

Ampicillin의 免疫毒性에 미치는 Ethanol의 影響

安 榮 根 · 金 正 勳 · 羅 憲 鎮

圓光大學校 藥學大學

Effect of Ethanol on the Immunotoxicity of Ampicillin in Mice

Young Keun Ahn, Jung Hoon Kim and Heon Zin Ra

College of Pharmacy, Won Kwang University

ABSTRACT

Experiments were performed on mice to investigate the influences of ampicillin and ethanol on the immune response. Ampicillin was injected intraperitoneally and ethanol was administered in the drinking water. Mice were sensitized and challenged with sheep red blood cells. Immune responses were evaluated by humoral immunity, cellular immunity, peripheral circulating white blood cell and phagocyte activity.

1. The combined administration of ampicillin and ethanol as compared to ampicillin had not influence on the weight of spleen, but increased the weight of thymus.

2. Humoral immune response was slightly reduced by ampicillin. Especially, the combined administration of ampicillin and ethanol significantly reduced hemclysin production.

3. Cellural immune response was reduced by ampicillin. The combine administration of ampicillin and ethanol significantly reduced cellural immune response.

4. Peripheral circulating white blood cell was reduced by the combined administration of ampicillin and ethanol as compared to ampicillin.

5. The combined administration of ampicillin and ethanol as compared to ampicillin had not influence on the phagocyte activity.

緒 論

Ethanol은 古來로 酒類 및 alcohol性 飲料等의 主成分으로 嗜好 飲料로서 또는 工業用溶媒로 使用되어 왔으며 또한 胃腸管을 통하여 吸收된 다음

主로 肝에서 酸化酵素인 cytosolic alcohol dehydrogenase 와 mitochondrial aldehyde dehydrogenase에 의한 酸化作用을 받아 代謝되며, 腎臟, 筋肉 및 肺에서도 少量이 代謝된다고 報告되고 있다. 이러한 alcohol 代謝는 nicotinamide adenine dinucleotide hydrogenase (NADH)를 增加시켜 NADH/NAD의 比의 增加로 인하여 代謝障害의 主要 因子인 acetaldehyde의 量을 增加시킨다고 하였다¹⁾.

Rubin等, Lieber等은 ethanol이 肝에서 脂肪代謝 障害를 일으켜 triglyceride의 增加에 의한 肝 cirrhosis를 일으키는 原因이 되며 ethanol을 계속 投與할 때에는 alcohol性 肝炎 肝 cirrhosis의 단계로 進行되고 다시 肝 hepatitis로 進展한다고 보고하였다^{2,3)}.

Ethanol은 肝細胞의 smooth endoplasmic reticulum을 增加시켜 肝에서의 藥物代謝를 增加시키므로 肝障害의 原因과 關聯이 있다고 한 事實은 이미 1700年代 後半에서 부터 잘 알려져 있으며^{4,5)}, 근래에는 免疫學的 側面에서 alcohol의 免疫抑制作用 報告되어 Berenyi 等은 肝硬化患者에 있어서 T-Rosette 形成細胞가 顯著히 減少하고 Mumps antigen에 對한 反應이 低下함을 報告하였으며⁶⁾ Tennenbaum 等은 rat에 慢性的으로 ethanol을 投與하였을 때 dinitrobenzene에 의한 遲延型過敏反應을 顯著히 抑制한다고 報告하였고⁷⁾ Demeo 等은 肝硬變患者에 있어서 血清內 顆粒球化學走阻止因子를 觀察하였다⁸⁾. 또한 Loose 等은 rat에 있어서 ethanol의 급성투여는 macrophage의 機能을 손상시키지 않으나 慢性投與는 macrophage의 機能을 손상시킨다고 報告하였으며⁹⁾, Tapper 等은 感染의 發生頻度を 增加시키고 또한 惡化시킨다고 報告하였다¹⁰⁾.

Ampicillin은 광범위한 抗菌 spectrum을 가진 半合成 penicillin으로 過敏症狀으로는 好酸球增多症, 白血球減少症, 無顆粒細胞症, 血小板減少症 및 貧血이 나타나는 일이 있다¹¹⁻¹⁷⁾.

한편 ampicillin이 免疫反應에 미치는 影響에 대하여 Forsgren 等은 ampicillin이 多核球 白血

球의 化學的 走性에는 影響이 없다고 하였으며,¹⁸⁾ Goran 等은 ampicillin이 人體 T淋巴球의 mitogenic transformation에 거의 影響이 없다고 하였다¹⁹⁾.

그러나 Chakrabarty 等은 ampicillin은 全體 溶血性 補體와 C 3 level의 顯著한 減少를 초래하며 mitogen에 의한 淋巴球의 transformation과 多核球 白血球의 遊走能이 低下한다고 하였으며,²⁰⁾ North 等은 bacteria접종 24시간 후의 ampicillin 投與는 protective Tcell에 顯著한 減少를 가져오며 이러한 細胞性 免疫의 抑制作用은 bacteria 感染前에 ampicillin을 投與하였을 때 顯著하다고 하였다²¹⁾.

앞에서 본 바와 같이 ampicillin이 免疫反應에 미치는 影響에 대하여는 여러가지 理論이 있는 것으로 미루어 ampicillin의 投與量에 따라 免疫反應이 差異가 있을 것으로 思料되어, 또한 alcohol性 飲料 및 工業原料로 쓰이고 있는 ethanol이 藥物의 代謝 및 生體防禦에 影響을 미치므로, ampicillin과 ethanol의 併用投與가 免疫反應에 미치는 影響이 있을 것으로 思料되어, 本 實驗을 실시하여 有意한 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗動物

體重 20 g 전후의 ICR male mouse를 경남축산(경기도 화성군 소재)에서 分讓받아 市販飲料로 1週間 給食시켜 適應시킨 後에 8~10마리를 1群으로 하고 全體를 7群으로 分類하여 온도 23±2°C, 습도 50~60%로 유지되는 恒온 恒습 사육실에서 4週間 飼育하였다.

2. Ampicillin의 調製 및 投與

Ampicillin sodium (영진약품)을 Phosphate buffered saline(以下: PBS)에 溶解하여 體重 kg當 50 mg, 100 mg, 200 mg을 2週間 1日 1回 一定한 時刻에 腹腔內 注射하였다.

3. Ethanol 溶液의 調製 및 投與

Ethanol (Duksan pharmaceutical Co. LTD)을 증류수에 溶解시켜 4% ethanol로 한 뒤 ethanol 併用投與群 mouse에 임의로 마시게 하였다.

4. 體重 및 臟器의 重量 計測

1) 體重: 實驗動物의 體重은 ampicillin 溶液 및 ethanol 併用投與 開始日과 最終 藥物投與日 2日 後에 測定하였다.

2) 臟器 重量: 實驗動物의 頸動脈을 切斷 採血한 後 脾臟 및 胸腺을 各各 摘出하여 그 外觀을 觀察하고 그 重量을 測定하여 對體重 百分比를 求하였다.

5. 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하였다. 그 方法은 雄性 緬羊의 頸動脈으로부터 heparin을 처리한 注射器로 採血한 後 同量의 Alserver氏液 (PH 6.1)를 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 PBS로 3回 遠心洗滌한 後 1×10^8 S-RBC/ml를 濃度로 Hank's balanced salt solution (以下 HBSS)에 浮遊시켜 使用하였다.

2) 免疫: 上記 抗原 浮遊液 $0.1 \text{ ml} (1 \times 10^7 \text{ S-RBC})$ 를 Reed等의 方法으로 mouse의 尾靜脈에 注射하여 1次免疫을 實施하였다²²⁾. 2次免疫은 1次免疫을 實施한 4日 後에 mouse 左側後 肢足皮內에 2×10^9 S-RBC/ml 浮遊液 $0.05 \text{ ml} (1 \times 10^8 \text{ S-RBC})$ 를 注射하여 추가免疫하였다.

6. 赤血球 凝集素價 및 溶血素價의 測定²³⁾

1) 血清의 分離 및 非動化

mouse의 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 凝集素價 (Hemagglutination titer; 以下 HA titer)의 測定

S-RBC의 凝集素價를 microtitration tray (Nunc micro test tray)를 使用하여 다음과 같이 實施하였다. 즉 各 實驗動物로부터 얻은 個個의 非動化 血清을 各 well에 PBS에 2倍 系列로 稀釋한 後 PBS에 浮遊한 0.5% S-RBC 0.025 ml 를 잘 混合한 後 37°C에서 18시간 放置하여 赤血球의 凝集 類型을 觀察 判讀하였으며 凝集을 일으키는 血清의 最高稀釋度를 그 血清의 凝集素價로 하였다.

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

S-RBC의 量 및 血清의 稀釋은 凝集素價 測定時와 同一하게 實施하였으며 S-RBC와 稀釋血清이 들어있는 各 well에 guinea pig complement를 20倍로 稀釋하여 0.025 ml 씩 加한 後 37°C에서 1시간 放置하여 溶血 여부를 觀察하였다. 이때에 完全 溶血을 일으키는 血清의 最高稀釋度를 그 力價로 判讀하였다.

7. 足蹠腫脹反應 (foot pad swelling test)

Arthus反應 (antibody mediated hypersensitivity) 및 遲延型 過敏反應 (delayed type hypersensitivity; 以下 DTH)을 測定하기 위하여 Reed等이 記述한 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다²²⁾. 즉 1次免疫 4日 後에 S-RBC $0.05 \text{ ml} (1 \times 10^8)$ 을 mouse의 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 數値를 平均하였다. 判讀의 基準은 Sugimoto等의 判讀基準에 따라 3時間의 反應을 Arthus反應, 24時間 經過 後의 反應을 遲延型 過敏反應으로 看做하였다²⁴⁾. 足蹠腫脹指數는 다음과 같이 表示하였다.

$$\text{Foot pad swelling index} = \frac{\text{腫脹時 두께} \pm \text{正常 두께}}{\text{正常 두께}} \times 100$$

8. 脾臟細胞 浮遊液의 調製

脾臟을 mouse로부터 無菌的으로 摘出하여

minimum essential medium(以: MEM)에 조심스럽게 粉碎한 後 nylon mesh를 濾過하여 死細胞를 除去하였으며 寒冷 MEM으로 4°C에서 3回 遠心洗滌한 後 脾臟細胞가 2×10^7 cell/ml가 되도록 PBS에 浮遊하였다. 每 實驗 때마다 이 檢査는 trypan blue dye exclusion method으로 다음과 같이 하였다. 즉 試驗管에 0.3 ml의 細胞浮遊液을 넣은 後 0.1 ml의 trypan blue dye solution을 加하여 5分間 經過 後 血球計算板에서 無色 生細胞와 青色으로 染色된 死細胞의 數를 센 後 그 百分率로 計算하였다²³⁾.

9. 脾臟細胞의 Rosette 形成細胞(RFC)의 檢出

脾臟細胞의 Rosette 形成細胞의 檢査는 Garvey等 및 Elliot等이 다음과 같이 實施하였다^{25,26)}. 脾臟細胞 浮遊液 0.25 ml (5×10^6 cell)와 S-RBC 浮遊液 0.25 ml (5×10^7 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.

FRC(%)

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

10. 末梢循環白血球 數의 測定

Mouse의 眼球靜脈業으로부터 末梢血液을 採取하여 Türk 液으로 稀釋하여 血球計算板上에 滴한 後 白血球 總數를 測定하였다.

11. 大食細胞의 活性檢査

大食細胞의 貪食能力을 測定하고자 本 實驗에서는 Biozzi等이 記述한 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다²⁷⁾. 즉 最終 實驗藥物 投與日 2日 後에 carbon 즉 rotring ink을 滅菌燕溜水에 녹인 1% gelatin液으로 稀釋하여 懸溫液을 調製하여 本 實驗期間동안 密栓하여 37°C에 保管하였다. 위와 같이 調製한 colloid狀 炭素懸濁液을 mouse 體重 g當 0.01 ml씩 mouse의 眼窩後部靜脈血管

叢(retro-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube(20 μ l; microhemocrit)로 穿刺하여 20 μ l의 血液을 10分, 20分, 30分 間격으로 採取하고 採取 血液 sample을 0.1% sodium carbonate(燕溜水에 溶解한 溶液) 溶液 2 ml가 든 vial에 各各 옮겨서 赤血球가 溶解되도록 잘 混和하였다. 이어서 吸光度를 600 nm에서 測定하고 다음의 公式에 準하여 計算하였다.

Corrected Phagocytic Index,

$$P = \frac{W_B^C}{W_S^A + W_L^B} \times \sqrt[3]{K}$$

W_B^C : 體重

W_S^A : 脾臟의 重量, W_L^B : 肝臟의 重量

K : Phagocytic coefficient(測定濃度の 10倍 數를 log로 轉換하고 時間에 大하여 plot한 graph 曲線)

통계분석~모든 data의 유의성 檢定은 student's t-test로 檢定하였다.

實 驗 結 果

mouse에 있어 ampicillin 單獨投與와 ampicillin 併用投與時 緬羊 赤血球 抗原에 對한 免疫反應은 다음과 같다.

1. 體重, 脾臟, 및 胸腺의 重量變化

1) 體重의 變化

實驗 開始日 및 藥物投與 4週間 測定한 體重 및 體重의 增加率은 Table 1과 같이 ampicillin 單獨投與群은 正常對照群에 比하여 그 增加率이 低下되었으나 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서는 差가 거의 없었다.

2) 脾臟의 重量變化

脾臟對 體重 重量比는 Table 2에서 보는 바와 같이 正常對照群이 $0.67 \pm 0.07\%$ 인데 比하여 ampicillin 單獨投與는 약간 減少하였으며 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서도 減少가 있었다. 特히 ampicillin 20 mg/kg 및 ethanol併用投與群은 $0.49 \pm 0.03\%$ 으로 有意한 減少가 있었다.

Table 1. Effects of ampicillin and ethanol on the body weight increase in mice.

Group	Body weight (gm)		Increasing rate (%)
	Initial wt.	Final wt.	
Normal	19.83±0.30	26.20±0.83	33.33±2.82
Ampicillin 50 mg/kg	19.68±0.32	23.66±0.92	23.47±2.23
Ampicillin 100 mg/kg	19.54±0.32	24.12±0.60	24.05±2.69
Ampicillin 200 mg/kg	19.16±0.14	24.87±0.91	28.70±4.33
AMP 50 mg/kg+Ethanol	19.42±0.40	26.37±1.14	38.43±3.52
AMP 100 mg/kg+Ethanol	20.11±0.21	26.70±1.32	34.12±3.61
AMP 200 mg/kg+Ethanol	19.22±0.21	27.27±1.06	40.02±4.00

Each value is the mean±S.D.
Ampicillin was administered intraperitoneally, and 4% ethanol was administered in the drinking water for 4 weeks.

Table 2. Effects of ampicillin and ethanol on spleen and thymus weight in mice.

Group	Spleen weight (mg)	Spleen / Body wt. ×100	Thymus weight (mg)	Thymus wt. / Body wt. ×100
Normal	168.60±13.67	0.67±0.07	37.70±3.07	0.14±0.01
AMP 50 mg/kg	161.60±15.67	0.64±0.06	37.65±2.55	0.16±0.01
AMP 100 mg/kg	148.20±15.67	0.59±0.06	37.50±2.76	0.15±0.01
AMP 200 mg/kg	153.25± 8.33	0.62±0.04	38.60±3.00	0.16±0.01
AMP 50 mg/kg+Ethanol	162.10±16.33	0.62±0.06	50.63±3.28**	0.19±0.01*
AMP 100 mg/kg+Ethanol	166.25±15.67	0.62±0.05	44.30±4.00	0.06±0.01
AMP 200 mg/kg+Ethanol	147.90±10.67	0.49±0.03*	48.11±4.00*	0.17±0.01

Each value is the mean±S.D.
Ampicillin and ethanol were administered for 4 week.
Significant difference from normal group. (*p<0.05, **p<0.01)

3) 胸腺의 重量

胸腺 對 體重 重量比는 Table 2에서 보는 바와 같이 正常對照群이 0.14±0.01%인데 比하여 ampicillin 單獨投與群은 약간 增加하는 경향을 보였으며 ampicillin 및 ethanol 併用投與群은 0.19±0.01로 有意한 增加가 있었다.

2. 體液性 免疫反應에 미치는 影響

1) 赤血球 凝集素價 및 溶血素價

Ampicillin 單獨投與群과 ampicillin 및 ethanol 併用投與群을 4週間 投與한 後 緬羊赤血球로 免疫하여 測定한 赤血球 凝集素價 및 溶血素價는 Table 3과 같다. 赤血球 凝集素價는 ampicillin 單一投與群과 ampicillin 및 ethanol 併用投與群이 正常對照群에 比하여 減少하였으나 有意한

Table 3. Effects of ampicillin and ethanol on the anti-body production in mice.

Group	HA titer (log ₂)	HY titer (log ₂)
Normal	3.99±0.20	4.12±0.28
AMP 50 mg/kg	3.50±0.18	3.77±0.19
AMP 100 mg/kg	3.50±0.17	3.72±0.16
AMP 200 mg/kg	3.97±0.18	3.05±0.22**
AMP 50 mg/kg+Ethanol	4.04±0.20	3.25±0.21**
AMP 100 mg/kg+Ethanol	3.59±0.19	2.70±0.17**
AMP 200 mg/kg+Ethanol	3.61±0.15	2.55±0.14**

Mice were challenged with 10⁸ SRBC 4 days after sensitization.

On 5th day, the HA and HY titer were assayed.

Each value is the mean±S.D (log₂) of 8-10 mice.

Significant difference from normal group. (**, p<0.01)

차는 없었다. 그러나 赤血球 溶血素價에 있어서

ampicillin 單獨投與群은 ampicillin의 投與量이 增加함에 따라 減少하여 ampicillin 200 mg/kg 單獨投與群에서는 3.05 ± 0.22 로 正常對照群의 4.12 ± 0.28 에 比하여 顯著하게 減少하였다. 또한 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서는 全體에서 顯著하게 減少하였으며 ampicillin의 投與量이 增加함에 따라 더욱 減少하여 ampicillin 200 mg/kg 및 ethanol 併用投與群은 2.55 ± 0.14 로 가장 낮은 力價를 나타냈다.

2) Arthus 反應

緬羊赤血球로 感作한 mouse에 2×10^8 S-RBC를 左側後肢足蹠皮內 注射한 3時間後 測定한 Arthus反應은 Table 4와 같이 ampicillin 單獨投與群과 ampicillin 및 ethanol 併用投與群 모두에서 약간 減少하는 경향을 보였으나 有意한 差는 없었다.

3. 細胞性免疫反應에 미치는 影響

1) 遲延型 過敏反應(DTH)

緬羊赤血球 皮內注射 24時間 後 測定한 遲延型 過敏反應은 Table 4와 같다. 正常對照群이 14.40

Table 4. Effects of ampicillin and ethanol on the Arthus and delayed type hypersensitivity reaction.

Group	Arthus reaction	DTH
Normal	24.12 ± 1.75	14.40 ± 1.29
AMP 50 mg/kg	20.51 ± 1.97	12.83 ± 1.29
AMP 100 mg/kg	20.51 ± 1.30	11.53 ± 1.23
AMP 200 mg/kg	22.77 ± 2.06	$11.20 \pm 1.30^*$
AMP 50 mg/kg + Ethanol	25.11 ± 1.83	$11.40 \pm 1.00^*$
AMP 100 mg/kg + Ethanol	27.03 ± 1.76	$7.56 \pm 0.79^{**}$
AMP 200 mg/kg + Ethanol	20.66 ± 1.35	$6.85 \pm 0.78^{**}$

Foot pad swelling was measured after intradermal challenge of 10^8 S-RBC.

$$\text{Foot pad swelling index} = \frac{\text{swelling of foot pad}}{\text{thickness of foot pad}} \times 100$$

At 4 hour FPSI was Arthus reaction and 24 hour FPSI was DTH.

Each value is the mean \pm S.D.

Significant difference from normal.

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

± 1.29 인데 比하여 ampicillin 單獨投與群에서 減少하는 경향이 있었으며 ampicillin의 投與量이 增加함에 따라 減少하여 ampicillin 200 mg/kg 單獨投與群은 11.20 ± 1.30 으로 有意한 減少가 있었다. 한편 ampicillin 및 ethanol 併用投與群은 全群에서 有意하게 減少하였으며 特히 ampicillin 100 mg/kg 및 ethanol 併用投與群, ampicillin 200 mg/kg 및 ethanol 併用投與群에서 顯著하게 減少하여 各各 7.56 ± 0.79 , 6.85 ± 0.78 이었다.

2) 脾臟細胞의 Rosette形成能

脾臟細胞의 Rosette形成能은 Table 5에서 보는 바와 같이 正常對照群이 $13.50 \pm 1.24\%$ 인데 比하여 ampicillin 單獨投與群에서 減少하는 경향이 있었으며 特히 ampicillin 100 mg/kg 單獨投與 및 ampicillin 200 mg/kg 單獨投與群에서 各各 10.05 ± 0.68 , 9.88 ± 0.58 로 有意하게 減少하였다. 또한 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서는 9.38 ± 0.42 , 8.18 ± 0.43 및 7.08 ± 0.45 로 全群에서 매우 顯著하게 減少하였다.

Table 5. Effects of ampicillin and ethanol on Rosette forming cell in mice.

Group	RFC (%)
Normal	13.50 ± 1.24
AMP 50 mg/kg	10.47 ± 1.14
AMP 100 mg/kg	$10.05 \pm 0.68^*$
AMP 200 mg/kg	$9.88 \pm 0.58^*$
AMP 50 mg/kg + Ethanol	$9.88 \pm 0.42^{**}$
AMP 100 mg/kg + Ethanol	$8.18 \pm 0.43^{**}$
AMP 200 mg/kg + Ethanol	$7.08 \pm 0.45^{**}$

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

Each value is the mean \pm S.D.

Significant difference from normal group.

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4. 末梢循環 白血球 및 大食細胞 活性에 미치는 影響

1) 末梢循環 白血球

Ampicillin 單獨投與群과 ampicillin 및 ethanol 併用投與群을 4週 投與한 後 mouse의 眼窩

後部靜脈血管叢으로부터 血液을 取血하여 測定한 白血球數는 Table 6과 같다. ampicillin 單獨投與群은 正常對照群에 比하여 有意한 差가 없었으나 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서는 減少하였으며 特히 ampicillin 50 mg/kg 및 ethanol 併用投與群, ampicillin 200 mg/kg 및 ethanol 併用投與群은 各各 8600±542, 7000±563로 有意하게 減少하였다.

Table 6. Effects of ampicillin and ethanol on peripheral WBC and phagocyte activity in mice.

Group	WBC (/mm ³)	Phagocyte activity
Normal	10,080±256	3.95±0.26
AMP 50 mg/kg	11,800±377	3.44±0.27
AMP 100 mg/kg	9,920±277	2.93±0.18**
AMP 200 mg/kg	10,466±633	2.41±0.23**
AMP 50 mg/kg+Ethanol	8,600±542*	2.87±0.24**
AMP 100 mg/kg+Ethanol	9,280±461	2.94±0.30**
AMP 200 mg/kg+Ethanol	7,000±563*	2.50±0.20**

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

Each value is the mean±S.D.

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

2) 大食細胞의 活性

Ampicillin 單獨投與群과 ampicillin 및 ethanol 併用投與群을 4週 投與한 後 carbon clearance test로 실시한 大食細胞의 活性은 Table 6과 같다. 正常對照群이 3.95±0.26인데 比하여 ampicillin 單獨投與群은 投與量에 따라 顯著하게 減少하는 경향이 있었으며 特히 ampicillin 100 mg/kg 單獨投與群과 ampicillin 200 mg/kg 單獨投與群은 各各 2.93±0.18, 2.41±0.23로 매우 顯著하게 減少하였다. 또한 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서도 顯著하게 減少하였다.

考 察

人間에 있어서 慢性的인 ethanol中毒은 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. Mc Farland 等에 依하면 ethanol中毒患者에 있어서 果粒球 減少症, 淋巴球 減少症 및 骨髓에 毒作用이 있음을 報告하였다²⁸⁾. Ampicillin은 全體 溶血性 補體와 C₃ level의 현저한 減少를 초래하며 mitogen에 의한 淋巴球의 transformation과 多形核 白血球의 遊走能이 低下된다고 하였다²⁹⁾. 脾臟은 淋巴球 및 網內系 細胞로 구성되어 있는 末梢免疫臟器로 免疫反應에 重要한 역할을 하고 있다²⁹⁾. 本 實驗에서 脾臟의 重量의 減少로 미루어 ampicillin 및 ethanol 併用投與가 末梢免疫臟器에 약간의 影響이 있을 것으로 보인다. 또한 胸腺은 中樞淋巴組織으로 T-淋巴球의 分化에 깊이 關係하고 있는 바, 本 實驗에서 ampicillin 單獨投與에 依해서는 약간 增加하는 경향을 보였으며 ampicillin 및 ethanol 併用投與에 依하여 그 重量이 正常對照群에 比하여 有意하게 增加한 점으로 미루어 ampicillin 및 ethanol 併用投與가 胸腺의 hypertrophy를 가져와 體液性 免疫反應보다는 細胞性 免疫反應에 더 影響을 미친 것으로 思料된다. 體液性 免疫反應 가운데 T-淋巴球 依存性 抗原인 緬羊赤血球에 對한 血清抗體인 赤血球凝集素價 및 溶血素價의 測定은 血中 體液性 免疫抗體의 消長을 測定하는데 널리 利用되고 있다³⁰⁾. 本 實驗에서 赤血球 凝集素價는 ampicillin 및 ethanol 併用投與에 依해서 약간 減少하였으나, 溶血素價는 ampicillin 過量 投與群과 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서 顯著하게 減少하여 ampicillin의 投與量이 增加함에 따라 體液性 抗體生産이 低下되며 ampicillin 및 ethanol 併用投與에 依하여 그 作用이 더욱 減少하였다. 이는 Chakrabarty 等の 報告로 미루어 赤血球溶血素價의 顯著한 減少는 補體 活性化의 低下와 깊은 연관성이 있는 것으로 思料된다²⁰⁾.

Arthus 反應은 多形核白血球에 依한 抗原-抗體複合體와 補體 等の 巨大 분자의 貧食에 의해 遊離되는 lysosomal enzyme에 의하여 일어나는 抗體 媒介型 過敏反應 現象으로 本 實驗에서 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서는 正常對

照群과 큰 差異가 없었다. 이는 抗體生産에는 影響이 없는 것으로 思料된다.

遲延型 過敏反應은 感作 T-淋巴球에 의해 遊離된 lymphokines의 化學傳達物質에 의한 細胞性 免疫反應으로 特히 大食細胞가 깊이 關여하는 本 實驗에서 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서 顯著하게 低下하였다³⁰⁾. 이는 白血球數와 大食細胞活性的 低下에 起因하여 ampicillin의 細胞性 免疫抑制作用과 ethanol의 抑制作用이 相乘적으로 作用하였다고 思料된다.

脾臟細胞의 Rosette形成能은 主로 T-cell에 의해 이루어지는 바³¹⁾, 本 實驗에서 ampicillin 單獨投與群과 ampicillin 및 ethanol 併用投與群의 Rosette形成細胞數의 顯著한 減少는 胸腺의 hypertrophy 및 T-lymphocyte의 生成環境의 變化에 따른 T-lymphocyte의 減少에 起因되며 特히 ampicillin 單獨投與보다 ampicillin 및 ethanol 併用投與가 影響이 더 큰 것은 ethanol과 ampicillin의 毒性이 相乘적으로 作用한 것으로 思料된다.

末梢循環白血球는 ampicillin 單獨投與보다는 ampicillin 및 ethanol 併用投與에 依하여 有意性 있게 低下한 것은 ethanol의 毒性이 相乘으로 作用한 장애에 起因한 것으로 보인다.

大食細胞는 免疫反應에 重要한 역할을 하는 細胞로 carbon clearance test는 in vivo에서 細網內皮系 細胞의 活性을 檢査하는 有用한 方法으로 靜脈注射한 carbon 粉子는 肝의 kupffer cell에서 40%, 脾臟의 大食細胞에 依해 10%가 除去되는 것으로 알려져 왔다. 本 實驗에서 ampicillin의 投與量이 增加함에 따라 大食細胞의 活性이 顯著히 減少하였으며 ampicillin 및 ethanol 併用投與에 있어서는 ampicillin에 의한 大食細胞에 影響을 미친 바 없다. 이는 Loose 등이 報告한 rat에 있어서 ethanol의 급성투여는 大食細胞의 機能을 손상시키지는 않으나 慢性投與는 大食細胞의 機能을 손상시킨다는 報告로 미루어⁹⁾ 이는 ethanol의 免疫毒性이 ampicillin의 phagocytic activity에는 影響을 미치지 않은 것으로 思料된다.

結 論

Ampicillin과 ethanol이 mouse의 免疫反應에 미치는 影響은 다음과 같다.

1. Ampicillin 및 ethanol 併用投與群은 ampicillin 單獨投與群에 比하여 脾臟의 重量에는 큰 影響이 없었으나 胸腺의 重量을 增加시켰다.

2. Ampicillin 單獨投與群은 體液性 免疫反應을 약간 減少시켰으며 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에 있어서는 特히 赤血球 溶血素價가 有意하게 減少하였다.

3. Ampicillin 單獨投與群은 대체적으로 細胞性 免疫反應을 有意하게 減少시켰으며 特히 ampicillin 및 ethanol 併用投與群은 顯著하게 減少하였다.

4. 末梢循環 白血球는 ampicillin 單獨投與群에 比하여 ampicillin 및 ethanol 併用投與群에서 減少하였다.

5. 大食細胞의 活性은 ampicillin 單獨投與에서도 減少하였으나 ampicillin 및 ethanol併用投與群은 ampicillin 單獨投與群에 比하여 差가 없었다.

REFERENCES

1. Slater, T.F., et al: Changes in liver nucle tide concentrations in experimental liver injury, 2. acute ethanol poisoning. *Biochem. J.*, **93**; 267 9(1964)
2. Rubin, E., et al: Experimental alcoholic hepatitis. *Science*, **182**, 305 (1973)
3. Lieber, C.S., et al: 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)
4. Glamros, J.T.: Alcohol and liver disease. *Am. J. Digest. Dis.*, **14** 477 (1969)

5. Rubin, E., et al.: Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes. *Science*, **159**, 1469 (1968)
6. Berenyi, M.S., Straus, B. and Avila, L.: T-Rosettes in alcoholic cirrhosis of the liver. *J.A.M.A.*, **44**, 232 (1975)
7. Tennenbaum, J.I., Ruppert, R.D., St. Pierre, R.L. and Greenberger N.J.: The effect of chronic alcohol administration on the immune responses in rats. *J. Allergy*, **44**, 272 (1969)
8. Demeo, AN. and Anderson, DR.: Defective chemotaxis associated with a serum inhibitor in cirrhotic patients. *Engl. J. Med.*, **286**, 735 (1972)
9. Loose, L.D., Stege, T. and Dr. Luzio, N.R.: The influence of acute and chronic ethanol or bourbon administration on phagocytic and immuneresponse in rats. *Experimental and Molecular Pathology*, **23**, 459 (1975)
10. Tapper, M.L.: Infections complicating the alcoholic host: Infections in the Abnormal Host. *Xorke Medical Books*, **474** (1980)
11. Sjoberg, B., et al.: New aspects on antigens in penicillin CRC critical reviews in toxicology, **7**, 219 (1980)
12. Petz, L.D.: Drug-induced immune haemolytic anaemia. *Clinicology*, **9**, 455 (1980)
13. Bergan, T.: Aminopenicillins: concluding remarks. *Infection*
14. Levine, B.B., et al.: Prediction of penicillin allergy by tests. *J. Allergy*, **43**, 231 (1969)
15. Stewart, G.T.: Allergy to penicillin and related antibiotic and immunochemical mechanism. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **13**, 3
16. Ahlstedt, S., and Kristofferson, A.: Experimental evidence of incidence of penicillin allergy through use of pure infection, **7**, 499 (1979)
17. Garratty, G., and Petz, L.: Drug-induced immune hemolytic a. *J. Med.*, **58**, 398 (1975)
18. Forsgren, A., and Schmeling, D.: Effect of antibiotics on of human leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **11**,
19. Goran Bang, and Forsgren, A.: Antibiotics and suppression function in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**, 55
20. Chakrabarty, A.K., et al.: Effects of antibacterial agents on complement system. *Immunopharmacology*, **3**, 281 (1981)
21. North, R.J., Berche P.A., and Newborg M.F.: Immunologic consequences of antibiotic-induced abridgement of bacterial infection on generation and loss of protective T-cell and immunologic memory. *J. Immunol.*, **127**, 342 (1984)
22. Reed, N.D., Crowle, P, K, and Ha, T.: Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immuno-deficient animals, B. Sordet ed. Karger Baselip 134 (1984)
23. Ha, T.Y. and Rhee, H.K.: Effect of inosin on cellular and humoral immune response. *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **1**, 57 (1981)
24. Sugimoto, Kojima, A.M., Yaginuma, K. and Gashira, Y.E.: Cell mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **28**, 23 (1972)
25. Garvey, J.S., Cremer, N.E., Sussclorf, D.H. Methods in immunology, 3rd, 449 (1980)
26. Elliott, B.E., J.S.Haskill.: Characteristics of thymus-derived bone marrow-derived Rosette forming lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **3**, 68 (1973)
27. Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C., and Halpern, B.N.: Etude quantitative de l'activite granulopexique du systeme reticulo entherial chez la souris. *C.R. Soc. Biol. Paris*, **148**, 431 (1954)
28. Mofarland, H. and Libre, EP.: Abnormal leucocyte response in alcoholism, *Ann. intern. Med.*, **59**, 865 (1963)
29. Simons, B.: Graft versus host reaction. their natural history and applicability as tools of research. *Progr. Allergy*, **6**, 349 (1961)
30. Kim, J.N.: Immunobiological studies in mice treated with chemical calcinogen 3-

methylcholanthrene. Dept. of Vet. Med. Jeonbuk Natl. Univ. Graduate School, (1983)

31. Back, J.F., and Dardenn, M.: Antigen recognition by T lymphocytes. *Cell Immunol*, **3**, 1 (1972)