

同種 移植耐性の誘致에 關한 實驗*

서울大學校 醫科大學 外科學敎室

(主任 秦 柄 鎬 副敎授)

(指導 金 子 勳 敎 授)

金 宗 國

目 次

I. 緒 論

II. 實驗 動物

III. 實驗材料 및 實驗方法

1. 生存脾細胞液의 調製

1) 脾細胞液

2) 全 血

2. 細胞液의 注入

3. 皮膚移植

IV. 實驗 成績

1. 脾細胞液의 初生期注射를 實施한

動物에서의 移植皮膚의 經過

2. 全血의 初生期注射를 實施한 動

物에서의 移植皮膚의 經過

V. 總括 및 考按

VI. 結 論

文 獻

英 文 抄 錄

I. 緒 論

1953年 Billingham等¹⁾은 Felton²⁾의 Immunoparalysis의 原理에 着眼하여 mouse의 子宮內胎兒에게 同種 生存脾細胞를 注射하고 그 胎兒가 出產하여 成長한 後에 同一한 脾細胞給與動物의 皮膚를 移植하였든 바 移植皮膚는 長期間 또는 永久히 注射動物에게 生着하는 事實을 보고, 이같은 處置에 依하여 動物이 同種移植를 받아 들이는 狀態를 能動性 獲得性 同種移植耐性(Actively Acquired Homograft Tolerance)이라고 稱하였다.

以來 Woodruff³⁾等 및 Egdahl等⁴⁾은 Rat에서 同一한 處置에 依하여 類似한 成績을 보았고,金子勳⁵⁾은 同種脾細胞代身에 同種全血을 使用하여서 脾細胞와 同一한 結果를 얻었다고 하였다.

著者は 高等哺乳動物인 犬에서도 이와같은 同種移植耐性이 誘致되는 것인가를 보고져 이 實驗을 하였다. 即 著者は 同種生存脾細胞 또는 同種全血을 出產直後의 初生犬에게 注射하고 注射動物이 成長한 後에 當該細胞給與犬의 皮膚를 移植하고 移植皮膚의 經過를 觀察하여 아래의 成績을 얻었기 이에 報告하는 바이다.

II. 實驗 動物

細胞 및 移植受得動物로서 3匹의 妊娠한 Mongrel犬에서 出產한 仔犬 合計 20匹을 使用하였고, 細胞 및 移

植給與動物로서는 3匹의 Shepherd 牡犬을 使用하였다. 또 對照로서 移植給與動物로 任意的 Shepherd 牡犬 또는 Mongrel 牡犬과 當該母犬 및 同一 Litter의 同胞犬을 使用하였다.

III. 實驗材料 및 實驗方法

1. 生存脾細胞液의 調製

1) 脾細胞液

脾細胞液은 Egdahl⁴⁾金子勳⁵⁾等의 方法에 따라서 調製하였다. 即 給與犬인 Shepherd犬을 Pentothal Sod. 으로 麻醉하고 一般 無菌의 外科處置에 따라서 開腹하여 脾一部를 摘出한 다음 摘出脾組織을 Scalpel로 亂刺하여서 實質內血液을 排除하고 또 Saline으로 數回洗滌하여 可及의으로 完全히 實質內血液을 除去한 後 脾組織 1.0 gm에 對하여 4.0c.c.의 比例로 Saline을 注加하고 다시 Saline 1.0cc.에 1滴씩의 Heparine을 添加한 다음 滅菌皿內에서 Scalpel과 Forceps로 細切壓挫하여서 纖維性 殘滓를 除去한 後 17 gauge, 19 gauge, 21gauge의 順序로 注射針을 通過하여 얻은 輕度の 血性色調를 띤 濃厚粘稠한 液體를 輸血用 金屬 Filter로 濾過하여 即時 使用하였다. 이같이 調製한 脾細胞液 1.0 Cu. mm의 有核細胞數는 11~17 Million이었다.

*本論文의 要旨는 1959年 大韓外科學會 第22次 外科集談會에서 發表하였음.

2) 全血

全血은 給與犬의 前足靜脈에서 採血하되 그 100cc.에 對하여 0.4gm.의 比率로 Sod. oxalate를 添加하여 採取直後에 使用하였고, 그 1.0cu.mm.中的 細胞數는 RBC 4~7 Million, WBC 15000-20000 이었다.

2. 細胞液의 注入

脾細胞液 및 全血은 各各 그 3.0cc.~5.0cc. 씩을 體重 250gm.~300gm.의 初生犬에게 出生後 18時間以內

에 그 腹腔內에 注射하였다.

3 Litters의 20匹의 注射初生犬中 脾細胞液 5.0cc.를 注射한 2匹과 3.0cc를 注射한 1匹 및 全血 5.0cc.를 注射한 1匹의 合計 4匹의 注射動物은 注射後 2日~5日에 死亡하였고 殘餘의 16匹은 生殘하여 잘 成長하였다. 只今 初生犬에게 注射한 脾細胞液 및 全血의 匹當注入量과 匹當 注入細胞數를 比較하여 보면 第1表와 같다.

<第1表> 脾細胞液 및 全血의 匹當注入量과 匹當注入細胞數의 比較

注入細胞種類	匹當注入細胞量 (單位c.c.)	匹當注入細胞數 (單位 10 ⁶)	初生犬番號																			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
脾	5	55000~255000																				
	3	33000~510000																				
全血	5	W.B.C 76~95																				
	3	45.6~57																				

3. 皮膚移植

給與皮膚片은 比較的 얇은 full-thickness graft를 얻기 爲하여 腹部皮膚를 使用하였다. 即 給與犬의 腹部를 剃毛하고 無菌의 處置下에 0.5% Procaine 局所麻酔를 한 後에 큰 矩形의 皮膚片을 皮下筋膜을 損傷하지 않도록 注意하여 남기면서 切取하여 Penicillin 및 Streptomycin을 包含한 Saline에 浸漬하여 두었다가 用에 臨하여 차례로 2.0cm×3.0cm.의 크기로 分切하여 移植에 供하였다.

移植의 時期로는 注射動物의 年齡이 注射後 40~56日에 達하였을 때를 擇하였고 各 動物마다 Ether 點滴麻酔下에 그 背柱兩側을 剃毛清拭하고 一般無菌法에 따라서 胸部 및 臀部의 兩側에 約 4.0cm 間隔을 두면서 合計 5個의 2.0cm×3.0cm의 皮膚剝離創을 만들고 即時 各創面마다 細胞給與犬의 皮膚, 任意犬의 皮膚, 母犬皮膚, 同一 Litter의 同胞間의 皮膚 및 自家皮膚의 5個의 皮膚片을 移植하도록 하였다. 그리고 給與皮片의 生毛方向은 受得者의 그것과 反對方向으로 되도록 하였다.

移植은 4~0 絹絲로 結節縫合을 하고 皮膚片의 中心部에는 受得部創底에 이르는 1個의 結節縫合을 添加하여서 皮片의 固定을 確實히 하였다.

術後에는 移植마다 3重의 Gauze片을 놓고 이것을 두꺼운 布片으로 덮고 그 四隅를 受得者皮膚에 縫合 固定하여서 移植部의 汚染 및 咬吮을 防止하였고 各動物마다 隔離하여 飼育하면서 以後 每日 或은 隔日로 綑帶 交換을 하고 移植局所의 所見을 觀察하였다.

IV. 實驗成績

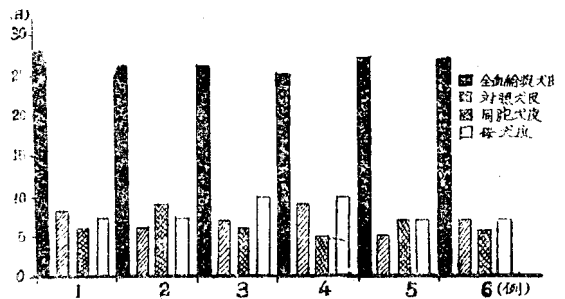
移植全例 16匹의 動物中 細胞給與犬의 死亡으로 移植을 못한 3匹과 實驗途中에 創傷傳染을 일으킨 1匹을 除外한 2 Litters의 12匹에서 觀察한 移植皮膚의 經過는

아래와 같다.

1. 脾細胞液의 初生期注射를 實施한 動物에서의 移植皮膚의 經過

脾細胞液을 注射한 2 Litter中的 6匹의 移植動物에 있어서는 Litter와 性別에 關係없이 全例에서 細胞給與犬

<第2表> 脾細胞의 初生期注射를 한動物에서의 移植皮膚의 生着期間



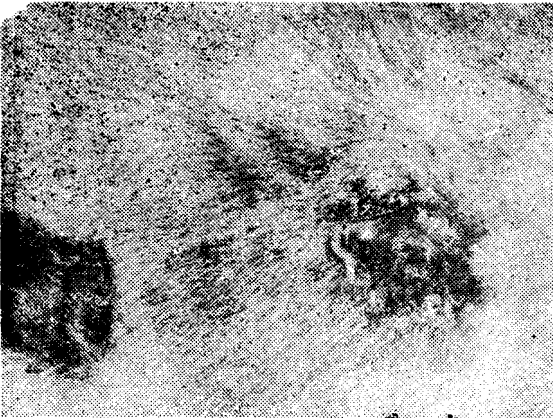
의 移植皮膚는 移植後 3日~7日間은 輕度の 浮腫性腫脹과 함께 暗赤色調를 보이다가 그 後부터는 自家移植과 다름없이 術後 第3週末까지는 第2表 및 第1圖에서 보는 바와 같이 宿主에게서 잘 生着을 持續하였다. 그러나 術後 第4週에 이르러면 移植皮膚는 徐徐히 그 面積을 縮小하고 第5週에 이르러서 부터는 漸進的으로 落屑과 함께 生毛脫落 毛孔消失等의 退行性變化를 일으켜서 皮膚外觀을 喪失하고 마침내 宿主에게 吸收 消失되어 點狀의 痕痕을 남기게 된다. 이와같은 移植皮膚의 經過는 脾細胞液 5.0cc를 注射한 動物과 3cc를 注射한 動物間에 大差를 볼 수 없었다.

移植皮膚가 그 面積을 縮小하면서도 皮膚外觀을 잘 維持하는 時期까지를 生着期間으로 看做하면 脾細胞給與動物의 皮膚의 生着期間은 23日~28日로서 6例의 平均은 26.5日이 된다.

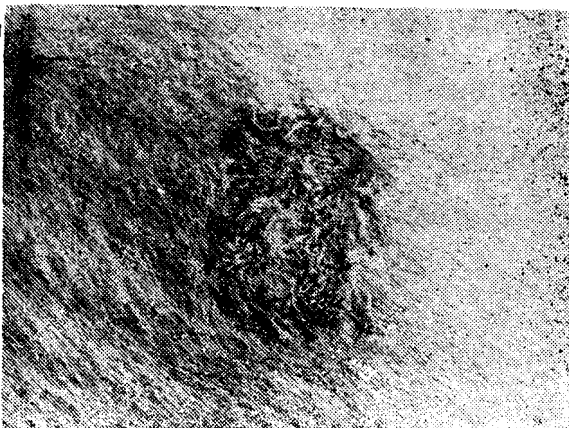
이에 反하여 對照로서 細胞給與者皮膚와 同時에 同一 受得動物에게 移植한 任意의 無緣犬인 Shepherd 牡犬 或은 Mongrel 牡犬의 皮膚는 第2表, 第2圖 및 第3圖



[第1圖] 細胞의 初生期注射를 한 犬에 移植한 當該給與犬의 皮膚(術後 第22日)



[第2圖] 脾細胞注射한 犬에서의 同胞皮膚 (左) 및 任意의 無緣犬皮膚 (右) (術後 第8日)



[第3圖] 脾細胞注射動物에서의 當該母犬의 皮膚 (術後 第8日)

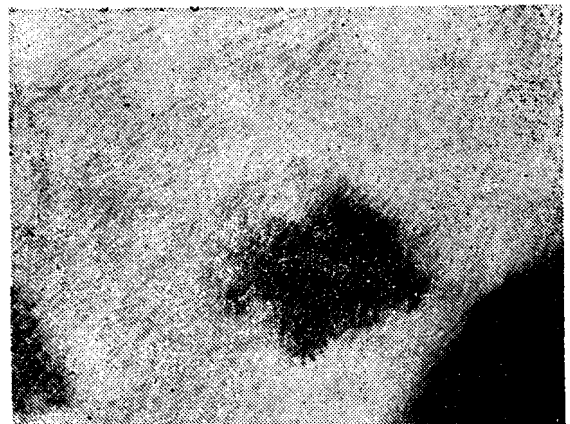
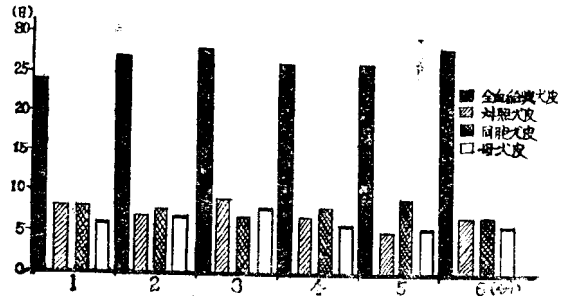
와 같이 6匹의 全例에서 移植後 1週日以內에 壞死에 빠저서 崩潰하였으며 母犬의 皮膚나 同一 Litter의 同胞間의 皮膚交叉移植도 또한 術後 10日内外에 崩壞落下하는 定型的인 同種移植拒否過程을 보였다.

2. 全血의 初生期注射를 實施한 動物에서의 移植皮膚의 經過

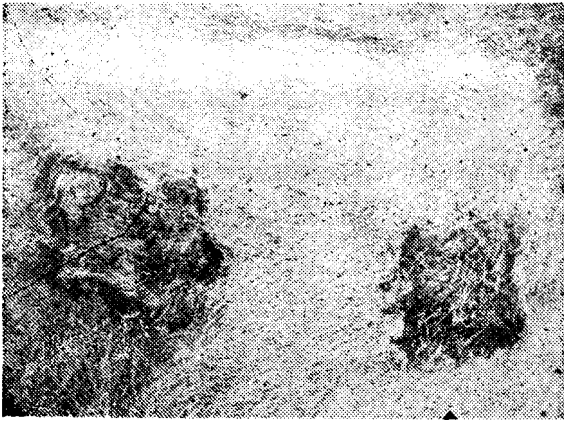
全血을 注射한 2 Litters 中の 6匹의 移植動物에 있어서도 Litter와 性別에 關係없이 全例에서 全血給與犬의 移植皮膚의 經過는 前項 脾細胞注射動物에서와 大差없이 第3表 및 第4圖와 같이 移植皮膚는 術後 22日-29日間 (6例의 平均 25.6日) 宿主에게 生着한 後에는 漸進的으로 退行性變化를 일으키면서 吸收 消失되었으며 全血의 注射量이 5.0cc.인 動物과 3.0cc.인 動物間에 差異를 보지 못하였다.

對照로서 同時에 同一受得動物에게 移植한 任意의 Shepherd 犬 或은 Mongrel 犬의 皮膚나 母犬皮膚 또는 同一 Litter의 同胞皮膚는 第5圖 및 第6圖와 같이 術後 1週~10日内外에 定型的의 拒否過程에 따라서 崩壞落下하였다.

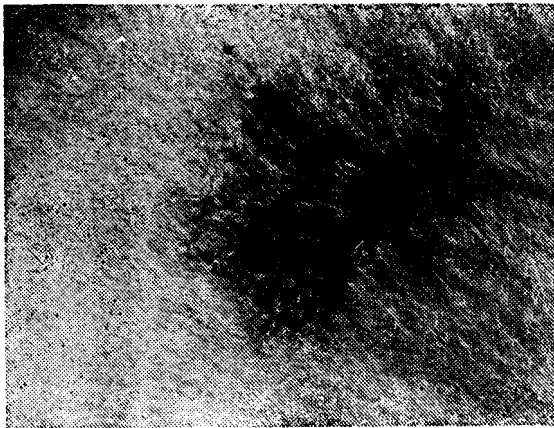
<第3表> 全血의 初生期注射를 實施한 動物에서의 移植皮膚의 生着期數



[第4圖] 全血의 初生期注射를 한 犬에 移植한 當該給與犬의 皮膚 (原給與皮膚는 黑色皮膚였음) (術後 第22日)



[第5圖] 全血를 注射한 犬에서의 同胞皮膚(左) 및 任意的 無緣犬의 皮膚(右)(術後 第8日)



[第6圖] 全血注射를 한犬에서의 當該母犬의 皮膚(術後 第8日)

V. 總括 및 考按

以上 實驗成績을 總括하여 보면 Mongrel 成犬에서 出生한 初生犬에게 그 出產 18時間以內에 Shepherd 成犬으로 부터 採取한 生存脾細胞 或은 全血를 腹腔內에 注射하고 注射動物이 生殘하여 成長한 後에 各各 同一한 脾細胞 或은 全血를 給與한 當該 動物의 皮膚를 移植하면 移植皮膚는 顯著히 그 生着을 延長하여서 移植後 3週以上이나 宿主에게서 生殘을 持續하는 것으로서 即 犬에서도 脾細胞 또는 全血의 初生期注射를 實施하면 皮膚移植에 對한 獲得性 同種移植耐性を 誘致할 수 있는 事實을 알 수 있다.

그리고 犬에서 誘致되는 同種移植耐性は 注射動物의 Litter 別과 性別에 關係없이 全例에서 볼 수 있는 것이었고 또 注射細胞가 脾細胞이거나 全血이거나 그 間에 差異를 보지 못하였다.

그러나 著者가 犬에서 初生期注射에 依하여 誘致한 同

種移植耐性は 그 程度가 一般的으로 弱하여서 移植皮膚는 宿主에서의 生着을 延長한 後에는 漸進的인 退行性變化에 依하여 宿主에게 吸收 消失되는 所謂 慢性拒否機轉에 따라서 拒否되는 것이었다. 그리고 對照로서 同一한 注射動物에게 移植한 任意的 無緣犬의 皮膚가 初期生着을 보인 後에 定型的 同種移植拒否過程에 따라서 拒否된 事實은 獲得性 同種移植耐性的 誘致가 給與者 特殊性인 것을 말하는 것이며 또 母犬皮膚나 同一 Litter의 同胞間의 皮膚移植이 無緣者에 있어서와 같이 崩壞한 것은 犬에서도 近親者 乃至 血族間의 同種移植은 不可能한 것을 意味하는 것으로 보겠다.

生存細胞의 初生期注射에 依하여 皮膚에 對한 同種移植耐性を 誘致한 報告를 보면 Billingham 等¹⁾은 Mouse에서 Woodruff 等³⁾ 및 Egdahl 等⁴⁾은 Rat에서 各各 脾細胞를 靜脈內 或은 腹腔內에 注射함으로써, 또 金子勳⁵⁾은 脾細胞以外에 冷藏全血의 腹腔內注射에 依하여서 各各 長期間 또는 永久的인 耐性を 誘致하였다고 한다. 그들은 注射細胞數가 많을 수록 耐性的 誘致率과 그 程度가 높아지는 것을 認定하고 있지만 만드이 細胞數의 多寡에 平行하는 것은 아니라고 하였다. 著者의 實驗에서 보면 脾細胞에 있어서 初生犬의 體重 gm當 注射細胞數는 110~170 Million 으로서 前者 報告者들의 Mouse나 Rat에 對한 注射細胞數에 比하여 顯著히 많았음에도 不拘하고 誘致된 耐性的 程度가 比較的 弱하였던 事實로 미루어 보아서 犬과 같은 高等哺乳動物에 있어서는 훨씬 많은 細胞를 要하는 것 같다.

全血의 要素中 所謂 移植免疫에 關係하는 細胞는 白血球 뿐인 것으로 알려져 있는데⁶⁾ 著者가 注射한 匹當 白血球數는 初生犬 體重 gm當 0.15~0.30 Million 으로서 脾細胞數에 比하여 極히 적었음에도 不拘하고 脾細胞注射動物에 있어서와 比等한 耐性を 誘致한 것을 보면 金子勳⁵⁾이 指摘한 바와 같이 全血中에서 耐性的 誘致에 關與한 것은 白血球만은 아닌 것으로 推測된다.

Puza & Gombos⁷⁾는 初生犬의 動靜脈을 通하여 그 血液 全部를 給與犬의 血液으로 置換할 뿐만 아니라 多量의 血液으로 灌流하는 "washing technique"를 利用하여 3個月 以上이나 給與皮膚의 生殘延長을 일으켰다고 하는데, 이것으로 미루어 高等哺乳動物에 있어서는 全血에 依하여 長期間의 獲得性耐性を 誘致하려면 極히 多量의 血液 乃至 白血球가 所要되는 것임을 推測할 수 있다.

VI. 結 論

1) 犬에 있어서도 脾細胞 或은 全血의 初生期注射에 依하면 高率에서 給與者 特殊性인 獲得性 同種移植耐性を 誘致할 수 있다.

2) 犬에서는 母體皮膚나 同胞間皮膚의 移植과 같은 近親間의 同種移植이 不可能하다.

REFERENCES

- 1) Billingham, R.E., Brent, L. & Medawar, P.B.:
Actively acquired tolerance of foreign cells. 172 :
603-606, 1953.
- 2) Felton, L.D., Kauffmann, G., Prescott, B & Ottinger,
B.:
Studies on the mechanism of immunological paralysis
induced in mice by pneumococcal polysaccharides. J.
Immunol. 74 : 17-26, 1955.
- 3) Woodruff, M.A.F. & Simpson, L.O.:
Induction of tolerance to skin homograft in rats by
injecting cells from prospective donor soon after
birth. Brit. J. Exp. 36 : 494-499, 1955.
- 4) Egdahl, R. H., Roller, F.D. & Varco, R.L.:
Studies on acquired tolerance to homografts & het-
erografts. Surg. Forum, Vol. 8, 1958.
- 5) Kim, J.H.:
Induction on Induction of Acquired Homograft Toler-
ance. J. Korean Surg. Assoc. Vol. 1, No. 2, Apr.,
1960.
- 6) Medawar, P.B.:
Relationship between antigen of blood & skin.
Nature. 157 : 161-62, 1946.
- 7) Puza, A.& Gombos, A.:
Acquired tolerance of skin homografts in dogs.
Transpl. Bull. P. 30, Vol. 5, No.1 Jan., 1958.

SUMMARY

Induction of Acquired Tolerance of Homologous Skin Grafts in Dogs.

Jong-Kook Kim, M. D.

Directed by

(Associate Prof. Ja Hoon Kim, M.D. F.I.C.S.)
*Dept. of Surgery, Graduate School of Medicine,
Seoul National University.*

Since Billingham's success of inducing acquired tole-

rance of homologous skin graft by prenatal injection of spleen cells in mice Woodruff et al and Egdahl et al also produced tolerance in rats injected postnatally with spleen cells, while Kim successfully induced tolerance by postnatal injection of refrigerated whole blood as well as spleen cells.

This study was performed to see whether postpartum induction of tolerance to homologous skin in dogs which are rather high phylogenetically can be produced by injecting whole blood as well as spleen cells.

Twenty puppies from 3 Mongrel mother dogs were used as recipients and 3 male adult Shepherd dogs were used as donors.

As the control animals an optional unrelated Shepherd dog or Mongrel dog, mother dogs and the same litter siblings were used.

Each recipient was injected intraperitoneally with 3.0cc-5.0cc of spleen cell suspension or whole blood from prospective donors on the day of birth and at the age of 40-56 days was grafted with skin of 2.0 cm. x 3.0 cm. from corresponding cell donors, optional dogs and siblings.

Of the 12 grafted dogs 2 animals of 2 litters injected with spleen cells showed prolonged survival of donor skin(23-28 days after grafting), followed by the chronic rejection; whereas the skin from unrelated donor and mother dog sloughed within the first postoperative week and the reciprocal skin grafts of the same litter animals were rejected within 10 days with the typical pattern of homograft rejection.

In animals of 2 litters injected with whole blood grafts from corresponding cell donors also survived for 22-29 days after grafting while the control grafts sloughed from 7-10 days postoperatively.