

장수버섯 자실체의 열탕추출액으로부터 분리한 단백다당체의 약리적 효과

윤상홍^{1*} · 임재현¹ · 김양섭¹ · 김창한² · 조준형³ · 황영수¹

¹농업과학기술원 생물자원부

²건국대학교 축산학과

³수의과학연구소

Pharmacological Effects of Proteoglycans Extracted from Fruiting Bodies of *Fomitella fraxinea*

Sang-Hong Yoon*, Jae-Hyeon Lim¹, Yang-Seop Kim¹,
Chang-Han Kim², Joon-Hyeong Jo³ and Young-Soo Hwang¹

¹National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707

²Keonguk University, Seoul 133-701

³National Veterinary Research Institute, Anyang 430-016, Korea

ABSTRACT: Anti-complementary assay for immuno-stimulating polysaccharide screening, human tumor colony-forming assay for discovering anti-tumor drugs, and toxic assay against mouse were performed to examine pharmacological activities of polysaccharides extracted from fruiting bodies of Jang-soo mushroom (*Fomitella fraxinea*). Hot water (100°C, FF-I), 1% ammonium oxalate solution (80°C, FF-II), and 5% sodium hydroxide solution (80°C, FF-III) were used for extraction of three polysaccharides from fruiting bodies of it. Anti-complementary activity of FF-I was more effective than the others. FF-I was further fractionated into three groups of polysaccharide by DEAE-Sephadex A25 column chromatography (FF-NP, FF-AP1, and FF-AP2). FF-AP1 showed not only the highest anti-complementary activity but also the growth-inhibitory activity against Snu-1 (human stomach cancer cell) among 9 kinds of human tumor cell lines. But FF-AP2 exhibited its activity against Hep-2(larynx cancer) and KB(mouth epidermal cancer) cell lines at 500 µg/ml although its anti-complementary activity was lower than it of FF-AP1. When FF-I was orally administrated to mice with dosage of 5000 mg/kg, no remarkable changes were observed in viewpoint of tissue-pathology.

KEYWORDS: Anti-complementary activity, Human tumor colony-forming assay, Toxicity test, *Fomitella fraxinea*

자연계의 생물로부터 분리한 일부 다당체는 외부에서 침입한 항원이나 생체내에서 생기는 이상물질을 탐지하여 제거하는 면역기능을 증강시킴으로써 생체의 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다(Benzamini 등, 1988). 특히 다당류는 동물이나 인간의 생체에 부작용이 매우 적은 저독성 물질이기 때문에 약의 투여량이나 기간을 증가하여도 돌연변이나 알레르기 반응에는 영향을 주지 않는 안

전한 물질로 알려져 있으므로 새로운 신약 개발의 이상적인 재료로 많은 관심의 대상이 되고 있다(Franz 등, 1989).

동양에서 약초로 사용되어 온 일부 식물의 주 유효성분인 다당체는 척추동물의 면역 방어계에 중요한 역할을 하는 보체들을 활성화시킴으로써 외부에서 침입한 항원들에 대한 거식세포(macrophage)나 백혈구 세포의 탐식능(endocytosis)을 높이거나(Luttig 등, 1989), 세포막 공격 단백질(membrane attack protein)을 생성하여 감염미생물의 세포막

*Corresponding author

을 용해시킴으로써 궁극적으로 숙주의 면역기능을 증강시키는 것으로 알려져 있다(Reinhard 등, 1986). 또한 일부 담자균(버섯)에서 분리한 다당체가 암세포 증식을 억제하거나 치사시킨다는 보고가 다수 발표된 바 있는데, 특히 *Lentinus edodes*의 자실체와 *Coriolus versicolor*의 균사체로부터 분리한 다당체인 Lentinan과 Krestin은 그것의 항종양 효과를 인정받아 일본에서 이미 상품화되어 임상적으로 적용되고 있다(Chihara 등, 1970; Hirase 등, 1976). 이외에도 브라질의 열대 우림지역에 서식하는 *Agaricus blazei*, 동아시아 지역의 뽕나무 고목에서 자라는 *Phellinus linteus*나 *Ganoderma applanatum*에서 분리한 다당체는 동물실험에서 매우 탁월한 항암효과를 지닌 것으로 보고된 바 있다(Mizuno 등, 1989; Ikegawa 등, 1968; Usui 등, 1981).

한편 본 실험에서 선발된 장수버섯은 국내에서 널리 자생하는 버섯으로 인공재배 방법이 매우 용이하므로 그것의 약리적 효과만 인정된다면 버섯재배 농가의 소득에 크게 기여할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 국내산 자연 장수버섯 자실체의 열탕추출액으로부터 분리한 다당체들을 대상으로 항보체 활성, 암세포 성장 저해활성, 및 쥐에 대한 급독성 검정을 시행하여 그것의 약리성과 안전성을 확인하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

국내의 아카시아 나무에 자생하는 장수버섯(*Fomitella fraxinea* RDAGB-129)의 자실체를 채취한 뒤, 작게 조각 내어 물로 세척하여 응달진 곳에서 건조시켜 다당체 분리를 위한 공시재료로 사용하였다. 한편 항보체 검정을 위해 양의 감작적 혈구(IgM hemolysine sensitized sheep erythrocyte, EA cells)와 정상인의 혈청(normal human serum)은 일본 Biotest 연구소로부터 구입하여 사용하였고 clonogenic 검정을 위해 사용된 9종의 인간 종양 세포들은 미국 Texas 대학 D. D. Von Hoff 교수의 암학 연구실에서 분양받았으며 암세포주의 배양에 사용된 RPMI 1640배지,

Eagle's MEM 배지, CMRL1066배지, McCoy's 5A 배지 fetal calf serum, nonessential amino acids, insulin 등은 Gibco-BRL사의 제품을 구입하여 사용하였다.

정량방법

중성당 함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 phenol-sulfuric acid 방법(Dubois 등, 1956), uronic acid 함량은 glucuronic acid를 표준으로 carbazole 분석법(Galambos, 1967)에 의해 측정하였으며 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준으로 Bradford법(Bradford 등, 1976)에 의해 정량하였다.

조다당체의 분리

본 연구의 공시재료인 장수버섯(*Fomitella fraxinea* RDAGB-129)은 담자균류, *Fomitella* 속에 속하는 버섯으로서 한국 내에 자생하는 아카시아 나무에서 분리하였다. 수집된 장수버섯 자실체는 작게 조각 내어 말려서 85% ethanol로 30°C에서 하루동안 침지한 뒤 ethanol 용해성 물질을 버린다. 풍건한 자실체 1kg에 5l의 물을 가해 100°C에서 1시간 이상 열을 가해 추출한 액을 Whatman no.2 여지로 여과하여 이 액에 2.5배 부피의 ethanol을 가하고 4°C에서 하룻밤 방치하여 그 침전물을 원심분리(5,000 rpm, 10분)로 회수하였다. 회수된 침전물을 증류수로 녹여 3일간 투석후 동결 건조한 분말을 수용성 조다당체 시료로 하였다. 또한 염용성 및 alkali 용해성 조다당체의 분리는 Fig. 1의 과정에 의해 분리되었다.

DEAE Sephadex A-25 ion exchange chromatography

상기에서 분리한 조다당체를 더욱 정제하기 위해 조다당체 분말 500 mg을 25 ml의 0.01M 인산염 완충액(pH 7.0)에 용해시킨 후 DEAE-Sephadex A-25로 충전시킨 column(Φ 5×25 cm)을 이용하여 0.01M 인산염 완충액(pH 7.0)으로 1차, 0~2M NaCl gradient로 2차 용출시키면서 3 ml/min 속도로 9 ml/fraction을 분취하여 phenol-sulfuric acid 반응에 양성인 분획들을 모아 3일간 투석 및

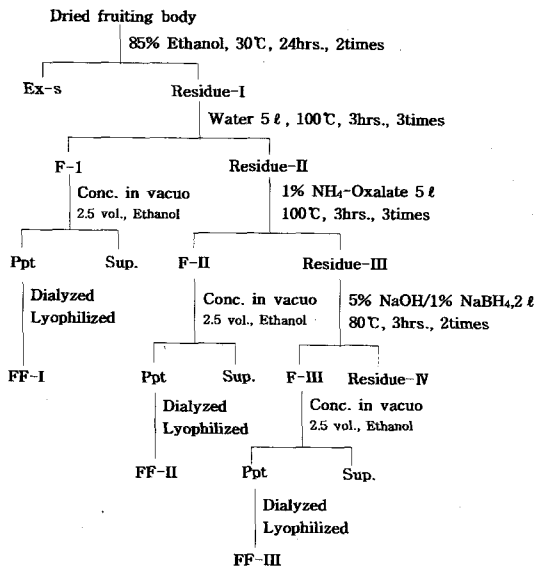


Fig. 1. Flow chart for fractionation of polysaccharides from fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*. (Ex-S: Extracting supernatant)

동결건조하여 중성다당체와 산성다당체 분말을 얻었다.

항보체 활성의 측정

항보체 활성은 Mayer 방법(Kabat과 Mayer, 1961)에 의해 측정하였다. 즉 증류수로 녹인 해당 농도의 다당체 용액 50 μ l, 정상인간 혈청 50 μ l와 gelatine-veronal saline(GVB, pH 7.4) 완충액 50 μ l을 혼합한 뒤 37°C에서 30분간 사전 반응시켰다. 반응 후 350 μ l의 GVB 완충액과 250 μ l의 감작된 면양 적혈구 세포(haemolysine sensitized sheep red blood cell, 1×10^8 세포/ml)를 가한 뒤 10배에서 160배로 2배씩 연속 희석하여 37°C에서 1시간 배양하였다. 배양후 사전 냉각된 인산 완충조제액(PBS, pH 7.4)을 각 2.5 ml씩 가하고 4°C에서 10분간 3,000 rpm으로 원심분리한 상층액을 412 nm에서 homoglobin 함량을 측정함으로써 잔존 용혈 활성을 측정하였다. 한편 대조구는 동일 조건에서 시료를 함유하지 않은 채 측정하였으며 처리구의 항보체 활성도는(ITCH, Inhibition of 50% of total complement hemolysis) 대조구 대비 총보체 용혈(TCH50, 50% of total complement

hemolysis)의 저지율로서 나타내었다

$$\text{ITCH}_{50}(\%) = \frac{\text{대조구 TCH}_{50} - \text{처리구 TCH}_{50}}{\text{대조구 TCH}_{50}} \times 100$$

Clonogenic 분석법에 의한 항암성 검정

항암성 검정은 건국대학교 동물 자원 연구센터 김창한 교수의 협조를 받아 9종의 인체 암세포 간주(human tumor stem lines)를 직접 이용하는 clonogenic plate assay법으로 수행하였다(Hamburger 등, 1977; 김 등, 1991). 즉 직경 35 mm 동물조직 배양용 petri dish에 0.5% agar를 함유하는 double-enriched CMRL배지 1 ml을 주입하여 하층을 제조한 다음 CO₂ incubator에 보존하면서 사용하였다. 하층 위에 0.3% agar와 각 농도의 다당체 용액(5, 0.5, 0.05 mg/ml)을 함유하는 각 세포가 현탁된 배양 배지 1 ml을 분주하여 굳힌 뒤 37°C의 5% CO₂ 항온기에서 14일간 배양하였다. 배양 14일 후 약제 처리 plate와 비처리 plate에 나타난 50 μ m 이상의 암세포 집락의 수를 비교함으로써 약제 감수성을 백분율로 나타내었다.

Mouse에서의 급성 경구 독성 시험

ICR계 SPF mouse 5주령의 암, 수(♀, ♂) 각각 80수를 암, 수 각각 6개군으로 나누어 mouse kg당 조다당체 분말 988, 1481, 2222, 3333 및 5,000 mg이 되게끔 농도 조절하여 1회 경구투여한 후, 당일에는 30분, 1시간, 2시간, 4시간 및 8시간, 그 이후에는 매일 오전 및 오후 2회씩 14일간 독성 증상 및 증체량을 관찰하고 시험종료후 부검시 전장기의 중량을 측정하고 조직검사를 행하여 이상 유무를 관찰하였다.

결과 및 고찰

장수버섯의 특성

장수버섯의 자실체는 반원형 및 부채형이고 표면은 적갈색-갈적색을 나타내며 자실 층은 관공형, 또는 유구형이고 조직은 제3균사형(Trimitic)으로 아카시아 나무에 사물 기생 또는 활물 기생한다. Fig. 2는 장수버섯의 형태적 특성을 사진으로 나타



Fig. 2. Photographs of *Fomitella fraxinea*.

낸 것이다.

이온교환 chromatography에 의한 중성 및 산성 다당체의 분리

장수버섯 자실체의 열탕추출액으로부터 획득한 조다당체는 DEAE-Sephadex A25 chromatography에 의해 Fig. 3에서 보는 바와 같이 중성다당체(FF-NP), 2종의 산성다당체(FF-AP1, FF-AP2)로 분리되었다. FF-NP는 소량의 uronic산을 함유하지만 단백질은 거의 존재하지 않았으며 산성다당체인 FF-AP1과 FF-AP2는 7%의 uronic산과 함께 10%의 단백질이 포함되어 있기 때문에 단백질 산성다당체라 할 수 있다. 분리된 다당체의 해당 분획들을 모아서 종류수를 교환하면서 4일간 투석 및 동결건조하여 칭량한 결과 세종류 다당체의 상대증량비가 FFNP:FFAP1:FFAP2=9:4:2인 것으

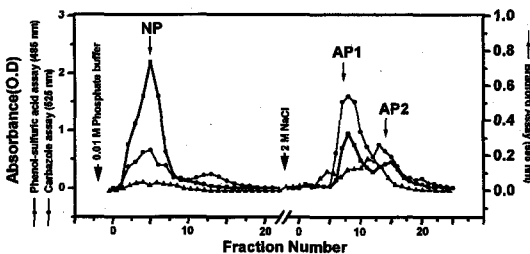


Fig. 3. Elution profiles of crude polysaccharide fraction (FF-CP) from a column of DEAE-Sephadex A-25.

The column ($\phi 5 \times 40$ cm) was equilibrated with 0.01 M phosphate buffer, and 500 mg was applied. Fractions of 7 ml were collected and polysaccharide, protein, and uronic acid were assayed by the phenol-sulfuric acid method, Bradford method, and by the carbazole-sulfuric acid method, respectively.

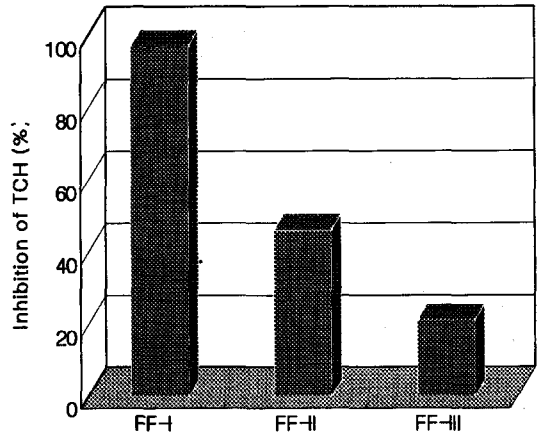


Fig. 4. Anticomplementary activities on three kinds of polysaccharides extracted from fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*.

FF-I: hot water-extractable polysaccharide
 FF-II: 1% ammonium oxalate-extractable polysaccharide
 FF-III: 5% sodium hydroxide-extractable polysaccharide

로 나타났으며 중성다당체는 백색, 산성다당체는 황갈색 무정형 분말로 획득되었다.

장수 버섯 자실체로부터 분리한 다당체들의 항보체 활성

담자균(버섯) 유래 다당체의 약리성은 종종 염용성과 alkali 용해성 다당류에 의한 것으로 일부 보고되어 있으나(Mizuno 등, 1992), 장수버섯 자실체에서 분리한 수용성, 염용성, 알칼리 용해성 다당체를 대상으로 항보체 활성 검정을 한 결과 약리적으로 인정될 만한 유효한 활성은 수용성 다당체에서 주로 나타났다(Fig. 4). 한편 수용성 조다당체를 DEAE-Sephadex A25 column chromatography로 분리한 3종의 부분 정제 다당체의 항보체 활성 검정 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 100 $\mu\text{g/ml}$ 수준에서 중성다당체(FF-NP)와 강산성 다당체(FF-AP2)가 FF-AP1에 비해 비교적 낮은 55%와 11%로 나타났고 면역기능에 관련하는 보체 군들을 가장 활성화시키는 FF-AP1은 약 99%의 매우 강력한 항보체 활성 효과를 가짐으로써 이것이 장수버섯 자실체의 항보체 활성의 주 유효성분임을 알 수 있었다. FF-AP1은 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도

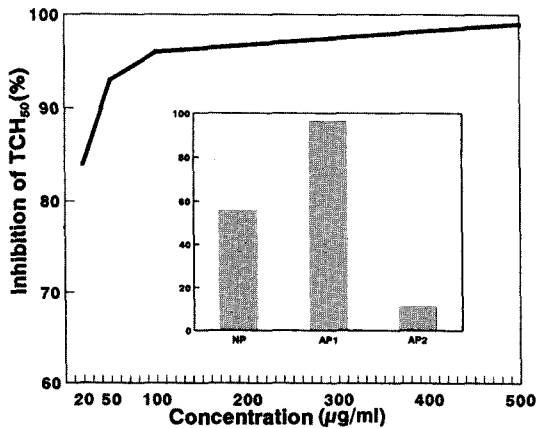


Fig. 5. Anti-complementary activities on various concentrations of FF-AP1.

Inner Fig.: Inhibition of TCH was also investigated on 100 $\mu\text{g/ml}$ concentration of neutral polysaccharide (NP) and acidic polysaccharides (AP1, AP2), which were fractionated by DEAE-sephadex A25 column chromatography

약 84%의 항보체 활성을 보임으로써 일반적으로 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 다당체 농도에서 약 70% 이상의 항보체 활성도를 보이면 그 약리성을 인정해 주는 기준에 비추어 볼 때 적어도 50배 이상의 항보체활성 효과를 나타내었다. 이것은 Shin 등(1992)이 55종의 한약재를 대상으로 선별한 대복피(*Areca catechu*)의 다당체나 항암성 다당체인 Lentinan (Sasaki 등, 1976)보다 항보체 활성이 더 우수하였으며 예로부터 악성종양이나 피부 상처의 치료제로

사용해 온 자근(*Lithospermum euchromum royle*)의 항보체 활성과 비슷한 효과를 보여주고 있다(Yamada 등, 1986). 또한 송이버섯, 표고버섯이나 느타리버섯 등에서 분리한 조다당체가 약리적으로 유효한 항보체 활성을 가지지 않는다는 Shin 등(1993)의 보고에서와 같이 담자균 유래의 다당체들이 강력한 항보체 활성을 갖는다는 보고는 드물기 때문에 본 결과는 매우 의미가 있다.

한편, 항보체활성 다당체가 면역기능 증강에 밀접히 관련된 보체계의 활성을 위해 대체 경로를 열어 줌으로써 macrophage를 자극 및 유도하여 이것이 궁극적으로 감염 미생물이나 암 세포를 억제한다는 Luettig 등(1989)이나 Hamuro 등(1978)의 보고에 비추어 볼 때, 탁월한 항보체 활성을 가진 FF-AP1은 새로운 약리성 물질로의 가능성을 높여 주고 있다.

Clonogenic plate assay법에 의한 항암성 검증

9종의 인체 암세포들을 대상으로 3종의 수용성 다당체들의 암세포 저해 효과를 clonogenic plate assay법으로 검증한 결과 암세포 생존 저해율 70% 이상을 기준으로 할 때, 대조구에 비해 0.5 mg/ml 수준에서 FF-AP1은 위암 세포주인 Snu-1에 86%, FF-AP2는 후두암 세포주인 Hep-2에 71%와 설암 세포주인 KB에 77%의 생존 억제율을 보였다 (Table 1). 이것은 기존 항종양성 항생물질인 mitomycin C, actinomycin D, adriamycin,

Table 1. Results of clonogenic assays for inhibition of 9 human tumor cell lines

Human Tumor Cell Line	AP1 (mg/ml)			AP2 (mg/ml)			NP (mg/ml)		
	5	0.5	0.05	5	0.5	0.05	5	0.5	0.05
Farrow(melanoma)	38	43	100	97	100	100	93	100	100
Raji(lymphoma)	11	45	56	19	33	48	24	57	90
Calu-3(lung cancer)	19	50	85	14	69	97	81	100	100
WiDr(colon cancer)	65	98	98	75	79	94	85	86	91
Hep-2 \blacklozenge (larynx cancer)	59	100	100	3	29	96	94	100	100
Hep-G2(liver cancer)	57	59	70	24	66	71	58	58	78
Caki-2(kidney cancer)	26	75	83	24	70	86	19	90	98
KB \blacklozenge (mouth epidermoid)	7	33	46	19	23	35	14	41	50
Snu-1 \blacklozenge (stomach cancer)	8	14	33	37	41	51	7	59	63

*values is % ratio of survival of human tumor colonies on agar media.

bleomycin 등 보다는 수 백배 낮으나 분리 방법의 용이성, 상대적으로 높은 수율과 저독성을 감안해 보면 이러한 단점이 상쇄될 것으로 생각된다.

한편 clonogenic 분석법은 기존의 막대한 유지비가 소요되는 실험동물에 의한 항암성 검정법보다 경제적으로 비용 절감 효과가 있고 무엇보다 다양한 암세포 주에 대한 특정 유효 물질의 선택성과 투여량을 신속히 결정할 수 있으므로 임상적으로 매우 유용한 기술이다(Von Hoff 등, 1981). 일반적으로 약리성 다당체는 앞에서 언급한 바와 같이 숙주 매개성 면역기능(host-mediated immune response)을 증강시켜 암세포를 제어한다고 알려져 있으나 clonogenic 검정법은 암세포에 대한 직접적인 저해 효과(cytotoxicity)를 보는 *in vitro* 실험이므로 분자량이 큰 다당체가 암세포 성장을 직접 저해할 수 있다는 본 결과는 매우 흥미롭다. 이와 유사한 보고로는 운지버섯 균사체에서 분리한 단백다당체가 인간의 후두암 세포를 저해한다는 것을 clonogenic plate assay법으로 확인한 이 등(1992)의 보고가 있다. 또한 조 등(1995)은 장수버섯 자실체에서 분리한 일부 산성 다당체가 TMV(Tabaco Mosaic Virus)감염에 대해 저해 효과를 가진다고 하였고 Sorimachi 등(1990)은 *Lentinus edode*에서 분리한 고분자의 lignin이 HIV에 대해 cytotoxicity를 가짐을 보고하였다. Clonogenic assay에 의해 나타난 다당체의 항암효과는 암세포주의 고체 배지내 colony 형성이 비교적 어렵고 여러가지 알려지지 않는 요인에 의해 colony 수의 변이가 많기 때문에 여러 차례의 반복 실험으로 얻어진 상기 결과들이지만 인간 생체내 암세포에도 동일한 효과를 준다고 단언할 수 없다. 그러나 고분자 다당체가 특정 암 세포에만 cytotoxicity를 보인다는 본 결과는 항암성이 숙주매개성 면역반응 뿐만 아니라 세포독성에 기인할 수 있음을 추측할 수 있다. 저독성인 것으로 알려진 다당체가 어떻게 암세포를 저해하는지는 추후 검토되어야 할 것이다.

수용성 조다당체의 급성독성 검정

상기 방법에서 얻어진 조다당체의 인체내 안전성 여부를 검정하기 위해 특정 병원체가 없는 ICR계 SPF mouse를 대상으로 급성독성 실험을 하였다.

이 결과에서 mouse당 조다당체 5,000 mg/kg 농도를 투여하고 14일 후에도 외관상 뚜렷한 독성 증상이 관찰되지 않았으며 공시약물의 투여후 간장 및 심장의 상대중량이 대체적으로 감소하는 경향이 있었으나 공시약물의 영향으로 인정될 만한 뚜렷한 조직 병리학적 소견이 관찰되지 않았다. 따라서 장수버섯 자실체로부터 분리된 조다당체와 부분 정제 다당체들은 독성이 거의 없는 안전한 물질로 생각되지만 의약품으로의 임상적 사용을 위해 안전성을 보다 확실히 하려면 만성 독성 검정, 돌연변이원성 검정, 알레르기 유발 검정 시험이 뒤따라야 할 것이다.

이상의 결과들에서 보는 바 처럼 장수버섯 자실체의 수용성 다당체들은 매우 가치 있는 약리성과 약제로서의 안전성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이것은 최근 배 등(1996)이 장수버섯 균사체 배양에서 분리한 단백다당체가 체액성 면역의 결과를 나타내는 응집소가와 용혈소가를 각 2배와 2.5배로, 항체 생성 세포를 약 90%, 말초 임파구의 탐식능을 130% 수준으로 증강시킨다는 보고와 장수버섯 자실체에서 분리한 일부 산성다당체가 B세포를 자극하여 항체 생산능을 고양시킨다는 조 등(1995)의 보고를 고려해 볼 때 면역 증강제 및 항암제로서의 개발 가능성을 높여 주고 있다. 또한 장수버섯의 인공재배법은 농업과학기술원 미생물과에서 이미 개발되어 있고(장 등, 1995), 그 생산성이 뛰어나므로 버섯 재배 농가의 새로운 소득원으로 자리잡는데 상기 결과들이 기여할 것으로 생각된다.

적 요

국내에 자생하는 장수버섯(*Fomitella fraxinea*)의 자실체에서 분리한 수용성 다당체의 약리적 효과를 검정하기 위해 본 실험을 수행한 결과는 다음과 같다. 장수버섯 자실체에서 추출한 수용성 다당체는 DEAE-sephadex A-25 column chromatography에 의해 1종의 중성다당체(FF-NP)와 2종의 산성다당체(FF-AP1, FF-AP2)로 분리되었다. 3종의 다당체중 FF-AP1이 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서도 약리적으로 유효한 항보체 활성을 나타내었다. Clonogenic assay에 의한 9종의 인체 암세포에 대

한 각 다당체의 저해효과검정에서, FF-AP1은 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 인체 위암 세포주(Snu-1)에 대해 86%, FF-AP2는 동농도에서 인체 후두암(Hep-2)과 구피암(KB)에 대해 각각 71%와 77%의 생존억제율을 보여주었다. 장수버섯 자실체로부터 열수 추출한 조다당체에 대한 mouse의 급성독성 검정시험 결과에서 반수치사량이 5000 mg/kg 이상이었으며, 육안이나 조직학적 관점에서 어떠한 이상도 관찰되지 않았다.

참고문헌

- 김창한, 이명성, 백영진. 1991. 새로운 항암물질의 탐색을 위한 plateassay에 관한 연구. 건국대학교 동물자원 연구지. 제 16집: 33-37.
- 배만중, 박무희, 이재성. 1996. 고등균류 균사체의 면역조절 기능성에 관한 연구. 한국균학회지. 24: 142-148
- 장현유, 차동열, 강안석, 홍인표, 김광표, 석순자, 윤호중, 성재모. 1995. 장수버섯의 배약적 특성. 한국균학회지. 23: 238-245.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I), 중성염 용액 추출 다당류의 특성. 한국균학회지. 23: 332-339.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(II), 열수추출 다당류의 분리 및 특성. 한국균학회지. 23: 340-347.
- Benzamini, E. and Leskowitz S. 1988. Complement. Immunology. Alan R. Liss. New York. p 121.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially *Lentinan*, from *Lentinus edodes* Sing. *Cancer Research.* 30: 2776-2781.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Franz, G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Medica.* 55: 493-497.
- Galambos, J. T. 1967. The reaction of carbazole with carbohydrates. *Anal. Biochem.* 19: 119-132.
- Hamburger, A. W. 1977. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science.* 197: 461-463.
- Hamuro, J., Hadding, U. and Bitter-Suermann, D. 1978. Solid phase activation of alternative pathway of complement by β -1,3-glucans and its possible role for tumor regressing activity. *Immunology.* 34: 695-705.
- Hirase, S., Nakai, S. and Akstu, T. 1976. Structure studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). I. Fractionation with barium hydroxide. *Yakugaku Zasshi.* 96: 413-418.
- Ikekawa, T. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus Linteus*. *GANN.* 59: 155.
- Kabat, E. A. and Mayer, M. M. 1961. Complement and complement fixation in *Experimental Immunochimistry*, 2nd edition, Charles, C., Thomas publisher, Springfield, p 459.
- Luettig, B., Stein Iler, C., Gifford, G. E., Wagner, H. and Lohmann-Matthes, M. L. 1989. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinaces purpurea*. *J. of Natl. Cancer. Institute* 81: 669-675.
- Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Asakura, T. 1990. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "*Hime-matsutake*", the fruiting body of *Agaricus blazei*, *Murill. Agric. Biol. Chem.* 54: 2889-2896.
- Mizuno, T., Ando, M., Sugie, R., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Matsuura, A. 1992. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, *Ningyotake*, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporous confluens*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 34-41.
- Reinhard Burger. 1986. Complement research: the impactat molecular genetics, *Immunology Today*, 7: 27-29.
- Sasaki, T. and Takasuka, N. 1976. Further study of the structure of lentinan, an anti-

- tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carbohydrate Research*. 47: 99-104.
- Sorimachi, K., Niwa, A., Yamazaki, S., Toda, S. and Yasmura, Y. 1990. Anti-viral of water-solubilized lignin derivatives *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1337-1339.
- Shin, K. S., Kwon, K. S. and Yang, H. C. 1992. Screening and characteristics of anti-complementary polysaccharides from chinese medicinal herbs. *J. Korean. Agric. Chem. Soc.* 35: 42-50.
- Shin, K. S., Ra, K. S., Sung, H. C. and Yang, H. C. 1993. Screening of complement-system activating polysaccharide from edible plants and its action mode. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* 25: 197-203.
- Usui, T., Iwasaki, Y., Hayashi, K., Mizuno, T., Tanaka, M., Shinkai, K. and Arkawa, M. 1981. Anti-tumor activity of water-soluble β -D-glucan elaborated by *Ganoderma applanatum*. *Agric. Biol. Chem.* 45: 323-326.
- Von Hoff, D. D., Casper, J., Sandbach, J. and Makuch, R. 1981. Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *The American J. of Medicine.* 70: 1027-1032.
- Yamada, H., Yanahira, S., Kiyohara, H., Cyong, J. C. and Otsuka, Y. 1986. Water-soluble glucans from the seed of *Coix laorymajobi* var. *Ma-Yuen*. *Phytochemistry.* 25: 129.
- Yamada, H., Cyong, J. C. and Otsuka, Y. 1986. Purification and characterization of complement activating-acidic polysaccharide from the root of *Lithospermum euchromum royle*. *Int. J. Immunopharmacol.* 8: 71-8.
- Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J. C. and Otsuka, Y. 1987. Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba*. *Carbohydrate Research.* 159: 275.