

임신중 투여된 Azathioprine이 신생원쥐의 임파기관에 미치는 영향

Effects of the Azathioprine (Imuran) Administered During Pregnancy on the Lymphoid Organs of the Neonatal Rats

서울大學校 醫科大學 産婦人科教室

이 준 식 · 박 재 일

서울大學校 醫科大學 解剖學教室

장 가 용 · 차 중 익

서 론

면역억제제에는 corticosteroid, azathioprine(Imuran), cyclophosphamide, antilymphocyte serum 등이 있으며 이중 corticosteroid와 azathioprine이 임상적으로 가장 널리 사용되고 있는데, corticosteroid의 면역억제작용이나 부작용에 대해서는 많은 연구가 진행되어 있으나 azathioprine에 대해서는 아직 연구가 불충분한 실정이다.

azathioprine은 6-MP(6-mercaptopurine)의 유도체로서 synthetic purine analogue인데 원래는 암을 치료하기 위한 화학요법제로 개발되었으나 최근 동종이식 또는 자가면역병 등의 치료에 면역억제제(Berenbaum, 1962)로서 자주 사용하게 됨에 따라 이에 수반되는 여러가지 부작용이 문제로 대두되게 되었다(Eduardo, 1970; Daniel, 1972; Jones, 1974; Philip, 1975).

특히 Human Kidney Transplant Registry에서는 임신중 azathioprine 투여를 받은 환자 29명 가운데 7명이 자연유산이 되었다고 보고 하였으며 (Golby, 1970) Colorado대학에서는 임신중 azathioprine투여를 받은 환자 10명 가운데 2명은 미숙아를 낳아서 초자막병(hyaline membrane disease)으로 죽었으며 4명은 폐동맥관 협착증, 일시적인 부신부전증 혹은 호흡곤란증이 있는 아이를 낳았다는 보고가 있다(Penn 등, 1971).

또한 azathioprine이 임파기관에 미치는 영향으로는 개에서 azathioprine의 투여가 임파소절의 위축을 일으켰다는 보고(Starzl et al, 1964; Sokolowski & Olszewski, 1971)와 6-mercaptopurine이 임파계의 위축과 배아중심(germinal center)의 퇴축변화(involutive change)

를 일으켰다는 보고(Andre et al, 1962)가 있다.

한편 이등(1977)은 임신중인 원쥐에 azathioprine을 투여하여 태자 및 신생 원쥐의 임파기관을 조직학적으로 관찰한 결과 전반적으로 임파조직의 발육이 지연된 소견을 보고하였다.

따라서 저자는 임신중에 azathioprine 투여가 신생아의 면역능력획득에도 영향을 미칠 수 있는지를 규명하기 위하여 임신한 원쥐에 azathioprine을 투여한 후 신생원쥐에 plaque assay법 및 조직화학적 염색법을 이용하여 면역반응의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 200g 내외의 정상원쥐에서 교미에 의해 얻어진 임신한 원쥐 50마리와 이들에게서 출산된 신생원쥐 300마리를 사용하였으며 임신한 원쥐 50마리 중 25마리에는 임신 제 7일과 8일에 azathioprine을 각각 15mg/kg씩 경구 투여하였고 임신일은 교미후 질전(vaginal plug)이 확인된 때를 임신 제 0일로 정하였다. 신생원쥐 300마리는 아래와 같이 각군에 75마리씩 4군으로 나누고 각군에서 생후 제 1주, 4주, 8주, 12주 및 16주에 각각 15마리씩 항원(면양적혈구) 혹은 생리식염수를 주사하였으며 주사후 제 1일 3일 및 7일에 각각 5마리씩 도살하여 비장 및 흉선을 적출하였다.

제 1군: 임신제 7일과 8일에 azathioprine을 각각 15mg/kg씩 경구투여한 원쥐에서 태어난 신생원쥐에 항원(면양적혈구)을 복강내 주사한 군

제 2군: 임신 제 7일과 8일에 azathioprine을 각각 15mg/kg씩 경구 투여한 원쥐에서 태어난 신생원쥐에 생

리식염수만을 복강내 주사한 군

제 3군 : 정상원귀에서 태어난 신생원귀에 항원을 복강내 주사한 군

제 4군 : 정상원귀에서 태어난 신생원귀에 생리식염수만을 복강내 주사한 군

항원처리

항원은 Alsever액에 무균적으로 채취한 번양의 적혈구를 생리식염수로 3회 세척(4°C에서 1000 rpm으로 10분간 원심분리과정을 반복하였음)한 후 30% 적혈구부유액으로 만들어 사용하였으며 투여량은 마리당 1ml를 복강내로 1회 주사하였다.

조직처리과정

각군의 동물에서 비장 및 흉선을 적출한 후 각 조직의 일부는 60% ethyl alcohol과 formalin을 섞어서 만든 6% formalin용액에 1~2일간 4°C에서 고정하여 통상방법에 따라 paraffin포매를 한 후 5~6μ 두께의 조직 절편을 만들어 Methyl-Green Pyrorin 및 Silver염색을 하여 광학현미경에서 관찰하였다.

Plaque assay 과정

나머지 비장조직은 icebath에 들어있는 pH 7.2인 Hank's Balanced Saline Solution(이하 BSS로 약칭함)에 넣은후 세포부유액을 만들고 다시 BSS로 3회 원심분리를 하여 세척한 다음 cell packed volume을 1:10이 되게 BSS로 희석하여 재부유액을 만들어 plaque assay에 사용하였다. 이때 원심분리는 4°C에서 1000 rpm으로 10분간 시행하였다.

저자가 사용한 방법은 Jerne등(1963)의 plaque assay법의 변형으로 사용한 slide method로서 BSS에 0.5%가 되게 용해시킨 agarose용액 0.5ml와 BSS로 3회 세척한후 cell packed volume을 1:15가 되게 희석하여 얻은 면양적혈구 부유액 0.5ml를 미리 45°C 항온수조 속에 넣어 둔 시험관에다 넣고 여기에 각 조직에서 얻은 세포부유액 0.1ml를 가한 다음 시험관을 흔들어서 잘 섞은 후 실온에서 생리식염수에 0.2%가 되게 용해시킨 agarose를 얇게 바른 microscopic slide 위에 쏟아 agar층을 만들었다. 그후 각 agar slide는 건조를 방지할 수 있는 chamber 속에 넣고 여기에 guinea-pig에서 얻은 혈청을 1:10이 되게 BSS로 희석한 보체를 가한 다음 37°C 항온기에 3시간 동안 반응시킨 후 간접광선 아래에서 각 slide의 plaque 수를 계수하였다. 이때 명확히 않은 plaque는 광학현미경을 사용하여 plaque 중앙부에 존재하는 단일세포, 즉 용혈소를 분비하는 plaque-forming cell(이하 PFC로 약칭함)의 유무를 확인하였다.

그리고 본 실험의 성적은 각 조직에서 얻은 세포부유액중 1×10^6 개의 세포중 출혈하는 PFC의 수로 환산하여 표시하였다.

성 적

1. 비장에서의 plaque 형성세포

A. 항원 투여군에서의 plaque수의 변화

생후 1주부터 12주까지는 임신중 azathioprine을 투여한 제 1군이 투여하지 않은 제 3군에 비해서 적은 수의 plaque를 형성하다가 생후 16주에는 두 군사이의 차이가 없었다.

생후 1주에는 제 1군에서는 항원 투여후 제 1일, 3일 및 7일에 모두 plaque를 형성하지 않았으나 제 3군에서는 항원 투여후 제 3일에는 4개의 plaque를 형성하였고 항원 투여후 제 1일 및 7일에는 plaque를 형성하지 않았다<표 1>.

Table 1. Number of plaque-forming cells per 10^6 spleen cells of the antigen injected rat at the age of 1 wk.

Day after Ag injection	Group	
	Experimental group(group 1)	Control group (group 3)
1	0.0±0.00	0.0±0.00
3*	0.0±0.00	4.0±1.00
7	0.0±0.00	0.0±0.00

*p<0.01

생후 4주에는 제 1군에서는 항원투여후 제 1일에는 plaque를 형성하지 않았으나 제 3일에는 117.6개, 제 7일에는 84.6개의 plaque를 형성하였으나 제 3군에서는 항원투여후 제 1일에는 5.2개, 제 3일에는 170.7개

Table 2. Number of plaque-forming cells per 10^6 spleen cells of the antigen injected rat at the age of 4 wks.

Day after Ag injection	Group	
	Experimental group(group 1)	Control group (group 3)
1*	0.0±0.00	5.2±0.95
3*	117.6±10.16	170.7±14.17
7*	84.6±8.73	105.0±7.78

*p<0.01



제 7일에는 105개로서 제 3군에 비해 제 1군에서 적은 수의 plaque형성을 나타내었고 항원 투여후 제 3일에 그 차이가 가장 현저하였다<표 2>.

생후 8주에는 제 1군에서는 항원투여후 제 1일에 5.2개, 제 3일에 173개, 제 7일에 104개의 plaque를 형성하였으나 제 3군에서는 항원투여후 제 1일에 10.2개, 제 3일에 258.3개, 제 7일에 185개의 plaque를 형성하여 항원투여후 제 1일에는 제 1군과 제 3군이 비슷한 수의 plaque형성을 나타내었으나 항원투여후 제 3일 및 7일에는 제 3군에 비해 제 1군에서 훨씬 적은 수의

plaque형성을 나타내었다<표 3>.

생후 12주에는 제 1군에서는 항원투여후 제 1일에 19.6개, 제 3일에 302개, 제 7일에 157.6개의 plaque를 형성하였으나 제 3일에서는 항원투여후 제 1일에는 25.7개, 제 3일에는 470.7개, 제 7일에는 250.5개의 plaque를 형성하여 제 1군에서 제 3군에 비해 현저히 적은 수의 plaque형성을 나타내었으며 항원투여후 제 3일에 그 차이가 가장 심하였다.

Table 3. Number of plaque-forming cells per 10^6 spleen cells of the antigen injected rat at the age of 8 wks.

Day after Ag injection	Group	
	Experimental group(group 1)	Control group (group 3)
1*	5.2±1.48	10.2±1.50
3*	173.0±4.69	258.3±17.55
7*	104.0±4.63	185.0±8.83

*p<0.01

Table 4. Number of plaque-forming cells per 10^6 spleen cells of the antigen injected rat at the age of 12 wks.

Day after Ag injection	Group	
	Experimental group(group 1)	Control group (group 3)
1*	19.6±1.14	25.7±2.98
3*	302.0±6.67	470.7±10.99
7*	157.6±7.30	250.5±19.67

*p<0.01

생후 16주에는 제 1군에서는 항원 투여후 제 1일에는 28.5개 제 3일에는 469개, 제 7일에는 263.3개의

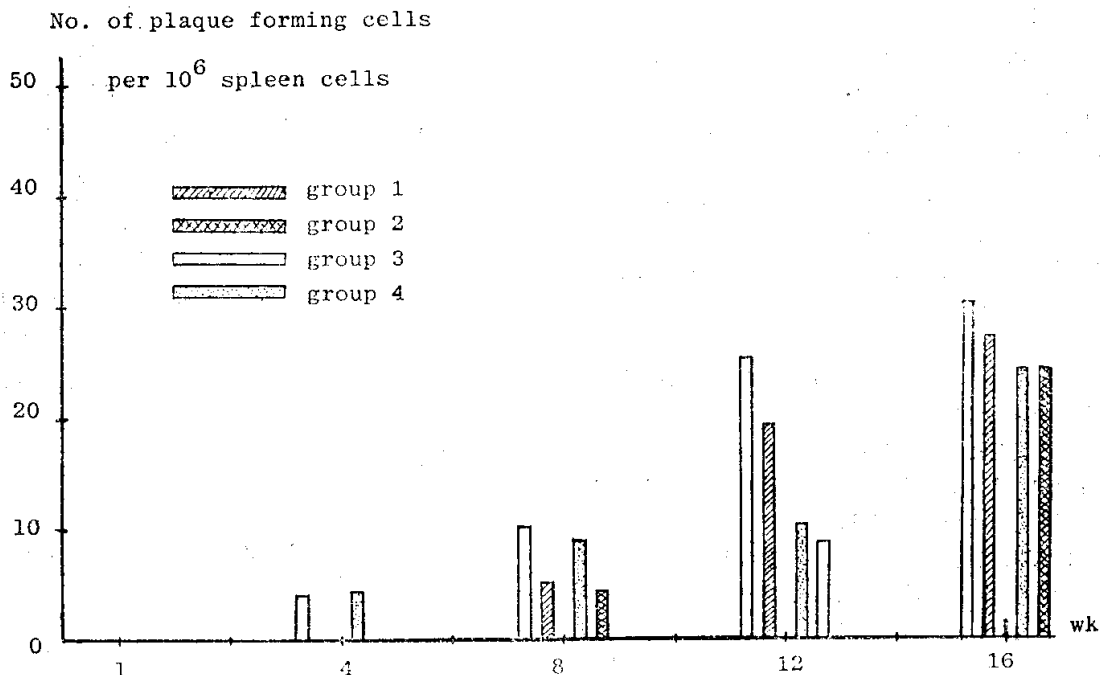


Fig. 1. Changes of the number of plaque forming cells with increasing age on the 1st day after antigen or saline injection.

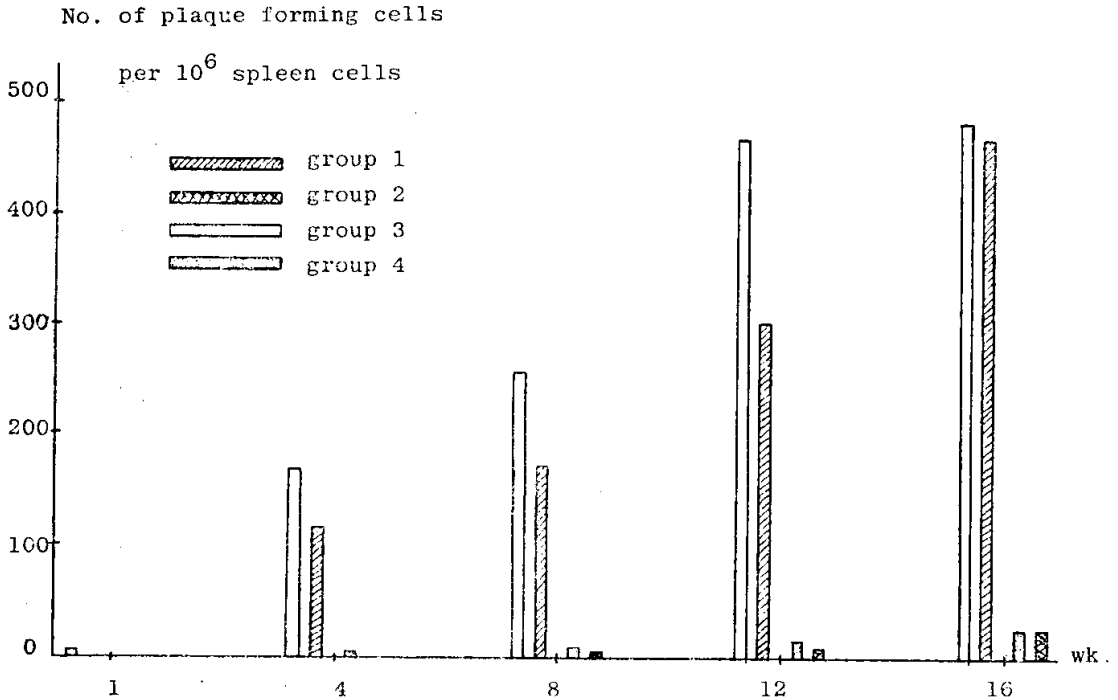


Fig. 2. Changes of the number of plaque forming cells with increasing age on the 3rd day after antigen or saline injection.

plaque를 형성하였으며 제 3군에서는 항원 투여후 제 1일에는 30.7개, 제 3일에는 485개, 제 7일에는 260개의 plaque를 형성하여 제 1군과 제 3군이 거의 같은 수의 plaque 형성을 나타내었다<표 5>.

Table 5. Number of plaque-forming cells per 10^6 spleen cells of the antigen injected rat at the age of 16 wks.

Day after Ag injection	Group	
	Experimental group(group 1)	Control group (group 3)
1	28.5 \pm 3.10	30.7 \pm 4.19
3	469.0 \pm 12.76	485.0 \pm 18.88
7	263.3 \pm 7.57	260.0 \pm 10.14

제 1군과 제 3군에 있어서 흰쥐의 연령 증가에 따른 plaque 형성의 변화를 보면 항원 투여후 제 1일의 경우에는 생후 1주에 제 1군과 제 3군이 모두 plaque를 형성하지 않았으나 생후 4주부터 12주까지는 제 3군에 비해 제 1군에서 적은수의 plaque 형성을 나타내었으며 생후 16주에는 제 1군과 제 3군이 비슷한 수의 plaque

형성을 나타내었다<그림 1>.

항원 투여후 제 3일의 경우 1주에 있어서는 제 1군과 제 3군이 거의 plaque를 형성하지 않았으므로 별로 차이가 없었으나 생후 4주부터 12주까지는 제 1군이 제 3군에 비해 적은 수의 plaque 형성을 나타내었으며 생후 16주에는 제 1군과 제 3군이 거의 같은 수의 plaque를 형성하였다<그림 2>.

항원 투여후 제 7일의 경우에는 제 3일의 경우와 같은 경향을 나타내었으나 제 1군과 제 3군이 모두 제 3일의 경우에 비해서는 적은 수의 plaque 형성을 나타내

Table 6. Number of plaque-forming cells per 10^6 spleen cells of the saline injected rat at the age of 1 wk.

Day after saline injection	Group	
	Experimental group(group 2)	Control group (group 4)
1	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00
3	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00
7	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00

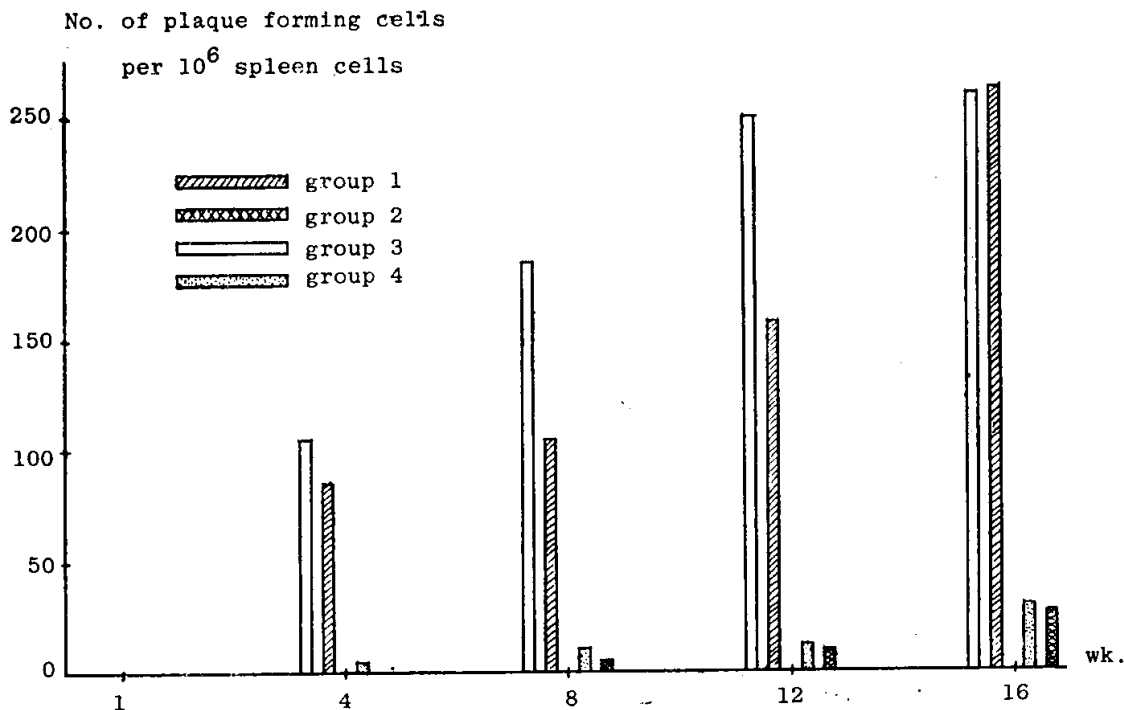


Fig. 3. Changes of the number of plaque forming cells with increasing age on the 7th day after antigen or saline injection.

었다(그림 3).

B. 항원을 투여하지 않은 군에서의 plaque 수의 변화
 생후 1주의 흰쥐에서는 제 2군과 제 4군이 모두 plaque를 형성하지 않아서 차이가 없었으나 생후 4주부터 12주까지는 제 2군이 제 4군에 비해서 적은 수의 plaque형성을 나타내었고 생후 16주에는 제 2군과 제 4군이 비슷한 수의 plaque를 형성하였다. <표 6, 7, 8, 9 및 10과 그림 1, 2 및 3>

Table 7. Number of plaque-forming cells per 10^6 spleen cells of the saline injected rat at the age of 4 wks.

Day after saline injection	Group	
	Experimental group(group 2)	Control group (group 4)
1*	0.0±0.00	4.5±1.29
3*	0.0±0.00	5.7±0.95
7*	0.0±0.00	5.0±1.73

*p<0.01

Table 8. Number of plaque-forming cells per 10^6 spleen cells of the saline injected rat at the age of 8 wks.

Day after saline injection	Group	
	Experimental group(group 2)	Control group (group 4)
1*	4.5±0.57	9.0±0.81
3*	5.2±1.25	9.5±1.29
7*	5.0±0.81	10.0±1.82

*p<0.01

2. 조직학적 소견

미장의 methyl green-pyronin 염색에서 항원을 투여한 제 1군과 제 3군의 경우 생후 1주에는 적수 (red pulp)에 비해 백수(white pulp)의 발달이 빈약하였으며 동맥주위림파구초(periarterial lymphocyte sheath)에서 large pyroninophilic cell이 관찰되지 않았다.

생후 4주에는 미장에 백수가 1주에 비해서 충분히 발달되어 있었으며 동맥주위림파구초의 핵에는 DNA가 많기 때문에 methyl green에 청색으로 염색되고 세포질에는 RNA가 많기 때문에 pyronin에 적색으로 염색

Table 9. Number of plaque-forming cells per 10⁶ spleen cells of the saline injected rat at the age of 12 wks.

Day after saline injection	Group	
	Experimental group(group 2)	Control group (group 4)
1	9.0±0.81	10.5±2.38
3*	9.5±1.29	14.2±1.70
7	10.0±1.82	12.7±1.71

*p<0.01

Table 10. Number of plaque-forming cells per 10⁶ spleen cells of the saline injected rat at the age of 16 wks.

Day after saline injection	Group	
	Experimental group(group 2)	Control group (group 4)
1	24.7±1.70	24.5±2.88
3	28.2±2.62	27.0±3.91
7	27.2±3.86	30.2±2.21

되는 large pyroninophilic cell이 제 3군에서 제 1군에 비해 훨씬 많이 나타났다고(그림 4 및 5).

생후 8주 및 12주에는 동맥주위입파구조에 large pyroninophilic cell이 제 1군과 제 3군에서 모두 4주에 비해 많이 나타났는데 제 1군에서 제 3군에 비해 약간 적게 나타났다.

생후 16주에는 동맥주위입파구조에 large pyroninophilic cell이 상당히 많이 나타났는데 제 1군과 제 3군이 별로 조직학적 차이를 보이지 않았다(그림 6 및 7).

항원을 투여하지 않은 군의 경우 생후 1주에는 제 2군의 동맥주위입파구조에 있는 입파구가 제 4군의 입파구에 비해 세포의 크기가 약간 크며 핵에는 소량의 염색질과 큰 핵소체를 가지고 있는 미성숙 입파구가 많이 나타났으며 생후 4주 이후에는 제 2군과 제 4군 사이에 별로 조직학적 차이를 나타나지 않았다.

흉선은 methyl green pyrorin 염색에서 생후 제 4주 및 8주에 azathioprine을 투여한 군(제 1군 및 제 2군)이 azathioprine을 투여하지 않은 군(제 3군 및 제 4군)에 비해서 피질 전반에 걸쳐 미성숙 흉선세포가 많이 나타났으므로 피질과 수질의 구별이 덜 뚜렷하여 흉선의 발달이 지연된 조직학적 소견을 나타냈으나(그림 8 및 9) 생후 16주에는 azathioprine을 투여한 군과 투여

하지 않은 군이 거의 같은 조직학적 소견을 나타내었는데 두 군이 모두 흉선의 발달이 충분히 이루어져서 피질과 수질의 구별이 뚜렷하였다.

Silver 염색에서는 비장에서 생후 1주 및 4주에는 azathioprine을 투여한 군의 백수에 세망섬유(reticular fiber)가 azathioprine을 투여하지 않은 군에 비해 적게 나타났으나 8주 이후에는 두 군 사이에 별로 조직학적 차이가 없었다.

고 찰

azathioprine의 면역반응에 미치는 영향에 대해서는 여러 학자들이 연구를 하였으나 아직 연구자들 간의 의견의 일치를 보지 못하고 있는 성질이다.

Santos와 Owens(1965), Rölinghoff(1973) 및 Otterness와 Chang(1976) 등은 azathioprine이 세포면역반응과 체액면역반응을 모두 감소시키는 작용을 갖고 있다고 주장하는데 반해서 Camiener와 Wechter(1971) 및 Abdou등(1973)은 azathioprine이 체액성 면역반응만을 선택적으로 감소시킨다고 주장하였다.

한편 Bach등(1969), Bach(1971) 및 Fournier등(1973) 등은 azathioprine이 T-세포만을 선택적으로 억제하는 작용을 갖고 있다고 하였으며 Brown등(1976)은 B-세포 유사분열물질의 작용을 억제하는데 필요한 azathioprine의 양보다 적은 양의 azathioprine으로 T-세포 유사분열물질의 작용을 억제하였다고 보고 하면서 T-세포가 B-세포보다 azathioprine에 더 감응성이 강하다는 의견을 암시하였다.

또한 Rölinghoff등(1973)과 Galanud등(1975)은 T-cell dependent antigen에 의한 면역반응이 T-cell independent antigen에 의한 면역반응보다 azathioprine에 의해서 더욱 쉽게 억제된다고 보고하였다.

위의 사실들을 종합해 볼때 azathioprine의 면역반응에 미치는 영향은 T-세포에 대한 작용이 중요한 영향을 미치는 것으로 생각되므로 본 실험에서는 T-dependent antigen인 면양적혈구를 항원으로 사용하여 실험을 하였다.

본 실험에서 관찰한 바에 의하면 비장내의 입파구 중 항원으로 면양적혈구를 투여한 후 나타나는 항체를 생성하는 plaque-forming cell (PFC)의 숫자가 임신중 azathioprine을 투여한 군에서 투여하지 않은 군에 비해 감소한 성적을 나타내었다. 이러한 현상은 생후 1주에는 PFC가 거의 나타나지 않았으므로 두 군 사이에 차이가 없었으나 생후 4주, 8주 및 12주에는 azathiop-

rine을 투여한 군에서 현저히 감소하였으며 생후 16주에는 두 군 사이에 차이가 없었다.

표 1 및 6에서 보이는 바와 같이 생후 1주에 PFC가 거의 나타나지 않은 것은 신생 흰쥐는 생후 몇일 동안은 항원의 자극에 대해서 항체를 형성하지 않는다는 Cooper와 Lawton(1974)의 보고와 일치하는 결과이며 이러한 사실은 흉선에서 T-세포가 말초 임파기관으로 이동하는 시기가 출생을 전후하여 시작하므로 (Raff Owen, 1971) 생후 1주까지는 비장에 T-helper cell이 충분히 형성되지 않아서 T-dependent antigen인 면양적혈구에 대한 면역반응이 제대로 일어나지 않은 결과라고 해석된다. 이러한 사실은 T-dependent antigen인 면양적혈구를 흰쥐에 투여했을 때에는 생후 1주에 PFC가 전혀 형성되지 않았는데 T-independent antigen인 DNP₃₂ Ficoll을 투여했을 때에는 1주에 PFC가 10%개의 비장세포중 80개 정도 형성되었다는 Mosier와 Cohen(1975)의 실험이 뒷받침 해 주고 있다.

생후 4주, 8주 및 12주에 있어서 항원 투여후 PFC의 출현이 임신중 azathioprine을 투여한 군에서 azathioprine을 투여하지 않은 군에서보다 감소된 것은 azathioprine이 흉선의 발육을 지연시킴으로 인하여 비장에 T-helper cell이 충분히 형성되지 않았고, 따라서 T-세포와 B-세포의 면역반응에 있어서의 협동작용(collaboration)이 제대로 이루어지지 않아서 (Claman et al, 1967) T-dependent antigen에 대한 B-세포의 항체생성이 저하된 것이라고 생각되며 이것은 본 실험에서 생후 4주의 흉선을 조직학적으로 관찰한 결과 임신중 azathioprine을 투여한 군이 투여하지 않은 군에 비해서 흉선의 발달이 지연된 조직학적 소견을 나타낸 것과 일치하는 결과이다.

생후 16주에는 임신중 azathioprine을 투여한 군과 투여하지 않은 군이 거의 같은 수의 plaque를 형성하였는데 이때에는 흉선이 조직학적으로 두군 사이에 차이가 없음을 나타내었다.

본 실험에서 생리식염수만을 주사한 제 2군 및 4군의 비장에서 소수이기는 하지만 뚜렷한 plaque가 출현하는 것을 볼 수 있었는데 이와 같은 결과는 실험 조작중 오염에 의한 경우이거나 혹은 사용된 동물이 주어진 항원과 교차반응을 가지는 항원을 갖고 있을 경우, 아니면 이 동물들이 전에 면양적혈구의 항원에 이미 노출되어 있었을 경우 등을 생각할 수 있다. Jerne(1963), Kim 등(1969)에 의하면 면양적혈구의 항원은 자연계에 널리 분포되어 있기 때문에 자연환경에서 사육한 동물의 경우 plaque가 나타날 수 있다고 보고

하고 있어서 본 실험의 제 2군 및 4군에서의 양성반응은 이러한데 원인이 있었다고 생각할 수 있다.

plaque assay에 의해서 나타난 변화를 조직학적으로 뒷받침하기 위해서 비장에 methyl green-pyronin염색을 하여 관찰하였는데 생후 1주에는 백수에 large pyroninophilic cell이 거의 나타나지 않아서 이때 PFC가 나타나지 않은 것과 일치하는 결과를 보였으며 생후 4주, 8주 및 12주에는 azathioprine을 투여하지 않은 군에서 투여한 군보다 large pyroninophilic cell이 현저히 많이 나타나서 plaque assay의 결과와 부합하였으나 생후 16주에는 조직학적으로는 양 군간에 차이를 발견할 수 없었다.

결 론

임신중 azathioprine 사용이 신생아의 면역능력 획득에 영향을 미치는가를 규명하기 위하여 본 실험을 실행하였다.

즉 Sprague-Dawley계의 임신한 흰쥐에 azathioprine을 투여하고 여기에서 태어난 신생 흰쥐에 제 1주, 4주, 8주, 12주 및 16주에 해당하는 날에 항원을 주사한 후 비장 및 흉선을 적출하여 plaque assay법 및 조직화학적 염색법에 의해 면역 반응을 대조군과 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 생후 제 1주의 비장에서는 태생기중 azathioprine을 투여받은 군이나 투여받지 않은 군에서 모두 plaque-forming cell 및 large pyroninophilic cell이 나타나지 않았다.

2. 생후 제 4주, 8주 및 12주의 비장에는 azathioprine을 투여받은 군이 투여받지 않은 군에 비해 항원투여 후에는 plaque-forming cell 및 large pyroninophilic cell의 수가 훨씬 적게 나타났는데 생리식염수 투여 후에는 약간 적게 나타났다.

3. 생후 제 16주에서는 azathioprine을 투여받은 군이나 투여받지 않은 군에서 모두 거의 같은 수의 plaque-forming cell 및 large pyroninophilic cell이 나타났다.

4. 흉선의 조직학적 관찰에서 생후 제 8주 이전에는 azathioprine을 투여받은 군이 투여받지 않은 군에 비해 피질의 발육이 지연되어 미성숙한 흉선세포가 나타났으나 생후 제 12주 및 16주에서는 발육정도가 양 군간에 비슷하였다.

이상의 결과는 임신중 azathioprine 투여가 흉선의 발육을 지연시켜서 신생흰쥐의 항체생성에 장애를 준 것으로 추측된다.

—ABSTRACT—

Effects of the Azathioprine Administered during Pregnancy on the Lymphoid Organs of the Neonatal Rats.

Choon Sik Lee, Jae Il Park

Dept. of Obstetrics and Gynecology

Ka Yong Chang, Choong Ik Cha

Dept. of Anatomy

College of Medicine, Seoul National University

The following experiment was performed to study the effect of azathioprine administered during pregnancy on the development of lymphoid organs of neonatal rats.

The experimental animals were the three hundred Sprague-Dawley neonatal rats which were divided into four groups. The animals born from the azathioprine-administered adults during pregnancy were named for group 1 and 2, and were injected with antigen to group 1 and saline to group 2 respectively after birth. The animals of group 3 and 4 were born from the adults free of azathioprine during pregnancy and were injected with antigen to group 3 and saline to group 4 respectively after birth.

Antigen or saline was injected intraperitoneally on the 1st, 4th, 9th, 12th and 16th week after birth. Then the spleen and thymus were resected on the 1st, 3rd, and 7th day after the injection for the plaque assay and histochemical studies.

The following results were obtained:

1. No plaque-forming cells and large pyroninophilic cells were observed in the spleens of all groups on the first week after birth.

2. The number of plaque-forming cells and large pyroninophilic cells observed in the spleens was much less after antigen injection but a little less after saline injection in the group of azathioprine administration than in the control group on the 4th, 8th and 12th week after birth.

3. A similar number of many plaque-forming cells and large pyroninophilic cells were observed in the all groups on the 16th week after birth.

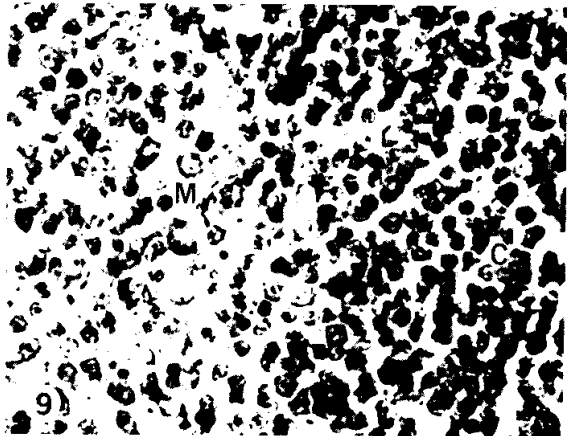
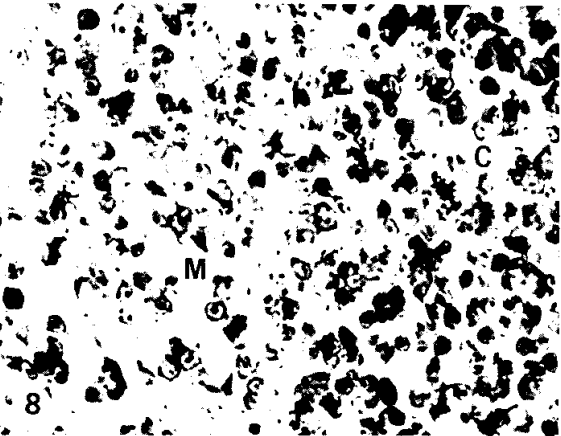
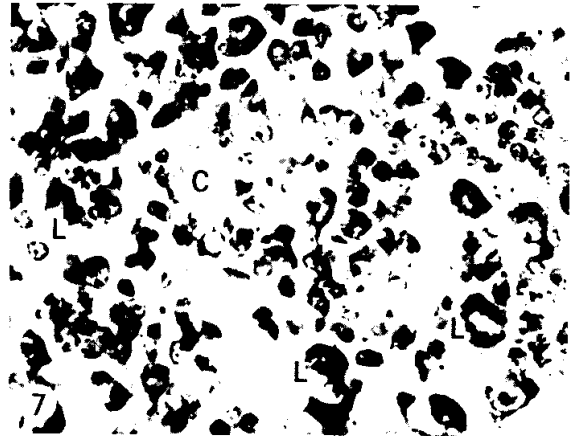
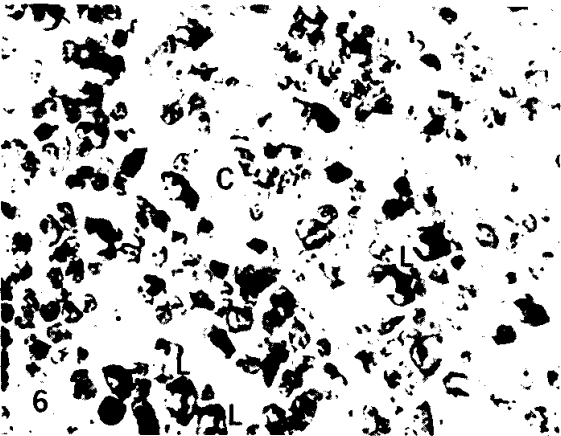
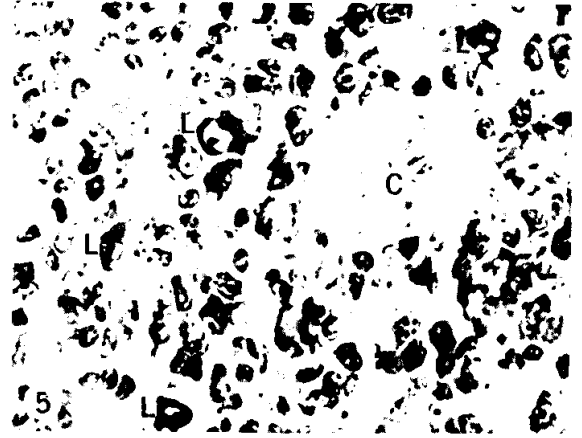
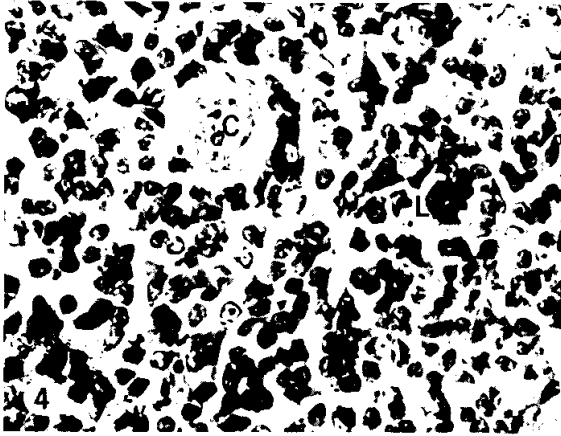
4. While the development of thymus was retarded histologically for the groups of azathioprine administration than the control groups until the 8th week after birth, a similar development of thymus between the two groups was observed on the 12th and 16th week after birth.

5. It may be suggested that administration of azathioprine did interfere with the development of T-lymphocyte and consequently affected the formation of antibody due to the insufficient collaboration between T cells and B cells.

REFERENCES

- 이광호, 차중익, 조사선, 문용자, 장가용: *Imuran*이 흰쥐 태자의 흉선발육에 미치는 영향. *서울의대학술지* 18:63, 1977.
- Abdou, N.T. et al.: *Effects of azathioprine therapy on bone marrow dependent and thymus dependent cells in man. Clin. Exp. immunol.* 13:55, 1973.
- Andre, J, et al: *Lymphoid responses to skin homografts. II. Effects of antimetabolites. Blood.* 19:334, 1962.
- Bach, J.F.: *Immunosuppression by chemical agents. Transpl, Proc.* 3:27, 1971.
- Bach, J.F. et al: *In vitro evaluation of immunosuppressive drugs. Nature (Lond):* 222:998. 1969.
- Bach, J.F. & M. Dardenne: *Activities of immunosuppressive agents in vitro. I. Rosette inhibition by azathioprine. Rev. franc. etud. clin.* 16:770, 1971.
- Bach, J.F. & M. Dardenne: *Antigen recognition by T lymphocytes. II, Similar effects of azathioprine, antilymphocyte serum, and anti-theta serum on rosette forming lymphocytes in normal and neonatally thymectomized mice. Cell. Immunol.* 3:11, 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, 1962.
- Brown, T.E. et al.: *The immunosuppressive mechanism of azathioprine. Transplantation* 21:27, 1976.
- Camienner, G.W. & W.J. Wechter: *Immunosuppression-agents, procedures, speculation and prognosis. Progr. Drug Res.* 16:67, 1971.
- Chan, G.R. & R.L. Stone: *Inhibition of nucleic acid and protein synthesis in mouse spleen cells in vitro*

- by azathioprine. *Appl. Microbiol.* 20:910, 1970.
- Claman, H.N. et al.: *Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 122:1167, 1967.
- Cooper, M.D. & A.R. Lawton: *The development of the immune system. Sci. Am.* 230:58, 1974.
- Daniel, M. et al: *Inhibition of cell proliferation by azathioprine. Cancer Res.* 32:1226, 1972.
- Danier, E. & W.P. Armstrong: *Induction of antibody formation and tolerance in vitro to a purified antigen. Lancet* 11:1281, 1967.
- Dutton, R.W. & R.J. Mishell: *Cell populations and cell proliferation in the in vitro response of normal mouse spleen to heterologous erythrocytes. J. Exp. Med.* 126:443, 1976.
- Eduardo, M.G. et al.: *Modification of nucleic acid synthesis in regenerating liver by azathioprine. Surgery* 68:254, 1970.
- Feldmann, M. & M.B. Pepys: *Role of C3 in vitro lymphocyte cooperation. Nature (Lond)* 249:159, 1974.
- Fournier, C. et al.: *Selective action of azathioprine on T cells. Transpl. Proc.* 5:523, 1973.
- Galanaud, P. et al: *Effect of azathioprine on in vitro antibody response. Clin. Exp. Immunol.* 22: 139. 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, 1976.
- Golby, M.: *Fertilty after renal transplantation. Transplantation* 10:201-207, 1970.
- Jerne, N.K. et al.: *In Cell Bound Antibodies*, p. 109. Wister Institute Press, Philadelphia, 1963.
- Jones, R.A.: *Larger doses of immunosuppressive drugs. Lancet* 2:107, 1974.
- Kim, Y.B. & D.W. Watson: *The true primary immune response in germfree colostrum deprived piglets, in Germ-Free Biology, Plenum Press, P. 259.* 1969.
- Lagrange, P.H. et al.: *Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T-cells. J. Exp. Med.* 139:528, 1974.
- Malamud, P. et al.: *Inhibition of cell proliferation. Cancer Res.* 32:1226, 1972.
- Mosier, D.E. & P.L. Cohen: *Ontogeny of mouse T-lymphocyte function. Fed. Proc.* 34:137, 1975.
- Otterness, I. G. & Y.H. Chang: *Comparative study of cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, azathioprine and methotrexate. Clin. Exp. Immunol.* 26:346, 1976.
- Penn, I. et al.: *Parenthood in renal homograft recipients. JAMA* 216:1755, 1971.
- Philip, S.S. et al.: *Immunosuppressive and cytotoxic chemotherapy: Long-term complications. Ann. Int. Med.* 82:84, 1975.
- Poulter L.W. et al: *Different effect of azathioprine on θ -antigenicity of mouse lymphocytes. Immunology* 26:777, 1974.
- Raff, M.C. & J.T. Owen: *European J. Immunol.* 1: 27, 1971. Cited by Mosier & Cohen (1975)
- Röllinghoff, M. et al.: *Effect of azathioprine and cytosine arabinoside on humoral and cellular immunity in vitro. Clin. Exp. Immunol* 15:261. 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, 1965.
- Sokolowski, J. & W. Olszewski: *Biochemical and histological changes following imuran administration. Pol. Med.* 10:717, 1971.
- Starzl, T.E. et al.: *Experience in Renal Transplantation. W.B. Saunders Philadelphia,* 1964.
- Wagner, H.: *The correlation between the proliferative and the cytotoxic responses of mouse lymphocytes to allogeneic cells in vitro. J. Immunol.* 109:630, 1972.
- Wagner, H. & M. Feldmann: *Cell-mediated immune response in vitro. I. A new in vitro system for the generation of cell-mediated cytotoxic activity. Cell. Immunol.* 3:405, 1972.
- Winkelstein, A.: *Differential effects of immunosuppressants on lymphocyte function. J. Clin. Invest.* 52: 2293, 1973.



Legends of Figures

- Fig. 4.** Periarterial lymphocyte sheath in the spleen of the 4 weeks old rat in the group 1 on the 3rd day after antigen injection. A few large pyroninophilic cells are observed. C: Central artery, L: Large pyroninophilic cell. MGP stain, X400
- Fig. 5.** Periarterial lymphocyte sheath in the spleen of the 4 weeks old rat in the group 3 on the 3rd day after antigen injection. Note the numerous large pyroninophilic cells in the periarterial lymphocyte sheath. C: Central artery, L: Large pyroninophilic cell. MGP stain, X400
- Fig. 6.** Periarterial lymphocyte sheath in the spleen of the 16 weeks old rat in the group 1 on the 3rd day after antigen injection. Numerous large pyroninophilic cells are seen in the periarterial lymphocyte sheath. C: Central artery, L: Large pyroninophilic cell. MGP stain, X400
- Fig. 7.** Periarterial lymphocyte sheath in the spleen of the 16 weeks old rat in the group 3 on the 3rd day after antigen injection. Note the numerous large pyroninophilic cells in the periarterial lymphocyte sheath as those in the Fig. 6. C: Central artery, L: Large pyroninophilic cell. MGP stain, X400
- Fig. 8.** Corticomedullary junction in the thymus of the 4 weeks old rat in the group 1. The distinction between cortex and medulla is not clear. C: Cortex, M: Medulla. MGP stain, X400
- Fig. 9.** Corticomedullary junction in the thymus of the 4 weeks old rat in the group 3. The distinction between cortex and medulla is more clear than that in the Fig. 8. C: Cortex, M: Medulla, MGPstain, X400