□ 원 저 □

활동성 폐결핵 환자의 백혈구 산성 인산화효소 (Leukocyte Acid Phosphatase)에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

공 현 호 · 우 준 희 · 한 성 구
심 영 수 · 김 건 열 · 한 용 철

= Abstract =

The Activities of Leucocytic Acid Phosphatase in Pulmonary Tuberculosis

Hyun-Ho Kong, M.D., Jun-Hee Woo, M.D., Sung-Koo Han, M.D.

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

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

It has been known that the activation of phagocytic activity of macrophage will induce the increment of leucocyte lysosomal enzyme activity. It also has been reported that the leucocyte lysosomal enzyme activity is increased in experimental tuberculosis, and acid phosphatase is one of the predominant lysosomal enzymes implicated.

In order to evaluate the diagnostic value of leucocytic acid phosphatase (LAP) as an index of activity in pulmonary tuberculosis patients we measured the LAP activity in active pulmonary tuberculosis patients and obtained the following results.

- 1) The mean activity of LAP of active pulmonary tuberculosis patients was 14.7 ± 6.0 and it was significantly higher than the control value of 6.2 ± 2.8 ($p < 0.005$)
- 2) The mean activity of LAP showed no significant difference between the cavitory and non-cavitory pulmonary tuberculosis groups and also showed no relation with the extent of the disease and between primary and re-treatment groups.
- 3) Some difficulties in standardization of LAP activity counting was encountered during this study and the poor staining intensity was considered as major limitation factor

서 론

결핵의 진단과 치료에서 자주 문제가 되는 점은 결핵의 활동성 판정이다. 활동성 여부를 판단할 수 있는 소견으로는 객담 도말검사 혹은 배양검사에서 결핵균을 증명하거나, 흉부 X-선검사상 음영의 변화를 관찰하는 방

법이 있으며 보조적인 방법으로서 Tuberculin 반응검사, 적혈구 침강속도(ESR), 혈청학적인 검사방법 및 뇨 중 Neopterin의 측정등이 있으나 절대적인 것은 아니다¹⁾.

따라서 세균학적으로 결핵균이 증명되지 않으면 활동성 여부나 이에 따른 항결핵제 투약 여부 결정에 어려움을 겪게 될 때가 많다²⁾.

결핵균이 인체 내를 침입하게되면 우리 몸의 방어기전이 발동하게되어 백혈구등의 탐식능력이 증가하게되고 동시에 백혈구의 Lysosomal 효소 농도도 증가함이 알

*본 논문은 1987년도 서울대학교병원 임상연구비의 보조로 이루어진 것임.

Table 1. Clinical Features of the Pulmonary Tbc and Control Patients

	Minimal	Moderately	Far	Control
No. of cases	20	20	25	25
Age (yr)*	36.9 ± 12.3	35.1 ± 16.1	47.2 ± 12.5	40.1 ± 14.0
Sex (M:F)	9 : 11	15 : 5	19 : 6	13 : 12
Cavitary cases	0	3	13	
Recurrent cases	0	10	23	

* Mean ± S.D.

Table 2. Disease Categories in Control Patients

Pneumonia	4 cases
Asthma	6
COPD	5
Bronchiectasis	5
Lung ca.	5
Total	25

려져 있다^{3,4)}. 실험적으로는 BCG균을 쥐에 주입하였을 때 대식세포내 Lysosomal 효소의 증가가 관찰되었으며 Lysosomal 효소중의 하나인 산성인산화효소(acid phosphatase) 활성도도 증가함이 증명되었다^{5,6)}.

이에 저자들은 폐결핵 활동성 판정의 한 보조지표로서 백혈구 산성인산화효소(Leukocytic acid phosphatase : 이하 LAP로 약함) 활성도의 가치를 알아보고자, 폐결핵의 활동성 여부와의 상관관계를 비교하여 그 결과를 보고하고자 한다.

대상 및 방법

1. 연구대상

서울대학교 병원 내과에 입원한 균양성 폐결핵환자 65명과 비결핵성 폐질환을 가진 대조군 25명을 대상으로 하였다(Table 1). 대상환자군의 평균 연령은 30대에서 40대 사이였고 경증, 중등증이 각 20명씩 중증이 25명이었다.

남녀 비는 중등증 및 중증 폐결핵환자군에서 남자가 많아 3 : 1이었고, 대조군에서는 1.1 : 1로 비슷하였다.

흉부 X-선 사진에서 공동이 있었던 경우는 중등증에서는 3명, 중증에서는 13명으로 총 16명이었다. 초치료가 아니고 재발된 경우는 중등증에서 10명, 중증에서 23명으로 총 33명이었다(Table 1).

대조군의 질병분포는 급성세균성폐렴이 4명, 기관지천식이 6명, 만성폐색성폐질환이 5명, 기관지확장증이 4명, 폐암이 5명이었다(Table 2).

2. 방 법

백혈구 산성인산화효소(LAP) 활성도(actioity)의 측정은 아래와 같은 Li등의 방법에 따라 직접 세포화학적 염색(cytochemical staining)을 하는 방법을 택하였다^{7,8)}.

그 방법은

1) 환자의 혈액을 EDTA tube에 채취해서 말초혈액 도말표본을 만든다.

2) 즉시 Methanol 10 cc와 0.03 M 구연산으로 산도(PH)를 5.4로 맞춘 60% Acetone 90 cc를 섞어 만든 고정액에 도말표본을 4~10 °C에서 30초간 고정시킨다.

3) 증류수로 여러번 씻은 후에 실온에서 10~30분간 말린다.

4) 기질용액은 0.5 ml N, N-di-methylformamide (Eastmam Kodak Co.)에 Naphthol AS-BI phosphoric acid (Sigma chemical Co.) 10 mg을 혼합하여 만든다. 이런 기질용액 10 cc에 fast garment GBC (Sigma chemical Co.) 5 mg을 섞은후 도말표본을 이 용액속에서 45분간 37 °C로 항온처리하여 naphthol 염을 유리 침전시킨다.

5) 수도물(tap water)에 여러차례 씻은후 Hematoxylin으로 1~3분간 대조염색을 한 다음 글리세린(glycerine jelly)으로 봉입하여 보존하였다가 일시에 판독되었다.

이 방법에 의하여 LAP는 붉은색으로 세포질내에 염색되었으며 판독(reading)은 도말염색표본의 염색강도에 따라 0에서 3까지의 점수로 판정하였다. 단핵구인 경우(Fig. 1)에서 보는 바와같이 세포질내에 붉은(red

pinkish) 입자가 간혹 흩어져 있으나 배경(background)은 염색되지 않는 경우를 1점으로 하였고, 이 정도 이하는 0점으로 처리하였다. 세포질내에 붉은 입자(granule)가 흩어져 있으면서 배경까지 붉게 염색되는 경우를 2점으로 하였고(Fig. 2), 전체 세포질에 짙은(dense) 입자가 전반적으로 깔려 있는 경우를 3점으로 하였다(Fig. 3). 다형핵백혈구(Polymorphonuclear lenkocyte)와 림프구도 같은 방법으로 계수하였으며 염색표본 1매당 단핵구 5개, 림프구 10개, 다형핵백혈구 10개로 총 25개를

찾아 계수하여 그합을 LAP 활성도로 하였다.

3. 통계 처리

Student t-test를 이용하여 각각의 군을 비교하였다.

결 과

1. 결핵환자와 대조군의 활성도 비교 (Table 3)

결핵환자군에서의 평균 LAP 활성도는 14.7 ± 6.0 이었

Fig. 1. LAP score 1, shows occasional pinkish granule in cytoplasm without background staining.

Fig. 2. LAP score 2, showing scattered red granules in cytoplasm.

으나 대조군에서는 6.2 ± 2.8 로 유의한 차이가 있었으며 ($p < 0.005$) 각세포별 비교에서도 유의한 차이를 관찰할 수 있었다. 그러나 폐결핵 환자군내에서 결핵의 진행정도에 따른 활성도 간에는 유의한 차이가 없었다($p > 0.1$).

2. 초치료 환자군과 재치료환자군과의 비교

경증 폐결핵환자군은 모두 초치료인 경우였으며 중증

환자군에서는 초치료 환자가 2명 밖에 없어 중등증 폐결핵환자군만을 대상으로 하였다. 초치료와 재치료환자군 사이의 LAP 활성도는 각각 13.6 ± 3.7 로서 유의한 차이는 없었으며 각세포별 비교에서도 차이가 없었다($p > 0.1$) (Table 4).

Fig. 3. LAP score 3, showing multiple dense granules and reddish staining of entire cytoplasm.

Table 3. Activities of LAP in Pulmonary Tbc and Controls

	PMN	Mono	Lym	Total
Minimal	3.0 ± 2.1	5.0 ± 1.9	6.2 ± 3.0	$14.2 \pm 6.0^*$
Moderately	2.9 ± 1.6	5.0 ± 2.2	6.3 ± 2.8	$14.4 \pm 5.8^*$
Far	2.8 ± 1.7	5.5 ± 2.4	6.7 ± 2.9	$15.6 \pm 6.2^*$
Mean	2.9 ± 1.8	5.2 ± 2.2	6.6 ± 3.3	$14.7 \pm 6.0^{**}$
Control	1.1 ± 1.0	2.2 ± 1.7	3.0 ± 1.5	$6.2 \pm 2.8^{**}$

* $P > 0.1$, ** $P < 0.005$

LAP : Leukocyte acid phosphatase,
Mono : Monocyte,

PMN : Polymorphonuclear leukocyte
Lym : Lymphocyte

Table 4. Comparison of Activities of LAP in Fresh and Recurrent Cases in Moderately Advanced Pulmonary Tbc

	PMN	Mono	Lym	Total
Fresh cases (n=10)	2.4 ± 1.4	4.9 ± 2.7	5.9 ± 3.7	$13.6 \pm 7.3^*$
Recurrent cases (n=10)	3.4 ± 1.8	5.0 ± 2.2	6.7 ± 1.3	$15.1 \pm 3.7^*$

* $P > 0.1$

Table 5. Comparison of Activities of LAP of Cavitary and Noncavitary Cases in Moderately and Far Advanced Pulmonary Tbc

	PMN	Mono	Lym	Total
Cavitary (n=16)	3.3 ± 2.0	5.7 ± 2.4	6.8 ± 3.8	15.8 ± 8.0*
Noncavitary (n=29)	2.7 ± 1.4	5.0 ± 2.0	6.4 ± 2.2	14.5 ± 4.9*

* P > 0.1

3. 공동이 있었던 환자와 없었던 환자군의 비교
(Table 5)

경증 폐결핵군에는 공동이 없기 때문에 중등증 및 중증 폐결핵에서 흉부 X-선사진상 공동이 있었던 환자군과 없었던 경우를 비교해보았다. 평균 LAP 활성도는 각각 15.8±8.0과 14.5±4.9로 유의한 차이는 없었다(p>0.1).

고 안

1891년 Robert Koch가 결핵환자에서 지연성 과민반응을 기술한 이후 결핵균에 대한 인체의 면역학적인 방어기전은 주로 세포면역(cellular immunity)에 기인하는 것으로 알려져 있으며 특이감작림프구와 대식세포가 관여하는 것으로 되어있다¹⁰⁾.

일단 결핵균이 침입하게 되면 대식세포가 균세포의 표면 혹은 세포내에 존재하는 항원을 처리한 다음 T-세포에게 제공한다. 이러한 항원처리는 특이면역수임 T-세포의 생산이나 증식을 야기시키며 항원인식을 동반한다. 항결핵면역에 있어서는 이렇게 감작된 T-세포가 종양면역이나 이식면역에서와는 달리 감작세포 자체가 세포내 기생세균을 살멸할 수는 없지만 대식세포에 의한 항균이나 정균작용을 매개할 수는 있다. 이 과정에서 감작된 T-세포의 작용은 선택적이나, 작용세포(effector)로서의 대식세포 역할은 비선택적이다¹¹⁾.

대식세포의 활성화는 결핵균에 의하여 직접자극을 받거나 감작 T-세포에서 유출된 lymphokine에 의해 간접적인 자극을 받음으로써 시작되며, 활성화된 대식세포는 탐식능력의 증가를 가져와 작동세포로서의 역할을 하게 된다¹¹⁾.

대식세포 탐식능의 증가는 세포질내 lysosomal 효소 농도의 증가를 가져오게 된다⁴⁾. lysosomal 효소 성분중

가장 중요한것은 세포벽의 다당질(polysaccharide)을 파괴하는 가수분해효소(hydrolytic enzyme)이며 이중에서 대표적인 것이 산성인산화효소이다⁵⁾.

실험적으로 가토나 백서에 BCG균을 주입하면 대식세포내 lysosomal 효소 및 산성인산화효소 농도가 증가함을 관찰할 수 있었으며 이에따라 여러 연구자들이 활동성 폐결핵환자에서 산성인산화효소 활성도를 측정하여 보고하였다^{13~18)}.

산성인산화효소는 pH 5.0 이하에서 최대 활성도를 나타내는 일군의 효소들을 지칭하며 작용은 phosphate ester를 가수분해하여 phosphate ion을 유리시키며, pH 7.0 이상의 산도에서나 37℃ 이상의 온도에서는 불안정하게 된다는 특성을 가지고 있다^{19,20)}.

염색법을 이용하여 산성인산화효소 활성도를 측정하는 방법은 두 가지가 있다. 첫번째 방법은 본 연구에서와 같이 조직절편이나 세포를 직접 염색하는 방법이고, 두번째는 세포를 동결 및 해동시키는 조작을 반복하여 효소 성분을 용액내로 유리시킨 다음에 cephadex 나 acrylamide gel에 흡착시켜 전기영동법으로 분획시킨 다음에 염색을 하는 방법이다^{21~24)}.

후자의 방법은 복잡하기는 하나 정량하기가 쉽다는 장점이 있으며, 전자의 방법은 간편하다는 장점이 있다.

효소염색법은 세포속의 산성인산화효소가 기질인 naphthol phosphate에 작용하여 naphthol을 유리시키면 여기에 diazonium염을 결합(coupling) 시켜서 세포속에 침전을 하게하여 육안으로 반응 정도를 확인 가능하게하는 것이다^{19,20)}.

산성인산화효소 활성도가 높은 조직은 간 비장 및 림프선이며 혈액세포의 활성도는 파골세포(osteoclast)와 대식세포가 가장 높으며 형질세포(plasma cell), 거핵구(megakaryocyte)나 단핵구등이 중등도의 활성도를 보이며 다형질백혈구나 림프구는 약하게 염색이 된다^{8,25)}.

실제적인 방법론에 있어서 조직내 거식세포 즉 조직구

의 산성인산화효소 농도를 측정하려면 결핵균에 감염된 조직을 얻어야 하며, 설사 조직을 얻는다 하여도 혈액에 오염되기 때문에 순수한 조직구를 분리하기는 힘들다. 그러므로 간접적인 방법으로 말초혈액내의 단핵구와 다형 백혈구 및 림프구의 효소 활성도를 측정하는 방법이 제안되었으며 이에 의하면 서로 높은 상관관계가 있다하여 저자들도 이 방법을 따랐다⁴⁾.

염색된 말초혈액도말표본에서 단핵구 5개, 다형백혈구와 림프구를 각각 10개씩 계수하였으며 갯수 선정은 임의로 하였다. 결과를 분석하여 볼때 활동성 폐결핵군과 대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정되었으나 75점 만점에 평균 14점을 얻음으로서 개개의 세포는 평균 1점도 못 얻고 있었고, 결과로 염색이 잘 되지 않고 있음을 나타내고 있으므로, 이 정도의 염색강도에서 차이를 구별한다는 것은 무리가 있을 것으로 사료된다. 또한 대조군으로서 비활동성 폐결핵환자군을 대상으로 하였어야 실제적으로 목표한 활동성여부 감별에 도움이 되었을 것이며 이점에 대해서도 추시가 필요할 것으로 사료된다.

초감염된 환자군과 재감염된 환자군 사이에 면역학적 차이가 있을 수 있지 않을까하여 비교해 보았으나 유의있는 차이는 없었고 ($p>0.1$), 공동의 유무도 산성인산화효소 활성도 차이를 나타내 주지 못하였다 ($p>0.1$).

결론적으로 말초혈액내 백혈구의 산성인산화효소 활성도를 염색법을 이용하여 측정하여 폐결핵의 활동성을 나타내는 지표가 될 수 있는지 시도해 보았으나 염색법으로는 객관화가 힘들다는 문제점이 제기되었으며, 항결핵 면역능력의 획득이 감염후 2~3주 후 부터 시작되어 경과에 따른 차이가 있을 수 있으며⁴⁾ 개개인의 면역상태가 다르기 때문에 진단의 목적으로 백혈구 산성인산화효소 활성도를 측정하는것은 한계가 있을 것으로 사료된다. 오히려 분획염색법을 이용하여 치료경과를 관찰함이 더 유용한 방법으로 추측된다.

결 론

폐결핵의 활동성판정의 보조지표를 구하는 노력의 일환으로 LAP를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다

1) 활동성 폐결핵환자군과 비결핵성 폐질환군 사이에는 LAP score상 유의한 차이가 있었다.

2) 결핵성 병변의 정도, 재치료 여부, 공동유무에 따른 LAP score의 차이는 관찰되지 않았다.

3) 활동성 폐결핵환자에서 LAP score상 차이는 있었지만 염색의 강도가 뚜렷치 않아 진단 목적으로 사용하는데는 한계가 있을 것으로 사료되며, 분획법을 사용한 치료경과에 따른 추시가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Crofton J, Douglas A: Respiratory diseases tuberculosis. Oxford, Blackwell scientific publications, 1981
- 2) Stead WW, Dutt AK: Tuberculosis. Clinics in chest medicine **209**:May, 1980
- 3) 대한결핵협회 : 결핵. 1st Ed, p 129, 대한결핵협회 1984
- 4) Dannenberg AM: Cellular hypersensitivity & cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: Specificity, systemic & local nature, and associated macrophage enzymes. Bacteriol. Rev **32**:85, 1968
- 5) Carson ME, Dannenberg AM: Hydrolytic enzymes of rabbit mononuclear exudate cells. J Immunol **94**:99, 1965
- 6) Saito K, Suter E: Lysosomal acid hydrolase in mice infected with BCG. J Exptl Med **121**:727, 1965
- 7) Li CY, Yam LT, Lam KW: Acid phosphatase isoenzyme in human leukocytes in normal and pathologic conditions J Histochem. cytochem **18**:473, 1970
- 8) Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA: Hematology 3rd Ed. 91650, New York, McGraw-Hill Book Company 1983
- 9) Collins FM: The immunology of tuberculosis. Am Rev Respir Dis **125** (No3, pt2) : 42, 1982
- 10) 김주덕 : 결핵의 면역, 결핵 및 호흡기 질환 **29**:73, 1982
- 11) Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS: Microbiology. 3rd Ed. p 732, Hagerstown & Row 1980
- 12) Kyoich Kano: 의학면역학, 2nd Ed, p 191, 서울, 대학서림 1982
- 13) Heise ER, Mlyrvik QN, Leake ES: Effect of BCG on the levels of acid phosphatase, lysozyme & cathepsin in rabbit alveolar macrophage. J Immun **95**:123, 1965
- 14) Myrvik QN, Heake ES, Oshima S: A study of macrophages epithelioid-like cells from granulomatous lungs of rabbits. J Immunol **89**:745, 1962
- 15) Saito K, Suter E: Lysosomal acid hydrolase and hyperreactivity to endotoxin in mice infected with BCG. Exp Med **121**:739 1965
- 16) Thorbeke GJ, Old LJ, Bnacerraf B, Clarke DA: A histochemical study of acid and alkaline phos-

- phatase in mouse livers during various conditions modifying activity of the RES. *J Histochem* **9**:392 1961
- 17) Mizunoe K, Dannenberg AM: Hydrolase of rabbit macrophage. *Proc Soc Exptl Biol Med* **20**:184 1965
- 18) Cohn ZA, Wiener E: The particulate hydrolases of macrophages. *J Exptl Med* **118**:991 1963
- 19) William DL: Scientific fundamentals of clinical chemistry. 1st Ed, London, William Heinemann medical books 1978
- 20) Tietz NW: Fundamentals of clinical chemistry. 2nd Ed, Philadelphia, WB Saunders 1976
- 21) Li CY, Yam LT, Lam KW: Studies of acid phosphatase isoenzymes in human leukocytes demonstration of isoenzyme cell specificity. *J Histochem Cytochem* **18**:901 1970
- 22) Tomaolci N, Essner E: Distribution of acid phosphatase, β -glucuronidase and N-acetyl- β -glucosaminidase activities in lymphocytes of lymphatic tissues of man and rodents. *J Histochem* **17**:238 1969
- 23) Burstone MS: Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphatases. *J Nat Cancer Inst* **21**:523 1958
- 24) Yam LT, LiCY, Lam KW: Tartarate resistant acid phosphatase isoenzyme in the reticulum cells of leukemic reticuloendotheliosis. *NEJM* **284**:357 1971
- 25) Sonnenwirth A: Gradwohl's clinical laboratory methods & diagnosis. 8th Ed, St Louis, CV Mosby 1980
-