

HSV-2에 특이한 단세포균항체를 이용한 HSV-2 항체 측정을 위한 효소면역측정법의 개발

서울대학교 의과대학 미생물학교실 및 의학연구원 감염병연구소,
원자력병원 비뇨기과*, 을지외과대학 을지병원 피부과†

박정규 · 박재원 · 김대중 · 김진희 · 황응수 · 이현무* · 이애영† · 차창룡

Development of the Enzyme Immunoassay for the Detection of Anti-HSV-2 Antibody with HSV-2 Specific Monoclonal Antibody

Chung-Gyu Park, M.D., Jae-Won Park, M.D., Dae-Joong Kim, Jinhee Kim, Eung-Soo Hwang, M.D.,
Hyun-Moo Lee, M.D.*, Ai-Young Lee, M.D.† and Chang-Yong Cha, M.D.

*Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine and Institute of Endemic Diseases,
Seoul National University Medical Research Center*

Department of Urology, Korea Cancer Center Hospital, Department of Dermatology,
Eulji Hospital Eulji Medical College†, Seoul, Korea*

Background : The serological diagnosis of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) infection has pitfalls, in that most of the antibodies against HSV-2 cross-react with HSV-1 and the prevalence of HSV-1 infection is high, especially in Korea. In this study, we tried to establish the serological diagnostic method, which could detect and measure the specific antibodies against HSV-2 by competitive immunofluorescent staining method as well as competitive ELISA based on the specific monoclonal antibody, MH2-7.

Methods : Immunofluorescent staining and western blot analysis were used to characterize the antigens recognized by MH2-7. Competitive immunofluorescent staining (IF), competitive enzyme immunoassay (ELISA), and western blot analysis were used to detect specific antibodies against HSV-2 in patients' sera.

Results : In western blot analysis, the sera from two of six patients clinically diagnosed as genital herpes showed characteristic band patterns, which have been known to be compatible with HSV-2 infection. In com-

petitive immunofluorescent staining, only the sera from the two patients clinically diagnosed as genital herpes and with characteristic band pattern showed competition with MH2-7 monoclonal antibody. The dilution range of the serum showing specific competition was between 1 : 10 and 1 : 80. Competitive ELISA was also performed and evaluated as the diagnostic efficacy as ELISA has been known to be advantageous over IF staining in mass screening. The result showed linear dose-response relationship for the patient's sera in inhibition of the reactivity of MH2-7.

Conclusion : We suggest that the competitive immunofluorescent staining method and competitive ELISA based on the specific monoclonal antibody MH2-7 is a simple, accurate, and precise method, which can be used in serological diagnosis of HSV-2 infection (Korean J Infect Dis 31:309~316, 1999).

Key Words : Herpes simplex virus type 2 (HSV-2), Monoclonal antibody, Immunofluorescent staining, Competitive ELISA

서 론

* 이 연구는 1994년도 서울대학교 의과대학 일반연구비의 지원으로 수행되었음.

접수 : 1999년 4월 22일, 승인 : 1999년 7월 22일
교신저자 : 박정규, 서울대학교 의과대학 미생물학교실
Tel : 02)740-8308, Fax : 02)743-0881
E-mail : chgpark@plaza.snu.ac.kr

Herpes simplex virus는 Alphaherpesvirinae에 속하는 double-strand DNA virus이다. 생활 주기가 짧아 증식 속도

가 빠르고 증식 후에 신경세포 절에 잠복 감염의 형태로 존재하는 특성을 가진다. 혈청형에 따라 type 1(HSV-1)과 type 2(HSV-2)로 나눈다. HSV-2는 성기 헤르페스증을 주로 일으킨다. 감염의 특성은 성기 부위의 상피를 침범하게 되면 상피세포를 급성으로 파괴하며 해당되는 감각신경 절에 잠복한다. 일단 잠복감염형태로 남아있는 바이러스는 여러 가지 조건에 의해 재활성화 될 수 있으며 세포 조절 인자에 여러 가지 변화를 초래할 수 있다. 특히 HSV-2는 자외선조사를 통하여 용해능을 불활화시킨 후 설치류 세포에 접종시켰을 때 이 세포를 혈청 전환시키는 특징을 가진다.

자궁경부암은 체부에 생기는 암과 달리 독특한 위험요소가 있다는 사실이 알려졌으며 이러한 위험요소는 성 접촉에 의해 전염되는 질병의 요소와 유사한 것으로 관찰되었다. Preinvasive 자궁경부암의 경우 성기 단순포진 병변을 앓았던 사람에서 비정상적인 세포가 더 많이 관찰되었으며 일부 역학 조사에서 자궁경부암이 있는 여성에서 자궁경부암이 없는 여성보다 HSV-2에 대한 항체가 더 많이 존재하며 바이러스의 유전자가 자궁경부암 세포에 존재한다는 사실을 보고하고 있다¹⁻³⁾. 위와 같은 역학 조사 결과와 생물학적 특성을 고려해 볼 때 HSV-2가 직접 혹은 간접적으로 발암에 관련된다고 생각할 수 있지만 HSV-2의 감염여부와 자궁경부암 발생과의 관계는 더 연구되어야 할 것이다. HSV-2의 감염 여부는 첫째 환자에서 바이러스를 분리하던지, 둘째 암 조직에서 바이러스의 유전자 정보가 존재하는가를 보여주던지 셋째 환자에서 HSV-2에 대한 항체가 존재하는지를 보여줌으로써 알 수 있다. 그러나 HSV-2의 생물학적 특성상 첫째, 둘째 방법으로 자궁경부암과의 연관성을 알기는 쉽지 않다. 왜냐하면 HSV-2의 분리는 초도 감염이나 예측할 수 없는 시기에 발생하는 재활성화 때에만 가능하고 일단 잠복 감염의 형태가 되면 많은 경우에서 환부에 유전자 정보를 남기지 않는다. 따라서 HSV-2의 발암 관련 여부에 대한 연구는 시험관 내에서의 직접적인 발암 기전에 대한 연구와 함께 항체의 존재를 통한 과거 감염과의 연관성에 대하여 진행되어야 할 것이다. HSV-2에 대한 과거 감염은 면역 반응을 통하여야만 알 수 있다. 즉 혈청학적인 방법으로 HSV-2에 대한 과거 감염을 검색할 수 있다⁴⁾. 이 특정법은 임상적으로 명확히 HSV-2에 감염된 환자에서 신뢰도가 높다. 또한 일반 집단에서의 양성률은 성 접촉질환의 위험요소와 연관성이 매우 좋다. 그러나 일반집단에서 HSV-2 감염을 검색하는데 민감도와 특이도가 확립된 방법이 없는 실정이다. 이런 문제가 발생하게 되는 이유는 HSV-1과 HSV-2의 항원이 많은 부분에서 교차반응을 보여

이전에 HSV-1에 감염되었던 환자에서 HSV-2에 대한 면역반응이 HSV-1에 대한 과거 감염이 없던 사람에서 보이는 면역반응과 다르게 나타나게 되기 때문이다⁵⁾. 따라서 HSV-2에 특이한 항체를 측정할 수 있는 방법이 필요하다. 이 방법은 하나의 항원 결정기에 대한 항체의 측정 방법이 되어야 한다. 왜냐하면 순수 분리된 한 종류의 항원도 여러 가지 항원결정기를 가지고 여러 가지 항체와 반응할 수 있기 때문이다.

본 연구에서는 HSV-2에 특이한 단세포균향체(MH2-7)를 이용하여 환자의 혈청 내에 있는 HSV-2에 대한 특이 항체를 측정할 수 있는 경쟁면역형광항체법을 확립하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1993년 5월부터 1997년 5월까지 충북대학교 의과대학 비뇨기과 및 을지의과대학 피부과학교실에 내원한 환자 중 임상적으로 성기허피스증이 의심되는 환자 6명의 혈청을 사용하였다. 음성 대조군으로 동 병원에 내원한 환자 5명의 혈청을 사용하였다.

2. 바이러스

HSV-2 G strain(ATCC VR734)을 표준 바이러스주로 사용하였으며, 대조 바이러스주로는 HSV-1 MacIntyre strain(ATCC VR539), human cytomegalovirus(HCMV) AD169 strain(ATCC VR538), Epstein-Barr virus(EBV) EB-3 strain(ATCC CCL85), varicella-zoster virus(VZV) Ellen strain(ATCC VR586)을 사용하였다.

3. 단세포균향체

HSV-2에 특이하게 반응하는 단세포균향체 MH2-7과 HSV-1에 특이하게 반응하는 단세포균향체 MHSV-116을 사용하였다⁶⁾. MH2-7과 MHSV-116을 생산하는 잡종세포종 세포를 배양하여 배양 상청액을 사용하였다. 고농도의 항체를 얻기 위해 BALB/c mouse의 복강 내에 배양된 세포를 접종하고 복수를 얻은 후 이를 ammonium sulfate 침전법과 DEAE-Sepharcel ion exchange chromatography를 이용하여 정제하였다.

4. HSV-2의 배양 및 역가 결정

숙주세포는 10% 우태아혈청이 들어있는 EMEM(Eagle modified minimum essential medium) 배지를 이용하여 배양한 Vero 세포를 사용하였다. 직경 100 mm 평판, 또는 24 well 배양판에 숙주세포를 배양한 후 미리 역가가 정해진 바이러스 용액을 접종하고 2시간 동안 흡착시켰다. 세포가 특징적인 세포병변을 나타내면 모아서 단세포균향체를 이용한 간접 면역형광염색법에 사용하였다. 바이러스의 역가 결정은 plaque assay로 시행하였다. 24 well 배양판에 배양된 Vero 세포에 바이러스를 계단 희석하여 접종하고 methylcellulose-EMEM을 중층한 후 세포병변이 나타나면 중층을 제거하고 플라크 수를 측정하였다. 희석 농도당 2개 well씩 각각의 플라크 수를 세어 평균한 뒤 희석 배수대로 교정하여 원액의 plaque forming unit(PFU)을 계산하였다.

5. Western blot analysis

배양된 Vero 세포에 바이러스를 감염시키고 CPE가 나타나면 1% Nonidet P-40(Sigma Co., N3516), 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.5% deoxycholate(Sigma Co., D6750), 1 mM PMSF(Sigma Co., P7626)로 구성된 세포추출완충용액(lysis buffer)을 가하여 세포를 용해시키고 이를 10% gel SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 항원을 nitrocellulose membrane에 전사시키고 일차 항원으로 MH2-7 단세포균향체 또는 1:100으로 희석된 환자 혈청, 이차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-mouse 또는 human IgG(Promega)를 처리하였다. 발색 반응은 NBT와 BCIP를 사용하였다.

6. 항바이러스제제를 이용한 대응 항원의 출현 시기 결정

Spot slide(Cel-line associates, Inc., 10~370)에 4×10^5 cell/ml로 수가 맞추어진 세포를 40 μ l씩 분주하여 72시간 동안 우태아혈청이 10% 포함된 RPMI배지에서 배양한 후 실험에 사용하였다.

1) Phosphonoacetic acid

바이러스를 1시간 30분 동안 흡착시키고 바이러스 용액을 제거한 후 phosphonoacetic acid(100 μ g/ml) 50 μ l을 분주하고 바이러스만 분주한 양성 대조군에서 세포병변이 나타나면 인산완충 용액으로 3회 세척하고 아세톤으로 10분간 고정한 후 단세포균향체를 사용하여 간접면역형광염색법을 실시하였다.

2) Ara-C

Ara-C(20 μ g/ml) 50 μ l을 바이러스를 흡착시키기 24시간 전에 각 well에 가하여 전처리하고 나머지 과정은 위와 동일하게 시행하였다.

3) Cycloheximide와 Actinomycin-D

Cycloheximide(50 μ g/ml) 50 μ l을 각 well에 가하고 30분 동안 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에 배양 후 cycloheximide를 제거하고 1시간 30분 동안 바이러스를 흡착시켰다. 흡착이 끝나면 바이러스를 제거하고 다시 cycloheximide를 4시간 동안 처리하였다. Immediate early antigen만을 발현시키기 위해서 일부 well은 actinomycin-D(20 μ g/ml) 50 μ l을 가하고 나머지 well에는 유지 배지를 가하였다. 나머지 과정은 위와 동일한 방법으로 시행하였다.

6. 경쟁면역형광염색법

배양된 Vero 세포에 바이러스를 감염시키고 세포병변이 나타나면 인산완충액으로 세척하고 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 바닥으로부터 떼어내고 인산완충액으로 부유한 후 spot slide에 세포 부유액을 가하였다. 세포를 말리고 10분간 아세톤으로 고정하였다. 인산완충액에 희석된 단세포균향체와 계단 배 희석된 환자 혈청을 혼합한 후 각 well에 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시키고 세척한 후 FITC conjugated(goat anti-mouse IgG, Cappel, H&L chain specific, Cat No. 32668)를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 인산완충액으로 세척하였다. Mounting media를 떨어뜨리고 cover glass를 덮은 후 형광 현미경으로 검정하였다.

7. 경쟁효소면역측정법

배양된 Vero 세포에 바이러스를 감염시키고 세포병변이 나타나면 세포추출완충용액을 가하여 세포를 용해시켰다. 포획항체로는 본 교실에서 생산한 HSV-2에 특이한 MH2-14 단세포균향체를 사용하였다. MH2-14를 salting out 방법으로 정제 농축한 후 500 μ g/ml의 농도를 희석하고 well 당 100 μ l을 분주한 후 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰다. 0.05% Triton X-100이 함유된 인산완충액으로 2회 세척하고 2% skim milk가 함유된 인산완충액으로 실온에서 1시간 동안 여백을 차단하였다. 세척 후 준비된 항원을 100 μ l/well 씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 세척 후 1/100부터 1/51,200까지 2배씩 계단배 희석된 환자 혈청 50 μ l과 MH2-7 배양 상청액 50 μ l을 혼합하여 well에 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 양성대조군은 환자 혈청 대신 동량의 인산완충액을 사용하였고 음성대조군은 100 μ l의 인산완충액

을 사용하였다. 2차 항체는 peroxidase conjugated anti-mouse IgG를 사용하였고 발색 반응은 o-phenylene diamine을 사용하였다.

결 과

1. MH2-7에 반응하는 항원의 특성

MH2-7 단세포균항체의 특이성을 확인하기 위해 herpes simplex virus type 1(HSV-1)과 type 2(HSV-2), varicella zoster virus(VZV), Epstein-Barr virus(EBV), human cytomegalovirus(HCMV)로 감염된 세포를 spot slide에 coating한 후 MH2-7을 일차 항체로 이용하여 면역형광염색을 시행하였다. 그 결과 MH2-7은 HSV-2가 감염된 세포에만 반응하였으며 HSV-1과 교차반응을 보이지 않았고 MH2-7과 반응하는 항원은 감염된 세포의 세포질에 위치하였다(Figure 1).

MH2-7 항체가 인지하는 항원의 특성을 파악하기 위해 반응 항원이 발현되는 시기를 항바이러스제를 이용하여 알아보았다. 재료 및 방법에 설명된 바와 같이 cycloheximide, actinomycin-D, phosphonoacetic acid를 이용하여 바이러스 증식 주기를 중간 차단하여 감염된 세포에 극초기(immediate early), 초기(early), 만기(late) 항원을 표현하였다. 이를 MH2-7을 일차 항체로 이용하여 면역형광염색을 시행하였다. 그 결과 MH2-7은 HSV-2 증식 주기의 만기에 나타나는 항원과만 반응하였다(Figure 2).

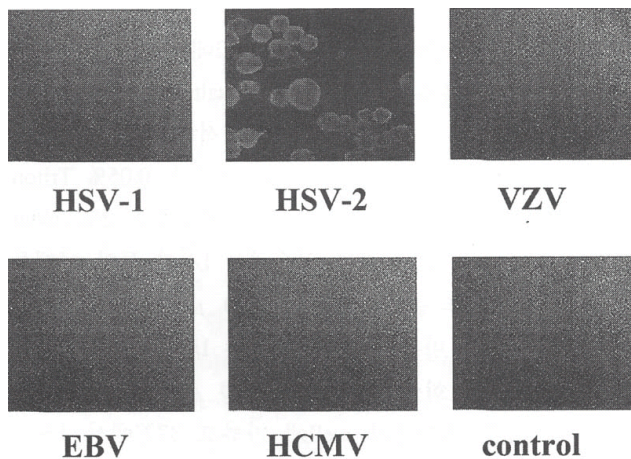


Figure 1. Immunofluorescent staining of various herpes virus-infected cells with MH2-7 monoclonal antibody. Each host cell was infected with the indicated virus. When the cytopathic effect (CPE) appeared, the cells were detached from culture flask and coated on the spot slide. Immunofluorescent staining was performed as described in the Materials and Methods. Greenish yellow cytoplasmic mass was observed only in the HSV-2-infected cells.

2. Western blot analysis

MH2-7 대응 항원의 분자량을 결정하기 위해 감염된 세포를 용해시키고 이를 10% SDS-PAGE를 이용하여 단백항원을 분리시켰다. 분리 후 nitrocellulose membrane에 전사하고 MH2-7과 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG를 각각 일차, 이차 항체로 이용하여 염색하였으나 어떤 밴드도 보이지 않았다(결과는 보여주지 않음). 이는 MH2-7에 의해서 인지되는 항원의 항원결정기가 3원적 공간 구조에 의해 결정된다는 것을 의미한다.

비뇨기와 외래에 내원하는 임상적으로 HSV-2에 감염되었다고 진단되어진 환자의 혈액을 5 ml 채취하여 혈청을 준비하였다. 환자의 HSV-2 감염 여부를 확인하기 위해 HSV-1과 HSV-2에 감염된 세포의 세포추출액을 만들고 이를 10% acrylamide gel에 SDS-PAGE를 시행하여 분리한 다음 NC membrane에 전사한 후 환자 혈청을 일차 항체로, alkaline phosphatase-anti-human IgG를 이차 항체로 사용하여 western blot을 시행하였다. 염색 양상은 특이한 pattern을 보였는데 그 대표적인 염색 양상 결과는 Figure 3에 나타내었으며 A, B, C, D의 4가지가 있었다. 숫자 1은 HSV-1에 감

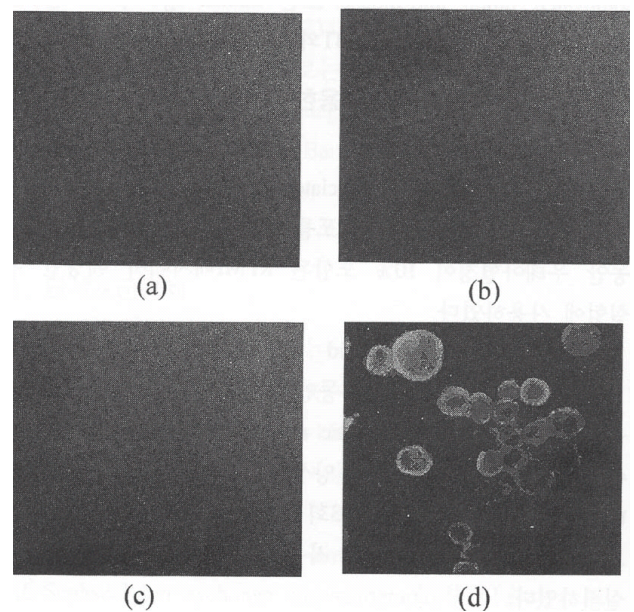


Figure 2. Immunofluorescent staining of HSV-2-infected cells; cells were treated with antimetabolite including cycloheximide (A), actinomycin D (B) and phosphonoacetic acid (C) prior to virus inoculation with MH2-7. Each antimetabolite was treated as described in Materials and Methods. Greenish yellow cytoplasmic mass was seen in the cells without treatment (D), indicating that the Ag recognized by MH2-7 could be the late Ag.

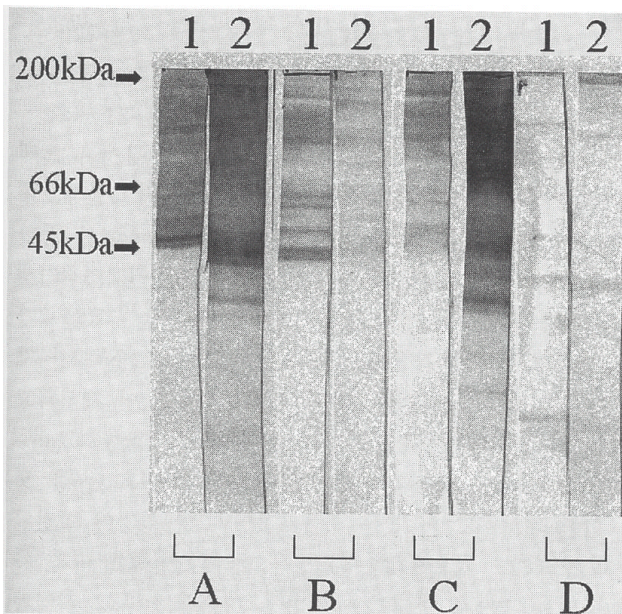


Figure 3. Western blot analysis of the herpes virus infected cells using the patients' sera as the probe. Each cell lysates obtained from HSV-1 and HSV-2 was subjected to the 10% acrylamide gel SDS-PAGE. The separated bands were then transferred to nitrocellulose membrane. The sera from patients clinically diagnosed as HSV-2 infection were applied as a first Ab. The bands were visualized as described in Materials and Methods. 1: lysates from HSV-1 infected cells, 2: lysates from HSV-2 infected cells. A, B, C: sera from the patients clinically diagnosed as herpes genitalis, D: sera of the patients who have been confirmed as HCMV infection. Three patterns (A, B, C) were observed.

염된 세포추출액을 숫자 2는 HSV-2에 감염된 세포추출액을 가리킨다. A, C는 HSV-2 세포추출액에 대하여 강한 반응을 보이면서 HSV-1과 교차 반응을 보이는 group이다. 여기에는 HSV-2에 대한 반응성의 강도로 다시 2 group으로 나눌 수 있으며 C가 A에 비해 HSV-2에 대하여 더 강한 반응성을 보였다. B도 임상적으로 HSV-2 감염을 의심하는 성기 허피스증을 보이는 환자의 혈청을 사용한 결과인데 A, C군과는 대조적으로 HSV-2에 대한 반응성은 매우 약했으며 HSV-1에 대한 반응성이 상대적으로 높게 나타났다. D는 사람 세포거대바이러스에 감염된 환자의 혈청에 대한 반응 양상으로 음성대조군이다. 6명의 대상 환자 중 A 양상을 나타내는 환자는 1명, B 양상을 나타내는 환자는 4명 C 양상을 나타내는 환자가 1명이었다.

3. 경쟁면역형광항체염색법

최종적으로 환자의 혈청 내 HSV-2에 대한 특이 항체의 존재 여부를 확인하기 위해 경쟁면역형광항체염색을 시행하

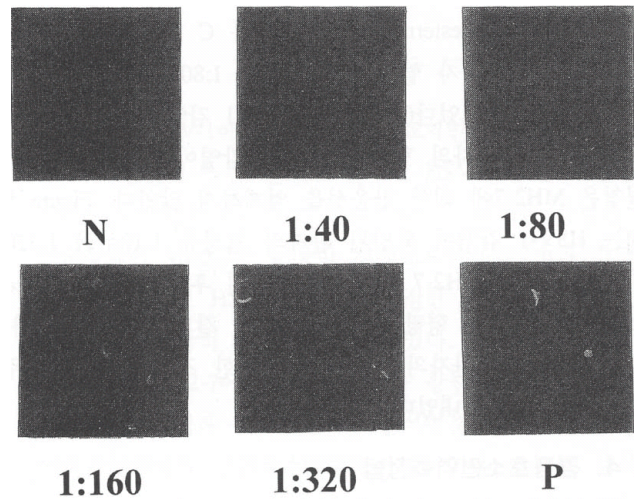


Figure 4. Competitive immunofluorescent staining of HSV-2 infected cells. HSV-2 infected cells were coated on the spot slide. Serially diluted each patient's sera was mixed with MH2-7 monoclonal Ab and then applied to the coated spot slide. No staining was observed with the sera diluted below 1:80.

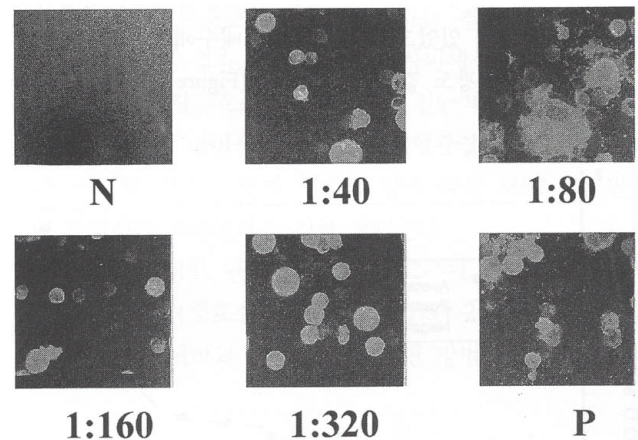


Figure 5. Immunofluorescent staining of the HSV-2-infected Vero cells with MH2-7 monoclonal antibody which had been competed off with the given concentration of the HSV-1-infected patient serum. Vero cells were infected with HSV-2 and were coated on the slide. MH2-7 monoclonal antibody and given concentration of HSV-1-infected patient serum were added and incubated. FITC-antimouse IgG was used as detection antibody. The sera of HSV-1-infected patient could not compete off the binding of MH2-7 on HSV-2 infected cells throughout the concentration from 1:40 to 1:320. PBS instead of MH2-7 was used in negative control and PBS instead of patient sera was used in positive control.

였다. 숙주세포를 HSV-2로 감염시키고 세포병변이 나타나면 trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 세포를 떼어낸 후 이를 spot slide에 부착하였다. 환자의 혈청을 PBS로 계단 희석하

여 MH2-7 항체와 혼합하고 37 °C에서 1시간 반응시켰다. PBS로 세척한 후 FITC-anti-mouse IgG를 이용하여 염색하였다. 그 결과 western blot 에서 A와 C 양상을 나타내는 환자 모두에서 환자 혈청의 희석 배수 1:80까지에서 MH2-7의 반응이 차단되었다(Figure 4). HSV-1 감염이 western blot 으로 확인된 환자의 혈청 및 VZV 감염이 확인된 환자의 혈청은 MH2-7에 대한 반응성을 억제하지 않았다. Figure 5에는 HSV-1 감염이 확인된 환자의 혈청을 1:10부터 1:320까지 희석하여 MH2-7 항체와 경쟁시킨 후 FITC-anti mouse IgG를 이용하여 형광염색을 시행한 결과를 나타내었다. VZV에 감염된 환자의 혈청으로 경쟁한 경우에도 이와 유사한 결과를 나타내었다.

4. 경쟁효소면역측정법

HSV-2에 특이하게 반응하는 항체가 존재하는 환자의 혈청을 1:100~1:51,200의 범위로 희석하여 재료 및 방법에 전술된 바와 같이 MH2-7 항체와 HSV-2 감염세포에 대해 경쟁효소면역측정법을 시도하였다. 환자 혈청 내에 존재하는 항체의 희석 배수에 역비례하여 MH2-7의 반응이 억제되어 MH2-7과 혈청 내 HSV-2에 대한 특이항체 간의 경쟁이 있음을 관찰할 수 있었고 1:100의 희석배수에서 음성대조군과

같은 정도의 흡광도 값을 나타내었다(Figure 6).

고 찰

Human herpesvirus type 2와 자궁경부암의 관계는 오래 전부터 연구되어왔는데 자궁경부암 환자에서 혈청 내 HSV-2에 대한 항체 존재 여부, DNA hybridization을 통한 바이러스 핵산의 존재 여부, Pap smear 혹은 면역조직염색법을 이용한 바이러스 항원 탐지 등을 통해서⁷⁻¹²⁾ HSV-2가 자궁경부암 발생과 직접 관계가 있거나 적어도 HSV-2가 자궁경부암의 cofactor로 작용할 수 있다는 증거들이 제시되고 있다. 일부 학자의 연구에 따르면 cervicitis, cervical dysplasia, cervical cancer 환자에서 HPV 16, 18, 11 type을 모두 합한 것보다도 더 높은 비율로 HSV-2의 항원이 발견된다고 보고하고 있으며 그 연관성은 나라와 민족에 따라 차이가 있는 것으로 보고하고 있다¹³⁾. 따라서 HSV-2 감염과 자궁경부암 발생과의 관계는 더 연구가 진행되어야 할 것이다.

HSV-2 감염 여부의 조사는 이 바이러스가 잠복 감염을 일으킨다는 특성을 고려할 때 직접 항원 탐지나 핵산 탐지는 바이러스 감염 여부를 직접 반영하기 어려운 점이 있다. 또한 역학 조사에는 자궁 경부에서 직접 항원 혹은 핵산의 존재 여부를 조사하는 것보다는 혈청에 존재하는 항체를 증명하는 것이 더 용이한 방법이 될 것이다. 그러나 특이 항체의 존재 여부를 조사하는 것도 HSV-2가 HSV-1과 공통항원을 많이 공유하고 있고 HSV-1의 이환율이 높아 어려운 점이 있다. 즉 HSV-1에 감염된 환자의 혈청 내에 존재하는 항체가 HSV-2에 존재하는 항원과 교차 반응을 일으켜 위양성 반응을 나타낼 수 있다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하는 방법으로 HSV-2에 특이한 단세포균항체인 MH2-7을 이용하여 환자 혈청 내에 존재하는 항체가 HSV-2 항원에 반응하는 것을 저지함으로써 특이 항체를 증명하는 방법을 시도하였다.

면역형광항체염색법을 이용하여 MH2-7의 특이성을 확인하였다. 허피스바이러스과에 속하는 HSV-1, VZV, EBV, HCMV에 대한 반응성을 조사한 결과 HSV-2에만 특이하게 반응한다는 사실을 확인하였으며 항체가 인지하는 항원은 세포질에 존재한다는 것을 알았다. 항바이러스제를 이용하여 증식 주기를 차단하고 면역형광염색을 시행한 결과

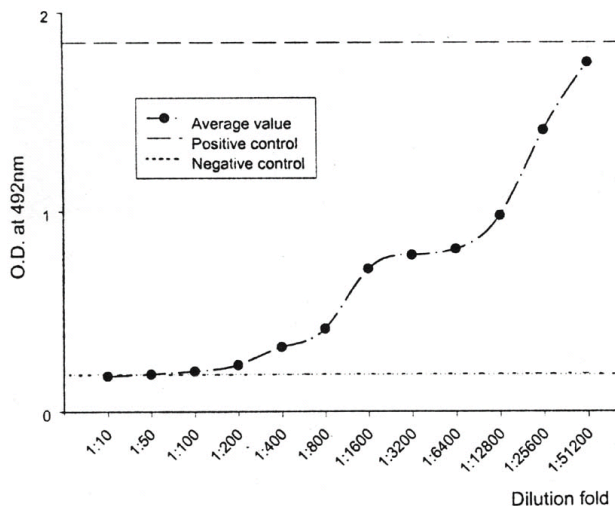


Figure 6. Competitive ELISA of HSV-2-infected cells. The patient's sera definitely having specific Ab against HSV-2 which was proved in the competitive IF staining, was serially diluted and mixed with MH2-7 monoclonal antibody. Sandwich ELISA was performed as described in the Materials and Methods. The linear dose-response relationship could be seen for the patient's sera to inhibit the reactivity of MH2-7 against HSV-2 antigen. one to one hundred diluted sera could completely block the reactivity of MH2-7.

MH2-7과 반응하는 항원은 증식 주기의 만기에 나타났고 western blot analysis를 통하여 conformational epitope을 인지한다는 사실도 확인하였다.

혈청은 비뇨기와 외래에 내원하는 환자로 임상적으로 성기허피스증으로 진단 받은 환자의 혈청을 사용하였다. 실제 감염을 일으킨 바이러스 종을 확인하기 위해 HSV-1 및 HSV-2로 감염시킨 Vero 세포를 항원으로 사용하여 Western blot을 시행하였다. 모든 환자에서 HSV-1 및 HSV-2에 반응하는 항체가 존재하였고 반응성의 정도에 따라 A, B, C의 3 군으로 구분되었다(Figure 3). B군 환자는 A나 C군 환자에 비해 HSV-2에 대해 낮은 역가의 항체를 가지고 있었다. 이는 두 가지로 해석될 수 있는데 첫째는 HSV-2의 활동 감염이 있는 지 오래 되어 항체 역가가 낮아진 경우와 둘째는 실제로 HSV-1에 의해 성기허피스증이 발생한 경우이다. 이를 구분하기 위해서는 환자를 추적하여 활동감염이 있는 후 2주 내에 다시 항체를 측정하는 것이 요구된다. D군은 임상적으로 HCMV 감염을 의심하여 실험실에서 항체의 역가가 확인된 환자의 혈청을 사용한 것이다.

Western blot을 이용하여 반응성의 정도를 확인한 환자의 혈청을 이용하여 경쟁면역형광항체법을 시행하였다. 환자의 혈청을 1:10부터 계단 배 희석하여 MH2-7 단세포균항체와 경쟁시켰을 때 A, C군의 환자 혈청은 1:10부터 1:80 희석 배수에서 MH2-7의 HSV-2 항원에 대한 반응성을 저지하였다. 그러나 B군에 속하는 환자의 혈청은 원액에서도 MH2-7의 반응성을 저지하지 못하였다. 이는 A, C군 환자의 혈청 내에 MH2-7 항체가 반응하는 특이 항원결정기에 대한 항체가 존재한다는 것을 의미하는 것이며 곧 이는 이 환자가 HSV-2에 대한 과거 감염이 있었다는 것을 의미한다.

경쟁면역형광항체법은 민감도에서는 우수하나 주관적인 판단에 의존하고 형광현미경이 갖추어진 실험실이 필요하며 역학조사와 같은 mass screening에는 적합하지 않은 단점이 있다. 따라서 이를 객관화하고 mass screening에 사용하기 위해 경쟁면역효소법을 개발하였다. HSV-2에 감염된 세포로부터 재료 및 방법에 서술한 바와 같이 추출액을 제작하고 96 well plate에 coating하였다. 환자의 혈청과 MH2-7 단세포균항체를 경쟁시킨 후 OPD를 이용하여 발색 정도를 관독기를 이용하여 측정하였다. 결과는 Figure 6에 나타냈는데 1:100의 희석배수까지 MH2-7의 반응성을 억제하였다.

이상의 결과로 볼 때 MH2-7 단세포균항체를 이용한 경쟁면역형광항체법 및 경쟁면역효소법은 환자의 혈청에서 HSV-2에 대한 특이 항체를 측정할 수 있는 객관적인 방법으로 사용가능하며 특히 경쟁면역효소법은 mass screening에

사용할 수 있다. 그러나 여기에 사용한 단세포균항체가 환자에서 발견되는 wild strain의 specificity를 모두 반영할 수 있는지에 대해서는 더 많은 환자의 혈청을 이용한 역가 측정이 요구된다.

요 약

배 경 : HSV-1에 대한 항체의 교차반응과 특히 국내에서 HSV-1 감염의 높은 빈도로 인해서 HSV-2 감염의 혈청학적 진단에는 상당한 어려움이 있다. 본 연구에서는 특정한 단세포균항체인 MH2-7을 이용한 경쟁효소면역측정법과 경쟁면역형광염색법으로 HSV-2에 대한 특정한 항체를 감지, 측정할 수 있는 혈청학적 진단법을 시도하였다.

방 법 : MH2-7에 의해 인지되는 항원을 파악하기 위하여 면역형광염색법과 Western blot 분석법을 시행하였다. 경쟁면역형광염색법과 경쟁효소면역측정법, Western blot 분석법을 이용하여 환자 혈청에서 HSV-2 특이 항체를 검출하였다.

결 과 : 임상적으로 성기헤르페스 감염으로 진단된 6명의 환자 중 2명의 혈청에서 HSV-2 감염시 나타나는 것으로 알려진 특징적인 Western blot 결과를 나타내었다. 경쟁면역형광염색법에서는 임상적으로 성기헤르페스 감염으로 진단되었으며 특징적인 Western blot 결과를 나타낸 두 환자의 혈청만이 MH2-7 단세포균항체와 경쟁하는 결과를 보였다. 혈청을 희석하여본 결과, 1:10과 1:80사이에서 특이 경쟁현상을 나타내었다. 경쟁효소면역측정법의 진단적 유효성을 측정해본 결과 다량 선별을 할 경우 면역형광염색법보다 유리하였다. 이상의 결과는 환자 혈청의 양에 따라 MH2-7의 반응성이 일정하게 저해된다는 것을 보여준다.

결 론 : 특정한 단세포균항체 MH2-7에 기반한 경쟁면역형광염색법과 경쟁효소면역측정법은 HSV-2 감염을 진단하는데 있어서 간단하고 정확하며, 정교한 방법이다.

참 고 문 헌

- 1) Eglin RP, Sharp F, MacLean AB, Macnab JCM, Clements JB, Wilkie NM: *Detection of RNA complementary to herpes simplex virus DNA in human cervical squamous cell neoplasm*. Cancer Res 41:3597-3603, 1981
- 2) Galloway Da, Nelson JA, McDougall JK: *Small fragments of herpesvirus DNA with transforming activity contain insertion sequence-like structures*. Proc Natl Acad Sci USA 81:4736-4740, 1984

- 3) Tevethia MJ : *Transforming potential of herpes simplex viruses and human cytomegalovirus*, In : *The Herpesviruses*. Vol. 3(Roizman D, ed), pp. 257-313, Plenum Press, New York, 1985
- 4) Rawls WE : *Herpes simplex virus types 1 and 2 and herpesvirus simiae*, In : *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, 5th ed.(Lennette EH and Schmidt NJ, eds), pp. 309-373, American Public Health Association, Washington, 1979
- 5) Hampar B, Zweig M, Showalter SD, Bladen SV, Riggs CW : *Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of antibodies against herpes simplex virus types 1 and 2 in human sera*. J Clin Microbiol 21:496-500, 1985
- 6) Cha CY, Hwang ES, Kook YH : *Production and characterization of monoclonal antibodies specific to herpes simplex viruses*. J Korean Soc Microbiol 23:505-515, 1988
- 7) Adam E, Levy AH, Rawls WE, Melnick JL : *Seroepidemiologic studies of herpesvirus type 2 and carcinoma of the cervix. I. Case-control matching*. J Natl Cancer Inst 47:941-51, 1971
- 8) Adam E, Kaufman RH, Melnick JL, Levy AH, Rawls WE : *Seroepidemiologic studies of herpesvirus type 2 and carcinoma of the cervix. III. Houston, Texas*. Am J Epidemiol 96:427-442, 1972
- 9) Adam E, Kaufman RH, Melnick JL, Levy AH, Rawls WE : *Seroepidemiologic studies of herpesvirus type 2 and carcinoma of the cervix. IV. Dysplasia and carcinoma in situ*. Am J Epidemiol 98:77-87, 1973
- 10) Adam E, Rawls WE, Melnick JL : *The association of herpesvirus type 2 infection and cervical cancer*. Prev Med 3:122-41, 1974
- 11) Adam E, Sanders EK, Melnick JL, Levy AH, Rawls WE : *Antibodies to herpesvirus type 2 in breast cancer and cervical cancer patients*. Cancer 33:147-52, 1974
- 12) Ashley R, Wald A, Corey A : *Cervical antibodies in patients with oral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: local anamnestic responses after genital HSV-2 infection*. J Virol 68:5284-5286, 1994
- 13) Meng XJ : *Correlation of human papilloma virus (HPV) and herpes simplex virus-2 (HSV-2) in the viral etiology of carcinoma of uterine cervix*. Chung Hua Chung Liu Tsa Chih 11:108-110, 1989