

緬羊의 混合淋巴球培養의 Micro-technique 定立에 關한 研究

農村振興廳 家畜衛生研究所

全 茂 炯

= Abstract =

A Microtechnique for Mixed Lymphocyte Culture in the Sheep

Moo Hyung Jun

Institute of Veterinary Research, Anyang, Korea

A microculture technique for the mixed lymphocyte culture test (MLC) in the sheep is described. The optimal incubation periods for the MLC are varied from 4 to 6 days depending on the sources of lymphocytes. It is found that a 2.5:1 stimulator-responder cell ratio and the responder cell concentration of 1×10^6 cells/well produce the highest (^3H)-thymidine incorporation. Moreover cryopreservation of bovine lymphocytes results in satisfactory and reproducible MLC reaction. It is also evident that the MLC reactions of the sheep are under the control of histocompatibility matching between the stimulator cells and the responder cells. Significance of the technique as a tool for study on cell mediated immunity in sheep system, either normal or squamous cell carcinoma-bearing, are discussed.

緒 論

Shork 및 Donnelly¹³⁾가 최초로 서로 다른 個體에서 由來된 白血球나 淋巴球를 混合하여 培養했을 때 細胞相互間에 histocompatibility antigen의 作用에 의하여 芽細胞發生(blastogenesis)을 惹起한다는 事實을 報告한 이때, mixed lymphocyte culture (MLC) 方法은 사람 및 動物의 細胞免疫體係의 研究를 위한 *in vitro* 方法으로써 광범위하게 應用되어 왔다^{1-7,9,12,15,17)}. 특히 최근에 와서는 腫瘍免疫, histocompatibility phenotyping 및 免疫生物學의 機轉을 연구하는데 效果의 으로 利用되고 있다^{1,6)}.

사람에 있어서는 組織移植에서 donor-recipient combination을 說明하기 위해서 MLC 方法이 여러學者들^{3,5,7,9,12)}에 의해 研究되어 實用化 되고 있다. 그러나 家畜에서는 소¹⁶⁾, 말¹¹⁾, 개¹⁰⁾ 및 돼지¹⁵⁾에 대한 MLC 技術이 定立되어 免疫學의 研究에 應用된 바 있으나, 緬羊體係에서는 아직 報告된 바가 없다.

著者는 緬羊의 squamous cell carcinoma에 대한 細胞免疫學의 研究 과정에서 正常緬羊과 腫瘍保有緬羊의 細胞免疫上의 차이점을 究明하기 위한 方法으로써

MLC 技術의 定立과 應用에 대한 必要性을 認知하고 緬羊體係에서의 混合淋巴球培養法을 研究하였다.

本 論文에서는 正常緬羊의 末梢淋巴球를 利用하여 microsystem에서 one way-MLC를 standardization 한 結果를 記述한다.

材料 및 方法

使用動物 및 採血

2 내지 3歲의 健康한 암 면양 11頭(A~K)를 選別하였고, 그중 4頭는 仔羊을 각각 한마리씩 保有하고 있었다. 試驗動物은 모두 同一한 條件下에서 飼養하였다. 末梢血液은 頸靜脈에서 採血하여 헤파린(15iu/ml)을 加한 試驗管에 넣어 實驗室로 운송했다.

사용培地

RPMI 1640 培地(C.S.L., Melbourne)에 페니실린(200 iu/ml), 스트렙토마이신(200 μg /ml), 폴리믹신 B(20 iu/ml), 카나마이신(40 μg /ml) 및 훈저존(2 μg /ml)을 加하여 사용했다. growth medium에는 2 mM HEPES buffer와 12% fetal calf serum을 追加하였다. 淋巴球保存試驗에 사용된 凍結保存培地는 RPMI

培地를 基礎培地로 하여 10% dimethylsulfoxide 및 20% fetal calf serum을 加한 것을 사용했다.

淋巴细胞分離

헤파린 처리된 血液으로부터 淋巴球의 分離는 Ficoll-Paque(Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)을 利用하여 Jun 및 Johnson⁸⁾의 方法에 準하여 遂行했다.

刺戟細胞(Stimulator) 및 反應細胞(Responder)

刺戟細胞는 分離된 淋巴球를 5×10^6 cells/ml의 濃度로 조절하여 mitomycin-c(Sigma chemical Co. U.S.A.)를 加하고 37°C에서 45분간 處理한 후 RPMI 培地로 3回 洗滌한 후 viability를 測定하고 細胞數를 다시 調整한 것을 사용했다. Mitomycin-c는 通常 最終濃度가 30 μ g/ml되지 사용했고, DNA 合成阻止効果는 Phytohaemagglutinin-P (Wellcome Reagent Co. U.K: PHA-P)를 1.25 μ g/well되지 注入하여 測定했다⁸⁾. Stimulator와 responder는 結果에서 記述된 바와 같이 여러 濃度로 調節하여 사용하였다. 結果에서 특별한 言及이 없을 때는 stimulator는 2.5×10^5 cells/100 μ l, responder는 1×10^6 cells/100 μ l의 濃度로 사용하였다.

混合淋巴细胞培養

滅菌된 round bottomed micro-culture plate(Linbro Scientific Co. U.S.A)를 利用하였다. 100 μ l의 stimulator cell과 同量의 responder cell을 isogeneic 혹은 allogeneic 體係로 混入시킨 후 뚜껑을 닫고서 5% CO₂-95% air, 37°C에서 2 내지 7일간 培養하였다.

Labelling, Harvesting 및 Radio-isotope Counting

Jun 및 Johnson⁸⁾의 方法에 따라 遂行했으며, 略述하면 다음과 같다. 培養終了 20 내지 23시간 전에 1 μ Ci의 (³H)-thymidine (Radiochemical Centre, Amersham, U.K.)을 20 μ l의 RPMI 培地에 含有시켜 well에 각각 注入하였다. 培養終了 후 淋巴球는 glass fiber filter (Whatman Inc., U.S.A) 및 Semiautomatic cell harvester (Microbiological Associates, U.S.A)를 利用하여 收獲하였다. 放射線同位元素量은 Liquid Scintillation Spectrophotometer, Model 3320 (Packard Instrument Co., U.S.A)을 利用하여 測定했다.

實驗成績

Mitomycin-C의 DNA 合成阻止效果

正常綿羊 3頭에서 얻은 末梢淋巴球를 여러가지 濃度의 mitomycinC로 37°C에서 45분간 處理한 후 PHA-

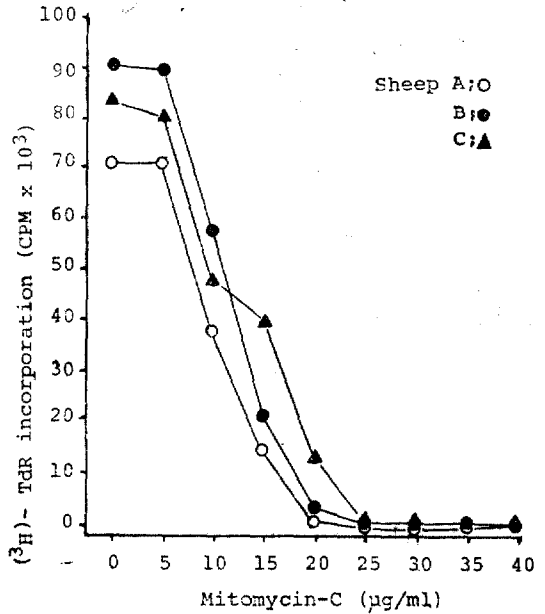


Fig. 1. Effect of different concentrations of mitomycin-c on phytohaemagglutinin response of sheep lymphocytes cultured for 4 days.

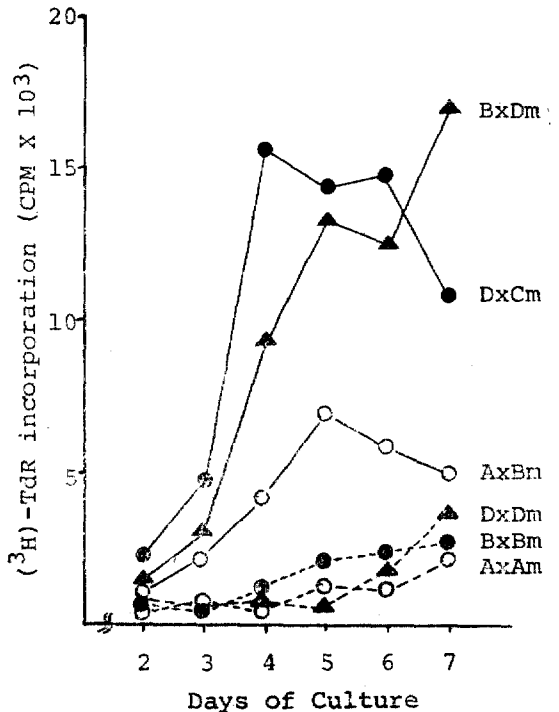


Fig. 2. Effect of culture duration on (³H)-thymidine incorporation by isogeneic and allogeneic mixtures of sheep lymphocytes. Each culture contains 2×10^5 responder cells and 4×10^5 stimulator cells per culture. A×Am, B×Bm and D×Dm are the isogeneic controls for the allogeneic mixtures.

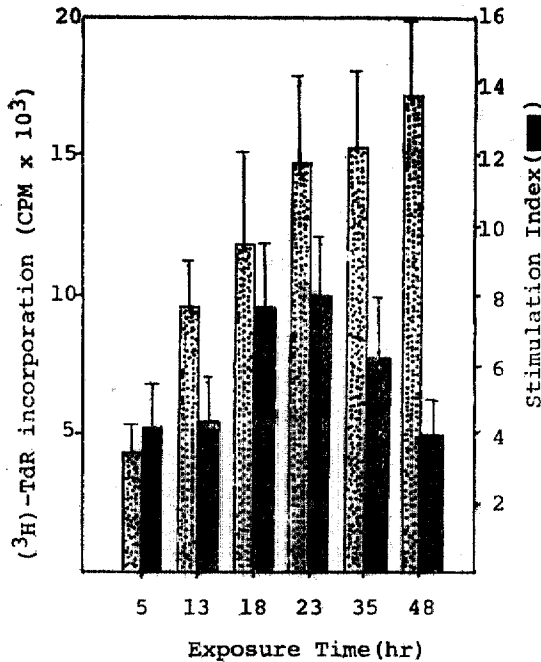


Fig. 3. Effect of exposure time to (^3H) -thymidine on mixed leukocyte culture. Cells were cultured for 5 days. Data represent the mean CPM \pm SD of three sets of mixtures; C \times Am, D \times Cm and E \times Dm. stimulation index = cpm of the culture with stimulator cells \div cpm of responder cell alone.

에 대한 lymphocyte blastogenesis能을 調査한 바 그림 1과 같은 結果를 얻었다. Mitomycin-c 濃度에 따른 DNA 合成阻止效果는 0~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度에서는 阻止效果가 전혀없었고, 10~15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 현저하게 높았으며, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서는 완전한 DNA 合成阻止를 보였다.

混合培養期間의 影響

그림 2에 圖示된 바와 같이 對照로 使用한 isogenic 과 allogeneic 混合培養사이에 (^3H) -thymidine uptake 는 4~6일 사이에 현저한 差異를 나타냈으며, 培養 5일에서 最高의 差異를 보였다. Isogenic 培養에서는 시간이 경과 할수록 (^3H) -thymidine uptake가 높아 가는 傾向이 있었다.

(^3H) -thymidine 作用時間

(^3H) -thymidine uptake는 作用時間이 길수록 높게 나타났으며, 그림 3에서 圖示된 바와 같이 13時間부터 현저히 增加하여 48時間에서 最高로 나타났다. 그러나 對照群의 數置로 나누어서 算出된 stimulation index 에서는 23時間에서 最高로 나타났다.

細胞濃度

反應細胞의 濃度와 刺戟細胞 對 反應細胞 濃度比率 (S/R)이 (^3H) -thymidine uptake에 미치는 영향은 그림 4에서 要約된 바와 같다. 反應細胞의 濃도가 1×10^5 cells/well이고 刺戟細胞와 反應細胞의 比率이 2.5:1~3.0:1일때 가장 높은 (^3H) -thymidine uptake를 나타냈다.

淋巴球冷凍保存의 影響

反應細胞와 刺戟細胞를 liquid nitrogen tank에 2個月間 貯藏한후 混合培養한 結果는 表 1에서와 같다. A \times Em, C \times Fm, D \times Fm에서는 冷凍保存前과 後의 反應에 有意한 差가 없었다 ($P > 0.05$). B \times Em은 冷凍保存後의 反應이 약간 높게 나타났다.

Dam-Offspring 淋巴球混合培養

4雙의 어미와 새끼로부터 얻은 淋巴球를 混合培養한 바 表 2와 같은 結果를 얻었다. 4雙 모두 同一한 dam-offspring 組合에서의 (^3H) -thymidine uptake는 isogenic보다는 높고 allogeneic 組合보다는 낮게 나타났다.

考 察

混合淋巴球培養法(mixed lymphocyte culture)은 여러 哺乳動物에서 免疫生物學의 研究의 試驗管內方法으로 광범위하게 應用되어 왔다^{1-7,9,12,15,17}. 그러나 緬羊體係에서는 이 方法이 定立되어 報告된 바가 없었다. 이에 著者는 緬羊의 Squamous cell carcinoma의 細胞免疫學의 研究에 應用하고자 micro-system을 利用하여 緬羊淋巴球의 混合培養技術을 試驗하여 最適의 反應條件을 究明하기 위해서 本 實驗을 實施하였다.

그림 1, 2, 3 및 4에서 나타낸 結果와 같이 緬羊淋巴球는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 mitomycin-c 處理에 의해 DNA 合成能力을 完全 消失하고, 混合培養反應은 培養開始後 5일에, 그리고 (^3H) -thymidine 注入後 23 時間에 最高에 達했다. Stimulator와 responder의 비율은 2.5:1~3.0:1일때 가장 높게 나타났다. 그러나 이런 最適條件은 細胞培養與件 및 其他 材料에 基因하여 달라질 可能性도 있는 바^{1,3,7,10,17}, 混合培養法을 利用하고자 할 때는 該當 實驗條件에서 最適條件을 究明해야만 한다.

混合培養技術을 實際 應用하고자 할 때는 항시 淋巴球를 長期 保管할 必要性을 갖게 마련인 바^{10,14}, 本研究에서는 最適條件에 定立된 緬羊淋巴球混合培養技術

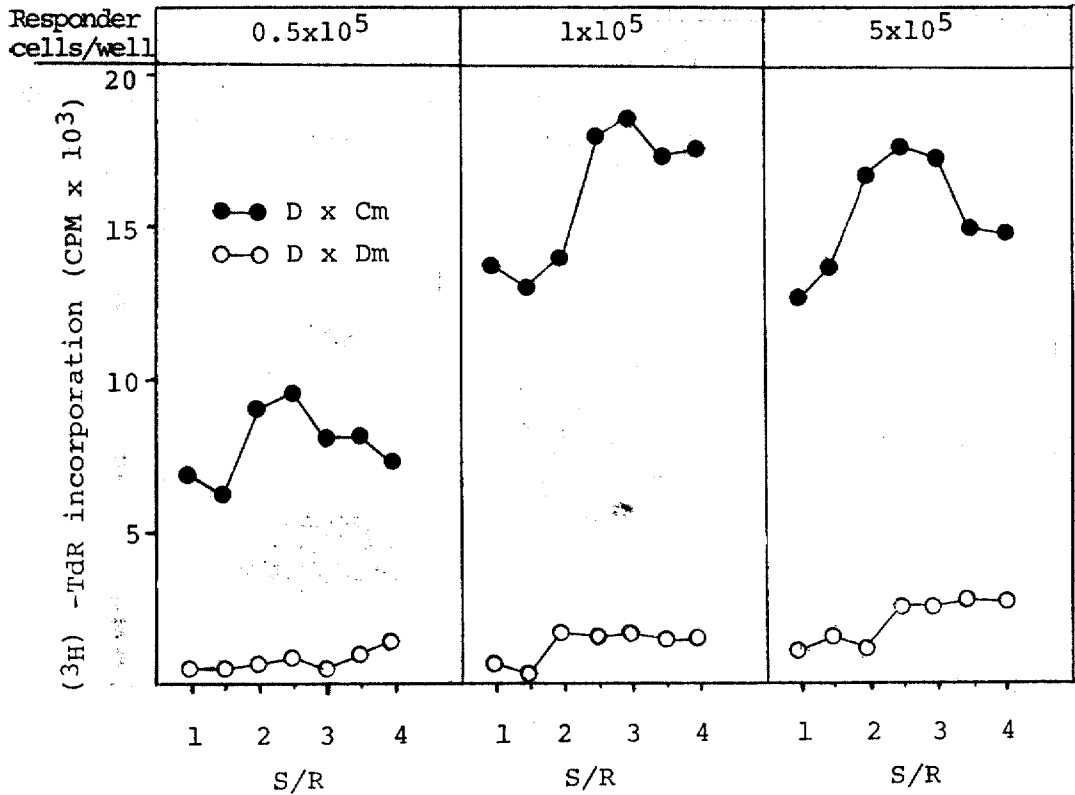


Fig. 4. Effect of responder cell concentrations and stimulator/responder (S/R) cell ratio on the (^3H) thymidine incorporation. Cells were cultured for 5 days.

Table 1. Effect of cryopreservation of sheep leukocytes on mixed leukocyte culture responses

Responder \times Stimulator	Leukocytes	
	Fresh	2 month cryopreserved
A \times Em	12,482 \pm 3,380	10,856 \pm 2,029
B \times Em	8,709 \pm 1,024	11,449 \pm 2,971
C \times Fm	9,781 \pm 896	8,128 \pm 926
D \times Fm	13,568 \pm 3,543	12,067 \pm 3,487

Each culture contains 1×10^5 responder and 2.5×10^5 stimulator cells per culture. Cells were cultivated for 5 days. Data represent the mean cpm of triplicate culture \pm 1 SD.

Table 2. One-way mixed leukocyte culture responses of 3 pairs of dam-offspring

Responder cells (1×10^5 /culture)	Stimulator cells (2.5×10^5 /culture)					
	Em	em	Fm	fm	Gm	gm
E	1,676	5,856	10,362	8,971	14,086	12,496
F	13,536	9,356	1,136	1,748	14,256	8,018
G	11,756	6,956	13,785	12,196	928	2,740
H	8,736	10,856	9,212	9,350	11,351	9,398

Data represent the mean cpm of triplicate culture. Cells were cultured for 5 days. Dam and offspring are symbolized by the paired capital and small letters, respectively.

Table 3. One-way mixed leukocyte culture responses of the lymphocytes from sheep with various stages of bovine squamous cell carcinoma

Stimulator cells	Sources of responder cells and tumour stages				
	Normal (3)	I (5)	II (5)	III (5)	IV (5)
Am	12,494	14,863*	13,809	10,931*	8,376**
Bm	9,731	12,074*	12,732**	9,824	7,841*
Cm	11,635	14,316*	14,086*	12,478	9,126*

Each culture contains 1×10^6 responder and 2.5×10^6 stimulator cells per culture. Numbers in parentheses represent the numbers of sheep in the groups. Data represent the mean cpm of the groups. Significant differences between the data of normal and tumor bearing sheep (Student's t test): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

을 利用하여 液體窒素냉각(-196°C)에 2個月間 保存한 淋巴球에 對한 MLC 反應을 試驗한 바, 冷凍保管에 基因된 MLC 反應의 差異는 認定되지 않았다. 이는 緬羊에서도 他動物^{4,7,10,14}에서 처럼 淋巴球를 長期冷凍 保存하여 MLC에 使用 할수 있음을 示唆한 結果라고 생각된다.

混合淋巴球培養의 作用機轉은 다른 個體에서 由來된 두개의 淋巴球 集團(主로 T-細胞)의 遺傳的 相異點 即 major histocompatibility complex의 差異에 起因하여 刺戟을 주고 받게 된다고 알려져 있다^{2,3,4,5,7,9,11}. 이와 같은 사실이 緬羊體係에서도 일어난지를 試驗한 바 表 2와 같은 結果를 얻었고, 緬羊에서도 다른 哺乳動物에서와 같이 遺傳的 差異에 依해서 混合淋巴球反應이 發現된다는 事實을 確認했다.

本 試驗에서 micro-system에 依해 標準化된 緬羊의 混合淋巴球培養法을 利用하여 正常緬羊과 squamous cell carcinoma를 保有한 緬羊의 MLC 反應을 比較 調査하였다(表 3). 表 3의 結果와 같이 正常緬羊과 腫瘍을 保有한 緬羊 淋巴球의 MLC 反應은 腫瘍의 clinical stage가 I 및 II일때 3種의 stimulator 細胞에 對해 모두 높게 나타났으며, stage IV 腫瘍保有 緬羊의 淋巴球는 正常 淋巴球에 비해 낮은 反應을 보였다. Stimulator 細胞에 MLC 反應值에 多少 變異가 있을지라도, Deegan 등⁵이 사람의 squamous cell carcinoma에서 MLC 反應을 測定하여 비교한 成績과 類似하였다. Deegan의 MLC反應 測定에서도 患者間에 약간의 차이가 있어서 33名の SCC 患者중 27名은 낮은 反應을 보였고, 5名은 높은 反應을 나타냈다.

以上과 같은 試驗成績을 綜合하여 보면 混合淋巴球培養法은 緬羊의 細胞免疫學의 研究를 위해 信憑性있는 方法으로 看做되며, 특히 緬羊의 腫瘍免疫 및 histocompatibility antigens 研究에 利用價値가 높을것으로 思料된다.

結 論

Micro-culture system을 利用하여 緬羊의 混合淋巴球培養法(MLC)을 standardization한 바 다음과 같은 成績을 얻었다.

1. Stimulator cell의 mitomycin-c 濃度別 處理效果는 10 μ g/ml부터 DNA合成阻止 效果가 있었고, 25 μ g/ml 이상의 濃度에서는 DNA 合成을 完全阻止했다.
2. MLC 反應值의 變化는 培養開始後 3~4日사이에서 急增했고, 5~6日사이에서 最高에 달했으며, 7日以後에는 減少했다.
3. Stimulator와 responder의 比率이 2.5:1일때, 그리고 responder의 濃度가 1×10^6 cell/well일때 가장 높은 反應을 보였다.
4. MLC에 使用되는 緬羊淋巴球의 冷凍保存은 MLC 反應에 有意한 差異를 주지 않았다.
5. One-way MLC에서 同一한 dam-offspring 間에서 MLC 反應은 isogenic 組合보다는 높고 allogeneic 組合보다는 낮았다.
6. 混合淋巴球 培養法은 緬羊의 細胞免疫 研究에 應用價値가 높다.

參 考 文 獻

- 1) Anderson, R.T., McBride, C.M. and Hersh, E.M.: Lymphocyte blastogenic responses to cultured allogeneic tumour cells in vitro. *Cancer Research* (1972) 32 : 988.
- 2) Ardans, A.A., Trommershausen-Smith, A. and Osburn, B.I.: Immunotherapy in two foals with combined immunodeficiency, resulting in graft versus host reaction. *J.A.V.M.A.*

- (1977) 170 : 167.
- 3) Bain, B. and Lowenstein, L.: *Genetic studies on the mixed leukocyte reaction. Science* (1964) 145 : 1315.
 - 4) Bradley, B.A., Edwards, J.M. and Franks, D.: *Histocompatibility phenotyping by mixed lymphocyte reaction. Tissue Antigens* (1973) 3 : 340.
 - 5) Clot, J., Massip, H. and Mathien, O.: *In vitro studies on human B and T cell purified populations. Stimulation by mitogens and allogeneic cells, and quantitative binding of phyto-mitogens. Immunology* (1975) 29 : 445.
 - 6) Deegan, M.J., Coulthard, S.W., Qualman, S.J. and Schrok, M.A.: *A correlative analysis of in vitro parameters of cellular immunity in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res.* (1977) 37 : 4475.
 - 7) Hirschhorn, K.: *In vitro histocompatibility testing. In "Human Transplantation", edited by Rapaport, Felix and Dausset, Jean, New York Gtune and Stratton* (1968) 8 : 406.
 - 8) Jun, M.H. and Johnson, R.H.: *A standardized microtechnique used to evaluate responses of ovine peripheral blood lymphocytes to phyto-mitogens. Korean J. of Virology* (1979) 9 : 31.
 - 9) Kuperman, O.J. and Bach, F.H.: *Genetic basis of memory in cell-mediated immune responses. Scand. J. Immunol.* (1977) 6 : 161.
 - 10) Kuramochi, T.: *Mixed leukocyte culture test in dogs. Am. J. Vet. Res.* (1974) 35 : 127.
 - 11) McClue, J.J., Muscoplat, C.C., Johnson, D.W. and Senogles, D.R.: *Microculture method for mixed lymphocyte cultures in the horse. Am. J. Vet. Res.* (1978) 39 : 337.
 - 12) Miller, R.A. and Kaplan, H.S.: *Generation of cytotoxic lymphocytes in the autologous mixed lymphocyte culture. J. Immunol.* (1978) 121 : 2165.
 - 13) Schrok, R. and Donnelly, W.J.: *Differences between lymphocytes of leukemic and non-leukemic patients with respect to morphologic features, motility and sensitivity to guinea pig serum. Blood* (1961) 18 : 561.
 - 14) Schroeder, M.L., Storb, R., Goselink, H. and Gluckman, E.: *Freezing of canine lymphocytes for use in mixed leukocyte culture and cell-mediated lympholysis tests. Transplantation* (1977) 23 : 33.
 - 15) Shimizu, M. and Shimizu, Y.: *Demonstration of cytotoxic lymphocytes to virus-infected target cells in pigs inoculated with transmissible gastroenteritis virus. Am. J. Vet. Res.* (1979) 40 : 208.
 - 16) Solled, A.E. and Frank, G.H.: *Bovine trypanosomiasis; Effect on the immune response of the infected host. Am. J. Vet. Res.* (1979) 40 : 658.
 - 17) Uotila, M., Rode, H.N. and Gordon, J.: *Blas-togenic factor; its role in the mixed leukocyte culture reaction. Eur. J. Immunol.* (1978) 8 : 133.