

Ureaplasma Urealyticum 感染 淋巴球에서의 Interferon 生産에 關한 研究

高神大學 醫學部 微生物學教室

金光燦, 朴仁達, 張明雄

Interferon Production in Human Lymphocyte Infected with Ureaplasma Urealyticum

Kwang Hyuk Kim, In Dal Park and Myung Woong Chang

Department of Microbiology, Kosin Medical College, Pusan, Korea

= Abstract =

Interferon production was measured in human lymphocyte culture using Phytohemagglutinin-P, *Ureaplasma urealyticum* and Phytohemagglutinin-P plus *Ureaplasma urealyticum*.

The findings in this study were as follows;

- 1) Interferon on the culture of peripheral blood lymphocyte infected with *Ureaplasma urealyticum* was produced. Interferon titre induced with *Ureaplasma urealyticum* was higher than that induced with Phytohemagglutinin-P.
- 2) Phytohemagglutinin-P plus *Ureaplasma urealyticum* as inducer exhibited synergism in Interferon production.
- 3) Peak times of Interferon quantity induced with Phytohemagglutinin-P, *Ureaplasma urealyticum* and Phytohemagglutinin-P plus *Ureaplasma urealyticum* were 72 hours.

I. 緒 論

Mycoplasma는 動物血液內 免疫담당 細胞에 作用하여 Interferon(IFN)과 같은 lymphokine을 生成시

키는 것으로 알려지고 있다.^{10, 11, 14, 22, 23, 26, 27)} 이 外에도 사람白血球에 作用하여 IFN을 生成시키는 inducer로서는 virus, 細菌, 合成 Polyamine, mitogen 등이

있다.²⁴⁾ 木田 등²⁵⁾에 의하여 *M. pneumoniae* 感染 淋巴球에서 leukocyte migration inhibitory factor가 生成함을 보고 하였으며, 升田 등²⁶⁾은 *M. pneumoniae* 肺炎患者 血液의 約 半數에서 IFN이 檢出되고 있다고 보고 하였다. 또한 小松茂夫²⁷⁾ 등은 肺炎 mycoplasma 感染症 어린이의 血清中 約 70%에서 40 units 이상의 IFN이 檢出되었다고 보고하고 있다. Sumio 등²⁸⁾ 및 荒井 등²⁹⁾은 사람淋巴球에 *M. pneumoniae*를 作用시켜 IFN을 生成시켰으며, 이렇게 IFN이 生成되는 機轉으로서 *M. pneumoniae*가 放出하여 내는 過酸化水素에 의하여 淋巴球에서 IFN이 生成됨을 證明하였다. Ginsburg 등은 rat 淋巴球를 *M. pulmonis*로 刺戟시켰을 때 2日 후에 淋巴球가 芽球化 現象을 觀察하여 phytohemagglutinin (PHA)의 mitogenic한 效果와 비슷한 結果를 볼 수 있었다.²¹⁾

이와 같이 Mycoplasma屬에 속하는 菌에 있어서의 IFN 生成能에 대해서는 數次에 걸쳐 보고된 바 있으나 같은 Mycoplasma科에 속하면서 別개의 Ureaplasma屬을 이루고 있는 *U. urealyticum*에 대한 IFN 生成能은 아직 보고된 바 없다.

따라서 著者들은 사람淋巴球에 *U. ureaplasma*를 감염시켜 IFN 生成與否를 밝힘과 同時에 mitogen인 PHA와도 함께 作用시켜 IFN 生成 정도를 파악코저 하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. Ureaplasma

本 實驗에 使用된 菌株은 *Ureaplasma urealyticum* T 960株(Canada, J.A.Robertson 教授로부터 分讓)이었다.

*U. urealyticum*의 培養을 위한 培地는 增菌培地인 10-B 培地³⁰⁾를 사용하였다.

培養條件은 10-B 培地 36ml에 *U. urealyticum* 보관 菌株 4ml를 接種하여 18시간 培養하였다. 菌數의 결정은 18시간 동안 培養된 菌액을 階段 희석하여 Ureaplasma 分離用培地인 A-7 寒天平板培地³¹⁾에 0.01ml씩 接種 한 후 CO₂ Gas Pak System에서 37℃, 48시간 동안 培養한 후 colony forming unit(CFU)로

決定하였다.

2. 淋巴球의 分離

健康한 20代 男子의 末梢血液을 heparin으로 처리한 다음 Ficoll-Hypaque 比重遠心分離法^{5,7,16)}에 의하여 分離하였다.

3. IFN의 誘導

上記方法으로 準備된 細胞부유액(1×10^6 cells/ml)을 24 Well-microplate(Costar, U.S.A.)에 well당 2ml씩 분주하였다. 다음 *U. urealyticum*을 감염시키는 群에는 *U. urealyticum* 부유액(1×10^6 CFU/ml)을 各 well 당 0.2ml씩을 적하하여 淋巴球 1×10^6 에 대하여 *U. urealyticum* 1×10^5 CFU가 집중되도록 하였다.

PHA로 자극시키는 群에는 PHA-P[Gibco, U.S.A.]液을 ml당 0.2ml씩을 적하하여 細胞 1×10^6 에 대하여 PHA 5 μ g를 作用시켰다. *U. urealyticum*과 PHA를 함께 作用시키는 群에서는 各 well 당 *U. urealyticum* (1×10^6 CFU/ml) 0.2ml와 PHA-P(50 μ g/ml) 0.2ml를 作用시켰다.

淋巴球에서 IFN을 유도하기 위한 培地로서는 RPMI 1640(FLOW Lab., U.S.A.)에 우태아血清[KC Biological, U.S.A.]을 10% 포함시킨 조직배양액을 사용하였다.

培養條件은 37℃, 5% CO₂ 부란기 위에서 培養하였으며, 試料의 採取는 17, 24, 72, 96시간만에 시행하였으며 對照群으로서 淋巴球만을 培養시켜 上記 시간에 取하였다.

4. IFN의 力價檢定

IFN 力價檢定은 CPE₅₀ Method인 Armstrong³⁾의 dye-binding 檢定方法과 Kobayashi 등¹³⁾의 檢定方法을 택하였으며, 그 方法을 요약하면 다음과 같다. flat-bottomed 96wells microculture plate(Costar, U.S.A.)에 牛胎兒血清 10%, Hepes 10mM이 包含된 pH7.3의 Eagle's MEM 0.1ml씩을 加한 다음 試料 0.1ml를 加하여 계단희석하였다. 희석된 試料列에 사람섬유아세포株인 FL細胞(慶熙大學校 慶熙醫療院 細胞保存室에서 分讓)를 ml당 7×10^5 細胞가 되게 부유시킨 세포부유액을 0.1ml씩 加하였다. 37℃, 5%

CO₂ 부란기에 5시간 동안 배양시킨 후 challenge virus인 Vesicular Stomatitis Virus(New Jersey Strain, 10⁶ TCID₅₀/well, MEM, FBS 2%, 20mM Hepes, pH 7.3) 0.15ml씩을 각 well에 加하였다. 37℃ 부란기에서 overnight 培養시킨 후 cytopathogenic

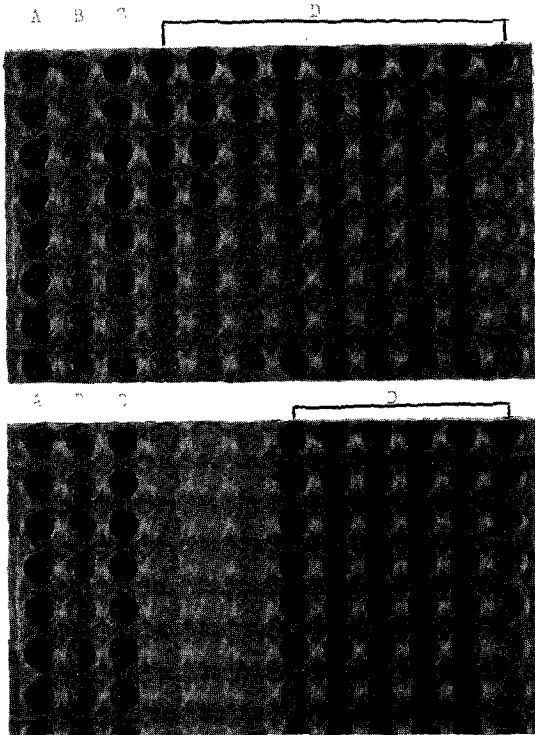


Fig. 1. Microtiter plate interferon assay system showing the cytopathic effect(CPE) between FL cells and vesicular stomatitis virus(VSV).

A : cell control. B : virus control,
C : standard interferon, D : tested group

effect(CPE) 結果를 판독하였다.

標準대조 IFN은 British Medical Research Council(BMRC)의 α-IFN(Lot # 69/19, 250 units)을 사용하였다.^{7,12,15)}

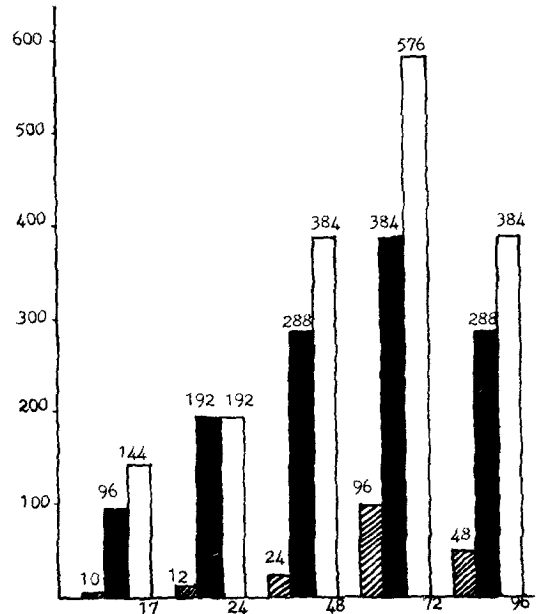


Fig. 2. Effect of PHA-P, *U. urealyticum* and PHA-P + *U. urealyticum* at different times on interferon production in PBL culture(1×10⁶ cells/ml)

□. PHA-P 5 μg/ml: ■. *U. urealyticum* 1×10⁵ cells/ml.

▨. PHA-P 5 μg/ml + *U. urealyticum* 1×10⁵ CFU/ml

Table 1. Interferon induction by PHA-P, *U. urealyticum* and PHA-P + *U. urealyticum* in human peripheral blood lymphocyte(PBL) *

Inducers	Interferon (units/ml)				
	17	24	48	72	96 hrs
PHA-P	10	12	24	96	48
<i>U. urealyticum</i>	96	192	288	384	288
PHA-P + <i>U. urealyticum</i>	144	192	384	576	384

* The suspensions of 1 × 10⁶ cells/ml for PBL were cultured in 10 % FCS-RPMI 1640 with PHA-P 5ug/ml, *U. urealyticum* 1 × 10⁵ CFU/ml and PHA-P 5ug/ml and PHA-P 5ug/ml + *U. urealyticum* 1 × 10⁵ CFU/ml at 37℃, 5% CO₂ incubation.

III. 結 果

1. PHA-P로 刺戟시킨 淋巴球의 IFN 生成能

淋巴球 부유액에 PHA-P를 작용시켜 나타난 시간별 IFN의 생성치는 표1과 그림2에 나타난 바와 같다. 1×10^6 cells/ml 濃度の 淋巴球에 PHA-P를 $5 \mu\text{g/ml}$ 되게 作用시켜 培養했을 때에 나타난 IFN의 力價는 17시간 만에는 10units미만이었으며, 24시간에 12, 48시간에 96, 96시간에 48units를 나타내어 72시간 째에 가장 높게 나타났으나 96시간 째에는 力價의 減少를 나타내었다.

2. U. urealyticum으로 感染시킨 淋巴球의 IFN 生成能

淋巴球 부유액에 *U. urealyticum*을 感染시켜 나타난 시간별 IFN의 생성치는 표1과 그림2에 나타난 바와 같다. 1×10^6 cells/ml 濃度の 淋巴球에 *U. urealyticum*, 1×10^5 CFU/ml를 接種하여 培養하였을 때에 나타난 IFN의 力價는 17시간만에는 96 units이었으며, 24시간 192, 48시간에 288, 72시간에 384, 96시간에 288 units를 나타내어 72시간에 최대치를 나타내고 96시간에는 48시간의 수준으로 떨어졌다.

3. PHA-P와 U. urealyticum으로 자극 및 感染시킨 淋巴球의 IFN 生成能 상승작용

淋巴球 부유액에 PHA-P와 *U. urealyticum*을 함께 作用시켜 나타난 시간별 IFN 生成値는 표1과 그림1에 나타난 바와 같다. 1×10^6 cells/ml 濃度の 淋巴球에 PHA-P $5 \mu\text{g/ml}$ 를 作用시키고 *U. urealyticum* 1×10^5 CFU/ml를 感染시켜 나타난 IFN의 力價는 17시간만에 144 units, 24시간에 192, 48시간에 384, 72시간에 576, 96시간에 384를 나타냈다. 72시간 째에 최대치를 나타내고 96시간 째에 384를 나타내어 다른 시험군과 같은 양상으로 나타났으나 PHA-P, *U. urealyticum* 各各에 依해서 生成되는 力價의 疊보다 상승되어 나타났다.

Interferon(IFN)은 antigenic specificity의 차이에 依하여 세가지 type으로 分類하여 α , β , γ 로 나누고 있다. 이中 γ -IFN은 한때 type II 또는 immune IFN으로 명명되었으나 현재는 γ -IFN으로 부르고 있다. γ -IFN의 生成은 주로 淋巴球에 mitogen 또는 bacteria, virus 등의 자극 및 感染에 依하여 이루어지며, 요즘에는 gene engineering에 依해서도 生成되고 있다.²¹⁾ 또한 分離된 淋巴球에 Mycoplasma를 感染시켜 γ -IFN을 生成시켰음이 보고된 바 있으나^{1,10)} 아직 Ureaplasma에 依한 IFN 生成에 관한 보고가 없기 때문에 본 저자들은 Ureaplasma에 依한 IFN 生成 여부를 관찰해 보고자 하였다.

林 등¹⁸⁾의 보고에 依하면 1×10^6 cells/ml 濃度の 임파구에 PHA-P $5 \mu\text{g/ml}$ 를 作用시켰을 때 72~96 시간만에 IFN 생산량이 최대치에 도달하였다고 하였으며, 本 試驗에서도 이와 비슷한 양상을 나타내어 72시간에 최고의 生成을 나타내다가 96시간 째에는 약간 감소되는 것으로 나타났다. Sumio 등²⁶⁾은 淋巴球 5×10^5 cells/ml에 *M. pneumoniae*, 1×10^6 CFU/ml를 感染시켜 37°C에서 72시간 배양시켰을 때 供血者에 따라서 508~2650 units로 나타나 IFN 生成能이 血液의 個體 差異에 따라 크게 差를 나타내며 관찰하였으므로 生成되는 IFN의 type을 決定하기 위하여 IFN 各 type에 對한 抗體반응 시험과 pH2.0에 노출시켜 本 結果 *M. pneumoniae*에 依한 IFN은 γ 와 β type이 混在되어 있음을 보고한 바 있다. 本 試驗에서는 *U. urealyticum*에 依해서 生成된 IFN의 力價는 72시간만에 384 units를 나타냈으며, IFN의 type의 決定은 추후 試驗을 더 시행하여 決定해야 할 것으로 思料된다.

淋巴球 부유액 1×10^6 cells/ml에 PHA-P $5 \mu\text{g/ml}$ 와 *U. urealyticum* 1×10^5 CFU/ml를 感染시킨 試驗群에서의 IFN 生成量은 PHA-P, *U. urealyticum* 各各을 作用시켰을 때보다 높은 상승치를 나타내어 두가지 inducer의 복합작용의 結果로 해석된다. 따라서 IFN의 생성시 어떤 한가지 inducer에 依한 IFN 生成도 있을 수 있겠으나 이렇게 또 다른 inducer까지도 함께 作用시켜 疊으로서 더 높은 力價의 IFN을 생성시킬 수 있는 가능성도 있을 것으로 사료된다.

IV. 考 察

V. 結 論

正常인의 末梢淋巴球에 PHA-P, *U. urealyticum* 및 PHA-P+ *U. urealyticum*으로 作用시켰을 때 아래와 같은 결과를 얻었다.

1) *U. urealyticum*에 의해서 PBL로부터 IFN을 유도할 수 있었으며, PHA-P에 의해서 유도된 IFN 力價보다 높게 나타났다.

2) IFN을 生成하는데 있어서 PHA-P나 *U. urealyticum* 단독으로 처리했을 때보다 PHA-P와 *U. urealyticum*을 함께 作用시켰을 때 상승작용을 나타내었다.

3) PHA-P, *U. urealyticum*, PHA-P+*U. urealyticum*에 의해서 유도되는 IFN 力價의 최대치는 72시간만에 나타났다.

參 考 文 獻

1. 荒井澄夫, 山本英彦, 宗像哲男, 紫田雄司, 今給梨亮, 前田浩 : M.pneumoniae 感染 림파球からの IFN生産. 第9回 日本 マイコプラズマ學會記録 : 82, 1982
2. Arai S, Munakata T, Kuwano K : Mycoplasma interaction with lymphocytes and phagocytes : Role of hydrogen peroxide released from M.pneumoniae The Yale J of Biol and Med 56 : 631, 1983
3. Armstrong JA : Semi-micro dye-binding assay for rabbit. Appl Microbiol 21 : 723, 1971
4. Barile MF, Razin S, Tully SJ, Whitcomb RF : The Mycoplasma, vol. II, Academic Press, 1979, pp.415~416
5. Beck J, Brunner H, Kirchner H : Interferon production in cocultures between mouse spleen cells and tumor cells. Possible role of Mycoplasmas in interferon induction. J of Immunol Methods 38 : 673, 1980
6. 張明雄, 崔大卿, 白太鉉 : 尿道感染 患者로부터 Ureaplasma urealyticum의 分離 同定. 忠南醫大雜誌 10 : 1, 1983
7. 張明雄, 崔大卿, 白太鉉, 朴鼎圭 : 健康人에서 Ureaplasma urealyticum의 分離率. 忠南醫大雜誌 9 : 1, 1982
8. Davis JK, Delozier KM, Asa DK, Minion FC, Cassell GH : Interactions between murine alveolar macrophages and Mycoplasma pulmonis in vitro. Inf and Imm 29 : 590, 1980
9. Erb P, Bredt W : Interaction of Mycoplasma pneumoniae with alveolar macrophages; Viability of adherent and ingested Mycoplasmas. Inf and Imm 25 : 11, 1979
10. 夏潤文, 金光燦, 金茂炯, 禹鍾設, 林壽德 : 韓國正常人 末梢血液 淋巴球의 Natural Killer(NK) 活性値에 관한 研究. 대한의학 협회지 24 : 503, 1981
11. 夏潤文, 禹鍾設, 金光燦, 林壽德 : 淋巴球 培養上 清의 淋巴球 分裂增殖에 미치는 影響에 관한 研究. 대한의학 협회지 26 : 237, 1983
13. 本田一陽, 荒井澄夫, 瀧鳥任 : Mycoplasma pneumoniae 感染 림파球 からの Leukocytes Migration Inhibitory Factor의 生産 第6回 日本 마이코플라즈마學會記録 : 70, 1979
14. 許忠霖, 南相潤, 裴榮載, 金光燦, 林壽德 : Monoclonal 抗體에 의한 正常 韓國人의 T-淋巴球 및 T-Subsets의 定量分析. 대한의학 협회지 26 : 53, 1983
15. 林壽德, 金茂炯, 韓乙男, 尹在一, 金光燦, 夏潤文 : Human Leukocyte Interferon(α -IFN)에 對한 研究 I. Human Leukocyte Interferon(α -IFN) 力價檢定에 관한 研究. 대한의학 협회지 24 : 879, 1981
16. 임수덕, 김광혁, 남상윤 : 인터페론 Alpha, Gamma 존재하에 NK 세포가 암세포 파괴에 미치는 影響에 대한 연구. 大韓癌學會誌 15 : 1, 1983
17. 임수덕, 김광혁, 남상윤 : Interferon(α -IFN) inducer로 사용되는 Sendai Virus 生産에 관한 연구. 最新醫學 26 : 107, 1983
18. 林壽德, 南相潤, 金光燦 : 臨床應用을 위한 Human Gamma(γ) Interferon 生産에 대한 研究.

- 대한의학협회지 26:1119, 1983
19. 金光琳, 南相潤, 林壽德: 사람 말초 혈액내 Large Granular Lymphocyte(NK 세포)의 Interleukin-2 생산에 관한 연구. 大韓癌學會誌 16: 26, 1984
 20. Kobayashi S, Iizuka M, Hara M, Ozawa H, Nagashima T, Suzuki J: Preparation of human fibroblast interferon. Uni Tokyo Press, 1982, pp.57~68
 21. 小松茂夫, 洲崎健, 宮地辰雄, 寺澤政彦, 堀川雅浩, 末武富子, 新津泰孝: 肺炎マイコプラズマと2,3의ウイルス感染症における 血清中 인터フェロン, 第10回 日本マイコプラズマ學會記録: 99,1983
 22. 中山哲夫, 加部一彦, 中本留美子, 池田信彦, 浦野隆, 前原信敏, 牧野慧: Mycoplasma pneumoniae 感染症 における血清インターフェロン(IFN) 第12回 日本マイコプラズマ學會記録: 69, 1985
 23. Naot Y, Tully JG, Ginsburg H: Lymphocyte activation by various Mycoplasma strains and species Inf and Imm 18:310, 1977
 24. 升田隆雄: Mycoplasma pneumoniae 肺炎患者血中におけるIFN様活性の検出. 第10回 日本 マイコプラズマ學會記録: 111, 1983
 25. 升田隆雄, 森正樹: Mycoplasma pneumoniae 肺炎における血中インターフェロン. 第6回 日本 マイコプラズマ學會記録: 77, 1979
 26. Stewart II WE: The interferon System, Springer-Verlag, 1981, pp.133
 27. Stewart II WE, Blalock JE, Burke DC, Chany C, Dunnick JD, Falcoff E, Friedman RM, Galasso GJ, Joklik WK, Vilcek J, Youngner JS, Zoom KC: Interferon nomenclature. Nature 286:110, 1980