

8-Azaguanine 내성 인형 형질세포종 세포주의 확립*

서울대학교 의과대학 미생물학 교실 및 암연구소¹

차창룡 · 황응수 · 국윤호 · 임동균 · 조한익¹ · 박명희¹ · 김노경¹ · 장우현 · 이문호¹

= Abstract =

Establishment of 8-Azaguanine Resistant Human Plasmacytoma Cell Line

Chang-Yong Cha, Eung-Soo Hwang, Yoon-Ho Kook, Dong-Kyun Lim, Han-Ik Cho,
Myung-Hee Park¹, Noe-Kyung Kim¹, Woo-Hyun Chang and Munho Lee¹

Department of Microbiology and Cancer Research Institutes¹, College of Medicine,
Seoul National University, Seoul, Korea

This study was performed to establish human plasmacytoma cell line as the partner cells for producing human hybridoma.

Bone marrow cells from a multiple myeloma patient from Seoul National University Hospital, Korea were cultured and established as the cell line, named as HMC-BM4. HMC-BM4 cells were cultivated in RPMI 1640 media containing 8-azaguanine (8-AG; gradually increasing concentration from 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 8-AG resistant cells were collected and cloned by limiting dilution. Each clone was divided and tested to die in hypoxanthine, aminopterin and thymidine (HAT) selection media. Finally one clone was selected and named as HMC-AR, which was sensitive to HAT selection media.

HMC-AR cells showed typical morphology of plasmacytoma in Wright staining. No cell formed the rosette with sheep erythrocytes. Surface membrane μ heavy chain was detected in 20% of HMC-AR cells and cytoplasmic μ heavy chain in 90% of them by direct immunofluorescent staining. Ia-like antigen was found in 90% of HMC-AR cells by indirect immunofluorescent staining using anti-Ia-like antigen monoclonal antibody, 1BD9-2. And about 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of human μ heavy chain was detected in the 3-day culture supernatant of HMC-AR cells. 88% of cells contained 46 chromosomes. Mycoplasma was not detected in HMC-AR cells by Hoechst 33258 staining. This cell line would be used for making hybridomas secreting human monoclonal antibody.

Key Words: 8-azaguanine resistance, human plasmacytoma line, human myeloma cell line

서 론

Köhler와 Milstein¹⁾이 BALB/c 마우스에서 유래한 형질세포종 세포와 면역적혈구에 특이한 항체를 생산하는 세포를 융합하여 면역적혈구에 특이한 단세포군 항체를 생산하였다. 그 이후 여러 분야에 이용할 수 있는 단세포군 항체가 많이 개발되었다. 즉 병원성세균, 바이러스, 기생충 등에 의한 감염성질환, 각종 종양, 체내 대사물의 변동에 의한 질환

* 본 연구는 서울대학교 유전공학연구소가 지급하는 1985년도 유전공학연구비로 경비의 일부가 충당되었음.

환 및 임신울 진단하는 데 이용할 수 있는 단세포군 항체가 개발되었다^{2, 10, 24, 25, 26}. 그러나 단세포군 항체로 감염성질환이나 악성종양환자를 치료하는데 사용하려는 시도가 있었으나^{10, 20}, 아직도 성공을 거두지 못하였다. 그 이유는 사람에게 마우스에서 기원한 단세포군 항체를 주입할 경우 이중단백질로서 anaphylaxis, 면역복합체의 형성에 따른 제증상이 발현되기 때문이다.

그러므로 단세포군 항체를 치료제로 사용하려면 사람세포에서 생산한 것이어야 한다. 사람에서 유래한 단세포군 항체를 만드는 방법으로는 마우스형-인형세포의 융합^{22, 25}) Epstein-Barr virus(EBV)를 이용한 인형 B 세포의 transformation²²), 인형-인형

세포간의 융합¹²⁾ 등이 알려져 있다. 마우스형-인형 세포간의 융합으로 생산한 융합세포는 인형 면역글로브린의 생산을 관장하는 염색체를 쉽게 소실하기 때문에¹³⁾ 인형 단세포군 항체의 생산을 무한정 지속시킬 수 없는 근본적인 단점을 가지고 있다. 또한 마우스형-인형 hybrid immunoglobulin 또는 마우스형 immunoglobulin이 오염될 수 있어서 이를 분리 정제하여야 하는 단점도 있다. Epstein-Barr virus를 이용하여 어떤 항원에 특이한 항체를 생산하는 B세포를 불사화시키는 방법이 시도되었으나^{14, 15, 16)}, 전환시키는 효율이 일정하지 않고, 항체의 생산이 비교적 단기간내에 중지하는 등의 문제점이 있다¹⁷⁾. 또한 살아있는 바이러스를 사용하기 때문에 생산된 단세포군 항체가 Epstein-Barr virus로 오염될 위험성이 크다. 그러므로 이 방법으로 생산된 단세포군 항체를 치료제로 사용할 수 없다.

인형 단세포군 항체를 제조하는 가장 이상적인 방법은 인형-인형세포간의 융합이다. 이를 실현시키기 위해서는 인형 형질세포종세포를 확립시키는 것이 필요하다. 그러나 형질세포는 완전히 분화된 세포로서 종양세포라도 세포배양을 통해 세포주로 확립시키기 어렵다¹⁸⁾.

현재까지 인형-인형하이브리도마에 이용하기 위해 개발된 세포주로는 LICR-LON-HMy2¹⁹⁾, SKO-007²⁰⁾, GM1500 6TG-A11/A12²¹⁾, H35.1.1;0467.3²²⁾, KARPAS 707²³⁾ 등이 알려져 있다.

이들 세포주들은 외국인에서 유래한 세포에서 확립된 것으로서 한국인의 유전적인 소인과 상이하다. 그러므로 한국인에 이용할 수 있는 인형 단세포군 항체를 만들기 위해서는 한국인에서 기원한 세포주를 세포융합에 사용하여야 한다. 따라서 치료제로 사용할 수 있는 인형 단세포군 항체를 만들 수 있는 인형 형질세포종 세포를 국내에서 확립하는 것이 시급하였다.

본 연구에서는 서울대학교병원에 입원한 다발성 골수종(multiple myeloma) 환자의 골수천자 표본에서 형질세포종을 채취하여 세포배양으로 세포주를 확립하고, 8-azaguanine 내성인 세포주를 확립하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포주의 확립

서울대학교병원에 다발성 골수종(multiple myeloma)으로 입원한 환자의 골수표본을 채취하였다. 골수표본을 동량의 phosphate buffered saline(PBS)에 섞어 Ficoll-Hypaque (비중 1.077)위에 중층시켜 400×

g로 원심분리하여²⁴⁾ 그 계면에서 백혈구성분만을 분리하였다. 이 세포를 우태아혈청 20%, NCTC135 배지 10%, gentamicin 50 µg/ml이 함유된 RPMI 1640배지에 2×10⁶/ml이 되게 부유시켜 배양플라스크에 분주하고 CO₂의 농도가 5%인 배양기에서 배양하였다. 역위현미경으로 관찰하면서 세포수가 증가하게 되면 초기 2주간은 플라스크 수를 2배로 늘리는 방법으로 배양하였다. 그 후부터는 1주일에 2회씩 50%정도의 배지를 새 것으로 바꾸어 주면서 배양하고, 일부는 냉동 보관하였다.

약 2개월이 지난 후부터는 우태아혈청 10%와 gentamicin 50 µg/ml만 첨가된 RPMI 1640 배지로 바꾸어 1주일에 2회씩 새로운 배지로 갈아 주면서 유지시켰다.

2. 8-Azaguanine(8-AG) 내성 변이주의 확립

4×10⁶/ml의 세포배양액에 8-AG(Sigma Chemical Co. A-1007)의 최종농도가 1 µg/ml되게 하여 3일에 한번씩 배지를 갈아주면서 2주일간 배양하였다. 그후 8-AG의 최종농도를 2 µg/ml, 4 µg/ml, 10 µg/ml과 20 µg/ml로 증가시키면서 각각 2주간씩 같은 방법으로 배양하였다.

최종적으로 생존한 세포들을 McKearn²⁵⁾의 무한대 희석법에 따라 96well배양판에 well당 0.1~1.0 세포가 들어가도록 희석하여 분주하였다. 하나의 세포에서 기원한 것을 확인하고 나서 각 well의 세포를 증식시켰다. 그후 세포를 이분하여 한쪽에는 Littlefield²⁶⁾가 고안한 HAT(최종농도 hypoxanthin 13.6 µg/ml, aminopterin 0.174 µg/ml, thymidine 3.87 µg/ml)가 첨가된 RPMI 1640배지를 넣어 세포의 사멸여부를 관찰하였다.

3. 세포면역학적 검사

1) **Wright 염색**: 농축된 배양세포를 슬라이드에 도말하여 공기중에서 건조시켜 Wright 염색액으로 5분간 염색하였다. 그후 수도물로 세척하고 건조시킨 후 고배율에서 관찰하였다.

2) **E-rosette 형성 시험**: RPMI 1640배지로 3회씩 세척된 2×10⁶/ml의 세포와 2% (v/v) 면양적혈구를 0.25ml씩 혼합하여 37°C 수조에서 15분간 반응시켰다. 그후 200×g로 5분간 원심침전하고 4°C에서 18시간 방치한 후 가볍게 흔들어 200개의 세포중 rosette를 형성한 세포수를 세어 E-rosette 형성율을 계산하였다.

3) 세포표면 immunoglobulin 검사

세포를 0.02% sodium azide가 함유된 차가운 PBS (PBS-NaN₃)로 3회 세척한 후 농도를 2×10⁶/ml

로 만들었다. 세포부유액 50 μ l에 1:10으로 희석된 50 μ l의 FITC-conjugated rabbit anti-human IgG(Cappel Lab, lot #12424), FITC-conjugated rabbit anti-human IgM(Cappel Lab, Lot #25832), FITC-conjugated rabbit anti-human lambda chain (Cappel Lab, Lot #15821), FITC-conjugated rabbit anti-human kappa chain(Cappel Lab, Lot #21100)를 각각 섞어 빙수조에서 30분간 반응시켰다. 3회 PBS-Na₃로 세척한 후 glycerol과 PBS-Na₃가 동량 섞인 mounting media에 세포를 부유시켜 슬라이드에 한방울을 넣고 커버글라스를 덮어 형광현미경으로 관찰하였다. 세포표면에 형광을 발하는 것을 양성으로 보고 100개의 세포를 세어 각각의 양성율을 구했다.

4) 세포질내 immunoglobulin 검색

세척된 세포(2×10^6 /ml)를 microtest 슬라이드의 각 well에 10 μ l씩 넣어 세포를 부착시킨 후 absolute methanol로 5분간 고정시켰다. 1:20으로 희석된 각 FITC-conjugated anti-immunoglobulin 20 μ l씩을 각 well에 넣고 37%에서 1시간 반응시켰다. PBS를 3번 갈아주면서 30분간 세척하고 mounting media로 슬라이드위에 점적하고 형광현미경으로 관찰하여 양성율을 구하였다.

5) 배양액내 분비된 immunoglobulin의 측정

Srikumaran³¹⁾의 방법을 변형하여 시행하였다. 0.05M borate buffer(pH 8.0)에 rabbit anti-human IgM(Cappel Lab, Lot #31015)을 10 μ g/ml되게 희석하여 50 μ l/well씩 분주하여 4°C에서 18시간 방치하였다. 0.05%의 Tween 20이 함유된 10mM phosphate buffer(pH 7.2) (PBS-Tw)로 3회 세척하고 5×10^4 /ml의 농도로 3일간 배양한 배양액을 50 μ l 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이때 human IgM 표준시료(Cappel Lab, Lot #23393)를 4 μ g/ml부터 2배계단 희석하여 각 농도별로 50 μ l로 넣어 동시에 반응시켰다. PBS-Tw으로 3회 세척하고 PBS-Tw에 1:2,000으로 희석된 peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgM(Cappel Lab, Lot #18283)을 50 μ l씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. PBS-Tw으로 3회 세척하고 phosphate citrate buffer(pH 5.0)에 400mg/ml의 o-phenylenediamine과 0.06%의 H₂O₂가 함유된 기질용액을 50 μ l씩 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 2M H₂SO₄를 50 μ l씩 첨가하여 반응을 정지시키고 492nm에서 흡광도를 측정하였다. IgM 표준시료에 대한 표준직선을 산출하고, 이것을 기준으로 하여 배양액내에 함유되어 있는 IgM의 양을 산출하였다.

6) Ia 유사 항원의 검색

Brooks³⁾ 등의 방법을 변형하여 간접형광항체법으로 검색하였다. 즉 세포를 차가운 PBS로 3회 세척하여 10⁷ cells/ml로 준비하였다. 세포부유액 200 μ l와 Ia 유사 항원에 대한 단세포군 항체인 1BD9-2³²⁾를 200 μ l 혼합하여 빙수조에서 30분간 반응시켰다. 0.02M Na₃N가 함유된 PBC-Na₃로 3회 세척하고 1:20으로 희석된 FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG(heavy and light chains specific)(Cappel Lab. #20418)를 200 μ l 넣어 혼합하였다. 다시 빙수조에서 20분간 반응시키고 차가운 PBS-Na₃로 3회 세척하였다. Glycerol과 PBS로 동량 섞어 만든 mounting media에 세포를 부유시켜 슬라이드에 놓고 커버글라스로 덮은 후 형광현미경으로 관찰하였다. 밝은 형광을 세포표면에서 나타내는 것을 양성으로 판정하였다. 200개의 세포를 관찰하여 양성율을 산출하였다.

4. 염색체수 분석

Wang과 Federoff³³⁾의 방법에 따라 Giemsa trypsin banding을 시행하였다. 하루전날 10⁶ cells/ml로 계대배양한 세포부유액 3ml에 새로운 배지 2ml을 첨가하고 Colcemid의 최종농도를 0.2 μ g/ml되게 넣어 37°C에서 90분간 배양하였다. 200 \times g로 8분간 원심침전시켜 5ml의 75mM KCl 용액에 부유시켜 37°C에서 15분간 방치하였다. 200 \times g로 8분간 원심분리하여 acetic acid와 methanol(1:3)로 만들어진 5ml의 고정액을 점적하며 부유시켜 빙수조에서 15분간 방치하였다. 200 \times g로 8분간 원심분리하여 위와 같은 방법으로 반복하여 고정시켰다. 최종적으로 0.5ml의 고정액에 부유시켜 세척된 슬라이드 위에 점적하였다. 공기중에서 건조시킨 후 56°C에서 18시간동안 방치하였다. 56°C로 미리 맞추어진 25mM KH₂PO₄ 용액에 15분간 반응시킨 후 36.5ml의 25mM KH₂PO₄, 12.5ml의 absolute methanol, 1ml의 Giemsa stock(66ml의 methanol과 66ml의 glycerol에 1g의 Giemsa를 녹여 만든)과 0.25ml의 trypsin-EDTA($\times 10$)을 혼합하여 만든 용액에 10분간 반응시켰다. 종류수로 세척하고 공기중에서 건조시켜 1,000배 비율로 관찰하였다.

5. Mycoplasma에 의한 오염여부의 검색

Chen⁴⁾의 방법에 따라 시행하였다. 하루 전날 새로운 배지로 갈아주어 키운 세포를 5ml의 고정액(acetic acid와 methanol을 1:3으로 혼합한 것)에 부유시켜 5분간 실온에 방치하였다. 한번 더 고정액으로 처리한 후 최종적으로 1ml에 부유시켰다. 이것을 슬라이드에 한방울 떨어뜨리고 공기중에서

건조시켰다. PBS에 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되게 Hoechst 33258 (Sigma, B-2883)를 희석하여 세포위에 놓고 실온에서 20분간 반응시켰다. 증류수로 세척하고 형광현미경으로 관찰하여 핵이외에 형광을 나타내는 점상의 Mycoplasma가 존재하는가를 검색하였다.

성 적

1. 세포주의 확립

다발성 골수종환자의 골수표본세포를 세포배양할 당시의 세포에 대한 세포면역학적 특징은 다음과 같았다¹⁾. 즉 골수표본세포의 78%정도가 특징적인 형질세포종 세포의 모양을 나타내었다. 또 세포표면에 immunoglobulin을 표출하였고, 세포질내에는 IgG heavy chain과 lambda light chain을 함유하고 있었다.

이 환자의 골수표본세포를 분리하여 배양하니 초기에는 세포가 급속히 증식하였으나 1주일이 지나면서부터 많은 세포가 사멸하였다. 1개월이 지나서 생존한 세포는 비교적 안정적으로 증식하였다. 그 후 1주일에 2회씩 새로운 배지로 갈아주면서 계대배양하였다.

40회이상 계대배양하여 확립한 세포주를 HMC-BM4로 명명하였다. $2 \times 10^5/\text{ml}$ 의 HMC-BM4 세

포를 6일간 배양하였더니 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 까지 증식하였다.

2. 8-AG 내성 변이주의 확립

배지에 8-AG의 최종농도를 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 하여 HMC-BM4를 배양하였을 때 첫 3일내에 반이상의 세포가 사멸하였다. 세포가 증식하면 8-AG의 농도를 약 2배씩 증가시키면서 배양시켰다. 8-AG의 농도를 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 배양시켜 생존한 세포를 무한대 희석법으로 단세포배양하였다. 단세포배양하여 증식된 세포를 일부 분양하여 HAT배지에 배양시켰다. 3~5일 후에 거의 모든 세포가 사멸하는 것을 확인하였다. HAT에 선택적으로 사멸하는 세포군을 증식시켜 "HMC-AR"이라 명명하였다. 1주일에 2회씩 계대배양하며 세포주를 유지시켰다. HMC-AR이 6개월 이상 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 8-AG이 첨가된 배지에서 안정적으로 증식하는 것을 확인하였다. HMC-AR 세포는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 aggregation이 되어서 자라는 세포들과 하나씩 떨어져서 자라는 세포로 구성되어 있었다.

3. 세포면역학적 특징

HMC-AR 세포는 Fig. 2에서 보듯이 Wright 염색에서 세포질이 풍부하고 세포질내에 특징적으로

Fig. 1. Aggregated and single-dispersed cells were observed in HMC-AR cell culture under the phase-contrast inverted microscope ($\times 100$)

Fig. 2. Large mononucleated cells with plenty cytoplasm and large fine nucleus were observed in HMC-AR cell smear stained by Wright staining under the light microscope ($\times 1,000$).

Table 1. Characteristics of cell line established from multiple myeloma

E-rosette	SmIg*				CIg**				Ia-like antigen	
	μ	γ	k	λ	μ	γ	k	λ		
HMC-AR	0***	20	0	0	0	90	0	0	0	90

*Surface membrane immunoglobulin

**Cytoplasmic immunoglobulin

***Number means percentage of positive reaction in immunofluorescence

Fig. 3. Bright greenish fluorescence around the surface of the intact cell. HMC-AR cells reacted with FITC-conjugated anti-human μ heavy chain and were observed under the fluorescent microscope ($\times 450$).

Fig. 4. Bright greenish fluorescence in the cytoplasm of the smeared cells. HMC-AR cells reacted with FITC-conjugated anti-human μ heavy chain and were observed under the fluorescent microscope ($\times 1,000$).

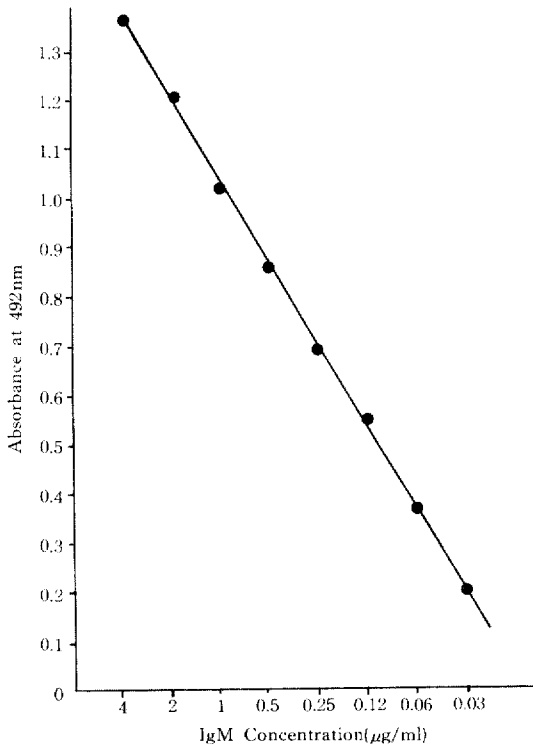


Fig. 5. Standard curve for the estimation of human IgM concentration using enzyme-linked immunosorbent assay.

Fig. 6. Bright greenish fluorescence around the surface of the intact cells. HMC-AR cells reacted with anti-Ia-like antigen monoclonal antibody (1B-D9-2) and FITC conjugated anti-mouse IgG and observed under the fluorescent microscope ($\times 1,000$).

세포표면과 세포질내 immunoglobulin을 형광항체법으로 검색하였다. Fig. 3, Fig. 4와 Table 1에서 보는 바와 같이 20%의 세포에서 세포표면에 μ heavy chain만을 표출하였고, γ heavy chain이나 k 와 λ light chain은 표출하지 않았다. 또 세포질내에는 90%의 세포에서 μ heavy chain만을 표출하였고, λ heavy chain이나 k 와 λ light chain은 표출하지 않았다.

세포표면과 세포질내 immunoglobulin을 형광항체법으로 검색하였다. Fig. 3, Fig. 4와 Table 1에서 보는 바와 같이 20%의 세포에서 세포표면에 μ heavy chain만을 표출하였고, γ heavy chain이나 k 와 λ light chain은 표출하지 않았다. 또 세포질내에는 90%의 세포에서 μ heavy chain만을 표출하였고, λ heavy chain이나 k 와 λ light chain은 표출하지 않았다.

효소면역측정법으로 표준 human IgM에 대한 standard curve를 Fig. 5에 도시하였다. $5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 3일간 배양한 HMC-AR의 배양액내의 IgM에 대한 효소면역측정법을 시행한 결과 492nm에서 흡광도가 1.11으로 나타나서 human IgM이 배양액내에 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 로 분비되어 존재함을 의미하고 있다.

효소면역측정법으로 표준 human IgM에 대한 standard curve를 Fig. 5에 도시하였다. $5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 3일간 배양한 HMC-AR의 배양액내의 IgM에 대한 효소면역측정법을 시행한 결과 492nm에서 흡광도가 1.11으로 나타나서 human IgM이 배양액내에 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 로 분비되어 존재함을 의미하고 있다.

Fig. 7. Metaphase chromosome pattern of HMC-AR stained by Giemsa-trypsin observed under the light microscope ($\times 1,000$).

Table 2. Distribution of chromosome in HMC-AR (n=50)

Number of chromosome	45	46	47	48
Number of cell	2	44	3	1

간접형광항체법으로 Ia 유사 항원을 검색한 결과 Table 1과 Fig. 6에서 보듯이 90% 세포에서 Ia 유사 항원이 세포표면에 표출함을 확인하였다.

4. 염색체수 분석

Fig. 7과 Table 2에서 보듯이 사람의 정상 염색체수인 46개를 함유하고 있는 세포가 88%를 차지하고 있었다.

5. Mycoplasma 에 의한 오염여부의 검색

Fig. 8에서 보는 바와 같이 핵부위만이 형광을 나타내고 있고 다른 세포표면 부위에 작은 점상의 형광을 나타내는 것은 없었다. 이로써 Mycoplasma 에 의해 오염이 되지 않았음을 확인하였다.

고 찰

형질세포는 완전히 분화된 세포로서 증식능력이 없기 때문에 이 세포가 종양세포로 되더라도 다른 미분화된 세포와 달리 세포배양법으로 세포주를 확립하기 힘들다²⁰. 그리하여 현재까지 10여종의 세포주만 보고되었다^{2, 11, 12, 14, 23, 29}. 본 연구에서 확립한 8-AG 내성 변이주인 HMC-AR의 Wright 염색상은 Jobin 등¹²이 확립한 세포주와 비슷하게 세포질 내에 vacuolation이 특징적으로 나타나고 있다. 반면 IgD lambda를 생산하는 LA-49¹⁴, IgG1 kappa를 생산하는 LICR-LON-HMy2¹¹, lambda를 세포

Fig. 8. Nuclei of HMC-AR were only stained by Hoechst 33258 observed under fluorescent microscope ($\times 1,000$).

내에 함유하고 있는 Karpas707¹⁴, IgM lambda를 생산하는 Karpas160¹⁵, IgG2 kappa를 생산하는 GM1500 변이주들⁷과 달리 HMC-AR은 light chain들을 생산하지 않았다.

90%정도의 세포에서 세포질내에 μ heavy chain을 생산하고 있으나 세포표면에는 20% 정도만 μ heavy chain을 나타내고 있었다. 또한 90% 정도에서 HLA class II인 monomorphic Ia-유사항원을 표출하고 있었다. 3일간 배양한 배양액내에는 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 정도의 IgM이 검출되었다. 이상의 결과로서 HMC-AR 세포중 일부만이 μ heavy chain을 배양액내로 생산분비하는 것을 확인하였다.

Mycoplasma에 오염되면 세포의 표면구조가 변화되며⁶, 세균이 갖고 있는 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) 때문에 HAT 선택배지에서 융합세포를 선택할 때 문제가 생긴다⁶. 이런 위험성을 배제하기 위해 HMC-AR 세포에는 Hoechst 33258 염색법⁶으로 Mycoplasma가 존재하지 않음을 확인하였다. HGPRT의 존재여부를 HMC-AR 세포내에서 직접 확인하지는 못하였으나 HMC-AR 세포는 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 8-AG에 내성을 나타내고, HAT 선택배지에서는 거의 모두 사멸하므로 인형세포와 융합시킬 수 있는 partner 세포로 사용할 수 있을 것이다.

염색체수는 대부분이 46을 나타내고 있으나 앞으로 핵형을 분석하여 세포의 안정성을 확인하여야 할 것이다.

이렇게 확인된 HMC-AR 세포를 인형-인형세포의 융합에 사용한다면 마우스형 단세포군항체를 치료제로서 사용할 때의 문제점들을 극복하게 될 것으로 기대된다.

결 론

마우스 단세포군 항체를 치료제로서 사용할 때의 문제점을 극복하기 위하여 인형 하이브리도마를 생산할 때 세포융합에 쓰이는 인형 형질세포종 세포주를 확립하기 위하여 본 연구를 시행하였다. Multiple myeloma 환자의 골수천자표본을 세포배양하여 세포주를 확립하여 HMC-BM4라 명명하였다. 이 HMC-BM4 세포종 20 $\mu\text{g/ml}$ 8-azaguanine에 내성을 나타내는 변이주를 확립시켜 단세포 배양하였다. 이 중에서 HAT 배지에서 사멸하는 clone을 배양시켜 HMC-AR이라 명명하였다. 이 HMC-AR은 E-rosette를 이루지 않았다. 세포표면에는 μ heavy chain을 20% 정도의 세포에서 나타냈으며, 세포질내에는 μ heavy chain을 90% 정도의 세포에서 나타냈다. 90% 정도에서 세포표면에 Ia-유사 항원을 표출하였다. 세포를 3일간 배양한 배양액내에는 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 μ heavy chain이 존재하였다. 염색체수는 88%에서 46개이었다. Hoechst 33258 염색법으로 Mycoplasma에 오염되어 있지 않음을 확인하였다. 이로써 HMC-AR 세포는 인형 형질세포종 세포주로 인형 하이브리도마를 생산할 수 있는 세포로 쓰일 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- 1) 차창룡, 황웅수, 조명재, 박명희, 안효섭, 김노경, 장우현, 이문호: 급성백혈병 세포항원에 반응하는 단세포항체를 분비하는 림프집종세포종(Hybridoma) 생산에 관한 연구. 대한의학협회지, **27**: 253, 1984.
- 2) Böyum A: Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21** (suppl. 97): 1, 1978.
- 3) Brooks DA, Beckman I, Bradley J, McNamara PF, Thomas ME and Zola H: Human lymphocyte markers defined by antibodies derived from somatic cell hybrids. I. A hybridoma secreting antibodies against a marker specific for human B lymphocyte. *Clin. Exp. Immunol.* **39**: 447, 1980.
- 4) Chen TR: In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell. Res.* **104**: 255, 1977.
- 5) Chiorazzi N, Wasserman RL and Kunkel H

- G: Use of Epstein-Barr virus-transformed B cell lines for the generation of immunoglobulin-producing human B cell hybridomas. *J. Exp. Med.* **156**: 930, 1982.
- 6) Cox FEG: Monoclonal antibodies and immunity to malaria. *Nature(London)* **284**: 304, 1980.
- 7) Croce CM, Linnenbach A, Hall W, Streplewski Z and Koprowski H: Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus. *Nature (London)*, **228**: 488, 1980.
- 8) Van Diggelen OP, Shin S and Phillips DM: Reduction in cellular tumorigenicity after mycoplasma infection and elimination of mycoplasma from infected cultures by passage in nude mice. *Cancer Res.* **37**: 2680, 1977.
- 9) Van Diggelen OP, Phillips DM and Shin S: Endogenous HPRT activity in a cryptic strain of mycoplasma and its effects on cellular resistance to selective media in infected cell lines. *Exp. Cell. Res.* **106**: 191, 1977.
- 10) Dix RD, Pereira L and Baringer R: Use of monoclonal antibody directed against HSV glycoproteins to protect mice against acute virus-induced neurological disease. *Infect. Immun.* **34**: 192, 1981.
- 11) Edwards PAW, Smith CM, Neville AM and O'Hare MJ: A human-human hybridoma system based on a fast-growing mutant of the ARH-77 plasma cell leukemia derived line. *Eur. J. Immunol.* **12**: 641, 1982.
- 12) Jobin ME, Fahey JL and Price Z: Long-term establishment of a human plasmacyte cell line derived from a patient with IgD multiple myeloma. *J. Exp. Med.* **140**: 494, 1974.
- 13) Kaplan HS and Olsson L: Monoclonal antibodies produced by human-human hybridomas, pp. 427-431, in Monoclonal antibodies and T-cell hybridoma edited by Hämmering GJ and Hämmering U. *Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1981.*
- 14) Karpas A, Fischer P and Swirsky D: Human myeloma cell line carrying a Philadelphia chromosome. *Science* **216**: 997, 1982.
- 15) Karpas A, Fischer P and Swirsky D: Human plasmacytoma with an unusual karyotype growing in vitro and producing light-chain immunoglobulin. *The Lancet*, **24**: 931, 1982.

- 16) Köhler G and Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody predefined specificity. *Nature* **256** : 495, 1975.
- 17) Kozbor D and Roder JC: Requirements for the establishment of high-titered human monoclonal antibodies against tetanus toxoid using the Epstein-Barr virus technique. *J. Immunol.* **127** : 1275, 1981.
- 18) Kozbor D, Lagarde AE and Roder JC: Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** : 6651, 1982.
- 19) Kupchik HZ, Zurawski VR, Hurrell JGR, Zamcheck N and Black PH: Monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen produced by somatic cell fusion. *Cancer Res.* **42** : 3306, 1981.
- 20) Littlefield JW: Selection of hybrids from matings of fibroblast in vitro and their presumed recombinants. *Science* **145** : 709, 1964.
- 21) McKearn TJ: Cloning of hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase, p374 in *Monoclonal antibodies*, edited by Kennet RH, McKearn TJ and Bechtol KB. *Plenum press, New York*, 1980.
- 22) Nowinski R, Berglund C, Lane J, Lostrom M, Bernstein I, Young W, Hakomori S, Hill L and Cooney M: Human monoclonal antibody against Forssman antigen. *Science* **210** : 537, 1980.
- 23) Olsson L and Kaplan HS: Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77** : 5429, 1980.
- 24) Pereira L, Klassen R and Baringer JR: Type-common and type-specific monoclonal antibodies to herpes simplex virus 1. *Infect. Immun.* **29** : 724, 1980.
- 25) Perussia B, Trinchieri G, Lebman D, Jankiewicz J, Lange B and Rovera G: Monoclonal antibodies that detect differentiation surface antigens on human myelomonocytic cells. *Blood* **59** : 382, 1982.
- 26) Ritz J and Schlossman SF: Utilization of monoclonal antibodies in the treatment of leukemia and lymphoma. *Blood* **59** : 1, 1982.
- 27) Ruddle FH: Human genetic linkage and gene mapping, pp. 1-12, in *Somatic cell genetics* edited by Davidson RL and de la Cruz FF *Raven Press, New York*, 1974.
- 28) Schlom J, Wunderlich D and Teramoto YA: Generation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** : 6841, 1980.
- 29) Sikora K and Alderson T: Human hybridomas from malignant gliomas. *The Lancet*, **i** : 11, 1982.
- 30) Siroka K and Neville AM: Human monoclonal antibodies. *Nature* **300** : 316, 1982.
- 31) Srikumaran S: Bovine x mouse hybridoma that secret bovine immunoglobulin. *Science* **220** : 523, 1983.
- 32) Steinitz M, Klein G, Koskimies S and Mäkela O: E. B. virus induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature* **269** : 420, 1977.
- 33) Tiebout RF, Stricker EAM, Hagenaaers R and Zeijlemaker WP: Human lymphoblastoid cell line producing protective monoclonal IgG1, k anti-tetanus toxin. *Eur. J. Immunol.* **14** : 399, 1984.
- 34) Tsung YK, Milunsky A and Alpert E: Derivation and characterization of a monoclonal hybridoma antibody specific for human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Methods* **39** : 363, 1980.
- 35) Wang HC and Federoff S: Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biol.* **235** : 52, 1972.