

*Proteus vulgaris* RH-90에서 추출하여 감마선 조사시킨  
Lipopolysaccharide(LPS)의 항암 및 면역활성에 미치는 영향

류 병 호 · 박 우 열 · 김 희 숙 · \*박 중 옥  
경성대학교 식품공학과, \*경성대학교 화학과

Antitumor and Immunological Activities of  $\gamma$ -ray Irradiated  
Lipopolysaccharide Extracted from *Proteus vulgaris* RH-90

Beung-Ho Ryu, Woo-Yeul Park, Hee-Suck Kim, \*Jong-Ok Park  
Department of Food Science and Technology,  
\*Department of Chemistry, Kyung-Sung University, Pusan, Korea

ABSTRACT

The aims of this study were investigated the antitumor effects and immunological activities of lipopolysaccharides (LPS) extracted from *Proteus vulgaris* RH-90 toward sarcoma-180 cells.

LPS extracted from *Proteus vulgris* RH-90 was irradiated with gamma ray for detoxification. The tumor incidence of sarcoma-180 occurs all group which injected with gamma ray irradiated LPS and tumor of sarcoma-180 was necrotized with breeding in the injected group of 10 $\mu$ g LPS.

The inhibition ratio of tumor growth showed at the highest level of 60.88% when 5 $\mu$ g gamma ray irradiated LPS was injected into mice. The prolongation ratio of life showed 20.72% when injected into mice with gamma ray irradiated LPS of 5 $\mu$ g.

In the effect of immunological activity, the number of circulating leucocyte and peritoneal exudate cells were increased significantly in the treatment group than that control group, and dose-dependent responses indicated by the increase of weights of immunorgans which revealed the improvement of immunity.

The effect of macrophage on phagocytes, there were not found the differences between phagocytic and corrected phagocytic index.

서 론

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람음성 병원성 세균의 세포 외막의 구성성분으로 lipid A라 불리는 지질에 각종의 당류가 공유결합하고 있어 옛부터 중요한 연구의 대상이었다. 병원성 세균에서 분비되는 LPS는 사람이나 동물에 감염되면 발열등 병을 일으키는 endotoxin의 원인물질이지만 반면에 생물에게 유익한 생화학적 특성이 있어

많은 연구가 진행되고 있다. Boivin 등(1), Morgan과 Pairidge(2) 및 Goebel등(3)이 LPS를 최초로 분리하여 다당류, 단백질 및 미동정 지질의 복합체임을 밝혔다.

Westpal등(4)은 미생물에서 단백질을 함유하지 않은 LPS를 정제하였는데, 이 LPS는 O-specific antigen, oligosaccharide 및 lipid A로 구성되어 있으며, lipid A라는 성분이 독성을 나타내는 것으로 알려졌다.

한편 LPS가 감염 저항성 증가, 비특이적 감염방어작용

및 항종양 효과 등의 면역부활작용이 알려져 지금까지 많은 연구가 계속 이루어지고 있어 의학방면에 응용될 가능성이 검토되고 있다(5-9).

이와같이 LPS의 유익한 생화학적 활성이 보고되면서 LPS의 endotoxin을 저하시킬 연구가 이루어지고 있다. 이에 관한 연구로는 *Vibrio Parahaemolyticus*(10), *Proteus mirabilis*(11), *Salmonella typhimurium*(12) 및 *Serratia minnesota*(13)에 대한 gamma선의 조사에 의한 endotoxin을 약화시킨 LPS의 항암 및 면역활성에 대한 보고가 있다.

본 연구는 도양에서 분리하여 본 실험실에서 보관하고 있는 독성이 비교적 약한 *Proteus vulgaris* RH-90을 배양하여 LPS를 추출 정제하고 gamma선을 조사하여 endotoxin을 약화시킨 후 마우스를 대상실험동물로 하여 sarcoma-180 cell을 주사하여 항암효과 및 면역기능에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 실험

### 균주

*Proteus vulgaris* RH-90은 본연구실에서 분리보관한 균주를 사용하였다.

### 균주배양

*Proteus vulgaris* RH-90 균주를 5L의 발효조(Marubishi, Co. Model No. HBF-300)에 1.5L의 nutrient broth을 넣고 전배양액을 1.5%가 되도록 첨가하고 37°C에서 16시간 배양한 다음 배양액을 원심분리하여 0.9% NaCl 용액으로 씻은 후 증류수로 2회 세척하고 다시 원심분리(44,000×g, 10min)한 후 동결 건조하였다.

### LPS의 분리 및 정제

Chloroform: methanol (CM) 혼합액에 대한 균체의 전처리

동결건조한 균체 500mg에 CM용액 (chloroform:methanol, 4:1, v/v) 100ml를 넣어 53°C에서 6-8시간 추출하였다. 실온에서 냉각한 후 추출물을 Whatmann No. 1 여과지로 여과한 후 그 잔사를 같은 방법으로 3회 추출한 후 다시 여과하여 그 잔사를 진공건조 시켰다.

### LPS의 분리

진공건조시킨 균체를 대량으로 정제하기 위해 Darveau와 Hancock(14) 및 Galanos등(15)의 방법에 따라 분리하였다.

### LPS의 확인

LPS를 확인하기 위하여 추출한 LPS를 표준 LPS(Sigma Co.)와 비교하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, UV spectrophotometer (UV Spectrophotometer 160, Shimadzu Co.) 및 IR Spectrum (島律赤外分光光度計, IR-470)으로 동시에 측정하였다.

### LPS의 감마선조사

LPS 수용액(1mg/ml)을 28°C에서 5, 10, 15 및 20 kGy 용량으로 감마선(Gamma cell-220, Atomic Energy of Canada)을 조사한 후 다시 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

### 치사독성

LPS와 감마선조사 LPS의 독성을 알아보기 위하여 Galanos등(16)의 방법에 따라 galactosamine을 주사한 마우스를 사용하여 실험하였다.

### 항암실험

#### 실험동물

본 실험에서 사용한 동물은 경성대학교 동물 사육장에서 양성 ICR 마우스로서 체중 18-22g에 속하는 것이고 사료는 삼양유지 사료사의 항생제 무첨가 마우스용 pellet를 사용하였다. 물과 사료는 충분히 공급하였고, 동물실은 12시간 간격의 light-dark cycle을 유지하였으며 실험동물의 24시간 주기를 고려하여 사료의 투여와 실험은 가능한한 오전 9시에서 11시 사이에 행하였다.

#### 종양세포

본 실험실에서 ICR 마우스의 복강내에 1주일 간격으로 계대 배양하고 있는 sarcoma-180 cell을 실험용 종양세포로 사용하였다. 즉, 실험동물의 복강내에서 7일간 배양된 sarcoma-180 cell을 경추 탈골법(cervical dislocation)에 의하여 마우스를 치사시킨 후 복수와 함께 취하고 0.83% NH<sub>4</sub>Cl을 가하여 잘 섞어준 후 5분간 원심분리(400×g)하여 종양세포 침전물을 분리하였다. 세포 침전물을 다시 빙냉의 멸균 생리식염수에 부유시켜 재차 원심분리하여 상등액을 제거한 후 잔존하는 적혈구를 피해 sarcoma-180 cell만을 취하였다. 동일 방법으로 2회 세척하고 hemacytometer로 세어서 1.0×10<sup>7</sup> cells/ml가 되도록 종양 세포 부유액을 만들어 0.1ml(1.0×10<sup>6</sup> cells/mouse) 씩을 실험 동물의 복강에 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

#### 시료의 조제

시료는 멸균 생리식염수를 사용하여 조제하였고 투여량은 마우스당 1mg과 5mg으로 하고 대조군은 생리식염수만 투여하였으며 투여하지 않을 때는 냉장고에 보관하였

다.

#### 고형암 발생빈도 실험

실험동물을 각 군당 7마리로 하여 전술한 방법으로 조제한 종양 세포 부유액을  $1.0 \times 10^7$  cells/ml로 현탁하여 각 실험동물에  $0.1\text{ml}$  ( $1 \times 10^6$  cells/mouse)씩을 왼쪽 서혜부(left groin)에 피하 이식하였다. 이식 24시간 후부터 시료를 10일간 연속으로 복강투여하고 종양이식 26일째 되는 날 치사시킨 후 고형암의 발생 여부를 관찰하였다.

#### 고형암 성장저지 실험

실험실에서 일주일 간격으로 계대 보관중인 종양 세포 부유액  $0.1\text{ml}$  ( $1.0 \times 10^6$  cells/mouse)씩을 실험동물의 왼쪽 서혜부에 피하 이식한 후 24시간 후부터 10일간 연속으로 시료용액을 복강내에 투여하고 종양 세포 이식 26일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하여 그 무게를 측정 후 Goldin 등의 방법(17)에 따라 종양 성장저지 백분율(tumor growth inhibition ratio, I.R., %)을 계산하였다.

#### 수명 연장 실험

전술한 방법으로 조제한 종양 세포 부유액  $0.1\text{ml}$  ( $1.0 \times 10^6$  cells/mouse)씩을 실험동물의 복강내에 이식한 뒤 24시간 후부터 10일간 연속으로 시료를 복강내에 투여하여 35일까지의 생존여부를 관찰하고 평균 수명 일수를 계산하여 Goldin 등의 방법(17)에 따라 수명 연장 백분율(prolongation ratio, %)을 구하였다.

#### 면역기능에 미치는 영향

##### 혈중 백혈구수에 미치는 영향

실험동물에 시료를 10일간 연속으로 복강내에 투여하였다. 시료 투여 최종일로부터 1일, 2일, 4일 및 7일째 되는 날 각 마우스 눈의 정맥총으로부터 heparinized capillary를 이용하여  $80\mu\text{l}$ 의 혈액을 취하여 citrate-saline  $320\mu\text{l}$ 와 잘 섞은 다음 Turk's solution으로 염색하고 hemacytometer를 이용하여 백혈구수를 측정하였다(18).

##### 총 복강 세포수에 미치는 영향

실험동물을 시료 투여군과 대조군으로 나눈 후 시료를 3일간 연속으로 복강내에 투여하였다. 시료 투여 최종일로부터 1일, 2일 및 4일째 되는 날 각 3마리의 마우스를 경추 탈골법에 의해 치사시키고 5ml의 생리식염수로 복강내를 잘 세척한 다음 복수액과 함께 취하여 Turk's solution으로 염색한 후 hemacytometer로써 총 복강 세포수를 측정하였다(19).

##### 면역 관련 장기의 무게 변화

실험동물을 시료 투여군과 대조군으로 나누어, 시료를

10일간 연속으로 마우스의 복강내에 투여하고 투여 최종일로부터 8일째 되는 날 마우스를 경추 탈골법에 의하여 치사시키고 체중을 측정후한 후, 비장 및 흉선을 적출하여 각각 장기 무게를 측정하였다(20).

#### Macrophage의 식작용에 미치는 영향

시료의 *in vivo*에서의 macrophage의 식작용에 미치는 영향을 알아보기 위해 Halpern 등(21) 및 Biozzi 등(22)의 방법에 따라 carbon clearance test를 실시하였다.

## 실험결과 및 고찰

### LPS의 분리 정제

5L 용량의 발효조에 1.5L의 nutrient broth를 넣고 여기에 *Proteus vulgaris* RH-90을 전배양한 배양액을 전체 용량의 1.5%를 넣어 16시간 배양시킨 후 Darveau와 Hancock (14) 및 Galanose 등(15)의 방법에 따라 분리하고, LPS를 확인하기 위하여 표준품 LPS와 동시에 UV 및 IR-spectrum으로 확인한 결과를 표준품 LPS(Sigma Co.)와 비교하여 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. UV-

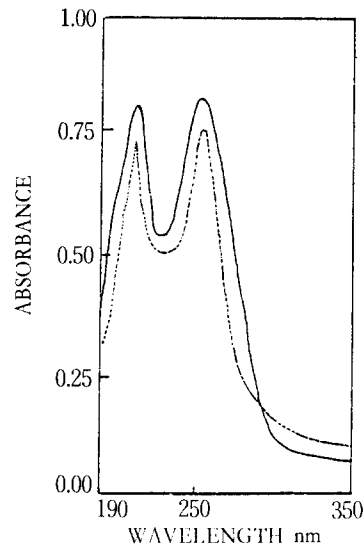


Fig. 1. UV spectrum of LPS extracted from *Proteus vulgaris* RH-90 and standard LPS as reference. The sample were scanned at a concentration of  $30\mu\text{g/ml}$  by UV spectrophotometer.

—: LPS extracted from *P. vulgaris* RH-90  
 -----: Standard LPS purchased from Sigma Co.

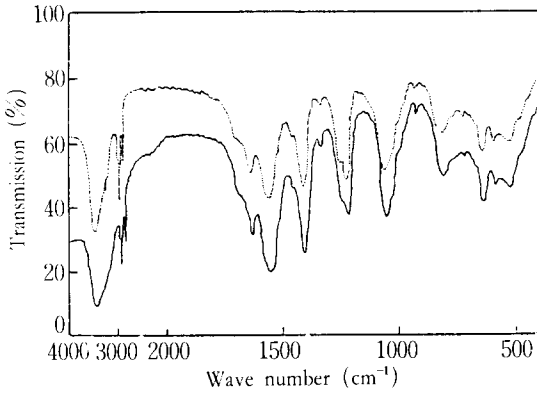


Fig. 2. Infrared spectra of LPS extracted from *Proteus vulgaris* RH-90 and standard LPS as reference.  
 — : LPS extracted from *P. vulgaris* RH-90  
 - - - : Standard LPS purchased from Sigma Co.

spectrum에서는 205 및 250nm 부근에서 각각 흡수 peak 를 나타내었다(Fig. 1). 그리고 IR spectrum에서 보면 일반적으로 다당류에서 확인되는 3400cm<sup>-1</sup> 부근의 -OH 기 신축진동, 1225-1200cm<sup>-1</sup>의 glycosidic기의 신축진동으로 당의 특성을 알 수 있고 또 1650cm<sup>-1</sup>와 1500-1580 cm<sup>-1</sup> 흡수영역은 N-acetyl hexosamine이 있는 acetoamide 기의 특성임을 알 수 있으며, 표준품 LPS와 비슷한 spectrum 을 나타내고 있다.

한편 1735cm<sup>-1</sup>의 신축진동으로 carbonyl기의 존재이고 1270-1150cm<sup>-1</sup>과 1120-1030cm<sup>-1</sup>의 C-O-C기의 신축진동으로 이들 흡수대는 지방산의 에스테르 결합을 나타내므로 LPS임을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 표준품 LPS 도 균체에서 추출한 LPS와 spectrum이 비슷한 경향을 나타내고 있다.

**LPS 치사독성에 대한 감마선조사의 효과**

LPS를 15 및 20kGy 용량의 gamma선으로 각각 조사한 후 조사하지 않은 LPS와 UV spectrum 및 IR spectrum을 비교한 결과는 Fig. 3, 4와 같다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 gamma선을 조사하지 않은 정상 LPS는 205nm 및 255nm부근에서 2개의 peak가 높게 나타나고 있으나 gamma선조사 LPS는 peak가 현저히 줄어들었다. 그러나 Fig. 4에서 나타낸 IR spectrum에서는 감마선을 조사한 LPS는 감마선을 조사하지 않은 LPS와 뚜렷한 차이를 찾아 볼 수 없었다.

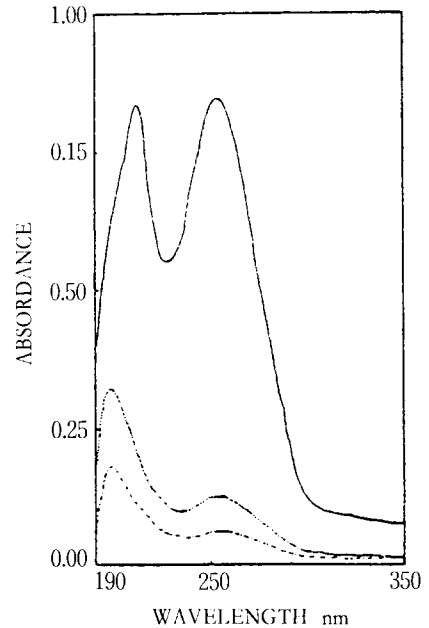


Fig. 3. Comparison of UV spectrum of native and irradiated LPS of *Proteus vulgaris* RH-90  
 — : native LPS  
 - - - : irradiated LPS (15kGy)  
 - · - : irradiated LPS (20kGy)

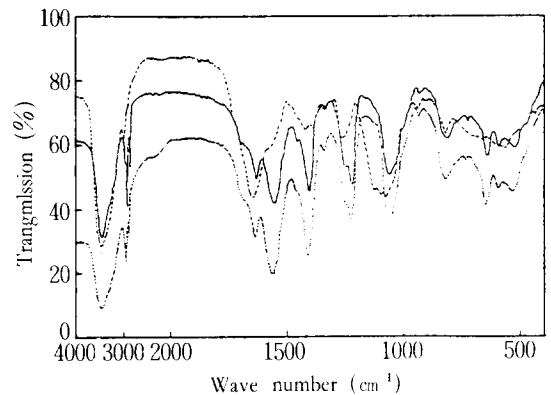


Fig. 4. Comparison of infrared spectra of native and irradiated LPS of *Proteus vulgaris* RH-90  
 - - - : native LPS  
 — : irradiated LPS (15kGy)  
 - · - : irradiated LPS (20kGy)

Table 1. Effect of gamma ray irradiation on toxicity of LPS extracted form *Proteus vulgaris* RH-90

Dose(kGy)	LD <sub>50</sub> ( $\mu$ g) <sup>a)</sup>
0	1.2
5	2.5
10	5.2
15	7.5
20	10.5

LPS was irradiated at different doses ranging from 5-20kGy. Each concentration of LPS was injected with i. p. into ICR mice injected with 30mg of D-galactosamine HCl (each group 6 mice) and the mice were observed for 24hr.

LPS는 암의 치료에 이용 가능성은 있으나 독성이 가장 문제가 된다. LPS는 자체독성이 강하기 때문에 독성을 줄이기 위하여 gamma선을 조사한 후 독성을 조사하였다. Galanos등(16)의 방법에 따라 대상실험동물에 감수성을 높이기 위하여 galactosamine, HCl을 30mg씩 근육주사 한 후 감마선을 조사한 LPS를 주사한 다음 LD<sub>50</sub>을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

LPS의 대조군은 LD<sub>50</sub>이 1.2 $\mu$ g이었으나 감마선을 5, 10, 15 및 20kGy의 용량으로 조사하였을 때의 LD<sub>50</sub>은 2.5, 5.2, 7.5 및 10.5 $\mu$ g으로 감마선조사의 용량이 증가할수록 LPS의 낮은 치사독성을 나타내고 있다.

Bandekar등(10)은 *Vibrio parahaenolyticus*의 LPS를 복강주사 하였을 때 galactosamine을 주사한 C57 BL/6 mice에서는 LD<sub>50</sub>이 1.5 $\mu$ g이었다고 보고하였다. 그리고 *Salmonella typhimurium*에서 추출한 LPS를 gamma선을 조사했을 때의 LD<sub>50</sub>이 약 200배 정도 독성이 약하였다(12). El Sabbagh등(13)은 LPS의 감마선 조사의 양이 증가되면 투석과정에서 lipid A에 결합하고 있는 인산이 제거되어 독성이 없는 monophosphoryl lipid A가 되기 때문이라고 주장하였다.

이와 같이 감마선 조사에 의한 LPS의 독성의 감소는 당질의 변화와 독성이 있는 lipid A에 화학적 수식이 일어난 것이라고 추정된다(12, 16, 23).

## LPS의 항암활성

### 고형암 발생빈도

고형암의 발생 빈도를 알아 보기 위하여 LPS의 각 농도별로 감마선을 조사한 그룹과 조사하지 않은 그룹으로 구분하여 실험한 결과 Table 2와 같다.

이와 같이 각 농도별로 시료를 투여하고 26일째 되는

Table 2. The effect of gamma ray irradiated LPS of the *Proteus vulgaris* RH-90 on the tumor incidence.

Treatment	Dose ( $\mu$ g)	Incidence (a / b)	Incidence ratio(%)
control	0.9NaCl	7 / 7	100
Irradiated	1	7 / 7	100
LPS(15kGy)	5	7 / 7	100
	10	-	-

\*a: The number of tumor bearing mice survived

b: The number of mice used

날 고형암의 발생여부를 관찰한 바 감마선을 15kGy의 용량으로 조사한 LPS 투여군에서는 대부분 고형암이 발생하였고 10 $\mu$ g 이상 투여군에서는 출혈이 나타났다. 감마선을 조사하지 않은 LPS만을 주사했을 때는 죽거나 종양의 출혈 현상이 나타났다. 이러한 출혈 현상은 LPS의 독성으로 인한 종양의 괴사현상으로 오는 출혈인 것으로 추정된다(24-26).

### 고형암 성장저지 효과

LPS는 소량이라도 독성이 강하기 때문에 감마선을 5, 10, 15 및 20kGy의 용량으로 조사하여 독성을 약화시켰다. 예비 실험에서 감마선을 조사하지 않은 LPS를 1, 5 및 10 $\mu$ g씩 각각 주사하여 관찰 하였으나 투여시 대부분의 마우스가 종양에 출혈이 생기거나 죽는 수가 빈발하였다. 그러므로 본 실험에서는 임의로 15kGy량으로 감마선을 조사한 LPS를 1 $\mu$ g과 5 $\mu$ g의 그룹으로 나누어 sarcoma-180 cell을  $1.0 \times 10^6$  cell 되도록 희석하여 서혜부에 주사하고 항암실험을 실시하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 15kGy 용량으로 감마선을 조사한 LPS를 투여한 마우스의 고형암 저지 실험에서는 대조군의 종양무게는  $3.40 \pm 0.82$  g 이었으나 1 $\mu$ g과 5 $\mu$ g에서의 종양무게는  $2.83 \pm 0.28$  g,  $1.33 \pm 0.21$  g 이었고 이에 따른 저지율은 각각 16.76% 및 60.88%였다.

그러나 10 $\mu$ g 투여시 종양 무게는  $2.73 \pm 0.34$  g으로 19.71%의 낮은 종양 저지 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 독성이 강한 LPS를 감마선 조사에 의하여 독성을 약화시켰을 때 투여량에서는 다소 차이가 있으나 고형암 성장 저지 효과는 비슷한 경향이었다(10, 12, 13).

### 수명 연장 효과

*Proteus vulgaris* PH-90에서 추출 정제된 LPS를 감마선을 조사하여 수명 연장 실험을 한 결과는 Table 4에 나타내었다.

15kGy 용량의 감마선을 조사한 LPS를 1, 5 및 10 $\mu$ g으로

로 주사한 결과 1 $\mu$ g과 5 $\mu$ g에서는 10.81, 20.72%의 수명 연장 효과를 나타 내었으며 10 $\mu$ g을 주사했을 때는 2.61%로 낮은 수치였다. 이러한 결과는 *in vivo*에서의 고형암 성장저지 효과는 높은 항암효과를 나타내었지만 부강에 이식한 복수형암에 대해서는 낮은 효과를 보이므로 투여한 LPS가 *in vivo*에서 항암효과는 숙주 매개형작용에 의한 것으로 생각되며 tumor cell에 대한 직접적인 세포독성작용은 별로 없는 것으로 생각된다. 일반적으로 수명 연장 실험은 sarcoma-180 cell을 이식하고 35일까지의 생존여부를 관찰 했지만 최종일까지 생존한 마우스는 없었다.

따라서 면역기능에 미치는 영향에 대한 실험은 항암실험에서 약간의 좋은 결과를 얻은 15kGy용량의 감마선을

조사한 LPS를 1 $\mu$ g과 5 $\mu$ g농도만 사용하였다.

#### 면역기능에 미치는 영향

##### 혈중 백혈구수에 미치는 영향

항암 실험을 근거로 LPS가 높은 항암효과를 나타내므로 그 효과의 작용기전을 알아보기 위하여 면역기능에 미치는 영향을 조사하였다(Table 5). 이중 순환말초 혈액 내의 백혈구수에 미치는 영향은 시료투여 후 1일, 2일, 4일 및 7일째 백혈구수는 대조군에 비하여 현저히 증가를 나타내다가 시간이 경과함에 따라 점점 감소하는 경향을 나타내었다. 5 $\mu$ g 투여시 증가율이 양호하였으며 1일째에 64.20%로 최고 증가하였다.

백혈구는 다형핵 백혈구와 단핵 백혈구로 나눌 수

Table 3. Antitumor activity of native and gamma ray irradiated LPS extracted from *Proteus vulgaris* RH-90

Treatment	Dose ( $\mu$ g)	No. of mice	Tumor weight (mean $\pm$ SE)	Inhibition ratio(%)
control	—	7	3.40 $\pm$ 0.82	—
Irradiated	1	7	2.83 $\pm$ 0.28	16.76
LPS(15kGy)	5	7	1.33 $\pm$ 0.21	60.88
	10	7	2.73 $\pm$ 0.34	19.71

Table 4. The effect of gamma ray irradiated LPS of *Proteus vulgaris* RH-90 on life span of bearing ICR mice

Treatment	Dose ( $\mu$ g)	No. of mice	Survival days	Prologation ratio(%)
control	—	7	21.43	—
Irradiated	1	7	23.78	10.81
LPS(15kGy)	5	7	24.90	20.72
	10	7	20.87	2.61

Table 5. Effects of irradiated LPS extracted from *Proteus vulgaris* RH-90 on the number of circulating leucocyte in male ICR mice

Treatment	Dose ( $\mu$ g)	No. of mice	Day 1 <sup>a)</sup>	Day 2	Day 4	Day 7
Control	—	12	7,340 $\pm$ 156 <sup>b)</sup>	7,120 $\pm$ 192	7,300 $\pm$ 120	7,240 $\pm$ 0.2600
LPS	1	12	9,442 $\pm$ 310	8,800 $\pm$ 184	7,745 $\pm$ 213	7,230 $\pm$ 0.1760
	5	12	11,900 $\pm$ 360	11,840 $\pm$ 3906	11,440 $\pm$ 331	9,720 $\pm$ 0.2310

a) Day after last injection

b) Mean  $\pm$  S. E.

있으며 다형핵 백혈구의 주된것은 호중구이며 나머지는 호산구와 호염기구이다. 다형핵 백혈구는 감염에 대한 방어의 제1선을 맡고 감염방어의 제2선을 구성하는 단핵 백혈구는 분열증식 할 수 있어 다형핵 백혈구 보다는 긴 반감기를 갖고 있어 식작용을 되풀이 할 수 있다 (27). 이러한 백혈구의 수가 증가하는 것은 면역기능이 증가하였음을 알 수 있다.

**총 복강 세포수에 미치는 영향**

LPS가 총복강 세포수에 미치는 영향의 실험결과는 Table 6에 나타내었으며 시료투여 후 1일, 2일 및 4일째의 총 복강 세포수는 1일째의 복강 세포수가 5 $\mu$ g 투여군이 대조군에 비해 2.84 $\pm$ 0.501( $1 \times 10^6$  cells / ml)로 최고로 증가하였으나 2일째, 4일째는 점점 감소하였고 1 $\mu$ g일때는 5 $\mu$ g보다 다소 낮은 증가치를 나타내었다.

복강 세포 중에는 대식세포, 다형핵 세포 및 단핵 세포들이 함유되어 있으며 이는 암에 대한 방어기구의 기능으로서는 식세포 기능, 항원제공기능, 분비기능, 세포상대성 기능등을 나타내므로 복강세포의 증가는 면역기능 증가의 지표가 된다.

**면역 관련 장기의 무게변화**

당지질을 투여하였을 때의 면역 관련 장기의 무게변화에 대한 결과는 Table 7, 8에 나타난 바와 같이 시료투여 농도가 1 $\mu$ g과 5 $\mu$ g일때 간의 무게증가는 8.73%와 15.13%이며 비장의 무게증가는 20.96%와 32.34%이고 흉선은 4.85%와 13.50%로 나타났다. 모든 장기에 있어서 5 $\mu$ g을 투여 했을때가 1 $\mu$ g을 투여했을 때 보다 장기무게증가가 좋은 것으로 나타났다.

간에는 kuffer cell를, 비장에는 splenic macrophage를

**Table 6. Effects of gamma ray irradiated LPS extracted from *Proteus vulgaris* RH-90 on the number of peritoneal exudate cells in male ICR mice**

Treatment	Dose ( $\mu$ g)	No. of mice	(1 $\times 10^6$ cells / ml)		
			Day 1 <sup>a)</sup>	Day 2	Day 4
Control	—	9	1.88 $\pm$ 0.501 <sup>b)</sup>	1.74 $\pm$ 0.21	1.94 $\pm$ 0.334
LPS	1	9	2.64 $\pm$ 0.320	1.68 $\pm$ 0.320	1.67 $\pm$ 0.367
	5	9	2.84 $\pm$ 0.501	2.26 $\pm$ 0.580	1.84 $\pm$ 0.110

a) Day after last injection

b) Mean  $\pm$  S. E.

**Table 7. Effects of irradiated LPS extracted from *Proteus vulgaris* ATCC 6380 on the immunoorgan weight of ICR mice ( I )**

Treatment	Dose ( $\mu$ g)	No. of mice	Body weight( g ) <sup>a)</sup>		Liver weight (mg)	Weight Increase (%)
			on 1st day	on 18th day		
Control	—	12	18.87 $\pm$ 1.76	24.80 $\pm$ 1.90	1,249 $\pm$ 201	—
LPS	1	12	20.64 $\pm$ 0.60	24.18 $\pm$ 1.80	1,358 $\pm$ 289 <sup>b)</sup>	8.73
	5	12	20.28 $\pm$ 0.54	24.00 $\pm$ 1.37	1,438 $\pm$ 197 <sup>b)</sup>	15.13

a) Mean  $\pm$  S. E.

b) P>0.05

**Table 8. Effects of irradiated LPS extracted from *Proteus vulgaris* RH-90 on the immunoorgan weight of ICR mice ( II )**

	Dose ( $\mu$ g)	No. of mice	Spleen	Weight	Thymus	Weight
			weight(mg)	increase(%)	weight(mg)	increase(%)
Control	—	12	167 $\pm$ 54.25	—	103.0 $\pm$ 7.64	—
LPS	1	12	202 $\pm$ 54.90	20.96	108.0 $\pm$ 10.24	4.85
	5	12	221 $\pm$ 71.80	32.34	115.0 $\pm$ 20.00	13.50

Table 9. Effects of gamma ray irradiated LPS extracted from *Proteus vulgaris* RH-90 on the carbon clearance activity in ICR mice

Treatment	Dose ( $\mu\text{g}$ )	No. of mice	Phagocytic <sup>a)</sup> Index	Corrected Phagocytic Index <sup>a)</sup>
Control	—	7	0.048 $\pm$ 0.0008	6.8943 $\pm$ 0.0970
LPS	1	7	0.054 $\pm$ 0.0008	5.3664 $\pm$ 0.1538
	5	7	0.056 $\pm$ 0.0007	7.7940 $\pm$ 0.1105

a) Mean  $\pm$  S.E.

함유하고 있으며 이는 체내의 이물질에 대한 방어작용을 담당한다는 사실과 관련해 볼 때 이들 무게증가는 세포 수 증가뿐만 아니라 기능의 증가도 생각할 수 있으며 흉선의 증가는 T-림파구의 작용도 증가했다고 볼 수 있다(28).

#### Macrophage의 식작용에 미치는 영향

Macrophages는 미생물의 침입에 대한 방어기구나 노폐물 혈구의 처리등 외에 항암효과 및 항체생산 과정의 중요한 단계를 담당하고 있다는 사실은 이미 잘 알려져 다당류가 tumor cell에 대한 macrophage의 세포독성을 증가시킨다고 보고되어 있다(29).

본 실험에서는 대조군과 시료투여군에서 별차이를 나타내지 않았는데 이는 macrophage 기능에는 영향을 주지 않았으며 정상적인 마우스에서 생체의 항상성 유지 기능을 초월해서까지 탐식능을 증가시키지 않는다는 것을 나타내고 있다(Table 9).

## 요 약

본 연구는 *Proteus vulgaris* RH-90의 배양액에서 추출한 lipopolysaccharide(LPS)를 감마선으로 조사하여 저독화(低毒化)시킨 LPS를 Sarcoma-180 cell을 이용한 항암효과와 면역활성을 검토 하였다.

*Proteus vulgaris* RH-90으로 부터 추출한 LPS는 감마선에 의하여 독성이 약화되었고, sarcoma-180 cell의 발생빈도는 감마선을 조사한 LPS의 투여군에서 모두 나타났으며, 10 $\mu\text{g}$  투여군에서는 중량의 출혈로 괴사현상이 나타났다. Sarcoma-180의 성장저지율은 감마선 조사 LPS를 5 $\mu\text{g}$ 을 투여하였을 때 60.88%로 가장높은 항암효과를 나타내었다.

수명 연장실험은 감마선 조사 LPS 5 $\mu\text{g}$ 을 쥐에 투여하였을 때 20.72%이었다. 면역활성에 미치는 영향에서는 백혈구수와 흉복강 세포수는 대조군에 비하여 현저한 증가를 나타내었으며, 면역 관련 장기의 무게도 용량에 따라 증가하는 용량의존성 반응을

보였다.

그리고 Macrophage의 식작용에 미치는 영향은 Phagocytic index와 corrected phagocytic index는 거의 차이를 찾아 볼 수 없었다.

## 감 사

본 연구는 1989년도 교육부 학술 연구 조성비에 의하여 이루어졌으며, 교육부 당국에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Boivin, A., Mesrobian, I. and Mesrobian, L. (1983); Extraction d'un complexe toxique et antigenique. A partir du Bacille d'aertrycke. C. R. Soc. Biol., **114**, 307—310.
- Morgan, W. T. J. and Patridge, W. M. (1941); Studies in immunochemistry. 6. The use of phenol and alkali in the degradation of antigenic material isolated from *Bct. dysenteriae* (Shiga), *Biochem. J.*, **35**, 1140—1163.
- Goebel, W. F., Binkly, F. and Perlman, E. (1945); Studies on the Flexner group of dysentery bacilli, 1. The specific antigen of Shigella dysenteriae (Flexner), *J. Exptl. Med.* **81**, 315—330.
- Westphal, O., Luderitz, O., Galanos, C., Mayer, H. and Rietsch El, E. T. (1985); The story of bacterial endotoxin. In *Advances in Immunopharmacology*, pp. 13—34. Edited by L. Chedid, J. W. Hadden, F. Spreafico, P. Dukor and D. Willoughby. Oxford: pergamon press.
- Ikawa, M., Koepfl, J. B., Mudd, S. G. and Nieman, C. (1952); An agent from *E. coli* causing hemorrhage and regression of an experimental tumor. I. Isolation and properties, *J. Natl. Cancer Inst.*



- 13, 157–166.
6. Luderitz, O., Tanomoto, K., Galanos, C., Brade, H., Zahringert, U., Rietschel, E. T., Kusumoto, K. and Shiba, T. (1984): Lipopolysaccharides, structural principles and biological activities, *Rev. Infect. Dis.* **6**, 428–431.
  7. Mizuno, D., Yoshika, O., Akamatu, M. and Kataoka, T. (1968): Antitumor effect of intracutaneous injection of bacterial lipopolysaccharide, *Cancer Res.*, **28**, 1531–1537.
  8. Ribí, E. W., Haskins, E. T., Milner, K. C., Anacker, R. C., Ritter, D. B., Goode, G., Trapani, R. J. and Landy, M. (1962): Physicochemical changes in endotoxin associated with loss of biological potency, *J. Bacteriol.* **84**, 803–814.
  9. Sultzter, B. M. (1962): Chemical modification of endotoxin and inactivation of its biological properties, p. 91–126, Vol. 5. In Kadis, S., Weinbaum, G. and Ajl, S. J. (eds), *Microbial Toxins, Bacterial Endotoxins*, Academic Press, New York.
  10. Bandekar, J. R. and Nerkar, D. P. (1987): Antitumor activity of LPS and radio-detoxified LPS of *Vibrio parahaemolyticus*, *Microbiol. Immunol.*, **31**(7), 675–691.
  11. Nakahara, M., Kitahara, N., Hamano, K., Arai, M. and Okajaki, H. (1975): Antitumor lipopolysaccharide from heptoseless mutant of *Proteus mirabilis*. *Agr. Biol. Chem*(Japan), **39**(9), 1821–1826.
  12. Nerka, D. P. and Bandekar, J. R. (1986): Stimulation of macrophage and antitumor activity of radiodetoxified endotoxin, *Microbiol. immunol.* **3** **0**(9), 893–901.
  13. El Sabbagh, M., Galanos, C., Bertok, L., Fust, G. and Luderitz, O. (1982): Effect of ionizing radiation on chemical and biological properties of *S. minnesota*-R 595 lipopolysaccharide, *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **29**, 255–261.
  14. Darveau, R. P. and Hancock, R. E. (1983): Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhimurium* strains, *J. Bacteriol.*, **155**, 831–838.
  15. Galanos, C., Luderitz, O. and Westphal, O. (1969): A new method for the extraction of lipopolysaccharides, *Eur. J. Biochem.* **9**, 245–249.
  16. Galanos, G., Freudenberg, M. and Reutter, W. (1979): Galactosamine induced sensitization of lethal effects of endotoxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 5939–5943.
  17. Goldin, A., Kline, I., Sofina, Z. P., Syrkin, A. B. (1980): Experimental Evaluation of Antitumor Drugs in the USA and USSR and Clinical Correlations. NIH, 33–34.
  18. Miturka, B. M. (1981): Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Experimental Animals and Humans. *Massion, N. Y.* 31–60.
  19. Weir, D. M. (1979): Handbook of Experimental Immunology. Vol. 2. Cellular Immunology. Alden Press. Oxford 30. 1.
  20. Benacerraf, B. Biozzi, G., Cuendet, A. and Halpern, B. N. (1955): Influence of Portal Blood Flow and Partial Hepatectomy on the Granuloplectic Activity of the Reticulo-Endothelial System. *J. Physiol.* **128**, 1–8.
  21. Halpern, B. N., Benacerraf, B. and Biozzi, G. (1954): Quantitative Study of the Granuloplectic Activity of the Reticulo-Endothelial System. I. *Brit. J. Exp. Pathol.* **34**, 426–440.
  22. Biozzi, G., Benacerraf, B. and Halpern, B. N. Biozzi, G. (1954): Quantitative Study of the Granuloplectic Activity of the Reticulo-Endothelial System. 2. *Brit. J. Exp. Pathol.* **34**, 441–452.
  23. Quereshi, N, Mascagni, P, Ribí, E, and Takayama, K. (1985): Monophosphoryllipid A obtained from LPS of *S. Minnesota* R 595, *J. Biol. Chem.*, **260**, 5271–5278.
  24. Philip, R. and Epstein, I, B.(1986): Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, *r*-interferon ad interleukin I, *Nature*, **323**, 86–89.
  25. Tamatani, T, Urawa, H, Hashimoto, T, and Onozaki, K, (1987): Tumor necrosis factor as an interleukin 1-dependent differentiation inducing factor (D factor) for mouse myeloid leukemic cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 390–397.
  26. Arata, S, Nakaya, K, Furuhashi, H, Nakamura, Y, Hirayama, T, Mashimo, J, and Kasai, N, (19

- 88); Tumor necrosis factor-inducing activities of lipid A preparation from *Pseudomonas diminuta* and *Pseudomonus vesicularis*, *Jph. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 626–631.
27. 狩野恭一 (1982); 醫學免疫學, 大學書林, 70–77.
28. Roitt, I. M. (1977); *Essential Immunology*, 3rd Ed. Blackwell, *Scien. Pub., Oxford*, 151–173.
29. Halpern, B. N., Benaceraf, B. and Biozzi, G. (1954); Quantitative Study of the Granuloplectic Activity of the Reticulo-Endothelial System, *I. Brit. J. Exp. Pathol.* **34**, 426–440.

**(Received; March 8, 1991, Accepted; April 30, 1991)**