

# Freund's Adjuvants 및 그 組成因자의 血管增殖作用에 關하여\*

서울大學校 醫科大學 外科學教室

(主任 秦 柄 鎬 教授)

(指導 金 子 勳 副教授)

李 相 文

## 目 次

- I. 緒 論
- II. 實驗材料 및 方法
- III. 實驗 成績
- IV. 總括 및 考按

- V. 結 論
- 參 考 文 獻
- 英 文 抄 錄

### I. 緒 論

Freund's adjuvants는 water-in-paraffin-oil 으로 된 Adjuvant 로서, 各種의 抗原을 添加함으로써 그 抗體產生을 增進시키는 目的에 使用하는 것이며<sup>1-5)</sup>, 所謂 Freund's Adjuvants (以下 F. F. A. 로 略稱)라 함은 이 adjuvant 에 死滅結核菌을 添加한 것을 指稱하는 것이다<sup>6)</sup>.

F. A. 는 또한 이것을 下等 齧齒動物에게 注射하면 그 網狀內皮系의 增殖이나 또는 肝, 脾에 肉芽增殖 乃至 amyloid 變性を 일으킨다고 한다<sup>7)</sup>.

1960年 Dale<sup>8)</sup>은 F.A.를 mice의 耳介皮下에 注射하여 注射局所에서 脈管이 增殖하는 것을 처음으로 보았는데, 그는 F.A.와, pullinger等<sup>9)</sup>이 그 古典的 實驗에서 使用한 Turpenfine 과의 脈管增殖作用을 比較觀察한 結果 F.A.에서 더 顯著한 淋巴管增殖을 보았고, 同時에 血管增殖도 있었다고 한다. 그러나 그는 이러한 F.A.의 局所作用이 Complete F.A.의 作用인지, 또는 그 組成因자의 作用인지 不明하다고 하였다.

局所貧血性障害에 對한 決定的 治療法이 없는 現在, 局所血管增殖劑의 渴求是 切實한 것이다. 이에 著者는 局所 血管增殖性物質의 追求에 있어서, F.A.의 局所血管增殖作用의 有無를 追試 確認하는 同時에 그 各組成因자의 作用도 아울러 檢討하고자 家兔를 使用하여 아래의 實驗을 試圖하였다.

### II. 實驗材料 및 方法

實驗動物은 體重 1900~2100gm.의 白色家兔 55匹을 7

群으로 區分하여 使用하였고, 注射材料로서는 (1) complete F.A., (2) paraffin-oil and lanolin emulsion, (3) paraffin-oil, (4) lanolin, (5) 生理的食鹽水의 五種을 使用하였다.

本實驗에서 使用한 一切의 注射材料는 國立防疫研究所 調製 或은 그 所藏으로서 F.A.는 paraffin-oil 2分, lanolin 1分 및 每 cc.當 2mg.의 死滅結核菌을 包含하는 生理的食鹽水 3分을 2,000 R. P. M.으로 4分間 waring blender 中에서 混合乳化하여 調製한 것이며, 이에 使用한 結核菌은 100°C에서 30分間 加熱殺菌한 人型結核菌 H37RV 이다.

paraffin-oil and lanolin emulsion은 complete F.A.에서 死滅結核菌만을 除去하고 同一한 方法에 依하여 製造한 것이며, 其他 本實驗에서 使用한 試藥 및 注射器는 完全滅菌한 것을 使用하였다.

注射部位는 家兔의 左耳介中心部皮下, 左臂中央部筋肉內 및 胃前壁中央部漿液膜下를 擇하였고, 注射量은 complete F. A. 0.1~0.3cc., paraffin-oil & lanolin emulsion 0.1cc., paraffin-oil 0.1cc., lanolin 0.1cc.씩을 各各 No. 22 針으로 注射하였다. 右耳介 및 右臂部에는 同量의 生理的食鹽水만을 注射하고 對照로서 남겨 두었다.

注射量의 決定은 Dale<sup>8)</sup> 및 Freund等<sup>10)</sup>의 方式을 基礎로 한 것으로서 Dale이 mice의 皮下에 注射한 complete F.A.의 量이 0.005cc. 이므로 그 家兔量은 大略 0.3cc.에 該當하며 따라서 著者는 complete F. A. 0.1

\* 本論文의 要旨는 1960年 大韓醫學協會 第12次 綜合學術大會에서 發表하였음.

~0.3cc. 를 注射하였다.

注射回數는 亦是 Dale<sup>8)</sup>의 方式에 따라서 單一回注射에 끝났고 注射後에는 隔日로 140日間 注射局所의 所見을 視診 및 觸診으로 檢査하였다.

組織檢査는 局所의 肉眼의 變化가 가장 顯著한 注射後 30日에 行하였다.

注射後 1個月以內에 死亡한 動物은 없었고, 其後 死亡한 것은 F.A. 以外의 原因으로 推測되었으며, 死亡한 것 및 創傷傳染을 일으킨 것은 實驗에서 除外하였다.

### III 實驗成績

1) 第1群에서 第5群까지는 左耳介中心部皮下에 注射한 群으로서 第一群은 complete F.A. 0.1cc 씩을 各各 注射한 8匹인데, 8匹 全例에 있어서 注射 24時間後부터 注射局所에 輕한 充血 및 肥厚가 始作되어 그 後 時日의 經過에 따라서 局所肥厚는 徐徐히 그 面積을 增加하면서 皮膚面으로 부터 若干 隆起한 硬結로 觸知되는 一便, 硬結周圍血管의 顯著한 怒張을 볼 수 있다. 이것을 透光하여 보면 硬結部는 比較的 境界 明瞭한 帶赤色の 均等한 充血帶로서 그 中心部는 不透明하나 邊緣部는 鮮紅色로 透明하여 그 안에 外部로 放散하는 多數의 細

少한 血管을 볼 수 있었다. 이와같은 血管增殖帶는 硬結邊緣部는 勿論 邊緣部를 떠나서 그 周圍에까지 이르고 있으며, 뿐만 아니라 附近血管이 또한 擴大 怒張되어 있다. 이러한 所見은 第1圖에서 보는 바와 같이 大略 注射後 30日에 最大에 達하고 그 後부터는 漸次로 減少 消退하기 始作하여서 注射後 120日까지에는 第1表와 같은 經過를 取하면서 完全히 消失되었다.



[第1圖] 第1群의 局所所見 (注射後 30日)

<第1表>

第1群의 血管增殖部의 크기 (單位 cm)

日數 家兔番號	1	3	7	10	20	30	40	60	80	100	消退日	
1	0.4×0.3	0.6×0.4	0.8×0.5	1.1×0.8	1.3×0.9	1.3×1.0	Histological Examination					
2	0.3×0.3	0.6×0.4	0.9×0.6	1.2×1.0	1.5×1.1	1.8×1.1	H.					
3	0.4×0.3	0.4×0.4	0.8×0.6	1.0×0.8	1.2×1.0	1.3×1.0	1.2×1.0	1.0×1.9	0.6×0.4	0.2×0.2	115	
4	0.4×0.4	0.5×0.5	0.8×0.7	1.2×1.0	1.3×1.1	1.5×1.2	1.4×1.2	1.3×1.1	0.9×0.8	0.5×0.4	120	
5	0.4×0.4	0.5×0.5	0.8×0.8	1.0×1.0	1.3×1.2	1.4×1.3	H.					
6	0.4×0.4	0.5×0.4	0.9×0.8	1.3×1.2	1.4×1.3	1.4×1.4	1.4×1.3	1.2×1.2	0.9×0.8	0.4×0.3	120	
7	0.3×0.3	0.6×0.5	0.9×0.8	1.2×1.1	1.5×1.2	1.9×1.3	H.					
8	0.4×0.4	0.5×0.4	0.8×0.7	1.1×1.0	1.3×1.3	1.4×1.3	H.					

2) 第2群은 complete F.A. 0.3cc.씩을 各各 注射한 6匹의 成績인데 大體로 第1群에 恰似한 成績이나 그 局所所見이 第2圖 및 第2表와 같이 第1群에서보다 顯著하였다.

3) 第3群은 8匹의 家兔에게 paraffin-oil and lanolin 即 original F.A. 0.1cc. 씩을 各各 注射한 것인데, 全例에서 第一群에 比肩할 만한 局所肥厚, 局所充血 및 血管增殖을 볼 수 있었다. (第3圖 및 第3表參照)

4) 第4群은 Lanolin 0.1cc.씩을 各各 注射한 것으로서 8匹中 6匹에서는 注射後 2~3週에 完全히 吸收되었고, 2匹에서는 第3群에 準하는 輕微한 變化를 볼 수 있었다. (第4圖 및 第4表參照) 吸收된 6匹에서는 局所肥厚 局所充血은 있었으나 注目할 만한 血管增殖은 없었다.

5) 第5群에는 paraffin-oil 0.1cc.씩을 各各 注射하였다. 6匹의 全例에서 注射後 第1日부터 局所充血이 있고,



[第2圖] 第2群의 局所所見 (注射後 30日)

第3日에 이것이 最大에 達하였으나 第一週末로부터 第二週末까지 사이에 全例가 完全히 吸收되었다.

<第2表> 第2群의 血管增殖部の 크기 (單位 cm)

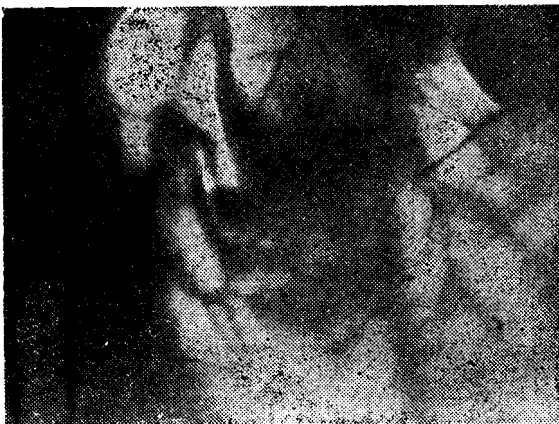
日數 家兔番號	1	3	7	10	20	30	40	60	80	100	120	消退日
9	0.5×0.5	0.8×0.6	1.5×1.3	2.5×2.0	3.0×2.5	3.3×2.7	3.0×2.4					
10	0.6×0.5	0.8×0.6	1.5×1.0	2.3×1.5	2.9×2.0	3.1×2.2	Histological examination					
11	0.6×0.6	0.7×0.6	1.3×1.0	1.8×1.5	2.3×1.9	2.5×2.1	H.					
12	0.6×0.5	0.8×0.7	1.0×1.0	1.5×1.3	2.0×1.5	2.0×1.8	H.					
13	0.6×0.5	0.9×0.8	1.5×1.5	2.0×2.0	2.6×2.5	2.8×2.8	H.					
14	0.6×0.5	0.9×0.9	1.8×1.6	2.8×2.5	3.6×3.5	4.0×3.6	H.					

<第3表> 第3群의 血管增殖部の 크기 (單位 cm)

日數 家兔番號	1	3	7	10	20	30	40	60	80	100	消退日
15	0.4×0.4	0.5×0.4	0.8×0.7	1.0×0.9	1.3×1.0	1.4×1.3	1.2×1.2	0.9×0.8	0.4×0.3	0.1×0.1	110
16	0.4×0.4	0.5×0.4	0.8×0.8	1.3×1.0	1.3×1.0	1.5×1.1	Histological examination				
17	0.4×0.3	0.6×0.5	1.0×1.0	1.3×1.3	1.4×1.3	1.5×1.4	H.				
18	0.4×0.4	0.6×0.5	0.8×0.7	1.1×1.0	1.3×1.0	1.3×1.2	1.2×1.0	0.9×0.8	0.5×0.4	0.2×0.2	120
19	0.4×0.4	0.6×0.5	0.8×0.7	1.2×1.1	1.5×1.3	0×0	H.				
20	0.3×0.3	0.5×0.4	1.1×1.0	1.5×1.3	1.7×1.5	0×0	H.				
21	0.4×0.4	0.5×0.4	0.8×0.7	1.0×0.9	1.2×1.1	1.0×1.0	0.7×0.6	0.3×0.2	0.1×0.1	0×0	105
22	0.4×0.3	0.4×0.4	0.6×0.6	0.8×0.8	1.0×0.9	1.1×1.0	H.				

<第4表> 第4群의 血管增殖部の 크기 (單位 cm)

日數 家兔番號	1	3	7	10	20	30	40	60	80	100	120
23	0.4×0.4	0.4×0.4	0.3×0.2	0.2×0.2	0.1×0.1	0×0					
24	0.4×0.4	0.4×0.4	0.5×0.4	0.6×0.5	1.0×0.9	1.3×1.1	Histological examination				
25	0.4×0.4	0.4×0.4	0.3×0.3	0.1×0.1	0×0	0×0	H.				
26	0.4×0.4	0.4×0.4	0.2×0.2	0.1×0.1	0×0	0×0					
27	0.4×0.4	0.3×0.2	0.2×0.1	0.1×0.1	0×0	0×0	H.				
28	0.4×0.4	0.4×0.4	0.2×0.2	0.1×0.1	0×0	0×0					
29	0.4×0.4	0.4×0.4	0.5×0.4	0.5×0.5	1.0×1.0	1.2×1.2	H.				
30	0.4×0.4	0.3×0.3	0.2×0.2	0.1×0.1	0×0	0×0					



[第3圖] 第3群의 局所所見 (注射後 30日)



[第4圖] 第4群의 局所所見 (注射後 30日)

6) 第6群은 筋肉內 注射群으로서 Complete F. A. 0.1 c.c.씩을 各各 注射한 5匹, Paraffin-oil and Lanolin emulsion 0.1cc. 씩을 各各 注射한 3匹에서는 注射局所의 外觀上 所見이나 或은 剖面所見에 있어서 注射後 어느 時期에서도 何等의 變化를 볼 수 없었다.

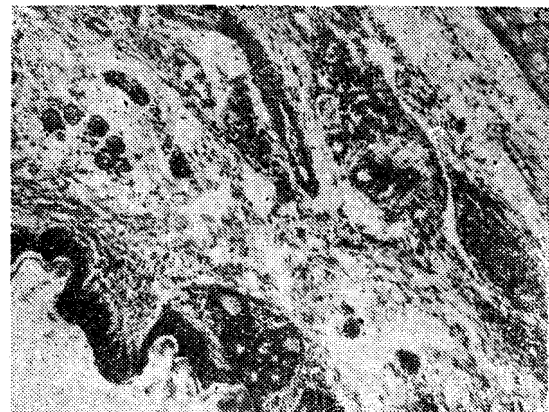
7) 第7群은 Ether 麻醉下에 開腹한 後, 胃前壁漿液膜下에 Complete F.A. 0.1cc.씩을 各各 注射한 5匹인데 手術後 30日에 再開腹하고 觀察하였드니, 5匹中 3匹에서 第5圖에서 보는바와 같이 輕度の 局所肥厚 및 局所 充血을 볼 수 있었을 뿐 2匹에서는 完全히 吸收되어서 何等의 變化가 없었다.



[第5圖] 第7群의 局所所見 (注射後 30日)

8) 組織學的 檢查所見

注射後 30日에 各群마다 注射局所의 硬結部組織을 摘出하여 組織學的 檢查를 行하였다. Complete F.A. 0.1 cc.씩을 皮下注射한 第1群에서는 5匹을 檢鏡하였는데 5匹의 所見에 大差없이 顯著한 血管增殖과 細胞浸潤을 볼 수 있었다. 即 主로 硬結部에서 多數의 多核白血球, 淋巴

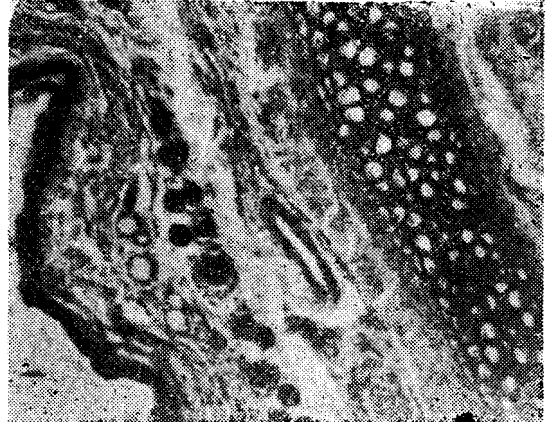


[第6圖] 第1群의 組織像

球, Plasma 細胞 및 大形細胞의 浸潤을 볼 수 있었고, 邊緣部에서는 多數의 血管을 볼 수 있었다.(第6圖參照)

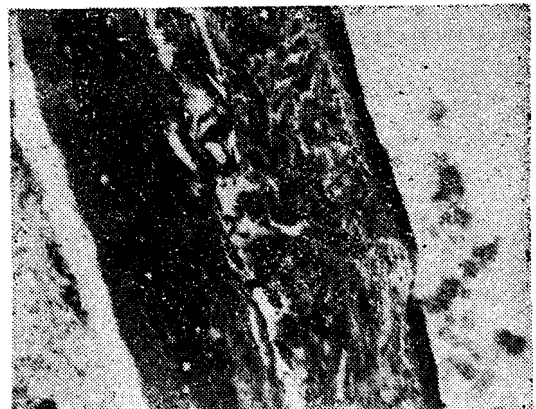
Complete F.A. 0.3cc.씩을 皮下注射한 第2群에서도 5例를 檢鏡하였는데 그 所見은 大體로 第1群에 恰似하고, 다만 細胞浸潤이 一層 顯著할뿐이었다.

Paraffin-oil and Lanolin emulsion 0.1cc.씩을 皮下注射한 第3群에서는 5例의 所見에 大差없었으며 硬結部에 輕微하게 多核白血球 淋巴球 및 大形細胞의 浸潤이 있고 邊緣部에서는 第1群에 比肩할만한 血管增殖을 볼 수 있었다.(第7圖參照)



[第7圖] 第3群의 組織像

Lanolin 0.1cc.씩을 皮下注射한 第4群에서는 吸收된 2匹과 局所變化가 있는 2匹을 檢鏡하였는데, 吸收된 2匹에서는 特記할 所見이 없고, 局所變化를 일으킨 2匹에서는 極히 輕微한 細胞浸潤과 그 邊緣部에 亦是 輕微한 血管增殖을 볼 수 있다.(第8圖參照)



[第8圖] 第4群의 組織像

Paraffin-oil 을 皮下注射한 第5群 및 筋肉內 注射한 第6群에서는 各群마다 어느 것에서도 特記할 所見을 보지 못하였고, 漿液膜下에 注射한 第7群에서는 吸收된 2匹과 局所變化가 있는 2匹을 檢鏡한바 吸收된 家兎에서는 特記할 所見이 없는데 反하여, 局所變化가 있는 家兎에서는 第3群의 所見과 類似하나, 이 보다는 輕微한 所見을 나타내었다.

#### IV. 總括 및 考按

以上の 成績을 總括하면

1) 所謂 F.A. (Complete F.A.)는 그 0.1 cc. 或은 0.3cc.를 家兔耳介皮下에 注射하면 8匹의 全例에서 注射局所에 顯著한 血管增殖을 일으키는 것을 알 수 있다. 그 局所變化는 注射 24時間後로 부터 始作하여 徐徐히 進行하는 局所充血帶로 된 硬結部와 그 邊緣部 및 周圍의 血管增殖帶로서 看取되며, 注射後 30日에 最大에 達한 後에는 徐徐히 消退를 거듭하면서 注射後 大略 120日을 前後하여 吸收를 完了한다.

이와같은 所見은 局所의 病理組織像에 依하여서도 大體로 一致된다. 그리고 0.3cc.를 注射한 例에서는 0.1 cc.를 注射한 例에 比하여 그 變化가 一層 顯著하다.

2) F.A.의 oil fraction인 paraffin-oil and Lanolin emulsion 0.1c.c.를 皮下注射한 8匹의 全例에서도 一般的으로 前者와 大差없는 局所所見 및 經過를 보인다. 即 F.A.의 血管增殖作用은 主로 그 oil fraction에 있는 것으로 推測할 수 있다.

3) F.A.의 組成因子인 Lanolin 0.1 cc.를 皮下에 注射한 8匹의 家兔에서는 그 大多數인 6匹에서는 注射後 輕微한 局所肥厚 및 局所充血을 보이었으나 注目할 만한 血管增殖이 없이 注射後 2~3週日에 完全히 吸收 消失되며, 殘餘의 2匹에서만 輕微한 血管新生을 보여 oil fraction 注射와 同一한 經過를 밟는다. 即 Lanolin 에는 輕微한 血管增殖作用이 있으나, 그 單獨으로서는 顯著한 作用을 發揮하지 못하는 것을 알 수 있다.

4) F.A.의 組成因子인 paraffin-oil를 皮下注射한 6匹의 動物에서는 注射 初期에 局所充血을 보일 뿐 血管增殖이 없이 注射後 第2週末까지에 吸收 消失되었다.

Complete F.A. 및 그 組成因子를 各各 筋肉內에 注射한 合計 14匹의 動物에서는 注射物質의 種類에 關係 없이 外觀上으로나 剖面所見에 何等의 變化를 나타내지 않는 反面에 胃漿液膜下에 Complete F.A.를 0.1 cc. 注射한 境遇에는 5匹中 3匹에서만 輕微한 局所肥厚 및 血管增殖을 보인다.

以上으로써 考按컨대, 所謂 F.A.는 이것을 家兔皮下에 注射하면 注射局所에 顯著한 血管增殖을 일으키는 것이 分明하며 0.1—0.3c.c.와 같은 小量의 單一注射에 依하여서도 그 効果는 約 3箇月間은 持續하며, 注射後 1箇月을 前後하여 最大에 達하는 것을 알 수 있다.

그리고 이와같은 血管增殖作用은 主로 F.A.의 oil fraction 即 original F.A.에 存在하는 것이 分明하며, Lanolin은 그 單獨으로는 極히 輕微한 作用을 나타내는데 不過하며, 또 paraffin-oil 單獨으로는 全然 效果가 없음에도 不拘하고 兩者의 混合劑에서는 顯著한 作用

을 나타내는 點으로 미루어서 兩者의 synergistic effect 에 基因하는 것으로 推測된다.

그리고 complete F.A.를 注射한 境遇 그 局所所見이 oil fraction의 注射에 比하여 若干의 增強을 보이는 것은 兩者의 病理組織像으로 미루어 F.A.에 添加한 死滅 結核菌에 依한 allergic inflammation에 基因한 듯 思料된다.

complete F.A. 或은 그 oil fraction이 筋肉內注射에 있어서 血管增殖作用을 나타내지 않는 것은 注射局所에 長期間 停滯하지 못하고 早期에 吸收 消失된데 基因하는 듯 하다. 그리고 F.A. 및 그 組成因子는 0.1~0.3cc.의 注射量으로서는 注射經路의 如何를 莫論하고 注射動物에게 毒作用을 나타내는 일이 없다.

#### V. 結 論

1) 所謂 Freund's adjuvants는 이것을 家兔皮下에 注射하면 注射局所에 顯著한 血管增殖을 일으킨다. 그 血管增殖作用은 注射後 1箇月을 前後하여 最大에 達하며, 單一注射에 依하여서도 3箇月以上 持續된다.

2) 所謂 Freund's adjuvants의 血管增殖作用은 그 組成因子인 lanolin이나 paraffin-oil의 單獨作用이 아니고 兩者의 synergistic effect에 基因하는 듯 하다.

4) 所謂 Freund's adjuvants의 血管增殖作用은 皮下注射에 依하여 顯著히 나타나는 것이며 漿液膜下注射에 있어서는 極히 輕微한 效果를 보이는데 反하여 筋肉內注射에 依하여서는 그 效果를 볼수 없다.

本實驗에 있어서 注射材料를 調製 分讓하여 주신 國立防疫研究所 細菌科長 金容鉉先生과, 病理組織檢査에 盡力하여 주신 本學病理學敎室 金相仁先生에게 深甚한 謝意를 表한다.

#### REFERENCES

- 1) Freund J.: Some aspects of active immunization. *Annual Rev. Microbiol.*, 1 : 291-308, 1947.
- 2) Freund J.: Effect of paraffin-oil & mycobacterium on antigen formation. *Am. J. Clin. Path.*, 21 : 645-656, 1951.
- 3) White R.G., Coon A.H., Coonly J. M.: Study on antibody production: The role of wax fraction of mycobacterium Tuberculosis in adjuvant emulsion on the production of antibody. *J. Exp. Med.*, 102 : 83, 1955.
- 4) Gorer p.A.: Acute disseminated encephalo-myelitis produced in mice by brain proteolipide. *J. Path. Bact.*, 50 : 25, 1940.
- 5) Freund J., McDermott K.: Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. Exp.*

- Biol. Med., 49 : 548, 1942.
- 6) Odell R. T. & Key J.A.: The production of anaphylactic arthritis with the use of Freund's adjuvants: Surg. Form., 7 : 596, 1956.
  - 7) A. Laufer, Chloe T., Behar A.J.: Effect of adjuvant (Freund's type) and its components on the organs of various animal species. Brit.J. Exp. Path., p. 1-7, Vol. 40, No. 1, 1959.
  - 8) Dale M.M.: The effect of Freund's adjuvants on lymphatic in the mouse's ear. Brit. J. Exp. Path., p. 86, Vol. XLI No. 1, 1960.
  - 9) Pullinger B.D. Florey H.W.: J Path Bact. 45 : 157, 1937, cited from 8.
  - 10) Freund J., Casals-ariet J., Genghof D.S.: The Synergistic effect of paraffin-oil combined with heat killed tubercle bacilli. J. Immunol., 38 : 67, 1940.

#### SUMMARY

### The Vascularization Effect of Freund's Adjuvants and its Components in Rabbits

Sang-Moon Lee, M.D.

Directed by

(Associate prof. Ja Hoon Kim, M.D. F.I.C.S.)

*Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Seoul National University.*

The original Freund's Adjuvant is a water-in-paraffin-oil emulsion, which has been used for the purpose of enhancing antibody production; but the adjuvant combined with killed mycobacterium is generally called

Freund's adjuvants (F.A.).

In 1960 Dale reported first of the lymphatics proliferation effect of F.A. in mice, but he did not elucidate whether such effect is due to the complete F.A. or to each of its components. This study was done to confirm the vascularization effect of F.A. and to determine if the effect is based upon the complete F.A. or upon its components.

Fifty-five adult albino rabbits were injected respectively subcutaneously (ear), subserously (stomach) and intramuscularly (buttock) with 0.1 c.c. of complete F.A. and its components; and the site of each injection was examined for the subsequent period by simple inspection, tranillumination and biopsy.

#### The results are as follows.

1) Complete F. A., when injected subcutaneously, produced marked proliferation of blood vessels both macroscopically and microscopically at the site of injection. Such effect of this agent reached its maximum peak on approximately one month after injection and lasted at least 3 months.

2) The oil fraction of the adjuvant (original F.A.) produced nearly the same degree of vascularization as the complete F.A., whereas each component of the adjuvant showed no or little response.

3) It would appear therefore that the vascularization effect of F.A. is mainly due to its oil fraction and this is probably based on the synergy of paraffin-oil and lanolin.

4) F.A. and its components, when injected subserously, showed little vascularization, but not any at the site of intramuscular injection.

