

마우스의 항암 세포활성에 미치는 키토산의 효과

고신대학교 의과대학 미생물학교실, ¹소아과학교실, ²부산대학교 식품영양학과

정양숙 · 정현기¹ · 박건영² · 김광혁

Effects of Chitosan on Anti-tumor Cellular Activity in Mice

Yang Sook Chung, Hyun Kee Chung¹, Kun Young Park² and Kwang Hyuk Kim

Department of Microbiology, ¹Department of Pediatrics, Kosin Medical College,
Busan 602-702, Korea ²Department of Food Science and Nutrition,
Pusan National University, Busan 609-735, Korea

A main goal of cancer research is to completely prevent recurrence following surgery and to increase survival time. Cytotoxic anticancer chemotherapeutic agents generally produce severe side effects, while reducing host resistance to cancer and infections, especially through the destruction of lymphoid and bone marrow cells. In this study, we have investigated the effect of chitosan on lymphocyte proliferation, natural killer (NK) cell activity, and monocyte activity in mice. Mice splenocytes were incubated with chitosan and Concanavalin A to observe the effects on cell proliferation. The cytotoxic activities of NK cell and monocyte in chitosan-exposed mice were assayed by cytotoxicity against Yac-1 cells. We detected an increase of cell growth in splenocytes proliferation. The cytotoxic activities of NK cell and monocyte in chitosan-exposed mice were increased in comparison with control. Our results suggest that chitosan augments lymphocyte proliferation, and activation of NK cells and monocyte.

Key Words: Chitosan, Lymphocyte proliferation, NK, Monocyte

서 론

키토산은 갑각류 껍질 등에 존재하는 자연물질인 키틴이 탈 아세틸화되어 나타나는 양이온성의 다당류이다. 키틴은 게, 새우 등의 갑각류 껍질, 연체류의 껍질과 근육, 곤충류, 버섯류, 사상균의 세포벽 등에 존재하는 *N*-acetyl-*D*-glucosamine의

중합체이다. 키토산은 자연의 다른 다당류와 비교하였을 때 독성이 낮고 사람에게 자극적이거나 알러젠으로서 작용하지 않는다. 키토산은 여러 가지 유익한 효과를 발휘하고 있다. 즉, 항 캔디다 혹은 항 바이러스 활성을 통하여 상처 치유에 관계하는 것으로 보고되고 있으며 키토산 부유액이나 입자들은 면역학적 자극능을 발휘하여 대식세포나 다핵구 활성화와 축적, 암세포의 성장 억제,

미생물에 의한 감염에 대하여 저항성 항진, 사이토카인의 유도, 항체 반응의 증강, 지연형 과민반응의 증가, 세포독성 T 림프구의 반응을 항진시키는 등의 효과를 나타내고 있다.^{1~12)} 또한 근래에 키토산이 암 화학 요법제의 항암 활성을 증강시키거나 암 화학 요법제로 인한 부작용을 막을 가능성이 제기되고 있다.^{13~20)}

암 연구의 주된 목표는 외과적 치료를 통해서 재발을 완전히 막는 것과 생존 기간을 연장시키는 데 있다. 세포 독성을 나타내는 항암 화학 요법제는 일반적으로 극심한 부작용을 나타내어 환자의 림프 혹은 골수세포가 파괴당함으로서 암과 감염에 대한 저항력 저하를 보여주게 된다. 결과적으로 많은 암 환자들이 암 그 자체보다는 이차 질환인 폐렴, 패혈증, 요독증 등의 질환으로 사망한다. 대부분의 항암 화학 요법제는 암 환자의 생명을 연장시키는 데에 영향을 주지 못하는 유해한 부작용들을 나타내고 있다. 따라서 비 독성의 생물학적으로 적합한 새로운 항암제의 발견이 중요하다.

Suzuki 등²¹⁾은 키틴 유도체인 hexa-N-acetylchitohexose와 chitohexaose를 ddY마우스 정맥 내 투여하였을 시 마우스 sarcoma 180고형암세포의 성장에 각각 85%와 93%까지 억제됨을 발견하였다. Miwa 등²²⁾은 세포에 항암제인 paclitaxel (taxol)을 작용시킬 때 N-lauryl-carboxymethyl-chitosan (LCC)을 캐리어로 함께 작용시키면 taxol 단독일 때보다 세포 억제 활성면에서 더 효과적임을 관찰하여 LCC가 taxol의 캐리어로서 이용될 수 있음을 제의하였다. Shikata 등¹⁸⁾은 암 치료에 사용되는 gadolinium (Gd)을 L929마우스 섬유아세포에 작용시킬 때 키토산 소립자에 장전시켜 작용시키면 세포에 대한 억제력이 상승됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 암 조직에 Gd를 장시간 정체케 하여 암세포성장을 유의하게 억제시킬 것이라 하였다. Hasegawa 등¹³⁾은 키토산으로 처리된 암세포에서는 caspase-3와 유사한 활성이 올라가고 아포토시스의 특징인 핵산절편을 관찰하여 키토산이 암 치료에 유용하게 쓰일 수 있음을 제의한 바 있다.

본 연구에서는 키토산이 암세포에 미칠 수 있는 효과를 보기 위한 실험으로서 림프구에 대한 증식능, 세포성 면역에 관련을 갖는 natural killer

(NK)세포, 단구에 대한 활성 증강 효과의 변화를 관찰하여 암 치료에 키토산의 이용가능성을 타진코자 한다.

재료 및 방법

1) 연구재료

(1) 실험동물: 암컷 Balb/C 마우스로서 생후 8주 내외, 체중 25 g 내외의 것을 한국 효창 사이언스(대구)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

(2) 시약: 수용성 고분자 키토산(탈 아세틸화한 N-acetyl-D-glucosamine polymer, 평균분자량 200,000~1,000,000)은 우리 바이오텍사(포천, 경기)의 제품을 사용하였다.

2) 연구방법

(1) 림프구 세포 증식 효과: 마우스 비장세포 분리는 다음과 같이 시행하였다. 경부를 탈구하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하여 4°C의 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, Grand Island, NY, USA)으로 2회 세척하였다. 이를 직경 60 mm 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, MA, USA)에 옮기고 다시 신선한 HBSS를 가한 후 핀셋으로 가볍게 문질러 비장세포를 유리시켰다. 이 세포 부유액을 15 ml 원심관(Falcon, Oxnard, USA)에 옮긴 후 2~3분 동안 실온에 방치한 다음 세포 부유액의 상층액을 새로운 15 ml 원심관에 옮겼다. 이 세포를 200×g에서 5~10분 원침한 후 HBSS로 1회 원침 세척한 다음 증류수와 10배 농축 phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 혼입된 적혈구를 용해시킨 후 HBSS로 2회 원침 세척하여 사용하였다. 림프구에 대한 세포 증식 효과는 상기와 같이 준비된 비장세포(2×10^6 cells/ml)를 96 wells microplate에 100 μ l씩 분주하고 키토산액은 배양액 ml당 3, 10, 30 μ g씩 되게 적하하였다. Concanavalin A (Con A, Sigma, USA)의 농도는 ml 당 2 μ g이 되게 사용하였다. 분주가 완료된 plate는 5% CO₂, 37°C 그리고 충분한 습도가 유지되고 있는 배양기에 3일 동안 배양하였다. 3일 배양 후에 plate의 각 well에 MTT (PBS 1ml 당 5 mg의 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)액 10 μ l씩을 적하하고 4.5시간

추가 배양하였다. 시간이 경과된 후 10% SDS-0.02 M HCl액 25 μ l씩을 well에 적하하여 실온과 암실조건에서 하룻밤 방치하였다. Optical density (OD)는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

(2) 세포성 면역에 미치는 효과

① **자연 살해세포의 활성**; NK세포에 대한 표적 세포로서는 마우스 T lymphoma 유래 세포주인 Yac-1세포를 25 cm² 플라스틱 플라스크(Falcon, Oxnard, USA)에 10% 우태아혈청(fetal calf serum, FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 2 mM L-glutamine (Gibco, Grand Island, USA), 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml amphotericin B (Gibco, Grand Island, USA)를 포함시킨 RPMI 1640 배지(complete RPMI 1640)로 부유 배양시켜 유지시켰다. 작용자 세포는 다음과 같이 준비하였다. 연구방법 2)-(1)과 같이 준비된 세포에 포함되어 있는 플라스틱 부착성 세포를 제거하기 위하여 complete RPMI 1640배지에 부유시킨 다음 배양기에 1시간 동안 정지하였다. 시간이 경과된 후 비부착성세포만을 수거하였다. 수거된 세포를 4 \times 10⁶ 세포/ml로 세포 농도를 조절하여 사용하였다. 키토산액은 배양액 ml 당 3, 10, 30 μ g씩 되게 적하하였다. Effector/target cell ratio (E/T ratio)는 200 : 1로 하였다. 96 wells microplate를 사용하여 well당 표적세포를 1,000개씩 분주(50 μ l)한 다음 작용자세포를 중첩 분주(50 μ l)하였다. 대조군으로는 각 세포농도의 작용자 세포만의 배양, 표적세포만의 배양 그리고 배지만의 배양 well들을 준비하였다. 사용배지로는 complete RPMI 1640 배지에 2-mercaptoethanol, 10⁻⁵ M을 추가하여 사용하였다. 각각의 시험은 triplicate로 시행하였다. 분주가 완료된 plate는 5% CO₂, 37°C 그리고 충분한 습도가 유지되고 있는 배양기에 4일 동안 배양하였다. 4일 배양 후에는 실험방법 2)-(1)의 MTT시험법에 준하여 OD를 540 nm에서 측정하였다. OD에서 나타난 수치에서 % dead cell (% D)은 다음과 같은 식으로부터 산출되었다.

$$\% D = \left(1 - \frac{OD_{effector+target} - OD_{effector}}{OD_{target} - OD_{blank}}\right) \times 100$$

In vivo 실험으로서는 마우스 정맥 내로 키토산

을 500 μ g 투여한 후 24시간이 경과된 다음 비장 세포를 분리하여 시험하였으며 방법은 전과 동일하였다.

② **단핵구의 활성**; 실험 (2)-①에서와 같이 표적 세포를 준비하였고 작용자 세포는 비장세포 중 플라스틱 용기에 부착된 세포만을 수거하여 사용하였다. Effector/target cell ratio (E/T ratio)는 200 : 1로 하였다. 96 wells microplate를 사용하여 well당 표적 세포를 1,000개씩 분주(50 μ l)한 다음 작용자 세포를 중첩 분주(50 μ l)하였다. 대조군으로는 각 세포농도의 작용자 세포만의 배양, 표적 세포만의 배양 그리고 배지만의 배양 well들을 준비하였다. 사용배지로는 complete RPMI 1640배지에 2-mercaptoethanol, 10⁻⁵ M을 추가하여 사용하였다. 각각의 시험은 triplicate로 시행하였다. 배양조건 및 결과관찰은 실험방법 (2)-①과 같이 시행하여 OD에서 나타난 수치로부터 % dead cell (% D)을 산출하였다. *In vivo* 실험으로서는 마우스 정맥 내로 키토산을 500 μ g 투여한 후 24시간이 경과된 다음 비장세포를 분리하여 시험하였으며 방법은 전과 동일하였다.

③ **통계학적 분석**: 실험성적은 평균 또는 평균 \pm 표준편차로 나타냈으며 각 군 간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하고 p값이 0.05 미만일 때 유의 있는 차로 간주하였다.

결 과

1) 림프구 세포 증식 효과

정상마우스 비장세포에 키토산만을 노출시켰을 때 림프구의 증식은 PBS 노출군인 대조군에 비하여 약간의 감소를 보였다. 즉, 대조군에서의 OD가 3.28을 나타낼 때 키토산 3 μ g 노출의 경우 3.19, 10 μ g에서는 3.06, 30 μ g에서는 3.00을 보여 약간의 감소를 나타냈다. 그러나 세포자극물인 Con A 노출군에 키토산을 작용시켰을 때는 림프구의 증식이 증가하였다. 즉, Con A만을 작용시킨 시험 군에서 5.00을 나타낼 때 키토산을 3, 10, 30 μ g을 추가하여 작용시키면 5.19, 5.15, 5.33으로 증가하였으며 3, 30 μ g에서 유의성을 나타냈다(P < 0.01)(Table 1).

Table 1. Effect of chitosan on the Con A-induced proliferation of mouse splenocytes

Agents	Optical density (540 nm)×10
Chitosan, 3μg	3.19±0.04
Chitosan, 10μg	3.06±0.04
Chitosan, 30μg	3.00±0.05
Con A, 2μg+Chitosan, 3μg	5.19±0.11*
Con A, 2μg+Chitosan, 10μg	5.15±0.17
Con A, 2μg+Chitosan, 30μg	5.33±0.04*
Con A, 2μg	5.00±0.03
Control	3.28±0.16

Mouse splenocytes were exposed with Concanavalin A (Con A), Con A+chitosan, and PBS (control) each for 72 hr. Proliferation was determined as described in materials and methods. Data are mean±SD. *p<0.01 compared to Con A group

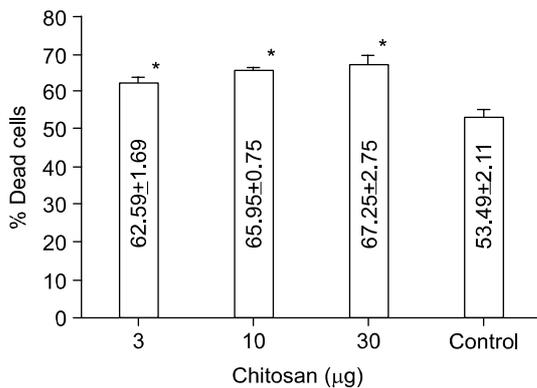


Fig. 1. NK cell mediated cytotoxicity in chitosan-exposed effector cells at the effector/target cell ratio of 200/1. Values are given as the mean±SD of triplicate cultures of one representative experiment. *p<0.01 compared to corresponding control (PBS alone).

2) In vitro 시료 노출에 따른 마우스 NK세포 활성화

정상마우스 비장세포에 존재하는 NK세포에 키토산을 노출시켰을 때 NK세포활성은 비 노출군인 대조군에 비하여 증가를 보임으로서 *in vitro*에서 시료 노출에 의한 NK세포 활성화 증강을 나타냈다. 즉, NK세포 활성화는 200/1의 E/T ratio에서 ml

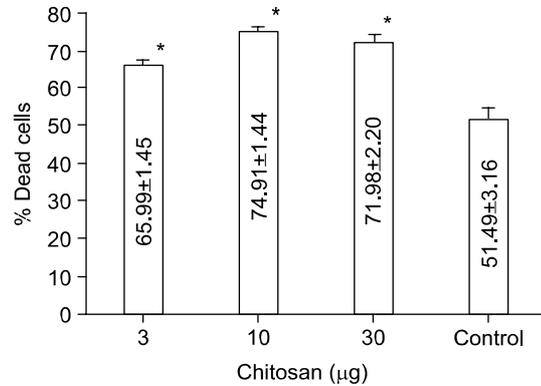


Fig. 2. Adherent splenocytes mediated cytotoxicity in chitosan-exposed effector cells at the effector/target cell ratio of 200/1. Values are given as the mean±SD of triplicate cultures of one representative experiment. *p<0.01 compared to corresponding control (PBS alone).

당 시료를 3, 10, 30μg 작용시켰을 때 각각 62.59, 65.95, 67.25%를 나타낸 반면 대조군에서는 53.49%를 나타냄으로서 모든 군에서 유의한 상승효과를 보였다(p<0.01)(Fig. 1).

3) In vitro 시료 노출에 따른 마우스 단구세포 활성화

정상마우스 비장세포 내에 존재하는 단구에 키토산을 노출시킨 후 나타나는 단구세포 활성화는 비 노출군인 대조군에 비하여 증가를 보임으로서 *in vitro*에서의 시료 노출에 의한 단구세포 활성화의 증가를 나타냈다. 즉, 단구세포활성은 200/1의 E/T ratio에서 ml당 시료를 3, 10, 30μg 작용시켰을 때 각각 65.99, 74.91, 71.98%를 나타낸 반면 대조군에서는 51.49%를 나타냄으로서 10μg 노출군에서 가장 높게 나타났고 모든 군에서 유의한 상승효과를 보였다(p<0.01)(Fig. 2).

4) In vivo 시료 노출에 따른 마우스 NK세포 활성화

정상마우스 복강 내로 키토산을 투여한 후 분리한 비장세포에 존재하는 NK세포 활성화는 비 노출군인 대조군에 비하여 증가를 보임으로서 *in vivo*에서의 시료노출에 의한 NK세포 활성화의 증가를 나타냈다. 즉, NK세포 활성화는 200/1의 E/T ratio에

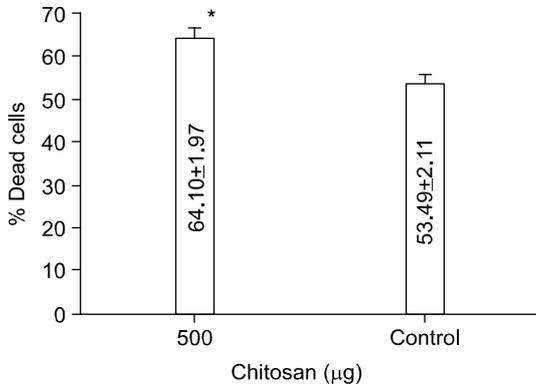


Fig. 3. NK cell mediated cytotoxicity in chitosan-injected mice at the effector/target cell ratio of 200/1. Values are given as the mean±SD of triplicate cultures of one representative experiment. *p<0.01 compared to corresponding control (PBS alone).

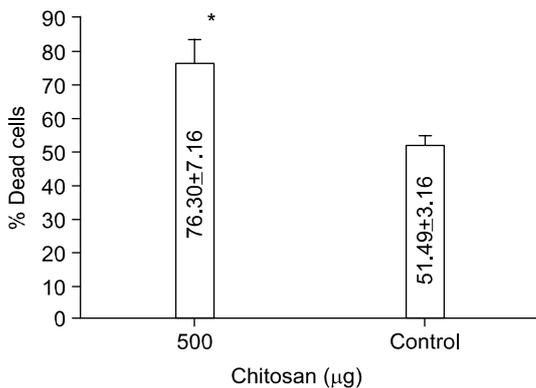


Fig. 4. Adherent splenocytes mediated cytotoxicity in chitosan-injected mice at the effector/target cell ratio of 200/1. Values are given as the mean±SD of triplicate cultures of one representative experiment. *p<0.01 compared to corresponding control (PBS alone).

서 마우스 당 시료를 500µg 작용시켰을 때 64.10%를 나타낸 반면 대조군에서는 53.49%를 나타냄으로서 유의한 상승효과를 보였다(p<0.01)(Fig. 3).

5) In vivo 시료 노출에 따른 마우스 단구세포 활성화

정상마우스 복강 내로 키토산을 투여한 후 분리한 비장세포에 존재하는 단구세포 활성화는 비노출군인 대조군에 비하여 증가를 보임으로서 in

vivo에서 시료노출에 의한 단구세포 활성화의 증가를 나타냈다. 즉, 단구세포 활성화는 200/1의 E/T ratio에서 마우스 당 시료를 500µg 작용시켰을 때 76.30%를 나타낸 반면 대조군에서는 51.49%를 나타냄으로서 유의한 상승효과를 보였다(P<0.01)(Fig. 4).

고 찰

보조식품으로서 키토산은 지질과 결합할 수 있는 능력 때문에 장내에서 지질의 흡수를 낮추고 혈장 콜레스테롤과 중성지질을 줄이는 장점이 있는 반면 혈장 내 비타민 E의 수준을 낮춘다.²³⁾ 또한 식이 키토산이 항 세균 혹은 항 이스트의 작용을 나타냄으로서 상처에서 감염을 막지만 오랜 기간의 섭취는 장내 정상 세균 층에 변화를 줌으로서 저항성 병원체의 성장에 영향을 끼칠 가능성이 있다.

Marcinkiewicz 등²⁴⁾은 물에 불용성인 키토산의 아뉴반트 활성을 본 실험에서 마우스에 키토산을 주사함으로써 면역 적혈구에 대한 T-의존성 체액 면역반응이 증가되었다고 보고하였다. 본 실험에서도 일차적으로 키토산이 림프구세포 증식에 미치는 효과를 보기 위하여 마우스 비장세포에 키토산만을 작용시켰을 경우는 오히려 세포의 증식을 저해하는 효과를 발휘했지만 Con A와 함께 작용시키면 Con A 단독처리 때보다 증가하는 것을 알 수 있다. 이는 Con A의 세포 자극 능력을 돕고 있음을 의미한다. 이러한 돕는 작용은 소량으로서도 가능한 것으로 보인다(Table 1).

다공성의 탈 아세틸화한 키틴 입자가 마우스 복강 큰포식세포(대식세포)의 세포독성 활성화의 증가와 큰포식세포, 비장세포, 골수세포 등에서 콜로니 자극인자의 생성이 증강됨을 Nishimura 등²⁵⁾이 관찰하였으며 Peluso 등³⁾은 키토산이 랫드 큰포식세포에서 nitric oxide의 생성과 화학주성의 증가를, van der Lubben 등²⁶⁾은 점막을 통한 예방 접종에서 키토산에 의한 면역 반응 증강 효과를 보고한 바 있다. 본 실험에서는 암 면역에서 최일선을 맡고 있는 NK세포가 키토산과 같은 물질에 노출되었을 때 그 활성화에 미치는 정도를 알아보려고 하였다. 시험관 내에서 투여량에 의존적으로 NK활성이 증가함으로써 키토산 단독으로도

그 활성화에 영향을 미칠 수 있음을 보여줬다(Fig. 1). 단구세포의 세포독성에 미치는 키토산의 작용을 보기 위하여 시험관 내에서 키토산의 농도를 증가시켰을 때 단구 세포독성이 증가하였지만 고농도에서는 오히려 그 활성이 감소하였다(Fig. 2). 마우스 생체 내에 키토산을 투여한 후 분리된 NK 세포의 활성 또한 대조군에 비하여 유의한 활성을 나타냈다(Fig. 3). 마우스 생체 내에 키토산을 투여한 후 분리된 단구세포의 세포독성 또한 유의하게 증가하였지만 그 증가폭은 NK세포 경우보다 높게 나타났다(Fig. 4). 이와 같이 키토산은 세포성 면역에서 NK세포보다는 단구세포에서 그 활성화에 기여하는 바가 크다고 볼 수 있겠다.

요 약

본 연구에서는 키토산이 암세포에 미치는 효과를 보기 위하여 림프구에 대한 증식능, 세포성 면역에 미치는 효과를 보기 위한 NK, 단핵구에 대한 활성 증강 효과의 변화를 관찰하여 암 치료에 이용 가능성을 타진코자 하였다.

세포 자극제인 Con A 노출군들에서 키토산에 의하여 비장세포가 더욱 증식됨으로서 림프구 증식 효과가 있음을 알 수 있다. 키토산을 노출시킨 마우스에서 NK세포와 단구세포 활성이 증가됨은 세포성 면역 활성화에도 기여할 것으로 보인다. 따라서 이러한 결과들은 앞으로의 추가적인 연구 결과들이 있게 되면 임상에서 암 치료에 키토산의 이용가능성을 시사한다 하겠다.

감사의 글

본 연구를 수행함에 있어 2001년 고신대학교 의학부 연구비의 일부 지원이 있었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1) Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Tokura S, Azuma I. Effect of chitin heparinoids on the activation of peritoneal macrophages and on the production of monokines in mice. *Mol Biother* 1990; 2: 115-120.

2) Usami Y, Okamoto Y, Minami S, Matsuhashi A, Kumazawa NH, Tanioka S, Shigemasa Y. Chitin and chitosan induce migration of bovine polymorphonuclear cells. *J Vet Med Sci* 1994; 56: 761-762.

3) Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosio L, Calabro D, Avallone B, Balsamo G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 1994; 15: 1215-1220.

4) Kosaka T, Kaneko Y, Nakada Y, Matsuura M, Tanaka S. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 963-996.

5) Kas HS. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsul* 1997; 14: 689-711.

6) Takashi M, Masahiro O, Mitsunobu M, Keisuke U, Seiichi T, Yoshiharu O, Sabro M, Toru F. Effect of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 1997; 18: 947-951.

7) Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials* 2001; 22: 2959-2966.

8) Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulation and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52: 105-115.

9) Seferian PG, Martinez ML. Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine* 2001; 19: 661-668.

10) Westerink MAJ, Smithson SL, Srivastava N, Blonder J, Coeshott C, Rosenthal GJ. ProJuvant (Pluronic F127/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. *Vaccine* 2002; 20: 711-723.

11) Iqbal M, Lin W, Jabbal-Gill I, Davis SS, Steward MW, Illum L. Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. Article in press. 2002; *Vaccine* 2002; 3585: 1-8.

12) Van der Lubben IM, Kersten G, Fretz MM, Beuvery C, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. Articles in press. *Vaccine* 2002; 3600: 1-9.

13) Hasegawa M, Yagi K, Iwakawa S, Hirai M. Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 459-466.

- 14) Pae HO, Seo WG, Kim NY, Oh GS, Kim GE, Kim YH, Kwak HJ, Yun YG, Jun CD, Chung HT. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leuk Res* 2001; 25: 339-346.
 - 15) Mitra S, Gaur U, Ghosh PC, Maitra AN. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J Cont Rel* 2001; 74: 317-323.
 - 16) Kato Y, Onishi H, Machida Y. Lactosaminated and intact N-succinyl-chitosans as drug carriers in liver metastasis. *Int J Pharm* 2001; 226: 93-106.
 - 17) Kimura Y, Sawai N, Okuda H. Antitumor activity and adverse reactions of combined treatment with chitosan and doxorubicin in tumor-bearing mice. *J Pharmacol* 2001; 53: 1373-1378.
 - 18) Shikata F, Tokumitsu H, Ichikawa H, Fukumori Y. *In vitro* cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53: 57-63.
 - 19) Eroglu M, Irmak S, Acar A, Denkbaz EB. Design and evaluation of a mucoadhesive therapeutic agent delivery system for postoperative chemotherapy in superficial bladder cancer. *Int J Pharm* 2002; 235: 51-59.
 - 20) Kato Y, Onishi H, Machida Y. Efficacy of lactosaminated and intact N-succinyl-chitosan-mitomycin C conjugates against M5076 liver metastatic cancer. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 529-537.
 - 21) Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, Suzuki M. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose. *Carbohydr Res* 1986; 151: 403-408.
 - 22) Miwa A, Ishibe A, Nakano M, Yamahira T, Itai S, Jinno S, Kawahara H. Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. *Pharm Res* 1998; 15: 1844-1850.
 - 23) Koide SS. Chitin-chitosan: properties, benefits, and risks. *Nutrition Res* 1998; 18: 1091-1101.
 - 24) Marcinkiewicz J, Polewska A, Knapczyk J. Immunoadjuvant properties of chitosan. *Arch Immunol Ther* 1991; 39: 127-132.
 - 25) Nishimura K, Nishimura S, Seo H, Nishi N, Tokura S, Azuma I. Effect of multispheres derived from chitin and partially deacetylated chitin on the activation of mouse peritoneal macrophages. *Vaccine* 1987; 5: 136-140.
 - 26) Van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Del Rev* 2001; 52: 139-144.
-