

흰쥐 악성 뇌종양 모델에서
Holmium-166 chitosan 복합체의
치료효과

연세대학교 대학원
의과학사업단
허 룡

흰쥐 악성 뇌종양 모델에서
Holmium-166 chitosan 복합체의
치료효과

지도 박용구 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

허 룡

허 룡의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

의학자의 공통 숙제인 암 정복 사업의 일환에 참여하여 이 연구를 마치고 논문으로 완성된 데 대하여 영광으로 생각하며 무한한 감사를 드립니다. 이 연구가 악성 뇌종양이 정복될 수 있다는 방법을 제시함으로써 암 정복이 멀지 않았다는 희망을 가질 수 있었다고 봅니다.

연구 과정 내내 애정과 관심으로 이끌어 주신 박용구 교수님, 장진우 교수님께 감사드립니다. 바쁘신 중에도 자상하게 자문에 응해주신 김태승 교수님, 조경기 교수님, 이종두 교수님께도 큰 감사를 드립니다. 오늘날 의학을 가르치고 연구할 수 있도록 지도하여 주시고 배려해 주신 정상섭 교수님, 김영수 교수님, 최중언 교수님께도 영광과 감사를 올립니다. 특별히 이 논문이 완성될 때까지 실험과 연구에 시종일관 참여하여 큰 도움을 주신 임상연구동 전기생리학실 조윤희 선생님과 논문 완성에 많은 조언과 도움을 주신 안희정 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

부족하기만 한 저를 한 명의 신경외과의의로 이끌어 주시고 무궁한 사랑으로 감싸주신 아버지 허곤 박사님과 자애와 기도로 저의 곳곳한 버팀목이 되어 주신 어머니 최순옥 여사님께 무한한 감사를 드립니다.

늦은 나이까지 공부할 수 있도록 물심양면으로 도와주신 사랑하는 내 가족들께 머리 숙여 감사드립니다.

끝으로 사랑하는 저의 아내 은영과 딸 미에게 이 논문을 바침으로써 제 사랑과 감사를 표하고자 합니다. 감사합니다.

저 자 씬

차 례

국문요약	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	3
1. 종양세포의 배양	3
2. 종양 세포 이식 및 holmium-166 chitosan complex의 주입	3
3. 조직준비	4
4. 이식세포 및 Ho-166 chitosan 복합체 주입 효과의 계량화	4
5. TUNEL 염색	4
6. 면역조직 화학 염색	5
III. 결 과	5
1. Ho-166 chitosan 복합체 투여 후 종양의 크기 변화와 생존율	5
2. 병리 조직학적 소견 비교	8
가. H-E 염색 소견	8
나. TUNEL 염색 결과	8
다. 면역조직 화학 염색 소견	10
IV. 고 찰	11
V. 결 론	14
참고문헌	14
영문요약	17

그림 차례

그림 1. 각 군별 육안 소견	6
그림 2. 각 군별 종양 용적의 비교	7
그림 3. 각 군별 생존 곡선	7
그림 4. H&E 염색 소견	8
그림 5. TUNEL 염색 소견	9
그림 6. TUNEL 염색 양성률 비교	9
그림 7. Bax 염색 결과	10
그림 8. Bcl-2 염색 결과	10

표 차례

표 1. 각 군별 종양 용적	6
표 2. 각 군별 TUNEL 염색 양성 세포 백분율	9

흰쥐 악성 뇌종양모델에서 Holmium-166 chitosan 복합체의 치료효과

본 연구는 임상에서 악성 뇌종양 환자에 Holmium-166 chitosan (Ho-166 chitosan) 복합체를 투여하여 치료하는 전 단계로서 흰쥐 악성 뇌교종 모델에 Ho-166 chitosan 복합체를 투여하여 흰쥐 악성 뇌 교종에 대한 파괴 효과와 생존율 연장 효과 등을 파악함으로써 치료 효과를 알아보고자 한다. 또한 적정 약물 용량을 파악하고 과용량 투여 시 합병증 등을 파악하고자 한다.

배양된 5 μ l, 100,000개의 C6 신경교종 세포를 40마리의 200~250 그램의 Wistar rat 피각 부를 목표로 이식한 후 5일째 Ho-166 chitosan 복합체를 종양세포 이식부위와 동일한 부위에 10 μ l의 100 μ Ci, 5 μ l의 50 μ Ci, 1 μ l의 10 μ Ci 및 생리식염수 5 μ l를 군별로 주입하였다. 이를 각 군당 10마리씩 나누어 생리 식염수 5 μ l를 투여한 대조군, Ho-166 chitosan 복합체 10 μ l의 100 μ Ci을 투여한 군(1군), 5 μ l의 50 μ Ci을 투여한 군(2군), 1 μ l의 10 μ Ci을 투여한 군(3군) 등의 총 4개 군으로 실험을 시행하였다. 각 군당 5마리씩은 생존율 산출을 위해 조직 표본을 얻지 않고 사망할 때까지 추적 관찰하였다. 헤마톡실린-에오신(H&E staining) 방법을 사용하여 종양 부위에 대한 Ho-166 chitosan 복합체의 침투된 정도를 알아보았다. Transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling (TUNEL)염색과 Bax 항체와 Bcl-2 항체를 이용하여 면역 조직화학 염색을 시행하여 잔존 종양 세포의 괴사와 세포고사를 알아보았다.

대조군 종양의 용적은 평균 1.385 mm³, 제 1군의 종양 용적은 평균 0.036 mm³, 제 2군의 종양 용적은 평균 0.104 mm³, 제 3군의 종양 용적은 평균 0.111 mm³이었다. 대조군 종양의 용적에 대한 백분율은 제 1군은 97.4%, 제 2군은 92.5%, 제 3군은 91.9%의 용적 감소율을 나타냈다. 제 1군은 투여 중심부가 광범위하게 파괴되는 공동 현상(空洞 現象)이 발생하였다. Kaplan-Meier 생존 곡선은 제 2군이 가장 길었고 그 다음으로 제 3군, 제 1군, 대조군의 순서로 나타났다. 각 군의 평균 생존 기간은 대조군 22.8일, 제 3군 59일, 제 2군 60일, 제 1군 44.6일로 산출되었다. H-E 염색 소견 상 제 2군에서 가장 안정적인 종양 파괴 효과가 관찰되었다. TUNEL 염색소견과 면역 염색 조직화학 소견 상 세포고사를 시사하는 소견이 관찰되었다.

Ho-166 chitosan 복합체는 악성 뇌 교종 세포를 파괴하는 효과가 있으며 그 파괴 효과는 Ho-166 chitosan 복합체 용량에 비례하지만 과량(100 μ Ci)을 투여하였을 때는 정상 조직까지도 과급되는 부작용이 일어나는 것을 알 수 있었다. 또한 뇌 교종을 파괴하고 성장을 정지 시킴으로써 탁월하게 생명을 연장시키는 효과를 나타냈다. 그러나 과량(100 μ Ci)을 투여하였을 때 생명 연장 효과가 크지 않았다.

이상과 같은 실험 결과로 Ho-166 chitosan 복합체는 악성 뇌교종 치료의 부가적 치료의 한 방안이 될 수 있으며 앞으로 그 적정 용량에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

핵심되는 말: Holmium-166 chitosan 복합체, 악성 뇌 교종, 근접치료, 치료효과

흰쥐 악성 뇌종양모델에서 **Holmium-166** **chitosan** 복합체의 치료효과

<지도 박 용 구 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

허 룡

I. 서 론

뇌에 발생하는 악성 신경교종은 주변 조직에 침습적이어서 개두술에 의한 단순 종양 적출술만으로 종양을 완치할 수 없고 더욱이 항암요법과 방사선치료법에도 반응이 적어 이러한 치료법이 단지 생명 연장의 보조적인 치료 역할 밖에 못하는 상황이다. 특히 악성 신경교종은 현대의학의 발달에도 불구하고 아직까지도 수술, 화학요법, 방사선 치료 요법 등과 최근의 면역 요법과 유전자 치료 요법까지의 모든 치료방법으로 종양의 성장을 효과적으로 억제 및 제어할 수가 없다.^{1,3}

그나마 일시적인 효과가 있는 것이 방사선 치료법이다. 방사선 치료는 외부 방사선 치료를 분할하여 사용하는 방법이 가장 널리 이용되었으며 근래에는 선형 가속기(linear accelerator) 혹은 감마나이프(Gamma knife)를 이용한 방사선 수술이 시도되고 있다. 방사선 수술은 병소가 작거나 양성인 경우에는 일차적인 치료 방법으로 시도될 수 있지만, 병소가 크거나 악성인 경우에는 외부 방사선치료 후 종양부위에만 선량 증가의 목적으로 병용된다. 그러나 이러한 방사선 치료법들은 모두 주변 정상 조직에 조사되어 방사선 괴사와, 이로 인하여 야기되는 뇌부종 등 각종 부작용을 흔히 일으킨다. 이러한 부작용은 환자의 신경학적 증상을 악화시켜 환자의 남은 여생동안 정상적인 생활을 방해하며 심한 경우 환자를 사망에 이르게 하기도 한다.^{4,7}

악성뇌종양에 대한 뇌종양의 방사선 치료의 부작용을 줄이고 치료효과를 높이기 위해서는 종양 부위에만 국한되게 방사선을 조사하는 것이 바람직하다고 할 수 있고, 이러한 방편으로 이용될 수 있는 치료법으로 조직 내에서 투과력이 약한 방사선을 이용하는 방법이 있다. 투과력이 약한 방사선을 이용시 동위원소를 종양 조직내로 삽입하여야 하며 이러한 방법이 irridium-192, palladium-103, iodine-125 등의 동위원소를 이용한 근접치료방법 (brachytherapy)이다.⁸⁻¹⁰ 그러나 뇌종양의 근접 치료는 방사선 동위원소를 일정 기간 동안 삽입

고정시킨 후 다시 제거하는 방법으로 수술 과정이 복잡하고 감염, 출혈, 종양의 전이 등의 합병증의 발생가능성이 높은 단점들이 있다.^{11,12} 따라서 이러한 단점을 보완하기 위해서는 액체상태로 주입한 후 조직 내에 침투되어 일정 시간 후 교질화되어 침투가 멎는 동위원소가 이상적이다.

최근 원자력연구소에서 개발되어 임상에서 피부암, 간암, 유방암 등의¹³⁻¹⁶ 치료에 이용되고 있는 chitosan과 혼합된 Holmium-166 complex (Ho-166 chitosan 복합체)가 이러한 성질을 가지고 있으며 뇌신경 교종의 치료에도 시도될 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 임상에서 악성 뇌종양 환자에게 시도하기 위한 전단계로써, chitosan과 혼합된 Holmium-166가 흰쥐 악성 뇌종양을 파괴하고 성장 억제에 미치는 영향을 확인하려한다. 일차적으로 정상 흰쥐 뇌 조직과 C6 신경 교종 세포주를 이중 이식한 흰쥐 뇌 조직의 반응을 비교 연구하고 이와 동시에 흰쥐 종양 모형의 생존율을 확인하고자 한다.^{17,18} 또한, transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling (TUNEL)염색, Bcl-2와 Bax 염색 등의 면역조직 화학 염색을 이용하여 잔존 종양세포에서의 세포고사와 괴사의 진행 과정을 알아보하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 종양세포의 배양

C6 신경교종 세포주를 10% bovine serum (HyClone; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 추가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Pharmacia, Peapack, NJ, USA)에서 배양했다. 모든 배양물에는 50µg/ml당 2 mM L-glutamine과 gentamycin이 포함되었다. 모든 세포들은 5% CO₂/95% air, 섭씨 37도에서 배양하였다. 유착시킨 세포들은 흰쥐에 이식하기 전에 DMEM에서 트립신화시켰다.

2. 종양 세포 이식 및 Holmium-166 chitosan complex의 주입

Ketamine (75 mg/kg), acepromazine (0.75 mg/kg), 그리고 rompun (4 mg/kg)를 이용하여 흰쥐를 마취하였고 종양 세포는 30 gauge의 바늘을 가진 Hamilton syringe (Fischer Scientific, Tustin, CA, USA)를 이용해서 두개내에 주입하였다. 주입을 위한 목표 좌표는 bregma를 기준으로 좌측 2.5 mm, 경막에서 5.5 mm 깊이였다. 총 이식하는 C6 신경교종 세포의 수는 5µl, 100,000개로, 주사침은 5분간 주입 후 누설을 방지하기 위해서 4분간 제 위치에 그대로 둔 후 1분간 걸쳐 서서히 제거하였다.

종양 세포 이식 5일 후 Ho-166 chitosan 복합체를 종양세포 이식부위와 동일한 부위에 종양세포 이식할 때와 같이 Hamilton syringe를 이용하여 10µl의 100µCi, 5µl의 50µCi, 1µl의 10µCi 및 생리 식염수 5µl를 군별로 주입하였다.

배양된 종양 세포는 모두 40마리의 200~250 gram의 Wistar rat에 이식되었다. 이를 각 군당 10마리씩 나누어 생리 식염수 5 μ l를 투여한 대조군, Ho-166 chitosan 복합체 10 μ l의 100 μ Ci을 투여한 군(이후 1군), 5 μ l의 50 μ Ci을 투여한 군(이후 2군), 1 μ l의 10 μ Ci을 투여한 군(이후 3군) 등의 4개 군으로 실험을 시행하였다.

각 군당 5마리씩은 생존을 산출을 위해 조직 표본을 얻지 않고 사망할 때까지 추적 관찰하였다.

3. 조직준비

쥐들을 에테르로 마취시키고, 흉부 절제 후에 우심방을 절개하고 cannula를 좌심실로 삽관한 후에, pH 7.4인 10 mM의 phosphate buffer에 섞은 120 mM NaCl/2.7 mM KCL와 3.7% paraformaldehyde를 사용하여 환류시켰다. 뇌는 동일한 고정액에 30분 동안 담가두고, 30% sucrose phosphate-buffered saline (PBS)에서 저온처리해서 dry ice로 동결시켰다. 조직절편은 12 μ m 두께로 절편내어서 chrome alum/gelatin으로 코팅한 slide 위에 올려놓았다.

4. 이식세포 및 Ho-166 chitosan 복합체 주입 효과의 계량화

종양부위의 cross-sectional 면적과 종양 절편당 이식된 세포수는 Microcomputer Imaging Device를 이용하여 영상분석으로 계량화했다. 전체 종양 용적에 대한 추정치는 최대 횡단면의 종양면적으로부터 유도했다. 이때 종양 부위에 대한 Ho-166 chitosan 복합체의 침투된 정도는 조직 검사를 통하여 알아볼 수 있었는데, 헤마톡실린-에오신(H&E staining)방법을 사용하여 조직을 염색하고 현미경을 이용하여 관찰하였다.

5. TUNEL 염색

파라핀에 포매되어 있는 Ho-166 chitosan 복합체에 의해 손상을 받은 뇌종양 흰쥐 모형의 뇌 조직을 4 mm의 두께로 자른 다음 조직 슬라이드에 올려 놓고 실온에서 건조시킨 후, xylene처리를 하여 탈파라핀 과정을 거쳤다. Proteinase K (DAKO Corp., CA, USA)를 조직 위에 떨어뜨리고 실온에서 반응시켜 proteolytic digestion을 통해 고정 중에 덮여진 표적 부위를 노출시켰다. 조직 슬라이드를 3% hydrogen peroxide in PBS에 실온에서 5분간 담귀 endogenous peroxidase의 작용을 막은 후 생리 식염수로 세척하였다. 이후 과정은 kit (ApopTag Peroxidase kit, Intergen Co., NY, USA)를 사용하여 염색하였다. 즉, equilibration buffer를 조직이 덮일 정도로 슬라이드에 떨어뜨려 실온에서 반응시킨 다음 가볍게 털어내고 반응 완충제와 TdT 효소를 7 : 3으로 혼합하여 제조한 working strength TdT 효소를 가한 후 37°C humidified chamber에서 1시간 동안 배양하였다. 1시간 배양한 조직 슬라이드를 stop/wash buffer에 담근 후 약간 흔들어 주며 실온에서 10분간 배양하였다. 그 후 생리 식염수로 세척하고 anti-digoxigenin peroxidase conjugate를 슬라이드에 도포한 뒤 실온의 hu-

modified chamber에서 30분간 배양하였다. 생리 식염수로 씻어낸 후 DAB 용액으로 실온에서 발색시켰다.

손상 조직 내에서 TUNEL에 대한 염색이 가장 많이 일어난 부위를 중심으로 하여 200배의 현미경하에서 염색된 세포의 수를 측정하였다.

6. 면역조직 화학 염색

파라핀에 고정된 뇌조직에, Bcl-2 family 중에서 세포 고사를 촉진하는 것으로 알려진 Bax의 항체(Polyclonal rabbit anti-mouse/rat Bax antibody, PharMingen Co., CA, USA)와 세포 고사를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2의 항체(Polyclonal rabbit anti-rat/mouse Bcl-2 antibody, Pharmingen Co., CA, USA)를 이용하여 면역 조직화학적 염색을 시행하였고, biotin이 결합된 제2 항체와 반응시킨 후에 발색시켰다.

즉, 파라핀에 고정되어 있는 뇌종양 모형의 뇌 조직을 4 mm의 두께로 자른 다음 조직 슬라이드 위에 놓아 실온에서 건조시킨 후, xylene처리를 하여 탈파라핀 과정을 거치고 여러 단계의 알코올로 처리하여 수화과정을 거친 뒤 3% hydrogen peroxide에 조직을 담가 5분간 배양한 후 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 담가 씻어내었다. 일차 항체(anti-Bcl-2 Ab, anti-Bax Ab)를 조직에 도포하고 실온에서 30분, 4°C에서 철야로 배양한 후 PBS로 세척하였다.

PBS로 씻은 후 kit (DAKO LSAB kit, DAKO Corp., CA, USA)의 biotinylated anti-rabbit/anti-mouse immunoglobulins을 도포하여 10분간 배양하였다. PBS로 세척한 후 streptavidin peroxidase를 도포한 후 10분간 배양하였다. PBS로 씻어낸 후 DAB (3,3-diaminobenzidine, DAKO Corp., CA, USA) 용액을 도포하여 발색시켰다.

뇌종양 조직 내에서 Bcl-2나 Bax에 대한 염색이 가장 많이 일어난 부위를 중심으로 하여 200배의 현미경하에서 관찰하였다.

III. 결 과

1. Ho-166 chitosan 복합체 투여 후 종양의 크기 변화와 생존율

배양된 종양 세포를 이식한 후 5일째 Ho-166 chitosan 복합체를 10 μ l의 100 μ Ci, 5 μ l의 50 μ Ci, 1 μ l의 10 μ Ci 및 PBS 5 μ l를 각 각의 군에 투여한 뒤 다시 5일 후 각각 4마리씩을 희생 시켜 뇌 조직 표본을 얻었고 모든 조직에서 종양의 이식이 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다(그림 1). 종양의 크기(mm³)는 $4/3\pi \times$ 가로(a, μ m) \times 세로(b, μ m) \times 깊이(c, μ m)의 공식으로 산출하였다. 대조군 종양의 용적은 평균 1.385 mm³, 1군의 종양 용적은 평균 0.036 mm³, 2군의 종양 용적은 평균 0.104 mm³, 3군의 종양 용적은 평균 0.111 mm³였다. 대조군 종양의 용적에 대한 백분율은 1군은 97.4%, 2군은 92.5%, 3군은 91.1%의

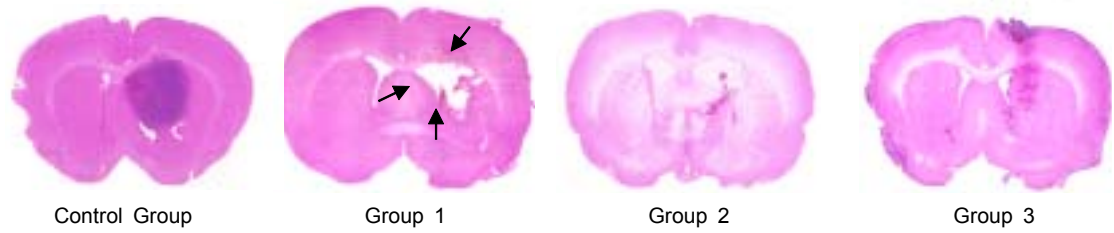


그림 1. 각 군별 육안 소견. 대조군에서는 좌측 피각부에 종양 이식이 성공적으로 이루어진 것이 관찰된다. 1군에서는 Ho-166 chitosan 복합체의 과량 투여에 따른 투여 중심부에 공동 현상(화살표 표시)이 관찰된다. 2군과 3군에서는 이식된 종양 부위가 Ho-166 chitosan 복합체에 의해 파괴되어 그 크기가 매우 작아진 것이 관찰된다.

표 1. 각 군별 종양 용적

Average	Volume (mm ³)	Percentage (%)
Control group (n=4)	1.385±0.74	100.0
Group 1 (n=4)	0.036±0.029	2.6
Group 2 (n=4)	0.104±0.066	7.5
Group 3 (n=4)	0.111±0.032	8.0

용적 감소율을 나타냈다(표 1, 그림 2). 하지만 이 중 1군은 많은 종양 크기의 감소가 관찰되었지만 Ho-166 chitosan 복합체 투여 중심부를 중앙으로 광범위하게 파괴되는 공동 현상이 관찰되었다.

또한 정상 뇌에 각 용량을 투여하여 육안적 결과를 관찰하였을 때 1군은 투여 중심부가 광범위하게 파괴되는 공동 현상(空洞 現象)이 발생하였고 2군과 3군에서는 투여 중심부를 중심으로 뇌종양 조직이 파괴된 현상이 보이기는 하였지만 1군에서 보였던 광범위한 공동 현상은 관찰되지 않았다.

생존율을 산출하기 위해 조직 표본을 얻지 않고 자연사 할 때까지 생존시킨 실험 백서는 각 군마다 5마리씩이었고 Kaplan-Meier 생존 곡선은 2군이 가장 길었고 그 다음으로 3군, 1군, 대조군의 순이었다. 각 군의 평균 생존 기간은 대조군 22.8일, 3군 59일, 2군 60일, 1군 44.6일로 산출되었다. 또한 각 군간의 생존율의 차이가 통계학적으로 유의한 것으로 판명되었다($P < 0.001$).

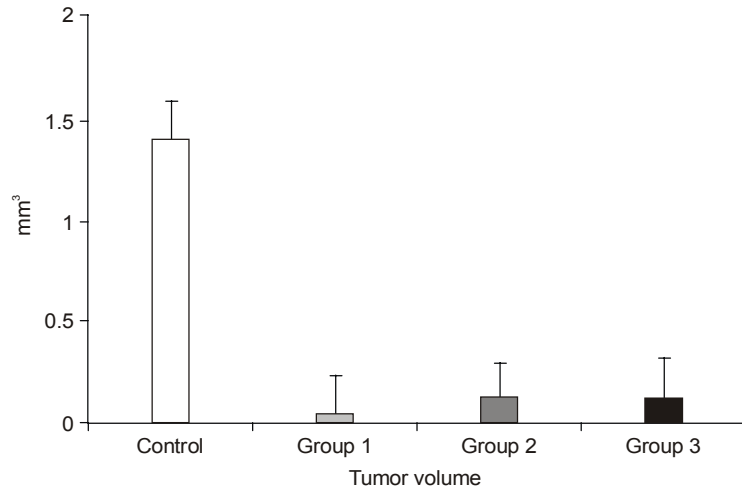


그림 2. 각 군별 종양 용적의 비교. 대조군 종양의 용적은 평균 1.385 mm³, 1군의 종양 용적은 평균 0.036 mm³, 2군의 종양 용적은 평균 0.104 mm³, 3군의 종양 용적은 평균 0.111 mm³였다. 대조군 종양의 용적에 대한 백분율은 1군은 97.4%, 2군은 92.5%, 3군은 91.1%의 용적 감소율을 나타냈다.

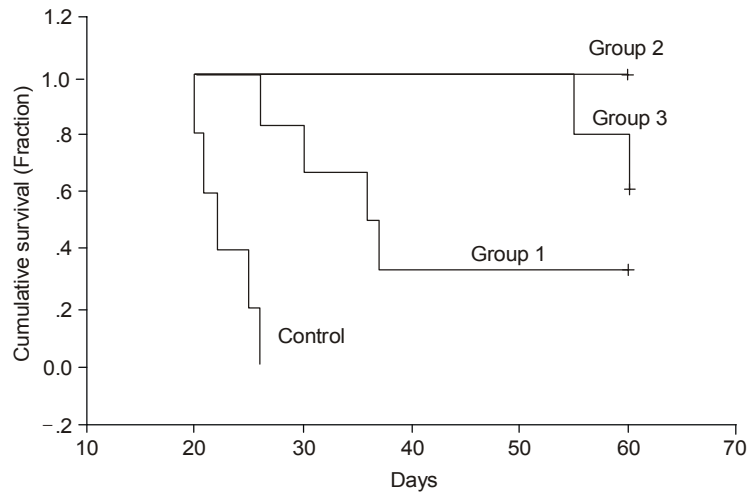


그림 3. 각 군별 생존 곡선. 2군과 3군의 생존 곡선의 연장이 대조군과 1군에 비해 통계학적으로 유의하게 연장되었다($p < 0.001$).

2. 병리 조직학적 소견 비교

가. H-E 염색 소견

각 군에서 Ho-166 chitosan 복합체를 투여한 후 5일째 각 4마리씩을 희생하여 악성 뇌교종의 조직 표본을 얻었고 포르말린에 고정 후에 뇌 교종의 가장 큰 단면을 얻도록 절편하여, 병리 조직학적인 차이점을 비교하기 위해 H-E 염색을 시행하여 광학 현미경 하에서 관찰하였다.

뇌 피각부에 위치한 뇌교종의 H-E 염색 소견은 핵과 세포질이 풍부한 악성 뇌교종의 소견이 보였다. 대조군에 비교해 1군에서는 투여 중심부에는 거의 모든 세포가 형태도 없이 파괴되어 있는 공동(空洞) 소견이 보였으며 정상 조직까지 파괴가 파급된 것이 관찰되었으며 종양 세포도 응고 괴사되는 양상을 나타냈다.

이에 반해 2군에서는 투여 중심부에서 공동 현상은 보이지 않았고 염색성이 떨어지고 세포핵이 관찰되지 않는 응고 괴사된 세포들이 관찰되었다. 괴사된 종양 세포들은 띠 모양의 배열을 이루고 있었으며 주변부에는 생존해 있는 종양 세포가 관찰되었다. 3군에서는 2군에 비해 응고 괴사의 범위가 넓지 않았고 생존해 있는 종양세포가 2군에 비해 더 많이 관찰되었다(그림 4).

나. TUNEL 염색 결과

TUNEL 염색 소견 상 Ho-166 chitosan 복합체를 투여한 실험군 모두에서 핵이 염색되는 양성 소견이 보였으며 Ho-166 chitosan 복합체의 용량에 비례하여 양성 세포의 빈도가 높았다. 즉, 1군에서는 평균 19.6%, 2군에서는 30.4%, 3군에서는 36.7%의 양성 소견이 200배하

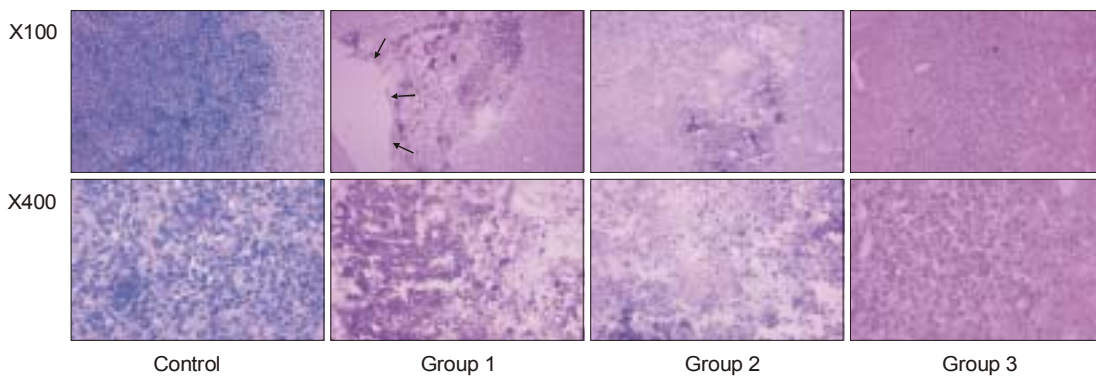


그림 4. H&E 염색 소견. 광학 현미경 100배와 400배 하에서 대조군에서는 핵과 세포질이 풍부한 악성 뇌교종의 소견이 보이며 3군에서는 Ho-166 chitosan 복합체에 의해 종양 세포가 파괴된 것이 관찰되나 다른 군에 비해 그 활성도가 높고 2군에서는 종양 세포의 괴사가 보다 광범위하게 관찰된다. 1군에서는 투여 중심부에는 거의 모든 세포가 형태도 없이 파괴되어 있는 공동(空洞) 소견(화살표 표시)이 보이며 정상 조직까지 파괴가 파급된 것이 관찰되며 종양 세포도 응고 괴사되는 양상을 나타낸다.

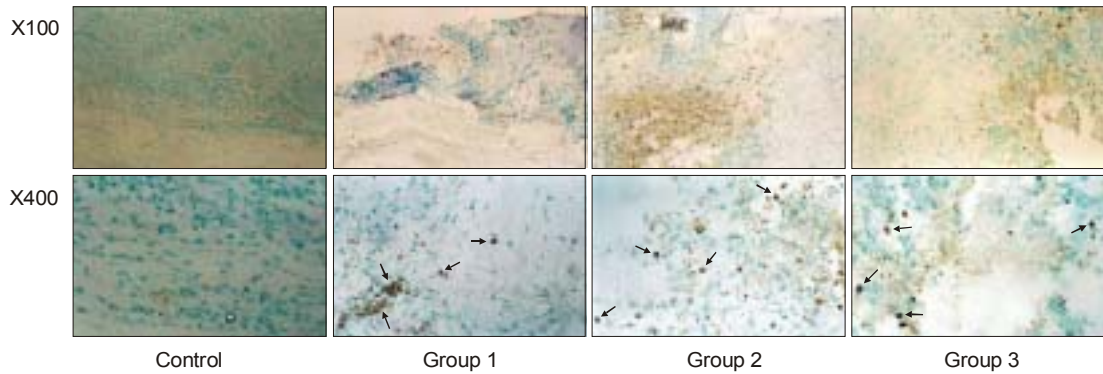


그림 5. TUNEL 염색 소견. Ho-166 chitosan 복합체를 투여한 실험군 모두에서 핵이 염색되는 양성 소견이 보이며(화살표 표시) Ho-166 chitosan 복합체의 용량에 비례하여 양성 세포의 빈도가 높다. 3군에서는 종양 세포 주변의 정상 세포에서도 방사선 괴사로 보이는 부분에서도 양성 반응이 관찰된다.

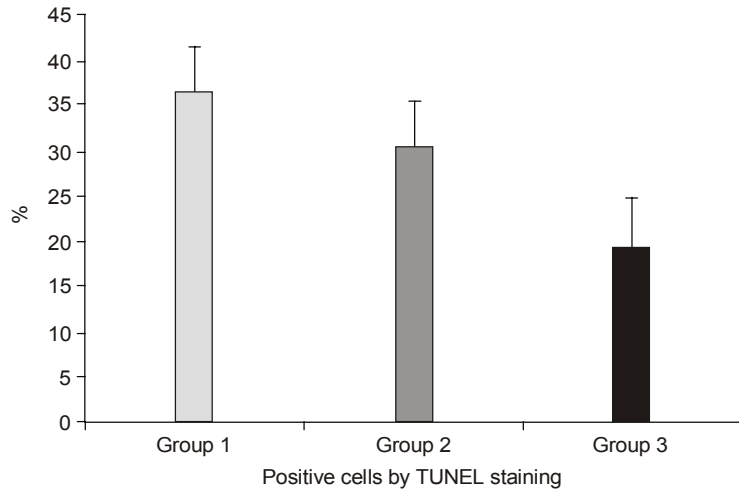


그림 6. TUNEL 염색 양성률 비교. 3군에서는 평균 19.6%, 2군에서는 30.4%, 1군에서는 36.7%의 양성 소견이 관찰되었다.

표 2. 각 군별 TUNEL 염색 양성 세포 백분율

Positive cells by TUNEL staining (%)	
Group 1 (n=4)	36.7±17.1
Group 2 (n=4)	30.4±10.7
Group 3 (n=4)	19.6±16.1

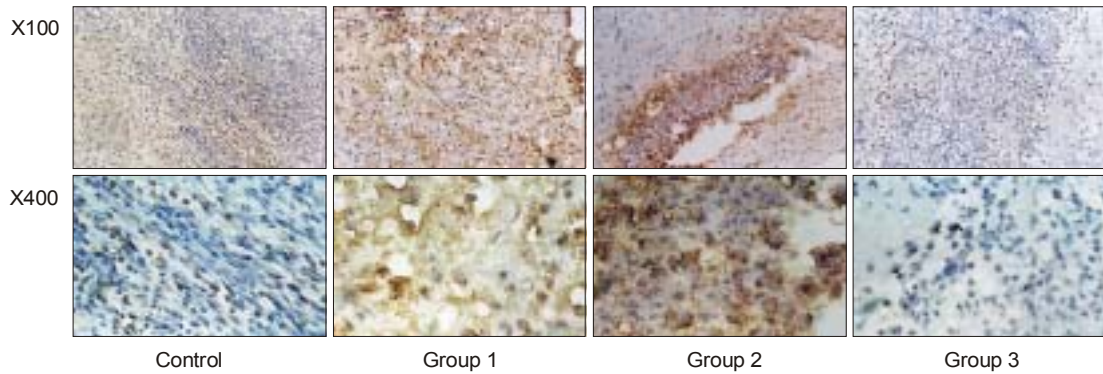


그림 7. Bax 염색 결과. 1군에서는 종양이 파괴된 부위를 중심으로 광범위한 세포질이 진황색으로 염색 되는 것이 관찰되고 2군에서도 유사한 소견이나 3군에서는 거의 염색이 안 되는 양상을 보인다.

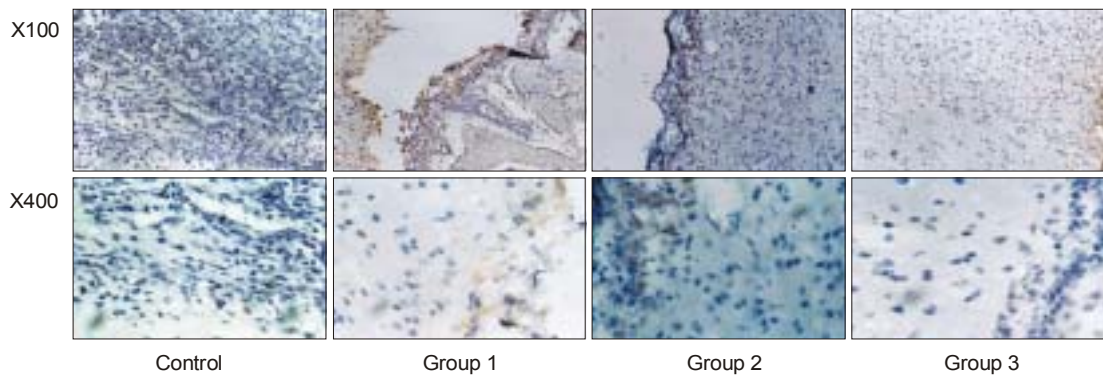


그림 8. Bcl-2 염색 결과. 모든 군에서 염색이 안 되는 것으로 관찰된다.

광학현미경으로 관찰되었다. 3군에서는 종양 세포 주변의 정상 세포에서도 방사선 괴사로 보이는 부분에서도 양성 반응이 관찰되었다(표 2, 그림 6, 7).

다. 면역조직 화학 염색 소견

Bcl-2 family 중에서 세포 고사를 촉진하는 것으로 알려진 Bax의 항체와 세포 고사를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2의 항체를 이용하여 면역 조직 화학적 염색을 시행하였다. Bax 항체에는 1군에서는 종양이 파괴된 부위를 중심으로 광범위한 세포질이 염색되는 것이 관찰되었고 2군에서도 유사한 소견이었으나 3군에서는 거의 염색이 안되는 양상을 보였다. Bcl-2에는 모든 군에서 염색이 안 되는 것으로 관찰되었다(그림 7, 8).

IV. 고 찰

전체 원발성 뇌종양의 40~50%를 차지하는 신경교종은 그 절반 이상이 악성이고, 양성 종양도 악성화 되는 경과를 취한다. 다른 장기에 전이를 거의 하지 않음에도 불구하고, 그 발생 부위에서 주위 정상 조직을 침윤하거나 매우 빠른 성장 속도를 보임으로써, 수술, 방사선 치료, 화학요법 등 적극적인 치료에도 불구하고 대부분의 경우 재발하고 평균 생존 기간이 1년 이하로 그 예후가 매우 불량하다.^{3,19}

종양의 국소 침윤은 악성 교종의 완치를 거의 불가능하게 하는 악성 교종의 특징으로 영상진단에서 조영 증강되는 부위부터 약 2 내지 3 cm까지의 범위까지 침윤되는 것으로 알려져 있다.²⁰

뇌종양 치료의 일차적 치료는 수술이다. 수술의 목적은 조직학적 진단과 신경학적 장애가 없이 최대한 많이 제거함으로써 보조적인 치료의 효과를 극대화시키는 것이다. 영상 진단 기구, 수술 기구, 수술 수기 등이 비약적으로 발전하였음에도 불구하고 수술만으로는 완치가 불가능하며 보조적인 치료로 방사선 치료, 화학 요법 등과 현재 초기적 연구 단계인 면역 요법과 유전자 요법 등이 시행되고 있다. 화학 요법은 BCNU, ACNU, PCV (procarbazine, lomustine, vincristine) 등의 제제가 이용되었으나, 그 효과가 다른 장기의 종양에 비해 대체로 낮은 것으로 나타났다. 그 이유는 종양세포의 이질성(heterogeneity), 혈-뇌장벽(blood-brain barrier), 혈-종양 장벽(blood-tumor barrier), 낮은 혈류량 등이다. 혈-뇌장벽, 혈-종양 장벽 때문에 약물이 충분히 전달되지 않는 것을 극복하기 위해 주입 펌프, 카테터, 중합체 등을 이용한 종양 간질내 화학 요법이 도입되었다. 5-FU, methotrexate, bleomycin, cisplatin, ACNU가 이용되었으나 명백한 치료의 증대 효과는 입증하지 못했다.^{21,22}

뇌교종에 대한 면역 요법과 유전자 요법은 기존의 치료법들이 뇌교종에 대한 특이성 내지 선택성이 떨어지기 때문이란 것이 이유가 되어 개발된 것이다. Interleukin-2나 tumor necrosis factor-a (TNF-a) 등은 고용량을 쓰므로 해서 발생하는 부작용이 심하다. Interferon-b가 임상에서 활용 중이나 확실한 치료 효과는 입증하지 못한 상태이다. 유전자 요법은 근래 분자 세포 생물학의 발전과 더불어 활발한 연구가 진행 중이다.^{1,2}

방사선 치료는 가장 효과가 입증된 보조적 치료법이다. 방사선 치료 기법의 발달로 최근 10년간 뇌교종 환자의 생존율은 2배 이상 높아졌다.^{2,3} 그러나 이러한 방사선 치료법들은 주변 정상 조직에 조사되어 방사선 괴사와, 이로 인하여 야기되는 뇌부종 등 각종 부작용을 흔히 일으킨다. 이러한 부작용은 환자의 신경학적 증상을 악화시켜 환자의 남은 여생동안 정상적인 생활을 방해하며 심한 경우 환자를 사망에 이르게 하기도 한다.^{4,7}

악성 뇌교종에 대한 방사선 치료의 부작용을 줄이고 치료효과를 높이기 위하여 근접 치료(brachytherapy)를 시행하게 되었다. 근접 치료는 종양 주위의 정상 조직에는 조사량을 최

소화하고 특정한 종양에 세포 독성 용량의 방사선을 집중 조사하여 악성 종양을 괴사시키는 치료법이다. 하지만 뇌종양에 대한 근접 치료는 방사선 동위원소를 일정 기간동안 삽입 고정시킨 후 다시 제거하는 방법으로 수술 과정이 복잡하고 감염, 출혈, 종양의 전이 등의 합병증의 발생가능성이 높은 단점들이 있다. 따라서 이러한 단점을 보완하기 위해서는 액체상태로 주입한 후 조직 내에 침투되어 일정 시간 후 교질화되어 침투가 멎는 동위원소가 이상적이다.^{9,10}

이러한 동위 원소는 베타선을 내는 동위원소가 적합하다. 베타선의 경우 연부 조직 침투 두께는 평균 2.5 mm, 최대 10.3 mm이므로 종양 주위의 정상 조직에는 미치는 영향이 거의 없거나 매우 적을 것으로 생각할 수 있고 체내 방사선 치료에 주로 사용이 되며 이러한 종양의 치료에 시도되는 강력한 베타선을 방출하는 동위원소 선원으로는 Iodine-131 (I-131), Phosphorus-32 (P-32), Yttrium-90 (Y-90), Rhenium-186 (Re-186), Rhenium-188 (Re-188), Holmium-166 (Ho-166) 등이 있다. 이 가운데 Y-90, Re-186, Ho-166의 공통된 특징은 짧은 반감기를 가지고 고 에너지의 베타선을 방출하며, 안정된 붕괴산물(daughter product)로 붕괴한다는 점이다. Ho-166의 반감기는 26.83시간으로 짧고, 94%의 베타선[평균 0.61 MeV, 최대 1.766 MeV (48%), 1.855 MeV (51%)]과 6%의 감마선 [0.081 MeV (6.24%), 1.379 MeV (0.93%)]을 방출하여 Y-90에 상응할 만한 높은 에너지를 가지며, 감마선을 방출하므로 감마카메라에서 정량적인 영상을 만들 수 있는 장점이 있다. Ho-166의 연부 조직 투과 두께 (penetration range)는 평균 1.23 mm, 최대 8.6 mm로 종양 내부에 주입될 경우 90%의 에너지가 2.1 mm 범위 안에 조사되고, 나머지 10%는 2.1~8.6 mm 범위에 조사되어 종양 내에만 집중적으로 조사되며, 주위의 정상조직에는 거의 영향을 미치지 않으므로 체내 방사선치료의 동물 실험에 성공적으로 이용된 바 있다. 또한 Chitosan은 2-deoxy-2-amino-D-glucose의 고분자 중합체로서 산도가 4.0 이하일 때는 액체 상태로 존재하다가 체내에 투입되면 중성인 체액과 만나게 되면 산도가 떨어지면서 산도가 6.5에 이르게되면 교질화된다. 이러한 특징으로 투여 물질이 투여한 부위에 오랜 기간 잔류할 수 있게 하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 Ho-166 chitosan 복합체는 이 방사선 동위 원소를 체내에 사용함으로써 발생할 수 있는 방사능이 주입된 곳에 머무르지 않고 다른 장기로 확산되어 생기는 부작용을 예방할 수 있다. 또한 기존의 근접 치료에서처럼 삽입되었던 방사선 동위 원소를 제거해야 하는 단점을 피할 수 있다.^{14,15,22}

이 등은 누드마우스의 피하에 이식시킨 간세포암(SK-HEP1)에 Ho-166 chitosan 복합체를 직접 주사하여 종양이외의 다른 조직이나 다른 장기에 미치는 부작용이 거의 없이 간세포암을 방사선으로 괴사시키는 치료 효과를 보고한 바 있으며,²³ 여러 종류의 피부암이나 Bowen's disease 등에서 동물 실험과 임상연구를 통하여 Ho-166 chitosan 복합체의 치료효과가 입증된 바가 있고 특수하게 고안된 Ho-166 chitosan복합체가 부착된 피부 반창고(skin patch)를 이용한 임상 연구에서 피부의 편평상피암, 기저세포암과 Bowen씨 병 등에서도 좋

은 치료효과를 보인 바 있었다.¹³⁻¹⁵ 또한 류마티스성 관절염 환자의 무릎 활액낭염에 대해서도 좋은 효과를 보였다.²⁴

이 동위원소 제제를 임상적으로 악성 뇌 교종의 치료에 이용하기 위해서는 Ho-166 chitosan 복합체에 의한 종양의 괴사 유무 및 범위와 적절한 주입 용량의 산출이 필요로 한다. 누드마우스의 피하에 이식시킨 간세포암(SK-HEP1)에 Ho-166 chitosan 복합체의 직접 주사에 관한 연구에서는 투여한 전체 용적이 0.025 ml로 작았으나, 직경이 1 cm인 종양에서는 3.7 mCi로, 2 cm인 경우는 10.94 mCi로 완전한 간세포암의 괴사를 일으킬 수 있다는 보고가 있었다.²³ 흰 쥐에 이식한 피부 흑색종에서 종양의 평균 크기가 1 cm인 경우를 대상으로 하여 1 mCi를 주입한 경우에도 종양의 완전 소실을 가져올 가능성이 있다 하였다.¹⁵ 본 연구에서는 대조군 종양의 용적은 평균 1.169 mm³, 100 μ Ci 투여군의 종양 용적은 평균 0.043 mm³, 50 μ Ci 투여군의 종양 용적은 평균 0.104 mm³, 10 μ Ci 투여군의 종양 용적은 평균 0.111 mm³였다. 대조군 종양의 용적에 대한 백분율은 1군은 96.3%, 2군은 91.1%, 3군은 90.5%로 모두 90% 이상의 용적 감소율을 나타내었다. 하지만 1군에서는 정상 조직을 포함하는 광범위한 공동 현상이 보이고 생존율도 다른 군들에 비해 현격히 떨어지는 결과가 나왔다. 이는 과도한 방사선량뿐만 아니라 과도한 투여 용량(10 μ l)에 의해서 발생할 수 있다고 볼 수 있다. 이는 각 군별 투여 용량을 정량화 하지 못한데서 오는 결과라 할 수 있겠다. 2군과 3군은 대조군에 비해 생존율이 월등히 높았으며 이는 통계학적으로도 유의하였다($p < 0.001$). 10 μ Ci의 용량과 50 μ Ci의 용량은 종양의 용적을 감소시키고 생존율을 연장시킴으로써 악성 뇌 교종에 대한 치료 효과를 보였다고 할 수 있다. H-E 염색 소견이나 TUNEL 염색 소견에서는 2군이 종양 파괴 효과에 있어 1군에 비해 우월한 것으로 보이나 생존율 연장과 종양의 용적 감소율에서는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

Ho-166 chitosan 복합체의 종양 파괴 기전이 세포 괴사에 의한 것인가 또는 괴사에 의한 것인가에 대한 실험으로 이 등은 Ho-166 chitosan 복합체가 피부 흑색종에 대해 투여 중양부는 세포 괴사에 의해 종양을 파괴하고 방사선 용량이 적은 말초부는 성장 정지 현상이 보였다고 하였다. 면역 조직화학 염색 결과, RT-PCR 소견과 TUNEL 염색의 소견 상 세포 괴사가 종양 성장 정지 현상에 관여하는 것으로 나타났으나 형태학적, 육안적 분석과 flow cytometry 소견에서는 세포 괴사의 소견이 보이지 않았고 종양의 성장 정지와 2차적 세포 괴사는 형태학적으로 세포 괴사에 의한 것으로 본다 하였다.¹⁵ 본 실험에서도 TUNEL 염색 결과와 면역 조직화학 염색 소견 상 세포괴사와 부합되는 소견이 있었으나 H-E 염색 소견과 공동 현상을 보이는 형태학적 소견 상 종양에 대한 Ho-166 chitosan 복합체의 작용 기전은 세포 괴사에 의한 것으로 보인다. TUNEL 염색 결과 양성 소견은 종양 괴사 부위 내에서 DNA 손상에 반응을 보인 가 양성 소견이라 할 수 있겠다.

Ho-166 chitosan 복합체는 악성 뇌교종 치료에서 부가적 치료의 한 방편으로 사용 될 수 있을 것으로 생각되며 이를 인체에 적용하기 위해서는 적절한 용량에 대한 연구가 앞으로

진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

흰쥐 악성 뇌종양모형에서의 Ho-166 chitosan 복합체 치료효과에 대한 연구를 통하여 Ho-166 chitosan 복합체는 적절한 용량을 투여하면 종양 주위의 정상 조직에는 조사량을 최소화하고 종양에 세포 독성 용량의 베타선을 집중 조사하여 악성 종양을 괴사시키는 치료로서 악성 뇌 교종을 주위의 장기에는 직접적인 장애나 해리에 의한 부작용이 없이 치료할 수 있는 방법임을 알 수 있었다.

Ho-166 chitosan 복합체는 악성 뇌 교종 세포를 괴사시키는 효과가 있으며 그 괴사 효과는 Ho-166 chitosan 복합체 용량에 비례하지만 과량(100 μ Ci)을 투여하였을 때는 정상 조직까지도 과급되는 부작용이 일어나는 것을 알 수 있었다. 또한 뇌 교종을 파괴하고 성장을 정지시킴으로써 탁월하게 생명을 연장시키는 효과를 나타냈다. 그러나 과량(100 μ Ci)을 투여하였을 때 생명 연장 효과가 크지 않았다.

교종을 파괴하는 작용 기전은 이전 다른 연구 결과에서와 같이 응고 괴사였다. Ho-166-chitosan 복합체는 앞으로 인체의 뇌 교종 치료에서 정위적 방법에 의한 투여나 수술과 동시에 잔여 종양에 대하여 수술 시야에서의 투여 등으로 보조적 치료로의 한 방안이 될 수 있으리라 믿는다.

앞으로 종양 용적에 맞는 적절한 투여 용량에 대한 연구가 선행되고 생체 실험을 통해 임상적 유용성을 확인하여한다고 본다.

참 고 문 헌

1. Chang JW, Lee H, Kim E, Lee Y, Chung SS, Kim JH. Combined antitumor effects of an Adenoviral Cytosine Deaminase/Thymidine Kinase fusion gene in rat c6 glioma. *Neurosurgery* 2000;47(4):931-9.
2. Brandes A, Soesan M, Fiorentino MV. Medical treatment of high grade malignant glioma in adults: An overview. *Anticancer Res* 1991;11:719-27.
3. Nieder C, Grosu AL, Molls M. A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat Rev* 2000;26(6):397-409.
4. Nwokedi EC, DiBiase SJ, Jabbour S, Herman J, Amin P, Chin LS. Gamma knife stereotactic radiosurgery for patients with glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 2002;50(1):41-7.
5. Park YG, Chung SS, Kim DI, Chang JW, Cho J. Complications following Gamma Knife radiosurgery. *Stereotact Funct Neurosurg* 1995;64 Suppl 1:239-48.
6. Kureshi SA, Hofman FM, Schneider JH, Chin LS, Apuzzo ML, Hinton DR. Cytokine expres-

- sion in radiation-induced delayed cerebral injury. *Neurosurgery* 1994;35(5):822-9.
7. Plowman PN. Stereotactic radiosurgery. VIII. The classification of postradiation reactions. *Br J Neurosurg* 1999;13(3):256-64.
 8. Bampoe J, Glen J, Hubbard SL, Salhia B, Shannon P, Rutka J, et al. Adenoviral vector-mediated gene transfer: timing of wild-type p53 gene expression in vivo and effect of tumor transduction on survival in a rat glioma brachytherapy model. *J Neurooncol* 2000;49(1): 27-39.
 9. Bampoe J, Laperriere N, Pintilie M, Glen J, Micallef J, Bernstein M. Quality of life in patients with glioblastoma multiforme participating in a randomized study of brachytherapy as a boost treatment. *J Neurosurg* 2000;93(6):917-26.
 10. Patel S, Breneman JC, Warnick RE, Albright RE Jr, Tobler WD, van Loveren HR, et al. Permanent iodine-125 interstitial implants for the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 2000;46(5):1123-30.
 11. Oppenheimer JH, Levy ML, Sinha U, El-Kadi H, Apuzzo ML, Luxton G, et al. Radionecrosis secondary to interstitial brachytherapy: correlation of magnetic resonance imaging and histopathology. *Neurosurgery* 1992;31(2):336-43.
 12. Houston SC, Crocker IR, Brat DJ, Olson JJ. Extraneural metastatic glioblastoma after interstitial brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48(3):831-6.
 13. Chung YL, Lee JD, Bang D, Lee JB, Park KB, Lee MG. Treatment of Bowen's disease with a specially designed radioactive skin patch. *Eur J Nucl Med* 2000;27:842-6.
 14. Lee JD, Park KB, Lee MG, et al. Radionuclide Therapy of Skin Cancers and Bowen's Disease Using a Specially Designed Skin Patch. *J Nucl Med* 1997;38:697-702.
 15. Lee JD, Yang WI, Lee MG, Ryu YH, Park JH, Shin KH, et al. Effective local control of malignant melanoma by intratumoral injection of a beta-emitting radionuclide. *Eur J Nucl Med* 2002;29(2):221-30.
 16. Mumper RJ, Ryo UY, Jay M. Neutron-Activated Holmium-166-Poly (L-Lactic Acid) Microspheres: A Potential Agent for the Internal Radiation Therapy of Hepatic Tumors. *J Nucl Med* 1991;32:2139-43.
 17. Bradford R, Darling JL, Thomas DGT. The development of an animal model of glioma for use in experimental neurooncology. *Br J Neurosurg* 1989;3:197-210.
 18. Engebraaten O, Hjortland GO, Hirschberg H, Fodstad O. Growth of precultured human glioma specimens in nude rat brain. *J Neurosurg* 1999;90:125-32.
 19. Chandler KL, Prados MD, Malec M, Wilson CB. Long-term survival in patients with glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 1993;32(5):716-20.
 20. Ammirati M, Vick N, Liao YL, Ciric I, Mikhael M. Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery* 1987;21(2):201-6.
 21. Levin VA. Chemotherapy for brain tumors of astrocytic and oligodendroglial lineage: the past

- decade and where we are heading. *Neuro-oncol* 1999;1(1):69-80.
22. Lee WY, Moon EY, Lee J, Choi CH, Nam SC, Park KB, et al. Toxicities of 166Holmium-chitosan in mice. *Arzneimittelforschung* 1998;48(3):300-4.
 23. 이연희, 이종태, 유형식, 문영명, 김병로, 박찬일 등. 마우스 피하에 이식시킨 간세포암(SK-HEP1)에 대한 Holmium-166의 효과. *대한방사선의학회지* 1998;38:83-91.
 24. Song J, Suh CH, Park YB, Lee SH, Yoo NC, Lee JD, et al. A phase I/IIa study on intra-articular injection of Holmium-166 chitosan complex for the treatment of knee synovitis of rheumatoid arthritis. *Eur J Nucl Med* 2001;28(4):489-97.

Abstract

Therapeutic effects of Holmium-166 chitosan complex in rat brain tumor model

Ryoong Huh

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School Yonsei University*

(Directed by Professor Yong Gou Park)

This investigation was undertaken to determine the effectiveness of Holmium-166 chitosan complex therapy on malignant glioma. Wistar rats were chosen as the specimen for pre-clinical testing and were injected with a malignant glioma model and afterwards treated with the Holmium-166 chitosan complex therapy. From observing the prolongation of survival resulting from the destruction of malignant glioma, the effectiveness of the Holmium-166 chitosan complex therapy would be determined. In addition, adequate dosage according to varying tumor-volumes was investigated, as well as complications resulting from over-dosage.

One hundred-thousand cultured 5 μ l C6 glioma cells were injected into the putamen of 200~250 gram specimen wistar rats. Five days afterwards, Holmium-166 chitosan complex was injected into the same site of the glioma injection. The injection dosages were given at four variations: The first specimen was given a PBS 10 μ l as a control group, group 1 received an injection of 100 μ Ci (10 μ l), group 2 received an injection of 50 μ Ci (5 μ l), and group 3 received an injection of 10 μ Ci (1 μ l). Each group consisted of 10 specimen wistar rats, five of which were left to die from the malignant glioma to determine the survival rate. Hematoxylin-Eosin (H-E) staining was performed to determine the results of the Holmium-166 chitosan complex therapy on the malignant glioma. Transferase-mediated doxyuridine triphosphate nick end labelling (TUNEL) staining and immunohistochemical studies using Bcl-2 antibody and Bax antibody were performed to determine the tumor's destruction as either necrosis or apoptosis.

The average tumor volume of the different groups resulted as follows: the control group yielded 1.385 mm³, group 1 yielded 0.036 mm³, group 2 yielded 0.104 mm³, and group 3 yielded 0.111 mm³. Compared to the control group, the size of group 1 tumors was reduced by an average of 97.4%, group 2 by 92.5%, and group 3 by 91.9%. The injection center of group 1 contained a cavitation phenomenon. The Kaplan-Meier survival curve of group 2 was the longest, followed by group 3, group 1, and the control group, respectively. The mean survival of the control group was 22.8 days, 59 days for group 3, 60 days for group 2, and 44.6 days for group 1. H-E staining revealed that group 2 yielded the best results in destruction of malignant glioma. TUNEL staining and immunohistochemical studies suggested apoptotic features. Ho-166 chitosan complex proved to be effective in the destruction of malignant glioma, however, as an over-dosage complication,

the destruction of normal brain tissue resulted. Following destruction and growth arrest of the malignant glioma, survival rate was effectively prolonged, but over-dosage would cancel out any survival benefits.

These results suggested that Ho-166 chitosan complex could be of value in providing adjuvant therapy in cerebral malignant glioma, and that the further study for optimal dosage of Ho-166 chitosan complex is necessary.

Key Words: Holmium-166 chitosan complex, malignant glioma, brachytherapy, therapeutic effects