

연층백혈구 응집반응의 기전

The Mechanism of Buffy Coat Leucocyte Aggregation Reaction

서울대학교 의과대학 미생물학교실* 및 피부과학교실

장우현* · 최명식* · 김익상* · 김원석 · 신용우 · 이유신

서 론

시험관내 방법을 이용한 특정항원에 대한 세포성면역반응의 측정은 세포성면역반응과 관계된 질환의 진단 및 치료를 용이하게 할 뿐 아니라 세포성면역반응의 작용기전을 이해하는 데에도 커다란 도움을 줄 것으로 기대되며 최근까지 림프구 변환법(Whitney(1974), 거식세포유주저지법(David et al, 1964, Rocklin et al, 1974) 백혈구 유주저지법(Rocklin et al, 1974) 등이 개발되어 이용되고 있다.

그러나 이들 방법들은 경제적인 문제점외에 시행상에도 많은 어려움을 지니고 있어 특이적이고도 간편한 숙주의 세포성면역반응의 실험관내 측정방법이 요구되고 있다.

최근 Nicholls등(1974) 및 김등(1979)은 사람의 말초혈액에 PPD를 작용시켜 나타난 연층백혈구응집반응이 세포성면역반응에 의해 특이적으로 유발되는 반응임을 관찰하고 이 반응이 특정항원에 대한 숙주의 세포성면역상태를 측정하는데 이용될 수 있음을 보고한 바 있으며 Macleod등(1976) 및 Hutchinson등(1976)도 각각 니켈황산염과 염화수은을 사용하여 특이적인 연층백혈구 응집반응을 관찰, 연층백혈구응집반응이 특정항원에 대한 숙주의 세포성면역상태를 측정할 수 있는 특이적이며 간편한 방법이라 보고하였다.

그러나 연층백혈구응집반응의 기전에 대해서는 정확히 알려진 바 없으며 Ford등(1977)은 KLH와 quinine을 사용하여 연층백혈구응집반응은 세포성면역반응 뿐만 아니라 체액성면역반응에 의해서도 나타날 수 있다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 연층백혈구응집반응의 본태 및 기전을 알아보고서 투베르쿨린반응검사와 연층백혈구응집반응을 실시하여 두 반응을 비교, 분석하고 연층백혈구응집반응의 특성을 조사하여 그 성적을 보고하는 바이다.

* 본 연구는 1980년도 삼일문화재단 연구비의 보조로 이루어졌음.

재료 및 방법

1. 실험대상 : 서울대학교 의과대학 학생중 지원자 64명을 대상으로 투베르쿨린반응 검사와 연층백혈구응집반응을 각각 실시하였다.

2. 항원 : PPD원액을(Lot No: 10, Batch: RT23, 50,000TU/ml Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark) RPMI 1640(GIBCO)으로 희석하여 사용하였다.

3. 항응고제처리 : 헤파린(Ricker Laboratory)을 RPMI 1640로 200u/ml되게 희석하여 혈액 1ml당 10 μ 가 되게 처리하였다. ACD용액은 미국국립보건원의 A공식의 용액의 5배 농축액을 제작하여 혈액10ml당 0.5ml의 5배 농축 ACD 용액으로 처리하였으며 EDTA는 RPMI 1640 1ml에 20mg을 녹인후 혈액 10ml당 0.5ml씩 처리하였다.

4. 투베르쿨린반응검사 : PPD 5TU를 상완부피부내에 주사하여 48시간후 주사부위의 경결을 측정하였다.

5. 연층백혈구응집반응 : 헤파린처리 말초혈액(10 μ /ml) 0.9ml에 1024TU에서 16TU까지 2배계단희석한 PPD 및 5TU PPD 0.1ml을 각각 14mm 시험관에 넣어 조심스럽게 혼합한 후 1,000 RPM 5분 원심분리한 후 37°C에서 24시간 작용시켜 연층에 응괴생성 유무를 육안으로 판독하였다. 대조군으로는 헤파린처리 말초혈액 0.9ml에 RPMI 1640 0.1ml을 가한 군과 헤파린처리 말초혈액 1ml만을 넣은 것을 사용하였다.

6. 림프구 분리 및 배양법 : 말초혈액에서의 림프구 분리는 Ficall-Hypdque(1.077)를 이용하여 B ϕ yum(1976)의 방법으로 시행하였으며 세포 부유액은 10% fetal calf serum과 penicillin이 100u/ml 및 streptomycin이 10 μ g/ml되게 넣은 RPMI 1640에 2~3 \times 10⁶세포/ml되게 제조하여 10% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 세포 생사 여부는 Trypan blue exclusion방법으로 확인하였다.

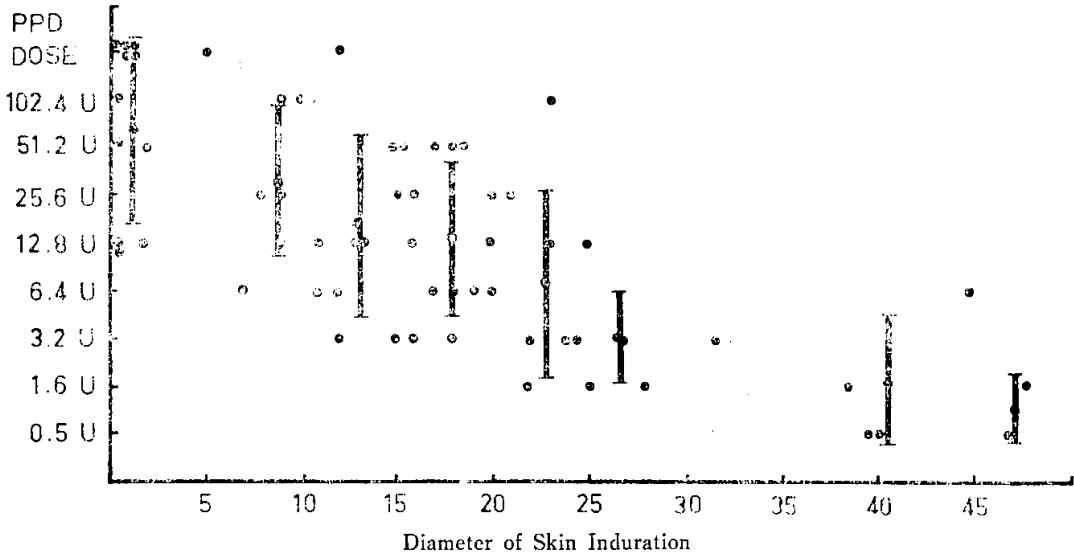


Fig. 1. Correlation between BCLA reaction and tuberculin reaction.

실험 결과

1. 투베르클린반응과 연충백혈구응집반응의 상관관계 : 투베르클린반응과 연충백혈구응집반응의 상관관계를 알아보기 위하여 투베르클린반응과 연충백혈구응집반응을 각각 실시하여 그 결과를 그림 1에 표시하였다. 그 결과 피부경결직경이 큰 대상에서는 작은단위의 PPD에 의해서도 응집이 일어나나 피부경결직경이 작은 대상에서는 많은 단위의 PPD가 응집에 요구되는 경향을 보였으며 이들 사이의 상관계수는 -0.648 ($p < 0.005$)이었다. 한편 피부경결직경이 5mm 증가되면 PPD요구단위가 1/2로 줄어드는 경향이 있는것으로 보인다. (그림 1참조)
2. 연충백혈구응집반응의 최적온도 : 연충백혈구응집반응의 최적온도를 결정하기 위하여 반응온도를 4°C에서 45°C까지 약 2°C 간격으로하여 연충백혈구응집반응을 시행하여 각 온도별 응집여부와 응집이 이루어지는 시간을 측정한 결과 27°C~41°C까지 모두 일어났으나 37°C에서 4~6시간으로 가장 빨리 응집이 형성되어 연충백혈구응집반응의 최적온도는 37°C임을 알 수

있었다. (표 1).

3. 연충백혈구응집반응에 대한 항응고제의 영향 : 연충백혈구응집반응에 사용하는 항응고제가 미치는 영향을 알아보기 위하여 연충백혈구응집반응에서 강, 중, 약 양성 및 음성을 보인 사람의 혈액을 ACD용액, EDTA 및 헤파린등 여러 항응고제로 처리하여 연충백혈구응집반응을 시행하였다. 표2에서 보는 바와 같이 칼슘이온을 직접 제거하여 항응고작용을 하는 ACD용액이나 EDTA로 처리한 혈액에서는 연충백혈구응집이 일어나지 않았으나 헤파린으로 처리한 혈액에서는 예측된 PPD량에서 연충백혈구응집 반응이 재현되었다.
4. 연충백혈구응집반응에 대한 칼슘이온의 영향 : 연충백혈구응집반응에 대한 항응고제의 영향을 본 결과, 칼슘이온을 제거하는 ACD용액이나 EDTA로 처리한 혈액은 연충백혈구응집반응이 강양성인 입에도 불구하고 연충백혈구응집이 일어나지 않았으므로 연충백혈구응집에 칼슘이 필요할 것이라는 추측하여 EDTA로 처리한 혈액에 칼슘이온을 100ml당 7mg되게 첨가한 후 연충백혈구응집반응을 시행한 결과 칼슘이온을 첨가하지 않았던 경우에는 연충백혈구응집이 일어나지 않았던 혈액에서 연충백혈구응집이 일어남을 관찰하였다. 한

Table 1. Optimal temperature of buffy coat leucocyte aggregation reaction

	Temperature incubated(°C)												
	4	15	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43	45
Aggregate	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Reaction time (hrs)					10		9~10		4~6		10~11		

Table 2. Effect of anticoagulants on buffy coat leucocyte aggregation reaction

Blood from	Blood treated with	Amount of PPD. (Unit)				Control
		102.4	51.2	12.8	3.2	
Strong positive	ACD	—	—	—	—	—
	EDTA	—	—	—	—	—
	Heparin	+	+	+	+	—
Moderate positive	ACD	—	—	—	—	—
	EDTA	—	—	—	—	—
	Heparin	+	+	+	±	—
Weak positive	ACD	—	—	—	—	—
	EDTA	—	—	—	—	—
	Heparin	+	±	—	—	—
Negative	ACD	—	—	—	—	—
	EDTA	—	—	—	—	—
	Heparin	—	—	—	—	—

Table 3. Effect of Ca²⁺ on buffy coat leucocyte aggregation reaction

	Treated with				
	RPMI	Whole blood only	PPD	PPD+EDTA	PPD+Heparin
Heparinized blood	—	—	+	N.D	N.D
EDTA treated blood	—	—	—	N.D	N.D
Ca ²⁺ restored EDTA treated blood	—	—	+	—	+

N.D: not determined

Table 4. Positive conversion of the negative BCLA reaction by transfer of the supernatant from positive BCLA reactor's lymphocyte culture with PPD

	Negative BCLA reactor's blood incubated with							
	SP [#] -6	SP-12	SP-24	SP-48	SP-72	S*-24	PPD	RPMI
BCLA reaction	+	+	++	++	+	—	—	—

0.9ml negative BCLA reactor's blood was incubated with 0.4ml supernatant of lymphocyte culture, PPD or RPMI for 18 hours at 37°C.

#Supernatant collected from the positive reactor's lymphocyte culture with PPD.

*Supernatant collected from the positive reactor's lymphocyte culture without PPD.

Each number represent the incubation period for lymphocyte culture(hours)

편 칼슘을 첨가한 EDTA처리혈액을 재차 EDTA및 헤파린으로 처리하여 연홍백혈구응집반응을 시행한 결과 대조군인 재차 헤파린으로 처리한 경우에는 연홍백혈구응집이 일어났으나 재차 EDTA로 처리한 경우에는 연홍백혈구응집이 일어나지 않았다. 따라서 연홍백혈구응집반응은 칼슘이온을 필요로 하는 반응임을 알 수 있었다.

5. 연홍백혈구응괴의 구성세포 : 연홍백혈구응괴의 구성세포를 알기위하여 연홍백혈구응집이 일어난 혈액을 조심스럽게 흔들어 만든 슬라이드 도말표본과 연홍백혈구응괴를 연속 절편하여 경검한 소견을 보면 그림에서 보는바와 같이 다핵구가 연홍백혈구응괴의 대부분을 구성하는 세포이며 소수의 림프구와 거식세포가 산재해 있음을 알 수 있었다.

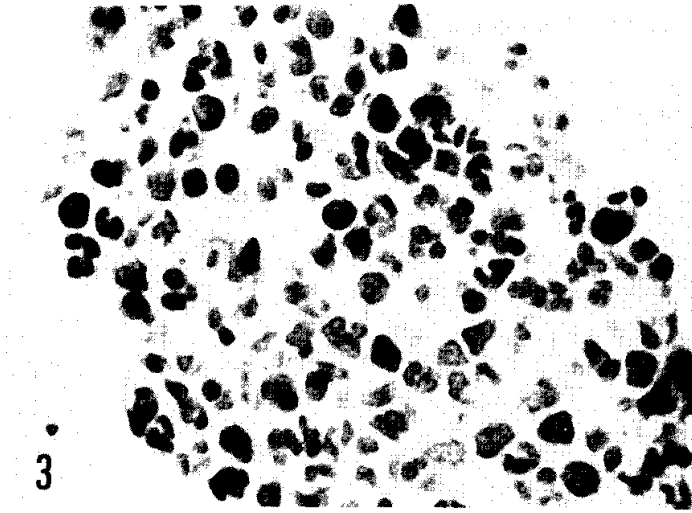


Fig. 3. Thin section of the buffy coat leucocyte aggregates show many polymorphonuclear leucocytes and a few monocytes and lymphocytes (Wright staining, $\times 980$).

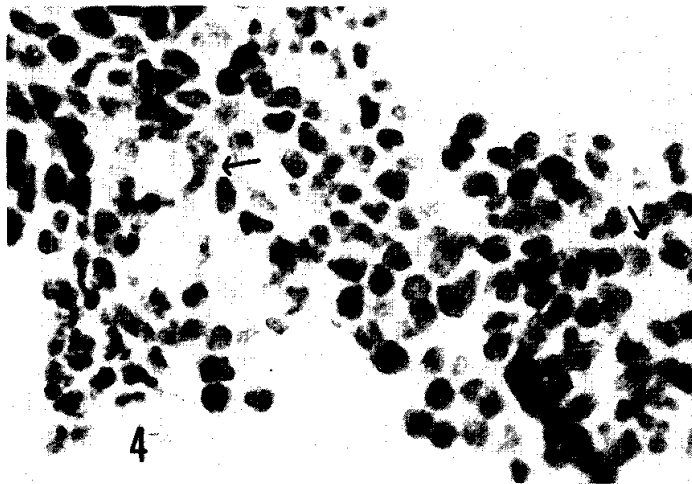


Fig. 4. Center of the aggregate shows polymorphonuclear leucocytes tend to be attached around the monocyte. Arrows indicate the monocyte (Wright staining, $\times 980$).

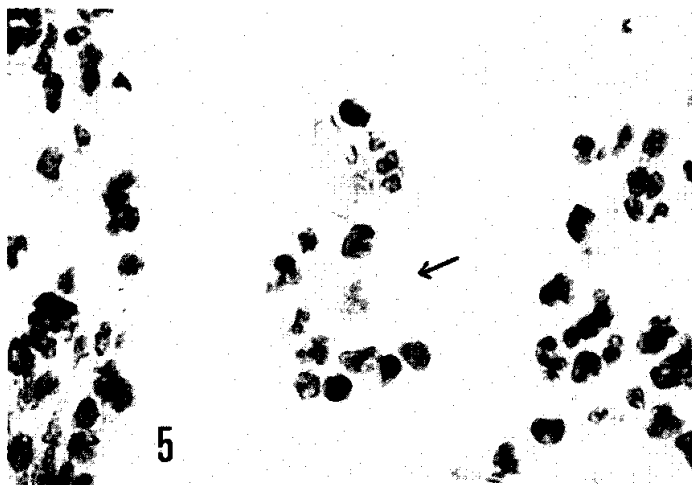


Fig. 5. Thin section of the small aggregate shows clearly the monocytes are surrounded with polymorphonuclear leucocytes (Wright staining, $\times 930$).

또한 연속절편에서 응괴의 중심부를 보면 거식세포 주위에 다핵구가 모여 있는 경향이 있는 것을 볼 수 있었다(그림 4, 5 참고).

6. PPD감작림프구 배양상층액에 의한 음성연총백혈구응집의 양성전환: 감작림프구 배양액에 존재하리라고 예상되는 가용인자가 연총백혈구응집반응을 양전시킬 수 있는가를 알아보기 위하여 연총백혈구응집반응에서 양성을 보인 사람에서 분리한 림프구를 PPD와 함께 6시간에서 72시간까지 배양한 배양액의 상층액을 연총백혈구응집반응에서 음성을 보인 사람의 현액에 가하여 연총백혈구응집반응을 시행하여 얻은 결과를 표 4에 표시하였다. 그 결과 6시간에서 72시간 배양한 배양액의 상층액을 전달한 실험군 모두에서 음성의 연총백혈구응집반응이 양성으로 전환되었고 대조군으로 PPD를 가하지 않고 배양한 림프구 배양액을 전달한 경우에는 음성연총백혈구응집반응의 양성으로의 전환이 일어나지 않았다. 위의 결과에서 연총백혈구응집반응에 가용인자가 관여하며 가용인자는 PPD자극 6시간후에 이미 배양 상층액에 존재하며 72시간후에도 상층액에 존재함을 알 수 있었다.

고 안

Nicholls(1974)가 세포성면역반응의 시험관내 측정 방법으로 제시한 연총백혈구응집반응은 이제까지 알려진 임파구변환법(Whitney(1974), 거식세포유주저지법(David et al, 1964; Rocklin et al., 1974) 및 백혈구 유주저지법(Rocklin et al, 1974)등에 비해 체외에서의 세포조작이 적어 인공오차가 적을 뿐 아니라 조작이 간편한 장점을 지니고 있어 여러 항원에 대한 숙주의 세포성면역반응을 측정할 수 있는 중요한 방법으로 주목되고 있다.

연총백혈구응집반응의 기전에 대해 Nicholls(1974)는 특이항원에 의해 감작된 림프구가 분비한 백혈구구성인자가 다핵구와 거식세포를 주위로 유도하여 림프구를 중심으로 응괴를 일으키거나 림프구가 분비한 백혈구 구성응집인자가 직접 다핵구의 표면에 작용하여 다핵구표면전도를 높여 림프구를 포함하지 않고 다핵구와 거식세포의 응괴를 일으키는 것으로 추측하고 있으나 아직 정확한 기전은 밝혀진 바 없다.

피부반응적경과 연총백혈구응집에 요구되는 최소 PPD양을 측정, 분석한 본 실험결과에서 피부반응적경과 연총백혈구응집반응에 요구되는 최소 PPD양과의 사이에는 $-0.648(p<0.005)$ 의 상관관계가 관측되었으며 이는 연총백혈구응괴수와 피부반응적경과의 상관관

계를 규명한 Nicholls(1974) 및 Ford등(1977)의 결과와 함께 연총백혈구응집반응이 지연성 과민반응을 시험관내 반응으로 반영된 것임을 나타내고 있다.

연총백혈구응집반응은 27°C에서부터 41°C까지 비교적 넓은 온도범위내에서 관찰되었으나 반응시간은 37°C에서 4~6시간으로 가장 짧아 37°C가 연총백혈구응집반응에 가장 적합한 것으로 판정되었다. 연속절편을 통해 확인한 연총백혈구응집의 구성세포는 주로 다핵구였으며 소수의 림프구와 거식세포가 관찰되었다. 다핵구와 소수의 림프구, 거식세포가 어떤 기전을 통하여 응괴를 이루는가는 본 실험에서 정확히 밝힐 수는 없으나 PPD와 반응시에도 연총백혈구응집반응이 일어나지 않았던 연총백혈구응에 PPD로 감작된 림프구의 배양상층액을 넣어 준 경우 연총백혈구응집반응이 일어난 본 실험결과로 볼 때 PPD에 의해 감작된 림프구에서 분비된 가용인자가 다핵구에 작용하여 일어나는 현상임을 알 수 있었다. 말초혈액을 ACD용액이나 EDTA용액으로 처리하여 Ca^{++} 를 제거하였을 경우 연총백혈구응집반응이 일어나지 않았으나 Ca^{++} 의 재첨가로 연총백혈구응집반응이 일어난 실험결과에서 Ca^{++} 이 연총백혈구응집반응에 필수적인 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

감작림프구에서 배양 6시간이후부터 증명되는 연총백혈구응집 유발인자는 이물질도 림프킨의 일종일 것이라는 점을 고려할 때 Bennett등(1967)이 보고한 거식세포유주억제인자 출현시간이 6시간이라는 점과 일치하고 있으며 그 작용기전으로는 PPD 양성인 기니픽의 복강세포를 항원자극없이 일단유주시킨후에 PPD와 반응시키는 경우 유주되어 있던 복강세포들이 서로 응집을 일으킨다는 David등(1964)의 결과와 거식세포유주억제인자처리 거식세포나 다핵구는 강음전부하하에서 세포간의 반발을 유지시키는 당단백의 세포 피복이 특이하게 소실되어 서로 응집을 일으키리라는 Dvorak(1972)등의 관찰로 미루어 볼 때 연총백혈구응집 유발인자가 직접 다핵구표면에 작용하여 다핵구의 표면전도를 변화시켜 다핵구의 응집을 유발시키는 것으로 추측되나 이에 대한 앞으로의 연구가 필요하다 하겠다. 연총백혈구응집반응에 있어서 Ca^{++} 이 어느 단계에 작용하는가는 본 실험에서는 규명되지 않았으나 Alford(1970), 및 Whitney등(1972)에 의해 밝혀진 바와 같이 림프구의 phytohemagglutinin에 대한 반응초기에 나타나는 RNA합성이 Ca^{++} 이 없는 상황하에서는 일어나지 않으며 따라서 Ca^{++} 이 림프구변환에 중요한 역할을 한다는 사실과 Concanavalin A에 의한 림프구 활성화에 있어서 세포외액에 있는 Ca^{++} 이 세포내로 들어가 세포내

에서의 DNA합성에 중요한 역할을 담당한다는 Freedman(1979) 등의 결과로 볼 때 연충백혈구응집반응에서도 Ca^{2+} 이온이 PPD자극에 의한 감작림프구의 활성화에 관여하여 연충백혈구응집을 유발하는 인자를 만든데 관여할 것으로 추측된다.

총괄

연충백혈구응집반응의 기전을 밝히고자 튜베르쿨린반응점사와 연충백혈구응집반응을 실시, 비교하고 연충백혈구응집반응의 특성을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 튜베르쿨린반응과 연충백혈구응집반응 사이에는 높은 상관관계가 있었다($r = -0.648, p < 0.005$).
2. 연충백혈구응집반응의 최적온도는 $37^{\circ}C$ 였으며 반응출현시간은 4~6시간이었다.
3. 연충백혈구응집반응은 Ca^{2+} 을 필요로 하는 반응이었다.
4. 응집된 세포는 주로 다핵구였으며 소수의 림프구와 거식세포가 존재하였다.
5. PPD자극 림프구 배양상층액에 의해 음성 연충백혈구응집반응이 양성 전환되어 가용인자가 관여함을 알 수 있었다.

—ABSTRACT—

The Mechanism of Buffy Coat Leukocyte Aggregation Reaction

Woo Hyun Chang*, Ik Sang Kim*, Myung Sik Choi*, Won Suk Kim, Yong Woo Cinn and Yoo Shin Lee

Department of Microbiology and Dermatology, College of Medicine, Seoul National Univeisity

Nicholls claimed that buffy coat leucocyte aggregation(BCLA) reaction was the simple and sensitive test for cell-mediated immunity. Thereafter, some clinical approaches were performed by several investigators. However the mechanism of human BCLA reaction was not studied in detail, This study was designed to clarify some factors involved in the mechanism of BCLA reaction and results are summarized as follows.

1. The strong correlation was observed between

minimal amounts of PPD required for BCLA reaction and skin induration diameter of tuberculin reaction (correlation coefficient = $-0.648, p < 0.005$)

2. Optimal temperature of BCLA reaction was $37^{\circ}C$ and reaction time was 4 to 6 hours.

3. Calcium ion was essential for BCLA reaction.

4. Cellular composition of aggregates was mostly of polymorphonuclear leukocytes and partly of lymphocytes and monocytes.

5. BCLA reaction appeared to be mediated by solublefactor released from sensitized lymphocyte.

REFERENCES

Alford, R.H.: *Metal cation requirments for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocyte. J. Immunol.*, **104**:698, 1970.

Bennett, B. and Bloom. B.R.: *Studies on the migration inhibitory factor associated with delayed-type hypersensitivity: cytodynamics and specificity. Transplantation*, **5 (suppl)**:996, 1967.

Bøyum, A.: *Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages, Scand. J. Immunol.*, **5(suppl)**:5, 1976.

Cohen, S., Pick, E. and Oppenheim J.J. eds: *Biology of the lymphokine. Academic Press, New York*, p. 72, 1979.

David, J.R., Al-Askari, S., Lawrence, H.S. and Thomas, L.: *Delayed hypersensitivity in vitro I. The specificity of inhibition of cell migration by antigen. J. Immunol.*, **93**:264, 1964.

Dvorak, A.M., Hammond, M.E., Dvorak, H.F. and Karnovsk, M.J.: *Loss of cell surface material from peritoneal exudate cells associated with lymphocyte-mediated inhibition of macrophage migration from capillary tubes. Lab. Invest.*, **27**:561, 1972.

Folk, R.E., Collst, L., and Möller, G.: *Relaease of migration inhibitory factors from immune rat lymphocytes confronted with histocompatibility antigens. Nature (London)*, **224**:1206, 1969.

Ford, P.M., Ford, S.E. and Gibson, J.: *Evaluation of antigen induced buffy coat leucocyte aggregation as a simple test of allergic reactivity. Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.*, **53**:56, 1977.

Hutchison, F., Macleod, T.M. and Raffle, E.J.: *Leucocyte aggregation and lymphocyte transformation*

- induced by mercuric chloride. Clin. Exp. Immunol.*, 26:531, 1976.
- Kaltreider, H.B., Soghor, S.O., Taylor, J.B. and Decker, J.L.: *Capillary tube migration for detection of human delayed hypersensitivity: Difficulties encountered with "buffy coat" cells and tuberculin antigen. J. Immunol.*, 103:179, 1969.
- 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, 1979.
- Macleod, T.M., Hutchinson, F., and Raffle, E.J.: *Leucocyte aggregation in subjects with nickel dermatitis. Clin. Exp. Immunol.*, 26:528, 1976.
- Nicholls, E.M.: *Aggregation of buffy coat leucocytes. A simple sensitive assay for cell-mediated immunity. Clin. Exp. Immunol.*, 17:673, 1974.
- Quastel, M.R., eds.: *Cell biology and immunology of leucocyte function. 12th international leucocyte culture conference, Academic Press, New York, p. 49, 1979.*
- Rocklin, R.E.: *Products of activated lymphocytes: Leucocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migration inhibitory factor (MIF). J. Immunol.*, 112:1451, 1974.
- Whitney, R. and Sutherland, R.: *Requirement for calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin. J. Cell. Physiol.*, 80:329, 1972.