

# 細胞融合과 單clone 性抗体

## — 그 產生, 應用 및 展望 —

金 宇 鎬

江原大學校 生命科學研究所

培養이 不可能한 抗体產生細胞를 腫瘍細胞와 融合시켜 永久히 增殖을 持續할 수 있는 雜種融合細胞腫 (hybrid-myeloma; hydridoma)을 만들고 그것을 clone化 (cloning) 하여, 均質하며 高度의 特異性을 갖는 抗体를 大量으로 얻을 수 있는 것이 可能하게 되었다. 즉 “hybridoma”란 單語는 骨髓腫 (myeloma)의 腫瘍細胞와 淋巴球 (lymphocyte)와를 融合시켜 樹立된 株化細胞系 (established cell line)에 命名한 新造語이다. 그 淋巴球가 事前에 免疫된 mouse로부터 由來된 것이면 어떤 hybridoma는 미리 定해진 特異性을 갖는 더욱 安定된 樣相의 單一의 clone (細胞分枝系) 性的 抗体 즉 單clone性 抗体 (monoclonal antibody; MCA)를 分泌하게 된다. 實로 MCA는 各種 抗原 (antigen), 受客體 (receptor), 組織適合性 抗原 (histocompatibility antigen) 등의 識別을 包含한 細胞表面分子 (cell surface molecule)의 研究에 利用될뿐만 아니라 免疫機轉의 解析, 類似 抗体間의 識別, 各種微生物의 型 (type) 別 分類, virus 蛋白의 mapping, 生物材料의 構成要素의 構造 및 機能의 分析, 病態의 鑑別診斷 및 感染病의 治療等 廣範圍한 分野에 걸쳐 利用될 수 있다. 따라서 이와같은 單clone性 抗体는 生物學이나 醫學分野에 있어서의 새로운 武器로서 脚光을 받게 되었다.

**抗体產生의 遺傳的制藥:** 脊椎動物의 體내에 異物이 侵入하거나 또는 注射되면 各가지 種類의 免疫反應이 惹起된다. 그와같은 反應의 한가지로서 形質細胞 (plasma cell)가 抗体를 分泌한다. 抗体는 globulin 分劃에 屬하는 蛋白質 (免疫globulin; Ig)로서 異物 즉 抗原上의 特定の 構造 (抗原決定基, antigenic determinant)를 認識하고 이것과 結合하는 性質을 지니고 있다. 生體내에 있어서 抗体가 抗原과 結合하는 것은, 結果적으로 抗原이 生體에 미치는 作用을

中和시키며 또한 異物 그自體를 體내로부터 排除시키는 一連의 過程을 惹起시킨다. 한편 이와같은 免疫反應에 있어서의 生理的인 機能과는 別途로 抗体는 只今까지 研究의 道具로서도 使用되어 왔다. 그것은 特定の 抗原決定基하고만 反應한다는 抗体의 性質을 利用한 것으로서 特定の 分子나 細胞를 標識하거나 혹은 同一性證明을 行하여 各가지 混合物속에서 顯하는 目的物을 分離하기위한 道具로서 극히 有效하였던 것이다.

通常의인 抗原에 대해서 產生되는 抗体는 極히 異質的 (不均一)인 것으로, 그것은 形質細胞의 前驅細胞 (precursor cell)인 B淋巴球가 사람이나 mouse의 脾臟에 多分히 100萬 clone (細胞分枝系) 씩이나 存在하기 때문인 것으로 믿어진다. 事實 모든 B細胞 clone은 共通의 幹細胞 (stem cell)에 由來한 것이기는 하나 各 相異한 抗原決定基를 認識하고 特異的인 抗体를 產生하게끔 分化되어 있다 (Clone選擇說) 그와같은 理由로서 어떤 免疫原 (抗原)으로 動物을 免疫시킨 경우에는 매우 均一치 못한 多樣한 抗体가 產生되게 된다. 또한 그 組成을 보더라도 注射된 物質上에 存在하는 相異한 抗原決定基에 대해서 各 別個의 抗体가 產生될뿐만 아니라 하나의 決定基에 대해서도 親和性이 相異하다고 하더라도 結合할 수 있는 複數의 種類의 抗体가 產生되게끔 되는 것이다. 그중에서도 한가지 한가지의 抗体를 따로 分離한다는 것은 困難하므로 普通 使用하고 있는 抗血清 (免疫血清)이라는 것은 各가지 抗体의 混合物이며 또한 免疫된 動物間에서 그 組成이 相異한 것이 常例이다.

그러나 個個의 抗体는 各 各 하나의 B細胞 clone 으로부터 分化된 形質細胞로부터 產生되는 것이다. 그러면 特異的인 抗体를 產生하는 細胞를 따로 따로 골라내어 試驗管內에서 培養하는 것이 可能하다면 어

떻게 될 것인가? 하나의 clone으로부터 分化하는 形質細胞는 均一한 것이므로 어떤 抗原決定基에 대해 完全히 同一한 抗體를 만들수 있을 것이다 (Fig. 1). 그렇게 되면 多量의 MCA가 얻어질수 있을 것이나 不幸히도 正常의 抗體產生細胞를 培養系로 維持시킬수가 없다.

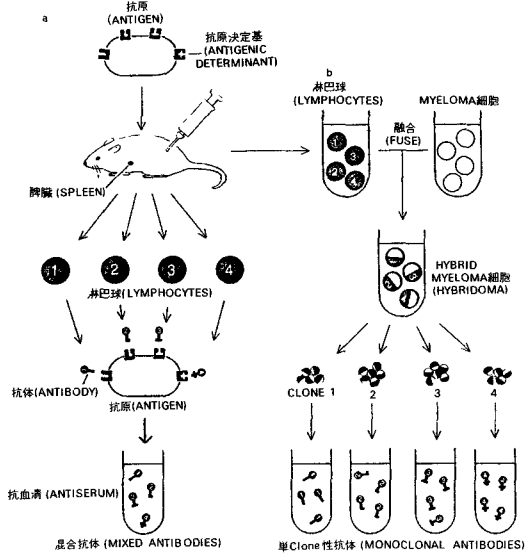


Fig. 1. 抗血清과 單clone性抗體 (MCA)

複數의 抗原決定基을 갖는 抗原分子가 動物의 體內에 들어가면 B淋巴球가 增殖하여 각각 1個의 抗原決定基에 대한 親和性을 갖는 Ig(抗體)를 分泌한다. 普通의 抗血清은 이들 抗體를 混合物로서 含有하고 있다(a). MCA는 脾臟의 淋巴球와 惡性의 myeloma細胞가 融合하므로써 얻어진다. 個個hybridoma細胞는 clone化되어 抗原分子上의 하나의 抗原決定基과 特異的으로 結合하는 MCA를 分泌한다(b).

한편 免疫系의 惡性腫瘤(malignant tumor)에는 myeloma(骨髓細胞腫)라고 하는 新生物(neoplasm)이 있으며, 迅速히 增殖하는 이 細胞는 myeloma蛋白質이라고도 하는 異常한 Ig를 大量으로 產生한다. 이腫瘍은 한 前驅細胞로부터 發生하여 增殖을 繼續하는 clone 그自體로서 培養系에서 維持하는 것이 可能할뿐 만 아니라 分泌되는 Ig의 化學構造는 모두 同一하다는 것이 알려져 있다. 이와같은 意味에서 myeloma蛋白質은 MCA라고 할수 있으나 그 特異성이 어느 抗原에 指向된 것인지는 알길이 없으며, 反對로 抗原에 대해서 特異的인 抗體를 產生하는 myeloma를 뜻대로 만들어 낼 수도 없는 것이다.

사람의 myeloma의 存在는 오래前부터 알려져 있었으나 免疫學者에 의한 myeloma蛋白質의 詳細한 解析은 1960年代初에 이르러 겨우 始作되었다. Potter(英國 國立癌研究所)는 mouse에 大量의 單clone性的 Ig를

產生하는 myeloma를 誘導하기에 이르렀다. 그러나 많은 努力에도 不拘하고 投與된 抗原에 대한 特異的인 抗體를 產生하는 myeloma를 만들지는 못하였다.

Sachs등(Salk生物學研究所)은 試驗管內에서 培養될수 있는 myeloma細胞株를 確立하는데 成功하였으나 이 細胞株는 그後 消失되어버렸다. 그러나 Horibata와 Harris는 多數의 myeloma細胞株를 培養系로 確立시켜 다른 研究者들에게 分讓하였다. Milstein과 그 協同研究者들(英國醫學研究會)은 Potter의 腫瘍株로부터 派生한 한 細胞株를 넘겨받아 精力的인 研究를 施行하였다. 當時 Milstein등은 MCA 그 自體에 關心을 가지고 있지 않고, 研究의 主目的은 培養系에 있어서 體細胞가 어떻게 分化하며, 突然變異가 抗體의 結合特異性에 어떻게 變化를 附與하는가를 調査하는데 있었으므로 mouse의 myeloma細胞株는 단순히 研究對象의 하나에 지나지 않았다. 1973年 Milstein등은 培養細胞에서 分泌되는 mouse myeloma蛋白質의 構造遺傳子突然變異體를 作成하는데 처음으로 成功하였다. 이 研究와 Scharff(Einstein醫科大學)의 研究에 의해서, 培養細胞의 突然變異는 產生하는蛋白質의 構造에 變化를 招來한다는 것이 明白하게 되었으며 突然變異가 일어나는 頻度와 그것이 分子構造에 미치는 影響에 대해서 한가지 研究成果를 얻게되었다. 萬若 產生되는 Ig이 抗體活性을 갖는 것이라면 그 活性의 微細한 變化를 示顯하는 것이 構造遺傳子の 突然變異를 아는데 가장 有效한 方法인 것이다. 그러나 이경우 抗體活性이 없는 Ig였기때문에 突然變異體를 찾아내는 것은 매우 어려운 일이었다. Milstein등이 研究를 더욱 進展시키기 위해서는 抗體活性을 지니며 또한 그 活性의 測定이 容易한 Ig產生細胞가 必要하였으나 當時 그와같은 細胞株는 存在하지 않았다. 그러나 때마침 이들은 細胞融合(cell fusion)의 方法을 알게 되었던 것이다.

Kohler 및 Milstein은 體細胞突然變異研究를 繼續하는 한편 抗體產生에 있어서의 遺傳的制禦에 관한 研究를 進行시켰다. 抗體產生은 2組의 遺傳子群에 의해서 支配되고 있는 것으로, 한쪽의 遺傳子群은 抗體分子의 L chain과 H chain의 V領域(可變域)의 構造를 決定 즉 code하는 遺傳子群으로 構成되고 있으며, 다른 한쪽은 H, L 兩 chain의 C領域(定常域)을 code하고 있는 것이다. V領域은 Ig의 抗體活性을 나타내는 部分이며 C領域은 補體(complement: 免疫應答에 關與하는 血漿蛋白複合物)와의 結合, 細胞膜과의 結合, 또는 抗體分子의 細胞膜通過등 抗體의 各가지 作用을 擔當하는 部分이다. 個個 淋巴球는 각각 하나의 V領域遺傳子和 C領域遺傳子에 의해서code된 抗體를 產生하고 있다. 相同染色體사이에서 V領域

域遺傳子和 C 領域遺傳자의 組合이 相異할 경우에는 한쪽의 V-C 遺傳子만이 表現되며 다른 것은 排除된다 (對立遺傳子의 排除).

1973年 Cotton과 Milstein은 만약 對立遺傳子排除의 機構가 破壞되면 產生되는 Ig는 어떤 分子構造를 갖게되는가를 調査하기 위해서 한가지 實驗을 行하였다. 즉 mouse 由來의 myeloma細胞와 rat 由來의 그것을 融合시켰다. 이 融合細胞로부터 分泌되는 Ig를 分析해보면 兩쪽의 어미細胞由來의 H chain과 L chain이 각가지 組合으로 Ig分子를 構成하고 있음을 알게되었다. 그러나 V 領域과 C 領域의 組合은 반드시 한쪽 어미細胞由來의 것으로, 이 사이에 兩쪽 어미細胞形質의 無作爲의인 組合은 없었다. 이것은 V 領域遺傳子和 C 領域遺傳자가 같은 染色體上에 있다는 것을 나타내는 것이다. 現在 V 領域과 C 領域을 code하고 있는 DNA配列間에는 intron(介在配列)이 存在한다는 것이 알려져 있다. RNA로 轉写될때는 intron을 包含하여 모든 DNA配列이 判讀되어 相補의인 RNA가닥을 形成한다. 다음 이 RNA가닥은 細胞內的 酵素로 處理되어 intron部分이 喪失되며 V 領域과 C 領域을 code하는 RNA配列의 連結이 일어나 mRNA가 만들어진다. Ig는 이 mRNA를 amino 酸配列로 判讀하므로써 만들어지는 것이다. 이와같이 Milstein 등의 myeloma細胞融合의 實驗은 V 領域과 C 領域의 結合이 mRNA의 形成段階에서 行해진다는 것을 나타내었다.

**細胞融合法의 應用** : 위에서와 같은 Milstein 등의 實驗은 同時에 融合細胞에 있어서는 對立遺傳子排除의 機構가 作動하고 있지 않다는 것을 나타내고 있다. 그것은, 產生되는 Ig에 兩親細胞의 形質이 함께 表現되는 것으로서 明白하다고 보고 있다. Kohler와 Milstein은 이 結果를 보고 細胞融合法을 그들의 突然變異의 實驗에 應用할수 있을것이라 생각한 것이다. 즉 正常淋巴球 또는 形質細胞(plasma cell)와 myeloma細胞를 融合시키므로써 抗原特異的인 抗體를 繼續 產生하는 細胞를 만들어낼수 있을것이라 생각하였던 것이다. 이미 確立되어 있던 細胞融合法을 새로운 目的에 應用하고자 하는 것으로, 그것은 抗原刺戟을 받은 B淋巴球의 最終的分化段階인 形質細胞의 特有한 機能을 永久히 增殖시킬수 있는 細胞로 固定시키고자한 試圖이기도 하였던 것이다.

最初의 試圖로서 이들은, 免疫原으로 羊赤血球를 擇하였다. 이미 1963年 Jerne과 Nordin은 이 抗原에 대한 抗體의 測定法을 開發하고 있어 融合細胞로부터 分泌되는 抗體의 解析이 容易할 것이기때문이다. 우선 免疫시킨 mouse의 脾細胞와 mouse 由來의 myeloma細胞를 混合하고 이것에 細胞融合을 促進하는 媒

體를 作用시켜 融合細胞를 얻었다. 뒤이어 融合細胞만이 生存할수 있는 特殊培養液으로 細胞를 培養하여 融合이 일어난 細胞만을 選別하였던바 그 培養上 清液에는 兩親株由來의 Ig가 모두 分泌되어 있음을 알게되었다. 그중에서 羊赤血球에 대한 抗體만을 產生하는 融合細胞를 選別하여 個個細胞로 分離培養하므로써 抗原特異的인 한種類의 抗體만을 分泌하고 있는 細胞를 clone化(cloning)하였다(Fig. 2) 이렇게

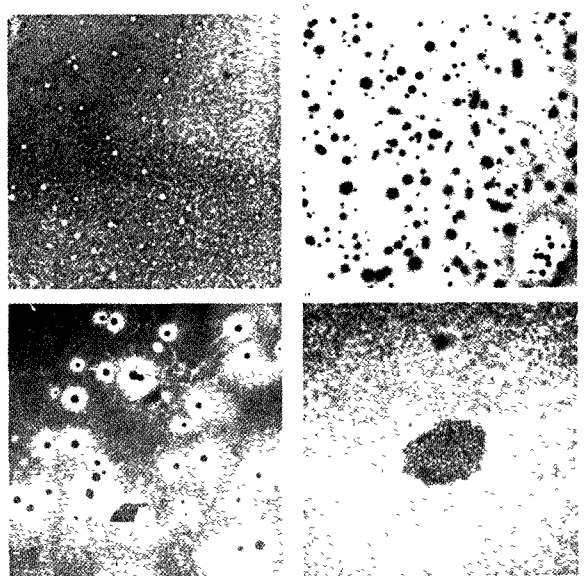


Fig. 2. 抗體를 分泌하는 hybridoma clone

Kohler와 Milstein은 hybridoma中에서 抗體를 分泌하는 clone을 同一性證明하기 위해서 우선 羊赤血球(se)에 대한 抗體產生의 有無를 調査하였다 se와 抗體產生細胞를 培養(agar-overlay法)하고 이것에 補體를 加하는 것이 標準方法이다 分泌細胞로부터 擴散된 抗體는 가까이 있는 se上的 抗原과 結合하고 補體의 作用에 의해서 溶血性plaqu를 形成한다(A) (寫眞에서 白點으로 나타난 plaque는 分泌細胞周圍의 透明部位임) Milstein과 kohler는 se에 대해서 抗體를 產生하고 있는 mouse의 細胞를 myeloma細胞와 融合시켜 만들어진 hybridoma를 培養접시에 散布하였다. 寫眞에서의 黑點이 形成된 hybridoma의 colony들이다(B) 이것에 se와 補體를 加하면 數個의 colony가 plaque(colony周圍의 흰部分)를 形成하고 抗體產生을 나타낸다. 이 colony로부터 個個細胞를 採取하여 매우 낮은 細胞密度로 접시에 심었다(C). 이곳에 增殖한 clone은 거의 se에 대한 抗體를 產生하고 있다 하나의 抗體分泌clone의 寫眞(D)에서는 clone의 個個細胞와 그周圍를 둘러 쌓고 있는 死滅細胞의 領域이 나타나고 있다.

하여 처음으로 MCA를 分泌하는 融合細胞를 培養維持하는데 成功하였던 것이다 (Fig. 3, 4).

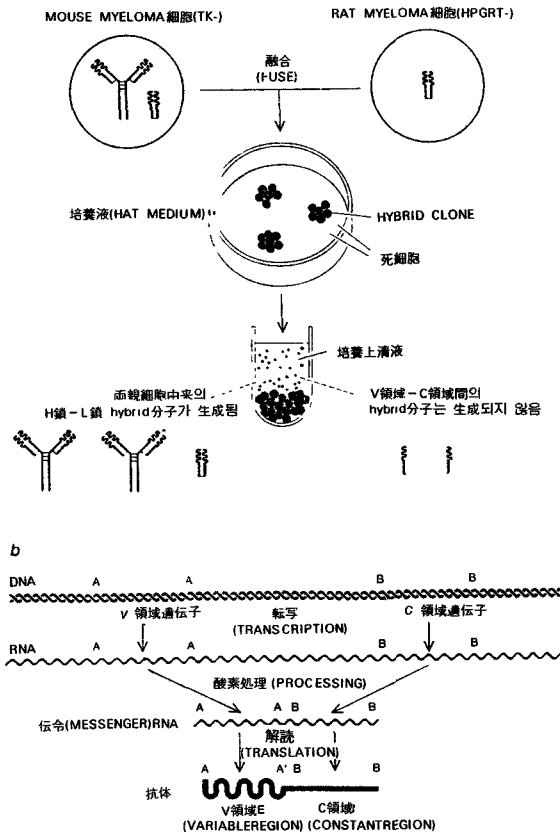


Fig. 3. 最初로 成功한 細胞融合實驗

母細胞는 IgG分子 및 過剩의 L鎖를 分泌하는 mouse myeloma細胞株와 L鎖만을 分泌하는 rat의 myeloma細胞株 였었다. 兩쪽 細胞는 모두 變異株로서 前者는 TK (thymidine kinase), 後者는 HGPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase)라는 DNA合成에 關與하는 酵素가 缺損되어있다. 細胞融合後 兩쪽酵素를 가지고 있지 못하면 生存할 수 없는 HAT培養液中에서 細胞를 培養하면 서로의 缺損을 補充한 hybrid細胞만이 生殘하여 clone을 形成한다. 이 clone은 mouse 由來의 H鎖와 rat由來의 L鎖가 各々로 組合된 雜種分子를 培養上清中에 分泌한다 (a의右下). 그러나 a의 右下와 같은 異種間의 V領域과 C領域의 組合는 찾아볼수 없다. 이 事實은 V領域과 C領域을 code하는 DNA는 한가닥의 RNA 分子로 轉寫되어 이것이 處理를 받은 後 蛋白質로 判讀되는 것을 나타내고 있다 (b). 兩쪽의 어미細胞의 遺傳情報는 모두 hybridoma에 表現되어 있다. DNA에 關한 最近의 知見에 의하면 V領域과 C領域을 code하는 DNA配列間에는 介在配列(intron)이 存在하나 이것은 RNA의 處理段階에서 除去된다.

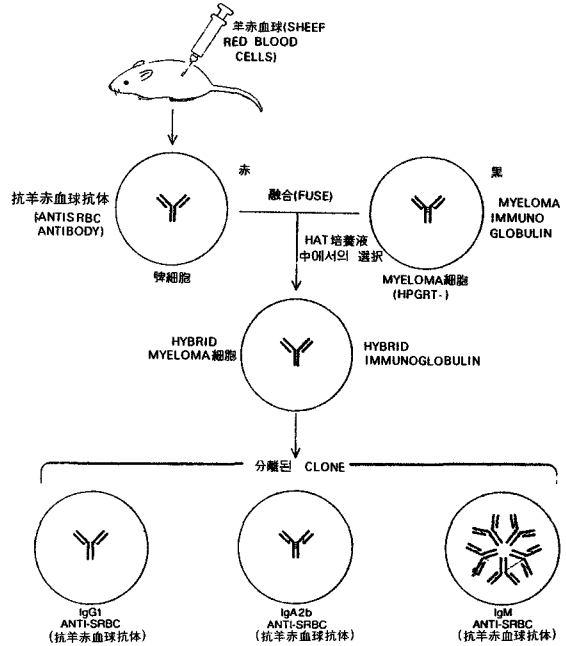


Fig. 4. Hybridoma의 製作와 分泌된 Ig分子의 模式圖

처음 만들어진 hybridoma細胞에서, mouse의 免疫는 羊赤血球(SRBC)로 行해졌다. 免疫된 mouse의 脾細胞(어떤培養系에서도 培養되지 못하고 죽음)와 HGPRT이 缺損된 mouse의 myeloma細胞(HAT培養液으로 培養하면 죽음)와를 融合시켰다. Hybrid細胞는 HAT培養液中에서 生存을 繼續, 兩쪽의 어미細胞由來의 Ig를 分泌하고 있었다. 그중에서 羊赤血球에 대해서 特異性을 갖는 1種類의 抗體만을 產生하고 있는 clone을 分離하였다. 한편 抗體의 class는 IgG<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgM이었다.

그後 이들은 細胞融合이 잘되지않는 어려운 問題에 直面하였으나 Calfré가 合勢하여 融合法에 關한 各々지 改善을 試圖하였으며, 특히 融合媒體로서 polyethylene glycol (PEG)을 使用하므로서 커다란 成果를 얻게되었으며, 使用한 融合媒體가 細胞毒性을 지니고 있다는 것이 밝혀졌다. 細胞融合이 順調롭게 遂行되므로서, 그들은 rat의 主要組織適合性抗原에 대한 一聯의 MCA를 產生하는데 成功하였다 (主要組織適合性抗原이란 自己와 非自己를 識別하는 細胞表面의 marker로서, 이것이 相異하면 移植片의 拒絶反應이 惹起된다) 이 研究는 Howard 및 Butcher (cam-

bridge 農業研究會議 動物生理學研究所)와 더불어 행해진 것으로, 細胞融合의 標準의 方法과 抗體產生을 解析하는 새로운 手段이 確立되므로서 다른 研究室에서도 MCA의 產生이 急速히 進展되게끔 되었다.

이들의 實驗의 成果는 豫想外의 特徵과 意義를 지니게 되었다. Myeloma細胞와 融合된 脾細胞(hybrid-oma의 一種)中에는 抗體를 產生하고있는 形質細胞가 100個에 1個程뿐일 것이었으나 이들이 만든 融合細胞에서는 10個中 1個가 形質細胞由來의 抗體를 產生하고 있었던 것이다. 모든 脾細胞가 같은 確率로 myeloma細胞와 融合하고 clone化된다고 생각할 경우에 比하여 實際로 얻어진 結果에는 10倍의 間隙이 있게되는 것이다. 이것은 明白히 myeloma와의 融合에서부터 clone化로의 過程에서 抗體產生細胞에 選擇性이 作動하였다는 것을 나타내고 있는 것이다. 그 理由는 아직도 充分히 알려져 있지못하나 最近의 知見으로 미루어 두가지 要因을 含有하고있는 것으로 보인다. 즉, 한가지는, 抗體合成은 이루어지고 있으나 分泌는 하고있지않는 淋巴球가 融合細胞를 만들므로서 活性化되어 分泌가 이루어지는 것이 아닌가 推定된다. 이 경우 多分히 分泌機能이 缺如된 淋巴球가 myeloma細胞와 結合하므로서 이 機能을 獲得한 것으로 보인다. 다른 要因으로서, 細胞融合을 行하는 條件下에서는 B細胞以外的 脾細胞가 融合하여 永續적인 clone細胞로 될 可能性은 거의없다는 것이다.

細胞融合(cell fusion)에 관해서는 이미 몇가지 技法이 詳細하게 紹介되고 있다. 融合劑로서는 Sendai virus(Parainfluenza virus-1)와 polyethylene glycol (PEG)이 흔히 使用되고 있으나 myeloma細胞와 脾淋巴球의 融合實驗에는 壓倒의으로 後者를 使用한 例가 많다. 그 理由는 後者쪽이 準備하기 쉽다는 點, 前者를 使用하여도 hybrid細胞의 產生頻도가 體細胞끼리의 融合의 경우 만치 增加하지 않는다는데에 있는 것으로 보인다. PEG는 分子量이 1,000에서 6,000까지의 것이 使用되고 있으나 淋巴球의 實驗에는 PEG 1,000의 것이 흔히 使用된다. PEG의 濃度は 30%~50%程度의 것이 一般的으로 使用되나 濃도와 處理時間이 增加되면 細胞融合하는 頻도가 높아지며 또한 그 毒性도 強해진다. 따라서 trypan blue로 染色되는 細胞數가 急増하지않는 程度로 處理하는 것이 重要하다. 普通 30~40%로 PEG를 無血清培地에 加하고 이것을 融合시키려고하는 細胞混合液의 遠心沈澱物에 少量(0.2ml) 滴下한 다음 約2分間 가볍게 흔들고, 細胞끼리의 接觸을 더욱 稠密하게 하기위해서 低速으로 6~8分間 遠心沈澱한다. 즉시 5~10ml의 無血清培地로 PEG를 稀釋하여 遠心沈澱으로 PEG를 除去한다. 腫瘍細胞와 脾淋巴球의 比率은  $10^7$

:  $5 \times 10^7 \sim 10^8$ 程度가 適當하며, 直徑11cm의 petri 접시 한장에 增殖시킨 腫瘍細胞와 mouse의 脾臟 1個로부터 얻어진 細胞로서 거의 이 程度의 比率이 된다. 이들 細胞를 融合시킨 後에는 30ml의 血清加培地에 浮游시켜 96孔의 microplate 6枚에 1ml pipette으로 1滴(約 $50\mu\text{l}$ )씩 各孔에 滴下하고  $\text{CO}_2$  恒溫器內에서 培養한다. 다음날 HAT培地(hypoxanthine  $10^{-4}\text{M}$  + aminopterin  $4 \times 10^{-7}\text{M}$  + thymine  $1.6 \times 10^{-5}\text{M}$ )를 1滴씩 加하고 1週日後에는 2滴씩 追加한다. 2~3週에 이르러 몇個孔에 細胞의 增殖이 觀觀된다. 細胞融合時 PEG外에 dimethyl-sulfoxide (DMSO)를 加하면 頻도가 增加한다는 報告가 있으며, 이것을 加할 경우는 10~15%의 濃도가 適合할것이다. 培養期間이 길어지면 microplate의 外側에 面한 周邊의 孔은 蒸發이 顯著하여 培地가 alkali性化하기 쉬우므로 hybrid細胞의 增殖도 나쁘게된다. 그러므로 外側周邊의 孔에는 細胞를 넣지말고 培地 또는 滅菌蒸溜水를 넣어두는 것이 바람직하다. 培地에는 一般的으로 Dulbecco의 Modified Eagle medium (普通培地보다 glucose濃도가 4.5g/l 높음) 또는 RPMI-1640培地에 牛胎兒血清(BI<sub>2</sub>S) 또는 馬血清을 10~20% 加하여 使用한다. 그밖에 核酸代謝系補酵素를 含有하는 NCTC-135培地를 10%程度로 加하면 더좋은 結果를 얻을수 있다고 한다. 96孔의 microplate에서 增殖된 colony는 最終의으로 그 上清液中的 抗體有無가 檢査되는 것으로, 반드시 모든것이 抗體陽性이라고는 할수 없다. 正常mouse의 脾臟을 使用하여도 몇個의 hybrid colony를 얻을수도 있고 腫瘍細胞로부터 HAT培地에서 增殖한 revertant가 생길 可能性도 있으므로, 적어도 그 頻度は 實驗前에 알아둘 必要가 있다. 願하는 抗體를 產生하고 있는 colony를 다시 24孔의 microplate에 옮기고 漸次 Petri접시의 크기를 크게하여 간다. 그때 細胞密度를 4倍以上 稀釋하지 않도록 操心할 必要가 있다. Hybrid細胞의 出現頻도가 매우 높았을 경우에는 願하는 colony에 대해서만 再clone化할 必要가 있다. Clone化 때는 96孔의 microplate를 使用하고 目的하는 細胞가 各孔에 1個以下로, 들어가게끔 稀釋하여 加한다음 增殖을 돕기 위해서 4,500R의 放射線으로 照射한 纖維芽細胞를 各孔에  $10^3$ 個씩 加해서 培養하거나 纖維芽細胞로 feeder layer를 만든 Petri접시를 使用하여 soft agar培地속에 colony를만들게하는 方法을 利用하는 것이 좋다. 目的으로하는 hybrid細胞가 充分히 얻어지면 液體要素속에 凍結保存하였다가 必要에 따라 꺼내어 쓰면된다. 抗體를 多量으로 얻고져 할때는 어미株로 使用하였던 腫瘍細胞가 移植될수 있는 動物에 hybrid細胞를 移植하면 10日~2週後에는 腫瘍이 發育하여 血清中에는 數mg

/ml의 濃度로 MCA가 上昇한다고 한다(Fig. 5 ).  
 Mouse나 rat에서는 癌의 移植에 組織適合性抗原이 影響을 미치는 例가 적지않으므로 移植動物로는 同系 또는 F<sub>1</sub>動物을 使用하는 것이 바람직하나, 많은家畜에서는 癌의 移植이 組織適合性抗原의 影響을 받지 않는 例가 많으므로 純系가 아닌것을 너무 念慮할 必要가 없을 것이다.

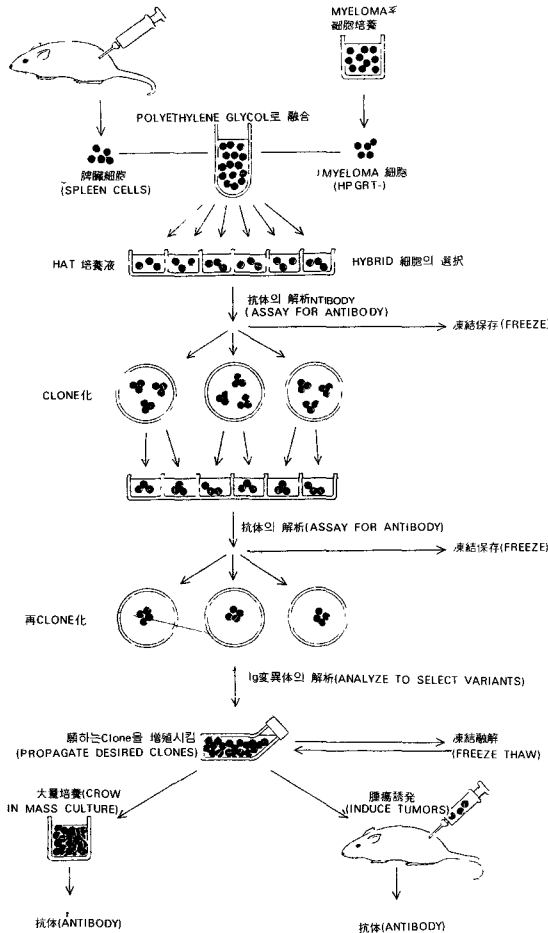


Fig. 5. 單clone性抗體(MCA)의 標準作製方法

免疫된 mouse 또는 rat의 脾細胞와 mouse 또는 rat由來의 myeloma細胞를 polyethylene glycol (PEG)을 使用하여 融合한다. HAT培養液에서 hybrid細胞를 選擇的으로 增殖시켜 培養上清液中の Ig의 有無를 調査한다. 抗體分泌細胞는 cloning하기 前에 그 一部를 凍結保存하고 培地를 옮겨 cloning한다. 增殖한 clone의 抗體產生을 test하고 陽性인 clone도 一部凍結시킨 다음 다시 cloning을 反復한다. 이와같이하여 cloning된 細胞에 대해서 Ig變異體(Fig. 6)의 產生有無를 解析한다.

**Hybridoma (hybrid- myeloma)의 clone化:** 融合細胞가 하나의 clone으로서 確立되면 分泌되는 抗體는 本質的으로 한個의 細胞에 由來된 것이다. 그러나 免疫學的立場에서는 이것만으로 MCA라고 부를수는 없다. 그 理由는 融合되어 만들어진 個個의 雜種細胞 즉 hybridoma가 myeloma細胞와 脾臟細胞(林巴球)의 兩親株에 由來하는 染色體를 가지고 있어서 그 形質을 함께 表現하기 때문이다. 즉 이 細胞는 兩親由來의 相異한 H鎖와 L鎖를 產生하는 能力을 가지고 있으므로서 각각 한種類만의 H, L鎖로 이루어진 MCA의 分泌細胞라고는 말하기 어렵다. Milstein 등은 이와같은 細胞를 HLGK라고 불렀다. 그것은 脾細胞由來의 H鎖와 L鎖 및 myeloma細胞由來의 gamma (G)와 kappa (K)를 分泌하기 때문이었다. 融合細胞는 특히 增殖初期에 急速히 染色體를 喪失하는 性質이 있다. 抗體를 分泌하는 融合細胞에서는 染色體의 脱落이 제멋대로가 아니고 한가지 傾向을 갖고 惹起된다는 것이다. 大部分의 경우 H 또는 G의 H鎖가 最初로 脱落하고 다음 L鎖中 L 또는 K가 喪失된다. 이렇게 하여 HLGK의 細胞는 HLK, GLK의 變異株를 생기게 하며 더욱이 HL, HK, LK, L, K 등의 分泌型細胞를 생기게 한다.

이 중에서 HL型clone이 顯하는 細胞株일때 分泌되는 抗體는 脾細胞由來의 H鎖와 L鎖만으로 이루어져있는 것이다. 勿論 다른 目的으로 다른 變異株, 특히 HK型細胞도 取해들 必要는 있다. 融合細胞를 clone化하는데는 產生되는 抗體에 對應하는 抗原의 特異性을 調査하지 않으면 안되는 것이나 同時에 HL型clone을 選出해내기 위해서 構成하는 H鎖, L鎖의 解析이 必要하다. 그러나 이 clone化過程을 더욱 簡便히 하는 手段이 있다. 脾細胞의 融合相對로서 K型的 L鎖만을 產生하는 myeloma細胞라든가 또는 全然 抗體를 產生하지 않는 變異株를 利用하는 方法 등이 그것이다. 前者의 경우, 생겨나는 融合細胞는 HLK型이며, 後者의 경우에서는 처음부터 單clone性의 HL型 그 自体가 되는 것이다 (Fig. 6).

目的하였던 細胞의 clone化가 成就되면 凍結保存한다. 다시 抗體가 必要할 때에는 凍結시켜둔 細胞를 融解하여 動物에 注射하므로서 融合細胞의 腫瘍을 誘發시켜 그 血清中에서 高濃度의 MCA를 얻을 수 있게 된다. 이 경우 使用하는 動物은 細胞融合에 使用한 어미細胞와 同種이며, 또한 同系統의 것이어야 한다. 血清中の 抗體의 濃度는 보통 10mg/ml 이상이며, 抗體活性으로서 본다면 抗血清의 100萬배에 達하는 수도 있다. 또한 clone化된 融合細胞를 大量으로 培養하여 培養上清液으로부터 抗體를 收集하는 것도 可能하다 (Fig. 5).

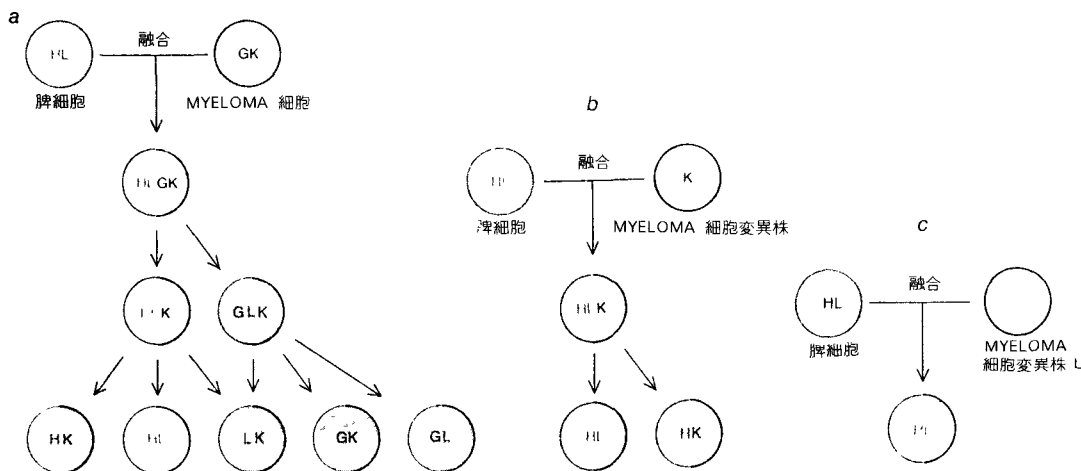


Fig. 6. HL鎖clone의 選別

普通的 細胞融合法으로 作製한 hybridoma는 脾細胞由來의 H鎖와 L鎖를 産生할 뿐만 아니라 myeloma由來의 G鎖와 K鎖도 産生한다(a). 이와같은 細胞를 HLGK로 表示하고 있다. 融合細胞는 染色體를 喪失하기 쉬우므로 培養하고 있는 동안에 몇가지 peptide鎖를 産生치 못하게 된다. 目標로하는 變異株(HL株)를 選出하기 위해서는 培養上清液의 分析을 反復한다. 安定된 HL株가 얻어지면 分離하여 cloning한다. K鎖만을 分泌하는 myeloma細胞(b)나, 全然 Ig를 産生하지 않는 變異株(c)를 어미細胞로 選出하면 目標로 하는 HL clone이 容易하게 얻어진다.

위에서와 같은 方法을 利用하여 Milsten 등은 각가지 物質에 대한 MCA를 만들었다. 그 對象은 極히 작은 抗原인 hapten, 酵素까지 包含하여 蛋白質, 炭水化合物, 細胞의 表面構成物質이나 virus 抗原에까지 이르렀다. 이들의 實驗으로 미루어 거의 모든 抗原의 경우에도 應用될수 있는 것으로 보인다. 動物이 投與한 抗原에 對應해서 抗体를 産生하기만 한다면 hybridoma가 만들어질수 있기 때문이다. hybridoma 作製에 있어서의 難易의 程度는 動物의 免疫反應의 差에 의하는 것으로 생각된다. 反應이 매우 弱한 경우에는 抗原特異的인 clone의 數가 적기때문에 願하는 融合細胞를 얻기가 어렵다. 또한 생겨났다하더라도 數많은 抗原非特異的인 clone 중에서 選出해낸다는 것은 매우 어려운 일이 된다. 그러나 Milstein 등은 多數의 clone들이 産生하는 抗体를 比較的 容易하게 screen해내는 方法을 開發하였다. 同時에 그들은 細胞融合을 行할 때 抗原特異的인 抗体産生細胞가 無數히 存在하는 脾臟을 擇하는 方法도 研究하였다. 이와같은 일은 動物에 抗体産生細胞가 있기만하면 可能할 것이다.

**複合抗原의 解析:** MCA는 매우 훌륭한 化學的 試藥의 한가지로 볼수 있어 必要할 때는 언제나 再生케 할수 있다. 한편 動物을 免疫하여 얻는 普通의 抗血清은 性質이 相異한 抗体가 각가지 比率로 混合되어 있으며, 또한 한번 完全히 使用해 버리면

두번 다시 똑같은 것을 만들수 없다. 이와같은 理由에서 MCA가 여러 基礎 및 臨床研究室에서 普通의 抗血清에 代身하게끔 되어가고 있다. ABO式 血液型의 判定이 그 한가지 例가 될것이다. A, B 兩型의 赤血球型物質에 對한 抗体는 普通 人血清으로부터 얻고 있으나 가장 效果的인 것은 血清의 提供者를 事전에 過免疫시켜 놓는 일이다. 그러나 매우 危險을 隨伴하는 일이므로 英國에서는 施行하지 않는다고 한다. 따라서 얻어지는 抗血清은 아무래도 抗体活性이 낮은 것이 된다. 그뿐만 아니라 供血者의 血清中에 抗A, 抗B 反應을 不明瞭하게 하는 過外의 抗体가 含有되어 있지 않는가를 慎重히 調査할 必要가 있다. 이와같이 구차한 過程을 거치면서도 人血清을 使用하지 않으면 안되는 理由는, 實驗動物을 免疫하여도 有效한 抗体가 얻어지지 못하기 때문이다. 즉 A, B 어느쪽型의 赤血球로 免疫하여도 實驗動物의 血清中에는 人赤血球에 共通의 抗原에 對應하는 抗体가 생겨서 全體의 反應으로서의 型物質에 特異的인 反應이 감추어져 버리게되는 것이다.

Milstein 등은 이 問題를 解決하기 위해서, 個個의 血液型物質에 對應하는 MCA를 만들므로써 이 複雜한 過程을 不要한 것으로 만들어 버렸다. 이 實驗은 Lennox, Sacks 등(英醫學研究會 分子生物學研究室)이 行한 것으로, hybridoma의 培養上清으로부터 A型 赤血球의 型物質에 對應하는 特異的인 抗体를 얻게된 것이다. 이 抗体의 活性을 調査하기 위해서 市

販되고있는 가장 抗体價가 높은 試藥을 對照로하여 反應을 觀察한 結果 거의 같은 程度의 力價가 있다는 것을 알게 되었던 것이다.

이 實驗에서는 多數의 抗原을 含有한 混合物로 免疫하여도 그중의 한가지 抗原에 대한 MCA를 만들 수 있다는 것이 明白해졌다. 이와같은 事實은 또한 可逆的으로 混合物中에서 特異的인 物質을 精製할수 있는 새로운 길을 열었다고 볼수 있다. Milstein 등은 이 可能性을 確信하고 精力的으로 研究를 推進시켰으며 精製對象으로서 interferon(IF)을 選定하였다. 이 物質은 精製하는데도 多量으로 얻는데도 困難하기때문에 有名한 것이다. Secher와 Berke(Warwick 大學)가 이 實驗을 擔當하여, 于先 免疫吸着法으로 IF를 精製하였으나 이 方法으로서는 겨우 1% 程度의 純度를 갖는것 밖에 얻을수 없었다. 그들은 不純物을 多量 含有하고 있는 이 IF를 써서 mouse를 免疫하고 그 脾細胞와 myeloma細胞를 融合시켰다. 融合細胞가 만들어지면 抗 IF 抗体를 分泌하고 있는가의 如否를 調査한바 生物學的測定法이 充分히 信賴할수 있는것이 못되었기때문에 Ig의 分泌有無를 于先 解析하였다. 매우 困難을 겪었지만 그들은 活性이 있는 clone을 選擇하는데 成功하였다. 그리하여 이 clone을 mouse에 注射하여 腫瘍을 만들고 多量의 單clone性의 抗 IF 抗体를 얻게되었다. 다음에 抗体를 炭水化物 bead들에 結合시켜 免疫吸着體의 column을 만들었다. 이 column에 不純物이 多量 含有된 IF를 한번 通過시키면 5,000배나 活性이 높은 것이 精製되었었다. 이렇게하여 工業的水準으로 抗原의 精製가 行해지게끔 된것이다 (Fig. 7).

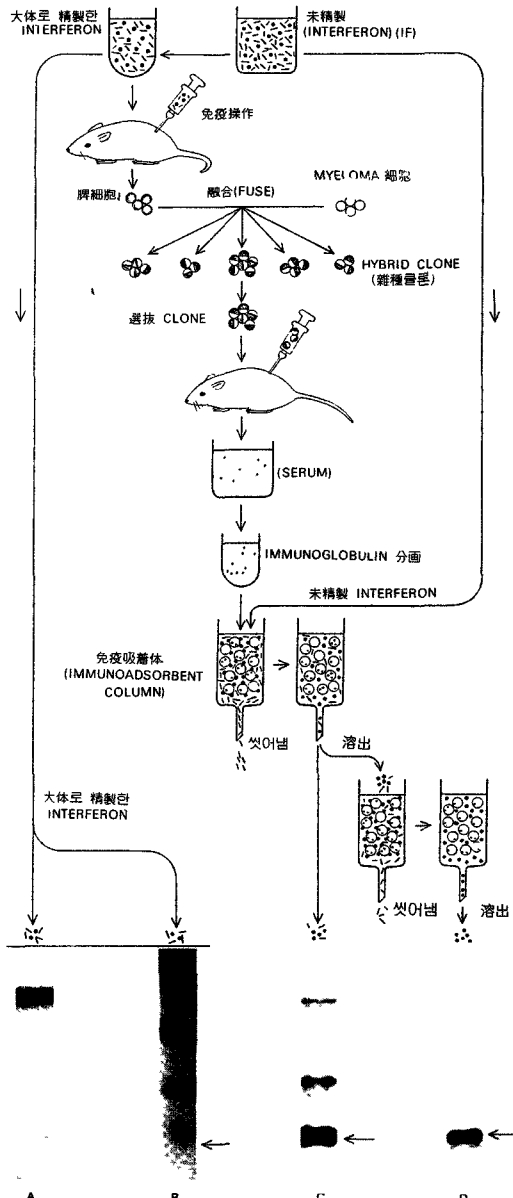


Fig. 7. 單clone性抗interferon抗體의 產生과 interferon (IF)의 精製過程

우선 不純物을 含有한 IF를 免疫吸着法으로 大略 精製하고 IF를 比較的 多量으로 含有하는 抗原을 準備한다. 이것으로 mouse를 免疫하고 그 脾細胞와 myeloma細胞를 融合한다. 融合細胞中에서 IF에 特異的인 抗體를 分泌하는 hybridoma를 cloning하여 mouse에 移植한다. 이 mouse의 血清中에서 抗 IF 抗體를 精製하고 炭水化物 bead들에게 結合시켜 免疫吸着體 column을 만든다. 不純物이 含有된 抗原을 이 column에 通過시키면 IF만이 抗體와 結合하여 다른 不純物로부터 分離된다. 이것을 column으로부터 溶出시켜 純粹한 IF를 얻는다. 1回操作으로 一定量當의 IF 活性은 約5,000倍 增加하고있다. 밑의 寫眞은 各精製段階에서의 電氣泳動 pattern의 autoradiography이다. 大略的으로 精製한 段階의 IF는 한가닥의 band를 나타내고 (A) 있으나 이것은 分明히 albumin의 band인 것이며, 感度를 높여가면 몇가닥의 弱한 band가 出現한다 (B). 확실表示의 位置가 IF의 分子量에 相當한다. Column을 1回通過하여 溶出된 分劃은 이 位置에 強한 band를 나타낸다 (C). 2回通過시키면 IF以外의 band는 全然보이지 않게 된다 (D).

이와같이 混合物中의 個個構成要素에 대해서 MCA를 만들수 있으면 이것을 使用한 免疫吸着體column을 만들어 未知의 混合物를 하나하나의 要素로 分離하고 그 組成을 알수 있게끔하는 것이 可能하다. 즉 우선 分析하고자하는 混合物로 mouse를 免疫하고 hybridoma를 만든다. 그리하여 個個의 clone이 產生하는 抗原特異的抗體로 混合物中에서 對應하는 要素를 段階的으로 採取해가면서 그 組成을 밝히는 것이다 (Fig. 8, 9).



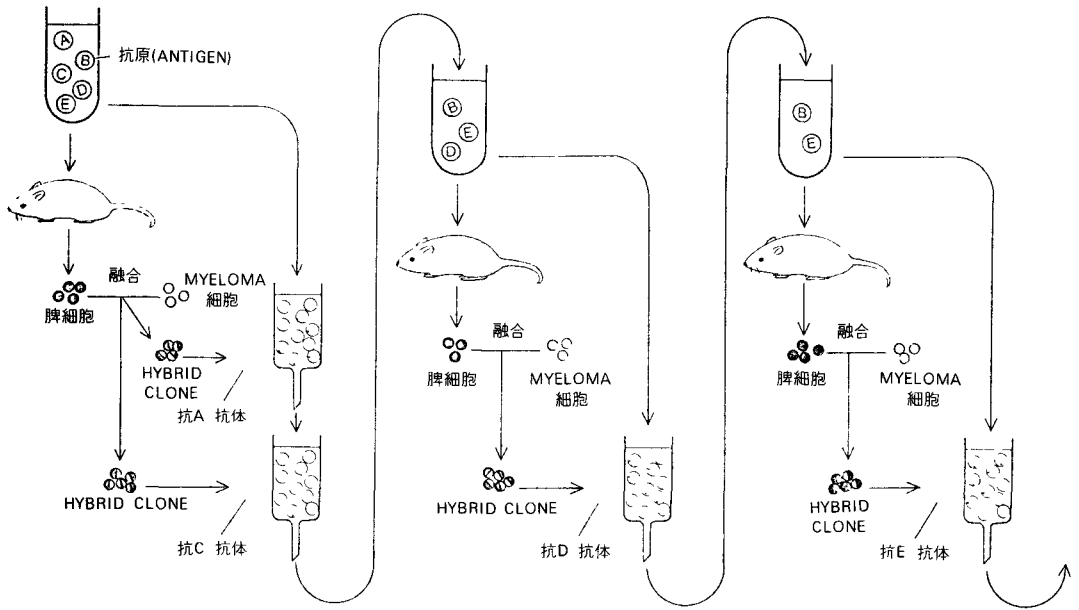


Fig. 8. 未知成分(混合物)의 分析

그 構成成分이 알려져 있지 않은 混合物을 分析할때에도 MCA는 有用하다. 混合物로 免疫한 動物의 脾細胞를 使用하여 hybridoma를 作製하고 復數의 MCA를 얻는다. 各各의 抗體로 免疫吸着column을 만들어 混合物을 通過시켜가면 對應하는 抗原단이 次次除去된다. 殘留한 抗原으로 再次動物을 免疫하고 같은 操作을 段階的으로 反復하므로써 모든 組成을 解析한다. 이와같이 hybridoma는 抗原을 分離精製하는데 有用할 뿐만 아니라 混合物의 組成을 調査할때에도 有用한 道具가 된다.

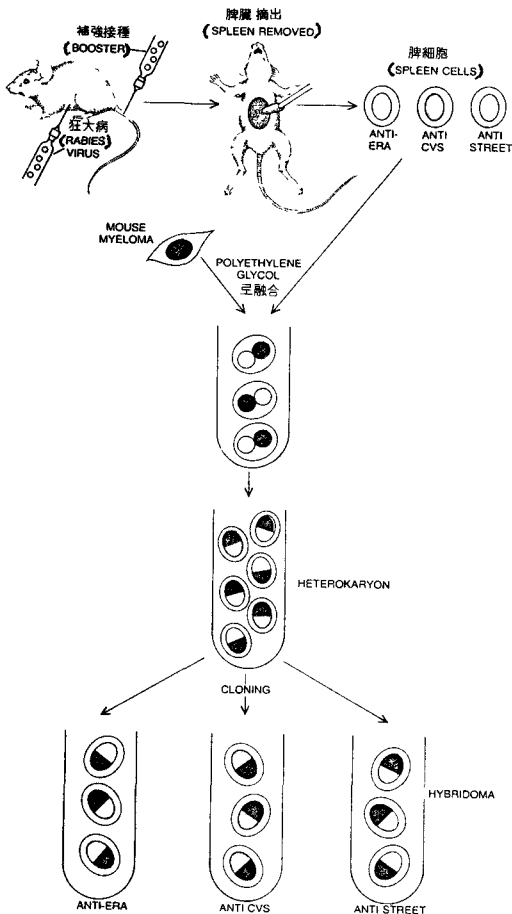


Fig. 9. 單clon性抗體(MCA)에 의한 Virus Strain別識別

MCA法은 어느 한 virus의 한가지 strain(株)을 다른 strain으로부터 識別하는데 있어 高度의 特異性을 지닌다. 狂犬病의 경우 狂犬病 virus 또는 glycoprotein이나 nucleocapsid 와 같은 virus分離 成分으로 mouse를 免疫한다. 그와 같은 抗原의 第1回注射은 腹腔內로, 3~4週後의 補強接種(booster shot)은 靜脈內로 注射한다. 3~4日後脾臟을 採取하여 調製한 mouse 淋巴球浮游液과 培養한 HGRF酵素缺損 mouse myeloma細胞를 PEG의 存在下에서 融合시킨다. 融合된 細胞 즉 heterokaryon을 myeloma細胞發育阻止 培養液에 넣어 培養한다. Mouse 淋巴球亦是 培養液에서 永久株(株化細胞系)로 發育되지 못하므로 培養上에 나타난 集落은 淋巴球와 myeloma細胞의 形質이 結合된 hybrid細胞만므로 이루어지게 된다. 이들 hybridoma는 一個의 hybrid細胞에서 由來된 娘細胞培養의 產生을 위해서 clone化된다. 이들 clone에 대해서 "ERA", "CVS" 및 "street"와 같은 狂犬病(rabies) virus strain에 對應하는 特異抗體의 存在를 檢査한다. 이들 特殊한 狂犬病 virus抗體를 만드는 각 hybridoma는 培養으로 維持될 수 있다.

**單 clone性抗体 (MCA) 의 檢出** : hybridoma 로 부터 培地中에 分泌되는 抗体濃度는 겨우 數 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이므로 이것을 檢出하는때는 相當히 敏感한 免疫反應이 要求된다. 一般의으로 抗原이, 不溶性인 細胞表面 抗原이나 細菌抗原에서는 그대로 細菌이나 菌體가 使用되나 蛋白抗原과 같은 경우에는 sepharose 또는 赤血球에 抗原을 結合시킨것이 使用된다. 이들 抗原의 一定量에 培養上清液을 加하고 抗原에 特異的으로 結合한 mouse Ig를  $^{125}\text{I}$ -抗mouse Fab 또는  $^{125}\text{I}$ -葡萄球菌protein A로 檢出하는 것이다.  $^{125}\text{I}$ 代身 適當한 酵素로 標識한것도 可하다. Protein A는 中性이므로 mouse의 IgG<sub>1</sub>을 除外한 IgG subclass 全部와 反應하나 IgM과 IgA와는 反應하지 않는다. (但, pH 8.5로 하면 IgG<sub>1</sub> 과도 反應함). Soft agar를 使用하여 hybridoma의 集落을 만들게 하였을 경우에는 어느 集落이 願하는 抗体를 產生하고 있는가를 判定할 必要가 있다. 이것에는 抗原을 赤血球에 結合시켜 이것을 agar에 塗布하고 soft agar上에 重層하고 補體를 加하였을때 溶血斑을 만드는 集落을 잡아내거나 (Fig. 2), 抗原을 結合시킨 nitrocellulose 紙를 soft agar上에 數時間 密着시켜 集落으로 分泌되는 抗体를 吸着시켜, 그 抗体를 抗原과 結合시킨 赤血球로 染色하거나  $^{125}\text{I}$ -抗mouse Fab와 反應시켜 autoradiography로 檢出하는 方法이 簡便하다.

Hybridoma clone으로부터 產生된 抗体가 單一 clone 인가의 如否를 判定하는때는 一般的으로 poly-acrylamid 電氣泳動 (SDS-PAGE) 및 等電點分劃 電氣泳動 (IEF) 法이 利用된다. 分離된 hybridoma에 5~10  $\mu\text{Ci}$ 의  $^{14}\text{C}$ -amino 酸 또는  $^{35}\text{S}$ -methionine 을 培地에 加하여 24時間 取入시킨다음 2~3日後 上清液에 分泌되는 蛋白質을 電氣泳動後 autoradiography로 分析하면 된다 (Fig. 7).

이와같이 標識된 抗体를 2-mercaptoethanol 로 還元시켜 SDS-PAGE로 分析하면 抗体의 L鎖 및 H鎖의 異質性을 檢出할수 있다. 免疫血清에서 얻어지는 特異抗体를 對照로 하여 標識된 抗体를 IEF로 分析하면 對照로 使用한 抗体가 等電點 pH 8.5~6.0에 이르는 廣範圍의 無數한 band를 나타내는데 反하여 MCA는 極히 좁은 範圍로 數個의 band를 나타낼뿐이므로 容易하게 MCA임을 確認할수 있다.

酵素 또는  $^{125}\text{I}$ 로 標識된 可溶性抗原이 利用될때는 抗体를 IEF에 걸은後 이 gel을 抗原液에 浸漬시켜서 特異抗体의 band를 染色할수 있다. 이 경우 免疫血清을 그대로 對照로 使用할수 있다. 다음 hybridoma가 만드는 抗体의 subclass를 分析할 必要가 있으나 이것에는 protein A에 대한 親和性이 利用되거나 市販의 mouse Ig의 各 subclass에 대한 特異抗血清을

利用하여 2次抗體로 免疫沈降시켜 SDS-PAGE와 結合시켜 解析하는 것이 一般的이다.

**膜抗原 (MA) 과 單 clone性抗體 (MCA)** : MCA가 가장 힘을 發揮하는 것은 細胞膜生物學分野이다. 細胞膜의 蛋白質은 精製하는 것이 困難하며 量的으로 적기때문에 그生物學的活性的 檢定이 어려운 경우가 많다. 가령 活性이 있다하더라도 膜을 可溶化하면 損傷되어버린다. 이와같은 問題點을 克服하는데 免疫學的手段을 適用하여 細胞表面分子 (cell surface molecule)를 解析하는 方法이 있다. 이것은 組織의 各分化段階에서 特定の 細胞表面에 表現되는 抗原을 同一性證明하는데 매우 훌륭한 것이다. 그러나 細胞로 動物을 免疫하여 얻을수 있는 普通의 抗血清은 各가지 抗體의 混合物로서 單一分子를 認識하는 抗體가 아니다. 이런 意味에서 더욱 純粹한 抗體를 만드는 方法이 追求되어 왔던 것이다.

1977年 Galfre 등은 細胞膜의 分化에 의해서 생기는 抗原을 解析하는데 있어 hybridoma術法이 얼마나 有用한가를 보여주었다. 우선 rat의 胸腺細胞의 細胞膜으로 mouse를 免疫하였다. 그리고 胸腺淋巴球에 對應하는 抗體를 產生하고있는 融合細胞를 만든後 抗原特異性이 相異한 clone을 分離하는데 成功한 것이다. 이 한번의 試圖로서 그들은 3가지의 새로운 抗原을 同一性證明할수 있게 되었다. 이 試圖는 普通의 抗體를 使用한, 所謂推定을 根據로 하는 일이 많은 免疫學에서는 數年을 要하는 成果였던 것이다. 이 렇게하여 rat의 細胞膜分化抗原에 對應하는 몇가지 MCA가 만들어지므로서 mouse나 사람의 細胞에 대해서도 같은 試圖가 行해지게끔 되었다.

細胞膜 (cell membrane)의 抗原構造가 明白해지면 그 細胞가 어떤 細胞系에 屬하는 가를 알수 있으며 細胞集團의 subset (亞分劃)가 確實해 진다 (Fig.10). 즉 B淋巴球는 細胞表面에 Ig를 지니고 있는 것으로서 T細胞와 區別될수 있다. 또한 T細胞는 抗體產生보다도 細胞性免疫反應에서 重要的 役割을 演出하고 있으나 그 細胞膜表面에는 Thy-1 抗原과 같은 特徵 있는 maker를 지니고있는 것으로서 識別된다. 그러나 單一의 細胞subset에만 表現되는 surface marker는 것이 存在하지 않는다. B細胞에 特徵的인 Ig라 할지라도 B細胞系列에 包含되는 機能이 相異한 subset群에 共通的으로 表現되어 있다. 그것은 所謂 免疫記憶細胞나 實際로 抗體를 分泌하고있는 形質細胞 (plasma cell) 등에서, 前者는 抗原刺戟을 過去에 받은적이 있기 때문에 같은 抗原으로 재차 면역되면 抗体產生細胞는 分化될수 있는 B細胞subset인 것이다. 이와 같이 特定の 分化段階에 있는 細胞를 特徵지우고 있는 것은 複數의 膜抗原의 組合, 혹은 그 量的인 差

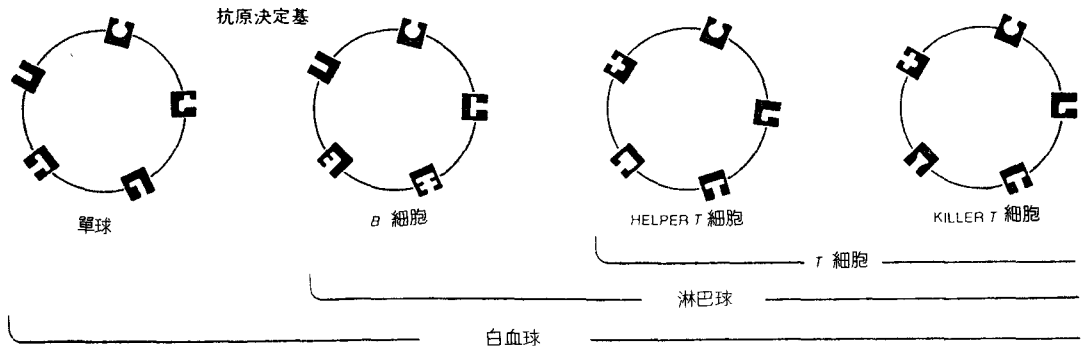


Fig.10. 分化抗原의 解析

分化抗原 (differentiation antigen)은 細胞表面에 있는 抗原決定基로서, 어느 細胞系列에 特異的인 것과 한가지 '細胞 subset에 共通으로 表現되는 것이 있다. 이것은 4가지 type의 白血球에 存在할 分化抗原을 模式的으로 假定해본 것이다. 어떤 細胞가 어떤 細胞系列 또는 細胞subset에 屬하는가를 同一性證明하는 가장 훌륭한 方法은 細胞表面에 表現되는 抗原의 pattern을 解析하는 것이다. 이와같은 意味에서 MCA는 理想的인 手段이 될 수 있다.

인 것이다. 따라서 個個集團에 特徵的인 抗原構造를 明白히 하기 위해서는 多數의 MCA가 必要한 것으로, 매우 時間이 걸리는 일이 된다. Cytofluorometer 나 螢光自働細胞分析分離裝置 (fluorescence-activated cell sorter; FACS)를 使用하여 只今까지 確立된 MCA에 의한 細胞膜抗原의 廣範한 解析이 始作되고 있다. FACS란 細胞의 크기와 螢光的 強度를 同時에 알 수 있는 裝置로서 螢光色素로 標識한 MCA로 細胞를 染色하므로써 短時間에 多數의 MA의 解析이 可能하다. 또한 FACS는 細胞集團을 그 크기와 螢光的 밝기에 따라 分離하는 能力도 지니고 있기 때문에 個個 subset를 꺼내어 그 機能을 調査하는 일도 可能하다. 只今까지 各가지 造血細胞 및 淋巴球에 關해서 훌륭한 結果가 報告되어 있으며 어떤 것은 直接臨床分野에 應用되어 白血病이나 그것에 關聯되는 病態의 鑑別診斷에 有用하게 利用될 수 있다는 것을 보여주고 있다. 어떤 細胞subset에 대한 MCA의 反應程度는 그 細胞의 分解段階에 對應하고 있는 수가 많으나, 그렇지 않은 경우도 있다. 어떤 MCA는 rat의 未分化한 骨髓細胞에 特徵的인 MA를 認識하나, 한쪽에서는 未梢淋巴組織의 細胞와도 反應한다. 普通, 이 抗體에 의해서 同一性證明이 되는 未梢淋巴球의 MA는 T細胞에 있는 것으로 B細胞에서는 確認되지 못하나 B細胞가 分化하여 形質細胞가 되면 이것에도 表現되 게끔 된다. Milstein 등은 이와같은 抗原決定基를 跳躍하는 抗原決定基(jumping antigenic determinant)라고 불렀다. MCA로 分化抗原을 解析하면 그 抗原이 細胞의 어느 分化段階에 表現되는 것인가 또는 어떤 系列의 細胞에 特徵的인가가 明白해진다. 前述한 段階的인 抗原精製方法은 細胞表面에 있는 複雜한 抗

原系의 解析뿐만 아니라 細胞小器官이나 藥理學的으로 活性이 있는 細胞抽出物과같은 다른 生物材料의 構成要素에 대해서 構造나 機能을 分析하는 데에도 有用한 手段을 提供하는 것이다.

#### 單 clone性抗體 (MCA)의 抗原-抗體反應 :

Hybridoma가 分泌하는 MCA는 現象으로서 이미 잘 알려져 있는 抗原-抗體反應의 機序解明에도 새로운 빛을 던져주고 있다. 이것도 또한 單一の 特異性이라는 特質에 根據하고 있다. 例컨대, 抗原과 不均一한 抗體와의 結合은 in vitro에서는 沈降反應으로서 觀察되나 그 抗體가 MCA일 경우에는 一般的으로 이 反應은 보이지 않는다. 40年前 「抗原과 抗體가 結合하여 생기는 沈降物質은 兩者가 3次元的인 格子(lattice)構造를 形成하므로써 만들어 진다」는 假說이 세워졌었으나 MCA의 出現에 의해서 처음으로 이 假說이 確實한 形態로서 證明되었다고 생각되는 것이다. MCA는 하나의 抗原決定基하고만 結合하는 抗體인 것이다. 그러므로 多様な 抗原決定基를 지닌 物質과 MCA의 結合에서는 뒤이어 繼續 손과 손을 잡아 格子構造를 만드는 것과 같은 反應은 일어나지 않는다. 다만 抗原이 同一의 構成要素의 反復으로 이루어져 있는 重合體(polymer)의 경우에만 이 抗體로 沈降反應이 일어나는 것이다.

이것과는 反對로 只今까지 豫想하지 못하였던 現象이 出現하여 抗原-抗體反應에 關한 새로운 說明이 必要하게 된 例도 있다. 例컨대, 補體(complement)에 의한 細胞膜의 破壞에 있어서는 同一抗原上의 이웃結合部位에 다른 抗體가 結合하는 것이 重要한 意味를 갖는다는 事實이다. 이 共同效果(synergistic

effect)는, Milstein등이 主要組織適合性抗原에 대한 rat의 抗體를 單離하는 過程에서 發見되었다. Hybridoma가 抗體를 產生하고 있는가 어떤가를 調査하기 위해서 그 培養上清을 使用한 補體依存性的 細胞障害 test를 行했더니 clone化되고 있지않은 細胞의 培養上清에서는, 반드시 標的細胞가 되는데에는 一旦 個細胞로 clone化되면 그 性質을 喪失한 것이 된다. 이때 Howard는 test判定이 陰性으로 나타난 培養上清을 2가지以上 混合하여 檢討하였다. 結果적으로 混合物는 細胞障害성을 나타낸 것이다. 以後에 共同的으로 作動하는 成分을 決定짓는 것은 容易하였던 것이다.

共同效果的의 解明에 따라 一見 아무런 活性을 나타내지 않는 것으로 보이는 單離成分을 特殊한 方法으로 利用할 수 있게끔 되었다. 이것은 細胞를 어떤 MCA에 露出시킨後 다른 各가지 clone의 抗體에 다시 露出시키는 것이다. 이것에 의해서 어느 抗體가 共同的으로 作動하는가가 明白해졌다. 이 實驗은 MCA의 경우에는 相互混合하여 使用하지 않으면 期持하는 效果를 얻지 못하는 경우가 있다는 것을 나타내고 있다. 이 事實은 普通的 抗體에서는 含有된 抗體의 比率를 自由로 變更改할 수 없는 것에 反하여 MCA에서는 이것이 可能하다는 말도 된다. 그것이 MCA의 利點이 될 수 있는가의 如否는 各々の 경우에 따라 判斷할 問題라고 본다.

**單clone性抗體(MCA)의 應用:** 研究面에서 MCA를 만드는 意義는 抗原을 더욱 깊이 解析하는데에 있다. 細胞表面에 表現되는 抗原의 解析에 있어서는 腫瘍抗原을 包含하여 分子의 水準에서 理解되어 있는 것이 적다. 組織適合性抗原이나 腫瘍抗原에 대해서 오래前부터 使用되어온 免疫血清은 抗體價가 充分히 높지 못하여 抗體를 利用한 affinity chromatography로 抗原을 精製하는데 使用하기는 어렵다. 그러나 MCA는 高力價이며 또한 單一의 抗原分子에 대한 抗體이므로 이 目的에는 매우 有効한 것이다. 이미 사람의 HLA抗原等の 精製에 있어서는 좋은 結果가 얻어지고 있다고 한다. 한편 從來의 免疫血清을 使用한 研究에서는 抗原성이 比較的 적은 細胞表面成分의 研究에서는 아무래도 소홀히 되기 쉬우나 MCA 技法을 이용하면 이들 成分에 대한 獨立的인 抗體를 容易하게 얻을 수 있을 것이다. 따라서 이와같은 抗體를 利用하여 相異한 細胞間의 差가 더욱 細密히 分析될 수 있다. 例컨대, 淋巴球에 대한 몇가지 MCA를 作製하면 그 各々の 相異한 淋巴球의 亞集團(subpopulation)과 反應할 可能性이 있으며 淋巴球亞集團의 研究가 더욱 活發해질 것이다. 어떤 抗原分子의 細胞表面에 있어서의 遺傳的 發見機構도 MCA

를 利用하여 解析할 수 있으며, 目的으로 하는 抗原을 發見하고 있는 細胞와 抗原이 없는 異種의 細胞를 融合시켜 雜種細胞(hybrid cell)에 어버이의 어느 染色體가 缺損되었을 때 抗原의 發見이 喪失 되는가를 알게 되면 抗原發見에 關與하는 遺傳子의 染色體上의 存在位置가 確認될 것이다. 同種抗原의 遺傳的 法則의 解明에 있어서도 이 技法이 應用되었다는 報告가 있다.

또한 radioimmunoassay를 利用한 測定用kit등 實用的인 方面에 있어서도 MCA가 日常의 抗血清과 代置되어가고 있으며, 外國에서는 많은 企業들이 이것을 取扱하게끔 되었다. 只今까지 抗體를 使用한 診斷用kit는 一般化하기에는 너무나 特殊한 것이었으나, MCA의 大量生産이 可能해진다면 診斷用kit에도 널리 利用되게 될 것이다. 이미 만들어진 例로는 Cuello와 Milstein이 最近 作製한 "substance P"라는 神經傳達物質에 대한 MCA도 그 한가지일 것이다.

數많은 微生物의 分類에 있어서는 現在까지 많은 型特異抗血清外에 반드시 標準이 되는 型的 細菌 또는 virus株를 準備하여두고 恒常 使用하는 抗血清의 交叉反應을 檢討하면서 慎重히 行하는 것이 常例였으나 모든 型에 대해서 特異的인 MCA가 만들어진다면 어느곳의 研究室에 있어서도 서로 細胞(hybridoma)를 分讓하는 것 만으로도 같은 抗體가 使用될 수 있을 것이며, 診斷은 더욱 正確하고 容易하게 遂行될 수 있을 것이다. 萬若 influenza virus의 各型에 대해서 特異的인 血球凝集性蛋白質分子(HA)에 대한 MCA가 各々 作製된다면, 그것을 準備하는 것 만으로 分離된 influenza virus의 HA型을 同一性 證明하게 될 날도 멀지 않을 것이다.

感染病의 治療에 있어서의 MCA의 應用에 관해서도 現在 外國에서는 綿密히 檢討되고 있다고 한다. 事實 MCA를 治療目的으로 使用하는 것은 臨床醫들이 꿈꾸는 最大의 關心事일 것이다. 受動免疫의 으로 MCA를 利用하는 것이 더욱 確實한 方法일 것이다. 즉 抗體(抗血清) 그 自體를 患者(畜)에게 注射하는 方法이다. 抗原의 導入으로 患者(畜)自身이 抗體產生을 刺戟하는 能動免疫과는 달리 남이 만든 抗體를 移入받는 것이다. 不純物을 含有한 抗體를 投與하는 것은 危險을 隨伴하나 精製한 抗體를 使用하면 治療는 더욱 效果의 으로 遂行될 것이다. 惡性腫瘍 즉 癌의 治療에 있어서는 2가지 利用法이 推定된다. 그 한가지는 抗癌劑에, 目的하는 組織과 特異的으로 結合하는 能力을 附與하는 方法이다. 特定臟器의 組織抗原이나 腫瘍特異抗原에 대한 MCA를 만들 수 있다면 이것을 抗癌劑에 結合시켜 投與하므로써 藥劑의 效果를 顯著히 높일 수 있을 것이다. 또다른 方法으

로서는, 腫瘍細胞를 認識하고 이것을 攻擊하는 抗腫瘍抗體를 作製하고저하는 試圖도 있음직 하다.

사람에서의 治療의應用을 考慮할때는 사람의 淋巴球由來抗體쪽이 mouse나 rat의 것보다도 理想的인 것이다. 따라서 사람의 淋巴球와 mouse나 rat의 myeloma細胞를 融合시켜 永續인 抗體產生clone을 만드는 것이 試圖되고 있으나 아직은 順調롭게 進行되는 것으로 보이지않는다. 사람의 染色體가 選擇의으로 迅速히 喪失되어버리기 때문이다. 今後 培養可能한 사람의 myeloma株를 確立하고 같은 種 안에서의 細胞融合이 可能하게되지 않는限 매우 어려울것으로 짐작된다. 事實 目的하는 抗原을 認識한 사람의 MCA를 얻는 일은 매우 困難하다고 한다. Epstein-Barr virus (EBV)로 癌化轉形(transformation)된 사람의 杉巴球를 mouse의 myeloma細胞株에 融合시켜 사람의 Ig를 產生시키는데 成功하였으나 그 Ig에 目的하는 抗原을 認識한 V領域의 peptide를 鑲어넣는 遺傳子를 導入시키기 위해서는 Ig의 遺傳機構가 더욱 理解되지 않으면 안될것이다. 實驗水準에서는 rat에서 이와같은 試圖가 成功하고 있다. 어떤 移植抗原으로 同種免疫된 rat의 脾淋巴球를 mouse의 myeloma細胞(PB31×63-Ag 8)와 融合하고 만들어진 hybridoma의 培養上清液으로부터 目的하는 移植抗原을 認識한 MCA를 80 $\mu$ g/ml의 濃度로 叩집어 낼수 있었다는 것이다. 이 抗體分子는 rat의 Ig의 抗原성을 갖으며, 같은 移植抗原을 갖는 細胞나 腎臟을 異系의 rat에 移植하였을때 同時에 投與하면 in vivo에서 遮斷抗體(blocking antibody)로서 作動하므로서 長期間 排除되는 일도 없이 移植細胞에 대한 宿主의 液性免疫및 細胞性免疫의 兩反應을 抑制하였다고 報告하고 있다. MCA가 virus學, 細菌學, 寄生蟲學등에 던진 衝擊이 크기는 하지만 아직도 그 첫길에 들어선데 不過하다고 느껴진다. 臟器移植에의 應用面에 있어서도 組織適合의 判定에 關하여 世界的規模의 規準을 作成할 수 있을것이라는 近期持가 걸려있다고 보겠다. 또한 基礎的研究에 있어 이 抗體가 利用될 可能性은 더욱 넓다. 藥理學分野나 hormone, 神經傳達物質의 受容體의 研究에 있어서는 이미 이 抗體를 利用하여 얻은 훌륭한 結果가 報告되고 있다.

特別한 操作으로 動物(家畜)의 腫瘍細胞株를 適當한 藥劑에 대해서 耐性으로 되게끔 할수 있으면 mouse나 rat와 같은 系統과 마찬가지로 同種同系の 動物을 미리 抗原으로 免疫한 다음 그 脾淋巴球와 細胞融合을 시킬수 있다. Myeloma이면 무엇이던지 細胞融合에 의해서 脾淋巴球의 抗體產生遺傳子를 잘 發現한다고 볼수는 없다. Rat의 例에서 다른 myeloma細胞와 融合시켰을때의 極히 高率로 hybrid抗體(MC

A)를 產生하는 細胞를 만든株라 할지라고 脾淋巴球와 融合하였을때는 目的하는 抗體를 產生하는 hybrid細胞를 全然 얻지못했던 例도 있다. 이와같은 경우에는 더욱 clone化하여 加一層 適合한 clone을 選抜해 내야 한다는 것이다.

Kohler와 Milstein이 처음에는 Ig의 合成과 表現에 關한 遺傳的制禦問題를 더욱 잘 理解하기 위해서 hybridoma의 作製法을 開發하였던 것이지만 現在는 이 方法이 各가지 分野에서 印象的인 展開를 보이고 있는 것이다. 事實 基礎免疫學에의 hybridoma抗體 즉 MCA의 應用은 앞으로 더욱 深化될것이다. 基礎的研究과 應用分野의 境界는 어느 경우에도 明白하지 못한 것으로서, hybridoma에서 MCA를 얻는 것은 基礎에서 應用으로 넘어가는 過程을 그대로 나타낸 것이다.

結言: 最近 널리 이야기되고 있는 遺傳工學이나 細胞工學이라는 새로운 名稱으로 불리워지는 學問分野가 마침내 免疫學의 領域에까지도 侵透되어 왔다는 感이 크다. 흔히 遺傳工學(genetic engineering)이라고 稱하는 遺傳子操作(gene manipulation)에 의한 再結合DNA術法(recombinant DNA technique)과 더불어 細胞工學의 方法이라 볼수 있는 細胞融合에 의해서 생기는 雜種融合細胞腫 즉 hybridoma를 作製하여 單clone性抗體(monoclonal antibody; MCA)을 產生시키는 이 새로운 技術들은 今後 우리 獸醫學의 여러 分野에서도 研究되어 感染病의 診斷 및 治療등에 널리 應用되어야 한다. 그중에서 무엇보다도 期待되는 것은, 여러 種類의 많은 動物에의 MCA를 만들어 낼수 있는 技術이 確立되는 일이다. MCA에 의해서 많은 動物疾病이 免疫學的으로 解明되기 쉬워질 것이며 다른 學問分野에의 貢獻도 클것이다.

液性免疫을 擔當하는 B淋巴球끼리의 細胞融合뿐만 아니라 細胞性免疫機能을 갖는 hybridoma도 T淋巴球끼리의 細胞融合으로 만들어낼수 있을 것이다. 많은 家畜에서 T細胞由來의 淋巴性白血病의 發生이 報告되고 있으며, 닭에서는 이미 培養細胞株가 利用될 수 있게 되었다. 이 T細胞由來의 hybridoma가 各家畜의 것에서 作製될수 있게되면 細胞性免疫機構의 解明에 貢獻할뿐만 아니라, 家畜의 感染病이나 腫瘍性疾病(癌)에 대한 治療法으로서도 새로운 길이될 것이다.

#### 〔參 考 文 獻〕

1. Andersson, J, & Melchers, F. : Curr. Topics in Microbiol. & Immunol. Vol. 81, "Lymphocyte Hybridomas". pp. 1-246, 1978, Springer Verlag, Berlin.

2. Braun, D. G., Quintans, J., Luzzati, A. L., Lefkovits, I. & Read, S. E. : *J. Exp. Med.* 143 : 360-371, 1976.
3. Burnet, F. M. : *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity.* Camb. Univ. Press, London, 1959.
4. Buttin, G., LeGuern, C., Phalente, L., Lin, E. C. C., Medrano, L. & Cazenave, P. A. : *Curr. Topics in Microbiol. & Immunol.* Vol. 81, "Lymphocyte Hybridomas". pp. 1-246, Springer Verlag, Berlin, 1978.
5. Buttin, G., Medrano, L., Legrain, P., Leguern, C. & Cazenave, P. A. : Kaplan, G. ed., *The Mole. Basis of Immune Cell Funct.* : 331-342, 1979, Elsevier/North-Holland Biomed. Press, Amsterdam.
6. Eckels, D. & Gershwin, M. E. : In "Leukocyte Activation". 12th Int. Leuk. Cult. Conf., Quastel, M. ed., Academic Press, N. Y. 1977
7. Eckels, D. & Gershwin, M. E. : Kaplan, G. ed., *The Mole. Basis of Immune Cell Funct.* : 343-390, Elsevier/North-Holland Biomed. Press, Amsterdam, 1979.
8. Frensky, W., Hammerling, U., Hardy, W. D. Jr. & Vedbrate, S. S. : *Adv. in Comp. Leuk. Res.* 1979, Yohn, Lapin, & Blakeslee, eds, pp. 287-288, 1980.
9. Galfre, G., Milstein, C. & Wright, B. : *Nature* 272 : 131-133, 1979.
10. Gershwin, M. E. : Kaplan, G. ed., *The Mole. Basis of Immune Cell Funct.* : 742-743, 1979. Elsevier/Holland Biomed. Press, Amsterdam.
11. Herzenberg, L. A. & Ledbetter, J. A. : Kaplan, G. ed., *The Mole. Basis of Immune Cell Funct.* : 315-320, 1979. Elsevier/North-Holland Biomed. Press Amsterdam.
12. Jerne, N. K. & Nordin, A. A. : *Science* 140 : 405, 1963.
13. Kennett, R. H. : Cell fusion, in "Methods in Enzymology". 58 : 152-163, 1979.
14. Kennett, R. H., Mckearn, T. J. & Bechtol, K. B. eds., *Monoclonal Antibodies. Hybridomas : A New Dimension in Biological Analysis.* Plenum Pub. Co., N. Y. 1980.
15. Köhler, G. & Milstein, C. : *Nature* 256 : 495-497, 1975.
16. Köhler, G. & Milstein, C. : *Eur. J. Immunol.* 6 : 511, 1976.
17. Köhler, G. & Shulman, M. J. : *Curr. Topics in Microbiol. & Immunol.* Vol. 81, "Lymphocyte Hybridomas". pp. 1-246, 1979. Springer Verlag, Berlin.
18. Köhler, G., Pearson, T. & Milstein, C. : *Somatic Cell Genet.* 3 : 303-312, 1977.
19. Köhler, G., Hengartner, H. & Shulman, M. : *Eur. J. Immunol.* 8 : 82-88, 1978.
20. Maizel, J. V. : In "Methods in Virology" 5 : 179-246, 1971.
21. Mckearn, T. J., Sarmiento, M., Weiss, A., Stuart, F. P. & Pitch, F. W. : *Curr. Topics in Microbiol. & Immunol.* 81 : 61-65, 1978.
22. Melchers, F., Potter, M. & Warner, N. : *Curr. Topics in Microbiol. & Immunol.* Vol. 81, "Lymphocyte Hybridomas". pp. 1-246, 1978. Springer Verlag, Berlin.
23. Milstein, C. : *Monoclonal Antibodies. Sci. Am. (Oct.)* : 56-64, 1980.
24. Milstein, C., Galfre, G., Secher, D. S. & Springer, T. : *Cell Biol. Int. Reports* 3 : 1-16, 1979.
25. Milstein, C., Galfre, G., Secher, D. S. & Springer, T. : *Ciba Found. Symp. No. 66* : 251-276, 1979.
26. Moller, G. : *Immunol. Reviews* 47 : 146-150, 1979.
27. Okada, Y. : *Biken's J.* 1 : 103-110, 1958.
28. Reid, L. C. : Cloning, in "Methods in Enzymology" 58 : 152-163, 1979.
29. Royston, I. & Levy, R. : Yohn, Lapin, & Blakeslee, eds., *Adv. Comp. Leuk. Res.* 1979 : 251-252, 1980. Elsevier/North Holland Biomed. Press, Amsterdam.
30. Sharon, J., Morrison, S. L. & Kabat, E. A. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76 : 1420-1424, 1979.
31. Sovova, V., Cerna, H., Dostalova, V. & Hlozaneck, I. : *Folia Biol.* 26 : 366-369, 1980.
32. Wiktor, T. J. & Koprowski, H. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75 : 3938-3942, 1978.
33. 岡田善雄 : 細胞融合と細胞工学. 講談社サイエンティファイブ 1976
34. 容口克 : 免疫'78 山村一多田編代謝 15 : 1543-1549, 1978.
35. 渡辺武 : 臨床化学 15 : 662-674, 1979.

## CELL FUSION AND MONOCLONAL ANTIBODY — ITS PRODUCTION, APPLICATION AND PROSPECT —

Uh - Ho Kim

The Institute of Life Science, Kangweon Natl. Univ.

Lymphocytes that secrete antibodies can be made immortal by fusing them with myeloma tumor cells (cell fusion) and cloning the hybrids (hybridomas). Each clone is a long-term source of substantial quantities of a single highly specific antibody (monoclonal antibody).

Since the first report of hybridomas producing monoclonal antibodies by Köhler and Milstein in 1975 (a major achievement of somatic cell genetics) this technique has spread to nearly all areas of biological, biochemical, and biomedical research. Watching the use of these methods spread from immunologists to cell biologists, biochemists and to other biological disciplines and observing the increase in publications using these reagents has been in itself fascinating and informative. Hybridomas (hybrid-myelomas)-monoclonal antibodies are indeed a new dimension in biological analyses.

The development of this technology, its applications and the prospect are briefly reviewed.