□ 원 저 □

한국인 결핵환자의 말초혈액 및 늑막삼출액에서의 T림프구 및 그 아형들의 수적변화에 관한 면역세포화학적 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실

김준우 · 심영수 · 김건열 · 한용철

해 부 학 교 실

이 왕 재 · 장 가 용

= Abstract =

Immunocytochemical Study on the Change of the Percentage and Absolute Numbers of T Lymphocytes and their Subsets in the Peripheral Blood and Pleural Effusion of Tuberculosis Patients

Joon Woo Kim, M.D., Young Soo Shim, M.D., Keun Youl Kim, M.D.
and Yong Chol Han, M.D.

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

Wang Jae Lee, M.D. and Ka Young Chang, M.D.
Department of Anatomy

The immunocytochemical study was performed to observe the changes of the percentage and absolute numbers of T-lymphocytes and their subsets in the peripheral blood and pleural effusion of tuberculosis patients.

The peripheral blood obtained from fifteen healthy persons and thirty-eight pulmonary tuberculosis patients (minimal 14, moderate 11, far advanced 13), and the pleural fluid from tuberculous pleurisy patients were smeared onto the gelatin coated slide glass prepared for the smear of mononuclear cells.

The double bridge technique of alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase (APAAP) method was used. As the primary antibodies, T₁ (anti-human T cells), T₄ (anti-human helper/inducer T cells) and T₈ (anti-human suppressor/cytotoxic T cell) antibodies were used.

The following results were obtained from this experiment.

- 1) The percentage of T₁₊ and T₄₊ cells showed marked decrease in the pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy patients. That of T₈₊ cells showed no change. T₄₊/T₈₊ ratio showed marked decrease in all experimental groups.
- 2) There are no differences in the percentage of T₄₊ cells and T₄₊/T₈₊ ratio between each group of pulmonary tuberculosis patients.
- 3) The tuberculous pleurisy patients showed decrease in the percentage of T₄₊ cells but no change in that of T₈₊ cells in the peripheral blood, and showed 76% of T₁₊ cells, 68% of T₄₊ cells and 17

of T_{8+} cells in the pleural effusion.

4) There were significant decreases in the absolute number of T_{1+} , T_{4+} and T_{8+} cells in the peripheral blood of all groups of tuberculous patients.

5) There were positive correlations between the long diameter of induration caused by tuberculin skin test and the percentage of T_{1+} cells, T_{4+} cells and T_{4+}/T_{8+} ratio.

서 론

1891년 Koch에 의해 결핵균에 의한 숙주의 재감염시 저항능력을 가지는 면역반응의 형성이 알려진 이후 여러 실험결과에서 결핵감염시의 면역반응은 세포매개성이라는 점이 증명되었다. 이는 1945년 Chase의 실험에서 결핵항원에 대한 지연형 과민반응은 sensitized donor로부터의 living lymphocyte에 의해 nonreactive recipient로 인정되는 점이 증명되었고¹⁾, 1952년 Lurie에 의해서 림프구와 대식구가 결핵감염에 대한 저항에 중요한 역할을 한다는 점이 역시 증명되었다²⁾.

이후 이러한 종류의 세포성 과민증은 질병의 발현 및 증상에 관련된다는 점이 확립되었다^{3,4)}. 또한 후천면역과 지연형 과민증에 대한 연관성 여부로 논란이 되었고, 이러한 현상은 림프구의 2가지 아형에 대한 연구로 발전되었다^{5,6)}.

한편 결핵감염시의 후천면역과 지연형 과민증에 관여하는 세포들의 역할과 조절기능에 대한 이론적 배경에서 결핵감염의 세포매개성 면역에 대한 기본 논제를 요약해 보면, effector T 림프구가 혈액내를 순환하면서 감염부위에 존재하는 결핵항원을 인식하고 상주하는 대식세포의 활성화 및 여러 soluble mediator를 분비하여 혈액내의 단핵세포를 동원 및 활성화시킴으로서 조절된다는 내용이다⁷⁻¹²⁾.

따라서 effector T 림프구의 연구는 결핵감염시의 초기단계에 대한 중요한 과제가 되었고, specifically committed T 림프구에 대한 개념도 생기게 되었다^{7,10,13-15)}.

임상적으로도 결핵의 초기단계에서는 실제 많은 환자에서 T 림프구의 기능 감소를 보이고 있고, 질병의 안정화 혹은 치유됨에 따라서 T 림프구의 기능이 항진된다고 생각하였다. 더우기 T 림프구의 기능이 저하된 경우 예후가 나쁠 것이라는 가정도 있지만 여러 연구 결과를 조사해 보면 아직은 확실히 알 수 없는 단계에 있다. 이외에도 질병이 진전되어 결핵균의 양이 많아지면 억제세포

의 영향이 우세해진다는 보고도 있다¹⁶⁻²⁰⁾.

이러한 관점에서 볼 때에 결핵환자의 진단시 활동성 유무 및 진행정도 그리고 방어기능과 치료에 대한 반응을 객관적인 측정치로 평가할 수 있는 방법이 있다면 임상적 측면에서는 매우 유용할 것으로 사료된다. 한편 현재까지 논란의 대상이 되는 지연형 과민증과 후천면역과의 독립적 혹은 종속적 관계 여부를 알아 보는 것도 역시 중요하다. 이러한 이유에서 처자는 세포매개성 면역에 관련된 T 림프구 및 그 아형에 대한 연구를 실시하게 되었다.

이는 단계적인 연구가 필요한데 본 실험에서는 이 연구의 기초적인 첫단계로 정상인과 폐결핵환자의 말초혈액의 T 림프구 및 그 아형의 수적 차이를 보고, 결핵성 늑막염 환자의 늑막삼출액과 말초혈액에서의 T 림프구 및 그 아형의 분포 차이를 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 정상군

결핵에 과거 이환력이 없으며 흉부 X-선 촬영상 정상으로 판정된 남자 8명, 여자 10명을 정상군으로 삼았으며, 그 연령범위는 20세에서 55세였고 평균연령은 31 ± 9 세였다. 그리고 남·여 모두 흡연을 하지 아니하는 사람을 택했다.

2) 실험군

1985년 3월부터 1986년 9월까지 서울대학교 병원 내과에 입원 또는 외래로 내원했던 결핵환자 44명을 대상으로 했다. 결핵환자는 다시 활동성 폐결핵환자 38명과 결핵성 늑막염환자 6명으로 나누어 구분하였고, 전자의 경우 객담의 양성도말검사, 흉부 X-선 촬영으로 진단하였으며, 후자의 경우는 늑막생검 및 세포진 검사로 확진된 환자만을 대상으로 하였다. 폐결핵환자는 흉부 X-선 촬영을 통해 진행도를 경증, 중등도, 중증으로 구분하였다(Table 1~2). 환자의 선택시 CBC와 differential count, 혈액화학검사(Blood chemistry test), B형 간

염검사 및 기타 검사를 시행하여 가능한 결핵 이외의 다른 만성질환, 감염성질환, 악성질환을 배제하였다. 또한 실험군으로 이용된 모든 환자는 결핵에 관한 치료를 시작하기 전의 경우로 제한되었다(Table 3). 조사대상자의 성별, 연령 분포는 44명중 남자가 19명, 여자가 25명이었고, 평균연령은 35±10세였다.

2. 방 법

1) 재료 채취

(1) 말초혈액

말초혈액채취를 위해서는 정주피정맥을 택하였으며 일주기에 의한 변화(Miyawaki등, 1984)를 막기 위해 채취시간은 오전 9시에서 11시 사이를 택하였으며, 혈액응고를 피하기 위해 Heparin(10 unit/ml of peripheral blood)을 처리한 시험관에 5ml를 채취하였다.

(2) 늑막 삼출액

늑막천자에 의해서 뽑힌 15~20 ml의 늑막삼출액을 재료로 사용하였다.

2) 재료의 처리

(1) 단핵세포부유액

채취된 말초혈액은 pH 7.2의 Hank's Balanced Salt solution(이하 HBSS라 약함)으로 2배 희석한 후 Ficoll-Hypaque 밀도경사 용액과 2 : 1의 용적비로 Ficoll-Hypaque 용액을 시험관의 아래층에 넣고 희석된 혈액을 그 위에 넣은 후 원심분리기에서 600 g로 30분간 원심분리하여 단핵세포만을 골라내었다. 이렇게해서 얻

Table 1. Patient Categories and Its Distribution

Patient categories	Subclassification	
Pulmonary tuberculosis (38)	Minimal	(14)
	Moderately advanced	(11)
	Far advanced	(13)
Tuberculous pleurisy with effusion (6)		

Table 2. Criteria for Activity in Pulmonary Tuberculosis

Symptoms
Changes in roentgenogram
Evidence of cavitation
Positive sputum
Response to therapeutic trial

어진 단핵세포부유액을 HBSS로 희석하여 400 g로 10분간 원심분리하여 세척하되 3회 반복하였다. 마지막으로 단위 ml당 10⁶개의 세포가 들어가도록 HBSS로 세포부유액을 희석하였다.

늑막삼출액의 경우는 먼저 HBSS로 3회 세척(400 g로 10분간 원심분리)한 후 Ficoll-Hypaque밀도 경사용액으로 단핵세포만 골라낸 후 말초혈액의 경우와 마찬가지로 단위 ml당 10⁶개의 단핵세포가 되도록 HBSS로 희석하였다.

(2) 단핵세포 도말표본

Paraffin 종이에 양면 tape를 붙이고 punch로 2~3개의 구멍(직경 6 mm)을 낸후 slide glass위에 직경이 6 mm인 2~3개의 well을 만들었다. 이렇게 만들어진 well에 2)의 가)에서 준비된 단핵세포부유액을 50~100 μ l 넣은 후 4℃ 냉장고에서 1시간 동안 자연침강시킨 후 상층액을 micropipette으로 걷어내고 가급적 빠른 시간내에 말렸다. 이렇게해서 만들어진 단핵세포도말 slide는 즉시 면역세포화학 염색에 사용되어지거나 -20℃ 냉동고에 보관되었다.

3) 면역세포 화학

Immunoperoxidase법의 peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 법에 상응하는 Alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase (APAAP) 법을 사용 하되 Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 법보다도 더 민감한 것으로 알려진 PAP의 double bridge 기법 (Vacca, 1984)을 응용한 APAAP의 double bridge 기법을 사용하였다.

(1) 항 체

1차 항체는 T림프구와 그 아형인 조력 T 림프구와 억

Table 3. Laboratory Investigation for Diagnosis of Tuberculosis

1. Sputum examination	To prove bacteriologically
2. Bronchial lavage	
3. Chest radiography	To subclassify
4. WBC count & differential	
5. ESR	
6. Blood chemistry	
7. Pleural fluid examination and biopsy	
8. Tuberculin test (0.1 ml of 1/1000 OT)	
9. Exclude the patients with other concomittent disease	

Table 4. Absolute Number of T_1^+ , T_4^+ and T_8^+ Cells in Unit Volume of Peripheral Blood of Normal Control, Pulmonary Tuberculosis and Tuberculous Pleurisy Patients

Group	No. of subjects	T_1^+ cells T_4^+ cells T_8^+ cells		
		cells/mm ³		
Normal control	18	1509 ± 300	995 ± 154	595 ± 105
Pulmonary tuberculosis	Minimal	1088 ± 301 *	698 ± 146 *	483 ± 98 *
	Moderate	904 ± 303 *	593 ± 192 *	401 ± 126 *
	Far advanced	939 ± 255 *	615 ± 209 *	409 ± 158 *
Tuberculous pleurisy, with effusion	6	838 ± 284 *	537 ± 175 *	382 ± 116 *

* Statistically significant decrease ($p < 0.05$) compared to those of normal control.

제 T 림프구에 대해서 만들어진 단세포군 항체들인 T_1 (mouse antihuman T cell, DAKO Corp.), T_4 (mouse anti-human T helper cell, DAKO Corp.)와 T_8 (mouse anti-human T suppressor cell, DAKO Corp.)를 사용하였다. T_1 항체와 T_8 항체는 pH 7.2인 phosphate buffered saline(이하 PBS로 약함)으로 1:40으로 희석하여 사용하였다. T_4 항체는 1:20으로 희석하여 사용하였다.

2차항체로는 anti-mouse Immunoglobulins (Sigma Chemical Co.)을 PBS로 1:50으로 희석하여 사용하였다.

APAAP (DAKO Corp.)는 alkaline phosphatase에 대해서 mouse에서 만들어진 단세포군 항체와 alkaline phosphatase와의 immune complex로서 PBS로 1:50으로 희석하여 사용하였다.

(2) 발색제

2mg의 Naphthol AS-MX sodium salt (3-Hydroxy-2-Naphthoic acid 2,4-dimethylanilide) (Sigma Product No. N5000)를 0.1 M의 Tris buffer (pH 8.2) 10 ml에 넣어 녹였다. 그 용액에 2.43mg의 Levamisole (Sigma product No. L9756)과 10mg의 Fast Red TR Salt (5-Chloro-2-toluidinediazonium Chloride hemizinc chloride) (Sigma Product No. F1500)를 녹였다. 이 용액은 가급적이면 쓰기 직전에 만드는 것이 바람직하다. 만든 후 용액을 여과용지에 여과하여 녹지않은 과립들을 제거하였다.

4) 내인성 Alkaline Phosphatase 염색을 포함한 비특이성 염색에 대한 검증

내인성 Alkaline phosphatase의 존재 여부를 알기 위해 1차 및 2차 항체, APAAP 모두를 생략하고 직접 발

색제 용액에 30분간 반응시킨다. 그밖의 비특이성 염색의 정도를 검증하기 위해 1차항체를 생략한 경우와 1차 및 2차 항체를 모두 생략한 경우의 염색정도를 관찰하였다.

(1) 염색순서

- ① 준비된 세포도말 slide를 cold acetone ($-10^{\circ} \sim -20^{\circ}C$)에서 5~10분간 고정한다.
- ② 충분히 말린 후 PBS로 2~3번 씻어낸다
- ③ 1차 항체를 넣고 30분간 반응시킨다.
- ④ PBS로 1~2분씩 3번 씻어낸다.
- ⑤ 2차 항체를 넣고 30분간 반응시킨다.
- ⑥ PBS로 1~2분씩 3번 씻어낸다.
- ⑦ APAAP를 넣고 30분간 반응시킨다.
- ⑧ PBS로 1~2분씩 3번 씻어낸다.
- ⑨ 2차항체와 APAAP를 똑같은 조건으로 반복해서 반응시킨다.
- ⑩ PBS에 5분간 담근 후 발색제를 각 well마다 가득 채우고 30분 혹은 그 이상 반응시킨다.
- ⑪ 현미경 하에서 발색정도를 관찰하고 어느 정도 진하게 염색되면 PBS로 씻어내고 mayer's Hematoxylin으로 대조염색한다.
- ⑫ 대조염색이 끝나면 slide glass 위에 붙어 있는 paraffin 종이를 떼어내고 glycerogel (DAKO Corp.)로 wet mounting을 한다.

(2) 분석 방법

현미경 400배하에서 1mm²의 격자 안에 들어있는 전체 림프구의 수를 계수하고, APAAP법에 양성세포인 빨강계 염색된 세포의 수를 계수하여 전체 림프구수에 대한 백분율을 구하였다.

한 종류의 항체에 대해서 3개의 well을 만들어 반응시

켜서 각 well 당 4시야에서 계수하여 모두 12시야에서 얻은 값을 구했다. 또한 말초혈액 채취시 1mm²당 백혈구 수를 계수하고 말초혈액도말을 감별 염색하여 전체 백혈구 중 림프구가 차지하는 백분율을 구해서 말초혈액 1mm³당 T 림프구와 그 아형들의 절대수를 구하여서 비교하였다. 백분율에 의한 T 림프구 및 그 아형의 증감을 비교한 이외에 조력 T 림프구에 대한 억제 T 림프구 비율(H/S ratio)도 비교하였다.

4) Tuberculin 반응검사 결과와 T 림프구 및 그

아형과의 관계

결핵환자에게 tuberculin 항원을 피하주사한 후 48시간 후에 생긴 피부의 홍색결절의 장축(mm)을 측정하여 각 환자의 T 림프구 및 그 아형들의 수치와 상관관계를 그려서 상관계수를 구했다.

5) 통계처리

Student T test를 이용하여 통계적 유의성을 검정했다.

연구 성적

1. 내인성 Alkaline Phosphatase 염색을 포함하는 비특이성 염색에 관한 검증

내인성 Alkaline phosphatase를 지닌 세포를 검색하

기 위해 1차, 2차항체 및 APAAP를 일절 처리하지 않고 발색제에 반응시킨 결과 빨간색의 발색침전물을 나타내는 세포는 거의 관찰되지 않았다. 또한 각종 세포들이 갖는 Fc수용체에 대한 비특이적 항체반응을 관찰하기 위해 1차 항체만을 생략한 경우와 1차 및 2차 항체를 모두 생략시키고 나머지를 반응시킨후 발색제에 반응시킨 결과 아주 소수의 세포에서 약하게 빨간색 반응을 보였으나 Mayer's Hematoxylin 대조염색에 의해서 가려질 정도로 미미하였다.

2. T₁, T₄, 및 T₈ 양성세포들의 백분율

건강한 성인으로 구성된 정상군은 전체 임파구에 대한 T₁ 양성세포의 비율이 $63.6 \pm 3.12\%$ 이었고, 환자군인 경증, 중등도, 중증 및 늑막결핵군의 경우 각각 55.2 ± 5.41 , 53 ± 3.64 , 53.6 ± 6.45 및 $52.5 \pm 2.60\%$ 로 정상군에 비해 통계적으로 유의한 감소($p < 0.05$)를 보였는데, 그중 늑막결핵의 경우는 가장 심한 감소($p < 0.01$)를 보였다(Fig. 1). T₄ 양성세포의 경우는 정상군이 $40.8 \pm 2.50\%$ 이었고, 환자군인 실험군의 경우 경증, 중등도, 중증 및 늑막결핵군에 있어서 각각 35.6 ± 3.44 , 35.0 ± 2.77 , 34.0 ± 3.77 및 $34.4 \pm 2.48\%$ 들어있다. 이 경우에도 전체 T₁ 양성세포의 백분율과 거의 같은 양상을 보

Fig. 1. Mean percentage of T₁⁺ cells to whole lymphocytes in peripheral blood of normal control, pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy patients.

이고 있어 환자군들에서 통계적으로 유의한 수준의 감소를 보이고 있었다($p < 0.05$) (Fig. 2). T_8 양성세포의 경우에는 정상군이 $24.5 \pm 1.49\%$ 를 보이고 있었으며, 실험군들에서는 경증, 중등도, 중증 및 늑막결핵군이 각각

23.2 ± 1.92 , 23.7 ± 2.07 , 25.0 ± 3.02 및 $25.5 \pm 3.39\%$ 를 보이고 있어서 정상군과 통계적으로 유의한 수준의 차이를 보이고 있지 않았다 (Fig. 3).

Fig. 2. Mean percentage of T_4^+ cells to whole lymphocytes in peripheral blood of normal control, pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy patients.

Fig. 3. Mean percentage of T_8^+ cells to whole lymphocytes in peripheral blood of normal control, pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy patients.

3. T_8 양성 세포에 대한 T_4 양성 세포의 비율 (T_4^+/T_8^+ 비율)

실질적인 조력 T 림프구와 억제 T 림프구의 활동도의 지침이 되는 T_4^+/T_8^+ 비율은 정상군의 경우 1.67 ± 0.11 을 보이고 있었으며, 환자군의 경우 경증, 중등도, 중증 및 늑막결핵군의 경우 1.54 ± 0.16 , 1.48 ± 0.17 , 1.41 ± 0.21 및 1.37 ± 0.09 들로서 정상군에 비해 통계적으로 유의한 수준의 감소를 보이고 있었다(Fig. 4).

4. T 림프구 및 그 아형들의 단위부피(1 mm^2)당 절대수

말초혈액 단위부피(1 mm^3)당 T_1 양성세포, T_4 양성세포와 T_8 양성세포의 절대수의 변화를 관찰해 보면 다음과 같다(Table 1).

1) T_1 양성 세포

정상군의 경우 단위부피당 1509 ± 300 개를 보인 반면, 환자군의 경우, 경증, 중등도, 중증 및 늑막결핵군들은 각각 1029 ± 201 , 904 ± 303 , 939 ± 255 및 838 ± 284 개를 보여 환자군 모두가 정상군에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.01$)의 현격한 감소를 보이고 있었다.

2) T_4 양성 세포

정상군의 경우 단위부피당 995 ± 154 개를 보인 반면, 환자군으로 구성된 실험군을 보면 경증, 중등도, 중증 및

늑막결핵군들에 있어서 각각 670 ± 146 , 593 ± 192 , 615 ± 209 및 537 ± 175 개들을 보여 환자군 모두가 정상군에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.01$)의 뚜렷한 감소를 보이고 있었다.

3) T_8 양성 세포

정상군의 경우 단위부피당 595 ± 105 개를 보인 반면, 실험군을 보면 경증, 중등도, 중증 및 늑막결핵환자군들에서 각각 433 ± 98 , 401 ± 126 , 409 ± 158 및 382 ± 116 개들이 계수됨으로써, 억제 T 림프구의 백분율 비교에서와는 달리 실험군들에서 단위부피당의 절대수에서는 통계적으로는 유의한 수준($p < 0.05$)의 감소를 보이고 있었다.

5. 결핵성늑막염환자의 말초혈액과 늑막삼출액에서의 T 림프구 및 그 아형의 분포

6명의 결핵성늑막염 환자의 말초혈액내에서 전체 림프구에 대한 T_1 양성세포, T_4 양성세포와 T_8 양성세포의 비율은 각각 $52.5 \pm 2.6\%$, $34.4 \pm 2.48\%$ 과 $25.5 \pm 3.39\%$ 들이었다. 한편 12명의 결핵성늑막염 환자로부터 얻은 늑막삼출액에서의 결과를 보면 T_1 양성세포, T_4 양성세포 및 T_8 양성세포가 각 76.7 ± 8.9 , 66.0 ± 9.2 및 $17.2 \pm 4.0\%$ 들을 나타내어 말초혈액에 비해 T_1 양성세포와 T_4 양성세포의 비율이 높고 T_8 양성세포의 비율은 낮았다(Fig. 5).

Fig. 4. T_4^+/T_8^+ ratio in normal control, pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy patients.

Fig. 5. Comparison of numbers of T_1^+ , T_4^+ and T_8^+ lymphocytes between peripheral blood and pleural fluid from tuberculous pleurisy patients.

Fig. 6. Correlation between PPD skin test and degree of T_1^+ lymphopenia.

6. Tuberculin 피부반응검사 결과와 T_1 , T_4 양성세포 수 및 T_4^+/T_8^+ 비율과의 상관관계

1) T_1 양성세포와의 관계

Tuberculin 반응검사에 양성으로 나타나는 피부의 홍색결절의 장축의 길이와 T_1 양성세포들의 상관관계를 조사한 결과 상관계수의 값이 0.49이며 그 상관관계에 의한 직선 $Y=1.1X-37.7$ 의 함수로 표시되었으며 그 직선의 기울기에 대한 통계적 유의성 검정의결과 유의한 수준($p<0.05$)으로 직선의 기울기가 인정됐다(Fig. 6).

Fig. 7. Correlation between PPK skin test and degree of T_4^+ lymphopenia.

Fig. 8. Correlation between PPD skin test and degree of T_4^+/T_8^+ ratio.

2) T_4 양성세포의 관계

상관계수의 값은 0.39이며 직선은 $Y=1.1X-16.5$ 로 표시되었으며 통계적으로 유의한 수준($p<0.05$)의 직선의 기울기가 인정되었다. (Fig. 7).

3) T_4^+/T_8^+ 비율과의 관계

실질적으로 면역반응의 방향을 가늠할 수 있는 지표인 T_4^+/T_8^+ 비율과의 상관관계를 보면 상관계수의 값(r)이

0.50이 나왔으며 함수식은 $Y=26.8X-17.5$ 로 표시되었고 통계적으로 유의한 수준($p<0.05$)으로 직선의 기울기가 인정되었다(Fig. 8).

고 찰

1. 면역세포 화학

본 실험에서 Sternberg 등²³⁾이 처음으로 사용한 바 있는 Immunoperoxidase 방법중 PAP법에 상응하는 Immunoalkaline phosphatase방법의 APAAP법을 이용하되 ABC법^{24,25)}보다도 더 민감한 것으로 알려진 double bridge 기법²²⁾을 사용하였다. Lansdorp 등²⁶⁾은 세포표면 항원의 염색법으로 PAP를 사용하였으나 그 양이 소량이기 때문에 단순한 PAP법의 민감도(sensitivity)로는 그 항원을 검색할 수가 없어서 그 민감도를 증폭하는 방안을 찾던 중 PAP법에서 2차항체와 PAP 복합체를 반복해서 반응시키는 소위 단계적 PAP증강(stepwise amplified PAP)을 시킨 후 peroxidase 효소의 양을 Agar gel electrophoresis 방법을 이용하여 측정함으로써 단계적 증강을 시키는 횟수에 따라서 peroxidase 효소가 몇개가 증가하는가 하는 것을 산출해냈다. 그 결과 PAP의 단계적 증강을 2회(소위 double bridge 기법)시켰을 때에 peroxidase 효소수의 총계는 6개로서, 그 총계가 3개로 알려진 ABC기법보다도 2배 민감한 것으로 보고하였다.

본 실험에서는 Lansdorp 등²⁶⁾의 단계적 증강법의 원리와 cordell 등²⁷⁾이 사용한 APAAP법을 결합시킨 방법으로서 세포의 도말 표본이나 냉동 절편과 같이 내인성 peroxidase의 존재가 크게 문제되는 표본의 염색에서 PAP법의 double bridge기법을 능가하는 좋은 방법으로 사료된다. 또한 염색의 최종 결과가 진홍색으로 세포에 침착되기 때문에 아주 소량 존재하는 항원이라 할지라도 그 위치가 쉽게 눈에 띄고 Hematoxylin과 같은 푸른색의 대조염색을 통해 각 세포들의 형태를 명확히 파악할 수 있는 장점을 가지고 있다.

본 실험에 사용된 3개의 1차 항체들(T_1 , T_4 와 T_8)중에서 T_4 는 조력 T 림프구의 표면항원에 대한 단세포군 항체인데 이 항체의 단점으로 단핵구의 표면 항체를 동시에 인지할 수 있다는 사실이다. 조력 T 림프구에 대해서만 특이성을 가진 것이 아니고 일부의 단핵구에도 항원항체반응을 일으킬 수 있다는 것이 제조회사(DAKO

Corp.)의 지적이다. 그러나 본 실험에서 사용된 면역조직화학 방법은 대조염색을 통해서 세포의 형태를 비교적 정확하게 감별할 수 있기 때문에 상당수의 단핵구는 배제되었지만 일부에서 감별이 어려워서 T_4 양성세포의 경우 그 비율이 약간(5%이내)높게 관찰되었다.

2. T_1 , T_4 및 T_8 양성세포들의 결과에 관한 고찰

말초혈액의 전체 림프구에 대한 T 림프구의 비율 및 절대수는 정상군에 비해 모든 결핵환자에서 유의한 감소를 보였는데, 특히 결핵성 늑막염의 경우 가장 심한 감소를 보였다. 이러한 T 림프구의 감소는 본 연구 결과에 의하면 주로 조력 T 림프구의 감소가 주종을 이루고 있다.

이러한 결과는 결핵감염시 주로 조력 T 림프구가 어떤 밝혀지지 않은 기전으로 영향을 받는다는 것을 시사하고 있다. 예를 들어 Shiratsuchi와 Tsuyuguchi²⁸⁾는 결핵성 늑막염환자의 늑막삼출액과 말초혈액내 림프구 아형을 시험관 내에서 PPD(purified protein derivative of tuberculin)로 자극한 후에 나타나는 현상을 관찰하여 다음 같은 결론을 얻었다. 즉 PPD 자극에 의해 증식하는 T 림프구는 억제 T 림프구가 아닌 조력 T 림프구라는 점이다.

이와같이 결핵환자 전반에서 T 림프구 및 조력 T 림프구가 통계적으로 유의한 수준의 감소를 보였는데 그 감소 기전에 대해서는 아직 명확히 알려진 바가 없다. Fujiwara 등²⁹⁾에 의하면 말초혈액내의 T 림프구가 결핵병원에 대해 면역반응을 일으키기 위해 결핵병소로 모여들기 때문에 말초혈액내에 T 림프구, 그 중에서도 조력 T 림프구가 의미있게 감소한다는 것이었다(Compartmentalization or migration theory).

이러한 관점에서 본 실험에서의 결과를 분석해 볼 때 결핵성 늑막염환자의 경우 다른 어떤 종류의 결핵환자군보다도 말초혈액내에서의 T 림프구 및 조력 T 림프구의 감소를 보이고 있었다.

한편 이 결핵성 늑막염 환자들로부터 얻은 늑막삼출액의 분석 결과 단위부피당(1 mm^3)의 림프구의 수효가 $2 \times 10^3 \sim 10^4$ 개였으며, T 림프구의 비율은 76%, 그중에서 조력 T 림프구가 66%, 억제 T 림프구가 17%를 차지해 주로 조력 T 림프구로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 볼 때 앞서 주장된 "림프구 이동설(Migration theory)"이 전적으로 들어 맞을 것 같으나 실제 수치상의 계산에 의하면 늑막삼출액을 이동한 T 림

프구의 비율이 말초혈액내의 T 림프구에 대해 평균적으로 3~4% 이내이기 때문에 본 실험에서의 결과인 10% 내외의 차이를 전적으로 설명하기엔 미흡한 감이 없지 않다.

최근 들어 Rohrbach와 Williams³⁰⁾는 말초혈액내의 T 림프구 감소에 대한 또 다른 주장을 보고하였는데 그 내용을 보면 억제 T 림프구에 의해 억제인자(suppressor factor)가 분비되어, 말초혈액내의 T 림프구, 그중에서도 조력 T 림프구를 감소시키며, 결핵병변으로는 소수의 T 림프구가 이동되되 그 이동된 T 림프구들이 항원에 의해 활성화되어 세포군집팽창(clonal expansion)을 해서 그 수효가 증가하는 것이라는 것이다.

본 실험의 결과를 볼 때 억제 T 림프구의 전체 T 림프구에 대한 비율은 거의 감소하지 않았지만 단위부피당의 절대수는 의미있게 감소하고 있음을 볼 수 있다. 따라서 Rohrbach 등의 주장과는 다름을 볼 수 있다. 그러나 면역반응의 방향이 억제나 증강이나를 결정해 주는 실질적인 인자인 T_4^+/T_8^+ 비율을 볼 때 중증의 경우와 결핵성 늑막염에서 가장 현저하게 감소하고 있음을 볼 수 있다. 이는 상대적으로 T_4 양성세포의 감소로 보거나 T_8 양성세포의 증가로 해석할 수 있다고 볼 때 억제 T 림프구에 의한 조력 T 림프구의 억제에 의해 말초혈액상의 T 림프구가 감소한다는 이론과 부합한다고 볼 수 있다. 따라서 본 실험의 결과를 토대로 볼 때 “림프구 이동설”과 억제 T 림프구에 의한 억제설 모두가 말초혈액 T 림프구의 감소에 기여하는 것으로 봐야 옳을 것으로 사료된다.

본 실험의 결과중 T_8 양성세포에 대한 변화에 대해서 주목해 볼 필요가 있을 것 같다. 이제까지의 이에 대한 보고는 전체 림프구에 대한 이 세포의 비율이든 단위부피당의 절대수이든 간에 T_8 양성세포는 증가하거나³¹⁾ 변화가 없다³²⁾는 것이 대부분의 보고였고, 정설로 받아들여져 왔으나, 본 실험의 결과로 볼 때 T_8 양성세포의 비율은 정상인과 별 차이가 없지만, 단위부피(1mm³)당의 절대수에 있어서는 의미있는 감소를 보이고 있음을 알 수 있다. 이는 Shiratsuchi와 Tsuyuguchi³³⁾의 보고에서와 같이 PPD의 자극에 의해 증식하는 것은 T_8 양성세포, 즉 억제 T 림프구가 아니고, T_4 양성세포, 즉 조력 T 림프구라고 하는 사실과 본 실험의 결과중 Tuberculin 피부반응검사에 의한 피부의 홍색결절의 장축 길이와 T_1 양성세포, T_4 양성세포수와 T_4^+/T_8^+ 비율의 상관관계에서 양의 상관관계를 보임으로써 지연형 과민반응의 주

체가 되는 T 림프구의 아형은 T_4 양성세포, 즉 조력 T 림프구라는 사실들로부터 결핵의 병인에 관한 중요한 면역학적 기전을 유추할 수 있다. 즉 T_8 양성세포를 억제하지 못하기 때문에 결핵의 병변의 주원인인 지연형 과민반응이 진행되어 소위 활동성 결핵환자가 되는 것이라고 볼 수 있겠다. 앞에서 언급된 결과들이 치료 이전의 활동성 결핵환자들에서 온 것들이라고 생각할 때, 이와 같이 유추된 새로운 사실을 통해 활동성 결핵환자의 치료의 예후를 가늠할 수 있는 지표를 설정할 수 있으리라 본다. 즉 치료전과 치료 시작후 시기별로 T_8 양성세포수의 절대수를 추적 관찰해 비교해 봄으로써 병의 예후를 가늠하고, 결핵의 병인에 대하여 보다 가까이 접근할 수 있으리라 본다.

결 론

결핵환자의 말초혈액 및 늑막삼출에서의 T 림프구 및 그 아형들의 수적 변화에 관한 면역세포화학적 실험의 결과는 다음과 같다.

1) 18명의 정상인에 비해 44명의 결핵환자의 경우 전체 T 림프구의 비율은 감소되어 있었으며, 특히 조력 T 림프구의 비율은 유의한 감소가 있었고($p < 0.01$), 억제 T 림프구는 차이가 없었다. 또한 T_4^+/T_8^+ 비율은 유의한 감소가 있었다($P < 0.01$).

2) 결핵환자의 경우 진행도에 따른 경증, 중증도, 중증 상호 관계에 있어서 조력 T 림프구, T_4^+/T_8^+ 비율의 감소 정도는 차이가 없었다.

3) 결핵성 늑막염의 경우, 정상인에 비해 말초혈액내의 조력 T 림프구가 가장 현저한 감소를 보였으나 억제 T 림프구의 경우는 유의한 차이가 없었다. 늑막삼출액의 경우 존재하는 세포들의 대부분이 임파구였으며 그중 78%가 T_1 양성세포, 66%가 T_4 양성세포세포였다.

4) T 림프구 및 그 아형들의 단위 부피당 절대수는 결핵환자군 전군에서 T 림프구, 조력 T 림프구 및 억제 T 림프구 모두가 의미있는 감소를 보였다.

5) Tuberculin 피부 반응 검사시 생기는 결절의 장축 길이와 전체 T 림프구, 조력 T 림프구 및 T_4^+/T_8^+ 비율과 모두 양의 상관관계를 보였다.

REFERENCES

- 1) Chase MY: The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. *Proc Soc Exp Biol Med* **59**:134-146, 1945
- 2) Lurie MB: On the response of genetically resistant and susceptible rabbits to the quantitative inhalation of human type tubercule bacilli and the nature of resistance to tuberculosis. *J Exp Med* **95**:119-134, 1952
- 3) Canetti G: The tubercle bacillus in the pulmonary lesion in man. Springer Publishing Co New York 1955
- 4) Dannenberg AM: Cellular hypersensitivity and cellular immunity the pathogenesis of tuberculosis: Specificity, systemic and local nature, and associated macrophage enzymes. *Bacteriol Rev*, **32**:85-102, 1968
- 5) Lefford MJ: Properties of peritoneal exudate lymphocytes that mediate tuberculin delayed-type hypersensitivity and antituberculous immunity. II. Velocity Sedimentation Analysis *Immunology* **41**, 1980
- 6) Salvin SB, Neta RA: A possible relationship between delayed hypersensitivity and cell mediated immunity. *Am Rev Resp Dis* **111**:373-377, 1975
- 7) Hawrylko E: The kinetics of lymphoid proliferation in tuberculosis mouse spleen. *Cell Immunol* **5**:148-170, 1972
- 8) W.H.O: Technical Report Series No. 519: cell-mediated immunity and resistance to infection. WHO p18-23, 1973
- 9) Mackaness GB: Immunopotential with BCG: I. Immune response to different strains and preparations. *J Natl Cancer Institute* **51**:1655-1667, 1973
- 10) Collins FM: Growth of mycobacterium bovis (BCG) in T lymphocyte depleted mice *Infect Immunity* **11**: 57-64, 1975
- 11) Sher NA: Response of congenitally athymic (nude) mice to infection with mycobacterium bovis (BCG). *J Natl Cancer Institute* **54**:1419-1426, 1975
- 12) Thomas M Daniel: Immunology of tuberculosis. *Clin Chest Med*, **1** (2):189-200, 1980
- 13) Marshall WH, Valentine FT, Lawrence HS: Cellular immunity in vitro: Clonal proliferation on antigen-stimulated lymphocytes. *J Exp Med* **130**:327-344, 1969
- 14) North RJ: The histogenesis of immunologically committed lymphocytes. *Cell Immun* **3**:680-694, 1972
- 15) Lagrange PH: A stable form of delayed type hypersensitivity. *J Exp Med* **141**:85-95, 1975
- 16) Chan SH, Lee SK, Simons MJ: Levamisole augmentation of lymphocyte hyporesponsiveness to phytohemagglutinin in patients with pulmonary.
- 17) Bullock WE, Carlson EM, Gershon RK: Evolution of immunosuppressive cell populations in experimental mycobacterial infection. *J Immunol* **120**: 1709-1716, 1978
- 18) Katz P, Goldstein RA, Fauci AS: Immunoregulation in infection caused by mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* **140**:12-20, 1979
- 19) Llinenz ME, Ellner JJ: Regulatory interactions between T_H cells and monocytes in health and tuberculosis. *Proc Joint Conf Tuberc* **16**:192, 1981
- 20) Mustafa AS, Godal T: In vitro induction of human suppressor T cells by mycobacterial antigens. *Clin Exp Immunol* **52**:29-37, 1983
- 21) Miyawaki T, Taga K, Nagaoli T, et al: Circadian changes of T lymphocyte subsets in human peripheral blood. *Clin Exp Immunol* **55**:618-622, 1984
- 22) Vacca LL: "Double bridge" technique of immunocytochemistry. Bullock GR. et al. (Ed.) *Techniques in immunocytochemistry*. Vol 1, Academic Press London pp155-182, 1984
- 23) Sternberg LA, Hardy PHG Jr, Cuculis JJ, Meyer HG: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* **18**:315-33, 1970
- 24) Hsu S, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique. *J Histochem Cytochem* **29**:577, 1981
- 25) Child G, Unabia G: Application of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method to light microscopic localization of pituitary hormones. *J Histochem Cytochem* **30**:713, 1982
- 26) Lansdorp PM, Van Derkwast TH, Martin De Boer et al: Stepwise amplified immunoperoxidase (PA) staining. I Cellular morphology in relation to membrane markers. *J Histochem Cytochem* **32** (2):172-178, 1984
- 27) Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al: Immunoenzy-

- matic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* **32** (2):219-229, 1984
- 28) Shiratsuchi H, Tsuyuguchi I: Analysis of T cell subsets by monoclonal antibodies in patients with tuberculosis after in vitro stimulation with purified protein derivative of tuberculin. *Clin Exp Immunol* **57** (2):271-278, 1984
 - 29) Fujiwara H, Okuda Y, Fukukawa T, Tsuyuguchi I: In vitro tuberculin reactivity of lymphocytes from patients with tuberculous pleurisy. *Infect Immunol* **35**:402, 1982
 - 30) Rohrbach MS, Williams DE: T lymphocytes and pleural tuberculosis *Chest* **89** (4): 473-474, 1986
 - 31) 이미완, 채정하, 변해원, 김상호 : 결핵환자의 말초혈액내 T세포 아형, 결핵 및 호흡기질환 **31** (4):171-175, 1984
 - 32) Beck JS, Potts RC, Kardjito T, Grange JM: T lymphopenia in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **60** (1):49-54, 1985
 - 33) Shiratsuchi H, Tsuyuguchi I: Analysis of T cell subsets by monoclonal antibodies in patients with tuberculosis after in vitro stimulation with purified protein derivative of tuberculin. *Clin Exp Immunol* **57** (2):271-278, 1984
 - 34) Dannenberg AM: Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **125**:25-29, 1982
 - 35) Zeitz SJ, Ostow JH, V An Arsdell PP Jr: Humoral and cellular Immunol **53**:20-26, 1974
 - 36) Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L: The spectrum of human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **27**:230-247, 1977
 - 37) Bona CF: Cell suppression in PPD-induced blast specific response of human peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol* **26**:258, 1976
 - 38) McMurray DN, Echeverri A: Cell mediated immunity in anergic patients with pulmonary tuberculosis. *Amer Rev Resp Dis* **118**:827-834, 1978
 - 39) Crofton J, Douglas AZ: Tuberculosis in respiratory disease, 3rd ed, Blackwell Scientific publication, Oxford 1981
 - 40) Lefford MJ: Properties of peritoneal exudate lymphocytes that mediate tuberculin delayed-type hypersensitivity and anti-tuberculous immunity I. The effect of cytotoxic agents. *Immunology* **41**, 1980
 - 41) Collins FM, Watson SR: Suppressor T cells in BCG infected mice. *Infect Immun* **25**:491-486, 1979
 - 42) Koch R: Fortsetzung Der Mitteilung über ein heilmittel gegen tuberculose. *Dtsch Med Wochensh* **17**: 101-102, 1981
 - 43) Waxman J, Lockshin M: In vitro and in vivo cellular immunity in anergic military tuberculosis. *Amer Rev Resp Dis* **107**:661-664, 1973