

# 항암요법을 받고 있는 난소암 말기 환자에서 MISTLETOE (ABNOBAviscum®)의 임상 연구

연구기관 가톨릭 대학교 강남성모병원 산부인과

## 목적

이 연구의 목적은 난소암 stage III 이상의 수술을 시행 받은 환자에게 항암 화학요법과 아울러 보조적으로 ABNOBAviscum®을 투여한 후, 환자의 혈중의 면역물질 cytokine인 IFN-gamma, IL-2, TNF-alpha와 IL-4, IL-12 의 변화와 , CD3+, CD4+, CD8+, CD56+ 임파구 아형의 증감을 다각적으로 측정한 후 난소암 환자에서 치료에 미치는 영향과 면역 보조 요법이 가지는 임상적 유효성과 안전성 및 효능을 연구, 검토하기 위하여 실시하였다.

## 방법

### 1. 연구 대상

1) 대상환자: FIGO stage III 이상의 난소암으로서 수술 후 항암 화학요법 치료 환자를 무작위로 두 군으로 나누어 ABNOBAviscum® 을 투여하지 않은 대조군 16명, 투여군 16명 총 32명

2) 사용된 임상시험용 의약품 :

ABNOBAviscum® 주사액 A 0.02mg, 0.2 mg, 2mg, 20mg 주사액

ABNOBAviscum® 주사액 M 0.02mg, 0.2 mg, 2mg, 20mg 주사액

### 2. 총 임상 연구 기간

2001년 4월 1일 - 2004년 1월 3일 (2년 9개월간)

### 3. 연구 방법

ABNOBAviscum® 투여군의 환자는 첫 수술 후 항암 화학 요법이 시작되는 수술 후 9일에서 21일 사이에 ABNOBAviscum®의 투여를 시작하여 30주까지의 결과를 분석하였다. 처음 시작 시 ABNOBAviscum® M 또는 A 0.02mg 주사액을 1주에 3회 오전에 피하 주사를 2주간 지속하고 같은 방법으로 ABNOBAviscum® M 또는 A 0.2mg를 2주간 투여한 후 ABNOBAviscum® M 또는 A 2mg 을 동일한 방법으로 2주간 투여한 후에 유지 용량으로 ABNOBAviscum® M 또는 A 20mg 을 1주 3회 오전에 피하 주사로 투여하였다.

### 4. 관찰항목, 임상검사항목 및 관찰 검사 방법 :

1) Immunologic assay - 5회 (0, 6, 12, 18, 30주)

FACS analysis : CD3+, CD4+ CD8+, CD56+ 임파구 아형 검사 (Flow cytometry법)

Cytokine ELISA assay : IFN-gamma, IL-2, TNF-alpha, IL-4, IL-12 (ELISA법)

2) Safety and Toxicity - 5회 (0, 6, 12, 18, 30주)

WBC , Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil 수

Biochemical analysis(BC) : SGOT, SGPT, Total Bilirubin (TB),

## Total Protein (TP), Alkaline Phosphatase

### 5. 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법 (통계분석방법) :

- 1) 대조군과 투여군간의 비교: two-sample t-test와 Satterthwaite t-test로 검정.  
(IFN-gamma, TNF-alpha, IL-2, IL-4, IL-12, CD3+, CD4+, CD8+, CD56+ 임파구 아형)
- 2) 대조군과 투여군 각각의 투여 후 6주, 12주, 18주, 30주에서 각 항목의 시간에 따른 변화 : Repeated measures ANOVA로 검정.
- 3) 대조군과 투여군간 시간 변화에 따른 각 항목의 변화량 차이: Bonferroni t-test로 검정.
- 4) 대조군과 투여군의 각군에서 투약전 값을 기준으로 한 변화량: paired t-test  
\*대조군과 투여군 간의 변화는 유의수준 0.05 미만으로 함.

### 6. 부작용을 포함한 안전성의 평가방법

#### 안전성의 평가 변수 (parameters)

- ① 혈압, 맥박, 신체검사
- ② 이상반응 및 자각증상
- ③ 실험실적 검사
  - CBC(wbc count, Lymphocyte count, Monocyte count, Eosinophil count): 8회
  - LFT(SGOT, SGPT, Alkaline Phosphatase, Total Bilirubin, Total Protein): 8회

### 결과 및 고찰 <별첨>

환자들의 연령 및 병기를 포함한 일반적 사항과 수술 후 시행한 항암 화학요법제의 종류, 투약 기간은 유의한 차이가 없었다. 혈액 내 백혈구 절대수와 호산구 절대수는 두 군 모두에서 변화를 보이지 않았으나 임파구와 단핵구는 투여군에서 유의한 상승이 관찰되었다. 임파구 아형의 변화에 있어 대조군의 경우 CD3+, CD4+, CD8+, CD56+ 임파구 아형의 감소가 관찰되었고 투여군에서는 모든 아형의 유의한 증가가 관찰되었다. cytokine의 경우 IL-2, IL-4, IL-12, IFN-gamma, TNF-alpha가 모두 투여군에서 대조군보다 유의한 상승을 보였다. ABNOBAviscum® 투여군은 임파구 아형인 CD3+, CD4+, CD8+, CD56+ 절대수와 cytokine IFN-gamma, TNF-alpha, IL-2, IL-4, IL-12 의 농도의 지속적인 상승을 보였다. 두 군간 SGOT, SGPT, 총단백량(TP), 총 빌리루빈 치(TB)는 통계적 유의성이 없이 일정하게 유지되었다.

### 결론

ABNOBAviscum® 는 투약 4~6주 후 반응이 나타나는 것으로 보아 복합적인 작용기전이 있을 것으로 사료되며, cytokine의 변화와 세포 매개성 면역능의 변화가 면역세포에 영향을 주어 항종양 면역능을 증가시킴을 본 연구에서 입증하게 되었다. 향후 본 연구의 결과를 바탕으로 무작위적 이중 맹검법에 따른 전향적 연구를 통해 적절한 ABNOBAviscum® 의 투약 스케줄과 표준화된 투약 일정을 확립하여 현재의 대체요법이 치료요법으로 전환될 것을 기대한다.

## < 별첨 >

### 1. 유효성 평가

#### (1) 백혈구, 임파구, 단핵구 그리고 호산구의 변화

백혈구 수는 두 군간에 실험 기간 동안 유의한 차이는 보이지 않았다.

임파구 절대수는 투여군에서 ABNOBaviscum® 투약전( $1383.5 \pm 546.0 \times 10^6/L$ )과 비교하였을 때 투약 18 주에  $2651.6 \pm 3467.9 \times 10^6/L$  로 상승되어 지는 듯하였으나 두 군간 표준편차와 분산의 차가 크고 Satterthwaite t-test 결과  $P = 0.1093$  으로 통계적 유의성은 없었다. 투약 후 30 주에 이르러  $1825.3 \pm 790.5 \times 10^6/L$  으로 나타났으며 two-sample t-test 상  $P=0.0256$  으로 통계적으로 유의하게 증가하였다. 또한 동일한 시기의 대조군 ( $1230.3 \pm 633.7 \times 10^6/L$ )보다 유의하게 증가되었다( two-sample t-test,  $P = 0.0256$ ).

단핵구 절대수는 대조군에서 관찰 초기값이  $624.8 \pm 357.8 \times 10^6/L$  로 투약전 투여군의 평균값  $345.0 \pm 220.7 \times 10^6/L$  보다 통계적으로 유의하게 높은( two-sample t-test , $P = 0.0124$ )것이 확인되었는데 이러한 결과는 투약전 실험군의 면역능이 상대적으로 대조군보다 낮았던 것과 관련있다고 여겨진다. 그리고 투약후 30 주경 투여군의 평균값( $499.8 \pm 405.5 \times 10^6/L$  )이 대조군의 평균값( $393.8 \pm 297.3 \times 10^6/L$ ) 보다 유의한 상승을 보였다(Repeated measures ANOVA, $P = 0.0202$ ).

호산구 절대수는 투약전 초기값이 실험군에서 상대적으로 증가되어 있는 것으로 보이나 Satterthwaite t-test 결과  $P = 0.0832$  로 통계적 유의성은 없었으며 시간 변화에 따른 군내 변화도 유의하지 않았다(Repeated measures ANOVA, $P = 0.7952$ ).

#### (2) 임파구 아형의 변화

말초 혈액 내 CD3+ 임파구 아형의 수는 투여군에서 투약전  $832.6 \pm 312.9 \times 10^6/L$  이었으나 30 주에  $1226.9 \pm 516.9 \times 10^6/L$  로 증가 되었고 ( Repeated measures ANOVA, $P = 0.0024$  ) 동일한 시기인 30 주의 대조군은  $780.2 \pm 460.5 \times 10^6/L$  로 초기값보다 오히려 감소가 되어 있어 대조를 이루고 있으며 two-sample t-test,  $P = 0.0150$  로 두 군간의 차가 유의함이 확인되었다.

투여군의 CD4+ 임파구 아형의 수는 투약전  $527.1 \pm 244.6 \times 10^6/L$  이었으나 투약후 18 주에  $911.8 \pm 878.9 \times 10^6/L$  로 증가 되었고 ( Repeated measures ANOVA, $P = 0.0282$  ), 투약후 30 주에  $764.3 \pm 395.2 \times 10^6/L$  로 증가 되었다 ( Repeated measures ANOVA, $P = 0.0021$  ). 동일한 시기인 30 주의 대조군은  $439.1 \pm 258.8 \times 10^6/L$  로 초기값보다 오히려 감소가 되었고 이 시기의 두 군간 two-sample t-test,  $P = 0.0099$  로 두 군간의 차가 유의하게 나타났다.

CD8+ 임파구 아형의 수는 투여군에서 투약전  $336.0 \pm 181.2 \times 10^6/L$  에 비해 투약후 18 주(  $695.2 \pm 543.3 \times 10^6/L$ , Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0060$ )부터 증가되어 30 주(  $635.8 \pm 335.4 \times 10^6/L$  Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0003$ )까지 유지되었으며, 동일한 시기인 관찰 18 주, 30 주의 대조군은 각각  $300.3 \pm 166.2 \times 10^6/L$ ,  $307.0 \pm 248.6 \times 10^6/L$  로 초기값보다 오히려 감소되었으며 18 주의 두 군간 Satterthwaite t-test 결과  $P = 0.0125$  로, 30 주의 두 군간 two-sample t-test 결과  $P = 0.0037$  로 나타나 관찰 18 주, 30 주의 두 군간의 차가 유의함을 알 수 있었다.

CD56+ 임파구 아형의 수는 투여군에서 투약전  $216.1 \pm 110.8 \times 10^6/L$  에 비해 투약후 18 주(  $411.3 \pm 302.5 \times 10^6/L$ , Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0096$ )부터 증가되어 30 주(  $417.1 \pm 221.5 \times 10^6/L$  Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0002$ )까지 유지되었으며, 동일한 시기인 관찰 18 주, 30 주의 대조군은 각각  $186.3 \pm 122.7 \times 10^6/L$ ,  $184.2 \pm 133.2 \times 10^6/L$  로 초기값보다 감소되고 18 주의 두 군간 Satterthwaite t-test 결과  $P = 0.0123$  로, 30 주의 두 군간 two-sample t-test 결과  $P = 0.0011$  로 확인되어 관찰 18 주, 30 주의 두 군간의 차가 통계적으로 유의함을 알 수 있었다.

요약하면, 대조군은 상기 4 가지 임파구 아형의 절대수가 관찰 30 주경에 모두 유의한 감소를 나타낸 반면 투여군은 투약후 30 주에 모두 유의한 증가 소견을 보였다.

### (3) 사이토카인의 변화

말초 혈액 내 IL-2 의 농도는 투여군에서 투약전  $17.7 \pm 2.5$  pg/mL 이었으나 투약후 6 주부터  $21.1 \pm 2.8$  pg/mL 로 유의하게 증가 되었고 ( Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0073$  ), 이후 지속적으로 증가하여 투약후 30 주에 이르러서는  $35.2 \pm 14.6$  pg/mL 로 투약전 농도의 2 배 가량 증가 되었다 ( Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0028$  ). 동일한 시기인 관찰 후 30 주의 대조군은  $23.4 \pm 7.1$  pg/mL 로 약간의 증가 소견이 관찰되었으나 Satterthwaite t-test 검정 결과  $P = 0.0085$  로 확인되어 두 군간의 차가 유의함이 확인되었다.

투여군의 IL-4 의 농도는 투약전  $12.4 \pm 1.8$  pg/mL 이었고 투약후 6 주부터  $15.7 \pm 3.7$  pg/mL 로 유의하게 증가 되었다 ( Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0445$  ). 이후 지속적으로 증가하여 투약후 30 주에 이르러서는  $20.8 \pm 4.5$  pg/mL 로 지속적 증가가 관찰 되었다 ( Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0001$  ). 동일한 시기인 관찰 후 30 주의 대조군은  $15.7 \pm 4.3$  pg/mL 로 약간의 증가 소견이 관찰되었으나 two-sample t-test 검정 결과  $P = 0.0027$  로 확인되어 두 군간의 차가 유의함이 확인되었다.

투여군의 IL-12 의 농도는 투약전  $9.9 \pm 1.4$  pg/mL 이었고 투약후 18 주에만  $15.8 \pm 5.6$  pg/mL 로 유의한 증가( Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0033$  )가 관찰되었으며 다른 시기(투약후 6, 12, 30 주)에 측정된 농도는 유의성을 갖는 정도의 농도 증가는 관찰되지 않았다. 관찰 후 18 주 대조군의 농도는  $11.7 \pm 1.8$  pg/mL 로 나타나 관찰 초기값과 비교시 거의 동일하게 나타났다. 이

시기의 두 군간 Satterthwaite t-test 검정 결과  $P = 0.0123$  로 확인되어 두 군간의 차는 통계적 유의성이 있었다.

투여군의 IFN- $\gamma$  농도는 투약전  $11.3 \pm 2.2$  pg/mL 이었으나 투약후 6 주부터  $14.2 \pm 3.5$  pg/mL 로 유의하게 증가 되었다 ( Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0100$  ). 이후 투약후 18,30 주에도 증가가 지속되고 통계적 유의성도 확인되었다 ( Repeated measures ANOVA, 18 주  $P = 0.0006$  , 30 주  $P = 0.0023$  ). 동일 관찰 시기 6 주의 두 군간 two-sample t-test 검정 결과  $P = 0.0109$  로 확인되어 두 군간의 차가 유의함이 확인되었다. 18,30 주의 두 군간 비교시 Satterthwaite t-test 검정 결과 각각의  $P = 0.0014$ ,  $P = 0.0079$  로 확인되어 두 군간의 차는 유의하였다.

투여군의 TNF- $\alpha$  의 농도는 투약전  $10.3 \pm 1.4$  pg/mL 이었고 투약후 6 주부터  $15.7 \pm 3.7$  pg/mL 로 유의하게 증가 되었다 ( Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0004$  ). 이후 지속적으로 증가하여 투약후 30 주에 이르러서는  $20.6 \pm 8.6$  pg/mL 로 지속적 증가가 관찰 되었다 ( Repeated measures ANOVA,  $P = 0.0185$  ). 동일한 시기의 두 군간 유의성을 two-sample t-test 와 Satterthwaite t-test 로 검정하였는데 그 결과  $P$  값이 모두 0.05 미만으로 확인되어 두 군간의 차가 전 실험 기간 동안 유의함이 확인되었다.

## 2. 안전성 평가

### (1) 간 기능 검사 결과 비교

SGOT, SGPT, 총 단백질(TP) 측정치는 전 실험 기간 동안 두 군간 혈중 농도의 차나 각각의 군내 시간에 따른 변화는 없었고 투약 여부에 따른 차이 또한 관찰 되지 않고 일정하게 유지되었다.

그러나 Alkaline phosphatase(ALP)의 측정치는 투여군이 대조군에 비해 투약 전부터 그 값이 낮게 측정되었으며 초기값, 관찰 6 주, 18 주, 30 주의 두 군간 차를 Satterthwaite t-test 로 검정한 결과 P 값이 모두 0.05 미만으로 확인되어 이 시기의 두 군간의 차가 유의하게 나타났다.

총 빌리루빈 치(TB)는 관찰 6 주에 두 군간 차이가 나타났으나( two-sample t-test, P = 0.0214 ) Repeated measures ANOVA 로 검정한 결과는 모든 관찰 시기의 P 값이 0.05 보다 큰 것으로 확인되어 통계적으로 유의하지 않았다.

### (2) 백혈구, 임파구, 단핵구 그리고 호산구의 변화

백혈구 수는 두 군간에 실험 기간 동안 유의한 차이는 보이지 않았다.

임파구 절대수는 투여군에서 ABNOBAviscum<sup>®</sup> 투약전( $1383.5 \pm 546.0 \times 10^6/L$ )과 비교하였을 때 투약 18 주에  $2651.6 \pm 3467.9 \times 10^6/L$  로 상승되어 지는 듯하였으나 두 군간 표준편차와 분산의 차가 크고 Satterthwaite t-test 결과 P = 0.1093 으로 통계적 유의성은 없었다. 투약후 30 주에 이르러  $1825.3 \pm 790.5 \times 10^6/L$  으로 나타났으며 two-sample t-test 상 P=0.0256 으로 통계적으로 유의하게 증가하였다. 또한 동일한 시기의 대조군 ( $1230.3 \pm 633.7 \times 10^6/L$ )보다 유의하게 증가되었다(two-sample t-test ,P = 0.0256).

단핵구 절대수는 대조군에서 관찰 초기값이  $624.8 \pm 357.8 \times 10^6/L$  로 투약전 투여군의 평균값  $345.0 \pm 220.7 \times 10^6/L$  보다 통계적으로 유의하게 높은( two-sample t-test ,P = 0.0124)것이 확인되었는데 이러한 결과는 투약전 실험군의 면역능이 상대적으로 대조군보다 낮았던 것과 관련있다고 여겨진다. 그리고 투약후 30 주경 투여군의 평균값( $499.8 \pm 405.5 \times 10^6/L$  )이 대조군의 평균값( $393.8 \pm 297.3 \times 10^6/L$ ) 보다 유의한 상승을 보였다(Repeated measures ANOVA, P = 0.0202).

호산구 절대수는 투약전 초기값이 실험군에서 상대적으로 증가되어 있는 것으로 보이나 Satterthwaite t-test 결과 P = 0.0832로 통계적 유의성은 없었으며 시간 변화에 따른 군내 변화도 유의하지 않았다(Repeated measures ANOVA, P = 0.7952).

### 3. 고 찰

모든 사이토카인의 농도가 투여군이 대조군보다 높게 나타나는 것은 항암 면역능의 증강을 보였기 때문인 것으로 생각된다. 또한 총 단백질 농도도 투여군에서 대조군에 비해 모든 시기에서 증가되어 있어 임상적으로 두 군간의 차이를 나타내는 지표로 활용될 수 있는 가능성이 있음을 시사한다.

본 연구시 현재까지 적절한 ABNOBAviscum®의 투약 스케줄과 표준화된 프로토콜이 확립되어 있지 않아 투여량 결정에 어려움이 있었다. 한 증례 보고에 따르면 기생 식물 추출액 복용 후 나타난 간염의 증례<sup>49</sup>가 있어 본 연구자들은 투여량 제한 독성(dose-limiting toxicity)의 한 척도로 간독성을 관찰하였다. 투약에 따른 간독성을 평가하기 위해 시행한 혈액 생화학적 검사상 투여군에서 SGOT가 통계적으로 유의하게 대조군보다 높은 것으로(P = 0.0284) 나타났으나 사실은 ABNOBAviscum® 투약 전에 이미 실험군이 대조군보다 SGOT 값이 높았다가 ABNOBAviscum®를 투여하면서 정상화되고 그 상태를 투약 기간 동안 유지하는 것을 관찰할 수 있다. 이러한 현상은 ABNOBAviscum® 투여군이 대조군에 비해 항암 화학 요법 중 일반적 건강 상태가 상대적으로 좋지 않았던 것을 반영하며 ABNOBAviscum®을 투여한 후 면역 증강과 더불어 간 기능도 회복된 것이 아닌가 생각된다. 통계적 유의성은 없었으나 SGPT의 경우도 마찬가지로 해석할 수 있으리라 생각된다. 투여군에서 Alkaline phosphatase의 증가가 사이토카인의 증가 시기와 유사한 것은 흥미로운 현상으로 연관성을 더 규명하여야 할 것이다.

ABNOBAviscum®는 겨우살이 추출액의 한 종류이며 그 숙주 나무의 종류에 따라 매우 다양한 추출액이 있다. 그 주된 작용을 알고자 면역능 상승 효과와 세포독성을 통한 항암 작용 그리고 전이 억제 효과 등이 연구 되어왔으나, 실제 암 환자에 있어 그 효능에 관한 임상 연구는 아직 부족한 상태이다. 더욱이 ABNOBAviscum®의 효능에 관한 임상 연구는 현재까지 체계적으로 이루어지지 못하고 있다.

종양 면역학적 관점에서 볼 때 세포 독성 임파구, 대식 세포, 자연 살해 세포등이 체내 종양 세포를 제거하는 주요 면역 세포로 알려져 있다. ABNOBAviscum®을 실험용 토끼와 실제 환자에 투여한 후 다핵성 과립세포의 식세포 기능 활성도가 증가되었다는 보고와 시험관내에서 ABNOBAviscum®가 자연 살해 세포의 세포 독성을 증가시킨다는 결과와 유사하게 본 연구에서 ABNOBAviscum® 투여를 지속하면 할수록 임파구와 단핵세포의 수가 증가하고 임파구 중에서 세포독성 T 임파구(CD8+)와 자연살해 세포수(CD56+)가 증가하여 종양 면역능이 증가됨을 시사하고 있다.

ABNOBAviscum®에 함유되어 있는 생체 활성 물질로는 lectins, alkaloids등이 있고 그 중 세포 독성과 면역 조절 효과를 가장 강하게 나타내는 것은 lectins이라 알려져 있다. 이러한 lectins의 생체내 면역 조절능 증강 효과가 최근에 보고되었고 사람의 말초 혈액내 단핵구로부터 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6를 유리하도록 하는 능력이 있다는 것이 밝혀졌다. 본 연구에서는 IL-2와 IL-4가 동시에 상승되어 T 임파구가 전체적으로 활성화된 것을 나타내며 특히 IL-2은 항종양 면역능을 나타내는 세포성 면역반응을 증가시키는 Th1으로서, ABNOBAviscum®의 자연 살해 세포수의 증가와 관련이 있을 것으로 생각된다. 본 실험에서 호산구를 활성화시키고 체액성 면역능을 증가시키는 것으로 알려져 있는 IL-4의 상승이 관찰되었으나 호산구가 증가되지 않아

Th1에 의한 면역반응을 우세하게 유도하는 것으로 생각된다. 또한 대식세포와 수지상 세포들에서 분비되는 IL-12는 강력한 항종양 면역능을 나타내는 사이토카인으로 면역 유전자 치료에 이용되고 있는 사이토카인으로서 투여군에서 증가되어 있는 것은 ABNOBaviscum<sup>®</sup>의 항종양 면역능에 대한 증거가 될 수 있다.

