

## 키틴과 파추출액 반응물의 항암 작용

김영식\* · 박경신 · 장일무 · 현진원\* · 박재갑\* · 박호균\*\*  
서울대학교 천연물과학연구소, 서울대학교 의과대학\*, 한국과학기술연구원\*\*

(Received July 5, 1994)

## Antitumor Activity of Reaction Mixture of Chitin and Green Onion Extract

Yeong Shik Kim\*, Kyung Shin Park, Il-Moo Chang, Jin Won Hyun\*,  
Jae-Gahb Park\* and Ho Koon Park\*\*

\*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

\*Laboratory of Cell Biology, Cancer Research Institute and Cancer Research Center, College of Medicine,  
Seoul National University, Seoul 110-744, Korea

\*\*Korea Institute Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

**Abstract**—Antitumor activity was tested by administration of reaction mixture of green onion extract and chitin to mice bearing sarcoma-180 cells. An intraperitoneal injection of mixture(20 mg/kg/day) to mice gave an 52% inhibition of tumor growth. Inhibition of tumor growth was found to be dose-dependent. When eighty milligrams of the mixture were administered, the weight of tumor was reduced significantly. HPLC analysis indicated the mixture was composed of N-acetyl-D-glucosamine, N-acetylchitobiose and N-acetylchitotriose.

**Keywords** □ Chitin, N-acetylchitooligosaccharides, chitinase, green onion, antitumor activity, sarcoma-180

다당류의 일종인 키틴은 N-acetyl-D-glucosamine 이  $\beta$ -1,4 결합으로 이루어진 순수한 당<sup>1)</sup>으로 게 또는 새우 등의 갑각류의 껍질과 곤충류의 외부골격의 주 성분이고 곰팡이나 효모의 세포벽을 이루고 있으며 자연계에서 cellulose 다음으로 많이 존재하기 때문에 여러 측면에서 응용이 활발해지고 있다.<sup>2-3)</sup> Hirano<sup>4)</sup>에 의하면 1986년 일본의 경우 1270톤 정도가 생산되어져 대부분이 탈아세틸화 되어 키토산(N-deacetyl chitin)을 제조하는데 사용되어졌다. 이중 다량이 폐수처리에 사용되고 있고 기타의 활용은 화장품제제 등이다. 또한, 키틴은 토양이나 식물에 대해 항균제로 작용을 하고 혈전증, 항암제, 혈중콜레스테롤 저하제, 상처치료제 등을 보여주고 있으며<sup>5)</sup> 최근에 들어서, 키틴 다당체는 면역활성을 증가시킬 수 있다는 보고가 발표되면서 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있

는데 아세틸화키틴(acetylated chitin)은 항암 및 면역활성이 우수한 것으로 보고되어 있다.<sup>6-7)</sup> 다른 측면에서의 응용은 chitin을 분해하는 효소와 chitin의 분해로부터 얻어지는 다당류이다. Chitinase는 미생물, 동물, 식물 등에 분포하는데 chitinase의 작용양식에 따라서 endo 또는 exo 형태로 분류된다.<sup>8)</sup> 특히 식물에서의 chitinase는 외부 침입으로부터 방어수단으로서 유도되는 단백질로 생각되고 있다.<sup>9-11)</sup> 최근에는 김<sup>12-13)</sup>에 의해 파에서 키틴 분해계 존재가 확인되었으며 또한 chitinase가 분리, 정제되어졌다. 따라서 본 연구에서는 한국인의 식생활에서 가장 일반적이며 구하기도 쉬운 식품인 파로부터 chitin분해계와 chitin을 반응시켜 얻은 올리고당 혼합물이 면역조절제로서 작용할 수 있다는 생각하에 생쥐에게 암세포 sarcoma-180을 이식하여 고형암 저지율과 수명연장률을 각각 측정하였다.

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

## 실험방법

**재료**—본 실험에 사용한 파는 시장에서 구입하였고 chitin은 미국 Sigma사에서 구입하여 단백질을 제거한 후 분말로 만들어 기질로 사용하였다.<sup>14)</sup> N-Acetyl-D-glucosamine, N-acetylchitobiose, N-acetylchitotriose 역시 Sigma 제품이었고 N-acetylchitotetraose, N-acetylchitopentaose, N-acetylchitohexaose는 chitin을 염산으로 가수분해시켜 Bio-Gel P4를 이용하여 분리하였다.<sup>15)</sup> 대조 약물로 사용된 운지버섯 균사체의 추출물인 Krestin은 광동제약 제품이었다. 고행암주인 sarcoma-180은 서울대학교 암연구소에서 분양받아 ICR 생쥐에 계대 배양을 하여 사용하였다.

**키토올리고당의 제조**—조 chitin(5 mg/ml)을 chitinase의 효소원이 파추출액(녹즙기로 액을 추출하여 동결건조함, 10 mg/ml)과 37°C에서 온도를 고정시켜 진탕배양기에서 24시간 동안 반응시킨 후 반응액을 3분간 끓여 반응을 중단시켰다.

이것을 여과후 원심분리하고 상등액을 동결건조하여 실험에 사용하였다. 경우에 따라서, 온도를 변화시키고, 반응시간도 6, 12, 48시간 동안 진행시켰다.

**키토올리고당의 분석**—파와 chitin의 반응으로부터 얻은 다당체를 에탄올로 침전시킨 후 원심분리하여 상등액은 버리고 침전만을 물에 녹여 분석에 이용하였으며 다당체의 분석은 김<sup>12)</sup> 등의 방법에 따라 고속액체크로마토그래피를 이용하여 표준당과 함께 주입을 하여 확인하였다. 분석조건은 Spectra Physics 액체크로마토그래프에 Applied Physics제품의 아민 칼럼(0.46×20 cm)을 부착하고 용매를 사용하여 유속 1 ml/min의 속도로 흘렸다. 검출기는 220 nm에 고정시킨 자외선 분광검출기를 사용하였다.

**실험동물 및 종양세포의 유지**—4~5 주령의 ICR계 수컷 생쥐(20~25 g)를 서울대학교 실험동물 사육장에서 분양받아 실험 1주일전 부터 실온 18~23°C의 실험사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사료는 고행사료(삼양사)를 사용하였고 그 조성은 조단백 21%, 조지방 3.5%, 셀룰로오스 5.0%, 무기질 8.0% 등이었다. 급수는 수도물을 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다.

Sarcoma-180 종양세포를 ICR생쥐의 복강내에 1주일 간격으로 계대 배양하여 종양세포로 사용하였다. 즉 실험동물의 복강내에서 7일 간격으로 계대 배양된

sarcoma-180 세포를 경추 탈구법으로 실험동물을 치사시킨 후 복수와 함께 취해 4°C의 식염수로 부유시켜 원심분리하여 상등액을 제거한 후 sarcoma-180 세포만을 취했다.<sup>16)</sup> 동일방법으로 2회 세척하고 hemocytometer로 약 5×10<sup>6</sup> cells/ml이 되도록 종양세포 부유액을 만들어 0.1 ml/씩을 실험동물의 복강내에 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

**항암실험용 시료의 조제**—시료는 멸균 생리식염수를 사용하여 조제하였으며 투여량을 20 mg/kg/day로 하고, 키토올리고당군에 대해서 10, 20, 40, 80 mg/kg/day으로 양을 변화시켜 투여하였다. 대조군으로는 생리식염수 투여군, 파추출물 투여군과 함께 항암 다당체로 알려진 krestin을 투여하였고 투여하지 않을 때에는 냉장고에 보관하였다.

**고형암 성장저지**—일주일 간격으로 계대 배양중인 종양세포 부유액 0.1 ml(5×10<sup>6</sup> cell/ml)씩을 실험동물의 왼쪽 서혜부(left groin)에 피하 이식한 후 24시간 후부터 각군을 10마리로 하여 생리식염수에 용해시킨 시료(20 mg/kg/day)를, 다당체 투여군에 대해서는 시료양을 10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg/kg/day으로 양을 증가시켜 고행암 저지율을 측정하였다. 종양세포 이식 30일째 되는 날 실험동물을 경추 탈구법으로 치사시키고 유발된 고행암을 적출한 후 그 중량을 측정하여 평균 종양 중량을 얻고 다음 식에 따라 종양저지 백분율(percent of inhibition ratio, I.R. %)을 계산하였다.<sup>16)</sup>

$$I.R.(%) = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

C<sub>w</sub>: 대조군의 평균 종양 중량

T<sub>w</sub>: 시료 투여군의 평균 종양 중량

**종양부피 측정**—종양부피 측정은 시간에 따른 고행암의 성장저지 정도를 알아보기 위해 암 이식후 7, 14, 21 및 28일째에 종양의 크기를 측정하여 다음식에 따라 종양부피를 계산하였다.<sup>16)</sup>

$$Tumor\ volume(cm^3) = \frac{ab^2}{2}$$

a: 종양의 장반경(cm)

b: 종양의 단반경(cm)

**수면연장실험**—앞에 기술된 방법으로 조제한 종양세포부유액 0.1 ml(5×10<sup>6</sup> cells/mouse)씩을 실험동물의 복강내에 이식한 뒤 24시간 후부터 10일간

연속으로 시료를 복강내에 투여하여 대조군과 시료 투여군의 생존여부를 60일까지 관찰하여 평균생존일 (mean survival time, MST)을 계산하여 다음 식에 따라 수명연장백분율(prolongation ratio, %)을 구하였다.<sup>16)</sup>

$$T/C(\%) = \frac{T_{MST}}{C_{MST}} \times 100$$

a: 종양의 장반경(cm)

b: 종양의 단반경(cm)

**수명연장실험**—앞에 기술된 방법으로 조제한 종양세포부유액 0.1 ml( $5 \times 10^6$  cells/mouse)씩을 실험동물의 복강내에 이식한 뒤 24시간 후부터 10일간 연속으로 시료를 복강내에 투여하여 대조군과 시료 투여군의 생존여부를 60일까지 관찰하여 평균생존일 (mean survival time, MST)을 계산하여 다음식에 따라 수명연장백분율(prolongation ratio, %)을 구하였다.<sup>16)</sup>

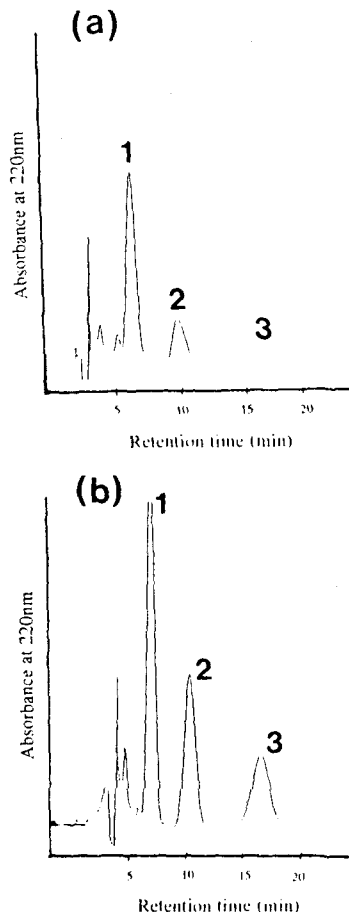
$$T/C = \frac{T_{MST}}{C_{MST}} \times 100$$

T<sub>MST</sub>: 대조군의 평균생존일

C<sub>MST</sub>: 시료투여군의 평균생존일

**결과 및 고찰**

**다당체의 확인**—파녹즙과 chitin의 방법으로부터 얻은 올리고당의 HPLC에 의한 분석은 Fig. 1과 같다. 먼저 표준당인 N-acetylglucosamine, N-acetylchitobiose, N-acetylchitotriose를 잘 섞어 HPLC상에서 분리됨을 확인하였고(Fig. 1) 반응생성물과 표준당을 함께 주입하여 시료만을 주입한 경우와 비교하였을 때 peak가 증가하는 것으로 다당체를 확인하였다 (Fig. 1). 효소원으로 사용된 파추출물에 chitin deacetylase가 존재하지 않았다. 파의 chitinase가 end 형태이지만<sup>11)</sup> 파에는 chitin분해제(chitinase와 N-acetylglucosaminidase)가 존재하기 때문에 N-acetylchitobiose였으며 N-acetylchitotriose도 소량 존재하였다. 효소에 의해서 키틴올리고당을 제조하는 방법은 미생물을 이용하는 것이 혼한 것으로 인식되어 졌다.<sup>17)</sup> 미생물의 chitinase는 주로 N-acetylchitobiose를 만든다. 대량 생산에서 유리할 수 있을 수 있지만 분리 및 정제에서 어려움이 따른다. 본 연구는 키틴올리고당을 분리하지 않고 바로 이용이 가능하기



**Fig. 1**—HPLC analysis of reaction mixture of chitin and extract of green onion. The conditions of enzymatic reaction and chromatography were described in experimentals. (a) chromatogram of reaction mixture (b) coinjection of reaction mixture and standards.

- 1. N-acetyl-D-glucosamine
- 2. N-acetylchitobiose
- 3. N-acetylchitotriose

때문에 훨씬 경제적이고 유리할 수 있다.

**종양부피 측정**—시간경과에 따른 고형암의 성장 정도를 Fig. 2에 나타내었다. 암 이식 후 7, 14, 21일 및 28일에 고형암의 크기를 측정하였을 때 암 이식 후 2주까지는 투여군들의 고형암 성장 정도가 비슷하였으나 3주부터는 파추출물 및 키틴 반응물 투여군과 krestin 투여군의 고형암 성장이 둔화됨을 알 수 있었다.

**고형암 성장저지효과**—파와 chitin의 반응으로 부

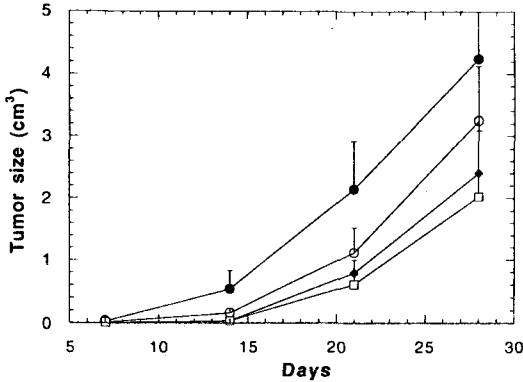


Fig. 2—Antitumor effect of test samples on the growth of sarcoma-180. Twenty miligram of samples were administered to mice. ● control, ○ extract of green onion, ◆ reaction mixture, □ krestin

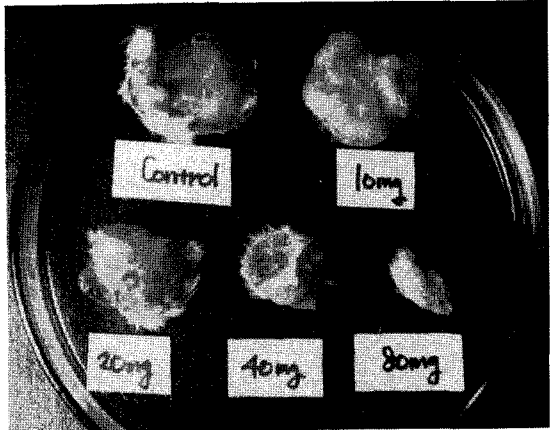


Fig. 3—Tumors excised from the groin after administration of reaction mixture. The tumor weight was significantly shrunk on administration of 80 mg/kg/day.

터 얻은 키토올리고당의 sarcoma-180의 성장저지 효과에 대한 결과를 Table I에 나타내었다. 대조군으로 사용된 식염수 투여군의 종양무게는 9.6 g이었고 이에 비해 키토올리고당 20 mg/kg을 투여하였을 때 종양무게는 4.7 g으로 51.5%의 종양억제율을 보였고, krestin 투여군의 경우 종양무게 2.9 g으로 대조군 식염수 투여군에 비해 69.9%의 종양억제율을 보였다. 또한 투여량에 따른 키토올리고당의 고형암 저지율을 Table II에 나타내었다. 대조군인 식염수 투여군에 비해 시료 투여군 모두가 고형암 저지율을 나타내었으며 10 mg 투여군은 그 정도가 약하여 32.3%의 저지율을 나타내었고 20 mg은 52.6%, 40 mg은 75.4%, 80 mg은 84.8%의 저지율을 나타내었다(Fig. 3, Table II). 이러한 결과는 해조류에서 추출한 당단백질의 sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역활성,<sup>18)</sup> 새우껍질에서 추출한 키토산의 항암 및 면역활성<sup>19)</sup>과 비교해

볼때 비슷하거나 더 우수한 종양저지효과를 나타내었다. 키틴과 키토산으로 부터 얻어진 육탄당(N-acetylchitohexaose)이 활성 산소증가에 따른 화학발광 측정치가 제일 높은 것으로 나타났고<sup>20)</sup> 생쥐에 이식된 sarcoma-180에 대해서도 100 mg/kg의 농도를 투여하였을 때 종양의 성장을 저지하는 결과가 보고되었다.<sup>21)</sup> 그러나, 사탄당 이하의 N-acetyl-D-glucosamine으로 이루어진 당들이 고형암 세포에 대해서는 면역학적으로 가치가 없는 것으로 알려져 있다.<sup>22)</sup> 화학발광측정치가 사탄당 이하에서는 매우 낮게 나타나지만 D-glucosamine이 자연살상 세포를 증가시킬 수 있다는 보고가 있어 sarcoma 종양세포에 대해서도 파와 키틴과의 반응으로 부터 얻어진 N-acetylchitotriose 이하의 올리고당 혼합물이 효과를 나타낼 수 있다.<sup>23)</sup> Oda 등<sup>23)</sup>은 거식세포(macrophage)의 식균작

Table I—Growth-inhibitory effect of chitooligosaccharides obtained from the reaction of chitin and green onion extract on sarcoma 180 solid tumor implanted in ICR-mice

Materials	Dose (mg/kg/day)	Tumor weight <sup>1)</sup> (g)	Inhibition (%)	Regression (No. of cured/No. of treated mice)	P value <sup>2)</sup>
Control	—	9.60 ± 1.05	0	0/10	<0.01
Krestin	20	2.89 ± 0.81	70	0/10	<0.01
Green Onion	20	6.69 ± 1.12	30	0/10	<0.01
Mixtures	20	4.66 ± 0.35	52	0/10	

<sup>1)</sup> Mean ± standard error

<sup>2)</sup> Compared with control by student's t-test

**Table II**—Growth-inhibitory effect of chitooligosaccharides obtained from the reaction of chitin and green onion extract on sarcoma-180 solid tumor implanted in ICR-mice

Materials	Dose (mg/kg/day)	Tumor weight <sup>1)</sup> (g)	Inhibition (%)		Regression		P value <sup>2)</sup>
			(No. of cured/No. of treated mice)				
Control	—	8.54 ± 2.41			0/10		<0.01
Mixtures	10	5.78 ± 1.55	32		0/10		<0.01
	20	4.05 ± 0.90	53		0/10		<0.01
	40	2.10 ± 0.66	75		0/10		
	80	1.30 ± 0.49	85		0/10		

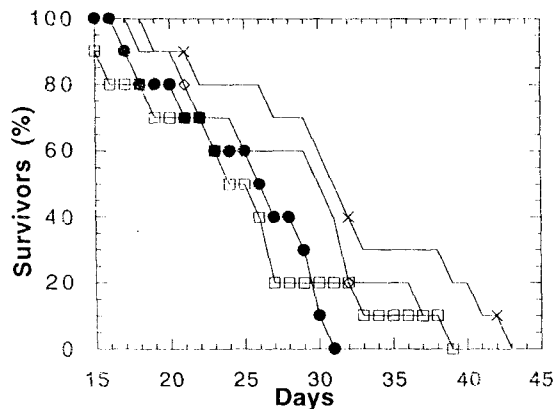
<sup>1)</sup> Mean ± standard error

<sup>2)</sup> Compared with control by student's t-test

용에 대한 활성부위는 N-acetylglucosamine과 glucosamine의 수용체와 관련이 있다고 발표하였다. Suzuki 등<sup>22)</sup>은 아미노 당들이 활성산소를 증가시켜 식균작용의 시작을 활성화시킬 수 있다는 결과를 제시하였다. 버섯의 균사체로부터 추출된 다당류들이 sarcoma-180을 이식시킨 생쥐에 대해서 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 직접적인 세포 독성보다는 숙주세포의 면역활성을 증가시키는 것으로 설명되어진다.

무엇보다도 키토올리고당(특히 삼당류 이하)의 장점은 키틴 다당체가 물에 대한 용해도가 매우 낮고 투여시 항체를 만들 수 있는 단점이 있는 것에 비해 구강으로 섭취가 가능하고 투여량 조절이 가능한 점에서 훨씬 유리할 수 있다.

**수명연장 효과**—파와 키틴의 반응으로 부터 얻어진



**Fig. 4**—Antitumor effect on the life span of ICR mice bearing sarcoma 180 clls. ● control □ extract of green onion, ◇ reaction mixture, X krestin

**Table III**—Effect on life-span of chitooligosaccharides obtained from the reaction of chitin and green onion extract on sarcoma-180 solid tumor implanted in ICR-mice

Materials	Dose (mg/kg/day)	Survival day (mean)	T/C (%)
Control	—	25.8	100.0
Krestin	20	26.2	101.6
Green Onion	20	29.8	115.5
Mixture	20	32.6	126.4

키토올리고당에 대한 sarcoma-180 복수암의 수명연장률을 알아보기 위해 암이식 후 60일까지 생쥐를 관찰한 결과는 Fig. 4 및 Table III과 같다. 일반적으로 sarcoma-180 세포를 이식한 후 60일 까지의 수명을 관찰하지만 실험종료 60일까지 생존한 생쥐는 대조군이나 키토올리고당 투여군 모두 한마리도 없었다. 본 실험에서는 수명연장효과는 대조군의 평균수명이 25.8일인데 비해 krestin을 20 mg/kg 투여했을 경우 32.6일, 키토올리고당을 20 mg/kg 투여했을 경우 29.8일로 나타났고 파즙의 동결건조물을 20 mg/kg 농도로 투여했을 경우가 26.2일로 나타났다. 이러한 결과는 고형암 성장저지 실험결과와 비교하여 볼때 투여한 약물이 *in vivo*에서의 고형암성장에는 그렇게 높은 항암효과를 보이지 않고 있음을 나타내고 있다. 이것은 투여한 약물의 *in vivo*에서의 항암효과는 숙주매개반응(host-mediated response)에 의한 것으로 생각되며 암세포에 대한 직접적인 독성작용은 별로 없는 것으로 받아들여지고 있다.<sup>24-25)</sup> Sarcoma-180은 이종계(allogenic) 종양이기 때문에 이룬이 있을 수 있다. 앞으로 동정계(syngenic) 종양세포를 이용하여

시험할 필요가 있다고 생각한다.

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

### 감사의 말씀

본 연구는 보사부 신약개발과제의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 심심한 감사를 드리는 바이다.

### 문 헌

- 1) Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E. and Zikakis, J. P.: Chitin: New Facets of Research, *Science* **212**, 749 (1981).
- 2) Zikakis, J. P.: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, ACS symposium series, **389**, 116 (1989).
- 3) Cabib, E.: The synthesis and degradation of chitin. *Adv. Enzymol.* **56**, 59 (1987).
- 4) Hirano, S.: *Chitin and Chitosan*, London, pp. 37 (1989).
- 5) Muzzarelli, R. A.: Chitin in *The Polysaccharides*, **3**, 417 (1985).
- 6) Tokura, S., Nishi, N. and Azuma, I.: Immunological aspects of chitin derivatives, *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*, Elsevier, pp. 347 (1987).
- 7) Murata, J., Saiki, I., Nishimura, S., Nishimura, N., Tokura, S. and Azuma, I.: Inhibitory effect of chitin heparinoids on the lung metastasis of B16-BL6 melanoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **80**, 866 (1989).
- 8) Gooday, G. W.: Chitinase: enzymes in biomass conversion Ed. Leatham, G. F. & Himmel, M. E. American Chemical Society, Washington ACS Symp. Ser, pp. 478 (1991).
- 9) Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U.: Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* **157**, 22 (1983).
- 10) Broglie, K., Guymer, J., Broglie, R.: Molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6820 (1986).
- 11) Schlumbaum, A., Felix Mauch, F., Vogeli, U. and Boller, T.: Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324**, 365 (1986).
- 12) Kim, Yeong S. Lee, Eun B. and Joo S. H.: Identification of chitinolytic system in *Allium fistulosum* *Arch. Pharm. Res.* **14**, 255 (1991).
- 13) Kim, Yeong S., Lee, M. Y., Park, Y. M.: Purification and characterization of chitinase from green onion. *Korean Biochem. J.* **25**, 175 (1991).
- 14) Shimahara, K. and Takiguchi, Y.: Preparation of crustaeen chitin, *Methods in Enzymol.* **161**, 417 (1988).
- 15) Eikeren, P. and McLaughlin H.: Analysis of the lysozyme-catalyzed hydrolysis and transglycosylation of N-acetyl-D-glucosamine oligomers by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **77**, 513-522 (1977).
- 16) Hyun, Jin Won: Studies on antitumor components of *Agrocybe cylindracea*. Ph. D. Thesis, Seoul National University (1993).
- 17) Deshpande, M. V.: Enzymatic degradation of chitin & its biological applications. *J. Sci. Ind. Res.* **45**, 273 (1986).
- 18) Ryu, Beung-Ho, Kim, Dong-Seuk, Cho, Hyung-Ja and Sin, Dong-Bun: Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**, 595-600 (1989).
- 19) Ryu, Beung H., Antitumor and immunologic activity of chitosan extracted from shell of shirimp. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**, 154 (1992).
- 20) Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Enhancing effects of N-acetylchitoooligosaccharides on the active oxygen-generation and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 886 (1985).
- 21) Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Effect of N-acetylchitoooligosaccharides on activation of phagocytes, *Microbiol. Immunol.* **30**, 777 (1986).
- 22) Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antitumor effect of N-acetylchitoohexaose and chitoohexaose *Carbohydr.*

- Res.* **151**, 403 (1986).
- 23) Oda, L. M., Kubelka, C. F., Alviano, C. S., and Travassos, L.: Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **37**, 292 (1983).
- 24) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.: Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk). *Cancer Res.* **30**, 2776 (1970).
- 25) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. y., Arai, Y. and Fukuoka, F.: Antitumor polysaccharides derived chemically from natural glucan (Pachyman) *Nature*, **225**, 943 (1970).