



면역활성물질 검출을 위한 동물세포 이용
시험계의 개발에 관한 연구

Development of testing system for
the immunoactive agents using cultured cells

연구기관
한국과학기술연구원
부설유전공학연구소

과 학 기 술 처

배 포 선

사본 번호	부 수	배 포 선
1/50 - 2/50	2	과기처 제출용
3/50 - 9/50	7	유전공학연구소 연구관리과 보존용
10/50 - 29/50	20	유전공학연구소 동물실험담당
30/50 - 50/50	21	관련 산.학.연

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “면역활성물질 검출을 위한 동물세포 이용 시험계의 개발”에 관한 3차 년도 최종보고서로 제출합니다.

1994. 8. 31.

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학 연구소

총괄연구책임자 : 김 환 목 (유전공학연구소 선임연구원)

연 구 원 : 현 병 화 (유전공학연구소 선임연구원)

오 구 택 (유전공학연구소 선임연구원)

한 상 배 (유전공학연구소 연구원)

박 은 숙 (유전공학연구소 위촉연구원)

홍 동 호 (유전공학연구소 위촉연구원)

김 문 순 (유전공학연구소 위촉연구원)

이 기 훈 (유전공학연구소 기능원)

김 영 희 (유전공학연구소 위촉연구원)

박 선 미 (유전공학연구소 위촉연구원)

요 약 문

1. 제목

면역활성물질 검출을 위한 동물세포 이용 시험계의 개발에 관한 연구

2. 연구개발의 목표 및 중요성

생명공학기술은 신약 창출의 중요한 일익을 담당하고 있으며 미래 지향적인 기술로 각광을 받고 있다. 미생물, 천연물 등에 의해 만들어진 신의약품은 산업화 과정을 거쳐 환자의 치료에 응용되기 전에 안전성 및 유효성 등 실용화 연구를 거쳐야 하는데 안전성 및 유효성 검사방법은 국가마다 법률로 지정하여 그 시험법의 신뢰성을 부여하고 있다. 생명공학기술의 발달에 힘입어 안전성 검정항목은 급성, 아급성, 만성, 발암성, 국소자극성 등의 일반적인 검사항목에 부가하여 변이원성, 최기형성, 면역독성 등 선택적이고 기술집약적인 검사항목 등이 첨가되었고 현재도 선진국 등에서 국가차원으로 국민의 건강보호를 위해 새롭고 더욱 선택적이고 예민한 시험방법을 개발하고 있다. 그리고 최근 면역계의 이상으로 인한 질환이 증가함에 따라 면역조절물질의 개발이 많이 요구되고 있으며 이에 따라 이들 물질의 효능을 정확히 검색할 수 있는 시험계의 개발이 요구되고 있다. 이와 같은 배경하에서 면역시험법은 최근 들어 많은 주목을 받고 있으며 최

근들어 미국에서도 National Toxicology Program을 만들어 시험법 개발과 응용을 서두르고 있다. 면역독성 검정방법에는 cell mediated immunity 를 검정하기 위한 skin graft assay 와 delayed hypersensitivity assay 등 *in vivo* assay와 혈구수, 면역조직의 병리검사 등 pathological assay와 같은 고전적 방법이 통용되어 왔었으나 근래에 와서는 세포생물학적, 분자생물학적 기술이 발달함에 따라 ELISA에 의한 IgM, IgG, IgE의 선택적 역가검정, plaque assay에 의한 항체형성 세포측정, mitogen assay, cell mediated cytotoxicity assay 등의 새로운 방법이 개발 응용되고 있다. 이와 같은 *in vitro* assay는 간편하고 선택적으로 면역계의 이상을 탐지 할 수 있다는 장점 외에도 *in vivo* test가 불가능한 인간면역세포를 *in vivo*로 연구 시험하여 좀 더 의미 있는 결과를 도출할 수 있다는 좋은 점이 있다. 따라서 본 연구에서는 인체에 선택적인 생체조절 의약품의 면역계에 대한 영향을 평가하기 위해 인체를 대신 할 수 있는 model system의 창출을 최종 목표로 하여 동물과 인체의 면역세포를 배양하여 점차적으로 *in vitro* testing system을 구축하고 이 기술을 면역 부전 동물에 응용하는 전략으로 연구를 추진하고 있다. 1차년도에는 mouse 면역세포의 면역기능 중 체액성 면역반응에 주안점을 두어 반응성을 측정하였다. 2차년도에는 human 면역세포의 면역기능에 주안점을 두어 체액성 면역반응과 mitogenicity를 측정하여 mouse lymphocyte의 반응성과 비교 하였다. 본 연구에서는 human lymphocytes를 SCID mouse에 이식하여 인체를 대신할수 있는 *in vivo* 시험계를 만들고 그 반응성을 mouse

와 인체 면역세포와 비교 하였다.

본 연구에서 확립된 방법은 안전성 시험항목 중 면역독성 시험에 응용될 수 있을 뿐만 아니라 면역조절제, 면역조절항암제등의 개발에 있어서 유효성 검색과 평가에 널리 이용될 수 있다.

3. 연구의 내용 및 범위

1) SCID mouse의 유지

- SCID mouse는 무균의 vinyl isolator내에서 사육하였다.
- 사료, 물 등의 SCID mouse 사육에 필요한 물품들은 고압증기멸균기에서 멸균하여 사용하였다.

2) Human peripheral blood lymphocyte (PBL)의 분리 및 배양

- Human peripheral blood는 적십자 혈액원으로 부터 구하였다.
- Lymphocytes는 Ficoll을 이용하여 분리하였다.
- Cyclophosphamide (CP), Cyclosporin A (CsA)를 실험하여 그 반응성을 비교하였다.
- Pokeweed mitogen (PWM), Phytohemagglutinine (PHA), Concanavaline A (ConA)에 대해 mitogen assay를 행하였다.
- SRBC에 대해 T-dependent antibody response를 행하였다.

3) SCID Mouse에 human lymphocyte의 reconstitution 및 확인

- Human에서 분리한 PBL을 SCID mouse의 복강에 5×10^7 cells 의 농도로 투여 하였다. 이식 후 7일, 14일, 21일, 28일에 눈에서 혈액을 취하여 serum을 분리 하였으며, human IgM, G의 양을 sandwich ELISA법으로 측정하여 reconstitution을 확인 하였다.
- hu-PBL-SCID mouse의 spleen 무게 및 세포 수를 측정하여 비교 하였다.

4) hu-PBL-SCID mouse의 면역기능 측정

- 1 주일 간격으로 human IgM, G의 양을 측정 하였다.
- SCID 및 hu-PBL-SCID의 lymphocytes는 spleen으로 분리 하여 SRBC에 대한 항체생성능력을 측정하였다.
- 표준 mitogen에 대해 그 반응성을 측정 하였다.

5) 면역억제 물질의 hu-PBL-SCID에 대한 영향

- Cyclosporin A와 cyclophosphamide를 선택하였다.
- 면역억제물질을 *in vivo*와 *in vitro*에서 투여 하였다.
- 면역억제물질의 영향을 hematocrit value, Ig level, mitogen assay, PFC assay등으로 측정 하였다.

4. 연구결과 및 활용에 대한 건의

- Mitogen assay를 이용하여 human PBL의 반응성을 성공적으로 측정하였다.
- 인체의 PBL을 SCID mouse의 복강에 약 95 % 정도 성공적으로 이식 하였다.
- Human PBL을 이식하지 않은 SCID mouse에서는 human IgG, M을 검출 할 수 없었으나, human PBL을 이식한 SCID mouse에서는 human IgG, M을 검출 할 수 있었다.
- Human IgG는 이식후 7일에 16, 14일에 214, 21일에 1369, 28에는 1011 ug/ml이 검출되었다.
- Human IgM은 이식후 7일에 1.4, 14일에 8.36, 21일에 14.8, 28에는 81.7 ug/ml이 검출되었다.
- hu-PBL-SCID에 cyclophosphamide와 cyclosporin A를 투여한 후 human IgG, M의 양을 측정해본 결과 IgG의 양은 별 차이가 없었으나 IgM의 양이 감소함을 알수 있었다.
- hu-PBL-SCID의 면역세포와 human PBL의 반응성을 PFC assay와 mitogen assay로 측정하여 비교하였다. PFC assay의 결과 두 세포 모두 반응성이 없었으며, mitogen assay의 결과 hu-PBL-SCID lymphocyte의 기능이 매우 억제되어 있었다.

- CsA의 투여에 의해 spleen의 무게 및 세포수가 감소함을 알 수 있었고, CP의 투여에 의해서는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.
- hu-PBL-SCID를 이용한 in vivo protocol이 확립되었다.

활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 확립시킨 시험법을 이용하여 미생물, 천연물 등에서 유래하는 많은수의 면역조절물질을 단기간에 검색함으로써 신약개발을 성공적으로 수행할수 있으리라 여겨진다. 특히 인체 유래 면역세포를 사용한 실험계이므로 인체 특이 의약품의 개발에 유용하게 이용될수 있으리라 여겨진다. 인체의 면역세포는 SCID mouse에 성공적으로 이식될수 있으나 인체를 대신하는 생체내 실험계로 사용되기에는 문제가 있음을 알 수 있다. 인체의 면역계 이상으로 유래하는 발암기전의 규명 및 면역계 질환 연구 등의 기초의학 분야에도 이용될수 있으리라 사료된다. 약효 및 안전성 관련 연구기관, 정부출연 연구기관에서 계획 또는 추진하고 있는 면역약리독성 시험법의 확립에 기본결과로서 활용될수 있으리라 사료된다.

Summary

I. Title of Research

Development of testing system for the screening of immunoactive agents using cultured cells

II. The Object and Importance of This Research

Biotechnology has an importance role in new drug development as a future technology. New drug should be evaluated on its efficacy and safety before mass production and clinical application. Testing methods on efficacy and safety are under control of national law to assure its confidence. Owing to the recent development in biotechnology and medical science, more sophisticated testing are added to general and classical items. Immunoactivity testing is a new technology which require more advanced techniques, and is under development in many nations including U.S.A. and Japan. To test immunotoxicity and efficacy, classical methods such as skin graft assay, delayed hypersensitivity assay and pathological examination were

used. But recently, new methods such as IgM, G, E, ELISA, PFC assay, mitogen assay, cytotoxicity assay were developed and made addition to routine immunotoxicity items. The *in vitro* are easy and selective and also has another merit that can be applicable to human systems. However, owing to the limitations of *in vitro* techniques in biopotency evaluation, the *in vivo* experiments should be added before decision making of the usefulness of new drug. The final goal of present study is the development and application of new *in vivo* methods to predict the effects of xenobiotics on human immune systems. The strategy of present research is a set up of *in vitro* animal system and application of established tools to human lymphocytes culturing system and immunodeficient mouse model system. In present study, put a stress on the development of human *in vivo* system by using human peripheral blood lymphocyte and immunodeficient mouse. The system derived by present study has a broad application fields to screen and study on immunostimulants, immunosuppressants, anticancer agent and toxicants.

III. Scope and Contents of Research

1. Maintenance of immunodeficient mouse

- Severe combined immunodeficient (SCID) mouse was maintained in aseptic vinyl isolator under strict identification of individuals.
- Food, drinking water and other goods essential for maintenance of SCID mouse were sterilized by autoclaving.

2. Isolation and characterization of human peripheral blood lymphocytes.

- Peripheral blood samples were obtained from blood bank on day of blood-gathering.
- Lymphocytes were isolated from blood samples by Ficoll-density gradient centrifugation.
- Mitogenicity assays were performed against three standard lymphocyte mitogens (PWM, PHA and ConA).
- *In vitro* primary T-dependent antibody response was determined against SRBC as a standard antigen.

3. Xenogenic transplantation of human blood lymphocytes to SCID mice

- Human peripheral blood lymphocytes were injected by i.p. route to reconstitute the human immune system in SCID mouse.
- Periodically, blood samples were collected from eye to measure the level of human-specific immunoglobulin G and M.

4. Examination of immune function of hu-PBL-SCID mouse.

- Human immunoglobulin G, M was monitored on weekly.
- Primary antibody response against SRBC was determined by PFC assay and spectrophotometric assay.
- Spleen cells were isolated and their responses to three standard mitogens (PWM, PHA and ConA) were determined.

5. Effects of immunosuppressants on hu-PBL-SCID mouse.

- Cyclosporin A and cyclophosphamide were selected as standard immunosuppressive agents.
- These agents were applied *in vivo* and *in vitro* to induce the immunosuppression.
- Hamatocrit value, the levels of human specific IgG and M, mitogenic response and primary T-dependent antibody response were examined to assess the effects of immunosuppressants.

IV. Conclusion and Recommendations

1. Severe combined immunodeficient (SCID) mouse was maintained

for up to 2 months.

2. Mitogenicity assay was successfully applied for routine checking of function of peripheral blood lymphocyte before and after transplantation.

3. Xenigenic transplantation of human blood lymphocyte to 95% of animals. For up to 6 weeks, serum human IgG and M was produced by transplanted lymphocytes.

4. Primary antibody response was quite refractory in human peripheral blood lymphocytes which was stimulated *in vivo* and *in vitro*.

5. Mitogenic response was not observed in lymphocytes isolated from hu-PBL-SCID mouse.

6. Serum IgM level was quite responsive to added cyclosporin A and cyclophosphamide.

7. Standard *in vivo* protocols were established to develop and apply hu-PBL-SCID mouse in immunopotency evaluation.

Recommendation

Results established in the present study will contribute to the development of immune modulating drugs via screening and mechanistic studies. Results were applicable to the establishment of *in vivo* system which was a final goal of this study. At national level, the establishment of human *in vivo* testing systems will shorten the drug development process and offer back up results clinical application of immunoactive drug candidates.

목 차

제 1 장 서 론	18
제 2 장 재료 및 방법	23
1. hu-PBL-SCID mouse 면역세포의 분리	23
2. human 면역세포의 분리	23
3. mitogenicity assay	23
4. in vitro immunization	24
5. in vivo immunization	24
6. PFC assay	25
7. SCID mouse에 human PBL의 이식	25
8. ELISA 측정법	26
제 3 장 결 과	28
1. human PBL의 SRBC에 대한 항체생성반응 및 표준 mitogen에 대한 반응	28
2. 면역억제제가 mitogen에 의해 유도된 human PBL의 유사분열 촉진에 미치는 영향	30

3. human IgG and IgM levels in hu-PBL-SCID mouse	35
4. 면역억제제가 hu-PBL-SCID mice serum내의 human Igs에 미치는 영향	37
5. hu-PBL-SCID mouse의 항체생성세포수의 측정	42
6. hu-PBL-SCID mouse 면역세포의 mitogen에 대한 반응성	45
7. 면역억제제가 hu-PBL-SCID의 mitogen 반응에 미치는 영향	45
제 4 장 고 찰	53
참고 문헌	62

Contents

I. Introduction	18
II. Materials and Methods	23
1. Isolation of lymphocytes of hu-PBL-SCID mouse	23
2. Isolation of human PBL	23
3. mitogenicity assay	23
4. in vitro immunization	24
5. in vivo immunization	24
6. PFC assay	25
7. Transplantation of human PBL to SCID mouse	25
8. ELISA	26
III. Results	28
1. Antibody response of human PBL to SRBC	
antigen and mitogenic response to standard mitogen	28
2. Effect of immunosuppressants on the mitogenic	
response of human PBL	30

3. human IgG and IgM levels in hu-PBL-SCID mouse	35
4. Effects of immunosuppressants on human Igs of hu-PBL-SCID mice serum	37
5. Antibody response of hu-PBL-SCID mouse	42
6. Mitogenic response of hu-PBL-SCID mouse	45
7. Effects of immunosuppressants on mitogenic response of hu-PBL-SCID	45
IV. Discussion	53
References	62

제 1 장 서론

생명공학방법에 의해 인체질환을 정복하려는 노력이 다각도로 경주되고 있다. 또한 최근 면역관련질환이 증가함에 따라 많은 의약품의 개발이 면역조절제에 집중되고 있다. 생명공학기술의 발전에 따라 biological responses modifier의 개발이 많이 이루어 졌으며 이들은 인체의 생리활성을 조절하여 질병을 치료하는데 많이 이용되고 있다. 특히 면역반응을 조절하여 인체질환을 치료하고자 많은 노력을 하고 있다. 이들 면역관련의약품들의 활성을 평가하기 위해서는 반드시 면역활성을 검증할수 있는 시험법이 확립되어야 하고 또한 면역과 관련이 없는 의약품의 경우에도 반드시 면역독성 유발여부를 확인해야 실용화 및 생산이 가능하게 되어 있다. 이러한 이유로 여러 선진국에서도 국가적차원에서 국민의 건강보호를 위해 더욱 선택적이고 예민한 검사방법을 개발하고 있으며, 약리 안전성 분야에서 면역계 시험법이 새로운 분야로 부각되고 있다. 그러나 국내에서는 아직 그 수준이 선진국을 모방하는 초보적인 단계에 있고 검사방법의 개발에는 많은 투자를 하고 있지 않아 신약개발에 많은 장애요인이 되고 있다. 따라서 본 연구에서는 면역활성을 검증할수 있는 방법을 확립하고 새로운 방법을 확립하고자 하였다. 면역계에 미치는 영향을 전반적으로 검색하는 방법들은

screen, comprehensive, host resistance model로 구별되고 있는데, 신약의 개발에 따른 면역계의 검증에는 우선 screen에 속하는 항목들이 이용되고 있다. screen에는 대개 4가지의 세부항목이 있는데 immunopathology, humoral mediated immunity, cell mediated immunity, nonspecific immunity가 그것이다. 본 연구과제에서 주안점을 두고 개발한 항목은 mitogen assay와 항체생성세포 측정법이다. Mitogen assay법은 standard mitogen인 LPS, PWM, ConA 및 PHA등으로 면역세포의 유사분열을 촉진시켜 세포의 증식을 유도한 후 반응성을 측정하는 방법이다 (Luster et al., 1988). 항체생성세포 측정법은 면역세포를 *in vitro*에서 면역화시킨 후 면역화의 정도를 PFC assay로 측정하는 방법이다 (Mishell and Dutton, 1967).

본 연구의 1차 년도 계획으로 mouse lymphocytes를 이용하여 기존의 면역활성 검증법을 확립하고자 하였으며 새로운 방법을 개발하여 그 결과를 비교 하였다. 2차 년도 계획으로 mouse lymphocyte 대신 인체면역세포를 이용한 시험계를 확립하여 인체에 선택적인 신규 활성물질을 검증하고자 하였다. 3차 년도 계획으로 생체내 실험이 불가능한 인체를 대신할 수 있는 생체내 시험계를 만들고자 하였다. 즉, 면역기능이 없는 SCID mouse에 인체면역세포를 이식함으로써 인체를 대신할수 있는 시험계를 만들어 보다 선택적인 면역활성물질을 검색하고자 하였다.

SCID mouse를 이용하여 인체 세포를 주입하거나 기타질환의 *in vivo* 실험계를 만들고자 하는 연구가 진행되고 있다. Human thymus, lymph

node, spleen등을 SCID에 주입하여 정상적인 기능을 가진 hu-PBL-SCID mouse를 만들었으며, hu-PBL-SCID는 정상기능의 Human T cell, B cell, APC를 포함하고 있었다 (Namikawa at al., 1990, Alter at al, 1990). hu-PBL-SCID를 이용한 시험계로는 1) 초기 hu-PBL-SCID mouse의 확립을 통해 human T cell과 myeloid 분화과정의 보조적인 system을 제공해 주는 조혈계 분석 system (Mosier at al., 1988; Lubin at al., 1991), 2) Epstein-Barr virus에 의해 발생하는 B cell lymphomagenesis model system의 제공 (Mosier at al., 1988, 1989), 3) HIV-1 virus를 hu-PBL-SCID mouse에 challenge시켜 HIV-1를 연구하는 system (Rosenberg at al., 1989; Schnittman at al., 1990) 등이 대표적인 SCID mouse를 이용한 in vivo 시험계로 사용되고 있다. 이러한 면역부전동물을 선별하는 방법으로 sandwich ELISA method를 이용하여 혈중 항체를 측정하고 있다 (Bosma at al., 1983).

본 실험에서는 인체의 PBL을 SCID mouse의 복강에 주사하여 이식시키고자 하였으며 ELISA를 이용하여 이식의 정도를 측정하였다. Torbett(1991) 등은 이식한 후 2 주째 부터 SCID의 spleen에서 human 세포를 측정 하였으며 15 주째에는 SCID 혈액의 80 % 가 인체의 면역세포임을 보고 하였다. Mosier (1988) 등은 1×10^9 PBL을 i.p.로 이식을 하였을때 SCID의 peritoneal cavity, spleen, lymph node, blood에서 이식세포를 검출할수 있었으며 6 개월 까지 인체의 면역세포를 검출 할 수 있었다. 이식된 세포의 구성 비율은 CD8+ 세포가 CD4+ 보다 2배 정도 많았으며 B cell의

구성비율은 매우 다양 하다고 보고가 되어 있다. 인체 면역세포를 이식한 후 1 주일 부터 human IgM, G, A, E, D를 측정 할 수 있었으며, 이는 이식 된 B cell이 항체를 만들수 있음을 시사하고 있다. 그러나 인체의 면역세포 를 intravenous로 이식 할때에는 이식이 되지 않는다고 보고가 되어 있다 (Mosier et al., 1988).

본 연구과제의 1차 년도 연구에서 확립된 mouse 면역세포를 이용한 항체생성 시험법을 2차 년도에 여러 인체 면역세포에 응용을 해 보았다. *in vitro*에서 인체 면역세포의 면역화는 여러 보고자들의 보고와 같이 매우 어려웠으며 tonsil의 경우에만 mouse의 약 50 % 정도 항체생성을 나타내었을 뿐 다른 인체 면역세포에서는 매우 약한 반응성을 나타내었다.

따라서 본 연구과제에서는 연구의 최종목적인 인체를 대신할 수 있는 *in vivo* model을 만들기 위해 면역부전동물인 SCID mouse를 이용하여 hu-PBL-SCID model을 만들고자 여러 실험을 실시 하였다. 먼저 human PBL에 대한 mitogenicity assay와 PFC assay로 확인 한 후 human PBL을 SCID mouse에 이식시켜서 hu-PBL-SCID를 만들었다. 본 실험결과 human PBL을 성공적으로 SCID mouse에 이식시킬수 있었으며, 이는 hu-PBL-SCID mouse의 혈액에서 human IgG, M을 검출하여 확인 할 수 있었다. 이렇게 확립이 된 hu-PBL-SCID mouse를 이용하여 mitogenicity assay와 PFC assay 등의 면역기능 시험법을 실시 하였다. 그리고 면역억제제를 처리하여 그 반응성을 구하였다. 결론적으로 인체를 대신 할 수 있는

model에 대한 연구는 앞으로 계속 진행되어야 할 중요한 과제이며, 이러한 연구에는 SCID mouse를 이용한 시험계가 가장 좋으리라 사료된다.

제 2 장 재료 및 방법

1. hu-PBL-SCID mouse 면역세포의 분리

Mouse의 spleen을 무균적으로 절제 하여 3ml의 EBSS를 함유하고 있는 petri dish로 옮긴다. syringe plunger를 이용하여 잘게 한 후 15 ml tube로 옮겨 10 분간 방치 하여 cell debris를 제거 한다. 상층액을 취하여 원심분리 (1200rpm, 10 min)하고, pellet을 RPMI1640/10% FCS 배지에 현탁 하여 세포의 수를 계수하였다.

2. Human 면역세포의 분리

인체의 peripheral blood는 EBSS로 세척한 후 ficoll로 gradient centrifugation을 하여 분리 하였다. EBSS에 2 배 희석된 혈액 35 ml을 Ficoll-Hypaque 15 ml이 들어 있는 50 ml tube에 천천히 가한 후, 2000 rpm에서 20 분간 원심분리 하였다. 면역세포층을 분리한 후 EBSS로 3 번 세척하여 실험에 사용 하였다. 분리한 세포는 RPMI1640/10% FCS배지에 현탁하여 세포수를 측정 하였다.

3. Mitogenicity assay

분리된 mouse 및 인체 면역세포를 1×10^6 cells/ml로 세포수를 조

질 한 후 96 well microplate에 200 μ l씩 분주 하였다. T cell의 증식능력을 측정하기 위하여 phytohemagglutinine (PHA)와 concanavalin A (Con A)를 가하였고, B and T 세포의 증식을 측정하기 위해 pokeweed mitogen (PWM)을 가하였다. 배양은 37°C CO₂ incubator에서 3 일 동안 실시하였으며, 마지막 18 시간 동안 1 μ Ci/well로 3H-thymidine을 가하여 면역세포의 DNA 합성능력을 측정하였다. Cell harvester를 이용하여 세포를 수거한 후 방사능 동위원소 측정기를 사용하여 DNA 합성시에 유입된 방사능의 양을 측정하였다.

4. *In vitro* immunization

분리된 면역세포를 T-dependent의 경우 1 x 10⁷ cells/ml로 세포수를 조절 한 후 48 well microplate (0.5 ml/well)에서 배양하였다. 세포배양은 낮은 산소분압의 혼합가스(7% 산소, 10 % 탄소, 83 % 질소)로 채워진 chamber내에서 하였고, CO₂ incubator에서 rocker를 이용하여 rocking (7-10 complete cycle/min)을 하였다. *In vitro* T-dependent를 위해서 항원으로 SRBC (6.5 μ l of 1 x 10⁹ cells/ml)를 사용 하였고, human 면역세포의 경우 stimulant로 LPS와 PWM을 사용 하였다. 인체면역세포의 경우 5 일에서 8일 동안 목적에 따라 배양을 하였다.

5. *In vivo* immunization

1.2 x 10⁹ cells/ml의 SRBC를 B6C3F1 mouse에 i.p.로 주사 하여 면

역화 시켰다. 5일 동안 면역화 한 후 spleen cell을 분리하여 실험에 사용하였다. hu-PBL-SCID의 *in vivo* 면역화를 위하여 SRBC를 항원으로 복강내 주사를 하였고, 4일 또는 7일 동안 면역화를 시켰다.

6. PFC assay

면역화가 끝난 면역세포를 harvest하여 사용하였다. T-dependent의 경우 target cells로 SRBC를 사용하였다. 한번의 assay에 면역세포 100 ul, target cell 25 ul, complement 25 ul를 사용 하였으며, base로 0.8 % agarose (350ul)를 사용 하였다. 이들을 잘 섞은 후 petri dish에 부운 후, cover glass로 덮어 고정 시킨 후, incubator에서 2 시간 반응을 시켰다. Plaque을 계수한 후 10^6 세포당 plaque수로 표현 하였다. Target cell의 haptentation은 Rittenberg and Pratt (1969)의 방법을 사용 하였다. SRBC를 EBSS와 cacodylate buffer (44.9 g/l L D.W.)로 세척한 후 picrylsulfonic acid (40mg/40ml cacodylate)로 incubator에서 20 분간 rocking을 하면서 haptentation하였다. Haptentation 후 glycylglycine (40 mg/ 50 ml cacodylate)으로 세척 한 후, 다시 cacodylate와 EBSS로 세척하여 사용 하였다.

7. SCID mouse에 human PBL의 이식

일본 (CLEA)에서 구입한 C.B. 17-SCID mouse는 무균 isolator에서 사육을 하였다. 인체의 PBL을 분리하여 세포의 농도를 2.5×10^8 cells/ml로

조절하여 mouse당 0.2ml 씩 i.p.로 주사를 하였다. SCID mouse에 human PBL이 성공적으로 이식이 되었는지를 알아보기 위해 7일, 14일, 21일, 28일 후에 SCID의 눈에서 capillary로 혈액을 취하여 serum내의 human IgG, M의 양을 측정 하였다. 그리고 인체 면역세포의 이식이 확인된 35일째에 SCID mouse에 항원으로 SRBC를 주사 하여 면역화 시켰으며, 4일과 7일 후에 PFC assay를 실시하였다.

8. ELISA 측정법

hu-PBL-SCID mouse내의 human IgG, M의 양을 정량하기 위해 ELISA를 행하였다. 정해진 시간에 hu-PBL-SCID mouse의 눈에서 혈액을 취한 후 serum을 분리 하였다. 사용된 재료는 다음과 같다. First antibody: 10ug goat anti-human IgM, IgG in coating buffer. Washing buffer (TBST): 0.05 % Tween 20 in TBS (pH 7.4). Blocking buffer: 3-5 % BSA in wash buffer. Diluent buffer: 1% BSA in wash buffer. Second antibody: affinity purified, Fc specific, peroxidase conjugated goat anti human IgM, IgG antibody. OPD solution: 40 mg/100ml o-phenylenediamine in substrate buffer (40ul 30 % H₂O₂). Coating buffer (1 L, pH 9.6): Na₂CO₃ (1.59g), NaHCO₃ (2.93g), NaN₃ (0.2g). Termination of reaction: 2.5 M H₂SO₄ or 3 M NaOH. Substrate buffer (100 ml): 0.1M citric acid (24.3 ml), 0.2 M Na₂HPO₄ (25.7 ml), D.W. (50 ml).

Primary antibody를 ELISA plate에 100ng-1ug/100ul/well의 농도로 coating buffer에 희석하여 37°C도 에서 2 시간 동안 coating시킨 후, blocking buffer를 100 ul씩 가한 후 37°C에서 2 시간 더 반응 시킨다. Washing buffer를 이용해 3 번 세척한 후, serum이나 standard를 100ul씩 가하여 37°C에서 2 시간 동안 반응을 시킨다. Washing buffer를 이용해 3 번 세척한 후 2차 항체로 사용할 anti-human IgG, M radish peroxidase conjugate를 적당한 농도로 1% BSA/TBST에 희석하여 100ul 씩 넣은후 37°C에서 2 시간 동안 반응을 시킨다. Washing buffer를 이용해 3 번 세척한 후, OPD 용액을 100ul 가하고 상온에서 10분간 반응을 시킨다. 황산을 이용해 반응을 멈추게 한 후 492 nm에서 OD를 측정 한다.

제 3 장 결 과

1. human PBL의 SRBC에 대한 항체생성반응 및 표준 mitogen에 대한 반응

인체의 면역세포를 이용한 면역학적, 약리, 독성학적 응용은 많은 보고가 되어 있으며, mouse 면역세포의 반응성은 human 면역세포와 매우 다르므로, 인체에 선택적인 면역활성물질을 검색하기 위해서는 human 면역세포를 사용해야 한다. 인체의 면역세포를 이용한 면역시험계의 도출을 위해 2차 년도에 여러종류의 면역세포를 응용을 해보았으며, 본 실험에서는 가장 용이하기 구할수 있는 PBL을 이용하여 시험계를 구축 하였다. 인체 peripheral blood lymphocytes (PBL)의 function을 알아보기 위해서 체액성 면역반응의 지표가 되는 SRBC antigen에 대한 PFC assay를 실시하였고, pokeweed mitogen (PWM), phytohemaglutinine (PHA), concanavaine A (ConA)에 대해 mitogen assay를 실시하였다.

Human PBL을 *in vitro*에서 T-dependent antigen인 SRBC로 면역화 하였을때 아무런 반응성을 관찰할 수 없었다 (Table 1). 그리고 면역반응을 증가시키기 위해 LPS, PWM등을 가하여 보아도 그 반응성이 증가하지 않음을 알수 있었다. 이로서 human PBL은 *in vitro*에서 SRBC 항원으로는 면역화하기가 매우 어려움을 알수 있으며, function을 보기 위한 지표로서 B cell의 기능을 측정하는 *in vitro* PFC assay는 부적합함을 알수 있다.

Table 1. In vitro T-dependent antibody response of human PBL. PBL was immunized with SRBC for 5, 6 and 7 days in 48 well microplate. Poke weed mitogen (PWM, 10 ug/ml) and lipopolysaccharide (LPS, 10 ug/ml) were added to culture medium to stimulate the antibody responses

Group	immunization period		5 days	6 days	7 days
	mitogen				
1	none		9.5 ± 3.6	0	2.5 ± 3.5
	PWM		5.8 ± 5.1		19.7 ± 14.1
	LPS		1.0 ± 1.4	2.7 ± 3.8 1.5 ± 2.2	32.0 ± 3.3
2	none		5.2 ± 5.3	-	12.1 ± 11.3
	PWM		0		15.3 ± 9.8
	LPS		1.1 ± 1.6	-	6.1 ± 5.7
3	none		0.8 ± 1.1	0	10.6 ± 2.1
	PWM		3.9 ± 4.0	1.5 ± 2.0	8.3 ± 4.7
	LPS		0	0	12.5 ± 10.2
4	none		0	0	1.1 ± 1.9
	PWM		2.5 ± 3.5	0	1.8 ± 2.5
	LPS		0	0	2.7 ± 3.8
5	none		2.2 ± 3.1	0	11.1 ± 2.2
	PWM		2.8 ± 3.9	1.1 ± 1.6	9.5 ± 6.7
	LPS		9.5 ± 0.7	0	2.8 ± 3.9

Human PBL의 기능을 측정하기 위한 다른 방법으로 mitogenicity assay를 실시하였다. 인체면역세포를 이용한 *in vivo* 시험계를 도출하기 위해서는 *in vitro* 시험법의 확립이 필요하여, *in vitro*에서 B cell mitogen인 LPS, B 및 T lymphocyte mitogen인 pokeweed mitogen (PWM), T lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A) 및 phytohemagglutinine (PHA) 등의 유사분열 유도물질에 대한 반응성을 시험하였다 (Figure 1). T lymphocyte mitogen인 PHA는 가장 낮은 농도인 1.0 ug/ml에서도 대조군에 비해 77배이상의 DPM의 증가를 보였으며, 10 ug/ml에서는 대조군보다 105배가 높은 DPM의 증가를 보여 가장 강력한 유사분열 촉진효과를 보였다. Con A와 PWM 역시 10 ug/ml의 농도에서 각각 51배 및 30배의 DPM증가를 보여 human PBL이 T cell mitogen에 대해 반응이 높음을 알 수 있었다. 반면에 B lymphocyte mitogen인 LPS는 용량의존적으로 human PBL의 유사분열을 촉진하였으나, T lymphocyte mitogen과 T 및 B lymphocyte mitogen 보다는 유사분열 촉진 능력이 미약함을 알 수 있었다. 이는 다른 보고자들의 결과와 동일하게 bacterial lipopolysaccharide (LPS)는 human PBL에 약하게 반응함을 알 수 있다.

2. 면역억제제가 mitogen에 의해 유도된 human PBL의 유사분열 촉진에 미치는 영향

Normal human PBL이 mitogen에 의해 유사분열이 촉진되는 현상

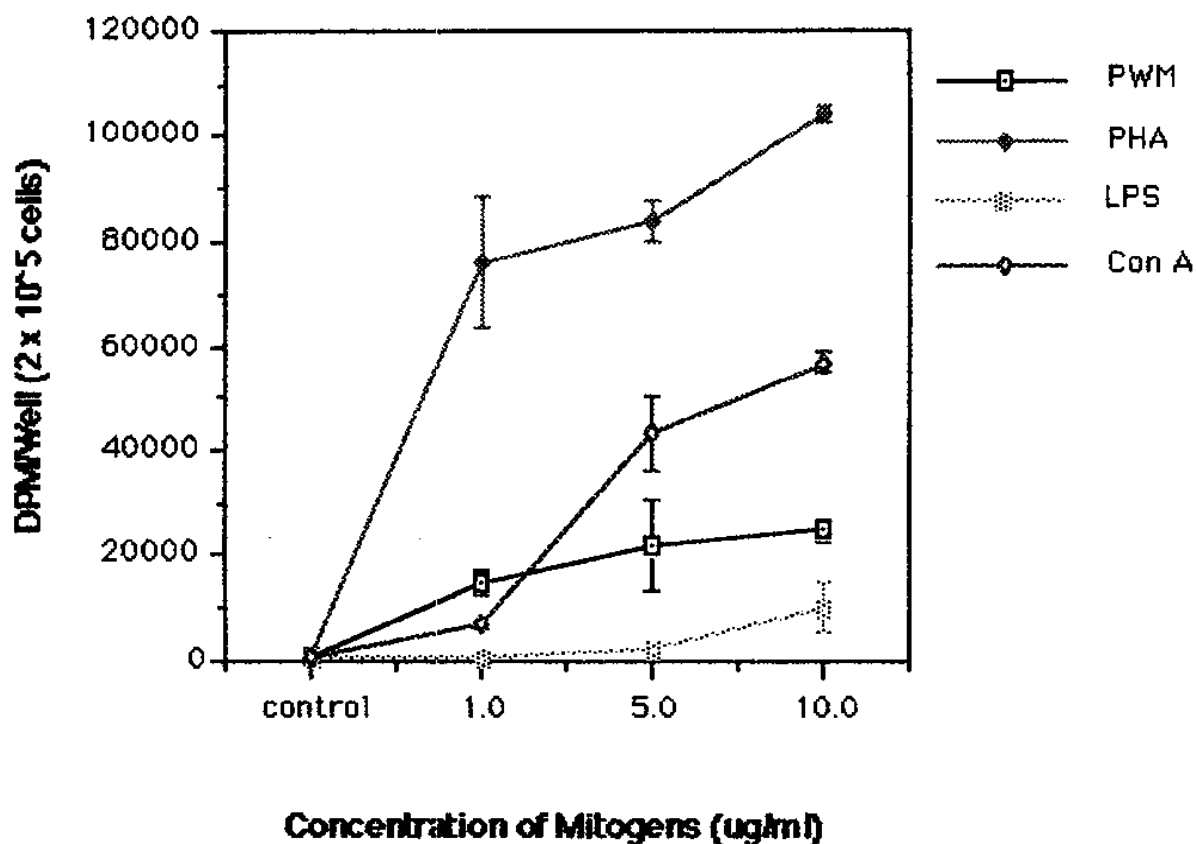


Figure 1. Dose-dependent effects of mitogens on proliferation of human peripheral blood lymphocytes. Lymphocytes were cultured for 3 days in 10 % FCS/RPMI 1640 medium. ³H-thymidine was added in culture medium for final 18 hrs to determine DNA synthesis. Values represent the mean±SD of triplicate cultures. PWM; pokeweed mitogen, PHA; phytohemagglutinine, LPS; lipopolysaccharide, Con A; concanavalin A.

을 이용하여, 면역계에 영향을 미칠 수 있는 물질을 검색 할 수 있는 시험계를 확립하기 위하여 면역세포에 mitogen을 처리하여 세포증식을 유도한 후 cyclophosphamide (CP)를 농도별로 처리한 결과, Con A를 10ug/ml로 처리한 후 CP를 처리하였을 경우에는 세포증식효과가 억제되는 경향을 보였으나, Con A를 낮은 농도 (1 ug/ml 및 5 ug/ml)로 처리하여 세포증식을 유도하였을 경우에는 CP가 세포증식을 억제하지 못하였다 (Figure 2). PWM 및 LPS로 세포증식을 유도하고 CP를 처리하였을 경우에는 CP의 세포증식효과가 10 ug/ml의 PWM 농도에서만 약간 나타났다. PHA로 세포증식을 유도한 경우에는 PHA 모든 농도에서 CP에 의한 세포증식효과가 나타나지 않았다. 이와같이 CP의 투여에 의해 세포증식 반응이 감소하지 않거나 오히려 약간 증가하는 경향이 있는것은, CP가 생체내에서 활성을 거쳐야 면역억제 활성을 나타낼 수 있는 물질이기 때문인 것으로 사료된다. Bio-activation이 필요 없는 면역억제물질인 cyclosporin A (CsA)를 투여하여 mitogen assay를 행하여 보았을때 CsA의 투여에 의해 human PBL의 반응성이 모두 억제됨을 알 수 있었다.

Figure 3에서 보는 바와 같이 CsA는 Con A, LPS 및 PHA를 처리하여 유도된 세포증식효과를 유의성 있게 억제 시킴을 알 수 있었다. 따라서 *in vitro*에서 normal human PBL에 mitogen을 처리하여 세포증식을 유도하는 시험계는 면역세포에 영향을 미칠 수 있는 물질을 검색할 수 있는 시험계로서 유용성은 있지만, *in vivo*에서 대사를 거친 후에 활성을 나타내는

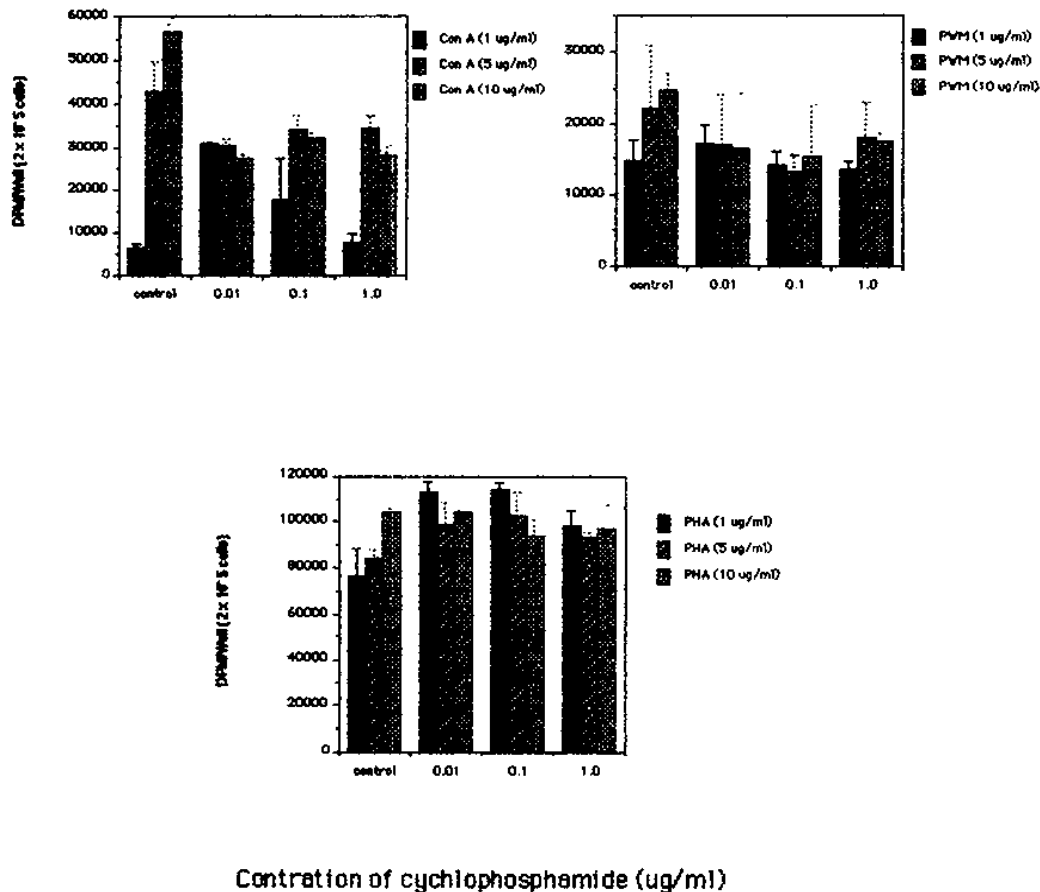


Figure 2. The effects of cyclophosphamide on mitogen induced proliferation of human peripheral lymphocytes. Lymphocytes were cultured for 3 days in 10 % FCS/RPMI 1640 medium. Cyclophosphamide and mitogens were added in culture medium for all culture period. ³H-thymidine was added in culture medium for final 18 hrs to determine DNA synthesis. Values represent the mean \pm SD of triplicate cultures.

Con A ; conconavaline A, PWM; pokeweed mitogen, PHA ; phytohaemagglutinin.

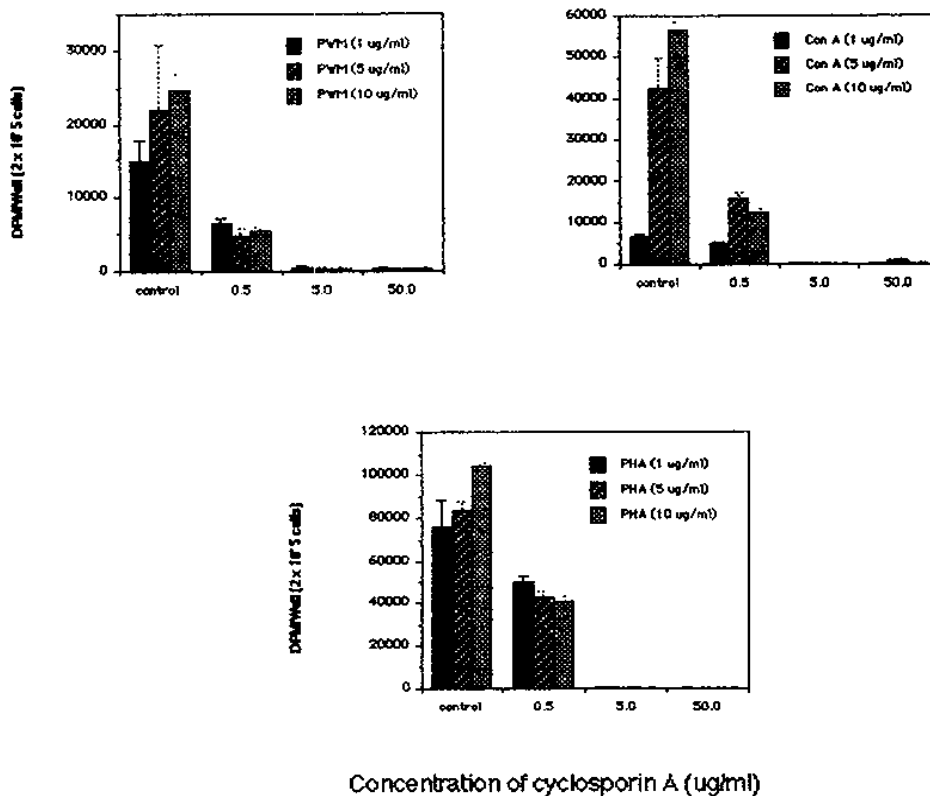


Figure 3. Effects of cyclosporin A on mitogen induced proliferation of human peripheral lymphocytes. Lymphocytes were cultured for 3 days in 10 % FCS/RPMI 1640 medium. Cyclosporin A and mitogens were added in culture medium for all culture period. 3H-thymidine was added in culture medium for final 18 hrs to determine DNA synthesis. Values represent the mean±SD of triplicate cultures. Con A ; concanavaline A, PWM ; pokeweed mitogen, PHA ; phytohaemagglutininne.

물질에 대하여서는 한계가 있음을 입증해 준다.

따라서 본 실험에서는 *in vivo*에서 면역조절물질이 인체 면역계에 미치는 영향을 평가하는 시험계를 확립하기 위하여 human PBL이 reconstitution된 hu-PBL-SCID mice를 이용하여 mitogenicity assay를 시험하였다.

3. Human IgG and IgM levels in hu-PBL-SCID mouse

본 실험에 사용한 human PBL은 한 사람의 혈액에서 분리 하였으며 세포의 viability는 거의 100 % 였다. 총 16마리의 SCID mice를 사용하였으며 임의로 grouping을 하여 무균 isolator에서 사육을 하였다. human PBL의 이식은 intraperitoneal로 5×10^7 cells을 주사하였다. Human PBL을 이식한 후 hu-PBL-SCID의 spleen의 size는 SCID에 비해 상당히 비대해 있음을 알 수 있다 (Table 2). 주사한 후 1 주일 간격으로 SCID의 눈에서 혈액을 취하여 serum을 분리하였다. Serum내의 human IgG와 IgM의 양을 측정하여 human PBL의 이식정도를 측정 하였다. human PBL을 이식하지 않은 SCID mice의 serum 내에서는 human IgG를 검출할 수 없었다. 이식 후 7일에는 hu-PBL-SCID mice의 serum내에서 human IgG가 16.3 ± 10.35 , 14 일에는 214.2 ± 99.7 , 21일에는 1369.9 ± 551.6 , 28일에는 1011.0 ± 278.6 ug/ml가 검출되었다. 이 양은 Duchosal 그룹 (1992)이 보고한 1004 ± 395 ug/ml (n=6) and 1175 ± 691 ug/ml (n=6)과 비슷한 결과를 보여 human PBL이 SCID mouse내

Table 2. Comparison of SCID mouse spleen weight with hu-PBL-SCID mouse spleen weight. hu-PBL-SCID mouse were treated with cyclophosphamide (CP) or cyclosporine A (CsA)

Group	Spleen Weight(S)	Body Weight(B)	percent of spleen weight (S/B)
SCID	0.06	23.30	0.26
	0.03	22.40	0.13
hu-PBL- SCID	0.10	20.38	0.49
	0.66	18.70	3.53
hu-PBL- SCID (Cs A)	0.07	21.02	0.33
	0.93	19.33	4.81
hu-PBL- SCID (CP)	0.48	22.05	2.18
	0.16	19.47	0.82
	0.25	22.26	1.12

에 이식이 되었음을 나타내고 있다 (Table 3).

Human PBL을 이식시킨 hu-PBL-SCID mice에서 human IgM 양을 동시에 정량하였다. IgM양은 이식 후 7일에는 1.40 ± 0.33 , 14일에는 8.36 ± 5.02 , 21일에는 14.6 ± 5.55 , 28일에는 81.7 ± 32.4 ug/ml로서 증가하는 양상을 보였다 (Table 4). 이 결과로 이식된 human PBL중의 B lymphocytes가 SCID mouse내에서 Ig를 만들어 낼 수 있으며, 인체의 면역세포가 성공적으로 이식되었음을 알 수 있다.

4. 면역억제제가 hu-PBL-SCID mice serum내의 human Igs에 미치는 영향

면역억제제의 투여에 의한 hu-PBL-SCID mouse 면역세포의 반응성을 알아보기 위하여 human PBL을 이식한 후 5 주째에 CsA와 CP를 처리하여 2일, 4일 후에 human Ig의 양을 측정하였다. Human IgG의 양은 Table 5에 나타난 결과와 같다. CsA를 처리한 시험군은 처리 후 2일째의 평균이 751.7, 4일째 평균이 797.3으로서 처리직전의 728.7과 비교할 때 양의 차이가 거의 없었으며, CP를 처리한 경우에도 각각 910.7, 1039.3 및 919.0으로 면역억제제의 투여에 대한 효과는 나타나지 않았다. 반면에 human IgM의 양은 면역억제제를 투여하면 감소하는 경향을 보였다 (Table 6). CsA를 투여한 hu-PBL-SCID mice의 serum내 human IgM의 양은 투여 2일째 평균이 15.1, 4일째는 1.79 ug/ml로서 투여직전의 39.8 ug/ml에 비해 현저히 감소하였고, CP투여시에도 각각 16.4, 9.69 및 55.9 ug/ml로서 면역억제제 투여로

Table 3. Human IgG serum Levels (ug/ml) in hu-PBL-mice. Human PBL was injected to SCID mouse by intraperitoneal on day 0. Blood was collected from eye on a given day and serum was isolated from blood. The human IgG was quantitated with ELISA

animal number	Day			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
47	22.58	189.19	2599	1010
48	-	-	2202	744
49	15.84	148.33	1996	1187
50	7.96	182.08	784	806
51	4.31	178.90	931	573
52	18.81	365.76	1166	808
53	4.32	196.50	1023	1096
54	10.66	282.72	1682	1605
55	12.88	376.72	1286	1003
56	16.76	70.02	688	474
57	44.16	228.60	1739	1129
58	10.65	332.50	844	1049
59	3.74	179.86	740	869
60	23.93	117.14	1546	1366
61	26.23	-	1059	1054
62	22.06	-	1633	1333
63	-	-	-	-
64	-	-	-	-
65	-	-	-	-

Table 4. Human IgM serum levels (ug/ml) in hu-PBL-SCID mice. Human PBL was injected to SCID by i.p. on day 0. Blood was collected from eye on a given day and serum was isolated from blood. The human IgM was quantitated with ELISA

Day animal number	Day			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
47	1.89	22.32	22.94	115.75
48	-	-	11.61	49.02
49	1.09	9.94	13.17	50.09
50	1.48	3.82	9.93	62.00
51	1.28	2.92	7.70	21.83
52	1.62	8.35	21.42	116.10
53	1.29	5.51	10.74	73.67
54	1.21	9.78	20.83	127.44
55	1.26	8.38	9.91	84.94
56	1.09	1.22	9.03	43.88
57	1.68	8.14	19.09	96.72
58	1.46	6.54	8.85	93.91
59	1.01	12.18	22.52	48.68
60	2.20	117.14	16.83	100.08
61	1.44	-	21.18	87.27
62	0.95	-	9.93	136.36
63	-	-	-	-
64	-	-	-	-
65	-	-	-	-

Table 5. Effect of immunosuppressants on human IgG serum levels (ug/ml) in hu-PBL-SCID. SCID mouse were transplanted with human PBL on day 0 and SCID-hu mouse were treated with cyclophosphamide (CP) and cyclosporine A (CsA) on day 35, and exposed for 2-4 days. Blood was isolated from eye on a given day and serum was prepared. Human IgG was quantitated with ELISA

Group	Exposed day	0 day	2 days	4 days
	SCID		-	-
hu-PBL- SCID		1010	1009	2638
		806	552	860
		1049	912	1076
hu-PBL- SCID (Cs A)		744	838	763
		573	764	879
		869	653	750
hu-PBL- SCID (CP)		1187	778	1219
		1096	1877	1589
		474	77	310

Table 6. Effect of immunosuppressants on human IgM serum levels (ug/ml) in hu-PBL-SCID. SCID mouse were transplanted with human PBL on day 0 and SCID-hu mouse were treated with cyclophosphamide (CP) and cyclosporine A (CsA) on day 35, and exposed for 2-4 days. Blood was isolated from eye on a given day and serum was prepared. Human IgM was quantitated with ELISA

Group	exposed day	0 day	2 days	4 days
	SCID		-	-
hu-PBL- SCID		115.75	111.7	108.7
		62.00	49.7	82.9
		93.91	25.7	47.0
hu-PBL- SCID (Cs A)		49.02	45.4	5.38
		21.83	0.0	0.0
		48.68	0.0	0.0
hu-PBL- SCID (CP)		50.09	7.0	7.07
		73.67	25.7	22.0
		43.88	0.0	0.0

현저히 감소하는 경향을 볼 수 있었다. hu-PBL-SCID에서 serum을 분리 할 때 hematocrit value를 구하여 면역독성물질에 의한 영향을 알아 보고자 하였다. cyclophosphamide를 투여 하였을 경우 2 일, 4일째에 약 20 % 정도의 감소를 나타내었다. 그러나 Cyclosporin A에 의한 hematocrit value의 감소는 관찰 되지 않았다 (Table 7).

5. hu-PBL-SCID mouse의 항체생성세포수의 측정

hu-PBL-SCID mice에 이식된 human PBL이 인체의 면역세포와 같은 기능을 하는지를 알아 보고자 T-dependent antigen인 SRBC를 human PBL 이식 후 5 주째에 *in vivo*로 투여하여 면역화 시켰다. 정상 B6C3F1 mouse의 경우 *in vivo*로 SRBC 항원을 투여하여 면역화한 후 PFC assay를 하였을때 항체 생성 세포수가 증가함을 알수 있다. 그러나 hu-PBL-SCID mouse에 SRBC로 면역화하였을때 Table 8에서 보는 바와같이 항체생성세포수가 증가하지 않았다. 이 결과는 hu-PBL- SCID에 이식된 면역세포가 항원에 반응을 하지 않음을 나타내고 있다. Human PBL을 *in vitro*에서 SRBC 항원으로 면역화하고 그반응성을 PFC assay로 검사해 보았을때 반응을 하지 않음을 보고한 바가 있는데, 역시, hu-PBL- SCID mouse에서도 그 반응성이 없음을 알수 있다. 이는 human PBL이 *in vitro*에서 또는 hu-PBL- SCID mouse내에서 외부 항원인 SRBC에 반응을 하지 않고 최소한의 항체만 생산하며 존재하는 것으로 사료가 된다.

Table 7. Comparison of the hematocrit value in hu-PBL-SCID mouse treated with cyclophosphamide (CP) and cyclosporine A (CsA). hu-PBL-SCID mouse were immunized with SRBC and treated with chemicals for 2 and 4 days

	the Number of animals	2 days	4 days
hu-PBL-SCID	63	58.6	53.0
hu-PBL-SCID + SRBC	47	58.6	54.0
	50	47.2	35.0
	58	50.0	45.0
hu-PBL-SCID + SRBC + CsA	48	47.1	36.0
	51	60.4	50.0
	59	63.5	47.0
hu-PBL-SCID + SRBC + CP	49	30.0	20.0
	53	43.7	40.0
	56	20.3	11.0

Table 8. Comparison of in vivo T-dependent antibody response of B6C3F1 mice with in vivo antibody response of hu-PBL-SCID mice. In vivo T-dependent antibody response of spleen cells of hu-PBL-SCID mouse, SCID mouse were transplanted with human PBL on day 0 and hu-PBL-SCID mouse were injected with SRBC on day 35 and immunized for 4 or 7 days in CO₂ incubator. On day 39 (immunized for 4 days) and 42 (immunized for 7 days), the spleen cells of hu-PBL-SCID mice were isolated and determined antibody formation of immunized lymphocytes (A). In vivo T-dependent antibody responses of B6C3F1 mice, lymphocytes were injected with SRBC and immunized in peritoneal for 3, 4, and 5 days (B)

(A)		
Treatment	Cell No. (10 ⁷ /spleen)	PFC (AFCs/10 ⁶)
SCID	1.19 ± 0.42	0 (4 Days)
hu-PBL- SCID	11.40 ± 2.12	0 (4 Days)
	9.30 ± 0.42	0 (7 Days)
	11.97 ± 2.12	0 (7 Days)
hu-PBL- SCID (Cs A)	0.90 ± 0.00	24.5(4 Days)
	27.60 ± 1.12	0 (7 Days)
	5.40 ± 0.73	0 (7 Days)
hu-PBL- SCID (CP)	4.77 ± 0.42	0 (4 Days)
	20.70 ± 2.64	0 (7 Days)
	12.30 ± 0.84	0 (7 Days)

(B)		
mouse	Cell No. (10 ⁷ /spleen)	PFC (AFC/10 ⁶ cells)
B6C3F1	6.5 ± 0.83	214 ± 67 (3 days)
	12.7 ± 0.63	635 ± 48 (4 days)
	8.7 ± 0.6	496 ± 78 (5 days)

6. hu-PBL-SCID mouse 면역세포의 mitogen에 대한 반응성

hu-PBL-SCID mouse의 면역세포를 분리하여 human PBL의 경우와 같이 PWM, PHA, ConA 등의 mitogen에 대해 실험을 실시 하였다 (Figure 4). 반응성이 낮은 LPS에 대한 반응성은 실험하지 않았다. Human PBL이 mitogen에 대해 용량의존적으로 반응함에 비해 hu-PBL-SCID 면역세포는 반응성이 약함을 알 수 있다. SRBC 항원의 *in vivo*투여에 의한 hu-PBL-SCID 면역세포의 반응성이 없었던 결과와 유사하게, hu-PBL-SCID mouse의 면역세포는 mitogen에도 반응을 하지 않음을 알 수 있다. Human PBL을 이식하지 않은 SCID mouse의 면역세포에 대한 mitogen assay에서도 반응성을 찾을수 없었다. 이는 SCID mouse의 면역세포가 기능을 하지 않는 상태이기 때문인 것으로 사료된다.

7. 면역억제제가 hu-PBL-SCID의 mitogen 반응에 미치는 영향

hu-PBL-SCID의 spleen cell에 표준 mitogen과 면역억제 물질을 처리 하여 그 반응성을 실험 하였다. SCID mouse에 이식하기 전의 human PBL은 표준 mitogen에 대해 반응을 용량의존적으로 하였으며 면역억제제를 처리 하였을 경우에도 면역억제제의 농도에 따라 반응을 하였다 (Figure 1). 그러나 SCID mouse에 이식을 하여 hu-PBL-SCID를 만든 후의 반응성은 상이함을 알 수 있다. hu-PBL-SCID에 *in vivo*로 cyclosporin A를 처리하고

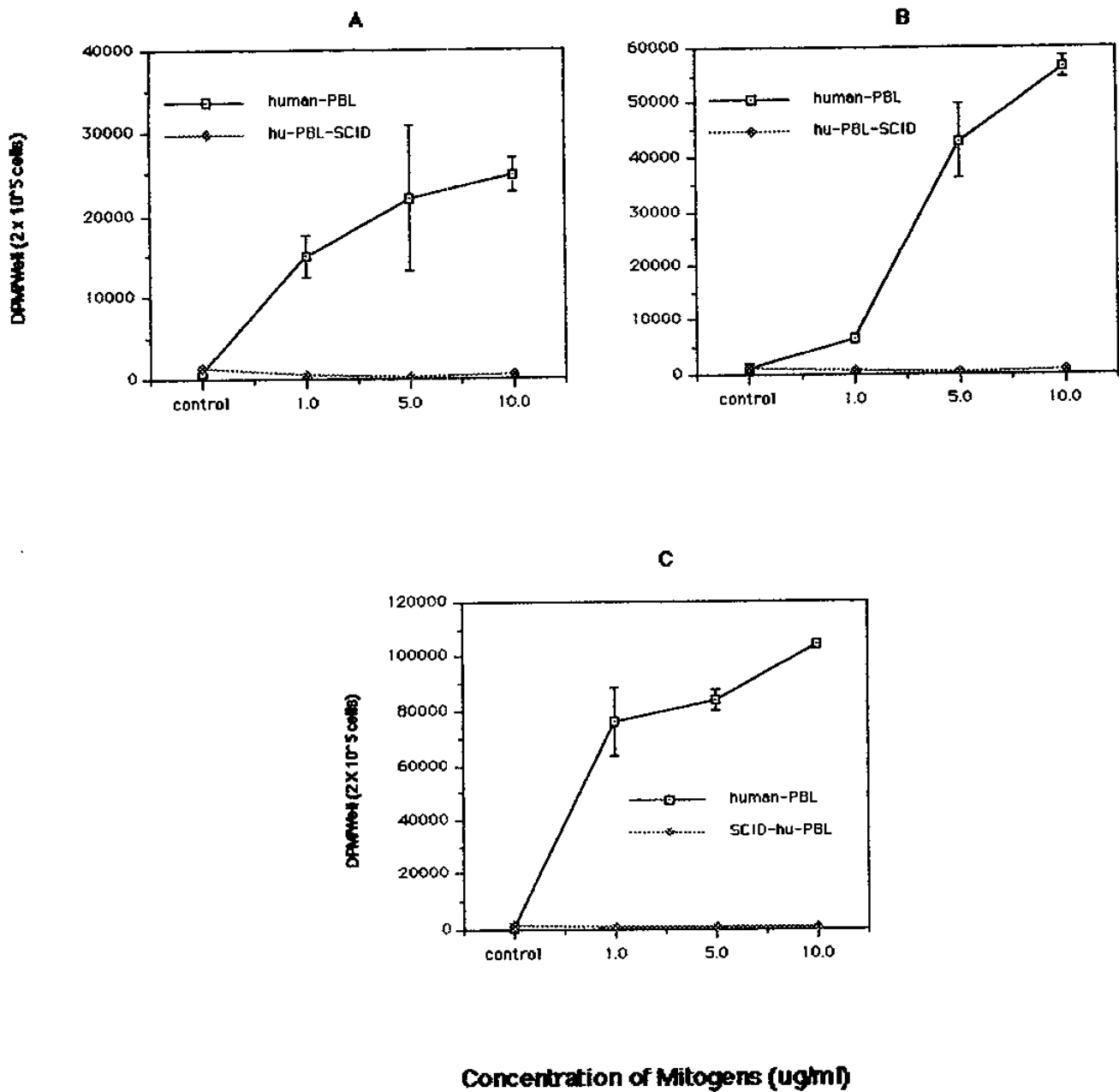


Figure 4. Comparison of mitogenic activity of mitogens on human PBL and hu-PBL-SCID mice splenocytes. Lymphocytes were cultured for 3 days in 10 % FCS/RPMI 1640 medium. Mitogens were added in culture medium for all culture period. 3H-thymidine was added in culture medium for final 18 hrs to determine DNA synthesis. Values represent the mean±SD of triplicate cultures.
 A ; pokeweed mitogen, B ; conconavaline A, C ; phytohaemagglutinine

PWM, ConA, PHA에 대해 반응성을 구하여 보았을때, 그 반응성에서 아무런 차이도 없었으나, hu-PBL-SCID에 cyclophosphamide를 처리 하였을 경우 mitogen에 대해 반응을 하고 있음을 알 수 있다 (Figure 5). CP의 투여에 의해 mitogen에 대한 반응성이 증가함을 알 수 있었다. 따라서 지금까지의 결과에서 hu-PBL-SCID mouse의 면역세포가 mitogen에 대한 반응성 및 T-dependent antigen에 대한 반응성이 약한것을 고려할 때, *in vivo*에서 CP를 처리한 hu-PBL-SCID의 면역세포는 mitogenicity에 어느정도 반응할 것으로 사료된다. hu-PBL-SCID mouse의 spleen cell을 분리하여 *in vitro*에서 면역억제제를 처리하여 보았다. cyclosporine A를 처리 하였을 때 표준 mitogen에 대한 반응성에는 차이가 없었다. 그러나 cyclophosphamide를 처리 하였을 때 ConA에 대한 반응이 증가 함을 알 수 있었다 (Figure 6). 다음으로 *in vivo*와 *in vitro*에서 면역억제제를 병용 투여 하여 그 반응성을 비교 하였다. hu-PBL-SCID에 *in vivo*로 cyclophosphamide를 투여하여 mitogen에 대한 반응성을 증가 시킨 후 *in vitro*에서 CP와 CsA를 다시 처리하여 그 반응성을 비교 해 본 결과, mitogen에 대한 반응성을 감소 시킴을 알 수 있었다 (Figure 7). hu-PBL-SCID에 *in vivo*로 CsA를 투여하고 *in vitro*에서 CP와 CsA를 처리 한 후 표준 mitogen에 대한 반응성을 비교 하였다. mitogen을 처리하지 않은 unstimulated 상태에서 *in vitro*에서 면역억제제를 투여 하면 그 반응성이 상당히 감소 함을 알 수 있다. Mitogen에 대한 반응성을 비교하여 보아도 약한정도의 감소를 나타내고 있다 (Figure 8).

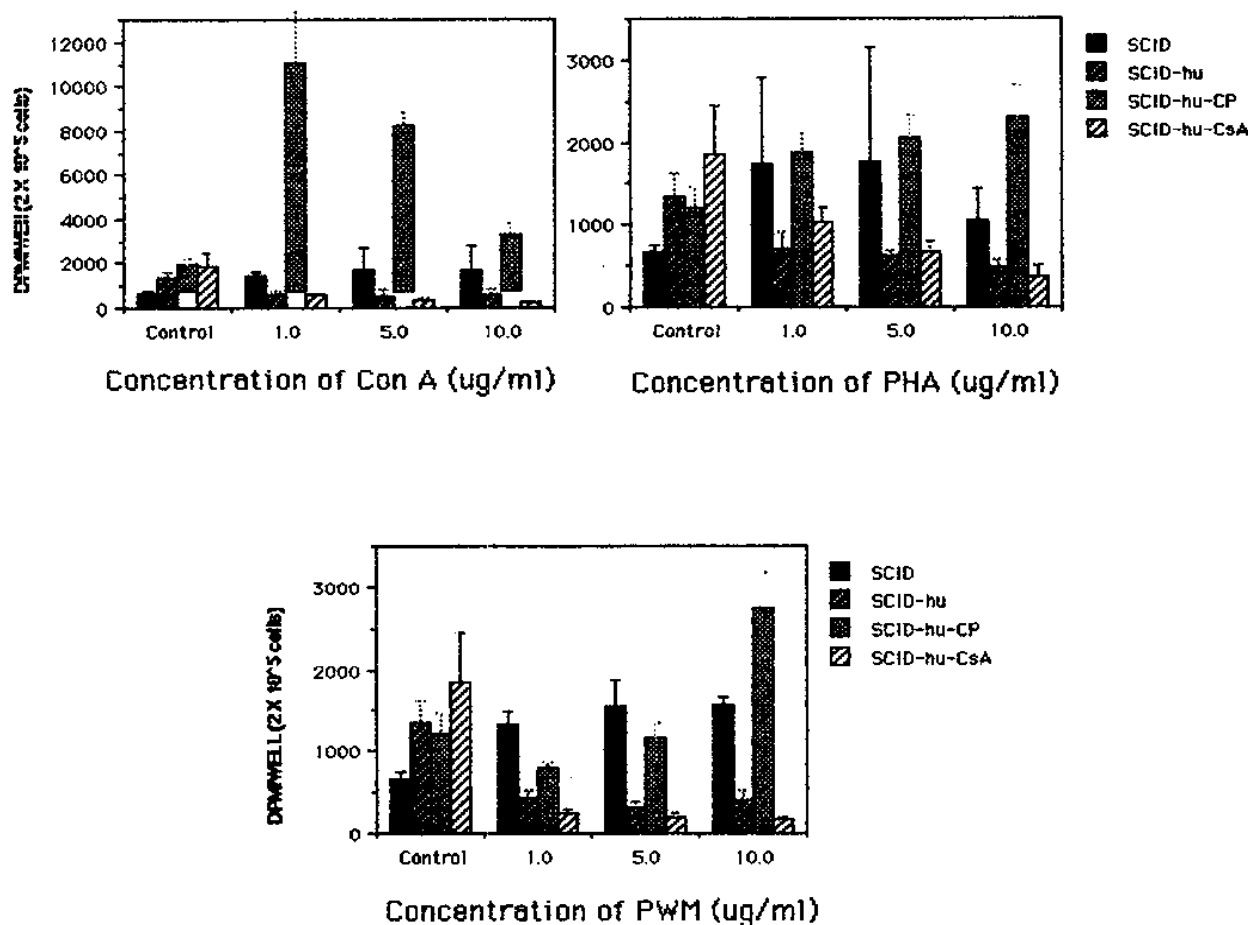


Figure 5. Effects of mitogens on the proliferation of splenocytes of hu-PBL-SCID mice treated with immunosuppressants *in vivo* and SCID mice. Splenocytes were cultured for 3 days in 10 % FCS/RPMI 1640 medium. Mitogens were added in culture medium for all culture period. 3H-thymidine was added in culture medium for final 18 hrs to determine DNA synthesis. Values represent the mean+SD of triplicate cultures. SCID-hu ; hu-PBL-scid mice, SCID-hu-CP ; cyclophosphamide treated hu-PBL-SCID mice, SCID-hu-CsA ; cyclospoline A treated hu-PBL-SCID mice.

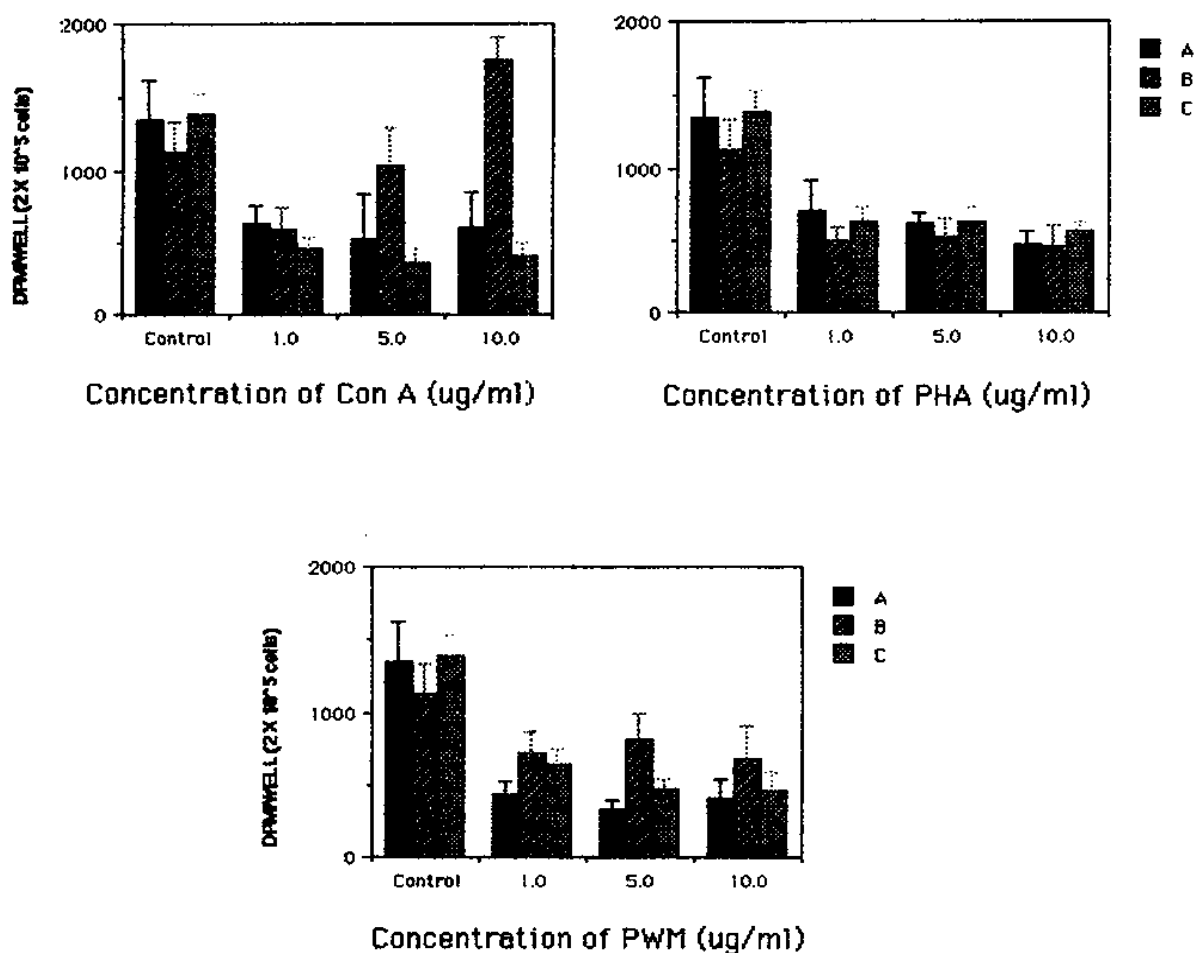


Figure 6. Effects of mitogens and immunosuppressants on the proliferation of splenocytes of hu-PBL-SCID mice in vitro. Splenocytes were cultured for 3 days in 10 % FCS/RPMI 1640 medium. Mitogens and immunosuppressants were added in culture medium for all culture period. ³H-thymidine was added in culture medium for final 18 hrs to determine DNA synthesis. Values represent the mean+SD of triplicate cultures. A ; hu-PBL-SCID mice, B ; cyclophosphamide treated hu-PBL-SCID mice, C ; cyclospoline A treated hu-PBL-SCID mice.

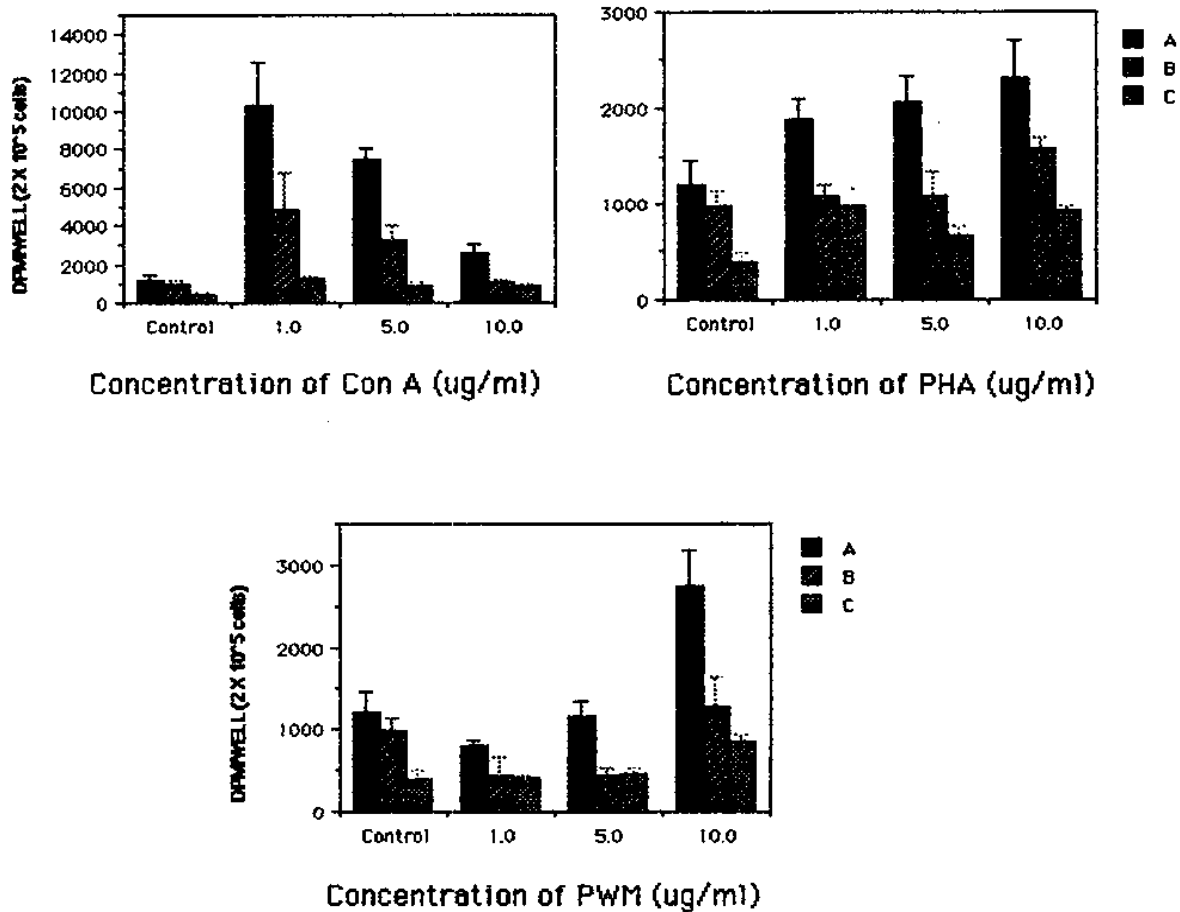


Figure 7. Effects of mitogens and immunosuppressants on the proliferation of hu-PBL-SCID mice treated with cyclophosphamide *in vivo*. Splenocytes were cultured for 3 days in 10 % FCS/RPMI 1640 medium. Mitogens and immunosuppressants were added in culture medium for all culture period. ³H-thymidine was added in culture medium for final 18 hrs to determine DNA synthesis. Values represent the mean±SD of triplicate cultures.

A ; *in vivo* cyclophosphamide treated control

B ; treated cyclophosphamide *in vivo* and *in vitro*

C ; treated cyclophosphamide *in vivo* and cyclosporine A *in vitro*

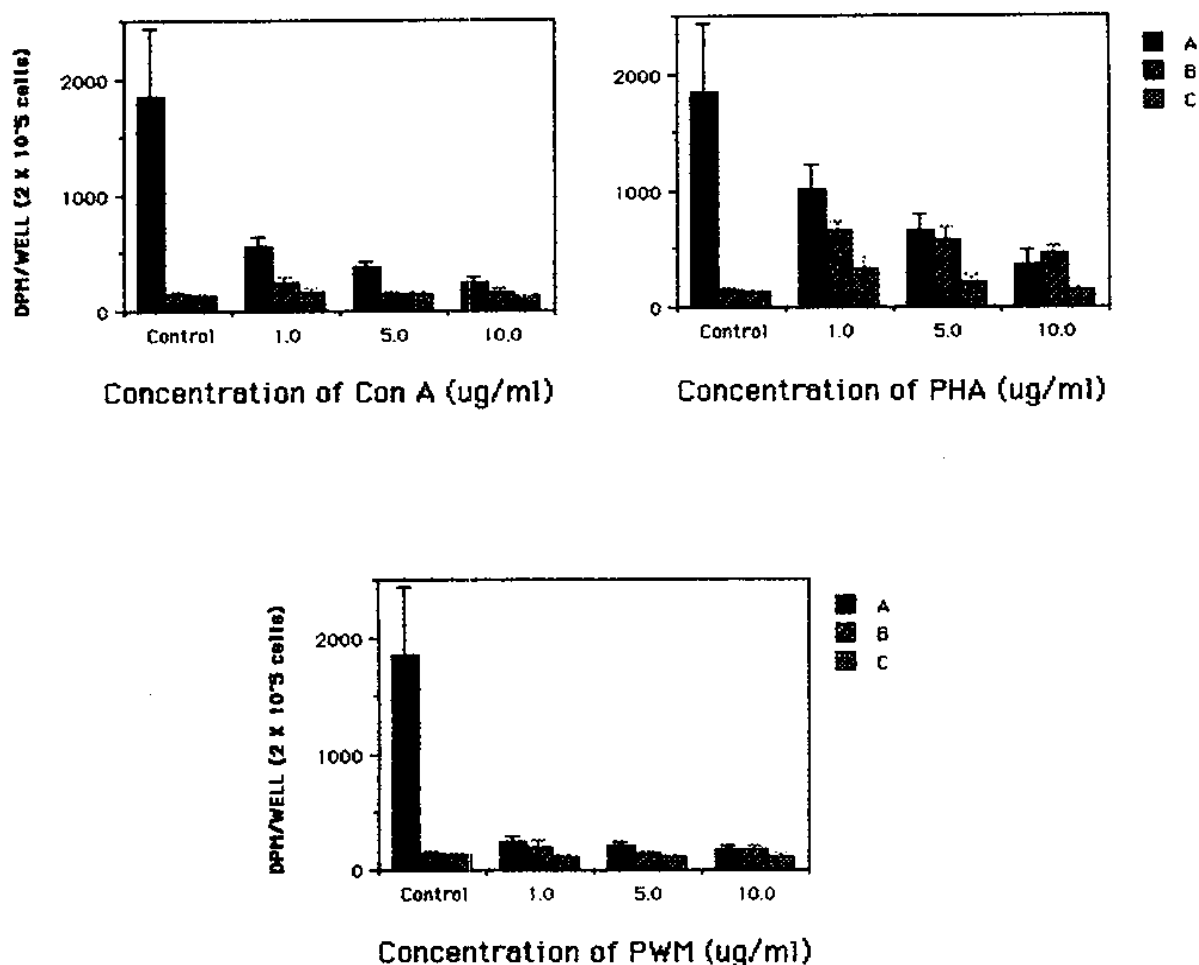


Figure 8. Effects of mitogens and immunosuppressants on the proliferation of hu-PBL-SCID mice splenocytes treated with cyclospoline A in in vivo. Splenocytes were cultured for 3 days in 10 % FCS/RPMI 1640 medium. Mitogens and immunosupprants were added in culture medium for all culture period. 3H-thymidine was added in culture medium for final 18 hrs to determine DNA synthesis. Values represent the mean \pm SD of triplicate cultures. A ; in vivo cyclospoline A treated control
 B ; treated cyclospoline A in vivo and cyclophosphamide in vitro
 C ; treated cyclospoline A in vivo and in vitro

이상의 실험을 종합해 볼 때 *in vivo*에서 CP를 처리한 hu-PBL-SCID mice의 면역세포는 mitogen에 대해 반응성을 나타냄을 알 수 있었으며, 여기에서 나타난 반응성은 *in vitro*에서 CP와 CsA를 처리함으로써 감소됨을 알 수 있었다.

제 4 장, 고 찰

본 연구에서는 인체를 대신할 수 있는 면역시험계를 개발함에 있어 1차 년도에 확립된 동물세포 이용기술과 2차 년도에 확립된 인체 면역세포의 배양 시험계를 통한 생체외 인체면역시험기술을 발전시켜 면역부전 동물에 이식된 인체 면역세포를 통한 생체내 인체 면역 시험기술로 확대 발전시켜 인체 대체 시험법의 확립을 그 목표로 하고 있다. 동물세포 또는 동물에서 약물에 대한 면역기능에 대한 평가를 수행하여 이를 바로 인체에 적용하는 데는 많은 무리가 따르며 이것은 비단 면역계 뿐만 아니라 약리학 또는 독성학 및 생명공학 전분야에서 나타나는 문제점이다. 이와같은 문제점을 해결하기 위한 방편으로 최근 많은 연구가 진행되고 있는 것 중의 하나가 인체 면역계를 배양이나 이식을 통하여 그 기능을 연구할 수 있는 시험계의 도출이다. 본 연구에서는 인체의 면역세포를 면역부전동물인 SCID mouse에 이식하여 그 이식여부와 약리독성학적 시험계를 응용함으로써 신약개발의 약리검정의 최종단계의 시험법을 도출하는데 주안점을 두고 수행되었다. 연구의 범위는 SCID mouse의 유지, human peripheral blood lymphocyte의 분리 및 *in vitro* 면역기능 검색, human peripheral blood lymphocyte의 SCID mouse에 대한 xenogeneic graft, 이식된 peripheral blood lymphocyte의 기능분석등 이었다.

현재 면역계에 작용하는 약물을 개발하고자 하는 노력은 다각도로 경주되고 있다. 특히 생명공학의 혁신적인 발달에 힘입어 세포생물학 분야에서 많은 lymphokine들을 비롯한 biological response modifier가 밝혀지고 있으며, 이들의 의약품으로서의 응용이 활발히 연구되어 지고 있다. 또한 난치병치료의 목적으로 시행되는 tissue나 cell의 이식연구 또한 활발하여 이의 임상치료에서 반드시 수반되는 면역억제제의 개발도 많이 연구되어지고 있다. 이와 더불어 자가면역질환등의 면역계이상질환의 병인이 점차 밝혀지고 이에 따라 선택적인 치료제의 개발도 많은 연구자들의 연구분야이다. 그러나 이들 면역조절제의 개발에 있어서는 면역기능 평가 시스템이 아직까지는 실험동물 특히 inbred 또는 hybrid mouse 차원에서 이루어지고 있으며 인체 시험계의 응용은 선진국에서도 최근 들어 시도되고 있는 분야라 할 수 있다.

인체 면역세포를 이용한 생체내 시험계를 도출하기 위해서 우선적으로 가장 비중이 큰 것은 면역부전동물이다. 면역부전동물은 초창기 nude mouse (rat) 처럼 thymus 결핍에 의해 xenogeneic graft rejection이 일어나지 않는 동물들이 주로 사용되었으나 최근들어 SCID (Severe Combined Immune Deficient) mouse가 개발됨으로써 인체의 면역세포 및 장기의 이식이 가능하게 되었다. SCID mouse의 개발은 Bosma등이 1983년 inbred strain인 C, B-17 [BALB/c-C57BL/ka-Igh-1⁰/ICR (N17F34)] 으로부터 면역결핍증을 나타내는 4마리의 동물을 발견하여, lymphopoiesis에 심한 손상을 보이

는 mutant계통을 SPF로 확립 보고함으로써 밝혀 지게 되었다. 600마리의 test cross를 통해 single autosomal recessive gene, Immuglobulin heavy chain (Igh) locus 또는 major histocompatibility (h-2) locus와 연관되어 있지 않은 형질을 나타냄을 밝히고, CB-17 scid mouse로 명명하였다. 이 SCID mouse에는 functional B and T cell이 존재하지 않아 면역원성이 없는 Severe Combined Immunodeficiency상태를 나타낸다. 이것은 Ig이나 T cells receptor V region을 coding하는 variable diversity joining (VDJ) recombinase system의 손상에 의한 것으로 밝혀졌다 (Bosma et al., 1983; Custer et al 1985; Fulop & Phillips, 1990). 또한 functional B and T cell은 존재하지 않으나 hematopoietic lineage는 풍부하며 thymic stroma 등의 hematopoietic 환경은 정상적인 성격을 나타내고 있다. 따라서 SCID mouse에 syngeneic bone marrow cell을 이식하면 functional T abd B cell이 재활성화되며, xenogeneic cell을 투여 하여도 거부반응 없이 잘자란다 (McCune et al., 1988; Dick et al., 1991; Segal et al., 1992).

SCID mouse를 이용하여 인체 세포를 주입하거나 기타질환의 *in vivo* 실험계를 만들고자 하는 연구가 진행되고 있다. Human thymus, lymph node spleen등을 SCID에 주입하여 정상적인 기능을 가진 hu-PBL-SCID mouse를 만들었으며, hu-PBL-SCID는 정상기능의 human T cell, B cell, APC를 포함하고 있었다 (Alter et al., 1990). Hu-PBL-SCID를 이용한 시험계로는 1) HIV-1JR-CSF virus의 molecular clone을 집접 hu-PBL-SCID mouse

내에 이식된 human thymic 도는 lymph node에 주입하여 이 virus가 증식하는 것을 확인한 HIV-1 infectively assay system (Namikawa et al., 1990), 2) 초기 hu-PBL-SCID mouse의 확립을 통해 human T cell과 myeloid 분화과정의 보조적인 system을 제공하게된 조혈계 분석 system (Kamel-Reid & Dick, 1988; Lubin et al., 1991), 3) hu-PBL-SCID mouse를 이용해 human T cell의 경우 CD4/CD⁺ 비율은 정상이며 activating antigen, CD25, CD69를 express하지 않아 외견상 GVH 질환이 없는 것으로 보고가 되고 있다. 이외에도 pasteurella pneumotropica, pseudomonas aeruginosa, pneumocystis carinii 등의 병원체를 감염시켜 감염질환 모델동물로서의 SCID mouse의 응용연구가 보고되고 있다.

이와같이 hu-PBL-SCID mouse를 human hamatopoiesis, immune function, autoimmunity와 viral pathogenesis의 연구에 사용하기 위해서는 이식되는 인체의 조직이나 세포가 중요하다. Mosie등은 1988년 최초로 human peripheral blood mononuclear cell (HPBL)을 이식하는데 성공하였으며 같은해에 Kamel-Reid와 Dick은 human adult bone marrow (BM), McCune등은 human immunodeficiency virus (HIV-1)의 연구에 대한 실험적 방법론을 성공적으로 제시하여 주었다. 현재 우리나라에서 인체세포종 용이하게 다량을 얻을 수 있는 것이 HPBL이다. 현재까지 이식 시험계를 약리학적 측면에서 세포기능의 연구에 응용된것은 그다지 많지 않으며 기초면역연구나 항암제의 생체내 시험법에 이용되는 것이 주종을 이루고 있다.

본 연구에서 수행된 HPBL의 SCID mouse 이식 성공여부를 살펴보면 다음과 같은 결론에 도달할 수 있다. HPBL을 이식받은 mouse는 총 17마리 였는데 이중 16마리에서 1000 ug/ml 정도의 human IgG를 검출할수 있었으며, 50-100 ug/ml의 human IgM도 검출할 수 있었다. 이는 외국의 다른 보고자들에 의해 발표된 바와 같은 수준이었다. Human Ig level은 이식후 매주 확인된 바와 같이 서서히 증가하여 3주후 부터 거의 일정 하였다. 6주에 동물을 희생시켜 spleen을 절취한 경우 spleen size가 동물에 따라 다소 차이는 있었으나 크게 비대하여 있었다. 17마리의 동물중 유일하게 1마리는 HPBL의 이식에 거부반응을 나타내었으며 human IgG, M이 모두 탐지되지 않았는데, 이것은 SCID의 고유한 특성인 leaky현상으로 부터 초래되었다고 사료된다. 이상의 결과로 부터 본 연구자들은 SCID mouse 가 성공적으로 hu-PBL-SCID 상태로 만들어진 것을 확인할수 있었으며 동물의 개체에 따라 다소 이식정도의 차이가 있음을 알수 있었다. 이식에 사용된 HPBL의 면역시험 지표를 삼기 위해 면역의 일차 스크리닝 지표인 mitogenicity시험을 시행하여 mitogen에 대해 반응함을 알 수 있었다. 2차년도의 primary antibody response 실험 결과 HPBL을 이용하여 antigen에 대한 antibody response를 결정하기에는 어려움이 있었다. 그래서 human PBL의 적절한 시험지표는 mitogenicity시험으로 결정되었으며, 이 방법은 많은 수의 실험을 동시에 수행할수 있다는 장점을 지니고 있었다.

HPBL의 mitogenicity에 대한 반응성은 다른 연구자들과 마찬가지로

LPS에 대한 반응성이 아주 낮았고, PWM, PHA, 및 ConA에 대한 반응성은 mitogen의 종류에 따라 잘 반응함을 보여주었다. human PBL의 구성세포의 비율을 보면 B cell이 약 10-15 %이고, T cell이 약 70-75 %를 구성하고 있다. 그래서 상대적으로 human PBL의 mitogen에 대한 반응성은 T cell mitogen에 대해 강하게 반응을 한다. Specific antigen을 사용하여 실험을 할 경우 전체 면역세포중 일부만이 반응을 하기 때문에 그 반응성을 관찰하기가 매우 어렵다. 그래서 PWM, PHA, ConA등의 polyclonal activator를 사용한다. 이들 mitogen에 의해 자극을 받은 resting cell은 cell cycle의 G1 stage로 가게되며 곧 lymphoblast를 형성하게 된다. 반면 자극을 받지않은 면역세포는 수일내에 죽게된다. 자극을 받은 세포중에서 helper T cell은 형태적인 면에서 큰차이가 나지 않으나 CTL 이나 B cell은 size가 증가를 한다. 이때 antibody producing B cell은 plasma cell이라 불리는 거대세포로 되며, 이러한 plasma cell은 면역반응이 일어나는 장소 또는 lymphoid organ에 위치하며 일반적으로 blood나 lymph등을 통한 이동은 하지 않는다. Plasma cell은 terminally differentiated cell이며 mitogen에 대해 반응을 하지 않는다. 그러나 기본적인 antibody 생성은 하고 있는 것으로 여겨지고 있다. Human PBL에 존재하는 B cell은 약 0.1 % 정도의 아주 소량의 plasma cell만을 함유하고 있기 때문에 일부의 B cell mitogen에 대해 반응성을 나타낸다.

*In vivo*로 정착이 된 lymphocyte의 기능을 점검하기 위해, serum IgG, M level에서 hu-PBL-SCID임이 입증된 동물에 대하여 Sheep Red

Blood Cell (SRBC)에 대한 T-dependent primary antibody response를 시행한 결과 HPBL로 reconstitute된 hu-PBL-SCID일지라도 primary antibody response는 일어나지 않고 있음이 관찰되었는데 이는 HPBL을 아용한 *in vitro* T-dependent primary antibody response의 경우와 일치되었다. 또한 더욱 특이한 사항은 SCID mouse에 정착된 lymphocyte를 5주일에 분리하여 mitogenic response를 관찰하였는데 PWM, PHA, ConA에 대해 공히 mitogenicity를 나타내지 못하였고, SCID mouse보다도 낮은 반응성이 나타났다. 이는 5주경의 hu-PBL-SCID mouse는 IgG, M을 생성할 수는 있어도 면역반응을 매개할수있는 능력을 상실하고 있다는 것을 암시하고 있다.

T cell mitogen에 대해 반응성이 없는 이유는 SCID mouse에 이식이 된 human PBL중에 CD45RA+ cell은 대부분이 사라지는 데서 기인을 한다고 사료된다. CD45RA+는 40 %의 peripheral T cells, 40 %의 peripheral CD4+ T cells, 50 %의 peripheral CD8+ T cell에서 발견되는 surface marker로 주로 T cell의 지표이다 (Abbas et al., 1991). 즉, SCID mouse에 이식이 된 human PBL중에서 CD45RA 세포가 사라진다는 함은 대부분의 T cell이 없어짐을 의미하고 있다. 그러므로 hu-PBL-SCID mouse의 T cell mitogen에 대한 반응성은 나타나지 않는다. hu-PBL-SCID mouse의 lymphoid organ인 spleen에서 면역세포를 분리하여 B cell mitogen에 대해 실험을 한 결과 반응성이 전혀 나타나지 않았다. 이는 이식이 된 human PBL중 B cell이 SCID mouse의 체내에 들어가 대부분이 plasma cell로 분화되어 mitogen에 대해

반응을 하지 않는데서 기인한다는 것을 나타내고 있다. 그러나 mitogen에 반응을 하지 않는 plasma cell들은 기본적인 IgG, M은 생성하고 있어 serum 내에서 human IgM, G가 검출되는 것으로 사료된다.

잘 알려진 immune suppressant인 cyclophosphamide와 cyclosporin A의 *in vivo* treatment에 의한 반응성도 탐지되지 않았으며 오히려 cyclophosphamide의 처리에 의해서 mitogenicity가 증가하고 있음을 알수 있었다. 그러나 serum내의 IgM 수치는 cyclophosphamide와 cyclosporine A의 처리에 의해 급격히 감소하였으며, IgG level을 변화없이 유지함이 관찰되었다. 이 결과는 cyclophosphamide와 cyclosporine A의 처리에 의한 독성의 유발은 Hematocrit측정에서도 관찰된 바와 같이 잘 측정된 반면 새로운 antigen 또는 mitogen의 반응성은 전혀 일어나고 있지 않음을 보여주고 있다. 5주간 이식후 분리된 lymphocyte를 culture상에서 배양하여 cyclophosphamide와 cyclosporine A를 처리한 결과 mitogenic response에서 약간의 반응성이 관찰된 *in vivo* cyclophosphamide처리군만이 면역억제를 나타내었다. 이상의 결과로 본 연구자는 SCID에 이식된 HPBL은 기본적인 antibody생산 능력은 유지하고 있으며 또한 면역억제제에 대한 반응을 나타내지만 새로운 primary antibody response와 mitogen에 대한 mitogenicity를 나타내지 못하는데 이는 5주이상 장기간 이식시킨 동물에서 확연함을 나타내었다. 따라서, hu-PBL-SCID model은 EBV, HIV-1등의 virology연구에서 virus증식을 위한 lymphocyte 유지능력에서는 우수한 결과가 도출되지만 현

재 면역 약리, 면역 독성등의 screening item인 일차 면역지표에는 반응성이 약함을 나타내었다. 이 결과는 3주이내에서 다른 연구자들에 의해 시행된 Tetanus Toxoid에 대한 secondary antibody response와 DNP-KLH에 대한 아주 약한 primary antibody response의 결과와 비교하였을때 reconstitution후 면역기능 검색까지의 기간이 중요한 반응성 지표가 된다는 것을 시사하고 있다.

결론적으로 본 연구를 통해 virus연구의 귀중한 실험계인 hu-PBL-SCID model을 성공적으로 창출할수 있었으며 면역억제제의 약리반응성 탐지에 이용할 수 있었다. 그러나, 이때 사용하는 면역기능은 serum IgG, M level등의 지표로 탐지할수 있었으며 새로운 antigen이나 mitogen에 대한 반응성보다는 plasma cell과 같이 이미 terminally differentiated function을 약리지표로 삼는 것이 우수하다는 것을 알 수 있다. 본 시험계는 면역, 약리, 신물질 창출을 위한 인체를 대신할수 있는 생체 시험계로 사료되어진다.

References

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pober, J.S. Cells and tissues of the immune system. Cellular and molecular immunology. W.B. saunders company, 13-34, 1991.
- Bosma, G.G., Custer, R., & Bosma, M.J. Nature 301, 527-530, 1983.
- Custer, R.P., Bosma, C.G., & Bosma, M.J. Am. J. Path.120, 464, 1985.
- Dick, J.E., Lapidot, T., & Pflumio, F. Immunol. Rev. 124, 25-43, 1991.
- Duchosal, M.A., Eming, S.A., McConahey, P.J., & Dixon, F.J. Celluar Immunol. 139, 468-477, 1992.
- Segal, R., Globerson, A., Zinger, H., & Moges, E. Clin. Exp. Immunol. 89, 239-243, 1992.
- Kamei-Reid, S., & Dick, J.E. Science. 242, 1706, 1988
- Lubin, I., Faktorowich, Y., Lapidot, T. Gan, Y., Eshhar, Z., Gazit, E., Levite, M., & Reisner, Y. Science, 252, 427, 1991.
- Luster, M.I., Munson, A.E., Thomas, P.T., Holsapple., Fenters, J.D., White, J.K.L., Lauer, L.D., Gerinolec, D.R., Rosenthal, G.J., & Dean, J.H. Fund. Appl. Toxicol. 10, 2-19, 1988.
- McCune, J.M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L.D., Lieberman, M., & Weissman, I.L. Science. 241, 1632-1639, 1988.

- Mishell, R.I., & Dutton, R.W. *J. Exp. Med.* 126, 423-442, 1967.
- Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Baird, S.M., & Wilson, D.B. *Nature.* 335, 256, 1988
- Namikawa, R., Kaneshima, H., Lieberman, M., Weissman, I.L., & McCune, J.M. *Science.* 242,1684-1686, 1988.
- Namikawa, R., Weilbaecher, K.N., Kaneshima, H., Yee, E.J., & McCune, J.M. *J. Exp. Med.* 172, 1055-1063, 1990.
- Phillips, R.A., & Fulop, G.M. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 152, 11, 1989.
- Rittenberg, M.B., & Pratt, K.L. *P.S.E.B.M.* 132, 575-581, 1969.
- Rosengberg, J.F., & Fauci, A.S. *Adv. immunol.* 47, 377, 1989.
- Schnittman, S.m., Lane, H.C., Greenhouse, J., Justement, J.S., Baseler, M., & Fauci, C.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 6058, 1990
- Torbett, B.E., Picchio, G., & Mosier, D.E. *Immunol. Rev.* 124, 139-164, 1991