

원저

足三里에 施術한 旱蓮草 藥鍼의 免疫增進과 抗癌作用에 관한 研究

정영돈 · 이현 · 이병렬 · 임윤경*

*대전대학교 침구경혈학교실

Abstract

The effect of anti-cancer and Immune response improvement of ELP(*Eclipta prostrata*) Herbal-Acupuncture into Chok-samni(St36)

Jung Young-don, Lee Hyun, Lee Byung-ryul and Yim Yun-kyoung

*Department of Acupuncture & Moxibustion
College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

To study the effects of anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement of herbal-acupuncture with *Eclipta prostrata* diffusae herba infusion solution(ELP-HAS), we injected ELP-HAS into Chok-samni(St36) of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

We have reached the following conclusion through the effect on the number of CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ cells in mouse PBMCs, the effect on the pulmonary colony number, and the effect on MST(Median Survival Time) and ILS(Increase of Life Span) of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma

The results were obtained as follows :

1. In the experiment groups treated with ELP(*Eclipta prostrata*) Herbal-Acupuncture, the spleen cell proliferation in Balb/c mouse was significantly increased compared with control group.
2. In the experiment groups treated with ELP(*Eclipta prostrata*) Herbal-Acupuncture, the percentage of CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ cells in C57BL/6 mouse PBMCs was increased compared with control group.

· 접수 : 2003년 5월 14일 · 수정 : 2003년 5월 15일 · 채택 : 2003년 5월 17일

· 교신저자 : 정영돈, 대전광역시 동구 웅운동 93-3 대전대학교 침구경혈학교실

Tel. 042-280-2641 E-mail : han8jd@hanmail.net

3. In the experiment groups treated with ELP(*Eclipta prostrata*) Herbal-Acupuncture, the pulmonary colony number of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma was decreased significantly compared with control group.

4. In the experiment groups treated with ELP(*Eclipta prostrata*) Herbal-Acupuncture, MST(Median Survival Time) and ILS(Increase of Life Span) of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma were increased significantly compared with control group.

Key words : *Eclipta prostrata*(ELP), Herbal-Acupuncture, Chok-samni(St36), anti-cancer, immune response improvement

I. 緒 論

免疫이란 生體가 自己와 非自己를 識別하는 機能이며, 外部로부터 侵入하는 微生物 혹은 同種의 組織이나 生體에 생긴 不必要한 產物 등과 反應하고, 또한 이를 除去함으로써 그 個體의 恒常性(homeostasis)을 維持하는 現象이다¹⁾. 韓醫學에서는 《素問·刺法論》²⁾에 “五疫之至…正氣存內 邪不可干”, 《素問·評熱病論》²⁾에 “邪之所湊 其氣必虛”, 《素問·百病始生篇》²⁾에 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人 卒然逢風暴雨而不病者 皆無虛 故邪不能獨傷人”이라 하였으니 이는 疾病의 成立 過程中 生體의 抵抗力으로서의 正氣의 重要性을 強調한 것으로 西洋醫學에서의 免疫 機能의 概念과 類似하다³⁾.

腫瘍免疫 反應에서는 細胞性 免疫이 주된 役割을 하고, 體液性 免疫은 二次的 役割을 擔當하는 것으로 알려져 있어 T 淋巴球 및 Macrophage 등의 細胞가 腫瘍免疫作用을 主로 하므로 이러한 細胞들의 活性은 癌의 發生과 進行 및 豫後와 密接한 關係가 있다고 報告되어 있다⁴⁾⁻⁶⁾.

韓醫學에서 腫瘍은 癭^{7),8)}, 瘰^{9),10)}, 瘡^{11),12)}, 癥^{13),14)}, 癩¹⁵⁾, 積¹⁶⁾, 聚^{17),18)} 등의 範疇에 해당되며, 淸熱解毒,

化痰軟堅, 活血祛痰, 行氣散結, 以毒除毒 등의 祛邪法¹⁹⁾⁻²²⁾과 健脾益氣, 健脾益腎, 益氣補血, 滋陰溫陽 등의 扶正法²³⁾ 및 攻補兼施²⁴⁾의 治法이 活用되고 있다.

藥鍼療法(Herbal acupuncture)은 經絡療法과 藥物療法の 原理를 바탕으로 研究된 新鍼治療 中の 하나이다. 疾病과 有關한 部位인 經穴, 阿是穴 등의 陽性 反應點에 精製한 各種 韓藥物을 選擇 注入함으로써 經穴과 藥物이 疾病에 대해 綜合的인 作用을 충분히 發揮하여 疾病을 豫防하고 治療하는 方法으로, 免疫系疾患의 豫防 및 治療 등에 有效하다고 報告되고 있다²⁶⁾.

이에 著者는 涼血補陰, 斂陰止血, 益腎陰²⁷⁾⁻²⁹⁾의 效能이 있는 旱蓮草로 藥鍼液을 製造한 후 調氣血, 補虛弱하는 足三里³⁰⁾(St36)에 施術하여 抗癌 및 免疫增進에 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 試藥 및 機器

① 試藥

Diethyl pyrocarbonate(DEPC) Cocanavalin-Aisopropanol, RBC lysis solution, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride(MgCl₂), D-phosphate buffer saline, Diethyl pyrocarbonate(DEPC) chloroform 등

② 機器

機器名	製造社	製造國
Spectrophotometer	shimazue	Japan
Centrifuge	sigma	USA
Bio-freezer	sanyo	Japan
Primus 96 thermocycler system	MWG Biotech	Germany
Ice-maker	vision 科學	Korea
Homogenizer	OMNI	USA
Plate shaker	Lab-Line	USA
Elisa Leader	molecular devices	USA
Flow cytometer	Becton dickinson	USA
Digital thickness gauge	Mitutoyo Corp.	Japan
Electric chemical balance	MCI	Germany

2) 動物

動物은 4~5週齡의 雌性인 C57BL/6 생쥐를 대한실험센터에서 供給받아 實驗 當日까지 固型飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 充分히 供給하고, 室溫 22±2℃를 維持하여 2週日間 實驗室環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

3) 藥材

實驗에 사용된 旱蓮草(*Ecliptate Hera* 이하 ELP로 表現함)는 大田大學校 附屬韓方病院에서 구입한 것을 精選하여 使用하였다.

4) 藥鍼液의 選定

Acetone과 Methanol의 濃度를 달리해서 抽出한

旱蓮草 物質分劃 藥鍼液 중에서 cytokine 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 살펴본 結果는 70% acetone 100μg/ml의 旱蓮草 物質分劃 藥鍼液이 cytokine 遺傳子(IL-2, IL-10, IFN-γ, β-actin) 發顯에 다른 것들보다 뛰어난 것으로 나타났다.

5) 藥鍼液의 제조

旱蓮草 物質分劃 藥鍼液은 曠 등³¹⁾의 方法에 따라 Diaion HP-20 수지를 利用하여 調製하였다. 물로 抽出한 旱蓮草원액 100g을 수지가 들어있는 흡착 크로마토그래피에 부어 그 폭이 약 25~30cm 될 정도로 放置하였다. 이후 증류수 1,000ml를 부어 Diaion HP-20 수지를 통과한(pass층) 旱蓮草액을 분리하였다. 계속해서 30% MeOH 500ml, 70% MeOH 500ml, 30% Acetone 500ml, 70% Acetone 500ml를 각각 통과시켜 분리된 分획 중 생쥐의 PBMCs 세포에서 싸이토카인 유도에 활성이 있는 分획층을 選定하여 藥鍼液 製造를 하였다.

旱蓮草 70% Acetone층 分획을 3회 濾別(3M paper, USA)한 후 rotary evaporator로 減壓 濃縮하였다. 旱蓮草 濃縮液에 95% ethyl alcohol 30ml를 가하여 실온에서 攪拌한 후 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고, 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 攪拌 후 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고 다시 濾液을 75% ethyl alcohol 30ml를 가한 후 같은 操作을 2회 反復한 다음 濾液 중 ethyl alcohol을 減壓 제거하여 잔사전량을 20g이 되게 하고 1N NaOH로 pH 6.8로 조절하여 低溫에서 12時間 放置한 후 微量의 浮游液을 濾別한 후 滅菌하여 10%와 20% 旱蓮草 70% Acetone층 藥鍼液으로 稀釋하여 使用하였다.

2. 方法

1) 旱蓮草 70% Acetone층 藥鍼液에 의한 PBMC의 mRNA遺傳子 發現 調節

① PBMC 分離 및 藥物處理

㉔ PBMC(peripheral blood mononuclear cells) 細胞分離

C57BL/6 생쥐를 경추탈골법으로 致死시킨 후 脾臟을 摘出하고, 摘出した 脾臟을 100mesh(Sigma)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 組織을 粉碎하였다. 15ml conical tube(Becton dickinson)에 옮겨 약 5分間 放置하여 組織 덩어리를 沈澱시킨 후 上層液을 取해 2회 洗滌하고 0.83% NH₄Cl 溶液을 넣고 5分間 incubation시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2회 洗滌하고, Hipaque-1077(Sigma)로 2,000rpm에서 20分間 遠心分離하여 buffy coat 部分을 얻어 實驗에 使用하였다.

㉕ 細胞培養 및 藥物處理

PBMC를 24 well plate에 1×10⁶ 세포로 각 well에 분주하고, 旱蓮草 70% Acetone층 藥鍼液 추출물(100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml) 및 양성대조군(LP S, 2.5μg/ml)을 각각 처리하고 4시간 동안 배양한 후 D-PBS로 水洗하여 total RNA를 分離하였다.

② mRNA 遺傳子 分析

㉖ Total RNA의 抽出

培養 終了後 24-well plate의 上層液을 除去한 後 RNAzo^B(Tel-Test, USA)를 利用하여 total RNA를 抽出하였다. 抽出한 RNA는 DEPC(Diethyl Pyrocarbonate)를 處理한 20μl의 蒸溜水에 溶解시켜 定량하고, RNA를 確認하기 위하여 RNA 4μg을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70℃에서 10分間 denaturation시킨 後, formaldehyde를 넣은 1.5% agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그 量을 確認하였다. 確認한 RNA는 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

㉗ cDNA 合成

逆轉寫 反應은 準備된 total RNA 3μg에 該當하는 量을 75℃에서 10分 동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3μg에 2.5μl의 10mM dNTPs, 1μl의 random sequence hexanucleotides (25pmole/25μl), RNA inhibitor로서 1μl의 RNasin(20U/μl), 1μl의 100mM DTT 및 4μl의 5× RT buffer(250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 混合한 後, 1μl의 M-MLV RT (200U/μl)를 添加한 後 DEPC 處理된 蒸溜水를 더하여 最終 부피가 20μl가 되도록 하였다. 이 20μl의 反應 混合液을 잘 섞은 後 遠心分離하여 37℃ 恒溫 水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95℃에서 10分 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 合成이 完了된 first-strand cDNA는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

㉘ cDNA의 PCR 增幅

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG in Germany)를 利用하여 修行하였다. 反應은 이미 合成된 1μl의 first-strand cDNA를 主型으로 使用하였으며, 主型에 대한 β-actin, MMP-9, IL-1β, TNF-α, IL-18 및 NOS-II에 대한 primer는 다음과 같으며, sense primer(20pmole/μl)와 antisense primer(20pmole/μl)를 혼합하여 1μl를 가하고, 다시 3μl 2.5mM dNTPs, 3μl 10×PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 및 0.18μl Taq polymerase(5U/μl)를 添加한 다음 最終 부피가 30μl 되도록 滅균 증류수를 가하고 predenaturation ; 95℃, 5분, denaturation ; 74℃, 5분, annealing ; 55℃, 1분, elongation ; 72℃, 1분을 25 cycle한 後 postelongation을 72℃에서 3분 동안의 條件으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products

는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V
 條件에서 20分間 전기영동을 통하여 分析하였다.

2) 脾臟細胞 測定

脾臟免疫細胞를 分離하여 96 well plate의 각
 well에 5 \times 10⁵ cell씩 添加하고, 旱蓮草 70% Ace-
 tone층 藥鍼液을 농도별로 처리하였고, 陽性對照群
 으로 Con-A(cocanavalin A, 10 μ g/ml)를 處理한
 후 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 72시간 培養 후 50 μ Ci/ml의
 [methyl-³H] Thymidine(Amersham, USA)을 添
 加한 후 다시 8시간 培養하였다. 細胞內로 흡수된
 방사선 동위원소의 양을 測定하기 위하여 세포만을
 細胞수집기(Cell Harvester)를 使用하여 유리섬유
 여지(Glass microfiber filter, Whatman) 위에 포
 획하고, 乾燥한 후 放射線 測定器(Liquid Scintilla-
 tion Counter, LKB)를 이용하여 放射線 同位元素
 의 양을 測定하였다.

3) In vivo에서 免疫細胞 增進과 활성화 實驗

① B16-F10 癌細胞株 移植

B16-F10(ATCC, CRL-6475)을 C57BL/6 생
 쥐의 皮下에 繼代培養하였고 實驗前에 形成된 腫瘍
 組織 部位를 分離하여 腫瘍組織 1g에 10ml의 cold
 D-PBS(Ca²⁺ & Mg²⁺-free, Sigma)가 되게 調節한
 後, 100mesh(Sigma)로 腫瘍組織을 粉碎한 後 遠
 心分離(1,500 rpm, 5min.)하였다.

이 pellet에 col-lagenase(1,700U/mg, Type-XI
 Sigma)를 B16-F10 0.1g/ml에 處理하여 30分間
 water bath(37 $^{\circ}$ C)에서 培養시킨 後 遠心分離(1,300
 rpm, 5min.)하였다. 上騰液을 除去한 다음 0.85%
 NH₄Cl을 넣어 잘 섞은 것을 37 $^{\circ}$ C 培養器에서 5分
 間 放置하여 赤血球를 破壞시킨 後 遠心分離하여
 B16-F10을 分離하였다. BB16-F10 癌細胞株(2
 \times 10⁵cells/mouse)를 C57BL/6 생쥐의 尾靜脈에
 移植하였다.

② 實驗群의 分類

實驗群은 다음과 같이 分類하였다.

- 對照群-A(Control-A) : B16-F10 암세포주
 를 移植한 군

- 對照群-B(Control-B) : 7日間 足三里에 1일
 1회 刺鍼한 후 B16-F10 암세포주를 이식하고 계
 속해서 15일간 足三里에 1일 1회 刺鍼한 군

- 對照群-C(Control-C) : 7日間 生理食鹽水(0.1
 ml)를 足三里에 1일 1회 注入한 후 B16-F10 암세
 포주를 移植하고 계속해서 15일간 생리식염수(0.1
 ml)를 足三里에 1일 1회 注入한 군

- 實驗群-A(Sample-A) : 7日間 足三里에 10%
 旱蓮草 藥鍼(70% Acetone층 0.1ml)을 施術한 후,
 B16-F10 암세포주를 移植하고, 계속해서 15일간
 藥鍼施術한 군

- 實驗群-B(Sample-B) : 7日間 足三里에 1%
 旱蓮草 藥鍼(70% Acetone층 0.1ml)을 施術한 후,
 B16-F10 암세포주를 移植하고, 계속해서 15일간
 藥鍼施術한 군

③ 取穴

人體의 足三里에 相應하는 實驗動物의 體表面의
 털을 除去한 後 骨度分寸法에 依據하여 經穴探知器
 (D-J3型, 耳電鍼器 上海醫療器)를 使用하여 取穴
 하였다.

④ 藥鍼

藥鍼注入器로 1ml의 注射器를 使用하여 實驗始作
 2日부터 15日까지 各各의 實驗群에 따라 足三里에
 0.1ml씩, 1日 1回, 總 22日間 藥鍼 施術하였다.

⑤ CD3e⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD69⁺, N.K 1.1⁺, B220⁺ 형광세포 分析

B16-F10 세포주를 이식한지 3일째에 경추달골
 법으로 C57BL/6 생쥐를 치사시킨 후 脾臟을 分離
 하였다. 脾臟細胞에 赤血球 溶血液을 처리하여 赤血
 球를 除去하고 4 $^{\circ}$ C에서 免疫 형광염색(immunoflu-
 uorescence staining)을 實施하였고, 各各에 PE-

anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-NK1.1, PE-anti-B220을 넣고 30分間 얼음에서 反應시켰다. 反應 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 水洗한 후 flow cytometer(Becton Dickinson, USA)의 Cell Quest 프로그램을 利用하여 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, N.K.1.1⁺/CD3e⁺ 細胞를 分析(%)하였다.

⑥ Pulmonary colonization assay

C57BL/6 생쥐에 B16-F10 癌細胞株 移植한 後 15日에 colony assay를 實施하였다 Pulmonary colonization assay는 肺臟의 外部에 나타난 黑色의 colony 數를 顯微鏡(Nikon, Japan)으로 觀察하였다.

⑦ 病理組織檢査

B16-F10 癌細胞株를 移植하고 15日 後에 各群에서 肺를 分離하여 10% formaldehyde 溶液에 固定한 後 細切하여 흐르는 물에 8時間 동안 水洗한 過程을 거쳐 포매한다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 染色을 하였다.

⑧ 生命延長曲線 測定

B16-F10 암세포주를 C57BL/6 생쥐에 이식한 날부터 시작하여 매일 생존여부를 觀察하여 평균생존일수 및 연명율을 다음과 같이 구하였다.

MST(mean survival time) : 평균생존일수

ILS(Increase in MST over Control-C) : 연명률 = $\{(T-C)/C\} \times 100(\%)$

T : 處置群의 MTS

C : 對照群의 MTS

3. 統計處理

統計는 student's t-test로 하였다.

III. 成績

1. 旱蓮草 藥鍼液이 脾臟細胞 增殖에 미치는 影響

70% acetone 100 μ g/ml의 旱蓮草 物質分割 藥鍼液을 健康한 Balb/c mouse에서 抽出한 脾臟細胞에 各各 10, 1, 0.1%의 濃度로 處理하여 脾臟細胞의 增殖에 미치는 影響을 알아본 結果 細胞增殖에 有意性 있는 增加를 보였다<Table 1>.

2. 旱蓮草 藥鍼液이 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 細胞數에 미치는 影響

1) PBMCs 중 CD25⁺/CD4⁺ 細胞의 比率

Table 1. Effect of ELP-HAS extract on spleen cells proliferation in Balb/c mice

Group	Dose	Spleen cells production(cpm)
Media control	0	1,267 \pm 146
Con-A(μ g/ml)	0	38,760 \pm 5,194***
	10	8,025 \pm 1,032***
ELP-HAS(%)	1	3,520 \pm 459***
	0.1	1,468 \pm 205

Mouse B cells from healthy Balb/c mice were treated with ELP-HAS extract(10, 1, 0.1%).

Spleen cells were cultured with Con-A(Positive control) and ELP-HAS extract for 48hrs.

After 40 hrs incubation, treated ³H-thymidine uptake, the culture supernatants and spleen cells were collected using cell harvester(Cambridge Tee, UK).

The cell proliferation were measured to liquid scintillation counter(LKB, USA) as described in Materials and Methods.

Statistically significant value compared with control data by T test(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

C57BL/6 mouse의 PBMCs 중 CD25⁺/CD4⁺ 細胞의 比率이 10.4±1.1%이었고, Control-B에서는 12.7±2.2%였으며, Control-C에서는 13.8±2.5%이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 各各 20.6±3.1 %과 14.8±2.1%로 增加하였다.

2) PBMCs 중 CD8⁺/CD3e⁺ 細胞의 比率

C57BL/6 mouse의 PBMCs 중 CD8⁺/CD3e⁺ 細胞의 比率이 Control-A에서는 4.7±0.2%이었고, Control-B에서는 7.9±0.5%였으며, Control-C에서는 8.1±0.4%이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 各各 9.9±0.5%과 8.5±0.6%로 增加하였다.

3) PBMCs 중 CD69⁺/B220⁺ 細胞의 比率

C57BL/6 mouse의 PBMCs 중 CD69⁺/B220⁺ 細胞의 比率이 Control-A에서는 44.6±3.7%이었고, Control-B에서는 49.6±2.6%였으며, Control-C에서는 49.1±3.8%이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 各各 55.8±4.4%과 51.0±2.8%로 增加하였다.

4) PBMCs 중 NK1.1⁺/CD3e⁺ 細胞의 比率

C57BL/6 mouse의 PBMCs 중 NK1.1⁺/CD3e⁺ 細胞의 比率이 Control-A에서는 2.2±0.1%이었고, Control-B에서는 2.6±0.2%였으며, Control-C에서는 2.8±0.2%이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 各各 4.7±0.4%과 3.5±0.7%로 增加하였다.

3. Lung colony number에 미치는 影響

Control-A에서는 76.4±6.9개였고, Control-B에서는 67.2±4.2개였으며, Control-C에서는 69.1±3.7개였고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 各各 19.2±2.6개와 42.4±3.4개로 나타났다.

Table 2. Effects of ELP-HAS on Pulmonary colony number of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

Group	Dose	No./ animal	Pulmonary Colony No.	Decrease (%)
Control-A	0	12	76.4±6.9	
Control-B	0	12	67.2±4.2	
Control-C	0	12	69.1±3.7	
Sample-A	10(%)	12	19.2±2.6***	72.2
Sample-B	1(%)	12	42.4±3.4***	38.6

C57BL/6 mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10⁵cells) on days 7. The mice were treated with ELP-HAS into the Chok-Samni(St₃₆) for 22 days beginning on the day after the first ELP-HAS injection.

Pulmonary colony was observed 15days after the B16-F10 melanoma implantation.

Control-A : B16-F10 melanoma only

Control-B : B16-F10 melanoma+stimulation at left Chok-Samni(St₃₆)

Control-C : B16-F10 melanoma+intradermal injection into left Chok-Samni(St₃₆) with 0.1ml of saline.

Sample-A : B16-F10 melanoma+intradermal injection into left Chok-Samni(St₃₆) with 0.1ml of 10% ELP-HAS.

Sample-B : B16-F10 melanoma+intradermal injection into left Chok-Samni(St₃₆) with 0.1ml of 1% ELP-HAS.

Each point represents the mean±S.E of 12 mice.

Statistically significant value compared with control -3 data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 各各 Lung colony number의 減少率이 各各 72.2%, 38.6%로 增加하였다.<Table 2>.

4. 평균생존일수(MST) 및 연명률(ILS)에 미치는 影響

Table 3. Effects of ELP-HAS on MST of C57 BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

Group	Dose	No./ animal	MST (day)	ILS (%)
Control-A	0	12	17.1±2.7	
Control-B	0	12	18.4±3.4	
Control-C	0	12	17.6±2.6	
Sample-1	10(%)	12	25.9±3.1*	47.2
Sample-2	1(%)	12	21.3±2.7	21.0

C57BL/6 mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10^5 cells) on days 7, treated with ELP-HAS into the Chok-Samni(S_{36}) for 22 days beginning on the day after the first ELP-HAS injection.

MST(mean survival time) ; ILS(Increase in MST over Control-C) = $\{(T-C)/C\} \times 100(\%)$

T : MST of Sample group

C : MST of Control-C

Control-A : B16-F10 melanoma only

Control-B : B16-F10 melanoma+stimulation at left Chok-Samni(St_{36})

Control-C : B16-F10 melanoma+intradermal injection into left Chok-Samni(St_{36}) with 0.1ml of saline.

Sample-A : B16-F10 melanoma+intradermal injection into left Chok-Samni(St_{36}) with 0.1ml of 10% ELP-HAS.

Sample-B : B16-F10 melanoma+intradermal injection into left Chok-Samni(St_{36}) with 0.1ml of 1% ELP-HAS.

Each point represents the mean±S.E of 12 mice.

Statistically significant value compared with control-3 data by T test(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Control-A에서는 17.1 ± 2.7 이었고, Control-B에서는 18.4 ± 3.4 였으며, Control-C에서는 17.6 ± 2.6 였고 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 25.9 ± 3.1 와 21.3 ± 2.7 로 나타났으며 연명률(ILS)는 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서 각각 47.2%와 21.0%로 증가하였다<Table 3>.

IV. 考 察

旱蓮草(Eclipta Hera)는 菊花科에 속한 일년생草本인 Eclipta prostrata L의 全草를 乾燥한 것으로서 性은 寒無毒하고 味는 甘酸하며 補陰藥으로 分類된다. 旱蓮草는 涼血, 止血, 補腎, 益陰하는 功用을 가지고 있으며 주로 陰虛血熱로 인한 吐血, 咳血 등의 各種 出血症과 肝腎陰虛로 인한 頭暈目眩과 鬚髮早白을 治療하는 藥物로 알려져 있다^{(27)~(29)}

足三里(St_{36})는 足陽明胃經의 合穴로, 調脾胃, 調氣血, 補虛弱, 調中氣, 和腸消滯, 疎風化濕, 通調經絡, 穴氣 扶正培元, 祛邪防病하는 作用이 있어^{(30)~(32)}, 嘔吐, 霍亂, 腹瀉, 腹痛, 腹部膨滿, 便秘, 消化不良, 食慾不振, 泄瀉, 胃炎, 痢疾 등의 消化器疾患 등의 疾患에 廣範圍하게 活用되며, 脾胃의 機能을 調節하여 氣血의 運行을 圓滑히 하여 正氣를 敦篤히 하여 人體의 免疫機能을 向上시켜 疾病을 治療하고 疾病을 豫防할 수 있을 것으로 思料된다.

藥鍼療法은 經絡學說의 原理에 依據하여 東西藥物을 選擇해서 有關한 穴位, 壓通點, 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性 反應點에 注入하여 刺針과 藥物療法을 통하여 生體의 機能을 조절하고 病理狀態를 變化시켜 疾病을 治療하는 新針療法으로^{(25), (33), (34)}, 金⁽³⁵⁾의 藥鍼治療에서는 俞穴이 多用되고 있고, 여기에 募穴을 添加하면 이들은 서로 그 氣血이 相通한다는 原則에 따라 같이 使用하면 效果가 좋다⁽³⁴⁾고 하였다.

免疫이란 個體가 自己와 非自己를 識別하여 非自己를 抗原으로 認識한 後 特異하게 抗體를 生産하고 이에 對處하여 處理함으로써 個體의 恒常性を 維持하려는 人類의 進化 過程에서 獲得한 一種의 自衛能力이다^{(1), (36)}.

免疫機能이란 非自己 物質을 除去함으로써 그 個

體 內部의 恒常性을 維持하는 現像으로 人類의 모든 疾病의 發生機轉과 關聯이 있는데^{1),36)}, 免疫系에 關與하는 免疫細胞로서는 淋巴球의 細胞膜 表面에 存在하는 受容體에 따라 크게 T 및 B 淋巴球로 區分되며 T 淋巴球를 中心으로한 細胞 相互關係에 依한 細胞性 免疫 反應(cell mediated immune response)과 B 淋巴球로부터 形成된 免疫 反應에 依한 體液性 免疫 反應(humoral immune response)으로 大別된다³⁷⁾. 또한 細胞性 免疫 反應은 T 淋巴球 外에도 生體의 가장 重要한 免疫 擔當 細胞인 macrophage 活性에 依하여 決定된다³⁸⁾. 특히 腫瘍 免疫反應에서는 細胞性 免疫이 主된 役割을 하고 體液性 免疫은 2次的 役割을 하는데, 癌의 發生, 進行 및 豫後를 決定짓는 要素中 macrophage 活性이 매우 重要한 것으로 알려져 있다⁴⁾⁻⁶⁾. 특히 癌患者의 約 40% 程度가 急性 感染病 등의 感染症에 依하여 死亡한다고 하여 癌患者의 非特異的인 macrophage 등의 免疫能 調節에 依한 感染病의 防止는 癌患者의 治療 및 延命率 增加에 큰 目標가 되고 있다³⁹⁾.

韓醫學의으로 免疫은 《素問·上古天真論》²⁾에 “眞氣從之 精神內守 病安從來”라 하였고, 《刺法論》²⁾에 “正氣存內 邪不可干”, 《評熱病論》²⁾에 “邪之所湊 其氣必虛”라 하였으니 邪가 侵犯하는 곳에는 반드시 그 氣가 虛하기 때문이란 뜻인데, 따라서 正氣가 外邪를 防禦하고 除去하는 作用이 있음을 示唆하였다. 疾病의 發生過程이 正氣의 盛衰與否와 密接히 關聯된다는 內容들은 西洋醫學에서의 免疫과 類似하다고 할 수 있다. 《刺法論》²⁾에서는 “五疫之至 皆相染易 無問大小 病狀相似 正氣存內 邪不可干”이라 하여 五疫에 對하여도 感染되지 않는 것은 그 原因이 “正氣存內 邪不可干”이고, 이는 正氣가 內에 存在하고 있으면 邪가 있더라도 侵入하지 못한다는 뜻으로, 이에 對하여 匡³⁶⁾은 단지 生體의 正氣가 充實하게 되면 外邪 內邪를 莫論하고 미리 防

止할 수가 있고, 싸워서 이길 수 있다는 것이며, 人體가 疾病을 免할 수 있게 되지만, 여러 原因에 依하여 正氣虛衰하게 되면 한편으로는 外邪가 쉽게 虛한 틈을 타서 侵入하고, 한편으로는 內邪가 일어나 各種 疾病을 일으키게 되는 것이라 하므로, 疫邪에 대한 正氣의 抵抗性에 對하여 論하고 있다. 또 《玉機眞藏論》²⁰⁾에는 “邪氣勝者 正氣衰也 故病甚”이라 하였으며, 《百病始生篇》²⁾에 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人”, 《口問篇》²⁾에는 “故邪之所在 皆爲不足”, 《癰論》²⁾에 “衛氣之所在 與邪氣相合而病作”, 《刺節眞邪篇》²⁾에 “虛邪入於身也深… 有所結 其歸之… 有所結 深中骨 深中骨 氣因於骨”이라 하여 疾病의 發生과 進行에 있어서 正氣 不足이 重要한 病因임을 強調하였다.

또한 癌의 原因과 그 治法에 關해, 積에 對해서 李中梓는 “積之成者 正氣不足 以後邪氣踞之”라 하였고, 張介賓은 “凡脾胃不足及 虛弱失調之因 多有 積聚之病”이라 하여 積의 形成에 正氣虧虛를 癌發病의 가장 重要한 內的 要因으로 여겼으며, 특히 先天과 後天元氣의 根本인 腎과 脾의 正氣를 強調하였다. 그러므로 癌의 發生은 韓醫學의 大體의 病因論과 같이 正邪의 抗爭이며, 邪氣에 對한 正氣의 抵抗能力의 低下, 免疫能力의 低下로 發生된다고 볼 수 있다.

여기서 正氣는 人體의 正常 生理活動 및 體內 抗病能力을 말하고 邪氣는 一切 疾病을 일으키는 素因의 總稱으로서 外界의 六淫之邪 및 體內 陰陽失調로 因한 病理 狀態와 痰飲, 瘀血, 食積 등과 같은 病理產物 등을 指稱한다.

이러한 疾病 發生에 있어서의 正氣와 邪氣의 概念은 西洋醫學의 免疫學 理論과 類似함을 알 수 있는데, 載新民는 故人들이 疾病은 正邪抗爭의 過程이고, 疾病의 發生 및 轉變을 決定하는 要因으로 正氣의 強弱을 重要視하였으며, 아울러 扶正祛邪라는 療法을 提示하여 後代에 지대한 影響을 미쳤다고 하

였고, 蟲惠民은 正氣가 人體의 發病에 決定的 作用을 하는데 正氣는 先天的 支配를 받으며 後天的인 脾胃에 依해서 充滿된다고 하였다.

癌의 治法에 있어서 內經²⁾의 “治病必求本”의 學說에 根據하여 羅天益은 “養正則積自除”라 하여 扶正培本을 強調하였다. 또한 《素問·至真要大論》²⁾에서는 “堅者削之”, “結者散之”, “留者攻之”라 하여 攻邪를 더하여 扶正培本과 攻補兼施를 治療의 原則으로 삼았다.

CD는 cluster of differentiation의 略字로 표식인자 特性에 따라 CD1, CD2, CD3 등으로 부른다. CD4⁺인 T細胞는 보조 T림프구이고, CD8⁺ T細胞는 억제 T細胞 또는 細胞독성 T細胞로 CD4, CD8은 T림프구를 다시 細分하는 表식인자로 利用되고 있으나, 모든 T細胞 表面에 表現되는 表식인자로 CD2가 있다. 말초 T림프구는 CD4와 CD8 중 하나만 가진다. CD4⁺인 보조 T細胞는 다시 제1형 보조 T細胞(T_{H1})와 제2형 보조 T細胞(T_{H2})로 구별된다. CD4는 MHC 제1항원을 認識하고 作用하며, CD8은 MHC 제2항원을 알아보고 作用한다.

CD3는 T Cell 결정표지인자로, T림프구 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 細胞 안으로 傳達하고, CD25는 activated T와 B cell에 分布하며 IL-2 수용체의 機能을 하며, CD69는 activated B와 T cell, 大食細胞, NK cell에 分布하고, B220은 사람에게엔 없지만 mouse의 B細胞 表面에 있는 表식자이다.

MHC제한도 없고 항원 특이성도 없이 일부 癌細胞와 바이러스 감염細胞에 대하여 細胞毒性을 나타내는 細胞를 일반적으로 자연細胞독성細胞(natural killer cell : NK cell)라 부르며, 일부 NK-T細胞는 CD3를 갖는다. 최근 cytokine 등 免疫細胞 活性化를 이용한 免疫療法(immunotherapy)은 癌治療에 새장을 열고 있다. in vitro에서 免疫細胞를 活性化시켜 末梢血液에 주사한 후 癌細胞를 죽이든지,

in vivo에서 활성화된 T細胞, NK細胞, DCs細胞 등이 암細胞를 apoptosis로 유도하는 治療法이다. 이러한 研究에는 생쥐종이(Mouse melanoma) 모델이 使用되는데, 이는 癌 研究에서 比較的 잘 정립되어 있는 免疫療法, 轉移를 研究하기에 適한 모델이다.

抗腫瘍 및 免疫效果에 藥鍼을 利用한 實驗的 研究로는 人蔘, 金銀花, 猪苓, 瓦松 등을 藥鍼하여 各各 抗腫瘍 및 免疫機能增進에 有效하다고 報告되고 있으나, 旱蓮草 藥鍼을 利用한 抗癌 및 免疫效果에 대한 報告는 아직 接하지 못했다.

이에 著者는 旱蓮草를 藥鍼液으로 調製한 후 實驗動物의 各各에 調脾胃, 調氣血, 補虛弱, 調中氣 和 腸消滯 疎風化濕 通調經絡氣血 扶正培元 祛邪防病 하는 作用이 있는³⁰⁾⁻³²⁾ 足三里에 藥鍼하여 抗癌 및 免疫機能에 미치는 影響을 實驗的으로 究明하고자, 脾臟細胞 增殖, CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ 比率에 미치는 影響, Lung colony number에 미치는 影響, 평균생존일 수(MST) 및 연명률(ILS)에 미치는 影響 등을 觀察하였다.

實驗結果, 旱蓮草 藥鍼液이 脾臟細胞 增殖에 미치는 影響을 살펴보면 70% acetone 100μg/ml의 旱蓮草 物質分割 藥鍼液을 健康한 Balb/c mouse에서 抽出한 脾臟細胞에 各各 10, 1, 0.1%의 濃度로 處理하여 脾臟細胞의 增殖에 미치는 影響을 알아본 結果, 10%에서 8,025±1032cpm으로 나타났고, 1%에서 3520±459cpm으로 나타나서 對照群의 1267±146cpm보다 增加하여 濃度依存的으로 增加하였다<Table 1>.

旱蓮草 藥鍼液의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ 比率에 미치는 影響을 살펴보면 CD25⁺/CD4⁺의 비율이 對照群 A에서는 10.4±1.1%이었고, 對照群 B에서는 12.7±2.2%였으며, 對照群 C에서는 13.8±2.5%이었으나, 10%

ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 $20.6 \pm 3.1\%$ 과 $14.8 \pm 2.1\%$ 로 농도依存的으로 증가하였다.

CD8⁺/CD3e⁺의 比率이 對照群 A에서는 $4.7 \pm 0.2\%$ 이었고, 對照群 B에서는 $7.9 \pm 0.5\%$ 였으며, 對照群 C에서는 $8.1 \pm 0.4\%$ 이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 $9.9 \pm 0.5\%$ 과 $8.5 \pm 0.6\%$ 로 농도依存的으로 증가하였다.

CD69⁺/B220⁺의 比率이 對照群 A에서는 $44.6 \pm 3.7\%$ 이었고, 對照群 C에서는 $49.6 \pm 2.6\%$ 였으며, 對照群 C에서는 $49.1 \pm 3.8\%$ 이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 $55.8 \pm 4.4\%$ 과 $51.0 \pm 2.8\%$ 로 농도依存的으로 증가하였다.

NK⁺/CD3e⁺의 比率이 對照群 1에서는 $2.2 \pm 0.1\%$ 이었고, 對照群 2에서는 $2.6 \pm 0.2\%$ 였으며, 對照群 3에서는 $2.8 \pm 0.2\%$ 이었고, 10% ELP-ASS와 1% ELP-HAS에서는 각각 $4.7 \pm 0.4\%$ 과 $3.5 \pm 0.7\%$ 로 농도依存的으로 증가하였다.

위의 實驗結果 早蓮草藥鍼液을 施術한 群이 對照群에 比하여 增加한 것으로 나타났는데 이것은 早蓮草가 補腎, 益陰하여 陰虛血熱과 肝腎陰虛를 治療하는 效能과 免疫細胞增加와는 一定한 關聯性이 있는 것으로 思料된다.

肺細胞 轉移率을 살펴보면 對照群 A에서는 $76.4 \pm 6.9\%$ 였고, 對照群 B에서는 $67.2 \pm 4.2\%$ 였으며, 對照群 C에서는 $69.1 \pm 3.7\%$ 였고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 $19.2 \pm 2.6\%$ 와 $42.4 \pm 3.4\%$ 로 나타나서, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서 減少率이 각각 72.2% , 38.6% 로 농도依存的으로 有意하게 減少를 보였다<Table 2>.

平均生存日數 및 延命率에 미치는 影響을 살펴보면 對照群 A에서는 17.1 ± 2.7 이었고, 對照群 B에서는 18.4 ± 3.4 였으며, 對照群 C에서는 17.6 ± 2.6 로 나타났는데 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 25.9 ± 3.1 와 21.3 ± 2.7 로 나타나서 延命率(ILS)이 각각 47.2% 와 21.0% 로 농도依存的

으로 增加하였다<Table 3>.

以上の 實驗結果에서 早蓮草 藥鍼液을 施術한 實驗群이 施術하지 않은 對照群에 比하여 有意한 結果를 나타내었는데 이는 早蓮草의 效能이 補肝腎陰虛하는 補陰藥物로서 抗癌 및 免疫作用에 影響을 미친 것이라 생각되나, 이에 대해서는 向後 持續的인 研究가 필요하리라 思料된다.

V. 結 論

早蓮草로 藥鍼液을 製造하여 調氣血, 補虛弱하는 足三里(St36)에 藥鍼하여 抗癌 및 免疫效果에 대해 考察한 結果, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 脾臟細胞의 增殖은 對照群에 比하여 增加되었다.
2. CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ 細胞는 對照群에 比하여 增加되었다.
3. Lung colony 수는 對照群에 比하여 減少를 보였다.
4. 평균생존일수 및 延命률은 對照群에 比하여 增加를 나타냈다.

以上の 結果로 보아 早蓮草 藥鍼은 抗癌 및 免疫 增強 效果가 있는 것으로 생각되나, 向後 持續的인 研究 및 臨床的인 應用이 필요하리라 思料된다.

VI. 參考文獻

1. 菊地浩吉 외 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, pp.33-35, 204-205, 211-212, 316-337, 1989.

2. 洪元植 編 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院出版部, pp.37-38, p.55, 57, 78, 82, 118, 119, 122, 181, 213, 249, 256, pp.304-305, p.319, 326, pp.347-378, 1981.
3. 趙鍾寬 : 免疫에 관한 東洋醫學의 考察, 東洋醫學, 12(1) : pp.19-23, 1986.
4. Brunschwig, A., Southam, C.M. and Levin, A.G. : Host resistance to cancer. Ann. Surg., 162 : 416, 1965.
5. Burnet, F.M. : The concept of immunological surveillance. Pro. Exp. Tumor Res., 13 : 1, 1970.
6. Eiber, F.R. and Morton, D.L. : Impaired immunologic reactivity and recurrence of following cancer surgery. Cancer., 25 : 362, 1970.
7. 孫淑英 編譯 : 韓方內科學, 서울, 成輔社, pp.178-179, 1991.
8. 김진성 외 : 腫瘍의 豫防과 治療를 위한 食餌療法, 大韓韓方腫瘍會誌, 1(1) : p.231, 1995.
9. 徐政周 외 : 積聚의 病理에 관한 文獻的 考察, 大韓韓醫會誌, 15(1) : p.21, 1978.
10. 安圭錫 외 : 韓醫學的 診斷類型에 따른 韓藥方劑의 抗癌 및 免疫節作用에 미치는 영향, 東醫病理學會誌, 9 : pp.1-20, 1994.
11. 梁秀烈 외 : 更年期障碍의 東洋醫學의 考察, 동국대경주대논문집 6 : pp.303-315, 1987.
12. 張中植 외 : 삼부탕이 S-180에 대한 항암효과와 Cyclophosphamide에 의한 부작용 감소에 미치는 영향, 大韓韓醫學會誌, 13(1) : pp.313-323, 1992.
13. 黃奎東 외 : 噎隔·反胃와 胃癌과의 相關性에 대한 文獻的 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1) : p.129, 1995.
14. 上海中醫學院編 : 中醫內科學, 商務印書館, p.90, 1983.
15. 上海中醫學院編 : 中醫外科學, 商務印書館, pp.302-307, 308-309, 1982.
16. 沈連生 외 : 老人保健中成藥, 北京, 人民衛生出版社, pp.210-211. 1983.
17. 張代劉 編著 : 中西醫結合治療癌症, 山西人民出版社, p.1, 1984.
18. 厲暢 : 癌의 中醫治療, 東洋醫學, 18(1) : p.56, 1992.
19. 洪元植 : 現代中國의 癌治療法, 서울, 英文社, pp.17-35, 81-94, 361-388, 1980.
20. 邱佳信 외 : 惡性腫瘤服藥方法的實驗研究, 中國, 浙江中醫雜誌, 7 : 985. 1989.
21. 楊貴貞 외 : 人蔘抗小鼠手術應激의 細胞免疫調節效應, 中西醫結合雜誌, 8 : pp.479-480, 1988.
22. 許繼平 외 : 惡性腫瘤氣虛陰虛證患者免疫功能觀察, 浙江中醫雜誌, 7 : p.744, 1983.
23. 林宗廣 : 扶正培本法治療中 晚期原發性肝癌 31例, 上海中醫藥雜誌, 2 : p.7, 1984.
24. 楊金坤 외 : 健脾理氣清熱解毒軟堅化痰方劑治療晚期肝癌의 臨床觀察及實驗研究, 中國, 中西醫結合雜誌, 7 : p.275, 1987.
25. 催容泰 외 : 鍼灸學(上·下), 集文堂, 서울 pp.214-234, 382-384, 730-732, 1988.
26. 김대수 : 삼중의 제법에 따른 人蔘水鍼이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 免疫반응에 미치는 영향, 경희의학, 5(1) : pp.97-105, 1989.
27. 이상인 : 본초학, 서울, 修書院, p.159, 1981
28. 전국한의과대학 본초학교수 : 본초학, 서울, 영림사, p.599, 1991
29. 江蘇新醫學院編 : 中藥大辭典(下), 香港, 上海과학기술출판사, pp.2615-2617, 1977.
30. 林種國 : 침구치료학, 서울, 집문당, p.98, 99, pp.304-306, p.342, 343, 490, 491, 1983.
31. 곽이성 외 : 난소절제 흰쥐의 임상화학지수에

- 미치는 홍삼조사포논의 영향, 대전, 고려인삼학 회지, 24(1) : pp.46-50, 2000.
32. 李炳國 : 최신경혈학, 서울, 꽃丑文化社, pp.73-74, p.275, 276, 1979.
33. 崔容泰·李潤浩 : 最新針灸學, 서울, 成輔社, p.191, 345, 405, pp.502-522, 599-600, 1979.
34. 金延彦 : 奇蹟의 藥鍼療法 2, 서울, 金剛出版社, p.23, 1990.
35. 金潞經 외 : 癌백과(癌에 관한 모든 것), 瑞音出版社, p.27, 28, 1992.
36. 匡調元 : 中醫病理研究, 上海, 上海科學出版社, p.31, pp.174-175, 1980.
37. Biozzi, G., Stiefel, C., Mouton, Bouthillier, Y. and Deceusefound, G.A. : kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes. J. Immunol., 14 : 15, 1968.
38. Hume, D.A., Loutit, J.F. and Gordon, S. : The mononuclearphagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80 ; Macrophages of bone and associated connective tissue J. Cell Sci., 66 : 189, 1984.
39. 有地滋 : 現代醫學における漢方藥劑, 東京, 東洋醫學社, pp.84-98, 1986.