(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0079139
(43) 공개일자 2017년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01) *G01N 15/14* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C07K 16/249 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0189371
(22) 출원일자 2015년12월30일
심사청구일자 2015년12월30일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
이진수
인천광역시 연수구 해돋이로 107,4-2401호(송도동, 더샵퍼스트월드)
(74) 대리인
이처영, 장제환

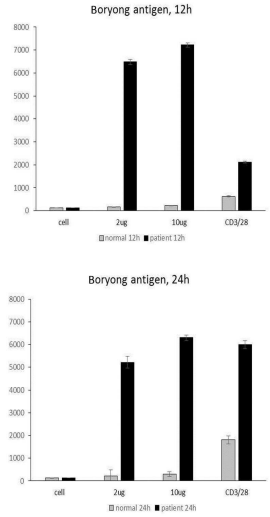
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **말초혈액단핵세포의 인터페론 감마 분비 측정을 이용한 쯔쯔가무시병 진단 방법**

(57) 요 약

본 발명은 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)의 인터페론 감마(interferon-γ; INF-γ) 분비 측정을 이용한 쯔쯔가무시병(scrub typhus) 진단방법에 관한 것으로, 본 발명의 쯔쯔가무시병 진단방법은 쯔쯔가무시균에 감염된 환자의 혈액으로부터 분리한 말초혈액단핵세포에 쯔쯔가무시균 추출물을 처리하여 항원 자극하면 INF-γ 생성이 증가하는 반면, 비감염인 유래 말초혈액단핵세포에서는 INF-γ 생성의 변화가 없는 것을 확인하였으며, 따라서 상기 INF-γ 생성농도의 측정만으로도 간단하게 쯔쯔가무시병을 진단할 수 있고, 나아가 본 발명의 쯔쯔가무시병 진단방법은 종래의 쯔쯔가무시병을 진단하는 간접면역형광법과 유전형 분석을 위한 PCR 분석과 비교하여 진단의 정확도가 현저하게 향상되어, 종래의 진단방법을 완전히 대체할 수 있을 뿐만 아니라 진단 결과에 대한 신뢰도를 현저히 향상시킨다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
C12N 5/0646 (2013.01)
G01N 15/14 (2013.01)
G01N 33/54306 (2013.01)
G01N 2333/57 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 쯔쯔가무시균(*Orientia tsutsugmushi*) 감염 여부를 판단하고자 하는 환자 혈액으로부터 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 분리하는 단계;

(b) 쯔쯔가무시균 추출물을 상기 (a) 단계에서 분리한 말초혈액단핵세포에 처리하여 항원 자극하는 단계; 및

(c) 말초혈액단핵세포에서 분비된 인터페론 감마(interferon-γ; INF-γ) 농도를 측정하여 쯔쯔가무시균 감염 여부를 판단하는 단계;

를 포함하는 쯔쯔가무시병(scrub typhus) 진단방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 쯔쯔가무시균 추출물은 길리암주(Gilliam strain), 카프주(Karp strain), 보령주(Boryong strain), 카토주(Kato strain) 및 카와사키주(Kawasaki strain)로 이루어진 군 중에서 선택한 1종 이상의 균주로부터 추출된 것임을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 쯔쯔가무시균 추출물은 56kDa형 특이적 항원(56kDa type specific antigen; TSA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 0.5 내지 10 ㎍/㎖ 농도의 쯔쯔가무시균 추출물을 말초혈액단핵세포에 처리하여 12 내지 24시간 동안 반응시키는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 인터페론 감마 농도는 ELISA 방법 또는 유세포분석(flow cytometry)을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 측정된 인터페론 감마 농도가 비감염인보다 높은 경우, 쯔쯔가무시균에 감염된 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 인터페론 감마는 말초혈액단핵세포에 포함된 CD3+ T 세포 또는 CD56+ NK 세포(natural killer cell)에서 생성되는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 쯔쯔가무시병 진단방법을 이용하고,

쯔쯔가무시균 추출물; 및

항-인터페론 감마(anti-interferon-γ; anti-INF-γ) 항체;를 포함하는 쯔쯔가무시병 진단 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)의 인터페론 감마(interferon-γ; INF-

γ) 분비 측정을 이용한 쯔쯔가무시병(scrub typhus) 진단방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 쯔쯔가무시균에 감염된 것으로 의심되는 환자의 혈액으로부터 말초혈액단핵세포를 분리한 다음, 쯔쯔가무시균 추출물을 처리하여 항원 자극시킨 후에 생성되는 인터페론 감마의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 방법으로 쯔쯔가무시병을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 쯔쯔가무시병은 전세계적으로 발생하며, 특히 말레이지아, 태국, 필리핀 등을 포함하여 중국, 일본 및 호주에서 빈발하고 있는데, 국내에서는 농촌 지방에서 괴질이라 불리어온 병에 걸린 환자 중 다수가 쯔쯔가무시병 환자임이 알려지게 되었다. 쯔쯔가무시병은 주로 가을철에 발생하는데 이는 주로 매개충인 털진드기 유충(chigger)의 밀도와 관련된 것으로, 우리 나라에서도 렙토트롬비디움 팔리둠 (Leptotrombidium pallidum)의 유충이 많이 출현하는 10 ~ 11 월에 전지역에 걸쳐서 많이 발생하고 있다.

[0003] 오리엔티아 쯔쯔가무시 (*O. tsutsugamushi*; 쯔쯔가무시균)는 그람음성간균으로 절대세포내 (obligated intracellular) 기생생활을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 쯔쯔가무시균은 쯔쯔가무시병(Scrub typhus)의 원인균으로서, 급성·만성 감염으로 그 증상으로는 폐렴(pnemonitis), 뇌염(encephalitis), 발진, 발열 및 두통 등을 포함한다.

[0004] 오리엔티아 쯔쯔가무시의 각 군(혈청형)에 따라서 병의 증상이나 역학적인 양상은 경우에 따라 상이한 차이를 보이고 있다. 같은 군 속의 균 상호간에는 혈청학적으로 연관이 있으나, 다른 군의 균과는 혈청학적 교차반응이 약하게 있거나 없다. 오리엔티아 쯔쯔가무시는 한 개의 종으로 분류되고 있으나, 항원구조가 다른 혈청형이 많이 존재하며, 이러한 항원의 차이에 따라 길리암(Gilliam), 카프(Karp), 카토(Kato) 등의 혈청형으로 분류된다. 국내에서는 길리암, 카프 외에 기존에 알려진 원형균주와는 혈청학적 반응 양상이 다른 강원주(Kangwon)와 보령주(Boryong)가 분리된 바 있다.

[0005] 이와 같은 항원형의 다양성을 결정짓는 오리엔티아 쯔쯔가무시의 세포막 단백 항원에는 종특이 항원과 혈청형특이 항원 등이 존재한다. 오리엔티아 쯔쯔가무시를 정제하여 항원을 폴리아크릴아미드 젤 전기영동과 면역블로팅(immunoblotting)으로 분석한 결과 70, 60, 54~56, 46~47kDa의 주요 항원이 존재하는 것으로 밝혀졌는데(Takahashi K 등, Microbiol. Immunol. 29: 475, 1985), 이중 46~47kDa, 54~56kDa 및 70kDa의 단백질이 항원성을 가지며, 56kDa과 46~47kDa 단백질은 균주 특이 항원이다(Tamura A 등, Microbiol. Immunol. 26: 321, 1982). 일반적으로 쯔쯔가무시병은 임상 증상이 가벼우며 증상에 의한 임상 진단이 용이한 질환으로 인식되고 있지만, 보고에 따르면 비전형적인 임상 증상을 나타내는 예가 많아 전신 임파선 종창이나 가피 형성 등 쯔쯔가무시병의 특징적인 소견이 없는 경우에는 렙토스피라증, 발진열 및 신증후출혈열 등의 급성열성질환과의 감별진단이 어렵다.

[0006] 또한, 적절한 치료가 지연되거나 초기에 치료받지 못한 경우, 환자는 폐렴, 수막염, 신부전 및 다중기관 부전(multi-organ failure) 및 사망에 이르게 되고, 감염자 중의 일부는 만성감염을 앓게 된다. 따라서, 조기 진단을 위한 정확한 검사 방법은 사망률 및 합병증을 감소시키는데 매우 중요하므로, 쯔쯔가무시병을 효과적으로 진단할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다.

[0007] 종래의 기술에서는 쯔쯔가무시병 진단을 위해 임상적 특징, 감염균주의 분리 및 동정, 간접면역형광법(indirect immunofluorescence assay; IFA)에 의한 혈원형 분석(serotyping) 및 면역우성적 56kDa 형 특이적 항원(56kDa type specific antigen; TSA)의 PCR 증폭에 의한 유전형 분석 등을 사용하였다. 또한, 공개특허 특2002-0020281(공개일자: 2002년03월15일)에는 오리엔티아 쯔쯔가무시(*Orientia tsutsugamushi*)의 항원결정기로부터 유래된 2 종 이상의 단백의 유전자를 연결한 DNA를 포함하는 벡터로 형질전환시킨 균주를 배양하여 얻어지는 유전자 재조합 단백질 항원을 이용하여 쯔쯔가무시병을 진단하는 방법을 기재하고 있다. 하지만 상기 방법 간접면역형광법은 일반적으로 쯔쯔가무시병의 진단에 사용되지만 균체 배양을 하여야 하기 때문에 세포배양시설이 필요하고 유지비용이 소요되며, 병의 초기에 진단하기 어렵고, 교차반응이 일어나며, 결과의 해석에 숙련된 전문가가 필요하다. PCR을 통한 유전형 분석은 감염된 균주의 양이 적을 경우 유전자가 제대로 증폭되지 않고, 검사장비가 필요하며 비용이 많이 드는 단점이 있다.

[0008] 한편, 인터페론 감마(interferon-γ; INF-γ)는 초기 숙주 방어에서 선천성 면역 세포에 의한 미생물 인식 및 세포내 병원균에 대한 세포 매개성 면역(cell mediated immunity) 발달에 매우 중요한 것으로 알려져 있다(Schroder 등, J Leukoc Biol. 2004 Feb;75(2):163-89). 특히, 특정항원에 민감한 T세포는 동일한 항원에 의해 재자극되었을 때 INF-γ를 분비하므로, INF-γ 분비정도는 결핵균(Mycobacterium tuberculosis) 및 브라질 레

슈마니아균(Leishmania braziliensis) 등과 같은 박테리아 또는 바이러스 감염의 진단에 적용되고 있다 (Pai 등, Ann Intern Med. 2008;149(3):177-, Turgay N 등, Am J Trop Med Hyg. 2010 Oct;83(4):822-4).

[0009] 이에, 본 발명자들은 쯔쯔가무시균에 의한 감염 여부를 간단하고 정확하게 판별할 수 있는 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 쯔쯔가무시균에 감염된 환자의 혈액으로부터 분리한 말초혈액단핵세포에 쯔쯔가무시균 추출물을 처리하면 INF-γ 생성이 증가하는 반면, 비감염인 유래 말초혈액단핵세포에서는 INF-γ 생성의 변화가 없는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 쯔쯔가무시균 감염 의심 환자 유래 말초혈액 단핵세포에서 분비되는 INF-γ 농도 측정을 통한 쯔쯔가무시병 진단방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 (a) 쯔쯔가무시균(*Orientia tsutsugmushi*) 감염 여부를 판단하고자 하는 환자 혈액으로부터 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 분리하는 단계; (b) 쯔쯔가무시균 추출물을 상기 (a) 단계에서 분리한 말초혈액단핵세포에 처리하여 항원 자극시키는 단계; 및 (c) 말초혈액단핵세포에서 분비된 인터페론 감마(interferon-γ; INF-γ) 농도를 측정하여 쯔쯔가무시균 감염 여부를 판단하는 단계; 를 포함하는 쯔쯔가무시병(scrub typhus) 진단방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계에서 쯔쯔가무시균 추출물은 길리암주(Gilliam strain), 카프주(Karp strain), 보령주(Boryoung strain), 카토주(Kato strain) 및 카와사키주(Kawasaki strain)로 이루어진 군 중에서 선택한 1종 이상의 균주로부터 추출될 수 있다.

[0013] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계에서 쯔쯔가무시균 추출물은 56kDa형 특이적 항원(56kDa type specific antigen; TSA)을 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계는 0.5 내지 10 ㎍/㎖ 농도의 쯔쯔가무시균 추출물을 말초혈액단핵세포에 처리하여 12 내지 24시간 동안 반응시킬 수 있다.

[0015] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (c) 단계에서 인터페론 감마 농도는 ELISA 또는 유세포 분석을 이용하여 측정할 수 있다.

[0016] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (c) 단계에서 측정된 인터페론 감마 농도가 비감염인보다 높은 경우 쯔쯔가무시균에 감염된 것으로 판단할 수 있다.

[0017] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 인터페론 감마는 말초혈액단핵세포에 포함된 CD3+ T 세포 또는 CD56+ NK 세포(natural killer cell)에 의해 생성될 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 쯔쯔가무시병 진단방법을 이용하고, 쯔쯔가무시균 추출물; 및 항-인터페론 감마(anti-interferon-γ; anti-INF-γ) 항체;를 포함하는 쯔쯔가무시병 진단 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)의 인터페론 감마(interferon-γ; INF-γ) 분비 측정을 이용한 쯔쯔가무시병(scrub typhus) 진단방법은 쯔쯔가무시균에 감염된 환자의 혈액으로부터 분리한 말초혈액단핵세포에 쯔쯔가무시균 추출물 또는 쯔쯔가무시균 유래 항원을 처리하여 항원 자극하면 INF-γ 생성이 증가하는 반면, 비감염인 유래 말초혈액단핵세포에서는 INF-γ 생성의 변화가 없는 것을 확인하였으며, 따라서 상기 INF-γ 생성농도의 측정만으로도 간단하게 쯔쯔가무시병을 진단할 수 있다.

[0020] 나아가, 본 발명의 쯔쯔가무시병 진단방법은 종래의 쯔쯔가무시병을 진단하는 간접면역형광법(IFA) 및 유전형 분석을 위한 PCR 분석과 비교하여 진단의 정확도가 현저하게 향상되어, 종래의 진단방법을 완전히 대체할 수 있을 뿐만 아니라 진단 결과에 대한 신뢰도를 현저히 향상시킨다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 보령 혈청형 쯔쯔가무시균의 항원 추출물을 농도별 및 시간별로 쯔쯔가무시병 환자 유래 말초혈액단핵세포에 처리하여 항원 자극하였을 때 인터페론 감마 생성정도를 측정한 데이터이다.

도 2는 카와사키 혈청형 쯔쯔가무시균의 항원 추출물을 농도별로 비감염인 및 쯔쯔가무시병 환자 유래 말초혈액단핵세포에 처리하여 항원 자극하였을 때 인터페론 감마 생성정도를 측정한 데이터이다.

도 3은 말초혈액단핵세포를 보령 혈청형 쯔쯔가무시균 항원 추출물로 항원 자극시킨 후 인터페론 감마 생성 정도를 측정한 데이터를 비감염인 그룹(N), 보령 혈청형 쯔쯔가무시균에 감염된 환자군(G1) 및 nPCR 결과가 음성인 환자군(G2) 그룹별로 분류한 것이다.

도 4는 56kDa형 특이적 항원에 대한 FS15항체를 전처리한 다음, 비감염인 및 쯔쯔가무시병 환자 유래 말초혈액단핵세포에 보령 혈청형을 갖는 쯔쯔가무시균 추출물을 처리하여 항원 자극시킨 후, 인터페론 감마 생성정도를 측정한 데이터이다.

도 5는 CD3 양성 세포 및 CD56 양성 세포에 의한 인터페론 감마 분비 정도를 확인한 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0023] 상술한 바와 같이, 쯔쯔가무시병의 특징적인 소견이 없는 경우에는 렙토스피라증, 발진열 및 신증후출혈열 등의 급성열성질환과의 감별 진단이 어려우며, 적절한 치료가 지연되거나 초기에 치료받지 못한 경우, 환자는 폐렴, 수막염, 신부전 및 다중기관 부전(multi-organ failure) 및 사망에 이르게 되고, 감염자 중의 일부는 만성감염을 앓게 되어 합병증을 유발하기에 쯔쯔가무시병을 효과적으로 진단할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다.

[0024] 본 발명에서는 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)의 인터페론 감마(interferon-γ; INF-γ) 분비 측정을 이용한 쯔쯔가무시병(scrub typhus) 진단방법을 제공함으로써 상술한 문제의 해결을 모색하였다. 쯔쯔가무시균에 감염된 환자의 혈액으로부터 분리한 말초혈액단핵세포에 쯔쯔가무시균 추출물 또는 쯔쯔가무시균 유래 항원을 처리하여 항원 자극하면 INF-γ 생성이 증가하여 쯔쯔가무시균 감염 여부를 쉽고 정확하게 판단할 수 있으며, 종래의 쯔쯔가무시병을 진단하는 간접면역형광법(IFA) 및 유전형 분석을 위한 PCR 분석과 비교하여 진단의 정확도가 현저하게 향상되어, 종래의 진단방법을 완전히 대체할 수 있을 뿐만 아니라 진단결과에 대한 신뢰도를 현저히 향상시킨다.

[0025] 따라서, 본 발명은 (a) 쯔쯔가무시균(*Orientia tsutsugmushi*) 감염 여부를 판단하고자 하는 환자 혈액으로부터 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 분리하는 단계;

[0026] (b) 쯔쯔가무시균 추출물을 상기에서 (a) 단계에서 분리한 말초혈액단핵세포에 처리하여 항원 자극시키는 단계; 및

[0027] (c) 말초혈액단핵세포에서 분비된 인터페론 감마(interferon-γ; INF-γ) 농도를 측정하여 쯔쯔가무시균 감염 여부를 판단하는 단계;

[0028] 를 포함하는 쯔쯔가무시병(scrub typhus) 진단방법에 관한 것이다.

[0029] 본 발명의 일실시예에서는, 일반적으로 쯔쯔가무시병 진단을 위한 절대적 표준도구(gold standard tool)인 것으로 알려진 간접면역형광법(Indirect Immunofluorescence Assay; IFA)의 정확도와 INF-γ 분비 측정을 이용한 진단 방법을 비교하기 위해 쯔쯔가무시균 감염에 대한 전형적인 임상특징을 보이는 환자 13명과 비감염인 10명을 대상으로 분석을 수행하였다.

[0030] IFA를 통한 진단 결과, 표 3에 나타난 바와 같이 13명의 환자 중, 쯔쯔가무시 길리엄 혈청형 및 카프 혈청형은 검출되지 않았으며, 11명은 보령 혈청형에 양성을 보이는 것을 확인하였다. 또한 13명의 환자 중 9명은 카와사키 혈청형에 대해 양성이었으며, 보령 혈청형과 교차반응을 보이는 것을 확인하였다.

[0031] 또한, 상기 환자에 감염된 쯔쯔가무시균의 유전형을 분석하기 위해 환자 혈액을 이용하여 네스티드 PCR(nested PCR; nPCR) 분석을 하였으며, 네스티드 PCR은 1차적으로 타겟 위치를 크게 포함하여 증폭시키고, 증폭된 산물을 이용하여 좀 더 타켓 위치에 밀접하게 증폭시키는 것으로, 처음 PCR 에서 증폭된 단편이 특이적인(specific) 것인지 비특이적(non-specific)으로 증폭된 것인지를 확인하기 위해 사용된다.

[0032] 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이 nPCR에 의해 11명의 환자는 보령(Patients Group: G1)으로, 2명의 환자는 음성으로 확인(Patients Group: G2)되었으며, 간접면역형광법(IFA)에 의한 진단 결과에서는 쯔쯔가무시균에 대한

임상적 특징을 보인 환자 중 2명(Patient Nos. P04 및 P10)이 음성으로 확인되어 IFA와 nPCR에 의한 진단 결과의 차이로 인해 기존의 진단방법만으로는 쯔쯔가무시 진단이 정확하지 않은 것을 확인하였다. 그러나, nPCR에 의해 음성으로 확인된 상기 2명의 환자(Patient Nos. P12 및 P13)와 IFA에 의해 음성으로 확인된 상기 2명의 환자(Patient Nos. P04 및 P10)는 본 발명의 진단방법으로 진단한 결과, 모두 INF-γ의 생성이 증가된 것을 확인할 수 있었으며, 따라서 IFA 및 nPCR에 의한 진단 결과에 오류가 있었음을 확인할 수 있었다.

[0033] 본 발명은 쯔쯔가무시 감염 여부를 쉽고 정확하게 판단할 수 있을 뿐만 아니라, 종래의 진단방법보다 정확도가 현저하게 향상된 진단방법을 제공하기 위하여 말초혈액단핵세포의 인터페론 감마 분비 측정을 이용한 쯔쯔가무시병 진단방법을 개발하였다.

[0034] 상기 방법을 구체적으로 설명하면, 먼저 (a) 단계는 쯔쯔가무시균(*Orientia tsutsugmushi*) 감염 여부를 판단하고자 하는 환자 혈액으로부터 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 분리하는 단계이다.

[0035] 상기 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; 말초혈액 단핵구; PBMC)는 혈액 내 존재하는 구형 핵을 가진 세포를 의미하며, 이러한 말초혈액단핵세포에는 B 세포, T 세포, 대식세포(macrophage), 수지상 세포(dendritic cell), 자연살해세포(NK cell, natural killer cell)등의 면역세포들이 포함되어 있다. 혈액에서 PBMC를 분류하는 방법은 일반적으로 피콜(Ficoll) 방법을 사용하는데, 피콜은 설탕과 에피클로로히드린을 서로 중합시킨 화합물로 일반적으로 약 40만 분자량을 사용한다. 피콜은 물에 녹이면 저점도에서 고밀도에 이르는 용액으로 변하기 때문에 세포, 바이러스 및 세포 소기관 등을 분리하기 위한 밀도기울기를 형성시키는 물질로 사용한다. PBMC의 경우에는 혈액 속에 포함되어 있는 적혈구(red boold cell; RBC), 과립성백혈구(granulocytes) 및 죽은세포에 비해 가볍고 혈장(plasma)보다는 무거우므로 분리가 된다.

[0036] 상기 (a) 단계의 환자는 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.

[0037] 다음으로, (b) 단계는 쯔쯔가무시균 추출물을 상기에서 분리한 말초혈액단핵세포에 처리하여 항원 자극하는 단계이다.

[0038] 상기 쯔쯔가무시균 추출물은 종래에 알려진 혈청형을 갖는 쯔쯔가무시균주로부터 추출될 수 있으며, 예를 들어, 길리암주(Gilliam strain), 카프주(Karp strain), 보령주(Boryong strain), 카토주(Kato strain) 및 카와사키주(Kawasaki strain)로 이루어진 군 중에서 선택한 1종 이상의 균주로부터 추출될 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0039] 또한, 상기 쯔쯔가무시균 추출물에는 56kDa형 특이적 항원(56kDa type specific antigen; TSA)이 포함되어 있으며, 필요에 따라서 56kDa형 특이적 항원만을 정제하여 사용할 수 있다.

[0040] 나아가, 상기 쯔쯔가무시균 추출물은 L929 세포, Vero 세포, HEL, MRC5 세포, BHK, McCoy 및 EVC-304 세포 등에 종래에 알려진 혈청형을 갖는 쯔쯔가무시균을 접종하고 배양한 뒤 쯔쯔가무시균에 감염된 세포를 원심분리 및 밀도기울기법으로 분리하여 제조될 수 있으며, 상기 쯔쯔가무시균이 접종되는 세포주는 상기 열거된 세포 외에도 쯔쯔가무시균 추출물을 제조하는데 사용할 수 있는 것이라면 특별히 제한하지 않는다.

[0041] 본 발명의 일실시예에서는 쯔쯔가무시 보령 혈청형(Boryoung serotype) 및 카와사키 혈청형(Kawasaki serotype)을 사용하였으며, EVC-304 세포에 상기 두 균주를 각각 감염시킨 다음 원심분리 및 밀도기울기법을 이용하여 쯔쯔가무시균 추출물을 제조하였다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서 쯔쯔가무시균 항원 추출물은 0.5 내지 10 ㎍/㎖로 첨가하여 12 내지 24시간 동안 반응시킬 수 있으며, 바람직하게는 보령 혈청형 추출물 5 ㎍/㎖, 카와사키 혈청형 추출물 2.5 ㎍/㎖로 처리하여 16시간 동안 처리할 수 있다.

[0043] 본 발명의 다른 일실시예에서는 세포 사멸을 유발하지 않는 항원 적정량을 확인하기 위해 다양한 쯔쯔가무시균 추출물 농도 및 처리시간을 다르게 하여 INF-γ 생성농도를 측정하였으며, 도 1에 나타난 바와 같이 12 내지 24시간 사이로 측정되었으며, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이 보령 혈청형에 대한 최대반응(peak response)은 2 ~ 10 ㎍/㎖ 사이인 반면, 카와사키 혈청형에 대한 최대반응은 0.5 ~ 2.5 ㎍/㎖인 것으로 확인하였다.

[0044] 마지막으로, (c) 단계는 말초혈액단핵세포에서 분비된 인터페론 감마(interferon-γ; INF-γ) 농도를 측정하여

쯔쯔가무시균 감염 여부를 판단하는 단계이다.

[0045] 상기 INF-γ 농도 측정은 당업계에 알려진 사이토카인 농도 측정법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법 또는 유세포분석(flow cytometry)을 수행하여 측정할 수 있다.

[0046] 상기 ELISA는 효소를 표식자로 하여 항원항체반응(抗原抗體反應)을 이용한 항원(抗原) 또는 항체량(抗體量) 측정 방법을 일반적으로 효소면역분석법으로 총칭한다. 일반적으로 항체에 효소(퍼옥시다아제, peroxidase 등)을 결합시켜 놓고 그 반응을 이용하여 정량을 수행하며, 보통 마이크로플레이트의 웰 안에서 반응이 완결하므로 미량분석이 가능하다.

[0047] 상기 유세포분석은 레이저를 기초로 한, 전기적 탐지 기술로 유동적으로 흐르는 세포들을 중지하거나 보내는 것을 통하여 세포를 세고 분류하고 생체 지표를 탐지하고 단백질 공학에 이용되는 생물물리학의 기술이다. 이것은 신체적인 다변수분석(Multivariable analysis)과 일초당 수천개의 입자들의 화학적 분석을 동시에 허락한다. 유세포 분석은 대게 건강 장애, 특히 혈액 암의 진단에 이용되지만 임상실험 같은 기본적인 연구에서 많은 적용을 할 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계에서 측정된 인터페론 감마 농도가 비감염인보다 높은 경우 쯔쯔가무시균에 감염된 것으로 판단할 수 있다.

[0049] 이때, 상기 "비감염인"이라함은 의료기관에서 쯔쯔가무시병의 진단을 받은 기왕력이 없으며, 쯔쯔가무시병을 의심할 만한 가피나 발진을 동반한 발열 질환을 앓았던 병력이 없는 정상 건강 성인을 의미한다.

[0050] 상기 (c) 단계에서 비감염인의 경우, 보령 혈청형 추출물 5 ㎍/㎖를 1 $\times 10^5$ 개의 PBMC에 처리했을 때, 1000 pg/㎖ 이하의 인터페론 감마가 생성되는 것으로 측정되며, 바람직하게는 900 pg/㎖ 이하, 더욱 바람직하게는 800 pg/㎖ 이하, 가장 바람직하게는 750 pg/㎖ 이하의 인터페론 감마가 생성되는 것으로 측정된다.

[0051] 따라서, 상기 (c) 단계에서, 1×10^5 개의 PBMC당 750 pg/㎖ 농도 이상의 인터페론 감마가 생성된 것으로 측정된 경우, 쯔쯔가무시균에 감염된 것으로 판단할 수 있고, 바람직하게는 1×10^5 개의 PBMC당 800 pg/㎖ 이상, 더욱 바람직하게는 1×10^5 개의 PBMC당 900 pg/㎖ 이상, 가장 바람직하게는 1×10^5 개의 PBMC당 1000 pg/㎖ 이상의 인터페론 감마가 생성된 것으로 측정된 경우, 쯔쯔가무시균에 감염된 것으로 판단할 수 있다.

[0052] 진단의 양성예측도(positive predictive value)와 음성예측도(negative predictive value)는 각각 아래와 같은 수학식 1 및 수학식 2로 구한다.

표 1

[0053]

결과	질병 (+)	질병 (-)	합
검사 (+)	a	b	a+b
검사 (-)	c	d	c+d
합	a+c	b+d	

[0054] [수학식 1]

[0055]
$$\text{양성예측도} = \frac{a}{(a+b)}$$

[0056] [수학식 2]

[0057]
$$\text{음성예측도} = \frac{d}{(c+d)}$$

[0058] 진단의 문턱값(threshold)에 따른 검사의 양성, 음성예측도는 아래 표 2와 같다. 문턱값이 750 pg/㎖이상일 경우 검사의 매우 우수한 양성, 음성예측도를 기대할 수 있다.

표 2

[0059] 문턱값(threshold)에 따른 검사의 양성, 음성예측도

문턱값 (pg/㎖)	양성예측도 (%)	음성예측도 (%)
700	92.8	100
≥750	100	100

[0060] 본 발명의 또 다른 일실시예에서는, 표 3의 PCR 유전형 분석 결과에 따라 쯔쯔가무시병 환자 중 균의 항원형 이 PCR 유전형 분석으로 보령 혈청형 균 감염으로 확인된 환자 그룹(G1) 및 균의 혈청형이 PCR 유전형 분석으로 확인되지 않은 그룹(G2), 그리고 표 4의 비감염인 그룹(N)으로 나누어 분석을 수행하였으며, 각각의 환자로부터 분리한 PBMC에 보령 혈청형 균 추출물 및 카와사키 혈청형 균 추출물을 각각 처리하여 항원 자극시킨 후, INF-γ 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이 보령 혈청형 균 추출물을 처리하였을 때, 보령 혈청형 균 감염 환자 그룹 전체는 비감염인 그룹(표 4)에 비해 INF-γ의 생성이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0061] 또한, 보령 혈청형 균 감염 환자 그룹은 카와사키 혈청형 균추출물 처리에도 INF-γ 생성이 현저하게 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 보령 혈청형과 카와사키 혈청형 사이에 강한 교차반응을 보이는 것을 의미한다.

[0062] 상기 PCR 분석 결과 증폭산물이 생성되지 않았지만 상기 750 pg/㎖ 보다 높은 농도로 인터페론 감마를 분비하는 경우, 현재 감염된 쯔쯔가무시균의 수가 적거나 또는 혈액 내에 존재하는 균수가 적거나 또는 이전에 쯔쯔가무시균에 감염된 적이 있는 것으로 판단할 수 있다.

[0063] 구체적으로 본 발명의 표 3에 나타난 바와 같이, nPCR 결과에서 음성판정이 된 G2 그룹의 경우, 쯔쯔가무시균 보령 혈청형 균 추출물 처리에 의해 PBMC에서 INF-γ의 생성이 현저하게 증가되는 것을 확인하였으며, 이는 감염된 쯔쯔가무시균의 수가 아주 적거나, 또는 혈액 내에 존재하는 균수가 적거나 또는 이전에 쯔쯔가무시 보령 혈청형 균에 감염된 적이 있는 것으로 예측할 수 있다.

[0064] IFA 검사에서 음성판정을 받은 환자(Patient Nos. P04 및 P10)인 경우에도, 본 발명의 표 3에 나타난 바와 같이, 쯔쯔가무시균 보령 혈청형 균 추출물의 처리에 의해 PBMC에서 INF-γ의 생성이 현저하게 증가되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 균 감염 이후 항체 형성이 충분히 이루어지기 이전의 시기에도 PBMC에서 INF-γ의 생성을 측정하여 더 빠른 시기에 쯔쯔가무시 병을 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[0065] 즉, 상기에서 설명한 바와 같이 IFA 결과와 nPCR 결과의 차이로 기존의 진단방법만으로는 쯔쯔가무시병 진단이 정확하지 않은 문제점이 있지만, 본 발명의 말초혈액단핵세포의 인터페론 감마 분비 측정을 이용한 쯔쯔가무시병 진단방법을 사용한다면 쯔쯔가무시병 진단의 정확도를 향상시킬 수 있는 것을 확인하였다.

[0066] 본 발명에 있어서, 인터페론 감마는 말초혈액단핵세포에 포함된 CD3+ T 세포 또는 CD56+ NK 세포(natural killer cell)에 의해 생성될 수 있다.

[0067] 본 발명의 일실시예에서는, INF-γ 생성을 위한 주요항원이 어떤 것인지 알아보기 위해 일반적으로 쯔쯔가무시균의 고도면역원성으로 알려져 있는 56kDa형 특이적 항원(56kDa type specific antigen; TSA)이 INF-γ 생성과 관련이 있는지 확인하고자 하였다. 도 4에 나타난 바와 같이 56kDa형 특이적 항원에 대해 특이적인 것으로 알려진 FS15 항체 처리에 의해 INF-γ 생성이 약 50% 정도 감소된 것을 확인하였다. 즉, 56kDa형 특이적 항원은 쯔쯔가무시병 환자에서 분리한 PBMC에서 INF-γ 분비를 위한 우성단백질인 것을 확인하였다. 하지만, FS15에 의해 INF-γ의 분비가 대부분 차단된 것이 아니므로, INF-γ 분비에 관여하는 다른 요인이 있는 것으로 볼 수 있다.

[0068] 본 발명의 다른 일실시예에서는 PBMC에서 INF-γ 생성에 관여하는 세포를 선별하고자 하였다. PBMC에서 생성된 INF-γ 분비를 차단하고, T 세포 또는 NK 세포(natural killer cell)의 마커인 CD3 및 CD56를 유세포분석기를 이용하여 분석하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 비감염인에서 분리한 PBMC에서는 CD3+ 세포 및 CD56+ 세포에서 INF-γ가 생성되지 않은 것을 확인한 반면, 보령 혈청형 균 추출물 첨가에 의해 항원 자극된 쯔쯔가무시병 감염 환자 유래 PBMC는 CD3+ 세포 및 CD56+ 세포에서 INF-γ가 생성되는 것을 확인하였다.

[0069] 즉, 쯔쯔가무시균 추출물 자극에 의해 말초혈액단핵세포에 포함된 CD3+ T 세포 또는 CD56+ NK 세포(natural killer cell)에서 INF-γ가 생성되는 것을 확인하였다.

[0070] 본 발명에서는 INF-γ 분비 차단을 위해 브레펠딘 A(Brefeldin A; BFA)를 사용하였으며, 브레펠딘은 사상균

Penicillium brefeldianum 등이 생산하는 마크로리드계 항생물질의 일종으로, 3합체 G단백질의 활성화 또는 효과인자의 공역을 저해한다. 소포체에서 골지체로의 소포수송을 저해하며, 골지체의 층판구조를 소실시켜 당전이효소 등의 골지체단백질을 소포체로 역수송시킨다. 트랜스골지망(TGN)에서 세포막으로의 수송과 세포내 섭취는 저해되지 않지만 TGN과 엔도솜계를 융합시킨다. 세포를 브레펠딘 A로 처리하면 골지체에 표재하는 ADP리보실화인자(ARF), 코트머단백질이 빠르게 세포질로 유리된다.

[0071] 본 발명의 표 3의 결과를 분석하면, nPCR에 의한 증폭이 확인되지 않은 두 환자(P12 및 P13)를 확인하였지만, 상기 두 환자로부터 분리된 PBMC는 보령 혈청형 균 추출물의 자극에 의해 강한 INF-γ 생성을 보여주는 것을 확인할 수 있다. 이는 보령 혈청형 쯔쯔가무시균주가 매우 적은 양으로 감염되었거나 또는 혈액 내에 존재하는 균수가 적어 nPCR에 의해 검출되지 않았거나, 보령 혈청형 균주에 감염된 적이 있어 장기 면역기억력을 획득한 것으로 예측할 수 있다. 즉, 도 5의 결과를 바탕으로, 보령 혈청형균의 추출물에 의해 NK 세포 및 T 세포에서의 면역기억이 이루어진다고 볼 수 있다.

[0072] 본 발명은 또한, 상기 방법을 이용한 진단키트를 제공한다.

[0073] 상기 진단키트는, 쯔쯔가무시균 추출물; 및 항-인터페론 감마(anti-interferon-γ; anti- INF-γ) 항체를 포함할 수 있다.

[0074] 상기 쯔쯔가무시균 추출물은 PBMC를 항원 자극하기 위한 것으로, 쯔쯔가무시균 유래 56kDa형 특이적 항원의 형태로도 제공될 수 있다. 이때, 상기 쯔쯔가무시균 추출물은 종래에 알려진 혈청형을 갖는 쯔쯔가무시균주로부터 추출될 수 있으며, 예를 들어, 길리암주(Gilliam strain), 카프주(Karp strain), 보령주(Boryong strain), 카토주(Kato strain) 및 카와사키주(Kawasaki strain)로 이루어진 군 중에서 선택한 1종 이상의 균주로부터 추출될 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명의 진단키트에 포함되는 항-인터페론 감마(anti-interferon-γ; anti- INF-γ) 항체는, 바람직하게는 단독으로 제공되거나 또는 고체 기질상에 고정되어 제공될 수 있다.

[0076] 고체 기질상에 고정되는 경우, 상기 항체는 문헌에 개시된 바와 같은 다양한 방법을 이용하여 고정될 수 있다(Antibodies: A Labotory Manual, Harlow & Lane; Cold SpringHarbor, 1988). 적합한 고체 기질로 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막을 들 수 있다. 이외에도, 막대, 합성 글래스, 아가로우스 비즈, 컵, 플랫 팩(flat packs) 또는 그 외의 고체 지지체에 의해 지지되거나, 이러한 것들에 부착된 막이나 코팅을 갖는 것들이 포함된다.

[0077] 또한, 본 발명에 따른 진단 키트는 면역학적 분석에 사용되는 시약을 포함할 수 있다. 상기 면역학적 분석은 본 발명 항체에 대한 항원의 결합을 측정할 수 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 면역세포화학 및 면역조직화학, 방사선 면역 분석법(radioimmunoassays), 효소결합 면역법(ELISA: Enzyme Linked Immunoa bsorbent assay), 면역 블롯(immunoblotting), 파아르 분석법(Farr assay), 침강소 반응법, 비탁계법, 면역확산법, 카운터-전류 전기영동법, 단일 라디칼 면역확산법 및 면역형광법이 있다.

[0078] 면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는 이에 한정되지는 않으나 가용성 담체, 예컨대 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액들 중 어느 한가지(예를 들어, PBS) 또는 불용성 담체, 예컨대 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교덱스트란, 폴리사카라이드, 락텍스에 금속을 도금한 자성미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0079] 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지로는 효소, 형광물질, 발광물질 및 방사성 물질 등을 사용할 수 있다. 효소로는 퍼옥시다아제, 알카린포스파타아제, β-D-갈락토시다아제, 글리코스 옥시다아제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있으며, 형광물질로는 플루오르신이소티옥시아네이트, 피코빌리프로테인 등을 사용할 수 있고, 발광물질로는 이소루시놀, 루시제닌 등을, 방사성 물질로는 I_{131}, C_{14}, H_3 등을 사용할 수 있다. 그러나, 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0080] 이 외에도, 상기 키트는 웨스턴 블랏, 면역침전분석법, 보체 고정 분석법, 유세포분석, 또는 단백질 칩 등을 구현하기 위한 키트일 수 있으며, 각 분석 방법에 적합한 부가적인 구성을 추가로 포함할 수 있다.

[0081] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실 시 예 1

[0082] **간접면역형광법(Indirect Immunofluorescence Assay; IFA)를 이용한 쯔쯔가무시균 감염 여부 확인**

[0083] 쯔쯔가무병 진단을 위해 쯔쯔가무시병 감염으로 의심되는 환자를 선별하여 혈액을 채취하였다. 본 발명의 실험은 연구의 제목을 오리엔티아 쯔쯔가무시균에 의한 쯔쯔가무시병 환자에서 INF-γ 생산(INF-γ production in scrub typhus patient challenged with O. tsutsugamushi)으로 하여 모든 프로토콜은 인하 대학 병원 의 임상시험 심사위원회(Institutional Review Board; IRB)에 검토 및 승인을 받았으며, 본 연구에 포함된 모든 환자로부터 동의서를 받았다.

[0084] 쯔쯔가무시병의 전형적인 임상특성인 발열, 발진, 가피(eschar) 등을 보이는 13명의 환자에서 보령(Boryong), 카와사키(Kawasaki), 길리엄(Gilliam) 및 카프(Karp) 혈청형에 대한 IFA 분석을 수행하였다.

[0085] 먼저, 환자의 혈청은 전체 혈액(whole blood)에 EDTA를 처리하여 수득하였다. 각 혈청은 PBS(phosphate buffered saline, pH=7.4)로 2배 순차희석하여 1:40 에서부터 1:1280까지 마이크로플레이트(U-bottomed microplates)에 희석하여 준비하였다.

[0086] 혈청 샘플의 희석액은 보령(Boryong), 카와사키(Kawasaki), 길리엄(Gilliam) 및 카프(Karp) 혈청형의 오리엔티아 쯔쯔가무시(*O. tsutsugamushi*)가 배양된 세포를 부착한 슬라이드의 각 원형 항원 스팟(each prototype antigen spots)에 처리하였으며, 습실(moist chamber)에서 37℃ 조건으로 30분 동안 슬라이드를 반응시키고, 반응이 완료된 슬라이드 0.05% tween 20이 포함된 PBS(PBST)를 이용하여 3번 세척한 다음, 형광이 컨쥬게이트된 goat anti-human IgG (Jackson laborotory, 미국)를 처리하여 습실에서 37℃ 조건으로 30분 동안 반응시켰다. 상기와 같은 방법으로 3번 세척한 다음, 건조하여 anti-fainting mounting media (Vectashild, Vector, CA)로 고정하였다. 그 다음 형광 현미경(fluorescence microscope; Axioskop 2, CarlZeiss, 독일)에서 x200 배율로 관찰하였다.

[0087] IFA를 통한 쯔쯔가무시병 진단의 경우, 이전에 인하대학교 병원에서 장기간 수집된 데이터 및 실험 데이터를 바탕으로 IgG 항혈청(antisera) 역가가 혈청의 1:160 희석 이상일 때 양성인 것으로 판단하였다.

[0088] 하기 표 3에 나타난 바와 같이, 13명의 쯔쯔가무시병 환자 중 11명은 보령 혈청형 오리엔티아 쯔쯔가무시(*O. tsutsugamushi*)에 대한 IFA 검사 양성인 것을 확인하였다. 균의 혈청형이 PCR 유전형 분석으로 보령 혈청형으로 확인된 11명의 환자 중 7명은 카와사키 항원에 대해 IFA 양성이었기에 보령항원과 강한 교차 반응을 보이는 것을 확인하였다. 2명의 쯔쯔가무시병 환자의 혈액은 IFA 검사에서 모두 음성인 것으로 나타났다.

[0089] 이들 결과는 IFA가 쯔쯔가무시병 진단을 위한 절대적 표준 도구(gold standard tool)이지만 그것만으로는 충분하지 않다는 것을 확인하였다.

실 시 예 2

[0090] **PCR 분석을 이용한 감염된 쯔쯔가무시균 유전형 분석**

[0091] 먼저, 버피코트(Buffy coat)를 쯔쯔가무시 감염 의심 환자 각각의 전체 혈액으로부터 수득하였다. DNA 추출은 QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, 독일)을 이용하여 상기 키트에 포함된 매뉴얼에 따라 수행하였다. DNA는 50㎕의 멸균된 증류수에 희석하였으며, 오리엔티아 쯔쯔가무시균의 56-kDa형 특정 항원을 검출하기 위해 네스티드 PCR(nested PCR; nPCR)을 수행하였다.

[0092] nPCR 수행을 위해 2개의 프라이머 세트를 제조하였으며(제노텍), 1차 PCR 수행을 위한 프라이머 세트는 56-kDa형 특이적 항원 유전자를 코딩하는 보령주(Bryong strain, Genbank accession number: L04956), 카프주(Karp strain, Genbank accession number: M33004), 길리암주(Gilliam strain, Genbank accession number: M33267) 및 카와사키주(Kawasaki strain, Genbank accession number: M63383) 유래 보존 DNA 서열에 기초하여 제작하였으며, 프라이머 서열 정보는 하기와 같으며, 1차 프라이머 세트에 의해 증폭되는 증폭산물의 크기는 1900bp이다.

[0093] 1차 프라이머 세트

[0094] [서열번호 1] 1F : 5'-ATAATTAATGTATTTTCGAACG-3'

[0095] [서열번호 2] 2R : 5'-CCTKCAAAGGACTTTTAGCT-3'

[0096] 2차 PCR 수행을 위한 프라이머 세트는 하기와 같으며, 2차 프라이머 세트에 의해 증폭되는 증폭산물의 크기는 1600 bp이다.

[0097] 2차 프라이머 세트

[0098] [서열번호 3] 1Fn : 5'-AACACAGTGTTTTATAGATTGTTTA-3'

[0099] [서열번호 4] 2Rn : 5'-RCATTAATTGCTACACCAAGT- 3'

[0100] 56-kDa 항원 유전자의 첫번째 PCR 증폭은 1F 및 2R 프라이머 세트를 이용하였으며, 두번째 PCR 증폭은 1Fn 및 2Rn 프라이머 세트를 이용하였다. 상기 두번째 PCR 증폭으로 생성된 증폭산물은 NCBI(National center for Biotechnology Information) 블라스트 프로그램을 통해 서열확인 및 동정하였다.

표 3

Patients Group	Patients NO.	IFA (IgG)*		nPCR	IFN-γ (pg/ml)	
		Boryong	Kawasaki	Strains	Boryong	Kawasaki
G1	P 01	++	++	Boryong	5694	5300
	P 02	+++	-	Boryong	4558	5140
	P 03	++	++	Boryong	4469	1080
	P 04	-	-	Boryong	3861	77
	P 05	+++	++	Boryong	2615	3071
	P 06	+++	+++	Boryong	2553	ND
	P 07	++	-	Boryong	2406	4300
	P 08	++	++	Boryong	2255	2053
	P 09	++	++	Boryong	1726	ND
	P 10	-	-	Boryong	1676	92
	P 11	++	++	Boryong	1193	2515
G2	P 12	++	++	NA	1700	ND
	P 13	++	++	NA	4183	ND

*혈청 희석 : 1:40 ~ 1:80 (-), 1:160 ~ 1:640 (++), 1:1280 ~ (+++)
NA, 증폭되지 않음 (not amplified); ND, 수행되지 않음 (not done).

[0101]

[0102] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 쯔쯔가무시병 환자 중 PCR 유전형 분석으로 보령 혈청형 오리엔티아 쯔쯔가무시(*O. tsutsugamushi*) 감염으로 확인된 환자 그룹(G1) 및 균의 혈청형이 PCR 유전형 분석으로 확인되지 않은 쯔쯔가무시병 환자 그룹(G2)으로 분류하였고, 비감염인 그룹(N)은 표 4와 같이 따로 분류하였다. 11명의 환자에서 보령 혈청형의 감염을 확인하였고(G1), 2명의 환자는 nPCR 검사에서 음성으로 확인되었다(G2)(표 3).

실 시 예 3

[0103] **오리엔티아 쯔쯔가무시균 조항원(crude antigen)의 정제 및 준비**

[0104] 쯔쯔가무시균 보령 혈청형(*Orientia tsutsugamushi* Boryong serotype, 질병관리본부 자원관리본부 NCCP NO. 14794) 및 카와사키 혈청형(Orientia tsutsugamushi Kawasaki serotype, Genbank accession number: M63383)을 ECV-304 세포(혈관내피세포주, Cell Line Service, 독일)에 접종한 후, 37℃에서 7일 동안 배양하여 균의 증식을 유도하였다. 쯔쯔가무시균에 감염된 ECV-304 세포는 10 %(v/v) 우태아혈청(fetal bovine serum, 미국 corning cellgro사 제품)을 포함하는 M199(한국 웰진사 제품) 배양배지(culture medium)를 이용하여 배양하였다.

[0105] 상기 감염된 ECV-304 세포의 배양 정도는 간접 면역형광검사 방법(indirect immunofluorescence assay; IFA)으

로 측정하였고, 90% 이상의 감염률이 확인되면 5개의 150 ㎜ 조직 배양 접시의 ECV 304 세포에 다시 감염시키고 위의 방법으로 감염이 확인된 세포는 쯔쯔가무시균 외막소포의 대량생산을 위하여 30개의 150 ㎜ 조직 배양 접시(tissue culture dish, 한국 SPL사 제품)에 다시 감염시켰다.

[0106] 이후 배양된 감염 세포는 배양 배지에서 부유시키고, 4℃에서 13,000 rpm에서 30 분 동안 원심분리하여 감염 세포가 없는 배양 상청액과 쯔쯔가무시균에 감염된 세포 펠렛으로 분리하였다.

[0107] 쯔쯔가무시균에 감염된 EVC-304 세포는 33 mM 트리-하이드로클로라이드(tri-hydrochloride)와 250 mM TS-버퍼로 표시한 수크로스(sucrose)를 포함하는 pH 7.4 용액으로 재부유되고, 직경 1㎜의 유리구슬을 이용하여 1분간 세포를 갈아서 세포 내에 있는 쯔쯔가무시 균이 세포 밖으로 나오도록 유도한다. 수득한 쯔쯔가무시균을 4 ° C에서 1200 rpm으로 3분 동안 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하고 쯔쯔가무시균 현탁액을 수득하였다. 수득한 쯔쯔가무시균 현탁액은 90 % 퍼콜(percoll; 미국 GE life science사 제품)을 40 % 퍼콜 밀도의 농도가 될 때까지 첨가하고, 14,000 rpm으로 60 분 동안 원심분리하여 세포 유래 찌꺼기 층과 균으로만 구성된 층으로 분리하였다. 수득한 쯔쯔가무시균 층을 모아서 인산완충식염수(Phosphate bufferd saline; PBS)로 2번 세척하고, 살균 인산완충식염수로 재부유시킨 후 액화 질소를 사용하여 동결하여 정제한 쯔쯔가무시균을 수득하였다.

[0108] 정제된 오리엔티아 쯔쯔가무시균은 PBS에 재현탁한 다음, 30% power (Sonic Dismembrator Model 300, Fisher)를 이용하여 얼음 위에서 10초 동안 작동/ 30초 동안 멈춤을 20회 반복하여 초음파 처리(sonication)한 다음, 13000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하고, BCA 측정법(PIERCE, 미국)을 이용하여 상등액에 포함된 단백질 농도를 측정하였다. 상기 수득한 상등액은 항원 자극을 위해 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다.

실 시 예 4

[0109] **PBMC 분리 및 오리엔티아 쯔쯔가무시 항원의 자극**

[0110] 4-1 : PMBC 분리

[0111] 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cells; PBMC)는 쯔쯔가무시병 환자(13명) 그룹 및 비감염인(10명) 그룹(Normal group)에서 분리한 전체혈액에 EDTA를 처리한 다음, Ficoll-Hypaque (Histopaque; Sigma Chemical Co., 미국)을 사용하여 밀도구배원심분리법에 의해 분리하였다.

[0112] 그 다음, 분리된 PBMC를 RPMI 1640 (Wellgene, 한국)를 이용하여 2번 세척한 다음, 항원 자극(antigen stimulation)을 위해 10% FBS(Hyclon, Thermo Scientific, USA)가 포함된 RPMI 1640 배지로 재현탁하였다.

[0113] 4-2 : 오리엔티아 쯔쯔가무시균 항원에 의한 자극

[0114] 오리엔티아 쯔쯔가무시균 특이적 INF-γ 반응을 위해, 6 × 10^5개의 PBMC를 10% FBS 및 100U/㎖ 페니실린(Gibco, 미국)이 포함된 RPMI1640 배지 200 ㎕에 현탁한 다음, 96웰(BD Biosciences, 미국)에 각 웰당 1 × 10^5개의 PBMC 세포가 되도록 분주하고 실시예 3에서 준비한 보령 혈청형 및 카와사키 혈청형을 갖는 쯔쯔가무시균 추출물을 각각 처리하여 항원 자극하였다. 쯔쯔가무시균 추출물에 의한 INF-γ는 항-CD3 및 항-CD28 항체 자극과 비교하였다.

[0115] 세포 사멸을 유발하지 않는 항원 적정량을 확인하기 위해, 보령 혈청형 균 추출물의 농도를 2 ㎍/㎖ 및 10 ㎍/㎖으로 처리하여 12시간 및 24시간 동안, 카와사키 혈청형의 농도는 0.5 ㎍/㎖, 2.5 ㎍/㎖, 5 ㎍/㎖ 및 10 ㎍/㎖로 처리하여 12시간 동안 37 ℃, 가습의 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

[0116] 배양 후, 배양 상등액을 수득한 다음, ELISA assay를 수행하기 전까지 20℃에서 보관하였다.

[0117] 4-3 : ELISA 방법을 이용한 INF-γ 농도 측정

[0118] 효소면역 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 수행하기 위해, 먼저, 폴리스틸렌 재질의 96-웰 플레이트(NUNC, Thermo Scientific, 미국)에 3 ㎍/㎖ 농도로 0.1M 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer (pH=9.0)에 녹아있는 항-INF-γ(mouse anti-INF-γ; BD Bioscience) 항체를 처리하여 코팅하였다.

[0119] 그 다음, 4℃에서 하룻밤 동안 반응시킨 후, 플레이트에 남아있는 용액을 제거하였다. 각 웰에 1% BSA (GA biochem, Georgia, USA)가 녹아 있는 PBS_ 용액 200 ㎕를 채운 다음 상온에서 2시간 동안 정치 시킨 후, 0.05% 트윈20 (tween 20; USB, ohio, USA) 이 포함된 PBS 버퍼로 3회 세척하였다. 각각의 웰에 상기에서 균자극을 받은 단세포들의 세포상등액 100㎕를 넣어 주고 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 상기와 동일한 방법으로 3회

세척하였으며, 바이오틴이 표지된 항-INF-γ (biotin labeled anti-INF-γ (BD Bioscience, USA) 항체를 처리하고 1시간 동안 반응시켰다.

[0120] 그 후, 다시 0.05% 트윈20이 포함된 PBS 버퍼로 3회 세척한 다음, 각 웰에 아비딘 컨쥬게이션된 겨자무과산화효소 (horseradish peroxidase; BD Biosciences, USA)을 처리하여 1 시간 동안 반응시키고, 0.05% 트윈20이 포함된 PBS 버퍼로 3회 세척하고, 100 ㎕ 기질(TMB, KPL, MD, USA)을 처리하여 반응시켰다. 발색이 충분히 나타나면, 정지용액(stop solution)으로 1M 황산(H_2SO_4)을 100 ㎕ 첨가하여 반응을 정지시켰다.

[0121] 그 다음, ELISA 리더기(BioTek Instruments, 미국)를 이용하여 450nm에서 광학밀도(optical densities; OD)를 측정하였다.

[0122] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 쯔쯔가무시균 추출물 첨가 후 반응 시간은 12 내지 24시간 사이로 측정되었으며, 도 1 및 도2에 나타난 바와 같이 쯔쯔가무시 환자 유래 PBMC는 보령 혈청형 및 카와사키 혈청형 쯔쯔가무시균 추출물 자극에 의해 높은 농도의 INF-γ를 생성하는 것을 확인하였다. 보령 항원에 대한 최대반응(peak response)은 2 ~ 10 ㎍/㎖ 사이인 반면, 카와사키 항원에 의한 최대반응은 0.5 ~ 2.5 ㎍/㎖인 것으로 확인하였다.

[0123] 상기 결과를 바탕으로 이후의 실험은 보령 혈청형 추출물 5 ㎍/㎖, 카와사키 혈청형 추출물 2.5㎍/㎖를 사용하여 16시간 동안 배양하였다.

실 시 예 5

[0124] **INF-γ 생성확인을 통한 쯔쯔가무시균 감염 여부 확인**

[0125] 본 발명의 쯔쯔가무시병 진단방법으로 실제 쯔쯔가무시균의 감염 여부를 확인할 수 있는지 확인하기 위해, 실시예 4-1에서 분리한 PBMC에 실시예 4-3의 조건으로 쯔쯔가무시균 추출물을 처리한 다음, INF-γ 생성정도를 ELISA 방법으로 측정하였다. 아래 표 4는 대조군(control group)으로서, 비감염인 그룹 10명으로부터 분리한 PBMC를 보령균으로 처리한 뒤 인터페론 감마의 농도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

표 4

[0126]

Normal group	
NO.	IFN-γ (pg/ml)
N 1	448
N 2	370
N 3	47
N 4	283
N 5	123
N 6	701
N 7	384
N 8	632
N 9	459
N 10	324

[0127] 그 결과, 상기 표 3 및 도 3에 나타난 바와 같이 보령 항원 추출물을 처리하였을 때, 쯔쯔가무시병 환자 그룹의 INF-γ는 비감염인 그룹(표 4)에 비해 현저하게 증가하였다. 보령 혈청형 쯔쯔가무시균(*O. tsutsugamushi*)에 감염된 환자의 PBMC를 보령 혈청형 균 추출물로 자극한 경우가 카와사키 혈청형 균 추출물로 자극한 경우보다 상대적으로 높은 INF-γ가 생성되는 것을 확인하였다.

[0128] 또한, 보령 혈청형 오리엔티아 쯔쯔가무시(*O. tsutsugamushi*) 감염이 확인된 환자 그룹(G1)은 카와사키 혈청형 추출물 처리에도 INF-γ 생성이 현저하게 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 보령 혈청형과 카와시키 혈청형 사이에 강한 교차반응을 보이는 것을 의미한다.

[0129] IFA 검사에서 음성인 경우에도 PBMC에서 INF-γ의 생성이 현저하게 증가하였으며, 이는 균 감염 이후 항체 형성이 충분히 이루어지기 이전의 시기에도 PBMC에서 INF-γ의 생성을 측정하여 더 빠른 시기에 쯔쯔가무시병을 진단할 수 있음을 알 수 있다(표 3).

[0130] nPCR이 음성인 그룹(G2)에서도 INF-γ의 농도가 증가하는 것을 확인하였으며 이는 감염된 쯔쯔가무시균의 수가 적거나 또는 혈액 내에 존재하는 균수가 적거나 또는 이전에 쯔쯔가무시균에 감염된 적이 있는 것으로 판단할 수 있다. 이러한 경우 nPCR이 음성이더라도 INF-γ 농도 측정이 쯔쯔가무시병 진단에 유용한 것을 확인하였다(표 3).

실 시 예 6

[0131] **PBMC에서 INF-γ 생성을 유도하는 항원 확인**

[0132] INF-γ 생성을 위한 주요항원이 어떤 것인지 알아보기 위해 일반적으로 쯔쯔가무시균의 고도면역원성으로 알려져 있는 56kDa형 특이적 항원(56kDa type specific antigen; TSA)이 INF-γ 생성과 관련이 있는지 확인하고자 하였다.

[0133] 실시예 5와 동일한 방법으로 실험을 수행하였으며, 보령 혈청형 쯔쯔가무시균 추출물 처리 1시간 전에 56kDa형 특이적 항원에 대해 특이적인 것으로 알려진 FS15 항체(인하대학교 의과대학 미생물학교실 강재승 교수 연구실)를 처리하였다.

[0134] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, 쯔쯔가무시균 추출물로 항원 자극된 그룹에 비해 FS15를 전처리한 그룹은 약 50%로 INF-γ 생성이 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 56kDa형 특이적 항원은 쯔쯔가무시병 환자에서 분리한 PBMC에서 INF-γ 분비를 위한 우성단백질인 것을 확인하였다. 하지만, FS15에 의해 INF-γ의 분비가 대부분 차단된 것이 아니므로, INF-γ 분비에 관여하는 다른 요인이 있는 것으로 볼 수 있다.

실 시 예 7

[0135] **유세포분석을 이용한 PBMC 세포 내 INF-γ 농도 확인**

[0136] 본 발명에서는 PBMC에서 INF-γ 생성에 관여하는 세포를 확인하기 위해 유세포분석(flow cytometry)을 이용하여 쯔쯔가무시균 추출물에 의해 항원 자극된 세포 내 INF-γ 농도를 확인하였다.

[0137] 먼저, 보령 혈청형 쯔쯔가무시균 추출물을 이용하여 실시예 5와 동일한 방법으로 PBMC를 자극시킨 다음, 브레펠딘 A(Brefeldin A; BFA, eBioscience, 미국)를 5 ug/ml 농도로 첨가하였다. 양성 대조군은 항 CD3/CD28(anti-CD3/CD28; BD Biosciences, 미국)를 처리하여 37℃에서 6시간 동안 활성화 시켰다. PBMC는 1200rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음, 고정 및 침투성(permeabilization)을 위해 Cytofix/cytoperm 버퍼(BD Biosciences, 미국) 0.4 ㎖ 처리하여 재현탁시켰다.

[0138] 침투성을 가진 세포(permeabilized cell)는 표면 마커인, CD3 FITC (Biolegend) 및 CD56 Percp (Biolegend)를 염색한 다음, INF-γ PE (eBioscience)로 염색하였으며, 얼음상태에서 30분 동안 반응시켰다.

[0139] 반응 완료 후, 세척을 한 다음, 세포를 0.4 파라포름알데하이드(paraformaldehyde; PFA)가 포함된 350 ㎕의 PBS를 처리하여 재현탁시킨 후, FACS caliber(Becton Dickinson, USA)를 이용하여 유세포 분석을 수행하였다. 데이터는 Flowjo 소프트웨어(Flowjo)를 이용하여 분석하였다.

[0140] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 비감염인에서 분리한 PBMC에서는 CD3+ 세포 및 CD56+ 세포에서 INF-γ가 생성되지 않은 것을 확인한 반면, 보령 혈청형 추출물 첨가에 의해 항원 자극된 쯔쯔가무시병 감염 환자 유래 PBMC는 CD3+ 세포 및 CD56+ 세포에서 INF-γ가 생성되는 것을 확인하였다.

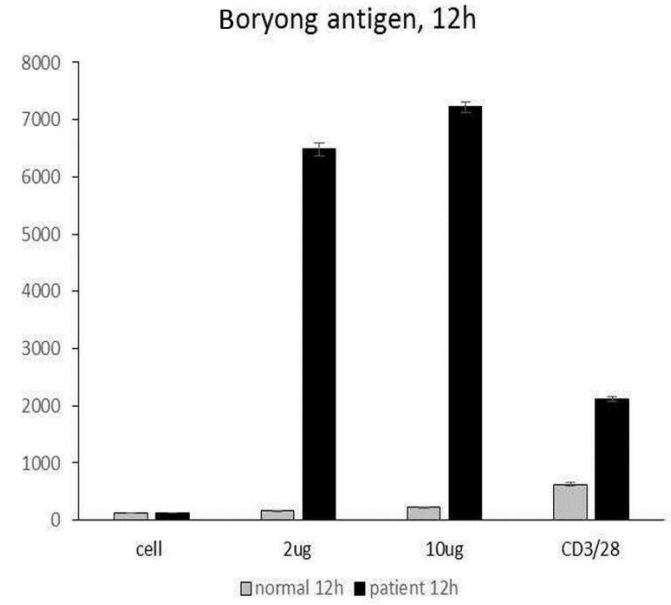
[0141] 즉, 쯔쯔가무시균 추출물 처리로 인한 항원 자극에 의해 말초혈액단핵세포에 포함된 CD3+ T 세포 또는 CD56+ NK 세포(natural killer cell)에서 INF-γ가 생성되는 것을 확인하였다.

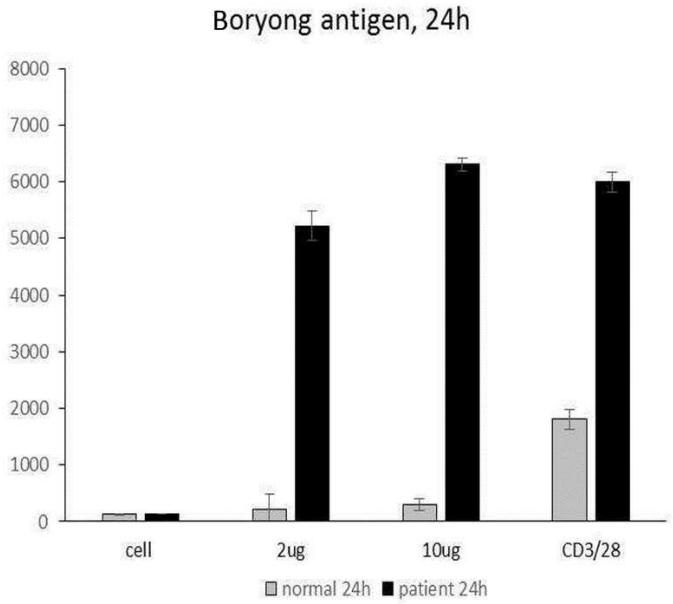
[0142] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은

명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

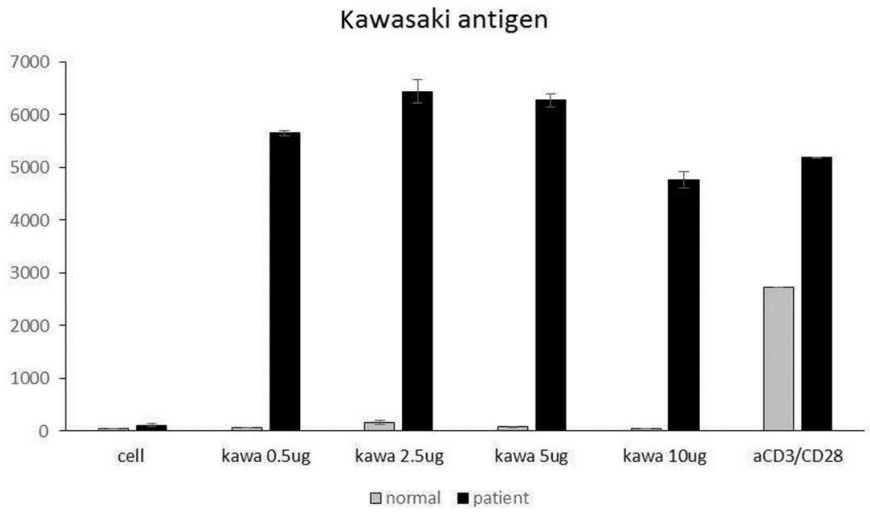
도면

도면1

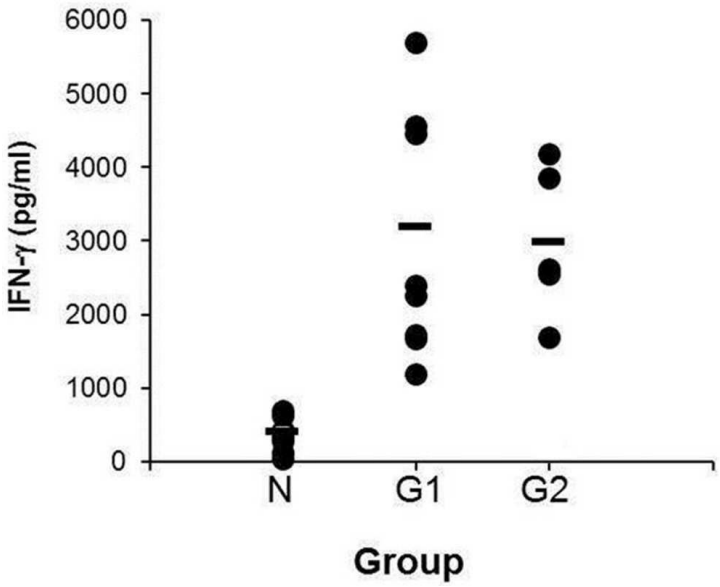




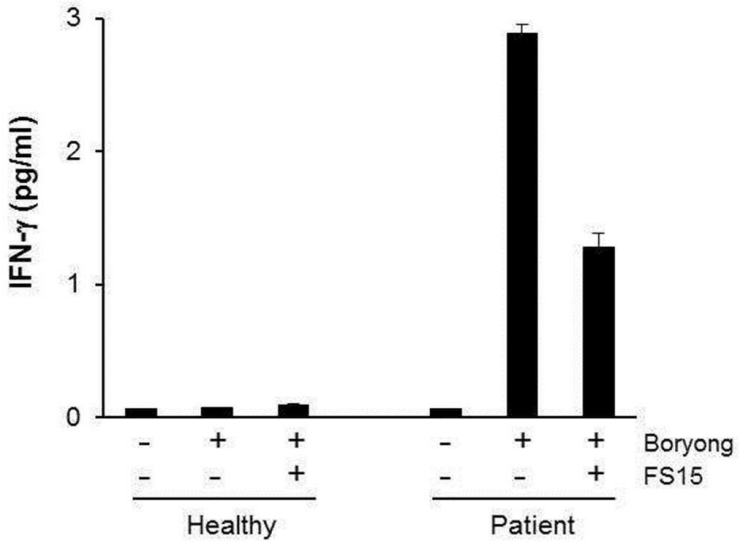
도면2


Kawasaki antigen
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
cell
kawa 0.5ug
kawa 2.5ug
kawa 5ug
kawa 10ug
aCD3/CD28
normal
patient

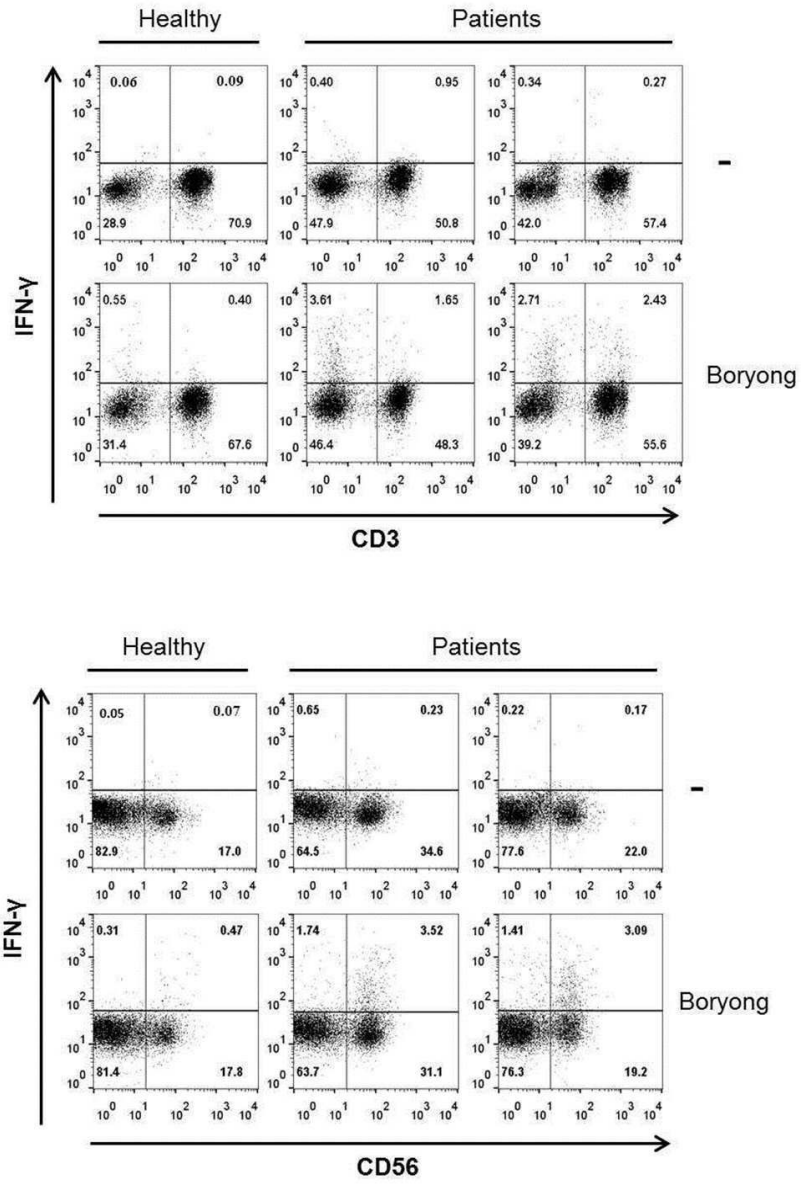
도면3


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IFN-γ (pg/ml)
N
G1
G2
Group

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE

<120> Method for Determing Scrub Typhus Using measurement

Interferon-Gamma Secretion of Peripheral Blood Mononuclear Cells

<130> 1041203

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 1

ataattaatg tattttcgaa cg 22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 2

cctkcaaagg acttttagct 20

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 3

aacacagtgt tttatagatt gttta 25

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 4

rcattaattg ctacaccaag t 21