

## Lewis 폐암 마우스 모델에서 톡소포자충에 의한 항암 및 항전이 효과

충남대학교 의과대학 내과학교실, 기생충학교실\*

김주옥, 정성수, 박희선, 김명훈, 김선영, 이영하\*

= Abstract =

### Antitumor and Antimetastatic Effects of *Toxoplasma Gondii* in Mice with Lewis Lung Carcinoma

Ju-Ock Kim, M.D., Sung-Soo Jung, M.D., Hee-Sun Park, M.D.,  
Myoung-Hoon Kim, M.D., Young-Ha Lee\*, M.D., Sun-Young Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Department of Parasitology\*,  
College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon, Korea

**Background** : Immunotherapy is another treatment modality for various cancers. There is little information on the antitumor effects of immunotherapy on implanted lung cancer mouse models. *Toxoplasma gondii* is able to potently induce a nonspecific stimulation of the host immune system. Therefore, this study evaluated the antitumor and antimetastatic effect of nonspecific immune stimulation by *T. gondii* in a Lewis lung cancer mouse model.

**Methods** : Female C57BL/6 mice were injected with either Lewis lung cancer cells ( $1 \times 10^6$  per mouse) or 5 cysts from the *T. gondii* Me49 strain with various schedules. The number of survival days, the tumor size of the implanted muscle and the histopathological findings of each group were noted. In addition to these mice, the *Toxoplasma* antigen (50  $\mu$ g per mouse) or a lymphokine (0.5 ml per mouse) was added to boost the immunotherapy.

**Results** : No mouse in the *Toxoplasma*-infected group had died, whereas the mice receiving only the cancer

---

\*본 연구는 2000년도 충남대학교병원 공모과제 연구비로 연구되었음.

**Address for correspondence :**

Ju Ock Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungnam National University,  
Daesadong, Jungku, Taejeon, Korea, 301-721

Phone : 042-220-7158 Fax : 042-257-5753 E-mail : jokim@cnu.ac.kr

cells (cancer control) survived for  $29.1 \pm 4.4$  days. Cancer cells were revealed from 1 week after cancer cell inoculation in the muscle and from 3 weeks in the lung of the cancer control, whereas cancer cells were found in both the preinfection control and coinfection control groups from 2 weeks and 4 weeks in the lung, respectively.

The number of survival days were  $32.4 \pm 3.3$  in the mice receiving *T. gondii* 2 weeks prior to the cancer cells inoculation (preinfection control),  $30.9 \pm 5.1$  in mice received both simultaneously (coinfection control), and  $34.9 \pm 2.9$  in mice received *T. gondii* 2 weeks after cancer cells implantation (postinfection control). These 3 infection groups had significantly longer survival days and suppressed tumor growth than those of the cancer control. In addition to these mice, an injection with the *Toxoplasma* antigen alone or in combination with lymphokine resulted in a significant increase in the number of survival days.

**Conclusion :** These findings suggest that an injection with *T. gondii* can induce the antitumor and antimetastatic effects in Lewis lung cancer mouse models. Moreover, these effects were increased with an injection of the *Toxoplasma* antigen alone or in combination with lymphokine. However, this therapy can not prevent the development of cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 52 : 317-329)

**Key words :** Lewis lung cancer, *Toxoplasma gondii*, Mouse, Immunotherapy.

## 서 론

의학의 발전에도 불구하고 종양은 우리나라뿐만 아니라 선진 국가에서도 아직 주요 사망 원인의 하나이다. 항암 화학요법 및 방사선 치료의 발전이 일부 암의 치료에서는 큰 성과를 보였지만 폐암 환자의 5년 생존율은 향상되지 않고 있어 새로운 치료법의 개발이 절실히 요구된다<sup>1</sup>. 종양 면역학 및 종양 분자생물학의 급속한 발전에 의하여 인체 종양의 특성에 관한 새로운 사실들이 많이 밝혀졌다. 대부분의 암 환자는 면역기능이 감소되어 있으며, 특히 지연형 과민반응, 표적세포 살해능, 림프구 증식반응 감소 등이 알려져 있다<sup>2</sup>. 따라서 면역학적, 분자생물학적 최신 지식을 바탕으로 기존의 종양 치료법의 부작용을 줄일 수 있으며, 종양의 치료뿐만 아니라 전이를 억제할 수 있는 새로운 치료보조방법으로 면역강화요법에 대한 연구가 세계적으로 관심을 모으고 있다<sup>3-7</sup>.

종양 면역강화요법은 면역계에 대한 비특이적 자극제, 종양항원 백신, DNA 백신, cytokine, 입양면역 및 종양특이 항체 등을 처치하여 암세포에 대한 면역성을 증가시키거나 cytokine의 국소 분비로 유리한

면역환경을 조성하여 종양치료 효과를 증가시키는 방법이다. 이중 비특이적 면역자극제로 결핵균, 코리네 박테리움, 독소포자충, Quil-A, 미생물 생성물, 합성 polynucleotide 복합체 등이 사용되고 있다<sup>6,8-11</sup>. 강력한 비특이적 면역자극제인 독소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 사람을 비롯한 온혈동물의 유핵세포내에 기생하는 세포내 원충의 일종으로 숙주의 세포독성반응 및 세포파괴성 면역반응을 항진시키기 때문에<sup>12-15</sup>, 이러한 특성을 이용한 항암 연구가 여러 종류의 암에서 이루어지고 있다<sup>11,16-19</sup>. EL4 림프종에 포르말린 고정 독소포자충을 주입한 결과 암의 성장이 현저히 억제되었고 생존기간이 뚜렷이 연장되었다고 하였으며<sup>17</sup>, 20-methylcholanthrene에 의해 유발되는 암에 독소포자충 추출항원을 투여시 항암작용이 있다고 하였다<sup>18</sup>. 또한 마우스 림프종과 사람 위암세포주에 독소포자충 혹은 독소포자충 추출물을 처치시 세포내 약물 침투를 증가시켜 항암효과를 나타낸다고 하였다<sup>19</sup>.

이와 같이 강력한 면역자극제인 독소포자충을 이용한 폐암 연구가 드물며, 또한 지금까지 보고된 연구의 대부분은 독소포자충 총체 혹은 항원을 폐암 조직에 국소적으로 처치한 다음 항암 효과를 관찰한 것으로

톡소포자충 총체나 항원을 전신적으로 처치한 후 일어나는 항암 효과에 대한 연구는 드물며, 또한 항암 효과를 높이기 위해서 톡소포자충의 처치 시기, 추가 면역 효과의 유무 및 면역 림프구 추출 물질 (lymphokine)에 의한 항암 효과에 대한 보고는 없다. 이에 본 연구는 Lewis 폐암 마우스 모델을 대상으로 톡소포자충을 서로 다른 시기에 복강내로 주입한 후 종양의 성장 및 전이 억제능을 마우스의 생존기간, 근육내 종양의 크기, 근육 및 폐의 조직병리학적 소견으로 평가하였다. 또한 톡소포자충 항원 혹은 lymphokine으로 추가 면역시 항암 효과의 증가 여부를 측정하여, 톡소포자충에 의한 종양 면역강화요법이 폐암의 새로운 치료법으로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 실험동물

한국생명공학연구소(대전광역시 유성구)에서 구입한 생후 8~10주 된 20 g 내외의 암컷 C57BL/6 마우스를 실험에 사용하였다. 이들 마우스는 동물사육실에서 감염 방지를 유지하면서 사육하였다.

#### 2) Lewis 폐암세포주

Lewis 폐암 세포주는 ATCC (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum, antibiotics-antimycotics 및 DMEM (Gibco BRL Co.)이 포함된 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

#### 3) 톡소포자충 총주

톡소포자충 Me49주는 동일 총체를 감염시킨 지 8주 된 마우스의 뇌조직을 무균적으로 적출한 후 생리식염수(0.9% NaCl)를 첨가, 마쇄하여 총체를 확보하였으며, 실험동물의 감염에 사용하였다. 톡소포자충의 RH주는 마우스 복강에 계대 배양하여 총체를 유지하였으며, 톡소포자충 항원 제조에 사용하였다.

#### 4) 톡소포자충 항원의 제조

톡소포자충 RH주의 tachyzoite를 마우스의 복강 내에 감염시킨 다음 3~4일 후 마우스의 복강 내로 생리식염수를 넣어 총체가 함유된 복강세액을 얻었다. 이 복강세액을 40% Percoll (Sigma, USA) 위에 중첩시킨 후 4°C, 4,500×g로 20분간 원심 분리하여 침사를 얻었다. 이 침사에 생리식염수를 가하여 3회 원심세척 후 -20°C로 냉동 보관하여 살충하였으며, 녹인 후 총체를 Sonicator (Ultrasonic Processor, USA)로 분쇄하고 4°C, 17,500×g로 30분간 원심 분리하여 그 상층액을 0.2  $\mu$ m pore size의 filter (Gelman Sciences, USA)로 여과하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad assay kit로 측정하였고 bovine serum albumin을 표준단백으로 사용하였다<sup>20</sup>.

#### 5) Lymphokine의 준비

정상 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 petridish에 옮긴 후 RPMI 1640 (GibcoBRL, USA)을 넣어 60-mesh stainless sieve로 마쇄한 다음, RBC lysis buffer (Sigma, USA)로 적혈구를 제거하였다. 분리한 비장세포를 비동화시킨 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, USA), 1mM sodium pyruvate (Sigma, USA), 5nM 2-mercaptoethanol, penicillin G 100U/ml 및 streptomycin 100 g/ml (Sigma, USA)을 첨가한 RPMI 1640에 비장세포 수가 1×10<sup>6</sup>/ml이 되도록 조절하여 culture dish에 분주한 후, 여기에 5.0  $\mu$ g/ml 농도의 concanavalin A (Con A ; Sigma, USA)를 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온항습기에서 48시간 배양하였다. 배양 상청액을 원심하여 모은 후 사용시 까지 -70°C에 보관하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 실험군의 설정

C57BL/6 마우스에 톡소포자충 총체 혹은 폐암세포의 주입 시기에 따라 Table 1과 같이 크게 5개군으로 분류하였다. 즉, 톡소포자충 총체만 감염시킨 마우스

**Table 1.** List of groups and injection schedule of each group

| Group <sup>a)</sup> | No. of mice | Injection schedule (Week of injection) |             |   |                          |
|---------------------|-------------|--|-------------|---|--------------------------|
|                     |             | <i>Toxoplasma</i> cyst                 | Cancer cell | <i>Toxoplasma</i> antigen <sup>b)</sup> | Lymphokine <sup>c)</sup> |
| InC                 | 10          | 0                                      | -           | -                                       | -                        |
| CnC                 | 10          | -                                      | 0           | -                                       | -                        |
| Cn+A                | 10          | -                                      | 0           | 1, 2, 4                                 | -                        |
| Cn+L                | 10          | -                                      | 0           | -                                       | 1, 2, 4                  |
| Cn+A+L              | 10          | -                                      | 0           | 1, 2, 4                                 | 1, 2, 4                  |
| PrC                 | 10          | 0                                      | 2           | -                                       | -                        |
| Pr+A                | 10          | 0                                      | 2           | 1, 2, 4                                 | -                        |
| Pr+L                | 10          | 0                                      | 2           | -                                       | 1, 2, 4                  |
| Pr+A+L              | 10          | 0                                      | 2           | 1, 2, 4                                 | 1, 2, 4                  |
| CoC                 | 10          | 0                                      | 0           | -                                       | -                        |
| Co+A                | 10          | 0                                      | 0           | 1, 2, 4                                 | -                        |
| Co+L                | 10          | 0                                      | 0           | -                                       | 1, 2, 4                  |
| Co+A+L              | 10          | 0                                      | 0           | 1, 2, 4                                 | 1, 2, 4                  |
| PoC                 | 10          | 2                                      | 0           | -                                       | -                        |
| Po+A                | 10          | 2                                      | 0           | 1, 2, 4                                 | -                        |
| Po+L                | 10          | 2                                      | 0           | -                                       | 1, 2, 4                  |
| Po+A+L              | 10          | 2                                      | 0           | 1, 2, 4                                 | 1, 2, 4                  |

a) Mice were divided into 5 groups according to the injection period of either *T. gondii* cysts or Lewis lung cancer cells, and each group was redivided into 3 subgroups according to the combination of either *T. gondii* antigen (A) or lymphokine (L). InC (infection control), mice were received 5 brain cysts of Me49 strains of *T. gondii* intraperitoneally; CnC (cancer control), mice were received intramuscularly with  $1 \times 10^6$  Lewis lung cancer cells; PrC (preinfection control), mice were received *T. gondii* cysts 2 weeks before cancer cells inoculation; CoC (coinfection control), mice were received both *T. gondii* cysts and cancer cells at the same time; PoC (postinfection control), mice were received *T. gondii* cysts 2 weeks after cancer cells inoculation.

b) Mice were received intraperitoneally *Toxoplasma* antigen (50  $\mu$ g per mouse) in combination with incomplete Freund's adjuvant.

c) Mice were received subcutaneously 0.5 ml of lymphokine per mouse.

(감염대조군), 폐암세포만을 주입한 마우스(폐암대조군), 총체 감염 후 2주에 폐암세포를 주입한 마우스(후감염대조군), 총체 감염과 동시에 폐암세포를 주입한 마우스(동시감염대조군), 폐암세포 주입 후 2주에 총체를 감염시킨 마우스(전감염대조군)으로 나누었다. 감염대조군을 제외한 폐암세포를 주입한 4개 군은 독소포자충 항원 혹은 lymphokine의 추가 면역 조합에 따라 각 군별로 3개군씩 다시 분류하였다. 즉,

독소포자충 총체 혹은 폐암세포를 주입한 후 1, 2, 4주에 독소포자충 항원만을 추가 면역한 마우스(항원군), lymphokine만을 추가 면역한 마우스(lymphokine군), 독소포자충 항원과 lymphokine을 병용하여 추가 면역한 마우스(항원/lymphokine군)로 나누었다. 각 처치군별로 10마리씩의 마우스를 사용하였으며, 서로 다른 기간에 2회 조사하였다. 마우스의 생존 여부는 매일 관찰하였으며, 폐암세포 주사부위 암조직

의 크기는 매주 1회씩 측정하였다. 또한 폐암세포 주입 후 암의 발생 및 전이 양상을 보기 위하여 매주 1회씩 마우스의 폐암세포 주사부위 근육 및 폐의 조직 병리학적 소견을 관찰하였다.

## 2) 마우스내 톡소포자충 충체, 폐암세포, 톡소포자충 항원 혹은 lymphokine의 처리

톡소포자충 충체는 마우스당 5개의 뇌조직내, 씨스트를 경구로 감염시켰으며, 폐암세포는 마우스당  $1 \times 10^6$  개를 오른쪽 대퇴 근육에 주사하여 실험에 사용하였다. 또한 톡소포자충 항원 50 $\mu$ g을 incomplete Freund's adjuvant (Sigma)와 혼합 후 마우스 복강으로 주입하였으며, lymphokine은 마우스당 0.5 ml를 피하로 주입하였다.

## 3) 마우스 생존기간 및 주사부위 근육내 종양 크기의 측정

마우스의 생존기간을 측정하기 위하여, 마우스의 생존여부는 총 8주 동안 각 군별로 매일 관찰하였다. 또한 근육내 종양의 크기는 폐암세포를 주입한 마우스의 우측 대퇴부에 있는 종양을 매주 1회씩 종양의 장축 및 단축의 길이를 측정한 다음, Brunda 등<sup>24</sup>의 방법에 따라 “종양의 용적 = (장축)  $\times$  (단축)”으로 계산하여 표기하였다.

4) 마우스 주사 부위 근육 및 폐의 조직병리학적 검사  
마우스 오른쪽 대퇴 근육에 폐암세포 주입 후 매주 1회씩 마우스의 폐암세포 주사부위 근육 및 폐를 적출한 다음, 10% buffered neutral formaline으로 고정, 파라핀 포매 후, hematoxylin-eosin 염색한 다음 광학 현미경으로 암세포 유무를 관찰하였다.

## 5) 통계 처리

모든 실험은 2회 이상 중복 실시하였고 실험성적은 각각 평균  $\pm$  표준편차로 표시하여 각 군별로 비교하였으며, 각 군간의 차이는  $X^2$ -test 또는 ANOVA test로 통계 처리하여 유의성을 검증하였다.

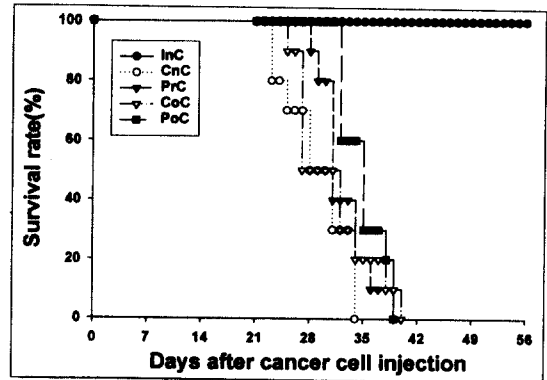


Fig. 1. Survival rates of C57BL/6 mice received either *T. gondii* cysts or Lewis lung cancer cells. The mice were observed for mortality every day for 8 weeks after cancer cells injection. The data are represented one of two separate experiments.

## 결 과

### 1. 톡소포자충 충체와 폐암세포의 주입 시기에 따른 생존기간 및 종양 크기의 비교

각 군별 생존기간은 Fig. 1 및 Table 2와 같이, 톡소포자충 충체만을 감염시킨 마우스(감염대조군)는 실험 8주 동안 기간중 한 마리도 죽지 않았으나, 폐암세포만을 주입한 마우스(폐암대조군)는 암세포 주입 후 23일부터 죽기 시작하여 34일까지 모두 죽었으며 이들의 평균 생존기간  $\pm$  표준편차는  $29.1 \pm 4.4$ 일이었 다. 톡소포자충 감염 후 2주에 폐암세포를 주입한 마우스(전감염대조군)의 생존기간은  $32.4 \pm 3.3$ 일, 톡소포자충 충체와 폐암세포를 동시에 주입한 마우스(동시감염대조군)의 생존기간은  $30.9 \pm 5.1$ 일, 폐암세포 주입 후 톡소포자충을 감염시킨 마우스(후감염대조군)의 생존기간은  $34.9 \pm 2.9$ 일로 톡소포자충 충체와 폐암세포를 모두 처치한 이들 3개군 마우스의 생존기간은 폐암대조군의 생존기간에 비하여 모두 유의하게 증가하였다( $0.0001 < p < 0.035$ ). 또한 이들 3개군을 상호비교시 전감염대조군과 동시감염대조군

**Table 2.** Survival days of C57BL/6 mice received either *T. gondii* cysts, Lewis lung cancer cells, *Toxoplasma* antigen or lymphokine.

| Group  | No. of mice | Survival days (range) <sup>a)</sup> | p-value |
|--------|-------------|-------------------------------------|---------|
| InC    | 10          | 56.0±0.0 (56~56)                    |         |
| CnC    | 10          | 29.1±4.4 (23~34)                    |         |
| Cn+A   | 10          | 33.2±3.0 (29~38)                    | b       |
| Cn+L   | 10          | 31.2±1.9 (28~33)                    | b       |
| Cn+A+L | 10          | 31.4±3.8 (26~36)                    | b       |
| PrC    | 10          | 32.4±3.3 (28~39)                    | b       |
| Pr+A   | 10          | 39.9±4.8 (35~49)                    | b, c    |
| Pr+L   | 10          | 34.8±3.7 (30~41)                    | b, c    |
| Pr+A+L | 10          | 44.4±6.3 (33~53)                    | b, c    |
| CoC    | 10          | 30.9±5.1 (25~40)                    | b       |
| Co+A   | 10          | 33.5±3.2 (28~40)                    | b, d    |
| Co+L   | 10          | 35.5±5.1 (25~43)                    | b, d    |
| Co+A+L | 10          | 33.9±4.7 (26~39)                    | b, d    |
| PoC    | 10          | 34.9±2.9 (32~39)                    | b       |
| Po+A   | 10          | 38.2±4.6 (34~46)                    | b, e    |
| Po+L   | 10          | 34.0±2.9 (31~40)                    | b       |
| Po+A+L | 10          | 39.2±4.1 (33~48)                    | b, e    |

a) The mice were observed for mortality every day for 8 weeks after cancer cell injection. The data are represented as mean±standard deviation of one of two separate experiments.

b) Significant compared with cancer control (CnC).

c) Significant compared with preinfection control (PrC).

b) Significant compared with coinfection control (CoC).

c) Significant compared with postinfection control (PoC).

사이에는 유의한 차이가 없었으나( $p=0.071$ ), 그 외의 대조군을 상호 비교시에는 유의한 차이를 보였다.

폐암세포 주사부위 근육의 종양 용적을 매주 측정 한 결과 Fig. 2와 같았다. 폐암대조군은 폐암세포 주입 후 1주에 30~60%의 마우스에서 암조직을 확인할 수 있었으며 2주 이후부터 큰 폭으로 성장하여 3주에는  $6740 \pm 1290\text{mm}^3$ , 4주에는  $8760 \pm 927\text{mm}^3$  이었다. 전감염대조군은 암세포 주입 후 2주부터 암조직을 측정할 수 있었으며, 2~3주 사이에 증가 폭 커서 3주에  $3855 \pm 742\text{mm}^3$ , 4주에  $5740 \pm 720\text{mm}^3$  이었으며, 그 이후에도 계속적으로 증가하였다. 동

시감염대조군은 암세포 주입 후 1주에는 암조직을 측정할 수 없었고, 2주에는  $426 \pm 150\text{mm}^3$  이었으며, 3주 이후에 급격히 증가하여 4주에는  $4482 \pm 1116\text{mm}^3$  이었다. 후감염대조군은 폐암세포 주입 후 1주부터 종양이 측정되기 시작하여 4주( $4210 \pm 918\text{mm}^3$ )까지 서서히 성장하다가 그 이후 큰 폭으로 증가하여 5주에는  $8544 \pm 1274\text{mm}^3$ 이였다. 독소포자충 총체와 폐암세포를 처치한 3군의 종양 면적은 폐암대조군에 비하여 유의하게 적었으나( $0.001 < p < 0.05$ ), 이들 3군을 상호 비교시 유의한 차이는 없었다( $0.111 < p < 0.085$ ).

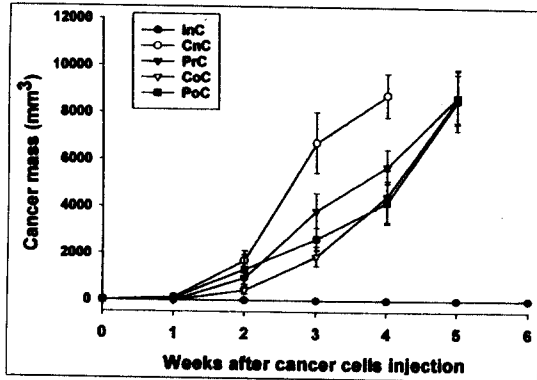


Fig. 2. Cancer mass of C57BL/6 mice received either *T. gondii* cysts or Lewis lung cancer cells. The data are represented as mean  $\pm$  standard deviation of two separate experiments.

### 2. 독소포자충 항원 혹은 lymphokine의 추가면역에 따른 생존기간 및 종양 크기 변화

독소포자충 항원 혹은 lymphokine을 단독 혹은 병용하여 추가 면역한 마우스의 생존기간은 Table 2와 같다. 폐암대조군에 독소포자충 항원만을 추가 면역한 마우스(폐암/항원군)의 생존기간은  $33.2 \pm 3.0$ 일, lymphokine만을 추가 주입한 마우스(폐암/lymphokine군)의 생존기간은  $31.2 \pm 1.9$ 일, 독소포자충 항원과 lymphokine을 병용 투여하여 추가 면역한 마우스(폐암/항원/lymphokine군)의 생존기간은  $31.4 \pm 3.8$ 일로 폐암대조군의 생존기간( $29.1 \pm 4.4$ 일)에 비하여 유의하게 증가하였다. 전감염대조군에 독소포자충 항원이나 lymphokine을 단독 혹은 병용하여 추가 면역시의 생존기간은 각각  $39.9 \pm 4.8$ 일(전감염/항원군),  $34.8 \pm 3.7$ 일(전감염/lymphokine군) 및  $44.4 \pm 6.3$ 일(전감염/항원/lymphokine군)로 전감염대조군( $32.4 \pm 3.3$ 일)에 비하여 유의하게 증가하였다( $0.0001 < p < 0.005$ ). 동시감염군에 독소포자충 항원 혹은 lymphokine을 단독 혹은 병용 처치시의 생존기간은  $33.5 \pm 3.2$ 일(동시감염/항원군),  $35.5 \pm 5.2$ 일

(동시감염/lymphokine군),  $33.9 \pm 4.7$ 일(동시감염/항원/lymphokine군)이었으며, 이들 3개군의 생존기간은 동시감염대조군의 생존기간( $30.9 \pm 5.1$ 일)에 비하여 유의하게 증가하였다( $0.0005 < p < 0.011$ ). 후감염대조군에 독소포자충 항원 단독 및 항원과 lymphokine을 병용 처치시의 생존기간은 각각  $38.2 \pm 4.7$ 일 및  $39.2 \pm 4.1$ 일로 후감염대조군의 생존기간( $34.9 \pm 2.9$ 일)에 비하여 유의하게 증가하였으나( $0.0002 < p < 0.0005$ ), lymphokine만을 추가면역한 마우스의 생존기간( $34.0 \pm 2.9$ 일)과 감염대조군의 생존기간과는 유의한 차이가 없었다( $p = 0.08$ ).

독소포자충 항원 혹은 lymphokine을 단독 혹은 병용하여 추가면역한 후 폐암세포 주사부위 근육내 암조직 용적을 매주 1회 측정된 결과, 폐암/항원군 및 폐암/항원/lymphokine군의 암조직 크기는 폐암대조군에 비하여 유의하게 적었으나( $p < 0.01$ ), 폐암/lymphokine군은 폐암대조군과 유의한 차이가 없었다( $p = 0.15$ )(Fig. 3A). 전감염대조군의 암조직은 폐암세포 주입 후 2~3주에 급격히 증가하였으나, 독소포자충 항원 단독 혹은 독소포자충 항원과 lymphokine을 병용 투여하여 추가 면역한 마우스의 암조직은 전감염대조군에 비하여 유의하게 적게 증가하였으나( $p < 0.0001$ ), 전감염/lymphokine군의 암조직 크기는 전감염대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3B). 동시감염/항원군, 동시감염/lymphokine군 및 동시감염/항원/lymphokine군의 암조직 크기는 폐암세포 주입 후 3주까지 동시감염대조군과 유사하였으나, 그 이후 동시감염/lymphokine군 및 동시감염/항원군의 암조직은 동시감염대조군에 비하여 서서히 성장하였다( $p > 0.05$ )(Fig. 3C). 후감염/항원군 및 후감염/항원/lymphokine군의 암조직 크기는 폐암세포 주입 후 4주까지 폐암대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, 그 이후에는 암조직의 성장이 뚜렷히 감소하였다. 후감염/lymphokine군은 후감염대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3D).

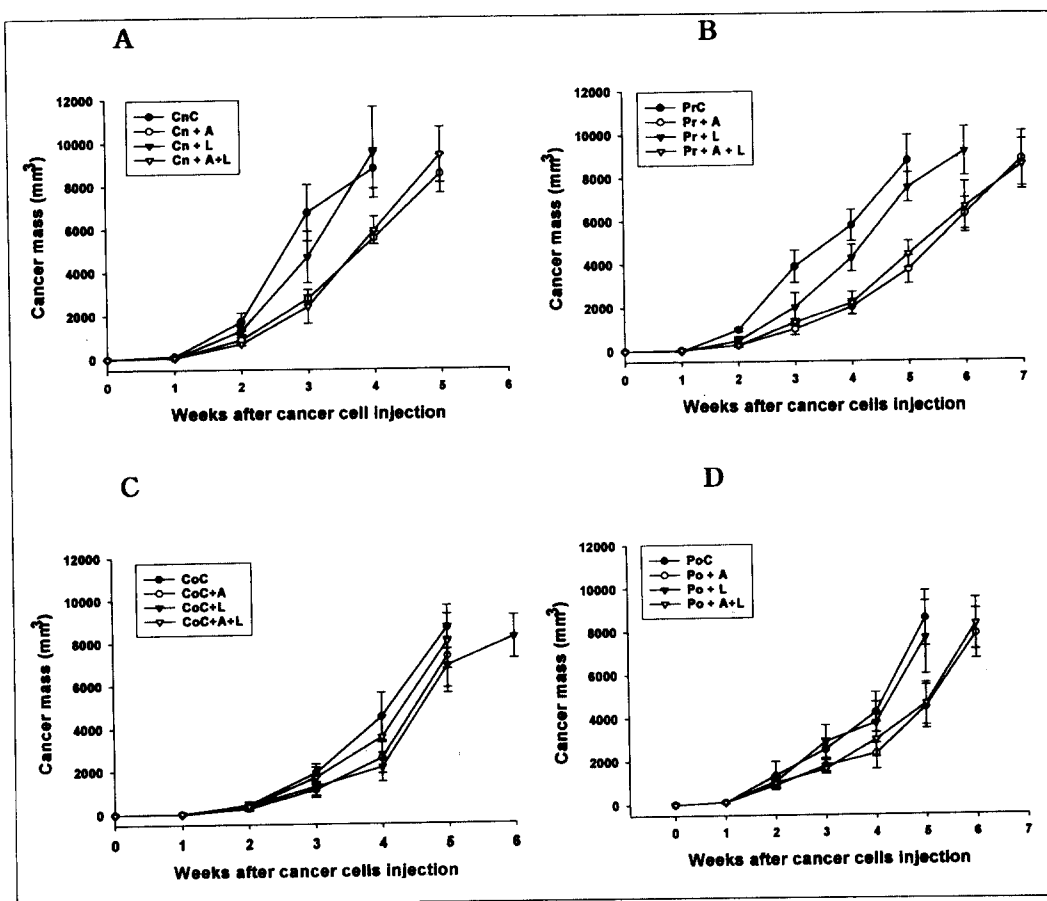


Fig. 3. Tumor size of C57BL/6 mice received either *T. gondii* cysts, Lewis lung cancer cells, Toxoplasma antigen or lymphokine. The data are represented as mean  $\pm$  standard deviation of two separate experiments. A, group of cancer control ; B, group of preinfection control ; C, group of coinfection ; D, group of postinfection.

### 3. 톡소포자충 감염 시기에 따른 암세포 발생 및 전이 시기 비교

폐암세포를 주입한 마우스의 근육내 암세포 발생 및 폐조직내 암세포 전이 여부를 매주 1회 병리조직병리 표본으로 관찰하였다. 폐암대조군은 폐암세포를 주입한 후 1주부터 주사부위 근육에서 암세포가 국소적으로 발견되기 시작하여, 2주부터 근육조직에서 쉽게 암세포를 확인할 수 있었고 (Fig. 4A), 3주부터 폐조직에서도 암세포가 발견되기 시작하였으며, 4주부터

근육조직의 괴사와 폐조직에서 심한 암세포 침윤을 볼 수 있었다 (Fig. 4B). 전감염대조군 및 동시감염대조군은 폐암세포 주입 후 2주부터, 후감염대조군은 폐암세포 주입 후 1주부터 근육조직에서 암세포를 관찰할 수 있었으며 4주 이후에는 모든 폐암세포 주입 마우스의 폐에 암세포가 전이된 것을 관찰할 수 있었다.

### 고 찰

Lewis 폐암은 C57BL/6 마우스의 폐에서 자연적으



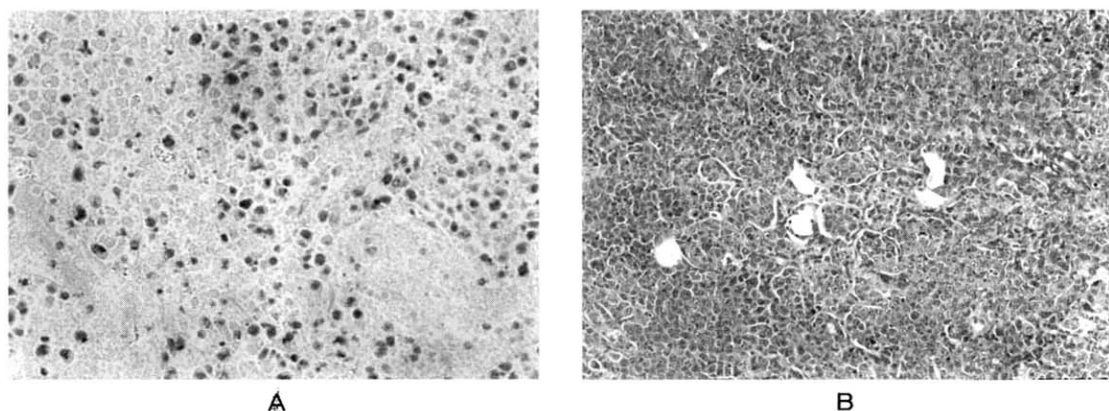


Fig. 4. Histopathologic findings of muscle and lung from C57BL/6 mice received either *T. gondii* cysts or Lewis lung cancer cells. A, cancerous change and necrosis of the muscle ; B, cancerous change of the lung. Magnification is X400.

로 발생된 암종으로 피하조직에 이식시 빠르게 폐로 전이되는 특징을 가지고 있어 폐암 연구에 좋은 모델이다. 본 연구에서 Lewis 폐암 마우스 모델에 톡소포자충을 감염시의 생존기간 및 종양의 크기는 폐암세포만을 주입한 마우스의 생존기간보다 유의하게 증가되었고 종양의 성장도 억제되었으며 종양의 성장억제는 톡소포자충 처치 후 2주 이내에 주로 일어났다. 여기에 톡소포자충 항원을 단독 혹은 lymphokine과 병용하여 추가면역시 항암효과가 증가되었다. 그렇지만 폐암의 발생 및 전이 자체를 막을 수는 없었다.

암세포는 DNA 손상 또는 비정상적인 유전자 전사 등에 의해 변형된 유전자가 발현되며, 이에 대한 면역 반응을 일으킨다. 대부분의 암환자는 지연형과민반응, 표적세포 살해능, 림프구 증식반응 감소 등이 알려져 있고, 일부 암세포에서 종양특이 림프구 클론의 결손, 면역억제 세포의 활성화, 림포카인 생산감소 및 암세포에서 분비되는 면역억제 매개물 등에 의하여 면역 기능이 감소되어있다고 한다<sup>2</sup>. 이러한 면역반응 감소기전으로 일부 암세포에서 종양특이 림프구 클론의 결손, 면역억제 세포의 활성화, 림포카인 생산감소 및 암세포에서 분비되는 면역억제 매개물 등의 역할로 설명되고 있으나<sup>2</sup>, 아직 이에 대한 정립된 의견이 없다. 본

연구에서는 감소된 면역기능을 강화하기 위해 강력한 비특이적 면역 자극제인 톡소포자충을 사용하였다. 톡소포자충은 면역반응에 중요한 역할을 하는 대식세포 내에서 증식할 수 있는 특성이 있어 면역학 연구에 많이 이용된다. 이 원충을 사람이나 마우스에 감염시 강한 세포매개성 면역반응을 일으키며, T 세포를 비롯한 면역관련 세포들을 활성화시키고 여러 종류의 cytokine을 생산한다<sup>13-15</sup>. 이런 특성을 이용하여 톡소포자충을 Lewis 폐암 마우스 모델, 림프종, 위암세포 및 2-methylcholanthrene에 의해 유발되는 암 조직에 처치한 결과 종양의 성장이 현저히 억제되었고 생존기간에 뚜렷이 연장되었다고 하였다<sup>11,16-19</sup>, 그렇지만 톡소포자충의 감염시기에 따른 항암효과 및 lymphokine 혹은 항원의 추가면역에 대한 연구는 없었다. 본 실험에서 폐암세포 마우스 모델에 톡소포자충 충체 혹은 항원 처치시의 종양억제 효과를 비교한 결과 톡소포자충 충체 처치시에 종양조직의 성장 억제 효과가 더 현저했다. 또한 톡소포자충의 감염시기에 따라 근육내 암 조직의 성장 유형을 분석한 결과, 암 조직의 성장 억제는 톡소포자충 충체 주입 후 2주 이내에 주로 일어났으며, 그 후 성장억제 효과는 현저히 감소하였다. 이는 Lewis 폐암세포 주입 후 형성된 종

양의 성장 억제에는 톡소포자충의 의한 지연형과민반응의 강도와 관련이 있다는 보고<sup>17</sup>와 톡소포자충 감염시 숙주에서 유발되는 Th1 세포매개성 면역 반응이 감염 후 2주 이내에 가장 강력히 일어나는 현상과 일치하는 것으로 생각된다<sup>14, 21-23</sup>. 톡소포자충 감염시기에 따른 폐암세포 주입 마우스의 생존기간을 측정한 결과 후감염대조군에서 가장 길었는데, 이는 폐암세포 주입 후 암 조직이 주로 성장하는 2~4주 사이에 강한 세포매개성 면역반응을 유도할 수 있기 때문으로 생각된다<sup>15, 23</sup>. 그렇지만 후감염대조군은 폐암세포 주입 후 2주에 종체를 주입한 것이므로 암 조직이 이미 자리를 잡은 후 커 가는 과정에 있는 암 조직의 성장을 일시적으로 억제한 것으로 감염 후 3주부터 급속히 성장하였다. 따라서 폐암의 성장을 초기부터 효과적 억제하기 위해서는 폐암세포 주입 이전에 톡소포자충을 감염시켜 전반적인 세포매개성 면역기능을 항진시키는 것이 필요할 것이며, 여기에 추가 면역을 하면 효과적으로 종양의 성장을 억제할 수 있을 것으로 생각된다<sup>16, 22</sup>. 위와 같은 이유에 의하여 이번 연구에서도 전감염대조군에 항원 혹은 항원과 lymphokine을 병용하여 추가 면역한 마우스에서 가장 생존기간이 길었다.

유전공학 기법을 이용한 유전자 재조합 cytokine의 대량생산이 가능해짐에 따라 이들을 이용한 면역학적 연구가 활발히 전개되고 있으며, 더 나아가서 임상치료도 시도되어 많은 주목을 끌고 있다. 암환자의 말초혈액에서 채취한 림프구를 rIL-2에 같이 3~5일간 배양 증식시켜 얻은 LAK세포를 다시 rIL-2와 함께 투여시 치료효과가 있다고 보고하였으며<sup>25</sup>, 종양 침윤 림프구(tumor-infiltrating lymphocyte)를 rIL-2와 함께 배양한 후 얻은 LAK세포의 종양세포에 대한 세포독성이 50~100배 증가하였으며, 이를 rIL-2와 함께 투여시 현저한 항암효과가 있다고 보고하였다<sup>26</sup>. 본 실험에서도 면역세포에서 추출되는 다양한 물질에 의한 면역치료 효과를 보기 위하여 비장 림프구 배양상청액인 lymphokine을 이용하여 실험한 결과, 폐암대조군, 전감염대조군 및 동시감염대조군에

lymphokine을 각각 처치시 생존기간이 유의하게 증가되어 Lewis 폐암 마우스모델에서도 폐암 조직이 발생하기 이전이나 초기에 lymphokine을 투여시 항암 작용이 있음을 입증하였다.

이상에서와 같이 Lewis 폐암 세포를 주입한 C57BL/6 마우스에 톡소포자충을 감염시 마우스의 생존기간이 유의하게 증가되었으며, 종양의 성장이 억제되었으나 종양의 발생 및 전이를 완전히 억제하지는 못했다. 추후 본 연구 결과를 토대로 톡소포자충의 다양한 항원중 면역증강 효과가 가장 강한 단백 항원을 획득하여 폐암의 성장 및 전이 억제 효과를 더욱 증강시키고자 한다.

## 요 약

### 배 경 :

종양은 우리나라뿐만 아니라 선진 국가에서도 주요 사망 원인의 하나로, 새로운 치료법의 개발이 절실히 요구된다. 최근 면역종양학의 발전으로 면역강화요법에 의한 종양의 면역치료에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 본 연구는 Lewis 폐암 마우스 모델을 대상으로 원충의 일종인 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)에 의한 비특이적 면역증강요법에 의한 폐암의 성장 및 전이 억제 효과를 평가하고자 시행하였다.

### 방 법 :

C57BL/6 마우스에 톡소포자충 총체(마우스당 5개의 씨스트를 복강내로 주사) 혹은 Lewis폐암세포(마우스당  $1 \times 10^6$ 씩 대퇴근육에 주사)를 여러 조합으로 처치하여 각 군별 생존기간, 주사부위 근육의 종양 크기, 근육 및 폐장의 조직병리 소견을 조사하였다. 또한 각 군별 마우스를 톡소포자충 항원(마우스당 50  $\mu$ g) 혹은 lymphokine(마우스당 0.5 ml)으로 추가 면역한 다음 항암 및 항전이 효과를 비교하였다.

### 결 과 :

톡소포자충 총체만을 감염시킨 마우스는 실험기간중 한 마리도 죽지 않았으나, 폐암세포만을 주입한 마우스(폐암대조군)의 평균 생존기간은  $29.1 \pm 4.4$ 일이었

다. 톡소포자충 감염 후 2주에 폐암세포를 주입한 마우스(전감염대조군), 충체와 폐암세포를 동시에 주입한 마우스(동시감염대조군) 및 폐암세포 주입 후 충체를 감염시킨 마우스(후감염대조군)의 생존기간은 각각  $32.4 \pm 3.3$ 일  $30.9 \pm 5.1$ 일 및  $34.9 \pm 2.9$ 일로 폐암대조군에 비하여 모두 유의하게 증가하였으며( $0.0001 < p < 0.035$ ), 이들 3개군을 상호비교시 전감염대조군과 동시감염대조군 사이에는 유의한 차이가 없었으나( $p=0.071$ ), 그 외의 비교에서는 유의한 차이를 보였다. 전감염대조군은 폐암세포 주입 후 2~3주 사이에, 동시감염대조군은 3주 이후에, 후감염대조군은 4주 이후 종양의 크기가 큰 폭으로 증가하였으며, 이들 3개군의 종양 크기는 동일기간 폐암대조군에 비하여 유의하게 적었으나, 3개군을 상호 비교시 유의한 차이는 없었다( $0.2 < p < 0.085$ ). 폐암대조군, 전감염대조군 및 후감염대조군에 톡소포자충 항원 단독 혹은 항원과 lymphokine을 병용하여 추가 면역한 마우스의 생존기간 및 암 조직 크기는 각각의 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으나, 대조군에 lymphokine만을 추가 주입한 마우스의 생존기간 및 종양 크기는 대조군과 유의한 차이가 없었다. 폐암대조군은 폐암세포를 주입한 후 1주부터 근육에서, 3주부터 폐에서 암세포를 발견할 수 있었으나, 전감염대조군 및 동시감염대조군은 2주부터 근육에서, 4주부터 폐에서 암세포를 관찰할 수 있었다.

#### 결론:

Lewis 폐암 마우스 모델에 톡소포자충을 감염시킬 경우 생존기간이 유의하게 증가하였고 종양의 성장도 느려졌으며, 여기에 톡소포자충 항원 단독 혹은 항원과 lymphokine을 병용하여 추가 면역시 항암작용 및 항전이 작용이 증가되었으나 종양의 발생 및 진행을 정지시키지는 못했다.

#### 참고문헌

1. 정은택. 한국인에서의 폐암의 실태. 결핵 및 호흡기질환 2000;49:137-48.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders;1997.
3. Emori Y, Sasaki H, Hayashi Y, Nomoto K. Effect of Z-100, an immuno-modulator extracted from human type tubercle bacilli, on the pulmonary metastases of Lewis lung carcinoma in attempt to regulate suppressor T cells and suppressor factor IL-4. Biotherapy 1996;9:249-56.
4. Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, et al. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. J Immunol 1999;163:5020-8.
5. Sharma S, Stolina M, Luo J, Strieter RM, Burdick M, Zhu LX, et al. Secondary lymphoid tissue chemokine mediates T cell-dependent anti-tumor responses in vivo. J Immunol 2000;164:4558-63.
6. Scott AM, Geleick D, Rubira M, Clarke K, Nice EC, Smyth FE, et al. Construction, production, and characterization of humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody 3S193 for targeted immunotherapy of solid tumors. Cancer Res 2000;60:3254-61.
7. Zhu LX, Sharma S, Stolina M, Gardner B, Roth MD, Tashkin DP, et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol inhibits antitumor immunity by a CB2 receptor-mediated, cytokine-dependent pathway. J Immunol 2000;165:373-80.
8. Budzynski W. Lewis lung carcinoma in mice as an experimental therapy model. I. The growth kinetics and the effect of tumor on host. Arch Immunol Ther Exp 1982;30:363-72.
9. Law MR, Lam WK, Hodson ME. Post-operative intrapleural BCG in lung cancer. Eur J Cancer Clin Oncol 1988;24:1527-8.

10. Nowicki A, Ostrowska G, Aukerman SL, Wiktor-Jedrzejczak W. Effect of macrophage-modulating agents on in vivo growth of transplantable Lewis lung cancer in mice. *Arch Immunol Ther Exp* 1994;42:313-7.
11. Gangjee A, Vasudevan A, Queener SF, Kisliuk RL. 6-substituted 2,4-diamino-5-methyl-pyrido [2,3-d] pyrimidines as inhibitors of dihydrofolate reductases as from *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* and as antitumor agents. *J Med Chem* 1995;38:1778-85.
12. Khan IA, Ely KH, Kasper LH. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* 1991;147:3501-6.
13. Kasper LH. Chapter 219. *Toxoplasma* infections. In: Isselbacher KJ, Martin JB, Braunwald E, Gauci AS, Wilson JD, Kasper DL, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 14th ed. New York: McGraw-Hill Company; 1997. p.1197-1202.
14. Lee YH, Ely KH, Lepage A, Kasper LH. Interleukin-15 enhances host protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in T-cell receptor alpha-/-deficient mice. *Parasite Immunol* 1999;21:299-306.
15. Lee YH, Channon JY, Matsuura T, Schwartzman JD, Shin DW, Kasper LH. Functional and quantitative analysis of splenic T cell immune responses following oral *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Exp Parasitol* 1999;91:212-21.
16. Suzuki Y, Kobayashi A. Antitumor effect of intralesional injection with formalin-fixed *Toxoplasma gondii* organisms on Lewis lung carcinoma in *Toxoplasma*-infected mice. *Cancer Lett* 1985;25: 247-54.
17. Suzuki Y, Muto M, Kobayashi A. Antitumor effect of formalin-fixed *Toxoplasma gondii* organism on EL4 lymphoma in *Toxoplasma*-infected mice. *J Biol Response Mod* 1986;5:288-93.
18. Miyahara K, Yokoo N, Sakurai H, Igarashi I, Sakata Y, Yoshida Y, et al. Antitumor activity of *Toxoplasma* lysate antigen against methylcholanthrene-induced tumor-bearing rats. *J Vet Med Sci* 1992;54:221-8.
19. Varga A, Sokolowska-Kohler W, Presber W, Von Baehr V, Von Baehr R, Lucius R, et al. *Toxoplasma* infection and cell free extract of the parasites are *Toxoplasma* able to reverse multidrug resistance of mouse lymphoma and human gastric cancer in vitro. *Anticancer Res* 1999;19:1317-24.
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
21. Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 1994;153:1697-706.
22. Brunda MJ, Luistro L, Hendrzak JA, Fountoulakis M, Garotta G, Gately MK. Role of interferon- $\gamma$  mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1995;17:71-7.
23. Fernando GJ, Stewart TJ, Tindle RW, Frazer IH. Th2-type CD4+ cells neither enhance nor suppress antitumor CTL activity in a mouse tumor model. *J Immunol* 1998;161:2421-7.
24. Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin-12 against

- murine tumors. *J Exp Med* 1993;178:1223-30.
25. Hoffman DM, Figlin RA. Intratumoral interleukin 2 for renal-cell carcinoma by direct transfer of a plasmid DNA/DMRIE/DOPE lipid complex. *World J Urol* 2000;18:152-6.
26. Tahara H, Lotze MT. Antitumor effects of interleukin-12 (IL-12): applications for the immunotherapy and gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1995;2:96-106.
-