

# T subset定량을 위한 抗牛赤血球 IgG抗體의 分離·精製(I)

夏潤文\*·李振鏞\*·林壽德\*\*

\* 慶熙大學校 醫科大學 微生物學教室

\*\* 慶熙大學校 醫科大學 皮膚科學教室

=Abstract=

## Purification of Anti-ox Red Blood Cell IgG Antibody for T subset Assay

Youn-Mun Ha, Ph. D.,\* Jean-Yong Lee, D.D.S.,\* Soo-Duk, Lim, M.D.\*\*

Department of Microbiology\*, Department of Dermatology\*\*,  
Kyung Hee University, College of Medicine, Seoul, Korea.

Antisera to ox red blood cell were prepared by intraperitoneal hypermultiple injections without adjuvant in outbred white rabbits. Purified IgG fraction from these rabbits anti-ox red blood cell antiserum for T subset assay was obtained by precipitation with 50% saturated ammonium sulphate followed by DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G-150 gel filtration. These purified IgG fraction was compared with Cappel company standard IgG fraction for T<sub>6</sub> subpopulation assay.

We used home-made IgG fraction and obtained favorable results in T<sub>6</sub> subpopulation assay as Cappel company standard IgG fraction.

### 序 論

사람 末梢淋巴球을 이용하여 牛赤血球抗體에 感作된 牛赤血球와 rosette를 형성하는 淋巴球는 感作된 抗體의 class에 따라서 helper-T細胞와 suppressor-T細胞로 定量·區分되어 있다<sup>1,2,3)</sup>. 즉, helper-T細胞는 IgM의 Fc部分에 대한 receptor를 가지고 있는 반면, suppressor-T細胞는 IgG의 Fc部分에 대한 receptor를 가지고 있는 것이 분명히 밝혀졌다<sup>4,5)</sup>.

綿羊赤血球에 의한 免疫는 補體結合反應의 指示系, 또는 補體實驗의 基礎材料로써 이용되는 경우가 많지만<sup>6)</sup>, 牛赤血球를 免疫하여 얻은 抗體分劃으로 末梢血液內的 T subpopulation을 감별하는 EA rosette法을

最近 많이 利用하고 있다.

著者들은 T subset를 定量하기 위하여 지금까지 미국 Cappel會社製品를 標準으로 사용했으나, 보다 低廉한 가격으로 같은 成績을 얻을 수 있는 토끼免疫血清으로부터 IgG를 精製하였기에 이에 보고하는 바이다.

### 材料 및 方法

#### 1. 材料 및 실험동물

血球保存液(Alsever's液)에 無菌的으로 채취한 牛赤血球와 免疫에는 2.0kg 전후의 건강한 토끼를 실험에 사용하였다.

#### 2. 方法

(1) 牛赤血球抗原에 對한 토끼 免疫血清으로부터



試驗에서 얻은成績은 표 1에 나타난 바와 같이 最高 102,400배에서 最低 3,200배의 抗體價를 보여 주었다.

50%飽和 ammonium sulphate에서 얻은 crude IgG 分劃을 DEAE-cellulose上에서 chromatography한 pattern을 그림 1에서 보여주고 있다.

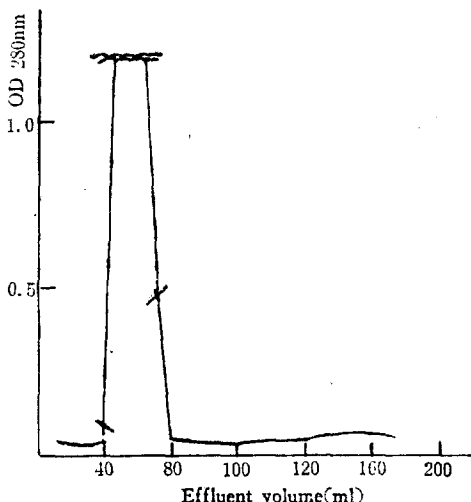


Fig. 1. Chromatography of rabbit anti ox RBC crude IgG fractions (from 25ml of original rabbit antiserum) at room temperature. crude IgG fractions were applied and IgG fraction was eluted with 0.0175M Na-PB pH6.3. Arrows indicate the fraction collected.

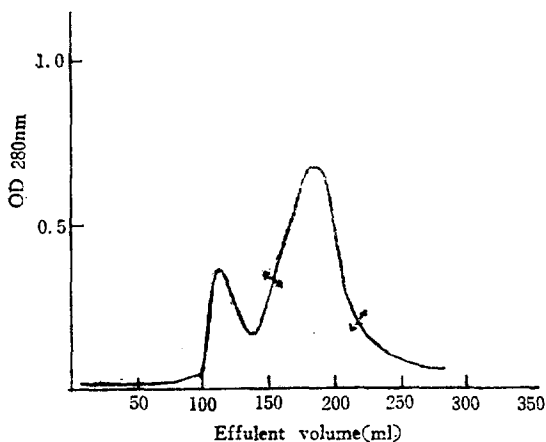


Fig. 2. Purification of IgG fraction by Gel filtration through a Sephadex G-150 column(3 x 72cm) in 0.1N acetic acid at room temperature. Arrows indicate the fraction collected.

DEAE-cellulose chromatography에서 얻은 1次精製 IgG를 다시 Sephadex G-150에서 Gel filtration한 결과를 그림 2에서 보여주고 있다.

그림 3에서 보여주는 것은 最終적으로 純粹分離精製한 rabbit anti ox RBC IgG抗體를 定電壓 5 volts/cm의 電壓이 걸리게 하여 1~3시간동안 泳動한 것을 cappel 會社製品과 比較한 것으로, 陽極쪽으로 移動하는 약간의 albumin이 混在되어 있음을 示唆하고 있다.

Fig. 3. Comparison of two IgG fractions on electrophoresis patterns (5 volts/cm)

R. IgG : Cappel Laboratories Inc. U. S. A. anti-bovine Red Blood Cell

Hm. IgG(home made IgG) : purified rabbit anti-ox RBC IgG fraction

方法論에서 記述한 바와 같이 牛赤血球를 感作시키는 IgG抗體의 蛋白濃度를 固定시키기 위해서 1.0mg/ml, 2.0mg/ml, 그리고 2.5mg/ml의 각각 다른 濃度

Table. 2. Comparison of percentage of EA(IgG)-RFC between Moretta's data and tested in our laboratory at 2.0mg, home made IgG/ml

Exp. No.	EA(IgG)-RFC %	Exp. No.	Moretta data*(Percentage of EA(IgG)-RFC in PBL suspension on cultured for 24 hrs in media)
1	24	1	16
2	22	2	16
3	22	3	20
4	19	4	16
5	19	5	19
6	—	6	18
7	—	7	20
8	—	8	21
9	—	9	19
10	—	10	23
Mean value ±S. D.	21±2		19±2

\* Reference No. 5

에서 EA(IgG)-RFC의 成績을 조사한 結果, 그림 4에서 보는 바와 같이 2.0mg/ml, 2.5mg/ml에선 별다른 변화를 보이지 않고 있었으며, 또한 IgG抗體 2.0 mg/ml의 濃度로 感作된 ox RBC로 얻어진 정상인의 EA(IgG)-RFC의 數値는 Table 2에서 보는 바와 같이 정상 범위에 있을 수 있다.

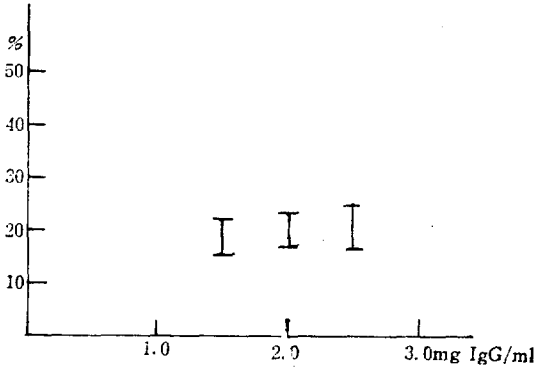


Fig. 4. Percentage of EA(IgG)-RFC ox RBC sensitized at various concentration of anti-ox RBC IgG protein

### 考 察

사람末梢血液內的 淋巴球는 다른 異種動物의 赤血球에 對한 receptor를 가지고 있어 자연적으로 rosette를 形成하고 있으며 그 중에서도 綿羊赤血球에 對한 receptor를 가진 것은 T細胞라는 것이 밝혀졌다<sup>8),9)</sup>.

이들 T細胞는 EA(IgG)-RFC, EA(IgM)-RFC, 그리고 EA(IgA)-RFC를 形成하여 各種 Ig의 Fc部分에 對한 receptor, 즉 T細胞의 獨自의인 surface marker가 檢출되고 있다. 이들 T<sub>6</sub>와 T<sub>M</sub>은 lymphoid organ에 따라 서로 다른 비율로 分布하고 있음이 또한 밝혀졌다. 臟器別로 보면, bone marrow에서 T<sub>M</sub>(55.0±23.8%, mean±S.D)이 가장 높은 비율로 分布되어 있으며, 그의 lymph node, tonsils, 그리고 cord blood 등에도 41%~45% 전후의 T<sub>M</sub>이 分布되어 있다. 한편 T<sub>6</sub>는 spleen에서 가장 높다(45%). 그의 bone marrow, tonsils등의 臟器는 peripheral blood와 비슷한 수준을 보여주고 있다(8.5±4.4~8.7±7.7%, mean±S.D)<sup>10),11),12)</sup>.

mouse를 사용한 實驗 system이 수없이, 그리고 깊이 研究되어 있어, mouse의 T細胞特異抗原의 하나인 Ly抗原중에서 Ly-1抗原만을 가진 T細胞는 helper-T細胞, 또는 amplifier-T細胞이며, killer-T細胞 및 sup-

pressor-T細胞는 Ly-2, Ly-3抗原을 가지고 있는 것으로 알려져 있다<sup>13),14)</sup>.

이와같은 것을 사람에게 그대로 적용시킬 수 있을 것인가 하는 문제는 명확하지 않지만, Ly-2, Ly-3抗原을 가진 細胞가 IgG·Fc receptor를 가지고 있으므로 사람에게 있어서도 E rosette 및 EA(IgG) rosette의 double rosette를 形成하는 細胞는 killer-T細胞, 또는 suppressor-T細胞로 생각하고 있다<sup>15)</sup>. 그리고 지금까지 T<sub>M</sub>과 T<sub>6</sub>의 특성을 감별하는데 대표적인 것으로 T<sub>M</sub>과 T<sub>6</sub> cell의 구별점은 PHA에 대한 blastogenic response, MIF생산, locomotor properties등은 T<sub>M</sub> cell만 가지고 있으며, 반면 natural killer activity, Ia antigen, histamine receptor 등은 T<sub>6</sub> cell에만 存在한다. 그리고 B cell分化에 있어선 T<sub>M</sub> cell이 促進作用을 하고 있으나, T<sub>M</sub> cell은 抑制的인 作用을 하는 것으로 指摘되고 있다.

著者들이 檢討한 한국인중 정상인 末梢血液內的 淋巴球 中에서 IgG·Fc receptor를 가진 T細胞는 全 淋巴球 中에 8~14%정도인 것이 밝혀졌다<sup>3)</sup>.

이와같이 IgG·Fc receptor를 가진 T細胞를 檢출하기 위한 방법이 最近 Moretta<sup>1)</sup>에 의해 개발되어 T-subset定량에 크게 寄與하고 있다. T-subset定량을 위해 절대적으로 필요한 것이 바로 牛赤血球 IgG 및 IgM抗體이다. 著者들은 T-subset定량을 위해 사용되는 牛赤血球 IgG抗體 및 IgM抗體를 국내 보급기 위해, 의 국회사에서만 生産·販賣되고 있으며, 高價인 IgG抗體 및 IgM抗體를 직접 分離·精製하여 Cappel 會社製품을 標準으로 하여 比較檢討한 結果, 약간의 albumin의 混入을 인정할 수 있었으나 T-subset定량에는 영향을 미치지 않았으므로 量産할 수 있을 것으로 기대한다.

### 要 約

사람에 있어서 免疫담당세포의 하나인 T細胞는 몇몇 subpopulation으로 나누어지고 있으며 그중 T<sub>M</sub> 및 T<sub>6</sub>를 同定하는 수단으로 사용되는 牛赤血球抗體중에서 우선 純粹 IgG抗體를 分離·精製하였으며, 이 精製된 IgG抗體는 標準製品과의 比較實驗에서 T<sub>6</sub>細胞의 一致되는 成績을 얻을 수 있었다.

### References

1. Moretta, L., M. Ferrarini, M. L. Durante, and M. C. Mingari: *Expression of a receptor for*

- IgM by human T cells in vitro. Euro. J. Immunol.* 5 : 565. 1975.
2. Gupta, S., and R. A. Good : *Subpopulations of human T lymphocytes. J. Immunol.* 112 : 1214. 1979.
  3. 夏潤文, 金燦洙, 李武炯, 尹在一, 林壽德 : 韓國人正常人的 T lymphocytes와 T subsets에 관한 研究. 대한의학회지, 23 : 703. 1980.
  4. Gupta, S., and R. A. Good : *Subpopulation of human T lymphocytes. V. T lymphocytes with receptors for immunoglobulin M and G in patients with primary immunodeficiency disorders. Clin. Immunol. Immunopathol.* 11 : 292. 1978.
  5. Moretta, L., M. Ferrarini, M. C. Mingari, A. Moretta, and S. R. Webb : *Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. J. Immunol.* 117 : 2171. 1976.
  6. 西岡久壽彌 : 면양적혈구에 대한 항체 만드는 법, 免疫의 生化學. pp. 79. 共立出版社. Tokyo. 1974.
  7. Sever, J. L. : *Application of a microtechnique to viral serological investigations. J. Immunol.* 88 : 320. 1962.
  8. Perrudet-Badoux A., and P. C. Fre : *On the mechanism of rosette formation in human and experimental thyroiditis. Clin. Exp. Immunol.* 5 : 117. 1969.
  9. Brain, P., J. Gordon, and S. Willett : *Rosette formation by peripherallymphocytes. Clin. Exp. Immunol.* 6 : 681. 1970.
  10. Elliot, E. V., and G. Stathopoulos : *Formation of mouse or sheep red blood cell rosettes by lymphocytes from normal and leukemic individuals. Lancet.* 1 : 600. 1974.
  11. Vitetta, E. A. : *Immunoglobulin receptors revisited. Science.* 189 : 964. 1975.
  12. Gupta, S., and R. A. Good : *Human T cell subsets in health and disease. Human lymphocyte differentiation : Its application to cancer. INS ERM symposium No. 8. pp. 367-374. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.* 1978.
  13. Huber, B., H. Cantor, and F. V. Shen : *Independent differentiative pathways of Ly 1 and Ly 23 subclasses of T cells. J. Exp. Med.* 144 : 1128. 1976.
  14. Marchalonis, J. J., R. E. Cone, and J. L. Atwell : *Isolation and characterization of lymphocyte surface immunoglobulins. J. Exp. Med.* 135 : 956. 1972.
  15. Chiao, J. W., J. Fried, Z. A. Arlin, W. B. Feeitag, and R. A. Good : *Delineation of the development of T-lymphocytes from leukemic null lymphocytes upon induction by conditioned medium in "Cellular Immunology" In press.*