

# 마우스 T세포 증식인자(interleukin-2)에 의한 마우스 T림프구의 장기배양 및 그 특성

경희의료원 면역학연구소 · 경희대학교 의과대학 미생물학교실

남상윤 · 하윤문 · 최용복

= Abstract =

## Proliferation and Characteristics of Murine T Lymphocytes in A Mitogen-Induced Conditioned Media(Interleukin-2)

Sang Yun Nam\*, Youn Mun Ha\*\* and Yong Mook Choi\*

Immunology Research Laboratory, Kyung Hee University Hospital\*

Department of Microbiology, Kyung Hee University, School of  
Medicine\*\*, Seoul, Korea

Balb/c mouse spleen cells in vitro sensitized against ICR spleen cells were cultured in conditioned media(CM). The CM was produced by ICR spleen cells stimulated with Concanavalin-A(Con-A), and sensitized lymphoid cells were grown in CM. ICR mouse spleen cells were appeared to be a good generator of IL-2.

Optimal growth was seen in growth medium containing 20% fetal calf serum, and 25% CM.

When cultures were initiated at  $1.5, 10 \times 10^4$  cells/ml, the cells were increased in numbers by about 20, 13, 5-fold, respectively, every 9 days.

Such growth pattern was sustained for about 4-6 weeks and thereafter the cell growth was diminished gradually.

Direct immunofluorescence indicated that 93% of the lymphoid cells grown in CM(for 10 days) expressed Thy1 surface antigen. And the cells grown in CM were cytotoxic to the sensitizing ICR mouse spleen cells though cytotoxicity level was not high. According to these results, the cells grown in CM were considered to be cytotoxic T lymphocytes.

The lymphoid cells grown for 20 days were nearly unresponsive to Con-A and therefore dependent only IL-2 to be used for IL-2 assay.

### 서 론

Morgan 등<sup>1)</sup>이 phytohemagglutinin(PHA)로 자극한 임파구 배양상청액(conditioned media; 이하 CM으로 약함)을 이용하여 사람 T임파구의 장기배양에 성공한 이후 사람과 마우스의 세포독성 T 임파구(cytotoxic T lymphocytes; 이하 CTL로 약함)의 배양에 관한 많은 연구 결과가 발표되었으며<sup>2-7)</sup> 임파구 배양상청액에 존재하면서 생물학적 활성을 가진 수많은 인자중에서 가장 관심을 모으고 있는 T세포 증식인자(interleukin-2; 이하 IL-2로 약함)<sup>8)</sup>는 면역학적 관점에서 많은 연구의 대상이 되고 있다.

\*이 연구는 1984년 경희의료원의 특별 연구기금으로 이루어졌음.

IL-2는 T 임파구 뿐만 아니라, virus 감염세포나 종양세포를 비특이적으로 파괴할 수 있는 natural killer(NK)세포의 증식에도 관여한다<sup>9,10)</sup>. 또한 시험관내에서 CTL 유도<sup>11,12)</sup> NK세포의 표적세포에 대한 세포상해성을 증가시켜주는 인자임이 밝혀졌다<sup>13,14)</sup>. 이와같은 IL-2의 면역조절작용은 생체내에서도 증명되고 있어<sup>15,16)</sup> 암환자에 대한 IL-2의 임상응용에 많은 기대가 모아지고 있다.

저자들은 사람 임파구 배양상청에 의해 사람 T 임파구가 증식함을 이미 보고한 바 있으며<sup>17)</sup> IL-2 생산세포에 관한 실험을 수행한 바 있다<sup>18)</sup>. 본 연구에서는 마우스 IL-2를 생산하여 이 인자를 매개로 하여 마우스 임파구의 장기배양을 시도하였으며 배양된 임파구의 특성에 관하여 실험한 결과를 보고하고자 한다.

IL-2는 비교적 종특이성이 낮아서 사람의 IL-2는 마우스 임파구에도 그 활성이 인정되고있어<sup>11,12</sup> 본 연구 결과는 사람 IL-2에 의한 면역세포의 증식 및 배양에 활용될 수 있게 되기를 기대한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

ICR마우스는 경희대학교 의과대학 미생물학 교실에서 계대 사육하고 있는 체중 20-30g 정도의 것을 암수 구별없이 사용하였다. BABL/C 마우스는 서울대학교 미생물학교실로 부터 분양받은 것을 사용하였다.

### 2. 혼합임파구 배양(mixed lymphocyte culture;MLC)

마우스 동종항원에 대한 CTL을 유도해내기 위하여 MLC를 아래와 같이 시행하였다.

BABL/C 마우스와 ICR 마우스로 부터 비장을 적출하고 유리막대를 이용하여 비장세포를 유리시켰다. Nylon mesh에 세포부유액을 통과시켜 debris를 제거하고 혼합된 적혈구는 염화암모늄용액을 이용하여 용혈시켰다. 이렇게 하여 얻어진 비장세포를 hank's balanced salt solution(HBSS)(GIBCO, Grand Island, NY)으로 2회 세척한 후 complete medium(RPMI 1640(GIBCO)/10% Fetal calf serum(FCS)(CSL, Melb)/1% antibiotic-antimycotics(GIBCO))에  $2 \times 10^6$  cells/ml 농도로 부유시켰다. Stimulator로 사용할 ICR마우스 비장세포는 2,500rad(<sup>60</sup>Co-Source)의 감마 방사선을 조사하였다. 동량의 세포부유액을 혼합한 후 6well microplate (Costar 3406, Cambridge, Mass)에서 4~11일간 배양하였다.

### 3. Conditioned media(CM)

IL-2 Source로서 사용한 CM은 Rosenberg 등(1978)의 방법에 따라 생산되 무혈청배지를 사용하였다. 즉 상기와 같은 방법으로 얻어진 ICR 마우스 비장세포를 0.25%의 bovine serum albumin을 가한 무혈청 complete medium에  $5 \times 10^6$  cells/ml 농도로 부유시키고  $10 \mu\text{g/ml}$  농도의 concanavalin A(이하 con A로 약함) (Difco, Detroit, Mich)를 가하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기내에서 배양하였다 48시간 배양한 후 원침하여 세포를 제거하고 상청액을 0.22 $\mu\text{m}$ -filter(Na/gene 120-0020, Rochester, NY)로 여과필균하여 CM으로 사용하였다.

### 4. 임파구 배양

혼합임파구 배양에 의해 동종항원으로 자극된 임

파구를 적당한량의 FCS와 CM을 첨가한 RPMI1640 배양액에  $5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 부유시켜 6well microplate에서 배양하였다. 3일마다 새로운 배양액을 가해 주었으며 9일후 세포농도가  $5 \times 10^6$  cells/ml 이상이 되면 새로운 배양액을 가해  $5 \times 10^6$  cells/ml 농도로 재조정하여 배양하였다.

### 5. T세포 항원검사

배양한 임파구의 T세포 항원 검사에는 직접 면역 형광법을 이용하였다. 즉 complete media에  $4-5 \times 10^6$  cells/ml 농도로 조정된 세포부유의 200 $\mu\text{l}$ 를 6ml plastic tube(costar 2022)에 분주하고 FITC-conjugated anti-Thy-1 monoclonal 항체(Sera-Lab, Sussex, England) 10 $\mu\text{l}$ 를 가하여  $4^\circ\text{C}$  냉수조에서 1시간 작용시켰다. 1시간후 phosphate-buffered saline(PBS) pH7.4용액으로 2회 원심 세척하고 세포 pellet에 PBS, pH7.4용액 3-4방울을 가하여 세포를 부유시켰다. 여기에 mounting medium(30% glycol/70% PBS, pH7.4) 2-3방울을 가하여 형광현미경하에서 양성세포를 관찰하였다.

### 6. 세포독성 검사

표적세포로는 lipopolysaccharide(LPS)(Difco)로 자극 배양한 ICR 마우스 비장세포를 사용하였다. 즉 complete media에  $2 \times 10^6$  cells/ml 농도로 조정된 ICR 마우스 비장세포 부유액에  $5 \mu\text{g/ml}$  농도의 LPS를 가하여 48시간 배양한 후 임파구를 수거하였다.

이 임파구를 RPMI 1640 배양액으로 2회 세척한 후  $1.5 \times 10^6$  세포를 0.2ml의 complete media에 부유시키고 200 $\mu\text{Ci}$ 의 <sup>51</sup>Cr-Na,Cro,(에너지연구소 서울)를 가하였다. 90분동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기내에서 표지(labelling)한후 complete media로 4회 원심 세척하여  $5 \times 10^6$  cells/ml의 세포농도로 조정하였다.

세포독성검사를 위해 V-bottom microplate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 표적세포 부유액 10 $\mu\text{l}$ 와 혼합임파구 배양에서 얻은 작동세포(effector cell) 부유액 200 $\mu\text{l}$ 를 가하여 100G에 5분간 원침하였다. 이를  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  배양기내에서 4시간 방치한 후 각 well로부터 100 $\mu\text{l}$ 의 상청액을 6ml plastic tube에 취하여 r-counter(packard gamma 500)로 방사능활성을 측정하였다.

각 실험은 3배수(triplicate)로 시행하였으며 spontaneous release(SR)의 측정을 위해서는 작동세포 부유액 대신 동량의 complete media를, maximum release(MR)를 측정하기 위해서는 1% triton X-

100을 가하여 실험하였다.  
세포독성은 아래식에 따라 계산하여 나타내었다.

% specific lysis

$$= \frac{\text{CPM of test} - \text{CPM of SR}}{\text{CPM of MR} - \text{CPM of SR}} \times 100$$

### 7. 배양임파구의 IL-2 의존 증식 검사

배양된 임파구의 IL-2 의존 증식을 검사하기 위해서는 10~20일 동안 IL-2가 함유된 complete media 중에서 배양된 임파구를 RPMI 1640 배양액으로 2회 원심 세척한 후 IL-2를 가하지 않은 complete media 중에서 24시간 배양하였다. 24시간후 세포를 수거하여  $1 \times 10^6$  viable cells/ml 농도로 재부유시켰다.

Complete media를 U-bottom microplate (Costar)에 well 당  $100 \mu\text{l}$ 씩 가하고 mitogen (con A) 또는 IL-2가 함유된 CM 용액을 A 열의 well에  $100 \mu\text{l}$ 씩 가하여 2배 계단 희석하였다. 여기에 임파구 부유액을 well 당  $100 \mu\text{l}$  (즉  $1 \times 10^6$  cells/w)씩 가하여  $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  배양기내에서 배양하였다. 48시간후  $^3\text{H}$ -thymidine (New England Nuclear, Boston, Mass)를 well 당  $1 \mu\text{Ci}$ 씩 가하고 18시간 동안 배양한 다음 세포수거기 (Flow Lab, Syrhshire, Scotland)를 이용하여 glass fiber filter (Gelman 61638, Ann Arbor, Mich)에 세포를 수거하였다. Fiter disc를  $60^\circ\text{C}$ 에서 1시간 건조시킨후 scintillation vial에 넣고 scintillation fluid 5ml을 가하여  $\beta$ -scintillation counter (Beckman 8000, Irvine CA)를 이용하여 방사능 활성을 측정하였다.

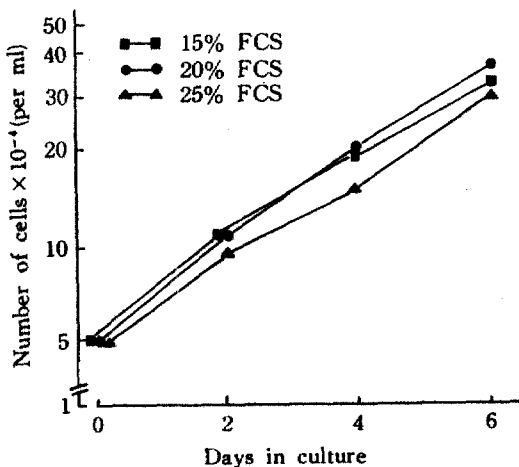


Fig. 1. growth of murine lymphoid cells in varying concentration of fetal calf serum. Eleven day-sensitized lymphoid cells were cultured in growth medium containing 25% CM.

각 실험은 3배수(triplicate)로 실시하여 그 평균치를 계산하였다.

## 성 적

### 1. 동종항원 자극 마우스 임파구의 증식

혼합임파구 배양에 의해 11일간 동종항원의 자극을 받은 임파구를 CM 존재하에서 배양하였다. 저자들이 생산 사용한 CM은 ICR 마우스 비장세포를 Con A로 자극하여 얻은 것으로서 ICR 마우스 비장세포도 우수한 IL-2 생산세포로 이용할 수 있음을 알 수 있었다. 즉 Fig. 1과 2에서 보는바와 같이 몇몇 FCS 및 CM 농도에 따른 임파구 증식이 큰 차이는 없었으나 FCS, 20% 농도에서 6일 동안의 증가 비율이 좋은 것으로 나타났다(Fig. 1). CM의 농도가 20%와 30%인 경우에도 임파구의 증식이 25%에 비해 약간 떨어져 20%의 FCS와 25% CM을 각각 첨가한 배양액을 임파구 장기배양에 사용하였다.

임파구 배양을 시작할 때의 세포농도가 임파구 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 1, 5 및  $10 \times 10^6$  cells/ml 농도로 조정된 후 배양하면서 임파구 수의 증가를 비교하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도로 배양한 경우 9일후에는 약 20배의 수적 증가를 보여 세포 증식율이 가장 높았다.  $5 \times 10^6$  cells/ml 농도로 배양하였을 때는 약 13배의 세포수로 증식하였으며  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도에서 배양을 시작하였을 때 세포증식율이 약 5배로서 가장 낮았다. 그러나  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도로 배양을 시

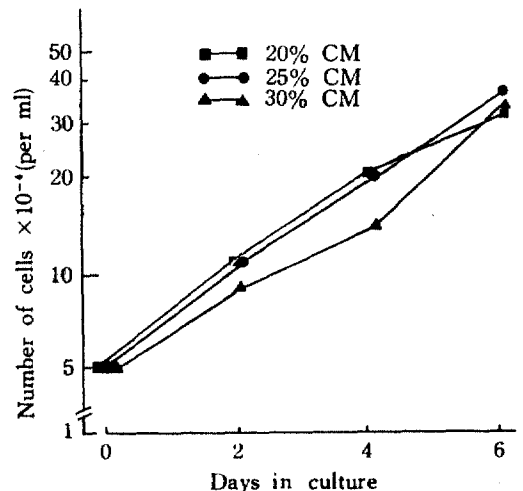


Fig. 2. Growth of murine lymphoid cells in varying concentration of CM. Growth medium was supplemented with 20% FCS.

작할 경우  $5 \times 10^4$  cells/ml 농도에서 보다 5배의 배양액이 더 소요되었으므로 장기배양에 있어 계대배양 때는 초기 세포수를  $5 \times 10^4$  cells/ml 농도로 조정

하여 실시하였다.

CM에 따라 다소 차이는 있었으나 임파구 증식의 양상은 Fig. 4와 같았다.  $1 \times 10^4$  cells/ml 이상의 농도까지는 세포가 증식되지 않음을 관찰할 수 있

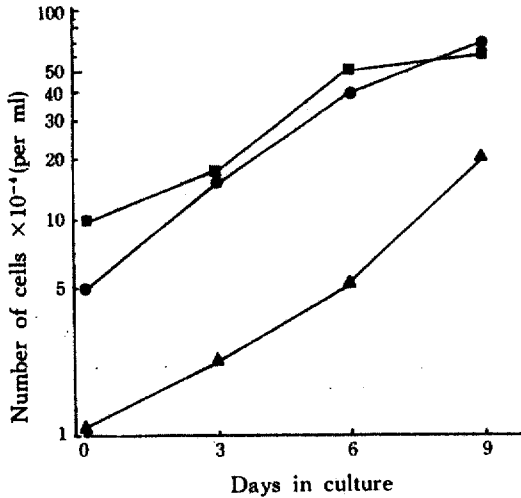


Fig. 3. Growth of murine lymphoid cells in CM at three different starting cell concentration. Eleven day-sensitized lymphoid cells were cultured in growth medium containing 20% FCS and 25% CM.

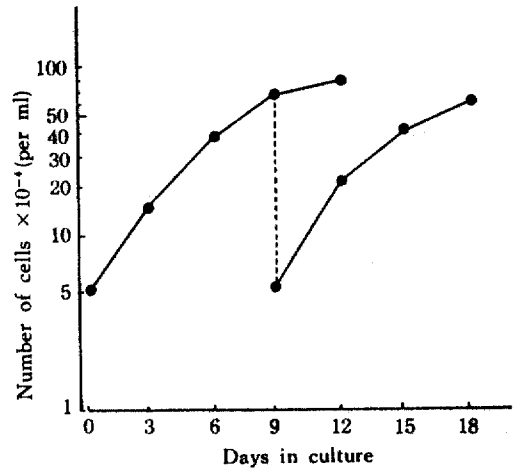


Fig. 4. Growth of murine lymphoid cells in CM. At day 9, the cells were diluted back to  $5 \times 10^4$  cells/ml in fresh growth medium.

Table 1. Reactivity of lymphoid cells grown in CM\* with anti-Thyl monoclonal antibody\*\*

Cells	Fresh spleen cells	11 day-mixed lymphocyte cultured	10 day-grown in CM
% Reactivity	31	68	93

\*conditioned media

\*\* FITC-conjugated rat anti-Thyl monoclonal antibody was used for immunofluorescence.

Table 2. Cytotoxicity of lymphoid cells grown in CM.

Cells	% Cytotoxicity against		
	ICR blast cells*		Yac-1 cells
	50 : 1**	25 : 1	50 : 1
Fresh spleen cells	-2.6***	1.0	5.3
Mixed lymphocyte cultured			
at day 4	ND****	8.3	1.8
at day 11	1.7	1.3	ND
Cells grown in CM			
at day 4	ND	22.1	-2.4

\* ICR spleen cells were stimulated with 50ug/ml of LPS for 48 hrs

\*\* E/T ratio

\*\*\* The mean of triplicate measurements.

\*\*\*\* Not done

었으며  $5-6 \times 10^6$  cells/ml 정도의 세포농도에 이르면(약 9일후)  $5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 계대배양하였다. 이와같은 세포의 증식률은 4-6주 동안 유지할 수 있었으며 그후에는 세포의 증식이 서서히 저하되었다.

### 2. 배양된 임파구의 T세포 항원

마우스 T임파구 표면에 존재하는 Thy-1 항원에 대한 monoclonal 항체를 사용한 직접면역 형광법으로 배양한 임파구중 T 임파구의 수적 비율을 측정하였다.

동중항원에 자극되기 전에는 비장세포군의 31%가 anti-Thy1 항원과 반응하였으며 혼합임파구 배양 직후에는 68%가 T세포인 것으로 나타났다(Table 1).

CM을 가하면 10일간 배양한 임파구는 93%가 T세포로 판정되었다.

### 3. 배양된 임파구의 세포독성

세포독성 실험에는 자극 마우스인 ICR종 유래의

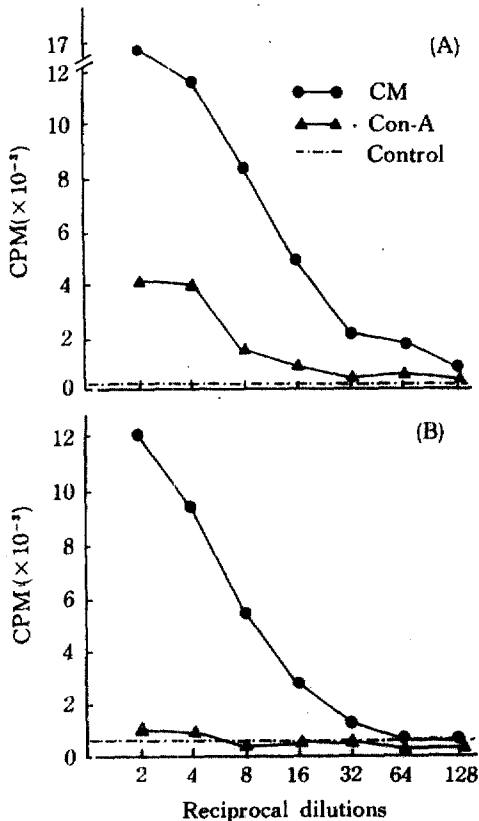


Fig. 5.  $^3\text{H}$ -thymidine uptake of lymphoid cells grown in CM for 10(A) and 20(B) days. The means of triplicate measurements are presented.

세포주가 없어 ICR 마우스의 비장세포를 이용하였다.

세포독성은 비교적 낮은 편이었으며 혼합임파구 배양 4일후에는 8.3%(E/T ratio, 12.5:1)의 세포상해도를 보였으나 11일후에는 거의 보여주지 못하였다(Table 2).

CM을 가하여 배양한 후 4일에는 22.1%의 비교적 높은 세포독성을 보였다.

배양된 임파구는 Yac-1 세포주에 대해 세포독성을 거의 나타내지 못하여 NK활성은 없음을 알 수 있었다.

### 4. 배양된 임파구의 IL-2 의존 증식성

25% CM을 함유한 배양액 중에서 10일간 배양한 임파구의  $^3\text{H}$ -Thymidine 이용(uptake)은 CM이 2배 희석된 well에서 16900cpm; 4배희석된 well에서 11680 cpm으로 20일간 배양한 임파구의 경우(각각 12820 cpm, 9480 cpm)보다 높았다(Fig. 5). CM 대신 Con A 만이 가해진 2배 및 4배 희석한 well에서 10일간 배양된 임파구는 각각 4070, 4000cpm으로 20일간 배양한 임파구의 1000, 1080 cpm 보다 높았다. 또는 complete media 만 가한 대조군 well에서 보여준  $^3\text{H}$ -Thymidine 이용(uptake)은 10일 및 20일 배양한 임파구가 각각 220, 770 cpm으로서 10일간 배양한 임파구가 20일간 배양한 임파구 보다 낮았다. 즉 10일간 배양된 임파구는 아직도 mitogen의 영향을 받아 대조군 보다 매우 높은 증식을 유지하고 있으며 20일간 배양된 임파구는 1100 cpm의 낮은치를 보여주어 대조군(770 cpm)과 거의 같은 수준을 나타내고 있었다.

이상 시간을 달리한 2종류의 배양군에서 CM내에 함유하고 있는 IL-2에 의존하여 임파구가 분열 증식함을 알 수 있을 뿐 아니라 CM의 농도에 크게 영향을 받고 있음을 알 수 있었다.

### 고 찰

Morgan 등<sup>1)</sup>에 의해 사람 T임파구의 장기배양이 성공한 이후 IL-2에 관한 수많은 연구가 보고되어 왔다. 마우스를 이용한 실험은 Gillis 등<sup>2)</sup> 및 Rosenberg 등<sup>3)</sup>에 의해 시행되어 마우스 임파구 배양상청(IL-2)을 이용하여 세포독성 T임파구(CTL)를 장기 배양할 수 있음이 알려졌다.

저자들은 우리나라에서 보편적으로 사육 실험되고 있는 마우스종을 사용하여 이러한 결과를 확인하고 각 실험실에서 용이하게 이용할 수 있는 IL-2 연구 모델을 수립하고자 본 연구를 시행하였다.

Rosenberg 등<sup>1)</sup>의 방법을 이용한 결과로서 ICR 마우스의 비장세포는 IL-2 생산에 있어 우수한 생산세포(good producer)로서 이용할 수 있었으며 개체간의 productivity는 다소 차이가 있었으나 많은 수(30-40마리)의 마우스를 동시에 혼합하여 사용함으로써 그 변동을 줄일 수 있었다.

실험결과에 의하면 마우스 임파구 배양에는 CM 25%와 FCS 20%의 농도가 가장 적당하였다. 특히 30% 이상의 CM을 가할 경우 시간이 경과 할수록 임파구의 증식이 저하되었다. 이는 CM내에 존재하는 mitogen의 농도 또는 세포증식을 억제하는 타종의 림포카인등 여러가지 요인이 작용할 것으로 생각된다.

ICR 마우스 비장세포와의 혼합배양에 의해 자극된 BALB/C 마우스 비장세포는 상기 방법으로 얻은 CM을 이용하여 6-8주 동안 배양이 가능하였다. 배양된 임파구의 증식율은 계대에 따라 차이가 있었으며 암세포주로 감각시킨 후 배양한 Gillis 등<sup>2)</sup>의 결과보다 낮았으나 정상 임파구의 동종항원으로 감각시킨 Rosenberg 등<sup>3)</sup>의 결과에 접근됨을 알 수 있었다. 그들은  $5 \times 10^8$  cells/ml의 낮은 농도로 배양을 시작함으로써 5-7일에 10배 정도의 수적증가를 보였으며 저자등은  $5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 배양하여 9일동안에 13배의 세포수로 증가하였다. 또한  $1 \times 10^6$  cells/ml의 낮은 농도로 배양을 시작할 경우에는 9일 동안에 약 20배의 수적 증가를 보였으나 배양액 등 임파구 배양에 드는 재료가 많이 소요되므로 많은 세포를 효율적으로 얻기 위해서는  $5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로서 배양하는 것이 적당할 것으로 믿는다.

이러한 세포증식율은 4-6주 후부터 감소되었으며 8주후 대개는 그 증식이 현저히 저하되었다.

저자들이 배양한 임파구는 anti-Thyl 항혈청과의 반응성에 의해 T임파구임을 확인할 수 있었다. 저자들이 사용한 anti-Thyl 항혈청은 NIM-RI Clone<sup>4)</sup> 으로부터 얻은 monoclonal 항체로서 BALB/C 마우스 흉선세포의 90% 이상과 반응하였고 비장세포 중 31%정도가 반응하여 T임파구 정량에 사용할 수 있음을 확인하였다. 세포독성은 Rosenberg<sup>5)</sup>의 연구 결과에 비해 낮았으며 이는 자극 마우스인 ICR 종 유래 세포주가 없어 정상 비장세포를 사용하였기 때문이 아닌가 생각되며 순계의 ICR 마우스를 얻기 어려운 점도 문제가 되리라고 생각된다. 또한 배양된 임파구는 NK활성은 거의 보여주지 않아서 배양된 임파구에 있어 표적세포의 세포독성이 NK세포의 작용이 아니었음을 알 수 있었다.

<sup>3</sup>H-Thymidine 이용(uptake) 실험결과 10일간 배

양된 임파구는 CM 존재하에서 그 증식이 우수하였으나 Con A를 가한 경우에도 control 보다 매우 높은 증식을 보였으며 20일간 배양된 임파구의 경우는 그 증식이 Con A에 의해 크게 자극을 받지 않은 것으로 나타났다.

IL-2의 역가 검정을 위해서는 CM내의 mitogen 농도에 영향을 받지 않아야 하며 20일 배양한 임파구는 이러한 목적으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 사람의 경우에도 IL-2 역가 검정을 위해서는 최소한 20일간 배양된 임파구를 사용해야 한다는 보고가 있어<sup>6,7)</sup> 저자등의 결과와 유사한 것이라고 생각되었다.

지금까지의 연구 결과로서 IL-2에 의한 T임파구 증식의<sup>1)</sup> 기전은 다음과 같이 설명되고 있다. 즉, 특이적 또는 비특이적 항원자극에 의해 활성화된 단구(monocyte)가 임파구 활성화 인자(Interleukin-1; 이하 IL-1이라 약함)를 생산하고 항원에 의해 자극된 T임파구가 IL-1의 도움을 얻어 IL-2를 생산한다<sup>8,9)</sup>. 항원은 또한 다른 T임파구아군(subpopulation)을 자극하여 그 세포로 하여금 IL-2에 대한 수용체(receptor)를 발현하여 IL-2를 흡수증식을 가능하게 한다는 것이다<sup>10)</sup>. 즉 T임파구 증식은 free IL-2의 농도, 세포의 IL-2수용체의 농도 및 수용체의 IL-2에 대한 친화성의 3가지 요인에 의해 좌우된다고 지적되고 있다<sup>11)</sup>.

IL-2에 의한 항원 특이적 살해성 T세포의 증식 배양에 관한 많은 연구 결과가 보고된 바 Gillis와 Smith<sup>12)</sup>, Baker 등<sup>13)</sup> 및 Mills 등<sup>14,15)</sup>은 동계(syngenic)마우스의 암세포에 대한 살해성 T세포를, Vose와 Moore<sup>16)</sup>, Vose와 Bonnard<sup>17)</sup> 및 Ichino 등<sup>18)</sup>은 사람의 자기암세포에 반응하는 살해성 T세포를 배양하여 표적세포의 세포독성을 확인한 바 있다.

최근에는 IL-2를 이용한 NK세포의 시험관내 증식과<sup>19,20,21)</sup> CTL 및 NK세포와는 다른 "림포카인에 의해 활성화된 살해성세포(lymphokine-activated killer(LAK) cell)"의 배양이 보고된 바 있어<sup>22,23)</sup> adaptive immunotherapy에 대한 관심이 고조되고 있다. 앞으로 IL-2와 면역세포와의 관계에 관한 연구는 암의 면역학적 치료에 크게 기여할 것으로 생각되어진다.

## 결 론

우리나라에서 사육되어 보편적으로 실험되고 있는 ICR마우스를 interleukin-2(IL-2) 생산에 이용한 결과 con-A로 자극하여 얻은 임파구 배양 상청액(conditioned media; CM)내에 T세포분열증식 배개

체인 IL-2가 함유되어 있음을 확인하였고, 이를 이용하여 ICR 마우스 동종항원으로 자극된 BALB/C 마우스의 비장세포를 장기배양할 수 있었다.

배양액내의 우태아혈청 및 CM 함유율 변화에 따른 임파구 증식분열을 비교한 바 우태아혈청 20%, CM 25% 를 가한 배양액중에 BALB/C 마우스 임파구의 증식이 가장 우수하였다.

임파구를 1, 5 및  $10 \times 10^4$  cells/ml의 농도에서 배양을 시작하여 세포수의 증식을 비교한 결과 각각 20, 13, 5배의 세포수로 증가하여  $1 \times 10^4$  cells/ml 농도에서 가장 높은 증식을 보였으나 배양 재료를 감안  $5 \times 10^4$  cells/ml 농도가 IL-2 매개 임파구 장기 배양 실험의 초기 농도로 이용되었다. 3일마다 새로운 배양액을 가하고 9일후  $5 \times 10^4$  cells/ml 이상의 최고 농도에 달하였다. 이와같이 제대배양하여 4-6주동안 비슷한 증식사이클을 보여주어 적어도 1개월이상 장기배양할 수 있었다.

10일간 배양된 임파구의 93%가 Thyl 표면항원을 가진 T 임파구였으며, 자극마우스인 ICR 비장세포에 대해 세포독성을 나타내어 이들이 세포 살해성 T 임파구임을 확인할 수 있었다.

20일간 배양된 임파구는 con-A의 영향을 거의 받지 않고 IL-2에 의존하여 증식함을 보여 IL-2의 역할 결정에 이용할 수 있을 것으로 판단되었다.

본 연구에 참가해주신 암센타산하 면역연구실 여러분께 감사사를 드립니다.

### 참 고 문 헌

- 1) 하운문, 우종설, 김광혁, 임수덕: 임파구 배양 상청이 임파구 분열증식에 미치는 영향에 관한 연구, 대한의학협회지, 26: 237, 1983.
- 2) 김광혁, 남상윤, 임수덕: 사람 말초혈액내 Large granula lymphocyte(NK세포)의 Interleukin-2 생산에 관한 연구, 대한의학협회지 16:1, 1984.
- 3) Morgan DA, Ruscetti FW, and Gallo RC: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193:1007, 1976.
- 4) Gillis S, and Smith KS: Long-term culture of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Nature* (London) 268:154, 1977.
- 5) Gillis S, Baker PE, Rucetti FW, and Smith KA: Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T cell lines. *J. Exp. Med.* 148:1093, 1978.
- 6) Rosenberg SA, Schwarz S, and Spiess PJ: In vitro growth of murine T cells. II. Growth of in vitro sensitized cells cytotoxic for alloantigens. *J. Immunol.*

121:1951, 1978.

- 7) Von Boehmer H, Hengartner H, Nabholz M, Lernhardt W, Schreier, MH, and Haas W: Fine specificity of a continuously growing killer cell clone specific for H-Y antigen. *Eur. J. Immunol.* 9:592, 1979.
- 8) Aarden LA, Burner TK, Cerottini JC, Dayer JM, de Weck AL, Dinarello CA, Disabato G, Farrar JJ, Gery I, Gillis S, Handschumacher RE, Henny CS, Hoffmann MK, Koopman WJ, Karane SM, Lachman LB, Lefkowitz I, Mischell RI, Mishel RI, Mizel SB, Oppenheim JJ, Paetkau V, Plate J, Rollinghoff M, Rosenstreich D, Rosenthal AS, Rossenwasser LJ, Shimpl A, Shin HS, Simon PL, Smith KA, Wagner H, Watson JD, Wecker E, and Wood DD.: Letter to editor. Revised nomenclature for antigen non-specific T cell proliferation and helper factor. *J. Immunol.* 123:2928, 1979.
- 9) Suzuki R, Handa K, Itoh K, and Kumagai K: Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin-2 (IL-2). I. Proliferative response and establishment of cloned cells. *J. Immunol.* 130:981, 1983.
- 10) Vose BM, and Bonnard GD: Limiting dilution analysis of the frequency of human T cells and large granular lymphocytes proliferating in response to interleukin 2. I. The effect of lectin on the proliferative frequency and cytotoxic activity of cultured lymphoid cells. *J. Immunol.* 130:687, 1983.
- 11) Shaw J, Monticone V, Millis G, and Paetkau V: Effects of co-stimulator on immune responses in vitro. *J. Immunol.* 120:1974, 1978.
- 12) Farrar WL, Johnson HM, and Farrar JJ: Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J. Immunol.* 126:1120, 1981.
- 13) Henny CS, Kuribayashi K, Kern DE, and Gillis S: Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 291:335, 1981.
- 14) Kuribayashi K, Gillis S, Kern DE, and Henny CS: Murine NK cell cultures: Effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J. Immunol.* 126:2321, 1981.
- 15) Wagner H, Hardt C, Heeg K, Rollinghoff M, and Pfizenmaier K: T cell-derived helper factor allows in vivo induction of cytotoxic T cells in nu/nu mice. *Nature* 284:278, 1980.
- 16) Herfenider SH, Conlon PT, Henny CS, and Gillis S:

- In vitro Interleukin-2 administration augments the generation of alloreactive cytolytic T lymphocytes and resident natural killer cells. *J. Immunol.* **130**:222, 1983.
- 17) Gillis S, Ferm MM, Ou W and Smith KA: T cell growth factor; Parameters of production and quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* **120**:2027, 1978.
  - 18) Ruscetti: FW, and Gallo RC: Human T-lymphocyte growth factor; Relation of growth and function of T lymphocyte. *Blood.* **57**:379, 1981.
  - 19) Clayen A, and Parkhouse RME: Preparation and properties of a cytotoxic monoclonal rat anti-mouse Thy-1 antibody. *J. Immunol Metho.* **49**:17, 1982.
  - 20) Mier JW, and Gallow RC: Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:6134, 1980.
  - 21) Mier JW, and Gallo RC: The purification and properties of human T cell growth factor. *J. Immunol.* **128**:1122, 1982.
  - 22) Smith KA, Lachman LB, Oppenheim JJ, and Favata MF: The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* **151**:1551, 1980.
  - 23) Gillis S, Gillis AE, and Henney CS: Monoclonal antibody directed against interleukin-2. I. Inhibition of T-lymphocyte mitogenesis and the in vitro differentiation of alloreactive cytolytic T cells. *J. Exp. Med.* **154**:983, 1981.
  - 24) Smith KA, Gillis S, Baker PE, McKenzie D, and Ruscetti FW. T cell growth factor-mediated T cell proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **332**:423, 1979.
  - 25) Smith KA: T-cell growth factor, a lymphocytotropic hormone. In genetics of the immune response, NY. Plenum, p. 151, 1983.
  - 26) Baker PE, Gillis S, and Smith KA: Monoclonal cytolytic T-cell lines. *J. Exp. Med.* **149**:273, 1979.
  - 27) Mills GB, and Paetkau V: Generation of cytotoxic lymphocytes to syngeneic tumors by using costimulator (interleukin-2). *J. Immunol.* **125**:1897, 1980.
  - 28) Mills GB, Calson G, and Paetkau V: Generation of cytotoxic lymphocytes to syngeneic tumors by costimulator (interleukin-2). In vivo activity. *J. Immunol.* **125**:1904, 1980.
  - 29) Vose BM, and Moore M: Cultured human T-cell lines kill autologous solid tumors. *Immunol. Lett.* **3**:237, 1981.
  - 30) Vose BM, and Bonnard GD: Specific cytotoxicity against autologous tumor and proliferative responses of human lymphocytes grown in interleukin-2. *Int. J. Cancer.* **29**:33, 1982.
  - 31) Ichino Y, and Ishikawa T: Cytolysis of autologous fresh osteosarcoma cells by human cytotoxic T lymphocytes propagated with T cell growth factor. *Gain.* **74**:584, 1983.
  - 32) Herberman RB: Natural killer cells. *Hospital practice.* **17**:93, 1982.
  - 33) Grimm EA, Mazumder A, Zhang Hz, and Rosenberg SA: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* **155**:1823, 1982.
  - 34) Grimm EA, Robb RJ, Roth JA, Neckers LM, Lachman LB, Wilson DJ, and Rosenberg SA: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* **158**:1356, 1983.