폐질환 환자의 임프구 Purified Protein Derivatives 자극실험성적

가톨릭의대 내과

박성학 · 김동집 · 변해원

= Abstract =

Purified Protein Derivatives Lymphocytes Stimulation Test in Pulmonary Tuberculosis and non-tuberculous Pulmonary Diseases

Sung Hak Park, Dong Jip Kim, and Hae Won Byun

Department of Internal Medicine, Catholic Medical College, Seoul, Korea

It is believed by many investigator that there is dissociable phenomena between tuberculin hypersensitivity and host resistance to tuberculosis. Tuberculin test is not a reliable diagnostic aids for adult tuberculosis in Korea.

Purified protein derivative (PPD) lymphocyte stimulation test may be helpful to differentiate pulmonary tuberculosis from non-tuberculous pulmonary diseases, so we carried out this experiments in 45 patients with active tuberculosis, 30 patients with non-tuberculous pulmonary diseases and 20 normal healthy subjects. The results were as follows:

1. PPD induced DNA synthesis in active tuberculosis (6.4 ± 4.4) was significantly higher than shown in non-tuberculous pulmonary diseases (1.3 ± 0.6) and normal subjects (1.7 ± 0.4). ($p < 0.01$)
2. The PPD lymphocyte stimulation index was 7.0 ± 3.0 in minimal pulmonary tuberculosis, 4.4 ± 5.1 in moderately advanced pulmonary tuberculosis, 7.0 ± 5.8 in far advanced pulmonary tuberculosis, 7.7 ± 4.9 in tuberculous pleurisy, 6.7 ± 1.5 in miliary tuberculosis and 6.1 ± 1.1 in tuberculous meningitis.
3. There were no relationship between PPD lymphocyte stimulation index and skin reactivity in tuberculous and non-tuberculous patients.

In conclusion, these findings suggest that PPD lymphocyte stimulation test may be helpful to differentiate pulmonary tuberculosis from non-tuberculous pulmonary diseases.

* 이 연구는 1979년도 가톨릭 중앙의료원 학술연구 보조비로 이루어진 것임.

서 론

항 결핵제의 발달로 결핵치료는 조기에 발견되면 완치가 거의 가능하다.

그러나 반복하는 객담검사에 음성인 폐결핵이나 늑막조직검사에 음성인 결핵성 늑막염, 조기 치료를 하지 않으면 사망율이 높은 속립성 결핵 및 결핵성 뇌막염 등과 다른 질환과의 감별 진단은 어려운 경우가 많다.

결핵 환자에서는 대부분 튜베르린 피내 반응검사가 양성이나, 우리 나라와 같이 결핵 이환율이 높은 상황에서는 튜베르린 피내 반응 양성을 진단 기준으로 삼을 수 없으며, 결핵성 뇌막염 및 속립성 결핵같이 중증 결핵에서는 피내 반응이 음성인 경우가 많아 진단에 도움이 안된다.

저자들은 결핵균의 특이 항원이라 할 수 있는 Purified Protein Derivatives (P. P. D.) 자극에 의한 배양 임프구의 반응검사를 시행하여 비결핵성과 결핵성 폐질환과의 감별 진단에 도움이 될 가능성 여부를 알기 위하여 결핵 및 비결핵성 폐질환 환자의 말초 임프구를 배양하여 PPD 자극 시험을 하여 그 결과와 PPD 피내 반응도 등을 비교 검토하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

대상 및 방법

1. 대 상

1978년 9월 1일부터 1979년 8월 31일까지 가톨릭의대 부속 성바오로병원내과에 입원한 15세에서 58세까지의 환자로 객담 도말 검사, 생화학적 검사 및 조직 검사로 결핵으로 확진된 45명과 비결핵성 폐질환 환자 30명을 대상으로 하였고 정상 대조군으로 16세에서 54세까지 건강한 사람 20명을 택하였다.

2. 방 법

2-1 : 임프구의 분리 및 배양

5-15ml의 heparin을 첨가한 정맥 혈액을 무균적으로 채취하여 동량의 0.9% 식염수로 희석한 후 8.0ml를 Ficoll - Hypaque 4 ml 위에 조심스럽게 올려놓고 20-25°C의 실온에서 1,900 rpm (500G) 으로 40분간 원심분리하여 형성된 임프구층을 걸어내

후 적당량의 Hank's balanced Salt Solution (HBSS) 으로 3회 세척한 후 세포수가 1.5×10^6 /ml가 되도록 배지에 부유시켜 림프구 부유액을 만들었다.

배지는 자가혈청이 20% 가 되도록 혼합한 RPM I1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) 을 사용하였으며 Penicillin 100 μ /ml 과 Streptomycin 10 μ g/ml 를 첨가하였다.

배양은 시험관에 위에서 만든 임프구 부유액 1 ml와 Purified Protein Derivatives (P. P. D.) 1 ng을 넣고 (대조 배양시험관에는 넣지 않았다) 37°C 에서 적당량 습도와 5% CO₂로 유지되는 보육기에 배양하였다. 배양 3일 (72시간) 후 시험관을 보육기에서 꺼내 1 μ Ci의 H-thymidine을 가하고 6-18시간 5% CO₂보육기에서 계속 배양하였다.

2-2 : 배양림프구 수집 및 자극지수

Trichloroacetic acid 침전방법을 사용하였으며 그 조작방법은 다음과 같다. 즉 ① 배양 시험관을 잘 흔들어 임프구를 재부유시킨다. ② 0.9%의 냉각된 생리식염수를 가한다. ③ 1,000rpm 으로 10분간 원심분리한다. ④ 상층액은 버리고 침전물에 trichloroacetic acid 3.0ml를 가하고 1,500 rpm 으로 10분간 원심분리하여 상층액은 버리는 조작을 2회 반복한다. ⑤ methyl alcohol 3.0 ml를 가한 후 2,000 rpm 으로 20분간 원심분리하여 상층액은 버린다. ⑥ 침전물에 H₂O₂ 1-2 방울을 가한 후 수시간 방치하여 완전히 분리시킨 후 진탕혼합기로 잘 섞는다. ⑦ scintillation cocktail [2,5-diphenyl-Oxazole (PPO) 4.0gm, dimethyl 1,4bis (5-phenyl-oxazole) benzene (dimethyl POPOP) 100 mg을 1.0 L의 toluene에 녹인 것] 8.0ml를 각각 가하여 scintillation Vial에 옮긴 후 이를 beta liquid scintillation counter에 넣어 방사능을 측정하였다. ⑧ PPD를 가하고 배양한 임프구의 방사능계수 (C. P. M.)를 PPD를 넣지 않고 배양한 임프구의 방사능계수 (C. P. M.)로 나누어 PPD 자극지수 (test/control)를 구하였다.

2-3 : PPD 피내 반응 검사

임프구 배양에 사용할 혈액을 채취한 후 0.1ml의 PPD를 피내에 주사하여 72시간 후에 판정하였다.

성 적

I) PPD 임프구 자극지수

Table. Purified Protein Derivdtives Stimuldtion Index In Normal, active Pulmonary Tuberculosis and Non-tuberculosis Pulmonbary Diseases

Group Description	No. of Cases	PPD Stimulation Index
Normal Control	PPD - 10	1.3 ± 0.4
	PPD + 10	2.2 ± 0.7
Pulmonary Tuberculosis	45	6.4 ± 4.4
Non-tuberculous Pulmonary Diseases	30	1.3 ± 0.6

Fig. 1. The Purified Protein Derivatives Stimu-lation Index in Normal, active Pulmonary Tuberculosis and Non-tuberculous Pneumonia

신체 검사상 건강하다고 판정된 튜베르린 피내반응 양성 10명과 음성 10명, 거의 같은 연령층의 비결핵성 폐질환 환자 30명 및 결핵 환자 45명의 PPD 임프구 자극지수는 표 1에서 보는 바와 같이 각각 1.3 ± 0.4 , 2.2 ± 0.7 , 1.3 ± 0.6 과 6.4 ± 4.4 로서 결핵 환자군에서 현저히 증가되었다.

(P < 0.01) (그림 1)

I - 가) 결핵의 임상적 분류별 비교

흉부 X선상에 따라 결핵 환자군을 경증, 중증증, 중증 및 속립성 결핵과 결핵성 늑막염 및 결핵성 늑막염 별로 비교하면 PPD 임프구 자극지수는 각각 7.0 ± 3.0 , 4.1 ± 5.1 , 7.0 ± 5.8 , 6.7 ± 1.5 , 7.7 ± 4.9 및 6.1 ± 1.1 로서 임상적 분류군 간에 뚜렷한 차이는 없었다. (표 2)

I - 나) 비결핵성 폐염의 질환별 비교

세균성 간질성 폐염, 폐암, 진균성 폐염, 폐농흉, 세균성 늑막염 및 고원성 질환들의 PPD 임프구 자극지수는 각각 1.4 ± 0.4 , 0.9 ± 0.5 , 0.4 ± 0.2 , 1.7 ± 0.2 , 1.0 ± 0.2 및 2.0 ± 0.6 으로 모두 정상범위이었다. (표 3)

II) 피내반응과 임프구 자극지수와의 관계

II - 가) 정상 대조군

건강인 중 PPD 반응 음성 및 양성에서 각각 PPD 임프구 자극지수는 1.3 ± 0.4 와 2.2 ± 0.7 로서 피내 반응 양성군에서 약간 높았다.

II - 나) 결핵 환자군

결핵 환자에서 피내 반응 검사 결과와 PPD 임프구 자극지수 사이에는 비례적인 상관관계는 없었으며, 특히 속립성 결핵 및 결핵성 늑막염에서는 피내 반응은 대부분 음성이었으나 PPD 임프구 자극지수는 증가되었다.

(그림 2)

II - 다) 비결핵성 폐질환군

임프구의 PPD 피내 반응 검사 결과와 PPD 임프구 자극지수 사이에는 특이한 상관관계가 없었다. (그림 3)

고 찰

결핵균에 감염되면 대개는 PPD 피내 반응에 양성으로 되며 숙주가 결핵균에 대하여 저항력을 갖게 된다. 그들 중 일부가 임상적으로 활동성 결핵으로 진전되는데 그 이유는 확실히 규명되지 않았으나 많은 보고에 의하면 세포성 면역이 관여한다

Table 2. Purified Protein Derivatives Stimulation Index in different clinical states of Tuberculosis

Group Description	No. of Cases	PPD Stimulation Index
Minimal Pulmonary	10	7.0 ± 3.0
Moderate Pulmonary	10	4.4 ± 5.1
Far Advanced Pulmonary	8	7.0 ± 5.8
Miliary Tuberculosis	5	6.7 ± 1.5
Tuberculous Pleurisy	8	7.7 ± 4.9
Tuberculous Meningitis	4	6.1 ± 1.1

Table 3. Purified Protein Derivatives Stimulation Index in Non-tuberculous Pulmonary Diseases

Group Description	No. of Cases	PPD Stimulation Index
Pneumonitis	14	1.4 ± 0.4
Lung Cancer	6	0.9 ± 0.5
Fungus Pneumonia	2	0.4 ± 0.2
Pyothorax	2	1.7 ± 0.2
Bacterial Meningitis	3	1.0 ± 0.2
Collagen Diseases	3	2.0 ± 0.2

Fig 2. The relationship of lymphocyte PPD stimulation index to skin reactivity in pulmonary tuberculosis

- : No induration
- ± : Induration of 5 mm or less
- + : Area of induration 6–10 mm
- ++ : Area of induration 11–20 mm
- +++ : Area of induration 21–30 mm
- ++++ : Area of induration over 30mm

Fig 3. The relationship of lymphocyte PPD stimulation index to skin reactivity in Non-tuberculous pulmonary diseases

— : No induration
 ± : Induration of 5 mm or less
 + : Area of induration 6–10mm
 ++ : Area of induration 11–20mm
 +++ : Area of induration 21–30mm
 ++++ : Area of induration over 30mm

고 생각한다.

오래 전부터 피내반응과 숙주의 저항력 사이의 상관관계에 대하여 많은 논란이 있으나 아직도 규명되지 않았다.

Yamaguchi 등은 최근에 피내반응과 체액성 면역에 관여하는 억제 T세포가 서로 각기 다르다는 것을 보고하였다.

결핵의 진단은 임상적 증상, 흉부 X선, 조직 검사, 객담 도말 검사 및 배양 등으로 확진을 하는데, 일반적으로 호흡기 증세를 주소로 내원한 환자에서 흉부 X선상 병변이 있으나 객담 도말 검사가 음성인 사람에서 결핵의 여부를 확진하려면 최소한 3회 배양검사를 하여야만 한다. 그동안 환자의 치료가 문제가 되며 가능한 빠른 감별진단

방법이 필요하다.

폐결핵 환자에서 말초 T임프구가 감소되며, 말초 T임프구 수는 결핵의 임상 변형과 관계가 있다고 하였다. (김정규, 최응규들)^{2) 3)}

활동성 폐결핵 환자에서는 세포성 면역이 감소되나 이것은 결과이지 원인이 아니라고 할 수 있다. (4) Bajni Bhatnagar 들, 변해원들⁵⁾

결핵 환자에서 세포성 면역을 관찰하는 것은 치료 및 예후 판정에는 도움이 되나 감별 진단에는 문제점이 많다. PPD 피내반응은 결핵균에 일단 감염되면 결핵의 임상적 발병 여하를 막론하고 대부분 양성화되나, 급성 중증 결핵 환자에서는 오히려 일시적으로 음성이므로 PPD 피내반응 검사

는 특수한 경우(유아 및 감염율이 적은 사회)를 제외하고는 진단에 도움을 주지 못한다.

활동성 폐결핵 환자에서 PPD 피내반응이 음성인 이유로 과거에는 결핵균에서 분비되는 단백질에 의한 자가탈감작에 기인한다고 하였으며 혹은 결핵균이 잠복기 내에 있다고 설명하였다.

(Stead,⁶ Kent & Schwartz⁷)

Howard⁸ 등은 소수의 중증 동공성 폐결핵 환자에서 상태가 호전되어 PPD 피내반응이 계속적으로 음성인 증례를 보고하였으며 이런 경우에는 항결핵 제에도 잘 반응을 하지 않는다.

Rook⁹ 등은 여러 가지 종류의 결핵균에 감염된 결핵 환자에서 피내반응이 음성으로 나타나는 이유는 특히 항원에 자극된 임프구는 염증성 조직, 임프결절에 운집하여 결핵내로 재순환하지 못한다고 하였다.

저자들의 실험 성적에서도 속립성 결핵, 결핵성 뇌막염 및 중증 폐결핵 환자에서는 대부분 PPD 피내반응은 음성이었으나 PPD 임프구 자극지수는 정상 대조군보다 증가하였다.

Pearmain¹⁰ 등이 PPD 피내반응 양성인 사람에서 Phytohaemagglutinin(PHA) 대신에 PPD를 가하여 임프구 배양에 의한 아세포형성 반응을 처음 시행하여 PHA같은 결과를 얻었다.

Mc¹¹ Farland 와 Heilman은 여러 가지 항산균에 의한 피내반응 및 PPD 임프구 자극시험을 실시하여 서로 특이한 항원에만 작용하는 것을 관찰하였다. (Chaparas et al)¹²

건강한 사람에서 피내반응 검사가 강하게 양성으로 나타나나 PPD 자극에 의한 임프구 변형 값이 낮게 나오는 이유는 혈청내 임프구 억제 인자가 존재하는 것으로 설명하였다.

저자들의 실험에서도 피내반응이 양성인 정상대조군의 PPD 자극지수가 낮은 것은 Mc Farland의 보고와 일치하였다.

Matsanoitis¹³ 등은 BCG 투여 후 피내반응 음성인 어린 아이도 PPD 임프구 자극 시험에는 반응하는 것을 관찰하여 PPD 임프구 자극 시험이 피내반응보다 예민하다고 하였다.

Kerby¹⁴ 는 PPD에 의한 피내반응과 임프구 변형

값이 정상과 결핵 환자군에서 대부분 비례한다고 하였다.

Smith¹⁵ 및 Reichman 등은 활동성 폐결핵 환자에서 PPD에 의한 피내반응은 음성이었으나 PPD 임프구 변형은 의의가 있었으므로 결핵의 진단에 유효하다고 하였다. 피내반응이 음성으로 나타나는 이유는 혈중 임프구의 감소로 설명하였다.

저자들의 실험 성적은 경증, 중등증, 중증, 결핵성 늑막염, 결핵성 뇌막염 및 속립성 결핵 환자에서 PPD 임프구 자극지수와 피내반응 검사 결과와는 서로 상관관계가 없어 Kerby와의 성적과는 상이하였다.

결핵 환자에서 PPD 임프구 자극지수는 임상 변형과는 관계가 없었으며 결핵의 활동기에 증가하였다.

비결핵성 폐질환 환자에서는 배양 임프구의 PPD 자극지수는 대부분이 증가되지 않았다. 그러므로 PPD 임프구 자극 검사는 각종 다른 폐질환으로부터 결핵을 감별 진단하는데 도움이 될 것 같다.

결 론

저자들은 정상 대조군 20명, 결핵 환자군 45명 및 비결핵성 폐질환 환자군 30명을 대상으로 하여 PPD 임프구 자극시험 및 PPD 피내반응 검사를 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 활동성 결핵 환자에서는 PPD 임프구 자극지수가 정상보다 증가하였다.

2) PPD 임프구 자극지수는 결핵의 임상 변형과는 무관하였다.

3) 비결핵성 폐질환 환자에는 PPD 임프구 자극지수는 정상인과 차이가 없었다.

4) PPD 피내반응 정도와 PPD 임프구 자극지수 사이에는 상관관계가 없었다.

이상의 실험 결과로 보아 PPD 임프구 자극 시험은 결핵 환자와 비결핵성 폐질환의 감별 진단에 도움이 될 것으로 사료된다.

Reference

1. Yamaguchi, K. and Kishimoto, S.: *Distinction between suppressors of the delayed-type hypersensitivity and the humoral response to sheep erythrocytes. Immunology.* 35:721-731, 1978.
2. 김정규: 결핵환자의 말초 혈액내의 T cell. 가톨릭의대 논문집 36:83-94, 1974.
3. 최응규, 박태수·김희숙, 변해원: 폐결핵환자에서의 roette-forming lymphocytes 수에 관한 연구. 결핵호흡기질환. 24:85-91, 1977.
4. Bajni Bhatnatnagar, A. N., Malaviya, S. N., Premavathi Rajgopalan, R. K. and Bharadwaj, O. P.: *Spectrum of immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis. Am. Rev. Resp. Dis.* 115:207-212, 1977.
5. 변해원, 박성학, 김동집: 결핵환자의 임상적 변형과 면역반응에 관한 연구. 대한 내과학회 잡지. 22:18-21, 1979
6. Stead, W. W.: *Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man: Recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection? Am. Rev. Resp. Dis.* 95:729-745, 1967.
7. Kent, D. C. and Schwartz, R.: *Active pulmonary tuberculosis with negative skin reactions. Am. Rev. Resp. Dis.* 95:411-418, 1967.
8. Howard, W. L., Klopfenstein, M. D., Steinger, W. J. and Woodruff, C. E.: *The loss of tuberculin sensitivity in certain patients with active pulmonary tuberculosis. Chest.* 57:530-534, 1970.
9. Rook, G. A. W., Carswell, J. W. and Stanford, J. L.: *Preliminary evidence for the trapping of antigen-specific lymphocytes in the lymphoid tissue of anergic tuberculosis patients. Clin. Exp.* 26:129-132, 1976.
10. Pearmain, G., Lycette, R. R. and Fitzgerald, P. H.: *Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet.* 1:637-638, 1963.
11. McFarland, W. and Heilman, D. H.: *Comparison of lymphocyte transformation and intradermal reactions to tuberculins. Am. Rev. Resp. Dis.* 93:742-748, 1966
12. Chaparas, S. D., Sheagren, J. N., DeMeo, A. and Hedrick, S.: *Correlation of human skin reactivity with lymphocyte transformation induced by mycobacterial antigens and histoplasmin. Am. Rev. Resp. Dis.* 101:67-73, 1970
13. Matsaniotis, N., Tsenghi, C., Economou-Mavrou, C and Metaxotou-Stavridaki, C.: *Skin hypersensitivity in vitro and lymphocytic reactivity to tuberculin in childhood. J. Pediat.* 72:599-605, 1968.
14. Kerby, G. R.: *Correlation of tuberculin skin reaction with in vitro lymphocyte transformation. Am. Rev. Resp. Dis.* 97:904-908, 1968.
15. Smith, J. A. and Reichman, L. B.: *Lymphocyte transformation. An aid in the diagnosis of tuberculosis in patients with nonreactive skin tests. Am. Rev. Resp. Dis.* 106:194-201, 1972.