약학회지 제42권 제 2 호 132~139(1998)
Yakhak Hoeji Vol. 42, No. 2

천연물로부터 항암면역증강물질 탐색연구

송지영* · 양현옥** · 표석능*** · 박신영* · 김기환* · 손은화*** · 강남성*** · 윤연숙**#
*한국원자력연구소, **서울병원 아산생명과학연구소, ***성균관대학교 약학대학

(Received December 15, 1997)

Screening of Antineoplastic Immunomodulator from Herbal Medicines

Jie-Young Song*, Hyun-Ok Yang**, Suhk-Neung Pyo***, Sin-Young Park*, Ki-Hwan Kim*, Eun-Hwa Son***, Nam-Sung Kang*** and Yeon-Sook Yun**#

**Laboratory of Immunology, Korea cancer center Hospital KAERI, Seoul 139-240, Korea*
***Department of Traditional Medicines, Asan Medical Center, Seoul 138-040, Korea*
****College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Seoul 440-746, Korea*

Abstract—Currently, cancer is the primary cause of death and 50% of cancer patients are incurable by surgery, radiotherapy and chemotherapy. Therefore, immunotherpy is interested as the fourth remedy. Biological response modifier (BRM), such as organometallic compounds, glycoproteins, polysaccharides and other natural products, is the one which can enhance the immune response against cancer cell. To develop new BRM from natural sources, we investigated 63 species Korean traditional medicines by observing the mitogenic activity to splenocytes, generation of activated killer cells and activation of macrophages. Finally, we selected 9 species including Angelicae gigantis Radix, Mori Cortex Radicis, Arisaematis Tuber, Salviae Radix, Cnidii Rhizoma, Ligusti Fructus, Pasoraliae Semen, Loranthi Ramulus, Ginseng Radix. Bioassay-guided fractionation and purification is undergoing.

Keywords □ Plant extract, antitumor immunostimulator, mitogenic activity, LAK cell, macrophage.

현재 암치료법에는 외과적수술요법, 화학요법, 방사선요법이 주종을 이루나 전이암 및 재발암에 대한 치료는 대부분 불가능한 상태이다. 이러한 상황에서 암에 대한 면역요법의 중요성이 강조되고 있으며 암에 대한 면역요법은 암세포표면에 있는 종양특이항원을 인지한 T세포를 이용하는 방법과 여러종류의 암세포에 공통으로 존재하는 종양공통 표지자를 인지하여 암세포를 비특이적으로 살해하는 NK세포(natural killer cell), LAK세포(lymphokine activated killer cell), 대식세포를 이용하는 방법이 있다. 비특이적 암세포 살해면역세포는 IL-2, IL-12, INFγ 등과 같은 싸이토카인에 의해 활성화되는 것으로 알려져 이들 유전자재조합 싸이토카인을 이용한 항암면역요법연구가 활발히 진행되고 있다.[1-6] 그러나 유전자재조합 싸이토카인은 생체내 독성이 심하고 반감기가 매우 짧아 이에 따른 부작용이 심하여 이용에 한계가 있으며, 더욱이 이들 싸이토카인은 서로 상승적으로 작용하므로[7-14] 독성이 적은 물질로서 생체내에서 여러종류의 항암성 싸이토카인을 지속적으로 생성시킬수 있는 물질이 발굴된다면 암의 예방 및 치료에 크게 기여할 것으로 기대된다. 외국에서 현재 발굴된 대표적인 비특이적 항암면역 증강제로는 미생물의 건조균사체인 BCG,[15] OK-432,[16] Corynebacterium parvum,[17] 미생물의 세포벽성분인 MDP,[18] 합성화합물인 polyinosinic cytidic acid(POLY I.C),[19] AS101,[20] 흉선성분인 thymosin,[21] 버섯의 다당체인

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-970-1309 (팩스) 02-975-3231

lentinan,[22] 알칼로이드인 swainsonine,[23] flavonoid[24]가 연구, 이용중이다. 또한 암환자에 대한 화학요법 및 방사선요법시 조혈세포의 사멸에 의한 부작용이 심하여 항암제 및 방사선의 용량을 높이는데 제한이 되고 있다. 현재 조혈세포의 재생을 위하여는 GM-CSF (granulocyte monocyte colony stimulating factor)가 사용되고 있으나 혈구중 과립구 및 단핵구수만 편파적으로 증가시키고 임파구 및 혈소판에 대한 재생효과가 결여되고 있으므로 모든 종류의 혈구세포를 균형있게 증식시킬 수 있는 약제가 요구되고 있다. 또한, 대식세포는 세포성 면역에서 virus가 감염된 세포를 사멸하거나 감염된 세포내에서 virus의 복제를 억제함으로써 virus감염에 대한 중요한 역할을 하며,[25-27] 다양한 물질에 의해 생체내 투여시 virus에 대한 저항성을 증가시킨다고 보고되었다.[28-32] 또한 암의 자발적인 퇴보가 활성화된 대식세포의 존재에 기인된다는 보고도 있어[33] 대식세포의 활성화 경로와 작용기전에 대한 연구가 활발하다. 따라서 본 연구에서는 민간 및 동의보감에서 암치료 및 조혈목적으로 사용되어온 63종의 생약을 대상으로 LAK세포생성실험, 대식세포의 암세포 살해능 유도실험, 조혈세포 증식실험을 통해 항암성조혈면역증강작용을 검색하였다.

재료 및 방법

생약 조제

민간 및 동의보감에서 암치료 및 조혈목적으로 사용되어온 생약 63종을 경동시장에서 구매하였으며 1차 검색용 시료는 처음부터 상온에서 물로 추출하여 냉동건조한 후 사용하였다.

실험동물

미국 국립암연구소에서 비근교계인 N : GP(S)생쥐를 분양받아 원자력병원 실험관리실에서 사육한 생쥐를 사용하였으며 CD-1생쥐는 Charles River Breeding Laboratory에서 구입하였다. 동물은 실험에서 사용하기 전까지 사육실의 온도는 22±2°C, 습도는 55~60%로 유지시켰으며 명암순환이 12시간 단위로 조절되게 하였고 고형사료(NIH-7-open formula)와 물을 자유로이 공급하였다.

사용배지

실험에 사용한 세포배양액은 RPMI 1640에 5% Fetal Bovine Serum, 2×10^{-2}의 HEPES buffer, 2×10^{-3}M glutamine, 1×10^{-3}M pyruvate, 100 u/m*l* penicillin과 50 μg/m*l* streptomycin, 5×10^{-5}M의 2-mercaptoethanol, 1% non-essential amino acid로 이루어져 있으며 모두 GIBCO, USA에서 구입하였다.

임파구증식능시험

6~8주령의 N : GP(S)생쥐의 비장세포를 적출하여 생약추출물이 용량별로 함유된 96well flat-bottom microplate에 1.5×10^5 cells/0.2 m*l*로 분주한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 72시간 배양하였다. ^{3}H-Thymidine을 2 μCi/well로 처리한 후 4시간 배양한 다음 세포를 수확하여 scintillation scocktail을 가해 β-counter로 cpm을 측정하여 stimulation index를 구하였다. 각 실험은 3배수로 하였고 같은 실험은 5회 이상 실시하였다.

$$\text{Stimulation index (S.I.)} = \frac{^3\text{H-thymidine incorporation(cpm) of splenocytes cultured with plant extracts}}{^3\text{H-thymidine incorporation(cpm) of splenocytes cultured in medium control}}$$

LAK세포 활성능 측정

7주령의 N:GP(S)생쥐 비장세포를 적출하여 생약 물추출물이 용량별로 함유된 24well plate에 3×10^6 cells/2 m*l*로 분주하여 5일간 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양 후 임파구를 꺼내어 세척한 후 5×10^6 cells/m*l*로 하였으며 암세포살해능을 ^{51}Cr-release법으로 측정하였다. 표적세포인 Yac-1를 방사선 동위원소인 Na_2CrO_4를 200 μCi를 가하여 37°C에서 45분간 배양한 다음 배지로 3회 세척하였으며 5×10^4 cells/m*l*로 농도를 맞춘 후 이미 준비해 놓은 작동세포와 표적세포의 비율을 100:1, 30:1, 10:1로 하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 4시간 배양하였다. 배양 2,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 0.1 m*l*씩 취해 γ-counter로 상층액에 유리된 ^{51}Cr의 γ선을 측정하였다. 각 실험은 2배수로 하였고 같은 실험을 3회 이상 실시하였다. 다음의 식에 의해 cytotoxicity(%)를 산출하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{ER} - \text{SR}}{\text{MR} - \text{SR}} \times 100$$

* ER : mean count from the experimental group (cpm)
SR : mean count from target cells incubated in media alone (cpm)
MR : mean count from target cells treated with 5% Triton X-100 (cpm)

대식세포의 항바이러스 활성 및 암세포살해능 측정

대식세포의 분리 – CD-1(4-6 주) 생쥐의 복강내에 1 ml의 4.05% thioglycollate(Difco Lab. Detroit, MI)를 주사하고 3일 후에 RPMI 1640 배양액으로 복강을 세척하여 복강세포를 수확한 후 두번 세척하고 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin(100 IU/ml)과 streptomycin(100 μg/ml)를 함유한 RPMI-1640(Gibco, Grand Island, NY, RPMI-FBS)에 부유하였다. 복강세포로부터 대식세포를 Klimetzek이 서술한 방법에 의해 분리했다.[34] 즉, 복강세포를 5~6×10^5 cells/ml 농도로 teflon-coated petri dishes에 넣고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 2~3시간 동안 부착 시켰다. 비부착 세포를 배양액으로 세척하여 제거한 후 10ml의 배양액을 넣고 4°C에서 10분 동안 배양하였다. 상층액을 제거하고 Dulbecco's phosphate buffered saline(PBS, Gibco)으로 다시 세척한후 1.5% FBS를 함유한 차가운 PBS(15 ml)와 0.3 ml의 0.1 M-EDTA(pH 7.0)를 넣은 다음 15분동안 실온에서 배양하고 10ml 주사기를 이용하여 10회 세척하여 대식세포를 제거하였다. 분리한 대식세포의 생존능은 trypan blue exclusion에 의해 결정하며, 세포의 생존능은 >95%였다.

Neutral red dye uptake 시험[35] – Virus의 Cytopathic effects(CPE)를 측정하기 위해 식물추출물로 처리하여 12시간 배양한 대식세포를 세척한 후 7 m.o.i (multiplicity of infection)의 HSV-1 KOS strain으로 대식세포를 감염시켰다. 1시간 후 비흡수된 virus는 RPMI-FBS로 2회 세척하여 제거하고 48시간 배양한 다음 0.02% neutral red dye로 염색하였다. 염색된 세포를 배양액으로 세척하고 50% ethanol을 함유한 0.2 ml의 Sorensen citrate 완충액(pH 4.1)을 사용하여 neutral red dye를 추출한 후 Molecular Device microplate reader (Menlo, CA)를 이용하여 540 nm에서 optical density(OD)를 측정하였다. Virus CPE는 Viability Index 계산에 의해 평가하였다.

$$\text{Viability Index(\%)} = \frac{\text{O.D. of virus infected cells}}{\text{O.D. of uninfected cell}} \times 100$$

암세포에 대한 대식세포의 세포독성시험

분리한 대식세포에 다양한 농도의 식물추출물을 가하고 암세포(B16)와 함께 37°C, 5% CO_2 배양기에서 48시간동안 배양한 후 25 μl의 MTT(2 mg/ml)를 가하고 다시 4시간 동안 배양하였다. Plate를 200×g에서 5분간 분리한 후 50 μl만을 남기고 상층액을 제거한 후 formazan 결정을 용해하기위해 150 μl의 DMSO를 가하고 10분간 진탕한 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 OD를 측정하고 다음의 식을 이용하여 세포독성을 계산하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = 100 - \frac{\text{O.D.(Macrophages + Tumor cells)} - \text{O.D.(Macrophages)}}{\text{O.D.(Tumor cells)}} \times 100$$

결과 및 고찰

임파구증식능이 있는 물질 탐색

생약 63종(Table I)의 물추출물을 대상으로 임파구증식능에 대한 활성을 검색한 결과는 Table II와 같다. 높은 증식능이 나타나는 것으로 관찰된 생약은 4종이었다. 활성의 정도는 S.I.로 표시하였으며 당귀의 S.I.가 95.64, 상백피 101.83, 보골지 104.78, 인삼 146.29로 나타났다. Positive control로 사용한 concanavalin A(2.5 μg/ml)의 경우 S.I.가 169.9이며lipopolysaccharide(20 μg/ml)는 76.7이었다. 상백피의 경우는 2.5 μg/ml에서부터 hemagglutinin test에서 양성반응을 보였으므로 lectin임을 알 수 있었다.

LAK세포 활성화 물질 탐색

생약 63종의 물추출물을 대상으로 LAK 세포를 활성화시키는 작용을 검색한 결과는 Table III에서 나타나는 것처럼 오가피가 12.5 μg/ml에서 75.2%의 세포독성을 보였다. 오가피의 glucan과 heteroxylan의 phagocytosis 활성증가에 대해서는 이미 보고된 바 있다.[10] 천남성, 여정실, 인삼, 상기생이 각각 43.4%, 45.9%, 46.7%, 44.7%로 비슷한 활성을 나타냈다. 생약을 처리하지 않고 작동세포와 표적세포를 배양한 대조군의 경우

Table I — List of 63 species Korean traditional medicinal plants

No.	Samples	No.	Samples
1	Acanthopanacis Cortex	33	Evodiae Fructus
2	Aconiti Tuber	34	Forsythiae Fructus
3	Agrimoniae Herba	35	Galla Rhois
4	Alpiniae officinali Rhizoma	36	Ginseng Radix Alba
5	Atractylodis Rhizoma Alba	37	Gleditsiae Spina
6	Angelicae gigantis Radix	38	Hoelen
7	Anthrisci Radix	39	Houttuyniae Herba
8	Arisaematis Tuber	40	Indigo pulverata Levis
9	Artemisiae capillari Herba	41	Ligusti Fructus
10	Asini Gelatinum	42	Lonicerae Flos
11	Asparagi Tuber	43	Loranthi Ramulus
12	Astragali Radix	44	Lycii Fructus
13	Bambusae Folium	45	Mori Cortex Radicis
14	Belamcandae Herba	46	Morindae Radix
15	Bupleuri Radix	47	Paeoniae Radix
16	Chrysanthemi Flos	48	Pasoraliae Semen
17	Cinnamomi Cortex Spissus	49	Phlomidis Radix
18	Cistanchis Herba	50	Pinelliae Tuber
19	Cnidii Rhizoma	51	Polygonati Rhizoma
20	Coicis Semen	52	Polygoni multiflori Radix
21	Coptidis Rhizoma	53	Polyporus
22	Corydalis Tuber	54	Rehmanniae Radix Crudus
23	Crataegi Fructus	55	Rubiae Radix
24	Curculiginis Rhizoma	56	Salviae Radix
25	Curcumae longae Rhizoma	57	Saussureae Radix
26	Cuscutae Semen	58	Schizandrae Fructus
27	Cynomorii Herba	59	Scutellariae Radix
28	Cyperi Rhizoma	60	Taraxaci Herba
29	Dioscoreae Rhizoma	61	Ulmi Cortex
30	Ecliptae Herba	62	Xanthii Fructus
31	Ephedrae Herba	63	Zizyphi spinosi Semen
32	Epimedii Herba		

Table II — Proliferation of murine splenocytes with total water extracts from 63 species Korean traditional medicinal plants

No.	Concentration (μg/m*l*)	S.I[a]	No.	Concentration (μg/m*l*)	S.I[a]	No.	Concentration (μg/m*l*)	S.I[a]
1	62.5	15.10	22	62.5	3.82	43	62.5	13.04
2	1000	4.70	23	500	7.28	44	62.5	2.34
3	62.5	5.80	24	500	7.08	45	250	101.83
4	62.5	4.08	25	125	17.20	46	500	5.26
5	250	11.74	26	500	23.72	47	500	7.06
6	1250	95.64	27	500	9.74	48	500	104.78
7	125	8.40	28	1000	32.56	49	250	27.02
8	2000	23.96	29	1000	12.22	50	1250	50.07
9	62.5	3.00	30	125	12.63	51	62.5	3.66
10	1000	6.48	31	250	11.20	52	500	5.14
11	500	3.78	32	31.25	4.06	53	250	7.30
12	250	7.54	33	125	14.22	54	1000	26.90
13	62.5	4.46	34	7.81	5.20	55	250	5.14
14	3.91	2.46	35	62.5	1.64	56	250	28.36
15	500	35.57	36	500	146.29	57	31.25	3.08
16	31.25	3.12	37	15.63	3.34	58	62.5	2.76
17	3.91	2.80	38	500	4.22	59	1.95	2.58
18	500	27.26	39	62.5	10.60	60	500	34.02
19	1000	19.38	40	125	3.14	61	31.25	2.26
20	1000	7.76	41	125	11.30	62	125	6.66
21	7.81	16.64	42	250	5.68	63	250	3.40

[a] Stimulation Index(S.I) $= \dfrac{{}^{3}\text{H-thymidine incorporation(CPM) of splenocytes cultured with plant extracts}}{{}^{3}\text{H-thymidine incorporation(CPM) of splenocytes cultured in medium control}}$

Table III — Generation of activated killer cells by culturing N:GP(S) mouse splenocytes with total water extracts from 63 species Korean traditional medicinal plants

No.	% Cytotoxicity (E:T=100:1)	No.	% Cytotoxicity (E:T=100:1)	No.	% Cytotoxicity (E:T=100:1)
1	75.2(12.5)*	22	2.4(12.5)	43	44.7(12.5)
2	4.6(200)	23	9.3(50)	44	1.9(12.5)
3	0.3(50)	24	4.5(200)	45	8.3(12.5)
4	3.8(25)	25	3.4(12.5)	46	11.3(50)
5	24.7(200)	26	2.4(200)	47	2.9(50)
6	30.3(50)	27	1.5(200)	48	10.6(50)
7	1.8(50)	28	24.1(12.5)	49	2.0(12.5)
8	43.4(200)	29	6.7(200)	50	5.3(12.5)
9	7.6(3.8)	30	3.4(200)	51	2.2(50)
10	0.7(50)	31	4.9(50)	52	0.3(50)
11	6.1(200)	32	3.1(50)	53	1.7(50)
12	34.9(50)	33	11.4(50)	54	29.3(200)
13	5.6(50)	34	3.8(3.74)	55	4.3(12.5)
14	2.9(2.5)	35	0(50)	56	40(50)
15	3.2(50)	36	46.7(50)	57	3.3(30)
16	2.2(12.5)	37	13.7(12.5)	58	0.3(200)
17	6.7(12.5)	38	1.4(12.5)	59	2.2(50)
18	8.5(200)	39	3.5(50)	60	1.9(50)
19	61.1(50)	40	5.5(15)	61	4.4(12.5)
20	14.2(200)	41	45.9(12.5)	62	2.3(200)
21	7.1(12.5)	42	0(50)	63	2.8(200)

(μg/ml)*

Table IV — Tumoristatic activity of peritoneal macrophages induced by plants

No.	Tumoristatic activity[a]			No.	Tumoristatic activity[a]			No.	Tumoristatic activity[a]		
	1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml		1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml		1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml
1	–[b]	–	–	22	105	127	–	43	–	–	–
2	116	109	–	23	353	211	241	44	119	110	–
3	–	108	114	24	–	–	–	45	118	146	136
4	–	270	216	25	–	–	–	46	117	107	–
5	116	–	–	26	108	108	–	47	108	108	108
6	–	–	–	27	119	156	121	48	115	118	114
7	117	121	118	28	105	148	125	49	134	–	–
8	–	–	–	29	–	143	155	50	–	–	110
9	143	311	267	30	115	132	103	51	118	114	–
10	–	–	–	31	–	–	–	52	127	106	–
11	–	–	–	32	–	–	–	53	118	117	104
12	109	–	115	33	–	–	–	54	111	–	139
13	–	109	–	34	158	156	166	55	–	–	–
14	229	148	355	35	–	–	–	56	195	103	167
15	115	–	237	36	119	133	136	57	107	162	–
16	117	116	–	37	152	115	142	58	–	113	107
17	–	156	–	38	127	205	183	59	107	112	–
18	106	115	109	39	–	–	–	60	–	–	119
19	–	–	–	40	112	128	112	61	–	–	111
20	–	–	–	41	–	109	314	62	–	–	–
21	105	146	153	42	109	110	105	63	104	103	–

[a] % of control, [b] not detected

2%, positive control로 사용한 rhIL-2의 경우 30 u/ml에서 87.4%로 세포독성이 나타났다. 버섯 추출물인 lentinan의 경우 100 μg/ml에서 거의 대조군과 유사한 결과(2.4%)가 나타났으나 OK-432를 50 μg/ml로 처리시에는 76.3% 정도로 높은 세포독성을 보였다. 생약을 분획별로 세분화하여 검색할 경우 OK-432에 준하는 활

성을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

암세포에 대한 대식세포의 세포독성시험

생약 63종의 물추출물을 대상으로 암세포에 대한 대식세포의 세포독성시험을 시행한 결과는 Table IV에서 나타난 바와 같다. 각각의 생약추출물을 1, 10, 100 μg/ml로 조정한 다음 분획물을 처리하지 않은 음성대조군의 viability index와 비교하였을 때 검색한 생약 중 인삼, 사간, 산약, 양강, 단삼, 육계, 복령등이 대식세포의 항암작용을 유도하였으며 사용된 생약의 고농도(> 100 μg/ml)에서는 독성을 나타냈다. 항바이러스작용은 63종의 생약에서는 관찰되지 않았다.

결 론

이상적인 BRM이란 정상세포에 세포독성을 나타내지 않으면서 비특이적으로 모든 활성경로(T, NK, Macrophage)를 자극, 조절하는 면역증강물질을 말한다. 그 선도물질은 면역세포를 증식시키고 최대효과를 내는 용량이 독성을 나타내는 용량보다 낮아야 한다.[14] 본 연구에서는 오랫동안 민간에서 사용해온 생약을 대상으로 하였으므로 비교적 독성이 적은 물질을 분리할 가능성이 높다. 또한 현재 사용중인 면역요법은 말초혈액 임파구를 고농도의 재조합 IL-2와 함께 실험관내에서 배양하여 생성된 LAK세포와 고농도의 재조합 IL-2를 함께 투여하는 입양요법이 주종을 이루고 있으며 이 경우 LAK세포는 대부분 NK세포가 활성화된 것이다. 이와 같이 생성된 LAK세포는 NK세포에 살해되지 않는 암세포를 살해하는 능력을 지니게 되므로 천연물로부터 여러 종류의 싸이토카인을 유발시켜 LAK세포를 생성하는 물질을 검색하는 것은 의의가 있다고 할 것이다.

문 헌

1) Rosenberg S., M. Lotze, L. Muul, S. Leitman, A. Chang, S. Ettinghausen, Y. Matury, J. Skibber, E. Shilon, J. Vetto, C. Seipp, C. Smpson and C. Reichert. : Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *M. Engl. J. Med.* **313**, 1485 (1985).

2) Mule, J. J., S. Shu and S. Rosenberg. : The antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 *in vivo*. *J. Immunol*. **135**, 616 (1985).

3) Ochoa, A. C., G. Gromo, B. J. Alter, P. M. Sondel and F. II. Bach. : Long-term growth of lymphokine-activated killer (LAK) cells: role of anti-CD3, β-IL-1, interferon-γ and -β. *J. Immunol*. **138**, 2728 (1987).

4) Ballas, Z. K., W. Rasmussen and J. K. Van Otegham. : Lymphokine-activated killer (LAK). II. Delineation of distinct murine LAK-precursor subpopulation. *J. Immunol*. **138**, 1647 (1987).

5) Tang, J. C., J. J. Mule and S. Rosenberg. : Murine lymphokine-activated killer (LAK) cells: phenoytpic characterization of the precursors and effector cells. *J. Immunol*. **137**, 715 (1986).

6) Geimm, E. A., A. Mazumder, II., Z. Zhang and S. A. Rosenberg. : Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med*. **155**, 1823 (1982).

7) Oldham, R. K. : Biological Response Modifiers Program. *J. Biol. Resp. Mod*. **1**, 81 (1982).

8) Talmadge, E., Lenz, B. F., Collins, M. S., Uithoven, K. A., Schneider, M. A., Adam-s, J. S., Pearson, J. W., Agee, W. J., Fox, R. E., Oldham., R. K. : Tumor models to investigate the therapeutic efficiency of immunomodulators. *Behring Inst, Mitt*. **74**, 219 (1984).

9) Talmadge, J. E., Fidler, I. J., Oldham., R. K. : The NCI preclinical screen of biolog-ical response modifiers. *Behring Inst, Mitt*. **74**, 189 (1984).

10) Fang, J. N., Proksch, A. and Wagner, H. : Immunologically active polysaccharide-s of Acantopanax senticosus. Phytochemistry **11**, 2619 (1985).

11) Smalley R. V, Oldham R. K. : Phase I trials of biological response modifiers. *Drugs Exptl. Clin. Res*. **12**, 31 (1986).

12) Talmadge, J. E. and Herberman, R. B. : The preclinical screening laboratory: Eval-uation of immunomodulatory and therapeutic properties

of biological response modifiers. *Cancer Treatment Resports*. **70**, 171 (1986).

13) Kalland, T., Alm, G., Stalhandske, T. : Augmentation of mouse natural killer cell activity by LS 2616: a new immunomodulator. *J. Immunology*. **134**, 3956 (1985).

14) Wimer, B. M. : The ideal biological response modifier. *Mol. Biother*. **1**, 311 (1989).

15) Yanagawa E., Yasumoto K., Ohta M., Nomoto K., Azuma I. and Yamamura Y. : Comparative study on antitumor effect of cell-wall skeleton of Mycobacterium bovis BCG and Nocardia rubra, with reference to T-cell dependency and independency. *Jpn. J. Cancer Res*. **70**, 141 (1979).

16) Atsushi Uchida, Michael Micksche. : *In Vitro* augmentation of natural killing activity by OK-432. *Int. J. Immunopharmac*. **3**, 365 (1981).

17) Fisher, B., Brown, A., Wolmark N., Fisher E. R., Redmond C., Wickerham D. L., Margolese R., Dimitrov N., Pilch Y., Glass A., Sutherland C. and Foster R. : Evaluation of the worth of *Corynebacterium parvum* in conjunction with chemotherpy as adjuvant treatment for primary breast cancer. *Cancer* **66**, 220 (1990).

18) Shaw J. M., Futch W. S. and Schook L. B. : Induction of macrophage antitumor activity by acetylated low density lipoprotein containing lipophilic muramyl tripeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **85**, 6112 (1988).

19) Alexander, P. and Evans, R. : Endotoxin and double-stranded RNA render macrophages cytotoxic. *Nature* **232**, 76 (1971).

20) B. Sredri, R. R. Caspi, A. Klein, Y. Kalechman, Y. Danziger, M. BenYa'akov, T. Tamari, F. Shalit and M. Albeck. : A new immunomodulating compound (AS101) with potential therapeutic application. *Nature* **330**, 173 (1987).

21) Goldstein A. L., Ahirigos M. A. : *Lymphokines and thymic hormones*. In progres-s in cancer research and therpy. **20**, Raven Press, NY. (1982).

22) Maeda Y. Y., Watanabe S. T., Chihara G. and Rokutanda M. : T-cell mediated vascular dilation and hemorrhage induced by antitumor polysaccharide. *Intl. J. Immunopharmacol*. **6**, 493 (1984).

23) Mohla S., Humphries M. J., White S. L., Matsumoto K., Newton S. A., Sampson C. C., Bowen D. and Olden K. : Swansonine: a new antineoplastic immunomodula-tor. *J. Natl. Med. Assoc*. **81**, 1049 (1988).

24) Robert H. Wiltrout and Ronald L. Hornung. : Natural products as antitumor agents.: direct versus indirect mechanisms of activity of flavonoids. *J. Natl. Cancer Institute*, **80**, 220 (1988).

25) Allison A. C. : On the role of mononuclear phagocytes in immunity. *Prog. Med. Virol*. **18**, 15 (1974).

26) Mims C. A. : Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bact. Rev*. **28**, 30 (1964).

27) Mogensen S. C. : Role of macrophage in natural resistance to virus infections. *Microbiolol. Rev*. **43**, 1 (1979).

28) Gangemi D., Nachtigal M., Barnhart D., Krech L., and Jani P. J. : Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated ribavirin and muramyl tripeptide in experimental infection with influenza and herpes simplex virus. *J. Infect. Dis*. **135**, 763 (1987).

29) Glasgow L. A., Fischbach J., Bryant S. M. and Kern E. R. : Immunomodulation of host resistance to experimental viral infections in mice. *J. Infect. Dis*. **135**, 763 (1977).

30) Kirchner H., Hirt H. M. and Munk K. : Protection against herpes simplex infection in mice by Corynebacterium parvum. *Infect. Immun*. **16**, 9 (1977).

31) McGeoch D. J. : The genomes of the human herpesviruses: Contents, relationship-s and evolution. *Ann. Rev. Microbiol*. **43**, 235 (1989).

32) Morahan P. S., Kern E. R. and Glasgow L. A. : Immunomodulator-induced resista-nce against herpes simplex virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. **154**, 615 (1977).

33) Russell S. W. and McIntosh A. T. : Macrophages isolated from regression: Molon-ey sarcoma are more cytotoxic than those recovered from progressing sarcomas. *Nature* **268**, 69 (1977).

34) Klimetzek, V. and Remold, H. G. : The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator

cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell. Immunol*. **53**, 257 (1980).

35) Pyo. S., Gangemi J. D., Ghaffar A. and Mayer E. P. : Poly I:C-induced anti-herp-es simplex virus type I activity in inflammatory macrophages is mediated by induction of interferon-β. *J. Leukoc. Biol*. **50**, 479 (1991).