

세포융합에 의한 Vasopressin 항체 생산 Production of Monoclonal Antibody for Vasopressin

서울대학교 의과대학 해부학교실
조사선 · 차중익 · 장가음 · 백상호 · 이광호

서 론

근래에 신경전달물질(neurotransmitter)이나 신경호르몬(neurohormone)과 같은 신경분비물(neurosecretion)의 존재가 밝혀짐으로써 신경계통 분야의 연구는 새로운 극면을 맞게 되었다. 즉 이와 같은 물질들에 의하여 신경흥분(nerve impulse)이 항진 또는 억제되며, 어떤 물질은 뇌의 특정 부위에만 존재하므로 이들의 존재가 신경계 특정 기능에 필수적임이 밝혀지고 있다(McGeer et al., 1979).

지금까지 알려진 신경분비물들은 생화학적 분석방법에 의하여 신경계의 일정부위를 분쇄 추출하여 얻어진 결과이기 때문에 그 물질 자체의 화학적 성상이나 조성은 잘 밝혀져 있으나 세포내 위치를 밝힐 수 없었다. 그러나 신경계는 수 많은 신경로와 신경핵들의 집단으로 되어 있고 이들의 구성단위는 세포이기 때문에 특정 기능을 갖는 물질을 함유 또는 분비하는 세포와 그 위치 및 다른 세포와의 연결관계를 밝힐 수 있다면 뇌의 기능과 작용기전을 규명하는데 큰 도움이 될 것으로 본다.

근래에 조직내의 항원의 위치를 밝힐 수 있는 효소표지항체법(enzyme labelled antibody method)이 개발되어 형태학 연구에 획기적인 진기가 마련되었다(Nakane, 1968). 이 방법의 원리를 이용하여 neurohypophyseal hormones(Watkins & Choy, 1977; Kawata & Sano, 1982), hypothalamic hormones(Krey & Silverman, 1981; Krisch & Leonhardt, 1980; Phillips et al., 1982) 및 neurotransmitters(Specht et al., 1981; Teitelman et al., 1982) 등의 뇌조직내의 분포가 보고되어 있다. 그러나 이 연구방법에서 가장 중요한 요건은 항체가 고도의 특이성(specificity)을 지녀

야 한다는 것이다.

그런데 종래에 사용된 항체는 대부분이 동물에 항원을 면역하여 만든 항원형이므로 여러 종류의 항체성분이 함께 섞여 있기 때문에 교차반응(cross reaction)으로 인하여 해당 항원항체 반응의 특이성에 문제가 있었다.

특히 조직내에는 비슷한 분자구조를 갖고 있는 유사 물질들이 얼마든지 존재할 수 있기 때문에 해당물질(항원)만을 감별 동정하는 데는 더욱 더 고도의 특이성이 요구된다(Swaab & Pool, 1975; Watkins, 1977). 따라서 저자들은 위와 같은 문제점들을 해결할 수 있는 세포융합법(Köhler & Milstein, 1975)을 이용하여 신경계의 면역세포화학적 연구에 사용할 고도의 특이항체를 생산하고자 하며 본 연구의 일환으로 우선 vasopressin에 대한 단세포항체(monoclonal antibody) 생산을 시도하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

항원 및 면역 조작

Arginine vasopressin(AVP; Peninsula Lab)을 Odell 등(1972)의 방법에 의하여 bovine thyroglobulin(Sigma, Type I)과 결합하여 BALB/c mice의 복강내로 주사하였다. 즉 항원(conjugated AVP)을 complete Freund's adjuvant(Calbiochem-Behring)에 섞어 emulsion을 만든 다음 복강내에 2주 간격으로(10 μ g AVP/mouse) 주사하였다. 주사 후 10일 간격으로 radioimmunoassay(RIA)에 의하여 혈청의 항체를 검정하였고 세포융합시행 3일 전에 미정맥(tail vein)을 통하여 항원을 재주사(boost)하였다.

비장세포 및 myeloma cell의 준비

면역된 mice를 경부탈구(cervical dislocation)에 의하여 희생시킨 다음 체표면을 70% ethanol로 깨끗히 세척하고 복벽을 절개하여 비장을 적출하였다. 적출된 비장을 culture dish에 넣고 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)으로 세척한 다음 Collector(Belco)에

† 접수일자: 1983. 12. 20.

* 이 논문은 1983년도 서울대학교 병원 특진연구비 보조 및 과학기술원 연구비 보조에 의하여 이루어졌음.

의하여 결합조직으로부터 비장세포를 분리하여 centrifuge tube에 옮긴 다음 다시 2회 세척하고 3ml의 DMEM에 세포수가 10^6 이 되도록 부유시켰다. 세포융합에 대비하여 7~10일전 부터 미리 배양시켜 준비된 myeloma(NS₁)세포를 같은 방법으로 centrifuge tube에 옮겨 DMEM으로 2회 세척하고 3ml내의 세포수가 10^7 이 되도록 부유시켰다.

세포융합 및 융합세포의 선택배양

위와 같이 준비된 NS₁ 및 비장세포 부유액을 함께 섞고 여기에 1ml의 30% polyethyleneglycol 1000을 1분 동안에 걸쳐 서서히 첨가 반응시켰다. 이 혼합물을 DMEM으로 1회 세척하고 마지막으로 20ml의 DMEM에 부유시킨 다음 2개의 culture dish에 옮겨 6% CO₂ incubator(37°C)에서 15~16시간 배양하였다. 원심분리에 의하여 상층액을 버리고 HAT medium(hypoxanthine, 13.6 μ g/ml; aminopterin, 0.18 μ g/ml; thymidine 3.6 μ g/ml) 50ml로 부유액을 만든 다음 96 microwell culture plate(0.2ml/well)에 분주하였다. CO₂ incubator에 넣어 배양하면서 융합세포(hybrid cell)의 출현과 분열증식 상태를 inverted microscope로 검경하였다. 융합세포가 왕성한 분열증식을 보이는 microwell을 가려내고 배양액의 상층부를 거두어 항체의 존재 여부를 검정한 다음 항체분비가 확인된 융합세포는 24 well plate에 옮겨 세포수를 증식시켜 -180°C의 액체질소 통에 보관하였다.

항체의 검정

1. Radioimmunoassay(RIA)

Hybridoma 배양액 0.1ml과 ¹²⁵I-AVP 40,000cpm(10 pg in 0.1ml PBS)을 disposable centrifuge tube(5ml)에 섞어 4°C에서 24시간 반응시킨 다음 적정 희석된 normal mouse IgG 0.01ml 및 goat anti-mouse IgG 0.1ml을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 원심분리에 의하여 상층액을 버리고 tube속의 침전물을 Autogamma Counter(Peckard)에 넣고 1분간 방사능을 측정하였다.

2. Enzyme Linked Immunospecific Assay(ELISA)

Microtiter well에 적정 희석된 AVP, oxytocin(OT), arginine vasotocin(AVT)을 각각 0.2ml(0.1 μ g/1ml sodium bicarbonate buffer pH 9.6)씩 넣고 4°C에서 24시간 방치하여 well 표면에 항원이 도포(coating) 되도록 하였다. PBS로 well을 5회 세척한 다음 위에서 RIA에 의하여 선정된 hybridoma 배양액 0.1ml을 넣어 4°C에서 24시간 반응시켰다. 위와 같은 방법으로 세척하고 적정 희석된 peroxidase labeled goat anti-mouse IgG 0.2ml을 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시

켰다. 항원 항체 반응물의 정색반응에는 0.08% O-phenyldiamine을 기질액으로 사용하였고 이를 Automatic Reader(Bioteck)에 넣어 1분간 정색치(scan value)를 측정하였다.

3. 면역세포 화학반응

ELISA에 의하여 선정된 hybridoma 배양액을 1:200으로 희석하여 paraffin 또는 vibratome section에 적용하고 4°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음 peroxidase labeled anti-mouse IgG(1:400)에 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 또는 4-chloro-1-naphthol 기질액에 넣어 정색반응을 시키고 조직표본을 만들어 현미경으로 반응된 세포를 검경하였다.

성 적

세포융합 시행후 3일부터 hybrid cell이 나타나기 시작하였고 이들은 급속히 분열증식하여 곧 clone을 이루었으며 10~14일에는 microwell 바닥이 세포괴(cell mass)로 차 있게 되었고 hybridoma 배양액의 색깔이 퇴색되므로 육안으로도 세포증식이 왕성한 microwell을 쉽게 판별해 낼 수 있었다. 384개의 microwell 중에서 검색 대상이 될 만큼 충분히 증식된 hybridoma를 함유한 것은 104개(27%)이었다. 이들로부터 상층액을 거두어 RIA를 시행한 결과 표 1에 나타난 바와 같다. 즉 7종의 hybridoma가 8~60%(bound/total)의 양성 반응을 보였다.

ELISA에 의하여 이 7종의 hybridoma의 특이성(specificity)을 검사한 결과 hybridoma 62D5만이 AVP에 대하여 특이적 반응을 보였으며 나머지 6종은 AVP와 반응하는 외에 OT 또는 AVT와도 결합하여 상호 교차반응(cross reaction)을 나타내었다(Fig. 1). 즉 hybridoma 61B4의 경우 AVP외에 OT 및 AVT와 모두 반응을 나타내었고 61G8, 62B5 및 62F7은 AVP외에 OT와 그리고 61E2는 AVP와 AVT에 각각 교차반응을 보였으며 63C6은 이들 3종의 항원에 대하여 거의

Table 1. Specific bindings of monoclonal antibodies to I¹²⁵-AVP(antigen) screened by modified RIA*

Antibodies (Clones)	61B4	61E2	61G8	62B5	62D5	62F7	63C6
Binding % (Bound/Total)	32.5	26.4	49.8	60.3	42.5	28.4	8.2

* 102 Hybridoma clones were initially screened and 7 of 102 clones showed positive bindings. (Background binding, <3%).

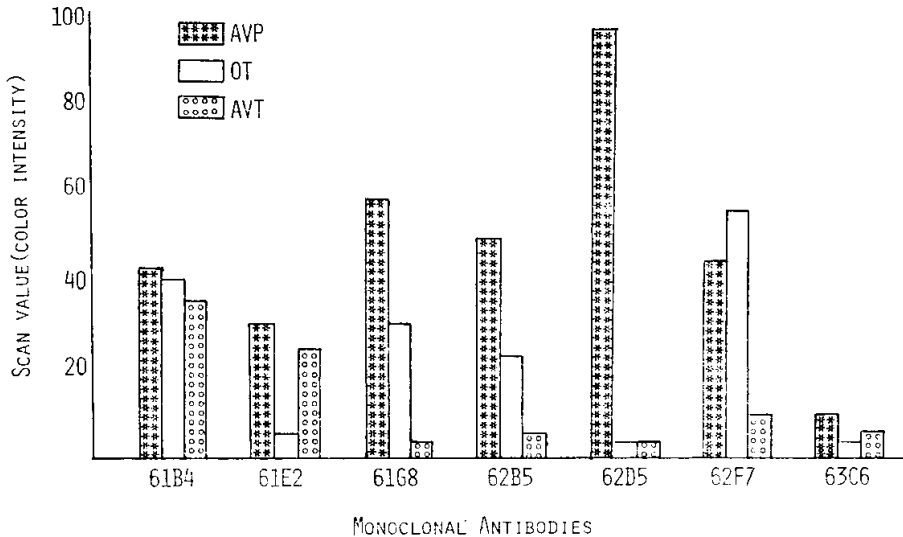


Fig.1. Immunoreactivities of monoclonal antibodies to AVP, OT and AVT tested by ELISA method.

반응을 보이지 않았다. 그러나 62D5는 AVP와 강한 결합반응을 보였으나 OT나 AVT에는 거의 반응을 나타내지 않았다(background scan value 10~30).

한편 hybridoma 62D5의 배양액을 면역조직화학 염색에 적용한 결과 쥐의 시상하부(hypothalamus) 내에 있는 실방핵(paraventricular nucleus), 시상상핵(supra-optic nucleus), 정중용기(median eminence)등에서 vasopressin neuron과 fiber를 각각 동정(localization) 할 수 있었으며(Fig. 2-A, B, C), anti-oxytocin과의 2중 염색법에 의하여 oxytocin neuron과 감별 염색되었다(Fig. 3). 또한 과량의 AVP(100µg/ml)와 62D5 항체를 미리 반응시킨 다음 면역조직화학 염색을 시행한 결과 조직내의 반응물이 전혀 나타나지 않았으나 OT 또는 AVT의 첨가에 의하여 vasopressin neuron을 동정하는데 아무런 영향을 받지 않았다.

고 찰

Köhler와 Milstein(1975)이 처음으로 세포융합법에 의하여 변양절편구에 대한 단세포항체 생산에 성공한 것이 계기가 되어 현재 각 연구분야에서 이 새로운 방법을 도입하여 활발한 연구가 진행되고 있다. 신경전달물질에 대한 단세포항체로는 Chan-Palay(1979)와 Cuello등(1979)의 substance P, Ross등(1981)의 tyrosin hydroxidase, Hou-Yu등(1982)의 vasopressin에 대한 보고가 있으나 여러 신경전달물질을 비롯한 신경호르몬에 대한 항체는 아직 개발단계에 있다. 세포융합법에 의한 항체생산은 항원의 순도가 높지 않

아도 검정체계(screening system)만 잘 갖추어져 있으면 고도의 특이성을 지닌 항체를 얻을 수 있는 장점이 있기 때문에 특히 신경분비물에 대한 항체를 만드는데 적합한 방법으로 사료된다. 즉 신경분비물들에 대한 항원형을 만들기 위하여는 그 분자구조가 매우 간단하여 대개 amino acid 10개 미만(M.W. 1000 내외)으로 되어 있어 자체만으로는 충분한 항원성(antigenicity)이 없기 때문에 큰 분자량의 단백질질을 결합시켜 동물체에 주입하게 되는데 이로부터 얻어지는 항체는 필연적으로 불필요한 항체들이 섞여 있어 특이성이 떨어지고 교차반응이 일어나는 문제를 안게된다. 특히 신경분비물의 경우 분자량이나 amino acid의 종류가 매우 유사한 것들이 뇌조직 내에 공존하므로 교차반응의 가능성이 더욱 크다고 볼 수 있다. 따라서 혼합되어 있는 항체들 중에서 해당 항체만 가려내어 시험관 내에서 동일한 항체를 원하는 양대로 계속 생산할 수 있는 세포융합법이 최적의 방법이 될 수 있을 것이다.

본 실험의 경우에서도 RIA에 의한 1차 검정에서 7종의 hybridoma가 양성반응을 보였으나 ELISA에 의하여 이들의 특이성을 조사한 바 hybridoma 62D5만이 AVP에 특이적 반응을 보였고 나머지는 OT 또는 AVT에 교차반응을 보였다. 1차로 선정된 hybridoma의 특이성 검사에 있어서 AVP항원 외에 OT와 AVT를 택한 것은 이들 3종의 peptide는 그 amino acid의 종류나 배열상태가 아주 유사하여 교차반응의 가능성이 높을 것으로 생각되었기 때문이고 또한 이들 peptide가 모두 뇌조직 속에 함께 들어 있어서 서로의 감별검사가 필연적이기 때문이다. 이들중 AVP 및 OT는 사

람을 포함한 포유동물 뇌의 실방핵 및 시상상핵 내에서 생성되며 AVT는 하등동물이나 발생중인 포유동물 태아 뇌에 존재하는 것으로 밝혀져 있다(Gorbman et al., 1983).

본 실험에서도 AVP와 특이적 반응을 보인 62D5항체를 면역세포화학반응(immunocytochemistry)에 적용한 결과 쥐의 방실핵(paraventricular neuron)과 시상상핵(supraoptic nucleus)에서 vasopressin neuron을 특이적으로 동정(localization) 할 수 있었으며 이중염색(double antibody staining)에 의하여 oxytocin neuron과의 감별 염색이 가능하였다.

이상과 같이 62D5 단세포군 항체는 시험관 내나 조직속에 들어 있는 AVP와 선별적으로 결합할 수 있는 특성을 갖추고 있어 면역조직화학반응에서 vasopressin neuron을 선별 동정하는 데 충분한 신뢰도를 가진 것으로 판단된다.

결 론

Vasopressin에 대한 단세포군 항체를 만들기 위하여 arginine vasopressin을 bovine thyroglobulin에 결합시켜 BALB/c mice에 면역시키고 혈장내에 항체의 존재를 확인한 다음 세포융합에 사용하였다. PEG를 매체로 하여 비장세포와 형질세포종(NS₁)과의 hybridoma를 만들고 이들로 부터 분리되는 항체를 RIA, ELISA 및 면역조직화학반응 등에 의하여 검정한 결과 시험관 내에서 AVP와 특이반응을 일으키며 뇌조직에서 vasopressin neuron을 인접 oxytocin neuron과 감별 동정할 수 있는 단세포군 항체를 얻었다.

—ABSTRACT—

Production of Monoclonal Antibody for Vasopressin

Sa Sun Cho, Choong Ik Cha,

Ka Young Chang, Sang Ho Baik
and Kwang Ho Lee

Department of Anatomy, College of Medicine,
Seoul National University

Monoclonal antibodies were produced against arginine vasopressin(AVP) by fusion of mouse myeloma cells with hyperimmune mouse spleen cells. Modified radioimmunoassay(RIA) was used to detect the

presence of specific antibody in culture. Specificity of the antibody was further characterized by enzyme linked immunospecific assay(ELISA). This antibody was able to localize differentially the vasopressin neuron from the oxytocin neuron in tissue sections of the hypothalamus.

REFERENCES

Chan-Palay V.: *Immunocytochemical detection of substance P neurons, their processes and connections by in vivo microinjections of monoclonal antibodies.* *Anat. Embryol.*, 156:225-240, 1979.

Cuello, A.C., Grafre, G. and Milstein, C.: *Detection of substance P in the central nervous system by a monoclonal antibody.* *Pr. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3532-3536, 1979.

Gorbman, A., Dickhoff, W.W., Vigna, S.R., Clark, N.B. and Ralph, C.L.: *Comparative endocrinology.* *Wiley Interscience*, p.45-157, 1983.

Hou-Yu, A., Enrich, P.H., Valiquette, G., Engelhardt, D.L., Sawyer, W.H., Nilaver, G. and Zimmerman, E.A.: *A monoclonal antibody to vasopressin.* *J. Histochem. Cytochem.*, 30:1249-1260, 1982.

Kawata, M. and Sano, Y.: *Immunohistochemical identification of oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamus of the monkey(Macaca Tuscata).* *Anat. Embryol.*, 165:151-167, 1982.

Köhler, G. and Milstein, C.: *Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity.* *Nature*, 256:495-497, 1975.

Krey, L.C. and Silverman, A.J.: *The luteinizing hormone releasing hormone(LHRH) neuronal networks of the guinea pig brain. III. The regulation of cyclic gonadotropin secretion.* *Brain Research*, 229:429-444, 1981.

Krisch, B. and Leonhardt, H.: *An intermittent somatostatin immuno-reactivity in the cortex and basal ganglia of the rat.* *Cell Tiss. Res.*, 205:327-331, 1980.

McGeer, P.L., Eccles, J.C. and McGeer, E.G.: *Molecular neurobiology of mammalian brain.* p.172-358, *Plenum Press*, 1979.

Nakane, P.K.: *Simultaneous localization of multiple antigen using the peroxidase-labeled antibody*

- method; A study on pituitary glands of the rat. J. Histochem. Cytochem.*, 16:557-559, 1968.
- Odell, W., Skowsky, R., Abraham, G., Hescocx, M., Fisher, D. and Grover, P.K.: *Production of antisera for polypeptide and steroid radioimmunoassays. Biol. Reprod.*, 60:427-442, 1972.
- Phillips, H.S., Ho, S.T. and Linner, J.G.: *Ultrastructural localization of LH-RH-immunoreactive synapses in the hamster accessory olfactory bulb. Brain Research*, 246:193-204, 1982.
- Ross, M.E., Reis, D.J. and Joh, T.H.: *Monoclonal antibodies to tyrosine hydroxylase; production and characterization. Brain Res.*, 208:493-498, 1981.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H. and Reis, D.J.: *Light microscopic immunocytochemical localization of tyrosinase in perinatal rat brain. I. Early ontogeny. J. Comp. Neurol.*, 199:233-253, 1981.
- Swaab, D.F. and Pool, C.W.: *Specificity of oxytocin and vasopressin immunofluorescence. J. Endocr.*, 66: 263-272, 1975.
- Teitelman, G., Joh, T.H., Park, D., Brodsky, M., New, M. and Reis, J.: *Expression of the adrenergic phenotype in cultured fetal adrenal medullary cells; Role of intrinsic and extrinsic factors. Develop. Biol.*, 89:450-459, 1982.
- Watkins, W.B.: *Precautions in the application of immunohistochemical techniques of the pig hypothalamo-neurohypophyseal system. J. Histochem. Cytochem.*, 25:61-68, 1977.
- Watkins, W.B., and V.J. Choy: *Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophyseal system. III. Localization of oxytocin- and vasopressin containing neurons in the pig hypothalamus. Cell Tiss. Res.*, 180:491-503, 1977.

LEGENDS FOR FIGURES

- Fig. 2.** Photomicrographs of the rat hypophyseal coronal sections immunoreacted for vasopressin using monoclonal anti-AVP and 3,3'-diaminobenzidine.
- Vasopressin neurons were stained dark brown in the paraventricular nuclei around the third ventricle(V). $\times 40$.
 - Vasopressin neurons in the supraoptic nucleus (arrows) were stained brown in this darkfield micrograph. OC; optic chiasm. $\times 40$.
 - Vasopressin fibers localized in the internal zone (arrows) of the median eminence. V; third ventricle. $\times 100$.
- Fig. 3.** Photomicrograph of the rat hypophyseal vibratome section showing differential localization of two cell types in the single section. Vasopressin neurons (arrows) reacted with anti-AVP and 3,3'-diaminobenzidine were stained dark brown, and oxytocin neurons (arrows heads) were stained bluish gray by the treatment of anti-oxytocin and 4-Cl-1-naphthol. $\times 400$.

