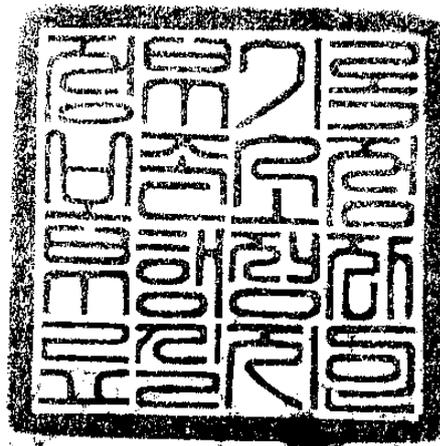


AIDS(Acquired Immunodeficiency Syndrome)의 早期診斷法 開發에 關한 研究(Ⅱ)

Study on the Establishment of Diagnostic
Methods for Acquired Immunodeficiency Syndrome(Ⅱ)

研究機關
國立保健院



科學技術處

提 出 文

科學技術處長官 貴下

本 報告書를 “AIDS 早期診斷法 開發에 관한 研究(Ⅱ)” 課題의 第
二次年度 最終報告書로 提出합니다.

1990. 7.

主官研究機關： 國立保健院
總括研究責任者： 龍 群 鎬
研究責任者： 申榮午, 白承福, 朴聖會
責任研究員： 申光淳, 金文湜
先任研究員： 黃應洙, 尹在得, 金泰奎, 徐教一
 李雄洙, 朴貴禮, 金慶子
研究員： 李鴻來, 康 椿, 朴曾奭, 李榮鍾
 白善英, 金成順, 奇美京, 南廷球
 金聖俊, 河敬花, 楊愛順, 金永丸
 崔炳喜, 金宗玄, 全暎主, 김은영
 趙泳杰, 池桂淑

요 약 문

I. 제 목

AIDS의 조기진단법 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome)가 1981년 미국의 큰 항구도시에서 처음으로 확인된 이후 1983년에 HIV (Human Immunodeficiency Virus)가 원인 병원체로 규명되었다. 그 후 AIDS는 급속도로 전세계에 전파되었으며 1985년 5월에 국내에서 첫 미국인 환자가 보고되었다. 우리나라에서 발견된 감염자 수는 사망자 포함 97명에 이르고 있으며 (1990. 7월) 해마다 전해보다 2~3배 많은 수의 새로운 감염자가 검사되고 있다. 따라서 수년내에는 감염자가 급증할 것으로 예상되고 있다.

AIDS의 조기진단에 관한 본 연구의 목적 및 중요성은 다음과 같다.

1) 본 연구팀에서 현재까지 확인한 환자와 감염자를 역학적으로 분석하여 한국에서의 AIDS감염 현황을 파악하고 유행양상을 규명한다.

2) HIV 감염자에 대하여 배독이나 B형 간염과 같은 타질병 감염상황을 파악한다.

3) 국내 HIV감염자로부터 HIV를 분리하여 국내에서 유행하는 HIV분리주를 확보하고 성상을 파악하여 각각의 분리주와 표준주와의 상관관계를 규명하고 백신개발에 대비한다.

4) 현재 사용하고 있는 각종 혈청시험방법은 검사시약의 종류, 혈청의 상태, 보관조건, 검사자의 과거병력등에 따라 많은 비특이반응이 초래되고 있다. 따라서 검사시약 및 혈청상태등에 따른 혈청시험방법을 평가하여 문제점을 해결한다.

5) 현재까지 국내에서 사용하고 있는 대부분의 고가수입진단제와 특수시약을 빠른 시일내에 국산화하여 외화를 절감하고 기술을 축적한다.

6) HIV는 혈구세포와 특이세포에서 존재하며 극히 소량의 재료로는 탐지하기 어렵다. 따라서 이러한 목적을 위하여 감도가 높고 시간이 짧게 소요되며 세포로부터 직접 virus 감염을 탐색할 수 있는 HIV hybridization probe를 이용한 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법의 자체 개발이 필요하다.

7) HIV세포 감수성 흉선세포주를 확보하여 새로운 HIV감염 세포주를 개발하고 흉선세포 생산물질 중 항HIV 물질을 스크리닝하여 효능을 평가함으로써 항HIV 신물질을 찾아낸다.

8) HIV감염자는 발병시기가 개인에 따라 상이하여 임상증세 이전에 면역학적 시험 방법으로 질병 진전 상태를 미리 예지함으로써 치료제의 조기 사용등 감염자 관리에 중요한 조치를 취할 수 있다. 따라서 국내감염자

의 질병진전에 대한 자세한 면역학적 시험을 통하여 각종 면역학적 측정치와 임상진전간의 상관관계를 찾으려 한다.

Ⅲ. 연구개발의 주요내용

본 연구사업의 2차년도 기간중에서 연구수행으로 얻어진 주요연구 성과 및 내용은 다음과 같다.

1) 현재까지 국내에서 감염자 조기발견의 목적으로 검사한 400여만의 검사대상자로부터 1990년 6월 말까지 94명의 감염자(환자포함)가 확인되었다. 이는 확인된 AIDS환자 6명을 포함한 숫자로서 현재까지 10여명의 사망자 이외는 거의 대부분의 감염자가 임상적으로 특이 증상을 나타내지 않고 있다. 환자를 포함한 국내발견 HIV감염자에 대하여 연령별, 성별, 연도별, 지역별, 성별 및 역학군별(성형태등) 특성을 분석하여 국내 HIV감염의 특성을 규명, 외국과 비교 하였다.

특히 감염원을 국내, 국외로 구분하여 조사함으로써 차츰 국내감염의 비율이 증가함을 규명하였다.

2) 아프리카로부터 입국하는 귀국근로자에 대하여 HIV혈청검사한 결과, ELISA 검사에서 높은 율의 HIV항체 양성자가 시험되었으며 이들에 대하여 Western blot(WB) 방법으로 HIV-1뿐만 아니라 HIV-2 감염여부에 관하여서도 시험하였다.

3) 감염자의 질병 진전상태의 파악과 국내 유행 바이러스의 확보를 위

하여 감염자 60명에 대하여 림프세포를 배양하면서 바이러스 존재 여부를 시험하였다. 시험한 60명중 7명으로부터 바이러스를 분리하였으며 2명으로부터는 plasma 내의 항원 존재는 증명하였으나 림프세포로부터 바이러스 분리는 불가능하였다.

4) HIV감염자들에 대하여 매독 및 B형 간염의 감염 현황에 대하여 조사 하였다. HIV감염자를 역학군별에 의하여 매독과 B형 감염의 항체 및 항원 보유율을 조사하고 비슷한 연령군의 HIV 항체 음성자와 비교하였다. 이 조사를 통하여 우리나라 HIV감염자의 다수가 높은 매독 감염율을 갖고 있음을 알았다.

5) 분리 바이러스주의 성장과약과 항원탐지용 ELISA 방법 및 바이러스의 정제등에 이용하고자 HIV에 대한 모노클론항체를 제조하였으며 면역마우스의 항체가, 융합율, 항체분비상태등을 시험하였다.

6) 항체형성이전시기의 진단과 현재 사용하는 방법에 의한 항원탐지용 진단기술의 결점을 보완하고자 polymerase chain reaction 방법으로 HIV 탐지용 DNA hybridization probe를 개발하고자 하였다. 실험에 사용되는 온도, primer, Mg^{++} , dNTP 및 template 농도등에 대한 최적 조건을 시험하였다. 9명의 HIV 감염자로부터 배양한 림프세포에서 ELISA 방법으로 HIV 항원 음성인 배양상층액에 대하여 본 연구에서 제작한 probe 방법에 의하여 시험한 결과 7건 정도에서 양성으로 시험되어 PCR 방법의 높은 감도를 증명할 수 있었다.

7) 임상증세를 나타내지 않는 HIV 감염자의 질병 진전 상태를 파악하고자 말초혈액내 백혈구, 림프구, T, T_h (T helper/inducers), Ts (T suppressor/cytotoxic) 세포수와 T_h/Ts비 등에 대하여 시험하였으며 환자의 혈액학적 소견도 조사하여 감염자의 질병진전 예보 및 AIDS 환자들의 혈액학적 특성을 규명하고자 하였다.

8) HIV 항체양성자들이 혈액내에 존재하는 neopterin, sIL-2R, β_2 -microglobulin 및 IgA등 물질이 비감염자와의 차이점과 상기물질 상호간의 관련성을 시험하였다. 상기물질들은 T_h수와 연관성이 없었으며 sIL-2R과 neopterin, IgA는 통계학적으로 유의한 연관성을 보였다. Neopterin과 IgA는 연관성이 있었으나 β_2 -microglobulin과는 연관성이 없었다.

SUMMARY

Title: Study on the Establishment of Diagnostic Methods for
Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (II)

Yong, Kun-Ho¹, Shin, Yung-Oh¹, Paik, Sung-Bok²,
Park, Sung-Hoe³, et al.

1. Division of AIDS
National Institute of Health
2. The Korea Mogam Biotechnology Research Institute
3. Department of Pathology, Medical School of Seoul
National University

Since the first AIDS patient and HIV infected person in Korea were discovered in 1985, the number of HIV infected persons have been increased two or three times more than those of the previous years.

As of August 1990, the total numbers of HIV infected persons outnumber 100 including AIDS cases. In case this trend continues, it is supposed that HIV infected persons would be discovered to be thousands within next 10 years.

Diagnostic reagents are consumed annually for around two million tests to detect seropositive persons in the country. Those reagents for HIV antibody tests have some problems in specificity and sensitivity. In HIV tests even small numbers

of nonspecific reaction and low sensitivity causes serious side effects to the persons concerned.

In addition, reagents for HIV antibody and antigen tests should be produced in Korea.

The present methods to detect HIV infected persons by serological methods have limits in sensitivity and window period of antibody formation. The development of HIV hybridization probe by polymerase chain reaction can detect HIV DNA in lymphocyte with higher sensitivity than the detection of protein antigen from lymphocyte culture of HIV infected persons.

The monitoring on the immunological status of HIV infected persons should be performed for the better patient management and drug administration. The change of immunological status before symptoms can provide important informations for the person concerned.

In order to solve the above described problems in HIV diagnosis, we performed the 2nd year research project "Study on the Establishment of Diagnostic Methods for Acquired Immunodeficiency Syndrome (II)".

The important contents and results performed in 2nd year are as follows:

1. As of 30 June 1990, 94 HIV infected persons including AIDS cases have been found from 4 millions tested since May

1985. All the HIV infected persons except 10 dead persons do not show any distinct clinical symptoms. The epidemiological characteristics of HIV infection in Korea are elucidated by analyzing annual findings, age, gender, sex orientation of HIV infected persons and compared with those of other countries.

Particularly, it was found out that the ratio of infections among Korean within the country is in increasing trends, compared with the infections from foreigners out of the countries.

2. ELISA tests on sailors returning to Korea from foreign countries showed that about half of HIV infected persons in Korea are sailors with the history of staying in foreign countries. In addition, Western blot tests on sailors from Africa showed that there is high probability of HIV-2 infection in Korea.
3. For the monitoring of immunological status of HIV infected persons and isolating of HIV strains within the country, virus isolation tests were performed from lymphocyte cultures of 60 HIV infected persons.

HIV virus isolations were possible from 7 of 60 HIV infected persons. The presences of HIV antigens in the

plasma were demonstrated from 2 of 60 persons tested while no viruses were confirmed in these persons.

4. Infections of syphilis and hepatitis B virus (HBV) on HIV seropositive persons were surveyed. Antibody to syphilis and hepatitis B surface antigen (HBs Ag) of HIV infected persons were tested according to epidemiological groups. The survey showed that HIV infected persons were infected with syphilis in much higher rate than HIV noninfected persons. However, infection rate of HBV in HIV infected groups was similar to that in noninfected groups.
5. Hybridoma lines secreting monoclonal antibodies to HIV were generated by the fusion of myeloma cells and spleen cells from Balb/c mice immunized with HIV antigen. For the characterization of isolated HIV strains and purification of HIV antigens, the tests to obtain specific monoclonal antibodies to each polypeptide of HIV were performed.

Results on antibody potency in mouse immunized, fusion rates and antibody secretion by Hybridoma lines were obtained.

6. HIV DNA Hybridization probe by polymerase chain reaction (PCR) was tried to develop for the enhancement of sensitivity of viral detection tests particularly in the window period. Optimal conditions on temperature, primer, Mg^{++} , dNTP and template concentration used in PCR were tested. Using PCR

method with DNA hybridization probe produced in this experiment, 7 specimen among lymphocytes cultures from 9 seropositive persons not showing antigen by ELISA tests were positive. Above result suggested that PCR method showed higher sensitivity than conventional ELISA tests.

7. White blood cells, lymphocytes, T cells, Th (T helper), Ts (T suppressor) and Th/Ts ratio on HIV infected persons were counted for the monitoring of disease progression of asymptomatic seropositive persons.

A significant numbers of HIV seropositive persons showed decreased ratio of Th/Ts than normal healthy control even though they do not show any apparent clinical symptoms. The degrees of decrease of immunological alterations in HIV seropositive persons were between those of normal seronegative persons and AIDS cases.

8. Neopterin, sIL-2R, β 2-microglobulin and IgA were tested on HIV seropositive persons and corresponding controls. In addition, the correlations among those 4 factors were tested in HIV infected and noninfected persons. The statistically significant correlation between sIL-2R and neopterin was present, whereas no correlation was present between Th and the above described 4 factors. In the other hand, neopterin had correlation with IgA but did not show any correlation with β 2-microglobulin.

CONTENTS

Chapter I.	Introduction	31
Chapter II.	Specificity of HIV infection in Korea	37
Sub-chapter I.	Specificity and situation of HIV infection in Korea	39
Section 1.	Introduction	39
Section 2.	Materials and methods	40
1)	Subjects and system	40
2)	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ...	41
3)	Western blot (WB)	43
4)	Immunofluorescence antibody (IFA)	43
Section 3.	Results	44
1)	Detection of HIV infected person by year	44
2)	Distribution of HIV infected person by source of infection	46
3)	Infection by sex and age	46
4)	Distribution of HIV infected person by region	50
5)	Infection of HIV-2	50
Section 4.	Discussion	56
References	59

Sub-chapter 2. Prevalence of Syphilis and Hepatitis B virus (HBV) among Korean seropositive persons to human immunodeficiency virus (HIV)	63
Section 1. Introduction	63
Section 2. Materials and methods	64
1) Subjects	64
2) Methods	65
(1) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	65
(2) Western blot (WB)	65
(3) Immunofluorescence antibody (IF)	66
(4) Particle agglutination(PA)	66
(5) Serological test to syphilis	66
(6) Serological test to HBV markers	67
Section 3. Results	68
1) Syphilis infection of HIV seropositive persons	68
2) Syphilis infection of high risk group by HIV infection status	70
3) HBV infection of HIV seropositive persons ...	72
4) HBV infection of high risk group by HIV infection status	73
Section 4. Discussion	77
References	79

Sub-chapter 3. Virus isolation from HIV infected person	83
Section 1. Introduction	83
Section 2. Materials and methods	84
1) Cell and cell culture	84
2) Virus isolation from lymphocyte culture	84
3) Reverse transcriptase (RT) test	84
4) Test of virus isolation from plasma of HIV isolated person	85
5) Test of cell susceptibility against HIV	85
6) Neutralization test of HIV positive and negative serum	85
Section 3. Results	86
1) Virus isolation from HIV infected person	86
2) Virus isolation from plasma of HIV isolated person	86
3) Test of cell susceptibility against HIV	91
4) Neutralization test of HIV positive and negative serum	92
Section 4. Discussion	93
References	95

Chapter III. Improvement of HIV diagnostic methods	99
Sub-chapter 1. Production of specific monoclonal antibodies against HIV	101
Section 1. Introduction	101
Section 2. Materials and methods	102
1) Preparation of antigen	102
2) Quantification of p24 from isolated and concentrated HIV-1 antigen	102
3) Immunization	102
4) Enzyme-linked immunosorbent assay	104
5) Immunofluorescence assay	104
6) Titration of anti-HIV mouse serum	105
7) Cell fusion and cloning	105
Section 3. Results	106
1) Detection of p24 from HIV-1 antigen	106
2) Calibration of p24 from HIV-1 antigen	106
3) Quantification of p24 from HIV-1 antigen ...	106
4) Enzyme-linked immunosorbent assay	110
5) Immunofluorescence assay	111
6) Titration of anti-HIV mouse serum	111
7) Cell fusion and cloning	111
Section 4. Discussion	115
References	118

Sub-chapter 2.	Development of Hybridization probe for the detection of HIV	123
Section 1.	Introduction	123
Section 2.	Materials and methods	126
1)	Preparation of control DNA for PCR	126
2)	Establishment of reaction condition for PCR .	128
a.	Preparation of reaction buffer	128
b.	PCR reaction	130
c.	Identification of PCR product	131
d.	Restriction analysis of PCR product	135
3)	Optimization of reaction condition for PCR ..	135
4)	Preparation of DNA template from lymphocyte	138
5)	Dot blot hybridization	140
Section 3.	Results	140
1)	Preparation of control DNA template for PCR	140
2)	Comparison of 5X Taq pol buffer with 10X amplifying buffer	141
3)	Optimization of reaction condition for PCR ..	147
4)	Optimization of amount of DNA template	149
5)	Restriction analysis of PCR product	153
6)	PCR of lymphocyte DNA from HIV seropositive persons	156

Section 4. Discussion	163
References	166
Chapter IV. Immunological characterization of HIV infected person	171
Sub-chapter 1. Immunological evaluation	173
Section 1. Introduction	173
Section 2. Materials and methods	174
1) Studied population	174
2) Preparation of peripheral mononuclear cell ..	174
3) Measurement of T lymphocyte subsets	175
Section 3. Results	176
Section 4. Discussion	187
References	189
Sub-chapter 2. Neopterin, soluble interleukin-2 receptor, beta ₂ -microglobulin and immunoglobulin A in blood of HIV seropositive in Korea	195
Section 1. Introduction	195
Section 2. Materials and methods	197
1) Subject	197
2) Measurement of neopterin	197

3) Measurement of sIL-2R	198
4) Measurement of beta ₂ -microglobulin	198
5) Measurement of IgA	199
6) Measurement of T lymphocyte subsets	200
Section 3. Results	201
1) Neopterin concentration in blood of HIV infected person	201
2) sIL-2R concentration in blood of HIV infected person	202
3) Beta ₂ -microglobulin concentration in blood of HIV infected person	203
4) IgA concentration in blood of HIV infected person	205
5) Relation with the number of Th	206
6) Correlation with neopterin, sIL-2R, beta ₂ - microglobulin and IgA in blood	206
Section 4. Discussion	210
References	215
Sub-chapter 3. Study on the HIV infection of human thymocyte and leukemia cell line and on the effects of cytokines to the HIV regulating gene	221
Section 1. Introduction	221

Section 2. Materials and methods	224
1) Infection of the thymocytes	224
2) HIV infection of U-937 cell line and the effect of Jsup to the infection	224
3) HIV infection of H9 cell line and the effect of J ₂ , J ₄ sup to the infection	225
4) HIV infection of MT-4 cell line and the effect of Jsup.	225
5) Culture of human tumor cell line and human leukemia cell line	226
6) Reverse transcriptase assay	226
7) Antigen capture ELISA	227
8) Transformation	229
9) CAT (chloramphenicol acetyltransferase) assay	230
Section 3. Results	232
1) HIV infection of thymocytes	232
2) HIV infection of U-937 cell line and the effect of Jsup	236
3) HIV infection of H9 cell line and the effect of Jsup	239
4) HIV infection of MT-4 cell line and the effect of Jsup	242
5) Effects of cytokines to the HIV regulating gene	247

Section 4. Discussion	247
References	249

목 차

제 I 장 서 론	31
제 II 장 우리나라의 HIV감염 특이성	37
1. 우리나라의 HIV감염의 현황 및 특이성	39
제 1 절. 서 설	39
제 2 절. 실험재료 및 방법	40
1) 시험대상 및 체계	40
2) Enyme linked immunosorbent assasy (ELISA)	41
3) Western blot (WB)	43
4) Immunofluorescence antibody (IFA)	43
제 3 절. 실험결과	44
1) 연도별 HIV감염자 발견	44
2) 감염원별 HIV감염자 분포	46
3) 성별 연령별 감염	46
4) 지역별 감염자 분포	50
5) HIV-2 감염	50
제 4 절. 고 찰	56
참고문헌	59
2. 한국인 Human Immunodeficiency virus (HIV) 항체	
양성자의 매독 및 B 형 간염 감염	63

제 1 절. 서 설	63
제 2 절. 실험재료 및 방법	64
1) 대상자	64
2) 실험방법	65
(1) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	
시험	65
(2) 웨스턴브롯 (Western Blot, WB) 시험	65
(3) 면역형광항체 (Immunofluorescence antibody, IF)	
시험	66
(4) 입자응집 (Particle agglutination, PA)	66
(5) 배독혈청 시험	66
(6) 간염표식 인자시험	67
제 3 절. 실험결과	68
1) HIV항체 양성자의 배독감염	68
2) HIV감염 여부에 따른 위험군의 배독감염	70
3) HIV항체 양성자의 HBV감염	72
4) HIV감염 여부에 따른 위험군의 HBV감염	73
제 4 절. 고 찰	77
참고문헌	79
3. HIV감염자로부터 바이러스 분리	83
제 1 절. 서 설	83

제 2 절. 실험재료 및 방법	84
1) 사용세포 및 배양	84
2) 림프세포로부터 바이러스 분리	84
3) 역전사효소 (TR, Reverse Transcriptase) 시험	84
4) HIV분리된 사람의 plasma로부터 바이러스 분리시험 ...	85
5) HIV에 대한 세포감수성 시험	85
6) HIV항체 양성 및 음성혈청과의 중화시험	85
제 3 절. 실험결과	86
1) HIV감염자로부터 바이러스 분리	86
2) HIV분리된 사람의 plasma로부터 바이러스 분리	86
3) HIV에 대한 세포 감수성 시험	91
4) HIV항체 양성 및 음성 혈청과의 중화시험	92
제 4 절. 고 찰	93
참고문헌	95
제 III 장 HIV 검사방법의 개선	99
1. HIV 특이 Monoclonal 항체의 제작	101
제 1 절. 서 설	101
제 2 절. 실험재료 및 방법	102
1) 항원분리	102
2) 분리, 농축된 HIV-1 항원에서의 p24 정량	102
3) 면역	102

4) 효소면역의 분석법.....	104
5) 면역형광항체시험	104
6) Anti-HIV mouse serum의 Titration	105
7) 세포융합 및 Cloning.....	105
제 3 절. 실험결과	106
1) 분리, 농축된 HIV-1 항원에서 p24의 검출	106
2) HIV-1 p24 Calibration	106
3) HIV-1 p24 Quantification	106
4) 효소면역의 분석법.....	110
5) 면역형광항체시험	111
6) Anti-HIV mouse serum의 Titration	111
7) 세포융합 및 Cloning.....	111
제 4 절. 고 찰.....	115
참고문헌	118
2. HIV 탐색을 위한 Hybridization probe의 제작 및 평가.....	123
제 1 절. 서 설.....	123
제 2 절. 실험재료 및 방법	126
1) PCR을 위한 control DNA의 제조.....	126
2) PCR의 반응조건	128
(1) 반응 buffer의 제조	128
(2) PCR 수행	130

(3) PCR product의 확인	131
(4) PCR product의 restriction analysis.....	135
3) PCR 반응조건의 최적화	135
4) Lymphocyte로부터 PCR을 위한 DNA template의 제조 ...	138
5) Dot blot hybridization	140
제 3 절. 실험결과	140
1) PCR을 위한 control DNA template의 제조	140
2) 5 x Taq pol buffer와 10 x Amplifying buffer 비교 ...	141
3) PCR template 반응조건의 최적화	147
4) DNA template양의 반응조건의 최적화	149
5) PCR product의 restriction analysis.....	153
6) Seropositive한 사람에서 얻은 lymphocyte DNA에서의 PCR수행	156
제 4 절 고 찰	163
참고문헌	166
제 IV장 HIV감염자의 면역학적 특성	171
1. HIV감염자의 면역학적 특성	173
제 1 절. 서 설.....	173
제 2 절. 실험재료 및 방법	174
1) 대상자	174

2) 말초혈액 단핵세포의 분리	174
3) T림파구 아세포군의 측정	175
제 3 절. 실험결과	176
제 4 절 고 찰	187
참고문헌	189
2. 한국인 HIV항체 양성자의 혈중 Neopterin, soluble	
interleukin-2 receptor, beta ₂ -microglobulin	
Immunoglobulin A	195
제 1 절. 서 설	195
제 2 절. 실험재료 및 방법	197
1) 대상자	197
2) Neopterin의 측정	197
3) sIL-2R의 측정	198
4) Beta ₂ -microglobulin	198
5) IgA의 측정	199
6) T림파구 아세포군의 측정	200
제 3 절. 실험결과	201
1) HIV 감염자의 혈중 neopterin농도	201
2) HIV 감염자의 혈중 sIL-2R 농도	202
3) HIV 감염자의 혈중 beta ₂ -microglobulin 농도	203
4) HIV 감염자의 혈중 IgA 농도	203

5) T _h 세포수와의 연관성	206
6) 혈중 neopterin, sIL-2R, beta ₂ -microglobulin 및 IgA의 상호연관성	206
제 4 절 고 찰	210
참고문헌	215
3. 인체 흉선세포 및 백혈병세포주에서 HIV감염여부 및 각종의 Cytokine이 HIV조절유전자에 미치는 영향에 관한연구	221
제 1 절. 서 설	221
제 2 절. 실험재료 및 방법	224
1) 흉선세포에 대한 감염	224
2) U-937 cell line에 대한 HIV감염과 Jsup이 HIV 감염에 미치는 영향	224
3) H9 cell line에 HIV감염과 J ₂ , J ₄ sup의 HIV infection의 효과	225
4) MT-4 cell line에 HIV감염과 Jsup이 미치는 영향	225
5) 인체 종양세포주 및 인체백혈병 세포주의 배양	226
6) 역전사효소 활성 측정과 민감도비교 (RT activity 측정)	226
7) 항원검색 호소면역	227
8) Transformation	229
9) Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 분석	230

제 3 절. 실험결과	232
1) 흉선세포에 대한 HIV 감염	232
2) U-937세포주에 HIV감염과 Jsup이 감염에 미치는 영향	236
3) H9세포주의 HIV감염과 Jsup이 미치는 영향	239
4) MT-4세포주에 HIV감염과 Jsup이 미치는 영향	242
5) 각종의 Cytokine이 HIV 조절유전자에 미치는 영향	247
제 4 절 고 찰	247
참고문헌	249

제 I 장 서 론

Introduction

제 I 장 서 론

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)가 처음 미국에서 유행하기 시작한 이후 10여년의 기간동안 세계적으로 환자 및 감염자의 증가 현상을 보이고 있다.

1990년 7월 6일 세계보건기구 발간 Weekly epidemiological record (WER)의 집계에 의하면 세계의 AIDS환자는 266,098이다. 이들 환자 중 미국에서 133,889명의 환자가 발생하여 전세계 환자의 약 반을 차지하고 있다. 이들외에 Uganda, Zaire, Brazil, France등이 10,000명 내외의 감염자를 갖고 있어 세계적으로 AIDS가 문제되고 있는 국가들이다.

이들 환자뿐만 아니라 전세계적으로 500만~1,000만명의 환자가 존재하는 것으로 추정되어 AIDS의 환자발생의 심각성은 더욱 증가되고 있다.

우리나라에서는 1985년에 외국인 환자 및 한국인 감염자가 처음으로 발견된 이래에 해마다 환자가 전해의 2배 정도 증가하여 1990년 7월중에 환자포함 총 감염자가 97명으로 증가하였다.

따라서 국내의 AIDS환자 및 감염자에 대한 현황 파악, 진단 및 치료 등 각종 필요한 조치를 수행해 나감에 있어 이에 요구되는 기술적 과제의 해결이 시급히 요구되고 있다.

현재 국내에서 해마다 약 200여만 건의 AIDS 혈청시험이 수행되고 있다. 검사 대상군에 대하여 AIDS감염 여부를 시험하기 위하여 혈청내의 항체를 탐식하게 되며 이를 위하여 enzyme linked immunosor-

bent assay (ELISA) 시험등 각종 시약이 사용되고 있다.

근래 국내에도 HIV 항체 시험을 위한 ELISA 시약이 생산 판매되고 있으나 특이도, 감도등을 개선하여야 할 점이 많다.

시약 자체의 항원정제, 혈청내의 비특이 반응물질등으로 인하여 비특이 시험이 초래되고 있다. 외국으로부터 다수의 ELISA 시약을 수입하게 되어 국산품 비율의 증가가 요구되며 국내인 혈청에 적합한 진단 시약의 개발이 시급하다. 나아가 한 종류의 ELISA시약으로 양성이 시험되었을때 이를 확인하기 위하여 Western blot (WB) 및 immunofluorescent antibody (IFA) 시험을 필수적으로 수행하여 결과를 비교한다. 지금까지는 WB방법이 가장 특이적이며 감도가 높은 것으로 알려져 있으나 human immunodeficiency virus (HIV) 감염과 무관하게 WB시험에서 band를 관찰하는 경우가 많다. WB방법에 의한 비특이 반응에 대하여 원인규명이 필요하며 수요의 증대에 의하여 우수한 제품의 자체생산이 필요하다. 다수의 혈청시험에서 대상인의 전염병에의 폭로여부, 생활양식 및 인종에 따른 비특이 반응의 가능성을 배제할 수가 없다. 따라서 한국인에 대한 비특이 반응의 원인을 규명함으로써 감염자의 증가에 따라 이들이 질병으로 진전되기전 면역상태에 관한 각종 혈액학적 성상을 파악하는 것이 감염자 자신은 물론 HIV의 질병진전을 이해하는데 극히 중요하다.

국내에는 HIV 감염자 수가 상당시간동안 증가할 것으로 예측되고 있다. 이들이 AIDS로 진전되는데에 소요되는 기간, 발병되는 율, 발병되기 전의 면역변화등이 현재 관심의 대상이 되고 있다.

따라서 감염자에 대한 정기적인 면역시험, 혈액내 각종 미량물질측정

및 수종의 선택된 항원에 대한 피부반응 시험을 수행함으로써 질병진전의 예보에 기초 자료가 될 것으로 판단하고 있다. 감염자로부터 HIV 바이러스 분리를 계속함으로써 감염자의 질병진전 시기 및 상태의 파악은 물론 자연계 HIV 바이러스의 특성을 규명하고자 시도하였다. 타질병에서와 같이 현재까지의 HIV 진단은 항체의 존재여부에 의존하고 있으나 항체형성 이전의 window period 내에서의 진단을 위하여 항원의 존재를 시험할 수 있는 방법의 개발이 필연적이다. 이를 위하여 2차년도 기간에는 polymerase chain reaction에 의한 hybridization probe를 개발하고자 하였으며 실제 감염자의 림프세포를 배양하여 probe의 감도를 평가하였다.

제 II 장 우리나라의 HIV 감염 특이성

Specificity of HIV infection in Korea

申榮午, 尹在得
李鴻來, 白善英
南廷球, 金成順
金永丸, 徐教一
河敬花

1. 우리나라 human immunodeficiency virus (HIV) 감염의 현황 및 특이성

제 1 절 서 설

1981년에 AIDS가 미국에서 처음으로 발견된 이후 급격히 환자 및 감염자가 증가되었을뿐만 아니라 우리나라에도 1985년 외국인 환자와 한국인 감염자가 확인됨으로서 AIDS문제가 국내에 대두되기 시작하였다. 이 후 AIDS 환자는 급격히 증가하여 전세계에 확인된 환자만도 1990년 7월 6일 27만여명으로 세계보건기구에 집계됨에 따라 각국은 AIDS 예방에 필요한 각종 대책을 강화하지 않을 수 없게 되었다.

AIDS예방 대책의 기초자료로 필요한 AIDS의 전파양상은 지역과 국가에 따라서 큰 차이를 나타내고 있다.

미국, 유럽 및 남아메리카에서는 남자 동성연애자, 마약중독자, 혈우병 환자에서 환자 및 감염자가 많으며 여성환자는 상대적으로 낮은 율을 차지하고 있다.

아프리카에서는 이성간의 성관계에 의한 환자 및 감염자가 다수를 차지하며 전체 인구에서 감염자가 차지하는 율이 극히 높다. 특히 우간다, 자이레 근처 중앙아프리카에서의 환자가 많으며 윤락여성의 감염자는 매우 높다.

우리나라가 속하는 아시아 지역에서의 감염양상은 일반적으로 감염율이 유럽, 아프리카에 비하여 낮으며 나라에 따라 특이양상을 보인다.

우리나라에서의 HIV감염양상을 파악하기 위하여 위험군으로 추정되며 검사가 가능한 유흥업종사자, 재소자, 귀국근로자등에 대하여 HIV검사가 지속되어 왔으며 헌혈자에 대한 검사는 '87년에 시작하여 계속하고 있다.

아직 국내에서의 HIV감염은 비교적 초기에 해당되는 것으로 추정되어 AIDS환자에 의한 자료만으로 역학조사나 현황 파악은 어려운 실정이다.

따라서 우리나라에서의 HIV감염에 관한 연구는 주로 대상군에 대한 반자의적인 집단검사를 토대로 이루어지고 있다. 특히 검사 대상과 숫자에 따라 감염자의 분포가 변화하고 있다.

본 연구에서는 1985년의 첫 감염자 발견이래 1990년 6월 말까지 국내에서 확인된 감염자에 대하여 역학적 양상을 분석함으로써 우리나라에서의 HIV감염 상황을 파악하고자 하였다.

제 2 절 실험대상 및 방법

1. 시험대상 및 체제

국내의 HIV검사 대상자는 헌혈자, 등록된 위생업종사자, 윤락여성들이 대부분을 이루며 남성동성연애자, 혈우병환자, 재소자, 의뢰된 마약중독자등이 소수이나마 포함되어 있다. 이 외 귀국근로자, 자원자등이 근래에 추가되었다. 년도별 검사대상군과 대략적인 역학군은 Table 1에서와 같다. '85, '86년에는 수천명에 불과하였으나 '87년후반기부터 헌혈자가 추가됨으로서 대상수가 급증하였으며 '88년 이 후부터 선원이 추가되었다. 현재까지 검사건수는 약 400만건을 약간 상회하고 있다.

Table 1. Numbers and groups of sera tested for HIV by year and epidemiological groups

Year	No. of sera	Epidemiological groups
1985	3,877	mostly prostitutes to foreigners
1986	7,781	hospitality girls, hemophiliacs, homosexuals
1987	603,788	prisoners and blood donors were added
1988	1,373,000	sailors were added
1989	1,541,000	same as above
1990(Apr.)	625,000	same as above
Total	4,154,446	

검사체계는 Fig. 1에서와 같이 헌혈자는 혈액원에서, 위생업종사자 및 윤락녀는 보건소에서 채혈하여 시도보건환경연구소에서, 귀국근로자는 검역소에서 그리고 래원자는 병원검사실에서 항체검사하며 양성반응시에는 국립보건원에서 확인 시험한다.

2. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

HIV항체 탐지를 위한 ELISA시험은 간접방법 및 경쟁적저지방법을 사용하였다. 두 방법 모두 상업적제조사에서 구매하여 검사하고 있다. 간접방법은 정제한 HIV항원을 coating한 microplate에 가검혈청을 일정

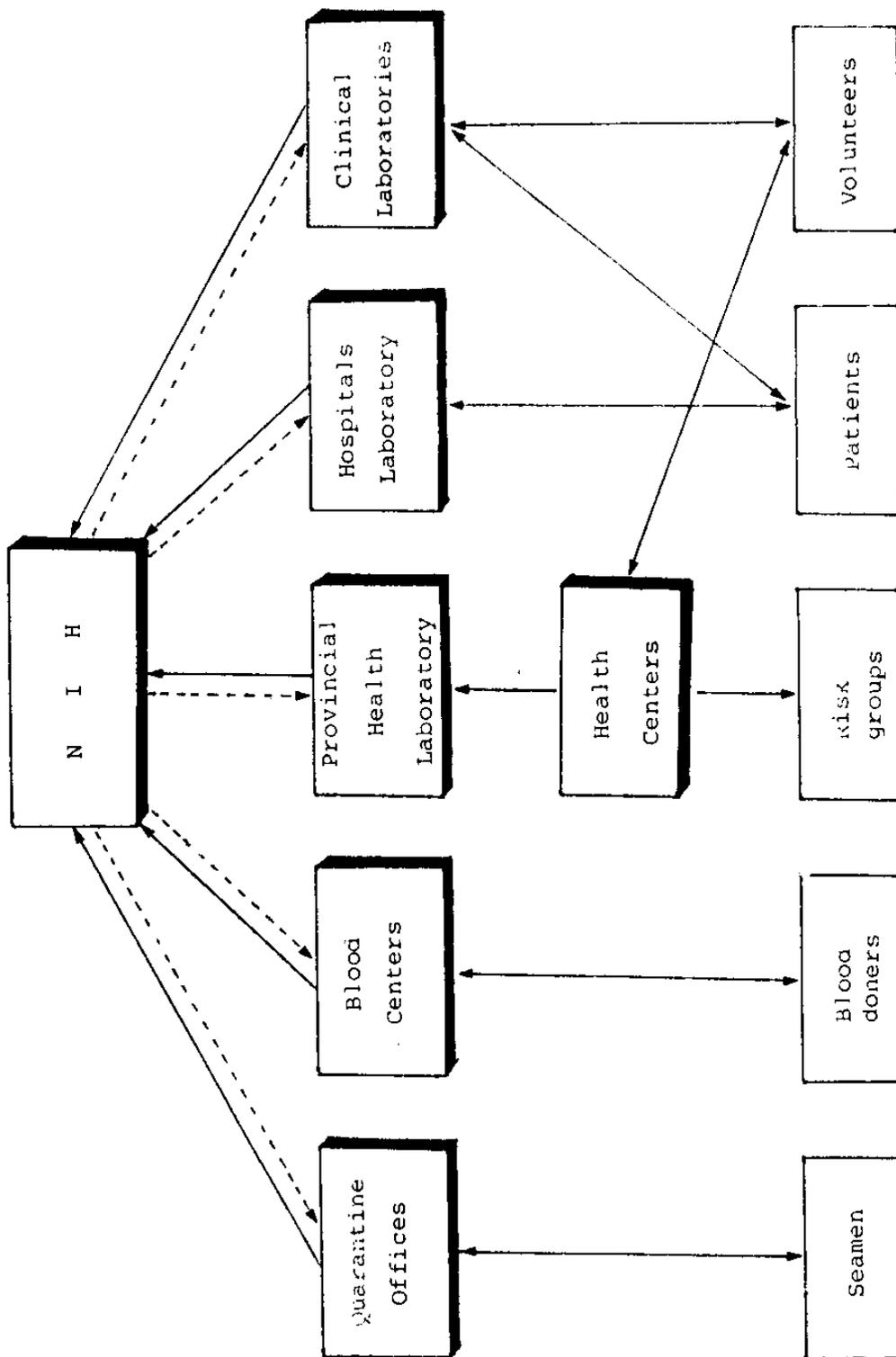


Fig. 1. System of specimen collection and serological tests according to levels of laboratories in Korea.

시간 작용시켰다. 세척 후 효소표식 anti-human IgG conjugate를 작용시켰다. 다시 3회 세척 후 사용효소 관련 기질과 발색소를 가하고 일정시간후 반응여부를 optical density(OD)를 ELISA 판독기로 측정하였다.

경쟁적저지방법은 HIV항원으로 coating시킨 microplate에 가검혈청과 효소표식 anti-HIV IgG conjugate를 동시에 가하고 작용시켰다. 기질을 작용시킨 다음 OD를 ELISA 판독기로 측정하였다.

3. Western blot (WB)

타 시험의 확인과 바이러스 부위에 대한 항체를 탐지하기 위하여 WB시험을 수행하였다. 미국의 Food and drug administration (FDA)에서 인가받은 Dupont 제품을 지속적으로 사용하였다.

HIV 항원을 nitrocellulose membrane에 옮긴 후에 가검혈청과 양성 및 음성 대조혈청을 가하여 microshaker에서 작용시킨 후 세척 하였다. 효소표식 anti-human IgG conjugate를 가하고 실온에서 1시간 작용시켰다. 기질을 작용시킨 다음 특이 band의 형성을 육안으로 판독하였다. 자세한 실험방법 및 판독은 제조사의 실험지침서에 준하였다.

4. Immunofluorescence antibody (IFA)

ELISA 혹은 WB에서 양성으로 시험된 혈청에 대하여 IFA로서 확인시험하였다. HIV가 감염된 세포 (H9/HTLV-III)와 미감염세포 배양 부유액을 원심하여 상층액을 제거하고 pellet에 0.2ml 정도의 pho-

sphated butter solution (PBS)를 가하여 부유액을 만들었다. slide에 dropping시켜, 공기건조시킨 후 cold acetone에 10분간 정치시켜 고정시켰다. butter를 세척한 다음 알려진 HIV항체 양성 대조혈청과 가검혈청을 20배 희석하여 20 μ l씩 처리한 다음 37°C 흡습상자에서 30분간 반응시켰다. 3회 세척 후 40배 희석된 형광색소 (FITC) 표식 anti-human IgG conjugate를 20 μ l씩 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 3회 세척하였다.

FA mounting medium으로 mounting시킨 후 coverslip을 덮고 현광현미경 (Leitz) 으로 항체 존재 여부를 실험하였다.

제 3 절 실험 결과

1. 연도별 HIV 감염자 발견

우리나라에서의 환자포함 감염자 수는 1990년 5월말 현재 총계 94명으로서 연도별 감염자발견수는 전체의 2~3배의 증가가 계속되고 있다 (Fig. 2).

'88년도의 22명에 비하여 '89년에는 37명, '90년도 초반기 5개월간에 21명의 새로운 감염자가 발견되어 아직도 지속적으로 감염자가 증가되고 있음을 알 수 있다.

AIDS환자의 분포는 환자발견시기를 기준으로 하였을 때 '89년 중 1명에 불과하여 AIDS증상을 나타내는 감염자는 더 이상 발견되지 않았다.

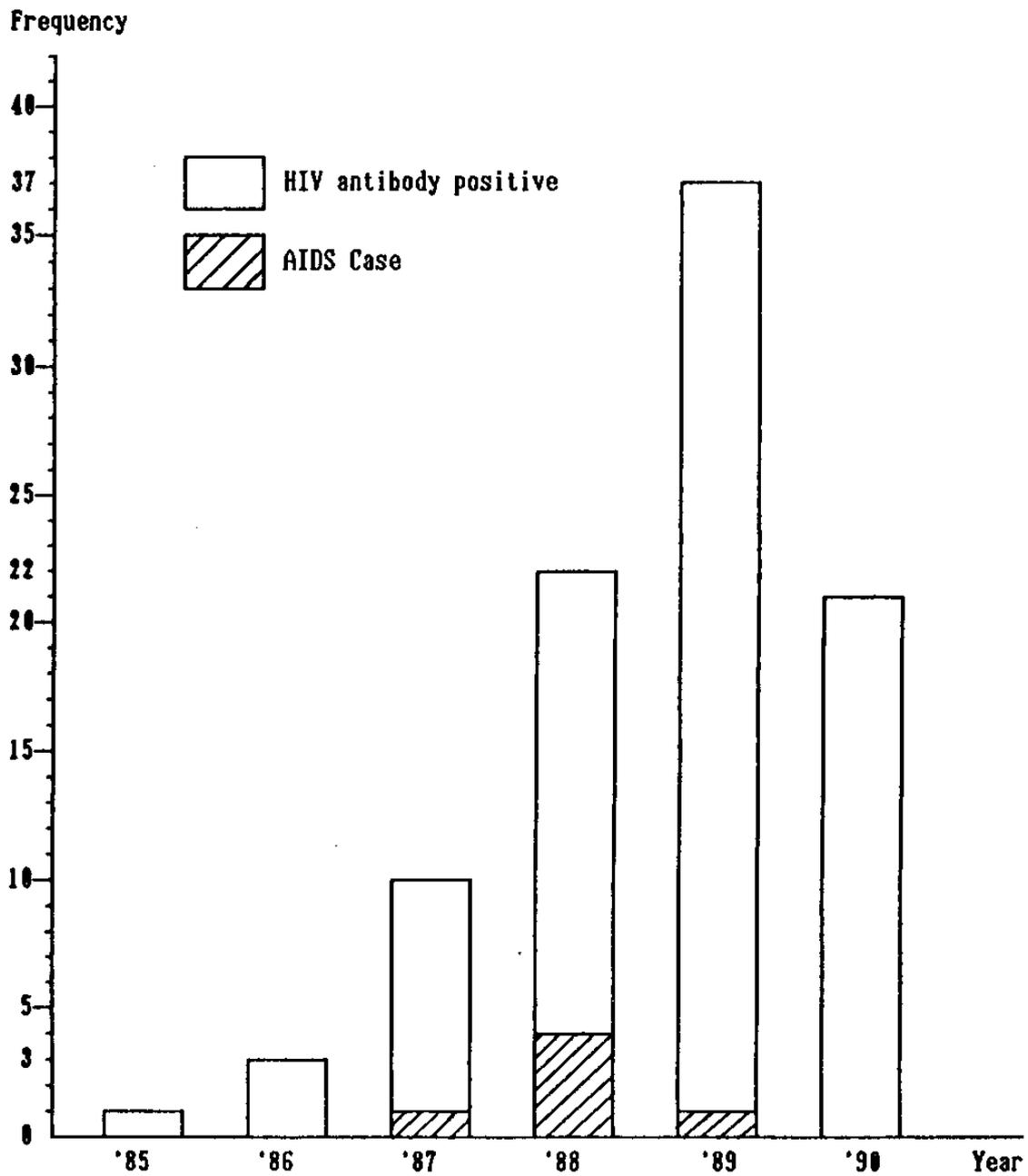


Fig. 2. Distribution of persons infected with HIV by year. Number of sera tested are different by year. Year '90 is as of 31 May 1990.

년도에 따라 발견되는 성별분포를 보면 남자는 계속 증가하고 있으나 여자감염자는 증가되지 않고 있다 (Fig. 3).

2. 감염원별 HIV감염자분포

국내 HIV 감염자의 역학군별분포는 Table 2와 같다. 외국에 취향한 선원이 감염자 94명중 44명으로 전체의 약 반을 차지하고 있다. 다음이 외국인 상대 윤락녀와 확인된 남자동성연애자등이며 혈우병환자는 2명으로 더 발견되지 않고 있다.

감염자발견의 연도에 따른 역학군별 변화를 보면 Table 4 및 Fig. 3와 같이 선원이 '88년부터 계속 증가하고 있음을 알 수 있다. 등록된 윤락녀의 경우 새로운 감염자 발견은 감소되고 있다. 남자동성연애자 발견자는 계속 증가하는 것으로 보이나 '90년 중 동성연애자 감염자를 확인할 수 없었다. 해외교포감염자가 증가되지 않은 것은 AIDS환자로서의 귀국자가 없었으며 검사대상이 되지 않기 때문으로 보인다.

HIV감염원을 국내외인으로 구분하면 Fig. 5와 같이 국내인에서의 감염비율이 증가하여 '88년 감염자의 약 10%, '89년 감염자의 약 20%가 국내인으로부터 감염되었음이 확인되었다. 반면 국외인으로부터의 감염은 '87년 발견자부터 감소하여 '89년 감염자의 약 60%가 외국인으로부터 감염되었음이 확인되었다.

3. 성별, 연령별 감염

우리나라 HIV 감염자의 성별 분포는 75 : 19로 남자가 약 4배정도

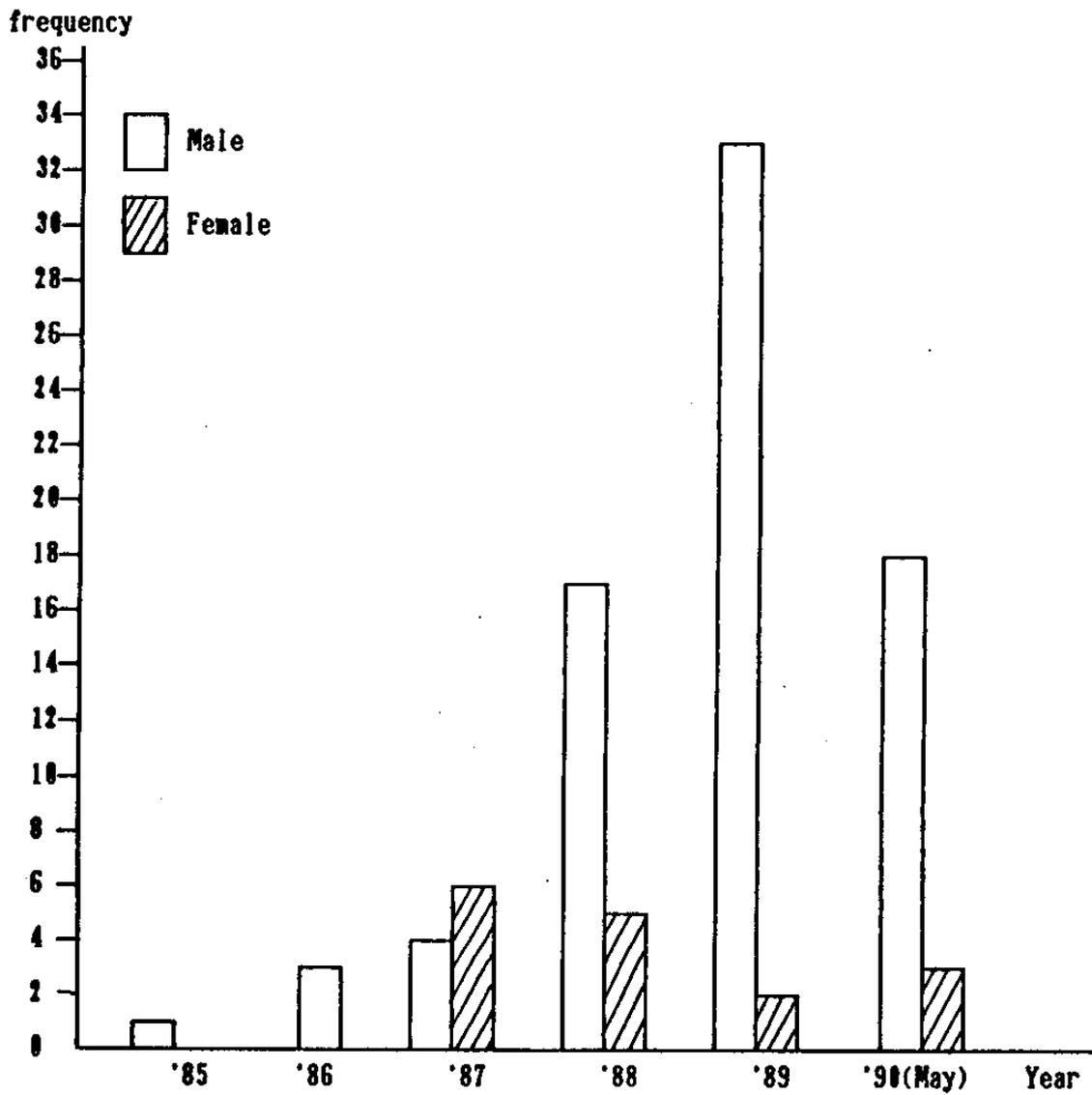


Fig. 3. Distribution of HIV infected persons by sex and year.

Table 2. Distribution of HIV infected persons by high risk groups

Group	Number detected	Percentage	No	100,000
Sailors	44	46.8		35
Prostitutes to foreigners	13	13.8		120
Homosexual	8	8.5		-
Oversea Korean	7	7.5		-
Hemophiliacs	2	2.1		-
Unknown	20	21.3		-
Total	94	100.0		

- ; meaningless or impossible to count

Table 3. Distribution of HIV infected persons by high risk groups and year

Group	1985	1986	1987	1988	1989	1990	Total	Percent
Sailors	0	0	0	12	19	11	44	46.8
Prostitutes	0	3	6	3	0	1	13	13.8
Homosexual	0	0	0	2	6	0	8	08.5
Oversea Korean	1	0	1	3	2	0	7	07.5
Hemophiliacs	0	0	2	0	0	0	2	02.1
Other (Unknown)	0	0	1	2	3	8	20	21.3
Total	1	3	10	22	37	21	94	100.0

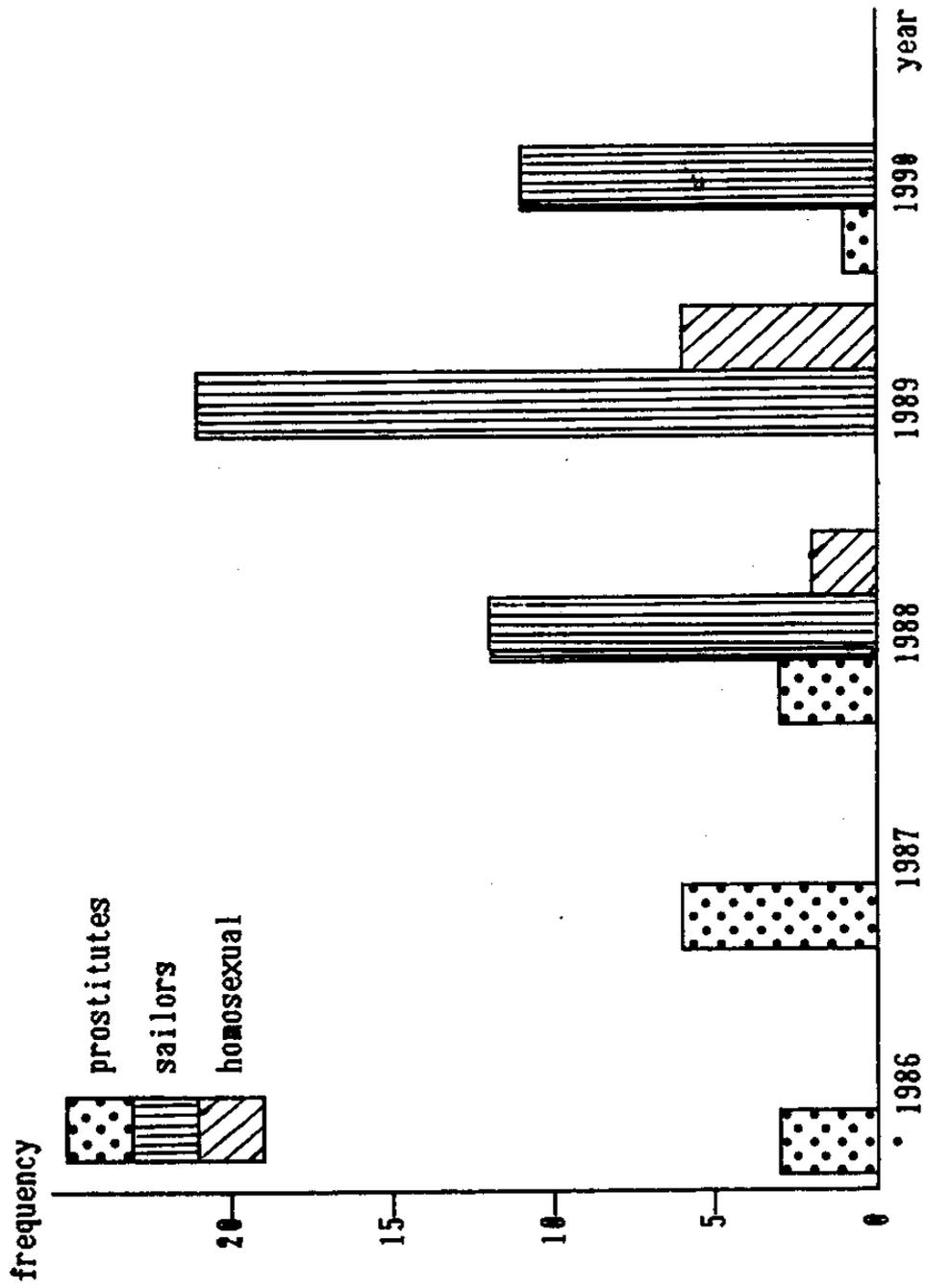


Fig. 4. Trends of HIV infected persons including AIDS cases found during the period of 1986 to 1990 in Korea. 1990 ; as of 31 May 1990.

많은 수를 차지하고 있다. '88년 이후 부터 남자 감염자비율이 증가하여 '89년 감염자 중에서 남자는 여자의 10배 이상을 차지하고 있다. (Table 4 및 Fig. 2)

감염자의 연령별 분포는 감염자의 70%가 20세이상 40세이하로서 (Table 4 및 Fig. 6) 성활동계층임을 뜻하고 있다. 남자는 감염자의 25.3% (19/75)가 40세 이상인 반면, 여자감염자의 5.3% (1/19)만이 40세이상이어서 남자감염자의 연령이 비교적 높았다.

4. 지역별 감염자 분포

국내 HIV감염자의 지역별 분포를 시도 기준으로 보면 Table 5에서와 같이 서울, 부산등 인구밀집지역 및 외국인 다수거주지역에서 압도적으로 많은 수를 차지하고 있다. 서울, 부산 이외 지역으로는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 항구도시, 외국군 주둔지역에 HIV감염자가 거주하고 있는 것으로 판명되었다. 이들 자료는 주소상에서의 거주지로서 실제 거주지와는 얼마간의 상이함을 보이고 있다.

5. HIV-2 감염

한국인에서의 HIV-2 감염 여부를 시험하고자 HIV-1에 양성을 보이거나 서아프리카로부터 입국하는 근로자에 대하여 시험한 결과 HIV-2 ELISA 항체 시험에서 35명이 양성으로 시험되었다. 이들 혈청에 대하여 HIV-2 WB을 시험하였으며 이 중 6건이 Table 6에서 보는바와 같이 gp36등 HIV-2특이 band를 보였다.

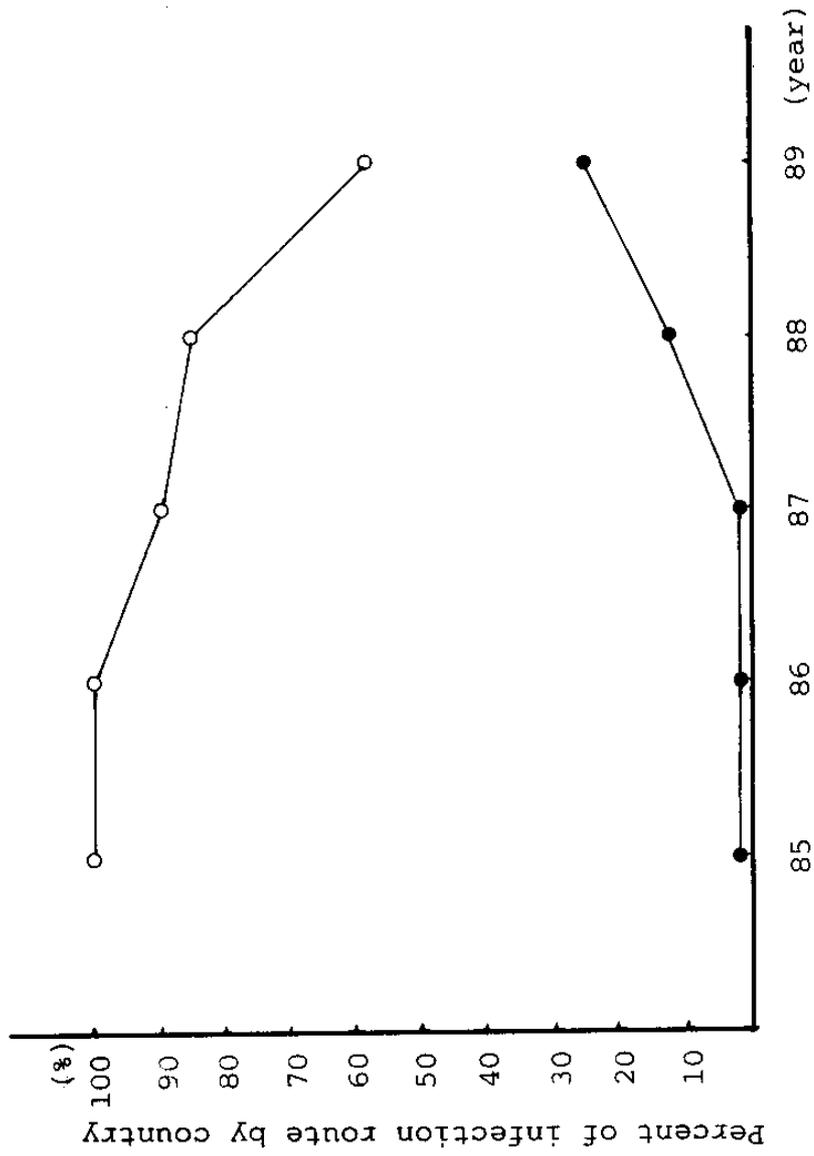


Fig. 5. Trend of HIV infection according to source of infection in Korea.

o - o : infection by contact with foreigners.

• - • : infection among Korean with in the country.

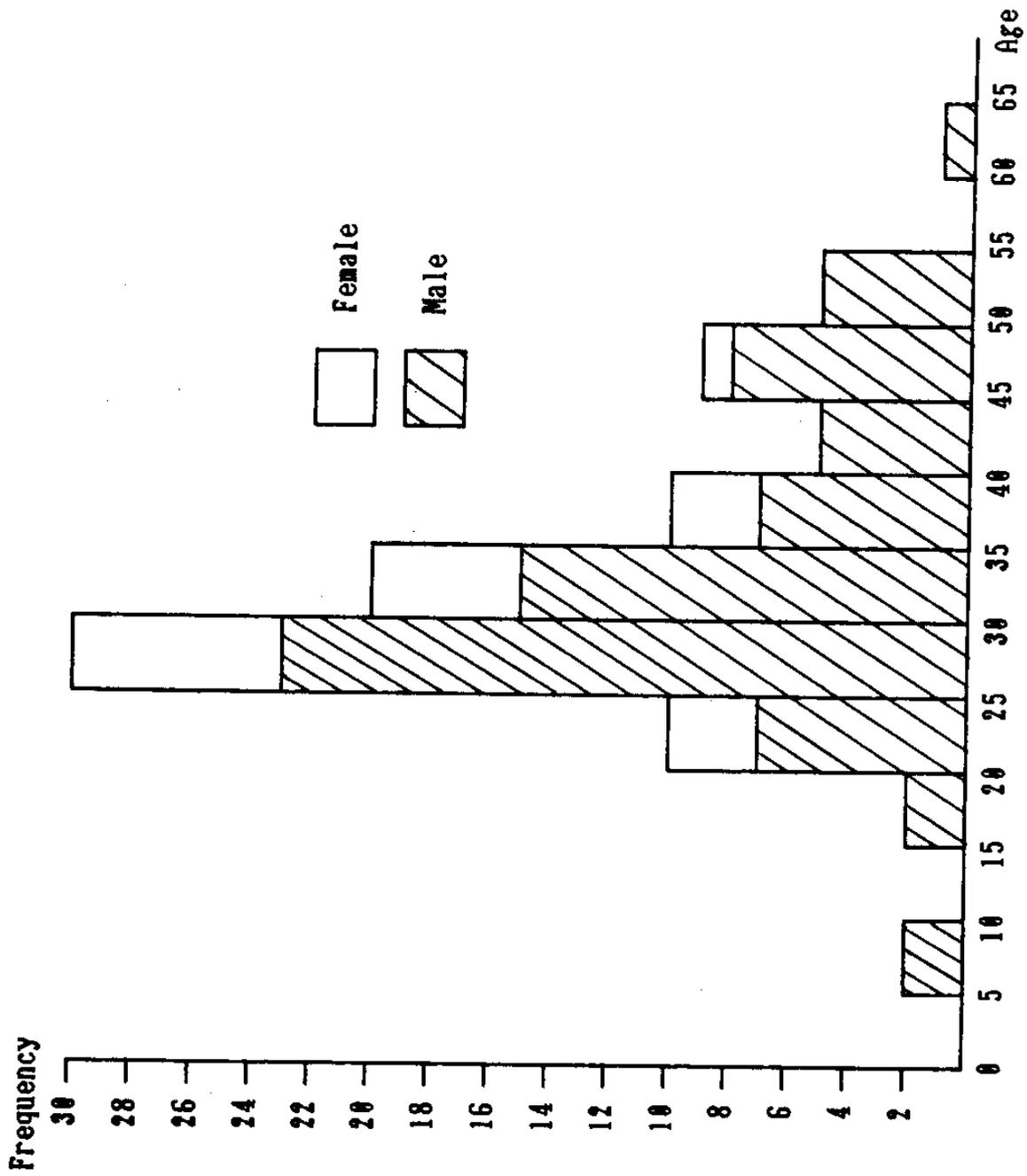


Fig. 6. Distribution of HIV infected persons and AIDS cases by age and sex.

Table 4. Distribution of HIV infected persons by age and sex

Age	Male	Female	Total	Percent
0 - 4	0	0	0	00.0
5 - 9	2	0	2	02.1
10 - 14	0	0	0	00.0
15 - 19	2	0	2	02.1
20 - 24	7	3	10	10.6
25 - 29	23	7	30	31.9
30 - 34	15	5	20	21.3
35 - 39	7	3	10	10.7
40 - 44	5	0	5	05.3
45 - 49	8	1	9	09.6
50 - 54	5	0	5	05.3
55 - 59	0	0	0	00.0
60	1	0	1	01.1
Total	75	19	94	100.0

Table 5. Distribution of HIV infected persons by region

Region	Male	Female	Total
Seoul	25	4	30
Pusan	22	3	25
Kyungkee	1	6	7
Kyungnam	8	2	10
Junbook	0	1	1
Junnam	6	2	8
Kyungbook	3	0	3
Kangwon	4	0	4
Inchon	2	0	2
Chungbook	1	0	1
Chungnam	1	0	1
Taegu	2	0	2
Total	75	19	94

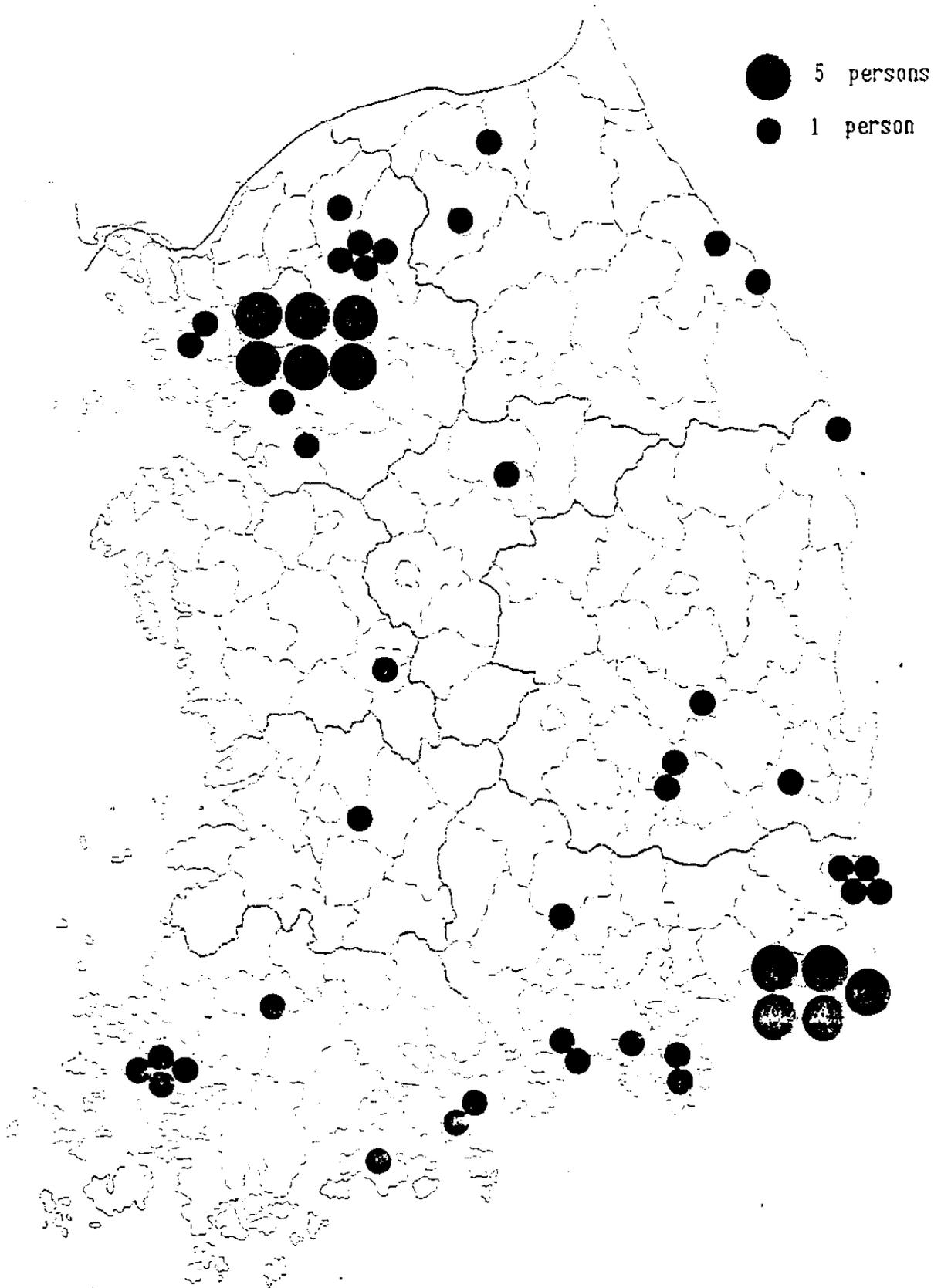


Fig. 7. Distribution of HIV infected persons by region.

이들 6건에 대하여 Centers for Disease Control (CDC)에서 다시 확인한 결과 5건은 HIV-1과 cross-reaction 되었음이 판명 되었고 1건이 HIV-2 감염가능성을 제시하고 있으며 lymphocyte로서 확인 시험중에 있다.

제 4 절 고 찰

우리나라에서와 같이 AIDS환자와 감염자가 극히 적은 나라에서는 검사 대상자의 선택에 따라 역학군별 감염자의 분포가 달라질 가능성이 극히 높다. 그러나 검사 건수가 증가되고 대상이 다양해짐에 따라 국내 HIV 감염에 관한 대체적인 윤곽이 밝혀지고 있다.

Table 6. Western blot pattern of 6 sera showing positive reactivity to HIV-2 ELISA

Specimens	HIV-2 Western blot bands						
	gp140	gp105	p68	p56	gp36	p26	p16
K-1	+++	+++	+++	++	+++	++	-
K-2	++	++	++	+	++	+++	D+
K-3	++	++	+	+	++	+++	D+
K-4	+	++	+	+	+	++	++
K-5	++	++	+	+	++	++	+
K-6	+	++	+	+	++	+++	++

+++ : strong reactivity, D+ : diffused band, ++ : some reactivity
+ : weak reactivity

1987년 이 전 초기단계에서는 윤락녀 등이 감염자의 대부분을 차지하였으나 이후부터 선원과 남자동성연애자 등이 새로운 감염자의 대부분을 차지하고 있으며 선원과 남성동성연애자 감염자가 증가되고 있다. 새로운 감염자 발견자가 1989년 및 1990년도에 계속 증가하고 있다. 이러한 추세는 일정기간이 경과되면 증가율이 둔화될 것으로 추정된다.

AIDS환자 발견은 1989년에 발견된 1명이 1990년에 사망한 것을 제외하면 현재 임상증세를 나타내는 환자는 아직 발견되지 않으나 감염자에 대한 면역검사를 참조할 때 일정 기간내 상당수의 감염자가 환자로 진전될 가능성이 높다.

현재에도 특수업태부에 대한 검사가 계속되고 있으나 미군자체내의 각종조치로 인하여 더 이상의 감염자 발견은 감소되어 1990년에는 1명에 불과하였다. 남자동성연애자 수는 계속 증가 추세에 있다. 이는 헌혈군으로부터 다수가 발견되었으며 선원의 상당수가 동성연애자인데 기인하고 있다.

국내 AIDS 감염자의 지역적 분포가 대도시와 외국군주둔 지역 및 항구도시에 집중된 것은 외국의 상황과 거의 일치하고 있다. 이는 외국인과의 빈번한 접촉, 선원들의 주소 그리고 도시의 성적 자유화등에 기인하는 것으로 생각된다.

아프리카로부터의 귀국자에 대하여 HIV-2 감염 가능성을 가정하고 이들에 대하여 HIV-2 ELISA 시험을 수행하여 35건의 양성 반응을 얻었으나 WB에서 대부분이 음성으로 판정되었다.

HIV-2 시험을 위하여 아직도 ELISA 시험의 문제점을 제시하고 있다. 6건이 WB에서도 양성이었으나 5건이 CDC에서 HIV-1 감염임이 시험되

있다.

HIV-2 가능성이 극히 높은 1건에 대하여 계속 추적시험중에 있으며 HIV-2로 확인되는 경우 그 의의는 크다고할 수 있다.

해외교포 AIDS 환자가 증가하지 않고 있는 것은 특이 현상으로 해석되고 있다. 이는 국내의 엄격한 AIDS 관리법을 인식한 환자 혹은 감염자가 귀국을 기피하는 것으로 해석되고 있다.

혈우병환자로서의 HIV 감염자는 1988년 이 후 발견되지 않아 일본에서와의 큰 차이점을 나타내고 있으며, 혈우병치료제의 엄격한 관리에 의해 새로운 감염자는 거의 없을 것으로 추산된다.

국내인 사이에서의 감염자 비율이 계속 증가되는 반면 외국인으로부터의 감염비율이 감소됨으로서 앞으로 AIDS 감염이 토착화 될 가능성이 높음을 제시하고 있다.

HIV 감염을 인식하지 못하고 있는 각종 감염자에 의한 국내 감염이 우려되고 있다. 대부분의 감염자 연령이 성활동계층인으로서 우리나라 AIDS 감염이 미국과 외국과는 상이하게 성활동에 의한 감염이 대부분이며 마약이나 수혈, 혈우병치료제에 의한 감염이 극히 적은 것으로 해석되고 있다.

우리나라에서 HIV 감염자 발견에 근거한 감염양상을 분석하는 경우 대부분 감염추정자에 대하여 시험이 불가능한 문제점을 갖고 있다. 그러나 이제까지 규명된바와 같이 해외장기독신거주자, 동성연애자, 외국인상대 윤락녀 및 감염자의 성적배우자 등이 우리나라에서 HIV 감염의 가장 위험군으로 제시되고 있다.

참 고 문 헌

1. 용군호, 신영오, 윤재득, 이홍래, 강춘, 최정희 : AIDS (후천성면역결핍증) 및 관련바이러스 감염증에 관한 연구, 국립보건원보, Vol.24,539-549,1987.
2. 용군호, 신영오, 윤재득, 이홍래, 강춘, 최정희, 김태규, 서교일 : 후천성면역결핍에 대한 바이러스학적 역학적 연구(Ⅱ), 국립보건원보, Vol.25,331-341,1988.
3. Friendland GH and Klein RS. Transmission of the human immunodeficiency virus: an updated review. Department of Medicine. Montefiore Medical Center. Albert Einstein College of Medicine. Bronx. N.Y, Int. Nurs. Rev. 35(2): p44-52, 54, Mar-Apr. 1988.
4. Le Pont F, Costagliola D, Massari V and Valleron AJ. Blood donation and HIV infection: impact of seroconversion delay on the sensitivity of the testing procedure. Rev Epidemiol Sante Publique, 37(2): p97-102, 1989.
5. Kevin M Cahill, The AIDS Epidemic. ST. Martin's Press, New York, 7, 1983.
6. Molbak K, Lauritzen E and Fernandes D et al., Antibodies to HTLV-IV associated with chronic, fatal illness resembling "Slim" disease, Lancet II. 1214-1215, 1986.
7. Barbara JA, Salker R, Challis P and Contreras M. Gelatin particle agglutination assay for HIV antibodies: a rapid economical modification with increased sensitivity. Med. Lab. Sci. 46(2): p135-140, Apr. 1989.

8. Ohya K, Morishima Y, Funato E, Hasegawa I and Kamiya T. Screening of blood donors for antibody to human immunodeficiency virus.
9. Gallo D and Diggs JL et al. Comparison of detection of antibody to the acquired immune deficiency syndrome virus by enzyme immunoassay, immunofluorescence, and western blot methods. *J. Clin. Microbiol* 23: 1047-1051, 1986.
10. Sarngadharan MG, Popovic M and Bruch L et al., Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS, *Science* 224: 508, 1984.
11. Esteban JI, Chang-chin T and Kay JWD et al., Importance of Western blot analysis in predicting infectivity of anti-HTLV-III/LAV positive blood. *Lancet*, 1083-1086, 1985.
12. Joanne R, Higgins, Niels C, Pedersen, and James R, Carlson: Detection and Differentiation by Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Human Immunodeficiency Syndrome-associated Retrovirus like Clinical Isolates. *J. Clin. Microbiol.* Sept. 424-430, 1986.
13. Lawrence S. Kaminsky, Thomas McHugh, Daniel Stites, Paul Volberding, Gertrude Henle, Werner Henle, and Jay A. Levy: High prevalence of antibodies to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus (ARV) in

- AIDS and related conditions, but not in other disease states.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5535-5539, 1985.
14. James R. Carlson, Josnn Yee, Steven H. Hinrichs, Martin L. Bryant, Murray B. Gardner, and Niels C. Pedersen: Comparison of Indirect Immunofluorescence and Western Blot for Detection of Anti-Human Immunodeficiency Virus Antibodies. J. Clin. Microbiol. Mar. 494-497, 1987.
 15. Dana Gallo, Marjorie N. Hoffman, Cynthia K. Cossen, Janice L. Diggs, Jerry W. Hurst, and Larry M. Penning: Comparison of Immunofluorescence, Enzyme Immunoassay, and Western Blot (Immunoblot) Methods for Detection of Antibody to Human T-cell Leukemia Virus Type I. J. Clin. Microbiol. Aug. 1487-1491, 1988.

2. 한국인 Human immunodeficiency virus (HIV) 항체양성자의 매독 및 B 형간염 감염

제 1 절 서 설

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)는 1981년 미국에서 처음으로 임상학적으로 확인되고¹⁾, 1983년에 불란서의 Sinoussi등에 의하여 Human immunodeficiency virus (HIV)란 전혀 새로운 retro-virus가 원인 병원체임을 규명하였다²⁾.

우리나라에서는 1985년 미국인 첫 환자가 발견된 이래에³⁾ 환자를 포함한 감염자가 해마다 급격히 증가하고 있어 큰 문제가 되고 있다.

AIDS의 전파는 혈액제제를 포함한 혈액이나 성교시의 체액, 그리고 모유등에 의하여 이루어지며 역학적 감염양상은 지역에 따라 상이하다.

우리나라에서는 제3형의 역학양상을 보이는 지역으로서 주로 외국으로부터 유입되어 감염되고 있으나, 동성연애군 등에서는 감염이 국내인에서 토착화 되어 가고 있다⁴⁾. 우리나라에서의 HIV 감염은 70~80%가 성적으로 매개되며 혈액에 의한 감염은 극히 적은 것으로 판명되었다⁵⁾. 따라서 각종 성매개 질환의 위험군은 HIV 감염의 위험군이 되고 있다. 아프리카, 미국등 AIDS환자 발생이 높은 나라에서는 매독, 임균, genital warts등의 감염이력을 가진 자나 현성 감염자에게서 HIV감염자가 많음을 나타내 주고 있다⁶⁾.

특히 상피세포 파괴를 동반한 성매개 질환 환자에게서의 HIV 감염은

정상대자의 수나 형보다 더 큰 상관성을 가진 것으로 보고 되었다⁷⁾.

HIV감염자에서는 매독등 성매개 병원체 이외에 Hepatitis B virus (HBV), Cytomegalovirus (CMV) 및 Herpes simplex virus (HSV) 등 바이러스 감염율이 높은 것으로 보고되고 있다⁷⁾.

HIV와 HBV의 유행양상은 극히 비슷하여 AIDS환자 발견 초기에는 HBV가 AIDS의 원인병원체로 주장되기도 하였다⁸⁾. 스페인에서 남자 동성연애자 및 재소자 군에서의 HBV와 HIV 상관성은 매독보다 더 높은 것으로 보고 되었다⁹⁾.

우리나라에서는 HIV 감염자의 상당수가 성매개에 의하여 감염됨이 규명됨에 따라 이들의 매독, HBV등 성매개 질환의 감염상황을 규명할 필요성이 증대되고 있다.

이에 본 연구에서는 동성연애자등 각종 역학특이성을 가진 HIV 감염자에 대하여 매독 및 HBV에 대한 감염율을 조사하여 그 결과를 보고한다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 대상자

1985년에서 부터 1989년까지 ELISA, Western blot, IFA, PA등의 혈청학적 시험방법에서 일치하게 HIV-1에 대한 항체 반응을 나타낸 사람의 혈청중 보관상태가 좋고, 그 양이 실험하기에 충분한 가를 고려하여 매독 실험시에는 이 중 49명을, HBV실험에는 43명을 선별

하여 실험하였다.

또한 대조군으로는 선원 105명, 동성연애자 61명의 혈청을 취하여 ELISA 실험법으로 HIV에 대한 항체 음성반응을 확인한 후 매독 실험을 하였으며, 이중 무작위로 선원 20명, 동성연애자 20명을 선별하여 간염 비교 실험을 하였다.

2. 실험방법

(1) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 시험

대조군에 대한 HIV 항체가 측정은 상용으로 시판되고 있는 ELISA 방법을 사용하였다. 먼저 H9 등 각종 세포주에서 배양한 HIV를 정제하여 항원으로 coating시킨 microplate에 가검혈청을 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 세척제로 4~5회 세척한 후 효소를 표식한 anti-human IgG 콘쥬게이트를 가하여 30분간 반응시켰다. 반응후 세척하여 과산화수소에 녹인 ortho-phenylenediamine (OPD) 등의 기질을 가하여 실온에서 30분간 발색시켜 흡광도(optical density, OD)를 ELISA 판독기로 측정하였다. 자세한 실험방법 및 판독기준은 제품의 설명서에 따랐다^{10,11)}.

(2) 웨스턴브롯(Western blot, WB) 시험

Dupont사에서 공급하는 상업시약을 사용하여 실험 지침서에 따랐다. 가검혈청을 nitro-cellulose paper에 작용시킨 후 혈청을 버리고 micro shaker에서 세척하였다. 효소표식 anti-human IgG 콘쥬게이트를 가하고 실온에서 1시간 동안 작용시켰다. 효소에 대한 기질을 작용

시킨 다음 band 형성을 육안으로 판독하였다. gp160/gp120, gp41 및 p55, p31 및 p24등이 완전하게 나타날때 양성으로 판독 하였다.

(3) 면역형광항체 (Immunofluorescent antibody, IF) 시험

H9/HTLV-Ⅲ 세포를 배양한 후 세포부유액을 만들어 slide에 떨어뜨려 건조시킨 다음 냉 acetone 혹은 메타놀에 10분간 정치시켜 고정하였다. 40배로 희석한 가검혈청 20 μ l를 고정시킨 세포에 떨어 뜨리고 포화습도 상자에서 30분간 작용시킨 후 인산완충액으로 세척하였다. Fluorescent isothiocyanate (FITC)로 표식한 anti-human IgG conjugate를 20 μ l씩 적하시켜 37°C에서 30분 작용시킨 다음 PBS로 세척한후 형광현미경으로 검경하였다.

(4) 입자응집 (Particle agglutination, PA) 시험

HIV 정제항원을 가한 gelatin입자에 혈청을 가하고 37°C에서 작용시켜 일정시간 후 응집여부를 관찰하였다. Fujirebio사의 시약을 사용하였으며 실험방법은 동사의 실험 지침서를 따랐다.

(5) 매독 혈청시험

HIV 항체양성자 및 음성대조군의 매독 혈청시험은 Rapid plasma reagin test (RPR)와 Treponema hemagglutination test (TPHA) 방법을 병행하여 실험하였다.

RPR 방법은 Wellcome사 제품을 사용하였다. 각 혈청 혹은 plasma를 50 μ l씩 반응 card에 떨어뜨리고 항원용액을 한방울씩 떨어뜨려 혼합한 후 8분간 반응시킨다. 반응 후 검은 입자의 응집이 생긴 것은 양성

으로 판독 하였다^{12,13)}.

TPHA 방법은 Fujirebio사 제품을 사용하였으며 그 방법은 먼저 가검 혈청을 소시험관에 1:80, 1:160등으로 희석하여 상온에서 30분간 방치 하였다. Hemagglutination (HA) tray에 옮긴 후 감작 입자와 미감작 입자를 떨어뜨려 잘 혼합한 후 정치하여 3~4시간 후에 1차 판정을 하고 약 18시간 후에 2차 판정을 하였다.

그 결과 판독에 있어서는 Fujirebio사의 분류기준에 따랐는데 RPR과 TPHA가 동시에 음성인 것은 음성, RPR이 양성이고 TPHA가 음성인 것은 위양성 반응으로 간주하였으며, RPR이 음성 혹은 양성이고 TPHA가 양성인 것은 진구매독이거나 자연치료매독 또는 잠재매독으로 보고 일단은 매독항원에 노출되었던 것으로 간주하여 매독 양성반응자로 분류하였다.

(6) 간염표식인자시험

HIV 항체양성자와 음성대조군에 대한 검사는 HBsAg, anti-HBs, anti-HBc 검출 실험을 병행하였으며, 시약으로는 Abbott사의 ELISA시약을 사용하였다. Anti-HBs 검출시에는 indirect ELISA method를 사용하였다. 300 μ l의 혈청에 항원이 coating된 bead를 넣고 40°C에서 2시간 반응시킨 후 3회 세척한다. 여기서 anti-human IgG 콘쥬게이트를 200 μ l 넣고 40°C에서 2시간 반응시켜 세척한 후 bead를 소시험관에 옮겨 기질을 300 μ l 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 발색 후 1ml의 반응정지액을 넣고 OD값을 측정하였다. HBsAg과 anti-HBc 검출은 경쟁적 저지방법 (competitive inhibition method)에

의한 ELISA 방법을 사용하였으며 먼저 100~200 μ l의 검체와 50~200 μ l의 anti-HBV 콘주게이트를 동시에 넣고 여기에 항원이 coating된 bead를 각각 넣었다. 40°C에서 2시간 반응시킨 후 3~5회 세척 후 bead를 소시험관으로 옮겼다. 여기에 기질을 300 μ l 넣어 30분간 발색시킨 후 1ml의 반응정지액을 넣어 OD값을 측정했다^{14,15,16}.

세가지 실험 모두에서 음성반응이 나온 것은 음성, anti-HBs나 anti-HBc의 양성. 음성에 관계없이 HBs Ag이 양성이면 간염보균자(carrier), HBs Ag이 음성이면서 anti-HBs가 양성이면 자연면역이거나 백신에 의한 protective한 immune이 있는 사람으로 간주하였다.

또한 세가지 실험중 어느 한 실험에서라도 양성반응이 나온 것은 HBV에 일단은 노출되었던 것으로 간주하였다.

제 3 절 실험결과

1. HIV 항체 양성자의 매독 감염

성활동 계층에 속하는 HIV항체 양성자 49명에 대하여 RPR 및 TPHA방법으로 매독 감염을 시험하였다. 선택한 HIV항체 양성자는 선원 21명, 업태부 9명, 군인 2명, 기타 17명이었다.

시험결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 선원 21명 중 4명(19.0%), 특수업태부 9명 중 2명(22.2%)이 매독에 감염되었으나 군인은 감염자가 없었다. HIV 항체 양성자의 직업군간의 매독 감염율에는 유의적인 차이가 없었다 ($P > 0.05$).

Table 1. Serological markers for Syphilis infection in HIV seropositive persons

	Number tested	Only RPR ⁺ pos.	Only TPHA ⁺⁺ pos.	RPR and TPHA pos.	Prior exposure
Sailor	21	1 (4.8)	2 (10.5)	2 (10.5)	4 (19.0)
Prostitute	9	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)	2 (22.2)
Soldier	2	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Others	17	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (57.1)	4 (23.5)
Total	49	1 (2.0)	2 (3.9)	8 (16.3)	10 (29.4)

+RPR : Rapid plasma reagin card test
 ++TPHA: Treponema hemagglutination test
 * () : Reaction percent

성행위별에 따른 매독 감염율은 정상 성생활자 39명 중 6명인 15.4%의 감염율을 보인 반면 동성 연애자는 10명 중 4명인 40.0%의 높은 감염율을 보였다 (Table 2).

Table 2. Serological markers for Syphilis infection in HIV seropositive persons.

	Number tested	Only RPR pos.	Only TPHA pos.	RPR and TPHA pos.	prior exposure
Heterosexual	39	1 (2.6)	2 (5.2)	4 (10.3)	6 (16.3)
Homosexual	10	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (40.0)	4 (40.0)
Total	49	1 (2.0)	2 (4.1)	8 (16.3)	10 (20.4)

* () : Reaction percent

2. HIV감염 여부에 따른 위험군의 매독 감염

실험에 사용한 선원, 동성연애자의 가검 혈청에 대하여 HIV 감염 여부에 따라서 매독 감염을 시험하였다.

Table 3에서와 같이 HIV 양성자는 49명 중 10명인 20.4%의 매독 감염을 보인 반면, HIV 음성자는 166명 중 13명인 7.8%가 매독에 감염되었다. HIV 양성자와 음성자 집단 사이의 매독 감염율에 유의적인 차이가 있었다 ($P < 0.05$).

Table 4는 126명의 선원에 대하여 매독반응 시험을 한 결과로 HIV 감염자는 21명 중 4명으로 19.0%의 매독 양성율을 보인 반면 HIV 음성자인 선원 105명은 5명인 4.8%만이 매독 감염율을 보였다 ($P < 0.05$).

Table 5는 71명의 동성 연애자에 대하여 매독반응 시험을 한 결과로 HIV 감염자 10명 중 4명으로 40.0%가 매독 감염자로 판정된 반면 HIV 비감염자는 61명 중 8명으로 13.1%의 매독 감염율을 보였다 ($P < 0.05$).

Table 3. Serological markers for Syphilis infection, according to HIV status

	Number tested	Only RPR pos.	Only TPFA pos.	RPR and TPFA pos.	Prior exposure
HIV seropositive	49	1(2.0)	2(4.1)	0(16.3)	10(20.4)
HIV seronegative	166	14(8.4)	7(4.2)	6(3.6)	13(7.8)
P Value		>0.05	>0.05	<0.002	<0.05

* () : Reaction percent

Table 4. Serological markers for Syphilis infection in sailor, according to HIV status

	Number tested	Only RPR pos.	Only TPHA pos.	RPR and TPHA pos.	Prior exposure
HIV seropositive	21	1(4.8)	2(9.5)	2(9.5)	4(19.0)
HIV seronegative	105	14(12.4)	1(1.0)	4(3.8)	5(4.8)
P Value		>0.05	<0.05	>0.05	<0.05

* () : Reaction percent

Table 5. Serological markers for Syphilis infection in homosexual, according to HIV status

	Number tested	Only RPR pos.	Only TPHA pos.	RPR and TPHA pos.	Prior exposure
HIV seropositive	10	0(0.0)	0(0.0)	4(40.0)	4(40.0)
HIV seronegative	61	1(1.6)	6(9.8)	2(3.3)	8(13.1)
P value		>0.05	>0.05	<0.001	<0.05

* () : Reaction percent

3. HIV항체 양성자의 HBV감염

무작위로 취한 43명의 HIV항체 양성자에 대해 HBV감염 여부를 시험한 결과는 Table 6과 같다.

Table 6. Serological markers for Hepatitis infection in HIV seropositive persons

	Number tested	HBs Ag pos.	HBs Ag neg. anti-HBs pos.	Anti-HBc only pos.	Prior exposure
Sailor	19	3(15.8)	11(57.9)	1(5.3)	15(78.5)
Prostitute	9	0(0.0)	5(55.6)	2(22.0)	7(77.8)
Soldier	2	1(50.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(50.0)
Others	13	1(7.7)	9(69.2)	1(7.7)	11(84.6)
Total	43	5(11.6)	25(58.1)	4(9.3)	34(79.1)

* () : Reaction percent

HBs Ag 보유율은 11.6%, anti-HBs항체 보유율은 58.1%, anti-HBs 항체만 보유한 사람은 9.3%, HBV에 대한 폭로자는 34명으로 79.1%를 나타냈다. 이를 다시 직업별로 세분하면 선원 19명 중 15명인 78.5%, 윤락녀 9명 중 7명인 77.8%로써 직업군간의 HBV감염율에는 유의한 차이가 없었다.

Table 7은 HIV 양성자와 음성자의 HBV 감염율을 비교한 것으로 HIV 음성자는 40명 중 31명인 77.5%가 감염되어, HIV 양성자와 HBV

감염율에도 유의한 차이가 없었다.

Table 7. Serological markers for Hepatitis infection, according to HIV status

	Number tested	HBs Ag pos.	HBs Ag neg. anti-HBs pos.	Anti-HBc only pos.	Prior exposure
HIV seropositive	43	5(11.6)	25(58.1)	4(9.3)	34(79.1)
HIV seronegative	40	3(7.5)	27(67.5)	1(2.5)	31(77.5)
P value		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

* () : Reaction percent

4. HIV감염 여부에 따른 위험군의 HBV감염

39명의 선원 및 29명의 동성연애자에 대하여 HIV감염 여부에 따른 HBV항원 및 항체 보유상황을 시험하였다.

Table 8에서 보는 바와 같이 선원 중 HIV 양성자 19명에서 15명인 78.9%가 HBV 폭로율을 보인 반면 HIV 음성자 20명 중 18명인 90.0%가 HBV에 대한 폭로율을 보였다.

동성 연애자 중 HIV 양성자인 9명에서 7명인 77.8%가 HBV 폭로율을 보인 반면 HIV 음성자 20명 중 13명인 65.0%의 HBV 폭로율을 보였다 (Table 9).

선원 및 동성 연애자들의 배독 및 HBV감염 현황은 Fig. 1과 Fig. 2

Table 8. Serological markers for Hepatitis infection in sailors, according to HIV status

	Number tested	HBs Ag pos.	HBs Ag neg. anti-HBs pos	Anti-HBc only pos	Prior exposure
HIV seropositive	19	3(15.8)	11(57.9)	1(5.2)	15(78.9)
HIV seronegative	20	3(15.0)	15(75.0)	0(0.0)	18(90.0)
P value		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

* () : Reaction percent

Table 9. Serological markers for Hepatitis infection in homosexuals, according to HIV status

	Number tested	HBs Ag pos.	HBs Ag neg. anti-HBs pos.	Anti-HBc only pos.	Prior exposure
HIV seropositive	9	2(22.2)	5(55.6)	0(0.0)	7(77.8)
HIV seronegative	20	0(0.0)	11(55.0)	2(10.0)	13(65.0)
P value		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

* () : Reaction percent

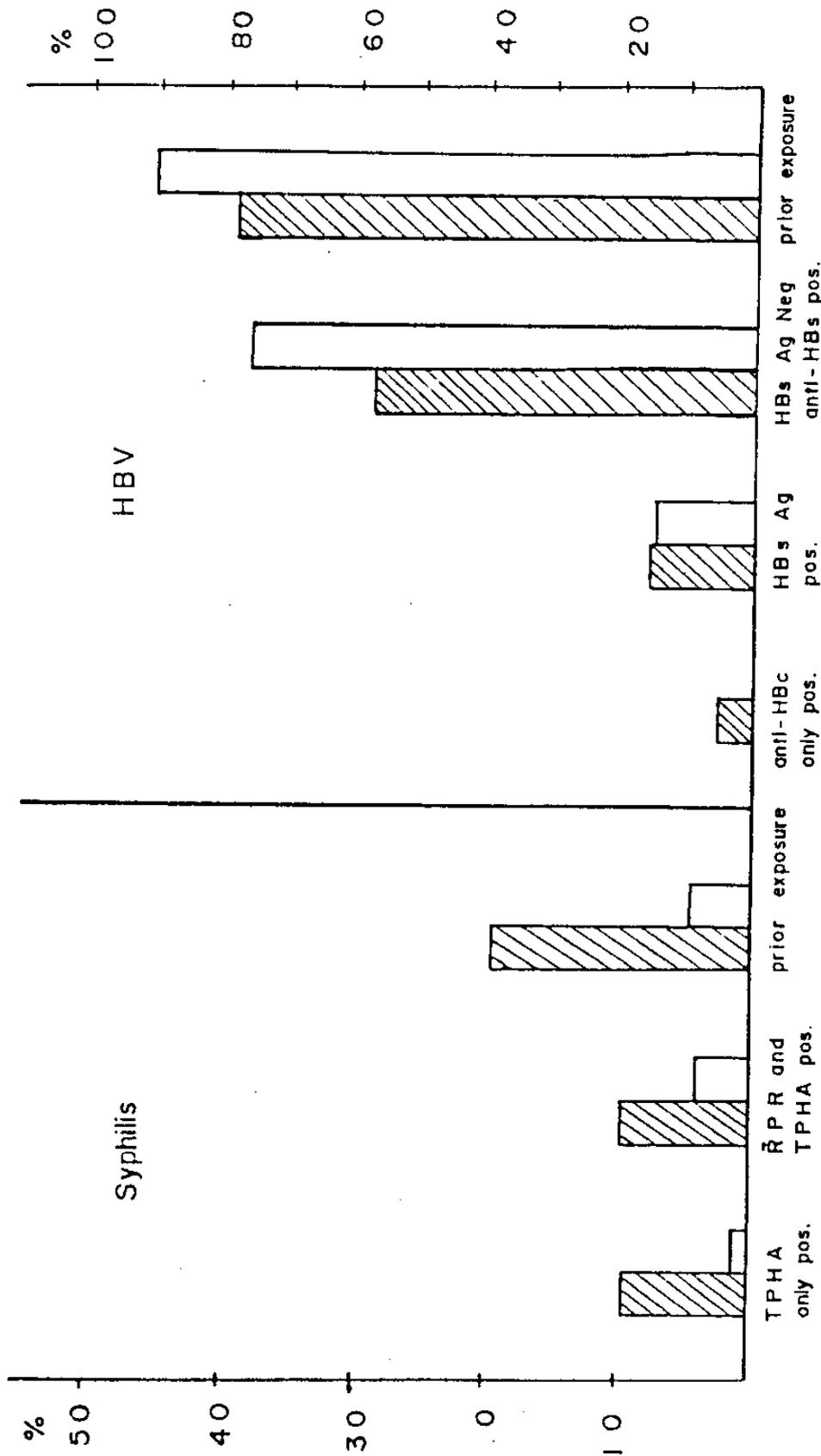


Fig. 1. Serological reactions to Syphilis and HBV among sailors by HIV infection status.

▨ : HIV infected persons, □ : HIV noninfected persons.

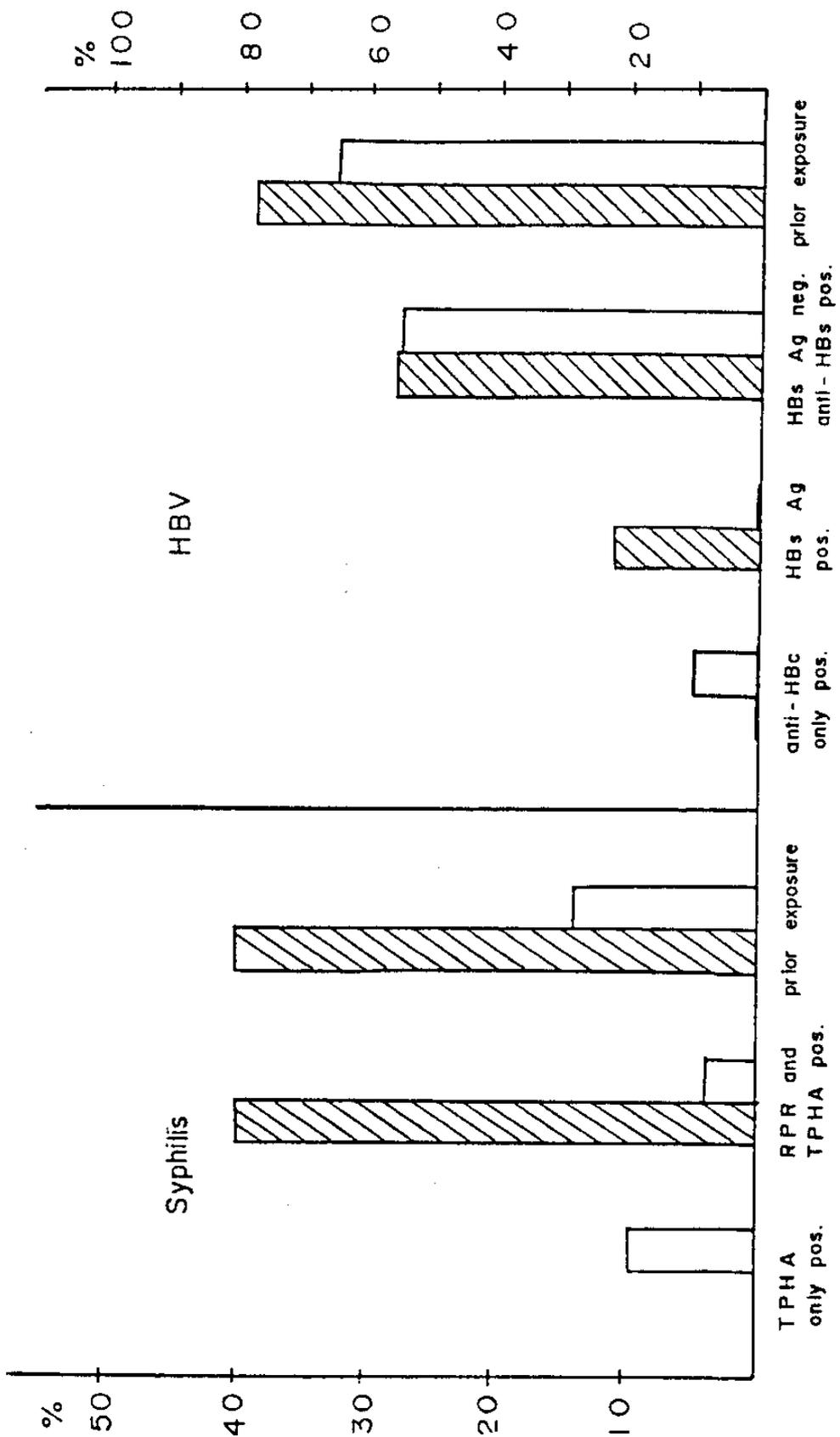


Fig. 2. Serological reactions to Syphilis and HBV among homo-
sexuals by HIV infection status.
 ■ : HIV infected persons, □ : HIV noninfected persons.

에 나타난 바와 같이 HIV 감염자의 매독율은 HIV 비감염자의 매독율보다 높았으나 HBV 감염율은 HIV 감염 여부에 무관하였다.

제 4 절 고 찰

1985년에 한국인 HIV 감염자가 확인된 이래에⁴⁾ 감염자 발견이 전 해의 2~3배 증가됨에 따라 우리나라에도 AIDS문제의 중요성이 증대되었다.

특히 申등의⁴⁾ 조사에 의하면 국내 감염자의 90%정도가 성매개에 의하여 전파됨이 확인되어 HIV 감염자에 대한 타 성매개 질환 감염에 대한 조사가 필수적으로 요구되었다.

본 연구에서 HIV 감염군의 매독 감염율은 20.4%로 HIV 비감염군의 매독감염율 7.8%보다 높게 나타났으며 이는 같은 성매개 위험군에서 HIV 양성자가 매독에 대해 보다 높은 감염의 위험성을 보여주었다. 특히 HIV에 감염된 동성연애자의 매독 감염율 40.0%는 HIV 비감염군의 동성 연애자의 매독 감염율 13.1%에 비해 극히 높은 감염율을 보였다. HIV 양성자 중 직업군에 따른 매독 감염율에는 별 다른 차이를 보이지 않아 직업군에 따른 차이보다 성행위 차이에 의한 매독 감염 가능성이 더 높음을 보여 주었다.

이렇게 HIV 양성자가 높은 율의 매독감염을 보이는 것은 우선 이들이 많은 수의 성 상대자를 접하는 등 성매개 질환의 위험군이기 때문인 것으로 추정된다. 이는 일반 한국인 성활동 계층의 매독 감염율 2.4%와

비교할때 지극히 높은 수치임을 보여준다¹⁷⁾. 연구에 사용된 매독 시험은 면역형광시험법이 사용되지 않아 감수성에 있어 문제점이 있다.

HBV감염에 관한 시험은 소수의 검사 건수에 의해 확정적인 해석에 문제점이 있으나 HBs Ag보유율 11.6%, 과거 폭로율 79.1%는 국립보건원에서 조사한 자료(미발간 자료)의 일반 한국인 HBs Ag 보유율 11.0% 과거 폭로율 72.1%와 별차이가 없는 것으로 판명되었다.

이는 HBV가 우리나라 사회에서 성인성 질환이라기 보다 식생활과 생활습성에 의해 높은 감염율을 이미 갖고 있기 때문에 HIV감염이나 성적 위험군과는 직접적인 연관성이 적은 것에 기인하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Gottlied M.S, Schroff R, et al.: Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. New England Journal of Medicine 305: 425, 1981.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann J, Reg F, et al.: Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for the acquired immune deficiency syndrome (AIDS): Science 229: 368-71, 1983.
3. Shin-Young Oh, Yong-Kun Ho et al.: Studies on HTLV-III (AIDS) and related virus infection. The report of NIH republic of Korea 509-550, 1987.
4. Shin-Young Oh, Lee-Hong Rei et al.: Serovirological study on Human Immunodeficiency virus (HIV) infection in Korea. Journal of Korea Society of virology 181-193, 1988.
5. Shin-Young Oh, Yong-Kun Ho et al.: Virological and epidemiological study on acquired immunodeficiency syndrom. The report of NIH republic of Korea 331-342, 1988.
6. Thomas C.Q, David G. et al.: Human immunodeficiency virus infection among patients attending clinics for sexually transmitted diseases. The New England Journal of Medicine 274-278, Vol. 319, No. 5, 1988.

7. Simonsen J.N, Cameron D.W et al.: Human immunodeficiency virus infection among men with sexually transmitted diseases. The New England Journal of Medicine 274-278 Vol. 10, No. 5, 1988.
8. Ravenholt R.T.: Role of Hepatitis B virus in acquired immunodeficiency syndrom. The Lancet 385-386, 1985.
9. Acedo, A, Campos A et al.: HIV infection, hepatitis and syphilis in spanish prisons. The Lancet 226, 1989.
10. Voller A, Bidwell DE et al.: ELISA in infection disease in "The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)" p51-53, 1979.
11. Curran JW, Lawrence SM et al.: Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions. The New England Journal of Medicine 319:60-75, 1984.
12. Coffey E et al.: Manual of clinical microbiology. 3rd Ed. p509-520 American Society for Microbiology, Washington D.C, 1980.
13. Schofield C.B.S.: Sexually transmitted diseases, 3rd Ed, Churchill Livingstone London and New York, 1979.
14. Wolters G, Kuijpers L et al.: Solid phase enzyme immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen. The Journal of Clinic Pathology 29:373-379, 1976.

15. David G.S, Present W et al.: Monoclonal antibodies in the detection of hepatitis infection. The Medical of Laboratory of Science 88:341-348, 1981.
16. Shin, JW-K, Cote P.J et al.: Production of monoclonal antibodies against Hepatitis B surface antigen (HBsAg) by somatic cell hybrids. The Journal of Virology of Methodology 1:257-273, 1989.
17. Park-Kee D, Kim-Ho H et al.: Studies on the sexually transmitted disease infection in Korea (I). The report of NIH republic of Korea 61-74, 1983.

3. HIV 감염자로 부터 바이러스 분리

제 1 절 서 설

1984년 미국에서 HTLV-Ⅲ와 AIDS-related virus (ARV) 라고 명명된 retrovirus가 AIDS 또는 pre-AIDS인 환자의 peripheral blood lymphocytes로부터 분리되었으며^{1,2)}, 또한 LAV₁이라는 유사한 바이러스가 프랑스에서 lymphadenopathy syndrome을 앓고 있는 환자에서 분리되었다³⁾. 핵산배열을 결정함으로써 이 두 종류의 바이러스는 동일바이러스의 variants라는 사실이 규명되었다⁴⁾.

1985년 국내에서 처음으로 Human immunodeficiency syndrome (AIDS) 환자가 발견된 이래 감염자의 조기발견을 위하여 항체시험대상자를 150만명 이상으로 증가시켰으며, 이로부터 꾸준한 감염자 증가가 나타났다^{5,6)}. 더구나 전세계적으로 AIDS 환자수가 미국의 10만명등 20만명을 상회하고 있으며, 국제교류가 증대함에 따라 국내의 AIDS환자 및 감염자수는 확산일로에 있는 것으로 추정되고 있다. 이에 본 연구자들은 국내 HIV 감염위험군으로 지목되고 있는 외국인상대 특수업체부, 위생업 소종사자, 동성연애자, 해외취업 외항선원 및 재소자, 헌혈자등에 대하여 1차로 혈청시험을 행하였으며 항체양성자로 규명된 사람들에 대해서는 바이러스 분리시험을 하였다. 더불어 HIV 항원의 존재, HIV 분리자 plasma에서의 바이러스 분리, 세포감수성 비교, 중화항체시험등을 행하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 사용세포 및 배양

면역형광시험의 항원 및 HIV 감염자로 부터 바이러스 분리에 사용하고자 H9/HTLV-Ⅲ, pooling된 정상인의 lymphocytes, HTLV-I 바이러스를 함유하고 있으며 HIV 감염에 의해 다핵거대세포를 형성하는 MT-2, H9세포주를 사용하였으며, OKT4⁺ 세포주인 HuT78, Jurkat, CCRF-CEM, MOLT-4, MT-4등의 세포를 확보하여 HIV 감염 및 증식시험을 하였다. MT-2, H9 및 H9/HTLV-Ⅲ 세포주의 origin은 이미 전년도 과기처 보고서에 기술된 바와 같으며, HuT-78, Jurkat, CCRF-CEM, MOLT-4등은 미국 ATCC에서 분양받았고, MT-4세포는 일본 NIH special pathogen laboratory로 분양받아 RPMI-1640 (GIBCO) 배지를 사용하여 본 실험실에서 계대배양하였다.

2. 림프세포로 부터 바이러스 분리

HIV 감염자 혈액으로 부터 림프세포 분리 및 바이러스 배양시험은 전년도 과기처 보고서에 기술된 바와 같다^{7,8,9,10}.

3. 역전사 효소 (RT, Reverse transcriptase) 시험

HIV 배양상층액으로 부터 RT를 측정하는 방법은 전년도 과기처 보고서에 보고된 바와 같다^{11,12,13,14}.

4. HIV 분리된 사람의 plasma로 부터 바이러스 분리시험¹⁵⁾

배양중인 MT-2, MT-4, Jurkat, MOLT-4등의 세포를 각각 1,200 rpm에서 10분간 원심하여 상층액을 제거한 후 각 침전세포에 0.2ml씩의 HIV 분리자 plasma를 접종하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS, GIBCO), penicillin (100 u/ml)-streptomycin (100µg/ml)이 함유된 RPMI-1640 배지로 suspension하여 각각 24 well plate에 1ml씩 분주하여 날짜별로 상층액을 취하여 RT activity를 측정하였다.

5. HIV에 대한 세포감수성 시험

HIV에 대한 H9 및 CCRF-CEM세포주의 감수성시험을 하였다. 배양중인 H9 및 CCRF-CEM세포를 원심하여 상층액을 제거하고 0.2ml의 HIV를 접종한 후 37°C에서 1시간 동안 감염시켰다. 10% FBS, penicillin (100 u/ml)-streptomycin (100µg/ml) 함유 RPMI-1640 배지로 suspension한 후 각각 24 well plate에 1ml씩 분주하고 날짜별로 상층액을 취하여 RT activity를 측정하였다.

6. HIV 항체양성 및 음성혈청과의 중화시험¹⁶⁾

HIV 항체양성 및 음성혈청을 각각 세척배지를 사용하여 10배 부터 2 fold로 80배까지 희석하였다. 각 희석된 혈청 1 ml에 HIV 1 ml을 넣어 4°C에서 2시간 반응시킨 후 4°C에서 5,000 rpm에서 20분간 원심하였

다. 원심상층액을 1 ml 씩 취하여 최종농도가 8%되게 polyethylene glycol (M. W. 6,000)로 농축한 다음 RT activity를 측정하였다.

제 3 절 실험결과

1. HIV 감염자로 부터 바이러스 분리

1985년 초부터 1990년 6월말 현재 HIV 항체양성자 60명의 림프세포로 부터 바이러스 분리를 시도한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 5명 (8.3%)에서 HIV가 분리되었는 바, 그 중 3명은 AIDS환자로 사망하였으며 나머지 2명은 무증상 감염자이었다. HIV 항원은 4명에서 탐지가 되었는 바 2명 (AIDS환자 1명 포함)에서는 plasma에서 나타났고, 2명으로 부터는 세포배양액에서 검색되었다. Table 2에 나타난 바와 같이 AIDS환자 6명 (모두 사망)중 3명에서 HIV가 분리되어 50%의 분리율을 나타냈으며, 무증상 감염자에게서는 4%로 매우 낮은 분리율을 보였다. Ag-capture ELISA 방법이 CPE, IFA, RT등 보다 더욱 민감한 것으로 판명되었다.

2. HIV 분리된 사람의 plasma로 부터 바이러스 분리시험

배양세포에서 HIV가 분리된 2명의 plasma를 각각 MT-2, MT-4, Jurkat, MOLT-4등의 세포에 접종하여 21일동안 관찰하여 RT activity를 측정한 결과 Fig. 1 및 Fig. 2와 같았다. 비록 21일경에 RT 수치가

Table 1. Identification tests of HIV from lymphocyte culture of infected persons

Method of No. detection of specimen	CPE	RT	IFA	ELISA	Remarks
1	-	-	-	-	
2	-	ND	-	-	
3	-	ND	ND	-	
4	-	ND	-	-	
5	-	ND	-	-	
6	-	-	-	-	AIDS
7	-	ND	-	-	
8	-	ND	-	-	
9	-	-	-	-	
10	-	ND	-	-	
11	-	ND	-	+	Plasma only
12	-	-	-	+	Plasma only, AIDS
13	-	-	-	-	
14	-	-	ND	-	
15	-	-	ND	+	
16	-	-	ND	+	
17	-	-	ND	-	
18	-	-	ND	-	
19	+	+	+	+	AIDS
20	+	+	+	+	AIDS
21	-	-	ND	-	
22	-	-	ND	-	
23	-	-	ND	-	
24	-	-	ND	-	
25	+	+	+	+	AIDS
26	-	-	ND	-	
27	-	-	ND	-	
28	-	-	ND	-	
29	-	-	ND	-	
30	-	-	ND	-	
31	-	-	ND	-	
32	-	-	ND	-	
33	-	-	ND	-	
34	-	-	ND	-	
35	-	-	ND	-	

Method of No. detection of specimen	CPE	RT	IFA	ELISA	Remarks
36	-	-	ND	-	AIDS
37	-	-	ND	-	
38	-	-	ND	-	
39	-	-	ND	-	
40	-	-	ND	-	
41	-	-	ND	-	
42	-	-	ND	-	
43	-	-	ND	-	
44	-	-	ND	-	
45	+	+	+	+	Asymptomatic
46	-	-	ND	-	
47	-	-	ND	-	
48	-	-	ND	-	
49	+	+	+	+	Asymptomatic
50	-	-	ND	-	
51	-	-	ND	-	
52	-	-	ND	-	
53	-	-	ND	-	
54	-	-	ND	-	
55	-	-	ND	-	
56	-	-	ND	-	
57	-	-	ND	-	
58	-	-	ND	-	
59	-	-	ND	-	
60	-	-	ND	-	

+ : Positive reaction, - : Negative reaction, ND : Not done
RT : Reverse transcriptase, IFA : Immunofluorescence antibody
test, ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

Table 2. HIV isolations from lymphocyte culture of 60 seropositive persons

Symptoms	Virus isolation	Methods	Positive	Negative	Total
AIDS		ELISA	4	2	6
		CPE	3	3	
		IFA	3	3	
		RT	3	3	
Asymptomatic		ELISA	5	49	54
		CPE	2	52	
		IFA	2	10	
		RT	2	44	
Total			9	51	60

* Some IFA tests were omitted when ELISA showed negative.

그 전의 수치보다 높았으나 정상세포 배양상층액의 수치와 큰 차이가 없었다.

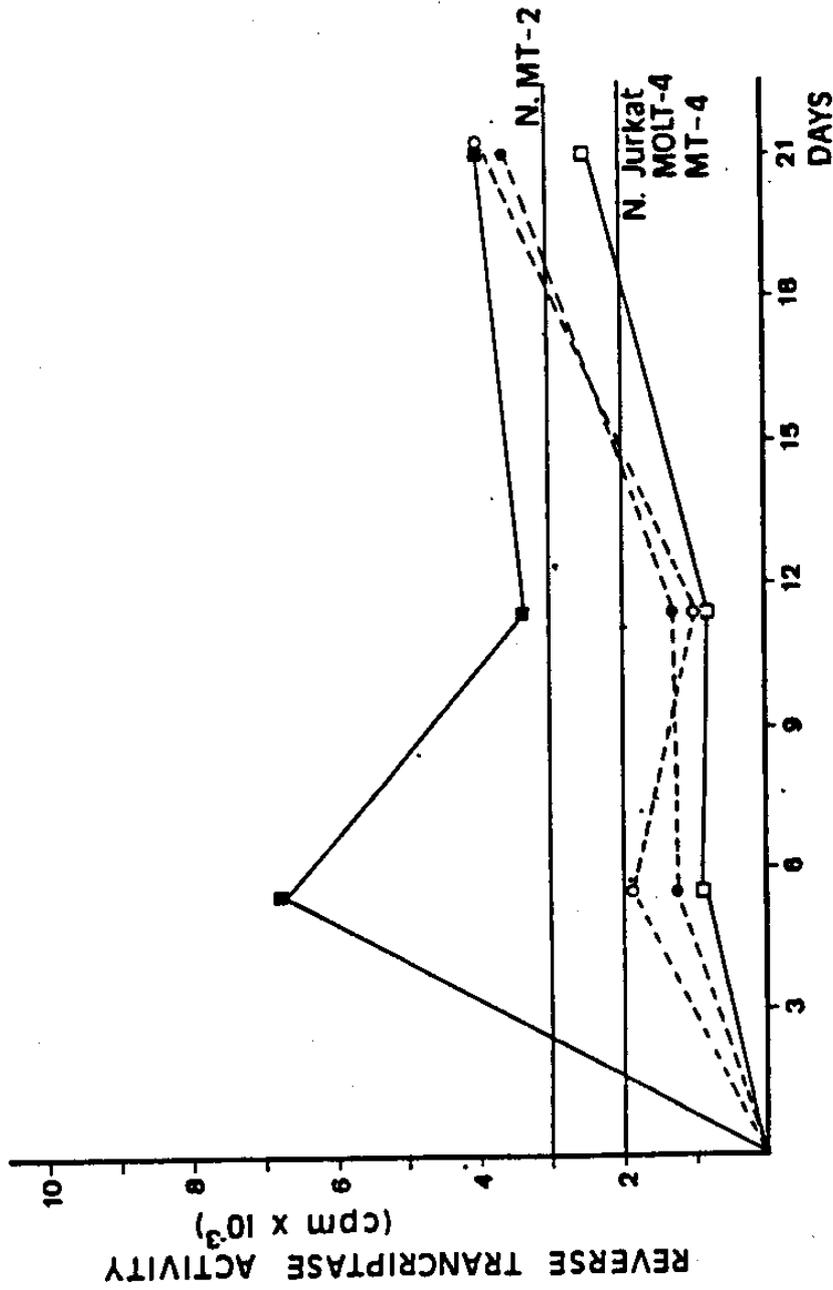


Fig. 1. RT activity of supernatant from Jurkat, MOLT-4, MT-2 and MT-4 cells infected with plasma from HIV-isolated person 1.

○-○: Jurkat cells, •-•: MOLT-4 cells,
 ■-■: MT-2 cells, □-□: MT-4 cells

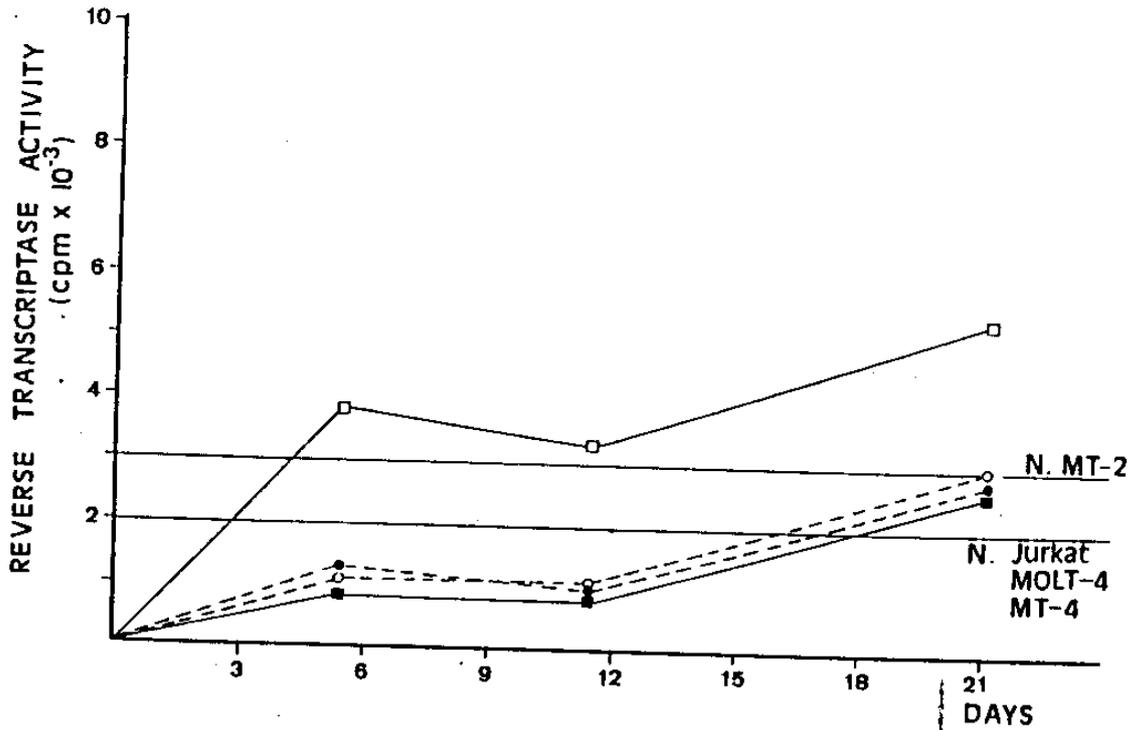


Fig. 2. RT activity of supernatant from Jurkat, MOLT-4, MT-2 and MT-4 cells infected with plasma from HIV-isolated person 2.

○-○: Jurkat cells, •-•: MOLT-4 cells,
 □-□: MT-2 cells, ■-■: MT-4 cells

3. HIV에 대한 세포감수성 시험

표준 HIV를 OKT4⁺세포주인 H9 및 CCRF-CEM에 접종한 후 23일 동안 관찰하면서 배양상층액을 취하여 시기별로 RT activity를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. H9세포에 접종된 HIV는 계속 증식하여 7일을 전후하여 최고의 RT 수치를 나타낸 반면, CCRF-CEM에 접종된 HIV는 증식하지 못하고 계속 낮은 수치를 유지하였다.

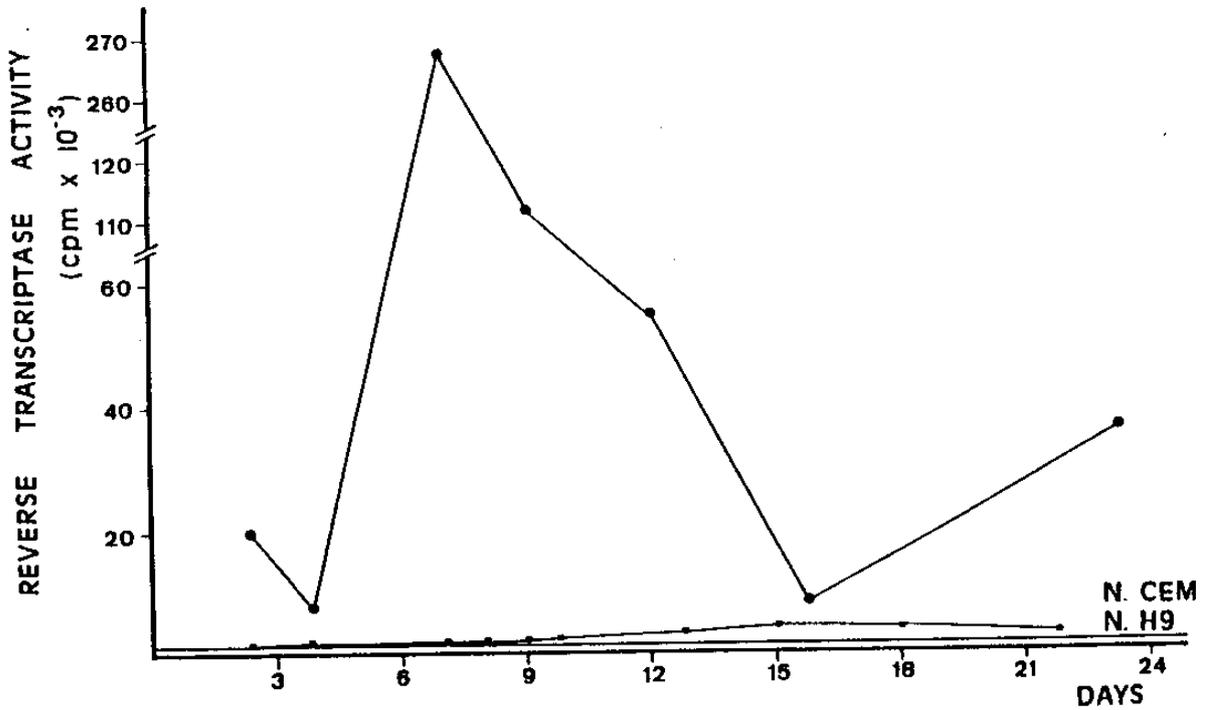


Fig. 3. Susceptibility test of H9 and CCRF-CEM cells to HIV-infection.

---○: H9 cells, ■—■ : CCRF-CEM cells

4. HIV 항체양성 및 음성혈청과의 중화시험

Fig. 4와 같이 양성혈청과의 중화에 있어서 10배 희석의 경우 거의 완전히 중화되어 RT 수치가 극히 낮게 나타났으며 (1,200 cpm/min), 혈청 희석배수가 늘어남에 따라 RT activity는 2배이상으로 증가하였다. 반면 음성혈청의 경우에는 10배 부터 80배 희석까지 RT 수치는 변동없이 매우 높은 값(200,000 cpm/min)을 유지하였다.

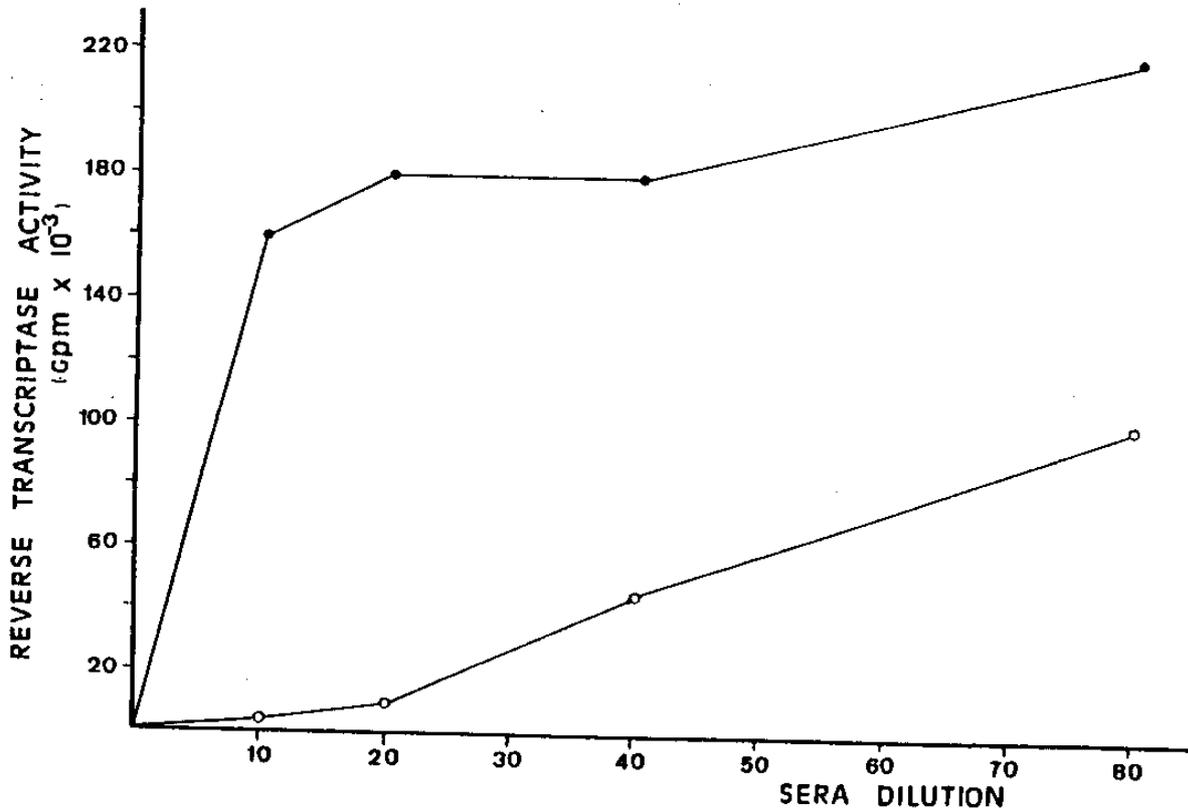


Fig. 4. Neutralization test of HIV with positive and negative sera.

○-○: positive serum, ●-●: negative serum

제 4 절 고 찰

1985년 국내에서 처음으로 HIV 양성자가 발견된 이래 매년 급속하게 감염자 및 환자가 증가하고 있다. 현재 HIV에 대한 여러가지 감염위험군이 존재하고 있으나 그 중 해외취업 외향선원들의 감염율이 급속히 증가하고 있다. HIV 감염자로 부터의 바이러스 분리는 질병발전과 상관관계가 깊은 것으로 사료되며, HIV가 분리된 감염자는 감염시기가 극히

오래 되거나 임상증상을 나타내는 경우가 대부분이었다. AIDS환자이면서 바이러스가 분리된 사람의 plasma를 취하여 HIV 분리시도를 하였는 바 전혀 검출되지 않은 점으로 보아 plasma내에 HIV양이 적기때문이라고 사료되며, 외국의 논문에서는 plasma내에 바이러스의 양이 많은 ARC상태에서 약 50%의 HIV 분리율을 나타내고 있다. HIV에 대해 좀 더 감수성이 있는 세포주를 확보하고자 CCRF CEM등과 같은 OKT4' 세포에 HIV를 감염시켰으나 전혀 바이러스의 증식이 이루어지지 않은 점으로 보아 세포표면에 HIV에 대한 receptor가 상실되었기 때문이 아닌가 사료되며, OKT4' 세포를 확보하기 위한 cell cloning이 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Shinji Harada, Yoshio Koyanagi and Naoki Yamamoto: Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and Application in a Plaque Assay. *Science*. 229:563, 1985.
2. M. Popovic et al., *Science* 224:497, 1984; J.A. Levy et al., *ibid.* 225:840, 1984.
3. F. Barre-Sinoussi et al., *ibid.* 220:868, 1983.
4. L. Ratner et al., *Nature (London)* 313:277, 1985; R. Sanchez-Pescador et al., *Science* 227:484, 1985; S. Wain-Hobson et al., *Cell* 40:9, 1985.
5. 용균호, 신영오, 윤재득, 이홍래, 강춘, 최정희: AIDS (후천성면역결핍증) 및 관련 바이러스 감염증에 관한 연구, *국립보건원보*, Vol. 24, 539-549, 1987.
6. 용균호, 신영오, 윤재득, 이홍래, 강춘, 최정희, 김태규, 서교일: 후천성면역결핍증에 대한 바이러스학적 역학적 연구 (II), *국립보건원보*, Vol. 25, 331-341, 1988.
7. Salahuddin SZ, Markham PD, Popovic M, Sarngadharan MG, Orhdorff S, Fladagar A, Patel A, Gold J and Gallo RC, Isolation of infectious human T-cell leukemia/lymphotropic virus type III (HTLV-III) from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS related complex (ARC) and from healthy carriers: A study of risk groups

- and tissue sources. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:5530, 1985.
8. Zagury D, Bernard J, Leonard R, Cheynier R, Feldman M, Sarin PS and Gallo RC, Long term cultures of HTLV-III infected T cells: A model of cytopathology of T cell depletion in AIDS. Science. Vol. 231:850, 1986.
 9. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al.: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 224:500, 1984.
 10. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, et al.: Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science. 224:497, 1984.
 11. Salahuddin S.Z., Markham P.D., Popovic M., Sarngadharan M.G., Orhodorff S., Fladagar A., Patel A., Gold J. and Gallo R.C.; Isolation of infectious human T-cell leukemia/lymphotropic virus type III (HTLV-III) from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related complex (ARC) and from healthy carriers: A study of risk groups and tissue sources. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 5530, 1985.

12. Dana Gallo, Jaculyn S. Kimpton and Peter J. Daily: Comparative studies on use of Fresh and Frozen Peripheral Blood Lymphocyte Specimens for Isolation of Cell Lysis of Isolation Efficiency. *J. Clin. Microbiol.* 1291-1294, 1987.
13. Hoffman, A.D., Banapour B. and Levy J.A.: Characterization of the AIDS-associated retrovirus reverse transcriptase and optimal conditions for its detection in virions. *Virology.* 147:326-335.
14. Mari Kannagi, Joanne M. Yetz, and Norman L. Letvin: In Vitro Growth Characteristics of Simian T-lymphotropic Virus type III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7053-7057, 1985.
15. S. Zaki Salahuddin, Phillip D. Markham, Mikulas Popovic and M.G. Sarngadharan: Isolation of infectious human T-cell leukemia/ lymphotropic virus type III (HTLV-III) from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related complex (ARC) and from healthy carrier: A study of risk groups and tissue sources. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5530-5531, 1985.
16. Alfred M. Prince, Donna Pascual and Luda Bardina Kosolapov: Prevalence, Clinical Significance, and Strain Specificity of Neutralizing Antibody to the Human Immunodeficiency Virus. *The Journal of Infectious Diseases.* 156: No. 2: 268-269, 1987.

제 Ⅲ 장 HIV 검사방법의 개선
Improvement of HIV
diagnostic methods

白承福,	申光淳
金慶子,	黃應洙
康 椿,	金聖俊
李榮鍾,	池桂淑
全暎主,	김은영

1. HIV 특이 Monoclonal 항체의 제작

제 1 절 서 설

1983년 Sinoussi등¹⁾에 의해 AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome)의 병원체가 HIV (Human Immunodeficiency Virus) 규명된 이래 HIV에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 HIV의 감염 여부를 밝히기 위해 여러가지 진단 방법이 개발되었으며 그 중 보편적으로 널리 사용되는 방법이 ELISA 방법이다. ELISA 시험방법은 비교적 높은 감도를 나타내고 있으나 특이도가 낮은 것으로 시험되고 있다²⁾. 기타 각종 항체 시험방법도 어느 정도의 비특이 양성 반응이 나타나는 것으로 시험되고 있다. 따라서 근래에 감도와 특이도를 높이기 위하여 monoclonal 항체를 사용하는 방법이 개발되고 있다³⁾.

1975년 monoclonal 항체 제조 기법이 개발된 후⁴⁾ 이 기법은 Measles virus에 대한 monoclonal 항체 생산⁵⁾, Rota virus 진단에의 응용^{6,7)}, Feline Leukemia virus의 연구⁸⁾ 등 다수의 질병 진단에 광범위하게 사용되고 있다.

HIV에 대한 monoclonal 항체 또는 감염 여부를 진단하기 위해 제조되었다⁹⁾. HIV이 p 24등과 같은 특이 항원들에 대한 monoclonal 항체는 감도 진단에 이용될 뿐 아니라 중화시험¹⁰⁾과 HIV 특이 항원의 생화학적, 면역학적 특성 규명^{11,12)} 등 여러 분야에 응용되고 있다.

따라서 HIV-1의 p 24, gp 120등과 같은 특이 항원에 대한

monoclonal 항체의 제조는 필수적인 사항이며, ELISA나 Western Blot시험 방법에 도입할 계획이다. 그리고 HIV 감염을 조기에 고감도 진단하기 위하여 HIV에 대한 monoclonal 항체를 생산하는 수 개의 hybridoma line을 얻었다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 항원분리

전보에 보고된 바와 같이 H9/HTLV-Ⅲ를 대량 배양하여 분리된 HIV-1 농축액을 항원으로 사용하였다.

2. 분리, 농축된 HIV-1 항원에서의 p 24 정량

HIV-1 p 24 Ag Capture-ELISA (Dupont Co., Fig. 1, Table 1)를 사용하여 분리, 농축된 HIV-1 항원에서 p24의 양을 결정하였다.

요약하면, 항원을 2단계 희석하여 OD 값을 측정하여 각각의 희석 단계별 ml 당 p 24의 양을 계산하였다.

3. 면 역

Balb/c를 이용한 면역은 Lutz등⁸⁾과 Higgins등⁹⁾의 방법을 참고하였다.

첫번째 면역을 HIV 항원 농축액 $2 \mu l$ 에 PBS를 섞어 $0.1 ml$ 로

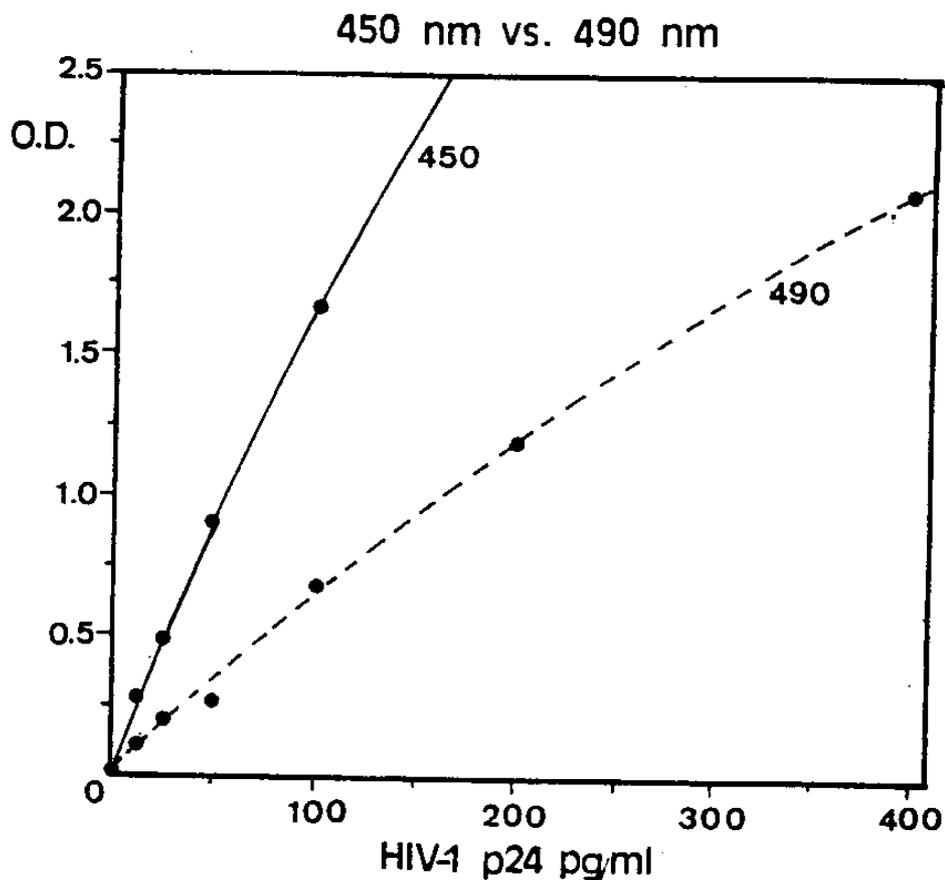


Fig. 1. Calculation curve for the quantitation of HIV-1 p24 Ag by HIV-1 p24 Ag Capture-ELISA.

Table 1. Calculation for the quantitation of HIV-1 p24 Ag

HIV-1 p24 Standard Concentration	O.D. (450 nm)	O.D. (490 nm)
0 pg/ml	0.020	0.046
12.5 pg/ml	0.113	0.276
25 pg/ml	0.200	0.488
50 pg/ml	0.368	0.906
100 pg/ml	0.682	1.671
200 pg/ml	1.203	2.911
400 pg/ml	2.083	3.916

만든 다음 0.1 ml의 Freund's complete adjuvant와 잘 혼합하여 복강내에 접종하였다. 계속되는 면역은 같은 양의 항원과 Freund's incomplete adjuvant를 혼합하여 복강내에 3주 간격으로 4~5회 접종하였다. 마지막 면역은 adjuvant 없이 꼬리 정맥에 접종하였으며 3일 후 세포융합에 사용하였다.

4. 효소면역분석법 (ELISA)

HIV항원 농축액을 1 : 2,000배로 희석하며 microplate에 100 μ l씩 넣고 4 °C에서 overnight coating시켰다. coating된 microplate를 PBS-Tween 20 buffer로 6회 세척한 다음 anti-HIV mouse serum과 normal mouse serum, 그리고 융합에 성공한 wells의 상층액 100 μ l를 넣고 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척하였다. Anti-mouse IgG-peroxidase conjugate를 1 : 2,000배 희석하여 100 μ l씩 넣고 동일한 조건으로 반응시킨 다음 세척하였다. 100 μ l의 기질 (OPD + H₂O₂/Substrate buffer)을 넣어 암소에서 30분간 정치시켰다. 50 μ l의 반응 정지액인 2 N H₂ SO₄를 넣고 ELISA 판독기로 492/620 nm에서 판독하였다.

5. 면역형광항체시험 (IFA)

H9 및 H9/HTLV-III 세포를 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 취하여 spot slide에 도말하였으며 공기 건조 후 cold acetone으로 10분간 고정시켜 사용하였다. FA buffer(Difco)로 3회 세

척한 다음 anti-HIV mouse serum과 normal mouse serum 그리고 융합에 성공한 wells의 상층액을 20 μ l 씩 처리하였다. 37 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 30분간 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척하였다. 1:40으로 희석된 anti-mouse IgG-FITC conjugate 20 μ l 를 처리하고 동일한 조건으로 반응시켰다. 반응 후 3회 세척하였으므로 FA mounting medium (Difco)으로 mounting시킨 다음 coverslip 을 덮고 형광현미경 (AO)으로 항체 존재 여부를 확인하였다.

6. Anti-HIV mouse serum의 Titration

세포융합을 하기 위해 HIV항원을 주사한 Balb/c 혈청의 역가를 확인하는 방법으로 ELISA와 IFA를 사용하였다.

ELISA의 경우 항원을 500, 1,000, 2,000, 4,000, 8,000, 16,000배 희석하여 microplate에 coating하였다. 여기에 mouse serum을 200, 400, 800, 1,000, 2,000배 희석하여 반응시켰다.

IFA의 경우 mouse serum을 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1,000배 희석하여 반응시켰다.

7. 세포융합 및 Cloning

면역된 Balb/c로 부터 비장세포를 분리하여 두번 세척한 다음 그 세포와 SP2-0/Ag 14의 비율이 10:1 되게 하였다. 융합물질로는 50% polyethylene glycol (PEG, Sigma, MW, 1300-1600)을 사용하였다. 융합된 세포들은 융합 전날 준비한 96 well plate에 100

μl 씩 분주하여 colony가 형성될 때까지 hypoxanthin-aminopterin-thymidine (HAT) 배지를 사용하여 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. Colony가 형성된 well중 anti-HIV 항체를 분비하는 well은 limiting dilution 방법으로 0.5 cell/well되게 cloning 하였다.

제 3 절 실험 결과

1. 분리, 농축된 HIV-1 항원에서 P 24의 검출

HIV-1의 항원 단계 희석하여 Ag Capture-ELISA한 결과 Fig. 2에서와 같이 p 24의 존재를 확인하였다.

2. HIV-1 p 24의 Calibration

1항에서 확인된 p 24의 OD값을 Fig. 1과 Table 1에 대입하여 각 희석 단계별로 p 24의 양을 계산하였다. Fig. 3은 단계 희석별 p 24의 양을 나타내고 있다.

3. HIV-1 p 24의 quantification

2항에서 계산된 p 24의 양을 각 희석 단계별로 희석되기 전의 양으로 환산하였다. 그리고 그 평균치를 구하여 Fig. 4에 나타냈다. 분리 농축된 HIV-1항원 농축액 ml 당 p 24의 양을 $1.112 \mu\text{g}$ 으로 확인되었다.

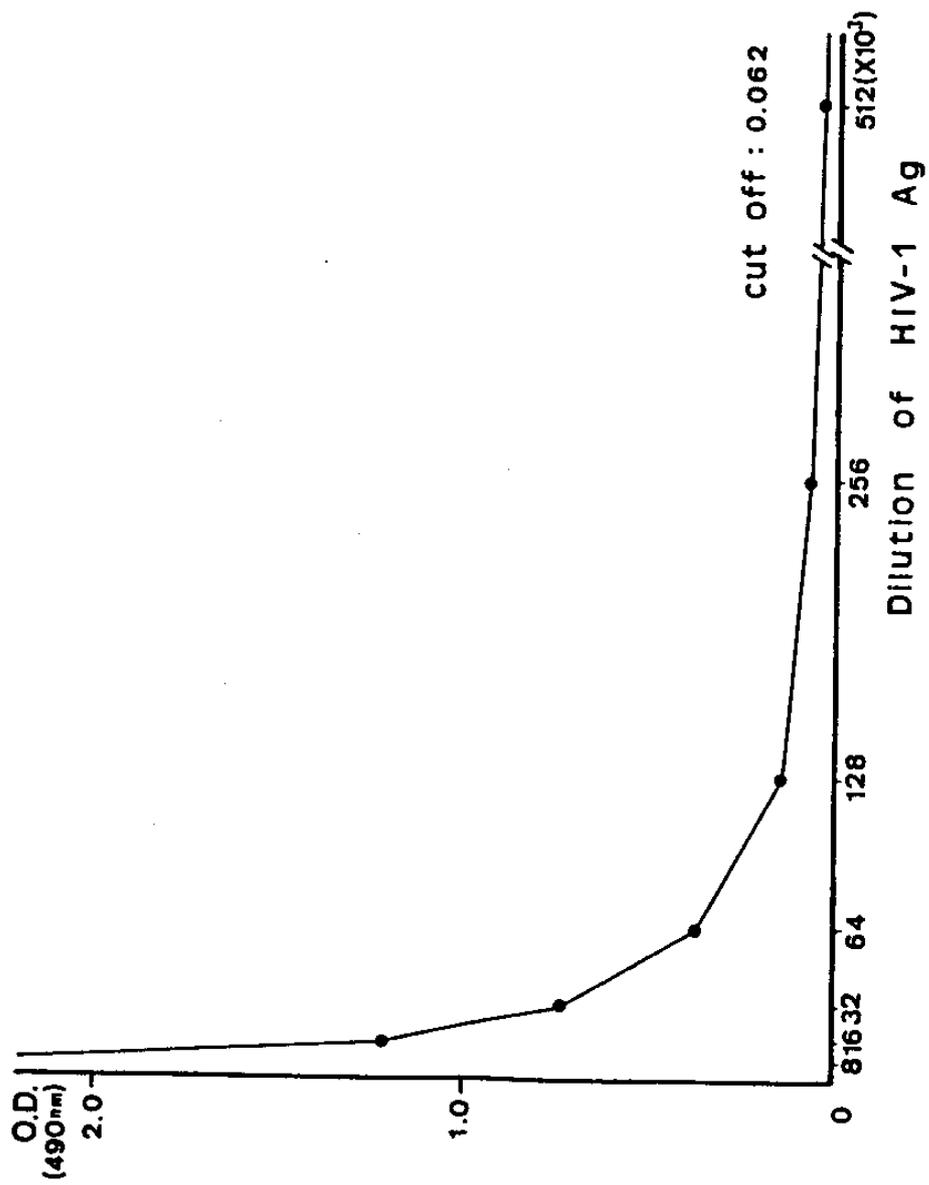


Fig. 2. Detection of HIV-1 p24 Ag from concentrated and isolated HIV-1 by HIV-1 p24 Ag Capture-ELISA.

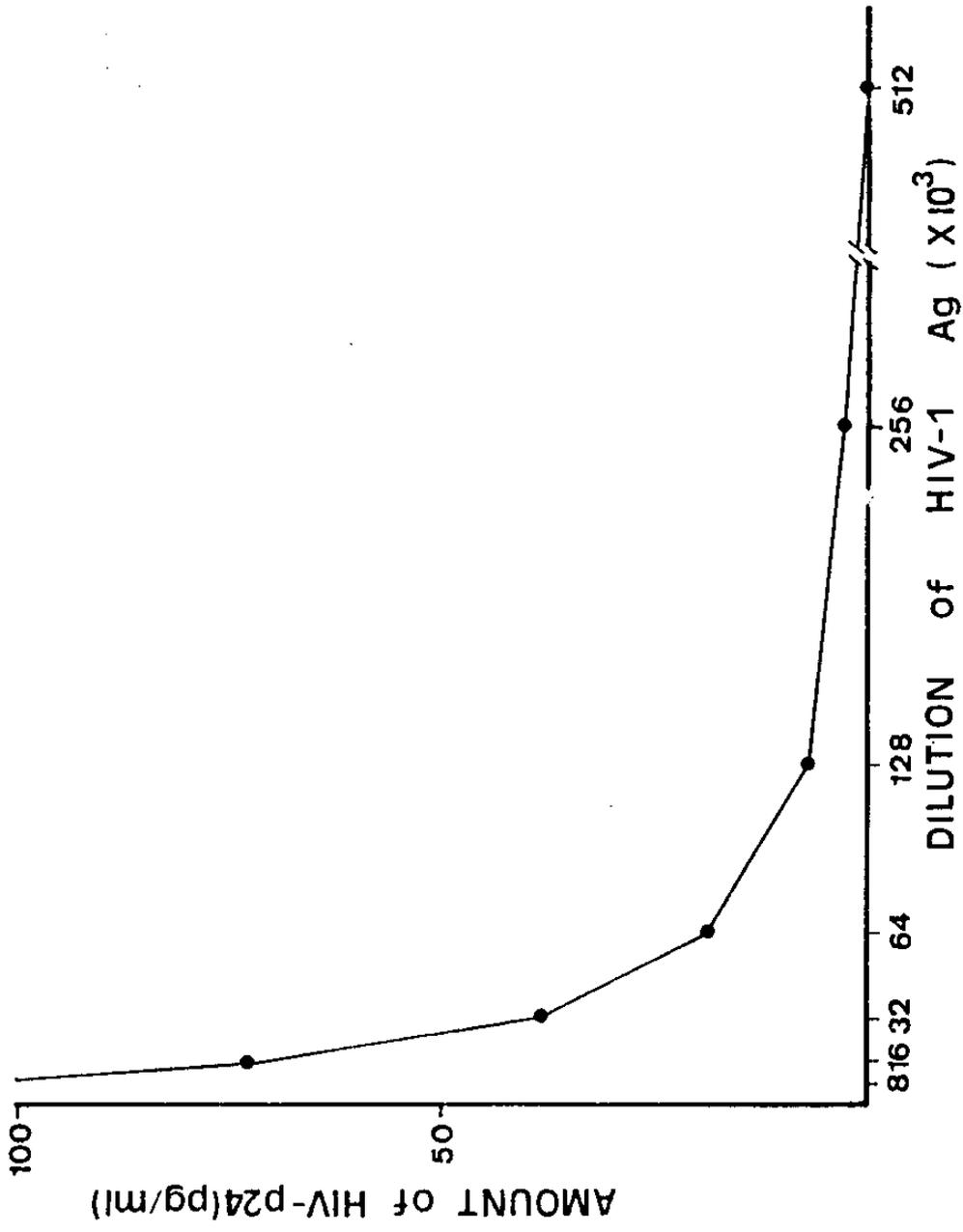


Fig. 3. Calibration of the amount of HIV-1 p24 Ag from concentrated and isolated HIV-1.

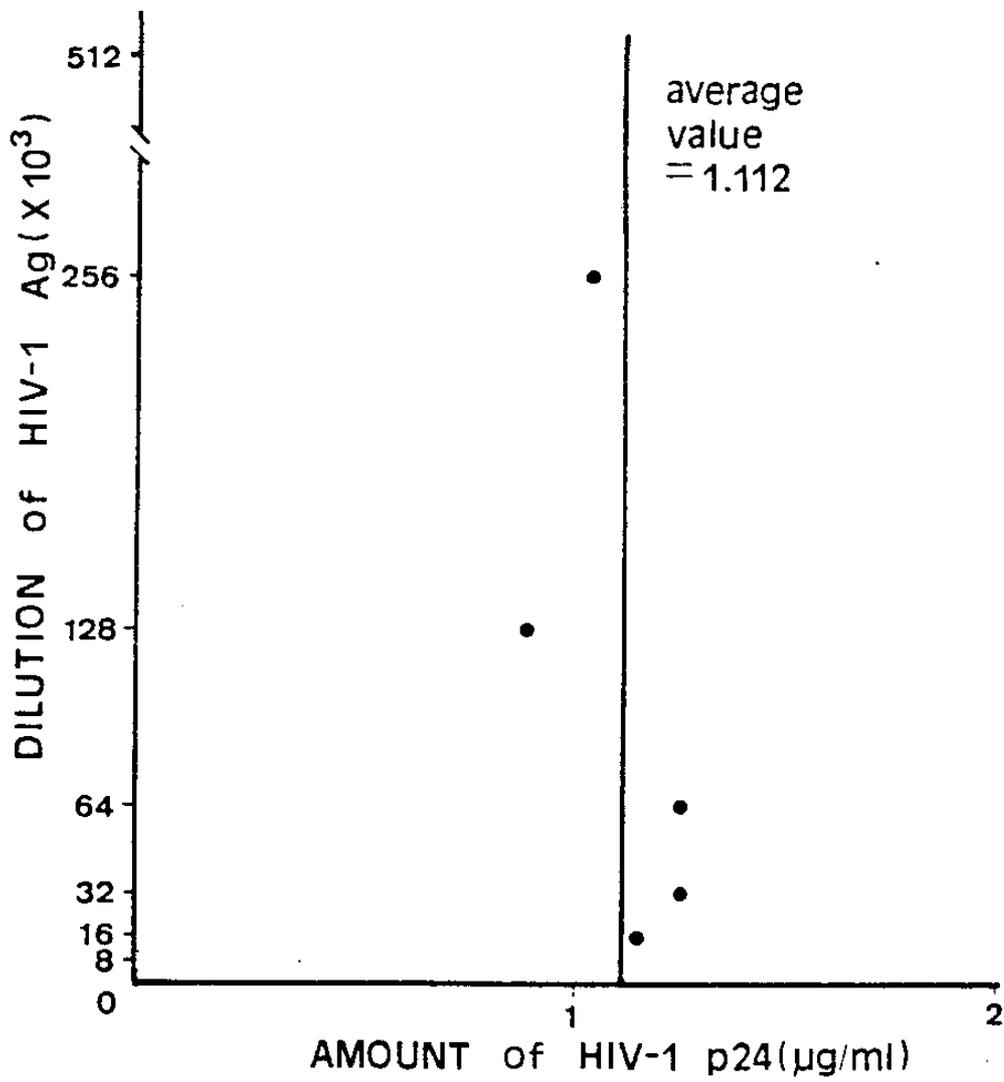


Fig. 4. Quantification of the amount of HIV-1 p24 Ag from concentrated and isolated HIV-1.

4. 효소면역분석법 (ELISA)

Mouse antiserum의 역가 측정과 융합된 세포에서의 항체 생성 여부를 확인하기 위해 배양 상층액을 사용하여 ELISA 시험을 하였다.

Fig. 5는 anti-HIV mouse serum의 역가와 융합에 성공한 일부의 hybridoma에서 항체 생성 여부를 보여주고 있다. 융합된 3개의 well에서 높은 역가의 항체가 분비되는 것을 볼 수 있다. 그리고 나머지 수 개의 well에서도 항체가 생성되는 것으로 나타났다.

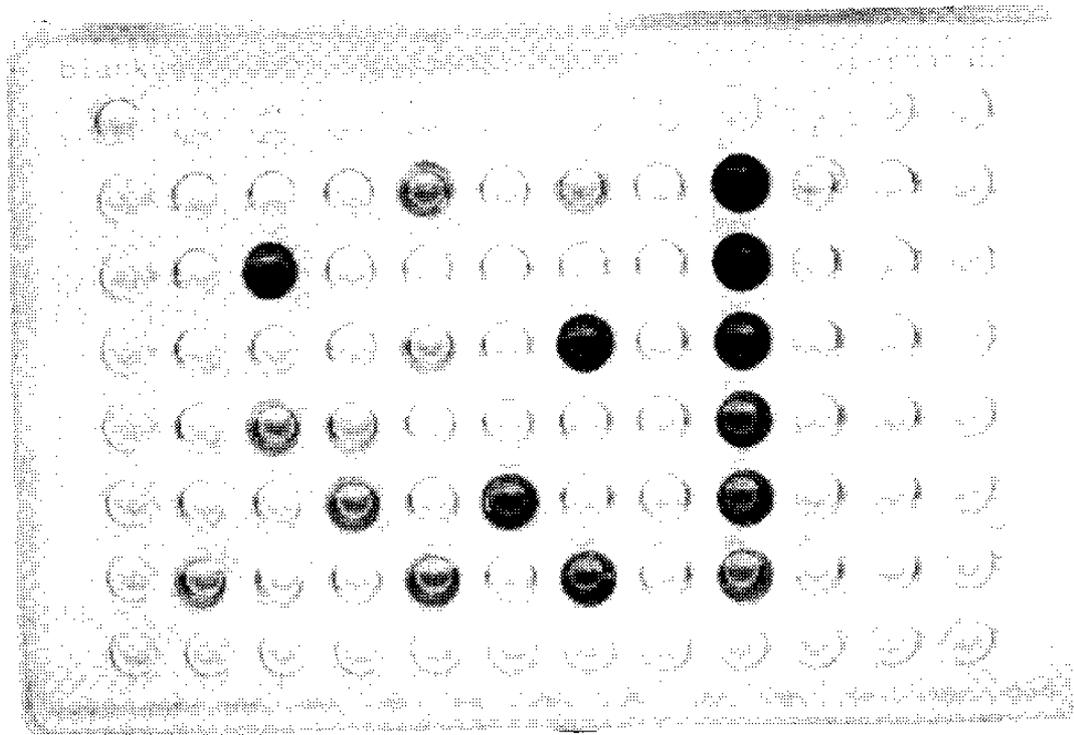


Fig. 5. ELISA test of HIV immunized mouse serum and hybridoma culture supernatant against HIV.

5. 면역형광항체시험 (IFA)

ELISA와 마찬가지로 hybridoma의 항체 생성 여부를 확인하기 위해 배양 상층액을 사용하여 면역형광항체시험을 하였다.

Fig. 6A에서 보는 바와 같이 항체와 결합한 바이러스 감염 세포에서는 세포질내에 황녹색의 형광이 관찰되었으며, Fig. 6B에서와 같이 항체와 합하지 않은 세포에서는 형광이 관찰되지 않았다.

6. Anti-HIV mouse serum의 Titration

충분히 면역된 Balb/c의 혈청 역가를 측정한 결과 Fig. 7에서와 같이 나타났다. 가장 최적의 조건은 항원을 1 : 2,000배 희석하여 microplate에 coating하였을 때이며 항체 역가는 2,000배로 나타났다.

Table 2는 ELISA와 IFA의 감도를 비교한 것으로 ELISA에서 2,000배로 측정된 항체 역가는 IFA에서 400배로 관찰되었다.

7. 세포융합 및 Cloning

세포융합 후 HAT배지로 배양하여 7~10일 경과 후 384 well중 278 well에서 hybridoma가 관찰되었으며 (Fig. 8), 이들 278 well 중 HIV에 대한 항체의 분비 여부는 ELISA와 IFA로 확인하였다.

Anti-HIV 항체를 분비하는 세포들을 limiting dilution 방법으로 cloning하여 12주의 hybridoma line을 얻었다 (Table 3). 그러나 아직 각각의 특이성을 확인하지 않은 상태이다. Fig. 9는 cloning한 후 10일 경과된 colony를 보여 주고 있다.

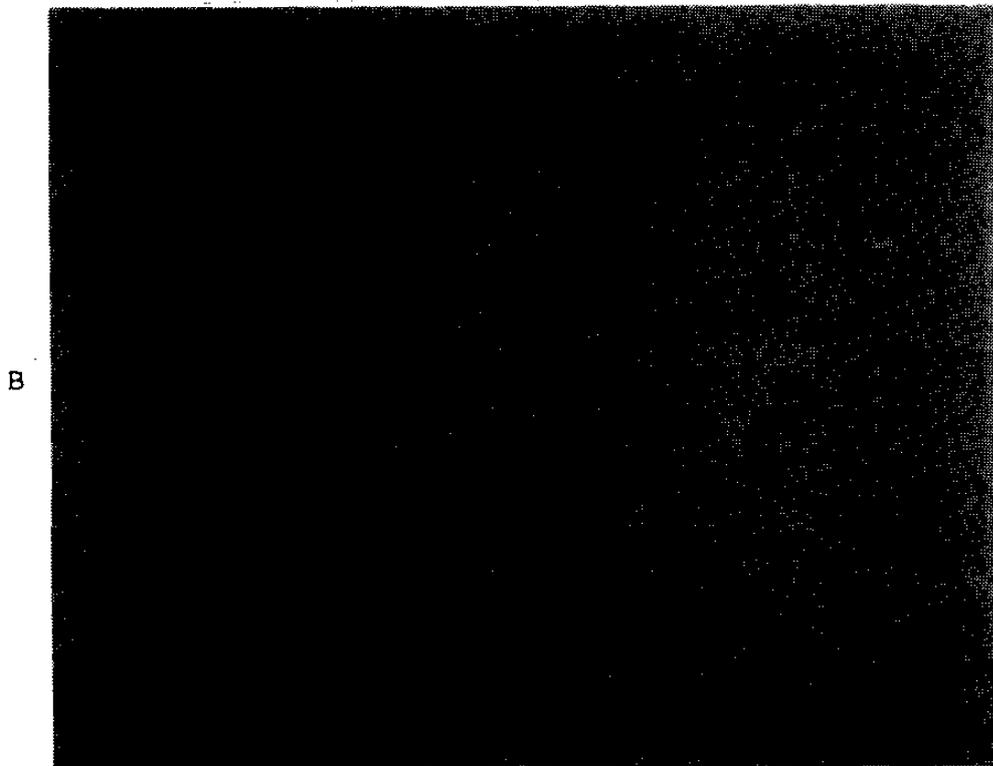
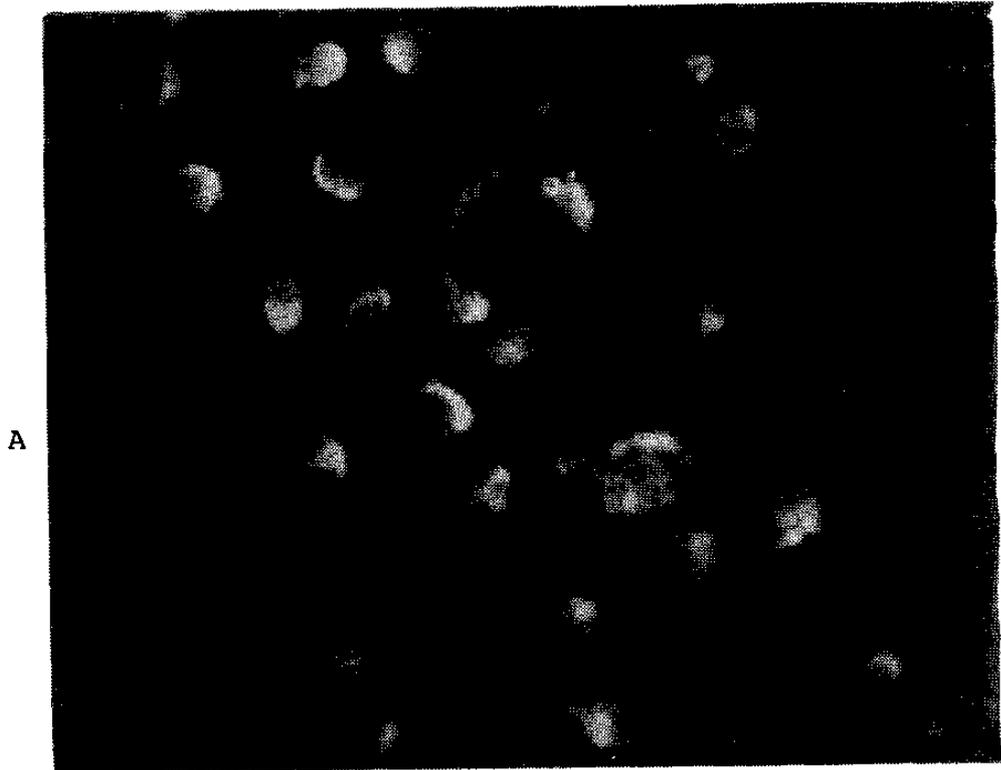


Fig. 6. Immunofluorescence test of HIV immunized mouse serum and hybridoma culture supernatant against H9/HTLV-III cells.

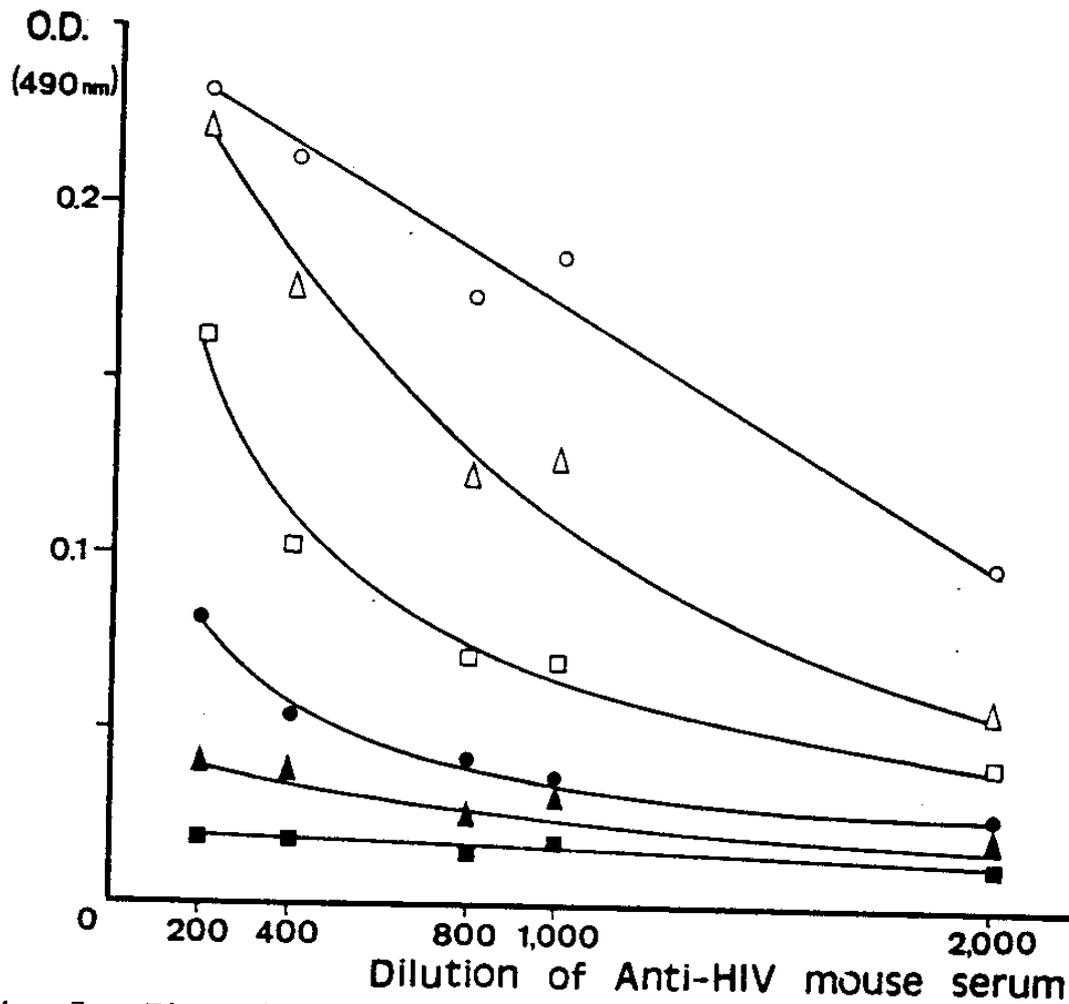


Fig. 7. Titration of anti-HIV mouse serum by ELISA (cut off = 0.013). Ag dilution (○-○: 500, △-△: 1,000, □-□: 2,000, •-•: 4,000, ▲-▲: 8,000, ■-■: 16,000)

Table 2. Comparison of the sensitivity between ELISA and IFA for anti-HIV antibody of mouse serum after immunizing with HIV antigen

No. of dilution	10	20	50	10 ²	2x10 ²	4x10 ²	8x10 ²	10 ³	2x10 ³	4x10 ³
IFA	+	+	+	+	+	+	-	-	ND	ND
ELISA	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	-

ND : not done

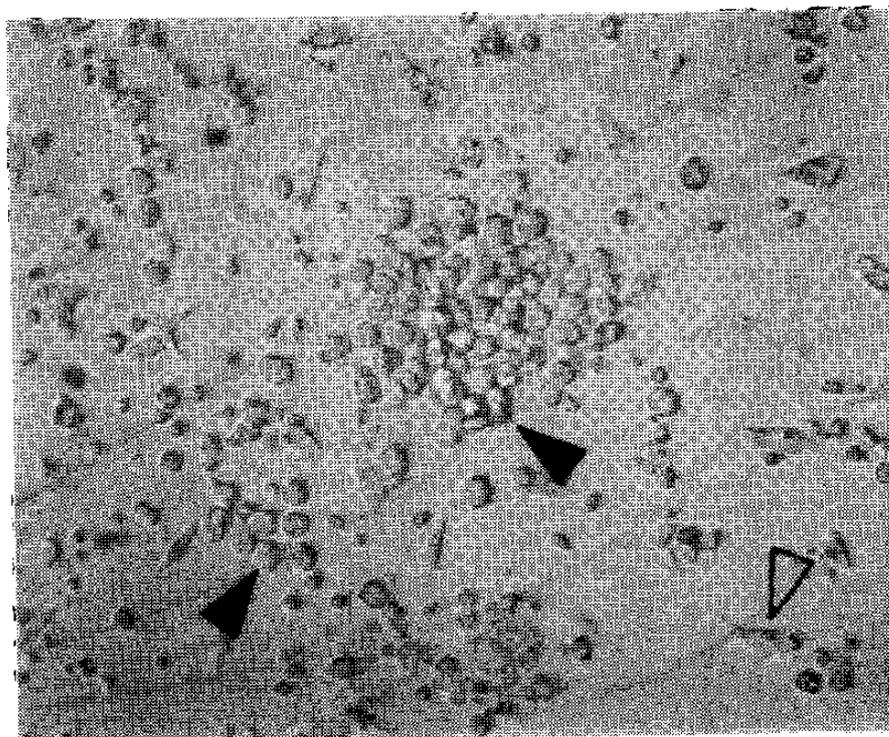


Fig. 8. Hybridoma cell colonies showing 7-10 days after fusion. \blacktriangle : Hybridoma, \triangle : Feeder cell.

Table 3. Numbers of hybridoma lines showing secreting monoclonal antibodies to HIV in 96 well microplates after cloning

Test No.	Wells showing cloned hybridoma	Wells showing specific Ab secretion
1	33	5
2	26	2
3	23	1
4	26	4
Total	108	12

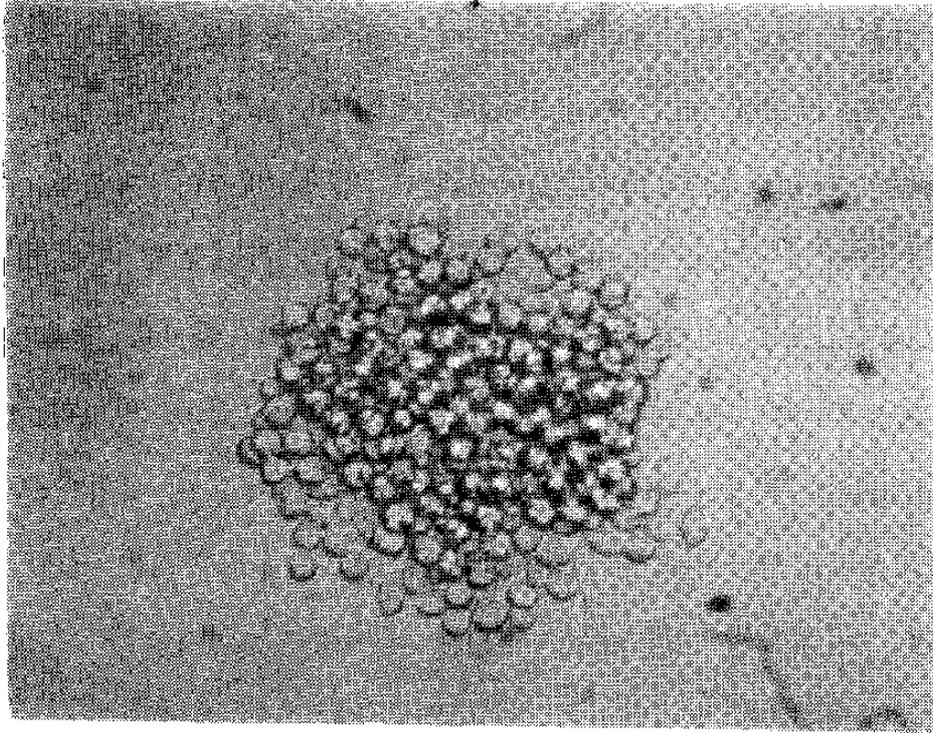


Fig. 9. Hybridoma clone producing monoclonal Ab 10 days after cell cloning.

제 4 절 고 찰

전보에 보고한 바와 같이 분리, 농축된 HIV-1항원에서 HIV-1이 특이 항원인 p24의 정량은 번역에 사용할 항원의 양을 결정하기 위한 전 단계로 실험하였다. Fig. 4에서 각각의 희석단계별 p24의 양이 정확히 일치하지 않은 것은 희석시 오차인 것으로 추정된다. 또한 이를 토대로 HIV의 특이항원을 순수 정제하여 면역시 항원으로 사용하는 것이 바람직하다. 따라서 p17과 p24의 정제를 위한 HPLC^{10,12)}, 표면당단백질의 immunoaffinity column을 이용한 정제^{3,11,13)} 등의 방법과 같이

본 실험실에서 분리, 농축한 HIV에서 특이 항원을 정제하여 epitopes의 분석과 정밀한 진단에 응용하고자 한다.

충분히 면역된 Balb/c antiserum의 항체 역가는 개체별 큰 차이는 보이지 않았다. 항체 역가 측정시 ELISA가 IFA보다 감도가 높게 나타났다으며 ELISA 시험 조건은 항원 1 : 2,000배 희석과 항체 1 : 2,000배에 희석일 때 최적으로 나타났다. 이와 같이 항체 역가가 높게 측정된 Balb/c의 비장세포와 myeloma를 융합하였을 때 융합비율이 약 72%이었으며 그 중 일부를 실험하였다. 세포 융합비율은 융합시의 조건 즉 PEG의 분자량 및 농도, 적합한 온도유지, 배8는의 한 조성인 유타아혈청등에 의해 큰 차이를 보였다. Fig. 8은 세포융합 후 7일이 경과한 hybridoma를 보여주고 있으며 다른 wells의 colony도 비슷한 양상을 보이거나 성장 속도에는 각각 많은 차이를 보였다.

융합에 성공한 wells의 상층액을 ELISA와 IFA시험을 해 본 결과 항체 생성 여부의 결과는 일치하였으나 IFA보다 ELISA 시험의 감도가 훨씬 높았다. 따라서 이 후의 실험은 ELISA로 하였다.

HIV에 대한 항체를 생성하는 well의 cells를 cloning하여 108개의 monoclonal을 얻었으나 이들중 12개의 line만이 HIV에 대한 항체를 분비하였다. 이는 항원이 순수정제되어 있지 않고 다른 단백질등이 항원애에 존재하기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 전술한 바와 같이 정제된 항원의 사용이 보다 효율적이다. 그리고 HIV의 특이 항원별로 유전자 조작 방법을 사용하여 대장균이나 다른 바이러스에서 생산하는 방법도 사용되고 있다^{14,15,16,17}. 이러한 방법은 시간과 경제적인 측면에 도움이 될 것으로 생각된다. Epstein-Barr virus를 이용

하여 human monoclonal 항체를 생산하는 방법도 사용되고 있으며¹⁸⁾, 이러한 기법의 사용도 바람직하다고 본다.

차후의 실험은 cloning하여 형성된 hybridoma 12개 line에 대한 특성 규명과 생성되는 항체의 면역학적 특성 규명, 그리고 ELISA와 Western Blot등 진단방법에 적용할 예정이다.

참 고 문 헌

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rosenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871, 1983.
2. Tribe DE, Reed DL, Lindell P, Kenealy WR, Ferguson BQ, Cybulski R, Winslow D, Waselefsky DM, Petteway SR. Antibodies reactive with Human Immunodeficiency Virus gag-coded antigens (gag reactive only) are a major cause of ELISA reactivity in a blood donor population. *J Clin Microbiol* 26:641-647, 1988.
3. Dalgleish AG, Chanh TC, Kennedy RC, kanda P, Clapham PR, Weiss RA. Neutralization of Diverse HIV-1 Strains by Monoclonal Antibodies Raised against a p41 Synthetic peptide. *Virology* 185:209-215, 1988.
4. Köhler G. and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(7): 495-497, 1975.
5. Carlo MC, Alban L, William H, Zenon S and Hilary K. Production of human hybridomas secreting antibodies to measles

- virus. *Nature* 288(4): 488-489, 1980.
6. Barbara SC, Leanne EU, Graham AP and Ruth FB. Simple and Specific Enzyme Immunoassay Using Monoclonal Antibodies for Serotyping Human Rotaviruses. *J Clin Microbiol* 25(3): 509-515, 1987.
 7. Koki T, Yasuyuki M, Tomoko U, Shozo U. Cross Reactive Neutralization Epitopes on VP3 of Human Rotavirus: Analysis with Monoclonal Antibodies and Antigenic Variants. *J Virol* 61(5): 1726-1730, 1987.
 8. Lutz H, Pedersen NC, Durbin R, Theilen GH. Monoclonal Antibodies to Three Epitopic Regions of Feline Leukemia Virus p27 and their use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of p27. *J Immunol Methods* 56:209-220, 1983.
 9. Higgins JR, Pedersen NC, Carlson JR. Detection and Differentiation by sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus and Acquired Immunodeficiency Syndrome - Associated Retrovirus like Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 24(3): 424-430, 1986.
 10. Veronese FDM, Copeland TD, Oroszlan S, Gallo RC, Sangadharan MG. Biochemical and Immunological Analysis of Human Immunodeficiency Virus gag Gene Products p17 and p24. *J Virol* 62(3):795-801, 1988.

11. Nara PL, Robey WG, Pyle SW, Hatch WC, Dunlop NM, Bess JW Jr., Kellher JC, Arthur LO, Fischinger PJ. Purified Envelope Glycoproteins from Human Immunodeficiency Virus Type I Variants Induce Individual, Type-Specific Neutralizing Antibodies. *J Virol* 62(8): 2622-2628, 1988.
12. Henderson LE, Benveniste RE, Sowder R, Copeland TD, Schultz AM, Oroszlan S. Molecular Characterization of Proteins from Simian Immunodeficiency Virus (SIV_{Mne}). *J Virol* 62(8): 2587-2595, 1988.
13. Pyle SW, Dubois GC, Robey WG, Bess JW, Jr., Fischinger PJ, Arthur LO. Purification and Characterization of the External Envelope Glycoprotein from Two Human Immunodeficiency Virus Type I Variant, HTLV-III_B and HTLV-III_{RF}. *J Virol* 62(7): 2258-2264, 1988.
14. Charles F, Steven SB, Patricia E, Sekar C, Bernard M. Characterization of Human Immunodeficiency Virus gag/pol Gene Products Expressed by Recombinant Vaccinia Virus. *Virology* 166:339-349, 1988.
15. Scott DP, Thomas JM, Robey WG, Lynn DL, Robert-Guroff M, Mueller WT, Alphonse JL, John G, Stephen RP, Jr, Kent JW, Peter JF, Wong-Staal F, Gallo RC, Bolognesi DP. HTLV-III/LAV-Neutralizing Antibodies to an *E. coli*-Produced Fragment of the Virus Envelope. *Science* 234(12): 1392-1395, 1986.

16. Christine D, Gorniak JG, Strickler JE, Meek TD, Metcalf BW, Martin R. Human Immunodeficiency Virus Protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. PNAS 84:8903-8096, 1987.
17. Graves MC, Lim JJ, Heimer EP, Kramer RA. An 11-kDa form of human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* is sufficient from enzymatic activity. PNAS 85:2449-2453, 1988.
18. Prigent S, Goossens D, Clerget-Raslain B, Bahraoui E, Roussel M, Tsikas G, Ronger P. Production and characterization of human monoclonal antibodies against core protein p25 and transmembrane glycoprotein p41 of HIV-1. AIDS 4: 11-19, 1990.

2. HIV 탐색을 위한 Hybridization probe의 제작 및 평가

제 1 절 서 설

Human lentivirus의 prototype인 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)은 pathogenic retrovirus로서 인간의 면역계와 상호작용하여 결국에는 systematic immune deficiency, 즉 AIDS를 유발시키게 된다.

HIV의 genome은 virion 단백질인 Gag, Pol과 Env 외에 virion morphogenesis와 maturation에 관여하는 Vif, Vpu 단백질과 3종류의 non-structural 단백질인 Tat, Rev, Nef 단백질들이 암호화되어있다.

이러한 non-structural 단백질들과 여러종류의 세포인자(cellular factor)들이 상호작용함으로써, proviral latency and activation^{1,2}, early³ and late⁴ HIV-1 gene expression을 조절하게 된다.

이러한 현상을 이용하여 초기에 HIV를 탐지해내려는 시도가 계속되어 왔는데 즉, HIV는 RNA virus이므로 viral genome이 reverse transcriptase에 의해 complementary DNA로 복제가 되며 결국은 감염된 세포의 (주로, T lymphocytes, macrophages, 그리고 brain의 microglial cell)^{5,6,7,8} 염색체 DNA에 삽입(integration)되게 된다.

이러한 HIV DNA를 lymphocyte의 DNA로 부터 Southern blot hybridization으로 탐지하려는 시도가 일찍부터 있었으나 별로 성공적이지 못했는데⁹⁾, 이는 HIV에 감염되는 lymphocytes의 수가 매우 적기 때문에 탐지되기에는 HIV DNA가 너무 적은 양으로 존재하기 때문이라 보고되었다.

한편, HIV에 감염된 사람을 검사하는 일상적인 진단방법으로 혈청내에 viral epitope에 대한 항체가 있는 지를 검사하는 방법이 시도되었다¹⁰⁾. 이러한 specific polyclonal 또는 monoclonal 항체에 의한 viral 항원의 동정은 sensitivity가 부족하여 어려움이 많았는데¹¹⁾, 주된 원인은 HIV에 감염된 사람이 항 virus 항체를 만들어내지 않는 기간이 수개월에서 1년까지도 계속될수 있다는 것으로 설명될수 있겠다^{12, 13, 14)}. 이러한 사실은 혈청학적 표지 (serological marker)에 대해 negative인 사람에서도 HIV가 확인될수 있는 가능성이 있다는 것이므로 큰 의미를 가지며 특히 seronegative blood donor도 예외일수 없으므로 이들을 탐지해낼수 있는 조기진단 방법이 요구되는 형편이다¹⁵⁾.

또한, HIV-seropositive인 모체에서 태어난 어린이의 경우, 모체의 IgG 항-HIV 항체가 태반을 통하여 유아의 체내로 옮겨갈수 있으며 유아의 체내에서 15개월 정도 존속되며 유아에서는 대개 HIV antigenaemia가 탐지되지 않으며 IgM은 믿을만한 표지(marker)가 되지 못하므로 seropositivity 만으로는 신생아의 HIV 감염증거로 사용될수가 없다. 따라서 유아의 경우는 virus의 분리나 viral genome 탐지에 의존해야만 한다. HIV virus의 분리는 감염되지 않은 donor로 부터

유래된 phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte susceptible uninfected indicator cell line과 함께 감염된 사람의 peripheral blood mononuclear cell을 지속적으로 공동배양(cocultivation)하여야만 가능한데¹⁶⁾ 이는 3~4주 정도로 시간이 많이 걸리며 역시 sensitivity가 부족한 것으로 알려져 있다^{17,18,19)}.

앞에서 잠깐 언급했듯이, 감염된 세포에서 Southern blot이나 in situ hybridization등의 방법으로는 HIV DNA를 검출해내기가 어렵기 때문에 매우 적은 양의 시료 DNA로 부터 DNA의 특정부위를 증폭시켜 쉽게 탐지할수 있는 polymerase chain reaction(PCR) 방법이 도입되었다²⁰⁾.

PCR 기술은 자연계에서 일어나는 DNA 복제과정을 모방하여 각 cycle을 지날때마다 DNA의 양이 두배로 증가된다는 간단한 원리를 가지고 실험관내에서 DNA의 양을 증가시키는 방법으로 개발되었다²¹⁾. 개발초기에는 열에 강한 DNA polymerase가 발견되지않아 제한되게 사용되다가 thermostable DNA polymerase가 발견되면서 손쉬운 방법으로 발전되었다. 즉, 반응온도만을 조절해줌으로써 denaturation, annealing, primer extension의 3가지 step을 계속 반복시켜서 목적하는 DNA양을 증폭시킬수 있게 되었다. 이를 이용하여 감염된 사람의 혈액에서 total DNA를 추출하고 이런 시료 DNA를 template로하여, 그 안에 소량으로 들어있는 HIV-specific DNA를 수백만배로 증폭시킨 후, 일상적인 hybridization 방법으로 탐색하여 seropositive인 사람뿐 아니라, seronegative인 사람의 감염여부도 탐지하려 시도했다.

그러므로 우리는 감염되었다고 생각되는 또는 감염여부를 판단하기가

어려운 사람들의 lymphocyte로부터 Vpu와 Tat 부위에 해당하는 HIV DNA 부위를 증폭시키고 적당한 DNA 탐색자로 검사하여 HIV-genomic DNA (또는 RNA)의 존재를 규명하며 나아가서 빠르고 믿을만한 조기 진단방법을 개발하는 것을 목적으로하여 실험하였으며, PCR 조건의 확립과 lymphocyte PCR 산물을 확인하는 실험이 수행되었기에 보고합니다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. PCR을 위한 control DNA template의 제조

전술하였던 (AIDS 조기진단방법 개발에 관한 연구 - 1차년도 최종 보고서) plasmid pENV와 pHIV에서 HIV-specific DNA 절편을 분리해내서 template로 사용하였다.

Vpu 부위의 PCR을 위해서는 pENV를 Sac I과 Kpn I으로 double digestion하여 얻어지는 345 bp 크기의 DNA를 template로 이용하였다 (HIV-genome에서의 위치 : 5584에서 5929 : Fig. 1). Tat 부위의 PCR을 위해서는 pHIV를 Xba I으로 digestion하여 얻어지는 9700 bp 크기의 HIV 전체 DNA를 template로 이용하였다.

각각의 plasmid는 250~500 ml 배양액으로부터 alkaline lysis method로²⁷⁾ 분리해낸 다음 lithium chloride를 이용하여 RNA들을 제거하고 남은 plasmid를 농축하여 digestion 하였다.

Digestion하는 DNA의 양은 나중에 얻어지는 DNA의 절편 (Vpu

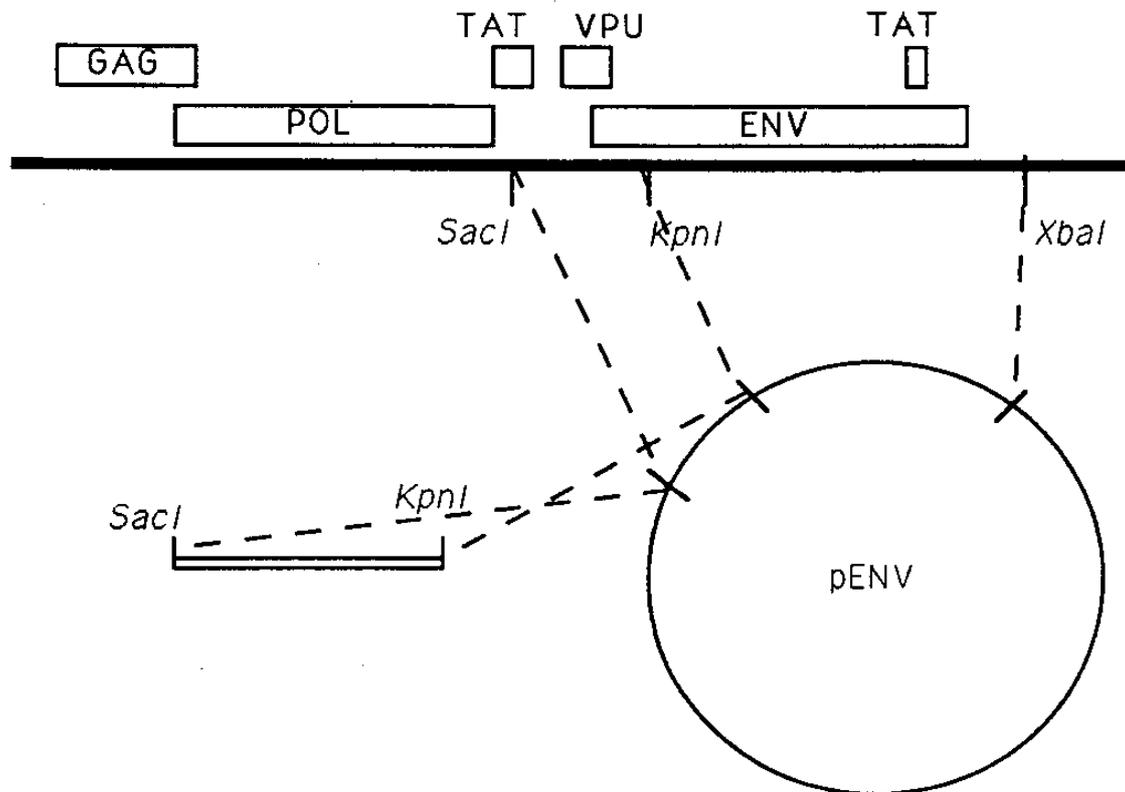


Fig. 1. Localization of 350 base paris (b.p.) DNA template

부위 경우는 345 bp, Tat 부위의 경우는 9700 bp)의 양이 Vpu 부위의 경우는 2~4 μ g, Tat 부위의 경우는 10 μ g이 되도록 digestion 하였다.

적당량의 DNA를 0.5 \times KGB²⁵⁾ 또는 1 \times KGB buffer가 들어 있는 용액에서 digestion 하고 (6 \times KGB : 600 mM potassium glutamate, 3 mM β -mercaptoethanol, 300 μ g/ml bovine serum albumin, 150 mM Tris-acetate (pH 7.5), 60 mM magnesium acetate) Vpu 부위의 경우는 1.5%, Tat 부위의 경우는 0.8% agarose gel에서 분리해 내었다.

DNA의 분리는 DEAE-membrane을 이용한 electroelution으로 하였고 분리해낸 DNA는 PCR-template dissolving buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.1 mM EDTA)에 녹여 Vpu 부위를 포함하는 DNA는 10 ng/ μ g로, Tat 부위를 포함하는 DNA는 500 ng/ μ g로 농도를 맞추었다.

대략적인 계획도는 Fig. 2와 같다.

2. PCR 반응 조건의 확립

ㄱ. 반응 Buffer의 제조

전술하였던 보고서에서 Saiki 방법을 기초로 하였던 반응 Buffer는 (5 × Taq Pol buffer로 명명) 구성 성분들이 여러가지인 관계로 오염될 가능성이 많으며, 비특이적인 (non-specific) PCR 산물이 생성될 우려가 있으므로 이것과 병행하여 보다 간단한 buffer (10 × Amplifying buffer로 명명)를 같이 실험하였다¹⁰⁾. 각 buffer의 조성은 Table 1과 같다.

Primer의 농도는 합성된 primer 용액을 50배 희석하여 260 nm에서 흡광도를 측정하고 1 O.D.₂₆₀이 primer농도 20 μ g/ml 이라는 기준치를 가지고 계산하여 각 반응물에 10 pmole 되도록 맞추어서 더하였다.

dNTPs는 1N NaOH용액으로 pH 7.0이 되도록 맞춘후 각각의 특정 파장에서 흡광도를 측정하여 흡광도로부터 molar 농도를 계산하고 각각의 nucleotide들을 섞어서 10 mM dNTPs 혼합용액으로 제조하여 사용하였다.

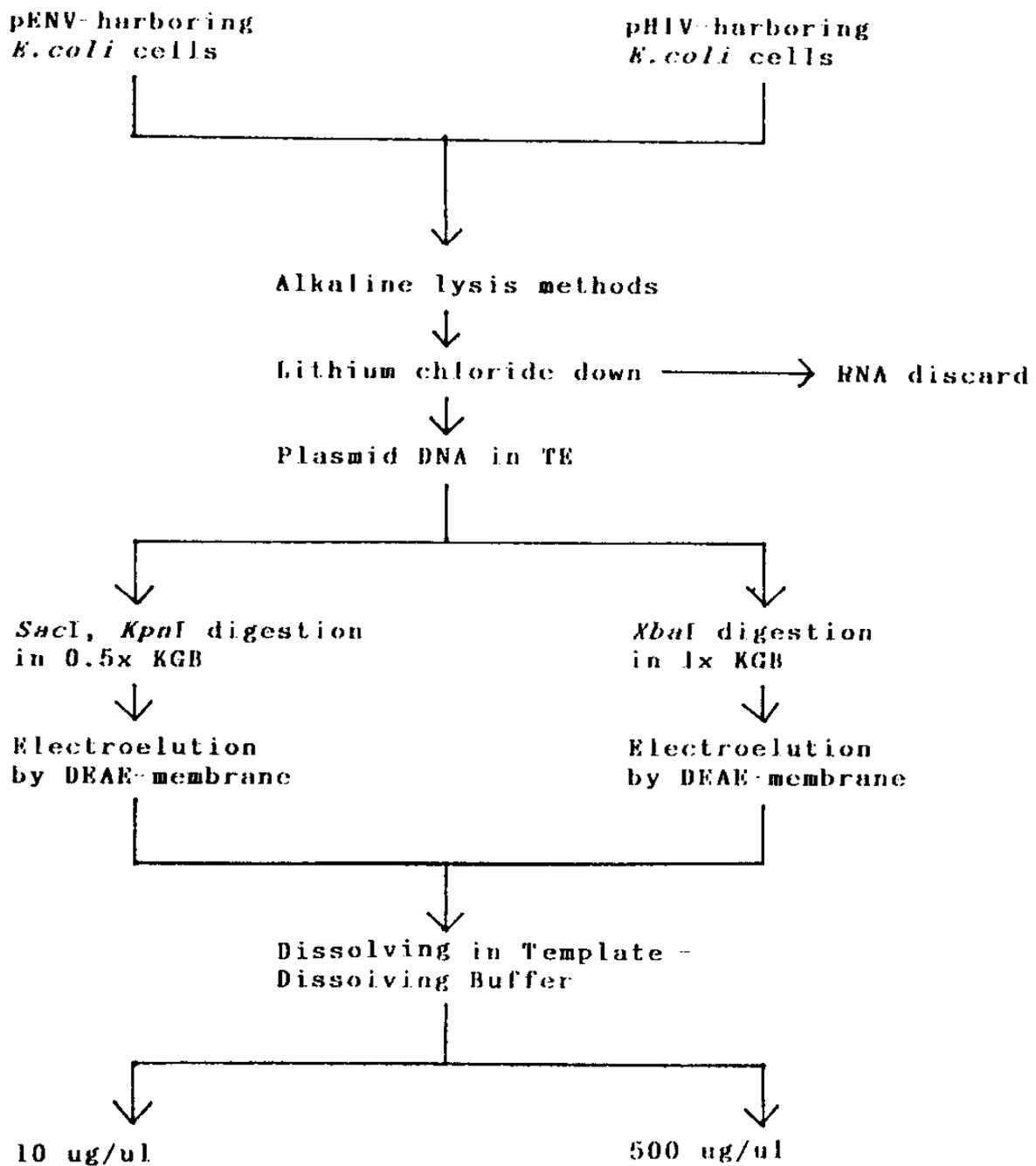


Fig. 2. The Scheme of preparation of DNA templates.

Table 1. Comparison of amplifying buffer recipes.

5 × Taq Pol Buffer	10 × Amplifying Buffer
335 mM Tris-HCl (pH 8.8)	100 mM Tris-HCl (pH 8.3)
33.5 mM MgCl ₂	15 mM MgCl ₂
0.05% Gelatin	0.1% Gelatin
83 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	500 mM KCl
850 μg/ml BSA	
50 mM β-Mercaptoethanol	
5 mM dNTPs	

ㄴ. PCR의 수행

수행한 PCR 반응조건은 다음과 같다.

Vpu 부위를 포함하는 DNA 절편	2 μl (20 ng)
Tat 부위를 포함하는 DNA 절편	1 μl (500 ng)
10×Amplifying buffer	10 μl
Vpu sense primer	1.25 μl (10 pmole)
antisense primer	2 μl
Tat sense primer	1.5 μl
antisense primer	1.5 μl
10mM dNTPs	2.5 μl

Water	82.25 또는 83.75 $\mu\ell$
Taq DNA polymerase	1 $\mu\ell$ (5 unit)

위의 성분들을 넣고 100 $\mu\ell$ paraffin oil을 용액위에 얹은 후, 94 °C에서 10분간 방치하는 동안에 5 unit의 Taq DNA polymerase를 더하고 계속적으로 30 cycle을 수행하였다. 반응온도조절은 Table 2와 같이 수행하였다. 마지막 step에서는 72 °C에서 10분간 extension 시킨 후 chloroform 200 $\mu\ell$ 를 더하고 원심분리하여 반응종료 및 paraffin oil을 제거하였다.

상층을 다른 tube에 옮긴 후 -20 °C에서 보관하였다.

Table 2. Condition of PCR temperature cycles.

1 cycle	90 °C, 10 min.	50 °C, 2 min.	72 °C, 3 min.
28 cycle	94 °C, 1 min.	50 °C, 2 min.	72 °C, 3 min.
1 cycle	94 °C, 1 min.	50 °C, 2 min.	72 °C, 3 min.

ㄷ. PCR product의 확인

PCR 결과를 확인하기 위해 우선 product 100 $\mu\ell$ 중에서 10 $\mu\ell$ 를 취하여 8% nondenaturing polyacrylamide gel에 loading하여 5~10 W에서 1~2시간동안 전기영동 하였다. Xylene cyanol이 gel의 밑부분까지 갔을때 영동을 멈춰서 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide 용

액에서 15분간 염색한 후, UV조명하에서 사진을 찍어 확인하였다.

또한, PCR product가 HIV DNA에서 유래된 것인지를 알기 위해 Southern blot hybridization도 수행하였다. PCR product 10 μ l (혹은 20 μ l)에 10 \times agarose gel loading dye (0.4% xylene cyanol, 0.4% bromophenol blue, 50% glycerol)를 5' 말단이 표지된 size marker와 함께 ethidium bromide가 포함된 1.5~2% agarose gel에 loading하여 전기영동을 수행하였다. Bromophenol blue가 gel 길이의 3/4의 위치에 도달되면 UV조명하에서 사진을 찍은 후, 600 ml의 denaturing solution (1.5M NaCl, 0.5N NaOH)에서 30분간 변성시켰다³⁰⁾. 변성이 끝나면 600 ml의 neutralizing solution (1M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5M NaCl)에서 30분간 중화시킨 후, nitrocellulose membrane (0.22 μ m)이나 PVDF (polyvinylidene difluoride) nylon membrane에 transfer 시켰다. Capillary transfer를 이용할 때에는 overnight 동안 transfer 시켰고, vacuum transfer를 이용할 때는 1시간 정도 transfer 시켰다^{32,33)}. Transfer가 완료된 membrane은 vacuum dry oven에서 80 $^{\circ}$ C, 1시간동안 baking 하여 PCR product의 DNA를 membrane에 고정화시킨 다음, hybridization solution (Table 3)에서 1시간정도 prehybridization 한 후, 적당한 핵산 탐색자를 넣어 overnight 동안 hybridization을 수행 하였다. hybridization이 끝난 membrane은 핵산 탐색자에 따라 알맞은 세척 과정을 거친 후 autoradiography 하였다.

각 product에 대한 핵산 탐색자는 random priming에 의한 DNA 탐색자와 증폭부위-specific oligonucleotide 탐색자의 두 종류를 사

용하였다.

Random-priming DNA probe의 제조는^{34,35} Vpu 부위의 경우는 template 350 bp의 DNA 절편을, Tat 부위의 경우는 역시 template로 사용했던 9700 bp의 DNA 절편을 각각 사용하였으며 multiple-primed DNA labelling system (Amersham)을 이용하여 탐색자를 만들었다. Random priming buffer, random primer, [α -³²P] dCTP와 2 units의 Klenow enzyme를 첨가하여 실온에서 2시간동안 반응한 후, Sephadex G-50으로 제작된 spun-column을 통해 unincorporated [α -³²P] dCTP를 제거하고 탐색자로 사용하였다.

Table 3. Comparison of hybridization solution with each probes.

SDS : sodium dodecyl sulfate

20 × SSPE : 3 M NaCl, 0.23 M NaH₂PO₄, 0.02 M EDTA.

20 × SSC : 3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate.

Random priming probe	Oligonucleotide probe
6 × SSPE	5 × SSC
5 × Denhardt solution	5 × Denhardt solution
50 % formamide	0.5 % SDS
0.5 % SDS	100 μ g/ml single stranded salmon sperm DNA
100 μ g/ml single stranded salmon sperm DNA	

Table 4. Comparison of washing condition with each probes.

SDS : sodium dodecyl sulfate

20 × SSC : 3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate.

R. T. : room temperature.

Random priming probe	Oligonucleotide probe
<p>* first washing – 400 ml of solution I (2 × SSC, 0.1 % SDS) at R. T. for 20 min. repeat 3 times.</p> <p>* second washing – 500 ml of solution II (1 × SSC, 0.1 % SDS) at 68 °C for 30 min. repeat 2 times</p>	<p>* first washing – 300 ml of solution A (2 × SSC, 0.1 % SDS) at R. T. for 30 min. repeat 2 times.</p> <p>* second washing – 500 ml of solution B (5 × SSC, 0.1 % SDS) at 52 °C for 15 min.</p> <p>* third washing – 500 ml of solution C (5 × SSC, 0.1 % SDS) at 59 °C for 15 min.</p>

oligonucleotide 탐색자의 (Fig. 3) 경우는 ³²P 각각의 합성된 oligonucleotide 10 pmole에 T4 polynucleotide kinase buffer (10 × buffer : 500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 50 mM dithiothreitol, 1 mM spermidine · HCl, 1 mM EDTA)와 [γ-³²P] ATP 그리고 T4 polynucleotide kinase 8 unit를 더하여 37 °C에서 1시간 반응하여 spun column으로 분리한 후 탐색자로 사용하였다.

ㄴ. PCR product의 restriction analysis

PCR product가 HIV DNA에서 유래되었는지를 알아보기 위한 간접적인 방법으로 HIV genome의 염기순서에서 알아낸 제한효소 자리가 PCR product에 존재하는지를 검사했다. 즉, HIV DNA의 염기순서를 알고있고 우리가 목표로했던 부위의 염기순서를 자르는 제한효소도 알고있으므로 (Fig. 3) PCR product를 이러한 효소로 digestion하여 나타나는 DNA 절편의 크기를 비교해 봄으로써 증폭된 DNA가 HIV DNA에서 유래되었음을 간접적으로 증명했다. Vpu 부위의 경우는 *Ava* II와 *Ban* I으로 자르고 Tat 부위의 경우는 *Bst* NI과 *Rsa* I으로 잘라서 2% agarose gel에서 전기영동하고 사진을 찍어 digestion product의 크기를 조사하였다.

3. PCR 반응조건의 최적화

$MgCl_2$ 의 농도를 최적화하기 위해 10 × Amplifying buffer에서 $MgCl_2$ 를 제외한 반응 buffer를 만들고 이러한 buffer를 이용하여 $MgCl_2$ 의 농도를 1.5 mM, 2 mM, 4 mM (250 μ M dNTPs) 또는 1.5 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM (1 mM dNTPs)로 각각 변화시키면서 PCR을 수행하여 반응정도에 미치는 $MgCl_2$ 와 dNTPs 농도의 영향을 알아보았고 primer의 농도는 50 fmole, 100 fmole, 200 fmole, 500 fmole, 1 pmole, 2 pmole, 5 pmole, 10 pmole, 20 pmole로 각각 변화시키면서 반응에 미치는 영향을 보았다. 한편 DNA template의 농도변화는 PCR 반응의 sensitivity를 대변해주는

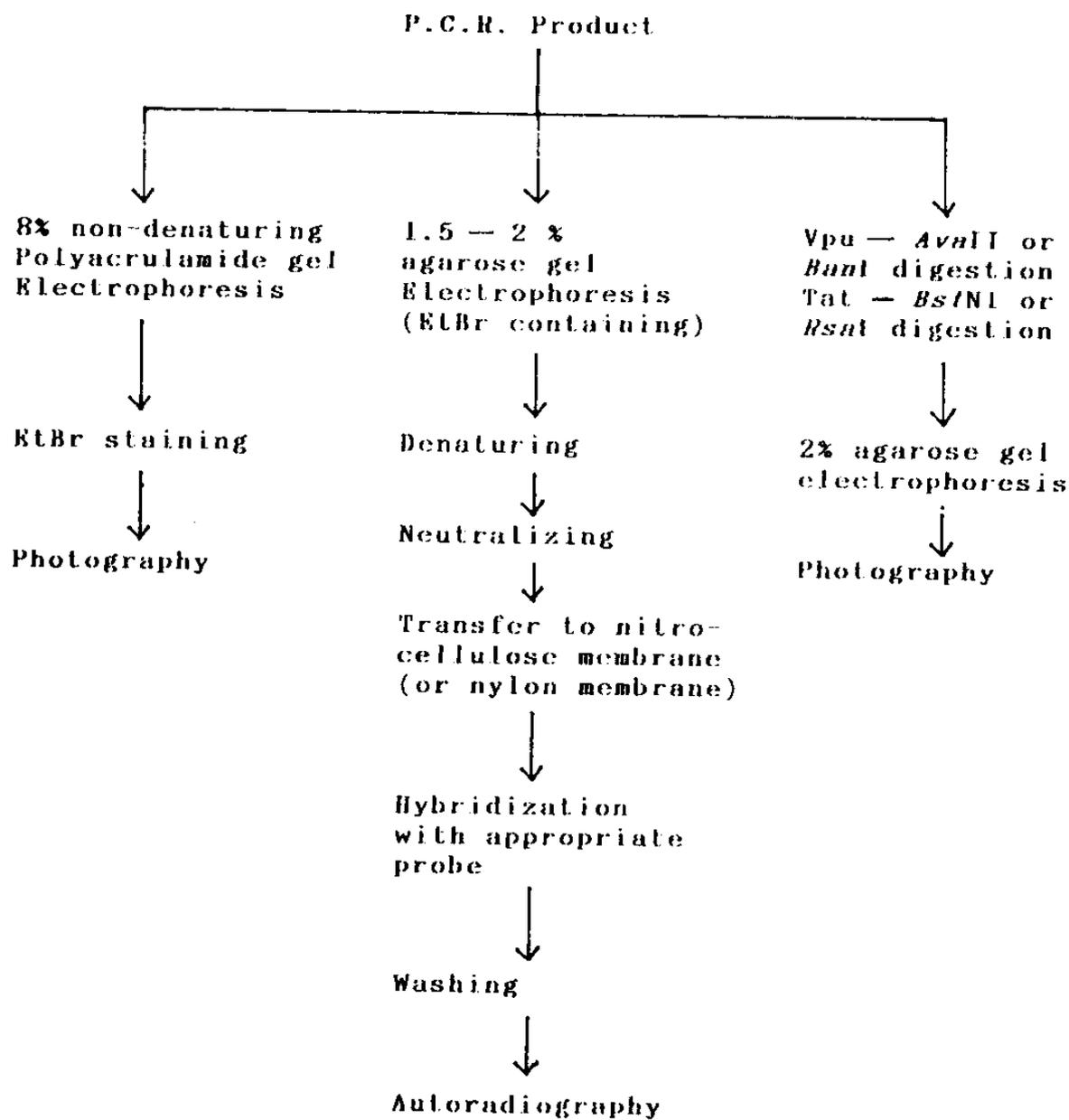


Fig. 4. The scheme of identification of PCR products.

구실을하므로 중요한 요소인데 Vpu 부위의 경우는 20 ng, 1 ng, 1×10^{-2} ng, 1×10^{-4} ng, 1×10^{-5} ng 까지 실험하였으며, Tat 부위의 경우는 500 ng, 5 ng, 5×10^{-2} ng, 5×10^{-3} ng, 5×10^{-4} ng, 5×10^{-5} ng, 5×10^{-6} ng까지 회석하여 시험하였다.

4. Lymphocyte로부터 PCR을 위한 DNA template의 제조(Fig. 5)

HIV 항체 양성자 10인의 전혈 (Table 5)로 부터 분리하여 -70°C 에 보관하였던 $2-5 \times 10^6$ 개의 lymphocyte를 실온의 수욕조에서 빨리

Table 5. Characterization of sample No. 1-10

Sample No.	antibody		Virus	
	ELISA	WB	ELISA	RTase assay
1	+	-	-	-
2	+	-	-	-
3	+	+	+	+
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	-	-
7	+	-	-	-
8	+	-	-	-
9	+	-	-	-
10	+	-	-	-

녹인 후 동일 부피의 PBS를 가하여 실온에서 3,500 g로 15분간 원심 분리하였다. 얻어진 pellet을 7.5 ml의 extraction buffer (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.1M EDTA (pH 8.0), $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ pancreatic RNase, 0.5% SDS)에 잘 부유한 다음 37°C 에서 1시간동안 정치하였

다. 최종 농도가 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 되도록 Proteinase K를 가하여 유리봉으로 잘 섞어 주었다. 50°C 수욕조에서 3시간 동안 용액을 가끔씩 흔들며 주면서 정치시켰고, lysate의 일정량을 취하여 동일부피의 평형화시킨 phenol/chloroform을 더하여 섞은 후 원심분리하여 상층액을 취하고 다시 동일부피의 chloroform으로 extraction을 반복한 후, 1/10 부피 sodium acetate (5M)를 더하여 ethanol로 침전시켰다. 70% ethanol로 세척한 후 말려서 $20 \mu\text{l}$ PCR-template-dissolving-buffer에 녹인 다음 250 mM 에서 흡광도를 측정하여 정량한 후 -20°C 에

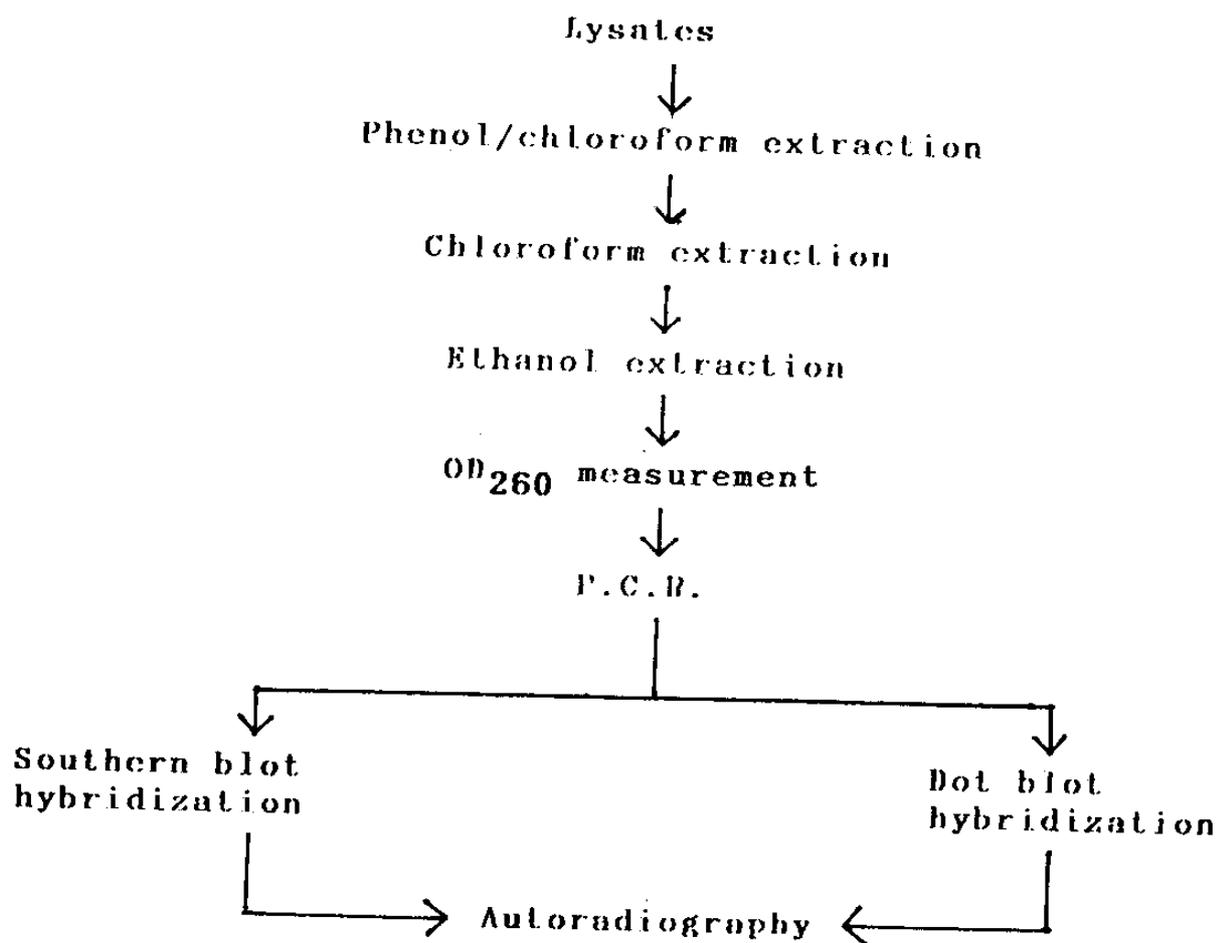


Fig. 5. The scheme of preparation of DNA from lymphocyte samples and experimental strategy.

보관하였다. 각각의 DNA에서 2 μ g을 취하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 product를 적당량 취하여 Southern blot하고 random-priming DNA 탐색자로 hybridization하여 탐색하였다.

5. Dot blot hybridization

Lymphocyte DNA에서 얻어진 PCR product 중에서 50 μ l를 취하고 그외에 positive control PCR product, negative control PCR product, 그리고 sample DNA를 함께 적당량 취하여 96 well plate에 배열해놓고 50 μ l denaturing 용액 (2N NaOH, 1.0 M NaCl)을 더하여 변성시킨 후, 200 μ l neutralizing 용액 (1M Tris-HCl (pH 7.5), 1.0M NaCl)을 가하여 중화한 다음, dot blot apparatus를 통하여 nylon membrane에 blotting 하였다. Random-priming DNA 탐색자로 hybridization 한 후 세척하여 autoradiography를 수행하였다.

제 3 절 실험 결과

1. PCR을 위한 control DNA template의 제조

Vpu 부위의 PCR을 위해 pENV를 Sac I와 Kpn I으로 double digestion하고 Tat 부위의 PCR을 위해 pHIV를 Xba I으로 digestion하여 각각 350 bp와 9700 bp의 DNA를 분리하였다(Fig. 6). 각각의 DNA는 PCR-template-dissolving buffer에 녹여서 Vpu 부위의 PCR의 경우는 10 ng/ μ l로 희석하고 Tat 부위의 PCR의

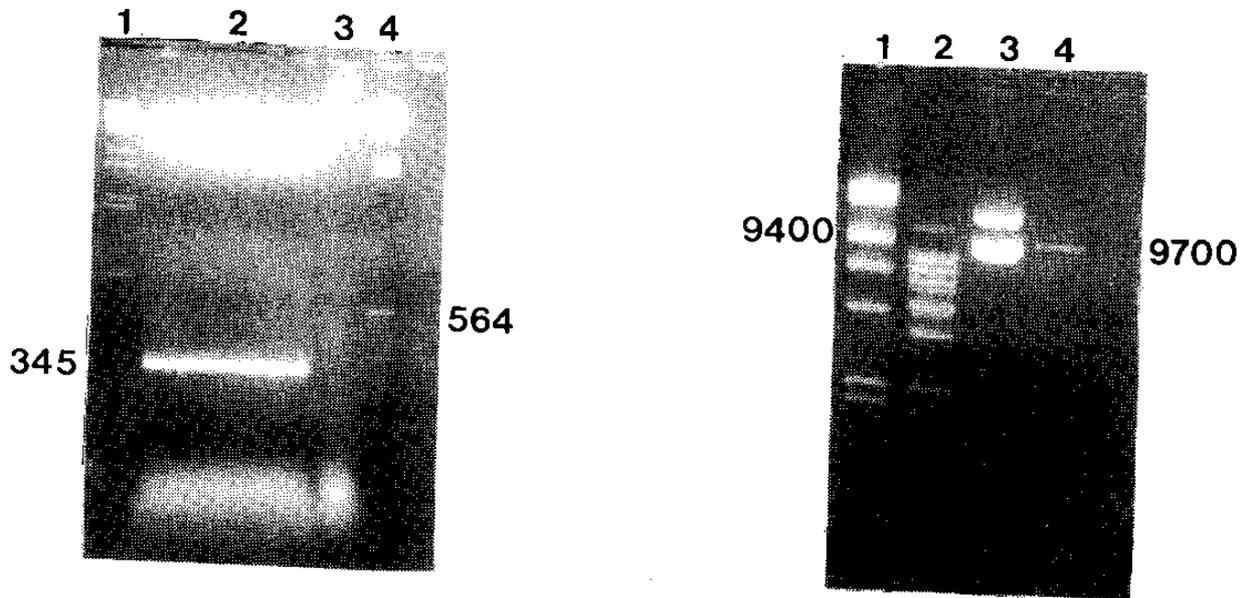


Fig. 6. Electrophoretic pattern of restriction fragments by pENV/S, K and pHIV/X.

- | | |
|---|--|
| Panel a : | Panel b : |
| lane 1 : λ -BestEII size marker | lane 1 : λ -HindIII size maker |
| lane 2 : pENV-SacI, KpnI digestion | lane 2 : λ -BstEII size marker |
| lane 3 : pENV - uncut | lane 3 : pHIV - uncut |
| lane 4 : λ -HindIII size marker | lane 4 : pHIV - XbaI digestion |

경우는 500 ng/ μ l로 희석하였다.

2. 5 x Taq Pol Buffer와 10 x Amplifying Buffer의 비교

각각의 buffer를 가지고 pENV에서 얻어진 350 bp의 DNA 절편을 template로 하여 PCR을 수행하였다 (Fig. 7와 Fig. 8).

5 x Taq Pol buffer를 사용한 PCR product가 10 x Ampli-

ifying buffer를 사용한 PCR product 보다 많은 양이 생성된 것으로 보인다 (Fig. 7).

그러나 Southern blot하여 동일한 탐색자를 가지고 hybridization 하였을때 10 × Amplifying buffer를 사용한 PCR의 product는 short product, long product와 DNA template가 독특한 band로써 뚜렷하게 나타나는 반면 (Fig. 9), 5 × Taq Pol buffer를 사용한 경우는 product의 크기가 약간의 비정상적인 모습을 보임을 알 수 있었다. PCR 반응의 경우는 매우 적은 양의 DNA에서 product를 증폭시키는 것이므로



Fig. 7. Electrophoretic pattern of PCR product in 8% polyacrylamide gel.

- lane 5 : PCR product using 5 × Taq Pol buffer
- lane 6 : PCR product using 10 × amplifying buffer
- lane 1 and lane 7 : λ - HindIII size marker
- lane 2 and lane 8 : λ - BstEII size marker

로 specificity가 가장 중요한 문제이다. 이를 감안하여 비정상적인 band 크기를 보이는 5 × Taq Pol buffer 대신 10 × Amplifying buffer를 사용하였다.

증폭된 DNA양의 문제는 뒤에서 서술하는 반응조건의 조정으로 10 × Amplifying buffer나 5 × Taq Pol buffer 모두 거의 비슷한 증폭능력이 있음을 확인하였다 (Fig. 10과 Fig. 11).



Fig. 8. Electrophoretic pattern of PCR product in 1% agarose gel.

lane 5 : PCR product using 5 × Taq Pol buffer
lane 6 : PCR product using 10 × amplifying buffer
lane 1 and lane 7 : λ -BstEII size marker

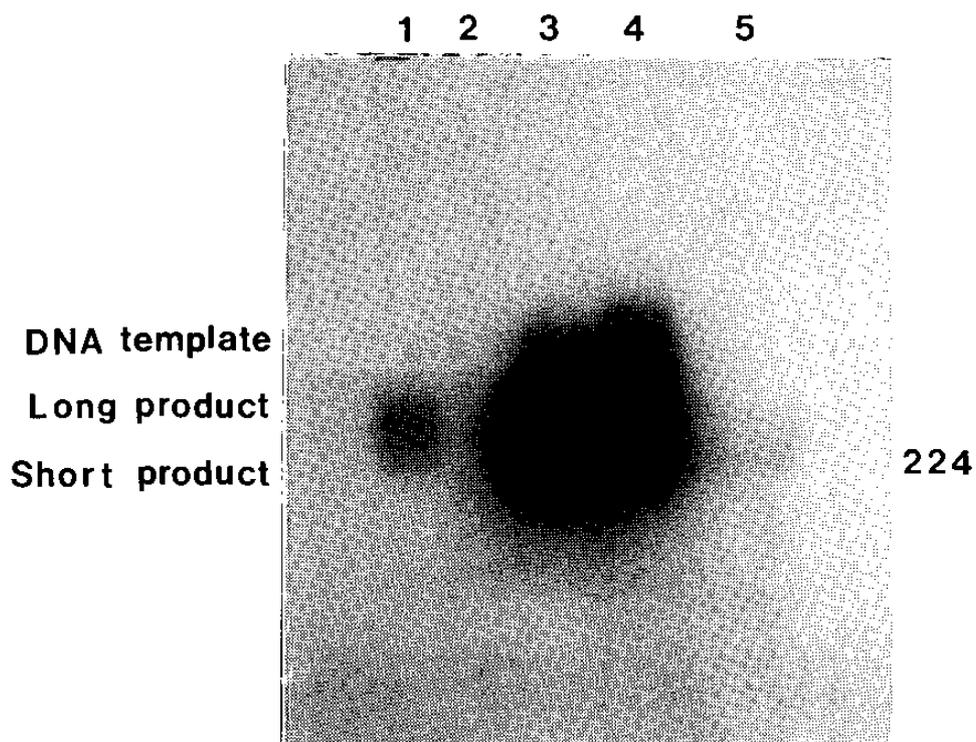


Fig. 9. Electrophoretic pattern of PCR product by hybridization.

- lane 3 : PCR product using 5 × Taq Pol buffer
- lane 4 : PCR product using 10 × amplifying buffer
- lane 5 : λ -BstEII size marker

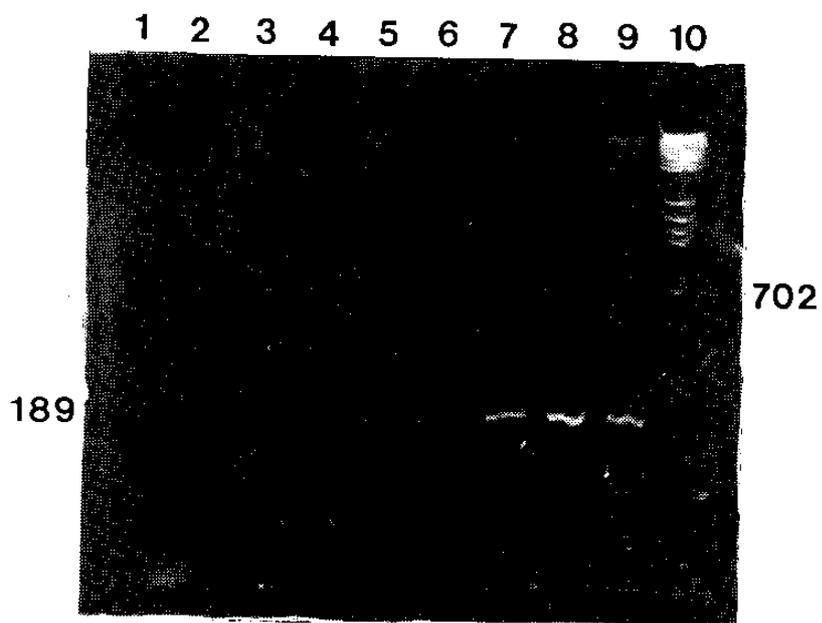


Fig. 10. Electrophoretic pattern of PCR product in 8% polyacrylamide gel with variation of primer concentration using $5 \times$ Taq Pol buffer.

lane 1 : 50 fmole	lane 2 : 100 fmole
lane 3 : 200 fmole	lane 4 : 500 fmole
lane 5 : 1 fmole	lane 6 : 2 fmole
lane 7 : 5 fmole	lane 8 : 10 fmole
lane 9 : 20 fmole	lane 10 : λ -BstEII size marker

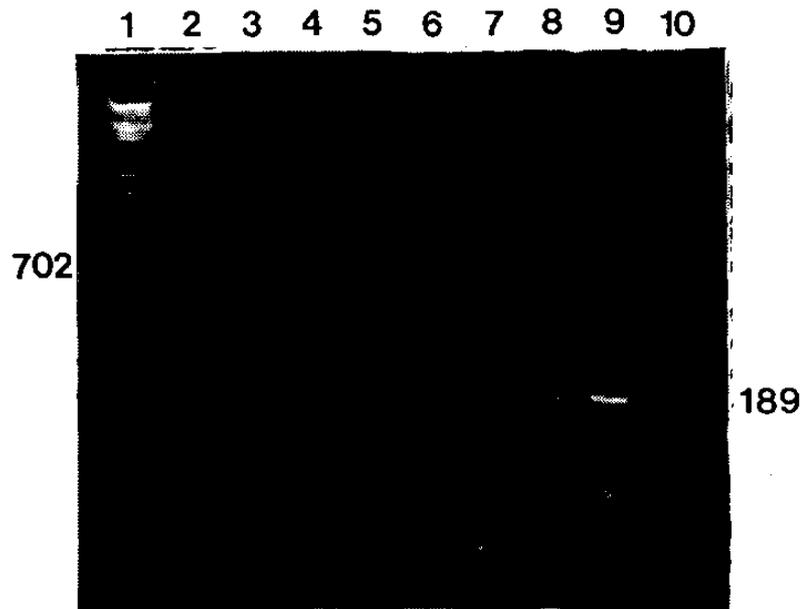


Fig. 11. Electrophoretic pattern of PCR product with variation of primer concentration using $10 \times$ amplifying buffer.

lane 2 : 50 fmole	lane 2 : 100 fmole
lane 4 : 200 fmole	lane 4 : 500 fmole
lane 6 : 1 fmole	lane 6 : 2 fmole
lane 8 : 5 fmole	lane 8 : 10 fmole
lane 10 : 20 fmole	lane 1 : λ -BstEII size marker

3. PCR 반응조건의 최적화

Taq DNA polymerase의 최적 Mg^{++} 농도는 매우 낮기 때문에 (1.5 mM) 반응용액내의 Mg^{++} 농도를 적절하게 맞추어줄 필요가 있다. 이런 이유에서 DNA template를 녹이는 buffer의 경우도 Mg^{++} 와 chelating하는 EDTA의 양을 일반적으로 DNA를 녹이는 TE buffer의 1/10로 줄여주어야 하며 너무기 dNTP 농도와 primer 농도에 따라 이용 할수 있는 Mg^{++} 의 양이 영향을 받으므로 PCR 반응을 확립하기 위해서는 먼저 이들간의 상호 농도를 적절히 조절하여 반응이 가장 잘 일어나는 조건으로 맞추어 주어야 한다. 이를 위해 우선 $MgCl_2$ 농도를 1.5 mM로 dNTPs 농도를 250 μ M로 맞추어놓고 primer의 농도를 변화시켜 보았다 (Fig. 10과 Fig. 11).

5 \times Taq Pol buffer와 10 \times Amplifying buffer 양쪽모두에서 10 pmole을 사용했을때 가장 많은 양의 product가 생성되었음을 알 수 있었다.

dNTPs의 농도를 두가지로 (250 μ M과 1 mM) 고정하고 10 pmole의 primer에서 $MgCl_2$ 의 농도를 검사하였는데 (Fig. 12와 Fig. 13) dNTPs의 농도변화는 250 μ M 일때나 1 mM 일때나 거의 차이를 보이지 않는 것으로 미루어 250 μ M 정도면 반응부피 100 μ l에서 dNTPs가 포화될 수 있는 농도임을 알 수 있었다. dNTPs가 250 μ M일 경우에 $MgCl_2$ 의 농도를 1.5 mM를 실험 하였을때 보다 2 mM이나 4 mM로 실험하였을때 product의 양이 증가하였으나 2 mM이나 4 mM일때 양쪽에서 큰차이를 보이지 않았으므로 2 mM 또는 4 mM이 적정농도임을 알 수

있었고, dNTPs가 1 mM일 경우에는 4 mM에서 최대의 product양을 보였으므로 dNTPs의 양의 증가가 MgCl₂ 적정농도에 영향을 미치는 것으로 생각되며 아마도 dNTPs의 인산기와 Mg⁺⁺간의 ionic interaction이 dNTPs 양의 증가에 따라 증가되기 때문이라 생각된다.

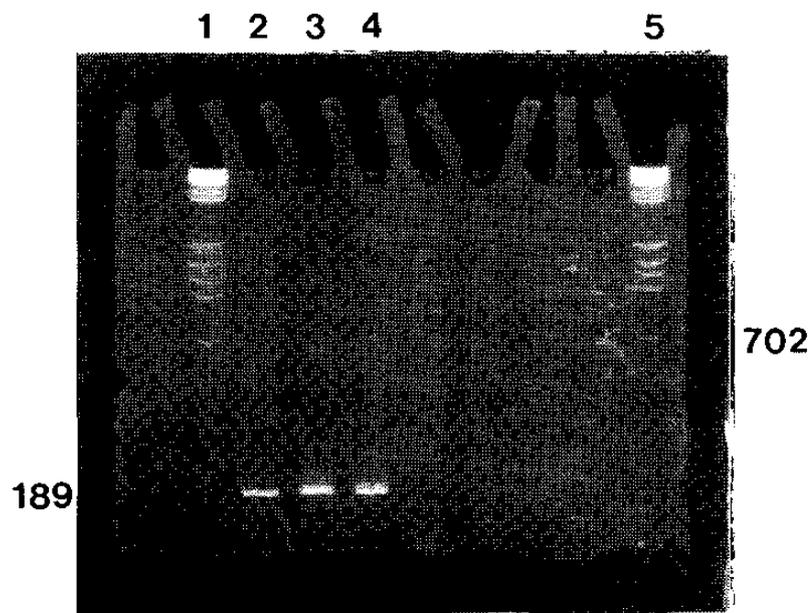


Fig. 12. Electrophoretic pattern of PCR product with variation of MgCl₂ concentration in 250 uM dNTPs.

lane 1 and 5 : λ - BstEII size marker

lane 2 : 1.5 mM MgCl₂

lane 3 : 2 mM MgCl₂

lane 4 : mM MgCl₂

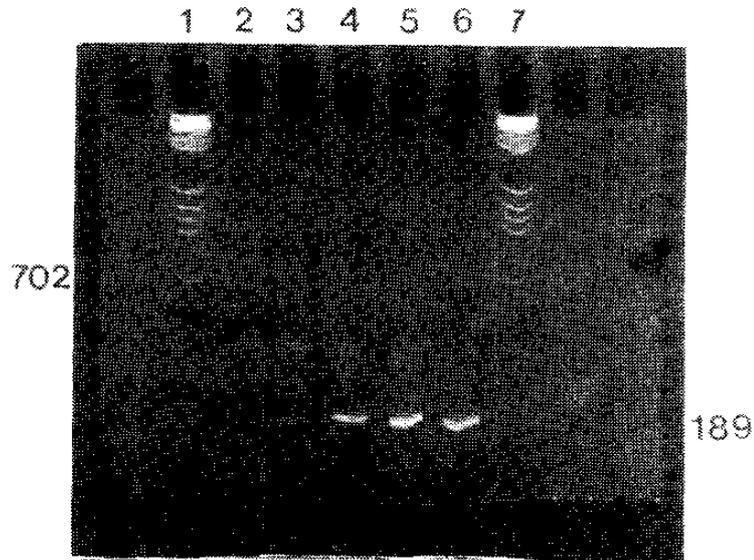


Fig. 13. Electrophoretic pattern of PCR product with variation of $MgCl_2$ concentration in 1 mM dNTPs.

lane 1 and 5 : λ - BstEII size marker

lane 2 : 1.5 mM $MgCl_2$

lane 3 : 2 mM $MgCl_2$

lane 4 : 3 mM $MgCl_2$

lane 5 : 4 mM $MgCl_2$

lane 6 : 5 mM $MgCl_2$

4. DNA template 양의 최적화

앞에서도 서술했듯이 DNA 양의 최적화는 PCR에 의해 최저 어느정도 양의 DNA가 탐지될 수 있는지를 나타내주는 중요한 척도이므로 lymphocyte 시료로 실험하기 전에 control DNA를 가지고 위에서 확립된 반응조건들의 sensitivity를 실험하여 보았다.

Vpu 부위의 경우는 최저 1×10^{-5} ng (1×10^{-4} fmole)까지 희석하여 실험을 수행하였는데 1×10^{-2} ng (1×10^{-2} fmole)을 사용한 경우까지

polyacrylamide gel에서 band 를 볼 수 있었으므로 $10^4 \sim 10^5$ 정도 증폭되었다고 생각된다 (Fig. 14).

Tat 부위의 경우는 최저 5×10^{-6} ng (8×10^{-7} fomle) 까지 회석하여 PCR을 수행하였는데 5×10^{-3} ng을 사용한 경우까지 band를 볼 수 있었으므로 $10^5 \sim 10^6$ 정도 증폭되었다고 생각된다 (Fig. 15). 또한, Southern blot하여 Tat 부위의 PCR product를 검사한 결과, 5×10^{-4} ng을 사용한 경우까지 autoradiogram 에서 band가 나타남을 알수 있었다(Fig. 16).

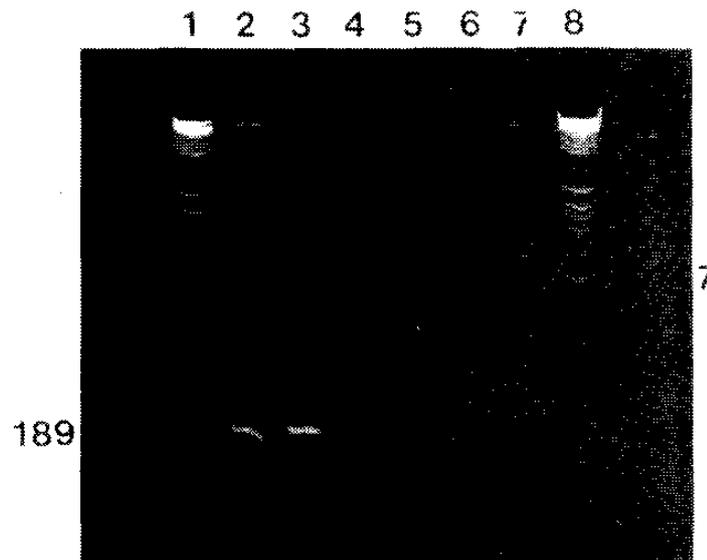


Fig. 14. Electrophoretic pattern of PCR product with variation of DNA concentration using Vpu-specific fragments (350 bp).

lane 1 and 8 : λ - BstEII size marker

lane 2 : 20 ng

lane 3 : 1 ng

lane 4 : 1×10^{-2} ng

lane 6 : 1×10^{-4} ng

lane 6 : 1×10^{-5} ng

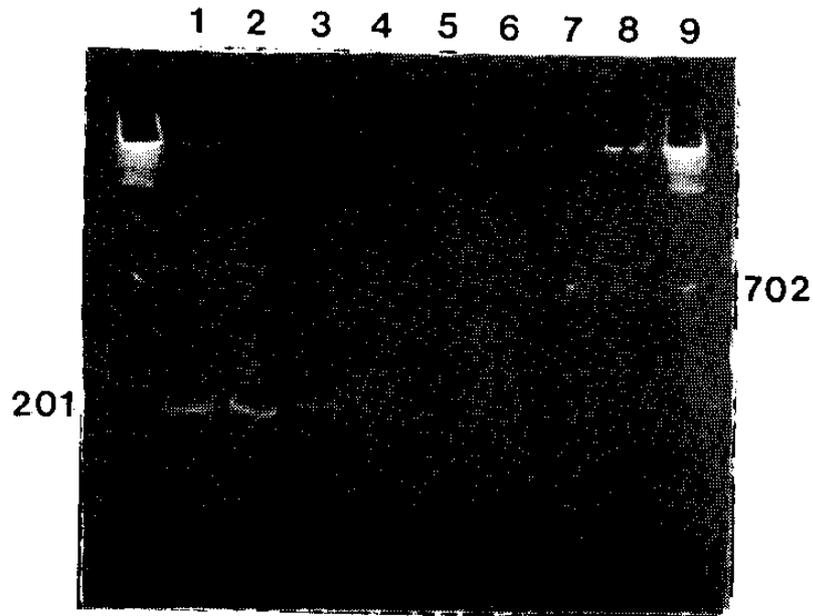


Fig. 15. Electrophoretic pattern of PCR product with variation of DNA concentration using Tat-specific DNA fragments (9700 b.p.).

- | | |
|--|--------------------------------|
| lane 1 : 500 ng | lane 2 : 5 ng |
| lane 3 : 5×10^{-2} ng | lane 4 : 5×10^{-3} ng |
| lane 5 : 5×10^{-4} ng | lane 6 : 5×10^{-5} ng |
| lane 7 : 5×10^{-6} ng | |
| lane 8 : PCR product using buffy coat DNA for negative control | |
| lane 8 : λ -BstEI size marker | |

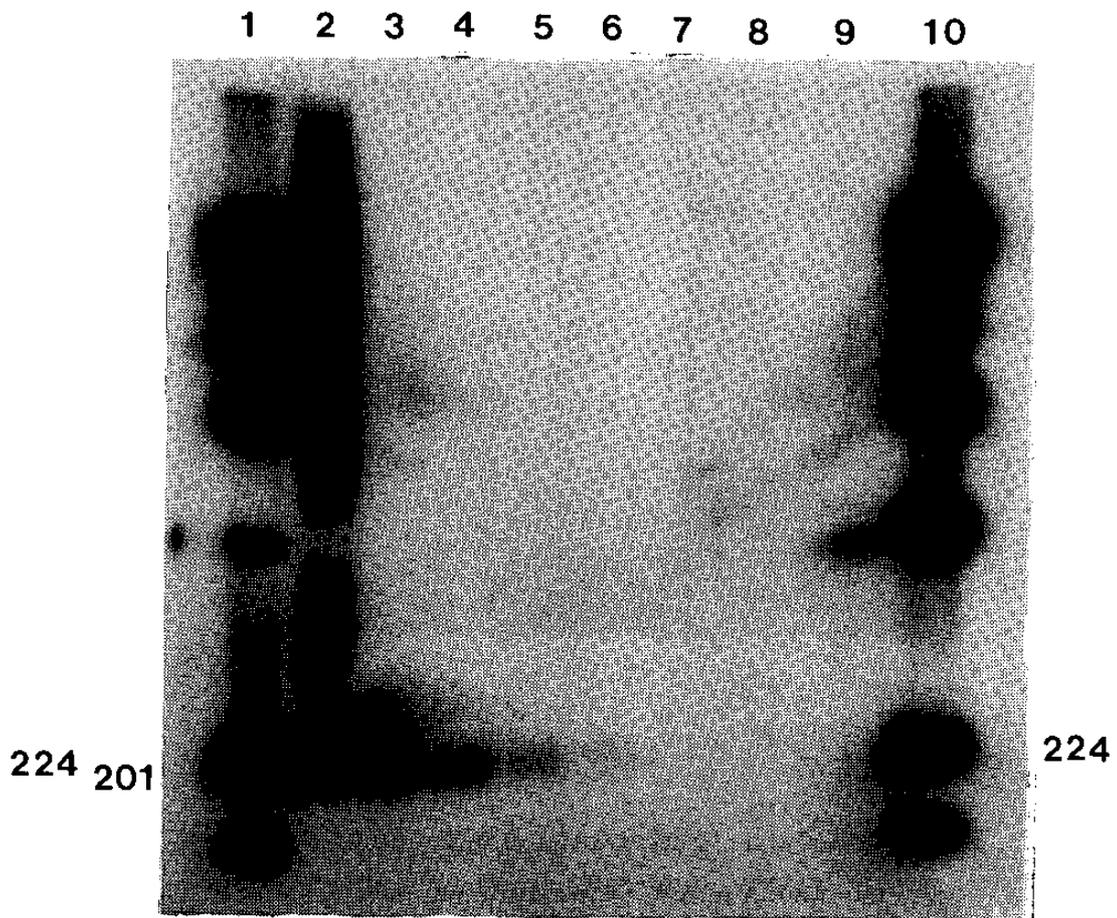


Fig. 16. Autoradiogram pattern of PCR product with variation of DNA concentration using Tat-specific DNA fragments.

- | | |
|---|--------------------------------|
| lane 1 and 10 : radiolabeled | λ -BstEII size marker |
| lane 2 : 500 ng | lane 3 : 5 ng |
| lane 4 : 5×10^{-2} ng | lane 5 : 5×10^{-3} ng |
| lane 6 : 5×10^{-4} ng | lane 7 : 5×10^{-5} ng |
| lane 8 : 5×10^{-6} ng | |
| lane 9 : PCR product using buffer coat DNA for negative control | |

그러므로 5×10^{-3} ng (8×10^{-4} fmole) 을 사용하여 증폭된 product의 양과 5×10^{-4} ng (8×10^{-5} fmole) 을 사용하여 증폭된 product의 양을 비교해보면 약 10^6 배정도 증폭되었음을 알 수 있다.

한편, in situ hybridization에 의한 보고에 의하면³⁷⁾ 감염된 사람에게서 viral RNA를 발현하는 peripheral blood lymphocyte의 수는 10^4 개의 세포 중에서 한개 정도가 있다고 알려져있다. 그러므로 10^6 배 정도로 증폭된다면 일상적인 hybridization에 의해 탐지할 수 있는 수십 pg ~ 수 pg 정도로 증폭될 수 있다고 본다.

5. PCR Product의 restriction analysis

증폭된 product를 매우 간단하게 확인하는 방법으로 증폭된 부위에 있는 특정 제한효소를 가지고 double-stranded DNA product를 digestion하여 band를 확인함으로써 간접적으로 목적부위-특정증폭임을 증명하는 방법이다³⁸⁾.

Fig. 17에 나타낸 제한효소로 digestion 했을때 나타나는 각 product들의 절단된 절편들의 크기로 참조하여 Vpu product를 Ava II, Ban I 으로, Tat product를 BstN I, Rsa I 으로 digestion 하였다.

Ava II로 자른 Vpu product는 176 bp와 13 bp 크기의 band로 나타나며 Ban I으로 자른 Vpu product는 169 bp와 29 bp 크기의 band로 나타난다. 또한, BstN I으로 자른 Tat product는 171 bp, 11 bp 그리고 29 bp 크기의 product로 나타나며 Rsa I으로 자른 Tat product는 146 bp와 65 bp 크기의 product로 나타

난다. 이들을 모두 2% agarose gel에서 band로 확인하였다(Fig. 18).

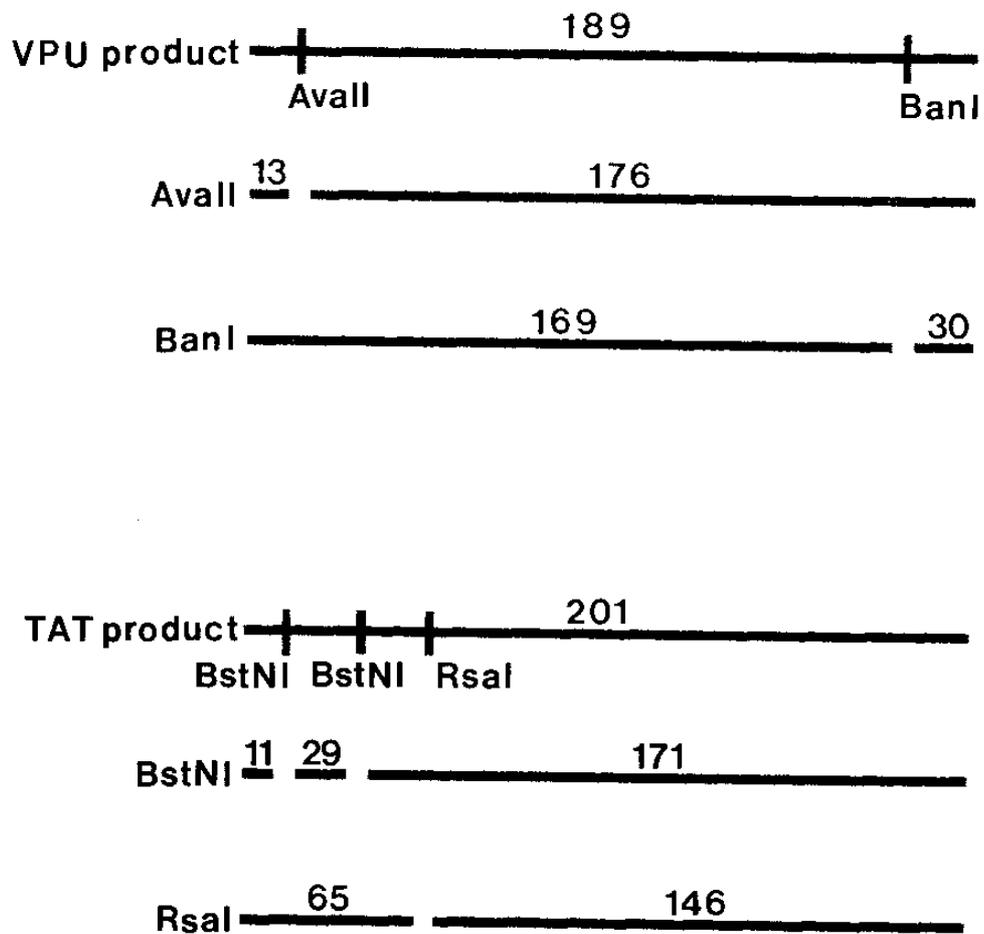


Fig. 17. Restriction sites of each PCR product and the size of digested fragments.

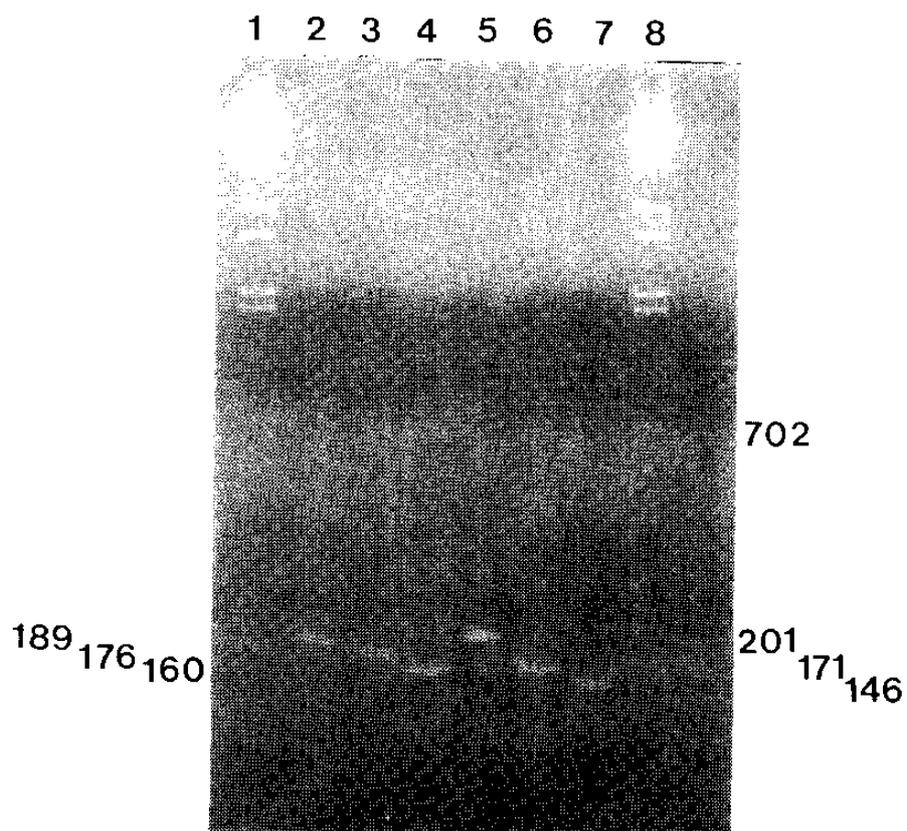


Fig. 18. Electrophoretic pattern of digested fragments in 2% agarose gel.

lane 1 : Vpu product - uncut

lane 3 : *Ava*II - digested Vpu product

lane 4 : *Ban*I - digested Vpu product

lane 5 : Tat product - uncut

lane 6 : *Bst*NI - digested Tat product

lane 7 : *Rsa*I - digested Tat product

lane 1 and 8 : λ -*Bst*EII size marker

6. Seropositive인 사람에게 얻은 lymphocyte DNA에서의 PCR 수행

ELISA와 WB에 의해 항체 양성자로 판정되었으나 virus 분리가 되지 않은 9건과 virus 분리가 된 1건의 lymphocyte의 일부를 전술한 방법으로 DNA를 추출하여 분광 광도계로 O. D. ₂₆₀ 에서 정량하였다. 7 ml의 lysate 중에서 1 ml을 취하여 정량한 결과 각 sample의 DNA 양은 대개 1 μ g/ μ l에서 0.1 μ g/ μ l 사이의 값으로 계산되었다.

그외에 positive control로써 Vpu 부위의 분리된 350 bp DNA 절편과 Tat 부위의 분리된 9700 bp DNA 절편을 가지고 PCR을 함께 수행하였고 negative control을 위해 buffy coat DNA와 human placental DNA를 PCR하여 negative control로 사용하였다.

PCR 반응은 Vpu 부위와 Tat 부위를 따로 증폭하였으며 product 들을 일단 8% polyacrylamide gel에서 전기영동해 보았으나 양이 적은 관계로 band를 확인할 수 없었으므로 다시 agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane으로 옮기는 Southern blot hybridization을 수행하였다 (Fig. 19, 20).

각각의 nylon membrane을 Vpu 와 Tat 부분의 random-priming 탐색자로 탐색한 결과 각기 7건과 4건의 PCR positive signal을 확인할 수 있었다 (Fig. 21, 22).

Tat product의 경우는 100 μ l 중에서 10 μ l를 취하여 실험하였고, Vpu product의 경우는 100 μ l 중에서 20 μ l를 취하여 실험하였는데 많은 양을 사용한 Vpu product쪽의 autoradiogram에서 더 강한 signal을 나타내었으므로 단지 product의 양이 적은 것이지,

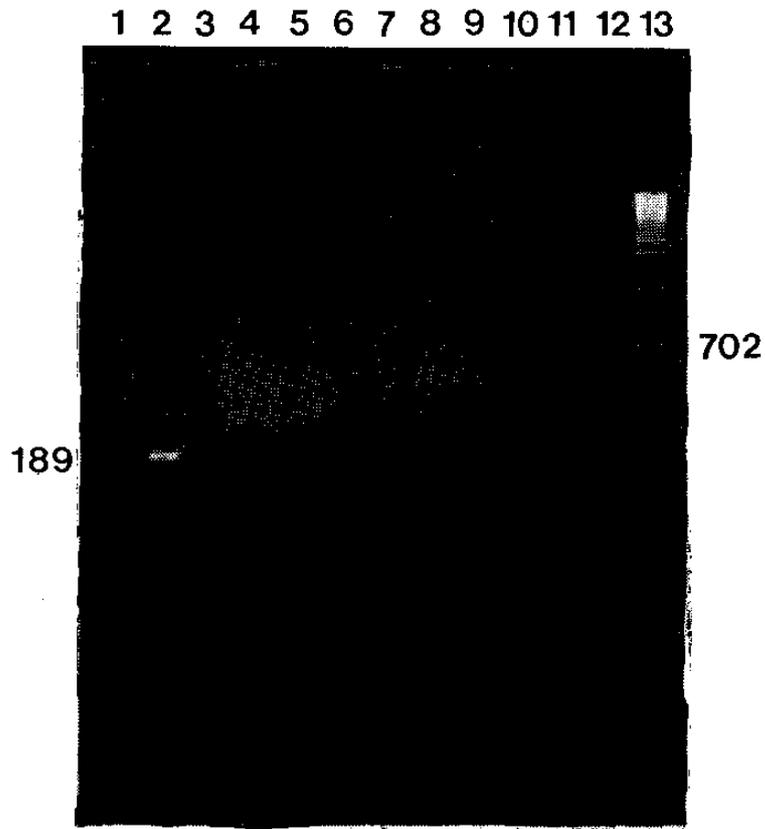


Fig. 19. Electrophoretic pattern of PCR product using Vpu specific primer in 1.5% agarose gel.

lane 1 : negative control PCR product using buffy coat DNA

lane 2 : positive control PCR product using Vpu-specific DNA

lane 3 - lane 12 : PCR product using each sample DNA from #10 to #1

lane 13 : radiolabeled λ - BstEII size marker

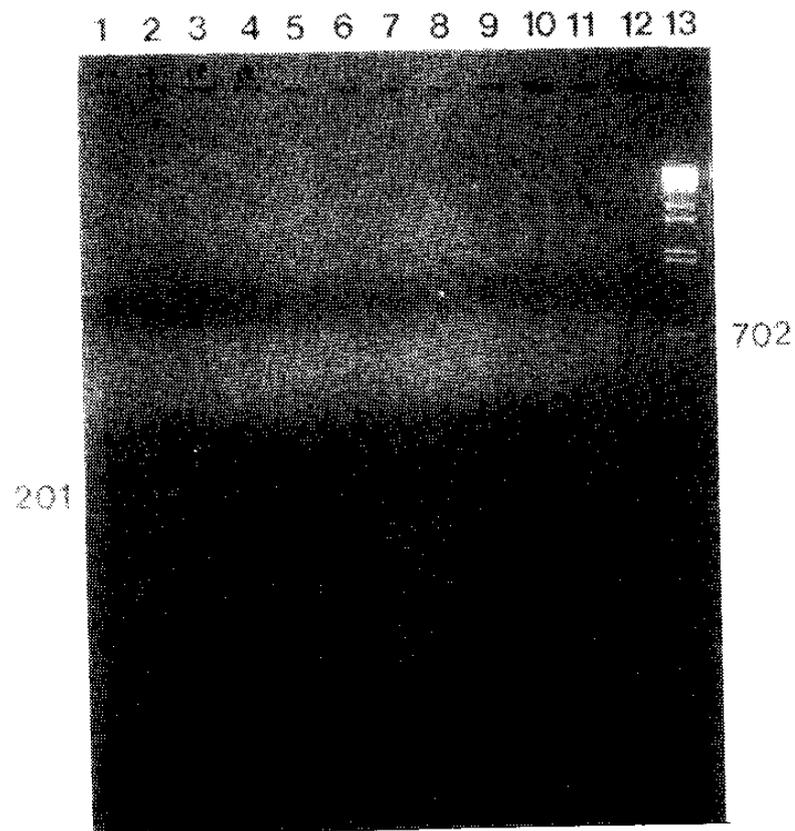


Fig. 20. Electrophoretic pattern of PCR product using Tat specific primer in 2% agarose gel.
 lane 1 : negative control PCR product using buffy coat DNA
 lane 2 : positive control PCR product using Tat-specific DNA
 lane 3 - lane 12 : PCR product using each sample DNA from #10 to #1
 lane 13 : radiolabeled λ -BstEII size marker

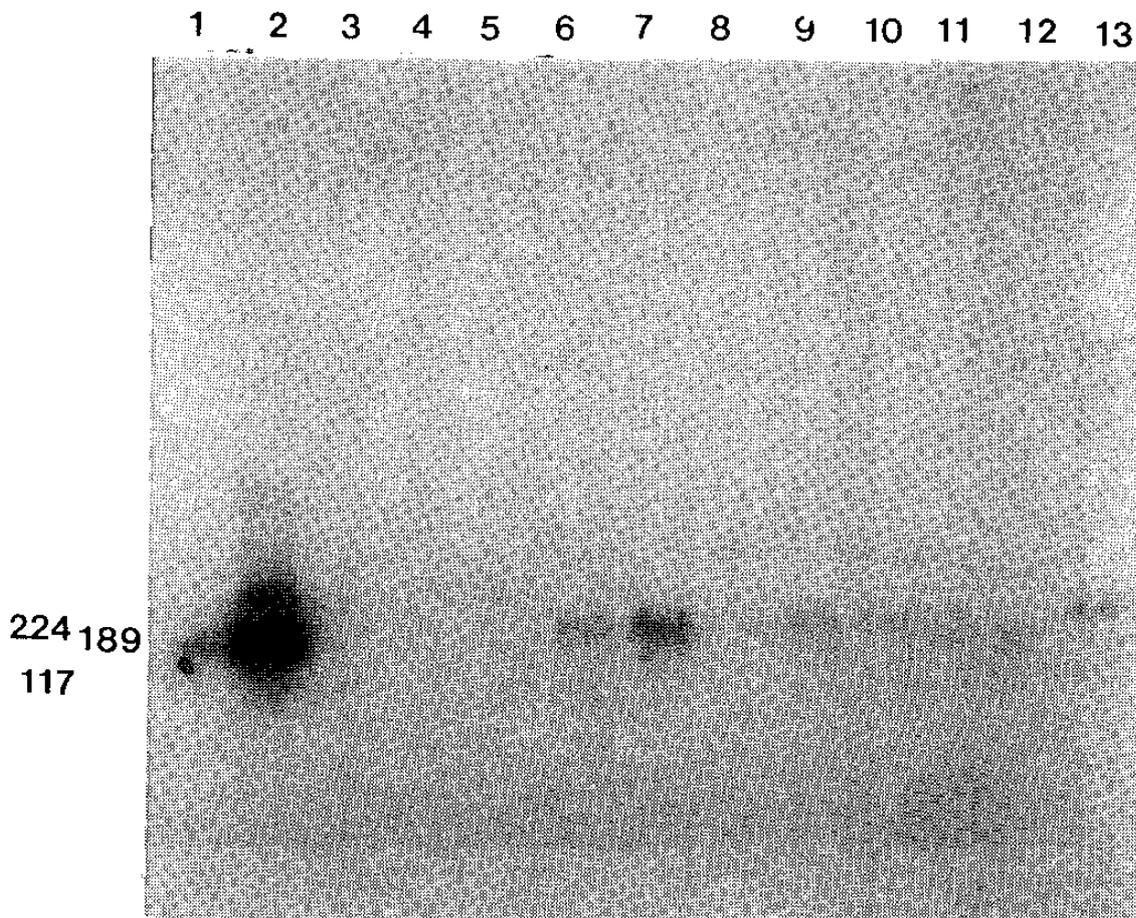


Fig. 21. Autoradiogram of PCR product using Vpu specific primer.

lane 1 : negative control PCR product using buffy coat DNA

lane 2 : positive control PCR product using Vpu-specific DNA

lane 3 - lane 12 : PCR product using each sample DNA from #10 to #1

lane 13 : radiolabeled λ -BstEII size marker

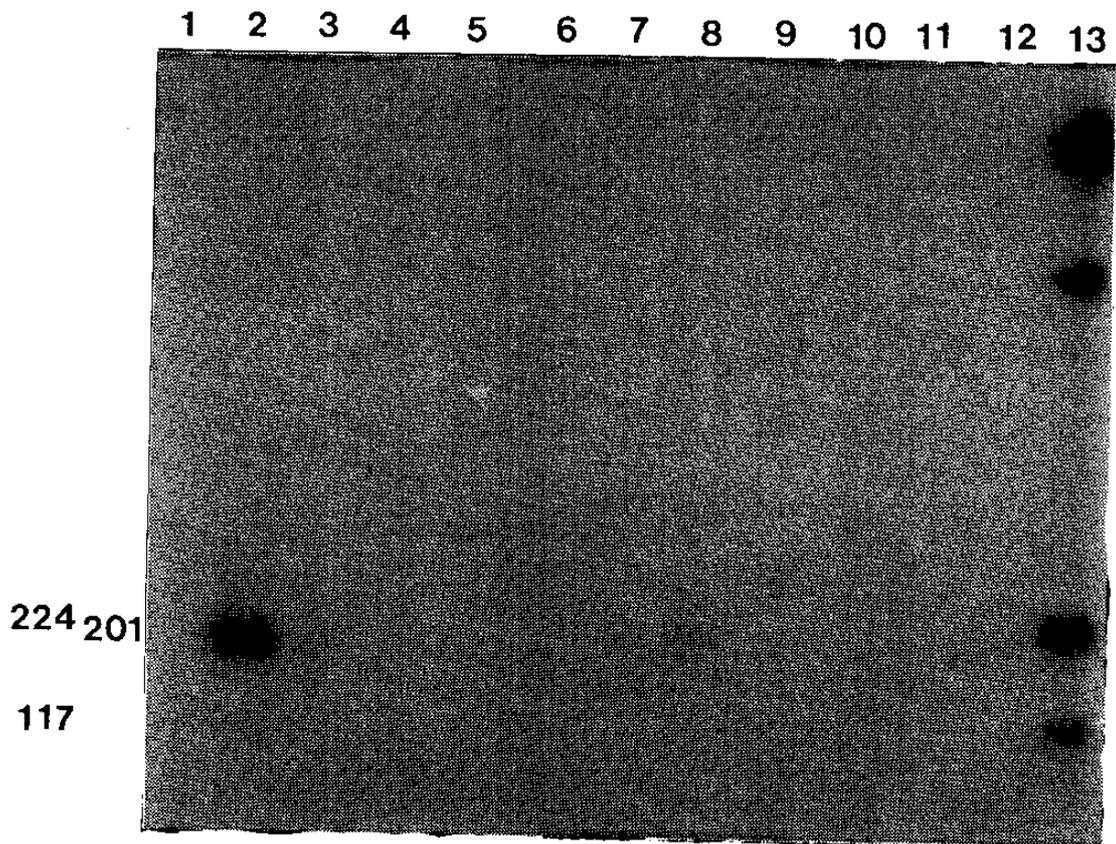


Fig. 22. Autoradiogram of PCR product using Tat specific primer

lane 1 : negative control PCR product using buffy coat DNA

lane 2 : positive control PCR product using Tat-specific DNA

lane 3 - lane 12 : PCR product using each sample DNA from #10 to #1

lane 13 : radiolabeled λ -BstEII size marker

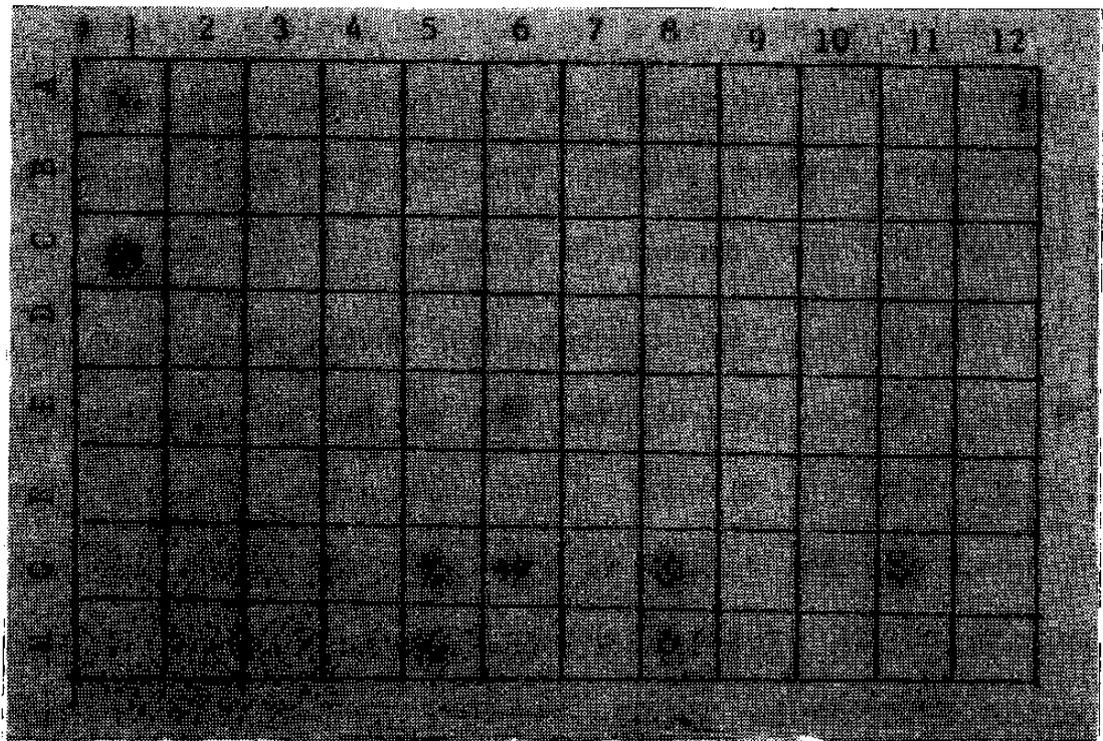
hybridization과 probe에 문제가 있는것은 아니라고 생각된다. 또한, Southern blot transfer의 효율이 100%라고 말할 수 없으므로 transfer하는 과정중에 손실되는 양도 감안해야 하므로 되도록 손실이 적은 dot blot hybridization을 수행하였다.

Dot blot을 하기위해 각 sample에서 증폭된 product들을 50 μ l 씩 취하였고, positive control Vpu, Tat product를 1 μ g에서 1 pg까지 10배씩 희석하여 취하였고, 그외 negative control DNA와 각 sample DNA를 1 μ g 되게 취하여 (Fig. 23) nylon membrane에 blotting 하였다. 결과에서 전체적으로 signal이 약하게 나타난 것과 control PCR product들에서도 1 μ g외에 signal이 잘 잡히지 않은 것으로 미루어봐서 blotting하는 과정중에 손실이 되었거나 아니면 9.7 kbp 크기의 DNA를 가지고 probe를 만들어 탐색하였으므로 약 200 bp 정도의 짧은 DNA product들을 잡아낼 수 있는 probe의 양이 상대적으로 적기 때문이 아닌가 생각된다.

이를 극복하기 위해 9.7 kbp 전체 genomic DNA 중에서 Tat와 Vpu 부위를 포함하는 500~600 bp정도 크기의 DNA 절편을 재조합하여 probe를 만들려고 시도하고 있다.

이런 맥락에서 보면 E11과 G11의 negative control 에서도 약한 signal이 잡히는 것과 template DNA를 같이 blotting 하였던 H lane 의 경우에 signal이 나타나는 것을 설명할 수 있을 것 같다.

즉, HIV-genome (9700 bp) 내에는 human chromosomal DNA와 서로 비슷한 부분들이 있어서 이렇게 크기가 큰 DNA에서 만들어진 무작위의 탐색자들은 human DNA에서 signal이 나타날 수 있다



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
VPU CONTROL PCR PRODUCT	1 ug	0.1ug	10ng	1ng	0.1ng	10pg	1 pg						
TAT CONTROL PCR PRODUCT	1 ug	0.1ug	10ng	1 ng	0.1ng	10pg	1 pg						
VPU SAMPLE PCR PRODUCT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B		BUFFY COAT DNA PCR PRODUCT
TAT SAMPLE PCR PRODUCT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	P		PLACENTAL DNA PCR PRODUCT
TEMPLATE DNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

Fig. 23. Autoradiogram of PCR product by dot blot hybridization.

고 생각되며 아마도 negative control DNA에서 signal이 나타난 것이 이런 경우인 것으로 생각된다. 이런 문제도 보다 specific하고, 크기가 적은 DNA probe로 극복될 수 있으리라 생각된다.

제 4 절 고 찰

PCR이란 기술은 앞서서도 이야기했듯이 매우 적은 양의 시료, 즉, 다른 방법들로는 낮은 sensitivity 때문에 만족할만한 결과를 얻을 수 없는 정도로 적은양 일때 탐지할 수 있는 범위로 시료의 양을 증가시키는 방법으로 사용되었다.

이런 이유로 해서 장점도 많이 있으나 반응조건등에 매우 민감하다는 단점이 있다. 이를 위해 우선은 어떤시료, 어떤 primer, 어떤 dNTPS 혼합용액을 사용하든지 정확하고 최적한 조건을 맞출 수 있도록 반응조건들에 대한 PCR의 반응 정도를 고찰하였다.

반응정도를 높이는 관건은 Mg^{++} 의 양에 있음을 알 수 있는데 효소가 필요로 하는 Mg^{++} 의 양을 적절히 공급해 주기 위해 Mg^{++} 를 빼앗아 가는 것들 즉, EDTA, dNTPs, primer, 또는 DNA template의 양이 변화함에 따라 Mg^{++} 의 농도를 적절히 조절해 주어서 PCR과정을 확립해야 한다는 것을 알았다.

한편, control DNA template (350 bp의 분리된 DNA 또는 분리된 9700 bp의 HIV-DNA)를 사용할 때와 직접 시료 DNA를 사용할 때, 전자는 비교적 길이가 짧은데 반해, 후자의경우는 human

chromosomal DNA가 조각된 것들로서 전자의 DNA에 비해 길이와 양이 많음을 감안하여야 하므로 control DNA에서 얻어진 실험결과를 가지고 시료DNA를 사용하는 PCR 조건에 수정을 가할 계획으로 있다.

HIV-DNA를 탐지하고자 하는 것이 목적이므로 증폭된 DNA의 양이 많을수록 유리한, 감염된 사람의 혈액내에서 viral RNA를 발현하는 lymphocyte의 수가 제한적이므로 (1 세포 / 10^4 lymphocyte 세포) 문제를 야기시킬 수 있다. 그러나, 10^6 cells 정도의 lymphocyte를 사용한다면 human 염색체 DNA에 삽입된 HIV DNA가 약 100개 (molecule) 정도이므로 (1×10^{-7} fmole) 여기서 10^6 배로 증폭되어 200 bp 정도의 product가 10^8 개 (molecule) 정도 나온다면 약 20 pg 정도를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 20 pg이란 양은 수 pg 까지 탐지해 낼 수 있는 dot blot hybridization을 적용한다면 아무 문제없이 탐지해 낼 수 있는 양으로 생각되나 실험과정중에 손실을 감안해야하는 Southern blot의 경우는 이상적인 탐지 방법이 될 수 없다고 생각된다.

한편 우리가 목표로 하고 있는 것은 항체 음성자이면서 viral DNA (또는 RNA)를 가지고 있는 사람인데, 이들의 경우는 viral DNA 또는 RNA를 가지고 있는 lymphocyte의 수가 우리가 예상했던 것보다 더 적을 수도 있다고 생각된다.

이런 맥락에서 보면 dot blot에 의한 탐지방식이 항체 음성자이면서 viral DNA (또는 RNA)를 가지고 있는 사람에게 어느 정도로 신뢰성있게 적용될 수 있는지는 의문이다. 그래서 보다 많은 양의 증폭된 product를 얻을 수 있도록 double PCR을 적용하든지, 아니면 PCR product를 직접 방사선동위원소로 표지할 수 있도록 하여 적은 양의

product도 autoradiography를 통해 탐지해낼 수 있도록 하는 방법들을 시도해 보려고 계획중이다. 이를 위해 지금까지는 control DNA template와 항체양성자 시료를 사용하였으나, 항체 음성자이면서 virus에 감염되었다고 생각되는 사람의 lymphocyte에서도 실험을 하려고 계획중이다.

참 고 문 헌

1. Varmus, H.E., *et. al.*, Cell 11, 307-319, (1977).
2. Fritsch, E.F., *et. al.*, J. Virol. 24, 461-469, (1977).
3. Feinberg, M.B., *et. al.*, Cell 46, 807-817, (1986).
4. Malim, M.H., *et. al.*, Nature 338, 254-257, (1989).
5. Ho, D.D., *et. al.*, Infection of monocyte/macrophage by human T lymphotropic virus type III. J. Clin. Invest. 77, 1712-1715, (1986).
6. Gartner, S., *et. al.*, The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. Science 233, 215-219, (1986).
7. Koenig, S., *et. al.*, Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. Science 233, 1089-1093, (1986).
8. Funke, I., *et. al.*, The cellular receptor (CD4) of the human immunodeficiency virus is expressed on neurons and glial cells in human brain. J. Exp. Med. 165, 1230-1235, (1987).
9. Shaw, G.M., *et. al.*, Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. Science 226, 1165-1171, (1984).
10. Couroure, A.M., *et. al.*, Comparison of commercial kits for the detection of anti-LAV antibodies in blood donors. Ann. Inst. Pasteur/Virol. 138, 61-66, (1987).

11. Lang, J.M.A., *et. al.*, Persistent HIV antigenaemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS. *Br. Med. J.* 293, 1459-1462, (1986).
12. Salahuddin, S.Z., *et. al.*, HTLV-III in symptom free seronegative persons. *Lancet* *ii*, 1418-1420, (1984).
13. Marlink, R.G., *et. al.*, Low Sensitivity of ELISA testing in early HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 315, 1549, (1987).
14. Ranki, A., *et. al.*, Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human-immunodeficiency-virus infection. *Lancet* *ii*, 589-593, (1987).
15. Ward, J.W., *et. al.*, Transmission of human immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusions as negative for HIV antibody. *N. Engl. J. Med.* 318, 473-478, (1988).
16. Feorino, P.M., *et. al.*, *Science* 225, 69, (1984).
17. Gomperts, E.D., *et. al.*, *Blood* 65, 1549, (1987).
18. Ward, J.W., *et. al.*, *J. Am. Med. Assoc.* 256, 357, (1986).
19. Feorino, P.M., *et. al.*, *N. Engl. J. Med.* 312, 1293, (1985).
20. Kwok, S., *et. al.*, *J. Virol.* 61, 1690, (1987).
21. Mullis, K.B., *et. al.*, *Meth. Enzymol.* 155, 335 (1987).
22. Chin, Y.O., *et. al.*, DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 239, 295-297, (1988).

23. Michel, L., *et. al.*, Identification of HIV-infected sero-negative individuals by a direct diagnostic test based on hybridization to amplified viral DNA. *Lancet* 418-421, (1988).
24. Laure, F., *et. al.*, Detection of HIV-1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* 538-540, (1988).
25. Clyde, H., *et. al.*, Direct detection of HIV DNA expression in seropositive subjects. *Lancet* 596-599, (1988).
26. Bryan, R.C., *et. al.*, Regulatory pathway governing HIV-1 replication. *Cell* 58, 423-426, (1989).
27. Birnboim, H.C., *et. al.*, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *N.A.R.* 7, 1513, (1979).
28. Hanish, J., *et. al.*, Activity of DNA modification and restriction enzymes in KGB, a potassium glutamate buffer. *Gene Anal. Tech.* 5, 105, (1988).
29. Dretzen, G., *et. al.*, A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gel. *Anal. Biochem.* 112, 295, (1989).
30. Maniatis, T., *et. al.*, *Molecular Cloning*, 2nd. ed., Cold spring harbor laboratory press, (1989).

31. Southern, E., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503, (1975).
32. Medveczky, P., *et. al.*, Rapid vacuum driven transfer of DNA and DNA from gels to solid support. *Biotechnology* 5, 242, (1987).
33. Olszewska, E., *et. al.*, Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer. *Trends Genet.* 4, 92, (1988).
34. Feinberg, A.P., *et. al.*, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6, (1983).
35. Feinberg, A.P., *et. al.*, - Addendum -, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137, 266, (1984).
36. Warang, S.A., *et. al.*, Chemical synthesis of deoxy oligonucleotides by the modified triester methods. *Meth. Enzymol.* 65, 610, (1980).
37. Herper, M.E., *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 772, (1986).

제 IV장 HIV 감염자의 면역학적 특성

Immunological characterization
of HIV infected person

朴聖會, 李雄洙

金文湜, 朴貴禮

金泰奎, 朴曾奭

崔炳喜, 奇美京

趙泳杰, 楊愛順

金宗玄

1. HIV 감염자의 면역학적 양상

제 1 절 서 설

후천성면역결핍증 (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) 는 1981년 미국에서 뚜렷한 원인이 없이 면역기능이 저하된 젊은이들에 드문 기회감염이나 Kaposi 육종등 악성종양이 발생한것이 보고된 후에¹⁻⁴⁾ 미국질병관리센터(Centers for Disease Control, CDC)에서 이러한 증후군을 후천성면역결핍증으로 정의하였다⁵⁾.

1983년 Barre-Sinoussi등이 T-cell tropic retrovirus를 분리하였고⁶⁾ 그후 Gallo등이 AIDS 환자들에서 같은 virus를 분리하였으며⁷⁾ 현재는 이 virus를 HIV(Human Immunodeficiency Virus)로 통일하였다⁸⁾. 이 질환에 대한 원인체인 virus가 발견되었으나 현재까지는 백신이나 완전한 치료제는 없고 면역상태를 향상시키며 기회감염의 정도나 빈도를 감소시키는 약제가 개발되어 이용되고 있다.

HIV 항체 양성자의 분류 (classification)는 미국 CDC와⁹⁾ Walter Reed Army Institute of Research에서의 stage¹⁰⁾가 있으며 CDC 분류는 감염자 보고와 감시, 역학조사, 예방 및 관리활동, 공중보건 정책과 계획등 공중보건의 목적으로 개발되었으며 Walter Reed 분류는 환자개개인의 예후를 알기 위한 분류로서 각 stage에서 14개월 및 36개월 후의 stage 변화를 보고하기도 하였다¹¹⁾.

HIV 항체 양성자에서의 질병의 건강상태를 예측할 수 있는 지표로는 CD₄⁺림프구 절대수, CD₄/CD₈ 비, P₂₄핵단백에 대한 항체, β₂-microglobulin, 소변 및 혈청내의 neopterin 양, P₁₇ 핵단백에 대한 항체, 혈청내 면역글로부린의 양, cytomegalovirus에 대한 항체가, 혈소판 감소증, α-interferon, soluble interleukin-2 수용체의 양¹²⁾, P₂₄ antigenemia¹³⁾ 등이 있으나 본 연구에서는 HIV 항체 양성자에서의 혈액학적 검사와 Walter Reed Stage에 이용되고 AIDS 환자에 면역기능의 지표로 많이 사용되는 CD₄⁺림프구, CD₈⁺림프구수 및 CD₄/CD₈ 비를 조사하였으며 HIV 항체 양성자가 AIDS 환자로 진행되어 사망할 때까지의 검사소견을 조사하였다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 대상자

국립보건원에서 실시한 항HIV항체 검사결과 효소면역측정법 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), 면역형광항체법 (Immunofluorescence Antibody assay, IFA), Western blot 시험으로 최종확인된 HIV 항체 양성자 55명에 대하여 6개월 간격으로 전혈을 채취하여 혈액검사 및 T 림프구의 아세포군을 측정하였으며 6명의 AIDS 환자의 혈액 및 면역학적 소견과 비교하였다.

2. 말초혈액 단핵세포의 분리

헤파린이 처리된 진공 tube (BD 회사제)로 10 ml의 전혈을 채취하

여 1500 rpm으로 10분간 원심하여 buffy coat를 분리한 후 동량의 RPMI-1640배지로 잘 섞어 Ficoll/Hypaque 비중차 용액 ($\alpha = 1.077$) 위에 서서히 중첩하여 1800 rpm으로 15분간 원심하여 단핵세포를 분리하였다.

3. T 림프구 아세포군의 측정

EDTA가 첨가된 진공 tube (BD 회사제) 에 3 ml의 전혈을 채취하여 백혈구측정기 (Coulter 회사제) 로 총 백혈구를 측정하였으며 일부는 Wright-Giemsa 염색을 하여 현미경으로 관찰하여 백혈구 백분율을 구하여 총 림프구수를 계산하였다.

분리된 단핵세포 ($2 \times 10^7 / ml$) $50 \mu l$ 에 FITC가 결합된 항-Leu-3a (CD_4) 단일항체와 phycoerythrin (PE)가 결합된 항-Leu-2a (CD_8) 단일항체가 섞여있는 용액 (Simultest, BD 회사제) $10 \mu l$ 를 첨가하여 이중형광염색을 하여 30분간 얼음에 정치 시키고 냉 phosphate buffered saline (PBS, pH=7.4) $2 ml$ 를 첨가하여 섞은 후 $4^\circ C$ 에서 5분간 원심분리 (250 g) 하였다. 상층액을 버리고 여기에 1% paraformaldehyde용액 $50 \mu l$ 를 첨가하여 Fluorescence Activated Cell Sorter (BD 회사제) 를 이용하여 CD_4^+ 림프구의 백분율을 구하여 CD_4^+ 림프구수 및 CD_8^+ 림프구수를 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{절대림프구수} = \text{백혈구수} \times \frac{\text{림프구 \%}}{100}$$

$$CD_4^+ \text{ 림프구수} = \text{절대림프구수} \times \frac{CD_4^+ \text{ 림프구 \%}}{100}$$

$$CD_4^+ \text{ 림프구수} = \text{절대림프구수} \times \frac{CD_4^+ \text{ 림프구 \%}}{100}$$

$$CD_4/CD_8 \text{ 비} = \frac{CD_4^+ \text{ 림프구 \%}}{CD_8^+ \text{ 림프구 \%}}$$

제 3 절 실험 결과

질병의 예후 지표로 사용되고 있는 CD_4^+ (T_4 cell), CD_8^+ (T_8 cell) 세포 수 및 CD_4/CD_8 비를 측정하여 무증상 HIV 항체 양성자와 AIDS 환자와 비교하였으며 6개월 간격으로 측정한 T_4 세포, T_8 세포 및 T_4/T_8 비를 관찰하고 AIDS 환자에서 발견시부터 사망전까지의 혈액학적 검사 성적을 비교하였다.

HIV 항체 양성자 및 AIDS 환자의 백혈구 및 림프구수의 성적분포는 그림 1, 2와 같다. 백혈구수 및 림프구수는 AIDS환자에서 무증상 HIV 항체 양성자보다 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$) (표 1).

림프구아세포군의 성적 분포는 그림 3, 4와 같다. T_4 세포수는 무증상 HIV 항체 양성자 48명중 $200/mm^3$ 미만이 4명, $200-400/mm^3$ 이 13명, $401/mm^3$ 이상이 31명 이었으며, AIDS 환자는 5명 모두 $200/mm^3$ 이하 이었다. T_8 세포수는 무증상 HIV 항체 양성자 51명 중 $200/mm^3$ 미만이 1명, $200-400/mm^3$ 이 8명, $401-1000/mm^3$ 이 18명, $1001/mm^3$ 이상이 24명 이었으며 AIDS환자 5명중 $200/mm^3$ 미만이 2명, $200-400/mm^3$ 이 2명, $500/mm^3$ 이상이 1명 이었다.

T_4/T_8 비의 성적분포는 그림 5와 같다. T_4/T_8 비는 무증상 HIV 항체 양

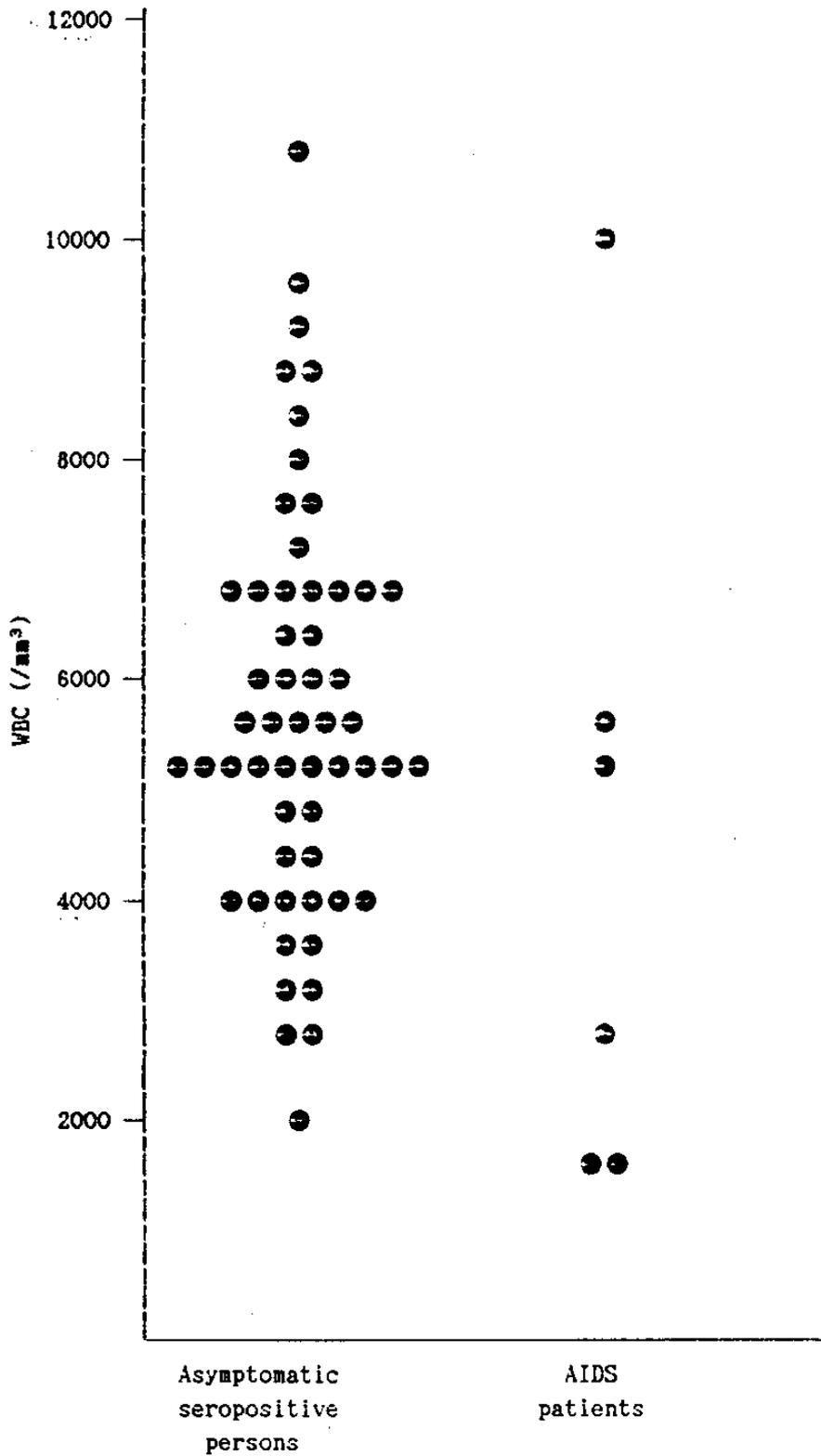


Fig. 1, Comparison of WBC count in asymptomatic HIV seropositive persons and AIDS patients.

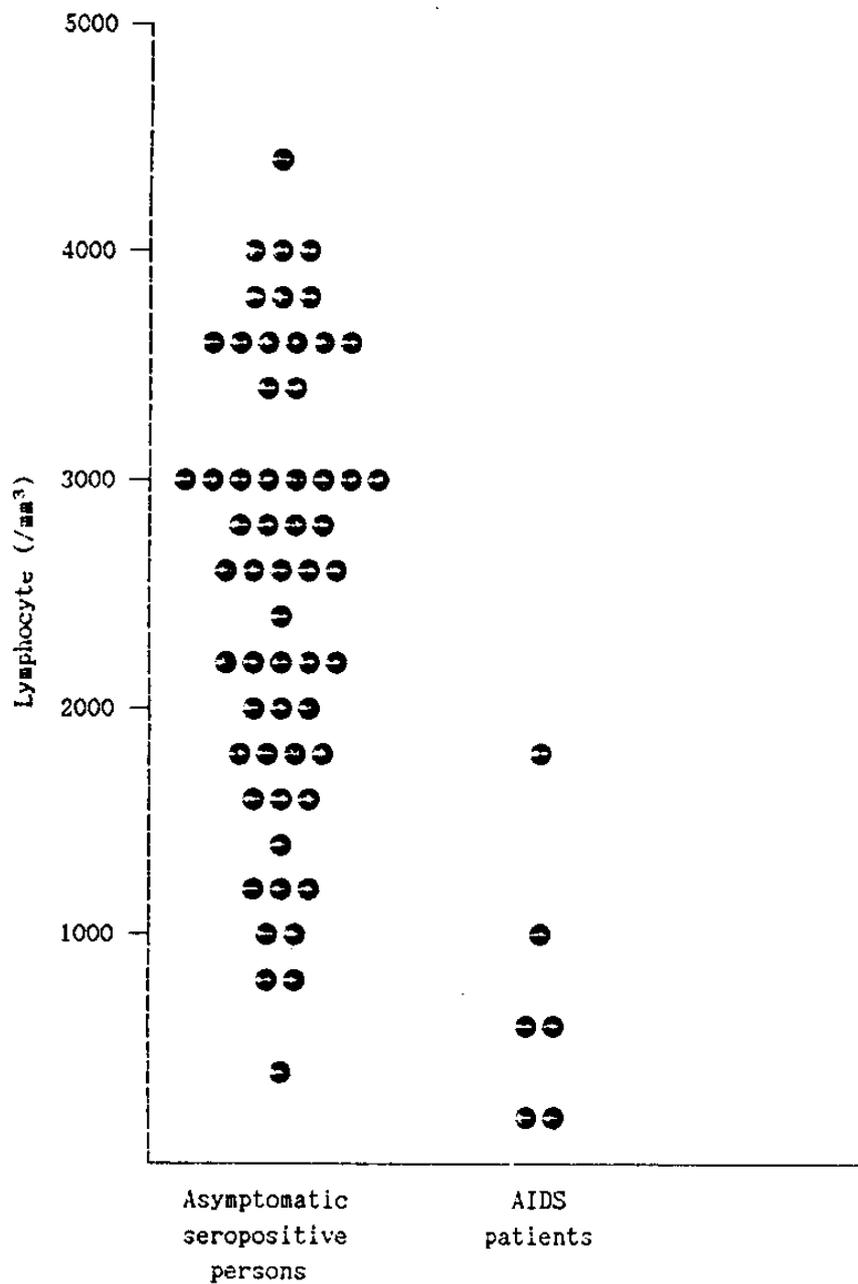


Fig. 2, Lymphocyte count in asymptomatic HIV seropositive persons and AIDS patients.

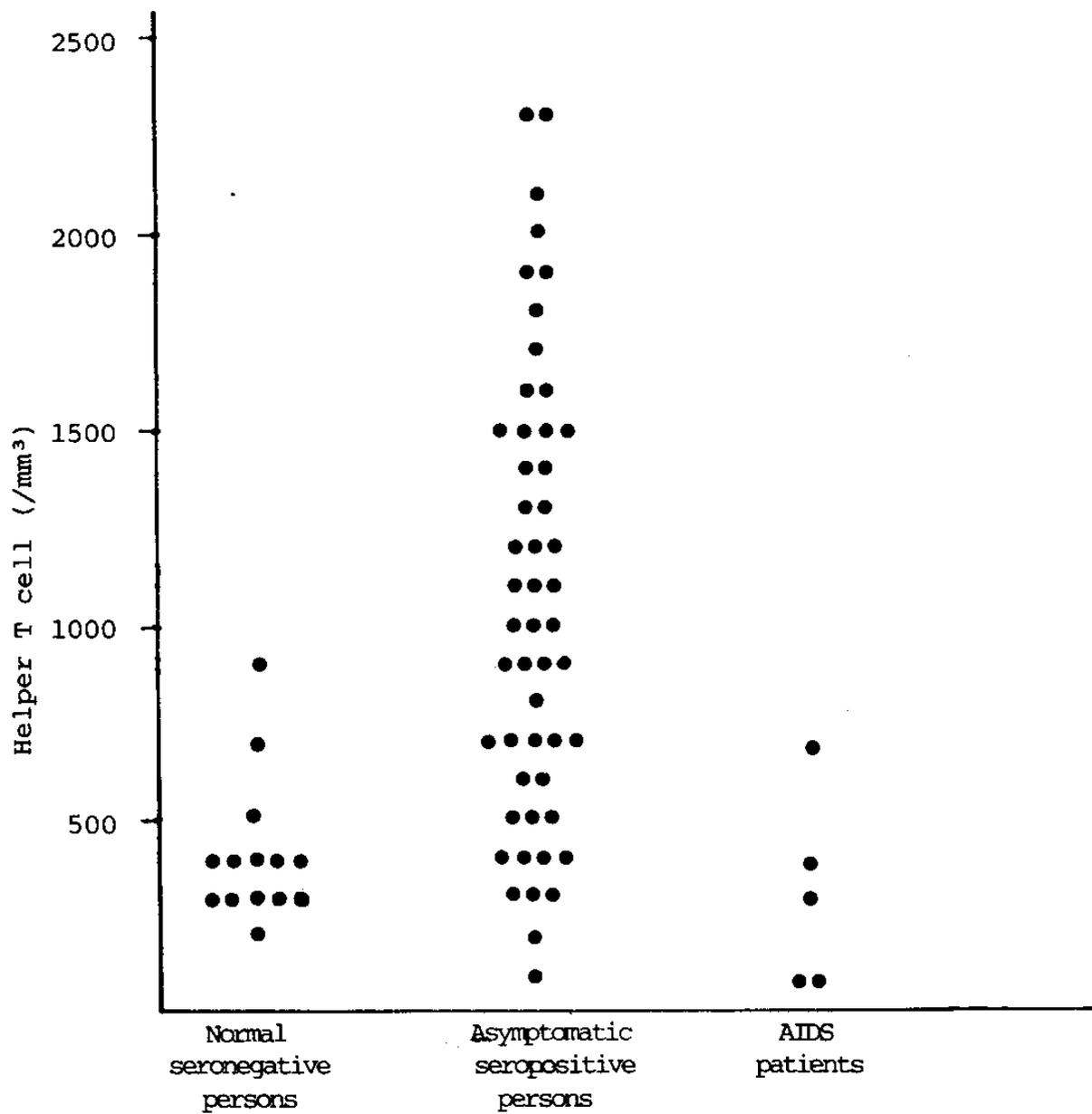


Fig. 4. Supressor T cell count in normal seronegative, asymptomatic HIV seropositive persons and AIDS patients.

Table 1. Comparison of laboratory findings between asymptomatic HIV seropositive persons and AIDS patients.

Tests	Asymptomatic persons			AIDS			
	No.	Mean	S.D	p-value	No.	Mean	S.D
WBC (/mm ³)	55	5655	1798	0.05	6	4366	2974
Lymp (/mm ³)	56	2566	1028	0.01	6	713	544
T4 (/mm ³)	50	604	346	0.01	4	71	248
T8 (/mm ³)	50	1481	566	0.01	4	285	75
T4/T8	58	0.66	0.51	0.01	3	0.36	0.42
RBC (x10 ⁴ /mm ³)	46	4.72	0.76	0.01	2	3.16	0.69
Hgb (g/dL)	47	14.6	1.8	0.01	6	9.8	1.6
Hct (%)	47	43.4	5.3	0.01	5	30	4.6

S.D.;; tandard deviation

성자 54명중 0.5미만이 19명, 0.5이상 1미만이 30명, 1이상이 6명 이었으며 AIDS환자 3명중 0.1이하가 2명, 0.5이상이 1명 이었다.

혈액학적 및 면역학적 소견의 무증상 HIV항체 양성자와 AIDS 환자와 비교는 표 1과 같다.

측정항목 8가지(백혈구수, 림프구수, T_4 세포수, T_8 세포수, T_4/T_8 비, 적혈구수, 헤모글로빈, 헤마토크릿) 모두가 무증상 HIV항체 양성자와 AIDS 환자와의 사이에 유의한 차이를 보였다 ($P < 0.05$, 그 외 $P < 0.01$). 8명의 HIV항체 양성자는 4~14개월 간격으로 혈액학적 및 면역학적 검사를 한 결과 표 2와 같았다.

증례 1, 4, 5는 무증상 HIV항체 양성자로 T_4/T_8 비가 서서히 감소하였으며, 증례 2는 CDC 분류상 group IV subgroup A로서 T_4 세포수가 $200/mm^3$ 이하로 감소하였으며 T_4/T_8 비가 $0.94 \rightarrow 0.31 \rightarrow 0.44$ 로 변화하였다. 증례 6, 8은 무증상 HIV항체 양성자로 T_4/T_8 의 비는 비슷하나 림프구 백분율의 증가로 T_4 세포수가 증가 하였으며 증례 7은 무증상 HIV항체 양성자로 백혈구수의 증가로 림프구수가 증가하여 T_4 세포수도 증가하였다. 증례 3은 무증상 HIV항체 양성자로 림프구의 백분율이 증가하여 림프구수는 증가하였으나 T_4/T_8 비는 0.5이하로 감소하였다.

AIDS 환자에서의 발견시 및 사망직전의 혈액 및 면역학적 소견은 표 3과 같다. 발견부터 사망까지의 기간은 10일에서 19개월까지로 1년 이하가 5례이고 1례만 발견후 1년이상 생존하였었다.

측정 가능한 2례에서의 T_4 세포수는 $100/mm^3$ 이하였고 1례는 발견당시부터 $100/mm^3$ 이하이었으며 1례는 $200/mm^3$ 에서 $41/mm^3$ 로 감소하였다. 사망전의 T_4/T_8 비도 2례에서 0.1이하이었다. 임파구수는 1례를 제외하고

Table 2. Changes of Hematologic Findings and T cell Subsets in HIV antibody positive 8 Korean Persons.

Cases	Date of Tested	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	WBC	Count ($/\text{mm}^3$)			Th/Ts
						Lymphocyte	Th	Ts	
1	88.10	-	-	-	1450	566	368	319	1.15
	89. 6	-	-	-	5040	1500	438	672	0.7
	89.10	4.93	14.3	-	4280	1241	434	595	0.71
2	89. 7	4.50	14.8	-	6200	2356	754	801	0.94
	90. 1	4.69	14.7	47	5500	1650	305	962	0.31
	90. 6	4.43	13.7	41	1800	1152	112	259	0.44
3	88. 9	4.99	15.6	47	5800	2262	-	-	-
	90. 6	3.99	13.7	41	6900	5800	1055	3988	0.26
4	88. 6	-	-	-	3000	1470	558	632	0.9
	89. 8	5.00	13.5	39	4300	2021	485	990	0.5
	90. 6	2.91	9.6	31	3400	1800	414	973	0.44
5	88. 9	-	-	-	-	-	-	-	1.0
	89. 2	-	-	-	7400	2664	1305	986	1.32
	89. 8	4.91	14.1	39	7700	2926	936	492	0.63
6	88. 2	-	-	-	-	-	-	-	1.56
	89. 8	5.01	15.2	46	5000	2500	750	1200	0.63
	90. 6	4.57	14.9	45	5100	3825	950	1710	0.55
7	88. 4	-	-	-	-	-	-	-	1.77
	89. 7	-	-	-	4900	1911	306	975	0.3
	89. 9	-	13.4	41	9500	3500	598	1582	0.4
8	88.10	-	-	-	4300	1720	249	338	0.74
	89. 3	-	-	-	-	-	-	-	0.42
	89. 8	5.60	13.9	42	6600	2300	647	924	0.7

Table 3. Laboratory Findings of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) Patients.

Record No.	Date, Detection	Date of Test	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	PLT ($/\text{mm}^3$)	WBC ($/\text{mm}^3$)	Differential Count Seg N. L. M. E.	ESR	T4 cell	T4/T8 ratio	Lympho- cyte
1	86.11.	87. 1. 2	-	10.0	30	-	3500	62 37 1 1	-	-	-	-
	87. 2.	87. 1.12	-	11.0	33	-	5200	64 34 1 1	-	-	-	1768
2	88. 2.22	88. 2.12	3.85	12.7	37	-	2500	51 32 2 15	47	38	0.96	-
	88. 7.26	88. 7.26	-	-	-	-	1600	59 15 - -	-	-	-	240
	88. 9.23	88. 9. 1	-	-	-	-	2200	- - - -	-	20	-	-
3	88. 3.21	89. 8. 1	-	9.8	-	161000	3370	52 7 10 28	11	-	-	-
	89.10. 8	89. 8.28	-	7.9	-	68000	1400	73 9 14 11	7	-	0.07	126
4	88. 4.23	88. 4.16	-	8.8	25	193000	10000	78 6 6 7	-	-	1.0	600
	88. 9.27	-	-	-	-	-	-	- - - -	-	-	-	-
5	88. 4.19	88. 4.20	-	10.0	30	399000	2600	47 22 5 -	-	-	-	572
	88. 4.29	-	-	-	-	-	-	- - - -	-	-	-	-
6	89. 4.25	89. 3.29	3.50	11.5	34	432000	5400	77 15 8 -	27	200	0.53	810
	89. 5. 3	89. 5. 3	3.63	11.6	35	379000	4000	60 22 12 6	-	-	-	880
	90. 4.16	89.12.22	2.47	8.4	25	-	5400	75 18 7 -	-	41	0.06	972

Table 4. The Walter Reed Staging Classification for HIV Infection

Stage	HIV Ab or Virus Isolation	Chronic Lymphadenopathy	CD4 ⁺ T Cells (/mm ³)	DTH*	Thrush	OI
WRO	-	-	400	NL*	-	-
WRI	+	-	400	NL	-	-
WR2	+	+	400	NL	-	-
WR3	+	+ or -	400	NL	-	-
WR4	+	+ or -	400	Partial*	-	-
WR5	+	+ or -	400	Anergy and/or	+	-
WR6	+	+ or -	400	Partial or anergy	+ or -	+

* DTH, delayed type hypersensitivity; NL, normal; partial, partial anergy (defined as induration of 5mm or greater to only one of the test antigens tetanus, trichophyton, mumps, and candida).

1000/mm³이하이었다. 5례에서 기회성감염인 *Pneumocystis carinii*에 감염되었고 1례에서는 kaposi 육종이 발생하였다.

제 4 절 고 찰

HIV에 감염시에 CD₄⁺ 림프구의 감소는 CD₄⁺ 림프구 표면의 CD₄ 분자가 HIV의 외피단백질과 높은 친화력이 있어 수용체로 작용한다. 이러한 사실은 CD₄에 대한 단일항체를 이용하여 HIV와의 결합을 방해함으로써 CD₄ 분자가 감염에 필요하다는 것이 증명되었다^{14,15)}.

세포질에서 CD₄분자와 HIV의 외피단백질의 결합체가 세포에 대한 세포변성 (cytopathic) 효과가 있으며 그외 면역매개성 반응에 의해 CD₄⁺ 림프구의 감소가 초래되기도 한다¹⁶⁾.

HIV가 감염되는 세포는 Langerhans세포¹⁷⁾, 림프절의 follicular dendritic cell¹⁸⁾ 그외 CD₄분자를 갖고 있는 단핵구, 대식세포, pro-monocytic tumor cell¹⁹⁻²³⁾ 들이며 transformed B cell²⁴⁾, endothelial cell²⁵⁾, transformed colon cell²⁶⁾ 등에서도 HIV가 감염되었다는 보고가 있다.

AIDS환자들에서 초기검사상의 이상은 T 림프구의 T₄/T₈ 세포 비율로 이것은 CD₄⁺ 림프구의 감소에 의한 것이며 T₄/T₈ 세포비 및 CD₄⁺세포의 감소는 어느정도 질병의 중증도와 비례하기도하나 CD₄⁺세포의 절대수를 더욱 중요시한다. Walter Reed 분류 (표 4)¹⁰⁾에서도 CD₄⁺세포수 400/mm³를 기준으로 구분한다. HIV항체 양성자에서 CD₄⁺세포수가 200/mm³이하에서는 AIDS로 진행될 지표로 삼기도 한다²²⁾.

본 연구에서 무증상 HIV 항체 양성자의 T_4 세포수 ($604/\text{mm}^3$)에 비해 AIDS 환자의 T_4 세포수 ($64/\text{mm}^3$)는 현저히 감소하였다 ($P < 0.01$). CD_8^+ 세포수도 HIV 감염자에서의 변화가 있으며 무증상 HIV 항체 양성자 및 임파절증후군에서 증가되는데 이것은 HIV 또는 다른 병원체에 세포독성작용으로 나타난다.

또한 HIV 항체 양성자에서 T_4/T_8 비가 역전되는데 T_4 세포의 감소에 기인한다. T_4/T_8 비는 무증상 HIV 항체 양성자 (0.66)에 비하여 AIDS환자 (0.36)에서 감소되었으며 말기 AIDS환자에서 0.1이하로 감소되며 T_4 세포도 $100/\text{mm}^3$ 이하로 감소되었다.

본 연구에서는 질병의 예후 지표로 CD_4^+ 림프구, CD_8^+ 림프구 및 CD_4^+/CD_8^+ 비를 측정하고 질병의 진행상태에 따라 비교하였으나 HIV 항체 양성자가 계속 증가추세에 있으므로 간단히 검사할 수 있는 질병 예후 지표를 발견하여 HIV 항체 양성자의 분류 및 예후 진단을 하여야 하겠다.

참 고 문 헌

1. Gottlieb Ms, Schoroff R, Schanker HM et al: *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquired immunodeficiency. N Engl J Med 305:1425, 1981.
2. Masur H, Michelis MA, Greene JB et al: An outbreak of community acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: Initial manifestations of cellular dysfunction. N Engl J Med 305:1431, 1981.
3. Siegal FP, Lopez C, Hammer GS et al: Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. N Engl J Med 305:1439, 1981.
4. Hymes KB, Cheung T, Greene JB et al: Kaposi's sarcoma in homosexual man: A report of eight cases. Lancet 2:598, 1981.
5. Centers for Disease Control: Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-United States. MMWR 31:507, 1982.
6. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F et al: Isolation of a T cell lymphotropic virus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Science 220:868, 1983.
7. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M et al: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS. Science 224:500, 1984.

8. WHO Weekly Epidemiological Record. 16(3):229, 1986.
9. Centers for Disease Control: Classification system for human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus infections. MMWR 35:334, 1986.
10. Redfield RR, Wright DC, Tramont EC: The Walter Reed Staging Classification for HTLV-III LAV infection. N Engl J Med 314: 131, 1986.
11. Redfield RR, Burke DS: HIV infection, The clinical picture. Scientific American 259:70, 1988.
12. Lifson AR, Rutherford GW, Jaffe HW: The Natural History of Human Immunodeficiency Virus Infection. J Infect Dis 158: 1360, 1988.
13. Wolf FD, Lange JMA, Houweling JTM et al: Appearance of predictors of disease progression in relation to the development of AIDS. AIDS 3:563, 1989.
14. Klatzmann D, Champagne E, Charmaret S et al: T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. Nature 312:767, 1984.
15. Dalgleish AG, Beverly CL, Clapham PR et al: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature 312:763, 1984.

16. Klatzmann D, Montagnier L: Approaches to AIDS therapy. Nature 319:1011, 1986.
17. Belsito DV, Sanchez MR, Baer RL et al: Reduced Langerhan's cell Ia antigen and ATPase activity in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 310:1279, 1984.
18. Armstrong GA, Horne R: Follicular dendritic cells and virus-like particles in AIDS-related lymphadenopathy. Lancet 2:370, 1984.
19. Levy JA, Shimabukuro J, McHugh T et al: AIDS-associated retrovirus (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. Virology 147:441, 1985.
20. Ho DD, Rota TR, Hirsch MS: Infection of monocyte/macrophage by human T lymphotropic virus type II. J Clin Invest 77: 1712, 1986.
21. Nicholson JKA, Cross GD, Callaway CS et al: In vitro infection of human monocytes with human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV). J Immunol 137:323, 1986.
22. Salahuddin SZ, Rose RM, Groopman JE et al: Human T-lymphotropic virus type II infection by human alveolar macrophages. Blood 68:281, 1986.

23. Gartner S, Markovits P, Markovits DM et al: The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/ALV infection. *Science* 233:215, 1986.
24. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM et al: Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233:1089, 1986.
25. Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA et al: Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immunodeficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7089, 1986.
26. Gartner S, Markovits P, Markowitz DM et al: Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS. *JAMA* 256:2365, 1986.
27. Stoler MH, Eskin TA, Benn S et al: Human T-cell lymphotropic virus type III infection of the central nervous system. *JAMA* 256:2360, 1986.
28. Vazeux R, Brousse N, Jarry A et al: AIDS subacute encephalitis: Identification of HIV-infected cells. *Am J Pathol* 126:403, 1987.
29. Rieber P, Riethmuller G: Loss of circulating T4⁺ monocytes in patients infected with HTLV-III. *Lancet* 1:270, 1986.

30. Montagnier L, Gruest J, Chamaret S et al: Adaption of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cells lines. *Science* 225: 63, 1984.
31. Adachi A, Koenig S, Gendelman HE et al: Productive persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J Virol* 61:209, 1987.
32. Polk BF, Fox R, Bookmeyer R et al: Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. *N Engl J Med* 316:61, 1987.

2. 한국인 HIV 항체양성자의 혈중 Neopterin, soluble interleukin-2 receptor, beta₂-microglobulin 및 immunoglobulin A

제 1 절 서 설

후천성면역결핍증(Acquired Immunodeficiency Syndrome : AIDS)은 뚜렷한 원인 없이 면역결핍증이 심하게 나타나, 중증의 기회감염이나 Kaposi육종 등의 악성 종양을 동반한 증후군으로 발견 초기에 임상적 정의를 하였으나 1983년 미국과 프랑스에서 HTLV-III(Human T cell Leukemia Virus-III), LAV(Lymphadenopathy virus)등의 이름으로 원인 병원체가 분리됨으로서 AIDS의 진단과 역학 그리고 발병기전등의 특성을 명확히 규명할 수 있는 계기가 되었다. 후에 이들 바이러스의 명칭이 HIV(Human Immunodeficiency Virus)로 통일 명명되었다. HIV는 retrovirus의 일종으로 Th 세포 (T helper/inducer) 표면에 있는 CD4와 바이러스의 외피단백질인 gp120과 강한 친화력이 있어 주로 Th 세포가 선택적으로 감염되어 파괴되는데 현재 일부 B 세포와 대식세포들도 감염될 수 있다고 보고되고 있다.

면역계 자체가 복합적이므로 AIDS에서 면역기능이 광범위하게 황폐화되는 원인은 단순히 HIV의 감염만으로 설명되지 않으므로 병인성을 규명하는 연구들이 진행되고 있다. AIDS가 발견된 초기부터 입과구 감소가 심하다는 것이 알려져 있으며, 특히 Th 세포의 감소와 기타 T 세포의

기능장애들이 많이 보고 되었는데, 예를 들면 mitogen에 대한 임파구 반응의 저하, 혼합 임파구 반응의 결함, T 임파구매개성세포독성의 결함, 바이러스에 대한 면역반응 및 자연살해세포 활성의 감소 등이다. 대식세포의 기능도 저하되어 대식세포의 화학주성 및 기생충에 대한 세포독성의 감소 등이 보고되었다. 반면 대식세포들이 활성화되어 있다는 소견도 있다. B 세포 기능에도 이상이 초래되는데 여러종류의 B 세포들이 활성화되어, B 세포의 분화증식성이 증가되어 있으나 mitogen에 대한 반응은 저하되고 특이항원에 대한 반응도 저하되며, 혈청내 면역글로부린치와 면역복합체가 증가되어 있다. 이와같이 AIDS는 면역기능의 저하에 의한 기회감염과 악성종양의 유발과 더불어 여러가지 자가면역질환의 양상을 보이고 있어 면역체계의 여러 단계에서 면역조절능력이 비정상적으로 변화되어 있음을 알 수 있다.

생체내에서 면역기능의 상태는 면역기능에 관련된 세포를 분리하여 시험관 내에서 알 수 있지만 최근 면역세포 활성화전이 자세히 밝혀짐에 따라 림포카인을 비롯한 여러인자들을 혈중에서 직접 측정함으로써 더욱 빠르고 용이하게 알 수 있게 되었다.

이러한 혈청내 인자 중 neopterin은 pyrazino-pyrimidine 유도체로 guanosine triphosphate (GTP) cyclohydrolase에 의해 GTP로부터 만들어지는 물질이며 gamma-interferon에 의해 monocyte/macrophage에서 합성되어 분리된다. 따라서 neopterin의 증가는 macrophage axis의 활성화를 나타낸다고 한다. Interleukin-2 receptor는 T 임파구의 활성화에 필수적인 세포표면항원으로 T 임파구 자극에 의해 생기며 일부 유리되는 것으로 T 임파구의 활성을 나타낸다. beta₂-

microglobulin은 Class I HLA 항원 (A, B, C)의 subunit으로서 alpha interferon과 beta interferon에 의해 항원의 표현이 증가되므로 interferon의 생성과 연관된 여러과정에서 증가된다.

국내 HIV 항체양성자들이 대부분 임상적으로 건강한 상태를 유지하고 있으나 이들의 면역기능은 정상인에 비해 감소되어 있음을 이미 보고한 바 있다. 그러므로 본 연구에서는 혈중 neopterin, soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R), beta₂-microglobulin 및 immunoglobulin A의 농도를 측정하여 HIV 감염자에서 생기는 면역억제의 기전을 이해하고 좋은 예후지표로서의 의의를 찾고자 하였다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 대상자

항 HIV 항체검사 결과 ELISA, 면역형광항체법, Western blot 시험으로 최종 확인된 HIV 항체양성자 총 30명과 정상대조군으로 HIV 항체검사 결과 음성인 건강 성인 총 30명을 대상으로 면역학적 검사와 임상 상태를 관찰하였다. 임상상태에 따라 건강 HIV 감염자군과 AIDS환자군으로 분류하였는데 대상 HIV 항체양성자 중 ?명이 AIDS 환자이며, 나머지 ??명은 건강 HIV 감염자 이었다.

2. Neopterin의 측정

혈청 100 μ l를 high pressure liquid chromatography

(HPLC, Waters Co, USA)에 주입하고 10 μ m Radial Pack C₁₈ column (Water Co.) 를 사용하여 혈청내 neopterin을 분석하였다. 이동상은 15 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)을 사용하였으며 분리된 neopterin은 excitation 파장 353 nm, emission 파장 438 nm에서 그 형광을 측정하여 정량하였다.

3. sIL-2R의 측정

혈액내 유리된 sIL-2R의 농도는 sandwich enzyme immunoassay를 이용한 interleukin-2 receptor test kit (T Cell Sciences, USA)로 측정하였다. 항 IL-2R 단세포군항체로 처리된 polystyrene microtiter well에 표준정량용액과 희석된 혈청을 넣어 반응 시킨후 세척하였다. 여기에 HRPO (horseradish peroxidase) 결합 항 IL-2R 단세포군항체와 반응시키고 세척한 다음 기질 (H_2O_2)과 발색제 (OPD)로 발색시키고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 4개의 IL-2R 표준정량용액에 의하여 정해진 표준정량 곡선을 이용하여 혈청내 sIL-2R량을 U/ml 단위로 정량하였다.

4. Beta₂-microglobulin의 측정

혈청내 beta₂-microglobulin의 농도는 competitive inhibition enzyme assay를 이용하여 측정하였다. 순수분리된 beta₂-microglobulin을 인산완충용액 (pH 7.4)으로 5 μ g/ml 되게 희석하여 microwell EIA plate에 well당 200 μ l씩 분주하고 4 °C에서 18시간 반

응시켰다. 0.05%의 Tween 20이 함유된 인산완충용액으로 세척하고, 1% Bovine serum albumin 함유 인산완충용액으로 37 °C에서 1시간 반응시켜 비특이반응을 차단시키고 세척하였다. 여기에 1 : 50으로 희석된 혈청과 항 beta₂-microglobulin 단세포균항체를 각각 100 μl씩 동시에 넣고 37 °C에서 1시간 반응시켰다. 세척하고나서 peroxidase가 결합된 항 mouse IgG 항체를 200μl씩 넣고 37 °C에서 1시간 반응시켰다. 세척하고나서 기질용액 (phosphate citrate buffer (pH 5.0)에 0.04% (w/v)의 o-phenylenediamine과 0.06% (v/v) 과산화수소를 넣어 만듬)을 100 μl씩 넣고 실온에서 20분간 반응시켰다. 2M 황산을 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 492 nm (대조 620 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 순수 분리된 beta₂-microglobulin를 단계 희석하여 정한 표준 정량 곡선을 이용하여 혈청내 beta₂-microglobulin의 농도를 정하였다.

5. IgA의 측정

Sandwich enzyme immunoassay를 이용하여 혈청내 IgA를 정량하였다. 항 human IgA 항체를 적정농도로 인산완충용액 (pH 7.4)에 희석하여 microwell EIA plate에 well당 100 μl씩 분주하고 4 °C에서 18시간 반응시켰다. 0.05%의 Tween 20이 함유된 인산완충용액으로 세척하고, 1% Bovine serum albumin 함유 인산완충용액으로 37 °C에서 1시간 반응시켜 비특이반응을 차단시키고 세척하였다. 여기에 1 : 1000으로 희석한 혈청을 100 μl씩 넣고 37 °C에서 1시간 반응시켰다. 세척하고나서 peroxidase가 결합된 항 human IgA 항체를 200μl씩 넣고 37°C에서

1시간 반응시켰다. 세척하고나서 기질용액 (phosphate citrate buffer (pH 5.0) 에 0.04% (w/v) 의 o-phenylenediamine과 0.06% (v/v) 과산화수소를 넣어 만듬)을 100 μ l씩 넣고 실온에서 20분간 반응시켰다. 2M 황산을 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 492 nm (대조 620 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 순수 분리된 human IgA를 단계 희석하여 정한 표준 정량곡선을 이용하여 혈청내 IgA의 농도를 정하였다.

6. T 임파구 아세포군의 측정

말초혈액 단핵세포의 분리는 헤파린이 처리된 진공시험관 (BD 회사제)으로 20 ml의 전혈을 채혈하여 1500 rpm으로 10분간 원심하여 buffy coat를 분리한 후 동량의 RPMI-1640 배양액으로 잘 섞어 Ficoll/Hypaque 비중차용액 (비중 = 1.077, Sigma 회사제) 위에 조심스럽게 중첩하고 1800 rpm으로 15분간 원심하여 분리된 단핵세포층을 채취하였다. 분리된 단핵세포 부유액을 RPMI-1640 배양액으로 3회 세척한 후 T 임파구 아세포군 측정에 사용하고 일부는 mitogen 자극 시험을 위해 동결 보관하였다. 단세포의 동결보관은 세포수를 $5\sim 10\times 10^6/ml$ 로 하고 동량의 20% DMSO (dimethylsulfoxide), 40% 우태아혈청이 함유된 RPMI-1640 배양액을 서서히 첨가한 후 $-70^{\circ}C$ 로 보관하여 1개월 이내에 사용하였는데 사용전 $37^{\circ}C$ 로 급격히 녹인 후 3회 세척하였다.

분리된 단핵세포 1×10^6 개를 인산완충용액으로 1회 세척한 후 이중형광 염색으로 Th 세포와 Ts (T suppressor/cytotoxic) 세포를 동시에 관찰하기 위해 FITC (fluorecein isothiocyanate)가 결합된 항-Leu-2a

(CD8) 단일항체, PE (phycoerythrin)이 결합된 항-Leu-3a (CD4) 단일항체 (BD 회사제)를 10 μ l씩 첨가한 후 4°C에서 30분간 반응시키고 인산완충용액으로 1회 세척하고, 원침된 세포에 2% paraformaldehyde 함유 인산완충용액을 50 μ l 첨가하여 4°C에서 고정하였다. 총 T 세포수를 측정하기 위해 FITC가 결합된 항-Leu-1 (CD5) 단일항체를 사용하였다. 마지막으로 인산완충용액으로 1회 더 세척한 후 원침된 세포를 50 μ l로 부유시켜 슬라이드에 점적하여 광학현미경과 형광현미경하에서 400배로 전체 세포수와 형광염색된 세포수를 측정하여 다음과 같은 공식으로 계산하였다. 말초혈액 백혈구수는 counting chamber 방법으로 측정하였고, 임파구수는 말초혈액을 Wright 염색하여 백분율을 구하여 계산하였다.

$$\% \text{Th} (\% \text{Ts}) = \text{PE (FITC) 염색된 임파구수} / \text{전체임파구수} \times 100$$

$$\text{Th/Ts 비} = \% \text{Th} / \% \text{Ts}$$

$$\text{Th(Ts) 세포수} (/ \text{mm}^3) = \text{백혈구수} (\text{mm}^3) \times \% \text{임파구} / 100 \times \% \text{Th(Ts)} / 100$$

제 3 절 실험 결과

1. HIV 감염자의 혈중 neopterin 농도

Gamma interferon의 자극 하에 대식세포로부터 생성되는 저분자물질인 neopterin은 세포성 면역계의 활성도를 반영한다. 그러므로 HIV 감염이 T 임파구-대식세포계의 활성화에 미치는 영향을 보기 위해 30명의 HIV 감염자에게 혈중 neopterin 농도를 측정하였는 바 19.1 + 12.9 nM/l로 정

상성인의 혈중 neopterin 농도 ($7.0 \pm 2.7 \text{ nM/l}$)에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 1).

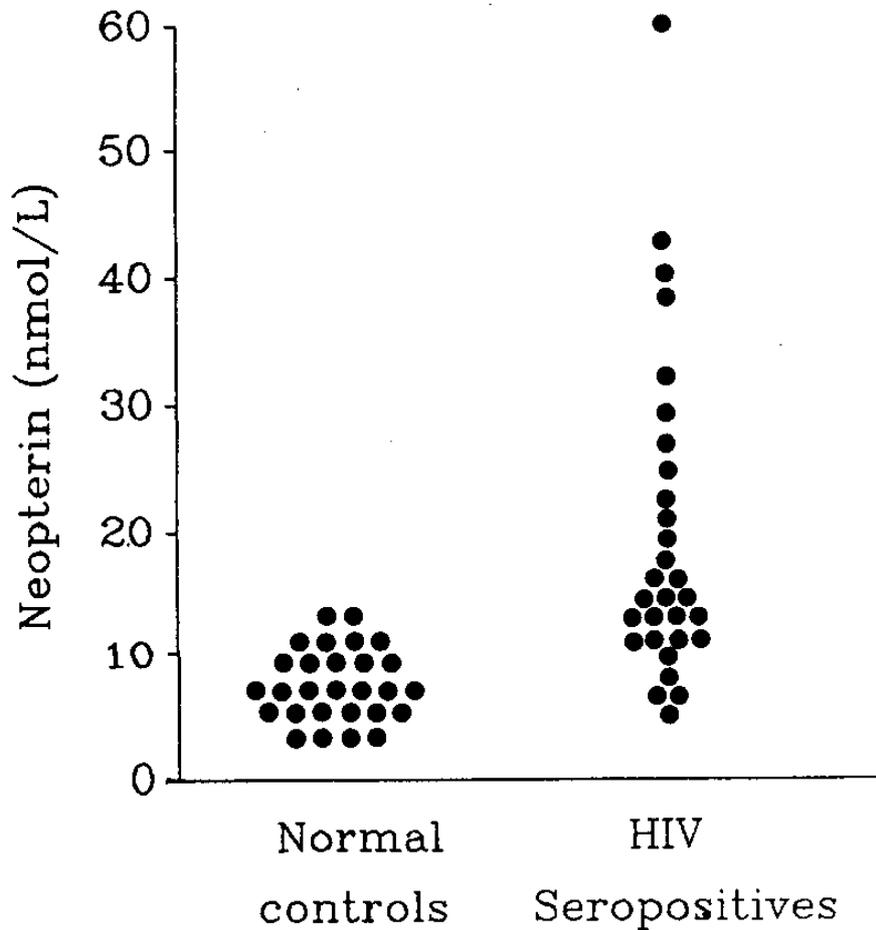


Fig. 1. Level of serum neopterin in anti-HIV seropositive and normal seronegative persons.

2. HIV 감염자의 혈중 sIL-2R 농도

세포성면역형성 과정에서 sIL-2R는 T림파구의 활성화에 필수적인 세포 표면항원으로 T림파구 자극에 의해 IL-2에 대한 sIL-2R가 유리되는 것으로 알려져 있어 T림파구의 활성을 반영한다. 그러므로 HIV 감염이 T림

과구의 활성화에 미치는 영향을 보기위해 30명의 HIV 감염자에서 혈중 sIL-2R 농도를 측정하였는 바 $728 \pm 580 \text{ U/ml}$ 로 정상성인의 혈중 sIL-2R 농도 ($249 \pm 65 \text{ U/ml}$)에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2).

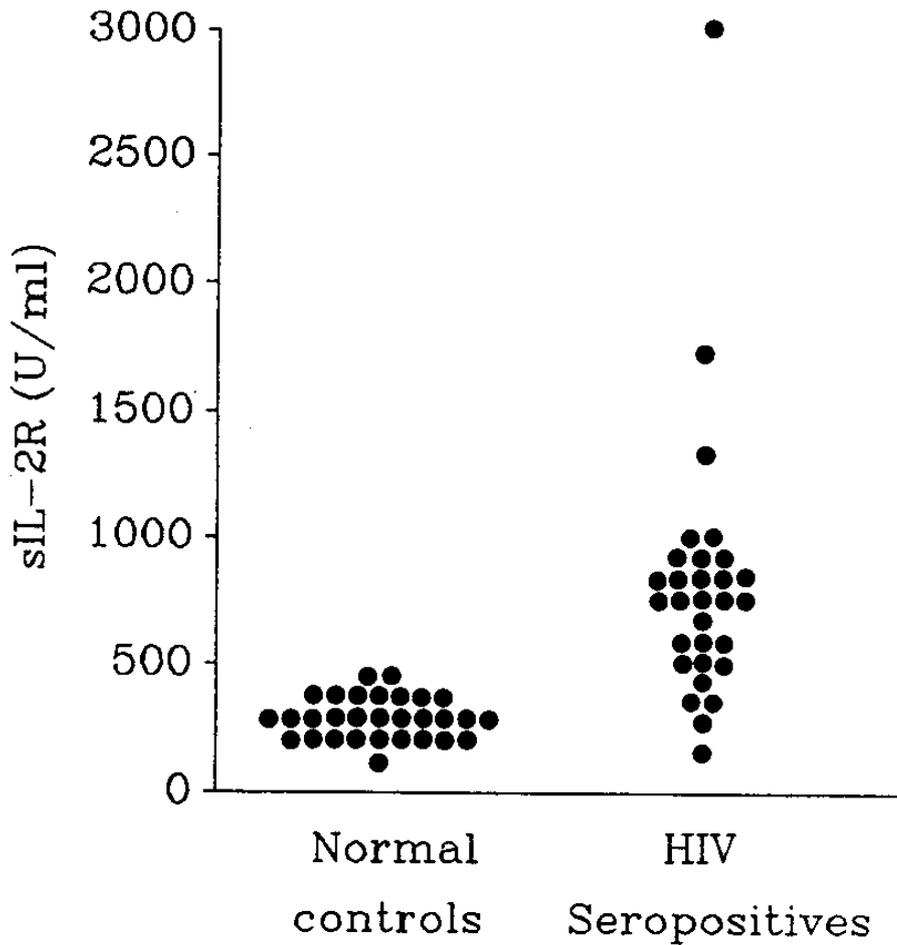


Fig. 2. Level of serum sIL-2R in anti-HIV seropositive and normal seronegative persons.

3. HIV 감염자의 혈중 beta₂-microglobulin 농도

Beta₂-microglobulin은 생체내 모든 유핵 세포에 존재하는 Class I HLA 항원 (A, B, C)의 subunit으로서 alpha interferon에 의해 항원의

표현이 증가되므로 interferon의 생성과 연관된 여러 질병에서 증가된다. HIV 감염이 혈중 β_2 -microglobulin의 농도에 미치는 영향을 보기위해 31명의 HIV 감염자에서 혈중 β_2 -microglobulin 농도를 측정하였는 바 $2316 + 1024 \mu\text{g}/\ell$ 로 정상성인의 혈중 β_2 -microglobulin 농도 ($1507 + 366 \mu\text{g}/\ell$)에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 3).

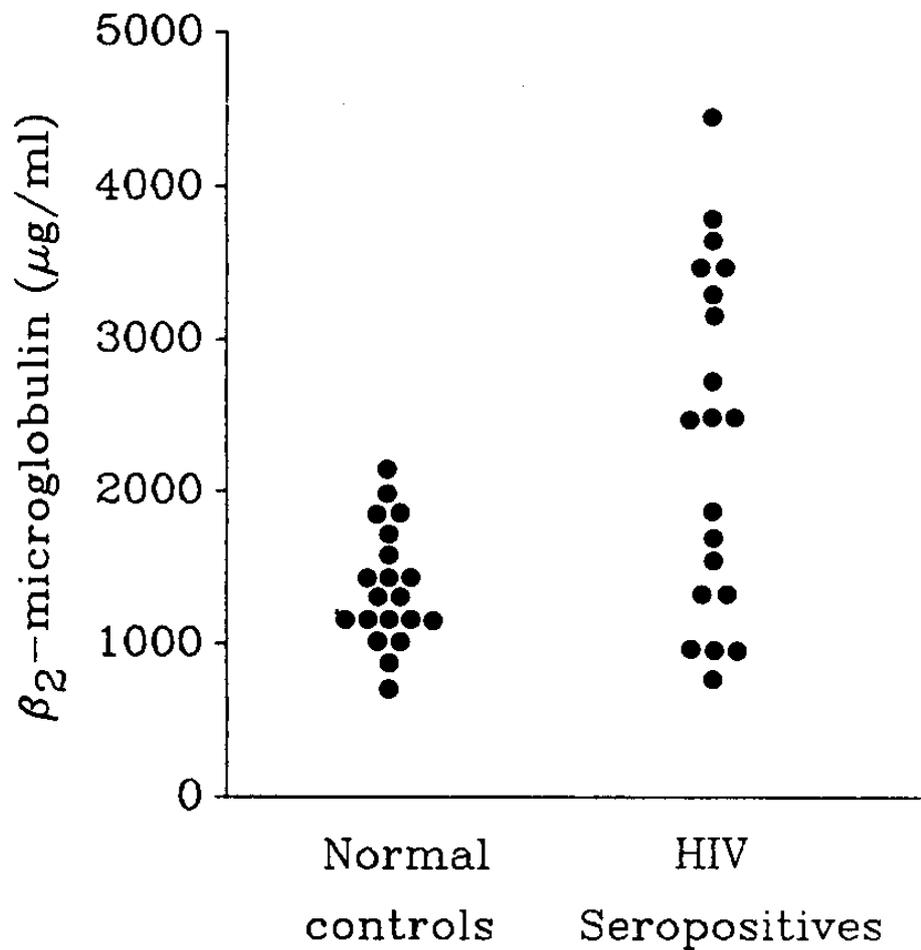


Fig. 3. Level of serum β_2 -microglobulin in anti-HIV seropositive and normal seronegative persons.

4. HIV 감염자의 혈중 IgA 농도

HIV 감염시 T 림파구 기능의 이상과 함께 B 림파구에도 이상이 초래되어 여러 종류의 B 세포들이 활성화되고, 분화증식성이 증가되어 있다. 혈중 면역글로부린의 농도가 이러한 B 림파구의 비특이적 활성을 반영할 수 있는 지표이므로 26명의 HIV 감염자에서 혈중 IgA 농도를 측정하였는바 $2033 \pm 1052 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 정상성인의 혈중 IgA 농도 ($1785 \pm 645 \mu\text{g}/\text{ml}$)에 비해 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 4).

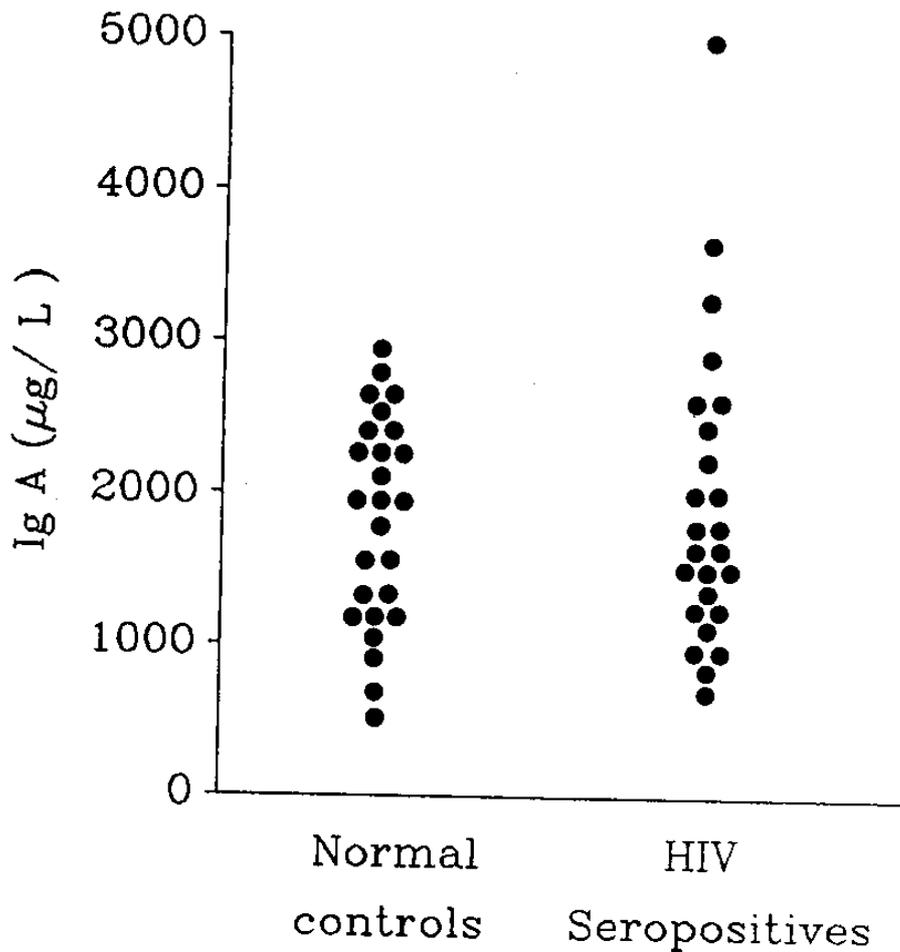


Fig. 4. Level of serum IgA in anti-HIV seropositive and normal seronegative persons.

5. Th 세포수와의 연관성

HIV 감염자의 중요한 양상은 HIV가 바이러스의 수용체로 작용하는 CD4를 세포표면에 있는 Th 임파구에 선택적으로 감염되어 나타나는 Th 임파구의 결핍이다. Th 임파구는 직접 혹은 간접적으로 임파구와 비임파구 세포의 면역반응에 중요한 역할을 하므로 HIV 감염자에서 Th 임파구수와 혈중 neopterin, sIL-2R, beta₂-microglobulin, 및 IgA의 농도와의 연관성을 조사하였는데 유의한 연관성이 없었다 ($p > 0.1$).

6. 혈중 neopterin, sIL-2R, beta₂-microglobulin 및 IgA의 상호 연관성

혈중 neopterin, sIL-2R, beta₂-microglobulin, 및 IgA의 농도가 연관된 면역기전에 의해 영향을 받으므로 이들의 상호 연관성을 조사하였는 바 sIL-2R과 neopterin ($r=0.79$, $p=0.0001$), sIL-2R과 IgA ($r=0.52$, $p=0.0061$)가 매우 유의한 연관성이 있었으며 neopterin과 IgA ($r=0.37$, $p=0.0631$)도 연관성이 있었으나 (Fig. 5, 6, 7), beta₂-microglobulin과는 상호 연관성이 없었다.

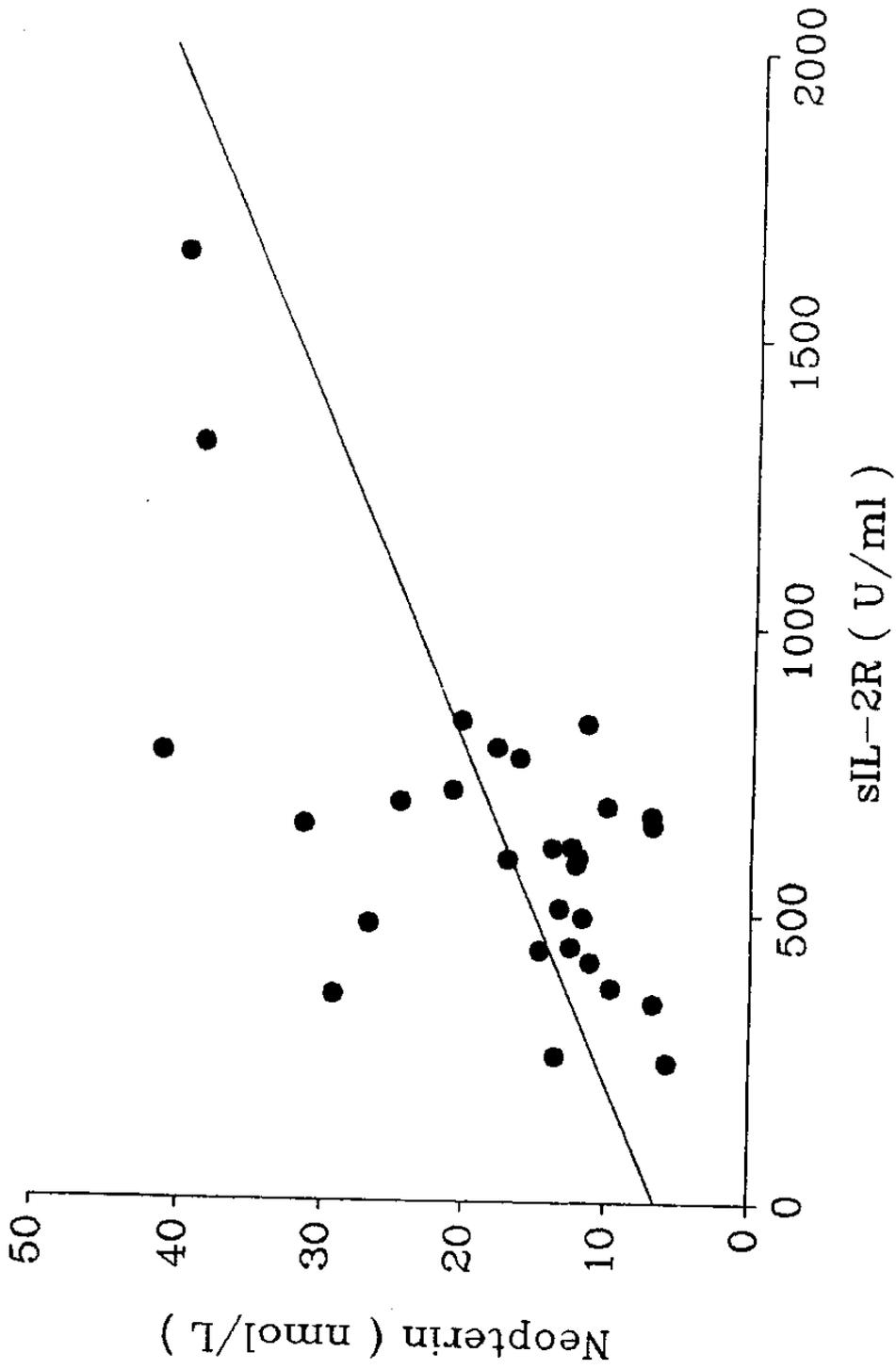


Fig. 5. Correlation between sIL-2R and neopterin in anti-HIV seropositive persons.

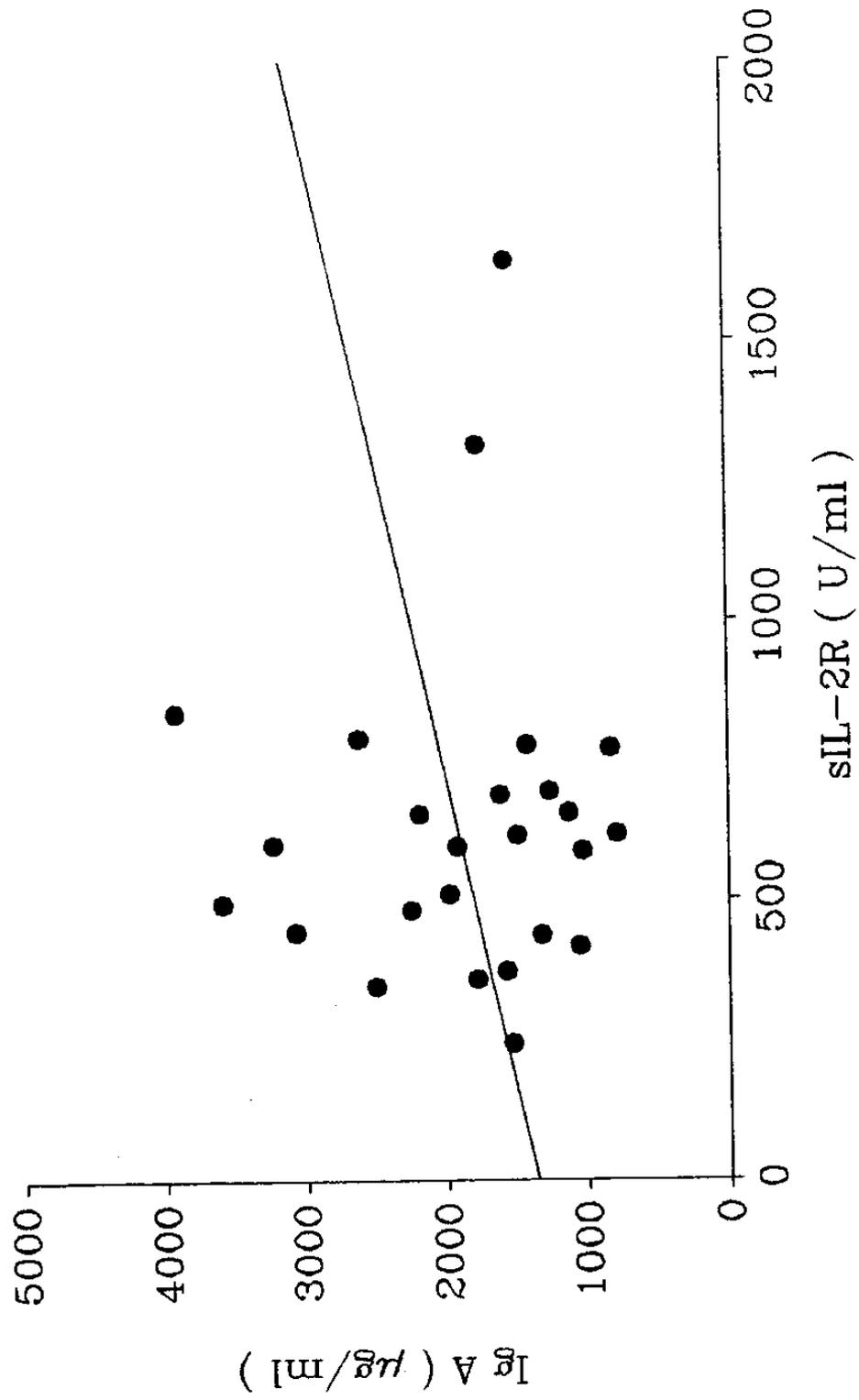


Fig. 6. Correlation between sIL-2R and IgA in anti-HIV sero-positive persons.

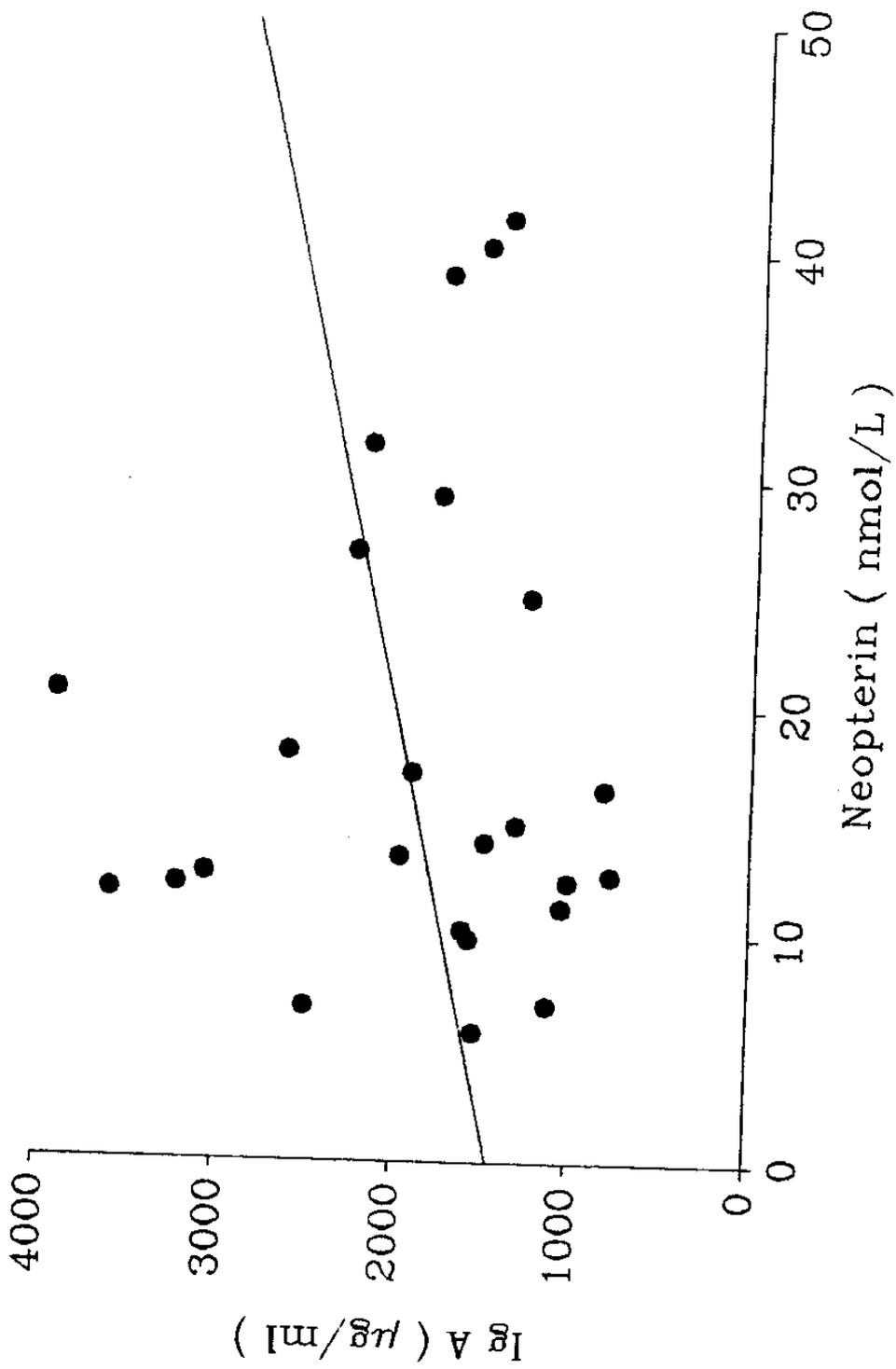


Fig. 7. Correlation between neopterin and IgA in anti-HIV seropositive persons.

제 4 절 고 찰

HIV 감염의 중요한 양상은 HIV가 CD4가 표현형인 Th에 선택적으로 감염되어 나타나는 Th 임파구의 결핍이다. CD4가 바이러스에 대한 receptor인데 viral envelope에 대해 강한 친화력이 있으며 일부 단핵세포와 대식세포도 CD4를 나타내고 HIV에 결합되어 감염될 수 있다. 그러나 HIV는 Th 임파구와 달리 단핵세포에서는 세포괴사를 나타내지 않는다. 감염된 T4 세포의 세포표면에 다량의 HIV gp120이 나타나 비감염 Th 임파구와 세포융합을 해서 거대다핵세포를 만들어 융합된 세포들이 괴사하는데 이것이 순환중인 많은 비감염세포들을 감소시키는 기전일지도 모른다. 또한 Th 세포에 HIV가 비괴사적 감염을 일으켜 기능적 장애를 나타내기도 하는데 이런 경우 Th 세포표면에 CD4가 더이상 나타나지 않는다.

HIV 감염자에서 Th 임파구수의 감소에 의하여 Th/Ts비가 역전되는 것도 특징적인 소견이다. Th/Ts비가 역전되는 것은 다른 바이러스성 질환들에서도 나타나는데 이 경우 Ts 임파구수가 상대적으로 증가되기 때문에 AIDS환자들에서 역전되는 것과 다르다. AIDS와 유관질환들에서 관찰되는 면역기능의 결함은 다양하다. 이것은 HIV가 감염되는 Th 임파구의 기능이 매우 다양하며 정상 면역기능에 있어 중심적인 역할을 하기 때문이다. Th 세포는 임파구와 비임파구 세포기능의 유도에 관여 하는데 대부분의 Th 세포효과는 다른 세포에 선택적, 유도적인 효과를 갖는 인자를 분비하여 이루어진다. 이러한 기능들로는 대식세포 활성화, NK, Tc, Ts 및 B 세포의 유도, 그리고 임파구 성장과 혈액조세포에 영

향을 주는 인자들을 분비한다. 본 연구에서 HIV 감염이 T 임파구에 미치는 영향을 보기위해 HIV 감염자에서 혈중 sIL-2R 농도를 측정하였는 바 HIV 감염자에서 $728 + 580 \text{ U/ml}$ 로 정상적인 혈중 sIL-2R 농도 ($249 + 65 \text{ U/ml}$)에 비해 유의하게 증가 하였다. 세포성면역 형성 과정에서 sIL-2R는 T 임파구의 활성화에 필수적인 세포 표면항원으로 T 임파구 자극에 의해 IL-2R에 대한 sIL-2R가 유리되는 것으로 알려져 있어 HIV 감염자에서 T 임파구가 활성화 되어 있음을 반영한다.

AIDS 환자들은 polyclonal activation, hypergamma globulinemia, circulating immune complex, 및 autoantibodies등의 비정상적인 B 세포 기능을 나타낸다. 이러한 B 세포의 polyclonal hyperactivity는 여러 요인에 기인하는데 polyclonal B cell activator인 Epstein-Barr Virus와 Cytomegalovirus의 감염이 증가되기 때문인지도 모른다. 혈중 면역글로부린의 농도가 이러한 B 임파구의 비특이적 활성을 반영할 수 있는 지표이므로 본 연구에서는 HIV 감염자에서 혈중 IgA 농도를 측정하였는 바 $2033 + 1052 \mu\text{g/ml}$ 로 정상성인의 혈중 IgA 농도($1785 + 645 \mu\text{g/ml}$)에 비해 증가되어 있음을 확인 하였다. 이와 같이 AIDS에서 B 세포의 반응이 증가됨에도 불구하고 새로운 항원에 대한 항체 반응이 결핍되어 있는데 이는 T cell dependent B cell responses에서 Th 세포의 helper function의 결핍에 의하기도 하지만 B 세포 수준에서의 이상도 기인한다. 이러한 B 세포의 결핍반응은 항원에 대한 적절한 항체를 형성하지 못하는 것으로 이전에 여러 병원성 세균에 폭로되지 않고 방어를 위한 초기 항체 반응에 의존하는 HIV 감염 영유아에 치명적인 결과를 초래한다. 성인들도 여러 pyrogenic bacteria에 대한 감염

성이 증가된다.

단핵세포와 대식세포는 HIV의 증식과 병인성에 중요한 역할을 한다. 이러한 대식세포들은 virus를 탐식할 수 있다. 어떤 단핵세포들은 CD4를 나타내어 HIV외피와 결합하므로 감염이 성립되어 혈액과 여러 장기에서 유래된 단핵세포에서 HIV가 분리된다. 뇌에서 HIV에 감염된 주요 세포들이 단핵 대식세포로 이들이 HIV 감염과 연관된 신경, 정신 증상의 발현에 중요한 원인일지도 모른다. 감염된 pulmonary alveolar macrophage는 AIDS 환자에서 interstitial pneumonitis를 초래하기도 한다. 대식세포에 HIV의 감염은 대식세포가 체내에서 HIV의 reservoir로 작용할 수 있음을 암시한다. Th 세포와 달리 단핵세포는 HIV에 세포 괴사를 일으키지 않으므로 세포내에서 virus가 폐나 뇌 등의 여러 장기로 이동될 수 있다. HIV의 지속적 감염은 면역기능이 바이러스를 완전히 제거하지 못한다는 것을 의미한다. HIV 감염이 대식세포에 미치는 영향을 보기위해 HIV 감염자에서 혈중 neopterin 농도를 측정하였는데 19.1 ± 12.9 nM/ℓ로 정상성인의 혈중 neopterin 농도(7.0 ± 2.7 nM/ℓ)에 비해 유의하게 증가하였다. Neopterin은 gamma interferon의 자극 하에 대식세포로부터 생성되는 저분자물질로서 세포성면역계의 활성도를 반영한다.

Beta₂-microglobulin은 생체내 모든 유핵 세포에 존재하는 Class I HLA 항원 (A, B, C)의 subunit으로서 alpha interferon과 beta interferon에 의해 항원의 표현이 증가된다. 그러므로 종양과 감염질환 등 interferon의 생성과 연관된 여러 질병에서 증가된다. 이미 AIDS 환자에서 acid-labile alpha interferon이 증가 되어 있다는 보고가 있으므로

로 HIV 감염이 혈중 β_2 -microglobulin이 농도에 미치는 영향을 보기 위해 HIV 감염자에서 혈중 β_2 -microglobulin 농도를 측정하였는 바 $2316 \pm 1024 \mu\text{g}/\ell$ 로 정상성인의 혈중 β_2 -microglobulin 농도 ($1507 \pm 366 \mu\text{g}/\ell$)에 비해 유의하게 증가하였다. 이러한 혈중 β_2 -microglobulin의 증가는 면역자극이 계속되고 있음을 의미한다.

HIV의 초기 감염에서 부터 임상적으로 면역결핍 증상이 발현되기까지 7년 혹은 더이상 소요된다. 그 동안 바이러스는 임파구 등에 잠복 혹은 만성 감염 형태로 점진적인 Th 세포의 감소를 일으키며, 한편으로는 간헐적인 바이러스 증식이 일어나 감염된 Th 세포를 급격히 죽이거나 Th 세포나 단핵세포에 감염을 확산시킨다. 시험관내에서 임파구와 대식세포의 자극이 HIV의 생성을 위해 필요하다. 체내에서도 이러한 자극이 만성 혹은 잠복 감염 상태의 HIV의 증식을 유도할 것으로 사료된다. 시험관내에서 PHA가 바이러스의 증식을 유도하는 것과 유사하게 HIV 감염자의 체내에 많은 종류의 항원적 자극이 세포활성화에 기인할 것으로 보이는 데 EBV, CMV, HBV, HSV 등의 동시감염이 HIV 증식을 유도하고 AIDS로의 진행에 보조인자로 작용할 것으로 생각된다. 본 연구에서 HIV 감염자의 혈중 neopterin, sIL-2R, β_2 -microglobulin 및 IgA 등이 모두 증가되어 있으나 Th 임파구 수와 연관성을 보이지 않은 것은 세포수의 감소에 의한 면역기능의 감소와 대식세포, T 임파구, B 임파구 등 면역에 관련된 세포들의 비정상적, 비특이적 활성화에 의한 면역기능의 감소가 서로 무관하게 일어나는 것으로 생각된다. 이러한 양상은 자가면역질환과 유사하므로 HIV의 감염이 면역조절 기구를 심각하게 변형시키고 있음을 알 수 있다.

앞으로 이러한 면역세포의 활성화가 어떤 요인에 기인하는 것인지, 질병의 진전 즉 면역기능의 억제에 어떤 역할을 하는지 그리고 체내에서 HIV의 증식에 어떤 영향을 주는 지에 대해 자세한 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Barre-Sinoussi F, Chermann J-C, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Alexr-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzuoux C, Rosenbaum W, Montanier L (1983): Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 863.
2. Bhalla RB (1983): Abnormally high concentration of beta 2 microglobulin in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. *Clin. Chem.* 29:1560.
3. Centers for Disease Control (1982): Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) - United States. *MMWR* 31:507, 513.
4. Ciobanu N, Welk K, Kruger G (1983): Defective T-cell responses to PHA and mitogenic monoclonal antibodies in male homosexuals with acquired immunodeficiency syndrome and its in vitro correction by interleukin-2. *J. Clin. Invest.* 73:332.
5. deStefano E, Friedman RN, Friedman-Kien AE (1981): Acid-labile human leukocyte interferon in homosexual men with kaposi's sarcoma and lymphadenopathy. *J. Infect. Dis.* 146: 451.

6. Fahey JL, Detels R, Gottlib MS (1983): Immune-cell augmentation (with altered T-subset ratio) is common in healthy homosexual men. *N. Engl. J. Med.* 308:842.
7. Flinger JA, Fischer JR (Jr), Boswell RN, Reid MJ (1988): The relationship of serum IgA concentration to human immunodeficiency virus (HIV) infection: A cross-sectional study of HIV-seropositive individuals detected by screening in the United States Air force. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82:965.
8. Fuchs D, Banekovich M, Hausen A, Hutterer J, Reibnegger G, Werner ER, Gschnait FD, Dierich MP and Wachter H (1988): Neopterin estimation compared with the ratio of T-cell subpopulation in persons infected with Human Immunodeficiency Virus-1. *Clin. Chem.* 34(12), 2415-2417.
9. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M (1984): Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and risk for AIDS. *Science* 224:500.
10. Gottlib MS, Schroff R, Schander HM (1981): *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305:1425.
11. Gupta S, Safai B (1983): Deficient autologous mixed lymphocyte reaction in kaposi's sarcoma associated with deficiency of Leu-3 positive responder cells. *J. Clin. Invest.* 71:296.

12. Hofmann B, Lindhardt BO, Gerstoft J, Pertersen CS, Patz P, Odrum LP, Ryder N, Dickmeiss E, Nielsen PB, Ullman S, Sveijgaard A (1987): lymphocyte transformation response to pokeweed mitogen as a predictive marker for development of AIDS and AIDS related syndromes in homosexual men with HIV antibodies. *Br. Med. J.* 295:293.
13. Honda M, Kitamura K, Matsuda K, Yokota Y, Yamamoto N, Mitsuyasu R, Chermann JC and Tokunaga T (1989): Soluble IL-2 receptor in AIDS correlation of its serum level with the classification of HIV-induced diseases and its characterization. *J. Immunol.* 142, 4248-4255.
14. Janet KA Nicholson, Jones BM, Echonberg DF, Spira TJ, McDougal JS (1987): Phenotypic Distribution of T-cells of patients with have subsequently developed AIDS. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 48:82.
15. Kim TG, Suh KI, Hwang ES, Shin YO and Park SH (1989): Selection of Immunological parameters related with progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in the Korean Human Immunodeficiency Virus (HIV) seropositives: T cell subsets and mitogen stimulation tests. *Korean J. of Immunology* 11:185-195.
16. Lane HC, Masur H, Edgar LC (1983): Abnormalities of B lymphocyte activation and immunoregulation in patients

- with the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 309:453.
17. McDougal JS, Hubbard M, Nichoson JKA (1985): Immune complexes in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). J. Clin. Immunol. 5:130.
 18. McDougal JS, MS Kennedy, JM Slingh, SP Cort, A Mawle, JKA Nichoson (1986): Binding of HTLV-III/LAV to T4+T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. Science 231:382.
 19. Mildvan D, Mathur U, Enlow RW (1982): Opportunistic infection and immunodeficiency in homosexual men. Ann. Intern. Med. 96:700.
 20. Mobtagnier L, Gruet J, Chamaret J (1984): Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. Science 225:63.
 21. Murry HW, Rubin BY, Masur H (1984): Impaired production of lymphokines and ummune (gamma) interferon in the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 310:883.
 22. Polk BF, Fox R, Brookmeyer R (1987): Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. N. Engl. J. Med. 316:61.

23. Rook AH, Masur H, Lane HC (1983): Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and CMV-specific cytotoxic activation of lymphocytes from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Invest.* 72:298.
24. Seligmann M, Pinching AJ, Rosen FS (1987): Immunology of Human Immunodeficiency Virus infection and the Acquired Immunodeficiency syndrome. An Update. *Ann. Int. Med.* 107:234.
25. Smith P, Ohura K, Masur H (1987): Monocyte Function in the acquired immunodeficiency syndrome: Defective chemotaxis. *J. Clin. Invest.* 74:2121.
26. Williams RC Jr, Masur H, Spria TJ (1984): Lymphocyte activation antibodies in acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Immunol.* 4:118.

3. 인체홍선세포 및 백혈병세포주에서 HIV 감염여부 및 각종의 cytokine이 HIV조절 유전자에 미치는 영향에 관한 연구

제 1 절 서 설

AIDS환자의 기본병변은 면역체계의 손상으로 알려져 있고 특히 helper T 세포의 선택적 살해가 뚜렷하게 관찰되어, cell mediated immunity의 현저한 손상과 함께 이에 따른 humoral immunity의 손상이 뒤따르게 된다. 즉 helper T 세포의 숫적감소 및 mitogen에 대한 반응성의 저하, 혼합 림프구반응의 결함, T림프구 매개성 세포독성의 변화, 바이러스에 대한 면역반응 및 자연살해세포활성의 감소등이 알려져 있으며, 대식세포의 기능도 저하되며 B 세포의 기능에도 이상이 초래되는 사실들이 밝혀져 있다. 이와 같이 생체면역체계의 여러단계에서 면역조절 능력이 비정상적으로 변화된 상황은 단순히 HIV의 감염만으로는 설명하기 힘들기 때문에 HIV 감염에 따라 일어나는 표면항원의 변화 등 구체적인 발병기 전 및 병인을 규명하는 연구들이 현재에도 다각적으로 진행되고 있다. 특히 면역조절의 증추가 되고 있는 홍선에 대해 HIV의 감염이 미치는 영향은 큰 관심사가 되고있다.

본 연구의 궁극적인 과제인 HIV감염여부를 정확히 판정하기위한 기본전제로 홍선세포의 배양 및 홍선상피세포의 배양조건의 확립이 필요해진다.

본 연구자는 흉선세포의 분화과정 및 그 과정중 흉선 상피세포와의 상호관련성 여부에 대한 연구의 일환으로 흉선세포의 in vitro 배양을 시도한 바 부분적인 결과이기는 하나 일부 유도제제들을 통한 자극으로 15일까지의 in vitro 배양을 성공적으로시행하고 그 결과를 '89년도 본 연구보고서에 보고한 바 있다. 인체 흉선세포는 그 표본을 구하기 힘들다는 제약조건 이외에도 in vitro 상태에서 너무 쉽게 죽는 연약성을 보인다. 이러한 상태에서는 지속적인 실험이 불가능하므로 현재까지 알려진 여러 성장인자 및 유도제제 등을 광범위하게 단독 및 혼합사용하여 최적의 배양조건을 유지하는 제제의 조합 및 그 농도를 알아내야 하겠으며, 특히 2주이상의 장기배양이 가능한 조건을 알아내어 장기가 시도되는 실험에 문제가 없도록 대비해야 하는바, 이의 해결은 본 연구자에 의해 해결된 바 ConA+IL2+TPA의 적정농도 배합으로 거의 15일 정도까지의 장기배양이 가능해졌다.

흉선상피세포의 배양에 있어서는 이미 외국의 경우 많은 연구발표들이 있으며 제일 문제되는 점은 섬유아세포의 과증식을 어떻게 극복하고 보다 순수한 상피세포만의 집합을 얻을 수 있는가 하는 점이다. 제1과제 연구자는 흉선상피세포를 면역원으로 이용하여 흉선상피세포 표면의 단백질구조에 대한 단일클론항체를 얻기위한 hybridoma 기법을 시도하는 과정에서 흉선상피세포를 배양한 경험이 있는 바 고농도 혈청, differential trypsinization 등의 방법을 알아내었다.

이러한 연구에 대한 현황을 살펴보면 국내에서는 HIV에 대한 연구가 상당히 제한되어 있는 실정으로 흉선세포 및 흉선상피세포에 대한 HIV의 감염여부에 관한 보고를 찾아 볼 수 없으며 AIDS환자에 대한 부검 예

에서 흉선 및 입파조직에 대한 형태학적 고찰과 AIDS의 역학조사에 관한 소수자료가 있을 뿐이다. 국내에서 HIV 감염과 관계된 연구는 국립보건원 병독부 후천성면역결핍증과에서 주로 AIDS 환자의 혈청학적 진단에 관한 일들이 이루어지고 있다. Radio immunoassay (RIA), ELISA, IFA, Immunoblotting (Western blot) 등의 방법을 통해 AIDS에 감염된 환자의 혈청에서 HIV의 항체가 생성되었는지 여부를 판별하는 방법이 사용되고 있다. 또한 국내 감염자들에게서 분리된 HIV를 이용하여 말초혈액 단핵세포 및 HIV 친화성이 있는 각종 세포주(조혈계 계통)에서 표준 HIV 감염과의 차이에 대한 연구발표 및 HIV 항체가에 대한 연구, 중화항체에 대한 연구 등이 있을뿐 HIV의 흉선내 감염 여부에 대한 기초적인 연구자료들은 거의 없는 상태이다.

국외의 경우 체외 배양된 흉선상피세포에서 HIV감염을 일으켰다는 보고가 있으나, 이 경우는 AIDS 환자에서 분리된 HIV로 실험된 예이고, single cloned HIV의 감염여부에 대한 보고나 비교연구는 현재까지 없다. 또한 흉선세포에서의 HIV 감염여부에 대한 보고는 찾아볼 수 없으며, 이러한 이유로하여 본 연구자들은 HIV 감염에 의한 T₄ cell deletion의 원인은 단지 T₄ 림프구에 대한 HIV 감염뿐만 아니라 T림프구 공급원인 흉선내의 감염으로 인해 T림프구 모세포 고갈도 중요한 원인이 될 것이라는 가정하에 이를 증명하기 위하여 본 연구를 시도하였다. 또한 다양한 백혈병 세포주 특히 U-937, H9, MT-4 등의 대표적인 백혈병 세포주를 이용하여 HIV 감염의 Kinetics를 정하고 U-937 cell line을 이용하여 HIV의 HIV-LTR, Tat, k β regulatory gene을 Transfect 시켜 각종의 cytokine 이 상기한 regulatory

gene 에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서 CAT assay를 시행하였다.

제 2 절 연구재료 및 방법

1. 흉선세포에 대한 감염

분리된 흉선세포를 Bovine calf serum이 20% 함유된 RPMI-1640 배양액에다 ConA $20 \mu\text{g}/\text{ml}$, IL-2 $100 \text{ u}/\text{ml}$, TPA $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 첨가하여 3-6일간 배양하여 blast form이 형성된 것을 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 되게 하여 H9/HTLV-III b에서 유래한 HIV를 감염시켜 3일 간격으로 감염여부를 Ag capture ELISA와 Reverse transcriptase assay로 측정하였다. 대조군은 blast된 thymocyte에 HIV infection 시키지 않은 것으로 사용하였다.

2. U-937 cell line에 대한 HIV감염과 *Jsup이 HIV감염에 미치는 영향

monocytic cell line인 U-937을 Bovine calf serum이 20% 함유된 RPMI-1640배양액에다 1×10^5 개를 첨가 H9/HTLV-III b 에서 유래한 HIV를 1 ml 씩 감염시키고 다른 군에는 Jsup을 1 ml 첨가 감염여부를 3일 간격으로 배양하면서 Ag capture ELISA와 Reverse transcriptase assay로 측정하였고 대조군으로 U-937 cell 에다 HIV를 infection시키지 않은 것을 사용하였다.

* 인체종양세포주 배양액

3. H9 cell line에 HIV감염과 J₂, J₄ sup의 HIV infection 의 효과

T cell leukemic cell line인 H9 cell에다 HIV infection과 J₂, J₄ sup을 처리하여 HIV infection에 미치는 영향을 보았다. 먼저 H9 cell 1×10^5 개를 20% Bovine calf serum이 함유된 RPMI-1640 Media에 H9/HTLV-III b에서 유래한 HIV를 0.5ml을 감염시키고 다른군에 각각 J₂, J₄ sup을 1ml씩 첨가하고, HIV를 0.5ml씩 감염시킨다. 음성대조군으로 H9 cell을 사용하였다. 감염여부는 3일씩 배양하면서 Ag capture ELISA와 Reverse transcriptase assay로 측정하였다.

4. MT-4 cell line에 HIV감염과 Jsup이 미치는 영향

HTLV-1이 infection된 T cell leukemic cell line인 MT-4 cell에다 HIV 감염여부와 Jsup이 여기에 미치는 영향을 보았다. 먼저 MT-4 cell을 20% Bovine calf serum이 함유된 RPMI-1640 Media 에다 1×10^5 개 cell을 suspension하여 H9/HTLV-III b에서 유래한 HIV를 0.5ml을 infection하고 다른군에는 HIV를 0.5ml infection하였다. Jsup을 1ml 첨가하면서 배양하고 대조군으로는 infection 시키지 않은 MT-4 cell을 배양하였다. 4일간 배양하면서 감염여부를 Ag capture ELISA와 Reverse transcriptase assay로 측정하였다.

5. 인체 증양 세포주 및 인체 백혈병 세포주의 배양

ATCC (American type culture collection)로부터 구입된 각종 세포주를 FBS 10%가 첨가된 적정 배지 (RPMI-1640, DMEM)에 키운다. 이때 세포농도를 적절히 조절하여 exponential stage에 있는 세포를 HIV infection과 gene transfection에 사용한다. 이들 세포의 배양은 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 시행된다.

6. 역전사효소 활성측정과 민감도 비교 (RT activity 측정)

세포배양 상층액내에 HIV가 존재하는가를 확인하기 위하여 역전사효소 활성측정 및 항원검색 효소면역측정을 시행하며 어느 방법이 더 민감한가를 비교한다. 역전사효소 활성의 측정은 Levy and Shimabukura의 방법을 변형하여 시행한다. 즉 1ml의 배양상 청액에 polyethyleneglycol (PEG) 6000을 최종농도가 8% (w/v) 되게하여 4 °C에서 18시간 방치한다. 원심 분리하여 상층액을 완전히 제거하고 침전물에 다음과 같은 조성의 반응액을 40 ul 넣는다. 반응액은 50 mM Tris (pH 8.0), 5mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 0.5 mM EDTA와 50 μl/ml의 poly (rA) oligo (dT) 12-18로 구성되어 있다. 이 반응물을 빙수조에 둔 다음 (³H) thymidine triphosphate를 30 uCi 넣은 후 37 °C에서 1시간 반응시킨다. 1N HCl에 0.01 M sodium pyrophosphate를 만들어 2ml 넣고 이어서 10% trichloroacetic acid를 2ml 넣는다. 침전이 생기도록 4 °C에서

20분간 방치한 후 잘 흔들어서 침전물을 glass fiber로 회수한다. 0.01 M sodium pyrophosphate로 세척하고 95% 에탄올로 헹군 후 건조시켜서 scintillation cocktail solution에 넣어 beta-counter로 카운트 한다.

항원검색 효소면역 측정은 위해서 결정된 최적 조건을 사용한다. 다만 항원이 들어 있는 샘플의 처리는 역전사효소의 활성측정시와 동일하게 PEG 6000을 처리하여 얻은 침전물을 1% Triton X-100이 함유된 세포배양배지 100 μ l로 처리하여 반응시킨다.

7. 항원 검색 효소면역 측정법

1) 부착항체의 적정농도 결정

부착항체의 적정농도를 결정하기 위해 정제된 IgG 항체를 단백질 양으로 50 μ g/ml, 10 μ g/ml 및 0.4 μ g/ml되게 10 mM carbonate buffer (pH 9.6)에 희석하여 microwell EIA plate에 well당 100 μ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 반응시킨다.

0.05%의 Tween 20이 함유된 인산완충용액으로 세척하고, 1% Triton X-100으로 처리된 HIV 배양상청액을 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다. 다시 세척하고 peroxidase가 결합된 항체를 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000과 1 : 4000으로 희석하여 각각 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다. 세척하고 나서 기질 용액 (phosphate citrate buffer (pH 5.0)에 0.04% (w/v)의 o-phenylenediamine과 0.06% (v/v) 과산화수소를 넣어 만듦)을 100 μ l씩 넣고 실온에서

20분간 반응시킨다. 2 M 황산을 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 492 nm에서 흡광도를 측정한다.

2) 표준 정량 곡선

위에서 결정된 최적조건을 사용하여 표준 정량 곡선을 구한다. 표준 항원으로 사용한 것은 상품으로 판매하는 제품 (Retro-Tek) 내에 양성대조로써 들어있는 HIV p24항원이다. 이 항원을 4 ng/ml 로부터 2배 계단 희석하여 well 당 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣어 반응 시킨다. 492 nm 에서 흡광도를 측정하여 각 농도에 따른 반응으로 본다.

3) 특이도 측정

HIV 뿐만 아니라 HIV 이외의 항원도 검색되는가를 알아보기 위하여 항원 검색 효소면역 측정법을 시행한다. 항원으로 사용한 것은 HIV로서 H9/HTLV-III 표준 바이러스와 국내에서 분리된 HIV 2주, HTLV-I으로서 MT-2 세포주의 배양상청액 및 B 형 간염 바이러스로서 혈구응집가가 1 : 1000인 B 형 간염 바이러스 표면항원 등이다. 대조로서는 표준 바이러스를 배양하는데 사용했던 H9 세포주의 배양상청액을 사용한다. 항원의 준비는 4-7일간 배양한 배양상청액을 각각 1 ml 씩 준비하여 PEG 6000을 최종농도가 8%되게 넣어 18시간 동안 4°C 에 방치한다. 그후 원심분리하여 침전물을 회수한다. 이때 역전사효소의 활성을 동시에 측정한다.

4) 항체반응 양상 측정

위의 실험에서 나타난 최적조건을 이용하여 최종 결과에서 흡광도

가 1.0정도 나타나는 조건을 선택하여, 항체를 4 °C에서 18시간 plate에 부착시킨다. 그후 H9/HTLV-Ⅲ 배양상청액을 Triton × 100으로 처리하여 37 °C에서 1시간 반응시킨다. 여기에 HIV에 대한 항체 양성자와 음성자의 혈청을 각각 1 : 25부터 2배 계단희석한다. 각 희석액을 동량의 적절히 희석된 peroxidase-항체 결합체를 섞어서 37 °C에서 1시간 반응시킨다. 음성 대조로는 혈청을 넣지않은 희석액을 사용한다. 기질 용액을 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 2 M 황산을 첨가하여 효소반응을 정지시키고 발색정도를 492 nm (대조 6200 nm)에서 측정한다. 다음식에 의해 반응 저지율 (% inhibition)을 구한다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{음성대조-관찰치}}{\text{음성대조-background}} \times 100$$

8. Transformation

1) Competent cell을 만드는 과정

E. coli strain (균주)을 LB 고체배지 위에 심어 37 °C에서 16-20시간 (1일) 배양한 후 colony가 생성되면 LB 액체배지로 옮겨 심는다. 이를 37 °C shaking incubator에서 16-20시간 자라게 한 후 LB액체배지에 일부 옮겨 심어 다시 배양한다. 약 3시간 후 흡광도 측정기로 A600 nm = 0.4-0.5가 되도록 자라면 원심분리하여 cell을 모은다. Ice위에서 일정시간 둔 후 다시 37 °C에서 5분동안 열충격을 준다. 여기에 LB broth (액체배지)를 넣어서 1시간동안 배양한 후에 원심분리하여 상층액을 버리고 남아있는 cell에 멸균증류수를 넣어서 LBamp 고체배지에 심

는다. 그리고 37 °C 배양기에서 하루동안 자라도록 한다.

여기서 자란 colony를 다시 LBamp 액체배지에 옮겨심고 다시 하루 동안 37 °C의 shaking incubator에서 자라도록 한다.

2) Plasmid 분리과정

LBamp 액체배지에서 자란 cell들을 원심분리해서 모으고 이 cell pellet에 STET을 넣고 섞어준 후 lysozyme (12.5 mg/ml) 을 넣고 혼합하고 끓는 물에서 일정 시간 넣어 cell막이 파괴되도록 한다. 이것을 다시 원심분리하고 이때 생긴 상층액을 모아 동량의 Isopropanol을 더하여 -20 °C에서 10분 둔 후 원심분리하여 완전히 상층액을 제거하고 멸균증류수를 더한다. 이를 A260 nm에서 측정하여 분리된 plasmid DNA 농도를 알아낸다.

9. CAT (Chloramphenicol acetyltransferase) assay

1) Gene transfection

a. DEAE-dextran method

Cell을 필요한 만큼 세어 원심분리하여 pellet을 얻고 media (배지) 를 제거한다. 그후 남아있는 cell pellet에 TS를 넣고 잘 섞은 후 다시 원심분리하여 cell들을 모은다. 준비한 cell에 TS plasmid DNA, DEAE-dextran을 혼합한 용액을 넣어 잘 섞는다. 이때 DEAE-dextran을 넣고 잘 섞어 DNA가 골고루 용액내에 분포하여 cell내로 잘 transfection되도록 한다.

위의 준비된 용액에 chloroquine (IX)을 넣어 1시간 동안 37 °C CO₂ 배양기에서 배양한다.

위의 cell들을 다시 원심분리하여 배지를 넣어 섞어 준 후 원심분리하여 상층액을 제거해 버리고 cell pellet만 남긴다. 다시 여기에 배지 (media)와 적정 양의 cytokines을 첨가하여 2일(48 시간)동안 배양한다.

b. CaPO⁴ method (adherent cell)

준비된 DNA를 0.5 M CaCl₂에 잘 섞는다. 여기에 HeBS를 동량 섞어 vortex mixer로 잘 섞어 20분간 실온에 방치한다. 이 용액을 media를 제거한 cell에 첨가하고 15분간 incubation하고 PBS로 2회 세척한다. 그리고 이 transfected cell에 배지를 첨가한다.

* HeBS (pH 7.1)

274 mM NaCl
10 mM KCl
1.4 mM Na₂HPO₄ 7H₂O
12 mM Dextrose
42 mM Hepes

2) 단백질 정량 과정

2일후 gene transfection이 된 cell들을 원심분리하고 cell pellet에 PBS를 넣은후 다시 원심분리하여 상층액을 다제거한다. Pellet에 0.25 M Tris-Cl (pH 7.8)을 200 μ l 넣어 잘 섞어준다.

Tris-Cl 처리된 cell들을 dry ice (드라이 아이스) 에서 5분, 37 °C에 2분 처리하는 것을 한 회전으로 하여 이 과정을 4회 반복한다. 이들을 다시 60 °C에서 7분동안 열처리를 한후 원심분리하여 상층액만을 모은다.

BSA (Bovine serum albumin)를 이용하여 standard (표준) 곡선을 만들고 이것을 기준으로 하여 위에서 얻은 상층액속의 부피당 단백질양을 계산해낸다.

3) CAT assy 과정

¹⁴C-chloramphenicol, acetyl coenzyme A, distilled water를 섞은후 상층액 속에 들어있는 단백질을 일정한 양을 취해 혼합하여 CAT 반응이 일어나도록 37 °C에서 약 1시간 배양한다. 배양후 ethylacetate를 넣어 원심분리하고 상층액만 모아 desiccator에서 약 30분간 건조시킨다. Ethylacetate가 다 증발된 후 다시 ethylacetate를 적절한 양 넣어 TLC (thin layer chromatography)상에 점을 찍어 (dotting) 전개액 (chloroform : methanol = 95 : 5)에 넣어 전개 시킨다.

TLC용지 전체 길이의 80% 정도가 전개되면 TLC를 꺼내 말리고 필름 카세트 X-ray 필름을 끼워 방사선이 노출되도록 하여 후에 현상한다.

제 3 절 실험 결과

1. 흉선세포에 대한 HIV 감염

흉선에서 분리한 흉선세포에 3차례의 HIV감염 결과를 볼 수 있었는

데 표 1과 같이 첫번째 HIV감염에서는 Ag capture ELISA 에서는 감염 시킨 후 11 일째 감염을 볼 수 있었어서 15 일경에 최고치를 보였다. (Table 1).

Table 1. HIV infection in Human thymocytes

days after infection		1st Exp.			
		8th	11th	15th	17th
N.C	EIA (O.D)	0.075	0.065	0.115	0.111
	*R.T (cpm)	3327	2597	2981	3159
HIV infection	EIA (O.D)	0.364	0.54	1.292	1.169
	R.T (cpm)	3244	3918	15416	11641

N.C: negative controls
*Reverse transcriptase Assay

Reverse transcriptase assay 에서는 역시 11 일째부터 서서히 항원량이 증가해 15 일경에 최고치를 나타내었다 (Fig. 2, Table 1). 두번째 HIV 감염에서는 감염후 8일째부터 서서히 감염이 보이다가 21일경에 항원량의 증가가 Ag capture ELISA에서 보였다 (Fig. 1). Reverse transcriptase의 경우는 11 일부터 항원량의 증가가 시작되어 14 일부터 21 일까지 거의 같은 항원량을 보였다 (Fig. 2, Table 2). 그러나 더 이상의 배양을 하지않아 최고치를 볼 수 없었다. 세번째 HIV 감염에서는 Ag capture ELISA 에서 10 일째부터 서서히

Table 2. HIV infection in Human thymocytes

2nd Exp.

days after infection		4th	8th	11th	14th	17th	21th
N.C	EIA (O.D)	0.227	0.250	0.253	0.188	0.212	0.213
	R.T (cpm)	4938	2789	4483	3869	2420	5038
HIV infection	EIA (O.D)	0.283	0.342	0.547	0.592	0.6	1.146
	R.T (cpm)	3436	2723	3748	7493	7479	7400

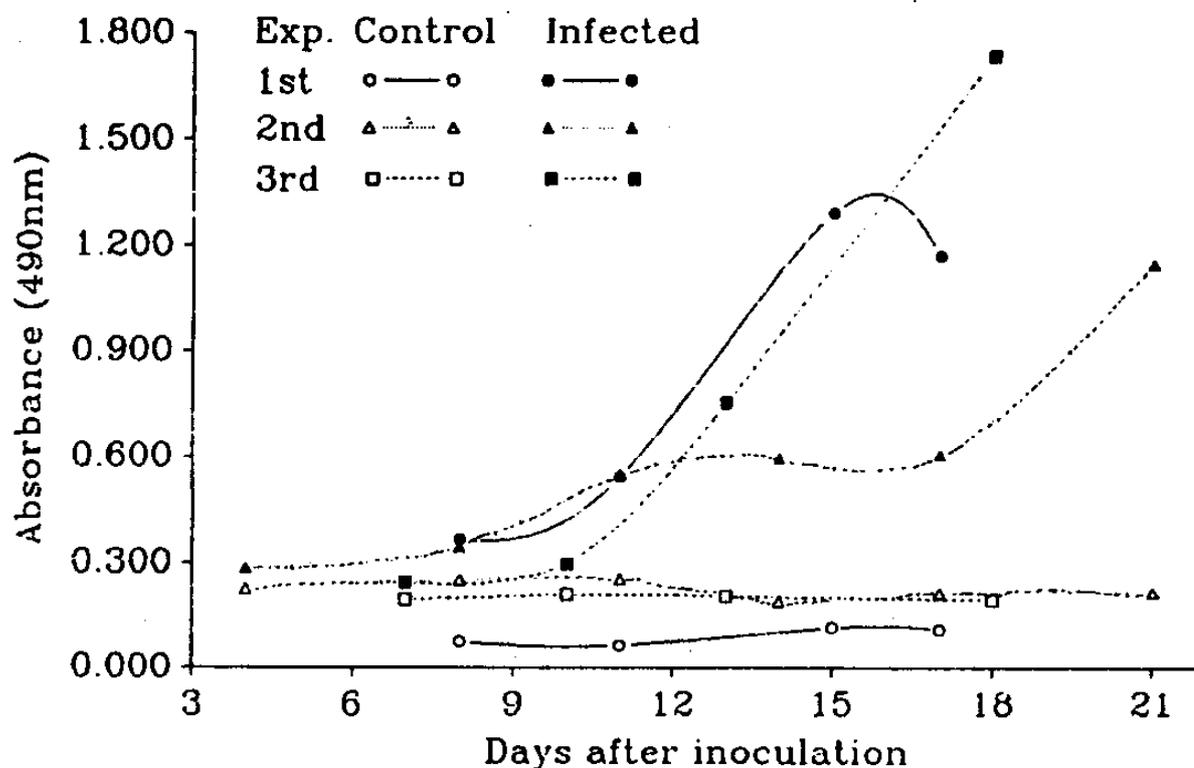


Fig. 1. HIV infection in Human Thymocytes.

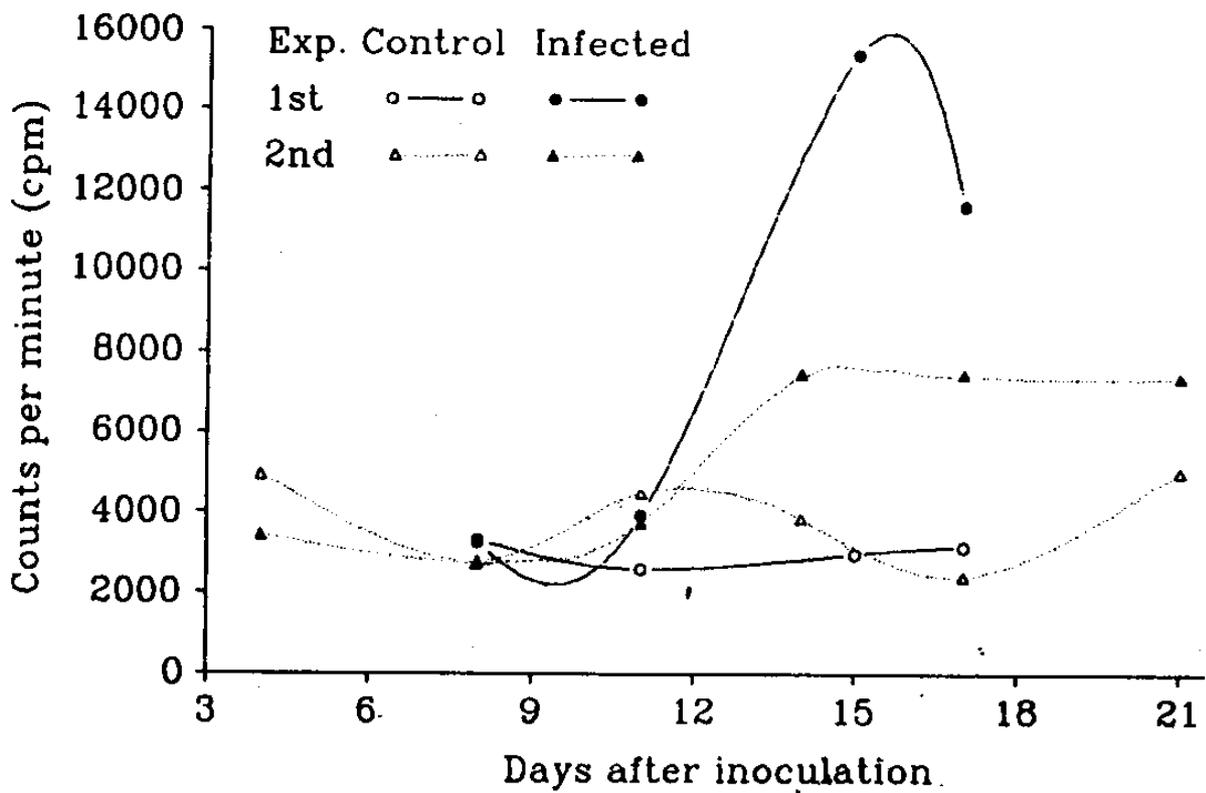


Fig. 2. HIV infection in Human Thymocytes.

Table 3. HIV infection in Human thymocytes

days after infection		3rd Exp.			
		7th	10th	13th	18th
N.C	EIA (O.D)	0.195	0.210	0.205	0.193
	R.T (cpm)	*-	-	-	-
HIV infection	EIA (O.D)	0.241	0.296	0.752	1.734
	R.T (cpm)	-	-	-	-

* not done

감염을 보이며 18 일째까지 감염이 증가하였으나, 더 이상의 배양을 하지 않아 최고치는 볼 수 없었다. (Fig. 1, 2, Table 3).

이상의 결과로 T cell 분화 및 체내 면역체계에 중요한 역할을 하는 흉선에 HIV 감염될 수 있음을 확인할 수 있었고 in vitro 실험에서 감염된 후 처음 항원의 탐지가 8 - 11일 사이에 이루어지는 것을 알 수 있었다.

2. U-937 세포주에 HIV 감염과 Jsup01 감염에 미치는 영향

먼저 HIV만을 U-937 cell에 감염시킨 경우는 Ag capture ELISA 에서 9 일이후부터 항원의 급격한 증가가 보이고 16 일 경에 최고치를 보였다 (Fig. 3, Table 4). HIV와 Jsup을 동시에 처리한 경우는 감염후 6 일부터 항원의 증가가 보여지고 13 일째 최고치를 나타내었다 (Fig. 3, Table 4). Reverse transcriptase assay에서는 전자는 9 일이후에 항원의 증가가 보였고 13 일째 최고치를 나타내었다.

후자의 경우는 6 일 이후부터 항원의 증가가 보였고 13 일째 최고치를 보였다 (Fig. 4, Table 4). 이 결과로 HIV 만을 감염시켰을 경우 감염여부는 9 일 이후에 나타나며 13 - 16 일에서 최고값을 나타내는 것을 알 수 있었고 Jsup 와 HIV가 동시에 감염시켰을 경우는 6 일 이후부터 감염여부를 알 수 있었고, 13 일경에 최고치를 나타내는 것을 알 수 있었다. 이로써 Jsup 이 viral rlication 을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다.

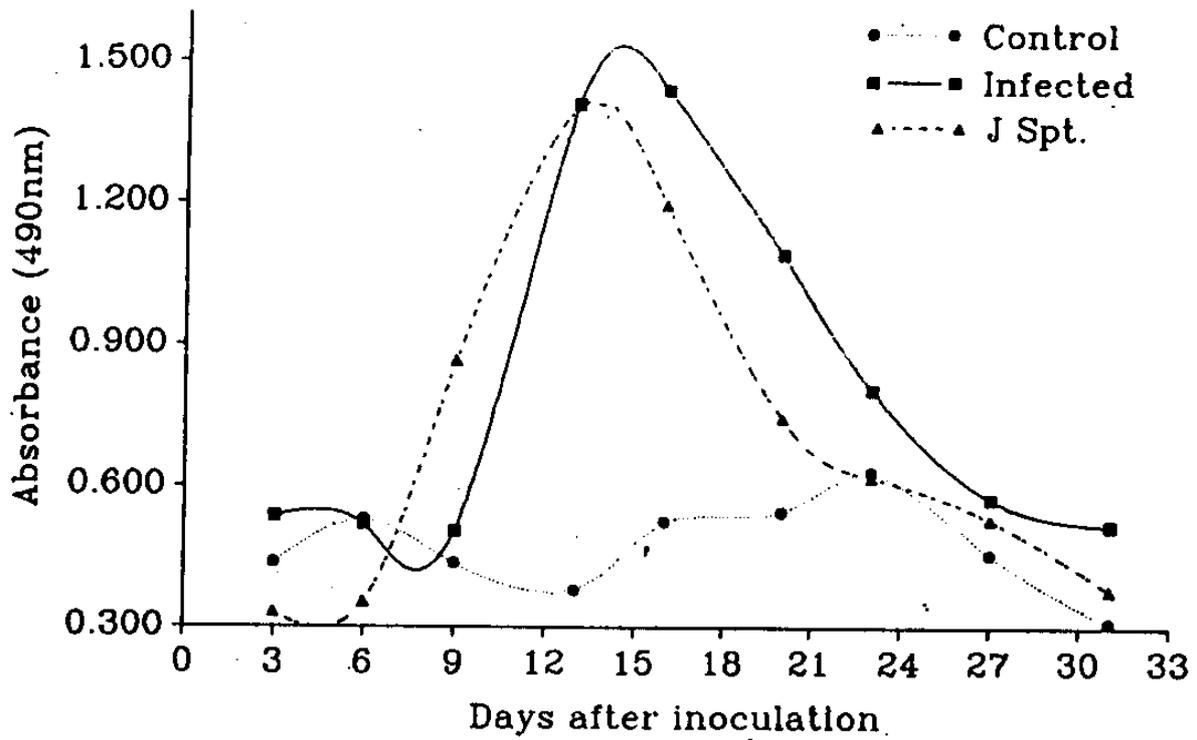


Fig. 3. HIV infection in U937 cell line.

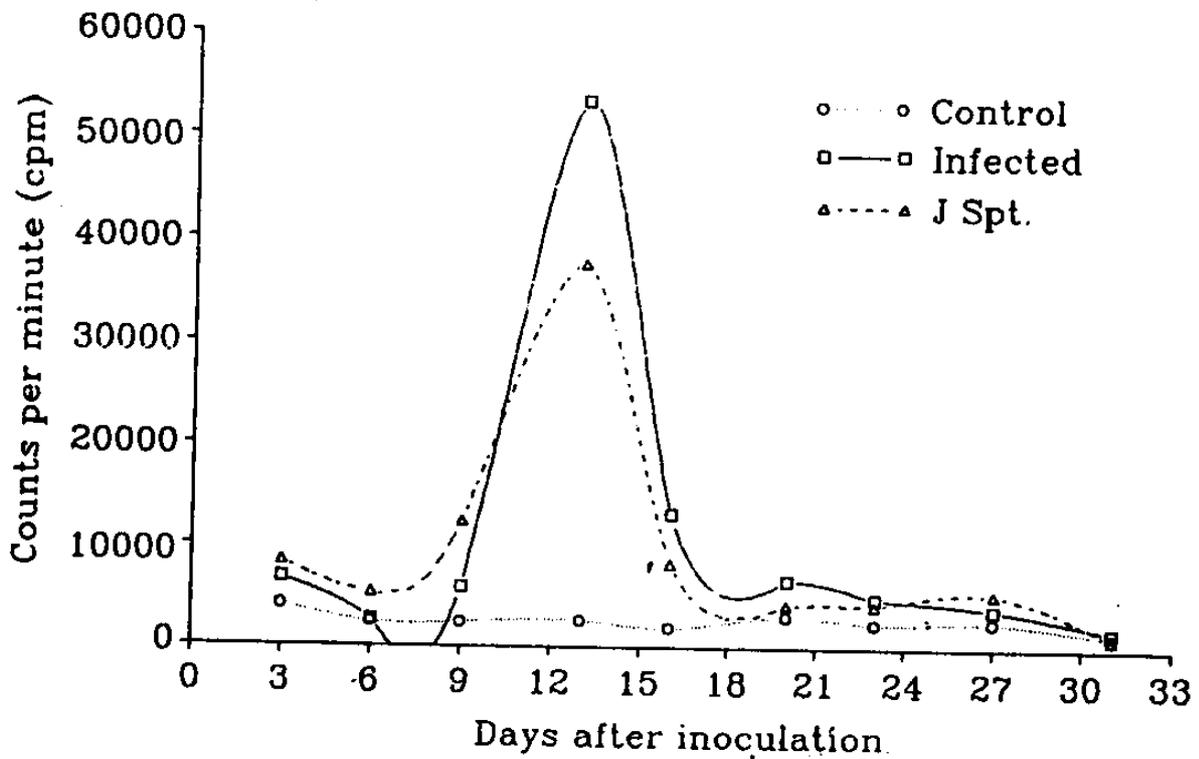


Fig. 4. HIV infection in U937 cell line.

Table 4. HIV infection in U-937 cell line

	3th	6th	9th	13th	16th	20th	23th	27th	31th
days after infection									
	0.439	0.530	0.438	0.380	0.527	0.546	0.633	0.458	0.313
EIA (O.D)									
N.C	4086	2387	2414	2627	1896	3126	2406	2605	1151
R.T (cpm)									
	0.536	0.520	0.506	1.409	1.438	1.093	4.805	0.575	0.519
EIA (O.D)									
HIV infection	6691	2671	5894	53385	13085	6594	4848	3852	1665
R.T (cpm)									
	0.330	0.353	0.867	1.405	1.196	0.746	0.622	0.531	0.380
EIA (O.D)									
HIV + Jsups infection	8363	5329	12349	37573	8232	4207	4216	5351	1003
R.T (cpm)									

3. H9 세포주에 HIV 감염과 Jsup이 미치는 영향

T cell 계열인 H9 cell에 HIV 감염여부와 Jsup이 감염에 미치는 영향을 보았는데 Ag capture ELISA에서는 HIV만 감염시켰을 경우 7일부터 항원량이 증가해 11일째 최고치를 나타내었다. 그리고 Jsup과 HIV를 같이 감염시켰을 경우 7일 후부터 항원량이 증가해 11일째 최고치를 나타내었다 (Fig. 5, Table 5).

Reverse transcriptase assay 경우에는 전자는 7일 이후에 항원량이 증가해 13일째 최고치를 나타내었고 후자는 역시 7일 이후부터 항원량이 증가하기 시작하여 13일째 최고치를 나타내었다 (Fig. 6, Table 5).

위의 결과로 H9 cell에 HIV 감염이 될 수 있음을 알 수 있었고 Ag capture ELISA에서는 Jsup이 viral replication을 어느 정도 촉진시키는 걸 볼 수 있었으나 Reverse transcriptase assay에서는 관찰할 수 없었다.

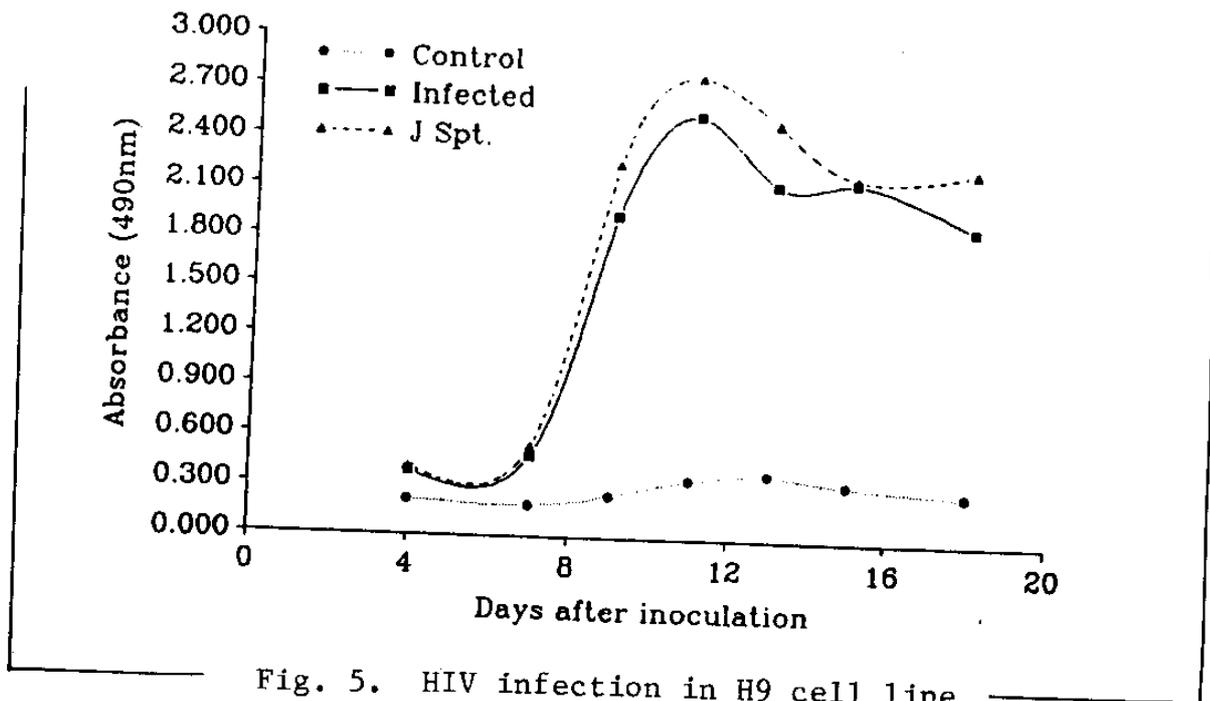


Fig. 5. HIV infection in H9 cell line.

Table 5. HIV infection in H9 cell line

days after infection	4th	7th	9th	11th	13th	15th	18th
N.C	EIA (O.D)	0.206	0.185	0.249	0.347	0.385	0.283
	R.T (cpm)	3131	1515	1383	1903	1105	3081
HIV infection	EIA (O.D)	0.379	0.477	1.935	2.55	2.142	1.890
	R.T (cpm)	3344	3351	31722	33142	44104	19290
HIV + Jsupsup infection	EIA (O.D)	0.4	0.536	2.250	2.780	2.512	2.248
	R.T (cpm)	3335	2823	12752	23073	28475	7388

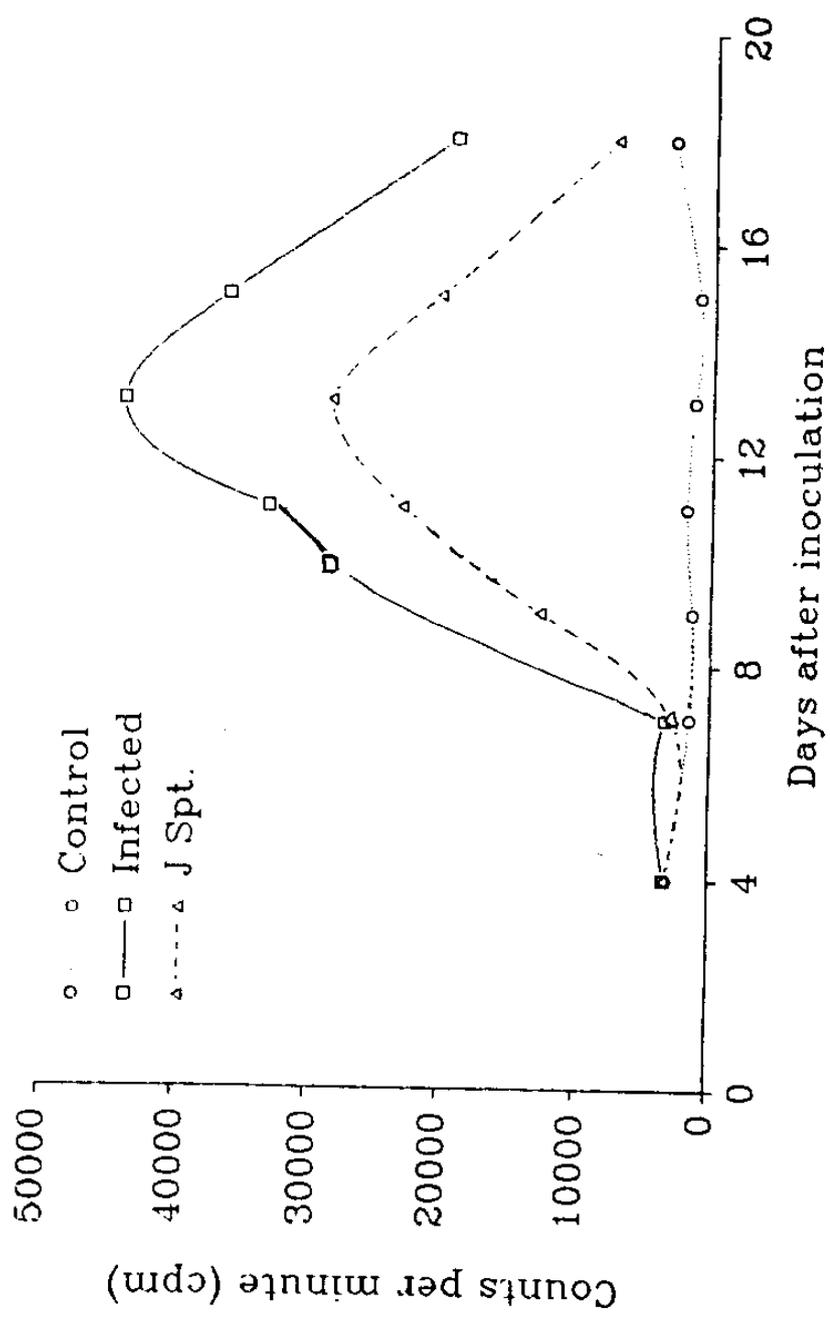


Fig. 6. HIV infection in H9 cell line.

4. MT-4 세포주에 HIV 감염과 JsupO이 미치는 영향

MT-4 cell에다 HIV를 감염시킨 후 4 일째 배양상액에서 감염여부를 확인하였는데 HIV만을 감염시켰을 때보다 Jsup 을 같이 감염시켰을 경우 Ag capture ELISA 와 Reverse transcriptase assay에서 같이 훨씬 높은 수치를 보였다 (Fig. 7, Table 6). 이로써 Jsup이 viral replication을 촉진시키는데 작용한다는 것을 알 수 있었다.

Table 6. HIV infection in MT4 cell line

	N.C	HIV infection	HIV + Jsup infection
EIA (O.D)	0.103	0.98	1.35
R.T (cpm)	5860	132980	232986

4 days after infection

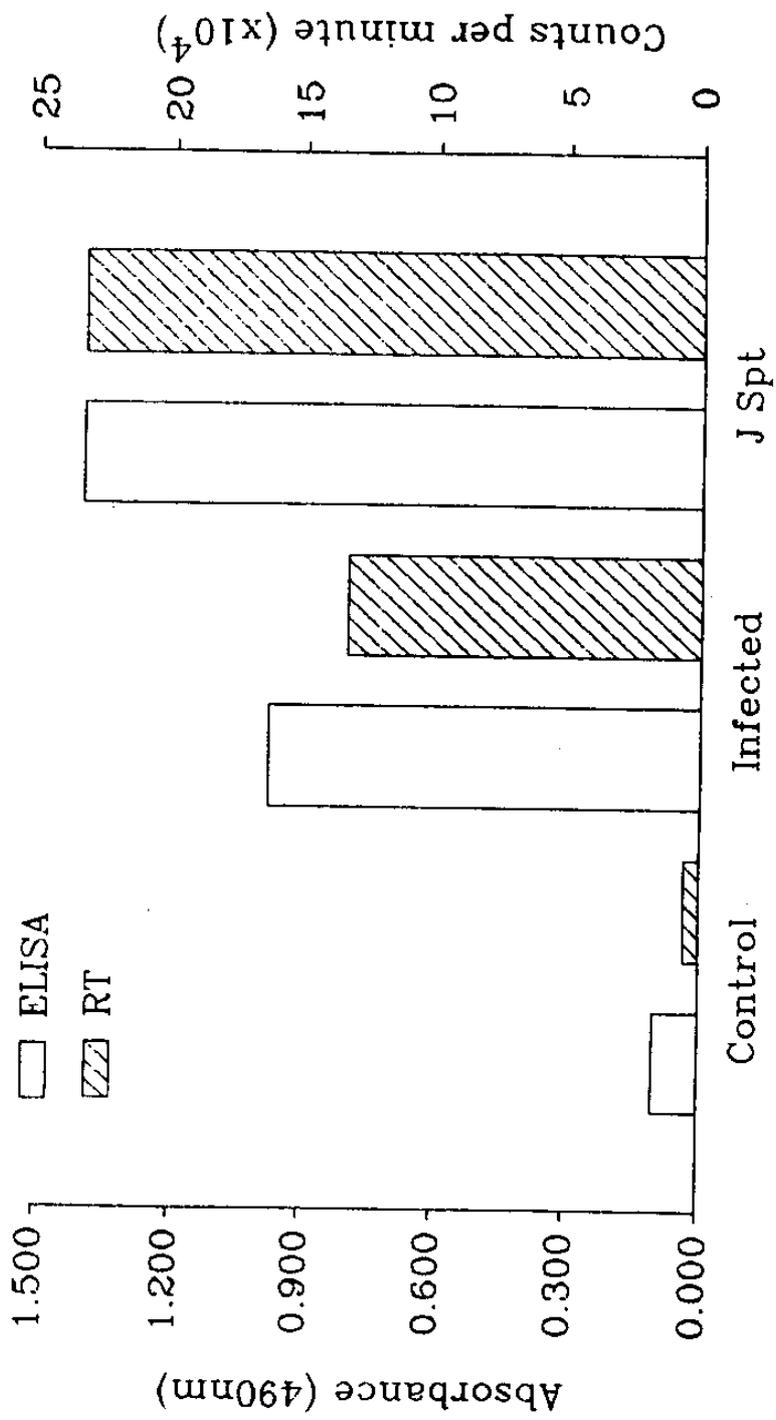


Fig. 7. HIV infection in MT4 cell line.

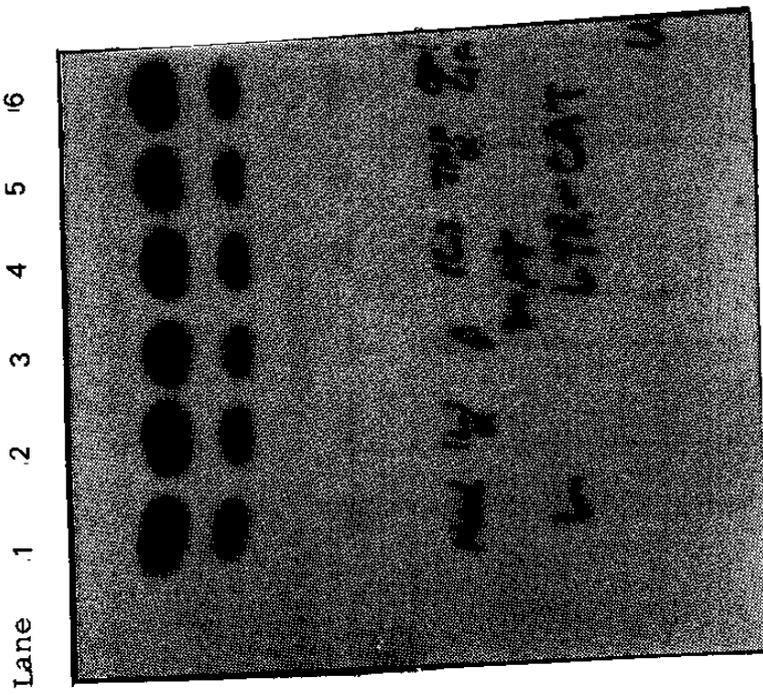


Fig. 8. The effects of 5 kinds of cytokines on LTR-CAT plus CMV-tat gene cotransfection to U937. Lane 1; Media, Lane 2; IL-1 α (10u/ml), Lane 3; IL-1 β (10u/ml), Lane 4; IL-3 (50u/ml), Lane 5; TNF α (100u/ml), Lane 6; GM-CSF (100u/ml). 20 μ g cell lysate was used in the tests.

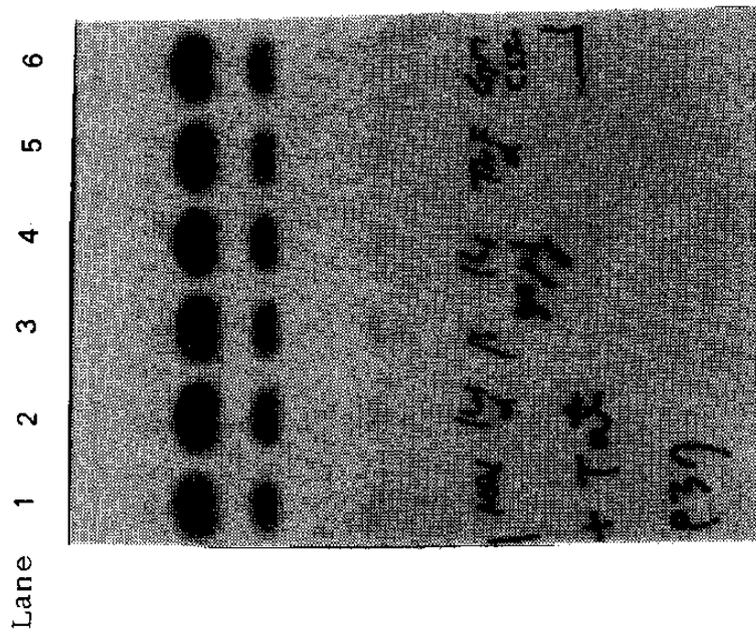


Fig. 9. The effects of 5 kinds of cytokines on LTR-CAT plus CMV-tat gene cotransfection to U937. Lane 1; Media, Lane 2; IL-1 α (10 μ /ml), Lane 3; IL-1 β (10 μ /ml), Lane 4; IL-3 (50 μ /ml), Lane 5; TNF α (100 μ /ml), Lane 6; GM-CSF (100 μ /ml), 50 μ g cell lysate was used in the tests.

Lane 1 2 3 4 5 6

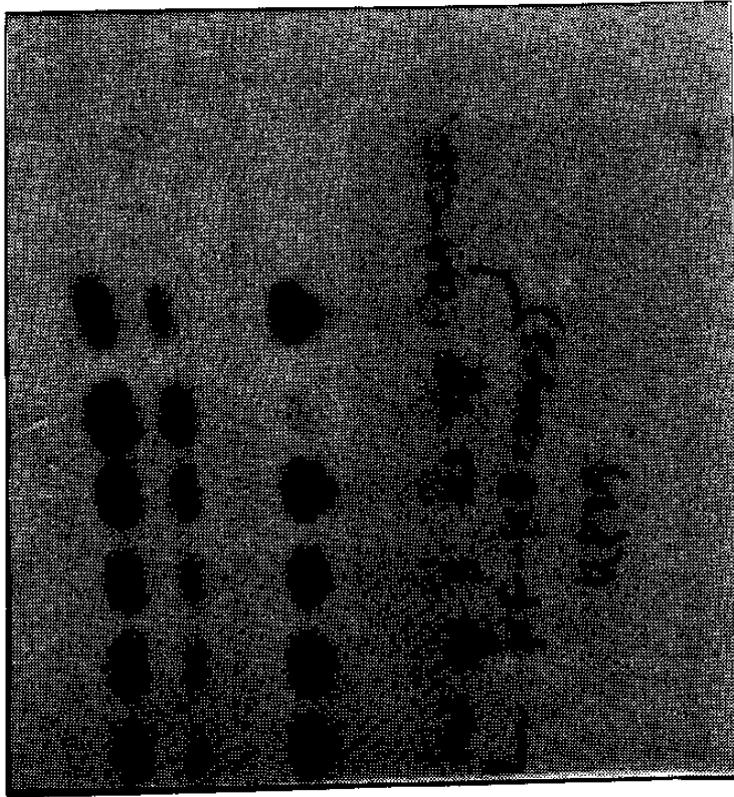


Fig. 10. The effects of 5 kinds of cytokines on NF-KB-CAT gene transfection to U937. Lane 1; Media, Lane 2; IL-1 α (10u/ml), Lane 3; IL-1 β (10u/ml), Lane 4; IL-3 (50u/ml) Lane 5; TNF- α (100u/ml), Lane 6; GM-CSF (100u/ml). 10 μ g cell lysate was used in the tests.

5. 각종의 Cytokine 이 HIV 조절유전자에 미치는 영향

TNF α 의 HIV replication 을 증가시키는 역할이 뚜렷하여 (Fig. 10) NF - $k\beta$ inducin activity 를 보였다.

IL-1 α, β 그리고 GM-CSF는 Control 에 비해 경미한 증가를 보였을 뿐이다.

제 4 절 고 찰

HIV는 체내 여러가지 cell에 감염될 수 있는 것으로 보고된 바 세포 표면에 CD4 분자와 virus envelope protein 인 gp 120과 친화력을 통한 감염이 널리 알려져 있다.

그러나 현재는 CD4 분자가 세포표면에 존재하지 않는 Neural cell에도 감염이 되는 것으로 보고되어 CD4 분자와 다른 요소가 역시 HIV 감염에 영향을 미치는 것으로 보여진다'. 인체 흉선에서 분리한 흉선세포에 HIV를 감염시킴으로서 체내 면역체계에 중요한 역할을 하는 흉선에 감염되는지를 확인하였다 (Fig. 1, 2, Table 1, 2, 3). 이를 수행하면서 흉선세포의 체외배양을 위해 IL-2, ConA, TPA 를 첨가하여 배양하였는데 여기에서 TPA는 HIV infection의 중요한 물질인 CD4 분자의 interalization 을 촉진시키고 HIV infection 시 나타나는 syncytium 형성을 억제하여 virus infection 을 지연시키는 것으로 보여지는 바, TPA 가 흉선세포 표면의 CD4 분자에 미치는 영향도 같이 측정해 보아야 할 것이다. 그리고 monocytic 계열인 U-937 에

HIV 감염은 체내 monocyte, macrophage 같은 cell 에 HIV가 감염될 수 있다는 것을 보여준다 (Fig. 3, 4, Table 4).

역시 monocytic cell인 U-937에 TPA를 처리하면 macrophage 로 분화를 촉진시키는 반면 CD4 분자의 internalization 을 촉진시키는 것을 보인다고 보고되며 감염된 세포의 syncytium 이 억제되는 것으로 보고가 되어있다.^{4, 7, 8, 9)}

이에 대해서도 TPA가 HIV infection에 미치는 영향에 더 자세한 연구가 필요되어진다. 또한 T cell leukemic cell line 인 H9 cell, HTLV-1이 감염된 MT-4 cell, U-937 cell 에서 각각 Jsup이 HIV infection 을 촉진시키는 것으로 나타나고 있다 (Fig. 3~7, Table 4 ~ 6).

또한 여기에서 고려해야 할 것으로 H9 cell 에서 유래한 HIV strain 과 다른 cell 에서 유래한 HIV strain 사이에 다른 감염의 결과가 난다고 보고되어졌다¹⁰⁾. 이것을 고려하여 다양한 HIV strain 의 확보가 필요하다고 보여진다.

따라서 본 연구에서는 여러 종류의 세포주에서 HIV infection을 관찰하였는 바, 이는 HIV가 인체내에서 감염경로를 좀 더 명확하게 설명해 주고 있으며 HIV 감염에 주된 물질인 CD4 에 대한 TPA 효과라든지 Jsup 이 viral infection 에 미치는 효과 등은 더 연구해서 HIV infection 의 다른 이면을 밝혀나가야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Janet M. Harouse, F. Gonzalez-Scarano, et al: CD4-Independent Infection of Human Neural cells by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 63:2527-2533, 1989.
2. Barbara J. Poitts, Malcolm A. Martin, et al: Replication of HIV-1 in Primary Monocyte Cultures. *Virol.* 175:465-476, 1990.
3. W. Edward Robinson, William M. Michell, et al: Complement-Mediated Antibody-Dependent Enhancement of HIV-1 infection Requires CD4 and Complement Receptors. *Virol.* 175:600-604, 1990.
4. James A. Hoxie, Richard A. Cooper, et al: Transient Modulation and Internalization of T4 Antigen Induced by Phorbol Esters. *J. Immunol.* 137:1194-1201, 1986.
5. Giovanni Rovera, Caroline Damsky, et al: Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:2779-2783, 1979.
6. Alan P. Fields, W. Stratford May, et al: Human Immunodeficiency virus induces phosphorylation of its cell surface receptor. *Nature*. 333:278-280, 1988.

7. Iqbal Hossum Chowdhury, Naoki Yamamoto, et al: The phorbol Ester TPA Strongly Inhibits HIV-1-Induced Syncytia Formation but Enhances Virus Production: Possible Involvement of Protein Kinase C Pathway. *Virology*. 176:126-132, 1990.
8. Paul R. Clapham, Nancy Hogg, et al: Human Immunodeficiency Virus Infection of Monocytic & T-lymphocytic cells: Receptor Modulation & Differentiation Induced by Phorbol Ester. *Virology*. 158:44-51, 1987.
9. Birgitta Asjö, Hans Wigzell, et al: Susceptibility to Infection by the Human Immunodeficiency Virus (HIV) correlates with T4 Expression in a Parental Monocytoid cell line & its subclones. *Virology*. 157:359-365, 1987.
10. Monte S. Meltzer, Howard E. Gendelman, et al: HIV and the Immune System. *Immunology Today*, Vol. 11, No. 6, 1990.
11. Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT, Dauguet C, Vilmer E, Griscelli C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Gluckman JC, Chermann JC, Montagnier L: Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science*. 225:59, 1984.
12. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature (London)*. 312-763, 1984.

13. McDougal FS, Kennedy MS, Slish JM Cort SP, Mawle A, Nicholson JKA: Binding of HTLV-LAV to T4 cells by a complex of the 110K viral protein and the %4 molecule Science. 231:382, 1986.
14. Rosenbery ZF, Fauci AS: Immunopathogenic mechanisms of HIV infection: cytokine induction of HIV expression. Immunol Today 11(5): 176-180, 1990.
15. Fauci AS: The human immunodeficiency virus: Infectivity and mechanisms of pathogenesis. Science 239:617, 1988.
16. Haseltine WA, Wong-Staal F: The molecular viology of the AIDS virus. Sci. Am. 259:52, 1988.
17. HO, DD et al: Pathogenesis of infection with human immunodeficiency virus. N. Engl. J. Med. 317:278, 1987.
18. Jameson BA et al: Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein. Science 240: 1335, 1988.
19. Palacios R, Von Boehmer H (1986) Requirements for growth of immature thymocytes from fetal and adult mice in vitro. Eur J Immunol 16:12-19.
20. Piantelli M, Larocca LM, Aiello FB, Maggiano M, Carbone A, Ranelletti FO, Musiani P (1986) Proliferation of phenotypically immature human thymocytes with and without interleukin 2 receptors. J Immunol 136:3204-3210.

21. Draber P, Kisielow P (1981) Identification and characterization of immature thymocytes responsive to T cell growth factor. *Eur J Immunol* 11:1-7.
22. d'Angeac DA, Moris M, Reme T (1986) Mitogenic effect of PMA + IL 2 on subpopulations of a corticosteroid resistant thymocytes. *J Immunol* 137:3501-3508.
23. Kim DY, Otten G, Moldwin RL (1986) PMA alone induces proliferation of some murine T cell clones but not others. *J Immunol* 137:2755-2760.
24. Lugo JP, Krishnan SN, sailor RD (1986) Early precursor thymocytes can produce interleukin 2 upon stimulation with calcium ionophore and phorbol ester. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1862-1866.
25. Gilbert SF, Migeon BR. D-Valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell* 5:11-17, 1975.
26. Singer KH, Harden EA, Robertson AL, Lobach DF, Haynes BF. In vitro growth and phenotypic characterization of mesodermal-derived and epithelial components of normal and abnormal human thymus. *Human Immunology* 13:161-176, 1985.
27. Haynes BF. Scarce RM, Lobach DF, Hensley LL. Phenotypic characterization and ontogeny of mesodermal derived and endocrine epithelial components of the human thymic micro-

- environment. *J. Exp. Med.* 159:1149, 1984.
28. Rheinwald JR, Green H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331, 1975.
29. Beardsley TR, Pierschbacher M. Wetzel GD, Hays EF: Induction of T-cell maturation by a cloned line of thymic epithelium (TEPI). *Proc. Natl. Acad. So* 80:6005, 1983.
30. Infection of cultured human thymic epithelial cells by human immunodeficiency virus. *Immunol. immunopathol.* 51:165-195, 1989.
31. Folks, T.M., J. Justement, A. Kinter, C.A. Dinarello, and A.S. Fauci: Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science* 238: 800-832, 1987.
32. Harada, S., Y. Koyanagi, H. Nakashima, N. Kobayashi, and N. Yamamoto: Tumor promoter, TPA. enhances replication of HTLV-III/LAV. *Virology* 154:249-258, 1986.
33. Lahdevirta, J., C.P.J. Maury, A.M. Teppo. and H. Repo: Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Med.* 85:1289-291, 1988.
34. Matsuyama, T., Y. Hamamoto, S. Kobayashi, M. Kurimoto, J. Minowada, N. Kobayashi, and N. Yamamoto: Enhancement of

- human immunodeficiency virus production by natural lympho-
toxic. *Med. Microbiol. Immunol.* 177:181-187, 19-8.
35. Feng, S., and E.C. Holland: HIV-1 tat transactivation requires the loop sequence within tar. *Nature (London)* 334:165-167, 1988.
 36. Fisher, A.G., M.B. Feinberg, S.F. Josephs, M.E. Harper, and F. Wong-Staal: The transactivator gene of HTLV-III is essential for viral replication. *Nature (London)* 320:367-371, 1986.
 37. Gendelman, H.E., W. Phelps, L. Feigenbaum, J.M. Ostrove, A. Adachi, P.M. Howley, G. Khoury, H.G. Ginsberg, and M.A. Martin: Transactivation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequence by DNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9759-9763, 1986.
 38. Kadonga, J.T., and R. Tjian: Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5889-5893, 1986.
 39. Kao, S.Y., A.F. Calman, P.A. Luciw, and L.W. Peterlin: Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by Tat gene product. *Nature (London)* 330:489-493, 1987.
 40. Kawakami, K., C. Scheidereit, and R.G.: Identification and purification of a human immunoglobulin enhancer binding

- protein NF-kB that activates transcription from a human immunodeficiency virus I promoter *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4700-4704, 1988.
41. Muesing, M.A., D.H. Smith, and D.J. Capon: Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus transactivator protein. *Cell* 48:691-701, 1987.
 42. Nabel, G., and D. Baltimore: An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T-cells. *Nature (London)* 326:711-713, 1987.
 43. Rice, A.P., and M.B. Mathew: Transcriptional but not translational regulation of HIV-1 by the Tat gene product. *Nature (London)* 332:551-553, 1988.
 44. Siekeevitz, M., S.F. Josephs, M. Dukovich, N. Pfeffer, F. Wong-Staal, and W. Greene: Activation of the HIV-1 LTR by T-cell mitogens and the transactivator protein of HTLV-1. *Science* 238:15785-1578, 1987.
 45. Wu, F., J. Garcia, R. Mitsuyasu, and R. Gaynor: Alternations in binding characteristics of the human immunodeficiency virus enhancer factor. *J. Virol.* 62:218-225, 1988.
 46. Ahmad, N., and S. Venkatesan: Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of the HIV-1 LTR. *Science* 241:1481-1485, 1988.

47. Rosen, C.A., E. Terwilliger, A. Dayton, J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine: Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2071-2075, 1988.
48. Cullen, B.R., Hauber, J., Campbell, K., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., and Rosen, C.A.: Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting art gene product. *J. Virol.* 62, 2498-2501, 1988.
49. Felber, B.K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T., and Pavlakis, G.N.: Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1495-1499, 1989.
50. Hammarskjold, M.L., Heimer, J., Hammarskjold, B., Sangwan, I., Albert, L., and Rekosh, D.: Regulation of human immunodeficiency virus env expression by the rev gene product. *J. Virol.* 63:1959-1966, 1989.
51. Hauber, J., Bouvier, M., Malim, M.H., and Cullen, B.R.: Phosphorylation of the rev gene product of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 62:4801-4804, 1988.
52. Malim, M.H., Jauber, J., Fenrick, R., and Cullen, B.R.: Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* 335:1811-183, 1988.

53. Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R.: The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338:254-257, 1989.
54. Toshifumi Matsuyama, Yoshiaki Hamamoto et al: Cytocidal effect of tumor necrosis factor on cells chronically infected with HIV: enhancement of HIV replication. *J. Virol.* 63(6): 2504-2509, 1989.
55. David Harrich, Joseph Garcia et al: Role of SPI-Binding domains in vivo transcriptional regulation of the HIV type 1 long terminal repeat. *J Virol.* 63(6): 2585-2591, 1989.
56. Marie-Louise Hammarskjold, Jessica Heimer et al: Regulation of HIV env expression by the rev gene product. *J. Virol.* 63(5): 1959-1966, 1989.
57. Michael H. Malim, Sabine Bohnlein, Joachim Hanber, Bryan R. Cullen: Functional dissection of the HIV-1 rev trans-activator-derivation of a trans-dominant repressor of rev function.

感謝의 말씀

本 研究課題를 遂行할 수 있도록
研究費를 支援해 주신 科學技術處와
行政支援과 可檢物 確保에 많은 도
움을 주신 保健社會部 및 關係機關
여러분께 感謝를 드립니다.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발 사업의 연구보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 한다.