

임신중 투여된 Azathioprine에 의한 신생 흰쥐 비장의 면역반응 억제에 관한 연구

Study on the Inhibition of the Immune Response of the Neonatal Rat Spleen by the Azathioprine Administered during Pregnancy

서울대학교 의과대학 해부학교실

장 가 용 · 조 사 선 · 이 왕 재

서 론

임상적으로 많이 사용되고 있는 Azathioprine은 6-Mercaptopurine(6-MP)의 유도체로서 Synthetic purine Analogue인데 원래는 암을 치료하기 위한 화학 요법제로 개발되었으나 최근 동종이식 또는 자가면역병 등의 치료에 면역 억제제(Berenbaum, 1962)로서 자주 사용하게 됨에 따라 이에 수반되는 여러 가지 부작용이 문제로 대두 되게 되었다(Eduardo, 1970; Daniel, 1972; Jones, 1974; Philip, 1975).

이에 저자들은 Sprague-Dawley계 흰쥐를 실험 대상으로 Azathioprine의 기형 유발 효과(Teratogenic Effect)를 조사하는 실험에서 임신중 투여한 Azathioprine이 흰쥐 태아의 흉선 발육을 억제하는 것을 알게 되었고(이등, 1977) 흉선의 발육 억제는 흰쥐 태아에서 비장, 임파절 등의 말초 임파 기관의 발육을 지연시키는 결과를 초래하여 출생 후 이 흰쥐 태아들의 면역 능력이 정상 임신 흰쥐에서 태어난 신생 흰쥐의 면역 능력에 비해 현저 저하 되어 있음을 알게 되었다(이등, 1978).

저자들은 이상의 결과, 즉 Azathioprine을 임신중인 흰쥐에 투여했을 때 그 태아에서 면역 기관의 발육이 억제되고 그 결과로 생후에 갖게 되는 면역 능력이 저하되었다고 할 때 그 동물의 T 및 B계통 면역기구중 어느 기구에 발육 장애를 일으켰는지를 규명하기 위해서 T-dependent antigen인 면양 적혈구와 T-independent antigen인 Dextran 및 이계 교배된 신생 흰쥐에서 얻은 흉선 세포들을 투여한 후 비장을 조직하여 Plaque Assay법 및 조직 화학적 염색법을 이용하여 면역 반응의 변화를 관찰하였다.

† 접수일자: 1983. 9. 15.

* 본 논문은 1980년도 서울의대 동창회 학술연구 재단 연구비의 지원을 받았다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 정상 흰쥐의 교배에서 얻어진 임신한 흰쥐 60마리(이 중 45마리는 임신 확인후 제 7일에 Azathioprine을 8mg/kg경구 투여하였는데, 임신일은 교미후 질전, vaginal plug가 확인된 때를 임신 제 0일로 하였고 나머지 15마리는 Azathioprine을 투여하지 않음)에서 출산된 200마리의 신생 흰쥐를 사용하였다. 실험군은 24마리씩 6군으로 나누고 각 군에서 생후 4주, 8주, 12주로 나누어 각각 8마리씩에 항원(면양 적혈구 혹은 Dextran)을 복강내 주사하였고 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 4마리씩 도살하여 비장을 적출하였다.

제 1군: Azathioprine을 투여하지 않은 임신 흰쥐에서 태어난 신생 흰쥐에 면양 적혈구를 투여한 군.

제 2군: Azathioprine을 투여한 임신 흰쥐에서 태어난 신생 흰쥐에 면양 적혈구를 투여한 군.

제 3군: Azathioprine을 투여한 임신 흰쥐에서 태어난 신생 흰쥐에 면양 적혈구를 투여하고 이계 교배에서 얻은 신생 흰쥐 흉선 세포를 투여한 군.

제 4군: Azathioprine을 투여하지 않은 임신 흰쥐에서 태어난 신생 흰쥐에 Dextran을 투여한 군.

제 5군: Azathioprine을 투여한 임신 흰쥐에서 태어난 신생 흰쥐에 Dextran을 투여한 군.

제 6군: Azathioprine을 투여한 임신 흰쥐에서 태어난 신생 흰쥐에 Dextran을 투여하고 이계 교배에서 얻은 신생 흰쥐 흉선 세포를 투여한 군.

2. 항원 처리

A. 면양 적혈구: Alsever액에 무균적으로 채취한 후 멸균처리된 Hank's Balanced Salt Solution(이하 HBSS로 약함)으로 3회 세척(4°C에서 1000rpm으로 10분간

원심분리함)한 후 HBSS로 30% 적혈구 부유액으로 만들어 사용하였으며 투여량은 4주군에서는 0.5ml/마리, 8주군에서는 1ml/마리, 12주군에서는 1.5ml/마리로 복강내로 1회 주사하였다.

B. Dextran: 평균 분자량이 500,000이고 SIGMA회사 제품인 Dextran 15mg을 HBSS 50ml에 잘 녹여 Milli-Pore로 여과시킨 후 Complete Adjuvant와 동량 섞어서 복강내 1회 주사되되 4주군에는 50 μ g/마리, 8주군에는 100 μ g/마리, 12주군에는 150 μ g/마리 투여하였다.

3. 흉선 세포

이제 교배에서 얻은 같은 연령의 신생 원위를 도살하여 무균적으로 흉선을 적출하여 멸균처리된 HBSS로 흉선 세포 부유액을 만들고 Ficoll-Hypaque 용액으로 4°C에서 1700~1800rpm으로 30분간 원심 분리하여 임파구만을 분리한 후 멸균처리된 HBSS로 3회 세척하여 세포 부유액속에 남아 있는 Ficoll-Hypaque용액을 완전히 제거한 후 4주군에는 2.0 \times 10⁸/ml개의 임파구를, 8주 및 12주군에는 4.0 \times 10⁸/ml개의 임파구를 미정맥 (Tail vein)에 정주하였다.

4. 조직처리 과정

각 군의 동물에서 비장을 적출하여 그 일부를 60% Ethyl Alcohol에 Formalin을 6%되게 탄 고정액에 1~2일간 4°C에서 고정하여 통상 방법에 따라 파라핀 포매를 한 후 5~6 μ 두께의 조직 절편을 만들어 Methyl Green-Pyronin 염색을 하여 광학 현미경하에서 비장의 동맥주위임파구초에 존재하는 Large Pyroninophilic Cell들을 계수하였다.

5. Plaque Assay 과정

A. Direct Plaque Assay: 적출된 비장은 pH7.2인 HBSS(4°C)에 넣어 세포 부유액을 만든 다음, 1,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전물 상층의 Buffy Coat를 걷어 내어 제 2차 세포부유액을 만든 후 2~3회의 원심 분리를 통해 HBSS로 세척하고 이 세포 부유액은 검정 계수를 통해서 임파구의 수가 10⁷/mm³개가 되도록 희석하였다.

본 실험에 사용된 방법은 Jerne등(1963)의 Plaque Assay법의 변형으로 사용한 Slide Method로서 HBSS에 0.5% 되게 용해시킨 Agarose용액 0.5ml와 HBSS로 3회 세척한 후 Cell packed volume이 1:10되게 희석하여 얻은 면양 적혈구 0.5ml를 45°C항온 수조속에 가온시켜 놓은 작은 시험관에 미리 넣고 여기에 각 군의 비장 세포 부유액 0.1ml를 가한 다음 시험관을 흔들어서 잘 섞은 다음 Microscopic Slide위에 쏟아 Agar층을 만들어 Guinea Pig 혈청을 1:10되게 HBSS로 희석한

보체와 함께 습도 95% 이상의 37°C 항온기에서 3시간 동안 반응시켰다.

B. Indirect Plaque Assay: Dextran을 항원으로 사용한 군들에 대해서는 Indirect Plaque Assay법을 이용하였다. 즉 Dextran을 면양 적혈구에 부착시키기 위해 Ghanta등(1972)의 법을 이용하였다.

Dextran을 산화시키기 위해 100mg의 Dextran을 0.01M Acetate Buffer(pH6.0) 10ml에 녹인 후에 Na⁺ periodate의 최종농도가 10⁻²M이 되도록 함께 넣고 잘 섞어 반응시켰다. 1시간 후 Borate Buffered Saline (0.2M, pH8.0)으로 하룻밤 동안 투석하였다. 다음 날 투석이 끝난 후 20,000rpm으로 10분간 원심한 후 상층액 (Supernatant)을 Milli-Pore(0.4 μ m)에 여과시켜 사용하였다. 이렇게 산화된 Dextran을 면양 적혈구에 부착시키기 위해 면양 적혈구를 HBSS로 5회 세척하고 Borate Buffered Saline으로 1회 더 세척한 후, Borate Buffered Saline으로 Cell Packed Volume이 1:10되게 적혈구 부유액을 만들고 이 적혈구 부유액 2ml에 산화된 Dextran 200 μ l를 가한 후 37°C의 항온기에서 잘 저어 주면서 1시간 이상 배양시켰다. 배양후 Dextran이 부착된 면양 적혈구 용액을 등장성 생리 식염수로 3회 세척하여 부착되지 않고 용액속에 존재하는 Dextran을 제거하고 HBSS로 10% 적혈구 부유액을 만들어 Direct Plaque Assay법과 마찬가지로 사용하였다.

성 적

1. Plaque 형성 세포(PFC)

A. 면양 적혈구를 투여한 제 1군, 2군 및 3군에서의 PFC: 생후 4주에는 제 1군에서 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 68.5개, 208개의 PFC를 보였고 제 2군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 13.5개, 6.6개의 PFC를 나타내어 제 1군에 대한 제 2군의 PFC 수의 비율이 약 5:1을 나타내었다. 제 3군에서는 항

Table 1. Number of PFC per 10⁶ spleen cells of the Ag-injected rat at the age of 4 weeks

Day(s) After Ag injection	Ag*		SRBC**		
	Group	G-1	G-2	G-3	
3		65.8 \pm 7.4	13.5 \pm 1.7	68.2 \pm 5.7	
7		20.8 \pm 2.4	6.6 \pm 0.7	23.8 \pm 3.2	

*Ag : Antigen

**SRBC : Sheep RBC

원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 68.2개, 23.8개의 PFC를 보았다(표 1).

생후 8주에는 제 1군에서 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 99.0개, 27.9개의 PFC를 보였고, 제 2군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 30.4개, 14.7개의 PFC를 나타내어 제 1군에 대한 제 2군의 PFC수의 비율이 약 3:1의 비율을 보여 생후 4주에 비해 감소하였다. 제 3군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 234.0개, 40.2개로 다군에 비해 현저히 많은 수의 PFC를 보았다(표 2).

Table 2. Number of PFC per 10^6 spleen cells of the Ag-injected rat at the age of 8 weeks.

Day(s) After Ag injection	Ag			SRBC			
	Group	G-1	G-2	G-3	G-1	G-2	G-3
3		99.0±8.7	30.4±2.5	234.0±19.2			
7		27.9±3.7	14.7±1.6	40.2±3.6			

생후 12주에는 제 1군에서 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 93.2개, 48.3개의 PFC를 보였고 제 2군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 59.8개, 29.4개의 PFC를 보여 제 1군에 대한 제 2군의 PFC수의 비율이 약 1.5:1정도로 생후 4주군에 비해 비율이 상당히 감소하였다. 제 3군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 196.3개, 69.5개의 PFC를 보았다(표 3).

Table 3. Number of PFC per 10^6 spleen cells of the Ag-injected rat at the age of 12 weeks.

Day(s) After Ag injection	Ag			SRBC			
	Group	G-1	G-2	G-3	G-1	G-2	G-3
3		93.2±7.4	59.8±4.8	196.3±20.1			
7		48.3±5.1	29.4±3.1	69.5±7.2			

이상의 성적을 종합하면 생후 4주에서 12주까지 전반적으로 Azathioprine을 투여한 제 2군이 투여하지 아니한 제 1군에 비해 적은 수의 Plaque를 형성하였고 Azathioprine을 투여한 군이라고 하더라도 항원투여와 함께 이계 교배에서 얻은 신생 흰쥐의 흉선 세포를 투여한 제 3군에서는 흉선 세포를 투여하지 않은 제 2군에 비해 현저하게 많은 수의 Plaque를 형성하였다(그림 1).

한편 제 1군, 2군 및 3군에 있어서 흰쥐의 연령 증가에 따른 PFC수의 변화를 보면, 먼저 항원 투여후

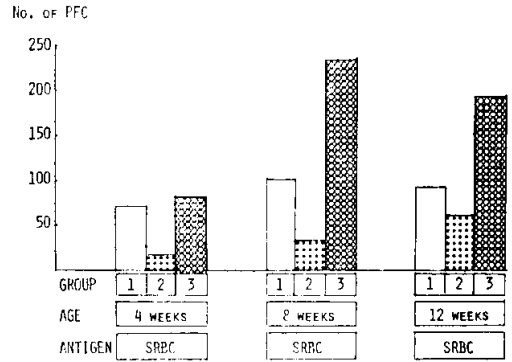


Fig. 1. Changes of the number of PFC with increasing age on the 3rd day after antigen injection.

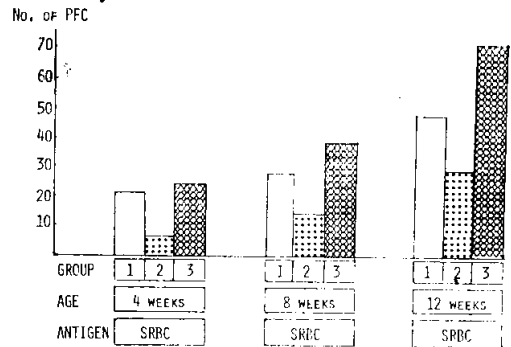


Fig. 2. Changes of the number of PFC with increasing age on the 7th day after antigen injection.

제 3일에는 제 1군과 2군은 생후 8주까지는 유의한 정도로 증가하다가 생후 8주 이후에는 증가가 거의 보이지 않았다. 제 2군에서는 생후 12주까지 연령의 증가에 따라 유의한 차이를 보이지 서서히 증가하였다(그림 1).

항원 투여후 제 7일에는 제 1군, 2군 및 3군이 전반적으로 생후 12주까지 연령의 증가에 따라 서서히 증가하였다(그림 2).

B. Dextran을 투여한 제 4군, 5군 및 6군에서의 PFC: 생후 4주에는 제 4군에 있어서 항원투여후 제 3일과 제 7일에 각각 3.4개, 19.8개의 PFC를 보였으며 제 5군에 있어서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 1.2개, 24.9개의 PFC를 형성하여 제 4군에 대한 제 5군의 PFC의 비율이 약 0.8:1을 보였다. 제 6군에 있어서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 1.8개, 31.8개의 PFC를 보여 전반적으로 항원 투여후 제 7일에 많은 수의 PFC를 나타내었다(표 4).

생후 8주에는, 제 4군에서 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 6.6개, 29.8개의 PFC를 보였으며 제 5군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 5.4개

Table 4. Number of PFC per 10⁶ spleen cells of the Ag-injected rat at the age of 4 weeks.

Day(s) After Ag injection	DEXTRAN			
	Group	G-4	G-5	G-6
3		3.4±0.1	1.2±0.0	1.8±0.1
7		19.8±2.1	24.9±3.4	31.8±2.7

31.2의 PFC를 보여 제 4군에 대한 제 5군의 PFC 비율은 약 1:1을 보여 생후 4주군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 제 6군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 3.6개, 32.4개의 PFC를 나타내어 생후 4주군들에 비해 전반적으로 증가하였지만 각 군간의 차이는 보이지 않았다(표 5).

Table 5. Number of PFC per 10⁶ spleen cells of the Ag-injected rat at the age of 8 weeks.

Day(s) After Ag injection	DEXTRAN			
	Group	G-4	G-5	G-6
3		6.6±0.5	5.4±0.3	3.6±0.0
7		29.8±2.7	31.2±4.7	32.4±4.4

생후 12주에는 제 4군에서 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 4.0개, 31.4개의 PFC를 보였으며, 제 5군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 6.6개 33.3개의 PFC를 보여 제 4군에 대한 제 5군의 PFC수의 비율이 약 0.9:1을 보여 연령 증가에 따르는 변화는 없었다. 제 6군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 6.5개, 35.7개의 PFC를 보였다(표 6).

Table 6. Number of PFC per 10⁶ spleen cells of the Ag-injected rat at the age of 12 weeks.

Day(s) After Ag injection	DEXTRAN			
	Group	G-4	G-5	G-6
3		4.0±0.2	6.6±0.3	6.5±0.2
7		31.4±2.9	33.3±4.7	35.7±5.2

이상의 성적을 종합하면 생후 4주에서 12주까지 항원 투여후 제 3일 및 제 7일 모두에 있어서 각 군간에 PFC수의 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 3 및 4).

2. 비장의 조직학적 변화

A. 면양 적혈구를 투여한 제 1군, 2군 및 3군에서의

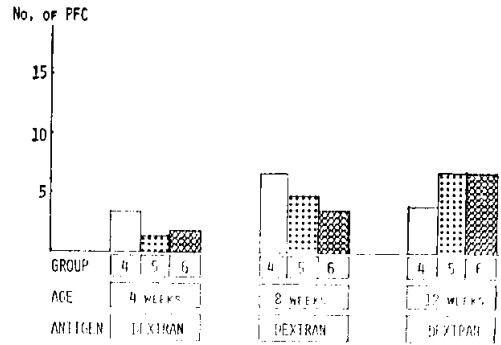


Fig. 3. Changes of the number of PFC with increasing age on the 3rd day after antigen injection.

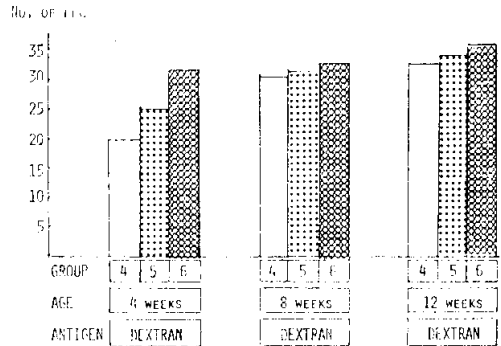


Fig. 4. Changes of the number of PFC with increasing age on the 7th day after antigen injection.

변화: 생후 4주에는 제 1군에서 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 High Power Field(이하 HPF로 약함)에서 30.3개, 22.0개의 Large Pyroninophilic Cells(이하 LPC로 약함)이 관찰되었으며 제 2군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 7.7개, 7.1개의 LPC가 관찰되어 제 1군에 대한 제 2군의 LPC수의 비율은 약 4:1을 보였다. 제 3군에서는 항원 투여 후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 39.3개, 25.0개의 LPC가 관찰되었다(표 7).

Table 7. Number of large pyroninophilic cells per HPF* of the Ag-injected rat spleen at the age of 4 weeks.

Day(s) After Ag injection	SRBC			
	Group	G-1	G-2	G-3
3		30.3±6.7	7.7±0.6	39.3±2.5
7		22.0±4.0	7.1±0.5	25.0±4.6

*HPF: High Power Field

생후 8주에는 제 1군에서 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 42.0개, 19.7개의 LPC가 관찰되었고 제 2군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 22.7개, 13.0개의 LPC가 관찰되어 제 1군에 대한 제 2군의 LPC의 비율은 약 2:1의 비율을 보여 생후 4주군에 비해 유의하게 감소하였다. 제 3군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 42.3개, 23.0개의 LPC가 관찰되어 생후 4주군에 비해 다소 증가하였다(표 8).

Table 8. Number of large pyroninophilic cells per HPF of the Ag-injected rat spleen at the age of 8 weeks

Day(s) After Ag injection	Ag			SRBC			
	Group	G-1	G-2	G-3	G-1	G-2	G-3
3		42.0±3.0	22.7±3.2	42.3±3.2			
7		19.7±2.9	13.0±1.0	23.0±1.7			

생후 12주에는 제 1군에서 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 36.7개, 28.7개의 LPC가 관찰되었으며 제 2군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 23.7개, 15.0개의 LPC가 관찰되어 제 1군에 대한 제 2군의 LPC수의 비율이 약 1.5:1을 보였다. 제 3군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 74.0개, 48.3개의 LPC가 관찰되어 다 군에 비해 현저히 증가되었다(표 9).

Table 9. Number of large pyroninophilic cells per HPF of the Ag-injected rat spleen at the age of 12 weeks.

Day(s) After Ag injection	Ag			SRBC			
	Group	G-1	G-2	G-3	G-1	G-2	G-3
3		36.7±4.5	23.7±1.5	74.0±4.4			
7		28.7±2.1	15.0±1.0	48.3±3.5			

한편 생후 4주, 8주 및 12주의 모든 군들에서 백수 및 적수의 발달은 충분하였으나 전체적으로 Azathioprine을 투여한 군에서 투여하지 않은 군에 비해 백수의 위축 현상을 보였다.

흰쥐의 연령 증가에 따른 LPC수의 변화는 항원 투여후 제 3일에는 제 1군을 보던 흰쥐의 연령 증가에 따른 유의한 차이를 보이지 않았으나 제 2군은 연령 증가에 따라 서서히 증가했으며 제 3군은 생후 8주까지는 큰 변화 없으나 12주에 크게 증가하였다(그림 5).

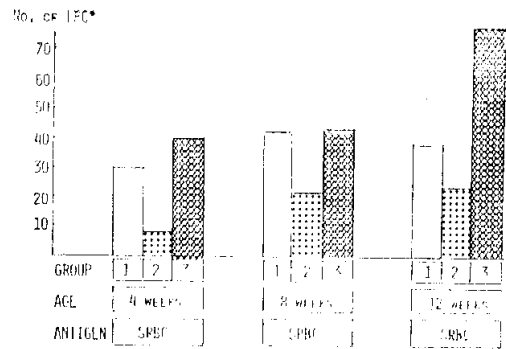


Fig. 5. Changes of the number of large pyroninophilic cells on PALS per HPF with increasing age on the 3rd day after antigen injection.

*LPC: Large pyroninophilic cells.

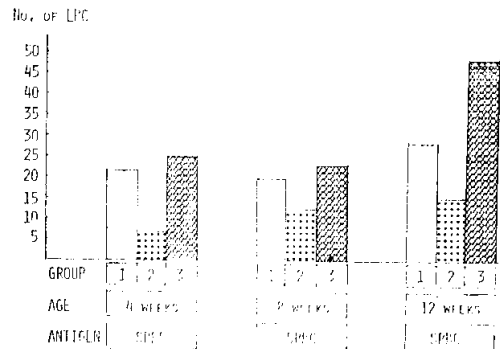


Fig. 6. Changes of the number of the large pyroninophilic cells on PALS per HPF with increasing age on the 7th day after antigen injection.

항원 투여후 제 7일에는 제 1군과 3군은 생후 8주까지 큰 변화없다가 생후 12주에 유의한 증가를 보인데 반해 제 2군은 연령 증가에 따라 서서히 증가하였다(그림 6).

B. Dextran을 투여한 제 4군, 5군 및 6군에서의 변화: 생후 4주에는 제 4군에서 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 12.3개, 31.7개의 LPC가 관찰되었으며 제 5군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 13.3개, 33.6개의 LPC가 관찰되어 제 4군에 대한 제 5군의 LPC수의 비율은 약 0.9:1을 보였다. 제 6군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 21.3개, 33.3개의 LPC가 관찰되었다(표 10).

생후 8주에는 제 4군에서 항원 투여 후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 13.3개, 32.3개의 LPC가 관찰

Table 10. Number of large pyroninophilic cells per HPF of the Ag-injected rat spleen at the age of 4 weeks.

Day(s) After Ag injection	DEXTRAN			
	Group	G-4	G-5	G-6
3		12.3±0.6	13.3±1.2	21.3±4.6
7		31.7±2.5	33.6±2.1	33.3±3.1

Table 11. Number of large pyroninophilic cells per HPF of the Ag-injected rat spleen at the age of 8 weeks.

Day(s) After Ag injection	DEXTRAN			
	Group	G-4	G-5	G-6
3		13.3±2.3	17.0±2.6	26.3±2.3
7		32.3±3.1	32.7±4.0	31.7±1.2

되었으며, 제 5군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 17.0개, 32.7개의 LPC가 관찰되어 제 4군에 대한 제 5군의 LPC수의 비율이 약 1:1을 보였다. 제 6군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 26.3개, 31.7개의 LPC가 관찰되었다(표 11).

생후 12주에는 제 4군에서 항원 투여 후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 28.3개, 50.0개의 LPC가 관찰되었으며 제 5군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 26.0개, 53.0개의 LPC가 관찰되어 제 4군에 대한 제 5군의 LPC수의 비율이 약 0.9:1을 보여 생후 4주, 8주에 비해 큰 변화가 없음을 나타내었다. 제 6군에서는 항원 투여후 제 3일과 제 7일에 각각 HPF에서 32.0개, 48.0개의 LPC가 관찰되었다(표 12).

Dextran 투여군에서 원취의 연령 증가에 따른 LPC 수의 변화를 보면 항원 투여후 제 3일에는 생후 4주부터 12주에 이르기까지 서서히 증가하는 양상을 보였고

Table 12. Number of large pyroninophilic cells per HPF of the Ag-injected rat spleen at the age of 12 weeks.

Day(s) After Ag injection	DEXTRAN			
	Group	G-4	G-5	G-6
3		28.3±7.2	26.0±1.7	32.0±2.6
7		50.0±3.6	53.0±4.6	48.0±3.6

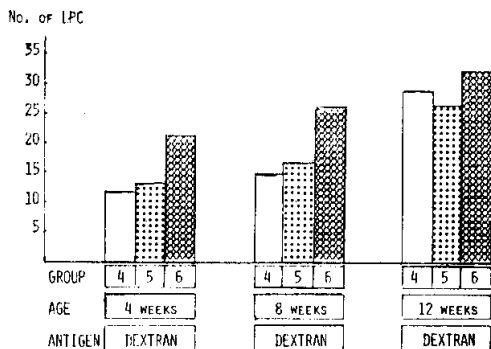


Fig. 7. Changes of the number of the large pyroninophilic cells on PALS per HPF with increasing age on the 3rd day after antigen injection.

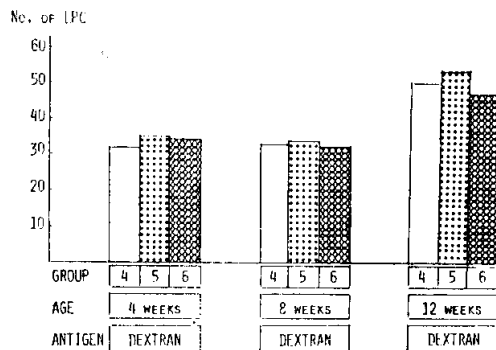


Fig. 8. Changes of the number of the large pyroninophilic cells on PALS per HPF with increasing age on the 7th day after antigen injection.

<그림 7>, 항원 투여후 제 7일에는 생후 8주까지는 비슷한 정도의 LPC수를 보이다가 생후 12주에 이르러 급증가를 보였다(그림 8).

고 찰

Azathioprine이 면역 반응에 미치는 영향에 대해서는 여러 학자들이 연구하였으나 아직 연구자들 간에 의견의 일치를 보지 못하고 있는 실정이다.

Santos와 Owen(1965), Rölinghoff(1973) 및 Otterness와 Chan(1970) 등은 Azathioprine이 세포 면역 반응과 체액 면역 반응을 모두 감소시키는 작용을 갖고 있다고 주장하는데 반해서 Camiener와 Wechter(1971) 및 Abdou등(1973)은 Azathioprine이 체액성 면역 반응을 선택적으로 감소시킨다고 주장하였다.

한편 Bach등(1969), Bach와 Fournier등(1973)은 Azathioprine이 T세포만을 선택적으로 억제하는 작용

을 갖고 있다고 하였으며 Brown등(1976)은 B세포 유사분열 물질의 작용을 억제하였다고 보고하면서 T세포가 B세포보다 Azathioprine에 더 감응성이 강하다는 의견을 암시하였다. 또한 Röllinghoff등(1973)과 Galanaud등(1975)은 T-cell dependent Antigen에 의한 면역 반응이 T-cell independent Antigen에 의한 면역 반응보다 Azathioprine에 의해서 더욱 쉽게 억제된다고 보고하였다.

위의 연구자들의 결과를 미루어 보아 Azathioprine에 의한 면역 억제 기전이 아직 명확히 규명되어 있지 않은 상태이고 또 지금까지의 저자들의 연구 결과 즉, 임신중 Azathioprine을 투여한 흰쥐에서 태어난 신생 흰쥐에서 흉선을 비롯한 임파기관들의 발육이 억제되고 면역 적혈구 항원에 대한 면역 반응이 저하된다는 결과가 어떤 기전에 의해 이루어지는가를 규명한다는 것은 Azathioprine의 면역 억제 기전을 밝히는 데 큰 의미가 있다고 생각한다.

본 실험에서 T-cell dependent Antigen인 면역 적혈구를 투여한 군(제1, 2 및 3군)에서의 면역 반응을 보면 우선 항원 투여후 제 7일 보다는 제 3일에 보다 강한 반응을 보여 이 결과는 이등(1978)의 보고와 잘 일치하였다.

면역 반응이 강하게 일어나는 항원 투여후 제 3일에서의 면역 반응을 보면 임신중 Azathioprine의 투여로 흉선 발육이 억제된 제 2군이 정상적으로 발육한 흉선을 갖고 있는 제 1군에 비해 현저하게 저하된 면역 반응을 보였으며 흉선 발육이 억제된 신생 흰쥐에 이계 교배에서 얻은 신생 흰쥐의 흉선 세포를 투여한 제 3군에서는 제 1군 및 제 2군의 어느 것 보다는 많은 PFC의 수가 나타나 있었다. 이와 같은 결과는 임신중 투여한 Azathioprine이 흰쥐 태자의 흉선 발육을 억제시킨 결과 말초 임파기관에 T세포 계통의 발육 장애가 초래되었기 때문에 T-cell dependent Antigen인 면역 적혈구에 대한 면역 반응이 일어나지 않았음을 제시하는 결과이다. 그리고 제 1군, 2군 및 3군에서 관찰된 조직학적 변화 소견도 PFC의 숫자 변화와 동일한 양상을 나타냈는데, 상기 기전 설명을 뒷받침해 주는 소견으로 생각된다.

한편 신생 흰쥐의 연령이 증가함에 따라 제 1군에 대한 제 2군에서의 PFC수의 비율이 점차 낮아지고 있음을 관찰했는데 즉, 생후 4주에는 그 비율이 5:1이었던 것이 생후 12주에는 1.5:1로 정상 대조군인 제 1군과 Azathioprine투여 군인 제 2군에서의 PFC 수가 거의 비슷해지고 있음을 보였는데 이는 임신중 어미 흰쥐에 투여되었던 Azathioprine에 의해 발육이 억제

되었던 흉선이 연령이 증가됨에 따라 차차 회복됨으로써 말초임파기관인 비장도 흉선의 영향을 받아 면역 반응 능력이 회복되어 있음을 의미하며 이와 같은 소견은 조직 표본상에서 관찰한 결과와도 잘 일치하고 있었다.

T-cell independent Antigen인 Dextran을 투여한 군에서의 PFC 수를 보면 면역 적혈구를 투여한 제 1, 2 및 3군에서와는 달리 항원 투여후 제 3일 보다는 제 7일에 강한 면역 반응을 보이고 있다. 이것은 항원성의 차이에서 온 결과로 사료되며 이런 결과는 1976년 Chen등이 항원 투여후 제 7일에서 10일 사이에 면역 반응의 결정을 보이고 제 3일에는 아주 약한 면역 반응을 나타낸다고 보고한 바와 잘 부합되고 있는 사실이다.

면역 반응이 강하게 일어난 항원 투여후 제 7일에서 보면 임신중 Azathioprine의 투여로 인하여 흉선의 발육이 억제된 제 5군과 제 6군, 그리고 흉선이 정상적으로 발육한 제 4군에서 연령의 증가에 따른 각 군간의 유의한 차이를 보이지 않고 있다. 이와 같은 결과는 임신중 Azathioprine 투여로 흉선의 발육이 억제된 신생 흰쥐에는 적어도 B세포계통은 건전한 것을 의미하고 있음은 물론이고 더 나아가서 T-cell dependent Antigen인 면역 적혈구를 투여한 제 1군, 2군 및 3군의 성적과 비교해 볼 때 T세포 계통의 발육 장애가 있음을 강력히 제시하는 결과라 하겠다. 그리고 이와 같은 결과는 조직학적 변화 소견과도 잘 일치하고 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 Azathioprine은 B세포가 아닌 T세포를 선택적으로 억제하며(Bach등, 1969, 1973) 그 결과 말초의 T-helper Cell이 감소(Depletion)되고 이에 따라 비장에서의 B세포와의 협동작용(Collaboration)이 이루어지지 않아서 면역 반응이 억제된다는 사실을 제시하고 있다.

결 론

임신중 투여된 Azathioprine이 그 모체에서 태어난 신생 흰쥐 임파기관의 발육을 저해시키는 기전을 규명하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

실험 동물로는 Sprague-Dawley계통의 200g 내외의 임신한 흰쥐 60마리(이중 45마리에게는 임신 제 7일에 Azathioprine을 8mg/kg경구 투여함)에서 정상 분만으로 태어난 신생 흰쥐 200마리를 6군으로 나누어 그 중 3군에는 항원으로 면역 적혈구를, 나머지 3군에는 항원으로 Dextran을 투여하고, 이계 교배에서 얻은 신생

원취 흉선 세포를 그 일부의 군에 투여하여 항원 투여 후 제 3일과 제 7일에 도살하여 비장을 적출한 다음 그 일부는 Methyl Green-Pyronin 염색을 통한 조직학적 관찰을 위해 6 μ 두께의 조직 절편을 만들었으며 나머지는 비장 세포 부유액을 만들어 Plaque Assay법을 이용하여 Plaque-Forming Cells(이하 PFC로 약함)을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. T-cell dependent Antigen인 면양 적혈구를 투여한 군들에서는 항원 투여후 제 3일에 보다 많은 수의 PFC를 보였으며 T-cell independent Antigen인 Dextran을 투여한 군들에서는 항원 투여후 제 7일에 보다 많은 수의 PFC를 보였다.

2. T-cell dependent Antigen인 면양 적혈구를 투여한 군들에서는 임신중 Azathioprine을 투여한 군에서 정상 대조군에 비해 훨씬 적은 수의 PFC를 보였으며 이제 교배에서 얻은 신생 원취 흉선 세포를 투여한 군에서는 더 많은 수의 PFC를 보였다.

3. T-cell independent Antigen인 Dextran을 투여한 군들에서는 각 군간에 PFC수에 있어서 유의한 정도의 차이를 보이지 않았다.

4. T-cell dependent Antigen인 면양 적혈구를 투여한 군들에서는 원취의 연령이 증가함에 따라 차차 그 면역 기능을 회복해 나가는 양상을 보였다.

5. 위의 결과들은 각 군에서의 비장의 조직학적 소견과 잘 일치하였다.

6. 이상의 결과는 임신중 투여된 Azathioprine이 원취 태자의 흉선 발육을 억제시키고 그 결과 비장의 발육 또한 장애를 받아 항원에 대한 면역 반응이 억제된 것으로서 이런 현상은 흉선 발육 부전으로 인하여 말초의 T-helper Cell이 감소(Depletion)한 결과임을 강력히 제시하고 있다.

—ABSTRACT—

Study on the Inhibition of the Immune Response of the Neonatal Rat Spleen by the Azathioprine Administered during Pregnancy

Ka Young Chang, Sa Sun Cho, and Wang Jae Lee

Department of Anatomy, College of Medicine, Seoul National University

The following experiment was performed to study

the inhibition mechanism of the immune response in the neonatal rat spleen by azathioprine administered during pregnancy.

The experimental animals were the two hundred neonatal rats which were born by sixty normal Sqrage-Dawley pregnant rats, of which 45 rats 8mg/kg of azathioprine were administered to orally at the 7th gestational day.

Above two hundred experimental animals were divided into 6 groups as follows:

Group 1: Neonatal rats to which T-dependent antigen, Sheep Red Blood Cells (SRBC) were injected intraperitoneally, born by normal pregnant rats.

Group 2: Neonatal rats to which SRBC were injected intraperitoneally, born by pregnant rats to which azathioprine had already been given orally during pregnancy.

Group 3: Neonatal rats to which SRBC were injected intraperitoneally and thymus cells derived from outbred neonatal rats were injected intravenously, born by pregnant rats to which azathioprine had already been given orally during pregnancy.

Group 4: Neonatal rats to which T-independent antigen, Dextran was injected intraperitoneally, born by normal pregnant rats.

Group 5: Neonatal rats to which Dextran was injected intraperitoneally, born by pregnant rats to which azathioprine had already been given orally during pregnancy.

Group 6: Neonatal rats to which Dextran was injected intraperitoneally and thymus cells derived from outbred neonatal rats were injected intravenously, born by pregnant rats to which azathioprine had already been given orally during pregnancy.

Antigen was injected intraperitoneally to above each group on the 4th, 8th and 12th weeks after birth and then, the spleen was resected on the 3rd and 7th days after injection of antigen for the plaque assay and histochemical studies.

The following results were obtained:

1. Many plaque-forming cells(PFC) were observed

on the 3rd day after injection of antigen in all groups to which SRBC were injected, while many PFC were observed on the 7th day after injection of antigen in all groups to which Dextran was injected.

2. More PFC were observed in Group 1 than Group 2, and much more PFC were observed in Group 3.
3. There were no significant differences in number of PFC between Dextran-Groups(Group 4, Group 5 and Group 6).
4. There was strong tendency to recover the immunological function with increasing age in SRBC-Groups(Group 1, Group 2 and Group 3).
5. Above results were in good accordance with those of histochemical observations.
6. It is strongly suggested that administration of azathioprine during pregnancy did suppress the development of fetal thymus, and that as a result of that suppression peripheral T-helper cells were depleted and consequently the formation of antibody was inhibited due to the insufficient collaboration between T cells and B cells.

REFERENCES

- Abdou, N.T. et. al.: *Effects of azathioprine therapy on bone marrow dependent and thymus dependent cells in man. Clin. Exp. Immunol.*, 13:55-57, 1973.
- Bach, J.F.: *Immunosuppression by chemical agents. Transpl. Proc.*, 3:27-29, 1971.
- Bach, J.F. et al.: *In vitro evaluation of immunosuppressive drugs. Nature(Lond)*, 222:998-999, 1969.
- Bach, J.F. & M. Dardenne: *Activities of immunosuppressive agents in vitro. I. Rosette inhibition by azathioprine. Rev. franc. etud. clin.*, 16:770-773, 1971.
- Bach, J.F. & M. Dardenne: *Antigen recognition by T lymphocytes. II. Similar effects of azathioprine, antilymphocyte serum, and anti-theca serum on rosette forming lymphocytes in normal and neonatally thymectomized mice. Cell. Immunol.*, 3:11-14, 1972.
- Berenbaum, M.C.: *The effect of cytotoxic agents on the production of antibody to T.A.B. vaccine in the mouse. Biochem. Pharmacol.*, 11:29-32, 1962.
- Brown, T.E. et. al.: *The immunosuppressive mechanism of azathioprine. Transplantation*, 21:27-35, 1976.
- Camier, G.W. & W.J. Wechter: *Immunosuppression agents, procedures, speculation and prognosis. Progr. Drug Res.*, 16:67-70, 1971.
- Chan, G.Y. & R.L. Stone: *Inhibition of nucleic acid and protein synthesis in mouse spleen cells in vitro by azathioprine. Appl. Microbiol.* 20:910-912, 1970.
- Chen, J.C. & M.A. Leon: *The immune response to dextran in BALB/c mice. J. Immunol.*, 116:416-422, 1976.
- Daniel, M. et. al.: *Inhibition of cell proliferation by azathioprine. Cancer Res.*, 32:1226-1229, 1972.
- Danier, E. & W.P., Armstrong: *Induction of antibody formation and tolerance in vitro to a purified antigen. Lancet*, 11:1181-1183, 1967.
- Eduardo, M.G. et. al.: *Modification of nucleic acid synthesis in regenerating liver by azathioprine. Surgery*, 68:254-259, 1970.
- Fournier, C. et. al.: *Selective action of azathioprine on T cells. Trnaspl. Proc.*, 5:523-526, 1973.
- Galanaud, P. et. al.: *Effect of azathioprine on in vitro antibody response. Clin. Exp. Immunol.*, 22:139-142, 1975.
- Galanaud, P. et. al.: *Two processes for B-cell triggering by T-independent antigens as evidences by the effect of azathioprine. Cell. Immunol.*, 22:83-85, 1976.
- Ghanta, V.K., N.M. Hamlin, T.G. Pretlow, and R.N. Hiramoto: *Use of dextran-conjugated SRBC for the detection of MOPC-104E tumor cells. J. Immunol.*, 109:810-813, 1972.
- Jerne, N.K. et. al.: *In Cell Bound Antibodies, p. 109-110, Vister Institute Press, Philadelphia, 1963.*
- Jones, R.A.: *Larger doses of immunosuppressive drugs. Lancet*, 2:107-108, 1974.
- 이춘식, 박재일, 장가용, 차중익: 임신중 투여된 Azathioprine이 신생 흰쥐의 임파기관에 미치는 영향. 서울의대학술지, 19(2):54-64, 1978.
- 이광호, 차중익, 조사선, 문용자, 장가용: Imuran이 흰쥐 태자의 흉선발육에 미치는 영향. 서울의대학술지, 18:63-70, 1977.
- Otterness, I.G. & Y.H. Chang: *Comparative study of cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, azathioprine*

- and methotrexate. Clin. Exp. Immunol.* 26:346-349, 1976.
- Philip, S.S. et. al.: *Immunosuppressive and cytotoxic chemotherapy; Long-term complications. Ann. Int. Med.*, 82:84-86, 1975.
- Röllinghoff, M. et. al.: *Effect of azathioprine and cytosine arabinoside on humoral and cellural immunity in vitro. Clin. Exp. Immunol.*, 15:261-265, 1973.
- Santos, G.W. & A.H. Owens: *A comparison of the effects of selected cytotoxic agents on allogeneic skin graft survival in rats. Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 116:327-329, 1965.
- Sokolowski, J. & W. Olszewski: *Biochemical and histological changes following imuran administration. Pol. Med.*, 19:717-719, 1971.