

인형 T세포 백혈병에 대한 단세포군 항체 생산에 관한 연구

서병석 · 김원배 · 최응철 · 김병자

서울대학교 약학대학

(Received June 10, 1987)

Studies on Production of Monoclonal Antibodies Reactive with T-Cell Leukemia

Byung Seok Seo, Won Bae Kim, Eung Chil Choi and Byong Kak Kim

Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—To develop hybridomas secreting monoclonal antibodies to be used as unlimited sources of reagents indispensable for the diagnosis and treatment of leukemic malignancy, a monoclonal antibody was generated to human pre-T leukemia cells (Jurkat). Hybridomas were produced against Jurkat cell line by fusing spleen cells from hyperimmunized mice with murine plasmacytoma cells (P3×63Ag8.V653). One monoclonal antibody derived from this fusion, designated DMJ-2 was reactive with T-cell lines (Jurkat, Molt-4 and RPMI-8402) and normal peripheral E-rosette forming T cells, but unreactive with B-cell lines (Daudi, Nalm-6) and non-T, non-B cell line (K562). Conclusively DMJ-2 was reactive with mature and immature T-lineage lymphoid cells.

백혈병은 림파구나 적혈구 등의 면역세포가 성숙한 세포로 되는 과정에서 발생하는 암의 일종으로서, 아직도 진단 및 치료에 있어 다양한 양상을 보여 주고 있다. 최근의 연구결과 백혈병 세포를 형태학적, 기능적, 면역학적 표지에 따라 분류함으로써 임상 및 치료에 임해 왔다. 그러나 백혈병은 양상이 다양하고 복잡하기 때문에 질병의 분류, 경과 및 치료에 대한 반응성 등을 예측하기가 어렵다.

백혈병 세포와 정상세포들을 구별하는 방법으로 최근까지는 주로 Wright-Giemsa 염색과 hematoxylineosin 염색을 사용하는 형태학적 구분이 사용되어 왔다. 그러나, 림파 세포의 면역학적 역할과 그 특성이 밝혀지고 세포 화학적 성분들에 대한 연구가 진행됨에 따라 면역학적 및 세포 화학적 방법을 이용하게 되었다.

세포 화학적 방법은 대부분 과립구(granulocyte)와 단구(monocyte)의 감별에 많이 사용되어 왔으며 림파구의 감별에는 별 도움이 되지 못하였기 때문에, 림파구의 감별에는 면역학적인 표지

를 이용하여 왔다. 이러한 면역학적인 표지로는 면양 적혈구 수용체(Sheep RBC receptor), 인형 T-세포 항원, Fc수용체, C₃수용체 및 surface immunoglobulin(sIg) 등이 있다.¹⁻³⁾

이를 이용하여 백혈병을 급성 또는 만성, 소아 또는 성인, lymphoid 또는 myeloid 백혈병 등으로 분류하는 형태학적 분류와는 별도로 새로운 분류가 가능하게 되었다. 이에 따라 T-림파구나 B-림파구가 지닌 표지가 존재하는 양상에 의해 T-세포 백혈병(T-cell leukemia: T-ALL) 또는 B-세포 백혈병(B-cell leukemia: B-ALL)으로 구별되고, 이런 T-림파구나 B-림파구의 표지를 갖지 않은 것을 non-T, non-B세포 백혈병(C-ALL)으로 구분한다.⁴⁻⁶⁾

Greaves는⁷⁾ 정상 세포나 백혈병 세포중 급성 림파성 백혈병(Acute lymphoblastic leukemia: ALL) 세포에만 반응하는 항체를 토끼에서 분리하여 이 항체와 특히 반응하는 항원을 순수 분리하여 common ALL antigen(CALLA)이라 칭하였다. 이는 다른 marker들과 함께 ALL을

진단하는데 중요한 marker로 이용되고 있다. 그러나 통상적으로 면역하여 얻은 항체는 그 자체가 특이성에 있어서 이질성을 나타낼 뿐 아니라 연구자나 실험동물, 면역방법에 따라 더욱 이질성이 심하므로, Greaves 이후에 만들어진 anti-CALLA 항체는 특이성이 다양하여 ALL을 진단하는 데에는 아직도 근본적인 단점을 지니고 있다. 또한 종래에 사용하던 항 혈청은 특이한 성분에 대한 항체만을 남기기 위해 흡수 과정을 거쳐야 하기 때문에 최종산물을 소량 밖에 얻지 못하였고, 이질성 및 다양성의 배제할 수 없는 polyclonal 항체로서의 단점을 지니고 있다.

이에 대해 최근에 Köhler와 Milstein⁸⁾에 의하여 개발된 hybridoma technique으로 단일 특이성을 가진 특이 항체를 대량 생산할 수 있는 잡종 세포종 세포주를 얻을 수 있게 됨에 따라 기존 방법에 의하여 얻은 항체가 지닌 단점을 보완하게 되었다.

Monoclonal antibody 기술을 이용하여 1980년 Ritz 등에 의해 처음으로 J-5 monoclonal anti-CALLA 항체가 개발되었으며 J-5의 반응성도 연구되어졌다. 그후 Knapp에 의해 VIL-A1 단일 clone항체가 개발되었으며, 1981년 Lebein⁹⁾ 등에 의해 BA-1 monoclonal항체가 연구 개발되었다. 이러한 일련의 monoclonal항체를 이용하여 이들과의 반응성에 따라 ALL을 분류할 수 있고, 이에 따른 환자의 질병 경과, 예후의 추적과 더불어 화학요법에 대한 반응성을 추적할 수 있게 되었다.

또한, 백혈병에 대한 단세포군 항체가 또 하나의 중요성을 갖는 것은 ALL에 대한 특이한 치료제로써 이용될 수 있다는 것이다. Berstein이 murine 백혈병에 대해 monoclonal항체를 주입하여 탁월한 치료 효과를 발표한 이래 Ritz는 J-5를 직접 common ALL환자에 주입하여 탁월한 치료 효과가 있음을 발표하였고, Dillman은 T101 monoclonal antibody를 주입하여 역시 탁월한 효과를 얻었다. 최근에 와서는 ricin의 A chain과 monoclonal항체를 conjugation시켜 백혈병 환자에게 투여해서 보다 특이하게 선택적으로 leukemia cell만을 파괴하는 immunotoxin을

개발하고 있다.

이처럼 백혈병 세포에 대한 monoclonal항체는 백혈병을 분류, 진단하는데 지표로 사용될 뿐 아니라, 백혈병을 치료하는데 중요한 치료제로서의 역할을 하기 때문에, 우리나라에서도 급성 백혈병 환자가 많으므로 백혈병을 신속, 정확하게 T-ALL B-ALL 및 non-B, non-T ALL 등으로 진단할 수 있는 표준 시약을 개발하기 위한 실험을 행하였다.

저자는 T-cell leukemia인 Jurkat 세포를 항원으로 쥐에 면역하여 얻은 비장 림파구와 형질세포종 세포를 융합하여 림파잡종 세포종을 만들었고, 이 림파잡종세포가 생산하는 항체를 분리 정제하였으며, 여러 종류의 백혈병 세포와의 반응특성을 분석하여 보고하는 바이다.

실 험 방 법

백혈병 세포주의 확립—1) 사용 세포주(Cell line): 면역원으로 사용한 세포주는 미국 Boston에 소재하는 Dana Farber Cancer Institutes에서 분양 받은 Jurkat cell line을 사용하였다. 이 세포는 급성 림파성 백혈병 환자에서 유래한 것으로 Table 1에 표시한 바와 같이 T3 밀도가 높은 T-세포의 특징을 갖고 있다.^{10,11)}

2) 세포 배양용 배지(RPMI 1640, Gibco Lab.): 이 배지 10.4 g을 3차 증류수 1 l에 녹인 후 2.0 g NaHCO₃를 가하고 CO₂를 포화시켜 pH를 7.0~7.4로 조정하였다. 이를 millipore filtration(0.22 μm)하여 멸균하였다.

사용시에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco Lab.)과 Penicillin-streptomycin(PC-SM), 2 mM L-glutamine을 첨가한 complete medium을 사용

Table 1-Characteristics of surface markers of Jurkat cell line determined by microcytotoxicity.

Surface marker	% Specific lysis
OKT3	35~40
OKT4	5
OKT8	10~15
OKM5	1

하였다. 그 조성은 RPMI 1640 90 ml, FBS 10 ml PC-SM 1 ml, L-glutamine 1 ml이었으며 FBS는 56°C에서 30분간 열처리 하여 inactivation시킨 후 사용하였다.¹²⁾

3) 세포 배양 : culture dish에 complete medium 10 ml를 분주한 후에 세포를 10⁴/ml 접종한 후 1 주일에 두번씩 새로운 배지로 갈아 주면서 37°C, 10% CO₂ incubator에서 세포주를 확립시켰다.

형질 세포종 세포주(Plasmacytoma cell line)의 배양—융합에 사용한 형질 세포종 세포는 미국 국립보건원에서 분양받은 P₃×63Ag8.V653 (V653으로 약기)이었다. 이 세포주는 P₃×63Ag 8의 변이 세포주(mutant cell line)로 immunoglobulin(Ig)을 생산하지 못하고 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT⁻)가 없어 8-azaguanine에 내성을 나타낸다.

이 세포주를 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에서 1주일에 2회씩 새로운 배지로 갈아 주면서 계대 배양하여 세포주를 유지시켰다.

면역된 림파구의 족비—1) 시약 : ① Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco Lab.)의 제조 : HBSS시약용 분말 9.8g을 3차 증류수에 녹여 1 l가 되도록 한후 NaHCO₃ 0.2 g~0.35 g을 가하여 pH를 7.4로 조정한 후에 millipore filtration (0.22 μm)하여 사용하였다.

② Trypan blue solution : Trypan blue 0.02 g을 100 ml 3차 증류수에 녹여 Whatman No. 1 filter로 여과하여 사용하였다.

2) 면역방법 : Jurkat세포를 RPMI 배지에서 배양한 후 이를 원심분리 tube에 수확하여 HBSS로 세번 세척하여 배지에 존재하고 있는 FBS를 제거하였다.

이를 trypan blue로 염색하여 세포수와 viability를 hemocytometer로 측정하여 viability가 90% 이상일때 세포를 면역하였다. 세포의 농도를 2.0×10⁷/ml로 조절한 후 0.5 ml(1.0×10⁷ cell)을 생후 4주일된 Balb/c female mice 2마리에 복강주사하였다. 1주일 간격을 두고 4번 계속해서 주사한 후 마지막 면역후 3일후에 쥐를 희생시켜 비장을 취해 fusion을 행하였다. 면역방법을 Scheme I에 정리하였다.

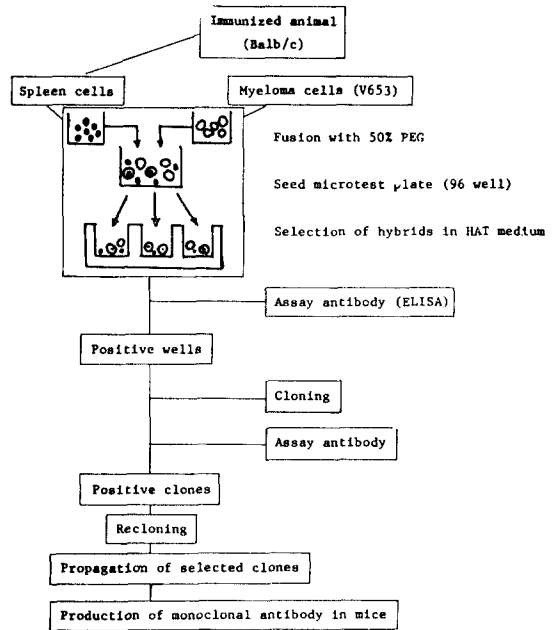
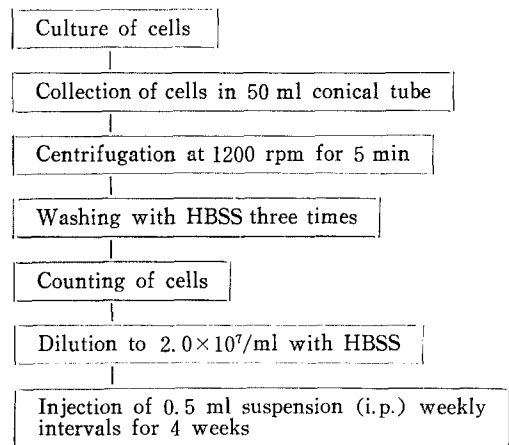


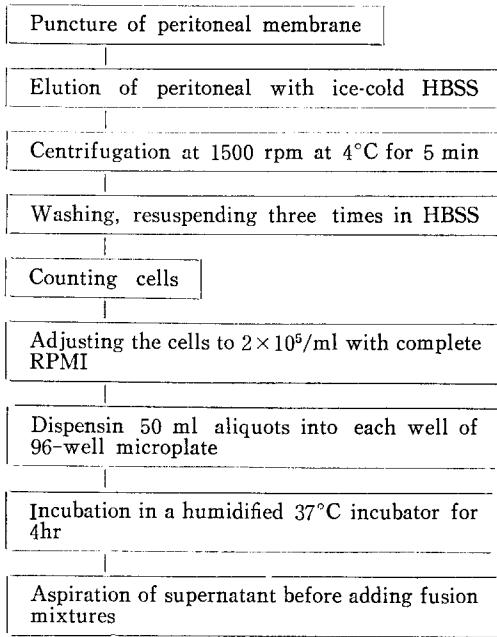
Fig. 1-Basic protocol for establishing hybridomas.



Scheme I-Immunization of mice with Jurkat cell.

3) 항체 생산 측정 : 면역이 제대로 되었는지를 알기 위해 처음으로 주사한 후 1주일 후부터 1주일 간격으로 쥐의 눈으로 부터 heparinized capillary를 사용하여 혈액을 채취하여 항체 생산 여부를 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)방법으로 측정하였다. 항체의 titer를 확인한 후에 fusion을 행하였다.

세포 융합—1) 복강세포의 준비(Peritoneal exudate cells, PECs) : 융합된 세포가 잘 자라게



Scheme II-Preparation of macrophage as feeder layer.

하기 위해서 융합된 세포를 feeder cells이 들어 있는 well에서 배양시켰다.

Balb/c mouse를 희생시켜 차가운 HBSS로 복강 macrophage를 용출시켰다. 이를 HBSS로 3번 세척한 후에 hemocytometer로 cell수를 계산하였다. 이를 complete RPMI 배지에 현탁시켜 96-well microplate에 well당 $50 \mu\text{l}$ (10^4 cells)씩 분주하였다. 이를 10% CO_2 가 있는 37°C incubator에서 4시간 incubation시킨 후 상등액을 제거한 후 융합시킨 cell을 분주하였다.

이 과정을 Scheme II에 요약하였다.

2) 면역된 비장세포의 준비 : Balb/c mouse에 Jurkat cell을 마지막으로 면역한 3일 후에 쥐를 희생시켜 복강을 개방하여 비장을 적출하였다. 비장을 RPMI 배지가 들어있는 culture dish에 놓고 뾰족한 핀셋으로 찢어서 비장세포를 유출시켰다. 이를 15 ml 원심분리 tube에 옮겨 15분 동안 상온에서 방치하여 지방질, cell debris 등을 침전시키고, 그 상등액을 모아서 원심분리한 후 RPMI 1640배지로 세척하였다. 세포수와 viability를 측정한 후 fusion에 사용하였다.

3) V653의 준비 : V653을 complete RPMI배지에서 2일 동안 배양시켜 log phase의 세포를 수확하여 RPMI 1640배지로 3번 세척한 후 균의 수와 viability를 측정하였다.

viability가 90% 이상인 것을 fusion에 사용하였다.

4) Fusogen의 준비(PEG-DMSO-RPMI) : 비장세포와 형질세포중 세포를 융합시키기 위해 polyethylene glycol 4000(Sigma Co.)을 사용하였고 융합빈도를 증가시키기 위해 dimethylsulfoxide를 첨가하였다.

PEG 2 g을 달아 121°C 에서 15분간 autoclave한 후에 이를 사용하기 전까지 끓는 물에서 계속 진탕하였다. 1.7 ml RPMI 배지에 DMSO 0.3 ml를 가하여 15% DMSO 용액을 만든후, 이 용액 2 ml를 PEG 2 g에 섞어 50%(w/v) PEG-DMSO-RPMI 용액을 제조하여 융합에 사용하였다. 이 혼합물을 사용하기 바로 직전까지 37°C 에서 보관하였다.

5) Supplemented RPMI-HAT 배지의 준비 : 융합된 세포를 선택하기 위해서 Littlefield¹³⁾가 고안한 HAT(hypoxanthine, aminopterin, thymidine)를 사용하였다.

hypoxanthine 272.2 mg($100 \mu\text{M}$), thymidine 76.5 mg($16 \mu\text{M}$)을 200 ml 증류수에 녹여 HT용액을 제조하였으며, aminopterin 3.82 mg($0.4 \mu\text{M}$)을 200 ml 증류수에 녹여 A용액을 제조하였다. 이들을 millipore filtration한후 -20°C 에서 냉동 보관하여 사용하였다.

supplemented RPMI-HAT배지의 조성은 Table II에 표시하였다.

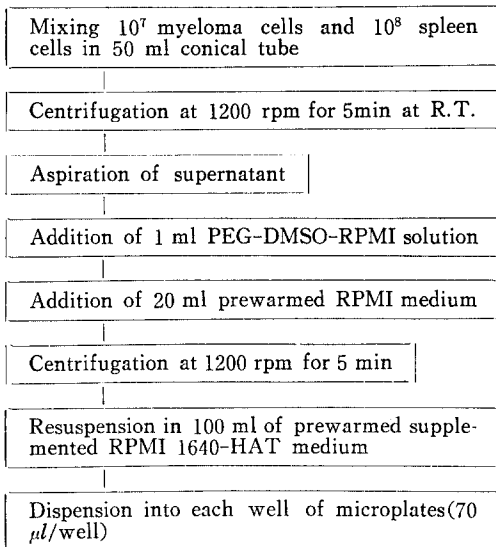
6) 융합조작 : 10^7 개의 myeloma(V653) 세포와 10^8 개의 면역된 비장세포를 50 ml 원심분리 tube에 혼합한 후 이를 원심분리(1200 rpm, 5 min)하여 상등액을 제거시켰다. 침전된 세포 pellet를 탁탁 친후, PEG-DMSO-RPMI용액 1 ml를 tube를 손으로 돌려가면서 1분동안에 걸쳐 천천히 가해 주었다.

미리 37°C 에서 보관한 RPMI배지 1 ml를 마찬가지로 방법으로 1분에 걸쳐 가해 주고, 계속해 10 ml의 배지를 넣었다. 그후 RPMI배지를 한번

Table II-Compositions of supplemented RPMI 1640-HAT medium.

RPMI 1640(without HEPES)	90ml
FBS	10ml
Gibco essential amino acids(50×)	2ml
Gibco nonessential amino acids(100×)	1ml
Gibco L-glutamine(200 mM)	1ml
Gibco vitamins(100×)	0.4ml
L-Asparagine*(10 mg/ml in H ₂ O)	0.16ml
L-Serine*(221 mg/ml in H ₂ O)	0.04ml
Gibco sodium Pyruvate(100×)	1ml
Sodium Bicarbonate*(7.5%)	1.5ml
2-Mercaptoethanol*(5×10 ⁻² M)	0.1ml
Gibco antibiotic-antimycotic*	1ml
HT*	1ml
A*	1ml

* Millipore filtration with 0.22 μm filter

**Scheme III**-Fusion procedure.

에 10 ml 더 가해준 후 원심분리시켜(1200 rpm, 5min) 상등액을 제거시켰다. 이 cell pellet를 RPMI-HAT 배지 100 ml에 현탁시킨후 이 현탁액을 feeder layer가 미리 덮여 있는 microplate에 well당 70 μl씩 분주하여 37°C, 10% CO₂ incubator에서 배양시켰다. 이상의 융합 과정을 Scheme III에 요약하였다.

7) 융합된 세포의 선택 : 융합시킨후 제 1일, 3일, 6일, 8일에 각각 50 μl/well씩 HAT 배지를 첨가 하였고, 제11일에는 100 μl의 상등액을 제거시킨후 50 μl HT배지를 넣었다. 14일, 17일에도 각각 HT배지 50 μl를 첨가하여 주었다.

한편 제15일에 융합세포의 증식여부를 위상차 역위 현미경으로 관찰하였다. 그후 제19일에 융합된 세포가 자라는 각 well로부터 상등액을 50 μl씩 취하여 ELISA 방법으로 항체 생성 여부를 검색하였다.

효소결합 면역분석법(ELISA)에 의한 융합세포(hybridoma)의 검색—1) 세포의 고정 : A. 시약 : 사용한 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)은 Na₂HPO₄ 24.28 g, NaH₂PO₄ 7.45 g, NaCl 13.14 g을 3차증류수 1 liter에 용해시켜 pH를 7.2로 조절한후 사용하였다.

B. 실험방법 : 세포를 배양한후 이를 수확하여 PBS로 2번 세척한 후에 이를 적당히 희석시켜 현탁액을 microplate에 well당 5×10⁵ cell씩 분주시켰다. 1시간 정도 실온에서 방치하여 세포를 침전시킨후 상등액을 aspiration시킨후, 기벽으로 천천히 PBS용액을 가하여 세척하였다. 3번 세척한후 5분간 공기중에 방치하여 PBS를 완전히 말린후 well당 100 μl의 absolute methanol(Merck)을 첨가하여 세포를 고정시켰다. 5분후에 methanol을 제거시킨후 PBS로 5번 세척하였다.

이렇게 세포가 고정된 plate를 호일로 싸서 4°C에서 냉장 보관하면서 ELISA방법에 사용하였다. Jurkat세포 뿐만 아니라 다른 백혈병세포, 정상 B, T-세포 등도 마찬가지로 고정시켜 실험하였다.

2) ELISA방법—A. 시약 : ① Bicarbonate buffer(BCB, pH 8.2~8.4) : NaHCO₃ 8.4 g, Na₂CO₃ (anhydride) 0.11 g을 3차 증류수 1 l에 용해시켜 사용하였다.

② 2% Bovine serum albumin-bicarbonate buffer(BSA-BCB) : Bovine serum albumin(Sigma Co.) 2 g을 100 ml의 BCB에 가한후 4°C에서 12시간 stirring하면서 완전히 녹였다. 이를 millipore filtration(0.22 μm)하여 사용하였다.

③ NGP용액: 10 mg의 p-nitrophenyl- β -D-galactoside(Bethesda Research Lab.)를 1.5 mM $MgCl_2$ 가 들어있는 10 ml의 PBS에 녹여 사용하였다.

④ 효소 결합 항체(β -galactosidase conjugated (Fab)₂' fragments of sheep anti-mouse Ig, BRL): 이 효소 결합 항체를 1% BSA-PBS에 1:200으로 희석하여 실험에 사용하였다.

B. 실험방법: 2% BSA-BCB용액 0.2 ml를 세포가 부착된 microplate well에 가하여 세포가 부착되지 않은 well표면을 BSA로 부착시켰다. 1시간 동안 incubation한 후에 상등액을 제거하고 여기에 세포 배양액, 혈청 또는 복수액을 적당히 희석시켜 100 μ l씩 첨가하고 37°C에서 90분간 항원 항체 반응을 진행시켰다. 이때 대조군으로(negative control) 2% BSA-PBS를 따로 넣어 주었다.

그 후에 PBS 용액으로 5회 세척한후, 1:200으로 희석한 효소결합 항체를 50 μ l씩 넣어 37°C에서 90분간 반응시키고 PBS로 5회 세척하였다. 여기에 기질용액인 NGP를 100 μ l씩 가하여 37°C에서 1시간 동안 효소시질 반응을 진행시켰다. 그 후에 3 N NaOH용액 50 μ l씩 가하여 반응을 정지시키고 automatic ELISA reader(Multiskan, Titerteck, Flow Lab.)로 414 nm에서 흡광도를 측정하여 양성반응을 결정하였다.

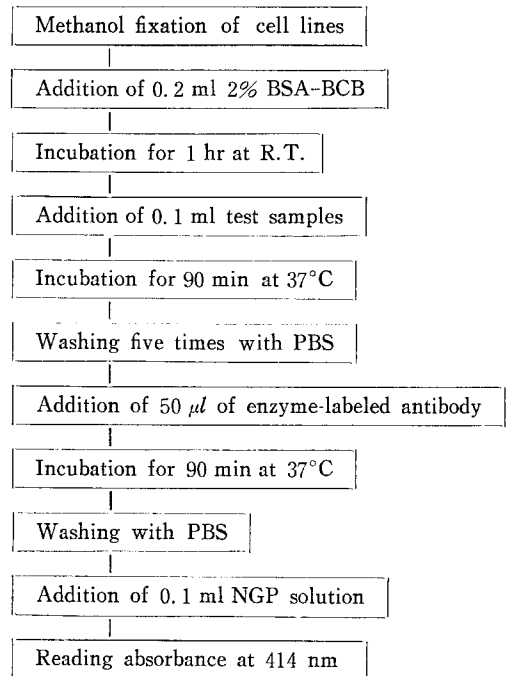
이 과정을 Scheme IV에 정리하였다.

Subculturing—항체를 생산하고 있는 well내에는 보통 5~10개의 hybridoma colony가 존재하기 때문에 이를 subculture하여 단일 hybridoma를 분리하였다.

양성반응을 나타낸 well의 배양액을 complete RPMI 배지에 희석하여 feeder cell이 존재하는 96-well microplate에 분주하여 subculture하였다.

이때 well당 20개의 hybrid가 존재하게 하였으며 5일 후에 현미경으로 hybridoma의 성장을 관찰하고, 그 상등액을 취해 다시 항체가 생성하였는지를 검사하여 가장 높은 titer를 갖는 subculture를 단세포 배양하였다.

단세포 배양(Cell cloning)—양성반응을 나타내는 well의 세포를 complete RPMI배지에 5 cells/



Scheme IV—Procedure of ELISA.

ml 농도로 희석하여, 0.2 ml씩 96-well plate에 분주하였다. 이 plate를 37°C incubator에서 배양하였다. 세포의 증식 여부를 위상차 현미경으로 관찰한 후 다시 상등액을 취해 항체 생성 여부를 검색하였다. 검색결과 항체의 titer가 높은 clone을 선택하여 24-well plate에서 배양시켰다.

Cell freezing—Clone이 확립된 세포들을 보관하기 위하여 freezing을 행하였다.

1) 시약: ① Freezing media; 10% FBS가 들어있는 complete RPMI 배지에 동량의 cryoprotective 배지를 혼합하여 사용하였다. ② Cryoprotective media: RPMI 30 ml, FBS 50 ml, DMSO 20 ml.

2) 방법: 세포를 원심분리시켜 이를 freezing media에 5~10×10⁶/ml 농도로 현탁시켰다. 이를 1.0 ml씩 cryotube에 분주하여 -70°C deep freezer(Revco)에서 하루밤 냉동시켰다. 그후에 cryotube를 액화질소 탱크속으로 옮겨 냉동 보관하였다.

쥐 복강내 항체 생산—1) Pristane 주사: 면역억제제로서 pristane(2, 4, 10, 14-tetra methyl

pentadecane, Sigma Co.) 0.5 ml씩을 hybridoma cell을 주사하기 2~3주 전에 미리 생후 4주된 mouse에 복강 주사하였다.

2) Hybridoma 세포의 준비: 24-well plate에서 자라는 hybridoma 세포를 culture dish에 옮겨 배양시킨후 50 ml 원심분리 tube에 수확하여 원심 분리시켰다. 이를 HBSS로 2번 세척한후 cell수를 측정하여 cell 농도를 $2.0 \times 10^7/\text{ml}$ 로 조정하였다.

쥐 1마리당 이 세포 현탁액 0.5 ml(1.0×10^7 cell)씩 복강주사하였다.

3) 복강액의 수확: hybridoma 세포를 주사한 후 1주일 후에 배가 불룩한지를 조사한후, 암이 자라고 있음을 확인하여, 쥐를 희생시켜 복강액을 pasteur pipette으로 수확하였다.

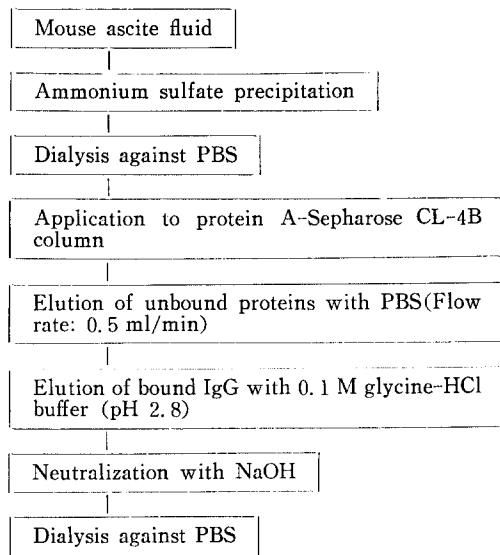
생성 monoclonal antibody의 분리 및 정제—
1) Ammonium sulfate 침전: 4°C 에서 쥐의 복강액에 31.5%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 가하여 침전을 생성시킨후 이를 2,000 g에서 10분간 원심 분리하여 침전 시켰다. 이를 PBS에 녹인 후에 다시 28% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액을 가하여 침전을 시켰다. 이를 최소량의 PBS에 녹인후 투석막에 넣어 PBS에 대하여 dialysis를 행하였다.

2) Affinity chromatography에 의한 분리: 투석하여 얻은 Ig fraction을 동량의 PBS로 희석한 후 이를 protein A-Sepharose CL-4B(Pharmacia Fine Chem., 1.2c m \times 10 cm) column에 loading시킨후 PBS로 0.5 ml/min 속도로 용출시켰다. 결합되지 않은 protein을 완전히 다 용출시킨 후에 결합되어 있는 IgG를 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 2.8)로 용출시켰다.

용출된 Ig fraction을 NaOH로 중화시킨 후에 PBS에 대해 투석하였다. 이러한 과정을 4°C 에서 행하였으며 분리 정제하는 과정을 Scheme V에 정리하였다.¹⁴⁾

3) IgG의 정량: 단백질 정량법인 Lowry method를 이용하여 정량하였다. bovine serum albumin을 표준으로 하여 검량곡선을 만들었고 이를 이용하여 IgG의 함량을 계산하였다.

단세포군 항체의 특이성 결정—단세포군 항체의 특이성을 결정하기 위하여 ELISA방법으로



Scheme V—Procedure for purification of monoclonal antibody.

각종 세포주와의 표면 항원과의 반응성을 검토하였고, 또한 미세포 독성시험을 행하여 반응성을 검토하였다.

1) 인형 림파아세포주(Human lymphoblastoid cell line)의 배양: 생성된 단세포군 항체의 반응성을 알아보기 위해 사용된 세포주는 B-세포의 특성을 갖는 Daudi, Nalm-6이었으며 이들은 Dana Farber Cancer Institutes에서 분양 받았다. T세포의 특성을 갖는 세포주는 Sloan Kettering Institutes에서 분양 받은 Jurkat, Molt-4, RPMI-8402를 실험에 사용하였다. 또한 T세포나 B세포의 항원 성분이 전혀 없는 K562(non-B, non-T)는 경희 의료원에서 분양 받아 실험에 사용하였다.

위의 모든 세포주는 10% FBS가 첨가된 complete RPMI 배지에서 1주일에 2회 정도 계대배양하여 유지시켰다.

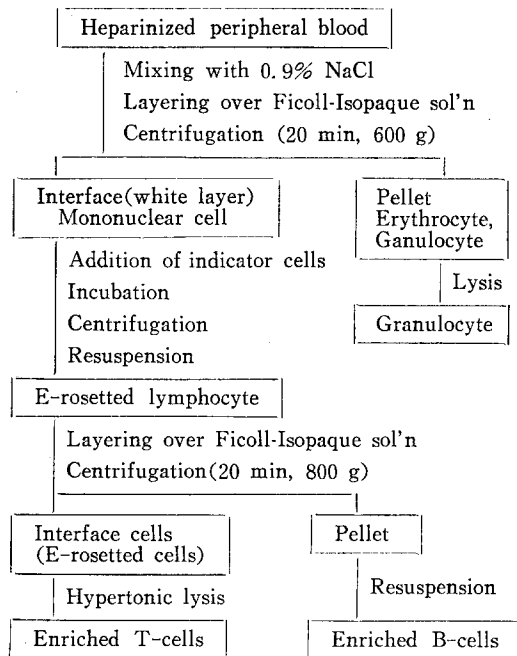
2) 정상 말초 림파구의 분리: 생성된 monoclonal antibody가 정상적으로 존재하는 B-세포, T-세포와 반응하는 지를 알아보기 위해 이를 분리하였다.

① 단핵구(Mononuclear cell, MNC)와 과립구(Granulocyte)의 분리; heparin처리시킨 혈액을 동량의 0.9% NaCl과 혼합한후 이를 Ficoll-

Isopaque(Pharmacia Fine Chem., s.g. 1.077) solution이 담긴 원심분리 tube에 기벽에 따라 천천히 가하였다. 그후 600 g에서 20분간 원심분리시켜 계면에 존재하는 MNC를 수확하였다. 침전된 pellet에는 적혈구와 granulocyte가 같이 존재하는데 이를 0.9% NaCl에 현탁시킨후 Tris-NH₄Cl용액을 가하여 적혈구는 lysis시키고 granulocyte를 얻었다.

② Rosette의 형성 : MNC용액 100 μ l(2×10^6 cell/ml)를 1% indicator cell(Sheep red blood cell) 100 μ l와 혼합한후 incubation시켰다. 이를 200 g에서 5분간 원심분리시킨후 상등액을 제거시켰다. 그 후에 100 μ l의 crystal violet를 넣어 염색시킨후 rosette형성세포를 관찰하였다.

③ Rosette형성 임파구(T-cell)의 분리 : MNC와 SRBC와 반응시킨후 이 용액을 Ficoll-Isopaque에서 원심분리시켰다(800 g, 20 min, 20°C). 계면층을 모아 이를 PBS로 세척한후 여기에 Tris-NH₄Cl(Tris 20.6 g/l + NH₄Cl 8.3 g/l)를 가한후 5분간 37°C에서 반응시켜 RBC를 lysis시킨후 T-cell을 얻었다. pellet는 PBS로 세척하여 B-cell을 얻었다. 이상의 분리과정을 Scheme VI에 요



Scheme VI-Preparation of human hemopoietic cells.

약하였다.

3) 효소결합 면역분석법 : 생성된 monoclonal antibody가 인형 림파아세포주와, 정상적인 T-, B-세포와 반응하는 지를 검사하기 위해 ELISA를 행하였다.

4) 단세포군 항체의 Ig class결정 : 생성된 monoclonal antibody의 class를 결정하기 위해 Sri-kumaran 등의 sandwich ELISA방법을 변형하여 실험하였다.

anti-mouse IgG1, anti-mouse IgG2_a, anti-mouse IgG3, anti-mouse IgA, anti-mouse IgM(Cappel Lab.)을 polystyrene plate에 부착시켜 monoclonal antibody를 넣어 반응시킨후 galactosidase conjugated rabbit anti-mouse IgG로 반응시켜 실험하였다.

5) 미세세포 독성검사(Microcytotoxicity test) : A. 시약 : ① 배지 : 세포를 현탁시키고 보체를 희석시킬때 사용하는 배지로는 3% FBS, 0.8 mM L-glutamine, PC-SM을 함유하는 RPMI배지를 사용하였다.

② 보체 : 사용된 보체는 rabbit의 보체(Gibco)이었으며 이를 1:2로 희석하여 사용하였다.

B. 실험방법 : 미세세포 독성 시험관(Nunclon, Nunc Co.)의 각 well에 10 μ l의 세포용액(5.0×10^6 /ml)을 분주하고 10 μ l의 적당히 희석된 항체, 배양액, 복강액 등을 가한후 37°C에서 15분간 반응시켰다. 여기서 rabbit complement를 10 μ l 가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시켰다.

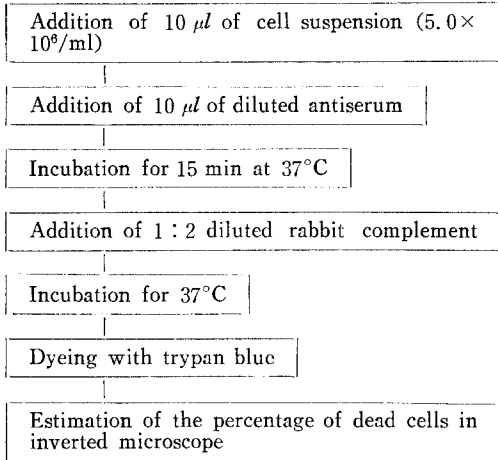
세포 파괴 여부를 알기 위해서 trypan blue를 가해 염색시킨후 35% formaldehyde(pH 7.0)를 가하여 세포를 고정시켰다. 그후 inverted microscope에서 최소 200개 이상의 cell을 관찰하여 죽은 세포를 관찰하였다.

다음 식에 의해 죽은 세포의 백분율을 구하였다.

% Specific lysis

$$= \frac{\text{관찰된 죽은세포}(\%) - \text{대조군 죽은세포}(\%)}{100(\%) - \text{대조군 죽은세포}(\%)}$$

specific lysis값이 20% 이상일 때 양성반응으로 판정하였고, 대조군으로는 normal rabbit serum을 사용하였다. 이상의 방법을 Scheme VII에 정



Scheme VII-Procedure of cytotoxicity assay.

리하였다.

실 험 결 과

항체를 분비하는 융합세포(Hybrid cell)의 선택—Jurkat 세포를 Balb/c(우)에 면역하여 anti-Jurkat 항체를 생성하는 가를 효소결합 면역측정법으로 확인 하였다.

Balb/c에 Jurkat 세포를 면역한후 혈청을 분리하여 그 항혈청의 역가를 ELISA로 측정한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 약 1:102400 이상의 titer를 확인하여 비장 림파구를 적출하여 fusion을 하였다.

비장 림파구와 V653을 50% PEG 4000으로 융합시켜 well당 5×10⁵ 세포를 1920 well에 분주하였다. 대조 well로서 V653세포, 비장세포만을 따로 분주하였다.

세포융합 제 1일부터 2~3일 간격으로 HAT 배지를 첨가한 후 10일 정도가 지나자 융합되지 않은 세포는 사멸되었고 융합된 세포만 자라기 시작하였다. 제 15일에 현미경으로 융합세포의 증식 여부를 확인한 결과 융합세포가 자라는 well수는 Table III에 표시한것 같이 806 well로서 융합빈도는 42%이었다.

제 19일에 융합세포가 자라는 well의 상등액을 취해 항체가 분비 되는지의 여부를 ELISA로 검색하였는데 806 well 중에서 124 well에서 anti-

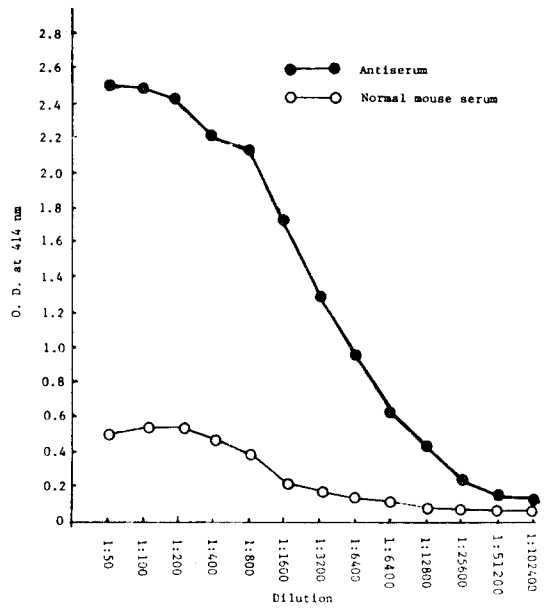


Fig. 2-Titration curves of mouse anti-Jurkat serum and normal mouse serum by indirect ELISA method.

Table III-Frequency of hybrids secreting antibodies to Jurkat cells from the cultures in HAT medium.

Total wells dispensed with cell mixture	Wells with growing hybrids in HAT medium	Wells with hybrid secreting Ab in medium
1920	806(42%)	124(8%)

Jurkat 항체가 있는 것이 확인되어, 전체 1920 well 중에 8%에 해당되었다.

anti-Jurkat 항체를 생산하는 124 well의 상등액을 다시 취해 B-cell leukemia인 Daudi 세포와 반응성을 시험한 결과 Table IV에 나타난 바와

Table IV-Reactivity of supernatant from hybrids reactive with Jurkat cells to Daudi cells.

Reactivity*	Number	Name
Positive	120	
Negative	4	DMJ-1, 2, 3, 4

* Determined by indirect ELISA
 Positive : >0.200 in O.D. at 414 nm
 Negative : <0.200 in O.D. at 414 nm

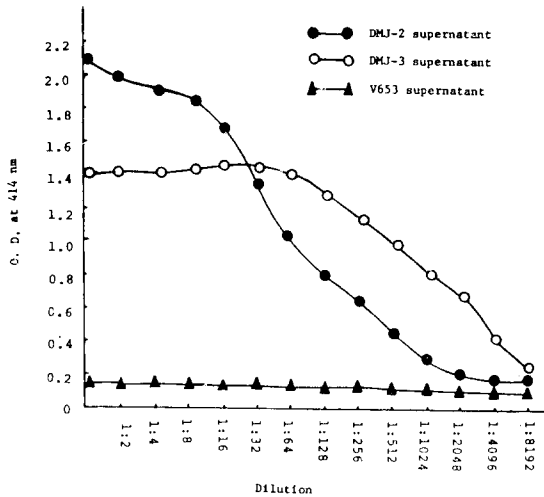


Fig. 3—Titration curves of anti-Jurkat antibodies in the supernatants from the cultured hybridoma clones, DMJ-2 and DMJ-3.

같이 120개의 well의 배양액은 반응을 하나 4 well에서 취한 배양액은 반응성을 나타내지 않았다.

따라서 이들은 DMJ-1, 2, 3, 4라 명명하고 무한 대 희석법으로 희석하여 약 10일간 배양시켜 하나의 세포로부터 분열 증식하는 clone을 얻었다.

그 후 배양액을 취해 항체생성을 검색한 결과 Jurkat cell에 반응성이 강한 DMJ-2, DMJ-3의 항체를 Fig. 3에 나타내었다. DMJ-2의 역가는 1 : 4096, DMJ-3의 역가는 1 : 8192 이상이었으며 반응성이 제일 강한 DMJ-2에 대해 특이성을 알아보는 실험을 행하였다.

쥐 복강으로부터 단세포군 항체 생산—DMJ-2, -3 세포를 pristane으로 전처리한 Balb/c mice의 복강에 주입시켜 배가 볼록해졌을 때 복강액을 수확하였다. 항체를 분리 정제하기 위해서 ammonium sulfate로 침전시키고 affinity chromatography를 행하였다.

복강액중의 단백질 함량을 Lowry 방법으로 정량한 결과 12.1 mg/ml이었으며, 이를 affinity column에 통과시키고 난후 다시 정량한 결과 0.68 mg/ml이었다. 항체의 획득수율은 12.2%이었다.

단세포군 항체의 특이성 결정—DMJ-2 세포가

Table V—Reactivity of DMJ-2 to the human leukemia cell lines.

Cell line	Diagnosis	Reactivity* of DMJ-2
Daudi	Burkitt	—
Nalm-6	B-ALL†	—
Jurkat	T-ALL	+
Molt-4	T-ALL	+
RPMI-8402	T-ALL	+
K562	Non-B, Non-T CML-BC#	—
Normal T**		+
Normal B		—

* Reactivity was determined by absorbance at 414 nm.

(+): Abs. > 0.200, (—): Abs. < 0.200

** Normal T: E-rosette forming cells in peripheral blood

Normal B: Peripheral mononuclear cells depleted E-rosette forming cells

CML-BC: Chronic myelogenous leukemia in blast crisis

† ALL: Acute lymphoblastic leukemia

생산 분비하는 단세포군 항체가 다른 세포와 반응하는 지를 알아 보았다.

B-세포인 Daudi, Nalm-6, T-세포인 Molt-4, RPMI-8402, B-, T-세포가 아닌 K562 및 정상 혈액중의 T-세포, B-세포 등을 각각 microplate에 부착시켜 DMJ-2 항체와 반응시킨후 ELISA로 검색한 결과를 Table V에 표시하였다.

DMJ-2는 Molt-4, RPMI-8402와 같은 T-세포에는 강한 반응성을 나타냈으며, Nalm-6, Daudi 등 B-세포 백혈병에는 반응하지 않았다. 다만 정상 T-세포와는 약간의 반응성을 나타내었다.

이처럼 Molt-4, RPMI-8402, Jurkat 같은 세포와 강한 반응을 나타냈기 때문에 DMJ-2는 T-세포 공통 항원과 관계가 있는 항체인 양상을 보여 주었다.

한편, ELISA 방법은 용해성 발색반응 이므로 항체의 생물학적 기능을 나타내지 못하는 단점이 있기 때문에 이를 보완하기 위해 세포 독성 시험을 행하였다. 그 결과 Table IV에서 보는 바와 같이 DMJ-2는 T-세포와는 강한 반응성을 보여 90% 이상의 세포가 파괴되었다. 그러나

Table VI-Reactivity of DMJ-2 to the human leukemia cell lines by microcytotoxicity test.

Cell line	Diagnosis	Anti-Jurkat antisera	Reactivity* of DMJ-2
Daudi	Burkitt	93	5
Nalm-6	B-ALL	78	10
Jurkat	T-ALL	95	95
Molt-4	T-ALL	87	91
RPMI-8402	T-ALL	90	87
K562	Non-T, Non-B CML-BC	90	7
Normal T**		95	25
Normal B		95	5

* Number means percent specific lysis.

** Normal T : E-rosette forming cells in peripheral blood

Normal B : Peripheral mononuclear cells depleted E-rosette forming cells

정상 E-rosette형성 T-세포와는 25%의 반응성을 보여주었다.

이상의 결과, ELISA나 세포독성 시험으로 DMJ-2의 반응성을 검사한 결과 마찬가지로 T-세포와 말초 T-세포의 일부와는 반응하는 양상이 유사하였고, B-세포나 K562와는 전혀 반응하지 않았다

DMJ-2 항체의 class를 ELISA로 시험한 결과 DMJ-2는 IgG2a 항체임을 확인하였다.

세포독성 시험으로 Jurkat 세포에 대한 DMJ-2

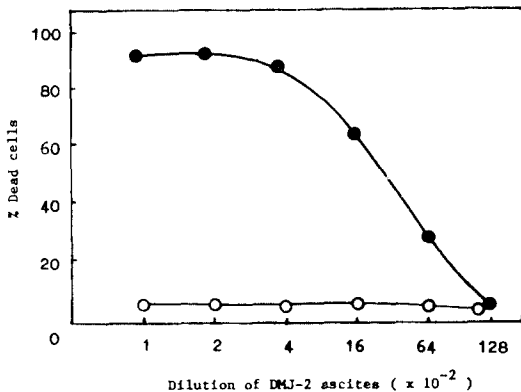


Fig. 4-Complement-mediated cytotoxicity of DMJ-2.

* Cell lysis was detected by trypan blue exclusion.

●-● : Jurkat cells

○-○ : Normal peripheral blood cells

의 세포독성을 검사한 결과를 Fig. 4에 도시하였다.

고 찰

Kohler와 Milstein이 면역 적혈구로 면역된 Balb/c의 비장림프구와 형질 세포종 세포를 융합시켜 융합세포를 만들었고, 이 융합세포는 면역 적혈구에 특이하게 결합하는 항체를 생산하여 세포배양에서 영원히 분열 증식할 수 있는 불멸성을 지닌 세포주임을 보고 함으로써 림프 잡종세포의 개념이 탄생되었다.

림프 잡종 세포가 생산하는 항체는 첫째로 Ig의 Fab가 동일한 분자의 집합체이며, 둘째로 특이성이 높고, 셋째로 세포 배양시 영구히 분열 증식하면서 항체를 생산할 수 있다. 또한 하나의 세포군이 생산하는 항체이므로 거대한 항원 분자중에 있는 수 많은 항원 결정기중에 하나에 만 반응하는 특징을 지니고 있다.

본 연구에서도 DMJ-2, DMJ-3의 hybridoma를 얻어서 이 세포가 생산하는 단세포군 항체를 분석하였다.

발색 반응을 관찰하는 ELISA나 생물학적 활성을 알 수 있는 세포독성 시험의 결과는 거의 일치하여 단세포군 항체인 DMJ-2는 T-세포 백혈병에만 반응하는 특이성이 있음을 확인하였다. 즉, DMJ-2는 급성 백혈병 환자에서 유래한 T-세포주(Jurkat, Molt-4, RPMI-8402)에 강한 반응을 나타내었으나(90% 이상) 정상인의 말초 혈액중의 T-세포에 대해서는 25~35%의 반응성을 보였다. 따라서 DMJ-2는 미성숙 시기의 T-세포와 성숙한 T-세포에 모두 반응하는 인상을 주었기 때문에 T-세포의 표면 항원중에 T1, T3, T10, T11에 대한 항체와 유사한 것으로 생각된다.

이 중에서 T11은 분화가 완전히 끝난 말초 T-세포가 지닌 항원으로 SRBC에 대한 수용체와 일치되는 구조로 간주되어 있으므로 DMJ-2는 이 항원과는 무관하다고 생각할 수 있다.

T-lymphoblastoid cell에서 강한 반응을 나타내는 것은 미성숙한 T-세포가 지닌 항원인 T1,

T3, T10인데 T10은 말초 T-세포에서는 사라져 버리는 항원이기 때문에 T10도 DMJ-2와는 무관하다고 볼 수 있다.

이처럼 DMJ-2는 B-세포에 대해서는 전혀 반응을 나타내지 않으나 T-세포와 미성숙한 단계의 T-세포와는 반응을 나타내므로 T-세포가 지닌 표면 항원과 강한 반응을 보인다고 볼 수 있다.

급성 림프구성 백혈병(ALL)에는 CALLA라는 공동항원이 존재하는데 Jurkat 세포도 T-ALL 이므로 CALLA를 갖고 있다. 따라서 Jurkat 세포로부터 표면 glycoprotein을 분리하여 이에 대한 DMJ-2의 반응성을 연구한다면 DMJ-2의 특이성을 자세히 알 수 있을 것이다.

또한 백혈병이나 림프종 환자에게 백혈구를 골수 천자나 생검 표본으로 분리하여 DMJ-2의 반응성을 검사하여 기존의 방법과 비교하여 봄으로써 DMJ-2의 반응 특이성을 확실하게 알 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

Hybridoma technique을 이용하여 백혈병을 진단 분류 하는데 사용할 수 있는 단세포군 항체를 개발하기 위해 본 연구에 착수하였다.

T-cell leukemia인 Jurkat cell을 면역원으로 하여 mouse에 면역하여 비장세포를 적출한후 이를 형질세포종 세포와 PEG를 사용하여 융합시켰다. 융합된 세포중 항체를 생산하는 것을 선택하였고 그 중에서 반응성이 가장 좋은 DMJ-2 monoclonal antibody를 얻었다.

DMJ-2의 반응성을 ELISA, 미세세포 독성검사를 통해 검사한 결과, T-세포주(Jurkat, Molt-4, RPMI-8402)와 정상 말초 T-세포에는 반응성을 나타내었고, B-세포주(Daudi, Nalm-6)와 non-T, non-B인 K562에는 전혀 반응성을 나타내지 않았다.

이처럼 DMJ-2는 B-세포 계통과는 반응을 하지 않으나 미성숙 및 성숙한 T-세포 계통에는 모두 특이하게 반응하는 단세포군 항체임을 확인하였다.

문 헌

- 1) Becksread, J.H. Halverson, P.S. Ries, C.A. and Bainton, D.F.: Enzyme histochemistry on biopsy specimen of pathologic human bone marrow. *Blood* 57, 1088 (1981).
- 2) Bowman, W.P. Melvin, S.L. Aur, R.J.A. and Mauer, A.M.: A clinical perspective on cell surface markers in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 41, 4794 (1981).
- 3) Melvin, S.L.: Immunological definition of leukemia cell surface phenotypes. *Cancer Res.* 41, 4790 (1981).
- 4) Janossy, G. Bollum, F.J. Brasstock, K.F. A. McMichal, Rapson, N. and Greaves, M.F.: Terminal transferase positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia. *J. Immunol.* 123, 1525 (1979).
- 5) Schroff, R.W. Foon, K.A. Billing, R.J. and Rahey, K.L.: Immunologic classification of lymphocytic leukemia based on monoclonal antibody-defined cell surface antigens. *Blood* 59, 207 (1982).
- 6) Metzgar, R.S. Dowell, B.L. Lachman, L.B. Janes, N.H.: and George, I.V.F.W.: Classification of human leukemia by membrane antigen analysis with xenoantisera. *Cancer Res.* 41, 4781 (1981).
- 7) Greaves, M.F.: Analysis of the clinical and biological significance of lymphoid phenotypes in acute leukemia. *Cancer Res.* 41, 4752 (1981).
- 8) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256, 495 (1975).
- 9) Lebien, T.W. McKenna, R.W. Abramson, C.S. Gajelpeczalska, K.J. Nesbit, M.E. Coccia, P.F. Bloomfield, C.D. Bruning, R.D. Kersey, J.H.: Use of monoclonal antibodies; Morphology and cytochemistry to probe the cellular heterogeneity of acute leukemia and lymphoma. *Cancer Res.* 41, 4776 (1981).
- 10) Brodsky, F.M. Parham, P. Barnstrable, C.J. Crumpton, M.J. Bodmer, W.F.: Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system. *Immunol. Rev.*

- 47, 3 (1979).
- 11) Kung, Reinherz, P.C.E.L. and Scholsmen, S.F.: Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* **206**, 347 (1979).
 - 12) Strikumarán, S.: Bovine X mouse hybridoma that secret bovine immunoglobulin. *Science* **220**, 523 (1983).
 - 13) Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from matings of fibroblast *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* **145**, 709 (1964).
 - 14) Shackelford, D.A. Kaufman, J.F. Korman, A.J. and Strominger, J.L.: HLA-DR antigens; structure, separation of subpopulation, gene cloning and function. *Immunol.* **66**, 133 (1982).