

눈꽃동충하초 (*Paecilomyces tenuipes* DGUM 32001) 균사배양물로부터 분리한 단백다당체 PJ-4의 *in vitro* 면역활성

정경수 · 이지선 · 김용해* · 한영환** · 이만형#

충남대학교 약학대학, *신화제약 중앙연구소,

**동국대학교 자연과학대학 생물학과, #대구가톨릭대학교 약학대학

(Received December 20, 2001; Revised April 19, 2002)

Flow Cytometrical Investigation on *in vitro* Immunomodulating Activity of PJ-4, a Protein-polysaccharide from Culture Fltrate of Insects-born Fungus *Paecilomyces Tenuipes* DGUM 32001

Kyeong-Soo Chung, Ji-Seon Lee, Yong Hae Kim*, Young Hwan Han** and Mann Hyung Lee#

College of Pharmacy, Chung-Nam National University, Taejon 305-764

*Research Center, ShinHwa Pharm. Ltd., Daegu 704-370

**Department of Biology, College of Natural Science, Dongkuk University, Gyeongju, Kyongbook 780-714

#College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Kyongsan, Kyongbook 712-702

Abstract — In the previous report, we described the *in vivo* antitumor activity of PJ-4, a protein-polysaccharide fraction prepared from the culture filtrate of an insect-born fungus, *Paecilomyces tenuipes* DGUM 32001. In the present study, we elucidated the immunomodulating activity of PJ-4 on the BALB/c mouse splenic lymphocytes using flow cytometrical techniques. As a result, PJ-4 was found to stimulate the lymphocytes not only to form lymphoblasts but also to express CD25 (IL-2 receptor α chain) molecule, which is well known as a T cell activation marker. More interestingly, its T cell stimulatory activity was more strongly exerted on CD8 $^{+}$ T cells than on CD4 $^{+}$ T cells. All these data suggest that PJ-4 exerts its anti-tumor activity at least partly through stimulation of T cells which play major roles in the cell-mediated immune system.

Keywords □ Basidiomycetes, *Paecilomyces tenuipes*, protein-polysaccharide, immunomodulation, flow cytometry.

면역계를 활성화시켜 활성화된 면역계로 하여금 암세포를 공격하게 하는 면역요법은 암치료법의 새로운 경향 중 하나로서, 많은 연구자들에 의해 활발한 연구가 이루어지고 있으며 그 중 일부는 이미 표준 치료법으로 인정받고 있다. 면역요법에 사용되는 재료는 크게 나누어 항체(antibodies),^{1,2)} 싸이토카인류(cytokines),^{3,4)} 암백신(tumor vaccine),⁵⁾ 비특이면역활성화제(nonspecific immunostimulating agents) 등이 있는데 이중 비특이면역활성화제에는 담자균류(basidiomycetes, 버섯류)의 단백다당체나 기타 미생물 및 천연물에서 유래하는 면역활성물질들이 속하게 된다. 담자균류의 단백다당체들은 뚜렷한 부작용이 없을 뿐만 아니라 항암제의 부작용을 경감시켜줄 수 있어서 암의 치료에 보조요법제로서 널리 사용될 수 있는 바,⁶⁾ 그 대표적 예로

는 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 lentinan,^{7,8)} 구름버섯(운지, *Coriolus versicolor*)의 PS-K(Krestin),⁹⁻¹¹⁾ 치마버섯(*Schizophyllum commune*)의 schizophyllan,^{12,13)} 상황버섯(*Phellinus linteus*)¹⁴⁻¹⁷⁾의 균사배양 추출물 메시마-엑스 등이 있다. 그러나 방대한 버섯류 중 항암효과가 검토된 것은 일부에 지나지 않기 때문에 이方面的 연구는 좋은 성과가 기대되고 있다. 이러한 관점에서 저자들은 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes* DGUM32001) 균사배양 여액으로부터 PJ-4 등 단백다당체 분획들을 분리하여 sarcoma 180 암세포에 대한 항암효과를 연구 보고한 바 있다.¹⁸⁾ 본보에서 PJ-4가 면역세포에 미치는 활성화 효과에 대해 실험하여 의미있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

실험 재료 및 방법

눈꽃동충하초 단백다당체 PJ-4 – 눈꽃동충하초 *Paecilomyces tenuipes* DGUM 32001 균주 배양여액에 95% 에탄올 3배량을

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-850-3611 (팩스) 053-850-3602
(E-mail) mhlee@cataegu.ac.kr

가해 조단백다당체를 침전시키고 이를 중류수에 재용해시킨 후 투석, 동결건조하여 담회갈색 무정형 분말상태의 수용성 단백다당체 PJ-4를 획득하였다.

실험동물 – 대한바이오링크로부터 약 4주령의 SPF(specific pathogen free) BALB/c 마우스(암컷)를 구입하여 공조시설을 갖춘 동물실내에서 1주일 이상 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. 사료와 물은 제한 없이 공급하였고 실온은 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 50%를 유지하였으며 하루에 12시간씩 조명을 시행하였다.

배지 – 세포 세척용 배지로는 인산염완충액(PBS, pH 7.2)을, 세포 배양 및 시료 용액 제조용 배지로는 penicillin-streptomycin solution(Sigma, Missouri, USA) 10 ml 및 fetal bovine serum (FBS)(Hyclone, Utah, USA) 10%를 첨가한 RPMI 1640(Sigma) 배지(“RPMI 1640 배지”라 칭하기로 함)를, 면역형광염색과 유세포 분석과정에서의 완충액으로는 FBS를 3% 첨가한 PBS(“3% FBS-PBS”라 칭하기로 함)를 각각 사용하였다.

비장 임파구^{19,20)} – BALB/c 마우스의 비장을 적출하여 100-mesh stainless steel 스크린을 통과시키고 PBS로 2회 세척한 후 RPMI 1640 배지에 2×10^6 cells/ml의 농도로 혼탁시켜 실험에 사용하였다.

세포 배양 – U-bottomed 96-well culture plate(Becton-Dickinson, NJ, USA)에 비장 임파구 혼탁액 및 시료용액 100 μ 씩을 각각 가하고(시료 최종농도 0~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) CO_2 배양기(Forma, USA) 내에서 37°C , 5% CO_2 조건 하에 18~48 시간 배양하였다. 단 모든 실험은 3중 또는 4중으로 실시하였다.

면역형광 염색^{19,20)} – 배양이 완료된 세포를 유세포분석용 5 ml 시험관(Beckton-Dickinson, catalogue No. 352052)으로 옮긴 후 1회 세척하고 fluorescein isothiocyanate(FITC) 또는 phycoerythrin(PE)-conjugated anti-mouse CD4(Sigma), CD8(Sigma) 및 CD25(BD Sciences, Catalogue No. 553080) monoclonal antibody를 가하여 빙욕상에 30분간 방치하여 면역형광염색(direct immunofluorescence staining)을 시행하였다. 다시 2회 세척한 후 500 μl 의 3% FBS-PBS에 부유시켰다. 이상의 면역형광염색 과정 중 세척 및 항체 희석용 완충액으로는 3% FBS-PBS를 사용하였다.

유세포 분석 gate 설정^{19,20)} – 면역형광염색이 완료된 비장세포 혼탁액에 propidium iodide(PI, 최종농도: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 가하고 3~4분 후에 Becton-Dickinson사의 FACSCalibur 유세포분석기로 시료당 10,000개의 세포에 대하여 자료를 취합하여 CellQuest 프로그램으로 분석하였다. 이때 FSC/SSC dot plot 상에 분석 대상이 되는 임파구를 포함하는 gate 1(R1 in Panel A of Fig. 1)을 설정하였고 FSC/FL3 dot plot 상에서는 FL3-세포(viable cell)를 포함하는 gate 2(R2 in Panel B of Fig. 1)를 설정하여 gate 1 및 gate 2를 동시에 만족시키는 세포들을 아래 항의 분석에서 전체 임파구(total lymphocyte)로 간주하였다.

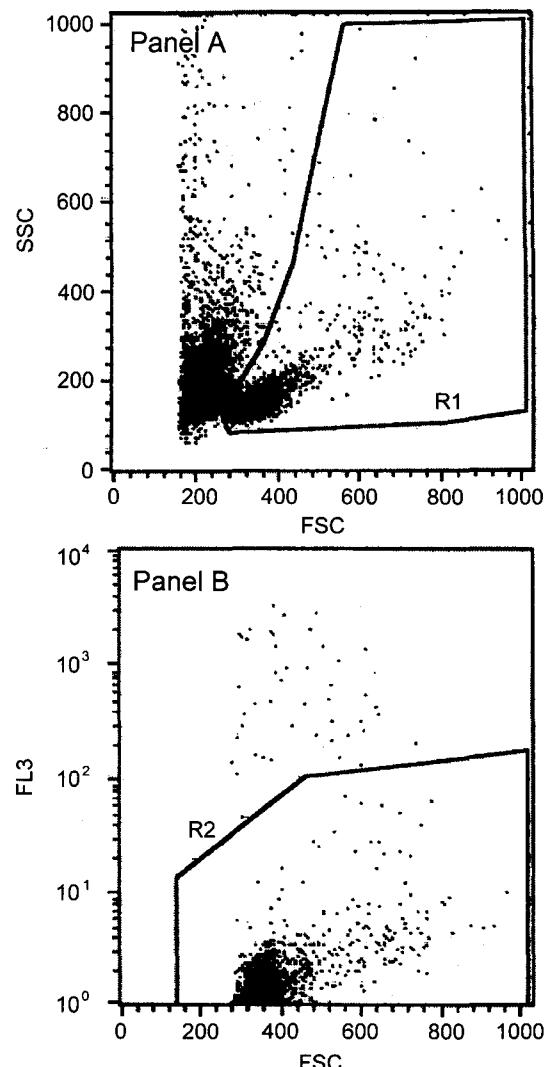


Fig. 1 – Representative dot plots showing the gate 1 (R1 in Panel A) and gate 2 (R2 in Panel B) set for lymphocytes and viable cells, respectively. Panel A: The cells were depicted according to their size (FSC) and granularity (SSC). Panel B: The cells satisfying gate 1 were depicted according to their size (FSC) and propidium iodide uptaking property (FL3).

임파아구(lymphoblast) 생성 촉진 효과 분석 – 전체 임파구를 세포직경과 비례하는 parameter인 FSC값에 따라 FSC histogram 상에 나타낸 후 FSC 값이 상대적으로 큰 집단을 임파아구로 간주하였다.

T cell 활성화 효과 분석 – 세포표면의 CD25 분자를 FITC로 형광표지한 후 전체 임파구를 FSC/FL1(FITC 형광 강도) dot plot에 나타내었다. 이어서 FSC/FL1 dot plot 상에 FSC 값이 상대적으로 큰 세포(lymphoblast)를 포함하는 gate 3(R3 in Panel A of Fig. 2)을 설정하고 전체임파구 및 gate 3을 만족시키는 임파아구들을 FL1 histogram(Panel B & C of Fig. 2)에 나타내어 그 형광강도의 증가 정도를 T cell 활성화 지표로 취하였다.

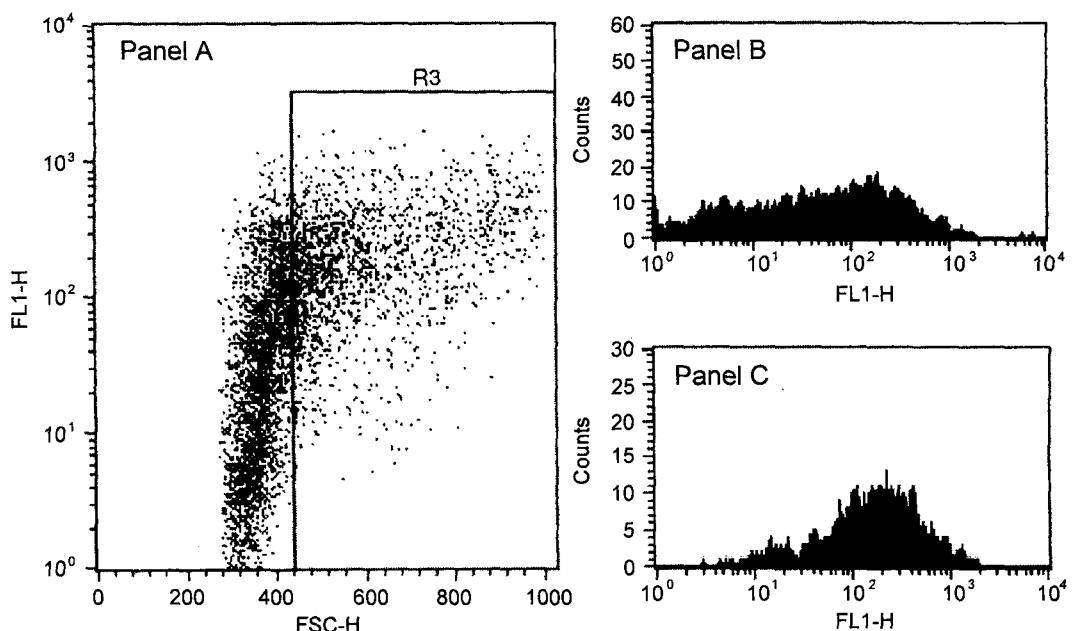


Fig. 2 – In Panel A, the viable lymphocytes were depicted according to their size (FSC) and CD25 (IL-2 receptor α chain) molecule (FL1) and the gate 3 (R3) was set for the lymphoblasts. In Panel B and C, respectively, the viable total lymphocytes and lymphoblasts were depicted according to their expression level of CD25 molecules (FL1).

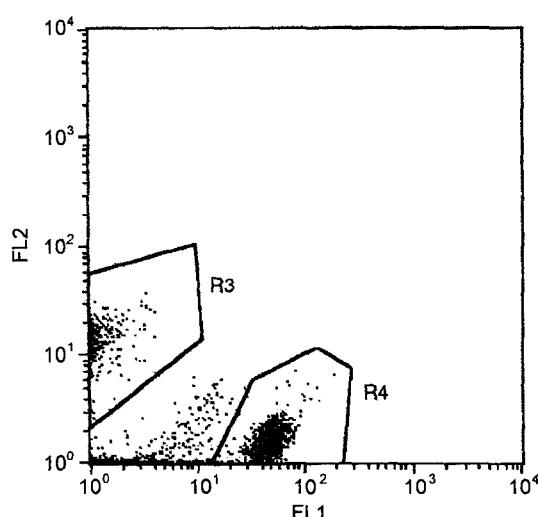


Fig. 3 – The viable lymphocytes stained with FITC-conjugated anti-mouse CD4 mAb and PE-conjugated anti-mouse CD8 mAb were depicted according to their expression of CD4 (FL1) and CD8 (FL2).

임파구 아형별 활성화 분석 – T 임파구 표면의 CD4 및 CD8 분자를 FITC 및 PE로 각각 형광표지한 전체 임파구를 FL1/FL2 (PE 형광 강도) dot plot에 나타내고 FL1⁺FL2⁻인 세포들 즉 CD4⁺ T cell을 포함하는 gate 4(R4 in Fig. 3)와 FL1-FL2⁺인 세포들 즉 CD8⁺ T cell을 포함하는 gate 3(R3 in Fig. 3)을 설정하였다. 이들을 각각 FSC histogram에 나타내고 FSC 값의 증가 정도를 활성화 정도로 간주하였다.

실험결과 및 고찰

FSC 값을 근거로 한 임파이구 생성 촉진 효과 – BALB/c계 생쥐 비장 임파구에 PJ-4를 가하고 48시간 배양한 후 세포직경과 비례하는 FSC 값을 유세포분석기로 분석한 결과 PJ-4는 FSC 값을 유의성 있게 증가시킴으로써 임파이구(lymphoblast) 생성 자극을 발휘하는 것으로 판명되었다. 즉 대조군에서 전체 임파구의 FSC 값은 305.61이었으나 PJ-4 존재하에서는 농도 의존적으로 FSC 값이 증가하여 200 μ g/ml에서는 340.3 (p<0.01)로 11.4 %의 증가가 확인되었다. FSC 값이 세포직경과 비례하는 변수임을 감안할 때 FSC 값의 11.4% 증가는 전체 세포들의 평균 용적을 54% 정도 증가시켰음을 의미한다. 또한 PJ-4의 작용이 모든 종류의 임파구에 미치는 것으로 보기 보다는 어느 특정 집단에 미치는 것으로 보는 것이 타당성이 높을 것이며 이러한 근거를 바탕으로 생각할 때 전체 세포 집단의 평균 세포 용적을 54% 증가시킨 결과는 매우 의미있는 결과로 받아들여진다. 한편 전보¹⁸⁾에서도 항암효과가 관찰되지 않았던 PJ-3는 본 실험에서도 유의성 있는 임파이구 생성 자극 효과가 관찰되지 않았다. 따라서 *in vivo* 항암효과와 *in vitro* 임파이구 생성 자극 효과 사이에는 상당한 연관성이 있는 것으로 판단된다.

PJ-4의 CD8⁺ T cell 활성화 효과 – 한편 이들 임파구 중 항암면역에서 중요한 역할을 담당하는 T cell에 대한 영향을 살펴보기 위하여 T cell을 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell로 구별하

Table I – In vitro Lymphoblast formation stimulatory effects of PJ-3 and PJ-4, protein-polysaccharide fractions prepared from culture filtrate of *Paecilomyces tenuipes*, on the splenic lymphocytes of a BALB/c mouse^b

Stimulant	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T lymphocytes ^c		Total lymphocytes
		CD4 ⁺	CD8 ⁺	
Control	-	293.80 \pm 7.29 ^d	260.07 \pm 0.91	305.61 \pm 3.92
PJ-3	100	296.09 \pm 2.66	271.19 \pm 5.84*	310.91 \pm 1.19
PJ-4	50	293.08 \pm 2.36	271.80 \pm 1.94***	325.00 \pm 7.85*
PJ-4	100	313.52 \pm 2.36	275.45 \pm 2.03***	326.48 \pm 2.83*
PJ-4	200	307.33 \pm 6.41	288.23 \pm 3.27***	340.34 \pm 4.52**

^aLymphoblast formation stimulatory effect was evaluated by measuring forward scattering (FSC) values, which correlates with the diameter of the cells.

^bThe splenic lymphocytes of BALB/c mouse were *in vitro* cultured at 37°C in 5% CO₂ for 48 hours with or without the stimulants.

^cThe cultured lymphocytes were double labeled with FITC-conjugated anti mouse CD4 monoclonal antibody and phycoerythrin (PE)-conjugated anti mouse CD8 monoclonal antibody (Sigma) in one step and then analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson).

^dmean \pm S.E.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

여 분석한 결과 PJ-4는 암세포 등 표적세포를 직접 공격하는 CD8⁺ T cell에 대하여 더욱 현저한 효과를 발휘하는 것으로 판명되었다(Table I). 즉 대조군 CD8⁺ T cell의 평균 FSC 값이 260.07인데 비해 PJ-4 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 288.23(p<0.001)으로 10.8%의 증가가 관찰되었으나 CD4⁺ T cell의 경우에는 그 증가율이 4.6%에 머물렀다. 이는 전보에서 PJ-4 복강

투여로 CD8⁺ T cell의 FSC 값은 약 6.6% 증가되었으나 (p<0.01) 전체 임파구나 CD4⁺ T cell에서는 유의성 있는 증가 효과가 관찰되지 않았던 것과 일맥상통하는 결과로 받아들여진다.

한편 각 집단 중 FSC 값이 상대적으로 큰 세포들을 임파아구로 간주하여 그 비율(% lymphoblast)을 비교한 결과, Fig. 4에 나타낸 바와 같이 PJ-4는 CD8⁺ T cell에 대하여 선택적인 활성화 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. 즉 PJ-4는 CD8⁺ T cell에 대해 모든 농도(50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 유의성 있는 증가를 나타내되 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 대조군에 비해 임파아구 비율을 2배 이상 현저히 증가시켰고(p<0.001), 전체 임파구에 대해서는 53.5% (p<0.01) 증가시켰으나 CD4⁺ T cell에 대해서는 23.0%의 미약한 증가에 그쳤다. 이로써 PJ-4는 CD4⁺ T cell 보다는 CD8⁺ T cell에 대해 더욱 효과적으로 작용함을 알 수 있었다. 이러한 경향 역시 전보¹⁸⁾의 *in vivo* 실험 결과와 일치하는 것이다.

PJ-4의 CD25 증가 효과 – 전보에서 PJ-4는 ICR 생쥐에 복강 투여시 CD8⁺ T cell의 CD25 분자(IL-2R α chain) 발현을 약 24.6% 유의적으로 증가시킴이 관찰되었다. 한편 CD25의 발현 증가는 T cell 활성화의 확고 부동한 증거로 받아 들여지기 때문에 CD25 증가는 FSC 값의 증가나 임파아구 비율의 증가에서 추정되는 T cell의 활성화를 결정적으로 입증할 수 있는 자료가 된다. 본 연구에서도 Table II에 나타낸 바와 같이, PJ-4에 의해 임파아구의 CD25 분자 발현이 71.8%나 증가함으로써 앞의 실험 결과들은 T cell 활성화에 의해 얻어진 것임을 확정지을 수 있었다. 한편 소임파구(small lymphocyte)의 CD25 발현이 거의 증가되지 않은 것은 PJ-4가 모든 유형의 임파구 모두를 활성화시키지 않고 CD8⁺ T cell 등 특정 집단에 보다 선택적임을 입증하고 있다.

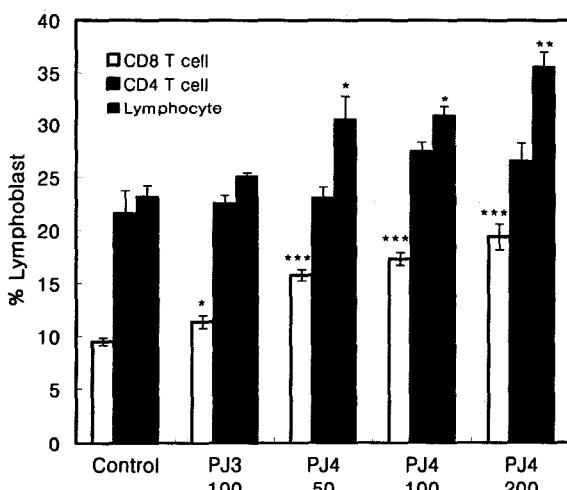


Fig. 4 – Stimulatory effect of PJ-4 on T cells. The BALB/c mouse splenic lymphocytes were cultured for 48 hours in the presence of the stimulants PJ-3 or PJ-4, protein-polysaccharides fractions prepared from culture filtrate of *Paecilomyces tenuipes*, and then stained with FITC-conjugated anti-mouse CD4 mAb and PE-conjugated anti-mouse CD8 mAb just prior to flow cytometric analysis. On a FL1/FL2 dot plot, gates for CD4⁺ and CD8⁺ T cells were set and the percentage of the lymphoblasts of each population was analyzed on a FSC histogram as described in the text.
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Table II – T cell stimulatory effect of PJ-4, a protein-polysaccharide from culture filtrate of *Paecilomyces tenuipes*, on the expression of CD25 (IL-2 Receptor chain) molecules on the BALB/c mouse splenic lymphocytes^a

PJ-4 (μ g/ml)	Lymphoblasts ^b		Small lymphocytes ^c		Total lymphocytes	
	Fluorescence intensity	% increase	Fluorescence intensity	% increase	Fluorescence intensity	% increase
0	44.36 ± 1.99 ^d	-	11.49 ± 0.32	-	16.6 ± 0.22	-
50	62.95 ± 5.72*	41.9	10.67 ± 0.23	-7.2	19.50 ± 0.03	16.9
100	77.87 ± 5.86**	75.5	13.44 ± 0.37*	16.9	24.15 ± 1.64*	44.8
200	76.22 ± 6.36**	71.8	12.38 ± 0.19	7.7	23.87 ± 1.59*	43.1

^aThe splenic lymphocytes were cocultured with PJ-4 at 37°C in 5% CO₂ for 48 hours and then immunofluorescence-stained with FITC-conjugated anti-mouse CD25 (IL-2 Receptor α chain) monoclonal antibody just prior to flow cytometric analysis.

^{b,c}The cells satisfying the rectangular regions set for higher and lower forward scatter (FSC) values on a FSC-SSC dual parameter dot plot were considered as lymphoblasts and small lymphocytes, respectively as described in the text.

^dmean ± SE

*p<0.05, **p<0.01.

결  론

눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes* DGUM 32001) 군사배양여액으로부터 분리한 수용성 단백다당체 분획 PJ-4의 항암활성 기전을 규명하기 위하여 BALB/c계 생쥐 비장 임파구에 대한 면역활성을 실험한 결과 PJ-4는 임파구를 활성화시켜 임파이구 생성을 증가시켰으며 이러한 임파구 활성화 효과는 CD8⁺ T cell에 보다 선택적인 것으로 입증되었다.

감사의 말씀

본 연구는 경북테크노파크 경산대학교 특화센터에서 시행한 신기술 고도화사업의 지원을 받아 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

문  헌

- 1) Blythman, H. E., Casellas, P. and Gros, O. : Immunotoxins; hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumor cells. *Nature*, **290**, 145 (1981).
- 2) Krolick, K. A. : Immunotoxins; current strategies for selective chemotherapy. *ASM News*, **51**, 569. (1985).
- 3) Oppenheim, J., and Landy, M.(eds.) "Interleukins, Lymphokines and Cytokines", Academic Press, New York. (1983).
- 4) Coleman, R. M., Lombard, M. F. and Sicard, R. E. "Fundamental Immunology (2nd ed.)", pp 459-483, Wm, C. Brown Pub., Dubuque. (1992).
- 5) Stevenson, F. K. Tumor vaccines. *FASEB J.*, **5**, 2250 (1991).
- 6) Hobbs, C. : Medicinal Mushrooms. Interweave Press, Loveland, Colorado pp. 252. (1995).
- 7) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. Fraction of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (an edible mushroom). *Cancer Res.*, **30**, 2776 (1970).
- 8) Jeannin, J. F., Lagadec, P., Pelletier, H., Reisser, D., Olsson, N. O., Chihara, G., and Martin, F. : Regression induced by lentinan, of peritoneal carcinomatoses in a model of colon cancer in rat. *Int. J. Immunopharmacol.*, **10**, 855 (1988).
- 9) Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann*, **65**, 557 (1974).
- 10) Tsukagoshi, S. Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H. Nomoto, K. and Orita, K. : Krestin (PSK). *Cancer Treat. Rev.*, **11**, 131 (1984).
- 11) Moon, C.-K., Lee, S.-H., 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).
- 12) 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).
- 13) Okamura, K., Suzuki, M., Chihara, T., Fujiwara, A., Fukuda, T., Goto, S., Ichinohe, K., Jimi, S., Kasamatsu, T., Kawai, N. : Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer. A randomized controlled study. *Cancer*, **58**, 865 (1986).
- 14) Ikegawa, T., Nakanishi, Y., Uehara, N., Chigara, G. and Fukoka, F. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann*, **59**, 155 (1968).
- 15) Chung, K. S. , Kim, S. S., Kim, H. S., Han, M. W. and Kim, B. K. : Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelial culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji*, **38**, 158 (1994).
- 16) Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S., and Yoo, I. D. : B-Lymphocyte-Stimulating Polysaccharide from Mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 2105 (1995).

- 17) Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y. Han, M. W., and Kim, B. K. : 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).
- 18) Lee, J. S., Lee, I. S., Chung, K. S., Kim, Y. H., Han, Y. H. and Lee, M. H. : Flow cytometrical investigation on antitumor activity of mycelial culture of Insect-born fungus *Paecilomyces japonica* DGUM 32001. *Yakhak Hoeji*, **45**, 64 (2001).
- 19) Oh, J. Y. and Chung, K. S. : 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*. *Yakhak Hoeji*, **42**, 487 (1998).
- 20) Chung, K. S., Kim, S. B. and Chung, S. H. : Immunoactivities of the protein-polysaccharides of the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **41**, 105 (1997).