

닭의 혈액내 단핵세포 표면항원 특이 단클론성 항체 생산

최준구, 성환우, 김선중*

국립수의과학검역원, 서울대학교 수의과대학*

(게재승인 : 2002년 5월 28일)

Production of monoclonal antibodies specific to the surface antigens of chicken peripheral blood mononuclear cells

Jun-Gu Choi, Haan-Woo Sung, Sun-Joong Kim*

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-016, Korea

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea*

(Accepted : May 28, 2002)

Abstracts : This study was performed to produce monoclonal antibodies (mAb) specifically reacting with chicken leukocyte surface antigens. Popliteal lymph node cells of BALB/c mice previously immunized through foot-pad with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of chickens separated by Ficoll-Histopaque method. They were fused with P3X63Ag14 mouse myeloma cells. A total of 34 hybridomas secreted antibodies specifically binding to the PBMC. According to the reactivity patterns with PBMC, the mAbs were divided into 4 groups. Group I mAbs (IIB3, IIB10, IIE10) specifically reacted with non-adherent lymphocytes but not with adherent cells which were mainly composed of thrombocytes and monocytes in PBMC culture. These mAbs were reactive with 25-59% of thymus cells and 42-64% of spleen cells of chickens. They did not show any significant reactivity with cells in the bursa of Fabricius, T-cell (MDCC-MSB1) and B-cell (LSCC-1104B1) lines. These results indicate that Group I mAbs specifically reacted with T-lymphocyte subpopulation. Monoclonal antibodies in Group II (IC6, IG2-2 and IID9) showed specific reactivity with monocytes but not with thrombocytes or non-adherent cells in PBMC culture. These mAbs, though not reacted with the chicken macrophage cell line, HD11, also bound to macrophages of the spleen and lung in immunohistochemical staining. Five mAbs in Group III showed characteristics of binding to lymphocytes and monocytes, but not to thrombocytes. Twenty-three mAbs in Group IV showed specific reactivity to lymphocytes, monocytes, and thrombocytes. Two mAbs (IC3 and IE9) in Group IV reacted with most of PBMC.

Key words : monoclonal antibody, chicken, peripheral blood mononuclear cell, lymphocyte, monocyte, thrombocyte, macrophage

서 론

닭에 있어서 면역학의 연구는 질병의 방역 및 조절 등 경제적인 문제 뿐 아니라 면역학의 기초적인 연구로서도 상당히 중요한 부분을 차지하고 있다. 닭 면역계의 구성세포와 기능 등은 포유류와 상당히 유사한 반면 태

아에 대한 접근의 용이성, B-cell system과 T-cell system의 분리로 인한 실험설계 및 결과판단에 있어서 단순화 등의 유리한 조건이 있다¹.

면역반응의 주체인 림프구는 형태학적으로 서로 구분이 어렵기 때문에 특정 기능을 갖는 림프구를 구분하기 위한 노력들이 계속되어져 왔다. 이러한 노력들은 이

* Corresponding author : Phone : +82-31-290-2733 (E-mail : kimsja@snu.ac.kr)

종간 혹은 동종간의 항혈청을 생산함으로써 비롯되었는데^{2,3}, 이들 각각의 세포에 대한 항혈청의 생산은 방법적으로 쉽지 않을 뿐만 아니라 상당한 시간을 필요로 하는 작업이다. Köhler와 Milstein⁴에 의해 PEG (polyethylene glycol)를 이용한 단클론성 항체(monoclonal antibodies: mAb)의 생산방법이 소개된 이후 사람을 비롯한 각종 동물의 백혈구에 존재하는 특정 표면항원에 대한 mAb는 백혈구를 아군별로 분류하는 데 널리 활용되고 있다⁵⁻¹⁰.

지금까지 밝혀진 백혈구 표면항원에 대한 대부분의 지식은 사람을 포함한 포유류를 근간으로 하고 있다⁵⁻¹⁰. 그러나 조류와 포유류 간의 계통발생학적 차이에도 불구하고 조류 림프구 표면항원 특이 mAb¹¹⁻¹⁵를 이용한 실험을 통하여 조류에도 포유류와 유사한 백혈구 표면항원들이 보존되어 있음이 밝혀지고 있다¹¹⁻¹⁸. 림프구 표면항원 특이 mAb는 면역세포의 조직내 분포와 분화과정의 파악, 특정 면역세포의 분리¹⁷⁻²³, 세균, 바이러스, 기생충 등의 감염에 대한 면역계 세포의 작용 이해 및 질병의 예후, 진행상태 등의 평가²⁴⁻²⁹에 중요한 도구로 활용되고 있다. 지금까지 작성된 조류 백혈구 표면항원에 대한 mAb는 다양성에서 제한적일 뿐만 아니라 모두 외국에서 제작된 것으로 아직 국내에서는 작성된 것이 없는 실정이다. 본 연구는 닭의 면역계 세포 표면에 발현되는 항원에 대한 mAb를 작성하고, 간접면역형광항체법과 면역조직화학염색법 등을 이용하여 작성된 mAb의 혈중 및 조직 내의 단핵세포에 대한 반응성과 이들 세포의 림프조직 내 분포를 파악하고자 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물

순환혈액 내 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)와 흉선, 비장, Fabricius (F) 낭세포, 복강 대식세포 등을 얻기 위하여 Hy-Vac(Adel, Iowa, USA)으로부터 구입한 specific pathogen free(SPF) 종란을 실험실에서 부화시켜 isolator에서 사육하며 실험에 사용하였으며, mAb 제작을 위해 BALB/c 마우스를 사용하였다.

PBMC의 분리

SPF 닭의 상완정맥으로부터 3ml의 혈액을 동량의 Alsever's solution이 담긴 주사기에 채혈한 후 Ficoll-Hypaque medium(Histopaque-1083, Sigma)에 중층하여 200×g에서 25분간 원심분리하여 경계면에서 PBMC를 분리하였다.

단클론성 항체의 생산

위에서와 같은 방법으로 분리한 PBMC를 10^7 - 10^8

cells/ml의 농도로 PBS에 희석하여 Chen 등¹⁶의 방법에 따라 개체당 0.2ml을 4-8주령의 BALB/c 마우스의 피하로 1차 접종하였고, 일주일 간격으로 PBMC 부유액 0.2ml씩을 마우스의 양쪽 발바닥을 통해 2회 접종하였다. 마지막 접종 3-4일 후에 슬와림프절(popliteal lymph node)을 채취하고 이로부터 얻어진 림프구를 마우스 골수종 세포(P3-X63Ag14)와 50% polyethylene glycol 1500 (Boehringer Mannheim)을 이용하여 융합하였다. 융합된 세포는 HAT supplement(0.1mM hypoxanthine, 0.4M aminopterin, 16M thymidine; Sigma)와 20% 소태아혈청이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified eagles medium, Gibco BRL)에 부유시켜 배양하였다. 융합세포 배양시 feeder cell로는 4-6주령의 ICR 마우스 복강에서 채취한 탐식세포(resident macrophage)를 사용하였다. 융합 1주 후부터는 HT supplement (100M hypoxanthine, 16M thymidine; Sigma)와 20% 소태아혈청이 첨가된 DMEM으로 배양하였고, 2주 후부터는 20% 소태아혈청만 첨가된 DMEM으로 배양하였다.

융합세포의 PBMC에 대한 특이항체 생산검사

융합세포의 특이항체 생산 여부는 융합 10-15일 후 융합세포군이 well 바닥의 1/3이상 자랐을 때 배양액을 채취하여 간접면역형광항체법(indirect immunofluorescence assay; IFA)으로 확인하였다. 위에서의 방법으로 준비한 PBMC를 poly-L-lysine(Sigma)으로 처리한 slide에 도말하고 융합세포 배양액을 가하여 37°C, humidified condition에서 30분간 반응시키고, 여기에 FITC-conjugated anti-mouse goat immunoglobulins(Cappel)를 25분간 반응시킨 후, mounting medium(0.5M carbonate buffer : glycerol(1:9))으로 mounting하여 형광현미경(Olympus, BX50)으로 관찰하였다.

융합세포의 cloning, isotyping 및 복수생산

IFA로 검사결과 PBMC와 반응하는 항체를 생산하는 융합세포는 limiting dilution 법으로 2회 cloning 하였으며 생산되는 항체의 isotyping은 mouse-hybridoma subtyping kit(Boehringer Mannheim)을 이용하여 확인하였다. 대량의 항체를 얻기 위해서는 Jones 등³⁶의 방법에 따라 BALB/c 마우스의 복강에 incomplete Freund's adjuvant (Gibco BRL) 0.1ml를 주사하고, 주사 1주일 후 PBMC 특이 mAb 생산 융합세포주 2.5×10⁶ 개를 복강으로 접종하였으며 세포주 접종 1주일 후부터 복수를 채취하였다. 채취된 복수는 3000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

세포주 및 PBMC 세포배양

실험에 쓰인 세포주는 chicken T-cell 유래 세포주 MDCC-MSB1, chicken B-cell 유래 세포주 LSCC-1104B1, chicken macrophage 유래 세포주 HD11 등 세 종류이다. 이들 세포주는 소태아혈청을 첨가한(10%) RPMI 1640(Gibco BRL) 배지에서 배양하였다. PBMC중 부착세포와 비부착세포를 분리하기 위한 PBMC의 배양은 Kaspers 등³⁷의 방법에 따라 PBMC를 소태아혈청(8%)과 닭혈청(2%)을 첨가한 DMEM에 5×10^6 cells/ml의 세포 농도로 부유시켜 멸균된 slide glass가 들어 있는 세포배양용 plastic petridish에 넣어 2시간 및 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 slide glass는 PBS로 3회 세척하여 비부착 세포를 제거하고 냉각된 acetone에 3분간 고정하였다. 비부착 세포는 따로 채취하여 다음 실험에 사용하였다.

닭의 복강 macrophage의 분리와 latex bead 탐식

닭의 복강 macrophage의 분리는 Sabet 등³⁸의 방법에 따라 5-6주령의 SPF 닭의 복강으로 3% Sephadex G-50 (Pharmacia) 5ml를 주사하고, 3-4일 후 복강 삼출세포(peritoneal exudate cell)를 채취하여 PBMC 배양에서와 같은 방법으로 배양하였다. 배양 2일 후 10% latex bead (0.8μ diameter, Sigma)를 5×10^4 배수로 희석하여 첨가한 후 4시간 동안 배양하였다.

생성된 단클론성 항체의 조직내에서의 반응성 조사

생성된 mAb의 조직내에서의 반응성을 조사하기 위하여 IFA나 면역조직화학 염색법(immunohistochemical staining)을 실시하였다. 4-12주령의 SPF 닭으로부터 흉선, 비장, F 낭, 폐를 각각 채취하여 Histo-prep 동결조직포매제(Fisher Scientific)로 포매한 후 -20℃에서 동결시켜 6 m 두께로 동결절편을 만들고 PBST(0.05% Tween 20, 0.01M phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세척하여 동결포매액을 제거한 후 항체의 비특이적 결합을 배제하기 위하여 3% BSA-PBS로 20분간 처리하였다. 1차항체로 위에서 제작한 mAb를 30분간 반응시켰으며, 2차항체로 FITC-conjugated anti-mouse goat Ig(Cappel)를 반응시켰다. 대조 염색으로 0.05% Evans blue (Sigma)를 3분간 처리하여 형광현미경으로 관찰하였다. 면역조직화학 염색법을 위하여 준비한 조직절편을 -20℃로 냉각시킨 acetone으로 5분간 고정하고, 염색전에 PBST로 10분간 세척하여 동결포매액을 제거하였으며, 0.3% H₂O₂ 함유 methanol로 30분간 처리하여 조직내 peroxidase활성을 제거하고, 3% normal horse serum으로 20분간 처리하여 항체의 비특이적 결합을 배제하였다. 여기에 1차항체로 위에서 제작한 mAb를 실온에서 30분간 반응시킨 후 2

차항체로 biotinylated anti-mouse horse antibody(Vector Laboratories)로 25분간 반응시킨 후 위에서와 같은 방법으로 세척하고 ABC reagent(avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase complex; Vector Laboratories)를 실온에서 30분간 반응시킨 후 발색액(0.6mg/ml DAB, 0.03% H₂O₂, 0.01M PBS, pH 7.2)으로 5-10분간 발색시켰으며, 필요에 따라 대조염색으로 Gill s No.3 hematoxylin (Sigma) 염색을 실시하였다.

생성된 단클론성 항체의 면역장기 세포와의 반응성 조사

면역장기 내에서의 mAb와 반응하는 세포는 IFA로 확인하였다. 5-6주령의 SPF 닭의 흉선, 비장, F낭을 무균적으로 채취하여 PBS에 넣고 세척하여 부유세포를 취하였다. 얻어진 부유세포액은 Ficoll-Hypaque (Sigma)에 증층하여 백혈구를 분리하여 소태아혈청(3%)과 NaN₃ (0.1%)를 첨가한 PBS에 2×10^7 cells/ml의 농도로 맞추어 V-bottom 96-well microplate의 well당 50μ씩 분주하였다. 융합세포의 세포배양액을 50 μ/well씩 첨가하여 4℃에서 40분간 반응시킨 후 3회 세척하였다. 상층액을 제거하고 2차항체로 FITC-conjugated anti-mouse goat Ig(Cappel)를 50 μ/well씩 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시켰다. 대조염색을 위하여 methanol로 3분간 고정시키고 0.05% Evans blue를 처리한 후 형광현미경으로 검경하였다. 항체들의 각 면역장기 세포에서의 양성 반응물은 아래의 술식으로 산출하였다.

$$\text{percentage of positive cells} = \frac{\text{Number of positive cells}}{\text{Number of total cells}} \times 100$$

결 과

닭의 PBMC 표면항원에 대한 단클론성 항체의 생산

PBMC의 표면항원에 대한 mAb를 생산하기 위하여 면역시킨 마우스의 슬와 림프절 세포와 마우스 유래의 골수종 세포와의 융합결과 총 134개의 hybridoma를 얻을 수 있었다. 이들을 IFA방법으로 screening한 결과 34개의 clone이 닭의 PBMC 표면항원에 특이적으로 반응하는 것으로 나타났다. 이들 mAb의 isotyping 결과 대부분 IgG1 subgroup에 속하는 것으로 나타났으며, 이들 mAb의 경쇄(light chain)는 모두 kappa chain이었다 (Table 1).

단클론성 항체의 PBMC및 세포주에 대한 반응성

작성된 mAb들의 PBMC에 대한 반응성을 알아 보기

Table 1. Isotypes of mAbs

Total No. of Hybridomas	No. of positive Hybridomas	Isotype				
		IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
134	34	26	2	4	1	1

위하여 PBMC 배양에서 얻은 부착세포, 비부착세포에 대한 IFA를 실시한 결과, 반응성에 따라 4개의 군으로 나눌 수 있었다 (Table 2). PBMC 2시간 배양에서 얻어진 부착세포는 대부분이 thrombocyte로 이루어져 있음을 형태학적으로 확인할 수 있었으며, 48시간 배양에서 얻어진 부착세포는 대부분이 latex bead를 탐식할 수 있는 monocyte/macrophage로 이루어져 있음을 확인할 수 있어 Kaspers 등³⁷과 Peck 등³⁹의 보고 내용과 일치함을 알 수 있었다.

Group I에 속하는 3개의 mAb(IIB3, IIB10, IIE10)들은 PBMC와의 반응성에서 비교적 크기가 작은 세포와 반응하는 양상을 나타내었으며 (Fig 1. A), PBMC배양 2시간 및 48시간 후의 부착 세포와는 전혀 반응하지 않은 반면, 비부착 세포에는 반응성을 나타내어 닭의 PBMC중 thrombocyte, monocyte 외의 세포와 특이적으로 반응함을 알 수 있었다.

Group II에 속하는 3개의 mAb(IC6, IG2-2, IID9)들은

PBMC와의 반응성에서 비교적 크기가 큰 세포에만 특이적으로 반응을 하였으며 (Fig 1. B), Group I의 mAb와는 달리 PBMC 2시간 및 48시간 배양 후의 부착 세포에만 반응성을 나타내었으며, 2시간 배양 후의 부착세포 중 형태학적으로 thrombocyte로 분류되는 세포와는 반응하지는 않았다 (Fig 2. A, B). Group II에 속하는 mAb들은 HD11을 포함한 모든 세포주와는 반응성을 보이지 않았다.

Group III에 속하는 5개의 mAb들은 PBMC 배양에서 얻은 부착 세포와 비부착 세포 모두에 반응성을 나타내었으나 2시간 배양 후 부착세포인 thrombocyte와는 반응성을 관찰할 수 없었으며, 대부분의 48시간 후의 부착세포에 대해서는 반응성을 나타내었다. 그 외의 Group IV로 분류된 mAb들은 부착, 비부착 세포 모두에 반응성을 보였으며, 이 중 두 종류(IC3, IE9)의 mAb는 PBMC를 구성하는 모든 세포 뿐만 아니라 MDCC-MSB1, LSCC-1104B1, HD11 세포주와도 모두 강하게 반응하였다.

Table 2. Reactivity of monoclonal antibodies to cultured peripheral blood mononuclear cells.

Group	Designated mAb	PBMC	2h incubation		48h incubation	
			AC ¹⁾	NAC ²⁾	AC	NAC
I	IIB3					
	IIB10	+	-	+	-	+
	IIE10					
II	IC6					
	IG2-2	+	+ ³⁾	-	+	-
	IID9					
III	IE4					
	IIB5-2					
	IIF2	+	+ ³⁾	+	+	+
	IIF2A11					
	IIIB6					
IV	Others	+	+	+	+	+

1) AC : adherent cells; thrombocytes and other cells

2) NAC : non-adherent cells

3) non-thrombocytes determined by morphological criteria

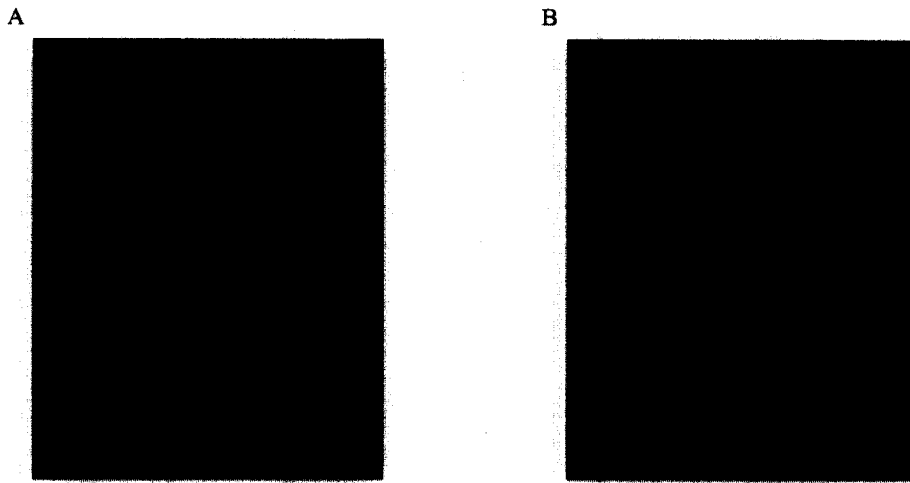


Fig. 1. Immunofluorescence staining of whole PBMC with Group I (A) and Group II (B) monoclonal antibodies. (B) Reactive cells are relatively larger than non-reactive cells.

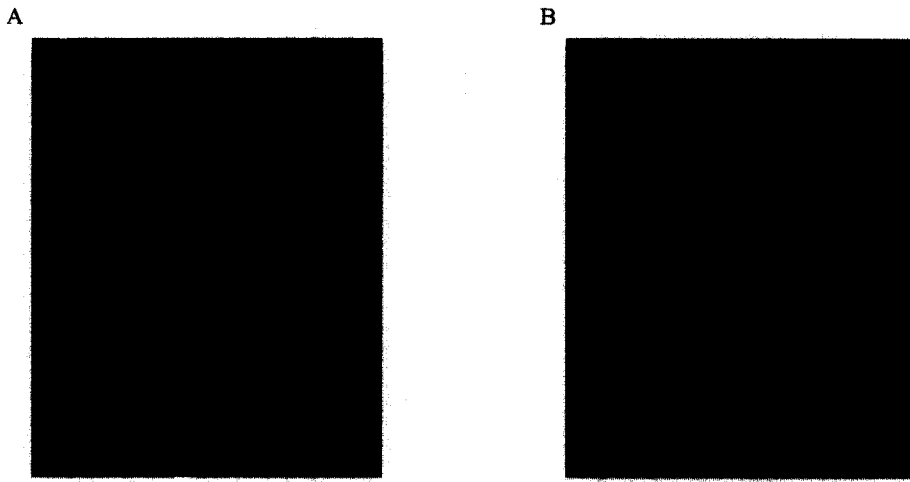


Fig. 2. Immunofluorescence staining of adherent PBMC with Group II antibody (IC6) after cultivation for 2 (A) and 48 hours (B). Note no reaction with the thrombocytes.

단클론성 항체의 면역장기에서의 반응성

Group I과 II 에 속하는 mAb들의 여러 장기에서의 반응성을 관찰하기 위하여 비장, 흉선, F낭, 폐 등의 장기의 동결절편을 제작하여 IFA 혹은 면역조직화학염색법을 실시한 결과, Group I에 속하는 mAb들은 비장에서 강한 반응성을 보였으며, 흉선에서도 반응하였으나, F낭에서는 반응성을 전혀 관찰할 수 없었다 (Fig 3. A, B). Group II에 속하는 mAb들은 비장과 폐에서 반응성을 관찰할 수 있었다 (Fig 4. A, B).

단클론성 항체의 면역장기별 반응세포 빈도

면역장기별로 Group I에 속하는 3개의 mAb와 반응하는 세포의 빈도를 측정하기 위하여 각 장기로부터 세포를 분리하여 IFA를 실시하였다. 이들 mAb는 비장세포의 42-64%, 흉선세포의 25-49%와 반응하였으나 F낭 세포와는 거의 반응하지 않았다. 각 mAb의 반응률은 Table 3과 같다.

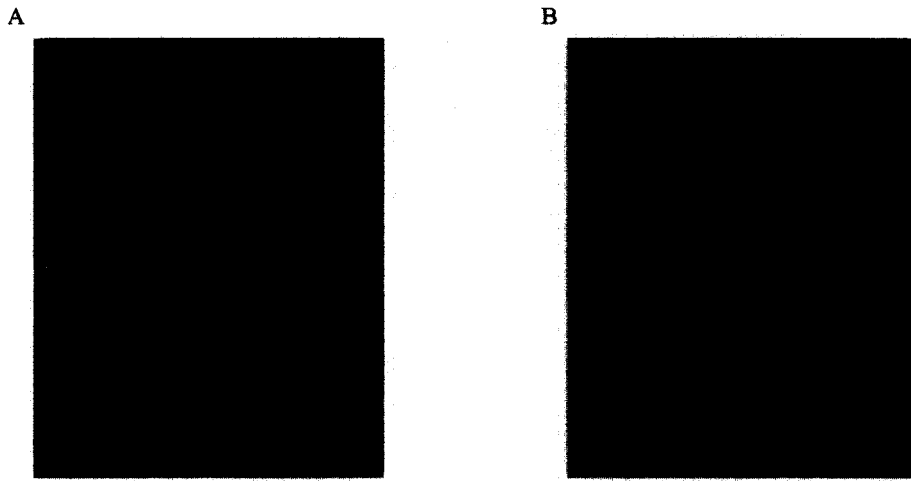


Fig. 3. Immunofluorescence staining of frozen tissue sections from 5-6 week-old SPF chickens with mAb IIB3 (Group I). (A) spleen, (B) thymus.

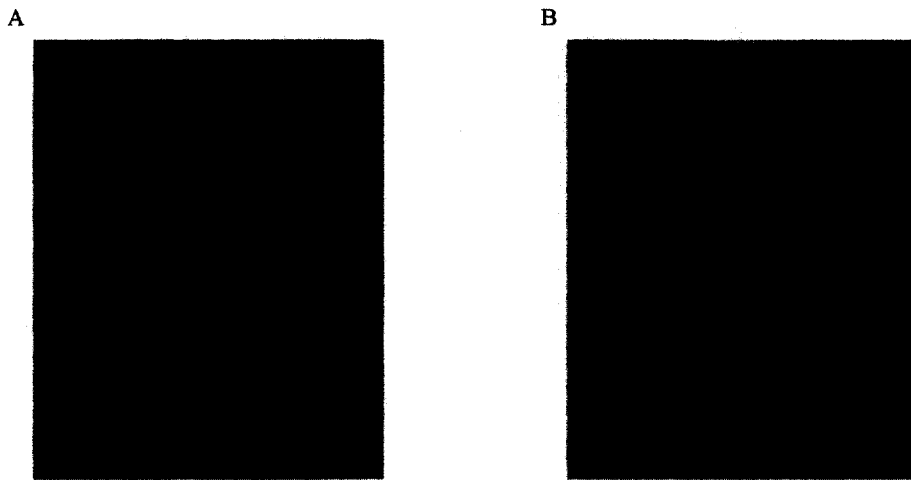


Fig. 4. Immunohistochemical staining of frozen tissue sections from 5-6 week old SPF chickens with mAb IC6 (Group II). (A) spleen, (B) lung.

Table 3. Frequencies of cells in the immune organs reactive with monoclonal antibodies belonging to Group I

mAb	Spleen	Thymus	Bursa of Fabricius
IIB3	41.9 ± 10.9*	24.5 ± 6.2	TRTC ¹⁾
IIB10	49.9 ± 8.7	54.5 ± 10.1	TRTC
IIE10	63.9 ± 11.3	59.3 ± 11.4	TRTC

1) TRTC : Too rare to count

* : mean percentage ± SD

고 찰

본 연구는 국내에서는 아직까지 작성되어져 있지 않은 닭의 혈액 내 단핵세포 표면항원에 특이적인 mAb를 생산하고자 시도하여 총 34개의 mAb를 작성하였으며 이들은 PBMC와의 반응성에 따라 4개의 group으로 분류할 수 있었다 (Table 2).

Group I으로 분류된 3종의 mAb (IIB3, IIB10, IIE10)는 PBMC중 비교적 크기가 작은 세포에만 반응성을 보였으며 (Fig 1. A), PBMC배양에서 얻은 부착세포에는 전혀 반응하지 않았으나 비부착세포에는 강하게 반응하는 것으로 보아 이는 부착세포의 대부분을 차지하는 thrombocyte와 macrophage를 제외한 PBMC에 특이성을 보이는 것으로 확인되었다. Kaspers 등³⁷은 혈중의 thrombocyte, monocyte/macrophage에 공통으로 반응하는 mAb를 이용하여 Ficoll-Hypaque 방법으로 분리한 혈중 단핵세포중 30% 정도가 이들 세포로 구성되어 있음을 밝힌 바 있으며, PBMC 2시간 배양에서의 부착세포의 80% 이상이 thrombocyte로 구성되어져 있다고 하였다. 또한 부착상태에서 thrombocyte는 형태학적으로 다른 세포와 구별이 가능하였으나 이들이 부유상태에 있을 때에는 크기와 세포내 granularity 정도로는 thrombocyte와 lymphocyte의 구분이 어렵다고 보고하였다. Peck 등³⁹은 혈중 단핵세포 48시간 이상 배양후의 부착세포는 96-99%가 monocyte임을 보고한 바 있다. 이상으로 미루어 Group I의 세 mAb는 닭의 PBMC중 granulocyte의 존재를 배제할 수는 없으나 반응 양상으로 볼 때 lymphocyte의 한 아군에 반응하는 것으로 생각되었다. 비록 추가적인 확인실험이 필요하지만 이들 mAb는 조직 내 반응성에서 비장과 흉선 세포에는 25-64%의 높은 반응성을 보인 반면 B-lymphocyte가 주종을 이루는 F낭 세포에는 거의 반응하지 않은 점과 닭의 조직내 림프구 분포를 고려할 때^{11, 16, 23} T-lymphocyte의 한 아군과 반응하는 항체일 가능성이 높은 것으로 사료된다.

지금까지 작성된 닭의 macrophage 표면항원에 대한 mAb는 Jeurissen 등⁴⁰, Trembiki 등⁴¹, Mast 등⁴²에 의해 작성되어진 몇 개 안 되는 mAb가 전부이다. 본 연구에서 Group II로 분류한 3개의 mAb (IC6, IG2-2, IID9)는 1차 screening시 PBMC와의 반응에서 비교적 크기가 큰 세포들에만 특이적인 반응을 나타낸 것으로 보아(Fig 1. B) 일차적으로 monocyte/ macrophage에 특이성이 있는 것으로 판단되었다. 이들은 또한 PBMC 배양에서 얻어진 비부착 세포에는 반응하지 않았으며, 2시간 배양에서 얻어진 부착 세포의 대부분을 차지하는 thrombocyte와도 반응하지 않았으나 (Fig 2. A), 48시간 배양후의 latex

bead 탐식능을 갖는 부착세포와 강하게 반응하여(Fig 2. B) macrophage 특이 항체일 가능성을 더욱 높게 하고 있다. 또한 이들은 Sephadex에 의해 유도된 닭의 복강 삼출세포(peritoneal exudate cell) 배양에서 얻어진 부착 세포에도 강한 반응성을 보였으며(결과 미제시), 이들도 latex bead를 탐식할 수 있음을 확인할 수 있어 Group II에 속하는 3종의 mAb가 반응하는 세포들은 Kaspers 등³⁷, Sabet 등³⁸, Peck 등³⁹이 밝힌 닭의 macrophage의 성상과 일치하였다. 또한 3개의 mAb 중 IC6로 명명된 mAb는 폐와 비장의 macrophage와도 반응성을 보임으로써 (Fig 4) 혈중의 monocyte뿐만 아니라 복강 및 조직중의 macrophage에도 반응성이 있음을 보여주었다. 그러나 Group II에 속하는 mAb들은 MC29 virus에 의해 유도된 닭 macrophage유래 세포주인 HD11에는 반응하지 않아 Mast 등⁴²이 보고한 mAb와는 다른 특이성을 갖는 것으로 생각되었다.

Group III로 분류된 5개의 mAb는 PBMC중 thrombocyte와는 반응하지 않아 PBMC를 구성하는 세포중 thrombocyte 외의 다른 세포의 표면항원에 반응하는 mAb임을 알 수 있었다. 그 외의 Group IV로 분류된 23개의 mAb는 thrombocyte를 포함한 다른 세포에도 반응성을 보였으며, 특히 이들 중 두 가지 mAb(IC3, IE9)는 모든 PBMC뿐만 아니라 닭의 T-lymphocyte (MDCC- MSB1), B-lymphocyte(LSCC-1104B1), macrophage(HD11) 유래 세포주와도 강한 반응성이 관찰됨에 따라 pan-leukocyte specific mAb로 인정되었다. Jeurissen 등⁴⁰ 및 Chung 등³⁴도 leukocyte common antigen(LCA)에 대한 mAb 작성을 보고한 바 있다.

본 연구에서 작성한 mAb는 group별로 PBMC 배양중 부착 및 비부착 세포, 조직 내 세포, 복강 삼출세포 및 세포주와의 반응성에 따라 각각의 특성들이 인정될 수 있었으나, 세포 구분에 이용된 방법이 정상 닭의 PBMC중 granulocyte, basophile, eosinophile, heterophile 등 소수의 구성세포까지 구분지을 수 없어 반응성이 있는 세포의 정확한 동정은 어려웠다. 더욱 확실하게 반응하는 항원을 확인하기 위해서는 이미 반응성이 파악된 mAb들과의 dual-fluorescence flow cytometry를 통한 상관관계, immuno-precipitation법이나 Western blotting법을 통한 항원 분석 등의 연구와 이들 mAb들이 검출할 수 있는 항원들의 기능적인 측면들이 추가로 연구되어져야 할 것이다.

결 론

1. 닭의 혈액내 단핵세포 (peripheral blood mononuclear

- cells: PBMC)에 반응하는 단클론 항체 (monoclonal antibody: mAb) 생성 세포주 작성을 시도하여 총 34개의 항체생산 세포주를 얻을 수 있었다.
- 이중 lymphocyte에만 반응하는 mAb는 3종(Group I), monocyte에만 반응하는 mAb는 3종(Group II)이었으며, monocyte와 lymphocyte에 공통으로 반응하는 mAb는 5종(Group III)이었다. 그 외 23종(Group IV)은 thrombocyte를 포함하는 PBMC를 구성하는 모든 종류의 세포에 반응하는 항체이었다.
 - Group I으로 분류된 3종의 mAb (IIB3, IID10, IIE10)는 닭의 혈중 비부착성 단핵세포, 흉선 세포(25-59%), 비장세포(42-64%)에는 반응하지만 Fabricius낭세포에는 반응하지 않아 T-lymphocyte의 한 아군에 특이적으로 반응하는 것으로 추정되었다.
 - Group II로 분류된 3종의 mAb (IC6, IG2-2, IID9)는 혈액내 monocyte는 물론 조직내의 macrophage와도 반응하는 mAb임을 알 수 있었다.
 - Group IV로 분류된 mAb중 IC3, IE9 두 종류의 mAb는 모든 PBMC에 반응을 나타내어 백혈구 공통항원에 반응하는 항체로 생각되었다.

참고문헌

- Chen CH, Cooper MD. Identification of cell surface molecules on chicken lymphocytes with monoclonal antibodies. In Toivanen A, Toivanen P, ed *Avian Immunology : Basis and Practice volume 1*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 137~154, 1987.
- Roitt IM, Greaves MF, Torrigiani G, et al. The cellular basis of immunological responses. *Lancet*, 367~371, 1969.
- Hudson L, Roitt IM. Immunofluorescent detection of surface antigens specific to T and B lymphocytes in the chicken. *Eur J Immunol*, 3:63~67, 1973.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495~497, 1975.
- Reinherz EL, Kung PC, Godstein G, et al. A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH2. *J Immunol*, 124:1301~1307, 1980.
- Pescovits MD, Lunnay JK, Sachs DH. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol*, 133:368~357, 1984.
- Cerf-Bensussan N, Guy-Grand D, Lisowska-Groszpiere B, et al. A monoclonal antibody specific for rat intestinal lymphocytes. *J Immunol*, 136:76~82, 1986.
- Mackay C. Sheep leukocyte molecules ; A review of their distribution, structure and possible function. *Vet Immunol Immunopathol*, 19:1~20, 1988.
- Ackley CD, Cooper MD. Characterization of a feline T-cell-specific monoclonal antibody reactive with a CD5-like molecule. *Am J Vet Res*, 53:466~471, 1992.
- Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, et al. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretion during lactation. *J Dairy Sci*, 75:998~1006, 1992.
- Chan MM, Chen CH, Ager LL, et al. Identification of the avian homologue of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J Immunol*, 140:2133~2138, 1988.
- Vainio O, Riwar B, Brown MH, et al. Characterization of the putative avian CD2 homologue. *J Immunol*, 147:1593~1599, 1991
- Chen CH, Ager LL, Gartland GL, et al. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *J Exp Med*, 164:375~380, 1986.
- Char D, Sanchez P, Chen CH, et al. A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody. *J Immunol*, 145:3547~3555, 1990.
- Chen CH, Lehmeyer JE, Cooper MD. Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. *J Immunol*, 129:2580~2585, 1982.
- Chen CH, Chanh TC, Cooper MD. Chicken thymocyte-specific antigen identified by monoclonal antibodies : ontogeny, tissue distribution and biochemical characterization. *Eur J Immunol*, 14:385~391, 1984.
- Guillemot FP, Oliver PD, Peault BM, et al. Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J Exp Med*, 160:1803~1819, 1984.
- Chen CH, Pickel JM, Lahti JM, et al. Surface markers on avian immune cells. In Sharma JM, ed *Avian cellular immunology*, CRC press, Boca Raton, Boston : 1~22, 1991.
- Cooper MD, Chen CH, Bucy RP, et al. Avian T cell ontogeny. *Adv Immunol*, 50:87~117, 1991.
- Houssaint E, Diez E, Jotereau FV. Tissue distribution and ontogenic appearance of a chicken T lymphocyte differentiation marker. *Eur J Immunol*, 15:305~308, 1985.

21. Bucy RP, Chen CH, Cihak J, *et al.* Avian T cells expressing receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J Immunol*, 141:2200~2205, 1988.
22. Cihak J, Löms Ziegler-Heitbrock HW, Trainer H, *et al.* Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens. *Eur J Immunol*, 18:533~537, 1988.
23. Lillehoj HS, Lillehoj EP, Weinstock D, *et al.* Functional and biochemical characterizations of avian T lymphocyte antigens identified by monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*, 18:2059~2065, 1988.
24. Lillehoj HS. Cell-mediated Immunity in parasitic and bacterial diseases. In Sharma JM, ed *Avian Cellular Immunology*, CRC Press, Boca Raton, Boston : 155~182, 1991.
25. Isobe T, Lillehoj HS. Effects of corticosteroids on lymphocyte subpopulations and lymphokine secretion in chickens. *Avian Disease*, 36:590~596, 1992.
26. Cloud SS, Lillehoj HS, Rosenberger JK. Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. I. Kinetic alterations of avian lymphocyte subpopulations. *Vet Immunol Immunopathol*, 34:337~352, 1992.
27. Baigent SJ, Ross LNJ, Davison TF. A flow cytometric method for identifying Marek's disease virus pp38 expression in lymphocyte subpopulations. *Avian Pathology*, 25:255~267, 1996.
28. Breed DGJ, Dorrestein J, Vermeulen AN. Immunity to *Eimeria tenella* in chickens : Phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets. *Avian Disease*, 40:37~48, 1996.
29. Trout JM, Mashaly MM, Siegel HS. Changes in blood and spleen lymphocyte populations following antigen challenge in immature male chickens. *British Poultry Science*, 37:819~827, 1996.
30. Breard J, Reinherz EL, Kung PC, *et al.* A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood monocytes. *J Immunol*, 124:1943~1948, 1980.
31. Gorden S, Perry VH, Rabinowitz S, *et al.* Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. *J Cell Sci*, Suppl, 9:1~26, 1988.
32. Pink JR, Rijnbeek A. Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens. *Hybridoma*, 2: 287~296, 1983.
33. Houssaint E, Tobin S, Cihak J, *et al.* A chicken leukocyte common antigen : biochemical characterization and ontogenic study. *Eur J Immunol*, 17:287~290, 1987.
34. Chung KS, Lillehoj HS, Jenkins MC. Avian leukocyte common antigens : molecular weight determination and flow cytometric analysis using new monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*, 28:259~273, 1991.
35. Dietert RR, Golemboski KA, Bloom SE. The avian macrophage in cellular immunity. In Sharma JM, ed *Avian Cellular Immunology*, CRC Press, Boca Raton, Boston : 71~95, 1991.
36. Jones SL, Cox JC, Pearson JE. Increased monoclonal antibody ascites production in mice primed with Freund's incomplete adjuvant. *J Immunol Methods*, 129:227~231, 1990.
37. Kaspers B, Lillehoj HS, Lillehoj EP. Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody, *Vet Immunol Immunopathol*, 36:333~346, 1993.
38. Sabet T, Hsia W, Stanisiz M, *et al.* A simple method for obtaining peritoneal macrophages from chickens. *J Immunol Methods*, 14:103~110, 1977.
39. Peck R, Murthy KK, Vainio O. Expression of B-L (Ia-like) antigens on macrophage from chicken lymphoid organs. *J Immunol*, 129:4~5, 1982.
40. Jeurissen SHM, Janse EM, Koch G, *et al.* The monoclonal antibody CVI-DhNL-68.1 recognizes cells of the monocyte-macrophage lineage in chickens. *Dev Comp Immunol*, 12:855~864, 1988.
41. Trembiki KA, Qureshi MA, Dietert RR. Monoclonal antibodies reactive with chicken peritoneal macrophages : identification of macrophage heterogeneity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 183:28~41, 1986.
42. Mast J, Goddeeris BM, Peeters K, *et al.* Characterization of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. *Vet Immunol Immunopathol*, 61:343~357, 1998.