응용약물학회지, The Journal of Applied Pharmacology 1, 1-6(1996)

영지의 단백다당체 G009의 마우스와 기니픽에 있어서의 항원성에 관한 연구

박종일[1] · 정태천 · 차신우 · 신호철 · 정 훈* · 김수웅* · 한상섭

한국화학연구소 안전성연구센터, *일양약품주식회사 중앙연구소

A Study on Antigenicity of G009, a Polysaccharide Isolated from *Ganoderma lucidum* IY009 in Mice and Guinea pigs

Jong Il PARK, Tae Cheon JEONG, Shin Woo CHA, Ho Chul SHIN, Hoon JEONG*, Su Ung KIM* and Sang Seop HAN

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology
P.O. Box 107, Yu Sung, Taejon 305-606, Korea
**Central Research Laboratory, Il Yang Pharmaceutical Company, Ltd., Yong-In 449-900, Korea*

(Received December 23, 1995; accepted January 18, 1996)

Abstract – In the present study, the antigenic potential of G009, a polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* IY009, was determined in BALB/c mice and Hartley guinea pigs. Antigenicity tests, including passive cutaneous anaphylaxis (PCA), active systemic anaphylaxis (ASA) and indirect hemagglutination test (IHA) were performed according to the established guidelines of National Institute of Safety Research. The results were as follows: 1. Mice showed no production of antibodies against G009 sensitized with an adjuvant, aluminum hydroxide gel (alum), when judged by the heterologous PCA test in rats. Meanwhile, antibodies against ovalbumin (OVA) sensitized with alum were clearly detected. 2. In the studies with guinea pigs, both the sensitization of G009 alone and of G009 with complete Freund's adjuvant (CFA) did not produce positive reactions in homologous PCA. In the case of ASA, however, G009 alone and G009 with CFA produced positive reactions. 3. No G009 specific reaction was observed in an IHA assay using sera isolated from G009 sensitized mice. These findings suggest that G009 have no antigenicity potential in mice but may have weak antigenicity in guinea pigs.

Keywords□ G009, antigenicity test, PCA, ASA, mice, guinea pigs

불로초속(Ganoderma)에 속하는 영지버섯, *Ganoderma lucidum* IY009는 자실체를 채집하여 균사를 분리한 것으로, G009는 *G. lucidum* IY009의 배양액으로부터 분리한 단백다당체이다.

최근에 G009는 간보호 효과를 나타내어 간의 섬유화를 억제하는 것으로 보고되었으며(Park 등, 1994), 또한 면역조절작용(Chung 등, 1993), 항바이러스(Kim 등, 1993), 항염증(Ukai 등, 1983), 항암(Miyazaki와 Nishijima, 1981; Sone 등, 1985; Stavinoha 등, 1993) 효과를 나타낸다고 보고되었다. 그러나 다당체와 단백질로 구성된 G009에 대한 안전성 자료가 충분치 않을 뿐만 아니라, 특히 항원성에 관한 연구가 수행되어 있지 않아서 G009의 제약화에 문제점이 되어왔다.

본 연구에서는 이러한 G009에 대한 안전성시험의 일환으로서 마우스와 기니픽을 이용한 항원성시험을 국립보건안전연구원의 제 94-3호 "의약품등의 독성시험기준(1994. 4. 14.)"에 따라 실시하였으며 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

실험방법

시험물질

본 시험물질은 일양약품에서 개발한 G009(Lot No., IY-G002)를 사용하였는데 총 단백질 함량은 23.9%, 당의 함량은 64.0%였다. 시험물질을 용량별로 멸균생리식염수를 이용하여 희석후 조제하여 사용하였다. 또한 양성대조물질로서는 ovalbumin (OVA, Sigma Chemical Co. U.S.A)을 사용

[1] To whom correspondence should be addressed.

하였다.

면역보조제

Mice에서는 alum (aluminum hydroxide) gel을 사용하였는데 Levine과 Vaz(1970)의 방법에 따라 $Al_2(SO_4)_3$+ $6NaOH \rightarrow 2Al(OH)_3+3Na_2SO_4$의 반응을 이용하여 아래와 같이 조제하였다. 33.3 g의 $Al_2(SO_4)_3$ $18H_2O$를 50 m*l*의 2차 증류수에 용해하여 1 N NaOH 300 m*l*을 가한 후 2차 증류수를 넣고 방치하였다. 수산화 aluminum이 침전되는대로 상층을 제거하는 작업을 5~10회 계속한 후 침전물을 세정하였으며 이것을 alum으로 사용하였다.

한편 guinea pig의 경우에는 complete Freund's adjuvant (CFA, Difco Laboratories, USA)를 시험물질 또는 양성대조물질과 혼합하여 (1 : 1, vol/vol) 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

BALB/c 마우스 수컷(24.0~31.5 g), Sprague-Dawley 랫트 수컷(316.2~424.8 g)을 한국화학연구소의 안전성연구센타 실험동물 육종실에서 구입하여 사용하였으며, Hartley계 기니픽(삼육실험동물연구센타)의 경우에는 감작동물의 경우 수컷(375.3~440.5 g)을 사용하였고 PCA 반응용 동물은 수컷(317.2~436.3 g)을 사용하였다.

한편 모든 실험동물은 입수후 약 2주일간 일반증상을 관찰하여 건강하며 병원체검사결과 이상이 없는 동물만을 시험에 사용하였다. 군분리는 체중범위에 따른 무작위법으로 실시하였으며 개체식별은 피크릭산에 의한 피모색소표시법 및 개체식별카드표시법을 이용하였다. 환경조건은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시), 조도 150~300 lux로 설정된 본 연구소에서 실시하였다.

사료는 마우스, 랫트의 경우 실험동물용 고형사료(제일사료 주식회사, 대전)를, 기니픽은 기니픽용 고형사료(퓨리나코리아 주식회사, 군산)를 자유섭취시켰으며, 물은 상수도수를 자외선 유수살균기로 소독하여 자유섭취시켰으며, 기니픽에 대하여는 vitamin C를 1 g/L(water)로 첨가한 후 자유섭취시켰다. 물은 대전보건환경연구원에 의뢰하여 오염물질의 검사를 실시하였으며, 오염물질의 분석결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

감작 및 혈청채취

Mice

감작항원, 감작항원량, 감작횟수 및 투여경로등은 Table I과 같다.

I군, II군의 투여량은 추정임상용량(50 mg/kg)을 참고로 하여, 각각 1배, 10배로 설정하였다. III군은 기지의 단백항원으로서 일반적으로 사용되는 양인 330 μg/kg으로 하였으며, IV군은 매체대조군으로 하였다. 한편 V군 및 VI군은 사망동물이 나타나지 않은 용량으로 각각 100 및 200 mg/kg을 설정하였다.

시험물질 단독투여군(I, II, V, VI군) 및 매체대조군(IV군)의 경우에는 주 3회씩 총 9회, alum과 혼합하여 투여하는 군(III군)은 3주에 1회씩 총 3회를 임상에서 예상되는 경로와 면역반응을 고려하여 주 1회 측정된 체중을 기준으로 하여 복강내에 투여하였다.

감작항원액의 조제에 있어서는 투여직전에 각 용량별로 시험물질을 멸균생리식염주사액에 녹여 사용하였으며, alum과 혼합하는 경우에는 G009 희석액의 2배량의 alum을 더하여 혼합하였다. 또한 최종감작 6일후에 좌우 안와정맥총으로부터 채혈하여 각 개체별로 혈청을 분리하였으며 분리된 항혈청은 −70℃에 보존하였다가 heterologous PCA 반응 및 IHA 반응에 사용하였다.

Guinea pigs

감작항원, 감작항원량, 감작횟수 및 투여경로등은 Table II와 같다.

I군, II군의 투여량은 추정임상용량(50 mg/kg)을 참고로 하여, 각각 1배, 10배로 설정하였다. III군은 II군과 동일한 양으로 설정하였다. IV군은 기지의 단백항원으로서 일반적으로 사용되는 양인 2.5 mg/kg으로 하였으며, V군은 매체대조군으로 하였다.

시험물질 단독투여군(I, II군) 및 매체대조군(V)의 경우에는 주 3회, 3주간(총 9회), (고용량+CFA) 투여군(III군) 및 양성대조군(IV군)은 3주에 1회, 6주간(총 3회) 임상에서 예

Table I. Sensitization of mice for heterologous passive cutaneous anaphylaxis and passive hemagglutination test.

Group	Substance	Sex	No. of animals	No. of treatment	Dose (mg/kg)	Route
I	G009	♂	5	9[a]	50	i.p.*
II	G009	♂	5	9[a]	500	i.p.
III	OVA+alum	♂	5	3[b]	0.33	i.p.
IV	Saline	♂	5	9[a]	10 m*l*/kg	i.p.
V	G009	♂	5	9[a]	100	i.p.
VI	G009	♂	5	9[a]	200	i.p.

[a]three times per week (every other day), [b]one time per three weeks *i.p.: intraperitoneal

Table II. Sensitization of guinea pigs for active systemic anaphylaxis and homologous passive cutaneous anaphylaxis.

Group	Substance	Sex	No. of animals	No. of treatment	Dose (mg/kg)	Route
I	G009	♂	5	9[a]	0	s.c.*
II	G009	♂	5	9[a]	500	s.c.
III	G009+CFA	♂	5	3[b]	500	s.c.
IV	OVA+CFA	♂	5	3[b]	5	s.c.
V	Saline	♂	5	9[a]	3 m*l*/kg	s.c.

[a]three times per week (every other day), [b]one time per three weeks, *s.c.: subcutaneous

상되는 경로와 면역반응을 고려하여 피하에 주 1회 측정된 체중을 기준으로 하여 피하에 투여하였다.

감작항원액의 조제에 있어서는 투여직전에 각 용량별로 시험물질을 멸균생리식염주사액에 녹여 사용하였으며, CFA와 혼합하는 경우에는 G009와 등량의 CFA를 더하여 emulsion화 하였다. 또한 최종감작 12일 후에 Pasteur pipettes을 이용하여 안와정맥총으로부터 부분채혈하여 각 개체별로 혈청을 분리하였으며 분리된 항혈청은 −70℃에 보관하였다가 homologous PCA 반응에 사용하였다.

Twenty four hrs Heterologous PCA test in rats

마우스-랫트계를 이용한 PCA 반응은 Mota와 Wong (1969)의 방법에 따라 실시하였다. 마우스로부터 얻어진 피검혈청을 10배 희석액부터 5120배까지 단계희석한 후 랫트의 배부피내의 각 부위에 50 μl씩 투여하고 24시간 후 야기항원액을 1% Evans Blue (Sigma Chemical Co., USA)와 등량(1 : 1) 혼합한 후 랫트의 미정맥에 주사하였다. PCA 반응 야기 30분 후에 랫트의 배부피부를 각피한후, 항혈청주사부위에 나타나는 청색반의 유무를 관찰하였는데 출현한 청색반의 장경과 단경의 평균치가 5 mm 이상 되는 것을 양성으로 하였고(Mota 등, 1968), 양성을 나타내는 항혈청의 최대희석 배율을 그 항혈청의 최종항체가로 하였다.

ASA test in guinea pigs

최종감작 14일후에 야기항원액인 G009 (50 또는 500 mg/kg) 및 OVA(1.67 mg/kg)을 후지정맥에 투여하고 30분간 전신의 증상을 관찰하여 아래의 기준에 따라 아나필락시 쇼크증상을 판정하였다.

− (Asymptomatic)
± (Mild) : 불안, 기모, 진전, 코를 문지르거나 핥음
\+ (Moderate) : 재채기, 기침, 호흡촉진, 배뇨, 배변, 유루
++ (Severe) : 호흡곤란, 찍찍거리는 소리, 청색증, 보행, 불안, 도약, 헐떡거리고 몸부림침, 경련, 횡와, Cheyne-Strokes 호흡
+++ (Death)

또한 판정이 끝난 동물은 도살후 부검하여 기관점막, 폐, 심장, 흉강 및 횡격막 등의 Shock organ에 대한 육안적인 관찰을 실시하였다.

Four hrs homologous PCA test in guinea pigs

기니픽-기니픽계를 이용한 PCA 반응은 Ovary (1958)의 방법에 따라 실시하였다. 기니픽으로 부터 얻어진 피검혈청을 10배 희석부터 5120배까지 단계희석한 후 기니픽의 배부피내의 각 부위에 50 μl씩 투여하고 4시간후 야기항원액을 1% Evans Blue와 등량(1 : 1) 혼합한 후 기니픽의 후지정맥에 주사하였다.

PCA 반응 야기 30분 후에 기니픽의 배부피부를 각피한 후 항혈청 주사부위에 나타나는 청색반의 유무를 관찰하였는데, 출현한 청색반의 장경과 단경의 평균치가 5 mm 이상 되는 것을 양성으로 하였으며 양성을 나타내는 항혈청의 최대희석배율을 그 항혈청의 최종항체가로 하였다.

IHA test

마우스-랫트계 PCA 반응시험에서 항원을 투여한 후 분리한 혈청을 이용하여 간접적혈구 응집반응을 수행하였다. 신선한 면양 적혈구를 0.005% tannic acid로 37℃에서 1시간 가온한 다음 4% 면양적혈구 용액을 제조하였고, 항원액 6 mg/ml 용액 동량과 함께 37℃에서 2시간 가온하여 항원을 피복하였다. 항원피복후 700 rpm에서 15분간 원심세척을 3회 실시한 후, 인산완충생리식염수에 1% 면양적혈구 용액을 만들어 간접적혈구 응집반응에 이용하였다. 96-well 응집반응용 plate의 제 1열에 4배 희석된 항혈청을 50 μl 가하고 전 well에 인산완충생리식염수 50 μl씩을 가하여 계단희석하였다. 여기에 항원피복 면양적혈구 용액을 50 μl씩 가한후, 2시간 이상 방치하여 적혈구 응집반응 여부를 판정하였다. 결과의 정확성을 기하기 위하여 각 혈청에 대하여 duplicate로 시험을 수행하였고, 응집이 나타난 최고 희석배수를 항체 titer로 결정하였다.

실험결과

Heterologous PCA test in rats

마우스-랫트계를 이용한 수동피부 아나필락시 반응의 결과는 Table III과 같다. 양성대조군인 (OVA+alum) 투여군에서는 전례(8/8)에서 160배에서 1280배 희석하여 투여하였을 때까지 항체가 검출되었으나, 매체대조군을 포함한 모든 시험물질 투여군에서는 전혀 항체가 검출되지 않았다. 한편 G009 500 mg/kg+alum 투여군의 경우 투여(감작) 도중 전례(5/5)의 동물이 사망하여 본 반응에서는 사용되지 않았다.

ASA test in guinea pigs

Table III. Twenty four-hours heterologous passive cutaneous anaphylaxis test in rats with sera from sensitized mice.

Sensitizing antigen	Challenging antigen[a]	PCA titer[b]	Positive ratio
G009 (50 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	−[c]	0/10
G009 (500 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	−	0/6
OVA+Alum (330 μg/kg)	OVA (2.86 mg/kg)	×160∼ ×1280	8/8
Saline (10 ml/kg)	G009 (500 mg/kg)	−	0/10
G009 (100 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	−	0/10
G009 (200 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	−	0/10

[a]Challenging antigen was intravenously injected 24 hours after sensitization of rats with sera. [b]PCA titer represents the maximum dilution fold of original serum which showed positive reaction. [c]Specific antibodies were not detected in 10-fold dilution of original sera.

Table IV. Active systemic anaphylaxis in guinea pigs.

Sensitizing antigen	Challenging antigen[a]	No. of animals	Severity of anaphylaxis				
			[−]	[±]	[+]	[++]	[+++]
G009 (50 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	5			4	1	
G009 (500 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	5			1	4	
G009+CFA (500 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	5				5	
OVA+CFA (2.5 mg/kg)	OVA (1.67 mg/kg)	5				5	
Saline (3 ml/kg)	G009 (500 mg/kg)	5	1		3	1	

[a]Severity of anaphylaxis was expressed as follows; 1. restlessness, 2. piloerection, 3. tremor, 4. rubbing or licking nose, 5. sneezing, 6. coughing, 7. hyperpnea, 8. urination, 9. evacuation, 10. lacrimation, 11. dyspnea, 12. rhonchus, 13. cyanosis, 14. staggering gait, 15. jumping, 16. gasping and writhing, 17. convulsion, 18. side position, 19. Cheyne-Strokes respiration and 20. death. [−], Asymptomatic; [±], Mild: symptoms of 1 to 4; [+], Moderate: symptoms of 1 to 10; [++], Severe: symptoms of 1 to 19; [+++], Death.

Table V. Four-hour homologous passive cutaneous anaphylaxis test in guinea pigs with sera from sensitized guinea pigs.

Sensitizing antigen	Challenging antigen[a]	PCA titer[b]	Positive ratio
G009 (50 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	−[c]	0/10
G009 (500 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	−	0/10
G009+CFA (500 mg/kg)	G009 (500 mg/kg)	−	0/10
OVA+CFA (2.5 mg/kg)	OVA (1.67 mg/kg)	×1280~ ×2560	10/10
Saline (3 ml/kg)	G009 (500 mg/kg)	−	0/10

[a]Challenging antigen was intravenously injected 4 hours after sensitization of rats with sera. [b]PCA titer represents the maximum dilution fold of original serum which showed positive reaction. [c]Specific antibodies were not detected in 10-fold dilution of original sera.

아나필락시 쇼크반응의 결과는 Table IV와 같다. 50 mg/kg 투여군은 5례중 5례에서 배뇨나 배변을 포함하여 기모(piloerection), 코를 문지르거나 핥음(rubbing 또는 licking nose), 호흡촉진(hyperpnea) 및 횡와(side position) 등의 증상이 나타났고, 500 mg/kg 투여군에서는 전례(5/5)에서 기모, 헐떡거리고 몸부림침(gasping and writhing) 및 횡와가 관찰되었다. 그리고 (500 mg/kg+CFA) 투여군에서는 배변(evacuation)은 관찰되지 않았으나 전례(5/5)에서 불안(restlessness), 기모, 호흡촉진, 배뇨(urination), 호흡곤란(dyspnea), 찍찍거리는 소리(rhonchus), 헐떡거리고 몸부림침 및 횡와 등의 증상들이 나타났다. 또한 양성대조군인 (OVA+CFA) 투여군의 경우에는 전례(5/5)에서 불안, 기모, 코를 문지르거나 핥음, 재채기, 기침(coughing), 호흡촉진, 배뇨, 배변, 호흡곤란, 도약(jumping), 경련(convulsion), 횡와 및 Cheyne- Strokes respiration 호흡 등의 사망직전의 중등도의 증상들이 관찰되었다. 매체대조군에서는 5례중 4례에서 배변, 1례에서 배뇨 및 1례에서 헐떡거리고 몸부림침이 관찰되었다.

또한 아나필락시 쇼크반응의 판정이 끝난 동물들을 부검하여 쇼크장기에 대한 육안적인 관찰을 실시한 결과 양성대조군(OVA+CFA)의 경우는 5례중 4례에서 기관점막의 충혈과 심장 및 횡격막의 출혈이, G009 (500 mg/kg+CFA) 투여군에서 5례중 2례에서 기관점막의 충혈 및 심장의 출혈이 관찰되었으나 그외의 군에서는 이상소견이 나타나지 않았다.

Homologous PCA test in guinea pigs

기니픽-기니픽계를 이용한 수동피부 아나필락시스반응의 결과는 Table V와 같다. 양성대조군인 (OVA+CFA) 투여군에서는 전례(10/10)에서 1280배에서 2560배 희석하여 투여하였을 때까지 항체가 검출되었으나 매체대조군을 포함한 모든 시험물질 투여군에서는 전혀 항체가 검출되지 않았다.

IHA test

마우스의 항혈청을 이용한 간접적혈구 응집반응의 결과는 Table VI과 같다. G009로 피복시킨 면양적혈구(SRBC)를 사용한 시험의 일부에서 저희석배율의 시료가 응집반응 양성을 보였으나 무피복 SRBC나 OVA 피복 SRBC를 이용한 시험에서도 동일시료에서 양성을 보여 G009에 특이적인 반응으로는 판단할 수 없었고, 오직 (OVA+alum) 감작에서만 OVA-피복 SRBC와 전형적인 적혈구 응집반응 양성을 보였다.

고 찰

BALB/c 마우스 및 Hartley 기니픽에서 영지의 단백다당체인 G009의 항원성을 조사하기 위하여 G009에 대한 항원성시험을 국립보건안전연구원의 '의약품등의 독성시험기준'에 따라 passive cutaneous anaphylaxis (PCA), active systemic anaphylaxis 및 indirect hemagglutination test (IHA)를 실시하였다.

PCA 반응은 동물의 피내에 항혈청을 투여하여 국소피내의 호염기구와 비만세포를 수동적으로 감작시키고 일정시간 후에 항원과 색소를 정맥주사하여 항원-항체 반응의 결

Table VI. Indirect hemagglutination test with sera isolated from sensitized mice.

Sensitized antigen	IHA with uncoated SRBC		IHA with G009-coated SRBC		IHA with OVA-coated SRBC	
	IHA titer[a]	Positive ratio	IHA titer	Positive ratio	IHA titer	Positive ratio
G009 (50 mg/kg)	–[b]	0/5	–	0/5	×4	2/5
G009 (500 mg/kg)	×4	1/3	×4	2/3	×4～×8	2/3
OVA+Alum (330 μg/kg)	×4～×16	2/4	×8～×16	2/4	×4096～×8192	4/4
Saline(10 ml/kg)	–	0/5	–	0/5	–	0/5
G009(100 mg/kg)	–	0/5	–	0/5	–	0/5
G009(200 mg/kg)	–	0/5	–	0/5	–	0/5

[a]IHA titer represents the maximum dilution fold of original serum which showed the positive hemagglutination. [b]Specific antibodies were not detected in 4-fold dilution of original sera.

과를 유도해 내는 것으로서, 세포로부터의 chemical mediator(histamine 등)의 유리에 의한 국소모세혈관의 투과성 항진으로 나타나는 누출색소의 정도를 측정하는 것이다.

마우스-랫트계를 이용한 PCA 반응의 경우 혈관의 투과성항진에 의한 약물특이적인 IgE 항체검출에 이용되고 있는데(Mota와 Wong, 1969), 본 시험에서는 추정임상용량(50 mg/kg)의 10배(500 mg/kg)까지 감작하였을 경우에도 전혀 항체가 검출되지 않았다. 그러나 양성대조군인 (OVA+alum) 투여군에서는 전례(8/8)에서 혈청을 160배에서 1280배까지 희석하여 투여하였을 때까지 항체가 검출되었다.

일반증상 및 사망율에 있어서는 추정임상용량(50 mg/kg)의 10배 투여군인 500 mg/kg 투여군에서는 투여후 2일째에 5례중 2례의 사망동물이 관찰되었으며 나머지 3례에서도 활동력감소, 보행불안 및 횡와 등의 증상이 나타났고, (500 mg/kg+alum) 투여군의 경우 전례(5/5)에서 투여후 1일째까지 활동력감소 및 기모증상이 나타난 후 투여후 2일째에 모두 사망하였는데, 이는 본 시험물질인 G009를 복강내 투여하였을 경우 나타난 급성독성 현상으로 사료되며, 면역보조제인 alum과 혼합투여시 독성발현이 크게 상승하여 투여초기에 모두 사망한 것으로 사료되었다. 그러나 이러한 일반증상 및 사망율은 시험물질의 감작투여기간중 마우스에 있어서 급성독성을 나타낸 것으로 본 시험의 목적인 랫트에 있어서 항원성(항체생성) 유무의 판단과는 별개의 내용이므로 본 시험의 수행에 영향을 미치지는 않는 것으로 사료되었다.

기니픽-기니픽계를 이용한 PCA 반응은 주로 세포친화성 항체(IgG type)의 검출에 이용되고 있는데(Ovary 등, 1958), 본 시험의 결과는 마우스-랫트계를 이용한 PCA 반응과 같이 양성대조군인 (OVA+CFA) 투여군에서는 전례(10/10)에서 혈청을 1280배에서 2560배까지 희석하여 투여하였을 때까지 항체가 검출되었으나 G009를 추정임상용량의 10배(500 mg/kg)까지 투여하였을 때에 전혀 항체가 검출되지 않았다.

아나필락시 쇼크반응은 감작이 성립된 동물에 항원을 투여하여 항원-항체반응을 전신성의 반응으로 보는 것으로서 일반적으로 기니픽을 이용하고 있다. 추정임상용량(50 mg/kg)을 투여한 경우에는 매우 경미한 쇼크증상이 나타났고, 500 mg/kg 투여군 이상에서는 중등도의 아나필락시 쇼크증상이 나타났다. 양성대조군인 (OVA+CFA) 투여군에서는 사망직전의 중등도의 아나필락시 쇼크증상들이 관찰되었다. 한편, 본 시험에서 매체대조군을 포함한 모든 시험물질 투여군에서 나타난 배뇨나 배변은 아나필락시 쇼크반응 야기후 30분간 전신의 증상을 관찰하는 동안 통상적으로 나타날 수 있는 증상으로 사료된다.

또한 마우스의 항혈청을 이용한 간접적혈구 응집반응에 있어서는 혈청중에 존재하는 항체중 항원에 특이적인 반응을 하는 항체의 존재여부를 판정하기 위하여 전 피검혈청에 대하여 무피복, G009 또는 OVA 피복 면양적혈구를 각각 시험하였는데, G009 피복 면양적혈구를 사용한 시험에서 G009 투여군 중 일부가 저희석배율에서 간접적혈구 응집반응을 보였다. 그러나 무피복 면양적혈구 및 OVA-피복 면양적혈구를 이용한 반응에서도 동일 시료에서 양성반응을 보여 피검혈청내에 G009에 대한 항체가 존재하여 나타난 반응이 아니고, 피검혈청에 존재할 수 있는 면양적혈구에 대한 항체에 의해 나타난 비특이적 양성반응으로 사료되었다. 실제로 정상동물의 혈청내에도 면양적혈구에 대한 항체가 존재할 수 있다는 것이 잘 알려져 있다(Hudson과 Hay, 1989). 한편, OVA로 피복시킨 면양적혈구를 사용하였을 때 양성대조군인 (OVA+alum) 감작군에서 모든 피검혈청이 4096배에서 8192배까지의 매우 높은 희석에서 적혈구 응집반응 양성을 보여, 본 시험에서 사용한 감작일정이 항원성 유무를 판정하기 위한 적당한 방법으로 판단되었고, G009는 마우스에서 항원성이 거의 없음을 입증해 준다고 사료되었다. 간접적혈구 응집반응은 항혈청내에 존재하는 항원에 특이적인 항체중 특히 IgM의 검출에 사용되는 바(Boyden, 1951), G009는 마우스에 감작시 양성대조물질인 OVA에 비해 IgM 생성에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면, G009는 추정임상용량의

10배 또는 면역보조제와 혼합하여 감작하였을 경우에 아나필락시쇼크를 유발할 수 있으나 임상에서 약물 자체만을 추정임상용량으로 투여하였을 경우 약물에 의해 전신적으로 쇼크를 일으킬 가능성은 거의 없다고 판단되었으며, 혈청중의 항체생성능 또한 전혀 없는 것으로 나타나 임상적 용시에 항원성 및 면역원성을 나타낼 가능성은 매우 적은 것으로 사료되었다.

참고문헌

Boyden, S. V. (1951). The adsorption of proteins or erythrocytes treated with tannic acid, and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.* **93**, 107.

Chung, H. T. (1993). Effect of G009 (Extract of *Ganoderma lucium* mycelium) on the nitric oxide from Macrophage-derived cell line (RAW 264.7). *Proc. Int. Sym. on Ganoderma lucium*. pp 39-54, Seoul, Korea.

Hudson, L. and Hay, F. C. (1989). Practical Immunology, pp. 207-263, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

Kim, B. K., Kim, H. W. and Choi, E. C. (1993). Anti-HIV activities of *Ganoderma lucium. Proc. Int. Sym. on Ganoderma lucidum*. pp 17, 67-72, Seoul, Korea.

Levine, B. B. and Vaz, N. M. (1970). Effect of combinations of inbred strain, antigen and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. *Int. Arch., Allerge* **39**, 156.

Miyazaki, T. and Nishijima, M. (1981). Studies on fungal polysaccharides (XXVII), structral examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum. Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3611-3616.

Mota, I., Wong, D., and Sadum, E. H. (1968). Mouse homocytotropic antibodies, I. Specific differentiation between mouse 7s, and mouse reagin-like antibodies. *Life science* **7**, 1289.

Mota, I. and Wong, D. (1969). Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life science* **8**, 813.

National Institute of Safety Research (1994). Toxicity test guideline for safety evaluation of drugs for human use (X), Korea.

Ovary, Z. (1958). Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. *Progr. Allerge* **5**, 459.

Ovary, Z. (1964). Passive cutaneous anaphylaxis in immunological methods. pp 259-283, Blackwell scientific publications, London.

Park, E. J., Kim, K. Y., Kim, J. B., Kim, S. W., Lee, S. Y. and Sohn, D. H. (1994). The anti fibrotic effects of polysacchavides extracted from *Ganoderma lucidum* on the experimental hepatic cirrhosis. *Yakhak Hoeji* **38**, 3, 338.

Sone, Y., Okuda, R. Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. (1985). Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucium. Agri. Biol. Chem.* **49**, 2641.

Stavinoha, W. B., Hardman, W. E. and Cameron, I. L. (1993). Short term dietary supplimentation with *Ganoderma lucidum* slows development and growth of microadenomatous lesions in the colon of rats treated with the carcinogen 1,2-Dimethylhydrazine, *Proc. Int. Sym.* on *Grnoderma lucidum*. June **17**, 12-22, Seoul, Korea.

Ukai, S., Kiho, T., Hara, C., Kuruma, I. and Tanaka, Y. (1983). Polysaccharides in fungi (XIV), anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *J. Pharm. Dyn.* **6**, 983.