

## 수종 생약의 항알레르기 작용

최수형 · 김영란<sup>#</sup> · 임동구 · 배은옥

전남대학교 약학대학

(Received March 7, 1992)

## Anti-allergic Action of Some Medicinal Plants

Soo-Hyung Choi, Young-Ran Kim<sup>#</sup>, Dong-Gu Lim and Eun-Ok Bai

College of Pharmacy, Chonnam National University, Kwang-Ju 500-757, Korea

**Abstract**—Anti-allergic action of each water extracts of some crude drugs was investigated in mice and rats. The activity of hyaluronidase which was used in the screening test of anti-allergic action was inhibited significantly by Amomi Semen, Asiasari Radix, Cimicifugae Rhizoma, Cinnamomi Ramulus, Glycyrrhizae Radix and Scutellariae Radix. The 48-hour homologous passive cutaneous anaphylaxis(48-hr PCA) in mouse ear was inhibited significantly by intraperitoneal(i.p.) injection of Amomi Semen, Cimicifugae Rhizoma, and ketotifen, a comparative drug of an anti-allergic action. The increase of vascular permeability induced by histamine or serotonin was inhibited significantly by i.p. injection of Amomi Semen, Cimicifugae Rhizoma, Cinnamomi Ramulus and ketotifen. In rat dorsal skin, the increase of vascular permeability which was induced by histamine, serotonin or compound 48/80 was inhibited significantly by i.p. injection of Amomi Semen, Asiasari Radix, Cimicifugae Rhizoma, Scutellariae Radix and ketotifen. Armeniacae Semen and Liriopsis Tuber which had not inhibited hyaluronidase activity did not inhibit 48-hr PCA and the increase of histamine, serotonin or compound 48/80-induced vascular permeability in mice and rats.

These results suggest that each water extract of Amomi Semen and Cimicifugae Rhizoma has anti-allergic action.

**Keywords** □ Hyaluronidase, Amomi Semen, Cimicifugae Rhizoma, passive cutaneous anaphylaxis, anti-allergic activity.

I형 알레르기는 즉시형 반응이며<sup>1)</sup> 3단계로 구분하여 설명할 수 있다.<sup>2)</sup> 제 1단계는 IgE 항체의 생성과 감작의 단계이다. 인체에 들어온 외인성 항원이나 생체에서 유래한 내인성 항원은 macrophage에 의해 처리되어 T 림프구와 B 림프구를 자극한다. 이때 B 림프구는 helper T 림프구의 보조를 받아 형질세포로 분화되어 IgE 항체를 생성·분비하며, 생성된 IgE 항체는 비만세포나 호염기구의 세포막 표면에 있는 Fcε 수용체에 결합하여 감작이 성립된다.<sup>3)</sup> 제 2단계는 탈과립 단계이다. 즉 다시 침입한 동일한 항원이 비만세포나 호염기구에 결합되어 있는 IgE 항체 사이에

가교(cross-linking)를 형성하면 세포막이 활성화되고 일련의 효소반응을 거친 다음 짧은 시간내에 탈과립되어 화학적 전달물질의 유리가 일어난다.<sup>4)</sup> 유리되는 중요한 물질로서는 미리 만들어져 저장되어 있다가 유리되는 histamine 및 eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis(ECF-A) 등과 새로이 합성되어 유리되는 slow reacting substance of anaphylaxis(SRS-A) 및 prostaglandins 등이 있다.<sup>5,6)</sup> 제 3단계에서는 화학적 전달물질에 의한 모세혈관 투과성 항진, 평활근 수축 및 분비항진 등으로 인해 조직장해가 일어난다. 알레르기성 질환으로는 기관지 천식, 고초열, 담마진, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염 및 알레르기성 위장염 등이 있다.

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

알레르기 질환의 치료약으로는 과거로부터  $\beta$ -adrenoceptor 효능약, 선택적  $\beta_2$ -adrenoceptor 효능약, dimethylxanthine 유도체, 항histamine약 그리고 중증 천식이나 알레르기 질환에 glucocorticoids 등이 사용되어 왔다. 근래 비교적 널리 사용되고 있는 항알레르기 약으로는 화학적 전달물질의 유리억제 및 길항작용이 있는 disodium cromoglycate(DSCG),<sup>7)</sup> tranilast,<sup>8)</sup> ketotifen,<sup>9)</sup> oxatamide,<sup>10)</sup> azelastine,<sup>11)</sup> repirinast,<sup>12)</sup> amlexanox<sup>13)</sup> 및 mequitazine<sup>14)</sup> 등이 있다. Koda 등은 생약과 한방방제의 I형 및 IV형 알레르기 반응에 미치는 영향을 실험한 결과 한국 지실, 중국 시호, 오미자, 황금 및 대추 등에서 유의성 있는 억제효과를 보고하였다.<sup>15)</sup>

본 연구에서는 문헌 조사를 통해<sup>16,17)</sup> 항알레르기 작용이 있을 것으로 예상되는 몇가지 생약들의 항알레르기 작용을 생쥐 및 흰쥐를 사용하여 2가지 실험 모델로서 검토하였으며, 비교약물로는 항알레르기약으로 알려져 있는 ketotifen을 사용하였다.

우선 동물실험에 앞서 시험관내 enzyme assay를 이용한 간단한 스크리닝을 하였다. 알레르기 과정에서 효소 활성이 증가하며, 이 활성의 증가가 혈관투과성 항진과 관련된 효소인 hyaluronidase 활성을 감소시킨다면 항알레르기 작용이 있을 것이라는 보고와,<sup>18,19)</sup> 실제로 DSCG나 tranilast 등의 항알레르기약들이 이 효소를 억제한다는 보고도 있다.<sup>18,19)</sup> 또한 기질인 hyaluronic acid가 비만세포에 다량으로 존재하며, 불활성형으로 존재하던 효소가 칼슘 등의 금속이온에 의해 활성화된다는 보고에 의해 hyaluronidase는 비만세포 탈과립 과정에서 칼슘이온의 표적효소일 것이라고 고려되고 있다.<sup>19)</sup> 따라서 hyaluronidase 활성을 유의성있게 억제하는 생약을 스크리닝하여 동물실험에 사용하였다.

동물실험의 첫번째로는 생쥐 양 이각(耳殼)에서 48-hour homologous passive cutaneous anaphylaxis (48-hr PCA)를 실험모델로 하였다. PCA는 1921년에 보고된 Prausnitz-Küstner 시험(PK-test)을<sup>20)</sup> 동물실험으로 모식화한 반응이며, 1958년 Ovary에 의해 실시되었다.<sup>21,22)</sup> PCA 실험은 알레르기 반응의 중요한 특징중의 하나인 모세혈관 투과성 항진을 이용한 실험으로서, 화학적 전달물질의 유리억제 연구에 사용되는 중요한 in vivo 실험모델로 간주되고 있다.

동물실험의 두번째로는 생쥐 양 이각과 흰쥐의 등

피부에서 비만세포 탈과립후 화학적 전달물질로 작용하는 histamine 및 serotonin의 혈관투과성 항진에 대한 각 생약의 저해효과를 조사하였다. 또한 비만세포로부터 저장되어 있는 histamine을 유리하는 것으로 알려진 compound 48/80의<sup>23)</sup> 혈관투과성 항진에 관한 생약의 저해효과를 흰쥐의 등피부에서 동시에 실험하였다. 이상의 2가지 실험모델로서 몇가지 생약 물엑스에서 항알레르기 작용의 유무를 확인하고, 각 생약의 작용기전을 검토하고자 하였다.

## 실험 재료 및 방법

**실험동물**—실험에 사용한 동물은 체중 20~30g의 ICR계 웅성 생쥐 및 200~300g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐로서 부성 농장(경기도 화성군)에서 구입하여, 1주일 이상 사육한 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $60 \pm 5\%$ 의 항온·항습 조건으로서, 물을 자유로이 공급하면서 고형사료로 사육하였다.

**실험 시약 및 생약**—Anti-dinitrophenylated ascarisuum extract serum(DNP-AS, Gifu Pharmaceu. Univ., Japan), compound 48/80(Sigma Chemical Co.), p-dimethylaminobenzaldehyde(DMAB, Sigma Chemical Co.), dinitrophenylated bovine serum albumin(DNP-BSA, Gifu Pharmaceu. Univ., Japan), Evans blue(Sigma Chemical Co.), histamine dihydrochloride(Sigma Chemical Co.), hyaluronic acid potassium salt from rooster comb(Sigma Chemical Co.), hyaluronidase type IV-S from bovine testis(Sigma Chemical Co.), 5-hydroxytryptamine creatine sulfate complex(Sigma Chemical Co.), ketotifen fumarate(Sigma Chemical Co.), diethyl ether(Showa Ether Co., Ltd., Japan) 등을 사용하였으며 기타 시약은 특급 또는 1급을 사용하였다. 실험에 사용된 생약들은 갈근, 감초, 계지, 맥문동, 목단피, 사인, 승마, 세신, 진피, 행인 및 황금의 11가지로서 시중 건재 한약방에서 선별 구입하였다.

**생약 물엑스 산의 조제**—11가지 생약 각각의 물엑스 산을 조제하였다. 둥근 플라스크에 생약과 증류수를 넣고, 이 플라스크에 냉각기를 부착하여 환류시키면서 직화상에서 2시간 30분 가열하여 추출하였다. 생약 추출물을 실온으로 식힌후, 여과지로 여과

하여 여액을 얻고, 잔사에 다시 증류수를 가해 동일한 방법으로 추출하고 여과하였다. 1회와 2회 추출에서 얻은 여액을 합하여 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 물엑스 산을 만들었다.

**항알레르기 작용의 시험관내 스크리닝**—Hyaluronidase 활성은 기질로서 hyaluronic acid를 사용하여 반응시킨 후 생성된 N-acetylglucosamine 양을 Morgan & Elson의 방법을 약간 개량한 류 등의 방법<sup>24)</sup>로 측정하였다. 실험에 사용된 생약은 갈근, 감초, 계지, 맥문동, 목단피, 사인, 승마, 세신, 진피, 행인 및 황금으로서 각각의 물엑스 산을 증류수에 용해 또는 현탁하여 사용하였다. 실험은 각 생약에 대하여 50, 10, 5 및 1 mg/ml 농도로 하였으며, 생약의 공시험은 기질 대신 증류수를 가하여 본실험과 병행하여 실시하였다. 사용된 시약중 potassium borate 용액과 p-dimethylaminobenzaldehyde(DMAB) 용액의 조제 방법은 다음과 같다.

Potassium borate 용액 : boric acid 4.944g을 증류수 100 ml에 녹인 용액에 KOH 2.24g을 가하여 조제하였다. DMAB 용액 : DMAB 10g을 glacial acetic acid : 10 N HCl = 7 : 1 용액 100 ml로 녹여 조제하고, 사용시 glacial acetic acid로 10배 희석하여 사용하였다.

**생쥐 이각에서의 Evans blue 검량선**—생쥐 이각 한쌍을 공전 시험관에 넣고, evans blue 0~100 µg을 함유한 1 N KOH 0.7 ml를 가한후 37°C incubator에서 하룻동안 용해하였다. 이 시험관에 0.6 N 인산·아세트 혼액(5 : 13) 9.3 ml를 첨가하고 진탕하여 색소를 추출한 후, 여과지로 여과해 여액의 색소량을 620 nm에서 흡광도로 측정하였다.

**흰쥐 등피부에서의 Evans blue 검량선**—Clippers를 사용하여 흰쥐 등부위의 털을 깎은후 방혈치사시키고, 등피부를 직경 1 cm 정도 되도록 둥글게 잘라 공전 시험관에 넣은 다음 evans blue 0~100 µg을 함유한 1 N KOH 1 ml를 가해 37°C incubator에서 하룻동안 용해하였다. 이 시험관에 0.6 N 인산·아세트 혼액(5 : 13) 9 ml를 첨가하고 진탕하여 색소를 추출한 후, 여과지로 여과해 여액중의 색소량을 620 nm에서 흡광도로 측정하였다.

**생쥐 이각에서 48-hr PCA**—Inagaki 등의 방법<sup>25)</sup>에 따라 실험하였다. Strejan과 Campbell의 방법<sup>26)</sup>에 따라서 만든 DNP-AS에 대한 IgE 혈청을 생리 식염수로

2배 희석하여 에테르로 마취한 생쥐 양 이각에 10 µl씩 주사하여 수동감작 시키고, 48시간후 DNP-BSA 0.25 mg과 evans blue 1.25 mg을 포함한 생리식염수 0.25 ml를 꼬리정맥에 주사하여 반응을 일으켰다. 20분후 경부탈구에 의해 치사시켜 양 이각에 누출된 evans blue 색소량을 Katayama 등의 방법<sup>27)</sup>로 측정하였다. 즉 생쥐 양 이각을 잘라 공전 시험관에 넣고 1 N KOH 0.7 ml를 가해 37°C에서 하룻동안 incubation하여 생쥐 이각을 용해하였다. 이 시험관에 0.6 N 인산·아세트 혼액(5 : 13) 9.3 ml를 가한다음 진탕하고 여과하여 추출된 색소를 620 nm에서 비색정량하였다. 생약은 생리식염수에 용해 또는 현탁하여 항원을 투여하기 1시간전에 복강내에 투여하였다.

**생쥐 이각에서 histamine 및 serotonin에 의한 혈관투과성 항진**—Inagaki 등의 방법<sup>28)</sup>에 따라 실험하였다. 즉 histamine  $5 \times 10^{-5}$  g/ml 및 serotonin  $5 \times 10^{-6}$  g/ml 농도의 생리식염수 용액 10 µl를 생쥐의 양 이각에 주사하였다. 즉시 evans blue 1.25 mg을 포함한 생리식염수 0.25 ml를 꼬리정맥에 주사하고 30분후 치사시켜 누출된 색소량을 PCA와 같은 방법으로 측정하였다.

**흰쥐 등피부에서 histamine, serotonin 및 compound 48/80에 의한 혈관투과성 항진**—하루 전에 흰쥐 등부위의 털을 clippers로 깎고 4~6마리를 1 군으로하여 실험하였다. 약물을 복강주사한 1시간후 에테르로 마취한 흰쥐 등피부에 saline, histamine( $5 \times 10^{-5}$  g/ml), serotonin( $10^{-6}$  g/ml) 및 compound 48/80( $5 \times 10^{-6}$  g/ml)을 각각 0.1 ml씩 주사하였다. 즉시 evans blue 5 mg을 함유한 생리식염수 1 ml를 꼬리정맥에 주사하고 30분후 방혈치사시켜 등부위에 누출된 색소량을 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 즉 흰쥐 등피부의 색소가 누출된 부분을 둥글게 잘라 공전 시험관에 넣고 1 N KOH 1 ml를 가해 37°C에서 하룻동안 incubation하여 용해하였다. 이 시험관에 0.6 N 인산·아세트 혼액(5 : 13) 9 ml를 가한 다음 진탕하고 여과하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계처리**—실험 성적은 Student's t test를 사용하여 통계학적으로 해석을 행하였다.

## 실험결과

**항알레르기 작용의 스크리닝**—시험관내 hyaluron-

**Table I**—The effect of some medicinal plants on hyaluronidase activity *in vitro*

Drug	Dose(mg/ml)	Inhibition (%)
Amomi Semen	1	23.5± 6.01***
	5	78.9± 3.17***
	10	92.1± 1.11***
	50	91.2± 4.17***
Armeniaca Semen	50	-66.9± 13.90
Asiasari Radix	1	8.0± 5.15*
	5	55.5± 2.40***
	10	78.5± 2.21***
	50	81.0± 2.65***
Aurantii Nobilis Pericarpium	10	31.0± 10.44***
	50	52.6± 2.81***
Cimicifugae Rhizoma	1	23.6± 2.03***
	5	86.1± 0.68***
	10	90.5± 1.65***
	50	98.2± 2.21***
Cinnamomi Ramulus	1	13.8± 7.87**
	5	82.2± 5.44***
	10	90.5± 1.65***
	50	79.2± 6.75***
Glycyrrhizae Radix	1	53.7± 4.40***
	5	89.8± 2.32***
	10	93.9± 2.04***
	50	94.1± 1.29***
Liriopsis Tuber	50	14.7± 2.53**
Moutan Cortex Radicis	10	22.9± 19.50*
	50	84.5± 0.46***
Puerariae Radix	10	32.2± 7.15***
	50	45.1± 5.65***
Scutellariae Radix	1	45.0± 10.28***
	5	92.5± 0.66***
	10	94.6± 2.01***
	50	93.0± 2.99***

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

Each value represents the mean± S.D. of 4 experiments.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

dase 저해효과는 황금, 감초, 승마, 사인, 제지, 및 세신의 50, 10 및 5 mg/ml 수용액에서 현저하게 나타났으며, 이들 생약중 감초 및 황금은 1 mg/ml 농도에서도 40% 이상의 저해효과를 나타내었다. 실험 결과를 Table I에 나타낸다. 이후의 동물실험에서는 hyaluronidase 활성 저해효과가 큰 이 6가지를 피검

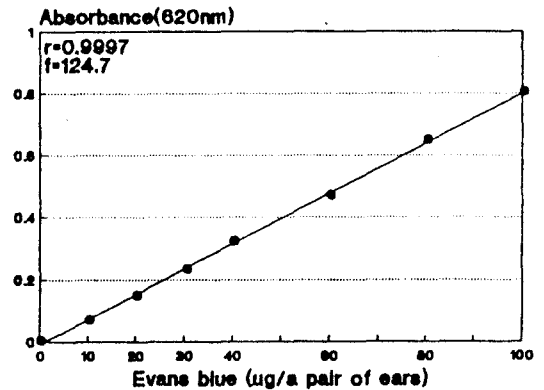


Fig. 1—The calibration curve of evans blue in mice.

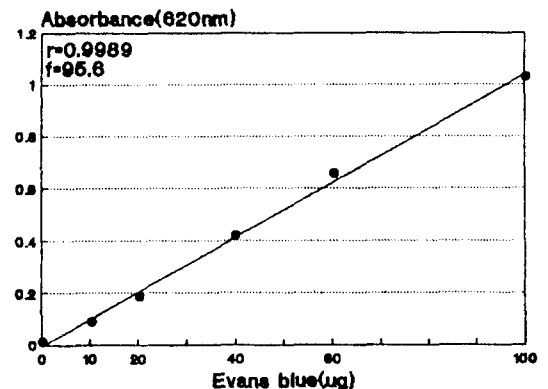


Fig. 2—The calibration curve of evans blue in rats.

생약으로 사용하였다. 또한 hyaluronidase 활성과 알레르기 반응과의 관계를 검토하기 위해 hyaluronidase 활성 억제작용이 없는 행인과 맥문동을 선택하여 동일한 실험에 사용하였다.

**생쥐 이각에서의 Evans blue 검량선**—Fig. 1에 그 결과를 나타내었으며, 상관계수  $r=0.9997$ 로 Evans blue 양과 흡광도 사이에 양호한 상관성을 보였다. 이 검량선으로부터 흡광도=1에 해당하는 색소량  $f=124.7 \mu\text{g}$ 을 산출하였고, 이후 실험의 생쥐 이각에서 색소 누출량은 흡광도×124.7로 계산하였다.

**흰쥐 등피부에서의 Evans blue 검량선**—Fig. 2에 그 결과를 나타내었으며, 상관계수  $r=0.9989$ 로 Evans blue 양과 흡광도 사이에 양호한 상관성을 보였다. 이 검량선으로부터  $f=96.6 \mu\text{g}$ 을 산출하였고, 이후 실험의 흰쥐 등피부에서의 색소 누출량은 흡광도×96.5로 계산하였다.

생쥐 이각에서 48-hr PCA와 histamine 및 seroto-

**Table II**—The effect of ketotifen and some medicinal plants on the 48-hr PCA in mouse ear

Drug	Dose (mg/kg)	N	Amount of dye ( $\mu\text{g/a pair of ears}$ )	Inhibition (%)
Control		8	12.6 $\pm$ 0.92	
Ketotifen	1	5	6.0 $\pm$ 0.60***	52.2
	10	5	3.4 $\pm$ 0.49***	73.0
Amomi Semen	50	4	9.7 $\pm$ 0.96*	22.8
	100	6	8.1 $\pm$ 0.88**	35.3
	200	6	5.1 $\pm$ 0.54***	59.4
Asiasari Radix	100	4	11.0 $\pm$ 2.00	12.2
	200	5	3.8 $\pm$ 0.39***	70.1
Cimicifugae Rhizoma	50	4	8.5 $\pm$ 0.86*	32.1
	100	7	6.0 $\pm$ 0.50***	52.0
	200	5	3.5 $\pm$ 0.47***	72.3
Cinnamomi Ramulus	100	5	9.2 $\pm$ 0.76*	26.7
	200	5	8.1 $\pm$ 0.36**	35.7
Glycyrrhizae Radix	100	5	10.7 $\pm$ 1.06	14.6
	200	5	6.6 $\pm$ 0.70***	47.5
Scutellariae Radix	200	5	11.0 $\pm$ 0.94	12.4
Armeniaca Semen	200	5	17.8 $\pm$ 1.78	-41.4
Liriopis Tuber	200	4	16.0 $\pm$ 1.63	-27.6

Each drug was administered intraperitoneally 1 hour prior to challenge with antigen.

Each amount of dye represents the mean $\pm$ S.E.

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

nin에 의한 혈관투과성 항진—생쥐 이각에서 48-hr PCA는 50 mg/kg의 사인 및 승마에 의해서, 100 mg/kg의 사인, 승마 및 계지에 의해서, 그리고 200 mg/kg의 사인, 승마, 계지, 세신 및 감초에 의해서 유의성있게 억제되었다. histamine에 의한 혈관투과성 항진은 50 mg/kg의 사인과, 100 mg/kg의 사인, 승마 및 계지에 의해서, 그리고 200 mg/kg의 사인, 승마, 계지 및 황금에 의해서 유의성있게 억제되었다. Serotonin에 의한 혈관투과성 항진은 25 mg/kg의 사인 및 승마와, 50 mg/kg의 사인, 승마, 감초 및 계지에 의해서 유의성있게 억제되었다. 비교약물로 사용한 ketotifen은 1 및 10 mg/kg에서 48-hr PCA와 histamine에 의한 혈관투과성 항진을 억제하였으며, 5 및 10 mg/kg에서 serotonin에 의한 혈관투과성 항진을 유의성있게 억제하였다. 또한 hyaluronidase 억제작용이 없는 행인과 맥문동은 48-hr PCA나 histamine 및 serotonin에 의한 혈관투과성 항진을 억제하지

**Table III**—The effect of ketotifen and some medicinal plants on the increase of vascular permeability induced by histamine in mouse ear

Drug	Dose (mg/kg)	N	Amount of dye ( $\mu\text{g/a pair of ears}$ )	Inhibition (%)
Control		8	10.7 $\pm$ 0.72	
Ketotifen	1	4	3.3 $\pm$ 0.63***	68.9
	10	4	3.3 $\pm$ 0.82***	69.1
Amomi Semen	50	5	7.8 $\pm$ 0.45**	27.0
	100	5	4.7 $\pm$ 0.41***	56.2
	200	5	3.2 $\pm$ 0.35***	70.5
Asiasari Radix	100	4	11.6 $\pm$ 0.85	-8.4
	200	4	8.3 $\pm$ 0.70	17.3
Cimicifugae Rhizoma	50	5	9.4 $\pm$ 0.73	12.5
	100	5	5.6 $\pm$ 0.40***	45.2
	200	5	3.3 $\pm$ 0.65***	68.9
Cinnamomi Ramulus	50	5	9.3 $\pm$ 0.75	12.8
	100	5	6.9 $\pm$ 0.66**	35.0
Glycyrrhizae Radix	200	5	5.9 $\pm$ 0.90**	44.6
	200	3	10.1 $\pm$ 0.06	5.5
Scutellariae Radix	100	4	11.5 $\pm$ 0.87	-7.6
	200	5	7.5 $\pm$ 0.67**	29.4
Armeniaca Semen	200	4	9.5 $\pm$ 0.59	11.2
Liriopis Tuber	200	4	10.9 $\pm$ 0.51	-2.0

Each drug was administered intraperitoneally 1 hour prior to challenge with histamine( $5 \times 10^{-5}$ g/ml).

Each amount of dye represents the mean $\pm$ S.E..

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

못하였다. 피검생약의 효과를 Table II, III, IV에 나타낸다.

흰쥐 등피부에서 histamine, serotonin 및 compound 48/80에 의한 혈관투과성 항진—흰쥐 등피부에서 histamine에 의한 혈관투과성 항진은 100 mg/kg의 사인, 승마 및 황금에 의해서, 그리고 200 mg/kg의 사인, 승마, 황금, 세신 및 계지에 의해서 유의성있게 억제되었다. Serotonin에 의한 혈관투과성 항진은 200 mg/kg의 사인, 승마, 세신, 황금 및 행인에 의해서 유의성있게 억제되었다. Compound 48/80에 의한 혈관투과성 항진은 100 mg/kg의 승마에 의해서, 그리고 200 mg/kg의 사인, 승마, 세신, 계지, 감초 및 황금에 의해서 유의성있게 억제되었다. Ketotifen은 1 및 10 mg/kg에서 histamine, serotonin 및 compound 48/80에 의한 혈관투과성 항진을 현저하게 억제하였다. 실험결과를 Table V, VI, VII에 나타낸다.

**Table IV**—The effect of ketotifen and some medicinal plants on the increase of vascular permeability induced by serotonin in mouse ear

Drug	Dose (mg/kg)	N	Amount of dye ( $\mu\text{g/a pair of ears}$ )	Inhibition (%)
Control		8	12.9 $\pm$ 0.83	
Ketotifen	1	5	11.7 $\pm$ 0.9	9.5
	5	4	9.2 $\pm$ 1.13*	28.9
	10	5	8.0 $\pm$ 1.01**	38.1
Amomi Semen	25	4	9.0 $\pm$ 0.79*	30.7
	50	5	6.8 $\pm$ 0.99***	47.2
	100	4	7.1 $\pm$ 0.52***	45.1
	200	4	7.1 $\pm$ 0.86***	44.8
Asiasari Radix	400	5	6.4 $\pm$ 0.86***	50.9
	100	5	10.4 $\pm$ 0.93*	19.3
	200	5	7.5 $\pm$ 0.59***	42.4
Cimicifugae Rhizoma	400	4	6.3 $\pm$ 0.62***	51.3
	25	4	8.0 $\pm$ 0.78**	37.9
	50	5	7.7 $\pm$ 0.94**	40.3
Cinnamomi Ramulus	100	5	6.2 $\pm$ 0.54***	52.5
	200	4	4.6 $\pm$ 0.46***	64.3
	400	5	4.6 $\pm$ 0.95***	64.4
	25	4	12.0 $\pm$ 1.38	7.3
Glycyrrhizae Radix	50	4	10.1 $\pm$ 0.60*	21.8
	100	5	9.0 $\pm$ 0.73***	30.1
	200	6	6.1 $\pm$ 0.69***	53.3
	400	5	6.0 $\pm$ 0.97***	53.6
Scutellariae Radix	25	4	11.0 $\pm$ 1.32	14.7
	50	4	10.4 $\pm$ 0.40*	19.6
	100	5	9.7 $\pm$ 0.69*	25.1
	200	6	8.9 $\pm$ 0.54**	31.5
Armeniacae Semen	400	4	9.2 $\pm$ 0.79**	29.2
	200	4	12.5 $\pm$ 1.39	3.4
Liriopis Tuber	400	5	12.3 $\pm$ 1.27**	5.2
	200	4	9.4 $\pm$ 0.97	27.4
		200	12.7 $\pm$ 1.47	1.6

Each drug was administered intraperitoneally 1 hour prior to challenge with serotonin ( $5 \times 10^{-6}$  g/ml).

Each amount of dye represents the mean  $\pm$  S.E..

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

## 고찰

Hyaluronidase(hydase)는 hyaluronic acid형의 mucopolysaccharide를 가수분해하는 효소로 결합조직에 투과성을 증가시킴으로서 임상적으로 피하주입 약물의 확산과 흡수를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. Hydase는 처음으로 미생물에서 단리되었으며<sup>29)</sup>

**Table V**—The effect of ketotifen and some medicinal plants on the increase of vascular permeability induced by histamine in rat dorsal skin

Drug	Dose (mg/kg)	N	Amount of dye ( $\mu\text{g/a spot}$ )	Inhibition (%)
Control		12	22.2 $\pm$ 0.90	
Ketotifen	1	3	5.5 $\pm$ 0.97***	74.4
	10	4	1.8 $\pm$ 0.21***	91.9
Amomi Semen	50	5	17.5 $\pm$ 3.21	20.6
	100	5	16.1 $\pm$ 1.63**	25.0
	200	5	9.3 $\pm$ 0.74***	58.0
Asiasari Radix	100	4	22.8 $\pm$ 1.70	-6.1
	200	5	9.2 $\pm$ 0.81***	58.5
Cimicifugae Rhizoma	50	4	19.4 $\pm$ 1.95	12.2
	100	5	18.4 $\pm$ 0.67*	14.6
	200	5	11.6 $\pm$ 1.04***	47.8
Cinnamomi Ramulus	200	5	15.5 $\pm$ 1.07***	29.6
Glycyrrhizae Radix	200	5	18.9 $\pm$ 1.39	14.5
Scutellariae Radix	50	5	18.1 $\pm$ 2.42	18.1
	100	5	14.8 $\pm$ 1.26***	40.5
	200	4	13.9 $\pm$ 1.37***	37.0
	200	4	21.0 $\pm$ 3.17	2.1
Liriopis Tuber	200	4	19.5 $\pm$ 2.99	9.3

Each drug was administered intraperitoneally 1 hour prior to challenge with histamine ( $5 \times 10^{-5}$  g/ml).

Each amount of dye represents the mean  $\pm$  S.E..

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

지금은 포유류의 고환에서 얻는다. 고환에서 얻은 hydase는 뱀독, 벌독, 많은 동물조직 및 사람 혈청 등으로부터 얻은 hydase와 유사한 성질을 가지며, 조직에 있는 hydase는 아마도 대부분이 lysosomes으로부터 유래한다고 알려져 있다.<sup>30,31)</sup>

항알레르기 작용의 본실험에 앞서 시험관내 스크리닝 시험을 함으로서 일차적으로 항알레르기 효과가 예상되는 약물을 선정할 수 있다. 스크리닝에 사용된 효소는 hydase이다. 이 효소의 기질인 hyaluronic acid는 비만세포에서 histamine과 같은 정도로 유리되며, 이 효소는 모세혈관 투과성 향진에 관여하고 있다고 보고되었으며<sup>32,33)</sup> 또한 trypsin 등의 protease와 같은 기염성 효소로서도 알려져 있다.<sup>34)</sup> Kakegawa 등은<sup>19)</sup> hydase를 이용한 시험관내 항알레르기 약물의 스크리닝을 위한 기초연구 결과를 발표하였는데,  $\text{CaCl}_2$ 나 compound 48/80에 의해 활성화된 hydase는 항알레르기약인 DSCG나 tranilast에 의해

**Table VI**—The effect of ketotifen and some medicinal plants on the increase of vascular permeability induced by serotonin in rat dorsal skin

Drug	Dose (mg/kg)	N	Amount of dye (μg/a spot)	Inhibition (%)
Control		10	23.1±1.70	
Ketotifen	1	3	9.6±1.21**	58.4
	10	4	7.6±1.15***	67.0
Amomi Semen	100	5	22.4±1.57	3.4
	200	4	11.2±1.69**	51.4
Asiasari Radix	100	4	28.5±3.49	-23.1
	200	4	12.5±0.82**	46.0
Cimicifugae Rhizoma	100	5	21.9±0.66	5.5
	200	5	12.9±1.12**	44.2
Cinnamomi Ramulus	200	5	19.5±1.71	15.7
Glycyrrhizae Radix	200	5	19.8±1.42	14.2
Scutellariae Radix	100	5	25.4±2.06	-9.9
	200	5	15.4±2.38*	33.4
Armeniacae Semen	200	5	16.4±3.04*	29.0
Liriopsis Tuber	200	4	19.3±1.09	16.6

Each drug was administered intraperitoneally 1 hour prior to challenge with serotonin ( $10^{-6}$ g/ml).

Each amount of dye represents the mean±S.E..

\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$

억제되었다. 또한 Kakegawa 등은<sup>35)</sup> 탄닌류(tannins) 등이 불활성 hydase활성을 억제하며 흰쥐 장간막 비만세포의 탈과립을 강력하게 억제함을 밝혀 항알레르기 활성을 시사하였다. Sakamoto 등은<sup>36)</sup> hydase 활성이 PCA시 증가되며, DSCG나 baicalein-6-phosphate에 의해 모세혈관 투과성 항진과 hydase 활성의 증가도 억제된다고 보고하여 I형 알레르기 반응에서 모세혈관 투과성 항진에는 이 효소가 중요한 역할을 할 것이라고 시사하였다.

스트리닝 시험으로 사용된 시험관내 hydase 활성 저해효과는 생약 물엑스 11종 중 감초, 계지, 사인, 승마, 세신 및 황금의 수용액에서 현저히 나타났다. 따라서 hydase 저해효과가 큰 이 6가지 생약을 동물실험에 피검생약으로 사용하였다. 또한 hydase 활성과 알레르기 반응과의 관계를 검토하기 위하여 이 효소 활성에 대한 저해 효과가 없는 행인 및 맥문동을 선정하여 동일한 실험에 사용하였다.

항알레르기 작용에 관한 실험모델 중 대표적인 것이 PCA이다. PCA 실험은 국소 아나필라시스이지만 전신

**Table VII**—The effect of ketotifen and some medicinal plants on the increase of vascular permeability induced by compound 48/80 in rat dorsal skin

Drug	Dose (mg/kg)	N	Amount of dye (μg/a spot)	Inhibition (%)
Control		10	40.9±2.57	
Ketotifen	1	3	13.5±0.43***	66.9
	10	4	8.7±1.95***	78.6
Amomi Semen	100	4	40.9±1.12	0.0
	200	4	14.2±0.75***	65.2
Asiasari Radix	100	4	42.4±5.70	3.8
	200	5	16.0±1.38***	60.8
Cimicifugae Rhizoma	50	4	41.0±3.36	-0.3
	100	5	29.5±1.72*	27.8
	200	4	24.5±2.09**	40.1
Cinnamomi Ramulus	200	5	29.2±0.73*	28.7
Glycyrrhizae Radix	200	5	26.8±2.00**	34.5
	100	5	43.3±3.17	-5.8
Scutellariae Radix	200	4	23.2±0.69**	43.3
	200	4	36.2±2.69	11.4
Armeniacae Semen	200	4	35.3±2.41	13.5

Each drug was administered intraperitoneally 1 hour prior to challenge with compound 48/80 ( $5 \times 10^{-6}$ g/ml).

Each amount of dye represents the mean±S.E..

\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$

아나필라시스와 특징이 일치하며 전신 아나필라시스 보다 정량하기 쉬운 장점을 가지고 있어서<sup>37)</sup> 화학적 전달물질의 유리억제 연구에 사용되는 중요한 in vivo 실험이다. 생쥐 양 이각에서 PCA에 의한 모세혈관 투과성 항진은 사인과 승마의 50 mg/kg의 복강내 투여에 의하여 억제되었고, 100-mg/kg에서는 사인, 승마 및 계지에서 억제되었으며, 200 mg/kg에서는 사인, 승마, 세신, 계지 및 감초에서 억제되었다. 비교약물로 사용된 ketotifen은 생쥐 이각의 PCA를 1 및 10 mg/kg에서 현저히 억제하였다. 생쥐에서는 사인과 승마가 비교적 소량에서도 PCA를 유의성있게 억제하는 것으로 보아 항알레르기 작용이 시사된다.

알레르기 반응에서 비만세포 탈과립 후 화학적 전달물질로 작용하는 histamine과 serotonin의 혈관투과성 항진에 관한 각 생약의 저해효과를 생쥐의 이각과 흰쥐 등피부에서 실험하였다. 또한 비만세포로부터 화학적 전달물질을 유리하는 것으로 알려진 compound 48/80의 혈관투과성 항진에 관한 생약의

효과를 rat 등피부에서 실험하였다. 생쥐 양 이각에서 histamine에 의한 혈관투과성 항진은 사인에서 50 mg/kg으로 억제되었고, 100 mg/kg에서는 사인, 승마 및 계지에서 억제되었으며, 200 mg/kg에서는 사인, 승마, 계지 및 황금에서 억제되었다. Ketotifen도 histamine 반응을 현저히 억제하였다. 생쥐 이각에서 serotonin에 의한 혈관투과성 항진은 25 mg/kg의 사인 및 승마에서 억제되었고, 50 mg/kg으로는 사인, 승마, 계지 및 감초에서 억제되었으며, 100, 200 및 400 mg/kg에서는 사인, 승마, 세신, 계지 및 감초에서 억제되었다. Ketotifen은 5 및 10 mg/kg에서 serotonin 반응을 억제하였다. 생쥐 이각에서 histamine과 serotonin에 의한 모세혈관 투과성 항진 억제작용은 PCA와 마찬가지로 사인 및 승마에서 소량에서도 현저한 점으로 보아 항알레르기 작용이 시사된다. 흰쥐 등피부에서 histamine에 의한 모세혈관 투과성 항진은 100 mg/kg의 사인, 승마 및 황금에 의해 억제되었고, 200 mg/kg에서는 사인, 승마, 세신, 계지 및 황금에 의해 억제되었다. Serotonin에 의한 모세혈관 투과성 항진은 200 mg/kg의 사인, 승마, 세신, 황금 및 행인으로 억제되었으며, hyaluronidase 활성을 저해하지 못한 행인도 억제하였음은 의외이며 앞으로 좀더 검토해볼 일이다. Compound 48/80의 histamine 유리에 의한 모세혈관 투과성 항진은 200 mg/kg에서 사인, 승마, 세신, 계지, 감초 및 황금에서 억제 작용이 나타났다.

한방에서 사인은 방향성 건위약 및 정장약으로 사용되고 있으나, 물엑스는 guinea pig 적출 회장을 이완시키고 항histamine 작용이 있음이 보고되어<sup>38)</sup> 있다. 승마는 발한 해열 및 해독약으로서 구내염, 편도선염, 치질 및 류마티스 등에 쓰이고 있으며, 물엑스는 부종 억제작용과 항분부 케양을 축소시킴이 알려져 있다.<sup>17)</sup>

이상의 성적으로 보아 hyaluronidase 활성 억제는 알레르기 반응의 혈관투과성 항진 억제와 밀접한 관련이 있으며, 특히 사인 및 승마는 항알레르기 작용이 있음을 시사한다.

## 결 론

### 1. 항알레르기 작용의 시험관내 스크리닝 시험으로

사용된 hyaluronidase 활성은 감초, 계지, 사인, 승마, 세신 및 황금의 50, 10 및 5 mg/ml 수용액에 의해서 현저하게 억제되었으며, 이들 생약중 감초 및 황금은 1 mg/kg에서도 유의성있는 저해효과를 나타내었다.

### 2. 생쥐 이각에서

1) 48-hr PCA는 50 mg/kg의 사인 및 승마에 의해서, 100 mg/kg의 사인, 승마 및 계지에 의해서, 그리고 200 mg/kg의 사인, 승마, 세신, 감초 및 계지에 의해서 유의성있게 억제되었다. 비교약물로 사용한 ketotifen은 1 및 10 mg/kg에서 현저하게 억제하였다.

2) Histamine에 의한 혈관투과성 항진은 50 mg/kg의 사인과, 100 mg/kg의 사인, 승마 및 계지에 의해서, 그리고 200 mg/kg의 사인, 승마, 계지 및 황금에 의해서 유의성있게 억제되었다. 1 및 10 mg/kg의 ketotifen에 의해서도 현저하게 억제되었다.

3) Serotonin에 의한 혈관투과성 항진은 25 mg/kg의 사인 및 승마에 의해서, 50 mg/kg의 사인, 승마, 계지 및 감초에 의해서, 그리고 200 mg/kg의 사인, 승마, 세신, 계지 및 감초에 의해서 유의성있게 억제되었다. 5 및 10 mg/kg의 ketotifen에 의해서도 현저하게 억제되었다.

### 3. 흰쥐 등피부에서

1) Histamine에 의한 혈관투과성 항진은 100 mg/kg의 사인, 승마 및 황금에 의해서, 그리고 200 mg/kg의 사인, 승마, 황금, 세신 및 계지에 의해서 유의성있게 억제되었다.

2) Serotonin에 의한 혈관투과성 항진은 200 mg/kg의 사인, 승마, 세신, 황금 및 행인에 의해서 유의성있게 억제되었다.

3) Compound 48/80에 의한 혈관투과성 항진은 100 mg/kg의 승마에 의해서, 그리고 200 mg/kg의 사인, 승마, 세신, 계지, 감초 및 황금에 의해서 유의성있게 억제되었다. Histamine, serotonin 및 compound 48/80에 의한 혈관투과성 항진은 1 및 10 mg/kg의 ketotifen에 의해서 유의성있게 억제되었다.

이상의 결과로 보아 실험결과들은 hyaluronidase 저해작용과 항알레르기 작용은 밀접한 상관성이 있음을 시사하며, 실험에 사용한 11가지 생약의 물엑스 중 특히 사인과 승마에서 항알레르기 작용이 있음을 제시한다.



### 감사의 글

본 연구는 1990년도 문교부 지원 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비로 수행된 것으로 동 재단에 깊은 감사를 드린다.

### 문 헌

- 1) Coomb, R.R.A. and Gell, P.G.H.: Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical Aspects of Immunology*, 3rd ed., Blackwell Sci. Pub., Oxford, pp.761-781 (1975).
- 2) 江田昭英, 稻垣直樹: 抗アレルギー薬. 臨床免疫, **17**, 228-238 (1985).
- 3) Ishizaka, T., Soto, C.S. and Ishizaka, K.: Mechanisms of passive sensitization-III. Number of IgE molecules and their receptor sites on human basophil granulocytes. *J. Immunol.*, **III**, 500-511 (1973).
- 4) Segal, D.M., Taugog, J.D. and Metzger, H.: Dimeric IgE serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **74**, 2993-2997 (1977).
- 5) Ishizaka, T.: Biochemical analysis of triggering signals induced by bridging of IgE receptors. *Fed. Proc.*, **14**, 17-21 (1982).
- 6) Samuelsson, B.: Leukotrienes-Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, **220**, 568-575 (1983).
- 7) MCox, J.S.G.: Disodium cromoglycate-A specific inhibitor of reaginic antibody-antigen mechanisms. *Nature*, **216**, 1328-1329 (1967).
- 8) Koda, A., Nagai, H. and watanabe, S., Yanagihara, Y., and Sakamoto, K.: Inhibition of hypersensitivity reaction by a new drug, N(3', 4'-dimethoxycinnamoyl)anthranilic acid(N-5'). *J. Allergy Clin. Immunol.*, **57**, 396-407 (1976).
- 9) Martin, U. and Baggiolini, M.: Dissociation between the antianaphylactic and anti-histaminic actions of ketotifen. *Arch. Pharmacol.*, **316**, 186-189 (1981).
- 10) Awouters, F. and Niemegeers, C.J.E.: Oxatomide, a new orally active drug which inhibits both the release and the effects of allergic mediators. *Experientia*, **33**, 1657-1659 (1977).
- 11) Katayama, S., Akimoto, N., Shionoya, H., Morimoto, T. and Katoh, Y.: Antiallergic effect of azelastine hydrochloride on immediate hypersensitivity reactions in vivo and vitro. *Arzneim.-Forschl. Drug Res.*, **31**, 1197-1203 (1981).
- 12) Morinaka, Y., Takahashi, K. and Hata, S.: Antiallergic agents- I. Pyranoquinoline derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **16**, 251-256 (1981).
- 13) Nobara, A. et al.: Studies on antianaphylactic agents-7. Synthesis of antiallergic 5-oxo-5H-benzopyrano [2, 3-b] pyridines. *J. Med. Chem.*, **28**, 559-567 (1985).
- 14) Tasaka, K.: Antiallergic drugs. *Drugs of Today*, **22**, 101-133 (1986).
- 15) 江田昭英, 西依建, 英井傳式, 松浦直資, 土星傳司: 和漢藥の抗アレルギー作用. 日藥理誌, **80**, 31-41 (1982).
- 16) 許浚: 東醫寶鑑, 東醫寶鑑國譯委員會譯編, 375-378, 705-708 (1976).
- 17) 韓大錫外: 生藥學, 東明社, 110, 116, 147, 165, 190, 191, 211, 235, 281, 296, 324 (1989).
- 18) Sakamoto, K., Nagai, H. and Koda, A.: Role of hyaluronidase in immediate hypersensitivity reaction. *Immunopharmacology*, **2**, 139-146 (1980).
- 19) Kakegawa, H., Matsumoto, H. and Satoh, H.: Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and Inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 642-646 (1985).
- 20) Prousnitz, C. and Küstner, H.: Studium über die Ueberempfindlichkeit. *Zentralbl. Bacteriol.*, **86**, 160-169 (1921).
- 21) Ovary, Z.: Immediate reaction in the skin of experimental animals provoked antibody-antigen interactions. *Progr. Allergy*, **5**, 459-508 (1958).
- 22) Ovary, Z.: Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *J. Immunol.*, **81**, 355-357 (1958).
- 23) Lagunnoff, D., Martin, T.W. and Read, G.: Agents that release histamine from mast cells. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 331 (1983).
- 24) 류재진, 박중세, 송윤선, 한국과학기술연구원 도평컨트롤센터: 항알러지 및 항염증 작용의 시험관내 1차 스크리닝법. 한국 생화학회 (1990).

- 25) Inagaki, N., Tsuruoka, N., Goto, S., Matsuyama, T., Daikoku, M., Nagai, H. and Koda, A.: Immuno-globulin E antibody production against house dust mite, *Dermatophagoides Farinae* in mice. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 958-963 (1985).
- 26) Strejan, G. and Campbell, D.H.: Hypersensitivity to ascaris antigens-I. Skin-sensitizing activity of serum fractions from guinea pig sensitized to crude extracts. *J. Immunol.*, **98**, 893-900 (1967).
- 27) Katayama, S., Shionoya, H. and Ohtake, S.: A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.*, **22**(2), 89-101 (1978).
- 28) Inagaki, N., Miura, T., Nagai, H., Ono, Y. and Koda, A.: Inhibition of vascular permeability increase in mice-An additional anti-allergic mechanism of glucocorticoids. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **87**, 254-259 (1988).
- 29) Meyer, K., Dubos, R. and Smyth, E.M.: The Hydrolysis of the polysaccharide acids of vitreous humor of umbilical cord, and of *Streptococcus* by the autolytic enzyme of *Pneumococcus*. *J. Biol. Chem.*, **118**, 71 (1937).
- 30) Aronsonja, N.N. and Davidson, E.A.: Lysosomal hyaluronidase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **242**, 437-440 (1967).
- 31) Vaes, G.: Hyaluronidase activity in lysosomes of bone tissue. *J. Biochem.*, **103**, 802-804 (1967).
- 32) Asboe-Hansen, G.: The origin synovial mucin (Ehrlich's mast cell)-A secretory element of the connective tissue. *Ann. Rheum. Dis.*, **9**, 149 (1950).
- 33) Asboe-Hansen, G. and Weglius, O.: Histamine and mast cells (Studies on living connective tissue in the hamstar cheek pouch). *Acta. Physil. Scand.*, **37**, 350 (1956).
- 34) 炎症と抗炎症療法, 醫齒藥出版, 東京, p.411 (1982).
- 35) Kakegawa, H., Matsumoto, H., Endo, K., Satoh, T., Nonaka, G. and Ishizaka, I.: Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5079-5082 (1985).
- 36) Sakamoto, K., Nagai, H. and Koda, A.: Role of hyaluronidase in immediate hypersensitivity reaction. *Immunopharmacol.*, **2**, 139-146 (1980).
- 37) Ovary, Z.: *Passive Cutaneous Anaphylaxis in Immunological Methods*. ed. by Ackroyd, Oxford Bla. Sci. Pub., p.259 (1964).
- 38) Itokawa, H., Mihashi, S., Watanabe, K., Matsumoto, H. and Hamanaka, T.: Studies on the constituents of crude drugs having inhibitory activity against contraction of the ileum caused by histamine or barium chloride-(1) Screening test for the activity of commercially available crude drugs and related plant materials. *Shoyakugaku Zasshi*, Japan, **37**, 223-228 (1983).