

생쥐에 있어서 에탄올의 면역독성에 미치는 메치오닌 식이의 영향

안영근# · 김정훈 · 구기범 · 문재규

원광대학교 약학대학

(Received June 15, 1992)

Effects of Methionine Diets on the Immunotoxicity of Ethanol in ICR Mice

Young Keun Ahn#, Joung Hoon Kim, Gi Bum Koo and Jae Gyu Moon
College of Pharmacy, WonKwang University, Iri 570-749, Korea

Abstract—Experiments were performed on mice to investigate the effect of methionine diets (MET) on the immunotoxicity of ethanol. ICR female mice were divided into 5 groups, Met (Basal (B)+0.19% methionine(M), B+1.71% M and B+5.13%(M) and ethanol(4%) were administered *ad libitum* for 21 days. The mice were evaluated for changes in immune status as measured by antibody titer, Arthus reaction, delayed type hypersensitivity (DTH), rosette forming cell(RFC) and plaque forming cell (PFC) to sheep red blood cells (S-RBC). To investigate the change of the non-specific immune response, the number of leukocytes in peripheral blood and phagocyte activity were measured. The results were summarized as follows: (1) The weight ratios of spleen and thymus to body weight were significantly increased by the B+0.19% M, B+0.57% M and B+1.71% M groups in comparison with control group(B), but B+5.13% M group was significantly decreased. (2) Humoral immune responses were significantly increased by the B+0.19% M and B+0.57% M groups in comparison with control group, but B+5.13% M group was significantly decreased. (3) Cellular immune responses were significantly decreased by the B+1.71% M and B+5.13% M groups in comparison with control group. (4) Phagocyte activities were significantly increased by the B+0.19% M, B+0.57% M and B+1.71% M groups in comparison with control groups, but B+5.13% M group was significantly decreased. (5) The number of circulating leukocyte was significantly increased in the B+0.19% M and B+0.57% M groups in comparison with control group, but B+5.13% M group was significantly decreased.

Keywords □ Methionine diet, ethanol, hemagglutination titer, Arthus reaction, hemolytic plaque forming cell, delayed-type hypersensitivity reaction, rosette forming cell, phagocytic activity, number of circulating leukocyte.

알콜은 오늘날 세계에서 가장 널리 남용되고 있는 물질중의 하나로 알콜 과량 섭취 및 알콜중독은 심각한 공중보건의 문제로 대두되고 있다.^{1,2)}

Ethanol은 폐렴, 결핵, 복막염 등과 같은 전염성 질병에 걸릴 위험을 증가시키는데, 그 원인은 숙주의 면역학적 방어기전이 제한되기 때문이라고 보고하였고,³⁻⁵⁾ MacGregor 등⁶⁾은 알콜성 간질환 환자는 정

상인에 비해 IgG의 생성이 월등히 감소함을 보고하였으며, Wands 등⁷⁾은 알콜중독자에서 natural killer (NK)세포의 활성이 감소되었다고 보고하였고, Loose 등⁸⁾은 ethanol을 함유하는 만성식을 투여한 흰쥐에게서 1차 면역반응의 유의한 감소를 보고하였고, Berenyi 등,⁹⁾ Bernstein 등,¹⁰⁾ Hus 등¹¹⁾ 및 Tisman 등¹²⁾은 ethanol이 *in vivo* 및 *in vitro*에서 체액성 및 세포성 면역반응을 억제시킨다고 보고하였으며, Tennenbaum 등¹³⁾은 흰쥐에 있어서 만성 ethanol 투여는

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

Table I—Composition of experimental diets

(100% diet, unit : %)

Dietary ingredients	Experimental animal group				
	Basal (B)	B+0.19 Met	B+0.57 Met	B+1.71 Met	B+5.13 Met
Soy protein isolate	18	18	18	18	18
Corn starch	24	24	24	24	24
Cotton seed oil	9	9	9	9	9
Salt mixture ^{a)}	4.15	4.15	4.15	4.15	4.15
Vitamin mixture ^{b)}	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Choline	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Sucrose	44.58	44.39	44.01	42.87	39.45
DL-methionine	0.22	0.41	0.79	1.93	5.35

세포성 및 체액성 면역의 저하를 나타낸다고 보고하였다. 그러나, Gluckman 등¹⁴⁾은 만성 ethanol 투여시 지방간이 생성되었으나 세포성 및 체액성면역에는 유의한 저하가 일어나지 않았다고 보고하였다.

한편, 간장해가 생기기 전에 예방목적으로 사용되어지는 필수 아미노산인 methionine은 황을 함유한 lipotrope이며, 생물학적 methylation에 있어 중요한 역할을 하며,¹⁵⁾ 수많은 일반대사경로에 참여하고 DNA의 합성에 이용된다. Methionine 결핍식은 흰쥐에서 면역반응에 negative effect가 있다고 보고되었고,^{16,17)} Gershoff 등¹⁸⁾은 methionine의 결핍이나 과잉공급은 polypeptide 항원이나 sheep red blood cells(S-RBC)로 면역된 흰쥐에서 항체반응을 변경시키지 못한다고 보고하였고, Bhargava 등¹⁹⁾은 chick에서 Newcastle disease virus에 대한 적혈구응집억제 소가가 methionine이 충분한 식이보다 결핍된 식이에서 높았다고 하였고, 이와 비슷한 결과가 S-RBC로 면역된 흰쥐에서도 나타났다고 보고하였다.²⁰⁾ 또한 Newberner 등²¹⁾과 Gebhardt 등²²⁾은 흰쥐에서 gestation과 lactation 식이중에 methionine-choline의 감소가 임파조직의 크기와 구조를 변경시키고 *S. typhimurium*의 감염에서 감수성을 증가시키고 생물학적 면역반응을 억제시켰다고 보고하였으나, Tsiagbe 등²³⁾은 broiler chick에 있어서 methionine을 첨가한 식이가 면역능력을 증가시켰다고 보고하였다.

앞에서 본 바와 같이 ethanol에 대한 면역독성연구는 많이 진행되어 왔으나, methionine식이와 연관시킨 면역영향에 관한 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 저자들은 methionine식이가 생쥐의 ethanol 면역독성에 methionine의 양에 따라 상이한 영향을 미칠 것으로 기대되어, 본 실험을 착수한 바

유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

실험방법

실험동물—생후 5~6주령, 체중 18~21g의 ICR 암컷 생쥐를 분양받아 Table I과 같은 methionine 식이를 만들어, 10마리를 1군으로 하여 전체를 5군으로 분리한 다음 4% ethanol과 실험식이를 자유로이 섭취케 하였으며, 온도 23±2°C, 습도 50~60%로 유지되는 항온·항습 사육실에서 3주간 사육하였다.

Ethanol 용액의 조제 및 투여—Ethanol(Merck Co., Ltd.)을 정제수에 용해하여 4% ethanol 용액을 만들어 임의로 음용케 하였다. Ethanol은 7 cal./g의 열량을 가지고 있으며, 보통 carbohydrate의 36% 정도의 양(5%)이 만성독성을 일으킨다고 보고^{13,24,25)}되었으나, 본 실험에서는 4% ethanol 용액으로 제조하여 실험에 착수하였다.

Methionine 식이의 조제 및 투여—실험식이의 조제는 Table I과 같다.

a) Salt mixture used had composition of Hegested. et al.²⁶⁾

b) Vitamin mixture (per 2g)

Vitamin A	50,000 I.U.	Biotin	0.5 mg
Vitamin B ₁	40 mg	Folic acid	2 mg
Vitamin B ₂	10 mg	Calcium panthotenate	23.2 mg
Vitamin B ₆	20 mg	Ca ₃ (PO ₄) ₂	258 mg
Vitamin B ₁₂	10 mg	MgO	60 mg
Vitamin C	300 mg	FeSO ₄	100 mg
Vitamin D ₂	1,000 I.U.	MnSO ₄	4.1 mg
Vitamin E	20 mg	CuSO ₄	7.8 mg
Nicotinic amide	100 mg	ZnSO ₄	4.6 mg

식이중 methionine의 성장에 필요한 기본요구량은 0.413%이라는 보고^{23,27)}와 Nauss 등¹⁵⁾과 Henry 등²⁸⁾의 실험식이를 토대로 하여 methionine 식이를 배합하였다. Bounous 등²⁹⁾의 보고에 의하면 soy protein isolate 중의 methionine 함량이 1.1%이므로, basal 군에 0.22% methionine을 더 첨가하여 기본요구량인 0.413%로 만들고, 임의로 섭취케 하였다.

체중 및 장기의 중량측정—실험동물의 체중은 공식약품투여 개시일과 최종일 약 24시간 전에 절식시킨 후 동일한 시간에 측정하였다. 최종 약물투여 1일 후에 실험동물의 경동맥을 절단하고 채혈한 후 간장, 비장 및 흉선을 각각 저출하여, 그들 중량을 측정하여 체중대백분비를 구하였다.

항원조제—본 실험에서는 면양적혈구(Sheep red blood cells 이하 S-RBC)를 사용하였는데, 그 방법은 웅성면양의 경동맥으로부터 heparin 처리 주사기로 채혈한 후, 동량의 Alserver's액(pH 6.1)을 가하여 4°C에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 S-RBC를 사용할 때에는 사용 직전 PBS로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hank's balanced salt solution(이하 HBSS: Gibco Laboratories Co., Ltd.)에 부유시켜 사용하였다.

면역—Reed 등³⁰⁾의 방법을 참고하여 원심세척한 S-RBC를 HBSS에 1×10^8 S-RBC/ml의 농도로 부유시키고 부유액 0.1 ml(1×10^7 S-RBC)를 생쥐의 미정맥에 주사하여 1차 면역을 유도하였다. 2차 면역은 1차 면역 4일 후에 생쥐의 좌측 후지족척피내에 2×10^9 S-RBC/ml의 부유액 0.05 ml(1×10^8 S-RBC)를 주사하여 면역하였다.

혈청의 분리 및 비동화—생쥐의 경동맥을 절단하고 혈액을 채혈하여 응고시킨 후, 원심분리하여 혈청을 분리하고 56°C에서 30분간 비동화시킨 후 4°C에서 보존하여 사용하였다.

적혈구응집소(Hemagglutination titer 이하: HA titer)의 측정^{31,32)}—S-RBC의 응집소가를 microtitration tray(Nunclon micro test tray)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 각 실험동물로부터 얻은 각 비동화 혈청을 각 well에 HBSS로 2배 계열 희석한 후, HBSS에 부유한 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 혼합한 다음 37°C에서 18시간 정치하여 적혈구의 응집 유형을 관찰 판독하였으며, 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다.

적혈구 2-ME-내성응집소가의 측정—각 혈청의 2-ME 내성응집소가를 판정하기 위하여 0.15 N 2-ME (Eastman Kodak Co., Ltd.)로 혈청을 처리하여, 2-ME 내성항체를 immunoglobulin G(IgG)항체로, 2-ME로 처리하기 전의 항체를 2-ME 감수성 항체 또는 IgM 항체로 판독하였는데, 판독방법은 다음과 같이 실시하였다. 즉 혈청의 2-ME 처리는 0.15 N 2-ME가 함유된 HBSS로 혈청을 희석하고, 증발하지 않도록 tray를 밀봉하여, 37°C에서 30분간 방치한 후, S-RBC를 가하여 응집소가를 상기의 방법으로 검사하였다.

족척종창반응의 측정(Foot pad swelling test)—Arthus반응 및 지연형 과민반응(delayed-type hypersensitivity reaction 이하: DTH)을 측정하기 위하여 Yoshikai 등³³⁾이 기술한 방법에 준하며 다음과 같이 실시하였다. 즉, 1차 면역 4일 후에 S-RBC $0.05 \text{ ml}(1 \times 10^8)$ 를 생쥐의 좌측후지족척에 피내주사하였다. 주사후 일정시간 경과한 후 종창의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper(Mitutoyo Mfg. Co., Ltd.)로 측정하고, 종창정도의 측정가는 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 3회 측정된 수치를 평균하였다. 판독기준은 Sugimoto³⁴⁾의 판독기준에 따라, 3시간 경과 후의 반응을 Arthus반응으로, 24시간 경과 후의 반응을 지연형과민반응(DTH)으로 간주하였다.

Footpad swelling index =

$$\frac{\text{종창두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

비장세포 부유액의 조제³⁰⁾—비장을 생쥐로부터 무균적으로 저출하여 minimum essential medium(이하: MEM: Gibco Laboratories Co., Ltd.)으로 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 사세포를 제거하였으며, 한냉 MEM으로 4°C에서 3회 원심분리 세척한 후, 비장세포 수가 2×10^7 cells/ml가 되도록 HBSS에 부유시켰다. 매 실험마다 비장세포의 생존율검사를 실시하였는데, 이 검사는 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 하였다. 즉, 시험관에 0.3 ml의 세포 부유액을 넣은 후, 0.1 ml의 trypan blue dye 용액을 가하여 5분 경과 후 백혈구계산판에서 무색으로 염색된 생세포와 적색으로 염색된 사세포 수를 측정하여 그 백분율을 계산하였다. 이때 세포 생존율이 95% 이상되었다.

비장세포의 rosette 형성세포수(이하 : RFC)의 측정—비장세포의 RFC 검사는 Garvey 등³⁵⁾ 및 Elliott 등³⁶⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 비장세포 부유액(2×10^7 cells/ml) 0.025 ml를 시험관에 넣은 후, HBSS에 한 S-RBC(2×10^8 cells/ml) 0.025 ml를 넣고 혼합하여 $200 \times G$ 에서 12분간 원심분리한 후, $4^\circ C$ 에서 2시간 방치하였다. 그 후 조심스럽게 흔들어 재부유시킨 후, 이 부유액 1적을 혈구계산판에 떨어뜨리고 RFC를 검경 관찰하였다. 검경시 비장세포에 S-RBC가 3개 이상 부착된 세포를 RFC로 판정하여 다음 식에 준하여 계산하였다.

$$\text{Rosette forming cell(\%)} = \frac{\text{No. of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ viability}} \times 100$$

비장세포의 용혈반형성세포수(plaque forming cell 이하 : PFC)의 측정—비장세포의 용혈반형성세포수의 측정은 Cunningham³⁷⁾의 방법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 적출한 비장을 빙냉의 HBSS와 함께 분쇄하여 비장세포를 유리시키고, $400 \times G$ 에서 5분간 원심분리하였다. 상정액을 제거 후 $37^\circ C$ 의 0.83% NH_4Cl 용액에 부유시켜 3분간 정지하여 적혈구를 용해시키고, 다시 원심분리하여 빙냉의 HBSS에 부유시켜 적혈구 제거 비장세포수를 혈구계산판에 검경 관찰하였다. S-RBC를 PBS로 4회 세척하고($400 \times G$, 5분) 마지막 세척 후 PBS에 4×10^9 S-RBC/ml의 농도로 부유시켰다. 4×10^9 S-RBC 250 μ l에 guinea pig complement(Gibco Lab. Co., Ltd.) 500 μ l를 혼합하여 ice bath상에서 30분간 정지 후 사용하였다. 상기 guinea pig complement와 4×10^9 S-RBC/ml 혼합액 150 μ l, 비장세포 부유액 650 μ l를 잘 혼합하여 microchamber (Takaha-shi Giken Glass 76 \times 26 mm)에 100 μ l씩 주입하고 wax-vaseline(1 : 1)으로 밀봉하여 CO_2 incubator($37^\circ C$)에서 1시간 배양 후 형성된 용혈반형성세포(plaque forming cells)수를 간접광선하에서 측정하였다. 비장세포 중 용혈반형성세포수(PFC/total spleen cells)를 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{PFC}/10^6 \text{ spleen cells} = \frac{N}{C \cdot V_{ma}} \times 10^6$$

$$\text{PFC/total spleen cells} = \left(\frac{\text{PFC}}{10^6 \text{ spleen cells}} \right) \cdot C \cdot V_s$$

$$\text{단, } a = \frac{650}{800} \text{ (배양혼합액중의 비장세포 부유액의 비율)}$$

N : the number of plaque observed in microchamber

C : the count of spleen cells in 1 ml of spleen cell suspension.

V_m : volume of incubation mixture filled into a microchamber(ml)

V_s : total volume of spleen cell suspension(ml)

대식세포활성도의 측정—대식세포의 탐식능력을 측정하고자, 본 실험에서는 Biozzi 등³⁸⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 최종 약물 투여 2일 후에 rotting ink를 멸균증류수에 녹인 1% gelatin액으로 6배 희석한 현탁액을 조제하여 $37^\circ C$ 에 보관하였다. 위와 같이 조제한 colloid상의 탄소현탁액을 생쥐 체중 g당 0.01 ml씩 생쥐의 미정맥내로 주사하였다. 그후 생쥐의 안와후부정맥혈관총(retro-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube(20 μ l : micro-hemocrit)로 천자하여 20 μ l의 혈액을 10분, 20분, 30분 간격으로 채혈하여 0.1% sodium carbonate 용액 2 ml가 든 vial에 넣어서 적혈구가 용해되도록 잘 혼합하였다. 이어서 흡광도를 600 nm에서 측정하고 다음 공식에 따라 계산하였다. 실험동물의 체중, 간장 및 비장의 무게를 측정하고, 이 들로부터 phagocytic coefficient, corrected phagocytic index를 계산하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index} = \frac{B}{L+S} \times \sqrt[3]{K}$$

B : body weight

L : liver weight

S : spleen weight

K : phagocytic coefficient(측정농도의 10배수를 log로 전환하고 시간에 대하여 도시한 그래프 곡선)

말초순환 백혈구수의 측정—생쥐의 안구정맥총으로부터 말초혈액을 채혈하여 Türk액으로 희석하여 혈구계산판상에 적하한 후, 백혈구 총수를 측정하였다.

통계학적 분석³⁹⁾—모든 자료는 mean \pm standard

Table II—Food intakes of methionine diets and 4% ethanol intakes administered 3 weeks in ICR mice

Group (% added)	Food intake (g/mouse/day)	4% Ethanol intake (ml/mouse/day)
Basal + EtOH(Control)	3.52 ± 0.27	4.62 ± 0.43
0.19 Met + EtOH	2.99 ± 0.23**	4.23 ± 0.39**
0.57 Met + EtOH	3.17 ± 0.24**	4.37 ± 0.46**
1.71 Met + EtOH	3.45 ± 0.34	4.68 ± 0.49
5.13 Met + EtOH	2.75 ± 0.34**	2.74 ± 0.07**

EtOH(4% ethanol) was provided *ad libitum* for 3 weeks. The basal diets contained methionine (Met; 0.19, 0.57, 1.71 and 5.13%) were fed for 3 weeks.

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. The significances of the difference as compared as control group; **, p < 0.01.

error(S.E.)로 나타내었으며, 유의성 검사는 Student's t-test로 행하였다.

실험결과

생쥐에 있어서 ethanol 면역독성에 미치는 methionine 식이의 영향을 구명하고자 실시한 본 실험의 결과는 다음과 같다.

식이와 ethanol의 섭취량의 변화—각군의 식이섭취량의 변화는 Table II에서 보는 바와 같다. 대조군의 식이섭취량이 3.52 ± 0.27(g/mouse/day)를 보인데 비해, 0.19 Met + EtOH군은 2.99 ± 0.23, 0.57 Met + EtOH군은 3.17 ± 0.24, 5.13 Met + EtOH군은 2.75 ± 0.34로 유의성 있게 감소하였으나, 1.71 Met + EtOH군은 별차이가 없었다.

Ethanol 섭취량 변화는 Table II에서 보는 바와 같이, 대조군의 에탄올 섭취량은 4.62 ± 0.43(ml/mouse/day)를 보인 반면 0.19 Met + EtOH군은 4.23 ± 0.39, 0.57 Met + EtOH군은 4.37 ± 0.46, 5.13 Met + EtOH군은 2.74 ± 0.07로 유의성 있게 감소하였다.

체중의 변화—각군의 체중변화는 Table III에서와 같이 대조군이 26.09 ± 6.18%인데 비하여 0.19 Met + EtOH, 0.57 Met + EtOH 및 1.71 Met + EtOH군은 34.52 ± 8.34, 33.22 ± 6.32 및 28.70 ± 6.69%로 유의성 있는 체중증가의 경향을 보였으나, 5.13 Met + EtOH군은 1.22 ± 3.08%로 유의성 있는 감소를 보였다.

간장의 중량변화—각군의 간장의 중량변화는 Table IV에서와 같이 간장의 대 체중 중량비가 대조군이 4.67 ± 0.29%를 보인데 비해 0.19 Met + EtOH와 0.57 Met + EtOH군은 4.65 ± 0.14%와 4.61 ± 0.20%로 유의성 없는 감소를 보였고, 1.71 Met + EtOH군은 4.57 ± 0.26%로 감소하는 경향을 보였고, 5.13 Met + EtOH군은 5.52 ± 2.86%로 유의성 있는 증가를 보였다.

비장과 흉선의 중량변화—각군의 비장의 대 체중 중량비는 Table V에서 보는 바와 같다. 대조군이 0.56 ± 0.07%인데 비하여, 0.19 Met + EtOH, 0.57 Met + EtOH 및 1.71 Met + EtOH군은 0.66 ± 0.04, 0.68 ± 0.08 및 0.64 ± 0.08%로 유의성 있는 증가를 보였으나, 5.13 Met + EtOH군은 유의성 없게 나타났다. 한편, 흉선의 대 체중 중량비도 Table V에서 보는 바와 같이 대조군이 0.13 ± 0.01%인데 비하여 0.19 Met + EtOH, 0.57 Met + EtOH, 1.71 Met + EtOH군은 0.15 ± 0.02, 0.16 ± 0.03, 0.15 ± 0.02%로 유의성 있는 증가를 보였으나, 5.13 Met + EtOH군은 0.10 ± 0.06%로 유의성 있는 감소를 보였다.

적혈구응집소가와 2-mercaptoethanol(2-ME) 내성

Table III—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the body weight in ICR mice

Group (% added)	Initial wt.(gm)	Final wt.(gm)	Increasing rate(%)
Basal + EtOH(Control)	18.45 ± 1.21	23.31 ± 1.22	26.09 ± 6.18
0.19 Met + EtOH	18.31 ± 0.54	24.44 ± 1.68	34.52 ± 8.34**
0.57 Met + EtOH	18.90 ± 0.59	25.07 ± 1.09	33.22 ± 6.32**
1.71 Met + EtOH	18.08 ± 0.28	23.19 ± 0.96	28.70 ± 6.69**
5.13 Met + EtOH	18.91 ± 0.55	19.14 ± 2.19	1.22 ± 3.08**

EtOH value represents the mean ± S.E. from 10 mice.

Other legends and methods are the same as in Table II.

(**, p < 0.01)

Table IV—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the liver weight in ICR mice

Group (% added)	Liver wt.(gm)	Liver wt. Body wt. × 100
Basal + EtOH(Control)	1.07 ± 0.07	4.67 ± 0.29
0.19 Met + EtOH	1.14 ± 0.07	4.65 ± 0.14
0.57 Met + EtOH	1.15 ± 0.06	4.61 ± 0.20
1.71 Met + EtOH	1.06 ± 0.08	4.57 ± 0.26*
5.13 Met + EtOH	1.04 ± 0.11	5.52 ± 2.86*

EtOH value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table II. (*, p < 0.05)

Table V—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the spleen and thymus weights in ICR mice

Group (% added)	Spleen wt. Body wt. × 100	Thymus wt. Body wt. × 100
Basal + EtOH(Control)	0.56 ± 0.07	0.13 ± 0.01
0.19 Met + EtOH	0.66 ± 0.04**	0.14 ± 0.02**
0.57 Met + EtOH	0.68 ± 0.08**	0.16 ± 0.03**
1.71 Met + EtOH	0.64 ± 0.08**	0.15 ± 0.02**
5.13 Met + EtOH	0.54 ± 0.09	0.10 ± 0.06**

EtOH value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table II. (**, p < 0.01)

응집소기—적혈구응집소기와 2-ME 내성응집소기는 Table VI에서 보는 바와 같이, 적혈구응집소기는 대조군이 5.97 ± 0.62인데 비하여, 0.19 Met + EtOH와 0.57 Met + EtOH군은 6.87 ± 0.42, 6.67 ± 0.52로 유의한 증가를 나타냈고, 1.71 Met + EtOH군은 5.87 ± 0.63으로 약간의 감소를 나타냈으나, 5.13 Met + EtOH군은 4.97 ± 0.53으로 유의한 감소를 나타냈다. 또한, 2-ME 내성응집소기 역시 대조군이 3.96 ± 0.43인데 비하여 0.19 Met + EtOH와 0.57 Met + EtOH군은 4.21 ± 0.48, 4.11 ± 0.38로 유의한 증가를 보였고, 1.71 Met + EtOH군은 3.88 ± 0.37로 유의성 없는 감소를 보였으나, 5.13 Met + EtOH군은 2.97 ± 0.27로 유의한 감소를 나타내었다.

Arthus 반응—Arthus 반응의 결과는 Table VII에서와 같다. 축척중량의 지수가 대조군이 34.16 ± 4.16인데 비하여 0.19 Met + EtOH와 0.57 Met + EtOH군

Table VI—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the antibody production in ICR mice

Group (% added)	HA titer (log ₂)*	MER HA (log ₂)*
Basal + EtOH(Control)	5.97 ± 0.62	3.96 ± 0.43
0.19 Met + EtOH	6.87 ± 0.42**	4.21 ± 0.48**
0.57 Met + EtOH	6.67 ± 0.52**	4.11 ± 0.38**
1.71 Met + EtOH	5.87 ± 0.63	3.88 ± 0.37
5.13 Met + EtOH	4.97 ± 0.53**	2.97 ± 0.27**

*HA: Hemagglutinin, MER-HA: 2-Mercaptoethanol-resistant HA

Mice were challenged with 10⁸ S-RBC 4 days after sensitization.

On the 5th day, HA and MER-HA titers were assayed. Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table II. (*, p < 0.05 and **, p < 0.01)

Table VII—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the Arthus reaction in ICR mice

Group (% added)	FPSI
Basal + EtOH(Control)	34.16 ± 4.16
0.19 Met + EtOH	41.18 ± 3.25**
0.57 Met + EtOH	36.61 ± 4.10**
1.71 Met + EtOH	34.96 ± 2.99
5.13 Met + EtOH	30.03 ± 2.46**

Mice were challenged with 10⁸ S-RBC on left hind footpad 4 days after sensitization. Footpad thickness was measured immediately before challenge and 3 hr after challenge.

$$\text{Footpad swelling index(FPSI)} = \frac{T_3 - T_0}{T_0} \times 100$$

Where, T₀ is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T₃ is the left hind footpad thickness 3 hr after challenge.

Each value represents the mean ± S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table II. (**, p < 0.01)

은 41.18 ± 3.25, 36.61 ± 4.10으로 유의한 증가를 보였고, 1.71 Met + EtOH군은 34.96 ± 2.99로 유의성 없는 감소를 보였으나, 5.13 Met + EtOH군은 30.03 ± 2.46으로 유의한 감소를 나타냈다.

비장세포의 용혈반형성세포수—용혈반형성세포수

Table VIII—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the hemolytic plaque forming cell(PFC) in ICR mice

Group (% added)	PFC/total spleen cells
Basal+EtOH(Control)	52.12± 9.12
0.19 Met+EtOH	57.27± 10.11**
0.57 Met+EtOH	55.26± 9.98**
1.71 Met+EtOH	50.98± 8.98
5.13 Met+EtOH	48.80± 9.09*

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table II. (*, p<0.05 and **, p<0.01)

Table IX—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the delayed type hypersensitivity (DTH) reaction in ICR mice

Group (% added)	FPSI
Basal+EtOH(Control)	17.28± 2.29
0.19 Met+EtOH	17.73± 3.31
0.57 Met+EtOH	16.84± 1.65
1.71 Met+EtOH	14.99± 1.74**
5.13 Met+EtOH	13.65± 2.00**

Mice were challenged with 10⁸ S-RBC on left hind footpad 3 days after sensitization. Footpad thickness was measured immediately before challenge and 24 hr after challenge.

$$\text{Footpad swelling index(FPSI)} = \frac{T_{24} - T_0}{T_0} \times 100$$

Where, T₀ is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T₂₄ is the left hind footpad thickness 24 hr after challenge.

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table II. (**, p<0.01)

는 Table VIII과 같이, 대조군은 52.12± 9.12를 보인데 비해, 0.19 Met+EtOH와 0.57 Met+EtOH군은 57.27± 10.11, 55.26± 9.98로 유의성 있는 증가를 보였으며, 1.71 Met+EtOH군은 50.98± 8.98로 유의성 없는 감소를 보였고, 5.13 Met+EtOH군은 48.80± 9.09로 유의한 감소를 나타내었다.

지연형과민반응(Delayed-type hypersensitivity : 이하 DTH)—DTH의 결과는 Table IX에서 보는 바와 같이, 대조군이 17.28± 2.29를 보인데 비하여 0.19

Table X—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the rosette forming cell (RFC) in ICR mice

Group (% added)	RFC(%)
Basal+EtOH(Control)	17.59± 3.43
0.19 Met+EtOH	21.68± 3.95**
0.57 Met+EtOH	18.69± 3.59*
1.71 Met+EtOH	15.43± 3.46**
5.13 Met+EtOH	15.14± 2.63**

Mice were challenged with 10⁸ S-RBC on left hind footpad 4 days after sensitization. On the 5th day, RFC assay was performed.

$$\text{RFC(\%)} = \frac{\text{No. of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ viability}} \times 100$$

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table II. (*, p<0.05 and **, p<0.01)

Table XI—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the phagocytic activity in ICR mice

Group (% added)	Corrected phagocytic index
Basal+EtOH(Control)	3.78± 0.15
0.19 Met+EtOH	4.28± 0.54**
0.57 Met+EtOH	4.18± 0.63**
1.71 Met+EtOH	4.16± 0.28**
5.13 Met+EtOH	3.49± 0.55**

Corrected phagocytic index is a constant obtained from a formula relating the cube root K to the ratio of body weight to the weight of the liver and spleen.

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table II. (**, p<0.01)

Met+EtOH와 0.57 Met+EtOH군은 17.73± 3.31와 16.84± 1.65로 유의성 없는 감소를 보였으나, 1.71 Met+EtOH와 5.13 Met+EtOH군은 14.99± 1.73, 13.65± 2.00으로 유의한 감소를 보였다.

비장세포의 rosette 형성능(이하 RFC)—각 군에서 관찰한 RFC를 %로 환산한 결과는 Table X에서와 같다. 대조군의 RFC는 17.59± 3.43%을 나타내는데 비해, 0.19 Met+EtOH와 0.57 Met+EtOH군은 21.68± 3.95%, 18.69± 3.59%로 유의성 있는 증가를 나타내었으나, 1.71 Met+EtOH와 5.13 Met+EtOH군은

Table XII—The effect of methionine diets on the immunotoxicity of ethanol on the number of circulating leukocyte in ICR mice

Group (% added)	Number of circulating leukocyte (/mm ³)
Basal+EtOH(Control)	5,074± 238
0.19 Met+EtOH	7,904± 693**
0.57 Met+EtOH	6,765± 1,063**
1.71 Met+EtOH	5,170± 785
5.13 Met+EtOH	4,327± 353**

Each value represents the mean±S.E. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table II. (**, p<0.01)

15.43± 3.46%, 15.14± 2.63%으로 유의성 있는 감소를 나타내었다.

대식세포의 활성에 미치는 영향—대식세포의 탐식 능력을 측정하여 corrected phagocytic index로 환산한 결과는 Table XI에서 보는 바와 같다. 대조군이 3.78± 0.15인데 비해, 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH, 1.71 Met+EtOH군은 4.28± 0.54, 4.18± 0.63, 4.16± 0.28로 유의성 있는 증가를 보였으나, 5.13 Met+EtOH군은 3.49± 0.55로 유의성 있는 감소를 보였다.

말초순환백혈구수에 미치는 영향—말초순환백혈구수는 Table XII에서 보는 바와 같이, 대조군이 5,074± 238인데 비하여, 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH군은 7,904± 693, 6,765± 1,603으로 유의한 증가를 보인 반면, 5.13 Met+EtOH군은 4,327± 353으로 유의한 증가를 보인 반면, 5.13 Met+EtOH군은 4,327± 353으로 유의한 감소를 보였다.

고 찰

Methionine식이 생쥐의 ethanol 면역독성에 미치는 영향을 검토하고자 실시한 본 실험의 결과에 대한 고찰은 다음과 같다.

Methionine식이와 ethanol의 섭취량에 미치는 영향—Methionine식이와 ethanol 섭취량이 Table II에서와 같이 대조군에 비해 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH, 5.13 Met+EtOH군에서 유의한 감소를 보였다. 이는 broiler chick에서 methionine이 더 첨가되었을 때 식이섭취량이 감소되었다는 Henry 등²⁸⁾의

보고와, chick에서 ethanol이 면역억제로 작용하여 amino acid 식이섭취량이 감소되었다는 Klasing 등⁴⁰⁾의 보고와, 만성알콜 섭취된 흰쥐에 있어 알콜섭취량이 감소되었다는 Porta 등²⁴⁾의 보고로 미루어, 장기간 과잉의 methionine의 첨가는 실험식이섭취량을 감소케 하고, 만성알콜의 면역독성에 의해 ethanol 섭취량이 감소하는 것으로 사료된다.

체중 및 각 장기에 미친 영향—체중의 증가율은 Table III에서와 같이 대조군에 비해 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH, 1.71 Met+EtOH군은 유의한 감소를 보였다. 인체에 있어 만성알콜섭취는 체중증가율을 감소시킨다는 Lieber 등⁴¹⁾과 Bernstein 등⁴⁰⁾의 보고와 methionine식이에서 methionine 함량의 증가는 chick의 체중증가율을 증가시켰다는 Tsiagbe 등²³⁾과 Leeming 등⁴²⁾의 보고와 만성 ethanol 투여한 chick에서 체중증가율이 저하되었다는 Nauss 등¹⁵⁾과 Henry 등²⁸⁾의 보고로 미루어, methionine이 ethanol의 해독작용에 의해 체중증가율 감소를 저지시키는 것으로 생각되나, methionine양의 초과반은 상반된 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

간장 대 체중 증량비는 Table IV에서와 같이 대조군에 비해 1.71 Met+EtOH군은 감소를 보였으나, 5.13 Met+EtOH군은 유의한 증가를 보였다. 이는 만성 ethanol이 섭취된 흰쥐에서 지방간이나 간경화로 간의 무게가 증가되었다는 Lieber 등⁴³⁻⁴⁵⁾의 보고와 만성ethanol 섭취로 지방간이 유도된 흰쥐에 있어 methionine의 체내 대사과정에서 생성되는 S-adenosyl-L-methionine(SAM)이 보호효과가 있다는 Feo 등⁴⁶⁾의 보고로 미루어, 이는 methionine이 체내에서 SAM으로 되어 ethanol 간독성을 억제시키는 것으로 생각되나 양의 초과가 간독성을 더욱 촉진시키는 것으로 사료된다.

비장 및 흉선의 증량변화는 Table V에서와 같이 대조군에 비해 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH, 1.71 Met+EtOH군에서 유의한 증가를 보였으나, 5.13 Met+EtOH군에서는 유의한 감소를 나타냈다. 이는 흉선과 비장이 만성알콜섭취된 흰쥐에서 흉선과 비장이 위축되었다는 Tennenbaum 등¹³⁾의 보고로 미루어, methionine이 ethanol에 의한 면역장기인 흉선과 비장의 위축을 저지시키는 것으로 생각되나, 양의 초과는 면역장기에 ethanol의 면역독성을 더욱 촉진시키는 것으로 생각된다.

체액성 면역에 미치는 영향—적혈구응집소(HA titer)와 2-mercaptoethanol(2-ME) 내성응집소가는 면양 적혈구에 대한 항체와의 반응으로서 T-임파구의 존성에 대한 면역항체의 양을 나타내는 지표인데, 이의 측정으로 혈중 면역항체의 소장을 측정하는데 널리 이용되는 것으로 Table VI에서 나타난 바와 같이 대조군에 비하여 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH군은 유의하게 증가하였으나 5.13 Met+EtOH군은 유의한 감소를 보였다(Table VI). 이는 만성알콜 투여된 흰쥐에서 HA titer가 유의한 저하를 보였다는 Loose 등⁸⁾의 보고와 broiler chick에 있어 methionine 첨가식이 HA titer를 증가시키고 IgG를 증가시켰다는 Tsiagbe 등²³⁾의 보고와 methionine이 chick에서 IgG를 증가시켰다는 Henry 등²⁸⁾의 보고로 미루어, methionine이 ethanol에 의한 HA titer 감소를 억제시켜 IgG를 증가시키는 것으로 생각되나 양의 초과는 상반되게 나타나는 것으로 생각된다.

Arthus 반응은 감각숙주에 주입된 항원이 항원-항체 면역복합체를 형성하여 조직에 침착하고 보체를 활성화시키며 항원에 의해 자극된 비만세포로부터 유리된 histamine 및 leukotriene이 다형핵 백혈구의 유주작용을 항진시키고 유도되어온 다형핵 백혈구가 lysosomal enzyme를 유리하여 염증반응을 촉진시키는 현상으로, 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH군은 대조군에 비하여 Arthus반응은 유의하게 증가하였으나, 5.13 Met+EtOH군은 유의한 감소를 보였다(Table VII).

비장세포의 용혈반형성세포(PFC)는 Table VIII에서 나타난 바와 같이, 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH군은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으나, 5.13 Met+EtOH군은 유의성 있는 감소를 보였다.

이상의 체액성 면역반응인 Arthus반응, HA titer, 2-ME 내성응집소, PFC를 종합해 보면 methionine이 ethanol의 체액성 면역저하를 억제시키는 것으로 생각되나, methionine양의 초과는 ethanol의 체액성 면역독성을 더욱 촉진시키는 것으로 사료된다.

세포성면역에 미치는 영향—지연형과민반응(DTH)은 감각임파구에 의한 lymphokines의 화학적 전달 인자의 유리에 의해서 성립되며, 특히 대식세포가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다.³²⁾ 본 실험에서는 대조군에 비하여 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH군은 유의한 변화가 없었으나, 1.71 Met+

EtOH, 5.13 Met+EtOH군은 유의한 저하를 보였다(Table IX). 이는 인체에 있어 만성알콜투여가 DTH를 감소시켰다는 Straus 등⁴⁷⁾의 보고와 흰쥐에 있어 만성알콜투여는 macrophages 기능감소와 DTH가 감소되었다는 Tennenbaum 등¹³⁾의 보고와 cirrhosis를 가진 만성알콜중독자는 DTH를 감소시켰다는 Berenyi 등⁹⁾의 보고로 미루어, methionine이 lymphokine의 생성 또는 macrophage이 활성화 등을 증가시켜 ethanol의 DTH 저하를 억제시킨 것으로 사료되나, methionine양의 초과는 상반되게 나타낸 것으로 생각된다.

비장세포의 rosette 형성세포(RFC)는 T-cell 및 대식세포가 모두 rosette cell을 형성할 수 있으나 대부분 T-cell이 깊이 관여한다고 하였다.⁴⁶⁾ 본 실험에서는 Table X에서와 같이 대조군에 비하여 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH군은 유의하게 증가하였으나, 1.71 Met+EtOH, 5.13 Met+EtOH군은 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 이는 인체에 있어 T-rosette forming cells 수의 유의한 감소가 만성알콜 group에서 나타났다는 Magdalena 등⁴⁹⁾의 보고와 만성알콜성 간염환자에서 T-cell의 기능과 circulating thymus-dependent lymphocytes의 감소는 흉선위축에 의해 세포성 면역기능이 감소되었다는 Watson 등⁵⁰⁾의 보고로 미루어, methionine이 ethanol의 면역독성에 의한 흉선의 중량감소, T-cell의 기능억제 및 T-lymphocyte의 감소를 억제시켜 세포성 면역반응을 증가시킨다고 사료되나, methionine양의 초과는 ethanol에 의한 T-cell의 기능억제나 T-lymphocyte의 감소를 억제시키지 못하고, methionine 자체가 체내에서 대사되어 세포성 면역독성을 나타낸 것으로 생각된다.

이상의 세포성 면역반응인 DTH와 RFC를 종합해 보면 methionine은 lymphokine의 생성, macrophage의 기능활성화, T-lymphocyte의 증가 및 흉선의 중량증가로 인해 ethanol의 세포성 면역독성을 억제시켜 세포성 면역반응을 증가시킨 것으로 사료되나, methionine양의 초과는 ethanol의 세포성 면역독성을 촉진시키는 것으로 생각된다.

비특이적 면역에 미치는 영향—대식세포의 활성화는 항원에 대한 면역능의 발현 및 interleukine의 분비에 중요한 역할을 하며, 그 탐식능이 망상조직내피세포(RES)에 영향을 끼쳤는가를 알기 위한 중요한 지표

로 이용되는 것으로,⁵¹⁾ 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH, 1.71 Met+EtOH군은 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나, 5.13 Met+EtOH군은 유의한 감소를 보였다(Table XI). 이는 만성 ethanol 투여된 흰쥐에 있어 대식세포의 기능이 감소되었다는 Goldberg 등⁵²⁾의 보고와 알콜투여된 흰쥐에서 항체생산 감소와, RES 기능감소에 의해 macrophage 기능이 감소되었다는 Tennenbaum 등¹³⁾의 보고와, ethanol을 만성섭취한 간장질환 환자에서 대식세포의 활성이 감소되었다는 Tsiagbe 등²³⁾의 보고와 methionine이 충분한 식이를 투여한 chick에서 혈중 interleukine-1 활성이 유의하게 증가되었다는 Klasing 등⁴⁰⁾의 보고로 미루어, methionine이 interleukine의 분비를 촉진시켜 ethanol에 의한 macrophage의 기능감소를 억제한 것으로 사료되나, methionine양의 초과는 상반되게 나타나는 것으로 생각된다.

말초순환백혈구(WBC)수는 Table XII에서와 같이 대조군에 비하여 0.19 Met+EtOH, 0.57 Met+EtOH군은 유의한 WBC의 증가를 보였으나 5.13 Met+EtOH군은 유의한 감소를 보였다. 이는 만성알콜성 간염환자에서 T-임파구가 감소되었다는 Bernstein 등¹⁰⁾의 보고로 미루어, methionine이 ethanol에 의해 억제된 T-임파구의 활성화에 영향을 미쳐 WBC를 증가시키는 것으로 생각되나, methionine양의 초과는 상반되게 나타나는 것으로 사료된다.

결 론

생쥐에 있어서 methionine(Met)식이 ethanol(EtOH)의 면역독성에 미치는 영향은 다음과 같다.

1. 체중의 증가율과 비장 및 흉선의 대 체중비는 대조군에 비해 EtOH과 0.19, 0.57 및 1.71% Met 식이병용투여군에서 유의하게 증가하였으나, EtOH과 5.13% Met식이병용투여군에서는 유의한 감소를 보였다.

2. 체액성면역반응은 대조군에 비해 EtOH와 0.19 및 0.57% Met식이병용투여군에서 유의하게 증가하였으나, EtOH과 5.13% Met식이병용투여군에서는 유의한 감소를 보였다.

3. 세포성면역반응은 대조군에 비해 EtOH과 1.71 및 5.13% Met식이병용투여군에서 유의한 감소를 보였다.

4. 대식세포의 활성은 대조군에 비해 EtOH과 0.19, 0.57 및 1.71% Met식이병용투여군에서 유의하게 증가하였으나, EtOH과 5.13% Met식이병용투여군에서는 유의한 감소를 보였다.

5. 말초순환 백혈구수는 대조군에 비해 EtOH과 0.19 및 0.57% Met식이병용투여군에서 유의하게 증가하였으나, EtOH과 5.13% Met식이병용투여군에서는 유의한 감소를 보였다.

문 헌

- 1) Gable, F.B.: *Psychosocial Pharmacy; The Synthetic Society*. Lea and Febiger. Philadelphia, Pennsylvania p.61 (1974).
- 2) Hathcock, J.N.: In *Nutrition and Drug Interrelations; Effect of Amino Acid Intake on Ethanol Toxicity*. Academic Press, New York pp.423-141 (1978).
- 3) Austrian, R. and Gold, J.: Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Am. Intern. Med.*, **60**, 759-776 (1964).
- 4) Kok-Jense, A.: The prognosis of pulmonar tuberculosis in patients with abuse of alcohol. *Scand. J. Reep. Dis.*, **51**, 42-48 (1970).
- 5) Conn, H. and Fessel, J.M.: Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *Medicine* **50**, 161-197 (1971).
- 6) MacGregor, R.R., Glickman, S.J. and Senior, J.R.: Granulocyte function and levels of immunoglobulins and complement in patients admitted for withdrawal from alcohol. *J. Infect. Dis.*, **138**, 747-753 (1978).
- 7) Wands, J.R., Diestag, J.L., Weake, J.R. and Koff, R.S.: *In vitro* studies of enhanced IgG synthesis in severe alcoholic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **44**, 39 (1981).
- 8) Loose, L.D., Steage, T. and Luzio, N.R.: The influence of acute and chronic ethanol or bourbon administration on phagocytic and immune response in rats. *Exp. Mol. Pathol.*, **23**, 459-472 (1975).
- 9) Berenyi, M.R., Straus, B. and Cruz, D.: *In vitro and in vivo* studies of cellular immunity in alcoholic cirrhosis. *Amer. J. Dig. Dis.*, **19**, 199-205 (1974).
- 10) Bernstein, I.M., Webster, K.H., Williams, R.C. and

- Strickland, R.G.: Reduction of circulating T-lymphocytes in alcoholic liver disease. *Lancet* **2**, 488-490 (1984).
- 11) Hus, C.C.S. and Leevy, C.M.: Inhibition of PHA-stimulated lymphocyte transformation by plasma from patients with advanced alcoholic cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **8**, 749-760 (1971).
 - 12) Tisman, G. and Herbert, V.: *In vitro* myelosuppression and immunosuppression by ethanol. *J. Clin. Invest.*, **52**, 1410-1414 (1973).
 - 13) Tennenbaum, J.I., Rupper, R.D., Pierre, R.L., Greenberger, N.J. and Columbus, O.: The effect of chronic alcohol administration on the immune responsiveness of rats. *J. Allergy*, **44**, 272-281 (1969).
 - 14) Gluckman, S.J., Dvorak, V.C. and Macgregor, R.R.: Host defenses during prolonged alcohol consumption in a controlled environment. *Arch. Intern. Med.*, **137**, 1539-1543 (1977).
 - 15) Nauss, K.M., Connor, A.M., Kavanaugh, A. and Newberne, P.M.: Alterations in immune function in rats caused by dietary lipotrope deficiency; Effect of age. *J. Nutr.*, **122**, 2333-2341 (1982).
 - 16) Elizabeth, A.J., Gebhardt, B.M., Morton, B. and Newberne, P.M.: Effects of early marginal methionine-choline deprivation on the development of the immune system in the rat. *J. Clin. Nutr.*, **32**, 1214-1223 (1989).
 - 17) Nauss, K.M. and Newberne, P.M.: Effects of dietary folate, Vitamin B₁₂ and methionine/choline on immune function. In *Diet and Resistance to Disease* (Phillips, M and Baetz, A., eds), Plenum Publishing Corp., New York, pp. 63-92, 1981.
 - 18) Gershoff, S.N. Gill, T.G., Simonian, S.J. and Steinberg, A.I.; Some effects of amino acid deficiencies on antibody formation in the rat. *J. Nutr.*, **95**, 184-190 (1968).
 - 19) Bhargava, K.K., Hanson, R.P. and Sunde, M.L.: Effect of methionine and valine on antibody production in chicks infected with *Newcastle Disease Virus*. *J. Nutr.*, **100**, 241-248 (1970).
 - 20) Kenney, M.A., Magee, J.L. and Pedad-Pascual: Dietary amino acids and immune response in rats. *J. Nutr.*, **100**, 1063-1072 (1970).
 - 21) Newberne, P.M., Wilson, R.B. and Williams, G.: Effects of severe and marginal lipotrope deficiency on responses of postnatal rats to infection. *Br. J. Exp. Pathol.*, **51**, 229-235 (1970).
 - 22) Gebhardt, B.M. and Newberne, P.M.: Nutritional and immunological responsiveness; T-cell function in the offspring of lipotrope and Protein-deficient rats. *Immunol.*, **26**, 489-495 (1974).
 - 23) Tsiagbe, V.K., Cook, M.E., Harper, A.E. and Sunde, M.L.: Enhanced immune response in broiler chicks fed methionine-supplemented diets. *Poultry Science* **66**, 1147-1154 (1987).
 - 24) Porta, E.A., Hartroft, W.S. and De la Iglesia, F.A.: Hepatic changes associated with chronic alcoholism in rats. *Laborat. Invest.*, **14**, 1437-1455 (1965).
 - 25) Leonore, M.D. and Lieber, C.S.: Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J. Nutr.*, **91**, 331-336 (1967).
 - 26) Hegsted, D.M. *et al.*: Salt mix IV. *J. Biol. Chem.*, **138**, 459-466 (1941).
 - 27) Tsiagbe, V.K., Cook, M.E., Harper, A.E. and Sunde, M.L.: Efficacy of cysteine in replacing methionine in the immune response of broiler chicks. *Poultry Science* **66**, 1138-1146 (1987).
 - 28) Henry, E.E. and Pran, V.: Influence of copper supplementation on the relationship between dietary methionine and free plasma methionine. *J. Nutr.*, **111**, 1621-1629 (1981).
 - 29) Bounous, G., Létourneau, L. and Kongshavn, A.L.: Influence of dietary protein type on the immune system of mice. *J. Nutr.*, **113**, 1415-1421 (1983).
 - 30) Reed, N.D., Crowle, D.K. and Ha, T.: Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immuno-deficient animals, B.S. Sordet *et. Karger Baselip*, p.184, 1984.
 - 31) Coombs, R.R.A. and Fiset, M.L.: Detection of complete antibodies to egg albumin by means of sheep red cell egg albumin antigen. *Unit. Trit. J. Exp. Pathol.*, **35**, 472 (1954).
 - 32) Stavitsky, A.B.: Micro-methods for the study of proteins and antibiotic. *J. Immunol.*, **72**, 360 (1954).
 - 33) Yoshikai, Y., Maie, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K.: Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the de-

- layed foot pad reaction to SRBC in mice. *Immunol.*, **38**, 577 (1979).
- 34) Sugimoto, M., Kojima, A.M., Yaginama, K. and Gashira, Y.E.: Cell mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **28**, 32 (1975).
 - 35) Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussclorf, D.H.; *Methods in Immunology*, 3rd ed., Benjamin p.499 (1980).
 - 36) Elliott, B.E. and Haskill, J.S.: Characteristics of thymus-derived and bone marrow-derived rosette forming lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 68 (1973).
 - 37) Cunningham, A.: Plaque assay for antibody producing cells. *Allergy* **17**, 5 (1973).
 - 38) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiiffel, C. and Halpern, B.N.: Etude quantitative du l'acivite granulo pexique du systeme reticuloentherial chezla souris. *C. R. Soc. Biol. Paris* **148**, 43 (1954).
 - 39) Snedecor, G.W. and Cochran, W.G.: *Statistical Methods*, 6rd ed., Iowa State Univ. Press, Iowa. p.1 (1967).
 - 40) Klasing, K.C. and Barnes, D.M.: Decreased amino acid requirements of growing chicks due to immunologic stress. *J. Nutr.*, **118**, 1158-1164 (1988).
 - 41) Lieber, C.S., Jones, D.P. and Leonore, M.D.: Effects of prolonged ethanol intake; Production of fatty liver despite adequate diets. *J. Clin. Invest.*, **44**, 1009-1021 (1965).
 - 42) Leeming, T.K. and Donaldson, W.E.: Effect of dietary methionine and lysine on the toxicity of ingested lead acetate in the chick. *J. Nutr.*, **114**, 2155-2159 (1984).
 - 43) Lieber, C.S.: Alcohol and the liver. *Med. World News, Gastroenterol.*, p.25 (1972).
 - 44) Lieber, C.S. and Spritz, N.: Effects of prolonged ethanol intake in man, Role of dietary adipose and endogenously synthesized fatty acid in the pathogenesis of the alcoholic fatty liver. *J. Clin. Invest.*, **45**, 1400 (1966).
 - 45) Lieber, C.S., Spritz, N. and Leonore, M.D.: Role of dietary, adipose, and endogenously synthesized fatty acids in the pathogenesis of the alcoholic fatty liver. *J. Clin. Invest.*, **45**, (1966).
 - 46) FeO, F., Pascale, R., Garcea, R., Daino, L., Pirisi, L., Frassetto, S., Ruggiu, M.E., Padova, C.D. and Stramentinoli, G.: Effects of the variations of s-adenosyl-l-methionine liver content on fat accumulation and ethanol metabolism; In ethanol-intoxicated rats. *Toxicol. Applied Pharm.*, **83**, 331-341 (1986).
 - 47) Straus, B. and Berenyi, M.R.: Infection and immunity in alcoholic cirrhosis. *Mt. Sinai J. Med.*, N.Y., **40**, 631-640 (1973).
 - 48) Back, J.E. and Dardenne, M.: Antigen recognition by T-lymphocytes. *Cell Immunol.*, **3**, 1 (1972).
 - 49) Magdalena, R., Berenyi, M.D., Bernard straus, M. D. and Luis Avila, M.D.: T-rosette in alcoholic cirrhosis of the liver. *JAMA* **232**, 44-46 (1975).
 - 50) Watson, R.R., Jackson, J.C., Hartmann, B., Sampliner, R., Mobley, D. and Eskelson, C.: Cellular immune functions, endorphins, and alcohol consumption in males. *Alcoholism. Clin. Exp. Res.*, **9**, 248-254 (1985).
 - 51) Hambach, A., Stiller-winkler, R., Oberbarnscheidt, J. and Ewerw, U.: Sind suppress T-zellen die primaren ziellen der immunotoxischen wirkungen von blei ? *Zbl. Bart. Hyg.*, **1. Abt Orig B.** **178**, 361 (1983).
 - 52) Goldberg, D.M. and Watts, L.: Serum enzyme change as evidence of liver reaction to oral alcohol. *Gastroenterol.*, **49**, 256-261 (1965).