

## 인체 전혈 모델을 이용한 세포내 결핵균 살균력에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 내과학교실, 의과학연구소, 순천향대학교 의과대학 미생물학교실\*

천선희, 송호연<sup>†</sup>, 이은희, 오희정, 강인숙, 조지윤, 홍영선

=Abstract=

### Measuring Intracellular Mycobacterial Killing Using a Human Whole Blood Assay

Seon Hee Cheon, M.D., Ho Yeon Song, M.D.<sup>†</sup>, Eun Hee Lee, Hee Jung Oh, M.D.,  
In Sook Kang, M.D., Ji Yoon Cho, M.D., Young Sun Hong, M.D.

Department of Internal Medicine, Research Medical Center, Ewha Womans University, College of Medicine, Seoul,  
Department of Microbiology, Soonchunhyang University, College of Medicine, Cheon An<sup>\*</sup>, Korea

**Background** : The mechanisms through which cellular activation results in intracellular mycobacterial killing is only partially understood. However, *in vitro* studies of human immunity to *Mycobacterium tuberculosis* have been largely modeled on the work reported by Crowle, which is complicated by several factors. The whole blood culture is simple and allows the simultaneous analysis of the relationship between bacterial killing and the effect of effector cells and humoral factors. In this study, we attempted to determine the extent to which *M. tuberculosis* is killed in a human whole blood culture and to explore the role of the host and microbial factor in this process.

**Method** : The PPD positive subjects were compared to the umbilical cord blood and patients with tuberculosis, diabetes and lung cancer. The culture is performed using heparinized whole blood diluted with a culture medium and infected with a low number of *M. avium* or *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra for 4 days by rotating the culture in a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. In some experiments, methylprednisolone- or pentoxifylline were used to inhibit the immune response. To assess the role of the T-cell subsets, CD4+, CD8+ T-cells or both were removed from the blood using magnetic beads. The  $\Delta$  log killing ratio was defined using a CFU assay as the difference in the log number of viable organisms in the

<sup>†</sup>본 연구는 과학재단 목적기초연구(우수여성과학자 도약지원 연구)의 지원에 의하여 이루어진 것임(2000-0-205-003-2).

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

completed culture compared to the inoculum.

**Results** : 1. A trend was noted toward the improved killing of mycobacteria in PPD+ subjects comparing to the umbilical cord blood but there was no specific difference in the patients with tuberculosis, diabetes and lung cancer. 2. Methylprednisolone and pentoxifylline adversely affected the killing in the PPD+ subjects, umbilical cord blood and patients with tuberculosis. 3. The deletion of CD4+ or CD8+ T-lymphocytes adversely affected the killing of *M. avium* and *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra by PPD+ subjects. Deletion of both cell types had an additive effect, particularly in *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra. 4. A significantly improved mycobacterial killing was noted after chemotherapy in patients with tuberculosis and the  $\Delta$  logKR continuously decreased in a 3 and 4 days of whole blood culture.

**Conclusion** : The *in vitro* bactericidal assay by human whole blood culture model was settled using a CFU assay. However, the host immunity to *M. tuberculosis* was not apparent in the human whole blood culture bactericidal assay, and patients with tuberculosis showed markedly improved bacterial killing after anti-tuberculous chemotherapy compared to before. The simplicity of a whole blood culture facilitates its inclusion in a clinical trial and it may have a potential role as a surrogate marker in a TB vaccine trial. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 53:497-509)

---

**Key words** : *Mycobacterium tuberculosis*, Whole blood culture, Bactericidal assay, Colony forming unit(CFU), Log killing ratio

## 서 론

결핵균 감염에 따른 인체의 면역반응은 세포-매개성 면역(cell-mediated immunity)이 중요한 역할을 하지만 아직도 대표적 세포내 감염질환인 결핵에 대한 숙주의 방어기전 및 면역반응이 정확히 이해되지 못하고 있다. 결핵균은 체내로 들어온 뒤 대부분 숙주의 면역 방어기전에 의하여 제거되지만 일부의 결핵균이 림프구에 의하여 활성화된 폐포 대식세포나 단핵구 내에서 증식하거나 잠복감염상태로 오랫동안 생존할 수 있고 숙주의 면역이 약해지면 재 활성화되어 질환을 유발한다<sup>1</sup>. 이러한 병리기전을 연구하기 위하여서는 적절한 감염모델이 필요한데 동물감염 모델은 질환의 경과를 관찰하기에는 좋으나 여러 가지 시설을 요하며 비용과 시간이 많이 들고 또한 실제 인체와는 감수성 및 병리기전에 많은 차이를 보인다. 따라서 인체의 세포를 대상으

로 인체 내 감염환경을 나타낼 수 있는 모델이 요구된다. 고식적으로 감염된 단핵구 내에서 세포 내 균주의 증식을 확인하기 위하여 고안된 집락형성단위(colony forming unit)에 기초한 Crowle<sup>2</sup>의 모델은 단핵구를 분리하는 절차가 번거롭고 많은 양의 혈액이 요구되기 때문에 실제로 환자의 혈액을 채취하여 경과를 관찰하기는 쉽지 않다.

전혈 배양(whole blood culture)은 이미 세포증식, cytokine의 분비 및 세포 표면 표지자(surface marker) 표현 등의 연구에 사용되어 왔고<sup>3-5</sup>, 최근 luciferase assay<sup>6</sup>나 BACTEC을 이용하여 균의 살균력을 측정하는 방법<sup>7</sup>이 시도되기 시작하였으나 아직은 정석이 없는 개발단계라 할 수 있다. 인체가 균주에 대한 적절한 방어력을 나타내기 위하여서는 혈청요인과 더불어 다양한 세포간의 상호반응이 중요한 역할을 하는데 전혈은 이러한 모든 인자를 다 포함하고 있으므로 인체의 면역상태를

반영하기 위한 좋은 모델이라 할 수 있다. 또한 우리 나라에서는 과거부터 고식적인 집락형성단위를 이용한 결핵감염의 진단방법이 정착되어 왔으므로 전혈 배양과 집락형성단위를 이용하여 결핵균 살균력을 측정할 수 있는 방법의 개발이 요구된다.

따라서 본 연구의 목적은 인체의 결핵균 전혈 배양 모델을 개발하여 결핵균 감염시 숙주의 면역반응이 미치는 역할과 균주 독성(virulence)의 역할을 탐구하며 인체 내에서 결핵감염을 조절하는 면역반응에 관한 기본정보를 제공하게 하여 궁극적으로 시험관내에서 숙주면역의 정도를 측정하는 대리 표지자를 개발하고자 하는 것이다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

정상 대조군은 결핵의 기왕력이 없고 흉부방사선검사가 정상이며 특별한 호흡기질환이 없는 투베르쿨린 피부반응(이하 PPD) 양성인 15명(25-45세)으로 이들로부터 얻은 전혈과 PPD 음성인 혈액을 대신하여 8명의 건강한 산모에게서 분만시 얻은 제대혈(umbilical cord blood)을 사용하였다.

또한 활동성 폐결핵환자 7명을 대상으로 치료전 전혈을 채혈하였는데 모두 흉부 방사선 사진에서 중등증 폐결핵(ATS guideline, 1969<sup>8</sup>)으로 객담 결핵균 배양 및 도말검사 양성이었다. 이 중 5명에서 항결핵 치료가 끝난 후 경과관찰을 위하여 다시 채혈하였다.

일반적으로 면역력이 감소되어 결핵이 병발되기 쉬운 대상환자로 당뇨병 환자 10예와 폐암 환자 5예를 대상으로 전혈을 채취하였다. 당뇨병은 Hb A1c가 8% 이상으로 혈당조절이 불량한 상태의 환자였으며, 폐암은 TNM stage IIIb 이상인 비소세포암 환자로 항암제 및 방사선 치료 시작 전에 채혈하였다.

### 2. 전혈에서 결핵균 감염, 배양 및 수확

헤파린을 첨가한 주사기에 말초혈액을 채취한 후 RPMI1640(GibcoBRL, Grand island, N.Y.)용액으로 1:1 희석하였다. 결핵연구원에서 분양 받은 결핵균 *Mycobacterium avium*(ATCC 25291)과 *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra(ATCC 35835)를 ml당 결핵균 수  $1 \times 10^4$  씩 섞었다. 희석된 전혈 900 $\mu$ l를 5ml polypropylene round bottom tube (Falcon 352063; Becton Dickson Labware, Lincoln, N.J.)에 넣고 결핵균을 100 $\mu$ l 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 속의 회전교반기(LABQUAKE rotator; Barnstead Thermolyne, Dubuque, I.A.)에서 회전시키면서 배양하였다. 배양 1일, 3일 및 4일 뒤에 시험관을 4000rpm에서 10분간 원침하여 상층액을 제거하였다. 증류수 1ml을 넣어 잘 섞은 뒤 14 ml polypropylene tube(Falcon 352059; Becton Dickson Labware, Lincoln, N.J.)에 옮겨 9ml의 증류수를 더 첨가하고 적혈구가 긴장저하용해(hypotonic lysis) 되도록 vortex 해주며 10분간 세워 놓았다. 시험관을 4000rpm에서 10분간 원침하여 상층액을 버리고 middlebrook 7H9/ADC(Sigma M-0178 ; Saint Louis, Missouri) 1ml으로 재 부유하여 몇 개의 bead를 넣고 가볍게 vortex 하였다. Middlebrook 7H9/ADC 용액으로 10배 씩 연속 2회 희석하여 각 희석액을 middlebrook 7H10/OADC(Sigma M-0303 ; Saint Louis, Missouri)로 만든 6mm 평판접시(Falcon 353002 ; Becton Dickson Labware, Lincoln, N.J.)에 10 $\mu$ l씩 네 방울 점적 하였다. 평판접시를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 결핵균 집락이 형성될 때까지 3-4주간 배양하여 집락수를 계산하였다. 결핵균의 수는 lysate ml(전혈 450 $\mu$ l)당 CFU(colony forming unit)로 계산하였다. 살균력은  $\Delta \log KR$ (log killing ratio)로 표시하였는데,  $\Delta \log KR = \log_{10}(\text{Final CFU}/\text{Initial CFU})$

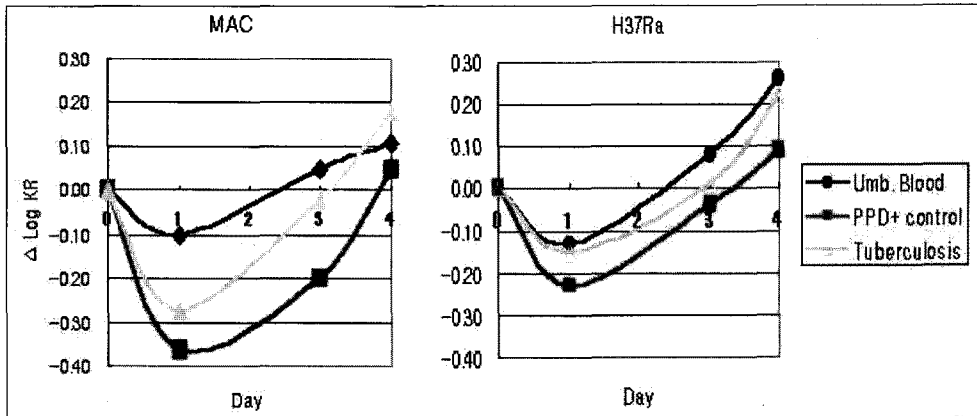


Fig. 1. Mycobacterial cytotoxicity in the whole blood culture of umbilical cord bloods, PPD positive subjects and patients with tuberculosis.

CFU)로 양의 값이면 실질적인 균의 증가, 음의 값이면 실질적인 균의 감소(살균)를 의미한다.

### 3. 면역억제제를 이용한 조정

일부 실험에서 TNF- $\alpha$ 의 분비능을 90%이상 감소시키기 위하여 전혈에 methylprednisolone(Pharmacia, Kalamazoo, Mich.) 50 $\mu$ g/ml과 pentoxifylline(Sigma, St Louis, Mo.) 1mM을 첨가한 후 결핵균을 배양하였다.

### 4. T-림프구 분획의 삭제(deletion)

일부 실험에서 전혈에서 CD4+ T-림프구와 CD8+ T-림프구를 magnetic bead(Dynabeads, Lake Success, N.Y.)에 코팅된 단클론 항체를 사용하여 제거하였다. 각각의 세척한 500 $\mu$ l의 단클론 항체를 함유한 polypropylene tube에 차가운 RPMI1640 용액으로 1:1 희석된 전혈 4ml를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C 진탕기(shaker)에서 30분간 진탕하였다. MPC(dynal magnetic particle concentrator)에 시험관을 3분간 위치하여 magnetic bead를 제거한 전혈을 새로운 시험관에 옮겼다. CD3PE+CD4FITC 혹은 CD3PE+

CD8PerCP 단클론 항체(Becton Dickinson, San Jose, CA.)로 면역형광 염색한 후에 유세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 T-림프구 분획의 삭제능을 측정된 결과 CD4+ T-림프구 및 CD8+ T-림프구 각각 99%이상의 제거율을 보였다.

### 5. 통계처리

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

## 결 과

### 1. 전혈의 결핵균 살균력

본 연구에서는 희석된 전혈 450 $\mu$ l에 결핵균  $1 \times 10^3$ 을 감염시켰으며 결핵균:단핵구 약 1:100 정도로 극히 낮은 감염률을 사용하여서 일반적인 단핵구 감염모델에 비하여 생체(in vivo) 내의 감염 상태와 더욱 유사하도록 하였다.

*M. avium*에 대한 전혈에서의 살균력은  $\Delta \log$  KR가 제대혈(n=8), PPD 양성 정상인(n=15) 및 결

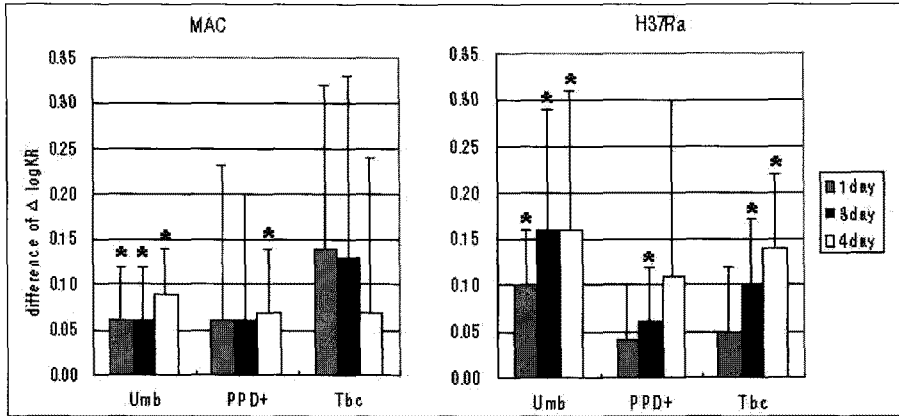


Fig. 2. Effect of methylprednisolone(5ug/ml) on mycobacterial growth in whole blood culture (\*p<0.05).

핵환자(n=7)에서 각각 배양 1일  $-0.10 \pm 0.07$ ,  $-0.36 \pm 0.27$ ,  $-0.27 \pm 0.17$ , 3일째  $0.05 \pm 0.11$ ,  $-0.20 \pm 0.32$ ,  $-0.02 \pm 0.15$ , 4일째  $0.11 \pm 0.13$ ,  $0.05 \pm 0.27$ ,  $0.18 \pm 0.20$ 로 균중식이 배양 첫날은 감소되지만 이후 포물선을 그리며 증식하였다. *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에 대한 살균력은  $\Delta \log KR$ 가 제대혈, PPD 양성 정상인 및 결핵환자에서 각각 배양 1일  $-0.13 \pm 0.07$ ,  $-0.23 \pm 0.18$ ,  $-0.15 \pm 0.20$ , 3일째  $0.08 \pm 0.12$ ,  $-0.04 \pm 0.28$ ,  $0.01 \pm 0.13$ , 4일째  $0.26 \pm 0.16$ ,  $0.09 \pm 0.25$ ,  $0.22 \pm 0.11$  이었다(Fig. 1).

결핵이 병발되기 쉬운 환자인 당뇨군(n=10)과 폐암군(n=5)의 *M. avium*에 대한 살균력은  $\Delta \log KR$ 가 각각 배양 1일  $-0.15 \pm 0.17$ ,  $-0.21 \pm 0.14$ , 3일  $-0.11 \pm 0.19$ ,  $-0.19 \pm 0.14$ , 4일  $-0.09 \pm 0.18$ ,  $-0.09 \pm 0.12$ 이었으며, *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에 대한 살균력은 각각 1일  $-0.16 \pm 0.12$ ,  $-0.25 \pm 0.18$ , 3일  $-0.03 \pm 0.16$ ,  $-0.19 \pm 0.13$ , 4일  $0.12 \pm 0.19$ ,  $-0.12 \pm 0.26$  이었다.

통계적인 의의는 없었지만 제대혈의 결핵균에 대한 살균력이 PPD 양성군에 비하여 감소된 경향을 보였으며, 예상과 달리 결핵환자의 살균력은 PPD 양성군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 당뇨군과 폐암군의 결핵균 살균력도 PPD 양성 정

상인에 비하여 특별한 차이를 보이지 않았다.

## 2. 면역억제제 조정에 의한 살균력의 변화

면역억제제로 부신피질호르몬제(methylprednisolone 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 사용하였을 때 *M. avium*에 대한 살균력의 변화는 각각의 대조군과 비교한  $\Delta \log KR$ 의 차이가 제대혈은 배양 1일, 3일 및 4일 째 각각  $+0.06 (\pm 0.06)$ ,  $+0.06 (\pm 0.06)$ ,  $+0.09 (\pm 0.05)$ , PPD 양성군은 각각  $+0.06 (\pm 0.17)$ ,  $+0.06 (\pm 0.14)$ ,  $+0.07 (\pm 0.07)$ , 결핵군은 각각  $+0.14 (\pm 0.18)$ ,  $+0.13 (\pm 0.20)$ ,  $+0.07 (\pm 0.17)$ 으로 부신피질호르몬제 사용시 살균력이 감소되는 경향을 보였다(Fig. 2). *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에 대한 살균력의 변화는 각각의 대조군과 비교한  $\Delta \log KR$ 의 차이가 제대혈은 배양 1일, 3일 및 4일 째 각각  $+0.10 (\pm 0.06)$ ,  $+0.16 (\pm 0.13)$ ,  $+0.16 (\pm 0.15)$ , PPD 양성군은 각각  $+0.04 (\pm 0.06)$ ,  $+0.06 (\pm 0.06)$ ,  $+0.11 (\pm 0.19)$ , 결핵군은 각각  $+0.05 (\pm 0.07)$ ,  $+0.10 (\pm 0.07)$ ,  $+0.14 (\pm 0.08)$ 로 역시 살균력이 감소되는 경향을 보였다.

면역억제제로 pentoxifylline 1mM을 사용하였을 때 *M. avium*에 대한 살균력의 변화는 각각의 대조군과 비교한  $\Delta \log KR$ 의 차이가 제대혈은 배

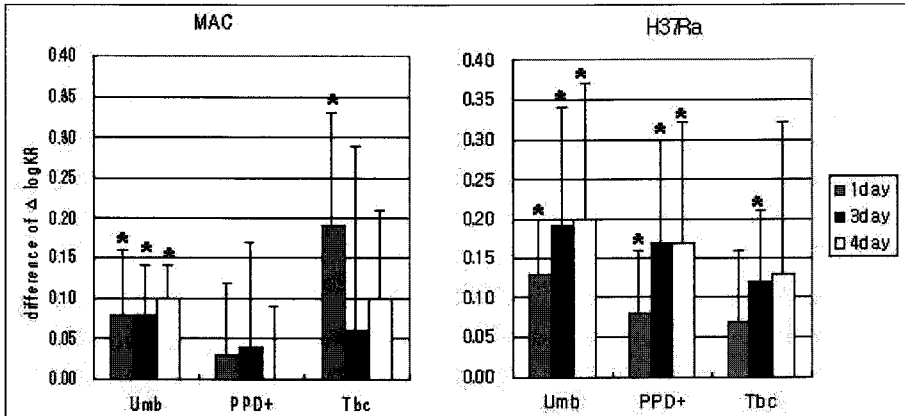


Fig. 3. Effect of pentoxifylline(1mM) on mycobacterial growth in whole blood culture(\*p<0.05).

양 1일, 3일 및 4일 째 각각  $+0.08(\pm 0.08)$ ,  $+0.08(\pm 0.06)$ ,  $+0.10(\pm 0.04)$ , PPD 양성균은 각각  $+0.03(\pm 0.09)$ ,  $+0.04(\pm 0.13)$ ,  $0(\pm 0.09)$ , 결핵균은 각각  $+0.19(\pm 0.14)$ ,  $+0.06(\pm 0.23)$ ,  $+0.10(\pm 0.11)$ 으로 역시 살균력이 감소되는 경향을 보였다(Fig. 3). *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에 대한 살균력의 변화는 각각의 대조군과 비교한  $\Delta \log KR$ 의 차이가 제대혈은 배양 1일, 3일 및 4일 째 각각  $+0.13(\pm 0.07)$ ,  $+0.19(\pm 0.15)$ ,  $0.20(\pm 0.17)$ , PPD 양성균은 각각  $+0.08(\pm 0.08)$ ,  $+0.17(\pm 0.13)$ ,  $+0.17(\pm 0.15)$ , 결핵균은 각각  $+0.07(\pm 0.09)$ ,  $+0.12(\pm 0.09)$ ,  $+0.13(\pm 0.19)$ 으로 살균력이 감소되는 경향을 보였다.

### 3. T-림프구 분획 삭제에 의한 살균력의 변화

PPD 양성균 8예를 대상으로 T-림프구 분획을 제거하고 결핵균에 대한 살균력을 조사하였다. 결핵균 *M. avium*에 대한 살균력은  $\Delta \log KR$ 가 배양 1일과 4일에 대조군 각각  $-0.11 \pm 0.07$ ,  $0 \pm 0.06$ 에 비하여 CD4<sup>+</sup> 림프구 삭제시  $-0.05 \pm 0.08$ ,  $0.04 \pm 0.08$ , CD8<sup>+</sup> 림프구 삭제시  $-0.02 \pm 0.07$ ,  $0.03 \pm 0.10$ , CD4<sup>+</sup> 림프구와 CD8<sup>+</sup> 림프구를 동시에 삭제시엔  $0.01 \pm 0.09$ ,  $0.06 \pm 0.08$ 로 대조군에 비하여 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 림프구 삭제시 *M.*

*avium*에 대한 살균력의 감소를 보였으며 두 림프구 분획을 동시에 삭제시엔 상승효과를 보였다. *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에 대한 살균력은  $\Delta \log KR$ 가 배양 1일과 4일에 대조군 각각  $-0.16 \pm 0.06$ ,  $-0.10 \pm 0.12$ 에 비하여 CD4<sup>+</sup> 림프구 삭제시  $-0.04 \pm 0.03$ ,  $0.13 \pm 0.10$ , CD8<sup>+</sup> 림프구 삭제시  $-0.08 \pm 0.04$ ,  $0.08 \pm 0.10$ , CD4<sup>+</sup> 림프구와 CD8<sup>+</sup> 림프구를 동시에 삭제시엔  $0.10 \pm 0.08$ ,  $0.33 \pm 0.14$ 로 역시 대조군에 비하여 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 림프구 삭제시 H<sub>37</sub>Ra에 대한 살균력의 감소를 보였으며 두 림프구 분획을 동시에 삭제시 현저한 상승효과를 보였다(Fig. 4).

림프구 분획 삭제시 살균력의 변화 정도는 결핵균 *M. avium*에 대해서 대조군과 비교한  $\Delta \log KR$ 의 차이가 CD4<sup>+</sup> 림프구 삭제시 배양 1일과 4일 각각  $+0.06(\pm 0.06)$ ,  $+0.04(\pm 0.03)$ , CD8<sup>+</sup> 림프구 삭제시  $+0.10(\pm 0.07)$ ,  $+0.03(\pm 0.09)$ , CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 림프구 삭제시  $+0.11(\pm 0.08)$ ,  $+0.06(\pm 0.07)$ 로 살균력의 감소를 보였으며 배양 1일과 CD4<sup>+</sup> 림프구 삭제 4일 배양시에 통계적으로 유의하였다. *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에 대한 대조군과 비교한  $\Delta \log KR$ 의 차이는 CD4<sup>+</sup> 림프구 삭제시 배양 1일과 4일 각각  $+0.13(\pm 0.07)$ ,  $+0.22(\pm 0.09)$ , CD8<sup>+</sup> 림프구 삭제시  $+0.09(\pm 0.05)$ ,  $+0.18(\pm 0.08)$ , CD4<sup>+</sup>

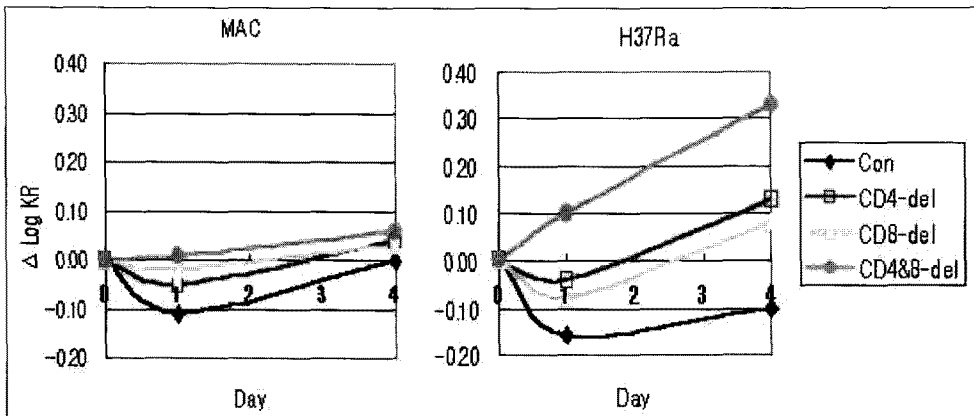


Fig. 4. Mycobacterial cytotoxicity when CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells are deleted in the whole blood culture of subjects with PPD positive(n=8).

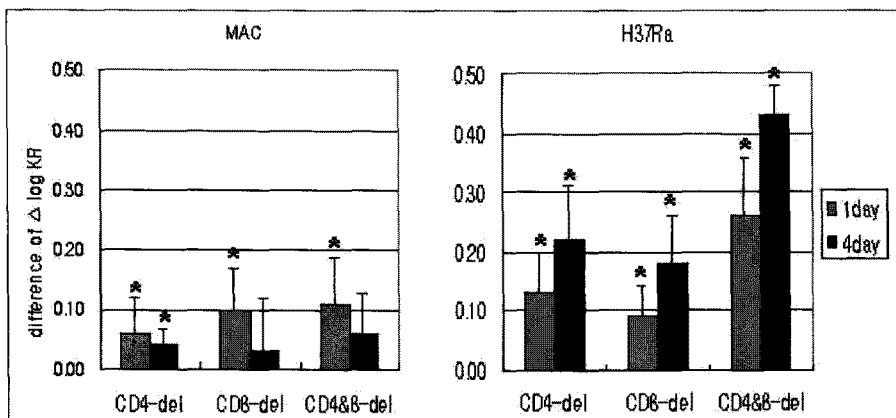


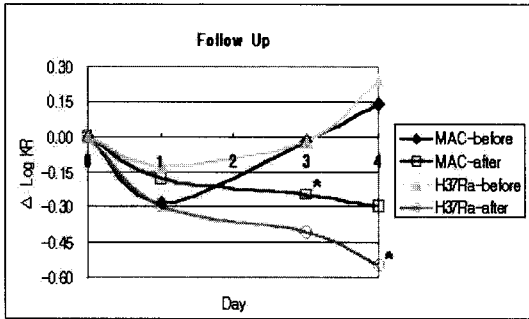
Fig. 5. Effect of deletion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells on mycobacterial growth in the whole blood culture of subjects with PPD positive(\*p<0.05).

및 CD8<sup>+</sup> 림프구 삭제시 +0.26(±0.10), +0.43(±0.05)로 통계적으로 유의한 살균력의 감소를 보였으며 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 림프구를 동시에 삭제시에는 현저한 상승효과를 보였다(Fig. 5).

#### 4. 폐결핵 환자의 치료 전후 결핵균 살균력의 변화

폐결핵 환자 5예에서 6-8개월의 항결핵 치료를 끝낸 후 결핵균에 대한 살균력의 변화를 추적하였다. *M. avium*에 대한 살균력은  $\Delta \log \text{KR}$ 가 치료 전

1일, 3일 및 4일 배양시 각각  $-0.28 \pm 0.23$ ,  $-0.02 \pm 0.04$ ,  $0.14 \pm 0.22$ 에서 치료 후 1일, 3일 및 4일 배양시 각각  $-0.18 \pm 0.06$ ,  $-0.25 \pm 0.07$ (p<0.05),  $-0.30 \pm 0.16$ 으로 치료 전에는 결핵균이 배양기간이 길어짐에 따라 포물선 모양의 증식을 보였으나 치료 후에는 배양 기간이 길어져도 실질적으로 결핵균의 증식을 억제하는 경향을 보였다. *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에 대한 살균력은  $\Delta \log \text{KR}$ 가 치료 전 1일, 3일 및 4일 배양시 각각  $-0.12 \pm 0.24$ ,  $-0.02 \pm 0.13$ ,  $0.24 \pm 0.05$ 에서 치료 후 1일,



**Fig. 6.** The change of mycobacterial cytotoxicity before and after antituberculous chemotherapy in the patients with tuberculosis (\* $p < 0.05$  comparing to before chemotherapy).

3일 및 4일 배양시 각각  $-0.30 \pm 0.29$ ,  $-0.41 \pm 0.35$ ,  $-0.55 \pm 0.46$  ( $p < 0.05$ )으로 *M. avium*과 마찬가지로 결핵 치료 후 실질적인 결핵균의 증식을 억제하는 경향을 보여 결핵균에 대한 살균력이 증가됨을 알 수 있다(Fig 6).

## 고 찰

인체의 결핵균 감염시 세포-매개성 면역이 중요한 역할을 하며 결핵균에 대한 감수성은 종(species) 간 획득내성(acquired resistance)의 차이에 달려 있다는 것은 잘 알려져 있는 사실이다<sup>9,10</sup>. 결핵균에 대한 획득면역(acquired immunity)은 림프구에 의하여 활성화된 대식세포와 단핵구의 결핵균 살균력과 균 증식 억제능으로 설명할 수 있다. 결핵균에 대하여 발생하는 인체의 면역반응을 시험관(in vitro)에서 시행하는 연구는 감염된 단핵구 내에서 세포 내 균주의 증식을 확인하기 위하여 고안된 집락형성단위(colony forming unit)에 기초한 Crowle<sup>2</sup>의 연구를 모델로 하여왔다. 이러한 연구에서 얻어진 결과를 쥐를 대상으로 한 실험결과와 비교하였을 때 인체 세포에서는 IFN- $\gamma$ 가 세포 내 결핵균을 탐식하고 있는 인체 단핵구를 효과적

으로 활성화시키지 못하며, vitamin-D가 어느 정도 결핵균에 감염된 인체 단핵구를 활성화시킬 수 있고, TNF- $\alpha$ 가 독력이 없는(avirulent) 결핵균주의 증식을 억제하는 기능이 있으나 이러한 매개물질 중 어느 것도 쥐에서 IFN- $\gamma$ 의 역할만큼 인체 단핵구에 탐식된 결핵균의 증식을 억제하지는 못한다고 보고되었다<sup>11-14</sup>. 인체 식세포의 결핵균 살균력을 연구하기 위하여 시험관 내 실험을 시행하는 데에는 몇 가지 어려움이 있는데 우선 많은 양의 혈액이 필요하고, 고식적으로 10:1, 5:1 등의 높은 균주:세포의 감염률이 요구되며, 감염된 단핵구를 활성화시키기 위하여 여러 가지 cytokine들이 동시에 고농도로 사용되어서 단핵구의 항균기능이 과도하게 제압되는 점등이다<sup>15-17</sup>. 1998년 Silver등<sup>18</sup>은 인체 단핵구를 대상으로 독성 결핵균주 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv를 낮은 감염률로 사용한 모델을 제안하였는데, 고식적인 감염률과 비교할 때 현저히 낮은 1:1의 감염률을 사용하였으며 인체 내에서 발생하는 세포-매개성 면역반응을 묘사하기 위하여 혈청과 전혈에서 분리된 림프구를 첨가하여 림프구와 가용성 매개체의 결핵균 증식 억제능을 측정하는 것이 가능하여 졌다고 보고하였다. 결과적으로 이러한 노력은 시험관 내의 실험에서 실제 생체 내에서 발생하는 감염환경과 유사한 상태를 만들어주기 위한 것으로 인체 식세포의 결핵균 살균력에 관한 연구에서 개체의 체액면역(humoral immunity)과 세포면역(cellular immunity) 성분을 모두 포함할 수 있는 모델이 필요하며 이것을 만족하는 것이 전혈(whole blood) 이라고 할 수 있다.

전혈을 이용하여 살균력(bactericidal activity)을 측정할 실험으로는 1995년 Ison등<sup>19</sup>이 *Neisseria meningitis*에 대한 살균력의 측정에서 성공적인 결과를 얻었으며 1999년 Kampmann등<sup>6</sup>이 BCG vaccine trial을 위한 예비실험에서 luciferase reporter gene을 사용한 luminescence assay에 전혈을 이용하였다. 2000년 Wallis등<sup>7</sup>이 BACTEC



460을 이용한 결핵균 살균력을 측정하는 연구에서 전혈을 이용하였으며 BACTEC 460은 민감도가 아주 높으므로 전혈 배양 시에 결핵균 대 단핵구의 감염률을 1:100 정도로 고식적인 감염률에 비하여 현저히 낮은 감염률을 사용할 수 있으며 균의 응괴(clumping)에 영향을 받지 않고 정확하고 결과가 빠른 장점이 있다고 하였다. 또한 전혈에 적은 수의 결핵균을 감염시키므로 균이 전혈 내의 식세포에 거의 대부분 탐식되어 적절한 세포내 결핵감염 모델로서의 가능성을 시사한다고 하였다.<sup>7</sup>

본 연구의 목적은 개체의 결핵균에 대한 감수성을 전혈에서 결핵균 살균력을 통하여 비교할 수 있는지 연구하고자 하는 것으로, 인체의 전혈에서 결핵균 살균력이 어느 정도인지 또한 숙주의 면역 상태에 따른 차이를 보이는지 살펴보고자 하였다. 전혈에서 결핵균:단핵구 약 1:100의 낮은 감염률을 사용하였으며, 우리나라에서는 BACTEC460의 사용이 정착되어 있지 않으며 과거부터 고식적인 집락형성단위로 결핵 감염을 진단하여 왔고 또한 이 방법이 균 수 측정의 가장 기본적인 방법이므로 결핵균의 증식을 집락형성단위를 이용하여 측정하였다. 결핵에 노출되지 않은 PPD 음성 혈액을 대신하여 체대혈을 사용하여 PPD 양성인 정상인 및 결핵환자와 비교하였을 때 PPD 양성 전혈의 *M. tuberculosis*와 *M. avium*에 대한 살균력이 체대혈에 비하여 증가된 경향을 보였으나 통계적인 의미가 없었으며 실질적으로 결핵균에 대한 면역반응이 가장 활성화되어 있을 결핵환자에서 예상과 달리 특별한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 또한 일반적인 면역의 저하로 인하여 결핵에 대하여 감수성이 클 것으로 예상하였던 당뇨와 폐암환자에서 PPD 양성인 정상인의 전혈과 비교하여 특별한 차이를 보이지 않았다. 따라서 전혈에서의 결핵균 살균력으로는 설명할 수 없는 조직에서 대식세포의 결핵균 살균력과 같은 다른 면역에서의 차이가 더욱 중요하게 작용할 가능성이 있다고 생각할 수

있겠다. 여러 대상의 전혈에서 결핵균 살균력 결과의 표준편차(standard deviation)가 상당히 커서 이것이 실험 자체의 변이성인지 아니면 고유면역(innate)이든 획득면역이든 각 개인의 기저면역 상태의 변이에 기인한 것인지는 확실하지 않으며, 이런 이유로 인해 여러 군간의 차이를 보이지 않는 것인지에 대한 판별을 요한다. 후자의 경우 사람에게서 타고난 결핵에 대한 감수성의 차이가 결핵에 대한 저항력의 존재를 설명한다고 할 수 있으며 또한 균에 노출된 뒤 면역을 획득하는 능력과도 관련이 있을 수 있음을 시사한다고 할 수 있다.

TNF- $\alpha$ 는 숙주가 결핵을 방어하는데 중요한 역할을 하는 cytokine으로 대식세포의 분화와 결핵균의 성장을 억제하는데 기여하여 결핵균의 배가 시간(generation time)을 약 2배정도로 증가시키는 결과를 가져온다<sup>20,21</sup>. 본 연구에서는 배양 상층액에서 24시간 후 TNF- $\alpha$  분비를 90% 이상 억제시키는 농도인 methylprednisolone(50 $\mu$ g/ml)과 pentoxifylline(1mM)을 사용하여 면역조정 시에 전혈에서 결핵균 살균력을 측정하였을 때 체대혈, PPD 양성 정상인과 결핵균 모두에서 결핵균의 살균력이 감소되는 경향을 보였으며 결핵균 *M. avium*과 *M. tuberculosis H37Ra* 간의 차이는 살펴 볼 수 없었다(Fig. 2 & 3).

림프구는 nitric oxide 분비와 세포자연사를 유도하는데 필수적인 역할을 담당하여, 세포내 감염균의 제거는 협력적으로 작용하는 CD4+ T-림프구와 CD8+ 세포독성 림프구 및 이에 의하여 활성화된 대식세포로 대변되는 세포면역과 세포-매개성 면역의 효과기에 의한다고 할 수 있다<sup>22-24</sup>. 본 연구에서는 T-림프구 분획의 삭제시 결핵균 살균력에 미치는 영향을 비교하고자 하였는데 배양 4일째 *M. avium*에 대한  $\Delta \log$ KR의 차이는 CD4+ T-림프구 삭제시 +0.04, CD8+ T-림프구 삭제시 +0.03, CD4+ 및 CD8+ T-림프구 동시 삭제시 +0.06으로 경미하게 살균력이 감소되었으며, *M.*

*tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에 대한  $\Delta \log\text{KR}$ 의 차이는 CD4+ T-림프구 삭제시 +0.22, CD8+ T-림프구 삭제시 +0.18, CD4+ 및 CD8+ T-림프구 동시 삭제시 +0.43으로  $\Delta \log\text{KR}$ 가 증가되어 유의하게 살균력이 감소되는 것을 알 수 있으며 또한 CD4+ 및 CD8+ T-림프구 동시 삭제시에 현저한 상승효과를 보였다(Fig. 4 & 5). 이러한 결과는 *M. avium* 보다는 독력이 없는 균인 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에서 보다 뚜렷하였다. 4일간의 배양기간은 기억세포(memory cell)가 완전한 항원특이반응을 나타내는데 요구되는 최소기간으로 생각되며 더욱 뚜렷한 결과를 얻기 위해서는 좀더 긴 기간의 배양이 필요하다고 생각한다. Silver등<sup>18</sup>의 단핵구를 이용한 연구에서도 CD4+ T-림프구가 배양 4-7일에 비부착세포 즉 림프구-매개성으로 세포내 H<sub>37</sub>Rv의 증식을 억제하였다고 보고하였다.

폐결핵환자 5예에서 6-8개월의 항결핵 치료를 끝낸 후 치료 전후 결핵균에 대한 살균력의 변화를 비교하였다. 결핵균에 대한 면역반응이 활성화되어  $\Delta \log\text{KR}$ 가 가장 감소될 것으로 예상하였던 결핵환자에서 PPD 양성 정상인과 비교하여 결핵균 살균력의 특별한 차이를 보이지 않았으나 치료 후의 결핵균 살균력은 치료 전과 비교하여 유의하게  $\Delta \log\text{KR}$ 가 감소하며 현저하게 살균력이 증가하였다. PPD양성 정상인, 당뇨 및 폐암 환자, 제대혈 및 결핵환자 모두에서 전혈과 결핵균 배양시 1일째에는 결핵균 살해를 보이나 3일, 4일 배양이 진행되면 결핵균이 포물선을 그리며 결과적으로 증식하지만 결핵치료 후의 환자에서는 배양 1일, 3일, 및 4일  $\Delta \log\text{KR}$ 가 점차 감소하며 유의하게 결핵균 살균력이 증가하였다(Fig 6). 이러한 결과를 전체적으로 살펴보면 결핵환자 자체에서는 결핵균에 대한 내성이 증가되어 있지 않으나 치료기간을 통하여 결핵균에 대한 면역이 증가되어 치료를 끝낸 후에는 현저히 내성이 증가하는 것을 보여준다. 결핵환자에서 치료 후에는 결핵균 살균력

이 현저히 증가되어 배양 3-4일째 결핵균 증식을 억제하지만 PPD 양성 정상인이나 제대혈에서는 결핵에 감수성이 큰 당뇨나 폐암 환자와 마찬가지로 전혈 배양 3-4일에 결핵균이 증식하는 것을 보면 백신으로 얻어지는 획득내성이 실제로 질환에 감염되어 치료된 후에 얻게되는 내성과 차이를 나타낼 가능성도 있고 결핵균에 감염된 후에 발생하는 내성이 치료 초기에는 생겼다가 지속되지 않을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 더욱 정확한 결과를 얻기 위하여서는 결핵환자에서 치료 후 장기간에 걸친 경과관찰 및 비활동성 폐결핵 환자에서의 검사가 도움이 될 수 있으며, 이러한 획득내성이 감염 후 세포-매개성 면역 증가의 결과인지 아니면 발생된 어떤 체액면역의 결과인지에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

인체 전혈 모델을 이용한 세포내 결핵균 살균력에 관한 연구에서 전혈에서의 결핵균 살균력으로 일반적인 인체의 결핵균에 대한 면역상태 즉 개체간의 결핵균에 대한 내성을 비교할 수는 없었으나 PPD 양성 정상인을 대상으로 한 연구에서 면역억제제를 첨가하거나 특히 전혈에서 림프구 분획을 삭제시에 결핵균 살균력이 감소되었으며, 결핵환자의 치료 후 전혈에서 치료전과 비교하여 유의하게 결핵균 증식을 억제하여 살균력의 현저한 증가를 보였다. 따라서 인체 전혈 모델을 이용하여 결핵균 살균력을 측정하는 방법을 최근 결핵연구의 가장 중요한 과제의 하나인 백신 개발에서 그 성과를 판단하는 vaccine trial에 사용해볼 수 있는 가능성을 시사한다. 인체 전혈 모델의 장점으로는 연구방법이 간단하며, 소량의 혈액을 사용하여 환자에게 부담을 주지 않는 채혈로 경과관찰이 용이하고 전혈이 개체의 세포면역과 체액면역 성분을 모두 포함하고 있다는 점을 들 수 있으며, 문제점으로는 결과의 variation이 큰 편이며 적혈구의 생존기간이 짧아 배양기간을 증가시킬 수 없었던 점을 들 수 있어 이러한 점을 보완할 수 있는 연구가 더

필요하다고 생각된다.

## 요 약

### 연구배경 :

대표적 세포내 감염질환인 결핵에 대한 숙주의 방어기전 및 면역반응은 아직도 정확히 이해되지 못하고 있으며 이러한 병리기전을 연구하기 위하여서는 적절한 감염모델이 필요하다. 전혈(whole blood)은 체액성 면역과 세포성 면역을 모두 포함한 생체의 상태를 반영하므로 다양한 대상에서 면역상태의 차이에 따른 개체간 결핵균 살균력의 차이를 비교할 수 있는 적절한 모델로 추정된다. 따라서 본 연구의 목적은 인체의 결핵균 전혈 배양 모델을 개발하여 궁극적으로 시험관내에서 숙주면역의 정도를 측정하는 대리 표지자를 개발하고자 하는 것이다.

### 방 법 :

PPD 양성 정상인을 대상으로 제대혈, 결핵환자, 당뇨 및 폐암환자와 비교하였다. 전혈을 회석하여 결핵균 *Mycobacterium avium*과 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에 낮은 감염률로 감염시키고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 속의 회전교반기에서 회전시키면서 배양(rotating culture)하였다. 배양 1일, 3일 및 4일 뒤 증류수로 긴장저하용해 시킨 후 Middlebrook 7H10/OADC 평판배지에서 결핵균 집락이 형성될 때까지 3-4주간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하여 집락수를 계산하였다. 일부실험에서 TNF- $\alpha$ 의 분비능을 90% 이상 감소시키기 위하여 methylprednisolone과 pentoxifylline을 첨가하여 면역조정을 하였으며, CD4<sup>+</sup> T-림프구와 CD8<sup>+</sup> T-림프구를 magnetic bead에 코팅된 단클론 항체를 사용하여 제거하였다. 결핵균의 수는 용해질 ml당 CFU로 계산하였다. 살균력은  $\Delta \log$  killing ratio로 표시하였다.  $\Delta \log KR = \log_{10}(\text{Final CFU}/\text{Initial CFU})$ .

### 결 과 :

1. 제대혈의 결핵균 살균력이 PPD 양성 대조군에 비하여 다소 감소된 경향을 보였으며, 결핵환자의 결핵균 살균력은 PPD 양성 대조군과 특별한 차이를 보이지 않았다. 또한 당뇨군과 폐암군의 결핵균 살균력도 정상 대조군에 비하여 특별한 차이를 보이지 않았다. 2. Methylprednisolone과 pentoxifylline을 사용한 면역조정 시에 제대혈, PPD 양성 정상 대조군과 결핵균 모두에서 전혈에서의 결핵균의 살균력이 감소되는 경향을 보였다. 3. CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T-림프구 삭제시 log KR가 증가되어 유의하게 결핵균 살균력이 감소되었으며 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T-림프구 동시 삭제시 현저한 상승효과를 보였고 이러한 결과는 *Mycobacterium avium*보다는 독력이 없는 균인 *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra에서 보다 뚜렷하였다. 4. 폐결핵 치료후의 결핵균 살균력은 치료 전과 비교하여 유의하게  $\Delta \log KR$ 가 감소하였으며, 배양 3-4일에도 현저한 결핵균 증식의 억제를 보였다.

### 결 론 :

인체의 결핵균에 대한 감수성인 개체간의 면역상태를 전혈에서 결핵균 살균력을 통하여 비교할 수는 없었다. 그러나 인체 전혈 모델은 간단하고 임상경과 관찰이 쉬우며 결핵환자에서 치료 전과 후에 현저한 결핵균 살균력의 차이를 보이므로, 최근 결핵연구의 가장 중요한 과제의 하나인 백신 개발에서 그 성과를 판단하는 vaccine trial에 이용할 수 있을 가능성을 시사한다.

## 참 고 문 헌

1. Collins FM : In vivo vs in vitro killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Res Microbiol 1990;127:212-7.
2. Crowle AJ, May M : Preliminary demonstration of human tuberculoimmunity in vitro. Infect Immun 1981;31:453-64.

3. Ison CA, Anwer N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman RS, Klein NJ, West J, Pollard AJ, Morley S, Levin M : Assessment of immune response to meningococcal disease: comparison of a whole-blood assay and the serum bactericidal assay. *Microb Pathog* 1999;27:207-14.
4. Miles AA, Misra SS : The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg* 1938;38:732-49.
5. Wallis RS, Lederman HM, Spritzler J, Devers JL, Georges D, Weinberg A, Stehn S, Lederman MM : Measurement of induced cytokines in AIDS clinical trials using whole blood: a preliminary report. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:556-60.
6. Kampmann B, Gaora PO, Snewin VA, Gares MP, Young DB, Levin M : Evaluation of human antimycobacterial immunity using recombinant reporter mycobacteria. *J Infect Dis* 2000;182:895-901.
7. Wallis RS, Palaci M, Vinhas S, Hise AG, Ribeiro FC, Landen K, Cheon SH, Song HY, Phillips M, Dietze R, Ellner JJ : A Whole blood bactericidal assay for tuberculosis. *J infect Dis* 2001;183:1300-3.
8. American Thoracic Society, Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis, 12th edition, New York. National Tuberculosis and Respiratory Disease Association 1969:68.
9. Ratcliffe HL, Palladino VS : Tuberculosis induced by droplet nuclei infection. Initial homogeneous response of small mammals (rats, mice, guinea pigs, and hamsters) to humans and to bovine bacilli, and the rate and pattern of tubercle development. *J Exp Med* 1953;97:61-8.
10. Edwards D, Kirkpatrick CH : State of Art : The immunology of mycobacterial disease. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:1062-71.
11. Douvas GS, Looker DL, Vater AE, Crowle AJ :  $\gamma$ -interferon activates human macrophage to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immun* 1985;50:1-8.
12. Rook GAW, Steele J, Ainsworth M, Champion BR : Activation of macrophages to inhibit proliferation of mycobacterium tuberculosis: comparison the effects of recombinant  $\gamma$ -interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology* 1986;59:333-8.
13. Crowle AJ, Ross ER, May M : Inhibition by  $1,25(\text{OH})_2$ -vitamine- $\text{D}_3$  of the multiplication of virulent tubercle in cultured human macrophages. *Infect Immun* 1987;55:2945-50.
14. Rook GAW, Steel J, Fraher L, Baker S, Karmal R, O'Riordan J : Vitamin  $\text{D}_3$ , gamma interferon and control of proliferation of mycobacterium tuberculosis by human monocyte, *Immunology* 1986;57:159-63.
15. Denis M : Killing of mycobacterium tuberculosis within human monocytes : activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol* 1991;84:200-6.
16. Flesch IE, Kaufmann SHE : Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages. *Infect Immun* 1988;56:1464-9.
17. Bermudez LEM, Young LS : Tumor necrosis

- factor or in combination with IL-2, but not IFN- $\gamma$ , is associated with macrophage killing of mycobacterium avium complex. J Immunol 1988;140:3006-13.
18. Silver RF, Li Q, Boom WH, Ellner JJ : Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human monocytes : requirement for CD4<sup>+</sup> T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative subjects. J Immunol. 1998;160:2408-17.
  19. Ison CA, Heyderman RS, Klein NJ, Peakman M, Levin M : Whole blood model of meningococcal bacteremia—a method for exploring host-bacterial interactions. Microb Pathog 1995;18:97-107.
  20. Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA : Complement receptor mediated uptake and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated growth inhibition of mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophage. J Immunol 1994;152:743-52.
  21. Denis M, Gregg EO, Ghadirian E : Cytokine modulation of mycobacterium tuberculosis growth in human macrophages. Int J Immunopharmacol 1990;12(7):721-7.
  22. Schluger NW, Rom WN : State of Art : The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:679-91.
  23. Orme IM : The kinetics of emergence and loss of mediator T-lymphocyte acquired in response to infection with mycobacterium tuberculosis. J Immunol 1987;138(1):293-8.
  24. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR : Major histocompatibility complex class I-restricted T cells acquired for resistance to mycobacterium tuberculosis infection. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(24):12013-7.