

키토산 resin formulae의 서방효과(sustained-releasing effect) 보조제로서의 활용

김상욱 · 강문일¹ · 이재일¹ · 김태중^{1*}

전라남도축산기술연구소, ¹전남대학교 수의과대학

(접수 2010. 3. 28, 게재승인 2010. 6. 11.)

Application of chitosan resin formulae as a sustained-releasing form adjuvant

Sang-Uk Kim, Mun-II Kang¹, Jae-II Lee¹, Tae-Jung Kim^{1*}

Jeollanamdo Institute of Livestock & Veterinary Science

¹College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received 28 March 2010, accepted in revised from 11 June 2010)

Abstract

Here, we report the suitability of using a resin-type chitosan formulae as a sustained-releasing form adjuvant in comparison with commercially well-known Freund's adjuvants. To induce the immunological responses, N-terminal region of *Pasteurella multocida* toxin was used as an antigen, which was found to be protective immunogen against *P. multocida* infection. Mice immunized with chitosan resin formulae showed statistically significant antibody induction ($P < 0.001$) as much as that of Freund's adjuvants. As a result, the resin-type sustained-releasing form chitosan formulae is thought to be a good candidate for a new type adjuvant.

Key words : Chitosan, Adjuvant, *Pasteurella multocida* toxin (PMT), Sustained-release

서 론

양이온성 다당류인 키토산은 주로 계나 새우 등의 갑각류의 껍질 및 골격을 이루는 키틴질을 탈아세틸화하여 만든 물질로 다른 자연계에 존재하는 다당류와 달리 생분해성이 좋고 저독성이며 점막부착성이 강하나 알러지 등을 일으키지는 않는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2007). 독성연구를 보더라도 비점막을 통한 국소투여 및 전신투여에서도 비독성 물질로 나타났다

(Illum 등, 1994). 또한 키토산은 점막내 투여 경로를 통해 약물이나 항원을 전달할 때 좋은 운송매개(delivery vehicle)가 되는 것으로 나타났다(Illum, 1998).

이 연구진에 의해서도 키토산용액을 보조제로 사용할 경우, 호흡기 점막에 항원을 노출시키면 국소 및 전신 면역반응이 유도됨을 알 수 있었다(Kim 등, 2007).

키토산은 응집유도체인 sodium tripophosphate (STP) 등과 같은 약물로 적절한 처리를 거쳐 다공형(多孔形) 미세입자(resin)가 만들어 질 수 있다(Mi 등, 1999).

이에 이 연구에서는 키토산의 보조제로써의 효과를 증폭하기 위해 서방효과 (sustained-releasing effect)를

*Corresponding author: Tae-Jung Kim, Tel. +82-62-530-2859,
Fax. +82-62-530-2857, E-mail. tjkim@chonnam.ac.kr

유도하고자 액상 카토산을 입자형 resin으로 준비하여 그 효과를 알아보았다. 이를 위해 사용된 항원으로는 이 연구진에 의해 그 면역원성이 잘 밝혀진(Seo 등, 2009) 세균독소인 *pasteurella multocida* toxin의 N-말단 분획을 이용하였다.

재료 및 방법

카토산 resin 준비

카토산 용액으로부터 입자형 resin을 만들기 위한 방법은 Mi 등(1999)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 카토산(low molecular weight, Aldrich) 0.125g에 2% acetic acid sol. 50ml에 magnetic stirrer를 이용하여 완전히 녹인 후 이 용액을 15% STP (Sigma) 10ml에 천천히 첨가하여 결정을 만들었다. 결정이 완전히 생긴 후 3,000rpm/5분간 3회 중류수로 원심 및 세척을 반복한 후 PBS를 5ml 첨가하여 재부유시켰다. 이를 sonication (2초 펄스/2초 휴식을 총 5분간 실시)을 통해 미세화하고 최종농도가 3.3%가 되도록 준비하였다.

카토산의 서방효과 확인

카토산의 서방효과를 검사하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 먼저 총 6마리의 6주령 ICR 마우스를 2개군으로 구분하고 아래 Table 1과 같은 방법으

Table 1. Preparation of recombinant PM-N antigen for screening of sustained-releasing effect of chitosan resin

Group	Formulation
1	PM-N* 10μl + PBS 90μl
2	PM-N 10μl + chitosan 50μl + PBS 40μl (final chitosan conc.=2%)

*From 1mg/ml stock

Table 2. Scheme of administration of recombinant PM-N antigen for screening of adjuvant effect of chitosan resin

Group	Formulation
1	PM-N* 10μl + PBS 90μl
2	PM-N 10μl + FCA** 50μl + PBS 40μl
3	PM-N 10μl + chitosan 15μl + PBS 70μl (final chitosan conc.=0.5%)
4	PM-N 10μl + chitosan 30μl + PBS 60μl (final chitosan conc.=1%)
5	PM-N 10μl + chitosan 60μl + PBS 30μl (final chitosan conc.=2%)

*From 1mg/ml stock

**Freund's complete adjuvant

로 항원을 준비하였다. 실험에 사용된 재조합 *P. multocida* toxin N-말단(PM-N)은 Seo 등(2009)에 의한 방법으로 준비하였다.

준비된 항원 formulae를 마우스 피하에 접종하고 접종부위를 검은색 oil pen으로 표지하였다. 일주일 후 마우스를 희생하고 접종부위를 절개하여 피하조작을 sampling하고 tissue grinder (Ultra-Turrax®, IKA-Werke, Germany)를 이용하여 세절하였다. Tissue homogenate를 원심분리하고 상층액만을 모아 SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하고 Western blot을 위해 membrane transfer를 실시하였다. 시료내에 존재하는 PM-N 항원의 검출을 위한 1차 항체는 토끼에서 준비된 polyclonal 항체를 이용하였고(Seo 등, 2009) 2차 항체는 goat anti-rabbit IgG HRP-labelled (Pierce)를 이용하였다.

카토산의 보조제 효과 확인

카토산의 면역보강제로써의 효과를 검사하기 위하여 다음과 같은 면역실험을 실시하였다. 먼저 총 15마리의 6주령 ICR 마우스를 5개군으로 구분하고 아래 Table 2와 같은 방법으로 항원을 준비하였다.

항원접종은 피하주사로 실시하였으며 초회 접종 후 2주일 간격으로 2회 더 boosting을 실시하였다. 단, group 2의 boosting에서는 Freund's incomplete adjuvant를 이용하였다. 최종 접종 1주일 후 마우스를 희생하여 채혈하고 혈중 항-PM-N 항체가를 ELISA로 측정하여 OD값의 증감을 항체생성여부 및 보조제로써의 효과로 해석하였다. ELISA (Frey 등, 1998) 실시를 위해 먼저 96-well plate (Maxisorp™, Nunc)에 PM-N 항원을 coating (1μg/well/90μl)하고 1% skim milk가 함유된 PBS로 blocking 후 1차 항체와 2차 항체를 차례로 반응시켰다. 반응 후 발색을 위해 substrate solution (1-Step™ ABST, Pierce)를 첨가하였고 410nm에서 흡광도를 ELISA reader (Emax®, Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다. OD값 사이의 평균값 차이는 Student's t-test를 이용하여 검증하였다.

Table 3. Comparison antibody titers (OD values) induced by different methods

Group*	1	2	3	4	5
Mean	0.95	1.83	1.52	1.61	1.75
SE	0.04	0.07	0.04	0.03	0.04

*See footnote to Table 2.

결 과

키토산의 서방효과 확인

서방효과를 알아보기 위해 실시된 Western blot assay 결과, 키토산 resin이 함유되지 않은 대조군 (Group 1)에서는 접종 7일째 항원이 검출되지 않았으나 키토산 resin을 포함하여 접종을 실시한 실험군 (Group 2)에서는 3마리 중 2마리에서 Fig. 1과 같이 항원반응이 나타났다.

키토산의 보조제 효과 확인

키토산의 면역보강제로써의 효과를 검사하기 위해 실시한 ELISA 결과는 다음 Table 3과 같다.

위 결과를 one-way analysis of variance (ANOVA, Graphad)법인 Bonferroni multiple comparison test법으로 분석하여 각각의 group 사이에서 얻은 OD값의 결과에 대한 통계적 유의성 분석을 실시하였다. 그 결과는 다음 Table 4와 같다.

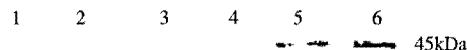


Fig. 1. The result of Western blot assay to detect the residual PM-N antigen 7 days after subcutaneous administration. Lane 1-3: group 1, lane 4-6: group 2 of Table 1. Expected bands (45kDa, PM-N) were found in 2 samples of group 2.

Table 4. The results of Bonferroni multile comparison test among 5 groups

Comparison between groups*	P-value
1 vs 2	< 0.001
1 vs 3	< 0.001
1 vs 4	< 0.001
1 vs 5	< 0.001
2 vs 3	< 0.01
2 vs 4	< 0.05
2 vs 5	> 0.05
3 vs 4	> 0.05
3 vs 5	< 0.05
4 vs 5	> 0.05

*See footnote to Table 2

고 찰

이 연구는 키토산 resin의 면역보강제로써의 효과를

검증하는 실험으로 실시되었다. 키토산 자체는 이미 많은 연구에서 면역보강제로써의 기능이 있음을 밝혀진 바 있다 (Bacon 등, 2000; van der Lubben 등, 2003). 위 연구 등에서 사용된 chitosan formulae는 접착성 수용액의 형태를 지닌 formulae인데 접막부착에 효능이 있고 구강경로나 호흡기 경로의 접막면역 증강에 효능이 있는 것으로 (Kim 등, 2007; McNeela 등, 2004) 나타났다. 하지만 수용액상의 formulae는 장시간 항원을 노출시키는 서방효과가 떨어져 이를 극복하기 위한 방법으로 resin-type formulae를 만들어 그 효과를 알아보고자 하였다. 마우스 피하에 동량의 항원을 투여한 실험 결과, 키토산 resin에 함유된 항원은 그 구조적 특징으로 인해 resin의 공포 안에 스며들어 접종 7일이 되어도 항원을 함유하는 것으로 나타나 서방효과가 있음을 보여주었다. 이는 항원노출의 회수를 줄이는 효과를 기대할 수 있어 주사형태의 백신 접종에서 오는 동물에 대한 심각한 스트레스를 줄일 수 있는 좋은 방법이라 할 수 있다.

키토산 resin의 보조제로써의 효과를 알아보기 위해 상업적으로 가장 많이 사용되는 보조제인 Freund's complete/incomplete adjuvant를 대조군으로 사용하여 실험을 실시한 결과, 표 4에서 보는 바와 같이 chitosan resin 첨가 group (3, 4, 5)들은 대조군(Group 1)에 비해 통계적으로 매우 유의성 있게($P < 0.001$) 높은 항체유도능을 보여 키토산 resin이 adjuvant로써 효과가 높음을 알 수 있었다. 한편 Freund's adjuvant를 사용한 양성대조군(Group 2)와 비교하여도 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않음으로써 양성대조군에 상응하는 보조제 효과가 있음을 알 수 있었다. 즉, chitosan을 면역보강제로 이용한다는 것은 통증과 염증 및 기타 많은 실험동물 윤리상의 문제점을 안고 있는 Freund's adjuvant (Projean 등, 2007)에 chitosan이 대용될 수 있음을 보여주는 결과이며 특히 기존 수용액상 형태의 formulae보다는 resin으로 사용할 경우 서방효과가 있어 더 효과적인 면역보강효과가 있다고 생각할 수 있었다.

키토산 resin의 농도별로의 결과만을 비교하면 최종 농도 0.5~2%(Group 3~5)간의 차이는 크지 않아 고농도의 키토산의 사용은 필요하지 않는 것으로 나타났다.

결 론

키토산의 서방효과 및 면역보강제로써의 효과를 알아보기 위해 실시한 실험 결과, 키토산 resin은 접종 후 7일 까지도 항원을 함유하면서 서서히 항원을 방출하는 서방효과가 있는 것으로 나타났고 면역보강제 효과도 양성대조군에 상응할 수준의 효과가 있는 것으로 나타나 키토산 resin의 재조합 백신 접종 시 운송매개로의 이용이 매우 기대되는 결과를 얻었다.

참 고 문 헌

- Bacon A, Makin J, Sizer PJ, Jabbal-Gill, Hinchcliffe M, Illum L, Chatfield S, Roberts M. 2000. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infect Immun* 68: 5764-5770.
- Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D. 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* 221: 35-41.
- Illum L, Farraj NF, Davis SS. 1994. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm Res* 11: 1186-1189.
- Illum L. 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* 15: 1326-1331.

- Kim TJ, Kim KH, Lee JI. 2007. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against recombinant transferrin-binding protein B of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Med Sci* 69: 535-539.
- McNeela EA, Jabbal-Gill I, Illum L, Pizza M, Rappuoli R, Podda A, Lewis DJ, Mills KH. 2004. Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans: enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan. *Vaccine* 22: 909-914.
- Mi FL, Shyu SS, Chen CT, Schoung JY. 1999. Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and *in vitro* release. *Biomaterials* 20: 1603-1612.
- Projean D, Lessard E, Ducharme MP, Ducharme J. 2007. Use of Freund's Complete Adjuvant (FCA) in inflammatory pain models: Consequences on the metabolism and pharmacokinetics of the non-peptidic delta receptor agonist SNC80 in the rat. *Xenobiotica* 37: 870-883.
- Seo JY, Pyo HJ, Lee SM, Lee JI, Kim TJ. 2009. Expression of 4 truncated fragments of *Pasteurella multocida* toxin and their immunogenicity. *Can J Vet Res* 73: 184-189.
- van der Lubben IM, Kersten G, Fretz MM, Beuvery C, Coos Verhoef J, Junginger HE. 2003. Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine* 21: 1400-1408.