

랏트에 있어서 에탄올과 삭카린이 免疫反應에 미치는 影響

안영근 · 김주영 · 김정훈 · 염정열

圓光大學校 藥學大學

Effects of Ethanol and Saccharin on the Immune Response in Rats

Young Keun Ahn, Joo Young Kim, Jung Hoon Kim
and Jung Youl Yum

College of Pharmacy, Won Kwang University, Iri 510 Korea

ABSTRACT

Experiments were performed to investigate effects of ethanol and saccharin on the immune system in rats. 4% ethanol and 0.02, 0.20, 2.00% saccharin solution in 4% ethanol were provided ad libitum by tap water for 4 weeks.

Rats were sensitized and challenged with sheep red blood cells (S-RBC).

Immune responses were evaluated by relative immuno organ weight, antibody production, Arthus reaction, delayed type hypersensitivity, and rosette forming cell.

Ethanol exposure decreased thymus weight and delayed type hypersensitivity. A combined solution of ethanol and saccharin decreased water intake, growth rate, spleen weight, thymus weight, humoral and cellular immune response.

Especially, a 2% saccharin solution in 4% ethanol very significantly suppressed cellular immunity.

緒 論

Saccharin(2,3-dihydro-3-oxobenzisulfonazole)은 100여년전에 合成된 非營養性 人工甘味料로 設糖보다 300배의 단맛을 가지며 지난 1世紀동안에 가장 廣範圍하게 利用되어 온 食品添加物이다. 文明

이 發達함에 따라 Saccharin의 利用量도 늘어 美國 人口의 4分の 1이 使用하고, 1976年 한 해에 무려 3百萬 킬로그램을 消費하는 등 날로 增加 趨勢에 있으며 食品衛生의 主要한 課題가 되고 있다.¹⁾

Saccharin의 毒性에 關하여 Chowaniec等을 비롯 한 많은 學者들이 腎臟 및 膀胱등에 對한 毒性을 研究 報告한 바 있다.²⁾³⁾ Bourgoignie等은 한 世代의

動物實驗에서 saccharin이 어떤 器管에서도 癌을 誘發하지 않는다고 報告하였으나 高用量的 saccharin을 投與하였을 때 다음 世代에서 癌의 發生率이 增加한다고 報告하였고, ¹⁾ Jaylor 등은 5% 혹은 7.5% saccharin 食餌를 投與한 rat의 다음 世代에서 膀胱癌이 發生한다고 하였으며, ⁴⁾ Hicks 등은 N-methyl-N-nitroso urea(MNU)를 前處理한 rat에 saccharin含有 飲用水(2g/kg/day) 혹은 saccharin含有 食餌(4g/kg/day)를 投與 하였을 때 膀胱癌 發生頻度率의 顯著한 增加를 報告하였다. ⁵⁾⁶⁾ 또한 Howe 등과 Hoover 등은 膀胱癌의 發生頻度率을 實驗한 결과 saccharin 攝取時 比較危險率이 1.6배에 達하였고 攝取量 및 投與期間과 密接한 相關關係가 있음을 報告하였다. ⁷⁾⁸⁾

이와 같이 saccharin은 發癌性物質 또는 促進劑로서 作用한다고 報告되었으나 人間에게 있어서 發癌 危險性은 아직도 論難의 對象이 되고 있다. saccharin의 動物發癌性기전에 對하여는 아직도 不分明하며, 免疫에 미치는 影響에 對하여 Spreafico 등은 *in vitro*에서 macrophage나 natural killer cell(N.K Cell)의 活性에는 影響을 미치지 않으나, phytohemagglutinin(PHA), Lipopolysaccharide(LSP)에 의한 림프球 細胞의 反應力은 Saccharin 0.5mg/ml 이상에서 顯著한 阻害가 있다고 報告하였다. ⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ 또한 1~5% saccharin含有 食餌를 rat나 mouse에 投與하였을 때 *in vitro*에서와 마찬가지로 macrophage나 N K cell의 活性에는 變化가 없었으나 高濃度の saccharin 投與時 抗體生産의 減少를 報告하였다.

한편 人間에 있어서 慢性的인 ethanol 中毒의 T-lymphocyte의 機能을 低下시키고 骨髓의 機能抑制 및 體液性免疫의 損傷을 招來한다고 알려져 왔다. Loose 등에 의하면 rat에 慢性的으로 ethanol을 投與하였을 때 1次 體液性免疫反應이 減少된다고 報告하였고, ¹²⁾ Tennenbaum 등은 DTH 反應의 低下, thymus와 spleen의 萎縮을 招來하고 2次 體液性免疫反應을 抑制한다고 報告하였으며 ¹³⁾ Tapper 등은 감염의 發生頻度를 增加시키고 또한 惡化시킨다고 하였다. ¹⁴⁾

著者は alcohol性飲料 및 工業原料로 쓰이고 있는 ethanol의 免疫毒性에 對한 saccharin의 投與用量에 따른 體液性 및 細胞性免疫 修飾作用이 期待되어 本實驗에 着手하였던 바 有意한 結果를 얻었기에 이를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗動物

體重 210~230 g의 健康한 Sprague-Dawley rat 35마리를 5個群으로 나누어 室溫 20~25°C로 維持한 環境에서 1주일간 適應시킨 후 着手하였다.

2. Ethanol溶液 및 Saccharin 溶液의 調製와 投與

Ethanol(Duksan pharmaceutical Co. LTD)을 精製水에 混合하여 4% ethanol 溶液을 만들고, 이 溶液에 saccharin(Sigma chemical company U.S. A.)을 加하여 0.02%, 0.20%, 2.00% saccharin含有 ethanol 混合溶液을 만들어 對照群에는 4% ethanol을 單獨 投與하고, 實驗群에는 0.02%, 0.20%, 2.00% saccharin含有 ethanol 混合溶液을 任意로 飲水케 하였다. 全實驗期間동안 飲水量을 每日 1回 一定한 時間에 計測하였다.

3. 體重 및 臟器重量 計測

1) 體重: 實驗動物의 體重은 saccharin 및 ethanol 投與 開始日과 最終日의 同一한 時間에 計測하였다.

2) 臟器重量: 實驗動物의 頸動脈을 切斷 採血한 後 肝臟, 腎臟, 膀胱, 脾臟 및 胸腺을 各各 摘出하여 그 重量을 測定하고 對體重 比로 나타내었다.

4. 抗原의 調製 및 免疫

1) 抗原

本實驗에서는 緬羊赤血球(Sheep red blood cell 以下 S-RBC)를 使用하였는데, 그 方法은 雄性 緬羊의 頸動脈으로 부터 heparin을 처리한 注射器로 採血한 後 同量의 Alserver's氏液(pH=6.1)을 加

하여 4°C에서 保存하여 2週日 以內에 使用하였다. 保存 中인 S-RBC를 使用할 때에는 使用 直前 phosphate buffered saline(以下 PBG: Gibco laboratories Co.)로 遠心洗滌한 後 1×10⁸ S-RBC/ml을 濃度로 Hank's balanced salt solution(以下 HBSS: Gibco laboratories Co.)에 浮遊시켜 使用하였다.

2) 免疫

遠心洗滌한 S-RBC를 Makannes等 및 河等の 報告를 참고하여^{15,16} HBSS에 10⁸ S-RBC/ml의 濃度로 浮遊하고 浮遊液 0.10 ml (10⁷ S-RBC)를 rat의 尾靜脈에 注射하여 1次 免疫을 實施하였다. 2次 免疫은 역시 河等の 報告를 참고하여 1次 免疫을 實施한 4日 後에 rat의 左側 後肢足蹠皮內에 2×10⁹ S-RBC/ml 浮遊液 0.05 ml (10⁸ S-RBC)를 注射하여 惹起시켰다.

5. 赤血球 溶血素價의 測定

1) 血清의 分離 및 非動化

rat의 頸動脈을 切斷하여 血液을 採取 凝固시킨 後에 遠心分離하여 血清을 分離하고 56°C에서 30分間 非動化 시킨 後 4°C에서 保存하여 使用하였다.

2) 赤血球 溶血素價 (Hemolysin titer; 以下 HY titer)의 測定

S-RBC의 溶血素價를 microtitration tray (Nunc-clon micro test tray)를 使用하여 다음과 같이 實施하였다. 즉, 各 動物로 부터 얻은 個個의 非動化 血清을 各 well에 HBSS로 2倍 系列로 稀釋한 後 HBSS에 浮遊한 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 混合한 다음 各 well에 guinea pig complement를 20倍로 稀釋하여 0.025 ml씩 加한 다음 37°C에서 1시간 放置하여 溶血 여부를 觀察하였다. 이 때에 完全 溶血을 일으키는 血清의 最高稀釋度를 그 力價로 判讀하였다.¹⁶

6. 足蹠腫脹反應 檢査 (Foot pad swelling test)

Arthus型 (Immediate type hypersensitivity) 反應 및 遲延型 過敏反應 (Delayed type hypersensitivity; 以下 DTH)를 測定하기 위하여 河等이 記

述한 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다.¹⁶ 즉 1次 免疫 4日 後에 S-RBC(10⁸) 0.05 ml를 左側後肢足蹠에 皮內注射하였다. 注射後 一定 時間이 經過한 後 腫脹의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper로 測定하였으며 腫脹程度의 測定價는 測定에 따른 誤差를 避하기 爲하여 2回 測定한 數值를 平均하였다. 判讀의 基準은 Sugimoto 및 河等の 判讀基準에 따라¹⁷⁾¹⁸⁾ 3~4時間의 反應을 Arthus反應, 24時間의 反應을 遲延型 過敏反應으로 看做하였다. 足蹠 腫脹指數의 表示는 다음과 같다.

Foot pad swelling index

(FPSI)

$$= \frac{\text{腫脹時 두께} - \text{正常 두께}}{\text{正常 두께}} \times 100$$

7. 脾臟細胞의 Rosette 形成細胞 (RFC) 檢査

1) 脾臟細胞 浮遊液의 調製

脾臟을 rat로부터 無菌의으로 摘出하여 minimum essential medium(以下; MEM)에 조심스럽게 粉碎한 後 nylon mesh로 濾過하여 死細胞塊를 除去하였으며 寒冷 MEM으로 4°C에서 3回 遠心洗滌한 後 脾臟細胞가 2×10⁷ cell/ml가 되도록 HBSS에 浮遊하였다. 每 實驗때 마다 脾臟細胞의 生存率 檢査를 實施하였는데 이 檢査는 trypan blue dye solution method로 다음과 같이 하였다. 즉 試驗管에 0.3 ml의 細胞 浮遊液을 넣은 후 0.1 ml의 trypan blue dye solution을 加하여 5分 경과 후 白血球計算板에서 無色 生細胞와 青色으로 染色된 死細胞의 數를 計算하고 그 百分率을 計算하였다.¹⁹⁾

2) 脾臟細胞의 RFC 檢出

脾臟細胞의 RFC 檢査는 河等이 記述한 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다.¹⁹⁾ 즉 脾臟細胞 浮遊液 0.25 ml (5×10⁶ cell)와 S-RBC 浮遊液 6.25 ml (5×10⁷ cell)를 試驗管에 넣고 混合하여 200×g에서 12分間 遠心分離한 後 이 再浮遊液 1滴을 血球計算板에 떨어뜨리고 RFC를 檢鏡 觀察하였다. 檢鏡時 脾臟細胞에 S-RBC가 3個 以上 부착한 細胞를 RFC로 判定하여 다음 公式에 準하여 計算하였다.

$$\text{RFC}(\%) =$$

$$\frac{\text{Number of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{Viability}} \times 100$$

8. 生化學的 檢査

rat의 頸動脈을 切斷하여 얻은 血液 約 1.5 ml을 實溫에서 30分間 靜置한 後 遠心分離하여 얻은 血清으로부터 다음과 같이 測定하였다.

1) S-triglyceride 測定

S-triglyceride는 酵素法²¹⁾을 利用하여 測定하였다.

2) 血清遊離 cholesterol의 測定

S-遊離 cholesterol은 酵素法²²⁾을 利用하여 測定하였다.

實驗 結果

1. 飲水量 및 Ethanol과 Saccharin의 攝取量

正常群은 精製水를, 對照群은 4% ethanol을 單獨 投與하고, 實驗群은 4% ethanol에 0.02%, 0.20%, 2.00%의 saccharin 溶液을 混合하여 各各

任意로 飲用케 한 結果는 Table 1과 같다.

即, 飲水量은 正常群에서 22.19±4.16인데 比하여 ethanol 單獨 投與群에서는 24.02±4.07%, 0.02% saccharin 併用投與群에서는 28.72±6.12, 0.20% saccharin 併用投與群에서는 27.18±6.04로 增加하였으나, 2.00% saccharin 併用投與群에서는 13.79±2.67로 顯著的 減少를 보였다. 또한 ethanol의 攝取量은 ethanol 單獨 投與群에서는 0.88±0.17인데 比하여 0.02%, 0.20% saccharin 併用投與群에서는 各各 0.96±0.20, 1.13±0.25로 有意性은 없으나 增加하였으며 2.00% saccharin 併用投與群에서는 0.57±0.11로 減少하였다. Saccharin의 攝取量은 0.02% saccharin 併用投與群에서 5.98±1.27을, 0.20% saccharin 併用投與群에서는 56.62±12.58을, 2.00% saccharin 併用投與群에서는 287.20±55.60을 보였다.

2. 體重의 變化

各 群의 實驗開始日 및 藥物投與 4週 後의 體重의 變化는 Table 2와 같다.

Table 1. Exposure schedule and intakes of ethanol and saccharin administered 4 weeks in rats

Group	Ethanol (%)	Saccharin (%)	Water (ml/rat/day)	Ethanol (ml/rat/day)	Saccharin (mg/rat/day)
1	—	—	22.19 ± 4.16	—	—
2	4	—	24.02 ± 4.07	0.88 ± 0.17	—
3	4	0.02	28.72 ± 6.12	0.96 ± 0.26	5.98 ± 1.27
4	4	0.20	27.18 ± 6.04	1.13 ± 0.25	56.62 ± 12.58
5	4	2.00	13.79 ± 2.67**	0.57 ± 0.11	287.20 ± 55.60

** Significantly different from ethanol treated at P < 0.01 level
Values are mean ± S.D.

Table 2. Effects of ethanol and saccharin on body weight in rats

Group	Initial wt. (gm)	Final wt. (gm)	Wt. gained (%)
Normal	212.86 ± 20.59	281.43 ± 31.09	32.56 ± 6.55
Et(OH) only	225.71 ± 17.86	292.86 ± 30.61	30.00 ± 6.42
Et(OH) + Saccharin 0.02	208.57 ± 17.73	265.71 ± 16.38	27.41 ± 5.97
Et(OH) + Saccharin 0.20	231.66 ± 13.29	285.71 ± 32.07	23.17 ± 5.56
Et(OH) + Saccharin 2.00	212.86 ± 17.04	257.50 ± 29.92*	21.23 ± 5.15*

* Significantly different from ethanol treated group at P < 0.05
Values are mean ± S.D.

即, ethanol과 saccharin 投與 4週 後 體重의 增加率은 正常群에서는 32.56±6.55%를 보였고, ethanol 單獨 投與群은 30.00±6.42%, 0.02% 및 0.20% saccharin 併用投與群에서는 各各 27.41±5.97%, 23.17±5.56%로 減少하였고, 2.00% saccharin 併用投與群에서는 21.23±5.15%로 有意性있게 減少하였다.

3. 肝臟, 腎臟, 膀胱의 重量 變化

藥物 投與 4週日 後 測定한 肝臟, 腎臟, 膀胱의 重量 變化는 Table 3에서 보는바와 같다.

即, 肝臟의 重量變化는 正常群이 3.13±0.46%인데 比하여 ethanol 單獨 投與群에서는 3.16±0.28%였고, 0.02%, 0.2% saccharin 併用投與群에서는 各各 3.55±0.35%, 3.58±0.30%로 有意性있게 增加하였으며, 2.00% saccharin 併用投與群에서는 4.29±0.26%로 顯著하게 增加하였다.

腎臟에 있어서 重量 變化는 正常群이 2.34±0.30%인데 比하여 ethanol 單獨 投與群 및 0.02%

saccharin 併用投與群에서는 減少하였고, 0.20% saccharin 併用投與群에서는 0.56±0.33%로 增加하였고, 2.00% saccharin 併用投與群에서는 2.64±0.31%로 有意性있게 增加하였다.

또한 膀胱에 있어서 重量 變化는 正常群이 0.125±0.03%, ethanol 單獨 投與群은 0.141±0.042%를 보였고, 0.02% saccharin 併用投與群에서는 0.189±0.018%로 有意性있게 增加하였고, 나머지 群에서도 增加하였다.

4. 免疫臟器인 脾臟과 胸腺의 重量 變化

藥物 投與 4週 後 免疫臟器인 脾臟과 胸腺의 重量 變化는 Table 4와 같다.

即 脾臟에 있어서 重量 變化는 正常群에서는 重量이 1.394±0.292g이며 對體重比率은 0.53±0.17%를 보였고 ethanol 單獨投與群인 對照群에서는 重量이 1.667±0.231g이며 對體重比率은 0.57±0.11%로 약간의 增加率을 보인 反面 0.02% saccharin 併用投與群에서는 重量이 1.395±0.274g이며 對體重

Table 3. Effects of ethanol and saccharin on organ weight body weight in rats

Group	Liver (%)	Kidney (%)	Bladder (%)
Normal	3.13 ± 0.46	2.34 ± 0.30	0.125 ± 0.031
Et(OH) only	3.16 ± 0.28	2.30 ± 0.31	0.141 ± 0.042
Et(OH) + Saccharin 0.02	3.55 ± 0.35*	2.22 ± 0.17	0.189 ± 0.018*
Et(OH) + Saccharin 0.20	3.58 ± 0.30*	2.56 ± 0.33	0.169 ± 0.045
Et(OH) + Saccharin 2.00	4.29 ± 0.26**	2.64 ± 0.31*	0.136 ± 0.045

Significant difference from ethanol treated group (* P < 0.05, ** P < 0.01)
Values are mean ± S.D.

Table 4. Effects of ethanol and saccharin on immuno organ weight in rats

Group	Spleen		Thymus	
	Weight (gm)	%	Weight (gm)	%
Normal	1.394 ± 0.292	0.53 ± 0.17	0.212 ± 0.032	0.078 ± 0.010
Et(OH) only	1.667 ± 0.231	0.57 ± 0.11	0.176 ± 0.040	0.061 ± 0.015
Et(OH) + Saccharin 0.02	1.395 ± 0.274	0.55 ± 0.12	0.231 ± 0.061	0.099 ± 0.028**
Et(OH) + Saccharin 0.20	1.341 ± 0.202*	0.49 ± 0.08	0.243 ± 0.051*	0.084 ± 0.026*
Et(OH) + Saccharin 2.00	1.223 ± 0.200**	0.51 ± 0.06	0.123 ± 0.045*	0.048 ± 0.014

Significant difference from Et(OH) treated group (* P < 0.05, ** P < 0.01)
Values are mean ± S.D.

比率는 $0.55 \pm 0.12\%$ 로 증가를 보였고 0.20% saccharin 併用投與群에서는 重量이 1.341 ± 0.202 g으로 有意性있게 減少하였고 對體重比率는 $0.49 \pm 0.08\%$ 이었다. 또한 2.00% saccharin 併用投與群에서는 重量이 1.223 ± 0.200 g로 重量의 顯著한 差를 보였고, 對體重比率는 $0.51 \pm 0.06\%$ 이었다.

胸腺에 있어서 重量 變化는 ethanol 單獨投與群인 對照群이 0.176 ± 0.040 g으로 $0.061 \pm 0.015\%$ 의 對體重比率를 보였고, 0.02% saccharin 併用投與群은 重量이 0.231 ± 0.061 g이며 對體重比率는 $0.099 \pm 0.028\%$ 로 顯著한 增加率을 보였으며, 0.20% saccharin 併用投與群에서는 重量이 0.243 ± 0.051 g 對體重比率는 $0.084 \pm 0.026\%$ 로 有意性있게 나타났다. 또한 2.00% saccharin 併用投與群에서는 重量이 0.123 ± 0.045 g으로 有意性있게 減少하였으며 對體重比率는 $0.048 \pm 0.014\%$ 를 나타내었다.

5. 體液性 免疫에 미치는 影響

1) 赤血球溶血素價

Ethanol과 saccharin을 4週間 投與한 後 緬羊赤血球로 免疫하여 測定한 赤血球 溶血素價 (HY titer)는 Table 5에서 보는 바와 같이 正常群이 4.57 ± 0.71 인데 比하여 ethanol 單獨投與群은 4.2 ± 0.72 , 0.02% saccharin 併用投與群은 4.25 ± 0.68 , 0.20% saccharin 併用投與群은 3.78 ± 0.65 , 2.00% saccharin 併用

投與群은 3.24 ± 0.62 로 全群에서 減少를 나타내었고 特히 2.00% saccharin 併用投與群에서는 有意性있게 減少하였다.

2) Arthus 反應

Arthus 反應의 結果는 Table 5에서 보는 바와 같이 足蹠腫脹의 두께가 正常群이 18.78 ± 2.75 이었고, ethanol 單獨投與群은 15.98 ± 3.28 이었고 0.02%, 0.20%, 2.00% saccharin 併用投與群은 各 各 15.54 ± 3.50 , 14.27 ± 3.45 , 13.78 ± 3.52 로 saccharin의 投與量이 增加함에 따라 減少하는 傾向을 보였으나 有意性은 없었다.

6. 細胞性 免疫에 미치는 影響

1) 遲延型 過敏反應 (Delayed type Hyper-Sensitivity ; 以下 DTH)

DTH 反應의 結果는 Table 6에서 보는 바와 같이 足蹠腫脹의 두께가 正常群에서 11.91 ± 2.78 이었고 ethanol 單獨投與群은 8.69 ± 2.56 으로 減少하였고 0.02% saccharin 併用投與群은 7.83 ± 2.30 으로 減少하였으며 0.20% saccharin 併用投與群은 5.62 ± 2.27 로 有意性있게 減少하였고 2.00% saccharin 併用投與群에서는 4.44 ± 1.32 로 ethanol 單獨投與群에 比하여 더욱 뚜렷하게 減少하였다.

2) 脾臟細胞의 rosette 形成能 (Rosette forming cell; 以下 RFC)

Table 5. Effects of ethanol and saccharin on humoral immune response in rats

Group	Hemolysin titer (\log_2)	Arthus reaction
Normal	4.57 ± 0.71	18.78 ± 2.75
Et(OH) only	4.20 ± 0.72	15.98 ± 3.28
Et(OH) + Saccharin 0.02	4.25 ± 0.68	15.54 ± 3.50
Et(OH) + Saccharin 0.20	3.78 ± 0.65	14.27 ± 3.45
Et(OH) + Saccharin 2.00	$3.24 \pm 0.62^*$	13.78 ± 3.52

Rats were intravenously sensitized with 10^7 S-RBC and given challenge injection with 10^8 S-RBC into the left hind foot pad 4 days after sensitization. Foot pad swelling was measured at 4 hours after challenge.

$$\text{Arthus reaction} = \frac{\text{thickness of foot pad ; after challenge} - \text{before challenge}}{\text{thickness of foot pad before challenge}} \times 100$$

Values are mean \pm S.D.

Significant difference from Et(OH) treated group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Table 6. Effects of ethanol and saccharin on cellular immune response in rats

Group	DTH	RFC (%)
Normal	11.91 ± 2.78	12.78 ± 1.85
Et(OH) only	8.69 ± 2.56	13.39 ± 3.85
Et(OH) + Saccharin 0.02	7.83 ± 2.30	9.26 ± 2.25*
Et(OH) + Saccharin 0.20	5.62 ± 2.27*	9.18 ± 2.76*
Et(OH) + Saccharin 2.00	4.44 ± 1.32**	8.05 ± 2.50**

DTH (delayed type hypersensitivity) was measured at 24 hours after challenge.

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

Values are mean ± S.D.

Significant difference from Et(OH) treated group. (* P < 0.05, ** P < 0.01)

Table 7. Effects of ethanol and saccharin on serum triglyceride and cholesterol in rats

Group	S-Triglyceride (mg/dl)	S-Cholesterol (mg/dl)
Normal	112.64 ± 25.99	87.31 ± 5.48
Et(OH) only	111.06 ± 15.70	87.69 ± 3.59
Et(OH) + Saccharin 0.02	128.08 ± 28.04	84.34 ± 5.26
Et(OH) + Saccharin 0.20	117.90 ± 16.11	94.68 ± 11.40
Et(OH) + Saccharin 2.00	167.12 ± 28.77**	63.81 ± 17.28**

Values are mean ± S.D.

Significant difference from Et(OH) treated group. (* P < 0.05, ** P < 0.01)

各群에서 觀察한 RFC를 %로 換算한 結果는 Table 6에서 보는 바와 같이 正常群에서는 12.78 ± 1.85%이었고 對照群인 ethanol 投與群이 13.39 ± 3.85%인데 比하여 0.02% saccharin 併用投與群은 9.26 ± 2.25%, 0.20% saccharin 併用投與群은 9.18 ± 2.76%로 有意性있게 減少하였고 2.00% saccharin 併用投與群에서는 8.05 ± 2.50%로 顯著的 減少를 보였다.

7. 生化學的 檢査所見

各 實驗群을 4週間 飼育한 다음 測定한 生化學的 檢査 結果는 Table 7과 같다.

卽 血清 triglyceride値는 ethanol 單獨 投與群이 11.06 ± 3.70인데 比하여 0.02%, 0.20% saccharin 併用投與群에서 各各 25.08 ± 5.04, 18.95 ± 4.11로 有意性있게 增加하였고 2.00% saccharin 併用投與群에서는 67.22 ± 14.77로 顯著的 增加하였

다. 또한 혈청 cholesterol値는 ethanol 單獨投與群에서 87.69 ± 4.59로 正常群과 비슷하였고 0.02% saccharin 併用投與群에서는 84.34 ± 5.26을, 0.20% saccharin 併用投與群에서는 84.68 ± 11.40을 나타냈고, 2.00% saccharin 併用投與群에서는 63.81 ± 15.28로 顯著的 減少하였다.

考 察

Saccharin이 免疫反應에 미치는 影響에 對하여 Spreafico 등은 *in vitro*에서 macrophage나 NK細胞의 活性에는 影響을 미치지 않으나 高濃度의 saccharin은 lymphocyte의 mitogen에 對한 反應力을 阻害하고 saccharin 1~5% 含有食餌를 投與한 rat나 mouse에서도 抗體生産이 減少된다고 하였다.⁹⁾ 또한 ethanol의 慢性的인 中毒은 T-lymphocyte 및 骨髓에 毒性을 나타내어 抗體生産을 減少시

키며 遲延型 過敏反應의 抑制 및 胸腺, 脾臟 등 免疫臟器의 萎縮을 招來한다고 報告되었다.²³⁾²⁴⁾

Ethanol 및 saccharin 併用投與時 saccharin의 投與量에 따른 免疫反應을 調査한 本 實驗에서도 saccharin의 併用投與는 ethanol의 免疫毒性을 향진시켰으며, 特히 高濃度의 saccharin 投與群에서 顯著하였다.

Saccharin의 投與用量에 따른 飲水量은 2.00% saccharin 併用投與群에서 顯著한 減少를 보인 反面 0.02%, 0.20% saccharin 併用投與群은 有意性은 없었으나 增加를 보였다. 이러한 減少의 原因은 saccharin의 用量에 따른 味覺的 差異에 起因하는 것으로 思料되며, 이러한 飲水量의 差異가 ethanol 및 saccharin 攝取量의 變동을 보였다.

4週 投與後 體重의 增加率은 saccharin 併用投與群이 ethanol 單獨投與群인 對照群에 比하여 低下되었으며, 特히 2.00% saccharin 併用投與群에서 顯著하게 鈍화된 것은 saccharin 自體의 毒性보다는 飲水量의 減少와 alcohol과 saccharin의 攝取가 食慾을 低下시킨데 起因한다고 思料된다.

Ethanol 毒性의 標的器管인 肝臟의 對體重比率은 saccharin 併用投與群에서 顯著하게 增加되었으며, 2.00% saccharin 併用投與群의 增加는 saccharin의 投與量이 增加함에 따라 ethanol의 肝毒性에 saccharin의 肝毒性이 加重된 것으로 보이며, 腎臟의 對體重 比率은 saccharin 併用投與群에서 增加되고, 特히 2.00% saccharin 併用投與群의 顯著한 增加는 Chowanec 등의 報告로 미루어 saccharin의 腎毒性에 起因한다고 생각되며, ethanol에 의하여 毒性이 增加된 것으로 보인다.⁶⁾ 膀胱의 對體重比率은 0.02% saccharin 併用投與群에서 顯著한 增加를 보였으며 0.20% 및 2.00% saccharin 併用投與群에 있어서는 saccharin의 增量에 따라 膀胱의 重量增加가 鈍化되었다. 이러한 膀胱의 重量變化는 Howe等과 Hoover 등이 報告한 saccharin에 依한 膀胱癌의 發生과 密接한 相關性이 있을 것으로 보이며, 低用量에서는 膀胱에 hypertrophy를 일으키나 高用量에서는 atrophy를 誘發하는 것으로 思料된다.⁷⁸⁾

重要 1次 免疫臟器인 胸腺의 重量은 正常群에 比하여 ethanol 單獨 投與時 減少되어 Tennenbaum의 報告와 一致하였고, 0.02% 및 0.20% saccharin 併用投與群에서 ethanol 單獨投與群인 對照群에 比하여 有意性있는 增加를 보였으나 2.00% saccharin 併用投與群에서 有意性있게 減少하였다. 이러한 胸腺의 肥大 및 萎縮은 T-cell 의존성 免疫에 影響이 있을 것으로 思料되며, 重要 2次 免疫臟器인 脾臟의 重量은 ethanol 單獨投與群인 對照群에 比하여 saccharin 投與量의 增加에 따라 減少하는 傾向을 보였으며 Washmuth 등의 報告로 미루어 體液性 및 細胞性 免疫毒性이 期待된다.²⁵⁾

赤血球 溶血素價는 感作緬羊赤血球에 對한 抗體와 抗原이 反應하여 溶血을 일으키는 現狀으로 血中 免疫抗體의 消長을 測定하는데 널리 使用되고 있다.²⁶⁾ 本 實驗에서 ethanol 單獨投與群인 對照群에 比하여 saccharin 併用投與群에서 減少하는 傾向을 보였고, 特히 2.00% saccharin 併用投與群에서 顯著하게 減少한 바, 이는 saccharin 投與量이 體液性 抗體生産을 減少시킨다는 Spreafico 등의 報告로 미루어⁶⁾ ethanol의 免疫毒性을 加重시킨 것으로 보였다. 한편, Arthus反應은 感作宿主에 注射된 抗原이 抗原-抗體 免疫 複合體를 形成하여 組織에 沈着하고 補體를 活性化시키며 抗原에 의해 刺戟된 mast cell로부터 遊離된 histamine 및 leucotriene을 多形核白血球의 chemotaxis를 增加시키고, 遊走하여 온 多形核白血球의 lysosomal enzyme 遊離로 炎症反應을 促進시키는 現狀으로 ethanol 單獨投與群인 對照群에 比하여 saccharin 併用投與群에서 saccharin 用量의 增加에 따라 Arthus 反應이 減少되었으며 赤血球 溶血素價의 減少와 더불어 ethanol 및 saccharin 併用投與群에 있어서 saccharin 用量의 增加가 體液性 免疫을 顯著하게 減少시킨 것으로 思料된다. 細胞性免疫을 觀察하기 위한 反應인 遲延型 過敏反應은 感作 T-淋沱球에 依한 MAF (Macrophage activating factor) MIF (Migration inhibition factor) 등 化學傳達因子의 遊離에 依하여 活性化된 大食細胞에 의하여 일어나는 炎症反應으로 本 實驗에서는 ethanol 單獨投與群인 對照群에 比하여

saccharin 投與量の 増加에 따라 DTH가 顯著하게 減少한 바 이는 Spreafico 등이 報告한 5% saccharin 食餌를 30日間 投與後 測定한 齧齒類에 있어서 DTH에는 별 影響이 없었다는 報告와는 反對되는 현상이다.⁹⁾ saccharin이 T-mitogen의 反應性에 影響을 미친다는 Arnold 등의 報告로 미루어 細胞性 免疫에 影響을 미칠 것으로 思料되며²⁷⁾, macrophage 活性에는 影響을 미치지 않으나 thymus의 atrophy에 依한 T-cell의 減少에 의하여 DTH의 減少가 나타날 수가 있다. 또한 ethanol 中毒時 T-lymphocyte의 機能이 低下된다는 報告로 미루어 ethanol과 saccharin의 併用投與時 ethanol의 免疫毒性和 saccharin의 免疫毒性이 相加되어 顯著한 DTH의 減少가 나타난 것으로 思料된다.

脾臟細胞의 rosette 形成細胞는 河等に 의하면 T-cell 및 大食細胞가 모두 rosette cell을 形成할 수 있으나 大部分 T-cell이 같이 干與한다고 하였다.¹⁶⁾ 本 實驗에서 ethanol 單獨投與群인 對照群은 正常群에 比하여 약간 增加하였으나 ethanol의 投與가 RFC值에 有意性있는 影響을 미치지 않았으나 saccharin의 投與量이 増加함에 따라 RFC值가 ethanol 單獨投與群인 對照群에 比하여 顯著하게 減少함을 나타냈다. 이는 ethanol과 saccharin의 併用投與에 依한 胸腺의 萎縮 및 T-lymphocyte의 生成環境의 變化에 따른 T-lymphocyte의 減少에 起因하는 것으로 思料된다.

生化學的 檢査所見에서 S-triglyceride 量은 ethanol 單獨投與群인 對照群은 正常群과 差異를 볼 수 없었으나 saccharin 投與用量的 増加에 따라 顯著하게 增加하였고 S-cholesterol 量은 ethanol 單獨投與群인 對照群은 正常群과 差가 없으나 2.00% saccharin 併用投與群에서 顯著하게 減少하였다. 이는 肝機能 장애에 起因하며 ethanol 肝毒性和 saccharin이 增強시킨 것으로 보인다.

이상의 實驗에서 ethanol의 免疫毒성에 미치는 saccharin의 影響은 低用量的 saccharin보다 高用量的 saccharin에서 ethanol의 體液性 및 細胞性 免疫毒성을 顯著하게 增加시켰다.

結 論

Rat에 있어서 ethanol과 saccharin이 免疫反應에 미치는 影響은 다음과 같다.

1. Ethanol은 胸腺의 重量, 抗體生産 및 DTH를 減少시켰다.
2. Ethanol과 saccharin의 併用投與는 體液性 免疫反應의 抑制를 招來하였다.
3. Ethanol과 saccharin의 併用投與는 細胞性 免疫反應을 顯著하게 抑制시켰으며 특히 2.00% saccharin 併用投與群에서 더욱 顯著한 抑制를 보였다.
4. Ethanol과 2.00% saccharin 併用投與群은 S-triglyceride值를 顯著하게 增加시켰으며, 反面에 S-cholesterol值는 顯著하게 減少시켰다.

參 考 文 獻

1. Bourgoignie, J.J., Hwang, K.H., Pennell, J.P., Brickerz, N.S.: Renal excretion of 2,3-dihydro-3-oxobenzisoxazole sulfonazole (Saccharin). *Am. Physiol. Soc.* (1980)
2. Cohen, S.M., Arai, M., Jacobs, J.B., and Friedell, G.H.: Promoting effect of saccharin and DL-tryptophan in urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* **39**, 1207 (1979)
3. Chowanec, J., and Hicks, R.M.: Response of the rat to saccharin with particular reference to the urinary bladder. *Br. J. Cancer.* **39**, 355 (1979)
4. Taylor, J.M., and Friedman, L.: Combined chronic feeding and three generation reproduction study of sodium saccharin in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **29**, 154 (1974)
5. Hicks, R.M., and Chowanec, J.: The importance of synergy between weak carcinogens in the induction of bladder cancer in experimental and humans. *Cancer Res.* **37**, 2943 (1977)
6. Hicks, R.M., Chowanec, J. and Wakefield, J. ST. J.: The experimental induction of bladder tumors by a two-stage system. In mechanism of tumour promotion and Co-carcinogenesis. Ed,

- slaga. New York Raven Press 2, 475 (1978)
7. Howe, G.R., Burch, J.D.: Artificial sweeteners and human bladder cancer. *Lancet*. **578** (1977)
 8. Hoover, R.N.: Artificial Sweeteners and Human Bladder cancer. *Lancet*. **837** (1980)
 9. Spreafico, F., Vecchi, A., Anaclerio, A., Moras, M.L., Tagliabue, A., Barale, C., Mantovani, A., Sironi, M. and Polenyarutti, N.: In "Pharmacology of Steroid Contraceptive Drugs" (eds S. Garattini and H.W. Berendes). Raven Press, N. W. **267** (197)
 10. Mantovani, A., Luini, W., Candiani, G.P., Salmona, M., Spreafico, F. and Garattini, G.P., Salmona, M., Spreafico, F. and Garattini, S. *Toxicol. Lett.* **5**, 287 (1980)
 11. Luini, W., Mantovani, A. and Garattini, S. *Toxicol. Lett.* **1** (1981)
 12. Loose, M.I., Stege, T. and DiLuzio, N.R.: The Influence of acute and chronic ethanol or bourbon administration on phagocytic and immune responses in rats. *Exp. Mol. Pathol.* **23**, 459(1975)
 13. Tennenbaum, J.I., Ruppert, R.D., St. Pierre, R.L. and Greenberger, N.J.: The effect of chronic alcohol administration on the immune responsiveness of rats. *J. Allergy*. **44**, 272(1969)
 14. Taper, M.L.: Infections Complicating the alcoholic host. In Criecco, M.H.: Infections in the abnormal host. Yorke Medical Books, New York, 474 (1980)
 15. Mackness, G.R., Lagrange, P.H., and Ishibashi, T.: The modifying effect of B.C.G. on the immunological induction of T-cells. *J. Exp. Med.* **139**, 1540(1974)
 16. Ha, T.Y., & Rhee, H.K.: Effect of inosiplex on cellular and humoral immune response. *J. Kor. Soc. Microbiol.* **1**, 57(1981)
 17. Sugimoto, Kojima, A.M., Yaginuma, K. and Gashira, Y.E.: Cell Mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **28**, 23(1975)
 18. Ha, T.Y., Lee, H.K., Song, Y.K.: Modulation of immune response by cimetidine. *J.Kor. Soc. Microbiol.* **16**, 49(1981)
 19. Kim, K.T., Ha, T.Y.: Effect of Cyclophosphamide Administration after stimulation with phytoagglutinin on immune response in mice. *J. Kor. Soc. Microbiol.* **14**, 71(1979)
 20. Reitman, S., Frank, S.: *Am. J. Clin. Path.* **28**, 56(1957)
 21. Fletcher, M.J.: A Colorimetric method for estimation of serum triglycerides. *Clin. Chem. Acta.* **22**, 393(1968)
 22. Allain, C.C al: *Clin. Chem.* **20**, 470(1974)
 23. Berenyi, M.R., Straus, B. and Avila, L.: T-rosettes in alcoholic cirrhosis of the liver. *JAMA.* **44**, 232(1975)
 24. Gluckman, S.J., Dvorak, V.C. and MacGregor, R.R.: Host defenses during prolonged alcohol consumption in a controlled environment. *Arch. Intern. Med.* **1539**, 137(1977)
 25. Wa Chsmuth, E.D.: In "Advances in pharmacology and Therapeutics II" pergamon press, Oxford and New York. **5**, 7(1982)
 26. Kim, J.H.: Immunobiological studies in mice treated with chemical carcinogen 3-methyl cholanthrene. Dept. of Vet. Med. Jeonbuk Natnl. Univ. Graduate school
 27. Arnold, D.L., Charbonneau, S.M., Moddie, C.A. and Munro, I.C.: *Toxico. Appl. Pharmacol.* **41**, 164 (1977)