



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0111849
(43) 공개일자 2015년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G06F 19/12 (2011.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G06F 19/12 (2013.01)
C12Q 1/6851 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0037536
(22) 출원일자 2015년03월18일
심사청구일자 2015년03월18일
(30) 우선권주장
1020140035386 2014년03월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
김성한
서울특별시 강남구 압구정로 151, 204동 903호(압구정동, 현대아파트)
(74) 대리인
위병갑

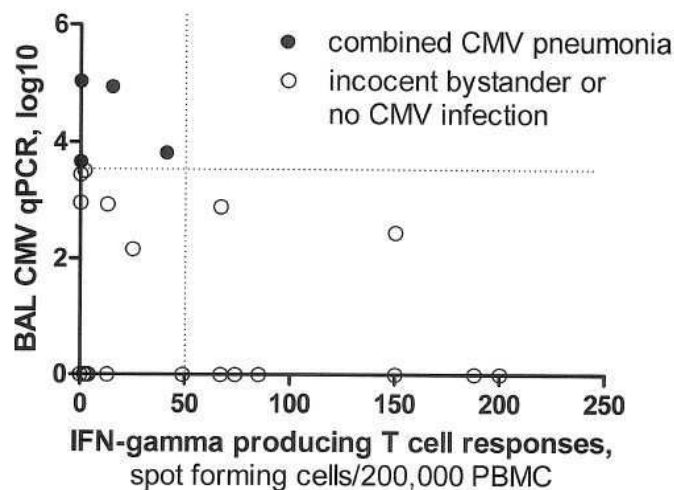
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 거대세포바이러스 실제 감염 여부를 진단하기 위한 거대세포바이러스의 감염 해석 모델

(57) 요약

본 발명은 신규한 거대세포바이러스의 감염 해석 모델 및 이를 이용한 거대세포바이러스 실제 감염 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 2차원적인 거대세포바이러스 감염 모델을 적용하는 경우, 실제로 임상에서 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)와 실제 감염(true infection)을 구별하여 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander) 환자에서 독성이 높은 간사이클로비르(ganciclovir)라는 항바이러스제의 불필요한 독성 노출을 줄일 수 있으며, 실제 감염(true infection) 환자에서는 적절하게 간사이클로비르(ganciclovir)를 투여함으로써 환자의 예후를 향상시킬 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1d



(52) CPC특허분류

C12Q 1/701 (2013.01)

G01N 33/53 (2013.01)

G01N 2800/26 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A1A05004354

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구_후속연구지원

연구과제명 결핵성 림프선염이 의심되는 환자에서 생검조직에 존재하는 림프구를 이용한 새로운 결핵
진단법의 유용성에 대한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치를 X축에 설정하고,

검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치 또는 병변 조직에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응을 Y축에 설정한 후,

상기 X축 및 Y축 각각의 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면에 해당하는 경우 거대세포바이러스 실제 감염(true infection) 고위험군으로 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 검체는 거대세포바이러스의 감염이 의심되는 폐렴, 위장관염 또는 망막염 질환을 갖는 피험자인 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 검체가 거대세포바이러스 감염이 의심되는 폐렴 질환을 갖는 피험자인 경우 X축 수치는 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 측정된 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치로서, sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 50을 X축의 중간 경계점으로 설정하며; Y축 수치는 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치로서, 3.5 log copies/ml을 중간 경계점으로 설정하는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 검체가 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 질환을 갖는 피험자인 경우 X축 수치는 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 측정된 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치로서, sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 100을 X축의 중간 경계점으로 설정하며; Y축 수치는 병변 조직에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사 수치로서, 양성(+)인 경우 중간 경계점 상측에 위치하며 음성(-)인 경우 중간 경계점 하측으로 설정하는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 거대세포바이러스 실제 감염(true infection) 고위험군으로 진단되는 경우 항바이러스제를 처방하는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항바이러스제는 간사이클로비르(ganciclovir)인 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 7

거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치를 X축에 설정하고,

검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치 또는 병변 조직

에서의 면역조직화화법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응을 Y축에 설정한 후,

상기 X축 및 Y축 각각의 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면에 해당하는 경우 거대세포바이러스 실제 감염(true infection) 고위험군 영역으로 구성하며; 2사분면 이외의 사분면에 해당하는 경우 무증상 거대세포바이러스 재활성화(inocent bystander) 또는 거대세포바이러스에 감염되지 않은 저위험군 영역으로 구성하는 거대세포바이러스의 감염 해석 모델.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 거대세포바이러스의 감염 해석 모델 및 이를 이용한 거대세포바이러스 실제 감염 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 거대세포바이러스(Cytomegalovirus, CMV) 감염은 인간 면역결핍 바이러스(HIV, human immunodeficiency virus) 감염 환자를 포함한 면역저하 환자에서 기회감염 중에서 가장 중요한 기회감염의 하나이다. 면역저하 환자에서는 거대세포바이러스의 감염으로 인한 망막염을 일으켜서 실명을 유발하기도 하고, 거대세포바이러스의 감염으로 인한 위장관염으로 장천공, 출혈 등의 합병증을 일으킬 뿐만 아니라, 사망률이 아주 높은 거대세포바이러스의 감염으로 인한 폐렴을 유발하기도 한다.

[0003] 문제는 이러한 거대세포바이러스 감염은 여러 가지 염증 상황, 즉 폐혈증이 생겨서 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)와 같은 사이토카인이 증가하면 거대세포바이러스가 재활성화되어 우리 몸의 여러 검체에서 거대세포바이러스가 검출된다. 따라서 거대세포바이러스가 우리 몸에서 검출되었을 때 실제로 거대세포바이러스 질환을 유발하지 않는 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)가 있지만 현재에는 이를 구별하는 방법이 없다.

[0004] 예를 들면, 중환자실에 입원하는 폐혈증 환자의 혈액에서 약 30% 비율로 거대세포바이러스 감염 증거가 있는 것으로 확인되고 있으나, 여기에서 어느 정도에 해당하는 환자가 실제로 거대세포바이러스 감염이고 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)인지 알 수 없는바, 간사이클로비르(ganciclovir)와 같은 항바이러스제의 사용이 추천되지 않는다.

[0005] 또 다른 예로, 인간 면역결핍 바이러스 감염 환자에서 생긴 주폐포자충 폐렴(pneumocystis pneumonia, PCP)의 경우 28~72% 정도의 환자에서 거대세포바이러스 중복 감염이 발생한다는 것이 알려져 있다. 그러나 인간 면역결핍 바이러스 감염 환자에서는 무증상 자원자(volunteer)에서도 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BAL fluid)에서 거대세포바이러스가 발견된다는 보고가 있어서 인간 면역결핍 바이러스 감염 환자의 경우 기관지 폐포 세척액에서 거대세포바이러스가 검출되었을 때 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)인지 실제 감염(true infection)인지 감별하기 어려운 실정이다.

[0006] 실제 의학적인 진단에 있어서, 인체 면역결핍 바이러스 감염 환자에서 생긴 주폐포자충 폐렴의 경우 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)와 구별이 어렵기 때문에 통상적으로 주폐포자충 폐렴을 먼저 치료한 후, 치료 반응이 좋지 않은 경우 거대세포바이러스 중복 감염이 있는 것으로 생각하고 간사이클로비르(ganciclovir)와 같은 항바이러스제 사용을 추천하고 있다.

[0007] 또 다른 예로, 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC) 환자의 약 40%에서 혈액 내 거대세포바이러스 감염 증거가 있는 것으로 알려져 있지만, 여기에 대한 실제 임상적 의미는 알 수 없다. 궤양성 대장염의 경우 조직 생체 검사에서 거대세포바이러스가 검출될 경우 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)일 수도 있고 실제 감염일 수도 있지만, 이를 구별할 수 있는 방법이 없어서 통상적으로 스테로이드에 반응하지 않는 궤양성 대장염에서 거대세포바이러스 감염의 증거가 있으면 의료 경험적으로 간사이클로비르(ganciclovir)를 투여하기도 한다.

[0008] 현재 거대세포바이러스 감염은 혈액 내 거대세포바이러스 항원 검출(CMV antigenemia), 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사, 기관지 폐포 세척액에서 거대세포바이러스 배양 양성, 병변조직에서 거대세포바이러스 PCR 양성, 거대세포바이러스로 형성된 봉입체(inclusion body) 확인, 거대세포바이러스 면역조직화화법 양성 소견 등으로 진단을 하고 있다.

[0009] 그러나 거대세포바이러스의 경우 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)와 같이 다른 감염이 생겼을 때 재활

성화가 잘되기 때문에 실제로 거대세포바이러스 감염이 혈액이나 여러 가지 체액에서 확인된 경우 임상적 의미를 파악하기가 쉽지 않다.

- [0010] 즉, 현재까지 거대세포바이러스 감염에 대한 해석은 상기 기술한 거대세포바이러스 감염의 증거의 강도, 다시 말하면 거대세포바이러스 수치(viral load)가 많다는지 혹은 침습적 검사에서 거대세포바이러스 감염을 확인하는 것과 같은 소견으로 거대세포바이러스 감염이 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)가 아닐 가능성이 높을 것으로 추정하고 있다.
- [0011] 또는, 상기 의학적인 소견과 함께 숙주가 면역저하상태가 어떤지, 예를 들면 HIV 환자, 골수이식 후 이식편대숙주반응이 있는 경우에 따라 거대세포바이러스 감염의 위험이 더 높으므로, 이러한 환자에서 거대세포바이러스의 수치가 많으면 거대세포바이러스 감염의 가능성이 더 높다는 방식으로 임상적인 추정을 하고 있다.
- [0012] 이와 같은 방식의 검사의 해석은 검사결과에 대한 1차원적인 해석이라고 할 수 있다. 즉, 거대세포바이러스에 대한 세포매개성 면역력을 객관적으로 정확히 측정할 수 없는 상황에서 거대세포바이러스의 수치가 높은 것에 따라서 숙주의 면역억제 정도를 추정함에 따라, 아마도 거대세포바이러스에 대한 세포매개성 면역력이 떨어져 있을 것으로 생각하고 거대세포바이러스 감염의 위험을 임상적으로 판단하는 것이다.
- [0013] 그러나 같은 면역억제제를 사용하더라도 거대세포바이러스에 특이한 세포매개성 감소는 개개인별로 다르기 때문에 객관적으로 거대세포바이러스에 대한 세포매개성 면역력을 수치로 측정할 수 있다면 이러한 불확실성을 해결할 수 있을 것이다.
- [0014] 한편, 최근 거대세포바이러스에 특이한 세포매개성 면역력을 측정하는 방법으로 ELISA-기반 에세이로 Quantiferon-CMV (Cellestis Ltd, a QIAGEN company, USA)가 개발되었는데, 이는 결핵에 특이한 세포매개성 면역력을 측정하는 방법인 Quantiferon-TB assay (Cellestis Ltd, a QIAGEN company, USA)와 유사한 검사이다. 또한, 거대세포바이러스에 특이한 세포매개성 면역력을 측정하는 다른 방법으로, ELISPOT-기반 에세이로 T-Track CMV (Lophius Biosciences GmbH, Germany)가 개발되었으며, 이는 결핵에 특이한 세포매개성 면역력을 측정하는 방법인 T-SPOT.TB assay (Oxford Immunotec, Oxford, UK)와 유사한 검사이다.
- [0015] 일반적으로 ELISPOT 에세이가 ELISA 에세이에 비해서 민감도가 더 높기 때문에, T-SPOT.TB assay가 Quantiferon-TB assay에 비하여 면역억제제의 영향을 덜 받고 보다 민감한 검사법으로 알려져 있다. 또한, ELISPOT 검사법은 말초혈액단핵구(PBMC, peripheral blood mononuclear cells)를 세어서 플레이트에 접종하여 배양하기 때문에 시기별로 검사 결과를 비교하는 것이 가능하지만, ELISA는 전혈(whole blood)을 사용하므로 백혈구 수치가 변하는 경우는 검사 결과의 직접적인 비교에 제한이 있다.
- [0016] 거대세포바이러스 항원을 이용하여 ELISA-기반 에세이와 ELISPOT-기반 에세이를 비교한 연구는 제한적으로 보고되고 있는데, 최근에 발표된 연구에 따르면 두 검사법이 비슷한 정도로 이식 후 거대세포바이러스 감염과 상관관계가 있는 것으로 보고되었다.
- [0017] 따라서 여러 가지 거대바이러스-특이 T 세포 반응을 측정하는 방법이 있지만, 현재 ELISA 기반의 Quantiferon-CMV와 ELISPOT 기반의 T-track CMV가 상용화된 키트로 임상에서 활용할 수 있다(도 1 참조). 이러한 상용화된 키트는 이식 또는 면역억제제를 사용하는 환자에서 거대세포바이러스에 대한 세포매개성 면역력을 측정하여 향후 거대세포바이러스 감염의 위험을 예측하거나 거대세포바이러스 치료 후 재발을 예측할 수 있는 지표로 개발된 것이다.
- [0018] 그러나 본 발명자는 상기와 같은 진단 키트를 거대세포바이러스 감염 위험의 예측의 수단으로 활용하는 것이 아니라, 거대세포바이러스 감염 진단 자체에 활용할 수 있다는 새로운 아이디어를 제시하고자 하였다. 즉, 거대세포바이러스 감염 진단에서 기존의 1차원적인 해석에서 탈피해서 거대세포바이러스 수치(CMV viral load)와 함께 거대세포바이러스에 대한 세포매개성 면역력의 정도를 정량화하여 이 2가지 요소를 모두 해석하는 2차원적인 해석을 통해서 보다 객관적으로 거대세포바이러스 감염을 임상적으로 판단하고자 노력하였다.
- [0019] 그 결과, 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치를 X축으로 설정하고, 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치; 또는 병변 조직에서 얻은 검체의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응을 Y축으로 설정하여, 상기 X 및 Y 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면 영역에 해당하는 경우 실제 감염(true infection) 고위험군으로 진단될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0020] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2010-0057288호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-2009-0114364호
(특허문헌 0003) 미국등록특허 제6,242,567호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 따라서 본 발명의 목적은 2차원적인 해석을 통해서 보다 객관적으로 거대세포바이러스 감염을 진단할 수 있는 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 다른 목적은 2차원적인 해석을 통해서 보다 객관적으로 거대세포바이러스 감염을 해석할 수 있는 새로운 거대세포바이러스 감염 해석 모델에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0023] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은,
- [0024] 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치를 X축에 설정하고,
- [0025] 검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치 또는 병변 조직에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응을 Y축에 설정한 후,
- [0026] 상기 X축 및 Y축 각각의 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면에 해당하는 경우 거대세포바이러스 실제 감염(true infection) 고위험군으로 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 검체는 거대세포바이러스의 감염이 의심되는 폐렴, 위장관염 또는 망막염 질환을 갖는 피험자일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 검체가 거대세포바이러스 감염이 의심되는 폐렴 질환을 갖는 피험자인 경우 X축 수치는 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 측정된 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치로서, sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 50을 X축의 중간 경계점으로 설정하며; Y축 수치는 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치로서, 3.5 log copies/ml을 중간 경계점으로 설정할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 검체가 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 질환을 갖는 피험자인 경우 X축 수치는 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 측정된 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치로서, sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 100을 X축의 중간 경계점으로 설정하며; Y축 수치는 병변 조직에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사 수치로서, 양성(+)인 경우 중간 경계점 상측에 위치하며 음성(-)인 경우 중간 경계점 하측으로 설정할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 거대세포바이러스 실제 감염(true infection) 고위험군으로 진단되는 경우 항바이러스제를 처방할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항바이러스제는 간사이클로비르(ganciclovir)일 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치를 X축에 설정하고,
- [0033] 검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치 또는 병변 조직에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응을 Y축에 설정한 후,
- [0034] 상기 X축 및 Y축 각각의 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면에 해당하는 경우 거대세포바이러스 실제 감염(true infection) 고위험군 영역으로 구성하며; 2사분면 이외의 사분면에 해당하는 경우 무증상 거대세포바이러스 재활성화(inocent bystander) 또는 거대세포바이러스에 감염되지 않은 저위험군

영역으로 구성하는 거대세포바이러스의 감염 해석 모델을 제공한다.

발명의 효과

[0035]

본 발명의 2차원적인 거대세포바이러스 감염 모델을 적용하는 경우, 실제로 임상에서 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)와 실제 감염(true infection)을 구별하여 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander) 환자에서 독성이 높은 간사이클로비르(ganciclovir)라는 항바이러스제의 불필요한 독성 노출을 줄일 수 있으며, 실제 감염(true infection) 환자에서는 적절하게 간사이클로비르(ganciclovir)를 투여함으로써 환자의 예후를 향상시킬 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0036]

도 1a는 총 39명의 주폐포자충 폐렴(Pneumocystis pneumonia, PCP) 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역력 검사 결과 및 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스 배양 양성(+) 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이다.

도 1b는 총 39명의 주폐포자충 폐렴(Pneumocystis pneumonia, PCP) 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역력 검사 결과 및 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정된 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이다.

도 1c는 총 39명의 주폐포자충 폐렴(Pneumocystis pneumonia, PCP) 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역력 검사 결과 및 혈액을 이용하여 거대세포바이러스 항원을 측정된 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이다.

도 1d는 총 39명의 주폐포자충 폐렴(Pneumocystis pneumonia, PCP) 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역력 검사 결과 및 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정된 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이다.

도 2a는 총 24명의 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역력 검사 결과 및 병변 조직(biopsy specimen)에서의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정된 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이다.

도 2b는 총 24명의 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역력 검사 결과 및 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스 항원 측정 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이다.

도 2c는 총 24명의 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역력 검사 결과 및 병변 조직(biopsy specimen)에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037]

본 발명은 거대세포바이러스(CMV: Cytomegalovirus) 감염이 의심되는 다양한 질환에 있어서, 실제 감염(true infection)과 무증상 거대세포바이러스 재활성화(inocent bystander)를 구별하기 위한 거대세포바이러스의 감염 해석 모델을 제공함에 그 특징이 있다.

[0038]

거대세포바이러스는 우리나라에서 성인의 대부분(약 95%)에서 어릴 때 바이러스 감염이 된 후에 우리 몸에서 바이러스를 제거하지 못하고 잠복 상태로 가지고 있게 된다. 평생 동안 이 바이러스를 가지고 있다가 면역기능이 떨어졌을 때, 예를 들면 후천성 면역결핍증(AIDS), 장기이식, 면역억제제 사용 등에서 거대세포바이러스가 잠복 상태에서 분열을 시작하게 된다. 이 때 일부 환자는 장기를 침범하여 염증을 일으키는 거대세포바이러스 질환(true infection or end-organ disease)이 발생하고, 일부 환자는 바이러스가 분열하여 재활성화가 되지만 장기를 침범하여 염증을 일으키지는 않는 무증상 거대세포바이러스 재활성화(inocent bystander)가 생긴다.

[0039]

따라서, 본 발명에서 “거대세포바이러스 질환(true infection)”이란 잠복된 거대세포바이러스(CMV)가 대상 숙주인 인체의 면역기능 저하로 재활성화됨으로써 감염 질환 환자에서 장기를 침범하여 염증을 일으킴으로써 실제 증상(예, 망막염을 일으켜서 실명을 유발, 위장관염으로 장천공, 출혈 등의 합병증 유발, 폐렴을 유발, 폐혈증 유발 등)을 수반하는 질환을 의미하며, 본 발명에서 “무증상 거대세포바이러스 재활성화(inocent bystander)”란 잠복된 거대세포바이러스(CMV)가 대상 숙주인 인체의 면역기능 저하로 바이러스가 분열하여 재활성화가 되지만 장기를 침범하여 염증을 일으키지는 않는 상태를 의미한다.

- [0040] 자세하게는 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치를 X축에 설정하고, 검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치 또는 병변 조직에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응을 Y축에 설정한 후, 상기 X축 및 Y축 각각의 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면에 해당하는 경우 거대세포바이러스 실제 감염(true infection) 고위험군 영역으로 구성하며; 2사분면 이외의 사분면에 해당하는 경우 무증상 거대세포바이러스 재활성화(inocent bystander) 또는 거대세포바이러스에 감염되지 않은 저위험군 영역으로 구성하는 거대세포바이러스의 감염 해석 모델에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명의 상기 ‘검체’는 거대세포바이러스의 감염이 의심되는 폐렴, 위장관염 또는 망막염 질환을 갖는 피험자일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 ‘기관지 폐포세척액’은 기관지내시경을 통해 식염수를 주입하여 폐포 내에 차 있는 세포 및 물질을 세척해 빼내는 기관지폐포세척(bronchoalveolar lavage, BAL) 방법으로 채취한 액체를 의미한다.
- [0043] 또한, 본 발명은 상기 모델을 이용하여 거대세포바이러스 실제 감염 여부를 객관적으로 진단하는 정보제공방법을 제공한다.
- [0044] 자세하게는, 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치를 X축에 설정하고, 검체로부터 분리 수득한 시료 내의 거대세포바이러스 검사 수치 결과를 Y축에 설정한 후, 상기 X축 및 Y축 각각의 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면에 해당하는 경우 거대세포바이러스 실제 감염(true infection) 고위험군으로 진단하기 위한 정보제공방법에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명자들은 거대세포바이러스 감염 진단에서 기존의 1차원적인 해석에서 탈피해서 거대세포바이러스 수치(CMV viral load)와 함께 거대세포바이러스에 대한 세포매개성 면역력의 정도를 정량화하여 이 2가지 요소를 모두 해석하는 2차원적인 해석을 통해서 보다 객관적으로 거대세포바이러스 감염을 임상적으로 판단하고자 노력하였으며, 그 결과 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치를 하나의 요소로 선정하고, 또 다른 요소로 검체로부터 분리 수득한 시료 내의 거대세포바이러스 검사 결과를 선정하였다.
- [0046] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사는 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays)로 측정된 수치를 정량화하여 사용할 수 있다.
- [0047] 즉, CMV IGRA(interferon- γ releasing assays)를 통해 측정된 50~100 sfu/500,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 수치를 X축의 중간 경계점으로 놓고 10000을 X축의 상한선으로 설정할 수 있다.
- [0048] 다만, 상기 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사로서 ELISPOT 검사법은 하나의 예시에 해당하는바, 종래 알려진 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사가 사용될 수도 있으며, 이러한 경우 정량화되는 수치도 변화될 수 있다.
- [0049] 한편, 본 발명에 따른 검체로부터 분리 수득한 시료 내의 거대세포바이러스 검사 방법에 있어서, 상기 검체로부터 분리 수득한 시료의 종류로는 기관지 폐포세척액, 혈액 또는 생검조직(병변조직)을 이용할 수 있으며, 이로부터 거대세포바이러스를 검사하는 방법으로는 qPCR, 항원검사 및 면역조직화학법 등을 예시할 수 있으나, 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니다.
- [0050] 더욱 구체적인 예로는, ① 검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스 배양 양성 검사, ② 검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정하는 검사, ③ 검체로부터 분리 수득한 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정하는 검사, ④ 검체로부터 분리 수득한 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스 항원을 측정하는 검사, ⑤ 검체로부터 분리 수득한 병변 조직(biopsy specimen)에서의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정하는 검사, 및 ⑥ 검체로부터 분리 수득한 병변 조직(biopsy specimen)에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사 등을 이용할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 검체가 거대세포바이러스 감염이 의심되는 폐렴 질환을 갖는 피험자인 경우 X축 수치는 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 측정된 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치로서, sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 50을 X축의 중간 경계점으로 설정하며; Y축 수치는 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치로서, 3.5 log copies/ml을 중간

경계점으로 설정할 수 있다. 참고로, Y축의 상한선은 특별히 제한하지 않으며, 10 log copies/ml를 예시할 수 있다.

[0052] 본 발명의 하기 실시예 <2-2>에서는 주폐포자충 폐렴 환자 총 39명을 대상으로 하여 세포매개성 면역력 검사로서 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 결과를 X축에 설정하고; 바이러스 검출 검사로서 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스 배양 양성(+) 검사 결과, 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정된 검사 결과, 혈액을 이용하여 거대세포바이러스 항원을 측정된 검사 결과 및 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정된 검사 결과를 Y축으로 각각 설정하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 주폐포자충 폐렴 환자 중 실제 CMV 감염이 동반된 폐렴 환자의 진단을 위한 방법으로서 Y축으로 기관지 폐포세척액 내의 CMV qPCR 검사 결과를 설정하는 경우, 상기 X축 및 Y축 각각의 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면에서 CMV 실제 감염 환자가 100%의 확률로 진단될 수 있음을 확인하였다.

[0053] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 검체가 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 질환을 갖는 피험자인 경우 X축 수치는 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 측정된 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치로서, sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 100을 X축의 중간 경계점으로 설정하며; Y축 수치는 병변 조직에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사 수치로서, 양성(+)인 경우 중간 경계점 상측에 위치하며 음성(-)인 경우 중간 경계점 하측으로 설정할 수 있다.

[0054] 본 발명의 하기 실시예 <2-3>에서는 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 환자 총 24명을 대상으로 하여 세포매개성 면역력 검사로서 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 결과를 X축에 설정하고; 바이러스 검출 검사로서 병변 조직(biopsy specimen)에서의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정된 검사 결과, 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스 항원 측정 검사 결과, 및 병변 조직(biopsy specimen)에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사 결과를 Y축으로 각각 설정하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 환자 중 실제 CMV 감염이 확인된 위장관염 환자의 진단을 위하여 Y축으로 병변 조직(biopsy specimen)에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사 결과를 설정하는 경우, 상기 X축 및 Y축 각각의 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면에서 CMV 실제 감염 환자가 92%의 확률로 진단될 수 있음을 확인하였다.

[0055] 본 발명의 방법에 따라 거대세포바이러스 실제 감염(true infection) 고위험군으로 진단되는 경우, 항바이러스제로서 간사이클로비르(ganciclovir)를 처방하는 것이 바람직하다.

[0056] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0057] <실시예 1>

[0058] 본 발명의 거대세포바이러스 검사 방법

[0059] 본 발명은 2가지 요소의 정량화를 통해 도출된 거대세포바이러스의 실제 감염(true infection) 여부를 판단하는 검사방법으로서, 자세하게는 2가지 요소를 X축과 Y축으로 각각 정량화하고, 이의 중간 경계점을 계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면 영역에 해당하는 경우 실제 감염(true infection)으로 진단하는 방법이다.

[0060] 본 실험에서 상기 2가지 요소 중 거대세포바이러스 세포매개성 면역력 검사 수치를 X축에 설정하였으며, 본 실험에서는 이러한 세포매개성 면역력 검사 수치를 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 측정하였고, 검사 수치는 sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 단위를 갖는다.

[0061] 한편, 상기 2가지 요소 중 Y축에는 검체로부터 유래한 시료로서 기관지 폐포세척액, 혈액 및 병변조직을 이용 qPCR, 항원검사 및 면역조직화학법을 통한 총 6가지 종류의 검사 결과를 설정하여 실험을 진행하였다.

[0062] 즉, ① 검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스 배양 양성 검사, ② 검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정하는 검사, ③ 검체로부터 분리 수득한 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정하는 검사, ④ 검체로부터 분리

수득한 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스 항원을 측정하는 검사, ⑤ 검체로부터 분리 수득한 병변 조직(biopsy specimen)에서의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정하는 검사, 및 ⑥ 검체로부터 분리 수득한 병변 조직(biopsy specimen)에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사를 각각 실시하였다.

[0063] (1) 거대세포바이러스 항원 검사(CMV antigenemia) 측정 방법

[0064] 헤파린으로 항응고 처리한 5-10 mL의 전혈에 텍스트란을 11:4의 비율로 섞고 37℃에서 20분간 배양하여 침전시켰다. 이를 원심분리시켜, 백혈구가 풍부한 상층액을 취하고, 섞여있는 적혈구는 염화암포늄을 사용하여 용해시켜 백혈구만 얻었다. 멸균된 PBS로 세척하고, 원심분리 후에, 백혈구 현탁액의 농도를 1×10^6 cells/mL로 맞추었다. 백혈구 현탁액 200 μ L(200,000 cells)를 현미경 슬라이드에 세포원심시켜 도말하였다. 섭씨 4℃의 아세톤과 메탄올을 1:1 용액을 이용하여 슬라이드를 고정시켰다. 이렇게 준비된 슬라이드에 상용화되어 있는 CMV pp65에 대한 단일클론항체(IC3 + AYM-1, CINAKIT Rapid Antigenemia, Argene, North Massapequa, NY, USA) 40 μ L로 염색하고, 섭씨 37℃ humid chamber에서 30분 동안 배양시켰다. 슬라이드를 PBS에 두 차례 세척하였다. FITC로 표지된 이차항체 40 μ L를 슬라이드에 넣은 이후에 37℃ humid chamber에서 30분 동안 배양하였다. 슬라이드를 PBS에 두 차례 세척하였고, 최종적으로 증류수를 이용하여 다시 세척하였다. 200배와 400배의 배율에서 슬라이드를 형광 현미경으로 관찰하여 감염된 세포의 핵 내에 밝은 녹색의 형광을 보인 경우에 양성으로 판단하였다. 정량 결과는 200,000개의 백혈구 중에서 양성인 세포의 수로 표기하였다.

[0065] (2) qCMV PCR in BAL or blood

[0066] 자동화 핵산 추출 기기인 QiaSymphony DNA extraction system (Qiagen, Valencia, CA, USA)에서 QIASymphony DNA Mini kit (Qiagen)를 사용하여 전혈에서 핵산을 추출하였다. 추출된 DNA를 CMV의 UL123 major immediate early (MIE) 유전자를 실시간중합효소연쇄반응으로 증폭하는 artusCMV QS-RGQ kit (Qiagen)를 이용하여 정량하였다. 결과로 도출된 수치는 copies/ml 단위를 log 값으로 변환하여 나타내었다.

[0067] (3) CMV culture in BAL

[0068] CMV는 Diagnostic Hybrids (Athens, OH, USA)사의 MRC-5 ReadyCells을 이용하여 shell vial법으로 배양하였다. 24시간 배양 후 D3 DFA Cytomegalovirus Immediate Early Antigen Identification kit (Diagnostic Hybrids)로 면역형광염색하여 형광현미경으로 세포 핵내 특이 형광을 관찰하였다. 양성인 경우 CMV 배양 양성(+)으로 표기하였다.

[0069] (4) 병변 조직(biopsy specimen)에서 CMV IHC (immunohistochemistry) 염색 및 CMV PCR 검사

[0070] 조직에서 IHC 검사는 포르말린에 고정된 파라핀 조직에서 자동화된 IHC staining device (Benchmark XT, Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA)를 이용하여 시행하였다. 검체는 CMV에 대한 항체(1:200 dilution, clone8B1.2, 1G5.2&2D4.2, mouse monoclonal, Cell Marque, CA, USA)를 이용하여 optiView Universal DAB Kit (Ventana Medical System)에서 배양하였다.

[0071] 조직에서 CMV PCR 검사는 파라핀 포매 조직을 1.5ml eppendorf tube에 넣고 탈파라핀 과정을 거친 후, QIAamp DNA mini kit (Qiagen)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 정량 후, 추출한 DNA의 quality test를 β -globin 유전자 증폭으로 확인하였다. 추출한 DNA 3 μ L (300 ng/ μ L), 25 mM Tris-HCl(pH 8.2), 50 mM NaCl, 400 each dNTP, 2mM MgCl₂, 10 pmol의 양쪽: TTGCAGGCCACGAACAACGT(forward primer), GTCTACGGATTGCTGACGCT (reverse primer), 0.625U MightyAmp DNA polymerase (1.25units/ μ L, Takara, Japan)를 넣고 최종 25 μ L 부피로 하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 시행하였다. 초기 변성 단계인 98℃에서 2분 후, 98℃ 10초, 55℃ 15초, 68℃ 30초의 과정을 31회 반복하였고, 후기 신장 단계로 68℃에서 7분간 Thermal cycler (Bio-rad, USA)를 사용하여 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물을 MultiNA(Shimadzu, Japan) 장비를 이용하여 전기영동을 하고 분석프로그램을 사용하여크기의 band 증폭 여부를 확인하였다.

[0072]

(5) ELISPOT assay

[0073]

IFN- γ 생산 T 세포 반응(T-track CMV, Regensburg, Germany)을 위한 ELISPOT 에세이를 수행하기 위하여 환자들로부터 말초정맥혈을 샘플 시료로 준비하였다. 간략하게는, 환자에서 채혈(~8ml) 후 30분 이내에 말초단핵구를 분리하여 세포수를 2.5×10^5 cells/well이 되도록 조절한 다음, 이를 Anti-human IFN-gamma 항체가 부착되어 있는 4-웰 플레이트에 처리한 후 8시간 동안 반응시켰다. 각각의 웰에 양성대조군에 해당하는 PHA(Sigma-Aldrich), 자극 항원으로써 urea-fomulated pp65 및 urea-formulated IE1를 첨가하였다. 음성대조군은 배지만 첨가하였다. 세포배양기에 약 18시간 동안 배양한 후에 염색하여 자동화된 ELISPOT reader (EliSpot 04 HR, Autoimmune Diagnostika GmbH, Germany)에서 spot을 판독하였다. 수치는 sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units)로 표기하였다.

[0074]

<실시예 2>

[0075]

본 발명의 거대세포바이러스 검사방법의 검증

[0076]

<2-1> 연구 설계

[0077]

2014.01-2014.12 기간 동안 서울아산병원에서 진료한 HIV-비감염 성인 환자로서 주폐포자충 폐렴(Pneumocystis pneumonia, PCP) 환자 41명 및 거대세포바이러스(CMV) 감염이 의심되는 위장관염 질환 환자 35명을 대상으로 하였다. CMV 폐렴 및 CMV 위장관염 질환을 진단하기 위한 미생물학적/병리학적 시료는 이전에 설명된 표준기술 및 절차를 따라 처리되었다. 간사이클로비르(ganciclovir)를 처방하는 항-CMV 치료는 각각의 환자별 초기 임상 형태, 혈액검사, 미생물검사, 이미지 및 조직병리학적 발견 등에 기초하여 종합적으로 결정되었다. 본 연구에서 진행한 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 결과는 경험에 의한 항-바이러스 치료의 결정에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 편견 배제를 위하여 병원소속내과의사에게는 상기 결과에 대해서는 밝히지 않았다. 본 연구의 프로토콜은 아산병원 시설 내 연구 심사위원회(Institutional Review Board; IRB)에 의해 승인을 받아 이루어졌다.

[0078]

<2-2> 거대세포바이러스 감염이 의심되는 폐렴 환자에 적용 결과

[0079]

연구 기간 동안 41명에 해당하는 주폐포자충 폐렴 환자가 아산병원에 등록하였다. 상기 환자들에 대한 기본적인 특성 및 연구 수행 결과는 아래 표 1에서 자세히 나타내었다. 41명의 환자 중 4명(10%)이 거대세포바이러스(CMV) 감염을 동반한 폐렴 환자로 분류되었으며, 12명(29%)은 무증상 거대세포바이러스 재활성화(inocent bystander reactivation) 환자로 분류되었으며, 23명(56%)은 거대세포바이러스 비감염 환자로 분류되었고, 나머지 2명(5%)은 정확하게 분류하기 어려운 환자에 해당하였다.

표 1

[0080]

거대세포바이러스(CMV) 감염이 의심되는 폐렴 환자의 기본적 특성(baseline characteristics) 및 연구 수행 결과

	Total (n=41)	Combined CMV pneumonia (n=4)	bystander activation (n=13)	no CMV infection (n=22)	Indeterminate CMV pneumonia (n=2)
나이, medianyears(IQR)	55 (35-62)	62	57	55	42 (35-48)
남성	30 (73)	4	9 (69)	15 (68)	2
기저질환					
혈액암	18 (44)	1 (25)	6 (46)	5 (23)	0
고형 장기 이식	12 (29)	1 (25)	6 (46)	5 (23)	0
신장이식	8	1	4	3	0
간이식					
기타 장기 이식					

	3	0	1	2	0
	1	0	1	0	0
고형암	4 (10)	0	2 (15)	2 (9)	0
스테로이드 사용자	2 (5)	0	1 (8)	1 (5)	0
기타	3 (7)	0	1 (8)	2 (9)	0
Positive BAL CMV culture	4 (10)	2 (50)	0	0	2 (100)
Positive BAL CMV qPCR	12//33 (36)	42098	7/10 (70)	0/18	1/1
Median(IQR)	3.3 (0-3.0)	4.4 (3.7-5.0)	2.9 (0-3.2)	0	0
Positive blood CMV qPCR	12/31 (39)	2/4 (50)	7/8 (88)	1/17 (6)	2/2
Median (IQR)	0 (0-2.8)	1.4 (0-3.5)	2.8 (1.3-4.4)	0	0
Positive blood CMV antigenemia	9/40 (23)	1/4 (25)	6/12 (50)	0/22	2/2
Median(IQR)	0	0 (0-2.2)	0 (0-21.5)	0	0
Mortality	6 (15)	2 (50)	2 (15)	2 (9)	0

* Data are number (%) of patients with a positive test result/no. of patients tested, unless otherwise indicated.

본 실험(연구)에서는 정확하게 분류되지 않은 2명의 환자를 제외한 총 39명의 환자를 대상으로 하여 상기 <실시예 1>에서 나타난 본 발명의 거대세포바이러스 검사방법을 진행하였다.

그 결과는 상기 표 1 및 도 1에서 자세히 나타내었다.

도 1a는 총 39명의 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역반응 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 검사 결과 및 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스 배양 양성 검사를 실시한 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이며, 도 1b는 총 39명의 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역반응 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 검사 결과 및 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정된 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이고, 도 1c는 총 39명의 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역반응 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 검사 결과 및 혈액을 이용하여 거대세포바이러스 항원을 측정된 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이며, 마지막으로 도 1d는 총 39명의 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역반응 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 검사 결과 및 검체로부터 분리 수득한 기관지 폐포세척액(BAL) 내의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정된 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이다.

이와 같은 결과를 살펴보면, 도 1d에서 나타난 바와 같이 X축으로 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 측정된 세포매개성 면역력 수치로서 sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 50을 X축의 중간 경계점으로 설정하며; Y축으로 기관지 폐포세척액 내의 거대세포바이러스 quantitative PCR 검사 수치로서 3.5 log copies/ml을 중간 경계점으로 설정하는 경우, 실제 CMV 감염이 동반된 폐렴 환자 4명 모두 상기 X 및 Y 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면 영역에서 형성되고 있으며, 그 외 다른 사분면 영역에서는 CMV 폐렴 환자가 전혀 형성되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이는 총 39명의 환자에서 실제 CMV 폐렴 환자로 진단되어진 4명의 피험자가 100% 확률로서 예측되는 것이다.

참고로, CMV 감염이 동반된 폐렴 환자로 진단된 상기 4명의 피험자는 환자별 초기 임상 형태, 혈액검사, 미생물 검사, 이미지 및 조직병리학적 발견 등에 기초하여 다수의 의사들의 의견을 통해 종합적으로 결정된 것이며, 본 발명에서는 주폐포자충 폐렴 환자 중 실제 CMV 감염이 동반된 폐렴 환자의 진단을 위한 방법으로서 상기 2가지 기준(X축: 세포매개성 면역반응, Y축: 기관지 폐포세척액 내의 CMV qPCR 검사)을 이용하는 경우, 100%의 확률로 예측될 수 있음을 확인하였다.

<2-3> 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 환자에 적용 결과

연구 기간 동안 35명에 해당하는 거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 환자가 아산병원에 등록하였다.

상기 환자들에 대한 기본적인 정보 및 검사 결과는 아래 표 2에서 자세히 나타내었다. 35명의 환자 중 12명(34%)이 거대세포바이러스(CMV) 감염이 확인된 위장관염 질환자로 분류되었으며, 12명(34%)은 무증상 거대세포바이러스 재활성화(inocent bystander reactivation)를 갖는 환자로 분류되었으며, 나머지 11명(31%)은 정확하게 분류하기 어려운 환자에 해당하였다.

표 2

거대세포바이러스 감염이 의심되는 위장관염 환자의 기본적 특성(baseline characteristics) 및 연구 수행 결과

	Total (n=35)	G-I CMV disease (n=12)	No G-I CMV disease (n=12)	Indeterminate CMV disease (n=11)
나이, medianyears(IQR)	55 (43-63)	57 (45-61)	49 (42-65)	57 (35-67)
남성	17 (49)	7 (58)	5 (46)	5 (42)
기저질환				
혈액암	9 (26)	6 (50)	2 (17)	1 (9)
고형 장기 이식	9 (26)	5 (42)	3 (25)	1 (9)
신장이식	8	4	3	1
간이식	1	1	0	0
염증성 장질환	14 (40)	1 (8)	6 (50)	7 (64)
기타	3 (9)	0	1 (8)	2 (18)
Positive CMV inclusion body	18 (51)	5 (42)	4 (33)	9 (82)
Positive CMV IHC	26 (74)	11 (92)	5 (42)	10 (91)
Positive blood CMV antigenemia	17 (49)	10 (83)	1 (8)	6 (55)
Median(IQR)	0 (0-24)	29 (2-100)	0	1 (0-21)
Mortality				

* Data are number (%) of patients with a positive test result/no. of patients tested, unless otherwise indicated.

정확하게 분류되지 않은 11명의 환자를 제외한 총 24명의 환자를 대상으로 하여 상기 <실시에 1>에서 나타낸 본 발명의 거대세포바이러스 검사방법을 진행하였다.

그 결과는 상기 표 2 및 도 2에서 자세히 나타내었다.

도 2a는 총 24명의 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역반응 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 검사 결과 및 검체로부터 분리 수득한 병변 조직(biopsy specimen)에서의 거대세포바이러스를 quantitative PCR로 측정된 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이며, 도 2b는 총 24명의 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역반응 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 검사 결과 및 검체로부터 분리 수득한 혈액(blood) 내의 거대세포바이러스 항원 측정 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이고, 도 2c는 총 24명의 환자를 대상으로 하여 세포매개성 면역반응 CMV IGRA(interferon- γ releasing assays) 검사 결과 및 검체로부터 분리 수득한 병변 조직(biopsy specimen)에서의 면역조직화학을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사 결과를 각각 X축과 Y축으로 하여 나타낸 것이다.

이와 같은 결과를 살펴보면, 도 2c에서 나타낸 바와 같이 X축으로 ELISPOT(Enzyme-Linked ImmunoSpot) 검사법을 통해 측정된 세포매개성 면역력 수치로서 sfu/200,000 cells(2×10^5 cells 당 Spot Forming Units) 100을 X축의 중간 경계점으로 설정하며; Y축으로 검체로부터 분리 수득한 병변 조직(biopsy specimen)에서의 면역조직화학을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사에서 양성(+)인 경우 중간 경계점 상측에 위치하며 음성(-)인 경우 중간 경계점 하측으로 설정하는 설정하는 경우, 실제 CMV 감염이 확인된 위장관염 환자 12명 중 10명이 상기 X 및 Y 중간 경계점을 기준으로 십자모양의 직교축에서 좌측상단인 2사분면 영역에서 형성되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 총 24명의 환자에서 실제 CMV 위장관염 환자로 진단되어진 12명의 피험자 중 11명의 환자

가 92% 확률로서 예측되는 것이다.

[0095] 참고로, CMV 위장관염 환자로 진단된 상기 12명의 피험자는 환자별 초기 임상 형태, 혈액검사, 미생물검사, 이미지 및 조직병리학적 발견 등에 기초하여 다수의 의사들의 의견을 통해 종합적으로 결정된 것이며, 본 발명에서는 CMV 감염이 의심되는 위장관염 환자 중 실제 CMV 감염된 위장관염 환자의 진단을 위한 방법으로서 상기 2가지 기준(X축: 세포매개성 면역반응, Y축: 병변 조직에서의 면역조직화학법을 통한 거대세포바이러스 양성 반응 검사)을 이용하는 경우, 92%의 확률로 예측될 수 있음을 확인하였다.

[0096] 결론적으로, 본 발명의 2차원적인 거대세포바이러스 감염 모델을 적용하여 실제로 임상에서 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander)와 실제 감염(true infection)을 구별하여 이노센트 바이스탠더(Innocent bystander) 환자에서 독성이 높은 간사이클로비르(ganciclovir)라는 항바이러스제의 불필요한 독성 노출을 줄이고, 실제 감염(true infection) 환자에서는 적절하게 간사이클로비르(ganciclovir)를 투여함으로써 환자의 예후를 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 이렇게 바이러스 측면과 숙주의 면역 반응 측면을 같이 정량화하여 해석하는 방법은 다른 감염, 예를 들면 EBV(Ebstein-Barr Virus) 등의 감염질환 해석도 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

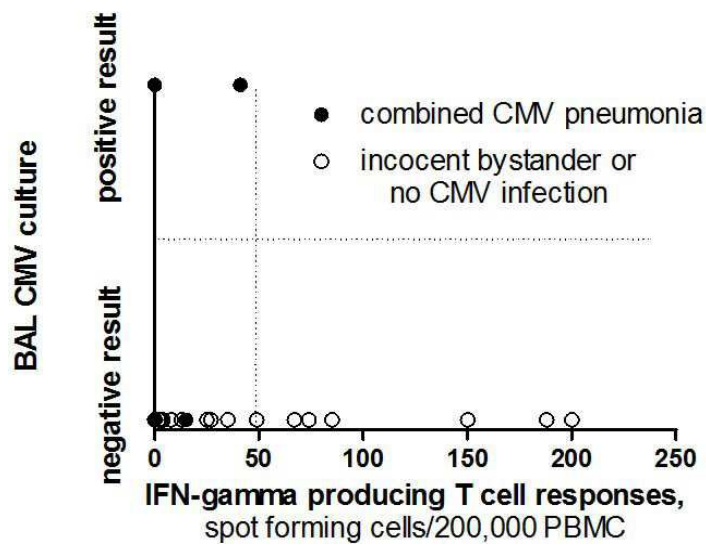
[0097] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

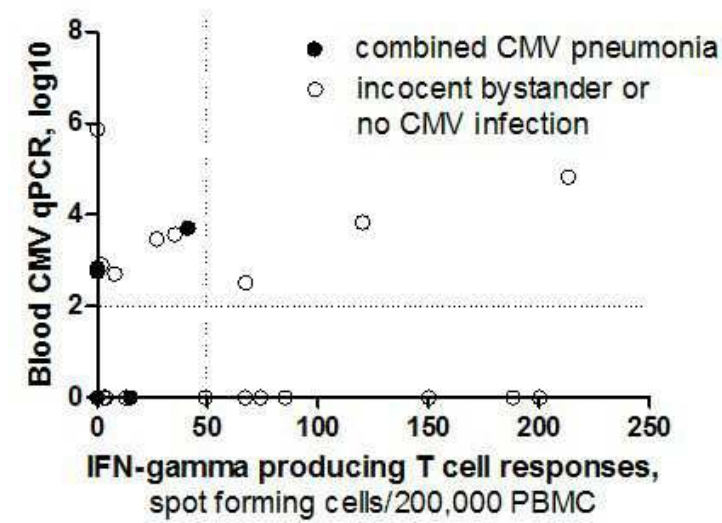
[0098] CMV: Cytomegalovirus
HIV: human immunodeficiency virus
TNF: tumor necrosis factor
PCP: pneumocystis pneumonia
BAL: bronchoalveolar lavage
UC: ulcerative colitis
PCR: polymerase chain reaction
IHC: immunohistochemistry
qCMV PCR: quantitative CMV PCR
IGRAs: interferon (IFN)- γ -releasing assays
G-I CMV disease: gastrointestinal CMV disease

도면

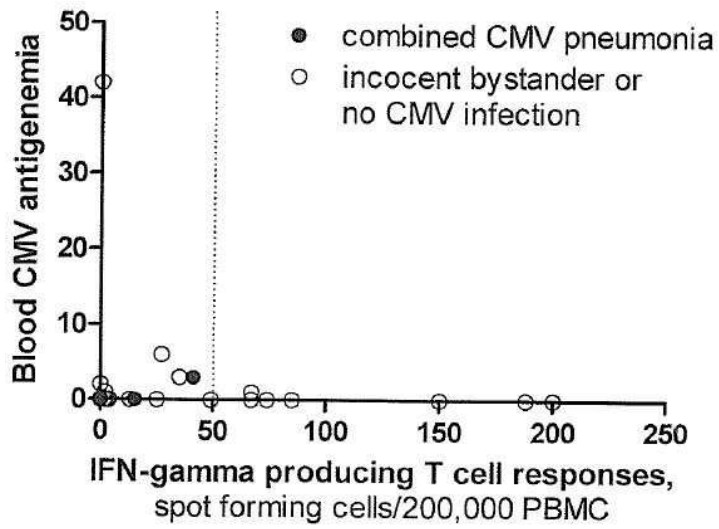
도면1a



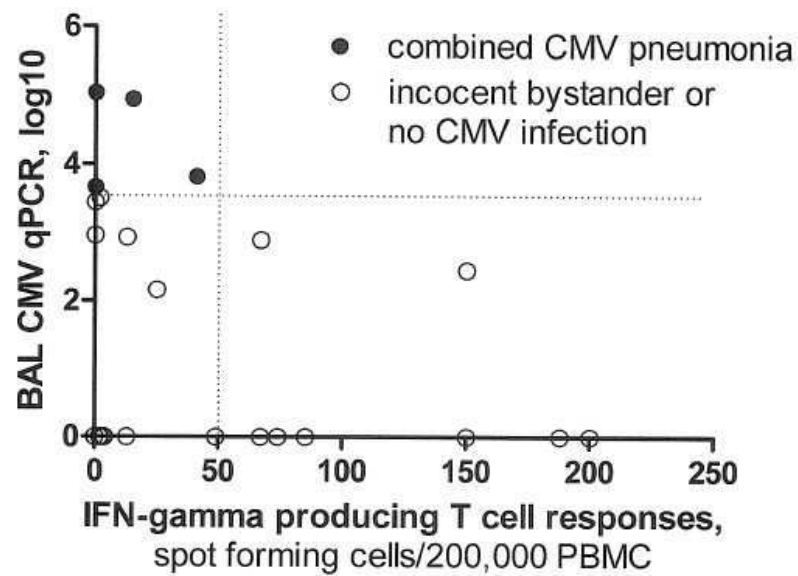
도면1b



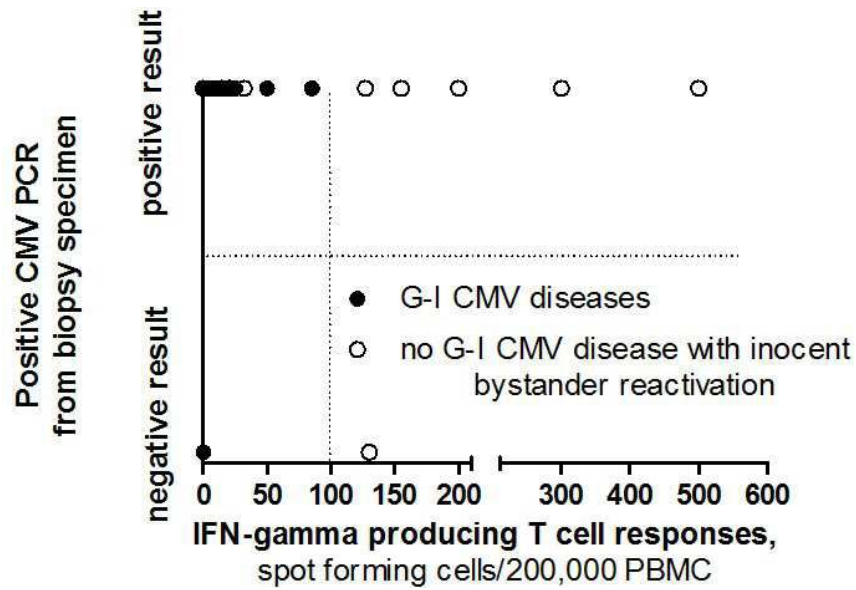
도면1c



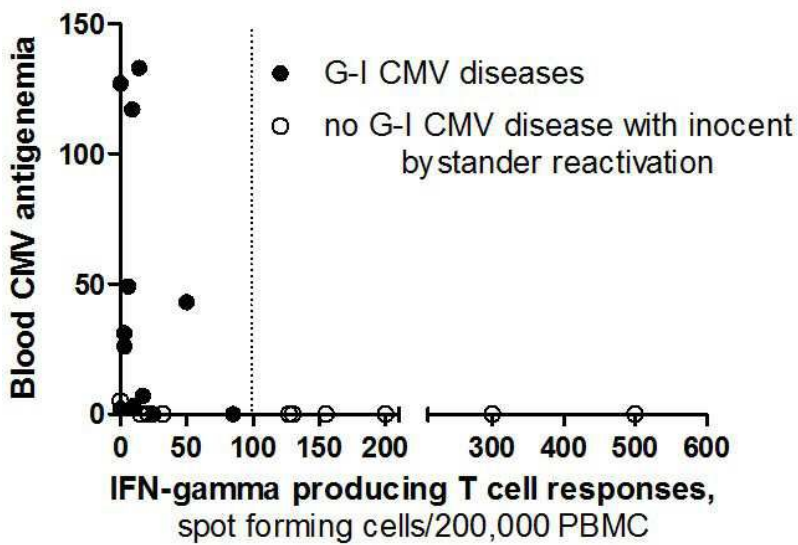
도면1d



도면2a



도면2b



도면2c

