

## 發癌劑 3-Methylcholanthrene 投與마우스에 對한 免疫生物學的 研究 : II. 脾臟細胞의 Rosette形成能 및 NK細胞의 活性

宋熹鍾 · 金象皓\* · 金鍾冕

全北大學校 農科大學 獸醫學科 · 全北大學校 醫科大學 病理學教室\*

(1986. 2. 28 接受)

### Immunobiological Studies on Mice Treated with Chemical Carcinogen, 3-Methylcholanthrene : II. Rosette Formation and Natural Killing (NK) Activity of Splenic Lymphocytes

Hee-jong Song, Sang-ho Kim\* and Jong-myeon Kim

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chonbuk National University

Department of Pathology, Chonbuk National University Medical School\*

(Received February 28th, 1986)

**Abstract:** The present study was undertaken to evaluate rosette formation and NK activity of splenic lymphocytes in 3-methylcholanthrene (MCA) treated mice. Mice were sensitized *iv* with 0.1ml of 1% sheep red blood cell (SRBC) suspension were treated with a single *ip* injection of olive oil alone or with different doses of MCA in oil at various time before or after sensitization, and were challenged at 4 days after SRBC. Rosette formation and NK activity of splenic lymphocytes were measured at 24 hours after challenge.

Erythrocyte(E) rosette formation of splenic lymphocytes was significantly depressed in mouse treated with large dose of MCA (5~50mg) regardless of injecting time. But, there was no difference in the response between the treated with small dose of MCA (0.5mg). Whereas erythrocyte-antibody(EA) rosette or erythrocyte-antibody-complement(EAC) rosette forming cells were significantly depressed by MCA.

Under small dose of MCA (0.5mg), any difference of NK activity was not observed in all course of injecting time. But, under large dose of MCA, the activity was markedly inhibited to about half the values seen in control and this suppression was transient, resulting that the normal level was reached again 19 days after MCA.

These results, which conform with the predictions of immunosuppression hypothesis, suggest that MCA inhibits immunological responses including NK activity and thereby allows the outgrowth of antigenic neoplastic cells.

#### 緒 論

免疫適格細胞(immunocompetent cell)에 의한 抗原의

認識은 細胞膜 受容體에 抗原이 結合됨으로써 이루어지며, 그 結果 rosette形成으로 나타난다.<sup>4,44)</sup> 따라서 rosette形成手技는 抗原結合性 細胞를 檢出하는 方法의

로 이용되고 있고, 이러한 rosette 형성은 주로 T 세포, B 세포 및 대식세포이며,<sup>13,45)</sup> 그 형성능은 세포의 cytophilic antibody의 흡收程度에 따라多樣하게 發現된다. 따라서 rosette 형성手技는 免疫反應을 細胞學的으로 評價하는 方法임은 물론,<sup>6,41)</sup> 免疫抑制劑에 의한 免疫能의 評價,<sup>3)</sup> 藥劑過敏反應의 測定<sup>34)</sup> 그리고 諸般 感染性 疾患에 있어서도 널리 應用되고 있다.<sup>36,37)</sup>

한편 Herberman 등<sup>19)</sup>, Kiessling 등<sup>25)</sup>, Zarlring 등<sup>49)</sup> 이 마우스에 있어서 淋巴球의 natural cytotoxicity를 研究하던 중 發見한 natural killer(NK) 세포는 細胞毒性 T淋巴球, 抗體依存性 細胞介性 細胞毒性反應(ADCC), 活性化된 大食細胞 등과 더불어 腫瘍細胞, 組織移植片, virus感染細胞, 自家免疫反應 동안의 正常組織細胞의 破壞 등과 같은 生體 防禦力에 重要한 役割을 함이 밝혀졌다.<sup>7,17,18,20,23,27,28,31,42)</sup> 특히 NK細胞는 各種 腫瘍細胞에 대하여 소위 T-cell independent surveillance mechanism으로 natural cytotoxicity를 보이고 있음이 밝혀져 腫瘍免疫뿐 아니라 骨髓移植免疫分野에서도 중요시되는 細胞이다.<sup>10,24,26,32,39,40)</sup>

이에 著者들은 前報<sup>50)</sup>에 이어 細胞學的 水準에서 腫瘍發生直前의 動物의 免疫反應을 알아보고자 마우스에 發癌劑를 投與하고, 이의 投與時期 및 投與量에 따른 免疫能의 差를 比較檢討한 바 그 結果를 報告하고자 한다.

### 材料 및 方法

**實驗動物 및 實驗群:** 實驗動物은 本 大學校 動物飼育場에서 繁殖飼育한 生後 8~10週齡의 體重 18~20g의 健康한 ICR마우스를, 標的細胞로 利用한 胸腺細胞는 生後 1週齡의 Sprague-Dawley rat를 使用하였다.

**實驗群은 前報<sup>50)</sup>에서와 同一하게 區分하였다.**

**發癌物質處理 및 SRBC感作:** 前報<sup>50)</sup>에서와 同一한 方法으로 各各 實施하였다.

**脾臟細胞 浮遊液:** 脾臟細胞 中에서 rosette 및 細胞毒性能을 갖는 細胞를 測定하기 위하여 各마우스의 脾臟을 摘出した 後 滅菌한 培養집시內의 PBS에서 硝子板으로 조심스럽게 壓搾, 遊離細胞를 얻고 nylon mesh로 濾過하여 죽은 細胞塊를 除去하였으며, 이를 塞冷한 PBS로 2回 遠心洗滌한 後  $1 \times 10^7$  splenocytes/ml의 濃도가 되도록 PBS에 再浮遊시켰다. 以上の 過程을 거친 後 trypan blue dye exclusion方法<sup>9)</sup>으로 浮遊脾臟細胞의 生存率을 檢査하였던 바 95% 以上の 生存率을 보였다.

**Rosette形成能 檢査:** 脾臟細胞中 erythrocyte(E) rosette 形成細胞의 檢査는 Bach와 Dardnerne<sup>2)</sup> 및 Van

Oss 등<sup>43)</sup>의 方法을, erythrocyte-antibody(EA) rosette 및 erythrocyte-antibody-complement (EAC) rosette 形成細胞의 檢査는 Gutierrez 등<sup>16)</sup> 및 Kwan과 Mishell의 方法<sup>29)</sup>을 다스 修正하여 各各 實施하였다.

**E rosette 形成細胞檢査:** 前述한 바와 같이 製作한 脾臟細胞 浮遊液 0.5ml( $5 \times 10^6$  splenocytes)와 2.5% SRBC 浮遊液 0.5ml를 各各 混合, 200g로 10分間 遠心한 다음 4°C에 30分間 放置한 後 檢鏡하였다.

**EA rosette 形成細胞檢査:** Ccomplete Freund's adjuvant에 混合한 SRBC浮遊液 0.5ml( $1 \times 10^8$  cells)로 랫트의 皮下에 注射하고 14日 後에 採血하여 分離한 IgG rich anti-SRBC serum<sup>29)</sup>을 非動化시킨 後 適正濃度(64倍)로 稀釋한 抗體液과 10% SRBC浮遊液을 同量混合, 37°C에서 30分間 作用시킨 後 400g로 10分間 遠心하여 上清液을 버리고, 이를 PBS로 洗滌한 다음 5% (V/V)가 되도록 再浮遊하였다. 여기에 脾臟細胞浮遊液( $2 \times 10^7$  splenocytes)을 同量 混合한 後 密檢하여 37°C 水槽에서 30rpm으로 15分間 rotation하고 ice bath에 保存하면서 適切히 PBS로 稀釋한 다음 檢鏡하였다.

**EAC rosette形成細胞檢査:** 脾臟細胞의 complement receptor rosette形成能은 生理食鹽水에 稀釋한 SRBC浮遊液 0.5ml( $1 \times 10^8$  cells)를 랫트의 尾靜脈內로 注入하고 7日 後에 採血하여 分離한 IgM rich anti-SRBC serum<sup>29)</sup>을 非動化시킨 後 適正濃度(512倍)로 稀釋한



Fig. 1. Phase contrast micrograph of a rosette formed by allowing antibody-coated SRBC to mouse splenic lymphocytes  $\times 400$ .

抗體液과 10% SRBC浮遊液을 混合 EA rosette形成能 檢査時와 同一하게 處理한 後 洗滌하여 EA를 얻고, 10% EA浮遊液과 正常마우스의 血清(complement, 4 倍 稀釋)을 同量 混合, 37°C에 1時間 放置하고 遠心하여 上清液을 버리고 이를 PBS로 洗滌한 後 5%(V/V)가 되도록 再浮遊하였다. 여기에 脾臟細胞浮遊液(5×10<sup>7</sup> splenocytes)을 同量混合한 後 密栓하여 37°C에서 30rpm으로 15分間 rotation하고 ice bath에 保存하면서 檢鏡하였다.

以上과 같은 過程이 끝난 後 各 試驗管에 0.3% methylene blue液 또는 0.5% crystal violet液을 1滴씩 加하고 位相差顯微鏡下에서 檢鏡하였으며, 檢鏡時 脾臟細胞에 SRBC가 3個以上 附着한 경우 rosette形成細胞로 判定하였다(Fig.1). Rosette形成率은 下記述式에 依據 計算하였다.

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

脾臟細胞의 細胞毒性能 檢査: 細胞毒性能을 갖는 脾臟細胞의 活性度檢査는 Grimm과 Bonavida<sup>14)</sup> 및 Grimm 등<sup>15)</sup>이 開發한 single cell cytotoxicity assay法을 다소 修正하여 agarose를 利用하여 實施하였다. 要約하면, 作動細胞(effector cells)는 MCA處理 또는 對照 마우스로부터 얻은 脾臟細胞를 RPMI1640培地에 浮遊하여 準備하였고, 標的細胞(target cells)는 Sprague-Dawley 랫트의 胸腺을 摘出하여 脾臟細胞의 浮遊時와 같은 方法으로 遊離細胞를 만들고, 同量의 脾臟細胞(10<sup>7</sup> splenocytes)와 標的細胞(10<sup>7</sup> thymocytes) 浮遊液을 37°C의 RPMI 1640에 混合하고, 250g로 5分間 遠心하여 作動細胞와 標的細胞와의 conjugation formation을 促進시킨 다음 上清液을 除去하였다. 그 後 沈渣를 再浮遊하여 그 一滴을 血球計算盤에 놓아 位相差顯微鏡으로 檢鏡하여 conjugate lymphocyte의 百分率

을 求하였다. 이 때 作動細胞 또는 標的細胞를 單獨으로 分注하였던 試驗管에서는 conjugate lymphocyte가 전혀 檢出되지 않았다. 한편, 나머지 細胞浮遊液은 40°C에 保存중인 0.5% agarose에 ml當 5×10<sup>6</sup>細胞의 濃度가 되도록 混合하여, 미리 準備하였던 agarose plate에 고루 퍼지게 分注하여 凝固시킨 다음 37°C에서 3時間 放置하였다. 그 後 平板에 0.1% trypan blue 液을 加하여 室溫에서 5分間 染色하였고, RPMI 1640 培地를 利用하여 殘餘染色液을 除去하고, 0.2% formalin含有 生理食鹽水로 細胞를 固定하고 位相差顯微鏡下에서 檢鏡, dye exclusion이 되지 않은 標的細胞를 計算하여 conjugate lymphocytes에 대한 百分率을 下記述式에 의해 計算하였다.

$$\% \text{ of NK cell activity} =$$

$$\frac{\text{Total number of conjugated target cell lysed}}{\text{Total number of conjugated cells}} \times 100$$

## 結 果

**E rosette 形成能:** 脾臟內의 E rosette形成細胞率은 Table 1에서와 같다. 即 MCA投與群에서는 全般的으로 對照群(20.8±2.6~23.7±0.8)에 比하여 減少되었는데 그 減少의 程度는 0.5mg MCA를 處理한 群에서는 比較的 緩慢하였으나, 5 또는 50mg의 MCA를 處理한 群에서는 共히 有意한 減少를 보였고, 特히 感作前 1日 또는 感作과 同時에 50mg을 處理한 群에서는 各各 42.7%(p<0.05) 및 42.6%(p<0.01)로 減少되었다.

**EA rosette形成能:** 脾臟細胞의 anti-SRBC抗體吸着 SRBC(EA<sub>FC</sub>)와의 EA rosette形成率을 測定한 結果는 Table 2와 같다. 即 MCA投與群에서의 EA rosette形成率은 低濃度인 0.5mg投與群에서 1.8±1.9~3.5±1.8, 5mg投與群에서 0.8±0.8~2.9±1.7, 50mg投與

Table 1. Suppressive Effect of MCA on Erythrocyte(E) Rosette of Spleen Cell in Mice

MCA (mg/Kg/Mouse)	Percent of rosette forming cells on day <sup>a</sup>					
	-28	-14	-7	-1	0	+4
Olive oil	21.5±2.2 <sup>b</sup>	20.8±2.6	23.2±1.4	21.3±2.1	23.7±0.8	22.6±1.2
0.5	20.3±2.2	21.1±2.4	21.2±1.9	19.2±1.6	19.8±3.5	20.7±3.1
5.0	14.5±1.8 <sup>c</sup>	12.5±2.1 <sup>c</sup>	12.9±2.2 <sup>c</sup>	11.2±2.4 <sup>c</sup>	13.3±1.8 <sup>d</sup>	15.9±0.7 <sup>c</sup>
50.0	12.5±2.8 <sup>c</sup>	12.4±2.3 <sup>c</sup>	11.3±1.4 <sup>c</sup>	9.2±2.5 <sup>c</sup>	10.1±1.3 <sup>d</sup>	11.9±1.8 <sup>c</sup>

Mice were *ip* administered with MCA on indicated day before(-) or after(+) sensitization, sensitized with 0.1ml of 1% SRBC suspension, and assayed for rosette formation of splenic lymphocytes on day 5 after SRBC sensitization.

a: % of rosette =  $\frac{\text{No. of rosette forming cells}}{\text{Total cell counted} \times \text{viability}} \times 100$

b: Mean±S.E.

c: p<0.05, d: p<0.01

**Table 2.** Effect of MCA on Erythrocyte-Antibody(EA) Rosette Formation of Spleen Cells in Mice

MCA (mg/Kg/mouse)	Percent of rosette forming cells on day <sup>a</sup>					
	-28	-14	-7	-1	0	+4
Olive oil	7.6±1.5 <sup>b</sup>	6.9±2.0	8.0±1.1	7.7±2.1	8.2±1.3	7.1±1.9
0.5	2.9±2.1 <sup>d</sup>	1.8±1.9 <sup>d</sup>	3.5±1.8 <sup>c</sup>	2.8±2.0 <sup>c</sup>	2.9±1.6 <sup>d</sup>	3.2±1.9 <sup>c</sup>
5.0	1.4±0.7 <sup>d</sup>	0.8±0.8 <sup>d</sup>	2.9±1.7 <sup>d</sup>	2.6±0.8 <sup>d</sup>	1.1±1.0 <sup>d</sup>	2.0±1.4 <sup>d</sup>
50.0	1.1±0.5 <sup>d</sup>	0.3±0.2 <sup>d</sup>	0.5±0.4 <sup>d</sup>	1.6±0.3 <sup>d</sup>	0.8±0.9 <sup>d</sup>	1.7±0.5 <sup>d</sup>

Remarks: Same as Table 1.

**Table 3.** Effect of MCA on Erythrocyte-Antibody-Complement(EAC) Rosette Formation of Splenic Lymphocyte in Mice

MCA (mg/Kg/mouse)	Percent of rosette forming cells on day <sup>a</sup>					
	-28	-14	-7	-1	0	+4
Olive oil	7.2±2.6 <sup>b</sup>	6.7±2.8	5.9±3.5	6.3±2.8	6.8±2.5	6.4±3.1
0.5	3.4±1.7	1.2±1.1 <sup>c</sup>	3.7±3.0	6.2±2.1	3.6±2.8 <sup>c</sup>	4.9±2.2
5.0	1.9±0.8 <sup>d</sup>	1.1±1.2 <sup>d</sup>	3.1±1.8 <sup>d</sup>	3.5±1.1 <sup>c</sup>	3.0±1.3 <sup>d</sup>	4.2±1.7 <sup>d</sup>
50.0	1.9±1.3 <sup>d</sup>	1.0±1.0 <sup>d</sup>	1.2±0.4	2.7±1.2	2.5±0.6	2.8±0.8

Remarks: Same as Table 1.

**Table 4.** Transient Inhibition of the Natural Killing Cell Activities by MCA

MCA (mg/Kg/mouse)	Percent lysis of conjugated target cells on day <sup>a</sup>					
	-28	-14	-7	-1	0	+4
Olive oil	29.6±1.5	28.8±1.7	30.1±1.4	28.3±1.2	29.8±0.8	26.5±3.2
0.5	28.9±1.7	28.2±2.3	28.6±1.6	27.3±1.9	27.5±2.2	27.1±0.8
5.0	28.5±2.4	29.4±1.9	21.2±2.5	16.5±1.8 <sup>c</sup>	15.2±0.6 <sup>d</sup>	18.4±3.7
50.0	27.0±2.9	23.2±1.1	17.2±1.7	15.6±1.6 <sup>c</sup>	10.5±0.3 <sup>d</sup>	13.5±3.4 <sup>c</sup>

MCA was administered on indicated day before(-) or after(+) sensitization with 0.1ml of 1% SRBC suspension and assayed for NK cell activity on day 5 after SRBC.

a: % of Natural killing cell activity =  $\frac{\text{Total No. of conjugated target cell lysed}}{\text{Total No. of conjugated cells}} \times 100$ 

b: Mean±S.E., c: p&lt;0.05, d: p&lt;0.01.

群에서 0.3±0.2~1.7±0.5의 範圍로서 對照(6.9±2.0~8.2±1.3)에 比하여 有意하게 減少되었으며 (p<0.05, p<0.01), 그 減少의 程度는 대체적으로 MCA의 投與濃度가 클수록 더욱 甚한 경향이였다. 그러나 MCA投與群에 있어서 同一量 投與群間에 있어서의 投與時期에 따른 rosette形成率은 有意한 差異가 認定되지 않았다.

**EAC rosette形成能:** 脾臟細胞의 EA<sub>FC</sub> 및 補體處理 SRBC와의 EAC rosette形成率은 Table 3과 같다. 卽 MCA投與群은 全般的으로 對照(5.9±3.5~7.2±2.6)

에 比하여 EAC rosette形成率이 減少되어 MCA投與各群에서의 EAC rosette形成率은 0.5mg MCA投與群에서 1.2±1.1~6.2±2.1, 5mg MCA投與群에서 1.1±1.2~4.2±1.7, 50mg MCA投與群에서 1.0±1.0~2.8±0.8의 範圍로서 대체적으로 MCA의 投與濃度와 減少의 程度는 比例하는 경향을 보였으나, 投與時期에 따라서는 다소의 差異를 보일 뿐이였다.

**脾臟內 NK細胞의 活性:** 發癌劑인 MCA가 免疫學的 監視에 關與하는 NK細胞의 活情에 미치는 影響을 알아보고자 各濃度の MCA를 感作前, 感作과 同時 또

는 感作後에 投與하고 SRBC感作後 5日에 脾臟을 摘出하여 脾臟內 NK細胞의 活情度를 測定하였던 바 그 結果는 Table 4와 같다.

即 MCA投與群에서의 NK活性도는 0.5mg MCA投與時는 投與時期에 無關하게 對照群(28.85±1.33%)에 비해 有意한 差異를 보이지 않았다. 그러나 5mg 또는 50mg濃度の MCA投與下에서는 投與時기가 感作時期에 近接 할수록 有意한 減少를 보여 感作과 同時에 投與한 群에서는 各各 51%(p<0.01) 및 35.2%(p<0.01)로 減少되었으나, MCA投與 後 時間이 經過될수록 正常으로 回復되었다. 따라서 MCA는 投與初期에 NK細胞의 活性을 選擇의으로 抑制시킴을 알 수 있었다.

## 考 察

本 實驗에서 應用한 脾臟細胞의 E, EA 및 EAC rosette形成手技는 末梢血液內 淋巴球에서와 마찬가지로 宿主의 免疫能을 評價하는 方法으로 사람 또는 免疫動物에서 자주 利用되고 있다.

E rosette는 사람의 T細胞와 SRBC가 結合하는 現象으로 E rosette의 形成手技는 T細胞의 分離 및 이의 分布를 測定하는 方法으로 널리 利用되고 있다.<sup>6,45)</sup> 그러나 마우스에 있어서는 사람에서와는 달리 E rosette를 形成하는 細胞가 전부 T細胞만이 아니고, 大部分의 T細胞와 小數의 大食細胞가 E rosette를 形成하고 있음이 밝혀졌다.<sup>2)</sup> 따라서 마우스에서의 E rosette形成細胞의 測定은 T細胞뿐 아니라 免疫에 關與하는 大食細胞의 測定方法이 될 수도 있다.

本 E rosette形成實驗에서 對照群은 平均 22.8±1.15%의 rosette形成率을 보인데 反해 MCA投與群에서는 MCA의 投與時期 및 投與量에 無關하게 全般的으로 對照에 비해 減少하였다. 이러한 減少率은 0.5mg MCA投與群에서는 對照에 비해 有意한 差가 없었으나, 5mg以上 投與群에서는 顯著히 減少되었다. 이러한 本 實驗의 結果는 effector T細胞가 rosette形成細胞라는 Wybran 등<sup>46-48)</sup>의 報告, 細胞膜 受容體의 親和性이 antigen specific T cell과의 作用力의 增加로써 이루어진다는 Marshall 등<sup>30)</sup> 및 Nowell 등<sup>33)</sup>의 報告 및 MCA가 直接 T-cell subsets에 immunocytotoxicity를 갖는다고 한 Alfred 등<sup>1)</sup>의 報告로 미루어 MCA가 effector T cell의 機能을 選擇의으로 抑制하였을 可能性과 MCA의 處理로써 SRBC와 結合할 수 있는 淋巴球膜에 直接 또는 間接的으로 作用하여 T<sub>H</sub>細胞와의 協力作用을 減少시킨 結果라고 思料된다.

EA 및 EAC rosette는 大部分의 哺乳動物에 있어서 B淋巴球의 細胞膜에 SIg에 대한 Fc受容體와 antigen-

antibody-complement와 結合할 수 있는 C<sub>3</sub>에 대한 受容體를 保有하므로써 이루어진다. 따라서 EA 또는 EAC rosette形成手技를 適用하므로써 쉽게 B細胞의 分布나 活性도를 細胞水準에서 測定할 수 있어 體液性免疫能을 評價하는데 자주 應用되고 있는 方法이다.<sup>5,16, 29,38)</sup> 本 實驗結果 MCA를 投與하므로써 EA 및 EAC rosette形成細胞가 投與時期 또는 投與量과는 無關하게 대체적으로 對照에 비해 顯著히 減少되었다. 이러한 結果는 EA 또는 EAC rosette를 形成할 수 있는 受容體에 microfilament monomers가 重合되는 것을 初期에 抑制하거나 또는 Fc receptor의 機能을 干涉하므로써 rosette形成이 抑制된다는 Gutierrez<sup>10)</sup>의 報告로 미루어 MCA가 直接·間接的으로 B細胞의 受容體에 關與하였을 것으로 思料되나 本 實驗의 過程만으로는 이를 說明할 수 없어 이에 대한 具體的인 實驗이 要求된다.

最近 Ehrlich 등<sup>8)</sup>, Gorellil과 Herberman<sup>11,12)</sup>, Kalland<sup>21)</sup> 및 Kalland와 Forsberg 등<sup>22)</sup>은 MCA를 비롯한 各種 發癌劑投與 動物에서와 tumor bearing 마우스에 있어서 NK細胞의 活性에 대하여 言及하고 있다. 그러나 이들 實驗의 大部分이 NK細胞의 recycling이 可能한 <sup>51</sup>Cr release assay"方法을 利用한 實驗結果이므로 single cell水準에서 effector細胞와 標的細胞가 直接 1:1로 結合하는 能力은 물론 生體內 NK細胞의 分布를 밝힐 수도 없으며, 다만 NK細胞의 活性만을 測定한 結果로 볼 수 밖에 없다. 따라서 著者들은 NK細胞의 recycling을 防止할 수 있는 "Single cell level"을 利用하여 MCA에 의한 NK細胞의 標的細胞에 대한 細胞毒性能을 評價하였다. 그 結果 低濃度(發癌最低濃度 0.5mg/kg/mouse)의 MCA投與群에서는 投與時期에 관계없이 별다른 影響을 받지 않는 反面, 高濃度の MCA投與群中에서는 抗原感作 28日前 또는 14日前에 投與한 群에서는 對照群의 活性도로 回復되는 경향이 있으며, 抗原感作과 同時 또는 感作後 4日에 投與했던 群에서는 對照에 비해 顯著하게 NK細胞의 活性이 減少(49%, 64.8%)되어 MCA가 NK細胞의 機能을 投與初期에 抑制시키고 있음을 알 수 있었다. 이러한 本 實驗의 結果는 MCA가 NK細胞의 活性을 選擇의으로 抑制시키고 있다고 한 Kalland와 Forsberg<sup>22)</sup>, Salmon 등<sup>39)</sup>의 報告와 一致하였다. 即, Kalland와 Forsberg<sup>22)</sup>는 diethylstilbestrol 또는 olive oil을 出生直後의 마우스에 投與하고 成熟한 後 마우스당 100μg의 MCA를 投與했던 實驗에서 olive oil投與群에서는 MCA의 投與直後 NK細胞의 活性이 顯著히 減少되었다가 MCA投與後 15日에 對照值에 到達함을 報告하였다. 그리

나 MCA投與 마우스의 脾臟細胞 또는 血清에 의한 suppressor activity가 없음을 確認하므로써 MCA自體가 NK細胞의 活性을 抑制시키며, 또한 DMBA投與로 100日以上 NK細胞의 活性이 抑制되었다는 Ehrlich 등<sup>8)</sup>의 報告는 發癌物質이 直接的으로 NK細胞의 活性에 관련하며, urethan투여로써 初期(1日)에 NK細胞활성이 抑制되나 4日째에 正常으로 回復된 後 7~8日에 2次的인 抑制現象이 있음을 觀察한 Gorelik과 Herberman<sup>11,12)</sup>의 報告는 發癌物質이 NK細胞의 活性에 直接的 또는 間接的으로 關與함을 指摘한다 하겠다.

以上과 같이 MCA가 Arthus反應, 血球凝集反應 및 溶血反應 뿐아니라<sup>50)</sup>, EA, EAC rosette 등의 體液性 免疫反應을 抑制시키는 물론, 遲延型過敏反應<sup>50)</sup>, E rosette形成能 등의 細胞性 免疫反應과 特히 免疫學的 監視에 關與하고 있는 NK細胞의 活性을 初期에 選擇的으로 抑制시킨 本 實驗의 結果는 MCA의 發癌作用에 있어서 重要な 要因의 하나라고 믿어지며, 이러한 成績은 MCA自體에 의해 宿主의 免疫機能이 干涉되리라고 暗示했던 Prehn과 Main의 報告<sup>35)</sup>를 뒷받침해 주는 좋은 結果로 본다. 그러나 앞으로 免疫機能을 亢進 또는 抑制시킬 수 있는 免疫調節劑를 同一條件下에서 使用하므로써 發現되는 免疫能의 動態를 把握함과 동시에 免疫擔當細胞들에 대한 試驗管内反應을 確認하므로써 發癌劑와 宿主의 免疫能에 對한 關係를 더욱 깊게 補完해야 되리라 본다.

## 結 論

腫瘍과 宿主免疫과의 關係를 究明하기 위하여 3-methylcholanthrene을 마우스에 投與하고, 經時的으로 脾臟細胞의 rosette形成能 및 natural killer(NK)세포의 活性度를 測定하여 아래의 結果를 얻었다.

E, EA 및 EAC rosette形成能은 MCA의 處理에 의해 全般的으로 抑制되었으며, 抑制의 程度는 대체로 投與한 MCA의 濃度에 比例하여 顯著하였다.

免疫學的 監視에 關與하는 NK細胞의 活性은 MCA 投與 初期에 顯著히 減少되나 時間이 經過함에 따라 正常으로 回復되었다.

以上の 結果로 미루어 MCA에 의해 誘發되는 腫瘍에 있어서 腫瘍發生 初期에 MCA自體에 의해 宿主의 體液性 및 細胞性 免疫能이 抑制되고 NK細胞의 活性이 初期에 一過性으로 抑制됨으로써 MCA에 의한 primary oncogenic process가 可能하리라 思料된다.

## 參 考 文 獻

1. Alfred, L. J., Wojdani, A., Nieto, M., Perez,

R. and Yoshida, G.: A chemical carcinogen, 3 methylcholanthrene, alters T-cell function and induces T-suppressor cells in a mouse model system. *Immunol.* (1983) 50:207.

2. Bach, J.F. and Dardenne, M.: Antigen recognition by T lymphocytes I. Thymus and marrow dependence of spontaneous rosette forming cells in the mouse. *Cell, Immunol.* (1972) 3:1.

3. Bach, J.F., Dardenne, M. and Fournier, C.: *in vitro* evaluation of immunosuppressive drugs. *Nature (London)* (1969) 222:998.

4. Bach, J.F., Mullner, J.Y. and Dardenne, M. *In vivo* specific antigen recognition by rosette forming cells. *Nature* (1970) 227:1257.

5. Bianco, C., Patrick, R. and Nussenzweig, V. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes I. Separation and characterization. *J. Exp. Med.* (1970) 132:702.

6. Biozzi, G., Stiefel, C., Mouton, S., Bouthillier, Y. and Deceusefond, C.: A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes. *J. Immunol.* (1968) 14:7.

7. Blair, P.B., Staskawicz, M.O. and Sam, J.: Inhibitor cells in spleens of mice with low natural killer activity. *J.N.C.I.* (1983) 71:571.

8. Ehrlich, R., Efrati, M., Bar-Eyal, A., Wollberg, M., Schiby, G., Ran, M. and Witz, I. P.: Natural cellular reactivities mediated by splenocytes from mice bearing three types of pulmonary tumor. *Int. J. Cancer* (1980) 26:315.

9. Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D. H.: *Methods in immunology. A laboratory text for instruction and research.* 3ed. W.A. Benjamin Inc. (1980) p.443.

10. Good, R.A., Kapoor, N. and Reisner, Y.: Bone marrow transplantation—An expanding approach to treatment of many diseases *Cell, Immunol.* (1983) 82:36.

11. Gorelik, E. and Herberman, R.B.: Inhibition of the activity of mouse natural killer cells by urethan. *J.N.C.I.* (1981) 66:543.

12. Gorelik, E. and Herberman, R.B.: Susceptibility of various strains of mice to urethan-indu

- ced lung tumors and depressed natural killer cell activity. *J.N.C.I.* (1981) 67:1371.
13. Greaves, M.F. and Miller, E.: Studies of antigen binding cells. I. The origin of reactive cells. *Cell. Immunol.* (1970) 1:37.
  14. Grimm, E. and Bonavida, B.: Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level I. Estimation of cytotoxic T lymphocytes frequency and relative lytic efficiency. *J. Immunol.* (1979) 123:2861.
  15. Grimm, E., Thoma, J.A. and Bonavida, B.: Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level II. Evidence for first-order kinetics of T cell-mediated cytolysis and for heterogeneity of lytic rate. *J. Immunol.* (1979) 123:2870.
  16. Gutierrez, C., Papamichail, M. and Pagefaulk, W.: The effect of cytochalasin B and vinca alkaloids on EA- and EAC-rosette formation and on the binding of heat-aggregated human IgG by human lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* (1976) 23:258.
  17. Henney, C.S., Tracey, D., Durdick, J.M. and Klimpel, G.: Natural killer cells. *In vitro* and *in vivo* Am. J. Pathol. (1978) 93:459.
  18. Herberman, R.B. ed.: NK cells and other natural effector cells. New York Academic Press (1982).
  19. Herberman, R.B., Nunn, M.E. and Lavrin, D. H.: Natural Cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* (1975) 16:216.
  20. Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R.: Natural killer cells: Their role in defences against disease. *Science* (1981) 214:24.
  21. Kalland, T.: Reduced natural killer activity in female mice after neonatal exposure to diethylstilbestrol. *J. Immunol.* (1980) 124:1297.
  22. Kalland, T. and Forsberg, J.G.: 3-methylcholanthrene: Transient inhibition of the lytic step of mouse natural killer cells. *J.N.C.I.* (1983) 71:135.
  23. Kaplan, J. and Callewaert, D.M.: Expression of human T-lymphocyte antigen by natural killer cells. *J.N.C.I.* (1978) 60:961.
  24. Kärre, K., Klein, G.O., Kiessling, R., Klein, G. and Roder, J.C.: *In vitro* NK-activity and *in vivo* resistance to leukemia: Studies of beige, beige/nude and wild-type hosts on C57BL background. *Int. J. Cancer* (1980) 26:789.
  25. Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H.: "Natural" killer cells in the mouse I. Cytotoxic cells with specificity and distribution according to phenotype. *Eur. J. Immunol.* (1975) 5:112.
  26. Kiessling, R., Petrányi, G., Klein, G. and Wigzell, H.: Genetic variation of *in vitro* cytolytic activity and *in vivo* rejection potential of non-immunized semi-syngeneic mice against a mouse lymphoma line. *Int. J. Cancer* (1975) 15:933.
  27. Korean, H.S. and Herberman, R.B.: Natural killing-Present and future (Summary of Workshop on Natural Killer Cells). *J.N.C.I.* (1983) 70:785.
  28. Kumar, V., Ben-Ezra, J., Bennett, M. and Sonnenfeld, G.: Natural killer cells in mice treated with <sup>90</sup>Strontium: Normal target-binding cell numbers but inability to kill even after interferon administration. *J. Immunol.* (1979) 123:1832.
  29. Kwan, E. and Mishell, R.I.: Fc and complement receptors. In Mishell, B.B., and Shigi, S. M. ed. Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman Co. San Francisco (1980) p.219.
  30. Marshall, W.H., Valentine, F.T. and Lawrence, H.S.: Cellular immunity *in vitro*. Clonal proliferation of antigen-stimulated lymphocytes. *J. Exp. Med.* (1969) 130:327.
  31. Minato, N., Reid, L. and Bloom, B.R.: On the heterogeneity of murine natural Killer cells. *J. Exp. Med.* (1981) 154:750.
  32. Möller, G. and Möller, E.: Immunological surveillance revisited. *Transplant. Proc.* (1979) 11:1041.
  33. Nowell, P.C., Daniele, R.P. and Winger, L. A.: Kinetics of human lymphocyte proliferation: proportion of cells responsive to phytohemagglutinin and correlation with E rosette formation. *J. Reticuloendothel.* (1975) 17:47.
  34. Perrudet-Boux, A. and Frei, P.C.: Detection

- of antibodies on blood lymphocytes in drug hypersensitivity using a rosette technique. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* (1971) 41:149.
35. Prehn, R.T. and Main, J.M.: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J.N.C.I.* (1957) 18:769.
  36. Roberts, G.D. and Larsh, H.W.: A study of immunocytadherence test in the serology of experimental sporotrichosis. *J. Infect. Dis.* (1971) 124:264.
  37. Roberts, G.D. and Larsh, H.W.: Immunocytadherence during experimental histoplasmosis. *Infect. Immun.* (1974) 10:30.
  38. Rudders, R.A. and Andersen, J.: The binding of IgM to B lymphocytes: A comparison of the binding characteristics of IgM aggregates and EA<sub>3</sub> (IgM) complexes to normal and leukemic B lymphocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1983) 174:33.
  39. Salomon, J.C., Creau-Goldberg, N. and Lynch, N.R.: Cancer induction by methylcholanthrene and metastatic spread of transplantable tumor in Chediak Higashi (beige) mice. *Cancer Immunol. Immunother.* (1980) 8:67.
  40. Seaman, W.E., Gindhart, T.D., Greenspan, J.S., Blackman, M.A. and Talal, N.: Natural killer cells, bone, and bonemarrow: Studies in estrogen-treated mice and in congenitally osteopetrotic (mi/mi) mice. *J. Immunol.* (1979) 122: 2541.
  41. Shearer, G.M., Gudkowitz, G., Connell, M. and Priore, R.L.: Cellular differentiation of the immune system of mice. I. Separate splenic anti-sheep antibody-forming cells. *J. Exp. Med.* (1968) 128:437.
  42. Timonen, T. and Saksela, E.: Isolation of human NK cells by density gradients by centrifugation. *J. Immunol. Methods* (1980) 36:285.
  43. Van Oss, C.J., Fuji, H., Wicher, K., Rabin, B. and Kite, J.: Immunocytadherence (rosette formation). In Rose, N.R. and Rigazzi, P.E., (ed.) *Methods in immunodiagnosis.* John Wiley & Sons (1973) p.166.
  44. Wilson, J.D.: The functions of immune T and B rosette-forming cells. *Immunology.* (1973) 25: 185.
  45. Wilson, T.D. and Miller, J.F.A.P.: T and B rosette-forming cells. *Eur. J. Immunol.* (1971) 1:501.
  46. Wybran, J., Carr, M.C. and Fudenberg, H.H.: The human rosette forming cell as a marker of population of thymus derived cells. *J. Clin. Invest.* (1972) 51:2537.
  47. Wybran, J. and Fundenberg, H.H.: Rosette formation. A test for cellular immunity. *Trans. Assoc. Am. Physicians* (1971) 84:239.
  48. Wybran, J., Levin, A.S., Spitler, L.E. and Fundenberg, H.H.: Rosetteforming cells, immunologic deficiency diseases and transfer factor. *N. Engl. J. Med.* (1973) 288:710.
  49. Zarling, J.M., Nowinsky, R.C. and Bach, F. H.: Lysis of leukemia cells by spleen cells of normal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1975) 72:278.
  50. 宋熹鍾, 金鍾冕: 發癌劑 3-Methylcholanthrene 投與마우스에 對한 免疫生物學的 研究. I. 足趾腫脹反應 및 血中抗體價. *大韓獸醫學會誌* (1986) 26: 109.