

Perchloric acid 가용성 *Mycobacterium tuberculosis* 항원이 말초혈액 림프구 증식에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 소아과학교실

한 부 현 · 김 동 수 · 이 기 영

1. 서 론

최근 결핵은 개발도상국만의 문제가 아니라 미국과 같은 선진국에서도 큰 문제점으로 대두되고 있다. 세계보건기구의 발표¹⁾에 의하면 전 세계에서 매년 300만명의 인구가 결핵으로 사망하고 있으며 800만명의 새 환자가 발생하고 있다. 1985년에서 1991년까지 미국에서는 활동성 환자가 18% 증가하였으며 유럽지역에서도 스위스에서는 33%, 덴마크에서 30%, 노르웨이에서는 20%의 활동성 환자가 증가하였다^{2,3)}. 이처럼 전염병 관리가 잘 되고 있는 선진국에서 근래에 결핵이 증가되고 있는 현상은 후천성 면역결핍증(AIDS) 감염의 증가와 내성균의 증가에 기인한 것으로 생각된다.

우리나라에서도 근자에 결핵에 대한 홍보가 잘 진행되고 위생환경과 영양상태가 현저히 개선

되었음에도 불구하고 아직도 결핵 유병률은 감소되고 있지 않으며 특히 최근에는 다약제 내성균에 의한 감염이 증가되어 더욱 문제가 되고 있다. 1990년에 조사되어 발표된 우리나라의 5세 이상에서 흉부 엑스선상 활동성 폐결핵 유병률이 1.8%로 집계되어 환자수는 72만 7천명으로 추정되는데 이것은 1985년의 2.2%에 비하여 약간 감소된 양상을 나타내고 있으나 전체적으로는 큰 변화가 없는 것으로 보고되고 있다⁴⁾. 물론 1980년대에 전국적으로 시작된 BCG 예방접종으로 소아 영역에서 결핵성 뇌막염, 결핵성 늑막염, 결핵성 신염, 결핵성 복막염, 속립성 결핵 등 전신적인 심한 증상의 결핵 빈도가 현저히 감소되기는 하였으나 아직도 원발성 결핵이 계속해서 발현되고 있는 것은 성인 결핵의 퇴치가 미비하기 때문인 것으로 생각된다.

이처럼 전 세계적으로 결핵이 문제가 되기 시작하면서 최근들어 결핵균에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고 아울러 면역학과 분자생물학의 발전으로 결핵균에 대한 지식이 폭발적으로 증가되

* 본 논문은 1993년도 연세대학교 의과대학 교수연구비에 의하여 이루어졌음.

고 있다. 최근에 항산균내의 항원을 추출하여 인체 면역계에서의 각 항원의 역할 및 상호작용을 연구하는데 급속한 발전을 이루었고 10여개 정도가 기능이 명확하게 밝혀졌으며 이들은 70kDa의 Dnak, 65kDa의 GroEI, 38kDa의 PhoS, 23kDa의 SodA, 12kDa의 GroEs, 그 외 44, 36, 35, 30/31, 24, 19, 14kDa의 항원들의 분자구조와 기능들이 밝혀져 있다⁵⁾ 또한 어떤 종류의 항원은 그 분자구조를 밝혀 항체 및 세포 매개성 면역 반응에 어떻게 관여하는지 연구되고 있다^{6,7)}. 이전의 보고에서 김⁸⁾은 perchloric acid(PCA)를 사용하여 *M.tuberculosis* 표면 항원을 추출하고 단세포균 항체를 제조하여 보고하였다. 이 보고에서 PCA가용성 *M.tuberculosis* 항원은 10개이상의 다양한 항원으로 구성되어 있었기 때문에 이 항원에 ethanol을 처리하고 열처리하여 58kDa의 단일 항원을 얻은 후 이 항원이 말초 혈액에 미치는 영향을 조사해 보고자 본 연구를 시도하였다.

II. 방법

1. 항원의 준비

연세대학교 의과대학 임상병리학교실에서 배양하고 있는 *Mycobacterium tuberculosis* 균 600mg에 증류수를 넣어 전체가 20ml가 되게 부유액(suspension)을 만든 뒤 PCA 2.6ml와 증류수 17.4ml를 섞은 용액 20ml와 섞어 30분 동안 휘저어 섞은 후 이것을 4°C 4,000-5,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 취하여 흐르는 물에 16시간 투석하였다. 투석이 끝나면 17,000 rpm으로 30분 동안 4°C에서 원심분리한 후 상층액을 취하여 증류수로 2일 동안 투석하고 냉동 건조하였다.

여기서 얻은 냉동 건조 항원은 TB-P로 명명하였고 이 항원을 100°C에서 30분간 처리한 후 2차 증류수로 원래의 volume으로 맞춘 후

10,000rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 autoclave하여 17,000rpm으로 30분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 상층액 1 volume에 99% ethanol 3 volume을 섞고 24시간 실온에서 방치한다. 이것을 3,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 pellet을 0.9% 생리 식염수에 녹이고 다시 3,000rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액 1 volume에 99% ethanol 3 volume을 섞고 24시간 실온에 방치하였다. 이것을 3,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 99% ethanol로 washing하고 다시 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 pellet을 냉동건조하였다. 이 냉동건조 항원을 TB-PBE로 명명하였고 이 항원의 건조분말 1mg에는 6 μ g의 단백질이 함유되어 있었다.

2. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

TB-PBE의 SDS-PAGE는 Laemmli⁹⁾의 방법을 변형하여 시행하였다. 간단히 요약하면 separating gel의 농도는 15% 를 사용하였고 stacking gel은 4% 농도로 하였다. TB-PBE를 2%(wt/vol) SDS, 5%(vol/vol) 2-mercaptoethanol, 0.02%(wt/vol) bromophenol blue가 함유된 0.06M/L Tris HCl, pH 6.8에 녹여 100°C에 3분간 처리하여 34mA로 전기 영동을 시행하였다. 4시간 전기 영동을 한 후에 neutral silver staining을 하였고 분자량은 저분자량의 표준 단백질(Bio Rad. Lab., Richmond, CA)에 의거하여 계산하였다. 이때 TB-PBE와 동시에 TB-P를 함께 전기 영동하여 비교하였다.

3. TB-PBE가 말초혈액 림프구에 미치는 영향

결핵을 앓은적이 없고 chest X-ray가 정상인

면서 PPD항원에 대한 피부반응검사가 양성인 성인 10명의 말초 혈액을 각각 30ml를 채혈하여 Ficoll-hypaque을 사용하여 단핵구를 얻었다. 간단히 요약하면 Ficoll(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 5ml와 heparinized syringe에 채혈된 동량의 혈액을 3,000rpm으로 20분간 원심분리한 후 buffy coat를 취하여 2,000rpm으로 5분간 원심분리하고 HF12(JRH Biosciences, Lenexa, KS) media로 washing한 후 다시 2,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. pellet에 media를 가하여 10ml로 만든 후 trypan blue와 섞어 세포수를 계산한다.

이렇게 얻은 단핵구를 96-well U bottom polystyrene plate(Costar, Cambridge, MA)에 넣고 각각 다른 TB-PBE농도(10, 1, 0.1, 0.01 μ g/ml)로 자극하고 날짜별(1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 14일)로 자극한 후 16시간 3 H-thymidine으로 pulse하고 β -counter(Beckman Instrument Inc., Palo Alto, CA)로 판독하였다. Control항원은 phytohemagglutinin(PHA, 1 μ g/ml, GIBCO, Gaithersburg, MD)와 PPD(1 μ g/ml, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark)를 사용하였다.

4.1

4. Fluorescence-activated cell sorter (FACS) 분석

위와 같은 방법으로 단핵구를 얻은 후 세포와 배지가 섞인 용액 10ml를 polystyrene round bottom tube 6개에 각각 1ml(1x10⁵개)씩 나누어 2,000rpm으로 5분간 원심 분리하고 상층액을 버리고 0.1% bovine serum albumin(BSA, Sigma, St. Louis, MO) phosphate-buffered saline-(PBS)으로 세척하고 각 시험관에 LeucoGATE(CD45/CD14, Becton Dickinson, San Jose, CA), CD3/CD19

(Becton Dickinson, San Jose, CA), CD4/CD8(Becton Dickinson, San Jose, CA), CD3/HLA-DR(Becton Dickinson, San Jose, CA), TCR- γ/δ -1(Becton Dickinson, San Jose, CA), Control(Becton Dickinson, San Jose, CA)을 10 μ l씩 첨가하고 4°C에서 30분간 방치하였다. 다시 한번 세척하고 0.5% paraformaldehyde로 고정하고 FACStar^{plus}(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 flow cytometry로 분석하였다. 나머지 용액 4ml를 각각 24well flat bottom polystyrene plate(Costar, Cambridge, MA)에 2ml씩 넣고 하나의 well은 TB-PBE(1 μ g/ml)로 자극하고 37°C에서 1주간 배양한 후 같은 방법으로 Fluorescence-activated cell sorter(FACS)로 분석하였다.

5. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

1x10⁶개의 세포를 96-well flat bottom polystyrene plate(Costar, Cambridge, MA)에 배양하여 TB-PBE(1 μ g/ml)와 PHA(1 μ g/ml), PPD(1 μ g/ml)로 자극한 후 2주에 걸쳐 1, 2, 5, 7, 14일째 상층액을 취하여 interleukin(IL)-2, IL-4의 분비를 측정하였다. 이때 ELISA 방법을 사용하였고 kit는 R&D사(Minneapolis, MN)의 Quantikine Immunoassays kit를 사용하였다.

6. 자료분석

실험 결과는 Wilcoxon signed rank test로 비교하였다.

III. 결과

1. 항원의 분석

- 한부현들: Perchloric acid 가용성 *Mycobacterium tuberculosis*
항원이 말초혈액 림프구 증식에 미치는 영향 -

97.4 kDa

66.2

45

31

21.5

14.4

Fig.1. SDS-PAGE analysis of TB-PBE. Lane A: TB-PBE, Lane B: TB-P, Lane C: Standard mixture of proteins of known MW

Lane A

Lane B

Lane C

TB-PBE 항원을 SDS-PAGE한 결과는 Fig. 1 과 같았다. TB-P는 58kDa 위치에 큰 띠를 보이고 이것 이외에 10개이상의 항원을 보이는데 boiling과 ethanol처리에 의해서 58kDa의 단일 단백질을 추출할 수 있었다.

2. IL-2의 분비

증가된 T cell이 분비하는 cytokine을 측정하기 위하여 IL-2, IL-4를 측정한 결과 (Fig. 2)

TB-PBE로 자극후 7일째 IL-2가 의미있는 증가를 나타내었다. 그러나 IL-4의 분비는 측정할 수 없었다. 이러한 TB-PBE의 IL-2분비 자극효과는 PPD항원으로 자극한 것과 유사한 결과를 보여 자극 후 7일째 가장 높은 분비 자극효과를 보였다. 그러나 PHA로 자극한 경우는 자극 후 3일째 가장 높은 IL-2분비 자극효과를 보여 TB-PBE나 PPD로 자극한 경우보다 먼저 자극효과를 보이고 있었다.

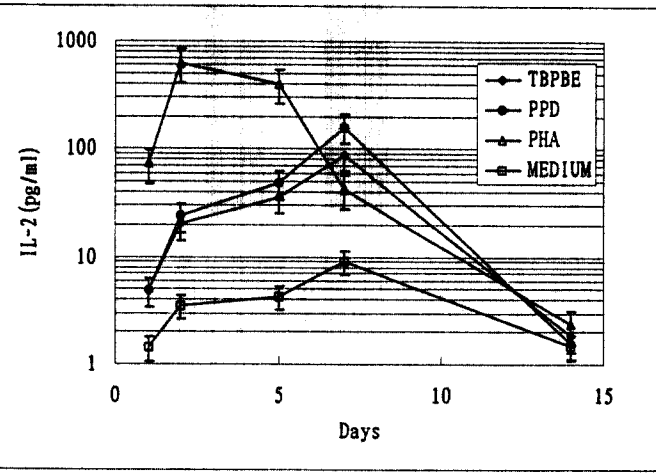


Fig. 2. IL-2 production from the cultured peripheral mononuclear cell stimulated TB-PBE(1 μ g/ml), PPD(1 μ g/ml), and PHA(1 μ g/ml).

3. TB-PBE의 말초 림프구 자극 효과

말초 혈액 림프구 자극효과를 cytokine분비와 비교하기 위해서 ^3H -thymidine uptake를 이용하여 측정하였다. TB-PBE로 자극하였을 때는 IL-2 분비 자극효과와 마찬가지로 자극후 7일째에 가장 높은 자극효과를 보였으며 이것은 PPD 자극효과에서도 같은 결과를 보였다. 아울러 PHA로 자극한 경우 IL-2 분비 자극효과와 마찬가지로 자극 후 3일째에 최고의 자극효과를 보였다. 이러한 결과들은 IL-2 분비 자극효과와 일치하는 결과를 보였다(Fig. 3).

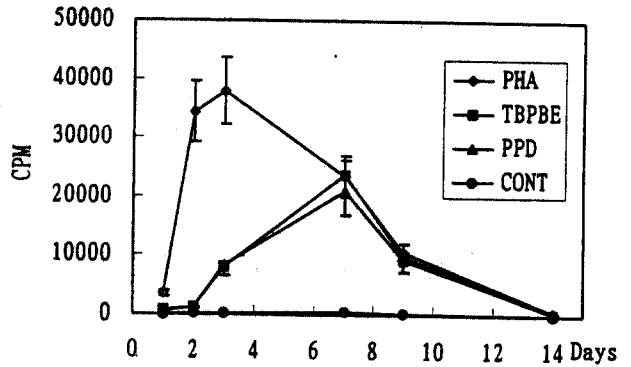


Fig. 3. Time course of ^3H -thymidine incorporation by human peripheral lymphocytes (1×10^6) stimulated by TB-PBE (1 μ g/ml), PPD(1 μ g/ml), and PHA(1 μ g/ml).

4. TB-PBE의 농도에 따른 자극 효과

TB-PBE의 농도별 말초혈액 림프구 자극효과를 관찰한 결과 농도가 증가할수록 자극효과는 증가하였으며 자극효과를 보이는 것도 앞의 결과와 마찬가지로 2일에 나타나기 시작하여 7일째 최고의 자극치를 보이다가 그 후 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4).

5. FACS 소견

이러한 TB-PBE의 말초혈액 림프구 자극효과를 각 아세포별로 관찰하기 위하여 7일간 자극한 후 소견을 관찰한 결과 leucogate에는 큰 변화가

- 한부현들: Perchloric acid 가용성 *Mycobacterium tuberculosis*
항원이 말초혈액 림프구 증식에 미치는 영향 -

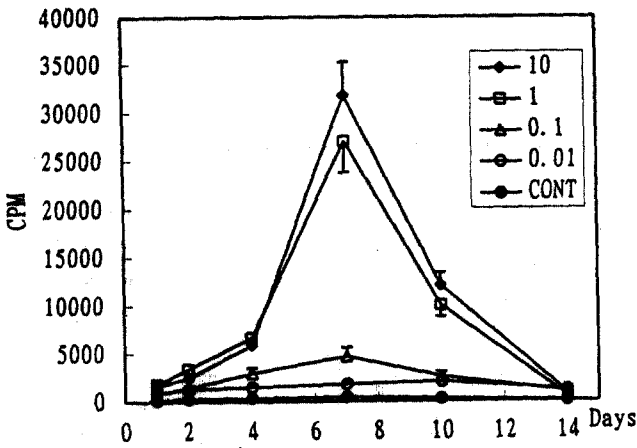


Fig. 4. ³H-thymidine incorporation of human peripheral lymphocytes (1×10^6) stimulated by TB-PBE with different concentrations.

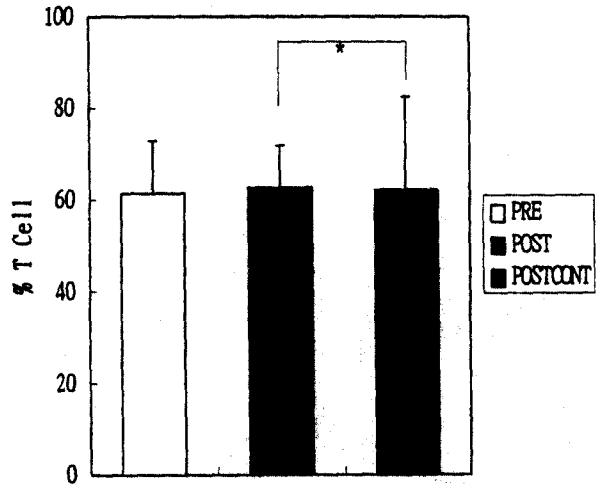


Fig. 6. Changes of T cell fraction before and after stimulation with TB-PBE ($1 \mu\text{g/ml}$) for 7 days (* $p < 0.05$). PRE: before stimulation, POST: after stimulation with TB-PBE for 7 days, POSTCONT: cultured with medium only for 7 days

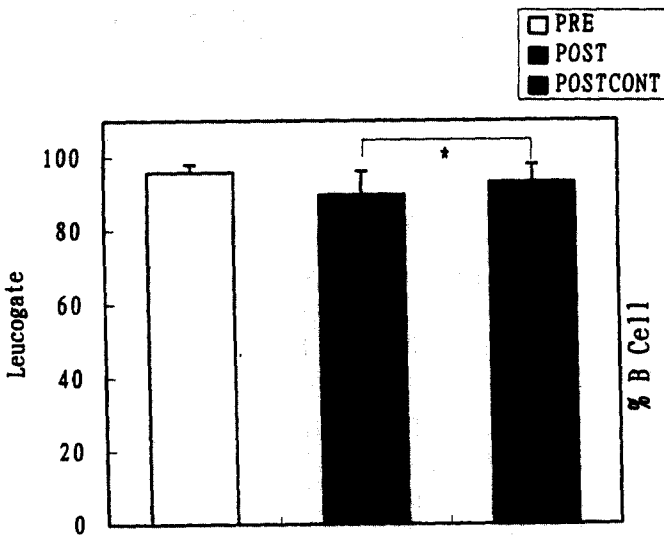


Fig. 5. Leucocyte before and after challenge with TB-PBE ($1 \mu\text{g/ml}$) for 7 days (* $p > 0.05$). PRE: before stimulation, POST: after stimulation with TB-PBE for 7 days, POSTCONT: cultured with medium only for 7 days

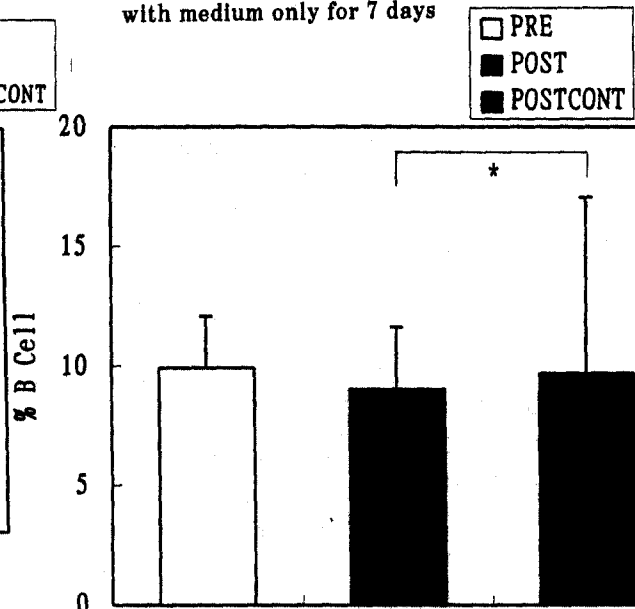


Fig. 7. Changes of B cell fraction before and after stimulation with TB-PBE ($1 \mu\text{g/ml}$) for 7 days (* $p < 0.05$). PRE: before stimulation, POST: after stimulation with TB-PBE for 7 days, POSTCONT: cultured with medium only for 7 days

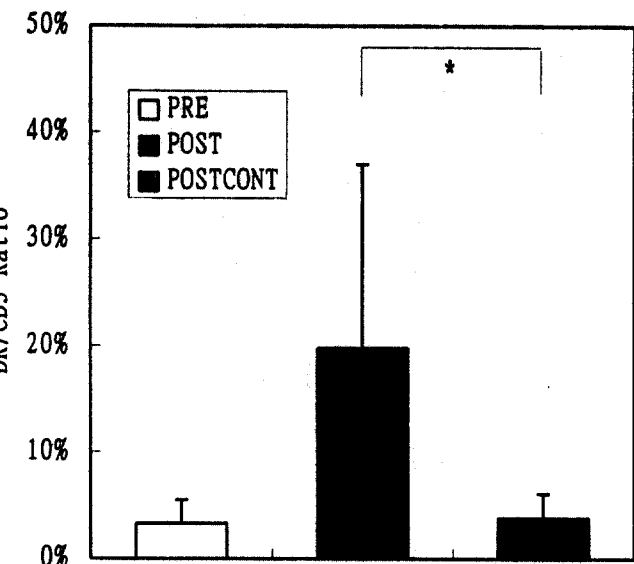


Fig. 8. Changes of DR/CD3 ratio before and after stimulation with TB-PBE(1 μ g/ml) for 7 days(*p<0.05). PRE: before stimulation, POST: after stimulation with TB-PBE for 7days, POSTCONT: cultured with medium only for 7days

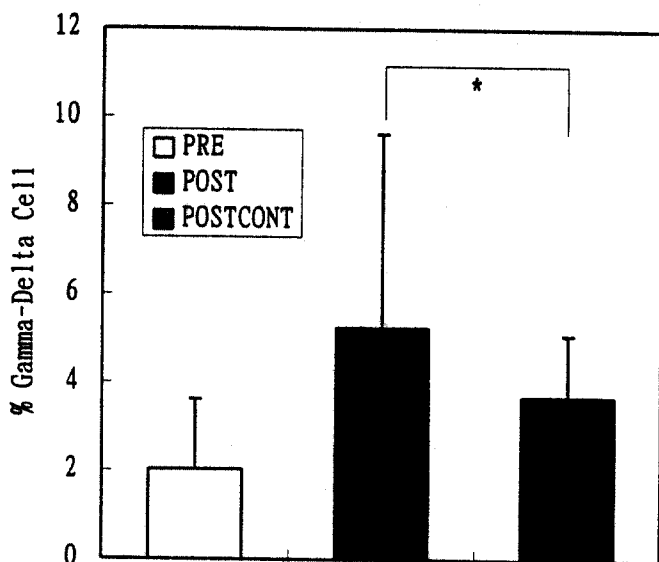


Fig. 10. Changes of Gamma-Delta cell before and after stimulation with TB-PBE(1 μ g/ml) for 7 days(*p<0.05). PRE: before stimulation, POST: after stimulation with TB-PBE for 7 days, POSTCONT: cultured with medium only for 7 days

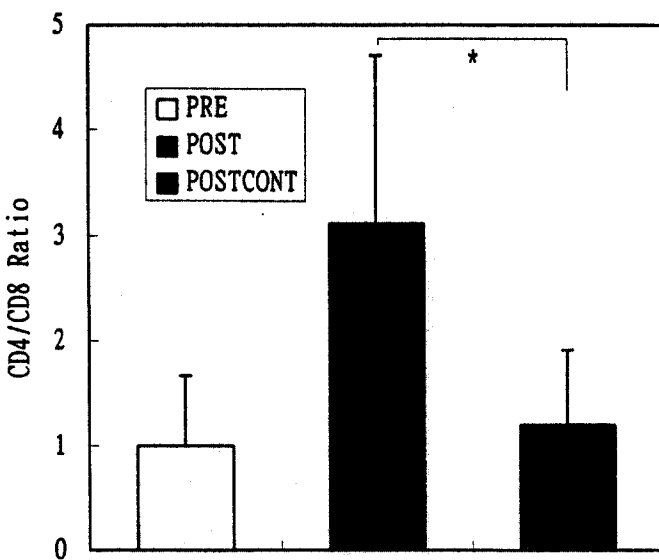


Fig. 9. Changes of CD4/CD8 ratio before and after stimulation with TB-PBE(1 μ g/ml) for 7 days (*p<0.05). PRE: before stimulation, POST: after stimulation with Tb-PBE for 7days, POSTCONT: cultured with medium only for 7days

없었다(Fig. 5). TB-PBE로 자극한 후에도 전체 T 세포의 수와 B 세포의 수에는 변화가 없었으나(Fig. 6,7) TB-PBE로 자극한 후 7일에 아무 자극도 하지 않은 대조군과 비교할 때 활성화된 T 세포가 현저히 증가하면서(Fig. 8) 특히 CD4 T 세포의 증가가 관찰되었다(Fig. 9). $\gamma\delta$ T 세포가 TB-PBE로 7일간 자극한 후 약간 증가하는 양상이 관찰되었으나 통계적인 의의는 없었다. 그러나 일부의 경우에는 현저하게 증가하는 경우가 관찰되었다(Fig. 10).

IV. 고찰

결핵 항원은 그 존재 위치에 따라 구분하기도 하는데 항원 단백질이 세포질 구성체인지 혹은 능동적으로 분비(active secretion)되는지에 따

라 구분하며 음파처리된 균 자체 (washed sonicated bacilli)와 배양액 (culture fluid)내의 각 항원 단백질의 동시 비교로 위치 지표 (localization index)를 삼아 항원의 성질을 특성짓기도 한다. 저자들은 결핵균체에서 분비된 항원을 얻기보다는 결핵균 표면에 존재하는 항원을 얻기 위하여 액상배지에 결핵균을 배양한 후 배양액을 이용하여 분비된 항원을 추출하지 않고 Ogawa배지에 자라고 있는 결핵균을 칼로 긁어내어 얻은 결핵균에 PCA를 첨가하여 PCA에 가용성인 항원을 분리하였다. PCA로 단백질을 얻어내는 방법은 전통적으로 carcinoembryonic antigen을 추출하는데 사용했지만¹⁰⁾ 이전 연구에서 저자들은 BCG에서도 같은 방법으로 항원을 추출하였다¹¹⁾. 이러한 방법을 통해서 얻은 항원은 11가지 이상의 단백질 항원으로 구성되어 있는 것을 알 수 있었다. 저자들은 이 중에서 단일 항원을 추출하기 위하여 열처리하였고 다시 ethanol로 처리하여 내열성이 강하고 ethanol에 녹지않는 58kDa의 단일 단백질 항원을 추출할 수 있었다. 물론 이 항원은 boiling과 autoclave를 거치고 ethanol로 처리되는 과정을 거쳤기 때문에 이 항원이 그 자체의 성상으로 결핵균체 표면에 존재한다고 생각되지는 않는다. 그러나 이 연구에서는 결과를 보여주지는 않았지만, 이 항원을 이용하여 PPD 양성인 사람에서 PPD와 같은 방법으로 지연성 피부반응검사를 시행하였을 때 양성을 보이는 것으로 보아 이 항원이 대사상 변형되었다 하더라도 그 생체기능 (bioactivity)은 존재하고 있는 것으로 생각되어 이 항원에 대한 말초 혈액에서의 림프구 자극 효과를 측정해 보았다.

결핵균에 대한 숙주내 면역 방어 기전은 현재까지 체액성 면역보다는 세포성 면역이 주된 기전으로 알려져 있다. 물론 결핵항원에 대하여 항체가 생기지 않는 것은 아니지만 생긴 항체 자체가 결핵을 숙주로 부터 막아줄 수 있는 방어 면역

에는 관여하지 않는 것으로 알려져 있다. 결핵항원이 일단 숙주내로 침입했을 때 초기에는 CD4+ T세포가 먼저 활성화된다. 물론 이 경우 항원을 T세포에 표현해주기 위해서는 단핵구 또는 거식세포가 먼저 결핵균을 탐식한 후 결핵 특이 항원을 T세포에 표현하게 되고 이후 T세포가 활성화되게 된다. 활성화된 T세포는 다시 γ -interferon을 포함한 여러가지 cytokine을 분비하고 그로 인하여 단핵구나 거식세포는 더욱 활성화되어 탐식한 결핵균을 죽이는 기능이 향상되게 된다. 이처럼 활성화된 CD4 T세포는 아울러 CD8 T세포를 유도하고 활성화시켜서 결핵균에 대한 살세포기능을 할 수 있도록 하는 기전도 유도한다⁵⁾.

본 연구에서도 보면 TB-PBE항원을 이용하여 말초혈액 림프구를 자극하였을 때 나타나는 현상은 B세포에는 전혀 영향이 없었으며 T세포를 활성화시키는 양상을 관찰할 수 있었다. 특히 CD4 T세포를 활성화시키는 현상이 두드러지게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 물론 이러한 양상이 말초혈액내에서 그리고 시험관내에서 관찰된 양상이기 때문에 조직내에서 또 생체내에서 결핵균에 대한 반응으로 바로 적용시키기는 어렵지만 생체내의 기전을 뒷받침해주고 있다고 생각된다.

최근 들어서 결핵균의 여러가지 항원은 T세포 중에서도 $\gamma\delta$ T세포를 활성화시키는 것이 보고되어 있다. Pechhold 등¹²⁾은 이러한 T세포의 활성화는 결핵 항원의 직접적인 자극과 유도로 유발되는 것이 아니고 활성화된 CD4 T세포에 의하여 유도되는 것으로 보고하고 있다. 저자들은 우리가 조사하고 있는 58kDa의 항원도 다른 항원들처럼 T세포를 유도하는지 말초 혈액에서 조사한 결과 의미있게 증가되지는 않았지만 일부에서는 증가되는 경우를 보여 TB-PBE항원도 T세포를 유도할 수 있는 항원으로 사료되었다.

사람에서는 아직도 확실히 밝혀지지는 않았지만 마우스에서는 T세포를 Th1, Th2 그리고

Th0로 나눈다. 이처럼 T helper 세포를 세 종류로 나누는 기준은 T세포가 어떠한 cytokine을 분비하느냐에 따라서 분류하고 있다. 잘 알려진 것처럼 Th1 세포는 IL-2, γ -interferon을 분비하고, Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-10을 분비하고 Th0는 Th1과 Th2의 cytokine을 모두 분비할 수 있다¹³⁾. 저자들은 58kDa항원에 의해서 자극을 받은 세포가 Th1이나 Th2 중에서 어떠한 종류의 세포군이 활성화되는지를 알아보기 위하여 TB-PBE로 자극한 세포의 상층액을 가지고 IL-2와 IL-4의 농도를 측정해본 결과 IL-4는 측정할 수 없었던 반면에 IL-2는 측정할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 TB-PBE항원은 주로 Th1세포를 자극하는 항원으로 사료되었다. 당연한 결과이지만 이러한 IL-2의 분비의 역동학적인 결과는 thymidine incorporation으로 보여주는 T세포의 활성화와 같은 양상을 보여주고 있었다.

결핵을 진단하는데 혈청학적 방법을 적용하기는 1898년 Arloing¹⁴⁾에 의해 처음 시도되었고 Nassau 등¹⁵⁾에 의해 효소 표식 면역검사법(ELISA)이 적용되면서 그 절정을 이루었다. Kalish 등¹⁶⁾의 보고와 Balestrino 등¹⁷⁾의 보고에서는 Antigen 5와 PPD를 항원으로 이용해 혈청 검사를 하여 비슷한 결과를 얻었고 Ma 등¹⁸⁾에 의해 이용된 Antigen 5에 대한 혈청 검사도 역시 놀라운 민감도와 특이도를 보여주었다.

Sada 등¹⁹⁾은 *M. tuberculosis*에서 30kD의 항원을 추출, 이를 이용해 객담 검사에서 항산균 양성인 환자의 혈청 검사를 효소 표식 면역검사법으로 시행한 결과 70%의 민감도를 보여주었고 정상인과 비교해 100%의 특이도를 보여주었으며 폐결핵 환자에서는 높은 진단율을 나타내었다.

결핵의 혈청학적 검사에서 다른 항산균과의 교차 반응을 줄이고 검사의 특이도를 높이기 위해서는 항원의 선택이 중요한 요인이 된다. 효소 표식 면역검사시 잘 정제된 항원을 사용할 경우

더 좋은 진단효과를 얻을 수 있다고 하였으며²⁰⁾ 정제된 항원을 얻기위한 여러 면역화학적 방법과 친화 크로마토그래피(affinity chromatography)외에 이러한 특이 항원을 선택하기 위해 최근에는 단세포군 항체를 이용해 항체와 반응하는 항원 결정기를 선택하였는데 38kDa과 14kDa 단백질이 항산균에 특이하게 반응하는 항원 결정기를 가졌다고 보고되었다²¹⁾. 또한 항원을 따로 정제하지 않고 Hewitt 등²²⁾은 단세포군 항체와 반응하는 혈청내 항체를 억제 방식 면역 측정법(inhibition radioimmuno-assay)으로 측정했으며 Ivanyi 등²³⁾은 결핵 환자의 혈청에서 TB72로 명명된 단세포군 항체와 반응하는 면역글로블린 G 항체를 측정하여 결핵 환자 47명중 25명에서 양성 결과를 얻었고 42명의 대조군에서는 1명에서만 양성인 나오는 좋은 결과를 얻었다. 현재 이 TB72 단세포군 항체에 의해 인식되는 항원은 Antigen 5와 동일한 것으로 생각되고 있다. 또한 유전자 재조합 방법은 결핵균에서 단백질 항원의 생산을 가능하게 했으며 이 항원에 대한 항체 측정도 혈청학적 진단에 활발히 응용되고 있다.

Daniel은²⁴⁾ 핵산 교잡 검사법(nucleic acid hybridization probes), 면역 검사법(immunoassay)을 이용한 항원 검사 등과 함께 효소 표식 면역검사법을 이용한 혈청학적 진단 방법을 결핵의 유행률이 높고 검사 장비가 제한되어 있는 나라에서 이용하는 것이 가장 바람직하다고 추천하였고 특히 효소 표식 면역검사법은 그 방법이 간단하고 검사 비용이 저렴하여 쉽게 이용될 수 있다고 하였다.

최근에는 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 결핵을 진단하고 있는데 이러한 분자 생물학적인 진단 방법이 개발되었음에도 아직까지도 결핵의 진단은 임상양상, X-ray, 결핵균의 배양 등의 고식적인 방법에 의존하는 경우가 많다.

현재 많은 연구자들에 의해 이용되는 항원과 진단을 위한 혈청학적 방법중 어느 특정 항원이나 방법이 가장 우수한 것인지는 아직 명확하지 않다. 또한 진행된 성인 결핵에서뿐 아니라 초기 결핵, 폐외 결핵, PPD 양성자와 소아 결핵에의 혈청학적 진단 방법의 응용은 완전히 정립되지 않은 상태이다. 그러므로 앞으로는 결핵의 혈청학적 진단을 위한 더 나은 항원의 추출 및 쉽게 이용 가능하며 특이도가 높은 방법의 선택, 그리고 다양한 결핵 임상 양상에의 적용 등이 절실히 요구되는 바인데 과연 저자들이 추출하고 확인한 TB-PBE항원이 진단적인 가치를 가지고 있는지에 관하여는 실제로 더 많은 연구가 시행되어야 할 것으로 사료되며 향후 이 항원을 가지고 이 부분에 대한 연구가 계속되어야 하리라고 생각되는 바이다.

V. 결론

M. tuberculosis 균에서 perchloric acid로 항원을 추출하고 다시 ethanol 처리와 열처리를 하여 58kDa의 단일 항원을 얻은 후 이 항원 (TB-PBE)이 말초혈액 림프구에 미치는 영향을 조사한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 림프구 배양 상층액에서 IL-2만 측정되었고 IL-4는 측정되지 않는 것으로 보아 TB-PBE는 주로 Th1세포를 자극하는 항원으로 생각되었다.
2. TB-PBE는 10 μ g/ml의 농도에서 자극 후 7일째 가장 강한 자극효과를 보였다.
3. 자극후 B, T 세포의 변화는 관찰되지 않았으나 CD3+, DR+ 세포가 증가하였으며, CD4/CD8 비가 증가하여 주로 CD4 T 세포의 활성화가 관찰되었다.
4. TB-PBE(1 μ g/ml)로 7일간 자극 후 γ T cell이 약간 증가하였으나 통계적 의의 없었다.

참고 문헌

- 1) Kochi A: The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 72:1-6, 1991
- 2) Kaufmann SHE, van Embden JDA: A neglected disease strikes back. *Trends Microbiol* 1:2-5, 1993
- 3) Bloom BR, Murray CJL: Tuberculosis :Commentary on a reemergent killer. *Science* 257:1055-1064, 1992
- 4) 홍 영표: 결핵의 역학-전국 실태조사성적을 중심으로. *대한의학협회지* 34:468-476, 1991
- 5) Kaufmann SHE: Tuberculosis - The role of the immune response. *Immunologist* 1:109-114, 1993
- 6) Oftung F, Mustafa AS, Shinnick TM: Epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton protein antigen as recognized by human T cells. *J Immunol* 141:2749-2754, 1988
- 7) Andersen AB, Hansen EB: Structure and mapping of antigenic domains of antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 57: 2481-2488, 1989
- 8) 김동수: Perchloric acid 가용성 *M. tuberculosis* 항원에 대한 단세포균항체의 제조 및 분석과 임상적 의의. 소아 알레르기 및 호흡기학회지 3:32-44, 1993
- 9) Pao CC, Yen TSB, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA

- amplification. *J Clin Microbiol* 28:1877 - 1880, 1990
- 10) Abeyounis CJ, Milgrom F: Studies on carcinoembryonic antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 43:30-38, 1972
 - 11) Kim DS, Kim KH: Analysis of perchloric-acid-soluble *Mycobacterium bovis* Bacille bilie de Calmette-Guerin antigen. *Int Arch Allergy Immunol* 101:352-358, 1993
 - 12) Pechhold K, Wesch D, Schonde Imaier S, Kabelitz D: Primary activation of V γ 9-expressing $\gamma\delta$ T cells by *Mycobacterium tuberculosis*: Requirement to Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. *J Immunol* 152:4784-4992, 1994
 - 13) Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW, Gajewski TF: Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol* 11:29-48, 1993
 - 14) Arloing S : Agglutination du bacille de la tuberculose vraie. *Comptes Rendus de l'Academie de Sciences*. 126:1398-1400, 1898
 - 15) Nassau E, Parsons ER, Johnson GD : The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle* 57: 67-70, 1976
 - 16) Kalish SB, 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 Infect Dis* 147:523-530, 1983
 - 17) Balestrino EA, Daniel TM, de Latini MDS, Latini OA, Ma Y, Scocozza JB: Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull WHO* 62:755-761, 1984
 - 18) Ma Y, Wang YM, Daniel TM : Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China. *Am Rev Respir* 134:1273-1275, 1986
 - 19) Sada DE, Ferguson LE, Daniel TM: An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 162:928-931, 1990
 - 20) Daniel TM, Debanne SM: The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 135: 1137-1151, 1987
 - 21) Young D, Kent L, Rees A, Lamb J, Ivanyi J: Immunological activity of a 38-KD protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*.

- Infect Immun* 54:177, 1986
- 22) Hewitt J, Coates ARM, Mitchison DA, Ivanyi J: The use of monoclonal antibodies without purification of antigen in the serodiagnosis of tuberculosis. *J Immunol Meth* 55:205-211, 1982
- 23) Ivanyi J, Krambovitis E, Keen M :Evaluation of a monocloonal antibody(TB72) based serological test for tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 54:337-345, 1983
- 24) Daniel TM: Rapid diagnosis of tuberculosis: Laboratory techniques applicable in developing countries. *Reviews of Infectious Diseases* 11(supp 2):S471-S478, 1989

-Abstract-

**The Effect of Perchloric acid Soluble *Mycobacterium tuberculosis*
Antigen to Mitogenesis of Peripheral Blood Lymphocytes**

Boo Hyun Han, M.D., Dong Soo Kim, M.D., Ki Young Lee, M.D.

*Department of Pediatrics,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Mycobacterium tuberculosis has very complex antigenic structures and large number of antigenic determinants. Due to recent development of immunology, the study on the role of each antigen and its mutual response in human immune system by extracting antigens from the acid-fast bacillus have undergone rapid development. Also, certain types of antigen have been studied on how they are related to antibody and cell mediated immune response by revealing molecular structures. In that regard, the authors investigated its antigenicity from such antigen by extract antigen(TB-PBE) using perchloric acid, ethanol, and boiling out of *M. tuberculosis*. TB-PBE was composed of only one antigenic band, molecular weight of 58kDa.

A 58kDa *M. tuberculosis* antigen(TB-PBE) stimulated peripheral blood lymphocytes of normal adult for a period from the 1st to the 14th at various times(1st, 2nd, 3rd, 4th, 7th, 9th, 10th, 14th day) in various concentrations (10, 1, 0.1, 0.01 μ g/ml) and after the stimulation, mitogenesis was measured by ³H-thymidine and measured B cell, T cell, CD4, CD8, DR, $\gamma\delta$ T cell. ELISA was used to measure IL-2 and IL-4.

TB-PBE showed the strongest stimulus effect 7 days after the stimulation. After the stimulation, no change in B and T cells was observed but the number of CD3+ and DR+ cells increased and observed more activities of CD4 T cells due to increase in the ratio of CD4/CD8. Only IL-2 could be measured in cultured supernatant and IL-4 was not observed.

TB-PBE antigen showed stimulatory effect on CD4 T cells in peripheral lymphocytes and caused more activation of Th1 than Th2. TB-PBE antigen exists on the surface of *M. tuberculosis* and induces only cellular immunity.

Key Words : *Mycobacterium tuberculosis*, Perchloric Acid, 58kDa *M.tuberculosis*
Antigen, T cell, IL-2