

새로운 종양항원인 CM1을 이용한 종양 진단 ELISA kit의 개발

¹서울대학교 의과대학 해부학교실, ²제주대학교 의과대학 해부학교실

강재승¹ · 김대진¹ · 김영인¹ · 이왕재¹ · 장가용²

Development of Tumor Screening ELISA kit by Using Novel Tumor Antigen, CM1

Jae Seung Kang¹, Daejin Kim¹, Young-In Kim¹, Wang Jae Lee¹ and Ka Young Chang²

¹Department of Anatomy and Tumor Immunity Medical Research Center, Seoul National University College of Medicine, Seoul, ²Department of Anatomy, Cheju National University College of Medicine, Jeju, Korea

ABSTRACT

Background: CM1 (centrocyte/-blast marker 1) is originally defined as a germinal center B cell marker. It is known that CM1 plays a critical role on B cell development in germinal center. In addition, we have found that CM1 is expressed on lymphoma cell lines, such as Raji, Ramos and IM-9. This means that CM1 might be served as a tumor marker as well. In the present study, we examined the expression of CM1 on the surface of the other tumors and the possibility of the development of tumor screening ELISA kit by using CM1. **Methods:** First, we have examined the expression of CM1 on stomach cancer and hepatoma, which are predominantly (discovered) occurred in Korean, by flow cytometry analysis. After purifying of CM1 antigen from Raji and Ramos, the optimal ELISA condition was determined. And then we compared the level of CM1 between normal individuals and cancer patients by ELISA. To decrease the non-specific binding of anti-CM1 mAb with serum components except CM1 and to enhance the diagnostic accuracy, albumin depletion spin column was used. **Results:** CM1 was highly expressed on stomach cancer and hepatoma cell lines. In addition, we have also confirmed the increased CM1 expression on cancer patients. The difference of CM1 expression between normal individuals and cancer patients were more clearly observed, after deletion of serum albumin by using albumin depletion spin column. **Conclusion:** Based on the results from this study, CM1 might be a useful molecule for the early diagnosis of cancer. In addition, further studies for the increase of ELISA sensitivity and appropriate albumin depletion methods should be needed. (*Immune Network* 2005;5(2):124-129)

Key Words: CM1, ELISA, tumor

서 론

암(cancer)의 발생은 해가 거듭될수록 증가하고 있는 추세이며 삶의 질적 향상이라는 측면에서 우리 사회가 당면하고 있는 가장 큰 사회적 문제이다. 따라서 암의 퇴치를 위한 연구에 사회, 경제적 측면에서의 지속적인

투자가 있었고 그 결과 탁솔(taxol), 글리벡(glivec), 이레사(irresia) 등과 같이 효능이 우수한 새로운 항암제를 이용한 효과적인 항암 치료법의 확립이 시도되고 있다(1-3). 그러나 새로운 항암 치료법의 경우에 있어서도 암의 완전한 퇴치보다는 생존기간을 연장시키는 정도의 효과만 보이고 있으며 재발률 역시 매우 높은 실정이다. 더욱이 항암제를 이용한 화학요법(chemotherapy)과 방사선을 이용한 방사선 요법(radiotherapy)을 통한 종양 치료는 이미 잘 알려진 것처럼 심한 부작용을 동반한다는 단점을 지니고 있다. 최근에는 화학요법의 부작용을 줄이기 위하여 인체의 면역기능 강화를 통하여 암을 치료하

책임저자 : 이왕재, 서울대학교 의과대학 해부학교실
☎ 110-799, 서울시 종로구 연건동 28
Tel: 02-740-8208, Fax: 02-741-8202
E-mail: kinglee@snu.ac.kr

This work was supported by a grant from the Cheju National University Medical Research Fund (1998).

고자 하는 면역요법(immunotherapy)이 진행되고 있는 추세이나 아직까지 괄목할 만한 성과를 거두지 못하고 있는 것이 현실이다(4-5). 따라서 암의 효과적인 치료를 위하여 기존 치료법에서 한 단계 발전된 새로운 시각에서의 치료법 개발뿐 아니라 조기 발견을 위한 효과적 진단법의 개발이 절실하게 요구되고 있는 실정이다.

현재 alpha-fetoprotein (AFP) 및 carcinoembryonic antigen (CEA) 등과 같은 종양항원을 대상으로 하는 항체들이 암의 조기 진단을 위하여 사용되고 있으나 이들 항체의 경우 암세포에만 특이적으로 반응하지 않고 체내의 다른 물질과 교차 반응을 함으로써 진단에서의 착오를 일으킬 수 있다(6-8). 또한 일부 암의 경우 말기가 되어서야 존재여부가 판단이 되는 등 암의 조기 진단에 사용하기에는 여러 가지 어려운 점이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 암의 조기 진단에 사용할 수 있는 적절한 종양항원 또는 종양표지인자를 찾아내고 이를 이용한 조기 진단 시스템의 구축이 절실히 요구된다.

본 연구진은 B세포 발달단계에 관한 연구를 수행하던 중, 사람 혈액 내의 단핵세포만을 분리해 다중활성 자극원(polyclonal activator)을 이용하여 활성화시킬 경우, 활성화 림프구 표면에서 특이적인 발현을 보이는 새로운 활성화 림프구 표면항원이 발현된다는 사실을 관찰한 바 있으며, 이 새로운 단백질을 CM1 (centrocyte/blast marker-1)이라 명명한 바 있다. 이후 CM1의 기능과 발현 분포에 관해 수행된 많은 연구 결과들을 통하여 CM1이 종자중심(germinal center)에서의 B세포 발달과정에 있어서 중요한 역할을 한다는 사실을 보고한 바 있다(9-10).

한 가지 흥미로운 사실은 정상세포의 경우 활성화된 B, T, NK세포에서만 발현되고 세포주에서는 Raji, Ramos, IM-9과 같은 B세포 유래 림프종 세포의 표면과 한국인에게서 빈번하게 발생하는 것으로 알려진 위암과 간암 세포주에서도 높게 발현된다는 것이다. 이는 CM1이 종자중심 B세포 발달과정 동안의 B세포 표면항원으로서의 역할과 더불어 종양세포의 종양 표면항원 또는 종양 표지인자로도 사용될 수 있음을 의미한다. 따라서 본 연구를 통하여 이전의 연구에서 종양항원 또는 종양표지인자로서의 사용가능성이 이미 확인된 CM1을 이용하여 종양의 효과적 조기 진단에 이용될 수 있는 CM1 ELISA kit의 개발 가능성을 알아보려고 한다.

재료 및 방법

세포주와 세포배양. 간암세포주로 Hep3B, 위암세포주로 SNU-1, SNU-620, 흑색종세포주로 SK-MEL2, 혈액암 세포주로 Raji, Ramos, IM9을 세포은행으로부터 분양받아 10% 우태아혈청(FBS)이 첨가된 RPMI1640 (penicillin, streptomycin 첨가) 배양액에서 배양하였다. CM1이 발현하지 않는다고 이미 알려진 Jurkat은 음성대조군

(negative control)으로 사용하기 위해 배양하였다.

종양세포주 표면에서의 CM1 발현 확인. 종양세포주 각각의 표면에서의 CM1 발현 유무를 알아보기 위하여 FITC가 결합된 항-CM1 항체를 이용한 유세포 분석(flow cytometry analysis)을 수행하였다. 각 종양세포주를 5×10^5 으로 맞춘 다음 1 μ g/ml의 농도로 FITC가 결합된 항-M1 항체와 함께 4°C에서 30분간 반응시켜 주었다. 그 후 인산완충용액으로 3회 세척한 다음 유세포 분석을 시행하여 세포 표면 CM1의 발현 정도를 알아보았다.

분비형(soluble) CM1의 확보. 분비형(soluble) CM1 확보를 위해 B림프구 유래 암세포주인 Raji를 우태아 혈청이 포함되지 않은 배양액(serum free media)에서 배양하여 배양액만 얻은 다음, Protein A-agarose bead에 항-CM1 항체를 부착시킨 column을 이용하여 분비형 CM1을 분리하였다. 분리된 분비형 CM1은 ELISA kit의 조건을 확립하는 데 사용되었다.

CM1 ELISA kit의 제작. 암의 조기진단을 위한 CM1 ELISA kit은 indirect ELISA 방식에 근거를 두고 제작하고자 하였다. 다시 말해서, CM1이 포함되어있는 혈청이나 세포성분을 96-well plate에 4°C에서 overnight로 부착시킨 뒤, 소혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)으로 blocking 한 다음, mouse anti-human CM1 mAb를 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 잔여 항체를 0.1% PBST로 3회 씻어준 다음, 2차 항체로 biotinylated goat anti-mouse IgG를 결합시켰다. 다시 0.1% PBST로 3회 씻어 준 다음, 3차 항체인 biotinylated donkey anti-goat Ig를 결합시키고 Streptavidin-AP (alkaline phosphatase)와 p-nitrophenylphosphate (p-NPP)를 차례로 반응시키고 이 때 나타나는 발색반응의 정도를 ELISA reader를 이용하여 판독하였다. **혈청에서의 albumin의 제거.** 정상인과 암환자로부터 얻은 혈액에서 혈청만을 얻은 후 Montage albumin depletion kit (millipore 제품)를 이용하여 혈청 내 알부민의 제거를 시도하였다. 우선 혈청 20 ul를 kit 내에 들어있는 equilibration buffer 180 ul와 섞어주고 이와 동시에 사용할 column 역시 equilibration buffer 400 ul로 채운 다음 2,000 rpm에서 2분간 원심하여 세척하여 주었다. 세척 후 희석된 혈청을 column에 넣고 2회에 걸쳐 2,000 rpm에서 2분간 원심한다. 이 과정을 통하여 혈청 내 알부민은 제거되며 column 통과 후 tube에 모아진 혈청만을 새로운 tube에 옮겨 실험에 사용하였다.

결과

암세포주 세포 표면 CM1 발현 확인. 위암, 간암, 림프종, 악성흑색종에서의 CM1의 발현을 확인하기 위해 각 세포주 표면에서의 CM1 발현을 유세포분석기로 확인하였다. 그 결과, 림프종 세포주인 Raji, Ramos와 다발성 골수종 세포주인 IM-9에서 높게 발현됨을 확인하였다.

또한, 간암 세포주인 Hep3B와 위암세포주인 SNU-620, SNU-1과 악성흑색종 세포주인 SK-MEL2에서도 CM1이 발현됨을 확인하였다. 그러나 T세포 유래 백혈병 세포주

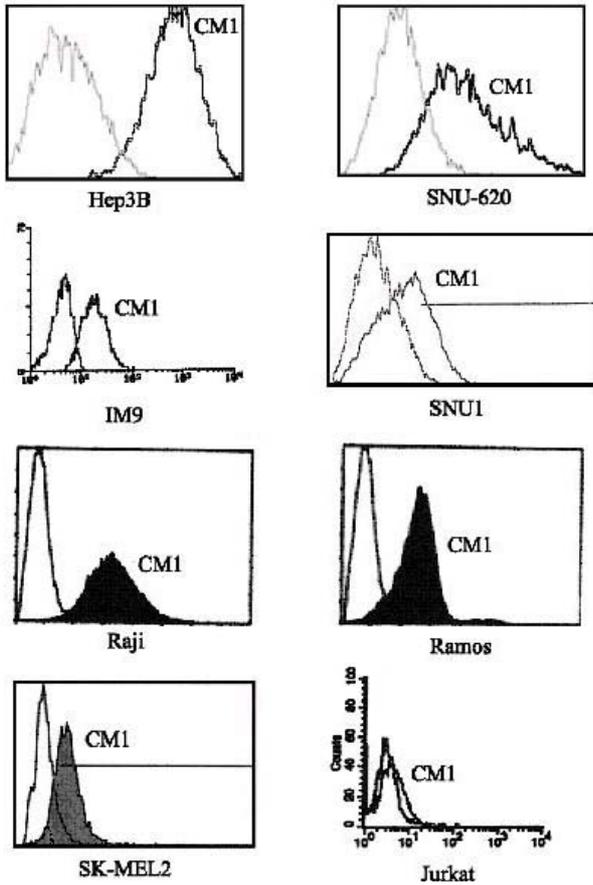


Figure 1. Expression of CM1 on several tumor cell lines. CM1 expression was investigated on hepatoma (Hep3B), stomach cancer (SNU-1 and SNU-620), myeloma (IM9), B cell lymphoma (Raji and Ramos), melanoma (SK-Mel2), and T cell leukemia (Jurkat) by flow cytometry analysis. Cells (1×10^5) were stained by FITC-conjugated anti-CM1 mAb ($1 \mu\text{g}$) on ice for 30 min. After washed twice with cold PBS, CM1 expression on their surface was examined by flow cytometry.

인 Jurkat에서는 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

종양세포주의 분비형 CM1 (soluble CM1) 존재 확인.

종양의 효과적 조기 진단을 위해 사용되는 종양항원 또는 종양표지인자가 가져야 할 조건은 종양세포 표면에서 발현됨과 동시에 종양세포로부터 분비되어야 한다는 것이다. 따라서 종양세포 표면 CM1 발현이 이미 확인된 종양세포로부터 CM1이 분비되는지의 여부를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위하여 Raji와 IM-9의 세포배양액을 얻어 항-CM1 항체와 실온에서 30분간 반응시켜 준 다음 Raji세포와 IM-9세포와 다시 반응시킨 후 유세포 분석을 실시하였다. 그 결과 Raji와 IM-9 세포배양액과 미리 반응 시켜주지 않은 항-CM1 항체를 처리한 세포군에 비해 세포배양액과 30분간 먼저 반응시킨 항-CM1 항체를 처리한 세포군에서 항-CM1 항체와 종양세포 표면 CM1과의 반응이 현저하게 떨어지는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이상의 결과는 세포배양액 내에 존재하는 CM1과 동일한 epitope를 가진 물질이 항-CM1 항체의 항원 결합부위에 먼저 결합하였기 때문에 나타난 현상이라 할 수 있으며 이는 결국 막단백형 CM1과 동일한 epitope를 가지면서 세포로부터 분비되는 분비형 CM1이 존재함을 의미하는 결과이다.

CM1 측정을 위한 ELISA 시스템 구축.

암세포로부터 분비되는 분비형 CM1 (soluble CM1)의 측정을 위한 ELISA 시스템의 구축을 위해 CM1을 표면에 많이 발현하는 것으로 확인된 Raji세포 배양액으로부터 ELISA 시스템의 항원으로 사용할 분비형 CM1을 확보하였다. 이때의 음성대조군으로는 CM1을 발현하지 않는 것으로 확인된 Jurkat의 배양액을 사용하였다. 우태아 혈청이 포함되지 않은 배양액에서 Raji와 Jurkat 세포를 배양한 뒤, 원심분리하고 상층액을 10배 농축하였다. 농축 상층액의 단백질농도를 측정하고 다음, 이를 배수(1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/650)로 희석하여 96 well-plate 상에 4°C에서 overnight로 부착시킨 후 ELISA를 수행한 결과, CM1을 발현하지 않는 것으로 확인된 Jurkat세포의 배양액에서는 희석배수에 관계없이 낮은 수준의 상대

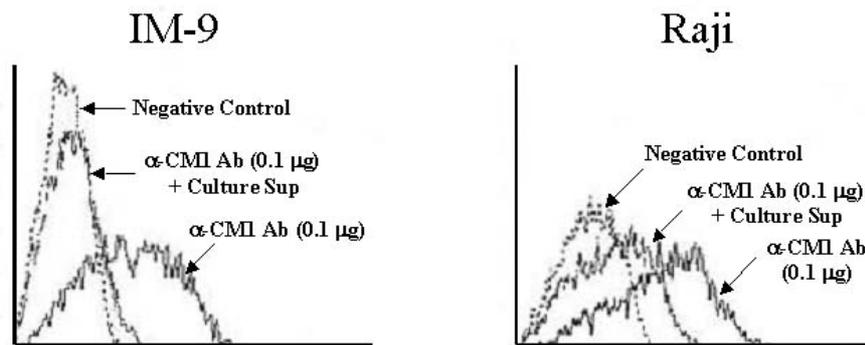


Figure 2. Analysis of soluble CM1 production from IM-9 and Raji.

Raji and IM-9 (1×10^5) were cultured in serum free media for 24 hrs and then culture supernatants were collected. After anti-CM1 mAb ($0.1 \mu\text{g}$) were pre-incubated with the serum free-culture supernatant of Raji and IM-9 cells for 1 hr at RT, and then added to Raji and IM-9 cells. Cells and antibody mixture were placed on ice for 30 min. After washed twice with cold PBS, CM1 expression on their surface was examined by flow cytometry.

흡광도를 확인하였다. Raji세포 배양액의 경우 75~150 μg 사이의 항원 농도에서 가장 높은 상대 흡광도를 나타내고 희석배수에 따라 상대 흡광도가 감소됨을 확인하였다(Fig. 3).

위암환자와 정상인 혈청 내 CM1 발현도 측정. 분비형 CM1을 대상으로 하는 CM1 ELISA kit의 임상적 적용 가능성을 알아보기 위해, 한국인에서 가장 흔한 종양인 위암을 대상으로 하여 실험을 진행하였다. 서울대학병원에서 얻은 위암환자의 혈청을 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10,000, 1/100,000

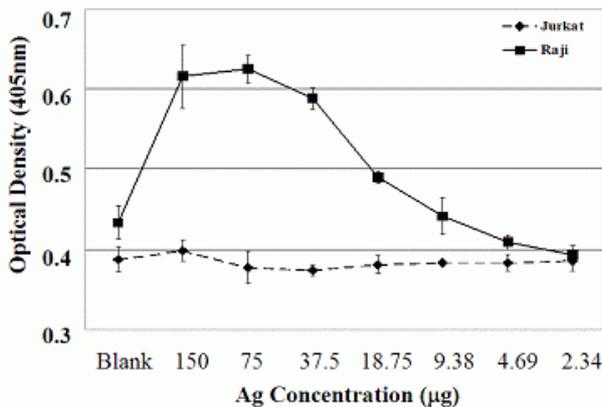


Figure 3. Determination of optimal condition for CM1 ELISA. Soluble CM1 was purified by using anti-CM1 mAb coupled Protein A column. After measuring the concentration of soluble CM1 and then coated onto 96-well ELISA plate by two fold serial dilution at 4°C, overnight. For the detection of soluble CM1, anti-CM1 mAb (primary antibody), goat developed anti mouse IgG (secondary antibody) and donkey developed anti goat Ig (tertiary antibody) were used. Results are representative of three experiments and each performed in triplicates. Values are the mean \pm SD.

으로 희석하고 96 well-plate상에 4°C에서 overnight로 부착시켰다. 이 때, 음성대조군(negative control)으로는 Jurkat세포 배양액을, 양성 대조군 (positive control)으로는 Raji세포의 배양액을 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80으로 희석하여 사용하였다. 그 결과 1/1,000의 희석비율을 중심으로 하여 이보다 더 높은 희석비율과 더 낮은 희석비율에서는 상대 흡광도가 낮아지는 것으로 보아 1/1,000의 희석배수가 가장 효과적임을 알 수 있었다(Fig. 4A). 그러나 정상인의 혈청을 이용하여 같은 방법으로 시행한 ELISA를 시행한 경우에도 위암환자의 혈청을 이용한 경우와 거의 유사한 형태의 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 4B).

항 CM1항체의 혈청 알부민(albumin)과 CM1의 교차반응. 앞선 그림 3에서의 결과는 본 연구에서 사용한 항-CM1 항체와 정상인과 위암환자의 혈청 내에 공통적으로 존재하는 물질간의 교차반응(cross-reactivity) 가능성을 제시하는 결과라고 하겠다. 사람 혈청 내에는 다양한 종류의 단백질이 존재하며 이 중에서 알부민(albumin)이 가장 많은 부분을 차지하는 것으로 알려져 있다. 따라서 혈청 내 알부민이 항-CM1 항체와 교차반응을 일으킬 가능성이 높을 것으로 생각하고 이를 확인하기 위해 사람의 알부민과 구조적으로 동일한 것으로 알려진 우(牛)혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)을 이용하여 앞의 실험과 동일한 조건으로 ELISA를 수행하였다. 2차 항체와 3차 항체만을 처리한 실험군에서는 BSA의 농도와 상관없이 상대흡광도의 증가가 관찰되지 않았으나, 항 CM1항체를 반응시킨 실험군에서는 상대흡광도의 현저한 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 따라서 항 CM1항체가 혈청 내의 CM1뿐 아니라 혈청 내 알부민과도 강하게 교차반응함을 알 수 있었다.

혈청 내 알부민 제거방법 확립을 통한 ELISA 시스템

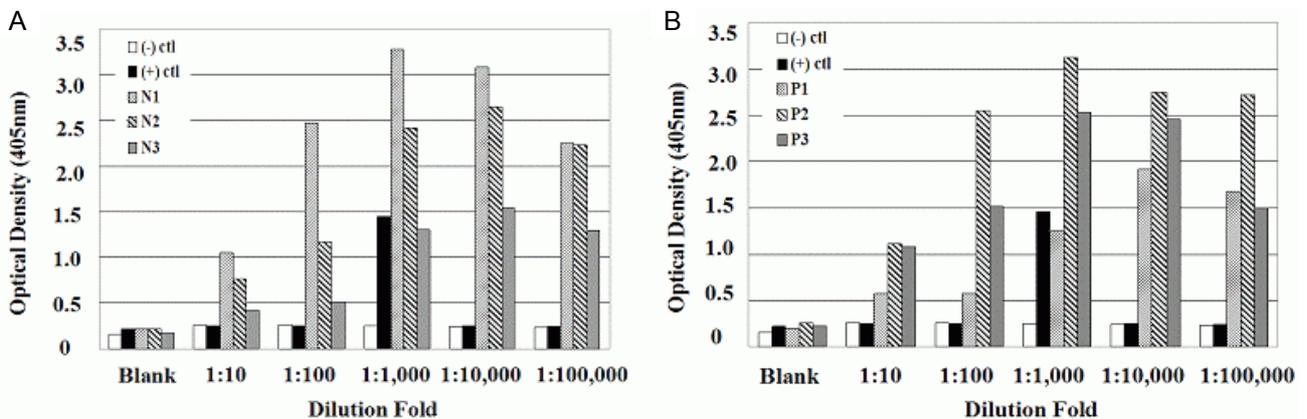


Figure 4. Detection of CM1 in normal individuals (A) and cancer patients (B), and then coated onto 96-well ELISA plate by ten fold serial dilution at 4°C, overnight. For the detection of soluble CM1, anti-CM1 mAb (primary antibody), goat developed anti mouse IgG (secondary antibody) and donkey developed anti goat Ig (tertiary antibody) were used. Results are representative of three experiments and each performed in triplicates. Values are the mean \pm SD.

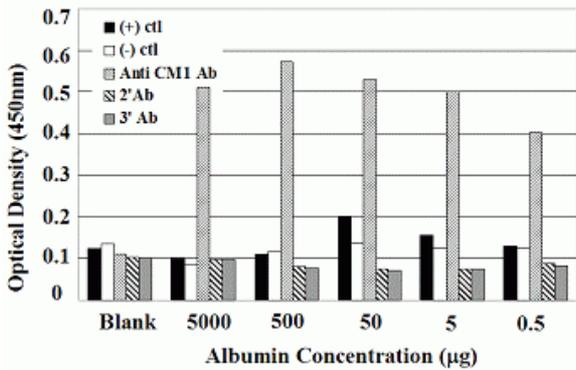


Figure 5. Cross-reactivity of anti-CM1 mAb with albumin. Bovine serum albumin was coated onto 96-well ELISA plate by ten fold serial dilution (5,000, 500, 50, 5, and 0.5µg) at 4°C, overnight. To investigate whether anti-CM1 mAb shows cross-reactivity with albumin, anti-CM1 mAb (primary antibody), goat developed anti mouse IgG (secondary antibody) and donkey developed anti goat Ig (tertiary antibody) were used. Results are representative of three experiments and each performed in triplicates. Values are the mean±SD.

의 개선. 지금까지의 결과를 토대로 하여, 혈청 내 CM1의 측정을 통한 종양발생 유무를 알아보기 위한 CM1 ELISA 시스템의 효율적인 구축을 위해서는 혈청 내 알부민의 효과적 제거 방법의 확립이 선결되어야 함을 알 수 있었다. 이를 위하여, millipore사로부터 Albumin depletion spin column을 구입하여 정상인과 암환자에서 얻은 혈액에서 혈청 내 알부민을 제거하고 이를 coating하여 ELISA를 시행하였다. 우선, 혈청 내 알부민 제거 시도 후 항-알부민 항체(anti-albumin mAb)를 이용한 ELISA 결과를 통하여 알부민의 제거가 성공적으로 이루어진 것을 확인하였고, 항-CM1 항체를 이용한 ELISA 결과를 통하여 정상인과 암환자간의 특이적인 CM1 발현도 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

암은 일단 발생된 후에 표면의 MHC class I의 표현을 감소시키거나, 분비형 Fas 리간드(soluble Fas ligand)를 분비하는 등의 여러 가지 기전을 통해 면역계로부터 회피하여 전신으로 전이가 진행하게 된다(11-13). 그러나 조기에 발견할 경우 완전한 퇴치가 가능하며 생존율 또한 급상승시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 암 발생 이전단계 또는 암 발생 초기 단계에서의 적절한 진단 방법의 확립은 반드시 필요하다. 현재 암의 조기 진단을 위해서 주로 사용하는 방법이 alpha-fetoprotein (AFP) 및 carcinoembryonic antigen (CEA)과 같은 단백질을 이용한 방법이다. 이 방법의 경우, 저렴한 비용으로 손쉽게 암 발생 여부를 알아볼 수 있다는 장점이 있으나, 이들에 대한 항체가 체내의 다른 물질과 교차반응을 보이기도

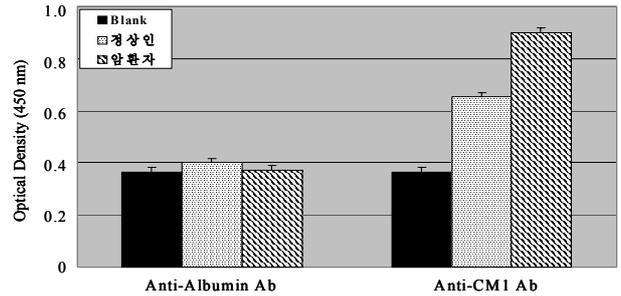


Figure 6. CM1 ELISA after depletion of serum albumin by spin column. Serum albumin was depleted from the serum of normal individuals and cancer patients by albumin depletion spin column (Millipore Inc.). And then serum was coated onto 96-well ELISA plate by ten fold serial dilution at 4°C, overnight. For the detection of CM1, anti-CM1 mAb (primary antibody), goat developed anti mouse IgG (secondary antibody) and donkey developed anti goat Ig (tertiary antibody) were used. Results are representative of three experiments and each performed in triplicates. Values are the mean±SD.

하며 또한 전체적인 종양을 대상으로 하지 못한다는 단점을 지니고 있다. 그러나 본 연구에서 대상으로 하는 CM1의 경우, 정상 림프구에서는 발현되지 않으나 활성화된 B, T, NK세포와 다양한 암세포의 표면에서 발현되며 또한 분비형(soluble)의 존재가 확인된 바 있다. 따라서 다양한 암을 대상으로 하는 암의 조기 진단에 사용될 수 있는 가능성이 충분한 물질이라고 하겠다. 특히, 우리나라 사람에게 많이 발생하는 위암과 간암에서 CM1이 높은 발현을 보이고 있다는 사실은 한국 사람을 대상으로 하는 종양 조기 진단 kit의 개발에 CM1의 효용가치가 대단히 높음을 의미한다고 하겠다.

그러나 기존의 alpha-fetoprotein (AFP) 및 carcinoembryonic antigen (CEA)과 이들에 대한 항체를 이용한 종양 조기 진단 kit에서 나타났던 문제점과 동일하게 항-CM1 항체가 혈청 내의 알부민과 높은 교차반응을 보였기 때문에(Fig. 4) 이를 극복하기 위해서 CM1과 이에 반응하는 항-CM1 항체간의 결합 특이성을 높이는 과정에 대한 연구가 좀 더 면밀하게 진행되어야 하였으며 Fig. 5에서 보여준 바와 같이 알부민만을 특이적으로 제거하는 spin column을 이용하여 CM1과 항-CM1 항체간의 특이적인 결합을 높인 바 있다. 그러나 이 역시 정상인의 경우 음성대조군에 비해 높은 양성 반응을 보였기 때문에 알부민 특이 제거 spin column과 함께 병행하여 사용할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요할 것으로 사료되며 고려하여 보아야 할 만한 사항들은 다음과 같다.

우선적으로 고려하여 볼 만한 것이 CuSO₄와 Tannin을 이용한 침전법이다(14-18). 이 두 물질의 공통적인 특징은 용액 내의 알부민과 특이적인 결합을 하여 침전물을 형성한다는 것이다. 즉, 충분한 양의 Copper 또는 Tannin

과 알부민 제거 spin column을 이용하여 1차적으로 대량의 알부민을 제거시킨 정상인과 암환자의 혈청을 혼합하여 spin column 사용 후에도 잔존하는 혈청 내 알부민을 침전물의 형태로 제거시킨다는 것이다. 그 후, 항 CM1 항체를 이용하는 ELISA를 시행할 경우 CM1과 항-CM1 항체간에 좀 더 높은 특이적 결합을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

CM1을 이용한 ELISA kit의 정확도를 높임과 함께 ELISA 시스템의 전환 또한 병행하여 진행하여야 할 필요성이 있다. 다시 말해서, 본 연구에서 제시한 ELISA 시스템은 indirect 방법으로 plate에 항원을 먼저 coating 한 후에 1차, 2차 항체를 사용하는 방식이다. 이 경우 Fig. 2와 3에서 보여준 바와 같이 사용된 항원의 희석농도에 따라 반응 결과가 달라지며 또한 비특이적 위양성 반응이 sandwich 방법에 비해 높게 나타나는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 보여준 결과들을 그대로 재현할 수 있거나 또는 좀 더 특이적인 반응결과를 나타낼 수 있도록 현재의 indirect ELISA 시스템에서 sandwich ELISA 시스템으로의 전환이 요구된다. 이를 위해서 CM1에 좀 더 높은 특이적 반응을 보이는 새로운 단클론(monoclonal) 항체와 다클론(polyclonal) 항체를 제작하고자 항원을 순수 분리, 정제하는 작업이 현재 진행 중에 있다.

현재까지는 연구결과를 토대로 하여 볼 때, 건강한 정상인의 경우에 있어서도 혈청 내에 분비형 CM1이 존재할 가능성을 배제할 수는 없다. 따라서 많은 수의 건강한 정상인 혈액을 확보하고 건강한 정상인의 경우도 분비형 CM1을 혈청 내에 보유하고 있는지의 여부와 암환자와의 양적인 차이 등에 관한 연구를 수행하여 암의 조기 진단에 있어서의 CM1 발현도에 따른 양성판정기준 확립 또한 필요할 것으로 사료된다.

적절한 발색시스템의 선택 및 조건 확립 또한 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 발색시스템으로 strepto-avidin-AP (alkaline phosphatase)와 p-nitrophenylphosphate (p-NPP)를 이용하였다. 그러나 본 연구의 결과에서는 제시하지 않았으나 streptoavidin-HRP (horse radish peroxidase)와 tetramethyl benzidine (TMB)를 이용한 발색반응의 경우 배경발색이 훨씬 적고 반응감도는 더 나은 것으로 확인된 바 있으므로 향후 진행될 실험에서는 streptoavidin-HRP, TMB 발색반응 시스템으로 전환하고자 한다.

참 고 문 헌

- Park MA, Volcheck GW, Guarderas JC: Successful progressive challenge after a cutaneous reaction to imatinib mesylate (Gleevec): a case report and review of the literature. *Allergy Asthma Proc* 25;345-347, 2004
- Kaneko T, Goto S, Kushima Y, Miyamoto Y, Eriguchi M, Nieda M, Egawa K: A report of three patients treated with immunocell therapy with imatinib mesylate. *Anticancer Res* 24;3303-3309, 2004
- Meier A, Reker S, Svane IM, Holten-Andersen L, Becker JC, Sondergaard I, Andersen MH, Thor Straten P: Spontaneous T-cell responses against peptides derived from the Taxol resistance-associated gene-3 (TRAG-3) protein in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 54;219-228, 2005
- Eklund JW, Kuzel TM: A review of recent findings involving interleukin-2-based cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 16; 542-546, 2004
- Riddell SR: Finding a place for tumor-specific T cells in targeted cancer therapy. *J Exp Med* 200;1533-1537, 2004 PMID: 15611285 [PubMed-indexed for MEDLINE]
- Han SL, Zhu GB, Yao JG, Lan SH, Shao YF: Diagnosis and surgical treatment of primary hepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 52;348-351, 2005
- Schmidt LE, Dalhoff K: Alpha-fetoprotein is a predictor of outcome in acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 41;26-31, 2005
- Berber E, Pelley R, Siperstein AE: Predictors of survival after radiofrequency thermal ablation of colorectal cancer metastases to the liver: a prospective study. *J Clin Oncol* 23;1358-1364, 2005
- Kim D, Hur DY, Kim YS, Lee K, Lee Y, Cho D, Kang JS, Kim YI, Hahm E, Yang Y, Yoon S, Kim S, Lee WB, Park HY, Kim YB, Hwang YI, Chang KY, Lee WJ: CM1 ligation initiates apoptosis in a caspase 8-dependent manner in Ramos cells and in a mitochondria-controlled manner in Raji cells. *Hum Immunol* 63;576-587, 2002
- Hur DY, Kim S, Kim YI, Min HY, Kim DJ, Lee DS, Cho D, Hwang YI, Hwang DH, Park SH, Ahn HK, Chang KY, Kim YB, Lee WJ: CM1, a possible novel activation molecule on human lymphocytes. *Immunol Lett* 74;95-102, 2002
- Zwart W, Griekspoor A, Kuijl C, Marsman M, van Rheenen J, Janssen H, Calafat J, van Ham M, Janssen L, van Lith M, Jalink K, Neeffes J: Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape. *Immunity* 22;221-233, 2005
- Mikyskova R, Bubenik J, Vonka V, Smahel M, Indrova M, Bieblova J, Simova J, Jandlova T: Immune escape phenotype of HPV16-associated tumours: MHC class I expression changes during progression and therapy. *Int J Oncol* 26;521-527, 2005
- Cho D, Song H, Kim YM, Houh D, Hur DY, Park H, Yoon D, Pyun KH, Lee WJ, Kurimoto M, Kim YB, Kim YS, Choi I: Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* 60; 2703-2709, 2000
- Li ZP, Fan SS, Zhang LN, Wang FC: Time-resolved chemiluminescence technique for the microdetermination of proteins based on their complexation with copper (II). *Anal Sci* 20;1327-1331, 2004
- Filipe P, Morliere P, Patterson LK, Hug GL, Maziere JC, Freitas JP, Fernandes A, Santus R: Oxygen-copper (II) interplay in the repair of semi-oxidized urate by quercetin bound to human serum albumin. *Free Radic Res* 38;295-301, 2004
- Nakano E, Williamson MP, Williams NH, Powers HJ: Copper-mediated LDL oxidation by homocysteine and related compounds depends largely on copper ligation. *Biochim Biophys Acta* 1688;33-42, 2004
- Ishida Y, Kitagawa K, Goto K, Ohtani H: Solid sampling technique for direct detection of condensed tannins in bark by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19;706-710, 2005
- Puchala R, Min BR, Goetsch AL, Sahl T: The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *J Anim Sci* 83;182-186, 2005