

韓國產 家兔에서 얻어진 棘體의 人間組織適合性 抗原試驗에의 適用*

慶明大學校 醫科大學 外科學教室

孫 壽 相

慶北大學校 醫科大學 基礎醫學 研究所

金 乘來·鄭 泰 浩

=Abstract=

The Usability of Korean Albino Rabbit Serum as a Complement in the Test of HLA*

Soo Sang Sohn

Departement of Surgery Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

Seung Lae Kim, Tai Ho Chung

Biomedical Research Laboratory, Kyungpook National
University School of Medicine, Taegu, Korea

This study was carried out to determine the usability of Korean albino rabbit serum as a complement in the test of HLA. Thirty albino male rabbits, weighing 2.5kg were purchased from the market. They were kept in an outdoor rabbit kennel and were fed ordinary diet for 30 days. Each was fasted overnight prior to bleeding of 20ml from ear vein. The blood samples were clotted separately to avoid hemolysis. The serum was centrifuged at 4°C for removal of residual RBC and stored at -70°C. No special treatment was given during and handling. Fifteen rabbits of negative antihuman factors tested by microcytotoxicity test were selected for this experiment. Average CH50 of the 15 rabbits was 0.29. Among these 15 rabbits serum, 13 sample showed positive at the dilution of 1:1 and 1:2 through the microcytotoxicity test of Terasaki with ABC tray. Two rabbit serum showed availability as a complement for DR tray. In accordance with this result, it was suggested that Korean albino rabbit serum could be used as a complement for HLA test.

서 론

액 성분의 하나로서 혈청중의 면역 항체와 협동작용으로 항원이 균체이면 용균작용을 유발하고 항원이 이종적일구이면 용혈작용을 유발케하는 활성 물질로 보체는 일찍 Ehrlich¹⁾에 의하여 명명된 정상 혈액에 정상화되었다. 그후의 연구에 의하면^{2,3,4)} 보체는 한

* 본 논문은 1985년도 제명대 학교 종·간의료원 임상연구 보조비로 이루어졌다.

* 본 논문은 손수상의 박사학위 논문임.

가지 성분으로 이루어진 것이 아니며 포유동물의 혈청중에 널리 분포하는 혈청단백의 한 종류로서 현재 약 11가지의 주요단백성분이 알려져 있다. 보체결합반응은 이를 단백질들의 순서있는 연쇄작용으로 일어나며 보체활성의 제 1경로²⁾나 제 2경로³⁾를 분문하고 항원-항체계의 발달하기 이전에 존재하던 하나의 생체방어기전으로 보여지고 있다⁴⁾. 따라서 보체는 면역학연구에서 항체, 항원과 더불어 반드시 검토해야 할 중요물질이 되었으며, 특히 세포상해시험을 그 주축으로 하는 조직적합성 항원시험에서 양질의 보체를 사용해야 한다는 것은 필수적 사항이 되었다. 한편 조직적합성 항원(HLA)의 결정이 소위 Terasaki와 McCollard⁵⁾의 미세 임파구상해시험(microlymphcytotoxicity test)으로 비교적 쉽게 행하여짐에 따라 HLA의 시험은 장기이식 수술, 친자감별, 유전학등 다양한 방면에 이용되기 시작하였으며⁶⁾ 많은 양의 보체가 요구되기 시작하였다.

1964년 Walford 등⁷⁾은 많은 동물의 혈청을 조사한 결과 상기 HLA 시험에는 가토의 혈청이 항인간요소가 가장 적게 함유되어 유리함을 보고하였다.

그러나 보체를 얻어야 하는 가토는 약년이어야 하며 운반시에 물리적 자극을 최소한으로 유지해야하는 등의 까다로운 조건을 제시하고 있으며 현재 여러 실험실에서 사용되고 있는 가토 보체의 질은 다양하며⁸⁾ 한국에서는 아직도 미국이나 일본산을 이용하고 있다.

본 연구는 한국산 백색성숙가토에서 혈청을 얻어 척혈구-용혈검사를 실시하여 보체역각과 항인간요소 존재여부를 검사하며 직접 HLA 시험에 사용하여 그 적용여부를 시험하였다.

재료 및 방법

1. 가토의 선택과 보체의 채취

한국산 백색 융성 가토(평균체중 2.5kg) 30필을 구입하여 일정한 조건하에 30일 사육하고 공복시 이

정맥으로부터 15ml의 혈액을 채취하여 4°C에서 2시간이상 경치하였다가 원심분리하여 혈청을 얻고 각 혈청은 1ml씩 분주하여 -70°C에 보관하였다.

2. 정상인 임파구에 대한 세포독성검사

MacQueen⁹⁾ 등의 방법에 따라 실시하였으며 임파구의 분리는 heparin(20I.U/ml)으로 처리한 주사기로 말초혈액을 채취하여 1500×g로 10분간 원침하여 그 연층을 취하고 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 희석한 후 비중 1.070으로 맞춘 ficoll/hyphaque 비중차용액위에 서서히 중층하였다. 1,000×g로 10분간 원침한 후 임파구층을 pasteur pipette로 회수하여 thrombin 처리로 혈소판과 다핵백혈구를 용집시킨 다음 5% fetal calf serum이 함유된 MacCoy's medium에 부유시켜 세포농도를 1.5×10^6 세포/ml로 하였다. Micro Test 3034(Terasaki tissue culture plate)에 항체는 분주하지 않고 임파구부유액만 각 well당 1μl씩 분주한 다음 30필분의 가토 혈청으로부터 얻은 experimental complement를 5μl씩 첨가하여 잘 혼합한 다음 25°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 후 각 well마다 eosin Y 용액을 5μl씩 분주하여 죽은세포를 염색하고 2분 후에 formalin(pH 7.2)을 5μl씩 첨가하여 세포를 고정한 후 도립 위상차현미경 하에서 관찰하여 eosin Y에 염색된 임파구수가 10%이하로 음성으로 판정된 15필분의 가토혈청을 보체역가시험과 조직적합성 항원시험에 사용하였다.

3. 척혈구 항체를 사용한 보체의 역가결정(Kabat 방법)¹⁰⁾

20%인간 척혈구액(생리식염수에 부유) 0.2ml를 흰쥐(mouse)의 복강에 주사하여 각각 4, 6, 7, 8, 10일 후에 사혈하고 용혈소(hemolysin)를 얻었다. Hemolysin의 역가는 시판 보체를 사용하여 용혈검사(hemolysis test)로 측정하였다. 본 실험에서 가토 보체의 역가 결정에는 hemolysis의 역가가 가

시험과	Blank	1	2	3	4	5	6	7	CB	CH
V B S(ml)	1.4	1.175	1.15	1.10	1.05	1.0	0.9	0.8	1.2	1.2
가토혈청(ml)	0.1	0.025	0.05	0.10	0.15	0.2	0.3	0.4	0	0
척혈구(ml)	0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

CB: Cell blank, CH: complete hemolysis

장 높은 것을 사용하였다. Hemolysin 0.1ml에 veronal buffered saline(VBS) 15ml와 6% 인간 적혈구에 15ml을 혼합하여 37°C에서 15분간 보온 장치하여 hemolysin과 적혈구를 결합시켜 두었다가 이 결합물에 대하여 각종 농도의 보체를 위하여 용혈시험을 실시하였다. Hemolysin과 적혈구 결합물은 24시간내에 보체결합 반응에 사용하였으며 보체와 VBS의 희석도는 전기의 표에 제시하였다.

상기 표에 나타난 바와 같은 10개의 시험판은 37°C에서 60분간 충분한 반응을 일어나게 하고 시험판을 곧 4°C의 냉수에 옮기고 냉각된 VBS 2ml씩을 각 시험판에 대하여 반응을 중지시켰다. 시험판들은 4°C에서 4,000rpm으로 원침하여 그 상층을 취하여 파장 541nm에서 각 시료의 흡광도를 측정하였다.

용혈의 정도를 나타내는 용혈 %는 시료의 흡광도이며 이는 동량의 적혈구를 0.04% ammonia 수로 완전 용혈하여 얻은 흡광도를 100으로 정하여 그 백분율로서 나타내었고 50%의 용혈을 유발케 하는 보체의 농도를 CH 50으로 표시하였다.

4. 가토 보체의 조직적합성 항원(HLA)시험에 대한 적용

HLA 시험은 Park과 Terasaki 방법¹¹⁾에 따라 아래와 같이 실시하고 보체는 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16으로 희석하여 그 사용여부를 조사하였다.

임파구의 항원은 A₂, A₂₄, A_{2,11}, A_{2,24}, A_{2,39}, B₅₁, B₆₀, B₁₃, B₄₈, B₃₅, B₆₂, B₄₆, B₅₄, B₄₈, B₆₂, B₅₁, B₆₀, B₅₉, B₆₂, C₃, C_{1,3}, C_{3,7}, DR₂, DR₅, DR₇, DR_{4,8}, DR_{5,7}, MT₁, MT₂, MT₃, MT₄, MT_{2,4} 등을 사용하였다.

임파구의 분리는 heparin(20I.U/ml)으로 처리한 말초혈액을 1,500×g로 10분간 원침하여 그 연층(buffy coat)을 채취하여 Hank's balanced salt solution(HBSS)을 동량 첨가하여 잘 혼합한 뒤 이것을 1.5ml ficoll/hyopaque 비중차용액위에 서서히 중층하였다. 비중차용액은 ficoll 9% 수용액과 hyopaque 33.9% 수용액을 12:5 용적비로 잘 혼합하여 비중계를 써서 비중 1.070으로 맞춘 다음 여과민균하였다. 비중차용액위에 중층시킨 연층액은 1,000×g로 10분간 원침하여 ficoll/hyopaque-HBSS 접촉면의 임파구총을 pasteur pipette로 회수하였다.

Fisher centrifuge (Model No. 59, Fisher Co. USA)에서 4,000×g에서 1분간 원침하여 세포를 회수한 후 thrombin (100units 1ml)을 1방울 섞어하여 37°C에서 2~3분간 혼합하여 혈소판과 다형

핵백혈구를 응집시킨 다음 다시 Fisher centrifuge로 1,000×g, 1분간씩 2회원침하여 세포를 세척하고 5% fetal calf serum이 함유된 McCoy's medium에 부유시켜 임파구부유액을 만들었다.

T 임파구와 B 임파구의 분리는 투명한 플라스틱 빨대에 nylon fiber 0.1g을 채운뒤 HBSS를 주입하여 37°C에서 30분간 가온한 후 그 column 내에 임파구부유액을 주입하여 37°C에서 30분간 보존한 다음 5ml 이상 HBSS를 통과시켜 유출되는 T 임파구를 회수하고 다음 nylon column을 짜서 격착된 B 임파구를 회수하여 T 임파구와 B 임파구의 농도는 1.5~2.0×10⁸ 세포/ml로 조정하였다.

각 항원에 대한 조직 형별 항체는 카톨릭 의대 미생물학교실과 경북의대 기초의학연구소에서 일어진 것을 사용하였다.

세포상해시험은 각 항원에 해당되는 항체를 각 well 당 1μl 씩은 Terasaki 형 tray에 임파구부유액을 각 well 당 1μl 씩 분주하여 HLA-A, B, C는 25°C에서 30분간 반응시키고 HLA-DR은 37°C에서 1시간 반응시켜 항원과 항체의 결합을 시킨 다음 각 well 당 5μl 씩 준비된 보체회색액을 첨가하여 HLA-A, B, C는 25°C에서 1시간 반응시키고 HLA-DR은 2시간 반응시켰다. 그 후 각 well마다 eosin Y 염색용액 5μl 씩을 분주하여 죽은 세포를 염색하고 2분 후에 formalin(pH 7.2)을 5μl 씩 첨가하여 세포를 고정한 후 도립위상차현미경 하에 관찰하여 eosin Y에 염색된 임파구수가 60% 이상을 차지하였을 때를 반응양성으로 판독하였다.

성 적

20% 인간 적혈구액 0.2ml를 25마리의 편쥐의 복강에 주사하고 각각 4, 6, 7, 8, 10일 후에 사인하여 얻은 적혈구항체 즉, hemolysin의 역가의 변동은 그림 1에 제시한 바와 같이 적혈구액 주입 후 세 7 일째가 가장 높았으며 8일째는 오히려 낮아졌다.

따라서 이하의 연구에서는 제 7 일째 혈청을 hemolysin 액으로 사용하였다. Hemolysin과 적혈구액과의 혼합액을 항원-항체계로 하고 본 실현에서 일어진 15필의 가토에서 얻어진 보체들의 역가(CH 50)와 각 보체의 HLA 시험에 대한 결과는 표 1과 표 2에 나타낸 바와 같다.

표 1은 보체의 시험결과로서 시험혈청 1번의 CH₅₀은 비교적 약한 0.5를 나타내었고 A₂₄, B₆₀ 및 C_{3,7}의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에 사용하였을

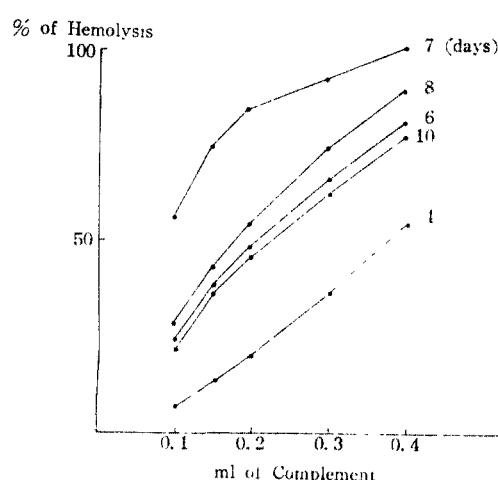


Fig. 1. 10 day activities of mouse serum antibodies on human RBC with commercial rabbit complement.

때 1:1의 회색에서는 모두 강한 양성을 표시하였고 1:2, 1:4의 회색에서도 각각 40%이상의 양성을 나타내었다. 시험혈청 2번에서는 CH_{50} 이 0.25였으며 A_2 , A_{51} 및 C_1 의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서 1:1의 회색에서는 강한 양성을 보였고 1:2의 회색에서는 60%이상의 양성이었고 1:4 이후의 회색에서는 음성을 나타내었으며 항임파구혈청파의 시험에서는 1:4의 회색까지 양성을 나타내었다. 시험혈청 3번에서는 CH_{50} 이 약한 0.18을 나타내었고 A_2 , B_{51} 의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에 사용하였을 때 1:1의 회색에서는 강한 양성을 보였으나 1:2회색 이후에는 음성을 나타내었고 항임파구혈청파의 시험에서는 1:4회색까지는 양성을 나타내었다. 시험혈청 4번은 CH_{50} 이 0.32로 비교적 약한 편이었으며 A_2 , B_{51} 의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서 1:1의 회색과 1:2의 회색에서 강한 양성을 보였고 1:4 이후에는 음성을

Table 1. Results of HLA tests with experimental rabbit serum in 5 dilution to the human lymphocyte antigens in ABC tray

No. of Experimental Serum	Type of Lymphocyte Antigen	HLA Test (% of cell death)					CH_{50}^* (ml)	
		Dilution of Complement						
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16		
1.	A_{24}	80	80	60	—	—	0.5	
	B_{60}	80	80	60	—	—		
	$C_3, 7$	80	60	60	—	—		
2.	A_2	80	80	20	20	—	0.25	
	B_{51}	80	80	20	—	—		
	C_1	80	60	—	—	—		
3.	A_2	80	20	—	—	—	0.18	
	B_{51}	80	20	—	—	—		
4.	$A_2, 24$	80	80	20	20	—	0.32	
	B_{51}	80	80	20	—	—		
5.	A_{24}	80	80	60	40	—	0.23	
	B_{60}	80	80	60	—	—		
	C_3	80	—	—	—	—		
6.	$A_2, 24$	80	80	20	—	—	0.30	
	$B_{51}, 60$	80	80	20	—	—		
	C_3	80	60	20	—	—		
7.	A_{24}	20	—	—	—	—	0.12	
	$B_{51}, 60$	—	—	—	—	—		

* CH_{50} : The quantitative assay of hemolytic complement activity based on the 50W hemolytic unit of complement of Mayer.¹²⁾

Table 2. Results of HLA tests with experimental rabbit serum in 5 dilution to the human lymphocyte antigen in ABC and DR trays.

No. of Experimental Serum	Type of Lymphocyte Antigen	HLA Test (% of cell death)					CH50	
		Dilution of Complement						
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16		
8	A2	80	—	—	—	—	0.17	
	B60, 62	—	—	—	—	—		
	C3	—	—	—	—	—		
	DR4, 8	80	—	—	—	—		
9	A2, 11	80	20	—	—	—	0.27	
	B59, 62	80	60	40	—	—		
	C1, 3	80	—	—	—	—		
	DR4	80	—	—	—	—		
	MT4	80	—	—	—	—		
10	A2	80	—	—	—	—	0.50	
	B48, 53	—	—	—	—	—		
	C3	—	—	—	—	—		
	DR5	—	—	—	—	—		
	MT2	—	—	—	—	—		
11	A2, 30	80	20	—	—	—	0.47	
	B48, 60	80	80	—	—	—		
	DR7	80	60	—	—	—		
	MT3	80	60	—	—	—		
12	A2, 30	100	80	—	—	—	0.32	
	B13, 48	100	80	—	—	—		
	DR7	80	80	—	—	—		
	MT3	80	—	—	—	—		
13	A2, 30	80	80	—	—	—	0.31	
	B35, 62	80	20	—	—	—		
	C3	80	—	—	—	—		
	DR5, 7	80	60	—	—	—		
	MT2	—	—	—	—	—		
14	A2	80	80	60	—	—	0.26	
	B48, 53	80	80	60	—	—		
	C3	80	80	60	—	—		
	DR	80	80	60	—	—		
15	A2	80	80	—	—	—	0.09	
	B62	80	60	—	—	—		
	C3	80	60	60	—	—		
	DR2	80	60	—	—	—		
	MT1	80	80	—	—	—		

나타내었으며 항임파구혈청파의 시험에서는 1:16 회석까지 강한 양성을 나타내었다. 시험혈청 5번의 CH₅₀은 비교적 약한 0.23이었으며 A₂₄, B₆₀ 및 C₃

의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에 사용해 보았을 때 1:1의 회석에서는 강한 양성이었으나 1:2의 회석과 1:4의 회석에서는 A₂, B₆₀ 단이 40% 이

상의 양성을 나타내었고 항임파구혈청과 같이 사용해 보았을 때 1:8의 희석까지 양성을 보였다. 시험혈청 6번에서는 CH₅₀은 0.30이었으며 A₂₄, B₆₀, C₃의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에 사용했을 때 1:1의 희석과 1:2의 희석에서 강한 양성을 보였고 1:4희석 이후에서는 음성을 나타내었으며 항임파구혈청과 같이 사용하였을 때 1:8희석까지 양성을 보였다. 이 혈청은 미국 Fel-Freezer 사의 상품용 보체와 같은 결과였다. 시험혈청 7번의 CH₅₀은 0.12로 상당히 약한 편이었고 A₂₄, B₆₀, C₃의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서는 A₂₄ 항원에 대하여서만 20%의 약한 양성을 나타내었고 그외는 모두 음성을 나타내었다. 시험혈청 8번에서는 CH₅₀이 0.17로 약한 편이었고 A₂₄, B₆₀, C₃ 및 DR_{4,6}의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서 A₂₄ 와 DR_{4,6}만이 1:1의 희석에서 강한 양성을 보여 HLA-DR 시험용에 적합한 것으로 나타났다. 시험혈청 9번의 CH₅₀은 0.27였으며 A₂₄, B₆₀, C₃, DR₄ 및 MT₂의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에 사용했을 때 1:1의 희석에서는 강한 양성을 보였고 1:2희석 이후에는 음성을 나타내었고 항임파구 혈청과 같이 사용하였을 때 1:4의 희석까지 양성을 나타내었다. 시험혈청 10번은 A₂₄, B₆₀, C₃, DR₅ 및 MT₂의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서 A₂₄만이 1:1의 희석에서 강한 양성을 나타내었고 다른 항원은 반응을 보이지 않았으며 항임파구혈청시험에서도 음성을 나타내었다. 시험혈청 11번의 CH₅₀은 0.47이었으며 A₂₄, B₆₀, DR₇, MT₂의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서는 1:1의 희석에서 강한 양성이었고 1:2의 희석에서는 거의 40%이상의 양성을 나타내었으며 항임파구 혈청시험에 사용하였을 때 1:4의 희석까지 양성을 나타내었다. 시험혈청 12번의 CH₅₀은 0.32였으며

A₂₄, B₆₀, DR₇, MT₂의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서는 1:1의 희석에서 상당히 강한 양성을 나타내었고 1:2의 희석에서도 강한 양성을 보였으며 항임파구 혈청과 같이 사용하였을 때 1:8의 희석까지 양성을 나타내었다. 시험혈청 13번의 CH₅₀은 0.31을 나타내었고 A₂₄, B₆₀, C₃, DR_{5,7} 및 MT₂의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서는 1:1의 희석에서 양성을 보였고 1:2의 희석에서는 A₂₄, DR_{5,7}만이 양성을 나타내었으며 항임파구 혈청과 같이 사용해 보았을 때 1:4의 희석까지 양성을 나타내었다. 시험혈청 14번의 CH₅₀은 0.26이었으며 A₂₄, B₆₀, C₃ 및 DR₇의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서는 1:1의 희석과 1:2의 희석에서 강한 양성을 보였고 1:4의 희석에서는 60% 이상의 양성을 나타내었으며 항임파구혈청과의 시험에서 1:8의 희석까지 양성을 나타내었다. 시험혈청 15번의 CH₅₀은 0.09로 상당히 약한 편이었고 A₂₄, B₆₀, C₃, DR₂ 및 MT₁의 항원을 가진 임파구의 HLA 시험에서 1:1의 희석에서는 양성을 보였고 1:2의 희석에서도 60%의 양성을 나타내었으며 항임파구 혈청과의 시험에서는 1:8의 희석까지 양성을 나타내었다.

표 3은 미국 Fel-Freezer 사의 상품화한 ABC Tray 용 보체를 A₂₄, B₆₀ 및 C_{3,7}의 항원을 가진 임파구에 대하여 HLA 시험을 실시한 결과로서 1:1과 1:2 희석에서는 A₂₄ 항원에서만 60%의 양성을 보였으며 B₆₀과 C_{3,7}에는 각각 20%정도의 양성을 나타내었다. 본 실험에서 사용한 시험혈청 6번과 같은 결과를 나타내었다. CH₅₀은 0.25를 표시하였고 항임파구혈청과 같이 사용하였을 때는 1:4의 희석까지는 80%의 양성을 나타내었다.

표 4는 일본 에이젠사(榮研社)가 상품화한 HLA-ABC tary 용 가토보체를 살기 미국산 가토보체 시

Table 3. Reseult of HLA test with commercial rabbit serum in 5 dilutions to the lymphocyte antigen of A24, B60, C3 and C7.

Type of Lymphocyte Antigen	HLA Test (% of Cell Death)					CH ₅₀ (ml)	
	Dilution of Complement						
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16		
A24	80	80	60	—	—	0.25	
B60	80	80	20	—	—		
C3,7	80	80	20	—	—		
With anti-lymphocyte serum	80	80	80	—	—		
Commercial rabbit serum: Fel-Freezer (U.S.A.)							

Table 4. Result of HLA test commercial rabbit serum 5 dilutions to the lmyphocyte antigen of A24, B60, C3 and C7.

Type of Lymphocyte Antigen	HLA Test (% of Cell Death)					CH50 (ml)	
	Dilution of Complement						
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16		
A24	80	80	40	—	—	0.25	
B60	80	80	20	—	—	—	
C3,7	80	60	40	—	—	—	
With anti- lymphocyte serum	80	80	80	—	—	—	

Commercial rabbit serum: Eiken (Japan)

험방법과 같은 방법으로 HLA 시험을 실시한 결과로서 1:1의 희석에서는 A₂₄, B₆₀, C_{3,7} 항원에 대하여 다같이 80%의 양성을 나타내었고 1:2의 희석에서는 A₂₄와 B₆₀에 대하여 각각 80%, C_{3,7}에 대하여서는 60%의 양성을 나타내었으나 1:4의 희석에서는 A₂₄와 C_{3,7}가 40%로 양성을 나타내었고 B₆₀에 대하여서는 20%의 양성을 나타내었다. CH₅₀은 0.25이었으며 항임파구 형체와 같이 사용하였을 때는 1:4 희석까지는 강한 양성을 나타내었다. 이상의 결과를 볼때 한국선 가토에서 얻어진 혈청도 사전에 HLA 시험을 실시하여 그 적용여부를 판단한다면 충분히 HLA-ABC 와 HLA-DR 용 시험 보체로서 사용할 수 있다는 것이 밝혀졌다.

고 졸

보체란 용어는 독일의 면역학자 Ehrlich¹⁾에 의하여 명명된 정상혈청성분의 하나로서 면역된 혈청중의 항체와 협동작용으로 균체가 항원이었다면 용균을, 이종적혈구가 항원이었다면 용혈을 일으키는 활성물질로 규정하였다. 항원에 의하여 유발되는 항체량은 감작의 상태나 항원에 접한 후의 시간에 따라서 증감되나 혈청중의 보체량은 면역조작에 의하여는 직접적 영향을 받지 않고 비교적 일정량을 유지하고 있다.

1895년 Belgium의 세균학자 Bordet는 세균이나 이종적혈구로 면역된 guinea pig의 혈청중에는 항원으로 사용된 세균 또는 이종적혈구를 응집할 뿐만 아니라 용균 또는 용혈하는 성분이 있음을 관찰하였으며 특히 이 세포의 용해(lysis)에는 혈청중의 두가지 성분의 상호작용이 필요하다는 것을 밝혔다. 즉, 면역 혈청을 56°C에서 30분간 가열(비동화)하

니 항원인 세포를 응집하는 능력은 있으나 용해하는 능력은 사라져 이와 같이 비동화된 혈청에 신선한 혈청을 가하니 세포용해현상이 재현하며 이때 가하는 신선혈청은 가토나 인간혈청등 비특이적인 것이 가능하다는 것이다. Bordet는 이 비특이적인 혈청성분을 Alexine이라 불렀으나 항체의 개념이 확립되면서 이를 보조한다는 뜻에서 보체라 불리워지게 된 것이다.

연구의 진행에 따라서 보체란 한가지 성분으로 이루어진 것이 아니고 몇가지 성분이 차례로 연결되어 그 적용이 발휘됨이 알려졌으며 1950년전까지는 4가지 성분으로 이루어 졌다고 하였으나 60년대 이후의 단백질분획기술의 고도의 발달과 더불어 현재 11개의 주요단백성분을 포함하여 약 20종의 혈청단백질이 보체계를 형성하고 있다. 이의 갈이 보체계는 면역응답반응 발생이전에 이미 생체제어기구로서 존재할 뿐만 아니라 항원항체 반응을 통한 소위 2차제어 반응에도 깊게 관계한다. 최근에 조직적합성항원(HLA)의 연구나 monoclonal antibody 기술의 적용에 필수적인 세포장해시험의 발전에 보체계의 이해와 그 이용은 매우 중요시 되고 있다.

1964년 Terasaki⁶⁾의 소위 microcytotoxicity 방법에 의한 HLA의 시험이 발표된 후 본 시험이 널리 보급됨에 따라서 이에 사용되는 적당한 보체의 필요성이 고조되었다. 특히 1964년 Walford 등⁷⁾은 각종 동물의 혈청을 사용한 경험을 발표하였으며 1965년의 조직적합성회의에서 Amos 등⁸⁾은 자연적인 항인간 요소를 비교적 적게 소모하는 희석되지 않은 가토 혈청이 가장 적당하다는 것을 발표하였다. 그러나 HLA 시험에 사용되는 가토혈청은 각자의 시험실에서 마련되었으며 때때로 상품화된 보체용 혈청이 나왔으나 그들의 HLA 시험에 적용하였을

때의 성적은 일정하지 못하였으며 그 가격도 상당한 범위의 차를 보이고 있었다. 그 당시의 보체용 가도 혈청의 채취는 생후 6개월 전후의 가토를 사용하였으며 개인 전후 명강보존하여 실온에 사용할 때까지는 물리적 자극을 피하는 등 비교적 까다로운 조건이 무여되어 있다.

1979년 MacQueen⁹⁾은 생후 3년생(체중 3kg 전후)의 비교적 성숙한 가토를 선택하여 항인간요소(xenoantibody, antihuman factor)와 A 형제혈구에 대한 용인반응 여부를 검사한 뒤 HLA 시험에 적당하다고 생각되는 혈청을 3년 이상 저장하였으나 그 여가가 별 이상이 없음을 보고하였다. 다만 보체는 자연에 변성하기 쉽고 50%이상의 진단이나 많은 양의 heparin을 추가 하였을 때 그 악기는 현저하게 떨어지며 -70°C 이하의 온도에서 오래 저장하면 그 악기가 하강함을 밝혔다. 따라서 보체용 가도 혈청 취급이 비교적 쉽게 행하여지게 되었다. 한국산 가토에서 얻어진 보체의 HLA 시험에 적용여부를 조사한 본 연구에서 체중 3kg 전후의 백색옹성가토 30마리에 대하여 정상인의 입파구에 대하여 세포독성(Anti-human factor test)¹⁰⁾을 나타내지 않았던 가토는 15마리이었으면 이것은 MacQueen⁹⁾의 조사한 비와 같은 결과였다. 적혈구 형체를 사용한 보체 역가 결정시의 CH₅₀의 평균은 0.29로서 미국 Fel-Freezer Biological 사 상품의 보체역가 0.25와 비교적 같은 결과를 보였으며 특히 시험용 혈청 6번의 결과는 미국의 Fel-Freezer Biological 사의 ABC-tray 용 보체현청과 같은 결과를 나타내고 있어 적당한 가토를 선정한다면 본 실험실에서는 HLA 시험용 가도 보체를 대량으로 얻을 수 있다는 것이 밝혀졌다. 본 실험에서는 채혈전에 가토의 귀를 특별히 막아하지 않았으며 원침등 조작에 있어서도 특별한 배려를 하지 않았다. 따라서 HLA 시험용 가도 보체를 얻는 것은 항인간요소를 갖지 않고 CH₅₀이 0.25 전후이며 pool로 되었을 때 인간임파구에 대하여 HLA 시험을 실시하여 적어도 1:1과 1:2의 회식에서 A, B, C loci에 대하여 80%정도의 양성을 나타내어 준다면 특히 HLA 시험용 보체현청이 될 수 있다고 생각된다.

요 약

본 연구는 한국산 백색가토에서 얻어진 보체를 조직 적합성 항원(HLA)시험에 사용하기 위해 시도되었다. 30마리의 가도 혈청을 정상인 임파구와 작용시

킨 비특이성 세포독성검사에서 15마리에만 음성을 나타내었고 음성을 표시한 가토 혈청의 적혈구 형체를 사용한 보체역가 CH₅₀은 평균 0.29이였다.

이들 혈청들을 HLA 시험에 적용한 결과 15개 표본 중 13개에서 1:1과 1:2 회식에서 A, B, C loci 시험판에 시용이 가능하였으며 시험혈청 8번은 특히 DR loci 용 시험판에 사용할 가치가 있었다. 한편 이들 성적은 미국 Fel-Freezer 회사나 일본 에이젠사의 상업용 보체현청을 사용하였을 때와 유의한 차이는 보이지 않았다. 따라서 평균 체중 2.5kg 정도의 한국산 가토에서 채혈하여 적혈구 형체의 CH₅₀의 평균이 0.2~0.3을 표시하고, 인간 임파구에 대한 비 특이성 세포독성을 표시하지 않는 혈청은 적당한 ABC loci를 갖는 시험판과 DR loci 시험판을 사용하여 일차적으로 HLA 시험을 거쳐 적당한 혈청들을 모으면 특히 HLA 시험용보체 혈청이 될 것으로 판명되었다.

참 고 문 헌

- Ehrlich, P.: On immunity with special reference to cell life. Proc. Soc. London, 66 : 424, 1906.
- Mayer, M. M.: The complement system. Sci. Am., 229 : 54-57, 1973.
- Porter, R. R., and Reid, K. B. M.: The biochemistry of complement. Nature, 275 : 699, 1978.
- 長澤滋治: 補體系의 蛋白質化學. 蛋白質 核酸, 酢素, 28 : 18-44, 1983.
- Götze, O., and Müller-Eberhard, H. J.: The alternative pathway of complement activation. Adv. Immunol., 24 : 1-6, 1976.
- Terasaki, P., and McColland, J. D.: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature, 204 : 998-1000, 1964.
- Walford, R., Gallagher, R., and Sjaarda, J.: Serologic typing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting. Science, 144 : 868-870, 1964.
- Terasaki, P.: Histocompatibility Testing, Report of the eighth international histocompatibility workshop held in Los Angeles, California, U.S.A. Feb. 1980.
- MacQueen, J. M.: Some practical exper-

- iences with rabbit complement in the cytotoxicity test. Manual of tissue typing techniques (1979—1980), NIH U.S.A. No. 83—545, pp. 216—220, 1982.
10. Kabat, E. A., and Mayer, M. M.: Experimental Immunochemistry, Charles C. Thomas, Springfield, Ill., p. 147, 1961.
11. Park, M. S., and Terasaki, P. I.: Microdroplet lymphocytotoxicity test. Manual of tissue typing technique, (1978—1979), NIH, U.S.A., No. 80—545, pp. 92—103, 1979.
12. Mayer, M. M.: Complement and complement fixation, in E. A. Kabat(ed.) Experimental immunochemistry, 2nd ed. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill. U.S.A., pp. 133—240, 1971.