

## 다년생 도라지의 항암 및 면역활성

김영섭<sup>#</sup> · 이병의\* · 김근재\* · 이연태\*\* · 조규봉\*\* · 정영철\*\*\*

한국화학연구소, \* 한남대학교 화학과, \*\*단국대학교, \*\*\*진주전문대학

(Received January 8, 1998)

### Antitumor and Immunomodulatory Activities of the *P. grandiflorum* Cultivated for More Than 20 Years

Y. S. Kim<sup>#</sup>, B. E. Lee\*, K. J. Kim\*, Y. T. Lee\*\*,  
K. B. Cho\*\* and Y.C. Chung\*\*\*

*Korea Research Instituted of Chemical Technology, Taejon 305-343, Korea*

*\*Department of Chemistry, Han Nam University, Taejon 300-791, Korea*

*\*\*Department of Microbiology, Dan Kook University, Chenan 330-714, Korea*

*\*\*\*Department of Food Science, Chinju Junior College, Chinju 660-759, Korea*

**Abstract**—*Platycodon radix* is a dried root of *Platycodon grandiflorum* (*P. grandiflorum*) A. DC, a perennial grown on the hills and fields in Korea and Japan, or cultivated in various districts. Recently, *P. grandiflorum* (Changkil) has been successfully cultivated for more than 20 years and generally has been employed as folk remedy for adult diseases such as hyperlipidemia, hypertension and diabetes. We investigated various biological activities of the extracts from Changkil. When treated *in vitro* with B16-F1 mouse melanoma cell lines, it showed 100% laminin-binding inhibitory activities at the concentration over 0.125 mg/ml. In *in vivo* test it showed 61.5% reduction of the solid tumor weight transplanted in mice and exhibited anticancer activity of 128% ILS against Sarcoma-180 ascites. It also increased the ratio of positive cells of natural killer cells in lymphocytic composition against Sarcoma-180 ascites and solid tumor transplanted in ICR mice when tests were carried out by FACScan method.

**Keywords** □ *P. grandiflorum* (Changkil), laminin, ascites tumor, solid tumor, natural killer cell.

도라지(길경 *Platycodon grandiflorum* A. DC)는 배농, 거담, 기관지염, 천식 등의 호흡기계질환에 사용되어 온 생약재로서 도라지가 배합되어 있는 한방 처방수는 동의보감에 273건, 방약합편에 49건이 수록되어 있을 정도로 다양한 약리작용을 갖고 있으며,<sup>1-3)</sup> 주요 약리성분은 테르펜계 사포닌으로서 동물실험에서 이 물질은 진해, 거담작용, 중추신경억제작용(진정, 진통, 해열효과), 급만성염증에 대한 항염증작용, 항괴양 및 위액분비억제작용, 혈관을 확장하여 혈압을 낮추는 항콜린작용, 혈당강하작용, 콜레스테롤대사 개선작용 등이 있는 것으로 밝혀졌다.<sup>4-8)</sup> 이외에 도라지의 열수 및 에

탄을 추출물은 곰팡이의 아프라톡신을 억제하며, 이눌린 분획은 식균작용과 고형암 및 복수암에 대한 강력한 항종양효능이 있고, 40% 도라지엑기스는 알코올흡수 억제작용이 규명된 바 있다.<sup>9-13)</sup>

이와같이 길경은 다양한 약리작용을 가지고 있음에도 불구하고 장기간 재배에 어려움이 있었다. 그러나 최근에 20년 이상 도라지를 재배할 수 있는 기술이 개발되어 다량 생산되고 있다.<sup>14)</sup> 현재까지 다년생도라지에 관한 연구는 정<sup>15)</sup> 등이 보고한 항당뇨효과에 관한 실험과 김<sup>16)</sup> 등이 보고한 고지혈증에 관한 실험이 전부이다. 이들의 보고에 따르면 다년생도라지는 길경보다 높은 생리활성효과가 있다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 다년생도라지의 다양한 생리활성을 검토하기 위한 계획의 일환으로 먼저 항암효과를 *in vitro* 및 *in*

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-860-7024 (팩스) 042-861-0307

*vivo* 실험을 통하여 규명하고 더불어 면역활성도 동시에 검토하고자 하였다.

**실험방법**

**시료의 추출 및 조제** - 경남 진주에서 재배한 건조된 분말형태의 22년생 다년생도라지(장길) 200 g을 증류수 3 L로 90°C 이하에서 3시간 동안 3회 추출하고 추출액들을 모아 40°C 이하에서 감압 증류시켜 물의 양이 1 L가 되면 동결건조시켜 사용하였다. 이때 얻어진 장길 추출물의 양은 67 g이었다. 메탄올 추출물은 건조장길 100 g을 메탄올 1L로 1시간 동안 가열환류시켜 3회 추출해내고 모아진 여액을 감압증류시켜 나머지를 사용하였다. 이때 얻어진 장길 추출물은 3.8 g 이었다.

**실험동물** - 한국화학연구소로부터 구입한 20±2 g의 3주령인 수컷 ICR 생쥐를 1주일간 안정화시킨후 생존율, 종양억제율 및 면역세포 증식능을 위한 실험에 사용하였다. 시료 투여후 암세포를 이식한 전투여 실험에서 10마리 또는 그 이상을 실험군으로 하였다. 실험기간 중 사료(생쥐용)와 물은 자유롭게 먹게 하였고 실온은 24±2°C를 유지하였다.

**종양세포의 배양** - 실험에 사용한 생쥐 복수형 sarcoma-180 종양세포는 서울대학교 의학연구소에서 분양받았다. 복수형 종양세포를 무균적으로 채취하여 4°C Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 세척한 후 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 ICR 생쥐 복강에 계대 배양하여 사용하였다. 계대 배양된 sarcoma-180을 pasteur pipets으로 복강내에서 채취하여 50 ml conical tube에 넣은 후 1200 rpm에서 10분간 원심분리하고 HBSS buffer용액으로 3회 씻은 다음 복수암 및 고형암의 발생에 사용하였다.

**복수암에 대한 항암실험** - 평균무게 25.1±0.2 g의 3~4주령된 ICR 생쥐 10마리를 24±2°C의 배양실에서 1주일간 안정화시키며 장길 추출물을 생리식염수에 녹여 1일 250 mg/kg은 경구로 1주일간 전투여 한 뒤 3×10<sup>5</sup> cells/ml의 sarcoma-180을 복강내에 이식하였다. 이식후에는 1일 500 mg/kg의 장길추출물을 같은 방법으로 투여하며 대조군과 비교하여 평균생존일수(MST)와 생존일수연장율(ILS)을 아래식을 이용하여 종양 이식 30일 후 판정하였다.

생존일수연장율 (ILS%)=

$$\frac{\text{피검체투여군의 평균생존일수}}{\text{비투여군의 평균생존일수}} \times 100$$

**고형암에 대한 항암실험** - 평균무게 24.8±0.2 g의 3~4주령된 수컷 ICR 생쥐 10마리를 복수암과 동일한 조건으로 전처리 한 후 고형암유발을 위하여 2.5×10<sup>6</sup> cells/ml의 sarcoma-180을 ICR 생쥐의 오른쪽 서혜부에 피하 이식하였다. 이식후 복수암과 동일하게 장길 추출물을 투여하며 30일 경과 후 발생한 고형암을 적출하여 중량을 측정하고 아래식에 의하여 종양증식억제율을 구하여 이를 항암효과의 지표로 하였다.<sup>17)</sup>

종양증식억제율 (IR,%) =

$$\frac{\text{피검체투여군의 평균종양중량}}{\text{비투여군의 평균종양중량}} \times 100$$

**세포독성실험** - 장길추출물을 사람의 다양한 암 세포주인 A549(사람폐암유래세포주), SKOV-3(사람난소암유래세포주), SKMEL-2(사람색소세포암유래세포주), HCT 15(사람결장암유래세포주), XF 498(사람중추신경계암유래세포주) 등에 대한 세포독성을 측정하였다. 이들 세포주들을 실험에 사용하기 위하여 trypsin-EDTA용액으로 부착면으로부터 분리시키고, 96-well flat-bottom microplate(Falcon)에 well 당 세포수가 4~5×10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록 분주하였다. 분주된 세포들을 CO<sub>2</sub> incubator내에서 24시간 배양하여 바닥면에 부착시킨 후 aspirator로 배지(RPMI 배지)를 제거하고, 배지에 장길추출물을 6가지 농도(6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 200 µg/ml)의 log-dose로 희석된 시료 용액들을 암세포가 들어 있는 well에 각각 100 µl씩 3배수로 넣어주고 46시간 동안 더 배양한 후 sulforhodamine-B(SRB) assay법에 따라 약물을 가할때의 세포수(Tz)와 약물이 들어 있지 않은 배지를 가하여 48시간을 배양 했을 때의 세포수(C) 및 각 농도의 약물과 함께 48시간 배양했을때의 세포수(T) 등을 측정하였다. 세포증식율은 아래식에 의하여 구하였다.

$$\text{세포증식율}(\%) = \frac{T - Tz}{C - Tz} \times 100$$

**암세포접착저해활성실험** - 장길추출물이 B16-F1 생쥐 melanoma 세포주의 세포와 기질의 일종인 laminin에 접착을 저해하는지의 여부를 정량적으로 측정하였다. 이들 세포는 Fetal calf serum(FCS, 10%)를 함

유한 Minimum essential medium(MEM, Hank's salt 함유)에서 유지시켰다.

Laminin-coated plate는 laminin 1 mg을 PBS (phosphate buffer saline) 2 ml에 용해하여 냉장고에 보관하면서 필요시에 laminin의 농도(20 µg/ml)를 결정하여 PBS 용액으로 희석하고 이 용액을 96-well microplate의 well에 50 µl씩 분주하여 하룻밤 동안 건조시켜 사용하였다.

세포 현탁액의 제조는 T-25 culture flask에 80% confluence를 성장한 B16-F1 세포를 3 ml의 2 mM EDTA용액으로 떼어낸 다음 serum-free MEM 5 ml를 가하여 800 rpm에서 5분 동안 원심분리시켜 얻은 세포를 1% BSA를 함유한 serum-free MEM의 적당한 양에 현탁하여 세포수가  $2 \times 10^6$  cells/ml 되게 조절하였으며, 실험에서는 이 현탁액 50 µl를 사용하였다.

활성의 측정은 laminin-coated well을 100 µl의 PBS로 3회 세척한 후 다시 1% BSA용액(PBS에 용해) 100 µl를 첨가하였고, BSA를 aspirator로 제거하였다. 이 판에 0.1% BSA를 함유한 serum-free MEM 50 µl, 시료 및 세포를 첨가하여 5% 탄산가스 존재하에서 37°C로 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS(37°C)로 두 번 세척한 후 0.5% BSA(PBS에 용해) 100 µl로 각각 세척한 다음 부착되어 있는 세포를 2.5% glutaraldehyde 40 µl로 실온에서 30분 동안 고정화시켰다.

**면역활성실험** - 항암실험과 동일한 방법으로 처리된 ICR생쥐를 3주가 지난 후 전혈을 채혈하여 항응고제가 처리된 EDTA tube 7개에 각각 100 µl씩 넣고, 단클론 항체들을 NK-cell, NK-cell control은 각각 10 µl씩 그리고 나머지 단클론항체(Hamster Anti-Mouse CD<sub>3e</sub> FITC, Rat Anti-Mouse CD<sub>3e</sub> FITC, Rat Anti-Mouse CD<sub>19</sub> FITC, Rat IgG 2a K/HC, Hamster IgG FITC, Anti-Mouse NK-cell, NK-cell control : Serotec에서 구입)들은 4 µl씩 가하였다. 이들을 4°C에서 30분 동안 배양한 뒤 여분의 적혈구를 용혈시키기 위하여 lysis solution(50% diethylene glycol과 15% formaldehyde가 혼합된 용액을 증류수와 1:10 v/v로 혼합한 용액)을 2 ml 가하여 10분동안 실온에서 방치하였다. 이것을 1500 rpm에서 5분동안 원심분리하고 완충용액으로 1회 씻고 다시 1500 rpm에서 5분간 원심분리하고 buffer 0.5 ml를 가하여 재부유시켜 FACScan tube에 sample을 준비하였다.<sup>17-19)</sup>

## 결과 및 고찰

**복수암에 대한 항암효과** - 장길 추출물(changkil)을 일주일간 전투여한 후  $3 \times 10^5$  cells/ml의 sarcoma-180 종양세포를 ICR 생쥐에 이식하고 계속 시료를 투여한 복수암 실험결과 Table I에 나타낸것과 같이 대조군의 평균생존일수(MST)가 19.4일이며 장길 투여군(changkil)은 24.9일로 MST가 5.4일 정도 연장되어 생존일수연장율이 128%로 나타났다. 그리고 30일 까지 생존한 생쥐도 3마리나 되었다. 이러한 결과는 Nagao<sup>10)</sup>등이 길경의 이눌린성분만 추출하여 실험하였을 경우 경구처리시 복수암에서 30일 이상 생존이 2마리이고 ILS가 131%인것과 비교해 볼 때 장길의 총추출물은 길경의 이눌린성분과 거의 비슷한 항암활성을 보여줄을 알 수 있었다.

**고형암에 대한 항암효과** - 복수암과 동일한 조건하에서  $2.5 \times 10^6$  cells/ml의 sarcoma-180 종양세포를 이식한 후 실시한 고형암 실험에서는 Table II에 나타낸것과 같이 대조군의 평균종양의 무게가  $1.79 \pm 0.14$  g이며 장길추출물(changkil) 투여군은  $0.69 \pm 0.22$  g으로 종양저지율이 61.5%로 상당히 높게 나타났다. 한편 길경의 이눌린성분만으로 실험한 Nagao<sup>10)</sup>의 결과에서 44.2%의 종양저지율을 나타내었으나 본실험에서 장길 총추출물의 종양저지율은 길경보다 약 15%이상 증가한 것으로 보아 길경보다 항암활성이 높다고 사료된다.

**세포독성 실험** - 길경(kilkyung)과 장길(changkil)의 열수 추출물에 대한 SRB assay에서 6.25 µg/ml로부터 200 µg/ml까지의 농도로 A549, SKOV-3,

**Table I**—Antitumor activities of water extraction from Changkil against Sarcoma-180 ascites tumor transplanted in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	MST (day)	ILS (%)	30 day survivors
Control	saline	p.o.	19.4	-	0/10
Changkil	500	p.o.	24.9	128 ↑	3/10

**Table II**—Antitumor activities of water extraction from Changkil against Sarcoma-180 solid tumor transplanted in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	Tumor weight (g)	Inhibition rate (%)
Control	saline	p.o.	$1.79 \pm 0.14$	-
Changkil	500	p.o.	$0.69 \pm 0.22$	61.5

**Table III**— Net growth as percent of control for Kilk-yung

Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cells				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
6.25	98.61	105.69	105.93	106.57	104.10
12.5	103.39	98.78	108.09	101.31	108.98
25.0	102.54	93.77	101.44	101.29	107.31
50.0	103.65	97.91	99.79	100.03	104.88
100.0	101.33	94.77	96.25	98.79	105.48
200.0	99.0	92.85	91.77	96.66	102.99

**Table IV**— Net growth as percent of control for Chang-kil

Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cells				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
6.25	99.91	100.81	101.25	100.49	96.19
12.5	103.13	98.62	100.76	97.15	102.39
25.0	103.75	94.59	96.52	96.88	99.40
50.0	103.20	99.29	94.48	93.57	97.86
100.0	99.82	98.90	88.90	99.60	98.39
200.0	96.69	87.00	84.04	95.30	91.54

SKMEL-2, HCT 15, XF 498 등 5종에 대하여 실험한 결과 Table III과 IV에 나타낸것과 같이 도라지 열수추출물들은 모두 암세포에 대한 영향이 없어 직접적인 세포독성을 나타내지 않음을 확인했다. 그러나 길경(kilk-yung)보다는 장길(changkil)에서 약간 높은 세포독성이 나타나고 있으나 저농도에서는 모두 세포독성이 없었다.

**암세포 접착저해활성** - 장길 추출물 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 및 0.031 mg/ml의 농도로 한시간 동안 처리하였을시 암세포의 laminin에의 결합형태 및 세포형태를 현미경하에서 관찰하여 사진촬영 하였다

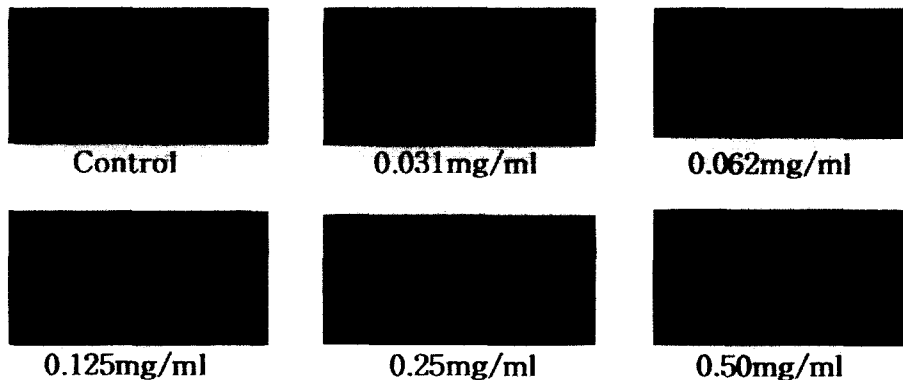
**Table V**— Laminin binding inhibitory activity of *Platycodon grandiflorum* MeOH extract

Concentration (mg/ml)	Relative Optical Density at 570 nm
Control	1.00
0.031	0.71
0.062	0.22
0.125	0.00
0.250	0.00
0.500	0.00

(Fig. 1). Fig. 1에서 관찰할 수 있듯이 대조구의 경우에는 암세포가 laminin에 부착되어 있었고 0.5 mg/ml의 농도에서는 20~30%의 세포가 세포막 손상을 받았으나 나머지 70~80%의 세포는 laminin에 부착하지 못하고 구형의 세포형태를 유지하였다. 0.25 mg/ml과 0.125 mg/ml의 처리구에서는 100%의 세포가 laminin에 부착하지 못하고 구형의 세포형태를 유지하였다. 0.062 mg/ml의 농도에서는 70% 정도의 세포가 부착하지 못하였고 0.031 mg/ml의 농도에서는 30% 정도의 세포가 부착하지 못하는 것으로 나타났다 (Table V).

암세포의 세포외 기질에의 결합은 암세포의 전이에 관여하는 것으로 알려져 있어 도라지 추출물이 동물실험에서 암세포 전이를 저해하는 것으로 밝혀진다면 도라지를 이용한 암전이를 예방할 수 있을 가능성이 높다고 사료된다.

**면역활성실험** - 대조군 및 장길추출물 투여군의 복수암 및 고형암이 이식된 생쥐의 혈액에 대한 FACScan을 이용하여 NK-cell, T-cell, B-cell, Tc-cell등 면역세포의 비율을 조사하였다. 복수암의 경우에는



**Fig. 1**— Microscopic observation on the laminin coated microplate of B16-F1 mouse melanoma cell treated with *P. grandiflorum* MeOH extract at the different concentration.

**Table VI**—Effect of water extraction from Changkil on the lymphocyte composition against Sarcoma-180 ascites tumor ransplanted in ICR-mice

	% positive cells			
	CD19 (B cell)	CD3e (T cell)	CD8a (Tc cell)	NK cell
Control	17.93	71.10	18.87	1.14
Changkil	23.04	62.88	23.37	6.23

**Table VII**—Effect of water extraction from Changkil on the lymphocyte composition against Sarcoma-180 solid tumor transplanted in ICR-mice

	% positive cells			
	CD19 (B cell)	CD3e (T cell)	CD8a (Tc cell)	NK cell
Control	43.85	49.77	12.97	3.6
Changkil	36.92	53.19	13.10	4.55

Table VI에서와 같이 직접적인 항암효과를 나타내는 NK-cell이 대조군에서 1.14%, 장길투여군에서 6.23%으로 장길투여군에서 약 5.5배 정도 높게 나타났다. 그리고 B-cell에서도 대조군보다 장길투여군이 높게 나타났으며 T-cell은 장길투여군이 비록 약간 낮았지만 오히려 Tc-cell이 높게 나타나 항암효과를 나타낸다고 사료된다. 또한 고형암에서는 Table VII에 나타낸것과 같이 NK-cell은 대조군이 3.6%, 장길투여군이 4.55%로 복수암의 경우보다는 낮지만 약간 높게 나타났다. 그리고 B-cell은 대조군보다 낮았으나 T-cell과 Tc-cell은 대조구에 비하여 높게 나타났다. 이와 같은 결과를 통하여 장길 추출물들의 항암활성은 면역세포의 비율 상대적으로 높아짐에 따라 나타났다고 사료된다.

## 결 론

이상의 결과들로 미루어 볼 때 장길의 총추출물은 길경보다 훨씬 높은 항암효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 복수암의 경우 ILS가 128% 이었으며, 고형암에서는 항종양저지율이 61.5%로 나타나 항암효과가 탁월하였다. 세포독성실험에서는 길경 및 장길 모두에서 세포독성을 거의 나타내지 않고 있으며, 암세포접착저해 활성실험에서는 장길추출물의 농도가 0.125 mg/ml 이상의 농도에서는 100%의 암전이를 억제하는 것으로 나타났다. 또한 면역관련 실험에서는 장길추출물은 복수

암에서는 NK-cell이 고형암에서는 Tc-cell이 크게 증가함을 알 수 있다.

이와같은 사실로부터 장길 추출물의 항암활성은 세포독성에 의한 암세포의 살멸효과에 기인 하는 것이 아니라 암전이를 억제하거나 면역세포의 비율이 증가함 따라 나타나는것으로 사료된다. 앞으로 많은 생물실험을 통하여 장길의 약리활성을 검토한다면 향후 항암제로의 개발 가능성이 있다고 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구수행에 다년생도라지를 공급하여 주신 영농법인 성호장생도라지에 감사의 말씀을 드립니다.

## 문 헌

- 1) 허 준, 동의보감, 서울 남산당, P486, P392 (1981).
- 2) 한대석, 생약학, 동명사, P197 (1992).
- 3) Hong, M. W. : Statistical analyses of *Platycodi radix* prescriptions. *Kor. J. Pharmacog.*, **5**, 61 (1974).
- 4) Akiyama, T., Tanaka, O. and Shibata, S. : Chemical studies of oriental plant drugs. *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1952 (1972).
- 5) Tada, T., Kaneiwa, Y., Shoji, J. and Shibata, S. : Saponins of the root of *P. grandiflorum*. Isolation and the structure of platycodin D. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2965 (1975).
- 6) Ishii, H., Tori, K., Tozoy, T. and Yoshimura, Y. : Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. *J. Chem. Soc.*, Perkin trans I, 661 (1984).
- 7) Igarashi, K. : *Sogoigaku*, **3**, 1 (1951).
- 8) Lee, E. B. : Pharmacological activities of crude platycodon. *J. Pharm. Soc. Kor.*, **19**, 164 (1975).
- 9) Hitokoto, H., Morozumi, S., Wake, T., Sakai, S. and Ueno, I. : *Mycopathologia*, **66**, 16 (1979).
- 10) Nagao, T., Matsuda, H., Nambo, K. and Kubo, M. : Immune pharmacological studies on platycodi radix I: Effect on the phagocytosis in the mouse. *Shoyakugaku Zasshi*, **40**, 367 (1986).
- 11) Naga, T., Matsuda, H., Makata, K., Namba and Kubo, M. : Immune pharmacological studies on platycodi radix I: Antitumor activity of inulin from Platycodi radix. *Shoyakugaku Zasshi*, **40**, 375 (1986).

- 12) Kubo, M. : Antitumor inulin-like substances from *Platycodon grandiflorum* roots. JP60-89427 (1985).
- 13) 加藤珠子, 關口珠子, 川口誠. : マルコロール吸収抑制劑, JP平3-264534 (1991).
- 14) 이성호, “다년생도라지재배법”. 대한민국 특허 제 045731호.
- 15) Sung, N. K., Lee, S. J., Shin, J. H., Kee, I. S., and Chung, Y. C. : Effect of *Platycodon grandiflorum* extracts on blood glucose and lipid composition in Alloxan induced hyperglycemic rats, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25**, 986 (1996).
- 16) Kim, K. S., Ezaki, O., Ikemoto, S. and Itakura, H. : Effects of *Platycodon grandiflorum* feeding on serum and liver lipid concentrations in rats with diet-induced hyperlipidemia, *J. Nur. Sci. Vitaminol*, **41**, 485 (1995).
- 17) Rubinstein, L. V., Paull, K. D., Shoemaker, R. H., Simon, R. M., Skehan, P. and Boyd, M. R. : Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, *Proceeding of the American Association for Cancer Research*, **30**, 2418 (1989).
- 18) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J. D., Vista, J., Warren, T., Kenney, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**(13), 1107 (1990).
- 19) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, N., Boyd, M. : Evaluation of colorimetric protein and biomass strains for assaying in vitro drug effects upon human tumor cell lines, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, **30**, 2436 (1989).