생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
22(2) : 95~100(1991)

丹蔘 엑기스의 간보호작용

은재순 · 임종필 · 박이규 · 염정렬 · 최동성* · 안문생**
전주우석대학 약학과 · *전주우석대학 생물공학과 · **원광대학교 한의과대학

Hepatoprotective Activity of Salviae miltiorrhizae Radix Extract

Jae Soon Eun, Jong Pil Lim, Yi Kyu Park, Dong Seong Choi* and Moon Seng Ahn**
Department of Pharmacy, *Department of Biotechnology, Chonju Woosuk University Wanju, Chonbuk 565-800 and **College of Oriental Medicine, Wonkwang University Iri, 570-749, Korea

Abstract—Salviae miltiorrhizae(SM) Radix extract increased [^{3}H]-thymidine incorporation into rat hepatocytes at the concentration ranging from 5×10^{-5} to 5×10^{-1}mg/ml. It decreased the activities of s-GOT and s-GPT in cirrhotic rats induced by CCl_4, TAA and D-GalN, respectively and reduced the sleeping time induced by hexobarbital in CCl_4, TAA and D-GalN intoxicated mice, respectively. SM extract shortened the half-life of sulfobromophthalein in CCl_4 intoxicated rats.

Keywords—*Salvia miltiorrhiza* · primary cultured rat hepatocytes · s-GOT · s-GPT · sulfobromophthalein · sleeping time

단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 출혈, 월경불순, 유산, 부종의 치료에 전통적으로 사용되어온 생약으로[1,2] 항응고,[3] 항진균[4] 및 혈관확장작용[5] 등의 약리작용과 만성 신부전등의 치료효과,[6,7] 요소결핍방지효과,[8,9] 만성간염의 예방 및 치료효과[10,11] 등이 알려져 있으며, 성분으로는 tanshinone Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, cryptotanshinone, tanshinol, methyltanshinone, hydroxytanshinone, miltirone[12] 등이 보고되었다. 특히 Han 등[10]은 단삼이 흰쥐의 간경변에 대해 collagenolytic effect와 collagen 흡수작용이 있음을 보고하였고, 王[11]은 단삼 투여 후, 간장을 부분 절제하여 간재생 실험을 한 결과 단삼에 효과가 있음을 보고하였다. 한편 간 손상시에는 혈청중에 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)), glutamic pyruvic transaminase(GPT), alkali phosphatase 및 leucine aminopeptidase 등의 활성도가 증가하고, cholinesterase 활성도가 감소하며[13], 약물대사속도 및 담즙배설속도 등의 속도론적 parameter에도 변화가 나타난다고 알려져 있다.[14,15] 실험적으로 동물에 간질환을 유발시키는 약물로는 CCl_4,[16,17] thioacetamide,[18,19] D-galactosamine,[20,21] ethionine,[22,23] chloroform 및 tetracycline 등[24]이 알려져 있다. 연구자들은 단삼엑기스의 간보호작용 기전을 좀더 규명하기 위해. 흰쥐의 간세포초대배양계를 이용하여 DNA 합성능에 미치는 영향을 살펴 보았으며, ***in vivo*** 실험에서는 지방간을 형성하고 간세포괴사를 일으키는 CCl_4, 간세포의 실질변화를 일으키어 일반적인 간질환과 유사한 간세포괴사 및 지방변성을 일으키는 thioacetamide 및 virus성 간염과 유사한 섬유화등의 병변을 유발하는 D-galactosamine 등 3종의 약물을 각각 흰쥐에 투여하여 간손상을 유발한 후, 혈청중 GOT 및 GPT치를 측정하였고, 위 3종의 약물을 각각 mouse에 투여하여 간손상을 일으킨 뒤, hexobarbital 수면시간을 측정하였다. 또한 CCl_4 간손상 흰쥐에서 sulfobromophthalein(BSP)에 대한 간세포

의 Y단백 결합능력이 50% 이상 감소하며, liver uptake에 영향을 미친다는 보고[25,26]에 따라 BSP의 체내 반감기를 측정한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

재료 및 시약—본 실험에 사용한 단삼은 시중에서 구입한 것을 엄선하여 사용하였다. 시약은 William's E medium(WE, Flow Lab.), Eagle's minimum essential medium E(MEM, Nissui Tokyo), fetal bovine serum(FBS, Bocknek Lab.), collagenase(Wako), [methyl-^{3}H]-thymidine (TdR, 83 Ci/m mol, Amersham)을 사용하였고, 배지에 첨가하는 시약은 Sigma Co.를 사용하였다. GOT 및 GPT kit는 Eiken Co.를 사용하였고, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

실험동물—간세포 배양용 흰쥐(female, Wistar계)는 7~8주령 되는것을 Clea Japan으로 부터 구입하였고, 급성 간염 유발용 흰쥐(체중 180±20 g, 웅성, Sprague-Dawley계) 및 mouse(20±2 g, 자성, ICR계)는 삼육동물에서 구입하여 사용하였다.

시료의 조제—100 g의 단삼에 증류수 500 ml를 넣어, 3시간씩 2회 가열추출하여, 여과한 후, 60° 이하에서 감압농축하여 연조엑스 46 g을 얻었다. 세포배양실험에는 엑스 일정량을 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.3) 용액에 용해시켜, 고압멸균한 다음, 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 그의 상등액을 실험에 사용하였으며, 급성간염 유발시에는 엑스를 0.9% 생리식염수에 용해시켜, 경구 투여하였다.

흰쥐 간세포의 초대배양—흰쥐 간세포의 분리 및 단층 배양은 Seglen의 전관류법[27]에 의해 행하였다. 흰쥐에 nembutal을 복강주사하여 마취시킨 후, benzalkonium chloride 50배 희석액으로 소독하고, 흰쥐를 개복하여, 간문맥에 canule (18 G×2")을 삽입하여 고정한 다음, 38°의 전관류액을 peristallic pump로 30 ml/min. 속도로 관류시키는 동시에, 하대정맥을 절단하여 혈액을 제거하였다. 심장을 노출시켜 우심방으로 들어가는 하대정맥에 canule을 삽입하여 전관류액을 관류시켜 간장에 남아있는 혈액을 완전히 제거한 후, 0.05% collagenase액을 10 ml/min. 속도로 관류시켜 *in situ*에서 간을 소화시켰다. 소화된 간엽을 잘라내어 petri dish에 넣고, MEM 10 ml를 가하여 조심스럽게 세절한 후, 피펫으로 간세포를 분산시켰다. 분산액을 세포여과기로 여과한 다음, 여액을 50 ml cell용 원심관에 넣고, MEM 40 ml를 가하여 4°에서, 1분간 수평원심분리(50×*g*)하였다. 상등액을 버리고 MEM 20 ml를 가하여 현탁한 후, 같은 조건하에서 원심분리하였다(2회 반복). Pellet에 WE 20 ml를 가하여, 간세포 현탁액을 만들어, 그 중 1ml를 취하여 0.1% trypan blue 1 ml와 혼합한 다음, 위상차현미경으로 생세포수를 계측하여, 85% 이상의 세포생존율이 나타날 때, 간세포배양액으로 사용하였다. 간세포 현탁액에 FBS(final 1%), WE, dexamethasone(final 10^{-7} M)을 첨가하여 세포수가 4×10^{-4} cell/ml가 되도록 조정한 후, 그 중 1 ml를 24 well tissue culture plate(Falcon Co.)에 주입한 다음, 37°의 CO_2 incubator(5% CO_2)에서 5시간 세포배양을 행하였다. Tissue culture plate 기벽에 간세포가 부착된 것을 확인한 후, pasteur pipette로 배양액을 제거하고, WE 0.5 ml(FBS 1%, dexamethasone 10^{-7} M, insulin 10^{-7} M)을 가한 후, PBS에 농도별로 희석한 단삼엑스 5 μl를 가하고, 37°의 CO_2 incubator에서 27시간 세포배양을 하였다.

DNA 합성능의 측정—DNA 합성능은 Nakamura[28]와 Moreley의 방법[29]으로 측정하였다. 간세포배양액에 TdR(1 mM thymidine 150 μl, [^{3}H]-TdR 75 μl, PBS 4.775 ml) 20 μl를 첨가하여 잘 혼합한 다음, 24시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척하였으며, 10% trichloroacetic acid(TCA) 0.5 ml를 가하여 세포를 고정시켰다. TCA를 제거하고 1 N NaOH 200 μl를 첨가하여 37°C에서 1시간 이상 방치시켜, 세포내의 단백질을 가용화시켰다. Scintillation vial에 넣고, 4 N HCl 50 μl를 가하여 중화시킨 다음, scintillator 5 ml를 혼합시켜, liquid scintillation counter로 측정하였다.

급성 간손상 rat의 s-GOT 및 s-GPT 측정—흰쥐 1군을 5마리로 하여 CCl_4, thioacetamide

(TAA), D-galactosamine(D-GalN) 투여군, 단삼엑기스 1,000 mg/kg+CCl_4, 단삼엑기스 1000 mg/kg+TAA, 단삼엑기스 1,000 mg/kg+D-GalN 투여군, control군으로 분류하여 dose schedule에서와 같이 투여하였다. 최종 투여 48시간이 경과한 후, 경동맥에서 채혈하여 1시간 방치하고, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 serum을 분리한 뒤, s-GOT 및 s-GPT 활성도를 Reitman-Frankel법으로 측정하였다.[30] 즉, serum 0.2 ml에 GOT 및 GPT 기질액 1 ml를 각각 가하고, 37°에서 60분 및 30분간 반응시킨 다음, 발색시 약 1 ml를 가하여 실온에서 20분 방치한 후, 0.4N-NaOH 10 ml를 넣어, 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

* Dose schedule

Group	Days			
	1	2	3	4
Control	Saline	Saline	Saline	Saline
CCl_4		CCl_4	CCl_4	
SM+CCl_4	SM	SM+CCl_4	SM+CCl_4	SM
TAA		TAA	TAA	
SM+TAA	SM	SM+TAA	SM+TAA	SM
D-GalN		GalN	GalN	
SM+D-GalN	SM	SM+GalN	SM+GalN	SM

SM extract(1,000 mg/kg) was given orally. CCl_4 (0.5 ml/kg) dissolved in olive oil, TAA(100 mg/kg) and D-GalN(400 mg/kg) dissolved in saline were administered intraperitoneally, respectively.

Hexobarbital 수면시간 측정—Mouse(female) 8마리를 1군으로 하여 Han 등의 방법[31]에 준하여 실험하였다. Dose schedule과 같이 약물을 투여하고, 최종 투여 24시간 후, hexobarbital sod.을 생리식염수에 용해시켜, 50 mg/kg을 복강내에 투여하고 수면시간을 측정하였다.

CCl_4에 의한 급성 간손상 흰쥐의 BSP측정—Dose schedule에서와 같이 CCl_4 및 단삼엑기스를 투여하고, 최종 투여 48시간 후에 Iga 등의 방법[25]에 준하여 실험하였다. Ether로 마취시킨 흰쥐를 수술대에 고정시키고, 좌측 대퇴부 동맥을 노출시킨 뒤, 미정맥에 1% BSP 용액 2 ml/kg을 투여한 후, 대퇴부 동맥에서 5, 10, 15 및 20분에 약 0.3 ml씩의 혈액을 채취하여, 3,500 rpm에서 30분 동안 원심분리시켰다. Serum 0.1 ml에 0.05 N NaOH 3 ml를 가하고, 578 nm 및 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. Serum 중의 BSP 농도는 미리 작성한 검량선으로부터 산출하였으며, 용혈된 혈액의 보정은 Richards 등[32]의 regression formula를 이용하였다.

1.02× (reading at 578 nm) −0.29× (reading at 414 nm)

Rate constant(K)와 half life는 first order rate process에 의해 산출하였다.

$$\log C = \frac{-K}{2.303} t + \log C_0$$

C_0; $t=0$일 때 약물의 혈중농도, K; rate constant, t; 약물투여 후 경과시간, C; 약물혈중농도

실험결과

간세포 DNA 합성능에 미치는 단삼엑기스의 효과

단삼엑기스를 농도별로 초대배양한 흰쥐간세포에 첨가하여 간세포 내의 TdR 양을 측정하였다. 단삼엑기스의 농도를 5×10^{-5} mg/ml부터 5×10^{-1} mg/ml까지 10배씩 단계적으로 증가시켰을 때, DNA합성능은 대조군 7,666±255 dpm에 비해, 7,529±504, 7,894±108, 8,580±360, 10,432±171, 및 14,818±1,016 dpm으로 각각 나타났고, 특히 5×10^{-2} 및 5×10^{-1} mg/ml 농도에서는 유의성 있게 증가되었으며, 5×10^{-1} mg/ml 농도에서는 93%의 활성증가를 나타냈다 (Fig. 1).

단삼엑기스의 간보호효과

CCl_4, TAA 및 D-GalN을 각각 투여하여 급성 간손상을 유발시켰을 때, 대조군에 비해 s-GOT 및 s-GPT치가 유의성 있게 증가되었으며, 그중 TAA 투여군이 가장 현저한 증가를 보였으나, 검액과 병용투여시에는 단독투여군에 비하여 전반적으로 유의성 있게 감소하였다(Table I).

한편 급성 간경변을 유발한 mouse에 검액을 투여하고 hexobarbital의 수면시간에 미치는 효과를 관찰한 결과, CCl_4, TAA 및 D-GalN 투

Table I. Effect of Salviae miltiorrhizae(SM) Radix extract on the serum GOT and GPT activities in hepatic intoxicated rats

Group	GOT (Karmen unit/ml)	GPT (Karmen unit/ml)
Control	79.8±5.30	38.0±2.62#
CCl_4	172.0±6.90*	162.5±6.70*
CCl_4+SM	117.5±4.80**	102.0±4.21**
TAA	826.2±35.21*	298.9±14.02*
TAA+SM	624.2±26.20**	215.0±13.98**
D-GalN	126.0±8.49*	139.0±9.21*
D-GalN+SM	110.0±8.21**	95.2±6.20**

#; Each value is expressed as mean±S.E. of 5 rats.
*; $p<0.01$ vs. control group.
**; $p<0.01$ vs. CCl_4, TAA and D-GalN group, respectively.

여서 대조군에 비해 수면시간이 현저히 증가하였으며, 검액과 병용투여시에는 대조군에 비하여는 약간 증가하였으나 단독투여군에 비하여는 유의성 있게 단축되었다(Table Ⅱ).

단삼엑기스가 CCl_4에 의한 급성 간손상 rat의 BSP 혈중농도에 미치는 영향

BSP를 정맥투여한 후, 혈장중 약물농도의 대수치 log C와 약물투여부터 경과시간 t와의 관계는 Fig. 2와 같으며, first-order rate process에 의하여 각시료의 rate constant(K)와 half life를 산출한 결과는 Table Ⅲ과 같다. 검액투여시 CCl_4 단독 투여군에 비해 K는 커지고, half life는 감소되었으나, 대조군에는 미치지 못했다.

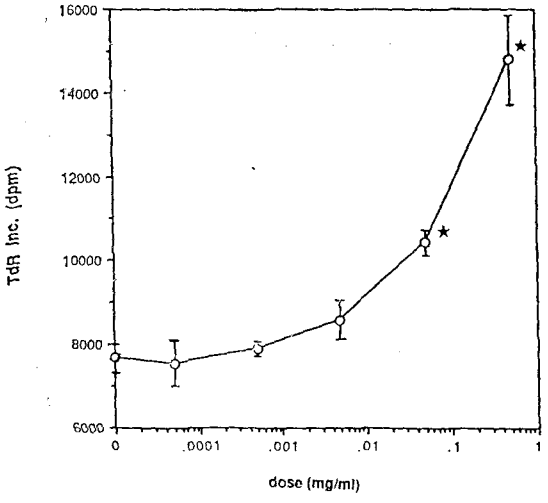

Fig. 1. Effect of Salviae miltiorrhizae Radix extract on [^{3}H]-thymidine incorporation into primary cultured rat hepatocytes. Each point represent the mean±S.E. from 4 wells.
*; Statistically significant compared with control group($p<0.001$).

Table II. Effect of Salviae miltiorrhizae(SM) Radix extract on the sleeping time induced by hexobarbital in hepatic intoxicated mice

Group	Sleeping time(min.)	Relative potency
Control	31.30±2.21	1.00
CCl_4	61.07±4.29*	1.95
CCl_4+SM	43.41±5.50**	1.38
TAA	67.53±3.39*	2.15
TAA+SM	36.01±2.55**	1.15
D-GalN	51.06±5.30*	1.64
D-GalN+SM	39.23±3.02**	1.26

Each value is expressed as mean±S.E. of 8 mice.
*; $p<0.01$ vs. control group.
**$p<0.05$ vs. CCl_4, TAA and D-GalN group, respectively.

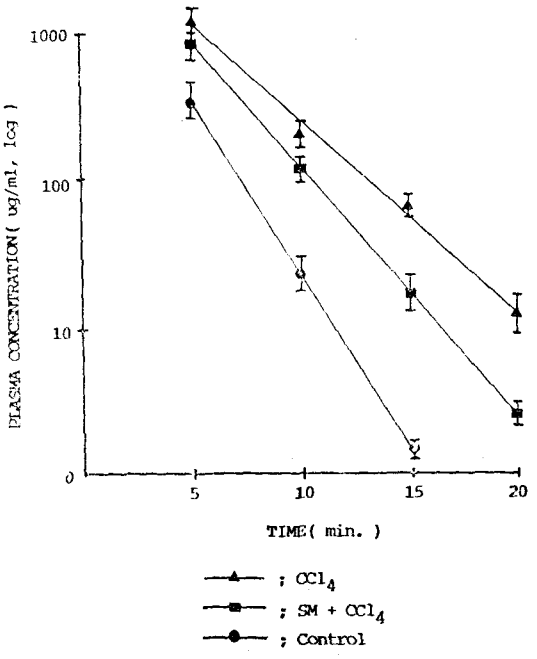

Fig. 2. Plasma disappearance curves of sulfobromophthalein after intravenous administration (20 mg/kg).
Each bar represents the mean±S.E. of 5 rats.

Table III. Effect of Salviae miltiorrhizae Radix extract on the rate constant and half life of BSP in CCl_4 intoxicated rats

Group	Rate constant $K(\times 10^{-2})$	Half life T 1/2(min.)
Control	12.91	5.37
CCl_4	5.09	13.00
CCl_4+SM	6.91	10.03

고 찰

간 보호작용이 강력한 물질을 찾기 위해, 11종의 생약을 물로 추출하여 간세포배양계를 이용하여 검색한 결과, 단삼엑기스가 가장 강력한 간세포 증식 능력이 있었기에 이의 작용을 확인하기 위해 CCl_4, TAA 및 D-GalN을 이용하여 흰쥐 및 mouse에 급성 간손상을 일으킨 후 간보호효과를 관찰하였으며, BSP의 체내 동태학적인 변화를 측정하여 간대사의 회복능을 살펴 보았다. Nakamura 등[33]은 1차배양 간세포의 DNA 합성을 촉진하는 활성을 70% 부분 간절제 후의 rat혈청 중에서 발견하여, hepatocyte growth factor(HGF)라 명명하였으며, 흰쥐 3,000마리분의 혈소판으로부터 HGF를 분리, 정제하는데에 성공하였다.[34,35] 그 밖에도 1차배양 간세포는 외부에서 유래하는 인자인 insulin과 epidermal growth factor(EGF)에 의해서도 수세대정도 증식할 수 있음이 알려져 있다.[36] 단삼의 DNA합성능 증가가 단삼에 함유된 saponin의 계명활성 효과에 기인될 수도 있으나, 위상차현미경으로 관찰한 결과 단삼엑기스를 첨가시 간세포의 성장이 활발하고, 정상적인 세포형태를 유지하는 것으로 보아, 초대배양시 간세포가 받는 stress를 완화하거나, 간세포의 growth factor의 하나로 알려진 HGF의 분비를 촉진했을 가능성이 더 크다고 생각된다. HGF가 간세포의 30%를 차지하는 비실질 간세포중 kuffer's cell과 혈관내피세포에서 산생되며,[38] 초대배양 rat 간세포에 비실질 간세포가 혼입되어 있을 수도 있으므로 그 가능성을 배제할 수 없다. CCl_4, TAA 및 D-GalN에 의해 급성 간독성이 유발되었을 때, s-GOT 및 s-GPT의 활성이 대조군에 비해 현저히 증가하였는데, 단삼엑기스를 투여함으로서 유의성 있게 감소하였다는 사실은, 단삼엑기스가 여러형태의 간손상에 효과가 있음을 시사하는 것이다. 또한 급성 간손상을 유발시킨 mouse에 단삼엑기스를 투여시 hexobarbital수면시간이 단축되었다는 것과 BSP의 체내 half life가 단축되었다는 사실은, 간의 대사능력이 회복되고 있음을 의미하는 것이라 할 수 있다. *In vitro*계와 *in vivo*계의 실험에서 단삼의 간보호작용이 현저하게 나타났다는 사실은 단삼을 간보호제로 개발할 가치가 있다고 인정되며, 이러한 작용을 일으키는 단삼의 주성분을 분리하는 연구를 계속하고 있는 중이다.

결 론

간세포 초대배양계 및 급성 간손상에 대한 단삼엑기스의 간보호작용은 다음과 같다.

1. 단삼엑기스는 농도 증가에 따라 간세포초대배양계에서 유의성있게 간세포의 DNA합성능을 증가시켰으며, 5×10^{-1} mg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 93% 증가를 나타냈다.
2. CCl_4, TAA 및 D-GalN으로 유발된 급성 간손상에서 s-GOT 및 s-GPT치를 유의성있게 감소시켰으며, 급성 간손상 mouse에서 hexobarbital의 수면시간을 유의성있게 단축시켰다.
3. CCl_4에 의한 급성 간손상 흰쥐에서 sulfobromophthalein의 체내반감기를 단축시켰다.

감사의 말씀—본 연구를 진행하는데 간세포배양에 도움을 주신 일본 나고야 공업연구소 T. Suzuki박사에게 감사드린다.

〈1991년 6월 3일 접수 : 6월 15일 수리〉

문 헌

1. Stuart, G.A.: Chinese materia medica, Kuting Book House(Taipei), 392(1969).
2. Jiang-su-xin-yi-xue-yuan: Zhong-yao-da-ci-dian, *Shanghai-ren-min-chu-ban-she*, 478(1977).
3. Onitsuka, M., Fujiu, M., Shinma, N. and Maruyama, H.: *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 1670

(1983).
4. Honda, G. Koezuka, Y. and Tabata, M.: *Chem. Pharm. Bull.* 36, 408(1988).
5. Chen, Y.C.: *Acta. Pharm. Sin.*, **19**, 876(1984).
6. Zhang, J.R., Zheng, X.R., Yang, H.T., Yan P.Z. and Chen, H.H.: *Shanghai J. Traditional Chinese Med.*, 17(1981).
7. Chung, H.Y., Yokozawa, T. and Oura, H: *Chem. Pharm. Bull.* 36, 274(1988).
8. Chung, H.Y., Yokozawa, T. and Oura, H.: *Chem. Pharm. Bull.* 34, 3818(1986).
9. Yokozawa, T., Chung, H.Y., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I.: *Chem. Pharm. Bull.* 36, 316, (1988).
10. Han, D. and Ma, X.: *J. Trad. Chin. Med.* 5, 279(1984).
11. 王禎等：中西醫結合雜誌 5, 509(1985).
12. 江蘇新醫學院： 中藥大辭典(上册) 成輔社, 478 (1982).
13. 太田康辛, 田中昭：診斷と 治療 65, 991(1977).
14. Cignoli, E.V., Custro, J.A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 8, 625(1971).
15. Benet, L.Z.: *Am. Pharm. Assoc. Acad. Pharm. Sci.* Washington. D.C. 53, (1976).
16. Ree, K.R. and Shotlander, V.L.: *Proc. Roy. Soc.* 157, 517(1963).
17. Acheson, R.H., Stubbs, J.K., Kuhla, D.E. and Baxter, A.R.: U.S. Pat. 3, 954,784(1976).
18. Koj, A. and Dubin, A.: *Br. J. Exp. Pathol.* 57, 733(1976).
19. Acheson, R.M., Cooper M.W. and Cox, I.R.: *J. Chem. Soc. Perkin* I, 773(1980).
20. Gupta, D.N.: *J. Pathol. Bact.*, 72, 183(1956).
21. Wilson, W. and Woodger, R.: *J. Chem. Soc.* 2, 943(1955).
22. Dutton, A.H.: *Health Nature* 178, 644(1956).
23. Dbhuri, S.N. and Nayak, A.: *J. Indian Chem. Soc.* XI, 1170(1982).
24. Balazs, T., Murray, T.K., Mclaughlan, J.H. and Grice, H.C: *Toxicol. Appli. Pharm.* 3, 71 (1961).
25. Iga, T., Sugiyama, Y., Yokota, M., Tomono, Y., Awazu, S. and Hanano, M.: *Biochem. Pharm.* 76, 1867(1977).
26. Suyma, A., Sugiyama, Y., Iga, T., Awazu, S., and Hanano, M.: *J. Pharm. Dyn.* 2, 105(1979).
27. Seglen, P.O.: *Exp. Cell. Res.* 82, 391(1973).
28. Nakamura, T., Tomita, Y. and Ichihara, A.: *J. Biochem.* 94, 1029(1983).
29. Moreley, G.D. and Kingdon, H.S.: *Anal. Biochem.* 45, 298(1984).
30. Reitman, S. and Frankel, S.: *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56(1957).
31. Han, V.G., Lehmann, H.D., Kurten, M., Uebel, H.: and Vogel, G.: *Arzneim. Forsch.* 18, 698 (1968).
32. Richards, T.G., Tindall, V.R. and Young, A.: *Clin. Sci.* 18, 499(1959).
33. Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A.: *Biochem. Biophy. Res. Commun.* 122, 1450 (1984).
34. Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 83, 6489(1986).
35. Nakamura, T., Nawa, K. Ichihara, A. Kaise, N.and Nishino, T.: *FEBS Lett.* 224, 311(1987).
36. Richman, R.A., Claus, T.H., Pilkis, S.J., and Friedman, D.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 73, 3589(1976).
37. Matsumoto, K., Higuchi, O. and Nakamura, T.: *Cell Technol.* 9, 877(1990).