

누드마우스에 이식된 인체대장암에서 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 이용한 방사면역치료법 : 치료성적에 관계되는 인자분석

삼성의료원 핵의학과

김병태 · 이경한 · 김상은 · 최 용 · 지대운

서울대학교병원 핵의학과

정준기 · 이명철 · 고창순

서울대학교 의과대학 생화학교실

정 흥 근

=Abstract=

Radioimmunotherapy of Nude Mice Bearing Human Colon Carcinoma with I-131 Labeled Anti-carcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody

Byung-Tae Kim, M.D., Kyung Han Lee, M.D., Sang Eun Kim, M.D.
Yong Choi, Ph.D. and Dae Yoon Chi, Ph.D.

Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Seoul, Korea

June-Key Chung, M.D., Myung Chul Lee, M.D. and Chang-Soon Koh, M.D.
Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Hong Keun Chung, M.D.

Department of Biochemistry, Seoul National University Medical College, Seoul, Korea

This study was designed to evaluate the effects of various factors on the therapeutic effect of the I-131 labeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody(anti-CEA antibody). Tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) was used to compare in vitro cytotoxicity of 3 Korean colon cancer cell lines (SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5) for selection of proper 2 cell lines in this study. The changes of the size of tumor which was xenografted to nude mice (balb/c nu/nu) were compared in 4 groups (group treated I-131 labeled anti-CEA antibody, group treated with non-radiolabeled anti-CEA antibody, group treated with I-131 labeled anti-human chorionic gonadotropin monoclonal antibody (anti-hCG antibody) as nonspecific antibody, and group injected with normal saline as a control). Immunohistochemical staining and in vivo autoradiography were performed after excision of the xenografted tumor. The results were as below mentioned.

*이 논문은 1993년도 서울대학교 병원 수경연구비(04-93-026)의 지원에 의한 것임.

The in vitro cytotoxic effect of I-131 labeled anti-CEA antibody is most prominent in SNU-C5 cell line between 3 cancer cell lines.

The changes of xenografted tumor size in both SNU-C4 and SNU-C5 cell tumors at the thirteenth day after injection of the antibodies were smallest in the group treated with I-131 labeled anti-CEA antibody (SNU-C4/SNU-C5; 324/342%) comparing with other groups, group treated with anti-CEA antibody (622/660%), group treated with I-131 anti-hCG antibody (538/546%), and control group(1030/724%)($p < 0.02$ in SNU-C4 and $p < 0.1$ in SNU-C5 at the 13th day after injection of antibodies).

On the thirteenth day after injection of the antibodies nude mice were sacrificed to count the radiouptake of tumor and to check the changes of tumor size. Correlations between radiouptake and change of tumor size were calculated in each groups and significant negative correlation was only obtained in the group treated with I-131 anti-CEA antibody ($p < 0.05$).

There were no correlations between antigenic expression of carcinoembryonic antigen and distribution of anti-CEA antibody in both SNU-C4 and SNU-C5 cell tumors on immunoperoxidase staining.

On in vivo autoradiography the distributions of anti-CEA antibody were heterogeneous and the intensities of binding were various in SNU-C4 and SNU-C5 cell tumors.

It is concluded that I-131 labeled tumor-specific monoclonal antibody, anti-CEA antibody is effective in suppressing the xenografted tumor growth and the effect is influenced by sensitivity of tumor cell itself to the radiolabeled antibody and other local factors instead of specificity of antibody.

Key Words : Radioimmunotherapy, Colon cancer, I-131 labeled anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody

서 론

단일클론항체에 독소(toxin), 항암제, 방사성동위원소 등을 결합시켜 암을 치료하려는 연구는 일찍부터 시도되었으나¹⁾, 항암제는 항체에 표지하기가 어렵고, 표지된 약물의 크기가 종양조직을 뚫고 들어가기에는 너무 크다는 점 등의 문제가 있어 가능성이 없음이 일찍이 밝혀졌다²⁾. 독소를 부착시키는 연구도 진행되고 있으나 종양조직내에 있는 모든 암세포에서 종양항원이 발현하는 것이 아니고 많은 경우에서 불균일(heterogeneous)하게 발현되며 또한 항체가 결합하는 암세포만을 파괴시킬 수 있기 때문에 종양항원이 없는 암세포에는 효과가 없으며, 종양관련항원이 정상세포에도 일부 존재할 수 있기 때문에 정상세포도 파괴되는 부작용이 있다³⁾.

그러나 방사성동위원소는 단일클론항체에 표지하기 쉽고, 치료용 방사선인 베타선의 투과력이 수mm이기 때문에, 방사성동위원소표지 단일클론항체는 항원이

불균일하게 발현되어 있는 종양조직에서도 그 주위 암세포까지 파괴시킨다는 장점을 가지고 있어 가장 적절한 항암치료제로서의 가능성을 가지고 있다^{4,5)}. 다만 문제점은 치료효과를 극대화하기 위하여 항체의 면역반응성(immunoreactivity)이 손상되지 않는 범위내에서 가능한 한 많은 양의 방사성동위원소를 항체에 표지시켜야 되는 것이다. 이를 위하여 세포결합분석(cell binding assay)을 통하여 면역반응성을 측정하면서 적절한 방사성동위원소표지량을 확립하고, 방사성동위원소표지 단일클론항체가 생체내에서 분리되지 않고 안정된 상태로 있는지, 종양세포막에 결합된 방사성동위원소표지 항체가 얼마동안 결합되어 있는지 등에 관한 기초자료가 있어야 인체적용에 관한 평가를 내릴 수 있다. 종양세포에 흡수되는 방사선량은 이러한 여러 인자가 관여하여 나타나는 중간결과의 하나로써 방사면역치료법의 효과를 예측하는데 있어서 가장 중요한 요인이다. 그밖에도 생체에 주입된 단일클론항체가 얼마나 종양내에 집적되는지와 종양내의 태아성 암항원의 농도 및 분포가 중요한 인자가 된다. 이러한

여러 인자들에 의해서 방사성동위원소표지 단일클론항체에 의한 방사면역치료의 결과가 변화될 수가 있다.

동물실험에서 종양에 피폭되는 방사선의 양, 다시 말하면 종양세포에 흡수되는 선량은 이러한 여러 인자가 관여하여 나타나는 중간결과의 하나이다. 일반적으로 피폭량과 비례해서 종양과피효과가 나타나게 되나 종양의 종류의 따라서는 방사선에 대한 예민도가 틀리기 때문에 각 종양항체모델에서 피폭량과 치료효과와의 관계를 규명할 필요가 있다.

이에 저자들은 인체대장암에서 수립한 세포주를 이용하여 이러한 방사면역치료효과에 영향을 미치는 종양의 조사선량, 항체의 면역학적 특성, 종양조직내 항원의 분포를 측정하고 이들을 생체외와 누드마우스실험을 통하여 얻은 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체의 종양과피효과와 비교분석하였다.

대상 및 방법

1. 대상

실험에 사용된 대장암세포는 서울대학교 의과대학 암연구소에서 배양되고 있는 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5이며 항태아성암항원 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마와 인유모성 성선자극호르몬항체를 분비하는 하이브리도마는 서울대학교 의과대학 생화학교실에서 분양받았다.

Balb/c마우스는 서울대학교 동물사육실에서 구하였고 누드마우스(nu/nu balb/c)는 일본의 CLEA사에서 구하였으며 생후 6주된 수컷을 사용하였다.

2. 방법

RPMI-1640에서 하이브리도마를 배양하여 세포를 얻은 다음 phosphate buffered saline(PBS)에서 10^7 세포/ml의 농도로 만들고, 마우스 한마리당 1ml씩 복강내에 주입하여 항태아성암항원 단일클론항체를 생산하였다. 이 항체에 chloramine-T법을 이용하여 방사성옥소(I-131)를 표지하였다.

방사성옥소로 표지된 CEA92항체와 hCG항체의 CEA에 대한 면역반응성을 알아보기 위하여 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5세포주의 항태아성암항원 단일클론항체에 관한 특이적 결합(specific binding)을 다음공식을 이용하여 구한 다음,

$$\text{Specific binding(B\%)} = \frac{\text{Total binding} - \text{NSB}}{\text{Total count}} \times 100$$

B%를 각 시험관의 세포농도에 관하여 plot하여 세포와 결합하는 최대의 B%(면역반응성)를 산출하였다⁶⁾.

생체의 암세포과피효과는 clonogenic assay의 변형인 tetrazolium⁻-based calorimetric assay를 이용하여, SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5 등 3개의 세포주를 RPMI-1640에서 지수적 성장기에 들어가도록 조건을 맞추고 96 well plate의 well에 $7 \times 10^4 / 180 \mu\text{l}$ 씩 넣어 1일간 배양한 다음 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 농도별로 20 μl 씩 투여하고 2시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시켰다. 세포만 있는 대조군과, 같은 농도의 항태아성암항원 단일클론항체만 투여한 군, I-131표지 비특이항체를 투여한 군을 설정하고 같은 조건으로 반응시켰다. 배양액을 제거한 후 새로운 RPMI-1640을 200 μl 씩 가하여 4일간 배양하고, 0.1 mg(2mg/ml의 50 μl)의 MTT(3-C4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 가하고 4시간동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 450g로 5분간 원심분리시키고 상층액을 버리고 150 μl 의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각 well에 넣고 10분간 잘 흔든 다음 540nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 각 군간의 차이를 관찰하였다.

항원항체반응을 친화상수에 대하여 정돈하면,

$$\frac{B}{F} = K[\text{Abi}] - K_B \text{이 되며, 이 결합형태 유리형의 비(B/F)}$$

를 측정하여

결합한 총항원의 양(B)에 대하여 그림으로 나타내면 Scatchard plot이 된다. 이 직선식에서 친화상수 K를 구한 다음 plot의 x절편을 구하여 세포당 결합항체의 수를 계산하였다.

위의 실험에서 비교적 좋은 효과를 보였던 SNU-C4, SNU-C5세포를 10^7 개/0.2ml씩 누드마우스의 어깨에 각각 피하주사하고 2-4주간 사육하여 종피가 0.5-1.0cm가 되게 키웠다. 이때 I-131의 갑상선내 섭취를 막기 위하여 I-131항체투여 2일전 부터 음식과 물에 Lugol용액을 섞어 항체투여 20일후까지 계속 섭취하게 하였다. I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 1mCi(500 μg)씩 정맥주사한 군 20마리, 동위원소가 표지되지 않은 같은 양(500 μg)의 항태아성암항원 단일클론항체만을 투여한 군 20마리, I-131표지 비특

이항체 1mCi(500 μ g)를 투여한 군 10마리, 생리식염수를 투여한 대조군 10마리로 나누어 실험하고 추적관찰하여 7일 간격으로 종괴의 크기를 측정하고 이를 항체투여전의 크기에 대한 백분율로 나타내었다.

I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체주사후 6시간, 1일, 2일, 5일, 13일에 1마리씩 희생시켜 종양을 적출한 다음 종양의 방사선량과 무게를 측정하여 %ID/g을 구하고 이를 시간에 따라 plot한 다음 그 곡선의 아래면적을 trapezoidal integration법으로 구하였다. 종양의 조사선량은 이 면적을 다음 식에 대입하여 계산하였다⁷⁾.

$$\text{조사량(rad)} = \text{곡선하면적} (\mu\text{Ci} \cdot \text{h/g}) \times 0.4165 (\text{g} \cdot \text{rad} / \mu\text{Ci} \cdot \text{h})$$

0.4165 : MIRD에서 결정된 I-131의 베타선, X-선, 아우거전자에 대한 상수

누드마우스의 종양조직을 5-8 μ m의 두께로 자르고 슬라이드에 입힌 다음 acetone에서 10분간 고정시키고 alcohol 200ml과 30% hydrogen peroxide 3ml가 혼합된 용액에서 30분간 슬라이드를 반응시켜 endogenous peroxidase의 작용을 차단시킨 다음에 PBS에 3분씩 3번 세척하고 5-20 μ g의 항태아성암항원 단일클론항체를 조직위에 놓고 2시간 반응시켰다. 다시 PBS에 세척후 biotin이 부착된 말의 마우스항체를 가하고 30분간 반응시키고 다시 PBS로 세척후 avidin peroxidase용액을 가하고 30분간 반응시켰다. PBS세척후 DAB를 조직위에 가하고 10-15분간 염색시킨 후 eosin으로 counterstaining하였다. 또한 종양조직 내에서 주입된 항태아성암항원 단일클론항체의 분포를 알기 위하여 항체를 반응시키는 대신 바로 biotin이 부착된 말의 마우스항체를 가하여 염색하여 면역조직화학적 소견을 얻었다. 또 누드마우스의 종양을 적출하여 cryocut을 사용하여 -20 $^{\circ}$ C에서 20 μ m의 조직표본을 만들어 슬라이드에 입힌 후에 0.25% glutaraldehyde로 고정시킨 다음 PBS로 세척하고 이들을 Kodak-5B필름에 2일동안 노출시켜 종양내에서의 I-131표지 항체의 분포를 관찰하여 종양의 항원발현과 항체의 분포를 분석하였다.

결과는 repeated measures analysis of variance의 general linear models방법을 이용하여 누드마우스 각 실험군간에 유의한 차이가 있는지 검정하고, 종양성장억제효과와 종양의 방사능섭취와의 상관관계는

선형회귀분석법을 이용하여 분석하였다⁸⁾.

결 과

1) 복수가 생긴 Balb/c마우스에서 한마리당 3-5ml의 복수를 얻었으며 복수 1ml당 2-5mg의 CEA-92 IgG 항체를 얻었다.

2) 항태아성암항원 단일클론항체의 방사성옥소 표지효율은 90%이상이었다.

3) I-131로 표지한 항태아성암항원 단일클론항체의 면역반응성은 약 60%였고(Fig. 1), I-131표지 인용모성 성선자극호르몬항체는 SNU-C4와 SNU-C5세포

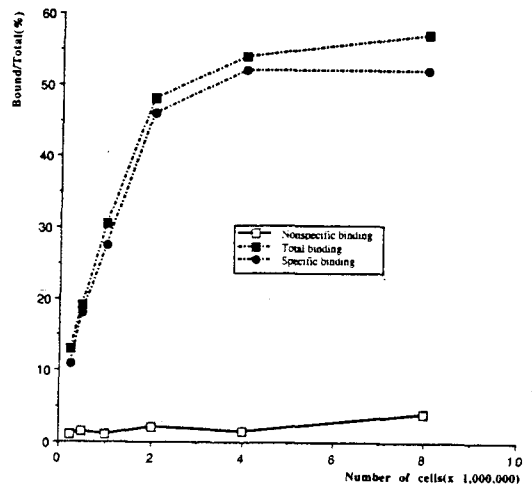


Fig. 1. Saturation curve of percent binding of I-131 CEA92 antibody to SNU-C4 colon cancer cells.

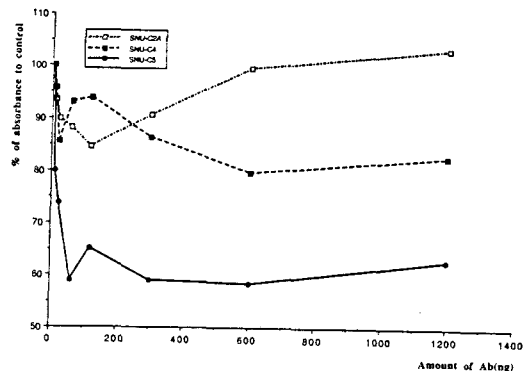


Fig. 2. Comparative effects of I-131 CEA92 antibody on SNU-C2A, SNU-C4, and SNU-C5 cell lines.

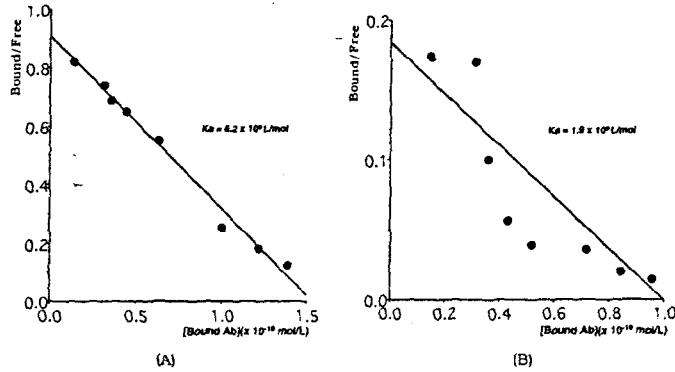


Fig. 3. Scatchard plots of in vitro binding of CEA92 antibody to SNU-C4(A) and SNU-C5(B) colon cancer cells.

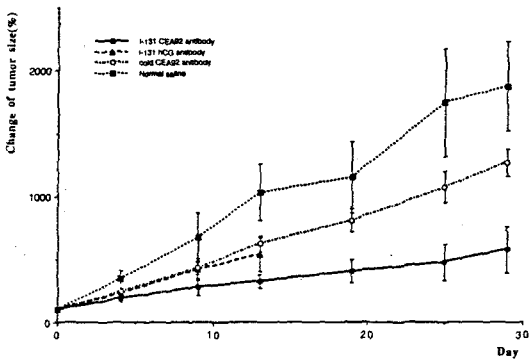


Fig. 4. Effects of I-131 CEA92 antibody, I-131 hCG antibody, CEA92 antibody(cold antibody), normal saline treatment on SNU-C4 tumor growth in vivo.

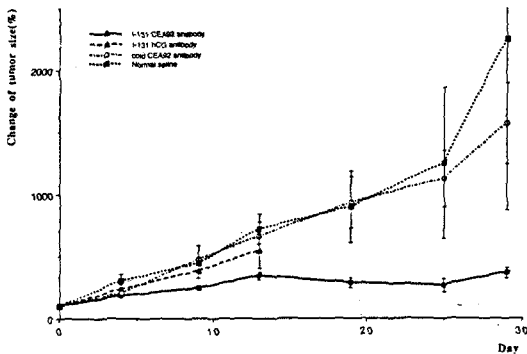


Fig. 5. Effects of I-131 CEA92 antibody, I-131 hCG antibody, CEA92 antibody(cold antibody), normal saline treatment on SNU-C5 tumor growth in vivo.

모두에서 특이한 결함을 보이지 않아 비특이항체로 사용할 수 있었다.

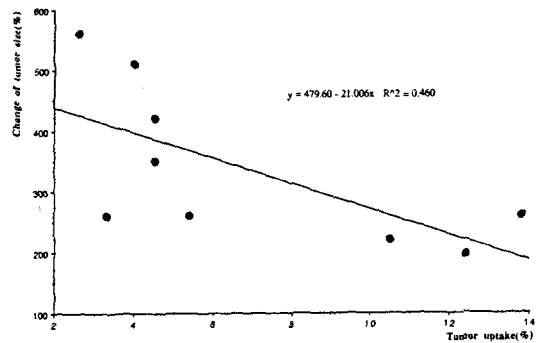


Fig. 6. Relationship between tumor uptake of the I-131 CEA92 antibody and volume change at the 13th day post-therapy in SNU-C5 tumor.

4) MTT법에서의 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체의 암세포파괴효과는 SNU-C4와 SNU-C5 세포주에서의 효과가 SNU-C2A 세포주에서보다 좋았다(Fig. 2).

5) Scatchard plot에서 구한 SNU-C4와 SNU-C5세포의 세포당 항체결합부위의 수는 각각 1.8×10^4 , 1.2×10^4 로서 두개의 세포주간에 큰 차이가 없었다(Fig. 3).

6) 누드마우스에서의 암성장억제효과는 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 투여한 군에서 생리식염수를 투여한 대조군, 방사성옥소가 표지되지 않은 항태아성암항원 단일클론항체를 투여한 군, 비특이항체인 인유모성 성선자극호르몬항체에 I-131을 표지하여 투여한 군에서보다 SNU-C4($p < 0.02$, 항체주입 13일후)(Fig. 4)와 SNU-C5($p < 0.1$, 항체주입 13일후) 세포종양 모두에서 성장속도가 늦었다(Fig. 5). I-131

표지 인용모성 성선자극호르몬항체를 투여한 군에서는 항체주입후 13일째에 전례 모두가 사망하였다.

7) I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 투여

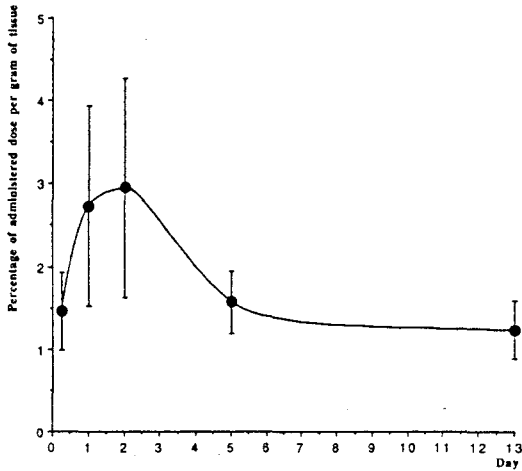


Fig. 7. Calculation of radiation dosimetry in the standard model of biodistribution of I-131 CEA92 antibody in SNU-C4 xenografted tumor.

한 군과 I-131표지 인용모성 성선자극호르몬항체를 투여한 군에서 항체주입후 13일에 종양을 적출하여 주사량에 대한 섭취율과 종양의 크기를 비교한 결과 SNU-C5세포종양에 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 투여한 군에서만 의미있는 역상관관계를 보였다($r^2=0.46$, $p<0.05$)(Fig. 6).

8) 종양의 조사선량은 종양당 평균 약 23.75Gy였다(Fig. 7).

9) 종양내 태아성암항원의 발현과 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체의 결합과는 상관관계가 없었으며(Table 1, 2, Fig. 8, 9), I-131표지 인용모성 성선자극호르몬항체는 거의 결합되지 않아 비특이항체로 사용가능하였다(Fig. 10).

10) 자가방사면역을 이용하여 얻은 종양내 항체분포는 SNU-C4와 SNU-C5세포종양 모두에서 균일하지 않았으며 결합강도도 다양하였다(Table 3, 4, Fig. 11, 12, 13).

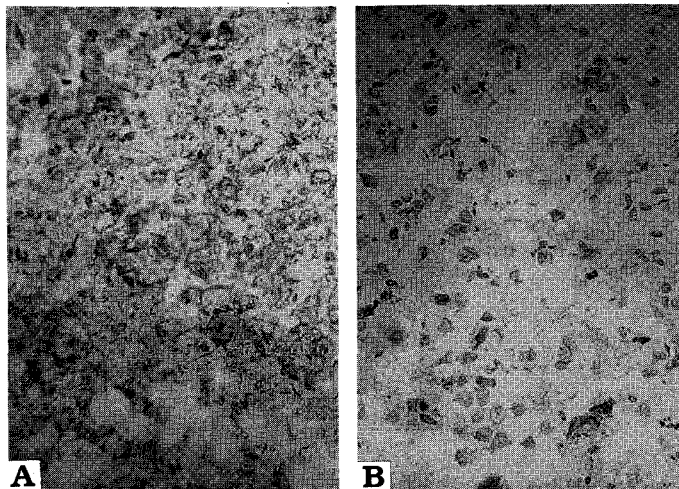


Fig. 8. Findings of immunoperoxidase staining(ABC method) in SNU-C4 xenografted tumor, which was treated with I-131 CEA92 antibody(X-200). A. Avidin-Biotin Complex staining using anti-CEA antibody as primary antibody. This finding means the concentration and distribution of CEA in tumor tissue. B. Avidin-Biotin complex staining without primary antibody. This finding means that small amount of CEA92 antibody bind to tumor despite of relatively large amount of CEA expression.

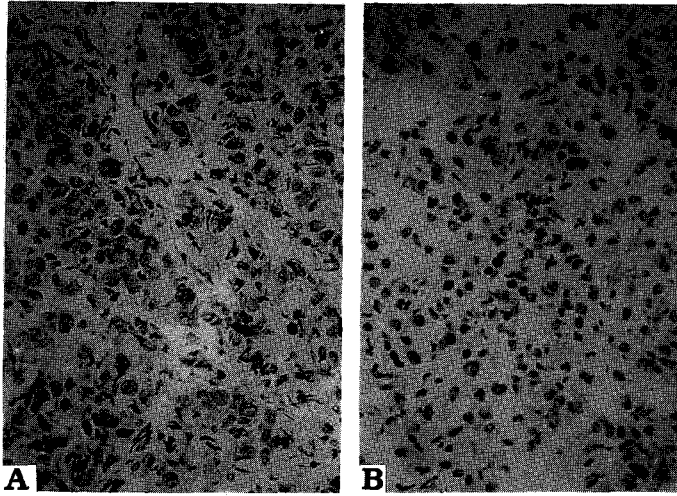


Fig. 9. Findings of immunoperoxidase staining(ABC method) in SNU-C4 xenografted tumor, which was treated with I-131 CEA92 antibody($\times 200$). A. Avidin-Biotin Complex staining using anti-CEA antibody as primary antibody. This finding means the concentration and distribution of CEA in tumor tissue. B. Avidin-Biotin Complex staining Without primary antibody. This finding means that similar amount of CEA92 antibody bind to tumor compared to the concentration of CEA expression.

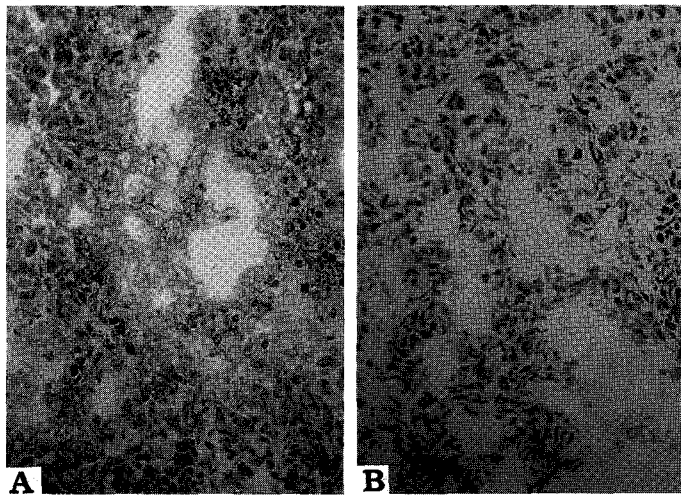


Fig. 10. Findings of immunoperoxidase staining(ABC method) in SNU-C4 xenografted tumor, which was treated with I-131 hCG antibody($\times 200$). A. Avidin-Biotin complex staining using anti-CEA antibody as primary antibody. This finding means the concentration and distribution of CEA in tumor tissue. B. Avidin-Biotin complex staining without primary antibody. This finding means that injected anti-hCG antibody does not bind the CEA in tumor.

- 김병태 외 8인: 누드마우스에 이식된 인체대장암에서 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 이용한 방사면역치료법: 치료성적에 관계되는 인자분석 -

Table 1. Results of Immunoperoxidase Staining (ABC method) Which Show CEA Expression and Distribution of Injected I-131 CEA 92 Antibody in SNU-C4 Xenografted Tumor Tissues

Serial number	CEA expression	Distribution of antibody
1	++	++
2	+++	++
3	++~+++	--±
4	++	±
5	++	±~+

Table 2. Results of Immunoperoxidase Staining (ABC method) Which Show CEA Expression and distribution of Injected I-131 CEA 92 Antibody in SNU-C5 Xenografted Tumor Tissues

Serial number	CEA expression	Distribution of antibody
1	++	+
2	+++	++
3	+	±
4	+~+++	--±
5	++	++
6	++~+++	--±
7	+~+++	+~+++

Table 3. Results of in Vivo Autoradiography of Injected I-131 CEA 92 Antibody in SNU-C4 Xenografted Tumor Tissues

Serial number	Intensity	Homogeneity
1	-	-
2	+++	-
3	+	-
4	++	-
5	+	-
6	+	-
7	++	-

Table 4. Results of in Vivo Autoradiography of Injected I-131 CEA 92 Antibody in SNU-C5 Xenografted Tumor tissues

Serial number	Intensity	Homogeneity
1	-	-
2	++	-
3	++	-
4	+	-
5	+++	-
6	++	-
7	+	-
8	++	-

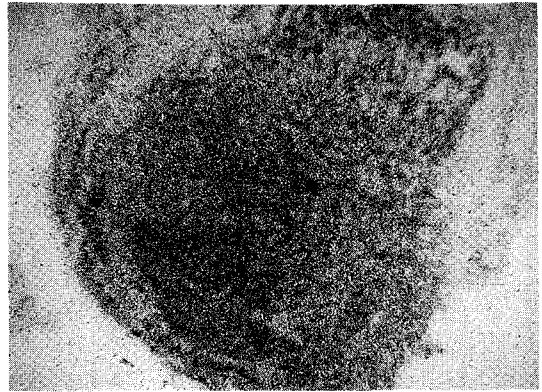


Fig. 11. In vivo autoradiography of SNU-C4 tumor section showing dense uptake of I-131 CEA92 antibody.

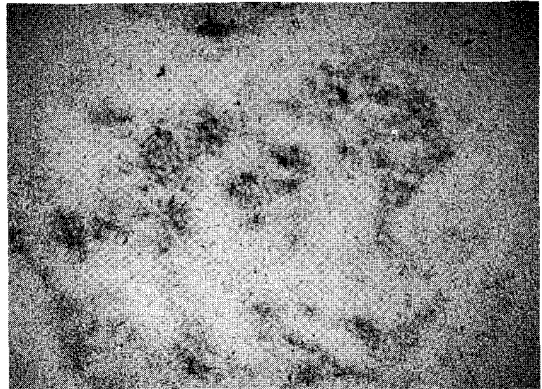


Fig. 12. In vivo autoradiography of SNU-C4 tumor section showing irregular uptake of I-131 CEA92 antibody.

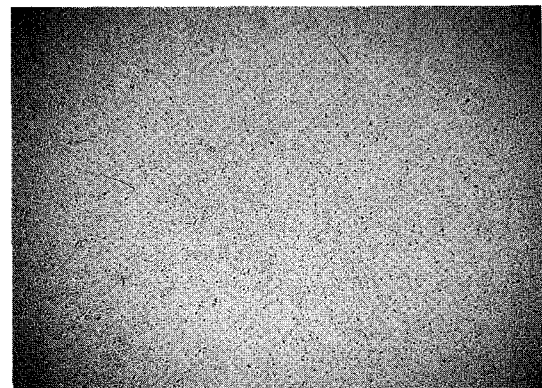


Fig. 13. In vivo autoradiography of SNU-C4 tumor section showing very faint uptake of I-131 hCG antibody.

고 찰

쥐의 육종으로 면역시킨 토끼와 정상토끼에서 얻은 혈청을 방사성옥소로 표지한 후 골원성육종을 가진 쥐에 정맥주사하고 희생시켜 각 부위의 방사능을 측정하고 다른 조직에 비하여 종양부위의 방사능이 더 많았고 특히 대조혈청보다 면역혈청을 사용하였을 때 더욱 높아 면역항체가 특이적으로 종양에 결합한다는 것이 알려진 후 종양의 방사면역검출법은 꾸준히 발전되어 왔다. 한편 항원과 항체가 특이적으로 결합한다는 점에서 종양의 치료에 종양관련항원에 대한 항체를 이용하면 효과가 매우 좋을 것으로 기대되었다. 그러나 실제로는 종양 g당 주사한 항체의 0.0007-0.01%만이 결합한다는 점이 암치료에 있어 커다란 제약점이 되었다⁹⁾. 따라서 이 항체에 방사성동위원소를 표지하면 치료효과가 높은 베타선을 이용할 수 있다는 점에서 각광을 받게 되었으나 그 효과는 보고자에 따라 다양하며 이는 방사성동위원소를 표지한 후에 항체의 면역반응성이 달라질 수도 있고 주입된 항체의 생체내 분포, 종양에서의 혈관투과성 등 많은 인자가 관여하기 때문이다.

본 연구에서 사용한 항태아성암항원 단일클론항체(CEA 92 Ab)는 방사면역측정에서도 측정감도가 높고 태아성암항원의 양과 방사능사이에 좋은 상관관계를 보이며 정상혈청성분과는 교차반응을 일으키지 않는다고 알려져 있고¹⁰⁾, 면역조직화학적 검사에서 정상적으로 태아성암항원을 생산한다고 알려진 위, 직장, 대장, 췌장에서도 종양에는 결합하나 정상조직에는 결합하지 않는 특이적인 단일클론항체임이 증명되었다¹¹⁾.

항체를 표지할 방사성동위원소로서 방사성옥소를 택한 것은, 항체에 대한 방사성옥소표지법은 1949년부터 사용되어온 신뢰도가 매우 높은 방법이며 구하기가 용이하고 가격이 저렴하기 때문이다. 베타선의 에너지가 높은 Y-90 등과 같은 방사성동위원소는 치료효과는 더 좋을 것으로 예측되지만 국내에서는 매우 구하기 어려운 고가의 방사성동위원소이다.

I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체가 실제 종양의 태아성암항원과 결합할 수 있는 능력을 면역반응성이라고 한다. 면역반응성이 100%가 되지 못하는 이유는 항체의 분리, 분질의 생산, 방사성동위원소의 표

지과정에서 항체의 구조적인 변화가 일어나 항원과 결합할 수 있는 능력이 감소하기 때문이다¹²⁾. 면역반응성이 감소한 표지 항체를 사용하면 종양에 결합되는 항체의 양이 그만큼 감소하게 되어 치료효과가 감소하게 되며 종양에 결합되지 않은 표지 항체가 혈액내에 남아 체내를 순환하거나 다른 장기에 비특이적으로 결합하게 되어 불필요한 방사능에 피폭된다. 면역반응성을 측정하는 방법으로는 종양항원을 순수하게 분리하고 항원에 대한 항체의 결합정도를 측정하는 것이 원칙적인 방법이지만 본 실험에서는 종양항원발현세포와 방사성동위원소표지 항체의 결합정도를 측정하는 간편한 방법을 선택하였다. 이 방법으로 Lindmo 등¹³⁾이 제시한 세포수와 결합항체의 double inverse plot을 사용하면 거의 이론치에 접근하는 수치를 얻을 수가 있다. 이 방법으로 구하는 면역반응성은 y축으로 선행의삽을 하여 세포수의 역수가 0일 때 즉 세포수가 이론적으로 무한하다고 할 때의 세포에 결합하는 항체의 결합비율로 계산된다. 이렇게 계산된 면역반응성은 세포수의 농도나 배양기간, 항체의 농도, 반응에 사용된 항원항체의 비 등에 무관하다. 이러한 방사성동위원소 표지 항체의 면역반응성은 보고자마다 달라 10%에서 100%까지 보고되어 있다¹⁴⁾. 본 연구에 사용된 I-131 표지 항태아성암항원 단일클론항체의 면역반응성은 약 60%이었다.

본 연구에서 사용된 인체대장암세포주는 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5 3개의 세포주로서 한국인의 대장암에서 수립한 태아성암항원을 생산하는 세포주이다¹⁵⁾. 이 3개의 세포주중에서 생체의 세포파괴효과검사(MTT법)에서 차이가 있다고 판단된 SNU-C4와 SNU-C5의 2가지 세포주만을 누드마우스에 이종이식하였다. MTT시험에서 3개의 세포주사이에 명확한 차이를 보이지 않고 항체의 농도가 증가됨에 따라 세포파괴효과가 다양하게 나타난 이유는 각 세포주마다 doubling time이 SNU-C2A 82시간, SNU-C4 34시간, SNU-C5 67시간으로 다르기 때문이다¹⁵⁾ well 마다 넣어주는 세포수와 반응시간을 다르게 조정하여야 하는데 본 실험에서는 같은 수의 세포와 동일기간 동안 배양을 하였기 때문일 가능성이 높으며 이는 추후에 다시 확인되어야 할 사항이나 전반적으로 SNU-C5세포주가 SNU-C4세포주보다 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체에 대한 세포파괴효과가 좋았다.

Scatchard plot에서 구한 SNU-C4와 SNU-C5세포의 세포당 항체결합부위의 수는 각각 1.8×10^4 , 1.2×10^4 로서 2개의 세포주간에 차이가 없어 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체의 종양성장억제효과는 항체결합부위의 수가 많고 적음에는 관계가 없다는 것을 추정할 수 있었다.

인체대장암세포주를 이식한 누드마우스에 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체, I-131표지 인유모성 성선자극호르몬항체, 방사성동위원소를 표지하지 않은 항태아성암항원 단일클론항체와 생리식염수를 투여하여 종양이 성장하는 속도를 비교한 결과 역시 SNU-C4세포주를 이식한 누드마우스보다 SNU-C5세포주를 이식한 경우에 종양의 성장속도가 더 느렸다. 또한 감마카메라를 이용하여 생체내의 분포와 방사선량측정을 시도하였으나 누드마우스의 크기가 너무 작고 투여한 마리당 1mCi의 방사선량이 대용량이기 때문에 표적인 종양의 방사능과 배후방사능을 감마카메라의 영상으로는 구분할 수 없어 생체내 분포와 방사선량측정은 원래 목표하였던 바와 같이 시행할 수 없었다. 따라서 생체내에서의 종양에 피폭된 방사능양을 알아보기 위하여 Badger 등⁷⁾이 보고한 trapezoidal integration 방법을 사용하였다. 이 방법은 방사성동위원소 표지 항체가 종양내에 균일하게 분포하며 감마선에 의한 피폭은 종양의 반경이 3cm이하일 경우에는 단지 10%이하만 흡수되므로 누드마우스와 같이 작은 동물에서는 무시할 수 있다는 가정하에 적용할 수 있다. 본 실험에서는 실험도중 죽은 누드마우스에서 종양을 분리하여 그 방사능을 측정하여 종양의 방사선량을 구하였다. 본 실험에서 사용한 마리당 1 mCi의 방사선량은 누드마우스의 평균체중이 20g인 것을 감안하면 60kg의 체중을 가진 사람의 경우에는 3Ci의 대용량이다. 실제로 실험도중 I-131표지 비특이항체를 투여한 군에서 항체주입후 13일째에 전례가 사망한 원인으로 종양에 특이적으로 결합하지 못하여 혈액내에 오랫동안 존재하면서 골수 등 방사선에 결정적으로 예민한 부위의 방사선조사량이 많았기 때문일 가능성을 배제할 수 없다.

누드마우스에 이종이식된 종양을 적출하여 immunoperoxidase로 면역조직화학적 염색을 시행하여 종양의 태아성암항원의 발현도와 투여한 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체의 종양내 분포를 관찰한

결과 SNU-C4세포와 SNU-C5세포사이에는 별로 차이가 없었으며 누드마우스 개체간의 차이가 매우 현저하였다. 또 생체내 자가방사기록법을 이용하여 관찰한 표지 항체의 분포도 누드마우스에 따라 그 강도가 다양하였으며 분포된 양상도 전혀 균일하지 않았으며 SNU-C4세포와 SNU-C5세포사이에도 차이가 없어 생체에서 보였던 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 투여한 군에서 유의하게 종양의 성장이 억제되었던 것은 항체의 특이성보다도 궁 등¹⁶⁾이 발표하였던 종양으로의 혈류, 종양에서의 항체의 투과성 등의 국소적인 인자에 의한 것과 방사선에 의하여 나타난 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에 사용하였던 마리당 1mCi의 용량보다 투여방사선량을 줄이고 베타선의 에너지가 높은 Y-90 등을 사용하면 보다 좋은 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대되며 향후 이에 대한 실험이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

대장암에서 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체의 치료효과를 알아보고 이에 영향을 미칠 수 있는 여러가지 인자들을 분석하고자 이 단일클론항체를 인체대장암세포주와 생체내에서 반응시켜 파괴효과를 측정하고 세포주를 누드마우스에 이종이식한 다음 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 투여하여 그 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

생리식염수를 투여한 대조군, I-131이 표지되지 않은 항태아성암항원 단일클론항체를 투여한 군, I-131표지 비특이항체인 인유모성 성선자극호르몬항체를 투여한 군에서보다 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체를 투여한 경우에 종양의 성장속도가 느려 특이적인 치료효과가 있음을 알 수 있었으며, SNU-C4세포주를 이식한 군보다 SNU-C5세포주를 이식한 군에서의 효과가 더 좋았고 이는 생체의 파괴효과의 결과와 일치하였다. 그러나 면역조직화학적 염색법과 자가방사기록법을 이용하여 종양항원의 발현이나 단일클론항체의 결합경도와 치료효과사이의 상관관계를 알아본 결과 이들사이에는 유의한 상관관계가 없어 치료효과에는 세포자체의 표지 항체에 대한 예민도와 종양으로의 혈류나 혈관투과성 등의 국소적인 요소가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과로서 I-131표지 항태아성암항원 단일클론항체가 인체대장암의 성장을 억제한다는 사실을 알 수 있었으며 향후 임상응용을 위한 기초적인 자료를 확립할 수 있었다.

REFERENCES

- 1) Pirker R, FitzGerald DJP, Willingham MC, et al.: *Enhancement of the activity of immunotoxins made with either ricin a chain or pseudomonas exotoxin in human ovarian and epidermoid carcinoma cell lines. Cancer Res, 1988;48:3919-3923*
- 2) Sharkey RM, Kaltovich FA, Shin LB, et al.: *Radioimmunotherapy of human colonic cancer xenografts with ⁹⁰Y-labeled monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen. Cancer Res, 1988;48:3270-3275*
- 3) Thorpe RE and Ross WC: *The preparation and cytotoxic properties of antibody-toxin conjugates. Immun Rev, 1982;62:119-158*
- 4) Epenetos AA: *Antibody guided irradiation of malignant lesions. Lancet, 1984;30:1441-1443*
- 5) Order SE, Klein JL, Ettinger D, et al.: *Use of isotopic immunoglobulin in therapy. Cancer Res, 1980;40:3001-3007*
- 6) Larson SM, Carrasquillo JA, Korhn KA, et al.: *Localization of ¹³¹I-labeled p97-specific Fab fragments in human melanoma as a basis for radiotherapy. J Clin Invest, 1983;72:2101-2114*
- 7) Badger CC, Krohn KA, Peterson AV, et al.: *Experimental radiotherapy of murine lymphoma with ¹³¹I-labeled anti-Thy 1.1 monoclonal antibody. Cancer Res, 1985;45:1536-1544*
- 8) 안윤옥: *분산분석. 실용의학통계론 pp59-63, 서울. 서울대학교출판부, 1990*
- 9) Goldenberg DM: *Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy: Am J Med 1993;94:297-312*
- 10) Chung HK, Lee JH, Kim SR, et al.: *Radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen employing monoclonal antibodies. Korean J Biochem, 1989;21:21-26*
- 11) 신성해, 문대혁, 이명혜, 이동수, 정준기, 이명철, 고창순: *이종이식된 인체 대장암에서 항 태아성암항원 단세포균항체 IgG 및 F(ab')₂ 분절을 이용한 방사면역 검출법. 대한내과학회지 1991;40:188-197*
- 12) Matzku S, Kirchgessner M, Diploid WG, et al.: *Immunoreactivity of monoclonal anti-melanoma antibodies in relation to the amount of radioactive iodine substituted to the antibody molecule. Eur J Nucl Med 1985;11:260-4*
- 13) Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, et al.: *Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J Immunol Method 1984;72:77-85*
- 14) Perkins AC, Pimm MV: *Immunoscintigraphy, practical aspects and clinical applications. 1st ed, pp17-38, New York, Wiley-Liss, 1991*
- 15) Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, et al.: *Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. Cancer Res, 1987;47:5875-5879*
- 16) 궁성수, 김승택, 이복희, 정준기, 이명철, 고창순, 정홍근: *누드마우스에 이식된 인체대장암 모델에서 주입된 항태아성암항원 단세포균 항체의 종양내 집적에 관련하는 인자. 대한내과학회지 1992;43:577-589*