결핵 환자의 말초혈액내 T 세포아형

가톨릭의과대학 내과학교실

이미완* · 채정하 · 문화식 · 송정섭

노재철 · 박성학 · 변해원

병리학교실

김 상 호

= Abstract =

Peripheral T Cell Subpopulation in Patients with Pulmonary Tuberculosis

Mi Wan Lee*, M.D., Jeong Ha Chae, M.D., Hwa Sik Moon, M.D., Jung Sup Song, M.D.

Jae Cheol Ro, M.D., Sung Hak Park, M.D. and Hae Won Byun, M.D.

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

Sang Ho Kim

Department of Pathology,

To evaluate cellular immunity in patients with pulmonary tuberculosis, peripheral T cell subsets were counted. Pan T cell and T cell subpopulation were observed by using monoclonal antibodies(Leu 1, Leu 2, Leu 3).

The results were as follows:

- 1) Pan T cell, helper T cell and Leu 3/Leu 2 were significantly decreased in patients with pulmonary tuberculosis compared with the normal control group.
- 2) Suppressor T cell were increased significantly in pulmonary tuberculosis than normal control.
- 3) There was no significant changes of pan T cell and T cell subpopulation among the patients of the minimal, moderately and far advanced pulmonary tuberculosis.

It is suggested that measurement of T cell subpopulation might be explained as one of pathogenesis in pulmonary tuberculosis

서 론

결핵의 발병과 경과에 숙주의 저항성과 병원체의 병원성에 의해 좌우되며, 결핵균에 감염된 사람의 90%는 숙주의 저항성이 결핵균의 증식을 억제하여 질환을 야기시키지 않는다. 숙주의 저항성은 세포성면역과 체액성면역이 관여하지만 결핵의 병리에서는 세포성면역

이 중요하다.

세포성면역의 기능적 변화를 조절하는 요인으로는 억제 T세포(suppressor T cell)와 협력 T세포(helper T cell)의 불균형이 중요하게 관여한다는 것이 많은 질환에서 보고되고 있다^{1~3)}.

결핵 환자에서 세포성면역이 저하되어 있다는 것은 여러 보고자에 의하여 알려져 왔다^{4~11)}.

결핵 환자에서 세포성면역의 감소 원인으로서는 혈청내 억제인자나 억제 세포의 존재가 시사되고 있다.

저자들은 결핵 환자에서 세포성면역 상태를 알아보기 위하여 활동성 결핵 환자 30명과 정상인 10명에서

* 서대문시립병원 내과

* 이 논문은 1983년도 가톨릭중앙의료원 학술연구 보조비로 이루어진 것임.

* Department of Internal Medicine, Suh Dai Moon City Hospital, Seoul, Korea

단일 세포군성 항체(Lue 1, Lue 2, Lue 3)를 이용하여 말초 혈액내 T세포아형을 관찰하여 문헌조사와 함께 보고하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대 상

1984년 1월부터 1984년 10월까지 가톨릭의대부속 성 바오로병원과 서대문시립병원에 입원한 환자중 결핵균 도말 검사상 양성이고, 항결핵제를 투여받은 기왕력이 없는 활동성 폐결핵 환자 30명과 정상인 10명을 대상으로 하였다.

2. 방 법

1) 임파구 분리 : Boyum(1968)¹²⁾의 방법을 수정한 것으로 요약하면 대상인의 상완 정맥에서 방부제가 없는 heparin을 생리적 식염수로 희석하여 600 unit/ml로 되게 한 후, heparin 0.5 cc 당 말초혈액 15 cc를 채혈하여 Ficollhypaque가 들어 있는 시험관에 3:4 비율로 띄운 후 실온(18°C~20°C)에서 원심 분리(2,000 rpm, 40분)를 하였다. 그후 buffy coat 층을 수집하여 HBSS(Hank's balanced salt solution)로 2회 반복세척(1,000 rpm, 10분)한 다음, 배양액에 재부유시켜 세포수가 2×10^6 /ml 되게 하였다.

2) 직접 면역 형광 항체법에 의한 T세포아형의 검색: 50 μ l의 임파구(2×10^6 /ml)가 든 시험관내에 FITC-conjugated anti-Leu 1, 2 및 3(Beckton-Dickson Co, USA)를 증류수로 1:250 희석하여 50 μ l씩 각각 넣어 ice bath에서 45분간 반응시켰다.

Stock anti sera의 농도는 anti Lue 1은 50 μ g/ml, anti-Leu 2 및 anti Leu 3은 100 μ g/ml였다.

반응이 끝난 후 500 g에서 3분간 원심분리하여 상층액을 micropipette로 제거한 후 HBSS로 3회 세척하였다.

세포는 최종 100 μ l의 HBSS에 부유시킨 후 50 μ l씩 무형광 유리 슬라이드에 떨어뜨려 많은 층을 만든 후 공기중에 2~3분 건조시켰다. 그후 95% alcohol-5% glacial acetic acid에 4°C에서 30분 고정하였다. 그후 phosphate buffered solution(PBS, Flow No. 17601-20)로 3회 세척하여 glycerol 완충용액 1방울을 떨어뜨리고 Cover glass로 봉입하여 AO(American optical company, U.S.A.)형광 현미경하에서 250배 배율로 관찰하였고 세포 100개당 형광을 발하는 세포

수를 계산하였다.

성 적

1. 정상대조군

정상대조군 10명에서 전체 T세포(%)는 84.3 ± 5.7 , 협력 T세포(%) 45.3 ± 6.1 , 억제 T세포(%) 25.2 ± 4.2 이고, Leu 3/Leu 2비는 1.81 ± 0.23 이었다(Table 1).

2. 결핵환자군

활동성 결핵 환자의 전체 T세포(%)는 74.8 ± 4.6 , 협력 T세포(%) 33.9 ± 3.5 , 억제 T세포(%) 34.8 ± 4.9 , Leu 3/Leu 2비는 0.98 ± 0.17 로서 정상대조군보

Table 1. Lymphocyte Subpopulations between Normal Control and Pulmonary Tuberculosis

	Control (n=10)	Pulmonary Tbc.(n=30)
Pan T cell	84.3 ± 5.7	74.8 ± 4.6
Helper T cell	45.3 ± 6.1	33.9 ± 3.5
Suppressor T cell	25.2 ± 4.2	34.8 ± 4.9
Leu 3 a/Leu 2 a	1.81 ± 0.23	0.98 ± 0.17

Fig. 1. The helper T cell/Suppressor T cell ratio in control and patients with pulmonary tuberculosis.

Table 2. Lymphocyte Subpopulations among Minimal, Moderately Advanced and Far Advanced Pulmonary Tuberculosis

	Min.(n=10)	MA(n=10)	FA(n=10)
Pan T cell	74.9±4.5	75.0±2.5	74.3±1.9
Helper T cell	31.9±2.5	35.9±6.6	33.4±4.2
Suppressor T cell	32.7±1.9	35.6±4.5	36.8±4.1
Leu 3 a/Leu 2 a	0.98±0.14	1.00±0.21	0.94±0.09

Fig. 2. Immunofluorescent microphotograph of T lymphocytes from pulmonary tuberculous patients. T lymphocyte were showing positive fluorescence stained with anti-Leu 1-FITC conjugate. Microscope A.O.(×250).

다 Leu 3/Leu 2비는 통계적으로 유의있게 감소하였다 ($p<0.01$)(Table 1).

3. 결핵 환자의 병상 경과별 비교

흉부 X선에 따라 결핵환자를 경증, 중등증, 중증으로 나누어 비교하였더니, 전체 T세포(%)는 경증 74.9±4.5, 중등증 75.0±2.5, 중증 74.3±1.9, 협력 T세포(%)는 경증 31.9±2.5, 중등증 35.9±6.6, 중증 33.4±4.2, 억제 T세포(%)는 경증 32.7±1.9, 중등증 35.6±4.5, 중증 36.8±4.1이고 Leu 3/Leu 2비는 경증 0.98±0.14, 중등증 1.00±0.21, 중증 0.94±0.09로 상호간에 통계적으로 차이가 없었다(Table 2)(Fig. 1).

고 안

세포성면역에 관여하는 세포계는 단핵구-대식구, 항

체의존성 세포파괴능에 관여하는 살해세포(K세포), 자연 살해 세포(NK 세포), T세포로 구성되며, 세포성면역상태를 관찰하기 위하여서는 상기세포의 숫적 및 기능적 변화를 관찰해야 한다. 본 교실에서는 결핵 환자에서 항결핵제치료전 K세포 및 NK세포의 기능이 저하되어 있으며 치료후 K세포의 기능은 회복되나 NK세포의 기능에는 변화가 없었다는 것을 보고한 바 있다^{9,11)}.

T세포는 대별하여 협력 T세포와 억제 T세포로 구성되는데, T세포의 기능을 정상적으로 유지하기 위하여는 협력 T세포 및 억제 T세포가 균형을 이루어야 한다.

결핵 환자에서 T세포의 기능과 임상경과간에는 상관관계가 있으리라고 생각되는데 즉, 피내반응이 음성이거나 특이항원 혹은 mitogen에 의한 임파구 배양후

자극지수가 저하된 환자에서는 임상증상이 심하며, 항결핵제에도 효과가 적었다⁶⁾. 이러한 T세포의 기능이 감소한 이유로는 Kleihenz 들¹³⁾은 피내반응에 음성인 결핵 환자의 혈청과 결핵균 항원을 정상인의 단핵구 및 임파구와 혼합 배양한 결과 T세포의 기능 저하를 관찰하여, 이는 결핵 환자 혈청 내에 T세포기능을 억제하는 Prostaglandin(PG) 물질이 존재하던지 혹은 단핵구로 생성된 PG에 의하여 억제된다고 하였으나, 본 연구실 성적에서는 결핵 환자의 혈청내에는 세포성 면역 억제인자는 발견할 수 없었다⁸⁾. 따라서 혈청인자보다는 결핵 환자의 말초혈액내 전체 T세포의 감소가 세포성면역의 저하의 중요한 요인으로 생각된다.

전체 T세포를 측정하는 방법으로는 면양 적혈구를 이용하는 전체로젯법, Wybran 등¹¹⁾의 능동로젯법, neuraminidase 처리로젯법¹⁴⁾, 2-amino ethylisothionium bromide 처리로젯법¹⁵⁾과 단일 세포군성 항체 이용법¹⁶⁾이 있으며, 단일 세포군성 항체 이용법으로 측정하는 것이 가장 정확하나, 특수기계를 사용하지 않으면 판독하는 사람의 주관이 많이 작용하여 오차가 많으며, 가격이 비싼 것이 단점이다.

저자들의 성적에서는 전체 T세포의 수는 감소하였으나, 임상 경과로 구분한 경증, 중등증, 중증 결핵환자군에서는 차이가 없어, 과거의 다른 보고자와는 상이하였으며, 원인으로는 환자 선택과 측정방법의 차이로 설명하였다.

Rook 들¹⁷⁾은 특이 항원에 자극된 임파구가 염증 조직에 운집하여 말초 혈액의 T세포수가 감소된다고 하였으나, 임상의 중등도와 비례하지 않는 것을 보면 결핵 환자에서는 말초 T세포보다는 실질적으로 전체 T세포의 감소가 중요한 것 같다.

세포성면역의 저하 요인으로 억제 세포의 존재 가능성이 논의된 후^{18,19)}, IgG의 Fc 수용체를 갖는 억제 T세포의 판여가 보고되었으^{20~22)}, Wade 들^{23,24)}은 비특이 억제 세포로 작용하는 단핵구로부터의 억압 인자가 억제 T세포를 활성화한다고 하였다.

억제 T세포를 측정하는 방법으로 임파구 표면에 있는 특이수용체를 이용하여 IgG의 Fc 수용체 양성, 히스타민(H₂) 수용체, 류마치스 혈청 양성인 억제 T세포 및 단일 세포군성 항체 측정법등이 있다.

저자들의 성적에서는 억제 T세포의 수가 결핵 환자에서는 증가되었으며, 임상 중증도와는 차이가 없는 것으로 보아 억제 T세포의 감소가 결핵의 병리에 원인적 요소로 작용하지 않나 생각되나 결핵의 결과에 기인하는지 확실치 않다.

최근에 여러가지 질환의 병태 생리를 설명하는데 단일 세포군성 항체를 사용하여 협력 T세포와 억제 T세포의 비를 산출하여 이용한다^{1~3)}.

저자들의 성적에 의하면 결핵 환자에서는 정상대조군에 비하여 Leu 3/Leu 2 값이 현저히 저하된 것으로 보아 협력 T세포와 억제 T세포의 불균형이 결핵 환자의 병인에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 시사된다.

결 론

저자들은 객담 도말 검사상 양성인 결핵환자 30명과 정상대조군 10명에서 단일 세포군성 항체를 이용하여 전체 T세포 및 T세포 아형을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 결핵 환자의 말초 혈액내 전체 T세포(%)는 74.8 ± 4.6 으로 정상대조군 84.3 ± 5.7 에 비해 통계적으로 유의있게 낮았다($p < 0.05$).

2) 결핵 환자의 말초 혈액내 협력 T세포(%)는 33.9 ± 3.5 로 정상대조군 45.3 ± 6.1 에 비해 통계적으로 유의있게 낮았다($p < 0.05$).

3) 결핵 환자의 말초 혈액내 억제 T세포(%)는 34.8 ± 4.9 로 정상대조군 25.2 ± 4.2 보다 현저히 증가되었다($p < 0.01$).

4) 결핵 환자의 말초 혈액내 Leu 3/Leu 2 값은 0.98 ± 0.17 로 정상대조군 1.81 ± 0.23 보다 통계적으로 유의있게 감소하였다($p < 0.01$).

5) 경증, 중등증, 중증 결핵 환자에서 전체 T세포, 협력 T세포, 억제 T세포 Leu 3/Leu 2 값 사이에는 통계적으로 차이가 없었다.

REFERENCES

- 1) Coovadia, H.H.: Suppressor cell assayed by three different methods in patients with chronic active hepatitis and systemic lupus erythematosus. Clin. Immunol. Immunopathol., 19: 268, 1981.
- 2) Ginns, L.C., Goldenbeim, P.D., Miller, L.G., Borton, R.C., Gillick, L., Colvin, R.B., Goldstein, G., Kung, P.C., Hurwitz, C. and Kazemi, H.: T-lymphocyte subsets in smoking and lung cancer, Am. Rev. Resp. Dis., 126:265, 1982.
- 3) deShazo, R.D., Nodberg, J.B.A., Baser, Y., Boze-

- lka, B., Weill, H. and Salvaggio, J.: Analysis of depressed cell-mediated immunity in asbestos workers. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **71**:418, 1983.
- 4) Wybran, J. and Fundenberg, H.H.: Thymus derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other disease. *J. Clin. Invest.*, **52**:1026, 1973.
- 5) Zeitz, S.J., Ostrow, J.H., and Van Arsdel, P.P.: Humoral and cellular immunity in the anergic tuberculosis patient. *J Allergy Clin Immunol*, **53**:20, 1974.
- 6) 김정규: 결핵 환자의 말초 혈액내의 T cell. 가톨릭대학의학부 논문집, **26**:83, 1974.
- 7) 최응규, 변해원, 박태수, 김희숙: 폐결핵환자에서의 Rosette-forming Lymphocytes 수에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환, **24**:85, 1977.
- 8) 변해원, 박성학, 김동집: 결핵환자의 임상적 변형과 면역반응에 관한 연구. 대한내과학회잡지, **22**:18, 1979.
- 9) 문화식, 김훈교, 김호연, 박성학, 김춘추, 김동집, 변해원: 결핵 환자의 자연살해세포 매개 파괴능. 결핵 및 호흡기질환, **28**:151, 1981.
- 10) 채장성, 김동집: 결핵 환자의 세포성면역. 가톨릭대학의학부 논문집, **36**:139, 1983.
- 11) 이진창: 폐결핵환자에서의 K세포와 자연살해세포의 세포파괴능. 가톨릭대학의학부 논문집, **36**:147, 1983.
- 12) Boyum, A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from blood *Scan. J. Clin. Lab. Invest(supple)*, **97**:77, 1968.
- 13) Kleinhenz, M.E., Ellner, J.J., Spagnuolo, PJ and Daniel, TM: Suppression of lymphocyte responses by tuberculosis plasma and mycobacterial arabinogalatan. *J. Clin. Invest*, **68**:153, 1981.
- 14) Weiner, M.S., Bianco, C. and Nussenzweig, V: Enhanced binding of neuramidase-treated sheep erythrocytes to human T lymphocytes. *Blood*, **42**:939, 1973.
- 15) Pellegrino, M.A., Ferrone, S., Dierch, M.P. and Reisfeld, RA: Enhancement of sheep red blood cell human lymphocyte rosette formation by the sulfhydryl compound 2-amino ethylisothiouronium bromide. *Clin. Immunol. Immunopathol*, **3**:324, 1975.
- 16) Hoffman, R.A., Kung, D.C., Hansen, W.P. and Goldstein, G.: Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **77**:4914, 1980.
- 17) Rook, GAW, Carswell, JW and Stanford, TL: Preliminary evidence for the trapping of antigen specific lymphocytes in the lymphoid tissue of anergic tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol*, **26**:129, 1976.
- 18) Ellner, JJ: Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J. Immunol*, **121**:2573, 1978.
- 19) Klimpel, G.R. and Henney, C.S.: BCG-induced suppressor cells. Demonstration of a macrophage-like suppressor cell that inhibits cytotoxic T cell generation in vitro. *J. Immunol*, **120**:563, 1978.
- 20) Katz, P, Goldstein, RA and Fauci, AS: Immunoregulation in infection caused by mycobacterium tuberculosis: The presence of suppressor monocyte and the alteration of subpopulation of T lymphocytes. *J. Infect. Dis.*, **140**:12, 1979.
- 21) Nakamura, RM and Tokunaga, T: Induction of suppressor T cells in delayed-type hypersensitivity to mycobacterium bovis BCG in low-responder mice. *Infect Immune*, **28**:331,
- 22) Tsuyugushi, I., Shiratsuchi, H., Teraoka, O. and Hirano, T: Increase in T cells bearing IgG Fc receptors in peripheral blood of patients with tuberculosis by in vitro stimulation with purified protein derivatives. *Am Rev Resp. Dis.*, **121**:951, 1980.
- 23) Wadee, A.A., Sher, R. and Rabson, AR: Production of a suppressor factor by human adherent cells treated with mycobacteria. *J Immunol.*, **125**:1380, 1980.
- 24) Wadee, A.A. and Rabson, A.R.: Production of a suppressor factory by adherent cells from mycobacterium tuberculosis-infected guinea-pigs. *Clin. Exp. Immunol.*, **45**:427, 1981.