

대식 세포와 결핵의  
잠복 감염 모델 동물을 이용한  
결핵 균주간 병원성 비교

연세대학교 대학원  
의 과학과  
곽 정 연

대식 세포와 결핵의  
잠복 감염 모델 동물을 이용한  
결핵 균주간 병원성 비교

연세대학교 대학원

의과학과

곽정연

대식 세포와 결핵의  
잠복 감염 모델 동물을 이용한  
결핵 균주간 병원성 비교

지도교수 조 상 래

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

과 정 연

# 곽정연의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

## 감사의 글

대학을 막 졸업하고 정신 없이 대학원 생활을 시작한지 벌써 2년이 지났습니다. 무사히 대학원 생활을 마치고, 지금까지 저를 이 길로 이끌어 주신 하나님께 감사를 보내고 싶습니다.

미생물학 교실에 들어와서 결핵에 대해 아무것도 모르는 저에게 많은 가르침을 주신 조상래 교수님께 감사 드립니다. 또 학부 때 부족한 저를 항상 이해해 주시고 이끌어 주신 한태욱 교수님께도 감사 드립니다.

부족한 논문에 대해 많이 조언해 주시고, 도와 주신 조성애 선생님과 최인홍 선생님께도 감사의 마음 전하고 싶습니다.

모든 미생물학 교실 선생님들, 특히 같이 석사 과정을 보내면서 힘들 때마다 많은 도움을 준 주영 선생님, 실험실 생활이나 실험에 있어 도움 주신 영미 선생님, 은희 선생님께도 감사 드립니다. 언니 같이 챙겨 주신 미진 선생님, 힘들 때 위로가 되어 주었던 민경이에게 감사하단 말 전하고 싶습니다. 멀리 영국에서 공부하고 계신 장은 선생님께도 감사 드립니다.

어릴 때부터 한결같이 곁에 있어준 윤경, 늦은 공부 중인 경윤, 좋은 조언으로 감동 주었던 동명인 정연 언니, 좋은 술친구가 되어주었던 지원, 민경 모두에게 고맙단 말 하고 싶습니다.

긴 대학생활과 대학원 공부까지 바깥 생활에만 정신 없는 저를 지금까지 보살펴 주신 부모님, 정은, 정민 언니, 동생 동한이, 그리고 환희에게 사랑하단 말 전하고 싶습니다.

무엇보다 많은 마우스의 희생으로 논문이 나왔고, 앞으로도 많은 마우스 실험을 할 것이라고 생각합니다. 가벼운 마음이 아닌 진실된 마음으로 앞으로도 실험에 임하고 싶습니다.

저 자 씀

# 차 례

그림 및 표 차례	
국문 요약 .....	1

## I. 서론

1. 결핵의 현황 .....	3
2. 결핵의 원인균 .....	4
3. 결핵균 대사의 특징 .....	6
4. 임상 분리균의 병원성 .....	6
5. T 세포에 의한 면역 반응 .....	8
6. 결핵의 잠복 감염 .....	9
7. 연구 목적 .....	11

## II. 재료 및 방법

1. 실험재료 .....	12
가. 실험 균주 .....	12
나. 마우스 .....	12
2. 실험방법 .....	12
가. 결핵균의 배양 .....	12
나. 대식 세포에서의 성장 곡선 비교 .....	13
다. 싸이토카인 측정 .....	14
라. 결핵의 잠복 감염 모델 동물의 확립 .....	15
마. 균 수의 측정 .....	15

바. 마우스 혈액에서의 mononuclear cell의 분리 .....	15
사. 마우스 폐와 비장의 분리 .....	16
아. IFN- $\gamma$ 분비 세포 수의 측정 .....	16
자. 통계 분석.....	17

### III. 결 과

1. Bone marrow-derived macrophage 내에서의 결핵균의 성장 곡선 .....	19
2. Bone marrow-derived macrophage 감염 시 결핵 균주에 따른 IL-6 분비 양상 .....	23
3. 결핵 균주에 따른 잠복 감염 모델 동물 성립.....	25
4. 잠복 감염 모델 동물에서 결핵 균주에 따라서 유도되고 있는 세포 매개 면역 반응 분석.....	30
5. 잠복 감염 모델 동물에서 폐의 조직 단면 .....	39

IV. 고 찰 .....	41
---------------	----

V. 결 론 .....	47
--------------	----

참고문헌 .....	48
------------	----

영문요약 .....	55
------------	----

## 그림 차례

그림 1. 결핵 균주 별로 대식 세포에서의 성장 곡선 (1).....	21
그림 2. 결핵 균주 별로 대식 세포에서의 성장 곡선 (2).....	22
그림 3. 결핵균을 마우스 골수 세포 유래의 대식 세포에 감염시킨 후에 분비되는 IL-6의 양 .....	24
그림 4. 항생제 치료 후의 마우스 비장에서 균 수 측정 .....	28
그림 5. 항생제 치료 후의 마우스 폐에서 균 수 측정.....	29
그림 6. 마우스에서 결핵 약제 치료 종료 후의 그룹과 치료하지 않은 그룹 간에 IFN- $\gamma$ 분비능 분석 (1).....	33
그림 7. 마우스에서 결핵 약제 치료 종료 후의 그룹과 치료하지 않은 그룹 간에 IFN- $\gamma$ 분비능 분석 (2).....	34
그림 8. 마우스에서 결핵 약제 치료 종료 후의 그룹과 치료하지 않은 그룹 간에 IFN- $\gamma$ 분비능 분석 (3).....	35
그림 9. 약제 치료 종료 3달 후에 마우스 비장에서 분리한 세포에서 IFN- $\gamma$ 에 대한 면역 반응 분석.....	36
그림 10. 약제 치료 종료 3달 후에 마우스 폐에서 분리한 세포에서 IFN- $\gamma$ 에 대한 면역 반응 분석.....	37
그림 11. 약제 치료 종료 3달 후에 마우스 혈액에서 분리한 세포에서 IFN- $\gamma$ 에 대한 면역 반응 분석.....	38
그림 12. 결핵균에 감염 후 12주간 약제 치료한 마우스 그룹과 치료 하지 않은 마우스 그룹의 폐 조직 사진 .....	40

## 표 차례

표 1. 마우스에 결핵균을 감염시킨 후에 폐와 비장에서의 균 수 측정.....	27
Scheme 1. 결핵의 잠복 감염 모델 동물 실험 일정 .....	18

## 국문 요약

### 대식 세포와 결핵의 잠복 감염 모델 동물을 이용한 결핵 균주간 병원성 비교

우리 나라 인구의 약 1/3 이상이 결핵에 감염되어 있는 것으로 추정되며, 매년 약 12 만 명의 결핵환자가 발생한다고 보고되고 있다. 결핵균에 감염된 사람은 대부분 효과적인 면역 반응을 유발하여, 감염된 부위에 육아종을 형성하고, 질병의 진행을 차단한다. 임상 연구에 따르면, 육아종 내의 결핵균은 죽은 것이 아니라 잠복해 있다고 알려져 있다. 잠복 감염 상태의 대략 5-10%가 다시 재발하여 결과적으로 활동성이 있는 결핵을 유발한다.

결핵의 잠복 감염에 영향을 주는 요인은 숙주의 면역 상태와 결핵균의 병원성 등으로 생각할 수 있다. 본 연구에서는 결핵 균주 간의 병원성의 차이가 잠복 감염 결핵균의 재활성화에 영향을 줄 것이라는 가설 하에 대식세포와 결핵균 잠복 감염 모델을 이용하여 한국에서 가장 많이 발견되는 결핵균 K균주와 다른 나라에서 분리된 임상 균주들 간의 병원성을 비교하고자 하였다.

대식세포에서의 성장 곡선과 cytokine 생산을 비교한 결과 HN878, K, H37Rv, CDC1551 순으로 성장률이 낮았으며, K와 HN878 로 감염된 대식세포에서 IL-6 의 분비를 많이 유도하였다.

결핵 잠복 감염 동물 모델에서 치료 3 개월 후에 마우스 폐, 비장, 혈액에서 IFN- $\gamma$  을 분비하는 세포 수를 균주 별로

비교한 결과 CDC1551 이 숙주의 면역 반응을 가장 활발히 유도하였고, K는 숙주의 면역 반응을 가장 억제하는 양상을 보였다.

요약을 하면, 각각의 결핵 균주에 따라 숙주는 다른 수준의 세포 매개 면역 반응을 유도하는 것으로 보인다. 또한 대식 세포 내에서의 결핵 균주의 증식과 감염성정도(infectivity)도 다른 것으로 보인다. 결핵 균주와 숙주간의 상호 작용을 규명하는 것은 앞으로 결핵에 대한 효과적인 백신과 치료 약제 개발에 도움이 될 것이라고 생각한다.

---

핵심 되는 말 : 결핵, 잠복 감염 모델, IFN- $\gamma$ , 대식 세포

# 대식 세포와 결핵의 잠복 감염 모델 동물을 이용한 결핵 균주간 병원성 비교

<지도교수 조상래>

연세대학교 대학원 의과학과

## 곽정연

### I. 서론

#### 1. 결핵의 현황

결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의해서 발생하는 만성 세균 감염이다. 1993년에 세계보건기구(The World Health Organization; WHO)에서 결핵을 ‘global emergency’로 선포하였을 만큼 결핵은 아직까지 퇴치되지 않고 있는 세계적인 보건문제이다. WHO의 발표에 의하면, 전세계 인구의 1/3이 결핵균에 감염되어 있으며 매년 8백만 명의 새로운 환자가 발생하고, 사망자 수 역시 매년 3백만 명에 이르고 있다(18).

우리나라에서도 전 인구의 약 1/3 이상이 결핵균에 감염되어 있는 것으로 추정되며, 매년 약 12만 명의 새로운 결핵환자가 발생한다고 보고되고 있다. 또한 OECD 가입 30개국 중 결핵사망률 1위를 기록하고 있다. 전세계 결핵 환자의 95%는 개발도상국에서 발생하고 있으나, 여행객의 증가 등 세계화의 영향으로 최근

결핵의 전 세계 확산이 문제가 되고 있다. 또한 선진국의 경우에는 acquired immunodeficiency syndrome(AIDS) 환자들이 *M. avium* complex(MAC)나 결핵균에 감염되어 사망하고 있으며, 이로 인한 결핵의 감염기회 역시 증가되고 있다.

결핵균에 감염된 사람은 대부분 효과적인 면역 반응을 유발하여, 감염된 부위에 육아종을 형성하고, 점차적으로 질병의 진행을 차단한다(2). 임상 연구에 따르면, 이러한 육아종 내의 결핵균은 죽은 것이 아니라, 잠복해 있다고 알려져 있으며, 이러한 상태를 잠복감염(latent infection)이라 한다. 잠복 감염 상태의 대략 10%가 평생 동안에 다시 재발하여, 결과적으로 활동성 결핵을 유발한다(20). 따라서 이러한 결핵의 예방, 진단, 치료를 위해서는 결핵균의 특성을 이해하고, 결핵균의 병독인자 탐색과 병인 기전 규명 및 병독인자의 유전자들에 대한 연구가 중요하다.

## 2. 결핵의 원인균

포유동물에서 결핵을 일으키는 균들을 *M. tuberculosis* complex (MTB complex)라고 하며, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* 등이 이에 속한다. 이 중에서 사람에게 감염되는 결핵균은 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, 아프리카에서 발견되는 *M. africanum* 이다.

Mycobacteria는 간균으로 항산성 염색성을 갖는데, 이러한 항산성 염색성은 mycobacteria 세포벽의 특성에 기인한다. Mycobacteria의 세포벽은 약 60%가 mycolic acid(MA), glycolipid,

peptidoglycolipids, phenolic glycolipids 등의 지방화합물로 이루어져 있어 소수성을 띠며, 다당류 등의 다양한 고분자와 함께 세포벽에 약 10 nm 두께의 표층을 이루어 구조적인 투과 장벽이 된다. 이러한 세포벽의 특징은 mycobacteria가 항산성 염색성과 유해한 환경이나 숙주방어 수단에 대한 저항력 등을 갖도록 한다. 한편, 표층지방인 mycosides 중에서 peptidoglycolipids와 phenolic glycolipids는 특이한 당을 포함하고 있어 독특한 항원 결정기를 이룬다.

결핵균은 분열하는데 필요한 시간이 17~18 시간에 이르도록 증식속도가 느리다. 절대 호기성 대사를 하며 휴면상태로 오랫동안 생존할 수 있는 특성을 가지고 있다. 결핵균의 병원성은 다른 병원균들처럼 내외독소를 생산함으로써 나타나는 것이 아니라 균이 숙주의 방어기전을 이겨내고 조직 내에서 증식할 수 있는 능력과 숙주의 면역반응 정도에 의해 결정된다(31).

폐결핵의 경우, 결핵균의 감염은 결핵균에 오염된 비말핵의 흡입에 의해 일어난다. 흡입된 결핵균은 폐포 표면에서 폐포대식세포에 의해 탐식되고 그 속에서 증식하기 시작한다. 세포성 면역작용에 의해 균이 증식하고 있는 폐조직에 반고형의 건락 괴사가 일어나고 이때, 대식세포에서 유리된 결핵균은 괴사조직에서 나온 독성물질과 낮은 산소 분압으로 인해 증식속도가 억제되거나 감소되었다가 괴사부위에 동공이 형성되면서 산소 분압이 높아지면 균수가 급속히 증가되어 다른 부위로 퍼져나가 괴사와 동공의 형성이 반복된다(31).

### 3. 결핵균 대사의 특징

결핵균은 공기 중에 있다가 사람이 호흡함과 동시에 호흡기를 통해 인체에 유입되게 되는데, 이 때 처음 만나게 되는 폐포 대식세포(alveolar macrophage)의 공격을 이겨내고 대식세포 내에서 증식을 반복하게 된다. 따라서 결핵균은 숙주 내로 감염되어 처음 만나게 되는 환경인 대식세포 내에서 살아서 번식하기 위한 방어기전을 가지고 있어야 한다. 결핵균은 대식세포가 세균을 살해하는 방법인 효소나 산을 분비하는 기전을 차단하여 대식세포를 무력화시키거나 대식세포의 공격에 의하여 손상된 기능을 회복할 수 있는 능력을 가짐으로써 대식세포 내에서 생존할 수 있는 것으로 알려져 있다(22). 이와 같은 결핵균의 방어기전에는 다양한 유전자들의 발현이 필수적이며, 결핵균은 대식세포 내의 환경에 따라 이러한 유전자의 발현을 조절하는 정교한 유전자 발현 조절 기작을 가지고 있는 것으로 사려된다.

### 4. 임상 분리균의 병원성

숙주의 방어 기작을 이겨내는 병원균의 상대적인 능력을 독성(virulence)이라 정의하였으며(10), 결핵 균주들 간에도 독성의 차이가 있는 것으로 알려졌다(16). 결핵균에 감염되어도 모두 발병으로 이어지는 것은 아니며, 감염 후 2년 이내에 감염자의 5-10%만이 결핵으로 진행된다. 나머지는 감염의 징후 없이 숙주의 면역작용에 의해 감염된 결핵균이 사멸되거나,

휴면상태로 죽지 않고 남아있다가 숙주의 면역력이 약해졌을 때 일부가 발병한다. 감염에서 발병에 이르기까지는 여러 가지 복합적인 요인들에 의해 결정되는데, 첫째는 각각의 숙주가 갖는 유전적 요인으로 결핵균에 대한 감수성이나 저항성을 결정짓는다(11). 또 다른 요인으로 숙주의 면역반응을 일으키는 능력이 결핵균에 따라 다른 것이다. 임상분리 결핵균주인 CDC1551의 경우에 다른 결핵 균주들에 비해 TNF- $\alpha$ , IL-6, 10, 12, IFN- $\gamma$  등의 cytokine이 크게 증가하는 등, 숙주에서 강한 면역반응이 유발되었고, 이 경우에 숙주의 생존율은 현저히 증가하였다(12). 마지막으로, 결핵균에서 자체적으로 유전적 변화가 일어나 독성에 변화가 생기는 경우이다(13).

임상 분리 결핵 균주들 간의 병원성의 차이는 환자들에게서 높은 비율로 발견되어 전염력 등이 높을 것으로 생각되는 특정 균주들이 존재하는 것에서 예측할 수 있다. 한국에서 결핵환자들로부터 분리 배양된 임상균들을 분리지문법 (restriction fragment length polymorphism:RFLP)의 양상을 기준으로 분류하였을 때, 높은 빈도로 발견되는 균주들이 동정되었으며, 그 중에서도 가장 높은 빈도를 나타내었던 균주를 K 균주라 명명하였다(14). 한국에서 가장 많이 발견되는 K 균주는 한국의 고등학교에서 학생들의 집단 발병에 관련된 바도 있다(14). 이러한 사실로 미루어 K 균주의 병원성이 높을 것으로 추측되고 있다.

CDC1551은 미국에서 집단 발병에 관여되었던 임상 분리 균주로서, 환자와 짧은 접촉시간을 가졌던 접촉자를 높은 빈도로 튜버쿨린 양성반응을 나타내게 하여 처음에는 독성이 높은 균주인 것으로

예상되었다(15). 그러나, 동물실험 결과, CDC1551은 다른 결핵 균주들에 비해 숙주에서 높은 면역반응을 유도 시키고, 숙주의 생존율은 더 높았지만, 병독성은 실험실 병독성 균주인 Erdman이나 다른 임상 분리 결핵 균주들보다 그리 높지 않은 것으로 밝혀졌다(12).

그 외에 미국의 휴스턴에서 임상 분리된 HN878 균주는 1995년에서 1998년 동안 60명의 환자들에게서 발견되고, 3번의 집단발병에 관여한 균으로 강독성 균으로 알려져 있다(13). HN878은, CDC1551과 반대로, 숙주에서 cytokine의 분비 유도가 적으면서 질병 초기에 감염자들이 사망 하는 것으로 나타났었다(12). 이는 HN878에 대한 숙주의 Th1 type 면역반응 유도가 실패하는데 기인하는 것으로 보인다(16).

## 5. T 세포에 의한 면역 반응

결핵에 대한 보호면역 기전으로는 여러 가지가 동반하게 되는데, 그 중 세포매개 면역 반응(cell-mediated immunity)이 중요한 부분을 차지한다. 특히 MHC class II(major histocompatibility complex: 주조직적합성 복합체) 분자에 의해 제공되는 항원 결정기를 인지하는 CD4+ T세포에 의해서 분비되는 IFN- $\gamma$  면역반응은 결핵의 감염에 대한 보호면역에서 중요한 부분으로 작용한다. 최근 결핵에 대한 보호 면역 반응에서 다른 T 세포들의 중요성도 부각되고 있는데, 결핵에 대한 MHC class I 분자에 의해 제공되는 항원 결정기를 인지하는 CD8+ T 세포의 면역작용도 그 중

하나이다. 항원 특이적인 CD8+ T 세포들은 type-1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 을 생산하는 작용을 한다(23).

대부분의 경우, 결핵균 감염에 대한 면역 반응으로 Th1 세포의 반응이 중요하다고 알려져 있다. 따라서, IFN- $\gamma$ 나 IL-12의 결핍은 결핵균 감염률을 증가시키게 한다고 알려져 왔다(25). 그러나, IFN- $\gamma$ 의 생산만으로는 결핵균에 대한 방어 작용으로 충분치 않다. 생산되는 IFN- $\gamma$ 에 의한 결핵균에 대한 숙주의 반응과 동물 실험에서의 결과는 이 cytokine의 양과 방어 작용에는 직접적인 상관관계가 없다는 보고도 있다(26).

일반적으로 증상이 없는 잠복감염 기간에 감염 여부를 확인하는 것은 쉽지 않다. 그러나, 잠복결핵의 경우 TB complex의 일부 항원을 이용하여 결핵균의 감염에 특이성이 높은 면역학적 진단을 가능하게 한다(27). 특히, 결핵균의 항원 중에서 early secretory antigenic target 6(ESAT6)에 대한 강한 면역 반응은 증상이 없는 숙주에서도 결핵균에 의한 잠복 감염의 진단에 상관관계가 있다고 알려져 있다(28).

## 6. 결핵의 잠복 감염

결핵은 결핵균에 의해 유발되는 공기 전파에 의한 질병이며, 대부분의 경우 폐에 침투하지만, 신체의 다른 부분은 잘 침투하지 못하는 질병이다. 대부분의 건강한 사람에서, 결핵의 발병은 면역 반응에 의해 억제된다. 균이 여전히 살아 있지만, 증상을 보이지 않는 상태를 잠복감염(latent infection) 상태라 한다(21).

결핵에서 latency는 “어떠한 결핵 병변은 존재하지만, 그것의 존재에 의해 어떠한 증상을 나타내는 데는 실패하는 것” 이라고 정의되었다(1). 일반적으로 신환자의 50%는 감염 후 2년 이내에 발병한 경우이며, 나머지가 잠복 감염 상태에서 활동성 있는 결핵으로 발병한 것으로 추정하고 있다. 그러나 사람의 잠복결핵 병인기전은 여전히 큰 수수께끼로 남아 있다.

잠복 상태의 균은 활동적으로 성장하는 균보다 항생제에 좀 더 저항성을 보이기 때문에 잠복감염에 대한 연구는 결핵 발병률을 감소시키려는 보건 정책상 매우 중요한 부분으로 생각된다(29). 따라서, 잠복 상태에 있는 균을 제거하기 위해서는 새로운 치료 방법이 필요하며, 그런 방법을 찾기 위해서는 오랜 기간 동안 살아 있는 균의 상태나 숙주에서 어떤 면역 반응이 일어나고 있는지 등의 잠복 상태의 기전을 이해하는 것이 필요하다(30).

또한, 세계보건기구 (WHO)에 의하면 rifampin(RIF), isoniazid(INH), pyrazinamide, streptomycin(STR) 또는 ethambutol(EMB)인 네 가지 항생제가 결핵치료에 효과적으로 알려져 왔지만, 결핵균이 약에 대한 내성이 나타나 치료율은 떨어지고 내성율은 증가하는 현상이 나타나고 있다. 전세계적으로 다제 약제 내성 결핵균(Multidrug resistant:MDR-TB)의 출현으로 결핵의 심각성은 더욱 커지고 있다. 이러한 상황에서, 좀 더 약제에 대한 저항성을 보이는 휴면 상태에서의 균과 숙주의 방어기전을 규명하는 것은 잠복결핵을 이해하는데 도움이 되리라 생각된다.

## 7. 연구 목적

잠복결핵의 실험동물 모델인 Cornell model은 널리 이용되고 있으나 여러 면에서 표준화가 필요한 실정이다. 즉 감염에 사용한 결핵균주, 감염에 사용한 결핵균의 준비방법, 감염경로 등에 따라 다른 결과를 얻을 수 있다. 현재로서는 *M. tuberculosis* H37Rv strain이 가장 널리 연구되어 왔으나 균주에 따라 병원성이 다르게 나타나리라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 한국에서 가장 많이 발견되는 균주인 K균주와 전세계적으로 발견되는 균주들 간의 차이에 따른 잠복 결핵 감염 모델의 변화를 조사하여 향후 결핵 약제나 예방 치료 백신의 평가에 활용하고자 하며, 그 세부 목적은 다음과 같다.

1) 결핵균이 침투하고, 증식하는 장소인 대식세포에서의 결핵 균주 별로의 증식 곡선과 면역학적 지표를 분석한다.

2) 잠복 감염 동물 모델을 결핵 균주 별로 확립하고 면역학적 지표를 알아본다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 가. 실험 균주

실험 균주로는 *M. tuberculosis* H37Rv, K, CDC1551, HN878을 사용하였다.

#### 나. 마우스

6주령의 specific pathogen-free female C57BL/6 마우스 (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan)를 구입한 후, 연세대학교 임상연구센터의 BL-3 biohazard animal room에서 barrier condition 상태로 유지하였다.

### 2. 실험방법

#### 가. 결핵균의 배양

*M. tuberculosis* H37Rv, CDC1551, HN878, K strain을 Ogawa 배지에 3주간 배양하였다. 균집락을 떠서 sauton potato media에 이식하여 3주간 배양하였다. Sauton potato media는 균을 이식한 감자 부위에서 균이 집락을 형성하여 발육하고 동시에 sauton potato media의 하단인 액체 부위 표면에도 균액이 흘러 균막을 형성하게 된다. 이 액체 부위에서 발육한 균막을 spatula로 떠서 sauton media의 표면에 띄어 놓은 후, 37°C incubator에서 3주간 배양하였다. Incubator에서 배양된 배양액을 Sorvall tube에 옮긴 후, 8000 rpm, 4°C에서 30분 간

원심 분리하였다. 원심 분리 후, 부유액은 완전히 버리고, 균체만 따라 수집하였다. 멸균된 PBS(phosphate buffered saline)을 넣고, 8000 rpm, 4°C에서 40분 간 세척을 한다. 세척이 끝난 후, 부유액을 버리고, 3 mm 유리 구슬을 넣어서, 균체 분산을 위한 vortex를 실시한다. Vortex가 끝난 후에, pipette-man을 이용하여 cryotube에 1 ml씩 분주하여 냉동실(-20°C)에 1시간 넣어 두었다가, -80°C로 옮겨 보관하였다.

#### 나. 대식세포에서의 성장곡선 비교

대식세포는 mouse bone marrow-derived macrophages를 사용하였다. 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Invitrogen Corp., NY, USA), penicillin (100 units/ml) 그리고 streptomycin (100  $\mu$ g/ml)가 포함된 RPMI 배지 (Gibco, NY, USA)에 L929 세포의 상층액이 10%가 포함되게 첨부한 후, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C incubator에서 대식세포를 배양하였다.

Bone marrow-derived macrophage는 C57BL/6 mice의 대퇴부로부터 분리해냈다. 대식세포에 결핵균 감염은 균 수를 MOI(multiplicity of infection)에 맞게 FBS가 포함된 RPMI 배지에 희석하여 대식세포에 잘 섞고, 4시간 동안 37°C에서 배양하여 균체가 대식세포 내로 충분히 들어가게 한 다음 항생제가 들어있지 않은 RPMI 배지로 3번 씻은 후 배양하였다. 대식세포 내 생존 균 수를 측정하기 위하여 대식세포를 0.1% saponin (w/v)으로 처리하여 37°C에서 10분간 CO<sub>2</sub>가 공급되는 incubator에서 반응시켰다. 10분 후에 resuspension하여 10<sup>-1</sup>,

$10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ 까지 희석한 후, M7H11 (Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 50  $\mu$ l씩 도말하여 37°C에서 배양하여 나온 colony 숫자를 세어 균주 별로 대식세포 내 생존율을 비교하였다.

#### 다. 싸이토카인 측정

결핵균을 감염시킨 bone marrow-derived macrophage의 상층액을 모아서 IL-6를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정하였다. ELISA plate에 capture antibody를 각각의 well에 넣고, 4°C에서 18시간 동안 흡착시켰다. 흡착이 안 된 항체를 제거하기 위해서 PBS containing 0.05% tween 20 (PBST)로 씻어준 후, PBS containing 10% FBS로 37°C에서 1시간 동안 block시켜준다. Blocking이 끝난 후, 결핵균을 감염시킨 bone marrow-derived macrophage에서 얻어낸 상층액을 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응을 시킨다. 반응이 끝난 후, PBS containing 0.05% tween 20 (PBST)로 씻어준 후, biotin-conjugated anti-mouse IL-6를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후, PBS containing 0.05% tween 20(PBST)로 씻어준 다음, avidin horse radish peroxidase를 넣고 1시간 동안 배양하였다. 기질용액(o-phenylene-diamine)을 넣고 실온에서 약 15분간 반응시킨 후, 2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣고 발색을 정지시켰다. 발색의 정도를 ELISA reader기로 측정하였다.

#### 라. 결핵의 잠복감염 모델동물의 확립

McCune *et al.* (33) 에 의해 기술된 Cornell model에 약간의 수정된 방법을 다음과 같이 도입하였다 (Scheme 1). 결핵 균주를 미정맥을 통해 마우스에 투여하였다. 투여 1일 후에, 감염된 균 수를 마우스 폐와 비장에서 확인하였다. 균에 감염시킨 후 2주 후부터, 마우스에 isoniazid(INH)를 25 mg/kg/day, pyrazinamide(PZA)를 1000 mg/kg/day로 12주간 투여하였다. 12주간의 약제 치료 (chemotherapy)가 끝나고 2주 후에 폐와 비장에서의 균 수를 확인하여, 마우스 조직에서 배양되는 균이 없다는 것을 확인하였다. 그 후, 균주 별로 재발되는 상황을 관찰하였다. 일정 기간 후에도 재발되지 않는 경우, 면역 억제제인 steroid를 투여하여 결핵균을 재발시킨 후, 균주 별로 면역상태를 확인하였다.

#### 마. 균 수의 측정

마우스를 이산화탄소로 안락사 시킨 후, 폐와 비장을 무균적으로 절단하여 PBS에 넣어 조직을 분쇄하였다. 조직 현탁액을 1/10으로 단계 희석하고, 각각의 희석액에서 50  $\mu$ l을 M7H11 agar 배지에 떨어뜨린 후, 37°C에서 3-4주간 배양하였다. 각각의 plate에서 결핵균 colony를 센 후, 결과를  $\log_{10}$  CFU (colony forming units)로 나타냈다.

#### 바. 마우스 혈액에서의 mononuclear cell의 분리

마우스의 심장을 통해 혈액을 채취하여 Ficoll-Paque™PLUS

(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 이용하여 mononuclear cell을 분리였다. 세포는 RPMI를 이용하여 두 번 씻는다.

#### 사. 마우스 폐와 비장의 분리

마우스를 이산화탄소로 안락사 시킨 후, 폐와 비장을 무균적으로 분리한 후, 폐와 비장의 일부를 떼어냈다. 폐는 collagenase (Sigma, St Louis, MO, USA)와 deoxyribonuclease (Sigma, St Louis, MO, USA)를 첨가한 후, 37°C water bath에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 폐와 비장을 으갠 후, 각각 70  $\mu$ m cell strainer에 여과시켰다. 여과된 세포들 중에서 RBC를 lysis 시킨 후, mononuclear cell의 수를 hemocytometer를 사용하여 센다.

#### 아. IFN- $\gamma$ 분비 세포 수의 측정

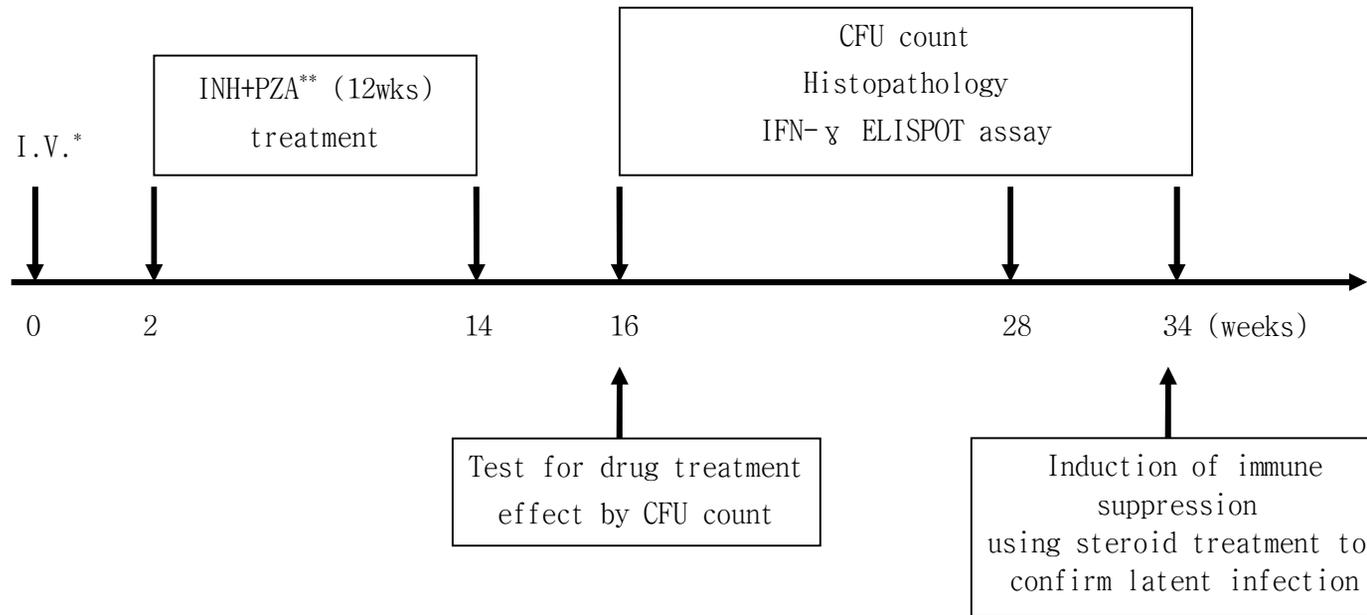
IFN- $\gamma$ 을 분비하는 세포를 ELISPOT assay로 측정하였다. 먼저 96 well assay plate (Millipore, Molsheim, France)를 anti-mouse IFN- $\gamma$  antibody로 하루 동안 4°C에서 coating하였다. 둘째 날 폐, 비장, 혈액 세포를 각각 RPMI에 10% FBS가 들어있는 배지에 넣은 후, 각 well에 넣어주고, antigen을 1 mg씩 반응을 시켰다. 이 plate를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, PBS로 plate를 4번 씻어주었다. Biotin-conjugated anti-mouse IFN- $\gamma$ 을 넣고 2시간 동안 반응시켰다. PBS containing 0.05% tween 20 (PBST)로 4번 씻어준 후, avidin

horse radish peroxidase를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, PBST로 4번 씻어준 후, 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) substrate (Sigma, St Louis, MO, USA)를 넣고 발색시킨 다음 반응을 정지하기 위해서 물로 씻어내고 automatic elispot reader system (AID, Germany)을 이용해서 spot count를 한다.

#### 자. 통계 분석

Bone marrow-derived macrophage로의 결핵균의 침투율을 분산 분석 (ANOVA test)를 통해 분석, 비교하였다.

Scheme 1. 결핵의 잠복 감염 모델 동물 실험 일정



\* Intravenous infection.

\*\*INH (Isoniazid : 25mg/kg/day) + PZA (Pyrazinamide : 1000mg/kg/day).

### Ⅲ. 결과

#### 1. Bone marrow-derived macrophage 내에서의 결핵균의 성장곡선

결핵 균주인 H37Rv, K, CDC1551, HN878 등을 0.5 MOI, 5 MOI, 20 MOI로 4시간 동안 bone marrow-derived macrophage에 감염시켜서 항산성 염색으로 감염을 확인하였다. 대식세포를 0.1% saponin 처리 후 serial dilution을 하고 M7H11 고체 배지에 도말하여 나온 colony 숫자를 세어서 대식세포 내 생존한 결핵균 숫자를 비교하였다.

감염시키고 4시간 후에 bone marrow-derived macrophage로 침투한 결핵균 colony 숫자를 분산분석 (ANOVA test)로 비교한 결과, 0.5 MOI, 5 MOI, 20 MOI 그룹간에 유의한 결과를 얻을 수 있었다 ( $p < 0.01$ , ANOVA). 따라서, 이러한 결과는 결핵 균주에 따라 숙주 세포 내에 초기 침투가 다르다는 것을 결론 내릴 수 있다.

0.5 MOI로 결핵균을 감염시켰을 경우, HN878 균주의 경우 6일 동안 높은 균수가 대식세포 내 생존하는 것을 확인할 수 있었고, lab strain으로 알려진 H37Rv의 경우, 가장 적은 균수가 대식세포 내 생존하였다. 한국인 결핵 환자에서 분리된 K 균주의 경우, 강독균으로 알려진 HN878 균주보다는 낮지만, CDC1551이나 H37Rv보다는 높은 균수 수준으로 대식세포 내에 생존하는 양상을 보였다 (그림 1).

결핵균을 20 MOI로 감염시켰을 경우, 0.5 MOI로 감염시켰을

때와 비슷한 양상을 보였지만, 특이하게도 4일째에 H37Rv 균주가 K 균주보다 많이 검출되는 결과를 보였다 (그림 1).

CDC1551 균주의 경우, 5 MOI로 감염시켰을 경우, 대식세포 내에서의 성장이 지속적으로 증가하는 양상을 보였다 (그림 2).

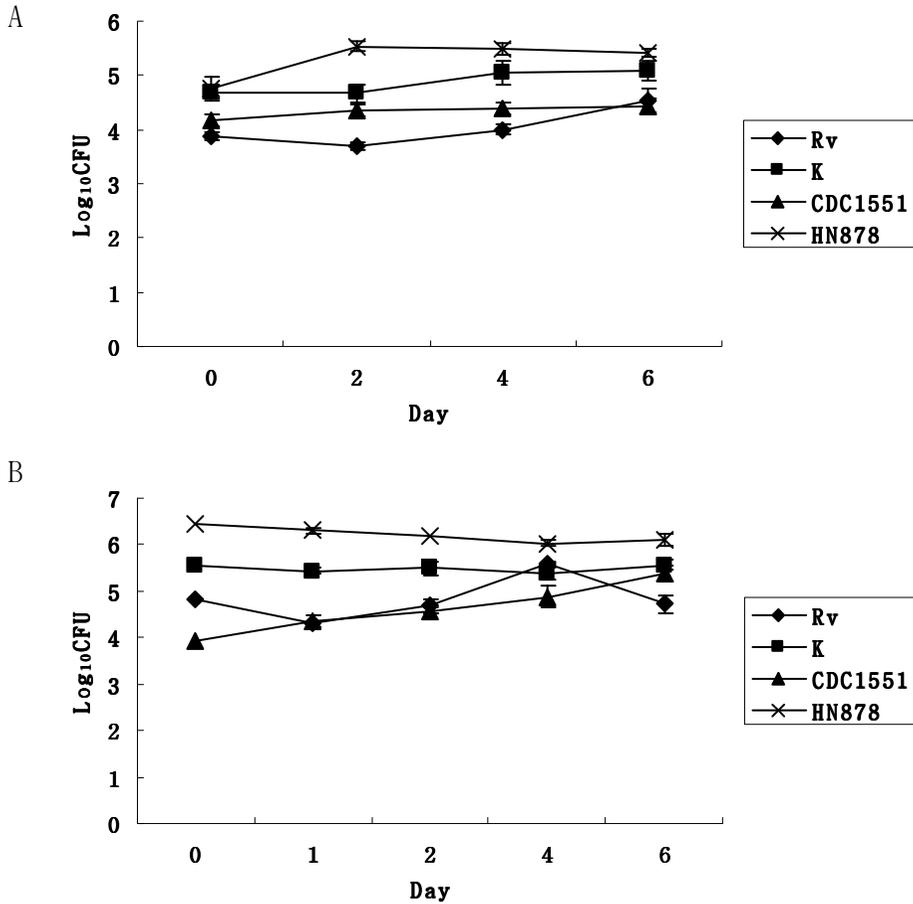


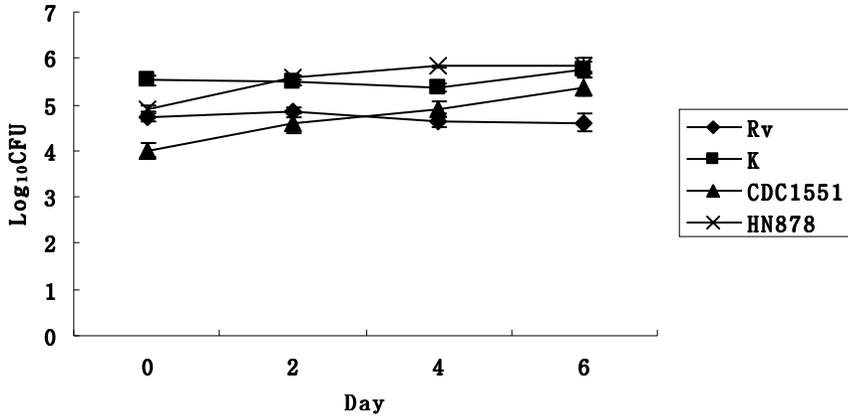
그림 1. 결핵 균주 별로 MOI에 따른 대식세포에서의 성장곡선.

마우스 골수 세포 유래의 대식 세포 (bone marrow-derived macrophage)에 4시간 동안 결핵균을 감염시킨 뒤 감염 직후, 1일, 2일, 4일, 6일 후로 대식세포 내에서 생존한 균의 수를 측정하여 그래프로 나타내었다.

A. 결핵균을 0.5 MOI로 감염시켰을 때

B. 결핵균을 20 MOI로 감염시켰을 때

A



B

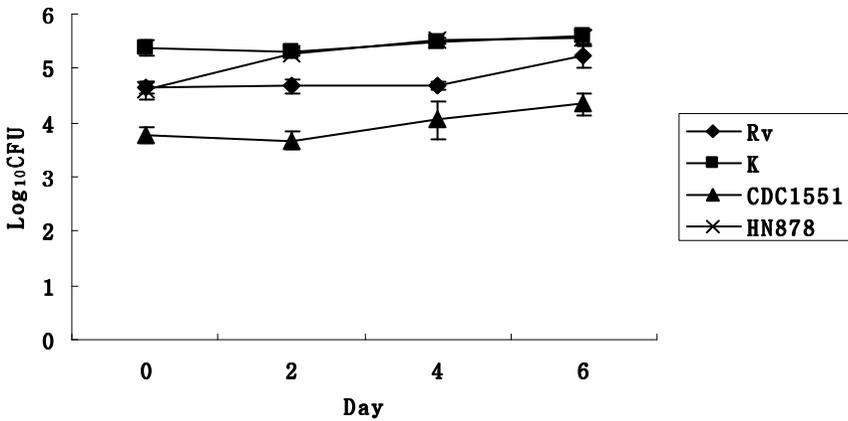


그림 2. 결핵 균주 별로 대식세포에서의 성장곡선.

마우스 골수 세포 유래의 대식 세포 (bone marrow-derived macrophage)에 4시간 동안 결핵 균을 5 MOI로 감염시킨 뒤 감염 직후, 2일, 4일, 6일 후에 대식세포 내에서 생존한 균의 수를 측정하여 그래프로 나타내었다. A와 B는 같은 실험을 반복한 결과이다.

## 2. Bone marrow-derived macrophage 감염 시 결핵 균주에 따른 IL-6 분비 양상

Interleukin-6 (IL-6)는 결핵균 감염에 대한 숙주의 면역반응으로 분비되는 cytokine이다. IL-6는 염증, 조혈작용, T 세포의 분화와 같은 면역 반응에 관여하고 있다(34). 결핵균을 균주 별로 bone marrow-derived macrophage에 감염시킨 후, 분비되는 IL-6의 양을 날짜 별로 ELISA assay를 통해 측정하였다. 결핵균에 감염되고 시간이 경과할수록 대식세포 내에서 분비되는 IL-6의 양이 증가하는 양상을 보였다.

특이하게도, K 균주로 감염시켰을 경우, 다른 결핵 균주에 비해 대식세포가 많은 양의 IL-6를 분비하였다. 그 다음으로 HN878 균주가 IL-6를 많이 분비하였고, H37Rv와 CDC1551의 경우, 분비되는 양이 적었다 (그림 3).

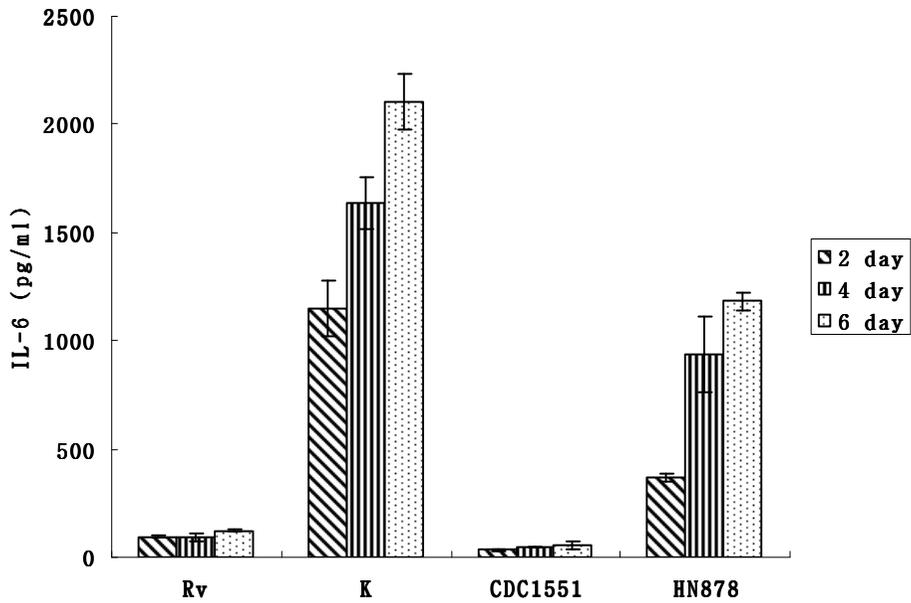


그림 3. 결핵균을 마우스 골수 세포 유래의 대식 세포 (bone marrow-derived macrophage)에 감염시킨 후에 분비되는 IL-6의 정량분석. 결핵균을 감염시키고 2일, 4일, 6일 후, 대식 세포의 상층액으로부터, ELISA를 통해 분비된 IL-6의 양을 측정하였다. Error bar는 standard deviation을 나타낸다.

### 3. 결핵 균주에 따른 잠복 감염 모델 동물 성립

*M. tuberculosis* H37Rv, K, CDC1551, HN878 등을 마우스 미정맥을 통해  $10^6$  cfu로 감염시켰다. 감염시키고, 18시간 내에 마우스의 폐와 비장을 분리하여 M7H11 고체 배지에 배양하여 감염된 균 수를 확인한 결과 K 균주가 가장 많이 폐와 비장에 감염되었고, H37Rv가 가장 적은 수로 감염되었다 (표 1).

결핵균을 감염시키고, 2주 후, 약제치료를 시작하기 전, 폐와 비장에서의 결핵균의 수를 확인하였다. 그 결과, K 균주가 폐에서 가장 많이 생존하여 증식하였고, HN878의 생존 균 수가 가장 적었다. 비장에서는 H37Rv와 HN878로 감염시킨 마우스에서 균 수가 가장 많이 검출되었다 (표 1).

결핵 치료제인 isoniazid와 pyrazinamide를 마우스 사료에 첨가하여 12주간 약제 치료를 실시한 후, 약제 치료를 한 마우스 그룹과 약제 치료를 하지 않은 마우스 그룹간의 cfu를 비교하였다. 약제 치료를 한 그룹의 경우, 폐와 비장을 분쇄하여 M7H11에 도말하여 배양한 결과, 결핵균이 검출되지 않았다. 약제 치료를 하지 않은 그룹의 경우, 감염 2주째와 비교하여 폐와 비장에서 결핵균이 더 증식된 결과를 얻을 수 있었다. 특이한 점은 HN878의 경우, 비장에서 검출되는 균의 수가 감염 2주째보다 약간은 감소한 양상을 보인 것이다. 또한 HN878은 폐에서도 결핵균이 증식하기는 했지만, 다른 균주에 비해 적은 양의 균이 검출되었다. 폐와 비장에서 H37Rv 균이 가장 활발하게 증식하였다 (표 1).

12주간의 isoniazid와 pyrazinamide를 이용한 약제 치료가

끝나고, 12주 후에 각각의 균주에 따른 마우스에서의 폐와 비장에서의 재발률을 알아보았다 (그림 4, 5). 그 결과, 폐에서는 균주 별로 각각 5마리의 마우스 중 2~3마리 정도가 결핵균이 다시 배양 상에 나타나는 것을 알 수 있었고 (그림 5), 비장에서는 K와 HN878의 경우 5마리 중 3마리에서, H37Rv와 CDC1551의 경우 5마리 중 2마리에서 결핵균이 재발한 것을 알 수 있었다 (그림 4).

이러한 결과는 CDC1551이 마우스에서 강한 IFN- $\gamma$  반응을 유도하고 비장에서 재발률이 낮은 것과, K는 약한 IFN- $\gamma$  반응을 유도하고 비장에서의 재발률이 다른 균주보다 높은 것과 연관성을 보인다.

표 1. 마우스에 결핵균을 감염시킨 후에 폐와 비장에서 균수 측정

Infection with <sup>b</sup>	Log <sub>10</sub> CFU <sup>a</sup>							
	Initial dose		Week 2		Week 16			
					Drug treatment		Drug non-treatment	
	Lung	Spleen	Lung	Spleen	Lung	Spleen	Lung	Spleen
H37Rv	3.48±0.07	3.72±0.05	4.44±0.11	4.73±0.05	N.D. <sup>c</sup>	N.D.	5.65±0.88	5.03±0.43
K	3.92±0.24	4.03±0.14	4.55±0.26	4.42±0.11	N.D.	N.D.	5.23±0.54	4.43±0.22
CDC1551	3.73±0.05	3.72±0.02	4.25±0.03	4.57±0.25	N.D.	N.D.	5.21±0.55	4.64±0.54
HN878	3.57±0.03	3.68±0.02	4.11±0.03	4.71±0.19	N.D.	N.D.	5.15±0.72	4.40±0.23

<sup>a</sup> Mean log<sub>10</sub>CFU±standard errors. Bacterial numbers are given as log<sub>10</sub>CFU of *M. tuberculosis* isolated from the lungs and spleens of mice.

<sup>b</sup> Each group consisted of five mice.

<sup>c</sup> Not Detectable.

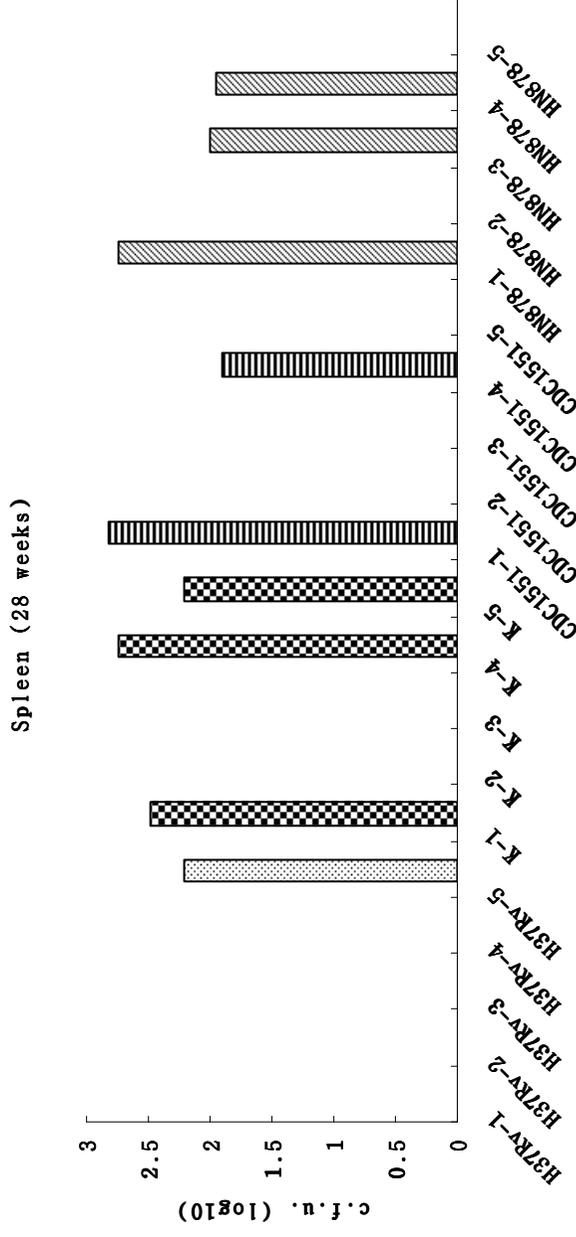


그림 4. 항생제 치료 후의 마우스 비장에서서의 균 수 측정. 마우스에 결핵균을 감염시킨 후, 12주의 항생제 치료가 끝나고, 12주 후에 비장에서 다시 성장한 결핵균 수를 측정하였다. 각각의 균주 별로 5마리의 마우스의 비장을 사용하였다.

Lung (28 weeks)

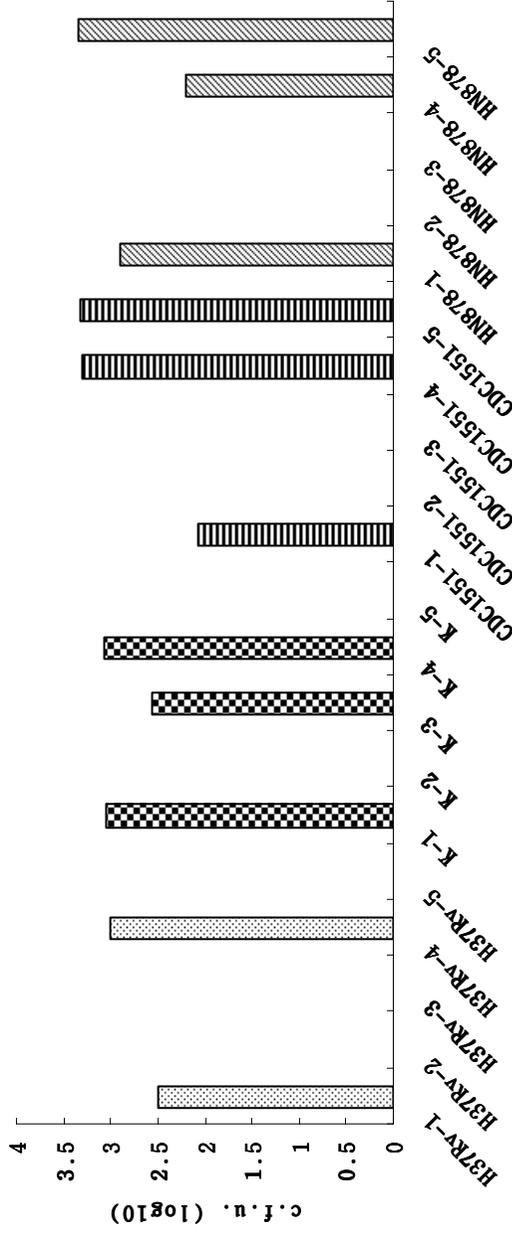


그림 5. 항생제 치료 후의 마우스 폐에서의 균 수 측정. 마우스에 결핵균을 감염시킨 후, 12주의 항생제 치료가 끝나고, 12주 후에 폐에서 다시 성장한 결핵균 수를 측정하였다. 각각의 균주 별로 5마리의 마우스의 폐를 사용하였다.

#### 4. 잠복 감염 모델 동물에서 결핵 균주에 따라서 유도되고 있는 세포 매개 면역 반응 분석

*M. tuberculosis* H37Rv, K, CDC1551, HN878 등을 마우스에 감염시키고 2주 후부터 12주간 약제 치료를 한 그룹과 약제 치료를 하지 않은 그룹에서 폐, 비장, 혈액을 분리하였다. 분리한 조직과 혈액에서 적혈구를 제외한 세포를 얻은 후, 각각에 결핵균에 특이 항원인 ESAT6와 CFP10으로 24시간 동안 자극을 준 후, IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포 수를 측정하였다.

결핵균 치료제로 치료를 하지 않은 그룹의 경우, 치료한 그룹과 비교해서 결핵균 항원으로 자극을 주었을 때, IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포 수가 많았다 (그림 6, 7, 8).

약제 치료가 끝난 후, 비장에서 결핵균 항원의 자극에 의해 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포 수가 적었다 (그림 6).

그에 반해, K와 HN878 균주에 감염된 마우스에서 분리한 폐의 세포에서 결핵균 항원에 자극되어 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포 수는 다른 균주보다 비교적 많았다 (그림 7).

혈액에서 분리한 세포에 결핵균 항원으로 자극을 주었을 경우, H37Rv에서 결핵균 항원에 의해 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포 수가 많았다 (그림 8). 따라서 감염 3개월 후에 비장과 폐에서 유도되는 IFN- $\gamma$  분비능을 분석한 결과를 보면 HN878이 가장 효율적인 세포 매개 면역 반응을 유도한 것을 알 수 있다. 그러나 감염 후 3개월 동안 항생제 치료를 통해서 성립한 잠복 감염 모델 마우스에서 볼 때는 K 균주가 가장 효율적으로 세포매개 면역 반응을 유도하였다.

마우스 잠복 결핵 감염 모델에서 약제 치료가 종료되고 3달 후,

폐, 비장, 혈액의 세포에서 결핵균 항원에 감작되었을 때 유도되는 IFN- $\gamma$  분비능을 측정하였다. 각각의 결핵 균주에 감염된 마우스에서 분리한 폐와 비장 세포에 마우스 개체 별로 positive control인 ConA와 결핵균 항원인 ESAT6와 CFP10으로 자극을 주었다 (그림 9, 10). 균주 별로 5마리의 마우스를 실험 대상으로 삼았다. H37Rv에 감염된 마우스의 경우, 5마리 중 4마리의 비장 세포에서 결핵균 항원 자극에 의해 IFN- $\gamma$  분비능이 유도되었다. K에 감염된 마우스의 경우 5마리 중 3마리, CDC1551의 경우 5마리 중 4마리, HN878의 경우 5마리 중 4마리의 비장 세포에서 결핵균 항원 자극에 의해 IFN- $\gamma$  분비능이 유도되었다. 결핵균 항원인 ESAT6나 CFP10에 자극 받아 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 세포 수는 전체적으로 적었다. 하지만, ConA에 의해 자극 받아 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 세포 수는 CDC1551로 감염된 마우스에서 높게 나타났다. 각각의 결핵 균주로 감염시킨 후, 폐에서 분리한 세포에 결핵균 항원 자극을 주었을 경우, 모든 개체에서 IFN- $\gamma$ 을 분비능이 유도되었다 (그림 10). 특히 CDC1551과 HN878로 감염된 마우스에서 결핵균 항원에 대해 IFN- $\gamma$ 을 생산하는 면역 세포의 수가 높게 나타났다 (그림 10). K 균주로 감염된 마우스의 경우, 다른 균주에 비해 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 세포 수가 적게 관찰되었다. 각각의 결핵 균주에 감염된 마우스에서 혈액을 모아 세포를 분리한 후 positive control인 ConA와 결핵 항원인 ESAT6와 CFP10으로 자극하여 IFN- $\gamma$ 을 생산하는 세포 수를 측정한 결과, HN878과 CDC1551로 감염된 마우스에서 높게 나타났다 (그림 11). 따라서 항생제 효과가 없어진 시점에서 잠복 감염 모델에서의 균주 간 세포 매개 면역

반응 유도를 비교하였을 때 CDC1551, HN878이 가장 세포 매개 면역 반응을 효율적으로 유도하며, K가 가장 효율성이 낮았다.

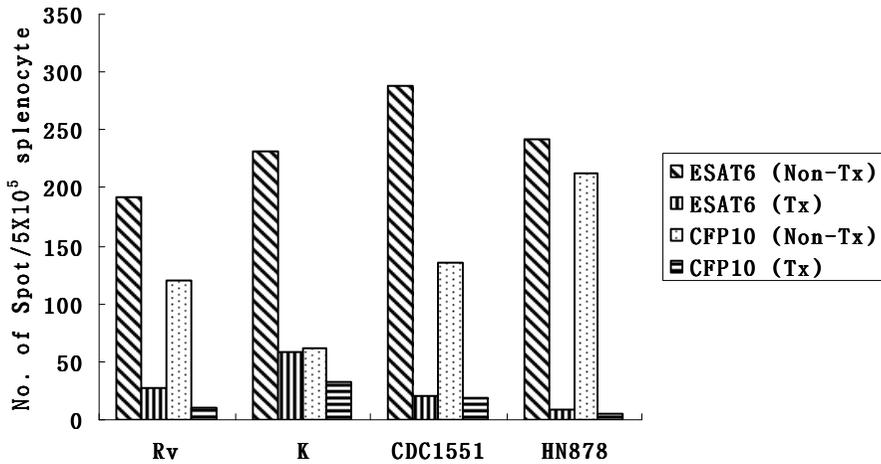


그림 6. 마우스에서 결핵 약제 치료 종료 후의 그룹과 치료하지 않은 그룹 간에 비장에서의 IFN- $\gamma$  분비능 분석. 약제 치료가 종료된 후, 마우스로부터 비장을 분리하여,  $5 \times 10^5$ 의 세포에 결핵균 항원인 ESAT6와 CFP10으로 각각 24시간 동안 자극을 준 후에 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포의 수를 ELISPOT assay를 통해 측정하였다.

(Non-Tx; not drug treatment, Tx; drug treatment).

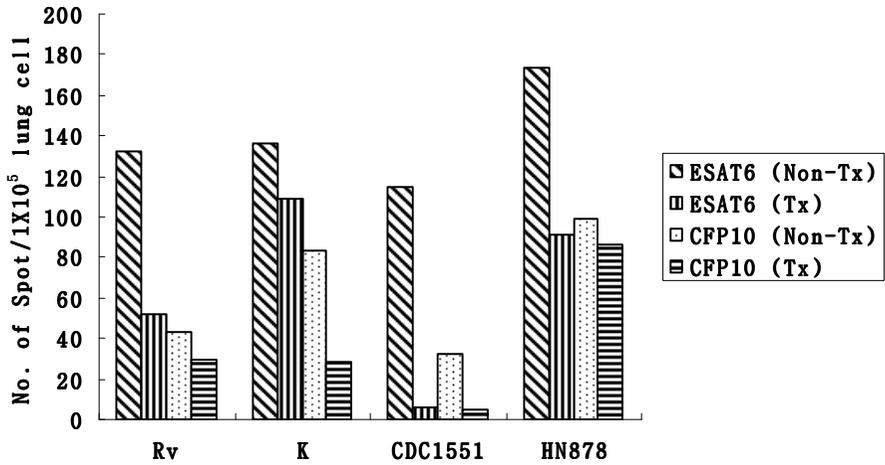


그림 7. 마우스에서 결핵 약제 치료 종료 후의 그룹과 치료하지 않은 그룹 간에 폐에서의 IFN- $\gamma$  분비능 분석. 약제 치료가 종료된 후, 마우스로부터 폐를 분리하여,  $1 \times 10^5$ 의 세포에 결핵균 항원인 ESAT6와 CFP10으로 각각 24시간 동안 자극을 준 후에 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 면역 세포의 수를 ELISPOT assay를 통해 측정하였다. (Non-Tx; not drug treatment, Tx; drug treatment).

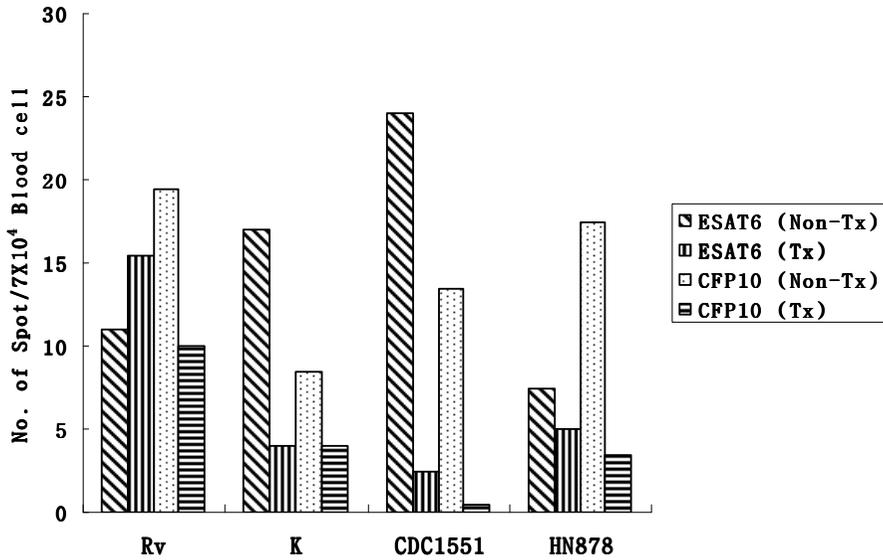


그림 8. 마우스에서 결핵 약제 치료 종료 후의 그룹과 치료하지 않은 그룹 간에 혈액에서의 IFN- $\gamma$  분비능 분석. 약제 치료가 종료된 후, 마우스로부터 혈액을 분리하여,  $7 \times 10^4$ 의 세포에 결핵균 항원인 ESAT6와 CFP10으로 각각 24시간 동안 자극을 준 후에 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포의 수를 ELISPOT assay를 통해 측정하였다.

(Non-Tx; not drug treatment, Tx; drug treatment).

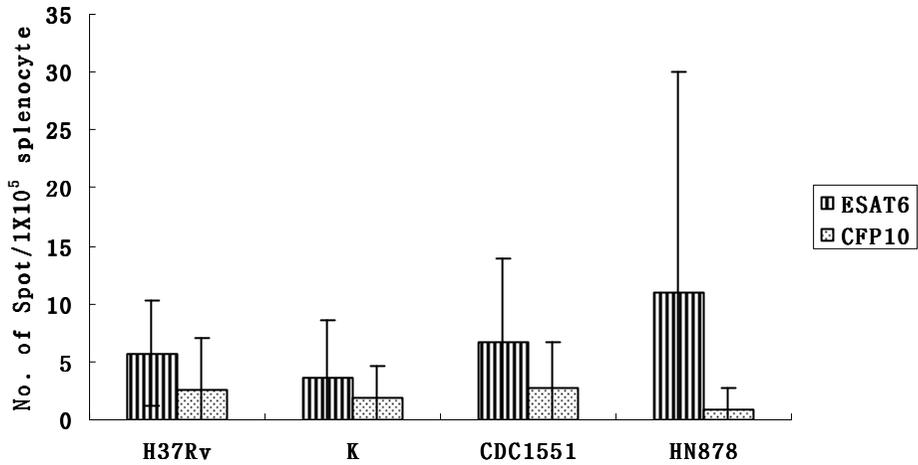


그림 9. 약제 치료 종료 3달 후에 마우스 비장에서 분리한 세포에서 IFN- $\gamma$ 에 대한 면역 반응 분석. 각각의 결핵균으로 감염시킨 마우스로부터 비장을 분리하여, 개체 별로 ConA와 결핵균 항원인 ESAT6, CFP10로 24시간 동안 자극을 준 후에 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포 수를 IFN- $\gamma$  ELISPOT assay를 이용하여 측정하였다. Error bar는 standard deviation을 나타낸다.

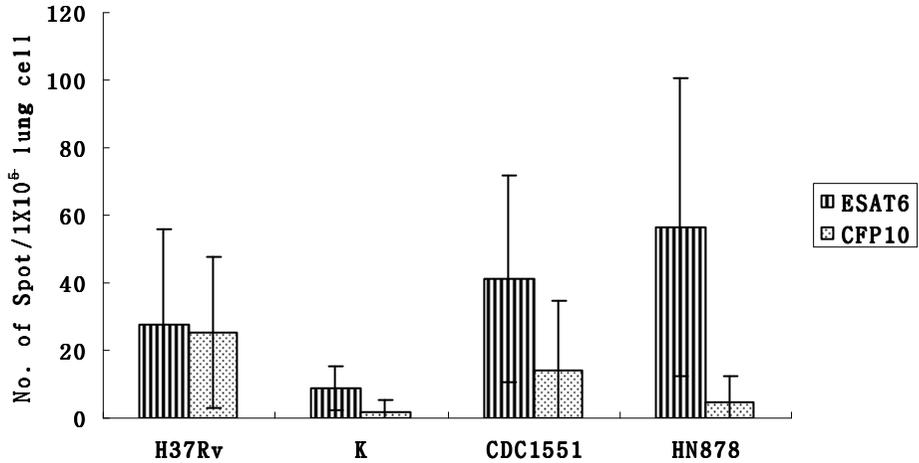


그림 10. 약제 치료 종료 3달 후에 마우스 폐에서 분리한 세포에서 IFN- $\gamma$ 에 대한 면역 반응 분석. 각각의 결핵균으로 감염시킨 마우스로부터 폐를 분리하여, 개체 별로 ConA와 결핵균 항원인 ESAT6, CFP10로 24시간 동안 자극을 준 후에 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포 수를 IFN- $\gamma$  ELISPOT assay를 이용하여 측정하였다. Error bar는 standard deviation을 나타낸다.

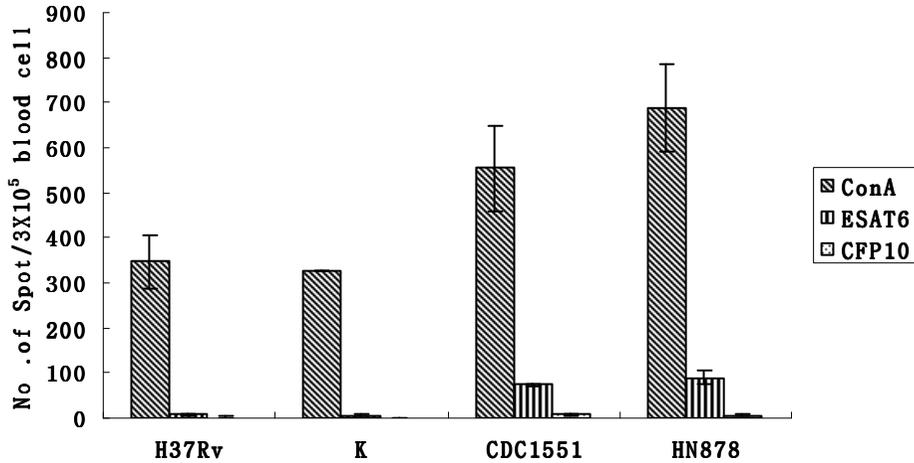


그림 11. 약제 치료 종료 3달 후에 마우스 혈액에서 분리한 세포에서 IFN- $\gamma$ 에 대한 면역 반응 분석. 각각의 결핵균으로 감염시킨 마우스로부터 혈액 세포를 분리하여, 개체 별로 ConA와 결핵균 항원인 ESAT6, CFP10로 24시간 동안 자극을 준 후에 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포 수를 IFN- $\gamma$  ELISPOT assay를 이용하여 측정하였다. Error bar는 standard deviation을 나타낸다.

## 5. 잠복 감염 모델 동물에서의 폐의 조직 단면

결핵균에 감염시키고 약제 치료가 종료된 후, 치료한 마우스 그룹과 치료하지 않은 마우스 그룹 간에 폐의 단면을 균주 별로 비교해 보았다 (그림 12).

그 결과, 치료한 그룹의 마우스 폐는 정상적인 마우스 폐의 소견을 보였고, 치료하지 않은 마우스의 폐는 숙주의 면역 세포가 침윤되어 있음을 알 수 있었다 (그림 12).

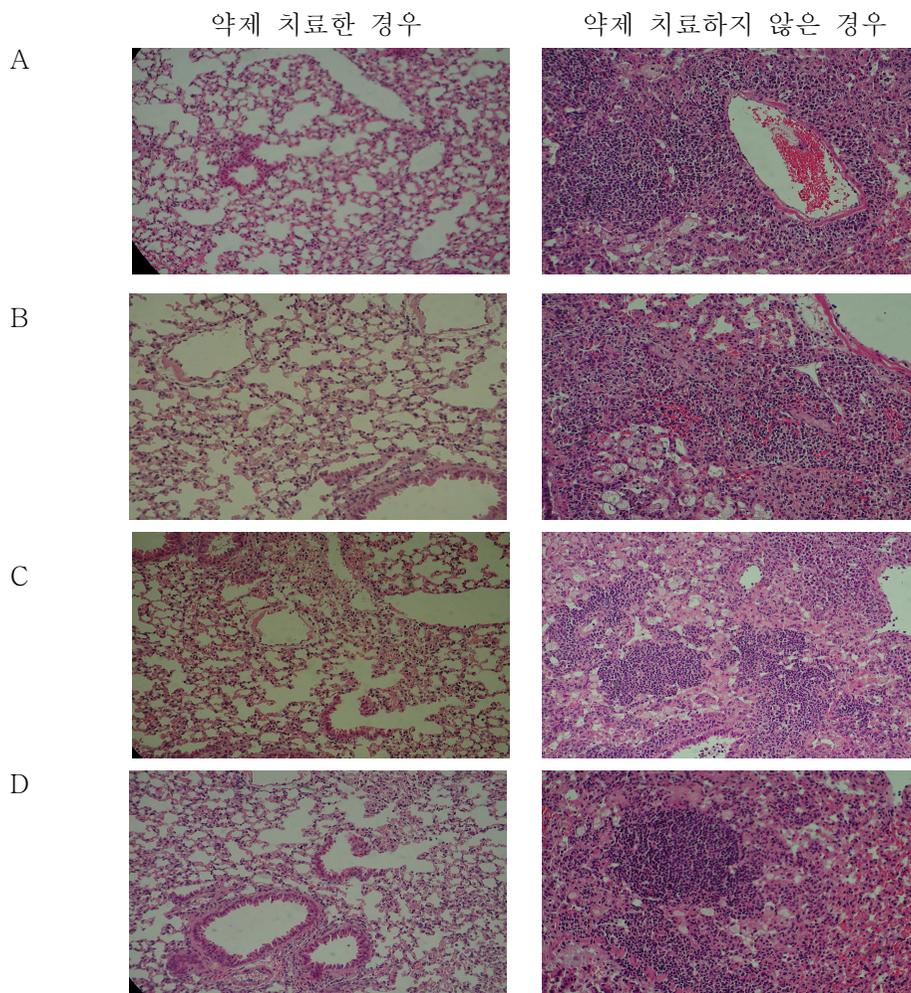


그림 12. 결핵 감염 후, 12주간 약제 치료한 마우스 그룹과 치료하지 않은 마우스 그룹의 폐 조직 사진. 폐 조직을 10% buffered neutral formalin으로 고정한 후 paraffin block을 만들고, sectioning 한 후, hematoxylin & eosin staining 방법을 이용하여 염색하였다. (X 400)

(A; H37Rv, B; K, C; CDC1551, D; HN878)

## IV. 고찰

결핵의 원인균인 *M. tuberculosis*는 숙주에 감염된 후 대식 세포에 침입, 증식하여 생존하는 것으로 알려져 있다. 대식 세포는 여러 가지 방어 기작으로 결핵균의 증식을 억제하고, 결핵균은 숙주의 방어 기작을 피해 생존하여 병을 진행시킨다.

결핵균에는 여러 균주가 존재하며, 이러한 균주들은 다른 병원성을 가지고 있으리라 사려된다. H37Rv는 lab strain으로 알려져 있으며, K는 한국에서 분리된 임상 균주 중에 가장 높은 빈도로 나타나는 균주이다. CDC1551과 HN878은 미국에서 분리된 균주이다. CDC1551은 처음에는 독성이 높은 균주로 예상되었으나 (15), 연구 결과 다른 결핵 균주들에 비해 숙주에서 활발한 면역 반응을 유도시키며, 독성은 다른 임상 분리 결핵 균주들보다 높지 않은 것으로 밝혀졌다(12). HN878은 3번의 집단 발병에 관여한 균으로 강독성인 균주로 알려져 있다(13).

이러한 균주들이 처음 침투하는 세포인 대식세포에서의 침투율과 성장률 그리고 감염으로 유발되는 cytokine이 균주 별로 어떠한 차이를 보이는지 연구하고자 하였다. 같은 양의 균을 4시간 동안 마우스의 bone marrow-derived macrophage에 감염시켰을 때, 대식세포에 대한 침투율은 HN878, K, CDC1551, H37Rv의 순으로 나타났다. 분산 분석 결과, 균주 별로 침투율이 유의한 차이를 보였다. 따라서, 비교적 병원성이 강한 균으로 생각된 HN878의 경우, 대식 세포에 대한 침투력이 다른 균주보다 강하게 나타나는 것으로 보인다. 또한 병원성이 약한 균으로 생각되는 CDC1551의

경우, 대식 세포로의 침투율이 가장 낮게 나타났다. 따라서, 한국 결핵 환자에서 분리된 임상균인 K는 HN878보다는 낮지만, H37Rv나 CDC1551보다 강하게 대식 세포에 침투하는 것으로 보아 병원성이 강할 것이라고 추정된다.

또한 6일 간 대식세포에서의 생존율을 cfu로 나타낸 결과를 통해서 강독균으로 알려진 HN878과 비슷한 수준으로 K균주가 대식 세포 내에서 성장하는 것을 알 수 있었다. 따라서, 병원성이 강하다고 알려진 균주의 경우, 대식 세포로의 침투력과 성장률이 높다고 생각이 되며, HN878과 K는 병원성이 높을 것이라고 추정된다. 결핵균에 감염된 대식세포에서 분비되는 cytokine의 하나인 IL-6의 양을 측정해 보았다. 그 결과, K와 HN878이 다른 균주에 비해 대식 세포에서의 IL-6의 생산을 활발히 유도하는 것을 알 수 있었다.

결핵균은 대부분의 경우 폐에 침투하지만, 신체의 다른 부분은 잘 침투하지 못하는 질병이다. 건강한 사람에서 결핵의 질병으로의 진행은 숙주의 면역 반응에 의해 억제된다. 결핵균이 여전히 살아 있지만, 증상을 보이지 않는 상태를 잠복감염 (latent infection) 상태라 한다(21). 사람에게 있는 결핵의 잠복 감염은 많은 수수께끼를 가지고 있다.

Cornell model은 널리 이용되는 잠복 결핵 감염의 실험적 모델이지만, 여러 면에서 표준화가 필요한 실정이다. 다양한 배양 상태에 따라, 병원성이 달라지듯이, 다른 strain의 균주에서도 다른 병원성이 나타나리라 생각된다.

본 실험에서는 *M. tuberculosis* H37Rv, K, CDC1551, HN878을

마우스에 감염시킨 후, 결핵균 치료제로 12주간 치료를 하는 것을 통하여, 잠복 감염 상태의 동물 모델을 성립하고자 하였다. 12주간의 치료를 통해 마우스의 폐와 비장에서 더 이상 결핵균이 검출되지 않는 것을 확인하였으며, McCune 등(33)이 보고한 결과와 동일하였다.

또한 12주 간의 치료 과정을 가진 마우스 그룹과 치료 과정을 갖지 않는 마우스 그룹간에 검출되는 결핵균 양과 숙주가 결핵의 진행을 차단하는데 중요한 역할을 하는 IFN- $\gamma$ 의 양을 측정하여 상관관계를 분석해 보고자 하였다.

치료하지 않은 마우스 그룹의 경우, 치료 전인 감염 2주째에 비해 결핵균이 증가하는 것을 알 수 있었다. 정맥 내 투여를 통해 감염되어 처음에는 비장에서 폐에서보다 결핵균이 많이 검출되었으나, 감염 16주째에는, 폐에서 더 많은 결핵균이 증식하였음을 확인할 수 있었다. 산소의 공급이 많은 폐에서 결핵균의 증식이 활발히 이뤄지는 것을 관찰할 수 있었다. 예상했던 대로 치료 과정을 가진 마우스의 폐와 비장에서는 결핵균이 검출되지 않았다.

또한 비장, 폐, 혈액 세포에서의 결핵 항원에 의해 감작되어 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 세포 수를 측정하여 결핵균 증식을 차단하는데 중요한 역할을 하는 IFN- $\gamma$ 의 변화를 알아 보고자 하였다. 항생제 치료를 받지 않아서 지속적으로 결핵균이 조직에 존재하여 자극을 받아온 세포의 경우, 결핵 항원으로 *ex vivo*상에서 재감작 되었을 때, 더 많은 양의 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포가 나타났다. K와 HN878에 감염된 후 항생제 치료 과정을 거친 마우스 그룹의 폐의

경우, H37Rv와 CDC1551보다 결핵균 항원에 감작되어 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 세포의 수가 더 많이 증가되어 있었다. 이는 치료 과정을 통해 결핵균이 조직의 culture 상에는 존재하지 않지만, K와 HN878 균주의 경우, 약제 치료 과정을 가졌음에도 폐에서 지속적으로 결핵균 감작에 의한 숙주의 면역 반응이 일어나고 있음을 추정하게 한다. 하지만, 폐의 조직 사진을 통해 치료가 종료된 경우, 숙주의 면역 세포의 침윤은 전혀 나타나지 않은 것을 알 수 있었다.

각각의 결핵 균주에 대한 잠복 감염 모델을 성립하기 위하여 결핵균의 치료가 끝나고 3달 후, 재발되는 양상을 관찰하고자 하였다. 결핵균에 감염된 마우스를 균주 별로 5마리에서 각각 결핵균의 재발률과 검출 양, 조직 세포에서 분비되는 IFN- $\gamma$ 의 양을 알아보았다.

비장에서 세포를 분리한 후, *ex vivo* 상에서 결핵균 항원과 positive control인 ConA로 24시간 동안 자극을 준 결과, 결핵균 항원의 자극에 의해 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 세포의 수는 적었다. 그러나, CDC1551의 경우, ConA로 자극을 주었을 때 IFN- $\gamma$ 을 생산하는 세포의 수가 다른 균주에 비해 높게 나타났다. 이것을 통해 CDC1551로 감염된 마우스의 경우, 비장에서 면역 반응이 다른 균주보다 활발히 일어나고 있음을 알 수 있었다. 폐에서도 같은 실험을 실시한 결과, K의 경우 비장과 폐에서 다른 균주에 비해 숙주의 면역 반응이 약하게 일어나고 있었고, CDC1551은 좀 더 강한 숙주 면역을 유도하고 있음을 알 수 있었다. 혈액에서도 앞의 결과와 마찬가지로 CDC1551로 감염되었을 경우에 강한 세포 매개 면역 반응이 유도되었다. 약제 효과가 없어진 시점에서 나온 분

결과는 기존의 연구와 유사한 결과로, CDC1551의 경우 숙주의 면역 반응을 강하게 유도한다는 것을 확인할 수 있었다. K의 경우, 숙주의 면역 반응이 다른 균주보다 약하게 나타나는 것으로 보아 다른 균주보다 더 생존률이 높을 것이라 추정된다. 하지만 이 것은 IFN- $\gamma$ 에 대한 면역 반응만을 분석한 결과이므로 다른 cytokine에 대한 숙주 면역 반응에 대한 연구가 추가적으로 필요하다. 또한 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 면역 세포가 적은 것이 균주의 병원성이 강하다는 것과 연관이 있는 것을 보기 위해서 폐와 비장에서의 균수를 측정하였다. 그 결과, 폐에서는 균주 별로 각각 5마리의 마우스 중 2~3마리 정도가 결핵균이 다시 배양 상에 나타나는 것을 알 수 있었고, 비장에서는 K와 HN878의 경우 5마리 중 3마리에서, H37Rv와 CDC1551의 경우 5마리 중 2마리에서 결핵균이 재발한 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 CDC1551이 마우스에서 강한 IFN- $\gamma$  반응을 유도하고 비장에서 재발률이 낮은 것과, K는 약한 IFN- $\gamma$  반응을 유도하고 비장에서의 재발률이 다른 균주보다 높은 것과 연관성을 보인다.

결과를 종합해 보면, 마우스 bone marrow-derived macrophage에서 비교적 성장이 활발한 K와 HN878은 숙주에서 분비되는 cytokine인 IL-6의 분비를 비교적 활발히 유도하였다. 이것은 그 밖에 대식세포에서 분비되는 proinflammatory와 inflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 등에 대한 추가적인 실험을 통해 결과를 보완할 것이다.

마우스 잠복 결핵 모델의 경우, 아직 실험상에 보완해야 할 점이 많지만, 치료가 종료되고 결핵균 재발률을 확인하는 시점에서

CDC1551로 감염된 경우, 숙주의 면역작용이 가장 활발히 유도되고 있음을 알 수 있었고, K로 감염된 경우, 숙주의 면역작용이 가장 억제되고 있음을 알 수 있었다. 그리고 이 것은 재발되어 나타나는 결핵균 수와 연관성을 보이고 있었다. 추후 면역 억제제인 steroid를 사용하여 숙주의 면역 억제를 유도하여 잠복 결핵 감염 상태를 확인할 예정이다.

## V. 결론

1. *M. tuberculosis* H37Rv, K, CDC1551, HN878을 sauton surface culture를 통해 배양한 후 대식세포에서의 성장 곡선과 cytokine 생산을 비교한 결과 HN878, K, H37Rv, CDC1551 순으로 대식세포 침투율이 낮았으며, K와 HN878로 감염된 대식세포는 IL-6의 분비가 가장 많이 유도되었다.

2. Cornell model로 알려진 결핵 잠복 감염 동물 모델을 결핵 균주별로 확립하였다. 마우스 미정맥을 통해 결핵균을 감염시킨 후, 치료 과정을 실시하였다. 예정된 12주 간 치료 후, 배양 상에 결핵균이 더 이상 검출되지 않은 것을 확인하였다.

3. 결핵 잠복 감염 동물 모델에서 치료 3개월 후에 마우스 폐, 비장, 혈액에서 IFN- $\gamma$ 을 분비하는 세포의 수를 결핵 균주 별로 비교한 결과 CDC1551이 숙주의 면역 반응을 가장 활발히 유도하였고, K는 숙주의 면역 반응을 가장 억제하는 양상을 보였다.

4. 따라서, 치료 백신의 유효성 검정을 위해서 Cornell model을 사용할 경우 그 동안 널리 이용되고 있는 H37Rv 균주와 아울러 K 균주와 같이 병독성이 비교적 강한 균주를 포함하는 것이 바람직하다고 판단된다.

## 참고문헌

1. Gomez JE, McKinney JD, *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. Tuberculosis 2004;84:29-44
2. Scanqa CA, Mohan VP, Joseph H, Yu K, Chan J, Flynn JL. Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. Infection and immunity 1994;67:4531-4538
3. Ha SJ, Jeon BY, Kim SC, Kim DJ, Song MK, Sung YC, Cho SN. Therapeutic effect of DNA vaccines combined with chemotherapy in a latent infection model after aerosol infection of mice with *Mycobacterium tuberculosis*. Gene therapy 2003;10:1592-1599
4. Ha SJ, Jeon BY, Youn JI, Kim SC, Cho SN, Sung YC. Protective effect of DNA vaccine during chemotherapy on reactivation and reinfection of *Mycobacterium tuberculosis*. Gene therapy 2005;12:1-5
5. Cardona PJ, Ruiz-Manzano J, On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli. Eur Respir 2004;24:1044-1051
6. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis:

mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *The Lancet* 2003;3:578-590

7. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and immunity* 2001;69:4195-4201

8. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis* 2004;84:93-101

9. de Wit D, Wootton M, Dhillon J, Mitchson DA. The bacterial DNA content of mouse organs in the Cornell model of dormant tuberculosis. *Tubercle and lung disease* 1995;76:555-562

10. Mish FC. Merriam Webster' s Collegiate Dictionary, 10<sup>th</sup> Ed. 1998.

11. Bellamy R, Beyers N, McAdam KP, Ruwende C, Gie R, Sammai P, Bester D, Meyer M, Corrah T, Collin M, Camidge DR, Wilkinson C, Hoal-Van Helden E, Whittle HC, Amos W, van Helden P, Hill AV. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: A genome-wide scan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000;97:8005-8009

12. Manca C, Tsenova L, Barry CE, Bergtold A, Freeman S, Haslett P, Musser JM, Freedman VH, Kaplan G. *Mycobacterium*

*tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response *in vivo* and *in vitro*, but is not more virulent than other clinical isolates. *J. immunol.* 1997;162:6740-6746

13. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicated evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997;94:9869-9874

14. Kim SJ, Bai GH, Lee HY, Kim HJ, Lew WJ, Park YK, Kim Y. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among high school students in Korea. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5:824-830

15. Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, Jones JS, Westmoreland H, Onorato IM. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* 1998;338:633-639

16. Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE, Freedman VH, Kaplan G. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- $\alpha/\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.*

2001;98:5752-5757

17. Grange JM. Mycobacteria and human disease. London. Edward arndd Pty Ltd ; 1998

18. Dolin PI, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull. W.H.O. 1994;72: 213-220

19. Amberson JB. The significance of latent forms of tuberculosis. N Engl J Med. 1938;219:572-576

20. Stead WW. Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man : recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection? Am. Rev. Respir. Dis. 1967;95:729-745

21. Ross L, Goff M. Latent tuberculosis infection and BCG vaccination. Journal of Midwifery & Women' s Health. 2005;50:344-347

.

22. Padmini S. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. Current Opinion in Immunology. 2005;17:374-380

23. Glenn T, Cornelius K, Hanni H, Ingeborg Z, Claudia N, Kirsten F, Klaus K, Markus J M. Highly Focused T Cell Responses in Latent Human Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Immunology*. 2005;174:2174-2184.
24. Demissie A, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Fletcher H, Zumla A, Weldinck K, Brock I, Andersen P, Doherty TM : the VACSEL Study Group. Healthy Individuals That Control a Latent Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Express High Levels of Th1 Cytokines and the IL-4 Antagonist IL-4 $\delta$ 2. *The Journal of Immunology* 2004;172:6938-6943.
25. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, Levin M, Blanche S, Seboun E, Fischer A, Casanova JL. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N. Engl. J. Med.* 1996;335:1956-1961.
26. Agger EM, Andersen P. Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon- $\gamma$ . *Vaccine* 2001;19:2298-2302.
27. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2002;356:1099-

1104.

28. Ulrichs T, Anding P, Porcelli S, Kaufmann SH, Munk ME. Increased numbers of ESAT-6- and purified protein derivative-specific interferon- $\gamma$  producing cells in subclinical and active tuberculosis infection. *Infect. Immun.* 2000;68:6073-6076.

29. Dickinson JM, Mitchison DA. Experimental models to explain the high sterilizing activity of rifampin in the chemotherapy of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1981;123:367-371.

30. Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GAW, Hernandez Pando R. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology.* 2002;128:229-237

31. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection by Enumeration of Antigen-specific T Cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:824-828

32. Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in

*Mycobacterium tuberculosis*. Trends in microbiology. 1998;6:107-112.

33. McCune RM, Tompsett R. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. I. The persistence of drug susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. J Exp Med 1956;104:737-760.

34. Flynn J, Chan J Immunology of tuberculosis. Annu. Rev. Immunol. 2001;93-129.

## **Abstract**

Comparison of virulence among *Mycobacterium tuberculosis* isolates in macrophages and in a latent infection model

Jeong Yeon Kwak

*Department of Medical Science*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Sang-Nae Cho)

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is one of the world's major infectious diseases. *M. tuberculosis* is a facultative intracellular pathogen residing in macrophages of the hosts. There have been many strain variations observed in *M. tuberculosis* over the several continents. Some of these *M. tuberculosis* strains caused outbreaks in several endemic and non-endemic areas. The virulence of these *M. tuberculosis* strains seemed to be related to many factors such as hosts' immune responses, exposure of hosts to environmental mycobacteria, and strain variations. However, it has not been well characterized how different *M. tuberculosis* strains respond to the protective immune system of hosts. In this study, therefore, virulence of

four *M. tuberculosis* strains (H37Rv, CDC 1551, HN878 and K) was compared by examining their growth rates in macrophages, induction of cytokines in macrophages and cell mediated immune responses in mice, and relapse rate in a latent infection model.

When mouse bone marrow-derived macrophages were infected with *M. tuberculosis*, the HN878 strain was phagocytized most efficiently by or infected the macrophages, followed by the K and H37Rv strains in order. The CDC1551 strain was least infectious to macrophages. Number of live bacilli of these strains maintained at the approximately same level as the initial infection doses for six days. This may indicate that the K strain is as virulent as the HN878 strain.

IL-6, a pro-inflammatory cytokine, was detectable in the highest concentration in the culture supernatant of macrophages infected with the K strain of *M. tuberculosis* and in lower concentration in the macrophages infected with either H37Rv or CDC1551. This may reflect bacterial load in the macrophages rather than efficiency of induction of IL-6 by *M. tuberculosis* strains.

Lastly, a modified Cornell latent tuberculosis model was established and employed to compare relapse rate among the *M. tuberculosis* strains. When examined at 12 weeks after the last day of treatment, two to three animals of five animals

per group had re-growth of *M. tuberculosis* in the lungs. In the spleen, however, both the K and HN878 strains had relapse in three out of five animals while H37Rv and CDC1551 only one or two, indicating that there may be a slight difference in extent of dissemination or relapse rate between *M. tuberculosis* strains. Interestingly, the CDC1551 strain induced strongly IFN- $\gamma$  response while the K strain elicited a weak IFN- $\gamma$  response, which may explain higher relapse in the latent infection model.

In summary, there was a clear difference in efficiency of entering macrophages and in relapse rate in a latent infection model of TB in mice among *M. tuberculosis* strains. Such difference may be due to their ability of inducing cell-mediated immune response in *ex vivo* and *in vivo* models. The pathogenesis of *M. tuberculosis* may be, therefore, affected by the host factors in addition to the bacterial virulence. Further characterization of the interaction between *M. tuberculosis* and the host will help to develop the effective vaccine and therapeutic drugs for TB.

---

Key Words : *M. tuberculosis*, virulence, macrophage, T cell, IL-6, IFN- $\gamma$ , latent infection, Cornell latent tuberculosis model.