

# 결핵균 및 기타 3종 Mycobacteria의 파쇄추출항원과 교차반응하는 폐결핵환자의 항체분석†

서울대학교 의과대학 미생물학교실·암연구소\* 및 결핵연구소\*\*

조명제\* · 황응수\* · 국윤호\* · 김익상\* · 이승훈\* · 차창용\*  
심영수\*\* · 한용철\*\*

대한결핵협회 대한결핵연구원

배길한 · 김상재

= Abstract =

## Analysis of Antibodies Cross-reactive with Pressate Extract Antigen from *Mycobacterium tuberculosis* and Other 3 Species Mycobacteria in Sera of Patients with Pulmonary Tuberculosis

Myung-Je Cho,\* Eung-Soo Hwang,\* Yoon-Hoh Kook,\* Ik-Sang Kim, Seoung-Hoon Lee,\*  
Chang-Yong Cha,\* Young-Soo Shim\*\* and Yong-Chol Han\*\*

Department of Microbiology, Cancer Research Institutes,\* and Tuberculosis Institutes,\*\*  
Seoul National University, Seoul, Korea

Gill-Han Bae and Sang-Jae Kim

Korean Institutes of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

It is important to discriminate between tuberculosis and tuberculosis-like disease by Mycobacteria other than tuberculosis in the serodiagnosis of tuberculosis. But because common antigens share among Mycobacteria, their antigenicities to human are similar. Therefore degree of cross-reactivity of antibody in the sera of patients with tuberculosis between *M. tuberculosis* and Mycobacteria other than tuberculosis should be checked to increase the specificity in the serodiagnosis of tuberculosis.

The activity levels of IgG antibody in the sera of 106 patients confirmed as active pulmonary tuberculosis and 30 normal healthy control person to the pressate extract antigen (TE, BE, AE, and FE antigen) from *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, and *M. fortuitum* were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and the crossreactivity of IgG antibody with mycobacterial species was analysed.

The results were as follows;

1. The activity level (O.D. at 492nm) of IgG to TE antigen in sera of patients with pulmonary tuberculosis was  $0.228 \pm 0.167$  in minimal tuberculosis; moderately advanced,  $0.556 \pm 0.616$ ; far advanced,  $1.116 \pm 0.651$  and  $0.315 \pm 0.245$  in miliary tuberculosis.
2. The activity level (O.D. at 492nm) of IgG to BE antigen in sera of patients with pulmonary tuberculosis was  $0.190 \pm 0.162$  in minimal tuberculosis; moderately advanced,  $0.337 \pm 0.361$ ; far advanced,  $0.713 \pm 0.460$  and  $0.204 \pm 0.162$  in miliary tuberculosis.
3. The activity level (O.D. at 492nm) of IgG to AE antigen in sera of patients with pulmonary tuberculosis was  $0.165 \pm 0.114$  in minimal tuberculosis; moderately advanced,  $0.392 \pm 0.494$ ; far advanced,  $0.751 \pm 0.512$  and  $0.233 \pm 0.191$  in miliary tuberculosis.

†본 연구의 경비일부는 1984년도 서울대학교병원 임상연구비에 의해서 충당되었음.

4. The activity level (O.D. at 492nm) of IgG to FE antigen in sera of patients with pulmonary tuberculosis was  $0.280 \pm 0.227$  in minimal tuberculosis; moderately advanced,  $0.460 \pm 0.564$ ; far advanced,  $0.845 \pm 0.573$  and  $0.257 \pm 0.103$  in miliary tuberculosis.
5. The activity level (O.D. at 492nm) of IgG in sera of healthy control person was  $0.126 \pm 0.084$  to TE antigen,  $0.105 \pm 0.041$  to BE antigen,  $0.103 \pm 0.052$  to AE antigen, and  $0.095 \pm 0.061$  to FE antigen.
6. Degree of correlation( $r$ ) in activity level of IgG between TE antigen and BE antigen was 0.905; between TE antigen and AE antigen, 0.760; between TE antigen and FE antigen, 0.790, and between AE antigen and FE antigen, 0.945.
7. As O.D. above 0.200 was determined positive for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis, the sensitivity and specificity in ELISA using TE antigen were 80% and 87% respectively, whereas in the case of using BE antigen, 66% and 100%; in the case of using AE antigen, 62% and 100%, and in the case of using FE antigen, 72% and 93%, respectively.

## 서 론

많은 학자들이 *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, 그리고 *Mycobacterium fortuitum*의 항원특이성에 대한 연구를 실시하였으며<sup>10, 16, 20, 33, 40, 42</sup> 특히 혈청학적인 특성으로 이들 균종사이의 관계를 규명하기 위한 시도가 많이 이루어졌다. 즉 Wilson<sup>47</sup>은 응집반응을 이용하여 결핵균의 혈청학적인 분류를 시도하였고 Griffith<sup>47</sup>은 항체흡수반응을 통하여 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*의 항원특이성은 유사하나 *M. tuberculosis*와 *M. avium*사이의 항원특이성은 상이하다고 보고하였다. Parlett<sup>39</sup> 등은 한천확산침강반응을 이용하여 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*의 항원상관관계가 밀접하다는 것을 밝혔다. Turcotte<sup>48</sup>은 항혈청을 이용한 전기영동방법으로 병원성 결핵균에는 비병원성 결핵균에 존재하지 않는 항원성분이 있다고 명시하였다. Norlin<sup>49</sup>이 gel filtration으로 항원을 분리하여 zone electrophoresis로 *M. avium*과 *M. fortuitum*의 항원성분을 분석한 결과  $\beta$  항원을 공유하고 있다는 것을 보고하였다. 최근에는 Wieten<sup>46</sup>이 pyrolysis mass spectrometry를 이용한 *Mycobacterium*균속의 동정에서 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, 그리고 *M. fortuitum* 사이 성분이 유사하다는 것을 명시하고 있고 Chapara<sup>11</sup>은 modified rocket 그리고 crossed immunoelectrophoresis 등을 이용하여 *Mycobacterium* 균속의 항원상관성을 조사한 실험에서 *M. tuberculosis*와 *M. fortuitum* 사이에서 항원 유사성이 60% 이라고 보고하였다.

결핵환자의 혈청학적인 진단방법은 Middlebrook와 Dubos<sup>34</sup>가 혈구응집반응을 통하여 환자혈청에서 항결핵항체를 처음 측정할 이래로 여러학자들이

그 유용성을 보고하였다. 최근 면역학의 발달로 여러가지의 새로운 면역학적 측정방법이 개발되었다<sup>5, 6, 20, 31, 32, 37, 40</sup>. 이 중에서 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>5, 6, 20, 37</sup>은 시약의 제한성이 없고 특이성과 민감도가 높아 단백질 농도로 1~10ng/ml정도도 검출할 수 있다. 특히 표준화된 분석용 plate가 개발되어 판매되고 있고 측정도 기계화가 되어있기 때문에 많은 양의 시료를 동시에 측정할 수 있어 집단검진에도 편리하게 사용할 수 있다.

결핵균에 감염된 환자의 혈청에서 결핵균에 특이한 IgM, IgG, IgA가 상승한다고 보고하고 있지만 진단에 있어서의 유의성은 보고자에 따라 다르다<sup>14, 24, 25, 26</sup>. 그러나 대부분의 보고자들은 IgG가 상승하며 그역가를 측정함으로써 결핵의 진단에 유의하다고 제시하였다<sup>7, 25, 26</sup>.

Timpe와 Runyon<sup>44</sup>이 결핵균 아닌 *Mycobacteria*도 사람에서 폐결핵양의 질환을 초래한다고 보고한 이래로 근년에 들어 나라에 따라 그 정도는 다르지만 결핵균 아닌 *Mycobacteria* 감염에 대한 관심이 높아가고 있다<sup>4</sup>. 우리나라에서는 1970년에 김성진·김상재<sup>21</sup>가 폐결핵으로 의심이 되는 환자의 객담에서 *M. fortuitum*을 분리함으로써 결핵균 아닌 *Mycobacteria*에 의한 폐결핵양 질환이 확인되었으며 1979년에서 1982년 사이에 결핵균 아닌 *Mycobacteria*에 의한 발병율은 전체 폐결핵환자의 1.8% 정도이다. 특히 김성진·김상재<sup>21</sup> 및 최철순<sup>20</sup>이 우리나라 토양에서 결핵균 아닌 *Mycobacteria* 분리보고하고 있는바 이들에 의한 질병유발 빈도가 점증할 것으로 사료된다. 이하하여 여러 학자들이 결핵을 혈청학적으로 진단함에 있어 결핵균 아닌 *Mycobacteria*에 의한 항체와 구분이 필요하다고 역설하고 있다<sup>22</sup>.

그리하여 결핵환자의 혈청에서 *M. bovis*, *M.*

*avium*, *M. fortuitum*에 반응하는 항체의 역가가 어느정도인가를 조사하고 결핵균과 비교하는 것이 혈청학적 진단에 기본자료가 될 것으로 사료하여 저자는 폐결핵환자 혈청과 정상인 혈청내 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, 그리고 *M. fortuitum*의 파쇄추출항원에 대한 항체가를 효소면역측정법으로 측정하여 각균의 항원성을 조사하고 교차반응 정도를 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 항원 제조

*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* 및 *M. fortuitum*을 Sauton 배지에 대량으로 배양한 후 phenol을 1%되게 첨가하여 균을 사멸시킨다. 이것을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)으로 3회 세척하고 PBS로 다시 부유시켰다. 다음 French-press로 15,000 psi에서 결핵균을 파쇄하였다. 파쇄된 균성분을 4°C에서 10,000rpm으로 원심분리하여 상청액을 모아서 냉동건조시켜 사용하였다. 이 성분을 균주에 따라 TE, BE, AE 그리고 FE라고 명명하고 본 실험을 위하여 대한결핵협회 결핵연구원에서 제조하여 공급받았다.

### 혈청 준비

1982년 11월부터 1983년 11월까지 서울대학교병원 전염병내과에 입원하였던 결핵환자중 객담검사상 양성으로 판정되고 활동성결핵으로 판정된 106명의 환자를 대상으로 실험을 하였다. 이들은 1969년도 National Tuberculosis and Respiratory Diseases Association USA의 분류법에 따라 속립결핵(miliary tuberculosis, MIL-TBC) 5명, 경증결핵(minimal tuberculosis, MIN-TBC) 10명, 중등증결핵(moderately advanced tuberculosis, MA-TBC) 44명, 중증결핵(far advanced tuberculosis, FA-TBC) 47명으로 구분하였다. 그리고 여기에 정상대조군으로 결핵병력이 없는 건강한 서울대학교 의과대학 2학년 학생중 30명을 무작위로 선택하여 사용하였다.

환자로부터 채취한 혈액을 실온에서 응고시켜 4°C냉장고에서 18시간 보관한 후 실온에서 1500×g로 30분동안 원심분리하여 얻은 혈청을 페니실린 병에 0.5ml씩 분주하여 -20°C 냉장고에서 보관하였다가 실험하기 직전에 상온에서 용해하여 사용하였다.

### 표준혈청 준비

본 실험의 재현성을 재고하기 위하여 표준양성혈

청과 표준음성혈청이 필요하였다. 표준양성혈청은 피부반응에서 40~48시간에 국소경결이 64mm, 객담에서 결핵균도말염색 양성, 배양검사양성, 흉부 X선촬영 결과 중등증병변을 가지고 효소면역측정법에서 항체가 높은 환자의 혈청을 사용하였다. 표준음성혈청은 피부반응에서 음성이고 객담검사상 음성이며 건강하게 정상적인 생활을 영위하는 사람의 혈청을 사용하였으며 표준양성혈청과 표준음성혈청은 대한결핵협회 결핵연구원에서 분양받아 본 실험에 사용하였다.

효소면역 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)은 심영수·김종숙<sup>4)</sup>과 차창용·김상재 등<sup>5)</sup>이 결정한 방법대로 TE, BE, AE, FE항원을 붙여서 사용하였다. 항원을 carbonate buffer(pH 9.6)에 10µg/ml의 농도로 녹여 polystyrene 96-well EIA plate(Costar; Serocluster 96 well EIA plate, flat bottom, Catalog No. 3590, Lot # 2171)에 well 당 100µl씩 분주하고 4°C냉장고에서 18시간 동안 부착시켰다. 부착시킨 다음 증류수로 2회 세척하고 PBS에 Tween 20을 0.05%(w/w), bovine serum albumin(BSA)을 3% 첨가한 3% BSA-PBS-Tween 20 용액을 well 당 150µl씩 첨가하여 37°C에서 2시간 방치하여 blocking 시킨다. 그리고 나서 PBS-Tween 20 용액으로 3회 세척한 후에 즉시 사용하거나 건조시켜 냉장고에 보관하여 사용하였다.

환자혈청을 상온에서 녹여 0.1% BSA-PBS-Tween 20 용액을 사용하여 1:400으로 희석한 다음 항원을 부착 blocking 시킨 well 당 100µl씩 분주한 다음 37°C에 1시간 동안 항원항체반응을 실시하였다. 반응이 끝나면 PBS-Tween 20 용액으로 3회 세척한다. Peroxidase conjugated goat antihuman IgG (Cappel Laboratories, Lot # 14468)을 0.1% BSA-PBS-Tween 20 용액으로 1:2000으로 희석하여 항원항체를 반응시킨 후 well 당 100µl씩 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 PBS-Tween 20 용액으로 5회 세척하고 기질용액을 넣는다. 기질용액은 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 20µl와 발색제인 ortho-phenylenediamine 4mg을 phosphate citrate buffer (pH 5.0) 10ml에 혼합한 용액이다. 기질용액을 well 당 100µl씩 넣고 상온에서 25분간 반응시킨 다음 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 well 당 100µl씩 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 그 후 Multiscan (Titertek Model, Flow Laboratories)를 사용하여 각시료의 IgG 역가를 492 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)로 측정하였다. 각시료는 2well씩 실험하여 산술평균치를 내어 실험치로 사용하였으며 효소면역측정 실시 일별, plate 별 변이를 상쇄하기 위하

여 아래의 식을 이용하여 수정하였다.

검체의 수정 흡광도

$$= \text{검체의 흡광도} \times \frac{1}{\text{표준양성혈청흡광도}}$$

### 성적

#### TE 항원에 대한 폐결핵환자 혈청의 IgG역가

TE항원에 대한 폐결핵환자 혈청의 IgG역가의 평균치는 흡광도로 Table 1에 나타나 있듯이 경증결

핵의 경우  $0.228 \pm 0.167$ , 중등증결핵은  $0.556 \pm 0.616$ , 중증결핵은  $1.116 \pm 0.651$ , 속립결핵의 경우  $0.315 \pm 0.245$ 이다. 역가의 순서는 경증이 가장 낮고 그 다음이 속립결핵 그리고 중등증결핵, 중증결핵이다. 그리고 중등증결핵은 경증결핵의 두배, 중증결핵은 중등증결핵의 2배의 역가를 보이고 있다. Fig. 1은 결핵의 임상증상별 역가의 빈도를 나타낸 도표이다.

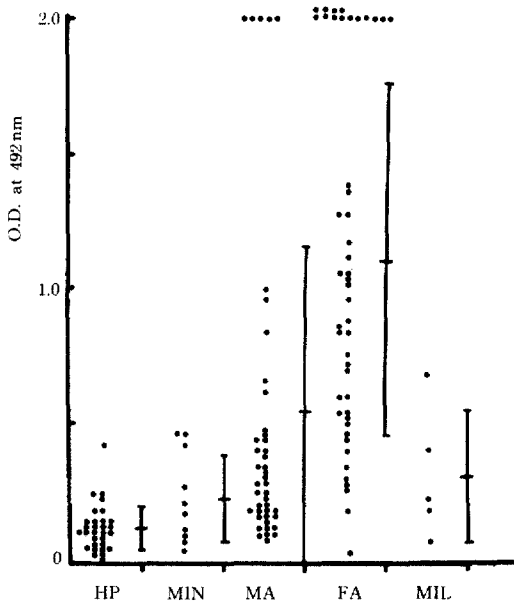
#### BE 항원에 대한 폐결핵환자 혈청의 IgG역가

**Table 1.** The means of activity of IgG to TE, BE, AE and FE antigen in sera from patients with different clinical stage of pulmonary tuberculosis and normal healthy control in ELISA

Clinical stage	No. of patients	Antigen			
		TE	BE	AE	FE
MIL*	5	$0.315 \pm 0.245^{**}$	$0.204 \pm 0.162$	$0.233 \pm 0.191$	$0.257 \pm 0.103$
MIN	10	$0.228 \pm 0.167$	$0.190 \pm 0.162$	$0.165 \pm 0.114$	$0.280 \pm 0.227$
MA	44	$0.556 \pm 0.616$	$0.337 \pm 0.361$	$0.392 \pm 0.494$	$0.460 \pm 0.564$
FA	47	$1.116 \pm 0.651$	$0.713 \pm 0.460$	$0.751 \pm 0.512$	$0.845 \pm 0.573$
HP	30	$0.126 \pm 0.084$	$0.105 \pm 0.041$	$0.103 \pm 0.052$	$0.095 \pm 0.061$

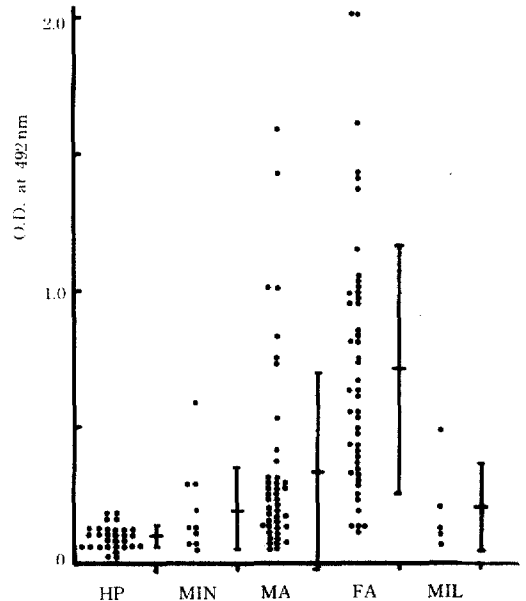
\* MIL: Miliary tuberculosis, MIN: Minimal tuberculosis, MA: Moderately advanced tuberculosis, FA: Far advanced tuberculosis, HP: Healthy control person.

\*\* Standard deviation.



**Fig. 1.** Demonstration of activity of IgG antibody to TE antigen in sera of patients with different clinical stages of tuberculosis.

HP: healthy control person, MIN: minimal tuberculosis, MA: moderately advanced tuberculosis, FA: far advanced tuberculosis, MIL: miliary tuberculosis.



**Fig. 2.** Demonstration of activity of IgG antibody to BE antigen in sera of patients with different clinical stages of tuberculosis.

HP: healthy control person, MIN: minimal tuberculosis, MA: moderately advanced tuberculosis, FA: far advanced tuberculosis, MIL: miliary tuberculosis.

BE 항원에 대한 폐결핵환자의 IgG역가의 평균치는 흡광도로 경증결핵의 경우  $0.190 \pm 0.162$ , 중등증결핵은  $0.337 \pm 0.361$ , 중증결핵은  $0.713 \pm 0.460$ , 그리고 속립결핵은  $0.204 \pm 0.162$ 이다. 역가의 순서는 TE와 마찬가지로 경증결핵이 가장 낮고 속립결핵, 중등증결핵, 중증결핵의 순이다. 증상별 역가의 대비도 TE와 비슷하게 중등증은 경증의 2배, 중증은 중등증의 2배의 역가를 보이고 있다. Fig. 2는 BE항원에 대한 폐결핵의 임상증상별 역가의 빈도를 나타낸 도표이다.

#### AE 항원에 대한 폐결핵환자 혈청의 IgG역가

AE 항원에 대한 폐결핵환자혈청의 역가의 평균치는 흡광도로 경증결핵의 경우  $0.165 \pm 0.114$ , 중등증결핵의 경우  $0.392 \pm 0.494$ , 중증결핵,  $0.751 \pm 0.512$  그리고 속립결핵은  $0.233 \pm 0.191$ 이다. 역가의 순서는 TE, BE항원에서와 같이 경증, 속립, 중등증, 중증결핵의 순이다. 증상별 역가의 대비도 TE, BE항원과 비슷하다. Fig. 3은 AE항원에 대한 결핵의 임상증상별 역가의 빈도를 나타낸 도표이다.

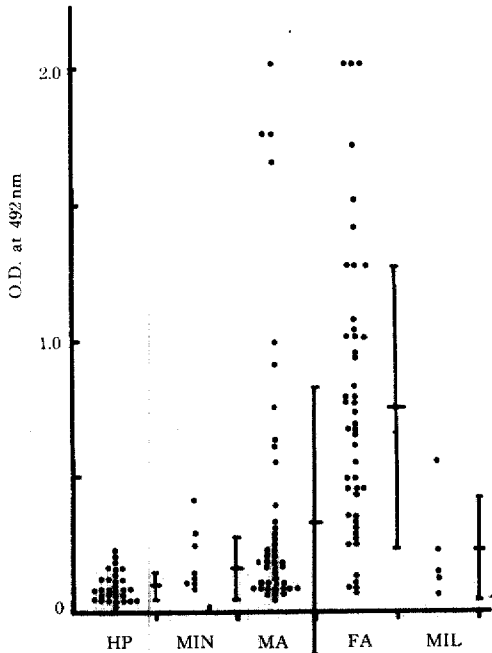


Fig. 3. Demonstration of activity of IgG antibody to AE antigen in sera of patients with different clinical stages of tuberculosis.

HP: healthy control person, MIN: minimal tuberculosis, MA: moderately advanced tuberculosis, FA: far advanced tuberculosis, MIL: miliary tuberculosis.

#### FE 항원에 대한 폐결핵환자혈청의 IgG역가

FE 항원에 대한 폐결핵환자혈청의 IgG역가의 평균치는 흡광도로 경증결핵의 경우  $0.280 \pm 0.227$ , 중등증결핵은  $0.460 \pm 0.564$ , 중증결핵은  $0.845 \pm 0.573$  그리고 속립결핵은  $0.257 \pm 0.103$ 이다. 역가의 순서는 경증결핵과 속립결핵이 서로 비슷하고 그 다음 중등증결핵, 중증결핵의 순이다. 증상별 역가의 대비도 TE, BE, AE항원과 유사하다. Fig. 4는 FE항원에 대한 결핵의 임상증상별 역가의 빈도를 나타낸 도표이다.

#### TE, BE, AE, FE항원에 대한 정상인혈청의 반응정도

정상인 30명중 1명을 제외하고는 모두 BCG를 접종한 경력이 있다. TE항원에 대한 이들의 평균 IgG역가는 표 1과 같이 흡광도로  $0.126 \pm 0.084$ 이고 BE항원에 대한 평균 IgG역가는  $0.105 \pm 0.041$ , AE항원에 대한 역가는  $0.103 \pm 0.052$ , 그리고 FE항원에 대한 역가는  $0.095 \pm 0.061$ 이다. TE항원에 대한

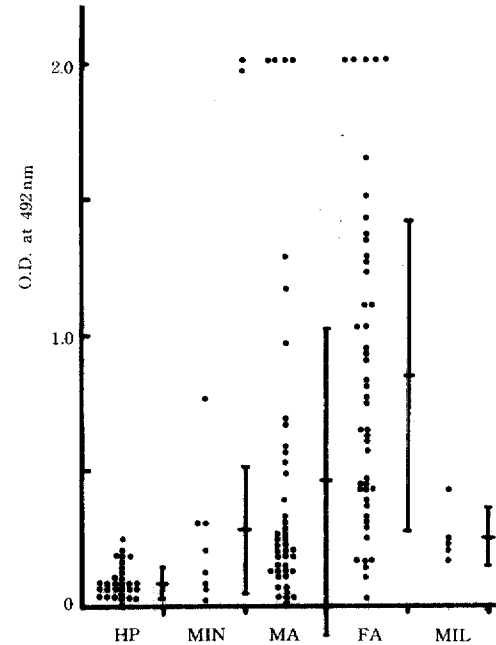
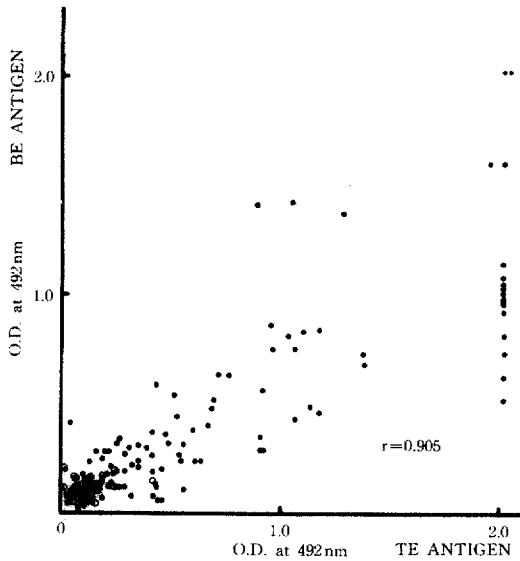
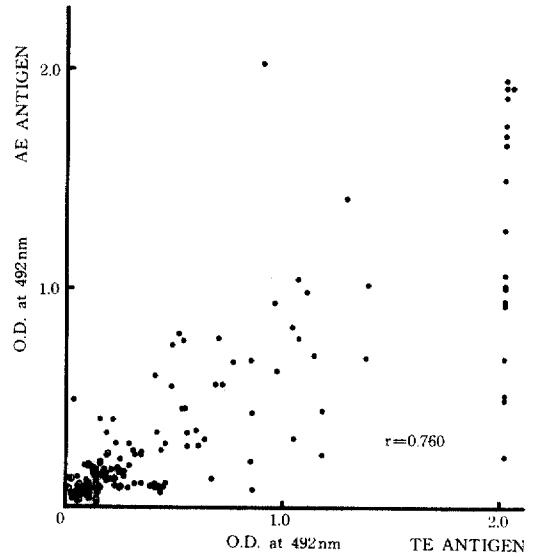


Fig. 4. Demonstration of activity of IgG antibody to FE antigen in sera of patients with different clinical stages of tuberculosis.

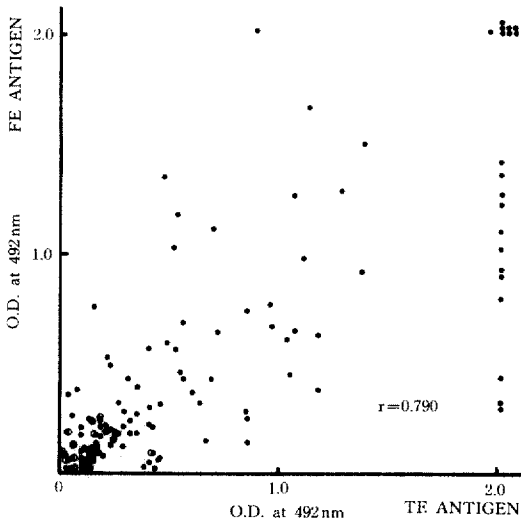
HP: healthy control person, MIN: minimal tuberculosis, MA: moderately advanced tuberculosis, FA: far advanced tuberculosis, MIL: miliary tuberculosis.



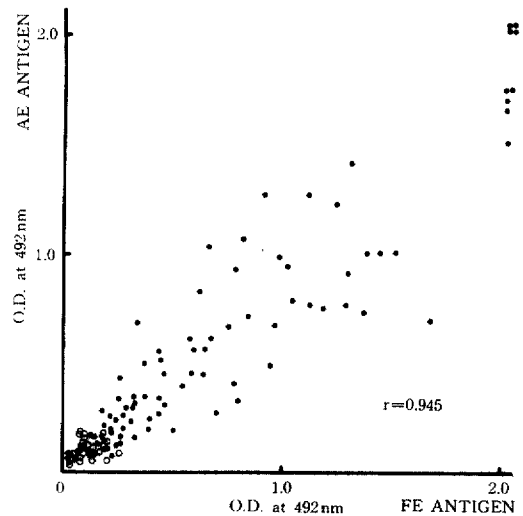
**Fig. 5.** Correlation in activity level of IgG between TE antigen and BE antigen in ELISA in sera of patients with pulmonary tuberculosis. closed circle: tuberculosis patients open circle: healthy control person.



**Fig. 6.** Correlation in activity level of IgG between TE antigen and AE antigen in ELISA in sera of patients with pulmonary tuberculosis. closed circle: tuberculosis patients open circle: healthy control person.



**Fig. 7.** Correlation in activity level of IgG between TE antigen and FE antigen in ELISA in sera of patients with pulmonary tuberculosis. closed circle: tuberculosis patients open circle: healthy control person.



**Fig. 8.** Correlation in activity level of IgG between AE antigen and FE antigen in ELISA in sera of patients with pulmonary tuberculosis. closed circle: tuberculosis patients open circle: healthy control person.

IgG 역가가 가장 높게 나타나 있지만 4개의 항원에 대하여 모두 비슷한 역가를 나타내며 육안으로 음성으로 구분할 수 있는 O.D.인 0.200이하를 보이고 있다.

**TE 항원에 대한 IgG 역가와 BE, AE, FE 항원에 대한 IgG 역가의 상관관계**

TE항원에 대한 항체의 역가와 BE항원에 대한 항체의 역가의 상관관계는 Fig. 5와 같이 상관계수가 0.905이며 AE항원에 대한 항체역가와 상관계수는 Fig. 6과 같이 0.760이다. 그리고 Fig. 7에 나타나 있듯이 FE항원에 대한 항체의 역가와 상관계수는 0.790이다. 이것으로 미루어보아 TE와 BE 항원

은 사람에게 있어서 항원성이 상당히 밀접하나 TE 항원과 AE 또는 FE항원과의 항원성은 BE 항원에 비하여 떨어지는 것을 알 수 있다. 그리고 AE 항원에 대한 항체역가와 FE항원에 대한 항체역가의 상관계수는 Fig. 8과 같이 0.945인바 이들이 인체에서 표현하는 항원성은 밀접하다. 그리고 상관계수로 TE항원에 대한 유사성을 보면 BE, FE, 그리고 AE항원의 순이다.

#### 파쇄추출항원을 이용한 효소면역측정법에서 진단의 유용성

정상인 역가의 표준편차범위를 벗어나고 육안으로 구분이 가능한 O.D. 0.200 이하를 음성으로 판정하였을 경우 TE 및 기타 3종의 파쇄추출항원을 이용한 효소면역측정법으로 결핵을 혈청학적으로 진단하였을 경우 민감도와 특이도를 결정하였다. TE항원의 경우 각각 80%, 87%이고 BE항원은 66%, 100%, AE항원은 62%, 100%, 그리고 FE항원은 72%, 93%이다.

#### 고 찰

폐결핵환자에 있어서 혈청성분의 검색은 결핵의 혈청학적인 진단과 증상의 상태를 추시하기 위한 목적으로 여러 연구자들에 의하여 시도되었다. 특히 1948년 Middlebrook와 Dubos<sup>34</sup>가 혈구응집반응을 이용하여 폐결핵환자혈청에서 항결핵균 항체를 검출한 이후 결핵환자혈청에서 항결핵균항체를 분석하기 위한 시도가 많이 이루어졌다. 이러한 목적으로 침강시험<sup>35</sup>, 응집시험<sup>36</sup>, Latex<sup>37</sup> 또는 카올린<sup>38</sup>, 응집시험, 보체결합시험<sup>39</sup>, 그리고 벤토나이트면상시험등이 개발되었다. 그러나 이러한 방법으로는 항결핵항체의 증감은 검색이 될 수 있지만 결핵균의 감염에 의한 특이한 항체의 class 별 변동은 알 수가 없었다. 이러한 난점은 해결하기 위하여 환자의 혈청을 전기영동, sucrose gradient ultracentrifuge, 또는 column등을 이용하여 분획하고 분획별 항체를 측정하였지만<sup>40</sup> 결핵균에 특이한 항체의 Ig class는 구분할 수 없었다.

최근에 들어 면역학의 발달로 보다 간편하고 특이성과 민감도가 높은 면역분석법이 개발되었다. 방사면역분석법<sup>41</sup>, 형광항체분석법<sup>42</sup> 그리고 효소면역측정법<sup>4, 6, 26, 31, 37</sup>이 개발되었다. Nausau<sup>37</sup>가 처음으로 결핵의 진단에 효소면역측정법을 이용하여 그 유용성을 검토한 이후 여러보고자들이 결핵의 진단에 이 방법의 유용성을 보고하였다. 우리나라에서는 김상재<sup>43</sup>, 심영수·김중숙<sup>44</sup> 그리고 차창용

·김상재<sup>45</sup>가 질병증상단계별 항체역가를 측정하여 이 방법이 진단에 유용하다고 보고하였다.

Daniel<sup>46</sup>이 결핵균항원에 대한 가토의 면역반응의 연구에서 항원의 자극에 따라 초기에는 IgM이 상승하고 자극이 계속됨에 따라 IgG가 상승한다고 보고하였다. Freedman<sup>28</sup>은 활동성 결핵환자혈청에서 IgG의 유의한 증가를 관찰하였다. 일부학자들은 hemagglutination과 hemagglutination lysis 항체역가는 IgM과 관계가 있다고 보고하였으나 Faulkner<sup>40</sup>는 전기영동을 이용한 연구에서 IgM보다 IgG와 IgA가 유의하게 증가한다고 보고하였다. 최근 Grange<sup>28</sup>이 효소면역측정법을 이용한 실험에서 IgG만 증가한다고 보고하였지만 차창용·김상재<sup>45</sup>는 같은 방법을 이용한 연구에서 IgG와 IgA가 진단에 유의하다고 하였다. 이리하여 결핵의 혈청학적 진단에 있어 IgA와 IgM에 대한 문제는 추후 연구가 이루어져 확실한 결론을 지을 필요성이 있으며 본 연구에서는 대부분의 학자들이 공통적으로 진단에 유의하다고 하는 IgG만 측정하였다.

본 연구에 사용한 항원은 균을 파쇄하여 얻은 추출물로써 김상재<sup>43</sup>이 항원의 우수성을 보고하였고 국윤호<sup>47</sup>, 심영수·김중숙<sup>44</sup>, 차창용·김상재<sup>45</sup>는 이 항원을 이용한 일련의 실험에서 혈청학적 진단에 유용성을 입증하였다. 특히 항원성분을 분획하지 않음으로써 항원의 전반적인 교차반응정도를 조사하는데 적합하다고 사료된다.

여러 연구자들이 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, 그리고 *M. fortuitum* 사이에 항원구조가 유사하다고 보고하였고<sup>11, 48</sup> 특히 *M. tuberculosis* 와 *M. bovis* 사이와 *M. avium*과 *M. fortuitum* 사이는 아주 밀접하다고 제시하였는데<sup>27, 38, 39</sup> 이러한 현상은 본 실험에서도 확인되었다. TE와 다른 항원과의 상관계수가 0.760이상이며 TE와 BE 항원과의 상관계수가 0.905, 그리고 AE와 FE 항원과의 상관계수는 0.945로 나타나 이전 보고자<sup>27, 38, 39, 45</sup>들이 연구한 결과와 동일하게 나타났다. 결핵환자 혈청내의 항결핵항체가 결핵균 아닌 다른 Mycobacteria와 교차반응 정도가 높고 결핵증상별로 반응의 변동경향이 동일한 것은 사람에게서 항원성을 표지하는 일련의 결핵균 성분이 다른 Mycobacteria에도 공유되어 있다는 것을 암시하고 있으며, 균종에 따라 상관계수가 다른것은 이들 항원성분의 함유량이 Mycobacteria 균종에 따라 차이가 있기 때문에 생긴 결과로 사료된다.

우리나라 결핵환자에서 TE항원을 이용한 효소면역측정법의 혈청학적 진단의 유의성은 차창용·김상재<sup>45</sup>가 보고하였다. 본 실험에서 육안으로 구분이

가능하고 정상인 역가의 표준편차범위를 벗어나는 0.200 이상을 양성으로 판정하였을 경우 특이도는 87~100% 사이이었고 민감도는 62~80% 사이로 나타났다. 그러나 각 항원사이의 상관계수를 미루어 보아 어느 한항원에 대하여 0.200 이상의 역가를 보이면 4개의 균에 의하여 질병이 진행되고 있다는 것을 예시할 수 있다고 사료된다.

경증결핵과 중등증결핵에서 정상인역가의 표준편차 범위에 들어가는 경우가 상당히 많은데 이는 결핵균에 대한 항체의 생성이 일반적으로 낮고 어떤 사람은 생성이 되지 않는다는 보고<sup>30)</sup>와 일치하고 있고 상당히 진행된 상태인 속립결핵의 경우 검수한 환자의 수가 적어서 일반적으로 이야기할 수 없으나 이러한 증상은 면역기능이 저하된 사람에게서 일어난다는 보고와 일치하는 결과이다.

Dienn<sup>22)</sup>은 결핵을 혈청학적으로 진단하기 위한 조건으로 단순감염에 의한 항체보다 활동성결핵에 의하여 생성된 항체를 검색할 수 있어야 하고, BCG 접종에 의하여 유래된 항체와 구분이 되어야 하며 마지막으로 결핵균아닌 다른 Mycobacteria에 의한 항체와 감별할 수 있어야 한다는 것을 제시하였다. 특히 우리나라는 결핵의 발병빈도가 높고 대부분의 사람이 BCG를 접종한 경력이 있기 때문에 이것에 의한 정상인의 항체역가가 높을 것으로 사료되었으나, 본실험의 결과 정상인혈청내 TE, BE, AE 및 FE항원에 대한 항체역가의 평균치는 0.100 근처로 대체로 낮았다. 일부 표준편차 범위를 벗어나는 경우가 있으나 이는 우리나라의 결핵이환율이 높음에 따라 결핵항원에 노출될 가능성이 높고 또는 자연계의 Mycobacteria에 노출됨으로써 일어난 현상이지 BCG접종에 의하여 생성된 항체에 의한 것으로 볼 수 없어 결핵을 혈청학적으로 진단하는데 있어 BCG접종에 따른 문제는 배제할 수 있다고 사료된다.

결핵환자혈청에서 BE, AE, FE항원에 대한 역가가 육안으로 음성구분이 가능한 O.D.인 0.200 이하인 것이 TE항원에 비하여 많은 것은 전반적인 역가가 TE에 비하여 떨어져 있기 때문에 야기된 현상으로 사료된다.

과거에 비정형항산균 또는 비정형결핵균 이라고 부르던 것을 최근 Runyon이<sup>41)</sup> 결핵균아닌 Mycobacteria (mycobacteria other than tuberculosis; MOTT)라는 총칭하고 있다. 결핵의 이환율이 낮은 선진국에서 이들에 의한 감염이 상당히 문제를 일으키고 있는 것으로 보아 우리나라에서도 결핵에 의한 이환율이 감소됨과 동시에 결핵균아닌 Mycobacteria에 의한 결핵양질환이 증가될 가능성이 높

다. 이들에 의한 질환은 치료하는데 있어 현재 결핵을 치료하는 방법으로는 불가능하기 때문에<sup>42)</sup> 결핵과 이들에 의하여 유발되는 결핵양질환을 구분하여 진단할 수 있는 혈청학적 진단법이 요구된다. 본실험의 결과로 증명하였듯이 파쇄추출항원을 이용한 ELISA는 교차반응정도가 높아서 구분 진단이 불가능하였다. 이것을 타개하기 위하여서는 균종특이성 항원의 분리가 필수적이며 최근 이것을 위한 노력이 계속되고 있다. Daniel등<sup>17)</sup>이 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*에만 공유되어 있다는 표준항원 5를 분리 정제하여 그 특이성을 보고하였고 그의 *M. kansasii*에 특이한 항원 K<sub>11</sub><sup>33)</sup> 및 *M. bovis* BC G에만 특이하다는 MPB70<sup>36)</sup> 등이 보고되고 있다. 그러나 이들도 피부반응과 항체반응에서 교차성이 밝혀지고 있어 이에 대한 많은 연구가 이루어져야 하겠다. 최근 국윤호등<sup>1)</sup>, Daniel등<sup>18)</sup> 및 Hewitt등<sup>28)</sup>이 단세포균항체를 이용하여 결핵균에 특이한 항체를 생산하였음을 보고하고 있는바 이러한 단세포균항체를 이용하여 균종 특이항원을 분리정제함으로써 이러한 목적을 달성할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* 그리고 *M. fortuitum*의 파쇄추출항원인 TE, BE, AE 그리고 FE항원을 이용한 효소면역측정법을 통하여 증상별로 구분된 폐결핵환자 혈청과 정상인 혈청내 이들 항원과 교차반응하는 IgG 역가를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) TE항원에 대한 폐결핵환자의 IgG 역가는 492 nm에서의 흡광도로 경증이  $0.228 \pm 0.167$ , 중등증이  $0.556 \pm 0.616$ , 중증이  $1.116 \pm 0.651$  그리고 속립결핵은  $0.315 \pm 0.245$ 이다.
- 2) BE항원에 대한 폐결핵환자의 IgG 역가는 492 nm에서 흡광도로 경증이  $0.190 \pm 0.162$ , 중등증이  $0.337 \pm 0.361$ , 중증이  $0.713 \pm 0.460$ , 그리고 속립결핵이  $0.204 \pm 0.162$ 이다.
- 3) AE항원에 대한 폐결핵환자의 IgG 역가는 492 nm에서 흡광도로 경증이  $0.165 \pm 0.114$ , 중등증이  $0.392 \pm 0.494$ , 중증은  $0.751 \pm 0.512$  그리고 속립결핵은  $0.233 \pm 0.191$ 이다.
- 4) FE항원에 대한 폐결핵환자의 IgG 역가는 492 nm에서 흡광도로 경증이  $0.280 \pm 0.227$ , 중등증은  $0.460 \pm 0.564$ , 중증은  $0.845 \pm 0.573$  그리고 속립결핵은  $0.257 \pm 0.103$ 이다.
- 5) 정상인 혈청의 역가는 TE항원의 경우  $0.126 \pm 0.084$ , BE항원에 대하여는  $0.105 \pm 0.041$ , AE항원의



경우  $0.103 \pm 0.052$ , 그리고 FE항원에 대하여서는  $0.095 \pm 0.061$ 이다.

6) TE항원에 대한 IgG역가와 BE항원에 대한 역가사이의 상관 계수는 0.905이고 AE항원에 대한 IgG역가 사이는 0.760, FE항원에 대한 IgG역가 사이는 0.790이다. 그리고 AE항원에 대한 IgG역가와 FE항원에 대한 IgG역가 사이의 상관계수는 0.945이다.

7) O.D.치 0.200이상을 양성으로 판정할 경우 TE항원을 이용한 효소면역측정법에서 민감도는 80%이고 특이도는 87%이다. BE항원의 경우 각각 66%, 100%이고 AE항원의 경우 62%, 100% 그리고 FE항원의 경우 72%, 93%이다.

### 참 고 문 헌

- 1) 국윤호, 조명제, 황응수, 차창용, 이승훈, 김상재, 한용철 : *Mycobacterium tuberculosis* 파쇄추출항원에 대한 단세포는 항체의 생산 및 그 특성에 관한 연구, 결핵 및 호흡기질환 31: 83, 1984.
- 2) 김성진, 김상재 : 점담에서 분리된 미분류항산균에 관한 연구, 결핵 및 호흡기질환 17: 33, 1970.
- 3) 김성진, 김상재 : 한국 토양으로부터 분리한 미분류항산균에 관한 연구, 결핵 및 호흡기질환 18: 19, 1971.
- 4) 김성진 : *Mycobacterium*속의 분류 및 비결핵성항산균증, 결핵 및 호흡기질환 29: 61, 1982.
- 5) 김상재, 배길환, 김성진 : 효소결합면역분석법을 이용한 결핵환자 혈청내 항결핵균항체의 검출, 결핵 및 호흡기질환 28: 171, 1981.
- 6) 심영수, 김종숙 : 효소결합면역분석법을 이용한 결핵진단의 유용성에 관한 연구, 중앙의대지 9: 187, 1984.
- 7) 차창용, 김상재 : 폐결핵환자 혈청내 결핵균 특이 항체의 Immunoglobulin Class별 분포, 결핵 및 호흡기질환 30: 172, 1983.
- 8) 최철순, 양용태 : 서울시내 초중고등학교 토양으로부터 비정형 *Mycobacteria*와 *Nocardia*의 분리 및 생화학적동정, 대한미생물학회지 11: 69, 1976.
- 9) Alarcon-Segovia D, Eishbein, E: Serum immunoglobulins in pulmonary tuberculosis, *Chest* 60: 133, 1971.
- 10) Barksdale L, Kim KS: *Mycobacterium*, *Bacteriol. Rev.* 41: 217, 1977.
- 11) Chaparas D : Antigenic relationship among *Mycobacterial* species studied by modified-rocket and crossed immunoelectrophoresis, *Rev. Inf. Dis.* 3: 934, 1981.
- 12) Chapars SD, Thor DE, Godfrey HP, Baer H, Hedrick SR: Tuberculin-active carbohydrate that induces inhibition of macrophage migration but not lymphocyte transformation, *Science* 170: 637, 1970.
- 13) Coulthard HL: The complement fixation test in tuberculosis, *J. Path. Bact.* 26: 350, 1923.
- 14) Daniel TM : Observations on the antibody response of rabbits to mycobacterial antigens, *J. Immunol.* 95: 100, 1965.
- 15) Daniel M: Molecular characterization of the antibody response in rabbits to intravenously injected BCG, *Am. Rev. Resp. Dis.* 95: 262, 1967.
- 16) Daniel TM and Affronti LF: Immunoelectrophoretic analysis of antigenic constituents of Seibert fractions of mycobacterial culture filtrates. Identification with the proposed United States-Japan reference nomenclature, *Am. Rev. Resp. Dis.* 108: 1244, 1973.
- 17) Daniel TM and Anderson PA: The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5, *Am. Rev. Resp. Dis.* 117: 533, 1978.
- 18) Daniel TM, Baum GL : The immunoglobulin response to tuberculosis, I. Molecular characterization of hemagglutinating antibody to tuberculopolysaccharide in sera from patients with tuberculosis, *Am. Rev. Resp. Dis.* 98: 677, 1968.
- 19) Daniel TM, Gonchoroff NJ, Katzmann JA and Olds GR : Specificity of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 determined with mouse monoclonal antibodies, *Inf. Imm.* 45: 52, 1984.
- 20) Daniel TM and Janicki BW : Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry and immunological properties, *Microbiol. Rev.* 42: 84, 1978.
- 21) Daniel TM, Oxtoby MJ, Enrique Pinto M, Edgar Moreno S: The immune spectrum in patients with pulmonary tuberculosis, *Am. Re. Resp. Dis.* 123: 556, 1981.

- 22) Dienn BB: Problems in the serodiagnosis of tuberculosis, *Ann. Intern. Med.* **75**: 132, 1971.
- 23) Duboczy BO and White FC: Latex agglutination test for tuberculosis, *Am. Rev. Resp. Dis.* **94**:914, 1966.
- 24) Faulkner JB, Carpenter RL and Patnode RA: Serum Protein and immunoglobulin levels in tuberculosis, *Am. Clin. Path.* **48**: 556, 1967.
- 25) Freedman SO, Turcotte R, Sehon AH: A serological test active tuberculosis, *Clin. Res.* **12**: 243, 1965.
- 26) Grange JM, Gibson J, Nassau E: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): A study of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in the IgG, IgA and IgM classes in tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease, *Tubercle* **61**: 145, 1980.
- 27) Griffith AS: The serological classification of mammalian and avian tubercle bacilli, *Tubercle* **6**: 417, 1925.
- 28) Hewitt J, Coates ARM, Mitchison DA, Ivanji J: The use of murine monoclonal antibodies without purification of antigen in the serodiagnosis of tuberculosis, *J. Immunol. Methods* **55**:205, 1982.
- 29) Janicki BW, Chaparas SD, Daniel TM, Kubica GP, Wright GL. Jr, Yee GS: A reference system for antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, *Am. Rev. Resp. Dis.* **104**: 602, 1971.
- 30) Kaplan MH, Chase MW: Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. I. Development of antibodies before and after antimicrobial therapy, *J. Inf. Dis.* **142**: 6, 1980.
- 31) Kalish SF, Radin RC, Phair JP, Levitz D, Zeiss CR, Metzger E: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans, *J. Inf. Dis.* **147**: 523, 1983.
- 32) Matfouz O, Mahfouz C, Faser CEO, Macdonald AB: An immunofluorescent test for detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, *tubercle* **61**: 1, 1980.
- 33) Goren B: Immunoreactive substances of Mycobacteria, *Am. Rev. Res. Dis.* **125**(suppl): 50, 1982.
- 34) Middlebrook G, Dubos RJ: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli, *J. Exp. Med.* **48**: 521, 1948.
- 35) Minden P, McClatchy JK, Farr RS: Shared antigens between heterologous bacterial species, *Inf. Immun.* **6**: 574, 1972.
- 36) Harboe M and Nagi S: MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG, *Am. Rev. Resp. Dis.* **129**: 444, 1984.
- 37) Nassau E, Parson ER, Johnson GD: The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Tubercle* **57**: 67, 1976.
- 38) Norlin M, Ernevad H: Purification and separation of antigens in preparations of Mycobacteria, *Bull. Int. Union. Tuberc.* **38**: 29, 1966.
- 39) Parlett RC and Youmans GP: Antigenic relationships between ninety eight strains of mycobacteria using gel-diffusion precipitation techniques. *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* **77**: 450, 1958.
- 40) Reggiardo Z, Middlebrook G: Serologically active glycolipid family from *Mycobacterium bovis* BCG, I. Extraction, Purification and immunologic studies, *Am. J. Eped.* **100**: 469, 1975.
- 41) Runyon ER: Mycobacteria; An overview, *Rev. Inf. Dis.* **3**: 819, 1981.
- 42) Seibert FB: The isolation of three different proteins and two polysaccharides from tuberculin by alcohol fractionation. Their chemical and biological properties, *Am. Rev. Tuberc.* **59**: 86, 1949.
- 43) Takahashi Y: Specific serum agglutination of kaolin particles sensitized with tubercle phosphatides and its clinical evaluation is a serodiagnostic test for tuberculosis, *Am. Rev. Resp. Dis.* **85**: 708, 1962.
- 44) Timpe A and Runyon EH: The relationship of 'atypical' acid-fast bacteria to human disease: A preliminary report, *J. Lab. Clin. Med.* **44**: 202, 1954.
- 45) Turcott R, Boulanger RP: Comparison between the antigenic components extracted from virulent and avirulent strains of mycobacteria, *Can. J. Microbiol.* **17**: 95, 1971.
- 46) Wieten G, Haverkamp J, Engel HWB, Berwald LG: Application of pyrolysis mass spectrometry to the classification and identification

- of Mycobacteria, *Rev. Inf. Dis.* 3: 871, 1981.
- 47) Wilson GS: The serological classification of the tubercle bacilli by agglutination and adsorption of agglutinins. *J. Pathol. Bacteriol.* 28: 69, 1925.
- 48) Winters WD and Cox RA: Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay, *Am. Rev. Resp. Dis.* 124: 582, 1982.