

Cyclophosphamide가 마우스의 면역기억에 미치는 영향

전북대학교 의과대학 미생물학교실* 및 전북대학교 대학원 의학과**

박영민*, 박윤규**, 안우섭**, 하대유*

=Abstract=

Effects of Cyclophosphamide on Immunological Memory in Mice

Young-Min Park*, Yoon-Kyu Park**, Woo-Sup Ahn** and Tai-You Ha*

Department of Immunology and Microbiology, Chonbuk National University Medical School and
Department of Medical Science**, Chonbuk National University Graduate School,
Chonbuk, Korea*

The use of alkylating agent cyclophosphamide(CY), a widely used antitumor drug is well known as a potent immunosuppressant and has been used as a probe for investigating the functional capabilities of lymphocyte subsets of both T and B cells that play an important role in the regulation of the immune response. The present study was undertaken in an effort to assess the effects of CY on immunological memory in murine model. CY, given as a single dose of CY(250mg/kg) before sensitization with sheep red blood cells(SRBC) enhanced the primary response of Arthus and delayed-type hypersensitivity(DTH), as measured by footpad swelling reaction, but suppressed their tertiary DTH response. The similar CY pretreatment enhanced both the primary and tertiary hemagglutinin(HA) responses to SRBC, and the tertiary antibody response against polyvinylpyrrolidone(PVP), a thymus-independent antigen but not the primary response against PVP. CY, given as a single dose of 250mg/kg 2 days before the primary immunization and two doses of 100mg/kg 2 days before the secondary and tertiary immunization, markedly suppressed the tertiary DTH and HA responses to SRBC. However, CY, given as small multiple daily doses(10mg/kg) over 4 days before sensitization but not after sensitization, enhanced the secondary HA response to SRBC. Contact sensitivity to dinitrofluorobenzene(DNFB) was suppressed by the drug, given either as a single large dose(300mg/kg) or as multiple dose(10mg/kg) administered 2 days before, together with or after DNFB sensitization. This suppression was more pronounced and more significant when CY was given as multiple dose. However, the enhancement of the secondary contact sensitivity to DNFB by CY was not clear-cut. The splenectomy appears to increase the enhancing effect of CY on contact sensitivity. These results suggest that CY selectively influences the immune response depending on the time of the drug administration relative to immunization and that the secondary or tertiary immune response involve memory cells with different susceptibilities to CY. Moreover, these results suggest that multiple low doses may selectively inhibit suppressor T cell proliferation involving DTH, HA or contact sensitivity without effecting helper T cells, but high doses presumably inhibit helper T cells and suppressor T cells with effecting B cells.

Key Words: Immunos Immunological memory/Cyclophosphamide/Splenectomy.

서 론

Cyclophosphamide(CY)는 임상에서 항생제로 비교적 널리 사용되고 있는 약제로서, 이 알킬화 약

제인 CY는 면역억제제로서도 잘 알려져 있으며, 실험동물에 있어서 투여시기와 투여량에 따라 지연성 과민반응(DTH)을 현저히 증가시키기도 하고 반대로 현저히 억제시키기도 하는 면역조절작용을 가지고 있으며¹⁾, 특히 Askenase 등¹⁰⁾에 의하여 CY가

suppressor T cell(T_s)을 억제한다는 보고 이후 CY는 여러 가지 실험모델의 면역반응 조절을 연구하는데 probe로 널리 이용되고 있다¹⁴. 하등¹⁵은 CY에 의하여 체액성 면역반응은 현저히 억제되었으나, 세포성 면역반응은 오히려 증가되었다고 보고하였으며, 또한 정등¹⁶은 마우스를 CY로 처리할 경우 말초 임파조직의 흉선비의존역 뿐만 아니라 흉선의존역에도 역시 심한 세포손상이 초래되었으며, CY로 처리하기 전에 마우스에 phytohemagglutinin을 투여하면 체액성 면역반응 뿐만아니라 세포성 면역반응도 역시 감소되었는데, 이는 B세포와 같이 T_s 가 다른 임파구보다 CY에 더 감수성이 있기 때문일 것이라고 고안하였다.

B 및 T세포는 항원특이성 수용체를 가지고 있으며, 제 1차 임파계 기관에서 소위 virgin lymphoid pool을 형성하고 있으며, 이들이 항원자극을 받으면 증식하여 clone을 형성하여 세포독성 T세포(T_c), 면역억제능을 가지고 T_s 또는 성숙한 B세포로부터 항체형성세포(형질세포)와 같은 작동세포(effector cell)로 분화하거나 기억세포로 분화한다. 이들 기억세포가 다시 특이항원 자극을 받으면 제 1차 반응때 보다 급속하고 광범위하게 증식하여 강력한 제 2차 반응을 일으키며, clone의 일부세포는 작동세포로 성숙해가며, 다른 일부세포는 기억세포로 남게된다는 것은 잘 알려져 있다¹⁷. 또한 이 면역학적 기억은 특이반응이며, 면역반응의 중요한 특징 중의 하나이다.

상기한 바와 같이 CY가 면역조절능을 가지고 있고, 면역시스템에 선택적으로 작용한다는 보고는 비교적 많으나 CY가 면역기억에 미치는 영향에 관한 보고는, CY가 제 2차 IgG_2 ·항-BGG 항체반응은 억제하나 IgG_1 ·항-BGG 항체반응에는 영향을 미치지 않았다는 Drössler 등¹⁸(1981)의 보고와 DTH 반응에 관여하는 effector cells에 비하여 기억세포는 CY에 대하여 CY투여조건에 따라 각기 다른 감수성을 나타내었으며, CY가 IgG_2 항체반응을 조절하는 T_s 세포는 억제하였으나 IgG_1 항체반응은 억제하지 않았다는 Drössler 등¹⁹의 보고 이외에는 CY가 면역기억세포에 미치는 영향에 관한 연구보고는 찾아볼 수 없었으며, 특히 CY가 면양적혈구(SRBC)에 대한 DTH 그리고 B세포기능에 관여하는 흉선비의존성 항원에 대한 면역기억에 관한 보고도 찾아볼 수 없었다.

최근 Sabolovic 등²⁰은 Basidiomycetes로부터 유래한 다당질(ps-k)이 종양을 가지고 있는 마우스의 생존율을 증가시켰고, 놀랍게도 비장절제가 종양보유 마우스의 ps-k 치료에 더욱 잘 반응하였다고 보

고 하였으며, Ferrante¹⁹은 비장절제된 환자로부터 유래한 단핵백혈구의 natural killer cytotoxicity가 증가되었다고 보고하였다.

따라서 저자는 CY가 SRBC에 대한 항체반응과 DTH 반응 및 dinitrofluorobenzene(DNFB)에 대한 접촉성 과민반응, 그리고 흉선비의존성항원인 polyvinylpyrrolidone(PVP)에 대한 기억반응에 미치는 영향과 아울러 비장절제가 CY의 DNFB에 대한 접촉성 과민반응조절에 미치는 영향에 관하여 실험하여 흥미있는 결과를 얻었으므로 이를 제시하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험동물

대부분의 실험동물은 전북대학교 의과대학 미생물학교실에서 사육하고 있는 생후 8-10주된 ICR 마우스를 사용하였고, 일부 실험에는 원래 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)로부터 분양받아 전북대학교 의과대학 미생물학교실에 사육하고 있는 생후 10-12주된 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 이들 마우스는 암수 구별없이 사용하였으며, 실험군과 대조군은 항상 동성의 마우스를 사용하였고, 이들은 폴리카보네이트 케이지에 5~10마리씩 넣어 실험동물 pellet사료(제일사료 주식회사, 대전)를 공급하고 가능한 한 스트레스를 받지 않도록 하여 사육하였다.

항 원

흉선비의존성항원으로는 면양적혈구(SRBC)를 사용하였다. SRBC는 전북대학교 의과대학에서 사육하고 있는 면양경정맥으로부터 해파린을 가한 주사기로 채혈한 후 동량의 Alsever 씨액(PH 6.1)을 가하여 4~6°C에 보관하면서 1주일 이내에 사용하였다. 보관중인 SRBC를 사용할 때는 사용직 전에 인산완충액(PBS, PH 7.2)으로 3회 원심세척하여 필요한 농도로 PBS에 부유하여 사용하였다. 흉선비의존성항원으로는 polyvinylpyrrolidone(PVP; PVP_{K300}, 분자량 360KD, GAF Corporation, N.Y)을 사용하였다. 접촉성 과민반응 분석을 위한 항원으로는 2, 4-dinitro 20-1-fluorobenzene(DNFB; SIGMA Chemical Company, St Louis, MO)을 사용하였다.

SRBC 면역조치 및 SRBC에 대한 Arthus 및 DH 반응검사

SRBC 면역조치, Arthus 및 DTH 반응검사는 하등¹⁵이 기술한 즉취종창반응을 이용하여 실시하였

다. 간기하면, 10% SRBC 부유액 1ml를 마우스복강에 주사하여 제 1차 면역조치하고, 면역 후 4일에 20% SRBC 부유액 0.03ml를 마우스의 족척피하에 야기주사하였다. 족척종창 정도는 Mitutoyo engineer's micrometer를 사용하여 야기주사 직전(T_0), 3시간(T_3) 및 24시간(T_{24})에 측정하였으며, 종창 정도의 증가는 다음 공식에 따라 %증가로 표시하였다.

$$\text{즉, \% Increase} = \{(T_3 \text{ or } T_{24} - T_0) / T_0\} \times 100$$

면역기억능을 검사하기 위한 제 2 및 제 3차 면역조치는 제 1차 면역 후 15일에 제 2차 면역하였으며, 제 2차 면역 후 6개월에 제 1차 면역 때와 같은 양의 SRBC로 면역조치 하였으며, 각 면역조치 후 4일에 야기주사하여 Arthus반응과 DTH반응을 측정하였다.

SRBC에 대한 응집소 측정

10% SRBC 부유액 1ml를 마우스 복강에 주사하여 제 1차 면역하고, 제 1차 면역 후 15일에 제 2차 면역을 하였으며, 제 3차 면역은 제 2차 면역 후 6개월 후에 실시하였다. 항체가 측정은 하등⁷⁾이 기술한 방법에 준하여 실시하였으며, 각 면역조치 후 5~7일에 채혈하여 실시하였다. 간기하면, 총항체를 측정하기 위해서는 microtitration tray(Limbro Chemical Co, Inc., New Haven, CT)의 각혈(well)에 56°C 30분간 비동화시킨 혈청 0.025ml를 PBS로 2배계열 희석하고, 각 희석혈청에 동량의 0.5% SRBC 부유액을 혼합하여 37°C에 1시간 방치 후 응집을 일으킨 혈청의 최고 희석도를 총항체가로 판독 하였다. 항체중 2-Mercaptoethanol (ME) 내성 항체, 즉 IgG 항체를 측정하기 위해서는 각 희석혈청을 동량의 0.2N ME(Eastman Kodak, Rochester, N.Y)와 혼합하여 37°C에 30분간 방치후 상기한 바와 같이 0.5% SRBC 부유액 0.025ml를 가하여 37°C에 1시간 방치후 응집을 일으킨 혈청의 최고 희석도를 ME내성 항체로 판독하였다

PVP 면역 및 이에 대한 항체가 측정

하등^{4,8)}의 성적을 참작하여 각 마우스에 PVP_{ks} 0.25 μ g을 PBS에 용해한 후 복강주사하여 제 1차 면역하고, 제 1차 면역 후 15일에 제 2차 면역을 실시하였으며, 제 3차 면역은 제 2차 면역 후 6개월에 제 1차 면역 때와 같이 실시하였다. 항체가 측정은 하등이 기술한 방법에 따라 수동적혈구 응집반응으로 실시하였다. 즉 PVP에 대한 SRBC감작은 5% SRBC 부유액 40ml와 PBS에 0.1mg/ml 농도로 용해한 tannic acid(Malinckrodt Chemical Works, St.

Louis, MO)용액 40ml를 혼합하여 15분간 약 25°C에 방치한 후 처리된 SRBC를 PBS로 3회 원심세척하여 5% SRBC 부유액을 만들고, 이 부유액과 PBS에 용해한 0.1mg/ml 농도의 PVP_{ks} (분자량 40,000d; K and K Laboratories, Plainview, N.Y.) 용액 동량을 혼합하여 실온에 15분간 방치하였다. 이렇게 준비한 PVP 감작 SRBC(PVP-SRBC)를 PBS로 3회 원심세척하여 0.4% gelatin함유 PBS(PBS-gelatin)에 0.25% PVP-SRBC 부유액을 만들었다. 그후 V-shaped microtitration tray(Limbro Chemical Co., Inc. New Haven, CT)의 제 1혈에 56°C에서 30분간 비동화시킨 0.025ml의 혈청을 적하하고 PBS-gelatin 0.025ml로 제 11혈까지 2배계열 희석하고 각 희석혈청에 동량의 0.25% PVP-SRBC 부유액 0.025ml를 적하하여 실온에 약 4~18시간 방치후 응집을 일으킨 혈청의 최고 희석도를 PVP 항체가로 정하였다. 제 12혈에는 PVP-SRBC 만 적하하여 대조로 하였다.

접촉성 과민반응

접촉성 과민반응의 감작원으로는 DNFB를 사용하여 하등^{5,16,17)}이 기술한 방법에 따라 DNFB에 대한 접촉성 과민반응을 실험하였다. 간기하면 4:1, 아세트:올리브유(V/V)에 용해한 0.5% DNFB용액 20 μ l를 탈모한 마우스 복강피부에 도말하여 감작시키고, 그 다음날 0.5% DNFB용액 20 μ l를 다시 감작시켰으며, 실험 5일에 0.2% DNFB용액 10 μ l씩을 우측 귀 양면에 도말하여 접촉성 과민반응을 야기시켰다. 이(耳) 종창은 Mitutoyo engineer's micrometer를 이용하여 DNFB야기주사 직전(T_0), 야기주사 후 4시간(T_4), 24시간(T_{24}) 및 48시간(T_{48})에 측정하였으며, 이 종창의 변화율은 다음 공식 즉, % Increase = $\{(T_4, T_{24}, \text{ or } T_{48} - T_0) / T_0\} \times 100$ 에 의하여 계산하였다.

CY 투여

CY는 독일 Asta-Werke 회사의 endoxan을 멸균 생리식염수로 사용하기 직전에 용해하여 복강투여 하였다. CY는 제 1, 2 또는 3차 면역 전 2일에 250mg/kg을 단 1회 투여하거나 10mg/kg을 제 1차 SRBC 면역 전 매일 1회 4일간 투여하거나 또는 면역 후 매일 1회 4일간 투여한 때도 있었다. 또한 100mg/kg을 제 1차 및 2차 DNFB 감작 2일전에 투여하기도 하였다.

비장절제(splenectomy)

Roubinian²¹⁾이 기술한 방법에 따라 DNFB 감작

Table 1. Effect of cyclophosphamide(CY), given as a single dose of 250mg/kg 2 days before the tertiary sensitization on the Arthus and 24hr-delayed type hypersensitivity to sheep red blood cells(SRBC) in ICR mice

Group	SRBC sensitization ^a			CY ^a	No of mice	% Increase ^c	
	1°	2°	3°			Arthus	DTH
I	+	+	+	+	10	31.98±2.71** ^d	14.12±2.30*
II	+	+	+	-	5	46.32±5.23	57.43±3.71
III	-	-	+	-	5	30.10±1.34	24.00±3.31
IV	-	-	+	+	5	27.33±1.38	31.97±1.76**

^aGroup I and II mice were given the primary(1°) i.v. injection of 1×10^7 SRBC on day 0, and were given the secondary(2°) and tertiary(3°) sensitization 15 days and 6 months after the primary sensitization, respectively.

^bGroup I and IV mice were pretreated i.p. with 250mg/kg of CY 2 days before the tertiary sensitization.

^cThe sensitized mice were challenged 4 days after the last injection of SRBC by s.c. injection into right rear footpad of 0.03ml of a 20% suspension of SRBC in PBS. Footpad swelling reactions were measured at 3hr(Arthus) and 24hr(DTH) after challenge. % Increase was calculated using formula i.e., % Increase = $[(T_1 \text{ or } T_{24} - T_0) / T_0] \times 100$

^dMean ± SD

*P<0.05 as compared with groups II and IV

**P<0.05 as compared with groups III

Table 2. Effect of cyclophosphamide(CY), given as a single dose of 250mg/kg 2 days before the tertiary immunization, on a hemagglutinin(HA) response to sheep red blood cells(SRBC) in ICR mice

Group	SRBC immunization ^a			CY ^b	No of mice	HA titers(Log ₂) ^c	
	1°	2°	3°			Total	MER
I	+	+	+	+	10	11.8±0.5**	6.2±0.5*
II	+	+	+	-	5	10.8±0.5	5.0±0.5
III	-	-	+	-	5	8.0±1.0	2.0±1.5
IV	-	-	+	+	5	9.3±0.5	2.3±1.5

^aand ^b The SRBC-sensitization and CY-treatment were performed as described in footnote ^a and ^b in Table 1.

^cThe immunized mice were bled 5 days after the last injection of SRBC and were assayed for HA.

^dMean ± SD

*P<0.05 as compared with group II

전 5일에 실시하였다. 비장절제술은 3.6% chloral hydrate(Mallinckrodt Chemical Works, St Louis, MO) 수용액 0.3ml를 각 마우스 복강에 주사하여 마취하에 실시하였다.

실험성적

CY를 단 1회 투여했을 때 CY가 Arthus 및 DTH의 기억반응에 미치는 영향

마우스를 SRBC로 1차 감각한 후 15일에 2차 감각하고, 6개월 후에 3차 감각하고, 실험군은 3차 감각전 2일에 250mg/kg의 CY를 복강주사하고 감각후 4일에 SRBC로 야기주사하여 Arthus 반응과 DTH를 측정 종창반응으로 측정하였다. 그 결과 제 1표에서 보는 바와 같이 1차 감각하기전 2일에 CY를 투여한 마우스(제 IV군)의 DTH 반응은

CY를 투여하지 않은 마우스군(제 III군)에 비하여 유의하게 증가됨에도 불구하고 1차 및 2차 면역하고, 3차 면역전 2일에 CY를 투여한 마우스(제 I군)의 Arthus 반응과 DTH는 대조군(제 II군)의 그것에 비하여 유의하게 감소되었다.

CY를 단 1회 투여했을 때 CY가 SRBC 또는 PVP에 대한 항체반응에 미치는 영향

마우스를 SRBC 또는 PVP로 1차 면역한 후 15일에 2차 면역하고, 6개월후에 특이항원으로 3차 면역하고, 실험군은 3차 면역전 2일에 250mg/kg의 CY를 복강투여하여, 최후 항원주사 후 5일에 SRBC 응집반응으로 혈구응집소(HA)를, 그리고 수동 혈구응집반응으로 PVP에 대한 항체를 측정하였다. HA는 총 항체가와 ME내성 항체가를 측정하였다. 그결과 제 2표에서 보는 바와 같이 CY

Table 3. Effect of cyclophosphamide(CY), given as a single dose of 250mg/kg 2 days before the tertiary immunization, on antibody response to polyvinylpyrrolidone(PVP) in ICR mice

Group	PVP immunization ^a			CY ^b	No of mice	Anti-PVP titers(Log ₂) ^c
	1 ^o	2 ^o	3 ^o			
I	+	+	+	+	10	8.7±0.7 ^{d*}
II	+	+	+	-	5	7.3±0.3
III	-	-	+	-	5	6.2±0.1
IV	-	-	+	+	5	4.7±0.1 ^{**}

^aGroup I and II mice were given the primary(1^o), i.p. injection of 0.25μg on day 0, and were given the secondary(2^o)and tertiary(3^o)immunization 15 day and 6 months after the primary immunization, respectively.

^bGroup I and IV mice were pretreated i.p. with 250mg/kg of CY 2 days before the tertiary immunization.

^cThe immunized mice were bled 5 days after the last injection of PVP and were assayed for anti-PVP antibody by passive hemagglutination.

*P<0.05 as compared with group I.

**P<0.01 as compared with group II.

^dMean±SD

를 3차 면역전에 투여하였을 때의 SRBC에 대한 제 I군 마우스 총항체가 및 IgG 항체가는 대조마우스인 제 II군의 그것들에 비하여 약 2배 증가하였다. 또한 PVP에 대한 항체가는 제 3표에서 보는 바와 같이 실험군(제 I군)의 항체가가 대조군(제 II군)의 그것에 비하여 약 2배 증가하였다.

CY를 제1, 2 및 3차 면역전 투여하였을 때 CY가 DTH의 기억반응에 미치는 영향

SRBC로 마우스를 1차 면역하기전 2일에 250mg/kg의 CY를 복강투여하고, 제 1차 면역후 10일에 제 2차 면역을, 30일 후에 3차 면역을 실시하였으며, 제 2차 및 3차 면역전 2일에 100mg/kg의 CY를 복강주사하고, 3차 면역후 4일에 SRBC로 야기주사하여 Arthus 반응과, 24 및 48시간 DTH 반응을 검사하였던 바 제 1도에서 보는 바와 같이 CY전처리에 의하여 Arthus 반응과 DTH의 기억반응이 유의하게 억제되었다.

CY를 제1, 2 및 3차 면역전 투여하였을 때 CY가 HA 반응에 미치는 영향

마우스를 SRBC로 1차 면역하기전 2일에 250mg/kg의 CY를 복강투여하고, 제 1차 면역 후 10일에 제 2차 면역을, 30일 후에 제 3차 면역을 실시하였으며, 제 2 및 3차 면역전 2일에 100mg/kg의 CY를 복강주사하고, 제1, 2 및 3차 면역후 각 7일에 마우스로부터 채혈하여 제1, 2 및 3차 항체반응을 측정하였던 바 제 2도에서 보는 바와 같이 CY처리군의 제1, 2 및 3차 HA 항체 반응은 CY비처리 대조군의 그것들에 비하여 감소되었으며, 그 감소는 제 2 및 3차 면역반응에 있어서 현저하였다.

소량의 CY를 면역전 또는 면역후 여러번 투여했을 때 CY가 제1차 및 2차 HA 반응에 미치는 영향

모든 마우스를 SRBC로 1차 면역하고, 그후 7일에 제 2차 면역을 실시하였으며, 실험군 마우스는 제 1차 면역전 또는 제 1차 면역후 4일간 매일 10mg/kg의 CY를 복강주사하여, 제 1 및 2차 면역후의 HA 총항체가와 IgG 항체가를 측정하였다. 그 결과 제 3도에서 보는 바와 같이 1차 HA 반응에 있어서는 CY를 면역전 또는 면역후 투여한 마우스의 HA 반응은 CY를 투여하지 않은 대조마우스의 반응과 비슷하였으며, 제 2차 항체반응에 있어서도 CY를 면역후에 투여한 마우스의 항체가는 대조의 그것들과 비슷하였다. 그러나 CY를 면역전 투여하였을 때의 제 2차 항체가는 총항체가에 있어서나 IgG 항체가에 있어서 CY비처리 대조군의 그것들에 비하여 유의하게 증가되었다.

CY를 단 1회 투여했을 때와 여러번 투여했을 때 CY가 DNFB에 대한 접촉성 과민반응에 미치는 영향

마우스를 DNFB로 감각하기전 2일, 감각과 동시, 또는 감각후 2일에 300mg/kg의 CY를 단회복강투여하거나 또는 DNFB 감각전 또는 감각후 5일간 매일 10mg/kg의 CY를 투여하고, DNFB감각후 5일에 야기조치하여 24, 48, 72 및 96시간 후 접촉성 과민반응을 측정하였다. 그결과 300mg/kg의 CY를 감각전(A군), 또는 감각과 동시(B군) 투여했을 때는 CY를 투여하지 않았던 대조군(F군)에 비하여 접촉성 과민반응이 증가하였으며, 그 증가는 CY를 감각전에 투여했을 때(A군) 현저하였으며, 감각후 24시간에 정상반응을 나타내고, 그후는 점차 감소하였다. 감각후 CY를 투여했을 때

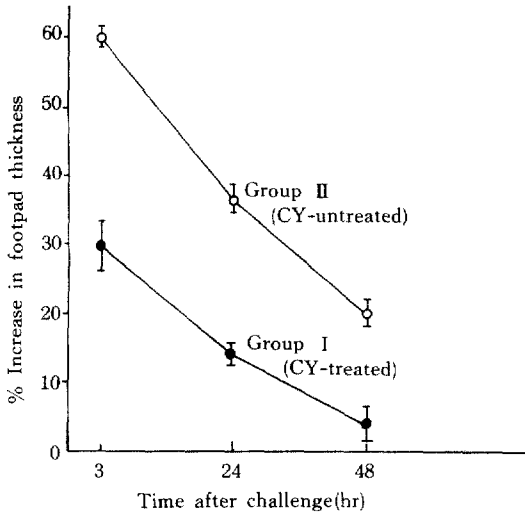


Fig. 1. Effect of cyclophosphamide(CY) on memory footpad swelling reaction to sheep red blood cells in ICR mice. All mice were given i.p. the primary sensitization with 1 ml of 10% SRBC suspension (approx. 1×10^8 cells), and were given i.p. the secondary and tertiary sensitization with the same amount of antigen 10 days and 30 days after the primary sensitization, respectively. Group I mice were pretreated i.p. with 250 mg/kg of CY 2 days before the primary sensitization and were pretreated with 100 mg/kg of CY 2 days before the secondary and tertiary sensitization. Group II mice were sensitized as in group I, but not treated with CY. All mice were challenged 4 days after the tertiary sensitization by injection of 0.03 ml of 20% SRBC suspension. Footpad thickness was measured immediately before, and 3, 24 and 48 hr after challenge and % Increase was calculated according to the formula as shown in footnote in Table 1. Each circle and bar represents mean \pm SD from 3 to 5 mice, respectively.

(C군)는 대조군(F군)의 그것과 비슷하였다. 10mg/kg의 CY를 여러번 주사했을 경우에 있어서는 CY를 감각전에 주사하였을 때(D군)의 DNFB에 대한 접촉성 과민반응은 CY를 투여하지 않았던 대조군(F군)에 비하여 현저하게 그 반응이 증가되었고 감각후 96시간까지도 반응이 높은 상태로 남아 있었다. 이와는 반대로 감각후 CY를 여러번 투여했을 때(E군)의 접촉성 과민반응은 대조군(F군)의 그것과 비슷하였다.

비장절제 마우스에 있어서 CY가 DNFB에 대한 접촉성 과민반응에 미치는 영향

비장절제 마우스와 가수술(sham-operation) 받은 마우스를 DNFB로 감각하기 전 2일, 감각과 동시, 또는 감각후 2일에 300mg/kg의 CY를 복강주사

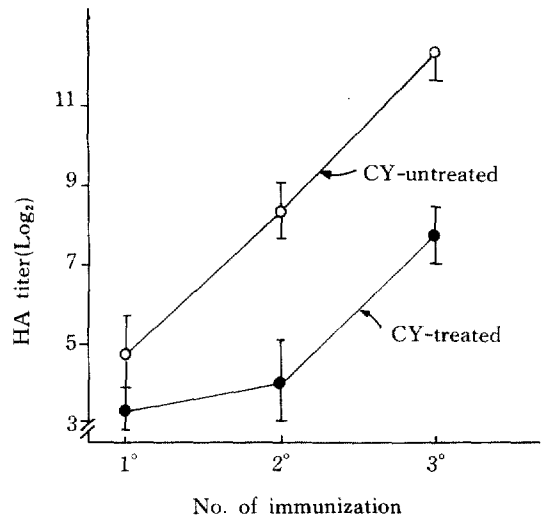


Fig. 2. Effect of cyclophosphamide(CY) on memory antibody responses against sheep red blood cells in ICR mice. All mice were given i.p. the primary(1°) immunization with 1 ml of 10% SRBC suspension, and the secondary(2°) and tertiary(3°) immunizations were performed 10 days and 30 days after the primary immunization, respectively, with similar amount of SRBC. Experimental group of mice(CY-treated) were pretreated i.p. with 250 mg/kg of CY 2 days before 1 immunization and were pretreated with 100 mg/kg of CY 2 days before 2 and 3 immunization. Control mice were similarly immunized, but not pretreated with CY(CY-untreated). Mice were bled 7 days after respective immunization and were assayed for hemagglutinin(HA) titer of each serum. Each circle and bar represents mean \pm SD from 3 to 5 mice, respectively.

하고, 감각후 5일에 야기조치하여 DNFB에 대한 24시간, 48시간 및 72시간 접촉성 과민반응을 측정하였다. 그결과 제 4도에서 보는 바와 같이 CY를 감각전에 투여하였을 때(A군)의 48시간후 반응은 대조군(D군)의 반응보다 낮았으나 24시간 및 72시간 반응은 대동소이하였고, CY를 감각과 동시 투여했을 때(B군)의 24시간 반응은 대조군(E군)의 그것보다 다소 낮았으나, 48시간 및 72시간 반응은 다소 높은듯 하였다. CY를 DNFB 감각후 투여했을 때는 대조군(F군)의 접촉성 반응은 24, 48 및 72시간 반응이 거의 검출되지 않았으나, 비장절제 마우스(C군)에 있어서는 반응이 다소 검출되어 CY를 투여하지 않은 정상대조군(G군)의 반응과 비슷하였다. 또한 가수술 받은 마우스에 있어서 GNFB 감각전 300mg/kg의 CY를 투여했을 때, CY를 감각과 동시 또는 감각후 투여했을 때 정상대조군등에 비하여 접촉성 과민반응을 현저하게 향

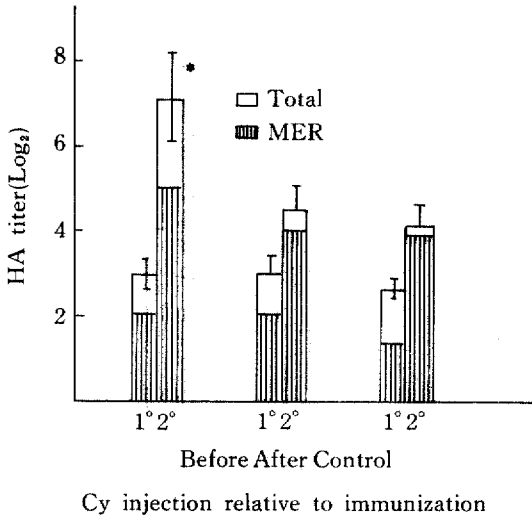


Fig. 3. Effect of cyclophosphamide (CY), given daily for 4 days as small multiple dose before or after SRBC immunization, on the primary (1°) and secondary (2°) hemagglutinin (HA) responses in IC R mice. All mice were primarily immunized i.p. with SRBC and were boosted 7 days later. Experimental group of mice were daily treated i.p. for 4 days with 10mg/kg of CY before (days -4, -3, -2 and -1) or after (day +1, +2, +3 and +4) the primary immunization and control mice were similarly immunized but treated with CY. Groups of mice were bled for the determination of total and mercaptoethanolresistant (MER) HA titers 7 days after each immunization. Each column and bar represents mean \pm SD from 3 to 5 mice, respectively. *P < 0.05 as compared with control.

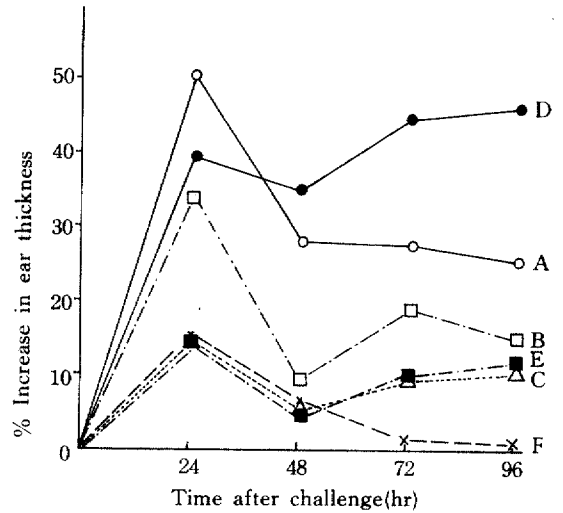


Fig. 4. Effect of cyclophosphamide (CY), either as a single large dose of 300mg/kg or as small (10mg/kg) multiple dose, on contact sensitivity to dinitrofluorobenzene (DNFB) in C57BL/6 mice. Groups of mice were given i.p. as a single large dose of a 300mg/kg of CY 2 days before (groups A), together with (groups B), or after (groups C) sensitization with DNFB. Other groups of mice were given daily as small (10mg/kg) multiple doses for 5 days before (group D) or after (group E) DNFB sensitization. Group F of mice was not treated with CY and employed as control. All mice were sensitized by applying 20 μ l of 0.5% DNFB on the clipped abdominal skin on day 0 and 1 and challenged on day 5 by applying 10 μ l of 0.2% DNFB to each side of right ear. Ear thickness was measured immediately before challenge and at 24, 48, 72 and 96 hr after challenge. % Increase was calculated according to the formula, as shown in footnote in Table 1. Each point represents mean from 3 to 5 mice.

진시켰다.

CY가 DNFB에 대한 제2차 접촉성 반응에 미치는 영향

공시한 모든 마우스를 DNFB로 제 1차 감각하고, C군과 D군 마우스는 그후 30일에 제 2차 감각을 실시하였으며, CY처리 실험군 마우스는 제 1차 및 2차 감각전 2일에 100mg/kg의 CY를 투여 (A군과 C군)하여 감각후 5일에 야기조치하여 4시간, 24시간 및 48시간 후의 접촉성 과민반응을 측정하였다. 그결과 제 6도에서 보는 바와 같이 제 1차 48시간 반응은 CY투여에 의해서 현저하게 항진되었으며, 제 2차 반응은 CY투여에 의해서 그 반응이 다소 증가되는듯 하였으나 유의하지 않았다.

고 안

본 실험에서 CY를 마우스에 단 1회 투여했을 때 및 소량을 여러번 투여했을때 DNFB에 대한 접촉성 과민반응을 대체적으로 항진시켰으며, 특히 그 면역반응의 항진은 DNFB로 마우스를 감각하기 전 투여했을 때 그리고 DNFB감각전에 대량의 CY (300mg/kg)을 투여했을 때보다 소량의 CY(10mg/kg)를 여러번 투여했을 때 더욱 현저하였는데, 이와같은 결과는 CY가 T_H만을 억제하여 나타난 결과라고 설명할 수 있었으며, 항원은 다르지만 SRBC를 사용하여 DTH반응이 증가되었다는 Askenase 등¹⁰⁾, 하등¹¹⁾ Bovbjerg 등¹¹⁾, Liew^{18, 20)}의 보고와 일치하였다. 또한 본 실험에서 비장 절제마우스를 DNFB로 감각하기전 CY를 투여하였을 때가 DNFB에 대한 접촉성 과민반응이 가수술한 마우스의 그것과 비슷하거나 또는 오히려 증가되는 경우가

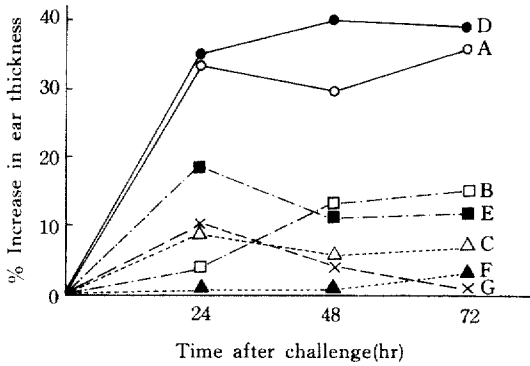


Fig. 5. Effect of cyclophosphamide (CY), given as a single large dose of 300 mg/kg on contact sensitivity to dinitrofluorobenzene (DNFB) in splenectomized or sham-operated C57 BL/6 mice. A, B and C groups of mice were splenectomized 5 days before the initiation of DNFB sensitization and were given as a single injection of CY 2 days before (group A), together with (group B), or after (group C) sensitization with DNFB. D, E and F groups of mice were sham-operated 5 days before the initiation of DNFB sensitization and were similarly given CY 2 days before (groups D), together with (group E), or after (group E) sensitization. Group G of mice were normal mice with no treatment of CY and were employed as control. All mice were sensitized, challenged, ear thickness was measured and calculated as described in footnote of Table 1. Each point represents mean from 3 to 5 mice.

있었는데 이와 같은 결과는 흥미있었으며, 최근 Sabolovic 등¹¹⁾은 비장절제가 종양보유 마우스의 면역조절제 PS-K 투여에 더욱 양성적으로 반응하였다고 보고하였으며, Ferrante 등¹⁶⁾은 비장절제가 사람의 natural killer cell activity를 증가시켰다고 보고하였다.

본 실험에서 SRBC에 대한 DTH 반응은 250mg/kg의 CY를 제 1차 SRBC감작전에 단 1회 투여하였을 때 제 1차 반응은 증가하였으나 제 3차 반응은 억제되었고, 또한 CY를 제 1, 2 및 3차 면역전에 투여하면 더욱 심하게 억제되었는데, 이는 DTH 반응에 관여하는 T_s 세포뿐만 아니라 T_H 세포 또는 B세포도 DTH에 관여하는 effector cells과 기억세포도 CY에 의해 억제되었을 가능성이 있다고 사료되었다. SRBC에 대한 DTH반응과는 달리 홍선의 존성 항원인 SRBC에 대한 항체반응과 홍선비의 존성 항원인 PVP에 대한 제 3차 반응은 대조군의 그것에 비해 오히려 증가하였는데, 이는 SRBC 및 PVP에 대한 항체반응에 관여하는 기억세포와 상기 DTH 반응에 관여하는 기억세포의 CY에 대한 감수성이 서로 상이함을 나타낸 결과라고 사료되었

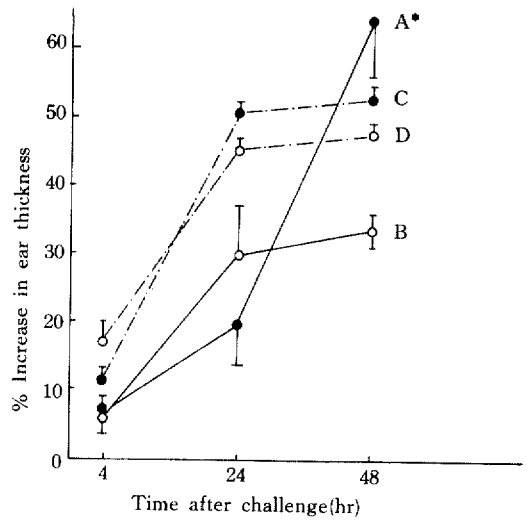


Fig. 6. Effect of cyclophosphamide (CY), given two doses of 100 mg/kg 2 days before the primary and secondary sensitization on memory response of contact sensitivity to dinitrofluorobenzene (DNFB). A and C groups of mice were pretreated i.p. with CY, but B and D groups of mice were not pretreated. All groups of mice received the primary sensitization and two groups of mice (C and D) received the secondary sensitization 30 days after the primary. All mice were challenged 5 days after each sensitization, ear thickness was measured and % Increase was calculated as described in footnote of Table 1. Each point and bar represents mean \pm SD from 3 to 5 mice, respectively.

다. CY를 제 1차 SRBC 면역 전에 1회 투여하였을 때는 이와 같이 제 3차 항체반응이 증가되었으나, CY를 제 1, 2 및 3차 면역전에 3회 투여하였을 때는 제 3차 HA 항체반응이 억제되었는데, 이는 아마도 수차 주사한 다량의 CY가 T_s 뿐만 아니라 T_H 또는 B세포도 억제하여 나타났을 것으로 추론할 수 있었으며, 소량의 CY(10mg/kg)를 SRBC감작전 4일간 투여하면 제 2차 항체반응이 증가된 본 실험결과(제 3도)는 이를 뒷받침해 준다고 사료되었는데 Bovbjerg 등¹¹⁾은 마우스를 SRBC로 면역하기전 100mg/kg 또는 200mg/kg의 CY를 투여하면 SRBC에 대한 DTH 반응이 장기간 항진되었으나, 항원으로 야기주사하기전 감작마우스를 CY로 처리하면 DTH 반응이 감소되었다고 보고하면서, CY에 의한 면역반응의 증가 및 감소는 항원자극이 필요하며, CY가 effector mechanism과 suppressor mechanism에 미치는 영향을 항원자극에 달려있음을 시사한다고 보고하였다. 또한 그들은 임파구 아형 등은 항원자극에 의해서 활성화될 때 어느 특정 단

제에서만 CY에 특별히 감수성일 가능성이 있을지도 모른다고 고안하였다. 또한 El-Sady 등¹⁰⁾은 CY (100mg/kg)를 Wistar 랫트에 단 1회 주사하였더니 $T_{8/c}$ 세포와 Ia 표현이 감소되고 pan T 세포와 T_H 세포는 현저히 증가되었다고 보고하였다. 하등¹¹⁾은 면역혈청을 CY를 전처치한 마우스에 투여하였을 경우에도 SRBC에 대한 DTH 반응이 항진된 것을 항체에 의한 feedback suppression이 아니고 CY에 의해서 T_8 가 제거되기 때문이라고 보고하였다.

Drössler 등¹²⁾은 DNP₂₀-BGG로 기니피ッグ을 면역한 후 10mg/kg의 CY를 7일간 투여후 DNP 및 BGG 특이항체인 IgG₁ 및 IgG₂ 항체를 측정하고 CY처리는 IgG₂ 항-DNP 반응을 유의하게 억제하거나, IgG₁ 항-DNP 항체 형성은 촉진시켰으며, BGG 특이 IgG₁과 IgG₂ 항체반응은 CY처리에 의해서 완전히 억제되었고, CY처리 마우스를 제 1차 면역후 86일에 BGG로 추가면역하였던 바 제 2차 IgG₂ 항-BGG 면역반응은 완전 억제되었으나, 이와는 반대로 IgG₁ 항-BGG 항체반응은 CY처리에 의해서 전혀 영향을 받지 않았다고 보고하였다. 또한 Drossler 등¹³⁾은 BGG와 항-BGG 복합물을 마우스의 피하에 주사하여 면역한 후 9일에 DNP-BGG를 주사하면 DNP와 BGG에 대한 항체반응과 DTH 반응이 야기되는데 CY를 여러번 주사했을 때 CY는 DNP에 대한 IgG₂ 항체반응은 억제하나 IgG₁ 항체반응은 억제하나 IgG₁ 항체 생산은 억제하지 않았고, 250mg/kg의 CY로 마우스를 전처리하면 DNP에 대한 IgG₂ 항체 생산은 증가시키나, IgG₁ 항체 생산은 증가시키지 않았다고 보고하고 이와 같은 결과는 CY가 IgG₂ 항체반응을 조절하는 T_8 는 억제하나 IgG₁ 항체반응을 조절하는 T_8 는 억제하지 않음을 시사한다고 보고했다. 저자의 본 실험에 있어서도 상기한 바와 같이 각 면역반응에 관여하는 T 및 B 세포와 기억세포가 CY에 대하여 각각 다른 감수성을 가짐을 시사하는 결과를 얻을 수 있었으며, CY의 면역조절작용은 생각했던 것보다도 더 복잡한 것 같으며, 더욱 명확한 CY의 면역조절을 이해하려면 앞으로 더욱 많은 연구가 필요하리라고 사료되었다.

결 론

항암제로서 널리 사용되고 있는 알킬화제인 cyclophosphamide(CY)는 강력한 면역억제제로서 잘 알려져 있으며, 면역반응조절에 중요한 역할을 담당하는 T 및 B 세포의 아형의 기능적인 capabilities를 연구하는데 probe로 이용되고 있다. 본 연

구는 마우스모델을 이용해 면역학적 기억에 대한 CY의 영향을 평가하려고 시도되었다. SRBC로 면역하기전 250mg/kg의 CY를 단 1회 투여했을 경우는 즉척종창반응의 정도에 의해서 측정된 제 1차 Arthus 및 DTH반응은 항진시켰으나 제 3차 DTH반응은 억제하였다. 유사한 CY전처리 경우에서 SRBC에 대한 1차 및 3차 HA치와 홍성비의존성 항원인 PVP에 대한 3차 항체가는 항진시켰으나 제 1차 항-PVP 항체가는 그러하지 못하였다. 제 1차 면역전 2일에 250mg/kg의 CY를 1회 투여시와 2차 및 3차 면역 2일전에 각각 100mg/kg의 CY를 투여시에는 SRBC에 대한 제 3차 DTH 및 HA 반응이 억제되었다. 그러나 면역전 소량(10mg/kg)의 CY를 매일 4일에 걸쳐 투여시는 SRBC에 대한 제 2차 HA 반응은 항진시켰으나 면역후 CY처리시는 그렇지 못했다. DNFB에 대한 접촉성 과민반응은 대량(300mg/kg)을 1회 투여의 경우나 면역전 2일에, 면역과 동시 또는 면역후에 소량(10mg/kg)의 CY를 여러번 투여한 경우에는 억제되었으며, 이 억제의 정도는 면역전에 투여한 경우와 여러번 투여한 경우에 보다 현저하였다. 그러나, CY에 의한 DNFB에 대한 제 2차 접촉성 과민반응의 항진은 명확하지 않았다. 비장 절제는 접촉성 과민반응에 대한 CY의 항진효과를 증대시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 CY는 면역과 투약의 상대적인 시간에 따라 선택적으로 면역반응에 영향을 미치며, 제 2차 또는 3차 면역반응에는 CY에 서로 다른 감수성을 지니는 기억세포가 관여된다는 것을 시사한다. 여기에 덧붙여 소량을 여러번 투여할 경우에는 협조 T 세포에는 영향을 미치지 못하나 접촉성 과민반응, DHT 및 HA에 관여하는 억제 T 세포 증식을 선택적으로 억제하고, 대량의 CY는 아마도 B 세포, 협조 T 세포 및 억제 T 세포도 억제할 것임을 시사한다.

참 고 문 헌

- 1) 정현택, 하대유, 정동규: Cyclophosphamide에 의한 마우스의 비장과 임파결의 조직학적 변화, 대한미생물학회지, 11:55, 1978.
- 2) 하대유, 정현택: Cyclophosphamide가 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향. 대한의학협회지, 20:985, 1977.
- 3) 하대유, 정현택: 면역혈청이 Cyclophosphamide로 전처치된 마우스 면역반응에 미치는 영향. 전북의대 논문집, 3:11, 1979.
- 4) 하대유, 김철기: Cyclosporin A가 Polyvinylpyr-

- roridone에 대한 마우스의 면역반응에 미치는 영향. 대한화학요법학회지, 2:36, 1984.
- 5) 하대유, 이용구, 이현구, 이정호: Steroid hormone이 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향. 대한면역학회지, 8:1, 1986.
 - 6) 하대유, 이현구, 이국재: 인정장(人精漿)의 실험관 및 생체내 면역반응 억제작용. 대한면역학회지, 8:13, 1986.
 - 7) 하대유, 임선영, 이희정: 초회 항원자극을 받은 모체로부터 출산된 신생마우스의 면역학적 기억. 대한면역학회지, 8:101, 1986.
 - 8) 하대유, 임선영, 김영배: S. ilica가 마우스의 전신성 칸디다증과 면역반응에 미치는 영향, 대한미생물학회지, 22:423, 1986.
 - 9) Asherson GL: Cyclophosphamide. In Dale M M and Foreman JC(Eds) Textbook of Immunopharmacology, p.325. Blackwell Scientific Publications, London, 1984.
 - 10) Askenase PW, Hayden B oj and Gershon RK: Augmentation fo delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. *J. Exp. Med.* 141:697, 1975.
 - 11) Bovbjerg DH, Addr R and Cohen N: Long-lasting enhancement of the delayed-type hypersensitivity response to heterologous erythrocytes in mice after a single injection of cyclophosphamide. *Clin. Exp. Immunol.* 66:539, 1986.
 - 12) Drossler K, Klima F and Ambrosius H: The influence of Cyclophosphamide and 6-mercaptopurine on the Ig G₁ and Ig G₂ immune response in guinea-pigs. *Immunology.* 44:61, 1981.
 - 13) Drossler K, Parker D and Turk JL: The effect of Cyclophosphamide on immunological memory. *Immunopharmacology.* 6:123, 1983.
 - 14) EL-Sady E, Parker D and Turk JL: The effect of Cyclophosphamide in vivo on the expression of lymphocyte markers, detected by monoclonal anlibodies, in the rat *Int. J. Immunopharmac.* 8:961, 1986.
 - 15) Ferrante A, Kiroff G.K and Drew PA: Elevated natural killer (NK) cytotoxicity of mononuclear leukocytes from splenectomized patients: increase in Leu-7⁺ and Leu-11⁺ leukocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 64:173, 1986.
 - 16) Ha TY and Lee YK: Effect of steroid hormones on humoral and cellular immune responses: Abstract of First international union of Immunological societies(IUIS) Conference on Clinical Immunology, p. 67. July 5-6, 1986.
 - 17) Ha TY, Reed ND and Crowle PK: Immune response potential of mast cell-deficient W/W^v mice. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.* 80:85, 1986.
 - 18) Lafrenz DE and Feldbush TL: Role of T cells in the development of memory B. cells. Quantitative and qualitative analsis. *Immunology* 44:177, 1981.
 - 19) Liew FY: Regulation of delayed-type hypersensitivity II Suppressor cells for delayed-type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. *Eur. J. Immunol.* 7:714, 1977.
 - 20) Liew FY and Howard JG: Regulation of delayed-type hypersensitivity V. Suppressor cell memory in antigen-specific suppression of delayed-type hypersensitivity to sheeo erythrocytes. *Eur. J. Immunol.* 10:937, 1980.
 - 21) Roubinian J: Selected surgical procedures. In Mishell BB and Shiigi SM(Ed): Selected Methods in cellular Immunology WH Freeman and Co., San Francisco, p. 225, 1980.
 - 22) Sabolovic D and Galoppin L: Effect of a protein bound polysaccharide(PS-K) on tumor development and infections in splenectomized rats and mice. *Int. J. Immunopharmac.* 8:41, 1986.