

총 설

키틴·키토산 및 그 올리고당의 면역작용에 의한 항종양 활성

전유진·김세권†

부경대학교 화학과

Antitumor Activities by Immunological Function of Chitin, Chitosan and Their Oligosaccharides

You-Jin Jeon and Se-Kwon Kim†

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

Chitin, a linked polysaccharide composed of 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose residues, is distributed widely in nature. It has been utilized on various application field due to the development of chitin derivatives such as chitosan, partial deacetylated chitin, carboxylmethyl chitin, sulfated chitin, and so on.

Chitin and chitosan have been recently interested in antitumor and antimicrobial activities, because of a powerful tumor inhibitory effect against experimental mouse tumors. Especially, the oligosaccharides obtained by partial degradation of them exhibited a remarkable antitumor effect against sarcoma 180, MM 46 and Meth A solid tumors and antimetastatic effect against Lewis lung carcinoma in mice.

This review describes on antitumor effects of chitin, chitosan and their oligosaccharides by their mechanism of action involving enhancement of immunological system.

Key words : Chitin, chitosan, antitumor activities, immunological activity

서 론

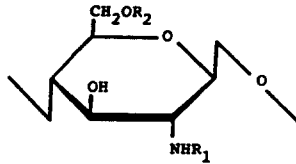
미이용 생물자원으로만 알려졌던 키틴·키토산의 기능성들이 차츰차츰 밝혀짐으로써 이들을 산업적으로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 지금까지 키틴·키토산의 연구 및 이용은 대부분 폐수처리 및 오염물질의 제거 등에 관한 고분자 소재로서의 이용이 압도적으로 많았다¹⁾. 그러

나 최근 키틴·키토산이 항균활성²⁻⁵⁾, 항종양 활성⁶⁻¹¹⁾, 콜레스테롤 저하작용¹²⁻¹⁴⁾ 및 고혈압 억제작용^{15,16)} 등 여러 가지 생리활성을 발현한다는 사실이 주목되고 있어 이에 대한 관심은 폭발적으로 증가하고 있다. 특히 이들 뮤코다당류(mucopolysaccharide)는 현재까지 불치의 병으로 여겨지고 있는 암의 증식이나 전이를 면역학적 시스템을 자극하여 억제한다는 사실이 알려지면서 면역요법에 의한 암

† Corresponding author

의 예방이나 치료제로서 각광을 받기 시작하였다.

육상식물 유래의 많은 종류의 다당류들이 *allogenic* 및 *syngeneic system*을 가지고 있는 실험적 마우스 종양에 대하여 항종양활성을 가지고 있다는 사실이 보고되었다¹⁷⁾. 이들의 작용은 면역시스템을 증가시켜서 이루어지는데, 특히 T-림프구(*lymphocyte*), 대식세포(*macrophage*) 및 *natural killer* 세포와 같은 종양파괴성 면역세포(*tumoricidal immunocytes*)를 자극하여 항종양 활성을 나타내는 메카니즘으로 발현된다⁹⁾. 이에 관한 것으로서 Hashimoto 등¹⁸⁾은 효모의 세포벽 다당류인 만난(*mannan*), Williams 등¹⁹⁾은 글루칸(*glucan*)의 면역부활 효과에 대하여 검토한 결과, 마우스에 이식한 고형종양에 대하여 증식억제효과가 숙주의 면역기능 활성화에 의하여 생성되었다는 사실을 밝혔다. 또한 Suzuki 연구팀²⁰⁻²⁴⁾에서는 효모의 세포벽 성분중 키틴·키토산과 같은 고분자 다당체에 대해서 면역부활작용이 있을 것으로 기대하여 이에 대한 검토를 수행하였다.



$R_1 = \text{COCH}_3$	$R_2 = \text{H}$	chitin
$= \text{COCH}_3 : 0.7$ $\text{H} : 0.3$	$= \text{H}$	30% deacetylchitin (DAC-30)
$= \text{COCH}_3 : 0.3$ $\text{H} : 0.7$	$= \text{H}$	70% deacetylchitin (DAC-70)
$= \text{H}$	$= \text{H}$	chitosan
$= \text{COCH}_3$	$= \text{COCH}_3$	acetylchitin
$= \text{COCH}_3$	$= \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	hydroxyethylchitin
$= \text{COCH}_3$	$= \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{OH}$	dihydroxypropylchitin (DHP-chitin)
$= \text{COCH}_3$	$= \text{H} : 0.75$ $= \text{CH}_2\text{COOH} : 0.25$	carboxymethylchitin(0.25) CM-chitin(0.25)
$= \text{COCH}_3$	$= \text{H} : 0.44$ $\text{CH}_2\text{COOH} : 0.56$	CM-chitin(0.56)
$= \text{COCH}_3$	$= \text{H} : 0.2$ $\text{CH}_2\text{COOH} : 0.8$	CM-chitin(0.8)
$= \text{COCH}_3$	$= \text{PO}_3\text{H}_2$	phosphorylated chitin
$= \text{COCH}_3$	$= \text{SO}_3\text{H}$	sulfonated chitin

Fig. 1. Chemical structure of chitin and chitosan derivatives.

그 이유는 Matheson 등²⁵⁾이 키토산의 단당체인 D-글루코사민(*glucosamine*)이 *natural killer*세포 활성을 증가시킨다는 것을 이미 보고하였기 때문에, D-글루코사민이나 N-아세틸-D-글루코사민의 반복단위 구조로 구성된 키틴·키토산 혹은 그 올리고당에도 이와 같은 효과가 발현될 가능성이 시사되어졌다.

본 총설에서는 최근 크게 주목을 받고 있는 키틴·키토산 및 그 유도체들 (Fig. 1)과 올리고당의 생리기능성 중 면역작용의 부활 내지 증강에 의한 항종양활성의 전반적인 사항들에 대해서 서술하고자 한다.

1. 키틴 유도체의 면역활성과 항종양활성

키틴의 생체내 소화성은 리소자임(*lysozyme*) 수용성(受容性)에 유래하고 있지만, 당골격의 C₂-아세트 아미노기, C₃-수산기가 그 수용성에 크게 기여하고 있다. 피라노오스(*pyranose*) 환(環) 구조에서의 C₂-아세트 아미노기와 C₃-수산기가 있는 잔기 주변에 제한적으로 리소자임 수용성이 기대되기 때문에 면역원성(免疫原性)의 측면에서 그 특성에 주목할만한 가치가 있다.

Table 1. Effect of chitin derivatives on activation of macrophages and NK cells, and suppression of tumor growth

Treatment	Macrophage activation ^a	NK activation ^a	Tumor suppression ^b	
Chitin	9.8	2.5	18.9	0/10
DAC-30	55.0	—	19.7	5/10
DAC-70	56.8	55.9	23.0	10/10
Chitosan	19.2	—	19.7	1/10
Acetyl-chitin	—	0.3	—	—
HE-chitin	—	22.2	—	—
DHP-chitin	—	15.3	—	0/10
CM-chitin	—	53.0	—	1/10
P-chitin	—	3.4	—	—
S-chitin	—	2.8	—	—
<i>P. acnes</i> -CWS	—	—	—	10/10
Control	1.0	1.0	12.2	0/10

^aResults are expressed as mean % cytolysis of target cells.

^bResults are expressed as the number of survived mice /number of mice inoculated.

Nishimura 등^{7,8)}은 키틴유도체의 면역활성 측면에서 대식세포 활성화(macrophage activation)에 관하여 검토한 결과, Table 1에서와 같이 30% 탈아세틸 키틴(30% deacetylated chitin : DAC-30), 70% 탈아세틸 키틴(DAC-70), 키틴산 및 카르복시메틸 키틴(carboxymethyl chitin : CM-chitin)에 강력한 대식세포 활성화능이 있으며, 그 중에서도 DAC-70이 가장 강력한 것으로 보고하였다. 또한 그들은 이어서 DAC-70은 마우스 복강(腹腔) 대식세포 활성화능 이외에, natural killer 세포(NK cell), 헬퍼 T 세포(helper T cell) 및 세포독해성 T 세포(cytotoxic T lymphocyte : CTL)에 대하여 효과적인 활성을 보여 면역증강 활성이 있음을 증명하였다.

戶倉²⁶⁾는 BALB/c 마우스에 이식한 Meth-A 선유육종(fibrosarcoma)에 대한 항종양 활성에서 비교적 높은 활성을 가진 것으로 알려진 *propionibacterium acnes*(*P.acnes*) 세포벽 성분보다도 DAC-70이 더 우수하였으며, 다음으로 디히드록시프로필 키틴산(dihydroxypropyl chitosan : DHP-chitosan), DAC-30의 순으로 활성이 높다고 보고한 바 있다.

따라서 DAC-70은 어떠한 메카니즘에 의해서 면역활성이 발현되는지에 관하여 Nishimura 등⁶⁾은 면역응답조절인자(cytokine)의 생산에 대한 검토(Table 2)에서, DAC-70을 마우스 복강 내에 투여하고 6~12시간 이후 혈청 중의 콜로니 형성 자극 인자(colony stimulating factor : CSF) 활성이, 24시간 이후에 인터페론(interferon : INF) 활성이 현저하게 증가하는 것을 밝혔다. *In vitro* 실험에서, DAC-70은 복강 대식세포에 의해서 인터루킨-1(interleukin-1 : IL-1)과 CSF의 생산이 증가하였으나 IL-2, INF 및 대식세포 활성화 인자(macrophage activation factor : MAF)와 같은 림포카인(lymphokine) 생산에서는 전혀 효과를 주지 못하였다.

Table 2. Stimulation of cytokine production by DAC-70

	IL-1	IL-2	CSF	INF	TNF	MAF
<i>In vivo</i>			+	+	-	-
<i>In vitro</i>	+	-	+	-		-

이와 같은 일련의 보고에 의하면, DAC-70이 미생물 감염이나 종양세포 증식에 대한 숙주의 방어는 복강 대식세

포와 NK세포의 세포파괴활성을 자극하는 것과 IFN과 CSF와 같은 수용성 매개체의 생산에 의해 효과적으로 이루어지지만, 어떠한 림포카인의 생산을 자극하지는 못하는 것으로 보였다. 결국, DAC-70은 사이토카인의 생산을 증가시켜 효율적인 숙주 저항활성을 조절하여 대식세포 특이적인 면역조절제(macrophage-specific immunomodulator)로서 작용하는 것으로 생각된다.

Iida 등²⁷⁾은 DAC-70이 마우스의 대장균이나 *Sendai* 바이러스 감염에 대하여 숙주의 비특이적인 저항성(non-specific resistance)을 현저하게 증강하는 것을 밝혔다. 또한 DAC-70의 C₂ 위치의 아미노기를 트리메틸화하여 염기성을 강하게 하여도 역시 *Sendai* 바이러스 감염에 대한 높은 저항성을 보인데 비하여 CM-키틴은 전혀 활성이 나타나지 않았다는 결과로 보아, DAC-70의 염기성이 중요한 작용을 하고 있음을 시사해 주었다.

키틴 유도체는 생체내 소화성이 좋고, 성형가공이 용이하기 때문에 각종 의약품 재료로서 활용할 목적으로 Nishimura 등²⁸⁾은 키틴 유도체 유래 다공성 미립자(multiporous microsphere)의 면역활성을 조사한 결과, Table 3에서와 같이 DAC-80으로 직경 0.2~0.7mm 크기로 제조한 다공성 미립자를 그대로 현탁액 상태로 마우스 복강 내에 투여하면 대식세포를 활성화시키지 못하지만, 0.5~4%의 초산용액에 전처리하였을 경우 대식세포의 활성을 증강시켰다. 이것은 입자표면의 아미노기가 산과 염을 형성함으로써 활성이 발현되었고 특히, 입자크기를 2.5 μ m로 매우 작게 가공하였을 때 산처리 없이도 DAC-70과 거의 같은 활성을 보였으며, 또한 CSF와 IL-1과 같은 모노카인(monokine)의 생산을 증가시켰다고 밝혔다. 따라서 이러한 키틴 유도체의 다공성 미립자는 서방성(徐放性) 약물수송 담체로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

2. 황산화 키틴 유도체의 암전이 억제효과

암의 전이는 암세포의 발생지로부터 유리되어 주변의 조직으로 침윤(intravasation 혹은 extravasation)하기 시작하여 증식하는 복잡한 과정을 거치게 되는데, 그 사이에 세포외 매트릭스(extracellular matrix)와 기저막(basement membranes) 등과의 상호작용을 포함하는 일련의 현상들이 일어난다²⁹⁾. 암의 침윤과정에서 세포의 매트릭스와 기저막의 주요 성분인 헤파란 황산(heparan sulfate)은 암 전이성 흑색종(melanoma)에 의해 생산되는 헤파라나아제(heparanase)에

Table 3. Effect of MS-DAC-80(2.5) and MS-Chitin(2.5) on the activation of peritoneal macrophages *in vivo*

Treatment	Dose (μg)	Timing (days)	No. of macrophages (×10 ⁶ /mouse)	Cytolysis ^b (%)	
				FBL-3	3LL
Exp. 1					
MS-DAC-80(2.5)	500	-5	6.4	20.4±2.6 ^d	ND
MS-chitin(2.5)	500	-5	6.1	-0.2±1.8	ND
DAC-70	500	-5	6.6	23.5±2.6 ^d	ND
Control	-	-	1.8	-0.2±1.5	ND
Exp. 2					
MS-DAC-80(2.5)	500	-1	6.5	42.1±1.4 ^d	42.1±2.7 ^d
	500	-5	11.8	33.5±1.0 ^d	47.6±2.1 ^d
	500	-10	3.1	25.2±1.9 ^d	35.9±1.5 ^d
	500	-20	3.1	17.7±2.8 ^d	26.5±1.9 ^d
	2500	-5	17.8	28.4±1.8 ^d	42.9±1.9 ^d
	100	-5	6.6	28.4±2.6 ^d	38.2±1.5 ^d
	20	-5	3.8	10.8±2.4 ^c	12.9±2.4 ^c
	4	-5	4.1	4.7±1.4	12.0±2.7 ^c
DAC-70	500	-5	7.1	31.8±1.1 ^d	36.8±1.1 ^d
	500	-20	1.0	22.5±1.9 ^d	31.2±3.0 ^d
Control	4	-5	4.1	30.2±4.2 ^d	37.5±1.7 ^d
	-	-	2.5	1.7±0.8	1.7±1.8

^aC57BL/6 mice were injected intraperitoneally(i.p.) with each adjuvant on the indicated days.

^bEach value is the mean±s.e. of six wells in each group.

^cSignificant difference from the control by Student's t-test(P<0.01). ^dSignificant difference from the control(P<0.001).

ND. not done

의해 분해되며³⁰⁾, 그 효소적 분해는 헤파린에 의해 저해되는 것으로 보고되어 있다³¹⁾.

헤파린의 당구조는 N-아세틸 글루코사민과 우론산(uronic acid)의 반복구조로된 황산화 다당류이며, 그 생리활성은 안티트롬빈(antithrombin) III와의 결합에 의한 항응혈 작용³²⁾, 혈관 신생촉진 작용³³⁾, 섬유아 세포 증식인자와의 상호작용³⁴⁾, 지연형 과민증의 억제³⁵⁾ 등 매우 다양하다.

한편, 헤파린 및 그 관련 화합물을 이용한 암 전이 억제 효과에 관한 연구가 Tsubura 등³⁶⁾에 의해서 이루어 졌는데, 그들은 헤파린이 폐암 전이를 억제하며 그 메카니즘으로는 혈소판응집에 의해 형성된 중앙혈전(腫瘍血栓)의 저해라고 보고한 바 있다. Irimura 등³⁷⁾은 항응혈작용이 없는 헤파린 유도체가 흑색종 세포의 헤파라나아제 활성을

저해하여 실험적으로 폐암 전이를 억제한다는 사실을 밝혔다.

이와 같이 헤파린이 여러 가지 생리활성이 높다는 사실을 인식하여 이와 유사한 구조를 가진 키틴을 황산화시켜 키틴 헤파리노이드(chitin heparinoid)와 같은 헤파린 유사물질 을 합성하여 그 활성을 비교한 연구들이 보고되었다.

Murata 등³⁸⁾과 Saiki 등³⁹⁾은 황산화 키틴 유도체의 전이성 암 세포에 미치는 효과에 대하여 검토한 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 황산화 키틴(S-키틴) 및 황산화 카복시메틸 키틴(SCM-키틴)은 헤파린과 마찬가지로 현저한 폐암 전이 억제효과를 나타내었고, 도입된 황산화도에 비례하여 강한 활성을 보였으며, 또한 황산화되지 않은 CM-키틴에는 전혀 효과가 없는 것으로 보고하였다. 또한 황산화 키틴 유도체들 중 강한 활성을 보인 높은 황산화도

Table 4. Effect of chitin heparinoids on experimental lung metastasis by intravenous injection of B16-BL6 melanoma cells

Administered i.v. with :	Dose ($\mu\text{g}/\text{mouse}$)	No. of lung metastases on day 14		P ^b
		mean \pm SD (range)		
Exp. I				
Untreated (PBS)	—	124 \pm 34 (92–165)		
Heparin-Na	250	8 \pm 4 (4–12)		< 0.001
S-chitin II (8.54) ^a	250	52 \pm 7 (47–65)		< 0.005
III (10.22)	250	15 \pm 7 (7–24)		< 0.001
S-chitosan (11.89)	250	103 \pm 9 (89–111)		
SCM-chitosan (5.90)	250	134 \pm 23 (96–156)		
Exp. II				
Untreated (PBS)	—	62 \pm 14 (44–78)		
SCM-chitin I (1.43)	250	58 \pm 18 (40–90)		
II (6.70)	250	30 \pm 10 (20–42)		< 0.005
III (7.66)	250	8 \pm 2 (4–12)		< 0.001
Exp. III				
Untreated (PBS)	—	109 \pm 16 (87–130)		
CM-chitin	250	100 \pm 12 (96–126)		
SCM-chitin III	500	35 \pm 3 (29–42)		< 0.001
	250	44 \pm 7 (48–64)		< 0.001
	100	77 \pm 3 (74–81)		< 0.005
	50	80 \pm 6 (74–87)		< 0.01
	10	95 \pm 7 (86–101)		

Five C57BL/6 mice per group were injected i.v. with B16-BL6(5×10^4) with or without chitin heparinoids. Mice were killed 2 weeks after tumor inoculation and lung colonies were measured.

^aThe degree (%) of sulfation.

^bCompared with untreated control by Student's two-tailed t test.

Table 5. Therapeutic effect of chitin heparinoids on spontaneous lung metastasis by intrafootpad injection of B16-BL6 melanoma

Administered i.v. with :	Dose ($\mu\text{g}/\text{mouse}$)	No. of lung metastases on day 14		P ^b
		mean \pm SD (range)		
Untreated (PBS)	—	66 \pm 22 (35–84)		
SCM-chitin III on day 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19	200	4 \pm 3 (0–8)		< 0.001
	100	11 \pm 8 (4–22)		< 0.005
	50	36 \pm 26 (16–71)		
S-chitin II	200	11 \pm 8 (6–23)		< 0.005
CM-chitin	200	41 \pm 18 (25–72)		
Heparin-Na	200	19 \pm 16 (8–43)		< 0.01

Five C57BL/6 mice per group were administered i.v. with chitin heparinoids at the indicated times after tumor inoculation. Primary tumors were surgically removed on day 21 and mice were killed 2 weeks after tumor excision.

^aCompared with untreated control by Student's two-tailed t test.

의 SCM-키틴 III(황산화도 7.66)를 이용하여 자연 폐암 전이에 미치는 효과에 대하여 B16-BL6 흑색종 세포를 이식한 C57BL/6 마우스에서 검토한 결과, Table 5와 같이 종양 이식 후 21일째 외과적으로 절제하기 전에 키틴 헤파리노이드를 투여하였을 때 투여량의 증가에 따라 전이 억제효과가 높다고 하였다.

이러한 결과로 볼 때, 글루코사민 잔기 중 C₆-위치의 황산화 및 C₂-위치의 N-아세틸화가 실험적 폐암 전이계에 있어서 키틴 헤파리노이드의 높은 암전이 억제효과와 발현에 중요한 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다.

3. 키틴·키토산 올리고당의 면역활성과 항종양활성

키틴·키토산의 생리활성 중 면역능을 증강시켜 항종양 활성을 검토하려는 연구가 초기에는 다당류를 그대로 마우스 복강내 투여하여 그 효과를 관찰하였지만, 키틴 및 키토산은 모두 물에 불용성이기 때문에 재현성이 있는 결과를 얻기 힘들어서 그 효과를 평가하는데 많은 어려움이 있었다. 따라서 수용성 키틴·키토산 올리고당을 제조하여 그 활성을 검토하게 되었다. 그렇지만 일반적으로 항암성 다당류는 산분해 등에 의해서 분자량이 감소될 경우 예외 없이 활성을 잃어버리기 때문에 이들 키틴·키토산 올리고당도 다른 대부분의 다당류와 같이 면역활성이 발현할 것으로 기대하지 못했던 것이다. 그러나 Suzuki 등⁹⁾은 키틴 및 키토산을 저분자화하여 얻어진 중합도 6의 N-아세틸 키토 올리고당(N-acetyl chitoooligosaccharide-6 : NACOS-6)과 키토올리고당(COS-6)을 이용하여 이형적(allogeneic) 마우스에 이식한 sarcoma 180 고형 종양계에서 항암작용을 검토한 결과, Table 6에서와 같이 NACOS-6과 COS-6에서 상당히 강력한 종양증식 억제효과를 볼 수 있었는데, 이것은 렌티난(lentinan)이 10mg/kg/day의 투여로 약 72%의 저해효과를 나타낸 것에 비해 NACOS-6은 100mg/kg/day로 3회 투여하여 약 85%의 효과를, 그리고 COS-6은 같은 양의 투여로 약 93%의 효과를 얻었다. 그리고 이들 두 올리고당의 투여횟수를 5번으로 늘리면 모든 마우스에서 종양이 완전히 억제되었고, 또한 동계간(syngeneic) 종양계로서 C3H/He계 마우스에 이식한 MM 46 고형종양에서는 NACOS-6만이 강력한 항종양 활성을 나타낸다고 하였다. Tokoro 등¹⁰⁾은 또 다른 동계간 마우스 종양계로서 BALB/c 마우스에 이식한 Meth-A 고형종양에서 NACOS-6과 COS-6에서 각각 44% 및 41%의 효과적인 항종양활

성을 나타내었으나 이들보다 분자량이 조금 더 낮은 NACOS-5와 COS-5에서는 종양억제활성은 거의 없는 것으로 보고하였다 (Table 6). Tsukada 등²¹⁾은 NACOS-6이 C57BL/6 마우스에 이식한 Lewis lung carcinoma(LLC)에 대하여 전이억제효과 뿐만 아니라 폐암의 증식을 저해하는 효과가 있는 것으로 보고하였다. 즉, 종양을 이식한 후 6일째에 NACOS-6(1mg/kg)을 정맥내주사로 1회 주입하였을 때 폐전이 억제효과가 약 50%로 렌티난(2.5mg/kg)보다

Table 6. Growth inhibitory effect of NACOS and COS on tumor cells

Materials	Dose (mg/kg)	Tumor weight(g)	Inhibition (%)	P ^e
Exp. 1^a				
Control	-	3.51±1.00 ^d	0	
Lentinan	10×1	0.98±0.44	72	< 0.05
NACOS-6	100×3	0.53±0.30	85	< 0.01
	100×5	0.00±0.00	100	< 0.01
COS-6	100×3	0.23±0.18	93	< 0.01
	100×5	0.00±0.00	100	< 0.01
Exp. 2^b				
Control	-	3.96±0.53	0	-
Lentinan	10×1	1.65±0.35	58	< 0.05
NACOS-6	100×3	0.68±0.17	83	< 0.01
COS-6	100×5	1.80±0.40	55	< 0.05
Exp. 3^c				
Control		9.5±0.4		
NACOS-6	10	5.3±0.8	44	< 0.01
NACOS-5	10	8.3±0.4	12	-
COS-6	10	5.6±1.0	41	< 0.01
COS-5	10	9.6±0.3	-	-

^aby intravenous administration on sarcoma 180 solid tumor implanted in ddY mice.

^bby intravenous administration on MM 46 solid tumor implanted in C3H/He mice.

^cby intravenous administration on Meth A solid tumor implanted in BALB/c mice.

^dAverages± standard errors.

^eVersus the control group.

Table 7. Effect of NACOS-6 on the pulmonary metastasis of Lewis lung carcinoma(LLC)and LLC local tumor growth in C57BL/6 mice^a

Sample ^b	Dose (/kg)	Antimetastasis		Antitumor	
		Number of lung nodules ^c	Inhibition (%)	Tumor weight ^e (g)	Inhibition (%)
Control		131.8±20.9 ^d		8.22±0.39 ^d	
NACOS-6	100mg	94.1±5.1	28.6	7.05±0.62	14.3
	10mg	92.0±9.3	30.2	6.80±0.34	17.3
	1mg	61.3±5.1	53.5	6.42±0.51	22.0
Lentinan	2.5mg	97.9±7.6	25.7	6.18±0.34	24.8

^aMice were implanted with 5×10⁵ cell of LLC.

^bMice were treated intravenously with NACOS-6 or lentinan 6 days after the tumor inoculation.

^cThe number of lung nodules was counted on day 21

^dAverages± standard errors

^eThe tumor weight was measured on day 21.

높은 활성을 보였고, 또한 LLC종양에 대하여 NACOS를 0.1~10mg/kg 범위로 1회 주입하였을 때 항종양활성은 약 14~22%로서 2.5mg/kg을 주입한 렌티난보다 다소 약한 활성을 보였다 (Table 7). 그러나 NACOS-6은 암 치료에 있어서 가장 문제가 되고 있는 다른 조직으로의 암 전이를 억제함과 동시에 암의 증식도 억제하는 효과가 있어 암치료에 활용이 기대되고 있다.

한편, NACOS-6는 종양세포에 대하여 직접적으로 살균 작용이나 항종양작용을 나타내는 것이 아니기 때문에 마우스의 면역계에 의한 면역부활 혹은 면역증강작용으로 인하여 그 효과가 발현되는 것으로 볼 수 있다. 鈴木²⁰⁾와 Tokoro 등¹¹⁾은 대식세포, 림프구 및 사이토카인이 상호 관련하고 있는 면역계에서의 종양억제 반응에 관하여 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

① IL-1 및 IL-2의 활성에 미치는 효과

BALB/c 마우스의 복강내에 카제인을 투여하여 얻은 대식세포에 NACOS와 COS를 첨가하였을 때, NACOS-6이 흉선세포로의 ³H-TdR 용합을 가장 높게 촉진하였다. 그러나 이들 올리고당은 직접 흉선세포에 대하여 ³H-TdR의 용합에 영향을 미치지 않기 때문에 마이트젠 활성을 보이지 않았고, 대식세포에 작용하여 IL-1생산을 통하여 임파구를 활성화하는 것으로 생각된다. 한편, Meth-A 종양이식 마우스에서의 IL-2에 대해서는 NACOS-6 및 COS-6 투여로 마

우스의 IL-2 생산량은 미처리 대조군과 비교하여 매우 유의적으로 높게 나타났으므로 (Table 8), 이들 올리고당에 의해서 활성화된 IL-1 및 IL-2의 관여가 시사되고 있다.

Table 8. Effect of NACOS and COS on response to interleukin 1 from macrophage and activation of interleukin 2 from spleen cells

Sample	Dose (mg/ml)	³ H-TdR Incorporation ^a	Ratio	P ^b
Exp. I				
Control		2125.9±122.6	1.0	
NACOS-6	0.01	2210.3±167.4	1.0	NS
	0.1	8339.6±234.0	3.9	< 0.001
	1.0	9403.9±415.6	4.4	< 0.001
NACOS-5	1.0	4822.9±237.2	2.3	< 0.001
COS-6	1.0	6069.8±134.9	2.9	< 0.001
COS-5	1.0	2395.7±257.5	1.1	NS
Exp. II				
Control		292.7±81.9	1.0	
NACOS-6	10.0	794.5±110.7	2.7	< 0.05
NACOS-5	10.0	279.9±66.1	0.9	NS
COS-6	10.0	487.5±81.7	1.7	< 0.05

^aMean± standard error. ^bVersus the control group.

② 종양세포 장해성(障害性)에 대한 효과

NACOS-6 및 COS-6를 투여한 Meth-A 종양 이식 마우스의 비장 T 세포를 이용하여 *in vitro*로 종양세포에 대한 장해활성을 조사한 결과, Table 9에 나타난 바와 같이 이들 올리고당은 대조군에 비하여 비장 T 세포에 약 2.5~3배의 장해성을 종양세포에 미치는 것으로 나타났다.

Table 9. Effect of NACOS-6 on tumoricidal activity of splenic T lymphocytes in tumor-bearing mice

Sample	Dose (mg/ml)	Percent of dead target cells ^a	p ^b
Control		12.2 ± 2.1	
NACOS-6	10	29.9 ± 2.4	<0.05

^aMean ± standard error. ^bVersus the control group.

③ 대식세포 활성화인자 활성화에 미치는 영향

NACOS-6를 투여한 마우스 비장 T 임파구의 배양상층을 대식세포에 첨가하여 대식세포 활성화능을 검토한 결과, Fig. 2에서와 같이 NACOS-6 상층액을 첨가한 대식세포는 정상 마우스의 비장 T 임파구의 배양 상층액보다도 약 1.6 배 H₂O₂ 생산량의 증가를 보여, NACOS-6의 투여로 얻어진 T 임파구의 배양 상층액 중에는 대식세포 활성화 인자가 함유되어 있다는 사실을 보여주는 것이다.

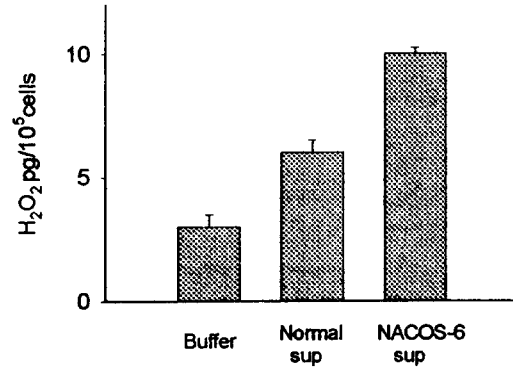


Fig. 2. Effect of NACOS-6 on macrophage activation factor.

④ 지연형 과민증(Delay-type hypersensitivity : DTH) 반응에 미치는 효과

DTH 반응은 Meth-A 종양세포, 양적혈구(sheep red blood cells : SRBC)를 항원으로 하여 마우스의 foot-pad test로 측정된 결과, Fig. 3에서 나타난 바와 같이 모두 대조군에 비하여 foot pad swelling이 현저하게 저하하였으며, NACOS-6 및 COS-6는 미처리 대조군에 비하여 약 2배 가량 강한 활성을 보였다. 그러나 NACOS-5는 전혀 활성을 나타나지 않았다. NACOS-6 및 COS-6를 투여한 종양 마

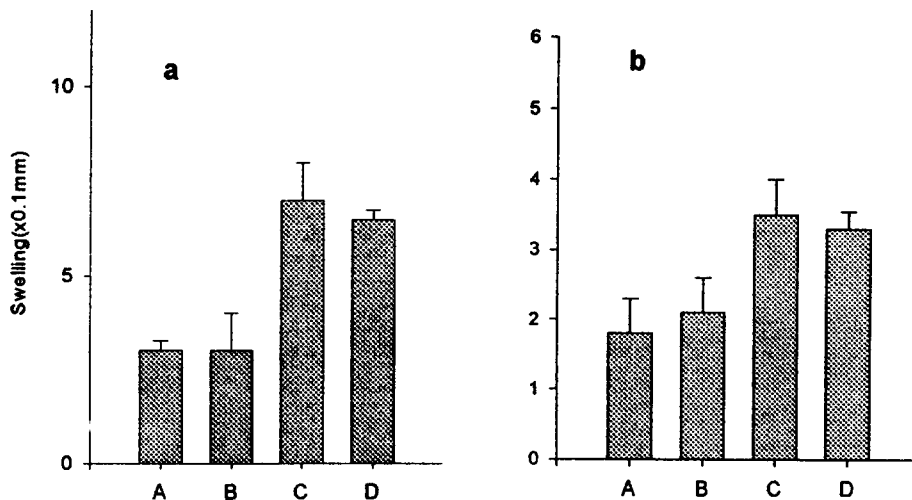


Fig. 3. Effect of NACOS and COS on delayed type hypersensitivity response against Meth-A(a) and SRBC(b) in tumor-bearing mice.

우스에 의해 나타난 DTH 반응은 정상 마우스보다도 훨씬 더 높기 때문에 이들 올리고당이 DTH 반응을 증가시킬 수 있다는 것이 증명된 것이다.

이상과 같은 결과에 의하면, NACOS-6은 IL-1과 IL-2를 유발하여 림프구의 응답성을 높혀서 세포장해성 T 세포와 대식세포의 종양세포 장해성을 활성화함으로써 면역작용을 증강하여 체내에서의 종양세포의 증식과 전이를 억제할 수 있는 것으로 보이며, 이에 대한 종합적인 면역계에서의 작용들을 Fig. 4에 나타내었다.

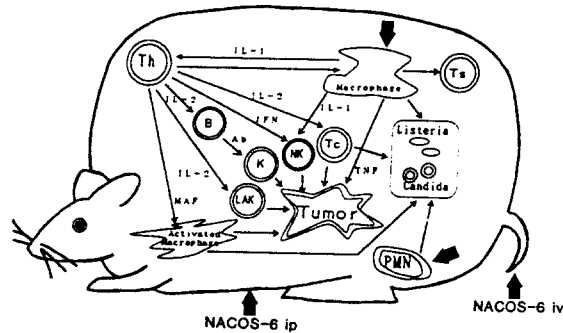


Fig. 4. Mechanism on immunopotentiation function of NACOS-6.

결론

이상으로 키티ن·키티산 및 그 올리고당의 생리활성 중 항종양 활성에 대하여 살펴보았다. 키티ن·키티산의 항종양 활성은 면역작용을 부활 내지는 증강시킴으로써 활성화되어 발현되는 메카니즘을 따르고 있다. 키티를 탈아세틸화함으로써 항종양 활성이 증가되는 것으로 보아 유리 아미노기가 항종양 활성 발현에 중요한 작용기로서 역할을 담당하고 있음이 시사되었다. 그리고 황산화된 CM-키티는 황산화도가 높을수록 폐암의 증식과 전이를 억제하는 것으로 보아 암전이 예방을 위한 물질로서의 이용이 기대된다.

한편, 다른 다당류와는 달린 키티·키티산이 가수분해되어 저분자량의 올리고당으로 되었음에도 불구하고 렌티난과 거의 유사한 항종양활성을 유지하였으므로 체내 흡수가 유리해 효과적으로 작용할 수 있을 것이다. 그러나 이러한 키티·키티산의 항종양 활성에도 불구하고 대부분의 실험적인 증거들이 정맥내 주사에 의한 것이어서 의약품으로서의 이용하기 위해서는 반드시 인체의 유해성 여부를 검증할

필요가 있다.

키티·키티산은 현재까지 여러 가지 분야에서 이용되고 있으며, 최근에 와서는 생리활성 물질로서 이용하기 위한 기초 연구들이 크게 증가하고 있다. 특히 현재까지도 불치의 병으로 남아있는 암을 화학요법이 아닌 면역요법으로서 극복할 수 있는 가능성들이 이들 물질에서 기대되고 있으므로, 좀 더 깊이있는 연구를 함으로써 하루 빨리 의약품으로 이용될 수 있는 날이 오기를 기대해 본다.

참고문헌

1. 坂井和男: 키티·키티산올리고당의開發と現狀, pp. 106-111, 別冊フドケミカル-I 키티·키티산의科學, 食品化學新聞社(1988).
2. 内田 泰: 키티·키티산의抗菌性, 月刊フドケミカル, No. 2, 22(1988).
3. Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A.: Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *pisum sativum*, *Exp. Mycol.*, 8, 276(1984).
4. Amako, K., Shimodori, S., Imoto, T., Miyake, S. and Umeda, A.: Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 608(1987).
5. Shimojoh, M., Masaki, K., Kurita, K. and Fukushima, K.: Bactericidal effects of chitosan from squid pens on oral streptococci, *Nippon Noeikagaku Kaishi*, 70, 787(1996).
6. Nishimura, K., Ishihara, C., Ukei, S., Tokura, S. and Azuma, I.: Stimulaton of cytokine production in mice using deacetylated chitin, *Vaccine*, 4, 151(1986).
7. Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Numata, F., Tone, Y., Tokura, S. and Azuma, I.: Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea pigs, *Vaccine*, 13, 379(1985).
8. Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I.: Immunological activity of chitin and its derivatives, *Vaccine*, 2, 93(1984).
9. Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose, *Carbohydr. Res.*, 151, 403(1986).
10. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 784(1988).

11. Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Protective effect of N-acetylchito-hexaose on *Listeria monocytogens* infection in mice, *Microbiol. Immunol.*, 33, 357(1989).
12. Sugano, M., Yoshida, K., Hashimoto, H., Enomoto, K. and Hirano, S.: *Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosan in rats*, pp. 472-478, In *Advances in chitin and chitosan* (Eds. Brine, C. J., Sandford, P. A., Zikakis, J. P.), Elsevier Applied Science, London and N. Y. (1992).
13. 次田隆志, 坂本廣司: キトサンのコレステロール改善作用と食品への利用, 月刊フドケミカル, No. 2, 45(1995).
14. Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, H. and Mitsuoka, T.: Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1439(1993).
15. 奥田拓道: 血圧調節とキトサンの役割, 月刊フドケミカル, No. 2, 33(1995).
16. 加藤秀夫: 食鹽による血圧上昇メカニズムとキトサンの降壓作用, キチン・キトサン健康讀本1, No. 2, 46(1995).
17. Chedid, L., Audibert, F., Lefrancirer, P., Choay, J. and Lederer, E.: Modulation of the immune response by a synthetic adjuvant and analogues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2472(1976).
18. Hashimoto, K., Okawa, Y., Okura, Y., Suzuki, K., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antitumor activity of acidic mannan fraction from bakers' yeast, *J. Pharm. Dyn.*, 6, 668(1983).
19. Williams, D. L. and Diluzio, N. R.: Immunopharmacologic modification of experimental viral disease by glucan, *Immunother. and Viral Diseases*, 5, 78(1985).
20. 鈴木茂生: キチンおよびキトサンの水溶性低級族オリゴ糖の生物活性の検討, *Fragrance J.*, 15, 61(1996).
21. Tsukada, K., Matsumoto, T., Aizawa, K., Tokoro, A., Naruse, R., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchito-hexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma, *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 259(1990).
22. Suzuki, K., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Candidacidal effect of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin and chitosan, *Microbiol. Immunol.*, 31, 375(1987).
23. Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Enhancing effects of N-acetyl-chito-oligosaccharides on the active oxegen-generation and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 886(1985).
24. 鈴木茂生: N-アセチルキトオリゴ糖とキトオリゴ糖の免疫賦活作用, *Nippon Nogekagaku Kaishi*, 62, 1241(1988).
25. Matheson, D. S., Green, B. J. and Friedman, S. J.: Effect of D-glucosamine on human natural killer activity in vitro, *J. Biol. Response. Modif.*, 3, 445(1984).
26. 戸倉清一: キチン,キトサンの生理活性について, pp. 5-11, 別冊フドケミカル-I キチン・キトサンの科學, 食品化學新聞社(1988).
27. Iida, J., Une, T., Ishihara, C., Nishimura, K., Tokura, S., Mizukoshi, N. and Azuma, I.: Stimulation of non-specific host resistance against Sendai virus and *Escherichia coli* infections by chitin derivatives in mice, *Vaccine*, 5, 270(1987).
28. Nishimura, K., Nishimura, S., Seo, H., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I.: Effect of multiporous microspheres derived from chitin and partially deacetylated chitin on the activation of mouse peritoneal macrophages, *Vaccine*, 5, 136(1987).
29. Liotta, L. A., Rao, C. V. and Barshk, S. H.: Tumor invasion and the extracellular matrix, *Lab. Invest.*, 49, 636(1983).
30. Nakajima, M., Irimura, T., Ferrante, D. Di, Ferrante, N. Di. and Nicolson, G. L.: Heparan sulfate degradation, *Science*, 220, 611(1983).
31. Nakajima, M., Irimura, T., Ferrante, N. Di and Nicolson, G. L.: Metastatic melanoma cell heparanase, *J. Biol. Chem.*, 59, 2283(1984).
32. Atha, D. H., Lormeau, J., Petitou, M., Rosenberg, R. D. and Choay, J.: Contribution of 3-O- and 6-O-sulfated glucosamine residues in the heparin induced conformational change in antithrombin III, *Biochemistry*, 26, 6454(1987).
33. Taylor, S. and Folkman, J.: Protamine is an inhibitor of angiogenesis, *Nature*, 297, 307(1982).
34. Klagsbrun, M. and Shing, Y.: Heparin affinity of anionic and cationic capillary endothelial cell growth factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 805(1985).
35. Sy, M. S., Schneeberger, E., McCluskey, R., Greene, M. I., Rosenberg, R. D. and Benacerraf, B.: Inhibition of delayed-type hypersensitivity by heparin depleted of anticoagulant activity, *Cell. Immunol.*, 82, 23(1983).
36. Tsubura, E., Yamashita, Y., Kobayashi, M., Higuchi, Y. and Isobe, J.: Inhibitory mechanism of blood-borne pulmonary metastasis b sulfated polysaccharides, *Gann Monogr. Cancer Res.*, 20, 147(1977).

37. Irimura, T., Nakajima, M. and Nicolson, G. L. : Chemically modified heparin as inhibitors of heparan sulfate specific endo- β -glucuronidase (heparanase) of metastatic melanoma cells, *Biochemistry*, **25**, 5322 (1986).
38. Murata, J., Saiki, I., Nishimura, S., Nishi, 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).
39. Saiki, I., Murata, J., Nakajima, M., Tokura, S. and Azuma, I. : Inhibition by sulfated chitin derivatives of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation by metastatic melanoma cells, *Cancer Res.*, **50**, 3631(1990).