

## 사람 태반혈청내의 항HLA항체 정제

가톨릭의과대학 미생물학교실

임병욱 · 한 훈 · 유문간 · 김태규 · 김금용 · 이종훈

=Abstract=

### Purification of Anti-HLA Antibodies in Human Placenta Sera

Byung-Uk Lim, Hoon Han, Moon-Gan Rhyu, Tae-Kyu Kim, Gum-Ryong Kim and Chong-Hoon Lee

Department of Microbiology, Catholic Medical College, Seoul, Korea

To determine the existence of anti-HLA antibodies finally in 220 human placental extracts to be proved negative antiserum by previous anti-HLA A,B,C antibody screening procedure, the present study was performed by fractionation of immunoglobulins using saturated ammonium sulfate and by simple batch method on DEAE cellulose.

Thereafter using known 150 T-lymphocyte panels, complement-dependent microlymphocytotoxicity test was performed to observe the existence of anti-HLA antibodies and the degree of the antibody response of the concentrates.

The following results were obtained:

1. Of total 141 placental sera concentrated 45 cases (31.9%) were showed significant anti-HLA A,B,C antibody response after concentration (Excellent, 19(13.5%), Good, 3(2.1%), Weak, 23(16.3%).
2. Anti-HLA specificities of placental sera obtained after concentration were A2, A24, B13, B27, B44, B51, CN1, C7.
3. A new type C new-1 anti-HLA antibody that is only expressed in Korean people, was obtained.
4. 79 placental sera purified by simple batch method using DEAE cellulose were showed negative anti-HLA antibody responses.

### 서 론

조직항원에 대한 연구는 1954년 Dausset<sup>1)</sup>이 다산부의 혈청내의 수혈을 다량 받은 환자의 혈청내의 사람의 백혈구를 응집시키는 항체가 있음을 보고한 이후부터 진행되기 시작하였다. 그후 1960년대 이르러 이러한 백혈구 응집항체는 여러종류가 있으며 이들 항체를 사용한 백혈구 항원분석을 통하여 이 항원은 한가지 유전자좌에 존재하는 수많은 대립유전자의 산물임이 밝혀졌다<sup>2,3)</sup>.

그후 HLA 항원 및 항체에 관한 연구가 세계적으로 진행되어 왔으나 우리 민족의 HLA 항원의 분포는 아직까지 보고된 것이 많지 않으며 단지 본 교실에서 1980년 7월부터 한국인의 HLA 조직항원을 조사 분석하여 발표한바 있다<sup>4)</sup>.

특히 이들의 HLA 조직항원을 분석하기 위하여는 각 HLA 조직항원에 대한 항 HLA 항체가 있어야

본 연구는 1983년도 가톨릭 중앙의료원 학술연구 조성비에 의하여 이루어졌음.

하는데 과거에는 주로 임신부의 혈청으로 부터 얻은 항 HLA 항체를 사용하여 왔으나<sup>5)</sup> 여기에는 임신부의 혈액을 다량으로 얻기가 어려운 단점이 있어왔다. 따라서 항 HLA 항체를 다량으로 얻기 위하여 태반으로 부터 혈청을 얻어서 사용하는 방법이 고안되었으며 본 교실에서는 이점에 착안하여 1980년도 부터 본 대학 부속병원 산실로 부터 태반을 회수하여 태반혈청을 분리, 항 HLA 항체 형별을 분석하여 따라서 한국인의 항 HLA 항체의 분포를 조사하여 간접적으로 HLA 항원의 분포도를 조사하여 왔다.

특히 이러한 태반혈청의 항 HLA 항체 분석후 항체가 없거나 매우 약한 반응을 보인 많은 혈청피검물들을 농축정제하여 고농도의 항체를 지니는 농축혈청을 얻을 수 있는지를 알아보기 위하여 저자들은<sup>6)</sup> 일차적인 시도에 이어서 보다 더 효율적인 농축방법을 모색하고자 본 실험을 실시하였다.

### 재료 및 방법

### 1. 태반혈청

총 26,800건의 태반추출 미검물(4°C에서 15,000×g로 20분간 원침)에서 항 HLA-A, B, C 항체유무를 screening 하여 그중 항체활성이 뚜렷하고 HLA 형이 밝혀진 피검물을 UCLA 와의 공동연구용 혈청재료로 따로 분리해 놓고, 그 나머지 피검물 중에서 항체반응이 매우 미약하여 쓸모없어서 버려야 하였던 피검물과 음성 피검물 중에서 220건을 무작위적으로 취하여 항체의 농축재료로 사용하였다.

### 2. 정제 및 농축

포화황산암모늄 용액을 이용하여 혈청내의 면역글로블린을 분리, 정제 및 농축하는 방법은 Heide<sup>13)</sup>와, Strauss 등(1964)<sup>14)</sup> 및 Knight 등(1966)<sup>15)</sup>의 방법을 참고로 하여 실시하였다. 즉, 피검배반 추출물 220건중 무작위 추출한 141건, 각 100ml를 4°C에서 15,000×g로 30분간 재원침하고 그 상층을 500 ml 비이커에 옮긴 다음 magnetic stirrer 위에서 이 혈청을 교반하면서 pH7.0인 포화황산암모늄을 40-45% 될때까지 서서히 첨가하고, 4°C에서 약 30분간 두었다가 4°C에서 10,000×g로 30분간 원침하고 그 상층을 제거한 다음 침전물을 0.1M glycine 함유 생리식염수로 원래의 용량으로 재 용해시킨 다음 비이커에 옮기고 다시 그 혈청성분을 교반하면서 포화암모늄용액을 30-33% 되도록 방울 방울 서서히 첨가하여 혼합한 다음에서 30분간 두었다가 4°C에서 10,000×g로 30분간 원침하여 가라앉은 globulin분획만을 회수하여 원액의 1/10용량이 되게 생리식염수로 재 용해시켜 visking tube에 넣었다. 그리고 0.1M glycine 함유, 0.01%의 sodium azide 함유 생리식염수로 48시간 동안 충분히 투석한 다음 -80°C에 보관하였다가 항 HLA 항체 유무 및 항체의 작용 강도를 조사하였다.

### 3. DEAE cellulose batch 법에 의한 정제

DEAE cellulose 를 이용하여 혈청내의 면역글로

부린을 분리, 정제하는 방법은 Webb(1972)<sup>21)</sup> 및 Darke 와 Perry (1976)<sup>22)</sup>의 단순 batch법에 따랐다. 즉 220건의 태반혈청피검물 중 79건을 무작위 선택하고 이들 태반혈청 각 100ml를 40-45% 포화황산암모늄염석법으로 일차 농축한 후 각 5 ml을 채취하여 준비된 DEAE-cellulose 25ml과 잘 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치하였다. 그다음 4°C에서 3,000rpm으로 15분간 원침하여 상층을 얻었다. 그리고 0.01M 인산식염원충액 5 ml를 동일 DEAE-cellulose 침전액에 가하고 혼합한 후 원침하여 상층은 얻고 먼저 얻어진 상층액과 합하고 생리식염수로 등장액이 되도록 조절한 다음 -60°C에 보관하였다가 항 HLA 항체 유무 및 작용강도를 조사하였다.

### 4. 항 HLA-A, B, C 항체 검정

당일 농축 과정만 거친 농축 글로블린 분획에 대한 항 HLA-A, B, C 항체 활성도에 대한 검정은 HLA-A, B, C 조직형을 이미 알고 있는 150사람 T 임파구 cell panels 을 사용하여 Park 과 Terasaki (1980)<sup>16)</sup> 방법에 따라 Microlymphocytotoxicity test 로 검정하였다. 58개의 글로블린 성분과 대조 혈청(항 T 임파구 항 양성대조 혈청과 음성대조혈청)을 Microtest tissue culture plate (60 wells, # 3034, Falcon, U.S.A) 각 well 에 각각 1 μl씩 분주하고, 150 plate 를 만든 다음 HLA-A, B, C 조직형을 알고 있는 150명의 T 임파구 세포 panel 을 각 well 마다 1 μl씩 넣고, 토끼의 보체를 써서 Park & Terasaki (1980)<sup>16)</sup> 법에 의한 Microlymphocytotoxicity test 법에 따라 각 세포에 대한 항체 활성을 검정하였다.

실험결과 판독과정 중, 50%이하의 cell panel 을 죽인 것을 Weak 로, 60-80%의 cell panel 을 죽인 것을 Good 으로, 그리고 85-100%의 cell panel 을 죽인 것을 Excellent 로 간주하였으며 Excellent 글로블린 중 의양성 반응과 의음성 반응이 전혀 없는 것을 perfect 로 판독하였다.

Table 1. Changes of HLA antibody qualities compare with before and after concentration

Before Concentration		After Concentration (%)				
Ab response	No. of cases	Negative	Positive Ab response			Total
		Ab response	Excellent <sup>a</sup>	Good <sup>b</sup>	Weak <sup>c</sup>	
Negative	141	96(68.1)	19(13.5)	3(2.1)	23(16.3)	45(31.9)

<sup>a</sup>Excellent = 85-100% reacting to cell panel, <sup>b</sup>Good = 60-84% reacting to cell panel, <sup>c</sup>Weak = below 59% reacting to cell panel

## 성 적

### 1. 태반혈청의 농축후 항체가 측정

총 141건의 태반혈청피검물을 농축 정제한 다음 항 HLA 항체 유무 및 반응강도를 조사한 결과 표 1 과 같은 성적을 얻었다. 즉 총 141건 중 45건(31.9%)이 뚜렷한 항체반응을 보였으며 96건(68.1%)이 항체반응 음성으로 나타났다. 항체반응을 보인 45건 중에서는 19건(13.5%)이 Excellent로, 3건(2.1%)이 Good으로, 그리고 23건(16.3%)이 Weak하게 항체반응을 보인 것으로 나타났다.

### 2. 농축후 Excellent 항 HLA 항체 분포

농축후 Excellent한 항 HLA-A, B, C 항체반응을 보인 19건의 항 HLA 항체 형별분포를 보면 표 2와 같다. 즉 항 HLA-A2 항체가 2건, B13이 3건, B44 및 B22+42가 각 2건이었으며 B13+27, B51

B15, B27, B40+7+48 및 CN1이 각각 1건씩으로 나타났다. 그리고 강한 HLA-ABC 항체 반응은 보였으나 형별을 알수 없는 피검물이 4건이었다.

### 3. 농축후 Good 항 HLA 항체 분포

농축후 good항 HLA-ABC 항체 반응을 보인 피검물은 3건이었으며 이들의 항 HLA 항체형별은 각각 항 HLA-A24, B60+61 및 C7이었다(표 2).

### 4. DEAE-cellulose batch 법으로 정제한 태반혈청의 항 HLA 항체 반응

40-45% 포화황산암모늄 염석법으로 일차 농축한 피검물을 다시 DEAE cellulose를 이용한 단순 batch 법으로 면역글로부린 분획만을 정제하여 항 HLA 항체 반응을 조사한 결과 79건 모두에서 항 HLA 항체반응이 없는 것으로 나타났다. 그리고 이들 정제된 혈청피검물은 150명의 T 임파구 세포판별에 대하여 비특이적인 독성반응을 보였다.

**Table 2.** Changes of HLA antibody qualities & types compare with before and after concentration

Serial No. of Specimens tested	After concentration		
	Type	Ab response	Percentage
1	C7	G <sup>a</sup>	68
2	Multi	EX <sup>b</sup>	98
6	B44	EX	92
8	B13	EX	99
11	A24	G	65
13	B40,7,48	EX	99
14	B13,27	EX	92
19	Multi	EX	99
41	B51	EX	99
42	B60,61	G	78
46	B44	EX	99
57	CN1	Perfect	100
63	B13	Perfect	100
66	A2	EX	67
73	Multi	EX	97
75	B22,42	EX	99
89	B13	EX	97
108	Multi	EX	88
109	NB22,42	EX	89
111	B15	EX	92
125	B27	EX	99
127	A2	Perfect	100

<sup>a</sup>G: Good, <sup>b</sup>EX: Excellent

## 고 찰

입산부의 혈액내에서 남편의 HLA 조직항원에 대한 항 HLA 항체가 생성되므로 이들의 혈청을 회수하면 각종 HLA 조직항원에 대한 항체를 얻을 수 있게 되고 따라서 이 항 혈청을 이용하면 사람의 HLA 조직 항원을 형별할 수 있게된다.

과거 국내에서는 이들 항 HLA 항체에 대한 연구가 전혀 이루어지지 않아 외국으로 부터 항 HLA 항체가 들어 있는 plate 를 비싸게 구입하여 HLA 조직형별에 사용하여 왔다. 그러나 종족 및 민족간에는 HLA 조직형별의 분포에 많은 차이가 있으므로<sup>2, 6, 9, 12, 16, 20</sup> 한국인의 특유한 HLA 조직항원의 분석에는 여러가지 문제점이 남게 되므로 본 교실에서는 1980년도부터 한국 민족 고유의 항 HLA 혈청을 얻고자 태반혈청을 이용 한국인의 항 HLA 항체를 분석하여 왔다.

이러한 분석 과정 중 항 HLA 항체가 없거나 매우 약한 반응만을 보여 실제로 HLA 항원 조직형별 시험에 사용할 수 없는 태반혈청들을 농축하여  $\gamma$ -globulin 분획만을 얻게 되면 고농도의 항 HLA 항체를 얻을 수 있는지의 여부를 알기위하여 본 실험을 실시하였다. 본 실험에 사용한 농축방법은 과거부터 널리 시행하여온 포화 ammonium sulfate 농축법으로서<sup>4, 5, 10, 11, 19</sup> 본 실험에서는 40-50%의 포화 황산암모늄농축법으로 globulin 분획을 1차 회수한 다음 다시 30-33%포화 황산암모늄농축법을 시행하여  $\gamma$ -globulin 분획을 제외한 모든 혈청 단백질 성분을 제거하고 그 용량을 원액의 1/10로 농축하였다.

농축혈청의 항 HLA 항체가 측정은 통상적인 항체 보체 매개 임파구 독성시험법<sup>14</sup>을 이용한 것으로 이미 HLA 조직형을 알고 있는 100-150개의 임파구 panel을 이용하여 농축 혈청의 항체를 측정하였고 80-100%의 임파구 panel을 파괴하는 농축혈청을 excellent serum으로 판정하였다. 그 결과를 보면 표 1에 나타난 바와 같이 항 HLA 항체가 없는 것으로 밝혀진 220건의 태반혈청피검물중 DEAE-cellulose 법으로 정제한 79건을 제외한 141건의 경우 45건(31.9%)에서 뚜렷이 항 HLA 항체가 농축된 것으로 나타났으며 특히 그중 19건은 Excellent한 항 HLA 항체반응을 보였으므로 즉시 사용가능한 농축혈청이 13.5%로 나타났다.

그러므로 1차 screen 과정에서 항 HLA 항체가 없는 것으로 밝혀진 태반혈청도 농축시키게 되면 항체 활성이 강한 항 HLA 항체를 얻을 수 있음을

알수 있었으며 이 성적은 1983년에 이종훈<sup>1</sup> 등이 조사한 성적과도 일치하였다.

한편 농축된 태반혈청의 항 HLA 항체 형별을 분석하여 보면 표 2에 나타난 바와 같이 항 HLA-A 항체가 2종, 항 HLA-B 항체가 9종, 항 HLA-C 항체가 2종이었으며 현재까지 알려진 HLA-ABC 조직항원으로는 항체 형별이 불가능한 피검물이 4종 등이었다. 특히 본 실험에서는 이종훈등(1983)<sup>1</sup>의 성적에서 나타난 항 HLA 항체와는 다른 항체들이 다양하게 검출되었으며 한국인에서만 특이하게 나타나는 것으로 최근 밝혀진 CN 1(HLA-C new type 1) 조직항원에 대한 항체가 검출되었다.

한편 DEAE-cellulose를 이용한 단순 batch 법으로 태반혈청중의 면역글로부린을 정제한 실험에서는 79건 모두가 정제후 항 HLA 항체반응음성으로 나타났다. 더욱이 이들 정제된 피검물이 항체형별에 사용한 150명의 임파구 세포판별에 대하여 비특이적인 독성반응을 보인것으로 보아 DEAE cellulose를 이용한 정제는 사용되는 완충액의 pH 및 온도, 삼투압등 여러 여건을 고려하여 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과를 분석해 볼때 포화 황산 암모늄농축법을 이용하여 항 HLA 항체가 없거나 미약한 태반혈청으로부터 고농도의 항체를 나타내는 항 HLA 항체를 얻을 수 있다는 고무적인 성적을 얻을 수 있었으며 농축법의 개선과 다양한 농축방법의 응용을 통해 고농도의 항 HLA 항체를 더욱 많이 회수할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

총 26,800건의 태반혈청 피검물중 항 HLA-A,B,C 항체반응이 없는 것으로 밝혀진 피검물중 220건을 무작위 선택하여 이들을 40-45% 및 30-33%의 포화황산암모늄 염석법과 DEAE-cellulose 단순 batch 법으로 면역글로부린 분획만을 정제한 다음 HLA 조직항원형이 알려져 있는 150명의 T 임파구 세포 판별을 사용한 보체매개성 항체의존성 세포독성시험을 실시하여 정제된 피검물 내의 항 HLA 항체반응을 조사한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 총 220건의 피검물중 포화황산암모늄염석법으로 농축시킨 141건의 경우 45건(31.9%)이 뚜렷한 항체반응을 보였으며 이들은 Excellent 19건(13.5%), Good 3건(2.1%), Weak 23건(16.3%)등으로 나타났다.

2. 농축후 Excellent 및 Good 피검물의 항 HLA 항체 형별을 분석하여 보면 항 HLA-A가 2종, B

가 9종, C가 2종이었다.

3. 특히 한국인에만 독특하게 나타나는 새로운 조직항원형인 HLA-CN1 항원에 대한 항체가 1건 분리되었으며 현재까지 알려진 HLA 조직항원으로는 형별이 불가능한 항체가 4건이었다.

4. DEAE-cellulose 단순 batch법으로 정제한 79건의 경우에는 정제후 모두 항 HLA 항체반응이 음성으로 나타났으며 이들은 150명의 T 임파구 세포판별에 대하여 비특이적 독성반응을 보였다.

### 참 고 문 헌

- 1) 이종훈, 김금용, 한훈, 임병욱, 유문간 : 사람 태반에서 남편의 조직항원에 대한 HLA 항체의 정제. 대한면역학회지 5 : 9-14, 1983.
- 2) 이종훈, 이연태, 김금용, 임병욱, 한훈, 이용각, 민병석 : 한국 민족의 조직형 분석에 관한 연구. 제 1 보 : 정상인 및 만성사구체 신염환자에 있어서의 HLA 항원 출현빈도 및 HLA 항원 적합성과 이식신장의 예후. 대한면역학회지 3 : 61, 1981.
- 3) Brain P, and Hammond M: Leukocyte antigens in three race group. *Med. Proc.* 14: 589, 1968.
- 4) Chon EJ, Strong LE, Huges JR, WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL. *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459, 1946.
- 5) Darke C, and Perry WNC: The use of the IgG fraction of typing sera in the lymphocytotoxic test: a comparison with other cytotoxic methods. *J. Immuno. Methods* 13: 381, 1976.
- 6) Dausset J: Leuco-agglutinins. IV Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang.* 4: 198, 1954.
- 7) Dausset J, Colombani J, Legrand L and Fellous M: Genetics of the HLA system. Deduction of 480 haplotypes. *Histocompatibility testing 1970*, Munksgaard 53: 1970.
- 8) Dixon M and Webb EC: In "Advances in Protein Chemistry": Academic Press, New York and Lon-

- don 16: 219, 1961.
- 9) Dossetor JB, McConnachie DR, Stiller CR, Alton JDM, Olson L and Howson WT: The major histocompatibility complex in Lskimos. *Transplantation Proceedings* S 209: 1973.
- 10) Fahey JL: *Adc. Immunol.* 21: 41, 1962.
- 11) Heide K and Schwick HG: Salt Fractionation of Immunoglobulins. In D.M. Weir, (ED). *Handbook of Experimental Immunology*, third edition, Blackwell Sciertifiz Publication S, Oxford 1978.
- 12) Ishibashi Y, Matsukuma Y, Tsuji K, Hasegawa T, Ozaki, Kodarma M and Tagucki Y: National survey of incidence of the HLA antigens in Japanese (Japan). *Transplantation J.* 6: 86, 1971.
- 13) Park MS and Terasaki PI: Microdroplet lymphocytotoxicity test. In manual of Tissue Typing Techniques, 92-103. Bethesda, Maryland, NIH Publication No. 545, 1979.
- 14) Payne R: Leukocyte agglutinins in human sera *Arch. Intern. Med.* 99: 607, 1957.
- 15) Payne R, Tripp M, Wigle J, Bodmer W and Bodmer J: A new leukocyte isoantigens system in man. Cold Spring Harbor, *Symp. Quant. Biol.* 29: 295, 1964.
- 16) Van Rood, JJ, Van Leeuwen A, Schippers A, Vooyo WH, Frederiks H, Balner H, and Eernisse JC. 1965.
- 17) Rubinstein P, Costa R, Van Leeuwen A and Van Rood JJ: The leukocyte antigens of Mapuche Indians. *Histocompatibility testing 1970*, Munksgaard, Copenhagen 251: 1970.
- 18) Strauss AJL, Kemp PC, Vannier WE and Coodman HC. *J. Immunol.* 93: 34,, 1964.
- 19) Ting A, Wee CC, Simons MJ and Morris PJ: The distribution of HL-A leukocyte antigens in singapore chinese, Malys and Indians. *Tissue Antigens* 1: 258, 1971.
- 20) Webb AJ: A 30-minute perparative method for isolation of IgG from human sera. *Vox Sang.* 23: 279, 1972.