

백서에서 자가 피부이식후 항 T 임파구 단일클론항체 분포에 관한 면역조직화학적 연구

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학 교실

박만규 · 김경욱

AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON ANTI-T LYMPHOCYTE MONOCLONE ANTIBODY AFTER AUTOGENOUS FULL-THICKNESS SKIN GRAFT IN RAT

Man - Kyu Park, D. D. S., Kyung - Wook Kim, D. D. S., M. S. D., Ph. D.

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Dankook University

This article is intended to study histopathological and immunohistochemical response after autogenous full-thickness skin graft in rat.

12 male Sprague - Dawley rats were used as the experimental animals. A 1Cm×1Cm skin(0.7mm diameter) was taken on the right inguinal area of the rat. Another full-thickness skin graft(1Cm×1Cm) was taken from the left inguinal area of the rat. And it was transplanted to the right inguinal area of the rat. The left side wound was closed directly. Light microscopic observation was made at the postoperative 1°3°8°16 day, after the hematoxylin - Eosin staining of the 4u-thick paraffin embedded specimens and the immunohistochemical staining of the 10u-thick frozen specimens with mouse anti-rat monoclonal antibodies and ABC staining kit. The results were as follows.

- 1. Electromicroscopic studies revealed interstitial tissue bleeding of transplanted autogenous skin. The response was severe in the 1 day group after operation, moderate in 3 day group, mild in 8 day group, and almost resolved in the 16 days group.*
- 2. Electromicroscopic studied also revealed a mild monocyte response in the 3 day and 8 day group. A histiocytic infiltrate was observed. There was a mild response in the 3 day group and moderate response in the 8 day group.*
- 3. Immunohistochemically studies revealed a few pan T cells in the 1 day group, mild appearance of pan T cells and cytotoxic T cells in the 3 day group, a moderate infiltrate of pan T cells and helper T cells in the 8 day group, and total resolution of pan T cells in the 16 day group.*
- 4. According to these finding, a strong inflammatory response was observed around transplanted autogenous skin in the 3 & 8 day groups. In the 16 day group this response had resolved histopathologically and immunohistologically.*

I. 서 론

이식의 초기 역사는 수명에 대한 인간교육과 연관되어 왔다. B. C. 2세기경 중국인 외과의인 Hua T'O 등은 다양한 조직과 장기를 이식하려고 생각했다. 하지만 이 기간동안 중국에서의 과학 사조는 외과 부분에 유리하지 않았으므로 이런 보고들은 모두 전설적인 귀표가 되었다. 고대 서구의 이식 구전은 종교적인 표상으로 가득차 있으며 이는 의학의 성인인 Cosmos와 Dmian을 포함하는데 이들은 A. D. 285-305까지 활약했다. 구전에 따르면, 최근에 죽은 사람의 다리가 동일 부위가 절단된 환자에게 성공적으로 이식되었다고 한다. 코, 귀, 입의 결손을 회복하기 위해 이마, 목, 뺨으로부터 얻은 자가 유경(pedicle) 이식체에 대한 최초의 기록은 인디아의 산스크리트 원문(Sushrum Shamhita)에서 발견되었다.

11세기부터 13세기까지 이탈리아의 대학이 유럽 의학의 중요한 핵심지였다. Bologna의 Gasparo는 그의 저서 "이식체를 이용한 불구에 대한 외과 술식에 관하여(De Custorum Chirurgia per Insitionem)"에서 전박피판을 이용한 이식과 코 성형술에 대해 보고하였다.

근세에 들어서서 John Hunter(1728-1793)는 제1 소구치가 탈구된지 몇시간 내에 성공적으로 원위치 시킨 것을 보고하고, 모든 살아있는 물체는 다른 어떤 것과 접촉시키기 위해 옮겨졌을 때 결합하려는 성향을 가진다고 주장했다. 그는 모든 살아있는 물질은 유사한 본질을 가지고 있기 때문에 혈액이 한 동물에서 다른 동물로 전이 될 수 있다고 믿고서, 인간의 치아를 수탉의 벼슬에 이식시키거나 어린 수탉에서 얻은 발톱을 암탉의 벼슬에 이식시킨 후, 그것이 자랄 수 없다는 것을 발견하였다.

19세기는 유리아식의 발달과 관계가 있었다. 골 이식 원칙을 세운 Ollier의 '진피-표피' 이식, 1809년 Reverdin의 소량 이식으로부터 피하층이 전혀 없는 피부이식까지 발전했다.

1804년 밀라노의 Rarnoio는 양에서 피부절편 유리아식 실험후 이식전 시간 간격의 다양성에도 불구하고 모든 실험은 성공적이었다고 보고하였으며, 18년후 Dieffenbach는 실험적 이식과 조직재생에 관한 그의 이론을 발표하고, 곧이어 임상적 연구에

대해 보고하였다.

Bert는 1863년에 새로운 숙주 혈관의 내부성장이 이식체의 영양 공급을 위해 요구된다는 것을 시사했으며, 피부 이식은 분할층 피부 이식물을 이용하는 Thierock의 방법에 의해 1886년에 더욱 개선되었다. 하지만, 유리아식에 대한 한계가 있었는데, 특히 큰 결손 부위로 이식시 뚫어지거나 찢어지는 것을 견딜 수 있도록 요구되었으며, 1898년에 William Halsted는 이런 결점을 극복하기 위해 유경피판을 "Waltzing"(수월히 가볍게)하는 방법을 소개한 바 있다.

유리아식에 대한 유용도와 광범위한 이용은 많은 좋은 보고와 지속적인 결과를 가진 광범위한 영역의 동종 이식과 이종이식의 이용을 낳았다. 이런 놀랄 만한 성공에 대한 고무는 1881년 MacEwen에 의한 동종이식의 의심할 바 없는 성공에 대한 보고와 1905년 Zurin에 의한 성공적인 각막 이식으로부터 유래되었다. 하지만 Ollier와 Thierock는 자가 이식이 최상의 생존률을 보이는 것을 관찰했다.

동종이식과 이종이식에 대한 빈번한 실패는 다른 종과 다른 계가 양립할 수 없다는 것을 의문으로 떠올리기 시작했다. 전체 장기나 부분 장기 이식에 있어 전체적인 초점이 19세기 후반에 기술적인 것으로부터 생물학적인 연구로 옮겨지기 시작했다.

자가 조직의 이식이 가능할 때는 면역적 고려가 필요하다. 수세기에 걸쳐 모든 장기와 조직은 한 부위에서 다른 부위로 이식되어 왔으며 각각은 생 활력 유지를 위해 특수한 것이 요구된다. 부분적 피부이식은 혈액 순환이 잘되고 이식부위를 깨끗이 해주는 것만이 요구되는데 반해 더욱 복잡한 근피층 또는 피부근육과 연골의 복합 이식은 적당한 혈액 공급이 따라야 한다. 분리골, 연골 또는 신경의 자가 이식은 재건 술식에 흔히 이용된다. 또한 처리된 골수 이식체가 백혈병과 임파종 치료에 있어 증가되는 빈도로 이용되어지고 있으며, 거부 반응이나 이식체 대 숙주(Graft-Versus-host) 질병의 문제점은 그 때문에 예방되어 진다. 부신과 같은 조직의 자가이식은 중추신경계의 결합을 교정하기 위해 사용된다. 자가 이식의 사용은 단지 구상적인 것과 생리학적인 고려로 제한되어 있다.

근친 교배된 쥐 계통은 분자유전학과 일차적으로 유전학자인 Geroge Snell의 연구로부터 전개되었던 주요 조직유사성 복합체(MHC)에 대한 정교한 이

해를 허용했다. 이런 동족과 같은 동물은 단일 좌위 또는 유전영역을 제외하고는 유전적으로 동일하게 시작되었다. 중앙 동종 이식으로 향한 면역학적 특징을 가지는 반응에 대한 특질화는 조직이식에 대한 상세한 혈청학적 유전학적 분석을 필요로 했다.

Peter gorer는 처음으로 상이한 계통의 쥐의 적혈구 상에서 구별될 수 있는 항원이 역시 그들의 조직세포 상에도 위치함을 보여주었다. 1938년에 Gorer는 이런 동종 항원의 요소는 유전적으로 결정되어 있다는 것과 “이식되는 조직에는 존재하고, 이식체 파괴를 낳는 반응을 유도할 숙주에는 없는” 어떤 것의 존재를 보고하였다.

강한 조직유사성(H) 항원(O)식 반응에 연관된 항원을 설명하기 위해 Snell에 의해 붙여진 이름은 H-2로 나타나는 다수의 대립형질을 가지는 유전자 영역에 의해 통제되고 있음을 발견했다. 이런 H-2(쥐의) 좌위는 독특한 상태에 있는데, 이는 양조직 항원을 조절하는 것으로 나타나며 거부 반응을 유도할 수 있고 적혈구 항원은 혈청학적으로 정의될 수 있다. 이리하여 적혈구 항원을 시험하는데 대한 용이성은 숙주거부반응에 대한 공여조직의 민감도를 결정하는데 사용될 수 있었다. 쥐의 계열사이에 조직이식체의 거부 반응이 H-2 영역에서는 동일하지만 다른 더욱 약한 H 좌위의 존재를 암시한다.

H-2영역에 대한 두번째 중요한 특징은 쥐에서 다른 $ndr-2=2$ 조직 유사체계에 의해 유도되는 것보다 더욱 빠른 상이한 종양에 대한 거부반응의 조절자라는 것이다. H-2항원을 조절하는 영역은 염색체 17번에 위치한다. 이런 많은 밀접하게 연관된 유전자 복합체는 모든 포유류의 진화동안 보존되어 왔다.

Jean Dausset, Beynard Amos와 다른 몇사람들은 수혈이나 임신 후에 환자의 혈액에서 백혈구 항원에 대응하는 특이 동종 항체를 발견함으로써 쥐의 H-2 복합체와 인간의 백혈구 항원(HLA)사이에 유사성을 설명하는데 도움이 되었다. HLA-A, B, C 좌위의 혈청학적 정의를 유도한 이런 연구는 이식 공여체와 수용체의 면역학적 특성을 비교하는 방법을 제공하기 위한 시도로 자리잡게 되었다. 이런 유전적 체계는 ABO 혈액형 집단과는 매우 독립되어 있는데, ABO 혈액집단 역시 이식적합성에 중요하다.

여러가지 항원 자극에 대한 능동면역반응의 조절에

있어 MHC내에 있는 면역반응유전자의 생리적 중요성이 Benacerraf와 Mcdevitt등에 의해 확증되었다. MHC의 그 영역내에서 발견되는 특수한 면역 반응 유전자는 여러가지 항원에 대한 동물의 면역학적 반응도를 조절하여 면역반응을 하는 세포 사이의 상호 연락을 조절한다.

Sister에 의한 방부법과 무균법에 의해서 감염을 줄이며 외과적 이식을 수행할 수 있도록 기여되었으며, 장기의 직접적 혈관 재생을 위해 혈전증, 출혈, 협착 등이 없이 혈관 문합을 효과적으로 하는 기술이 발달하게 되었다. 20세기에 들어 혈관수술의 기술을 진전시킨 Moerl, Matas, Murphy, Jaboulay와 같은 외과의사가 나타났다.

1902년에 Vllmann은 처음으로 보철튜브를 사용하여 신장의 자가, 동종, 이종 이식을 수행했다. Guthrie는 면역학에 대한 지식과 인체를 침공하는 박테리아를 제거하는 방법을 알고 있었는데 그는 만약 이식이 성공하려면 면역학의 원리가 유용하게 적용되어야만 할 것이라고 천명했다.

1923년 Mayo병원의 Williamson 박사는 자가 이식된 신장과 동종이식과 신장과의 차이점과 신장이식을 거부하는 조직학적 특성에 대해서 보고하였으며, 이식시의 조직분류(tissue typing)법의 사용을 예견하였다.

1924년에 Holman은 단일 공여체의 피부 이식체가 화상환자에게 적용되었을시 두번째 적용에서는 더욱 더 빨리 거부된다는 것을 관찰하였다. 이런 현상은 Medawar가 이런 “Second - Set”을 제시함과 결론적으로 외부의 피부이식체에 대한 거부 반응은 모든 면역학적 특이성의 법칙을 따른 다른 것을 확증한 2차 대전이 지나서야 연구되었다. 하지만 “능동적 후천성 면역”에 대한 주장은 고전적 면역학적 가르침에 적합하지 않았는데 그 이유는 항체를 발견할 수 없었기 때문이다.

세계 2차대전 동안 영국왕립의학 협회가 많은 수의 지반시민과 군대의 화상을 연구하기 위해 화상치료소를 만들었다. 동물학자인 Medawar는 심한 화상을 입은 비행사를 보고 피부이식문체에 관심을 갖기 시작했다. Medawar와 그의 동료들은 태아 발생동안(근친교배의) 한 종류의 쥐로부터 다른 쥐에게 세포로 주입함으로써 궁극적 피부이식에 대한 “후천성 면역학적 내성”의 상태를 유도시킴으로써 Burnet의

내성에 관한 주장을 확증했다. 내성(tolerance)에 관한 이런 연구는 동종이식의 문제점에 대한 완전한 해결이 적어도 실험실에서 달성될 수 있게 했고 의과의를 포함한 많은 특별한 연구자들을 이식면역학으로 유도했던 것으로 나타난다.

성형외과 의사인 Gihson은 부모로부터 화상입은 자녀에게로의 피부이식에 대한 "Second - set"은 first set보다 더 빠르게 일어난다는 것을 보여주었다. Gihson은 이런 현상은 동종이식이 즉각적으로 입상에 사용될 수 없는 마지막 증거라고 여겼으며, Medwar는 동종이식 거부는 주요하고도 설명할 수 없는 면역학적 현상이라는 것을 확신했다.

항체에 대한 정의는 1952년 Dausset에 의해 시작되어, Van rood와 Payne에 의해 계속되었다. 항체 검사 방법은 Amos와 Paul에 의해 고안되었는데, 이는 수용체에서 초급성 거부반응을 피하기 위해 미리 형성된 항체에 대한 테스트로 사용되어졌다.

1952년에 Dixon은 토끼의 면역반응이 X-ray 사용에 의해 저해될 수 있다는 증거를 보고했으며, 영국의 Lotit는 전체 인체의 치사 방사선량이 쥐사이에서 그리고 생쥐와 집쥐사이에서 성공적으로 피부를 이식하기 위해 항체 유도 세포를 파괴하는 것이 가능하지만, 동물이 생존하기 위해서는 골수를 더 많이 이식하는 것이 필요하다고 하였다. 1959년에 Schwartt와 Dameshek가 6-메르칸토 퓨린이 인체의 혈청알부민에 대한 토끼의 면역반응과 토끼의 피부이인자형이식에 대한 면역반응을 억제할 수 있다는 것을 발견하였고, 1960년 Woodruff와 Anderson은 항입파세포 혈청이 쥐의 피부 이종이식을 연장시킨다는 것을 보여주었으며, 1963년에 이 제제가 임상적으로 사용되었다.

1975년 Kohler와 Milstein이 hybridoma 술식에 대해 보고함으로써 단일 클론항체 연구가 가능하게 되었다.

Anti-rat T lymphocyte 단일클론항체(W3/13 HLK)는 백서 흉선세포, 다형핵세포들, 형질세포와 기저(stem cell)세포는 인식을 하나 B-림프구나 pre-B세포는 인식을 하지 못한다^{5,50}. 이 항체가 인지할 수 있는 항원은 분자량이 95,000이며 O-linked carbohydrate structure가 다량으로 있는 heavily glycosylated glycoprotein이다. 이 흉선세포의 주 당단백질과 T 림프구는 leukocyte sialoglycoprotein

이나 leukosialin으로 불리기도 한다. 흉선세포에서는 이 당단백질이 T 세포를 labeling하는데에는 유용하며, NK 세포를 분석하는 것⁴¹ Sialoglycoprotein을 인지함으로써 분자연구에도 이용될 수 있다.

Anti-rat T helper 단일클론항체(W3/25)는 흉선세포의 대부분(90-95%), 말초 T세포와 복강대식세포를 인지할 있다^{4,7,32,50}. 이 항체에 의해 인지할 수 있는 항원은 분자량이 48,000-52,000인 당단백질으로 인간의 CD4나 생쥐의 L3/T4 항원과 동일한 것으로서, 백서 T보조세포를 label시키며 B와 T세포의 보조활성, 혼합림프구반응(MLR)에서 이식 대숙주 반응(GVH)을 매개하며^{7,12,48}, 혼합림프구반응에서는 Interleukin-2의 생산을 차단하거나 증식을 억제한다^{12,39,48,49}. 이 항체는 세포독성 및 억제기능을 매개하는 세포에는 label되지 않으며 백서에서 면역반응의 세포학적 측면을 연구하거나 림프구의 기능적으로 뚜렷한 아형을 찾는 marker로서 이용되고 있다.

Rat cytotoxic/suppressor(MRC OX-8) 단일항체는 흉선세포의 대부분(90-95%), 말초 T 세포들, NK세포 대부분과 소장외 과립성세포내 백혈구를 인지한다^{12,17,38}. 이 항원은 분자량이 34,000, 39,000, 76,000의 표면당단백질의 복합체로 인간의 CD8, 생쥐의 Ly-2,3과 동일하다³². 이 항체는 항체형성의 억제⁷와 세포독성세포 전구물을 매개하는 T세포의 아형¹⁷으로, T세포를 분류하거나 치명적인 이식체 대 숙주 질환⁴⁰을 매개하는 백서의 T세포 아형에 대해 연구할 수 있다.

활성화된 보조 및 유도 T세포들이 체액성 및 세포매개 면역반응을 개시하고 유지하는데 요구되는 반면, T억제 및 세포독성세포들은 세포독성 반응에 관계하는 것 뿐 아니라 면역반응을 억제한다. 많은 구강병소들이 이런 면역조절의 불균형때문에 일어나는 것으로 알려져 있다^{36,38,44}.

1977년 Willams등은 mouse에서 만들어진 anti-rat 단일클론항체인 W3/13이 모든 형태의 T 림프구 세포들과 neutrophil을 동시에 감작시키며, 또한 골수에 존재하는 granulocyte 전구세포들과 polymorphocyte도 감작시키지만, B 림프구 세포들과는 반응하지 않는다고 보고하였다. 한편 Cantrell등은 1982년 W3/13의 단일항체가 rat의 natural killer cell을 Labeling할 수 있다고 보고하였다.

1977년 Williams 등은 단일클론항체인 W3/25가 대부분의 thymocyte 등과 중복되지 않은 T 임파구 세포들의 subpopulation을 labeling한다고 보고하였고, 1978년 White 등과 1979년 Webb 등은 혼합 임파구 반응, 이식체 대 숙주 반응, 또는 항체반응시 rat 보조 T 세포들을 labeling한다고 보고한 바 있다. 1981년 Barceley는 같은 W3/25 단일클론항체가 Macrophage도 labeling한다고 보고하였으며, 1982년 Cantrell 등은 rat의 Natural killer cell은 이 단일항체에 의해 labeling한다고 보고한 바 있는데 특히 Brideau에 의하면 이 단일항체는 혼합 임파구 반응시 유래된 rat의 세포독성 T 세포를 healing한다고 보고하였다. 한편 1982년 Cantrell 등은 이 Monoclonal 항체가 rat의 Natural killer cell도 labeling하는 것을 관찰하였다.

본 저자는 이상과 같은 문헌 고찰을 하여보고, 백서의 자가 피부이식후 수용부에서의 조직반응 및 MHC molecule에 의한 T 임파구의 적응능력에 있어서의 이상 여부를 알기 위하여, 범 T 세포, 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포의 구성변화 양상을 살펴본 결과 의의있는 결과를 얻었기에 보도드리고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 동물은 평균체중 250-300g 사이의 웅성 백서로의 12마리를 3마리씩 네군으로 나누어 실험하였다.

본 실험에 사용된 항체는 mouse anti-rat 단일클론항체인 W3/23, W3/25, MRX OX-8(Cedarlane Co.)을 사용하였다(표 1).

표 1. Monoclonal antibodies employed and their specificity

Antibody	Specificity	Dilution	Source
Anti T (W3/13)	Pan T	1 : 100	Cadalane
Anti T4 (W3/15)	T Helper / T inducer	1 : 100	Cadalane
Anti T8 (MRX OX-8)	T Suppressor / T Cytotoxic	1 : 100	Cadalane

2. 신경이식수술

클로로포름을 이용하여 흡입마취를 시행한 후 백서의 서혜부를 탈모하고 통법에 따라 소독초치하였다. 좌·우 서혜부에서 1Cm×1Cm 크기의 피부를 전층으로 절제하였다. 절제된 우측의 전층 피부편을 좌측의 피부 결손부로 인식하고 4-O black silk를 이용하여 봉합하여 고정시켰다. 마지막으로 우측의 피부 결손부를 4-O black silk를 이용하여 직접 창상을 봉합하였다.

이식술후 1일, 3일, 8일, 16일 째에 각각 세마리씩 희생시켜 광학현미경 검사 및 면역조직화학검사를 위한 피험재료를 적출하였다.

3. 광학현미경 검사

적출된 피험재료의 일부를 동결시킨 후, 동결박절기(Erma Co.)를 사용하여 10u 두께의 동결절편 10장을 제작하였다. 그중 한장은 Hematoxylin-Eosin 염색을 시행하고, 나머지 9장은 -70°C의 냉장고에 보관시켰다.

10장을 제작하고 남은 조직블럭을 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후, 통법에 의해 4u 두께의 파라핀절편을 제작하였다. 제작된 파라핀절편을 Hematoxylin-Eosin 중염색시킨 후, 앞서 만들어낸 동결절편과 비교하면서 광학현미경으로 검경하였다.

4. 면역조직화학검사 (표 2)

보관하였던 9장의 동결절편을 10분간 실온에서 건조시켰다가 3.5%의 중성 포르말린 용액에 30분간 고정시킨 후, 10mMol의 Phosphate buffered solution으로 수세하였다. 0.3% 과산화수소에 5분간 부란후 동일한 시약으로 수세하고, 다시 blocking serum으로 20분간 부란시켰다. 그리고나서 mouse에서 추출해 낸 범 T 세포, 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포에 대한 각각의 단일클론항체들(W3/13, W3/25, MRX OX-8 : Cedarlane Co.)로 30분간 부란후 수세하고, 다시 제2차 항체로 30분간 부란후 수세하였다.

이상 ABC 방법을 사용하였으며 염색재료는 아미노에칠카바졸(Aminoethylcarbasole : AEC)을 사용하였다.

양성반응을 보이는 T 임파구는 검경하기 위해 200배율 하에서 임의로 5군데를 선정하여 세포의 빈도를

표 2. Staining Steps in Immunohistochemistry

1. Defreezing and drying in room temperature
2. Hydration in alcohol
3. PRS Rinsing
4. Block endogenous peroxidase with 80% methanol containing 0.6% H₂O₂
5. Sreum Blocking agent
6. Primary antibody
7. Biotinylated secondary antibody
8. ABC reagent
9. Chromogen and Substrate
10. Mayer's hematoxylin
11. Mounting using glycerol gelatin

검경후 음성, 미세한 반응, 경도의 반응, 중등도의 반응, 고도의 반응 등 5등급으로 구분하였으며, 오차를 줄이기 위해 판독은 숙련된 전문가에 의해 시행되었다.

III. 실험성적

1. 1일군 (표3, 표4)

광학현미경 소견상 피부 이식편 하방으로 염증세포의 침윤 및 고도의 출혈 현상이 관찰되며, 간질조직 사이의 심한 부종의 양상을 보이고 있다. 또한 주위 혈관조직의 염증반응이 보인다.

면역조직화학검사 소견상 범 T 세포들이 이식된 피부 주위에서 일부 관찰되었다.

2. 3일군 (표3, 표4)

광학현미경 소견상 단핵구와 거대세포의 침윤 및 중등도의 조직내 출혈 현상이 관찰되며, 간질조직은 중등도의 부종의 양상을 보이고 있다. 또한 주위 혈관조직의 미세한 염증반응이 보인다.

면역조직화학검사 소견상 광학현미경 하에서 경도의 범 T 세포 및 세포독성 T 세포들이 이식된 피부 주위에서 관찰되었다.

3. 8일군 (표3, 표4)

광학현미경 소견상 단핵구와 거대세포의 침윤이 드물게 관찰되었으며, 출혈 및 부종현상은 거의 관

표 3. Histochmeical Results after skin autograft

responses / days	1	3	8	16
extensive interstitial mononuclear cell infiltration	-	+	+	-
edema	++	+	+	+
interstitial hemorrhage	+++	++	+	-
macrophage	-	+	+	-
vasculitis in arteriole & capillary.	++	+	+	+/-
interstitial fibrosis	-	-	+/-	+/-
destruction of muscle				

표 4. Immunohistochemical results after skin autograft

types of lymphocyte / days	1	3	8	16
T - cell	+/-	+/-	++	-
Cytotoxic T - cell	+/-	+	+	-
Helper T - cell	+/-	+	++	-

찰되지 않았다. 간질조직에서 섬유성 결체조직의 형성이 관찰되었다.

면역조직화학검사 소견상 이식된 피부 주위에서 중등도의 범 T 세포 및 헬퍼 T 세포의 출현이 관찰되며, 세포독성 T 세포들은 미세하게 관찰되었다.

4. 16일군 (표3, 표4)

광학현미경 소견상 염증세포의 침윤이 관찰되지 않았으며, 출혈 및 부종 현상도 거의 관찰되지 않아 정상 소견을 보였다. 섬유화된 간질조직의 형성이 관찰되었다.

면역조직화학검사 소견에서 범 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포는 모두 전혀 관찰되지 않았다.

IV. 총괄 및 고안

자가피부이식의 생착과정은 일반적으로 4기로 나뉘는데, 제1기는 조직의 순환기이고, 제2기는 혈관 문합기이며, 제3기는 혈관 재생기, 그리고 제4기는 혈행완성기로 구분되는데, 그 생착기전에 관해서는

Hynes(1954), Henly(1961), Hinshaw(1965), Friksson(1968), Eriksson(1972), Smahel(1977) 등 많은 선학들의 연구보고가 있다.

본 실험에서는 병리조직학적 소견상 간질조직에서 단핵구와 거대세포의 침윤 정도는 3일째와 8일째에서 경도의 상이 관찰되었으며, 조직구의 출현은 3일째에는 경도의 반응이, 8일째에서 경도의 상이 관찰되었다. 수술후 부종은 1일째 중등도의 상이 나타났으나 3일째에 이미 경도의 상으로 변화되었으며, 간질조직의 출혈상은 1일째에 강한 반응이 나타났지만 3일째에는 중등도, 8일째에는 경도였으며, 16일째에는 거의 사라졌다. 혈관주위에 나타나는 혈관염증은 대체로 경도의 반응이 보였으며 16일째에는 미약한 반응이 관찰되었다(표 3). 이러한 소견은 선학들의 연구보고와 일치하며, 전층 피부이식 후의 정상적인 치유과정을 거치고 있는 것으로 생각된다.

이식의 성공 또는 실패에 중요한 거부반응은 이식을 방해하기 위해 본질적으로 만들어진 것은 아니며, 오히려 적의 환경에 반대하여 방어하기 위하여 숙주에 의해 소유된 인식과 방어작용인 면역반응으로서 일어나는 것이다. 면역반응은 숙주에 대한 이물질로부터 몸진체를 방어하기 위한 수단으로 체액성 면역반응과 세포 매개형 면역반응의 두가지가 적용된다. 체액성 면역반응은 B Cell에 의해 형성된 혈청항체에 의해 매개되는 반면, 세포매개형 면역반응은 T Cell에 의존한다. 그러나 사실상 면역반응은 거의 배타적인 세포형이나 체액성 반응이 따로 나타나는 것이 아니라, 면역세포의 여러가지 형태 사이에서 매우 복잡한 상호작용을 가진 두가지 반응의 복합체인 것이다.

이러한 면역세계는 다음 세가지 형태로 가장 잘 표현될 수 있다. 즉, 항원의 특수성, 기억, 그리고 Self-antigen과 Nonself-antigen 사이의 인식능력이다. 면역반응시에는 이물질의 중화와 인식을 하는 정교한 특수성이 있다. 예를들어 T 임파구는 trinitropebulylated 항원과 dinitropebulylated 항원을 구별할 수 있으며, 면역계가 같은 항원에 재노출되었을 때 더욱 효과적으로 반응하도록 기억한다. 그리하여 면역계는 self-antigen과 Nonself-antigen을 구별하게 되고 자기자신의 조직이 침범되지 않게 이물항원을 효과적으로 공격하게 된다.

이식거부는 숙주가 이식조직을 이물로서 인식하

는데 달려있다. 거부반응은 세포매개면역과 순환항체가 그 역할을 하는 매우 복잡한 과정으로 이식거부에서 T세포의 역할은 인간 및 동물실험에서 논란이 되어왔다^{2,34,40}. T 세포매개 반응은 세포독성 T 세포(Cytotoxic T Lymphocyte : CD+8)의 활성화 된 보조 T 세포(Helper T Lymphocyte : CD+4)들에 의해서 촉발된 지연과민반응에 관계되는데, 수용자 임파구가 공급자의 HLA항원과 접촉될 때 개시된다.

공급자 임파구는(통행 임파구) 특히 이식물내 함유된 수지상세포(dfendritic cell)가 가장 중요한 면역원이며 class I과 class II 항원 모두가 풍부하다. CD4+ 보조 T 세포는 class II 항원의 인식에 의해 증식이 촉발되는데 이는 시험관내의 혼합 임파구반응에는 보는 것과 유사하다. 또한 CD8+ CTL(pre-killer cell)의 전구물은 class I HLA 항원에 대한 수용체를 갖고 있어 성숙한 CTLs로 분화된다. 이러한 분화과정은 복잡하고 완전히 이해되지 못하고 있지만, antigen presenting cells, T cell subsets와 IL-1, II-2 같은 cytokines유리간의 상호작용에 의해 이루어진다고 한다^{2,34,40}.

특히 세포독성 T 세포, 림포카인 유리 CD4+ T 세포는 지연과민반응에서처럼 감각에 의해 생성되며, 그 결과로 혈관 투과성 증가와 단핵구세포(임파구, 대식세포)의 국소적 축적을 일으킨다. Dvorak(1986)²⁰등에 의하면 지연과민반응은 미세혈관 손상, 조직허혈, 축적된 대식세포에 의해 매개된 파괴가 이식체 파괴(graft lysis)의 중요한 기전이라고 하였다.

기능적으로 뚜렷한 T세포 아형이 많은 종에서 확인되었다. 백서에서는 말초 Tf 림파구가 W3/13(pan T)에 의해 확인되었는데, 두개의 비중복 아형인 W3/25(helper/inducer T cells)와 MRC OX-8(cytotoxic/suppressor T cell)을 함유하고 있다⁷. W3/25는 T세포의 subset에 부착하여 항합텐 항체반응에 관계하는 B세포를 위해 도움을 주며³⁹, 치명적인 graft-versus-host 질환과 국소적인 graft versus-host 반응을 매개한다⁴⁰. 또한 W/325+세포 아형은 혼합 임파구배양에서 잘 성장하며 세포독성 T세포들의 전구물에 대한 보조 호라성을 제공한다⁴². W3/25+세포들은 기관 동종이식에 대한 지연과민 반응을 잘 나타낸다고 한다²².

MRC OX8은 말초 T 세포들에는 결합(bind) 하

지만 W3/25 항체에는 반응하지 않는다⁷⁾. 이러한 MRC OX8 세포들은 억제세포를 매개하거나^{7,40)}, 동종항원에 대한 세포매개 세포독성반응을 매개한다³⁷⁾. 또한 치명적인 이식체 대 숙주 질환을 유발하기도 하고³⁰⁾, 백서에서의 W3/25 세포들은 생쥐에서의 Lyt 1+, 인간에서의 OKT4+ 과 같은 유도/개시/지연형 과민세포들이며, 백서에서 MRC OX8+ 세포들은 mice에서의 Lyt+, 인간에서 OKT8+ 과 같은 세포 독성/억제 T 세포들이다⁷⁾.

Hall²⁴⁾ 등의 연구에서는 W3/25 세포들만이 방사선 조사 백서에서 관찰되었는데, 실험에 사용한 방사선 양으로 소입과구의 99.9%를 파괴시켰다고 하는데, 이는 B 세포와 억제/세포독성 세포 반응이 보조 T 세포 기능보다 방사선에 민감하기 때문이며¹⁾, 숙주 입과구 중 동종이식 반응 초기에는 W3/25세포가 남기 쉽다.

최근 단일항체 W3/25는 활성화된 대식세포에도 결합한다는 것이 밝혀졌다²²⁾. 따라서 이식물에 침윤된 W3/25 단핵세포들은 거의 대부분 입과구이다. Dallman¹⁷⁾과 Mason³⁰⁾ 등은 갑상선 절제, 방사선 조사를 하고 백서에 피부 동종이식을 하였는데, 피부 동종이식에 효과적이기 위해 필요한 것은 W3/25 세포이며, MRC OX8과 W3/25, 대식세포들이 거부된 이식물에서 존재한다고 하였다. 또한 B 백서는 MRC OX8+ Natural killer cell들을 갖고 있는데, W3/25세포가 축적되기 전에 2차량의 전신 방사선 조사를 하면 확실히 사라지고, W3/25세포들은 다른 세포에 변화를 주지 않고 효과적 조직파괴를 일으킬 수 있다.

Hall(1983)^{25,26)} 보조/유도 T 세포들이 피부 및 다른 장기 이식에 대한 동종이식 반응에 일으킨다는 것을 밝히지는 못했어도 보조/유도 T 세포가 잠재성 효과 T 세포(potent effector cells)일 수 있다고 하였다. 보조/유도 T 세포가 직접 이식 손상을 주는지, 또는 조직의 실제적 파괴를 일으키는 다른 세포를 활성화 시키는지는 아직도 밝히지 못하고 있다. 무엇보다도 유도/보조 T세포가 이식파괴의 매개물이며, 지연형 과민반응이 이식파괴에 있어서 잘 알려진 세포독성 T 세포보다 더 중요할 수도 있다고 하였다.

본 실험의 면역조직화학검사에서 범 T 세포는 1일군과 8일군에서 미약한 반응을 보였고, 8일군에서 중등도의 반응이 관찰되었다. 한편 보조 T 세포는

3일군에서 미세하게 나타나기 시작하여 8일군에서 중등도의 반응이 있었고, 세포독성 T 세포는 3일군과 8일군에서 미세한 반응이 있었으며, 16일군에서는 3가지 모두 음성으로 나타났다(표 4). 따라서 자가 피부이식시 면역반응을 극히 미세하게 나타내며, 이러한 반응들은 16일 후에는 이미 정상으로 회복되는 것을 알 수 있다.

V. 결론

본 저자는 백서의 자가 피부이식후 수용부에서의 조직반응 및 MHC molecule에 T 입과구의 적응능력에 있어서의 이상 여부를 알기 위하여, 범 T 세포, 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포의 구성변화 양상을 살펴보고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 광학현미경 소견상 이식된 자가피부조직의 간질 조직의 출혈상은 수술후 1일군에서 고도의 반응이 관찰되었으며, 3일군에서는 중등도, 8일군에서는 경도의 반응이 관찰되었고, 16일군에서는 거의 사라졌다.
2. 광학현미경 소견상 단핵구는 3일군과 8일군에서 경도의 반응이 관찰되었고, 조직구 침윤은 3일군에서 경도, 8일군에서 중등도의 반응이 관찰되었다.
3. 면역조직화학적 소견상 1일군에서 범 T 세포의 미세한 출현이 관찰되었고, 3일군에서는 경도의 범 T 세포 및 세포독성 T 세포들의 출현이 관찰되었으며, 8일군에서는 중등도의 범 T 세포, 보조 T 세포의 침윤상의 관찰되었으나, 16일군에서는 전반적으로 T 세포의 출현이 관찰되지 않았다.
4. 이상의 소견으로 미루어 이식된 자가피부조직의 주위에서 3일군과 8일군에서 고도의 염증 변화가 나타나지만, 병리조직학적 및 면역조직학적인 반응이 16일군에서는 정상으로 회복되는 것을 알 수 있다.

REFERENCE

1. Anderson R. E. and Warner N. L. : Ionizing radiation & the immune response. Adv. immunol. 24 : 215, 1976.

2. Rach F. and Sachs D. H. : Transplantation immunology. *N. Eng. J. Med.* 37 : 489, 1987.
3. Barclay A. N. : The localization of population of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissue. *Immunology* 42 : 593, 1981.
4. barclay A. N. : The location of populations of lymphocytes defined with monoclonal antibodies in rat lymphoid tissue. *Immunology* 42 : 593-600, 1981.
5. Bell W. H. : Surgical correction of dentofacial deformities. 3 : 411, 1985.
6. Bently F. H. and Schlopp W. : Experiments on the blood supply of nerves. *J Physiol.* 102 : 62, 1943.
7. brideau R. J., Carter P. B., McMaster W. R., Mason D. W. & Williams A. F. : Two subsets of rat T lymphocyte defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 10 : 609, 1980.

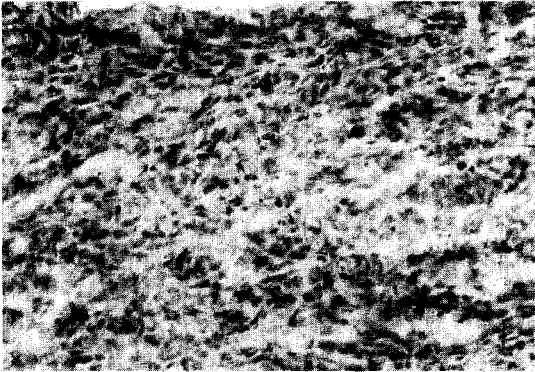


Fig. 1 : Autogenous skin graft 1 day after surgery.
Pan T cells were observed.(X100)

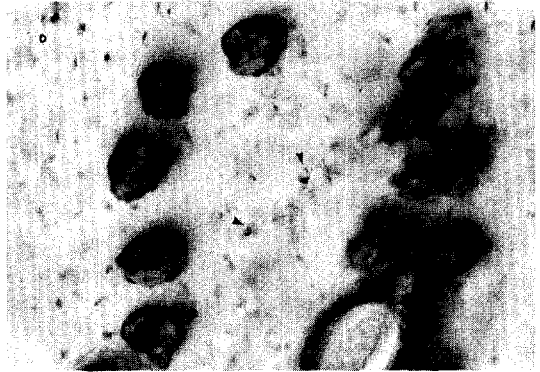


Fig. 2 : Autogenous skin graft 1 day after surgery.
Pan T -cells were observed.(X200)

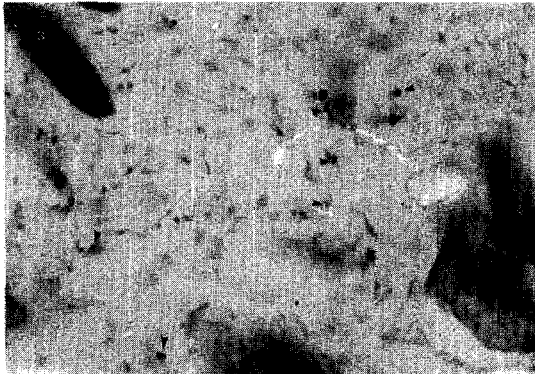


Fig. 3 : Autogenous skin graft 3 days after surgery.
Helper T - cells were observed.(X100)

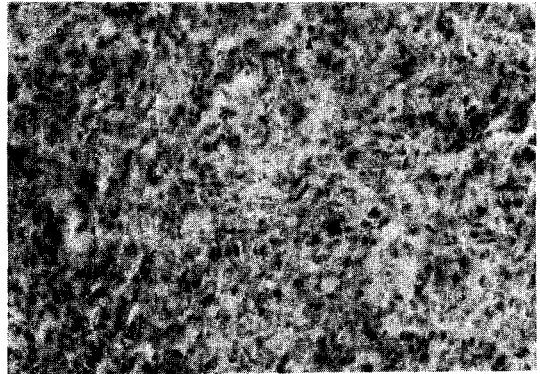


Fig. 4 : Autogenous skin graft 3 days after surgery.
Helper T - cells were observed.(X200)

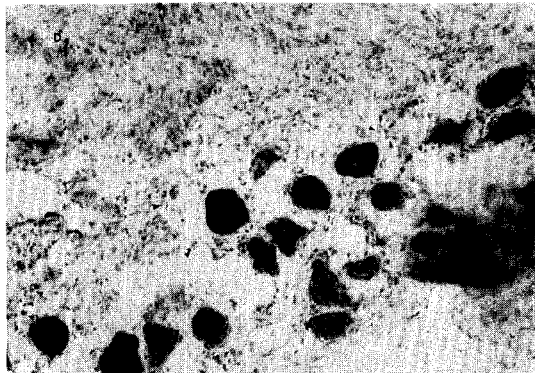


Fig. 5 : Autogenous skin graft 8 days after surgery.
Cytotoxic T - cells were observed.(X100)

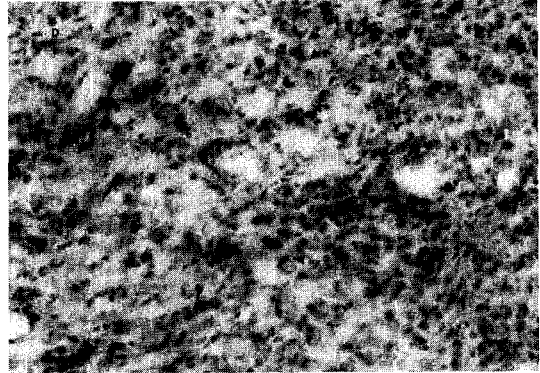


Fig. 6 : Autogenous skin graft 8 days after surgery.
T - helper cells were observed.(X200)

논문사진부도 및 설명 ②

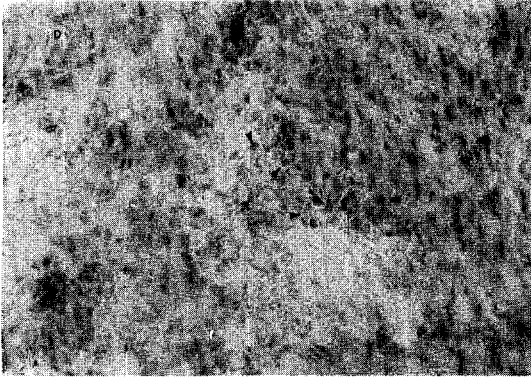


Fig. 7 : Autogenous skin graft 8 days after surgery.
Cytotoxic T - cells were observed.(X200)

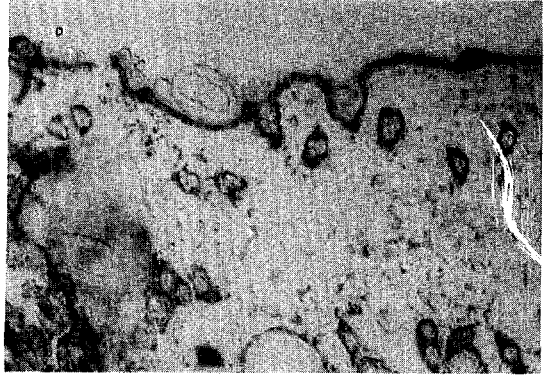


Fig. 8 : Autogenous skin graft 16 days after sur-
gery.
No T - cells(lymphocyte) were observed.
(X40)