

자가면역성 감각신경성 난청 환자에서 냉동보관법을 이용한 내이 조직 항원에 대한 T세포 반응성 검사의 유용성

인제대학교 의과대학 부산백병원 이비인후과학교실

백 무 진

Efficacy of Enzyme Linked Immunospot Assay Using Cryopreserved Cell in Detection of Inner Ear Antigen Specific T Cells in Patients with Autoimmune Sensorineural Hearing Loss

Moo Jin Baek, MD, PhD

Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, College of Medicine, Inje University, Busan Paik Hospital, Busan, Korea

— ABSTRACT —

Objective : Cryopreservation is very useful method for long term storage of various samples. Author tried to use the cryopreservation technique with ELISPOT assay to exam the T cell responsiveness to inner ear specific antigen (Cochlin) and evaluate its efficacy. **Methods** : Isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were suspended with freezing medias (A & B) in cryotube. After pre-chilling for 24 hours, transferred to liquid nitrogen tank. Cell viability and functionality were evaluated by viable cell count with trypan blue stain, proliferation assay with methyl-³H thymidine and the frequencies of IFN- γ and IL-5 producing T cells using ELISPOT assay with anti CD3 antibody before and after freezing. And also compared the frequencies of cytokine producing T cells in response to human Cochlin using ELISPOT assay with frozen cells between patient and control subjects. **Results** : The rate of viable cell count and stimulation index of frozen cells showed about 75%, 70% respectively when compared with before freezing cells. The frequencies of IFN- γ and IL-5 producing T cells in response to anti CD3 were 68% and 71% of before freezing condition. And the frequencies of IFN- γ and IL-5 producing T cells response to human recombinant cochlin were significantly higher in patients than control subjects using cryopreserved cell. **Conclusion** : The functional responsiveness and cell number of cryopreserved cells were restored nearly before freezing level. So the cryopreservation technique could be very useful tool in ELISPOT assay for determination of the frequencies of cytokines. (J Clinical Otolaryngol 2007;18:170-177)

KEY WORDS : Cryopreservation · Autoimmune sensorineural hearing loss · ELISPOT assay.

서 론

리하는 것이 가장 효과적인 방법이겠지만 시약 준비, 검사물의 수량, 검사 인력의 효율적인 사용 등 여러 가지

임상에서 검사를 위해 채취한 시료는 가능한 빨리 처 문제로 응급 상황이 아니면 대부분 보관하였다가 검사

논문접수일 : 2007년 8월 18일

심사완료일 : 2007년 10월 19일

교신저자 : 백무진, 614-735 부산광역시 부산진구 개금동 633-165 인제대학교 의과대학 부산백병원 이비인후과학교실

전화 : (051) 890-6311 · 전송 : (051) 892-3831 E-mail : mjbaek@ijnc.inje.ac.kr

를 시행하게 된다. 이로 인하여 효율적인 검체의 보관을 위해 여러 방법들이 개발되어 있고 이는 검사 항목에 따라 차이가 있다. 기술상의 어려움은 있지만 장기간 보관할 수 있는 방법으로는 냉동보관요법이 있는데 해동 후에도 세포 혹은 조직이 상하지 않고 최대한 해동 전의 상태를 유지하고자 많은 방법들이 소개되어 이용되고 있으며,¹⁻³⁾ 보존제와 같은 약물을 이용하는 방법에 비해서는 월등히 오랜 기간 보존이 가능한 장점을 가지고 있다. 자가면역성 감각신경성 난청(Autoimmune sensorineural hearing loss, 이하 ASNHL)⁴⁾은 발생 빈도가 아주 낮아서 임상에서 쉽게 접할 수 없는 질환으로 특징적인 임상경과와 스테로이드제에 대한 반응성 및 혈액학적 검사상 HSP70, 68kD 단백질 등의 자가 항체를 규명하여 진단한다.⁵⁾ 그러나 본 질환의 병인에 대한 많은 연구들이 진행되면서 원인 인자로 작용하는 내이 특이 항원들이 동물 실험을 통해 규명이 되고 있고 청력장애의 원인이 되는 내이 조직의 손상 과정에서 T 세포 매개성 면역반응이 중요한 역할을 수행함이 확인되었다.⁶⁾ 실제 환자에서 이를 확인하기 위해서는 자가 항원에 감작된 환자의 T 세포를 분리하여 합성된 원인 항원과 반응시켜 T 세포에서 분비되는 특정 사이토카인의 양상을 분석하여 내이 항원에 대한 환자의 T 세포 반응성을 확인하고 이를 바탕으로 병인에서의 역할을 규명하는 것이 중요하다. 이를 실행하기 위해서는 ASNHL이 의심되는 환자의 T 세포를 치료 전, 즉 스테로이드 투여 전에 혈액을 채취하고 말초혈액 림프구(PBMC, Peripheral blood mononuclear cells)를 분리하여 여기에 존재하고 있을 내이 특이 항원에 감작된 T 세포의 수(frequency)를 정량적인 방법으로 측정하는 것이 가장 이상적인 방법이다. 그러나 본 질환의 특성상 발생빈도가 낮아서 환자의 방문일이 극히 불명확하며, 일정 기간이 지나면 반응성에 문제가 될 수 있는 내이 항원과 ELISPOT assay를 위한 준비를 항상 하고 있어야 한다는 점, 대상선정 기준인 스테로이드에 대한 반응성의 평가는 투여 후 수주 혹은 수개월의 경과 관찰이 필요하므로 시간 및 시약 및 항원의 불필요한 소모에 따른 경제적 손실이 뒤따르게 된다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 의심되는 환자의 첫 내원시 혈액을 채취하여 분리된 말초혈액 림프구를 냉동보관 하는 방법을 사용하고자 하였고 이에 수반되는 문

제인 냉동 및 해동 과정에서 형태학적인 생존세포(viable cell)의 수와 기능의 보존 정도를 자극에 대한 증식능(proliferation assay) 및 사이토카인 분비 정도를 이용하여 평가한 후 합성된 내이 항원 Cochlin을 이용한 환자 T 세포의 반응성을 ELISPOT assay로 분석하여 냉동된 세포를 이용한 ELISPOT assay의 효율성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

대 상

자가면역성 감각신경성 난청의 대상 선정기준은 이학적 검사, 청력검사, 과거력상 이상 소견이 발견된 경우는 제외하였고 순수 청력검사상 30 dB 이상의 양측의 감각신경난청이 있고 적어도 일측 귀가 연속하는 3개의 주파수에서 3개월 이내에 10 dB 이상 역치의 상승 혹은 어음 청력검사상 어음명료도치가 16% 이상 감소하는 경우를 기준으로 하였다. 선천적 혹은 유전적 질환과 기타 감각신경성난청을 일으킬 수 있는 경우는 제외하였다.⁵⁾ 기준을 만족하는 8명의 환자를 대상으로 하였으며 여자 7명, 남자 1명 이었고, 나이 분포는 41세에서 73세까지 평균 55.9세 이었다. 대조군으로는 전신적 문제가 없고 정상 청력을 가진 성 및 연령이 일치하는 여자 7명 남자 1명으로 하였다.

혈액채취, 동결 및 해동

말초 정맥혈 80 cc를 채취한 후 피콜 하이팩(Ficoll hypaque®, Pharmacia, Uppsala, Sweden)용액을 이용 1,500 rpm에서 30분간 원심 분리하였다. 분리된 말초혈액 림프구는 trypan blue로 염색시킨 후 혈구세포계산기(hemocytometer)를 이용 생존 세포 수를 측정하였고 일부는 세포 배양에 이용하였고 나머지 세포는 동결 보존하였다. 동결 방법은 분리된 말초혈액 림프구를 실온에서 냉동매체 A(60% FCS, 40% RPMI) 2 ml를 첨가한 후 냉동 매체 B(20% DMSO, 80% FCS) 2 ml를 실온에서 시험관을 흔들면서 서서히 점적하였으며 최종 농도 2×10^7 개/ml로 맞춘 4 ml의 혼합 용액은 1.8 ml 냉동보관용 튜브(cryotube)에 1.5 ml씩 나누어 담은 후 Nalgene Cryogenic Controlled-Rate Freezing Con-

tainer에 넣고 -4°C 냉장 보관한 다음 24시간 후에 액화질소 탱크(-70°C)에 옮겨 검사 전 까지 보관하였다. 해동은 냉동보관용 튜브를 37°C 물이 담긴 용기를 이용하여 냉동된 용액이 완전히 녹았을 때 15 ml Falcon tube로 옮긴 후 용량의 2배 정도의 complete RPMI media (93% RPMI, 5% heat inactivated ABO serum, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin)로 실온에서 2번 세척하여 냉동 보존액을 제거한 후 trypan blue 염색을 시행하고 혈구세포계산기를 이용하여 생존 세포 수를 측정하였다. 냉동 및 해동과정에서 세포막이 손상된 세포는 trypan blue 염색에서 세포 전체가 청색을 띠게 되는데 이를 손상 파괴된 세포로 정의하였고, 세포의 원형을 잘 유지하면서 염색약에 염색되지 않은 밝은 빛을 띠는 세포를 생존 세포(viable cell)로 정의하고 계산하였다. 혈구세포계산기는 가로 세로가 각각 1 mm인 9개의 정사각형으로 구성되어 있고 각 칸은 16개의 정사각형으로 구성되어 있으며, 현미경하에서 각 칸의 세포수를 지그재그형으로 측정하였고 이를 4곳의 정사각형에서 측정한 다음 평균하였다(Fig. 1). 냉동 기간은 혈액을 채취하여 분리한 후 질소탱크에 보관한 날부터 검사를 위해 해동한 날까지로 환자군의 8명의 경우 최소 45일에서 최대 64일까지로 평균 약 51일이었고 대조군의 경우 최소 27일에서 최대 50일까지로 평균 약 47일이었다.

Anti CD3 항체를 이용한 해동 전후의 증식능 및 사이토카인(IFN- γ , IL-5) 측정

96 well flat bottomed microtiter Falcon plate(BD Biosciences, San Jose, California, USA)에 세포를 10% FBS(fetal bovine serum), 2 mM fresh L-glutamine, 100 U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin, 30 mL HEPES buffer를 포함한 DMEM(DI-

becco's Modified Eagle Medium) 배양액에 첨가하여 plate well 당 3×10^5 개의 세포가 들어가도록 하였고 이곳에 각각 0, 0.1, 1, 5, 10, 30 μ l/ml의 anti CD3 항체(BD Science)를 농도별로 첨가하여 well 당 총 200 μ l가 되도록 하고 이를 각 농도별 3개씩 준비하였다. plate는 5% CO₂, 95% 공기가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 72시간 배양 후 [³H]-thymidine(1 uCi/ well, specific activity 6.7 Ci/mmol)를 첨가하였으며 16시간 이후 scintillation spectrometer를 이용하여 세포 증식에 사용된 핵산의 양을 radioactivity(count/min)로 측정하였다. 각 동일한 농도별 3개의 radioactivity가 측정되었고 이를 평균하였다. 측정된 결과는 anti CD3 자극을 주지 않았던 경우의 radioactivity와 자극을 주었을 때의 radioactivity를 이용 stimulation index(SI= anti CD3 자극 후 radioactivity/무자극 radioactivity \times 100)를 구하여 가장 activity가 높았던 anti CD3 농도 10 μ l/ml에서 해동 전후 SI 값을 비교하였다. anti CD3 0, 0.1, 1, 5, 10, 30 μ l/ml 각 농도별 IFN- γ 와 IL-5를 분비하는 T 세포의 수는 ELISPOT assay를 이용하여 측정하였고 냉동 전후의 cell에 대하여 비교하였다.

합성 내이 특이 항원 Cochlin을 이용한 ELISPOT assay

ELISPOT assay로 냉동 보관된 환자 8명 및 대조군 8명의 T 세포와 Cochlin을 이용하여 IFN- γ 와 IL-5를 분비하는 T 세포의 수(frequency)를 측정하여 비교하였다. ELISPOT plate(Polyfibrinics, Rockland, MA, US)에 mouse anti-human IFN- γ capture antibody(Endogen, Cambridge, MA)와 IL-5 capture antibody(BD Bioscience)를 각 well당 0.4 μ l/well 씩 첨가한 다음 4°C에서 12시간 전처리(coating) 하였다. 전처리된 plate의 well에 3×10^5 개의 세포를 추가하고 여기에 다시 Cochlin 100 μ g/ml를 추가하여 최종 200

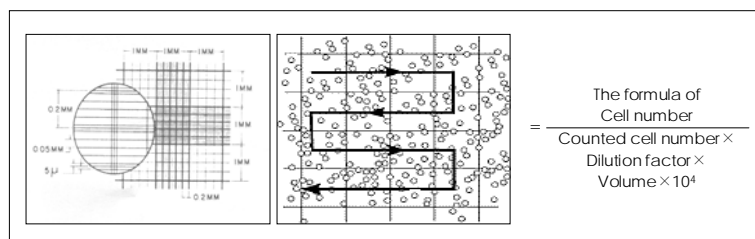


Fig. 1. Cell counting methods using hemocytometer and its formula. Right block shows real hemocytometer scales. Middle block shows counting method. Left block is the formula of cell number.

μ l가 되도록 하고 이를 검사 대상별 3개씩 만들었다. 이후 5% CO₂, 95% 공기가 공급되는 37°C 배양기에서 24시간(IFN- γ) 혹은 48 (IL-5) 시간 동안 배양 후 세포를 세척하여 제거하고 각 well에 이차 항체인 biotinylated mouse anti-human IFN- γ (no. M701 ; Endogen) 혹은 mouse anti-human IL-5 (no. 18522D ; BD Biosciences)를 처치하였다. 다시 24시간 배양 후 세척하고 Peroxidase-conjugated streptavidin (Dako-Cytomation)와 3-amino-9-ethylcarbazole substrate, 1/2000 희석된 30% H₂O₂로 처리 후 spot을 확인하였고 이들 spot의 수를 automated Series-1 Immunospot Satellite Analyzer® (Cellular Technology, Cleveland, OH, USA)를 이용하여 측정하였다.

결 과

해동 전후 생존 세포 수의 변화

8명의 환자의 냉동 전 측정된 생존 세포수는 8.8×10^6 개에서 최대 73×10^6 개로 평균 $45.7 \pm 21.0 \times 10^6$

개이었으며, 냉동 보관 후 해동한 경우는 5.2×10^6 개에서 최대 59×10^6 개로 평균 $35.9 \pm 24.7 \times 10^6$ 개이었다 (Fig. 2).

Anti CD3 항체를 이용한 증식능 및 IFN- γ , IL-5 분비 측정 결과

증식능에서 측정된 simulation index (SI)는 냉동 전 13.08에서 최대 28.21로 평균 21.0이었으며, 해동 후는 9.83에서 최대 20으로 평균 14.7로 해동후의 SI는 냉동 전의 약 70%에 해당하였다 (Fig. 3).

Anti CD3 항체에 대한 IFN- γ 및 IL-5를 분비하는 세포수를 측정된 결과 냉동 보관을 시행하기 전 anti CD3 항체 농도 0.1 μ g/ml와 10 μ g/ml에서 IFN- γ T 세포 수는 각각 평균 $904.43 \pm 132.72/1 \times 10^6$ PBMC, $1231.10 \pm 83.12/1 \times 10^6$ PBMC이었으며, 해동 후는 각각 평균 $640.38 \pm 34.25/1 \times 10^6$ PBMC, $840.36 \pm 37.21/1 \times 10^6$ PBMC이었다 (Fig. 4). IL-5를 분비하는 T 세포 수는 각각 평균 $726.63 \pm 93.52/1 \times 10^6$ PBMC, $1129.10 \pm 97.33/1 \times 10^6$ PBMC이었으며, 해동 후는 각

Fig. 2. Comparison of the number of viable cells before and after freezing using hemocytometer with trypan blue stain in each patient. Pn means the entitled number of each patient. Average viable cell number of frozen cells were about 75% of before frozen cell.

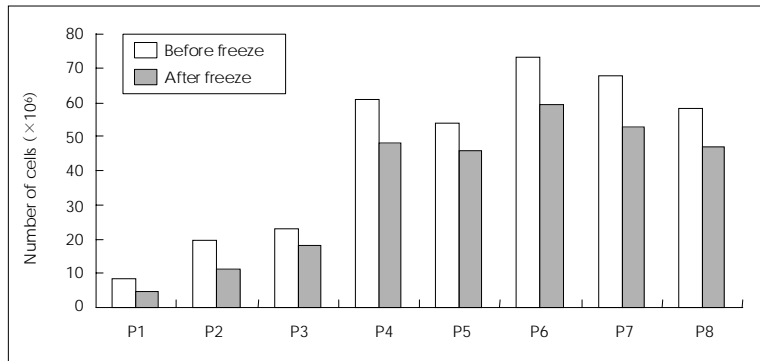
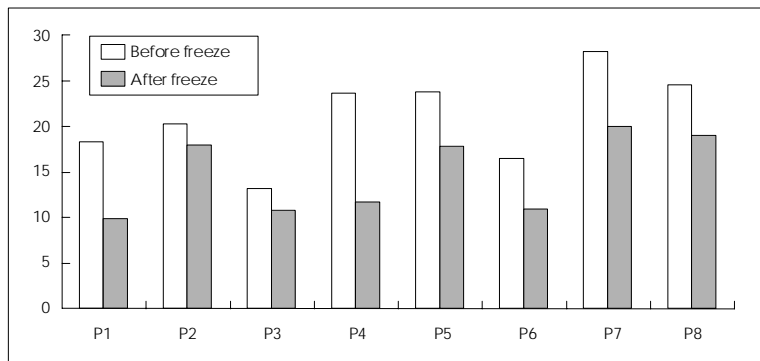


Fig. 3. Comparison of the stimulation index of before and after freezing cells in each patient. SI defined as mean counts minute of experimental cultures with antigen divided by mean counts per minute of culture without antigen. Pn means the entitled number of each patient. Average SI of frozen cells were about 70% of before frozen cell.



각 평균 $499.54 \pm 62.36/1 \times 10^6$ PBMC, $809.24 \pm 52.06/1 \times 10^6$ PBMC이었다(Fig. 5).

냉동 보관된 환자 및 대조군의 T 세포에서 Cochlin에 대한 IFN- γ , IL-5 assay 결과

IFN- γ 를 분비하는 T 세포 수는 환자군 및 대조군에서 각각 $472.22 \pm 64/87/1 \times 10^6$ PBMC 및 $118.20 \pm$

$23.97/1 \times 10^6$ PBMC로 환자군에서 대조군에 비해 약 4배 정도 유의하게 증가하였다($p < 0.05$) (Fig. 6). IL-5를 분비하는 T cell의 수는 환자 및 대조군에서 각각 $68.65 \pm 25.12/1 \times 10^6$ PBMC 및 $8.41 \pm 2.30/1 \times 10^6$ PBMC로 IFN- γ 를 분비하는 세포 수 보다는 적었지만 환자군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 7).

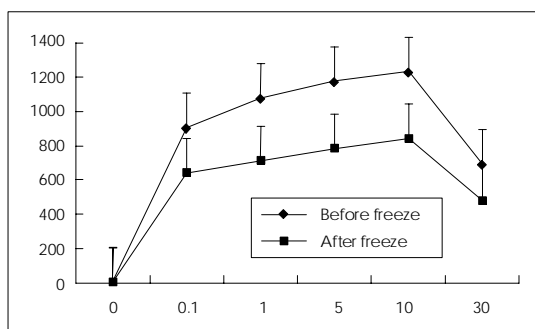


Fig. 4. The number of IFN- γ secreting T cells per 1×10^6 PBMC with anti CD3 antibody before (upper line) and after freezing (lower line) using ELISPOT assay. Average number of IFN- γ secreting T cells per 1×10^6 PBMC of frozen cells were about 69% of before frozen cell when compared with $10 \mu\text{l/ml}$ of anti CD3 antibody.

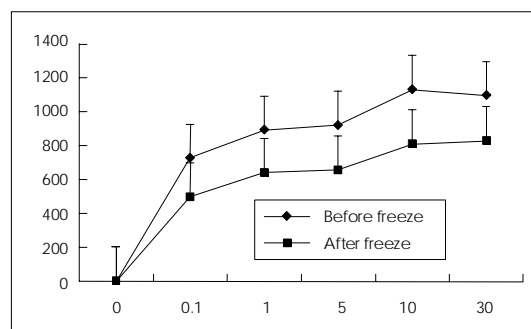


Fig. 5. The number of IL-5 secreting T cells per 1×10^6 PBMC with anti CD3 antibody before (upper line) and after freezing (lower line) using ELISPOT assay. Average number of IL-5 secreting T cells per 1×10^6 PBMC of frozen cells were about 71% of before frozen cell when compared with $10 \mu\text{l/ml}$ of anti CD3 antibody.

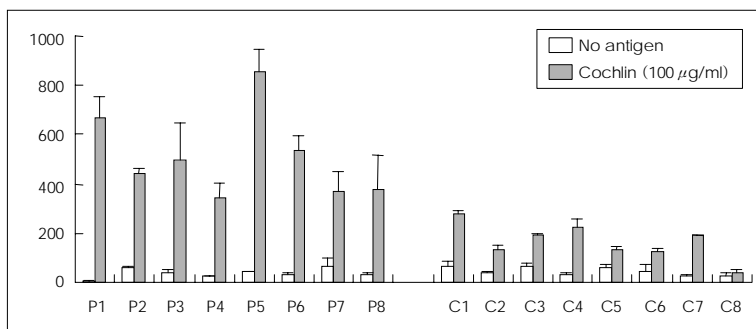


Fig. 6. The number of IFN- γ secreting T cells per 1×10^6 PBMC with human recombinant cochlin using ELISPOT assay. Frequencies of cochlin responsive IFN- γ secreting T cells in ASNHL showed significantly higher than compare with normal control. P : patient, C : age and sex matched control.

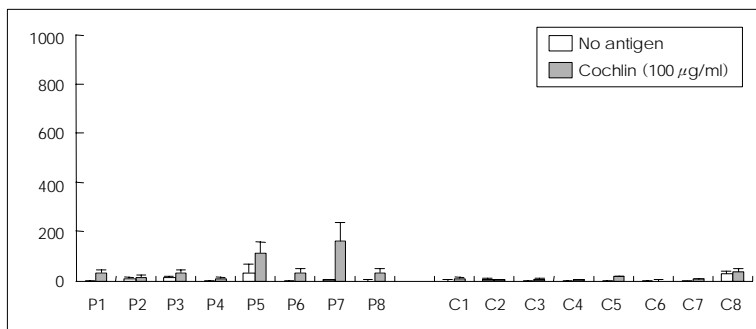


Fig. 7. The number of IL-5 secreting T cells per 1×10^6 PBMC with human recombinant cochlin using ELISPOT assay. Frequencies of cochlin responsive IL-5 secreting T cells in ASNHL showed markedly decreased than IFN- γ secreting T cells but significantly higher than compare with normal control. P : patient, C : age and sex matched control.

고 찰

자가 면역질환은 자신의 조직에 대한 면역반응의 결과로 질환이 초래된 상태로 신체의 어느 부위에나 발생 가능하며 내이에 발생하여 감각신경성 난청이 발생한 경우를 ASNHL이라 한다.⁴⁾⁷⁾ 병인으로는 자가 내이 항원에 대한 체액성 혹은 세포 매개성 면역반응으로 인한 내이 손상이 원인으로 알려져 있지만 이에 관여하는 주된 면역반응 및 과정에 대해서는 논란의 소지가 많은 실정이며 최근 병인에 관여하는 원인 내이 자가 항원에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. ASNHL의 임상적 특성상 다른 장기의 이상 소견을 동반하지 않는다는 것은 전신적으로 발현되는 항원에 대한 반응이 아니라 내이에서 특이적으로 발현되는 항원에 대한 면역반응에 의해 발생한다는 점은 병인 규명 뿐만 아니라 치료적 측면에서도 내이 특이 항원에 대한 연구가 중요함을 알 수 있다. 최근 내이 조직에 특이적으로 발현되는 단백질 중 하나인 Cochlin을 이용한 연구에서 이에 감작된 T 세포에 의해 실험동물에서 자가면역성 청력장애가 유발됨을 증명하여 자가 항원으로서의 Cochlin의 중요성과 T 세포 매개 반응이 중요한 역할을 수행함을 보고하였다.⁶⁾ 환자의 혈액 내 존재하는 자가 항체의 규명에 비특이적 내이 조직을 이용한 이전의 연구⁸⁾는 조직 특이성이 문제점으로 대두되었고 이를 해결하기 위한 방법으로 환자의 말초혈액 림프구에서 내이 특이항원에 감작된 T 세포에서 항원 자극에 의해 분비되는 사이토카인의 양상을 규명하는 것이 필요하게 되었다. 이를 측정하는 방법으로는 ELISA법과 ELISPOT assay가 사용되고 있는데 ELISPOT assay에서는 사이토카인을 분비하는 개개의 세포의 수를 정량적으로 측정이 가능하여 기존의 검사법에 비해 민감도 및 특이도가 높아서 최근 연구에서 많이 사용되고 있다.³⁾⁸⁾⁹⁾

ASNHL의 진단은 대상 선정 기준에서처럼 특징적인 청력장애 병력 및 임상경과와 스테로이드제에 대한 반응성으로 진단한다.⁵⁾ 검사실 소견으로는 HSP70, 68 kD 단백질 등에 대한 자가 항체를 규명하는 것이 중요한데 일부는 상표화된 시약이 개발되어있어 임상에 이용되고 있지만 내이 특이 항원에 대한 검사는 국내에서는 사용되고 있지 않다. 따라서 Cochlin 같은 새로운 내이 특이 항원

에 대한 항체를 환자에서 확인을 하기 위해서는 실험실에서 이를 합성하여 사용하게 되는데 본 질환처럼 발병률이 매우 낮은 경우 환자의 내원을 예측하기가 불가능하고 매우 불규칙적인 경우가 많아 합성된 항원을 환자 내원일에 사용하는 것이 거의 불가능하다. 아울러 임상적으로 의심이 되는 환자의 혈액을 내원 당일 채취하더라도 환자의 경과 및 스테로이드제에 대한 반응성을 확인하는데 최소 수주 혹은 수개월이 필요할 수도 있다. 결국 내원 당일 준비된 항원과 혈액을 이용하여 검사하더라도 결과에 따라 제외되는 경우가 발생한다. 항원을 준비하는 시간과 경비, ELISPOT assay⁸⁾⁹⁾가 최소 7일 정도의 시간과 많은 시약이 소요되는 점, 환자의 내원을 예측할 수 없어 항상 준비를 하다가 이를 폐기해야하는 등의 시간적 공간적 제약이 해결해야할 문제점으로 대두하였다. 이런 문제들은 환자의 내원시 혈액을 채취하여 세포를 분리한 후 장시간 보존할 수 있는 방법이 있다면 검체를 얻은 후 이를 선정기준에 따라 제외하기도 하고 일정한 수의 검체가 준비된 후 항원을 합성하고 검사에 필요한 시약 및 재료들을 준비하여 효율적인 실험이 가능하다. 이 방법으로 추천할 만한 방법이 냉동보존법으로 현재 의학 및 타 분야에서도 장기 보존 목적으로 많이 사용되고 있다. 보존 가능한 기간에 대해서는 이론적으로 거의 영구 보존이 가능하지만 이에 대해 정확히 제시된 자료는 없고, 특히 냉동 보존제 및 냉동 기법의 개발로 인하여 해동 후 세포 혹은 조직 등이 거의 해동 전 수준의 생존율을 보이고 있어 향후 많은 응용과 개발이 예상되고 있는 보존법이다. 종단적 연구(longitudinal study)가 필요한 임상 연구에서는 동일일에 대해 시간적 간격(수개월 혹은 수년)을 두고 여러 번의 샘플 채취가 필요하며 검사간의 차이를 최소화하기 위해 같은 시간에 검사가 필요한데 이를 가능하게 하는 방법 중의 하나가 냉동 보존 요법이다. 최근 알부민을 냉동매체로 사용하고 해동 이후 초회 희석시 가운의 매체를 사용함으로써 냉동 보존 이후 세포의 생존력과 기능을 최대한 유지할 수 있는 다양한 프로토콜이 제시되고 있다.¹⁻³⁾ 냉동 보존 요법을 사용하여 말초혈액 림프구를 장기간 보존할 수 있으나 냉동 및 해동 과정에서 발생하는 세포의 생존력과 기능에 대한 영향을 배제할 수는 없다.

저자는 ASNHL 환자를 대상으로 내이 특이 항원에 대

한 T 세포 반응성을 측정하기 위하여 스테로이드 투여 전 말초혈액을 채취하여 냉동 보존하였고 냉동 전후 세포 생존율과 기능의 보존 정도를 알아보고 환자의 냉동 보존 세포를 이용한 ELISPOT assay의 유용성을 평가하고자 하였다. 냉동 전후의 생존 세포수와 비특이적 자극에 의한 증식 및 사이토카인 분비 정도는 단순히 냉동 전후의 변화를 동일인에서 비교하였기에 대조군이 따로 필요치 않았으며, 본 질환의 원인 항원으로 생각되는 Cochlin에 대한 반응성의 경우는 정상 대조군과의 비교가 필수적인 조건이라 동일한 환경의 대조군(냉동 보존)을 선정하여 비교하였다.

냉동 전 후의 생존 세포 수의 변화는 냉동 후가 전에 비해 약 55%에서 최대 81% 수준임을 알 수 있었고, 대상 환자 P1, P2, P3에서 세포의 수가 적었던 것은 혈액을 분리하는 과정에서 기술적 측면의 미숙으로 인하여 적은 수의 세포를 얻었기 때문이었으며 P4에서 P8까지의 5명의 환자에서는 혈액채취 당시 많은 세포를 분리 저장한 결과 이었지만 전체적으로 냉동 전후 생존 세포의 비율은 각 환자 별로 큰 차이는 없이 냉동 전에 비해 약 75% 수준으로 냉동으로 인한 세포 소실이 약 1/4 정도임을 알 수 있었다(Fig. 2). 따라서 실험을 계획할 때 이를 감안하여 냉동 보관전의 세포 수를 미리 계산하여 저장하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 세포의 기능 보존 유무는 2가지 방법으로 측정을 하였는데 정상적인 기능을 수행하는 세포는 적절한 환경 및 특정 자극이 있을 때 증식하는 능력과 특정 자극에 대한 반응으로 사이토카인을 분비하는 정도를 이용하여 평가하였다. 세포가 증식할 때는 DNA 합성을 위해 핵산(nucleic acid)이 필요하게 되는데 방사능동위원소가 포함된 핵산(^3H -thymidine)을 이용하면 세포의 증식에 이용된 핵산의 양을 방출하는 방사선량으로 계산 할 수 있는데 anti CD3 항체를 첨가하지 않은, 즉 자극이 없는 경우와 첨가한, 즉 자극을 준 경우의 비(Stimulation Index)를 구하여 이를 냉동 전후에 비교한 결과 냉동 전의 약 70%에 해당하여 세포 기능이 약 70% 정도가 보존됨을 알 수 있었다. 이는 현미경하의 육안적 형태가 정상적인 세포라도 일부, 약 5% 정도는 기능이 상실됨을 보여준다고 할 수 있다. 본 실험의 궁극적인 목표인 냉동 보관 세포의 특정 자극(Cochlin)에 대한 사이토카인(IFN- γ 및 IL-

5)의 분비 양상을 측정하는 것으로 이에 대한 전 단계로 비특이적인 자극(anti CD3 항체)에 대한 냉동 보관 세포의 IFN- γ 및 IL-5의 분비 정도가 각각 해동 전에 비해 약 69%, 71% 수준임을 알 수 있어 전체 세포의 약 70%가 기능적인 회복을 보이는 것임을 알 수 있었다.

이를 토대로 환자의 냉동 보관 세포의 Cochlin에 대한 반응성을 측정한 결과 IFN- γ 를 분비하는 T 세포의 수가 대조군에 비해 약 4배 정도 유의한 증가가 관찰되었고, IL-5를 분비하는 세포의 수는 IFN- γ 에 비해 현저히 감소되어 있었지만 대조군에 비해서는 유의한 증가 소견이 관찰되었다. 따라서 Cochlin에 대한 환자의 T 세포 반응은 proinflammatory Th1-like response가 현저히 증가되어 있음을 알 수 있어 본 질환의 병인 원인 항원으로서 Cochlin의 중요성과 proinflammatory Th1 response가 중요할 것이라 생각되었다.

Cochlin에 대한 세포의 반응성은 냉동 보관 전에는 앞서 언급한 여러 가지 문제로 인하여 실시하지는 못하였지만 냉동 보관후의 세포 상태를 분석한 결과 냉동 보관된 세포로도 충분히 만족할 만한 결과를 얻을 수 있음을 파악한 후 진행한 결과 Cochlin에 대한 반응성에서 환자군에서 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 관찰 할 수 있었고 또한 동시기에 한꺼번에 실험을 진행함으로써 시간적 공간적 제약 및 검사의 신뢰성 및 객관성이 높아질 수 있고 인력 및 경비에서 많은 이익을 볼 수 있음을 알 수 있어 냉동 보존법을 이용한 ELISPOT assay가 유용한 방법임을 알 수 있었다.

결 론

냉동 보관된 세포의 수 및 기능이 해동 후에 거의 대부분 회복 할 수 있음과 특정 자극에 대한 반응으로 사이토카인을 분비하는 정도가 환자 및 대조군에 명확한 차이를 보이는 점은 향후 연구에 냉동보관 요법이 유용하게 사용될 수 있고 특정 검사를 위한 시간적 공간적 제약 및 경비를 절감할 수 있는 효율적이며 추천할 만한 방법의 하나로 생각된다.

중심 단어 : 냉동보관법 · 자가면역성 감각신경성 난청 · ELISPOT assay.

본 논문은 2005년도 인제대학교 학술연구조성비 보조에 의한 것임(This work was supported by the 2005 Inje University research grant).

REFERENCES

- 1) Makino M, Baba M. A cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells. *Scand J Immunol* 1997;45:618-22.
- 2) Jennes W, Kestens L, Nixon DF, Shaklett BL. Enhanced ELISPOT detection of antigen-specific T cell responses from cryopreserved specimens with addition of both IL-7 and IL-15 -the Amplispot assay. *J Immunol Methods* 2002;270:99-108.
- 3) Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, Boehm BO, Tary-Lehmann M. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 2003;278:79-93.
- 4) McCabe BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979;88:585-9.
- 5) Baek MJ. Autoimmune sensorineural hearing loss: Immunological review. *Korean J Otolaryngol* 2006;49:674-81.
- 6) Solares CA, Edling AE, Johnson JM, Baek MJ, Hirose K, Hughes GB, et al. Murine autoimmune hearing loss mediated by CD4+ T cells specific for inner ear peptides. *J Clin Invest* 2004;113:1210-7.
- 7) Rose NR. Mechanism of autoimmunity. *Seminars in Liver Disease* 2002;4:387-94.
- 8) Lorenz RR, Solares CA, Williams PM, Sikora J, Pelfrey CM, Hughes GB, et al. Interferon-gamma production to inner ear antigens by T cells from patients with autoimmune sensorineural hearing loss. *J Neuroimmunol* 2002;130:173-8.
- 9) Baek MJ, Park HM, Johnson JM, Altuntas CZ, Jane-wit D, Jaini R, et al. Increased frequencies of cochlin-specific T cells in patients with autoimmune sensorineural hearing loss. *J Immunol* 2006;177:4203-10.