

폐 및 폐외결핵환자에서의 T 림프구 매개성 면역기능의 변화에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

최동철 · 심태선 · 조상현 · 정기호 · 현인규
유철규 · 김영환 · 심영수 · 김건열 · 한용철

= Abstract =

T-cell Mediated Immunity in Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis

Dong Chull Choi, M.D., Tae Sun Shim, M.D., Sang Heon Cho, M.D.
Ki Ho Jung, M.D., In Gyu Hyun, M.D., Chul Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D.
Young Soo Shim, M.D., Keun Youl Kim, M.D. and Yong Chol Han, M.D.

Department of Internal Medicine & Tuberculosis Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: T-cell mediated cellular immunity has been suggested as an important mechanism in mycobacterial infection and imbalance between helper/inducer and suppressor/cytotoxic T-cell has been suggested as an important immunological abnormality in the pathogenesis of tuberculosis in human.

Method: To determine whether there is any difference in T-cell mediated immunity in the pathogenesis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, total numbers of WBC&lymphocytes were counted and helper/inducer and suppressor/cytotoxic cells were calculated by flow cytometry.

Blastogenesis after stimulation with Concanavalin-A, Phytohemagglutinin and PPD were measured by ³H-thymidine uptake. PPD skin test was performed as an in vivo test.

Results:

- 1) There was no significant difference in the size of PPD skin test between pulmonary and extrapulmonary tuberculosis groups.
- 2) Number of total lymphocytes significantly decreased in tuberculosis patients compared with healthy control group. But there was no significant difference between pulmonary and extrapulmonary tuberculosis groups.
- 3) Number of HLA-DR and Interleukin-2 receptor (+) cells were significantly increased in tuberculosis patients. But there was no significant difference between pulmonary and extrapulmonary tuberculosis groups.
- 4) There was no significant difference in the numbers of WBC, T₃, T₄ and T₈ lymphocytes and T₄/T₈ ratio between tuberculosis patients and healthy controls.
- 5) There was no significant difference in the blastogenesis after stimulation with specific and non-specific blastogens between tuberculosis patients and healthy controls.
- 6) The percentage and absolute number of T₄ lymphocyte were significantly correlated with the size of PPD skin test. (r=0.689 and 0.598)

본 논문은 1990년 제71차 대한 결핵 및 호흡기학회 추계학술대회에서 발표 되었음.
본 논문은 학술진흥재단의 연구비보조로 이루어 졌음.

Conclusion: From these results, it is concluded that there was no difference in T-cell mediated immunity between pulmonary and extrapulmonary tuberculosis group.

But, because it is suspected that there might be some difference in the role of T-cell mediated immunity in the pathogenesis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis or even among the extrapulmonary tuberculosis patients, further studies would be required.

Key Words: Tuberculosis, T-lymphocyte, Immunity

서 론

결핵은 비록 그 유병율이 지난 여러해동안 감소하기는 하였으나 아직까지 세계적으로 중요한 감염성 질환중의 하나이며 국내에서도 X선상 활동성 폐결핵의 유병율이 1.8%로 보고되고 있다¹⁾.

결핵균의 초감염은 공기를 통한 결핵균의 흡입에 의하며^{2~4)} 이때 폐포내에 도달한 직경 1내지 5미크론의 비말내에 함유된 결핵균은 대식세포에 의하여 탐식되고 효과적인 대식세포와 세포매개성 면역이 있는 경우에는 결절(tubercle)을 형성하면서 치유되어 결핵의 병변이 폐에 국한되는 것으로 알려져 있다. 그러나 활성이 있는 균이 혈중내로 전파되어 임파선이나 신장, 골등에 결핵의 병변을 형성하게 될수도 있으며 결핵균의 감염의 치유에 있어 세포성면역과 활성화된 대식세포가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 마우스를 이용한 실험적인 우형항산균(*Mycobacterium bovis* strain, *Bacillus Calmette-Guerin*)의 감염시에 인위적으로 세포성면역 기능을 제거한 마우스에 인체의 조력 T림프구에 해당되는 L3T4(+)림프구를 투여하였을 때에는 항산균의 감염을 효과적으로 제거할 수 있었으나 억제 T림프구에 해당되는 Lyt-2⁺림프구⁶⁾의 투여시에는 그 효과가 미미한 점⁷⁾, 결핵균의 감염시에 획득된 면역이 T림프구를 파괴했을 때 전달되지 않는다는 점, PPD 자극에 의하여 T림프구의 증식이 일어나는 점등⁸⁾은 결핵균의 감염시 숙주가 면역성을 나타내는데에 T림프구가 중요한 역할을 할 것이라는 사실을 시사하는 것이며, 국내에서도 조력 T림프구의 수 및 T₄/T₄ ratio가 PPD피부 반응시의 병변의 장축길이와 상관관계가 있다는 보고⁹⁾와 림프아구형성의 정도와 PPD 피부반응검사의 크기가 관련이 있다는 보고¹⁰⁾가 있다.

한편 결핵균의 감염시에 발생하는 병변은 1차감염경로인 호흡기관에 국한되는 경우도 있으나 폐의 병변 유

무와 무관하게 림프선, 신장, 늑막, 중추신경계등의 폐외장기에도 발생할 수도 있으며 외국의 경우 최근 폐결핵의 유병율이 급격히 감소함에도 불구하고 폐외결핵의 유병율은 미미한 감소만을 보이고 있을 뿐이어서^{11~14)} 폐외결핵의 중요성이 대두되고 있으며 국내에서도 최근 항결핵화학요법의 시행에 따라 폐결핵의 유병율은 감소 추세를 보이고 있고¹⁵⁾ 폐결핵의 치료는 최근 6개월내지 9개월의 단기화학요법으로도 만족할 만한 효과를 기대할 수 있다고 생각되고 있으나¹⁶⁾ 폐외결핵의 경우는 비록 9개월간의 단기요법으로 만족할 만한 치료결과를 얻을 수 있었다는 보고¹⁷⁾도 있기는 하나 실제 임상에서는 단기요법에 잘 반응하지 않는 경우를 종종 경험하게 되어 상대적으로 폐외결핵의 중요성이 대두되고 있다.

과거 결핵균의 감염시에 숙주의 면역반응과 병변의 양상 및 치료경과에 따라 reactive, reactive-intermediate, unreactive-intermediate, unreactive 등으로 그 양상을 분류한바 있으며¹⁸⁾ 결핵이 국한성인 경우보다 광범위한 경우에 지연형 과민반응도 저하된다는 보고도 있어 동일한 결핵균의 감염에 대한 숙주의 면역반응에는 개인간의 차이가 있을 것으로 의심할 수 있고 정상인과 폐결핵환자간, 또는 폐결핵환자와 폐외결핵환자간에 결핵균감염시의 면역반응에 어떤 차이가 있을 것으로 추측할 수 있으며 이에 대해 국내외에서 많은 연구들이 행하여져 왔다^{8~10,19~22)}.

그러나 과거의 연구들은 폐결핵과 폐외결핵의 경우를 구분하지 않았거나^{20,22)} 폐외결핵의 경우 결핵성 늑막염환자들에서의 T림프구 매개성 면역기능의 변화만을 관찰한 경우가 많아서^{9,10,23,24)} 폐결핵환자와 폐외결핵환자군간의 T림프구 매개성 면역기능의 차이를 규명하기에는 미흡한 점이 많았다.

따라서 저자들은 폐결핵환자 11명, 결핵성 늑막염환자 3명을 포함한 폐외결핵환자 17명 및 정상 대조군 10명에서 말초혈액의 총 림프구수, 총 T림프구수와 T림프구 아형의수, 억제 T림프구와 조력 T림프구간의 비

을 유세포측정법(flow cytometry)을 이용하여 측정하였고, PPD피부반응검사의 크기와 유사분열물질 자극시의 림프아구 형성의 정도를 비교하여 T림프구 매개성 세포성 면역기능의 차이를 관찰하여 폐결핵과 폐외결핵의 병인론적 차이점을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1) 환자군

1990년 5월부터 12월까지 서울대학병원에 입원하였거나 외래에서 진료를 받았던 28명의 결핵환자를 대상으로 하였으며 폐결핵환자가 11명 폐외결핵환자가 17명이었다. 각 결핵환자군은 과거 결핵치료의 병력이 없으면서 다른 급만성 전신 질환이 없는 환자로서 객담이나 조직의 항산균 도말검사상 양성이거나 조직 병리검사상 전락

성피사가 관찰된 경우에 국한하였고 이들에 대한 임상적 특징은 Table 1과 같다.

2) 대조군

최근 6개월간 호흡기 증세가 전혀 없었으며 기타의 전신질환이 없는 건강한 성인 10명을 대조군으로 하였다.

2. 방 법

1) PPD피부반응검사

생체내의(in vivo) T림프구매개성 면역기능의 지표로 5TU/ml의 PPD 시약(국립보건원)0.1ml를 전박내 측부위에 피내주사하고 48시간후에 경결(induration)의 크기를 측정하였다.

2) 백혈구수 및 총 림프구수

상완에서 2ml의 정맥혈을 채취하여 EDTA로 항응고 처리후 미국 Coulter사의 Coulter Counter[®]를 이용하여 측정하였다.

Table 1. Patient Characteristics

Control			Pulmonary Tuberculosis			Extrapulmonary Tuberculosis			
Age	Sex	PPD**	Age	Sex	PPD**	Age	Sex	PPD**	Disease*
25	F	21x21	58	M	16x16	31	F	0x0	5
27	F	19x19	53	M	6x6	23	F	15x15	1, 2
31	M	16x16	19	F	3x3	16	F	0x0	4, 8
32	M	16x16	28	F	20x20	33	F	20x20	1, 5
24	M	15x15	58	M	20x20	21	F	20x20	3, 4
28	M	14x14	80	M	0x0	34	M	—	3
38	M	—	75	F	12x12	29	M	8x8	3
24	M	12x12	50	F	20x20	26	M	14x14	6
31	M	—	33	F	15x15	17	M	—	4
26	M	16x16	18	M	18x18	30	F	0x0	4
			21	M	12x12	25	F	14x14	2
						28	F	22x22	2
						21	F	25x20	2
						22	M	0x0	4
						61	F	12x12	8
						46	F	0x0	5, 6, 8
						17	F	25x22	2

* 1 : Pulmonary Tuberculosis, 2 : Tuberculous Lymphadenitis, 3 : Tuberculous Pleurisy, 4 : Tuberculous Peritonitis, 5 : Miliary Tuberculosis, 6 : Intestinal Tuberculosis, 7 : Tuberculous Meningitis, 8 : Bone Tuberculosis

** Size of PPD skin test (mmxmm)

3) 성숙림프구, 조력림프구 및 억제림프구의 백분율 및 절대수의 측정

(1) 림프구의 분리

상완에서 정맥혈 24 ml를 채취하여 헤파린 300 unit와 혼합한 후 동량의 IMDM (Isocove's modified Dulbecco's media)으로 2:1로 희석한 다음 15 ml Falcon Tube® 6개에 희석한 혈액 8 ml와 비중 1.018의 Ficoll-Hypaque 밀도경사용액 4 ml를 넣은후 400 rpm에서 30분간 원심분리하여 단핵세포만을 분리하였다. 이렇게 얻은 단핵세포부유액을 IMDM으로 희석하여 2500, 1500, 1500 rpm으로 각각 10분간 원심분리한 후 3회 세척하였다.

Tube 4개의 단핵세포 부유액을 다시 0.05% sodium azide와 0.2%의 우혈청 알부민(bovine serum albumin)으로 세척한 후 1500 rpm으로 원심분리한 후 동일한 PBS용액으로 단위 ml당 2×10^7 개의 세포가 들어가도록 조절하였고 Tryphan Blue 염색을 시행하여 세포의 생육성(viability)이 90%이상임을 확인하였다.

(2) 림프구아형의 백분율 및 절대수의 측정

희석된 단핵세포 부유액을 Green Tube® 4개에 각각 0.05 ml씩 넣고 tube 1에는 PBS용액 0.02 ml를, tube 2, 3, 4에는 단일클론항체용액을 0.02 ml씩 넣었는데 단일클론항체용액은 미국 Becton & Dickinson사의 Simultest T₃-T₄®, Simultest T₈-HLA-DR®, Anti-interleukin-2 (이하 IL₂라 약함) Receptor Antibody®를 사용하였다.

은박지(Aluminum foil)에 싸서 섭씨 4도 냉장고에서 30분간 배양한 후 0.1% sodium azide가 포함된 PBS 용액 0.05 ml로 3회 세척후 1500 rpm으로 3분간 원심분리하여 상층액을 버리고 0.1% sodium azide가 포함된 PBS용액 0.05 ml를 넣는다.

Becton & Dickinson사의 Facscan®을 이용하여 flow cytometry를 시행하여 T₃, T₄, T₈ 및 HLA-DR, IL₂

receptor양성인 림프구의 백분율을 구하고 총 림프구수에 백분율을 곱하여 각각의 단일클론항체에 대하여 양성인 림프구의 절대수를 구하였다.

4) 림프아구형성(Blastogenesis)의 측정

단핵세포부유액을 단위 ml당 세포수가 1×10^6 개가 되도록 IMDM으로 조절한 다음 Tryphan Blue염색을 하여 생육성을 확인하고 96 well Microplate®에 세포수를 조절한 세포부유액 0.15 ml를 넣는다. 위 Microplate®에 비특이적 유사분열 물질(mitogen)인 Concanavalin-A(이하 Con-A라 약함), Phytohemagglutinin(이하 PHA라 약함)과 특이적 유사분열물질인 PPD를 3가지 농도로 각 농도당 0.02 ml씩 3 well에 넣는다. 각 유사분열물질의 농도는 Con-A는 단위 ml당 0.02 mg, 0.006 mg, 0.002 mg으로 PHA는 0.2 mg, 0.06 mg, 0.02 mg으로 PPD는 1 TU, 0.33 TU, 0.1 TU로 하였다.

유사분열물질과 혼합된 세포부유액을 5% CO₂ 섭씨 37도에서 120시간동안 배양하며 배양이 끝나기 6시간전에 10% IMDM으로 농도를 100 µCi/ml로 조절한 방사성 동위원소용액인 ³H-thymidine을 각 well당 0.01 ml씩 넣는다. 배양이 끝나면 세포수집기로 세포를 수집(harvest)하여 12시간 동안 건조시킨 후 Scintillation cocktail 2 ml를 넣고 β-Counter로 림프아구형성에 이용된 ³H-thymidine의 양을 측정하여 대조군에 대한 비율을 구하여 Stimulation index(이하 STI로 약함)를 구하였으며 각각의 농도중 STI가 가장 높은 농도의 3 well의 평균을 구하여 각 유사분열물질에 대한 STI로 하였다.

5) 통계처리 및 결과 분석

통계처리 및 자료의 분석은 SPSSPC+ 통계 package를 이용하였으며 유의성은 비모수검정법인 Mann-Whitney의 U검정법으로 p value를 산출하여 검정하였다.

Table 2. Comparison of PPD Skin Test, WBC and Lymphocyte Numbers

	PPD Skin Test (mm)	WBC (/mm ³)	Lymphocyte (/mm ³)
Control	16.8 ± 4.0	6938.5 ± 2005.7	2048.7 ± 533.6
Pulmonary TB	13.0 ± 6.9	8654.5 ± 2388.2	1230.2 ± 594.0*
Extrapul. TB	10.6 ± 8.7	7305.9 ± 2439.1	1500.2 ± 711.4*

* Statistically significant difference (p < 0.05) between control and tuberculosis patients.

Table 3. Comparison of Percentage of T₃, T₄, T₈ (+) Cells & T₄/T₈ Ratio

	T ₃ (+) %	T ₄ (+) %	T ₈ (+) %	T ₄ /T ₈ (+) Ratio
Control	67.9 ± 9.3	39.8 ± 3.4	28.0 ± 3.7	1.45 ± 0.15
Pulmonary Tuberculosis	62.4 ± 13.6	41.0 ± 12.1	25.4 ± 6.1	1.79 ± 0.94
Extrapulmonary Tuberculosis	67.8 ± 15.2	42.1 ± 9.3	25.0 ± 7.3	1.82 ± 0.76

Table 4. Comparison of Number of T₃, T₄, T₈ (+) Cells

	T ₃ (+) Number (/mm ³)	T ₄ (+) Number (/mm ³)	T ₈ (+) Number (/mm ³)
Control	1470.6 ± 557.2	828.0 ± 266.6	587.8 ± 208.0
Pulmonary TB	800.1 ± 449.5	534.7 ± 303.1	297.8 ± 145.6
Extrapul. TB	1047.0 ± 589.3	639.6 ± 346.2	399.6 ± 261.4

Table 5. Comparison of Percent and Number of HLA-DR & Interleukin-2 Receptor (+) Cells

	HLA-DR (+) %	HLA-DR (+) No	IL ₂ -R (+) %	IL ₂ -R (+) No
Control	3.6 ± 2.8	63.0 ± 31.9	4.0 ± 1.7	71.6 ± 30.9
Pulmonary TB	15.1 ± 7.9*	191.2 ± 145.1*	11.0 ± 5.5*	142.1 ± 114.5*
Extrapul. TB	17.1 ± 14.2*	232.8 ± 158.6*	7.8 ± 4.0*	115.0 ± 71.3*

* Statistically significant difference (p < 0.05) between control and tuberculosis patients.

결 과

1. PPD 피부반응검사

PPD 피부반응검사상 경결의 크기는 정상 대조군 16.8±8.7 mm로 3군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 2).

2. 백혈구 및 총 림프구수

단위 mm³당 백혈구수는 정상대조군 6938.5±2005.7, 폐결핵환자군 8654.5±2388.2, 폐외결핵환자군 7305.9±2439.1로 3군간에 유의한 차이가 없었으며, 총 림프구수는 정상대조군 2048.7±533.6에 대하여 폐결핵환자군 1230.2±594.0, 폐외결핵환자군 1500.2±711.4로 결핵환자군에서는 정상대조군에 비하여 유의하게 감소되어 있었으나 폐결핵 환자와 폐외결핵환자군 간에는 유의한 차이가 없었다(Table 2).

3. 림프구아형의 백분율과 수

T₃(+)인 림프구의 백분율은 정상대조군 67±

15.2%, 폐결핵환자군 62.4±13.6%, 폐외결핵환자군 67.8±15.2%로서 3군간에 유의한 차이가 없었으며 절대수도 3군이 각각 단위 mm³당 1470.6±557.2, 800.1±449.5, 1047.0±589.3개로 유의한 차이가 없었다.

T₄(+)인 림프구의 백분율 및 절대수도 3군이 각각 39.8±3.4%, 41.0±12.1%, 42.1±9.3%와 828.0±266.6, 534.7±303.1, 639.6±346.2로서 유의한 차이가 없었다. 또한 T₈(+)인 림프구의 백분율 및 절대수도 3군이 각각 28.0±3.7%, 25.4±6.1%, 25.0±7.3%와 단위 mm³당 587.8±208.0, 297.8±145.6, 399.6±261.4개로 유의한 차이를 발견할 수 없었다. T₄/T₈의 비(T₄/T₈ ratio)도 정상 대조군 1.45±0.15, 폐결핵환자군 1.79±0.94, 폐외결핵환자군 1.82±0.76으로 유의한 차이가 없었다(Table 3, 4).

그러나 HLA-DR 양성인 림프구의 백분율은 대조군 3.6±2.8%, 폐결핵환자군 15.1±7.9%, 폐외결핵환자군 17.1±14.2%로 결핵환자군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가되어 있었고 절대수도 단위 mm³당 각각 63.0±31.9, 191.2±145.1, 232.8±158.6개로 결핵환

Table 6. Comparison of Blastogenesis after Mitogen Stimulation

	Stimulation Index		
	Concanavalin-A	Phytohemagglutinin	PPD
Control	149.4 ± 136.0	180.1 ± 162.9	10.3 ± 9.0
Pulmonary TB	336.8 ± 432.0	420.9 ± 450.7	10.6 ± 9.1
Extrapul. TB	147.4 ± 272.4	412.3 ± 633.6	11.7 ± 16.8

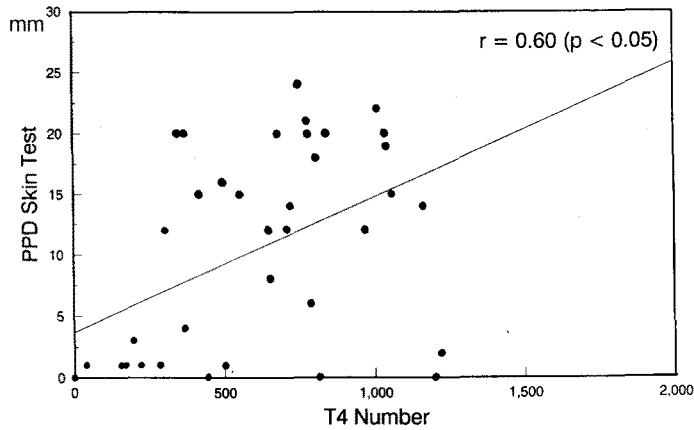


Fig. 1. Relationships between T₄ percent and PPD skin test.

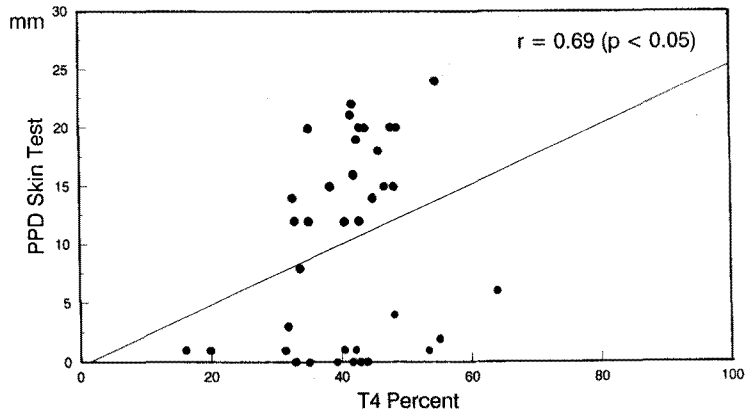


Fig. 2. Relationships between T₄ number and PPD skin test.

자군에서 유의하게 증가되어 있었으며 백분율과 절대수 공히 폐결핵환자군과 폐외결핵환자군간에 유의한 차이는 없었다(Table 5).

IL₂ 수용체양성인 림프구도 3군에서 백분율이 각각 4.0±1.7, 11.0±5.5, 7.8±4.0%, 절대수가 단위 mm³당 71.6±30.9, 142.1±114.5, 115.0±71.3개로 결핵

환자군에서 유의하게 증가되어 있었으나 결핵환자군간의 차이는 없었다(Table 5).

4. 림프아구형성(Blastogenesis)

아무 자극을 가하지 않았을 때에 비하여 유사분열물질로 자극한 후의 림프아구형성의 정도를 나타내는 STI는

Con-A자극시에 대조군 149.4 ± 136.0 , 폐결핵환자군 336.8 ± 432.0 , 폐외결핵환자군 147.4 ± 272.4 이었고, PHA자극시에 대조군 180.1 ± 162.9 , 폐결핵환자군 420.9 ± 450.7 , 폐외결핵환자군 412.3 ± 633.6 으로 3군 간에 유의한 차이가 없었으며 특이적 유사분역물질인 PPD자극시에도 각각 10.3 ± 9.0 , 10.6 ± 9.1 , 11.7 ± 16.8 로 유의한 차이가 없었다(Table 6).

5. 여러 면역기능의 지표들((Parameters)간의 상관 관계

생체내 (in vivo) 검사 및 생체의 (in vitro) 면역기능검사들 사이의 상관관계를 분석한 결과 생체내 면역기능검사인 PPD파부반응검사와 생체의 면역기능검사중 T₄(+) 림프구의 백분율 및 절대수간의 유의한 상관관계가 있음을 알 수 있었다($r=0.689, 0.598$ & $p<0.05$) (Fig 1, 2).

고 안

총 림프구수와 T림프구의 수에 대하여 종래의 연구들에서는 말초혈액에서의 총 림프구수 및 T림프구중 특히 조력 T림프구의 수가 감소하며^{8,9,18,20,22} 결핵성 늑막염 환자에서는 늑막삼출액에서의 조력 T림프구의 수가 상대적으로 증가한다고⁹ 보고되었고 이의 원인으로 조력 T림프구가 결핵의 병소내로 이동하였을 것이라는 설 (Compartmentalization theory)^{8,22}과 억제 T림프구보다 조력 T림프구가 임파선에 더 많이 포획되기 때문이라는 학설이 있다. 저자들의 경우에는 결핵환자에서 총 림프구수는 정상인보다 감소되어 종래의 보고들과 일치하는 소견을 보였으나 T림프구의 수는 정상인보다 약간 감소되기는 하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었고 폐결핵환자군과 폐외결핵환자군간에는 유의한 차이가 없었다.

한편 림프구의 아형에 대해서는 결핵환자의 말초혈액에서 조력 T림프구는 감소한다는 보고가 많으며^{8,9,19,22} 억제 T림프구에 대해서는 증가한다는 보고^{19,22}와 변화가 없다는 보고^{8,20,23}가 있어 보고자에 따라 차이를 보이고 있으며 저자들의 경우에는 조력 및 억제 T림프구 공히 결핵환자군과 정상 대조군간에 백분율과 절대수에 유의한 차이가 없었다. 조력 T림프구와 억제 T림프구의 상대적 비율인 T₄/T₈ ratio는 결핵환자의 말초혈액에서

는 정상인에 비하여 감소되어 있는 경우가 많다는 국내 외의 보고가^{8,9,19,24} 있었으나 저자들의 실험에서는 정상 대조군과 결핵환자군간에 유의한 차이를 발견할 수 없었으며 폐결핵군과 폐외결핵군간에도 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

이의 원인으로 몇 가지를 생각해 볼 수 있는데, 첫째는 아형의 측정방법에 따른 결과의 차이로서 과거의 연구들에서는 림프구의 아형을 측정하는데 면역화학적 기법(Immunoperoxidase법등)을 사용하여 육안으로 양성인 세포의 수를 측정하는 방법을 사용하였으나 저자들의 경우는 단일클론항체를 이용하여 유세포분석법(flow cytometry)으로 아형의 백분율을 측정하였으며 두 방법간의 차이에 따라 결과가 다를 수 있다는 점인데 현재 면역화학적 방법과 유세포분석법간의 일치도에 관한 보고는 그다지 많지는 않으나 최근에 림프구의 아형을 면역화학적 기법과 유세포분석법의 2가지방법으로 측정하였을 때 유의한 차이가 없었다는 보고가 있었으므로²⁵, 면역화학적 방법과 유세포분석법의 차이에 의한 것일 가능성은 크지않을 것으로 생각되고, 유세포분석법 시행시에 단핵구층의 분리방법으로 Ficoll-Hypaque법을 사용한 경우나 혈액을 즉시 처리하지 않고 보관한 경우에 억제 림프구가 선택적으로 감소하였다는 보고²⁶도 있으나 저자들의 경우 혈액은 채혈후 30분내에 처리하였으므로 보관에 따른 영향은 배제할 수 있고 정상대조군과 환자군에서 모두 Ficoll-Hypaque법을 사용하였기 때문에 Ficoll-Hypaque사용에 따른 억제 림프구의 감소가 비록 있었다고 하더라도 두군간의 차이는 있었을 것이므로 방법에 의한 결과의 차이는 배제할 수 있을 것으로 생각된다.

둘째로는 결핵의 병기에 따른 아형의 백분율 변화에 따른 영향을 생각할 수 있는데 Katz등은 결핵의 초기 감염시에 초기에는 전체 T림프구 및 조력 T림프구의 수가 감소한다고 보고하였²¹ 다른보고에서는²⁷ 실험적으로 마우스에서 결핵균(Mycobacterium tuberculosis의 Erdman strain)의 감염을 일으켰을 때 시간의 경과에 따라 T림프구의 아형의 비율에 변화가 있고 인체의 조력 T림프구에 해당되는 L3T4 림프구가 감염후 20내지 30일만에 그 증식이 최고에 도달하고 이때에 결핵균의 증식도 억제되며 감염후 약 40일 후에는 L3T4 림프구의 수는 감소하는 경향을 관찰하였고, 인체의 억제 T림프구에 해당하는 Lyt-2⁺림프구의 수는 감염후 약 80일만

에 최고에 도달하였고 결핵균의 증식을 억제하는 효과가 L3T4림프구에 비하여 미미하였다고 보고하였으며 결핵균의 만성적인 감염시에도 결핵균에 대한 면역이 완전히 소멸되지 않고 남아있고 면역기능의 강도에 따라 주기적으로 잠복중이던 결핵균의 활성화(reactivation)가 일어날 수 있을 것이라고 주장하였다. 한편 결핵의 발병기전으로는 초감염시의 발병과 잠복중이던 결핵균(dormant bacilli)의 재활성화(reactivation)에 의한 발병의 2가지 경우를 생각할 수 있는데 폐결핵의 경우는 그 부위에 따라 그 발병기전의 차이가 있어 결핵성늑막염¹³⁾이나 속립성 결핵¹²⁾의 경우는 대부분이 초감염시 발병하는 것으로 생각되고 있고 결핵성 림프선염이나 뇌막염의 경우는 초감염시나 재활성화에 의한 발병이 모두 가능하며 골 및 관절결핵의 경우는 재활성화에 의한 발병이 대부분일 것으로 생각되고 있다¹²⁾. 그런데, 임상적으로 결핵의 병변이 초감염에 의한 것인지 아니면 재활성화에 의한 것인지를 구분하기는 매우 어려울 것으로 생각되기 때문에 저자들의 경우 비록 결핵의 병력 및 치료력이 없는 환자를 대상으로 하기는 하였으나 대상 환자에서 결핵균의 감염이 급성인지 만성인지를 구별할 수 없었으며 이러한 사실을 고려한다면 조력 및 억제 T림프구의 백분율과 상대적 비율이 다른 보고들의 결과와 다른 점을 부분적으로 설명할 수 있지 않을까 생각된다. 즉, 결핵성 늑막염 환자의 경우는 대개 초감염이기 때문에 발병 초기에 아형의 검사를 시행하였다면 조력 T림프구의 수가 감소한 상태이기 때문에 어느 정도의 시간이 경과했을때에 검사한 경우에 비하여 조력 T림프구의 백분율 및 T₄/T₈ ratio가 낮게 나올 수 있을 것이며⁹⁾ 폐결핵의 경우 새로 진단된 경우와 진행된 경우에서 Shiratsuchi 등의 보고⁸⁾에서와 같이 조력 T림프구의 비율이 차이가 나는 것도 결핵균의 만성감염시에 T림프구의 수가 감소한다는 실험결과²⁷⁾를 고려한다면 부분적으로 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 결핵균 감염시에 결핵의 병소로 조력 T림프구가 이동하여 그 결과 말초혈액에서 조력 T림프구가 감소한다는 분획화설(compartmentalization theory)^{22,28)}과 억제 T림프구에 의한 억제인자(suppressor factor)의 분비로 인하여 말초혈액내의 조력 T림프구가 감소한다는 설²⁴⁾도 있으며 분획화설에 대해서는 저자들의 경우 결핵의 병소에서 T림프구의 아형을 측정하지는 않았기 때문에 향후 병소에서의 아형의 수적 변화에 대한 연구가 필요할 것으로 사료되며 억제

인자설은 정상인과 결핵환자군간에 총 T림프구수, 억제 T림프구수, 조력 T림프구수의 차이를 발견할 수 없었으므로 가능성이 떨어질 것으로 사료된다. 본 연구에서는 폐결핵환자군과 폐외결핵환자군간에서도 유의한 아형의 백분율 및 절대수의 차이를 발견할 수 없었다.

결핵균의 감염시에 대식세포는 활성화되어 인터루킨-1(Interleukin-1)을 분비하며 결핵균과 대식세포의 세포막의 HLA-DR 인지질의 공존하에 T림프구는 활성화되어 인터루킨-2(Interleukin-2, 이하 IL₂로 약함)를 분비하게 되고⁵⁾ 활성화된 T림프구는 IL₂를 분비할 뿐만 아니라 IL₂에 대한 수용체를 세포 표면에 가지게 된다⁶⁾. 본 연구에서는 정상 대조군에 비하여 폐 및 폐외결핵환자군에서 모두 IL₂수용체 양성인 림프구의 백분율과 절대수가 증가되어 있어 활성화된 T림프구의 수가 증가되어 있음을 알 수 있었고 활성화된 림프구에 나타나는 또 다른 표식자인(surface marker)인 HLA-DR 역시 정상대조군에 비하여 결핵환자군에서 HLA-DR양성인 T림프구의 백분율과 절대수가 증가한 소견을 보여 위의 결과와 일치하는 소견을 보였으나 폐결핵 환자군과 폐외결핵 환자군간에는 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

한편, T 및 B림프구는 Phytohemagglutinin이나 Concanavalin-A와 같은 유사분열물질에 의하여 자극을 받으면 구조적인 변화가 일어나게 되고 생체내에서 결핵균을 포함한 여러가지 항원에 의하여 자극을 받았을 때에도 이러한 변화가 일어나게 된다⁶⁾. 결핵환자에서는 이러한 림프아구의 형성이 감소한다는 보고들이 많이 있으며^{10,28-30)} 이러한 림프아구형성이 감소하는 기전으로서 자극된 림프아구가 병변내로 이동하기 때문이라는 설²⁹⁾과 억제 T림프구(adherent suppressor cell)가 혈액내에 존재하기 때문이라는 설³⁰⁾ 또는 B림프구에 의해 T림프구가 PPD를 인식하는 것이 억제되기 때문이라는 설³¹⁾이 있다. 본 연구에서는 정상대조군과 결핵환자군간에 PHA, Con-A, PPD자극에 대한 림프아구형성이 유의한 차이를 보이지 않았고 폐결핵 환자군과 폐외결핵 환자군간에서도 유의한 차이를 보이지 않았는데 이의 원인으로서는 몇가지 점을 고려할 수 있다.

첫째는 저자들의 경우는 T림프구와 B림프구를 따로 분리하지 않으므로 Bona등의 주장³¹⁾과 같이 T림프구의 림프아구형성이 B림프구에 의해 영향을 받는다면 단핵구층에는 T림프구외에 B림프구도 존재하므로 림프아구의 형성이 T림프구의 기능만으로 결정되지 않아서 T림

프구의 림프아구형성이 유의한 차이가 없는 것으로 보였을 가능성이 있다는 점인데 다른 실험에서는 T림프구와 B림프구를 분리하지 않은 경우에도 유의한 차이가 있었다는 보고¹⁰⁾도 있어 이에 대해서는 추후 연구가 필요하리라고 생각된다.

둘째로는 유사분열물질의 농도가 적당하지 못할 수 있다는 점인데, 저자들의 경우 비록 전실험에서 각각의 유사분열물질에 대한 림프아구형성이 가장 활발하게 나타난 농도인 Con-A 0.006 mg/mL, PHA 0.06 mg/mL, PPD 0.33 TL/mL(=약 0.007 μ /mL)에서의 림프아구형성을 비교하였으나 각각의 유사분열물질의 농도가 다른 보고들^{10,31,32)}에서보다 낮아서 림프아구의 형성을 일으킨 자극의 강도가 충분하지 못하였을 가능성을 완전히 배제하기는 어렵다고 생각된다.

셋째로는 말초혈액내의 T림프구가 모두 PPD에 대해 감작된 것은 아나기 때문에 세포 부유액내에 포함된 T림프구중 감작된 T림프구의 비율이 각 환자간에 동일하지 않고 따라서 단위 microplate내에 포함된 감작된 T림프구의 비율이 환자마다 다를 수 있고 따라서 결과의 신뢰도가 떨어질 수도 있다는 점이며, 마지막으로서는 실제로 유의한 차이가 없을 가능성도 고려할 수 있겠다.

결핵균의 감염시 획득된 세포성 면역이 T림프구를 파괴하였을때에 전파되지 않음이 실험으로 증명되었고 PPD 반응세포가 T림프구이며 PPD 자극에 의하여 조력 T림프구의 증식이 일어난다는 보고가⁹⁾ 있으며, 국내에서는 조력 T림프구의 수 및 T_4/T_8 ratio가 PPD피부반응시의 병변의 장축길이와 상관관계가 있다는 보고가⁹⁾ 있었으며 림프아구형성의 정도와 PPD피부반응검사의 크기가 관련이 있었다는 보고도¹⁰⁾ 있었다. 그러나 다른 보고²²⁾에서는 조력 T림프구와 PPD 피부반응검사의 크기와는 상관관계가 없었다고 하였다.

저자들의 경우는 조력 T림프구의 백분율 및 절대수와 PPD피부반응검사의 장축길이간에 유의한 상관관계를 발견할 수 있어 PPD피부반응이 조력 T림프구에 의한 것임을 간접적으로 시사하는 소견을 관찰할 수 있었으나 림프아구형성의 정도와 PPD피부반응검사의 크기 사이에는 유의한 상관관계를 발견할 수 없었다.

본 실험에서 비록 폐결핵 환자군과 폐외결핵 환자군의 세포성 면역의 차이점을 명확히 규명하지는 못하였으나 폐외결핵 환자군을 결핵에 이환된 장기 및 병기의 차이에 따라 보다 세분하여 각각의 폐외결핵군간의 면역기

능의 차이점을 규명하는 연구가 시행되어야 할 것이며 그렇게 한다면 본 실험에서 발견할 수 없었던 T림프구 매개성 세포성 면역기능의 차이를 발견할 수도 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 : 결핵의 감염에서는 세포성면역이 중요하며 그 중에서도 T림프구가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 조력 T림프구와 억제 T림프구의 기능의 불균형이 결핵의 발병에 있어 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 동일한 결핵균의 감염시 일부 환자에서는 결핵의 병변이 폐에 국한되는 반면, 일부의 환자들에서는 폐의 결핵병변의 유무와 관계없이 폐외장기의 결핵이 발생되고 이러한 폐외결핵의 경우 항결핵화학요법에 잘 반응하지 않는 경우를 종종 경험할 수 있을 뿐만 아니라 그 유병율의 감소도 폐결핵의 경우와는 달리 현저하지 못하여 폐결핵환자와 폐외결핵환자군간의 면역기능의 차이가 의심된다.

방법 : 폐결핵환자와 폐외결핵환자군에서의 T림프구 매개성 세포성면역기능의 차이와 면역기능의 생체내검사와 생체외검사의 상관성을 규명하고자 T림프구 및 아형의 수적변화를 유세포분석법(flow cytometry)을 이용하여 측정하였고 PPD피부반응검사 및 림프아구형성을 측정하여 비교하였다.

결 과 :

- 1) 총 림프구수는 결핵환자군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소되어 있었으나 폐결핵환자군과 폐외결핵환자군간의 차이는 없었다.
- 2) PPD 피부반응검사와 백혈구수는 3군간에 유의한 차이가 없었다.
- 3) T_3 , T_4 , $T_8(+)$ 인 세포의 백분율과 절대수는 3군간에 유의한 차이가 없었으며 T_4/T_8 의 비도 3군간에 유의한 차이가 없었다.
- 4) HLA-DR(+)인 세포의 백분율과 절대수는 대조군에 비하여 결핵환자군에서 유의하게 증가되어 있었으며 IL_2 수용체(+)인 세포의 백분율과 절대수도 결핵환자군에서 유의하게 증가되어 있었으나 폐결핵환자군과 폐외결핵환자군에는 유의한 차이가 없었다.
- 5) Concanavalin-A, Phytohemagglutinin 및 PPD 자극에 대한 림프아구형성은 3군간에 유의한 차이가 없

었다.

6) T₄(+)인 림프구의 백분율 및 절대수와 PPD 피부 반응검사의 크기사이에는 유의한 상관관계가 있었다.

결론 : 이상의 결과에서 폐결핵환자와 폐외결핵환자군 간에 T림프구성 매개성 세포성면역기능의 변화를 발견할 수 없었다. 그러나 본 연구만으로 세포성 면역기능의 차이를 모두 관찰하였다고 할 수는 없기 때문에 이에 대하여는 추후 연구가 필요하리라고 사료된다.

REFERENCES

- 1) 보건사회부. 대한결핵협회 : 제 6차 전국결핵실태조사 결과, p 23, 1990
- 2) Daniel TM: The immunology of tuberculosis. Clin Chest Med 1:189, 1980
- 3) Dannenberg AM Jr: Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 125:25, 1982
- 4) Chaparas SD: The immunology of mycobacterial infections. CRC Crit Rev Microbiol 9:139, 1982
- 5) Dearborn E, Chaparas SD: The immunology of mycobacterial disease. Am Rev Respir Dis 134:1063, 1986
- 6) Peter L, Carlo G: Cells involved in the immune response, In Ivan MR, Jonathan B, David KM (Ed), Immunology, 2nd Ed, 2.5, London, Gower Medical Publishing, 1989
- 7) Thierry P, Katharina H, Jaques AL: Importance of L3T4⁺ and Lyt-2⁺ cells in the immunologic control of infection with Mycobacterium bovis strain Bacillus Calmette-Guerin in mice. J Immunol 139:2032, 1987
- 8) Shiratsuchi H, Tsuyuguchi I: Analysis of T-cell by monoclonal antibodies in patients with tuberculosis after in vitro stimulation with PPD. Clin Exp Immunol 57:271, 1984
- 9) 김준우, 심영수, 김건열, 한용철, 이원재, 장가용 : 한국인 결핵환자의 말초혈액 및 늑막삼출액에서의 T림프구 및 그 아형들의 수적변화에 관한 면역세포화학적 연구. 결핵 및 호흡기질환 34(3):197, 1987
- 10) 김대수, 김완동, 임상부, 정연태, 우준희, 김용훈, 박춘식, 이희발 : 결핵 환자에서 T세포 매개성 면역의 변화. 결핵 및 호흡기질환 36(4):341, 1989
- 11) Laurence SF, Anthony ML, Marion PM: Extrapulmonary tuberculosis in the United States. Am J Epidemiol 109:205, 1979
- 12) Salvador A, William RM: Extrapulmonary tuberculosis revisited. Medicine 63:25, 1984
- 13) Matthew RW, George FT: Extrapulmonary tuberculosis. Am J Med 79:467, 1985
- 14) Rieder HL, Snider DE, Caythen GM: Extrapulmonary tuberculosis in United States. Am Rev Respir Dis 141:347, 1990
- 15) 한용철 : 임상호흡기학, 1판, p 165, 서울, 일조각, 1990
- 16) Daniel TM: Mycobacterial disease, In Wilson JD, Braunbald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (Ed), Principles of internal medicine, 12 th Ed, p 637, New York, McGraw-Hill, 1990
- 17) Dutt AK, Moers D, Stead WW: Short-course chemotherapy for extrapulmonary tuberculosis. Ann Int Med 104:7, 1986
- 18) Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L: The spectrum of human tuberculosis. Clin Exp Immunol 27:230, 1977
- 19) 이미완, 채정하, 문희식, 송정섭, 노재철, 박성학, 변해원, 김상호 : 결핵환자의 말초혈액내 T 세포아형, 결핵 및 호흡기질환 31(4):171, 1984
- 20) 한성구, 조상헌, 김준우, 김영환, 심영수, 김건열, 한용철 : 폐결핵환자에서 기관지폐포세척액 및 말초혈액의 임파구아형에 관한 연구. 대한내과학회잡지 34(3): 285, 1988
- 21) Katz P, Goldstein RA, Fauci AS: Immunoregulation in infection caused by mycobacterium tuberculosis. J Infect Dis 140:12, 1980
- 22) Beck JS, Potts RC, Kardjito T, Grange JM: T₄ lymphopenia in patients with active pulmonary tuberculosis. Clin Exp Immunol 60:49, 1984
- 23) Fujiwara H, Okuda Y, Fukukawa T, Tsuyuguchi I: In vitro tuberculin reactivity of lymphocytes from patients with tuberculous pleurisy. Infect Immunol 19:268, 1981
- 24) Rohrbach MS, Williams DE: T-lymphocytes and pleural tuberculosis. Chest 89:473, 1986
- 25) Padovan C, Allmeling A, Gerlach T, Behr J, Krombach F: Immunophenotyping of BAL lymphocytes. Am Rev Respir Dis 141:A233, 1990
- 26) Renzi P, Ginns LC: Analysis of T cell subsets in normal adults. J Immunol Methods 98:53, 1987
- 27) Orme IM: The kinetics and loss of mediator T-lymphocytes acquired in response to infection with Mycobacterium tuberculosis. J Immunol 138:293, 1987
- 28) Fujiwara H, Tsuyuguchi I: Frequency of tuberculin-reactive T-lymphocyte in pleural fluid

- and blood from patient with tuberculous pleurisy. *Chest* 4:530, 1986
- 29) Rook GAW, Carswell JW, Stanford JL: Preliminary evidence for the trapping of antigen-specific lymphocytes in the lymphoid tissue of anergic tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 26:129, 1976
- 30) Ellner JJ: Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J Immunol* 124:2573, 1976
- 31) Bona C, Audibert F, Juy D, Chedid L: Cell suppression in PPD-induced blast specific response of human peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 26:258, 1976
- 32) Lane HC, Whalen G, Fauci AS: In vitro evaluation of human lymphocyte function. In Weir DM, Hezenberg LA, Blackwell C (Ed), *Cellular immunology*, Vol. 2:66.5, 4th Ed, London, Blackwell Medical Publishing, 1986