

암의 치료에 있어서 인체에 무해하고 효과적으로 암을 퇴치할 수 있는 새로운 항암제의 개발이 현대의약의 당면과제이다. 이러한 점을 고려할 때 불완전한 기존의 암치료에 병행하여 직접적인 세포독성보다는 면역활성을 이용하여 암을 치료하려는 것은 매우 의미있는 일이라 할 수 있다.

즉 암세포에 대한 생체의 비특이성 내지는 세포성 면역을 자극하므로써 항암효과를 기대하는 면역화학요법의 시도는 그 치료적 타당성을 가지고 있는 것으로 생각된다.

현재 연구되고 있는 항암제도 다당체를 주성분으로 하는 면역증강제 의약품의 개발이 진행중이며, 그 효과 및 타당성이 높은 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구는 새우의 껍질에서 추출한 키토산의 항암 및 면역활성에 대하여 실험을 실시하여 자연에 풍부히 존재하는 폐자원을 재활용하는 방안을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

Chitosan의 원료 및 제조

새우껍질에서 chitosan을 만들기 위하여 대롱수염새우(*Solenocera promineta*)의 껍질을 부산시 자갈치 시장에서 수집하여 사용하였고 키토산은 Hackman¹⁷⁾의 방법에 따라 제조 하였다.

키토산의 IR 분석

키토산의 IR측정은 상법에 따라 KBr disc법으로 분석하였다.

항암활성 및 고형암 발생빈도 실험

본 실험에서 사용할 동물은 경성대학교 동물사육장에서 사육한 웅성 ICR마우스로 체중 8~22g에 속하는 것을 사용하였다¹⁸⁾.

종양 세포는 류 등¹⁹⁾의 방법에 따라 실시 하였고, 고형암 성장저지 실험 및 수명연장 실험은 Godin 등¹⁹⁾의 방법에 따라 실험하였다.

고형암고압 발생 빈도 실험은 각 군당 7마리씩으로 하여 전술한 방법으로 조제한 종양세포 부유액을 5×10^4 cells/mouse씩을 왼쪽 서혜부에 피하이식 한 후 이식 24시간 부터 시료를 10일간 연속으로 복강 투여하

고 종양 이식 26일째 되는날 치사시킴후 고형암 발생 여부를 관찰하였다.

Viability test

항암효과를 나타낸 시료의 직접적인 세포독성작용(direct cytotoxic effect)의 유무를 알아보기 위하여 dye exclusion method를 이용하여 *in vitro*에서 viability test를 행하였다^{20,21)}.

시료의 조제 및 종양 세포

시료는 미리 조제한 EMEM을 이용하여 20mg/ml의 농도로 조제 하였으며, 종양 세포는 앞의 방법과 동일한 방법으로 분리하고 EMEM을 이용하여 1.0×10^6 cell/ml의 농도로 조제하였다.

실험방법

미리 멸균한 시험관에 조제한 종양 세포 부유액 0.2ml(2.0×10^5 cells)와 HFCS 0.5ml씩과 시료 용액 0.25, 0.50, 0.75 및 1.00 ml씩을 가한 다음 EMEM으로 전체를 5ml가 되도록 하고 HFCS의 최종 농도가 10%가 되게 하여 5% CO₂의 조건으로 CO₂ incubator에서 37°C, 24시간 배양하였다.

24시간 후 배양된 종양 세포를 가볍게 흔들어 준 후 원심분리(600xg, min)하여 침전한 세포만을 HBSS로 1회 세척한 다음 얻어진 세포 침전물에 다시 HBSS 5ml를 가하여 종양 세포 부유액을 조제하였다. 이 종양 세포 부유액 0.9ml를 취하여 0.4% trypanblue용액 0.1ml와 잘 섞어 상온에서 2~3분간 방치시킨 후 hemacytometer를 사용하여 전체의 세포수와 염색되어진 세포(nonviable cell) 및 염색되지 않은 세포(viable cell)의 수를 측정하였다.

면역 기능에 미치는 영향

혈중 백혈구수에 미치는 영향은 Miturka 등의 방법²³⁾에 따라 실험하였으며 복강 세포수에 미치는 영향은 Weir 등의 방법²⁴⁾에 따라 실험하였다.

면역 관련 장기의 중량변화

실험 동물을 각 군당 12마리로 시료 투여군과 대조군으로 나누고 시료 투여군은 시료를, 대조군은 생리 식염수를 10일간 연속으로 복강내에 투여하고 시료 투여 최종일로 부터 8일째 되는 날 실험 동물을 경추 탈골법에 의하여 치사시키고 체중을 측정후 후 흉선, 비

장 및 간을 적출하여 각각 장기 무게를 측정하였다.

항체 매개형 과민 반응 및 지연형 과민 반응에 미치는 영향

항체 매개형 과민 반응(Arthus reaction, AMH) 및 지연형 과민 반응(Delay type hypersensitivity, DTH)에 미치는 영향은 Henningsen 등²⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다.

Macrophage의 식작용에 미치는 영향

시료의 *in vivo*에서의 macrophage의 식작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Biozzi 등의 방법²⁶⁾에 따라 carbon clearance test를 실시하였다.

용혈반 형성 세포수(Plaque Forming Cells, PEC)에 미치는 영향

용혈반 형성 세포수(PEC)의 측정은 Cunningham의 방법²⁷⁾을 이용하여 다음과 같이 행하였다.

시약 및 기구

Balanced Salt Solution (BSS)

용액 A : Glucose 10.0g, KH_2PO_4 0.6g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.58g 및 0.5% phenol red용액 20.0ml를 2차 증류수에 녹여 전체가 1,000ml가 되도록 하여 냉장고에 보관하여 사용하였다.

용액 B : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.86 g, NaCl 4.0g, $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0g 을 2차 증류수에 녹여 전체가 1,000ml가 되도록 하여 냉장고에 보관하며 사용하였다.

BSS : A 용액 100ml와 B 용액 100ml를 섞고 적당량의 2차 증류수를 가해 pH7.3이 되도록 맞추어서 전체가 1,000ml가 되도록하여 사용하였다.

Alsever's 용액

Glucose 20.5g, NaCl 4.2g 및 sodium citrate 8.0g 을 2차 증류수에 녹여 전체가 1,000ml가 되게 한 뒤 121°C에서 15분간 고압증기멸균하여 사용하였다.

면양 적혈구(Sheep red blood cell, SRBC)

건강한 면양으로부터 신선한 혈액을 동량의 Alsever's 용액에 채취하였고 이는 국립 부산 동물 검역소에서 분양받아 처리하였다.

Complement

Guinea pig complement (Denka seiken Co.)를 구입

하여 사용하였다.

Microchamber

Microscope slide (select micro slides, 26mm×76mm)를 무독성 세제인 7×cleaning solution (Flow Lab, Inc)으로 세척한 후 건조시켜서 양면 스퀴치 테이프(Scotch brand double stick tape)를 구입하여 사용하여 slide glass를 두 부분으로 단층면을 밀봉하여 각각 내용량 50 μl 가 되게 사용하였다.

실험 방법

약물 투여 및 immunization

실험 동물을 각 군당 7마리 씩으로 나누어 대조군에는 생리식염수를, 시료 투여군에는 시료를 8일간 연속으로 복강내에 주사하였으며, 시료 투여 최종일로 부터 2일 후에 SRBC현탁액을 0.2ml(8×10^7 cell/mouse)씩 복강내에 주사하여 SRBC에 대한 immunization을 행하였다.

Immunizing antigen과 target cell로 사용한 SRBC현탁액 제조 과정은 국립 부산 동물 검역소에서 분양받은 SRBC를 Alsever's 용액으로써 이를 희석한 후에 원심분리 (600×g, 15ml)하고 상등액을 제거하여 생리 식염수로 3회 세척한 다음 다시 원심분리하여 적혈구만을 취하며 생리 식염수로 2% SRBC 및 BSS로 12.5% SRBC를 조제하여 각각 immunizing antigen과 target cell로 사용하였다.

비장 세포 부유액 조제

Immunization시킨 4일 후에 실험 동물을 처사시켜 즉시 비장을 적출하여 방냉의 BSS 2ml와 함께 조심스럽게 균질화(Potter-Elvehjem type) 한 후 침전을 BSS 4ml에 부유시켜 23gauge needle syringe를 2번 통과시킨 다음 BSS를 첨가하여 전체를 8ml로 하고 비장 세포수를 hemacytometer로 측정하였다.

통계 처리

모든 실험 data는 mean standard error로 나타내었으며, 유의성 검정은 t-test로 하였다.

결과 및 고찰

키토산의 확인

대롱수염새우껍질의 키토산의 IR spectrum은 Fig. 1과 같다.

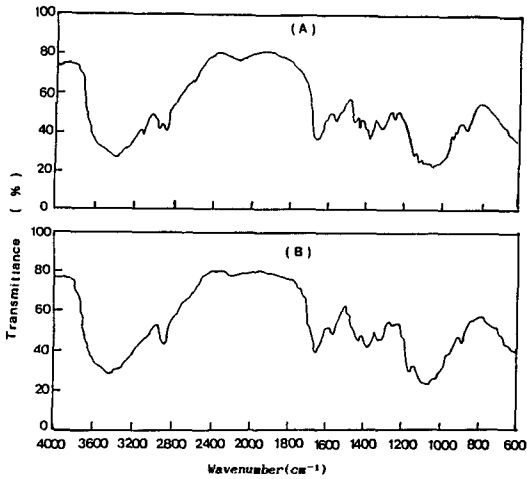


Fig. 1. Infrared spectrum of standard chitosan(A) and *Solenocera promineta* chitosan(B).

키토산 IR spectrum은 다당류에서 확인되는 3400 cm^{-1} 부근의 O-H 신축진동, 2900 cm^{-1} 부근의 C-H 결합의 신축진동, 1650 cm^{-1} 부근의 C=O 결합의 신축진동, 1400 부근에서 CH₂ 결합의 변각진동, 1200 cm^{-1} 부근의 N-acetyl기의 신축진동을 관찰할 수 있으며 1000~1100 cm^{-1} 의 glycoside 결합의 ester형 산소 및 각 OH기에 귀속하는 C-O의 신축진동에 의한 것이라고 생각된다. 그리고 spectrum 중 1655 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} 및 1300 cm^{-1} 에서의 진동은 amide의 신축진동으로 보인다.

항암효과

고형암 발생빈도

Sarcoma-180의 고형암의 발생빈도를 알아보기 위하여 대동수염새우의 껍질에서 추출한 키토산을 ICR mice의 체중 kg당 10, 20, 30, 40 및 50 mg을 투여하여 고형암의 발생여부를 관찰한 결과를 Table 1에 나타내었다.

Chitosan을 투여하고 26일째 되는 날 고형암의 발생여부를 관찰한 바 각 농도에서 고형암이 발생하였으므로 고형암의 발생빈도는 100%를 나타내고 있다.

고형암의 성장저지효과

대동수염새우의 껍질에서 분리한 chitosan이 고형암인 sarcoma-180의 성장저지 효과에 대한 결과를 Table 2에 나타내었다.

Table 1. Effects of chitosan extracted from *Solenocera promineta* on the sarcoma-180 tumor incidence

Treatment	Dose (mg/kg)	Incidence (a/b)	Incidence ratio (%)
Control		7/7	100
Chitosan	10	7/7	100
	20	7/7	100
	30	7/7	100
	40	7/7	100
	50	7/7	100

a : The number of tumor bearing mice
b : The number of mice used

Table 2. Antitumor activity of chitosan extracted from *Solenocera promineta* on the sarcoma-180 bearing ICR mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Tumor weight (g) (Mean \pm SE) ^{a)}	Inhibition ratio (%)
Control		7.55 \pm 3.67	
Chitosan	10	5.30 \pm 3.05 ^{a)}	29.80
	20	4.45 \pm 1.30 ^{a)}	41.05
	30	2.96 \pm 2.31 ^{a)}	60.79
	40	2.73 \pm 1.21 ^{a)}	63.84
	50	3.16 \pm 1.43 ^{a)}	41.05

^{a)} Statistically not significant, n : number of mice = 7

키토산을 각종 농도별로 투여하여 실험하는 동안 마우스가 죽는 경우는 없었다. Sarcoma-180을 ICR mice에 투여시 대조군의 평균 종양무게는 7.55g이었고 키토산을 30mg/kg로 투여하였을 때 종양무게는 2.73g으로 60.79%의 저지효과를 나타내었으며 40mg/kg을 투여하였을 때는 종양무게는 3.16g으로 58.15%의 저지효과는 약하였으며 투여농도가 적정량이 되어야 항암효과가 있을 것으로 사료된다.

이러한 결과는 오징어 껍질의 추출물의 항암효과²⁸⁾ 가리비 껍질의 추출물의 항암효과²⁹⁾ 해조류에서 추출한 당단백질의 sarcoma-180에 대한 항암효과^{30,31)} 및 *Vibrio anguillarum*에서 추출한 다당체의 항암효과³²⁾와는 약간의 차이는 있으나 일반적으로 해상동물이 항암효과가 높은 것으로 판단된다.

수명연장 효과

대동수염새우의 껍질에서 추출한 키토산을 수명연장 실험으로서 35일 까지 생존여부를 관찰한 결과는 Table 3과 같다.

일반적으로 지금까지의 실험결과에 의하여 복수형 고형암인 sarcoma-180을 이식한 후 35일까지는 생존

Table 3. Effects of chitosan extracted from *Solenocera promineta* on life span of sarcoma-180 bearing ICR mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Survival days	Prolongation ratio (%)
Control	—	17.02	—
Chitosan	10	20.03	17.69
	20	20.09	18.06
	30	20.69	21.56
	40	20.59	26.84
	50	20.50	20.43

n : number of mice = 7

Table 4. Effects of chitosan extracted from *Solenocera promineta* on life span of sarcoma-180 by dye exclusion method

Treatment	Dose (mg/kg)	Viability (%)
Control	—	75.21
Chitosan	10	73.03
	20	72.24
	30	78.36
	40	80.25
	50	76.01

하지 못하였다. 본 실험에서의 수명연장 효과는 대조군의 평균 수명이 17.02일 인데 비하여 키토산을 40mg/kg 투여했을 때는 26.84일로 가장 높았고 그 다음이 30mg/kg일 때 20.69일 이었고 50mg/kg일 때 20.50일로 가장 낮았다. 대조군의 평균수명에 비하여 키토산의 투여군이 다소 수명이 연장효과는 있었지만 80mg/kg 투여하였을 때 26.84%가 가장 높은 수명연장 백분율을 나타내었으나 그다지 높지 않았다.

이러한 결과는 고형암성장저지 실험결과와 비교해 볼 때 *in vivo*에서의 고형암성장에는 그렇게 높은 항암효과를 보이지 않고 있다. 이것은 투여한 약물이 *in vivo*에서의 항암효과는 host-mediated response에 의한 것으로 생각되며 수명연장효과 실험에서는 고형암저지 실험에서와 같이 키토산의 농도를 80mg/kg를 투여했을 때 가장 효과가 높았다.

본 실험의 결과는 오징어 껍질²⁸⁾, 가리비 껍질²⁹⁾ 및 해조류^{33,34)}의 수명연장 백분율과 거의 비슷한 수치를 나타내고 있다.

Viability test

대동수염새우 껍질에서 추출한 키토산을 *in vivo*에서 항암효과를 근거로 하여 *in vivo*에서 직접적인 세포독성작용의 유무를 알아보기 위하여 dye exclusion 방법에 따라 viability test를 실시한 결과는 Table 4와 같다.

대조군과 키토산 투여군에서 뚜렷한 viability의 차이는 없었으며 키토산의 항암효과가 가장 높았던 40mg/kg의 농도에서는 오히려 대조군의 75.21%보다 다소 높은 80.25%를 나타내었다. 고행암의 성장저지 효과와 비교해 볼 때 *in vivo*에서의 항암효과를 보이지 않았음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *in vivo*에서의 항암효과는 투여한 키토산이 sarcoma-180에 대하여 직접적인 세포독성 작용은 보이지 않았으며, 다른 경로 즉 간접적 세포독성 또는 체내의 면역반응을 자극 하므로서 나타나는 효과일 것으로 사료된다.

면역기능에 미치는 영향

혈중 백혈구 수에 미치는 영향

Chitosan의 항암효과는 투여량중 30mg/kg과 40mg/kg이 상당히 우수하였다. 이들 투여량으로 항암효과의 작용기전을 알아보기 위하여 면역기능에 대한 직접적인 방법으로 순환 말초 혈액내의 백혈구에 미치는 영향에 대하여 검토한 결과는 Table 5에 나타내었다.

키토산은 30mg/kg 및 40mg/kg을 투여하였을 때 대조군에 비하여 1일째가 가장 높은 수치를 보였고 2일째, 4일째 및 7일째 등도 시간이 경과함에 따라 점점 감소하는 경향을 나타내었다.

백혈구는 혈액을 구성하는 주성분으로 체내에서의 아메바 운동으로 체내에 들어오는 세균들의 phagocytosis에 의하여 우리 몸을 보호해 주고, 백혈구의 호중구는 생체의 leucocytosis에 관여하여 감염으로 부터

Table 5. Effects of chitosan extracted from *Solenocera promineta* on the number of circulating leucocytes in ICR mice

Treatment	Dose (mg / kg)	Day 1	Day 2	Day 4	Day 7
Control	0	7,323 ± 640 ^{a)}	7,360 ± 322	7,554 ± 630	7,600 ± 440
Chitosan	30	10,429 ± 453	10,110 ± 360	9,820 ± 240	8,160 ± 550
	40	10,600 ± 531	10,219 ± 530	9,990 ± 586	8,400 ± 340

^{a)} Mean ± S.E, n : number of mice = 12

Table 6. Effects of chitosan extracted from *Solenocera promineta* on the number of peritoneal exudate cells in ICR mice

(1.0 × 10⁶ cells / ml)

Treatment	Dose (mg / kg)	Day 1	Day 2	Day 4
Control	—	2.90 ± 0.24 ^{a)}	2.80 ± 0.26	2.70 ± 0.50
Chitosan	30	3.50 ± 0.58	3.01 ± 0.60	2.89 ± 0.47
	40	3.63 ± 0.62	3.21 ± 0.33	3.06 ± 0.70

^{a)} Mean ± S.E, n : number of mice = 9

Table 7. Effects of chitosan extracted from *Solenocera promineta* on the immunoorgan weight of ICR mice (I)

Treatment	Dose (mg / kg)	Body weight		Liver weight (mg)	Weight increase (%)
		On 1st day	On 18st day		
Control	—	22.81 ± 0.84	23.84 ± 3.66	1.323 ± 204	—
	60	22.65 ± 1.16	27.02 ± 2.67 ^{b)}	1.502 ± 246	13.53
Chitosan	80	22.50 ± 0.90	27.87 ± 3.23 ^{b)}	1.621 ± 214	22.52

^{a)} Mean ± S.E, ^{b)} p < 0.05, n : number of mice = 12

Table 8. Effects of chitosan extracted from *Solenocera promineta* on the immunoorgan weight of ICR mice (II)

Treatment	Dose (mg / kg)	Spleen weight (mg)	weight Increase (%)	Thymus weight (mg)	Weight increase (%)
Control	—	214 ± 23.65	—	87.2 ± 8.36	—
Chitosan	60	248 ± 50.43	15.88	93.3 ± 22.68 ^{b)}	12.72
	80	263 ± 43.62	22.89	104.4 ± 40.13 ^{c)}	19.72

^{a)} Mean ± S.E, ^{b)} p < 0.05, ^{c)} p < 0.01, n : number of mice = 12

방어하는 면역 반응에 관여하는 중요한 기능을 담당하고 있다. 키토산의 투여에 의한 백혈구수의 증가는 면역기능이 어느 정도 증가함을 나타내었다.

총복강 세포수에 미치는 영향

복강세포중에는 대식세포, 다형핵세포 및 단핵세포 등이 구성되어 있으며 이들 세포에 의한 식작용등에 의한 생체내의 이물질에 대한 방어기능이 있어 총복강 세포수의 증가는 이들 기능의 증대를 나타내므로 면역력 증가의 중요한 지표가 된다. 키토산의 총복강 세포수에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 6과 같다.

시료를 연속적으로 3일간 투여하고 1일 2일 및 4일째 되는날의 복강세포수를 측정된 결과 1일째의 총복강세포수가 80mg/kg투여군이 다소 높은 증가를 나타내었다.

Hamuro 등³³⁾은 lentinan을 투여한 생쥐의 총복강 세포수가 증가한다고 하였고, 또한 우수한 항암효과가 있는 해조류의 다당체^{30,31)}나 lipopolysaccharide의 투여에 의하여 복강세포수가 증가 한다는 보고³⁴⁾와 실험결

과와 비교해 볼때 복강세포수의 증가는 면역기능이 활성화에 다소 관여하는 것에 어떤 구실을 할 것으로 생각된다.

면역관련 장기의 무게 변화

키토산을 투여한 후 면역장기 중량의 변화에 대한 결과는 Table 7과 8에서와 같다.

키토산을 각각 30mg/kg와 40mg/kg 투여시의 경우 각각 15.53%와 22.52%, 비장의 경우 각각 15.88%와 22.89%, 흉선은 각각 12.72%와 19.72%로 증가하였다. 키토산의 투여량이 증가 할수록 이들 장기의 무게도 증가하였으므로 용량의존성 반응을 보였다.

간과 비장의 무게증가는 간에는 kuffer cell, 비장에는 splenic macrophage가 있으므로 체내의 이물질에 대하여 방어작용의 능력이 있다.

이들 장기의 증가는 macrophage수의 증가뿐만 아니라, macrophage기능의 증가에 기인한다고 생각된다. 또한 흉선의 무게 증가는 T-임파구의 작용이 약물 투여에 의하여 다소 증가 되었다고 생각할 수 있다.

Table 9. Effects of chitosan extracted from *Solenocera prominetis* on the antibody mediated hypersensitivity (AMH) and delayed type hypersensitivity (DTH) in sarcoma-180 tumor bearing ICR mice

Treatment	Dose (mg / kg)	Food AMH	Thickness (10mm) ^{a)} DTH
Negative control	—	7.80±1.32	4.87±0.68
Negative control	—	9.90±1.02	6.43±0.36
Sarcoma-180 control	—	5.69±0.76	3.43±1.72
Sarcoma-180 chitosan	30	8.46±1.75	5.43±1.87 ^{b)}
	40	8.40±1.53	3.43±1.72 ^{b)}

^{a)} Mean±S.E, ^{b)} p<0.01, n : number of mice = 9

Table 10. Effects of chitosan extracted from *Solenocera prominetis* on the carbon clearance activity in ICR mice

Treatment	Dose (mg / kg)	Phagocytic index ^{a)}	Corrected phagocytic index ^{a)}
Control	—	0.038±0.006	5.9843±0.2770
Chitosan	30	0.045±0.002	4.5327±0.1148
	40	0.041±0.010	4.6832±0.4538

^{a)} Mean±S.E, n : number of mice = 7

항체 매개형 및 지연형 과민반응에 미치는 영향

Chitosan이 마우스의 항체 매개형 과민반응(AMH) 및 지연형 과민반응(DTH)에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 9와 같다.

축적의 두께가 positive 대조군의 경우 AMH의 경우 9.90, DTH의 경우 6.43였으나, 육종암인 sarcoma-180을 이식한 다음 키토산을 60mg/kg과 80mg/kg을 투여한 경우 그 축적의 증가폭이 AMH의 경우 8.46과 8.40, DTH의 경우 5.43과 5.70으로 거의 정상 수준으로 회복된 것을 알 수 있었다.

이상의 실험결과를 보아 항체 매개형 과민반응 및 지연형 과민반응은 항암실험에서 우수한 항암 효과를 나타낸 다당체가 sarcoma-180을 이식시킨 마우스의 생체 내에서 체액성면역과 관련되어진 보체계를 활성화시켜주고, 다른 한편으로는 생체 면역 반응에서 주요한 역할을 하는 흉선과 관련하여 흉선 의존성 T-임파구의 작용을 특이적으로 활성화시켜 준 것으로 생각된다.

항체 매개형 과민반응은 항원과 액성 항체와의 복합체 형성으로 보체계를 활성화시켜 부분적 분해산물로 다형핵 백혈구에서 유리된 효소에 의하여 일어나는 체액성 면역 반응 현상으로 본 실험결과에서는 대조군에 비하여 동물의 경우 축적의 두께가 저하되어진 현상은 암세포의 이식으로 인한 혈청중의 활성이 저하되어진 것으로 생각된다. 담양동물에게 다당체를 투여함으로써 저하된 축적의 두께가 거의 정상수준까지 회복된 것은 약물투여로 인하여 억제되었던 보체활성이 다시

회복된 것으로 보인다.

지연 과민반응은 시간이 경과함에 따라 다형핵 백혈구 침윤은 쇠퇴하여 임파구가 침윤되는 반응으로 세균에 대한 알러지 반응으로 흉선 의존성 T-임파구가 macrophage와 결합한 항원과의 접촉에 의해 자극됨으로서 lymphokine으로 총칭되는 생물 활성이 다른 분자와 결합하여 일어나는 세포 매개형 과민 반응이 일어난다.

따라서 sarcoma-180이식으로 T-임파구 활성이 특이적으로 억제되지만 약물을 투여하므로써 T-임파구 활성이 어느정도 회복된 것이라 생각된다.

Macrophage의 식작용

Chitosan을 투여하여 macrophage의 식작용에 미치는 영향을 측정한 결과 Table 10에 나타내었다.

시료를 60mg/kg 및 80mg/kg을 투여 했을때 phagocytic index는 각각 0.045 및 0.041 이었으며 corrected phagocytic index는 각각 4.5327 및 4.6832로 나타났다. Macrophage는 미생물의 침입에 대한 방어기구나 노폐혈구의 처리외에도 항암효과와 항체 생산 과정에서 중요한 역할을 담당하고 있으며, 이외에도 활성화되어진 macrophage는 지연형과민반응 뿐만 아니라 여러가지 세포 매개형 반응에서도 중요한 역할을 담당하고 있다³⁵⁾.

용성반 형성 세포수에 미치는 영향

용혈성 반 형성 세포수는 흉선 의존성 항원인 SRBC

Table 11. Effects of chitosan extracted from *Solenocera prominetis* on the hemolytic plaque forming cells (PFC) in the spleen of ICR mice immunized with SRBC

Treatment	Dose (mg / kg)	SRBC	Spleen cell ($\times 10^7$)	PFC / 10^6 Spleen cell ^{a)}	PFC / Spleen cell ($\times 10^3$)
Control	—	8×10^7	32.4	854.8 ± 137	276 ± 48
Chitosan	30	8×10^7	36.3	1016.2 ± 158	367 ± 58
	40	8×10^7	35.1	1127.1 ± 173	409 ± 58

^{a)} Mean \pm S.E, ^{b)} $p < 0.05$, ^{c)} $p < 0.01$

의 항체생산정도를 보는 체액성 면역 반응으로서 이들 비장의 항체 생성은 T-세포와 B-세포의 상호작용 및 macrophage가 관여하고 이들의 활성화 정도를 짐작할 수 있다.

Immunity antigenic target cell로서 SRBC를 이용하여 chitosan이 생쥐의 PFC에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 11 과 같다.

Chitosan을 60mg/kg 및 80mg/kg 투여한 후 대조군과 비교하여 보면 PFC/ 10^7 spleen cell의 경우는 각각 약간씩 증가 하였고, PFC/ 10^6 spleen cell의 경우는 각각 18.88%와 31.83%로서 다소 증가하였다.

본 실험결과는 *Lentinus edodes*에서 추출한 lentinan을 투여한 정상 마우스에서 SRBC에 대한 면역 반응이 증강되어졌으나 흉선을 정제하여 T-세포가 결여된 마우스에서는 효과가 없다는 보고³⁶⁾와 비교하여 볼 때 키토산에 의한 항체 생산의 증가는 helper T-세포의 활성화에 기인한다.

요 약

수산물 폐기물을 이용하기위하여 대롱 새우껍질에서 추출하여 만든 키토산을 마우스에 이식한 sarcoma-180을 이용하여 *in vivo*와 *in vitro*에서 항암 효과 및 면역 기능에 미치는 영향에 대하여 실험하였다.

키토산의 sarcoma-180에 대한 고형압 성장 저지율을 40mg/kg투여시 63.84%의 저지율을 나타내었다. 수명 연장 효과는 대조군에 비하여 키토산을 40mg/kg 투여 하였을때 26.84%로 그다지 높지 않았다. *In vivo*에서의 항암효과를 근거로 하여 *in vitro*에서는 sarcoma-180에 대한 직접적인 세포의 독성 작용은 거의 없었다. 키토산은 30mg/kg과 40mg/kg을 투여시 혈중 백혈구수와 총복강세포수가 대조군에 비하여 다소 증가 하였고 장기인 간, 비장 및 흉선의 무게도 투여한 용량에 따라 증가하는 용량 의존성 반응을 보였다. 항체

유도염증 반응인 항체매개형 과민반응과 지연형 과민 반응은 축척의 두께가 키토산에 의해 거의 정상 수준까지 회복되었다. Macrophage의 식작용에 미치는 영향은 phagocytic index 와 corrected phagocytic index 에서 거의 차이가 없었고, 용혈성 반응 세포수(plaque forming cell, PFC)는 대조군에 비하여 PFC/ 10^7 spleen 의 경우 18.88%와 31.83%로 다소 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 1990년도 교육부 학술연구 조성비의 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며, 이를 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Bough, W. A. : Redution of suspended solids in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan. *J. Food Sci.*, **40**, 297(1975)
2. 外山 章夫 : 키토산의有効利用法. *食品と科學*, **1**, 107(1985)
3. No., H. K. : Application of crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compound from seafood processing wastes. *Ph. D. Thesis*, Louisiana State University, U. S. A.(1987)
4. Bissett, F. and Sternberg, D. : Immobilization of *Aspengillus* betaglucosidase on chitosan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**(4), 750(1987)
5. Knorr, D. : Functinal properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, **47**, 593(1982)
6. Knorr, D. : Use of chitinous polymers in food. *Food Tech.*, **38**(1), 85(1984)
7. Austin, P. R., Brine, S. J. and Castle J. E. : Chitin, new facets of research. *Science*, **212**(15), 749(1984)
8. 平野 茂博 : 키토산, 키토산의科學. *高分子加工*, **35** (9), 28(1986)
9. 平野 茂博 : カニの甲羅-バイオマスの有効素材への變身. *化學教育*, **34**(4), 22(1986)
10. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and

- Fukuoko, F. : Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes*(Berk) Sing.(an edible mushroom). *Cancer, Res.*, **30**, 2776(1970)
11. Park, W. H. : Studies on antitumor components of wild *Pholiota squarrosa*(Fr.). *Yakkhaak Hoeji*, **26**(3), 185(1982)
 12. Ryu, W. H., Kim, D. S., Cho, K, J. and Sin, D. B. : Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21**(5), 595(1989)
 13. Yananoto, I. and Nagumo, S. : Tumor-inhibiting effect of tangle and sargassum against sarcoma-180 solid tumor. *Annual Meeting of Jap. Soc. of Cancer Abstracts*, p.1225(1973)
 14. Shioda, A., Kaneko, Y. and Doi, S. : Studies on the production of polysaccharides by microorganisms. *J. Ferment. Technol.*, **46**(10), 623(1973)
 15. Sasaki, S., Kodama, K., Uchida, K. and Yoshino, H. : Antitumor activity of *Aspergillus* cell walls. *Agric. Biol. Chem.*, **49**(4), 1219(1985)
 16. Okurani, K : Antitumor activity of polysaccharide preparation from marine bacteria, *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, **26**(1), 75(1974)
 17. Hackman, R. H. : Chitin. I, Enzymatic degradation of chitin esters. *Austral. J. Biol. Sci.*, **7**, 168(1954)
 18. Spackman, D. G., Stein, W. H. and Moore, S. : Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190(1980)
 19. Godin, A., Kline, I., Sofina, A. P. and Syrkin, A. B. : Experimental evaluations of antitumor drugs in the USA and USSR and clinical correlations. NIH. p.33 (1980)
 20. Priest, J. H. : *Medical cytogenetics and cell culture*. Lea & Febiger, p.263(1977)
 21. Nuzzolo, L. and Vellucci, A. : *Tissue culture techniques*. Warren H. Green, Inc. p.74(1978)
 22. Jakoby, W. B. and Pastan, I. H. : *Methods in enzymology, cell culture*. Vol. 56. Academic Press. N. Y., p. 119(1979)
 23. Miturka, B. M. : *Clinical biochemical and hematological reference values in experimental animals and humans*. Massion. N. Y., p.31(1981)
 24. Weir, D. M. : *Handbook of experimental immunology*. Vol. 2. Cellular Immunology. Alden Press, Oxford, p.30(1979)
 25. Henningsen, G. M., Koller. L. D., Exon, J. H., Talcott, P. A. and Osberne, C. A. : A sensitive delayed-type hypersensitivity model in the rat for assessing *in vivo* cell-mediated, *Immunol. Methods*, **70**, 153(1984)
 26. Bozzi, G., Benacerraf, B. and Halpern, B. N. : Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system II . *Brit. J. Exp. Pathol.* **34**, 441 (1954)
 27. Cunningham, A. : Plaque assay for antibody producing cells. *Allergy*, **17**, 5(1973)
 28. Okutani, K. : Further investigation of the antitumor activity of the squid internal shell. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **48**(3), 421(1982)
 29. Sasaki, T., Uchida, H., Uchida, N. A., Takasuka, N., Tachibana, Y., Nakamichi, K., Endo, Y. and Kamiya, H. : Antitumor activity and immunomodulatory effect of glycoprotein fraction from *Scalloppatinopecten yessoensis*. : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**(2), 267 (1982)
 30. 류병호, 김동석, 신동분 : Sarcoma-180에 대한 해조류의 항암활성. *한국식품과학회지*, **21**(5), 596(1989)
 31. 조경자, 이영숙, 류병호 : 청각과 김에서 추출한 당단백질의 sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역활성. *한국수산학회지*, **23**(5), 345(1990)
 32. Ruy, B. H., Chi, B. H., Kim, D. S., Jang, M. K. and Kim, H. S. : Antitumor activity of protein-polysaccharide produced from *Vibrio anguillarum*, *Kor. J. Food Hygiene*, **3**(3), 111(1988)
 33. Hamuro, J., Rollinghoff, M. and Wangner, H. : Induction of cytotoxic peritoneal exudate cells by T-cell immune adjuvants of the β (1-3) glucan-type lentinan and its analogues, *Immunology*, **39**, 551 (1980)
 34. 류병호, 박정옥, 김희숙 : *Proteus vulgaris* RH-90에서 추출하여 감마친 조사시킨 lipopolysaccharide(LPS)의 항암 및 면역활성에 미치는 영향. *한국생물공학회지*, **6**(1), (1991)
 35. Halpern, B. N., Benacraf, B. and Biozzi, G. : Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system I . *Brit. J. Exp. Pathol.*, **34**, 426 (1954)
 36. Maeda, Y. Y. and Chihara, G. : The Effects of neonatal on the antitumour activity of lentinan, carboxymethyl pachymaran and zymosan, and their effects on various immune response. *Int. J. Cancer*, **11**, 153 (1964)

(1992년 3월 9일 접수)