

藥物反應의 診斷에 對한 軟層白血球 凝集檢査法の 應用에 關한 研究*

Application of the Buffy Coat Leucocyte Aggregation (BCLA) Test in Diagnosis of Drug Reaction

서울大學校 醫科大學 皮膚科學教室** 微生物學教室*** 臨床病理學教室****

金源錫** · 張友鉉*** · 趙漢翊**** · 李惟信** ·

金洪植** · 文基燦 · 愼鏞雨** · 李增燦**

緒 論

일부의 藥物反應, 接觸性過敏反應 및 투베르쿨린 過敏反應은 細胞免疫反應 機轉에 依하여 발생한다(Suzuki et al., 1978; Roitt, 1980).

細胞免疫反應의 生體內 檢査法으로는 藥物反應의 경우 皮內檢査法이나 再投藥에 依한 誘發法, 接觸過敏反應의 경우 貼布試驗法 및 투베르쿨린에서는 遲延型皮膚反應 檢査法이 사용되나 藥物反應의 경우에는 극히 제한된 약제에 대하여 조심스럽게 使用될 뿐이다(De Swarte, 1980). 試驗管内 檢査法은 淋巴球轉換檢査法(lymphocyte transformation test) (Whitney et al., 1972), 巨食細胞遊走抑制檢査法(macrophage migration inhibition test) (David et al., 1964) 白血球遊走抑制檢査法(leucocyte migration inhibition test) (Rocklin 1974) 등이 開發 이용되고 있으나 이들 檢査法은 藥物이나 接觸抗原에 對하여 널리 使用되지 못하고 있으며 試驗管内에서의 細胞 操作이 복잡하여 人爲的 實驗誤差가 생길 可能性이 크다.

最近 Nicholls(1974)는 투베르쿨린 PPD에 대한 皮內反應檢査成績과 試驗管内 全血 軟層白血球凝集檢査(buffy coat leucocyte aggregation test: 以下 BCLA檢査라 略함)에 의한 軟層白血球凝集(以下 BCLA라 略함)의 成績이 一致함을 관찰하고 이 檢査方法이 生體內的 條件과 가장 近似한 狀態에서 細胞免疫反應에 關여하는 모든 細胞의 機能을 總括的으로 檢査할 수 있는 簡便한 方法임을 報告하였고 이어서 Macleod等(1976), Hutchinson等(1976), Ford等(1977) 및 Kim等(1979)은 각각 nickel sulfate, mercuric chloride, KLH

및 투베르쿨린 PPD를 抗原으로 使用하여 BCLA檢査가 細胞免疫測定에 簡便하고 유용한 方法임을 確認하였다.

그러나 BCLA檢査의 機轉은 아직 不明하고(Nicholl, 1974; 張等, 1981) 臨床的 應用은 몇몇 抗原에 局限된 研究成績 밖에 없어 著者들은 藥物 或은 化學物質에 對한 過敏反應의 試驗管内 診斷法으로서의 有用性を 檢討確認하기 위하여 이 實驗을 試圖하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗對象

서울大學校病院에 入院한 患者中 病歷과 臨床所見으로 ampicillin에 의한 發疹性 藥物反應 患者가 確實한 5名の 患者와 서울大學校病院 皮膚科에 來院하여 臨床的으로 接觸過敏反應이라 診斷하고 貼布試驗을 實施하여 그 原因物質이 究明된 17名の 患者를 對象으로 하였다. 17名中 그 原因物質이 nickel sulfate인 경우가 7名, paraphenylenediamine인 경우가 4名, potassium dichromate와 mercuric chloride가 각각 3명이었다. 貼布試驗의 方法은 國際標準法(Fregert, 1974)에 依하였다.

對照群은 서울대학교 醫科大學 學生中 藥物反應이나 接觸過敏反應의 病歷이 없는 健康人 68名과 實驗對照群으로 투베르쿨린 PPD에 陽性을 보이는 3명의 皮膚科 醫局員을 選擇하였다.

2. 實驗材料

이 實驗에 使用된 抗原은 nickel sulfate(和光純藥), paraphenylenediamine(東京化成), potassium dichromate(東京化成), mercuric chloride(和光純藥) ampicillin sodium(鍾根堂) 및 tuberculin PPD(保健院)이었다.

3. 實驗方法

① 抗原의 準備: 各 抗原은 使用時 0.9% NaCl용액

* 本 研究은 서울大學校病院 研究費 補助로 이루어졌음.

Table 1. Results of the BCLA test to ampicillin in patients with ampicillin drug eruption

	No. of subjects	Concentration of ampicillin(mg/ml)						
		2.5×10	2.5×10^0	2.5×10^{-1}	2.5×10^{-2}	2.5×10^{-3}	2.5×10^{-4}	Saline
Patient	5	—	—	—	—	—	—	—
Control	18	—	—	—	—	—	—	—

Table 2. Results of the BCLA test to nickle sulfate in nickle-sensitive patients

	No. of subjects	Concentration of nickle sulfate(mg/ml)						
		2.5×10	2.5×10^0	2.5×10^{-1}	2.5×10^{-2}	2.5×10^{-3}	2.5×10^{-4}	Saline
Patient	7	*	*	—	—	—	—	—
Control	18	*	*	—	—	—	—	—

* Hemolysis and plaque formation of the leucocytes

Table 3. Results of the BCLA test to paraphenylenediamine in paraphenylenediamine-sensitive patients

	No. of subjects	Concentration of paraphenylenediamine(mg/ml)						
		2.5×10	2.5×10^0	2.5×10^{-1}	2.5×10^{-2}	2.5×10^{-3}	2.5×10^{-4}	Saline
Patient	4	*	*	—	—	—	—	—
Control	16	*	*	—	—	—	—	—

* Hemolysis of the leucocytes

으로 10배 倍數희석하여 그 농도가 $2.5 \times 10 \text{mg/ml}$ 에서 $2.5 \times 10^{-4} \text{mg/ml}$ 이 되도록 하였고 0.45μ 의 millipore filter로 투과하여 滅菌하였다. Tuberculin PPD는 10^{-2}mg/ml 및 10^{-3}mg/ml 의 두가지 농도를 사용하였다.

② BCLA檢査: BCLA檢査는 Kim等 (1979)의 方法에 準하였고 要約하면 다음과 같다. 靜脈血 7ml을 滅菌注射器로 採血하여 30IU heparin이 담긴 시험관에 옮겨 조심스럽게 混合한 다음 0.9ml을 抗原液 0.1ml이 담긴 시험관에 옮겨 혼합하고 室溫에서 5分間 200G로 遠沈하여 37°C 에서 18時間 保管한 후 BCLA를 肉眼의 으로 判讀하였다.

每實驗時 實驗對照群으로 tuberculin PPD皮內反應 陽性인 3名의 志願者에서 同一한 方法으로 BCLA檢査를 實施하였다.

實驗成績

Ampicillin sodium, nickel sulfate, paraphenylenediamine, potassium dichromate 및 mercuric chloride를 抗原으로 BCLA檢査를 實施한 成績은 Table 1, 2, 3, 4, 5에 要約하였다.

1. Ampicillin sodium

18名의 正常對照群과 5例의 ampicillin에 의한 發疹性 藥物反應 患者에서 BCLA檢査를 實施한 結果 어느 抗原濃度에서도 BCLA를 관찰할 수 없었다(Table 1).

2. Nickel sulfate

Nickel sulfate의 濃도가 $2.5 \times 10 \text{mg/ml}$ 및 $2.5 \times 10^0 \text{mg/ml}$ 에서는 18例의 正常對照群과 7例의 患者에서 모두 BCLA는 凝塊를 이루고 溶血이 일어나 適正濃度가 아님을 알았다. 그 以下の 濃度에서는 正常對照群 및 實驗群 모두 BCLA의 形成을 관찰할 수 없었다(Table 2).

3. Paraphenylenediamine

Paraphenylenediamine의 濃도가 $2.5 \times 10 \text{mg/ml}$ 및 $2.5 \times 10^0 \text{mg/ml}$ 에서는 16例의 正常對照群 및 4例의 實驗群에서 모두 BCLA는 凝塊를 이루고 溶血을 보여 判讀不能이었다. 그 以下の 濃度에서는 對照群 및 實驗群 全例에서 BCLA의 形成을 관찰할 수 없었다(Table 3).

4. Potassium dichromate

Potassium dichromate의 濃도가 $2.5 \times 10 \text{mg/ml}$ $2.5 \times 10^0 \text{mg/ml}$, 및 $2.5 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ 에서는 正常對照群 8例와 實驗群 3例에서는 BCLA 凝塊와 溶血을 보여 適正濃度가 아님을 알았다. 그 以下の 濃度에서는 對照群 및 實驗群 全例에서 BCLA의 形成을 관찰할 수 없었다(Table 4).

5. Mercuric chloride

Mercuric chloride의 濃도가 $2.5 \times 10 \text{mg/ml}$ 및 $2.5 \times 10^0 \text{mg/ml}$ 에서는 8例의 正常對照群과 3例의 實驗群에서 BCLA는 凝塊와 溶血을 보여 適正濃度로 判定하지 않았다. 그 以下の 濃度에서는 對照群 및 實驗群 全例에서 BCLA의 形成을 관찰되지 않았다(Table 5).

Table 4. Results of the BCLA test to potassium dichromate in potassium-sensitive patients

	No. of subjects	Concentration of potassium dichromate(mg/ml)						
		2.5×10	2.5×10^0	2.5×10^{-1}	2.5×10^{-2}	2.5×10^{-3}	2.5×10^{-4}	Saline
Patient	3	*	*	*	—	—	—	—
Control	8	*	*	*	—	—	—	—

* Hemolysis of the leucocytes

Table 5. Results of the BCLA test to mercuric chloride in mercury-sensitive patients

	No. of subjects	Concentration of mercuric chloride(mg/ml)						
		2.5×10	2.5×10^0	2.5×10^{-1}	2.5×10^{-2}	2.5×10^{-3}	2.5×10^{-4}	Saline
Patient	3	*	*	—	—	—	—	—
Control	8	*	*	—	—	—	—	—

* Hemolysis and plaque formation of the leucocytes

6. 對照實驗群인 tuberculin-PPD 陽性群은 모든 實驗을 통하여 tuberculin PPD의 농도가 10^{-2} mg/ml 및 10^{-3} mg/ml에서 ++ 또는 +++의 BCLA를 보였다.

總括 및 考案

Nicholls(1974)는 BCLA 檢査法이 細胞免疫의 試驗管內 測定方法中 既存의 다른 檢査法에 比하여 人爲的인 誤差가 적고 特異성과 再現성이 높은 檢査方法임을 報告한 以來 Macleod等(1976)은 nickel sulfate를 抗原으로 使用하여 nickel過敏反應 患者의 試驗管內 診斷法으로 使用된 可能性을 示唆하였고 Hutchinson等(1976)은 mercuric chloride를 抗原으로 BCLA 檢査를 實施한 成績이 同一 抗原에 對한 淋巴球轉換檢査 成績과 一致함을 確認 하였다. 著者들(1979)도 tuberculin PPD 抗原에 對한 BCLA 檢査成績과 生體內的 皮內反應 成績이 相關關係를 가진다는 것을 究明한바 있으나 아직까지 tuberculin PPD, nickel sulfate, mercuric chloride 및 KLH 등 少數의 抗原을 使用한 BCLA 檢査 以外的 研究는 文獻上 報告된 바 없다.

著者들은 BCLA 檢査法이 藥物反應 또는 化學物質에 對한 接觸過敏反應의 試驗管內 診斷法으로 利用될 수 있는 可能性을 檢討하기 위하여 ampicillin에 대한 發疹性 藥物反應 患者와 nickel sulfate, paraphenylenediamine, potassium dichromate 및 mercuric chloride에 대한 接觸過敏反應 患者를 對象으로 本實驗을 試圖하였다.

Ampicillin에 의한 發疹性 藥物反應을 일으킨 5例에서 ampicillin sodium을 抗原으로 여러가지 濃度에서 BCLA 檢査를 實施하였으나 正常對照群에서와 같이

BCLA의 形成을 관찰할 수 없었다. Ampicillin에 의한 發疹性 藥物反應의 機轉은 아직 不明하며 一部는 過敏反應 一部는 非過敏反應으로 생각되나(DeSwarte, 1980) 過敏反應機轉에 의한 다 하더라도 體液免疫과 細胞免疫중 어느 機轉이 관여하는지는 分明하지 않다. BCLA 檢査法은 細胞免疫 뿐만 아니라 體液免疫의 測定에도 有用하다고 하였으나(Ford et al., 1977) Kim等(1979)은 penicillin에 의한 即時型過敏反應 患者에서 penicillin sodium을 抗原으로 BCLA 檢査를 施行하였던 바 BCLA의 形成을 觀察할 수 없었다. 이러한 成績들로 미루어 비록 ampicillin에 의한 發疹性 藥物反應이 免疫反應이라 하더라도 BCLA 檢査로는 測定할 수 없다는 것을 確證할 수 있다. 또 Suzuki(1978)等은 藥物反應 患者에서 特定 藥物로 淋巴球轉換檢査를 實施할 때 皮膚組織의 可溶性蛋白質成分을 添加하여야만 淋巴球轉換이 일어난다고 하여 BCLA 檢査와 같이 單純히 藥物과 全血단의 反應으로는 BCLA가 形成되지 않으리라는 事實을 뒷받침하므로 앞으로 BCLA 檢査法은 藥物反應의 診斷에 利用하려면 方法의 修正이 必要하다고 생각된다.

Nickel sulfate에 對한 BCLA 檢査成績도 nickel sulfate에 陽性 貼布反應을 보인 實驗群이나 正常對照群에서 모두 BCLA의 形成을 觀察할 수 없었다. 著者들의 實驗에서 nickes sulfate의 濃度가 높은 경우에는 BCLA가 完全히 凝塊를 이루거나 溶血이 발생하여 適正濃度가 이남을 알았고 Macleod等(1976)도 0.5mg/ml 이나 1mg/ml의 濃度에서는 溶血과 粗大한 BCLA가 形成되어 適正濃度에 있어서 著者의 成績과 一致하였다. 그러나 Macleod等(1976)은 0.2mg/ml 以下の nickel sulfate溶液의 濃度에서는 濃度가 높을 수록

BCLA의 형성이 현저히 증가한다고 하여 著者들의 成績과는 完全히 相異한 結果를 얻었다. Macleod等 (1976)은 BCLA를 관찰할 때 軟層白血球를 硝子板에 塗抹하여 顯微鏡下에서 관찰하였으며 著者들은 직접 肉眼的으로 관찰하였기 때문에 成績의 差異는 관찰방법에 따른 結果라고 생각할 수 있다. 그러나 Kim等 (1979)은 이미 tuberculin PPD抗原을 사용한 BCLA檢査에서 肉眼的의 判讀法과 顯微鏡의 判讀法의 成績이 一致함을 確認하였고 顯微鏡의 判讀法은 오히려 非特異的의 白血球 凝集을 잘못 判讀할 수 있는 可能性을 指摘한 바 있다. 이에 따라 Macleod等 (1976)의 實驗成績은 이러한 非特異的의 白血球 凝集을 BCLA로 잘못 判讀하였다고 생각된다. 또한 著者들은 本實驗에서 每實驗時 tuberculin PPD 陽性인 實驗對照群에서 BCLA檢査를 同時에 施行하여 BCLA의 形成을 確認하였기 때문에 著者들의 判讀法은 正確하다고 생각한다.

Paraphenylenediamine, potassium dichromate 및 mercuric chloride에 對한 BCLA檢査도 nickel sulfate와 마찬가지로 이들 抗原에 對한 接觸過敏反應을 일으킨 患者群이나 正常對照群에서 모두 BCLA의 形成을 관찰할 수 없었다.

接觸過敏反應은 투베르쿨린 過敏反應과 마찬가지로 細胞免疫反應에 의하여 發生하나 BCLA檢査로 測定되지 않는 理由는 다음과 같이 생각된다. 즉 接觸過敏反應을 일으키는 抗原物質은 대부분 非蛋白性 低分子化合物로서 皮膚組織의 特定 蛋白成分과 結合하여야만 完全한 抗原性을 가지기 때문에 (Fregert 1974) 藥物反應에서와 마찬가지로 試驗管内에서 단순히 抗原과 全血만의 直接 反應으로는 BCLA가 形成되지 않으리라 推定된다. 또한 BCLA의 構成細胞는 主로 多核白血球이며 少數의 淋巴球과 巨食細胞임이 관찰되었고 淋巴球培養 上層液이 BCLA를 陽性으로 轉嫁함이 確認되었으나(張等 1981) 淋巴球에서 生成된 可溶性因子(soluble factor)가 어떤 機轉으로 BCLA를 形成하는지는 不明하다. Nicholls (1974)는 抗原에 感作된 淋巴球에서 白血球에 對한 化學走性因子가 生成되어 淋巴球 주위에 多核白血球와 巨食細胞를 誘導하여 BCLA를 形成하거나 生成分泌된 化學走性因子가 多核白血球의 表面粘度를 높히 淋巴球와는 關係 없이 BCLA를 形成하리라고 推定하였다. 또한 투베르쿨린의 體內反應에서는 反應 초기에 單核球가 나타나고 그 주위에 多核白血球와 巨食細胞가 유도되는 사실로 (Roitt, 1980) 미루어 보아 아마도 BCLA의 形成은 感作淋巴球를 중심으로 多核白血球와 巨食細胞가 凝集된다고 생각되며 發疹性藥物反應이나 接觸過敏反應에서는 生

體內에서도 反應過程에서 多核白血球가 나타나지 않기 때문에 (Baer et al., 1979; Ackerman, 1978) BCLA檢査는 아마도 細胞免疫反應 중에서도 感作淋巴球가 白血球의 化學走性因子를 生成分泌하는 경우에만 可能하다고 생각된다.

結 論

軟層白血球凝集檢査法 藥物反應이나 接觸過敏反應의 特定 抗原을 밝히는데 利用될 수 있는 可能性을 究明하기 위하여 ampicillin에 의한 發疹性藥物反應 患者 5例 및 nickels ulfate, paraphenylenediamine, potassium dichromate와 mercuric chloride에 接觸過敏反應을 보인 17例를 對象으로 試驗한 結果 이 檢査法은 이들 抗原의 試驗管内 檢査法으로 利用될 수 없음을 確認하였다.

—ABSTRACT—

Application of the Buffy Coat Leucocyte Aggregation (BCLA) Test in Diagnosis of Drug Reaction

W.S. Kim,* W.H. Chang,** H.I. Cho.,***
Y.S. Lee,* H.S. Kim,* K.C. Moon,*
Y.W. Cinn,* and J.H. Lee.*

Departments of Dermatology*, Microbiology** and
Clinical Pathology,*** College of Medicine
Seoul National University

Buffy coat leucocyte aggregation (BCLA) in the presence of a specific antigen was suggested a simple, sensitive and highly reproducible in vitro method to test the cell-mediated immunity to certain antigens. The cell-mediated immune response is known to be responsible for certain exanthematous drug reaction and contact hypersensitivity to chemicals.

The present study was undertaken to evaluate the BCLA test as a possible in vitro diagnostic aid to detect the drug reactions and contact hypersensitivity to certain chemicals. Twenty-two patients with ampicillin drug eruption, contact dermatitis to nickel sulfate, paraphenylenediamine, potassium dichromate and mercuric chloride and 68 control subjects entered this study. The method of the BCLA test was same

as described by the authors elsewhere (1979). At various concentrations of eah antigen ranging from 2.5×10 to 2.5×10^{-4} mg/ml, none of the patients and the control subjects showed the BCLA.

The authors concluded that in these antigen systems the BCLA test could not be a diagnostic method. The possible mechanism of this negative results was discussed.

REFERENCES

- Ackerman, A.B.: *Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases. A method by pattern analysis. Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 196-197, 1978.*
- Baer, R.L. and Gigli, I.: *Allergic eczematous contact dermatitis. In Dermatology in General Medicine. Fitzpatrick, T.B. et al. (eds), New York, McGraw Hill Book Co., pp. 512-519, 1979.*
- 장우현 · 최명석 · 김익상 · 김원석 · 신용우 · 이유진 : 연
충백혈구 응집반응의 기전. 서울의대잡지, 22(2):
221-227, 1981.
- David, J.R., Al-Askari, S., Lawrence H.S. and Thomas, L.: *Delayed hypersensitivity in vitro. I. The specificity of cell migration by antigen. J. Immunol., 93: 264-273, 1964.*
- DeSwarte, R.D.: *Drug Allergy. In Allergic Diseases. Diagnosis, and Management. Patterson, R. (ed), 2nd., Philadelphia. J.B. Lippincott Co., pp. 452-583, 1980.*
- Ford, P.M., Ford, S.E. and Gibson, J.: *Evaluation of antigen-induced buffy coat aggregation as a simple test of allergic reactivity. Int. Archs. Allergy appl. Immun., 53: 56-61, 1977.*
- Fregert, S.: *Manual of contact dermatitis. Copenhagen. Munksgaard, pp. 48-59, 1974.*
- Hutchinson, F., Macleod, T.M. and Raffle, E.J.: *Leucocyte aggregation and lymphocyte transformation induced by mercuric chloride. Clin. Exp. Immunol., 26: 531-533, 1976.*
- Kim, W.S., Cinn, Y.W., Lee, Y.S., Chang, W.H. and Kim, I.S.: *A study of the buffy coat leucocyte aggregation test. J. Dermatol., 6: 337-341, 1979.*
- Macleod, T.M., Hutchinson, F. and Raffle, E.J.: *Leucocyte aggregation in subjects with nickel dermatitis. Clin. Exp. Immunol., 26: 528-530, 1976.*
- Nicholls, E.M.: *Aggregation of buffy coat leucocytes. A simple sensitive assay for cell-mediated immunity. Clin. Exp. Immunol., 17: 673-680, 1974.*
- Rocklin, R.E.: *Products of activated lymphocytes: Leucocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migratory factor (MIF). J. Immunol., 112: 1461-1466, 1974.*
- Roitt, I.M.: *Essential Immunology. 4th ed., Oxford., Blackwell Scientific Publications, p. 241, 1980.*
- Suzuki, S., Asai, Y., Hamada, T., Mizoguchi, Y. and Morisawa, S.: *Drug-induced lymphocyte transformation in peripheral lymphocytes from patients with drug eruptions. Dermatologica, 157: 146-153, 1978.*
- Whitney, R.B. and Sutherland, R.M.: *Requirement of calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin. J. Cell. Physiol., 80: 329-338, 1972.*