

Lentinus edodes IY105 알칼리 추출물의 보체계활성 및 항종양효과

이준우 · 정천희 · 정 훈 · 이권행*

일양약품 (주) 중앙연구소

Anticomplementary and Antitumor Activities of the Alkali Extract from the Mycelia of *Lentinus edodes* IY105

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

Central Institute of Research, Il Yang Pharmaceutical Co. Ltd., Yongin 449-900, Korea

Alkali extract obtained from mycelia of *Lentinus edodes* IY105 was shown to have potent anticomplementary activity and alternative complementary activity *in vitro*. It was also shown to activate reticuloendothelial system of ICR mice in the carbon clearance. Amount of carbohydrates and protein of the extract were 17% and 42% respectively. It was found that carbohydrates were consisted of 5 monosaccharides and protein was consisted of 16 amino acids. Antitumor activity was observed in the alkali extract treated group of sarcoma 180 bearing ICR mice.

버섯은 담자균류에 속하는 미생물로 전통적으로 식용이나 약용 등으로 널리 이용되어 왔다. 최근에는 *Lentinus edodes* (Berk) Sing(1), *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel(2), *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Quel(3), *Flammulina velutipes* (Curt ex Fr.) Sing(4), *Schizophyllum commune* Fr.(5) 및 *Grifola umbellata* (6) 등으로부터 얻은 polysaccharides 가 종양세포인 sarcoma 180에 대한 강한 억제작용을 가지고 있다고 보고되었다.

이들은 종양세포에 직접 작용하여 항암효과를 발휘하는 것이 아니고, 면역계의 host mediated immune response에 관여하여 손상된 면역기능을 회복시켜 주거나, 촉진시켜 주므로써 효과를 나타낸다고 보고되고 있다(7,8). 또한, Okuda 등(9)은 항암활성을 가지고 있는 polysaccharides 가 생체내에서 감염방어 등의 면역기능을 나타내는 보체계(complement system)를 활성화시키며, 보체계의 활성화는 항암효과와 상호 밀접한

관계가 있다고 보고하였다. Polysaccharides는 생체방어작용 중에서도 망내계(reticuloendothelial systems) 내의 macrophage를 활성화시켜 이물질에 대한 탐식기능을 증진시켜, 암세포에 대하여 독성작용을 나타내며(10), 항암활성을 지닌 polysaccharides를 mouse에 투여하면 serum protein 중 특정성분이 증가되는 것으로(11) 알려지고 있다.

본 연구에서는 한국에서 자생하는 *Lentinus edodes*를 채취하여, 이로부터 균사체를 분리 및 배양하여 얻은 추출물이 보체계와 망내계에 미치는 영향과 sarcoma 180에 대한 항암효과에 대하여 검토하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 경기도 광릉에서 채집한 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 분리한 *Lentinus edodes* IY105 균사체이며, 보관용 배지는 potato dextrose agar(PDA) 사면배지를 사용하였다. 배양용 배지는 감자 200g에 물 1L를 가해 100°C에서 1시간 동안 추출한 액에 glucose 20g, FeCl₂·6H₂O 10mg, MnCl₂·4H₂O 7mg, CuSO₄·5H₂O 10mg 및 ZnCl₂ 4mg을 물

Key words: *Lentinus edodes*, anticomplementary activity, total complement hemolytic activity, alternative complement hemolytic activity, total complement system, reticuloendothelial system, antitumor activity

*Corresponding author

1/에 녹여 pH를 5.5로 조정한 후, 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 antisheep hemolysin(Difco Co.)과 antirabbit human serum(Sigma Co.)를 사용하였다. 완충액 조제를 위하여 사용한 barbital은 Merck사 제품을 사용하였고, gelatin, EGTA 및 MgCl₂는 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 한국인 삼연초연구소의 김명숙 박사로부터 제공받아 사용하였다.

조당류의 분리

배양용 배지 3l가 들어있는 fermentor(Marubishi MD300)에 5%의 종균을 접종하고, 교반속도를 300 rpm, 통기량을 1vvm으로 조정한 후, 25°C에서 7일간 배양하였다. 배양물을 6000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 균사체에 2.5N NaOH 용액을 가해 최종농도가 2N되게 조정하고 24시간 방치한 후, 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 acetic acid로 중화시켜 pH 7.0이 되게 조정한 후, dialysis membrane(Sigma Co.)에 넣어 흐르는 물에 3일 동안 투석하고, 농축한 뒤 3배량의 ethanol을 가해 4°C에서 24시간 방치하였다. 원심분리하여 얻어진 침전물에 소량의 증류수를 가해 용해시킨 후, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

보체활성의 측정

항보체활성(anticomplementary activity)은 Yamada 등(12)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시험관에 150 μl의 GVB²⁺ buffer(0.15 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1.8 mM sodium barbital, 3.1 mM barbituric acid, 141 mM NaCl 및 0.1% gelatin, pH 7.4)와 시료 50 μl(250 μg/ml)를 가한 다음, 여기에 50 μl의 guinea pig complement(100 u/ml)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, GVB²⁺ buffer를 가해 보체의 최종농도가 1

unit/ml이 되게 조정하였다. 조정된 보체 혼합물을 1.0, 1.2 및 1.6 units/ml되게 각 시험관에 분주한 후, 동량의 antisheep hemolysin(2 MHU/ml)으로 실온에서 30분간 감작된 2.5×10⁸ cell/ml의 sheep red blood cell(SRBC) 2 ml씩을 가하고 GVB²⁺ buffer로 최종 용량이 5 ml되게 조정하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해 70 μl의 0.5 M EDTA를 가하여 혼합한 후, 400×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액을 541 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항보체활성은 대조군의 total complement hemolytic activity(TCH 50)에 대한 저해율(%)로서 표시하였다.

Alternative complement hemolytic activity(ACH 50)의 측정은 Platts-Mill 등의 방법(13)에 따라 행하였다. 2.5 mM MgCl₂와 10 mM EGTA를 함유한 Ca²⁺ free GVB²⁻ buffer에 녹인 시료(550 μg/ml) 50 μl와 보체(normal human serum) 500 μl를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 완충액을 가하여 보체의 농도를 각각 5.6, 8.0 및 9.6 units되게 조정하였다. 여기에 5×10⁷ cells/ml의 감작되지 않은 rabbit red blood cell(RRBC) 1 ml씩을 첨가하고 완충액으로 최종 용량이 5 ml되게 하였다. 이것을 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 원심분리하여 상등액의 흡광도를 측정하였다. Alternative complement hemolytic activity는 대조군의 ACH 50에 대한 저해율(%)로서 표시하였다.

면역 전기영동

면역 전기영동은 Shimura 등의 방법(14)을 변형하여 행하였다. 6.25 mM EGTA, 2.5 mM MgCl₂가 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 2시간 동안 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-250 용액으로 염색한 후, native C3의 분해산물을 관찰하였다.

용혈반 형성 세포수의 측정

용혈반 세포수의 측정은 Jerner 등의 방법(15)에 따라 행하였다. Mouse 1군을 5마리로 하여 20 mg/kg 농도의 시료를 연속 5일간 투여한 후, 5일이 지난 다음 1×10⁷ 또는 5×10⁷의 SRBC를 복강주사하여 면역화시켰다. 5일 후 mouse를 치사시키고 비장을 분리하여, 빙

냉의 Hank's balanced salt solution (HBSS) 용액에 넣은 후, 분쇄하여 비장세포를 유리시킨 것을 400×g에서 5분간 원심분리하였다. 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 형성 세포수를 측정하기 위해, 비장세포 0.1 ml (1×10^8 cells/ml)와 10% SRBC 0.1 ml를 0.7% agar 용액에 혼합하여 1.5% agar 기저평판에 균일하게 분주한 후, 37°C에서 60분간 감각화시켰다. 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 (16)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 9분 후에 안와(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.

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

t_1 = initial time (min)

t_2 = final time (min)

OD₁ = t_1 에서의 OD 값

OD₂ = t_2 에서의 OD 값

항암효과의 측정

0.1 ml (1×10^7 cells/ml)의 sarcoma 180을 ICR 계 mouse의 우측 서혜부에 피하이식하고, 72시간 후부터 20 mg/kg 농도의 시료를 1일 1회씩 10일간 투여하였다. 종양세포를 이식한 후 30일째 되는 날에 mouse를 치사시키고, 고형암을 적출하여 중량을 평량하였다. 증식저지율은 생리 식염수를 투여한 대조군과 비교하여 종양 저지백분율 {percent inhibition ratio; I.R. (%) }로 계산하였다.

$$I.R. (\%) = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

C_w = 대조군의 평균 종양무게

T_w = 처치군의 평균 종양무게

시료의 당 및 단백질의 분석

당의 함량은 Anthrone 법 (17)에 의해 측정하였으며, 단백질은 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 사용하여 BCA protein assay reagent (Pierce Co.)를 사용하여 정량하였다 (18).

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 gas liquid chromatography (GLC, Shimadzu GL 9A)를 이용하여 분석하였으며, 분석조건은 다음과 같다. Column; 3% OV-17 (80-100 mesh Shimalite) 3 mm φ × 1 boronsilicate glass column, Column temperature; 150°C-180°C gradient, Detector temperature; 190°C, Flow rate; N₂-50 ml/min, H₂-60 ml/min, 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 것으로, 이 중 50 μl를 아래의 조건에서 분석하였다. Column; Beckman 2.6 × 200 mm, ion exchange resin No.38076, 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°C-70°C gradient, N₂ gas pressure; 2.8 kg/cm², Reaction bath temperature; 130°C, Wavelength; 440 nm, 540 nm, Detector; tungsten.

결과 및 고찰

Lentius edodes IY105의 배양 균사체를 알칼리로 추출하여 얻은 물질이 *in vitro*에서 보체계에 미치는 영향을 살펴본 결과, Fig. 1에서와 같이 알칼리 추출물의 농도가 증가함에 따라 보체의 소모량이 증가함을 알 수 있

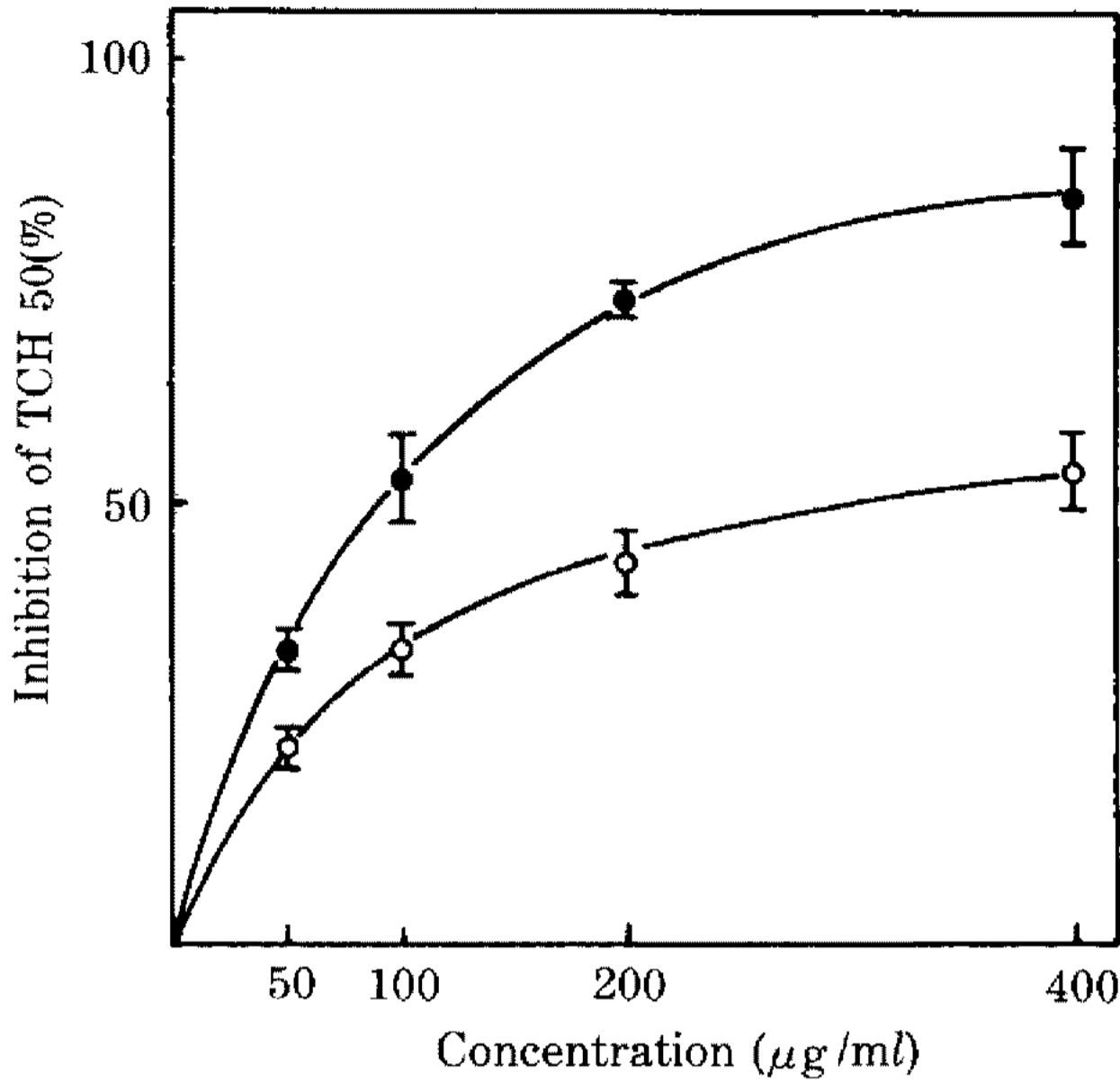


Fig. 1. Dependence of concentration of alkali extract from the *Lentinus edodes* IY105 (● - ●) and Krestin (○ - ○) on the anticomplementary activity.

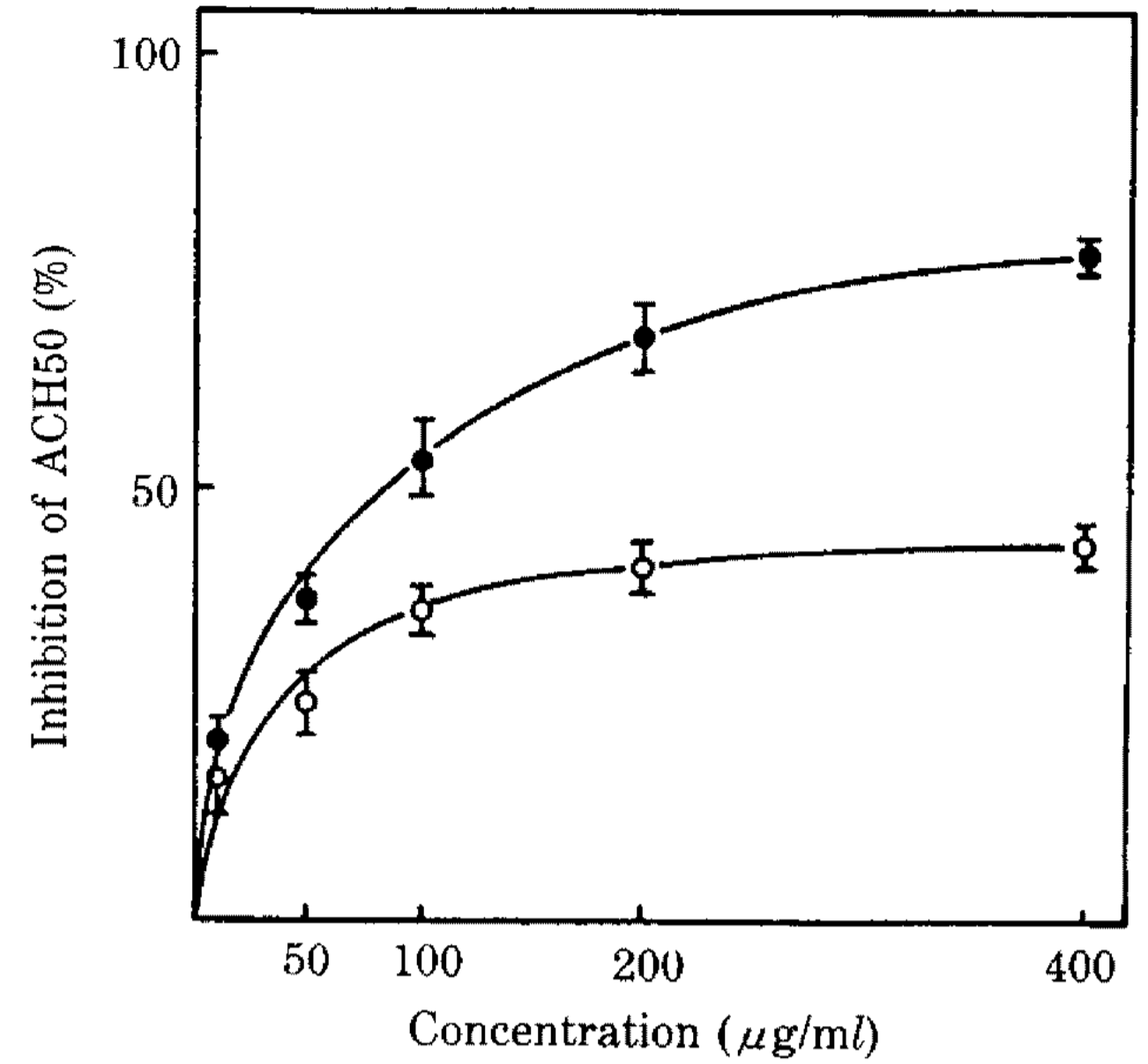


Fig. 3. Dependence of concentration of alkali extract from the *Lentinus edodes* IY105 (● - ●) and Krestin (○ - ○) on alternative complement pathway.

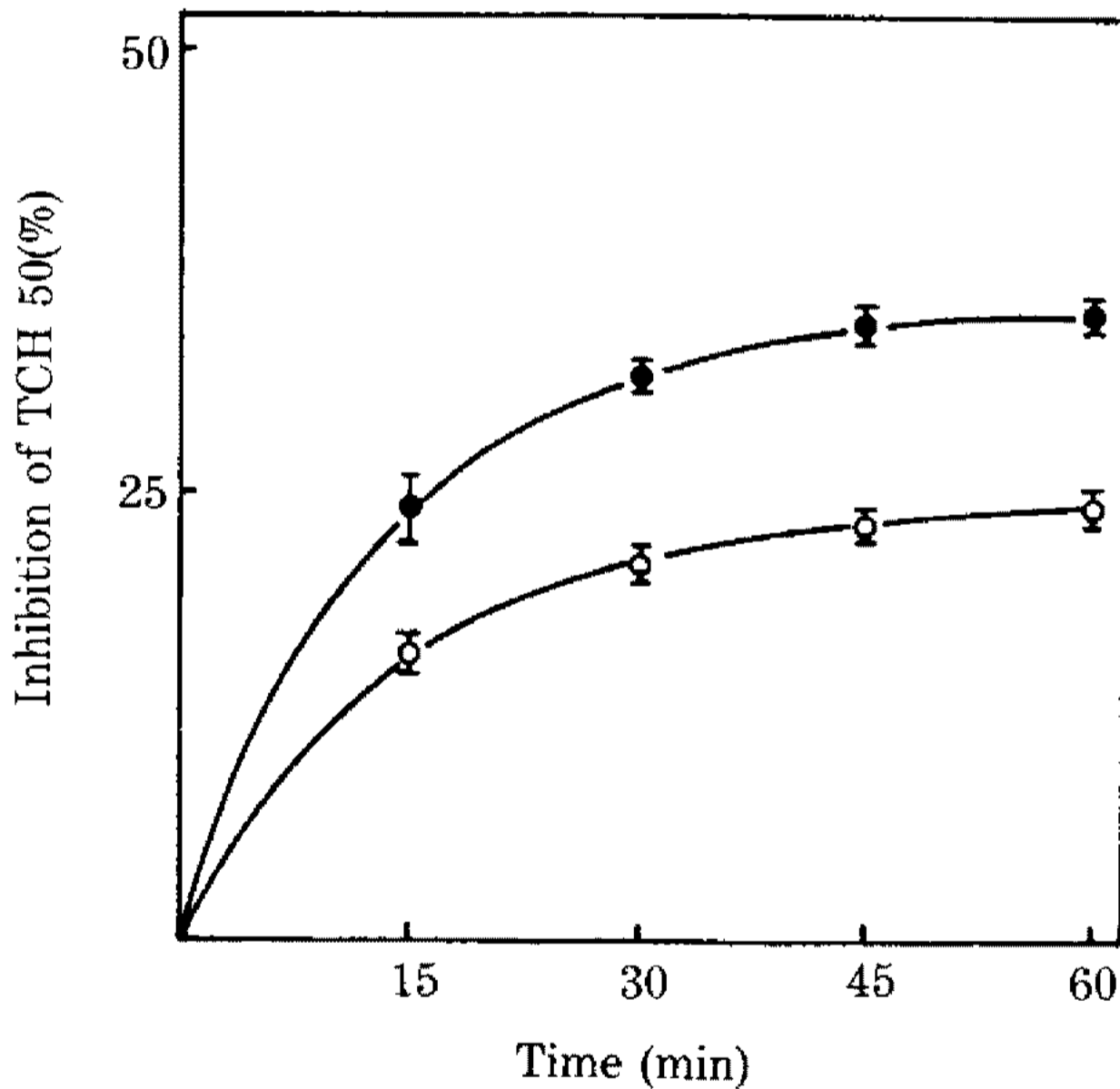


Fig. 2. Time course of anticomplementary activity by alkali extract from the *Lentinus edodes* IY105 (● - ●) and Krestin (○ - ○).

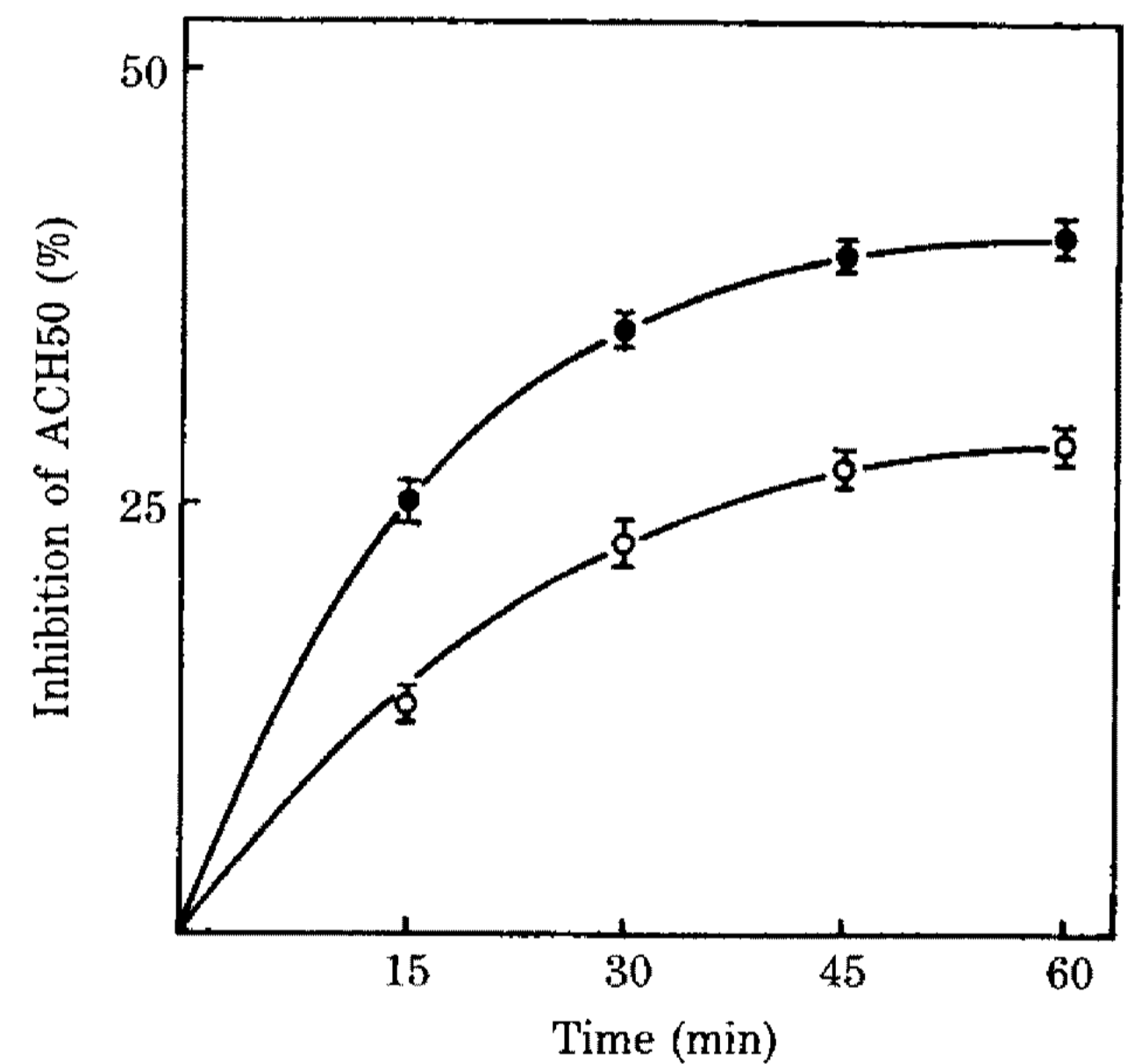


Fig. 4. Time course of complement inhibition by alkali extract from the *Lentinus edodes* IY105 (● - ●) and Krestin (○ - ○) on the alternative pathway.

었으며, TCH 50은 90 μg/ml로 양성 대조군으로 사용한 krestin의 TCH 50인 320 μg/ml보다 훨씬 높은 생물 활성을 나타내었으며, 보체의 활성화 정도는 30분까지는 급격히 증가하였으나, 45분 이후에서는 큰 증가양상을 나타내지 않았다(Fig.2).

ACH 50은 Fig.3에서와 같이, 농도증가에 따라 활성이 증가하였으나, TCH 50보다는 완만한 증가양상을 나타내었으며, krestin 100 μg/ml의 활성과 동일한 알칼

리 추출물의 농도는 약 50 μg/ml이었다. 반응시간별 ACH 50은 시간이 경과함에 따라 증가하여, 45분 이후부터는 큰 증가를 보이지 않았다(Fig.4).

이상과 같은 알칼리 추출물에 의한 보체계 활성효과는 보체 성분의 활성화와 직접적으로 연관되어 있을 것으로 생각되어, 알칼리 추출물을 처리하였을 때 보체의 제3 성분인 C3가 활성화되는 정도를 면역 전기영동에 의해 검토하였다. Fig.5에서와 같이 알칼리 추출물이나 양성

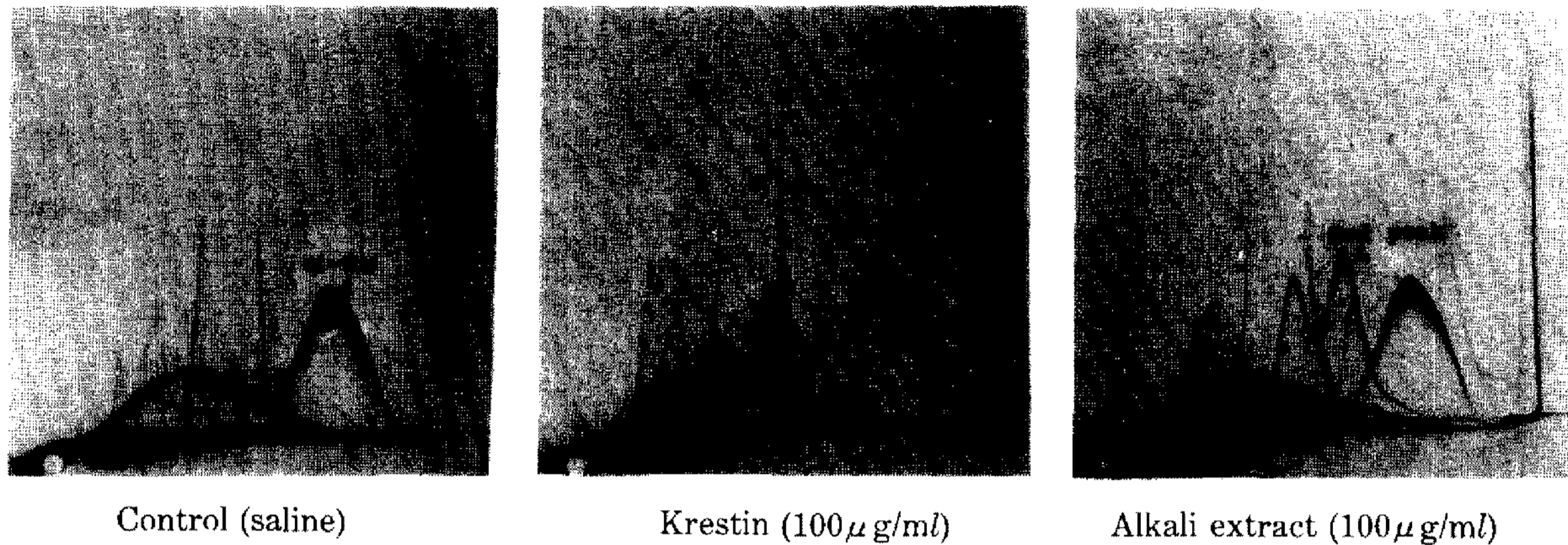


Fig. 5. Crossed immunoelectrophoresis patterns of normal human serum treated with alkali extract from the *Lentinus edodes* IY105.

Converted C3 (3rd peak) designated by arrow.

대조군인 krestin을 100 μg/ml 농도로 human serum과 반응시켰을 때, native C3가 감소함과 동시에 native C3의 분해산물(3rd peak)이 증가함을 알 수 있었다. C3 활성화효과는 분해된 C3와 α-2 macroglobulin의 비율(3rd peak/α-2 macroglobulin)로 나타내는데, 알칼리 추출물과 krestin의 값은 각각 1.21과 0.46으로 알칼리 추출물이 krestin보다 높은 C3 활성도를 보였다. Shimura 등(14)에 의하면, 3rd peak/α-2 macroglobulin의 값은 항종양활성을 갖는 다당류의 농도에 비례하여 증가한다고 보고하였으며, 이의 작용기작은 C3의 분해로 생성된 C3b가 macrophage를 활성화시켜 cytotoxicity를 증가시켜 항종양효과를 나타내는 것으로 추정하고 있다(18).

Macrophage의 활성화효과를 carbon clearance 법으로 측정한 결과, Table 1에서 볼 수 있듯이 대조군의 carbon clearance rate ($t_{1/2}$)는 11.24 분으로 나타났으나, 20 mg/kg의 알칼리 추출물을 투여한 경우는 6.19 분으로 krestin의 7.38 분보다 macrophage의 탐식기능을 더 많이 활성화시킴을 알 수 있었으며, 100 mg/kg을 투여하였을 때는 탐식기능이 더욱 활성화되어 $t_{1/2}$ 이 3.61 분으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Hamuro 등이 일본산 *Lentinus edodes*에서 분리한 다당류인 Lentinan이 macrophage를 활성화시킨다는 보고(19)와 일치하는 것이며, macrophage의 활성화는 이들 다당류가 항암효과를 나타내는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고(20)되고 있다.

따라서 이들 결과들로부터 얻어진 알칼리 추출물의 macrophage와 보체계 활성화효과는 서로 밀접한 관계를 갖고 숙주의 면역기능을 촉진시키는 것으로 추정된다.

Table 1. Effect of the alkali extract from *Lentinus edodes* IY105 on clearance rate of carbon in mouse.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mouse	Clearance rate of carbon ($t_{1/2}$, min)
Control		6	11.24 ± 0.16
Alkali extract	20	6	6.19 ± 0.23
	100	6	3.61 ± 0.05
Krestin	20	6	7.38 ± 0.55

Each value represents the mean ± S.E.

Significant difference from the control group, $p < 0.01$

알칼리 추출물이 SRBC에 대한 항체생성에 미치는 영향을 검토하기 위해, 시료를 mouse에 투여한 후, 비장을 분리하여 용혈반 세포수를 측정하였다. Table 2에서와 같이, 시료를 투여한 군이 대조군보다 비장세포의 수가 약간 증가하였고, 1×10^7 cells의 SRBC를 주사한 군에서는 시료를 투여한 것이 생리식염수를 투여한 대조군보다 plaque forming cell(PFC)의 수가 약 16.4 배 증가하였으나, 5×10^7 cells의 SRBC를 주사하였을 때는 1.1 배의 증가에 그쳤다.

알칼리 추출물의 sarcoma 180에 대한 항종양효과를 조사한 결과, Table 3에서 알 수 있듯이 20 mg/kg을 mouse에 투여시 종양저지율이 50%로서 krestin의 36%보다 높게 나타났다.

이상과 같은 면역계의 활성화효과와 항암효과를 나타내는 성분은 단백다당류로 추정되고 있으므로(22) 알칼리 추출물의 당과 단백질의 함량을 분석하였다. Table 4에서와 같이, 알칼리 추출물과 krestin의 polysacchar-

Table 2. Effect of the alkali extract from *Lentinus edodes* IY105 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
	1×10^7	14.8 \pm 6.7	4.0 \pm 2.8	5.3 \pm 1.2
	5×10^7	16.7 \pm 1.3	49.2 \pm 0.8	88.7 \pm 1.3
Alkali extract		14.8 \pm 0.6	2.0 \pm 0.5	3.0 \pm 1.1
	1×10^7	17.1 \pm 1.9	25.4 \pm 8.9	41.2 \pm 12.4
	5×10^7	20.7 \pm 0.9	56.2 \pm 8.1	114.0 \pm 20.7

Table 3. Antitumor activity of the alkali extract from *Lentinus edodes* IY105 in sarcoma 180 bearing mouse.

Treatment	No. of mouse	Dose (mg/kg)	Tumor weight (g) (mean \pm S.D.)	Inhibition ratio (%)
Control	10		1.4 \pm 1.3	
Alkali extract	10	20	0.7 \pm 0.6	50
Krestin	10	20	0.9 \pm 0.6	36

Significant difference from the control group, $p < 0.01$

Table 4. Polysaccharide and protein content of the alkali extract from *Lentinus edodes* IY105.

Samples	Polysaccharide (%)	Protein (%)
Alkali extract	17	42
Krestin	49	42

ide 함량은 각각 17%와 49%로서 알칼리 추출물이 krestin보다 당류 함량이 적었고, 단백질의 경우는 42%로서 서로 동일한 함량을 나타내었다. GLC에 의한 단당류의 정성결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 알칼리 추출물의 당은 주로 mannose, xylose, glucose, galactose 및 fructose 등의 5종류로 구성되어 있었으며, α -mannose의 함량이 25.01%로 가장 많았고 β 형태의 mannose와 glucose도 다량 함유된 것으로 확인되어, 이들이 항종양 활성을 나타내는 β -glucan(23)을 형성할 것으로 추측된다. 또한, 아미노산 분석에서는 16종의 아미노산이 확인되었으며, glutamic acid와 aspartic acid 등의 산성 아미노산이 많이 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 7).

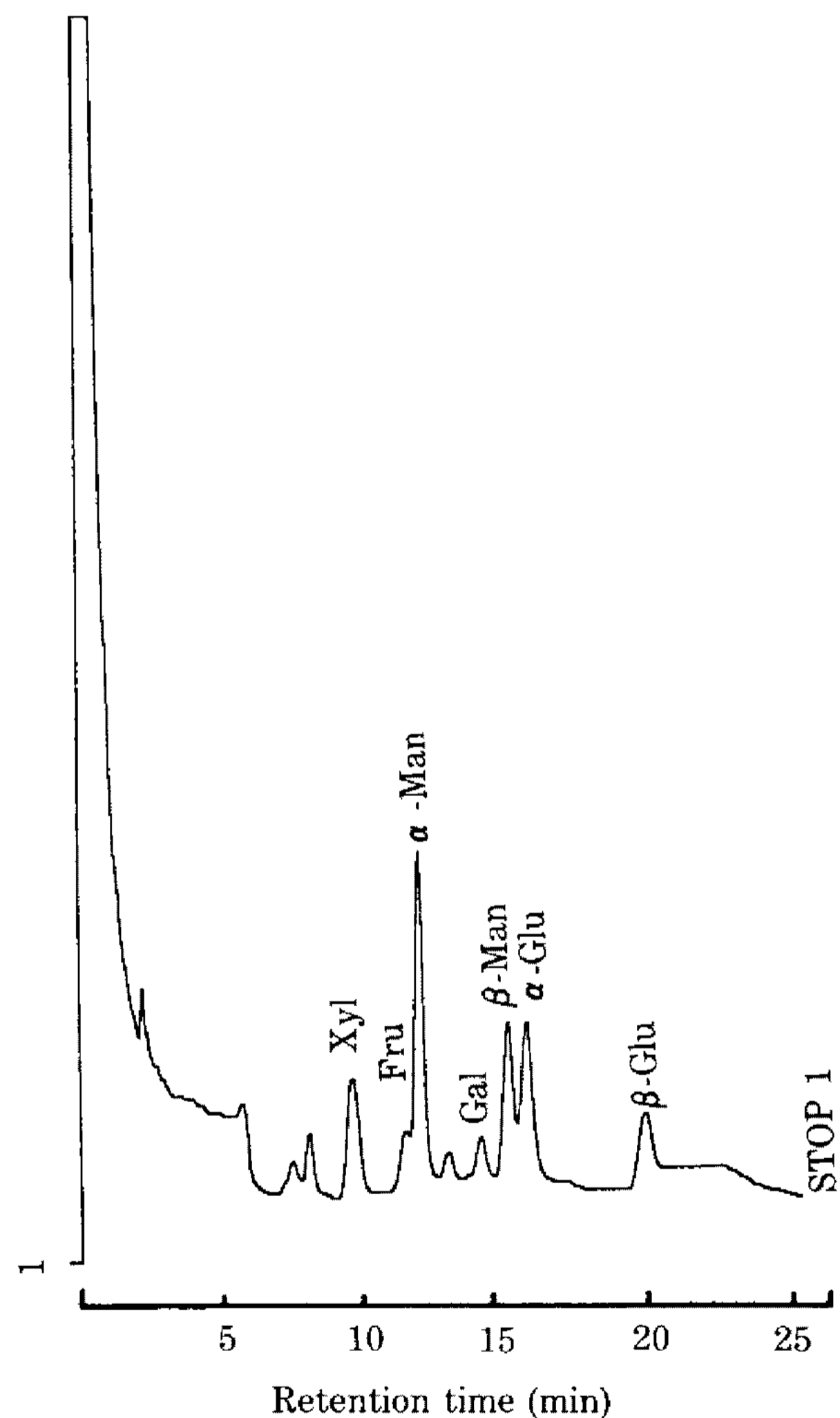


Fig. 6. G.L.C. pattern of monosaccharides of alkali extract from the *Lentinus edodes* IY105.

요 약

경기도 광릉에서 채집한 자실체로부터 분리한 *Lentinus edodes* IY105 균을 배양하여 얻은 균사체를 알칼

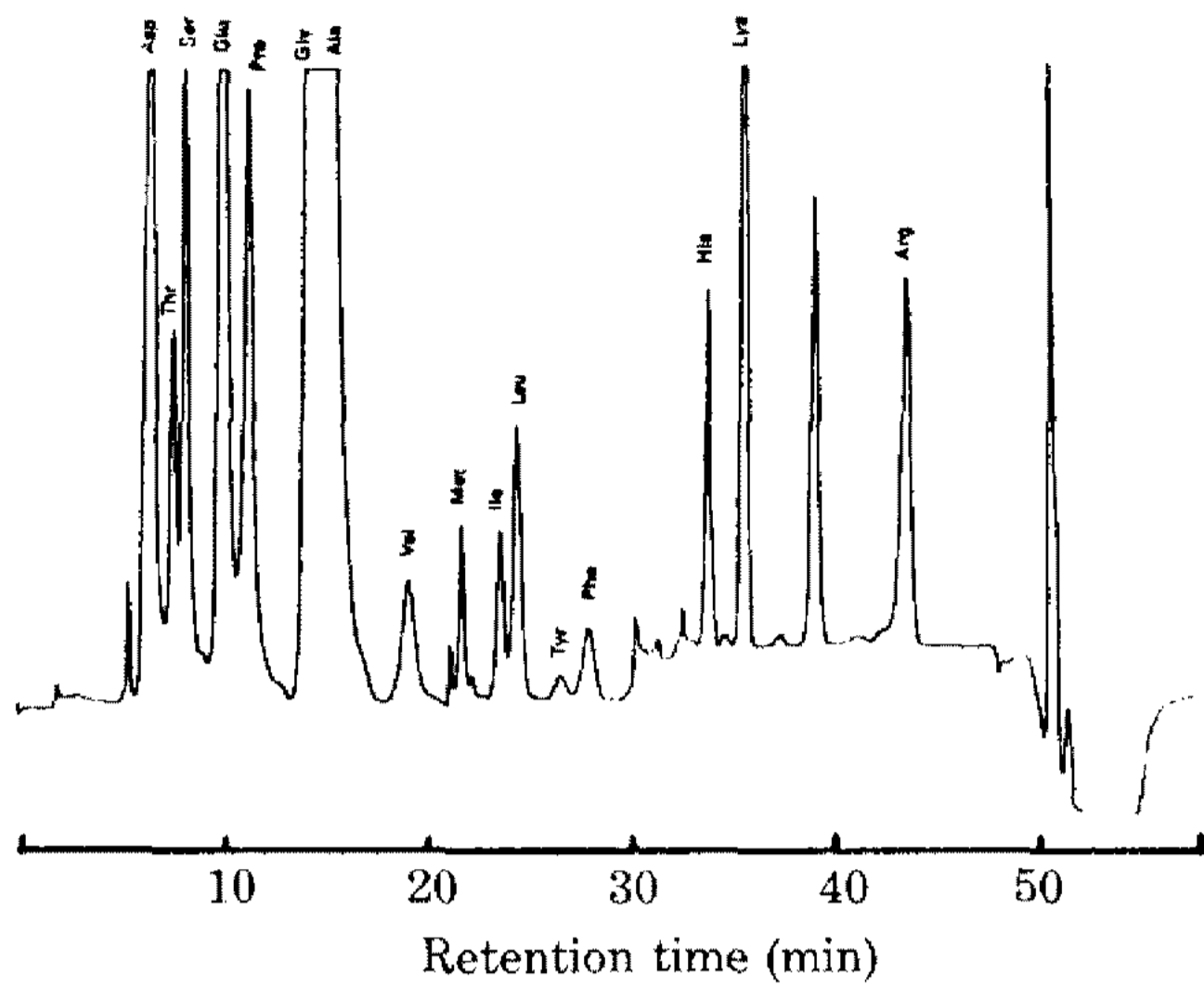


Fig. 7. Chromatogram of amino acids of the alkali extract from *Lentinus edodes* IY105.

리로 추출하여 얻은 물질이 면역계와 sarcoma 180 이 이식된 mouse 에 미치는 영향을 검토하였다.

Lentinus edodes IY105 배양균사체의 알칼리 추출물은 항보체활성과 alternative complement hemolytic 활성을 가지고 있었고, carbon clearance 활성을 나타내는 것으로 보아 mouse 의 망내계에 존재하는 macrophage 를 활성화시켜 이물질에 대한 탐식기능을 증가시킴을 알 수 있었다.

또한, 이물질은 mouse 의 용혈반 형성 세포수를 증가시키는 것으로 보아 항체생산 자극효과가 있는 것으로 추측되었으며, 종양세포인 sarcoma 180 이 이식된 mouse 의 암을 50% 정도 억제하는 효과를 나타내었다.

알칼리 추출물의 성분을 분석한 결과, 당 17%, 단백질 42%로 구성된 단백다당체가 주성분으로 단백다당체는 16종의 아미노산과 5종류의 당으로 구성되어 있었다.

참고문헌

1. Chihara, G., J. Hamuro, Y.Y. Maeda, Y. Arai and F. Fukuoka: *Cancer. Res.* **30**, 2776 (1970).
 2. Tsukagoshi, S. and F. Ohashi: *Gann* **65**, 557 (1974).

3. Yoshioka, Y., T. Ikekawa, M. Noda and F. Fukuoka: *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 1175 (1972).
 4. Yoshioka, Y., T. Sano and T. Ikekawa: *Chem. Pharm. Bull.* **121**, 1772 (1973).
 5. Komatsu, N., S. Okubo, S. Kikumoto, K. Kimura, G. Saito and S. Sasaki: *Gann* **60**, 137 (1969).
 6. Miyazaki, T., N. Okawa, T. Yadomae, H. Yamada, Y. Yamada, H. Hong-Yen and H. Ito: *Carbohydr. Res.* **69**, 165 (1979).
 7. Maeda, Y.Y. and G. Chihara: *Nature* **229**, 634 (1971).
 8. Maeda, Y.Y., J. Hamuro and G. Chihara: *Intern. J. Cancer*, **8**, 41 (1971).
 9. Okuda, T., Y. Yoshioka, T. Ikekawa, G. Chihara and K. Nishioka: *Nature New Biol.* **238**, 59 (1972).
 10. Hamuro, J., M. Rollinghoff and H. Wagner: *Immunol.* **39**, 551 (1980).
 11. Maeda, Y.Y., G. Chihara and K. Ishimura: *Nature* **252**, 250 (1970).
 12. Yamada, H., H. Kiyohara, J.C. Cyong, Y. Kojima, J. Kumazawa and Y. Otsuka: *Planta Med.* **50**, 165 (1983).
 13. Platts-Mills T.A.E. and K. Ishizaka: *J. Immunol.* **113**, 348 (1974).
 14. Shimura, K., H. Ito and H. Hibasami: *Japan J. Pharmacol.* **33**, 403 (1983).
 15. Jerner, N.K. and A.A. Nordin: *Science* **140**, 405 (1963).
 16. Kanari, M., M. Tomoda, R. Gonda, N. Shimizu, M. Kimura, M. Kawaguchi and C. Kawabe: *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3191 (1989).
 17. Roe, J.H.: *J. Biol. Chem.* **212**, 335 (1955).
 18. Smith, P.K., R.L. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Koeke, B.J. Olson and D.C. Klenk: *Anal. Biochem.* **150**, 75 (1985).
 19. Hamuro, J., U. Hadding and Bitter-Suermann: *Immunol.* **14**, 695 (1978).
 20. Suzuki, I., T. Itani, N. Ohno, S. Okawa, K. Sato, K. Miyazaki and T. Yamada: *J. Pharmacobio-Dyn.* **8**, 217 (1985).
 21. Ohno, R., S. Yokomaku, K. Wakayama, S. Sugiura, K. Imai and K. Yamada: *Gann* **67**, 97 (1976).
 22. Kim, B.K., E.K. Park and M.J. Shim: *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145 (1979).
 23. Hirata, F. and H. Ito: *Japan. J. Pharmacol.* **30**, 503 (1980).

(Received September 12, 1990)