

마우스에 있어서 에이코사펜타엔산이 免疫反應에 미치는 影響(II)

II. 細胞性 免疫 및 非特異的 免疫

安榮根·金正勳·李栢根·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(II)

II. Cell-mediated immunity and Nonspecific Immunity

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

College of Pharmacy, Won Kwang University

Abstract—The cellular and nonspecific immune response of EPA were 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. Immune responses were evaluated by hypersensitivity to SRBC(DTH), rosette forming cell(RFC), natural killer(NK) cell activity and macrophage activity.

The obtained results were as follows: As compared to normal group, 1) DTH was increased by EPA 5 mg, 10 mg administration groups. 2) RFC was significantly increased by EPA 20 mg administration group. 3) NK-Cell activity was significantly increased by EPA 10 mg administration group. 4) Macrophage activity was enhanced by EPA 5 mg administration group.

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, 生群 및 魚油에 主로 含有되어 있으며 血小板凝集抑制作用과 血漿의 cholesterol 低下作用, bleeding time 延長 및 降壓作用 등이 報告되어 있다.¹⁻²³⁾ 細胞內에서 cyclooxygenase와 lipoxygenase에 依한 두 經路로 代謝되는데, cyclooxygenase에 의해 酸化되어 prostaglandin I₃, prostaglandin E₃, prostaglandin D₃, prostaglandin F_{3α} 및 thromboxane A₃로 轉換되는데, 이 代謝經路에 對해서는 基質로서 比較적 貧弱하여 AA에 비해 1/8 정도가 cyclooxygenase의 代謝를 받는 反面, 主로 lipoxygenase의 代謝經路를 통하여서는 leukotriene B₅, leukotriene C₅, leukotriene D₅, leukotriene E₅를 生成한다고 報告되었다.²⁴⁾ 그런데 EPA는 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 leukotriene B₄의 生成을 用量依

存的으로 沮害한다고 보고되었다.²⁴⁻²⁷⁾

또한, Tamura 등은 血全性疾患患者들에 있어서 EPA가 血小板凝集과 血小板 thromboxane 形成을 減少시키고 whole blood의 粘度를 減少하며, 赤血球의 邊形能을 增加시켰다고 報告하였고,⁶⁾ Mouri 등은 rat에게 投與한 肝油와 정어리油가 血清 triglyceride와 cholesterol 및 phospholipid值를 減少시켰음을 報告하였으며,⁷⁾ Singer 등은 고등어油 投與로 收縮期 및 弛緩期 血壓이 顯著히 低下되었고 血漿 moradrenaline 有意性 있게 減少되었다고 報告하였다.²⁸⁾ Terano 등은 rat의 好中球凝集反應, 사람의 多形核白血球의 游走作用 및 lysosomal enzyme 游離, bradykinin으로 인한 血漿滲出 등에 關한 實驗에서 leukotriene B₅의 生物學的 活性이 leukotriene B₄의 1/30 정도로 弱하다고 報告하였고,²⁹⁾ Lee 등은 EPA가 好中球와 單核球의 5-lipoxygenase 代謝經路를 沮害하여 leukotriene B₄의 生成을 抑制하고 好中球에 對한 leukotriene

B₄의 媒介作用을 阻害함으로써 抗炎症效果를 나타낼 것이라고 報告한 바 있다.²⁷⁾

한편, cyclophosphamide는 microsomal enzyme system에 의해 活性化되어 많은 alkylating metabolite를 生成하고,^{30,31)} 여러 實驗動物과 사람의 癌에 對하여 상당한 抗癌作用이 있으며,³²⁾ 가장 강한 免疫抑制劑中의 하나로 알려져 있는데,³³⁾ 抗體形成을 顯著하게 阻害하여 體液性免疫을 抑制한다고 報告되었다.³⁴⁻³⁷⁾

이와 같이, EPA의 生體機能에 對한 研究은 많이 進行되어 있으나, 細胞性 免疫反應에 對한 報告는 없다. 따라서 著者 등은 前報에서 EPA의 體液性 免疫亢進作用에 對하여 報告한 바, 細胞性 免疫을 低下시키는 AA의 代謝를 競爭의으로 抑制하는 EPA의 細胞性 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

實驗動物—前報와 同一하였다.

供試 藥物의 調製 및 投與—前報와 同一하였다.

抗原의 調製 및 免疫—前報와 同一하였다.

足蹠腫脹反應 檢査(Foot and swelling test)—
遲延型 過敏反應(delayed type hypersensitivity :
以下 DTH)을 測定하기 爲하여 Reed 등이 記述한
方法에 準하여³⁸⁾ 다음과 같이 實施하였다. 즉 1次
免疫 4日 後에 S-RBC 0.05 ml(1×10⁸)를 마우스
의 左側後肢足蹠에 皮內注射 하였다. 注射 後 一定
時間 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 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 따라³⁹⁾ 24時間 經過 後의 反應을 遲延型 過
敏反應으로 看做하였다. 足蹠腫脹指數는 다음과 같
이 하였다.

Foot pad swelling index =
(FPSI)

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

脾臟細胞 浮游液의 調製—脾臟을 마우스로부터 無

菌的으로 適出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 數
가 2×10⁷ cell/ml가 되도록 HBSS에 浮游하였다.
每 實驗때마다 脾臟細胞의 生存率 檢査를 實施하였
는데 이 檢査는 trypan blue exclusion method로
다음과 같이 하였다. 즉 試驗管에 0.3 ml의 細胞
浮游液을 넣은 後 0.1 ml의 trypan blue dye 溶液
을 加하여 5分 經過 後 血球計算板에서 無色 生細胞
와 赤色으로 染色된 死細胞의 數를 센 後 그 百分率
을 計算하였다. 이때 細胞 生存率이 95% 以上 되었
다.

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 등 및
Elliot 등이 記述한 方法에 準하여^{40,41)} 다음과 같이
實施하였다. 즉 脾臟細胞 浮游液(2×10⁷ cell/ml)
0.025 ml를 試驗管에 넣은 後 HBSS에 浮游한
S-RBC(2×10⁸ cell/ml) 0.025 ml를 넣고 混合하
여 200×g에서 12分間 遠心分離한 後 4°C에서 2時
間 放置하였다. 그後 조심스럽게 흔들여 再浮游시킨
後 이 再浮游液 1適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하
여 다음 式에 準하여 計算하였다.

$$\text{RFC}(\%) = \frac{\text{Number of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ viability}} \times 100$$

Natural Killer Cell의 活性檢査—藥物投與 最終
日로부터 2日 後에 마우스를 致死시켜 前述한 方法
으로 脾臟細胞를 分離하여 RPMI 1640 배지에 2×
10⁷/ml의 濃度를 懸탁시켜 effector cell로서 利用
하였다. 標的細胞로는 YAC-I cell을 利用하였으며
Kiesseling 등의 方法으로⁴²⁾ 방사선 동위원소
sodium chromate를 labeling한 後 2×10⁵ cell/
ml의 濃度로 浮游시켜 使用하였다. 이때 細胞生存
率이 95% 以上 되게 하였다. 작동세포와 標的細胞
의 比率은 100:1 및 50:1로 하였다. ⁵¹Cr이 표지
된 標的細胞(2×10⁵ cell/ml) 100 μl와 작동세포
(2×10⁷ cell/ml) 100 μl를 96 well tissue culture
plate의 各 well에 혼합한 後 37°C 5% CO₂
incubator에서 5時間 incubation 하였다.

tissue culture plate를 500×g에서 10分間 遠心分離한 後 상층액 100 μl씩을 취하여 Gamma counter로 radioactivity를 測定하였다. 各 實驗은 3倍數로 實施하였으며 percent specific lysis를 다음의 式에 依하여 產出하였다.

% Specific lysis

$$\frac{\text{c.p.m. in experiment} - \text{c.p.m. spontaneous release}}{\text{c.p.m. maximum release} - \text{c.p.m. spontaneous release}} \times 100$$

여기에서 c.p.m. in experiment의 實驗群의 상층액 100 μl의 방사선량, c.p.m. spontaneous release는 작동세포가 들어있지 않고 標的細胞만 들어있는 對照群의 상층액 100 μl의 방사선량이고, c.p.m. maximal release는 標的細胞에 Triton X-100 1% 溶液 100 μl를 加하여 얻었으며, 표지된 방사능의 95% 이상이 되게 하였다. c.p.m. spontaneous release는 c.p.m. maximal release의 10% 以內가 되게 하였다.

大食細胞의 活性調查—大食細胞의 食食能力을 測定하고자 本 實驗에서는 Biozzi 등이 記述한 方法에 準하여⁴³⁾ 다음과 같이 實施하였다. 즉 最終藥物投與 2日 後에 rottring ink를 滅菌蒸溜水에 녹인 1% gelatin液으로 6倍 稀釋한 懸濁液을 調製하여 37°C에 保管하였다. 위와 같이 調製한 colloid狀 炭素懸濁液을 마우스 體重 g當 0.01 ml씩 마우스의 尾靜脈內로 注射하였다. 그後 마우스의 眼窩後部靜脈血管叢을 calibrated heparinized capillary tube로 穿刺하여 20 μl의 血液을 10分, 20分, 30分 間隔으로 採取하여 0.1% sodium carbonate(蒸溜水에 溶解한 液) 溶液 2 ml가 든 vial에 넣어서 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 따라 計算하였다. 實驗動物의 體重, 肝 및 脾臟의 무게를 測定하고 이 들로부터 phagocytic coefficient, corrected phagocytic index를 計算하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index} = \frac{W}{L+S} \times \sqrt[3]{K}$$

W : body weight

L : liver weight

S : spleen weight

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 검정은 student's t-test로 行하였다.

實驗結果

Mouse에 있어서 免疫反應에 미치는 eicosapentaenoic acid의 影響을 究明하고자 實施한 本 實驗의 結果는 다음과 같다.

遲延型 過敏反應—遲延型 過敏反應의 結果는 Table I에서 보는 바와 같이, 正常群은 4.99±2.90이고 EPA 5mg, 10mg 投與群이 各各 5.09±2.90, 5.11±1.92로 增加되는데 比하여 cyclophosphamide(以下 : CY) 投與群은 正常群에 比하여 減少되었으며 EPA 5mg, 10mg 및 20mg와 CY를 併用投與한 群은 正常群에 比하여 減少되고 CY 投與群에 比해서는 增加되는 傾向을 보였으나, 全群에서 有意성을 보이지는 않았다.

脾臟細胞의 Rosette 形成能—各 群에서 관찰한 RFC를 %로 換算한 結果는 Table II에서 보는 바와 같이 正常群이 10.13±0.47% 이었고, EPA 5mg 投與群이 9.57±0.47로 有意性 있게 減少하는데 比하여 EPA 10mg 投與群은 10.27±1.11%로서

Table I—Effect of EPA on the Delayed Type Hypersensitivity in mice.

Group	Foot pad swelling thickness (10 ⁻¹ mm) FPSI	
Normal	15.08 ± 1.03	4.99 ± 2.90
EPA 5mg +	15.30 ± 0.74	5.09 ± 2.90
EPA 5mg + CY	15.30 ± 0.74	4.92 ± 2.58
EPA 10mg	15.20 ± 0.62	5.11 ± 1.92
EPA 10mg + CY	14.50 ± 0.89	4.21 ± 0.11
EPA 20mg	14.40 ± 0.86	4.80 ± 1.90
EPA 20mg + CY	15.82 ± 0.78	4.62 ± 2.11
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 24 hours FPSI was the DTH reaction.

Each value is the meas ± S.D.

Table II—Effect of EPA on Rosette Forming Cell in mice.

Group	RFC(%)
Normal	10.13 ± 0.47
EPA 5mg	9.57 ± 0.47*
EPA 5mg + CY	9.29 ± 0.33**
EPA 10mg	10.27 ± 1.11
EPA 10mg + CY	9.72 ± 1.16
EPA 20mg	15.72 ± 1.35**
EPA 20mg + CY	13.15 ± 1.97**△△
CY	9.16 ± 0.82**

Mice were challenged with 1×10^8 SRBC/ml 4 days after sensitization.

On the 5th day, RFC were assayed.

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

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

(△△, $p < 0.01$)

有意한 差異는 없었으나 약간 增加하였고, EPA 20 mg 投與群은 15.72±1.35%로 매우 顯著한 增加를 보였다. 또한 CY 投與群은 9.16±0.82%로 매우 顯著히 減少하였고 EPA 5mg, 10mg을 CY와 併用投與한 群에서는 9.29±0.33%, 9.72±1.16%로서 正常群에 比하여 減少한 反面에 CY 投與群에 比해서는 增加하는 傾向을 보였으며, EPA 20mg와 CY 併用投與群은 13.15±1.97%로 正常群과 CY 投與群에 比해서 顯著히 增加하였다.

Natural Killer Cell Activity에 미치는 影響—Natural killer cell activity의 結果는 Table III에서 보는 바와 같이 effector cell : target cell이 100 : 1일 때는, 正常群이 19.27±4.15%인데 比하여 EPA 5mg 投與群은 20.28±6.19%로 有意性 있게 增加하였고, EPA 10mg, 20mg 投與群은 各各 26.45±4.59%, 25.60±4.51%로 매우 顯著히 增加를 보인 反面에 CY 投與群은 10.38±3.85%로 正常群에 比하여 매우 顯著히 減少하였으며, EPA 5mg, 20mg을 CY와 併用投與한 群은 各各 11.95±3.74%, 13.40±4.03%로서 正常群에 比해서는 매우 顯著히 減少하였으나 CY 投與群에 比하여서는 有意性 없는 增加를 보였고, EPA 10mg와 CY 併

Table III—Effect of EPA on natural killer cell activity in mice.

Group	% Specific lysis of cell(YAC-1)	⁵¹ Cr-labelled target
	Effector 100:1	Target cell 50:1
Normal	19.27 ± 4.15	14.21 ± 1.83
EPA 5mg	20.28 ± 6.19	15.45 ± 0.74
EPA 5mg + CY	11.95 ± 3.74**	9.26 ± 2.67**
EPA 10mg	26.45 ± 4.59**	19.34 ± 3.37**
EPA 10mg + CY	19.80 ± 3.61△△	12.77 ± 1.93△△
EPA 20mg	25.60 ± 4.51**	16.26 ± 2.29*
EPA 20mg + CY	13.40 ± 4.03**	10.74 ± 3.28**
CY	10.38 ± 3.85**	8.34 ± 3.25**

$$\% \text{ Specific lysis} = \frac{\text{Test culture counts} - \text{Spontaneous release counts}}{\text{Water lysis counts} - \text{Spontaneous release counts}} \times 100$$

$$\text{Water lysis counts} = \text{Spontaneous release counts} \times 100$$

All values are given as mean ± S.D.

Significant difference from the normal group.

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

Significant difference from the cyclophosphamide group

(△△, $p < 0.01$)

用投與群은 正常群에 比해서는 거의 差異가 없었으나, CY 投與群에 比해서는 顯著히 增加되었다.

또한, effector cell : target cell이 50 : 1일 때는 正常群이 14.21±1.83%이고 EPA 5mg 投與群은 15.45±0.74%로 有意性 있게 增加하였고 EPA 10mg, 20mg 投與群은 各各 19.34±3.37%, 16.26±2.29%로서 매우 顯著한 增加를 보였는데 比하여 CY 投與群은 8.34±3.25%로 正常群에 比하여 매우 顯著히 減少하였고, EPA 5mg, 20mg을 CY와 併用投與한 群에서는 各各 9.26±2.67, 10.74±3.28%로서 正常群에 比하여 매우 顯著한 減少를 보인 反面에 CY 投與群에 比해서는 有意性 없이 增加하였고, EPA 10mg와 CY 併用投與群은 12.77±1.93%로 正常群에 比해서는 有意性 없는 減少를 보였으나 CY 投與群에 比해서는 顯著히 增加되었다.

大食細胞의 活性 檢査所見—大食細胞의 食食能力을 測定하여 phagocytic index로 換算한 結果는 Table IV에서 보는 바와 같이, 正常群은 8.14±1.34이고 EPA 5mg 投與群은 9.84±2.14로서 有意하게 增加하였고 EPA 10mg, 20mg 投與群에서는 各各 8.46±2.52, 8.34±3.15로 有意한 差異가 없

Table IV—Effect of EPA on the Phagocyte Activity in mice.

Group	Phagocytic index
Normal	8.14 ± 1.34
EPA 5mg	9.84 ± 2.14*
EPA 5mg + CY	8.17 ± 1.32
EPA 10mg	8.46 ± 2.52
EPA 10mg + CY	7.19 ± 3.13
EPA 20mg	8.34 ± 3.15
EPA 20mg + CY	7.16 ± 2.10
CY	7.92 ± 1.24

Phagocytic index is a constant obtained 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 the normal group (* $p < 0.05$)

었으나 약간 증가하였으며, CY 투여군은 7.92 ± 1.24로 정상군에 비하여 감소하였다. EPA 5mg와 CY併用투여군에서는 정상군에 비하여 감소한 반면, CY 투여군에 비해서는有意性 없는 증가를 보였고 EPA 10mg, 20mg을 CY와併用투여한 군에서는 정상군과 CY 투여군에 비하여有意한 差異는 없었으나 감소하는 傾向을 나타내었다.

考 察

EPA는 生鮮 및 魚油에 主로 含有되어 있는 多價 不飽和脂肪酸으로 비슷한 構造의 AA의 代謝를 競爭적으로 抑制한다.²⁴⁾

AA의 代謝産物인 prostaglandins과 leukotrienes이 細胞性免疫에 미치는 影響에 關한 報告로는, Goodman 등은 AA의 15-lipoxygenase 代謝物이 mitogen으로 인한 mouse 脾臟細胞의 증식을 阻害했다고 報告하였고,⁴⁴⁾ Rola-pleszczynski 등은 leukotriene B₄는 phytohemagglutinin과 concanavalin A로 유발된 人血淋巴球에 [³H]-thymidine의 導入을 阻害하고, 3~24時間 preincubation 동안에 suppressor lymphocytes를 誘導하며 이들 suppressor cells은 같은 culture內에서 새로운 T-lymphocyte의 mitogen으로 인한 증식을 阻害할 수 있었다고 報告하였고,⁴⁵⁾ Payan 등은 人血의 T淋巴球의 T₄⁺ (helper/inducer) subset의

증식이 leukotriene B₄에 의해 阻害되는 反面, T₈⁺ (suppressor/cytotoxic) subset의 증식은 增進되었다고 報告하였다.⁴⁶⁾ 또한, Smith 등은 prostaglandins이 mitogen으로 유발한 淋巴球의 증식을 抑制한다고 報告하였고,⁴⁷⁾ Gordon 등은 prostaglandin이 lymphokine 形成을 抑制한다고 報告하였으며,⁴⁸⁾ Henney 등은 prostaglandin이 活性化된 淋巴球에 의한 直接的인 cytolysis를 抑制한다고 報告하였다.⁴⁹⁾

한편, prostaglandin 合成抑制劑인 indomethacin은 Morley가 indomethacin이 guinea pig의 淋巴球 증식은 물론 lymphokine의 形成을 增進한다고 報告하여⁵⁰⁾ AA의 代謝經路를 차단하는 indomethacin이 細胞性免疫을 亢進시킴을 示唆한 바, 이에 著者는 cyclooxygenase와 lipoxygenase에 의한 AA의 代謝를 競爭적으로 抑制하는 EPA의 免疫亢進作用이 期待되어 細胞性免疫反應, NK-cell 活性, 大食細胞의 活性에 미치는 EPA의 影響에 對하여 實驗을 實施하였다.

遲延型過敏反應(DTH)은 EPA 5mg, 10mg 投與群에서 増加를 보였으나 有意性은 없었다(Table I).

脾臟細胞의 rosette 形成細胞(RFC)는 EPA의 投與量이 增加함에 따라 増加하는 傾向을 보였으며 특히 EPA 20mg 投與群에서 顯著히 増加하였음을 관찰할 수 있었다(Table II).

이러한 細胞性免疫의 亢進作用은, prostaglandin E₂가 adenylate cyclase를 活性化하여 細胞內 cyclic AMP를 增加시키며, 이 細胞內 cyclic AMP는 淋巴球의 mitogenesis를 阻害하고, lymphokines 生成을 減少하며, 사람의 T細胞의 rosette 形成을 抑制한다는 報告와⁵⁰⁻⁵²⁾ leukotriene B₄에 의해 人血의 T淋巴球의 suppressor cell의 증식이 증진되었다는 報告에 依하여,⁴⁶⁾ EPA가 AA로부터 prostaglandins과 leukotrienes의 生成을 차단함으로써 cyclic AMP 농도를 低下시키고, suppressor cell의 誘導를 抑制하여 細胞性免疫을 亢進시킨 것으로 思料된다.

NK-cell 活性는 非特異的 免疫能의 賦活與否를 確認하기 爲하여 實施하는데, EPA 10mg, 20mg 投與群에서 顯著히 増加되었다(Table III). 이는 prostaglandins이 活性化된 淋巴球에 依한 direct

문 헌

cytolysis를 抑制한다는 報告와,⁴⁸⁾ indomethacin 이 T細胞刺戟에 依한 人血淋巴球의 活性을 亢進시킨다는 Goodwin 等의 報告에 따라서⁵³⁾ EPA가 淋巴球의 活性을 抑制하는 prostaglandins과 leukotrienes의 合成을 차단함으로써 淋巴球의 NK-cell 活性을 增進시킨 것으로 思料되며, NK-cell의 活性이 發癌劑나 X-線 照射 等에 依하여 抑制된다는 報告에 근거하여⁵⁴⁻⁵⁷⁾ NK-cell 活性을 增加시키는 EPA의 抗癌作用이 推測되므로 이에 對한 研究가 앞으로 進行할만한 과제인 것으로 思料된다.

大食細胞의 活性은 抗原에 依한 免疫能의 發顯 및 interleukins의 分泌에 重要한 役割을 하여 그 食能이 網狀組織內皮系에 影響을 끼치는가를 測定하는 指標로서 利用되고 있는 바, EPA 5mg 投與群에서 有意하게 增加하였는데 (Table IV), 이러한 結果는 leukotriene B₄가 人血淋巴球에 依한 lymphokins 形成을 阻害했다는 報告와⁵⁸⁾ indomethacin이 guinea pig의 淋巴球 증식과 lymphokine 形成을 增進하였다는 Morley 等의 報告에 依하여⁵⁹⁾ EPA가 AA의 代謝를 阻害하여 lymphokine의 形成을 촉진함으로써 大食細胞의 活性을 增進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. EPA 5mg, 10mg 投與群은 正常群에 비해 DTH 反應이 약간 增加하였으나 有意性은 없었다.
2. 脾臟細胞의 rosette 形成細胞는 EPA의 投與量이 增加함에 따라 增加하는 傾向을 보였는데 특히 EPA 20mg 投與群에서 顯著히 增加하였다.
3. EPA 投與群은 正常群에 비해 Natural Killer cell의 活性이 大體로 增加하였으며 특히 EPA 10mg 投與群에서 顯著히 增加하였다.
4. 大食細胞의 活性은 EPA 投與에 의해 약간 增加하는 傾向을 보였는데, 특히 EPA 5mg 投與群에서 有意性 있게 增加하였다.

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).

- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Weaver, B.J. and Holub, B.J.: The relative incorporation of arachidonic and eicosapentaenoic acids into human platelet phospholipids. *Lipids*, **20**(11), 773 (1985).
- 13) 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).
- 14) Margareta Thorngren, Anders Gustafson, Gertrud Wohlfart: Effects of acetylsalicylic acid on platelet aggregation before and during **13**(4), 244 (1983).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) Nordly, A., Davenas, E., Ciavatti, M. and Renaud, S.: Effect of dietary (n-3) fatty acids on platelet function and lipid metabolism in rats. *Biochem. Biophys. Acta.*, **835**(3), 491 (1985).
- 19) 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).
- 20) 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.
- 21) Singer, P., Wirth, M., Voigt, 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).
- 22) 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).
- 23) Rogers, S., Tames, K.S., Butland, B.K., Etherington, M.D., O'Brien, J.R. and Johes, J.G.: Effects of a fish oil supplement on serum lipids, blood pressure, bleeding time, haemostatic and rheological variables. *Atherosclerosis*, **63**, 137 (1987).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 26) Lee, T.H., Mencia-Huerta, J.M., Shih, 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).
- 27) 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 leu-

- kotriene generation and neutrophil function. *New Eng. J. Med.*, **312**(19), 1217 (1985).
- 28) 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).
- 29) Terano, T., Salmon, J.A. and Moncada, S.: Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₅. *Prostaglandins*, **27**(2), 217 (1984).
- 30) Brock, N: Pharmacologic Characterization of Cyclophosphamide (NSC-266271) and Cyclophosphamide Metabolites. *Cancer Chemotherapy Rept.*, **51**, 315 (1967).
- 31) Brock, N., R. Gross, H.J. Hohorst, H.O. Klein and B. Schneider.: Activation of Cyclophosphamide in Man and Animals. *Cancer*, **27**, 1512.
- 32) Livingston, R.B. and S.K. Carter.: Single Agent in Cancer Chemotherapy. IFI/Plenum, New York, 25 (1970).
- 33) Hersh, E.M.: Immunosuppressive Agents. In: (AC Sartoreli and DG Johns Eds.). Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 38, Part. I. Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. *Springer Verlag. Berlin*, 577 (1974).
- 34) Lerman, S.P. and W.P. Weidanz: The Effect of Cyclophosphamide on the Ontogeny of the Humoral Immune Response in Chickens. *J. Immunol.*, **105**, 614 (1970).
- 35) Stockman, G.D., and J.J. Trentin: Cyclophosphamide-induced Tolerance to Equine Gamma Globulin and to Equine Anti-Mouse-Thymocyte Globulin in Adult Mice. I. Studies on Antigen and Drug Requirements. *J. Immunol.*, **108**, 112 (1972).
- 36) Stockman, G.D., L.R. Heim, M.A. South, and J.J. Trentin: Differential Effects of Cyclophosphamide on the B and T Cell Compartments of Adult Mice. *J. Immunol.*, **110**, 277 (1973).
- 37) Ha, T.Y.: The Effect of Measles Virus Infection on Immune Response in Mouse. *The Korean Central Journal of Medicine*, **32**, 319 (1977).
- 38) Reed, H.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* 134 (1984).
- 39) Sugimoto, Kojima, A.M., Yaginuma, K. and Gashira, Y.E.: Cell mediated and humoral immunity in mice. *Jpm. J. Med. Sci. Biol.*, **28**, 23 (1972).
- 40) Garvey, J.S., Cremer, N.E., Sussclorf, D.H. Methods in immunology, 3rd, 449 (1980).
- 41) Elliott, B.E., J.S. Haskill: Characteristics of thymus-derived bonemarrow-derived reosette forming lymphocytes, *Eur. J. Immunol.* **3**, 68 (1973).
- 42) Kiesseling, *et al.*: *Eur. J. Immunol.*, **5**, 112 (1975).
- 43) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C., and Halpern, B.N.: Etude quantitative de l'activite granulopexique du systeme reticulo entherial chezla souris. *C.R. Soc. Biol. Paris*, **148**, 431 (1954).
- 44) Goodwin, M.G. and Weigle, W.D.: Modulation of lymphocyte activation. *J. Immunol.*, **125**(2), 593 (1980).
- 45) Rola-Pleszczynski, M., Borgeat, P., Sirois, P.: Leukotriene B₄ induces human suppressor lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **108**(4), 1531 (1982).
- 46) Payan, D.G., Missirian-Bastian, A. and Goetzl, E.J.; Human T-lymphocyte subset specificity of the regulatory effects of leukotriene B₄. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3501 (1984).
- 47) Smith, J.W., Steiner, A.L. and Parker, C.W.: Human lymphocyte metabolism: effects of cyclic and non-cyclic nucleotides on stimulation by phytohemagglutinin. *J. Clin. Invest.*, **50**, 442 (1971).
- 48) Gordon, D., Bray, M.A., and Morley, J.: Control of lymphokine secretion by prostaglandins. *Nature (London)*, **262**, 401 (1976).
- 49) Henney, C.S., Bourne, H.R., and Lichtenstein, L.M.: The role of cyclic 3', 5' adenosine monophosphate in the specific cytolytic activity of lymphocytes. *J. Immunol.*, **108**, 1526 (1972).
- 50) Morley, J.: Prostaglandins and lymphokines in arthritis. *Prostaglandins*, **8**(4), 315 (1974).
- 51) Chung, H.T., Ahn, B.S., Kim, U.H. and Ahn, D.S.; Regulation of immune response by arachidonic acid metabolites. *Kor. J. Immunol.*, **9**(1), 85 (1987).
- 52) 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).
- 53) Goodwin, J.S., Bankhurst, A.D. and Messner, R.P.; Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. *J. Exp. Med.*, **146**, 1719 (1977).

- 54) Prehn, R.T.: Immunomodulation of tumor growth. *American J. of pathology*, **77**, 199 (1974).
- 55) Elgert, K.D. and Farrar, W.B.: Suppressor cell activity in tumorbearing mice. *J. Immunol.*, **120**, 1345 (1978).
- 56) Goreilk, E. and Herberman, R.B.: Inhibition of the activity of mouse natural killer cell by urethan.
- 57) Hochman, P.S., Cudkowioz, G. and Dousset, S.; Decline of natural killer cell activity in sublethally irradiated mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**, 265 (1978).
- 58) Payan, D.G. and Goetzl, E.J.; Specific suppression of human Tolympocyte function by leukotriene B₄. *J. Immunol.*, **131**(2), 555 (1983).