유선의 림프구 기능이 각각 정상우에 비해 훨씬 더 저조하게 나타났다.

한편 건유기 젖소의 말초혈액과 유즙에서 분리한 호중구를 배양하여 얻은 상청액이 mitogen 유도성 림프구 증식반응을 억제하였으며 특히 유즙에서 분리한 호중구가 혈액 호중구 보다 훨씬 더 강력한 억제작용을 발휘했다. 또한 호중구 배양 상청액의 첨가량이 많을수록 억제작용도 더 강력하게 나타났는데 감염유선에 급증하는 체세포의 주종을 이루는 호중구의 림프구 기능 억제작용은 유방염 감염우 유선의 면역기능을 저하시키므로서 건유기 유방염 발생율을 증가시키는 또 하나의 주된 요인일 것이다.

Table 1. Mitogen-stimulated lymphoproliferative responses of peripheral blood lymphocytes

In vitro stimulators	Concentration (μg/ml)	C.P.M*(S.I)**	
		Infected (n = 3)	Non-Infected*** (n = 5)
Con A	0.5	86,035±2,715 (68.3)	158,588±3,123 (183)
P W M	0.25	77,165±1,092 (61.7)	143,960±2,190 (167)
P H A	2.5	91,021±983 (72.8)	114,598±732 (133)

* C.P.M ; Count per minute. ** S.I ; Stimulation index
*** Mid-lactation stage

Table 2. Mitogen-stimulated lymphoproliferative responses of mammary gland lymphocytes

In vitro stimulators	Concentration (μg/ml)	C.P.M*(S.I)**	
		Infected (n = 3)	Non-Infected*** (n = 5)
Con A	0.5	432±101 (2.16)	1,519±1,611 (7.56)
P W M	0.25	488±151 (2.24	836±271 (4.18)
P H A	2.5	352±73 (1.76)	2,317±918 (11.6)

* C.P.M ; Count per minute. ** S.I ; Stimulation index
*** Mid-lactation stage

따라서 건유기 젖소의 유선내 항원에 대한 림프구의 증식반응을 증가시키거나 면역증강세포 집단의 활성화를 촉진시키는 방법 또는 호중구의 림프구 증식 억제작용 기전을 차단하거나 억제시키는 방법 등을 다각적으로 더 연구하므로서 림프구에 의한 유선내 특이적 면역반응 및 숙주 방어기전을 강화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3. Comparision of suppressive activity on lymphoproliferation between PMNs from mammary gland and peripheral blood at nonlactating peroid

Target cell types*	Suppressive Activities**(% S.D)				
	PMN supernates from blood		PMN supernates from Milk		
	50μl***	100μl	50μl	100μl	150μl
1 2 3	9.6±4.5	32.2±11.1	63.8±3.8	92.9±1.3	96.2±2.5

* : 10^6 blast cells/well after treated with H/F and reagent to remove PMN and macrophage/monocytes
** : 1-(lymphoblastogenesis with PMN supernates/lymphoblastogenesis without PMN supernates) × 100(%)
*** : Added volume of supernatants obtained from 24 hrs culture of 20ml PMN cells(2 × 10^6 total)
1 ; Eight day cultured Con A blast cells(Cow # 743)
2 ; Four day cultured Con A blast cells(Cow # 785)
3 ; Four day cultured Con A blast cells(Cow # 725)

참 고 문 헌

1. Coppock CE, Everentt RW, Natzke RP, et al. Effect of dry period length on Holstein milk production and selected disorders at parturition. *J Dairy Sci*, 57 : 527-534, 1974.
2. Dias FM, Allaire FR. Dry period to maximize milk production over two consecutive lactations. *J Dairy Sci*, 65 : 136-145, 1982.
3. Swanson DW. Comparing continuous milking with sixty day dry periods in successive lactations. J Dairy Sci, 48 : 1205-1209, 1965.
4. Wheelock JV, Rook JAF, Dood EH. The effect of milking throughout the whlole of pregnancy on the composition of cow's milk. *J Dairy Res*, 32 : 249-254, 1985.
5. Hurley DJ, Kensinger MH, Mastro AM, et al. An

evaluation of the mononuclear cells derived from bovine mammary gland dry secretions using leukocyte antigen specific monoclonal antibodies, light scattering properties and nonspecific esterase staining. *Vet Immunol Immunopathol*, 25 : 177-193, 1990.

6. Oliver SP, Sordillo LM. Udder health in the periparturient period. *J Dairy Sci*, 71 : 2584-2606, 1988.
7. Smith KL. Mastitis control : A discussion. *J Dairy Sci*, 66 : 1790, 1983.
8. Eberhart RJ. Management of dry cows to reduce mastitis. *J Dairy Sci*, 69 : 1721-1732, 1986.
9. Oliver SP, Mitchell A. Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. *J Dairy Sci*, 66 : 1162-1166, 1983.
10. Uoshihito K, Uoshimitsu M, Shigeo N. Transformation of Bovine peripheral blood lymphocytes in the perinatal period. *Jpn J Vet Sci*, 47 : 337-339, 1985.
11. Ashman RF. Lymphocyte activation. *Fundamental immunology* Paul WE, ed. Raven Press, New York, NY. 1984, 267.
12. Kristensen F, Kristensen B, Lazary S. The lymphocyte test in veterinary Immunology. *Vet Immunol Immunopathol*, 3 : 203-208, 1982.
13. Craven N, Williams MR. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet Immunol Immunopathol*, 10 : 71-127, 1985.
14. Targowski SP. Role of immune factors in the protection of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 66 : 1781-1789, 1983.
15. Harmon RJ, Newbould FHS. Neutrophil leukocytes as a source of lactoferrin in bovine milk. Am *J Vet Res*, 41 : 1603-1610, 1980.
16. Richie ER, Steinmetz KD, Meistrich ML, et al. T lymphocytes in colostrum and peripheral blood differ in their capacity to form thermostable E-rosettes. *J Immunol*, 125 : 2344-2346, 1980.
17. Barta O, Barta VD, Crisman MV, et al. Lymphocyte blastogenesis inhibition by milk whey as an indicator of mastitis. *J Dairy Sci*, 73 : 2112-2120, 1990.
18. Ogra SS, Ogra PL. Components of immunologic reactivity in human colostrum and milk. *Immunology of breast milk*. PL Ogra and Dayton,ed. Raven Press, New York, NY. 185, 1979.
19. Parmely MJ, Beer AE, Billingham RE. *In vitro* studies on the T-lymphocyte population of human milk. *J Exp Med*, 144 : 358-370, 1976.
20. Collins RA, Oldham G. Proliferative responses and IL-2 production by mononuclear cells from bovine mammary secretions, and the effect of mammary secretions on peripheral blood lymphocytes. *Immunology*, 58 : 647, 1986.
21. Concha C, Holmberg O, Morein B. Characterization and response to mitogens of mammary lymphocytes from the bovine dry-period sectetion. *J Dairy Res*, 47 : 305-311, 1980.
22. Nonnecke BJ, Kehrli ME. Isolation of mononuclear cells from bovine milk by continuous-flow and density gradient centrifugation : Response to cells to mitogens. *Am J Vet Res*, 46 : 1259-1262, 1985.
23. Torre PM, Oliver P. Suppression of mitogenic response of peripheral blood mononuclear cellls by bovine mammary secretions. *J Dairy Sci*, 72 : 219-227, 1989.
24. HSU CCS, Wu MYB, Rivera-Arcilla J. Inhibition of lymphocyte reactivity *in vitro* by intact polymorphonuclear cells(PMN). *Cell Immunol*, 48 : 288-295, 1979.
25. Katherine T, Moti LT, Shirley Liu, et al. Normal human Neutrophils are a source of a specific interleukin 1 inhibitor. *J Immunol*, 136 : 3686-3692, 1986.
26. Staite ND, Messner RR, Zoschke DC. Inhibition of human T lymphocyte E rosette formation by neutrophils and hydrogen peroxide : differential sensitivity between helper and suppressor T lymphocytes. *J Immunol*, 139 : 2424-2430, 1987.
27. ALY EH, Robert AC. Immunosuppression by activated Human neutrophils-dependence on the

myeloperoxidase systems. *J Immunol*, 139 : 2406-2413, 1987.

28. Gaikowska H, Dabrowski M, Olszewski WL. Spontaneously active suppressive cells in canine peripheral blood. *Vet Immunol Immunopathol*, 20 : 101-108, 1989.
29. Cowan ST. Manual for the identifications of medical bacteria. 2nd ed., Cambridge University Press, London, 45-50, 1974.
30. Davis WC, Marusic S, Lewin HA, et al. The developement and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol*, 15 : 337-376, 1987.
31. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, et al. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J Dairy Sci*, 75 : 998-916, 1991.
32. Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, et al. Ruminant leukocyte differentiation molecules. In: Barta O, ed. *MHC, differentiation antigens, and cytokines in animal and birds*, Monographs in Animal Immunol Blasks burg, VA:BAR-LAB, INC : 47-70, 1990.
33. Roth JA, Kaeberle ML. Isolation of neutrophils and eosinophils from the peripheral blood of cattle and comparison of their functional activities. *J Immunol Meth*, 45 : 153-164, 1981.
34. Smith JW, Schultz RD. Mitogen and antigen-responsive milk lymphocyte. *Cell Immunol*, 29 : 165-173, 1977.
35. Warksman BH. Summary: breast milk and maternal-neonatal interactions. *Immunology of breast milk*. PL Ogra and Dayton, ed. Raven Press, New York, NY. 257, 1979.
36. Park YH, Jung SC, Moon JS, et al. A subset of mammary gland $\gamma\delta$ T lymphocytes downregulates BoCD4 T lymphocyte response to *Staphylococcus* aureus in cattle with intramammary infection. *Korea J Immunol*, 16 : 19-27, 1994.
37. Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res*, 50(2) : 207-214, 1989.
38. Brock JH, Mainou-Fowler T. The role of iron and transferrin in lymphocyte transformation. *Immunol Today*, 12 : 347-351, 1983.
39. Nonnecke BJ, Harp JA. Effect of chronic staphylococcal mastitis on mitogenic responses of bovine lymphocytes. *J Dairy Sci*, 68 : 3323-3328, 1985.
40. Torre PM, Oliver SP. Changes in blatogenic activity of bovine blood mononuclear cells throughout the nonlactating period. *J Dairy Sci*, 71 : 1078-1084, 1987.
41. Torre PM, Oliver P. Suppression of mitogenic response of peripheral blood mononuclear cellls by bovine mammary secretions. *J Dairy Sci*, 72 : 219-227, 1989.
42. Lincoln JA, Lefkowitz DL, Travis C, et al. Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. *Infect Immun*, 63 : 3042-3047, 1995.