

마우스에 있어서 Olive Oil의 食餌가 免疫反應에 미치는 影響

안영근 · 박병철 · 김정훈 · 이상근 · 박영길

원광대학교 약학대학

Effect of Olive Oil Diet on the Immune Response in ICR Mice

Ahn, Young-Keun, Park, Beung-Chul, Kim, Joung-Hoon
Lee, Sang-Keun and Park, Young-Gil
College of Pharm., Won Kwang Univ.

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of olive oil diet on the immune response in ICR male mice. Experimental diets of 4 groups were fed ad libitum to the ICR male mice for 27 days.

The results of this study were summarized as followings:

1. 10% Olive oil diet group as compared with the control diet group significantly decreased liver weight rate but significantly increased hemagglutination titer (HA), Arthus reaction, delayed type hypersensitivity reaction (DTH), rosette forming cell (RFC), and phagocyte activity.

2. 20% Olive oil diet group as compared with the control diet group significantly increased body weight gain, liver weight rate, and HA but significantly decreased Arthus reaction, DTH, RFC, phagocyte activity, and peripheral circulating white blood cell (WBC).

3. 30% Olive oil diet group as compared with the control diet group significantly increased liver weight rate but significantly decreased body weight gain, Arthus reaction, plaque forming cell (PFC), DTH, RFC, phagocyte activity, and WBC.

The results showed that the increase of olive oil doses significantly decreased humoral and cellular immune responses, phagocyte activity, and WBC.

緒 論

紀元前부터 지중해 沿岸과 유럽지방에서 食用, 藥用 및 美容用 등으로 廣範圍하게 利用되어 온 olive oil은 *Olea europaea L. (Oleaceae)*의 種子를 水壓法 등에 依해 얻어진 것으로 olive oil은 햇빛에 依해 酸化되는 性質이 強하며, 自然狀態에서 triglyceride 등의 많은 成分을 包含하고 있다. olive oil의 成分은 oleic acid(62~85%), linoleic acid(2.7~15%) 및 palmitic acid와 stearic acid(1.52~3.75%) 등을 含有하고 있다¹⁻⁴⁾.

Lee 등은 polyunsaturated fatty acid/saturated fatty acid ratio (P/S ratio)가 높은 物質을 含有하는 飼料를 投與한 動物群에 있어서 tocopherol의 不足으로 인한 症狀의 誘發을 報告한 바 있으며⁵⁾, 尾崎는 各種 脂肪酸의 營養價에 대해서 調査 研究한 바에 따르면 高度不飽和脂肪酸은 多數의 二重 結合을 가지고 있기 때문에 毒性이 나타난다고 하였으며⁶⁾, Matsuo는 高度不飽和脂肪酸의 ethyl ester는 空氣中에서 放置하면 自動酸化되어 胃·腸 및 肝臟에 毒性이 있음을 報告하였으나^{7,8)}, Jacotot 등은 oleic acid가 많이 含有된 食餌는 高度不飽和脂肪酸이 含有된 食餌에 比해서 전체적인 cholesterol의 量에는 變化가 없고, HDL-cholesterol의 增加를 가져옴과 同時에 lipoprotein의 代謝를 增加함을 報告하였고⁹⁾, Lokesh 등은 mouse의 肺와 脾臟에 있어서 olive oil은 prostaglandin 合成에는 影響을 미치지 않으나, arachidonic acid를 減少시킨다고 하였다¹⁰⁾.

癌에 관한 報告에서 William 등은 rat에 있어서 不飽和脂肪酸인 linoleic acid는 乳腺腫瘍細胞의 成長을 抑制함을 報告하였고¹¹⁾, Hillyard 등은 不飽和脂肪酸食餌를 投與한 결과, mouse의 增加된 乳房癌의 크기는 癌細胞增殖의 增加에 依한 것이 아니라 癌細胞崩壞를 減少시킨 結果라고 하였으며¹²⁾, David 등은 사람에 있어서 乳房癌의 要因은 estrogen이라 하였고, 高脂肪食餌는 血清 estrogen의 血中濃度를 높여주며 이로 因하여 乳房癌을 增加

시킨다고 하였으며¹³⁾, Leonard 등은 成熟된 rat에 있어서 體脂肪의 蓄積은 絶食時에 血液속에 free fatty acid, glycerol, ketone bodies 및 triglycerides로 增加되며 腫瘍의 成長을 促進하는 要素로 作用한다고 報告하였다¹⁴⁾.

免疫에 관한 報告에서 Mchugh 등은 linoleic acid 등의 不飽和脂肪酸이 免疫抑制作用이 있어서 腎臟 移植時 免疫抑制劑의 補助劑로 使用할 수 있다고 하였고¹⁵⁾, Kollmorgen 등은 rat에 있어서 DMBA (7.12-dimethyl benz(a)anthracene)에 依해 乳房癌誘發에 있어 免疫刺戟에 依한 癌誘發의 阻止效果는 低脂肪食群에 있어서는 有效하였으나 高脂肪食群에 있어서는 效果가 없었다고 報告하였고¹⁶⁾, Dewille 등은 必須脂肪酸이 缺乏된 飼料를 投與한 mouse에 있어서 脾臟細胞의 溶血斑形成細胞數가 減少하였으며 體液性免疫이 低下되었으나 高度不飽和脂肪酸이 含有된 飼料를 投與한 mouse에 있어서는 體液性免疫이 低下되지 않았다고 報告하였고¹⁷⁾, Chandra 등은 不飽和脂肪酸食餌는 飽和脂肪酸食餌에 比해 有意하게 自家免疫疾患이 發現한다고 하였다¹⁸⁾. 따라서 高度不飽和脂肪酸은 免疫에 影響을 끼치고 있음이 밝혀진 바 있으며, 특히 近來에 와서 olive oil의 使用頻度와 使用量이 增加함에 따라 olive oil이 免疫反應에 影響이 있을 것으로 期待되어, 本 實驗을 實施한 結果 有意性 있는 結果를 얻었기에 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 分讓받아 市販飼料(第一飼料 Co.)로 1週間 給食시켜 適應시킨 後에, 20마리를 1群으로 하고 全體를 4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 飼料의 調製 및 投與

① olive oil 食餌의 調製 및 投與

實驗食餌의 組成은 Table 1과 같다. 正常食餌의 比率은 Takuji 等의 報告와 AIN-76 diet 組成을 參考로 하여^{19,20)}, 各各의 實驗食餌와 물은 任意로 먹거나 마시게 하였고, 對照群은 참기름 食餌群을 使用하여 위와 同一한 方法으로 實施하였다.

Table 1. Composition of the Experimental Diet.
(unit : g/100 g diet)

Dietary ingredients	Experimental animal group			
	Control	(I)	Olive oil (II)	(III)
Corn starch ¹⁾	68	68	58	48
Casein ²⁾	15	15	15	15
Cellulose ³⁾	2	2	2	2
Fat sesame oil	10			
Olive oil ⁴⁾		10		
Olive oil			20	
Olive oil				30
Salt mixture ⁵⁾	4	4	4	4
Vitamin mixture ⁶⁾	1	1	1	1

¹⁾Corn starch: Pungjin chem. co.

²⁾Casein: lactic casein (Newzealand)

³⁾Cellulose: Sigma co.

⁴⁾Olive oil: Yakuri pure chemicals co. (Japan)

⁵⁾Salt mixture used had composition of Rogers and Harpers²¹⁾

⁶⁾Vitamin mixture (per 1 gm)

Vitamin A (USP XIX) 5,000 IU

Vitamin D (KP III) 400 IU

Vitamin B₁ (KP III) 5 mg

Vitamin B₂ (KP III) 5 mg

Vitamin B₆ (KP III) 0.5 mg

Vitamin B₁₂ (KP III) 2 mg

Vitamin C (KP III) 5 mg

Vitamin K (KP III) 0.2 mg

Nicotinic acid (KP III) 30 mg

Choline citrate (KP III) 5 mg

Folic acid (KP III) 0.5 mg

Calcium panthotenate (KP III) 5 mg

dl-Methionine (KP III) 2.5 mg

Lysine HCl (KP III) 1 mg

Glycine (KP III) 1 mg

Glutamic acid HCl (KP III) 1 mg

Minerals 75 mg

3. 體重 및 臟器의 重量計測

① 體重: 實驗動物의 體重은 供試 飼料投與 開始日과 最終日 約 24시간 前에 絶食시킨 후 同一한 時間에 測定하였다.

② 臟器의 重量: 最終 飼料投與 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

① 抗原: 本 實驗에서는 緬羊 赤血球(Sheep Red Blood Cell 以下 S-RBC)를 使用하였는데, 그 方法은 雄性緬羊의 頸動脈으로부터 heparin 處理 注射器로 採血한 後 同量의 Alserver's氏液(pH 6.1)을 加하여 4℃에서 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, 적절한 濃度로 Hanks Balanced Salt Solution(以下 HBSS: Gibco laboratories co.)에 浮遊하여 使用하였다.

② 免疫: 遠心洗滌한 S-RBC를 Reed 等의 報告를 參考하여²²⁾ HBSS에 1×10^8 S-RBC/ml의 濃度로 浮遊하고, 浮遊液 0.1 ml (1×10^7 S-RBC)를 最終 藥物投與 5日 前에 mouse의 尾靜脈에 注射하여 1次免疫을 實施하였다. 2次免疫은 1次免疫 4日 後에 mouse의 左側後肢足蹠皮內에 2×10^9 S-RBC/ml 浮遊液 0.05 ml (1×10^8 S-RBC)를 注射하여 免疫하였다.

5. 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, 遠心分離하여 血清을 分離하고 56℃에서 30分間 非動化시킨 後, 4℃에서 保存하여 使用하였다.

6. 赤血球 凝集素價

赤血球 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 各 非動化 血

清을 각 96 well tissue culture에 HBSS로 2배系列로 稀釋한 後, HBSS에 浮遊한 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 混合한 다음, 37°C에서 18時間 靜置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도를 그 血清의 凝集素價로 하였다.

7. 足趾腫脹反應 檢査(Foot pad swelling test)

antibody mediated hypersensitivity(以下 Arthus) 및 遲延型過敏反應(delayed type hypersensitivity 以下: DTH)을 測定하기 위하여 Yoshikai 등이 記述한 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다²³⁾. 즉 1次免疫 4日 後에 S-RBC 0.05 ml(1×10^8)을 mouse의 左側後肢足趾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 microcaliper(Mitutoyo mfg. co. ltd.)로 測定하였으며, 腫脹程度의 測定에 따른 誤差를 피하기 위하여 2回 測定한 數值를 平均하였다. 判讀基準은 Sugimoto의 判讀基準에²⁴⁾ 따라 3時間 經過 後의 反應을 Arthus 反應, 24時間 經過 後의 反應을 遲延型過敏反應(DTH)으로 看做하였다. 足趾腫脹指數는 다음과 같이 하였다.

Foot pad swelling index

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

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(以下 MEM: Gibco laboratories co.)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 2×10^7 cells/ml가 되도록 HBSS에 浮遊시켰다. 每 實驗때 마다 脾臟細胞의 生存率 檢査를 實施하였는데 이 檢査는 trypan blue exclusion method로 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 溶液을 加하여 5分 經過後, 血球計算板에

서 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% 이상 되었다.

9. 脾臟細胞의 rosette 形成細胞(以下 RFC)의 檢出

脾臟細胞의 rosette 形成細胞의 檢査는 Gravey 및 Elliot 등이 記述한 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다^{25,26)}. 즉 脾臟細胞 浮遊液(2×10^7 cells/ml) 0.025 ml를 試驗管에 넣은 後, HBSS에 浮遊한 S-RBC(2×10^8 /ml) 0.025 ml를 넣고 混合하여 200×g에서 12分間 遠心分離한 後, 4°C에서 2時間 放置하였다. 그 後 조심스럽게 흔들어 再浮遊시킨 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 式에 計算하였다.

Rosette forming cell (%)

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

10. 脾臟細胞의 溶血斑形成細胞數(Plaque Forming Cell 以下: PFC)에 미치는 影響

① 肝臟細胞의 溶血斑形成細胞數의 測定은 Cunningham의 方法을 利用하여 다음과 같이 施行하였다²⁷⁾. 摘出した 脾臟을 氷冷 HBSS와 함께 粉碎하여 脾臟細胞를 遊離시키고, 400×g에서 5分間 遠心分離하였다. 上澄液을 제거 後 37°C의 0.83% NH_4Cl 溶液에 浮遊시켜, 3分間 靜置하여 赤血球를 溶解시켰다. 다시 遠心分離하여 氷冷 HBSS에 浮遊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 浮遊시켰다.

③ 4×10^9 S-RBC 250 μl , guinea pig complement(Gibco lab. co. ltd.) 500 μl 를 混合하여, ice bath 상에서 30分間 靜置 後 使用하였다.

④ 上記 guinea pig complement와 4×10^9 S-RBC 혼합액 150 μ l, 脾臟細胞 浮遊液 650 μ l를 잘 혼합하여 microchamber (Takahashi Giken glass 76 \times 26 mm)에 100 μ l씩 注入하고, wax-vaseline (1:1)으로 밀봉하여 CO₂ incubator (37°C)에서 1時間 培養後, 形成된 溶血斑(plaque forming cells) 數를 間接光線下에서 測定하였다.

⑤ 百萬個의 脾臟細胞중 溶血斑形成細胞數 (PFC/10⁶ spleen cells) 및 脾臟細胞 全體중의 溶血斑形成細胞數 (PFC/total spleen cells)를 다음 式에 따라 계산하였다.

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

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

단, $a = \frac{650}{800}$ (培養混合液 中の 脾臟細胞 浮遊液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).

11. 大食細胞의 活性檢査

大食細胞의 食食能力을 測定하고자 本 實驗에서 是 Biozzi 等이 記述한 方法에 準하여²⁸⁾ 다음과 같이 實施하였다. 즉 最終 藥物投與 2日 後에 rotring 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 mouse 體重 g當 0.01 ml씩 mouse의 尾靜脈內로 注射하였다. 그 後 mouse의 眼窩後部靜脈血管叢 (retro orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube (20 μ l; micro hemocrit)로 穿刺하여 20 μ l의 血液을 10分, 20分, 30分 間隔으로 採血하여

0.1% sodium carbonate (蒸溜水에 溶解한 液) 溶液 2 ml가 든 vial에 넣어서 적혈구가 溶解되도록 잘 混和하였다. 이어서 吸光度를 600 nm에서 測定하고 다음 式에 따라 計算하였다. 實驗動物의 體重, 肝 및 脾臟의 무게를 測定하고, 이로부터 phagocytic coefficient 및 corrected phagocytic index를 계산하였다.

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

W : Body weight

L : Liver weight

S : Spleen weight

K : Phagocytic coefficient (測定濃度의 10倍 數를 10 g로 轉換하고 時間에 對하여 plot한 graph 曲線)

12. 末梢循環 白血球 數의 測定

mouse의 眼球靜脈叢으로부터 末梢血液을 採血하여 Türk 液으로 稀釋하여 血球計算板上에 滴下한 後, 白血球 總數를 測定하였다.

13. 統計學的 分析²⁹⁾

모든 資料는 mean \pm standard deviation로 나타내었으며, 有意性 檢定은 student's t-test로 行하였다.

實驗 結果

mouse에 있어서 olive oil 食餌가 免疫反應에 미치는 影響을 究明하고자 實施한 本 實驗의 結果는 다음과 같다.

1. Olive oil 實驗食餌의 攝取量

olive oil 食餌를 各各 임의로 섭취케 한 結果는 Table 2와 같다. 對照食餌群이 4.23 \pm 0.25 g인데 比하여 20% olive oil 食餌投與群에서는 4.41 \pm 0.57 g (P<0.01)로 有意한 增加를 보인 반면 30% olive oil 食餌投與群에서는 3.59 \pm 0.68 g (P<0.01)로 有意한 減少를 나타내었다.

Table 2. Food Intake of Experimental Diets.

Group	Food intake
	(g/mouse/day)
Control	4.23±0.25
10% Olive oil	4.22±0.49
20% Olive oil	4.41±0.57**
30% Olive oil	3.59±0.68**

Olive oil diets were fed to ICR mice for 27 days.
Each value is the mean±S.D. of results obtained from 10 mice.

Asterisks denote the significances of the difference between control group and olive oil-fed groups.

**P<0.01

2. 體重, 肝臟, 脾臟 및 胸腺의 重量變化

① 體重的 變化

各 群의 體重變化는 Table 3과 같다. 對照食餌群에서 3.41±2.00인데 비해 10% 및 20% Olive oil 食餌投與群에서 各各 15.72±1.34(P<0.01)와 15.36±0.06(P<0.01) 比率로 有意하게 增加하였으나, 30% Olive oil 食餌投與群에서는 -1.08±0.50(P<0.01)로 有意한 減少를 보였다.

Table 3. Effects of Olive Oil Diet on the Body Weight Increasing Rate of ICR Mice.

Group	Initial wt. (gm)	Final wt. (gm)	Increasing rate (%)
Control	18.79±1.44	19.45±0.74	3.41±2.00
10% Olive oil	19.94±1.77	23.66±2.96	15.72±1.34**
20% Olive oil	20.43±1.45	24.14±3.29	15.36±0.06**
30% Olive oil	19.31±0.98	19.10±1.08	-1.08±0.50**

Other legends and methods are the same as described in Table 2.

**P<0.01

② 肝臟의 重量變化

各 群의 肝臟의 重量變化는 Table 4에서 보는 바와 같다. 肝臟 對 體重 重量比는 對照食餌群이 4.09±0.39의 增加를 보인데 비하여 10% olive oil 食餌投與群에서는 3.85±0.42(P<0.01)로 有意한 減少를 보였으나, 20% 및 30% Olive oil 食餌投與

群에서는 各各 4.31±0.58(P<0.01), 4.73±0.64(P<0.01)로 有意한 增加를 나타내었다.

Table 4. Effects of Olive Oil Diet on the Liver Weight of ICR Mice.

Group	Liver wt. (gm)	Liver wt. / Body wt. ×100
Control	0.80±0.14	4.09±0.39
10% Olive oil	0.92±0.18	3.85±0.42**
20% Olive oil	1.04±0.18	4.31±0.58**
30% Olive oil	0.90±0.11	4.73±0.64**

Other legends and methods are the same as described in Table 2.

**P<0.01

③ 脾臟과 胸腺의 重量變化

各 群에서 脾臟의 對 體重重量比는 Table 5에서 보는 바와 같다. 對照食餌群이 0.35±0.12인데 비하여 10%, 20% 및 30% olive oil 食餌投與群에서는 各各 0.42±0.13(P<0.01), 0.41±0.26 및 0.37±0.28를 보였으며, 特히 10% olive oil 食餌投與群에서는 有意性 있는 增加를 보였다.

Table 5. Effects of Olive Oil Diet on the Lymphoid Organ Weight of ICR Mice.

Group	Spleen wt. (gm)	Spleen wt. / Body wt. ×100
Control	0.07±0.03	0.35±0.12
10% Olive oil	0.10±0.04	0.42±0.13**
20% Olive oil	0.10±0.06	0.41±0.26
30% Olive oil	0.08±0.05	0.37±0.28

Other legends and methods are the same as described in Table 2.

**P<0.01

한편 胸腺의 對 體重重量比는 Table 5에서와 같

이 對照食餌群이 0.08 ± 0.06 인데 比하여 10% olive oil 食餌投與群에서는 0.12 ± 0.11 ($P < 0.01$)로 有意한 增加를 나타내었고, 30% olive oil 食餌投與群은 0.09 ± 0.05 로 有意性 없는 增加를 보였으나, 20% olive oil 食餌投與群은 0.08 ± 0.03 로 有意性 없는 減少를 보였다.

3. 體液性免疫에 미치는 影響

① 赤血球 凝集素價

赤血球 凝集素價의 結果는 Table 6에서와 같다. 赤血球 凝集素價(HA titer)는 對照食餌群이 6.86 ± 1.12 인데 比하여 10% 및 20% olive oil 食餌投與群에서 各各 7.28 ± 0.69 ($P < 0.01$), 7.28 ± 1.03 ($P < 0.01$)로 有意한 增加를 나타내었고, 30% olive oil 食餌投與群은 7.00 ± 1.07 로 有意性 없는 增加를 보였다.

Table 6. Effects of Olive Oil Diet on the Antibody Production in ICR Mice.

Group	HA titer (\log_2)*
Control	6.86 ± 1.12
10% Olive oil	$7.28 \pm 0.69^{**}$
20% Olive oil	$7.28 \pm 1.03^{**}$
30% Olive oil	7.00 ± 1.07

#HA titer : Hemagglutinin titer.

Mice were challenged with 10^8 SRBC 4 days after sensitization.

Other legends and methods are the same as described in Table 2.

** $P < 0.01$

② Arthus 反應

Arthus 反應의 結果는 Table 7에서 보는 바와 같이, 足腫脹의 두께는 對照食餌群이 13.19 ± 0.74 인데 比하여 10% olive oil 食餌投與群에서는 14.67 ± 5.83 ($P < 0.05$)로 有意性 있는 增加를 나타내었으나, 20% 및 30% olive oil 食餌投與群에서는 各各 12.50 ± 2.61 ($P < 0.05$), 9.39 ± 5.32 ($P < 0.01$)로 有意한 減少를 나타내었다.

Table 7. Effects of Olive Oil Diet on the Arthus Reaction in ICR Mice.

Group	FPSI
Control	13.19 ± 0.74
10% Olive oil	$14.67 \pm 5.83^*$
20% Olive oil	$12.50 \pm 2.61^*$
30% Olive oil	$9.39 \pm 5.32^{**}$

Other legends and methods are the same as described in Table 2.

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

③ 脾臟細胞의 溶血斑形成細胞數(PFC)에 미치는 影響

脾臟細胞의 溶血斑形成細胞數에 대한 結果는 Table 8에서 보는 바와 같다. 10^6 濃度の 脾臟細胞에서는 對照食餌群이 68.19 ± 12.23 인데 比해 10%, 20% 및 30% olive oil 食餌投與群에서는 各各 66.21 ± 15.21 , 65.27 ± 21.32 및 40.42 ± 17.25 ($P < 0.01$)로 減少를 나타냈으며, 특히 30% olive oil 食餌投與群에서는 有意한 減少를 나타내었다.

또한, 10^2 濃度の 脾臟細胞에서는 對照食餌群이 28.00 ± 8.99 인데 比해 10%, 20% 및 30% olive oil 食餌投與群은 各各 26.42 ± 3.01 , 24.32 ± 3.21 및 12.25 ± 2.39 ($P < 0.01$)로 모두 減少를 나타내었으며, 특히 30% olive oil 食餌投與群에서는 有意性 있는 減少를 보였다.

Table 8. Effects of Olive Oil Diet on the Hemolytic Plaque Forming Cell (PFC) in ICR Mice.

Group	PFC/ 10^6 spleen cells	PFC/spleen ($\times 10^2$)
Control	68.19 ± 12.23	28.00 ± 8.99
10% Olive oil	66.21 ± 15.21	26.42 ± 3.01
20% Olive oil	65.27 ± 21.32	24.32 ± 3.21
30% Olive oil	$40.42 \pm 17.25^{**}$	$12.25 \pm 2.39^{**}$

Other legends and methods are the same as described in Table 1.

** $P < 0.01$

4. 細胞性免疫에 미치는 影響

① 遲延型過敏反應(Delayed Type Hypersensitivity 以下; DTH)

DTH에 대한 結果는 Table 9에서와 같이, 足蹠腫脹의 두께가 對照食餌群은 3.33 ± 1.08 인데 比하여 10% olive oil 食餌投與群은 5.97 ± 1.96 ($P < 0.01$)로 有意한 增加를 나타내었으나, 20% 및 30% olive oil 食餌投與群은 各各 2.39 ± 1.78 ($P < 0.01$), 2.58 ± 0.11 ($P < 0.01$)로 有意한 減少를 나타내었다.

Table 9. Effects of Olive Oil Diet on the Delayed Type Hypersensitivity (DTH) in ICR Mice.

Group	FPSI
Control	3.33 ± 1.08
10% Olive oil	$5.97 \pm 1.96^{**}$
20% Olive oil	$2.39 \pm 1.78^{**}$
30% Olive oil	$2.58 \pm 0.11^{**}$

Other legends and methods are the same as described in Table 2.

** $P < 0.01$

② 脾臟細胞의 rosette 形成能(RFC)

各 群에서 觀察한 RFC를 %로 換算한 結果는 Table 10에서 나타난 바와 같이, 對照食餌群이 4.41 ± 0.03 인데 比해 10% olive oil 食餌投與群은 4.87 ± 1.10 ($P < 0.01$)로 有意한 增加를 나타냈으나, 20% 및 30% olive oil 食餌投與群에서는 各各

Table 10. Effects of Olive Oil Diet on the Rosette Forming Cell (RFC) in ICR Mice.

Group	RFC (%)
Control	4.41 ± 0.03
10% Olive oil	$4.87 \pm 1.10^{**}$
20% Olive oil	$3.64 \pm 0.06^{**}$
30% Olive oil	$2.39 \pm 0.05^{**}$

Other legends and methods are the same as described in Table 2.

** $P < 0.01$

3.64 ± 0.06 ($P < 0.01$), 2.39 ± 0.05 ($P < 0.01$)로 有意한 減少를 나타내었다.

5. 大食細胞의 活性檢査

大食細胞의 食食能力을 測定하여 corrected phagocytic index로 換算한 結果는 Table 11에서 보는 바와 같이, 對照食餌群이 7.40 ± 3.07 인데 比해 10% olive oil 食餌投與群은 8.25 ± 0.83 ($P < 0.05$)로 有意한 增加를 보였으나, 20% 및 30% olive oil 食餌投與群은 各各 5.14 ± 1.88 ($P < 0.01$), 3.50 ± 0.50 ($P < 0.01$)로 有意한 減少를 나타내었다.

Table 11. Effects of Olive Oil Diet on the Phagocyte Activity in ICR Mice.

Group	Corrected phagocytic index
Control	7.40 ± 3.07
10% Olive oil	$8.25 \pm 0.83^*$
20% Olive oil	$5.14 \pm 1.88^{**}$
30% Olive oil	$3.50 \pm 0.50^{**}$

Other legends and methods are the same as described in Table 2.

** $P < 0.01$

6. 末梢循環白血球數

olive oil 食餌를 4週間 投與한 後, mouse의 眼球後部靜脈叢으로부터 血液을 採血하여 測定한 白血球數는 Table 12와 같다.

Table 12. Effects of Olive Oil Diet on the Number of Circulating Leukocytes in ICR Mice.

Group	Number of circulating leukocytes (/mm ³)
Control	$6,732 \pm 925$
10% Olive oil	$6,856 \pm 2,637$
20% Olive oil	$5,436 \pm 2,078^{**}$
30% Olive oil	$5,472 \pm 2,415^{**}$

Other legends and methods are the same as described in Table 2.

** $P < 0.01$

對照食餌群에서는 白血球數가 $6,732 \pm 925$ 인데 비해 10% olive oil 食餌投與群에서는 $6,856 \pm 2,637$ 로 有意性없는 增加를 보였으나, 20% 및 30% olive oil 食餌投與群에서는 各各 $5,436 \pm 2,078$ ($P < 0.01$) 및 $5,472 \pm 2,415$ ($P < 0.01$)로 有意한 減少를 나타내었다.

考 察

olive oil 食餌의 投與量이 免疫反應에 影響을 미칠 것으로 思料되어 實施한 實驗의 結果에 대한 考察은 다음과 같다.

本 實驗에서 實驗動物의 體重의 變化는 高用量的 olive oil에서는 體重의 減少가 觀察되었으나, 肝臟의 重量變化는 olive oil의 投與量이 增加함에 따라 비례해서 增加를 보였다. 이는 mouse에 들기름을 投與하여 肝의 cytochrome P-450의 增加와 肝肥大症狀과 肝靜脈血管周圍의 變化를 報告한 林에 의해³⁰⁾, olive oil의 投與量 增加는 肝臟에 脂肪의 蓄積이 增加되어 肝肥大症과 肝障害 等の 상당한 影響을 미친 것으로 思料된다.

免疫臟器인 胸腺의 重要變化는 對照群에 比하여 olive oil의 投與量이 增加함에 따라 減少하는 傾向을 보였고, 脾臟의 重量變化는 Simmons 等에 의해 免疫反應의 程度를 測定하는 方法으로 認定되고 있는 바³¹⁾, 本 實驗에서는 olive oil 投與量의 增加에 따라 減少하는 傾向을 보인 것은 免疫機能에 影響을 미친 것으로 思料된다.

體液性免疫反應인 赤血球 凝集素價反應은 緬羊 赤血球에 대한 抗體와 抗原과의 反應으로서 T-dependent antigen에 대한 免疫抗體의 量을 나타내는 指標인데, 本 實驗結果 赤血球凝集素價는 對照群에 比해 olive oil의 投與量이 增加할수록 減少를 보였다. 이는 過酸化物質가 높은 rancid perilla oil과 perilla oil의 投與量이 많을수록 suppressor-T cell의 作用을 더욱 亢進시켜 赤血球凝集素價를 減少시켰다는 Ahn 等의 報告로 미루어^{32,33)}, 高用量的의 olive oil이 IgG의 生産을 抑制하거나 helper T cell의 機能보다는 suppressor T cell

의 機能에 더 影響을 미친 것으로 思料된다.

Arthus 反應은 抗原-抗體複合體의 補體系의 活性化, hapeman 因子의 活性化 및 血小板 凝集 等に 의해 일어나는 組織障病性過敏反應으로, 本 實驗의 結果 olive oil 投與量이 增加함에 따라 有意性 있는 減少를 보인 바, 이는 補體活性化의 低下와 깊은 연관성이 있는 것으로 思料된다.

脾臟細胞의 溶血斑形成細胞(PFC)는 體液性免疫을 檢査하는 方法이며, 抗原으로 使用한 S-RBC는 T-cell의 도움을 받아서 B-cell의 抗體를 生成할 수 있는 抗原이다. 本 實驗의 結果 olive oil의 投與量이 增加함에 따라 有意하게 減少하였다. 이는 高水準의 必須脂肪酸食餌群(40.6%)이 低水準群(1.4%)에 比해 PFC 反應이 減少하였다는 Erickson 等의 報告와³⁴⁾ olive oil의 投與量이 增加함에 따라 脾臟의 重量이 減少하는 것으로 보아, 高用量的의 olive oil은 S-RBC에 대한 抗體生産能力을 減少시킨 것으로 思料된다.

足蹠腫脹反應에 의해 測定한 DTH 反應은 感作 淋巴球에 의한 lymphokines의 遊離에 起因하는 細胞媒介型過敏反應으로, 本 實驗에서는 對照群에 比해 olive oil의 投與量이 增加함에 따라 DTH 反應이 顯著한 減少를 보였다. 이는 perilla oil의 投與量의 增加는 cyclic AMP를 增加시켜 DTH 反應을 減少시켰다는 Ahn 等의 報告와³⁵⁾, prostaglandin이 lymphokine 形成을 抑制한다는 Gordon 等의 報告로³⁵⁾ 미루어, olive oil의 投與量의 增加는 cyclic AMP 濃度を 增加시켜 lymphokine의 生成을 減少시켰으므로 DTH 反應이 減少된 것으로 思料된다.

脾臟細胞의 rosette 形成細胞(RFC)는 T-cell 및 大食細胞가 모두 rosette를 形成할 수 있으나 大部分 T-cell이 더 깊이 關與한다고 하였는데³⁶⁾, 本 實驗의 結果 RFC는 對照群에 比해 olive oil의 投與量이 增加함에 따라 有意한 減少를 보였다. 이는 prostaglandin이 사람의 T-cell의 rosette 形成을 抑制했다는 Morley 等의 報告와³⁷⁾ prostaglandin이 많을수록 cell membrane에 대한 流動性を 增加시켜 用量依存的으로 T-cell에 대한 反應性を 抑制

한다는 Goodcoin 등의 報告로 미루어³⁰⁾, olive oil의 投與量의 增加는 細胞內 cyclic AMP 濃度를 增加시키고, helper T cell보다는 suppressor T cell의 誘導를 增加시켜 細胞性免疫를 低下시킨 것으로 思料된다.

大食細胞의 活性은 抗原에 대한 免疫能의 發顯 및 interleukines의 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 끼쳤는가를 알기 위한 重要한 指標로 利用되고 있는 바, 本 實驗의 結果에서 olive oil의 投與量이 增加함에 따라 有意한 減少를 나타내었다. 이는 高用量의 olive oil이 T-淋巴球의 增殖抑制와 lymphokines의 生産을 抑制함으로써 大食細胞의 活性이 減少된 것으로 思料된다.

末梢循環白血球數는 olive oil의 投與量이 增加함에 따라 有意한 減少를 보였다. 이러한 結果는 酸敗들가름이 造血機能에 影響을 미쳐 白血球生産을 阻害한다는 Ahn 등의 報告로 미루어³²⁾, 高用量의 olive oil은 造血機能을 抑制함으로써 白血球數가 減少한 것으로 思料된다.

結 論

마우스에 있어서 olive oil 食餌가 免疫反應에 미치는 影響에 대한 結果는 다음과 같다.

1. 10% olive oil 食餌投與群은 對照食餌群에 비해 肝臟의 對 體重比는 有意性 있게 減少시켰으나, 體重 增加率, 脾臟과 胸腺의 重量比, HA, Arthus, DTH, RFC 및 phagocyte activity를 有意性 있게 增加시켰다.

2. 20% olive oil 食餌投與群은 對照食餌群에 비해 體重增加率, 肝臟의 對體重比 및 HA는 有意性 있게 增加시켰으나, Arthus, DTH, RFC, phagocyte activity 및 WBC는 有意性 있게 減少시켰다.

3. 30% olive oil 食餌投與群은 對照食餌群에 비해 肝臟의 重量比는 有意性 있게 增加시켰으나, 體重增加率, Arthus, PFC, DTH, RFC, phagocyte activity 및 WBC는 有意性 있게 減少시켰다.

以上の 結果에서 olive oil 食餌群은 投與量이 增加함에 따라 體液性免疫과 細胞性免疫, 大食細胞의 活性 및 末梢循環白血球數를 有意性 있게 減少시켰다.

REFERENCES

1. Tiscornia, E., Forina, M. and Evangelisti, F.; Chemical composition of olive oil and its variations induced by refining, LA Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, Vol. LIX. 519 (1982)
2. Kiritsakis, A.K.; Studies in photooxidation of olive oil, J. Amer. Oil Chem. Soc., **62**(5), 892 (1985)
3. Kiritsakis, A.K.; Effect of selected storage conditions and packaging materials on olive oil quality, J. Amer. Oil Chem. Soc., **61**(12), 1867 (1984)
4. Kiritsakis, A.K.; Quality studies on olive oil, Dissertation Abstracts International, **44**(03), 179 (1983)
5. Lee, Y.C., Kwak, T.K. and Lee, K.Y.; Relationship between vitamine E and polyunsaturated fat-18 comparative animal study emphasizing perilla seed oil as a fat constituent, Korean J. Nutr., **9**, 19 (1976)
6. 尾崎, 農化; 油脂化學會誌, **2**, 10, 845 (1926)
3, 977, 1201 (1927)
8, 1286 (1932)
7. Matsuo, N.; Studies on the toxicity of fish oil, J. Biochem., **41**, 481 (1954)
8. Matsuo, N.; Studies on the toxicity of fish oil, J. Biochem., **41**, 647 (1954)
9. Jacotot, B., Baudet, M.T., Lasserre, M. *et al.*; Olive oil and lipoprotein metabolism, Rëunions A.F.E.C.G. en, 51 (1988)
10. Lokesh, B., Hui, L.H. and Kinsella, J.E.; Olive oil enriched diets decreases arachidonic acid without affecting prostaglandin synthesis in mouse lung and spleen, Nutr. Res., **8**, 499 (1988)

11. Willam, R., Kidwell, M., Monaco, E. *et al.*; Unsaturated fatty acid requirements for growth and survival of a rat mammary tumor cell line, *Canc. Res.*, **38**, 4091 (1978)
12. Hillyard, L.A. and Abraham, S.; Effect of dietary polyunsaturated fatty acid on growth of mammary adenocarcinomas in mice and rats, *Canc. Res.*, **39**, 4430 (1979)
13. David, I., Lawrence, J.E. *et al.*; Dietary fat consumption and survival among women with breast cancer, *J. Nat. Canc. Inst.*, **75**(1), 37 (1985)
14. Leonard, A.S. and Robert, T.D.; Blood nutrient concentrations and tumor growth in vivo in rats; Relationships during the onset of an acute fast, *Canc. Res.*, **47**, 1065 (1987)
15. Mchugh, M.I., Wilkinson, R., Elliott, R.W., Field, E.J. *et al.*; Immunosuppression with polyunsaturated fatty acids in renal transplantation, *Transplantation*, **24**(4), 203 (1975)
16. Kollmorgen, G.M.; Inhibition of lymphocyte function in rats fed high fat diet, *Canc. Res.*, **39**, 3458 (1979)
17. Dewille, J.W.; Effect of essential fatty acid deficiency and various levels of dietary polyunsaturated fatty acids on humoral immunity in mice, *J. Nutr.*, **109**, 1018 (1979)
18. Chandra, R.K.; Nutrition immunity and infection: present knowledge and future directions, *Lancet*, **1**, 688 (1983)
19. Takuji, T., Mori, H., Fuji, M., Takahashi, M. and Hirono, I.; Carcinogenicity examination of betal quid II: effect of vitamin A deficiency on rats fed semipurified diet containing betal nut and calcium hydroxide, *J. Nutr. and Canc.*, **4**, 1260 (1983)
20. American Institute of Nutrition (AIN), Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutrition studies, *J. Nutr.*, **107**, 1340 (1977)
21. Rogers, Q.R., Harper, A.E.; Amino acid diets and maximal growth in the rats, *J. Nutr.*, **87**, 267 (1965)
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., Kargen Baselip, 184 (1984)
23. Yoshikai, Y., Maike, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K.; Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed foot pad reaction to S-RBC in mice, *Immunol.*, **38**, 577 (1979)
24. Sugimoto, Kojima, A.M., Yaginuma, K. and Gashira, Y.E.; Cell-mediated and humoral immunity in mice, *J. Med. Sci. Biol.*, **28**, 23 (1975)
25. Garvey, T.S., Cremer, N.E., Sussclorf, D.H.; *Methods in immunology*, Benjamin 3rd, 449 (1980)
26. Elliott, B.E. and Haskill, J.S.; Characteristics of thymus-derived bone-marrow-derived rosette forming lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **3**, 68 (1973)
27. Cunningham, A.; Plaque assay for antibody producing cells, *Allergy*, **17**, 5, 112 (1975)
28. Biozzi, G., Benacerraf, B., Stuffle, C. and Halpern, B.N.; Etude quantitative de l'activite granulopexique du systeme reticuloendothelial chez la souris, *C.R. Soc. Biol. Paris*, **148**, 43 (1954)
29. Snedecor, G.W. and Cochran, W.G.; *Statistical methods*, Iowa State University Press, **6**, 1 (1967)
30. 林鐘弼; 圓光大學校 大學院 學位誌文集, **2**, 145 (1979)
31. Simonsen, M.; Graft versus host reaction: Their natural history and applicability as tools of research, *Prog. Allergy*, **6**, 349 (1961)
32. Ahn, Y.K., Kim, J.H. and Park, Y.G.; The effect of rancid perilla oil diet on the immune response in mice, *Kor. J. Environ. Toxicol.*, **3**(1/

- 2), 9 (1988)
33. Ahn, Y.K., Kim, J.H. and Kim, D.H.; Effect of perilla oil diet on the immune response in mice, *Kor. J. Environ. Toxicol.*, **3**(3/4), 17 (1988)
34. Krickson, K.L., Adams, D.A. and McNeil, C.J.; Dietary lipid modulation of immune responsiveness, *Lipids*, **18**, 468 (1983)
35. Gordon, P. and Morley, J.; Control of lymphokine secretion by prostaglandins, *Nature*, **262**, 401 (1976)
36. Back, J.F. and Dardenne, M.; Antigen recognition by T lymphocytes, *Cell Immunol.*, **3**, 1 (1972)
37. Morley, J.; Prostaglandins and lymphokines in arthritis, *Prostaglandins*, **8**(4), 315 (1974)
38. Goodcoin, J.S., Bankhugt, A.O. and Messenger, R.P.; Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin, *J. Exp. Med.*, **146**, 1719 (1977)