

영지버섯 생장점 단백질다당체 GLB-A, GLB-B의 항암효과 및 면역 활성화에 관한 유세포 분석학적 연구

오정연 · 정경수*

충남대학교 약학대학 미생물약품화학교실

(Received April 27, 1998)

Flow Cytometrical Analysis of the Antitumor and Immunomodulatory Activities of GLB-A and GLB-B, the Protein-polysaccharide Fractions of the Growing Tips of *Ganoderma Lucidum*

Jung-Yeon Oh and Kyeong-Soo Chung*

Laboratory of Microbial Chemistry, College of Pharmacy, Chung-Nam National University, Taejeon 305-764, Korea

Abstract—In the previous study we described the antitumor effect of GLB, a protein-polysaccharide fraction separated from the growing tips of *Ganoderma lucidum*, against sarcoma 180 solid tumor in ICR mice. In this study, we separated an acidic protein-polysaccharide fraction, GLB-A, and a basic protein-polysaccharide fraction, GLB-B, from GLB by differential precipitation, and elucidated their antitumor and immunomodulatory activities. When ip injected at the dose of 50 mg/kg/day into the ICR mice, GLB-A and GLB-B inhibited the growth of ip implantated sarcoma 180 cells by 32.4% and 21.0%, respectively. Of these, GLB-A increased the % lymphoblast in the spleen of the tumor-bearing and the normal mice by 20.9% and 123.0%, and the CD4/CD8 ratio by 73.3% and 22.4%, respectively. GLB-A also increased the expression of CD25 (IL-2 receptor α chain) in normal mice by 82.0%. These results strongly suggest that GLB-A is a promising candidate for antitumor immunomodulatory medicine.

Keywords □ *Ganoderma lucidum*, antitumor activity, immunomodulation, lymphoblast-formation, IL-2 receptor, CD4/CD8 ratio.

면역을 활성화시켜 암을 치료하는 면역요법에는 여러 방법이 사용되고 있으나, 그 중 BCG(*Bacillus Calmette-Guerin*),¹⁾ *Streptococcus* 속 세균, 담자균류 등의 미생물 및 그 성분을 이용하는 방법은 매우 활발히 연구되고 있는 분야 중의 하나이다. 한편 담자균류 중에서는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*),²⁾ 표고버섯(*Lentinus edodes*),³⁾ 구름버섯(*Coriolus versicolor*),⁴⁾ 치마버섯(*Schizophyllum commune*),⁵⁾ 잎새버섯(*Grifola frondosa*)⁶⁾ 등의 항암작용이 잘 알려져 있다. 이 중 영지버섯

은 항암작용^{7,8)} 외에도 항 allergy 및 항염증작용,⁹⁾ 면역증강작용¹⁰⁻¹²⁾에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 그동안의 연구는 주로 성숙한 자실체를 대상으로 이루어졌으며 본 연구에서 사용한 영지버섯 생장점에 대한 연구는 보고된 바가 없다. 영지버섯 생장점은 자실체 생성 초기 과정에서만 볼 수 있는 황백 내지 황갈색의 점성을 지닌 선단부를 말하며, 본 연구자 등¹³⁾은 생장점으로부터 분리한 단백질다당체 분획 GLB가 일반 영지버섯의 단백질다당체 보다 sarcoma 180에 대한 항암효과 및 cyclophosphamide-유도 백혈구 감소증에 대하여 억제효과가 더욱 우수함을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 GLB로부터 산성 단백질다당체 분획 GLB-

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5927 (팩스) 042-823-9630

A 및 염기성 단백다당체 분획 GLB-B를 분리·정제하여 그의 항암·면역활성을 유세포분석기(flow cytometer)를 이용하여 비교·연구하였다.

실험 재료 및 방법

실험동물 및 세포주 - 대한실험동물센터로부터 약 4주령의 SPF(specific pathogen free) ICR계 생쥐 암수컷을 구입하여 충남대학교 약학대학 동물실험실에서 안정화시킨 후 사용하였다. sarcoma 180 암세포는 ICR 생쥐의 복강 내에 1주일 간격으로 계대 보존 중인 것을 사용하였다.

배양 - RPMI 1640(Sigma, Missouri, USA) 배지에 1 M HEPES buffer(Sigma) 10 ml, penicillin-streptomycin solution(Sigma) 10 ml, sodium bicarbonate(Sigma) 2 g 및 56°C에서 30 분간 불활성화시킨 fetal bovine serum(Hyclon)을 10% 첨가하여 사용하였다. 배양은 모든 경우에 있어서 Forma사의 CO₂ 배양기를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 상태에서 행하였다.

영지버섯 생장점 다당체의 분리정제 - 이미 보고한 방법¹³⁾에 따라 영지버섯 생장점으로부터 단백다당체 GLB(6 g)를 분리하여 온수 240 ml에 용해시킨 후 95% 에탄올 70 ml를 첨가하고 20% 초산으로 pH를 3.0으로 조절하여 산성 분획을 침전시켰다. 이 침전을 원심분리하여 온수에 재용해시킨 후 1N-NaOH로 중화시키고 투석, 동결건조하여 건조분말 2.2 g을 얻었고 이를 "acidic fraction of GLB(GLB-A)"라 하였다. 한편 원심분리 상등액은 1N-NaOH로 중화시키고 95% 에탄올 700 ml를 가해 병용상에서 침전을 생성시켰다. 이를 원심분리하여 온수에 재용해시킨 후 투석, 동결건조하여 건조분말 3.1 g을 얻었고 이를 "basic fraction of GLB(GLB-B)"라 하였다.

다당류 및 단백질 함량 측정 - 총 다당류의 분석은 이미 보고된 방법¹⁴⁾에 따라 anthrone시약과 반응시켜 625 nm에서 발색도를 측정하여 정량하였으며 포도당을 표준당으로 사용하였다. 총 단백질의 함량은 Sedmak 등¹⁵⁾의 방법에 따라 Coomassie brilliant blue를 이용한 발색법으로 측정하였으며 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하였다.

항암실험 일정 - 실험군마다 ICR계 생쥐 5~6 마리를 사용하였고 제 1, 2, 3, 6, 7일에 시료(50 mg/kg) 또는 생리식염수를 1 일 1 회 복강주사하고 제 5 일에

sarcoma 180 암세포(1×10^6 cells/mouse)를 복강내 이식하였다. 제 8 일에 실험동물들을 치사시키고 50 IU heparine-saline 5 ml를 복강주사한 후 2~3 분 동안 마사지하였다. 복막을 절개한 후 복강세척액을 회수하고 비장을 적출하여 아래 항에 기술한 방법에 따라 복강유입세포(peritoneal exudate cell: PEC) 및 sarcoma 180 세포를 계수하고 비장 림프구의 표면항원 등을 분석하였다.

정상 생쥐에 대한 실험 일정 - 정상 ICR계 생쥐의 복강내에 생리식염수 또는 시료(50 mg/kg)를 1 일 1 회, 3 일간 연속투여하고 투여 종료 48 시간 만에 동물을 치사시키고 비장을 적출하였다.

비장 백혈구 분리¹⁶⁾ - 이미 보고한 바와 같이 적출한 비장을 100-mesh stainless steel screen 위에서 부드럽게 문질러 단세포로 분리시킨 후 PBS로 2회 세척하고 red cell lysis buffer(Sigma) 1 ml에 부유시켜 37°C 수욕상에서 3 분간 반응시킴으로써 적혈구를 용혈시켜 제거하였다. 이를 다시 PBS로 3 회 세척하였다.

면역형광 염색(Immunofluorescence staining) - 비장 백혈구는 Phycoerythrin(PE)-conjugated anti-mouse CD25 mAb, PE-conjugated anti-mouse CD4 mAb, fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-mouse CD8 mAb 등을 이용하여 직접 면역형광 염색을 하였다. 회수된 복강액 50 μ l를 취해 2 회 세척한 후 생쥐 백혈구와 반응하는 PE-conjugated anti-mouse CD45 mAb를 이용하여 면역형광 염색하였다. 본 실험에 사용한 항체들은 Sigma사로부터 구입하였다.

유세포분석(flow cytometric analysis) - Becton Dickinson 사의 유세포분석기인 FACScalibur와 Cell Quest™ 프로그램을 이용하여 다음과 같이 분석하였다.

자료취합영역 설정 - FSC(forward scatter), SSC(side scatter)의 dual parameter dot plot 상에서 FSC threshold를 설정하여 적혈구나 세포 debris 등을 제외한 영역(R1)을 설정하고 이 영역내에 포함되는 5,000~10,000 개의 세포에 대한 자료를 취합하였다(Fig. 1A). Two color 분석의 경우 FL1로 인한 FL2로의 bleeding을 보정한 후 자료를 취합하였다.

Lymphoblast 분석 - FSC/SSC dual parameter dot plot 상에서 크기 및 과립도가 큰 세포집단을 lymphoblast로 간주하되 granulocyte 영역을 피하여 영역(R2)을 설정하고 R2/R1의 백분율을 % lympho-

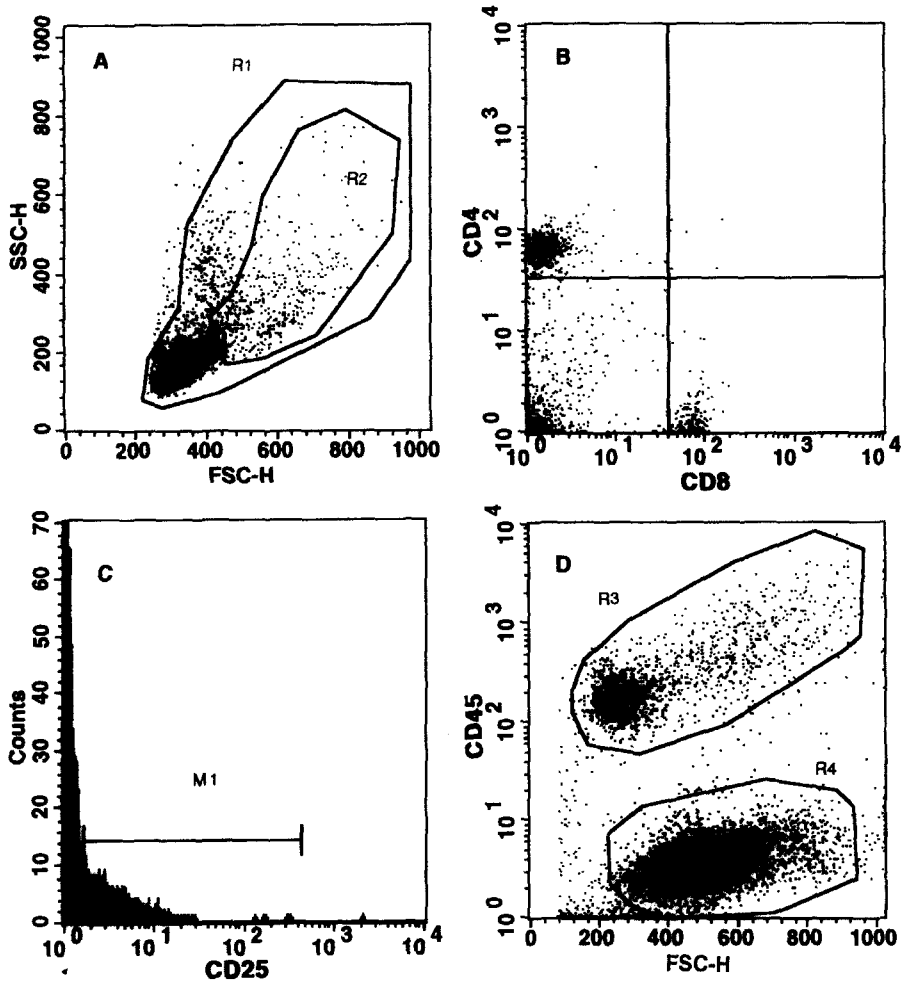


Fig. 1 — Flow cytometrical analysis. *Panel A*: A FSC/SSC dual parameter dot plot showing the gates R1 and R2 which encompass the total lymphocytes and lymphoblasts, respectively. *Panel B*: A FL1/FL2 dual parameter dot plot for analysis of CD4/CD8 ratio. The splenocytes were stained with PE-conjugated anti-mouse CD4 mAb and FITC-conjugated anti-mouse CD8 mAb. *Panel C*: A FL2 histogram for analysis of expression of CD25 molecules. The splenocytes were stained with PE-conjugated anti-mouse CD25 mAb. *Panel D*: A FSC/FL2 dual parameter dot plot for differential analysis of the peritoneal exudate cells(PECs) and the sarcoma 180 cells. The ascitics cells were stained with PE-conjugated anti-mouse CD45 mAb.

blast로 분석하였다(Fig. 1A).

CD4/CD8 비율 분석 - CD4 또는 CD8 분자를 인식하는 mAb를 동시에 가하여 2중 형광염색된 세포들을 FL1/FL2 dual parameter dot plot 상에 나타내어 quadrant 분석을 시행하였다(Fig. 1B).

CD25(IL-2 receptor α chain) 분석 - FL2 histogram상에서 marker를 설정하여 CD25⁺ 세포집단의 % 및 전체세포 집단의 FL2 평균형광강도(mean fluorescence)를 분석하였다(Fig. 1C).

Sarcoma 180 세포와 PEC의 분별계수 - 일정 유속

(80 μ /sec)으로 30 초동안 자료를 취합한 후 이를 FSC/FL2 dual parameter dot plot 또는 contour plot으로 나타내어 CD45⁺ PEC(R3)와 CD45⁻ sarcoma 180 세포(R4)를 구분하여 분석하였다(Fig. 1D).

결과 및 고찰

다당체 및 단백질 함량 - anthrone과 Coomassie brilliant blue를 이용하여 총 다당체 및 총 단백질 함량을 측정된 결과, GLB-A는 11.4%의 다당체 및 45.9%

Table I—Lymphoblast-formation stimulatory effect of GLB-A and GLB-B on the splenic leukocytes of ICR mouse

	n ^a	Body weight (g)	Spleen weight (g)	Lymphoblast ⁺	
				% in the spleen	% Increase ⁺⁺
Control	5	28.5±0.9 ^a	0.18±0.01	8.1±1.1	0
GLB-A ²²	5	28.09±0.3	0.30±0.02**	18.1±6.1*	123
GLB-B ²²	5	27.51±0.5	0.25±0.01**	16.7±8.3*	105

⁺ The lymphoblasts were distinguished from the small lymphocytes on the FSC/SSC dual parameter dot plot as described in materials and methods.

⁺⁺ $100 \times (T-C)/C$, where T and C is % lymphoblasts of the treated group and the control group, respectively.

^a Number of mice used.

²² GLB-A or GLB-B was ip injected at a dose of 50 mg/kg once daily for 3 consecutive days.

^a mean±S.E.

* significant at $p < 0.05$, ** significant at $p < 0.01$

Table II—Antitumor effect of GLB-A or GLB-B against ip-implanted sarcoma 180 cells and their induction of peritoneal exudate cells (PEC) in ICR mice

	No. of mice	Sarcoma 180 cells		PEC	
		Number ⁺ ($\times 10^2$ cells)	% Inhibition ⁺⁺	Number ⁺ ($\times 10^2$ cells)	% Increase ²²
(-)	6	127.2±5.1 ^a	0	28.5±2.1	0
GLB-A ²²	5	86.0±13.6*	32.4	46.7±8.6*	64.1
GLB-B ²²	5	100.6±25.7	21.0	85.1±12.1**	198.7

⁺ The mice were ip injected with GLB-A (50 mg/kg) or GLB-B (50 mg/kg) before and after ip implantation of sarcoma 180 (1×10^6 cells/mouse) cells.

⁺ The sarcoma 180 cells and PECs were immunofluorescence-stained with PE-conjugated anti-mouse pan-leukocyte mAb CD45, and then counted for 30 sec using a flow cytometer at the flow rate of 80 μ /sec after

⁺⁺ $100 \times (C_N - T_N)/C_N$, where C_N and T_N stands for the number of sarcoma 180 cells of the control group and the treated group, respectively.

²² $100 \times (T_N - C_N)/C_N$, where C_N and T_N stands for the number of the peritoneal exudate cells of the control group and the treated group, respectively.

^a mean±S.E.

* significant at $p < 0.05$, ** significant at $p < 0.01$.

의 단백질을, GLB-B는 55.8%의 다당체 및 6.7%의 단백질을 함유하는 것으로 확인되었다.

정상동물의 체중 및 비장 중량에 미치는 영향

ICR계 생쥐의 복강에 GLB-A, GLB-B를 50 mg/kg 농도로 1 일 1 회, 3 일간 연속 투여한 후 제 5 일에 분석한 결과 이들 시료가 실험동물의 체중에는 유의성있는 영향을 미치지 않았으나, 비장 중량은 두 시료 처리 군에서 모두 유의성있게 증가시켰다(Table I). 이러한 현상은 단순한 항원성 단백질의 투여에서도 관찰될 수 있다. 그러나 GLB-A 및 GLB-B가 sarcoma 180에 대해 항암효과를 발휘할 뿐만 아니라 CD4/CD8 비율 등 면역활성 지표를 상승시킨다는 점을 감안할 때, 비장중량의 증가는 단순한 항원성보다는 면역활성화에 의한 결과라고 사료된다.

Sarcoma 180 복수암에 대한 항암 효과 - 복강내에 sarcoma 180 세포를 이식한 후 복강내 세포를 회수하여 유세포분석기로 분석한 결과, GLB-A가 GLB-B보

다 우수한 항암효과를 발휘하여 sarcoma 180 복수 암 세포의 증식을 32.4% 유의성있게($p < 0.05$) 억제하였다(Table II). 이는 sarcoma 180 고형암에 대한 GLB의 항암효과(종양저지를 81.8 %)¹³⁾보다 낮은 수치지만, 급속히 증식하는 복수암에 대해서도 GLB-A가 효과적인 억제작용을 발휘할 수 있음을 암시하는 새로운 결과이다(Fig. 2). 한편 본 연구자¹³⁾등은 GLB가 직접세포 독성(cytotoxicity)을 나타내지 않음을 보고한 바 있으며, 본 연구에서도 GLB-A 및 GLB-B가 sarcoma 180에 직접세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다(자료제시 생략). 이러한 결과들은 GLB-A가 숙주매개성 항암효과를 발휘하는 것을 의미한다.

Lymphoblast 생성자극 효과 - Table I에 나타낸 바와 같이 정상동물에서 대조군의 lymphoblast 비율이 8.1% 인데 비하여 GLB-A, GLB-B 투여군에서는 각각 18.1%, 16.7%로서 대조군에 비하여 2.23배 및 2.05배 유의성있게($p < 0.05$) 증가하였다. 한편 담암동물

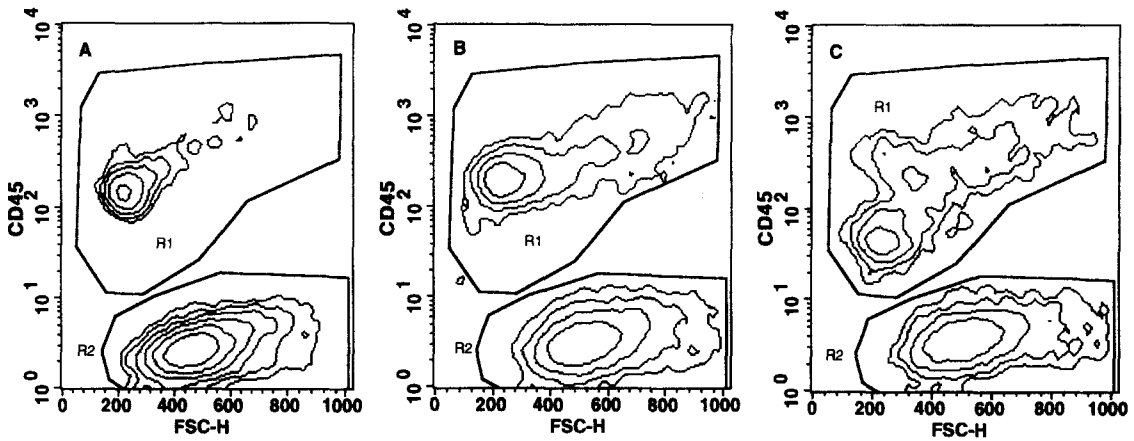


Fig. 2—A FSC/FL2 dual parameter dot plot showing sarcoma 180 cells and peritoneal exudate cells(PECs) stained with PE-conjugated anti-mouse panleukocyte mAb CD45. Panel A, Panel B and Panel C, respectively, shows sarcoma 180 cells and PECs of the control, the GLB-A-treated and the GLB-B-treated mice. R1 and R2, respectively, contains PECs and sarcoma 180 cells.

Table III— Effect of GLB-A and GLB-B on the CD4/CD8 ratio and the expression level of CD25 (IL-2 receptor α chain) of the splenic lymphocytes of the normal ICR mice

Group	n ⁺	CD4/CD8 ratio ^a			IL-2 receptor [†]				
		Small lymphocyte	% Increase [†]	Lympho-blast ^{**}	% Increase	Mean fluorescence	% Increase	% positive cells	% Increase
Control	5	3.16±0.42	0	0.72±0.16	0	4.08±0.29	0	6.87±1.24	0
GLB-A ⁺⁺	5	3.87±0.43	22.4	1.34±0.87	86.1	5.09±0.36**	11.1	12.50±1.94**	82.0
GLB-B ⁺⁺	5	3.26±0.19	3.2	1.02±0.32	41.7	4.48±0.35	-2.2	8.01±0.97	16.6

⁺ Number of mice used.

⁺⁺ GLB-A (50 mg/kg) or GLA-B (50 mg/kg) was ip injected once daily for 3 consecutive days into ICR mice.

^a The splenocytes were IF-stained with PE-conjugated anti-mouse CD4 mAb and FITC-conjugated anti-mouse CD8 mAb.

^{**} The cells with higher FSC and SSC values were counted as lymphoblasts.

[†] The splenic leukocytes were IF-stained with PE-conjugated anti-mouse CD25 mAb and the mean fluorescence intensities of all the leukocytes and the percent of the CD25-positive cells were analyzed.

[†] % Increase=100×(T-C)/C, where T and C is the values of the treated and the control group, respectively.

* significant at p<0.05, * significant at p<0.01.

Table IV— Effect of GLB-A and GLB-B on the lymphoblast formation and the CD4/CD8 ratio in the spleen of ICR mice which were ip-implanted with sarcoma 180 cells

n ⁺	Lymphoblast		CD4/CD8		
	% formation ^a	% Increase ^{**}	ratio [†]	% Increase	
Control	6	41.20±1.92	0	6.49±0.69	0
GLB-A ⁺⁺	5	49.80±1.91*	20.9	11.24±1.54*	73.3
GLB-B ⁺⁺	5	50.44±3.16*	22.4	9.41±1.27	45.1

^a The lymphoblast was distinguished from the small lymphocytes on the FSC/SSC dot plot.

^{**} % Increase=100×(T-C)/C, where T and C stands for the value of the treated and the control group, respectively.

[†] The splenocytes were IF-stained with PE-conjugated anti-mouse CD4 mAb and FITC-conjugated anti-mouse CD8 mAb.

⁺ Number of mice used.

⁺⁺ GLB-A (50 mg/kg) or GLB-B (50 mg/kg) was ip injected once daily for five days into ICR mice.

^a Mean±S.E.

* significant at p<0.05, ** significant at p<0.01.

에 대해서는 GLB-A, GLB-B가 lymphoblast 비율을 각각 20.9%, 22.4% 증가시켰다(Table IV). 일반적인

로 small lymphocyte가 lymphoblast¹⁷⁾로 전환되면 곧 effect cell 및 memory cell로 분화되어 체내 면역능

을 강화시키기 때문에 이들 시료의 lymphoblast 생성 자극 효과는 곧 면역활성의 증가로 받아들일 수 있다. 이로써 정상동물 뿐만 아니라 담암동물에서도 이들 두 시료 모두 뚜렷한 면역활성 효과가 있음을 알 수 있다.

CD4/CD8 증가 효과 - $CD4^{+}$ 인 T_H cell은 다양한 cytokine을 분비하여 B cell, T_C cell, monocyte, macrophage 등을 활성화시키기 때문에 T_H cell의 증가는 전반적인 면역활성화로 이어질 가능성이 높다. 정상동물의 비장 백혈구를 small lymphocyte 영역과 lymphoblast 영역으로 구별하여 분석한 결과, Table III에 나타난 바와 같이 small lymphocyte 영역에서 GLB-A는 CD4/CD8 비율을 22.4% 증가시켰으며, GLB-B는 3.2% 증가시켰다. 또한 lymphoblast 영역에서 GLB-A는 CD4/CD8 비율을 86.1% 증가시켰으며 GLB-B는 41.7% 증가시켰다. lymphoblast 영역에서 CD4/CD8 비율의 증가가 더욱 두드러진 것은 lymphoblast로 전환된 세포가 주로 $CD4^{+}$ T cell이기 때문으로 풀이된다. 한편 담암동물에서는 GLB-A 투여로 CD4/CD8 비율이 73.3% 증가되었으며 GLB-B 투여로 45.1% 증가되었다(Table IV). 즉 이들 시료가 정상동물은 물론 담암동물에서도 $CD4^{+}$ T cell을 보다 선택적으로 활성화시킴을 알 수 있다. 그 중 GLB-A가 GLB-B보다 CD4/CD8 비율을 더 현저히 증가시키는 것으로 확인되었다. 그러나 담암동물의 경우, 생리식염수 투여 대조군도 CD4/CD8 비율이 정상동물의 수치보다 높았는데, 이는 복강내에 이식한 sarcoma 180 암세포에 대한 면역반응으로 $CD4^{+}$ T cell(T_H cell)이 증가되었기 때문이라 고찰된다.

CD25(IL-2 receptor α chain)의 발현증가 효과 - IL-2는 다양한 면역세포들을 자극하여 활성화시키고 분화를 촉진하는 cytokine으로 T cell 등의 활성화에 중요한 역할을 한다. 한편 IL-2 receptor를 가진 세포들은 IL-2에 의해 자극되어질 경우, CD25 분자(IL-2 receptor α chain)의 발현을 증가시켜 더욱 활성화된다. 따라서 CD25 분자의 발현정도를 측정함으로써 면역활성 정도를 추정할 수 있다. 본 연구에서는 정상동물의 비장 세포 중 CD25 분자의 발현정도를 분석한 결과, GLB-A가 $CD25^{+}$ 세포의 비율을 82.0% 증가시켰으며, GLB-B는 16.6% 증가시켰다(Table III). 한편 GLB-A는 전체 비장 백혈구의 CD25 분자에 의한 평균 형광강도를 유의성있게 11.1% 증가시켰다.

담암동물에서의 PEC 유입 촉진 효과 - GLB-B는

PEC를 198.7%나 증가시켰으며 이는 항암효과가 보다 우수한 GLB-A의 64.1%보다 3 배 이상 높은 수치였다(Table II). 따라서 복강유입세포 증가와 sarcoma 180 증식 억제효과는 상관관계가 인정되지 않았다.

이상의 실험 결과를 종합하여 볼 때, GLB-A와 GLB-B 모두 뚜렷한 면역 활성이 입증되었으나 이 중 GLB-A가 더욱 현저한 효과를 발휘하였다. 즉 항암효과가 뛰어난 GLB-A가 PEC 증가 효과만을 제외한 모든 경우 즉 lymphoblast 형성, CD4/CD8 비율 증가 효과 및 CD25 분자 발현증가 효과면에서 모두 월등히 우수하였던 사실에 비추어 주로 대식세포로 이루어진 복강세포보다는 T cell 등의 면역활성이 GLB-A의 항암효과에 크게 기여했을 것으로 판단된다.

결 론

영지버섯 생장점으로부터 분리·정제한 산성 단백질 당체 분획 GLB-A 및 염기성 단백질당체 분획 GLB-B는 복강에 이식한 sarcoma 180 세포의 증식을 효과적으로 억제하였으며 담암동물 및 정상동물에서 lymphoblast 형성, CD4/CD8의 비율 및 CD25(IL-2 receptor α chain)의 발현을 증가시킴으로서 강력한 면역증강 작용을 나타내었다. 이 중 GLB-A는 항암효과 및 면역활성화 효과가 우수하여 항암성 면역요법제로의 개발이 기대된다.

문 헌

- 1) Nikonenko, B. V., Apt, A. S., Mezhlumova, M. B., Avdienko, V. G., Yereenev, V. V. and Moroz, A. M. : Influence of the mouse Bc₉, Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) vaccination. *Clin. Exp. Immunol.*, **104**, 37 (1996).
- 2) Mizuno, T., Suzuki, E., Maki, K. and Tamaki, H. : Fraction, chemical modification and antitumor activity of water-soluble polysaccharide of the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nokeikagaku Kaishi*, **59**, 1143 (1985).
- 3) Chihara, G., Hamura, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fraction of the polysaccharide with antitumor activity, especially lentinan

- from the *Lentinus edodes* (an edible mushroom). *Cancer Res.*, **30**, 2776 (1970).
- 4) Tsukagoshi, S. and Ohasi, F. : Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann*, **65**, 557 (1974).
 - 5) 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).
 - 6) Adachi, K. : Potentiation of host-mediated antitumor activity in mice by β -glucan obtained from *Griofola frondosa*. *Chem. Pharmaceu. Bull.*, **35**, 262 (1987).
 - 7) Maruyama, H., Yamazaki, K., Murofushi, S., Konda, C. and Ikekawa, T. : Antitumor activity of *Sarcodon asparatus* (Berk.) S. Ito. and *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *J. Pharmacobiodyn.*, **12**, 118 (1989).
 - 8) Wang, G., Zhang, J., Mizuno, T., Zhuang, C., Hitoshi, I., Mayuzumi, H., Okamoto, H. and Li, J. : Antitumor active polysaccharides from the chinese mushroom shongshan Ling Zhi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*, *Biochem. Biotech. Biochem.*, **57**, 894 (1993).
 - 9) Stavinoha, W. B., Satsangi, N. and Weintraub, S. T. : Study of the anti inflammatory effect of *Ganoderma lucidum*. Recent advances in *Ganoderma lucidum* research, The Pharmaceutical Society of Korea, Seoul, p. 3 (1995).
 - 10) Zhang, L. X., Mong, H. and Zhou, X. B. : Effect of Japanese *Ganoderma lucidum* on production of IL-2 from murine splenocytes. *Chung-Kuo-Chung-Hsi-I-Chieh-Ho-Tsa-Chih*, **13**, 613 (1993).
 - 11) Lieu, C. W., Lee, S. S. and Wang, S. Y. : The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in leukemic U937 cells. *Anticancer Res.*, **12**, 1211 (1992).
 - 12) Kino, K., Hem, L. G., Vliet, J. A., Bocken, C. F., Hoitsma, A. J. and Tax, W. J. : Ling Zhi-8(LZ-8) : Studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation*, **60**, 438 (1995).
 - 13) Chung, K. S., Kim, S. B. and Chung, S. H. : Immunoactivities of the protein-polysaccharides of the tips of the carpophores of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **41**, 105 (1997).
 - 14) Norris, J. R. and Robbons, D. W. (Eds.) : *Methods in Microbiology* (Vol. 5B). Academic Press, New York, p. 209 (1971).
 - 15) Sedmak, J. J. and Grossberg, S. E. : A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.*, **79**, 544 (1977).
 - 16) Reeves, J. P. and Reeves P. A. : *Current Protocols in Immunology*: Survival surgery, removal of the spleen and thymus. Wiley Interscience, New York, p. 1.10.1 (1991)
 - 17) Kubly, J. : *Immunology*, W. H. Freeman and Co., New York, p. 57 (1994).