

銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸의 抗癌效果와 免疫反應에 關한 研究

Experimental studies on antitumor effects and immune responses of Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong

金珍成 · 柳逢夏 · 朴東源 · 柳基遠
慶熙大學校 韓醫科大學 脾系內科學教室

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effects of Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong on the viability of tumor cells in vitro(MTT assay), on antitumor effects after Sarcoma-180 cells transplantation into the peritoneal cavity or left groin, and on decreased immune responses in mice induced by methotrexate. The extracts of its herbal medicines were orally administered for 14 or 21 days.

To evaluate the effects of the Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong many items such as 50% inhibitory concentration(IC₅₀), mean survival days, tumor and body weight for antitumor effects, and delayed type hypersensitivity, hemagglutinin titer, hemolysin titer, rosette forming cells, natural killer cell activity, lymphocyte transformation, productivity of interleukin-2 and phagocytic activity for immune responses were measured in ICR mice.

The results were obtained as follows ;

1. IC₅₀ of Eunwhasagantang treated group was 0.000204mg/ml on SNU-396 and that of Eunwhasagantangganokyong treated group was 0.000103mg/ml on SNU-1, those results indicate that the medicine has high antitumor activity.

2. Mean survival times in Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong treated groups were slightly increased with no significance, as compared with the control group.

3. Tumor weight in Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong treated group was depressed, as compared with the control group(P<0.01).

4. Body weight in Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong treated group was significantly

increased, as compared with the control group($P<0.05$).

5. Delayed type hypersensitivity in Eunwhasagantang and Eunwhasagantang-ganokyong treated group was slightly decreased with no significance, as compared with the control group.

6. Hemagglutinin titer in Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong treated group was slightly increased with no significance, as compared with the control group.

7. Hemolysin titer only in Eunwhasagantang treated group was significantly increased, as compared with the control group($P<0.01$).

8. Rosette forming cells only in Eunwhasagantangganokyong treated group was slightly increased with no significance, as compared with the control group.

9. In the NK cell activity, the ratio of effector cells and target cells of the Eunwhasagantang treated group was significantly increased($P<0.01$) in case which the ratio was 100:1, and that of the Eunwhasagantangganokyong treated group was significantly increased($P<0.01$, $P<0.05$) in case which the ratio was 100:1, 50:1, as compared with the control group.

10. Lymphocyte transformation in Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong treated group was significantly increased, as compared with the control group($P<0.01$).

11. Interleukin-2 in Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong treated group was significantly increased, as compared with the control group($P<0.05$, $P<0.01$).

12. Phagocytic activity in Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong treated group was significantly increased, as compared with the control group($P<0.05$).

According to the above results, it could be suggested that Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong have prominent antitumor effects, and enhance both cellular and humoral immunity.

I. 緒 論

人類的 健康을 威脅하는 癌의 發生率은 全世界의 으로 增加 趨勢에 있고, 우리나라에서도 每年 人口 10萬名當 200名 가량의 새로운 癌患者가 發生^{2,6)}하고 있어 疾病으로 인한 死亡原因中 第 1位^{5,15)}를 차지하고 있다.

科學의 發達에 따른 醫療 技術의 向上으로 癌의 診斷 및 治療方法이 向上되어 生存率 向上에는 多少 도움이 되었지만 아직 根本的인 解決策은 마련되지 못하고 있다.

韓醫學에서 癌은 積聚 膈中 反胃 翻胃 癰疽 石癰 癥瘕 疝瘕 腦疽 噎膈 腸覃 腸癰 妬乳 崩漏 癭瘤 等の 範疇에 屬하며, 그 治療法은 健脾益氣 養血滋陰 養陰生津 溫補腎陽 滋補強壯 等の 扶正固本法과 清熱解毒 活血化瘀 化痰散結 疏肝理氣 行氣散結 攻堅破積 消脹 等の 祛邪法 및 扶正과 祛邪를 兼施하는 扶正祛邪法의 3가지로 分類할 수 있다.^{3,7,38,60,71,72,75,76,80,82,87)} 이러한 治療方法의 活用에 있어 무엇보다도 重要的 것은 生體의 狀態와 病狀의 初·中·末期의 各 病期別로 어느 治療方法을 主

로하고 보조 할 것인가를 考慮하여 決定하여야 한다.

癌治療에 對한 韓醫學系의 動向은 免疫機能의 增強을 目的으로 扶正固本과 扶正祛邪의 兩部類의 治療方法을 爲主로 實驗的 研究 16,17,19,20,22,27-31,34,39,44,45,47,48,50,52,55,65,69,84,85)가 進行되고 있는데, 癌의 初期에 適用할 수 있는 祛邪法중 淸熱利濕解毒法에 對한 研究 32,42,46,56,81,82)는 微微한 편이다.

이에 淸熱利濕解毒의 治法에 合當한 韓藥物의 抗癌效果와 免疫反應에 對하여 實驗적으로 究明하고자 宋³⁶⁾의 銀花瀉肝湯과 補氣血益精髓하는 扶正의 效能이 있는 鹿茸^{11,17,70)}을 加味한 銀花瀉肝湯加鹿茸을 本 實驗에 使用하였다.

銀花瀉肝湯은 龍膽瀉肝湯⁷⁷⁾의 加味方으로 淸熱利濕, 消腫排膿의 效能이 있는 金銀花^{11,70)}를 君藥으로 加하고, 淸熱涼血, 活血散瘀의 效能이 있는 牡丹皮^{11,70)}와 行滯散氣 破瘀止痛의 效能이 있는 玄胡索^{11,70)}을 氣血兼治의 뜻에서 配伍하여 構成한 處方이다.

著者는 抗癌 및 免疫調節作用이 있을 것으로 기대되는 銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸을 選方하여 抗癌作用으로는 癌細胞의 生存能, 生存期間, 腫瘍成長抑制 및 體重變化를 觀察하였고, 免疫反應에 對한 作用으로는 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價, 赤血球溶血素價, Rosette 形成細胞數, 自然殺害細胞活性度, 淋巴球增殖能, Interleukin-2 生産能 및 carbon clearance에 의한 貪食能을 測定하여 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 材 料

1) 動 物

實驗動物은 大韓實驗動物센터에서 分讓받은 體重 18-22g의 ICR系 흰색 생쥐를 實驗群과 對照群으로 나누어 雌雄區別없이 使用하였고, 赤血球溶血素價의 測定을 위한 血清을 얻기 위하여 體重 2.5kg의 家兔를 準備하였으며, 固型 飼料(삼양유지, 小形動物用)와 물을 充分히 供給하면서 2週日間 實驗室環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥 材

藥材는 市中 乾材藥局에서 原產地가 確實한 것을 購入 精選한 後 使用하였으며, 특히 鹿茸은 中國産 梅花鹿(*Cervus nippon*)을 使用하였다.

宋³⁶⁾의 處方을 基本으로 한 銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸의 構成藥材와 1貼 分量은 다음과 같다.

① 銀花瀉肝湯

藥名	生藥名(學名)	用量(g)
龍膽草	Gentianae Radix (<i>Gentiana scabra</i> var. <i>buergeri</i> Max.)	3.750
柴胡	Bupleuri Radix (<i>Bupleurum falcatum</i> L.)	3.750
澤瀉	Alismatis Rhizoma (<i>Alisma plantago-aquatica</i> var. <i>orientale</i> Samuels)	3.750
木通	Akebiae Caulis (<i>Akebia quinata</i> Decne)	3.750
車前子	Plantaginis Semen (<i>Plantago asiatica</i> L.)	3.750

藥名	生藥名(學名)	用量(g)
赤茯苓	Poria (<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf)	3.750
生地黃	Rehmanniae Radix (<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) Libosch.)	3.750
當歸	Angelicae Gigantis Radix (<i>Angelica gigas</i> Nakai)	3.750
梔子	Gardeniae Fructus (<i>Gardenia jasminoides</i> for. <i>grandiflora</i> Makino)	1.875
黃芩	Scutellariae Radix (<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi)	1.875
甘草	Glycyrrhizae Radix (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	1.875
金銀花	Lonicerae Flos (<i>Lonicera japonica</i> Thunb.)	11.250
牡丹皮	Moutan Cortex (<i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.)	2.812
玄胡索	Corydalidis Tuber (<i>Corydalis turtchaninovii</i> Bess.)	2.812
總 量		52.499g

② 銀花瀉肝湯加鹿茸

藥名	生藥名(學名)	用量(g)
龍膽草	Gentianae Radix (<i>Gentiana scabra</i> var. <i>buergeri</i> Max.)	3.750
柴胡	Bupleuri Radix (<i>Bupleurum falcatum</i> L.)	3.750
澤瀉	Alismatis Rhizoma (<i>Alisma plantago-aquatica</i> var. <i>orientale</i> Samuels)	3.750
木通	Akebiae Caulis (<i>Akebia quinata</i> Decne)	3.750
車前子	Plantaginis Semen (<i>Plantago asiatica</i> L.)	3.750

藥名	生藥名(學名)	用量(g)
赤茯苓	Poria (<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf)	3.750
生地黃	Rehmanniae Radix (<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) Libosch.)	3.750
當歸	Angelicae Gigantis Radix (<i>Angelica gigas</i> Nakai)	3.750
梔子	Gardeniae Fructus (<i>Gardenia jasminoides</i> for. <i>grandiflora</i> Makino)	1.875
黃芩	Scutellariae Radix (<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi)	1.875
甘草	Glycyrrhizae Radix (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	1.875
金銀花	Lonicerae Flos (<i>Lonicera japonica</i> Thunb.)	11.250
牡丹皮	Moutan Cortex (<i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.)	2.812
玄胡索	Corydalidis Tuber (<i>Corydalis turtchaninovii</i> Bess.)	2.812
鹿茸	Cervi Pantotrichum Cornu (<i>Cervus nippon</i> Temminck)	3.750
總 量		56.249g

2. 方 法

1) 檢液의 調製

銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸 5貼 分量을 各各 5,000ml round flask에 넣고 3,000ml의 蒸溜水를 加하여 冷却器를 附着하고, 3時間 加熱 煎湯한 뒤 濾過한 濾液을 rotary evaporator로 減壓濃縮한 後 完全乾燥시켜 銀花瀉肝湯액기스 81.5g (收得率 ; 30.75%), 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 79.8g (收得率 ; 28.38%)을 얻어 檢液으로 使用하였다.

2) 抗腫瘍에 對한 實驗

(1) 檢液의 投與

생쥐 10마리를 1群으로하여 對照群, 銀花瀉肝湯익기스 投與群(以下 sample A群) 및 銀花瀉肝湯加鹿茸익기스 投與群(以下 sample B群)으로 나누었으며, 각 생쥐의 體重을 測定하여 銀花瀉肝湯익기스와 銀花瀉肝湯加鹿茸익기스 1g/kg를 蒸溜수로 稀釋하여 1日 1回 14日間 連續으로 經口投與하였다. 對照群에는 同量의 生理食鹽水를 經口投與하였다.

(2) 癌細胞의 生存能 測定^{33, 68, 100, 104, 113)}

① 細胞柱

實驗에 使用한 細胞柱들은 成長速度는 빠르나 一部分의 抗癌劑에 耐性을 갖는 SNU-C4(大腸癌 細胞柱), 大部分의 既存 抗癌劑에 耐性을 나타내는 SNU-396(肝癌 細胞柱)와 成長速度가 빠르고 比較的 抗癌劑 感受性이 銳敏한 SNU-1(胃癌 細胞柱)를 利用하였다. SNU-C4와 SNU-396은 多重藥材耐性 遺傳子의 發現이 比較的 높은 편이나, SNU-1은 그 發現이 낮은 細胞柱이다.

② MTT 檢索法

指數增殖期의 B16細胞를 1×10^4 cells/ml로 調整한 다음, 96well 微細細胞培養板(Falcon, U.S.A.)에 180μ 의 細胞浮遊液과 20μ 의 藥物을 넣었다. 藥物의 濃度는 最初의 濃度를 25mg/ml로 調整한 후 2倍씩 稀釋시켜서 使用하였으며, 96well 微細細胞培養板에 分柱 直前에 0.22μ m의 syringefilter로 濾過하여 使用하였다. 以後 3-4日間 37°C , 5% CO_2 의 培養器에서 培養하면서 細胞의 增殖程度를 位相差顯微鏡으로 隨時로 觀察하였다. 藥物이 處理되지 않은 對照 well의 細胞들이 充分히 成長 한 후, 培養液을 除去하고 각 well에 20μ 의 MTT solution(5mg/ml in phosphate buffered saline : PBS)(Sigma,

USA)을 넣고 37°C , 5% CO_2 培養器에서 3時間 培養하였다. 그 후 100μ 의 0.04M HCl(in propan-2-ol)을 넣어 MTT 溶液과 反應하여 생긴 푸른색의 formazan 結晶을 녹인 후 30분안에 540nm 의 ELISA 判讀者(Emax precision microplate reader, Molecular devices, U.S.A.)에서 吸光度(Optical Density)를 測定하였다. 이때 參考 波長으로 630nm 를 利用하였다. 이 吸光度는 MTT가 細胞에 의해 formazan(blue)으로 分解된 量을 나타내며, 따라서 각 well에 存在하는 細胞(viable cells)數와 比例한다. 이와같이 吸光度를 測定한 후 아래의 公式과 같이 實驗群의 吸光度를 對照群의 吸光도와 比較하여 生存率을 算하였다.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{實驗群의 平均 吸光度} - \text{基準 吸光度}}{\text{對照群의 平均 吸光度} - \text{基準 吸光度}} \times 100$$

③ 結果 分析

試驗群에서 각 well로부터 한 칼럼의 平均 OD_{540} (파장 540nm 에서의 Optical Density)값을 算하여 위의 公式에 의하여 對照群(100% 生存群)의 平均 OD_{540} 값에 대한 百分率 값을 算出하였다. 이 百分率은 對照群과 比較한 試驗群의 細胞 生存率에 該當하는 값이다. 50% 抑制濃度(Inhibitory Concentration : IC_{50})는 이 生存率이 50%가 되도록 하는 藥物의 濃度로 定義하였으며, 이 IC_{50} 값이 0.23mg/ml 以上으로 나타난 抽出物에 對해서는 抗癌活性이 없거나 微弱한 것으로 看做하였다⁶⁸⁾.

(3) 生存日數의 測定^{43, 89)}

생쥐를 對照群, sample A群 및 sample B群으로 各各 10마리씩 나누고, Sarcoma-180 cell 溶液을 한마리당 0.1ml (2.0×10^6 /mouse)씩 腹腔內에 移植한 뒤 24時間 後부터 檢液을 1日 1回 連續으로 經口投與하면서 壽命을 觀察하고 生存

增加率(increase of life span:ILS%)을 求하였다.

$$ILS (\%) = \frac{T - C}{C} \times 100$$

T : mean survival days of the sample group.

C : mean survival days of the control group.

(4) 腫瘍成長抑制의 測定^{43, 89, 111})

생쥐를 對照群, sample A群 및 sample B群으로 各各 10마리씩 나누고, Sarcoma-180 cell 溶液을 한마리당 0.2ml (4.0×10⁶/mouse)씩을 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 뒤 24時間 後부터 10日間 檢液을 1日 1回 連續으로 經口投與하고, Sarcoma-180 cell 投與 後 15日째 致死시켜 固型癌을 摘出하여 그 重量을 測定하고 腫瘍成長 抑制率(tumor growth inhibition rate:TIR %)을 計算하였다.

$$TIR (\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

T : mean tumor weight of the sample group.

C : mean tumor weight of the control group.

(5) 體重의 測定⁴³)

생쥐를 對照群, sample A群 및 sample B群으로 各各 10마리씩 나누고, Sarcoma-180 cell 溶液을 한마리당 0.2ml (4.0×10⁶/mouse)씩을 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 뒤 24時間 後 부터 14日間 檢液을 1日 1回 連續으로 經口投與하고, Sarcoma-180 cell 投與 後 15日째 致死시켜 固型癌을 摘出한 後 固型癌을 除外한 생쥐의 體重을 測定하였다.

3) 免疫에 對한 實驗

(1) 檢液의 投與

생쥐 10마리를 1群으로하여 對照群, sample

A群 및 sample B群으로 나누었으며, 각 생쥐의 體重을 測定하여 銀花瀉肝湯역기스와 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 1g/kg을 蒸溜水로 稀釋하여 1日 1回 21日間 連續으로 經口投與하였다. 對照群에는 同量의 生理食鹽水를 經口投與하였다.

(2) 抗原^{97, 109, 110})

抗原으로는 緬羊赤血球(Alsever sheep red blood cell, KOREA MEDIA CORP.)를 사용하여 4℃에서 保存하였으며, 保存 1週日 以內의 것만 使用하였다.

(3) 免疫^{97, 109, 110})

檢液 및 生理食鹽水를 1日 1回 21日間 經口投與한 後 對照群과 實驗群의 尾靜脈에 5×10⁸cells/ml의 濃度로 調整된 緬羊赤血球 浮遊液을 0.2ml를 注射하여 免疫시켰다.

(4) 免疫機能低下 誘發⁹⁾

免疫機能低下 誘發은 檢液을 21日間 經口投與한 後 對照群과 實驗群에 methotrexate(유한메트렉세이트정, 유한양행) 1mg/1kg을 1日 1回 4日間 經口投與하여 免疫機能을 低下시켰다.

(5) 遲延型過敏反應의 測定^{61, 62, 93, 95, 110})

遲延型過敏反應(delayed type hypersensitivity:DTH)의 測定은 Mitsuoaka등¹¹⁰⁾의 方法에 따라 免疫시킨 4日 後에 2×10⁹ cells/ml로 調整된 緬羊赤血球 浮遊液 0.05ml를 右側後肢 足蹠皮內에 注射하고, 24時間이 經過한 다음 足蹠腫脹反應檢査를 施行하였다.

足蹠腫脹程度는 생쥐를 ether로 가볍게 麻醉시키고, digimatic caliper(Mitutoyo, Co., Tokyo, Japan)을 使用하여 左右側後肢足蹠의 두께를 0.01mm까지 測定하여 左右足蹠 두께의 差異를 計算하였다.

(6) 採血 및 血清의 分離

足蹠腫脹反應檢査가 끝난 생쥐를 ether로 가

법게 痲醉하여 解剖板에 固定하고 1回用 注射器(syring, 보인)로 心臟에서 約 1ml 採血한 다음 5ml用 plastic tube(Falcon, No.2058, Oxford, CA., U.S.A.)에 옮긴 後 1時間 동안 室溫에서 放置하고 작은 유리봉으로 凝固된 血液을 數回 휘저은 後 遠心分離器로 2,000 rpm에서 30分間 遠心分離시켜 上層의 血液을 다른 tube에 取하였다. 이 血清을 56℃에서 30分間 非動化시킨 後 赤血球凝集素價와 赤血球溶血素價의 測定에 使用하였다.

赤血球溶血素價 測定에 補體로 使用된 家兔의 血清도 上記와 같은 方法으로 分離하여 非動化하지 않은 狀態로 使用하였다.

(7) 赤血球凝集素價의 測定^{10, 92, 94, 101, 102, 116}

緬羊赤血球에 對한 凝集素價(hemagglutinin titer)를 測定하기 爲하여 생쥐의 心臟에서 採血한 血液을 分離하여 얻은 血清을 56℃에서 30分間 非動化시키고 microtitration plate(Limbro chemical Co., Conn., U.S.A.)의 各 well에 磷酸鹽緩衝食鹽液(phosphate buffered saline : PBS, pH 7.2)으로 2倍 系列稀釋한 血清 25 μ l에 0.5% 緬羊赤血球 浮遊液을 50 μ l씩 加하여 잘 混合한 다음 37℃ 5% CO₂ 培養器內에서 18時間 放置한 後 赤血球凝集反應을 觀察判讀하였으며, 赤血球凝集을 일으키는 血清의 最大稀釋倍數를 凝集素價로 測定하였다.

(8) 赤血球溶血素價의 測定^{10, 92, 94, 101, 102, 116}

緬羊赤血球에 對한 溶血素價(hemolysin titer)를 測定하기 爲하여 위의 方法으로 非動化시킨 血清을 microtitration plate의 各 well에 PBS로 2倍 系列稀釋한 血清 25 μ l에 0.5% 緬羊赤血球 浮遊液을 50 μ l씩 加한 다음 各 well에 補體로서 5倍 稀釋한 家兔의 血清을 25 μ l씩 加하여 잘 混合하고 37℃ 5% CO₂ 培養器內에서 1時間 동안 放置한 後 緬羊赤血球가 完全히 溶血을 일으키는 最大稀釋倍數를 溶血數價로 算定하였다.

(9) 脾臟細胞浮遊液의 準備

採血이 끝난 생쥐를 頸椎脫骨로 致死시킨 後 腹部를 alcohol로 完全히 塗布하여 無菌의으로 脾臟을 摘出した 다음 脾臟 周圍의 組織들을 조심스럽게 除去하고나서 차거운 完全 培養液 RPMI-1640 으로 洗滌하였다. 準備된 脾臟을 cell dissociation sieve-tissue grinder kit (Sigma, U.S.A.)로서 잘게 으갠 뒤 組織破片을 除去한 後 RPMI-1640으로 2回 洗滌하였다. 그후 滅菌된 蒸溜水로서 hypotonic shock⁵⁷⁾를 일으켜 赤血球를 破壞한 後 10倍의 Hank's balanced salt solution(HBSS:Gibco, NO.310-4020)으로 2回 洗滌하고 다시 RPMI-1640으로 1회 洗滌한 後, 10% 牛胎兒血清(fetal bovine serum : FBS)가 添加된 RPMI-1640 培地에 脾臟淋巴球를 再浮遊하였다.

(10) Rosette 形成細胞數의 測定^{90, 92, 96}

Rosette 形成細胞(rosette forming cells : RFC)의 測定은 Bach⁹⁶⁾의 方法에 準하여 測定하였으며, 遠心洗滌한 脾臟細胞浮遊液을 1 \times 10⁷cells/ml의 濃度로 調整한 것과 3 \times 10⁸cells/ml의 濃度로 調整한 緬羊赤血球浮遊液을 12 \times 75mm plastic tube(Falcon No.2058, Oxford, CA., U.S.A.)에 各各 0.5ml씩 넣고 混合하여 遠心分離器로 980 rpm에서 5分間 遠心分離시킨 後, 4℃ 冷水槽에서 30分間 放置 後 HBSS 1ml를 加하면서 細胞를 再浮遊시킨 다음 細胞浮遊液을 血球計算板(American Optica, Buffalo, N.Y., U.S.A.)위에 한 방울 떨어 뜨리고 450倍率로 檢鏡觀察하였다.

脾臟細胞에 緬羊赤血球가 4個以上 附着된 境遇를 Rosette 形成細胞로 定하여 10⁶ 脾臟細胞當 10³ Rosette 形成細胞數를 算定하였다.

(11) 自然殺害細胞의 活性度 測定

25, 26, 50, 98, 103, 107, 108)

① 作動細胞 및 標的細胞의 準備

위의 實驗方法에 의해 準備한 脾臟細胞를 作動細胞로 使用하였으며, 自然殺害細胞의 殺害能測定시의 標的細胞는 韓國細胞柱銀行에서 分讓받은 생쥐 由來 YAC-1 淋巴腫 細胞(TIB-160)를 使用하였다. 分讓받은 후 本 實驗室에서 FBS가 10% 添加된 混合培地로 繼代培養하면서 測定하였다.

② 細胞毒性的 測定

i) 基本方法

細胞毒性實驗은 Promega社의 Cytotox96TM Non-radioactive Cytotoxicity assay KIT를 利用하였다. 이 KIT는 51Cr assay를 代替하는 것으로 알려져 있다^{103,108}). 즉, 細胞의 溶解시에 放出되는 Lactate dehydrogenase(以下 LDH라 稱함)가 酵素反應의 結果로 붉은색의 結晶을 生成하는데, 이를 ELISA判讀器를 利用하여 可視光線領域의 波長(490nm)으로 吸光度를 測定함으로써 溶解된 細胞의 數를 測定하는 것이다. 이것을 利用하여 cell-mediated cytotoxicity를 測定할 수 있다⁹⁸).

ii) 對照 well의 準備

이 方法은 5種類의 對照 well을 두었다. 이는 誤差를 補正하기 위한 것이다. 對照 well 1은 標的細胞의 LDH 自然放出量을 나타내는 것으로 最適數의 標的細胞 100 μ 와 培地 100 μ 로 構成하였고, 對照 well 2는 標的細胞의 LDH 最大放出量을 나타내는 것으로 最適數의 標的細胞 100 μ 와 培地 100 μ 로 構成하였으며 培養이 끝나기 45分前에 20 μ 의 lysis solution(溶解溶液)을 添加하였다. 對照 well 3은 作動細胞의 LDH 自然 放出量을 나타낸 것으로 最適數의 作動細胞 100 μ 와 培地 100 μ 로 構成하였고, 對照 well 4는 溶解溶液을 添加하여 發生하는

부피의 變化에 의한 誤差를 補正하기 위한 것으로 培地 200 μ 와 溶解溶液($\times 10$) 20 μ 로 構成하였다. 對照 well 5는 培地の background로서 培地내 血清이나 phenol red에 起因한 LDH의 活動能을 補正하기 위한 것으로 培地 200 μ 로 構成하였다.

iii) 測定方法

NK 活性度の 細胞毒性能 測定은 YAC-1細胞를 標的細胞로 利用하여, FBS가 添加된 混合培地에 5×10^4 cells/ml의 濃度로 製造하고, 96 well 微細細胞培養板(U-bottom plate)에 well當 100 μ 씩 分株한 후, 作動細胞와 標的細胞의 比가 100:1, 50:1, 10:1이 되도록, FBS가 10% 添加된 混合培地에 各各 5×10^6 cells/ml, 2.5×10^6 cells/ml, 5×10^5 cells/ml의 濃度로 調整된 脾臟細胞를 well에 100 μ 를 分株하여 最終 부피가 200 μ /well이 되도록 하였다. 對照 well은 위의 方法에 의해 準備하였다. 準備가 된 후 微細細胞培養板을 1,100rpm에서 4分間 遠心시킨 후, 4時間동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養器에서 培養하였다. 또한 培養完了 45分前에 對照 well 2에 100 μ 當 10 μ 의 溶解溶液($\times 10$)을 添加하였다. 終了시 37 $^{\circ}$ C, 1,100rpm에서 4分間 遠心分離하였고, 새로운 96 well plate(Flat-bottom plate)에 上層液을 50 μ 옮긴 후, 測定 buffer 12ml을 基質 混合器에 넣어 再組合基質을 만든 후, 각 well에 50 μ 씩 넣고 常溫에서 30分間 培養하였다. 이때 알루미늄 foil로 빛을 遮斷하였다. 培養후 50 μ 의 정지용액을 각 well에 넣은 후 注射器로 거품을 除去하였고, 그 후 1時間 以內에 490nm에서 吸光度를 測定하였다. 測定된 實驗값, 標的細胞 LDH 自然放出값, 作動細胞 LDH 自然放出量에서 培地の background값을 뺀고, 標的細胞 LDH 最大放出量에서 부피 補正값을 뺀다. 그 후 다음의 公式에 의하여 細胞 毒性能을 測定하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{(A - B) - C}{D - C} \times 100$$

A: 測定된 實驗값 - culture medium background

B: effect cell spontaneous LDH release - culture medium background

C: target cell spontaneous LDH release - culture medium background

D: target cell maximum LDH release - volume correction control

(12) 淋巴球增殖能 測定^{41, 62)}

위의 방법으로 浮遊된 脾臟淋巴球을 1×10^6 cells/ml 의 濃度로 調整한 뒤, T-細胞 有絲分裂 誘導物質인 Concanvalin-A(Sigma, U.S.A.)를 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 濃度로 添加하고, 96 well microplate에 well당 100 μl 씩 分株한 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培養器에서 72時間 培養한 다음 細胞柱를 採集하였다. [^3H]-thymidine(New England Nuclear, Boston MA, U.S.A.)을 각 well當 1 μCi 씩 加하여 18時間 동안 追加 培養하였다. 그 후 自動細胞收集機(SKATRON, Skatron instrument, Norway)로 glass fiber filter상에 收去한 후 이를 室溫에서 乾燥시킨 뒤 counting vial에 넣어 5ml의 cocktail 溶液(5g ppo., 250mg popop을 toluene 1 l 에 녹임)으로 溶解시킨 후 同位元素 測程器인 β -counter(Beckman, LS 3801, U.S.A.)에서 DNA合成시 陷入된 [^3H]-thymidine 量을 counter per minute(cpm)으로 測定하였고, 實驗도 3倍數로 하였다.

(13) Interleukin-2 生産能 測定^{105, 106)}

檢液投與후 생쥐를 致死시켜 脾臟을 摘出した 다음, 脾臟細胞를 10% FBS-RPMI1640 培養液에 5×10^6 cells/ml 의 濃度로 調整하고, 여기에 Concanavalin-A를 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 濃度로 添加한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 5%의 CO_2 培養器에서 24時間동안 各各 培養한 후 遠心分離한 다음 細胞를 除去하고 上層液을 收去하여 Interleukin-2(이하 IL-2)의

生産能을 測定하였다.

생쥐 IL-2의 測定은 Intertest-2X Kit(Genzyme, USA)를 利用하여 測定하였다. Intertest-2X Kit는 mouse IL-2 測定用 ELISA Kit로서 高형상 면역효소 측정법을 利用한 測定法으로 450nm 의 波長에서 吸光度를 測定하여 標準曲線으로부터 試料 내의 IL-2量을 算定할 수 있는 方法이다. 測定方法은 96 well plate의 각 well에 試料를 100 μl 씩 分株하고 덮개로 덮고나서 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40분간 培養한 후 well의 液體를 除去하고 洗滌用 buffer로 4번 洗滌 후 plate를 濾過紙로 말리고 각 well에 biotinylated polyclonal anti-mouse IL-2를 100 μl 씩 分株하여 다시 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40分間 培養하였다. 그 후 well의 反應溶液을 除去하고 洗滌用 buffer로 4번 洗滌 후 plate를 濾過紙로 말리고 각 well에 streptavidin- peroxidase를 100 μl 씩 分株하여 다시 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 25分間 培養하였다. 다시 well의 反應溶液을 除去하고 洗滌用 buffer로 4번 洗滌 후 plate를 濾過紙로 말리고 각 well에 基質을 100 μl 씩 分株하여 다시 덮개로 덮은 후 常溫에서 10分間 培養하였다. 다시 각 well에 整地 溶液을 100 μl 씩 分株한 후 ELISA 判讀器 (Emax precision microplate reader, molecular devices, U.S.A.)로 波長 450nm 에서 吸光度를 測定하였다.

(14) Carbon clearance에 依한 貪食能 測定^{58, 97, 114)}

細胞內皮系 貪食能의 測定은 Biozzi 등⁹⁷⁾의 方法에 依하여 생쥐의 尾靜脈에 carbon 16mg을 注射한 後 1分, 5分에 眼窩에서 25 μl 씩 血液을 micropipette로 採取하고 0.1% Na_2CO_3 2ml에 溶血시켜 分光光度計(Spectrophotometer, U-2000, Hitachi, Japan)를 使用하여 波長 675nm에서 末梢血管內 炭粉濃度를 測定하였으며, 貪食指數 K는 아래의 公式에 依하여 算出하였다.

$$\text{Phagocytic index } K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{T_2 - T_1}$$

C₁ : 時間 T₁에서의 sample 血液中の carbon 濃度

C₂ : 時間 T₂에서의 sample 血液中の carbon 濃度

T₁ : 처음 採血時間

T₂ : 마지막 採血時間

Ⅲ. 成 績

1. 癌細胞 生存能에 對한 效果

銀花瀉肝湯액기스와 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스가 SNU-C4(大腸癌 細胞柱), SNU-396(肝癌 細胞柱) 및 SNU-1(胃癌 細胞柱)의 成長에 미치는 影響을 MTT 檢索法을 通하여 觀察한 結果 SNU-C4, SNU-396 및 SNU-1에 대한 IC₅₀ (50% 抑制濃度)의 값이 銀花瀉肝湯액기스 投與群에서 各各 6.554mg/ml, 0.000204mg/ml 및 0.00041mg/ml 이었고, 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서는 各各 2.514mg/ml, 0.3998mg/ml 및 0.000103 mg/ml 으로 나타나서, 銀花瀉肝湯액기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群은 各各 SNU-396의 細胞柱와 SNU-1의 細胞柱에서 0.23mg/ml 以下로 抗癌活性이 높게 나타났다 (Table 1).

2. 生存期間延長에 對한 效果

Sarcoma-180 cell을 腹腔內에 移植한 瘡癥생쥐의 生存期間은 生理食鹽水를 投與한 對照群의 平均生存日數가 24.75±0.87日인데 比하여, 銀花瀉肝湯액기스 投與群의 平均生存日數는 25.00±0.58日로 生存增加率(ILS%)이 1.0%로 그쳐 對照群에 比하여 有意性이 認定되지 않았

Table 1. IC₅₀ of Eunwhasagantang and Eunwhasagatangganokyong on SNU-C4, SNU-396 and SNU-1

Groups	IC ₅₀ ^{a)} (mg/ml)		
	SNU-C4	SNU-396	SNU-1
Sample A	6.554	0.000204	0.00041
Sample B	2.514	0.3998	0.000103

a) : IC₅₀ = 50 % Inhibitory Concentration

Sample A : Group of Eunwhasagantang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagatangganokyong administered.

Table 2. Mean survival days of mice treated with Eunwhasagantang and Eunwhasagatangganokyong, after Sarcoma-180 cells transplantation into the peritoneal cavity

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	Mean survival Days	ILS ^{b)} (%)
Control	10	-	24.75±0.87 ^{a)}	-
Sample A	10	1	25.00±0.58	1.0
Sample B	10	1	27.44±1.12	10.9

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

b) : ILS (%)=(T-C)/C 100, where.

T=mean survival days of the sample group.

C=mean survival days of the control group.

Control : Group of normal saline administered.
Sample A : Group of Eunwhasagantang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagatangganokyong administered.

고, 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群의 平均生存日數는 27.44±1.12日로 生存增加率이 10.9%로 對照群에 比하여 增加하였으나 有意性은 認定되지 않았다(Table 2).

3. 腫瘍成長抑制에 對한 效果

Sarcoma-180 cell 溶液을 생쥐의 왼쪽 鼠蹠部에 注入한 뒤 24時間 後부터 各 檢液을 10日間 連續으로 投與하고 Sarcoma-180 cell 投與後 15 日째 致死시켜 固型癌을 摘出하여 그 重量을 測定하고 腫瘍成長抑制率(TIR%)을 計算한 바, 生理食鹽水를 投與한 對照群이 平均 2.58 ± 0.23 g의 腫瘍成長을 보인데 比하여, 銀花瀉肝湯역기스 投與群에서는 平均 1.75 ± 0.15 g으로 32.17%의 腫瘍成長抑制率을 보여 對照群에 比하여 $P < 0.01$ 의 有意성이 認定되었고, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群에서는 平均 1.74 ± 0.11 g으로 32.56%의 腫瘍成長抑制率을 보여 對照群에 比하여 $P < 0.01$ 의 有意성이 認定되었다 (Table 3).

Table 3. Tumor weight of mice treated with Eunwhasagatang and Eunwhasagatangganokyong, after Sarcoma-180 cells transplantation into the left groin

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	Tumor Weight (g)	TIR ^{b)} (%)
Control	10	-	$2.58 \pm 0.23^a)$	-
Sample A	10	1	$1.75 \pm 0.15^{**}$	32.17
Sample B	10	1	$1.74 \pm 0.11^{**}$	32.56

a) : Mean \pm standard error.

b) : TIR (%) = $(C-T)/C \times 100$, where.

T=mean tumor weight of the sample group.

C=mean tumor weight of the control group.

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group (** $p < 0.01$).

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagatang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagatangganokyong administered.

4. 體重變化에 對한 效果

Sarcoma-180 cell 溶液을 생쥐의 왼쪽 鼠蹠部에 注入한 뒤 24時間 後부터 各 檢液을 10日間 連續으로 投與하고 Sarcoma-180 cell 投與後 15 日째 致死시켜 固型癌을 摘出した 후 固型癌을 除外한 생쥐의 體重을 測定한 바, 生理食鹽水를 投與한 對照群의 1日, 15日째 體重은 各各 19.46 ± 0.14 g, 19.15 ± 0.26 g으로 0.31 ± 0.30 g의 體重減少를 보인데 比하여, 銀花瀉肝湯역기스 投與群은 各各 19.30 ± 0.20 g, 19.95 ± 0.22 g으로 0.65 ± 0.11 g의 體重增加를 보여 對照群에 比하여 $P < 0.05$ 의 有意성이 認定되었고, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群은 各各 19.35 ± 0.18 g, 19.90 ± 0.24 g으로 0.55 ± 0.12 g의 體重增加를 보여 對照群에 比하여 $P < 0.05$ 의 有意성이 認定되었다 (Table 4).

5. 遲延型過敏反應에 對한 效果

檢液 및 生理食鹽水를 21日間 經口投與한 후 實驗群과 對照群間의 遲延型過敏反應을 比較하기 爲하여 緬羊赤血球로 免疫시킨 4日 後 緬羊赤血球를 右側後肢 足蹠皮內에 注射한 다음 24時間이 經過한 후, 左右側後肢足蹠의 腫脹程度를 測定하여 差異를 計算하였던 바, 對照群이 0.16 ± 0.04 mm, 銀花瀉肝湯역기스 投與群이 0.12 ± 0.03 mm, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群이 0.11 ± 0.02 mm로 나타나 對照群에 比하여 實驗群은 모두 減少하여 有意성이 認定되지 않았다 (Table 5).

6. 赤血球凝集素價에 對한 效果

實驗群과 對照群間의 緬羊赤血球에 對한 凝集素價를 測定하여 \log_2 값으로 計算하였던 바,

Table 4. Body weight of mice treated with Eunwhasagatang and Eunwhasagatangganokyong, after Sarcoma-180 cells transplantation into the left groin

Groups	Number of animals	Dose (g/kg)	Body weight (g)		
			1 day	15 days	15-1 days
Control	10	-	19.46±0.14 ^{a)}	19.15±0.26	-0.31±0.30
Sample A	10	1	19.30±0.20	19.95±0.22	0.65±0.11*
Sample B	10	1	19.35±0.18	19.90±0.24	0.55±0.12*

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

* Statistically significant as compared with control group(*p<0.05).

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagatang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagatangganokyong administered.

Table 5. Effects of Eunwhasagatang and Eunwhasagatangganokyong on the delayed type hypersensitivity(DTH) response in methotrexate-pretreated mice at 24 hrs after challenge with SRBC

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	Footpad Swelling(mm)
Control	10	-	0.16±0.04 ^{a)}
Sample A	10	1	0.12±0.03
Sample B	10	1	0.11±0.02

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagatang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagatangganokyong administered.

對照群이 6.60±1.19, 銀花瀉肝湯역기스 投與群이 8.43±1.08, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群이 8.78±0.61로 對照群에 比하여 實驗群 모두에서 增加하는 傾向을 나타냈으나 有意性은 認定되지 않았다(Table 6).

Table 6. Effects of Eunwhasagatang and Eunwhasagatangganokyong on the hemagglutinin titer in methotrexate-pretreated mice at 24 hrs after challenge with SRBC

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	Hemagglutinin (Log ₂ titer)
Control	10	-	6.60±1.19 ^{a)}
Sample A	10	1	8.43±1.08
Sample B	10	1	8.78±0.61

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagatang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagatangganokyong administered.

7. 赤血球溶血素價에 對한 效果

實驗群과 對照群間的 緬羊赤血球에 對한 溶血素價를 測定하여 log₂값으로 計算하였던 바, 對照群이 6.10±0.60, 銀花瀉肝湯역기스 投與群은 5.20±0.42로 나타나 對照群에 比하여 多

Table 7. Effects of Eunwhasagatang and Eunwhasagatangganokyong on the hemolysin titer in methotrexate-pretreated mice at 24hrs after challenge with SRBC

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	Hemolysin (Log ₂ titer)
Control	10	-	6.10±0.60 ^{a)}
Sample A	10	1	5.20±0.42
Sample B	10	1	9.33±0.71**

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group (**P<0.01).

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagatang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagatangganokyong administered.

少 減少하였으나, 銀花瀉肝湯加鹿茸엑기스 投與群은 9.33±0.71로 對照群에 比하여 P<0.01의 有意性있는 增加를 나타내었다(Table 7).

8. Rosette 形成細胞數에 對한 效果

抗原인 緬羊赤血球에 對한 實驗群과 對照群間的 免疫反應細胞數를 比較하기 爲하여 脾臟細胞에 緬羊赤血球가 4個以上 附着된 境遇를 Rosette 形成細胞로 定하여 10⁶ 脾臟細胞當 10³ Rosette 形成細胞數를 算定한 結果, 對照群이 20.44±1.51인데 比하여, 銀花瀉肝湯엑기스 投與群이 19.00±0.61으로 多少 減少하였고, 銀花瀉肝湯加鹿茸엑기스 投與群은 32.00±3.16으로 對照群에 比하여 增加하는 傾向을 보였으나 有意性은 認定되지 않았다(Table 8).

Table 8. Effects of Eunwhasagatang and Eunwhasagatangganokyong on the appearance of rosette forming cells in methotrexate-pretreated mice at 24 hrs after challenge with SRBC

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	10 ³ RFC/10 ⁶ spleen cells
Control	10	-	20.44±1.51 ^{a)}
Sample A	10	1	19.00±0.61
Sample B	10	1	32.00±3.16

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagatang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagatangganokyong administered.

9. 自然殺害細胞活性에 對한 效果

自然殺害細胞의 活性度를 比較하기 爲하여 作動細胞와 標的細胞의 比가 各各 100:1, 50:1, 10:1이 되도록 調整하여 實驗한 후 % Cytotoxicity를 測定하였던 바, 作動細胞와 標的細胞의 比가 100:1의 경우 對照群에서는 22.07±3.77%인데 比하여 銀花瀉肝湯엑기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸엑기스 投與群에서는 各各 49.30±4.98% 와 52.78±3.34%로 P<0.01의 有意性있는 增加를 보였고, 50:1의 경우 對照群 42.49±6.67%, 銀花瀉肝湯엑기스 投與群 62.44±31.62%, 銀花瀉肝湯加鹿茸엑기스 投與群 72.45±3.80%로 增加하는 傾向을 나타내었으나 銀花瀉肝湯加鹿茸엑기스 投與群에서만 P<0.05의 有意性이 認定되었고, 10:1의 경우 對照群 40.61±8.08%, 銀花瀉肝湯엑기스 投與群 49.06±16.45%, 銀花瀉肝湯加鹿茸엑기스 投與群 51.84±2.74%로 增加하는 傾向을 보였으나

Table 9. Effects of Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong on the natural killer cell activity at Effector/Target Cell Ratio with 100:1, 50:1, 10:1 in methotrexate-pretreated mice

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	Cytotoxicity (%)		
			100 : 1	50 : 1	10 : 1
Control	8	-	22.07 ± 3.77 ^{a)}	42.49 ± 6.67	40.61 ± 8.08
Sample A	8	1	49.30 ± 4.98**	62.44 ± 31.62	49.06 ± 16.45
Sample B	8	1	52.78 ± 3.34**	72.45 ± 3.80*	51.84 ± 2.74

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group (*P<0.05, **P<0.01).

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagantang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagantangganokyong administered.

有意性は 認定되지 않았다(Table 9).

10. 淋巴球 増殖能에 對한 效果

생쥐 脾臟細胞를 Concanvalin-A로 刺戟 培養한 후 그 増殖을 比較하기 위하여 [³H]-thymidine의 吸收程度를 測定하였던 바, 對照群이 168.10 ± 24.26 cpm 인데 比하여, 銀花瀉肝湯액기스 投與群이 352.00 ± 36.96 cpm, 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群이 630.90 ± 107.90 cpm 으로 増加하여 모두 P<0.01의 有意성이 認定되었다(Table 10).

11. Interleukin-2 生産能에 對한 效果

Interleukin-2 生産能을 比較하기 위하여 이를 測定하였던 바, 對照群이 166.55 ± 3.84pg/ml 인데 比하여, 銀花瀉肝湯액기스 投與群이 186.58 ± 6.24pg/ml, 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群이 273.05 ± 13.34pg/ml로 各各 P<0.05와 P<0.01의 有意성이 認定되었다(Table 11).

Table 10. Effects of Eunwhasagantang and Eunwhasagantangganokyong on the Lymphocyte Transformation in methotrexate-pretreated mice

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	Proliferation (cpm)
Control	10	-	168.10 ± 24.26 ^{a)}
Sample A	10	1	352.00 ± 36.96**
Sample B	10	1	630.90 ± 107.90**

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group(**P<0.01).

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagantang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagantangganokyong administered.

12. Carbon clearance에 의한 食食能에 對한 效果

實驗群과 對照群間의 巨食細胞活性度를 比較해보기 爲하여 생쥐의 尾靜脈에 carbon을 注

Table 11. Effects of Eunwhasagantang and Eunwhasagantanganokyong on the Interleukin-2 Productivity in methotrexate-pretreated mice

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	Interleukin-2 (pg/ml)
Control	10	-	166.55±3.84 ^{a)}
Sample A	10	1	186.58±6.24*
Sample B	10	1	273.05±13.34**

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group

(*P<0.05, **P<0.01).

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagantang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagantanganokyong administered.

Table 12. Effects of Eunwhasagantang and Eunwhasagantanganokyong on the phagocytic index K in methotrexate-pretreated mice

Groups	Number of Animals	Dose (g/kg)	Carbon clearance (K-index)
Control	10	-	0.00676±0.00034 ^{a)}
Sample A	10	1	0.00661±0.00115
Sample B	10	1	0.01136±0.00169*

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group(*P<0.05).

Control : Group of normal saline administered.

Sample A : Group of Eunwhasagantang administered.

Sample B : Group of Eunwhasagantanganokyong administered.

射하여 Carbon clearance를測定하였던 바,對照

群의 phagocytic index K값이 0.00676±0.00034인데 비하여, 銀花瀉肝湯역기스 投與群이 0.00661±0.00115로 多少 減少하였고, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群은 0.01136±0.00169로 增加하여 對照群에 비하여 P<0.05의 有意성이 認定되었다(Table 12).

IV. 考 察

科學의 發達에 따른 醫學의 進歩와 人間生活의 變化는 過去 傳染性疾患의 減少를 가져온 반면 各種 成人病과 腫瘍性疾患의 增加를 가져왔으며, 특히 腫瘍發生의 頻度는 最近 急激히 增加하여 왔다^{5,15)}. 이는 文明이 發達하고 産業化, 工業化됨에 따라 여러 種類의 發癌物質에 暴露될 可能性이 높아졌고, 平均 壽命의 延長으로 癌이 發生되는 老人人口가 增加되었으며, 또한 診斷技術의 發達로 發見 患者의 數가 많아진 것 등을 그 原因으로 볼 수 있다.

腫瘍이란 組織의 自律的인 過剩의 成長이며 이것은 個體에 對해서 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 正常組織에 對해서 破壞的인 것을 말하며⁶⁾, 이를 構成하는 細胞의 行動樣相에 따라 良性腫瘍(benign tumor)과 惡性腫瘍(malignant tumor)으로 나눌 수 있는데, 우리가 一般的으로 指稱하는 癌(cancer)이란 惡性腫瘍을 말하는 것이다^{2,6)}. 이러한 癌은 正常細胞와 比較할 때 模樣이 不規則하고 核의 크기도 아주 多樣하며, 細胞는 아주 빠르게 分裂하는 特徵을 갖고 있다. 癌을 誘發하는 原因은 刺戟物, 食品, 化學物質, 放射線, 바이러스 등의 外因性因子와 遺傳의 素因, 호르몬代謝, 老化, 免疫 등의 內因으로 나누어 볼 수 있는데^{13,59)}, 특히 食品 및 汚染 등의 環境의 要因과 關係가 깊다⁵⁹⁾.

癌의 治療法으로는 手術療法, 放射線療法,

化學療法 등이單獨 또는 併用^{23,49,63})으로活用되고 있으며, 그밖에 免疫療法^{18,67})과 遺傳子療法^{53,66})에 對한 研究도 進行되고 있다. 그러나 手術療法, 放射線療법은 주로 初期 癌患者에만 適用할 수 있으므로 그 治療에 限界가 있고, 全身療法인 免疫療法과 遺傳子療法도 現在로는 治療方法이 定立되어 있지 않은 狀態이다. 그러므로 現在의 狀況에서는 化學療法の 重要性이 強調되고 있는데, 化學藥材의 毒性問題 및 各種 副作用을 防止하고 感受성이 높은 藥物의 開發 및 效果의인 治療法의 開發이 要求되고 있다¹¹¹). 최근에 Interferon이나 Interleukin-2와 같은 生物學的 反應調節物質(Biological response modifiers : BRM)은 抗바이러스 作用, 細胞의 增殖抑制作用, 自然殺害細胞(Natural killer cell)의 活性化, 巨食細胞(macrophage)의 貪食力 增大, 免疫글로불린 生産의 調節能 및 直接的인 癌細胞 抑制機能 등 多様な 生體反應調節作用을 갖는다고 알려져 있어 抗癌劑와의 併用投與가 試圖되고 있다^{23,99,115}). 이러한 BRM의 效果와 類似的한 抗癌性 天然物^{33,40})인 韓藥劑를 併用使用하여 上昇의 抗癌效果를 期待할 수 있는 것이다^{83,86,88}).

韓醫學에서 腫瘍에 對한 認識은 일찍부터 있었던 것으로 보인다. 腫瘍에 대한 記述은 殷墟의 甲骨文에서 '瘤'라 한 곳에서 처음 나타나며¹⁴), 以後 內經에서 積聚, 腸覃, 石瘕, 溜(瘤), 五臟之積 등에 對하여 具體的으로 言及한 이래, 歷代 醫書에서 腫瘍의 位置와 病理的 特性에 따라 瘦瘤(石瘦 肉瘦 筋瘦 血瘦 氣瘦의 五瘦, 骨瘤 脂瘤 氣瘤 肉瘤 膿瘤 血瘤의 六瘤), 陰菌(陰覃, 陰中息肉), 石疽, 失營, 惡核, 喉疔(喉菌), 芽菌, 舌疔(舌菌), 兔脣, 缺盆疽 등으로 多樣하게 記述하고 있으며, 積聚, 膈中, 反胃, 翻胃 등의 病證에서도 內部臟器 癌과 類似的한 症狀를 說明하고 있다^{3,7,60,71,72,75,76,80}).

腫瘍의 發生 原因은 風·寒·暑·濕·火의 外邪에 感受하는 外感六淫과, 怒·憂·思·悲·恐·鬱·驚 등에 의한 七情內傷, 辛鹹·甘膏·煎炒·酒濕의 飲食內傷 및 過勞 房勞過度의 不內外因으로 들 수 있으며¹⁴), 이들은 人體의 正氣虛와 複合的으로 作用하는 것으로 볼 수 있다. 이 중에서도 특히 正氣의 強弱은 疾病發生發展의 關鍵이 되는 것이고, 外在環境의 各種 發病因子가 人體를 侵犯하는 것은 發病의 條件이 되며, 人體의 體質狀態와 臟腑組織機能의 盛衰 및 그것의 疾病에 對한 防禦, 鬭爭, 回復力의 強弱은 疾病發生發展의 根據가 된다⁴). 이러한 原因에 의하여 個體의 臟腑機能과 氣血이 失調되어 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結, 正氣虛弱, 經絡瘀阻 등의 病理變化가 나타나고, 이런 變化가 單獨 혹은 相互錯雜되면서 氣機不通, 聚集日久하여 發生하는 慢性的인 疾患으로 理解할 수 있다⁷⁴).

免疫이란 人體內에서 어떤 要因으로 因해서 든지 異物의 侵入이나 變異細胞가 發生하면 生體防禦機構, 즉 immune system이 關與하여 異物은 물론 새로이 發生된 變異細胞를 非自己로 認識하여 處理하는 能力을 發揮함으로써 個體의 恒常性을 維持하려는 現象으로 抗原刺戟에 의해 抗體가 만들어지는 免疫反應을 體液性 免疫(humoral immunity)이라 하고 抗原刺戟을 받은 T 淋巴球나 T 淋巴球가 만들어낸 여러 蛋白質들에 의한 免疫反應을 細胞性 免疫(cellular immunity)이라 한다. 이러한 免疫學理論과 關聯하여 癌의 發生은 環境汚染에서 오는 發癌物質, X-ray 照射나 virus에 의한 것, 細胞의 毒素 또는 內因으로 因한 것 등이 免疫機構를 抑制하는 因子로 作用하는 일과 X-ray나 virus 또는 發癌性 物質들이 直接的으로 體細胞의 核酸의 代謝를 變動시킴으로써 오는 것과 어떤 細胞의 感染으로 細胞 周邊에 鹽基性 環境을 造成함으

로써, 體細胞의 代謝異常을 誘發할 수 있는 virus를 活成化시켜 virus와 免疫機構의 異常이 癌細胞가 免疫機構를 피하는 原因을 가져오게 함으로써 誘發될 수 있을 것임이 考察된다(1,12,51).

癌細胞 發生을 防禦하는 免疫監視機構의 主役은 細胞性 免疫이라 할 수 있는데, 첫째로 細胞傷害性 T-細胞(Cytotoxic T-lymphocyte), 둘째로 自然殺害細胞(Natural killer cell), 셋째로 細胞傷害性 大食細胞(Cytotoxic macrophage), 넷째로는 最近에 問題가 되기 시작한 LAK 細胞(lymphokine activated killer cell) 등이 癌細胞의 監視 第1線 細胞集團이라 생각된다¹²⁾.

이러한 免疫의 機能을 韓醫學의 正氣와 邪氣의 作用으로 理解할 수 있다. 正氣란 各種 臟腑 組織 器官의 機能活動을 正常的으로 維持하게 하고 內外部로 부터의 病邪에 對하여 抗病하는 抵抗力을 말하는 것으로⁴⁾, 黃帝內經⁷⁹⁾에서 “正氣存內 邪不可干”, “邪氣所湊 其氣必虛”, “邪之所在 皆爲不足” 이라고 하여 疾病의 發生이 正氣의 不足으로 惹起되므로, 人體의 抗病力을 調節하고 免疫效能을 높이며 그 安定性을 增強하는 扶正의 重要性을 強調하였다⁸⁾. 또한 邪氣란 人體를 致病케 하는 各種 發病要因과 病理的 損害因子를 말하는데⁴⁾, 이러한 邪氣를 없애는 祛邪란 免疫效能을 破壞하는 要所를 排除하는 것이다⁸⁾. 이러한 扶正祛邪의 作用을 통하여 韓藥劑의 免疫調節의 機轉을 理解할 수 있는 것이다.

宋³⁶⁾의 銀花瀉肝湯은 龍膽瀉肝湯⁷⁷⁾의 加味方으로 龍膽瀉肝湯의 效能을 “治肝經濕熱 或 囊癰 便毒 下疳 懸癰腫 作痛 小便澀滯……” 라 하였으며, 여기에 清熱利濕 消腫排膿의 效能이 있는 金銀花^{11,70)}를 君藥으로 加하고, 清熱涼血 活血散瘀의 效能이 있는 牡丹皮^{11,70)}와 行滯散氣 破瘀止痛의 效能이 있는 玄胡索^{11,70)}을 加味

한 處方이다. 또한 銀花瀉肝湯에 補氣血 益精髓하는 鹿茸^{11,17,70)}을 加한 銀花瀉肝湯加鹿茸을 扶正祛邪의 方劑로 本 實驗에 使用하였다.

銀花瀉肝湯 및 그 基本이 되는 龍膽瀉肝湯에 對한 實驗的 報告로는 宋³⁷⁾의 草龍膽 및 龍膽瀉肝湯이 家兔血壓 및 白鼠 TBA치에 미치는 影響, 宋³⁶⁾의 龍膽瀉肝湯과 銀花瀉肝湯의 抗炎症, 解熱, 鎮痛, 利尿 및 抗菌效果, 金²⁴⁾의 龍膽瀉肝湯 및 釣鉤藤, 夏枯草, 車前子 加味方이 高血壓에 미치는 影響, 徐³⁵⁾의 龍膽瀉肝湯 및 龍膽瀉肝湯加味方의 抗알레르기에 關한 實驗的 效果 등이 報告된 바 있으나, 銀花瀉肝湯 및 銀花瀉肝湯加鹿茸에 對한 抗癌 및 免疫反應에 對한 實驗에 關해서는 아직 報告되어진 적이 없다.

本 實驗에서는 銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸에 對한 抗癌效果와 免疫反應에 對한 效能을 究明하고자 抗癌作用으로는 MTT檢索法에 의한 癌細胞의 生存能과 擔癌생쥐의 生存期間延長, 腫瘍成長抑制 및 體重變化에 對한 效果와 免疫反應으로는 細胞內 DNA 및 RNA 合成을 抑制함으로써 免疫抑制效果를 나타내는 抗代謝性藥物의 一種인 methotrexate⁹⁾를 생쥐에 經口投與하여 免疫機能이 低下된 狀態下에서 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價, 赤血球溶血素價, 自然殺害細胞活性度, Rosette 形成細胞數, 淋巴球增殖能, Interleukin-2 生産能 및 carbon clearance에 依한 食食能에 對하여 實驗하였다.

最近 抗癌效果를 檢索하는 方法으로 敏感하면서도 實驗操作이 簡便한 能率의인 生物活性 大量檢索 시스템이 活用되고 있는데, 사람의 代表的인 癌들로부터 樹立된 癌細胞柱에 對한 生體外 細胞 毒性 檢査로 1次 檢索을 實施하는 傾向이다. 1次 檢索에서 어느 特定한 癌細胞에 對해 選擇의인 細胞 毒性을 보이면, 그 癌細胞

를 마우스에 移植하여 腫瘍을 만들고 이에 對한 治療效果를 檢索하는 異形移植 體內檢査로 移行하는 것이 一般的으로 쓰이는 方法으로 이를 疾患-指向性 抗癌劑 檢索 시스템(disease-oriented screening system)이라 한다^{33,68,91}).

MTT 檢索法은 生存 癌細胞의 酵素作用에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)가 還元되어 formazan crystal로 沈澱되는 程度를 吸光度로 測定하는 實驗法으로, 96 well plate를 利用하면 實驗操作의 自動化가 可能하고 實驗結果의 再現性和 客觀性도 優秀하여 大量檢索이나 1次 檢索에 適合하다^{33,68}).

먼저 癌細胞의 生存能을 觀察하기 위하여 MTT 檢索法을 利用하여 사람의 代表的인 癌들로부터 樹立된 癌 細胞柱인 SNU-C4(大腸癌 細胞柱), SNU-396(肝癌 細胞柱), SNU-1(胃癌 細胞柱)에 對한 腫瘍細胞의 生存能을 觀察하여 50% 抑制 濃度(IC₅₀)를 求하였던 바, 銀花瀉肝湯역기스 投與群에서는 SNU-396 細胞柱에 對한 IC₅₀ 값이 0.000204mg/ml 이었고 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群에서는 SNU-1 細胞柱에 對한 IC₅₀ 값이 0.000103mg/ml 로 各各 0.23mg/ml 以下로서 抗癌活性이 높게 나타났다.

Sarcoma-180 cell을 腹腔內에 移植한 후 各 檢液을 1日1回 連續로 經口投與하면서 擔癌 생쥐의 生存期間延長效果에 對하여 觀察한 바, 對照群의 平均生存日數가 24.75±0.87日이었고, 銀花瀉肝湯역기스를 投與群의 平均生存日數는 25.00±0.58日로 生存增加率(ILS%)이 1.0%이었으며, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스를 投與群의 平均生存日數는 27.44±1.12日이었으며 生存增加率이 10.9%로 對照群에 比하여 增加하는 傾向을 보였으나 有意性은 認定되지 않았다.

Sarcoma-180 cell 溶液을 생쥐의 왼쪽 鼠蹠部

에 注入한 뒤 24時間 후부터 各 檢液을 10日間 連續로 經口投與하고 Sarcoma-180 cell 投與 후 15日째 致死시켜 固型癌을 摘出하여 그 重量을 測定하고 腫瘍成長抑制率(TIR%)을 計算한 바, 對照群은 平均 2.58±0.23g의 腫瘍成長을 나타냈으며, 銀花瀉肝湯역기스 投與群에서는 平均 1.75±0.15g으로 32.17%의 腫瘍成長抑制率을 보였고, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群에서는 平均 1.74±0.11g으로 32.56%의 腫瘍成長抑制率을 보여 實驗群 모두 對照群에 比하여 P<0.01의 有意性이 認定되었다.

Sarcoma-180 cell 溶液을 생쥐의 왼쪽 鼠蹠部에 注入한 뒤 24時間 후부터 各 檢液을 10日間 連續로 投與하고 Sarcoma-180 cell 投與 후 15日째 致死시켜 固型癌을 摘出した 후 固型癌을 除外한 생쥐의 體重을 測定한 바, 對照群의 1日, 15日째 體重은 各各 19.46±0.14g, 19.15±0.26g으로 0.31±0.30g의 體重減少를 보였으나, 銀花瀉肝湯역기스 投與群은 各各 19.30±0.20g, 19.95±0.22g으로 0.65±0.11g의 體重增加를 나타냈고, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群은 各各 19.35±0.18g, 19.90±0.24g으로 0.55±0.12g의 體重增加를 보여 實驗群 모두 對照群에 比하여 P<0.05의 有意性이 認定되었다.

遲延型過敏反應은 오래 전부터 in vivo實驗에서 細胞性免疫反應을 測定하는데 使用되어 온 代表的인 方法으로 그 機轉은 抗原을 操作된 T細胞들에게 傳達하여 T細胞를 活性化시키면 活性化된 行動細胞들이 여러 가지 cytokine을 分泌하게 되고, 이로 因하여 周圍로 巨食細胞와 非特異炎症細胞들이 모여 들어 活性化되고 效率的으로 抗原을 죽이게 되는 것으로 즉, 抗原感作期나 反應誘導期에 있어서 T細胞依存現象^{110,116})인데, 本 實驗에서는 遲延型過敏反應을 比較하기 爲하여 緬羊赤血球로 免疫시킨 4日 후 緬羊赤血球를 右側後肢 足蹠皮內에 注

射한 다음 24時間이 經過한 후 左右肢足趾의 腫脹程度를 測定하였던 바, 對照群이 $0.16 \pm 0.04\text{mm}$, 銀花瀉肝湯역기스 投與群이 $0.12 \pm 0.03\text{mm}$, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群이 $0.11 \pm 0.02\text{mm}$ 로 實驗群 모두 對照群에 比하여 減少하는 傾向을 나타내었으나 有意성은 認定되지 않았다.

體液性免疫反應으로서 抗體生産能을 比較하기 爲하여 赤血球 表面抗原과 그에 對한 抗體와의 結合에 依하여 생기는 凝集反應을 보는 赤血球凝集素價^{92,101}와, 赤血球 表面抗原과 抗體의 結合體에 異種의 補體가 加해짐으로써 생기는 溶血反應을 보는 赤血球溶血素價^{92,101}를 測定하였던 바, 赤血球凝集素價는 對照群이 6.60 ± 1.19 , 銀花瀉肝湯역기스 投與群이 8.43 ± 1.08 , 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群이 8.78 ± 0.61 로 實驗群은 모두 對照群에 比하여 增加하는 傾向을 나타내었으나 有意성은 認定되지 않았고, 赤血球溶血素價는 對照群이 6.10 ± 0.60 인데 比하여, 銀花瀉肝湯역기스 投與群이 5.20 ± 0.42 로 減少하였고, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群은 9.33 ± 0.71 로 對照群에 比하여 增加하여 $P < 0.01$ 의 有意성이 認定되었다.

人體의 T細胞와 綿羊赤血球가 結合하는 現象을 보는 Rosette 形成 實驗은 T細胞의 分離 및 分布를 測定하는 方法으로써, 細胞性免疫反應을 測定하는 間接的인 方法으로 使用된다. 本 實驗에서는 in vitro 實驗에서 細胞性免疫反應을 測定하고자 Bach 등⁹⁶의 方法에 따라 Rosette 形成度檢査를 施行하였는데, 脾臟細胞에 綿羊赤血球가 4個以上 附着된 境遇를 Rosette 形成細胞로 定하여 10^6 脾臟細胞當 10^3 Rosette 形成細胞數를 算定한 結果, 對照群이 20.44 ± 1.51 인데 比하여, 銀花瀉肝湯역기스 投與群이 19.00 ± 0.61 로 多少 減少하였고, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群이 32.00 ± 3.16 으로

對照群에 比하여 增加하는 傾向을 나타냈으나 有意성은 認定되지 않았다.

免疫監視機能의 主役割을 맡고 있다고 알려진 T와 B淋巴球 그리고 이들의 subset淋巴球 以外에 抗原에 事前感作없이, 그리고 主要組織의 複合體(major histocompatibility complex: MHC)制限現象없이 腫瘍細胞를 認知하고 非特異的인 自發性 또는 自然性 細胞毒性(spontaneous or natural cytotoxicity)을 나타내어 腫瘍細胞를 破壞하기 때문에 腫瘍에 對한 免疫監視機能에 있어서 제 1선을 擔當하고 있다고 할 수 있는 作動細胞를 自然殺害細胞(natural killer cell)라고 하는데^{12,21,26,51,107}, NK細胞의 活性은 NK細胞의 숫자가 아닌 標的細胞와의 結合能力, 結合된 標的細胞의 傷害能力, 한 개의 作動細胞가 몇 개의 標的細胞를 傷害시킬 수 있는가에 따라 左右되는 것으로 思慮된다⁵⁴. 本 實驗에서는 이러한 自然殺害細胞에 對한 活性度를 比較해 보고자 作動細胞와 標的細胞의 比가 各各 100:1, 50:1, 10:1이 되도록 調整하여 實驗한 후 % Cytotoxicity를 測定하였던 바, 作動細胞와 標的細胞의 比가 100:1의 경우 對照群에서는 $22.07 \pm 3.77\%$ 인데 比하여 銀花瀉肝湯역기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群에서는 各各 $49.30 \pm 4.98\%$ 와 $52.78 \pm 3.34\%$ 로 $P < 0.01$ 의 有意性있는 增加를 보였고, 50:1의 경우 對照群 $42.49 \pm 6.67\%$, 銀花瀉肝湯역기스 投與群 $62.44 \pm 31.62\%$, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群 $72.45 \pm 3.80\%$ 로 增加하는 傾向을 나타내었으나 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群에서만 $P < 0.05$ 의 有意성이 認定되었고, 10:1의 경우 對照群 $40.61 \pm 8.08\%$, 銀花瀉肝湯역기스 投與群 $49.06 \pm 16.45\%$, 銀花瀉肝湯加鹿茸역기스 投與群 $51.84 \pm 2.74\%$ 로 增加하는 傾向을 보였으나 有意성은 認定되지 않았다.

淋巴球增殖能의 測定은 淋巴球機能을 間接

의므로把握할 수 있는 免疫指標로 應用되고 있으며, 抗原-非特異的 反應 및 非特異的 刺戟에 의해서 IL-2 依存性 T 淋巴球의 增殖이 發現된다고 하여 이의 增加는 淋巴球 活性의 亢進이나 數的 增加를 反映하고 있는데⁹⁴⁾, 實驗 結果 對照群은 $168.10 \pm 24.26\text{cpm}$ 인데 比하여, 銀花瀉肝湯액기스 投與群은 $352.00 \pm 36.96\text{cpm}$, 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群은 $630.90 \pm 107.90\text{cpm}$ 으로 모두 對照群에 比하여 $P < 0.01$ 의 有意性있는 增加를 보였다.

IL-2는 活性 淋巴球에서 由來된 物質로서 T 細胞의 成長 및 增殖에 關與하는 T 淋巴球 由來 因子로서 T 淋巴球의 成長이외에 B 細胞의 分化 因子誘導, 細胞毒性 T 淋巴球, NK 細胞, LAK 細胞 및 大食細胞 등의 增殖 및 活性에 關與하여 個體內에서 免疫反應의 中心的인 役割을 하는 것으로 알려져 있는데^{12,99)}, 實驗 結果 對照群은 $166.55 \pm 3.84\text{pg/ml}$ 인데 比하여, 銀花瀉肝湯액기스 投與群은 $186.58 \pm 6.24\text{pg/ml}$ 로 $P < 0.05$ 의 有意性있는 增加를 보였고, 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群은 $273.05 \pm 13.34\text{pg/ml}$ 로 $P < 0.01$ 의 有意性있는 增加를 보였다.

이와 같이 淋巴球의 增殖이 增加되고 T 淋巴球로 부터 IL-2 生産能이 增加된 것으로 보아 淋巴球의 數와 活性이 亢進되고 補助 T 細胞의 活性을 增加시켜 免疫系 細胞의 增殖과 分化가 直接的으로 亢進되었으리라 思慮된다¹¹⁸⁾.

巨食細胞(macrophage)는 骨髓로부터 生産되는 細胞로서, endocytosis 過程을 통하여 모든 固形物質을 吸收하고 破壞하도록 高度로 分化되어 있다. 이들 細胞는 細菌, 損傷된 혹은 老衰한 細胞, 癌細胞, colloidal materials 및 macromolecules 등을 除去하고 破壞한다¹²⁾.

非特異的인 免疫反應의 하나로 貪食作用(phagocytosis)과 抗原提供細胞로서의 役割 뿐만 아니라 腫瘍에 對하여 細胞毒성을 일으키는

巨食細胞⁵¹⁾의 活性度를 比較해 보기 爲하여 생쥐의 尾靜脈에 carbon을 注射하여 carbon clearance를 測定하였던 바, phagocytic index K 값이 對照群은 0.00676 ± 0.00034 인데 比하여, 銀花瀉肝湯액기스 投與群은 0.00661 ± 0.00115 로 對照群에 比하여 多少 減少하였고, 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서는 0.01136 ± 0.00169 로 對照群에 比해 增加하여 $P < 0.05$ 의 有意性이 認定되었다.

以上の 結果를 綜合하여 볼 때, 抗癌效果를 觀察하기 爲하여 MTT檢索法을 통하여 觀察한 結果, 銀花瀉肝湯액기스와 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스는 各各 SNU-396과 SNU-1에서 抗癌活性이 높게 나타났고, 擔癌생쥐에 投與된 銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸은 生存期間延長에 對하여 增加하는 傾向을 보였으나 有意性은 認定되지 않았고 腫瘍成長抑制, 體重變化에 對하여 모두 有意性있게 增加하였다.

免疫反應을 觀察하기 爲하여 methotrexate⁹⁾로 誘發된 생쥐의 免疫低下狀態에서, 銀花瀉肝湯액기스는 自然殺害細胞 活性度(作動細胞와 標的細胞의 比가 100:1의 경우), 淋巴球增殖能, IL-2 生産能에서 有意性있는 增加를 보였고, 赤血球凝集素價, 自然殺害細胞 活性度(作動細胞와 標的細胞의 比가 50:1, 10:1의 경우)는 增加하는 傾向을 보였으나 有意性은 認定되지 않았다. 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스는 赤血球溶血素價, 自然殺害細胞 活性度(作動細胞와 標的細胞의 比가 100:1, 50:1의 경우), 淋巴球增殖能, IL-2 生産能, carbon clearance의 貪食能에서 有意性있는 增加를 보였고, 赤血球凝集素價, Rosette 形成細胞數, 自然殺害細胞 活性度(作動細胞와 標的細胞의 比가 10:1의 경우)은 增加하는 傾向을 보였으나 有意性은 認定되지 않았다.

本 實驗을 통해 銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸은 抗癌 및 免疫 增強의 效果를 確認 할 수

있었으며, 銀花瀉肝湯加鹿茸은 優秀한 免疫增強效果를 期待할 수 있어 臨床에서 더 많이 活用되어 直接的인 癌의 治療뿐만 아니라 豫防에 있어서도 效能이 있으리라 思慮된다.

V. 結 論

銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸의 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 效果를 알아보고자 抗癌作用으로는 MTT 檢索法에 의한 癌細胞의 生存能과 Sarcoma-180 cell을 移植한 擔癌생쥐의 生存期間, 腫瘍成長抑制作用 및 體重變化를 觀察하였고, 免疫反應으로는 methotrexate로 免疫을 低下시킨 생쥐의 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價, 赤血球溶血素價, 自然殺害細胞活性度, Rosette形成細胞數, 淋巴球 增殖能, Interleukin-2 生産能 및 carbon clearance에 의한 貪食能을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 癌細胞의 生存能에 對하여 銀花瀉肝湯액기스 投與群은 SNU-396 細胞柱에 對한 IC_{50} 이 $0.000204mg/ml$ 이었고, 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群은 SNU-1 細胞柱에 對한 IC_{50} 이 $0.000103mg/ml$ 로서, 抗癌活性이 높게 나타났다.

2. 生存期間延長效果는 銀花瀉肝湯액기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서 모두 對照群에 比하여 增加하는 傾向을 나타내었으나 有意성은 認定되지 않았다.

3. 腫瘍成長抑制效果는 銀花瀉肝湯액기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서 모두 對照群에 比하여 $P<0.01$ 의 有意성이 認定되었다.

4. 體重變化에 對한 效果는 銀花瀉肝湯액기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群

에서 모두 對照群에 比하여 $P<0.05$ 의 有意性있는 增加를 보였다.

5. 遲延型過敏反應에 對한 效果는 銀花瀉肝湯액기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서 모두 對照群에 比하여 減少하여 有意성이 認定되지 않았다.

6. 赤血球凝集素價는 銀花瀉肝湯액기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서 모두 對照群에 比하여 增加하였으나 有意성은 認定되지 않았다.

7. 赤血球溶血素價는 銀花瀉肝湯액기스 投與群에서만 對照群에 比하여 增加하여 $P<0.01$ 의 有意성이 認定되었다.

8. Rosette形成細胞數에 對한 效果는 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서만 對照群에 比하여 增加하는 傾向을 나타냈으나 有意성은 認定되지 않았다.

9. 自然殺害細胞活性도에 對하여 銀花瀉肝湯액기스 投與群은 作動細胞와 標的細胞의 比가 100:1에서 $P<0.01$ 의 有意性있는 增加를 보였고, 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群은 100:1, 50:1에서 各各 $P<0.01$ 과 $P<0.05$ 의 有意性있는 增加를 보였다.

10. 淋巴球 增殖能은 銀花瀉肝湯액기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서 모두 對照群에 比하여 $P<0.01$ 의 有意性있는 增加를 보였다.

11. Interleukin-2 生産能은 銀花瀉肝湯액기스 投與群과 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서 모두 對照群에 比하여 各各 $P<0.05$ 와 $P<0.01$ 의 有意性있는 增加를 보였다.

12. Carbon-clearance에 의한 貪食能은 銀花瀉肝湯加鹿茸액기스 投與群에서만 對照群에 比하여 $P<0.05$ 의 有意性있는 增加를 보였다.

以上の 實驗結果로 보아 銀花瀉肝湯과 銀花

瀉肝湯加鹿茸은 抗癌效果와 免疫增強效果가 있음이 認定되었고, 免疫增強效果가 優秀한 銀花瀉肝湯加鹿茸은 癌의 治療는 물론 豫防에 있어서도 臨床的 效能이 있으리라 思慮된다.

參考文獻

1. 金淵臺 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, pp.33,204,215,pp.382-384,p.508, 1982.
2. 대한의학협회 분과학회 협의회 : 암의 진단과 치료, 서울, 여문각, p.3, 1992.
3. 柳基遠 外 : 脾系內科學, 서울, 그린文化社, pp.89-91,95-97, 1991.
4. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳 : 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.78-90, 1990.
5. 保健年鑑編纂委員會 : 保健年鑑, 서울, 保健新聞社, pp.256-257, 1995.
6. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, p.1, 1992.
7. 申天浩 譯 : 癌瘤防治研究, 서울, 新光文化社, pp.25-29, 1984.
8. 안덕균 역 : 면역과 한방, 서울, 열린책들, pp.45-48, 1992.
9. 이우주 : 약리학강의, 서울, 태광문화사, pp.498-499, 1984.
10. 李鍾訓 : 病院微生物學, 서울, 壽文社, pp.133-138, 1973.
11. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編 : 本草學, 서울, 永林社, pp.193-195,198-199,413-414,545-546, 1991.
12. 정태호 : 면역학강의, 대구, 경북대학교출판부, pp.294-303, 1993.
13. 채범석 : 병원영양학, 서울, 아카데미서적, pp.190-196, 1992.
14. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 杏林書院, p.19, pp.32-42, 1995.
15. 통계청 : 사망원인통계연감, 서울, Vol.11, pp.21-36, 1994.
16. 姜允皓 外 : 數種의 韓藥物이 白鼠의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 8(1):53-74, 1987.
17. 高炳熙 外 : 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 免疫反應 및 NK細胞活性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 7(2):157-173, 1986.
18. 김길현 : Interleukin-1, 수용체 및 활성저해인자, 암세포생물학, pp.195-206, 1992.
19. 金德浩 外 : 歸茸湯이 免疫反應에 미치는 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 6(2):55-63, 1985.
20. 金尙勳 : 紫이 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大 論文集, 13(1):317-329, 1990.
21. 김성 외 : 위암환자중 수술후 장기생존자의 자연살해능력에 관한 연구, 대한암학회지, 20(1):35-42, 1988.
22. 金聖洙 : 人蔘 및 熟地黃이 Methotrexate로 誘發된 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 9:355-366, 1986.
23. 김성철 외 : 소화기암 세포주에 대한 Interferon의 항암제 세포독성 증강 효과, 대한내과학회지, 43(5):652-667, 1992.
24. 金義泰 外 : 龍膽瀉肝湯 및 釣鉤藤, 夏枯草, 車前子 加味方이 高血壓에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 5:15-24, 1990.
25. 김재광 외 : 암환자에서의 T, K, NK세포 및 단구의 기능저하, 대한면역학회지, 5(1):106, 1983.
26. 김진복 외 : 정상인 및 암환자의 자연살해능력에 관한 연구, 대한면역학회지, 6(1):2-8, 1984.
27. 金漢燮 : 四妙湯, 大柴胡湯 및 構成藥劑들

- 의抗癌作用과免疫反應에關한實驗的
研究, 서울,慶熙大學校大學院 博士學位論文,
1989.
28. 羅瑛杰: 白朮과 枸杞子가 생쥐의 細胞性
및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙
韓醫大論文集, 10:579-588, 1987.
 29. 文炳河 外: 氣丸이 抗腫瘍 免疫反應에 미
치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):167-
190, 1995.
 30. 閔勇泰: 補中益氣湯의 投與가 紫外線照射
로 低下된 마우스의 免疫機能의 回復에 미
치는 影響, 大韓方劑學會誌, 2(1):107-129,
1991.
 31. 朴恩貞 外: 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 마
우스의 過敏反應 및 免疫細胞의 機能에 미
치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 11(2):149-169,
1990.
 32. 朴鍾郁 外: 巴豆加大黃이 抗腫瘍作用과
自然殺害細胞의 活性에 미치는 影響에 對
한 實驗的 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌,
2(1):43-56, 1996.
 33. 朴재갑 外: 전통약용식물의 항암효과에
대한 연구, 생약학회지, 24(3): 223-230,
1993.
 34. 白泰鉉: 半夏白朮天麻湯과 加味半夏白朮
天麻湯의 抗癌效果와 免疫反應에 關한 實
驗的 研究, 慶熙韓醫大論文集, 17(1):121-
143, 1994.
 35. 徐晚瑄 外: 龍膽瀉肝湯 및 龍膽瀉肝湯加
味方의 抗알레르기에 關한 實驗的 效果,
大韓韓方小兒科學會誌 5(1):15-28, 1991.
 36. 宋炳基: 龍膽瀉肝湯과 銀花瀉肝湯의 抗炎
症, 解熱, 鎮痛, 利尿 및 抗菌效果, 趙永植
博士 回甲紀念論文集, 慶熙大學校,
pp.1025-1040, 1981.
 37. 宋孝貞: 草龍膽 및 龍膽瀉肝湯이 家兔血
壓 및 白鼠 TBA치에 미치는 影響, 慶熙大
學校 大學院 碩士學位論文, 1978.
 38. 沈範相: 胃癌에서의 辨證分型에 關한 文
獻의 考察, 慶熙大學校 大學院, 1992.
 39. 安文生 外: 抗癌劑 Mitomycin C 와 數種
補益劑의 併用投與效果에 對한 研究, 大韓
韓方內科學會誌, 15(1):60-79, 1994.
 40. 안병준: 抗癌性 天然物, 암세포 생물학,
pp.318-331, 1992.
 41. 양규환: 면역항진효과 검정방법; 진통약
물로부터 신약개발 연구법, 서울대학교 천
연물과학연구소, pp.114-121, 1993.
 42. 梁緒賢: 靈芝, 山慈姑, 仙鶴草, 卷白, 瓦松
이 흰쥐의 自然殺害細胞活性에 미치는 影
響, 大韓韓醫學會誌, 10(2):103-114, 1989.
 43. 양용태 외: Sarcoma 180 복강암 면역에 대
한 홍삼의 효과, 대한면역학회지, 5(1):17-
27, 1983.
 44. 吳旻哲: 黃耆 및 當歸의 免疫增強效果에
關한 研究, 慶熙韓醫大論文集, 9 :343-354,
1986.
 45. 吳勇性: 水蓼, 白蓼 및 紅蓼이 細胞性免疫
反應 및 體液性免疫反應에 미치는 影響,
慶熙韓醫大論文集, 10:219-230, 1987.
 46. 吳千植: 靈芝, 山慈姑, 仙鶴草, 卷白, 瓦松
이 癌細胞感受성에 미치는 影響, 慶熙韓醫
大論文集, 10:99-116, 1987.
 47. 禹貞淳: 葛根解肌湯이 마우스의 免疫反應
에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌,
11(2):180-201, 1990.
 48. 尹相協: 六君子湯, 小柴胡湯, 魚腥草 및
加味方의 抗癌作用과 免疫反應에 關한 實
驗的 研究, 서울, 慶熙大學校大學院 博士
學位論文, 1991.
 49. 윤성수 외: 진행성 및 재발성 대장암에서
5-fluorouracil과 정용량 Leucovorin 병용요

- 법에 대한 제 II 상 임상연구, 대한암학회지, 24(5):737-742, 1992.
50. 尹星默, 河智容 : 息賁湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):25-42, 1996.
 51. 윤정구 : 종양에 대한 생체방어기전, 대한의학협회지, 32(10):1073-1077, 1989.
 52. 이능기, 최승훈 : 放射線照射後의 N:GP(S) mouse 脾臟細胞 增殖에 미치는 補中益氣湯과 四六湯의 效果, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):91-100, 1996.
 53. 이재호 : 종양억제유전자, 암세포생물학, pp.111-122, 1992.
 54. 임수덕 외 : 인터페론 Alpha, Gamma 존재 하에 NK세포가 암세포파괴에 미치는 영향에 대한 연구, 대한 암학회지, 15(1):1-13, 1983.
 55. 田炳旭 : 少陰人補中益氣湯과 瓦松이 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大 學校 大學院 博士學位論文, 1995.
 56. 趙誠珏 外 : 修治巴豆 및 巴豆加黃連의 細胞毒性和 抗腫瘍效果에 關한 實驗的 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):191-212, 1995.
 57. 조철호 : 마우스 악성 흑색종의 실험적 폐전에 대한 Monophosphoryl Lipid, Polyadenylic-polyuridylic acid 및 Ciplatin의 항암효과, 연세의대학위논문집, p.348, 1993.
 58. 조혁규 : 인삼 Crude Saponin이 저하된 면역반응 및 망내계 기능의 회복에 미치는 영향, 인삼의 약리연구 및 효능연구, 한국인삼연구소, pp.1-20, 1983.
 59. 최수용 : 한국인의 암발생위험요인, 한국역학회지 10(1):30-39, 1988.
 60. 崔昇勳 : 韓醫學의 腫瘍에 대한 認識과 病理論, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1): 11-28, 1995.
 61. 하대유 외 : 면양적혈구 감각량이 Mice의 지연형 과민반응과 항체생산에 미치는 영향, 전북의대논문집, 3(1):95-100, 1979.
 62. 하대유 외 : Colchicine이 마우스의 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향, 대한의학협회지, 30(4):409-420, 1987.
 63. 하성환 : 사이클로포스파마이드와 방사선 병용 요법시 종양의 크기가 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 암세포생물학, pp.291-317, 1992.
 64. 하재청 외 : Sarcoma 180에 대한 약용식물 성분의 항암효과, 대한암학회지, 23(2):204, 1991.
 65. 韓周錫 外 : 太陰人 葛根解肌湯이 免疫反應 및 NK細胞活性度에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 11(2):106-114, 1990.
 66. 허대석 : 암에 대한 유전자요법, 암연구의 최신지견 1995, pp.314-327, 1995.
 67. 허대석 : 암환자에서 림프구의 종양에로의 이동, 암세포생물학, pp.173-181, 1992.
 68. 현진원 외 : 전통약용식물 및 각종 식물의 항암효과에 대한 연구, 생약학회지, 25(2):171-177, 1994.
 69. 黃奎東 外 : 十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯加瓦松의 抗癌效果와 免疫反應에 關한 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):1-23, 1996.
 70. 江蘇新醫學院編 : 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, pp.919-922, 1127-1130, 1807-1808, 2232-2235, 1994.
 71. 上海中醫學院編 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.621-635, 1981.
 72. 楊寶仁 : 癌症的中藥治療, 河北, 河北科學技術出版社, p.1-6, 1992.
 73. 王冰 : 黃帝內經(素問靈樞), 서울, 高文社, pp. 素問91, 166, 229, 326 靈樞76, 88, 1977.

74. 鬱仁存：中醫腫瘤學(上冊)，北京，科學出版社，pp.1-25,65-74, 1991.
75. 原安徽中醫學院 編：中醫臨床手冊，서울，成輔社，p.219, 1983.
76. 李 岩：腫瘤臨證備要，北京，人民衛生出版社，pp.1-5, 1983.
77. 李：編註醫學入門 外集卷三，서울，大星文化社，p.351, 1982.
78. 張代釗：中西醫結合治療癌證，山西人民出版社，pp.11-19, 1984.
79. 程士德 外：素問注釋匯粹，北京，人民衛生出版社，p.518, 1982.
80. 陳貴廷 外：實用中西醫結合診斷治療學，北京，中國科學技術出版社，pp.1370-1400, 1991.
81. 邱佳信 外：健脾理氣，清熱解毒，軟堅化痰中藥對二乙基亞硝安致大鼠肝癌的作用，中西醫結合雜誌，8(12):734-735, 1988.
82. 潘敏求：健脾理氣 化痰軟堅 清熱解毒法으로 原發性肝癌을 治療，한글판중의잡지，34(4):84, 1993.
83. 王冠庭 外：扶正抗癌方爲主結合化療對158例術後晚期胃癌的治療及實驗研究，中西醫結合雜誌，10(12):712-715, 1990.
84. 周維順 謝長生：略論肝癌的診治原則，浙江中醫學院學報，17(6):4-5, 1993.
85. 陳凱，李新民：扶正抗癌液對移植 小鼠免疫功能的影响，中國中西醫結合雜誌，13(3):171-172, 1993.
86. 陳建中：中西藥配合化療在胃癌治療中對白細胞的影響，中西醫結合雜誌，10(12):717-719, 1990.
87. 崔同建 外：胃癌本虛表實證型病理學基探討，中國中西醫結合雜誌 12(3): 151-153, 1992.
88. 吳良村 外：中醫藥結合腹腔動脈插管化療治療晚期食管癌，胃癌130例臨床觀察，中國中西醫結合雜誌，13(3):173-174, 1993.
89. 田村豐行 外：Royal Jelly 抗腫瘍效果에 關한 研究，日藥理誌，89:73, 1987.
90. Avrames, S. et al : Antibody formation at the cellular level in immunology, New York, John Wiley & Son's Inc., pp.503-513, 1982.
91. Boyd, M. R. : Principles and practice of oncology, 3(10) pp.1-12, 1989.
92. Nowotny, A. : Antigen-Antibody interactions in basic exercises immuno-chemistry, Berlin, Heidelberg, N.Y., Springer-Verlag; pp.217-271,285-287, 1979.
93. Revillard, J. P. : Investigation of delayed hypersensitivity in man in Immunology, New York, John Wiley & Sons Inc., pp.393-394, 1982.
94. Sell, S. : Cell-mediated immunity in vitro in immunology, immunopathology and immunity, Hagerston, Maryland, Harper & Row Pub., pp.144-171, 1980.
95. Wing, E. J. et al : Delayed hypersensitivity reaction in basic and clinical immunology, California, Lange Med. Pub., pp.129-134, 1980.
96. Bach, J. F. and Dardenne, M. : Antigen recognition by T-lymphocytes I, thymus and marrow dependence of spontaneous rosette forming cells in mouse, Cell Immuno., 3:1, 1972.
97. Biozzi, G. et al : A kinetic study of antibody producing cell in the spleen with sheep erythrocytes, Immuno., 14:7, 1968.
98. Brander, C. et al : Carrier-mediated uptake and presentation of a major histocompatibility complex class II-restricted peptide, Eur. J.

- Immunol., 23: 3217-3223, 1993.
99. Budd GT et al : Phase I clinical trial of interleukin-2 and alpha interferon; Toxicity and immunologic effects, *Cancer Inst.* 81:1904, 1989.
 100. Carmichael, J. et al : Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay; Assessment of Chemosensitivity Testing, *Cancer Research*, 47: 936, 1987.
 101. Clamen, H.N. et al : Thymus marrow cell combination, synergism in antibody production, *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.*, 122:1167, 1966.
 102. Davis, A.J.S. et al : The failure of thymus derived cells to produce antibody, *Transplantation*, 5:222, 1967.
 103. Decker, T. et al : A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor(TNF) activity, *J. Immunol. Methods*, 15:61-69, 1988.
 104. Denizot, F. and Lang, R. : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods*, 89:271-277, 1986.
 105. Gillis, S. et al : T cell growth factor; Parameters of production and a quantitative microassay for activity, *J. Immunol.*, 120:1245, 1978.
 106. Gullberg, M. and Larsson, E. L. : Studies on induction and effector function of concanavalin A-induced suppressor cells that TCGF production, *J. Immunol.*, 128(2) 746-750, 1982.
 107. Kiessling, R. et al. : Natural Killer cells in the mouse, *Eur.J., Immunol.*, 5:112, 1975.
 108. Korzeniewski, C. and Callewaert, D. M. : An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, 64:313-320, 1983.
 109. Miller, T.E. et al : Immunopotentiality with BCG II, Modulation of reference to the sheep red blood cells, *J. Nat. Cancer Inst.*, 51:1669, 1973.
 110. Mitsuoka, A. et al : Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes, evidence for tuberculin type delayed hypersensitivity of the reaction, *Immunol.*, 13:363, 1978.
 111. Park C. G. et al : In vitro chemosensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines. *J. Kor. Cancer Assoc.*, 22:61, 1990.
 112. R. I. Geran et al : Protocol for screening chemical Agents and Natural products against Animal Tumors and other Biological systems(Third Edition), *Cancer chemotherapy Reports*, pp.48-59, 1972.
 113. Slater, T. F. et al : Studies on succinate-neotetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 77:383, 1963.
 114. Thorbeck, G. J. et al : The affinity of the reticulo-endothelial system for various serum proteins, *Brit. J. Exp. Path.*, 41(2):190-198, 1960.
 115. Usui, N. et al : Synergistic antitumor activity of etoposide and human interleukin-1 against

human melanoma cells, J. Natl. Cancer Inst.,
81:1904, 1989.

116. Zaalberg, O. B. : A simple method for

detecting single antibody forming cell
Nature, 202:1231, 1964.