

시험관내 면역기술에 의한 항 HLA 항체 생산에 관한 연구

김혜원 · 서동상

성균관대학교 유전공학과

사람의 항 HLA 단일군 항체 생산의 선결 조건인 가장 효과적인 시험관내 면역 조건을 확립하기 위해, 사람의 혈중 임파구를 항원으로 하여 마우스의 대식세포, 홍신세포, 이들의 조건배지, 그리고 임파구 촉진인자 등을 포함한 14가지의 다양한 배양 조건에서 세포를 배양하였으며, 마우스의 비장세포와 사람의 혈중 임파구에서 각각 항체 생산을 유도하였다. 항체의 생성 여부는 면역효소법(ELISA)으로 조사하였다. 마우스의 비장세포는 모든 조건에서 다량의 항체가 검출되었으며, 사람의 혈중 임파구 분화에는 마우스의 조건배지보다 PWM, LPS와 같은 임파구 촉진인자가 효과적임을 알 수 있었으며, 특히 allogenic MLC(Mixed Lymphocyte Culture)에 의해 임파구 분화유도에 유용한 물질이 생성됨을 알 수 있었다.

KEY WORDS: *In vitro* Immunization, Allogenic Mixed Lymphocyte Culture

Mishell과 Dutton에 의해 마우스의 비장세포를 이용한 시험관내 면역기술이 처음 시도된 이후로 다양한 항원을 이용한 실험들이 행해져왔다(Luben and Mohler, 1980; Borrebaeck and Carl, 1983; Pardue *et al.*, 1983; Van Ness *et al.*, 1984; Mishell *et al.*, 1986). 그 후로 사람의 비장세포나 혈중 임파구를 시험관내에서 면역시키기 위한 시도들이 시작되었으나, 마우스에서와는 달리 여러가지 기술적인 제약들이 존재하여, 사람의 B 임파구를 시험관내에서 면역시켜 사람-사람 하이브리도마를 생산하는 것은 최근에야 가능하게 되었다(Cavagnaro and Osband, 1983; Strike *et al.*, 1984; Borrebaeck, 1986). 지금까지 항체를 얻는 방법은 마우스와 같은 실험동물에 항원을 주사하는 것으로 다량의 항원이 필요할 뿐 아니라, 사람의 항원을 사용할 때는 비특이적인 항체가 다량 만들어져, 각 항원에 대한 특이적인 항체를 얻기가 어렵다는 등의 단점이 있었다. 그러나, 시험관내 면역방법은 생체내 면역방법의 단점들을 보완할 수 있는데, 그 장점들은 다음과 같다(Cavagnaro and Osband, 1983). 첫째,

면역기간과 투여되는 양이 생체내 면역방법보다 훨씬 짧고 적으며, 둘째, 생체내 면역이 위험하거나, 생체내 면역이 불가능한 항원을 면역시킬 수 있으며, 셋째, 사람의 단일군 항체를 얻고자 할 때 아주 효과적이라는 것이다. 생체내 면역방법으로는 사람에게 직접 항원을 투여하기 어렵기 때문에 지금까지의 항 HLA 단일군 항체 생산은 주로 마우스에 사람의 항원을 투여하여 마우스형-인형 세포의 융합방법을 주로 사용하여 왔지만(Strike *et al.*, 1984; Rothbarn *et al.*, 1980), 마우스형-인형 세포간의 융합에 의한 융합세포는 인형 면역글로불린(immunoglobulin)의 생산을 관장하는 염색체를 쉽게 소실하기 때문에 인형 단일군항체의 생산을 무한정 지속시킬 수 없다는 단점을 가지고 있다(Karol and Neville, 1982). 또한 마우스형-인형 hybrid 면역글로불린 또는 마우스형 면역글로불린이 오염될 수 있으므로 이를 분리, 정제해야하는 단점도 있다(Karol and Neville, 1982). 이와 같은 이유로 HLA에 대한 단일군 항체 생산의 가장 이상적인 방법은 인형-인형 세포간의 융합방법이며, 따라서 시험관내 면역방법은 human

hybridoma 생산에 꼭 필요한 기술이지만 설치류의 시험관내 면역에 의한 항체 생산 방법과는 달리 아직까지는 사람에서의 성공률은 낮으며 발표된 예도 적다(Savita *et al.*, 1989; Maurice *et al.*, 1989). 시험관내 면역반응에서 가장 중요한 것은 B 임파구를 자극하여 항체를 생산하는 plasma cell로 분화시키는 B 임파구 활성화인자로서, 흉선세포와 대식세포가 효과적으로 임파구 분화촉진인자(lymphocyte mitogen)를 생산하는 것으로 알려져 있다(전·서, 1994).

HLA(Human Lymphocyte Antigen)는 사람의 주요조직적합성 항원으로, 크게 class I, II, III로 나뉜다. 또한, 각 대립유전자들이 거의 비슷한 빈도를 보이는 특징적인 다형현상을 보이는데, 이는 초우성(overdominance)에 의해 유지되고 있다고 보고되어 있다(김·서, 1990). 항 HLA 항체는 HLA에 대한 연구 뿐만이 아니라, 장기나 조직이식시에 조직적합성 여부를 판정하는 아주 중요한 수단이 되고 있다. 따라서, HLA의 판정과 연구를 위해서는 각 항원에 특이적인 항체가 각각 필요하다. 그러나, 사람에게는 인위적으로 면역을 시킬 수가 없다는 제약이 있어, HLA에 대한 단일군 항체 생산의 가장 이상적인 방법은 시험관내 면역에 의한 항 HLA 단일군 항체를 생산하는 것이다. 그러나, 아직은 그 연구 사례가 전혀 없어, 항 HLA 단일군 항체 생산의 선결조건인 가장 효과적인 시험관내 면역조건을 확립하고자 하였다.

본 연구는 세포표면 항원인 HLA 항원을, MLC(Mixed Lymphocyte Culture)에 응용하여 항 HLA 단일군 항체 생산의 선결조건인 가장 효과적인 시험관내 면역조건을 확립하고자 하였다. 이 방법의 장점은 세포를 항원으로 사용하였기 때문에 항원을 준비하는데 어려움이 없었다는 점이고, 또한 시험관내 항체 생산 방법의 단점인 T_H 임파구의 활성도가 MLC에서는 극히 미약하여 거의 일어나지 않는다는 점이다(Maurice *et al.*, 1989).

재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용한 B10.D2 congenic 마우스와 C57BL/6ByJ 마우스는 일본 국립 유전학 연구소에서 1990년도에 분양받아 본 실험실에서 계통유지시킨 것을 사용하였다.

항원의 준비

HLA class I 항원은 세포의 표면에 존재하는 항원이기 때문에, 수혈을 받은 경험이 없는 건강한 지원자(19세-25세의 남성)로부터 정맥채혈하여 혈중 임파구를 분리하여 그대로 사용하였으며, 조건에 따라 mitomycin C(25 µg/ml)로 불활성화시켜 사용하였다. 혈액으로부터 혈중 임파구를 분리한 방법은 다음과 같다.

혈액 20 ml에 40 unit의 heparin을 첨가하여 혈액의 응고를 방지한 후, 세척배지(serum free medium: 10.2 mg/l RPMI 1640, 2 mg/l sodium bicarbonate)로 1:1로 희석하였다. 15 ml conical tube에 4 ml의 Ficoll-Hopaque 비중액을 넣고, 1:1로 희석한 혈액 10 ml씩을 살며시 중첩시켰다. Conical tube를 실온에서 400 ×g로 30분간 원심분리하였으며, 원심분리가 끝난 후 원심분리기에서 conical tube를 분리된 세포층이 흐트러지지 않도록 조심해서 꺼냈다. Pasteur pipet을 사용하여 흰색을 띠는 단핵세포층을 모두 수거하여 새로운 conical tube에 옮겼다. 세척배지로 현탁한 후 400 ×g에서 5분간 원심분리하는 과정을 3회 반복한 후, trypan blue로 세포를 염색하여 hemocytometer로 세포수를 산정하였다. 세포의 배양조건에 따라 임파구에 mitomycin C(25 µg/ml)를 첨가한 후 37°C에서 30분간 배양하여 불활성화시켜 사용하거나, 그대로 사용하였다.

Human AB serum의 준비

혈액을 유리로 된 50 ml centrifuge tube에 넣어, 실온에서 4시간 방치한 후, 4°C에서 하룻밤동안 놓아두어 혈병(clot)이 형성되도록 하였

다. 다음날 혈병이 부쉬지지 않도록 조심하며 나무막대를 이용해 유리벽으로부터 혈병을 떼어내었다. 혈청을 새로운 50 ml centrifuge tube에 옮기고, 4°C에서 350 ×g로 10분간 원심침전시킨 후, 상등액만을 취하여 남아있던 혈구세포를 제거하였다. 혈청은 56°C에서 30분간 열처리하여 불활성화시킨 후 분주하여 -20°C에 보관하였다.

세포배양배지

세포는 2×10^5 cells/ml의 농도로 세포성장배지(growth medium: 10.2 mg/l RPMI 1640, 50 mM HEPES, 24 mM Sodium Bicarbonate, 1 µg/ml penicillin, 1 µg/ml streptomycin)에 현탁하여 96-well plate에서 배양하였으며, 조건에 따라 15% FBS나 20% human AB serum을 첨가하였다. 각 배양조건에 따라 37°C의 5% CO₂ incubator에서 5일간 배양한 후, 세포배양액을 수거하여 생성된 항체량을 측정하였다.

세포배양조건

시험관내 면역기술에 의해 혈중 임파구 표면항원에 대한 항체를 생산하기 위해서 다양한 배양조건(Table 1)하에서 세포를 배양하였다.

조건배지와 혼합배지

전·서(1994)의 방법에 따라 준비한 후, 세포배양배지와 1:1로 희석하여 사용하였다.

임파구 촉진인자 포함배지(Lymphocyte Mitogen-Containing Medium)

T 임파구에 대한 분화촉진인자로 알려진 Concanavalin A(Con A)는 50 µg/ml, 100 µg/ml의 조건으로, B 임파구에 대한 분화촉진인자로 알려진 Lipopolysaccharide(LPS)는 100 µg/ml, 200 µg/ml의 조건으로 세포성장배지에 첨가하였다. Pokeweed Mitogen(PWM)은 T 임파구와 B 임파구 모두에 작용하는 분화촉진인자로서, 특히 인간의 혈중임파구에 분화촉진효과가 좋은것으로 알려져 있는데 각각 100배와 200

배씩 희석하여 세포성장배지에 첨가하였다.

또한, Con A 50 µg/ml와 LPS 100 µg/ml, Con A 50 µg/ml와 PWM(200:1), LPS 100 µg/ml와 PWM(200:1)과 같이 두가지 종류의 임파구 촉진인자를 함께 세포성장배지에 첨가하였다.

Mixed Lymphocyte Culture(MLC)

한 개체의 흉선세포와 흉선세포가 아닌 다른 세포를 서로 섞어 배양하는 경우나, 서로 다른 개체의 임파구를 서로 섞어 배양하는 것을 Mixed Lymphocyte Culture(MLC)라고 한다. 이를 응용하여, 항원을 준비한 것과 동일한 과정으로 두 명의 건강한 지원자로부터 혈중 임파구를 분리한 후 섞어주어, 37°C의 5% CO₂ incubator에서 5일간 배양하였으며, human AB serum을 첨가한 세포배양배지에 조건에 따라 다양한 B 임파구 분화촉진인자를 첨가시켜 주었다.

시험관내 면역방법의 최적화

시험관내에서 혈중 임파구 표면항원에 대한 항체를 생산하는 최적의 조건을 확립하기 위해서 위의 다양한 배양조건들로 시험관내 면역을 수행하였다.

마우스 체계

B10.D2 congenic 마우스(6주령-10주령)를 도살하여, 무균상태로 비장을 적출하여 세척배지로 현탁한 후, 400 ×g에서 원심침전하는 과정을 3회 반복하였다. 비장세포 침전물을 2×10^5 cells/ml로 준비하고, 항원으로 사용한 비장세포 침전물은 mitomycin C(25 µg/ml)로 불활성화시켜 역시 2×10^5 cells/ml로 준비한 후, 15% FBS를 첨가한 세포성장배지로 96-well plate에서 배양하였다.

이때, 임파구 분화촉진인자로서 흉선세포 조건배지, 대식세포 조건배지, 흉선세포 혼합배지, 대식세포 혼합배지, Con A, LPS, PWM 등을 세포성장배지에 각각 첨가한 조건에서 시험관내 면역을 수행하였다.

인간 체계

인간의 혈중 임파구에서 항 HLA 항체를 생산하는 최적의 조건을 찾기 위해 항원을 불활성화하여 배양액에 첨가시키는 경우와, 불활성화시키지 않고 MLC를 응용하여 배양하는 경우로 나누어 시험관내 면역을 수행하였다.

항원의 불활성화

건강한 사람으로부터 정맥채혈하여 얻은 혈중 임파구를 2×10^5 cells/ml로 준비하고, 항원은 불활성화시켜 역시 2×10^5 cells/ml로 준비하여 96-well plate에서 15% FBS를 첨가한 세포성장배지로 배양하였다. 이때, 임파구 분화촉진인자로서 흉선세포 조건배지, 대식세포 조건배지, 흉선세포 혼합배지, 대식세포 혼합배지, Con A, LPS, PWM, 그리고 임파구 촉진인자를 2가지씩 섞어 세포배양배지에 각각 첨가한 조건에서 시험관내 면역을 수행하였다.

MLC의 응용

건강한 두사람으로부터 분리한 혈중임파구를 각각 2×10^5 cells/ml로 준비하여 96-well plate에서 15% FBS 또는 20% human AB serum을 첨가한 세포배양배지로 배양하였다. 이때, 임파구 분화촉진인자로서 흉선세포 조건배지, 대식세포 조건배지, Con A, LPS, PWM, 그리고 임파구 촉진인자를 2가지씩 섞어 세포배양배지에 각각 첨가한 조건에서 시험관내 면역을 수행하였다.

항체의 분석

항체의 분석은 면역효소법을 사용하였다(전·서, 1994). 각 배양조건에 따른 세포배양액을 수거하여 $400 \times g$ 에서 5분간 원심침전하여 세포를 침전시킨 후, 상등액을 수거하여 농축시키지 않고 그대로 항체분석에 사용하였다. 또한 HLA가 세포표면 항원이기 때문에 공여자의 혈중 임파구를 분리하여 그대로 항원으로 사용하였다.

항체의 특이성

MLC를 수행한 결과로 생성된 항체가 HLA에 특이적인 항체인지의 가능성여부를 확인하기 위

하여, 건강한 6명의 지원자로부터 2명씩 짝을 이뤄 3가지 조합의 MLC를 수행하였다. 배양 5일 후에 이들 3가지 조합의 배양액을 수거한 후, 그 중의 1가지 조합을 이루었던 2명의 혈액으로부터 혈중 임파구를 분리하여, 이들을 각각 항원으로 하여 면역효소법을 수행하여 항체의 생성 정도를 비교하였다.

결과

시험관내에서 항 HLA 항체를 생산하는 최적의 조건을 확립하기 위해서 다양한 조건(Table 1)들로 시험관내 면역을 수행하였으며(Fig. 1), 마우스의 비장세포와 인간의 혈중 임파구에서 각각 항체 생산을 시도하였다.

마우스 체계에서의 시험관내 항체 생산

마우스의 조건배지와 혼합배지의 효과

항체량을 측정하기 위해서 시험관내 면역 5일째의 배양액을 수거하여 면역효소법을 수행하였다. 그 결과, 모든 조건에서 음성 대조구보다 훨씬 높은 양의 항체가 확인되었다(Fig. 2). 그 중 가장 많은 양의 항체가 검출된 조건은 대식세포 조건배지를 면역시 같이 넣어준 방법으로 0.945의 흡광도를 나타내었다.

임파구 촉진인자 포함배지의 효과

항체량을 측정하기 위해서 시험관내 면역 5일째의 배양액을 수거하여 면역효소법을 수행하였다. 그 결과, 조건배지나 혼합배지보다 적은 양의 항체가 확인되었다(Fig. 2). 가장 많은 항체가 검출된 LPS의 경우, 0.721의 흡광도를 나타내었다. Con A의 경우 첨가한 양을 증가시켰을 때 생성된 항체량이 증가한 반면에, LPS의 경우는 반대로 첨가한 양을 증가시켰을 때 생성된 항체량이 감소하였다. PWM은 T 임파구와 B 임파구에 모두 효과적인 촉진인자로 알려져 있는데, 0.65의 흡광도를 보여 기대했던 만큼의 항체량이 검출되지는 않았다.

Table 1. Various conditions for *in vitro* immunization. To establish the most effective methods for anti-HLA antibody production using the *in vitro* immunization, researches were practiced under 14 different culture conditions containing thymocyte and/or macrophage, or various lymphocyte mitogens such as concanavalin A, lipopolysaccharide, pokeweed mitogen.

culture conditions used in <i>in vitro</i> immunization		Abbreviation
Conditioned medium	Thymocyte conditioned medium	TCM
	Macrophage conditioned medium	MCM
	Co-conditioned medium	BCM
Mixed cultured medium	Mixed thymocyte cultured medium	T
	Mixed macrophage cultured medium	M
Lymphocyte mitogen-containing medium	Concanavalin A 50 mg/ml	C50
	Concanavalin A 100 mg/ml	C100
	Lipopolysaccharide 100 mg/ml	L100
	Lipopolysaccharide 200 mg/ml	L200
	Pokeweed Mitogen (100:1)	P100
	Pokeweed Mitogen (200:1)	P200
	Concanavalin A 50 mg/ml + Lipopolysaccharide 100 mg/ml	C50+L100
	Concanavalin A 50 mg/ml + Pokeweed Mitogen (200:1)	C50+P200
	Lipopolysaccharide 100 mg/ml + Pokeweed Mitogen (200:1)	L100+P200

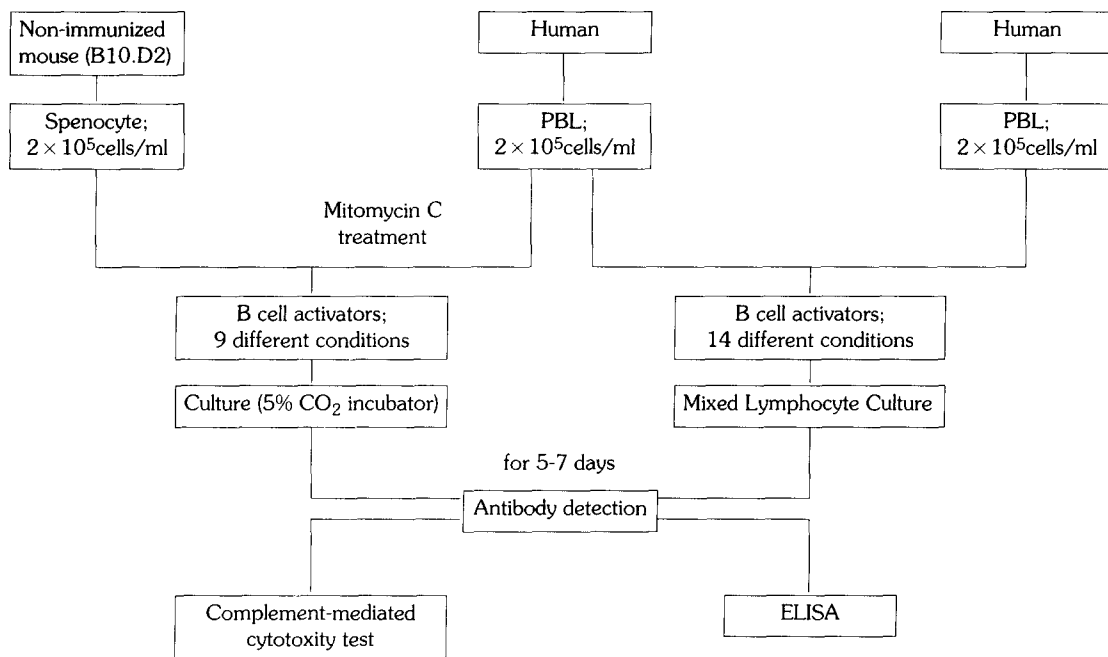


Fig. 1. Experimental scheme for *in vitro* immunization under various conditions.

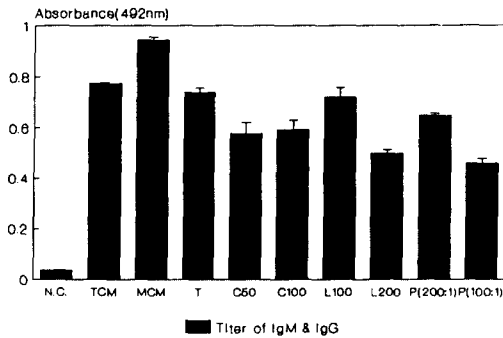


Fig. 2. Effect of various conditioned medium, mixed-cultured medium and lymphocyte mitogen on mouse splenocyte with inactivated antigen. Splenocytes of non-immunized B10.D2 mice were cultured *in vitro* for 5 days with inactivated antigen as described previously. After 5 day culture, the supernatant was collected and assayed for polyclonal IgM and IgG. Values given are means \pm SE from two different experiments. (N.C.; Negative Control)

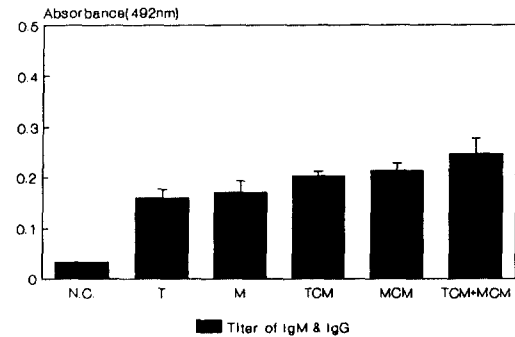


Fig. 3. Effect of various conditioned medium, mixed-cultured medium on PBL response with inactivated antigen. PBL of healthy individual were cultured *in vitro* for 5 days with inactivated antigen as described previously. After 5 day culture, the supernatant was collected and assayed for polyclonal IgM and IgG. Values given are means \pm SE from two different experiments. (N.C.: Negative Control)

인간 체계에서의 시험관내 항체 생산

마우스의 조건배지와 혼합배지의 효과

항체량을 측정하기 위해서 시험관내 면역 5일째의 배양액을 수거하여 면역효소법을 수행하였다. 그 결과 모든 조건에서 음성 대조구보다 높은 양의 항체가 확인되었으나, 마우스 체계에서의 항체량과 비교하면 매우 적은 양이었다. 그 중 가장 많은 양의 항체가 검출된 조건은 두 가지 세포조건배지로 0.247의 흡광도를 나타내었다(Fig. 3).

임파구 촉진인자 포함배지의 효과

항원을 불활성화시켜 사용하였을 경우

항체량을 측정하기 위해서 시험관내 면역 5일째의 배양액을 수거하여 면역효소법을 수행하였다. 그 결과로 모든 조건에서 음성 대조구보다 높은 양의 항체가 확인되었으나, 마우스 체계에서의 항체량과 비교하면 매우 적은 양이었다. 그 중 가장 많은 양의 항체가 검출된 조건은 PWM을 첨가시킨 조건으로 0.385의 흡광도를 나타내었다. 마우스 체계의 경우 PWM의 효과가 그다지 좋지 않았음과 비교할때, PWM에 대한 반응

성은 인간의 혈중임파구의 경우에 더 좋음을 보여주었다. 또한 마우스 체계와는 반대로 Con A는 첨가한 양을 증가시켰을때 생성된 항체량이 감소하였고, LPS의 경우는 첨가한 양을 증가시켰을때 항체 생성량이 증가함을 보여주었다(Fig. 4).

두가지 종류의 임파구 촉진인자를 함께 첨가시킨 경우, 전체적으로 항체 생성량이 약간 증가하기는 하였으나, 한 종류의 임파구 촉진인자를 첨가한 조건들보다 항체 생성량의 큰 증가는 보이지 않았다.

MLC의 효과

항원을 불활성화시켜 첨가하는 것이 아니라 두 사람의 혈중 임파구를 함께 배양하는 MLC를 수행하였으며, 항체량을 측정하기 위해서 시험관내 면역 5일째의 배양액을 수거한 후 MLC를 수행한 두사람의 혈중 임파구를 분리하여 이들 각각을 항원으로 하여 면역효소법을 수행하였다. 시험관내 면역은 임파구 촉진인자들을 첨가한 조건에서 수행하였으며, 그 결과 모든 조건에서 음성 대조구보다 높은 양의 항체가 확인되었으나, 마우스 체계에서의 항체량과 비교하면 매우 적은 양이었다. 가장 많은 양의 항체가 검출된 조건은 PWM을 첨가시킨 조건으로 0.33의 흡광도를 나

타내었다(Fig. 5).

지금까지 사용된 혈청은 FBS였는데, 이를 인간의 AB형 혈청으로 대체하여 MLC를 수행하였다. 항체량을 측정하기 위해서 시험관내 면역 5일째의 배양액을 수거하여 역시 위와 동일하게 면역효소법을 수행한 결과, 임파구 촉진인자들을 포함하는 모든 조건에서 다량의 항체가 확인되었

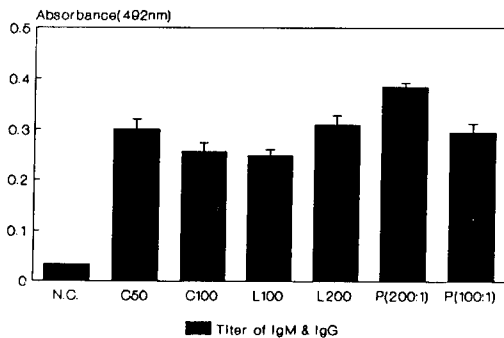


Fig. 4. Effect of various lymphocyte mitogen on PBL response with inactivated antigen. PBLs of healthy individuals were cultured *in vitro* for 5 days with inactivated antigen as described previously. After 5 day culture, the supernatant was collected and assayed for polyclonal IgM and IgG. Values given are means \pm SE from two different experiments. (N.C.; Negative Control)

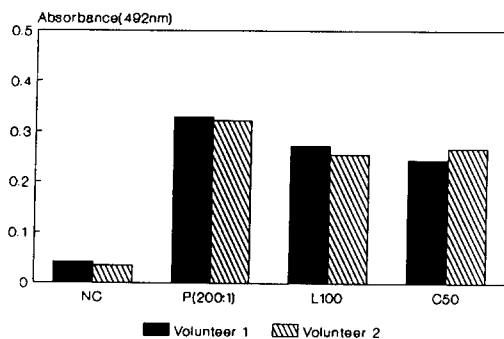


Fig. 5. Effect of various lymphocyte mitogen on PBL response in MLC (15% FBS supplemented). PBLs of two healthy persons were mixed and cultured *in vitro* for 5 days in presence of 15% FBS as described previously. After 5 day culture, the supernatant was collected and assayed for polyclonal IgM and IgG. Values given are means \pm SE from two different experiments. (N.C.; Negative Control)

다(Fig. 6). 가장 많은 양의 항체가 생산된 조건은 PWM을 첨가한 조건으로 0.727의 흡광도를 나타내었으며, 두가지 종류의 임파구 촉진인자를 함께 첨가시킨 경우 전체적으로 항체 생성량이 약간 증가하기는 하였으나, 한가지 종류의 임파구 촉진인자를 첨가한 조건들보다 항체 생성량의 큰 증가는 보이지 않았다.

항체의 특이성

두사람의 혈중 임파구를 함께 배양하는 MLC를 수행한 결과로 생성된 항체가 HLA에 특이적인 항체인지 여부를 확인하기 위하여, 6명의 지원자로부터 3가지 조합의 MLC를 수행한 후 그 중의 1가지 조합을 이루었던 2명의 혈중 임파구를 각각 항원으로 하여 면역효소법을 수행하였다. 항원으로 사용한 혈중 임파구와 MLC 배양액이 동일한 사람인 경우의 조합은 면역효소법을 수행한 결과 흡광도 0.648의 높은 항체 생성량을 보였으며, 이에 반해 면역에 사용하지 않은 혈중 임파구를 항원으로 면역효소법을 수행한 경우는 흡광도 0.285의 상대적으로 낮은 항체 생성량을 보였다(Fig. 7).

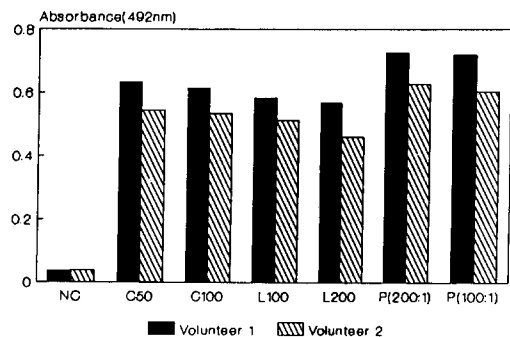


Fig. 6. Effect of various lymphocyte mitogen on PBL response in MLC (15% human AB serum supplemented). PBLs of two healthy persons were mixed and cultured *in vitro* for 5 days in presence of 15% human AB serum as described previously. After 5 day culture, the supernatant was collected and assayed for polyclonal IgM and IgG. Values given are means \pm SE from two different experiments. (N.C.; Negative Control)

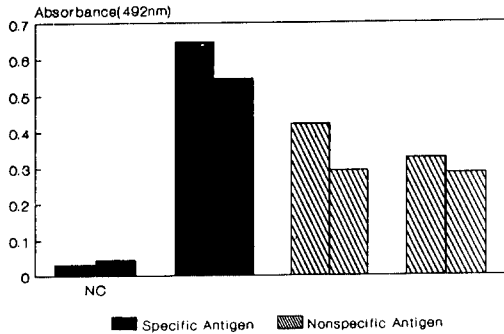


Fig. 7. Specificity of antigen-induced antibody production. PBLs of two healthy persons were mixed and cultured *in vitro* for 5 days in presence of 15% human AB serum as described previously. After 5 day culture, the supernatant was collected and assayed for polyclonal IgM and IgG. (N.C.; Negative Control)

고찰

HLA 항원에 대한 시험관내 항체 생산의 최적조건을 확립하기 위해서 본 연구를 수행하였다. 사람의 혈중 임파구를 항원으로하여 다양한 시험관내 면역조건으로 마우스의 비장세포와 사람의 혈중 임파구를 배양하여, 면역효소법(ELISA)으로 항체생성 정도를 검정하였다. 그 결과, 마우스의 비장세포의 시험관내 면역시에는 대식세포 조건배지와 LPS의 첨가가 가장 효과적이었고, 인간의 혈중 임파구의 시험관내 면역시에는 20% human AB serum과 PWM을 첨가하여 MLC를 수행한 조건이 가장 효과적임을 알 수 있었다.

시험관내 면역시 항원에 특이적인 면역 글로불린을 분비하는 세포를 유도하고자 하는데 있어서 중요한 것으로는, TS 세포의 제거, 고밀도의 임파구 배양, 그리고, 적합한 종류의 lymphokine의 첨가를 적절히 조절하는 것 등이 있다(Karol and Neville, 1982; Danielsson *et al.*, 1987; Borrebaeck, 1988; Gupta *et al.*, 1988). T_S 세포의 제거는 B 임파구의 활성화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, PWM을 함께 첨가해 줄 경우 target 세포의 증식을 도우며, T_H 세포로부터

lymphokine의 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Borrebaeck, 1988). PWM은 다른 종류의 활성화인자가 함께 첨가되지 않은 경우에는 고농도(1:50)로 첨가하는 것이 효과적이라고 보고되었으나(Strike *et al.*, 1984), 본 연구 결과에서는 저농도(1:200)로 첨가하는 것이 효과적임을 보여 주었다. 또한, 배양액내에 적합한 종류의 lymphokine을 첨가하는 것이 매우 중요한데, 임파구 촉진인자(lymphocyte mitogen)나 lymphokine의 첨가가 없이는 임파구 배양은 단지 4-5일만이 가능한 것으로 보고되고 있다(Borrebaeck, 1988). 따라서, 일반적으로 시험관내 면역시에는 IL-1, IL-2, BCGF(B cell growth factor), BCDF(B cell differentiation factor)와 같은 cytokine이나 lymphokine들을 첨가하는것이 보고되고 있다. MLC는 한 개체로부터 유래한 흥선 세포와 그 밖의 흥선 세포가 아닌 다른 세포를 서로 섞어 배양하는 경우나, 서로 다른 개체의 임파구를 서로 섞어 배양하는 경우, 2-3일 후면 거대분자의 합성, 임파구의 blast transformation, 증식등이 활발해지는 현상을 말한다(Klein, 1986). 본 연구에서는 이에 착안하여, 두사람의 혈중 임파구를 섞어서 4-5일간 배양하여 MLC를 수행한 결과, HLA 항원에 대한 항체 생산에 유용한 lymphokine의 생성이 유도됨을 알 수 있었다. 그러나, FBS를 human AB serum으로 대체하고, 사람의 혈중 임파구의 경우 lymphocyte mitogen에 대한 반응도가 비교적 낮으므로 PWM을 처리하기에 앞서 임파구세포를 preincubation시켜 처리한 결과, 두 사람의 항원에 대해 각각 다량의 항체가 생성됨이 확인되었다. 이로 볼때, MLC에 의해 효과적인 분화 촉진 물질들이 생산되는 것으로 사료된다. 또한, 마우스의 조건배지와 혼합배지는 마우스의 흥선세포의 분화에는 효과적이었으나, 인간의 혈중 임파구 분화에는 그 효과가 미미했다. 이는 인간의 B 세포를 형질세포로 분화를 유도시키는데 마우스의 조건배지나 혼합배지가 거의 효과가 없음을 보여주며, 중간 차이에 의한 분화 유도물질의 차이로 추정된다.

또한, Miller 등(1978)은 LPS를 이용하여

인간의 혈중 임파구를 활성화시키는데는 혈청의 종류가 중요하다고 보고한 바 있다. 이는 억제적인 물질을 합성하는 대식세포를 활성화시키는데 혈청의 성분이 관여하며, 특히 인간의 혈청이 이러한 대식세포의 활성을 억제한다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 human AB serum의 존재하에서 혈중 임파구를 20시간 preincubation시켜, LPS를 첨가한 결과 다량의 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다.

확립된 시험관내 항체생성 조건에서 PWM에 대한 각 개개의 반응성을 본 결과, 반응 정도에 차이를 보임을 알 수 있었는데 이는 개개의 PWM에 대한 감수성의 차이로 생각되어진다. 또한, 마우스와 인간 체계에서의 최적의 항체 생성 조건 하에서 각각의 항원에 대한 항체 생성 효율을 비교한 결과 인간 체계에서의 항체생성 효율은 마우스 체계의 약 77% 정도임을 보였다.

본 연구에서는 사람의 항 HLA 단일군 항체생성의 선결조건인 효과적인 시험관내 면역조건을 확립하였으며, 따라서 HLA 항원에 대한 사람의 단일군 항체를 생산할 수 있는 가능성을 확인하였다. 인간 체계에서 단일군 항체를 생산하고자 하는 데 있어서 가장 취약한 부분은 안정한 human myeloma cell line이 개발되어 있지 않다는 점이다(Karol and Neville, 1982). Human myeloma cell line을 murine myeloma cell line과 비교했을 경우, 상대적으로 긴 doubling time과 세포 분열중의 염색체소실, 그리고 이미 개발되어 있는 fusion partner cell line 중의 다수가 polyclonal origin이라는 점등의 단점이 발견되어진다. 따라서, 인간의 단일군 항체 생산을 위한 가장 시급한 문제의 해결을 위해서는, 무엇보다도, 보다 안정한 partner cell의 개발이 선행되어야 할 것이다.

감사

본 연구는 1993년도 교육부 학술연구조성비에

의해 수행된 연구의 일부임.

인용문헌

- Borrebaeck, C.A.K. and R.K. Carl, 1983. *In vitro* immunization of mouse spleen cells and the production of monoclonal antibodies. *Acta Chem. Scand.* pp.647.
- Borrebaeck, C.A.K., 1986. *In vitro* immunization for production of murine and human monoclonal antibodies. *Trends Biotechnol.* **4**: 147.
- Borrebaeck, C.A.K., 1988. *In vitro* stimulation in hybridoma technology. *Prog. Biotechnol.* **5**: 247.
- Cavagnaro, J. and M.E. Osband, 1983. Successful *in vitro* primary immunization of peripheral blood mononuclear cells and its role in the development of human-derived monoclonal antibodies. *Biotechniques* **3**: 30.
- Danielsson, L., S.A. Moller and C.A.K. Borrebaeck, 1987. Effect of cytokines on specific *in vitro* immunization of human peripheral B lymphocytes against T-cell dependant antigens. *Immunol.* **61**: 51.
- Gupta, S., S. Gollapudi and B. Vayuvegula, 1988. Short communication LPS-induced murine B cell proliferation: A role of protein kinase C. *Cell. Immunol.* **117**: 425.
- Karol, S. and A.M. Neville, 1982. Human monoclonal antibodies. *Nature*, **300**: 25. *Insulins. J. Immunol. Methods.* **120**: 159.
- Klein, J., 1986. *Natural history of the Major Histocompatibility Complex.* Wiley and Sons Press, New York.
- Luben, R.A. and M.A. Mohler, 1980. *In vitro* immunization as an adjuvant to the production of hybridomas producing antibodies against the lymphokine osteoclast activating factor. *Mol. Immunol.* **17**: 635.
- Maurice, R.G. and J.J. Oger, 1989. Regulation of *in vitro* PWM-induced IgG secretion in humans. *Cell. Immunol.* **118**: 435.
- Mishell, R.I. and R.W. Dutton, 1986. Immunization of normal mouse spleen cell suspension *in vitro*. *Science* **153**: 1004.
- Noriyaki, S. and K. Kuratsuki, 1989. The role of T cells in immunoglobulin class switching of specific antibody production system *in vitro* in humans. *Cell. Immunol.* **118**: 239.
- Pardue, R.L., R.C. Brady, G.W. Perry and J.R. Dedman, 1983. Production of monoclonal antibodies against calmodulin by *in vitro* immunization of spleen cells. *J. Cell. Biol.* **96**: 1149.

- Savita, P., C. Narendra, L. Corrine, L. Wilma, H. Rita, and B. Ravi, 1989. *In vitro* synthesis of human immunodeficiency virus-specific antibodies in peripheral blood lymphocytes of infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 7532.
- Strike, L.E., B.H. Devens and R.L. Lundak, 1984. Production of human-human hybridomas secreting antibody to sheep erythrocytes after *in vitro* immunization. *J. Immunol.* **132**: 1798.
- Van Ness, J., U.K. Laemmli and D.E. Pettijohn, 1984. Immunization *in vitro* and production of monoclonal antibodies specific to insoluble and weakly immunogenic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 7897.
- 김재범, 서동상, 1990. 컴퓨터 시뮬레이션을 이용한 MHC의 유전적 다형현상에 관한 연구. *성대논문집* **14**: 371-391.
- 전태훈, 서동상, 1994. 시험관내 면역기술에 의한 항체 생산에 관한 연구. *동물학회지* **37**: 19.
- (Accepted February 10, 1995)

Study on the Anti-HLA Antibody Production Using *in vitro* Immunization Technique

Hye-Weon Kim, Dong-Sang Suh (Department of Genetic Engineering Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, KOREA)

In this research, we established the most effective method of *in vitro* immunization suited for human anti-HLA monoclonal antibody production. Splenocyte from B10.D2 congenic mice, aged 2-4 months, and PBL from healthy individual were each cultured for 5 days with human PBL as an antigen under 14 different medium conditions including thymocytes, macrophage, conditioned medium and lymphocyte mitogens (LPS, Con A, PWM). The production of antibodies was detected by ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) in combination with anti-IgG and anti-IgM as second antibodies. Under the mouse system, it was found that these thymocytes, macrophage, conditioned medium and lymphocyte mitogens (LPS, Con A, PWM) were effective differentiation-activators. In the human system, differentiation effect of lymphocyte mitogens was better than those of thymocyte, macrophage and conditioned medium. And, it was found that allogenic mixed lymphocyte culture was the most effective culture method for production of the differentiation-activator.