酵素結合免疫分析法을 利用한 結核患者 血清内 抗結核菌抗體의 檢出

大韓結核協會 結核研究院

金 尙 材·裴 吉 漢·金 成 鎮

= Abstract =

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Antibody to *Mycobacterium tuberculosis* in Sera from Patients with Pulmonary Tuberculosis

Sang Jae Kim, Gill Han Bai and Sung Chin Kim

Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association

The levels of IgG antibody binding to the soluble antigens of *Mycobacterium bovis* BCG in sera from patients with tuberculosis and healthy individuals in Korea were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The most reactive antigenic components with homologous goat hyperimmune serum distributed in the fraction, which was extracted from live BCG cells homogenized by French-press at 15,000 psi and was precipitable at 75% saturation of ammonium sulfate.

Thirty eight (79.2) out of 48 sputum positive patients and 23 (45.1%) out of 51 sputum negative but radiologically suspected cases showed a positive reaction at the serum dilution 1 : 400, at which none of 24 healthy individuals showed a positive reaction. At a serum dilution 1 : 3,200, 29.2% of sputum positive patients showed a positive reaction while 11.8% of sputum negative cases showed a positive reaction. Of 13 smear negative culture positive cases, 10 were positive at the serum dilution 1 : 400. Fifteen of 24 healthy individuals were positive at the serum dilution 1 : 50, 6 at 1 : 100, and 1 at 1 : 200.

序 論

1948년에 Middlebrook와 Dubos等¹⁾이 結核患者의 血清에서 結核菌抗原에 대한 抗體를 檢出した以來 많은 學者들이 抗結核菌抗體의 測定을 통한 結核의 血清學的 診斷 可能性에 關해 研究해 왔다. 그러나 反應力과 特異性이 서로 다른 抗原을 使用했고 그리고 抗體檢出

方法的 感受性과 特異性이 서로 달라 매우 多樣한 結果를 얻으므로, 매우 診斷的 價値가 높다는 報告가 있는가 하면 도저히 許容할 수 없는 많은 僞陽性과 僞陰性 때문에 전혀 診斷的 價値가 없다는 報告도 많이 있다²⁻¹⁰⁾. 結局 結核의 血清學的 診斷方法은 使用抗原의 反應力과 特異性^{11,12)}, 活動性結核과 關聯이 큰 抗體 class의 分析與否^{13,14)}, 非特異性 反應(例 1gM 凝集 反應)의 除去與否¹⁵⁾ 및 抗體分析方法의 感受性에 따라

* 이 논문의 요지는 1981년 11월 7일 대한결핵학회 제53차 결핵학술대회에서 발표하였음.

** 이 논문은 1981년 결핵연구원 연구비에 의해 이루어졌음.

그 診斷的 價値가 決定된다고 본다.

再現 가능한 結核의 血清學的 診斷方法이 開發된다면 이는 既存 診斷方法들을 크게 補完할 수 있다고 보아 著者等은 加熱處理한 培養濾液으로부터 由來한 抗原 대신에 生菌體를 破壞하여 抽出한 抗原을 使用하여 이와 反應하는 患者의 IgG 抗體를 酵素結合免疫分析法 (ELISA)으로 測定하여 結核의 診斷에 利用하고자 本研究를 着手하였다.

實驗材料 및 方法

1. 抗原製造 : Sauton液體培養基에 表面培養한 生菌 BCG를 0.1% sodium azide가 含有된 pH 7.0 0.067M

phosphate buffered saline (PBS)에 浮游시킨 다음 French-press로 15,000 psi에서 菌體를 破壞한 후 10,000 rpm에서 20分間 遠心分離하여 上等液을 取해 粗抗原 (BE)으로 使用하였다. 粗抗原의 一部는 ammonium sulfate 75% 飽和溶液에서 沈澱시킨 다음 이를 PBS에 대해 透析하여 精製한 抗原을 BASP라 稱하고 75% ammonium sulfate 飽和溶液에 沈澱되지 않는 抗原을 BASS라 稱하였다. 그리고 美國 食品醫藥局 生物製劑研究所 (Bureau of Biologics, Food and Drug Administration, U.S.A)로 부터, 生菌 BCG를 超音波로 破壞하여 抽出한 抗原과 goat anti-BCG hyperimmune serum을 供與받아 모든 抗原製品을 immunodiff-

1. BCG-ASP antigen adsorbed to plate

&
Block by BSA

Wash

2. Add test serum, specific antibody to TB attaches to antigen

Wash

3. Add peroxidase conjugated Anti-human IgG rabbit immunoglobulins (Cappel Lab. Inc.)

Wash

4. Add enzyme substrate

AMOUNT HYDROLYSED = AMOUNT ANTIBODY PRESENT

Figure 1. Indirect method for microplate ELISA for the detection and measurement of antituberculous antibody.

usion으로 比較하였다.

2. 酵素結合免疫分析試驗^{16,17)}: 그림 1에서 보는 바와같이 먼저 flat bottom removable microplate(美國 Dynatech社製品)에 抗原을 含有시킨 pH9.6 炭酸緩衝液(Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g 및 NaN_3 0.2g 등을 蒸溜水 1l에 溶解)과 抗原 非含有 炭酸緩衝液을 각각 다른 well에 加한 다음 4°C에서 24時間 抗原을 吸着시켰다. 모든 well의 炭酸緩衝液을 除去한후 蒸溜水를 0.25ml씩 加하여 well을 씻어낸 다음 0.5% bovine serum albumin(BSA)이 含有된 炭酸緩衝液을 0.25ml씩 모든 well에 加하고 37°C에서 3時間 동안 作用시켜 殘餘吸着場所에 BSA를 吸着시켰다. 그 다음 pH7.4 PBS에 0.0005% tween 80을 含有시킨 well 洗滌用緩衝液을 0.25ml씩 加해 3회 洗滌하였다.

患者血清을 0.5% BSA와 0.001% 正常家兔 1g가 含有된 PBS-tween으로 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3,200 및 1:6,400까지 稀釋한 다음 37°C에서 1時間 동안 作用시킨후 0.2ml씩 抗原이 吸着된 well과 吸着되어 있지 않은 well에 各 血清稀釋液을 加하고 28°C에서 2時間 동안 作用시켰다. 作用液을 除去한 다음 PBS-tween으로 3회 洗滌한 후 0.5% BSA와 0.0002% rabbit anti-human IgG peroxidase conjugate(美國 Cappel社 製品)가 含有된 PBS-tween을 0.2ml씩 모든 well에 加하고 다시 28°C에서 2時間 동안 作用시켰다. 모든 well을 PBS-tween으로 2회 洗滌한 다음 마지막 1회는 蒸溜수로 씻어낸 후 peroxidase 基質溶液(O-phenylenediamine 0.01%와 0.028% H_2O_2 가 蒸溜水에 含有됨)을 0.2ml씩 모든 well에 加하여 發色程度를 視察하여 대체로 10~15分 후에 4N H_2SO_4 로 反應을 停止시켰다. 그 다음 血清稀釋倍數에 따른 抗原非含有 well의 反應과 抗原含有 well의 反應을 肉眼으로 視察하여 分明하게 發色程度가 다른 血清의 稀釋倍數를 抗結核菌抗體 titer로 表示하였다.

3. 患者血清: 結核研究院 附屬醫院에 새로 登錄되었거나 登錄治療中에 있는 結核患者 99名과 健康人 24名으로부터 約 3ml의 血清을 採取하여 merthiolate를 0.01% 되게 含有시켜 1~4°C에 保管하였다.

實驗 結果

結核의 血清學的 診斷은 使用抗原의 反應力에 크게 影響을 받기 때문에 優秀한 抗原製造를 試圖하였던바 그림 2에서 보는 바와같이 immunodiffusion test에서 goat anti-BCG hyperimmune serum에 대해 가장 많

은 沈降抗體反應을 나타내는 抗原은 75% ammonium sulfate 飽和溶液에 沈澱되는 生菌 BCG菌體抗原 BASP였다. 粗抗原 BE와 goat 抗BCG血清 사이에는 적어도

Figure 2. Immunodiffusion of different antigenic preparations with homologous goat anti-*Mycobacterium bovis* BCG hyperimmune serum. For abbreviations, see materials and methods.

6 precipitin line을 볼 수 있었고 그리고 BASP와는 7 precipitin line을 볼 수 있었다. 그러나 75% ammonium sulfate 飽和溶液에 沈澱되지 않는 BASS 抗原은 매우 微弱한 1 precipitin line만이 관찰되었다. 그리고 美國 FDA로 부터 供與받은 BCG sonicate는 4 precipitin line만을 形成하고 있어서 本研究에서 French-press로 菌을 破壞하여 製造한 抗原보다 劣等한 製劑라고 본다.

以上的 抗原製品中에서 BASP를 結核患者血清의 抗結核菌抗體 測定에 이용하였다. 먼저 10名の 菌陽性患者血清을 同一한 量으로 混合한 血清으로 ELISA試驗에 最適抗原濃度를 決定한 다음 그 濃度로 全患者에 대해 試驗하였다. 그 結果를 보면 表1에서 보는 바와같이 健康人 24名 中에서 15名은 血清稀釋倍數 1:50에서, 6名은 1:100에서, 그리고 1名은 1:200에서 各 陽性反應을 보여 주고 있는데 비해 咯痰이나 其他 病理可檢物에서 結核菌이 證明되었건 안되었건 結核으로 診斷된 患者 99名은 血清稀釋倍數 1:100에서 92名, 1:200에서 80名, 1:400에서 61名, 1:800에서 47名, 1:1600에서 31名, 1:3200에서 20名 그리고 1:6400에서 16名이 陽性反應을 보여 주었다. 塗抹과 培養에서 菌이 證明된 患者 35名은 健康人血清 모두 陰性反應을 보여준 血清稀釋倍數 1:400에서 80.0%가, 塗抹에는 陰性이고 培養에서 菌陽性인 患者 13名은 76.9%가, 그리고 菌陰性인 患者 51名은 45.1%가 各 陽性反應을 보여 주었다. 대체로 排菌量이 많은 患者일 수록 높은 血清稀釋倍數에서 陽性反應을 보여주는 경우가 많은 傾向임을 볼 수 있었다.

Table 1. Antituberculous Antibody(IgG) in Sera from Tuberculous Patients with Different Sputum Status and from Healthy Individuals in Korea.

Sputum status	Number of subjects tested	Positives at the serum dilution of							
		1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200	1 : 6400
Normal subjects	24	15 (62.5)	6 (25.0)	1 (4.2)					
D.S. + Cul. +	35	*	34 (97.1)	32 (91.4)	28 (80.0)	24 (68.6)	16 (45.7)	12 (34.3)	8 (22.9)
D.S. - Cul. +	13	*	13 (100.0)	12 (92.3)	10 (76.9)	7 (53.8)	4 (30.8)	2 (15.4)	2 (15.4)
D.S. - Cul. -	51	*	45 (88.2)	36 (70.6)	23 (45.1)	16 (31.4)	11 (21.6)	6 (11.8)	6 (11.8)
Subtotal	99	*	92 (92.9)	80 (80.8)	61 (61.6)	47 (47.5)	31 (31.3)	20 (20.2)	16 (16.2)

() = % * = Not done.

Table 2. Antituberculous Antibody(IgG) in Sera from Patients with Tuberculosis According to the Different Extent of Disease.

Extent of disease and sputum status		Number of patients tested	Positives at the serum dilution of						
			1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200	1 : 6400
FA	Sputum +	12	12 (100.0)	12 (100.0)	12 (100.0)	12 (100.0)	8 (66.7)	6 (50.0)	4 (33.3)
	Sputum -	2	2 (100.0)	2 (100.0)	2 (100.0)	2 (100.0)	2 (100.0)	1 (50.0)	1 (50.0)
MA	Sputum +	29	29 (100.0)	28 (96.6)	23 (79.3)	16 (55.2)	10 (34.5)	7 (24.1)	5 (17.2)
	Sputum -	17	17 (100.0)	16 (94.1)	11 (64.7)	10 (58.8)	6 (35.3)	5 (29.4)	5 (29.4)
Min.	Sputum +	7	6 (85.7)	4 (57.1)	3 (42.9)	3 (42.9)	2 (28.6)	1 (14.3)	1 (14.3)
	Sputum -	26	22 (84.6)	14 (53.8)	8 (30.8)	3 (11.5)	2 (7.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
Extrapulmonary TB or TB suspected, but undefined.		6	4 (66.7)	4 (66.7)	2 (33.3)	1 (16.7)	1 (16.7)		
Total	Sputum +	48	47 (97.9)	44 (91.7)	38 (79.2)	31 (64.6)	20 (41.7)	14 (29.2)	10 (20.8)
	Sputum -	51	45 (88.2)	36 (70.6)	23 (45.1)	16 (31.4)	11 (21.6)	6 (11.8)	6 (11.8)

() = %

그리고 病的 輕重과 排菌與否에 따른 結果를 보면 表2에서 보는 바와 같다. 즉 咯痰에서 結核菌이 證明된 안되는 重症(FA)인 경우에는 血清稀釋倍數 1 : 800에서 모두 陽性反應을 보여 주었고 中等症(MA)인 경우에는 1 : 400에서 64~79%가, 1 : 800인 경우에는 55~58%가 陽性反應을 나타내었다. 그러나 輕症(Min.)인 경우에는 血清稀釋倍數 1 : 800에서 菌陽性患者인 경우에는 42.9%가, 菌陰性患者인 경우에는 11.5%가 陽性反應을 보여 주었다. 그리고 肺外結核이거나 咯痰

에서 結核菌이 檢出되지 않고 結核으로 確診할 수 없었던 6名中에서는 2名이 血清稀釋倍數 1 : 400에서 陽性反應을 보여 주었다.

考 察

結核患者의 血清에서 抗結核菌抗體를 檢出하기 위해서 結核菌으로부터 由來한 蛋白抗原^{2,3)}, 多糖類抗原¹⁾, 脂質⁹⁾ 또는 糖脂質抗原¹⁸⁾ 등을 kaoline, latex 또는 動

物赤血球에 吸着시킨 다음 直接 또는 間接的인 方法으로 凝集시켜 抗體를 測定하는 方法이 診斷的 價値의 有無와 관계없이 從來에 널리 使用되어 왔다. 그밖에도 Farr等⁵⁾은 抗體檢出方法의 感受性を 높이기 위해 放射性同位原素를 結合시킨 結核菌抗原을 使用하여 이와 反應하는 抗體를 測定하였으며, Nicholls等¹⁹⁾은 phenol로 死滅한 結核菌을 直接患者血清과의 凝集反應에 利用하기도 했고, Nassau等²⁰⁾은 radioimmunoassay를 利用해 보기도 했으며, 學者에 따라서는 immunofluorescence가 結核의 血清學的 診斷에 매우 有用하다고 報告하기도 했다^{7,22)}. 그러나 최근에 와서는 酵素結合免疫分析法의 優秀성이 認定되고^{10,14,16,17,22)} 있고 使用 抗原의 反應力과 特異性도 많이 改善되고 있다. 一般的으로 培養濾液으로부터 由來한 抗原보다는 破壞한 菌體로부터 抽出한 抗原이 反應力이 크고 그리고 抗原의 反應力은 熱處理로 크게 損傷을 받기 때문에¹²⁾ 本研究에서는 破壞한 生菌으로부터 由來한 抗原을 使用하였다. 그리고 菌破壞는 熱發生이 많은 超音波보다 French-press가 優秀하다고 感覺되었으며 反應力이 큰 抗原成分은 75% ammonium sulfate 飽和溶液에 沈澱되므로 이와같은 方法으로 精製하여 使用하는 것이 좋다고 본다.

本研究의 結果에서도 나타났듯이 菌陽性患者인 경우에는 24名の 健康人血清이 모두 陰性反應을 나타내는 血清稀釋倍數 1:400에서 79.2%가 陽性反應을 보여주고 있고 菌陰性인 患者라도 45.1%가 陽性反應을 보여주고 있다. 後者の 患者들은 單 1回の 菌檢査에서 陰性結果를 나타낸 患者들이기때문에 反復檢査에서 菌을 檢出할 수 있는 患者도 섞여 있겠지만 治癒된 病變을 가지고 있는 患者도 많이 섞여 있을 것으로 思料되며 이러한 結果는 一部 다른 研究者들의 報告와 大同小異하다^{10,19)}. 菌陰性患者들의 抗結核菌抗體量과 그들의 豫後 및 病變의 活動性 與否는 앞으로 더 研究되어야 할 것으로 본다. 菌陰性患者가 自然治癒되지 않고 惡化되는 경우는 報告者에 따라 크게 달라 0.48%에서 34%에 이르기까지 多樣하나^{23,24)} 이처럼 治療를 받드시 필요로 하는 患者는 小數이므로 菌陰性患者를 모두 治療한다면 많은 患者가 不必要한 治療를 받게 되고 그로 因한 經濟的 損失, 藥物中毒危險 및 結核이라는 烙印으로 생길 수 있는 社會的 問題 등은 결코 看過할 수 없는 問題들이다. 不幸히도 菌陰性患者中에서 반드시 治療를 要하는 患者를 가려낼 수 있는 檢査方法이 現在로서는 없다. ELISA에 의한 抗結核抗體의 檢出이 그러한 目的에 符合될 수 있는지 앞으로 더 研究되어야 할 것이다.

塗抹檢査에서는 菌陰性 培養檢査에서는 陽性인 患者는 76.9%가 血清稀釋倍數 1:400에서 陽性反應을 보이고 있어서 培養檢査에 所要되는 時間을 考慮한다면 ELISA에 의한 抗體檢出이 이러한 患者들의 診斷 및 治療管理에 도움을 줄 것으로 思料된다.

結 論

結核患者의 血清에서 抗結核菌抗體를 檢出하기 위해 酵素結合免疫分析法을 利用한 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

먼저 血清學的 反應力이 큰 抗原成分은 生菌 BCG를 French-press로 破壞하여 抽出한 粗抗原(BE)을 ammonium sulfate 75% 飽和溶液에서 沈澱시킨 抗原製品(BASP)에 가장 많이 含有되어 있었다. BASP 抗原과 結合하는 1gG抗體를 結核患者血清에서 測定한 結果 喀痰에서 結核菌이 檢出된 患者 48名中 38名 (79.2%)이, 對照群으로 試驗된 24名の 健康人血清 모두 陰性反應을 나타낸 血清稀釋倍數인 1:400에서 陽性反應을 보여 주었고, 14名(19.2%)의 菌陽性患者는 血清稀釋倍數 1:3200에서도 陽性反應을 보여 주었다.

喀痰에서 菌이 檢出되지 않은 患者 51名中에서는 23名(45.1%)이 血清稀釋倍數 1:400에서 陽性反應을 보여 주었고 6名(11.8%)은 1:3200에서도 陽性反應을 나타내었다. 菌陽性患者中에서 菌이 培養檢査에서만 檢出된 患者 13名中에서는 10名이 1:400에서 陽性反應을 보여 주었고, 健康人 24名은 1:50에서 15名, 1:100에서 6名 그리고 1:200에서 1名이 陽性反應을 보여 주었다.

參 考 文 獻

1. Middlebrook, G, and Dubos, RJ : Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts with tubercle bacilli, J Exper Med, 88 : 521, 1948.
2. Boyden, SV : The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination, by anti-protein sera, J Exper Med, 53 : 107, 1951.
3. Daniel, TM, and Baum, GL : The immunoglobulin response to tuberculosis. II. Molecular characterization of hemagglutinating antibody to tuberculo-protein in serum from patients with tuberculosis, Amer Rev Resp Dis, 99 : 249,

- 1969.
4. Duboczy, BO, and White, FC : Latex agglutination test for tuberculosis, Amer Rev Resp Dis, 94 : 914, 1966.
5. Farr, RS, and Bloch, H : The binding capacity of tuberculous and nontuberculous human serum for I¹³¹-labeled extract from tubercle bacilli, Amer Rev Resp Dis, 82 : 687, 1960.
6. Favez, G, Jequier, S, and Vullemez, P : Demonstration and discrimination of distinct circulating antibodies during active tuberculosis in man, Amer Rev Resp Dis, 94 : 905, 1966.
7. Mahfouz, O, Mahfouz, C, Fraser, CEO, and MacDonald, AB : An immunofluorescence test for detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, Tubercle, 61 : 1, 1980.
8. Mitchison, DA, Aber, VR, Ahmad, FJ, Allen, BW, and Devi, S : Evaluation of a serological test for tuberculosis, Brit Med J, 1 : 1383, 1977.
9. Takahashi, Y : Specific serum agglutination of kaoline particles sensitized with tubercle phosphatides and its clinical evaluation as a serodiagnostic test for tuberculosis, Amer Rev Resp Dis, 85 : 708, 1962.
10. Tandon, A, Saxena, RP, Saxena, KC, Jamil, Z, and Gupta, AK : Diagnostic potentialities of enzyme-linked immunosorbent assay in tuberculosis using purified tuberculin antigen, Tubercle, 61 : 87, 1980.
11. Grange, JM, Gibson, J, Batty, A, and Kardjito, T : The specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in tuberculosis, Tubercle, 61 : 153, 1980.
12. Harboe, M. : Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studied by crossed immunoelectrophoresis, Amer Rev Resp Dis, 124 : 80, 1981.
13. Freedman, SO, Dolovich, J, Turcotte, R, and Sault, F : Circulating IgG (7S) hemagglutinins in pulmonary tuberculosis, Amer Rev Resp Dis, 94 : 896, 1966.
14. Grange, JM, Gibson, J, Nassau, E, and Kardjito, T : 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.
15. Bradley, GW, Nicholls, AC, and Banfield, L : Serological diagnosis of tuberculosis. Evaluation of two years experience, Scand J Resp Dis, 60 : 176, 1979.
16. Voller, A, Bidwell, D, and Bartlett, A : Chapter 45. Enzyme-linked immunosorbent assay, In Rose, NR (Ed), *Manual of Clinical Immunology* 2nd Ed., Washington, D.C : American Society for Microbiology, 1980, pp. 359-371.
17. Kim, SJ : Demonstration of IgG antibodies to *Aspergillus fumigatus* in aspergillosis by enzyme-linked immunoassay, Tuberc Resp Dis (Korea), 27 (1) : 27, 1980.
18. Reggiardo, Z, Aber, VR, Mitchison, DA, and Devi, S : Hemagglutination tests for tuberculosis with mycobacterial glycolipid antigens. Results in patients with active pulmonary tuberculosis before and during chemotherapy and healthy tuberculosis contacts, Amer Rev Resp Dis, 124 : 21, 1981.
19. Nicholls, AC, and Horsfield, K : Serological diagnosis of tuberculosis : a report of 12 month's clinical experience, Thorax, 31 : 289, 1976.
20. Nassau, E, Parsons, ER, and Johnson, GD : Detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by solid phase radioimmunoassay, J Immunol Methods, 6 : 261, 1975.
21. Nassau, E, Parsons, ER, and Johnson, GD : The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Tubercle, 57 : 67, 1976.
22. Affronti, LF, Fife, EH, and Grow, L : Serodiagnostic test for tuberculosis, Amer Rev Resp Dis, 107 : 822, 1973.
23. Toman, K. *Tuberculosis Case-Finding and Chemotherapy*, Geneva : World Health Organization, 1979.
24. Hong Kong Chest Service, Tuberculosis Research Centre, Madras, India, and British Medical Research Council : Sputum smear-negative pulmonary tuberculosis. Controlled trial of 3-month and 2-month regimens of chemotherapy. First report. Lancet, 1 : 1361, 1979.