

중이 진주종의 면역조직학적 고찰

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 이비인후과학교실
윤 태 현 · 이 봉 재 · 이 기 천 · 추 광 철

= Abstract =

Immunohistological Investigation of Middle Ear Cholesteatoma

Tae Hyun Yoon, Bong Jae Lee, Ki Cheon Lee, Kwang Chol Chu,
Department of Otolaryngology, University of Ulsan, College of Medicine, Asan Medical Center

The etiopathogenesis of cholesteatoma is still unknown; however, it has been reported that Langerhans' cells and T-lymphocytes play an important role in the pathogenesis of aural cholesteatoma. The authors performed immunohistological study to identify the distribution of the Langerhans' cells and T-lymphocytes in 32 cases of cholesteatoma tissue and in 5 cases of chronic inflammation of aural skin, and to correlate with clinical symptom of otorrhea. CD1 monoclonal antibody was used to demonstrate Langerhans' cells, CD4 for helper T-lymphocytes, and CD8 for suppressor T-lymphocytes. Our result showed that Langerhans' cells and helper T-lymphocytes were found abundantly in the cholesteatoma tissue than in noncholesteatoma skin, and the proportion of Langerhans' cells in cholesteatoma tissue was higher in cases with otorrhea than in cases without otorrhea.

Key words : Cholesteatoma, Immunohistology, Langerhans' cell, T-lymphocyte

I. 서 론

진주종은 이비인후과 영역에서 흔히 볼 수 있는 만성 중이염의 악성 종양 형태의 질환으로서, 점막 조직으로 구성된 중이강내로 각화된 편평상피 세포가 침입하고 keratin을 축적하면서, 중이강내의 조직 및 주위 측두골의 중요한 구조를 파괴하는 현상을 일으킬 뿐 아니라, 심지어는 두개내에까지 침입하여 사망에까지 이르는 합병증을 초래할 수 있다¹. 진주종은 조직병리학적 특성과 임상양상이 매우 다양하

며 발병기전에 관해 아직 명백한 규명이 이루어지지 않아서 진주종의 치료는 아직 어려운 문제점으로 남아있다.

최근들어 진주종의 발병기전에 Langerhans 세포와 T림프구 역할이 관여한다고 알려지면서, 진주종의 원인 및 발병기전을 이해하는데 면역조직학적인 연구가 시도되고 있으나 아직은 초보적인 단계에 머물고 있다.

저자들은 진주종 환자로 부터 수술로써 얻은 여러 형태의 진주종 조직에서 면역조직학적인 avidin-biotin conjugate(ABC) 방법을 이용하여, 진주종의

유발 및 병리 소견에 관여하는 Langerhans 세포와 주요면역세포인 T림프구의 분포 양상을 반정량적인 방법을 통하여 분석하여 임상소견과 연관시켜 비교함으로써, 진주종의 병리소견을 이해하고 진주종 환자의 치료에 도움이 될 지표를 알아보고자 한다.

II. 대상 및 방법

1. 조직표본의 채취

이비인후과 질환으로서 수술적 치료를 받은 37명 환자를 대상으로, 진주종성 중이염 환자의 진주종 조직 32례와 비진주종성 질환 5례중 4례의 만성 중이염 환자의 외이도 피부와 1례의 이전부 누공 환자의 피부를 채취하였다. 수술중에 채취한 조직은 즉시 Tissue-Tek OCT compound(Miles lab)에 포매하여 -70°C 에 보관하였다.

2. 면역조직학적 염색

단일클론성 항체를 이용한 Langerhans 세포와 T림프구의 아형들을 관찰하기 위해서 H_{50} 등²이 보고한 간접 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) 방법을 이용하였다. 포매된 조직은 동결절편기(Reichert-Jung Co)를 이용하여 $4\mu\text{m}$ 두께로 동결절편을 만든 후, poly-L-lysine(sigma Co)을 입힌 slide에 붙인 후 12시간에서 24시간 건조시킨다. Cold acetone(-20°C)에 약 10분간 고정한 후 2% H_2O_2 in absolute methanol에 약 10분간 담가 놓아서 endogenous peroxidase activity를 억제시킨다. 비특이성 항원항체 반응을 억제하기 위해서 2차 항체 동물의 정상 serum인 blocking serum(Vector Lab)을 약 20분간 작용시킨다. 일차 항체를 약 60분간 작용시킨 후 PBS buffer로 3회 씻어낸 후, biotin이 붙은 이차 항체를 약 30분간 작용시킨 후 다시 PBS buffer에 3회 씻어낸다. Avidin-biotinylate horseradish peroxidase complex(Vectastin, ABC reagents & Kit, Vector Lab)를 약 30분간 처리한 후 PBS로 3회 씻어낸다. Diaminobenzidine(DAB)용액으로 발색시킨 후 Mayer-Hematoxylin에 약 1분간 counter stain한다.

일차 항체로는 Langerhans 세포를 보기 위해서 CD1 단일클론성 항체(mouse anti-human Leu-6, Becton Dickinson)를 사용하였고, T림프구의 아형인

조력 T림프구를 위해서는 CD4 단일클론성 항체(mouse anti-human Leu 3a+3b, Becton Dickinson), 억제 T림프구를 위해서는 CD8 단일클론성 항체(mouse anti-human Leu-2a, Becton Dickinson)를 사용하였다. 이차 항체로는 anti-mouse IgG(Vector Lab)를 사용하였다.

1. 면역조직 소견에 대한 반정량적 분야

면역화학적 염색을 한 조직절편들을 400배의 광학현미경하에서 관찰하여, 진주종의 상피층 및 상피하층에 존재하는 면역염색 세포의 분포밀도의 정도를 반정량적으로 구분하였다. 즉 염색세포가 보이지 않는 경우는 음성(negative), 염색세포가 1개에서 4개까지 보이는 경우는 저등도(low grade), 염색세포가 5개에서 9개까지 보이는 경우는 중등도(medium grade), 그리고 염색세포가 10개 이상 보이는 경우는 고등도(high grade)로서 구분하였다.

III. 결 과

비진주종 피부조직 5례중에서 CD1 단일클론성 항체에 양성인 Langerhans 세포들의 분포밀도는 2례의 외이도 피부에서는 음성으로 나타났고, 2례의 외이도 피부에서는 주로 상피층의 상기저부에만 국한된 저등도의 분포밀도를 보였으나(Fig. 1A), 1례의 이전부 피부조직에서는 상피층의 모든 부위에서 분포밀도가 고등도인 양(성)을 보였다(Fig. 1B). 그러나 비진주종 조직의 모든례에서 Langerhans 세포들이 상피하층에서는 거의 관찰되지 않았을 뿐 아니라, T림프구의 아형들도 상피층 및 상피하층 모두에서 관찰되지 않았다.

진주종조직 32례에서 Langerhans 세포들의 분포는(Table 1)CD1 단일클론성 항체에 양성인 세포들이 상피층에서는 모든례에서 관찰되었고, 상피하층에서는 25례에서만 관찰되었다. 이러한 Langerhans 세포들은 주로 상피층의 상기저부에서 고등도의 분포밀도로 관찰되었으며(Fig. 2A), 상피층의 기저부 및 상피하층으로 갈수록 고등도에서 저등도로 분포밀도가 감소하는 것이 관찰되었다(Fig. 2B).

진주종조직에서 T림프구의 아형들의 분포는(Table 2) 조력 T림프구 및 억제 T림프구 모두가

	Grade of Density			
	Negative	Low	Medium	High
Epithelium	0	8	7	17
Basal layer	0	19	8	5
Subepithelium	7	14	7	4

Table 1. Distribution of Langerhans' cells in cholesteatoma tissue

	T-helper cells				T-suppressor cells			
	Neg.	Low	Med.	High	Neg.	Low	Med.	High
Subepithelium	4	3	7	18	16	13	3	0
Epithelium								
Basal layer	5	10	11	6	27	5	0	0
Suprabasal layer	8	15	6	3	31	1	0	0

Table 2. Distribution of Tlymphocytes in cholesteatoma tissue

상피층에 비해 상피하층에서 양성인 세포가 많이 관찰되었으며(Fig. 3A), 조력 T림프구의 양성분포가 많았다. 특히 조력 T림프구는 상피층의 상기저부에 까지 많이 분포하였다(Fig. 3B).

진주종 환자에서 임상적으로 이루가 있던 경우와 이루가 없던 경우를 비교할 때, 이루가 있던 경우가 없던 경우에서보다 Langerhans 세포가 상피층 및 상피하층 모두에서 고등도의 분포가 많았으나 통계학적으로 상피층에서만 유의한 차이가 있었다($P < 0.05$, Chi-square test)(Fig. 4). 그러나 T림프구의 아형인 조력 T림프구 및 억제 T림프구 모두가 상피하층에서 양성으로 나타나는 빈도는 이루가 있던 경

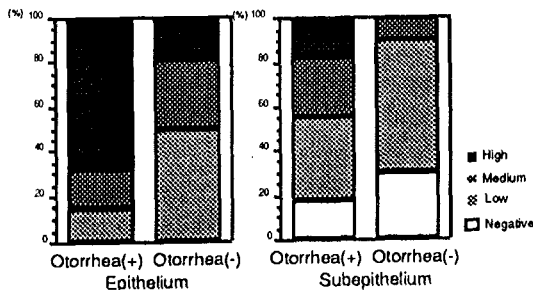


Fig. 4. Comparison of the distribution of Langerhans' cells between the presence and absence of otorrhea

우와 없던 경우의 양군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($P > 0.05$, Chi-square test)(Fig. 5).

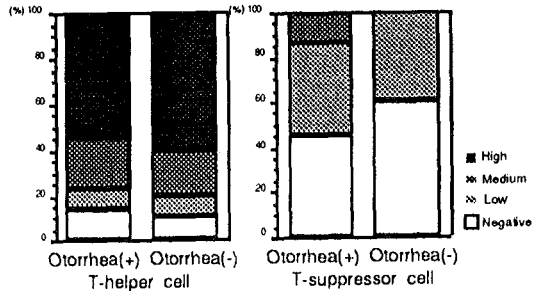


Fig. 5. Comparison of the subepithelial distribution of T-lymphocytes between the presence and absence of otorrhea.

IV. 고 찰

중이 진주종은 각화된 평편상피 세포가 점막조직으로 구성된 중이강내에 침입하여 Keratin을 축적함으로써 주위조직의 측두골에 심한 골파괴를 일으키는 만성 중이염의 악성형태이다¹. 진주종의 발병기전으로서 고막 천공을 통한 외이도 피부가 중이강으로 침입하는 invasion theory³, 고막자체의 내함에 의한 invagination theory⁴, 그리고 염증에 의한 중이 점막의 변화로 여겨지는 metaplasia theory⁵ 등이 제기되고 있다. 이러한 진주종의 유발원인으로 구취관의 기능장애와 만성 장액성 중이염이 중요한 역할을 한다고 알려져 있으나, 최근들어 진주종의 유발에 면역세포들 특히 상피조직에 존재하는 Langerhans 세포(이하 LC라고 함)의 역할이 중요하게 관여한다고 보고되고 있다^{6,7}.

피부조직에서 LC가 나타나는 빈도는 상피세포의 약 3-5% 정도를 차지한다고 알려져 있으나 조직의 부위마다 차이가 있다⁸. 정상사람의 고막에도 LC들이 존재하여서 진주종의 발생과 연관됨을 암시하고 있지만⁹, 이러한 LC들이 정상인의 고막에서 언제나 발견되지는 않음을 보고하는 저자도 있다¹⁰. 그러나 정상의 조직에 비하여 염증과 관련된 피부조직 즉 고막염, 만성중이염, 진주종이 있는 환자의 외이도 피부나 진주종조직에서 LC의 발견빈도가 증가되어 있다고 보고되었지만^{10,11,12,13}, LC들의 분포에

대한 정량적인 방법의 비교는 아직까지 보고되지 않았다.

본 연구는 반정량적인 방법을 이용한 면역조직학적 관찰로 진주종 조직에서 비진주종 조직에 비하여 LC이 나타나는 양성 빈도가 높고, LC 분포밀도의 정도는 고등도의 분포가 증가되었고, 또한 LC이 상피층의 상기저부에서만이 아니고 상피층의 심부인 기저부와 상피하조직에서까지 많이 존재함을 관찰하였다. 이러한 현상은 진주종의 병리기전에 LC들이 활발히 관여하며 주로 상피층에 존재하던 LC들이 상피하층으로 이동하여 역할을 수행할 것이라고 추측된다.

한편 진주종 발병기전에 상피층에 존재하는 LC들과 상피하층에 존재하는 림프구들이 상호 작용한다고 보고되어 있으나 정확한 작용기전은 아직 잘 밝혀져 있지 않다^{8,14,15}. 본 연구에서 진주종 조직에서 비진주종 조직에 비하여 상피층 및 상피하층에서 조력 T림프구 및 억제 T림프구가 발견되는 빈도는 아주 높았으며, 조력 T림프구가 억제 T림프구보다 상피하층에 높은 빈도로 분포되고 또한 상피층까지 전반적으로 존재함을 관찰하였다. 진주종성 중이염에서 T림프구의 아형인 조력 T림프구와 억제 T림프구가 많이 존재함은 진주종의 발생기전에 조력 T림프구와 억제 T림프구가 모두 작용함을 암시한다^{7,10,14}. 그러나 이러한 T림프구의 아형들이 비진주종성 만성 중이염 환자의 점막상피 조직에서도 많이 존재함으로 T림프구의 존재가 진주종의 발병기전에 고유의 기능을 갖고 관여하지 않음을 시사하기도 한다¹².

재발된 진주종의 경우에서는 재발이 아닌 경우에 비하여 임상 소견이 더욱 심하며 LC이 더욱 많이 발견되었다고 보고되고 있으나, 이와 관련해 조력 T림프구와 억제 T림프구의 출현빈도에는 차이가 없고 분포 형태에 있어서만 다소 차이가 있다고 보고하였다¹⁶. 또한 임상적으로 진주종 환자에서 이루가 있는 경우가 없는 경우에 비하여 골파괴 현상이 심한 것은 잘 알려진 사실이나, 임상적으로 중요한 이루의 존재여부에 대한 면역세포들의 분포에 대한 연구는 아직은 없었다. 본 연구에서는 이루가 있었던 진주종 조직에서는 이루가 없었던 진주종 조직에서 보다 LC이 상피층과 상피하층에서 고등도의

분포를 보인 경우가 더 많이 관찰되었으나, 상피하층에서의 T림프구 아형들의 출현 빈도에는 차이가 없음이 관찰되었다. 이러한 현상은 진주종때 나타나는 이루의 원인이 상피층에 존재하는 LC작용에 의하여 영향을 받음을 의미하나 상피하층에 존재하는 T림프구의 아형들과의 상호관계에 대해서는 좀더 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 요약

저자들은 진주종조직과 비진주종 조직에서 Langerhans 세포와 T림프구의 아형들의 분포를 면역조직학적 방법에 의해 관찰하고, 임상적으로 이루의 존재 유무와 연관시켜 고찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 비진주종성 조직 5례에서 Langerhans 세포들은 상피층에 나타나는 빈도가 적고 주로 상피층의 상기저부에 국한되어 있었으며, T림프구는 거의 관찰할 수 없었다.

2) 진주종조직 32례에서 Langerhans 세포들은 상피층에서는 항상 관찰되었으나, 상피하층에서는 25례에서만 관찰되었다.

3) 진주종 조직에서 Langerhans 세포들은 상피층에서 상피하층으로 갈수록 분포밀도가 감소하였다.

4) 진주종조직에서 T림프구의 아형들은 주로 상피하층에서 발견되었고, 조력 T림프구가 억제 T림프구보다 출현의 빈도가 많았다.

5) 진주종 환자에서 임상적으로 이루가 있던 경우 Langerhans 세포의 분포밀도가 없던 경우에 비하여 높았으나, T림프구 아형들의 분포는 양군간에 차이가 없었다.

참고 문헌

1. Schuknecht HF : Pathology of Ear. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts 1974 ; 225-228.
2. Hsu Sm, Raine L, Fanger H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques. J Histochem Cytochem. 1981 ; 29 : 577-580.
3. Palva T, Karma P, Makinen J : The invasion theory. Cholesteatoma and Mastoid Surgery(ed Sade J),

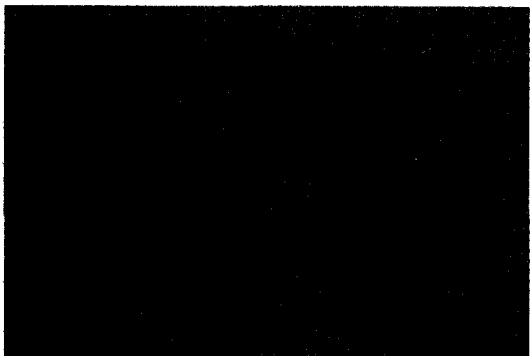
- Kugler Publication, amsterdam. 1982 ; 249-264.
4. Portman M : The invagination theory for the pathogenesis of cholesteatomas. *Cholesteatoma and Mastoid Surgery*(ed Sade). Kugler publication Amsterdam. 1982 ; 265-266.
 5. Sade j : The metaplasial and congenital origin of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol Stoch*). 1983 ; 96 : 119-129.
 6. Friedmann PS : The immunobiology of Langerhans' cell. *Immunology Today*. 1981 ; 2 : 124-128.
 7. Veldmann JE, Visser CE, Schurman H, DeGroot JCM, Huizing EH : Immunobiology of Langerhans' cells migrating into and aural cholesteatomas. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 1984 ; 92 : 1-6.
 8. Gantz BJ, Hart MJ : Immunobiology of acquired aural cholesteatomas. In *Immunology of the Ear*(eds. Bernstein J & Ogra P). Raven Press, NY, 1987 ; 391-402.
 9. Lim D, Saunders W : Acquired cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1972 ; 81 : 2-12.
 10. Van Dijk CM, Visser CE, Veldmann JE : Spatial distribution of Langerhans' cells and T-lymphocyte subpopulation in human tympanic membrane and aural cholesteatoma. *Virch Arch B*. 1986 ; 2 : 143-152.
 11. Palva T, Taskinnen E : Langerhans' cells in chronic otitis media. *Acta Otolaryngol*(Stockh). 1987 ; 103 : 448-450.
 12. Kähönen K, Palva T, Bergroth V, Kontinnen YT, Reitamo S : Immunohistochemical identification of inflammatory cells in secretory and chronic otitis media and cholesteatoma using monoclonal antibodies. *Acta Otolaryngol*(Stockh). 1984 ; 97 : 431-436.
 13. Veldman JE, van Dijk CM, Visser CE, Huizing EH : Aural cholesteatoma and immunity. In *Otoimmunology*(eds. Veldman JE). Kugler, Amsterdam/Berkeley. 1987 ; 69-79.
 14. Takahashi S, Nakano Y : Localization of Langerhans' cells and T lymphocytes in aural cholesteatoma. In *Cholesteatoma and Mastoid Surgery*(eds. Tos M et al). *Proceeding of the 3rd International Conference on Cholesteatoma and Mastoid Surgery*. Kugler & Ghedini, Amsterdam/Berkeley. 1989 ; 175-179.
 15. Veldman JE : The Langerhans' T-cell repertoire in cholesteatoma. In *Cholesteatoma and Mastoid Surgery*(eds. Tos M et al). *Proceedings of the 3rd International Conference on Cholesteatoma and Mastoid Surgery*. Kugler & Ghedini, Amsterdam/Berkeley. 1989 ; 157-163.
 16. Passali D, Bellussi L : The importance of B and T lymphocytes and Langerhans' cells in relapsing and non-relapsing cholesteatoma. *Cholesteatoma and Mastoid Surgery*(eds. Tos M et al). *Proceedings of the Third International Conference on Cholesteatoma and Mastoid Surgery*. Amsterdam/Berkeley. Kugler Publications. 1989 ; 165-170.



Fig. 1. Distribution of Langerhans' cells in non-cholesteatoma skin
A. External ear canal skin : low grade of density of CD1-positive cells only in the suprabasal layer of epithelium (X200)



B. CD1-positive cells : high grade of density in the suprabasal layer and low grade of density in the basal layer of epithelium (X200)



B. Preauricular fistula skin : high grade of density of CD1-positive cells in the entire epithelium (X200)

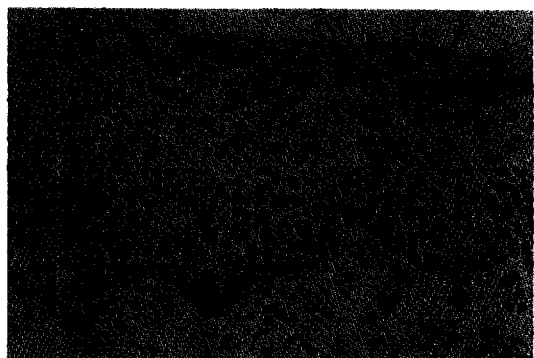


Fig. 2. Distribution of Langerhans' cells in cholesteatoma tissue
A. CD1-positive cells : low grade of density mostly in the suprabasal layer of epithelium (X200)



Fig. 3. Distribution of helper T-lymphocytes in cholesteatoma tissue
A. CD4-positive cells : diffuse distribution in subepithelium (X100)



B. CD4-positive cells : abundant in subepithelium and into the epithelium (X200)