Mycobacterium tuberculosis 파쇄 추출항원에 대한 단세포군 항체의 생산 및 그 특성에 관한 연구

서울대학교 의과대학 미생물학교실

국 윤 호 · 조 명 제 · 황 응 수
김익상 · 차창룡 · 장우현 · 이승훈

대한결핵협회 대한결핵연구원

김 상 재

서울대학교 의과대학 내과학교실

한 용 철

=Abstract=

Production and Study on the Specificity of Monoclonal Antibodies to Pressate Extract Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*

Yoon-Hoh Kook, M.D., Myung-Je Cho, M.D.V., Eung-Soo Hwang, M.D., Ik-Sang Kim, M.D.,
Chang-Yong Cha, M.D., Woo-Hyun Chang, M.D. and Seung-Hoon Lee, M.D.
Dept. of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Sang-Jae Kim, Sc.D.

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

Yong-Chol Han, M.D.

Dept. of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Pressate extract of *M. tuberculosis* was used as antigen for immunization of Balb/c mouse to obtain spleen cells producing antibodies to *M. tuberculosis*. Antibody producing spleen cells were prepared 3 days after the last challenge and then fused with HGPRT deficient, nonsecreting mouse myeloma cell line, P 3-X 63-Ag 8-653.

Primary screening by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) was performed 2 weeks after fusion to determine antibody secreting hybridom cells in 96-well culture plates, and among 576 wells, 124 wells (21.5%) were positive. These hybridom cells were cloned by limiting dilution method and 5 cell lines (TB-1, TB-2, TB-3, TB-4 and TB-5), were expanded to obtain culture supernatants containing antibodies reacting to *M. tuberculosis* antigen. These 5 monoclonal antibodies were tested for their specificity to *M. tuberculosis* extract antigen by antibody absorption tests.

All showed below than 50% of absorption when mixed with each extract antigen from *M. bovis*, *M. avium*, and *M. fortuitum* and no reactivities on ELISA plates coated with these three antigens.

Antibodies produced by TB-2 and TB-3 cell lines were determined to be more specific to

TE antigen than those from TB-1, TB-4, and TB-5 hybridoma cells.

These hybridoma cells were injected into the peritoneal cavity of Balb/c mice pretreated with pristane to induce tumor. 7 days after injection of the hybridoma cells, the antibody titer of ascitic fluid were determined by ELISA. All showed 2 or 3 times higher optical density in ELISA than those of hybridoma cell culture fluid.

서 론

세균의 항원성은 그 세균의 특징적인 병원성을 규정 짓는 중요한 기준점의 하나로 사용되고 있으며 세균에 의한 질병의 양상이나 경과등이 항원성과 밀접한 관계를 지니고 있어 항원성 물질의 추적은 질병의 진단과 그 경과를 추적하는 한 방편으로 사용될 수가 있다. *Mycobacterium* 속에 관해서도 역시 질병의 특성과 유관한 항원 성분을 찾으려는 면역학적 시도들이 많이 있어 왔다¹⁻³⁾. 그러나 이러한 각 실험자의 *Mycobacterium* 항원들은 순수한 물질이 아니어서 각기 특이성을 주장한 결과에 상당한 변화를 보이고 있는 것이 사실이다^{1,2)}. 이들 항원들은 단백질, 다당류, 지질등으로 알려져 있으며 그중 특히 단백질 항원들이 복잡성(complexity)이 심하고 각 균종에 특이적인 항원 성분도 포함되어 있는 것으로 생각되고 있다^{2,4)}. 항원 복잡성으로 말미암아 균주특이성(strain specificity)부터 균종특이성(species specificity)인 것, 또는 다른 균속(genera)에까지 유관한 비특이적 항원(nonspecific antigen)의 포함으로 인해 이들 항원으로 생산된 항혈청들은 흔히 교차반응(cross reaction)을 보일 수밖에 없었으며 이러한 이유로 *M. tuberculosis*의 특이항원의 정제 요구는 그 정제 항원의 유용성에 비하여 더 힘든 일로 평가되어 왔다. 그러나 종래의 부분 정제된 항원을 사용하여 얻은 항혈청이라 하더라도 균특이 항원에 의해 생성된 항체가 포함되어 있을 것이어서 그 특이 항체만을 생산케 할 수 있다면 대응하는 항원물질을 추적할 수 있어서 그 항체의 이용도는 실험실에서 뿐만이 아니라 면역학적, 역학적 또는 임상적으로 매우 클 것이다. Köhler와 Milstein 등에 의해 개발된 단세포항체 생산법⁵⁻⁸⁾은 이러한 문제를 해결할 수 있는 방법으로 알려져 있다. 즉, 특정 항원기에 대응하는 항체만을 생산하는 한 세포로부터 항체가 유래하기 때문에 특이성만 획득할 수 있으면 동질의 단일 특이성을 갖는 항체를 실험실에서 무한증식하는 잡종세포(hybridoma cell)로부터 대량생산을 할 수 있어

이러한 단세포항체의 이용도는 상당히 넓은 것으로 예상할 수 있다. 본실험은 이러한 용도로 쓰일 수 있는 *M. tuberculosis*의 항원 물질에 반응하는 단세포항체를 확보하고자, 종래의 항원 제조방법인 가열하거나 유기 용매의 처리없이 세균을 파쇄, 원심분리하여 고형 성분을 제거한 추출항원으로 Balb/c 마우스에 면역시켜 얻은 비장세포와 마우스 형질세포종세포(mouse plasmacytoma cell)를 융합시켜 결핵균 파쇄 추출 항원에 반응하는 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma cell line)를 얻고, 그 세포에서 생산 분비되는 항체들의 특이성을 검토하여 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 항원제작

M. tuberculosis, *M. bovis*(BCG), *M. avium*, *M. fortuitum*의 4종의 균을 Sauton 배지에 대량 배양하여 phenol을 1%가 되게 첨가한 다음 37°C에서 3일간 처리하여 균을 죽인후 phosphate buffered saline, pH 7.0(PBS, pH 7.0)으로 3회 세척하였다. PBS에 균을 부유시켜 French-press로 15,000 psi에서 균체를 파쇄한 후에, 4°C에서 20분간 10,000 rpm으로 원심분리하여 상청액을 꺼내 냉동건조(freeze-dry)시켜서 항원을 분말로 제조하였다. 위의 4종 항원은 대한결핵협회 결핵연구원에서 제조후 본 실험을 위해 제공받았다(*M. tuberculosis* 항원은 TE, *M. bovis* 항원은 BE, *M. avium* 항원은 AE, *M. fortuitum* 항원은 FE로 표기함).

2. 면역조작 및 비장세포의 준비과정

마우스 항체생산세포를 얻기 위하여 생후 6주된 4마리의 Balb/c 마우스(♀)에 TE 항원을 Freuds' incomplete adjuvant에 섞어서 400 µg/mouse씩 복강내에 주사하고 3주후 TE 항원을 멸균된 PBS(pH 7.2)에 녹여 100 µg/mouse씩 정맥내에 주사하였으며 다시 2주후 100 µg/mouse씩 정맥내에 주사한후 제 3일째 되는날 비장을 적출하여 Dulbecco's Modified Eagle's Med-

ium(DMEM)(Flow Lab. Cat. No. 10-331-26)용액 내에서 젓어 세포를 꺼낸후, Tris-NH₄Cl 용액(Tris 20.6 gm/l, NH₄Cl 8.3 gm/l)을 사용 적혈구를 용혈시키고 살아있는 비장세포수를 10⁶cell 이 되게 DMEM 으로 교정하여 세포 융합에 사용하였다.

3. 형질세포종세포(plasmacytoma; myeloma cells)의 배양 및 세포융합조작

세포융합에 사용한 형질세포종 세포는 서울대학교 의과대학 미생물학 교실에서 제대 배양하고 있는 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HG-PRT) 음성인 nonsecreting cell line 인 P3-X63-Ag 8.653을 사용하였으며 8-azaguanine 이 20 µg/ml, fetal bovine serum(FBS) 20%, gentamicin 20 µg/ml 이 함유된 DMEM 에서 제대 배양하였다. 세포 융합 조작 1일전에 새로 배지를 갈고 융합전에 산 세포를 측정하여 10⁷ cell 이 되게 DMEM 으로 교정하였고 융합제로는 50%(w/v) polyethylene glycol (PEG, Mol. Wt. 1,000, Sigma, Lot 1070-0047)를 사용하였으며 세포를 융합하는 과정은 Köhler 등에 의해 이미 기술된 방법^{5~7,9,10}에 따라 시행하였다. 세포융합후 세포들을 fetal bovine serum 20%, Medium NCTC-135(GIBCO, Cat. No. 440-1,100)이 10%씩 함유된 DMEM 배지에 부유시켜 96-well 배양판에 50 µl/well 씩 분주한 후에 CO₂농도 5~10%인 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양 제 1 일후 융합세포의 선택방법으로서 Littlefield¹¹가 고안한 hypoxanthine, aminopterin, thymidine 성분이 함유된 HAT 배지(FBS 20%, hypoxanthine 1.36 mg/100 ml, thymidine 0.76 mg/100 ml, aminopterin 0.018 mg/100 ml, gentamicin 20 µg/ml)를 50 µl/well 씩 첨가하였으며 제 7 일째 다시 100 µl/well 씩 첨가하였다. 이후 배지 상태에 따라 배양액을 제거 또 첨가하며 역위위상차 현미경으로 세포의 증식이 확인된 well 만 골라서 배양하면서 제 10~14일 사이에 배양액을 거둬 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)에 의해 항체를 생산하는 세포가 들어있는 well 을 일차적으로 선택하였다. 선택한 세포들은 다시 24-well 배양판으로 옮겼으며 이때부터 배지로는 aminopterin 이 제거된 HT 배지를 사용하였다. 24-well 배양판에서 증식된 세포들은 다시 ELISA 로 항체 생산 유무를 측정된 뒤 양성 반응을 보인 well 을 무한대 희석법(limiting dilution method)을 사용 cell cloning 을 시행하였다. Cloning 후 하나의 세포집락만 형성한 well 을 골라 다시 항체생산 여부

Fig. 1. Schematic representation of the stages of hybridization from immunization to screening of hybrids.

를 ELISA 로 결정한 후에 96-well 배양판 및 24-well 배양판에 옮겨가며 증식시킨후 T-75 culture flask 에서 배양한 다음 그 상청액을 꺼내 실험에 사용하였다. Cell cloning 시에는 conditioned medium 으로서 myeloma 배양액이 50% 포함된 HT medium 을 사용하였다.

4. ELISA 에 의한 항체가 측정

세포 배양액 내에 포함된 항체가를 측정키 위하여는 ELISA 를 사용하였다¹². 조건은 carbonate buffer (pH 9.6)에 항원 100 µg/ml 을 녹인후 polystyrene plate(Flow Lab. Lot, 7(381029)에 50 µl/well 씩 넣어 37°C 에 2시간 방치하고 4°C 냉장고에서 19시간 고정시켜 항원을 부착시켰다. 항원이 부착된 plate 는 다시 PBS(pH 7.2)로 세척하고 3% bovine serum albumin(ESA)PBS-Tween 20-NaN₃용액으로 37°C 에 2시간 blocking 시킨후 1% BSA-PBS-Tween 20-NaN₃용액으로 3회 세척하여 비닐에 포장하여 4°C 냉장고에 보관하였다가 실험에 사용하였다. 항체측정시 항원 항체의 반응은 각 50 µl/well 씩 배양액을 넣고 37°C 에 2시간 반응시킨후 PBS-Tween 20-NaN₃로 3회 세척하였다. 1:500으로 희석한 goat pe-

oxidase conjugated-antimouse IgG(heavy and light chains)(Cappel Lab. Lot. No. 14013)을 첨가하고 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 20 ml의 phosphate-citrate buffer(pH 5.0)에 발색제로서 orthophenylene-diamine 8 mg 및 30% H₂O₂ 40 μ l 이 든 기질용액을 만들어 각 well 에 50 μ l 씩 첨가하고 실온에서 30 분간 반응시켰다. 0.2 M H₂SO₄로 반응을 중단시킨후 automatic ELISA reader(Multiscan, Titertek)로 파장 492 nm 에 맞추어 흡광도를 측정하였다. 각 실험치는 3개 또는 10개를 평균하여 나타내었다.

5. ELISA 에 의한 항체흡수시험

융합세포의 배양액과 PBS(pH 7.2)에 녹인 4종의 *Mycobacterium* 항원을 동량 섞어 37°C 에서 2시간 반응시킨후에 14,000rpm 으로 5분간 원심분리하여 상층액을 거두어 TE 항원이 부착된 ELISA plate 로 상층액중의 잔존 항체가를 측정하였다. 각 시험에서 대조군의 흡광도(ODc)와 시험군의 흡광도(ODt)에서 음성대조군의 흡광도(ODn)를 제한 남은 흡광도 차이를 대조군의 값에서 음성대조군으로 사용한 형질세포중 배양액의 흡광도 값을 제한 흡광도를 나눈후 백분율로 계산 항원에 흡착으로 인한 잔존 또는 억제된 정도를 표현하였다.

$$\frac{\{(ODc-ODn)-(ODt-ODn)\}}{(ODc-ODn)} \times 100 = \%$$

실험 성적

1. TE 에 반응하는 항체생산 융합세포

세포 융합 조작후 융합세포 부유액을 96-well 배양판에 옮겨 HAT 배지로 2주일간 배양한후 세포 증식이 확인된 well 중에서 ELISA 로 검색한 결과 총 576 개의 well 중 124개가 양성으로 나타나 양성율은 21.5% 였다(Table 1). 이들중 4개의 well 을 골라 cell cloning 을 시행하여 선택한 5개의 clone(TB-1, TB-2, TB-3, TB-4, TB-5)을 실험에 사용하였다. 먼저 5 clone 배양액중의 TE 항원에 대한 항체가를 흡광도로 측정하여 Table 2에 표시하였다(Table 2). 흡광도는 TB-1의 0.217에서부터 TB-3의 0.240까지의 값을 보였으며 음성대조군으로 사용한 형질세포중 배양액은 0.106, 세포 배양 배지는 0.105로서 background activity 인 미만의 값을 보여 음성으로 판정할 수 있었다. 또한 이들 세포 배양액의 항체 역가는 2배씩 희석한 well 의

Table 1. Number of the Wells with Fused Cells Secreting Antibody Reactive to TE Antigen 2 Weeks after Cultured in HAT Medium

Total well	Positive well	Percent
576	124	21.5

Table 2. Antibody Titer of Hybridoma Cell Culture Fluid

Hybridoma cell line	OD*	Dilution titer
T B-1	0.217	1 : 256
T B-2	0.234	1 : 512
T B-3	0.240	1 : 512
T B-4	0.229	1 : 256
T B-5	0.230	1 : 256
P3-x 63-Ag8-653	0.106	negative
Hybridoma medium	0.105	negative
Background OD	0.115 $\pm$ 0.009	negative

* read by automatic ELISA reader(Multiscan, Titertek) at 492 nm.

Fig. 2. Titration of antibody in hybridoma cell culture fluid.

Hybridoma Culture fluid ●—●
Myeloma culture fluid ○—○

흡광도가 음성대조군과 background OD 의 값보다 높게 나타난 최대 희석배수를 항체 역가로 측정하였으며 그 한 예를 Fig. 2에 나타내었다(Fig. 2). 이렇게 측정된 항체 역가는 TB-1, TB-4, TB-5가 1 : 256 이었으며 TB-2, TB-3 은 1 : 512 였다.

Table 3. Binding of Antibodies to Extract Antigen of *M. tuberculosis*

Hybridoma cell line	B. max(%)*	Ag. amount for B. max
T B-1	74	200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$
T B-2	71	200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$
T B-3	93	200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$
T B-4	79	200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$
T B-5	78	200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$

* B. max=maximum binding(%)

Fig. 3. Binding of antibodies to varying amount of *M. tuberculosis* extract.

2. 단세포균항체의 항체특이성

TE 항원으로 생산된 5개 항체가 갖는 특이성을 검토하기 위하여 우선 각 항체를 TE 항원과 반응시켜 동중반응(homologus reaction)으로서의 최대 부착 정도와 그때 필요한 TE 항원의 양을 결정키위해 항원을 200 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 부터 2배씩 희석한 뒤 각 세포배양액을 4 배 희석하여 항원과 동량을 섞어 37°C에 2시간 반응시키고 난 후 항원과 반응하지 않은 잔존 항체량을 흡광도로 측정하였다. 대조군과의 차이를 계산하여 항원에 부착된 항체의 양을 백분율로 표시하여 Fig. 3과

Table 3에 나타내었다. TB-2에서 71%로 최저부착율을 TB-3에서는 93% 가 흡착되어 최고치를 보였으며 모두 70%이상 TE 항원에 흡착되는 것을 볼 수 있다 (Fig. 3, Table 3). 다섯 개의 항체 모두 TE 항원을 200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 첨가하였을 때 최고의 흡착율을 보였으며 50% 흡착에 필요한 양은 TB-3에서 69 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 로 가장 적게 TB-2에서는 97 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 로서 최다량의 항원을 필요로 하는 것을 알 수 있었다.

M. tuberculosis 항원에 대한 단세포균 항체가 타종의 *Mycobacterium* 즉 *M. bovis*, *M. avium*, *M. fortuitum* 또한 *E. coli*의 추출항원에 부착되는지의 여부와 그 정도를 측정키위해 각 항체가 TE 항원에 최대 흡착을 보인 항원의 양인 200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 의 각 항원을 준비하여 4배희석된 세포배양액과 동량을 섞어 37°C, 2시간동안 반응시킨후 잔존 항체량을 대조군과 비교 백분율로 Table 4에 표시하였다(Table 4). *M. bovis* 항원(BE)에 대해서는 TB-5가 48%, TB-4가 32%의 흡착율을 보였으며 나머지는 25% 미만의 값을 나타냈고 *M. avium* 항원(AE)에 대해서는 모두 15% 미만의 감소를 보였다. *M. fortuitum* 항원(FE)에 대하여는 TB-1, TB-5가 32%의 흡착율을 보였으며 전혀 다른 균인 *E. coli* 항원에 대해서는 10% 미만의 흡착율로 인한 반응감소를 나타내었다. 이들중 50% 가까운 변화를 보인것은 *M. bovis* 항원(BE)에 대해서 TB-5가 보인 48%의 부착율 뿐이었다.

한편 Fig. 4에는 각 항원 부착에 따른 잔존 항체의 감소율의 변화를 대조군과 비교하여 Fig. 4에 표시하였다. Table 4와 Fig. 4의 결과로 볼때 TB-2, TB-3은 타 항체에 비하여 *M. tuberculosis* 항원(TE)에 보다 특이적인 반응을 하는 항체일 것으로 추측되며 다른 항체들도 타종 항원에 의해 50%이상 감소되지 않는 것으로 보아 *M. tuberculosis* 항원에 대한 특이성은 갖추고 있는 것으로 생각된다. 5종류의 항체를 가지고

Table 4. Residual Activities of Antibodies in Hybridoma Culture Fluid to TE antigen after the Absorption by 5 Different Extract Antigens(%)

Cell line	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>E. coli</i>
T B-1	26	78	84	68	92
T B-2	29	85	82	75	100
T B-3	7	85	100	78	100
T B-4	21	68	93	78	95
T B-5	22	52	99	68	100

Fig. 4. Residual activities of antibodies to TE antigen in hybridoma culture fluid reacted with four different mycobacterial antigen(200 µg/100 µl).

Table 5. Reactivities of Antibodies in Hybridoma Culture Fluid Tested with ELISA Plates Coated with 4 Different Antigens

Cell line	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i> (BCG)	<i>M. avium</i>	<i>M. fortuitum</i>
T B-1	0.285±0.025	0.127±0.011	0.068±0.006	0.138±0.008
T B-2	0.317±0.018	0.137±0.010	0.068±0.003	0.144±0.012
T B-3	0.337±0.017	0.130±0.011	0.082±0.005	0.143±0.006
T B-4	0.336±0.021	0.136±0.009	0.074±0.009	0.139±0.003
T B-5	0.343±0.023	0.105±0.012	0.071±0.006	0.140±0.009

* negative range 0.137±0.016

시행한 흡착 시험과는 달리 4종 항원이 부착된 ELISA plate로 다섯개의 세포 배양액 중의 항체가를 측정하여 그 흡광도 값을 Table 5에 나타내었다(Table 5). 각 10개씩 시험한 결과 동종 반응인 *M. tuberculosis* 항원의 경우 0.285~0.346까지 높은 값을 보인 반면 이종 반응인 *M. bovis*, *M. avium*, *M. fortuitum* 항원과의 반응에서는 모두 음성 영역내로 나타나 앞의 흡착시험에서의 이종항원에 대한 항체가의 감소는 다량의 항원 투입에 따르는 비특이적인 감소일 것으로 추측된다. 한편 일주일전에 pristane 0.5 ml을 주사한 Balb/c 마우스에 항체를 생산분비 하는 융합세포(hybridoma cell) 10⁷ cell을 복강내에 주사하여 복수(ascitic fluid)를 생기기 주사한 후 1주일후 복수를 꺼내 TE 항원이

부착된 ELISA plate로 항체가를 측정하여 그 결과를 Table 6에 나타내었다. 복수에 포함된 TE 항원에 반응하는 항체가는 TB-1이 최고 값으로 0.969를 나타냈으며 TB-3가 0.528을 보이고 있으며 이들 값은 각각 세포를 배양한 상청액내의 항체 OD가 보다 2~3배가 높은 것을 알 수 있었다.

고 찰

단세포군 항체는 그 특성이 항원 물질의 특정 항원 결정기에 대한 항체를 생성하는 하나의 세포로부터 유래된 동질의 항체로 구성되어 단일특이성을 나타내며 종래의 항혈청과는 다른 특징을 갖는다고 알려져 있다.

Table 6. Antibody Level to TE Antigen in Ascitic Fluid Produced after Injection of Hybridoma into the Peritoneal Cavity of BALB/c mouse

Hybridoma cell line	OD of Ascites	OD of culture fluid
T B-1	0.969±0.064	0.359±0.057
T B-2	0.829±0.062	0.378±0.044
T B-3	0.528±0.051	0.282±0.045
T B-4	0.694±0.123	0.294±0.057
P 3-x 63-Ag 8 653	0.152±0.017	0.137±0.009

* OD read by automatic ELISA reader at 492 nm.

이러한 단세포균 항체의 특성을 고려하여 세균의 항원 물질에 대한 단세포균 항체를 생산할 수 있다면 면역학적 응용범위가 상당히 넓을 것으로 예견할 수 있다. 지금까지 결핵 환자의 진단 및 치료에 있어서 임상적 소견을 뒷받침하는 군배양 검사가 결정적인 자료이긴 하지만 수 주간을 기다려야 한다는 것이 큰 단점으로 지적되어 왔으며 이에 Nicholls 등^{13,14)}은 빠른 혈청학적 진단법을 대체하여 사용할 수 있으리라 생각하여 agglutination test를 진단법으로 제시한 바가 있다. 이들은 타실험자들의 혈청학적 검사법과 비교하여 항원의 autoagglutination을 제거하여 사용, 실험한 결과 간단하고 특이적인 방법으로서 진단 목적으로 사용할 수 있다고 주장하였으나 Mitchison 등¹⁵⁾은 위양성(false positive) 및 표음성(false negative)등으로 인해 활동성결핵 환자(active tuberculosis)의 진단에 무의미한 것으로 추시 보고한 바가 있다. 이처럼 아직 혈청학적 검사에 대하여는 특이성 및 민감도등의 문제로 논란의 여지가 있을 수 있으며 검사방법 그 자체외에도 근간 국내에서 오찬영등¹⁶⁾에 의한 보고에서 지적된 바와 같이 비정형 항산균(atypical mycobacterium)에 감염에 의한 질환이 결핵균 감염으로 오인되어 근본치료가 안된 경우등이 있어서 보다 특이적이고 신속한 결핵균 감염 진단법은 국내에서 더 필요로 하게 될 것이다. 이러한 요구는 단세포균 항체를 이용하여 대응 항원 또는 항체를 찾으므로써 해결할 수 있으리라 생각되며 그 측정에 있어서도 매우 민감도가 높은 ELISA나 RIA 같은 방법을 사용하면 더 보장될 수 있으리라 생각된다. 단세포균항체가 얼마나 특이성을 갖추고 있는가 하는 것이 주 판단이 될 것이지만 본실험에서 시도한 *M. tuberculosis* 항원에 대한 단세포균 항체외에 *M. bovis* 등 타 *Mycobacterium*에 대한 단세포균 항

체도 개발하여 동시에 사용할 수 있다면 더욱 정확한 혈청학적 검사법으로 응용될 수 있을 것이라 본다.

본실험에 사용한 항원은 Coates 등¹⁷⁾이 제조하여 사용한 항원이나 Gillis 등¹⁸⁾이 사용한 항원과는 달리 파쇄후 고형성분을 제거한 것을 사용하였는데 이는 화학적 또는 열처리등에 의한 항원 성분의 손상을 막기 위함이었으며^{2,3)} 세포 구조물 모두가 특이항원물질의 구성 요소가 될 수 있으나 용고물에 의한 분석 저해요인물 제거하고자 함이었다. 또한 이 항원 속에는 *M. tuberculosis*에 대한 특이 항원들이 다수 포함되어 있는 것으로 이미 알려져 있어²⁾ 단세포균 항체 제조에 큰 무리가 없을 것으로 생각한다. 이 항원으로 생산된 5개 항체의 타종 균 항원과의 흡착시험 결과를 보면 *M. bovis*에 두드러진 억제율을 보인 TB-4나 TB-5, *M. fortuitum*에 대한 TB-1, TB-5를 제외한 다른 반응에서는 이중 반응의 경우 20% 전후의 흡착율을 보이고 있으나 같은 항원을 ELISA plate에 붙여 측정 한 결과로 보면 타종항원에 이들 항체의 부착을 볼 수 없어 아마도 비특이적인 현상들일 것으로 추측되며 이러한 흡착반응도 최소의 값을 보였던 TB-2나 TB-3는 비교적 특이성을 갖춘 항체들로 판단할 수 있을 것이다.

요 약

*M. tuberculosis*의 파쇄 추출항원으로 면역한 Balb/c 마우스의 비장세포와 P 3-X 63-Ag 8.653 세포를 융합하여 *M. tuberculosis* 파쇄 추출 항원에 반응하는 항체를 생산분비하는 5개의 hybridoma cell line을 얻어 이들 세포의 배양액 중의 항체가들 ELISA로 측정하였으며 각 항체의 *M. tuberculosis* 추출 항원에 대한 특이성 양상을 흡착 시험을 통하여 결정하였다.

이중 TB-2, TB-3 cell line이 생성하는 항체는 *M. tuberculosis* 이외의 타종 *Mycobacterium* 추출 항원에 대해 25%이하의 부착율을 나타내었다. TB-1은 *M. fortuitum*에 TB-4는 *M. bovis*에, TB-5는 *M. fortuitum*, *M. bovis*에서 25%이상 50%미만의 부착율을 나타냈었다. 이들 항원을 부착하여 사용한 ELISA plate 상에서는 각 세포 배양액은 반응하지 않았다.

참 고 문 헌

- 1) Barksdale, L., Kim K.S.: *Mycobacterium*, Bacteriological Review, 41:217, 1977.
- 2) Daniel, T.M., Janicki, W.B.: *Mycobacterial antigens; A review of their isolation, chemis-*

- try, and immunological properties, Microbiological Review, 42:84, Mar., 1978.
- 3) Janicki, B.W., Wright, G.L. Jr., Good, R.C., and Chaparas, S.D.: Comparison of antigen in sonic and pressure cell extracts of *Mycobacterium tuberculosis*, Inf. Imm. 13:425, 1976.
- 4) Daniel, T.M., Good, R.C., and Janicki, B.W.: Immunoelectrophoresis of *Mycobacterium tuberculosis* antigens, Amer Rev. Resp. Dis. 112: 639, 1975.
- 5) Köhler, G., Howe, C.S., and Milstein, C.: Fusion between immunoglobulin secreting and nonsecreting lines, Eur. J. Immunol., 6:292, 1976.
- 6) Köhler, G.: The technique of hybridoma production, Immunological Methods Vol. II, Academic Press, New York, 1979.
- 7) Löhler, G., EMBO: Hybridoma technique, EMBO, SKMB course Basel, 1980.
- 8) Milstein, C.: Monoclonal antibodies, Sci. Am. 243:56, 1980.
- 9) Hurrel, J.G.R.: Monoclonal Hybridoma Antibodies; Technique and Applications, Boca Raton, Florida, CRC press, 1981.
- 10) Kennett, H.R., Mckearn, T.J., and Bechtol, K.B.: Monoclonal antibodies, Hybridomas: A new dimension in biological analysis, New Plenum Press, York, 1980.
- 11) Littlefield, J.W.: Selection of hybrid from mating of fibroblast in vitro and their presumed recombinants, Science 145:709, 1964.
- 12) 김상재, 배길환, 김성진 : 효소 결합 면역분석법을 이용한 결핵환자혈청내 항결핵균 항체의 검출, 결핵 및 호흡기질환 28:171, 1981.
- 13) Nicholls, A.C.: A serodiagnostic test for tuberculosis, J. Clin. Path. 28:850, 1975.
- 14) Nicholls, A.C., Horsfield, K.: Serological diagnosis of tuberculosis: A report of 12 months' clinical experience, Thorax, 31:289, 1976.
- 15) Mitchison, D.A., Aber, V.R., Ahmad, F.J., Allen, B.W. and Devi, S.: Evaluation of a serological test for tuberculosis, Brit. Med. J., 28:1383, 1977.
- 16) 오찬영, 최대경, 유준 : 결핵환자에서 분리된 비정형 항상균에 관한 연구, 연세의대 논문집 6:1, 1973.
- 17) Coates, A.R.M., Hewitt, J., Allen, B.W. and Ivanyi J.: Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies, Lancet ii:167, 1981.
- 18) Gillis, T.P., Buchanan, T.M.: Production and partial characterization of Monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*, Inf. Imm. 28: 172, 1982.