抗結核劑의 淋巴球培養에 關한 研究

서울대학교 醫科大學 內科學敎室

康 晰 榮 · 洪 性 質

同 上 臨床病理學敎室

金相仁, 李貴寧, 金寶鍊

서울市立 西大門病院

鄭 在 赫

STUDIES ON THE LYMPHOCYTE CULTURE IN PATIENTS WITH ANTITUBERCULOUS DRUG HYPERSENSITIVITY

Suck-Young Kang, M.D., Sung-Woon Hong, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine,
Seoul National University, Seoul, Korea

Sang-In Kim, M.D., Ki-Nyong Yi, Bo-Ryun Kim

Department of Clinical Pathology, College of Medicine,
Seoul National University

Jai-Hyuck Chung, M.D.

Seoul Municipal Seodaimoon Hospital

—Abstracts—

Lymphoblastogenesis (transformation of lymphocyte) from peripheral blood into blast-like cell in vitro patients with certain drug reactions in the presence of the appropriate drug has been used as a test for drug hypersensitivity since Ripps, Fellner and Hirschhorn in 1965.

In this paper, eleven patients with active pulmonary tuberculosis who were receiving a trial-chemotherapy with INH, PAS and SM were investigated, and in only one of these the culture was positive. In this case (10th patient of this series, case 10) the result of the lymphocyte culture with PAS showed evidence of blastogenesis in about 15 percent in concentration 0.15 micro gm and 0.015 micro gm per ml. In the control cultures only 1~2% of the lymphocytes were transformed.

On the other hand, in the same case (case 10) the result of ³H-thymidine uptake to INH revealed 1273 cpm count in a concentration of 0.06 micro gm per ml. comparing with a control cpm count 269.

The degree of lymphocyte culture is known to be dependent on the dose of the drug; this in turn means that optimum concentration for each drug will have to be established.

序 論

末梢血液의 淋巴球를 여러가지 條件을 賦與하여 試

驗管内에서 培養함으로써 그 個體의 免疫學的 特性을 把握할 수 있음은 많은 研究報告의 結果로 立證되었다.

即 淋巴球는 아무런 刺激도 加하지 않은 培養狀態에선

極少數만이 自然的인 淋巴球母細胞化(lymphocyte transformation)를 이끈다. 그러나 PHA (phytohemagglutinin), pokeweed 등의 非特異的 刺戟物質을 加하거나 生體內에서 어떤 特異的物質 또는 抗原에 依해 刺戟을 받았던 感作된 淋巴球는, 培養器內에 同一物質 乃至 抗原을 加하면 이들 刺戟에 反應하여 큰 核을 가진 母細胞樣細胞로 變形하게 된다. 따라서 淋巴球의 培養은 그 個體의 免疫學的狀態 特히 細胞免疫學의 特性, 過敏性疾患, 臟器移植에서의 組織適合性 등을 調査 把握하는데 基礎的인 方法이 되어 왔으며, 最近에는 特殊藥品에 對한 過敏反應을 證明하는데 높은 價値가 있음이 밝혀졌다. 1964年 Holland 및 Mauer가 發表한 以來로 活潑한 研究가 이루어지고 있다. 即 試驗管內에서 感作誘發物質(抗原性刺戟, 藥物等)을 주어 淋巴球가 母細胞樣細胞로 變形됨을 觀察하여, 過敏性의 有無, 程度 등을 測定하게 되었다. 이것은 僞陽性反應이 없으므로 臨床的인 藥物過敏反應을 推測하는 患者에서 그 價値가 매우 높음을 알 수 있다.

著者들은 금번 抗結核劑에 대한 藥物過敏反應을 일으킨 患者에서 淋巴球培養에 依한 過敏性誘發發見을 試圖하였던바, 그 培養方法, 培養基속에 加하는 藥物의 濃度等과 더불어 陽性結果를 보였던 症例를 이에 報告하는 바이다.

實驗對象, 材料 및 方法

本研究의 對象이 된 患者는 1971年 8月에서 1973年 8月까지 2年 사이에 서울大學校 醫科大學 附屬病院內科 및 市立西大門病院에 入院한 活動性肺結核患者로서, 數年 以上 INH, PAS, SM 등의 基本抗結核劑를 使用하여 이들 抗結核劑에 對한 過敏反應으로 생각되는 臨床症狀이나 徵候를 보였던 者들 11例이다. (表 1 參照)

1) 試藥 및 機器

- Media (M-199) Tc medium-199 11gm에 3次 蒸餾水 1,000ml를 加하고, 10% 重曹 3.5ml를 加하여 pH 7.2~7.4로 維持시킨다.
- Fetal calf serum
- 3% Dextran saline solution (or plasmaged Ficoll etc.)
- Thymidine
- Cap tube
- Lambuda pipette (100 μ , 50 μ)
- Test drug (INH, PAS, SM)
- CO₂ incubator
- Centrifuge

2) 實驗 方法

1. 細胞分離培養

患者의 靜脈血을 heparin 10IU/ml血을 添加하여 10~20ml씩 採血하여, 20ml cap-tube에 넣고 3% dextran saline solution 3ml를 넣은 다음, 거품이 생기지 않도록 잘 섞어서 37°C incubator에 30分間 45°傾斜로 세워둔다. 이 때 赤血球는 dextran solution에 依해 aggregation되어 沈澱되므로, 淋巴球가 豊富한 血漿을 얻을 수 있다. 이 上層液을 새로운 cap-tube에 옮겨 800rpm으로 10分 동안 遠沈하여, 沈澱된 白血球를 準備된 M-199로 1회 洗滌한 後 白血球數가 $3.0 \times 10^6/0.1\text{ml}$ 가 되도록 稀釋 또는 濃縮調節하여 M-199로 浮游液을 만든다.

培養試驗管(falcon plastics)에 M-199 2ml, fetal calf serum 0.2ml, 白血球 3×10^6 및 各濃度의 藥物 (INH, PAS, SM)을 各 tube에 添加하여, 37°C incubator에서 72時間 동안 培養한다. (表 2 參照)

54時間 培養後 一部 培養器에는 thymidine count를 위한 ³H-thymidine 0.5 μ C를 加하고, 18時間만에 培養을 終結한다.

2. 塗抹標本製作

塗抹標本製作用 培養試驗管을 800rpm으로 10分間 遠沈하여 上層液은 버리고 細胞層으로 塗抹標本 3枚를 作成하여, Wright染色 後 各 1,000개 씩의 淋巴球를 算定하여, 母細胞化率(%)을 算出하였다.

觀察部位에 따르는 差異가 많으므로 塗抹標本の 中央部分에서 부터 끝까지의 사이를 最少限 3回 以上 往來하면서 20 視野 以上을 油浸렌즈(immersion)로 觀察하면서 算定하여, 各 塗抹標本の 平均値를 算出하였다.

3. Liquid scintillation

³H-thymidine incorporation用 培養試驗管을 遠沈하여 冷生理的食鹽水로 3回 洗滌後 沈渣에 0.5ml의 formic acid를 加하여 全細胞를 完全히 溶解시킨 後, scintillation fluid 16ml를 젖어내어, liquid scintillation counter로 cpm을 測定, 計算하였다.

實驗結果

藥物알레르기 檢索에 있어서의 淋巴球培養은 試驗管內에서의 方法으로 應用할 수 있어 最近 關心이 매우 높아져 가고 있다. 本檢索의 對象이 된 11名의 肺結核患者중 뚜렷한 母細胞化現象을 나타난 例는 1例이었다. 大部分의 患者는 PAS, INH, SM의 三者併行療法(triple therapy)를 받았던 患者로, 呼吸困難, 氣管枝

Table 1. List of the patients, who are the subjects in this investigation

Pt. No.	Sex	Age	Clinical data	Drugs.	Positive skin test
1	M	51	dyspnea	INH, PAS, SM	INH, PAS, SM
2	M	55	papule, itching	INH, PAS, SM, Myambutal, 1314 TH	INH
3	M	26	fever, skin rash	PAS, INH, SM	PAS, INH, SM
4	M	34	exertional dyspnea	"	INH, PAS
5	M	52	itching, skin rash	PAS, INH, SM, PZA, 1321 TH	INH
6	M	40	erythema	PAS, INH, SM, 1321 TH	
7	F	36	eczema	PAS, INH, SM,	PAS, INH
8	F	25	asthma	"	PAS
9	F	43	skin rash	"	PAS
10	F	27	after 4wks of triple drugs, fever, jaundice and skin rash	PAS, INH, SM	PAS, INH
11	M	40	purpuric rash	PAS, INH, S.M. Gantrisin	PAS

Table 2.

Lymphocyte transformation and ^3H -thymidine incorporation in 72 hours culture

Drug		Blastogenesis (%)	^3H -thymidine (cpm/ 10×10^6)
control		less than 1%	269
S M	100 (mg)	less than 2	382
	200	less than 2	451
	400	16	668
PAS	0.015 (μg)	15	476
	0.15	less than 5	468
	0.30	less than 2	461
INH	0.02 (μg)	less than 2	459
	0.06	less than 10	1273
	0.12	less than 5	709

喘息, 皮膚發疹 및 搔痒感 등의 藥物過敏성에 의한 臨床症狀가 나타났으나, 第9번患者에 이르기 까지의 試驗에 있어서는, 培養器속에 加하는 藥物의 optimal dose를 確定하는데 그 어려움이 있었기 때문에 認知할 만 한 陽性成績을 얻지 못한 것으로 이해된다. 確實한 陽性反應을 보였던 1例(제10번例)는 25歲된 女子로, 約 1年前부터 微熱 및 惡寒, 全身衰弱感 등의 症勢를 보이다가 入院 40日 前에 個人病院에서 chest (P~A)를 찍고, 輕症活動性 肺結核의 診斷을 받아서, PAS 10gm, INH 400mg, SM 1.0gm을 每日 服用 내지 注射하기 시작하였다. 藥物服用 約 25日 後에 急激한 皮膚發疹이 甚한 搔痒感을 同伴하면서 頭頸部에서부터 發現되

었다. 皮膚發疹은 針頭大크기로 나타나기 시작, 漸次 全身으로 퍼져, 다음날엔 掌面, 足趾까지 나타났으며, 發熱 1週日 後부터는 症勢가 더욱 惡化되면서 黃疸이 나타나기 시작하였다. 入院當時 體溫은 38°C 로 全身에 甚한 黃疸을 나타내었고, 皮膚는 甚한 搔痒感을 同伴하는 紅斑性 蕁麻疹이 나타나 있었으며, 全身의 淋巴節의 腫大 및 2橫指 정도의 肝腫大를 觸知할 수 있었으나 脾의 腫大는 없었다. 末消血液像은 白血球가 $9,500/\text{mm}^3$ 로 그중 26%가 好酸球로 大幅 増大를 나타냈으며, 生化學的 檢査에서 Bil. T/D=9.5/2.2, TT T=8.1 unit, Alk-ph=18.3unit, GOT/GPT=750/630 unit 로서 肝細胞의 損傷을 나타내고 있었다. 肝

組織生檢上으로 viral hepatitis와 아주 恰似했으나 好酸球의 浸潤이 甚했다. 따라서 藥物 即 抗結核劑의 過敏反應을 確認하기 爲하여 誘發試驗(provocative test) 및 淋巴球培養을 PAS, INH, SM에 대하여 實施하였던 것이다.

그 結果, PAS에 있어서는 0.015 μ g과 0.15 μ g을 加한 培養基에서 다 같이 約 15%의 母細胞化率이 관찰되었고, 0.3 μ g에서는 毒作用(toxic effect)이 나타났.

그리고 INH는 0.02 μ g, 0.06 μ g, 0.12 μ g에서, SM은 100mg, 200mg, 400mg에서 각각 母細胞率이 對照와 大同小異하였다.

3 H-thymidine uptake에 있어서는 control cpm이 269인데 比하여 SM은 各濃度에 따라 382~668, PAS는 461~476의 cpm count를 나타내었으나, INH는 0.02 μ g에서는 459인데 比하여 0.06 μ 에 있어서는 1273의 높은 cpm count를 보였고, 0.12 μ g에 있어서는 709cpm을 나타내었다.

考 按

生體 및 試驗管内에서 淋巴球은 여러가지의 刺戟에 依해서 그 構造가 變化하기도 하고 潛在的인 能力이 나타나기도 한다. 即 어떠한 特殊抗原과 接觸時에 過敏細胞의 增殖이 일어나 蒼白한 染色性的 核과 鹽基性 細胞質을 가진 母細胞樣細胞로의 形態學的變化는, 試驗管内에서 遲延型알레르기 即 cell-mediated hypersensitivity素出을 爲한 檢査方法으로 實用하게 되었고, 이것은 生體內에서의 反應과도 매우 密接하게 符合되어 있어서, 대단히 有用하다. 그러나 모든 例에서 抗原이 되는 藥物의 至適濃度(optimal dose)가 있으므로 試驗培養제에 이 點을 잘 留意하지 않으면 안된다. 即 淋巴球의 變形程度는 藥物量에 依存(dependent)하여 各藥物의 至適濃度가 設定되어야 하므로, 培養培地에 있어서 藥物의 濃度는 매우 重要하기 때문에 그 critical factor로서 作用하기도 한다. 그밖에 藥物의 溶解度(solubility) 및 試驗管内에서 患者의 細胞에 대한 藥物의 毒性때문에 失敗하는 率이 많다. 本研究에서 陰性反應을 나타낸 例들은 이러한 理由에 起因하는 듯 하다.

陽性反應을 나타낸 第10例에서 出現率의 時間的趨移는 第3日째부터 變形細胞가 分明히 나타났으며, 第5日에는 가장 明白하였고, 그以後엔 細胞가 破壞되는 傾向을 보였다. 變形細胞는 染色塗抹標本에 依해서 確認하였는데, 이 때 淋巴球은 2~3個의 核小體를 包含하고 15 μ 直徑 以上の 큰 purple核을 가졌으며, 때로는

空胞(vacuole)을 包含한 蒼白한 細胞質(cytoplasm)을 가졌었고, 이 때 倍數分裂像(mitotic figure)도 모두 算定하였다.

이 때 對照培養(control culture)에서는 단 1~2%의 母細胞化現象(blastogenesis, transformation)을 나타내었으나, 陽性細胞率은 10~19%이었다.

生化學的인 面에서 볼 때, 免疫된 淋巴球가 特殊抗原에 依해서 다시 刺戟되었을 때 ribosomal RNA合成은 強化되며, 그 抗原에 따라 미리 感作된 淋巴球을 選擇적으로 刺戟한다. 即 PHA (phytohemagglutinin)에 依해서 活性化된 淋巴球은 主로 胸腺에서 由來되는 淋巴球(T-cell)가 刺戟되며, 主로 non-ribosomal RNA로 이루어진 새로운 RNA를 形成하게 된다.

反面 pokeweed mitogen에 露出된 淋巴球은 骨髓에서 由來되는 淋巴球(B-cell)를 刺戟하고, 많은 ribosome이 附着된 well-developed, endoplasmic reticulum을 含有한 淋巴球도, 刺戟의 程度는 培地에 生存하는 母細胞樣細胞의 率과 labelled-thymidine이 새로 合成된 DNA에 附着하는 것에 依해서 確認할 수 있다. 그러나 이러한 實驗은 刺戟된 細胞로부터 mitogenic factor의 放出을 통해서 非感作淋巴球(non-sensitized lymphocyte)가 分解될 可能性과, 또 B細胞(B-lymphocyte) 또한 變形할 수 있을 可能性으로 해서 매우 複雜性을 띠게 된다. 그 밖에 淋巴球가 모든 刺戟에 너무나도 敏感銳敏하므로 實驗條件의 一致가 매우 어렵기 때문이라고 理解된다. 例를 들어 淋巴球의 母細胞化는 培養하는 淋巴球의 數, 藥物로 刺戟된 期間(duration), 藥物의 分量, 先行된 藥物과의 接觸與否 및 淋巴球의 由來 내지는 起源(origin) 또는 機能上的 差異, 淋巴球 以外の 細胞와의 混合程度, 機械的인 損傷 내지 刺戟程度 等等, 헤아리기 어려운 程度로 많은 條件들이 淋巴球母細胞化에 影響을 미치는 것으로 알려져 있다. 그 밖에 또 間接核分裂(mitosis) 때에 核DNA合成을 爲한 thymidine uptake를 3 H-thymidine에 依해서 測定할 수 있으나, 이것 또한 藥物에 따라서 感作된 個體의 淋巴球을 選擇적으로 刺戟한다는 點을 볼 때, 앞으로 繼續的인 研究가 期待되는 바이다.

結 論

INH, PAS, SM 등의 基本抗結核劑에 대한 臨床過敏症狀이 疑心되는 11名의 肺結核患者의 末消血液을 가지고, 藥物過敏症의 有無와 程度를 確認하기 爲하여 淋巴球培養을 實施하였다.

1) 그 結果 11名의 患者중 뚜렷한 細胞化現象을 나타

넌 例는 1 例뿐이었고, 나머지 10例는 陰性 即 培養 失敗이었다.

2) 陰性症例는 培養基속에 加하는 藥物의 至適濃度를 確定하는데에 어려움이 있었던 것으로 推測된다.

3) 淋巴球培養에 陽性反應을 보인 1例 (第10例, 25歲, 女: INH, PAS 및 SM 每日投與의 三者療法를 實施한지 25日만에 全身에 搔痒을 同伴하는 皮膚發疹 <急性蕁麻疹>과 發熱, 黃疸, 肝腫大로 藥物肝炎을 發見한 症例)에서는 培養結果로, PAS에서 0.15 μ g과 0.015 μ g을 加한 培養에서 15%의 母細胞化率을 보였고, 0.3 μ g에서는 toxic effect를 나타냈으며, INH는 0.02 μ g, 0.06 μ g, 0.12 μ g에서, SM은 100, 200, 400mg에서 각각 母細胞化率이 對照와 大同小異하였다. 即 淋巴球培養이 陰性.

4) ^3H -thymidine-uptake에 있어서는 control cpm이 269인데, SM은 各濃度에 따라 382~668, PAS는 461~476의 cpm count이고, INH는 0.02 μ g에서 459, 0.06 μ g에서 1273의 높은 cpm count를 보였고, 0.12 μ g에서는 709이었다.

5) 結論的으로 本症例는 PAS와 INH에 대한 過敏性이 證明되었는데, 同一患者에 있어서 어찌하여 PAS에 대해서는 母細胞化率이 高率로 나오고, INH에 대해서는 thymidine-uptake rate가 高率로 나오는 지, 그 理由는 앞으로 究明의 對象이 될 것 같다.

1. Lymphocytes (72 hrs culture with SM) showing no blastogenesis. Several cells disclose toxic effects with pyknosis of nuclei.

2. Lymphocyte without blastogenesis but some lymphoid cells become enlarged with basophilic cytoplasm. (INAH group)

3. Areas of marked blastogenesis in a 0.15 μ g/of PAS treated culture group.

References

- 1) Hayakawa, H. *Transformation of human peripheral blood lymphocytes in vitro*, Part 2. Response to antigenic substances and in the mixed leukocytes cultures. *Jap. J. Allergy*, 17, 3, 210~227, 1968.
- 2) Hyaashi, M: *Study on mixed culture of lymphocytes by a new fixed staining method*. *Jap. J. Allergology*, 19, 10, 794~799, 1970.
- 3) Kim, S.I. & Yi, K.N: *Studies on the blastogenesis of PHA stimulated lymphocytes*. *Korean J. Pathology*, 6, 1, 11~15, 1972.
- 4) Bach, F.H. Hirschhorn, K. & Semin, K: *Hematology*, 2, 68, 1965.
- 5) Halpern, B., Ky, N.T., Amache, N.J: *Allergy*,

- 40, 168, 1967.
- 6) Neu, R., Aspillaga, M.J., Gardner, L.I.: *Nature*, London, 205, 171, 1965.
- 7) Ripps, C.S., Fellner M.J., Hirschhorn, K.: *Lymphocyte & drug hypersensitivity*. Lancet, ii, 951, 1965.
- 8) Reichenberger, M. & Heitmann, HJ: *Lymphocyte transformation in patients allergic to ampicillin and tetracycline*. Lancet, Lancet, No. 7618, 491, 1969.
- 9) Sarkany, I.: *Lymphocyte transformation in drug hypersensitivity*. Lancet, 743~745, April 8, 1967.
- 10) Evans, D.A.: *The Lymphocyte stimulation test in penicillin hypersensitivity* J. Allergy, 34, 340; 40, 168, 1967.
- 11) Vischer, T.L.: *Lymphocyte culture in drug hypersensitivity*. Lancet, ii, 467, 1966.
- 12) Holland, P. & Mauer, A.M.: *Drug induced in vitro stimulation of peripheral lymphocyte*. Lancet, 1, 1368, 1964; 1, 743, 1967.
- 13) Gill, F.A.: *The association of increased spontaneous lymphocyte transformation in vitro with clinical manifestation of drug hypersensitivity*. J. Immunology, 98, 778, 1967.
- 14) Ripps, C.S. & Fellner, M.: *Lymphocyte & drug hypersensitivity*: Lancet, 2, 803, 1966.
- 15) Weiser, R.S., Myrvik, Q.N. & Pearsall, N.N.: *Fundamentals of Immunology*, 191~204. Lea & Febiger, Philadelphia, 1971.
- 16) Roitt, I.M.: *Lymphocyte transformation*. Essential Immunology, 122~127, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1974.
- 17) Williams, W. J. et al.: *Hematology, Section 12, Biochemistry and Function of Lymphocytes & Plasma cells*. 782~801, McGraw-Hill Book Co., Blakiston Publications, New York et al., 1972.