

# Phytohemagglutinin 刺戟後 Cyclophosphamide 投與가

## 마우스의 免疫反應에 미치는 影響\*

全北大學校 附設醫科學 研究所 및  
全北大學校 醫科大學 微生物學教室

金 國 隆·河 大 有

==Abstract==

### Effect of Cyclophosphamide Administration after Stimulation With Phytohemagglutinin on Immune Response in Mice

Kook-Yung Kim, M.D. and Tai-You Ha, M.D.

*Institute for Medical Science, Jeonbug National University and  
Department of Microbiology, Jeonbug National University  
Medical School, Jeonju, Jeonbug, Korea*

This study was undertaken to elucidate the mechanism of the cyclophosphamide(CY)-induced potentiation of cell-mediated immune response by observing the effect of the phytohemagglutinin(PHA) treatment before the CY administration into mice.

Cy administration reduced the circulating white blood cells especially lymphocyte. PHA pretreatment before CY administration enhanced the depressing effect of CY administration on white blood cells. CY administration suppressed both the antibody formation to sheep red blood cells(SRBC) and rosette formation on the spleen cells with SRBC severely. On the other hand, CY administration potentiated the delayed-type hypersensitivity(DTH) strongly. Injection of PHA into mice slightly inhibited both the antibody formation and the DTH. PHA pretreatment before CY administration into mice suppressed not only humoral immune response but also cell-mediated immune response and the degrees of suppression were most remarkable when the PHA pretreatment was performed 5 days before CY administration.

This depression of DTH caused by PHA pretreatment before CY administration may be the result that PHA stimulation make the helper cell sensitive to CY. The potentiation of cell-mediated immune response by CT may be due to the destruction of CY-sensitive suppressor T cell.

\* 本 論文의 要旨는 1977年 10月 28日 大韓微生物學會 第40次 秋季學術大會에서 發表하였음.

## 緒 論

高等動物에 있어서 特異的 免疫反應을 擔當하고 있는 細胞는 淋巴球이며 이 細胞는 여러가지 階에 있어서 다른 組織의 細胞와 다르고, 特히 淋巴球는 아직 分化가 終結되지 아니한 休息狀態에 있는 細胞로서 特異抗體이나 phytohemagglutinin(PHA) 或은 Concanavalin A(Con A)와 같은 非特異性 mitogen에 露出하였을 境遇 變形增殖 및 分化 等の 過程을 거친다.<sup>1,2)</sup> 여러 mitogen 中에 PHA는 淋巴球 中에 體液性 免疫反應을 擔當하고 있는 淋巴球를 刺戟하지 않으나 細胞性 免疫反應을 맡고 있는 T細胞의 모든 clones을 刺戟하기 때문에 polyclonal T cell activator라고 한다.<sup>3)</sup>

Cyclophosphamide(CY)는 抗癌劑로서 分裂狀態에 있는 細胞에 特히 強力한 細胞毒性을 나타내며<sup>4)</sup>, CY가 免疫系에 미치는 影響은 投與된 量에 따라 다르지만 半致死量의 半量 程度를 動物에 投與할 때 體液性 免疫反應은 顯著히 減少되지만 細胞性 免疫反應은 오히려 亢進된다고 한다.<sup>5,7)</sup> 그러나 CY 投與에 依해서 細胞性 免疫反應이 亢進되는 機轉에 關해서는 確實히 究明된 바 없다.

따라서 著者는 마우스를 PHA로 刺戟한 후 CY를 投與하였을 때 CY 投與가 마우스의 免疫反應에 어떤 影響을 미치는가를, 그리고 나아가서 CY 投與에 依해서 細胞性 免疫反應이 亢進되는 機轉을 究明하고자 實驗하였던 바 興味있는 結果를 얻었으므로 報告하고자 한다.

## 實驗材料 및 方法

**實驗動物:** 體重이 20gm 內외의 2~3個月된 ICR 마우스를 雌雄區別없이 本 實驗에 使用하였다.

**藥物處理:** Cyclophosphamide(CY, Endoxan, Asta Werke, Brackwede, Germany)를 使用直前に 蒸溜水에 溶解하여 마우스의 體重 kg當 300mg을 CY溶液 0.2 ml의 分量으로 腹腔內, 1回 注射하였다. phytohemagglutinin-M(PHA-M, Bacto Laboratories)는 125倍 稀釋한 溶液 0.5 ml를 靜脈內에 1回 注射하였다.

**抗原:** Alsever氏 液에 保管中인 緬羊赤血球(SRBC)를 使用하였으며 使用直前に phosphate-buffered saline(PBS)으로 3回 遠心洗滌하여 必要한 濃度의 細胞浮遊液을 만들어 使用하였다.

**免疫:** PBS ml當  $5 \times 10^8$  細胞가 包含된 SRBC 浮遊液 0.2ml를 足趾腫脹檢査를 實施하기 위해서는 腹腔內에 注射하여 感作시키고, 血清抗價測定을 위해서는 靜脈內에 注射하여 第1次 免疫시켰다.

**足趾腫脹檢査(footpad Swelling Test):** 河等<sup>8)</sup>이 記述한 方法에 따라 實驗하였다. 簡記하면 感作 4日後에 ml當  $2 \times 10^8$  細胞가 包含된 SRBC 浮遊液 0.05 ml를 右後肢 走蹄皮內에 惹起注射(challenge)하였으며, 同時に 對照로 삼기 위하여 左後肢 足趾腫脹皮內에는 同量의 PBS를 皮內에 注射하였다. 그 後 1日, 4日 및 8日에 dial micrometer를 使用하여 左右後肢 足趾腫脹 程度의 差異를 測定하여 0.1mm 單位로 表示하였다.

**脾臟細胞浮遊液:** 脾臟細胞浮遊液은 河等<sup>9)</sup>의 記述한 方法에 따라 만들었다. 簡記하면 各 마우스를 犧牲시키고 無菌의으로 脾臟을 摘出하여 PBS에 조심스럽게 teasing하고 nylon mesh로 濾過하여 死細胞塊를 除去하였으며 寒冷 PBS, 4°C에서 遠心洗滌하였다. 그 後 脾臟細胞를  $1.2 \times 10^7$  細胞/ml가 되도록 PBS에 再浮遊하였다. , 實驗마다 脾臟細胞의 生存檢査는 trypan blue dye exclusion method로 實施하였다.

**Rosette 形成 細胞(RFC) 檢査:** 本 檢査는 河等<sup>10)</sup>이 記述한 方法에 따라 實施하였다. 簡記하면 4°C에서 3回 遠心洗滌하여 PBS에 浮遊한 脾臟細胞浮遊液 0.5 ml( $6 \times 10^6$  細胞)와 SRBC 浮遊液 0.5 ml( $1.8 \times 10^6$  細胞)를 混合하여 4°C에서 800 rpm 速度로 10分間 遠心한 다음 4°C에서 30分間 放置하였다. 여기에 0.3% methylene blue液 1滴을 添加하고 조심스럽게 흔들어서 再浮遊시켰다. 이 再浮遊液 1滴을 hemocytometer에 떨어트리고 位相差 顯微鏡(Bauch & Lomb, Balplan Microscopes)으로 RFC를 視察하였다. 檢鏡時 脾臟細胞에 3細胞 以上の SRBC가 附着한 脾臟細胞를 RFC로 判定하였으며 rosette 形成率은 다음 式에 依據하여 計算하였다.

$$\% \text{ rosette} = \frac{\text{No. of RFC}}{\text{Total Cells Counted} \times \% \text{ Viability}} \times 100$$

**赤血球凝集素測定:** SRBC에 對한 凝集抗體, (HA)를 microtitration tray(Limbro Chemical Co., Inc., New Haven, Connecticut)를 使用하여 microtitration 方法에 따라 實施하였다. 簡記하면 各 마우스로부터 얻은 個個의 血清을 56°C에 30分間 非動化시킨 다음 各 well에 veronal buffer로 2倍 系列 稀釋한 血清 0.025 ml와 veronal buffer에 浮遊한 0.5% SRBC 浮遊液 5.05 ml를 잘 混合하여 37°C에서 18~24時間 放置하여 赤血球凝集類型을 觀察하여 抗體價를 判讀하

였으며, 凝集을 일으키는 血清의 最高稀釋度를 그 血清의 抗體力價로 判定하였다.

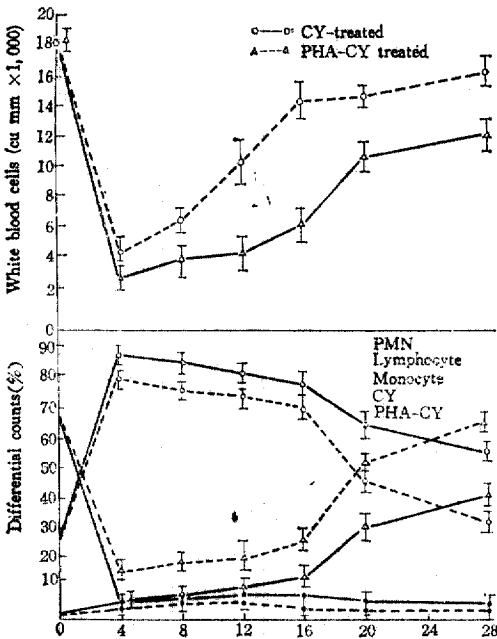
**溶血素力價測定:** 溶血素測定時의 SRBC量, 血清의 稀釋은 凝集素測定時와 同一하게 實施하였는데 SRBC와 稀釋血清이 들어 있는 各 well에 20倍로 稀釋한 補體(guinea pig 血清)를 0.025 ml. 加한 다음 37°C에서 1時間 放置하여 溶血與否를 觀察하였다. 이 때 完全溶血을 일으키는 血清의 最高稀釋度를 그 力價로 判讀하였다.

**2-Mercaptoethanol(2-ME) 處理:** 各 血清의 2-ME 耐性 凝集 및 溶血抗體를 檢査하기 위하여 0.15 N 2-ME(Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.)로 血清을 處理하여 2-ME 耐性抗體를 immunoglobulin G (Ig G) 抗體로, 2-ME로 處理하기 前의 抗體를 2-ME 感受性 抗體(MES), 總 抗體價 또는 Ig M 抗體로 判讀하였다. 血清의 2-ME 處理은 0.15 N 2-ME가 含有된 veronal buffer液으로 血清을 稀釋하여 증발하지

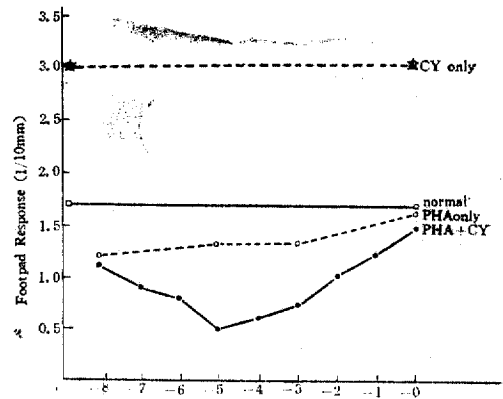
않도록 tray를 密封하여 37°C에 30分 放置한後 SRBC를 加하여 凝集素를 上記한 方法으로 檢査하였다.

### 實驗成績

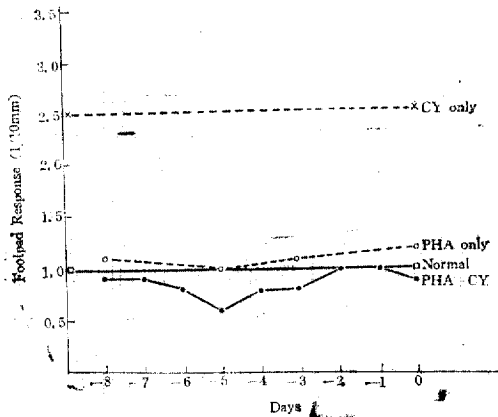
**PHA 刺戟後 CY 投與가 마우스의 末梢 循環血液 白血球에 미치는 影響:** 40마리의 마우스를 8個群으로 나누어 PHA로 刺戟한 5日後에 CY로 處理하고 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 및 28日後에 眼球靜脈 叢에서 血液을 採取하여 總白血球數와 白血球 百分率을 日中 變動의 差(diurnal variation)를 除去하기 위하여 낮 12時부터 午後 2時 사이에 實施하였다. 그 結果 第1圖에서 보는 바와 같이 CY 單獨投與時에는 甚한 白血球의 減少가 招來되었으며, PHA 刺戟後 CY로 處理할 境遇 그 程度가 더욱 甚하였다. 또한 CY 單獨投與時는 16日後 白血球數가 正常으로 回復되나 PHA 刺戟後 CY를 投與할 境遇는 28日이 지나서도 回復되지 아니하였다. 白血球 百分率을 보면 正常마우스에서는 淋巴球가 總白血球의 70%를 차지하고 있으나, CY 單獨投與 或은 PHA 刺戟後 CY 處理時는 CY로 處理한 16日後까지도 多型白血球의 80% 以上을 차지하고 淋巴球는 20% 以下로 減少되는 樣相을 보였다. 그러나 CY 單獨投與



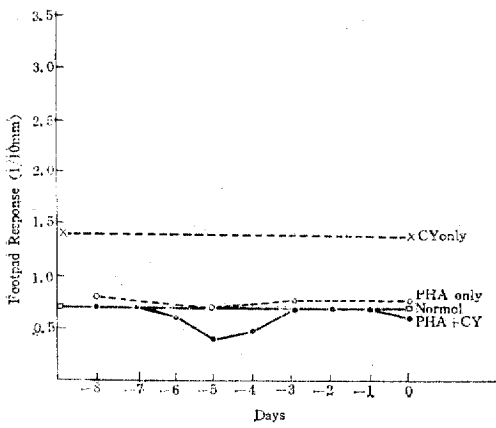
**Fig. 1.** Effects of CY treatment 5 days after PHA stimulation on WBCs in mice. Total WBC counts and cell differential were performed on blood collected between 0 and 2 p.m. Each point represents the arithmatic mean count obtained from 5 mice. I=The range of counts.



**Fig. 2.** Day-1 footpad response to SRBC in mice pretrated at varying days with PHA and treated with CY one day before SRBC immunization (0-0). Normal mice received neither PHA nor CY (□-□). Mice received only PHA (○-○), and mice received only CY (●-●). Days indicate PHA-stimulation before CY-treatment.



**Fig. 3.** Day-4 footpad response to SRBC in mice pretreated at varying days with PHA and treated with CY one day before SRBC immunization (0-0). Normal mice received neither PHA nor CY (□-□). Mice received only PHA(0-0), and mice received only CY(x-x) Days indicate PHA-stimulation before CY-treatment.



**Fig. 4.** Day-8 footpad response to SRBC in mice pretreated at varying days with PHA and treated with CY one day before SRBC immunization (0-0). Normal mice received neither PHA nor CY (□-□). Mice received only PHA(0-0), and mice received only CY(x-x) Days indicate PHA-stimulation before CY-treatment.

時는 20일이 지나면 淋巴球가 多核型 白血球數보다 많아졌지만 PHA 刺戟後 CY로 處理時는 28일이 지나서도 그러한 淋巴球의 回復는 觀察되지 않았다.

**PHA 刺戟後 CY 與投가 SRBC에 對한 足蹠腫脹反應(FPR)에 미치는 影響:** PHA 刺戟後 CY 處理가 마우스의 FPR에 미치는 影響을 보기 위하여 75마리의 마우스를 15個群으로 나누어 그 중 1個群은 아무 藥物도 投與하지 아니한 正常對照群으로 삼고, 그 중 다른 1個群은 CY만 單獨投與한 CY 對照群으로 삼고, 다른 4個群은 CY 投與 8, 5 및 3日前과 CY 投與日에 PHA만을 單獨投與한 PHA 對照群으로 삼고 나머지 9個群은 實驗群으로 CY 投與 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 및 1日前 그리고 CY 投與와 同時에 PHA로 刺戟하였다. CY 投與 1日後에 腹腔腔內에 SRBC를 注射하여 感作하고 感作한 4日後에 SRBC를 右側後肢足蹠에 皮內 惹起注射한 1, 4 및 8日後에 FPR 程度를 測定하였다. 그 結果 第2圖에서 보는 바와 같이 惹起注射 1日後의 FPR은 正常對照群이 1.7單位인데 比하여 CY를 單獨投與할 境遇 2倍 程度가 增加하여 3.0單位를 보이고 PHA를 單獨投與할 境遇는 약간 減少하였다. 그러나 PHA 刺戟後 CY를 投與할 때는 FPR은 甚히 減少하였는데 그 程度는 PHA를 CY 投與 5日前에 刺戟할 境遇에 가장 甚하였다. 惹起注射 4日後에 FPR을 測定할 境遇 第3圖에서 보는 바와 같이 正常對照群의 FPR이 많이 弱化되어 1.0單位인데 比하여 CY 對照群은 2.5單位로 甚히 增加한 狀態가 繼續 維持되었다. PHA對照群의 FPR은 正常對照群보다 若干 增加하였으나 有意한 差異를 보이지 않았고 CY 投與 5日前에 PHA로 刺戟한 實驗群의 FPR은 正常對照群보다 減少하였다. 惹起注射 8日後에 FPR을 測定하였을 때 第4圖에서 보는 바와 같이 모든 마우스群의 FPR이 減少되어 있으나 足蹠反應은 CY 對照群에서 如前히 正常對照群보다 增加되어 있었다. PHA 對照群은 正常對照群과 有意한 差異를 보이지 않았으며 實驗群에서도 CY 投與 5日前에 PHA로 刺戟한 實驗群을 除外하고는 FPR의 有意한 減少는 없었다.

**PHA 刺戟後 CY 投與가 마우스의 SRBC에 對한 抗體形成에 미치는 影響:** PHA 刺戟後 CY 投與가 마우스의 SRBC에 對한 抗體形成에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 마우스 40 마리를 正常對照群, CY對照群, PHA對照群 및 實驗群 등 4個群으로 나누어 實驗하였다. 正常對照群은 마우스의 靜脈內에 SRBC를 注射하여 第1次免疫하고 그 4日後에 第2次免疫하였으며, CY對照群은 SRBC로 免疫하기 1日前에 CY를 投與하

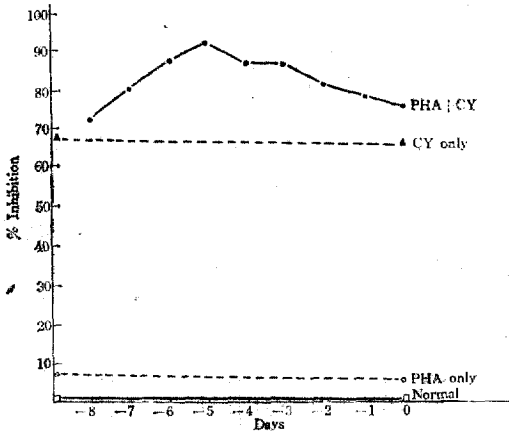


Fig. 5. Percent inhibition of spleen cell rosette formation in mice pretreated days with PHA and treated with CY one day before SRBC immunization. Days indicate PHA-stimulation before CY-treatment. % inhibition=100  

$$\frac{\% \text{ rosette of drug treated group}}{\% \text{ rosette of control group}}$$

였다. PHA對照群은 免疫 5日前에 PHA로 刺戟하였으며 實驗群은 免疫 6日前에 PHA로 刺戟하고 그 5日後에 CY를 投與한 마우스群인데, 第2次 免疫 7日 및 14日後에 모든 마우스群의 眼球 靜脈에서 血液을 採取하여 血清을 分離하여 抗體價를 測定하였다. 그 結果 第1表에서 보는 바와 같이 正常對照群의 凝集素價 및 溶血素價는 大部分이 mercaptoethanol에 抵抗을 보이는 Ig G인 것을 알 수 있었는데 이러한 抗體形成은 CY를 單獨投與함으로써 免疫 7日後에는 抗體가 거의 檢出되지 아니하다가 14日이 지나면 약간 檢出되었다.

PHA對照群은 正常對照群에 比하여 血球凝集素價 및 溶血素가 모두 減少된 樣相을 보였는데 CY 投與前에 PHA로 刺戟한 實驗群은 CY對照群과 같이 免疫 7日後에는 抗體가 檢出되지 않다가 14日이 지나서야 약간 檢出되었던 바 이 抗體의 力價는 CY對照群의 抗體의 力價보다 낮았다.

PHA 刺戟後 CY投與가 마우스 脾臟細胞의 Rosette形成에 미치는 影響: FPR을 惹起注射 8日後 測定한 마우스를 利用하여 脾臟細胞의 rosette 形成率을 檢査하였던바 第4圖에서 보는 바와 같이 正常對照群에 比하여 PHA對照群은 10% 以下の 抑制를 보이는 反面, CY 單獨投與時는 65% 以上の 減少를 보이고 PHA로 刺戟한 後 CY를 投與한 境遇에는 그 抑制가 더욱 顯著하였으며 PHA로 CY 投與 5日前에 刺戟할 때, 抑制의 程度가 가장 顯著하였다.

### 考 按

植物에서 抽出한 PHA나 Con A는 細胞性 免疫反應에 主로 關與하는 T淋巴球를 刺戟하고<sup>8,9)</sup> gram 陰性 桿菌에서 抽出한 lipopolysaccharide(LPS)는 動物의 體液性 免疫反應에 主役을 擔當하는 B淋巴球를 刺戟하며<sup>10)</sup> pokeweed mitogen(PWM)은 T細胞와 B細胞를 共に 刺戟하며 이와 같은 非特異性 mitogen인 PHA, Con A, LPS, PWM 등은 最近 免疫學의 研究, 特別히 細胞性 免疫學의 研究에 廣範圍하게 利用되고 있다.<sup>10)</sup> PHA의 刺戟을 받은 T細胞의 모든 clones는 淋巴芽球를 形成하여 DNA와 蛋白質의 合成이 세로이 促進되어 結局 mitosis를 이룩하며<sup>11)</sup> DNA의 合成이 가장 旺盛한 時期는 PHA 刺戟後 5日이라고 Penhale 등<sup>11)</sup>

Table 1. Effects of CY administrations 5 days after PHA stimulation on the antibody formation to SRBC in mice

GROUP	ANTIBODY TITER(log <sub>2</sub> ) 7 days after immunization				ANTIBODY TITER 14 days after immunization			
	Hernagglutinin		Hemolysin		Hemagglutinin		Hemolysin	
	TOTAL	MER	TOTAL	MER	TOTAL	MER	TOTAL	MER
Normal	7.2±0.3	6.0±0.4	7.8±0.3	5.6±0.2	7.4±0.4	7.0±0.3	7.5±0.4	7.2±0.5
CY only	0	0	0	0	2.4±0.5	2.0±0.4	2.6±0.4	2.4±0.3
PHA only	6.4±0.5	5.2±0.5	5.6±0.6	4.5±5.0	7.6±0.5	7.5±0.6	6.8±0.7	6.0±0.5
PHA+CY**	0	0	0	0	1.2±0.2	0.8±0.2	1.4±0.3	1.0±0.2

\* 2-mercaptoethanol resistant

\*\* CY-treatment 5 days after PHA-stimulation

에 의해 報告된 바 있다.

CY를 動物의 體內에 注射할 境遇 CY는 肝 細胞質 內的 酵素에 依하여 活性化되어 alkylating agent로 變化하여 動物의 實驗의 腫瘍이나 人體의 癌 細胞에 強力히 作用하는 抗癌劑로 잘 알려져 있다.<sup>12,13</sup> Van Putten 등<sup>14</sup>은 CY의 抗癌作用은 CY가 細胞의 DNA 中 合成期나 G<sub>2</sub>-premitotic phase에 있는 時期에 가장 顯著한 細胞毒성을 나타내기 때문이라고 報告하였다. 淋巴球는 終末細胞가 아니고, 特異의 抗原 또는 PHA와 같은 非特異의 mitogen과 接觸하면 淋巴芽球 形成反應을 일으킬 수 있는 未分化 細胞로서 DNA를 合成하고 있기 때문에 CY의 細胞毒性作用에 大端한 感受성을 가지고 있다.<sup>1,2</sup> 따라서 CY는 強力한 抗癌劑임과 同時에 강한 免疫抑制로 使用되고 있다. 그러나 CY가 免疫系에 미치는 影響에 關해서는 學者에 따라 意見이 區區하다. 即 Aisenberg 등<sup>15</sup>과 Many 등<sup>16</sup>은 CY가 主로 T細胞에 作用한다고 報告하였으며 Lerman 등<sup>17</sup>은 CY가 B細胞에 더 甚한 細胞毒성을 示하여 該 孵化된 병아리에 CY를 投與하였더니 IgM 및 IgG 血清抗體의 形成은 顯著히 抑制되었으나 graft-versus-host reaction으로 測定한 細胞性 免疫反應은 正常이었다고 報告하였다. Stockman 등<sup>18</sup>은 CY를 마우스에 投與한 結果 末梢淋巴樣組織의 胸腺非依存域(thymus-independent area)의 淋巴球는 甚히 損傷되었지만 胸腺依存域(thymus-dependent area)의 淋巴球는 正常이었다고 報告하였다. 그러나 最近 Zembala 등<sup>19</sup> Rollinghoff 등<sup>19</sup> Debre 등<sup>20</sup> Lagrange 등<sup>21</sup> 河等<sup>6</sup>은 CY B細胞 및 T細胞를 共히 損傷하나 主로 CY, B細胞를 더 損傷한다고 報告한 바 있으며 鄭等<sup>22</sup>은 極히 最近에 脾臟과 淋巴節의 組織學的 形態에 미치는 CY의 影響은 多樣하며, 胸腺依存細胞가 位置하는 脾臟의 periarterial lymphatic sheath와 淋巴節의 paracortex는 骨髓由來 細胞가 位置하는 follicle보다 1日乃至 2日 늦게 消失되었으며 CY는 B細胞뿐만 아니라 T細胞에도 影響을 미친다고 報告하였다.

著者の 本 實驗結果 SRBC로 마우스를 免疫하기 1日前에 CY를 마우스에 投與했을 때 體液性 免疫反應은 顯著히 抑制된 反面 遲延性 過敏反應(DTH)이 顯著히 增加되었고 더욱 그 反應이 長期間 持續되었는데 (第2, 3 및 4圖) 이와 같은 結果는 Lagrange 등<sup>21</sup>, Mackanase 등<sup>23</sup> 및 河等<sup>6</sup>의 結果와 一致하였다. CY 投與에 依한 마우스의 SRBC에 對한 DTH의 亢進現象이 Lagrange 등<sup>21</sup>에 依하여 처음으로 報告된 以來 많은 學者에 依해 確認되고 그 發現機轉에 對한 研究

가 活潑하다(文獻 6 參照). Katz 등<sup>24</sup>과 Campa 등<sup>25</sup>은 CY에 依한 細胞性 免疫反應의 亢進을 CY의 選採인 B細胞破壞作用에 依해서 DTH를 抑制하는 所謂 Suppressor B Cell이 除去되기 때문이라고 報告하였으며 Lagrange,<sup>20</sup> 및 Mackanase 등<sup>23</sup>은 CY가 B細胞에 細胞毒성을 示함으로써 體液性 免疫反應이 進行된 結果 形成된 抗體에 依한 feed back inhibition이 除去되었기 때문에 CY에 依한 DTH이 亢進되는 것 같다고 暗示하였다. 그러나 Askanase 등<sup>26</sup>은 抗體形成에 影響을 미치지 않을 程度의 CY량을 마우스에 投與할 때 마우스의 DTH이 증가하며, 따라서 그 反應의 增加는 血清抗體에 依한 feed back inhibition이 아닐 것이라고 主張하였으며, 鄭等<sup>22</sup>은 Syngeneic mouse를 SRBC로 免疫하여 얻은 'early immune serum'과 'late immune serum'을 CY로 前處置한 마우스에 靜脈注射하여 DTH와 體液性免疫反應을 測定하였을 때 免疫血清을 投與한 마우스는 正常血清을 投與한 마우스에 比하여 體液性免疫反應은 顯著히 抑制되었으나 DTH는 有意한 差異가 없으며 CY로 前處置된 마우스의 DTH는 免疫血清을 投與하였을 境遇에도 CY만을 投與한 마우스와 같이 亢進되는 實驗結果로 미루어 그 反應의 亢進은 CY가 抗體生産을 抑制시켜서라기 보다는 suppressor T cell을 抑制하기 때문일 것이라고 報告하였다. Debre 등<sup>20</sup>은 L-glutamic acid와 L-tyrosine의 copolymer를 마우스에 注射할 때 suppressor T cell이 活性化되며, 이 活性化된 細胞에 依해 抗體 形成을 하지 못하는 non responder 마우스에 CY를 體重 kg當 200mg을 投與하면 抗體가 形成됨을 報告하였는데 그들의 實驗結果는 B細胞뿐만 아니라 T細胞, 特히 T細胞中 suppressor T cell이 CY의 細胞毒性作用에 銳敏하다는 事實을 證明해주는 確實한 證據라고 思料되었다. 뿐만 아니라 Zembala 등<sup>19</sup>과 Rollinghoff 등<sup>19</sup> 및 鄭等<sup>22</sup>도 suppressor T cell이 CY에 銳敏함을 報告한 바 있다. 以上の 報告者들<sup>18-20, 22, 26, 27</sup>의 實驗結果를 미루어 CY 投與에 依해서 SRBC에 對한 DTH이 亢進된 著者の 本實驗 結果(第2圖)도 CY에 依해서 suppressor T cell의 破壞에 基因한 것이 아닌가 思料된다. 또한 本 實驗 結果 CY만을 마우스에 투여했을 때 보다 마우스를 PHA로 前處置(刺戟)한 후 CY를 投與하였을 때 總白血球數와 淋巴球가 感少(第1圖)되고 體液性免疫反應 뿐만 아니라 SRBC로 惹起 注射하여 DTH를 誘導한 後 第1日에 觀察한 細胞性 免疫反應은 正常的 그것에 比해 顯著히 低下되고(第2 및 5圖) 特히 CY 投與 5日前에 PHA

르 刺戟하였을 때 그抑制程度가 甚하였는데 이와 같은 結果는 PHA 刺戟後 5日에 刺戟된 T細胞의 DNA 合成이 가장 旺盛<sup>11)</sup>하고 CY는 DNA 合成이 가장 旺盛한 時期나 G<sub>2</sub> premitotic phase에 있는 細胞가 CY의 細胞毒性이 顯著하다는 Van Putten等<sup>14)</sup>의 報告로 미루어 보아, CY 單投與時는 Suppressor T cell이 helper T cell 보다 더 銳敏하기 때문에<sup>20)</sup> CY에 依하여 主로 suppressor T cell만이 破壞되어 helper cell에 의한 DTH가 增加되거나 PHA로 刺戟한 後 CY를 注射할 때는 helper T cell까지도 CY에 依해 破壞됨으로써<sup>20)</sup> 體液性免疫反應 뿐만 아니라 細胞性反應까지도 抑制되었을 것이라고 推測할 수 있다. 또한 本實驗 結果 PHA 前處置後 CY를 投與하고 SRBC, 惹起注射하여 DTH를 誘導한 後 第4日 및 8日에 觀察한 DTH는 第1日에 觀察한 DTH에 비해 그 抑制程度가 낮았는데 Lagrange等<sup>21)</sup>은 DTH가 第1日에 가장 잘 發現한다고 報告한 바 있다.

PHA만을 마우스에 投與하였을 때의 DTH도 正常 對照 마우스의 DTH에 비해 多少 低下된 本實驗 結果(第2圖)는 PHA와 같은 非特異性 mitogen의 刺戟에 依해 interferon이 生産된다는 Johnson等<sup>22)</sup> 및 Wietzerbin等<sup>20)</sup>의 報告와 interferon이 免疫反應을 抑制한다는 Brodeur等<sup>31)</sup> 및 河<sup>32)</sup>의 報告로 미루어 DHA에 依해 刺戟된 所謂 T-type interferon<sup>31)</sup>이 基因한 것이 아닌가 思料되었다.

## 要 約

Phytohemagglutinin(PHA) 單獨投與 및 PHA와 Cyclophosphamide(CY)의 同時投與가 마우스의 細胞性 및 體液性免疫에 미치는 影響을 알아보고자 緬羊赤血球(SRBC)로 마우스를 免疫하기 전에 PHA 및 CY를 投與하여 末消血液의 總 白血球數와 白血球百分率 檢査, SRBC로 誘導한 足趾腫脹反應檢査 및 脾臟細胞의 rosette 形成檢査를 實施하였으며 아울러 SRBC에 對한 凝集素抗體價 및 溶血素抗體價를 測定하였다.

그 結果 PHA를 投與한 마우스群의 免疫反應은 大體로 減少되었다. CY만을 投與한 마우스群의 體液性免疫反應은 減少되었으나 細胞性 免疫反應은 增加되었다. 이에 反하여 CY 投與前에 PHA로 마우스를 前處置한 경우 體液性免疫反應 뿐만 아니라 細胞性 免疫反應도 減少되었는데 이 免疫反應의 減少는 PHA를 CY 投與 5日前에 前處置한 마우스群에서 가장 顯著하였다.

## References

- 1) Weiss, L.: The cells and tissues of the immune system: *Structure, functions, interactions*. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall, 1972.
- 2) Andersson, J., O. Sjoberg, and Moeller: *Mitogens as proboc for immunocyte activation and cellular cooperation*, *Transplant, Rev.*, **11**: 113, 1972.
- 3) Stobe, J.D., Rosenthal, A.S., and Paul, W.E.: *Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. I. Responsiveness to and surface binding of concanavalin A and phytohemagglutinin*, *J. Immunol.*, **103**: 1, 1972.
- 4) Livingston, R.B., and Carter, S.K.: *Signal agent in cancer chemotherapy*. IFI/Plenum, New York, pp. 25: 80, 1970.
- 5) Kerkhaert, J.A.M., Van den Berg, G.L., and Willers, J.M.N.: *Influence of cyclophosphamide on the delayed hypersensitivity of the mouse*. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, **1250**: 415, 1974.
- 6) 河大有, 鄭憲譯: Cyclophosphamide가 體液性 및 細胞性 免疫反應에 미치는 影響. *大韓醫學協會誌* **20**: 985, 1977.
- 7) Stookman, G.D., Heim, L. R., South, M.A., and Trentin, J.J.: *Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of adult mice*, *J. Immunol.*, **110**: 227, 1973.
- 8) Hadden, J.W., Hadden, E.M., Sadlik, J.R., and Coffey, R.G.: *Effects of concanavalin A and a succinylated derivative on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**: 1717, 1976.
- 9) Ivanyi, L., and Lehner, T.: *Stimulation of human lymphocytes by B cell mitogens*. *Clin. Exp. Immunol.*, **18**: 347, 1975.
- 10) Greaves, M., Janossy, G., and Dienhoff, M.: *Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens*. *J. Exp. Med.*, **140**: 1, 1974.
- 11) Penhale, W.J., Farmer, A., Maccuish, A.C.,

- and Invine. W.J.: *A rapid micromethod for the phytohemagglutinin induced human lymphocyte transformation test. Clin. Exp. Immunol.* **18**: 155, 1974.
- 12) Brock, N., Gross, R., Hoherst, Klein, R.O., and Schneider, B.: *Activation of cyclophosphamide in man and animals. Cancer*, **27**: 1520, 1968.
  - 13) Crathorn, A.R., and Roberts, J.J.: *Mechanism of alkylating agents in mammalian cells and evidence for the removal of alkylated groups from deoxyribonucleic acid. Nature(Lond)* **211**: 150, 1966.
  - 14) Van Putten, L.M., and Lelieveld, P.: *Factors determining cell killing by chemotherapeutic agents in vivo. I. Cyclophosphamide. Euro. J. Cancer.*, **6**: 313, 1970.
  - 15) Aisenberg, A.C., and Davis, C.: *The thymus and recovery from cyclophosphamide-induced tolerance to sheep erythrocytes. J. Exp. Med.*, **128**: 35, 1968.
  - 16) Many, A., and Schwartz, R.S.: *Drug-induced immunological tolerance, Site of action of cyclophosphamide, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **133**: 754, 1970.
  - 17) Lermann, S.P., and Weidanz, W.P.: *The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral immune response in chickens, J. Immunol.*, **105**: 615, 1970.
  - 18) Zembala, M., and Asherson, G.L.: *The effect of cyclophosphamide and irradiation on cells which suppress contact sensitivity in the mouse. Clin. Exp. Immunol.*, **23**: 554, 1976.
  - 19) Roellinghoff, M., Powitz, A.S., Pfizenmaier, K., and Wagner, H.: *Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the in vivo generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes, J. Immunol.*, **112**: 564, 1974.
  - 20) Dobre, P., C. Waltenbauch, M.E. Dorf, and B. Benacerraf.: *Genetic control of specific immune suppression, IV. Responsiveness to the random copolymer L-glutamic and L-tyrosine induced in BALB/c mice by cyclophosphamide, J. Exp. Med.*, **144**: 277, 1976.
  - 21) Lagrange, P.H., Macknase, G.B., and Miller, T.E.: *Potentiation of cell-mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. J. Exp. Med.* **139**: 1529, 1974.
  - 22) 鄭憲鐸, 河大有, 鄭東奎: *Cyclophosphamide에 의한 mouse의脾臟과 淋巴節의 組織學的 變化: 大韓生微物學會誌*, **13**: 55, 1978.
  - 23) Macknase, B., Lagrange, P.H., Miller, and Ishinobashi, T.: *Feedback inhibition of specifically sensitized lymphocytes. J. Exp. Med.*, **139**: 543, 1974.
  - 24) Katz, S.I., Parker, D., and Turk, J.L.: *B-cell suppression of delayed hypersensitivity reaction. Nature(Lond)*, **251**: 550, 1974.
  - 25) Campa, M., Carzelli, C., Ferrannini, E. and Falcone, G.: *Evidence for suppressor cell activity associated with depression of contact sensitivity in pseudomonas aeruginosa infected mice. Clin. Exp. Immunol.*, **26**: 355, 1976.
  - 26) Askenase, P.W., Hayden, B.J., and Gershon, R.K.: *Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody response, J. Exp. Med.*, **141**: 697, 1975.
  - 27) 鄭憲鐸, 河大有: *免疫血清이 cyclophosphamide로 前處置된 마우스의 免疫反應에 미치는 影響. 大韓微生物學會誌*, **13**: 87, 1978.
  - 28) Schwarz, G.: *Drug-induced immunological unresponsiveness Selective inhibition of T-cell helper function by cyclophosphamide in mice pretreated with phytohemagglutinin. Clin. Exp. Immunol.* **27**: 178, 1977.
  - 29) Johnson, H.M., and S. Baron: *Regulatory role of interferon in the immune response, IRCS Med. Sci.*, **1**: 50, 1976.
  - 30) Wietzerbin, J., Falcoff, R., Catinot, L., and Falcoff, E.: *Affinity chromatographic analysis of murine interference induced by viruses and by T and B cell stimulants. Ann. Immunol. Inst. Pasteur.*, **128C**: 699, 1977.
  - 31) Rrodur, B.R., Y. Weinstein, K.I., Melmon, and T.C. Merigam: *Reciprocal changes in interferon production and immune responses of mouse spleen cells fractionated over columns of insolubilized conjugates of histamin, Cell. Immunol.* **329**: 363, 1977.
  - 32) 河大有: *紅痘 virus의 感染이 mouse의 免疫反應에 미치는 影響 中央醫學* **32**: 319, 1977.