

영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 생장점으로부터 분리한 단백다당류의 면역활성

정경수* · 김상범 · 정수현
충남대학교 약학대학 미생물약품화학교실
(Received September 30, 1996)

Immunoactivities of the Protein-polysaccharides of the Tips of the Growing Carpophores of *Ganoderma lucidum*

Kyeong-Soo Chung*, Sang-Bum Kim and Soo-Hyun Chung
Laboratory of Microbial Chemistry, College of Pharmacy, Chung-Nam National University

Abstract—Two protein-polysaccharide fractions, GLA and GLB, respectively, were prepared from the pileus of the fully grown carpophores and the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum*. At a dose of 100 mg/kg/day ip, GLA and GLB inhibited the growth of sarcoma 180 solid tumor in ICR mice by 56.3% and 81.8%, respectively. In a flow cytometric (FCM) analysis, GLA and GLB enhanced the formation of lymphoblasts of BALB/c splenic leukocytes at a concentration of 100 µg/ml, by 38.3% and 61.3%, respectively. When ip injected into ICR mice, GLB exerted anti-leukopenic effect against cyclophosphamide (75 mg/kg, ip) in that the leukocyte counts of the peripheral blood of the normal and the cyclophosphamide-treated mice, respectively, was $(11.1 \pm 3.8) \times 10^3$ and $(4.0 \pm 1.8) \times 10^3$, while the GLB-cyclophosphamide treated mice showed a leukocyte count of $(10.8 \pm 5.1) \times 10^3$ cells/µl. These results suggest that GLB is a promising candidate for an effective cancer immunotherapeutic agent.

Keywords □ *Ganoderma lucidum*, GLA, GLB, flow cytometry, lymphoblast-formation, antitumor polysaccharide, immunomodulator, antileukopenic.

영지버섯의 약리활성에 관한 연구로는 Mizuno 등^{1,2)}이 영지버섯 자실체의 항암효과에 대해 보고하였으며, Kohda 등³⁾은 히스타민 방출 억제효과를 보고하였고, 항고혈압 및 간장질환 치료효과 등에 대해서도 흥미로운 연구결과⁴⁻⁶⁾가 보고된 바 있다. 영지의 약효성분 중에서 열탕 추출로 얻어지는 단백질다당체(protein-polysaccharide) 분획은 마우스의 sarcoma 180 고형암에 대하여 우수한 항암효과가 보고^{1,7)}되었다. 일반적으로 영지 등 담자균류에서 분리된 단백질다당체는 일반 세포독성 항암 화학요법제와는 달리 뚜렷한 부작용이 없으며, 종양 발생에 의해 손상된 면역기능을 회복 또는 증강 시킴으로써⁸⁻¹¹⁾ 항암력을 나타내기 때문에 기존의

항암요법제와 병용 할 경우 그 치료 효과를 증대시키고 부작용을 완화¹²⁾시킬 수 있다. 따라서 이들 단백질다당체는 항암 면역요법제(antitumor immunotherapeutic agent)^{13,14)}로서 연구의 대상이 되고 있다. 실제 예로 구름버섯(운지, *Coriolus versicolor*) 분리균주의 배양 균사체로부터 분리한 단백질다당체는 Krestin¹⁵⁾이라는 의약품으로, 그리고 야생 천연 구름버섯 자실체로부터 추출한 단백질다당체는 Copolang^{16,17)}이라는 의약품으로 이미 위암 등의 치료에 사용되고 있으며, 최근에는 상황(桑黃, *Phellinus linteus*) 배양균사체 추출물이 Mesimalex^{18,19)}라는 의약품으로 개발되어 이용되고 있다. 이외에도 표고버섯(*Lentinus edodes*) 자실체로부터 분리한 lentinan^{20,21)}, 치마버섯(*Shizophyllum commune*)의 배양액으로부터 분리한 schizophyllan²²⁾ 등도 각종 암의 치료에 활용되고 있다. 그러나 이들 보다 효과적인

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5927 (팩스) 042-821-5903

단백다당류의 개발에 대한 기대 및 가능성은 상존하고 있다. 이에 본 연구자들은 이미 항암 효과가 잘 알려진 영지버섯을 연구 대상으로 하되 성숙된 영지버섯에서는 볼 수 없는 성장점, 즉 영지버섯의 성장과정에서만 나타나는 점성을 지닌 독특한 부위로부터 단백다당체 분획을 분리하여 그 항암 면역활성이 일반 영지버섯보다 탁월함을 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

영지버섯 자실체와 성장점 - 본 연구에 사용한 영지버섯 자실체는 성숙된 편각지(적지)의 갓(pileus) 부분을 말하며, 영지버섯 성장점이란 영지버섯 자실체 생성 초기에 나타나는 황백 내지 황갈색의 점성을 지닌 선단부를 말한다.

단백다당체의 분리 정제 - 이미 보고된 방법²³⁾에 의거하여 단백다당체 분획을 제조하였다. 즉 건조 시료를 조말로 분쇄한 후 증류수를 가하고 끓는 수욕상에서 2시간씩 2회 열탕 추출을 시행하였으며, 감압 농축한 추출액에 3배량의 95% 에탄올을 가해 침전을 생성시키고 4°C에 하룻밤 방치후 침전을 원심분리하였다. 분리된 침전을 소량의 증류수에 재용해시킨 후 증류수에 대하여 4°C에서 10일간 투석을 시행하고 투석 내용물을 동결 건조하여 수용성 건조 분말을 획득하였다. 영지버섯의 자실체로부터 분리한 수용성 단백다당체를 GLA, 영지버섯 성장점으로 부터 분리한 수용성 단백다당체를 GLB라 하기로 한다.

실험 동물 - BALB/c 마우스는 국립보건안전연구원과 한국화학연구소로부터, ICR 마우스는 대한실험동물센터로부터 각각 생후 약 4주령의 것을 분양 받아 7일 이상 안정화시킨 후 실험에 사용하였으며 전 기간 사료와 물은 자유로이 먹게 하였고 실온은 22±2°C, 습도는 50%를 유지하였으며 하루에 12시간씩 조명을 시행하였다.

임파아구 생성 촉진 효과에 관한 유세포 분석학적 실험 - BALB/c 마우스의 비장을 적출하여 이미 보고한 방법²⁴⁾에 준하여 비장 백혈구 현탁액을 제조하였다. 즉 비장을 100 mesh stainless steel screen 상에서 가볍게 문질러 분쇄한 후 인산염 완충액으로 2회 세척하고 0.83% NH₄Cl 용액을 이용하여 적혈구를 용혈시켜 제거하였다. 3회 세척 후, 2×10⁶cells/ml가 되도록, 10% fetal calf serum(Hyclone)을 첨가한 RPMI 1640 배

지에 현탁시켰다. 비장 백혈구 현탁액(2×10⁶ cells/ml) 500 μl씩을 6 ml 시험관에 넣고 단백다당체 시료 용액 500 μl를 가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 세포를 완충액으로 2회 세척하고 0.5 ml의 완충액에 부유시켜 propidium iodide 용액 20 μl씩과 혼합한 후 Beckton-Dickinson사의 FACScan으로 분석하였다. 자료 취합은 시료당 5,000개 세포에 대해 forward scatter(FSC), side scatter(SSC), FL3를 list mode로 취합하였으며 취합된 자료의 분석은 FSC, FL3의 dual parameter dot plot상에서 propidium iodide를 uptake한 후 높은 FL3값을 갖는 세포들을 dead cell로 간주하였으며 FSC, SSC dual parameter dot plot 상에서 높은 FSC, SSC 값을 갖는 세포들을 lymphoblast로 간주하였다.

항암 실험 - 체중 20~24 g의 암컷 ICR계 마우스 왼쪽 서혜부 피하에 sarcoma 180 세포 (1×10⁶ cells/mouse)를 이식하였으며, 실험약물은 암이식 24시간 후부터 매일 1회씩 10회 복강 주사하였다. 암이식 30일 만에 실험동물을 치사시키고 유발된 고형암을 적출하여 그 중량으로부터 공식-1에 따라 종양저지백분율(% tumor inhibition ratio)을 계산하여 항암 효과의 지표로 삼았다.

$$\text{tumor inhibition ratio} = \frac{C-T}{C} \times 100 \dots \text{공식-1}$$

단 C는 생리식염수 투여 대조군의 평균 종양 중량(g)
T는 약물 투여군의 평균 종양 중량(g)

In vitro 세포독성 실험 - 단백다당체 시료의 암세포에 대한 직접 세포독성 유무를 판명하기 위하여 sarcoma 180 세포를, 시료농도(0~400 μg/ml)를 달리한 10% FCS-RPMI 1640 배지에 1×10⁶ cells/ml 농도로 접종하고, CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 trypan blue exclusion법으로 % dead cell을 구하여 세포독성을 판정하였다.

백혈구 감소증 억제 실험²⁵⁾ - 숫컷 ICR 마우스를 실험동물로 하고 정상동물군에는 생리식염수만을, 대조군에는 일정(Fig. 1)에 따라 생리식염수 및 cyclophosphamide(75 mg/kg)를, 시료투여군에는 단백다당체(100 mg/kg) 및 cyclophosphamide를 각각 투여하였다. 제 8일에 모든 군의 혈액을 채취하여 자동 혈액분석기(SYSMEX, K-1000, Toa Co., Japan)를 이용하여

백혈구치를 측정하였다. 또한 혈액을 채취한 직후 실험 동물을 치사시키고 비장을 적출하여 평량하였다.

결과 및 고찰

임파아구 생성 촉진 효과 - 단백다당체 시료 존재하에 48시간 배양한 BALB/c 마우스의 비장 백혈구를 유세포 분석기로 분석한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이

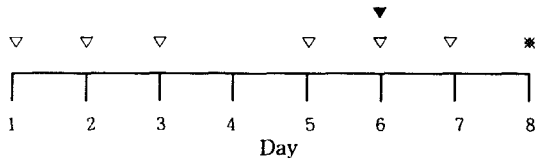


Fig. 1 - Experimental schedule for the antileukopenic effect of protein-polysaccharide against the leukopenia induced by cyclophosphamide in ICR mice.

(▽: ip injection of GLB, a protein-polysaccharide fraction of the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum*, ▼: ip injection of cyclophosphamide. *: blood analysis)

영지버섯 단백다당체인 GLA와 GLB는 상당수의 세포들을 활성화시켜 lymphoblast로 전환시켰음을 알 수 있었다. 이러한 임파아구 생성 촉진 효과를 대조군과 비교한 결과, 대조군은 전체 세포의 27.4%가 임파아구 영역에 들었으나 GLA 처리군은 100 µg/ml과 200 µg/ml에서 각각 37.9% 및 40.6%가 임파아구 영역에 들어 대조군에 비해 임파아구 생성이 각각 38.3%와 61.3% 증가하였다. 한편 GLB는 100 µg/ml과 200 µg/ml에서 각각 44.2% 및 52.8%로 대조군보다 임파아구 생성이 각각 61.3%와 92.7% 증가하였다. 따라서 GLB가 GLA 보다 임파아구 생성 촉진 효과가 강력함을 알 수 있었다(Table I).

한편 propidium iodide로 염색된 세포 즉, 사멸세포 비율은 Table 1에 나타낸 바와 같이, 대조군이 10.0%, GLA 100, 200 µg/ml에서 각각 13.7%, 17.4%였으나 이와는 대조적으로 GLB는 6.3% 및 4.2%였다. 이러한 결과는 GLB가 비장 백혈구에 대해 세포독성이 없음을 물론, 오히려 세포보호 효과가 있음을 암시하고 있다.

항암 효과 - ICR 마우스 피하에 이식한 sarcoma

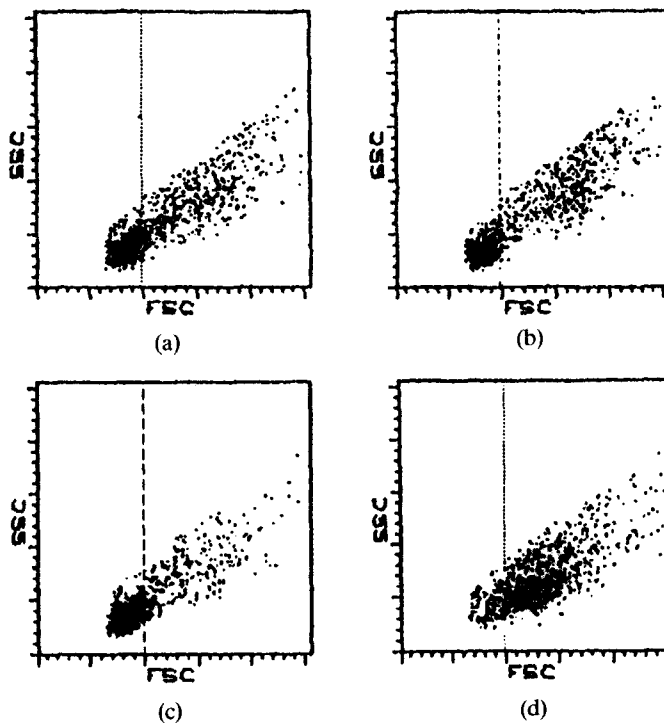


Fig. 2 - Lymphoblast formation-stimulatory effects of GLA and GLB, protein-polysaccharides of *Ganoderma lucidum*, on the primary cultured BALB/c mice splenic leukocytes. The cells were cocultured with the stimulants for 48 hr and subjected to flow cytometrical analysis. (A) Control, (B) Con A (5 µg/ml), (c) GLA (100 µg/ml), (D) GLB (100 µg/ml).

180 고형암에 대하여 GLA 및 GLB는 100 mg/kg/day에서 각각 56.3% 및 81.8%($p < 0.01$)의 종양 저지율을 나타냄으로써 영지버섯 자실체보다는 생장점에서 추출한 GLB가 더 강력한 항암효과를 발휘함을 알 수 있었다(Table II).

Sarcoma 180 세포에 대한 직접 세포독성 - sarcoma 180 세포를 다당체 시료(100 $\mu\text{g/ml}$)와 함께 24시간 배양한 후 trypan blue exclusion 법으로 viability를 확인한 결과, 대조군의 사멸세포가 7.9%인데 비해 GLA 및 GLB는 6.2~10.9%로서 유의할 만한 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 GLA 및 GLB의 항

Table I— *In vitro* Lymphoblast-formation stimulatory effects of the protein-polysaccharides of *Ganoderma lucidum* on the BALB/c mouse splenic leukocyte

	$\mu\text{g/ml}$	% viability ^a after 48hr culture	Lymphoblast formation	
			% blast	% increase ^b
control	-	90.0	27.4	-
ConA ^c	5	86.5	82.5	201.0
	10	85.0	90.6	231.0
GLA [*]	100	86.3	37.9	38.3
	200	82.6	40.6	61.3
GLB [†]	100	93.7	44.2	61.3
	200	95.8	52.8	92.7

^aThe viability was cytometrically determined by using propidium iodide exclusion method.

^b% increase : $\frac{T-C}{C} \times 100$,

where C and T is the % blast of the control and the test group, respectively.

^cCon A=concanavalin A.

^{*}GLA=a protein-polysaccharide fraction of the carpophores of *Ganoderma lucidum*.

[†]GLB=a protein-polysaccharide fraction of the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum*.

암효과는 숙주매개성(host-mediated)임을 알 수 있다.

백혈구 감소증 억제 효과 - Table III에 나타낸 바와 같이, cyclophosphamide 투여군의 말초혈액 중 백혈구 수치는 현저히 감소하여 $4.0 \pm 1.8 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 를 나타내었으나 (정상동물군: 11.1 ± 3.8), GLB를 투여한 실험군의 백혈구치는 cyclophosphamide 투여에도 불구하고 10.8 ± 5.1 로서 정상동물군과 대등한 수준이었다. 한편 체중에 대한 비장 중량의 백분율(Table III)을 보면 정상동물군이 1.23 ± 0.09 인데 반해 cyclophosphamide만을 투여한 대조군은 0.76 ± 0.14 로 현저히 감소하였으나 cyclophosphamide 및 GLB 병용투여군은 1.35 ± 0.65 로서 정상동물군과 $p = 0.05$ 수준에서 유의적 차이가 없었다. 이는 cyclophosphamide 투여로 인한 골수억제가 GLB 투여로 거의 완벽하게 억

Table II— Antitumor activities of GLA and GLB against sarcoma 180 solid tumor in ICR mice

Treatment	No. of mice	dose (mg/kg/day)	tumor weight (g)	% inhibition ratio ^a
saline	14	-	1.90 ± 0.35^b	-
GLA [*]	10	100	0.83 ± 0.26	56.3
	10	200	1.11 ± 0.23	41.6
GLB [†]	10	50	1.52 ± 0.25	20.0
	10	100	$0.35 \pm 0.07^*$	81.8

^a% inhibition ratio = $\frac{T-C}{C} \times 100$

where C and T is the mean tumor weight of the control and the test group, respectively.

^bmean \pm SE.

^{*}GLA=a protein-polysaccharide fraction of the carpophores of *Ganoderma lucidum*.

[†]GLB=a protein-polysaccharide fraction of the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum*

*significant at $p < 0.01$

Table III— Antileukopenic effect of GLB against the leukopenia induced by cyclophosphamide in the ICR mice

Group	No. of mice	Body weight ^a			% body wt. change ^b	Spleen wt/Body wt	Spleen wt	Leukocyte
		-24hr (g)	24hr (g)	48hr (g)		%	(g)	($\times 10^3/\mu\text{l}$)
normal	10	26.2 ± 2.3^c	26.3 ± 2.4	26.1 ± 2.4	-0.4	1.23 ± 0.30	0.32 ± 0.09	11.1 ± 3.8
CY [†]	10	23.8 ± 4.1	23.0 ± 4.2	22.6 ± 1.6	-5.0	0.76 ± 0.14	0.17 ± 0.04	4.0 ± 1.8
GLB [†] +CY	10	24.0 ± 2.9	24.1 ± 3.0	23.9 ± 2.9	-0.4	1.35 ± 0.65	0.32 ± 0.14	10.8 ± 5.1
GLB	10	25.2 ± 2.3	25.2 ± 2.4	25.2 ± 2.1	0.0	1.47 ± 0.22	0.37 ± 0.07	13.8 ± 3.5

^aThe body weight was measured at the designated time before or after the administration of cyclophosphamide.

^b% body wt. change = $\frac{\text{Body weight at 48hr} - \text{Body weight at -24hr}}{\text{Body weight at -2hr}} \times 100$

^cMean \pm SD

[†]CY: cyclophosphamide, 75 mg/kg \times once ip.

[†]GLB: a protein-polysaccharide fraction of the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum*, 100 mg/kg ip.

제 되었음을 보여주고 있다. 이러한 결과들은 항암제 투여로 인한 백혈구 감소증을 GLB로 예방 또는 완화시켜 줄 수 있음을 암시하고 있다.

결 론

영지버섯 성숙 자실체 및 성장부로부터 단백당체 GLB 및 GLA를 각각 분리하고 이들의 항암효과 및 면역활성 등을 비교 실험한 결과, 영지버섯 성장점으로부터 분리한 단백당체 GLB가 GLA 보다 우수한 항암효과 및 임파아구 생성 자극 효과를 발휘하였으며, cyclophosphamide 투여로 야기되는 백혈구 감소증을 거의 완벽하게 억제하였다. 따라서 GLB는 항암 면역요법의 유망한 새후보 약물로서 판단되며 현재 이에 대한 후속 연구가 진행 중이다.

감사의 말씀

이 연구는 1994년도 충남대학교 약학대학 부설 의약품개발연구소 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 또한 FACScan 사용 등에 많은 도움을 주신 이화여자대학교 약학대학의 김 길현 교수님과 KIST 생명공학연구소 이 회구 박사님, 그리고 본 연구에 직접적인 도움을 아끼지 않은 양 회정 석사와 이 대우 석사에게 감사합니다.

문 헌

- Mizuno, T., Kato, N., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, K. and Shimizu, M. : Fractionation, structural features and antitumor activity of water soluble polysaccharide from Reishi, the fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Noeigaku Kaishi* **58**, 871 (1984).
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. : Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm. Bull.* **29**, 3611 (1981).
- Kohda, H. Tokumoto, W., Sakamoto, K., Fujii, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S. and Uchida, M. : The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum*(Fr.)Karst. Histamine release-inhibitory triterpene. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1367 (1985).
- Shin, H. W., Choi, E. C., Kim, H. W. and Kim, B. K. : Studies on inorganic composition and immunopotentiating activity of *Ganoderma Lucidum* in Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* **16**, 181 (1985).
- Hyun, J. W., Choi, E. C. and Kim, B. K. : Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVII). Antitumor components of the basidiocarp of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **18**, 58-69 (1990).
- Kim, M. J., Kim, H. W., Lee, Y. S., Shim, M. J., Choi, E. C. and Kim, B. K. : Studies on safety of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **14**, 49 (1986).
- Kang, C. Y., Shim, M. J., Choi, E. C., Lee, Y. N. and Kim, B. K. : Studies on antitumor components of Korean Basidiomycetes. Mycelial culture and antitumor components of *Ganoderma lucidum*. *Kor. Biochem. J.* **14**, 101 (1981).
- Kupin, V. : A new biological response modifier, *Ganoderma lucidum*, and its application in oncology. *Abstracts of the international symposium on Ganoderma lucidum* 36 (1992).
- Maeda, Y. Y. and Chihara, G. : Lentinan, a new immuno-accelerator of cell-mediated response. *Nature* **228**, 634 (1971).
- Lee, M. H., Kim, H. W., Shim, M. J., Toh, S. A., Choi, E. C. and Kim, B. K. : Studies on constituents of higher fungi of Korea. General constituents and immunostimulation of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **14**, 149 (1986).
- Hersh, E. M. and Taylor, C. W. : Immunotherapy by active immunization : Use of non-specific stimulants and immunomodulators. In *Biologic Therapy of Cancer*, Vincent, T., Hellman, S. and Rosenberg, S. A. (Eds.), J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 617 (1991).
- Tsuro, T., Yusa, K., Sudo, Y., Takamori, R. and Sugimoto, Y. : A fluorine-containing anthracycline (ME 2302) as a antitumor agent against murine and human tumors and their multidrug resistant sublines. *Cancer Res.* **49**, 5537 (1989).
- Hengst, J. C. D. and Mitchel, M. S. : Principles of combining biological response modifier with

- cancer chemotherapy. In *Fundamentals of cancer chemotherapy*. Hellman, K. and Carter, S. K. (Eds.) McGraw-Hill Book Co., New York 64 (1987).
- 14) Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G., Nishioka, K. : Anticomplementary Activity of Antitumor Polysaccharides. *Nature, New Biol.* **238**, 59 (1972).
 - 15) Ohno, R., Yokomaku, S., Yakayama, K., Sugiyura, S., Imai, K. and Yamada, K. : Effect of protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, on the immune response of mice to sheep red blood cells. *Gann* **69**, 97 (1976).
 - 16) Moon, C. K., Lee, H. S., Mock, M. S., and Kim, D. O. : Antitumor activity of the polysaccharide fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its effects on the immune function. *Yakhak Hoeji* **31**, 126 (1987).
 - 17) Jo, S. K., Kim, S. H. and Yun, T. K. : Effect of copolang on murine immune function and antitumor activity. *J. Kor. Can. Aso.* **19**, 1987.
 - 18) Ikegawa, T., Nakanishi, Y., Uehara, N., Chihara, G. and Fukoka, F. : Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**, 155 (1968).
 - 19) Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y., Han, M. w. and Kim, K. H. : Effect of Kp, an antitumor Protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. *Arch. Pharm. Res.* **16**, 336 (1993).
 - 20) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fraction of the polysaccharide with antitumor activity, especially lentinan, from the *Lentinus edodes* (Berk) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**, 2776 (1970).
 - 21) Chung, K. S., Choi, E. C. and Kim, B. K. : Studies on constituents of the higher fungi of Korea. An antitumor fraction from the culture filtrate of *Lentinus edodes* DMC7. *Kor. J. Mycol.* **12**, 129 (1984).
 - 22) Komatsu, N., Okubo, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S. : Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune.*, *Gann* **60**, 137 (1969).
 - 23) Kim, B. K., Chung, H. S., Chung, K. S. and Yang, M. S. : Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* **8**, 107 (1980).
 - 24) Hyun, J. W., Kim, C. K., Park, S. H., Yoon, J. M., Shim, M. J., Kang, C. Y., Choi, E. C. and Kim, B. K. : antitumor components of *Agrocybe cylindracea*. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 207 (1996).
 - 25) Klaus, G. G. B. : Lymphocytes a practical approach, IRL press, Oxford, England, 24 (1987).