

# 淸肺散이 마우스의 免疫 및 過敏反應에 미치는 影響

심문경\* · 박은정\*\* · 정규만\*\*\*

\* 圓光大學敎 大學院 韓醫學科

\*\* 圓光大學敎 韓醫科大學

\*\*\* 慶熙大學敎 韓醫科大學

## 1. 緒論

淸肺散은 宋代 劉<sup>1)</sup>의 <幼幼新書>에 처음으로 記錄된 處方으로 發散解表<sup>6)</sup>, 30), 32-34), 祛痰止咳<sup>6)</sup>, 26), 30), 32-34), 降氣平喘<sup>6)</sup>, 26), 30), 32-34)의 效能이 있어 肺氣喘息 및 咳嗽에 응용되며, 그 構成 藥物은 發散解表하는 麻黃, 細辛, 柴胡, 升麻와 化痰止咳하는 貝母, 半夏, 桔梗, 杏仁, 款冬花, 馬兜鈴, 桑白皮, 百合과 淸肺熱하는 地骨皮, 利水滲濕하는 白茯苓, 理氣하는 青皮 및 潤肺生津하는 麥門冬으로 이루어져 있다.<sup>6), 30), 32), 34)</sup>

<黃帝內經><sup>2)</sup>에서는 喘喝, 喘咳, 喘呼, 喘麤 등이 記錄되어 있고, 明代에 와서 哮와 喘을 區分하여 喉中如水鷄聲은 哮이고, 氣促하여 連續不能以息한 것은 喘이라고 하였으며<sup>3)</sup>, 최근 王<sup>3)</sup>은 哮喘이 西醫學의 氣管支 喘息에 該當된다고 하였다.

哮喘의 病因은 夙根<sup>7)</sup>과 六淫傷(風寒暑濕相干<sup>16)</sup>, 21), 炎暑<sup>2)</sup>, 20), 燥氣流行

2)과 七情傷(驚憂氣鬱<sup>13)</sup>, 18), 20), 喜怒不節<sup>5)</sup>, 22), 墮恐<sup>2)</sup> 및 飲食傷(過食肥膩煎燂<sup>15)</sup>, 16), 食熱毒物<sup>15)</sup>, 16), 生冷物<sup>2)</sup>, 16)이다. 哮喘의 症狀은 喉中有水鷄聲<sup>1)</sup>, 3), 4), 9-11), 16), 23), 25), 27), 31), 氣急息數<sup>1)</sup>, 8), 16), 20), 22-24), 27), 氣促<sup>3)</sup>, 5), 氣粗<sup>1)</sup>, 7), 2), 擡肩<sup>3)</sup>, 8), 20), 23), 24), 27), 肩息<sup>1)</sup>, 2), 欠肚<sup>24)</sup>, 兩脇扇動 陷下作抗<sup>5)</sup>, 面青<sup>1)</sup>, 9), 2) 등이며, 治療法은 發作期에 發散<sup>17)</sup>, 攻邪<sup>28)</sup>를 하고, 緩解期에 補肺固衛<sup>31)</sup>, 健脾化痰<sup>31)</sup>, 益腎攝納<sup>31)</sup> 등의 扶正氣<sup>29)</sup>를 한다.

氣管支 喘息은 小兒期の 흔한 慢性疾患으로 여러 가지 刺戟에 대한 氣道の 過敏性과 炎症反應 및 平滑筋의 廣範圍한 攣縮에 의하여 기침과 喘鳴, 呼吸延長, 呼吸困難 등의 特徵 症狀이 可逆的으로 일어나는 閉鎖性 疾患이며<sup>41)</sup> 代表的인 I型 알레르기 疾患으로서 小兒에 있어서는 여러 가지 病因說中 免疫學說이 가장 有力하며 外因性 또는 알레르기性 喘息이라 불린다.<sup>38)</sup>

喘息과 關聯되는 免疫 및 過敏 反應

에 대한 實驗研究로는 崔 등<sup>43)</sup>이 加味 麥門冬湯으로 PCA의 遲延型 過敏反應 抑制效果를, 江田 등<sup>48)</sup>이 柴朴湯으로 PCA接觸性 皮膚炎과 atopy性 喘息의 抑制效果를 報告하였으며, 臨床研究로는 李 등<sup>44)</sup>이 免疫治療에 대한 T림프구 亞型和 增殖能의 變化를, 錢 등<sup>45)</sup>이 末梢 血液 림프구의 IgE 生成能力과 IgE 受容體 表現과의 關係를, 李 등<sup>46)</sup>이 atopy性 및 非atopy性 小兒 喘息에서 IgE, anti-IgE 自家抗體의 陽性率과 亞型에 관한 研究를, 李 등<sup>47)</sup>이 小兒喘息에서의 IgG亞型에 대한 調查를 報告하였다.

최근 T림프구에 속하는 協力 T細胞에도 TH1과 TH2 亞群이 있으며, TH1 協力 T細胞는 인터페론이나 인터루킨 2 및 12(IL-2와 IL-12)를 分泌하여 細胞性 免疫反應을 增加시키는 반면, IL-4, 5, 6 및 10 등을 分泌하여 IgE 形成을 促進하는 TH2 協力 T細胞의 機能을 抑制시킴이 보고되었다.<sup>61)</sup> 그러나 淸肺散이 TH1 協力 T細胞의 機能과 TH2 協力 T細胞의 機能에 미치는 影響에 대한 報告를 接한 바가 없다.

이에 著者는 圓光大學校 韓醫科大學 附屬 全州 韓方病院 小兒科에서 小兒의 알레르기性 喘息 患者의 發作期에 많이 活用하는 淸肺散을 臨床에서 活用하는 用量으로 加減한 後 마우스(mouse)에 投與하여 免疫및 過敏 反應에 미치는 影響에 대해서 여러 가지 實驗 方法을 通하여 알아보았으며, 이에 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 動物

8-10週 사이의 Balb/C 생쥐와 C57B L/6 생쥐(圓光大學校 韓醫科大學 實驗 動物飼育室)로 cage(18×20cm)당 6個體의 密度를 維持하였으며, 2週日間 室溫에서 물과 飼料(제일 사료 주식회사)를 충분히 供給하고, 낮과 밤의 週期를 12時間씩 調節하면서 스트레스를 받지 않도록 飼育한 다음 本 實驗에 使用하였다.

#### 2) 藥材

淸肺散은 <幼幼新書><sup>1)</sup>에 準하였으며 本 實驗에서 使用한 藥材는 圓光大學校 韓醫科大學 全州附屬韓方病院의 精選된 藥材를 使用하였고, 그 內容과 含量分量은 scheme1.과 같다.

#### 3) 抗原<sup>52-54)</sup>

胸腺 存在性 抗原으로 使用한 綿羊 赤血球(Sheep Red Blood Cell:SRBC)는 全北大學校 獸醫科大學에서 飼育하고 있는 綿羊의 頸靜脈로부터 採血한 後 同量의 Alsever 氏液(pH 6.1)을 加하여 4℃에서 보관하면서 4週 以內에 使用하였으며 보관 중인 綿羊赤血球를 使用할 때는 使用直前에 滅菌한 PBS(Phosphate Buffered Saline, pH7.2)로 2-3回 洗滌하여 1×10<sup>8</sup> cell의 濃度로 適定한 後 使用

Scheme 1. Prescription of Chungpyesan

韓 藥 名	生 藥 名	重 量(g)
半 夏 (薑汁浸一宿)	Tuber pinelliae (mixed rhizoma zingiberis juice)	6.00
馬 兜 鈴	Fructus aristolochiae	6.00
麻 黃	Herba ephedrae	6.00
杏 仁	Semen armeniacae	4.80
地 骨 皮	Cortex lycii radices	4.80
桑 白 皮	Cortex mori	4.80
貝 母	Bulbus fritillariae	4.00
升 麻	Rhizoma cimicifugae	4.00
青 皮	Pericarpium citri nobilis viride	4.00
百 合	Bulbus lili	4.00
款 冬 花	Flos farfarae	4.00
柴 胡	Radix bupleuri	4.00
桔 梗	Radix latycodi	4.00
白 茯 苓	Poria	4.00
麥 門 冬	Radix ophiopogonis	4.00
細 辛	Radix asari	2.80
Total amount		71.20

하였다.

## 2. 方法

### 1) 檢液의 調製

上記 淸肺散을 成人 分量 71.20g/60kg(1回)을 기준으로 하여 淸肺散 10g을 2000ml round flask에 넣고 蒸溜水 620ml를 加하여 100℃로 4時間 동안 重湯하여 濾過布로 濾過하였으며, 濾過液을 1000rpm에서 20分間 遠心分離하여 얻은 上層液을 다시 重湯하여 100ml(1×)씩으로 濃縮하여 檢液으로 使用하였다.

### 2) 檢液의 投與

#### (1) 生體內 實驗

各各의 檢液投與群에서는 檢液을 생쥐 1마리당 CPS1群은 檢液(淸肺散(CPS) : 蒸溜水(DW) = 1:10)을, CPS2群은 檢液(CPS × 1)을, CPS3群은 檢液(CPS × 10)을 0.5ml씩 1日 1回씩 14日 동안 經口投與 하였으며, 對照群은 同量의 生理食鹽水(0.85% NaCl)를 同一方法으로 投與하였다.

#### (2) 生體外 實驗

正常 마우스(mouse)의 大食細胞를 分離한 後 CPS1群은 檢液(CPS × 1)을, CPS2群은 檢液(CPS:DW=1:10)을, CPS3群은 檢液(CPS:DW=1:100)을 分離된 大食細胞에 處理한 後 6時間 培養하였다.

#### 3) 림프구의 增殖反應 測定<sup>51)</sup>

檢液의 投與가 마우스(mouse)의 림프구 增殖에 미치는 影響을 알아보기 위하여 림프구의 增殖反應을 [<sup>3</sup>H]-thym

idine이 單位 時間 內에 細胞內로 流入되는 정도로 測定하였다. C57BL/6로부터 얻은 脾臟細胞 1×10<sup>7</sup> cells/ml을 RPMI 1640/10% FBS 培養液에서 mytomycin C (MMC)(50 μg/ml)와 함께 37℃에서 30분간 培養한 後 細胞를 PBS로 2회 遠心 洗滌한 다음 實驗群 생쥐에서 摘出した 脾臟細胞 1×10<sup>7</sup> cells/ml과 함께 混合하여 96 well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 分注하였다. 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培養器에서 3-5일간 培養한 다음 培養이 끝날 무렵에 1μCi [<sup>3</sup>H]-thymidine을 각 well에 넣고 4時間이 지난 다음 well로부터 細胞를 모은 後 放射性 同位元素 測定器에 의하여 測定하였다. 細胞의 增殖率은 CPM(count per minute)으로 나타내었다.

#### 4) T 細胞 亞型分析<sup>60), 68)</sup>

##### (1) 單核細胞 分析

檢液 投與 14日 된 생쥐의 末端에 存在하는 림프節을 떼어 낸 後 3ml의 HBSS(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, -free)가 들어 있는 Petri-dish(diameter 30mm)에 옮겨 슬라이드 글라스로 으깨어 單液 浮遊液을 만든 다음 mesh를 통과시켜 單細胞 浮遊液을 얻었다. 單細胞의 分離는 ficoll-paque를 使用하여 400g(gravity), 10℃에서 10분 동안 遠心 分離 시켰다. 分離된 單核細胞는 PBS(pH 7.2)로 3회 洗滌하여 단클론 抗體의 結合에 使用하였다.

##### (2) T細胞 亞群과 단클론 抗體의 結合

단클론 抗體는 helper/inducer T cell을 認知하는 anti-mouse L3T4(CD4<sup>+</sup>)와 suppressor/cytotoxic T cell을 認

知하는 anti-mouse Lyt2(CD8<sup>+</sup>)를 사용하였다. 이들 단클론 항체와 T세포 亞群의 結合을 위해 단클론 항체를  $1 \times 10^5$ 개의 單細胞 浮遊液  $50\mu\text{l}$ 에 混合한 後  $4^\circ\text{C}$  暗冷 장소에서 30분간 反應시켰다. 反應後 2ml의 cold PBS로 洗滌하였다.

### (3) 流式細胞 分離 分析

anti-L3T4(綠色 螢光 物質; fluorescein isothiocyanate; FITC)와 anti-Lyt2(赤色 螢光 物質; phycoerythrin ; PE)抗體를 混合하여 異染色分法(two-color analysis)을 이용하였다. 단클론 항체에 染色된 單細胞 浮遊液에 림프구 亞型群은 488nm세기로 發光된 argon-ion laser beam 200mw 出力에서 分析하였다.

螢光 物質의 螢光 信號는 綠色 發光이 530nm에서, 赤色 發光이 575nm의 band pass filter에서 選擇적으로 透過되어 各各 感知되었다. 單細胞 浮遊液에서 림프구 이외의 細胞는 레이저 빛의 散亂에 의하여 細胞의 情報를 提供하는 前方感知器(forward scatter detector)와 側方感知器(angle detector)로 感知하여 除去하였다. 이와 같은 各各의 固有한 단클론 항체에 結合된 FITC 및 PE가 전해 주는 情報는 BDIS(Becton Dickinson Immunocytometry System, Sunnyvale, California)의 consort 30 computer program에 의하여 全體 림프구에 대한 亞細胞群의 比率로 환산되어 계산되었다.

### 5) Rosette形成細胞 測定<sup>52-56, 59)</sup>

Rosette形成細胞 (Rosette Forming C

ell: RFC) 測定은 Bach等의 方法에 따라서 測定하였다. 單核細胞 浮遊液은 實驗群의 BALB/C 생쥐로부터 腹腔을 切開하여 脾臟(2個體混合)을 摘出した 後 ficoll-paque을 利用하여 400g(gravity)로 遠心分離시켜 얻었다. 이렇게 얻은 單核細胞 混合浮遊液을  $3 \times 10^7$ 개의 細胞로 準備한 다음 附着細胞를 除去하기 위해서 滅菌된 注射器(2ml)에 glass wool을 體積하여 2ml의 細胞浮遊液을 添加한 後  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 培養하였다. 그 後 冷却된 15ml의 HBSS를 계속해서 注射器에 注入하여 通過시켰다. 이와 같이 準備된 淋巴球를  $1 \times 10^6$ 細胞로 滴定한 後에  $1 \times 10^7$  SRBC를 混合하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 1時間 동안 培養하였다. Rosette形成細胞의 測定은 上記와 같이 培養된 細胞浮遊液을  $4^\circ\text{C}$  暗冷狀態에서 12時間 以上 保管한 後  $400\times$  顯微鏡視野에서 淋巴球 한 개당 3개 이상의 SRBC가 附着된 것을 檢鏡하여 決定하였다.

### 6) 細胞 毒性 測定<sup>71)</sup>

本 藥物의 投與가 抗腫瘍 作用에 미치는 影響을 알아보기 위하여 癌細胞株인 K562 細胞를 培하여 [<sup>3</sup>H]-thymidine이 單位時間內에 細胞內로 流入되는 程度를 測定하였다. 사람의 lymphoma cell인 K562 細胞를 RPMI 1640, 10% FBS 培養液에서 5% CO<sub>2</sub>,  $37^\circ\text{C}$  條件을 맞춰 키워 96well plate에 分注하고 여기에 定量的 HGC를 添加하여 24時間 培養한 後  $1\mu\text{Ci}$  [<sup>3</sup>H]-thymidine을 넣고 4時間 동안 培養하였다. 각 well로부터 細胞를 모은 後 放射性 同位原素 測定器에 의하여 測定하였

다. 細胞의 增殖率은 CPM(count per minute)으로 나타내었다.

7) 自然致死細胞(Natural Killer cell : NK cell)의 活性度 測定<sup>81), 82)</sup>

(1) 標的細胞 (Target cell)

생쥐의 自然致死細胞에 感受성이 銳敏한 YAC-1細胞를 NK cell 活性度 測定에 使用하였다. YAC-1 細胞는 連續 浮遊 培養法으로 維持 하였으며, 培養液은 10% fetal bovine serum과 p enicillin(100  $\mu$ g/ml), streptomycin(100  $\mu$ g/ml) 및 gentamycin(100  $\mu$ g/ml)이 添加된 RPMI 1640을 使用하였다.

(2) 效果細胞 (Effector cell)

藥物이 投與된 實驗群 생쥐로부터 腹部를 切開하여 spleen를 摘出した 다음 3ml의 HBSS가 들어 있는 petri-dish 로 옮긴 後 slide glass로 으깨어서 細胞浮遊液을 만들었다. 細胞浮遊液을 Mesh로 거른 다음 ficoll-paque를 使用하여 400g(gravity)로 遠心分離시켜서 單核細胞層을 얻었다. 單核細胞는 HBSS로 3回 洗滌하여 hemocytometer를 使用하여  $4 \times 10^6$ 개의 細胞로 滴定한 後 自然致死細胞 活性度 測定에 使用하였다.

(3) 自然致死細胞 活性度 分析

C'FDA의 working solution(150  $\mu$ g/ml)은 C'FDA stock solution (20  $\mu$ g/ml/acetone) 7.5 $\mu$ l를 1ml의 HBSS에 稀釋시켜서 15分以內에 實驗에 使用하였다. 標的細胞의 label은 C'FDA의 working solution 1ml 에  $2 \times 10^6$ 개의 YAC-1 細胞를 浮遊시켜서 30分間 培養시

켰다. 培養後 2ml의 HBSS로 3回 洗滌한 後 自然致死細胞 活性度 測定에 使用하였다. C'FDA에 label된 YAC-1 細胞는 200 $\mu$ l RPMI 1640 medium이 들어 있는 5mm round-bottomed poly styrene tube에 效果細胞와 함께 培養하였고 效果細胞와 標的細胞의 比率은 20:1 로 하였으며, 融合을 向上시키기 위하여 200g(gravity)로 約 30초간 遠心分離시켜 37 $^{\circ}$ C에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에 培養하였다. 培養은 3時間동안 수행하였으며, 流式細胞 分離 分析器(FCM)로 測定할 때까지 4 $^{\circ}$ C의 暗冷狀態에서 保管하였다. 또한 C'FDA에 label된  $2 \times 10^4$ 개의 YAC-1 細胞만 200 $\mu$ l RPMI 1640 medium에서 實驗群과 同一한 時間으로 培養하였으며, 이것을 投與對照群으로 使用하였다. YAC-1 細胞의 生存率은 trypan blue(Flow L abs) exclusion方法과 流式細胞 分離 分析器로 測定하였으며 90%以上 이었다.

自然致死細胞에 의해 致死되는 標的細胞의 測定은 488nm 세기로 發光된 argon-ion laser beam 200mW出力에서 分析되었으며, 綠色螢光物質(fluorescein isothiocyanate)은 530nm의 band pass filter에서 選擇의으로 透過感知되었다. 感知된 情報는 BDIS의 consort 30 computer program에 의하여 百分率로 計算되었다. 自然致死細胞의 活性度는 다음 公式에 의해 計算되었다.

8) 接觸性 過敏反應의 測定<sup>54), 60), 64-68)</sup>

接觸性 過敏反應(Contact Hypersensitivity : CH)의 誘發을 위하여 DNFB

$$\text{NK Cell Activity(\%)} = \frac{\text{TE}_0 - \text{TE}_3}{\text{TE}_0} \times 100$$

TE<sub>0</sub> = C'FDA로 label된 YAC-1 cell과 effector cell (1:20)을 混合하여 培養直前 (0時間)의 C'FDA로 label된 YAC-1 cell의 수

TE<sub>3</sub> = C'FDA로 label된 YAC-1 cell과 effector cell (1:20)을 混合하여 培養3時間 後의 C'FDA로 label된 YAC-1 cell의 수

(Sigma)를 抗原으로 使用하였다. acetone과 olive oil을 4:1의 比率(V/V)로 溶解한 後 1.5% DNFB 溶液 20 $\mu$ l을 藥物 投與 8日된 實驗群 생쥐의 腹部 皮膚에 感作하고 感作 後 4日에 0.2% DNFB溶液 5 $\mu$ l을 耳輪內面에 各各 塗抹하여 惹起 措置하였다. 腫脹增加率은 mitutoyo engineer's micrometer를 이용하여 惹起直前과 惹起後 24時間뒤에 各各 測定하여 10<sup>-4</sup>inch로 나타냈으며, 抑制(Depression)의 百分率은 다음 公式에 의하여 計算하였다.

$$\% \text{ Depression} = \frac{A-B}{A-C} \times 100$$

A: Positive con.

B: Experiment con.

C: Negative con.

## 9) 大食細胞의 食食能 分析<sup>68-77)</sup>

### (1) 大食細胞의 誘導 및 分離

#### ① 生體內 實驗

檢液 投與 14日된 實驗群 생쥐에 3ml의 滅菌된 4.5% Brewer's modified thioglycolate broth를 腹腔皮下에 注射하여 大食細胞의 增殖을 誘導하였다. 3日後 實驗群 생쥐의 上皮를 切開한 後에 腹腔에 滅菌된 HBSS(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>

-free) 5ml를 注射하여 pasteur pipette으로 腹腔內의 大食細胞를 分離하였다. 分離된 大食細胞는 HBSS로 3回 洗滌한 後 食食能 分析에 使用하였다.

#### ② 生體外 實驗

正常 마우스(mouse)의 腹腔에 滅菌된 PBS(pH7.2)로 腹腔을 洗滌하여 腹腔 大食細胞가 充分한 peritoneal exudate cell(PEC)을 얻었다. CPS液을 各各의 濃度로 添加하여 6時間 培養 後에 細胞를 모아서 차가운 PBS로 400g(gravity)에서 10分間 遠心分離하여 2回 洗滌한 後 大食細胞 活性度 分析에 利用하였다.

### (2) 大食細胞의 食食能 分析

大食細胞의 食食能 測定은 FITC로 label된 polystyrene latex particle (1.8  $\mu$ m, Polysciences, Warrington)를 使用하였다. 5% fetal bovine serum이 添加되어 있는 RPMI 1640 medium에 1 $\times$ 10<sup>6</sup>개의 大食細胞와 5 $\times$ 10<sup>7</sup>개의 fluorescent latex particle 50 $\mu$ l를 添加한 後 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub> 및 濕氣가 充分한 培養器에 45分間 37 $^{\circ}$ C에서 培養하였다. 培養後 2ml의 cold HBSS를 添加한 後 400g(gravity)로 10分間 遠心分離하여 2回 反復 洗滌하였다. 綠色

螢光을 나타내는 大食細胞의 食食能은 流式細胞 分離 分析器로 測定하였다. 488nm 세기로 發光된 argon-ion laser beam 200mW 出力에서 分析되었으며, 綠色螢光物質은 530nm의 band pass filter에서 選擇의으로 透過되어 感知되었다. 感知된 情報은 BDIS consort 30 computer program에 의하여 百分率로 計算되었다. 大食細胞의 食食能 測定은 다음 公式에 따랐다.

$$P = \frac{TE_0 - TE_{45}}{TE_0} \times 100$$

P=Phagocytic Activity(%)

TE<sub>0</sub> = FITC로 label된 latex particle(5×10<sup>7</sup>)과 大食細胞(1×10<sup>7</sup>)를 0時間 培養後 latex particle의 數.

TE<sub>45</sub> = FITC로 label된 latex particle(5×10<sup>6</sup>)과 大食細胞(1×10<sup>6</sup>)를 45分間 培養後 latex particle의 數.

10) 培養中인 大食細胞에서 反應窒素 中間物質 生成能 測定(78), (79), (82)

(Reactive Nitrogen Intermediate : RNIs)

反應窒素 中間物質 (Reactive Nitrogen Intermediate ; RNIs)은 大食細胞 특히 생쥐의 腹腔內 大食細胞에서  $\gamma$ -인터페론 ( $\gamma$ -IFN ; Boehringer Mannheim, Germany)이나 Lipopolysaccharide (LPS ; Sigma, U.S.A.)또는 다른 微生物의 感染에 刺戟받아 L-arginine에 依存的으로 生成되며 이들이 特異的 또는 非特異的 免疫反應에 重要한 役割을 하는 것으로 알려져있다.

RNI는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO 등이 있는데 이들은 細胞培養液에 蓄積되기 때문에 蓄積된 RNI를 發色시켜 ELISA reader로 測定하였다.

藥物을 投與한 생쥐의 腹腔大食細胞를 分離한 後 96 well plate에 well당 1-2×10<sup>5</sup>개로 넣어 주었다.  $\gamma$ -IFN이나 LPS, 또는 RNI生成 阻害劑를 PBS에 녹여 各各의 濃度에 따라 培養細胞에 添加하고 48時間 동안 培養한 後에 각 well로부터 100 $\mu$ l씩의 培養液을 取하여 ELISA titer tek plate에 옮긴 後 同量의 griss reagent(1:1, v/v, N-1-naphthyle-thylendiamine 0.1% in H<sub>2</sub>O, sulfanilamide 1% in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 添加하고 10分間 室溫에 두었다. 全體 RNI titertek multiscan MCC/340(Flow Lab)으로 540nm에서 吸光度를 測定했다. 이때 RNI濃度에 對한 標準 曲線은 NaNO<sub>2</sub>를 連續 稀釋하여 얻었다.

11) 赤血球의 凝集素價 및 溶血素價 測定(57-59)

檢液 投與 14日째 모든 實驗群의 생쥐에 1×10<sup>8</sup>cell의 SRBC를 腹腔內로 注入하여 免疫하고, 免疫後 8日에 眼球後靜脈으로부터 pasteur pipette을 이용하여 採血한 다음 凝集素價 및 溶血素價를 測定하였다.

凝集素價의 測定은 實驗群으로부터 얻은 血清을 56℃에서 30分 동안 加熱하여 補體作用을 除去한 後에 microtitration trays(Lymbro chemical co.)에 滅菌한 PBS를 25 $\mu$ l씩 連續 稀釋한 後 여기에 1×10<sup>8</sup>cell의 SRBC를 50 $\mu$ l씩 各各 分注시킨 後 37℃에서 24時間 培養後 凝集이 發生한 最少 濃度의 값으



로 決定하였다.

溶血素價의 測定은 實驗群으로부터 얻은 血清을 56°C에서 30分 동안 加熱하여 補體作用을 除去한 後에 microtit

ration trays에 5% rabbit complement (PBS : RC = 19:1)를 25 $\mu$ l씩 分注한 다음 여기에 1 $\times$ 10<sup>8</sup>cell의 SRBC를 各 分注하여 37°C에서 1時間동안 培養

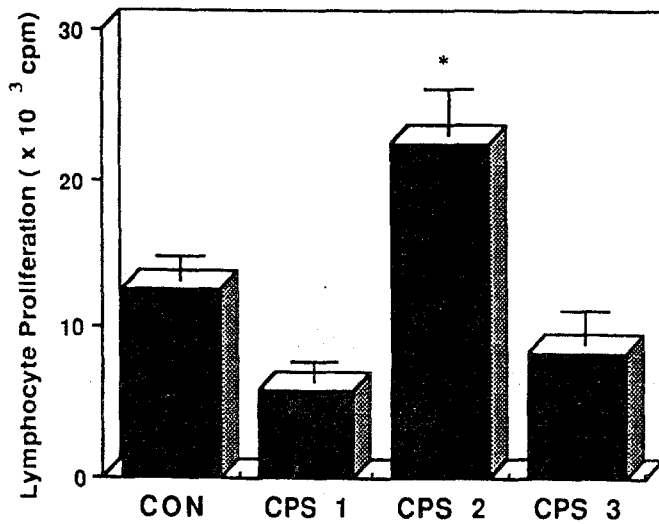


Fig. 1. Effects of CPS administration on the proliferation of mouse mixed lymphocytes reaction. Spleen cells from a BALB/C were incubated with mitomycine c (50mg/ml)-pretreated spleen cells from experimental mice cultured well labeled for 4hr with [<sup>3</sup>H] thymidine on day 5. The above data shows means  $\pm$  S.E. \*P<0.005 compared with the control group. The components of administered drug as follows :

CON, Normal saline (0.5ml/day)

CPS1, CPS : DW = 1:10

CPS2, CPS 1 $\times$ (0.5ml/day)

CPS3, CPS10 $\times$ (0.5ml/day)

한 後 血清이 發生한 最小 濃度의 값 은 影響  
으로 決定하였다.

### III. 實驗成績

#### 1. 림프구의 增殖反應에 미치

清肺散의 投與가 마우스(mouse)의 림프구 增殖에 미치는 影響을 알아보기 위하여 림프구의 增殖反應을 [<sup>3</sup>H]-thymidine이 單位時間內에 細胞內로 流入되는 程度로 測定한 結果 對照群이 1

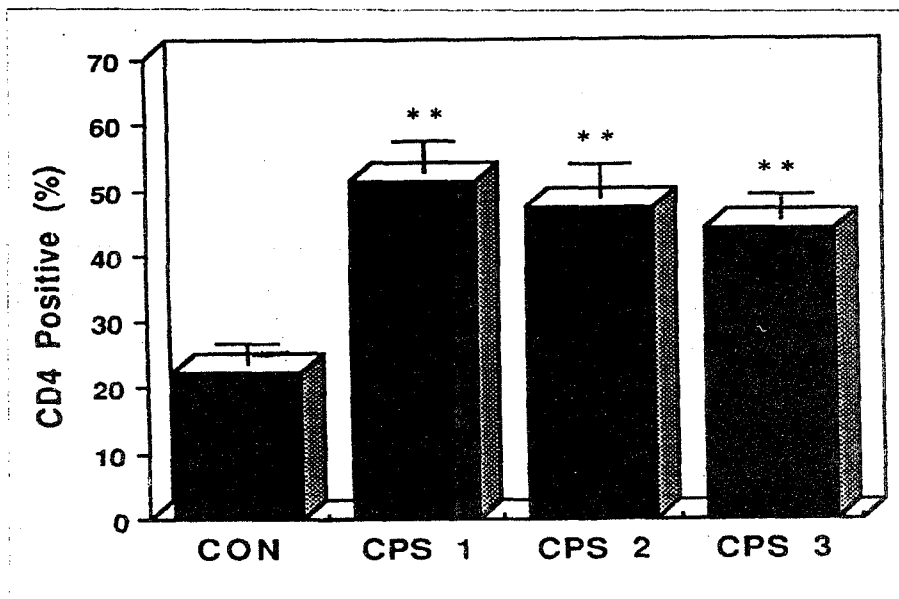


Fig. 2. Effects of antigen-challenge on sequestering of periperal lymphocytes subset during administration of CPS. A single cell suspension prepared from periperal lymph nodes was incubated with anti-L3T4 (CD4<sup>+</sup>) antibody and analysed FCM(Fac. flow cytometry). The components of administered drug are the same as Fig. 1. Significant increment was shown in three mouse groups.

The above data shows means  $\pm$  S.E. \*\*P<0.005 compared with the control group.

2.5±0.7×10<sup>3</sup>cpm인데 비하여 CPS1群, CPS2群, CPS3群은 各各 5.8±0.3×10<sup>3</sup>cpm, 22.4±0.3×10<sup>3</sup>cpm, 8.4±0.2×10<sup>3</sup>cpm으로 CPS2群에서 對照群에 비하여 有意性있게 림프구의 增殖을 增加시켰다(Fig.1).

## 2. T 細胞의 亞型 變化에 미치는 影響

BALB/C 생쥐에 淸肺散을 投與하여 림프절內의 T 細胞群의 亞型變化에 미치는 影響을 調査하였다. 淸肺散의

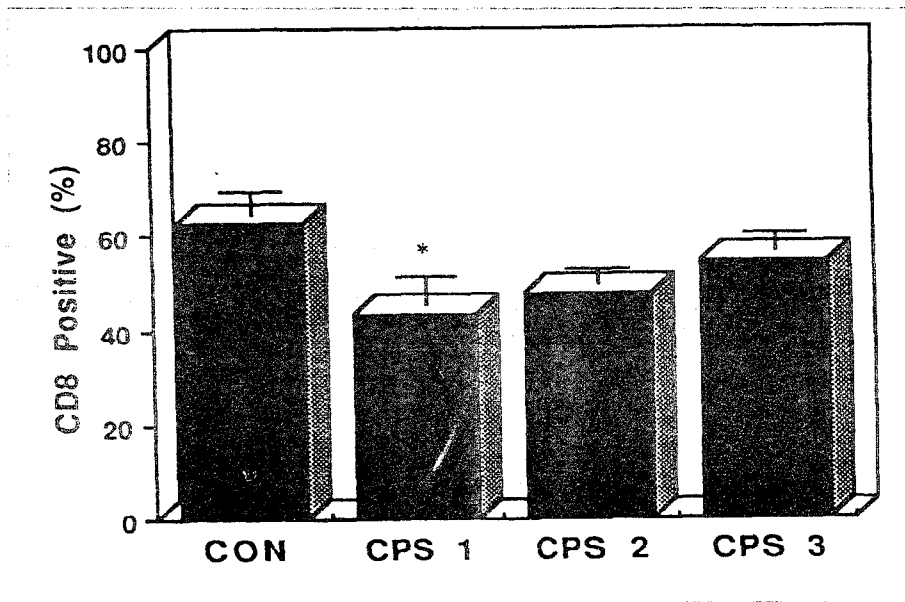


Fig. 3. Effects of antigen-challenge on sequestering of periperal lymphocytes subset during administration of CPS. A single cell suspension prepared from periperal lymph nodes was incubated with anti-Lyt2 (C D<sup>8+</sup>) antibody and analysed FCM. The components of administered drug are the same as Fig. 1. Significant inhibitions was shown in one mouse group (CPS1).

The above data shows means ±S.E. \*P<0.05 compared with the control group.

投與로 인하여 CD4 陽性細胞의 對照群이  $22.5 \pm 3$ 인데 비하여 CPS1群은  $51.4 \pm 7$ , CPS2群은  $47.2 \pm 5$ 이며 CPS3群은  $43.8 \pm 3$ 으로 全體적으로 增加하는 傾向을 보였으며, 특히 CPS1群에서 有意性 있는 增加를 보였다 (Fig.2). 반면 생쥐의 림프절에서 CD8 陽性細胞는  $62.8 \pm 6$ 인 對照群에 비하여 CPS1群

은  $43.2 \pm 5$ , CPS2群은  $47.8 \pm 5$ 이며 CPS3群은  $54.6 \pm 3$ 으로 全體적으로 낮아지는 傾向을 보였다 (Fig.3).

本實驗의 研究結果에 의한 CD4/CD8 陽性細胞의 比率는 對照群이 0.35/1인 반면 CPS1群은 1.18/1, CPS2群은 0.98/1, CPS3群은 0.80/1로 對照群에 비하여 有意性 있게 增加하여 淸肺散

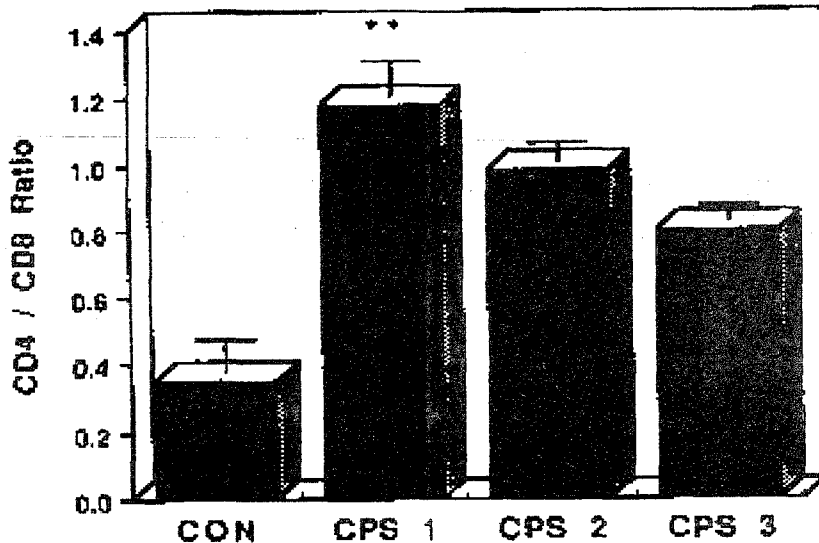


Fig. 4. Changes in anti-L3T4/ anti-Lyt2 ratio during administration of CPS. The data about CD<sup>4+</sup> and CD<sup>8+</sup> cells were obtained from previous aquired results. Significant increment was shown in one mouse group (CPS1).

The above data shows means  $\pm$ S.E. \*\*P<0.005 compared with the control group.

의 投與는 T 細胞群 중 CD4 兩性細胞의 比率을 全體的으로 增加시키는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

### 3. Rosette 形成細胞에 미치

는 影響

BALB/C 생쥐에 淸肺散을 投與하여 綿羊赤血球에 대한 免疫反應 細胞數에 미치는 影響을 比較하기 위해 생쥐로부터 脾臟을 摘出하여 rosette 形成細胞

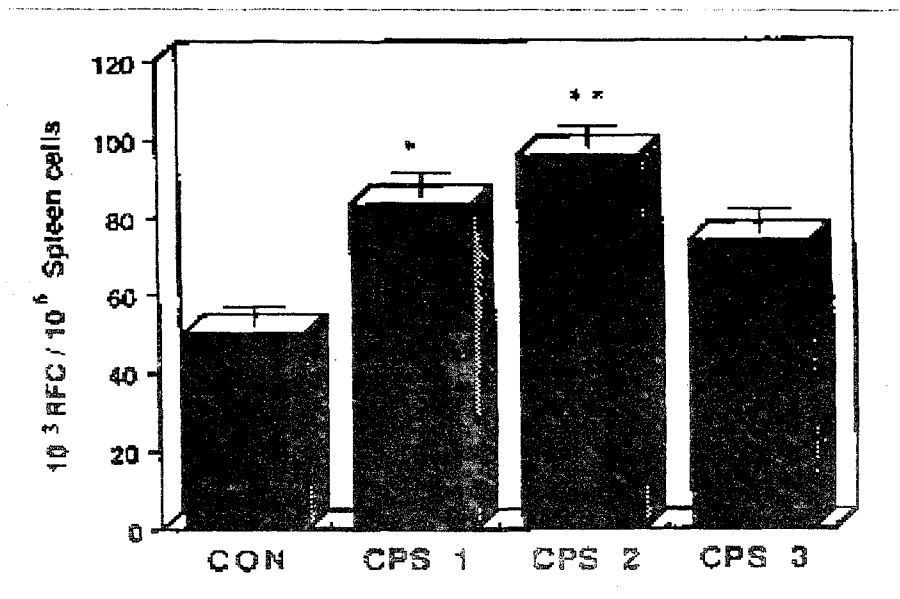


Fig. 5. Effects of CPS administrations on the appearance of rosette forming cells (RFC) in mice. Mice were immunized with SRBC, and spleen cells were assayed for RFC at 8days after immunization. Mice were orally given CPS for 14days before sensitization.

The components of administered drug are the same as in Fig. 1.

An significant increment was shown in two mouse groups (CPS1, CPS2).

The above data shows mean  $\pm$ S.E. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$  compared with the control group.

胞數를 測定하였던 바,  $10^6$  脾臟細胞當  $10^3$  RFC의 數는 對照群이  $50.4 \pm 3$ 인데 비해, CPS1群은  $82.9 \pm 8$ , CPS2群은  $95.4 \pm 5$ , CPS3群은  $73.8 \pm 5$ 로 對照群에 비하여 모두 增加하는 傾向을 보였으며, 특히 CPS2群에서 有意性 있게 增加하였고, CPS3群에서는 對照群보다는 增加하였지만 CPS2群과 비교하였을 때 약간 減少하는 傾向을 보였다(fig. 5).

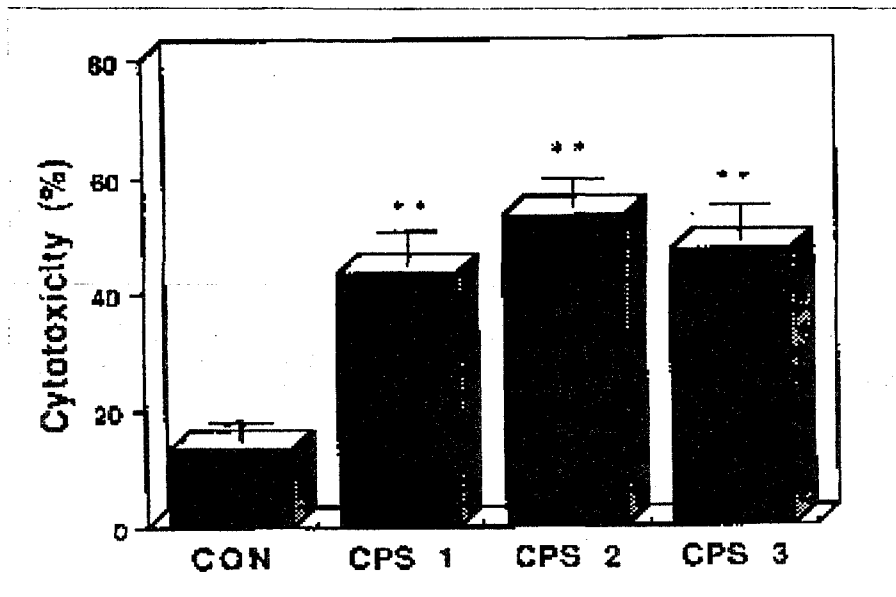


Fig. 6. Effects of CPS administrations on the cytotoxicity in human l-ymphoma (K562). For the analysis of cytotoxicity, the cells were incubated RPMI 1640/10% FBS and treated with various concentrations of CPS. After 1hr, the cells were labelled with  $1 \mu$  Ci [ $^3$ H]-Thymidine for 4 hr. A significant increment was shown in three mouse groups (CPS1, CPS2, CPS3).

The above data shows mean  $\pm$  S.E. \*\*P<0.005 compared with the control group. The components of administered drug are the same as in Fig. 1.

#### 4. 細胞 毒性에 미치는 影響

BALB/C 생쥐에 있어서 淸肺散의 投與가 抗癌作用에 미치는 影響을 알아 보기 위하여 癌細胞株인 K562를 使用하여 實驗한 結果, 對照群은  $13.2 \pm 4$ 인데 비하여 CPS1群은  $43.5 \pm 4$ , CPS2群은  $53.2 \pm 4$ , CPS3群은  $47.4 \pm 4$ 로 全體의므로 增加하는 傾向을 나타냈으며,

특히 CPS2群에서 有意性을 나타내며 크게 增加 하였다 (Fig.6).

#### 5. 自然致死細胞의 活性度에 미치는 影響

BALB/C 생쥐에 있어서 淸肺散의 投與가 自然致死細胞의 活性에 미치는 影響을 알아보기 위하여 YAC-1 target cell을 對象으로 實驗한 結果, 對照群

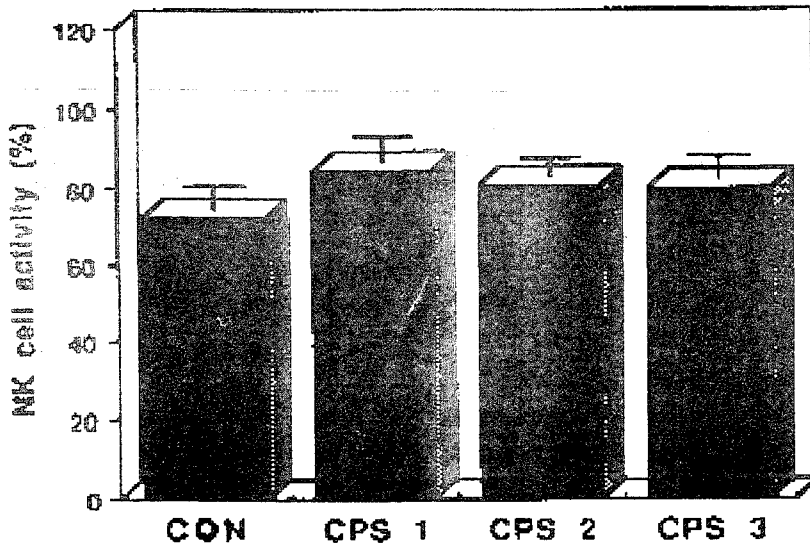


Fig. 7. Effects of CPS administration on NK cell activity. Effector cells are incubated with C<sup>14</sup>FDA labelled YAC-1 target cells at the ratio of 20:1 for 3hrs. The activity of NK cells was calculate according to the Materials and Methods. The components of administered drug are the same as in Fig. 6.

은  $72.3 \pm 6$ 인데 비하여 CPS1群은  $84.2 \pm 5$ , CPS2群은  $80.5 \pm 5$ , CPS3群은  $79.8 \pm 6$ 으로 약간의 增加를 나타냈다(Fig 7).

### 6. 接觸性 過敏反應에 미치는

### 影響

BALB/C 생쥐에 있어서 淸肺散의 投與가 DNFB減作에 의한 接觸性過敏反應에 미치는 影響을 알아보기 위하여, 檢液을 생쥐 한 마리당 0.5ml씩 14

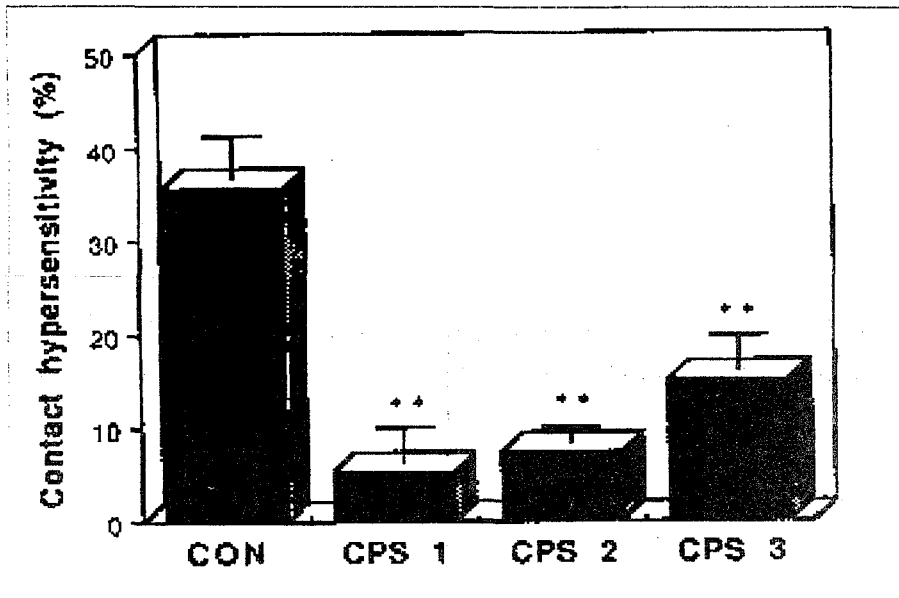


Fig. 8. Effects of CPS administrations on contact hypersensitivity responses in mice. Mice were contact-sensitized with  $20\mu\text{l}$  of 1.5% DNFB on the day 0. Mice were challenged on the day 5 after sensitization on ear, and ear swellings were measured 24 hrs later.

Significant inhibitions were shown in three mouse groups (CPS1, CPS2, CPS3).

The components of administered drug are the same as in Fig. 1. The above data shows mean  $\pm$ S.E.  $**P < 0.005$  compared with the control group.



日間 經口 投與한 結果, DNFB減作에 의한 接觸性 過敏反應의 抑制率은 對照群이  $35.8 \pm 5$ 인데 비해 CPS1群은  $5.3 \pm 2$ , CPS2群은  $7.2 \pm 3$ , CPS3群은  $14.9 \pm 1$ 로써 全體적으로 減少하는 傾向이 뚜렷하였으며, CPS1群에서 有意性있게 減少하였다(fig. 8).

## 7. 大食細胞의 貪食能에 미치는 影響

### (1) 生體內 實驗

淸肺散의 投與가 BALB/C 생쥐의 大食細胞 貪食能에 미치는 影響을 살펴 보기 위하여, 14日間 檢液을 投與한

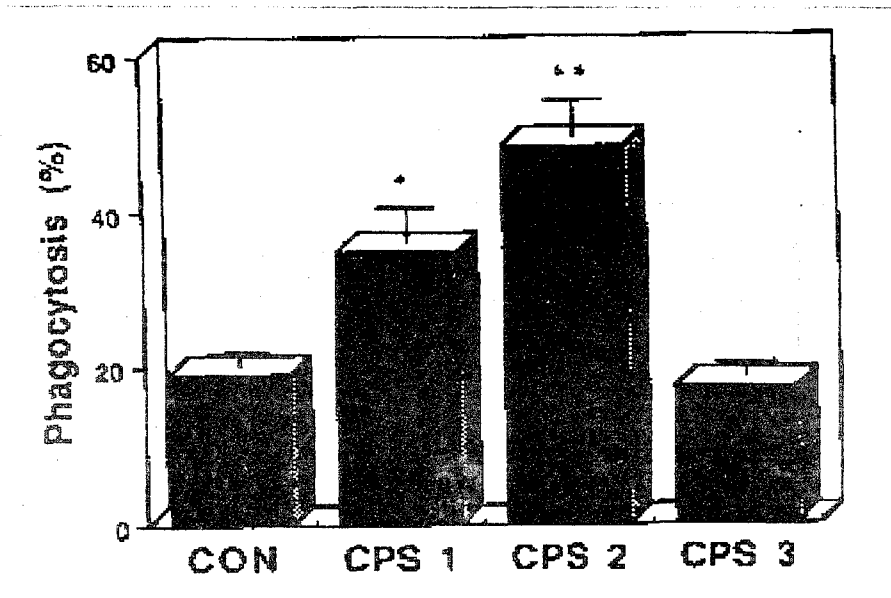


Fig. 9. In vivo effects of CPS administrations on phagocytic activity. An increment of phagocytic activity was shown in two mouse groups (CPS1, CPS2). The phagocytic activity was calculated by means of c-onsort 30 program of FACStar. The components of administered drug are the same as in Fig. 1.

The above data shows mean  $\pm$ S.E. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$  compared with the control group.

實驗群 생쥐에서 大食細胞를 分離한 後 FITC로 label된 polystyrene latex particle( $1.88\mu\text{m}$ )과 같이 培養한 다음, 流式細胞 分離 分析器로 大食細胞가 latex particle을 貪食한 活性度를 測定

하였다. 그 結果로서 對照群은  $19.3\pm 3$ 의 活性度를 보였으며, 이에 대하여 CPS1 및 2群에서 各各  $34.9\pm 4$ ,  $43.5\pm 3$ 으로 增加하는 傾向을 보였지만, CPS3 群에서는  $17.2\pm 2$ 로 對照群과 比較하

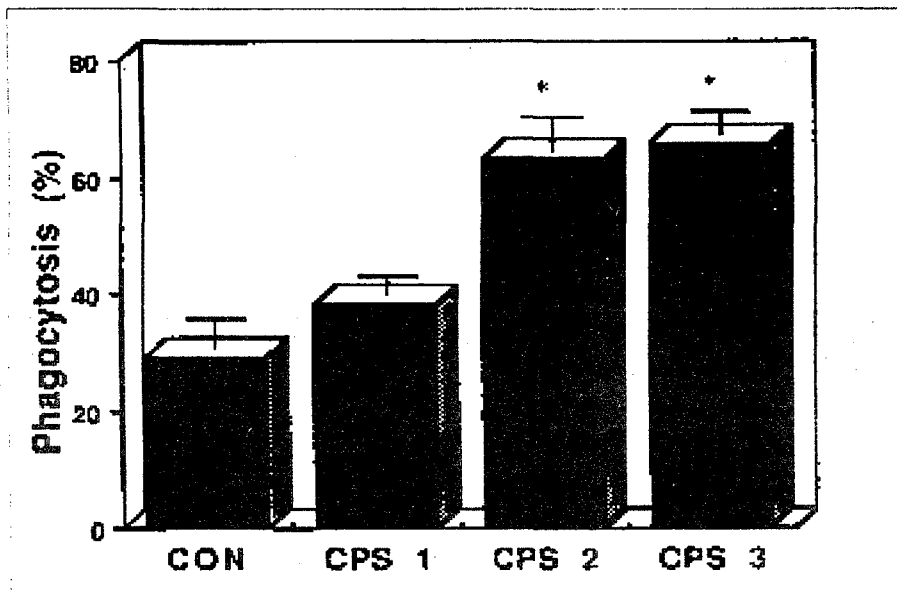


Fig. 10. In vitro effects of CPS on phagocytic activity. Thioglycolate-elicited macrophages were incubated with CPS for 6 hours. The cells were harvested, centrifuged and measured for phagocytic activity. A significant increment of phagocytic activity was shown in two mouse groups (CPS2, CPS3).

The phagocytic activity was calculated by means of consort 30 program of FACStar. The components of administered drug are the same as in Fig. 6. The above data shows mean  $\pm$ S.E. \* $P < 0.05$  compared with the control group.

여 減少하는 傾向을 보였으므로 高濃度의 淸肺散의 投與는 大食細胞의 食食能에 別다른 影響을 주지 않음을 알 수 있었다 (Fig 9).

(2) 生體外 實驗

淸肺散을 生體外에서 處理했을 때 B ALB/C생쥐의 大食細胞 食食能에 미치는 影響을 살펴보기 위하여 Thiogly

colate(TG) injected 正常 생쥐의 腹腔 大食細胞를 分離하여 淸肺散을 各濃度로 處理한 後 6時間 培養 後에 收穫한 細胞를 FITC로 label된 latex particle과 培養하여 活性度를 測定하였다. 그 結果 對照群이  $29.5 \pm 4$ 인데 비하여 CPS1群은  $38.4 \pm 5$ , CPS2群은  $63.2 \pm 6$ 으로써 增加하는 傾向을 보였고, CPS3

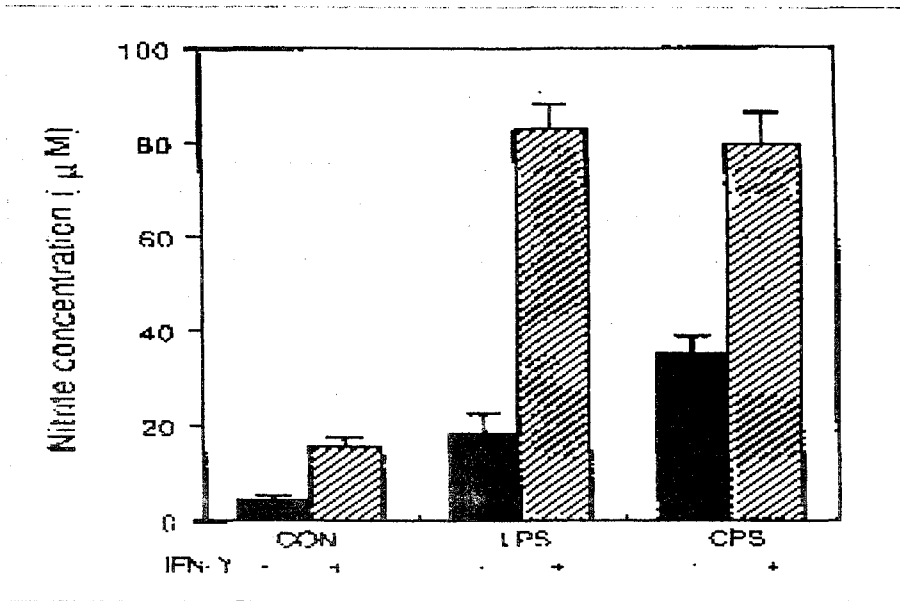


Fig. 11. TG(Thioglycolate)-elicited macrophages were cultured for 48 hours with either in medium alone or in medium containing IFN- $\gamma$  (5U/ml) and/or LPS or CPS. Dose dependent effects of CPS on the Nitrite production. The amount of  $\text{NO}^{2-}$  released by macrophages were measured after 48 hours of incubation. Values are means  $\pm$ SD of four experiments.

群은  $65.9 \pm 5$ 로써 가장 높은 大食細胞의 食食能 增大效果를 가져왔음을 시사하였다 (Fig 10).

8. 食食細胞의 反應窒素 中間物質 (Reactive Nitrogen Int

ermediates : RNIs) 生成能에 미치는 影響

淸肺散이 腹腔 大食細胞의 RNI 生成에 미치는 影響을 調査해 보기 위하여 培養中인 생쥐의 腹腔 大食細胞 ( $1 \times 10^5$  cell/ $200 \mu$ l)에 淸肺散을 各 濃度 (1,

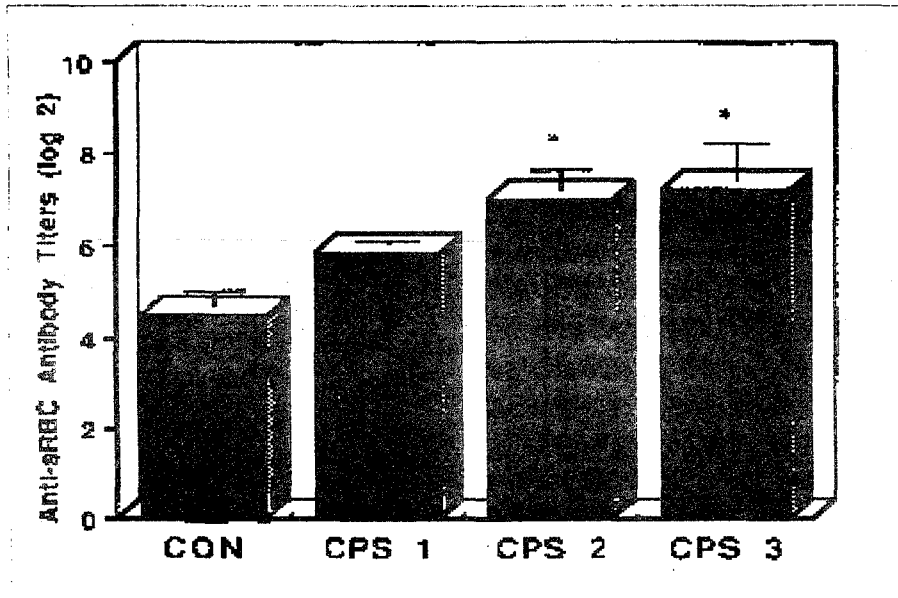


Fig. 12. Effects of CPS administrations on the hemagglutinin titers.

Mice were orally given CPS for 14 days before sensitization. Mice were sensitized with SRBC on day 0, and hemagglutinin titers were measured on the day 8. The components of administered drug are the same as in Fig. 1.

A significant increment was shown in two mouse groups (CPS2, CPS 3). The above data shows mean  $\pm$  S.E. \* $P < 0.05$  compared with the control group.

2, 3)에 따라  $10\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣은 後 48 時間 培養한 다음 RNI의 生成程度를 測定한 結果 對照群(6<)과 비교하여 볼 때 濃度에 依存的으로 RNI生成 程度가 增加하였다(Fig 11).

### 9. 赤血球 凝集素價 및 溶血素

### 價에 미치는 影響

BALB/C 생쥐에 있어서 淸肺散의 投與가 綿羊赤血球에 대한 抗體 生成能에 미치는 影響을 알아보기 위하여 綿羊 赤血球에 대한 凝集素價와 溶血素 價를 測定하여  $\log_2$ 값으로 計算하였다.

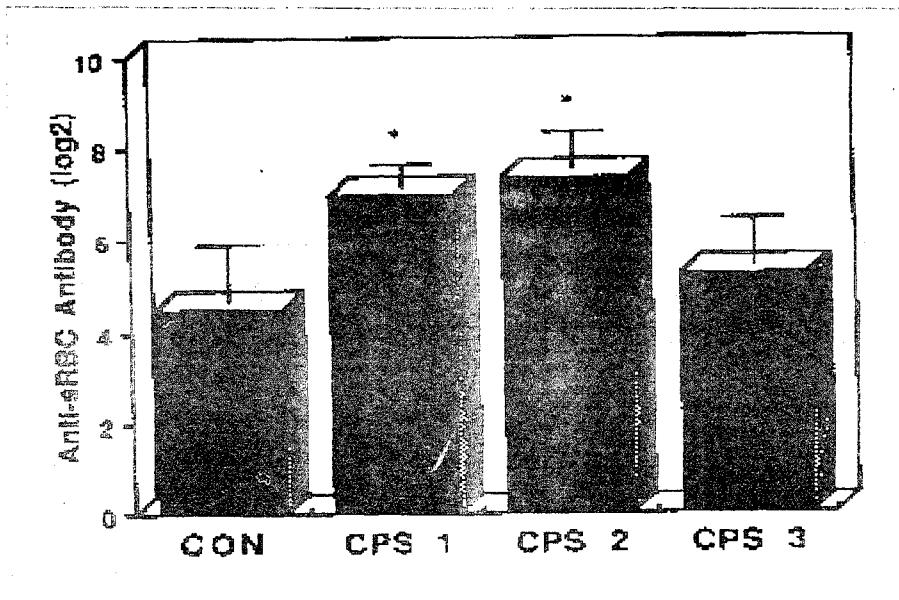


Fig. 13. Effects of CPS administrations on the hemolysin formation against SRBC. Mice were given orally CPS for 14 days before sensitization. Mice were sensitized with SRBC on the day 0 and hemolysin titres are measured on the day 8.

The components of administered drug are the same as in Fig. 1.

An increment was shown in two mouse groups.

The above data shows mean  $\pm$  S.E. \* $P < 0.05$  compared with the control group.

凝集素價는 對照群이 4.52±0.5인데 비하여 CPS1群은 5.84±0.4, CPS2群은 7.04±0.4, CPS3群은 7.22±0.7로써 모든 群에서 有意性있게 增加하였으며, 그중 특히 CPS2群과 CPS3群에서 가장 높은 增加를 보임을 알 수 있었으며(Fig.12), 溶血素價는 對照群이 4.58±1인데 비하여 CPS1群은 6.95±0.5, CPS2群은 7.34±0.6, CPS3群은 5.22±0.6으로 1群과 2群에서 有意하게 增加했으며 3群에서는 다소 減少하는 傾向을 보였다 (Fig 13).

#### IV. 總括 및 考察

小兒 喘息에 대하여 <黃帝內經><sup>2)</sup>에서는 乳子가 風熱에 맞으면 喘鳴을 發한다고 하여 原因과 特徵症狀를 記述하였으며, 喘喝, 喘呼, 喘咳 等の 異名을 言及한 以來 隨代의 巢<sup>4)</sup>는 咳嗽와 함께 呼呷有聲한다 하여 呷嗽라 하였고, 明代의 虞<sup>3)</sup>는 喘促喉間如水鷄聲은 哮라하고, 氣促而連續不能以息은 喘이라 하여 哮와 喘을 區分하였다.

喘息의 分類에 대해서 <六科準繩><sup>5)</sup>에서는 喘息의 發生을 臟腑와 關聯시켜 肺喘, 胃喘, 腎喘으로 나누고, 寒喘, 火喘, 虛喘, 實喘으로 辨證하였으며, <東醫寶鑑><sup>6)</sup>에서는 風寒喘, 痰喘, 氣喘, 火喘, 水喘, 久喘, 胃虛喘, 陰虛喘 등으로 區分하였다.

喘息의 病因은 夙根<sup>7)</sup>과 風寒暑濕相干<sup>16), 21)</sup>, 風冷入肺<sup>1), 9), 10), 14), 15), 24), 31)</sup>, 等의 六淫傷과 驚憂氣鬱<sup>13), 18), 20)</sup>, 怒氣鬱結<sup>7)</sup>, 喜怒不節<sup>5), 22)</sup> 等の 七情傷 및 過食肥膩煎燂<sup>15), 16)</sup>, 味過於甘<sup>2)</sup> 等の

飲食傷이며, 症狀는 喉中有水鷄聲<sup>1), 3), 4), 9-11), 16), 23), 25), 27), 31)</sup>, 氣急息數<sup>1), 8), 16), 20), 22-24), 27)</sup>, 氣促<sup>3), 5)</sup>, 氣粗<sup>1), 7), 22)</sup>, 擡肩<sup>3), 8), 20), 23), 24), 27)</sup>, 肩息<sup>1), 2)</sup>, 欠肚<sup>2), 4)</sup>, 兩脇扇動 陷下作抗<sup>5)</sup>, 坐臥不得<sup>1), 2), 11), 21), 27)</sup>, 咽中壅欲嘔<sup>5), 13)</sup>, 面青<sup>1), 9), 2)</sup> 等이다.

喘息의 治療는 “未發時而補正氣爲主, 已發時而攻邪爲主”<sup>22)</sup>라 하여 發作期와 緩解期로 나누어 適切한 治法을 使用해야 한다. 發作期에는 散邪<sup>17)</sup>, 攻邪<sup>2), 8)</sup> 를 하는데, 風寒咳喘은 溫肺散寒, 豁痰平喘하고, 痰火哮喘은 清熱滌痰, 降氣平喘하며, 痰濕哮喘은 健脾化痰, 降逆平喘한다.<sup>31)</sup> 緩解期에는 扶正氣, 補養<sup>28), 29)</sup> 하는데 肺虛로 因하면 補肺固衛하고, 脾虛로 因하면 健脾化痰하며, 腎虛로 因하면 扶元培本, 益腎攝納 한다.<sup>31)</sup>

氣管支 喘息은 집먼지, 花粉, 眞菌 等과 같은 吸入性 抗原이나 呼吸氣道 感染, 感情的 스트레스와 같은 非特定 刺戟 等이 氣道內의 過敏症을 誘發하여<sup>36)</sup> 氣管支 平滑筋의 收縮과 粘膜의 浮腫, 氣道內의 粘液과 炎症 細胞의 浸潤에 의한 可逆的 氣道閉塞으로 發作性 呼氣性 呼吸困難을 나타내는 現象이며<sup>37)</sup>, 代表的인 I型 알레르기 疾患이다.<sup>38)</sup>

I型 알레르기 反應은 IgE依存型이라고도 불리는데, IgE抗體가 mast 細胞, 또는 好鹽基球의 細胞膜의 表面에 附着되어 있다가 거기에 抗原이 侵入하게 되면 細胞 表面에서 抗原 抗體 反應이 일어난다. 그 結果 細胞로부터 脫顆粒이 나타나 histamine 等과 같은

化學傳達物質이 遊離되어 平滑筋의 收縮, 血管透過性的 亢進, 刺戟物 受用 등의 藥理作用이 일어나는데, 이러한 알레르기 反應의 發現部位에 따라 氣管支 喘息이나 알레르기性 鼻炎이 發病한다.<sup>38-40)</sup>

氣管支 喘息의 藥物療法으로 氣管支 擴張劑를 使用하는데 交感神經 刺戟藥이나 xanthine誘導體를 使用하여 氣道를 擴張시키는 cAMP의 濃度を 높이고, 抗콜린藥으로 氣道를 收縮시키는 cGMP의 生成을 抑制시킨다.<sup>36)</sup>

淸肺散은 劉<sup>1)</sup>의 <幼幼新書>에 收錄되어 있는 處方으로 半夏, 麻黃, 馬兜鈴, 貝母, 升麻, 杏仁, 地骨皮, 靑皮, 細辛, 麥門冬, 桑白皮, 百合, 款冬花, 柴胡, 桔梗, 白茯苓의 藥物로 構成되어 있으며 喘息 및 咳嗽에 使用한다고 하였다.

個個 藥物의 效能에 對해서 살펴보면, 半夏는 性味が 辛, 溫하고 入脾, 胃하며, 燥濕祛痰, 下氣降逆 하는 效能이 있어 胸脹咳逆, 咽喉脹痛, 咳嗽上氣 등을 治하며 祛痰, 鎮咳, 氣道の 刺戟을 緩解하는 作用이 있다.<sup>6), 30), 32-34)</sup> 麻黃은 性味が 辛, 溫하고 入肺, 膀胱하며 發汗解表, 祛痰, 宣肺平喘 하는 效能이 있어 中風傷寒, 咳逆上氣 등을 治하며, 交感神經 機能을 增強시키고 氣管支의 痙攣을 舒緩하는 作用이 있다.<sup>30), 32-34)</sup> 藥理作用으로는 精油成分인 α-terpineol이 正常마우스(mouse)의 體溫을 低下시키고, 氣管支 平滑筋을 弛緩하여 呼吸을 調節하고 呼吸困難을 改善한다고 하였으며,<sup>35)</sup> 氣管支 擴張이나 鎮咳 作用은 N-methylephedrine이 強力하고

抗炎症 作用은 pseudoephedrine이 強力하다고 하였다.<sup>36)</sup> 江田 등<sup>48)</sup>은 麻黃 水액기스가 生體外 實驗(in vitro)에서 抗anaphylaxis作用이 있음을 報告하였으며, 東海林徹 등<sup>49)</sup>은 麻黃 水액기스를 輕麻醉한 생쥐에 投與하여 氣管의 機械的 刺戟法에 의한 鎮咳 作用이 있음을 報告하였다. 馬兜鈴은 性味が 微甘·苦, 寒하고 入肺하며 淸肺止咳, 降氣平喘 祛肺中淫熱하는 效能이 있어 肺熱咳嗽, 痰結喘促, 肺氣上急을 治한다.<sup>30), 32-34)</sup> 貝母는 性味が 苦·甘, 涼하고 入肺하며 止咳化痰, 淸熱散結, 潤肺, 降氣하는 效能이 있어 喉痺, 咳嗽上氣, 煩渴을 治하며<sup>30), 32-34)</sup>, 氣管支 平滑筋의 擴張作用, 呼吸 抑制作用이 있다.<sup>33)</sup> 升麻는 性味が 辛, 涼하고 入肺, 脾하며 發表透疹, 淸熱解毒, 升舉陽氣 하는 效能이 있어, 風腫諸毒, 喉痛, 口瘡, 肺痿, 咳唾膿血을 治하며<sup>6), 30), 32-34)</sup>, 發汗, 解熱, 氣管支 痙攣의 解除, 利尿, 升壓作用이 있다.<sup>33), 35)</sup> 杏仁은 性味が 甘·苦, 溫하고 入肺, 大腸하며 宣肺, 解肌, 潤燥, 降氣, 止咳定喘 하는 效能이 있어, 風寒入肺하여 생긴 發熱咳嗽, 風熱咳嗽, 咳逆上氣雷鳴, 喉痺, 喘促을 治하며<sup>6), 26), 30), 32-34)</sup>, 副交感神經 興奮 作用, 氣管支 平滑筋의 弛緩作用이 있다.<sup>33)</sup> 地骨皮는 性味が 甘, 淡하고 入肺, 肝, 腎하며 淸熱涼血, 淸肺熱, 退骨蒸勞熱하는 效能이 있으며<sup>30), 32-34)</sup>, 靑皮는 性味が 苦·辛, 微溫하고 入肝, 膽하며 疏散破氣, 散積化滯하는 效能이 있다.<sup>30), 32-34)</sup> 細辛은 性味が 辛, 溫하고 入肺, 腎하며 發散風寒, 溫肺化痰하는 效能이 있어, 咳逆上氣, 風

濕痺痛, 喉痺를 治한다.<sup>6), 30), 32-34)</sup> 藥理作用으로 成分中 精油 methyleugenol 은 鎮咳 祛痰作用이 있어 氣道 粘膜의 消炎, 分泌物의 抑制, 鎮靜 等の 효과를 나타낸다.<sup>33)</sup> 江田 등<sup>48)</sup>은 感作된 생쥐의 肺切片으로부터의 anaphylactic mediator 遊離量에 대한 生藥의 作用을 스크리닝(screening)한 報告에서 細辛의 免疫 抑制作用이 認定 되었다. 麥門冬은 性味が 甘·微苦, 寒하고 入肺하며 滋陰清熱, 潤肺生津하는 效能이 있으며<sup>6), 30), 32-34)</sup>, 桑白皮는 性味が 甘, 寒하고 入肺, 脾하며 止嗽清痰, 瀉肺火利二便, 下氣行水하는 效能이 있어 肺熱喘滿唾血, 虛勞客熱을 治하며 解熱鎮咳, 祛痰의 作用으로 氣道の 炎症을 除去하여 咳嗽과 呼吸困難을 가라앉힌다.<sup>6), 30), 32-34)</sup> 百合은 性味が 甘·微苦, 平하고 入心, 肺하며 潤肺止咳, 清心安神하는 效能이 있으며<sup>30), 32-34)</sup>, 款冬花는 性味が 辛, 溫하고 入肺하며 潤肺降氣, 化痰止咳하는 效能이 있어 咳逆, 喘息, 肺痿, 肺癰을 治하며<sup>6), 32-34)</sup> 解毒과 祛痰作用을 가져 氣管支 痙攣을 抑制한다고 하였다.<sup>33)</sup> 柴胡는 性味が 苦, 涼하고 入肝, 胆, 肺 하며 和 解退熱, 消痰止咳, 潤肺, 散肌熱하는 效能이 있어 傷寒 寒熱往來, 天行時疾, 內外熱不解, 諸痰熱結實을 治하며<sup>6), 30), 32-34)</sup> 藥理作用으로는 成分中 crude saikoside가 中樞 抑制作用, 抗痙攣作用, 抗炎症作用, 抗潰瘍作用 이외에도 鎮靜, 鎮痛, 鎮咳作用이 있으며<sup>33)</sup>, 中烏松一 등<sup>50)</sup>은 梅寄生, 柴胡 抽出物의 마우스(mouse) IgE 抗體 生成 抑制效果를 알아보는 實驗에서 柴胡가 IgE抗體의

力價를 抑制하는 作用이 있음을 밝혔다. 桔梗은 性味が 苦·辛, 平 하고 入肺, 胃하며 宣肺祛痰, 排膿理氣하는 效能이 있어 咽喉腫痛을 治하며<sup>32-34)</sup>, 唾液 分泌나 氣管支 粘液 分泌의 促進, 弱한 鎮咳作用, 血糖 降下作用이 있다.<sup>33)</sup> 白茯苓은 性味が 甘, 淡하고 入心, 脾, 肺하며 利水滲濕, 健脾補中하는 效能이 있어 寒熱, 煩滿, 咳逆, 膈中痰水, 肺痿痰壅을 治한다.<sup>30), 32-34)</sup>

以上에서 살펴본 바와 같이 清肺散의 藥物 構成을 보면, 歸經은 대부분 肺, 脾이고, 效能上의 藥物 分類에 의하면 主로 發散解表하는 麻黃, 細辛, 柴胡, 升麻와 化痰止咳하는 貝母, 半夏, 桔梗, 杏仁, 款冬花, 馬兜鈴, 桑白皮, 百合으로 이루어졌으며, 이외에 清肺熱하는 地骨皮, 利水滲濕하는 白茯苓, 理氣하는 青皮, 補陰하는 麥門冬으로 構成되어 있어 發散解表, 祛痰止咳, 降氣平喘의 效能이 있으므로 風寒, 痰火, 濕痰으로 인해 發生하는 發作期 喘息의 症狀을 緩和시킬수 있을 것으로 思料된다. 또한 實驗研究에 의하면 柴胡가 IgE抗體의 力價를 抑制시키고<sup>50)</sup>, 細辛, 麻黃이 化學傳達物質의 遊離를 抑制시키며<sup>48), 49)</sup>, 細辛이 化學傳達物質에 의한 炎症反應을 抑制시키는 抗히스타민 작용이 있어<sup>48)</sup> I型 알레르기 反應을 遮斷하는 效果를 나타냈으며, 半夏<sup>33)</sup>, 麻黃<sup>33), 35), 36)</sup>, 升麻<sup>33), 35)</sup>, 杏仁<sup>33)</sup>, 款冬花<sup>33)</sup>, 柴胡<sup>33), 35)</sup> 등이 氣管支 痙攣을 緩和시키고, 貝母<sup>33)</sup>가 氣管支 平滑筋을 擴張시키며, 桑白皮<sup>33)</sup>는 氣道の 炎症을 除去한다 하여 氣道の 過敏性과 氣道 閉塞을 抑制시키는 個別 藥物의 實驗



效果로 보아 알레르기성 喘息에 有效할 것으로 思料된다.

外部에서 侵入한 微生物이나 内部에서 발생한 腫瘍등 抗原的 要素가 매우 多樣해짐으로 인하여 이에 對應하기 위한 免疫系의 免疫細胞도 多樣化되면서 進化하였다. 즉 림프구中 B 細胞는 抗體를 生産하여 防禦하지만, T 細胞는 大食細胞를 活性化시키는 사이토카인을 分泌하여 生體를 防禦하고 있다. 더 나아가 T 細胞는 體液性 免疫反應과 細胞性 免疫反應을 돕는 協力 T 細胞와 免疫反應을 終結시키는 抑制 T 細胞 및 細胞 毒性을 나타내는 細胞 毒性 T 細胞 등의 亞群으로 이루어졌음이 밝혀졌다.

최근 協力T 細胞는  $T_H1$ 과  $T_H2$ 亞群으로 이루어져 있고,  $T_H1$ 協力 T 細胞는 감마 인터페론 ( $IFN-\gamma$ )이나 인터루킨-2(IL-2) 및 인터루킨-12(IL-12)를 生産하며 大食細胞를 活性化시켜 細胞性 免疫反應과 體液性 免疫反應을 亢進시키며,  $T_H2$ 協力 T 細胞는 인터루킨-4(IL-4)나 인터루킨-10(IL-10)을 生産하여 抗體中에서 IgE를 生産케 하든지 肥滿細胞를 活性化하여 過敏反應을 惹起한다고 報告되었다<sup>61)</sup>. 이처럼 IgE 生産에는 T 細胞의 調節이 重要な 役割을 하며 特定 種類의 림포카인들을 生産하는 協力T 細胞의 亞集團들이 B 細胞에 의한 IgE 生産의 調節에 關與한다는 事實이 밝혀져있다.<sup>42)</sup>

淸肺散의 投與가 免疫系에 미치는 效果를 糾明하기 위하여 림프구의 增殖反應, T 細胞 亞型 分析, Rosette 形成細胞 測定, DNFB 減作에 의한 接觸性 過

敏 反應, 赤血球 凝集素價와 溶血素價를 測定으로 特異的 免疫系에 미치는 影響을 살펴보았으며, 細胞毒性 測定, 自然致死細胞의 活性度 測定, 大食細胞 食食能 測定, 反應室素 中間物質 生成能(RNIs) 測定으로 先天性 免疫系에 미치는 影響을 살펴보았다.

본 實驗에서 淸肺散의 投與가 마우스(mouse)의 림프구 增殖에 미치는 影響을 알아본바, 對照群( $12.5 \pm 0.7 \times 10^3$ cpm)에 비해 CPS2群( $225.4 \pm 0.3 \times 10^3$ cpm)에서 림프구의 增殖을 增加시켰다(Fig. 1). 이는 淸肺散의 投與로 마우스(mouse)의 림프구 分裂을 促進시킨 結果라고 思料된다.

림프절內의 T 細胞群의 亞型變化에 미치는 影響을 調査한 結果, CD4 陽性細胞는 對照群( $22.5 \pm 3$ )에 비해 全體적으로 增加하는 傾向을 보였으며, 특히 CPS1群( $51.4 \pm 7$ )에서 有意性있게 增加하였다(Fig. 2). CD8 陽性細胞는 對照群( $62.8 \pm 6$ )에 비해 全體적으로 낮아지는 傾向을 보였으며, 특히 CPS1群( $43.2 \pm 5$ )에서 有意性있게 減少하였다(Fig. 3). 本 實驗의 研究 結果에 의한 CD4/CD8 陽性細胞의 比率는 對照群(0.35/1)에 비해 모두 增加하였으며, 특히 CPS1群이 1.18/1로 有意性 있게 增加하였다(Fig. 4). 이는 協力 T 細胞의 增加를 招來한 結果라고 할 수 있다.

Rosette 形成 細胞數를 測定한 實驗에서는 對照群( $50.4 \pm 3$ )에 비해서 모두 增加하는 傾向을 보였으며, 특히 CPS2群( $95.4 \pm 5$ )에서 有意性있게 增加하였다(Fig. 5).

위의 事實들로 보아(Fig. 1-5) 이는

協力 T細胞에 의해 生成되며 T細胞의 分裂을 增進시키고 T細胞에 強力한 成長因子와 活性因子로 作用하는 IL-2의 分泌에 의한 效果와 同一하다고 할 수 있겠다.

大食細胞는 免疫反應의 모든 段階에 關與하는 데 T細胞에 의한 增幅이 일어나기 前에 빠른 保護作用을 나타내며 抗原을 處理하고 提供함으로써 T細胞 活性化를 惹起시킨다. 또한 T細胞 活性化의 結果로 細胞 媒介性 反應에서 作動細胞로 作用한다.<sup>42)</sup>

大食細胞의 食食能에 미치는 影響을 觀察한 바, 生體內 實驗에서는 對照群(19.3±3)에 비해 CPS 1 및 2群에서 增加 하였으며 CPS3群에서는 약간 減少하여 高濃度の 投與가 大食細胞의 食食能에 別다른 影響을 주지 않음을 알 수 있었다(Fig. 9). 生體外 實驗에서는 對照群(29.5±4)에 비해 모두 增加하는 傾向을 보였다(Fig. 10).

食食細胞의 反應窒素 中間物質 生成能에 미치는 影響을 觀察한 바, 濃도에 依存的으로 反應窒素 中間物質 生成 程度가 增加하였다(Fig. 11).

이처럼(Fig. 9-11) 淸肺散의 投與에 의해서 大食細胞의 食食能 增加와 大食細胞의 活性化에 따르는 Nitric oxide (NO)의 形成을 促進한 效果는 INF- $\gamma$ 의 生體內 效果와 同一하다고 할 수 있겠다.

淸肺散의 投與에 대한 免疫反應에 대한 이러한 效果(Fig 1-5, 9-11)는 T<sub>H1</sub> 協力 T細胞의 機能을 亢進시킨 結果라고 思料된다.

細胞 毒性에 미치는 影響을 알아보기

위하여 癌細胞株인 K562를 使用하여 實驗한 結果 對照群(13.2±4)에 비해 全體적으로 增加 하였으며 CPS2群(53.2±4)에서 크게 增加 하였다(Fig. 6). 이는 淸肺散이 大食細胞에 作用하여 그 機能을 亢進시키고 Nitric oxide(NO)를 生産케 하는 作用과 聯關이 있을 것으로 思料된다.

T細胞는 協力 T細胞를 提供함으로써 免疫反應을 分명히 調節하는데 더욱이 어떤 補助 細胞 (T<sub>H1</sub> 對 T<sub>H2</sub>)를 優先적으로 生成하느냐에 따라서 免疫反應의 本質에 影響을 미치게 된다. T<sub>H1</sub> 協力 T細胞는 大食細胞를 活性化시키며, 大食細胞에 提供된 抗原에 대해서 특히 잘 反應하는 데, 細胞 毒性和 局所的 炎症反應을 隨伴하는 몇 가지 機能을 媒介함으로써, 細胞內 寄生病原體의 攻擊에 重要하며, T<sub>H2</sub>協力 T細胞는 B細胞를 刺戟하여 增殖시키고 抗體를 生産토록 作用하여 細胞外 寄生微生物에 대한 防禦에 重要的 役割을 하고 있어, T<sub>H1</sub>協力 T細胞와 T<sub>H2</sub>協力 T細胞는 拮抗적으로 作用한다고 알려졌다.<sup>42)</sup>

淸肺散의 投與가 DNFB減作에 의한 接觸性 過敏反應에 미치는 影響을 살펴본 結果 對照群(35.8±5)에 비해 接觸性 過敏反應이 全體적으로 減少하는 傾向이 뚜렷하였으며, 특히 CPS1群(5.3±2)에서 有意性 있게 減少하였다(Fig. 8).

接觸性 過敏反應은 抗原에 의해 IgE-減作肥滿細胞가 特異적으로 刺戟되었을 때 일어나며, 이때 多樣한 機能을 가진 림포카인들과 사이토카인들이 遊

離되는데  $T_H2$ 協力 T細胞에 의해 生産된 IL-4는 B細胞에 의한 IgE生産을 도와주는 役割을 한다.<sup>42)</sup> 그러므로 淸肺散을 投與하여 接觸性 過敏反應이 뚜렷하게 減少된 것으로 보아  $T_H2$ 協力 T細胞의 機能을 抑制시킨 結果라고 思料된다.

以上の 實驗 結果에 의하면 淸肺散은 림프구 增殖의 增加, CD4陽性細胞數의 增加 및 CD8陽性細胞數의 減少, Rose tte形成細胞數의 增加, 大食細胞 食食能 增加와 이에 따른 反應窒素 中間物質 生成能의 增加를 招來하여  $T_H1$ 協力 T細胞의 機能을 亢進시켜 이에 拮抗적으로 作用하는  $T_H2$ 協力 T細胞의 機能을 抑制시킬 것으로 思料되는데, DNFB減作에 의한 接觸性 過敏 反應의 抑制 效果가 뚜렷하여 이를 뒷받침하고 있어 알레르기성 喘息에 有效할 것으로 思料된다.

## V. 結論

喘息에 應用되는 淸肺散을  $T_H1$  協力 T細胞의 機能과  $T_H2$  協力 T細胞의 機能에 미치는 影響에 대해서 살펴보기 위하여 여러 가지 尺度로 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 淸肺散은 림프구의 增殖에 影響을 주며 특히 對照群과 比較하여 2群에서 有意性있게 림프구의 增殖을 增加시켰다.
2. 淸肺散은 CD4陽性細胞數를 增加시키는 반면 CD8陽性細胞數를 減少시켰으며 協力T細胞와 抑制 T細胞

의 比率를 약간 增加시켰다.

3. 淸肺散은 全般的으로 濃度の 增加에 따라 SRBC와 이루는 Rosette 形成細胞 生成能을 有意性있게 增加시켰지만 高濃度の 淸肺散을 投與하였을 境遇는 오히려 減少시켰다.
4. 淸肺散은 K562에 대한 細胞 毒性作用을 濃도에 依存的으로 增加시켰다.
5. 淸肺散은 自然致死細胞의 活性度에는 意味 있는 效果가 없었다.
6. 淸肺散은 接觸性 過敏反應을 顯著하게 抑制시켰다.
7. 淸肺散은 生體內와 生體外에서 大食細胞에 의한 食食能을 增加시켰다.
8. 淸肺散은 濃도에 依存的으로 大食細胞에 作用하여 反應窒素 中間物質의 生成을 增加시켰다.
9. 淸肺散에 의한 抗體 生成能을 보기 위하여 赤血球의 凝集素價와 溶血素加를 본 結果 SRBC에 의한 抗體 生成能을 增加시켰다.

以上の 結果로 미루어 보아 淸肺散은 免疫系의  $T_H1$ 協力 T細胞의 機能을 亢進시키는 반면,  $T_H2$  協力 T細胞의 機能을 抑制시킴을 시사하고 있으며, 이러한 作用이 있는 淸肺散은 抗微生物等に 대한 防禦能을 增加시키되  $T_H2$  協力 T細胞에 의한 過敏 反應을 抑制시켜 알레르기성 喘息에 有效함을 알

수 있었다.

## 參考文獻

1. 劉 昉 : 幼幼新書 , 北京, 中國古籍出版社, 卷16 p.269, 1981.
2. 張隱庵, 馬元臺 編註 : 黃帝內經, 臺北, 臺聯國風出版社, pp. 26, 49, 147, 168, 180-181, 213, 276, 328, 402, 478, (素問), 60, 74, 179, 248, 258, (靈樞), 1977.
3. 虞 搏 : 醫學正傳, 서울, 成輔社, p p.101-104, 1986.
4. 巢元方 : 巢氏諸病源候論, 臺北, 昭人出版社, 卷13-3, 卷 14-3, 4, 5, 1983.
5. 王肯堂 : 六科準繩, 臺北, 新文豐出版社, pp.581-624, 1973.
6. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p p.474-479, 713, 721, 722, 728, 731, 733, 739, 740, 1980.
7. 張景岳 : 景岳全書, 서울, 杏林書院, pp.261-265, 1975.
8. 張仲景 : 金匱要略方論, 臺北, 臺聯國風出版社, pp.39-45, 1973.
9. 王 焘 : 外臺秘要, 서울, 成輔社, p p.963-965, 1975.
10. 錢 乙 : 小兒藥證直訣, 江蘇, 江蘇科學技術出版社, pp.20-48, 78, 1983.
11. 正和奉勅: 聖濟總錄, 서울, 翰成社, pp.315-322, 1877.
12. 洪金鼎 : 扁鵲心書·醫方一盤珠, 台北, 新文豐出版公司, 卷4 喘急門, 1976.
13. 陳無澤 : 三因方, 서울, 翰成社, p p.476-481, 1977.
14. 樓 英 : 醫學綱目, 台南, 北一出版

- 社, pp6-8, 1978.
15. 朱丹溪 : 丹溪心法附餘(上), 臺北, 五洲出版社, pp.807-809, 1981.
  16. 沈金鰲, 王大綸 : 婦科玉尺·嬰童類萃(合本), 서울, 翰成社, 下卷 p p.128-133, 1984.
  17. 薛鎧 : 保嬰撮要(醫部全錄), 서울, 成輔社, p.496, 1976.
  18. 李 梴 : 醫學入門, 서울, 翰成社, p.494 1983.
  19. 龔廷賢 : 萬病回春, 서울, 醫文社, pp.91-93, 1985.
  20. 李中梓 : 醫宗必讀, 서울, 書苑堂, pp.354-359, 1976.
  21. 秦景明 : 幼科金鍼, 臺北, 新文豐出版公司, pp.629-641, 1977.
  22. 方 賢 : 奇效良方, 香港, 商務印書館, pp.629-641, 1977.
  23. 陳 士鐸 : 增補辨證錄, 서울, 書苑堂, pp.151-153, 1981.
  24. 吳 謙 : 醫宗金鑑, 臺北, 人民衛生出版社, pp.117-121, 1980.
  25. 陳復正 : 幼幼集成, 上海, 上海科學技術出版社, pp.114-117, 1978.
  26. 葉天士 : 臨證指南醫案, 서울, 翰成社, pp.300-306, 1978.
  27. 曹 旭 : 小兒證治, 西安市, 陝西科學技術出版社, pp.152-164, 1979.
  28. 徐春甫 : 古今醫統秘方大全, 臺北, 新文豐出版公司 p.3124, 1977.
  29. 龔廷賢 : 濟世全書, 臺北, 新文豐出版公司, pp.147-151, 1981.
  30. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, pp.456-457, 463-464, 468-469, 475-476, 588-589, 693-697, 726, 960-961, 988-989, 1224-1226, 1985.
  31. 王 =伯岳 : 中醫兒科學, 北京, 人民衛生出版社, pp.401-406, 1984.
  32. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.232, 234, 250, 302, 381, 392, 461, 512, 538, 540, 556, 564, 599, 636, 646, 647, 1986.
  33. 陸昌洙 外 5名 : 韓藥學II, 서울, 光明醫學社, pp.20, 26-35, 74-77, 80-83, 173-177, 186-201, 550, 1992.
  34. 申佑求 : 申氏本草學(各論), 서울, 壽文社, pp.112, 211-213, 223, 228, 238, 357, 456-457, 462-463, 471-472, 479, 497, 627, 697-699, 704, 724, 729, 1988.
  35. 陸昌洙 外 5名 : 韓藥의 藥理, 成分, 臨床應用, 서울, 癸丑文化社, pp.306-308, 1982.
  36. 金一赫, 趙弼衡 譯 : 漢方醫藥學, 서울, 東南出版社, pp.77-83, 100-104, 1984.
  37. 康漸榮 : 알레르기 疾患의 診斷과 治療, 서울, 一湖閣, pp.129-151, 1987.
  38. 丁奎萬 : 알레르기와 한방, 서울, 第一閣, pp.17-18, 29-30, 35-38, 1990.
  39. 河合忠, 本間光夫 : 感染, アレギ一, 17, 免疫病學, 東京, 醫學書院, pp.26-30, 1986.
  40. 江田昭英 : 알레르기 治療劑의 免疫藥理學, 日本臨床, 39(4) : 1801, 1981.
  41. 洪彰義 : 小兒科學, 서울, 大韓教

- 科書株式會社, p1058, 1993.
42. 河大有 外 25名 : 그림으로 본 免疫學(제3판), 서울, 高文社, pp.294-296, 116, 112, 282-283, 1994.
43. 崔錫鳳 : 加味麥門冬湯의 效能에 관한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 10(2) : 153-160, 1989.
44. 이양근 外 5名 : 氣管支 喘息 患者에서 免疫 治療에 대한 T림프구 亞型과 增殖能의 變化, 알레르기, 13(1) : 30-39, 1993.
45. 천병도 外 5名 : 알레르기성 喘息 患者에서 末梢血液림프구의 IgE 生成能力과 IgE受容體 表現과의 關係, 알레르기, 13(3) : 326-333, 1993.
46. 이수영 外 4名 : atopy性 및 非atopy性 小兒喘息에서 IgG anti-IgE自家抗體의 陽性率과 亞型, 小兒 알레르기 및 呼吸器, 3(1) : 98-104, 1993.
47. 이몽영 外 3名 : 小兒喘息에서 IgG亞型에 대한 調査, 5(1) : 42-48, 1995.
48. 江田昭英 等 : 生藥의 抗 알레르기 作用에 대한 吟味, 日藥理誌, 66 : 366-378, 1970.
49. 東海林徹 外 : 鎮咳 祛痰效果를 지닌 生藥의 藥理學的 研究 (第 1報) 鎮咳와 毒性에 있어서의 數種 生藥의 配合效果에 대하여, 應用藥理, 10:407-415, 1975.
50. 中烏松一, 金 田平, 高津聖志 : 梅寄生, 柴胡抽出物의 마우스(mouse) IgE抗體 生成 抑制效果, proc Symp. WAKAN-YAKU, 13:42, 1980.
51. Nakagawa, t., Nakagawa, n., Ambrus, J.L., Jr., and Fauci, A.S. : Differential effects of interleukin 2 vs. B cell growth factor on human B cells, J.immunol., 140 : 465-469, 1988.
52. Biozzi G. Stiffel, C., Mounton, D., Bouthiller, Y. and Decruse found, C. : A Kinetic Study of Antibody Producing Cells in the Spleen of Mice Immunized Intravenously with sheep erythrocytes, Immunology, 14:7, 1968.
53. Miller, T.E.et al : Immunopotentialiation with BCGII, modulation of the response to sheep red blood cells, J.Nat. Cancer Inst., 51:16669, 1973.
54. Mitsuoka, A.et al : Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes, evidence for tuberculin type delayed hypersensitivity of the reaction, Immunology, 34:363, 1987.
55. Avrame, L., Bach, J. F and Preudhomme, J. L : Antibody formation at the cellular level in immunology, John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 508-513, 1982.
56. Bach, J.F., Dardenne M. : Antigen Recognition by T Lymph

- ocytes, *Cellular Immunology*, 3:1-10, 1972.
57. Claman, H.N., Chaperon, E.A. and Triplrtt, R.F. : Thymusmarrow Cell Combination Synergism in antibody Production, *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.*, 59:83-87, 122:1167, 1966.
58. Nowothy, A. : Antigen-Antibody interactions in basic exercises in immunochemistry, Springer, Verlag Bertin Heidelberg, N.Y., PP217- 271, 285 -287, 1979.
59. Zaalberg, O.B. : A simple method of detection single antibody forming cells, *Nature*, 202:1231, 1964.
60. Umezawa, H., M.Ishizuka, T. Takeuchi, F. Abe, K. Nemoto, K. Suppression of tissue graft rejection by spergualin. *J. Antibiot.*, 38:283-284, 1985.
61. Snapper CM, Paul WE : BSF-1 / IL-4 prepares resting murine B cells to secrete IgG 1 upon subsequent stimulation with bacterial lypopolysaccharide : *J. Immunol.*, 139 : 10-17, 1987.
62. Nemoto, K., M. Hayashi, Y. Sugawara, J. Ito, F. Abe. Biological activities of deoxyspergualin in autoimmune disease mice. *J. Antibiot.*, 41:1253-1259, 1988.
63. Nemoto, K., T Mae and T. Takeuchi. Deoxyspergualin therapy in autoimmune MRL/lpr mice suffering advanced lupus-like disease. *J. Antibiot.*, 41:1253-1259, 1988.
64. Stewart, C.C. and Lin. H. : Macrophage growth factor and its relationship to colony stimulation factor, *Reticuloendothel.Soc.*, 23:269, 1978.
65. Kubo, M. and Archi, S. : G.L. antihypertensive component. *Jpn, Kokai Tokkyo Koho*, 81:57801, 1981.
66. McGrinnes, K. M., Chopman, G., Marks, R. and Penny, R. : A fluorescence NK assay using flow cytometry. *J. Immunol., Meth.*, 86:7-15, 1986.
67. Mufti, S.I., Prahhal, R., Moriguchi, Sipes, I.G. and Watson, R.R. : Functional and numerical alterations induced by ethanol in the cellular immune system. *Immunopharmacol.*, 15:85-94, 1988.
68. Schmid, D. S. : The human MHC-restricted cellular response to herpes simplex virus type 1 is mediated by CD4 helper(+), CD8 suppressor(+) T cells and restricted to the DR region of the MHC Complex. *J. Immunol.*, 140:3610-3616, 1988.
69. Soerskaar, D., Foerre, Oe., Alb

- rechtsen, D. and Slavem, P. : Natural cytotoxicity in adult acute leukemia, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 86:190-195, 1988.
70. Davis, A.J.S. et al : The failure of thymus-derived cells to produce antibody Transplantation, 5:222, 1967.
71. Austyn, J.M. and Gordon, S. : F4/80 ; monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage, *Eur.J.Immunol.*, pp. 805-815, 1981.
72. Hume, D.A., Perry, V.H. and Gordon, S. : The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Macrophages associated with epithelia *Anat.Rec.*, 210:503, 1984.
73. Hume, D.A., Loutit, J.F. and Gordon, S. : The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Macrophages of bone and associated connective tissue. *J. Cell. Sci.*, 66:189-194, 1984.
74. Shepherd, V.L., Compbell, E.J., Senior, R.M. and Stahl, P.D. : Characterization of the mannose fucosyl receptor on human mononuclear phagocytes. *J. Res.*, 32:423-432, 1982.
75. Suny, S.S.J., Nelson, R.S. and Silverstein, S.C. : Yeast mannose inhibits binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages, *J. Cell Biol.* 106, 1983.
76. Walker, W.S., Hester, R.B. and Beelen, R.H.J. : Persistent expression of IgA-antigen on a subpopulation of murine resident peritoneal macrophages, *Cell Immunol.*, 79:125, 1983.
77. Winter, M. and Buschmann, H.G. : Measuring phagocytic capacity in polymorphonuclear cell of the pig a comparison between different assay, *J.Vet.Med.*, 834:504, 1987.
78. Hibbs, Jb., Jr., Taintor R. and Vavrin, Z. : Macrophage cytotoxicity, Role for L-arginine deiminase and immunonitrogen oxydation of nitrite, *science*, 235 : 473-478, 1987
79. Hibbs, J.B., Jr., Granger, D.L. : Cellular and cytokine networks in tissue, immunity, pp211-227, 1991
80. Hibbs, J.b., Jr., L.H. Lambert, Jr., and J. S. Remington. Possible role of macrophage-mediated nonspecific cytotoxicity in tumor resistance. *Nature, New Biol.*, 235:48, 1972.
81. Hibbs, J.B., Jr., R.R. Taintor, H.A. Chapman, Jr., and J. B.



- Weinberg Macrophage tumor killing : influence of the local environment. Science , 197, 1977.
82. Drapier J.C., and Hibbs, J.B., Jr. Differentiation of murine Macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells, J. Immunol., 140 : 689-2838, 1988.