

^{99m}Tc 표지 항과립구단일클론항체를 이용한 골수신티그라피법의 개발

서울대학교 의과대학 내과학교실

최창운 · 정준기 · 이명철 · 김병국 · 고창순

생화학교실

정 흥 근

서 론

일부 암배아성 항원(carcinoembryonic antigen; CEA)에 대한 단일클론항체가 백혈구에 선택적으로 결합하는 성질이 있음이 알려져 있다. 이러한 성질을 비특이교차 반응(nonspecific cross-reaction) 또는 정상교차반응(normal cross-reaction)이라 하며 이러한 특성을 가진 항원을 비특이교차반응 항원(nonspecific cross-reacting antigen; NCA)이라 한다^{1,2)}.

비특이교차반응항원은 당단백으로 암배아성항원과 구조적으로 유사하며 같은 항원군에 속한다. 비특이교차반응항원은 여러가지 분자량을 가진 항원군으로 이 중 분자량이 95,000인 NCA-95는 사람과립구계 세포에 존재한다^{3,4)}. 체내의 과립구는 정도 말초혈액 보다 골수에 50~100배 많이 존재한다. 따라서 NCA-95와 같은 과립구에 존재하는 항원에 대한 항체에 ^{99m}Tc 를 표지할 수 있다면, 이 항체는 정맥주사후 주로 골수에 분포하며 따라서 골수신티그라피가 가능하며 기존의 콜로이드스캔에 비하여 간, 비장의 섭취가 적고 직접 과립구생성기능의 정도를 측정할 수 있다⁵⁾.

독일의 Reske등⁶⁾은 혈액의 과립구에 반응하는 단일클론항체(항NCA-95항체)를 개발하여 여기에 방사성동위원소를 표지시켜 골수를 영상화하는 골수면역신티그라피(immunoscintigraphy) 방법을 고안하였다. 스페인의 Duncker등⁷⁾은 이 방사성동위원소 표지 항NCA-95항체를 사용한 골수신티그라피를 유방암환자에서 시

행하여 유방암에서 골 전이를 통상의 다른 방법보다 먼저 예민하게 밝혀낼 수 있음을 보고하였다. Berna등⁸⁾은 전립선암 골전이환자의 치료 후 효과판정에 골수신티그라피가 유용함을 보고하였다. 따라서 이 새로운 골수신티그라피는 암의 골 및 골수의 전이를 기존의 영상방법보다 더 예민하게 조기에 영상화 할 수 있으며 치료효과판정에 유용할 것으로 기대되고 있다. 또한 골수신티그라피는 비침습적이며 간단한 방법으로, 전신 골수기능의 평가, 방사선치료나 항암제 치료 후 골수기능 측정, 골수의조혈장기의 검사, 정확한 골수생검위치 결정, 미만성 혈액질환의 진단 및 병기 결정, 골수 및 대퇴골두의 경색 진단 등 다양한 질환에 이용될 수 있다⁹⁾.

우리나라에서도 1988년 서울대학교의과대학 생화학교실에서 이, 정 등⁹⁾이 사람대장암 세포주인 LS174 T에서 암배아성항원을 분리하고 이를 Balb/c 마우스에 감작시켜 항암배아성항원 단일클론 항체들을 생산하는 하이브리도마(hybridoma)를 만드는데 성공하였다. 이 항암배아성항원항체들 중 한 항체인 CEA-79에서 과립구와 특이적으로 반응하는 성질이 있음을 알 수 있었다.

본 연구에서는 국내에서 생산된 CEA-79단일 클론항체의 특성을 규명하고, 이 항체에 ^{99m}Tc 를 표지하여 아직 국내에서 미확립 분야인 골수면역신티그라피법을 개발 하고자 하였다.

대상 및 방법

1. CEA-79단일클론항체의 특성

1) 사람과립구와 CEA-79항체를 이용한 Western Blot

정상인 과립구와 대장암 세포주인 SNU-C4세포의 용

접 수 : 1993년 6월 28일

통 과 : 1993년 8월 13일

*본 연구는 1992년도 서울대학교병원 일반연구비의 지원으로 이루어 졌음.

해추출물을 western blot을 시행하여 추출물이 전이된 nylon membrane을 ^{125}I 을 표지시킨 CEA-79항체 (chloramine-T 법으로 CEA-79 항체 1 mg에 11.1 MBq(300 μCi)의 ^{125}I 를 표지하여 PD-10 column으로 표지항체를 분리하여 사용하였으며 표지효율은 98%이었다)를 넣어 만든 배양용액에 넣어 3시간 동안 실온에서 흔들면서 반응시켰다. Nylon membrane을 건조시킨 후 Beta-Max필름에 자가방사기록법을 시행하였다.

2) 말초혈액과 골수세포의 면역조직화학염색: Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase법

(1) 정상인

6명의 정상인의 말초혈액과 골수를 슬라이드에 도말한 후 실온에서 건조시킨 후 골수표본고정액으로 고정시켰다. 제작된 슬라이드에 CEA-79항체를 첨가하여 2시간 실온에서 배양하였다. PBS로 세척하고 항마우스 가토항체를 첨가하여 30분간 배양하고 PBS로 세척 후 Naphтол AS-MX Phosphate와 Fast red를 첨가한 후 10여분 간 관찰하여 적색의 반응이 보이기 시작하면 곧 증류수로 세척하였다. Mayer's hematoxylin으로 10분간 대조염색을 한 후 흐르는 물로 수세하고 표지슬라이드를 덮어 보존한 후 광학현미경으로 면역조직화학염색 결과를 판정하였다.

(2) 백혈병과 골수침범 종양환자

급성림프구성백혈병(L1 2명, L2 1명), 급성골수성백혈병(M1 2명, M2 2명, M3 1명, M4 1명, M5 1명), 만성골수성백혈병환자(3명)등 백혈병환자 13명과 다발성골수종 환자(1명)의 골수를 채취하여 위와 같은 방법으로 면역조직화학염색을 시행하여 염색결과를 판정하였다.

2. ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 특성

항체의 ^{99m}Tc 표지는 정동¹⁰⁾이 보고한 직접표지방법으로 시행하였다. ^{99m}Tc 표지방법을 요약하여 설명하면 환원제인 β -mercaptoethanol로 항체를 환원시켜 disulfide 결합을 sulfhydryl기로 바꾸고 여기에 ^{99m}Tc 표지 glucarate를 첨가하여 transchelation법으로 표지하였다. 항체 환원 조건은 CEA-79항체 대 β -mercaptoethanol의 물비를 1:3000으로 하여 pH 5, 37°C에서 30분간 반응시켰다. SnCl_2 와 glucarate를 1:1의 물비에서 pH 5, 실온에서 10분간 반응시켜 ^{99m}Tc 표지 glucarate를 제조하였다. 환원된 CEA-79항체와 ^{99m}Tc

표지 glucarate를 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이러한 방법으로 시행한 ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 표지효율은 60~85%이었으며 PD-10 column으로 ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체 본회를 분리하여 다음 실험을 시행하였다.

1) ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 사람과립구와의 면역반응성(Immunoreactivity)측정

사람과립구를 100 μl 의 용적에서 0.25 $\times 10^6$, 0.5 $\times 10^6$, 1 $\times 10^6$, 2 $\times 10^6$, 4 $\times 10^6$, 8 $\times 10^6$ 의 농도로 준비하였다. 각 시험관에 ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체를 5 ng/5 μl 씩 가하여 과립구와의 총결합방사능을 측정하고, ^{99m}Tc 를 표지시키지 않은 비표지 항체를 25 μg /25 μl 가하여 과립구와의 비특이결합을 보았다.

^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 사람과립구에 대한 특이결합(%)은 다음과 같다.

특이결합(%) =

$$\frac{\text{총결합 방사능} - \text{비특이결합 방사능}}{\text{총결합 방사능}} \times 100$$

위의 특이결합 %를 각 시험관의 세포농도에 관하여 plot하고 세포수의 역수에 대한 특이결합 %의 역수율도표에 그리고 회귀직선을 구하여 세포와 결합하는 최대의 특이결합 %, 즉 면역반응성을 산출하였다.

2) ^{131}I 표지항체와의 면역반응성 비교

10~30 mg/dl의 농도로 농축시킨 CEA-79항체를 Greenwood등¹¹⁾의 chloramine-T법으로 ^{131}I 을 표지하여 1)과 같은 방법으로 ^{131}I 표지된 항체의 면역반응성을 측정하여 ^{99m}Tc 표지된 항체의 면역반응성과 비교하였다.

3) ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체와 사람과립구와의 친화상수 측정: Scatchard Analysis

^{99m}Tc 표지 CEA-79항체를 0.25 ng/100 μl 부터 300 ng/100 μl 까지 단계적으로 희석시킨 후 1 $\times 10^6$ 개의 사람과립구와 반응시켜 결합방사능치를 측정하였다. 면역반응성측정과 같은 방법으로 비특이결합을 구하여 표지항체와 과립구 간의 특이결합도를 산출하였다. 세포와 결합한 항체의 농도를 가로축에, 결합항체와 유리항체의 비율 세로 축에 도시하였으며 이 때 X축 절편이 세포막에 결합되는 항체의 농도이고 기울기가 항원/항체 친화상수가 된다.

4) ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 체외 안정성검사(in vitro Stability Test)

^{99m}Tc 표지 CEA-79항체 40 μl 를 960 μl 의 신선한 사

람의 혈청에 첨가하여 37°C에서 반응시키면서 1시간, 2시간, 6시간, 10시간, 24시간 까지 각각 배양시켰다.

위의 각 시간에서의 30 μ l의 혈청에 2070 μ l의 생리식염수와 함께 centricon 30에 넣어 섞은 후 800 g에서 원심분리하여 상층액과 침전물에서의 방사능 계수를 측정하여 상층부(결합방사능)와 하층부(분리방사능)의 방사능치를 구하였다.

체의안정성은 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

$$\text{체의안정성(\%)} = \frac{\text{결합방사능}}{\text{결합방사능} + \text{분리방사능}} \times 100$$

또한 각 시간에서의 혈청으로 종이크로마토그래피(Whatmann, 3 MM), 즉석박층크로마토 그래피(instant thin layer chromatography; ITLC)를 시행하여 ^{99m}Tc 표지항체, 유리 과산화테크네슘, ^{99m}Tc 교질의 비를 측정하였다. 즉 생리식염수(종이)와 아세톤(즉석박층)에 전개시켜 종이크로마토그래피로는 ^{99m}Tc 표지 항체의 양을 즉석박층크로마토그래피로는 유리과산화테크네슘과 ^{99m}Tc 교질의 상대적 양을 각각 구하였다.

5) Formazan Test(Activated Nitroblue Tetrazolium: NBT Test)

정상인의 혈액을 채혈하여 0.5 ml씩 7개의 시험관에 넣고 0번 시험관은 대조시험관으로 하였고 1~3번 시험관에는 0.02 $\mu\text{g/ml}$, 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 CEA-79항체를 15 μ l씩 넣고, 4~6번 시험관에는 0.02 $\mu\text{g/ml}$, 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체를 15 μ l씩 넣고 잘 섞은 다음 7장의 슬라이드에 각각의 시험관에서 혈액 1방울을 떨어뜨렸다. 흡습기에 넣은 후 37°C에서 20분 간 배양하였다. 생리식염수로 응고된 혈액을 조심해서 씻고 0.5 ml의 AB혈액형의 혈청과 0.3 ml의 생리식염수와 0.6 ml의 nitroblue tetrazolium 염색액(Sigma)을 혼합한 용액 1방울을 넣고 덮개 유리를 덮은 다음 37°C에서 30분간 배양한 후 덮개유리를 제거한 후에 공기중에서 건조시켰다. 무수메탄올에 60초 간 고정 후 증류수로 세척하였다. 0.77% Safranin O에 10분 간 염색한 후 물로 세척하고 건조 후 판독하였다.

결 과

1. CEA-79단일클론항체의 특성

1) 사람과립구와 CEA-79단일클론 항체를 이용한 Western Blot

사람과립구의 추출물과 CEA-79항체와 western blot을 시행하여 분자량 95,000 dalton에서 단일 band를 관찰하였으며, 대장암 세포주인 SNU-C4와의 western

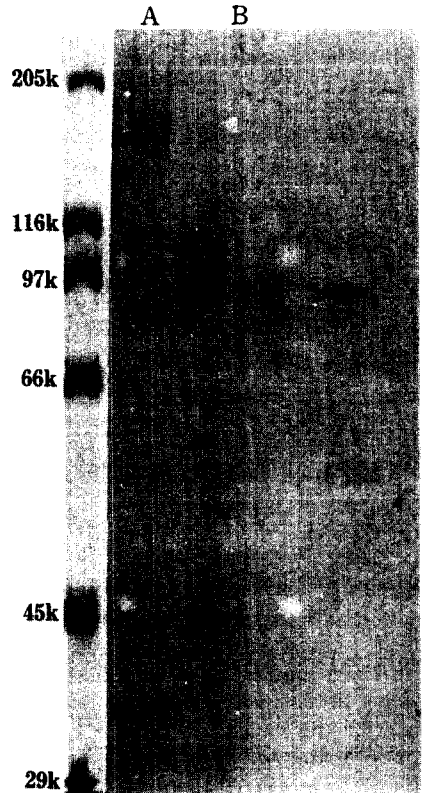


Fig. 1. Western blot of extracts of SNU-C4 human colon cancer cells (A), and human granulocytes (B) with CEA-79 antibody:

A single band was observed at a site equivalent to the molecular weight of 95,000 daltons in extract of SNU-C4 human colon cancer cells, and human granulocytes and another band was observed at a site of the molecular weight of 180,000 daltons in SNU-C4 extract. Molecular weight standard: 45kD-ovalbumin, 66kD-bovine serum albumin, 97,4kD-phosphorylase, 116kD- β -galactosidase, 205kD-myosin

blot에서 분자량 95,000과 분자량 180,000에서 band가 관찰되어 CEA-79항체가 NCA-95에 대한 항체와 암배아성항원공동항원에 대한 공통항원결정소를 가진 단일클론항체임을 확인하였다(Fig. 1).

2) 혈구와 골수세포의 면역조직화학염색법

말초 및 골수세포를 alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase (APAAP)법을 이용한 면역조직화학염색검사에서 CEA-79항체를 이용하여 과립구의 세포표면과 세포질 안에 적갈색으로 염색되어 양성반응이 확인되었다. 정상인 골수세포에서 골수계세포 중 골수모구를 제외한 전골수구, 골수구, 후골수구, band form과 림구, segment form과 림구에 염색되었으나 적혈구계세포, 혈소판계세포, 림프구와 단핵구에는 염색되지 않았다. 특히 골수모구를 제외한 전골수구 이하 세포에 양성염색되는 경향은 만성골수성백혈병 환자에서 분명히 관찰할 수 있었다(Fig. 2, 3, 4). 급성림프구성백혈병 환자의 말초혈액과 골수 세포 중에서 림프구성 백혈병세포에 염색되지 않았다. 급성골수성백혈병 환자의 M1, M2와 같은 미분화 골수모구에 염색되지 않았으나 M3에서 전골수구에는 양성으로 염색되었다. 또한 M5형에서 단핵구에는 염색되지 않았다. 또한 다발성 골수종 세포에는 염색되지 않았다(Table 1).

정상인 말초혈액에서 측정된 과립구와의 반응은 $93 \pm$

3% (n=6)에서 양성염색되었다.

2. ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 특성

1) ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 사람과립구에 대한 면역반응성과 ^{131}I 표지법과의 비교

Double inverse plot으로 측정된 과립구에 대한 ^{99m}Tc 표지 항체의 면역반응성은 60~67%이었으며 이 값은 chloramine-T법으로 표지한 ^{131}I 표지 항체의 60%와 비슷하였다(Fig. 5).

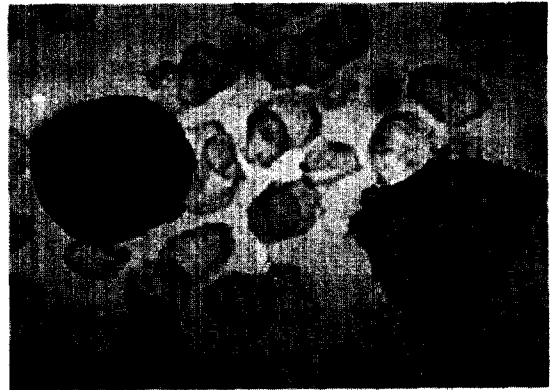


Fig. 3. Immunohistochemical staining of promyelocyte and myelocyte from the patient with chronic myelogenous leukemia by APAAP method (bone marrow aspirate, $\times 1,000$), P: promyelocyte, M: myelocyte

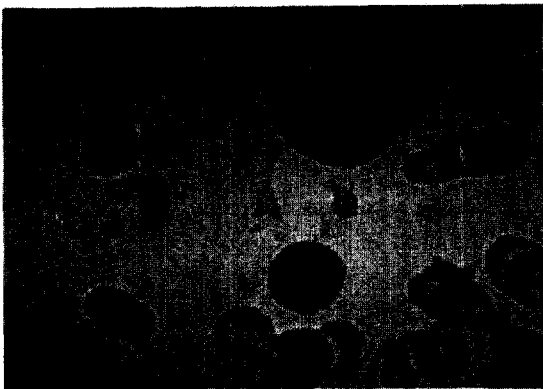


Fig. 2. Immunohistochemical staining of granulocyte from normal person by APAAP method (bone marrow aspirate, $\times 1,000$): Granulocyte was stained in reddish brown color in cytoplasm and cell membrane, but lymphocyte was not stained. G: granulocyte, L: lymphocyte



Fig. 4. Immunohistochemical staining of myeloblasts from the patient with chronic myelogenous leukemia by APAAP method. Myeloblasts were not stained with anti-NCA-95 antibody.

Table 1. Immunocytochemical Staining of Bone Marrow Aspirates in Patients with Leukemia or Multiple Myeloma

Diagnosis		No. of Patients	Results
ALL	L1	2	- : lymphoblast
	L2	1	- : lymphoblast
AML	M1	2	- : immature myeloblast
	M2	2	- : myeloblast
	M3	1	+ : promyelocyte
	M4	1	+ : myelocyte, - : monocyte
	M5	1	- : monocyte
CML		3	+ : promyelocyte~ segmented neutrophil
MM		1	- : plasma cell

ALL: acute lymphocytic leukemia AML: acute myelogenous leukemia

CML: chronic myelogenous leukemia MM: multiple myeloma

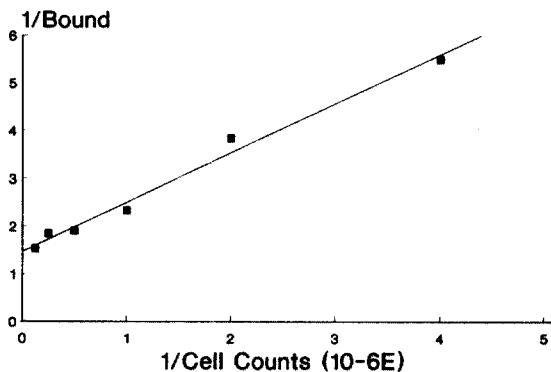


Fig. 5. Cell binding assay which measured the immunoreactivity of the ^{99m}Tc -CEA-79 antibody to granulocytes. The value of Y-intercept is the inverse value of the immunoreactivity.

2) ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체와 사람과립구와의 친화 상수 측정

Scatchard plot에서 구한 ^{99m}Tc 표지항체의 과립구에 대한 친화상수는 $K_a=1.10\sim4.75\times10^{10}$ l/mol이었다(Fig. 6).

3) ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 체외 안정성검사

신선한 사람 혈청과 ^{99m}Tc 표지항체를 37°C 에서 24시간 동안 체외배양하여 측정한 ^{99m}Tc 표지항체의 시간 경과에 대한 항체결합방사능은 0시간 98.4%, 1시간 96.7%, 2시간 95.3%, 6시간 93.3%, 10시간 92.6%, 24시간 90.3%으로 24시간 까지 안정하였다(Fig. 7).

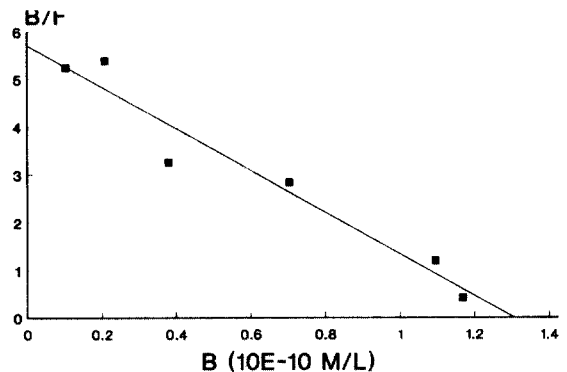


Fig. 6. Scatchard plot of *in vitro* binding of ^{125}I -labeled CEA-79 antibody to human granulocytes. The proportion of antibody specifically bound to granulocytes is plotted against the molar concentration of bound antigen. The affinity constant, K_a ($K_a=4.75\times10^{10}$ l/mol) is the slope of straight line obtained by regression analysis of the plot.

B: bound form, F: free form

또한 체외안정성과 동시에 종이크로마토그래피와 즉석 박층크로마토 그래피를 시행하여 측정한 항체결합방사능, ^{99m}Tc 과산화테크네튬, ^{99m}Tc 교질의 양은 각각 1시간에 96.7%, 0.9%, 2.6%, 2시간에 96.5%, 0.5%, 4.2%, 6시간에 95.4%, 0.7%, 3.7%, 19시간에 94.2%, 1.7%, 4.1%, 24시간에 93.5%, 0.6%, 4.3%이었다(Table 2).

Table 2. Radiochemical Purity of ^{99m}Tc -Labeled CEA-79 Antibody During in Vitro Stability Test

Incubation Time (hour)	$^{99m}\text{TcO}_4^{-1)}$	^{99m}Tc -colloid ²⁾
0	0.3	3.0
1	0.9	2.6
2	0.5	4.2
6	0.7	3.7
19	1.7	4.1
24	0.6	4.3

1):ITLC-SG, eluted with acetone

2):paper chromatography, eluted with normal saline

unit:%

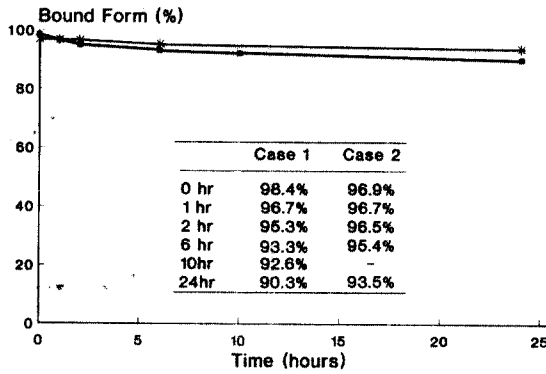


Fig. 7. In vitro stability of ^{99m}Tc -labeled CEA-79 antibody. The radioactivity of the antibody labeled with ^{99m}Tc in fresh human plasma at 37°C was measured at various intervals during a 24 hour period.

4) Formazan Test (Activated Nitroblue

Tetrazolium: NBT Test)

두 명의 정상인을 대상으로 검사를 시행하여 모두 30% 이상의 정상반응을 보인 결과를 얻었으며 CEA-79 단세포균 항체와 ^{99m}Tc 표지 CEA-79 단세포균항체에 의하여 과립구의 기능에 변화가 없었다.

고 찰

본 연구에 사용된 CEA-79항체는 Lee등⁹⁾이 생산한 항 암배아성항원 단일클론항체의 한 가지로 대장암세포주인 LS174T에서 암배아성항원을 분리하고 이를 Balb/c 마우스에 감작시킨 비장세포와 생쥐골수종세포인 Sp2와 세포융합시켜 만든 하이브리도마를 Balb/c 마우스 복강내 주사하여 복수를 얻어 protein-A column으로 정제하여 이용하였다.

1970년대 초에 Burtin등²⁾은 비특이교차반응항원이 사람혈구세포에 반응하여 표지자로 이용될 수 있음을 보고하였다. Wahren등¹²⁾은 토끼 항비특이교차반응항원 항체로 면역형광검사(immunofluorescence test)를 시행하여 비특이교차반응항원이 중성과립구에 특이적으로 반응하며 단핵구에 반응하지 않고, 특히 골수모구와 적모구에는 비특이교차반응항원이 없음을 보고하였다. Noworolska등^{13,14)}은 백혈병환자에서 급성골수성백혈병의 미분화 골수모구와 단핵구모세포, 급성림프구성백혈병의 림프모구는 비특이교차반응항원을 함유하고 있지 않음을 보고하였다.

CEA-79항체는 사람과립구와 CEA-79항체를 이용한 western blot으로 분자량 95,000 dalton인 NCA-95항원의 epitope에 대한 반응성을 가진 항체임을 확인하였다. NCA-95는 사람과립구 계통의 백혈구 세포막과 세포질에서 발견되었다. NCA-95는 혈액의 과립구 뿐 아니라 골수의 성숙과립구생성세포의 세포막과 세포질(cytoplasm)에 표현되며 정상골수에서는 골수구(myelocyte)와 후골수구(metamyelocyte)에 과립구 보다 더 강하게 염색된다. 그러나 적혈구계 세포, 혈소판계세포 및 림프구세포에는 NCA-95가 표현되지 않았다. 본 연구에서 정상인의 골수모구 뿐 아니라 급성백혈병 중에서 M1과 M2의 모세포에도 NCA-95가 발현되지 않았고 반면에 전골수구 이하의 골수성세포에서 NCA-95가 발현됨을 확인하였다. 따라서 NCA-95는 골수계세포가 모세포에서 분화되면서 전골수구 이후에 발현됨을 추정할 수 있다. 비특이교차반응항원의 작용은 아직까지 불분명하나 세포의 표면에 발현되어 세포간 접합물질로 역할을 한다고 보고되었다^{15,16)}.

정상인의 말초혈액에서 측정된 과립구와의 반응은 과립구중 93%에서 양성으로 염색되었다. 이는 Bosslet

등¹⁷⁾이 보고한 BW250/183 항NCA-95항체의 과립구에 대한 반응 정도와 유사한 결과이며 항체에 따라 다르나 대개 90% 이상이 과립구와 반응한다고 보고되었다¹²⁾. 또한 본 연구에서 미분화된 골수모구는 CEA-79항체와 반응하지 않았으며 이러한 특성은 초기 과립구형성세포에 불필요한 방사능 노출을 피할 수 있어 방사성동위원소 표지 CEA-79항체를 체내 투여할 때에 안정성을 높일 수 있다.

항체에 ^{99m}Tc를 표지하는 방법은 1980년 초부터 연구되었으나 ^{99m}Tc이 항체에 약하게 직접 결합하는 점과 환원된 ^{99m}Tc가 교질을 형성하며¹⁸⁾ 또한 항체마다 특성이 달라 한 항체에 적절한 표지 방법이 성공되더라도 다른 항체에 적용하기 어려워 각각의 항체에 대해 표지법이 연구되고 있다. 본 연구에서는 항체를 β -mercaptoethanol과 작용시켜 disulfide결합을 환원시켜 sulphydryl기로 바꾼다음 여기에 ^{99m}Tc으로 표지된 glucarate를 가하면 glucarate라는 약한 chelator에 결합되어 있던 ^{99m}Tc이 강한 chelator를 형성할 수 있는 항체의 thiol기와 결합되는 동위원소교환(isotope exchange)이 일어나서, ^{99m}Tc이 항체의 sulfhydryl기와 그 주변의 amine기에 결합하게 되는 transchelation법을 이용하였다¹⁹⁾. 그러나 표지율이 60~85%이었으며 따라서 PD-10 column으로 용출하여 표지분획을 분리하는 과정이 필요하였다.

Steinstrasser 등²⁰⁾은 NCA-95에 대한 항체인 BW250/183항체에서 친화상수가 과립구에 대하여 약 2×10^9 l/mol로 보고하였다. 본 항체의 ^{99m}Tc표지 후의 친화상수는 $1.10 \sim 4.75 \times 10^{10}$ l/mol로 더 친화성이 높았으며 임상적으로 유용한 항체로 생각된다.

^{99m}Tc 표지 단일클론 항체가 실제 표적 항원과 결합할 수 있는 능력을 면역반응성(immunoreactivity)이라고 한다. 면역반응성은 Arano 등²¹⁾과 Fawwaz 등²²⁾이 제시한 항원 발현 세포 즉 과립구와 동위원소 표지항체의 결합 정도로 측정하는 방법을 선택하였다. 이 방법으로 Lindmo 등²³⁾이 제시한 세포수와 결합항체의 이중 역 제도법(double inverse plot)을 사용하면 거의 이론치에 접근하는 수치를 얻을 수가 있다. 보통 동물실험이나 임상에 사용할 수 있는 항체는 면역반응성이 60% 이상이어야 한다. 본 실험조건에서 표지한 ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 과립구에 대한 면역반응성은 60~67%이었으며 chloramine-T법으로 표지한 ¹³¹I 표지 CEA-79항체

의 면역반응성과 차이가 없었다. 면역반응성이 100%가 안되고 감소되는 이유로는 우선 마우스의 복수에서 얻은 단일클론 항체를 순수분리한다는 것이 어렵고, 또한 이 항체에 ^{99m}Tc를 표지시 항체에 구조적인 변화가 일어나 항원과 결합할 수 있는 능력이 감소하게 되기 때문이다²⁴⁾. 면역반응성이 감소된 동위원소 표지 항체를 사용하면 표적세포에 결합되는 항체의 양이 감소됨은 물론 표적세포에 결합되지 않은 동위원소가 혈액내에 남게 되고 다른 조직에 비특이적(예를 들면, Fc 수용체 등)으로 결합되어 표적 대 정상조직의 항체 집적비(target-nontarget uptake ratio)가 감소되어 영상진단의 효과를 떨어뜨리게 된다^{21,22)}. 따라서 면역반응성이 가능한 높게 유지되도록 항체를 표지하여야 한다.

표지된 항체가 체외(in vitro)에서 안정성을 유지하는지의 측정은 필수적이다. 체내에 주입한 ^{99m}Tc 표지 단일클론 항체는 혈액내에서 순환되면서 표적 조직에 소량씩 축적되기 때문에 24시간 이상 혈액내에서 안정성을 유지하여야 하나 골수신티그라피는 대개의 경우 6시간 이내에 시행되므로 최소한 6시간 이상 안정성이 증명되어야 한다. 불완전하게 표지된 ^{99m}Tc는 혈액내에서 유리되어 갑상선, 위점막 등으로 분비되고, 항체의 일부와 함께 떨어져 나간 ^{99m}Tc 복합체는 담즙, 소장 등으로 빠져나와 위양성(false positive) 영상을 나타내기도 하여 여러 문제점을 야기시킬 수 있다. 또한 ^{99m}Tc 표지 항체끼리 결합되어 중합체화(polymerization)되면 체내 세망내피계 세포에 탐식(phagocytosis)되기도 한다²⁵⁾. 이러한 안정성의 측정을 위해서 ^{99m}Tc 표지 항체를 사람의 혈청과 37°C에서 24시간 까지 90% 이상이 체외에서 안정하였으며 이러한 결과는 본 항체를 이용하여 항체주사 후 6시간 이내에 시행하는 골수신티그라피를 할 수 있는 외에도 염증 병소를 진단하게 위하여 24시간 이상까지 지연영상을 촬영할 수 있을 것으로 생각된다²⁶⁾.

중성과립구의 기능을 완전히 평가하기 위하여 운동성, 과립의 내용물과 기능, respiratory burst activity, 살균기능 등 특수한 검사시설 및 방법이 필요하다. 과립구의 기능적 이상을 평가하는 선별검사(screening test)로 NBT 검사가 이용되고 있으며 NBT검사는 유리슬라이드에 부착된 과립구가 NBT에 의하여 활성화되어 superoxide가 생성되면 짙은 청색의 formazan과립을 침전시키게 된다. 본 연구에서 NBT검사의 판정은 formazan과립을 함유한 과립구가 30% 이상이면 정상

반응으로 판정하였다²⁷⁾.

본 연구에서 항체를 첨가하지 않은 대조군과 CEA-79 항체를 첨가한 군, ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체를 첨가한 군 모두 30% 이상의 NBT검사 양성세포가 관찰되었으며 CEA-79항체와 ^{99m}Tc 표지 항체를 첨가한 농도에 따라 차이가 관찰되지 않아 본 실험에 사용된 CEA-79항체가 superoxide 생성에 영향을 주지 않았다.

본 연구에서는 CEA-79항체의 사람과립구계세포와의 반응 특성과 ^{99m}Tc 표지 CEA-79 항체의 특성을 분석하여 ^{99m}Tc 표지 CEA-79 항체가 골수면역신티그라피(bone marrow immunoscintigraphy)에 적합함을 확인하였다. 이러한 ^{99m}Tc 표지 항체를 이용한 골수면역신티그라피는 6시간 내에 영상을 만들 수 있으면서 해상력이 좋은 선명한 영상을 만들 수 있어 그 유용성이 인정되고 있다. 즉 ^{99m}Tc 표지 '항과립구단일클론항체'를 이용한 골수신티그라피법의 개발은 값싸면서 쉽게 구할 수 있는 ^{99m}Tc 를 표지시키고 짧은 기간내에 영상을 얻을 수 있는 장점이 있고, 또한 골수면역신티그라피는 기존의 다른 골수신티그라피 보다 골수병변 진단율을 높일 수 있는 장점을 가지고 있다.

요 약

연구목적 : 일부 항암배아성항원항체는 과립구계 세포에 존재하는 비특이 교차반응 항원과도 반응한다. 과립구계 세포는 말초혈액에 비하여 50~100배 정도 골수에 많이 분포하므로 이 항체에 적격할 방사성동위원소를 표지하면 골수면역신티그라피를 시행할 수 있다. 이에 국내에서 개발한 항암배아성항원 단일클론항체(CEA-79)를 이용하여 과립구에 대한 면역학적 결합반응특성을 규명하고, ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 특성을 연구하였다.

방법 : CEA-79항체의 특성을 규명하기 위하여 사람과립구의 추출물과 CEA-79항체와 western blot을 시행하였고, 정상인과 백혈병환자의 말초혈액과 골수세포를 면역조직 화학염색을 하여 각 혈액세포와의 면역학적 반응성을 연구하였다. 또한 CEA-79항체의 ^{99m}Tc 표지는 β -mercaptoethanol을 항체환원제로, glucarate를 착화제로 사용하여 직접표지법으로 시행하고, 이 ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 기능을 평가하기 위하여 사람과립구와 면역반응성, 친화상수를 측정하고 체외안정성검사를 시행하였다. 또한 CEA-79항체의 과립구기능 변화에

미치는 영향을 평가하기 위하여 formazan test를 시행하였다.

결과 :

1) CEA-79항체는 사람과립구의 추출물과의 western blot에 분자량 95,000 dalton인 NCA-95와 반응하였다.

2) 면역조직화학염색에서 말초혈액 과립구의 93%가 과립구 세포막과 세포질에 적갈색으로 양성염색되었다. 골수세포 중에서 전골수구 이하의 분화된 과립구계 세포에 양성으로 염색되었으나 기타 정상혈액세포와 급성림프구성백혈병 환자의 림프구성 백혈병세포와 급성골수성백혈병 환자의 미분화 골수모구에 염색되지 않았다.

3) β -mercaptoethanol을 항체 환원제로, ^{99m}Tc -glucarate를 ^{99m}Tc 운반체로 이용하여 직접표지법에 의한 ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 표지효율은 60~83%이었다. ^{99m}Tc 표지 항체의 사람과립구에 대한 친화상수는 $1.10 \sim 4.75 \times 10^{10}$ l/mol 이었고, 면역반응성은 60~67%이었으며 기존의 확립된 방법인 chloramine-T 법으로 ^{131}I 을 표지한 경우의 면역반응성(60%)과 비슷하였다. 또한 ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체는 체외안정성 검사에서 24시간 까지 90% 이상 안정하였으며 과립구의 superoxide 생성능에 영향을 주지 않았다.

결론 : 항암배아성항원 단일클론항체인 CEA-79항체의 면역학적 특성을 규명하고 이 항체를 이용하여 방사성동위원소 ^{99m}Tc 를 표지하여 면역골수신티그라피에 적합함을 확인하였다. 새로이 개발된 ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체는 과립구에 특이적으로 반응하므로 골수스캔에 이용되는 외에도 다양한 염증병소의 진단에 유용할 것으로 생각된다.

= Abstract =

Development of Bone Marrow Scintigraphy using ^{99m}Tc -Labeled Antigranulocyte Monoclonal Antibody

Chang Woon Choi, M.D., June-Key Chung, M.D.
Myung Chul Lee, M.D., Byung Kook Kim, M.D.
and Chang-Soon Koh, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Hong Keun Chung, Ph.D.

Department of Biochemistry

Objectives: The purpose of the present study was to

determine the immunologic characteristics of a home made anti-CEA monoclonal antibody (MAB) called CEA-79 which was considered to bind with the epitope of nonspecific cross-reacting antigen (NCA) in human granulocytes, and to evaluate the potential of ^{99m}Tc -labeled CEA-79 as an immunoscintigraphic agent for bone marrow imaging.

Methods: In order to evaluate the immunologic characteristics of this MAb, western blotting and immunohistochemical staining were performed. Peripheral blood smears of 6 normals and bone marrow aspirates of 3 normals, 12 leukemic patients, and 1 multiple myeloma patient were immunohistochemically stained by the alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase method. CEA-79 MABs were labeled with ^{99m}Tc by a transchelation method using β -mercaptoethanol as a reducing agent and glucarate as a chelator. With this ^{99m}Tc -labeled CEA-79, scatchard analysis for affinity constant, immunoreactivity test and in vitro stability studies were performed. Formazan test was done for the evaluation of effect of CEA-79 to superoxide formation of granulocytes.

Results: Western blotting of human granulocyte extracts with the MAB showed a single band at a site equivalent to a molecular weight of 95,000 daltons, suggesting that the binding was with an epitope of the NCA-95.

Positive staining with CEA-79 antibody was shown in 93% of the peripheral granulocytes. Positively stained cells were derived from promyelocytes, myelocytes, metamyelocytes, band forms and segment forms. Erythroblasts of all maturation stages and normal lymphocytes were not stained. Leukemic blasts from patients with ALL, and M1, M2, M5 subtypes of AML were also not stained.

With a direct labeling method by transchelation of ^{99m}Tc , the labeling efficiency of CEA-79 MAB with ^{99m}Tc was 60 to 85%.

Scatchard analysis of the MAB with granulocytes yielded an affinity constant of 1.10 to 4.75×10^{10} l/mol. Immunoreactivity was 60~65% which was similar to that of ^{131}I -labeled monoclonal antibodies prepared by the chloramine-T method(60%). The antibody was stable for 24 hours, with over 90% of the MAB remaining labeled at 24 hours. And CEA-79 antibody did not change the granulocyte function of superoxide formation.

Conclusion: It can be concluded that CEA-79 reacts

specifically with an epitope of NCA-95 on human granulocytes and can be successfully labeled with ^{99m}Tc by a direct labeling method. This indicates that ^{99m}Tc -labeled CEA-79 MAB may be useful as an immunoscintigraphic agent for bone marrow imaging.

Key Words: Immunoscintigraphy of bone marrow, ^{99m}Tc -labeled monoclonal anti-CEA antibody, NCA-95, CEA-79

REFERENCES

- 1) Burtin P, von Kleist S, Sabine MC, King M: *Immunohistological localization of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting antigen in gastrointestinal normal and tumoral tissues*. *Cancer Res* 33:3299, 1973
- 2) Burtin P, Quan PC, Sabine MC: *Nonspecific cross reacting antigen as a marker for human polymorphs, macrophages and monocytes*. *Nature* 255:714, 1975
- 3) Audette M, Buchegger F, Schreyer M, Mach J-P: *Monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen (CEA) identifies two new forms of cross-reacting antigens of molecular weight 90,000 and 16,000 in normal granulocytes*. *Molecular Immunol* 24:1177, 1987
- 4) Buchegger F, Schreyer M, Carrel S, Mach JP: *Monoclonal antibodies identify a CEA cross-reacting antigen of 95 kD (NCA-95) distinct in antigenicity and tissue distribution from the previously described NCA of 55 kD*. *Int J Cancer* 33:839, 1984
- 5) Reske SN, Karstens JH, Gloeckner W, Steinstras-ser A, Schwarz A, Ammon J: *Radioimmunoimaging for diagnosis of bone marrow involvement in breast cancer and malignant lymphoma*. *Lancet* 299, 1989
- 6) Dunker CM, Carrio I, Berna L, Estorch M, Alonso C, Ojeda B, Blanco R, Germa JR, Oriega V: *Radioimmue imaging of bone marrow in patients with suspected bone metastases from primary breast cancer*. *J Nucl Med* 31:1450, 1990
- 7) Berna L, Germa JR, Estorch M, Torres G, Blanco R, Carrio I: *Bone marrow regeneration after hormonal therapy in patients with bone metastases from prostate carcinoma*. *J Nucl Med* 32:2295, 1991
- 8) Reske SN: *Recent advances in bone marrow scanning*. *Eur J Nucl Med* 18:203, 1991
- 9) Lee J-M, Chung H-K, Kimm S-W: *Purification of*

- carcinoembryonic antigen from culture supernatant of human colon cancer cell line, LS 174 T using monoclonal immunoaffinity chromatography. *Korean J Biochem* 20:23, 1988
- 10) 정준기, 이동수, 이명철, 정홍근, 고창순, 홍미경, 최석례, 서일택, 정준호: 국산 항 CEA항체의 I-131, Tc-99m 표지법 확립 및 면역학적 특성 분석. 대한핵의학회지 26:346, 1992
 - 11) Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89:114, 1963
 - 12) Wahre B, Gahrton G, Hammarstrom S: Nonspecific cross-reacting antigen in normal and leukemic myeloid cells and serum of leukemic patients. *Cancer Research* 40:2039, 1980
 - 13) Noworolska A, Harlozinska A, Richter R, Brodzka W: Non-specific cross-reacting antigen (NCA) in individual maturation stages of myelocytic cell series. *Br J Cancer* 51:371, 1985
 - 14) Noworolska A, Harlozinska A, Buchegger F, Lawinska B, Richter R: Expression of nonspecific cross-reacting antigen species in myeloid leukemic patients and healthy subjects. *Blut* 58:69, 1989
 - 15) Zhou H, Fuks A, Stanners CP: Specificity of intercellular adhesion mediated by various members of the immunoglobulin supergene family. *Cell Growth Differ* 1:209, 1990
 - 16) Oikawa S, Inuzuka C, Kuroki M, et al: A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family, W272, and NCA, is mediated by N-domains. *J Biol Chem* 266:7995, 1991
 - 17) Bosslet K, Steinstrasser A, Schwarz A, Harthus HP, Luben G, Kuhlmann L, Sedlacek HH: Quantitative considerations supporting the irrelevance of circulating serum CEA for immunoscintigraphic visualization of CEA expressing carcinomas. *Eur J Nucl Med* 14:523, 1988
 - 18) Srivastava SC, Meinken G, Smith TD, Richards P: Problems associated with stannous ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Intern J Appl Rad Isotopes* 28:83, 1977
 - 19) Mather SJ, Ellison D: Reduction-mediated ^{99m}Tc labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 31: 692, 1990
 - 20) Steinstrasser A, Schorlemmer HU, Schwarz A, Kuhlmann L, Bosslet K: A novel ^{99m}Tc labelled antibody for in vivo targeting of granulocytes (abstract). *J Nucl Med* 29:925, 1988
 - 21) Arano Y, Yokoyama A, Fukukawa T, Horiuchi K, Yahata T, Saji H, Sakahara H, Nakashima T, Koizumi M, Endo K, Torizuka K: ^{99m}Tc-labeled monoclonal antibody with preserved immunoreactivity and high in vivo stability. *J Nucl Med* 28: 1027, 1981
 - 22) Fawwaz RA, Wang TST, Estabrook A, Rosen JM, Hardy MA, Alderson PO, Srivastava SC, Richards P, Ferrone S: Immunoreactivity and biodistribution of Indium-111-labeled monoclonal antibody to a human high molecular weight melanoma associated antigen. *J Nucl Med* 26:488, 1985
 - 23) Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J, Bunn PA Jr: Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Method* 72:77, 1984
 - 24) Matzku S, Kirchgessner M, Dippold WG, Bruggen J: Immunoreactivity of monoclonal anti-melanoma antibodies in relation to the amount of radioactive iodine substituted to the antibody molecule. *Eur J Nucl Med* 11:260, 1985
 - 25) Perkins AC, Pimm MV: *Immunoscintigraphy, practical aspects and clinical applications*, pp 17-38, Wiley-Liss, New York, 1991
 - 26) Andres RY, Schubiger PA, Tiefenauer L, Seybold K, Locher JT, Mach JP, Buchegger F: Immunoscintigraphic localization of inflammatory lesions: concept, radiolabelling and in vitro testing of a granulocyte specific antibody. *Eur J Nucl Med* 13: 582, 1987
 - 27) Rose NR, Friedman H, Fahey JL: *Manual of clinical laboratory immunology*. 3rd ed, p715, American Society for Microbiology, Washington, 1986