

l-카라기난의 유동학적 성질과 어쥘번트 효과

김범수 · 이광재 · 이종혁 · 조두현 · 김윤중 · 정병욱 · 김하형[#]

중앙대학교 약학대학

(Received December 18, 2001; Revised January 31, 2002)

Rheological Property and Adjuvant Effect of *l*-Carrageenan

Bum Soo Kim, Kwang Jae Lee, Jong Hyuk Lee, Due Hyeon Cho,
Youn Jung Kim, Byung Wook Jung and Ha Hyung Kim[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University Seoul 156-756, Korea

Abstract — The present study investigated the rheological properties and adjuvant activity of IgG production of *l*-carrageenans prepared using two different methods : incubation at 37.4 °C after either being heated or not being heated at 60 °C for 10 minutes. The carrageenan exhibited plastic flow with thixotropy in both cases, but the viscosity of the sample that had been heated was significantly higher. C57BL/6 mice were then immunized intraperitoneally with either of the carrageenans containing protein antigens. The maximum adjuvant effect was found when using the nonheated carrageenan, especially in terms of IgG2a, IgG2b, and IgG3 production. In contrast, IgG1 antibody production was the same for both types of carrageenan. Furthermore, when administered orally, neither type of carrageenan resulted in the production of any antibodies.

Keywords □ Carrageenan, viscosity, rheological property, IgG production,

카라기난(carrageenan, CAR)은 해조류로부터 얻을 수 있는 sulfated polygalactan으로 핵소오스의 2번 위치에 황산기를 갖는 *l*-CAR, 이당류 단위에 한 개의 황산기를 갖는 κ -CAR, 2번 또는 2,6번 위치에 황산기를 포함하고 있는 λ -CAR과 같은 세가지 아이소타입으로 분류된다.¹⁻⁵⁾ 이중 λ -CAR은 대식세포에 대한 선택적 독성작용에 의해 급만성염증을 일으키는 특성을 가지고 있으며,^{6,7)} plasmin을 활성화시켜 kinin의 생성을 항진시키는 특성이 있고, thrombin time을 사람, 개의 혈장에서 두 배로 증가시켜 heparin의 1/15에 해당하는 항응고작용을 나타내는 작용등이 보고되고 있다.⁸⁾

한편, *l*-CAR은 면역계에 억제와 활성화라는 상반되는 활성을 나타내는데, 항원처리 전에 *l*-CAR을 투여하면 면역반응을 억제시키는 반면, *l*-CAR을 항원과 함께 투여하면 면역반응을 오히려 활성화하여 항체생성을 촉진시키는 것으로 보고되고 있으며,^{9,10)} 이때 제조방법으로는 60°C에서 10분간 가열후 사용하고 있으나

그 근거는 명확하지 않은 실정이다.¹¹⁻¹⁴⁾ 일반적으로 면역동물로부터 특정항원에 대한 면역글로부린을 효과적으로 생성시키기 위해 사용되는 어쥘번트(adjuvant)로는 Freund's adjuvant와 aluminum salt가 있으며, Freund's adjuvant는 동물 실험에서 널리 사용되고 있지만 그 독성으로 인해 인체에는 사용할 수 없고,¹⁵⁾ aluminum salts는 Freund's adjuvant에 비해 항체 생성 능력은 떨어지지만 인체에 사용할 수 있는 유일한 어쥘번트로 알려져 있다.¹⁶⁾

CAR은 비교적 광범위한 범위에 걸쳐 다양하게 응용되고 있고, *l*-CAR의 경우 어쥘번트로서의 이용 가능성이 제시되고 있음에도 불구하고 기존의 방법으로는 점도가 높아 동물에 주사시 불편하며 이를 극복하고자, 본 연구에서는 농도 및 온도조건에 따른 CAR의 유동학적 성질과 그에 따른 항체 생성에 관한 연구를 실시하였다. 구체적으로는 0.2%, 0.5%, 1.0%로 제조한 CAR의 온도 처리에 따른 유동학적 특성 변화에 대하여 연구하고, 제조 방법에 따라 점도 변화가 큰 0.5% *l*-CAR을 어쥘번트로 하여 C57BL/6 마우스에서 단백질 항원에 대한 IgG를 생성시키고 그 생성율을 IgG subclass별로 비교하였다. 마우스에 항원 투여시에는 복강 및 경구 경로를 통해 실시함으로써 투여경로에 따른

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5612 (팩스) 02-823-5612
(E-mail) hahyung@cau.ac.kr

변화도 확인하였다.

실험방법

시약 - 본 실험에서 사용한 C57BL/6 마우스는 대한실험동물센터에서 구입하였으며, I-CAR, k-CAR, λ-CAR, Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, fetuin, polyethylene sorbitan monolaurate(Tween 20), tris(hydroxymethyl)aminomethane, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), mouse monoclonal antibody isotyping reagent IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, monoclonal anti-goat/sheep IgG clone GT-34 peroxidase conjugate는 Sigma Co., Ltd. 로 부터 구입하였다. Potassium aluminum sulfate는 Lancaster synthesis Ltd.로 부터 구입하였다. 그 외에 분석용 시약은 모두 일급 혹은 특급을 사용하였다.

카라기난 용액의 제조 - CAR(I-, κ-, λ-)을 0.2%, 0.5%, 1.0% 가 되도록 10 mM phosphate bufer, 0.15M NaCl로 용해하고 37.4°C에서 한 시간 방치한 경우와 60°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 한 시간 방치한 경우로 하여 20 ml 씩 제조하였다. 단, 0.5%, 1.0% I-CAR의 경우에는 40°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 한 시간 방치한 경우를 추가로 제조하였다.

Rheological data의 측정조건 - Brookfield Digital Rheometer, Model DV-III에 Brookfield TC 500으로 SC4-21 Type의 spindle을 사용하였으며, Shear rate/shear stress rheogram의 경우에는 shear rate를 18.6에서 186 s⁻¹까지 30초마다 18.5 s⁻¹씩 증가시킨 후, 다시 18.6 s⁻¹까지 감소시키면서 측정하였고, viscosity/rpm flow curve의 경우에는 rpm을 20에서부터 200까지 30초마다 20씩 증가시킨 후, 다시 20까지 감소시키면서 측정하였다.

마우스 면역 - 실험동물은 7~9주된 수컷 C57BL/6를 사용하였으며, 각 군에는 3~6수의 마우스를 이용하여 복강주사 혹은

경구투여를 하였다. 먼저, 50 µg의 항원 fetuin을 함유하는 I-CAR 어쥬번트 400 µl를 제조하여 37.4°C에서 1시간 동안 방치한 경우, 60°C에서 10분간 가열하고 다시 37.4°C에서 1시간 동안 방치한 경우를 각각 마우스의 경구와 복강내 투여하였고, 3주 후 동일한 방법으로 추가면역을 실시하였다. 대조군으로는 항원 50 µg을 0.9% saline 400 µl에 용해시킨 것을 어쥬번트 없이 복강 주사한 경우, 0.5% I-CAR의 saline 용액을 항원 없이 복강 주사한 경우로 하였고, 각각 3주 후에 동일한 방법으로 추가면역을 실시하였다. Freund's adjuvant와 aluminum salt에 의한 경우에는 이미 보고한 방법에 준하여 실시하였다.¹⁷⁾ 마우스 혈액에서 혈청분리는 1차 면역일로부터 6일 후, 20일 후에 각각 실시하였으며, 최종적으로는 2차 면역일로부터 10일 후 즉 1차 면역일로부터 31일 후에 실시하였다. 그 외의 모든 대조군의 마우스는 2차 면역일로부터 10일 후 즉 1차 면역일로부터 31일 후에 혈청을 취하였다. 마우스의 혈액은 heparin 처리하여 취한 후 즉시 4°C에서 10,000 g로 10분간 원심분리하고, 그 상층액을 -20°C에 보관하였다.

IgG의 subclass별 생성확인 - 항원 fetuin에 대한 항체의 생성을 비교하기 위한 microplate의 코팅 및 ELISA방법은 이미 보고한 방법에 준하여 실시하였다.¹⁷⁾

결과 및 고찰

I-카라기난 용액의 점도 - I-CAR을 37.4°C에서 1시간 방치한 경우 0.2%; 0.5%, 1.0%로 농도가 증가할수록 점도가 3.71±1.36 cp, 11.85±0.43 cp, 100.09±5.24 cp로 급격하게 증가하였다. 한편 I-CAR을 60°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 1시간 방치한 후에는 0.2%에서 22.28±3.74 cp, 0.5%에서 56.05±9.48 cp를 나타냈으며 1.0%의 경우에는 겔을 형성하여 점도를 측정할 수 없었다(Table I). 그러나 40°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 1시간 방치한 경우에는 농도에 따른 점도의 상승은 확인되었

Table I - Viscosity of I-, κ- and λ-CAR

Isotype	Concentration (w/v)	Viscosity		
		37.4°C	40°C → 37.4°C	60°C → 37.4°C
I-CAR	0.2%	3.71 ± 1.36 cp	-	22.28 ± 3.74 cp
	0.5%	11.85 ± 0.43 cp	11.43 ± 0.46 cp	156.05 ± 9.48 cp
	1.0%	100.09 ± 5.24 cp	132.26 ± 3.12 cp	Rigid gel
κ-CAR	0.2%	3.90 ± 0.8 cp	-	~1 cp
	0.5%	1.86 ± 0.43 cp	-	~1 cp
	1.0%	15.40 ± 0.62 cp	-	12.57 ± 0.75 cp
λ-CAR	0.2%	4.86 ± 0.86 cp	-	~1 cp
	0.5%	12.13 ± 1.19 cp	-	30.23 ± 1.09 cp
	1.0%	66.79 ± 3.51 cp	-	78.55 ± 10.02 cp

Each value represents mean ± S.D. of 6-9 samples

으나 동일한 농도에서 가열을 하지 않은 조건과 거의 유사한 결과가 나타났다. 즉, *I*-CAR의 경우 농도가 증가함에 따라 점도가 증가하며 40°C에서 가열하기 보다는 60°C에서 10분간 가열한 경우에 동일한 농도에 대해 점도가 현저하게 증가하는 특성을 나타냈다.

κ- 및 λ-카리기난 용액의 점도 - κ-CAR과 λ-CAR의 경우 0.2%, 0.5% 1.0%로 농도가 증가할수록 점도의 증가는 확인되었으나 37.4°C에서 한 시간 방치한 경우에 비해 60°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 한 시간 방치한 경우 현저한 점도의 변화는 확인되지 않았으며, 오히려 κ-CAR의 경우에는 약간 감소하는 결과가 나타났다(Table I). 이 결과는 κ-CAR과 λ-CAR은 농도상승에 따른 점도의 증가는 있지만 가열처리 여부에 의해서는 유의성있는 점도의 차이는 나타나지 않음을 나타내며 *I*-CAR과는 현저하게 점도 변화가 다른 특성을 나타냈다.

***I*-카리기난 용액의 유동곡선** - *I*-CAR 용액의 경우 0.5%의 농도에서 37.4°C에 1시간 방치한 경우의 점도와 60°C에서 10분간 가열한 후 37.4°C에서 방치한 경우의 점도가 현저한 차를 나타냈다(Table I). 이러한 변화가 유동학적 성질에는 어떤 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 상기 두 방법으로 제조한 0.5% *I*-CAR 용액에서 점도계 spindle의 rpm을 20에서부터 200까지 20씩 증가시킨 경우와 200에서 20까지 감소시키면서 각 rpm에서 30초간 측정하여 얻은 전단응력과 전단속도의 유동곡선(Shear stress/shear rate rheogram), 점도와 rpm 유동곡선(viscosity/rpm flow curve)를 Fig. 1, 2에 각각 나타냈다. 이 경우의 점도와 전단응력의 평균값은 37.4°C에서 1시간 방치한 경우 평균점도 11.85 ± 0.43 cp, 평균 전단응력 10.61 ± 0.35 dyne/cm²이었으며, 60°C에서 10분간 가열 후 37.4°C에서 방치한 경우 평균점도 156.05 ± 9.48 cp, 평균 전단응력 112.09 ± 5.17 dyne/cm²로 나타났다. 즉, 37.4°C에서 1시간 방치한 경우보다 60°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 1시간 방치한 경우, 점도와 전단응력의 값이 현저하게 증가하였다. 한편, 두 경우 모두 rpm을 증가시켰다가 다시 감

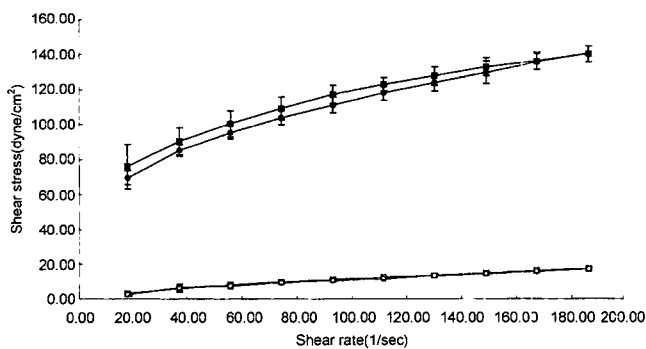


Fig. 1 - Rheogram of 0.5% *I*-CAR incubated at 37.4°C after either being heated (■; upcurve, ●; downcurve) or not being heated (□; upcurve, ○; downcurve) at 60°C for 10 minutes. Each point represents mean ± S.D. of 6 samples.

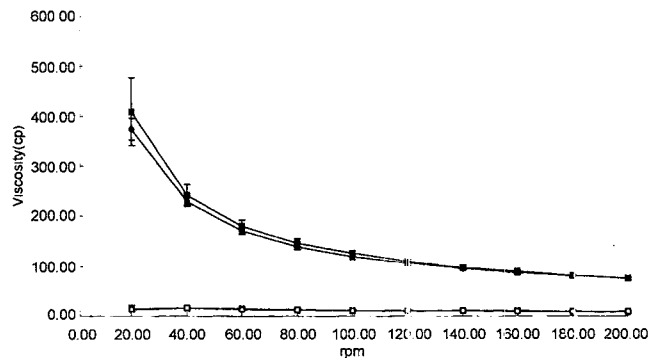


Fig. 2 - Flow curve of viscosity vs. rpm of 0.5% *I*-CAR incubated at 37.4°C after either being heated (■; increased, ●; decreased) or not being heated (□; increased, ○; decreased) at 60°C for 10 minutes. Each point represents mean ± S.D. of 6 samples.

소시킨 경우의 유동곡선으로는 각 rpm에서 점도가 감소하는 요변현상(thixotropy)을 동반하는 소성유동(plastic flow)적인 성질을 나타냈다.

***I*-카리기난 어쥬번트에 의한 IgG의 subclass별 생성양상** - *I*-CAR의 온도 처리에 따른 제조방법의 차이가 어쥬번트의 활성에 미치는 영향을 확인하고자 모델항원으로 페투인(fetuin)을 사용하여 37.4°C에서 1시간 동안 방치한 0.5% *I*-CAR과 60°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 1시간 방치한 0.5% *I*-CAR 어쥬번트를 각각 제조하여 마우스에 복강주사 및 경구투여하여 얻어지는 혈청으로부터 항 fetuin IgG의 subclass별 생성양상을 ELISA에 의해 측정 비교하였다.

먼저 대조군으로 사용한 어쥬번트없이 항원 단독투여, 항원 없이 *I*-CAR 단독 투여시에는 면역후 31일째에 IgG가 거의 검출되지 않았다. 한편, 항원을 포함한 두 경우의 제조방법에 따라 *I*-CAR을 마우스에 복강 주사하여 1차 면역 후 6일, 20일, 2차 면역 후 10일 즉 1차 면역 후 31일째의 혈청 중 항체 생성 양상을 확인하였다(Table II). 그 결과, 면역후 6일째에는 항체가 거의 형성되지 않았으나 IgG2a, IgG2b, IgG3의 경우 37.4°C에서 1시간 동안 방치한 CAR을 어쥬번트로 이용하였을 때 20일째에 높은 항체생성을 나타내고 31일째에 보다 더 높은 항체생성을 나타냈다. 반면, 60°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 1시간 방치한 경우에는 20일째까지는 항체생성이 미미하였으나 31일째에 비교적 높은 항체 생성율을 나타냈다. 그러나, 31일째에도 37.4°C에서 1시간 동안 방치한 경우에 비해서는 다소 낮은 항체생성을 나타냈다. IgG1의 경우에는 제조방법에 관계없이 20일부터 31일까지 항체생성율이 거의 동일한 수준이었다. 또한, 경구투여 하여 면역을 실시한 경우에는 제조방법에 관계없이 IgG가 거의 생성되지 않았다.

한편, 현재 가장 많이 사용되고 있는 Freund's adjuvant과 alum으로 1차 면역 후 31일째에 얻어진 혈청으로 IgG 생성양상을 31

Table II - Comparison of IgG subclass production from the serum of C57BL/6 mice immunized with antigen

Subclass	Treatment	CAR			CAR (p.o.)	Ag only	CAR only	Alum	Freund
		6 day	20 day	31 day					
IgG1	37.4°C	0.038 ± 0.007	0.457 ± 0.042	0.381 ± 0.016	0.048 ± 0.005	0.057 ± 0.004	0.046 ± 0.003	0.174 ± 0.009	0.353 ± 0.017
		0.028 ± 0.005	0.454 ± 0.052	0.371 ± 0.015	0.056 ± 0.005				
	60°C → 37.4°C	0.023 ± 0.004	0.213 ± 0.041	0.268 ± 0.017	0.030 ± 0.003				
IgG2a	37.4°C	0.022 ± 0.005	0.046 ± 0.013	0.235 ± 0.019	0.035 ± 0.002	0.042 ± 0.003	0.039 ± 0.002	0.077 ± 0.008	0.247 ± 0.015
		0.026 ± 0.004	0.225 ± 0.035	0.283 ± 0.011	0.049 ± 0.005				
	60°C → 37.4°C	0.023 ± 0.004	0.062 ± 0.007	0.221 ± 0.009	0.059 ± 0.006				
IgG2b	37.4°C	0.028 ± 0.004	0.069 ± 0.009	0.078 ± 0.004	0.039 ± 0.002	0.044 ± 0.003	0.043 ± 0.002	0.058 ± 0.004	0.174 ± 0.012
		0.028 ± 0.004	0.038 ± 0.003	0.069 ± 0.003	0.034 ± 0.003				
	60°C → 37.4°C	0.028 ± 0.004	0.069 ± 0.009	0.078 ± 0.004	0.039 ± 0.002				

C57BL/6 mice were i.p. injected except CAR(p.o.).
 Treatment : Incubation at 37.4°C after either being heated or not being heated at 60°C for 10 minutes.
 Each value represents mean ± S.D. of 6-9 samples

일체의 온도조건에 따른 CAR과 비교한 결과, alum과 비교해서는 온도 처리에 관계없이 CAR 어쥘번트에 의한 IgG 생성율이 모든 subclass에서 높게 나타났으며, Freund's adjuvant와 비교한 경우에는 IgG1과 IgG2a에서는 CAR 어쥘번트에 의한 IgG 생성율이 다소 높게 나타났고 IgG2b와 IgG3는 생성율이 다소 낮았으나 유사한 결과로 나타났다.

결론

카라기난의 아이소타입에 따른 농도, 온도에 따른 점도와 유동학적 성질을 연구하고, 그 중 온도 처리에 따라 겔을 형성하지 않는 범위에서 점도의 급격한 변화를 나타낸 0.5% I-CAR을 어쥘번트로 이용하여 항체생성에 미치는 영향을 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

I, κ, λ-CAR 공히 농도가 증가하면 점도도 이에 따라 증가하였으나, I-CAR이 37.4°C에서 1시간 방치한 경우 보다 60°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 1시간 방치한 후의 경우가 점도가 더 높게 나타난 반면, κ와 λ-CAR은 대체적으로 낮은 점도를 나타내 유의성있는 차이는 나타나지 않았다. 특히 0.5% I-CAR의 경우에는 가열을 하지 않은 경우에 비해 40°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 1시간 방치한 경우에는 점도의 변화가 크지 않았으나 60°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 1시간 방치한 경우에는 점도가 급격히 상승하였다. 이와 같이 동일한 농도에서 제조조건에 따라 현저한 점도변화가 있는 0.5% I-CAR의 유동학적 성질은 요변형상을 갖는 소성유동으로 나타났다. 한편, I-CAR 어쥘번트의 항체생성에 대한 어쥘번트 활성화으로는 IgG1의 경우에

는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았으나, IgG2a, IgG2b, IgG3의 경우에는 낮은 점도의 I-CAR을 어쥘번트로 사용하였을 때 보다 높은 점도의 I-CAR을 어쥘번트로 사용하였을 때 보다 동등 혹은 보다 높은 항체 생성을 나타냈으며, 특히 이러한 차이는 면역 후 20일째에 현저하게 나타났다. 이 결과로부터 0.5% I-CAR을 어쥘번트로 이용할 때에는 37.4°C에서 1시간 방치한 후 복강내 투여하는 것이 60°C에서 10분간 가열하고 37.4°C에서 1시간 방치한 후 복강내 투여하는 것보다 효율적인 처리방법임을 알 수 있었다. 또한, I-CAR 어쥘번트를 경구 투여하는 항체가 생성되지 않아 어쥘번트로서 효율적인 방법이 아님을 알 수 있었다.

이상과 같은 결과로부터 0.5% CAR에서 온도 처리에 따라 나타나는 점도의 차이가 CAR의 어쥘번트 활성화에도 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었으며, 지금까지 보고된¹¹⁻¹⁴⁾ 대부분의 CAR 어쥘번트 연구가 CAR를 60°C로 가열한 후 사용하는데 이는 점도가 높아 면역동물에 주사시 어려울 뿐만 아니라 항체 생성율도 그다지 높지 않으므로, 60°C로 가열하지 않고 사용하는 것이 CAR의 유동학적 성질은 유지하면서 주사시 편리하고 항체생성율도 보다 높게 나타내는 결과로 그 의의가 있다고 할 수 있다.

문헌

- Anderson, W. : Carrageenan structure and biological activity. *Cand. J. Pharm. Soc.* 2, 81 (1967).
- Rees, R. : Shapely polysaccharides. *Biochem. J.* 126, 257 (1972).
- Tobacmann, Joanne K. : Filament disassembly and loss of mammary myoepithelial cells after exposure to I-Carrageenan.

- Cancer research*. 57, 2823 (1997).
- 4) Di Rosa M. : Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* 24, 89 (1972).
 - 5) Anderson, N. S., Campbell, J. W., Harding, M. M. : X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates, double helix models for κ - and λ -Carrageenans. *J. Mol. Biol.* 45, 85 (1969).
 - 6) Bonney, R. J., Grey, I., Lin, T., Meyenhofer, M. F., Acevedo, W. and Davies, P. : Mononuclear Phagocytes from carrageenan induced granulomas. *J. Exp. Med.* 148, 261 (1977).
 - 7) Perez-Tamayo, R. : Collagen resorption in carrageenan granulomas. I. Collagenolytic activity in vitro explants. *Lab. Invest* 22, 137 (1970).
 - 8) Thomson, A. W., Wilson, A. R., Cruickshank, W. J. and Horne, C. H. W. : Evaluation of carrageenan as an immunosuppressive agent and mediation of intravascular coagulation. *Biomedicine* 24, 102 (1976).
 - 9) Rumjanek, Vivian M. and Brent L. : Immunosuppressive activity of carrageenan for cell-mediated responses in the mouse. *Transplantation* 26, 113 (1978).
 - 10) Ascheim, L. and Raffel, S. : The immunodepressant effect of carrageenan. *J. Reticuloendothel. Soc.* 11, 253 (1972).
 - 11) Hanazawa, S., Ishikawa, T., Yamaura, K. : Comparison of the adjuvant effect on antibody response of three types of carrageenan and the cellular events in the induction of the effect. *Int. J. Immunopharmac.* 4, 521 (1982).
 - 12) Mancino, D. and Minuccin, M. : Adjuvant effect of λ , κ and λ carrageenans on antibody production in Balb/c mice. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* 72, 359 (1983).
 - 13) Elfaki, M. G., Kleven, S. H., Jin, L. H. and Ragland W. L. : Protection against airsacculitis with sequential systemic and local immunization of chickens using killed *Mycoplasma gallisepticum* bacterin with λ carrageenan adjuvant. *Vaccine*. 11, 311 (1993).
 - 14) Nicklin, S., Atkinson, H. and Miller, K. : λ -carrageenan induced reagenic antibody production in the rat-I. characterization and kinetics of the response. *Int. J. Immunopharmac.* 7, 677 (1985).
 - 15) Claassen, E. and Boersma, W. J. A. : Characteristics and practical use of new-generation adjuvants as an acceptable alternative to Freund's complete adjuvant. *Res. Immunol.* 143, 475 (1992).
 - 16) Rejesh, K. Gupta, A. and Siber, G. R. : Adjuvants of human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 13, 1263 (1995).
 - 17) Koo, B. W., Lee, K. J., Kim, M. S., Kim, H. H. : Adjuvant effects of λ -carrageenan on the immunoglobulin G production. *Yakhak Hoeji* 44(6), 588 (2000).