

## 글리시르히진이 L1210 세포를 이식한 생쥐의 Lymphocytes Subpopulation 변화에 미치는 영향

은재순<sup>#</sup> · 염정열 · 전 훈 · 오찬호\*

우석대학교 약학대학, \*자연과학대학

(Received August 31, 2000)

### Effect of Glycyrrhizin on Lymphocytes Subpopulation Change of L1210 cells-transplanted Mice

Jae-Soon Eun<sup>#</sup>, Jung-Yul Yum, Hoon Jeon and Chan-Ho Oh\*

College of Pharmacy,

\*College of Natural Science, Woosuk University, Samrye, 565-701 Korea

**Abstract** — We have previously observed that glycyrrhizin(GL) inhibits the proliferation of transplanted-L1210 cells *via* the production of nitric oxide from peritoneal macrophages. In the present study, we examined the effect of GL on lymphocytes subpopulation change of L1210 cells-transplanted mice. GL increased the population of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells of thymocytes in L1210 cells-transplanted mice and the lucigenin chemiluminescence of human polymorphonuclear cells. These results suggest that the proliferation of transplanted-L1210 cells is partly inhibited by an enhancement of cytotoxic T cells population and phagocytic activity in GL-administered mice.

**Keywords** □ Glycyrrhizin, B220<sup>+</sup>, Thy1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, L1210, phagocytosis.

Glycyrrhizin(GL)은 감초(Glycyrrhizae Radix)의 주성분으로 항염, 항레양, 항알러지, 항암, 항바이러스 및 면역조절작용 등 다양한 작용이 있음이 보고되었다.<sup>1-6)</sup> 최근 GL은 T lymphocyte로부터  $\gamma$ -interferon의 생성<sup>7)</sup> 및 peritoneal macrophage로부터 nitric oxide의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.<sup>8)</sup> 본 연구자들은 nitric oxide가 human leukemia cell-line인 HL-60 cell의 apoptosis를 유도하고,<sup>9)</sup> GL이 복강 macrophage로부터 nitric oxide의 생성을 촉진하여 transplanted-L1210 세포의 apoptosis를 일부 촉진하며,<sup>10)</sup> GL이 mitochondrial transmembrane potential을 감소시켜 mature T lymphocytes의 apoptosis를 유도함을 보고하였다.<sup>11)</sup>

생체에서 면역작용을 나타내는 세포들은 종류가 다양하지만, 그 중에서 가장 중심적인 역할을 하는 세포는 B 및 T 임파구로 알려져 있다. 특히 T 세포는 골수에서 생성되어 흉선을 거치는 동안 heper T(Th) 및 cytotoxic T(Tc) 세포로 분화된다. Th 세포는 각종 cytokines를 분비하여, macrophage의 활성화 및 탐식기능을 증진시키고 B 세포로부터 항체생산을 촉진하는 등 생체 면역 기능에 중요한 역할을 하고 있으며, Tc 세포는 외부로부터 들어온 미생물과 암세포 등을 공격하여 lysis 및 apoptosis 시키는 기능을 가지고 있다.<sup>12)</sup>

전보<sup>10)</sup>에서 GL에 의한 transplanted-L1210 세포의 증식억제작용이 macrophage로부터 분비되는 nitric oxide에 일부 나타나며, 또 다른 factor가 관여하고 있을 가능성을 제시하였었다. 따라서 본 실험에서는 GL이 transplanted-L1210 세포의 증식억제작용에 관여하

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 063-290-1569 (팩스) 063-290-1567

고 있을 또 다른 가능성을 확인하고자 생쥐 lymphocytes의 subpopulation에 미치는 영향을 관찰하였다.

### 실험방법

**실험 동물** - 실험동물은 생후 8 주령된 BALB/c 계통의 웅성 생쥐를 대한실험동물에서 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용할 때까지 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 5\%$ , 명암주기가 12시간인 사육실에서 고품질 pellet 사료와 물을 자유로이 섭취하게 하면서 사육하였다.

**시약 및 기기** - 시약은 glycyrrhizin, DME, RPMI1640, MTT는 Sigma Co., FBS, thioglycollate는 Difco Co., PE conjugated anti-CD4, FITC conjugated anti-CD8, PE conjugated anti-B220, FITC conjugated anti-Thy1은 Dainippon Seiyaku Co. 등의 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 세포배양용 및 1급 시약을 사용하였다. 기기는 microplate reader(Dynatech MR5000), flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), luminometer(Berthold 96LP), CO<sub>2</sub> incubator(Vision Co.) 등을 사용하였다.

**L1210 세포의 증식능 측정** - Transplanted-L1210 세포의 증식에 미치는 GL의 영향을 알아보기 위해 Mosmann<sup>13)</sup>이 개발하여 Kotnik<sup>14)</sup> 등이 변형시킨 MTT법을 사용하였다. 생쥐 1군을 5 마리로 하여 1 마리당 L1210 세포를  $2 \times 10^6$  cells 씩 복강에 이식하고 7일간 전보<sup>10)</sup>에서 transplanted-L1210 세포의 증식을 억제시킨 GL 0.1 mg/mouse를 경구투여한 후 생쥐를 경추 탈구시켜 도살하였다. 도살 후 cold-PBS 5 ml를 복강에 주입한 다음 복강액을 분리하여 원심 분리(1,500 rpm, 5분, 4°C) 하였다. 침전된 세포를 petri dish로 옮겨 약 2 시간 동안 배양 한 후, 부착한 세포를 제거하고 부착하지 않은 세포를 모아 원심 분리한 후, 침전된 세포분획을 모아  $2 \times 10^5$  cells/ml로 조제하여 96 well plate의 각 well에 세포부유액 100  $\mu\text{l}$ 를 분주하고 배지 100  $\mu\text{l}$ 를 채워 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A)에 희석된 MTT용액 20  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고, dimethylsulphoxide 100  $\mu\text{l}$ 로 용해시켜 18 시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader를 이용하여 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세

포생존율을 백분율로 환산하였다.

**Lymphocyte subpopulation assay - In vitro** 실험에서는 생쥐를 경추탈구시켜 비장 및 흉선을 분리하였다. 세포분리는 Wysocki<sup>15)</sup> 및 Mizel 등<sup>16)</sup>의 방법을 이용하였다. 즉 적출한 흉선 및 비장을 각각 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 2회 세척한 다음, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 세포를 DPBS-A에 재부유시켜 3회 반복 세척한 후 분리한 thymocytes 및 splenocytes의 생존율 및 총세포수를 trypan blue exclusion법으로 측정하였다. 각 세포현탁액을  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 96 well plate에 분주한 후 GL 25, 50, 100, 200 및 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 세포를 수집하여 RPMI1640 배지로 3회 세척하였다. 비장세포는 phycoerythrin(PE) 및 fluorescein isothiocyanate(FITC)로 conjugate 시킨 PE-B220 및 FITC-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하였으며 (1:160 dilution), 흉선세포는 PE-CD4 및 FITC-CD8 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4°C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer(excitation 488 nm, emission FITC 525 nm 및 PE 575 nm)로 subpopulation을 측정하였다. In vivo 실험에서는 1군을 5 마리로 하여 7 일간 1일 1회씩 대조군에는 생리식염수만을, GL 투여군은 GL 0.1 mg/mouse를 복강 주사하였으며, L1210 세포 이식군은 첫째날 생쥐 1 마리당 L1210 세포를  $2 \times 10^6$  cells 씩 복강에 이식하였고, L1210 세포 이식군에 GL을 투여한 군은 첫째날 L1210 세포를 생쥐 1마리당  $2 \times 10^6$  cells 씩 복강에 이식하고 다음날부터 7일간 GL 0.1 mg/mouse를 복강투여한 후 생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 다음 동일한 방법으로 실험하였다.

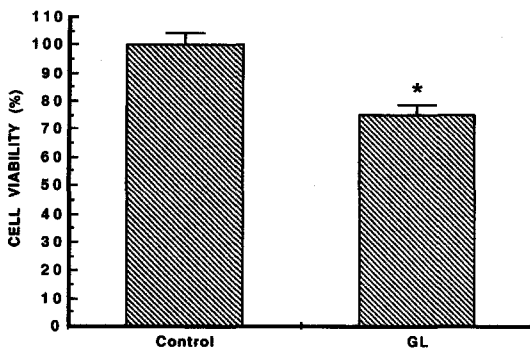
**Human polymorphonuclear cell의 분리** - Heparin 처리된 주사기로 건강한 성인으로부터 채혈하여 Ficoll-Hypaque(1.119~1.077) 용액에 조심스럽게 넣어 넣고 700 g로 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 분리한 세포를 DPBS-A로 3회 세척하고 최종 세포 농도가  $2 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 DME(without phenol red, 0.34 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 사용하였다.

**Lucigenin chemiluminescence 측정** - Zymosan 용액은 zymosan 67 mg을 10 ml의 DPBS-A에 넣어

37°C에서 30분간 방치한 후 DPBS-A로 2회 세척하고 혈액공여자의 혈청이 10% 첨가된 10 ml의 DME에 부유시켜 37°C에서 30분간 처리한 다음 신선한 DME로 세척한 후 10 ml의 DME에 재부유시켜 사용하였다. Lucigenin 용액은 lucigenin 5.1 mg을 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후 여과 멸균하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정용 luminometer를 이용하여 37°C에서 다음과 같이 측정하였다.<sup>17,18)</sup> 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 polymorphonuclear(PMN) 세포부유액 50  $\mu$ l, lucigenin 용액 50  $\mu$ l 및 zymosan 용액 30  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 15분간 전처리한 후 GL 25, 50, 100, 200 및 400  $\mu$ g/ml를 최종 volume이 200  $\mu$ l가 되도록 첨가하여 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

### 실험결과 및 고찰

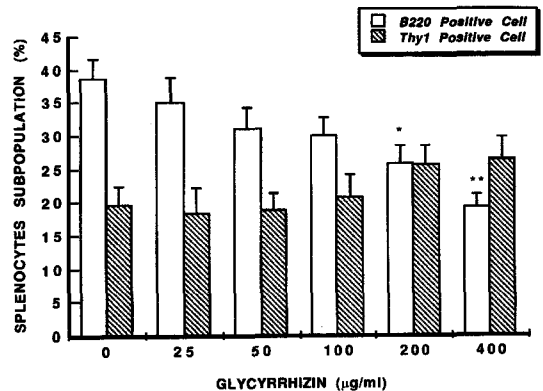
**GL이 transplanted-L1210 세포의 증식에 미치는 효과** - L1210 세포를 이식하고 GL을 투여한 생쥐에서 L1210 세포를 회수하여 세포생존율을 측정된 결과, 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때 GL 투여군은 75.3 $\pm$ 3.8%로 세포생존율이 대조군에 비해 감소하였지



**Fig. 1** - Effect of glycyrrhizin on the cell viability of transplanted-L1210 cells in mice. Glycyrrhizin (0.1 mg/mouse) was administered *p.o.* for 7 days, and L1210 cells were transplanted *i.p.* at the first day. The cells were cultured for 24 h in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*Significantly different from control group ( $p < 0.01$ ).

만(Fig. 1), L1210 세포에 GL을 직접 처리 시에는 세포생존율에는 별 변화가 없었다(data not shown). 이는 GL에 의한 transplanted-L1210 세포의 증식억제작용이 GL의 직접작용이 아니라 생체의 다양한 경로를 통한 간접작용임을 시사하는 것이다. GL의 transplanted-L1210 세포 증식억제작용에 관여할 수 있는 간접작용으로 면역계를 통한 작용을 생각할 수 있다. 전보<sup>10)</sup>에서 GL을 투여하고 분리한 macrophage로부터 nitric oxide의 생성이 증가하였고, macrophage와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때 lipopolysaccharide와  $\gamma$ -interferon을 처리하지 않아도 L1210 세포의 apoptosis가 유도되었으며, 이때 L-NMMA를 처리하면 apoptosis가 일부 억제되었다는 것은, GL이 macrophage를 자극하여 nitric oxide 생성을 촉진하고, 생성된 nitric oxide가 transplanted-L1210 세포의 apoptosis를 유도하여 L1210 세포의 증식을 일부 억제하고 있음을 시사하는 것이지만, transplanted-L1210 세포의 증식억제작용에는 또 다른 면역기전이 작용할 수 있다고 생각되어 lymphocytes의 subpopulation 변화에 미치는 영향을 관찰하여 보았다.

**In vitro**계에서 GL이 생쥐 lymphocytes의 subpopulation change에 미치는 효과 - 비장세포에서 대조군의 B220<sup>+</sup>(CD45R<sup>+</sup>) 세포 population은 38.7 $\pm$



**Fig. 2** - Effect of glycyrrhizin on the subpopulation change of murine splenocytes *in vitro* system. The cells were cultured for 24 h in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The subpopulation change of the cells was determined with a flowcytometer after staining with PE conjugated anti-B220 and FITC conjugated anti-Thy1 mAbs. The data represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments. \*Significantly different from control group ( $*p < 0.01$ ,  $**p < 0.001$ ).

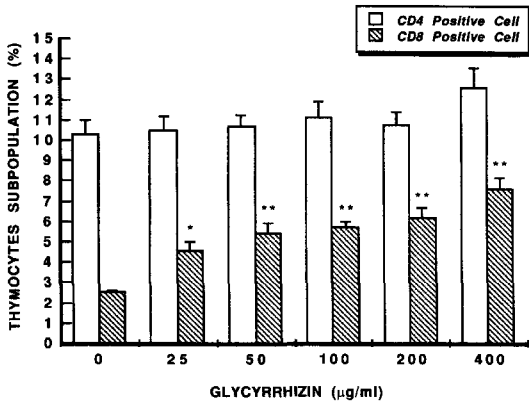


Fig. 3 – Effect of glycyrrhizin on the subpopulation change of murine thymocytes *in vitro* system. The subpopulation change of the cells was determined with a flowcytometer after staining with PE conjugated anti-CD4 and FITC conjugated anti-CD8 mAbs. The data represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments. \*Significantly different from control group (\* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.001).

3.0% 이었으며, GL 100  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서는 대조군과 별 차이가 없었으나, GL 200 및 400  $\mu$ g/ml의 고농도에서는  $25.8 \pm 2.7\%$  및  $19.2 \pm 2.0\%$ 로 B220<sup>+</sup> 세포의 population이 감소되었다. 대조군의 Thy1<sup>+</sup> 세포 population은  $19.6 \pm 2.8\%$  이었으며 GL 400  $\mu$ g/ml 처리시  $26.5 \pm 3.2\%$ 로 증가하는 경향을 나타내었으나 유의성 있는 차이는 없었다(Fig. 2). 흉선 세포에서 대조군의 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>(Th) 세포 population은  $10.3 \pm 0.7\%$  이었으며 GL 처리시 대조군과 별 차이가 없었다. 대조군의 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>(Tc) 세포 population은  $2.5 \pm 0.1\%$  이었으며 GL 25  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 증가되었다(Fig. 3). 이 결과는 GL이 *In vitro*계에서 cytotoxic T 세포를 증가시켜 면역능을 조절할 수 있음을 의미하는 것이다.

GL이 L1210 세포를 이식한 생쥐 lymphocytes의 subpopulation change에 미치는 효과 - 백혈병 세포주인 L1210 세포를 생쥐에 이식하고 GL을 7일간 투여한 후 분리한 비장세포 및 흉선세포의 population change를 측정한 결과 비장세포 중 대조군의 B220<sup>+</sup> 세포 population은  $33.6 \pm 1.8\%$  이었으며, GL 투여군 및 L1210 세포 이식군은 대조군과 별 차이가 없었으나, L1210 세포를 이식하고 GL을 투여한 군은  $39.7 \pm 1.3\%$ 로 L1210 세포를 이식한 군에 비해 증가하였다. 한편, 흉선세포 중 대조군의 Thy1<sup>+</sup> 세포 popula-

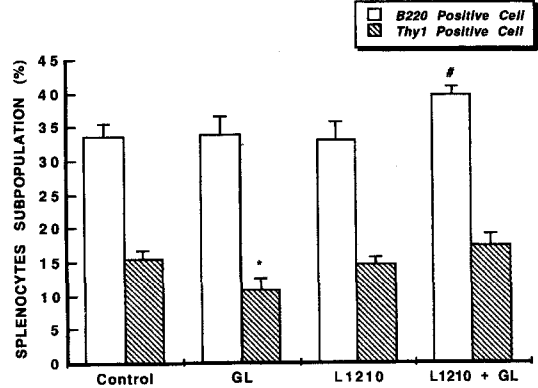


Fig. 4 – Effect of glycyrrhizin on the subpopulation change of murine splenocytes in L1210-transplanted mice. The subpopulation change of splenocytes obtained from L1210-transplanted mice was determined with a flowcytometer. GL(0.1 mg/mouse) was injected *i.p.* once a day for 7 days. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*Significantly different from control group (\* $p$ <0.05). #Significantly different from L1210-transplanted group (\* $p$ <0.05).

tion은  $15.5 \pm 1.1\%$  이었으나 GL 투여군은  $10.8 \pm 1.7\%$ 로 대조군에 비해 감소하였으며, L1210 세포 이식군 및 L1210 세포를 이식하고 GL을 투여한 군은 대조군과 별 차이가 없었다(Fig. 4). 흉선세포 중 대조군의 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 세포 population은  $11.9 \pm 0.5\%$  이었으나, GL 투여군은  $8.7 \pm 0.3\%$ 로 대조군에 비해 감소하였으며, L1210 세포 이식군 및 L1210 세포를 이식하고 GL을 투여한 군은 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 대조군의 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> 세포 population은  $2.5 \pm 0.2\%$  이었으며 GL 투여군은 대조군과 별 차이가 없었으나, L1210 세포 이식군은  $12.2 \pm 2.7\%$ 로 대조군에 비해 증가하였으며, L1210 세포를 이식하고 GL을 투여한 군은  $21.7 \pm 3.8\%$ 로 L1210 세포 이식군에 비해 증가하였다(Fig. 5). Thymocyte는 thymus의 피질 및 수질에서 증식 및 분화과정을 거쳐 helper T cell(CD4<sup>+</sup>) 및 cytotoxic T cell(CD8<sup>+</sup>)로 분화되며, 분화된 helper T cell에서 분비된 interleukin-2는 T cell의 증식을 촉진하고 NK cell을 활성화하며,  $\gamma$ -interferon은 macrophage의 phagocytic activity를 촉진한다. 한편, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>12)</sup> 이러한 다양한 기능을 가지고 있는 T lymphocytes의 비율은 정상 생쥐 흉선에서 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>

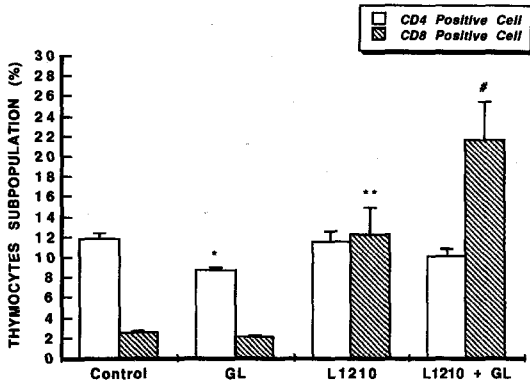


Fig. 5 - Effect of glycyrrhizin on the subpopulation change of murine thymocytes in L1210-transplanted mice. The subpopulation change of thymocytes obtained from L1210-transplanted mice was determined with a flowcytometer. GL(0.1 mg/mouse) was injected *i.p.* once a day for 7 days. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*Significantly different from control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ). #Significantly different from L1210-transplanted group ( $p < 0.01$ ).

cells은 약 12%이며, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> cells은 약 3%로 알려져 있으며, 본 실험의 결과에서도 비슷한 비율을 나타내었다. 이들 결과는 암세포가 생체에 들어왔을 때 cytotoxic T 세포가 증가하게 되며, GL 투여시 cytotoxic T 세포가 더욱 증가하여 암세포의 증식을 조절할 수 있음을 시사하는 것이다.

GL이 polymorphonuclear cell의 phagocytic activity에 미치는 효과 - Lucigenin에 의해 증가되는 chemiluminescence는 myeloperoxidase의 활성과는 관련이 없고, phagocytosis를 하는 동안 생성되는 superoxide와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>19)</sup> Human polymorphonuclear cell에 GL을 처리시 lucigenin chemiluminescence가 20분까지 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 GL 200  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 현저히 증가하였다(Fig. 6). 이 결과는 cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시킨다는 앞의 설명과 GL이 human T lymphocyte로부터  $\gamma$ -interferon의 생성을 증가시킨다는 Shinada 등의 보고<sup>20)</sup>와 비교할 때 GL은  $\gamma$ -interferon의 생성을 증가시켜 cytotoxic T cell의 population 및 PMN 세포의 phagocytic activity를 증가시킨 것이 아닌가 추정되나 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다.

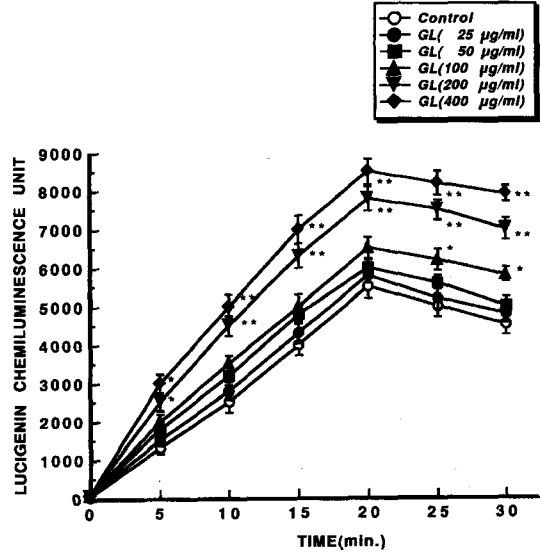


Fig. 6 - Effect of glycyrrhizin on lucigenin chemiluminescence in human polymorphonuclear cells. Polymorphonuclear cells were cultured in DME media with various concentration of GL and opsonized zymosan. The lucigenin chemiluminescence was measured at 5 min. intervals for 30 minutes. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments. \*Significantly different from control group (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ ).

## 결 론

GL은 cytotoxic T 세포 및 phagocytic activity를 증가시켜 transplanted-L1210 세포의 증식을 일부 억제할 가능성이 있다고 사료된다.

## 감사의 말씀

본 논문은 2000년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Fujisawa, K., Watanabe, Y. and Kimura, K.: Therapeutic approach to chronic active hepatitis with glycyrrhizin. *Asian. Med. J.* 23, 745 (1980).
- 2) Inoue, H., Mori, T., Shibata, S. and Saito, H.: Pharmacological activities of glycyrrhetic acid derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 3888 (1987).

- 3) Ito, M., Nakashima, H., Baba, M., Pauwells, R., Declercq, E., Shigeta, S. and Yamamoto, N. : Inhibitory effect of glycyrrhizin on vitro infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus. *Antiviral. Research* **7**, 127 (1987).
- 4) Abe, H., Ohya, N., Fujikawa, K., Shibuga, T., Arichi, S. and Odashima, S. : Effects of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on growth and melanogenesis in cultured B16 melanoma cells. *Eur. J. Cancer Clinic. Oncol.* **23**, 1549 (1987).
- 5) Nishino, H., Yoshioka, K., Iwashima, A., Takizima, H. and Kunishi, S. : Glycyrrhetic acid inhibits tumor promoting activity of teleocidin and 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two stage mouse skin carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* **77**, 33 (1986).
- 6) Han, J. H., Oh, C. H. and Eun, J. S. : Effect of glycyrrhizae Radix on the immune responses (II) Immuno-regulatory action of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid. *Yakhak Hoeji* **35**(3), 174 (1991).
- 7) Abe, N., Ebina, T. and Ishida, N. : Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in mice. *Microbiol. Immunol.* **26**, 535 (1982).
- 8) Kondo, Y. and Takano, F. : Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages enhanced with glycyrrhizin. *Biol. Pharm. Bull.* **17**(5), 759 (1994).
- 9) Pae, H. O., Kim, Y. H., Shin, Y. S., Yang, J. H., Eun, J. S. and Chung, H. T. : Protective effects of glucocorticoids on nitric oxide-induced apoptosis in leukemia HL-60 cells in man. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6**, 191 (2000).
- 10) Eun, J. S., Kwon, J. and Oh, C. H. : Effect of glycyrrhizin on apoptosis of transplanted-L1210 cells in mice. *Yakhak Hoeji* **42**(3), 324 (1998).
- 11) Oh, C. H., Kim, Y. A., Eun, J. S., Yokoyama, T., Kato, M. and Nakashima, I. : Induction of T lymphocyte apoptosis by treatment with glycyrrhizin. *Am. J. Chin. Med.* **27**(2), 217 (1999).
- 12) Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. : Cellular and molecular immunology. 2nd ed., Saunders, p.243 (1994).
- 13) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods* **65**, 55 (1983).
- 14) Kotnic V. and Fleischmann W. R. Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods* **129**, 23 (1990).
- 15) Wysocki, L. J. and Sato, V. L. : Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 2844 (1978).
- 16) Mizel, S. B., Openheim, J. J. and Rosensteich, D. L. : Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.* **120**, 1497 (1979).
- 17) Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. : Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods* **174**, 259 (1994).
- 18) Blair, A. L., Cree, I. A., Beck, J. S. and Hating, M. J. G. : Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods* **112**, 163 (1988).
- 19) Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. : Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **45**, 1 (1984).
- 20) Shinada, M., Azuma, M., Kawai, H., Sasaki, K., Yoshida, I., Yoshida, T., Suzutani, T. and Sakuma, T. : Enhancement of interferon- $\gamma$  production in glycyrrhizin-treated human peripheral lymphocytes in response to concanavalin A and to surface antigen of hepatitis B virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **181**, 205 (1986).