

## 생쥐에서 Sarcoma 180 및 Lewis Lung Carcinoma에 대한 *Lactobacillus casei*의 항암 효과

배형석\* · 백영진 · 윤영호<sup>1</sup>

한국야쿠르트연구소, <sup>1</sup>중앙대학교 산업대학 축산학과

### Antitumor Activity of *Lactobacillus casei* against Sarcoma 180 and Lewis Lung Carcinoma in Mice

Bae, Hyoung-suk\*, Young-Jin Baek and Young-Ho Yoon<sup>1</sup>

Hankuk Yakult Institute for Dairy Technology & Microbiology,

#449, Wanggok-dong, Ewiwang-shi, Kyunggi-do 437-020, Korea

<sup>1</sup>Department of Animal Science, Chung-Ang University, An-Sung 456-830, Korea

**Abstract** — Antitumor activity of *Lactobacillus casei* YIT 9018(LC9018) was studied in mice by using sarcoma 180(S-180) and Lewis lung carcinoma (3LL). Following the establishment of *in vivo* tumor models such as ascites form S-180, solid form S-180 and 3LL for estimating antitumor activity of *Lactobacilli*, optimal dose and injection route of heat-killed LC9018 for suppression of local tumor were examined. Administration of 100 µg/mouse of LC9018 significantly inhibited the growth of ascites form S-180, solid form S-180 and 3LL. The antitumor activity of LC9018 increased in proportion to the amount of administration at a dose range of 25~100 µg/mouse. Intralesional injection of LC9018 showed the greatest inhibition against the growth of all these tumors among intralesional, intravenous, intraperitoneal, and oral administrations. Heat-killed LC9018 was found not having cytotoxic substance which showed direct growth inhibition against S-180 and 3LL *in vitro*. These results suggested that the antitumor activity of LC9018 may be host-mediated.

BCG(*Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin), OK-432(*Streptococcus pyogenes*, type 3, Su strain-ATCC 21060), *Corynebacterium*과 이들 균주들의 세포성분들이 실험동물과 사람에서 현저한 항암 효과를 나타낸다는 것은 잘 알려져 있다(1-3). 이들은 암 치료용 보조 약제인 BRM(Biological Response Modifiers)제로 개발되어 시판되고 있으며 전통적 수술 요법에 항암제와 병용하게 되면 사람 암에 대하여 강력한 항암 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(4-6). 그러나, 불행하게도 이들 균체와 균체성분은 가끔 질병을 일으키고 임상 적용을 가로 막는 부작용을 야기하고 있다. 또한 BCG, OK-432 등은 국소 종양에

직접 주입할 때 발열, 균혈증, 궤양형성, 통증을 일으킬 수 있으므로 상당한 주의가 요구되고 있다(7). 특히, BCG는 주로 생균 상태로 사용하기 때문에 감염 합병증을 일으키고 드물게는 사망을 유도하기도 한다.

그런데, 최근에 유산균이 동물 실험에서 높은 항암 효과를 나타낸다(8, 9)는 보고 이후로 지난 10여년간 유산균의 항암 활성에 관한 연구가 활발하게 진행되었다(10-13). 왜냐하면 유산균은 옛부터 요구르트와 같은 발효유 제품에 이용되어온 그람 양성균의 비병원 균으로서 사람에게 독성이 없는 것으로 인식되어 왔기 때문이었다(14).

많은 연구에서, 가열 살균한 유산균이 실험 동물에서 육종(sarcoma), 유종암(carcinoma), 백혈병(leukemia)의 성장을 강력하게 억제하는 것으로 보고되었다(15, 16). 그리고, Matsuzaki 등(17)은 실험 동물에서 Lewis lung carcinoma의 폐 전이와 line-10

**Key words:** *Lactobacillus casei*, antitumor activity, sarcoma 180, Lewis lung carcinoma, cytotoxic substance

\*Corresponding author

hepatoma의 임파절 전이, 고 전이형 B16-melanoma도 *Lactobacillus casei* 투여로 현저하게 억제되었다고 하였다. 그러나, 국내에서는 이에 대한 연구가 몇몇 연구소에서 수행되고 있으나 아직 초보 단계를 벗어나지 못하고 있는 실정이다.

본 실험에서는, 마우스에서 sarcoma 180(S-180)과 Lewis lung carcinoma(3LL)를 유발시키고 유산균의 항암 활성을 정확하게 측정할 수 있는 *in vivo* 암 모델을 확립함과 동시에 그 암들을 치료하기에 적합한 가열 살균한 *Lactobacillus casei* YIT 9018(LC9018)의 최적 투여조건과 그 항암 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 동물

4주령의 ICR 마우스(♂)와 C57BL/6 마우스는 한국화학연구소 화학물질 안전성 연구센터로부터 구입하였다. 마우스를 2주간 예비사육한 후 실험에 사용하였다. ICR 마우스(28±2 g, 6주령)는 sarcoma 180의 복수암과 고형암을 유발하기 위한 숙주로, C57BL/6 마우스(19±1 g, 6주령)는 Lewis lung carcinoma를 유발하기 위한 숙주로 사용하였다. 마우스를 플라스틱 케이지에 8~10마리씩 넣고 사육하였다. 사육 온도는 22~24°C였으며 습도는 60~70%였다. 사료는 펠릿형 실험동물 사료(신촌 사료, 株)였으며 자유급식시켰다. 깔집은 주 2회 교체하였고 지하 정제수를 매일 1회 공급하였다.

### 암세포

Sarcoma 180(S-180) 세포는 유한양행 중앙 연구소로부터 그리고 Lewis lung carcinoma(3LL) 세포는 연세대학교 의과대학 미생물학실로부터 각각 분양받았다. 각 암세포의 숙주 동물과 특성은 Table 1과 같다. S-180은 8~12주령된 ICR 마우스의 복강에서

계대 배양하였다. 복수암에 걸려서 복부가 팽만한 마우스의 복강 속으로 일 회용 1-ml 주사기로 찢러 노란색의 복수액 1 ml를 채취한 후, 그 원액을 0.1 ml씩 ICR 마우스의 복강 속에 접종하고 배양하면서 13일마다 계대하였다. 3LL은 fetal bovine serum (FBS, Gibco, Cat. No. 240-6000AJ)을 10% 첨가한 RPMI 1640(Gibco, Cat. No. 430-1800EA) 배지에서 *in vitro* 계대배양하였다. T-flask(25 cm<sup>2</sup>, 녹십자 의료공업)의 배양액은 버린 후, 그 T-flask에 새로운 RPMI 1640(10% FBS) 배지 1 ml를 넣고 멸균된 파스퇴르 피펫으로 강하게 빨아들이고 배출함으로써 T-flask 바닥에 붙은 암세포를 떨어뜨려 현탁하였다. 그 현탁액을 RPMI 1640 배지(10% FBS)에 접종(약 2×10<sup>5</sup> cells/ml)한 후 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하면서 4일마다 계대하였다.

### 유산균 시료의 제조

*Lactobacillus casei* YIT 9018(LC9018)은 MILS(18) 액체배지에서 37°C로 48시간 배양하였다. 유산균 배양액을 12,000×g에서 10분간 원심분리한 후 균체만을 회수하였다. 그 균체를 멸균 생리식염수로 3회 세척하고 100°C에서 30분간 열처리하였다. 그것을 냉동 건조하여 분쇄·밀봉한 후 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

### Ascites form S-180의 유발

ICR 마우스의 복강에 *in vivo* 계대 중인 S-180 세포를 멸균된 주사기로 채취하였다. 그 암세포들을 MEME 배지(Gibco, Cat. No. 410-1100)로 희석하여 S-180 세포의 농도가 1×10<sup>7</sup> cells/ml되게 하였다. 이와 같이 희석한 S-180 세포액을 0.1 ml(1×10<sup>6</sup> cells)씩 ICR 마우스(♂, 6주령, 28±2 g)의 복강에 주사하였다.

### Solid form S-180의 유발

Table 1. Tumor cells used in the experiments

Tumor cell	Host mouse	Origin	Characteristics*
Sarcoma 180 (ATCC CCL 8)	ICR CFW	S-180 sarcoma in CFW mouse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10<sup>6</sup> cells or more can produce solid tumors</li> <li>• Anchorage-dependent</li> <li>• Useful for 1st screening of antitumor agents</li> </ul>
Lewis lung carcinoma (ATCC CRL 1642)	C57BL/6 BDF1	Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mouse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Highly metastatic to C57BL/6 mouse lung</li> <li>• Anchorage-dependent</li> <li>• Useful for 1st screening of antitumor agents</li> </ul>

\*American Type Culture Collection, 1988. Cataloge of CELL LINES & HYBRIDOMAS, p.8. 6th ed.

ICR 마우스의 복강에 *in vivo* 계대 중인 S-180 세포를 멸균된 주사기로 채취하였다. 그 암세포들을 MEME 배지로 희석하여 S-180 세포의 농도가  $4 \times 10^7$  cells/ml 되게 하였다. 이와같이 희석한 S-180 세포액을  $50 \mu\text{l}$  ( $2 \times 10^6$  cells)씩 ICR 마우스(♂, 6주령,  $28 \pm 2$  g)의 우측 서혜부에 피하 주사하였다.

**Lewis lung carcinoma(3LL)의 유발**

3LL을 RPMI 1640 배지(10% FBS)에  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도로 접종하고  $37^\circ\text{C}$ 의  $\text{CO}_2$  incubator( $\text{CO}_2$  level : 5%)에서 4일간 배양하였다. T-flask 바닥에 붙은 암세포를 수거한 후 RPMI 1640 배지에  $4 \times 10^7$  cells/ml 되게 현탁하였다. 그 현탁액을  $50 \mu\text{l}$  ( $2 \times 10^6$  cells)씩 C57BL/6 마우스(♂, 6주령,  $19 \pm 1$  g)의 우측 서혜부에 피하 주사하였다.

**마우스에서 LC9018의 항암 효과 측정**

S-180과 3LL에 대하여 가열 살균한 LC9018의 항암

활성을 측정하기 위한 전반적인 실험 과정은 Fig. 1과 같다.

**Ascites form S-180에 대한 LC9018의 항암 효과** : Ascites form S-180(S-180 복수암)을 ICR 마우스에 유발시킨 후 가열 살균한 유산균 시료를 멸균 생리식염수에 현탁하여 그 마우스의 복강에 투여하였다. 시험군의 마우스 수는 7~9마리였다. 암세포의 접종일로부터 15일간 마우스의 체중을 매 3일마다 측정하였으며 계속 50일까지는 마우스의 생존일을 관찰하였다. 생존율(survival rate)은 다음 공식으로 산출하였다.

$$\text{Survival rate(T/C, \%)} = \frac{\text{Mean survival days of treated mice}}{\text{Mean survival days of control mice}} \times 100$$

**Solid form S-180과 3LL에 대한 LC9018의 항암 효과** : Solid form S-180(S-180 고형암)을 ICR 마우스의 서혜부 피하에 그리고 3LL을 C57BL/6 마우스의

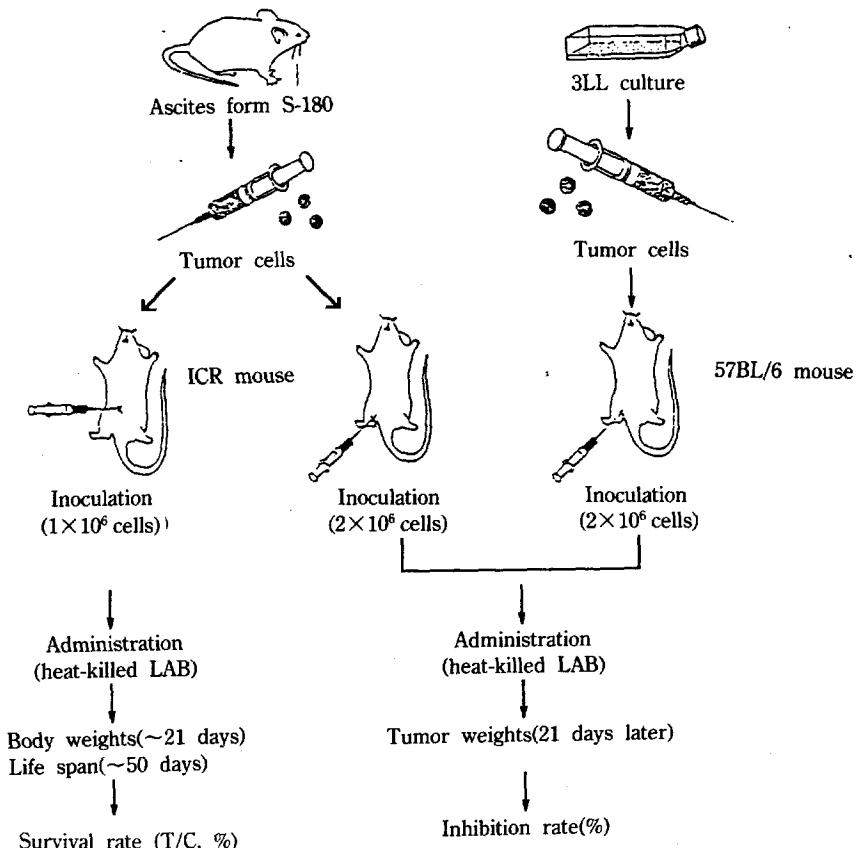


Fig. 1. Experimental scheme for investigating antitumor activity of lactic acid bacteria(LAB).

서혜부에 유발시킨 후 가열 살균한 유산균 시료를 멸균 생리식염수에 현탁하여 암 집중 부위에 투여(25~100 µg/마우스)하였다. 시험군의 마우스 수는 7~9마리였다. 대조 마우스에는 생리식염수를 투여하였다. 그 후 21일이 경과하였을 때, 마우스를 죽여 암 피를 적출하고 그 무게를 microbalance(Mettler, PE 360)로 측정하였다. 암 성장에 대한 억제율(inhibition rate)은 다음 공식으로 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Mean tumor weight of treated mice}}{\text{Mean tumor weight of control mice}}\right) \times 100$$

시험관내에서 암세포의 성장에 미치는 LC9018의 저해성 측정

3LL 또는 S-180 세포( $3.0 \sim 3.2 \times 10^5$  cells)를 RPMI 1640 배지(10% FBS) 6 ml에 접종하고 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator(CO<sub>2</sub> level : 5%)에서 1일간 배양하였다. 그리고 가열 살균한 LC9018을 마우스의 피하 투여 농도(100 µg/0.05 ml/마우스)와 동일한 농도(2 mg/6 ml/T-flask)로 암세포 배양액에 첨가하여 1일간 더 배양하였다. 그 배양액과 LC9018을 버리고 T-flask 바닥에 붙은 암세포를 RPMI 1640 배지(10% FBS)로 2회 세척하였다. 새로운 RPMI 1640 배지(10% FBS) 6 ml를 T-flask에 넣고 2일간 더 배양하였다. 배양일 별로 T-flask 바닥에 붙은 암세포를 수거하여 trypan blue 염색액으로 염색한 후 도립현미경으로 총 생세포 수를 계측하였다.

### 통계처리

암 성장에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test (19)로 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 암 유발

Sarcoma 180(S-180)과 Lewis lung carcinoma(3LL)를 이용하여 유산균의 항암 활성을 정확하게 측정할 수 있는 3가지 *in vivo* 암 모델(Fig. 1)을 확립한 결과는 다음과 같다.

**Ascites form S-180(S-180 복수암) :** S-180 세포( $1 \times 10^6$  cells)를 ICR 마우스의 복강에 접종한 결과 S-180이 15일내 복수암이 100% 유발되었으며 그 복수암에 걸린 마우스와 정상 마우스는 육안으로 쉽게 판별되었다(Fig. 2). S-180 복수암에 걸린 마우스의 체중은 암세포 접종 후 6일부터 급증하기 시작하였고 폐사 직전엔 정상 마우스 체중의 1.5배나 되었다(Fig. 3). 복수액내에 살아있는 암세포의 농도는 폐사 하루 전까지  $2 \sim 3 \times 10^8$  cells/ml로 일정하게 유지되었다. 그리고, 그 복수액은 암세포 접종 후 10일까지 암세포만을 갖고 있어 노란색을 띄었으나 11일 이후부터는 혈액이 점차 혼입되면서 붉게 변하였다. 따라서 S-180 복수암을 유발하기 위한 복수액 채취의 최적 시기는 암세포 접종 후 10~11일이었다. 복수암에 걸린 마우스의 평균 생존일은 주령(4~7주)에 따라 큰 차이 없이  $17 \pm 1$ 일이었다.

**Solid form S-180(S-180 고형암) :** S-180 세포(2



Ascites form S-180 in ICR mouse

Solid form S-180 in ICR mouse

3LL in C57BL/6 mouse

Fig. 2. Appearance of tumors in mice. Arrow:tumor

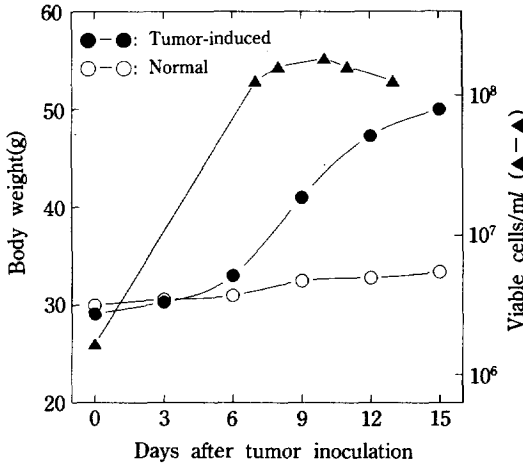


Fig. 3. Increase of body weight and growth of ascites form S-180 cells in tumor-induced and normal mice.

×10<sup>6</sup> cells)를 ICR 마우스의 우측 서혜부에 피하 접종한 결과 S-180 고형암이 21일내에 100% 유발되었으며 육안으로도 쉽게 확인되었다(Fig. 2). 암세포를 접종한 후 21일째에 마우스로부터 적출한 암괴의 무게는 1.29±1.08 g이었다. S-180 고형암의 성장은 ICR 마우스의 개체에 따라 다소 차이를 나타내었다.

3LL : 3LL 세포(2×10<sup>6</sup>)를 C57BL/6 마우스의 우측 서혜부에 피하 접종한 경우 3LL이 21일내에 100% 유발되었으며 외관상으로 쉽게 확인되었다(Fig. 2). 암세포를 접종한 후 21일째에 마우스로부터 적출한 암괴의 무게는 3.01±1.64 g이었다. 3LL 암괴의 크기는 C57BL/6 마우스의 개체에 따라 큰 차이없이 균일한 편이었다.

LC9018의 투여량에 따른 암 성장 억제

S-180 복수암 : S-180 복수암에 대하여 LC9018의 항암 활성을 알아보기 위하여, 1×10<sup>6</sup>의 S-180 세포를 ICR 마우스의 복강에 접종한 후 50, 100 µg의 가열 살균한 LC9018 균체를 그 마우스의 복강에 투여했다. 암세포 투여 후 21일 동안 그 복수암 성장에 의한 마우스의 체중 증가와 50일 동안 생존율(T/C%)을 조사하였는데, 100 µg의 LC9018 투여에서 S-180 복수암의 성장이 현저하게 억제되었다(Fig. 4). 50 µg과 100 µg의 LC9018을 투여한 마우스들의 평균 체중은 암세포 투여 후 19일에 각각 46.2 g과 42.7 g이었다. 한편 대조군 마우스들의 평균 체중은 49.5 g이었다. 50일 동안 50 µg과 100 µg의 LC9018을 투여한 마우스들의 생존율은 각각 160%와 185%로서 대조군(100

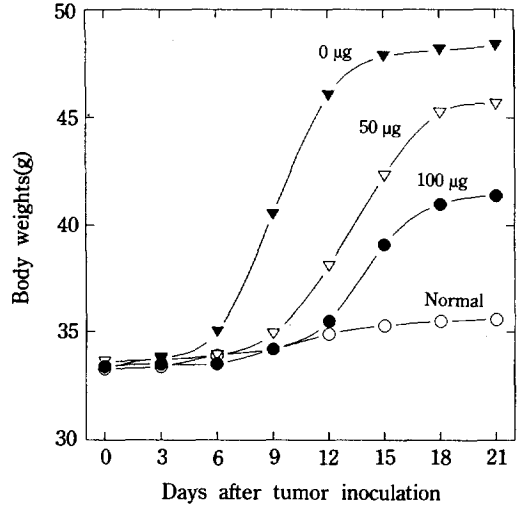


Fig. 4. Effect of intraperitoneal administration of LC 9018 on the increase of body weight in tumor-induced and normal mice.

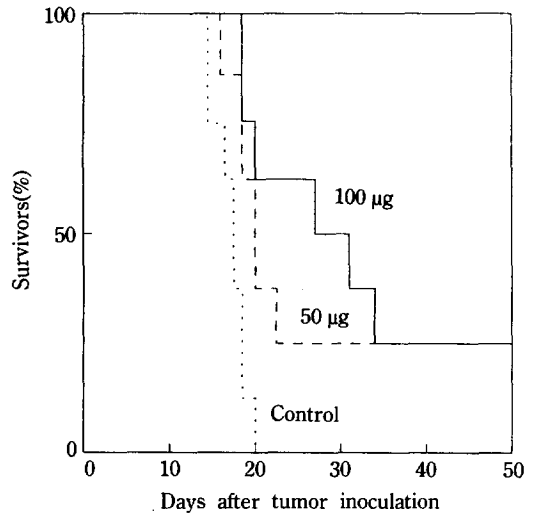


Fig. 5. Effect of intraperitoneal administration of LC 9018 on the growth of S-180 inoculated intraperitoneally.

%)에 비하여 현저히 높게 나타났다(Fig. 5). 100 µg의 LC9018을 투여한 마우스들은 암세포 투여 후 50일 동안 25%(8마리 중 2마리) 살아남았으나 대조군 마우스들은 암세포 투여 후 20일 이내에 다 폐사되었다.

S-180 고형암 : S-180 고형암에 대한 LC9018의 항암 활성을 알아보기 위하여 암세포(2×10<sup>6</sup> cells)를 접종 후 21일에 마우스들로부터 암괴를 적출하여 그 무게를 측정된 결과, 100 µg의 LC9018 투여에서 S-

**Table 2. Effect of LC9018 on the growth of solid form S-180 in ICR mice**

Dose (µg/mouse)	Tumor weight (g, mean±SD)	Inhibition rate(%)**	Tumor incidence
0	1.29±1.08	0	7/7
25	1.04±1.57	19.4	5/7
50	0.75±0.67	41.9	5/7
75	0.51±0.76*	60.5	4/7
100	0.09±0.19*	93.0	3/7

LC9018(0, 25, 50, 75, and 100 µg/mouse) was administered subcutaneously at the right groin of male ICR mice(6 weeks of age, 28±2 g) with S-180(2×10<sup>6</sup> cells/mouse). Tumors were taken out of the mice and weighed on the 21st day after tumor inoculation. Each experimental group consisted of 8 mice.

\*Significantly different(p<0.01) from control as determined by Student's t-test.

\*\*Inhibition rate(%)=

$$\left(1 - \frac{\text{Average tumor weight of tested mice}}{\text{Average tumor weight of control mice}}\right) \times 100$$

180 고형암의 성장이 현저하게 억제되었다(Table 2). 25, 50, 75, 100 µg의 LC9018을 투여하였을 때, S-180 고형암의 평균 무게는 각각 1.04, 0.75, 0.51, 0.09 g였다. 그런데, 75와 100 µg의 LC9018을 투여한 시험군의 평균 암무게가 대조군의 것(1.29 g)과 비교하였을 때 유의차(P<0.01)가 인정되었다. 100 µg의 LC9018을 투여한 시험군에서 종양 세포 접종 후 21일까지 고형암이 형성되지 않았던 마우스들은 7마리 중 4마리였으며 종양 성장에 대한 억제율은 93%였다.

**3LL : S-180 고형암에서와 같이 암괴를 적출하여 그 무게를 측정 한 결과, 75와 100 µg의 LC9018 균체를 투여하였을 때 3LL의 성장은 현저하게 억제되었다** (Table 3). 25, 50, 75, 100 µg의 LC9018을 투여하였을 때, 3LL 암괴의 평균 무게는 각각 1.68, 0.23, 0.10, 0.09 g였다. 이들 중 50, 75, 100 µg의 LC9018을 투여한 시험군의 암무게가 대조군의 것(3.01 g)과 비교하였을 때 유의차(P<0.01)가 인정되었다. 그리고, 100 µg의 LC9018을 투여한 시험군에서 종양세포 접종 후 21일까지 암괴가 형성되지 않았던 마우스들은 8마리 중 6마리였으며 종양 성장에 대한 억제율은 97%였다.

**LC9018의 투여 경로에 따른 암 성장 억제**

**S-180 복수암 :** S-180 세포를 ICR 마우스의 복강에 접종한 후 100 µg의 가열 살균한 LC9018을 그

**Table 3. Effect of LC9018 on the growth of 3LL in C57BL/6 mice**

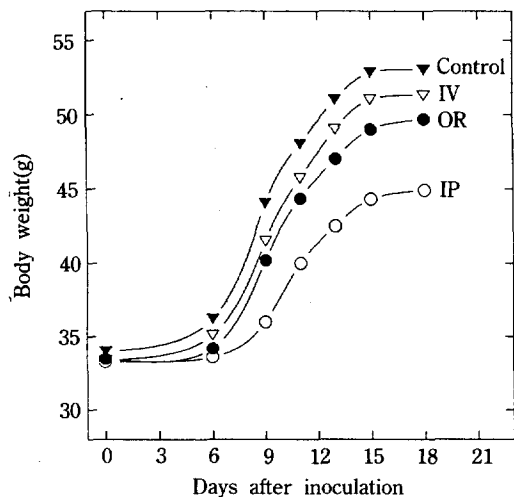
Dose (µg/mouse)	Tumor weight (g, mean±SD)	Inhibition rate(%)**	Tumor incidence
0	3.01±1.64	0	8/8
25	1.68±1.80	44.0	7/8
50	0.23±0.28*	92.0	5/8
75	0.10±0.21*	97.0	4/8
100	0.09±0.24*	97.0	2/8

LC9018(0, 25, 50, 75, and 100 µg/mouse) was administered subcutaneously at the right groin of male C57BL/6 mice(6 weeks of age, 19±1 g) with 3LL(2×10<sup>6</sup> cells/mouse). Tumors were taken out of the mice and weighed on the 21st day after tumor inoculation. Each experimental group consisted of 8 mice.

\*Significantly different(p<0.01) from control as determined by Student's t-test.

\*\*Inhibition rate(%)=

$$\left(1 - \frac{\text{Average tumor weight of tested mice}}{\text{Average tumor weight of control mice}}\right) \times 100$$



**Fig. 6. Effect of administration route of LC9018 on the growth of ascites form S-180 in ICR mice.**

마우스의 구강(OR), 정맥(IV), 복강(IP)에 투여하였다. 그 결과 복강 투여한 LC9018이 S-180 복수암의 성장을 현저하게 억제하였다(Fig. 6). 그러나, 구강과 정맥으로 투여한 LC9018은 암 성장을 억제하는데 실패하였다.

**S-180 고형암 :** S-180 세포를 ICR 마우스의 우측 서혜부에 피하 접종한 후 100 µg의 가열 살균한 LC9018을 그 ICR 마우스의 구강, 정맥, 복강, 암 유발

**Table 4. Effect of administration route of LC9018 on the growth of solid form S-180 in ICR mice for 21 days**

Route	Tumor weight (g, mean±SD)	Inhibition rate(%)**	Tumor incidence
Control	0.60±0.39	0	7/7
IV	0.48±0.24	20	7/7
IL	0.08±0.11*	97	4/7
IP	0.50±0.23	17	7/7
OR	0.36±0.22	40	5/7

ICR mice were inoculated subcutaneously with S-180(2 × 10<sup>6</sup> cells/mouse). and then, 100 g LC9018 was given intravenously(IV), intralesionally(IL), intraperitoneally (IP) and orally(OR). Tumors were taken out of the mice and weighed on the 21st day after tumor inoculation. Each experimental group consisted of 7 mice.

\*Significantly different(p<0.01) from control as determined by Student's t-test.

\*\*Inhibition rate(%)=

$$(1 - \frac{\text{Average tumor weight of tested mice}}{\text{Average tumor weight of control mice}}) \times 100$$

부위(IL)에 투여하였다. 암세포 접종 후 21 일에 LC 9018 투여 경로 그룹 별로 암괴를 적출하여본 결과, 암 유발 부위에 투여한 LC9018이 S-180 고형암의 성장을 가장 현저하게 억제하였으며, 대조군과 비교하였을 때 암 성장의 억제율은 97%였다(Table 4). 암 유발 부위 이외의 경로로 투여한 LC9018은 유의성 있는 항암 효과를 나타내지 않았으며 중앙 성장의 억제율은 40% 이하였다.

3LL : 3LL 세포를 C57BL/6 마우스의 서혜부에 피하 접종한 후 100 µg의 LC9018을 S-180 고형암에 서와 같이 투여하였다. 암세포 접종 후 21일에 LC 9018 투여 경로 그룹 별로 암괴를 적출하여본 결과, 암 유발 부위와 정맥으로 투여한 LC9018이 3LL의 성장을 현저하게 억제하였다. 위의 두 경로로 투여한 LC9018의 암 억제율은 각각 79, 65%였다. 그러나, 대조군과 비교하였을 때, 암 유발 부위로 투여한 LC 9018만 유의성(P<0.01)있는 항암 효과를 나타낸 것으로 확인되었다(Table 5). 한편, 정맥을 포함하여 구강, 복강으로 LC9018을 투여하였을 때는 항암 효과에 대한 유의성이 없는 것으로 나타났다.

이러한 결과들을 종합하여 볼 때, 암 성장을 억제 하기 위한 LC9018의 최적 투여 경로는 암 유발 부 위인 것으로 판단되었다. 이 결과는 Kato 등(15)과 Yasutake 등(20)이 Meth A와 S-180에 대하여 실시한

**Table 5. Effect of administration route of LC9018 on the growth of 3LL in C57BL/6 mice for 21 days**

Route	Tumor weight (g, mean±SD)	Inhibition rate(%)**	Tumor incidence
Control	0.72±0.38	0	7/7
IV	0.25±0.39	65	3/7
IL	0.15±0.22*	79	3/7
IP	0.56±0.58	22	7/7
OR	0.39±0.34	46	7/7

C57BL/6 mice were inoculated subcutaneously with 3 LL(2×10<sup>6</sup> cells/mouse), and then, 100 g LC9018 was given intravenously(IV), intralesionally(IL), intraperitoneally(IP) and orally(OR). Tumors were taken out of the mice and weighed on the 21st day after tumor inoculation. Each experimental group consisted of 7 mice.

\* Significantly different(p<0.01) from control as determined by Student's t-test.

\*\*Inhibition rate(%)=

$$(1 - \frac{\text{Average tumor weight of tested mice}}{\text{Average tumor weight of control mice}}) \times 100$$

항암 실험에서 *L. casei*의 암 부위 내 투여가 현저한 항암 효과를 나타내었다는 결과와 일치하였다. 한편, 전이암 모델인 3LL과 line-10 hepatoma에서는 유산 간균을 암 유발 부위내와 함께 정맥으로 투여하는 것이 이들 암의 폐 전이와 임파절 전이를 억제하는데 더욱 효과적이었다고 보고되었다(17). *L. casei*의 이러한 항암 활성은 유산간균들 중에서 가장 높게 나타났으며(21, 22), 실험 동물에서는 Meth A 폐암에 대하여 BCG, OK-432, *Corynebacterium parvum*의 것만큼 강력한 것으로 보고되었다(23).

**시험관내에서 암세포의 성장에 미치는 LC9018의 저해성**

본 연구에서 LC9018이 S-180과 3LL 세포에 대하여 직접적인 성장 저해성을 갖고 있는지의 여부는 LC 9018의 항암 효과에 관한 기작을 이해하는 데 매우 중요한 기준이 된다고 본다. 그 성장 저해성 유무를 확인하기 위하여, 가열 살균한 LC9018을 암세포 배 양액에 *in vivo* 암세포의 성장을 억제하는 투여량과 동일한 농도로 첨가하여 암세포들의 성장 상태를 관찰하였다. Table 6에서 나타난 바와 같이, 2 mg/ml의 농도에서 LC9018은 3LL의 성장을 전혀 억제하지 않았으며 S-180의 성장을 약하게 저해하는 것으로 나타났다.

**Table 6.** *In vitro* cytotoxic effect of LC9018 on 3LL and S-180

Target cells	Incubation time(days)	Number of viable cells (cells/T-flask)	
		control	LC9018 added
3LL	0	$3.0 \times 10^5$	$3.0 \times 10^5$
	1*	$9.5 \times 10^5$	$9.5 \times 10^5$
	2	$2.2 \times 10^6$	$2.1 \times 10^6$
	3	$5.3 \times 10^6$	$6.0 \times 10^6$
	4	$4.7 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
S-180	0	$3.2 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$
	1*	$1.5 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$
	2	$5.5 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$
	3	$6.4 \times 10^6$	$6.5 \times 10^6$
	4	$7.9 \times 10^6$	$1.2 \times 10^7$

3LL cells( $3.0 \times 10^5$ /T-flask) and S-180 cells( $3.2 \times 10^5$ /T-flask) were cultured in 6 ml RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum for 3 days at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator. Heat-killed LC9018 was added into the T-flask to a final concentration of 2 mg/ml on day 1, and was removed on day 2. Viable cells were collected and counted by the trypan blue dye exclusion method. \*LC9018 was added.

이러한 결과들은 LC9018 자체가 3LL과 S-180 세포들의 성장을 직접적으로 저해하는 독성물질을 갖고 있지 않음을 나타내었다. Kato 등(15)은 시험관내에서 EL4 leukemia와 P815 mastocytoma 세포의 성장에 미치는 *Lactobacillus casei*의 저해성 실험에서 *L. casei*가 암세포 성장을 직접적으로 억제하지 않았다고 하였다. 또한, Sekine 등(24)도 시험관내에서 암세포의 DNA 합성에 미치는 미생물의 효과를 확인한 결과 *Bifidobacterium infantis*는 10~1000 µg/ml에서 Meht A와 P388 세포들의 DNA 합성을 전혀 저해하지 않았다고 보고하였다. 한편, Manjunath 등(25)의 실험 결과에 의하면, *L. casei*와 *Lactobacillus plantarum*이 Hela, HEP-2, HFS-9의 암세포들에 대하여 34~36%의 현저한 세포독성을 나타내었다. 그러나 이들 암세포들에 대한 세포독성이 유산균의 균종과 균주에 따라서는 거의 없는 경우도 있는 것으로 보고되었다.

결론적으로 LC9018은 악성 종양에 대하여 직접 독성을 나타내지 않았기 때문에 숙주로 하여금 면역 반응을 일으켜 항종양 활성을 부여하는 것으로 사료되었다(19, 26). 지금까지 BCG, OK-432의 세포벽 성분에 강력한 항종양 활성이 있는 것으로 규명되었는데(1, 2, 5), LC9018의 항암 활성도 그 세포벽 성분에

기인하는지를 확인해볼 필요가 있을 것이다.

## 요 약

마우스에서 sarcoma 180(S-180)과 Lewis lung carcinoma(3LL)를 유발시키고 유산균의 항암 활성을 정확하게 측정할 수 있는 *in vivo* 암 모델을 정립하고 이 암들을 치료하기에 적합한 가열 살균한 *Lactobacillus casei* YIT 9018(LC9018)의 최적 투여조건과 그 항암 효과를 검토하였다.

S-180 복수암, S-180 고형암, 3LL의 3가지 *in vivo* 암 모델이 확립되었다. S-180 복수암이 유발된 마우스들의 평균 생존일은 17±1일이었다. 암세포( $2 \times 10^6$  cells)를 서혜부 피하에 접종한 후 21일이 경과하였을 때 S-180 고형암과 3LL에 걸린 마우스들로부터 적출한 암괴의 무게는 각각  $1.29 \pm 1.08$  g,  $3.01 \pm 1.64$  g 이었다. S-180 복수암, S-180 고형암, 3LL에 대한 항암 효과를 나타내는 가열 살균한 LC9018의 최적 투여량은 공히 100 µg/mouse였다. 그리고, LC9018의 항암 활성은 25~100 µg 범위에서 유산균 투여량에 비례하여 증가하였다. LC9018 100 µg을 마우스의 구강, 정맥, 복강, 암 유발 부위에 투여하였을 때, 암 유발 부위에 투여한 것이 이들 종양들의 성장을 가장 현저하게 억제하였다. LC9018 100 µg을 S-180 복수암에 걸린 ICR 마우스의 복강에 투여하였을 때, 암세포 접종 후 50일 동안 마우스의 생존율(T/C%)은 185%로서 대조군(100%)에 비하여 거의 2배로 증가하였다. LC9018 100 µg을 S-180 고형암과 3LL에 걸린 ICR 마우스의 우측 서혜부에 피하 투여하였을 때는, 암세포 접종 후 21일까지 종양 성장에 대한 억제율은 각각 93%, 97%였다. 그리고 가열 살균한 LC9018은 S-180과 3LL 세포에 직접적으로 작용하는 독성 물질을 갖고 있지 않는 것으로 확인되었다.

## 참고문헌

1. Azuma, I., M. Yamawaki, T. Ogura, T. Yoshimoto, R. Tokuzen, F. Hirao and Y. Yamamura. 1978. Antitumor activity of BCG cell-wall skeleton and related materials. *Gann* **21**: 73-86.
2. Yamaue, H., H. Tanimura, M. Iwahashi, M. Tani, T. Tsunoda, K. Tabuse, K. Kuribayashi and K. Saito. 1989. Role of interleukin-2 and interferon-γ in induction of activated natural killer cells from mice primed *in vivo* and subsequently chal-



- lenged *in vitro* with the Streptococcal preparation OK432. *Cancer Immunol. Immunother.* **29**: 79-86.
3. Milas, L. and M.T. Scott. 1978. Antitumor activity of *Corynebacterium parvum*. *Adv. Cancer Res.* **26**: 257-306.
  4. Vosika, G., J. Schmidtke, A. Goldman, R. Parker, E. Ribí and G.R. Gray. 1979. Phase I-II study of intralesional immunotherapy with oil-attached *Mycobacterium smegmentis* cell wall skeleton and trehalose dimylcolate. *Cancer Immunol. Immunother.* **6**: 135-142.
  5. Vosika, G.J. 1983. Clinical immunotherapy trials of bacterial components derived from *Mycobacteria* and *Nocardia*. *J. Biological Response Modifiers* **2**: 321-342.
  6. Bier, J., H.J. Rapp, T. Borsos, B. Zbar, S. Kleinschuster, H. Wagner and M. Rollinghoff. 1981. Randomized clinical study on intratumoral BCG-cell wall preparation (CWIP) therapy in patients with squamous cell carcinoma in the head and neck region. *Cancer Immunol. Immunother.* **12**: 71-79.
  7. Richman, S.P., J.U. Gutterman, E.M. Hersh and E.E. Ribí. 1978. Phase I-II study of intratumor immunotherapy with BCG cell wall skeleton plus P<sub>1</sub>. *Cancer Immunol. Immunother.* **5**: 41-44.
  8. Bogdanov, I.G., P. Popkhrstov and L. Marinov. 1962. Anti cancer effect of antibioticum bulgaricum on Sarcoma-180 and the solid form of Ehrlich carcinoma. Abstr. VIII Intl. Cancer Congress, Moscow, Pp. 364~365.
  9. Goldin, B.R. and S.L. Gorbach. 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**: 263-265.
  10. Mitsuoka, T. 1981. Intestinal flora and cancer. Pp. 16-40. *In Second annual national symposium for lactic acid bacteria and health*. Korea.
  11. Shahani, K.M. 1983. The anti-neoplasm effects of Lactobacilli. Pp. 3-20. *Third annual national symposium for lactic acid bacteria and health*. Korea.
  12. Takano, T. 1987. Role of lactic acid bacteria in carcinogenesis. *乳技協資料*, **37**: 1-12.
  13. 神邊 道雄. 1988. 發癌抑制と發酵乳. *New Food Industry*, **30**: 77-87.
  14. Mugitani, H. and H. Furue. 1987. Evaluation on the safety of LC9018-study of single subcutaneous administration of LC9018 to healthy men. *Biotherapy* **1**: 286-289.
  15. Kato, I., S. Kobayaahi, T. Yokokura and M. Mutai. 1981. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann* **72**: 517-523.
  16. Friend, B.A. and K.M. Shahani. 1984. Antitumor properties of Lactobacilli and dairy products fermented by Lactobacilli. *J. Food Prot.* **47**: 717-723.
  17. Matsuzaki, T., T. Yokokura and I. Azuma. 1985. Anti-tumor activity of *Lactobacillus casei* on Lewis lung carcinoma and line-10 hepatoma in syngeneic mice and guinea pigs. *Cancer Immunol. Immunother.* **20**: 18-22.
  18. 金鐘明, 白永振, 金顯旭. 1987. *Lactobacillus casei* YIT 9018의 冷凍時의 選擇培地에 관한 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 294-298.
  19. 趙載英, 張權烈. 1982. 實驗統計分析法, Pp. 68-78. 鄉文社.
  20. Yasutake, N., I. Kato, M. Ohwaki, T. Yokokura and M. Mutai. 1984. Host-mediated antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann* **75**: 72-80.
  21. Yasutake, N., M. Ohwaki, T. Yokokura and M. Mutai. 1984. Comparison of antitumor activity of *Lactobacillus casei* with other bacterial immunopotentiators. *Med. Microbiol. Immunol.* **173**: 113-125.
  22. 김형용, 배형석, 백영진. 1991. *In vivo* Sarcoma 180 과 mouse Lewis Lung Carcinoma에 대한 유산균의 항암효과. *대한면역학회지* **23**: 188-196.
  23. Matsuzaki, T., T. Yokokura, and M. Mutai. 1988. Antitumor effect of intrapleural administration of *Lactobacillus casei* in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* **26**: 209-214.
  24. Sekine, K., T. Toida, M. Saito, M. Kuboyama, T. Kawashima and Y. Hashimoto. 1985. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res.* **45**: 1300-1307.
  25. Manjunath, N. and B. Ranganathan. 1989. A cytotoxic substance produced by a wild culture of *Lactobacillus casei* D-34 against tumour cells. *Indian J. Exper. Biol.* **27**: 141-145.
  26. Kato, I., T. Yokokura and M. Mutai. 1983. Macrophages activation by *Lactobacillus casei* in mice. *Microbiol. Immunol.*, **27**: 611-618.

(Received March 15, 1993)