

혼합형 동종이인자형 키메라쥐에서 특정공여군의 동종 폐이식편에 대한 관용

염 옥*

=Abstract=

Mixed Chimerism to Achieve Donor-Specific Transplantation Tolerance for Lung Allografts in Rats

Wook Youm, M.D.*

Poor long term patient survival (60% at 2 years) in lung allograft recipients are mainly due to rejection and complications associated with the use of nonspecific immunosuppressants. Better means to achieve graft acceptance is desperately needed. I have investigated whether mixed allogeneic chimerism in the form of bone marrow stem cell engraftment would induce donor-specific tolerance for lung allografts. Fisher (F344) and Wistar Furth (WF) rats were lethally irradiated (1100cGy) and reconstituted with a mixture of T-cell depleted syngeneic and allogeneic bone marrow (F344+WF→WF, ACI+F344→F344). After Mixed chimerism was documented by peripheral blood lymphocyte typing at 28 days, orthotopic left single lung transplantation was performed, using donor-specific or third party allografts. No immunosuppressants were administered. Graft rejection was monitored by chest rentgenography, and confirmed by histology.

Mixed chimeric rats accepted lung allografts permanently, and it was not strain specific effect. Tolerance was all or none phenomenon which had nothing to do with the percentage of chimerism. Mixed chimeras rejected third party allografts in less than 10 days, a time course similar to that of unmanipulated controls. No acute or chronic rejection was observed in donor specific grafts more than 150 days posttransplant. These data suggest that mixed chimerism in the form of bone marrow stem cell engraftment results in stable, systemic donor-specific transplantation tolerance for lung allografts.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 29: 713-22)

Key words: 1. Chimerism
2. Lung transplantation
3. Allograft

서 론

장기이식분야에 있어서 최근 10여년간의 괄목할만한

발전의 요인을 여러가지로 들 수 있겠으나 수술기법 및 환자관리, 공여장기의 보전방법, 면역억제제등이 현재까지의 발전을 유도해 온 주된 공헌인자가 될 것이다.

* 한국보훈병원 흉부외과

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Korea Veterans Hospital

본 실험의 1차 중간결과는 1994년 10월 12일 Chicago의 Surgical Forum 80th Annual Clinical Congress에서 구연되었음

논문접수일: 95년 12월 11일 심사통과일: 96년 4월 19일

통신저자: 염 옥, (134-791) 서울시 강동구 둔촌동 6-2, Tel (02) 225-0243, FAX. (02) 477-5605

특히 면역억제제는 수용자의 이식장기에 대한 거부반응을 조절하지만 동시에 수술후 환자의 면역기전을 억제하여 야기될 수 있는 여러 합병증으로 사망의 원인이 되기도 한다. 또한 급성 거부반응의 시기를 무사히 넘기더라도 만성거부에 의한 이식장기의 손상이 일어나게 된다. 따라서 수용자가 이식된 공여장기의 동종항원(alloantigen)에 대하여 특정관용(specific tolerance)을 가지면서도 적절한 면역기전을 유지할 수 있다면 이식후 수용자와 공여장기를 최적의 상태로 유도할 수 있을 것이다. 더욱이 폐는 다른 고형장기와는 달리 아직도 이식후 2년생존율이 60%밖에 이르지 못하고 있는데 이것은 대부분 이식된 장기에 대한 거부반응 혹은 면역억제요법후의 감염에 의한 것이다. 따라서 장기이식후의 이식편수용(Graft acceptance)을 향상시키며, 수용자의 면역기능을 유지시킬 수 있는 더 좋은 방법이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

Ildstad와 Sachs 등¹⁾은 1984년 치사량의 방사선조사(1100cGy)후의 생쥐에게 T임파구를 제거한 일란성쌍생인자형(Syngeneic)골수세포와 동종이인자형(Allogeneic)골수세포를 재조합한 혼합동종이인자형골수세포를 지닌 키메라생쥐(mixed allogeneic bone marrow chimerism mouse)와, 일란성쌍생인자형골수세포와 이종인자(Xenogeneic)골수세포를 재조합한 혼합이종인자형골수(mixed Xenogeneic bone marrow)키메라생쥐에서 공여자에 특정된 이식편관용(Donor specific graft tolerance)이 이식된 고형장기나 세포편에 대하여 영구적으로 유지된다고 보고한바 있다. 저자는 혼합동종이인자형 골수세포를 지닌 키메라쥐에서(A+B→A) 공여자에 특정한 동종폐이식후의 관용이 초래될 수 있는지의 여부와, 이식된 폐의 조직학적 변화를 관찰하여 5개월이상의 이식된 특정공여자의 폐에 대한 관용을 확인하고 일정한 조건하에서 만들어지는 골수키메라현상이 장기이식 특히 폐이식분야에 새로운 전망을 제공할 수 있다는 것을 보고하려 한다.

대상 및 방법

무균적으로 사육된 10주내지 11주의 ACI rat와 Fisher rat(F344), Wistar-Furth(WF) rat를 Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianapolis, Ind.)으로부터 구입하였다. 키메라 쥐를 만들기 위하여 골수세포를 이식할 종주의 쥐(F344, WF)에 치사량의 방사선조사(1100c)를 한후, T-임파구를 제거한 5×10^6 개의 동일종주의 일란성쌍생인자형(Syngeneic)골수세포와 타종주의 1.5×10^7 개의 동종이인자형(Allogeneic)골수세포의 혼합물을 쥐의 외측미정맥(Lat-

eral tail vein)에 주사하였다. (F344+WF→WF, ACI+F344→F344) 28일후 혼합골수세포로 재구성된 쥐의 말초혈액에서 일란성쌍생인자형골수세포 및 동종이인자형골수세포에서 유래된 골수세포의 공존정도를 확인하기 위하여 쥐의 말초혈액을 채취하여 헤파린을 섞은 후 200 μ l의 배지(Medium 199, Gibco Lab;Grand Island, NY)를 첨가하여 철저히 섞어 부유액을 3ml의 임파구분리배지(Lymphocyte Separation Medium, Organon Technica, Kensington, MD)에 넣고 23 $^{\circ}$ C에서 원심분리(1700 rpm \times 30 min)하였다. 임파구층을 식염수-임파구분리배지의 계면에서 분리하여 배지로 잘 씻어내고, 적혈구는 Ammonium chloride potassium carbonate lysing buffer로 용해시킨 후 임파구를 표면표지항원의 단일클론항체인 anti-WF, anti-ACI, anti-F344-Biotin 으로 Class-1염색을하고 WF, ACI, F344종주의 말초혈액임파구의 백분율을 Flow cytometry(FACSII, Becton-Dickinson Fluorescence Activated Cell Sorter)를 이용하여 계산하였다. 염색된 세포들의 형광강도(Fluorescence intensity)의 log값을 x축으로, 세포수효를 y축으로 하여 자료들을 그래프로 표시하였다. 세포의 백분율은 표본의 형광염색의 강도와 염색된 대조군과 염색되지 않은 대조군의 대조형광의 profil로부터 계산되었다^{2,3)}. 쥐들은 모두 6군으로 나누어 1,2군은 정상대조군으로, 이식폐의 공여종주와 수용종주를 달리하여 좌측의 동소동종폐이식(Orthotopic allotransplantation of left lung)을 시행하였다. 3,4,군은 폐와 골수세포의 공여종주를 같이한 키메라쥐를 수용종주로 5군은 폐와 골수세포의 공여종주를 달리한 키메라쥐를 수용종주로하였다. 6군은 방사선조사의 효과를 보기위한 대조군으로, 키메라쥐를 만드는 동일한 조건으로 처리된 WF종주의 쥐에 일란성쌍생인자형의 골수세포를 주입한후에 좌측 동소동종폐이식을 시행한 군이다. 동소동종폐이식의 수술기법은 Marck⁴⁻⁶⁾, Prop 등⁷⁾이 최초로 기술하였고, Mizuta 등⁸⁾에 의해 변형된 기법을 사용하였다. 공여쥐를 Methoxyflurane으로 흡입마취를 시킨후, 즉시 좌측 제5늑간으로 개흉술을 시행하고 흉강내의 폐를 가능한 한 부드럽게 조작하여 손상을 주지 않도록 주의하며, 면봉으로 하폐인대(Inferior pulmonary ligament)를 박리하여 분리하고, 폐정맥과 폐동맥을 2mm정도의 cuff를 대어 줄 수 있도록 최대길이로 연기 위해 가능한 한 근위부까지 수술현미경의 시야하에서 미세박리하여 분리하였다. 좌주기관지(Left main bronchus)를 수용쥐의 기관지와 문합을 하기에 적당한 길이로 잘라내었다. 이렇게 적출된 폐에 6unit/ml의 Heparin이 포함된 섭씨4도의 Ringer lactate 용액을 50cc/kg로 폐동맥을 통하여 관류시킨 후, 18번

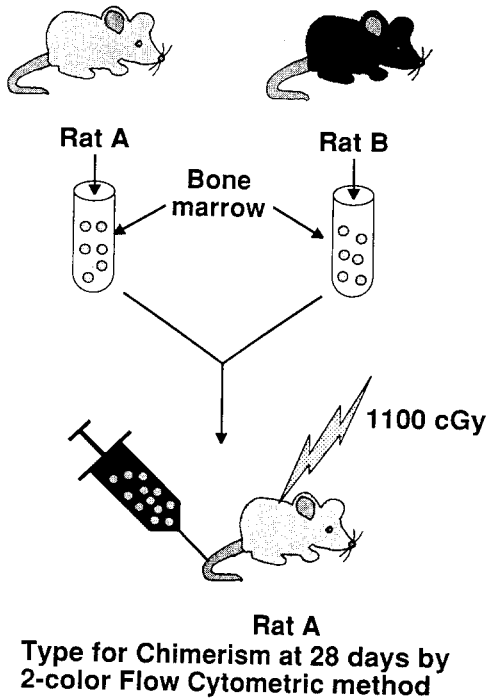


Fig. 1. Model. Prepare Chimeras

guage의 polyethylene 혈관도자를 이용하여 미리 만들어둔 1mm의 몸체(Body)와 1mm의 연장부(Extension part)를 가진 cuff를 폐정맥과 폐동맥에 cuff의 연장부위가 혈관의 후면으로 위치하는 방향으로 부착시키고 cuff밖으로 나와 있는 부분의 혈관을 cuff몸체 주위로 외번시켜 7-0심혈관 봉합사로 주위를 둘러싸 결찰하였다. 이러한 방법으로 처리된 폐는 섭씨4도의 생리식염수용액내에 허혈보존시켜 이식에 대비하였다.

수용쥐는 Methoxyflurane으로 가볍게 흡입마취를 시킨 후 6~6.5cm 정도의 14guage 혈관도자를 사용하여 특별히 고안된 plastic neck extender에 쥐를 고정시키고 목부위를 투과조명(Transillumination)하며 기관내삽관을 하였다. 삽관시 사용된 도자는 삽관후 호흡기와 연결시키는 부위가 쥐의 절치부위에 위치할 수 있도록 미리 길이를 재어 사용하였고, 삽관후 반드시 양측의 폐호흡을 확인하였다. 삽관도자는 설치류호흡기(Rodent ventilator, Model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA)에 연결하여 정상 호흡을 유지하도록 하였다(호흡수 70/min, 호흡용적 10ml/kg, 최고흡입압 20cm H₂O, 말기호기양압 PEEP, 5cm H₂O). 마취는 수술중 2% Halothane과 500ml/min 유속율의 100% 산소로 유지하였다. 폐이식은 6~16배의 확대배율을 가진 수술현미경시야하에서(M-650; Wild Heerburgg

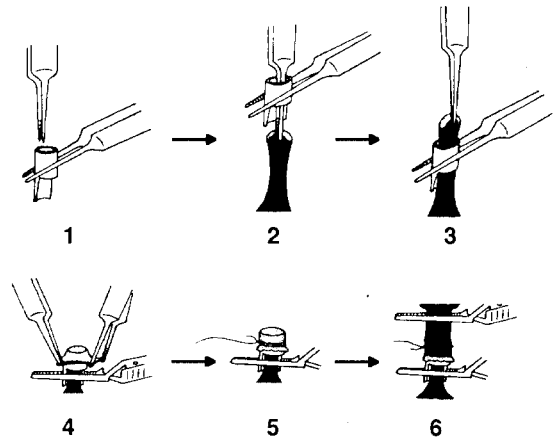


Fig. 2. Rat lung transplant by cuff technique

Ltd, Heerburgg, Switzerland) 단일인에 의해 동일한 과정으로 시행되었다. 수용쥐는 좌측흉부가 전방에 오도록 위치시킨 후에 5번 늑간으로 개흉하였다. 개흉 후 좌하폐인대를 우측의 늑막강내에 기흉이 생기지 않도록 조심스럽게 분리하고 폐문부위를 박리한 다음, 혈관경자로 폐동맥및 정맥, 기관지를 될 수 있는 한 원위부쪽에서 함께 차단시키고, 근위부의 폐동정맥및 기관지는 각각 Microbulldog clamp를 사용하여 차단하였다. 폐혈관 및 기관지의 차단 후 원위부 폐정맥의 혈관후벽을 횡절개하여 폐정맥을 헤파린을 함유한 생리식염수로 씻어낸 다음, 공여폐의 폐정맥에 부착시킨 cuff의 연장부(extension part)를 Microforcep으로 잡고, 수용쥐의 폐정맥절개부위를 통하여 cuff가 부착된 이식폐의 폐정맥을 수용쥐의 폐정맥안으로 삽입시킨 다음 7-0 혈관봉합사로 수용쥐의 폐정맥과 이미 삽입된 cuff가 부착된 이식폐의 폐정맥 주위를 둘러 결찰하고 폐정맥문합을 완료하였다. 폐동맥문합도 폐정맥문합과 마찬가지로 시행하였다. 혈관들의 문합을 완료한 후 근위부의 혈관경자들을 풀어 이식폐에 관류가 시작되도록 하였다. 기관지문합은 10-0 nylon을 사용하여 전면의 기관지연골부위는 단속봉합으로, 후면은 연속봉합으로 문합을 완료하고, 기관지근위부의 미세혈관감자를 풀어 이식폐의 호흡을 시작하고, 5cm의 PEEP를 걸어 허탈된 폐를 다시 팽창시키며 문합부의 공기누출을 확인하였다. 혈관과 기관지문합은 정확성을 기하기 위해 16배의 시야에서 시행되었다(Fig. 1,2,3). 폐이식을 완료한 다음 기관내 삽관을 통해 기도내의 점액분비물들을 제거하고 절개부위를 층층이 봉합하였다. 피부봉합을 하기 전에 늑막강내에 삽입해 두었던 혈관도자로부터 주사기로 늑막강내의 공기와 삼출

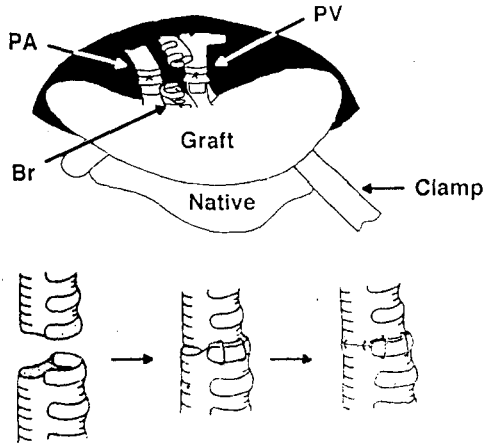


Fig. 3. Rat lung transplant by cuff technique (continued)

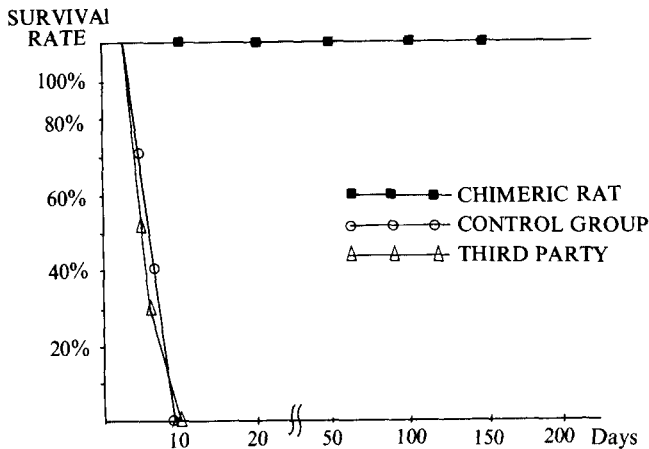


Fig. 4. Rejection free survival rate of lung allograft in chimeric and third party and control group rat

액을 배출시키며 혈관도자를 제거하였다. 폐이식후 수용 쥐는 즉시 halothane을 제외한 100% 산소로 호흡시키고 술후 호흡과 의식이 돌아온 것을 확인한후에 발관하고, 사육함에 넣어 경과관찰을 하였다. 모든 쥐들은 동일한 조건으로 수술전, 중, 후의 과정을 밟았고 수술후 어떠한 약물도 투여되지 않았다. 수술후 1, 2군의 대조군 및 5군의 키메라 쥐와 6군의 방사선조사 대조군의 모든 쥐들은 매일 흉부X선사진을 찍어 이식된 폐의 호흡상태를 조사하였고 X선 소견상 이식폐의 팽창정도를 나타내는 통기표면적(Aerated surface area)과 폐음영(Density of lung)상태를 세분하여 전혀 통기가 되지않고 방사선불투명한 상태를 0으로

Table 1. Grading scale for ventilation score of left lungs on chest roentgenograms

Score*	Aerated surface area of lung(part of normal expanded lung)	density of left lung
3	Total to two thirds	Normal
2	Two thirds to one third	Slight film or patchily increased
1	One third to minimal	Moderately increased
0	Not aerated	Opaque

* Total ventilation score of the left lung is the sum of the aerated surface score and the density score.

If the left lung is opaque except for an air bronchogram, the ventilation score is 1.

또한 정상적인 호흡소견을 3으로하여 각각 4단계의 점수를 매기고(Table. 1) 두 점수를 합산하였다¹²⁾. 합산점수가 1이하로 판정되면 즉시 쥐를 희생시켜 이식된 폐, 우측 자신의 폐, 심장, 간, 비장, 장간막및 경부임파절, 흉선등을 적출하고 혈장을 분리하여 액화질소로 급냉각하여 면역학적검사를 위해 냉동보관하고 조직편의 일부는 H-E염색을 위해 따로 보관되었다. 3, 4군의 키메라쥐는 수술후 처음 일주일엔 매일, 다음 두주일엔 이틀에 한번, 그후 일주일에 두번씩 두달간, 그후에는 매주 한번씩 흉부X선 사진을 찍어 이식된 폐의 호흡상태를 확인하였다. 키메라쥐들은 단기, 중기, 장기 관찰군으로 나누어 이식폐에 대한 거부반응이 없더라도 일정기간후 희생시켜 조직검사및 면역학적검사를 위해 준비하였다. 조직검사는 아무런 사전정보도 갖지 않은 동일한 병리의사의해 이루어졌다.

결 과

수용쥐와 공여쥐의 몸무게, 이식폐의 허혈시간, 공여쥐의 이식할 폐의 적출을 위한 피부절개에서부터 수용쥐의 이식후 피부봉합완료까지의 수술시간, 군별 분류및 이식된 폐의 생존기간은 Table 2,3과 같다. 이식폐의 허혈시간 및 수술시간은 군에 따른 차이는 없었다. 1,2대조군에서는 동종폐이식후 모든 예에서 중간값 7일째에 이식편의 거부반응이 완료되었으며 3,4군의 키메라쥐에서는 키메리즘의 백분율에는 상관없이 모든 예에서 이식편에대한 관용을 확인할 수 있었다. 골수와 폐가 각각의 다른 종주의 공여쥐로부터 온 제5군의 키메라쥐에서는 중간값 7일째에 거부반응이 완료되어, 키메라쥐에서도 골수와 폐의

Table 2. Body weight of the rat, Graft Ischemic and operation time

Gr	Donor Recipient		Weight Donor			Weight Recipient			Graft Ischemic time			Op. Tim(Min)		
	Strain	Strain	M	S.D	Med	M	S.D	Med	M	S.D	Med	M	S.D	Med
1	ACI	F344	238.9	24.9	246	252.6	32.4	257	57.0	6.8	58	112.3	8.5	110
2	F344	WF	291.8	31.3	272	300.4	29.1	315	60.8	5.4	60	115.8	5.9	115
3	F344	X-WF	281.3	29.5	282	291.6	42.9	295	60.4	3.5	61	121.5	6.4	122
4	ACI	X-F344	248.6	48.8	252	266.8	26.7	274	59.4	5.5	60	117.8	7.4	115
5	ACI	X-WF	272.7	35.2	274	274.9	48.9	264	58.4	4.7	56	122.6	8.5	120
6	F344	SR-WF	265.4	43.7	283	305.0	41.6	319	58.3	3.7	59	119.7	5.7	120

X:Chimerism, SR:Syngeneic radiation, M:Mean value, Med:Median

Table 3. Survival of rat lung allograft

Gr.	Donor		Recipient		% Donor		Graft	Median Graft	Cause of Failure
	BM	Lung	n.	Chimerism	Survival (Days)	Survival (Days)			
1	ACI	F344	8		6,7,7,7,7,9,9,11	7	Rejection		
2	F344	WF	5		4,7,7,7,8	7	Rejection		
3	F344	F344	X-WF	8	5~77%	>70(×3), >100(×3), >150(×3)	>100		
4	ACI	ACI	X-F344	8	6~97%	>60(×3), >100(×3), >150(×3)	>100		
5	F344	ACI	X-WF	7	10~62%	6,6,6,7,7,9	7	Rejection	
6	F344	SR-WF	7	0%	5,5,7,7,7,9,10	7	Rejection		

공여종주가 다룰 때에는 이식된 폐에 대하여 정상적인 거부반응이 일어났다는 것을 보여주었다. 6군의 일란성쌍생 이인자형골수군에서도 방사선조사와는 무관하게 동종이식 폐에 대한 거부반응이 대조군에서와 마찬가지로 중간값 7일째에 완료되었다(Fig. 4).

Fig. 5는 키메라쥐에서 수술 150일째에 찍은 흉부 X선 사진으로, 폐의 정상적인 호흡을 볼 수 있으며 Fig. 6은 제 3대조군에서의 7일째에 찍은 흉부 X선사진으로 호흡이 완전히 소실되어 거부반응이 완료되었다는 것을 암시하고 있다. Fig. 7은 쥐의 정상폐의 조직학적 소견이며 Fig. 8은 거부반응이 일어난 이식편의 소견, Fig. 9는 동종페이 식후 150일째에 희생시킨 키메라쥐의 이식편의 조직학적 소견으로 비교적 폐포들의 구조가 잘 유지되고 있는 소견을 보여 준다.

고 찰

1980년대의 임상적 페이식은 대부분 이식폐의 전격성

거부반응으로 끝을 맺고 그 성적이 매우 실망적이었다. 이식된 동종폐에 대한 숙주의 거부반응은 다른 장기에 대한 거부반응보다 더 급격하며 면역억제요법에도 더욱 반응이 떨어진다. 동종페이식후의 거부반응기전에 대한 대부분의 실험들은 실험모형의 면역학적 표준화가 되어있지 않았고, 그 거부반응조차도 매우 다양하게 관찰되었으므로 이식편의 거부반응기전에 대해 정확한 결론을 내리기가 어려웠고 또 다른 이식된 장기와의 비교가 불가능하였다. 이러한 문제점들이 10여년전 미세수술방법에 의한 쥐에서의 페이식이 보고되면서^{9,10,11)} 근친계쥐종주(Inbred rat strain) 간의 페이식실험으로 점차로 해결되었다. 쥐에서는 개나 다른 종류의 실험동물보다 면역학적연구에 있어 더욱 발전된 기술을 사용할 수 있고 그 면역기전이 잘 알려져 있으므로 이식폐에 대한 균일한 면역학적, 조직학적변화를 잘 관찰할 수 있다. Prop 등^{15,16,17)} RT-1 부적합종주의 쥐에서 페이식후 4~6일 사이에 급격한 거부반응이 일어나는 것을 관찰하고, 이것은 이식편의 호흡기내 점막의 면역계(Mucosal immune system)때문으로 이중 가장 중요한 것이

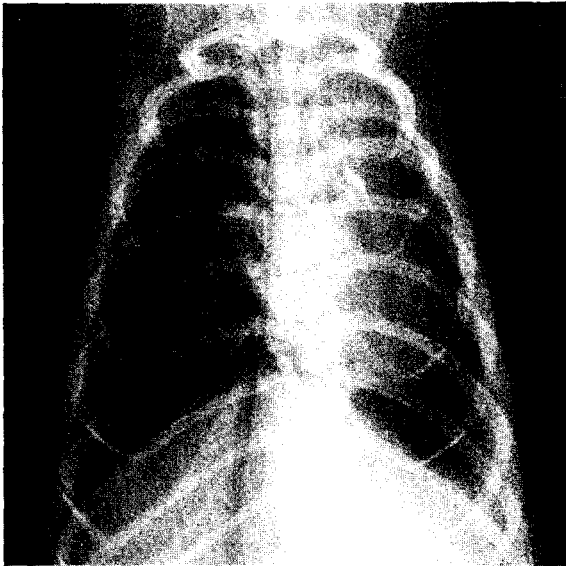


Fig. 5. Chest PA of allografted chimeric rat checked in post op. 150th day shows well ventilated left lung

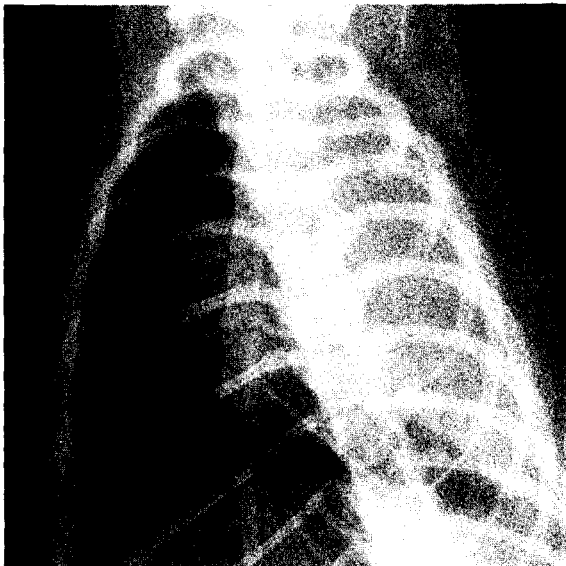


Fig. 6 Chest PA of allografted third party chimeric rat checked in post op. 7th day shows complete opacification of left lung, and suggests rejection of the graft.

기관지계류림파성조직(Bronchus Associated Lymphoid Tissue, BALT)이라고 하였다. 이식후 BALT에 숙주의 임파구가 침윤하며, 또한 공여자로부터 유래된 임파구의 근거지로, 이 임파구들은 이식편에 대한 거부반응을 촉진시키는 통과백혈구(Passanger leukocyte)와 비슷한 역할을 하고, 또한 이곳에는 대단히 높은 면역원성을 가진 수지상세



Fig. 7. Histomorphologic findings in normal rat lung.

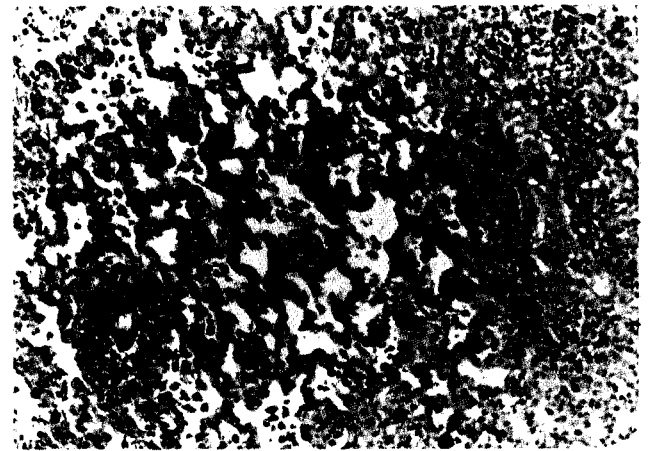


Fig. 8. Histomorphologic findings in rejected allografted lung of control group rat sacrificed in post op. 7th days.



Fig. 9. Histomorphologic findings in allografted lungs of chimeric rat sacrificed in post op 150th day.

포(Dendritic cell) 같은 보조세포(Accessory cell)가 많이 있어 이식에 대한 숙주의 거부반응을 촉진시킨다고 하였다. Prop 등¹⁶⁾은 쥐의 동종페이식후의 거부반응을 국소반응과 전신반응으로 나누어 관찰한 후 국소적 거부반응을 조직형태학적 변화에 따라 4기로 나누어 다음과 같이 단계적으로 기술하였다.

잠복기(Latent phase): 이식편에 면역반응이 일어나지 않는 시기로 약 24시간정도 지속된다. 이식후 4시간정도가 지나면 간질 및 폐포부종, 다형핵백혈구와 대식세포들의 침윤을 동반하는 국소출혈을 볼 수 있고 BALT에는 작은 피사구간들이 나타난다.

혈관기(Vascular phase): 이식후 1일정도가 지나면서 시작되는데, 피로닌기호 면역아세포(Pyroninophilic immunoblast)등이 BALT에 보이고 이시기의 초반부터 현저한 면역활동이 BALT에 나타난다. 이때에는 단지 국소적인 혈관주위의 임파구의 침윤과 폐실질내의 다형핵백혈구들의 분포를 볼 수 있으나 대부분의 혈관들은 정상이다. 이식후 3일이 지나면 혈관기의 말기에 도달하는데 BALT의 넓은 부위에서 면역아세포(Immunoblast)들이 자라며, 폐실질에서는 혈관주위의 세포침윤이 점차 증가한다. 이식후 48~72시간 정도후 현저하게 증가된 숙주의 임파구들이 이식편에 침윤되기 시작하고 BALT와 혈관주위에도 나타난다.

폐포기(Alveolar phase): 이식후 4~5일 경과후 거부반응은 급격히 진전되고 혈관기 때보다 이식편에 현저한 변화가 나타난다. 폐포기초기에 미성숙 B임파구가 BALT주위에 나타나고 BALT와 주위의 폐실질부위는 형질세포(Plasma cell)들과 BALT로부터 유래된 다른 세포들의 확산 및 광범위한 침윤으로 경계가 불분명해진다. 폐실질내에도 임파구, 면역아세포, 대식세포, 다형핵백혈구들이 광범위하게 침윤되고 계속해서 세포들은 폐포벽이나 폐포강내로 침윤하는데 이식편 전체에서 동시에 균일하게 일어난다. 이때 부종도 함께 혈관주위나 기관세지주위에 나타난다.

파괴기(Destructive phase): 이식 6일후 폐포강내에는 섬유소성부종(Fibrinous edema), 혹은 혈액으로 채워지고 폐포구조는 전반적으로 균일한 세포침윤으로 파괴되어지고, 8일째부터는 섬유아세포들이 자라나기 시작한다. 보통 폐혈관내의 혈전은 이중 어떠한 시기에도 나타나지 않는다.

전신반응으로는 비장에서 전형적인 증식성면역반응을 동종페이식후 1일내에 볼 수 있고 2~3일째에 최고조에 다다른다. 이때에 광범위한 증식성 T-임파구 반응이 동맥주위임파구초(Periarterial lymphocyte sheath, PALS)에 일

어나고 B-임파구반응(형질세포반응)은 비장의 적수(Red pulp)에 이동한 형질세포들로 꽉 채워지는 4일째부터 명백해진다. 이식편과 숙주 사이의 임파구의 상호이동도 일어나는데 BALT의 임파구가 이식편을 떠나 숙주로 이동하고 숙주의 임파구도 이식편내의 BALT로 이동한다. 이식후 1일내에 BALT의 대부분의 임파구들은 전신으로 퍼져 나가는데 임파구에 방사선동위원소를 부착시켜 추적한 결과 14%의 임파구만이 이식편에 남아 있고 15.5%가 간으로 11.5%가 비장으로 14.4%가 임파절로 이동하였다 한다. 혈구응집항체는 이식 4일이 지나서부터 숙주의 혈청에서 확인되고 항체의 출현은 비장에서의 형질세포반응이 최대에 달하는 시기와 일치한다. 6일부터는 높은 항체역가가 확인된다고 한다¹⁶⁾.

이상의 관찰소견으로 보아 BALT는 이식편의 국소적 거부반응과 숙주의 전신반응을 촉진시킨다는 것을 알 수 있다. BALT에서 숙주의 임파구와 이식편의 임파구가 서로 혼합임파구반응(Mixed lymphocytic reaction, MLR)을 일으켜 국소반응이 강화되는데 다른 이식장기에서도 이러한 현상이 보고 되기는 하나, 강도나 신속성에서 BALT를 따라가지 못한다.

또한 BALT로부터 숙주의 임파계로 퍼져 나간 임파구들은 숙주의 강력한 면역반응을 촉진시켜 전기한 바와 같이 페이식후 24시간내에 비장내의 T-임파구구역들이 동시에 광범위하게 활성화된다^{15,16)}.

이식된 다른 장기의 통과 백혈구(Passanger leucocyte) 혹은 수지상세포의 역할은 BALT의 재순환된 임파구나 Strong stimulating cell과 비슷한 작용을 하지만 BALT에는 순환하는 통과세포의 수요가 월등히 많고 이식편의 BALT는 숙주의 전신의 임파계와 연결되어 숙주의 임파구들의 신속한 이동으로 적절한 국소거부반응의 환경을 만들어 내고 또한 BALT에는 숙주에 강력히 반응하는 면역세포들이 많다. 이 면역세포들은 민감한 숙주에 대해 치명적인 이식편대 숙주병(Graft versus host disease, GVHD)을 일으킬 수 있다. 그러나 보통의 아임상적 이식편대 숙주반응(Subclinical graft versus host reaction)은 거부반응에 가려워진다. 이러한 이식편의 형태적 거부반응의 단계는 모든 쥐종주간의 동종 페이식후 기본적으로 동일하며 다른 종에서의 동종 페이식후의 거부반응에서도 기본적으로 동일할 것이라는 점은 분명하다^{16,17)}. Veith 등은 페이식후 면역억제를 시킨 개에서 단지 혈관주위의 세포침윤만 있는 혈관형 혹은 섬유소성 폐포 삼출액(Fibrinous alveolar exudate)이 나타나는 폐포형의 단일 거부반응을 관찰하였다¹⁴⁾. Cyclosporine 투여중에는 동종이식편에 숙주

의 임파구가 폐이식후 혈관기의 거부반응에서 보이는 것처럼 침윤되어지나, 이 세포들은 이식편특정 세포독성(Graft-specific cytotoxicity)을 가지지 않으며, 거부반응의 작동기(Effector stage)를 유발시킬 수 없다. 이러한 경우 작동임파구(Effector lymphocyte)가 없으므로 폐포벽이 작동임파구에 의해 침윤되는 폐포기를 볼 수 없다¹³⁾.

이러한 형태적 변화에 따른 기능적 변화가 당연히 동반되는데, Prop등은 쥐의 동종폐이식후의 거부반응에 따른 기능적 변화는 쥐의 종주와는 관계없이 같은 양상이었다고 보고하였다. 이들은 이식편의 관류와 호흡을 폐관류스캔과 흉부 X선 사진으로 확인하였는데 폐관류와 호흡은 거의 동시에 영향을 받았으나 관류저하가 호흡감소보다 약간 일찍 나타났다. 이것은 거부반응의 조직학적 소견과도 일치하는 것으로 호흡의 저하는 폐포기의 폐포막과 폐포강내의 작동임파구의 침윤에 의한 것이기 때문이다¹⁵⁾. 이식편에 대한 숙주의 거부반응을 감시하기에는 폐관류스캔이나 흉부 X선 사진이 매우 효과적인 방법인데^{11,15)} Prop등¹⁵⁾이 관찰한 바와 같이 이식편의 관류와 호흡은 거의 일치하여 감소하므로 본 실험에서는 흉부 X선 사진으로 거부반응을 감시하고 조직학적으로 이를 확인하였다.

키메라즘(Chimerism)은 수용자에서 공여자의 골수간세포(Bone marrow stem cell)가 이식되어져 수용자 자신의 골수세포와 함께 공존하며 양쪽의 조혈간세포에서 유래된 세포들이 수용자의 혈액내에 같이 보이는 상태를 의미하는데 최근 들어와 공여자에 특이성이 있는 이식편에 대한 관용때문에 이식분야의 큰 관심의 대상이 되고 있다. 1940년대 후반에 벌써 골수간세포가 공여자의 조직적합성항체(Histo-compatibility antigen)에 대해 영구적인 관용을 초래할 수 있는 특성을 가졌다는 것이 알려졌다. Owen은 태반을 공유하는 이란성쌍태송아지에서 혼합성 적혈구 키메라즘(Mixed RBC chimerism)을 발견하고 이것은 자궁내의 태생기에 두송아지간에 조혈간세포(Hematopoietic stem cell)들이 서로 교환된 것으로 결론을 내렸다⁴⁾. Billingham 등은 일란성쌍태(Monozygote)와 이란성쌍태(Dizygote)송아지를 감별할 수 있는 방법에 대해 연구하였는데, 그들은 조직 적합형(Histocompatibility type) 결정을 위해 피부이식법을 개발하여 조직 적합성의 차이에 따른 피부이식편의 거부를 증명하였다. 그러나 그들은 태반을 공유한 이란성쌍태송아지가 마치 일란성쌍태송아지처럼 그 형제로부터 이식피부편을 받아들이는 것을 보고, 이 실험을 갖 태어난 생쥐에로 연장하여 골수세포 주입과 이식피부편에 대한 관용을 확인하고 이 관용이 안정적이고 또한 성년기까지 계속된다는 것을 보고하였다⁵⁾.

사람에서는 16주미만의 태아, 쥐에서는 72시간내의 신생기까지는 키메라즘을 만들기 위하여 특별한 조건화(Conditioning)가 필요 없다. 이 시기까지는 골수세포의 이식이 아무런 문제없이 이루어질 수 있다. 조건화의 방법으로는 1. 전신의 방사선조사와 일란성쌍생이인자형(Syngeneic) 및 동종이인자형(Allogeneic) 또는 이종이인자형(Xenogeneic) 골수세포 주입^{1, 2)} 2. 전신의 임파계방사선조사와 동종골수세포 주입^{6, 7)} 3. 약리적 세포감쇄(Pharmacologic cytoreductive) 즉 Cyclophosphamide투여 및 골수세포 주입⁸⁾ 등의 방법들이 있으나 모두 그 과정에 따른 문제점들이 있고 항상 키메라즘이 초래되는 것은 아니며, 2,3 방법으로 갈수록 실패율이 높아진다.

1 방법은 골수이식의 성공율이 높지만 그 자체의 문제점으로 숙주에서의 이식편대 숙주반응, 적절한 면역세포반응의 실패에 의한 면역부전(Immunoincompetence) 등을 들 수 있다. Ildstad와 Sachs 등¹⁾은 이러한 문제점을 해결하기 위해 T-임파구를 제거한 골수의 주입으로 숙주를 재구성하여 장기생존 및 골수제공자와 같은 종주의 이식피부편에 대한 관용을 확인하였다. 이들은 B10 및 B10.D2의 두 종류의 생쥐와 F344, Wistar Furth 쥐를 사용하여 이들 사이에서 동종이인자형과 이종이인자형 키메라를 만들어 그들의 생존과 이식피부편의 관용을 관찰하였는데, 동종이인자형 키메라생쥐의 생존은 정상생쥐와 차이가 없었고 장기간(60~120일) 키메라즘을 유지하였다. 이종이인자형 키메라에서도 이와 비슷한 현상을 보였으나 그 기간은 동종이인자형 키메라 보다는 짧았고 이식피부편의 거부반응은 비교적 오랜 시간이 지난 후 일어났다고 보고하였다(중간값 50일 이상). 또한 Ricordi 등¹⁹⁾은 Streptozocin으로 당뇨를 유발시킨 이종이인자형 키메라 생쥐에서 이종의 랑게르한스 섬 세포를 이식하여 혈당의 항상성을 유도하고 이식된 섬 세포의 수명이 현저히 증가된 것(중간값 8개월 이상 생존)을 확인했고 Colson 등²⁰⁾은 같은 실험모델에서 이종의 이식 심장에 대한 관용을 보고했는데 이러한 사실들은 향후 이종간의 장기이식에 있어 이종이인자형 키메라가 임상적인 새로운 돌파구가 될 수 있으리라는 것을 보여주고 있다.

결 론

여러 종류의 쥐 종주간의 대조군 및 키메라 쥐의 폐이식에서 다음과 같은 사항을 확인할 수 있었다.

1. 키메라즘은 이식된 폐에 대한 수용쥐의 관용을 유발하였다.

2. 이식된 폐에 대한 관용은 특정공여군에만 유발되었고 제 3군에서는 대조군과 마찬가지로 이식편에 대한 거부반응이 일어났다.
3. 이식폐에 대한 관용은 키메라즘의 백분율 정도와는 관계 없이 일어났다.
4. 이식폐에 대한 관용은 공여자와 수용자의 종주간의 조합과는 무관했다.
5. 방사선조사후 일관성쌍생골수만 이식된 쥐에서도 정상 대조군과 같이 이식폐에 대한 거부반응이 일어났다.

참 고 문 헌

1. Ildstad ST, Sachs DH. *Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts.* Nature 1984;307:168-70
2. Ildstad ST, Wren SM, Bluestone JA, et al. *Characterization of mixed allogeneic chimeras: Immunocompetence in vitro reactivity and genetic specificity of tolerance.* J Exp Med 1985;162:231-44
3. Ildstad ST, Wren SM, Boggs SS, Hronakes ML, Vecchini F, Van den Brink MRN. *Cross-species bone marrow transplantation: Evidence for tolerance induction, stem cell engraftment, and maturation of T lymphocytes in a xenogeneic stromal environment (rat→mouse).* J Exp Med 1991;174:467-78
4. Marck KW, Prop J, Wildevuur CRH, Nieuwenhuis P. *Lung transplantation in the rat: Histopathology of left lung iso- and allografts.* Heart Transplantation 1985;4:263-6
5. Marck KW, Wildevuur CRH. *Lung transplantation in the rat I. Technique and survival.* Ann Thorac Surg 1982;34:74-80
6. Marck KW, Piers DA, Wildevuur CRH. *Lung transplantation in the rat II. Lung perfusion scintigraphy in normal and left lung-transplanted rats.* Ann Thorac Surg 1982;34:81-8
7. Prop J, Nieuwenhuis P, Wildevuur CRH. *Lung allograft rejection in the rat I. Accelerated rejection caused by graft lymphocyte.* Transplantation 1985;40:25-30
8. Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, Kawashima Y. *Simplified rat lung transplantation using a cuff technique.* J Thorac Cardiovasc Surg 1989;97:578-81
9. Prop J, Ehrie MG, Crapo JD, Nieuwenhuis P, Wildevuur CRH. *Reimplantation response in isografted rat lungs, analysis of causal factor.* J Thorac Cardiovasc Surg 1984;87:702-11
10. Prop J, Wildevuur CRH, Nieuwenhuis P. *Lung allograft rejection in the rat II. Specific immunological properties of lung grafts.* Transplantation 1985;40:126-31
11. Prop J, Wildevuur CRH, Nieuwenhuis P. *Lung allograft rejection in the rat III. Corresponding morphological rejection phases in various rat strain combinations.* Transplantation 1985;40:132-6
12. Veith FJ, Kamholz SL, Mollenkopf FP, Montefusco CH. *Lung transplantation.* Transplantation 1983;35:271-8
13. Veith FJ, Norin AJ, Montefusco CM, et al. *Cyclosporine A in experimental lung transplantation.* Transplantation 1981;32:474-81
14. Owen RD. *Immunologic consequences of vascular anastomoses between bovine twins.* Science 1945;102:400-1
15. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. *Actively acquired tolerance of foreign cells.* Nature 1953;172:606-8
16. Slavin S, Strober S, Fukes Z, Kaplan HS. *Induction of specific tissue transplantation tolerance using fractionated total lymphoid irradiation in adult mice: long term survival of allogeneic bone marrow and skin graft.* J Exp Med 1977;146:34-51
17. Slabin S, Fukes Z, Kaplan HS, Strober S. *Transplantation of allogeneic bone marrow without graft versus host disease using total lymphoid irradiation.* J Exp Med 1978;147:963-72
18. Mayumi H, Good RA. *Long-lasting skin allograft tolerance in adult mice induced across a fully allogeneic antigen barriers by a tolerance inducing method using cyclophosphamide.* J Exp Med 1989;160:213-38
19. Ricordi C, Zeng YJ, Carroll PB, et al. *Islet xenografts in fully xenogeneic (rat→mouse) chimeras. Evidence for normal regulation of function in a xenogeneic mouse environment.* Surgery 1992;112:327-32
20. Colson YL, Zudach KJ, Ildstad ST. *Mixed xenogeneic bone marrow chimerism (mouse+rat→mouse) induces donor-specific tolerance for cardiac grafts across a species barrier.* Surg Forum 1993;44:294-6

=국문초록=

페이식후의 수용자들의 낮은 생존율은 주로 거부반응 또는 면역억제제 사용에 따른 합병증과 관련이 있다. 따라서 이식편에 대한 수용자의 관용을 유도해낼 수 있는 더욱 좋은 방법이 절실히 요구된다. 저자는 동종의 골수간세포가 주입되어진 혼합동종이인자형 키메라 쥐에서 특정 동종 공여군의 공여 페이식편에 대한 관용의 초래여부를 연구하였다. Fisher(F344)와 Wistar Furth(WF)종주의 쥐에서 치사량의 (1100cGy) 방사선조사후 T-임파구를 제거한 동일종주와 동종이인자형 골수의 혼합물로 재구성하였다 (F344+WF→WF, ACI+F344→F344). 28일후 말초혈액에서 임파구형의 검사로 혼합형 키메리즘이 확인된 쥐에서 특정 공여군 또는 제3군의 동종 공여페로 좌측의 동소 페이식을 시행하였다. 이식후 어떠한 면역억제제도 투여하지 않았다. 이식편의 거부는 흉부 X선검사로 관찰하였고 조직학적으로 확인하였다. 혼합형 키메라쥐들은 특정 공여군의 폐들을 받아들였으나 종주들 끼리의 특정효과에 의한 것은 아니었고, 이들에게서 150일이상 거부반응을 관찰할 수 없었다. 이식편에 대한 관용은 키메리즘의 백분율과는 관계없이 일어났으며 제3군의 공여페에 대해서는 정상대조군에서와 마찬가지로 10일내에 이식편에 대한 거부반응이 완료되었다. 이 결과들은 혼합형 키메라에서 정상적인 면역기전을 유지하면서도, 특정 공여군의 페이식후 안정적이고도 지속적인, 이식편에 대한 관용이 일어난다는 것을 보여준다.