

마이코박테리아에 대한 인체 말초혈액 단핵구와 폐포대식세포의 림프구 의존적 살해능에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 내과학교실

천선희, 이유현, 이종수, 배기선, 신수연

=Abstract=

The Lymphocyte Dependent Bactericidal Assay of Human Monocyte and Alveolar Macrophage for *Mycobacteria*

Seon Hee Cheon, M.D., You Hyun Lee, M.D., Jong Soo Lee, M.D.,
Ki Sun Bae, M.D., Sue Yeon Shin, M.D.,

Department of Internal medicine, Ewha Womans University, College of Medicine,
Seoul, Korea.

Background : Though mononuclear phagocytes serve as the final effectors in killing intracellular *Mycobacterium tuberculosis*, the bacilli readily survive in the intracellular environment of resting cells. The mechanisms through which cellular activation results in the intracellular killing is unclear. In this study, we sought to explore an in vitro model of a low-level infection of human mononuclear phagocytes with MAC and H₃₇Ra and determine the extent of the lymphocyte dependent cytotoxicity of human monocytes and alveolar macrophages.

Method : The peripheral monocytes were prepared using the Ficoll gradient method from PPD positive healthy people and tuberculosis patients. The alveolar macrophages were prepared from PPD positive healthy people via a bronchoalveolar lavage. The human mononuclear phagocytes were infected at a low infection rate (bacilli:phagocyte 1:10) with MAC(*Mycobacterium avium*) and *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra. Non-adherent cells(lymphocyte) were added at a 10:1 ratio. After 1,4, and 7 days culture in 37°C, 5% CO₂ incubator, the cells were harvested and inoculated in a 7H10/OADC agar

† 본 연구는 2000년도 이화여자대학교 부속병원 임상연구비의 일부 보조로 이루어진 것임.

Address for correspondence :

Seon Hee Cheon, M.D.

Department of Internal Medicine, Ewha Womans University, College of Medicine,
#70, ChongRo 6-Ka, ChongRo-Ku, Seoul, 110-126, Korea

Phone: 02-760-5053 Fax : 02-760-7756 E-mail : shcheon@ewha.ac.kr

plate for the CFU assay. The bacilli were calculated with the CFU/ 1×10^6 of the cells and the cytotoxicity was expressed as the log killing ratio.

Results : The intracellular killing of MAC and H₃₇Ra within the monocyte was greater in patients with tuberculosis compared to the PPD positive controls ($p < 0.05$). Intracellular killing of MAC and H₃₇Ra within the alveolar macrophage appeared to be greater than that within the monocytes of the PPD positive controls. There was significant lymphocyte dependent inhibition of intracellular growth of the mycobacteria within the monocytes in both the controls and tuberculosis patients and within the macrophages in the controls ($p < 0.05$). There was no specific difference in the virulence between the MAC and the H₃₇Ra.

Conclusion : This study is an in vitro model of a low-level infection with MAC and H₃₇Ra of human mononuclear phagocytes. The intracellular cytotoxicity of the mycobacteria within the phagocytic cells was significantly lymphocyte dependent. During the 7 days culture after the intracellular phagocytosis, the actual confinement of the mycobacteria was observed within the monocytes of tuberculosis patients and the alveolar macrophages of the controls as in the case of adding lymphocytes. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 53:5-16)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Bactericidal assay, Lymphocyte, CFU assay

서 론

인체가 결핵균에 감염되면 숙주의 면역반응과 결핵균주 사이에 지속적이지만 불안정한 평형상태가 발생되는데 이 평형이 유지되는 한 대부분은 (>90%) 질환으로 발병되지 않은 채 결핵균이 작은 육아종 내에 휴지기 상태로 존재하여 면역체계로부터 감지되지 않으나 감염된 사람의 약 5%에서는 어느 시기에 면역체계의 약화로 인하여 평형상태가 깨어지면서 결핵균이 재활성화 되어 결국 결핵이란 질환으로 발병하게 된다. 이러한 평형상태를 유지하는데 감염된 사람의 세포-매개성 면역(cell-mediated immunity)이 중요한 역할을 하는 것은 익히 잘 알려진 사실이다^{1,2}. 그러나 인체 면역계가 결핵균을 제거하는 능력이나 결핵균이 인체의 방어기전을 회피하는 기전에 대하여서는 아직도 정확히 밝혀져 있지 않다. 폐포 대식세포와 말초혈액 단핵구가 림프구에 의하여 활성화된 후 탐식된 세포내 결핵균을 제거하는 최종 효과기로 작용하지만 결핵균은 이런 세포내에서 조차 살아

남아 결국은 증식한다³.

본 연구에서는 폐포 대식세포와 말초 단핵구의 결핵균 H₃₇Ra와 MAC(*Mycobacterium avium complex*)에 대한 살해능(cytotoxicity)을 조사하고 림프구가 이에 미치는 영향의 정도를 보고자 하였다. 또한 정상인과 폐결핵 환자를 대상으로 이들 간의 차이를 살펴보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

정상 대조군은 투베르쿨린 피부반응(이하 PPD) 양성인 11명을 대상으로 하였으며 이중 5명은 의사, 3명은 의과대학 학생이었으며, 3명은 경미한 객혈을 주소로 내원하였던 환자로 단순흉부 엑스선 촬영이 정상이고 기관지내시경 검사상 특별한 이상이 없었으며 기관지세척액의 세균 및 결핵균 도말과 배양에서 모두 음성이었던 경우이었다. 3명의 학생과 3명의 환자에서 고식적

인 방법을 이용하여 우중엽에서 기관지폐포 세척술을 시행하였다. 폐결핵 환자는 7명으로 모두 단순흉부 엑스선 촬영에서 중등도의 결핵음영을 보였으며, 객담 AFB 도말 및 배양 양성이었다.

2. 말초혈액 단핵구(부착세포) 및 림프구(비부착세포)의 분리

헤파린을 첨가한 주사기에 말초혈액을 채취한 후 말초혈액 단핵구를 Ficoll-Hypaque(Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 사용한 density sedimentation method를 이용하여 분리한 후 2회 RPMI 1640(GibcoBRL, Grand island, N.Y.)으로 세척하였으며 5% PHS(pooled human serum)과 5% FCS(fetal calf serum)으로 재부유하였다. 0.1% trypan blue를 사용하여 세포수를 확인한 후 $5-10 \times 10^6/\text{ml}$ 로 세포수를 맞추어 1ml PHS으로 처리한 tissue culture dish(Falcon 353003; Becton Dickinson Labware, Lincoln, N.J.)에 5ml씩 넣어 37°C 배양기에 1시간 배양하였다. 비부착세포를 씻어내고 2-5ml의 HBSS(GibcoBRL, Grand island, N.Y.)를 넣어 4°C 냉장고에 20-30분간 넣어둔 후 cell scraper로 부착세포를 분리하여 1% glutamine, 2% HEPES buffer, 5% 자가혈청을 함유한 RPMI1640 배양액으로 세포수를 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 로 맞추었다. 이렇게 분리된 단핵구를 round bottom 96well plate(Falcon 353007; Becton Dickinson Labware, Lincoln, N.J.)에 $100\mu\text{l}$ (세포수 1×10^5) 씩 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에 밤새 배양하였다. 비부착세포를 5% 자가혈청을 함유한 RPMI1640 배양액에 재부유하여 밤새 배양하였다.

3. 기관지폐포세척술과 폐포 대식세포의 분리

기관지폐포세척술은 고식적인 방법으로 시행하

였으며⁴ 기관지내시경을 3 혹은 4 분절 기관지에 고정시키고 37°C로 데운 무균 생리식염수 300CC로 5회 세척하였다. 회수된 용액을 세장의 무균 거즈를 통과시켜 점액을 걸러내고 RPMI1640 배양액으로 3회 세척한 후 총 세포수를 측정하고, Wright 염색법으로 구성세포를 측정하여 1% glutamine, 2% HEPES buffer, 5% 자가혈청을 함유한 RPMI1640 배양액으로 폐포 대식세포가 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 세포수를 맞추었다. 이렇게 분리된 폐포 대식세포를 round bottom 96well plate에 $100\mu\text{l}$ (세포수 1×10^5) 씩 넣어 역시 37°C, 5% CO₂ 배양기에 밤새 배양하였다.

4. 결핵균 감염

결핵균은 결핵연구원에서 분양 받은 *Mycobacterium avium*(ATCC 25291)과 *Mycobacterium tuberculosis H3Ra*(ATCC 35835)를 사용하였다. 인체감염 시와 유사한 감염환경을 조성하기 위하여 결핵균 대 포식세포(단핵구 혹은 대식세포)의 감염률을 1:10 정도가 되도록 아주 낮은 감염률로 결핵균을 감염시켰다. -80°C에 저장하였던 결핵균을 용해시켜 1% glutamine, 1% HEPES, 30% 자가혈청을 함유한 RPMI1640 배양액에 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 이 되도록 희석하였다. 단핵구와 폐포 대식세포를 배양한 96well plate에서 상층액을 제거하고 씻어낸 후 결핵균을 $50\mu\text{l}$ 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에 1시간 동안 배양하였다.

상층액을 제거하고 10% FCS을 함유한 RPMI1640 배양액으로 3회 세척하여 탐식되지 않은 결핵균을 제거한 후 10% 자가혈청을 함유한 IMDM(Icove's modified Dulbecco's medium)(GibcoBRL, Grand island, N.Y.) $100\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 밤새 배양한 비부착세포(림프구)를 세척하여 NaHCO₃, 25mM HEPES, 1% L-glutamine과 10% 자가혈청을 함유한 IMDM으로 세포수를 $10 \times$

$10^6/\text{ml}$ 로 맞추었다. 림프구를 첨가하는 경우에는 탐식되지 않은 결핵균을 제거한 직후에 림프구를 포식세포 대 림프구 1:10 비율로 첨가하였다. 37°C , 5% CO_2 배양기에 1일, 4일 및 7일간 배양하였으며, 모든 실험은 triplicate로 반복하였다.

5. 수확 및 집락형성단위(CFU)의 측정

결핵균을 감염시켜 배양한 후 1시간, 1일, 4일 및 7일 후 well에서 상층액을 흡인하고 각각의 well에 middlebrook 7H9(Sigma M-0178; Saint Louis, Missouri)/ADC로 희석된 0.067% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 $50\mu\text{l}$ 첨가하여 37°C 배양기에 10분간 배양하고, 20% BSA(bovine serum albumin)를 첨가하여 중화하였다. 5ml polypropylene tube에 각각의 $300\mu\text{l}$ lysate를 모아서 몇 개의 3mm bead를 넣고 vortex하였다. Middlebrook 7H9/ADC 용액으로 10배의 희석을 연속 3회 시행하여 각 희석액을 직경 6mm의 middlebrook 7H10(Sigma M-0303; Saint Louis, Missouri)/OADC agar로 만든 plate(Falcon 353002; Becton Dickinson Labware, Lincoln, N.J.)에 $10\mu\text{l}$ 를 세방울 씩 점적하였다. Agar plate를 37°C , 5% CO_2 배양기에 결핵균의 집락이 형성될 때까지 배양하여 집락수를 계산하였다. 결핵균의 수는 lysate의 ml (포식세포 10^6)당 CFU(colony forming unit)로 표시하였다. 결과는 logKR로 표시하였는데, $\log\text{KR} = \log_{10}(\text{Final CFU}/\text{Initial CFU})$ 로 양의 값이면 실질적인 균의 증가, 음의 값이면 실질적인 균의 감소(살해)를 의미한다.

6. Cytokine의 측정

결핵균에 감염된 단핵구 및 폐포 대식세포 배양액의 1일 및 4일 배양한 상층액을 건어 8000 rpm에서 10분간 원침하여 측정시까지 -70°C 에

냉동시켰다. OptEIA™(pharmingen, BD Bioscience)의 Elisa kit를 이용하여 Sandwich Elisa법으로 1일 상층액에서 γ -IFN을, 4일 상층액에서 TNF- α 를 측정하였다.

7. 통계처리

통계처리는 SPSS 통계처리 프로그램을 이용하여 student's t-test와 paired t-test를 사용하였으며, $p < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 해석하였다.

결 과

1. 포식세포의 결핵균 포식력(phagocytosis)

결핵균 대 단핵구 1:10의 낮은 감염률을 이용한 본 연구에서 말초혈액 단핵구의 결핵균 포식력은 MAC은 정상 대조군과 결핵환자군 각각 $24.2 \pm 9.4\%$, $26.1 \pm 5.6\%$, H_{37}Ra 는 각각 $20.7 \pm 10.1\%$, $12.0 \pm 4.6\%$ 로 결핵환자의 H_{37}Ra 에 대한 포식력이 유의하게 낮았다($p < 0.001$). 폐포 대식세포의 포식력은 정상 대조군에서만 검사되었는데 MAC이 $13.8 \pm 5.8\%$, H_{37}Ra 가 $11.3 \pm 3.6\%$ 로 단핵구에 비하여 MAC과 H_{37}Ra 에 대하여 유의하게 낮은 포식력을 보였다($p < 0.05$)(Table 1).

2. 단핵구의 결핵균 살해능

단핵구의 결핵균 살해능은 결핵균 MAC과 H_{37}Ra 를 대상으로 PPD 양성인 정상대조군($n=11$)과 결핵환자($n=7$)에서 단핵구 단독 및 비부착세포(림프구)를 첨가하여 그 효과를 측정하였다.

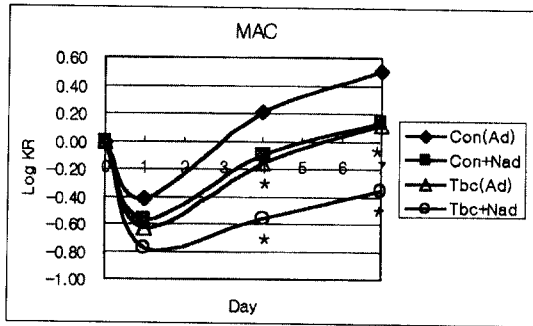
단핵구 1×10^6 당 초기(1시간 뒤) 결핵균 감염수는 정상대조군에서 MAC이 $\log 4.26 \pm 0.26$, H_{37}Ra 는 $\log 4.32 \pm 0.42$ 이었고, 결핵균에서는

Table 1. Initial phagocytosis of mycobacteria within peripheral monocyte and alveolar macrophage(%)

		Control	Tuberculosis
Monocyte	MAC	24.2±9.4	26.1±5.6
	H ₃₇ Ra	20.7±10.1	12.0±4.6**
Macrophage	MAC	13.8±5.8*	
	H ₃₇ Ra	11.3±3.6*	

* P<0.001 compared to monocyte

**P<0.05 compared to control



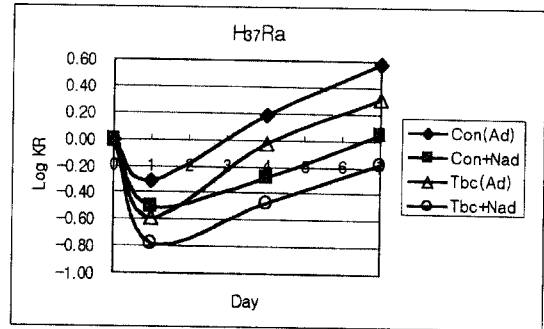
*p<0.05 comparing to control

*Ad(adherent cell);monocyte, Nad(non-adherent cell); lymphocyte

Fig. 1. Intracellular killing of MAC within human monocyte and effect of lymphocyte in control and tuberculosis.

MAC이 $\log 4.35 \pm 0.37$, H₃₇Ra는 $\log 4.27 \pm 0.40$ 으로 차이가 없었다.

MAC에 대한 단핵구 단독의 logKR는 정상대조군에서 1일, 4일 및 7일 쯤 각각 -0.42 ± 0.39 , 0.21 ± 0.29 , 0.51 ± 0.34 이었고, 결핵군에서 각각 -0.63 ± 0.42 , -0.16 ± 0.42 , 0.12 ± 0.38 로 결핵환자의 단핵구가 정상대조군에 비하여 MAC의 살해능이 유의하게 증가되어 있었다(p<0.05). 림프구 첨가시 MAC에 대한 단핵구의 logKR는 정상대조군에서 1일, 4일 및 7일 쯤 각각 -0.57 ± 0.51 , -0.10 ± 0.35 , 0.14 ± 0.31 이었고 결핵군에서 각각 -0.77 ± 0.36 , -0.56 ± 0.33 , -0.35 ± 0.18 로 림프구 첨가시에도 결핵환자의 단핵구가 유의한 살해능의



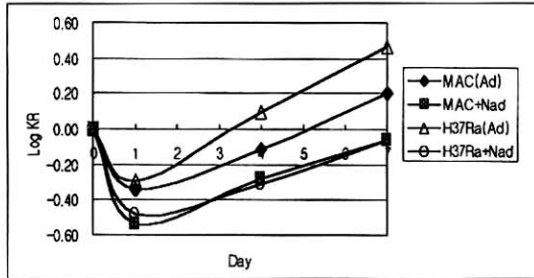
*Ad(adherent cell);monocyte, Nad(non-adherent cell); lymphocyte

Fig. 2. Interacellular killing of H₃₇Ra within human monocyte and effect of lymphocyte in control and tuberculosis.

증가를 보였다(p<0.05, Fig. 1).

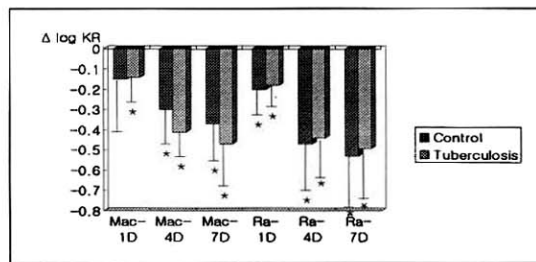
H₃₇Ra에 대한 단핵구 단독의 logKR는 정상대조군에서 1일, 4일 및 7일 쯤 각각 -0.31 ± 0.41 , 0.19 ± 0.42 , 0.58 ± 0.45 이었고 결핵군에서 각각 -0.59 ± 0.51 , -0.03 ± 0.51 , 0.31 ± 0.46 로 결핵환자의 단핵구가 정상대조군에 비하여 H₃₇Ra의 살해능이 증가된 경향을 보였다. 림프구 첨가시 H₃₇Ra에 대한 단핵구의 logKR는 정상대조군에서 1일, 4일 및 7일 쯤 각각 -0.50 ± 0.36 , -0.28 ± 0.51 , 0.05 ± 0.49 이었고 결핵군에서 각각 -0.78 ± 0.54 , -0.47 ± 0.60 , -0.17 ± 0.56 로 결핵환자의 단핵구가 살해능이 증가된 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

실질적으로 배양 7일까지 단핵구내 결핵균 증



*Ad(adherent cell);monocyte, Nad(non-adherent cell); lymphocyte

Fig. 3. Intracellular killing of MAC & H₃₇Ra within human macrophage and effect of lymphocyte in healthy control.



*p<0.05 comparing to adherent cells without lymphocyte

Fig. 4. Effect of lymphocyte on killing of MAC and H₃₇Ra within human monocyte.

식의 제한은 결핵환자의 단핵구에 림프구를 첨가한 경우에만 일어났다(Fig. 1 & 2).

3. 폐포 대식세포의 결핵균 살해능

정상대조군에서 폐포 대식세포 1×10^6 당 초기 (1시간 뒤) 결핵균 감염수는 MAC이 $\log 4.17 \pm 0.20$, H₃₇Ra는 $\log 3.87 \pm 0.27$ 이었다. 정상대조군 (n=6)에서 얻은 폐포 대식세포 단독의 MAC에 대한 logKR는 1일, 4일 및 7일 째 각각 -0.34 ± 0.28 , -0.12 ± 0.40 , 0.20 ± 0.43 이었으며 림프구를

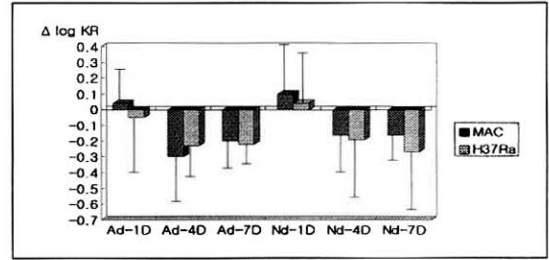


Fig. 5. Killing effect of alveolar macrophage comparing to monocyte in healthy control.

첨가하면 1일, 4일 및 7일 째 각각 -0.54 ± 0.34 , -0.28 ± 0.39 , -0.06 ± 0.39 로 유의하게 살해능이 증가되었다($p < 0.05$). 폐포 대식세포 단독의 H₃₇Ra에 대한 logKR는 1일, 4일 및 7일 째 각각 -0.30 ± 0.33 , 0.09 ± 0.31 , 0.47 ± 0.25 이었으며 림프구를 첨가하면 1일, 4일 및 7일 째 각각 -0.48 ± 0.31 , -0.31 ± 0.43 , -0.06 ± 0.22 로 살해능이 유의하게 증가되었다($p < 0.05$)(Fig. 3). 정상대조군에서 얻어진 폐포 대식세포의 MAC과 H₃₇Ra에 대한 유의한 살해능의 차이는 없었다.

4. 림프구 의존적 결핵균 살해능

단핵구에 림프구를 첨가하였을 때의 MAC 살해능은 단핵구 단독에 비하여 $\Delta \log KR$ 가 정상대조군과 결핵균 각각 1일째 -0.15 , -0.14 , 4일째 -0.30 , -0.41 , 7일째 -0.37 , -0.47 로 유의하게 감소되었다. H₃₇Ra 살해능 또한 림프구 첨가시 $\Delta \log KR$ 가 정상대조군과 결핵균 각각 1일째 -0.20 , -0.18 , 4일째 -0.47 , -0.44 , 7일째 -0.53 , -0.49 로 유의하게 감소되었다($p < 0.05$, Fig. 4). 단핵구에 림프구 첨가시 결핵균 살해능이 유의하게 증가되는 것을 알 수 있으나 정상대조군과 결핵환자간, 또한 결핵균 MAC과 H₃₇Ra간에 보여지는 차이는 없었다.

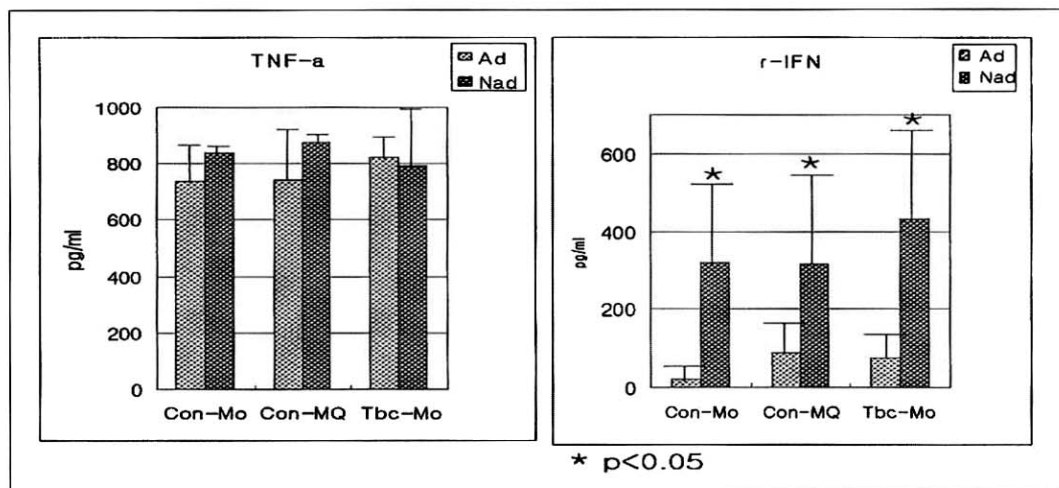


Fig. 6. Induction of $\text{TNF-}\alpha$ and γ -IFN following infection with $H_{37}\text{Ra}$ in control and tuberculosis.

정상대조군의 폐포 대식세포에 림프구를 첨가하였을 때의 MAC과 $H_{37}\text{Ra}$ 살해능도 폐포 대식세포 단독에 비하여 각각 $\Delta\log\text{KR}$ 가 1일째 -0.20, -0.18, 4일째 -0.15, -0.39, 7일째 -0.26, -0.52로 유의하게 감소되었다($p < 0.05$).

5. 폐포 대식세포의 단핵구에 비교한 결핵균 살해능

정상대조군 6예에서 폐포 대식세포와 단핵구의 결핵균 살해능을 비교하였는데 MAC 살해능은 단핵구의 살해능에 비하여 $\Delta\log\text{KR}$ 가 폐포 대식세포 단독과 림프구 첨가시 각각 1일째 0.04, 0.10, 4일째 -0.30, -0.16, 7일째 -0.20, -0.16 이었으며, $H_{37}\text{Ra}$ 살해능 또한 단핵구에 비하여 $\Delta\log\text{KR}$ 가 폐포 대식세포 단독과 림프구 첨가시 각각 1일째 -0.05, 0.04, 4일째 -0.23, -0.19, 7일째 -0.22, -0.27로 폐포 대식세포의 결핵균 살해능이 단핵구에 비하여 증가하는 경향을 보였다($p > 0.05$, Fig. 5).

6. $\text{TNF-}\alpha$ 와 γ -IFN의 분비

배양 1일째의 배양 상층액에서 $\text{TNF-}\alpha$, 4일째의 배양 상층액에서 γ -IFN 분비량을 측정하였다. $\text{TNF-}\alpha$ 의 분비는 정상대조군의 단핵구와 결핵균의 단핵구간에, 정상대조군의 단핵구와 폐포 대식세포간에, 또한 포식세포 단독 배양이나 림프구를 첨가하였을 때에도 분비량의 차이를 보이지 않았다. 그러나 γ -IFN의 분비는 정상대조군의 단핵구와 결핵균의 단핵구간에, 정상대조군의 단핵구와 폐포 대식세포간에는 유의한 차이가 없었으나 포식세포 단독배양에 비하여 림프구를 첨가하였을 때 유의한 분비량의 증가를 보였다(Fig. 6).

고 찰

결핵균 감염시 단핵 포식세포(mononuclear phagocyte)가 세포내 결핵균을 죽이는 최종 효과기로 작용하지만 결핵균은 이런 세포 내에서 쉽게

살아남아 증식한다³. 그러나 in vitro 실험에서 탐식된 결핵균의 세포내 증식이나 살해능(cytotoxicity)을 측정하는 것은 아직도 상당히 제한적이며, 숙주, 면역상태, 세포의 종류, 배양환경 뿐 아니라 균주(strain)에 따라서 많은 차이를 보일 수 있다. 약독화시킨 결핵균주(attenuated strain)인 H₃₇Ra는 쥐의 폐포 대식세포 내에서 독력이 강한(virulent) H₃₇Rv에 비하여 증식이 느리지만 이 H₃₇Ra의 증식정도는 인체 단핵구로부터 길러진 대식세포 내에서의 H₃₇Rv의 증식 정도와 비슷하다고 보고되어 이 두 숙주간에 결핵균에 대한 다른 살해기능이 작용할 것으로 추측되고 있다⁵. 최근까지 대부분의 결핵균 감염에 대한 면역기전은 쥐를 모델로 한 실험에 기초하여 왔으나 결핵균주의 독력은 숙주의 종(species)에 따라 특이적이므로 쥐에서 보이는 결핵균주의 독력이 인체에서의 변화를 설명하기 어려울 것으로 생각되고 있다. 쥐의 대식세포에서는 쥐의 종(strain)에 따른 유전적 배경이나 반응성 질소 매개체 및 사이토카인의 활성화 정도가 결핵균에 대한 면역에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있으나 인체에서 단핵구나 대식세포와 같은 탐식구가 결핵균을 죽이는 기전은 아직도 명확하지 않으며 최근에는 세포자멸사(apoptosis)가 중요한 하나의 기전이 될 것으로 생각되고 있다⁵⁻⁷. 따라서 결핵균 감염의 병리기전을 연구하기 위하여서는 적절한 인체의 감염모델이 필요하며 특히 in vivo 감염시와 유사한 환경을 만들어주기 위하여 재현 가능한 적은 수의 균으로 인체세포를 감염시키는 모델이 필요하다. 지금까지 결핵균의 독력을 측정하기 위하여 인체 단핵구 모델을 이용한 실험으로는 Crowle등⁸의 실험을 기초로 하여, Rook등⁹, Denis등¹⁰, Hirsch등¹¹의 연구를 들 수 있으며 이러한 포식세포의 감염모델에서는 고식적으로 결핵균:단핵구 100:1, 10:1, 5:1 등 감염률을 이용하여 왔으나 본 실험에서는

최근 Silver등^{12,13}의 연구에서의 결핵균:단핵구 1:1의 감염률 보다 더욱 낮은 감염률인 1:10을 이용하여 이를 colony-forming unit(CFU)로 측정하였다.

일반적으로 결핵균의 독력은 생체에서 감염을 일으키는 능력으로 설명되며, 세포내 균주가 감염을 일으키고 질병을 야기하는 능력은 숙주가 균을 제거하려는 노력에도 불구하고 얼마나 살아남아 증식하는가에 달려있다. 반면 인체에서는 결핵균 감염시 개체에 따라 탐식구 내에서 결핵균의 살해능(증식)에 차이를 보일 것이고, 이 차이가 숙주 개개인에서 면역의 차이를 대변할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 실험 결핵균주로 약독화시킨 결핵균주인 H₃₇Ra와 흙이나 물에 산재하여 비독성으로 일반적으로는 인체에 질병을 일으키지는 않으나 최근 AIDS와 같은 면역억제 질환자에서 위험한 기회감염을 일으켜 문제가 되고 있는 MAC을 사용하여 비교하였고, 정상 대조군과 결핵환자를 대상으로 세포내 결핵균 살해능의 정도와 그 차이를 비교하고자 하였다.

본 연구에서 정상대조군에서 결핵균:포식세포 1:10 비율로 1시간 동안 감염시켰을 때 MAC에 대한 포식력(phagocytosis)은 말초단핵구와 폐포 대식세포 각각 24.2±9.4 %, 13.8±5.8 % 이었고, H₃₇Ra에 대한 포식력은 각각 20.7±10.1 %, 11.3±3.6 %로 말초 단핵구에 비하여 폐포 대식세포의 결핵균 포식력이 유의하게 낮은 것을 보여주었다. 말초 단핵구의 결핵균 포식력을 정상 대조군과 결핵환자군에서 비교하였을 때 MAC에 대한 포식력은 차이가 없었으나 H₃₇Ra에 대한 포식력은 각각 20.7±10.1 %, 12.0±4.6 %로 결핵환자군에서 유의하게 낮았다(Table 1). 결과적으로 면역학적으로 더 활성화된 세포에서 결핵균 포식력이 감소되어 있으며, 같은 세포에서는 면역이 활성화된 개체에서 얻어진 경우, 특히 약독화

된 비독성 균주를 대상으로 뚜렷이 포식력이 감소되어 있는 것으로 생각된다.

세포내 결핵균의 증식은 정상대조군의 말초 단핵구 내에서 포식된 MAC과 H₃₇Ra 모두 처음 감염시킨 균주와 비교하여 배양 1일째는 감소되거나 배양 4일째 log 0.2, 배양 7일째 log 0.6 정도로 포물선을 그리며 점점 증식된다. 그러나 결핵 환자의 말초 단핵구는 정상 대조군과 비교하면 MAC에 대한 살해능은 log -0.4 ($p < 0.05$), H₃₇Ra에 대한 살해능은 log -0.2 ($p > 0.05$) 정도로 결핵균 증식의 감소를 보였다. 따라서 활동성 결핵 환자의 말초 단핵구가 정상인의 단핵구에 비하여 유의하게 활성화 되어있는 것을 볼 수 있다. 말초 단핵구와 결핵균 배양시에 비부착 세포인 림프구를 전혈(whole blood)과 비슷하도록 단핵구:림프구 1:10의 비율로 첨가하면 정상 대조군과 결핵 환자군 공히, MAC과 H₃₇Ra 모두에 대하여 통계적으로 유의하게 현저한 결핵균 증식의 감소를 보였다($p < 0.05$)(Fig. 4). 그러나 결핵균은 in vitro 실험에서 말초 단핵구에 포식된 이후 결과적으로 살아남아 증식하는 것을 볼 수 있는데 배양 7일째 실질적인 결핵균 증식의 억제는 결핵 환자의 말초 단핵구에 림프구를 첨가한 경우에만 볼 수 있다. 따라서 림프구가 세포내 결핵균 증식을 억제하도록 말초 단핵구를 활성화 시키며, 세포내 결핵균 살해능은 명확히 림프구에 의존적임을 알 수 있다.(Fig. 1&2). 결핵균에 감염된 단핵구와 림프구와의 상호작용으로 이루어지는 세포-매개성 면역은, 즉 비부착세포(림프구) 매개성 단핵구 살해능에 의해 결핵균 증식을 억제하여 감염된 인체의 대부분이 활동성 결핵이 되는 것을 방지할 뿐 아니라 일차 감염 후 갖게되는 특이면역(specific immunity)은 PPD 양성 피부반응을 일으키고 재감염에 대한 저항을 갖게 한다¹⁴. 최근의 연구에 의하면 림프구 매개성 살해능은 사이토카인과는 독립적으로 세포내

결핵균 증식을 억제하고 살해하며 그 기전으로는 다양한 종류의 결핵균에 반응하는 T-세포나 NK-세포에 의한 비특이 면역반응¹⁵⁻¹⁷, 세포자멸사⁶, perforin-매개성 살해능¹⁸등으로 세포내 결핵균을 세포 밖으로 유출시키지 않으면서 감염된 세포를 살해할 것으로 추측하고 있다. 본 연구에서의 정상 대조군은 모두 PPD 양성자로서 특이 면역을 가지고 있는 상태로 볼 수 있으나 활동성 폐결핵 환자는 대조군에 비하여서도 면역이 더욱 활성화되어 있는 상태로 세포내 결핵균 증식을 더욱 유의하게 억제함을 보여주었다.

인체의 결핵감염이 대부분 비말핵 흡입으로 발생되므로 1차적으로 결핵균을 방어하는 면역 세포는 폐포 대식세포이다. 본 연구에서 정상 대조군의 기관지 폐포 세척액에서 얻어진 폐포 대식세포를 대상으로 결핵균 살해능을 연구하였는데 정상대조군의 말초 단핵구의 살해능과 비교하여 4일과 7일 배양에서 경미한 증식의 억제를 보였을 뿐 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 3). 배양시 폐포 대식세포에 림프구를 첨가하였을 때에도 단핵구에서와 같이 유의한 결핵균 증식의 감소를 보여 폐포 대식세포의 세포내 결핵균 살해능도 림프구에 의존적임을 보여주었다(Fig. 5). 또한 정상 대조군에서 포식세포 배양시 7일째 결핵균 증식의 억제 능력은 실질적으로 폐포 대식세포와 림프구를 같이 배양한 경우에만 볼 수 있으며 말초 단핵구에서는 볼 수 없었다.

Silver등¹³의 연구에서는 1:1 감염률을 이용하여 인체 세포내 결핵균의 살해능을 연구하였는데 H₃₇Ra, BCG 및 H₃₇Rv가 in vivo 동물실험에서와 같이 독력에 따른 증식의 차이를 명백히 보였으나, 본 연구에서는 결핵균주로 MAC과 H₃₇Ra만을 사용하였으며 두 균주 사이에서는 독력의 차이를 보이지 않았다. 실제 인체에 감염되는 균주가 독력이 있는 균주이므로 H₃₇Rv나 clinical

isolate를 사용한 실험이 요망되지만 biohazard laboratory가 없는 일반 실험실에서는 어려운 문제이다.

쥐에서 세포내 결핵균 살해능의 기전으로 사이토카인이 특히 γ -IFN과 TNF- α 가 중요한 역할을 할 것으로 추측되지만 인체에서의 역할은 명확하지 않다. γ -IFN은 쥐의 대식세포 활성화의 가장 중요한 매개체로 nitric oxide 분비를 유도하여 세포내 결핵균 증식을 억제하고^{19, 20}, TNF- α 는 γ -IFN의 효과를 증폭시켜 방어작용을 한다^{21, 22}. 본 연구에서 배양 1일째 상층액에서 TNF- α , 배양 4일째 상층액에서 γ -IFN을 측정하였다. TNF- α 는 정상 대조군과 결핵환자군, 말초 단핵구와 폐포 대식세포 간 분비량의 차이가 없었으며, 배양시 림프구를 첨가하였을 때에도 결핵균의 증식이 유의하게 억제되었음에도 불구하고 분비량의 차이는 보이지 않았다. 따라서 결핵균이 TNF- α 의 분비를 자극하는 능력은 숙주의 방어기능과 관련이 있기보다는 병리현상을 야기시키는 원인이 아닌가 추측된다. γ -IFN은 말초 단핵구와 폐포 대식세포 단독배양시 분비량이 경미하였으나 림프구 첨가시에는 유의한 분비의 증가를 보였다. 그러나 정상 대조군과 결핵환자군, 말초 단핵구와 폐포 대식세포 간에 분비량의 유의한 차이는 없었다(Fig. 6). Denis등¹⁰의 보고에 의하면 γ -IFN 그 자체는 단핵구에 강한 항결핵 효과를 부여하지 못하지만 γ -IFN에 TNF- α 와 생리적인 용량의 calcitriol을 투여할 때에 단핵구의 결핵균 살해능이 증가한다고 하였다. 이러한 결과에서 세포내 결핵균의 살해능에 TNF- α 가 미치는 효과는 크지 않으며, γ -IFN의 역할이 비교적 중요할 것으로 생각된다.

결론적으로 낮은 결핵균 감염률을 이용한 인체 포식세포의 세포내 결핵균 감염 모델인 본 연구에서 결핵균 살해능은 림프구 의존적으로, 포식세포의 결핵균 탐식 후 7일까지의 배양에서

결핵환자의 단핵구와 PPD 양성 정상인의 폐포 대식세포에 림프구를 첨가한 경우에만 실질적인 결핵균 증식의 제한을 볼 수 있었다.

요 약

연구배경 :

말초혈액 단핵구와 폐포 대식세포가 림프구에 의하여 활성화된 후 탐식된 세포내 결핵균을 제거하는 최종 효과기로 작용하지만 결핵균은 이러한 세포 내에서조차 살아남아 증식한다. 본 연구에서는 인체 감염의 경우와 유사하도록 낮은 감염률(결핵균:포식세포 1:10)을 이용하여 MAC (*Mycobacterium avium*)과 *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra에 대한 단핵구와 폐포 대식세포의 림프구 의존적 결핵균 살해능의 정도를 측정하고자 하였다.

방 법 :

정상인과 폐결핵 환자의 말초혈액 단핵구를 Ficoll gradient 방법을 이용하여 분리하고, 정상인의 폐포 대식세포를 기관지폐포 세척액에서 분리하여 96well plate에 1×10^5 씩 분주하고 결핵균주 MAC 과 H₃₇Ra에 낮은 감염률(결핵균:단핵구 1:10)로 감염시켰다. 일부는 비부착세포(림프구)를 림프구:포식세포 10:1 비율로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 1일, 4일, 및 7일째 각각 수확하여 middlebrook 7H10/OADC agar plate에 접종 후 집락이 형성될 때까지 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 결핵균의 수는 lysate의 ml(세포수 10^6)당 CFU로 표시하였고, 결핵균의 살해능은 log killing ratio[logKR=log₁₀(Final CFU/Initial CFU)]로 표시하였다. 배양 1일째 상층액에서 TNF- α , 배양 4일째 상층액에서 γ -IFN을 Elisa kit를 사용하여 측정하였다

결 과 :

단핵구의 세포내 결핵균 살해능은 정상대조군에

비하여 결핵환자군에서 $\Delta\log\text{KR}$ 가 MAC -0.4, H_{37}Ra -0.2 정도로 유의하게 증가되어 있었다 ($p<0.05$). 정상대조군에서 폐포 대식세포의 결핵균 살해능은 단핵구에 비하여 $\Delta\log\text{KR}$ 가 MAC 과 H_{37}Ra 모두 -0.2정도로 증가된 경향을 보였다. 단핵구와 폐포 대식세포내 결핵균 살해능은 림프구 의존적으로 림프구 첨가시의 $\Delta\log\text{KR}$ 는 MAC -0.4, H_{37}Ra -0.5 정도로 포식세포 단독에 비하여 유의하게 증가되었다($p<0.05$). γ -IFN은 말초 단핵구와 폐포 대식세포 단독배양시 분비량이 경미하였으나 림프구 첨가시에는 유의한 분비의 증가를 보였다.

결 론 :

본 연구는 낮은 결핵균 감염률을 이용한 인체 포식세포의 세포내 결핵균 감염 모델이다. 결핵균 살해능은 림프구 의존적이며, 포식세포의 결핵균 탐식 후 7일까지의 배양에서 결핵환자의 단핵구와 PPD 양성 정상인의 폐포 대식세포에 림프구를 첨가한 경우에만 실질적인 균 증식의 제한을 볼 수 있었다.

참 고 문 헌

- Kaufmann SHE: Immunity to intracellular bacteria. Annu. Rev. Immunol 1993;11:129-63.
- Schluger NW, Rom WN : The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:679-91.
- Collins FM : In vivo vs in vitro killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Res Microbiol 1990;127:212-7.
- 천선희, 김성규 : 기관지폐포 세척액 검사의 임상적 유용. 결핵 및 호흡기 질환 1990;37: 363-71.
- Ferguson JS, Gaynor CD, Schlesinger LS : Mononuclear phagocytes in tuberculosis pathogenesis. Curr Opin Infect Dis 1997;10: 190-5.
- Malloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G: Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. J Exp Med 1994;180:1499-509.
- Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H : Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. Infect Immun 1997;65: 298-304.
- Crowle AJ, May M : Preliminary demonstration of human tuberculoimmunity in vitro. Infect Immun 1981;31:453-64.
- Rook GAW, Steele J, Ainsworth M, Champion BR : Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. Immunol 1986;56:333-8.
- Denis M : Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes : activation by cytokines and calcitriol. Clin Exp Immunol 1991;84:200-6.
- Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA: Complement receptor-mediated uptake and Tumor necrosis factor- α -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. J Immunol 1994;152:743-53.
- Silver RF, Li Q, Boom WH, Ellner JJ: Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis*

- H37Rv within human monocytes: requirement for CD4⁺ T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative subjects. J Immunol. 1998;160:2408-17.
13. Silver RF, Li Q, Ellner JJ : Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes : Virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. Infect Immun 1998;66: 1190-9.
 14. Stead WW : Management of health care workers after inadvertent exposure to tuberculosis : a guide for the use of preventative therapy. Ann Intern Med 1995;122:906-12.
 15. Boom WH, Wallis RS, Chervenak KA : Human *Mycobacterium tuberculosis*-reactive CD4⁺ T-cell clones : heterogeneity in antigen recognition, cytokine productions, and cytotoxicity for mononuclear phagocytes. Infect Immun 1991;59:2737-43.
 16. Tan JS, Canaday DH, Boom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rich EA : Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic T cell and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. J Immunol 1997;159:290-7.
 17. Barnes PF, Grisso CL, Abrams JS, Band H, Rea TH, Modin RL : γ , δ -T lymphocytes in human tuberculosis. J Infect Dis 1992;165: 506-12.
 18. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, Modin RL: Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infections. Sciences 1997;276: 1684-7.
 19. Flesh IE, Kaufmann SHE: Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibitions by gamma interferon-activated bone marrow macrophage : role of reactive nitrogen intermediates. Infect Immun 1991;59:3213-8.
 20. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR: Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. J Exp Med 1992;175:1111-22.
 21. Flesh IE, Kaufmann SHE : Activation of tuberculosis macrophage functions by γ -interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. Infect Immun 1990;58:2675-7.
 22. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR : Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Immunity 1995;2:561-72.