

영지 균사체의 알칼리 추출물이 보체계와 망내계에 미치는 영향

이준우 · 정 훈 · 정천희 · 이권행

일양약품(주) 중앙연구소

Effects of Alkali Extract of *Ganoderma lucidum* IY007 on Complement and Reticuloendothelial System

June-Woo Lee, Chun-Hee Chung, Hoon Jeong and Kweon-Haeng Lee

Central Institute of Research, II Yang Pharmaceutical Co.
Ltd., Yong-in, 449-900, Korea

ABSTRACT: To examine effects on complement and reticuloendothelial system, alkali extract was isolated from cultured mycelium of *Ganoderma lucidum* IY107. It was shown to strongly activate both classical and alternative pathways of complement as compared with krestin. Activated complement C3, 3rd peak, was observed by crossed immunoelectrophoresis. It was also shown to activate reticuloendothelial system of ICR mice in the carbon clearance test and to increase hemolytic plaque forming cells of the spleen. Carbohydrate and protein contents of the alkali extract were 10% and 49%, respectively. The carbohydrate consisted of four monosaccharides and the protein contained 16 amino acids.

KEYWORDS: *Ganoderma lucidum*, Complement system, Reticuloendothelial System, Carbon clearance, Hemolytic plaque forming cell

영지(*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karsten)는 Polyporaceae과에 속하는 고등균류로 불로초 또는 만년버섯으로 불리어 왔으며, 예로부터 한국, 일본 및 중국 등지에서 강장, 강심, 해열, 진정, 이뇨, 건위, 정장, 간염, 고혈압, 뇌졸중 및 심장병 등과 같은 질병을 치료하기 위한 전통 약으로 중요시 되어왔다. 특히, 최근에는 영지 자실체의 약효성분에 관한 과학적인 연구가 많이 시행되고 있으며, 이 중에는 adenosine 및 guanosine과 같은 nucleoside 성분에 의한 혈소판 응집 저해작용(Kubo 등, 1983; Shimizu 등, 1985) ganoderan B 및 C 등에 의한 혈당감소작용(Hikino 등, 1989) ganoderic acid A, B 및 C에 의한 항알러지작용(Kohda 등, 1985) 및 angiotensin I converting enzyme을 억제하는 성분에 의한 혈압조절작용(Kanmatsuse 등, 1985) 등이 알려지고 있다. 또한, 영지의 성분 중 ganoderic acid R, T, U, V, W, X, Y 및 Z는 *in vitro*에서 간암세포에 세포독성작용을 나타내며(Toth 등, 1983), 영지의

polysaccharide 성분은 mouse에 이식된 종양을 저지하는 항종양 효과가 있다고 보고되고 있다(Kim 등, 1980; Kang 등, 1981; Miyazaki 등, 1981; Mizuno 등, 1984; Sone 등, 1985). 담자균류에서 분리된 polysaccharide 성분들에 의한 항종양 작용은 이들이 hostmediated immune response에 관여하여 종양 발생에 의해 손상된 면역기능을 회복 또는 증강시켜 주므로서 효과를 발휘하는 것으로 밝혀짐에 따라(Maeda 등, 1971), polysaccharide 성분이 면역계에 미치는 영향에 관한 많은 연구가 진행되었다. Okuda 등(1972)은 polysaccharide가 생체내의 complement system에 관여하여 macrophage의 활성화, target cell에 대한 cytolysis와 opsonization기능을 증진시키므로서 항종양 효과를 나타낸다고 보고하였으며, polysaccharide에 의한 complement system의 활성화와 항종양 효과는 서로 상관관계가 있음이 밝혀졌다(Hamuro 등, 1978).

따라서, 본 연구에서는 국내에서 자생하는 *Gano-*

derma lucidum IY007의 자실체로부터 분리된 균사를 배양하여, 균사체로부터 얻어진 물질이 complement system과 망내계 등에 미치는 영향을 검토하였기에 보고하고자 한다.

材料 및 方法

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 전남 두류산에서 채집한 *Ganoderma lucidum*의 자실체로부터 분리한 *Ganoderma lucidum* IY007 균사체이며, 보관용 배지는 potato dextrose agar(PDA) 사면 배지를 사용하였다. 배양용 배지는 glucose 20g, peptone 5g, KH_2PO_4 0.87g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg 및 ZnCl_2 4 mg을 물 1l에 녹여 pH를 5.5로 조정후, 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

시약

보체로는 guinea pig serum(삼육축산)과 신선한 human serum을 사용하였다. 적혈구는 면양적혈구(한국 메디아)와 토끼(삼육축산)의 적혈구를 사용하였으며, 항체는 anti-sheep hemolysin(Difco Co.)과 antirabbit human serum(Sigma Co.)를 사용하였다. 완충액 조제를 위하여 사용한 barbital은 Merck사 제품을 사용하였고, gelatin, EGTA, MgCl_2 는 Sigma사 것을 사용하였다. Carbon clearance 측정을 위한 perikan drawing ink 17 black은 Günther-Wagner사의 것을 사용하였다.

실험동물 및 종양세포

Mouse는 20~25g의 ICR계 웅성으로 삼육축산에서 구입하여 사용하였고, 암세포인 sarcoma 180은 한국인삼연구소의 김명숙 박사로부터 제공받아 사용하였다.

조당당류의 분리

배양용 배지 3l가 들어있고 fermentor(Marubishi MD300)에 5%의 종균을 접종하고, 교반속도를 300 rpm, 통기량은 1 vvm으로 조정후, 25°C에서 7일간 배양하였다. 배양물은 6000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 균사체에 2.5 N NaOH 용액을 가해 최종 농도를 2N로 조정하고 24시간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 acetic acid로

중화시켜 pH 7.0이 되게 조정후, visking tube(Sigma Co.)에 넣어 흐르는 물에 3일 동안 투석하고 농축한 뒤 3배량의 ethanol을 가해 4°C에서 24시간 방치하였다. 원심분리하여 얻은 침전물에 소량의 증류수를 가해 용해시킨 후, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

보체활성의 측정

보체활성은 Yamada 등(1984a)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시험관을 150 μl 의 GVB^{2+} buffer (0.15 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 1.8 mM sodium barbital, 3.1 mM babiluric acid, 141 mM NaCl 및 0.1% gelatin, pH 7.4)와 시료 50 μl (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 가한 다음, 여기에 50 μl 의 guinea pig complement (100 u/ml)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, GVB^{2+} buffer를 가해 보체의 최종 농도가 1 unit/ml이 되게 조정한다. 조정된 보체 혼합물을 1.0, 1.2, 1.6 units되게 각 시험관에 분주한 후, anti-sheep hemolysin (2 MHU/ml)과 동량의 SRBC(5×10^8 cells)를 혼합하여 실온에서 30분간 감작된 SRBC 2 ml/씩을 가하고 GVB^{2+} buffer로 최종 용량을 5 ml로 조정하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해 70 μl 의 0.5 M EDTA를 가하여 혼합한 후, 400×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액을 541 nm에서 흡광도를 측정하였다. 보체활성은 대조군의 total complement hemolytic(TCH 50)에 대한 저해율(%)로서 표시하였다.

Alternative complement pathway의 활성(ACH 50) 측정은 PlattsMill 등의 방법(1974)에 따라 행하였다. 2.5 mM MgCl_2 와 10 mM EGTA를 함유한 Ca^{2+} free GVB^{2-} buffer에 녹인 시료(550 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl 와 보체(normal human serum) 500 μl 를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 완충액을 가하여 보체의 농도를 각각 5.6, 8.0 및 9.6 units되게 조정하였다. 여기에 감작되지 않은 rabbit RBC(5×10^7 cells/ml) 1 ml/씩을 첨가하고 완충액으로 최종 용량이 5 ml되게 하였다. 이것을 37°C에서 60분간 반응시킨 후 원심분리하여 상등액의 흡광도를 측정하였다. ACH50은 TCH50을 측정하는 방법과 같이 보체의 소모량으로 계산하였다.

면역 전기영동

면역 전기영동은 Shimura 등의 방법(1983)을

변형하여 행하였다. 6.25 mM EGTA, 2.5 mM MgCl₂ 가 함유된 GVB²⁻ buffer에 용해시킨 시료(2.5 mg/ml) 25 μl에 normal human serum 75 μl를 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 1차 전기영동은 tricine veronal buffer를 사용하여 1% agarose에서 2.1 mA/cm로 행하였으며, 2차 전기영동은 2.5%(v/v)의 antihuman whole serum을 함유한 1% agarose에서 4.2 mA/cm로 4시간 동안 행하였다. 전개된 gel은 coomassie brilliant blue R-250용액으로 염색한 후, native C3의 분해산물을 관찰하였다.

용혈반 형성세포수의 측정

용혈반 세포수의 측정은 Jerne 등의 방법(1963)에 따라 행하였다. Mouse 5마리를 1군으로하여 20 mg/kg 농도의 시료를 연속 5일간 복강내에 투여한 후, 5일이 지난 다음 1×10⁷ 또는 5×10⁷의 SRBC를 복강주사하여 면역시켰다. 5일 후 mouse를 치사시키고 비장을 분리하여, 빙냉의 HBSS 용액에 넣은 후 분쇄하여, 비장세포를 유리시킨 것을 400×g에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 tris buffered ammonium chloride(pH 7.3)에 부유시켜 적혈구를 용해시켰다. 다시 빙냉의 HBSS 용액으로 3회 세척한 후, hemocytometer로 세포수를 측정하였다. 용혈반 형성세포수를 측정하기 위해, 비장세포 0.1 ml(1×10⁸ cells/ml)와 10% SRBC 0.1 ml을 0.7% ager 용액 2 ml에 혼합하여 1.5% agar 기저평판에 균일하게 분주한 후, 37°C에서 60분간 감각화 시켰다. 여기에 보체로서 10%의 guinea pig serum을 2.5 ml씩 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 용혈반 세포수를 측정하였다.

탐식기능의 측정

탐식기능은 carbon clearance rate로서 측정하였으며, Kanari 등의 방법(1989)에 따라 행하였다. 20 mg/kg 농도의 시료를 복강내에 연속 5일간 투여하고, 24시간 후 mouse의 미정맥에 carbon 부유액(perikan drawing ink 17 black 3 ml, 생리식염수 4 ml, 3% gelatin 4 ml의 혼합액)을 0.1 ml/10g씩 주사하고 3, 6 및 6분 후에 眼窩 정맥에서 30 μl를 채혈한 즉시 0.1% Na₂CO₃ 3 ml를 가하여 용혈시킨 후, 675 nm에서 흡광도를 측정하였다. Carbon clearance rate는 아래식에 의해 계산하였다.

$$t_{1/2} = \frac{(t_2 - t_1)(1/2)OD_1}{OD_1 - OD_2}$$

t₁ = initial time(min)

t₂ = final time(min)

OD₁ = t₁에서의 OD값

OD₂ = t₂에서의 OD값

시료의 당 및 단백질의 분석

당의 함량은 Anthrone법(Elizabeth, F.N.V.G, 1966)에 의해 측정하였으며, 단백질은 BSA를 표준물질로 사용하여 BCA protein assay reagent(Pierce Co.)를 사용하였다(Smith 등, 1955). 구성당을 분석하기 위해 시료 10 mg을 0.1 N HCl에 용해시켜 질소를 충전시킨 후, 100°C에서 5시간 동안 가수분해시켰다. 여기에 3배량의 ethanol을 가해 4°C에서 하룻밤 방치한 후, 원심분리하여 얻은 상등액을 동결 건조하였다. 이것을 1 ml의 pyridine에 용해시키고 0.2 ml의 hexamethyl disilazane과 0.1 ml의 trimethyl chlorosilane을 가하고 80°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액 중의 당은 GLC(Shimadzu GL 9A)를 이용하여 분석하였으며, 분석조건은 다음과 같다. Column ; 3% OV-17(80~100)(Me-sh Shimalite) 3 mmφ×1 boronsilicate glass column, Column temperature ; 150~180°C gradient, Detector temperature ; 190°C, Flow rate ; N₂-50 ml/min, H₂-60 ml, air-60 ml/min, Attenuation ; 10²×2¹ a.f.s.

시료 중의 아미노산은 Beckman system 6300 amino acid analyzer를 이용하여 분석하였다. 시료 4 mg을 1 ml의 6 N HCl에 용해시켜, 질소를 충전한 후 밀봉하여 110°C에서 가수분해시켰다. 여과하여 침전을 제거한 후 감압농축하여 건조된 시료를 0.08 M sodium citrate와 0.2 N HCl이 함유된 완충용액 2 ml에 용해시킨 후, 이 중 50 μl를 아래의 조건에서 분석하였다. Column ; Beckman 2.6×200 m, ion exchange resin No. 338076, Flow rate ; buffer solution-0.33 ml/min, ninhydrin-0.17 ml/min, Analysis cycle time ; 60 min, Column pressure ; 147 kg/cm², Ninhydrin pressure ; 7 kg/cm², Column temperature ; 50~70°C gradient, N₂ gas pressure ; 2.8 kg/cm². Reaction bath temperature ; 130°C, Wavelength ; 440 nm, 540 nm, Detector ; tungsten.

結果 및 考察

국내에서 자생하는 *Ganoderma lucidum* IY007을 배양하여 얻은 균사체를 알칼리로 추출하여 얻은 물질이 보체계에 미치는 영향을 살펴보기 위해 *in vitro* 보체계에 시료를 농도별로 가하여 활성화 정도를 측정하였다. Fig. 1에서와 같이 시료의 농도가 증가함에 따라 보체의 소모량(TCH50)이 증가하였으며, 시료 64 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 생물활성은 양성 대조군으로 사용한 krestin 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 생물활성과 동일하였다.

반응시간에 따른 보체활성화 정도는 Fig. 2에서와 같이 시간이 증가함에 따라 증가하여 45분 이후에는 큰 증가양상을 나타내지 않았다. Krestin의 경우도 시간에 따라 보체의 소모량이 증가하였으나, 30분 이후에는 없었다.

ACH50(alternative complement hemolytic activity)은 TCH50에서와 유사하게 시료의 농도가 증가함에 따라 증가하였으며(Fig. 3), 반응시간에 따른 ACH50은 시료와 krestin 모두 시간이 경과함에 따라 ACH50이 증가하였으며, 45분 이후에는 큰 변화가 없었다(Fig. 4). ACH50 반응의 시발 물질인 C3의 활성을 면역전기영동에 의해 측정하기 위해

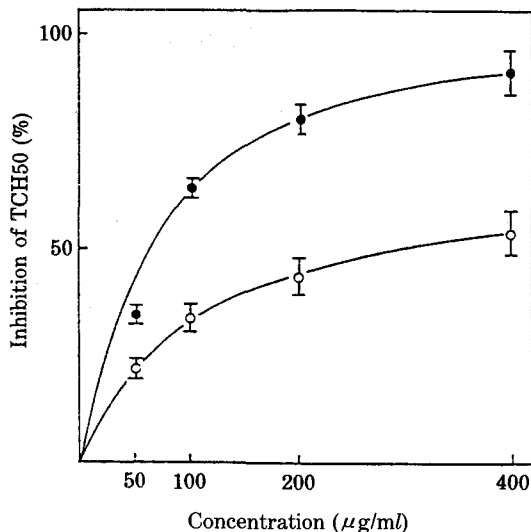


Fig. 1. Dependence of concentration of alkali extract from the *Ganoderma lucidum* IY007 (●-●) and krestin (○-○) on the anticomplementary activity.

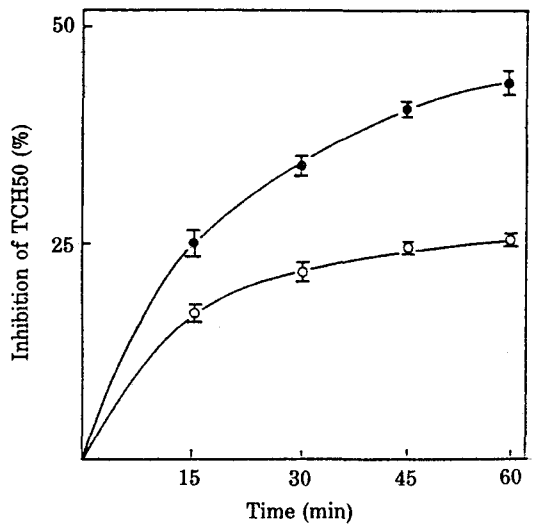


Fig. 2. Time course of anticomplementary activity by alkali extract from the *Ganoderma lucidum* IY007 (●-●) and krestin (○-○).

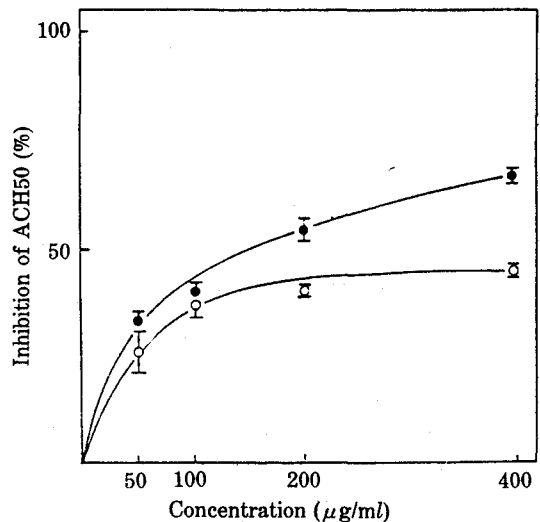


Fig. 3. Dependence of concentration of alkali extract from the *Ganoderma lucidum* IY007 (●-●) and krestin (○-○) on the alternative complement pathway.

영지의 알칼리 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 human serum과 반응시켰을 때 native C3가 감소함과 동시에 전환된 C3(3rd peak)는 증가하였다(Fig. 5). C3의 활성화 정도는 α -2 M(α -2 macroglobulin)과 3rd peak의 비율(3rd peak/ α -2 M)로 나타내는데, 영지와 krestin의 C3 활성화도는 각각 0.73과 0.46으로 영지가 C3

를 더 많이 활성화시킴을 알 수 있었다. 이상과 같은 결과들로부터 영지의 알칼리 추출물

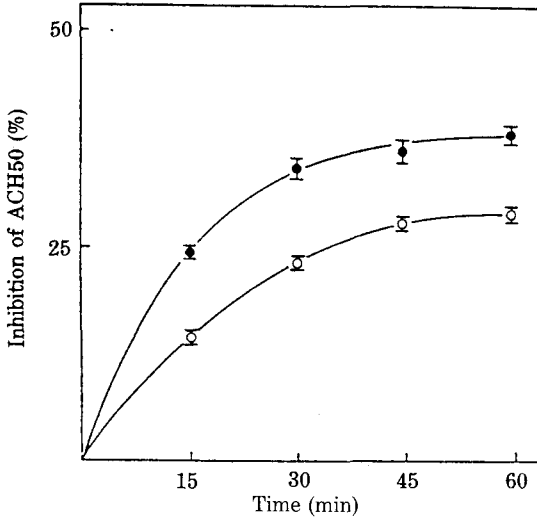


Fig. 4. Time course of complement inhibition by alkali extract from *Ganoderma lucidum* IY007 (●-●) and krestin (○-○) on the alternative pathway.

은 C1에서부터 시작되는 보체반응인 classical complement pathway(TCH50에서의 주반응)는 물론 C3부터 시작되는 반응인 alternative complement pathway(ACH50)를 활성화시키는 것으로 나타났으며 (Fig. 1, 3, 5), 이와 같은 담자균류의 성분에 의한 보체계의 활성화는 항암작용과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 추정(Okuda 등, 1972 ; Shimura 등, 1983)하고 있으나, 보체활성화 단독으로 항암활성을 나타냈다고 보기는 어려우며, 보체계 이외에 다른 면역계가 활성화되어 이들이 복합적으로 작용하여 항암활성을 나타낼 것으로 생각된다.

영지의 알칼리 추출물이 macrophage의 탐식능에 미치는 영향을 살펴보기 위해 carbon clearance rate ($T_{1/2}$)를 측정된 결과, Table I에서와 같이 생리식염수를 투여한 대조군은 13.04분으로 나타났으며, 영지와 krestin의 경우는 20 mg/kg을 투여하였을 때 각각 9.08분 및 10.04분으로 나타나 영지가 krestin보다 macrophage의 탐식능을 촉진시킴을 알 수 있었다.

또한, 영지는 mouse의 비장세포 수를 약간 증가

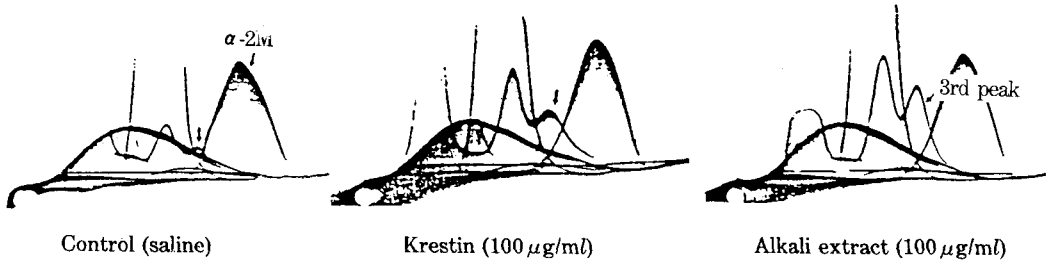


Fig. 5. Crossed immunoelectrophoresis patterns of normal human serum treated with alkali extract from the *Ganoderma lucidum* IY007. Converted C3 (3rd peak) designated by arrow.

Table I. Effect of the alkali extract from *Ganoderma lucidum* IY007 on phagocytic activity of reticuloendothelial system in IRC mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mouse	Clearance rate of carbon ($t_{1/2}$, min)	Phagocytic index (K)
Control		5	11.24 ± 0.16	0.017 ± 0.002
Alkali extract	5	5	10.70 ± 1.24	0.002 ± 0.003
	20	5	9.08 ± 0.98	0.026 ± 0.003
	100	4	7.69 ± 1.49	0.033 ± 0.010
Krestin	20	5	10.40 ± 0.70	0.023 ± 0.002

Each value represents the mean ± S.E.
Significant difference from the control group, $p < 0.01$.

Table II. Effect of the alkali extract from *Ganoderma lucidum* IY007 on hemolytic plaque forming cells in spleen of mouse immunized with SRBC.

Treatment	SRBC	Spleen cell count ($\times 10^7$) (mean \pm S.D.)	PFC/ 10^6 spleen cell (mean \pm S.D.)	PFC/spleen ($\times 10^2$) (mean \pm S.D.)
Control		13.3 \pm 1.3	1.0 \pm 0.5	1.3 \pm 0.6
	1 $\times 10^7$	14.8 \pm 6.7	4.0 \pm 2.8	5.3 \pm 1.2
	5 $\times 10^7$	16.7 \pm 1.3	49.2 \pm 0.8	88.7 \pm 1.3
Alkali extract		15.0 \pm 1.5	1.1 \pm 0.3	1.7 \pm 2.4
	1 $\times 10^7$	18.2 \pm 1.0	23.2 \pm 10.5	30.4 \pm 7.6
	5 $\times 10^7$	21.3 \pm 1.3	53.1 \pm 5.6	104.5 \pm 4.5

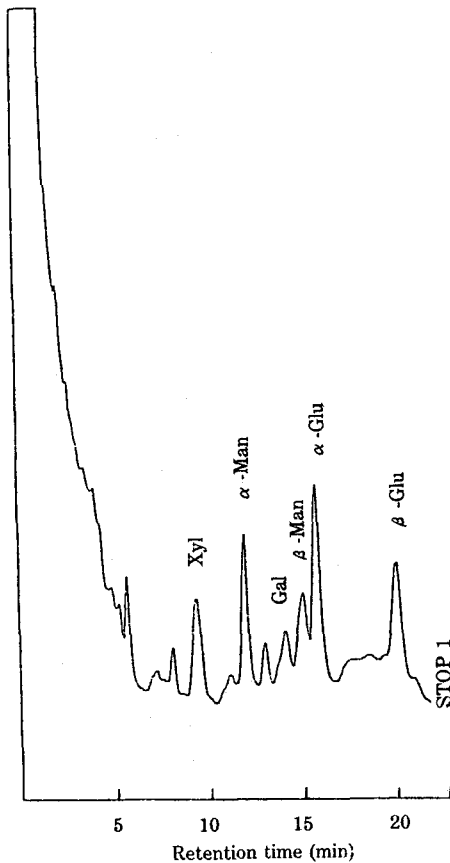


Fig. 6. G.L.C. pattern of monosaccharides of alkali extract from the *Ganoderma lucidum* IY007.

시킴을 알 수 있었으며, 5×10^7 의 SRBC를 주사한 mouse에서는 영지투여군이 대조군에 비해 용혈반형성세포수를 약 54배 정도 증가시켰다(Table II). 이러한 결과는 영지가 항체 생성을 촉진시켰음을

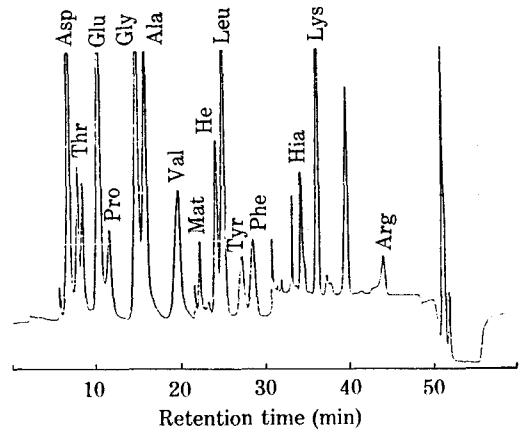


Fig. 7. Chromatogram of amino acids of the alkali extract from *Ganoderma lucidum* IY007.

Table III. Effect of the alkali extract from *Ganoderma lucidum* IY007 on hemolytic plaque forming cells in spleen of mouse immunized with SRBC.

Samples	Polysaccharide (%)	Protein (%)
Alkali extract	10	58
Krestin	49	42

보여주는 것으로, Ohno 등(1976)에 의하면 이러한 humoral immunity 자극효과는 helper T cell의 활성화에서 기인되는 것으로 알려져 있다.

영지의 알칼리 추출물을 분석한 결과, 당과 단백질의 함량은 각각 10%와 58%로 나타났으며(Table III), 당은 glucose, mannose, xylose 및 galactose 등 4종류로 이루어졌고(Fig. 6), 단백질은 glutamic

acid, aspartic acid 및 leucine 등 16종의 아미노산으로 이루어져 있었다(Fig. 7). 이와 같은 결과로 미루어 볼 때, 알칼리 추출물의 주성분은 단백질의 추정되었다.

摘 要

영지가 면역계에 미치는 영향을 살펴보기 위해, 국내에서 자생하는 자실체로부터 분리된 균사를 액내배양하여 얻은 균사체를 알칼리로 추출하였다. 영지의 알칼리 추출물은 *in vitro*에서 alternative 경로는 물론 classical 경로에 의해 보체계를 활성화시켰으며, 알칼리 추출물에 의해 활성화된 C3는 면역전기영동에서도 확인 되었다.

또한, 영지의 알칼리추출물은 mouse의 망내계에 존재하는 macrophage를 활성화 시켜 이물질인 carbon에 대한 탐식기능을 증진시켰으며, 항체생산을 자극하여 mouse의 용혈반 형성세포수를 증가시킴을 알 수 있었다.

알칼리 추출물의 성분을 분석한 결과, 당 10%와 단백질 58%로 4종의 당단류와 16종의 아미노산으로 이루어진 단백질당류로 추정되었다.

參考文獻

Elizabeth, F.N.V.G. (1966): *Methods in enzymology*, 8: Academic Press, New York, pp.4-5.
Hikino, H. and Mizuno, T. (1989): Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.* 55: 385.
Jerne, N.K. and Nordin, A.A. (1963): Plaque formation in agar by single antibody-producing cell. *Science* 140: 405-406.
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. *Immunol.* 34: 695-705.
Kanari, M., Tomoda, M., Gonda, R., Shimizu, N., Kimura, M., Kawaguchi, M. and Kawabe, C. (1989): A reticuloendothelial system activating arabinoxylan from the bark of *Cinnamomum cassia*. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 3191-3194.
Kanmatsuse, K., Kajiwara, N., Hayashi, K., Shimogachi, S., Fukinbara, I., Ishikawa, H. and

Tamura, T. (1985): Studies on *Ganoderma lucidum*. I. Efficacy against hypertension and side effects. *Yakugaku Zasshi* 105: 942-947.
Kim, B.K., Chung, H.S., Chung, K.S. and Yang, M.S. (1980): Studies on antineoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* 8: 107-113.
Kohda, H., Tokumoto, W., Sakamoto, K., Fujii, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S. and Uchida, M. (1985): The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpene. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 1367-1374.
Kubo, M., Matsuda, H., Nogami, M., Arichi, S. and Takahashi, T. (1983): Studies on *Ganoderma lucidum*. IV. Effect on the disseminated intravascular coagulation. *Yakugaku Zasshi* 103: 871-877.
Maeda, Y.Y. and Chihara, G. (1971): Lentinan, a new immuno-accelerator of cell-mediated responses. *Nature*, 228: 634.
Mizuno, T., Kato, N., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, K. and Shimizu, M. (1984): Fractionation, structural features and antitumor activity of water soluble polysaccharide from 'Reishi', the fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nogeigaku Kaishi* 58: 871-880.
Miyazaki, T. and Nishijima, M. (1981): Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 3611-3616.
Miyazaki, T. and Nishivima, M. (1982): Structural examination of an alkali-extracted, water soluble heteroglycan of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr. Res.* 109: 290-294.
Ohno, R., Yokomaku, S., Wakayama, K., Sugiura, S., Imai, K. and Yamaka, K. (1976): Effect of protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, on the immune response of mice to sheep red blood cell. *Gann* 67: 97-99.
Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Nishioka, K. (1972): Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature New Biol.* 238: 59-60.
Platt, M.T. and Ishizaka, K. (1974): Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.* 113: 348-358.

- Shimura, K., Ito, H. and Hibasami, H. (1983): Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immuno-electrophoresis using fresh human serum. *Japan. J. Pharmac.* **33**: 403-408.
- Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y. and Inada, Y. (1985): Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 3012-3015.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- 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 lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2641-2653.
- Toth, J.O., Luu, B. and Ourisson, G. (1983): Les acides ganoderiques T a Z, triterpens cytotoxiques de *Ganoderma lucidum* (Polyporaceae). *Tetrahedron Letters* **24**: 1081-1083.
- Yamaka, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Kojima, Y., Kumazawa, Y. and Otsuka, Y. (1984a): Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Part 1. Fractionation and biological properties of polysaccharides. *Planta Med.* **50**: 163-167.
- 강창술, 심미자, 최응철, 이영남, 김병각. (1981) : 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. 만년버섯의 균사배양 및 항암성분. 한국생화학회지, **14** : 101-112.

Accepted for Publication 17 October 1990