

마우스에 있어서 에이코사펜타엔산이 免疫反應에 미치는 影響 (I)

I. 體液性 免疫

安榮根·金正勳·李相根·金杏順

圓光大學校 藥學大學

(Received December 26, 1988)

The Effect of Eicosapentaenoic Acid on the Immune Response in Mice(I) I. Humoral-mediated immunity

Young Keun Ahn, Joung Hoon Kim, Sang Keun Lee and Haeng Soon Kim

College of Pharmacy, Won Kwang University

Abstract—The humoral immune response of Eicosapentaenoic acid(EPA) was investigated in mice. ICR male mice were divided into 8 groups and received intraperitoneal injection of EPA(5 mg, 10 mg, 20 mg/kg) for 4 weeks. Cyclophosphamide(5 mg/kg) was administered i.p. 2 days prior to secondary immunization. Humoral immune response was evaluated by antibody titer, hypersensitivity to SRBC (Arthus), plaque forming cell(PFC) and organ weight.

The obtained results were as followings: The increased rate of body weight, the ratio of liver weight, spleen weight to body weight were decreased by all EPA administration groups as compared to normal group. HA titer, HY titer and Arthus reaction were enhanced according to the increase of EPA doses as compared to normal group. PFC was significantly enhanced by EPA 10 mg administration group. These results suggest that EPA enhances humoral immune response to SRBC in mice, indicating that EPA may block a immunoglobulin synthesis inhibition of arachidonic acid.

Eicosapentaenoic acid(以下: EPA)는 arachidonic acid(以下: AA)와 비슷한 構造의 多價 不飽和脂肪酸으로서, 生鮮 및 魚油에 主로 含有되어 있다. 고래, 生鮮 및 물개 등을 主食으로 하는 Greenland Eskimo인들의 虛血性心臟疾患으로 인한 死亡率이 낮고,¹⁻³⁾ bleeding time이 延長되며⁴⁻⁷⁾ 血漿의 cholesterol과 triglyceride值가 低下된 點에 關心이 注目되기 시작한 以來,⁸⁻¹⁵⁾ EPA의 血小板凝集抑制作用과 降壓作用 등에 關하여 研究가 活發히 進行되어 왔고¹⁶⁻²⁶⁾ 最近에는 EPA가 AA에 對하여 競爭的으로 代謝를 抑制하여 抗炎症作用을 나타낼 것이라는 研究들이 報告되었다.²⁷⁻³⁰⁾

EPA는 cyclooxygenase와 lipoxygenase에 의한 두 經路로 代謝되며, 높은 結合反應力을 가지고

있어서, 同一한 經路로 代謝되는 AA의 酸化를 競爭的으로 抑制하여 AA의 代謝產物인 leukotriene B₄의 生成을 用量依存的으로 沮害한다고 報告되었다.³¹⁻³³⁾ 또한 EPA는 여러 細胞에서 cyclooxygenase에 의해 酸化되어, prostaglandin endoperoxide를 生成하고, 이 prostaglandin endoperoxide는 prostaglandin synthetase에 의해 prostaglandin I₃, prostaglandin E₃, prostaglandin D₃, prostaglandin F_{3α} 및 thromboxane A₃로 되어, prostaglandin I₃는 血小板凝集을 抑制하고, 血小板의 adenylate cyclase 活性을 增加시키는 血管擴張作用을 하며, thromboxane A₃는 血小板의 cyclic AMP를 增加시킴으로써, 다른 agonist에 의한 血小板凝集을 抑制하고, 血小板의

phospholipase A₂를 活性化시키는 要因을 抑制한다고 한다.³¹⁾

또한, EPA는 宿主의 炎症反應과 關連있는 細胞에서는 5-lipoxygenase에 의해 酸化되어 5-hydroperoxyeicosapentaenoic acid와 5-hydroxyeicosapentaenoic acid를 生成하고, 5-hydroperoxyeicosapentaenoic acid는 血小板凝集 및 serotonin 遊離를 阻害하며, dehydrase에 의하여 leukotriene A₅로 된다.^{29,32)} Leukotriene A₅는 epoxide hydrolase에 의하여서는 leukotriene B₅로 되고, 이 leukotriene B₅는 사람의 多形核白血球의 遊走作用과 凝集反應을 增進하는 作用이 있으나 이러한 作用은 arachidonic acid의 代謝產物인 leukotriene B₄에 比하여 効力이 1/10 정도이다.^{29,34,35)} 한편, leukotriene A₅는 glutathione-S-transferase에 依해서는 leukotriene C₅, leukotriene D₅ 및 leukotriene E₅로 轉換된다. Leukotriene C₅는 AA의 代謝產物인 leukotriene C₄에 匹敵할 만한 平滑筋 收縮作用을 지니고 있다.^{34,36)} Ahmed 등은 肝油가 thrombin으로 誘導된 血小板凝集을 有意性있게 減少시켰다고 報告하였고,⁷⁾ Singer 등은 高等어油를 投與하여 血清 triglycerides, total cholesterol 및 lecithin cholesterol acyltransferase 活性이 顯著히 減少되었다고 報告하였으며,³⁷⁾ Yoshimura 등은 rabbits에 있어서, EPA-E capsule을 投與하여 angiotensin II의 昇壓效果에 對한 反應이 有意性있게 減少하였다고 報告하였다.²⁵⁾ 또한, Goldman 등은 EPA의 代謝產物인 leukotriene B₅가 AA의 產物인 leukotriene B₄에 比하여 사람의 好中球에 對한 遊走反應力이 1/10~1/30로 弱하다고 報告하였다.²⁷⁾ 한편, cyclophosphamide(以下: CY)는 臨床에서 抗癌劑로 널리 쓰이고 있는 藥劑로써 免疫系에 미치는 影響은 CY의 LD₅₀의 1/2 정도를 動物에 投與할 때, suppressor T cell을 選擇적으로 抑制하여, 體液性 免疫反應은 顯著히 低下시키지만, 細胞性 免疫反應은 오히려 亢進되었다고 報告된 바 있다.³⁸⁻⁴⁰⁾

이와같이, EPA의 生體機能에 對한 研究는 많이 進行되어 왔으나, 이를 免疫反應과 連關시킨 報文은 없는 실정이다. 따라서 本 著者 등은 體液性 免疫을 低下시키는 AA의 代謝를 競爭적으로 抑制하는

EPA의 體液性 免疫 亢進作用이 期待되어, 本 實驗을 實施한 바 有意性있는 結果를 얻었기에 이를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗動物

生後 5~6週齡 體重 17~21g의 ICR male mouse를 경남축산(경기도 화성군 소재)에서 分讓받아 市販飼料로 1週間 給食시켜 適應시킨 後에 30마리를 1群으로 하고 全體를 8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. 供試 藥物의 調製 및 投與

Eicosapentaenoic acid 溶液의 調製 및 投與—Eicosapentaenoic acid(Sigma, Co. Ltd)를 corn oil에 溶解하여 體重 Kg當 5mg, 10mg, 20mg를 各 實驗群에 4週間 1日, 1回 一定한 時刻에 腹腔內에 注射하였다.

Cyclophosphamide 溶液의 調製 및 投與—Cyclophosphamide(Endoxan, Astawerke, Brackwede, Germany)는 使用 直前に 생리식염수에 溶解시켜 2차免疫 2日前에 5mg/kg를 腹腔內에 1回 注射하였다.

3. 體重 및 臟器의 重量計測

體重—實驗動物의 體重은 供試藥物投與 開始日과 最終日 約 24時間 前에 絶食시킨 後 同一한 時間에 測定하였다.

臟器의 重量—最終 藥物投與 2日後에 實驗動物의 頸動脈을 切斷 採血한 後 肝臟, 脾臟 및 胸腺을 各 各 摘出하여 그 重量을 測定하여 對 體重 百分比를 求하였다.

4. 抗原의 調製 및 免疫

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'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: PBS)으로 3回 遠心 洗滌한 後 적절한 濃度로 Hanks balanced salt solution(以下: HBSS, Gibco Laboratories

Co.)에 浮游하여 使用하였다.

免疫—遠心 洗滌한 s-RBC를 Reed 等の 報告를 參考하여 HBSS에 1×10^8 s-RBC/ml의 濃度로 浮遊하고 浮游液 0.1ml (1×10^7 s-RBC)를 마우스에 尾靜脈에 注射하여 免疫하였다.⁴¹⁾ 2次 免疫은 1次 免疫 4日 後에 마우스의 左側後肢足蹠皮內에 2×10^9 s-RBC/ml 浮游液 0.05ml (1×10^8 s-RBC)를 注射하여 免疫하였다.⁴²⁾

5. 血清의 分離 및 非動化

마우스의 頸動脈을 切斷하여 血液을 採取 凝固시킨 後 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.

6. 赤血球 凝集素價, 溶血素價 및 2-mercaptoethanol(以下: 2-ME) 耐性凝集素價의 測定⁴²⁾

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(Nunclon 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 HBSS로 2倍 系列로 稀釋한 後 HBSS에 浮游한 0.5% s-RBC 0.025 ml를 잘 混合한 다음 37°C에서 18時間 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.

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 ml씩 加한 다음 37°C에서 1時間 放置하여 溶血與否를 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.

2-ME 耐性凝集素價의 測定—各 血清의 2-ME 耐性凝集素價를 判定하기 爲하여 0.15 N 2-ME (Eastman kodak Co.)로 血清을 處理하여 2-ME 耐性抗體를 immunoglobulin G 抗體로, 2-ME로 處理하기 前의 抗體를 2-ME 感受性 抗體 또는 immunoglobulin M 抗體로 判讀하였는데 判讀方法은 다음과 같이 實施하였다. 즉 血清의 2-ME 處理은 0.15 N 2-ME가 含有된 HBSS로 血清을 稀釋하고 蒸發하지 않도록 tray를 密對하여 37°C에서

30分間 放置한 後 s-RBC를 加하여 凝集素를 上記한 方法으로 檢査하였다.

7. 足蹠腫腸反應 檢査(Foot pad swelling test)

Arthus 反應(antibody mediated hypersensitivity)을 測定하기 爲하여 Reed 等이 記述한 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다.⁴¹⁾ 즉 1次 免疫 4日 後에 s-RBC 0.05ml (1×10^8)를 마우스의 左側後肢足蹠에 皮內注射하였다. 注射 後 一定 時間 經過한 後 腫腸의 두께를 0.01mm 눈금 microcaliper(Mitutoyo Mfg. Co. Ltd.)로 測定하였으며 腫腸程度의 測定價는 測定에 따른 誤差를 피하기 爲하여 2回 測定한 數值를 平均하였다. 判讀基準은 sugimoto의 判讀基準에 따라 3時間 經過 後의 反應을 Arthus 反應으로 간주하였다. 足蹠腫腸指數는 다음과 같이 하였다.⁴³⁾

$$\text{Foot pad swelling index} = \text{(FPSI)}$$

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

8. 脾臟細胞의 溶血斑 形成細胞數에 미치는 影響 (Plaque forming cell: 以下 PFC)

1) 脾臟細胞의 溶血斑 形成細胞數의 測定은 Cunningham의 方法을 利用하여 다음과 같이 行하였다.⁴⁴⁾ 摘出した 脾臟을 氷냉의 HBSS와 함께 粉碎하여 脾臟細胞를 遊離시키고 400×g에서 5分間 遠心分離하였다. 상층액을 除去 後 37°C의 0.83% NH₄Cl 溶液에 乳遊시켜 3分間 放置하여 赤血球를 溶解시켰다. 다시 遠心分離하여 氷냉의 HBSS에 浮游시켜 赤血球 除去, 脾臟細胞數를 血球計算板에서 檢鏡 觀察하였다.

2) s-RBC를 PBS로 4回 洗滌하고(400×g, 5分) 마지막 洗滌 後 PBS에 4×10^9 s-RBC/ml의 濃度로 浮游시켰다.

3) 4×10^9 s-RBC 250 μl, guinea pig complement(Gibco Lab. Ltd) 500 μl를 혼합하여 ice bath上에서 30分間 放置 後 使用하였다.

4) 上記 guinea pig complement와 4×10^9 s-RBC 혼합액 150 μl, 脾臟細胞 浮游液 650 μl를 잘 혼합하여 microchamber(Takahashi Giken Glass 76×26 mm)에 100 μl씩 注入하고 wax-vaseline(1:1)으로 밀봉하여 CO₂ incubator

(37°C)에서 1時間 배양 後 形成된 溶血斑 形成細胞 數를 간접광선하에서 測定하였다.

5) 100만개의 脾臟細胞中 溶血斑 形成細胞數 (PFC/10⁶ spleen cells) 및 脾臟細胞 全體中의 溶血斑 形成細胞數 (PFC/total spleen cells)를 다음 式에 따라 計算하였다.

$$PFC/10^6 \text{ spleen cells} = \frac{N}{C \cdot V_m \cdot a} \times 10^6$$

$$PFC/total \text{ spleen cells} = \left(\frac{PFC}{10^6 \text{ spleen cells}} \right) \cdot C \cdot V_s$$

단, $a = \frac{650}{800}$ (배양혼합액 中의 脾臟細胞 乳遊液의 比率)

N : the number of plaque observed in microchamber

C : the count of spleen cells in 1 ml of spleen cell suspension

V_m : Volume of incubation mixture filled into a microchamber(ml)

V_s : total volume of spleen cell suspension(ml)

통계분석: 모든 data의 유의성 검정은 student's t-test로 行하였다.

實驗結果

Mouse에 있어서 免疫反應에 미치는

Table I—Effect of EPA on the body weight of mice

Group	Initial wt. (gm)	Final wt. (gm)	Increased rate (%)
Normal	18.03 ± 1.64	28.45 ± 4.57	53.19 ± 8.06
EPA5mg	18.18 ± 1.45	29.55 ± 3.09	53.04 ± 21.09
EPA5mg + CY	17.70 ± 1.18	31.07 ± 2.16	67.96 ± 7.93**
EPA10mg	18.36 ± 1.22	27.00 ± 3.83	41.60 ± 15.25*
EPA10mg + CY	17.33 ± 1.03	28.50 ± 4.23	64.42 ± 24.11
EPA20mg	18.35 ± 1.36	27.00 ± 3.83	41.60 ± 15.25*
EPA20mg + CY	16.22 ± 0.82	32.51 ± 2.33	99.56 ± 16.15**△△
CY	17.99 ± 1.74	31.26 ± 3.03	74.79 ± 19.05**

Each value is the mean ± S.D.
 Significant difference from the normal group (*, p < 0.05, **, p < 0.01)
 Significant difference from the cyclophosphamide group (△△, p < 0.01)

eicosapentaenoic acid의 影響을 究明하고자 實施한 本 實驗의 結果는 다음과 같다.

1. 體重, 肝臟, 脾臟 및 胸腺의 重量變化

體重的 變化—各 群의 體重的 增加率은 Table I과 같다.

正常群이 53.19 ± 8.06%의 體重增加率을 보인 반면에 EPA 10 mg, 20 mg 投與群은 各各 41.60 ± 15.25%, 41.60 ± 15.25%로 體重增加率이 有意性 있게 減少하였고, CY 投與群은 74.79 ± 19.05%로 正常群에 比하여 顯著하게 增加하였으며, EPA 5 mg, 10 mg와 cyclophosphamide를 併用 投與한 群은 各各 67.96 ± 7.93%, 64.42 ± 24.11%로 體重增加率이 正常群에 比하여 增加하였으나 CY 投與群에 比해서는 減少하였고, EPA 20 mg와 CY 併用 投與群은 99.56 ± 16.15%로 正常群과 CY 投與群에 比하여 顯著히 增加하였다.

肝臟의 重量變化—各 群의 肝臟의 重量變化는 Table II에서 보는 바와 같다.

肝臟 對 體重重量比가 正常群이 3.93 ± 0.50%인데 比하여, EPA 20 mg와 CY 併用 投與群이 4.09 ± 0.54%로 有意性없는 增加를 보였고 그 以外의 全群에서 減少하는 傾向을 보였다.

脾臟, 胸腺의 重量變化—脾臟의 重量은 Table III에서 보는 바와 같다.

脾臟 對 體重重量比에서 正常群이 0.64 ± 0.15%인데 比하여 EPA 10 mg, 20 mg와 CY를 併用 投與한 群은 各各 0.52 ± 0.08%, 0.51 ± 0.04%로 有意性있는 減少를 보였으나, 그 以外의 全群에서는 正常群과 큰 差異가 없었다.

Table II—Effect of EPA on the liver weight of mice

Group	Liver wt.(gm)	Liver wt. × 100(%) Body wt.
Normal	1.13 ± 0.26	3.93 ± 0.50
EPA 5mg	0.99 ± 0.38	3.94 ± 0.66
EPA 5mg + CY	1.36 ± 0.63	3.39 ± 0.90
EPA 10mg	1.01 ± 0.14	3.77 ± 0.47
EPA 10mg + CY	1.01 ± 0.21	3.60 ± 0.38
EPA 20mg	0.99 ± 0.21	3.71 ± 0.59
EPA 20mg + CY	1.33 ± 0.18	4.09 ± 0.54
CY	1.19 ± 0.33	3.76 ± 0.78

Each value is the mean ± S.D.

Table III—Effect of EPA on the lymphoid organ weight of mice.

Group	Spleen wt. (gm)	Spleen wt. Body wt. × 100(%)	Thymus wt. (gm)	Thymus wt. Body wt. × 100(%)
Normal	0.19 ± 0.05	0.64 ± 0.15	0.054 ± 0.017	0.19 ± 0.04
EPA 5mg	0.18 ± 0.08	0.59 ± 0.27	0.055 ± 0.013	0.19 ± 0.05
EPA 5mg + CY	0.20 ± 0.09	0.64 ± 0.29	0.064 ± 0.027	0.21 ± 0.08 ^{△△}
EPA 10mg	0.18 ± 0.07	0.69 ± 0.34	0.056 ± 0.022	0.21 ± 0.07
EPA 10mg + CY	0.15 ± 0.03	0.52 ± 0.08*	0.060 ± 0.030	0.20 ± 0.09 ^{△△}
EPA 20mg	0.16 ± 0.04	0.60 ± 0.18	0.048 ± 0.022	0.17 ± 0.09
EPA 20mg + CY	0.14 ± 0.04	0.51 ± 0.04*	0.064 ± 0.018	0.19 ± 0.05 ^{△△}
CY	0.17 ± 0.06	0.54 ± 0.16	0.054 ± 0.017	0.05 ± 0.02**

Each value is the mean ± S.D.

Significant difference from the normal group. (*, p < 0.05, **, p < 0.01)

Significant difference from the cyclophosphamide group. (△△, p < 0.01)

Table IV—Effect of EPA on the antibody production in mice

Group	HA titer (log ₂)#	MER-HA titer (log ₂)#	HY titer (log ₂)#
Normal	3.60 ± 0.41	2.40 ± 0.35	3.33 ± 0.10
EPA 5mg	4.00 ± 0.70	3.00 ± 0.41**	3.16 ± 0.68
EPA 5mg + CY	2.60 ± 0.35**△△	2.20 ± 0.16△△	1.83 ± 0.68***△△
EPA 10mg	4.00 ± 1.00	3.40 ± 0.02**	3.50 ± 0.25
EPA 10mg + CY	3.25 ± 0.08**△△	2.00 ± 0.90	2.33 ± 1.10*
EPA 20mg	4.80 ± 1.72*	2.20 ± 0.40	4.00 ± 1.63
EPA 20mg + CY	2.20 ± 0.16**	2.20 ± 0.49△△	2.83 ± 0.21**
CY	2.08 ± 0.16**	1.40 ± 0.48**	2.50 ± 0.61**

HA: Hemagglutinin; MER-HA: Mercaptoethanol-resistant HA; HE: Hemolysin

Mice were challenged with 10⁸ SRBC 4 days after sensitization

On the 5th day, HA titer was assayed. Mean ± S.D.(log₂)

Significant difference from the normal group

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

Significant difference from the cyclophosphamide group

(△ , p < 0.05, △△ , p < 0.01)

또한, 胸腺 對 體重重量比는 Table III에서 보는 바와 같이 正常群이 0.19 ± 0.04%인 反面에 EPA 20mg 投與群이 0.17 ± 0.09로 有意性없는 減少를 보였고 CY 投與群이 0.05 ± 0.02%로 매우 顯著히 減少되었으며, EPA 20mg와 CY 併用投與群이 0.19 ± 0.05로 正常群에 比해서는 거의 變化가 없었으나 CY 投與群에 比해서는 顯著한 增加를 보였고, 그 以外の 全群에서 增加하는 傾向이었다.

2. 體液性 免疫에 미치는 影響

赤血球 凝集素價, 溶血素價 및 2-ME 耐性凝集素價—赤血球 凝集素價, 赤血球 溶血素價 및 2-ME 耐性凝集素價는 Table IV와 같다.

赤血球 凝集素價(HA titer)는 正常群이 3.60 ± 0.41이었고, EPA 20mg 投與群이 4.80 ± 1.72로 有意性있게 增加되었으며, CY 投與群은 2.08 ± 0.16으로 正常群에 比하여 顯著하게 減少한 反面에, EPA 5mg, 10mg, 20mg와 CY를 併用投與한 群은 各各 2.60 ± 0.35, 3.25 ± 0.08, 2.20 ± 0.16으로 正常群에 比해서는 顯著하게 減少하였으나 CY群에 比해서는 增加하는 傾向을 보였다.

또한, 赤血球 溶血素價(HY titer)는 正常群이 3.33 ± 0.10이고 EPA 10mg와 20mg 投與群은 3.50 ± 0.25, 4.00 ± 1.63으로 有意性은 없으나 增加傾向을 보였고 CY 投與群은 2.50 ± 0.61로 正常群에 比하여 顯著히 減少되었으며, EPA 5mg, 10mg 및 20mg와 CY 併用投與群은 各各 1.83 ± 0.68, 2.33 ± 1.10, 2.83 ± 0.21로 正常群에 比하여 매우 顯著히 減少하였고, 特히 EPA 5mg와 CY 併用投與群은 cyclophosphamide 投與群에 比하여 有意하게 減少되었다.

한편, 2-ME 耐性凝集素價는 正常群이 2.40 ± 0.35이고 EPA 5mg, 10mg 投與群이 各各 3.00 ± 0.41, 3.40 ± 0.02로서 매우 顯著히 增加한데 比하여 CY 投與群은 1.40 ± 0.48로 顯著한 減少를 보였으며, EPA 5mg, 20mg와 cyclophosphamide를

Table V—Effect of EPA on the Arthus Reaction in mice

Group	Foot pad swelling thickness (10 ⁻¹ mm)	FPSI
Normal	15.96 ± 1.05	10.19 ± 3.26
EPA 5mg	15.80 ± 0.11	10.45 ± 2.90
EPA 5mg + CY	16.14 ± 0.87	9.78 ± 3.37 ^{△△}
EPA 10mg	15.78 ± 0.25	10.52 ± 3.22
EPA 10mg + CY	14.90 ± 0.80	9.64 ± 0.97 ^{△△}
EPA 20mg	15.40 ± 0.11	10.72 ± 3.72
EPA 20mg + CY	16.22 ± 0.94	9.42 ± 3.77 ^{△△}
CY	15.24 ± 0.62	3.96 ± 0.78 ^{**}

Foot pad swelling was measured after the intradermal challenge of 1 × 10⁸ SRBC/ml

FPSI = thickness of foot pad(means, after challenge-
before challenge thickness) / thickness of foot pad before challenge × 100

At 4 hours FPSI was the Arthus reaction.

Each value is the mean ± S.D.

Significant difference from the normal group

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

Significant difference from the cyclophosphamide group

(△△ , P < 0.01)

併用投與한 群은 2.20 ± 0.16, 2.20 ± 0.49로 正常群에 比해서는 有意性없는 減少를 보였으나 CY 投與群에 比하면 顯著히 增加하였다.

Arthus 反應—Arthus 反應의 結果는 Table V에서 보는 바와 같이 足蹠腫脹의 두께가 正常群이 10.19 ± 3.26인데 比하여 EPA 5mg, 10mg 및 20mg 投與群은 有意한 差異가 없었으나 CY 投與群은 3.96 ± 0.78로 正常群에 比하여 매우 顯著한 減少를 보였고, EPA 5mg, 10mg 및 20mg와 CY를 併用投與한 群은 各各 9.78 ± 3.37, 9.64 ± 0.97, 9.42 ± 3.77로 正常群에 比해서는 약간 減少되었으나, CY 投與群에 比하면 顯著히 增加되는 傾向을 보였다.

脾臟細胞의 溶血斑 形成細胞數에 미치는 影響—脾臟細胞의 溶血斑 形成細胞數에 대한 結果는 Table VI에서 보는 바와 같이, 10⁸ 濃度の 脾臟細胞에서는 正常群이 825 ± 154이고, EPA 5mg 投與群은 874 ± 246으로 有意性은 없었으나 약간 增加하였고, EPA 10mg, 20mg 投與群이 各各 1,163 ± 204, 1,072 ± 295로 매우 顯著한 增加를 보인데 比하여 CY 投與群은 397 ± 88로 正常群에 比하여 顯著히

Table VI—Effect of EPA on Hemolytic Plaque Forming Cell (PFC) in mice

Group	PFC/10 ⁶ spleen cells	PFC/spleen(× 10 ³)
Normal	825 ± 154	120 ± 15
EPA 5mg	874 ± 246	132 ± 16
EPA 5mg + CY	604 ± 227 ^{*△}	90 ± 42 [*]
EPA 10mg	1,163 ± 204 ^{**}	174 ± 30 ^{**}
EPA 10mg + CY	605 ± 125 ^{**△△}	90 ± 30 ^{*△}
EPA 20mg	1,072 ± 295 [*]	156 ± 42 [*]
EPA 20mg + CY	491 ± 57 ^{**△△}	72 ± 6 ^{**}
CY	397 ± 88 ^{**}	66 ± 18 ^{**}

ICR male mice were intraperitoneally administered with each samples for 28 days and immunized with 4 × 10⁹ SRBC.

Each value is the mean ± S.D.

Significant difference from the normal group.

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

Significant difference from the cyclophosphamide group.

(△△ , p < 0.05, △△ , p < 0.01)

減少하였으며, EPA 5mg, 10mg 및 20mg와 CY 併用投與群은 各各 604 ± 227, 605 ± 125, 491 ± 57로 正常群에 比하여 顯著히 減少된 反面, CY 投與群에 比해서는 顯著히 增加하는 傾向을 보였다.

또한, 10³ 濃度の 脾臟細胞에서는 正常群은 120 ± 15이고 EPA 5mg 投與群은 132 ± 16으로 有意性없는 增加를 보였고 EPA 10mg와 20mg 投與群은 各各 174 ± 30, 156 ± 42로서 顯著한 增加를 보인데 比하여 CY 投與群은 66 ± 18로 매우 顯著히 減少하였으며 EPA 5mg, 10mg 및 20mg와 CY 併用投與群은 各各 90 ± 42, 90 ± 30, 72 ± 6으로 正常群에 比하여 有意性있게 減少하였고 特히 EPA 10mg와 CY 併用投與群은 CY 投與群에 比해서 有意한 增加를 보였다.

考 察

Eicosapentaenoic acid는 生鮮 및 魚油에 主로 含有되어 있는 多價不飽和脂肪酸으로서 細胞內에서 cyclooxygenase와 lipoxxygenase에 依한 두 經路로 代謝되는데, 높은 結合反應力을 가지고 있어서 同一한 經路에 依한 arachidonic acid의 代謝를 競爭의으로 抑制하며, lipoxxygenase에 依한 AA로부

터 leukotriene B₄의 생성을 용량依存的으로沮害한다고報告된 바 있다.²⁹⁾

AA의代謝物인 prostaglandins과 leukotrienes이體液性免疫에 미치는影響에關한報告로는, Bailey 등은 leukotriene D₄와 leukotriene E₄가 *in vitro*에서 murine의脾臟細胞에 의한 immunoglobulin 生成을沮害할 수 있다고報告하였고,⁴⁵⁾ Atluru 등은 leukotriene B₄만이 사람의末梢血液單核細胞의 immunoglobulin 合成을抑制할 수 있다고報告하였으며,⁴⁶⁾ Melmon 등은 prostaglandin이抗體形成細胞를抑制한다고報告함으로써,⁴⁷⁾ AA의代謝物인 prostaglandins과 leukotrienes이體液性免疫을抑制함을示唆하였다.

한편,強力한 prostaglandin 合成抑制作用으로 인한抗炎症劑로 널리 알려져 있는 indomethacin은 Grinwich 등은 mice에投與한 indomethacin이 s-RBC에對한 antibody titer를增加시켰다고報告하였고,⁴⁸⁾ Orme 등은 cyclooxygenase 차단제로細胞배양을 하면 murine脾臟細胞에對한 2次的인抗s-RBC反應을增加시키며 또 s-RBC投與前에前處理한 indomethacin은 *in vivo*에서 1次的인 murine 抗s-RBC反應을增加시킨다고報告함으로써⁴⁹⁾ arachidonic acid의代謝經路를 차단하는 indomethacin이體液性免疫을亢進시킴을示唆한바, 이에著者は cyclooxygenase와 lipoxigenase에 의한 AA의代謝를競爭的으로抑制하는 EPA의免疫亢進作用이期待되어免疫臟器의變化,體液性免疫反應에 미치는 EPA의影響에對하여實驗을實施하였다.

體重의增加率에 미친影響은 EPA 10mg, 20mg 投與群에서有意하게減少되었고(Table I), 肝臟의重量은減少하는傾向을보였으나有意性은 없었다(Table II). 免疫臟器에 있어서脾臟의重量은 EPA 10mg, 20mg와 CY 併用投與群에서有意한減少를보였으며, 胸腺의重量은 CY 投與群이顯著히減少된反面, 그以外的全群에서增加를보였는데有意性은 없었다(Table III).

CY 投與群의脾臟 및 胸腺의重量減少는 CY의投與量이增加함에 따라脾臟과 胸腺의重量이減少되었다는 Wachsmuth의報告와一致하는傾向을보였다.⁵⁰⁾

赤血球凝集 및 溶血反應은 緬羊赤血球에對한

抗體와抗原과의反應으로서 T-dependent antigen에對한免疫抗體의量을 나타내는指標인데, 本實驗에서의赤血球凝集素價와 溶血素價는投與量이增加함에 따라增加하는傾向을 나타내었고, 2-mercaptoethanol 耐性凝集素價는 EPA 5mg, 10mg 投與群에서增加되었으며(Table IV), Arthus反應은感作宿主에注入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依해刺戟된 비만세포로부터遊離된 histamine 및 leukotriene이多形核白血球의遊走作用을增加시키고, 遊走하여온多形核白血球가 lysosomal enzyme을遊離하여炎症反應을促進시키는現象으로, EPA 投與群에서投與量이增加함에 따라增加하였으나有意性은 없었다(Table V). 脾臟細胞의 溶血斑形成細胞(PFC)는 EPA 10mg, 20mg 投與群에서有意하게增加하였다(Table VI).

이러한體液性免疫의亢進作用은 prostaglandin이 antibody titer와 PFC反應을沮害한다는報告와⁵¹⁾ leukotriene B₄가 immunoglobulin 合成을抑制한다는報告에依하여⁴⁶⁾ eicosapentaenoic acid가 arachidonic acid로부터抗體生成細胞를抑制하는 prostaglandins과 immunoglobulin 合成을抑制하는 leukotrienes의生成을 차단함으로써, immunoglobulin 合成을增進하여體液性免疫을亢進시킨 것으로思料된다.

結 論

마우스에 있어서免疫反應에 미치는 eicosapentaenoic acid의影響에對하여實驗한結果는 다음과 같다.

1. Eicosapentaenoic acid 投與群은正常群에 비해體重增加率, 肝臟 및 脾臟의重量變化는全般的으로減少하는傾向을보였고, 胸腺의重量은增加하는傾向을보였으나有意性은 없었다.

2. Eicosapentaenoic acid 投與群은正常群에 비해 eicosapentaenoic acid의投與量이增加함에 따라赤血球凝集素價와 溶血素價가增加하는傾向을보였고, 2-mercaptoethanol 耐性凝集素價는 eicosapentaenoic acid 5mg, 10mg 投與群에서顯著히增加하였다.

3. Arthus 反應은 eicosapentaenoic acid 投與에 의해 增加하는 傾向을 보였으나 有意性은 없었다.

4. 脾臟細胞의 溶血斑形成細胞는 大體로 增加하는 傾向을 보였는데 特히 eicosapentaenoic acid 10 mg 投與群에서 顯著히 增加하였다.

References

- 1) Dyerberg, J. and Bang, H.O.: Effect on hemostasis by feeding eicosapentaenoic acid. *Miles Int. Symp. Ser.*, **13**, 511 (1981).
- 2) Daan Kromhout, Edward B. Bosschieter and Cor de Lezenne Coulander.: The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *New Eng. J. Med.*, **312**(19), 1205 (1985).
- 3) Tamura, Y., Hirai, A., Terano, T., Kumagai, A. and Yoshida, S.: Effects of eicosapentaenoic acid on hemostatic function and serum lipids in humans. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.*, **15**, 265 (1985).
- 4) Singer, P., Berger, I., Wirth, M., Godike, W., Jaeger, W. and Voigt, S.: Slow desaturation and elongation of linoleic and alpha-linolenic acids as a rationale of eicosapentaenoic acid-rich diet to lower blood pressure and serum lipids in normal, hypertensive and hyperlipemic subjects. *Prostaglandins Leukotrienes Med.*, **24**(2-3), 173 (1986).
- 5) Kahl, P.E., Schimke, E., Hildebrandt, R., Beitz, J., Schimke, I., Beitz, H., Mrochen, H. and Mest, H.J.: The influence of cod-liver oil diet on various lipid metabolism parameters, the thromboxane formation capacity, platelet function and the serum MDA level in patients suffering from myocardial infarction. *Cor. Vasa.*, **29**(3), 199 (1987).
- 6) Sanders, T.A.B. and Roshanai, Farah: The influence of different types of w 3 polyunsaturated fatty acids on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. *Clin. Sci.*, **64**(1), 91 (1983).
- 7) Ahmed, A.A. and Holub, B.J.: Alteration and recovery of bleeding times, platelet aggregation and fatty acid composition of individual phospholipids in human subjects receiving a supplement of cod-liver oil. *Lipids*, **19**(8), 617 (1984).
- 8) Atkinson, P.M., Wheeler, M.C., Mendelsohn, D., Pienaar, N. and Chetty, N.: Effects of a 4-week fresh water fish (trout) diet on platelet aggregation, platelet fatty acids, serum lipids, and coagulation factors. *Am. J. Hematol.*, **24**(2), 143 (1987).
- 9) Tamura, Y., Hirai, A., Terano, T., Yoshida, S., Takenaga, M. and Kitagawa, H.: Anti-thrombic and Anti-atherogenic action of eicosapentaenoic acid. *Jpn. Circ. J.*, **51**(4), 471 (1987).
- 10) Mouri, K., Ikesu, H., Esaka, T. and Igarashi, O.: The influence of marine oil intake upon levels of lipid, -tocopherol and lipid peroxidation in serum and liver of rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**(4), 307 (1984).
- 11) Wong, S.H., Nestel, P.J., Trimble, R.P., Storer, G.B., Illman, R.J. and Topping, D.L.: The adaptive effects of dietary fish and safflower oil on lipid and lipoprotein metabolism in perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Acta.*, **792**, 103 (1984).
- 12) Singer, P., Wirth, M., Voigt, S., Richter-Heinrich, E., Godicke, W., Berger, I., Naumann, E., Listing, J., Hartrodt, W. and Taube, C.: Blood pressure-and lipid-lowering effect of mackerel and herring diet in patients with mild essential hypertension. *Atherosclerosis*, **56**(2), 223 (1985).
- 13) Sanders, T.A.B., Sullivan, D.R., Reeve, J. and Thompson, G.R.: Tryglyceride-lowering effect of marine polyunsaturates in patients with hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis*, **5**(5), 459 (1985).
- 14) Roshanai, F. and Sanders, T.A.B.: Influence of different supplements of N-3 polyunsaturated fatty acids on blood and tissue lipids in rats receiving high intakes of linoleic acid. *Ann. Nutr. Metab.*, **29**(3), 189 (1985).
- 15) Weaver, B.J. and Holub, B.J.: The relative incorporation of arachidonic and eicosapentaenoic acids into human platelet phospholipids. *Lipids*, **20**(11), 773 (1985).
- 16) Hirai, A., Terano, T., Hamazaki, T., Sajiki, J., Kondo, S., Ozawa, A., Fujita, T., Miyamoto, T., Tamura, Y. and Kumagai, A.: The effects of the oral administration of fish oil concentrate on the release and the metabolism of [¹⁴C] arachidonic acid and [¹⁴C] eicosapentaenoic acid by human platelets. *Thromb. Res.*, **28**(3), 285 (1982).

- 17) Margareta Thorngren, Anders Gustafson, Gertrud Wohlfart: Effects of acetylsalicylic acid on platelet aggregation before and during 13(4), 244 (1983).
- 18) Black, K.L., Hoff, J.T., Radin, N.S. and Deshmukh, G.D.: Eicosapentaenoic acid: Effect on brain prostaglandins, cerebral blood-flow and edema in ischemic gerbils. *Stroke*, 15(1), 65 (1984).
- 19) Driss, F., Vericel, E., Lagarade, M., Dechavanne, M. and Darcet, Ph.: Inhibition of platelet aggregation and thromboxane synthesis after intake of small amount of eicosapentaenoic acid. *Thromb. Res.*, 36(5), 389 (1984).
- 20) Von Schacky, Clemens, Weber, P.C.: Metabolism and effects on platelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in humans. *J. Clin. Invest.*, 76(6), 2446 (1985).
- 21) Nordly, A., Davenas, E., Ciavatti, M. and Renaud, S.: Effect of dietary (n-3) fatty acids on platelet function and lipid metabolism in rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, 835(3), 491 (1985).
- 22) Rylance, P.B., Gordge, M.P., Saynor, R., Parsons, V. and Weston, M.J.: Fish oil modifies lipids and reduces platelet aggregability in haemodialysis patients. *Nephron.*, 43(3), 196 (1986).
- 23) Weber, P.C.: Dietary supplementation of eicosapentaenoic acid (C20: 5 omega-3: EPA), Platelet function and blood pressure regulation. *Br. J. Clin. Pract., Symp. Suppl.*
- 24) Singer, P., Wirth, M., Voight, S., Zimontkowski, S., Godicke, W. and Heine, H.: Clinical studies on lipid and blood pressure lowering effect of eicosapentaenoic acid-rich diet. *Biomed. Biochem. Acta.*, 43(8-9), 421 (1984).
- 25) Yoshimura, T., Ito, M., Matsui, K. and Fujisaki, S.: Effect of highly purified eicosapentaenoic acid on vascular reactivity to angiotensin II and norepinephrine in the rabbit. *Prostaglandins*, 32(2), 179 (1986).
- 26) Rogers, S., Tames, K.S., Butland, B.K., Etherington, M.D., O'Brien, J.R. and Jones, J.G.: Effects of a fish oil supplement on serum lipids, blood pressure, bleeding time, haemostatic and rheological variables. *Atherosclerosis*, 63, 137 (1987).
- 27) Goldman, D.W., Pickett, W.C. and Goetzl, E.J.: Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B₅ (LTB₅) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 117(1), 282 (1983).
- 28) Terano, T., Salmon, J.A. and Moncada, S.: Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₅. *Prostaglandins*, 27(2), 217 (1984).
- 29) Lee, T.H., Hoover, R.L., Williams, J.D., Sperling, Ravalese III, J., Spur, B.W., Robinson, D.R., Corey, E.J., Lewis, R.A., Austen, K.F.: Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on *in vitro* neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *New Eng. J. Med.*, 312(19), 1217 (1985).
- 30) Fisher, M., Upchurch, K.S., Levine, P.H., Johnson, M.H., Vaudreuil, C.H., Natale, A. and Hoogasian, J.J.: Effects of dietary fish oil supplementation on polymorphonuclear leukocyte inflammatory potential. *Inflammation*, 10(4), 387 (1986).
- 31) Needleman, P., Raz, A., Minkes, M.S., Ferrendelli, J.A. and Sprecher, H.: Triene prostaglandins: Prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 944 (1979).
- 32) Takenaga, M., Hirai, A., Terano, T., Tamura, Y., Kitagawa, H. and Yoshida, S.: Comparison of the *in vitro* effect of eicosapentaenoic acid (EPA)-derived lipoxygenase metabolites on human platelet function with those of arachidonic acid. *Thromb. Res.*, 41(3), 373 (1986).
- 33) Lee, T.H., Mencia-Huerta, J.M., Shin, C., Corey, E.J., Lewis, R.A. and Austen, K.F.: Effects of exogenous arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on the generation of 5-lipoxygenase pathway products by ionophore-activated human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 74, 1922 (1984).
- 34) Lewis, R.A. and Austen, K.F.: The biologically active leukotrienes: Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J. Clin. Invest.*, 73, 889 (1984).
- 35) Lee, T.H., Mencia-Huerta, J.M., Shih, C., Corey, E.J., Lewis, R.A. and Austen, K.F.: Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B₅ and the double lipoxygenase product. *J. Bio. Chem.*, 259(4), 2383 (1984).
- 36) Hammarström, S.: Leukotriene C₅: a slow reacting

- substance derived from eicosapentaenoic acid. *J. Bio. Chem.*, **255**(15), 7093 (1980).
- 37) Singer, P., Jaeger, W., Wirth, M., Voigt, S., Naumann, E., Zimontkowski, S., Hajdu, I. and Goedicke, W.: Lipid and blood pressure-lowering effect of macerel diet in man. *Atherosclerosis*, **49**(1), 99 (1983).
- 38) Ha, T.Y. and Chung, H.T.: Effect of cyclophosphamide on the humoral and cellular immune response in mice. *J. Kor. Med. Assoc.*, **20**(11), 985 (1977).
- 39) Chung, H.T., Ha, T.Y. and Chung, D.K.: Histological changes of mouse spleen and lymph node by cyclophosphamide. *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **13**(1), 55 (1978).
- 40) Ha, T.Y. and Chung, H.T.: Effects of immune serum on the immune response in mice pretreated with cyclophosphamide. *MMMMMMM*, **3**(1), 11 (1979).
- 41) 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, Ssordet ed. *Karger Basel* 184 (1984).
- 42) Ha, T.Y. and Rhee, H.K.: Effect of inosiplex of cellular and humoral immune response. *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **1**, 57 (1981).
- 43) 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).
- 44) Cunningham, A.: Plaque assay for antibody producing cells. *Allergy*, **17**, 5 (1973).
- 45) Bailey, J.M., Bryant, R.W., Low, C.E., Pupillo, M.B. and Vanderhoek, J.Y.: Regulation of T-lymphocyte mitogenesis by the leukocyte product 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid (15-HETE). *Cell. Immunol.*, **67**, 112 (1982).
- 46) Atluru, D. and Goodwin, J.S.: Control of polyclonal immunoglobulin production from human lymphocytes by leukotrienes: leukotriene B₄ induces an OKT8(+) , radiosensitive suppressor cell from resting, human OKT8(-), T cells. *J. Clin. Invest.*, **74**, 1444 (1984).
- 47) Melmon, K.L., Bourne, H.R., Weinstein, Y., Shearer, G.M., Kram, J. and Bauminger, S.: Hemolytic plaque formation by leukocytes *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **53**, 13 (1974).
- 48) Grinwich, K.D. and Plescia, O.J.: Tumor-mediated immunosuppression: Prevention by inhibitors of prostaglandin, synthesis. *Prostaglandins*, **14**(6), 1175 (1977).
- 49) Orme, I.M. and Shand, F.L.: Inhibitors of prostaglandin synthetase block the generation of suppressor T cells induced by concanavalin A. *Int. J. Immunopharmac.*, **3**, 15 (1981).
- 50) Googwin, J.S., Bankhurst, A.D. and Messner, R.P.: Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. *J. Exp. Med.*, **146**, 1719 (1977).
- 51) Payan, D.G. and Goetzl, E.J.: Specific suppression of human T lymphocyte function by leukotriene B₄. *J. Immunol.*, **131**(2), 551 (1983).