

항체생성세포의 발생기원에 관한 연구

II. 자기방사법을 이용한 항체형성세포의 기원에 관하여

Studies on Antibody Forming Cells: II. Autoradiographic Study on the Origin of Plasma Cells.

서울대학교 의과대학 해부학교실

장가용 · 최병우 · 백상호 · 이광호

서 론

항원의 자극에 의해 임파기관내에서 형성되는 형질세포(plasma cell)의 기원에 관해서 Fagraeus(1948), Mashall and White(1950), Wissler 등(1957), Bernhard and Granboulan(1960)들은 임파기관내의 망상세포(reticular cell)에서 분화(differentiation)된다고 주장하는데 반해서 Harris and Harris(1957), Neil and Dixon(1957), Keuning 등(1963)들은 small lymphocyte에서 분화된다고 주장하는 등 학자들 사이에 의견을 서로 달리고 있어서 이세포의 분화과정에 대해서 현재까지 명확히 체계적으로 설명하기에는 많은 부족함이 있다.

근래에 와서 Langvoort(1965), Chang 등(1971)은 각기 그들의 실험에서 항원의 자극으로 형성된 large pyroninophilic cell을 비장의 periarterial lymphocyte sheath에서 관찰하고 이들이 형질세포의 전단계 세포일 것이라는 것을 보고하고 또 이세포는 periarterial lymphocyte sheath에 있었던 small lymphocyte가 변형(transformation)을 일으켜서 이루어 졌을 것이라는 암시를 주었으며 또 Movat and Fernando(1965)는 large pyroninophilic cell, 미성숙형질세포, 및 형질세포등에서 세포학적 구조의 차이를 전자현미경하에서 상세히 비교관찰함으로써 large pyroninophilic cell에서부터 형질세포로 분화되어가는 과정을 간접적인 증거로 제시해 주었다.

그러나 이상과 같은 실험들은 형질세포의 기원세포로부터의 분화과정을 규명함에 있어서 불명확한 간접적인 증거만을 제시했거나, 혹은 논리적인 암시를 주었을 뿐 이 과정을 입증할 수 있는 명확한 증거를 보여주지 못

하고 있는 것이다.

따라서 저자들은 자기방사법을 이용하여 이에 표지되는 large pyroninophilic cell의 운명을 추적함으로써 이세포가 형질세포의 전단계세포인지 아닌지의 여부를 보다 더 확실한 증거로 명백히 밝히기 위하여 본실험을 시도한 것이다.

재료 및 방법

실험동물 : 실험전 약 2주일동안 사육관찰하여 정상적이고 또 건강하다고 인정된 성숙토끼(1.7~2.0kg) 36마리를 암수구별없이 사용하였으며 실험중 사료는 무제한 공급하였다.

항원(Antigen): 0.07M의 phosphate buffer, pH 7.5 속에 들어있는 diphtheria toxoid (5X recrystallized diphtherial toxin에서 정제한 것)를 항원으로 사용하였으며 투여량은 토끼 한마리당 22Lf (39.5r protein)/ml로 정하고 정맥내로 1ml를 1회 주사하였다.

방사성동위원소(Radioisotope): Thymidine-Methyl- H^3 (New England Nuclear), specific activity 6.7 curies/mM를 동물체중 gm 당 0.3 μ c의 비율로하여 항원주사후 제 3일 즉 항원의 자극으로 형성되는 large pyroninophilic cell의 수가 최고에 도달하는 시기(Chang 등, 1971)에 실험군과 정상대조군중 제3일, 제6일, 제8일의 동물에 정맥내로 주사하였다.

조직(Tissue): 항원주사후 실험군(18마리)과 정상대조군(18마리), 각군에서 1일, 3일, 6일, 8일, 10일, 14일에 각기 희생시키고 비장을 결핵하여 3~5mm 정도의 두께로 조직을 trimming해서 6% formalin in 60% ethyl alcohol에 1~2일간 4°C에서 고정하였으며 이때

고정액은 2~3회 신선한 고정액으로 바꾸어 주었다. 고정후에는 통상방법에 따라 paraffin 포매를 하여 5~6 μ 두께의 조직절편을 만들었으며 3일, 6일, 8일의 조직절편은 자기방사법을 위하여 Kodak NTB-3 Nuclear Track Emulsion 액으로 피복시키고 3주간 감광시킨후 현상정착을 해서 나머지 방사성동위원소를 주사하지 않은 1일, 10일, 14일의 조직절편과같이 Methyl-Green Pyronin(이하 M. G. P.로 약칭)으로 염색하여 광학현미경하에서 검경하였다.

실험 성적

정상대조군의 조직학적 소견 : 정상대조군에 있어서 비장의 일반적인 조직학적 구조는 서로간에 비슷한 소견을 보이고 있었다. small lymphocyte를 그 구성의 주성분으로 하는 백수(white pulp)는 적혈구를 다수 포함하고 있는 혈관동(blood sinuses)과 비삭(cord of Billroth)으로 구성되어 있는 적수(red pulp)와 M. G. P. 염색상에서 용이하게 식별할수 있었으며, 부위에 따라서는 동맥 및 세동맥의 주위를 둘러싸고 있는 periarterial lymphocyte sheath 뿐만 아니라 림파소절(lymphatic nodule)을 포함하지 않고 있는 곳도 있었다.

Periarterial lymphocyte sheath는 다수의 small lymphocyte와 소수의 망상세포(reticular cell)로 구성되어 있었고 때로 이들 사이에는 pyronin에 양성물 나타내는 large pyroninophilic cell이, 혹은 백수와 적수의 경계부에서는 형질세포들이 관찰되었다.

림파소절은 그 중심부를 이루는 배아중심(germinal center)과 이 주위를 둘러싸고 있는 lymphocyte 층으로 되고 배아중심에서는 pyronin에 양성을 나타내는 다수의 medium-sized lymphocyte와 large lymphocyte, 거식세포(macrophage), 망상세포, 및 분열세포등이 관찰되었고 lymphocyte 층에서는 다수의 small lymphocyte와 medium-sized lymphocyte 등이 관찰되었다. Lymphocyte 층을 밖에서 둘러싸고 있는 perifollicular zone 즉 림파소절과 적수와 의 경계부에는 주위 조직과 구별이 되는 세포층으로 되어 있었으며 이 세포들은 small lymphocyte에 비해 크고 또 그해도 커서 methyl-green에 연하게 염색되었으며 그 세포질은 많고 pyronin 염색에 약하게 염색되었다. 그리고 이 세포층은 림파소절 주위를 둘러싸는 비교적 좁은 혈관동에 의해 lymphocyte 층과 접하고 있는 내층과 적수와 면하고 있는 외층으로 나누어져 있었다.

적수는 적혈구를 포함하고 있는 다수의 혈관동과 이들사이를 이루고 있는 비삭으로 구성되어 있으며 비삭

에서는 망상세포, 거식세포, 소수의 small lymphocyte, 및 중성호성백혈구등이 관찰되었다.

Thymidine-H³를 주사한 정상대조군의 소견을 보면, 이를 주사한지 1시간에 희생시킨 비장(정상대조군 제 3일)에서는 thymidine-H³에 표지된 세포들이 나타나지 않았으며, 주사후 3일(정상대조군 제6일)에서는 periarterial lymphocyte sheath내에서 몇개의 망상세포와 medium-sized lymphocyte가, 그리고 드물게 나타나는 large pyroninophilic cell 중에 몇개만이 표지되어 있는 것이 관찰되었으나 백수와 적수경계부에 출현하는 형질세포에서는 이와같은 표지가 관찰되지 않았다. 그리고 배아중심내에서도 소수의 medium-sized lymphocyte 및 large lymphocyte가 표지되어 있었다.

적수에있어서는 망상세포중 몇개만이 표지되어 있었고 그외의 세포에서는 표지된 것을 찾아볼 수 없었다.

주사후 5일(정상대조군 제8일)에는 periarterial lymphocyte sheath내에 있는 small lymphocyte 중의 소수가 주어진 thymidine-H³에 표지되어 있는 것과 배아중심내에 medium-sized lymphocyte 및 large lymphocyte들이 다수 표지되어 있는 것이 3일(정상대조군 6일)의 관찰소견과 다르고 이외 소견은 거의 동일하였다.

실험군의 조직학적 소견 : 항원주사후 24시간에 periarterial lymphocyte sheath와 perifollicular zone에서 large pyroninophilic cell이 정상대조군의 그것보다 훨씬 많은 수가 출현되었으며, 항원주사후 제3일(thymidine-H³ 주사후 1시간)에는 이세포들의 수가 항원주사후 24시간의 그것에 비해 많이 증가되어 최고에 달하였으며 또 이들은 주어진 thymidine-H³에 의해 모두 표지되어 있었다(그림 1). 그러나 제6일(thymidine-H³ 주사후 3일)에서는 이세포들이 훨씬 감소된데 반해서 small lymphocyte 및 medium-sized lymphocyte가 약간의 증가를 보였으나 이들이 방사성동위원소에 표지된 수는 정상대조군 제6일(thymidine-H³ 주사후 3일)의 그것과 비슷하였다. 그리고 배아중심내에서도 정상대조군에 비해 medium-sized lymphocyte 및 large lymphocyte의 수가 많이 증가되었으며 또 이들의 대부분이 thymidine-H³에 표지되어 있었으며, 백수와 적수경계부에서는 방사성동위원소에 표지된 미성숙 및 성숙형질세포(immature or mature plasma cell)들이 소수 관찰되었다.

항원주사후 제8일에는 백수와 적수경계부에서 다수의 미성숙 및 성숙형질세포가 출현하였으며 또 이들중 일부는 주어진 thymidine-H³에 표지된 것(그림 3)을 찾아 볼 수 있었다. 그리고 배아중심은 그 크기가 정상대

조군의 그것에 비해 훨씬 컸으며 다수의 medium-sized lymphocyte와 large lymphocyte을 포함하고 있었고 이들중 많은 수가 thymidine-H³에 의해 표지되어 있었다. 또 주어진 thymidine-H³에 표지된 small lymphocyte는 periarterial lymphocyte sheath와 임파소절의 lymphocyte층에서 각기 관찰되었으며 periarterial lymphocyte sheath에서 관찰된 이들의 수는 실험군 제6일의 그것과 비슷하였다.

실험군 제10일과 제14일에서는 배아중심의 변화 즉 medium-sized lymphocyte 및 large lymphocyte의 수가 증가된것 이외 다른 소견은 정상대조군의 그것과 동일한 양상을 보였다.

고 찰

본실험에 있어서 항원주사후 24시간에 large pyroninophilic cell이 비장의 periarterial lymphocyte sheath와 perifollicular zone에서 동시에 관찰된 결과는 Langvoort(1965), Chang 등(1971)의 보고와 대개 비슷한 소견이었으나 perifollicular zone에서 이세포가 관찰되었다는 것이 다른 점이라 할 수 있겠다. 이와 같은 소견은 Baik 등(1972)이 HRP(horseradish peroxidase)를 항원으로 하여 흰쥐에 주사한지 2시간에 얻은 비장의 조직절편상에서 HRP 양성세포들이 백수와 적수의 경계부인 perifollicular zone에 출현한다고 보고한 결과로 미루어보아 이 zone과 먼하고 있는 임파소절의 lymphocyte층에 있는 small lymphocyte들이 침입된 항원과 직접작용하므로서 변형(transformation)되어 이루어진 결과인지, 아니면 Nieuwenhuis(1969)가 주장하는 대로 periarterial lymphocyte sheath에서 형성된 large pyroninophilic cell이 perifollicular zone을 따라 백수와 적수의 경계부로 이전(migration)되는 동안 출현한 결과인지는 앞으로 더 연구되어야 할 과제라 하겠다.

한편 실험군 제3일에 periarterial lymphocyte sheath에서 다수 출현했던 표지된 large pyroninophilic cell들이 제6일에는 감소되고 8일 이후에는 정상대조군의 그것과 동일하게 환원되는 것에 반해서 실험군 제3일에는 백수와 적수경계부에서 찾아볼 수 없었던 thymidine-H³에 표지된 미성숙 및 성숙형질세포들이 제6일과 제8일에 나타났다는 결과는 Langvoort(1965), Movat and Fernando(1965), Chang 등(1971)이 large pyroninophilic cell이 형질세포로 분화(differentiation)된 것이라고 암시한 것을 입증할 수 있는 하나의 증거라 할 수 있겠다.

그러나 Oort and Turk(1965)는 저자들이 사용한 항원과는 전혀 다른 oxazolone을 항원으로 하여 delayed-type hypersensitivity를 guinea-pig에 이르고 이때 lymph node내에 형성된 large pyroninophilic cell이 medium-sized lymphocyte 및 small lymphocyte로 다시 분화되어 간다고 보고 있어 본실험의 결과와는 다른 면을 주장하고 있는 것이다.

만일 이들이 관찰한 large pyroninophilic cell과 저자들이 기술한 large pyroninophilic cell이 서로 같은 세포로서 multipotency를 가진 세포라면 주어진 항원의 종류에 따라 다른 종류의 세포로 분화되어갈수 있는 것이라고 생각할 수 있으나, 만일 이세포들이 monopotency를 가진 세포라면 이들이 관찰한 large pyroninophilic cell이 저자들이 관찰한 large pyroninophilic cell과는 비록 형태학적으로 같아 해도 이 세포들은 각기 전혀 다른 성질의 세포에서 기원되었다고 생각해야 될 것으로 사료된다.

배아중심의 기능에 관해서 Ward 등(1959)은 항체가 형성되는 곳이라고 주장하고 Congdon(1964)과 Hanna 등(1965)은 항체를 형성할 수 있는 세포를 생산하는데 중요한 역할을 한다고 주장하고 있으나 Chang 등(1971), Langvoort(1965)의 보고와 또 본실험에서 배아중심의 변화가 항원을 주사한지 6일이후부터 일어나고 있는 점 등으로 미루어 보아 이는 항체형성과정에는 직접적으로 관여 하지 않고 있는 것으로 생각되며, Jacobson and Thorbeck(1968)가 주장하는 대로 제2차면역반응을 위한 어떤 memory cell을 생산하는 역할을 담당하고 있는 것이 아닌가 추측된다.

결 론

Dithelia toxoid를 항원으로 하여 성숙토끼의 정맥내에 주사한후 비장의 백수내에서 형성되는 large pyroninophilic cell이 어떤 세포로 분화(differentiation)되어 가는지를 규명키 위해 자기 방사법과 methyl-green pyronin 염색법등을 이용하여 시행된 본실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 항원주사후 24시간에 비장의 periarterial lymphocyte sheath와 perifollicular zone에서 large pyroninophilic cell을 관찰하였다.
2. 실험군 제3일에서는 이 large pyroninophilic cell들이 다수증가되었으며 또 이들의 대부분은 thymidine-H³에 의해 표지가 되었다. 그리고 백수와 적수의 경계부에서 thymidine-H³에 의해 표지된 미성숙 및 성숙형질세포는 관찰할수가 없었다.

3. 실험군 제6일과 제8일에서는 표지된 large pyroninophilic cell 이 periarterial lymphocyte sheath 에서 관찰되지 않았으며 백수와 적수경계부에서 표지된 미성숙 및 성숙형질 세포들이 관찰되었다.

이상의 결과는 형질세포가 large pyroninophilic cell 에서부터 분화되었음을 강력히 암시해 주는 한 증거라 하겠다.

4. 배아중심은 항체생성세포의 형성과정에 관여한다 기 보다는 제2차 면역반응에서 필요로 하는 memory cell 과 관련이 있는 것으로 사료된다.

ABSTRACT

Studies on Antibody Forming Cells:

II. Autoradiographic study on the origin of plasma cells.

Ka Young Chang, Byong Woo Choi,
Sang Ho Baik, Kwang Ho Lee

*Department of Anatomy, College of Medicine
Seoul National University*

A development study of the plasma cells was performed on the spleen of the young adult rabbits, weighing from 1.7 to 2.0 Kg., after a single injection of 1 ml. diphtheria toxoid (22 Lf/ml., from 5x recrystallized diphtherial toxin,) intravenously.

Control and injected animals both received intravenously 0.3 μ C of ³H-thymidine (specific activity 6.7 curies/mM) per gm. body weight on the 3rd day after the injection.

Animals were sacrificed at various intervals (from 1st day to 14th day) and spleen of both groups (injected and control) stained with methyl-green pyronin were compared each other.

One of the main changes found was in the periarterial lymphocyte sheath and perifollicular zone in the white pulp. An increase of large pyroninophilic cells labelled with ³H-thymidine was found in this area on the 3rd day after the injection of the antigen. On the 6th and 8th days, a decrease occurred in the proportion of these cells in this area, while some of the labelled plasma cell series were found in the junction of the red and white pulp.

The other histological changes found were in the germinal center of the white pulp. An increase of the medium-sized lymphocytes and the large lymphocytes appeared in this area on the 6th day after the injection of the antigen and these cells were found incorporated with ³H-thymidine. And the changes of the germinal center persisted on the period during the subsequent 6th to 14th day. It suggests that the germinal center do not concern with the process of the antibody production and may play a role in the production of memory cells.

REFERENCES

1. Baik, S. H., Shim, J. D., Chang, K. Y., and Lee, K. H.: *Studies on antibody forming cells. I. Histochemical localization of injected horse-radish peroxidase in rat spleen. The Seoul Journal of Medicine.*, 13:21, 1972.
2. Bernhard, W. and Granboulan, N.: *Ultrastructure of immunologically competent cells. In Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity. 1959, Edited by Wolsten-holme, G. E. W. and O'connor, M., London, J. and A. Churchill, Ltd., 1960, p. 92.*
3. Chang, K. Y., Kim, Y. B., and Sung, J. H.: *Histological changes of lymph nodes and spleen during the "true" primary immune response in germ-free colostrum-deprived piglets. The New Medical Journal, 14:751, 1971.*
4. Congdon, C. C.: *The early histologic effects of antigenic stimulation. Arch. of Pathol., 78:83, 1964.*
5. Fagraeus, A.: *Antibody production in relation to the development of plasma cells; in vivo and in vitro experiments. Acta Med. Scand. (Suppl. 204) 130:3, 1948.*
6. Hanna, M. G.: *Autoradiographic study of germinal center in spleen white pulp during early intervals of immune response. Lab. Invest. 13: 95, 1964.*
7. Harris, T. N. and Harris, S.: *Formation of agglutinins to shigella paradysenteriae by transfer of lymph node cells. Fed. Proc., 16:643, 1957.*
8. Jacobson, E. B. and Thorbecke, G. J.: *Relation-*

- ship of germinal center in lymphoid tissue to immunologic memory. W. Formation of 19s and 7s antibody by splenic white and red pulp during the secondary response in vitro. *Lab. Invest.*, 19:635, 1968.
9. Keuning, F. J., van der Meer, J., Nieuwenhuis, P., and Oudendijk, P.: *The histophysiology of the antibody response. II. Antibody responses and splenic plasma cell reactions in sublethally X-irradiated rabbits. Lab. Invest.*, 12:156, 1963.
 10. Langvoort, H. L.: *The histophysiology of the antibody response. I. Histogenesis of the plasma cell reaction in rabbit spleen. Lab. Invest.*, 12: 106, 1963.
 11. Marshall, A. H. E. and White, R. G.: *Reactions of the reticular tissues to antigens. Brit. J. Exp. Pathol.*, 31:157 1950.
 12. Movat, H. Z. and Fernando N. V. P.: *The fine structure of the lymphoid tissue during antibody formation. Exper. & Molec. Pathol.*, 4:155, 1965.
 13. Neil, A. L. and Dixon, E. J.: *Immunohistochemical detection of antibody in cell-transfer studies. A. M. A. Arch. Pathol.*, 67:643, 1959.
 14. Nieuwenhuis, P.: *Histophysiology of germinal centers and their role in antibody response: An autoradiographic study in the rabbit. Advances in Experimental-Medicine and Biology Vol. 5, p. 113, 1969, Edited by Fiore-Donati, L. and M. G. Hanna, Jr., Plenum Press.*
 15. Oort, J. and Turk, J. L.: *A histological and autoradiographic study of lymph nodes during the development of contact sensitivity in the guinea-pig. Brit. J. Exp. Pathol.*, 46:147, 1965.
 16. Ward, P. A., Johnson, A. G., and Abell, M. R.: *Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxin on antibody formation. III. Histologic response of the rabbit spleen to a single injection of a purified protein antigen. J. Exp. Med.*, 109: 463, 1959.
 17. Wissler, R. W., Fitch, F. W., La Via, M. F., and Gunderson, C. H.: *The cellular basis for antibody formation. J. Cell. Comp. Physiol. (Suppl. 1)*, 50:265, 1957.



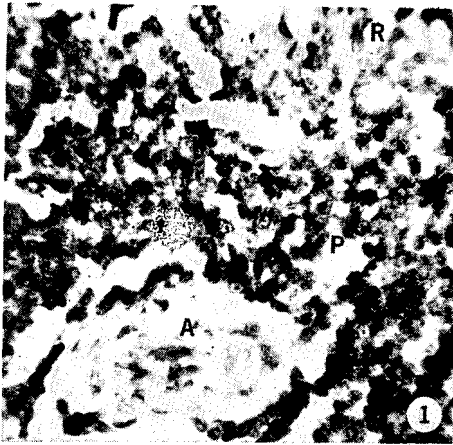


Fig. 1. Low magnification of the antigen injected spleen on the 3rd day. A:artery, P:periarterial lymphocyte sheath, R:red pulp. Methyl green pyronin stain. $\times 400$

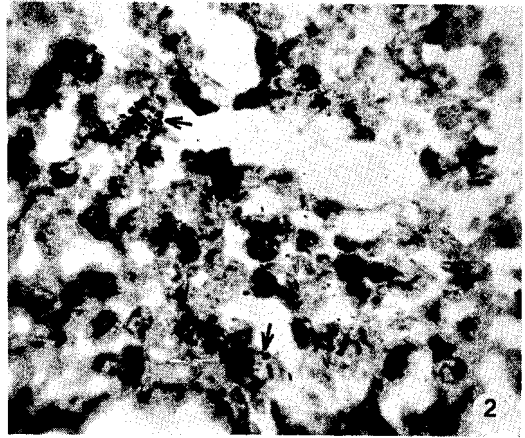


Fig. 2. Higher magnification of same field as shown in figure 1. Note the large pyroninophilic cells labelled with ^3H -thymidine (arrows) in the periarterial lymphocyte sheath. Methyl green pyronin stain. $\times 1,000$

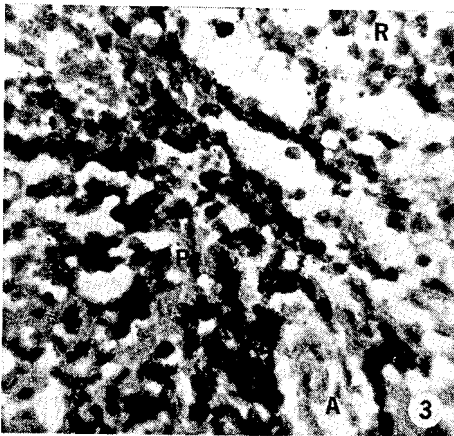


Fig. 3. Low magnification of the antigen injected spleen on the 8th day. A:artery, P:periarterial lymphocyte sheath, R:red pulp. Methyl green pyronin stain. $\times 400$

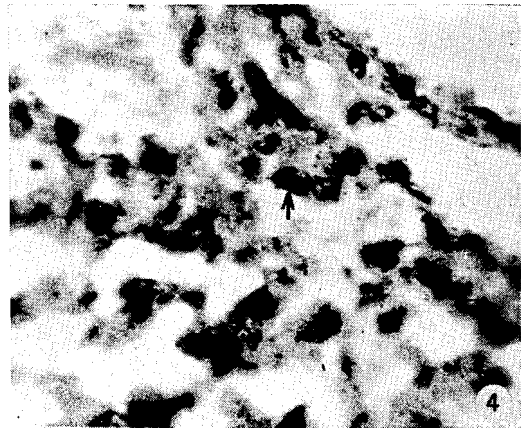


Fig. 4. Higher magnification of same field as shown in figure 3. Note the plasma cell (arrow) labelled with ^3H -thymidine at the junction of the red and white pulp. Methyl green pyronin stain. $\times 1,000$