

◇... 바이러스 감염을 방어하는 생물학적인 분자를 Alic...  
 ◇... k Isaacs and Jean Lindenmann에 의하여 인터페론...  
 ◇... (Interferon, 이하 IFN으로 약함) 이라고 명명된지 20...  
 ◇...년이 지난 오늘날 세계의 모든 선진국에서는 아직...  
 ◇...도 이에대한 연구에 집중되고 있다. 처음 IFN이 바...  
 ◇...이러스 감염에 효과가 있음이 증명되었을 당시는 이...  
 ◇...분자의 추출과 이분자의 작용기전 및 구조에 대한...  
 ◇...여 여러학자에 의하여 연구가 집중되었던 것이다. ...  
 ◇...그러나중 최근에 전세계적으로 이 IFN에 대대적인...  
 ◇...이목이 집중되어 이에대한 연구가 가열되기 시작한...  
 ◇...것은 IFN이 항암작용이 있다는 사실이 동물과 인...  
 ◇...상실험에서 입증되기 시작하였기 때문이다. 1960년후...  
 ◇...반에 불란서의 Institute de Recherches Scientifiq...  
 ◇...ues Sur le Cancer 와 Ion Gresser 등에 의하여 I...  
 ◇...FN이 동물악성종양에 대한 억제효과가 보고되었...  
 ◇...며 1972년 Finland의 Cantell 등에 의하여 일정수...  
 ◇...의 암환자에 사용할수 있는 대량의 사람백혈구 IF...  
 ◇...N생산법이 개발되어 수십명의 골육종환자에 세계 최...  
 ◇...초로 사용이 시도되었다. 그의 치료결과가 좋았다는...  
 ◇...사실이 보고되자 급속적으로 이에대한 연구가 가속...  
 ◇...화된 것이다.

r로 사용되는 미정제인터페론 (crude interferon: 이하 CIFN으로 약함)의량은 배지ml당 125 units으로 사용하였다. 배지에 부유된 세포가 IFN분자에 노출되어 inducer virus가 추가되었을 때에 곧 MRNA에 IFN분자의 생합성을 시작할수있는 상태로 준비되도록 하기위하여 즉 Preinduction 조작을 최소한 2시간 하여야 한다.  
 ⑥ IFN생산을 위한 incubation: inducer로서는 Cantell sendai virus를 사용하였으며 이 virus를 magnetic stirring 되고 있는 삼기 MAM 배지에 대하여 125HA Unit/ml로 첨가하고 배양을 계속하면서 Overnight시켰다.  
 ⑦ CIFN의 수확=14시간 동안 37.5℃의 배양액에서 IFN생산을 위하여 Incubation 된 세포부

하여 약60%의 수확률을 보였다.  
 ⑧ PIF의 생성률 및 이의 순도=본 연구소에서 CIFN에서의 PIFN생성률은 8%~57%로 평균 22.3%였다. 또한 specific activity는  $1 \times 10^6$ 으로 미국보건성이 요구하는 국제적단위의 표준범주내에 들었다.  
 <총괄>  
 저자가 사용한 방법으로 전혈로부터 buffy Coat에 얻어진 백혈구의 수확률은 37%~93%였으며 상당한 변위가 있으나 고율의 수확이 가능하였다. 이 buffy Coat로부터 HES를 사용한 방법으로 얻어진 순수백혈구의 수확률은 30%~88%로 높은 율의 백혈구가 수확되었다. 즉 전혈에 존재하는 백혈구의 17%~55%로서 평균 36%가 IFN

실이라 하였다.  
 또한 Isaacs 등이 지적한 priming을 시행하였으며, priming에 사용된 primer는 미국 스토안 카테린 암연구소에서 분양 받아 사용하였으며 primer의 양은 Isaacs 등이 지적한  $100 \sim 500u/ml$ 을 고려하여  $125u/ml$ 을 사용하였으며 priming의 시간도 2시간으로 Issacs가 지적한 최적 1~3시간의 중간을 택한 것이다. 배지의 수소이온농도는 Tovell 등이 지적한 바의 PH7.2~7.6의 중간인 7.4를 선택하였다. 이들은 약산성의 수소가 온농도보다 PH7.6의 배지에서 IFN생산농도가 6배나 된다고 지적하였다.  
 배양온도에 있어서 Tovell 등은 2%혈청이 추가된 배양액에서는 35.5℃가 최적이라 하였고 5%혈청추가 배지에서는 37~39℃의 범위에서 최고 수확을 얻었다고 지적되었기에 37.5℃를 배지온도로 택하였다.  
 이 사실은 Matsuo 등이 배지온도를 36℃로 택하여 저율의 IFN생산을 보인 것으로 뒷받침된다고 하였다.  
 IFN정제 있어 뒤떨어져 있던 사람백혈구 IFN ( $\alpha$ -IFN)의 정제법이 최근 진전되어 Lin 및 Rubenstein 등에 의하여 각각 다른 방법으로 약  $10^8 Iu/mg$ 의 순도  $\alpha$ -IFN을 정제하였다. 그러나 응용연구에 사용되는  $\alpha$ -IFN은 아직 순도가 그렇게 높지는 않다. 즉 이유는 임상에서 요구되는 IFN의 양은 대량이기 때문이며 여기에서  $10^8 \sim 10^6 Iu/mg$ 의 정제수준의 것이 응용되고 있다.  
 지금까지 사용법중 가장 효율적인 정제방법은 affinity chromatography 법이라 하였으며, Berg 등은 사람 CIFN을 암  $\alpha$ -IFN Cephrose Column Chromatography에 의하여  $80 \sim 126$



林 壽 德  
 <慶熙醫大교수·醫博>

# 癌환자治療用, 알파-인터페론

법을 개량하여 buffy Coat에서 다시 RBC를 제거하고 순수백혈구분리를 위하여 Hydroxyethyl starch (HES) 액을 사용하여 단시간내에 대량백혈구를 순수분리하였다.  
 ③ 세포부유액의 준비=상기와같이 얻어진 백혈구에 blood unit당 2.0ml의 조직배양 영양으로 균등한 부유액을 만든다. 이때 사용되는 조직배양액은 MEM으로서 이미 4℃에 냉각되어져 있어야 하며, 이를 이용하여 만들

유액을 다음날 아침 PH를 측정 한후 회수하게 된다. IEC 병동원칙기를 원침 (985 G, 20분) 하여 침전물을 제거한후 상층액을 채취하여 IFN정제시까지 30℃보관한다. 보관된 상층액이 소위 CIFN이라 한다. 정제하기 전에 소량을 채취하여 CIFN의 역가검사용으로 사용한다.  
 ⑧ IFN의 정제=이상과 같이 하여 생산된 CIFN은 Cantell의 원법과 Switzland Blood Bank에서 사용하는 방법, 그리고

생산을 위하여 수득되었다고 하였다. 또한 백혈구의 순수분리의 순도도 백혈구와 적혈구의 비가 1:5 이하 임으로 상당히 높은 순도로 Hemoglobin의 오염을 최소화하였다.  
 이의 순도는 Cantell이 ammonium chloride를 사용하여 백혈구를 분리한 것과 거의 동일한 순도라고 하였으며, 본 연구소에서 사용한 HES 부유법은 ammonium chloride를 사용한 것보다 단시간내에 즉 3~6시간

내에 대량 (3,000~30,000 ml)의 백혈구를 분리할수 있어 생산시간을 단축할수 있었다. 또한 IFN의 생산율은 도표 5에서 보는 바와 같으며 이는 Matsuo 등의 생산율보다 10배가 높은것은 여러가지요소가 기인되었지만 Horowitz 등이 지적했듯이 dextran류를 이용하여 분리된 백혈구가 고율의 IFN을 생산한다는 사실과 일치된다고 하겠다.  
 Inducer로서 Newcastle disease virus와 Sendai virus가 고단위생산율을 유발한다고 하여 본 연구소에서는 Cantell's Sendai virus를 사용하였다.  
 배지 역시 Cantell이 사용한 Eagle's MEM을 사용하였으며 Controlled 된 비교실험은 하지 않았지만 고가의 199배지나 RPMI 배지를 사용치않고도 충분한 고율의 IFN생산을 할수있었다고 할수있다. 이 사실은 Kishida 등이 지적한 사실과 일치되는사

## 가장 효율적인 IFN錠劑 방법은 親和性 Chromatography 法

현재 선진국에서는 IFN의 대량생산법의 개발, 구조식의 규명 및 IFN의 생물학적인 작용기전 등에 대하여 인류사상 최고의 연구비가 지출되어 연구에 집중되고 있다.  
 IFN은 종특이성이 있음으로 인하여 환자에 적용될 IFN은 사람의 세포에서 생산되어야 하기 때문에 사람백혈구 이의 생산원으로 선택되어져야 함이 이미 지적되어 왔다. 그러므로 저자는 일차적으로 백혈구 IFN의 임상사용을 위한 대량생산법 개발을 위한 연구에 착수하였기에 이에 대하여 기술하겠다.

### 全血로부터 Buffy Coat 에 얻어진 白血球의 수확률은 37~93%로 상당히 높아

### Dextran 類의 利用으로 分離된 白血球 경우 高率의 인터페론 生産가능성을 立證

어린 농축부유액도 0~4℃ (Ice bath)의 용기내에서 사용시까지 magnetic mixer로 각반을 계속한다.  
 ④ 조직배양액의 준비=IFN생산을 위한 배지는 MEM배지이며 IFN의 최고생산율을 가져오기 위하여 tricine과 L-glutamine 등이 첨가되었으며 오염을 막기 위하여 항생제도 첨가사용되었다.  
 이들이 첨가된 배지는 일주일 이내에 사용토록 하였으며, 배지의 PH는 7.4로 조절되었다.  
 ⑤ 생합성을 위한 준비=미리 셋업 37도로 가온시킨 MEM배지에 농축백혈구부유액을  $1 \times 10^7$  세포/ml 농도가 되도록 재조정한다. 조정된 MEM배지에 Agammaglobulin Protein과 priming을 위한 primer를 첨가하여준다.  
 첨가되는 무감마글로블린의 량은 배지ml당 0.92mg이며 prime-

뉴욕 Blood Bank에서 사용하는 정제법을 개량한 과정을 거쳐 정제화 (Purified interferon: 이하 PIFN으로 약함) 되었다.  
 ⑨ 정제화된 IFN (PIFN)의 순도감정=PIFN의 순도감정은 Lowry 방법을 개량한 Bio-Rad protein assay법으로 총단백질 함량을 측정하였고 이를 토대로 미국보건성의 표준 IFN에 준하여 측정된 역가를 기준으로 하여 specific activity가 산출되었다.

내에 대량 (3,000~30,000 ml)의 백혈구를 분리할수 있어 생산시간을 단축할수 있었다. 또한 IFN의 생산율은 도표 5에서 보는 바와 같으며 이는 Matsuo 등의 생산율보다 10배가 높은것은 여러가지요소가 기인되었지만 Horowitz 등이 지적했듯이 dextran류를 이용하여 분리된 백혈구가 고율의 IFN을 생산한다는 사실과 일치된다고 하겠다.  
 Inducer로서 Newcastle disease virus와 Sendai virus가 고단위생산율을 유발한다고 하여 본 연구소에서는 Cantell's Sendai virus를 사용하였다.  
 배지 역시 Cantell이 사용한 Eagle's MEM을 사용하였으며 Controlled 된 비교실험은 하지 않았지만 고가의 199배지나 RPMI 배지를 사용치않고도 충분한 고율의 IFN생산을 할수있었다고 할수있다. 이 사실은 Kishida 등이 지적한 사실과 일치되는사

의 고수확률로 부분정제품 (partial purified IFN: PPIFE)에서 시작했을때에는 25%의 회수율을 올렸다고 한다. 그러나 이들 방법은 아직도 대량제생산에는 이용되지 못하고 있다. 저자는 Cantell 등에 의하여 확립된 acid ethanol에 의한 분획법을 이용하였는데, 이 법에 Switzland의 Blood Bank에서 사용하는 법을 다소 간략한 개량법을 사용하였다.  
 이렇게 하여 얻어진 PIFN의 Specific activity가  $1 \times 10^6 Iu/mg$ 으로 국제단위로 인정되는 범주내에 속하였다. 현재의 규모에서 혈액사용수를 2배 또는 4배로 증가시킨다면 이들에서 생산되는 IFN의 양으로 임상에 필요되는 환자 (본 대학병원에서는 월 10~20명)에 필요되는 IFN의 양을 생산하는 예는 적당한 규모의 방법이라고 사료된다.

方法 및 材料  
 ① buffy Coat (연막)의 준비=신선한 전혈 (whole blood)를 냉동원침기 (IEC DPR 6000)에서 2,200 G로 7분간 원침하여 백혈구와 적혈구층을 만들게 한후 Plasma extractor로 plasma를 추출한 다음 buffy Coat를 50~70ml로 추출한다.  
 ② 대량백혈구의 순수분리=Finland의 Cantell 등이 사용한 원법과 Switzland의 혈액은행의랑

성적  
 ① 백혈구의 수확률 및 CIFN의 역가=예비실험에서 일회에 사용된 혈액은 16 units로서 백혈구의 수는 도표 5와 같다. 즉 혈액 330 ml에 포함되어 있다고 추정되는 백혈구의 수는  $330 ml \times 6000 \times 10^6$ 으로  $1.98 \times 10^9$ 로 순수분리과정을 통하여 얻어진 백혈구는 수확된 buffy coat층에대

### 營業種目

- MICRO FILTER 및 空調 FILTER
- 淨水 裝置
- 純水 裝置
- 濾過 裝置
- CHEMICAL FEEDER (消毒裝置)
- POOL場 濾過裝置
- 其他 機器製作

본 사 ; 서울특별시 중구 인현동 73~1 (풍전상가 3층가열 306)  
 전화 265-9380, 266-0855·8302

공 장 ; 경기도시흥군의왕면내손리 324-13  
 전화 1343-3-3552

부 산 지 사 ; 부산시 중구 부평동 2가 53  
 전화 23-2407

대 구 지 사 ; 경북대구시 중구 서문로 1가 25  
 전화 22-4819

호 남 지 사 ; 전주시 태평동 1가 4-10  
 전화 3-6859

포 향 지 사 ; 포항시 죽도 1동 35-34  
 전화 3-2489