□ 원 저 □

결핵균 PPD(RT40)에 반응하는 단세포균 항체의 생산 및 그 특성에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실

심 영 수 · 한 용 철

미생물학교실

조 명 제 · 차 창 룡

= Abstract =

Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Reactive to PPD of *Mycobacterium Tuberculosis*

Y.S. Shim, M.D*, M.J. Cho, M.D., C.Y. Cha, M.D. and Y.C. Han*, M.D.

Department of Medicine* and Microbiology, College of Medicine, Seoul National University

Using hybridoma technique, the analysis of antigenicity of tuberculin purified protein derivative (PPD) antigen and the identification of the species-specific antigen of *Mycobacterium tuberculosis* were attempted. Monoclonal antibodies to tuberculin PPD were produced by the fusion of BALB/c mouse spleen cells with BALB/c mouse myeloma (P3X63-Ag8. v653) cells.

Fifteen monoclonal antibodies were characterized as to their reactivity with tuberculin PPD antigen and *Mycobacterium tuberculosis* sonicate (TE) antigen by enzyme-linked immunosorbent assay. Among these, 8 monoclonal antibodies reacted with both tuberculin PPD antigen and TE antigen. All the antibodies were of IgG class. The subclass of antibody MPT-1 was IgG 2a and others were IgG 1.

The reactivity of the antibodies with 8 kinds of mycobacterial PPD were examined by enzyme-linked immunosorbent assay. Antibody MP-2, MP-5 & MPT-1 reacted selectively with tuberculin PPD antigen. Antibody MPT-6 cross-reacted weakly with 5 atypical mycobacterial PPD antigens.

Among 8 antibodies, reacting with both tuberculin PPD antigen and TE antigen, MPT-1 and MPT-6 were found to be specific of *Mycobacterium tuberculosis* antigen when tested against the sonicate and fractionate antigens of 5 mycobacterial species.

Nine antigenic determinants of *Mycobacterium tuberculosis* were identified by the reaction pattern of the antibody with PPD, sonicate and fractionate antigens. PPD-Antigen 1 was present only in tuberculin PPD and PPD-Antigen 4 was the specific antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. It is suggested that MPT-1 is the specific monoclonal antibody reacting with species-specific antigenic determinant. Also, this monoclonal antibody would be a valuable diagnostic reagent as well as a tool for the purification of specific antigen.

**본 연구는 1985년도 서울대학교병원 대단위연구비의 보조로 이루어진 것임.

***본 논문은 1986년도 제63차 대한결핵학회 추계학술대회에서 발표되었음.

서 론

결핵균에 감염되면 결핵균에 대한 세포성 면역의 유도 및 함께 체액성 면역의 일환으로 결핵균의 항원성분에 대한 다양한 항체가 생산된다. 이러한 항체의 양적 변화는 병의 정도와 관련이 있으며 민감하게 측정될 수 있다¹⁾.

결핵진단에 혈청검사가 시도된 것은 1901년 Widal과 LeSourd가 결핵환자의 혈청에서 보체결합항체를 검출하는데 성공하면서부터이다. 그 후 많은 학자들이 적혈구 응집법, 한천겔확산법, 카오린 응집시험, 라텍스응집시험, 벤토나이트면상시험, 보체결합시험, 침강시험, 형광면역측정법, 방사면역측정법, 효소면역측정법 등을 이용한 연구결과를 보고하였다¹⁾.

Diena²⁾는 결핵진단에 유용한 혈청학적 진단의 조건으로 ① 단순한 감염에 의한 항체의 검출보다는 활동성 결핵에 의한 항체의 생산을 검출할 수 있을 것, ② BCG 접종에 의한 항체의 생산과 감별할 수 있을 것, ③ 비정형성항산균에 의한 항체와 감별할 수 있을 것, ④ 집단검진에 사용하여 신환발견에 사용될 수 있을 것, ⑤ 질병의 경과를 관찰할 수 있을 것, ⑥ 비정형성항산균에 의한 감염과 구별할 수 있을 것 등을 들었다.

그런데 Grange³⁾는 현재까지의 연구성적을 종합해본 바 위의 조건을 충족시키주는 검사법은 아직까지 개발되지 않았다고 하였다.

혈청학적 진단법 개발에 실패한 주원인은 결핵균이 지닌 항원성분이 복잡하고, 다른 항산균과의 교차반응이 있기 때문인 것으로 해석된다³⁾. 따라서 결핵균에 특이한 항원성분을 순수분리하고 검정하려는 연구가 활발히 진행되었다.

결핵항원의 순수분리는 1890년 Koch에 의한 Old Tuberculin의 생산으로 시작되었다. 그후 Seibert가 1932년에 tuberculin purified protein derviative(이하 결핵균 PPD라 함)를 분리함으로써 순수항원 분리에 진일보하게 되었다⁴⁾. 결핵균 PPD는 결핵감염을 발견하기 위하여 널리 사용되어 왔으며 아직까지 결핵감염 발견의 표준 항원으로 사용되고 있다. 그러나 결핵균 PPD는 타 항산균과 교차반응함으로써 순수항원이 아닌 것이 판명되어 순수특이항원의 필요성이 대두하였다. 1949년 Seibert는 alcohol과 acetic acid 침전법을 사용한 화학적분획법으로 결핵균 PPD를 단백질 A, B, C와 다당질

I & II로 분리하여서 특이항원의 분리를 시도하였다⁵⁾. 그 후 여러학자들이 화학적, 면역학적 방법으로 특이항원의 분리를 시도하여 결핵균 PPD항원은 분자량이 10 KDa 전후인 여러가지 항원의 혼합물이며 다당질 항원이 공존하는데, 이 다당질항원이 교차반응의 주원인이 된다는 것이 알려졌다⁶⁾. 그러나 결핵균 PPD항원의 주항원의 정확한 구조에 대해서는 알려지지 않았으며, 또 결핵균 PPD항원의 주항원이 결핵균의 특이항원과 같은 성분인지도 아직 밝혀지지 않았다. 이는 결핵균 항원에 대한 항체로 다세포군항체(polyclonal antibody)를 이용하여서 특이항원성분을 결정하는데 문제가 많기 때문이다. 1975년 Köhler와 Milstein이 하이브리도마기법을 이용해서 단세포군항체를 생산하는데 성공함으로써 결핵균에 특이한 단일특이항체를 생산할 수 있게 되어서 이런 문제점을 해결할 수 있게 되었다⁷⁾. 결핵에서 단세포군항체를 사용한 연구는 1981년 Coates등이 단세포군항체를 이용해서 결핵균을 동정한 데서 시작되었고⁸⁾, 우리나라에서도 국등이 결핵균 파쇄항원을 사용한 단세포군항체를 개발하였다⁹⁾. 이 항체는 결핵균 파쇄항원과는 특이결합을 하지만 결핵균 PPD항원과는 결합하지 못한다는 것을 입증하여(Fig. 1) 결핵균 파쇄항원과 결핵균 PPD항원은 같은 균으로부터 유래한 항원이지만 서로 다르다는 것을 시사하였다⁹⁾. 그러나 심, 김은 결핵환자의 혈청속에 있는 항체는 결핵균 PPD항원이나 결핵균 파쇄항원에 거의 동일하게 반응한다는 결과를 제시함으로써

Fig. 1. Titration curves of TB-3 monoclonal antibody to TE antigen and tuberculin PPD antigen determined by ELISA.

써, 결핵균 PPD항원에 대한 단세포균항체를 이용하여 항원성분을 분석하는 것이 필요하다고 강조하였다¹⁰⁾.

본 연구는 하이브리도마기법을 이용하여 결핵균 PPD 항원에 특이한 단세포균항체를 제조하여, 이를 이용하여 결핵균 PPD항원의 항원성분을 분석하고 결핵균에 특이한 균종특이항원성분을 동정분리하고자 하는 목적에서 시도하였다.

연구재료 및 방법

1. 결핵균 항원의 준비

1) PPD 항원

본 실험에 사용한 PPD는 Tuberculin PPD(RT40), *M. avium* PPD(RS10), *M. fortuitum* PPD(RS20), *M. intracellulare* PPD(RS45), *M. scrofulaceum* PPD(RS95), 그리고 *M. smegmatis* PPD(RS27)로 Denmark의 Statens Seruminstitut로부터 구입하여 사용하였다.

2) 파쇄추출항원의 제조

파쇄추출항원은 김등의 방법을 이용하여 제조하였다¹¹⁾. 즉 *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, 그리고 *M. scrofulaceum*을 Sauton 액체배지에 대량 배양한 후 1% phenol 용액으로 세균을 사멸시켰다. 사멸된 균괴를 Tris HCl buffer와 2:1의 비율로 부유시키고 ultrasonicator로 세균세포를 파쇄한 다음 이 균파쇄액을 원심분리하여 상청액을 파쇄추출항원으로 사용하였다. 이 파쇄추출항원을 균주에 따라 TE, AE, FE, KE, SE라고 명명하였다. 이 항원은 본 연구를 위하여 대한결핵협회 결핵연구원에서 제조하여 사용하였다.

3) 중간정제항원의 제조

중간정제항원도 김등의 방법을 이용하여 제조하였다¹¹⁾. 즉 DEAE-Cellulose 수지를 Tris HCl buffer에 부유시켜서 이를 column에 채운 다음, 위에서 서술한 파쇄추출액을 적용시켰다. 수지에 부착된 항원을 0-2 M까지 NaCl의 선상농도구배(linear gradient)를 주면서 용출하였다. 용출된 peak를 염색하여 각각 F1, F2, F3, F4 항원으로 분류하였다. 이들 중 균종간에 특이성이 높은 항원을 선택하여 균주에 따라 TF₃, AF₂, FF₁, KF₂, SF₄라고 명명하였다.

2. 단세포균항체의 생산

1) 실험동물

생후 6주된 BALB/c 마우스 암컷을 서울대학교 동물사육장에서 구입하여 사용하였다.

2) 형질세포종 세포주

미국국립보건원에서 분양받은 P3X63-Ag8. v653 세포를 fetal bovine serum(이하 FBS라 함)이 20% 함유된 RPMI 1640(Flow Lab. Cat. No. 10-601)배지에서 일주일에 2회씩 계대배양하면서 유지시켰다.

3) 면역접종

결핵균 PPD(RT 40)항원을 Freund incomplete adjuvant에 섞어서 100 μ g씩 BALB/C마우스의 복강내에 주사하고 4주후에 같은 방법으로 100 μ g씩 추가면역을 실시하였다.

최종면역은 세포융합을 실시하기 3일 전에 결핵균 PPD(RT40)항원 400 μ g를 복강내로 실시하였다.

4) 세포융합조작과 융합세포의 선택

세포융합은 차등의 방법대로 아래와 같이 실시하였다¹²⁾. 결핵균 PPD(RT40)를 BALB/c 마우스에 최종면역한 후 3일째 되는 날에 마우스에서 비장을 적출하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Flow Lab. Cat. No. 10-331-26, 이하 DMEM이라 함) 용액 내에서 찢어서 비장세포를 수집하였다. 이 비장세포액을 원침하여 혈소판을 제거하고 0.17 M Tris-NH₄Cl 용액으로 처리하여 적혈구를 제거하였다. 이렇게 준비된 비장세포추출액의 세포농도를 1×10^8 /ml로 조정하였다. 세포융합 하루전에 배지를 교환하여 18시간 배양한 P3X63-Ag8. v653세포를 모아서 세포농도를 1×10^7 /ml로 조정하였다.

비장세포추출액 10 ml와 P3X63-Ag8. v653 세포액 10 ml를 50 ml 원침관에서 혼합하여 두번 원침한 다음, 상청액을 완전히 버리고 세포침전물을 재부유시켰다. 이 세포부유액에 온도가 37°C로 조정된 50% polyethylene glycol(M.W. 1,000, Sigma, Lot: 1070-0047) 1 ml를 1분동안 점적하면서 세포융합을 실시하였다. 다시 여기에 DMEM배지 1 ml를 1분동안에 점적하고 그 다음 15 ml를 5분동안에 점적하였다. 세포융합이 끝난 뒤에 200 G에서 5분간 원침시킨 다음, 상청액을 버리고 침전된 세포액에 FBS가 20% 함유된 DMEM 배지 20 ml를 첨가하여 세포를 부유시켰다. 96 well 배양판에 세포부유액

을 well당 50 μ l씩 분주하여 well당 세포수가 5×10^5 가 되도록 준비한 다음에 5~10% CO₂하에 37°C에서 배양하였다. 24시간 배양한 후 융합된 세포를 선택하기 위하여 HAT 배지를 well당 50 μ l씩 첨가하였다. 세포융합 후 3일, 5일, 7일째 되는 날 HAT 배지를 동량 첨가하였다. 이 후 역위상차 현미경으로 융합세포의 성장상태를 관찰하였다. 융합세포가 바닥에 1/3이상 자란 well을 골라서, 효소면역측정법으로 항체를 생산하는 well을 검색하여 세포를 24 well 배양판에 옮겼다. 이때부터는 aminopterin이 제거된 HT배지로 배양하면서 항체생성과 세포성장상태를 검색하여 cloning을 실시할 세포를 선택하였다. Cloning된 세포를 CO₂ 배양기에서 6일간 배양한 다음에 하나의 세포집락이 형성된 well을 표시해 두고서 10~15일 경에 효소면역측정법으로 항체생산여부를 관찰하였다.

3. 단세포군항체의 특성관찰

1) 효소면역측정법

세포배양액 내에 포함된 항체를 측정하기 위하여 효소면역측정법을 사용하였다. 효소면역측정법은 심·김의 방법대로 아래와 같이 실시하였다¹⁰⁾. PPD 항원(RT40)과 파쇄추출항원을 1 μ g/ml의 농도로 준비해서 96 well EIA plate에 well당 100 μ l씩 분주하여 부착시키고 3% BSA-PBS-Tween 20용액으로 항원이 부착되지 않은 부위를 blocking하였다. 그 다음에 융합세포배양 상청액을 100 μ l/well씩 첨가하여 항원-항체반응을 진행시켰다. 항원-항체반응 후에 0.1% BSA-PBS-Tween 20 용액으로 1 : 2000으로 희석된 peroxidase conjugated rabbit antimouse IgG heavy and light chains을 100 μ l/well씩 넣어 반응시킨 다음 ortho-phenylene diamine과 30% H₂O₂가 포함된 기질용액을 100 μ l/well씩 분주하여 효소-기질반응을 유도하였다. 그 후 2M H₂SO₄ 용액을 50 μ l/well씩 첨가하여 효소-기질반응을 정지시키고 automatic ELISA reader로 파장 492 nm에서 흡광도를 측정하여 항체역가를 측정하였다.

2) 경쟁효소면역측정법 (Competition ELISA)

선택배양한 하이브리도마세포가 분비하는 단세포군항체들이 반응하는 항원결정기의 동질성 여부를 확인하기 위하여 아래와 같이 경쟁효소면역측정법을 실시하였다. 결핵균 PPD항원(RT40)을 625 ng/ml의 농도로 희석하여 효소면역측정법과 같은 방법으로 96 well EIA Plate

에 부착시켰다. 여기에 항원결정기를 비교할 2개의 단세포군항체를 각각 50 μ l씩 같은 well에 넣어 항원-항체반응을 유도하였다. 그리고 positive control로 다른 well에 개개의 단세포군항체를 50 μ l씩 첨가하였다. 그 이후는 상기의 효소면역측정법과 동일한 과정을 거쳐 흡광도를 측정하였다. 경쟁효소면역측정법으로 ELISA를 실시한 well의 흡광도를 두개의 단세포군 항체의 positive control 흡광도를 합한 값으로 나누어 백분율로 구하였다. 그 결과 50%이하일 경우는 -, 50~60%일 경우는 $\pm$, 60~80%는 +, 80~100%는 #, 100%이상일 때는 ##로 표시하여 결과를 분석하였다.

3) 이중효소면역측정법 (Double sandwich ELISA)

단세포군항체의 Ig class 및 IgG subclass를 검색하기 위하여 아래와 같이 이중효소면역측정법을 실시하였다. Goat antimouse IgM heavy chain specific (Cappel Lab. Cat. No. 0211-0201), rabbit antimouse IgG1 (Miles Lab. Inc. Lot No. 27), rabbit antimouse IgG2b (Miles Lab. Inc. Lot No. 23), rabbit antimouse IgG3 (Miles Lab. Inc. Lot No. 23)을 10 μ l/ml의 농도로 희석한 다음 96 well EIA plate에 100 μ l/well씩 분주하여 부착하고 3% BSA-PBS-Tween 20 용액으로 blocking 시켰다. 그리고나서 하이브리도마 세포의 배양액을 4종류의 well에 100 μ l씩 첨가하여 반응시켰다. 이 후는 효소면역측정법과 동일한 과정을 거쳐 흡광도를 측정하여 단세포군 항체의 Ig class와 IgG subclass를 결정하였다.

결 과

1. 결핵균 PPD 항원 (RT40)에 반응하는 단세포군항체의 생산

1) 결핵균 PPD 항원 (RT40)을 면역시킨 BALB/c 마우스의 항체가

세포융합을 위하여 BALB/c 마우스에 최종면역을 실시한 다음, BALB/c 마우스의 체내에 결핵균 PPD 항원(RT40)에 대한 항체가 형성되었는가를 확인하기 위하여 효소면역측정법을 실시하였다. 그 결과는 그림 2에서 볼 수 있듯이 항체역가가 512에 달하여 BALB/c 마우스는 결핵균 PPD 항원(RT40)에 면역이 되었음을 확인하였다.

2) 항체를 분비하는 융합세포의 선택

융합세포액을 분주한 376개 well 중에서 세포가 자란 well은 334개 well로 89%에서 융합세포가 성장하였다. 이 중에서 결핵균 PPD 항원(RT40)에 반응하는 항체를 생성하는 well은 39개 well이었다(Table 1). 이들을 24 well 배양판에 옮겨 배양한 다음, 결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 대한 반응을 관찰한 결과는 아래와 같다. 9개 well은 배양과정에서 항체생성이 중단되었고, 14개 well은 결핵균 PPD항원(RT40)에만 반응하였고, 16개 well은 결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 모두 반응하였다. 이들 중 항체역가가 높고 성장상태가 양호한 세포를 선택하여 cloning을 실시하여 모두 76개의 하이브리도마 세포주를 얻었다. 이 중에서 대표적인 하이브리도마 세포주를 골라서 결핵균 PPD항원(RT40)에만 반응하는 7종의 세포주를 MP-1로부터 MP-7로 명명하고 결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 공통반응하는 8종의 세포주는 MPT-1로부터 MPT-8로 명명하여 계속 계대배양하면서 실험에 사용하였다(Table 2).

2. 결핵균 항원에 대한 단세포균항체의 역가

1) 결핵균 PPD항원(RT40)에 특이하게 반응하는 단세포균항체의 역가

결핵균 PPD항원(RT40)에 특이하게 반응하는 단세포균항체의 결핵균 PPD항원(RT40)에 대한 역가는 Fig. 3과 같다. 이들 항체는 정도의 차이는 있지만 1024이상의 역가를 나타내었다.

2) 결핵균 PPD 항원(RT40)과 TE 항원에 공통반응하는 단세포균항체의 역가

결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 공통반응하는 단세포균항체의 결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에

Table 1. Frequency of Hybrids Secreting Antibodies to Tuberculin PPD Antigen Selected by HAT Medium after Cell Hybridization

Total number of wells for cell mixture	Wells with growing hybrid in HAT medium	Wells with hybrid secreting antibodies in the medium *
376	334 (89%)	39

* Determined by ELISA (positive : > 0.250 in absorbance at 492nm)

Table 2. Reactivity Patterns Against Tuberculin PPD Antigen and TE Antigen of Supernatant from Culture Wells with Hybrids Secreting Antibodies

Pattern of reaction	Number of wells
React only with tuberculin PPD antigen	7
React with both PPD and TE antigen	8

Fig. 2. Titration curves of anti-tuberculin PPD antibody in the sera from the immunized and normal BALB/c mice determined by ELISA.

Fig. 3. Titration curves of the antibodies to tuberculin PPD antigen in the supernatant from the cultured hybridoma clone secreting tuberculin PPD specific monoclonal antibodies determined by ELISA.

대한 역가는 Fig. 4, Fig. 5와 같다. 결핵균 PPD(RT40)의 경우 MPT-1, MPT-5, MPT-6와 MPT-8이 1024 이상의 높은 역가를 나타내었다. TE항원에 대한 역가는 MPT-1, MPT-2, MPT-6, MPT-8의 경우 1024 이상이었다.

각 단세포균항체의 희석비에 따른 흡광도의 변화를 가지고 각 항체가 반응하는 항원결정기의 분포정도를 관찰하여 보았더니 아래와 같은 결과를 얻었다. MPT-4, MPT-6, MPT-8이 반응하는 항원결정기는 결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 모두 분포도가 높은 것으로 사료된다. 또한 MPT-5는 결핵균 PPD항원(RT40)에, MPT-2는 TE항원에 많이 분포되어 있는 항원결정기에 대한 항체임을 알 수 있다.

3. 단세포균항체와 반응하는 항원결정기의 유사성 조사

1) 결핵균 PPD 항원(RT40)의 농도에 따른 단세포균 항체의 흡광도의 변화

항원농도의 변화에 따른 단세포균항체의 반응 kinetics를 관찰하였다. 결핵균 PPD항원(RT40)을 10 µg/ml의 농도로 희석한 다음, 2배씩 계단희석하여 효소면역측정법을 실시하였다. 결핵균 PPD항원에 특이하게 반응하는 단세포균항체 중에서는 MP-3, MP-4, MP-7의

Fig. 4. Titration curves of the antibodies to tuberculin PPD antigen in the supernatant from the cultured hybridoma clone secreting monoclonal antibodies which react with tuberculin PPD and TE antigen determined by ELISA.

kinetics가 유사하여 이들 항체는 거의 같은 항원결정기에 반응하거나 분포도가 같은 항원결정기에 반응하는 단세포균항체임을 알 수 있었다(Fig. 6). 결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 공통반응하는 단세포균항체 중에서는 MPT-3과 MPT-7의 kinetics가 비슷하고 MPT

Fig. 5. Titration curves of the antibodies to TE antigen in the supernatant from the culture hybridoma clone secreting the monoclonal antibodies which react with tuberculin PPD and TE antigen determined by ELISA.

Fig. 6. Dose response of PPD specific monoclonal antibodies to tuberculin PPD antigen determined by ELISA.

-2, MPT-4, MPT-8의 kinetics가 유사한 것으로 나타났다(Fig. 7).

2) 경쟁효소면역측정법을 이용한 유사성 관찰
항원의 농도변화에 따른 단세포균항체의 반응 kinetics 만으로는 이들 항체가 반응하는 항원결정기가 서로 상이한 것인지, 또는 이들의 분포도가 다른 것인지를 구분할 수가 없다. 그래서 실험에 선택된 단세포균항체들의 항원결정기의 유사성을 확인하기 위하여 경쟁효소면역측정법을 실시하였다.

결핵균 PPD항원(RT40)에 특이하게 반응하는 단세포균항체들 사이의 항원결정기의 유사성을 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. MP-1, MP-3, MP-4와 MP-7사이, MP-2와 MP-5사이는 흡광도가 비교하는 단세포균항체의 positive control 흡광도를 합한 값의 50%정도이거나 이보다 낮은 양상을 보이므로 항원결정기의 유사성이 높다고 추론할 수 있다.

결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 공통반응하는 단세포균항체의 경우, Fig. 9에 나타나 있듯이 MPT-2와 MPT-4사이의 항원유사성이 높다고 추론할 수 있다.

4. 결핵균 특이항원 조사
1) 비정형성항산균에서 유래된 PPD 항원에 대한 교차 반응 관찰

Fig. 7. Dose response of the monoclonal antibodies, which react with both tuberculin PPD antigen and TE antigen, to tuberculin PPD antigen determined by ELISA.

결핵균 PPD항원(RT40)에 특이하게 반응하는 단세포균항체가 비정형성항산균에서 유래된 PPD항원에 어떻게 반응하는가를 관찰하였다. 그 결과는 Table 3에 나타나 있듯이 MP-2와 MP-5는 결핵균 PPD(RT40)에 특이하게 반응하였다.

결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 공통반응하는 단세포균항체의 경우는 Table 4와 같다. MPT-1은 결핵균 PPD 항원(RT40)에 강하게 반응하고 다른 PPD항원에는 일체 반응을 하지 않았으므로 *M. tuberculosis*에 특이한 항원결정기에 반응하는 단세포균항체임을 알 수 있었고 MPT-6는 대체로 결핵균 PPD항원(RT40)에만

Fig. 8. Checkboard analysis of monoclonal antibodies which react only with tuberculin PPD antigen by the competition ELISA.

Fig. 9. Checkboard analysis of monoclonal antibodies which react with both tuberculin PPD antigen and TE antigen by the competition ELISA.

Table 3. Reactivity Patterns of Monoclonal Antibodies, which React Only with Tuberculin PPD, to PPD Antigens from Various Species of Mycobacteria Determined by ELISA

PPD antigen from	Monoclonal antibodies						
	MP - 1	MP - 2	MP - 3	MP - 4	MP - 5	MP - 6	MP - 7
Tuberculin	+++*	+++	+++	+++	++	+++	+++
<i>M. avium</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>M. intracellulare</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>M. kansasii</i>	+	—	+	+	—	+	+
<i>M. scrofulaceum</i>	+	+ —	+	+	—	—	+
<i>M. fortuitum</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>M. phlei</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>M. smegmatis</i>	—	—	—	—	—	—	—

*+++ : > 1.0 in absolute absorbence + — : 0.05 >> 0.1 in absolute absorbence
 ++ : 1.0 >> 0.5 in absolute absorbence — : 0.05 > in absolute absorbence
 + : 0.5 >> 0.1 in absolute absorbence

Table 4. Reactivity Patterns of Monoclonal Antibodies, which React with Both Tuberculin PPD Antigen and TE Antigen, to PPD Antigens from Various Species of Mycobacteria Determined by ELISA

PPD antigen from	Monoclonal antibodies							
	MPT-1	MPT-2	MPT-3	MPT-4	MPT-5	MPT-6	MPT-7	MPT-8
Tuberculin	+++*	++	+	++	++	++	+	+
<i>M. avium</i>	—	+++	+	+++	+++	+ —	+	+++
<i>M. intracellulare</i>	—	+	—	+	+	—	—	+
<i>M. kansasii</i>	—	++	+ —	++	++	—	+	++
<i>M. scrofulaceum</i>	—	+	—	+	+	+ —	+ —	+
<i>M. fortuitum</i>	—	++	—	++	+	+ —	—	+ —
<i>M. phlei</i>	—	+ —	—	+ —	+	+ —	—	+ —
<i>M. smegmatis</i>	—	++	+ —	+	+	+ —	+	+

*+++ : > 1.0 in absolute absorbence + — : 0.05 >> 0.1 in absolute absorbence
 ++ : 1.0 >> 0.5 in absolute absorbence — : 0.05 > in absolute absorbence
 + : 0.5 >> 0.1 in absolute absorbence

반응하였다.

2) 결핵균 PPD항원(RT40)과 TE 항원에 공통반응하는 단세포균항체의 파쇄추출항원과 중간정제항원에 대한 반응

결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 공통반응 하는 단세포균항체의 파쇄추출항원에 대한 반응을 검색한 결과는 Table 5와 같다. MPT-1, MPT-3, MPT-6는 TE 항원에만 특이하게 반응하였고 다른 항체는 교차반응 하였다. 중간정제항원에 대한 반응결과는 Table 6과 같다. MPT-1과 MPT-6가 TE₃에만 반응하였으므로 이 두 단 세포균항체는 *M. tuberculosis*에 특이한 항원결정기에 반응하는 항체임을 추론할 수 있었다.

5. 단세포균항체의 Ig class 및 IgG subclass 결정

선택된 단세포균항체의 Ig class 및 IgG subclass는 Table 7과 같다. 15가지 단세포균항체의 Ig class는 IgG 이었고 이 중에서 MPT-1의 subclass는 IgG2a이었고 나머지는 모두 IgG1이었다.

6. 단세포균항체를 이용한 정상균에서 유래된 PPD 항원, 파쇄추출항원, 그리고 중간정제 항원의 항원분석

Table 3, 4, 5와 6의 결과를 토대로, 본 실험에서 선

Table 5. Reactivity Patterns of Monoclonal Antibodies, which React with Both Tuberculin PPD Antigen and TE Antigen, to TE, AE, KE, SE, FE Antigen Determined by ELISA

Antigen	Monoclonal antibodies							
	MPT-1	MPT-2	MPT-3	MPT-4	MPT-5	MPT-6	MPT-7	MPT-8
TE	+++*	++	+	++	+++	++	+	++
AE	-	-	-	+	+	-	-	-
KE	-	+	-	+	++	-	+	+
SE	-	++	-	++	+	-	-	-
FE	-	-	-	+	+	-	-	-

*+++ : > 1.0 in absolute absorbence
 ++ : 1.0 >> 0.5 in absolute absorbence
 + : 0.5 >> 0.1 in absolute absorbence
 + - : 0.05 >> 0.1 in absolute absorbence
 - : 0.05 > in absolute absorbence

Table 6. Reactivity Patterns of Monoclonal Antibodies, which React with Both Tuberculin PPD Antigen and TE Antigen, to TF3, AF2, KF2, SF4 and FF1 Antigen Determined by ELISA

Antigen	Monoclonal antibodies							
	MPT-1	MPT-2	MPT-3	MPT-4	MPT-5	MPT-6	MPT-7	MPT-8
TF3	+++*	+	+ -	+	++	++	-	+
AF2	-	-	-	+ -	+	-	-	-
KF2	-	-	-	-	+ -	-	-	-
SF4	-	++	+ -	+++	++	-	-	+
FF1	-	+ -	+ -	+ -	+	-	-	-

*+++ : > 1.0 in absolute absorbence
 ++ : 1.0 >> 0.5 in absolute absorbence
 + : 0.5 >> 0.1 in absolute absorbence
 + - : 0.05 >> 0.1 in absolute absorbence
 - : 0.05 > in absolute absorbence

Fig. 10. Antigenic analysis of PPD antigens from various species of mycobacteria by monoclonal antibodies.

택된 15종류의 단세포균항체가 여러종류의 항산균 항원에 반응하는 양상을 분류하여, 이들 항체로 확인할 수 있는 항원 또는 항원결정기의 종류를 Table 8과 같이 구

Fig. 11. Analysis of the PPD antigen, the pressate antigen, the purified fraction antigen from *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, and *M. fortuitum* by monoclonal antibodies.

분해 보았다. 결핵균 PPD항원(RT40)에만 존재하는 항원은 3개, 그리고 결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 공유되어 있는 항원은 6개로서 이들 단세포균항체로 확

인할 수 있는 항원 또는 항원결정기는 모두 9개이었다. Fig. 10은 이들 항원으로 여러종류의 PPD항원을 분석한 도표이다, PPD-Antigen 1과 PPD-Antigen 4는 결핵균에만 특이하게 존재하는 항원이었다. 이들 항원이 파쇄 추출항원과 중간정제항원에 어떻게 분포하는가를 알아보

기 위하여 *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* 그리고 *M. fortuitum*에서 준비한 항원과 단세포균항체의 반응양상을 분석하였다. 결과는 도 11과 같이 PPD-Antigen 4는 TE항원과 TF3항원에만 존재하였다.

Table 7. The Immunoglobulin Class and IgG Subclass of Monoclonal Antibodies Determined by Double Sandwich ELISA

Monoclonal antibody	IgM	IgG			
		G1	G2a	G2b	G3
MP-1	-*	+++	-	-	-
MP-2	-	+	-	-	-
MP-3	-	+	-	-	-
MP-4	-	+	-	-	-
MP-5	-	+	-	-	-
MP-6	-	+	-	-	-
MP-7	-	+	-	-	-
MPT-1	-	-	+	-	-
MPT-2	-	+	-	-	-
MPT-3	-	+	-	-	-
MPT-4	-	+	-	-	-
MPT-5	-	+	-	-	-
MPT-6	-	+	-	-	-
MPT-7	-	+	-	-	-
MPT-8	-	+	-	-	-

* - : < 0.300 in absolute absorbance

** + : > 1.500 in absolute absorbance

Table 8. The Classification of Antigens or Antigenic Determinants of Tuberculin PPD Determined by the Reactivities of Monoclonal Antibodies to PPD Antigen from Various Species of Mycobacteria

Antigen or antigenic determinant	Expressed site	Monoclonal antibodies
PPD-Ag 1	PPD	MP-2, MP-5
PPD-Ag 2	PPD	MP-1, MP-3, MP-4, MP-7
PPD-Ag 3	PPD	MP-6
PPD-Ag 4	PPD, Pressates	MPT-1, MPT-6
PPD-Ag 5	PPD, Pressates	MPT-4, MPT-5
PPD-Ag 6	PPD, Pressates	MPT-2
PPD-Ag 7	PPD, Pressates	MPT-3
PPD-Ag 8	PPD, Pressates	MPT-7
PPD-Ag 9	PPD, Pressates	MPT-8

고 찰

세균의 항원성은 그 세균의 특징적인 병원성을 규정짓고, 질병을 예방하는 면역기전을 유발시키는 중요한 기준점이 된다. 그리고 질병의 양상이나 경과 등이 세균의 군체성분이나 대사산물과 밀접한 관계를 지니고 있으므로 질병의 원인진단의 한가지 방편으로 사용될 수 있다. 그래서 항산균속에 의한 질병의 특성과 유관한 항원성분을 찾으려는 면역학적 시도들이 많이 있어왔다. 그러나 각 연구자들이 주장한 결과는 상당한 차이를 보이고 있다^{1,4,13}. 특히 결핵균 항원 중에서 단백질항원들이 다양하고 각균종에 특이한 항원성분을 포함하고 있을 것으로 생각되고 있다. 항원성분이 다양하며 균주특이항원으로 부터 균종특이항원, 또 다른 균종까지 유관한 비특이적 항원이 포함되고 따라서 이런 항원으로 생산된 항혈청은 다가항체이므로 교차반응을 보일 수 밖에 없다¹⁴. 그러나 종래의 부분정제된 항원을 사용하여 얻은 항혈청이라 하더라도 특이항원에 의해 생성된 항체가 포함되어 있을 것이므로 그 특이항체만을 생산할 수 있다면 그 특이항체에 대응하는 항원물질을 추적할 수 있을 것이고, 그 항체의 이용도는 실험실에서 뿐만 아니라 면역학적, 역학적 또는 임상적으로 매우 높을 것이다. 또한 최근에는 특정분자나 세포성분 또는 병원체를 동정하는데 특정물질에만 존재하는 단일항원결정기에 반응하는 특이항체가 필요하게 되었다. 항원과 항체를 정제함으로써 단일특이 항체를 얻을 수 있었으나 이러한 방법은 그 과정이 복잡하고, 얻을 수 있는 항체의 양이 적으며 더구나 비특이 항체가 함유될 가능성이 높다. 그리고 이러한 방법으로 얻은 항체는 특이성은 같지만 친화력이 다양한 항체의 집단이며 면역조작 때마다 항체집단이 달라지기 때문에 특이항체 생산에 있어 재현성이 없다¹⁵. 그러므로 단일항원결정기에 대한 특이성이 높은 항체를 대량 생산할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다.

사람의 형질세포종과 BALB/c마우스 형질세포종의 성상이 밝혀지고 항체생산에 있어 Burnet와 Klinmann

의 연구로 단세포군항체에 대한 개념이 실험적으로 확립되었다¹⁶⁾. 그러나 플라넬 세포가 조직배양에서 일주일 이상 생존할 수 없었기 때문에 이 방법으로 생산할 수 있는 양은 극소량이었다¹⁷⁾. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Köhler와 Milstein¹⁸⁾은 세포융합을 이용하여 면역적혈구로 면역된 BALB/c 마우스의 비장세포와 8-azaguanine 내성인 형질세포종 세포를 이용하여 하이브리도마를 만들었다. 하이브리도마기법의 성공으로 특정항원결정기에 대응하는 단세포군항체를 생산할 수 있게 되었고, 또 특이항체를 생산하는 세포를 무한 증식시킬 수 있게 되어, 특이성이 높은 항체를 대량 생산할 수 있게 되었다. 단세포군항체는 다세포군항체인 기존 항혈청에 비하여 특이성, 생산성, 재현성 등이 뛰어나기 때문에 임상적 진단, 치료, 백신개발, 특정물질의 순수 분리 등 여러 분야에 응용할 수 있다. 특히 전염병 진단면에 단세포군항체를 응용하면 획기적인 발전을 기대할 수 있다¹⁸⁾.

단세포군항체를 질병의 진단에 사용할 수 있다는 것이 알려지면서 항원이 복잡하기 때문에 정확한 항원성분을 밝혀내지 못했던 항산균을 연구하는 데 단세포군항체가 응용된 것은 당연한 일이라고 할 수 있다. 그래서 1981년 Coates 등이 결핵균에 대한 단세포군항체 생산에 성공한 이래¹⁹⁾ 단세포군항체를 사용해서 항산균의 항원성을 분석한 보고가 많이 있었고, 1985년에는 세계보건기구 주관으로 결핵균에 대한 단세포군항체 워크숍(IMMTUB workshop)이 개최되기 까지 이르렀다¹⁹⁾.

본 연구에서는 결핵균 PPD 항원(RT40)의 항원성을 분석하기 위하여 하이브리도마기법으로 단세포군항체를 생산하였는데 지금까지의 보고들은 결핵균과 우형결핵균을 사용하여 단세포군항체를 생산한 것 뿐이고 결핵균 PPD항원을 사용한 단세포군항체 생산에 대한 보고는 찾아 볼 수 없었기에, 이런 점에서 본 연구의 의의가 있다고 할 수 있을 것이다.

세포융합기법으로 융합이 성공하는 율은 림파구 10^7 개 당 1-100 clone인데^{16,20)}, 본 연구에서는 10^6 개의 림파구를 376개 well에 분주하여 이중 334개 well에서 clone 배양이 가능하였다. 하이브리도마 세포종에서 원하는 항체를 생산하는 세포수는 Köhler와 Milstein은 0.5~3%로 보고하였고¹⁸⁾ Kolk 등은 7-12%의 성공율을 보였²¹⁾. 본 연구에서는 11.7%의 성공율을 보였으니 세포융합기법은 성공적이었다고 할 수 있다.

본 연구에서 생성된 단세포군항체 15개 중에서 7개가 결핵균 PPD항원(RT40)과 TE항원에 공통반응 하였다. 공통반응하는 항체 중 MPT-4, MPT-6과 MPT-8은 두 항원에 두루 분포도가 높은 항원결정기와 반응함을 알 수 있었다. MPT-5는 결핵균 PPD항원(RT40)에는 분포도가 높으나 TE항원에는 낮은 분포도를 보이고 있으며, MPT-3은 반대로 TE항원에는 높은 분포도를 보이거나 결핵균 PPD항원(RT40)에는 분포도가 낮으니, 여기서 결핵균 PPD항원과 TE항원 사이에 항원결정기의 차이가 있음을 알 수 있다. 이는 Janicki 등이 주장한 바와 같이 결핵균 PPD항원은 열처리로 인해서 단백질항원이 변성되거나 응고될 수 있고 또 배양중에 효소에 의해서 항원이 변질되거나 분해 되어서 결핵균 자체의 항원과 성상이 다른 항원이 존재하기 때문이라고 설명할 수 있다²²⁾. 그러나 본 연구자는 두 항원에 공통반응하는 항체를 생산함으로써 국등이 개발한 단세포군항체를 사용한 실험과 상반된 결론을 얻었다. Ivanyi 등도 결핵균과 나병균에 반응하는 단세포군 항체를 사용하여 결핵균 PPD의 항원성을 검색하였는데, 이것은 결핵균에서 유래한 TB68항체에 약하게 반응하고 나병균에서 유래한 ML30에 강하게 반응한다고 했다²³⁾. 이는 두 항원 사이에 공통항원이 있다는 점에서 본 연구와 일치되었다. 국등의 단세포군항체가 본 연구와 다른 결과를 보인 이유는 하이브리도마기법에서 세포융합은 무작위적으로 발생하므로 세포융합에 실패하였거나 혹은 융합은 성공하였더라도 발육상태가 불량하여 clone 선택시 제외되었을 수 있기 때문이라고 생각된다.

항원결정기의 분포도와 항원결정기의 유사성을 판정하기 위해서 1983년 Friguet 등이 개발한 경쟁효소면역 측정법을 사용하였더니²⁴⁾ 여러 개의 항체가 유사한 항원결정기에 반응함을 알 수 있었다. 경쟁효소면역 측정법과 항원농도 변화에 따른 단세포군항체의 반응역가의 변화는 비슷한 결과를 보이고 있다. 즉 결핵균 PPD항원에서는 MP-3, MP-4와 MP-7이 비슷한 반응을 보였으며, 경쟁효소면역 측정법에서는 MP-1, MP-3, MP-4, 및 MP-7의 항원결정기가 유사한 것으로 판명되었다. 또한 두 항원에 공통반응하는 단세포군항체중 MPT-3과 MPT-7이 비슷한 반응을 보였으며, 경쟁효소면역 측정법에서 MPT-2, MPT-3, MPT-4와 MPT-7의 항원결정기가 유사한 것으로 판명되었으니 이는 두 검사법으로 보완이 될 수 있음을 시사해 주고 있다. 그러나 항

원결정기의 분포도나 친화도에 차이가 있으므로 경쟁효소면역측정법이 더 중요한 것으로 사료된다.

단세포군항체의 균종특이성을 관찰하기 위하여 비정형성 항산균이 결핵균 PPD 항원(RT40)과 교차반응하는 것을 관찰하여, MP-2, MP-5, MPT-1 및 MPT-6이 결핵균에 특이하게 반응하는 항체임을 알 수 있었다. 나머지 항체들은 교차반응을 보이고 있어서 결핵균 PPD 항원(RT40)에 교차반응을 일으키는 항원이 상당량 포함되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 이 교차반응의 정도는 TE 항원 등 조항원과의 반응에서 결핵균 PPD 항원(RT40)보다 감소하였으며 중간정제항원을 사용하였을 때에는 더 현저한 감소를 보여서, 결핵균 PPD항원(RT40)이 비록 교차반응을 일으키지만 결핵균에 특이한 항원결정기를 많이 함유하고 있다고 추정할 수 있다. 또한 조항원 및 중간정제항원에서의 실험으로 항체 MPT-1과 MPT-6는 결핵균에만 특이하게 반응하는 항체임을 알 수 있으니 이들을 사용하면 결핵균 PPD항원(RT40)에서 결핵에 특이한 항원성분만을 추출하여, 현재 사용하는 결핵균 PPD항원(RT40)보다 특이성이 높은 항원을 제조할 수 있는 가능성도 있다.

본 연구에서 단세포군항체의 면역글로불린 class는 모두 IgG로 판명되었고 IgM은 없었다. 이는 IgM이 면역반응 초기에 생산되며 교차반응을 잘 일으키고 IgG가 특이반응을 일으킨다는 사실과 부합된다. Coates 등도 IgM Class의 TB 73,77은 교차반응을 보이고 IgG2b의 TB71과 IgG1의 TB72는 특이성을 보인다고 보고하였다⁷⁾. Ivanyi 등도 나병균에 대한 항체중 IgG1 class의 ML06가 특이반응을 보였고 IgG3과 IgM class의 항체는 다당질항원에 반응하며 교차반응을 보인다고 보고하였다²⁵⁾. Young 등도 IgM class의 항체가 비특이적인 반응을 보인다고 보고하여 교차반응이 면역글로불린 class에 관계가 있음을 재확인하였다²⁶⁾.

Engers 등은 현재까지의 연구결과를 종합한 항원에 공통반응하는 단세포군항체를 가지고 5종의 항산균 파쇄추출항원과 중간정제항원에 대한 교차반응을 검색해 보니 MPT-1과 MPT-6이 결핵균항원에 특이하게 반응하였다.

이들 15개의 단세포군항체가 항산균 PPD항원, 항산균 파쇄추출항원 그리고 항산균 중간정제항원에 반응하는 양상을 통해 9개의 항원결정기를 얻었다. 이중 PPD-Antigen 1은 결핵균 PPD항원(RT40)의 특이항원

IMMTUB workshop에서 지금까지 보고된 단세포군항체를 조사해서 정리하였다^{19,27)}. 그에 의하면 현재로서는 균주특이항체는 분리하지 못하였고 결핵균의 특이항원은 아마도 단백질로 추측되며 그 분자량은 range가 넓은 것이라고 한다. 그리고 그는 최근에 개발된 recombinant DNA 기법^{28,29)}을 사용하여 특이항원을 생산하는 gene을 동정 분리한다면 특이항원과 항체의 대량생산이 가능할 것이라고 전망하였다.

DePinho 등은 단세포군항체를 이용한 질병의 진단과 치료의 장래를 전망하면서, 특히 치료면에 더 응용이 되기 위해서는 단세포군항체의 modification이 필요하다고 하였다.

본 연구에서 남겨진 과제는 다음과 같은 것이다. 우선 본 연구에서 추출된 항원에 대해 Western blot법이나 affinity chromatography법을 사용하여 항원의 성상을 동정하고, 현재 사용하고 있는 결핵균 PPD항원과 비교하여 단일특이결핵항원을 제조하도록 노력해야 할 것이다. 임상적으로는 지금까지의 혈청학적 연구가 정상인에서의 항체역가가 높기 때문에 결핵환자의 항체역가와 중복이 심해서 진단의 특이도가 떨어지는 문제가 있었는데^{10,31,32)}, 본 단세포군항체를 사용하여 혈청학적 연구로 재 시도해 보는 것도 의의가 있을 것으로 사료된다.

결 론

하이브리도마기법을 사용하여 결핵균 PPD항원(RT40)의 항원성을 분석하고 결핵균에 특이한 균종특이항원성분의 분리를 시도하였다.

결핵균 PPD항원(RT40)으로 면역한 BALB/c마우스의 비장세포와 BALB/c마우스 형질세포종 P3X63-Ag 8.v 653 세포를 융합하여, 결핵균 PPD항원(RT40)에 반응하는 항체를 생산, 분비하는 15개의 하이브리도마세포주를 얻었다. 결핵균 PPD항원(RT40)과 결핵균 파쇄추출항원에 대해 각 항체가 보이는 반응의 특이성 양상을 효소면역분석법으로 분석하여, 8종의 항체가 두 항원에 공통반응하는 것을 발견하였다.

모든 항체의 면역글로불린 class는 IgG이었으며 이 중에서 MPT-4의 subclass는 IgG2a이었고 나머지는 모두 IgG1이었다. 8종류의 항산균에서 유래된 PPD항원으로 이들의 특이성을 검색해 보니 MP-2, MP-5, MPT-1은 결핵균 PPD항원(RT40)에만 특이하게 반응하였고,

MPT-6는 비정형성항산균 PPD항원과 미약하게 교차반응하였다. 결핵균 PPD항원(RT40)과 결핵균 파쇄추출이었으며 PPD-Antigen 4는 결핵균의 특이항원이었다.

(본 연구를 위하여 항산균 파쇄추출항원과 중간정제항원을 제공하여 주신 대한결핵협회 결핵연구원 김상재 세균부장님께 감사드립니다.)

REFERENCES

- 1) Grange JM: The humoral immune responses in tuberculosis: Its nature, biological role and diagnostic usefulness. *Adv Tuberc Res* 21:1, 1984
- 2) Diena BB: Problem in the serodiagnosis of tuberculosis. *Ann Int Med* 75:132, 1971
- 3) 조명제, 황응수, 국윤호: 결핵균 및 기타 3종의 *Mycobacteria*의 파쇄추출항원과 교차반응하는 폐결핵 환자의 항체분석. *대한미생물학회지* 20:79, 1985
- 4) Daniel TM, Janicki BW: *Mycobacterial antigens: A review of their isolation, chemistry and immunological properties.* *Micro Rev* 42:84, 1978
- 5) Goren MB: Immunoreactive Substances of *Mycobacteria*. *Am Rev Respir Dis* 125 (supplement):50, 1982
- 6) Köhler G, Milstein C: Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256:495, 1975
- 7) Coates ARM, Hewitt J, Allen BW: Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet* II:167, 1981
- 8) 국윤호, 조명제, 황응수: *Mycobacterium tuberculosis* 파쇄추출항원에 대한 단세포균항체의 생산 및 그 특성에 관한 연구. *결핵 및 호흡기 질환* 31:83, 1984
- 9) 차창룡: 미 발표논문
- 10) 심영수, 김중숙: 효소결합면역분석법을 이용한 결핵 진단의 유용성에 관한연구. *중앙의대지* 9:187, 1984
- 11) 김상재, 배길한, 배용수: 결핵 및 비결핵성 항산균의 항원생성과 감염을 조사. *대한결핵협회 결핵연구원* 1984
- 12) 차창룡, 조명제, 황응수: 단세포균항체의 생산 및 응용. *결핵 및 호흡기질환* 31:141, 1984
- 13) Closs O, Harboe M, Axelsen NH: The antigens of *Mycobacterium bovis*, Strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: A Reference System. *Scand J Immunol* 12:249, 1980
- 14) Stanford JL, Grange JM: The meaning and structure of species as applied to mycobacteria. *Tubercle* 55:143, 1974
- 15) Krause RM: The search for antibodies with molecular uniformity. *Adv Immunol* 12:1, 1970
- 16) Goding JW: *Monoclonal antibodies: Principles and practice.* Academic Press, London, 1983
- 17) Potter M: Antigen-binding myeloma proteins of mice. *Adv Immunol* 25:141, 1977
- 18) Nowinski RC, Tam MR, Goldstein LC: Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious disease in human. *Science* 219:637, 1983
- 19) Engers HD, Bloom BR, Godal T: Monoclonal antibodies against mycobacterial antigens. *Immunology today* 6:345, 1985
- 20) Campbell AM: *Monoclonal antibody technology,* Elsevier, Amsterdam 1984
- 21) Kolk AHJ, Ho ML, Klaster PR: Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* (BCG) and *M. leprae*. *Clin Exp Immunol* 58:511, 1984
- 22) Janicki BW, Wright G, Good RC: Comparison of antigens in sonic and pressure cell extracts of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 13:425, 1976
- 23) Ivanyi J, Morris JA, Keen M: Studies with monoclonal antibodies to mycobacteria. In: Macario AJL. Demacario EC eds. *Monoclonal antibodies against bacteria.* Academic Press, London, 59, 1985
- 24) Friguet B, Djavadi-Ohanian L, Pages J: A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the antigenic site. *J Immunol Method* 60:351, 1983
- 25) Ivanyi J, Sinha S, Aston R: Definition of species specific and cross-reactive antigenic determinants of *Mycobacterium leprae* using monoclonal antibodies. *Clin exp Immunol* 52:529, 1983
- 26) Young DB, Khanolkar SP, Barg LL: Generation and characterization of monoclonal antibodies to the phenolic glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 43:183, 1984
- 27) Engers HD, Houba V, Bennedsen J: Results of a World Health Organization sponsored workshop to characterize antigens recognized by *Mycobacterium*-specific monoclonal antibodies. *Infect Immun* 51:718, 1986
- 28) Young RA, Bloom BR, Grosskinsky CM: Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Pro Natl Acad Sci* 82:2583, 1985

- 29) Thole JER, Dauwerae HG, Das PK: Cloning of *Mycobacterium bovis* BCG DNA and expression of antigens in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 50:800, 1985
- 30) DePinho RA, Feldman LB, Scharff MD: Tailor-made monoclonal antibodies. *Ann Int Med* 104:225, 1986
- 31) 차창룡, 김상재 : 폐결핵환자 혈청내 결핵균 특이항체 immunoglobulin class 별 분포. *결핵 및 호흡기질환* 3:105, 1983
- 32) 윤광선, 이춘택, 심영수 : 폐결핵 치료에 따른 항결핵 항체가의 변화에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 33: 79, 1986
-