啓明醫大 論文集 第4卷 第2號
The Keimyung Univ. Med. J.
Vol. 4, No. 2, December, 1985.

B細胞融合과 細胞選別 方法*

啓明大學校 醫科大學 解剖學敎室

張 性 翼·崔 寅 章

=Abstract=

Technique on the B Cell Selection Following Fused Cells.

Sung Ik Chang, In Jang Choi

Department of Anatomy, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

For the the basic technique of the monoclonal antibody, cell fusion was performed with spleen cell of BALB/C mouse and myeloma cell line treated with 41% PEG, 45% PEG and 50% PEG, and cell selection was performed with exchange of HAT media only and HAT contained RPMI plus 15% FCS for one week respectatively.

The results were summerized as follows;

1. The number of chromosome on lymphocyte of BALB/C mouse was 40 and in the P_3-U_1 cell line it was variable from 61 to 64 numbers.

2. There was a strong tendency for loss of chromosomes in fused cells as a range 84 to 94 chromosomal numbers.

3. For the cell fusion, we found it was the best status treated with 50% PEG and for the cell selection, it was better condition used to HAT and RPMI plus 15% FCS than used to HAT only.

序 論

1957年 Burnet[1]는 쥐에게 抗原을 투여했을때 그 抗原에 대해 作用하는 특수한 수용체가 있으며 그것은 한 種類의 淋巴球에 한하여 있고 이들 淋巴球만이 抗體를 分泌한다는 소위 "clonal selection" 理論을 發表하여 免疫學的으로나 遺傳學的으로 새로운 章을 열게하였다. 1962年 Okada[2]는 Sendai virus로 細胞融合을 처음으로 成功시켰으며 1964年 Littlefield[3]는 이들 融合細胞만 자라게 하는 배지를만들었다. 이들의 業績으로 서로 다른 두 種類의 細胞를 融合시켜 融合된 細胞만 선택적으로 자라게 할 수 있었기 때문에 抗體를 만들어 내는데 큰 공헌을 하였다. 그러나 細胞融合에 있어서 virus의 操作이 힘들고 融合은 되더라도 必要한 細胞만 選擇하는데 隘路가 많았다. 이런것을 解決하기 爲하여 1976年 Pontecorvo[4]는 Sendai virus 대신에 polyethyleneglycol (PEG)을 사용할 수 있게 하였고, 1975年 Köhler와 Milstein[5]은 hypoxanthine, aminopterine 및 thymine으로된 소위 HAT배지를 만들어 MOPC-21 myeloma細胞와 免疫된 쥐의 비장細胞를 融合시켜 잡종細胞 中 融合된 細胞만 選擇하는데 成功하여 單一抗體群을 生成하는데 획기적인 공헌을 하였다. 즉 B淋巴球는 自力으로 分裂을 하지 못하며 myeloma細胞는 HGPRT라는 효소가 없기 때문에 HAT배지에 자라지 못한다. 그러므로 B淋巴球와 myeloma細胞를 融合시켜 HAT배지에 培養을 하면 融合細胞는 분열을 계속하면서 抗體를 분비하나 myeloma細胞는 효소가 없기때문에

*본 논문은 1985년도 계명대학교 을종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

HAT에서 모두 죽게되며 비장細胞는 培養과정 中에서 역시 사망하게 된다는 것이다. 저자들은 monoclonal antibody를 만들기 위한 方便으로 BALB/C계 흰 쥐의 비장細胞와 myeloma 細胞인 P_3-U_1 cell line을 PEG로 融合시켜 Köhler의 Milstein[5]의 方法을 변형하여 최근에 開發된 HT배지에 재培養시켜 좋은 성과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

a. 암 수에 관계없이 BALB/C mouse 30마리를 선택하여 비장을 적출한 다음 mesh를 使用하여 비장細胞만 분리하였다.

b. 細胞融合을 爲하여 BALB/C계의 myeloma 細胞인 P_3-X_{63}-Ag_8-U_1(약자 P_3U_1) cell line을 使用하였다.

2. 實驗方法

a) 細胞分離(cell separation)

BALB/C mouse의 비장을 적출하여 125mesh를 利用해서 비장세포를 分離한 後 1,500rpm으로 10分間 원심분리하여 상층부를 버리고 tris HCl buffer (Ph: 7.6) 1 : NH_4Cl, 9로 만든 容血液 1ml를 첨가하여 0°C에 10分間 두었다. 이것을 다시 2,000 rpm으로 10分間 원심분리한 後 RPMI 5ml로 두번 씻고 0°C에 30分間 두었다. 한편으로 BALB/C mouse의 myeloma cell line인 P_3-X_{63}-Ag_8-U_1(약자 P_3-U_1)을 RPMI 5ml로 희석 (2×10^7ml cell)하여 0°C에 보관하였다.

b) 細胞融合(cell fusion)

준비된 P_3-U_1(2×10^7ml) 細胞와 비장세포(2×10^8/ml)를 혼합시켜 2,000rpm으로 10分間 원심분리하여 상층액을 버리고 41%, 45%, 50% polyethylene glycol (PEG: 분자량 6,000) 0.05ml를 각각 첨가하여 3分 동안 혼합하였다. 여기에 RPMI 1ml씩을 30초 간격으로 첨가하여 總 10ml가 될 때까지 실시하였다. 여기에 FCS 1m를 첨가하여 1,500rpm으로 10分間 원심분리하고 分裂細胞를 증가시키기 위하여 BALB/C mouse의 胸腺細胞 0.2ml (1×10^6 cel)을 주었으며 10% FCS가 함유된 RPMI 5ml를 더 첨가하여 1,000rpm으로 5分間 원심분리한 후 상층액을 버리고 10% FCS와 RPMI 혼합액 3ml를 넣어 96plate well의 각 well에 0.1ml씩을 넣고 24시간 培養하였다.

c) 細肥選別(cell selection)

P_3-U_1 細胞를 제거하기 위하여 제 1群은 HAT 培養液과 15% FCS가 함유된 RPMI를 잘 혼합하여 각 well에 0.1ml씩을 제 2群은 HAT만으로 0.1 ml씩을 제 1주에는 3日 간격으로 제 2주에는 2日 간격으로 培養液을 필요에 따라 교환해 주었다. 다시 3日 간격으로 HT 배양액으로 두 번 교환시킨 後 RPMI와 15% FCS만으로 融合細胞를 1주일 동안 培養하여 細胞를 選別하였다.

d) 染色驗 검사

BALB/C mouse 비장세포와 P_3-U_1 細胞 및 融合細胞를 각각 petridish에 옮긴 후 colchicine 0.1 μl/ml를 주고 2시간 後 1,000rpm으로 5分間 원심분리하여 상층액을 버리고 KCl 용액 6ml를 첨가하여 37°C 항온기에 8分間 두었다. 細胞의 고정은 acetic acid와 methanol을 1 : 3의 비율로 만든 액으로 0°C에서 고정하였으며 3회 반복하였다. 고정된 細胞를 slide에 옮겨 flame法으로 처리하여 Giemsa 염색하였다.

實 驗 成 績

BALB/C mouse의 비장을 적출하여 골수 癌細胞인 P_3-U_1 cell line과 融合한 實驗 成績은 다음과 같다.

1. BALB/C mouse의 染色體 數는 40個 였고 (plate Ⅰ), P_3-U_1 cell line의 染色體 數는 61—64 個였으며(plate Ⅱ). 이들의 融合細胞의 染色體 數는 다양하게 나타나서 84個—94個였다(plate Ⅲ, Ⅳ).

2. Table Ⅰ에서 보는 바와같이 細胞融合에 必要한 polyethylene glycol (PEG)을 41%로 만들어

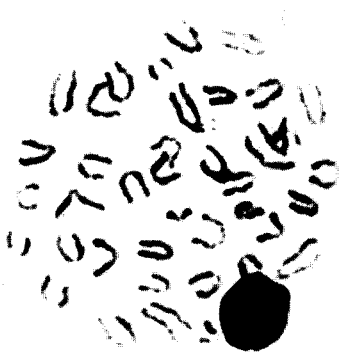

plate Ⅰ. Acrocentric chromosome on the lymphocyte of BALB/C mouse by routine Giemsa technique.

plate Ⅱ. Chromosome in P_3-U_1 cell line by routine Giemsa technique.

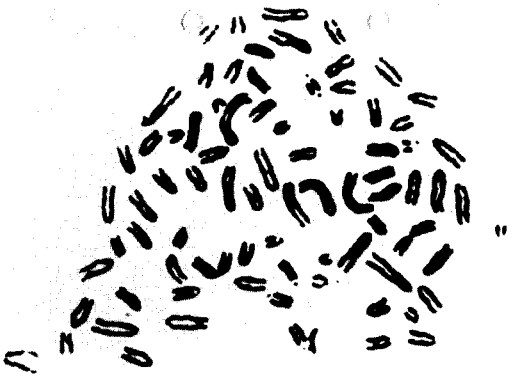

plate Ⅲ. One hybrids between B cell of BALB/C mouse and P_3-U_1 cell line by Giemsa technique.

plate Ⅳ. Another hybrids between B cell of BALB/C mouse and P_3-U_1 cell line by Giemsa technique.

使用 했을때 融合된 細胞는 14%였고, 45%로 使用 했을때는 21%였으나 50%로 使用 했을때는 融合된 細胞가 28%로서 가장 높았다.

Table Ⅰ

PEG	%	41	45	50
fusion cell	%	14	21	28

Rate of fusion cell at three different percent of polyethylen glycol one week after cell fusion.

Table Ⅱ

PEG	%	41	45	50
HAT only	%	5	13	27
HAT+Media		5	21	38

Survival rate in the two kinds of media one week after cell fusion.
*Media means RPMI plus 15% fetal calf serum

3. 細胞 選別을 위해 HAT 培養液에서만 細胞를 키운 결과 1주일 후에 41% PEG로 融合된 細胞는 5%만, 45% PEG 군은 13%였으나 50% PEG 군은 27%였는데 반해 HAT 培養液과 15% fetal calf serum이 포함된 RPMI 培養液을 50%씩 혼합된 培養液에서 細胞를 키운 결과 1주일 後에 41% PEG로 融合된 細胞는 5%만, 45% PEG 군은 21% 였으나 50PEG 군은 38%로 증가되어 있었다(Table Ⅱ).

4. 그러므로 이들 實驗을 종합해 볼때 細胞融合은 50% PEG가 가장 좋았고 細胞 選別은 HAT만으로 培養하는 것보다 HAT와 15% FCS가 함유된 RPMI를 동률로 만들어 사용하는 것이 더욱 좋다는 것을 알 수 있다.

總　括

최근 monoclonal antibody의 기술이 向上되고 있고 이 技術의 一部는 醫學에 적용하고 있으며 또한 응용할려는 努力을 계속하고 있다. 이것의 目的은 특수 抗原에 대한 특수 抗體를 많이 생산하는데 있다고 할 수 있다. 종전까지는 어떤 抗原에 대한 다종항체(polyclonal antibody)였기 때문에 여러가지 問題點이 노출되었다. 또한 이 技術의 원리는 한가지의 抗原을 동물에 免疫시켜 免疫된 B淋巴球와 안정된 骨髓細胞를 融合시켜 融合된 細胞만 選別的으로 자라게 하는데 있다. B淋巴球는 자체 분열 能力이 없고 형질세포로 이행하면 수 주일 後에는 사망하게 되므로 영구성이 없기 때문에 抗體를 계속 分泌하는 장치가 필요하다. 그러므로 骨髓癌 細胞를 B淋巴球에 融合시켜 融合細胞만 選別하면 이 中에서 單一抗體를 계속 分泌하는 안정된 細胞를 얻

을 수 있기 때문이다. 그러므로 monoclonal antibody를 얻을려면 그 첫 단계가 어떻게 잡종세포를 融合시키느냐이고 둘째는 融合된 細胞만 어떻게 選別 하느냐이다. 1958年 Nossal과 Lederberg[6]는 한 細胞에서 單一抗體가 分泌된다는 소위 one cell line antibody 理論을 發表하였고, 1962年 Okada[2] 가 Sendai virus로서 복수 종양細胞를 融合시켜 다핵細胞를 觀察하는데 成功하였다. 한편1962年 Potter와 Boyce[7]는 BALB/C mouse에서 oil를 1年間 주사하여 형질細胞癌을 만드는데 成功하였다. 이들의 業績으로 잡종細胞를 融合시킬수 있었으며 특히 종양細胞와 免疫細胞를 融合시킬수 있는 方法이 트이게 되었다. 細胞融合에 있어서 Sendai virus는 취급이 까다롭고 virus를 관리할 수 있는 장비가 必要하다. 그러므로 보다 簡便한 方法을 要하게 되었다. 1976年 Pontecorvo[4]는 polyethylene glycol (PEG)를 使用하여 잡종 細胞를 融合하는데 成功하여 細胞融合의 새로운 章을 열게 하였다. PEG는 분자량이 아주 다양하고 實驗室마다 使用量이 조금씩 다르다. 本 實驗에서는 가장 많이 使用되는 분자量 6,000의 PEG를 50%로 使用했을때 生存한 融合細胞가 가장 많았다. 細胞가 일단 融合되면 遺傳的으로 안정되지 못하고 처음에는 染色體의 감소가 강하게 일어나고 적어도 2 cell cycle을 거쳐야 安定되게 된다. 이런 現狀의 原因은 아직도 모르고 있다. 本 實驗에서도 BALB/C mouse의 染色體가 40個이고 P_3-U_1은 60—63個이므로 細胞融合는 100—103個 하야되나 融合후 1주일에는 染色體數가 84—94個 사이였으며 그 이후는 細胞가 안정되어 있었다. 細胞가 일단 融合되면 融合細胞만 어떻게 選別해 내느냐가 問疑가 된다. 1964年 Littlefield[3]는 guanosine의 主 生合成 過程이 folic acid의 antagonist인 aminopterin에 의하여 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT) 효소에 의하여 바뀌어진다는 事實을 알게 되었다. 그러므로 HGPRT가 없는 細胞는 HAT 培養液에서 살 수 없게 되고 이들 細胞는 HGPRT가 있는 細胞와 融合되면 生存할 수 있다. 이 理論은 1975年 Köhler와 Milstein[5]에 의해 發表된 소위 "HAT cell selection" technique다. HGPRT의 遺傳子가 X染色體에 one copy로 있기 때문에(Lyon, 1961)[8] 細胞選別이 容易하다. thymidine kinase로서 細胞融合을 可能하나 이것은 體 染色體에 遺傳子가 복수로 있기 때문에(Caskeyer kruh, 1979)[9] 細胞選別이 복잡하고 어렵다. 細胞選別에 있어서 어떻게 해야할 것인가는 매우 重要하다. 즉 HAT 培養液만 使用하느냐, HAT와 일반 배지 혼합액을 使用하느냐이다. 本 實驗에서는 HAT와 RPMI $\bar{C}$ 15% FCS를 혼합한 액으로 2주간 培養하여 좋은 結果를 얻었다. 물론 融合되지 않는 비장細胞는 초기에 살 수 있으나 1주일 後에는 모두 사망하게 된다. HAT만으로 選別하는 것은 보다 고도의 培養技術을 要하며 특히 HAT에 의해 融合되지 않는 비장細胞나 골수癌細胞가 파괴되어 融合細胞의 대사에 장애를 줄 일려가 있기 때문이다. 한편으로 monoclonal antibody를 얻기 위한 細胞融合에서 myeloma 細胞를 選擇하는 것이 또한 重要하다. 1980年 Köhler[10]는 抗體의 heavy chain은 細胞의 毒性作用을 나타낸다는 發表하였다. 그러므로 heavy chain이 없고 B_2 microglobblin을 생산하는 myeloma 細胞를 1975年 Warner[11]가 開發하였는데, 그는 BALB/C 쥐에 mineral oil를 복강內로 1年間 투여하여 40%의 myeloma를 얻었다. 그 내용은 IgA가 30—50%, IgG가 30%, IgM이 3%이다. 本 實驗에서 使用한 P_3-U_1 cell line은 BALB/C mouse myeloma cell을 E-B virus로 변형시켜 안정된 細胞로써 k chain만 分泌하는 特性을 가지고 있다. myeloma 細胞를 使用하는 理由는 만약 비장細胞에서 抗體를 1%로 分泌한다면 hybrids에서는 10%를 分泌시킬 수 있는데 이것은 myeloma 細胞가 활동성 B細胞와 融合할 뿐 아니라 抗體를 分泌하지 않는 B淋巴球도 融合하여 抗體를 分泌케 하기 때문이다.(Eshhar 등 1979)[12] monoclonal antibody를 生産하기 위하여는 免疫細胞를 어떤 종양細胞와 細胞融合 시키느냐 그리고 融合된 細胞를 어떻게 選別하느냐가 가장 重要하다고 사료되며 이런 觀點에서 本 實驗에서는 P_3 U_1 cell line으로 비장細胞와 50% PEG (분자량 6,000)로서 細胞融合하고 HAT와RPMI $\bar{C}$ 15% FCS 혼합액으로 細胞選別한 것이 최적이었다. 이 方法은 앞으로 monoclomul antibody를 應用하는 硏究에 도움이 될 것으로 생각된다.

要 約

저자들은 BALB/C mouse의 비장細胞와 myeloma cell line인 P_3—U_1 細胞를 다른 농도의 PEG로 融合하여 融合된 細胞를 HAT 배지 및 HAT와 RPMI 혼합배지액으로 細胞選別한 것을 요약하면 다음과 같다.

1. BALB/C mouse의 染色體 數는 40個였고 P_3—U_1 cell의 染色體 數는 61—64個 사이였으며 이들 細胞間의 融合細胞의 染色體 數는 84個—94個 사이

로 감소되었음을 알 수 있는데 이것은 細胞融合 즉시 강력한 분열과정 中에서 一部 染色體의 결손상태로 기인된 것으로 생각되었다.

2. 細胞融合은 41% PEG를 使用했을때 融合된 細胞는 14%였고, 45% PEG에서는 21%, 50% PEG를 使用했을 때 28%였다.

3. 細胞融合후 細胞選別을 위하여 HAT 培養液만 使用했을 때는 41% PEG로 融合細胞를 만들었을 때는 5%에서만 生存하였고, 45% PEG에서는 13%, 50% PEG에서는 27%였으나, HAT와 RPMI 혼합액으로 選別한 결과 각각 5%, 21%, 38%였다. 이상의 成績을 종합해 보면 B cell의 細胞融合은 50% PEG가 가장 좋았으며 細胞融合은 HAT 단독보다 HAT와 RPMI를 혼합한 培養液으로 하는것이 더 효과적이었음을 알 수 있었으며 이 方法은 monoclonal antibody를 만드는 技術에 가장 必要한 technique가 될 것으로 생각된다.

References

1) Burnet, F.M.: A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. Austral. J. Sci., 20 : 67—69, 1957.

2) Okada, Y.: Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. Exp. Cell Res., 26 : 98—107, 1962.

3) Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science, 145 : 709—710, 1964.

4) Pontecorvo, G.: Production of indefinitely multiplying mammalian somatic cell hybrids by polyethylene glycol (PEG) treatment. Somatic. Cell Genet., 1 : 397—400, 1976.

5) Köhler, G., and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256 : 495—497, 1975.

6) Nossal, G.J.V., and Lederberg, J.: Antibody production by single cells. Nature, 181 : 1419—1420, 1958.

7) Potter, M., and Boyce, C.R.: Induction of plasma cell neoplasms in strain BA LB/c mice with mineral oil adjuvants. Nature, 193 : 1086—1087, 1962.

8) Lyon, M.F.: Gene action in the X chromosome of the mouse. (Mus. musculus L.). Nature, 190 : 732—373, 1961.

9) Caskey, C.T., and Kruh, G.D.: The HPRT locus. Cell, 16 : 1—9, 1979.

10) Köhler, G.: Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77 : 2197—2199, 1980.

11) Warner, N.L.: Autoimmunity and the pathogenessis of plasma cell tumor induction in NZB inbred and hybrid mice. Immunogenetics, 2 : 1—20, 1975.

12) Eshhar, Z., Blatt, C., Bergman, Y., and Haimovitch, J.: Induction of secretion of IgM from cells of the B cell line 38C-13 by somatic cell hybridization. J. Immunol., 122 : 2430—2434, 1979.