

細胞融合 및 Hybridoma細胞作成에 의한 抗仔豚白痢 Monoclonone抗體의 生産

金宇鎬 · 安壽煥* · 尹用德*

江原大學校 農科大學 畜産學科

家畜衛生研究所*

(1987. 7. 30 授受)

Monoclonal Antibody Production against Piglet Diarrhea Agent (Enterotoxigenic *E. coli*) by Cell Fusion-Hybridoma Cell Technique

Uh-ho Kim, Soo-hwan An* and Young-dhuk Yoon*

Department of Animal Science, College of Agriculture, Kangweon National University

Veterinary Research Institute, Rural Development Administration*

(Received July 30th, 1987)

Abstract: Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) cause an acute diarrhea (white scour) in both animals and humans. The disease process initially involves the adherence and colonization of the mucosal surface of the small intestine, followed by the elaboration of a heat-labile enterotoxin (LT) and/or heat-stable enterotoxin (ST). Intestinal adherence or colonization by ETEC is generally mediated by a specific surface-associated pilus (fimbrial) antigen that endows the bacteria with the capacity to adhere to epithelial cell surface.

Fourteen monoclonal antibodies (MAbs) directed against pili antigens of ETEC were obtained by cell fusion/hybridoma technique. They were characterized by indirect immunofluorescence assay (IFA), and divided into four groups: specific to K99 antigen (group 1), cross-reactive with K99 and F41 antigens (group 2), specific to K88 antigen (group 3) and specific to 987P and K88 antigens (group 4), respectively.

These MAbs demonstrated the distinct pili (K) antigens on the surface of ETEC by IFA, and could be utilized as diagnostic reagent for the identification of ETEC.

When eighty-seven field isolates of *E. coli* from piglet with diarrhea were tested by group 3 MAb, forty-two strains (48.3%) has K88 pilus antigen suggesting that this is one of the major pilus antigen of ETEC present in field.

緒 論

近來 우리나라의 養豚業이 多頭飼育으로 企業化됨에 따라 仔豚의 消化器疾病중 大腸菌性泄瀉症(白痢)의 發生에 의한 經濟的 被害가 크게 問題視되고 있으며 특

히 抗生物質 등의 藥劑濫用에 의한 藥劑耐性菌株의 增加는 심각한 問題를 提起하고 있다.

大腸菌(*Escherichia coli*)은 溫血動物의 腸內에는 勿論 動物棲息環境에 널리 分布하고 있는 常在菌群으로서 數많은 serotype가 알려져 있으나 그 중 數10種에

本 課題는 1985年度 遺傳工學學術協議會의 研究費로 遂行하였음.

이르는 serotype는 사람이나 家畜에 病原性を 發揮하는 것으로 밝혀지고 있다(Wilson과 Francis, 1986; Cahill 등, 1978; Nagy 등, 1977; Renault 등, 1977). 특히 仔豚을 비롯한 다른 幼畜의 腸管感染症의 原因이 되는 主要 *E. coli*는 enteropathogenic, enteroinvasive 및 enterotoxigenic *E. coli*로 大別되나, 이 중에서 enterotoxigenic type의 *E. coli*가 仔豚의 설사증(白痢)에 가장 重要한 原因體로 알려져 있다(Altmann, 1982; Smith와 Linggood, 1971). 이와 같은 enterotoxigenic *E. coli*株(ETEC)들은 adhesin(pili 또는 fimbriae)과 enterotoxin(腸毒素)의 두 가지 種의 virulence因자를 產生하는 것이다(Grimes 등, 1986; Harnett와 Gyles, 1985; Sekizaki 등, 1984; Gaastra와 de Graaf, 1982). 즉, ETEC는 1次的으로 adhesin인 pilus抗原이나 colonization factor抗原을 지니고 있으므로 腸粘膜上皮細胞에 定着하여 集落化하고 發育增殖하면서 뒤이어 易熱性(LT) 및 耐熱性(ST)의 enterotoxin을 合成分泌함으로써 腸粘膜上皮細胞에 있는 adenylate 또는 guanylate cyclase를 活性化시켜 cyclic AMP 또는 GMP를 蓄積하게 되므로서 結果的으로 腸粘膜上皮細胞內에서는 Na 및 Cl과 같은 電解質物質의 吸收가 抑制되는 反面 腸粘膜細胞內에 있는 그와 같은 電解質은 腸管內에 계속 分泌하게 된다. 따라서 腸管內의 內容物에는 이들 電解質物質의 濃도가 점점 높아지게 되므로서 滲透現象에 의하여 組織內의 水分이 계속 腸管內로 流出되면서 組織內의 電解質의 濃도와 腸管內의 그것의 濃도가 平衡을 維持하려 하기 때문에 臨床的으로는 甚한 설사와 脫水症狀를 나타나게 되는 것이다. 이와 같이 설사증에 있어서의 第1段階로서는 ETEC의 adhesin의 1種인 pilus抗原이 重要한 役割을 담당하며, 第2段階로서 enterotoxin이 直接 作用한다는 것이 밝혀지고 있다(Wilson과 Francis, 1986; Morris 등, 1982; Moon 등, 1979; Aning과 Isaacson, 1978; Burgess 등, 1978; Parry와 Porter, 1978; Sellwood 등, 1975).

ETEC에 속하는 大部分의 菌株들은 K88, K99, 987P 또는 F41 등의 pili(K)抗原 중 한 가지 이상을 지니고 있다는 것이 많은 研究者들에 의해서 밝혀졌다(Wilson과 Francis, 1986; Morris 등, 1982; Symth 등, 1981; Ørskov 등, 1969).

尹用德 등(1984)은 9種의 serotype가 國內의 仔豚으로부터 分離된 病原性 *E. coli*의 約 80%를 占有하고 있음을 報告하였다. 따라서 어떤 細菌種의 特定抗原에 對應하는 monoclonal抗體(MAb)의 生産은 그 病原菌들과 宿主間의 免疫學的 相互關係를 糾明하는데 있어 매우 有用할 뿐만 아니라 關與菌株의 識別 및 診斷에 利

用될 수 있으며, 窮極的으로 MAb의 大量生産이 可能할 경우에는 當該感染症의 豫防 및 治療目的으로도 使用될 수 있을 것으로 期待된다(Sherman 등, 1983).

本 實驗에서는 仔豚白痢의 主要原因菌인 ETEC들의 pili抗原(설사증의 第1段階 因子)을 分離精製하고 그것들에 對應하는 MAb를 生産함으로써 感染仔豚으로부터 分離된 *E. coli*의 識別診斷法을 開發하고 또한 仔豚의 설사증에 關與하는 다른 病原體와의 鑑別診斷의 有用性도 檢討하고자 하였다.

材料 및 方法

Mouse 및 cell line: B lymph球(脾臟細胞)를 提供하여 細胞融合에 利用할 수 있게 하는 試驗群을 作成하기 위해서 家畜衛生研究所에서 飼育한 Balb/C mouse를 近親繁殖시켰으며, 細胞融合의 partner細胞로 使用할 myeloma細胞株로서는 NS-1由來의 SP2/0細胞株를, 牛胎兒血清(FBS) 10%, L-glutamine 및 抗生物質을 添加한 DMEM(Dulbecco's minimal essential medium) 또는 RPMI-1640 medium에 培養하고(5% CO₂, 37°C), 그 特性을 調査하여 使用하였다.

抗原精製 및 免疫操作: ETEC의 pili抗原(K88, K99, 987P 및 F41) 陽性株(家畜衛生研究所 保存)인 0141:K35ab:K88ab, 08:K85:K99, 09:K103:987P 및 0101:K99:F41 strain을 Minca medium(Altmann 등, 1982)에 約 20時間 培養(37°C)한 후 物理的方法으로 pili(fimbriae)를 分離 精製하였다. 즉, 培養한 供試菌株를 遠沈洗滌後 60°C에서 20分間 熱處理하고 搥盪한 다음 다시 遠沈하여 그 上清液 중의 pili成分을 50%(NH₄)₂SO₄로 沈澱시켜 收獲하였다(Altmann 등, 1982). 이 材料를 다시 15% SDS-PAGE로 分折하여 良質의 抗原을 選拔하였다. 精製된 各抗原의 力價는 馬赤血球를 使用한 MRAH(mannose resistant hemagglutination)價로 測定하였다.

精製한 各 pili抗原 30μg씩을 Freund's complete adjuvant(FCA)와 混合乳劑化하여 各各 10首의 Balb/C mouse에 4週間隔으로 2회에 걸쳐 腹腔內 注射하였고 다시 4週 後에는 各 pili抗原(30μg)만을 追加接種하는 方法으로 免疫操作하였으며, 最終免疫操作 後 4日만에 mouse脾臟細胞를 融合試驗에 提供하였다. 抗原의 刺戟能을 事前에 探知하기 위해서 接種한 mouse의 血中抗體質를 平板凝集反應方法으로 測定하였다.

細胞融合, hybridoma細胞의 作成 및 monoclonal抗體의 生産: 最終免疫操作 4日後에 mouse의 脾臟을 無菌的으로 摘出하여 lymph球를 分離시키고, 이것들을 增殖相이 旺盛한 SP2/0 myeloma細胞와 混合한 다음

PEG 4000(50%)으로 既存方法을 若干 補正하여 融合시킨 후 事前에 feeder細胞(mouse腹腔內 macrophage)를 添加한 96-well microplate에 分注(50 μ l/well)하여 CO₂(5%) incubator(37°C)에서 培養하였다. 다음날 이들 각 培養 microplate의 각 well에 同量의 HAT(hypoxanthine-aminopterin-thymidine) 選擇培養液을 添加한 다음 4日間隔으로 半量씩의 新鮮 HAT培養液을 交替하면서 10~14日間 hybridoma細胞의 發育를 觀察하였다.

한편, 電氣의 細胞融合裝置인 Zimmermann Cell Fusion System(GCA社)을 利用하여 電氣衝擊으로 細胞를 融合, hybridoma細胞를 作成하는 實驗도 試圖하였다(Lo 등, 1984; Zimmermann과 Greyson, 1983; Vi-enken과 Zimmermann, 1982; Zimmermann과 Vien-ken, 1982; Zimmermann, 1982).

Hybridoma細胞가 發育된 well의 上清液 중에 ETEC의 pili(K)抗原에 對應하는 特異抗體의 存在가 確認된 well의 hybridoma細胞를 limiting dilution法으로 cloning 또는 再cloning하여 培養함으로써 monoclonal性, 즉 monoclonal抗體(MAb)를 生産하는 hybridoma細胞株를 作成하였다.

IFA法에 의한 MAb의 檢索用 抗原 slide glass는 事前에 該當細菌浮游液(10⁸/ml)을 適當量 coating한 것을 50°C에서 乾燥시켜 使用하였다. 또한 生産된 MAb의 力價를 測定하기 위해서는 精製된 ETEC株의 特定菌株를 1% glucose添加 TSB培地에 18~20時間 培養한 후 0.5% formalin으로 不活化시킨 것을 抗原으로 使用하였다. 즉, 小試驗管에 MAb(0.2ml)를 1:10부터 倍數 稀釋하고 抗原을 0.2ml씩 加하여 混合한 후 37°C water bath에서 2時間 反應시킨 다음 다시 5°C에서 1晝夜 放置한 후 그 凝集程度에 따라 力價를 判定하였다. 또한 *Salmonella*菌 및 기타 腸內細菌과의 交叉反應 如否도 確認하였다.

特定 MAb를 生産하는 각 hybridoma clone 중 一部는 收集하여 凍結保存하고 다른 一部는 Balb/C mouse의 腹腔內에 注射(10⁷細胞)함으로써 多量의 高力價 MAb를 生産토록 하였다.

野外可檢材料의 檢索診斷: 生産된 特定 MAb를 使用하여 IFA法으로 仔豚의 실사可檢材料(白痢)로부터 分離된 *E. coli*株 또는 可檢物 中の 細菌이 ETEC인가의 如否를 檢索하고 그 發生頻度 및 K抗原別의 分布狀況을 檢討하였다.

結 果

Balb/C mouse群 및 myeloma細胞株의 特性調査:

近親繁殖된 B lymph球提供用 Balb/C mouse들은 SP 2/0 myeloma細胞株를 腹腔內注射한(10⁷細胞)後 2~4週만에 腹水癌을 誘發함으로써 本實驗에 利用될 수 있는 것으로 判定되었다.

SP2/0 myeloma細胞株는 DMEM 또는 RPMI-1640 medium으로 培養하였을 때 旺盛하게 增殖하였으며 그 倍加時間은 12~14時間이었다. 最大增殖濃度는 1~2×10⁶/ml로 優秀하였으며, HT(hypoxanthine-thymidine) 培養液에서는 正常的으로 發育하였으나 HAT選擇 培養液에서는 3日 以內에 完全死滅함으로써 HGPRT陰性임이 確實하였고, 融合에 適合함을 나타내었다. 또한 SP 2/0細胞株는 IFA法으로 檢定하였던 바 immunoglobulin (Ig)을 生産하는 mutant가 전혀 混入되어 있지 않음이 確認되었다.

抗原精製 및 免疫操作: 免疫操作에 利用된 ETEC의 K99 및 F41 精製抗原의 MRHA力價는 平均 512倍 및 64倍였으며, 平均 分子量은 18,500 및 29,000 dalton 이었다(Fig. 1). 한편, K88 및 987P 精製抗原의 MRHA力價는 平均 128~256倍였다.

免疫program에 따라 免疫操作한 Balb/C mouse의 血中抗體力價를 平板凝集反應法으로 測定한 結果 個體別로 關係없이 그 凝集力이 모두 1,000倍 以上이었다.

Hybridoma細胞의 作成 및 monoclonal抗體(MAb)의 生産: 總 12回의 細胞融合試驗을 거쳐 14株의 hybridoma clone중에서 4種類의 特定MAb를 生産시켰다(Table 1). Hybridoma細胞 group 1 및 3의 MAb는 각각 K99 및 K88抗原에 特異的으로 反應하였으나 group 2의 MAb는 K99抗原에는 强하게 反應하였으며 F41抗

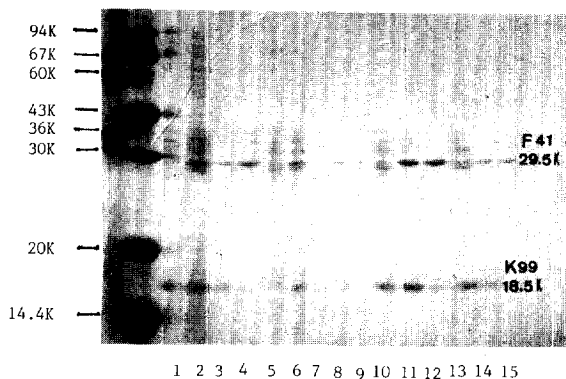


Fig. 1. Crude and purified K99 and F41 antigens of *E. coli* by SDS-PAGE

Lane 1, 2, 5, 6, 10 and 13: Crude antigens

Lane 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14 and 15: Purified antigens

Table 1. Production of Monoclonal Antibodies Against Pili (K) Antigens of ETEC

Hybridomas	Specific to K antigens				No. of clones
	K99	F41	987P	K88	
Group 1	+	-	-	-	3
Group 2	+	+	-	-	4
Group 3	-	-	-	+	2
Group 4	-	-	+	+	5

Table 2. Distribution of K88 Antigen in ETEC Isolated from Piglets with Diarrhea

OK serotypes	No. of tested	No. of K88+strain
08:K87	8	3
04:K87	14	5
0138:K81	22	13
0141:K85ab	32	15
0147:K89	9	5
0149:K91	2	1
Total (%)	87	42(48.3%)

原에도 中等度로 反應하였다. 또한 group 4의 MAb도 K88과 987P抗原에 交叉反應하였다(Fig. 2~5). 이들 4種類의 MAb는 모두 *Salmonella* 등 기타 腸內細菌種과의 交叉反應이 없었으며 따라서 特異성이 認定되었다.

한편, 生産된 monoclonal hybridoma細胞($5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$)를 Balb/C mouse의 腹腔內에 注射하여 生産한 腹水MAb에 대한 IFA力價는 모두 $10^5 \sim 10^6$ 의 高力價였으며, 이들 MAb를 野外分離 大腸菌株의 調査에 利用하였다.

野外可檢材料로부터의 ETEC K抗原의 檢索: 仔豚白痢의 可檢材料로부터 分離된 *E. coli* 87株를 對象으로 K88抗原의 分布狀況을 IFA法으로 檢索한 結果 42株가 全分離菌株의 48.3%를 차지하였다. 이와 같은 樣相은 國內에서의 仔豚의 실사증에 關與하는 *E. coli*株의 約 切半이 K88抗原을 지닌 ETEC임을 나타내는 것으로 判定되었다(Table 2, Figs. 6~7).

本實驗에서 얻어진 MAb들은 ETEC의 K抗原들에 特異적으로 反應하여 菌體表面에서 定型的인 螢光을 明確하게 觀察할 수 있었으며, 그 判定에 있어서도 2時間 程度로 短縮될 수 있었으므로 더욱 簡便迅速한 診斷方法으로 利用될 수 있을 것으로 믿어졌다. 또한 이들 MAb는 菌體의 K抗原을 分離精製하는데 利用可能할 것으로도 推定되었다.

考 察

特定抗原에 對應하는 抗體를 生産하는 B lymph球에 無限의 增殖性을 지니게 하여 Monoclonal抗體(MAb)를 얻고자 하는 着想(Collins 등, 1974)을 거쳐 永續培養이 可能한 myeloma細胞와 永續培養이 不可能한 B lymph球를 融合시켜 MAb를 生産하면서 增殖을 繼續하는 B細胞hybridoma가 처음 만들어진 것은 1975年이다(Kohler와 Milstein, 1975). 이와 같이 細胞融合으로 hybridoma細胞를 作成하여 MAb를 生産하는 데에는 다음의 3가지 利點이 있다. (1) 化學的 및 生物學的으로 單一性格을 갖는 한가지 抗原決定基에 대한 抗體가 얻어진다. (2) 同一化學構造의 抗體를 永續으로 供給할 수 있다. (3) 非精製抗原을 使用하여도 特異的 抗體를 얻을 수 있다.

이들 利點을 살려 細菌 및 virus의 抗原, 細胞表面抗原(組織適合性抗原, 分化抗原, 腫瘍關聯抗原) 등의 複雜한 抗原 그리고 各種 蛋白質, 核酸, 糖質, 脂質 등의 抗原에 대한 MAb가 作成되어 각가지 細胞의 分割, 發生過程의 各々 相異한 時期의 同定, 細菌 및 virus의 正確한 分離 및 感染의 有無, 各々 細胞表面分子의 同定과 精製, interferon을 비롯한 많은 蛋白質의 affinity chromatography에 의한 精製, 各々 抗原의 抗原決定基의 構造解析 등 生物學的의 모든 分野에서 利用되고 있다.

이 方法에서는 普通強度의 抗原性을 갖는 抗原으로 MAb를 얻는 것은 그리 困難하지 않다. 例컨대, 緬羊赤血球(SRBC)로 mouse를 免疫, 感作시킨 경우 SRBC는 抗原성이 強하여 脾細胞 100個當 1個가 抗體生産細胞로 될 수 있다는 것이다(Kennett, 1981; Hammerling 등, 1981). 한편, 脾細胞의 融合效率는 PEG를 쓰는 既存方法으로 約 2×10^5 脾細胞當 1個이므로 10^6 脾細胞(普通 調製法으로 約 1個 mouse脾臟에 該當하는 細胞數), 當 5個의 hybridoma細胞를 얻을 수 있을 것이다. 그러나 實際로는 20~30個의 hybridoma를 얻을 수 있다. 이와 같이 豫想價를 上回하는 效率로 hybridoma가 얻어지는 機構는 아직 正確히 解明되어 있지 못하나 抗體生産細胞의 分化過程의 어느 時期에 融合되기 쉬우며 그리고 融合後 生存되기 쉽기 때문으로 생각되고 있다. 各々 抗原으로 比較的 容易하게 再現성이 좋게 hybridoma가 얻어진다는 것은 어려우나 脾細胞의 融合效率로 보아 抗原성이 弱한 抗原의 경우에는 相當한 困難이 있을 것으로 豫測된다.

Myeloma細胞로서 現在까지 集中的으로 使用되어 온 것은 Balb/C mouse의 形質細胞種인 MOPC-21由來의

培養細胞株(X63, NS-1, SP2/0)를 母株로 使用하여 免疫感作된 Balb/C mouse의 脾臟細胞를 融合시켜 雜種細胞腫인 hybridoma를 얻는 system이다(Kohler와 Milstein, 1976). 다른 mouse形質細胞腫 由來의 株, 다른 動物腫의 形質細胞腫 由來의 株 등을 母株로 使用한 試圖가 많았으나 hybridoma出現頻度, 安定性, 抗體生産量 등의 어느 것인가에 問題가 있어 오히려 他 動物腫의 感作脾細胞를 MOPC-2/由來의 母株와 融合시키는 쪽이 나은 것 같이 보인다. 이와 같은 點과 얼어진 hybridoma細胞를 腹腔內에 接種하여 大量의 MAb를 얻기 위하여 免疫操作에 使用하는 動物로서 Balb/C mouse가 便利하다는 點이 많은 경우에 있어 이 system을 使用하는 理由일 것이며, 반드시 모든 抗原에 對해서 理想的인 system인가 아닌가는 別個問題인 것이다.

MAb는 하나의 isotype抗體이며 普通的 抗體는 많은 isotype抗體의 混合物인 것이다. 現在의 抗原抗體反應의 檢出系는 普通의 方法으로 얻어진 抗體를 基礎로 하여 開發되어 온 것이므로 이들 檢出法이 모두 使用될 수 없는 MAb도 있다. IgG₁의 isotype를 갖는 抗體는 補體結合反應에 利用될 수 없는 것이다. 또한 MAb는 單一의 抗原決定基와만 反應하기 때문에 特殊한 抗原을 除外하고는 沈降反應이 일어나지 않는다. 더욱이 生物活性의 不活化를 指標로 하는 中和反應에 關與하는 抗體는 극히 一部이므로 이 反應을 직접 hybridoma의 選擇에 利用하게 되면 많은 抗體生産 clone을 놓쳐 버릴 수도 있다. 이와 같은 것들이 MAb利用의 不利點들이며, MAb를 取扱할 경우 이 抗體는 單一의 抗原決定基에 對한 單一의 isotype로 이루어진 것이라는 것을 恒常 考慮해야 할 것이다. 따라서 單一의 抗原決定基에 對應하는 抗體라는, 只今까지는 얻을 수 없었던 probe가 利用되게 되므로서 抗原決定基의 構造가 細密히 解析된 것도 事實이다.

本 實驗에서 細胞融合에 使用된 Balb/C mouse由來 myeloma細胞株인 SP2/0는 그 增殖性이 훌륭하였으며, HGPRT陰性, Ig非分泌性으로서 融合partner로서 適合한 것으로 判定되었다.

細胞融合方法에 있어서는 각 研究者의 方法에 따라 多少間 差異가 있으므로 여러가지 條件을 比較檢討하여 훌륭한 融合條件이 充足되도록 標準化할 必要가 있다. 따라서 本 實驗에서는 免疫操作 program, 脾臟 lymph球의 採取 및 洗滌, 融合劑 및 融合後의 處理, feeder細胞의 處理, 選擇 培養液 및 培養條件, MAb生産如否를 screening하거나 願하는 MAb를 生産하는 hybridoma를 cloning하는 것 등 MAb生産을 위한 適合한 條件들을 比較하여 標準化하는데 注力하였다.

한편, PEG融合劑에 의한 細胞融合은 hybridoma細胞의 生成率이 낮아 상당히 不利하다고 볼 수 있다. 願하는 特異性을 지닌 抗體를 分泌하는 hybridoma細胞를 多量 生産하기 위해서 細胞의 電氣融合技法(Lo 등, 1984; Vienken과 Zimmermann, 1982; Zimmermann, 1982; Zimmermann 및 Vienken, 1982)이 試圖되었으나 充分한 fusion 및 post-fusion medium(GCA社 特許出願 中)의 購入 등의 問題로 只今까지 PEG에 의한 融合보다도 優秀한 融合效率를 얻지 못하였다. 그러나 電氣的 細胞融合으로 hybridoma細胞를 作成하거나 電氣pulse로 細胞膜을 穿孔하여 DNA 등 核酸을 注入하는 transfection技法은 將次 많은 脚光을 받게 될 것이므로 이 融合方法은 繼續 試圖될 것이다.

緒論에서도 言及한 바와 같이 pili(fimbriae) 및 enterotoxin의 產生은 幼畜에서 *E. coli*의 virulence에 寄與한다(Harnett와 Gyles, 1985; Lund, 1982; Morris 등, 1982; Moon 등, 1980; Renault 등, 1977). 돼지의 腸疾患材料에서 分離된 *E. coli*는 4種의 pili抗原 중 어느 것인가를 지닌다는 것이다(Wilson과 Francis, 1986). 즉, K88(Rutter, 1975), K99(De Graaf 등, 1980; Moon 등, 1977), 987P(Moon 등, 1980; Moon 등, 1977) 및 F41(Morris 등, 1982)이 그것들이다. 國內의 仔豚으로부터 分離된 病原性 *E. coli*의 serotype는 08, 010, 045, 064, 0119, 0138, 0139, 0141 및 0147의 9 type이 約 80%를 차지하고 있다고 報告되었다(尹用德 등, 1984). 따라서 仔豚白痢에 關與하는 ETEC의 起病性의 第1 段階因子인 上記 pili抗原들에 對한 MAb의 生産은 可檢材料로부터 關與菌株을 識別診斷하는데 매우 有用하게 利用될 수 있을 것이며, MAb의 大量生産이 可能할 경우에는 仔豚 및 기타 幼畜의 설사증의 豫防 및 治療目的으로도 使用될 것으로 期待된다.

本 實驗에서 著者들은 12회의 融合試驗을 통하여 14株의 hybridoma clone을 作成하였고 4種類의 MAb를 生産하였다. 이들 4 group의 MAb 중 group 1 및 3의 MAb는 각각 K99 및 K88抗原에 特異적으로 反應한 反面 group 2는 K99와 F41抗原에, group 4는 K88과 987P抗原에 交叉反應하였으나, *Salmonella*菌種 등 기타 腸內細菌株와의 交叉反應은 없었으므로 ETEC의 pili抗原에는 모두 特異성이 있는 MAb로 認定되었다. Group 2 및 4의 MAb들과 反應하는 ETEC는 두가지 pili抗原을 함께 지니는 것으로 推定되었다.

한편, 이들 抗原에 對해서 生産된 Balb/C mouse 腹水 MAb는 모두 10⁵~10⁶의 高力價(IFA)의 것으로서 野外分離 *E. coli*株의 pili抗原의 檢定에 使用할 수 있었다. 즉, 仔豚白痢의 可檢材料로부터 分離된 *E. coli*

87株에 대해서 1次的으로 K88抗原의 分布狀態를 IFA 法으로 檢定한 結果 42株가 陽性反應을 나타냄으로써 國內에서의 仔豚白痢에 關與하는 *E. coli*株의 約 切半이 K88抗原을 지닌 ETEC임을 推定케 하였다. 따라서 ETEC의 pili抗原에 對應하는 MAb의 生産은 仔豚 및 기타 幼畜의 大腸菌性설사증의 迅速正確한 診斷에 有用하게 利用될 수 있을 것이며 또한 이들 MAb의 大量生産이 可能할 경우 높은 治療效果가 期待되며 *E. coli*의 subunit(component) vaccine開發의 基礎資料를 얻는 데도 도움이 될 것으로 믿어진다.

結 論

1. 既存細胞 融合方法으로 ETEC의 pili(K)抗原에 對應하는 MAb를 分泌하는 14株의 hybridoma clone을 作成하였다.

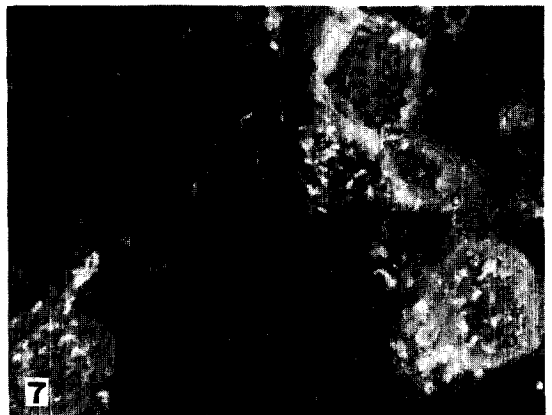
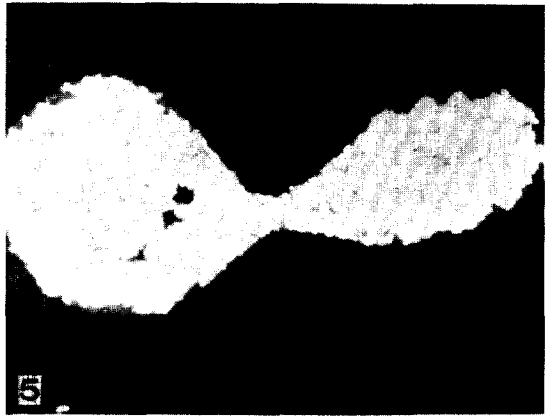
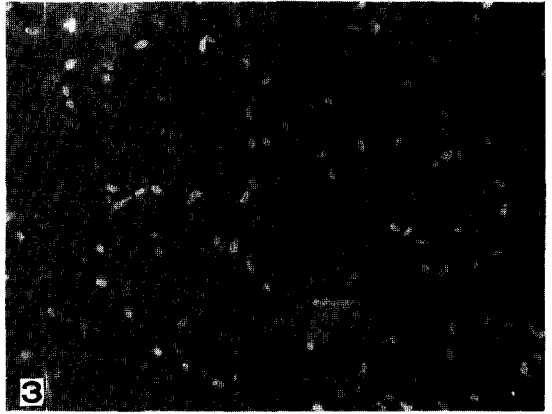
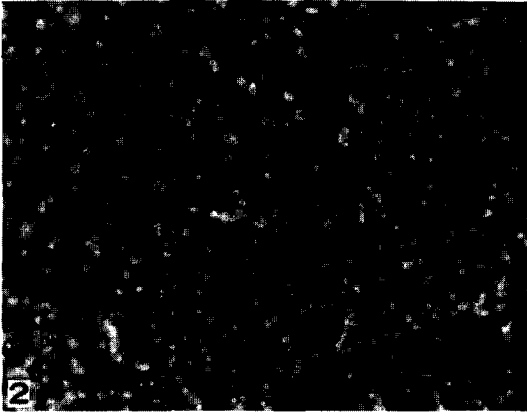
2. 이들 MAb는 IFA法으로 그 特性이 科明되었으며 4 group으로 區分되었다. 즉, K99抗原에 特異的인 것 (group 1), K99와 F41抗原에 交叉反應을 이루는 것 (group 2), K88抗原에 特異的인 것 (group 3), 그리고 K88과 987P抗原에 交叉反應을 이루는 것 (group 4)이다.

3. 이들 MAb는 IFA法에 의해서 ETEC의 表面에 存在하는 K抗原들을 明確히 밝혀 주므로서 ETEC의 檢定을 위한 診斷劑로서 利用될 수 있을 것으로 期待되었다.

4. 설사증의 仔豚으로부터 分離된 *E. coli* 87株를 group 3(K88)의 MAb로 檢索한 結果 이들 중 42株 (48.3%)가 K88 pili抗原이었음을 보여 준 것은, 이것이 野外에 散在하는 ETEC의 主要 K抗原임을 推定케 하였다.

Legends for Figures

- Fig. 2.** Indirect immunofluorescent staining with group 1 monoclonal antibody(MAb) specific to K99 antigen of enterotoxigenic *E. coli*(ETEC).
- Fig. 3.** Indirect immunofluorescent staining with group 2 MAb specific to K99 and F41 antigens of ETEC.
- Fig. 4.** Indirect immunofluorescent staining with group 3 MAb specific to K88 antigen of ETEC.
- Fig. 5.** Indirect immunofluorescent staining with group 4 MAb specific to 987P and K88 antigens of ETEC.
- Fig. 6 and 7.** Indirect immunofluorescent staining of field samples from piglets with diarrhea with group 3 MAb specific to K88 antigen of ETEC.



参 考 文 献

- Aning, K.G. and Isaacson, R.E. (1978) *In vitro* adhesion of piliated *Escherichia coli* to small intestinal villous epithelial cells from rabbits and the identification of a soluble 987P pilus receptor-containing fraction. *Infect. Immun.*, 36:1192~1198.
- Altmann, K., Pyliotis, N.A. and Mukkur, T.K.S. (1982) A new method for the extraction and purification of K99 pili from enterotoxigenic *Escherichia coli* and their characterization. *Biochem. J.*, 201:505~513.
- Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A. and Newsome, P.M. (1978) Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.*, 21:526~531.
- Cahill, E.E. and Glantz, P.J. (1978) Demonstration of the K88ac and K88ab antigens of *Escherichia coli* by means of immunoelectrophoresis and immunodiffusion. *Infect. Immun.*, 20:811~815.
- Collins, J.J., Black, P.H., Strosber, A.D., Haber, E. and Bloch, K.J. (1974) Transformation by simian virus 40 of spleen cells from a hyperimmune rabbit—Evidence for synthesis of immunoglobulin by transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71:260~263.
- Gaastra, W. and de Graaf, F.D. (1982) Host-specific fimbrial adhesions of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.*, 46:129~161.
- de Graaf, F.K., Klemm, P. and Gaastra, W. (1980) Purification, characterization and partial covalent structure of *Escherichia coli* adhesive antigen K99. *Infect. Immun.*, 33:877~883.
- Grimes, S.D., Waxler, G.L. and Newman, J.P. (1986) Adhesion of K99-positive *Escherichia coli* to intestinal brush borders of pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 47:385~388.
- Hammerling, G.J., Hammerling, U. and Kearney, J.F. (1981) Appendix: Production of antibody-producing hybridomas in the rodent systems, in "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas, Perspective and Technical Advances". Elsevier/North-Holland, New York, pp.563~587.
- Harnett, N.M. and Gyles, C.L. (1985) Linkage of genes for heat-stable enterotoxin, drug resistance, K99 antigen, and colicin in bovine and porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.*, 46:428~433.
- Kennett, R.H. (1981) Hybridomas: A new dimension in biological analyses. *In vitro.*, 17:1036~1050.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495~497.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.*, 6:511~519.
- Lo, M.M.S., Tsong, T.Y., Conrad, M.K., Strittmatter, S.M., Hester, L.D. and Snyder, S.H. (1984) Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. *Nature* 310:792~794.
- Lund, A. (1982) Serological, enterotoxin producing and biochemical properties of *E. coli* isolated from piglets with neonatal diarrhea in Norway. *Acta Vet. Scand.* 23:29~87.
- Moon, H.W., Isaacson, R.E. and Pohlentz, J. (1979) Mechanisms of association of enteropathogenic *Escherichia coli* with intestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* 32:119~127.
- Moon, H.W., Kohler, E.M., Schneider, R.A. and Whipp, S.C. (1980) Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.* 27:222~230.
- Moon, H.W., Nagy, B., Isaacson, R.E. and Orskov, I. (1977) Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99+enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Infect. Immun.* 15:614~620.
- Morris, J.A., Thorns, C., Scott, A.C., Sojka,

- W.J. and Wells, G.A. (1982) Adhesion *in vitro* and *in vivo* associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99 mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. *Infect. Immun.* 36:1146~1153.
- Morris, J.A., Sojka, W.J. and Wells, G.A. (1982) K99 and 987P adhesions on *Escherichia coli* enteropathogenic for piglets. *Vet. Res.* 111: 165~166.
- Nagy, B., Moon, H.W. and Isaacson, R.E. (1977) Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Selection of piliated forms *in vivo*, adhesion of piliated forms to epithelial cells *in vitro* and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *E. coli*. *Infect. Immun.* 16:344~352.
- Orskov, I., Orskov, F., Wittig, W. and Sweeney, E.J. (1969) A new *E. coli* serotype 0149:K91 (B), K88ac(L):H10 isolated from diseased swine. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 75:491~498.
- Parry, S.H. and Porter, P. (1978) Immunological aspects of cell membrane adhesion demonstrated by porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Immunology* 34:41~49.
- Renault, L., Mathew, D. and LeBourhis, E. (1977) Detecting enteropathogenic *Escherichia coli* strains of porcine origin. I. Correlations between O and K antigens and the enterotoxin production in strains isolated from new-born piglet. *Ann. Rech. Vet.* 8:319~325.
- Rutter, R.M. (1975) *Escherichia coli* infections in piglets: Pathogenesis, virulence and vaccination. *Vet. Rec.* 96:171~175.
- Sherman, D.M., Acres, S.D., Sadowski, P.L., Springer, J.A., Bray, B., Raybould, T.J.G. and Muscoplat, C.C. (1983) Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 42: 653~658.
- Sekizaki, T., Terakado, N. and Hashimoto, K. (1984) Cloning and comparison of heat-stable enterotoxin genes from *Escherichia coli* strains of bovine, porcine, and avian origins. *Am. J. Vet. Res.*, 45:314~318.
- Sellwood, R., Gibbons, R.A., Jones, G.W. and Rutter, J.M. (1975) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. *J. Med. Microbiol.*, 8:405~411.
- Smith, H.W. and Linggood, M.A. (1971) Observation of the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J. Med. Microbiol.*, 4:467~486.
- Symth, C.J., Olsson, E., Moncalvo, C., Soderlind, O., Orskov, F. and Orskov, I. (1981) K99 antigen-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets with diarrhea in Sweden. *J. Clin. Microbiol.*, 13:252~257.
- Vienken, J. and Zimmermann, U. (1982) Electric field-induced fusion: Electrohydraulic procedure for production of heterokaryon cells in high yield. *FEBS Letters.*, 137:11~13.
- Wilson, R.A. and Francis, D.H. (1986) Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *Am. J. Vet. Res.*, 47:213~217.
- Zimmermann, U. (1982) Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biocchim. Biophys. Acta.*, 694:227~277.
- Zimmermann, U. and Greyson, J. (1983) Electric field-induced cell fusion. *BioTechniques*, 1: 118~122.
- Zimmermann, U. and Vienken, J. (1982) Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J. Membr. Biol.*, 67:165~182.
- 尹用德, 金鍾萬, 金東成 (1984) 仔豚의 大腸菌性 설사 증에 關한 研究. 1. 설사 仔豚으로부터 分離된 病原性 大腸菌의 血清型 分布 調査. 農試報告(畜産·家衛), 26:66~71.