□ 원 저 □

호소결합면역분석법을 이용한 결핵성 늑막염의 면역학적 진단법에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실, 결핵연구소, 미생물학교실*

이춘택 · 심영수 · 김건열 · 한용철
조 명 제* · 차 창 룡*

= Abstract =

Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Tuberculous Pleural Effusion and Its Diagnostic Significance

Choon Taek Lee, M.D., Young-Soo Sim, M.D., Keun Youl Kim, M.D. Yong Chol Han, M.D.
Myung-Je Cho, M.S.* and Chang-Yong Cha, M.D.*

*Dept. of Internal Medicine, Tuberculosis Research Institute & Dept. of Microbiology**

The tuberculous pleural effusion is caused by the release of bacilli-laden caseous material into pleural space and is known to induce an inflammatory reaction with effusion.

The definite diagnosis can be established by the discovery of tubercle bacilli from the effusion or by the pathologic examination of pleural tissue.

However, these methods have some limitations in clinical application due to prolonged period of more than 4 weeks for bacteriologic culture examination and untoward complications of pleural biopsy procedure.

Recently immunologic diagnosis of tuberculosis using enzyme-linked immunosorbent assay emerged as a new diagnostic method.

We measured the anti-mycobacterial antibody from tuberculous pleural effusion using tubercle bacilli-extract(TE) as antigen and obtained the following results.

1) The absolute absorbance of IgG to TE antigen in tuberculosis pleural effusion was 0.770 ± 0.366 and 0.278 ± 0.149 in control group. ($p < 0.001$)

2) The absolute absorbance of IgM to TE in tuberculous pleural effusion was 0.821 ± 0.369 and 0.475 ± 0.286 in control group. ($p < 0.001$)

3) The absolute absorbance of IgA to TE in tuberculous pleural effusion was 0.544 ± 0.329 and 0.358 ± 0.234 in control group. ($p < 0.05$)

4) Among 3 immunoglobulin group, IgG to TE was most helpful for diagnosis.

When the absolute absorbance of IgG to TE above control mean + 2 S.D. (0.576) was tentatively defined as positive, 65% of tuberculous pleurisy patients were positive, whereas only 3% of controls were positive.

본 논문의 요지는 1985년 11월 대한결핵학회 학술대회석상에서 구연하였음.

본 연구는 1983년도 서울대학교병원 임상연구비의 지원으로 이루어진 것임.

서 론

삼출성늑막염은 임상에서 흔히 대하는 질환으로써 결핵성 원인을 위시하여 세균성, 암성, 진균성, 교원성질환등 수많은 원인과 원인을 찾을 수 없는 많은 경우를 임상에서 경험하고 있다¹⁹⁾. 우리나라에서는 결핵성 원인이 제일 많은 것으로 알려져 있는데^{3,5)} 결핵성늑막염으로 진단하기까지는 늑막천자검사로써 늑막액 내 임파구가 주된 백혈구의 증가, 단백양의 증가와 당분의 감소등 간접조건에 의해 진단하는 수가 많아 오진의 가능성을 내포하고 있는 반면 결핵의 확진을 위해서는 늑막액내에서 결핵균을 검출 혹은 배양하거나 늑막조직 생검에서 결핵에 합당한 소견을 얻는 방법이 있으나 세균점사인 경우 4주이상의 장시간이 소요되며 검출율도 낮고 후자 경우는 합병증의 가능성이 있어 널리 실시하기 어려운 단점이 있다.

최근 들어 면역학의 발달에 힘입어 결핵감염진단에 결핵의 특이면역반응을 이용하는 혈청진단법이 많이 개발되어 왔다. 1976년 Engvall¹⁸⁾이 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 개발하여 결핵의 혈청진단에 이용되면서 면역반응을 측정하는 결핵진단은 큰 발전을 이룩하였는데 ELISA를 이용한 결핵의 특이항체 측정은 폐결핵의 진단뿐만 아니라 폐외 결핵진단에도 이용 가능성이 제의된 바 있다. Stroebel⁴⁴⁾의 연구는 폐외결핵중 골 및 관절결핵에서 혈청내 항결핵항체를 측정하여 진단적 가치가 있음을 증명하였고 결핵성늑막염에서 뇌척수액내의 항결핵항체 및 결핵항원을 측정하여 뇌막염의 감별진단에 도움이 된다는 보고도 있었다^{22,40)}.

인체의 체액중 늑막액내에서의 ELISA를 이용한 항결핵항체의 변동에 대해서는 현재까지 연구된 바 없으며 늑막염의 원인진단을 위한 결정적 검사법 개발의 일환으로서 늑막액내의 IgG, IgM 및 IgA의 항결핵항체를 ELISA 방법에 의하여 측정하여 연구조사한 바 있어 보고하고자 함.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1985년 3월부터 1985년 9월까지 서울대학교병원 내과에 입원 혹은 의뢰내원했던 삼출성늑막염 환자 64명을 대상으로 했고 그중 늑막생검에서 육아종 및 전락성괴사병변이 발견되거나 늑막액에 결핵균이 배양되어

Table 1. Composition of Diseases of Study Group

Tuberculous pleurisy	34
Nontuberculous Pleurisy	30
Malignancy	12
Empyema	6
Parapneumonic Effusion	7
Connective tissue disease	2
Others	3

Table 2. Distribution of Age and Sex of Study Population

Sex	Tbc pleurisy		Nontuberculous pleurisy	
	M	F	M	F
Age				
<10	0	0	0	0
11~20	4	2	1	1
21~30	10	3	2	1
31~40	3	3	4	3
41~50	3	2	3	0
51~60	2	1	1	0
61~70	0	0	5	5
>70	1	0	4	0
Total	23	11	20	10
Mean Age & SD	33.0±15.0		49.9±18.8	

결핵성늑막염으로 확진된 환자군은 34명이고 대조군으로서 늑막생검 및 세포진검사 혹은 늑막액내의 CEA 측정치로 확진된 악성늑막염 환자 12명, 세균성농흉환자 6명, parapneumonic effusion 환자 7명, 교원성질환에 의한 늑막염환자 2명등 30명을 대상으로 하였다 (Table 1).

조사대상의 성별, 연령분포는 64명중 남자가 43명, 여자가 21명이었고 결핵성늑막염환자군은 남자 23명 여자 11명이었고 대조군은 남자 20명, 여자 10명이었다. 결핵성늑막염환자군의 연령은 10대 및 20대 환자가 많았고 평균연령은 33.0±15.0세였고 대조군은 악성늑막염환자와 30대 및 60대이후의 환자가 많아 평균연령은 49.9±18.8세였다 (Table 2).

1. 연구방법

1) 늑막액의 채취 및 준비

모든 대상환자에서 늑막천자 및 가능한 한 늑막생검

검사를 시행하였다. 늑막액은 혈액이 오염되지 않게 초회 늑막천자에서 10 ml를 채취하여 plain tube에 넣어 4°C 냉장고에 보관후 3일이내에 실온에서 1,500 g로 30분동안 원심분리하여 얻은 상층액(supernatant)을 0.5 ml씩 분주하여 -20°C에서 보관하였다가 실험하기 직전에 상온에서 용해하여 사용하였다.

2) 표준늑막액준비

본 실험의 재현성을 고려하고 측정의 최적농도를 결정하기 위하여 표준양성늑막액과 표준음성늑막액을 선정하였다. 우선 늑막생검에서 결핵성늑막염이 확진되고 PPD 피부반응에 양성을 보인 결핵성늑막염환자 10명과 세포진검사로 악성늑막액이 확진되고 PPD 피부반응이 음성이며 결핵의 병력이 없는 악성늑막염환자 5명과 세균성농흉환자 3명을 대상으로 임의로 IgG는 1:200희석, IgM 및 IgA는 1:10희석 농도에서 효소결합면역측정법을 실시하여 결핵성늑막염환자중 제일 높은 Absorbance를 보인 늑막액과 대조군중 제일 낮은 Absorbance를 보인 늑막액을 표준양성 및 표준음성늑막액으로 정하였다.

3) 항원준비

Mycobacterium tuberculosis(H₃₇RV strain)를 Sauton 배지에 대량 배양하여 phenol을 1%되게 첨가하여 37°C에 3일간 처리하여 균을 사멸시켰다. 이것을 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.0)으로 3회 세척하고 PBS에 재부유시킨 다음 초음파로 결핵균을 파쇄시켰다. 파쇄된 균성분은 4°C에서 10,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 항원성분은 Tubercle Extract(TE)항원이라 명명하고 본 실험에 사용하였다.

4) 효소결합면역측정법(Enzyme-linked Immunosorbent Assay):

심¹⁾과 차²⁾가 결정한 방법대로 TE 항원을 흡착시켜 사용하였다. 항원을 carbonate buffer(pH 9.6)에 10 µg/ml의 농도로 녹여 polystyrene 96well EIA plate (Costar; Serocuster 96 well EIA plate, flat bottom, Catalog No 3590, Lot #2171)에 well당 100 µl씩 분주하고 4° 냉장고에서 18시간 동안 부착시켰다. 부착시킨다음 증류수로 2회 세척하고 PBS에 Tween 20을 0.05%, bovine serum albumin(BSA)을 3% 첨가한 3% BSA-PBS-Tween 20용액을 well당 150 µl씩 첨가하여 37°C에서 3시간 방치하여 blocking시킨다. 그후 PBS-Tween 20용액으로 3회 세척한 후 즉시 사용하거나 건조시켜 냉장고에 보관하여 사용하였다. 환자 늑막액을 상온에 녹여 0.1% BSA-PBS-Tween

20용액을 사용하여 IgG는 1:50, IgM 및 IgA는 1:12.5로 희석하여 항원을 흡착, blocking시킨 well에 100 µl씩 분주한 다음 37°C에 1시간동안 항원항체반응을 실시하였다. 반응이 끝나면 PBS-Tween 20용액으로 3회 세척하였다. peroxidase conjugated goat antihuman IgG, antihuman IgM 및 antihuman IgA를 0.1% BSA-PBS-Tween 20용액으로 antihuman IgG 및 antihuman IgA는 1:2,000으로 antihuman IgM은 1:4,000으로 희석하여 well당 100 µl씩 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 PBS-Tween 20용액으로 5회 세척하고 기질용액을 넣는다. 기질용액은 30% H₂O₂ 20 µl와 발색제인 orthophenylene diamine(OPD) 4 mg을 phosphate-citrate buffer(PCB, pH 5.0) 10 ml에 혼합한 용액을 사용하였다. 기질용액을 well당 100 µl씩 넣고 상온에서 25분동안 반응시킨 다음 2M H₂SO₄ 용액을 well당 100 µl씩 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 그후 Multiscan(Titerteck Model, Flow laboratories)을 사용하여 각 sample의 IgG, IgM 및 IgA의 역가를 492 nm에 흡광도(absorbance)를 측정하였다. 각 sample은 2 well씩 실험하여 평균치를 내어 blank well의 absorbance를 뺀 절대흡광도(absolute absorbance)를 실험치로 사용하였다.

효소결합면역측정 실시 일별, plate 별 번이를 상쇄하기 위해 표준양성늑막액 및 표준음성늑막액을 매번 같이 측정하여 아래식으로 수정하였다.

검체의 수정 흡광도=검체의 흡광도

$$\times \frac{1}{\text{표준 양성 늑막액의 흡광도}}$$

연구 결과

1. 효소결합면역분석법의 최적조건결정

TE 항원의 농도는 심¹⁾과 차²⁾의 연구에서 결정한 대로 10 µg/ml로 고정시킨후 표준양성늑막액과 표준음성늑막액을 제단희석시켜 10 µg/ml의 항원과 반응시켜 양성늑막액의 측정흡광도가 1에 가깝고 음성늑막액의 흡광도와와의 차이가 큰 희석농도를 최적희석농도로 정하였다.

IgG 항체측정에서는 1:50희석, IgM 및 IgA 항체측정에서는 1:12.5희석이 최적희석농도였다(Fig. 1, 2, 3).

Fig. 1. Titration curve for IgG-TE of reference pleural fluid.

Fig. 2. Titration curve for IgM-TE of reference pleural fluid.

2. 늑막액내의 TE 항원에 대한 IgG 항체(IgG-TE) 측정결과

결핵성늑막염환자군과 대조군의 늑막액내의 TE 항원에 대한 IgG 항체를 측정한 결과 절대흡광도가 결핵성늑막염환자군에서는 0.770 ± 0.366 이고 대조군에서는 0.278 ± 0.149 으로 통계적으로 양군간에 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$).

대조군의 $\text{mean} \pm 2\text{S.D}$ 인 0.576을 기준으로 할 경우 ELISA 에 의한 IgG-TE 항체의 측정은 예민도는 65%

Fig. 3. Titration curve for IgA of reference pleural fluid to TE antigen.

Fig. 4. IgG antibody titers to TE antigen in pleural fluids from patients with tuberculous pleurisy and with non tuberculous pleurisy.

(22/34)이고 특이성은 96%(22/23)의 진단적가치를 보였다(Fig. 4).

3. 늑막액내 IgM-TE 측정결과

결핵성늑막염 환자군과 대조군의 늑막액내의 TE 항원에 대한 IgM 항체를 측정한 결과 절대흡광도가 결핵성늑막염환자군에서는 0.821 ± 0.369 , 대조군에서는 0.475 ± 0.286 으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$) (Fig. 5).

Fig. 5. IgM antibody titers to TE antigen in pleural fluid from patients with tuberculous pleurisy and with nontuberculous pleurisy.

Fig. 6. IgA antibody titers to TE antigen in pleural fluids from patients with tuberculous pleurisy and with nontuberculous pleurisy.

4. 늑막액내의 IgA-TE 측정결과

결핵성늑막염환자군과 대조군의 늑막액내의 TE 항

원에 대한 IgM 항체를 측정한 결과 결핵성늑막염환자군에서는 0.544 ± 0.329 , 대조군에서는 0.358 ± 0.234 로 유의한 차이가 있었다($P < 0.05$) (Fig. 6).

5. 결핵성늑막염환자중 늑막액내의 IgG

항체가 매우 낮았던 4명의 환자(IgG 흡광도: 0.242, 0.243, 0.298 및 0.347)에서 IgM 흡광도는 높게 측정되어 각각 0.829, 1.488, 1.236 및 0.951이었다. 그러나 IgG와 IgM 간의 상관관계는 없었다.

고 안

결핵성늑막염은 흉막에 인접한 작은 건락성폐병소가 장측성흉막을 침투해 나가 적은 양의 건락성물질이 흉막강을 감염시켜 여기에 대한 면역반응이 일어나 심한 염증반응을 야기시켜 삼출액이 고이게 된다. 결핵성늑막염은 대부분 초감염후 6개월이내 세포면역반응의 발현과 함께 나타나며 재발성결핵에서는 드물게 생긴다^{4,19)}.

결핵성늑막염의 증상으로는 60~70%에서는 급성질환으로 나타나 심한 기침과 흉통이 주로 나타나며 30~40%에서는 만성질환형태로 나타나 미열, 쇠약감 및 체중감소가 나타난다. 결핵성늑막염의 발현이후 약 50%에서는 폐결핵증이 속발되는 것으로 알려져 있다^{19,28)}. Patiala(1954)는 핀란드군인중 초기결핵성늑막염이후 7년이내에 43%에서, Roper(1955)는 늑막삼출액이 있고 PPD 피부반응이 양성이었던 141명의 군인중 65%에서 후에 폐결핵이 발생하였다고 보고하였다.

결핵성늑막염의 진단은 PPD 피부반응검사와 늑막삼출액의 검사로 이루어지고 있는데 결핵성늑막염이 의심되는 환자에서 5TU PPD 피부반응을 시행하여 양성이고 다른 것으로 설명이 안 되는 삼출성늑막염은 결핵성임을 강력히 의심케 하나 결핵의 유병율이 높고 BCG 접종율이 높은 우리나라에서는 진단적 가치가 떨어진다. 또한 결핵성늑막염 환자의 30~40%에서는 PPD 피부반응이 음성으로 나타나기도 한다. 결핵성늑막염 환자에서 PPD 피부반응에 음성이 많은 이유는 처음에는 immunocompetent cell이 늑막강내에 sequestration되어 혈액내에는 immunocompetent cell이 없을 것이라는 설이 있었으나 피부반응의 anergy를 설명하는 기전으로 adherent suppressor cell이 발견되면서 이 세포가 늑막액에는 존재치 않고 혈액내에만 존재하고 늑막삼출액내의 임파구는 면역반응을 나

타내나 말초혈액내의 adherent suppressor cell에 의해 피부반응이 음성으로 나타난다고 설명하고 있다¹⁷⁾.

현재 임상적으로 늑막삼출액내의 임파구가 주된 백혈구의 증가, 단백질의 증가, glucose의 감소등으로 결핵성늑막염의 추정진단하에 항결핵요법을 시행하는 경우가 많으나^{3,4,5)} 그 어느 것도 결핵의 직접적인 확진소견이 될 수 없고 결핵 이외의 다른 원인(악성늑막염 등)들이 증가하는 추세이어서 오진의 가능성이 많이 있다. 결핵성늑막염의 확진을 위해서는 늑막액내에서 결핵균을 검출 및 배양하거나 늑막생검에서 결핵에 합당한 병리소견을 증명하는 방법이 있다. 그러나 전술한 대로 결핵성늑막염의 기전이 소량의 결핵병변물질에 대한 과민면역반응으로 늑막액내의 결핵균의 검출 배양율은 20%정도 밖에 되지 않고 배양에는 4주이상의 오랜 기간이 걸려 실제 임상에 도움을 주지 못 한다^{11, 18, 41)}. 늑막생검으로 전락성괴사병변 혹은 육아종성병변이 발견되면 결핵으로 진단케 되며 1회생검으로 약 2/3정도에서 병변을 발견할 수 있고 3회생검시 80%에서 발견할 수 있으며 조직배양까지 할 경우 90%까지 진단을 얻을 수 있다²⁹⁾. 그러나 늑막생검은 늑막천자와 달리 생검에 익숙한 의사가 필요하며 기흉과 혈흉의 합병증의 가능성이 있고 늑막액이 소량인 경우에는 실시하기 어려운 단점이 있다.

이와 같은 문제점을 해결하기 위해 삼출성늑막염의 늑막액에서 각종 질환에 특이한 물질을 발견하여 진단에 이용하려는 많은 연구들이 이루어져 왔다.

최근 림도가 증가하는 악성늑막염의 진단을 위하여 cytology검사 외에 늑막액내의 orosomucoid, beta 2 microglobulin, ferritin, α FP, CEA 등의 측정이 이루어져 왔으며 그중 CEA는 진단적 가치를 인정받고 있다^{10, 32, 38, 48)}. 또한 결핵성늑막염에 특이한 물질을 측정하기 위한 연구도 많이 이루어져 lysozyme 및 adenosine deaminase(ADA)에 관한 연구가 많이 되어 있다. Perille(1973)등은 폐결핵환자의 혈청내 lysozyme 활성도가 높다고 하였으며 Klockars(1976)도 결핵성늑막염의 늑막액내의 lysozyme의 활성도가 비결핵삼출성늑막액내의 lysozyme보다 유의하게 증가한다고 하였으나 결핵성늑막염과 농흉간의 감별이 되지 않아 진단적 가치가 떨어진단⁷⁾.

최근 adenosine deaminase(ADA)의 측정이 결핵성병변의 진단에 가치가 있음이 알려져 있다. Piras(1973)는 결핵성늑막염환자의 뇌척수액에서 ADA 활성도가 높음을 관찰하고 바이러스성늑막염과의 감별에 도움을 줄 수 있음을 보고하였고 또한 그는 결핵성늑막

염환자의 늑막액에서 ADA를 측정하여 다른 질환과 완벽히 감별진단할 수 있음을 보고하였다. 그러나 그후 Niwa의 보고에서는 78%의 예민성과 84%의 특이성으로 좀 떨어지는 결과를 보고하였으며 국내 보고에서도 비슷한 결과가 보고되어 있다⁸⁾. 그러나 ADA는 임파구분화 및 증식에 필요한 것으로 세포성면역이 주된 질환인 전염성 단핵구증 및 장티프스환자의 혈청에서 높게 측정되는 것으로 알려져 있어 결핵의 특이한 성분이라는 할 수 없다.

결핵균을 직접 검출 및 배양하는 이외에 결핵을 확진하기 위해서는 다른 질환의 진단에서처럼 결핵의 특이한 면역반응을 측정하는 방법이 있다.

결핵균의 virulence에 의해 결핵의 임상형태가 결정되지 않는다는 것이 알려지고 결핵에 대한 면역반응에 의해 임상형태가 결정된다는 추정에 많은 연구가 진행되었다¹²⁾. Bhatnager(1977)는 결핵환자에서 B임파구, T임파구 및 immunoglobulin을 측정하여 세포면역반응과 체액면역반응간에 역상관계가 있음을 발견하였다. 또 Lenzini(1977)는 결핵의 immune spectrum이 있음을 제시하여 결핵에 대한 면역반응 spectrum을 RR, RI, UI 및 UU의 4group으로 구분하여 심한 형태의 결핵일 수록 세포면역기능은 저하되어 있고 체액면역기능이 증가되어 항체의 농도가 높음을 발견하였다. 결핵면역반응에서의 항체의 역할은 명확하지는 않으나 세포면역반응을 억제하여 antiprotective 효과를 나타내리라 생각되고 있다¹⁴⁾.

결핵의 면역학적 연구에는 표준항원과 표준검사방법이 필수적이다. 결핵균에 특이한 항원에 대한 연구는 1890년 Robert Koch가 old tuberculin(OT)을 추출함으로 시작되었다. 1941년 Seibert는 purified protein derivate(PPD)를 분리하여 현재까지 임상에서 결핵의 표준항원으로 사용되고 있다. 그후 결핵균에 특이한 순수항원을 얻기 위한 노력은 계속 되어 Seibert⁴³⁾, Jaricki²²⁾, Daniel 등^{15, 16)}의 연구로 많은 항원의 분리가 이루어지고 특히 Mycobacterium antigen 5는 M. tuberculosis와 M. bovis에 특이한 것이 알려지던서 이를 결핵진단에 사용하여 좋은 결과를 얻었으나¹⁶⁾ 이는 순수분리하기가 어려워 실제 임상에 이용하기에는 어렵다.

좀 더 쉬운 방법으로 항원을 얻을 수 있고 PPD의 문제점인 열처리과정의 변질가능성을 배제하기 위하여 결핵균을 파쇄하여 항원을 추출하는 방법으로 sonification 방법이 사용되고 있다. Grange(1980), Kiran(1985)등은 Mycobacterial sonicate를 항원으로 사용

하여 결핵혈청진단을 실시하여 좋은 결과를 얻었고 PPD 항원과 우수한 상관관계가 있음을 증명하였다. 본 연구에서도 초음파로 결핵균을 파쇄한 tubercle extract 항원을 사용하였다.

항원의 문제와 함께 항체의 측정방법에 대한 연구도 이루어져 1948년 Dubos와 Middlebrook의 적혈구응집반응을 거쳐 precipitation, gel diffusion³⁹⁾, 형광항체측정⁴⁶⁾ 및 방사면역측정법⁴⁹⁾ 등이 개발되었으나 예민도와 특이성이 떨어지는 것이 단점이다. 1972년 Engvall이 효소결합면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 개발하여 새로운 전기를 마련하였다. ELISA는 nanogram 정도까지 측정할 수 있는 예민도와 함께 다량의 sample을 처리할 수 있고 방사면역측정법처럼 동위원소의 위험성이 없는 것이 장점이다. Nassau(1976)가 결핵혈청진단에 ELISA를 최초로 이용한 이래 Tandon, Grange, Daniel, Zeiss 등 많은 사람이 ELISA를 이용한 결핵혈청진단을 시행하여 진단적 가치를 인정받고 있다. ELISA를 이용한 결핵혈청진단은 폐결핵 이외에 폐외결핵의 진단에도 이용되었다. Stroebe(1982) 등은 Mycobacterium antigen 6를 항원으로 하여 골, 관절 결핵환자의 혈청에서 항체를 측정하여 진단적 가치가 있음을 증명하였다.

혈청 이외의 체액내에 ELISA를 이용한 면역진단이 시도되어 Sada(1983)는 16명의 결핵성 뇌막염환자의 뇌척수액내에서 결핵항원을 측정하여 95%의 특이성과 81%의 예민성이 있음을 보고하였다. 또 Kalish(1983) 등은 결핵성 뇌막염환자 3명의 뇌척수액에서 PPD 항원에 대한 IgG 항체를 측정하여 대조군과 유의한 차이를 관찰하고 치료에 따라 IgG 항체가 초기에 증가하였다가 감소하는 것을 관찰하였다.

이에 뇌척수액 이외의 다른 체액내에서도 ELISA를 이용한 결핵의 면역진단의 가능성이 제시되었으나 현재까지 결핵성 뇌막염의 뇌막액내에서의 ELISA를 이용한 면역진단의 보고는 없는 실정이다.

이번 연구결과로 뇌막액내의 TE 항원에 특이 IgG, IgM 및 IgA(이하 IgG-TE, IgM-TE, IgA-TE로 약함)가 모두 결핵성 뇌막염군과 대조군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 IgG-TE를 제외한 IgM-TE와 IgA-TE는 두 군의 측정치의 중복이 많았다. 그러나 IgG-TE는 결핵성 뇌막염환자군과 대조군간의 측정치 중복이 적어 대조군의 mean+2S.D인 0.576을 경계로 나누면 결핵성 뇌막염환자 34명중 22명이 0.576이상이고 대조군 환자 33명중 1명만이 0.576이상이며

서 65%의 예민도와 96%의 특이성을 보였다.

특기할 점은 IgG-TE가 매우 낮았던 4명의 환자(IgG absorbance: 0.242, 0.243, 0.298 및 0.347)들의 IgM 흡광도가 높아 0.829, 1.488, 1.234 및 0.951로 IgM 측정치중 상위 group에 속하는 것이었다. 이 환자들은 모두 15~25세사이의 젊은 남자로서 결핵의 과거력은 없었고 뇌막염의 자각 증상이 나타나지 2주 이내의 초기 뇌막염환자였다. 이상의 결과로 초기의 결핵성 뇌막염의 뇌막액에는 IgM이 증가할 것이라는 생각이 들었으나 확인할 수 없었다. 그러나 IgG-TE와 IgM-TE 간의 상관관계는 없었다.

ELISA를 이용한 폐결핵의 혈청진단에서도 IgG의 진단적 가치는 널리 인정받고 있으나 IgM, IgA의 진단적 가치에는 상반되는 결과가 보고되고 있다^{6,9,20,25,45,47,50}. 이번 뇌막액의 연구에서도 IgG만 진단적 가치가 있었다.

이번 연구로 결핵성 뇌막염의 진단에 ELISA를 이용한 뇌막액내의 IgG 항결핵항체 측정이 진단적 가치가 있음을 알 수 있었으며 향후 과제로 순수결핵 항원의 사용 및 나아가 monoclonal antibody를 사용하여 항원 측정을 시도해 보고 결핵성 뇌막염, 심낭염 및 복막염 등의 결핵 확진이 어려운 폐외결핵의 체액내에서도 ELISA를 이용한 면역진단이 큰 의의가 있을 것으로 사료된다.

결 론

결핵균을 초음파로 파쇄한 TE 항원을 사용하여 결핵성 뇌막염환자의 뇌막액에서 효소결합면역분석법을 이용하여 IgG, IgM 및 IgA의 항결핵항체를 측정하고 대조군의 측정치와 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 뇌막액내의 TE 항원에 대한 IgG(IgG-TE)의 절대흡광도는 결핵성 뇌막염환자군에서 0.770 ± 0.366 이었고 대조군에서는 0.278 ± 0.149 로 유의한 차이가 있었고($p < 0.001$) 절대흡광도 0.576을 기준으로 할 경우 65%의 예민성과 96%의 특이성을 보였다.
- 2) IgM-TE는 결핵성 뇌막염환자군에서 0.821 ± 0.369 이었고 대조군에서는 0.475 ± 0.286 으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$).
- 3) IgA-TE는 결핵성 뇌막염환자군에서 0.544 ± 0.329 , 대조군에서는 0.358 ± 0.234 로 유의한 차이가 있었다($b < 0.05$).
- 4) IgG-TE, IgM-TE IgA-TE 및 IgG-TE가 모두

결핵성늑막염환자군과 비결핵성늑막염환자군간에 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 IgG-TE가 가장 진단적 가치가 높았다.

REFERENCES

- 1) 국윤호, 조명제, 황응수, 김익상, 차창룡, 장우현, 이승훈, 한용철 : Mycobacterium tuberculosis 파쇄추출항원에 대한 단세포균 항체의 생산 및 그 특성에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 31: 83, 1984
- 2) 김상재, 배길한, 김성진 : 효소결합면역분석법을 이용한 결핵환자 혈청내 항결핵균항체의 검출. 결핵 및 호흡기질환 28:171, 1981
- 3) 김재원, 정혜영, 조동일, 유재인, 유남수, 김홍 : 삼출성늑막염의 임상적 관찰. 결핵 및 호흡기질환 26:157, 1979
- 4) 김재원 : 결핵성 흉막염. 결핵. 379, 1984
- 5) 김진한, 고윤정, 김우태, 전준권, 진승범, 송창섭 : 삼출성 늑막염의 임상적 관찰. 대한내과학회잡지 27:73, 1984
- 6) 심영수, 김종숙 : 효소결합면역분석법을 이용한 결핵진단의 유용성에 관한 연구. 중앙의대지 9:187, 1984
- 7) 이양근 : 결핵성 및 비결핵성 삼출성늑막액에서 Lysozyme 치의 변동. 대한내과학회잡지 24:766, 1981
- 8) 차광수, 박병국, 엄석준, 이인수, 허성호, 신순현, 박실무, 김종숙 : 늑막삼출액과 복수에서의 Adenosine Deaminase의 활성도에 대한 연구. 대한내과학회잡지 25:364, 1983
- 9) 차창용, 김상재 : 폐결핵환자 혈청내 결핵균 특이 항체의 Immunoglobulin class 별분포. 결핵 및 호흡기질환 30:172, 1983
- 10) Asseo PP, Tracouboulos GD: Orosomucoid, α_2 -macroglobulin and immunoglobulins in serum and pleural effusions. Am J Clin Pathol 76: 437, 1981
- 11) Berger HW, Mejia E: Tuberculous pleurisy. Chest 63:88, 1973
- 12) Bhathena D, Mohabatra LN, Mital GS, Ramalingaswami V, Nayak NC: The pulmonary tuberculosis lesions in North India: A study in medicolegal autopsies II. Bacteriological aspects. Am Rev Respir Dis 101:18, 1970
- 13) Bhatnager R, Malaviya AN, Narayanan S, Rajgopalan P, Kumar R, Bharadwaj: Spectrum of immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 115:207, 1977
- 14) Chaparas SD: The immunity in tuberculosis. Bull WHO 60:447, 1982
- 15) Daniel TM, Affronti LF: Immunoelectrophoretic analysis of antigenic constituents of Seibert fractions of Mycobacterial culture filtrates. Identification with the proposed United States-Japanese reference nomenclature. Am Rev Respir Dis 108:1244, 1973
- 16) Daniel TM, Anderson PA: The isolation by immunosorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of Mycobacterium tuberculosis antigen 5. Am Rev Respir Dis 117:533, 1978
- 17) Ellner JJ: Pleural fluid and peripheral blood lymphocyte function in tuberculosis. Ann Intern Med 89:932, 1978
- 18) Engvall E, Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme linked antiimmunoglobulin in antigen coated tubes. J Immunol 109:129, 1972
- 19) George RB, Penn RL, Kinasewita GT: Mycobacterial, fungal, actinomycotic and nocardial infections of pleura. Clin Chest Med 6:63, 1985
- 20) 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 the tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease. Tubercle 61:145, 1980
- 21) Gribeta AR, Damsker B, Marchevsky A, Bottone EJ: Nontuberculous Mycobacteria in pleural fluid. Chest 87:495, 1985
- 22) Janicki BW, Chaparas SD, Daniel TM: A reference system for antigens of Mycobacterium tuberculosis. Am Rev Respir Dis 104: 602 1971
- 23) Kalish SB, Radin RC, Levitz D, Zeiss CR,

- Phair JP: The enzyme linked immunosorbent assay method for IgG antibody to purified protein derivatives in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. *Ann Int Med* 99:630, 1983
- 24) Kardjito, Handoyo I, Grange JM: Diagnosis of active tuberculosis by immunological methods. 1. The effect of tuberculin reactivity and previous BCG vaccination on the antibody levels determined by ELISA. *Tubercle* 63:269, 1982
 - 25) Kiran U, Shriniwas, Kumar R, Sharma A: Efficacy of three Mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur J Respir Dis* 66:187, 1985
 - 26) Klockars M, Petterson T, Riska H: Pleural fluid lysozyme in tuberculous and nontuberculous pleurisy. *Br Med J* 1:1381, 1976
 - 27) Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L: The spectrum of human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 27:230, 1977
 - 28) Levine H, Szanto PB, Cugell DW: Tuberculous pleurisy: An acute illness. *Arch Intern Med* 122:329, 1968
 - 29) Levine H, Metzger W, Lacera D, Kay L: Diagnosis of tuberculous pleurisy by culture of pleural biopsy specimen. *Arch Intern Med* 126:269, 1948
 - 30) Middlebrook G, Dubos GJ: Specific serum agglutination of erythrocyte sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J Exp Med* 88:521, 1948
 - 31) Nassau E, Parsons ER, Johnson GD: The detection of antibodies to Mycobacterium tuberculosis by micro enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle* 57:67, 1976
 - 32) Niwa Y, Kishimoto H, Shimokata K: Carcinomatous and tuberculous pleural effusions. Comparison of tumor markers. *Chest* 87:351, 1985
 - 33) Parlett RC, Youmans GP, Rehr C, Lester W: The detection of antibodies in the serum of tuberculous patients by an agar double-diffusion precipitation technique. *Am Rev Tuberc* 77:462, 1958
 - 34) Patiala J: Initial tuberculous pleuritis in Finnish armed forces in 1939~1945 with special reference to eventual postpleuritic tuberculosis. *Acta Tuberc Scand* 36(Suppl): 1, 1954
 - 35) Perille PE, Khan K, Finch SC: Serum lysozyme in pulmonary tuberculosis. *Am J Med Sci* 265:297, 1973
 - 36) Piras MA, Gakis C, Budroni M and Andreoni G: Adenosine deaminase activity in pleural effusions: An aid to differential diagnosis. *Br Med J* 23:1751, 1978
 - 37) Piras MA, Gakis C: Adenosine deaminase activity in CSF: an aid to differential diagnosis. *Enzyme* 14:311, 1973
 - 38) Rittgers RA, Loewenstein MS, Feinerman AE, Kupchik HZ, Marcel BR, Koff RS, Zamcheck N: Carcinoembryonic antigen level in benign and malignant pleural effusions. *Ann Intern Med* 88:631, 1978
 - 39) Roper WH, Waring JJ: Primary serofibrinous pleural effusion in military personnel. *Am Rev Respir Dis* 71:616, 1955
 - 40) Sada E, Lopez-Vidal Y, Ruiz-Palacio GM, Leon SP: Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* 2:651, 1983
 - 41) Scharer L, Mc Clement JH: Isolation of tubercle bacilli from needle biopsy specimens of parietal pleura. *Am Rev Respir Dis* 97:466, 1968
 - 42) Seibert FB: The isolation and properties of the purified protein derivative of tuberculin. *Am Rev Tuberc* 30:713, 1934
 - 43) 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
 - 44) Stroebel AB, Daniel TM, Lau JHK, Leong JCY, Richardson H: Serologic diagnosis of bone and joint tuberculosis by an enzyme-

- linked immunosorbent assay. J Inf Dis 146: 280, 1982
- 46) Toussaint AJ, Fife EH, Parlett RC, Affronti LF, Wright GL, Reich M, Morse WC: A soluble antigen fluorescent antibody test. Am J Clin Path 52:708, 1969
- 47) Viljanen MK, Eskola J, Tala E: Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for antibodies to purified protein derivative of tuberculin(PPD). Eur J Respir Dis 63:257, 1982
- 48) Vladutiu AO, Brason FW, Adler RH: Differential diagnosis of pleural effusions. Clinical usefulness of cell marker quantitation. Chest 79:297, 1981
- 49) Winters WD, Cox RA: Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay. Am Rev Respir Dis 124:582, 1981
- 50) Zeiss CR, Kalish SB, Erlich KS, Levitz D, Metzger E, Radin R, Phair JP: IgG antibody to purified protein derivative by enzyme linked immunosorbent assay. J Inf Dis 146: 280, 1982
-