

밀버섯의 항암성분에 관한 연구

김숙희 · 김진숙 · 진미림 · 김하원 · 최응철 · 김병각
서울대학교 약학대학 미생물약분화학교실

Studies on Antitumor Components of *Collybia confluens*

Sook Hee Kim, Jin Sook Kim, Mi Rim Jin, Ha Won Kim, Eung Chil Choi and Byong Kak Kim
Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—To find antitumor components from higher fungi, the mycelia of *Collybia confluens* (Pers. ex Fr.) Kummer were cultured in artificial media. For efficient production of the mycelia, the influences of various modifications of culture conditions were examined. A water-soluble protein-bound polysaccharide fraction, Fr. A, was obtained from the mycelia by hot water extraction. When Fr. A was purified and fractionated by DEAE-cellulose and Sephadex G-200 gel filtration chromatographies into four fractions which were designated B, C, C-I and C-II. The tumor inhibition ratios of these fractions ranged from 46% to 75% against the solid forms of sarcoma 180 in ICR mice at doses of 20 and 50 mg/kg/day when given intraperitoneally. Especially, Fr. C which was named Collyban(CB) exhibited a marked life-prolonging effect of the mice against ascitic forms of sarcoma 180 at a dose of 50 mg via *i.p.* administration. To extend spectra of the antitumor activities and eliminate the effects of allograft rejection, the characterization of antitumor effects of CB was performed in syngeneic host-tumor systems. It did not show any antitumor activity against L1210 murine leukemia in CD2F1 mice but prolonged their life span against ascitic forms of MM46 carcinoma in C3H/He mice. Also it exhibited antitumor activity against human cervical cancer HeLa cells that were xenografted into nude mice having BALB/c genetic backgrounds by the *i.p.* injection at a dose of 100 mg/kg/day. In order to characterize the antitumor components, CB was examined by chemical analysis. It was acidic protein-bound polysaccharides composed of 31% polysaccharide, 27% protein and 3% hexosamine. CB was fractionated into two fractions, Fr. C-I(M.W.: 500 Kd) and Fr. C-II(M.W.: 30 and 8 Kd) by Sephadex G-200 gel filtration chromatography.

Keywords—Basidiomycetes · *Collybia confluens* · antitumor component · cultured mycelia · Collyban · protein-bound polysaccharides · HeLa cell · immunomodulator

면역학이 발전함에 따라 여러가지 면역 기능 물질들이 생체의 면역 부전 상태를 개선 혹은 치료하는 면역요법제로 개발되어 암의 치료에 사용되고 있다. 이들 면역요법제의 기원은 고등 식물¹⁻³⁾을 위시하여 세균류⁴⁻⁶⁾, 진균류⁷⁻⁹⁾, 인체¹⁰⁻¹³⁾등 다양하다. 그러나 면역요법제중의 일

부는 임상 투여시 생체내에서 심한 부작용을 나타내는 경우¹⁴⁻¹⁷⁾도 보고되어 그 시도가 성공적인 것만은 아니다. 미생물에서 유래하는 생체반응 조절물질중에서 특히 진균류에 속하는 담자균류에서 분리한 단백다당체 또는 다당체가 생체면역 기능을 증강시키거나 억제된 면역 기능을 정상으로 회복시켜 줌으로써 효과를 발휘한다는 것은 그간의 연구 결과에 의해 밝혀지고 있다.^{18,19)}

Komatsu 등²⁰⁾이 치마버섯인 *Schizophyllum commune*으로부터 β -1,6; β -1,3-glucan인 schizophyllan을 분리하여 항암작용을 보고하였으며, 그 작용 기전을 숙주의 면역 세포들인 대식세포 및 T 임파구 등의 활성화에 의한 것임을 Suzuki 등²¹⁾이 밝혔다. 이외 Tabata 등²²⁾ 및 Kozima 등²³⁾은 schizophyllan의 triple helical 구조 및 분자량과 항암력과의 관계에 대한 연구를 수행하였다.

담자균류에서 분리한 다당체 및 단백다당체를 다양한 추출법과 정제 과정을 통하여 보다 우수한 항암효과를 나타내는 성분을 얻고자 하는 연구가 Ikekawa 등²⁴⁾ 및 Mizuno 등²⁵⁾에 의해 수행되었다. 그리고 다당체인 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan을 periodate로 산화시키거나 borohydride로 환원시킴으로써 D-glucan polyol로 변형시키면 항암효과가 현저히 증강됨을 Sone 등²⁶⁾이 발표한 이후, 다당체의 화학 구조와 분자량이 항암활성력에 미치는 영향에 대한 연구 결과가 Miyazaki 등²⁷⁾ 및 Adachi 등²⁸⁾에 의해 보고되었다.

한편 한국산 담자균류의 항암성분에 대한 연구는 본 연구실에서 Kim 등²⁹⁾이 구름버섯, 표고버섯 및 느타리버섯의 자실체로부터 마우스의 육종 180에 대해 강력한 항암작용을 나타내는 다당류와 단백질로 구성된 고분자 추출물을 보고한 이후로, 잣버섯아재비³⁰⁾ 및 메꽃버섯³¹⁾, 노랑다발버섯³²⁾, 노랑다리버섯³³⁾, 애기졸각버섯³⁴⁾, 뽕나무버섯³⁵⁾ 및 느타리마아재비버섯³⁶⁾ 등의 자실체 또는 배양 균사체로부터 마우스 육종 180에 대해 항암작용을 가진 단백다당체를 분리하여 보고하였다.

1966년 Gregory 등이 북미의 유목사 담자균류의 자실체와 균사 배양물 7000의 종의 대량 항

암작용 유무를 알아보기 위한 항암실험을 시행하여 그 중 *Agaricus* 등 20 속에 걸쳐 50개의 배양물에서 항암력을 확인하였다.³⁶⁾ Yang 등³⁷⁾은 중국에서 2000년의 역사를 가진 약용버섯을 의학의 발달과 더불어 107 종류로 분류하고 그 중에서 최근 의약품으로 개발한 9종류의 담자균에 대해 약효성분, 적응증, 투여법 등을 상세히 보고하였다. 상기의 107 종의 분류 중 밀버섯과 같은 속으로서는, 자실체 성분을 건위나 치질 치료에 사용한다는 *Collybia albuminosa*만을 예시하였을 뿐 *Collybia confluens* 즉 밀버섯에 관한 보고는 없다.

새로운 항암성분을 검색하기 위한 시도로서 현재까지 항암성분에 대한 보고가 전혀 없는 밀버섯을 선택하여 본 실험에 착수하게 되었다. 식용 버섯인 밀버섯 *Collybia confluens* (Pers. ex Fr.) Kummer는 송이과(Tricholomataceae)에 속하여 자실체는 지름 1~3.5 cm로 호빵형에서 거의 편평하게 되고 연갈색이며 자루는 2.5~9 cm로 연갈색~갈색이다. 포자는 다원형~종자형이며 6.5~8 \times 3~3.5 μ m로서 여름과 가을에 활엽수림내 땅위의 낙엽 사이에 군생 또는 속생하고 낙엽 분해에 큰 구실을 한다.³⁸⁾

농촌진흥청 균이과에서 분양 받은 밀버섯 균사로부터 항암성분을 다량 얻기 위해서, 균사 성장에 유리한 배양 조건을 찾기 위한 여러가지 항목을 비교 실험하였다. 균사체를 열수로 추출하여 얻어진 단백다당류를 이온 교환 수지 및 gel 여과법에 의해 정제하였으며 그 분획들을 allogeneic mice를 이용하여 육종 180 세포에 대한 항암효과를 검사하였다. 그 중에서 가장 우수한 항암효과를 나타낸 산성 단백다당체인 Fraction C를 주요 항암성분으로 결정하여 Collyban이라 명명하고, 항암성분의 특성을 화학적으로 분석하였다.

실험 재료 및 방법

배양 조건—밀버섯 *Collybia confluens* (Fr.) Kummer의 균주는 PDA배지상에 보존중인 것을 농촌진흥청 농업기술연구소 균이과로부터 분양 받았다. 액내 배양을 위한 최적 조건을 찾기 위

Table I. Composition of media used*

Medium No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Glucose	50	—	—	—	—	—	—	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
Peptone	10	10	10	10	10	10	10	20	—	—	—	10	10	—	—	—	—	—	—	5	2.5
Yeast extract	10	10	10	10	10	10	10	—	20	—	—	—	—	10	10	—	5	2.5	—	—	
Mannose	—	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Galactose	—	—	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Fructose	—	—	—	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Xylose	—	—	—	—	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Sucrose	—	—	—	—	—	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Starch	—	—	—	—	—	—	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Corn steep liquor(ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	60	—	—	30	—	30	30	45	52.5	45	52.5	
Malt extract(ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20	10	—	10	—	10	—	—	—	—	

* One liter of each medium contains KH_2PO_4 0.87g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, CaCl_2 0.3g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg. Nitrogen content in corn steep liquor was 3.68%.

Table I. Composition of media used (continued)

Medium No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Glucose	50	20	25	30	35	40	45	55	60	65	21.4	35.7	57.2
Peptone	20	50	45	40	35	30	25	15	10	5	4.3	7.1	11.4
Yeast extract	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.3	7.1	11.4

Table I. Composition of media used (continued)

Medium No.	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
Glucose	64.3	71.4	78.6	85.8	92.8	100	107.2	121.4	135.8	142.8
Peptone	12.8	14.3	15.7	17.1	18.6	20	21.4	24.3	27.1	28.6
Yeast extract	12.8	14.3	15.7	17.1	18.6	20	21.4	24.3	27.1	28.6

하여 각종 조건을 검토하였다. 균사를 무균적으로 100 ml의 배지 No. 1(Table I)과 함께 8~10 일간 일차 예비 배양하였다. 성장한 균사를 분쇄기로 10초간 분쇄한 후 배지 No. 1을 20% (v/v) 씩 접종하여 2차 예비 배양한후 본 배양을 실시하였다. 이때 Table I의 조성을 가진 각 배지를 별도 언급이 없는 한 pH를 5.5로 조절하여 고압 증기 멸균하였다. 각 실험군마다 100 ml의 배지에 각각 10%씩 (v/v)의 종균을 접종하고 27±1°C, 180 rev/min 조건으로 8일간 진탕배양을 실시하였다. 균사의 성장속도 측정은 건조 균사량 (mycelial dry weight; MDW)을 측정하여 각

실험군마다 비교하였다. 정치배양과 진탕배양의 가능성을 알아 보기 위해 배지 No. 1에 종균을 접종한 다음 각각 정치배양 또는 진탕배양 후 정치배양군과 진탕배양군의 배지 100 ml당 MDW를 비교하였다.

균사 성장에 적합한 배지의 pH 범위를 정하기 위해 pH 4.0~9.0의 각종 배지에 접종하고 진탕배양 후 배지 100 ml당 MDW를 비교하였다. 또한 접종량이 균사의 성장에 미치는 영향을 구명하기 위하여 배지 No. 1에 종균의 접종량을 각각 5, 10 및 20% (v/v)씩 접종하고 4, 6, 8 및 10일간 배양하여 배지 100 ml당 MDW를 비교하

였다. 적절한 수확시기를 결정하기 위하여 No. 1 배지에 10% (v/v)의 종균을 접종한 후 배양하고 2, 4, 6, 8, 10, 12 및 14일에 수확하여 각각 배지 100 ml당 MDM의 증가를 비교하였다. 군사 성장에 유리한 탄소원을 밝히기 위해 각기 다른 탄소원을 갖는 배지(No. 1~No. 7)를 사용하여 접종, 배양한 후 배지 100 ml당 MDW를 비교하였다. 군사 성장에 유리한 질소원을 찾기 위해 펩톤, 효모추출물, corn steep액, 맥아추출물 등의 질소원을 각각 단독 또는 함량을 변경하여 조제한 배지(No. 8~No. 11 및 No. 12~No. 20)를 사용하여 접종하고 배양한 후 배지 100 ml당 MDW를 비교하였다. 군사 성장에 적합한 carbon/nitrogen(C/N) 비율의 범위를 밝히기 위해 탄소원으로 포도당, 질소원으로 펩톤을 사용하고 총 농도는 7%로 고정하되 이들의 비율만 다르게 한 배지(No. 21~No. 30)에 접종, 배양한 후 배지 100 ml당 MDW를 비교하였다. 원만한 군사 성장을 이룰 수 있는 최적 농도를 찾기 위해 탄소원으로는 포도당을, 질소원으로는 효모추출물과 펩톤을 각각 5:1:1로 하되 그 절대량만을 변화시켜 총 농도 3% 부터 20%에 이르는 배지 계열(No. 1 및 No. 31~No. 43)을 만들어 접종, 배양한 후 배지 100 ml당 MDW를 비교하고 또 배지 성분의 군사 전환율[Conversion ratio: CR = 100 × 배지 100 ml로부터 얻은 건조 군사량(g)/배지 100 ml중의 성분량(g)]을 비교하였다. 포도당 농도의 영향을 검토하기 위하여 질소원은 고정하고 포도당의 농도를 1, 3, 5, 7, 9 및 10%로 각각 제조한 배지에 종균을 접종, 배양한 후 배지 100 ml당 MDW를 비교하였다.

성분의 추출, 분리 및 정제—밀버섯 군사 배양물(50 l)을 여과하여 증류수로 3회 세척하였다. 배양군사(3.1 kg)를 분쇄기로 균질화시킨 후 95±5°C에서 6시간 동안 열수로 추출을 시행하였다(2회 반복). 열수 추출액을 합하여 감압농축한 후 3배량의 냉각시킨 95% ethanol을 가하고 4°C에서 24시간 방치하여 침전을 완결시켰다. 원심분리하여 침전물을 증류수에 용해시킨 후 분자량 6000 이하의 물질을 제거하기 위해 4°C에서 증류수로 7일간 투석을 실시하였다. 투석한 후 동결건조하여 갈색 건조 분말(이후 Fr. A

라 칭함) 13.5 g을 얻었다.

상기에서 분리한 Fr. A를 0.01 M Tris-HCl buffer(pH 6.95)에 용해시킨 후 DEAE-cellulose column(Cl⁻ form, Sigma Chem. Co., USA)에 적용시켰다. 동일한 buffer로 용출시켰으며, 분획당 6 ml씩 분취하였다. 각 분획에 대해 625 nm에서 anthrone 반응, 540 nm에서 Lowry-Folin 반응을 실시하고 흡광도를 측정하여 다당체와 단백질을 확인하였다. 그중 anthrone 반응 양성인 분획들을 투석한 후 동결건조시켜 미백색 건조 분말(이후 Fr. B라 칭함) 2.4 g을 분리하였다. 한편 DEAE-cellulose에 흡착된 분획은 2 M NaCl(0.01 M Tris-HCl포함)로 용출시킨 후 분취한 각 분획에 대해 anthrone 및 Lowry-Folin 반응을 실시하여 다당체와 단백질을 확인하였다. Anthrone 반응 양성인 분획들을 투석한 후 동결건조시켜 담갈색 건조 분말(이후 Fr. C라 칭함) 2.1 g을 획득하였다.

상기에서 분리한 Fr. C(이후 Collyban이라 칭함)를 0.1 M NaCl에 용해시킨 후 Sephadex G-200 column(Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)에 적용시켰다. 0.1 M NaCl로 용출시켰으며 분획당 3.3 ml씩 분취하였다. 각 분획은 anthrone 및 Lowry-Folin 반응으로 다당체와 단백질을 확인한 다음 anthrone 반응 양성인 분획을 투석한 후 동결건조시켜 미백색의 Fr. C-I 350 mg과 진갈색의 Fr. C-II 1200 mg을 각각 분리하였다.

항암력 측정—웅성, 5주령에 속하는 ICR 마우스와 웅성, 6~7 주령의 C3H/He 마우스를 서울대학교 실험동물사육장에서 공급받았으며 자성, 6주령인 CD2F1 마우스는 동아제약(주) 중앙연구소로부터 공급받아 실험에 사용하였다. BALB/c strain인 nude mice는 자성, 4주령에 속하는 것을 제일제당(주) 중앙연구소로부터 구입하여 본 실험에 사용하였다. 마우스 육종 180 세포(이후 S180이라 칭함)는 본 연구실에서 ICR 마우스의 복강내에 1주일 간격으로 계대 배양한 것을 0.1 ml씩(1×10⁶ cells/mice)을 ICR 마우스의 왼쪽 서혜부에 피하 이식하여 고형암을 유발시켰다. 한편 동일 암세포를 약 5×10⁶ cells/ml이 되도록 부유시켜 0.1 ml씩(5×10⁵ cells/mice)

을 동계 마우스의 복강에 이식하여 복수암 유발에 사용하였다.

마우스 유암 세포인 MM46(이후 MM46이라 칭함) 세포는 오사까대학 의학부 암연구소 Fujiwara박사로 부터 제공받아 C3H/He 마우스의 복강내에 1주일 간격으로 계대 배양한 것 약 0.1 ml씩 (2×10^5 cells/mice)을 동계 마우스의 복강에 이식하여 복수암을 유발시켰다. 마우스 백혈병 세포인 L1210(이후 L1210이라 칭함) 세포는 DBA/2-마우스에 1주일 마다 복강으로 주사하여 계대시킨 것을 0.1 ml씩(약 1×10^5 cells/mice)을 CD2F1 [BALB/c(L) \times DBA/2(K)의 F1] 마우스의 복강에 이식하여 복수암 유발에 사용하였다. 자궁경부암은 HeLa 세포주로서 *in vitro*에서 10% fetal calf serum(이후 FCS라 칭함)이 첨가된 Waymouth's medium(Gibco Lab., USA)에 2~3일 간격으로 계대 배양시킨 것을 0.1 ml씩(1×10^7 cells/mice)을 nude 마우스의 하둔부에 피하 이식하여 고형암을 유발시켰다. S180 및 MM46 암세포를 이식하고 24시간 후 부터 시료를 매일 1회씩 10일간 복강내에 주사하였다. 대조군에는 생리식염수를, 시료 투여군은 Fr. A, B 및 C (Collyban)의 20 mg과 50 mg/kg/day 용량을, 양성 대조군으로 Krestin 20 mg/kg/day을 각각 주사하였다. HeLa 및 L1210 암세포를 이식하고 24시간 후 부터 매일 1회씩 7일간 복강내로 Collyban 50 mg 또는 100 mg/kg/day 용량을 주사하였다. 특히 L1210의 경우 양성 대조군으로 여러가지 농도의 adriamycin(Meiji Seika Co., Japan)을 암세포 이식 후 1, 5 및 9일 총 3회에 걸쳐 마우스당 0.2 ml씩 복강내로 투여하였다. 결과 판정은 S180의 경우 암세포 이식 후 30일째 되는 날 고형암을 적출한 후, 종양 저지 백분율(Percent Inhibition Ratio: I.R. %)을 계산하였다. HeLa 세포의 경우 암세포 이식 후 15일째 되는 날 고형암을 적출한 후, 다음식에 의거하여 대조군과 시료 투여군의 종양 부피를 각각 계산한 다음 판정하였다.³⁹⁾ : Tumor volume (mm^3) = $W \times L \times H \times 0.5236$ (W: width, L: length, H: height). 복수암에 의한 결과판정은 암세포 이식 후 60일까지 관찰하여 평균 생존일(Median survival time; 이후 MST라 칭함)을 계산한다

음 평균 생존 백분율 즉 T/C(%)로서 항암효과를 비교하였다 : $T/C(\%) = 100 \times \text{시료투여군의 평균 생존일} / \text{대조군의 평균 생존일}$.

항암성분의 특성 분석—다당체를 구성하고 있는 단당류의 분석은 Lain 등의 방법에 준하였다. 각 시료 10 mg을 3% HCl-methanol로 methanolysis시킨 후 pyridine에 녹였다. 이에 hexamethyldisilazane과 trimethylchlorosilane을 가하여 gas chromatography(Varian 3300 GC, RIA)를 실시하였다. 다당체의 함량은 Herbert 등⁴⁰⁾의 방법에 따라 anthrone 반응을 실시하여 정량하였다. 상기의 단당류 분석에 의해 시료의 구성 당이 glucose, galactose, mannose, fucose 및 xylose 이므로 이들의 혼합물을 사용하여 anthrone반응을 실시한 후 625 nm에서의 흡광도를 측정, 작성한 검량선으로부터 총 다당체의 함량을 구하였다.

단백질을 구성하고 있는 아미노산을 분석하기 위해 시료 10 mg을 6 N HCl로 가수분해시켜 phenylisothiocyanate 유도체로 만들어 아미노산 자동 분석기(Waters Pico-Tag analysis system, U.S.A.)로 분석하였다. 단백질 함량 측정은 Lowry-Folin법으로⁴¹⁾ bovine serum albumin(Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 표준으로 해서 총 단백질 함량을 구하였다.

Hexosamine 함량 측정은 Elson-Morgan 법을 수정한 Dische⁴²⁾법에 준하여 시행하였다. 각 시료 10 mg을 3 N HCl 1ml와 함께 밀봉하여 100°C에서 15시간 가수분해 후 여액을 감압 농축하여 1 ml의 H₂O에 녹였다. 표준 glucosamine과 각 시료액에 시약 A(표준 glucosamine에 대한 시약 A: 0.5 N Na₂CO₃ 50 ml에 acetylacetone 1.5 ml를 가한 것; 시료에 대한 시약 A: 1.25 N Na₂CO₃ 50 ml에 acetylacetone 1.5 ml를 가한 것)를 1 ml씩 각각 가하고 96°C에서 1시간 반응시킨 후 4°C상에서 급냉시켰다. 10 ml의 96% ethanol과 1 ml의 시약 B(c-HCl 30 ml에 *p*-dimethylaminobenzaldehyde 1.6 g을 녹인 후 96% ethanol 30 ml를 가한 것)를 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선으로부터 총 hexosamine의 함량을 구하였다.

분자량 측정은 Mizuno 등²⁵⁾의 방법을 수정하

여 Sephadex G-200 gel filtration chromatography에 의한 항암성분 Fr. C (Collyban)의 분자량 측정을 시도하였다. 표준당으로 dextran-72 (M.W.: 72,600), dextran-39 (M.W.: 39,100) 및 dextran-10 (M.W.: 10,200) (이상 Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 사용하였으며 각 표준당과 Collyban을 0.1 M NaCl로 2.5 ml~12 ml/hr의 유속으로 용출시켜 분획당 3.3 ml씩 분취하였다. 각 분획은 anthrone 반응을 실시하여 625 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음 식에 의거하여 K_{av} 를 구하고 분자량의 log 값과 K_{av} 를 이용하여 Collyban의 분자량을 구하였다 ($V_t = V_o + V_x$, $K_{av} = (V_e - V_o) \times V_x$, V_t : column의 total volume, V_o : column의 void volume, V_x : gel bead의 volume, V_e : elution volume).

실험 결과

배양의 최적 조건

밀버섯 *Collybia confluens*는 PDA 사면 배지상에서 백색의 솜털같은 공중 균사를 형성하였으며, 현미경하에서 그 균사의 clamp connection이 관찰되었다. 정치배양 및 진탕배양 결과 건조균사량(MDW)이 각각 배지 100 ml당 400 mg과 2090 mg으로 호기성 조건하에서 균사 성장이 탁월하였다. 특히 진탕배양의 경우 상수의 사용가능성을 알아 보기위해 상수를 사용한 경우 배지 100 ml당 MDW는 2000 mg으로 증류수의 경우 MDW 2200 mg과 상호간에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 1). 균사 성장은 pH 4.0~7.0의 비교적 넓은 범위내에서 양호하였으며 최적의 pH는 배지 100 ml당 약 1900 mg의 우수한 균사 성장을 나타낸 pH 6이었다(Fig. 2). 종균의 접종량을 증가시킬수록 배양 제 4일에서의 균사 성장은 증가되는 경향이였으며, 20%의 접종을 시행한 경우에는 제 6일에 배지 100 ml당 약 1800 mg의 MDW로 양호한 성장을 나타내었으나 이후에는 1200 mg 정도로 자가분해에 의한 MDW의 감소가 관찰되었다. 10% 접종량의 경우 제 8일에 배지 100 ml당 860 mg의 MDW로 최적의 균사 성장을 보였고 10일째의 MDW가 1760 mg 정도로 균사 성장이 완만하였다. 5%의 접종에서는

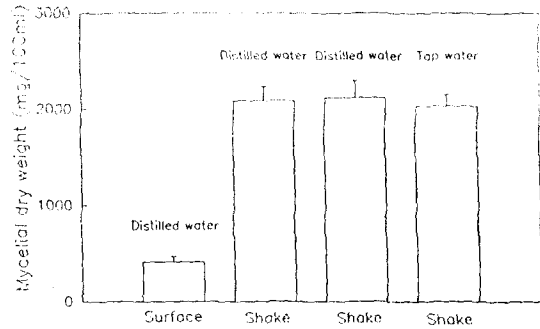


Fig. 1. Comparisons of shake culture with surface culture and distilled water with tap water for biomass production of the mycelia of *C. confluens* in medium No. 1

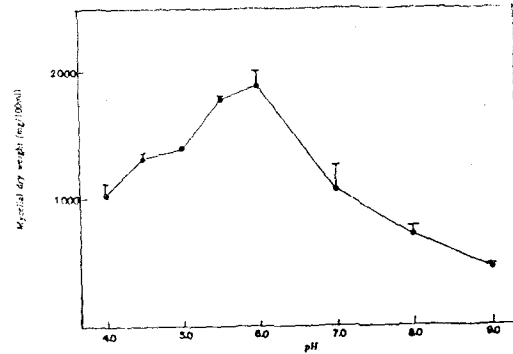


Fig. 2. Effects of pH on biomass production of the mycelia of *C. confluens*

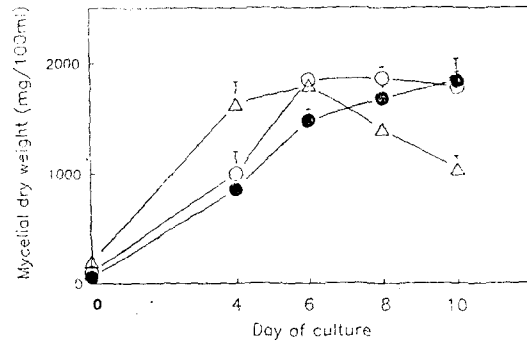


Fig. 3. Effects of inoculum size on biomass production of the mycelia of *C. confluens*
 ●-● : inoculum size 5%
 ○-○ : inoculum size 10%
 △-△ : inoculum size 20%

균사의 계속적인 성장이 이루어지다가 제 10일째에 약 1800 mg으로 MDW가 정상에 도달하였다(Fig. 3). 종균의 접종량을 10%(v/v)로 하여 14일까지 배양하였을 때, 6일까지는 지속적인 균사 성장이 이루어졌으며 제 8일째에 배지 100 ml

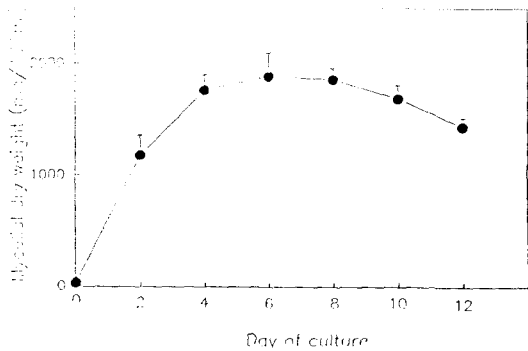


Fig. 4. Growth curve of the mycelia of *C. confluens* in medium No. 1

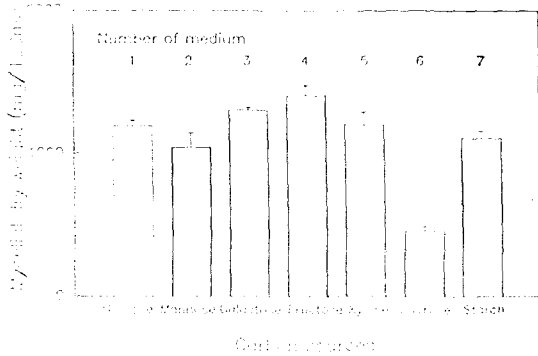


Fig. 5. Effects of carbon sources on biomass production of the mycelia of *C. confluens*

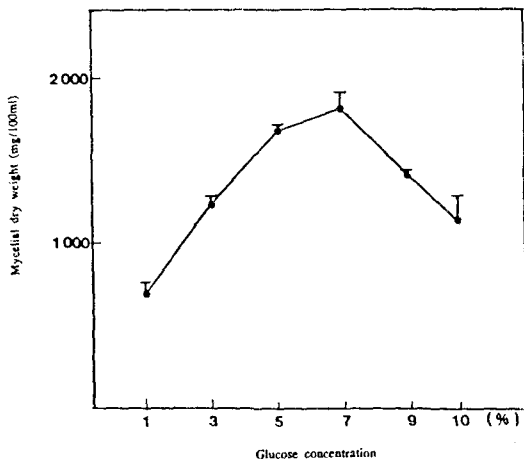


Fig. 6. Effects of nitrogen sources on biomass production of the mycelia of *C. confluens*

당 MDW 1800 mg으로 정상에 도달, 이후 MDW의 완만한 감소가 관찰되었다(Fig. 4).

7종류의 당류 중에서 서당만이 배지 100 ml당 MDW 450 mg으로 그 이용도가 현저히 낮았다.

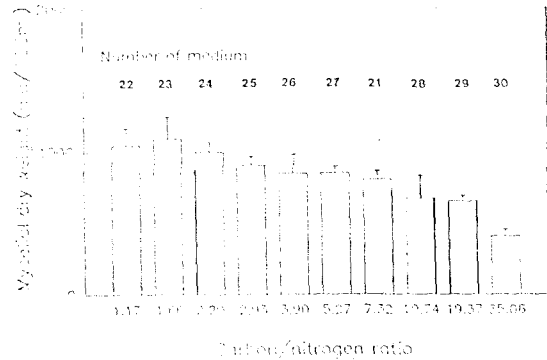


Fig. 7. Effects of carbon/nitrogen ratio on biomass production of the mycelia of *C. confluens*

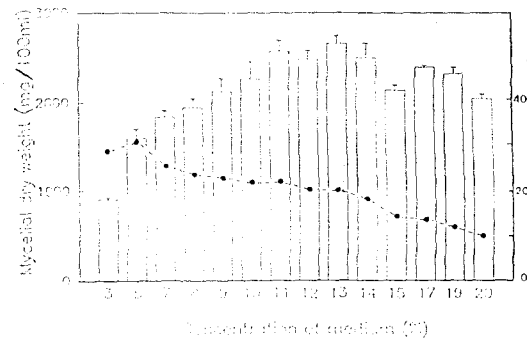


Fig. 8. Growth of the mycelia of *C. confluens* in different concentration of media and the conversion ratio of medium components in to mycelia (The dotted line is the conversion ratio)

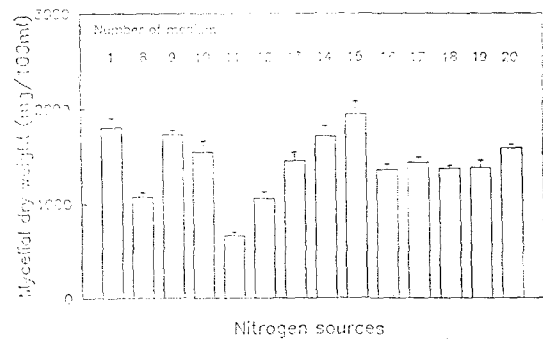


Fig. 9. Effects of glucose concentration on biomass production of the mycelia of *C. confluens*

Chung 등³⁵⁾은 탄소원으로서는 전분을 사용할 경우 균사 성장이 현저히 감소됨을 보고하였는데, 본 실험에서는 MDW 1150 mg으로 전분이 균사 성장에 유리한 탄소원으로 밝혀졌다(Fig. 5). 4종의 질소원을 각각 단독으로 사용하였을 경우

효모추출물이 배지 100 ml당 MDW 약 1700 mg으로 균사 성장을 가장 촉진시켰으며, 맥아추출물은 660 mg의 MDW로 질소원으로 적당하지 않았다. 그러나 맥아추출물을 효모추출물과 1:1 동량비로 혼합한 배지에서는 MDW 1730 mg으로 높은 균사 성장을 나타내었으며, corn steep 액 30 ml와 효모추출물 10 g을 혼합 사용한 배지에서 1940 mg의 MDW로 균사 성장이 가장 우수하였다(Fig. 6). 탄소원으로 포도당, 질소원으로 펩톤을 사용하여 C/N 비율이 균사 성장에 미치

는 영향을 본 결과, C/N 비율이 1.17~2.20인 경우 균사 성장이 양호하였고 C/N 비율이 10.74 이상으로 높은 경우 균사 성장이 불량하여 질소원이 균사 성장에 중요하였다(Fig. 7). 5% 이상의 배지 농도에서 균사 성장은 증가되는 추세였으며, 11%에서 14% 범위의 배지 농도의 경우 배지 100 ml당 MDW가 2500 mg 정도로 우수하였다. 배지 성분의 균사 전환율은 배지 농도가 증가할수록 점점 감소하였다(Fig. 8). 포도당 농도가 1.0%에서 7%까지 증가함에 따라 균사 성

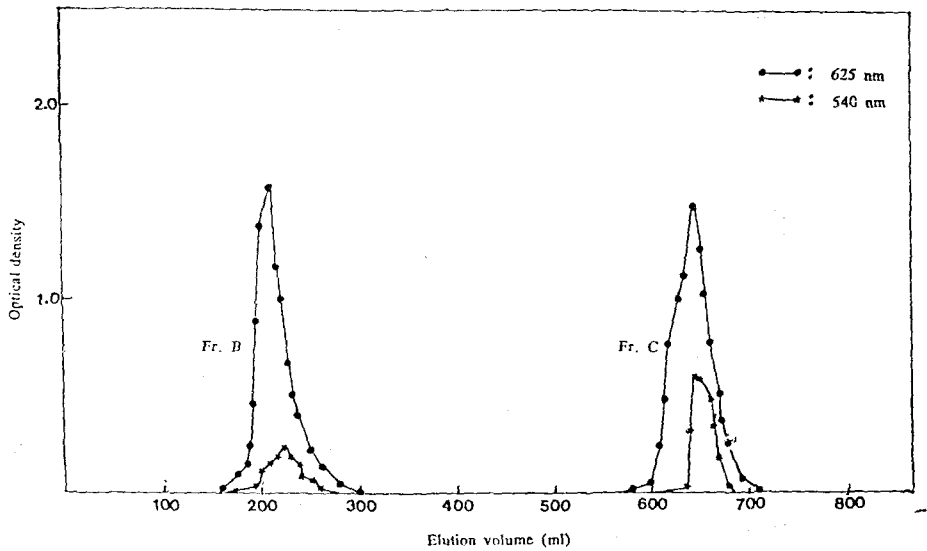


Fig. 10. The elution pattern of Fr. A by DEAE-cellulose column chromatography

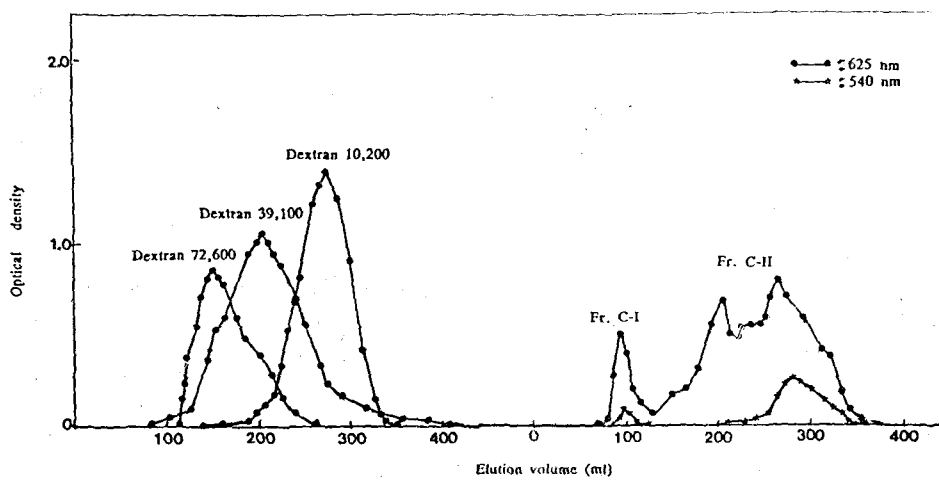


Fig. 11. The elution patterns of Collyban and standard dextrans by Sephadex G-200 gel filtration chromatography

장도 증가하여 7% 농도의 경우 배지 100 ml당 약 1800 mg의 MDW로 가장 우수한 성장을 나타냈으나 그 이상의 농도에서는 오히려 MDW가 감소, 군사 성장이 둔화되었다(Fig. 9).

항암성분의 추출, 분리 및 정제

밀버섯의 군사 배양물 50 l로 부터 분리한 군사체를 열수로 추출하여 갈색 건조 분말(Fr. A) 13.5 g을 얻었고, Fr. A 10 g을 DEAE-cellulose (Cl⁻) 이온 교환 수지를 이용하여 중성 다당체 분획인 미백색 건조 분말(Fr. B) 2.4 g과 산성 다당체 분획인 갈색 건조 분말(Fr. C) 2.1g을 각각 분리하였다(Fig. 10). 또한 Fr. C 2.1 g을 Sephadex G-200 gel filtration을 실시하여 antihrone 반응에 양성인 주 peak가 3개 관찰되었다. 첫번째 peak를 Fr. C-I(350 mg)이라 하고 나머지 두 peak를 합하여 Fr. C-II(1200 mg)라 하였다(Fig. 11).

항암력 비교 결과

1) 고행암 : 밀버섯 배양 군사로 부터 분리한 각 분획에 대하여 먼저 마우스 S180 고행암에 대해 항암실험을 한 결과 Fr. C 50 mg/kg/day의 투여군이 가장 우수한 종양 억제율 75%를 나타내었으며, 종양의 완전 퇴화도 20 mg 및 50 mg 투여군에서 각각 1마리씩 관찰되었다. 양성 대조군인 Krestin 20 mg 투여군의 경우 종양 억제율이 56%였으며 Fr. A 및 B는 각각 69%와

52%로 유의성 있는 종양 억제력이 인정되었다. 이 실험의 결과로서 항암력이 입증된 Fr. C를 주요 항암성분으로 결정하여 Collyban이라 명명하고 이후 모든 실험에 시료로 사용하였다. Nude 마우스에 피하로 이종이식시킨 자궁경부암에 대한 Collyban 100 mg/kg/day 투여군의 경우 암이식 15일 후 마우스를 희생시켜 판정한 결과 대조군 및 Collyban 투여군의 평균 종양 부피가 각각 100.2±85 mm³와 28.9±28 mm³로 대조군에 비해 Collyban 투여군의 종양 부피가 현저히 감소되어 약 71%의 종양 억제율을 나타내었다. Data는 제시하지 않았지만 예비 실험에서 Collyban 20 mg 투여군의 경우 유의성 있는 종양억제력이 인정되지 않았다. 이상의 결과를 Table II에 나타내었다.

2) 복수암 : S180 복수암에 대한 Collyban 50 mg 투여군의 경우 대조군에 비해 약 200%로 현저히 수명 연장 효과를 나타내었다. L1210 백혈병 세포에 대해서는 평균 생존율이 약 101%로 전혀 그 효과가 인정되지 않았으며, MM46 유암세포의 경우 약 150%로 수명연장 효과를 나타내었다. 각각의 암세포에 대한 복수암 실험 결과를 Table III에 나타내었다.

항암성분의 특성

종양 억제력이 입증된 항암성분 Fr. A, B 및 C의 특성을 화학적으로 분석한 결과, 이들 모두

Table II. Antitumor activities of the three fractions of *C. confluens* against solid forms of sarcoma 180 and HeLa tumor cells

Tumor	Group	Dose (mg/kg/day)	Average tumor weight(g) (mean±S.E.)	Average tumor volume(mm ³) (mean±S.E.)	Inhibition ratio(%)	Complete regression (No. of mice)
S180	Control	saline	5.18±0.73	—	—	0/8
	Krestin	20	2.26±1.80*	—	56.37	2/8
	Fr. A	20	2.11±1.53*	—	59.26	0/7
		50	1.61±1.19**	—	68.91	1/8
	Fr. B	20	2.80±1.05	—	45.95	0/8
		50	2.48±1.29*	—	52.12	1/8
Fr. C	20	1.76±1.01*	—	66.03	1/8	
	50	1.29±1.03**	—	75.10	1/8	
HeLa	Control	saline	—	100.2±8.5	—	0/18
	Collyban	100	—	28.9±2.8*	71.16	0/18

* p<0.05 compared to Control group

** p<0.05 compared to Krestin group

Table III. Antitumor activities of Collyban against ascitic form of sarcoma 180, MM46 and L1210 tumor cells

Tumor	Group	Dose (mg/kg/day)	Mean survival time (day) (mean±S.E.)	T/C* (%)
S180	Saline	—	22.4±2.1	—
	Collyban	20	39.8±5.5	178
		50	45.5±5.2	203
MM46	Saline	—	18.6±4.1	—
	Collyban	50	28.0±3.3	150
L1210	Saline	—	8.8±0.5	—
	Adriamycin	16	9.0±0.8	102
		8	25.9±4.2	294
		2	—	>302
		0.5	—	>304
		Collyban	50	8.9±1.0
100	8.9±1.2	101		

$$* T/C(\%) = \frac{\text{mean survival time of treated group}}{\text{mean survival time of control group}} \times 100$$

Table IV. Monosaccharide contents of the polysaccharide moiety of the antitumor fractions of *C. confluens*

Fraction	Monosaccharide (%)*					
	Glucose	Galactose	Mannose	Fucose	Xylose	Ribose
Fr. A	37.34	20.48	35.05	3.80	2.56	0.77
Fr. B	30.10	32.57	31.14	5.83	0.37	N.D.**
Collyban	50.15	14.64	26.90	2.36	5.25	0.70

* The content of each monosaccharide was calculated from the chromatograms compared to standard monosaccharides by peak area method and expressed as the area percentage.

** not detected

Table V. Polysaccharide and protein contents of the antitumor fractions of *C. confluens*

Fractions	Polysaccharide (mean±S.E.)*	Protein (mean±S.E.)**
Fr. A	48.92±4.58	44.94±4.67
Fr. B	86.11±3.35	12.63±0.18
Collyban	31.15±0.58	26.63±4.79

* Total polysaccharide contents were quantitatively determined by anthrone reaction and expressed as the weight percentage.

** Total protein contents were quantitatively determined by Lowry-Folin reaction and expressed as the weight percentage.

가 다당체와 단백질로 구성되어 있음이 판명되었다. Collyban이라 명명한 Fr. C의 경우 다당체를 구성하는 단당류는 glucose 50%, galactose

15%, mannose 27% 및 xylose 5%를 비롯한 fucose 2%와 미량의 ribose 등이었다(Table IV). 총다당체 함량은 구성 다당류의 혼합물을 표준당으로 하여 625 nm에서 anthrone 반응을 실시, 검량선을 작성하여 구하였다(Table V). 단백질을 구성하는 아미노산은 Collyban의 경우 glycine 13%, alanine 11% 및 proline 10% 등 모두 16종이 확인되었다(Table VI). 총단백질 함량은 BSA를 표준 단백질로 하여 540 nm에서 Lowry-Folin 반응을 실시, 검량선을 작성하여 구하였다. 항암성분의 다당체와 단백질을 결합시키는 hexosamine에 대한 분석 결과, 각 분획에서 hexosamine이 확인되었다(Table VII).

Sephadex G-200 gel 여과법에 의하여 Collyban의 분자량을 추정하였다. 표준 dextran의 elution

Table VI. Amino acid contents of the protein moiety of the antitumor fractions of *C. confluens*

Amino acid (%) [*]	Fr. A	Fr. B	Collyban
Aspartic acid	10.90	5.61	2.84
Glutamic acid	11.34	4.00	7.07
Serine	7.90	24.91	7.81
Glycine	10.67	9.92	13.06
Histidine	1.76	N.D.**	2.02
Arginine	1.58	0.57	1.88
Threonine	6.34	12.31	8.41
Alanine	9.74	15.95	10.83
Proline	7.33	8.01	9.76
Tyrosine	0.43	0.15	1.13
Valine	6.52	6.47	8.61
Methionine	1.09	0.95	1.52
Isoleucine	4.33	2.80	6.12
Leucine	5.90	3.96	7.98
Lysine	10.89	2.62	7.25
Phenylalanine	2.81	1.78	3.30

* The content of each amino acid was calculated from the chromatograms compared to standard amino acids by peak area method and expressed as the area percentage.

** not detected

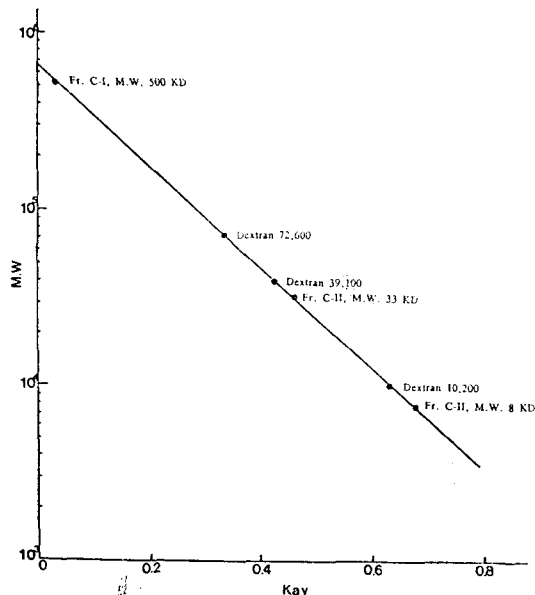


Fig. 12. The standard calibration curve for the determination of molecular weights of Collyban

Table VII. Hexosamine contents of the antitumor fractions of *C. confluens*

Fraction	Hexosamine(%) [*] (mean ± S.E.)
Fr. A	4.21 ± 0.08
Fr. B	1.77 ± 0.21
Collyban	3.05 ± 0.12

* Total hexosamine contents were quantitatively determined by Elson-Morgan reaction and expressed as the weight percentage.

pattern은 Fig. 13과 같으며, 분자량의 log 값과 Kav를 이용하여 (Fig. 12) 추정된 Collyban은 분자량 500 KD인 Fr. C-I 과, 분자량 약 33 및 8 KD인 Fr. C-II로 구성되어 있었다.

고 찰

예비 실험에서 한국산 담자균 4종 즉 밀버섯 *Collybia confluens*, 좁우단버섯 *Paxillus atroamentosus*, 노루궁뎅이버섯 *Hericium erinaceum* 및 진갈색주름버섯 *Agaricus subrutilescens*를 대상으로 마우스 S180 세포에 대한 종양 억제율을 검사한 결과, 밀버섯 균주가 71%로 가장 양호한 저지율을 나타내었다. 이것은 Gregory 등³⁶⁾에 의해 *Collybia*속 담자균인 *Collybia radicata*에서 S180에 대한 항암작용이 확인되었던 사실에 비추어 같은 속인 밀버섯의 배양균사로 부터 새로운 항암성분을 분리하여 화학적인 분석을 통해 그 특성을 밝히고 항암작용 기전을 면역학적인 측면에서 구명하는 연구가 의의있다고 사료되었다.

자실체가 아닌 균사체를 인공 배지에서 배양하여 보다 우수한 항암력을 나타내는 성분을 분리해서 마우스를 동물 모델로 하는 *in vivo* 실험 및 성분 분석과 항암기전의 구명에 수반되는 *in vitro* 실험등을 실시하고자 할 때에는 다량의 균사를 우선적으로 확보하여야 한다. 액내 배양시 호기성 조건인 진탕 배양에서 균사 성장이 배지 100 ml당 건조균사량이 약 2000 mg으로 우수하였으며, 배지 조제시 증류수 대신 상수를 사용해도 균사 성장이 양호하였고 pH가 7을 넘는 배지에 배양할 경우 균사 성장이 급격히 감소하였

다. 그러나 비교적 넓은 범위의 pH 4~7에서 균사 성장이 양호하여 배지 조제시 특별히 pH를 보정할 필요가 없었다. 가장 우수한 균사 성장을 얻기 위해서 10%의 종균을 접종하는 조건을 선택하였다. 한편 성장 곡선에 의해 배양 10일까지는 균사 성장이 완료됨으로 수확 시기는 8~10일이 적절한 것으로 판단되었다.

탄소원으로 일반적으로 사용되는 포도당 대신에 각종 산업의 부산물로 나오는 저렴한 전분 및 서당을 사용하려는 시도에서, 서당은 7종류의 당류 중에서 가장 이용도가 낮아 탄소원으로 적합하지 않았으며 전분의 경우 포도당과 비슷한 균사 성장을 나타내었다. 이것은 일부 담자균류에서 액내 배양시 배양 여액에 여러가지 섬유로 분해 효소를 생성한다는 보고⁴³⁻⁴⁶⁾에 미루어 볼 때 밀버섯의 경우도 액내 배양시 전분을 탄소원으로 이용할 수 있도록 이를 분해하는 효소의 생성 가능성이 추측되었다. 질소원으로서 일반적으로 사용되는 켈톤, 효모추출물, 맥아추출물 및 공업용 corn steep액을 각각 단독으로 사용하였을 경우 미량 성분으로서 vitamin류, mineral류, 기타 균사 성장 자극요소들이 함유된 효모추출물이 가장 적합한 질소원이었으며, 4종류의 질소원을 혼합 조제한 배지중에서는 배지 100 ml 당 효모추출물 10 g과 corn steep액 30 ml를 혼합 사용한 배지에서 건조균사량이 배지 100 ml당 약 2000 mg으로 균사 성장이 가장 우수하였다.

상수의 사용 가능성과 탄소원으로서 전분의 이용 및 질소원으로 공업용 corn steep액을 혼합 사용하여도 우수한 균사 성장이 이루어지는 점들은 대량 배양할 때 장점이 될 수 있다. C/N 비율이 1.17~2.20인 경우 균사 성장이 양호하였고 10.74 이상 높은 경우 불량한 점으로 보아 질소원이 이 균주의 액내 배양시 중요한 것으로 사료되었으며 최적의 탄소원과 질소원의 함량 비율은 1.66이었다.

각종 분획을 20 및 50 mg/kg/day의 용량으로 ICR 마우스의 복강에 투여하였을 때 마우스 S180 고형암에 대한 종양 억제율이 46~75%였다. 특히 Collyban이라 명명한 Fr. C 50 mg 투여군이 75%를 가장 양호한 저지율을 나타내었는데, S180 복수암에 대하여서도 평균 생존율 약 200%로 현

저하게 수명 연장 효과가 관찰되었다. 담자균류에서 분리한 항암성다당체가 ICR 마우스-S180의 allogeneic tumor system에 대해 강한 친화성을 나타낸다는 연구 결과는 이미 많이 보고되었다.^{8,20,44)} 한편 암세포와 숙주간의 MHC 차이로 인하여 allograft rejection이 일어날 가능성을 배제하기 위해 숙주와 동일한 MHC를 가진 syngeneic tumor system을 사용함으로써 항암작용 스펙트럼의 다양화를 도모하였다. Abe 등⁴⁸⁾은 면역 증강제의 항암작용에 있어서 암세포와 숙주간의 항원성 차이의 중요성을 강조하였으며, Zakany 등⁴⁹⁾은 allogeneic 및 syngeneic tumor-host system에서 포고버섯에서 분리한 lentinan의 항암효과가 A/Ph strain에서만 나타나고 DBA/2, BALB/c 및 C3H/Di 등에서는 거의 영향을 나타내지 못한 것은 숙주의 유전자형 뿐만 아니라 암세포와 숙주간의 항원성 차이에 의한 것임을 보고하였다.

Collyban의 특성을 화학적으로 분석한 결과, 다당체 31%, 단백질 27% 및 hexosamine 3%로 단백질의 함량이 풍부한 산성 단백질다당체였다. 그 구성당은 glucose 50%, mannose 27%, galactose 15%를 비롯한 fucose, xylose 및 미량의 ribose로 이루어진 결합 양식 미정의 heteropolysaccharide의 단백 복합체인데 gas chromatography 분석 결과 5탄당인 ribose의 존재가 확인되는 것으로 보아 고분자 중합체인 핵산의 혼재 가능성도 배제할 수는 없었다. 단백질 부분의 아미노산 조성은 glycine, alanine, proline 및 valine을 포함한 16종으로 구성되어 있었다. 구름버섯에서 분리된 PSK는 β -1,4:1,3 또는 β -1,4:1,6 glucan과 18~38%의 단백질이 공유 결합된 항암성 산성 단백질다당체로서 그것의 acidity는 강한 음전하를 가진 aspartic acid 및 glutamic acid 같은 아미노산 잔기에서 기인하며, 잎새버섯의 자실체에서 분리된 산성 분획인 β -1,6 및 6-branched β -(1 \rightarrow 3)-glucan의 acidity는 uronic acid 잔기에 의한 것으로, acidic glucan이 잎새버섯의 항암 특성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.⁵⁰⁾

자낭균류에 속하는 *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 균핵의 열수 추출물 TSHW는 탄수화

물 약 60%, 단백질 30% 및 미량의 phosphate로 구성된 단백 결합 다당체로 그것의 항암효과는 β -(1 \rightarrow 3)-glucan 부분에서, mitogenic activity는 aspartic acid 및 glutamic acid가 풍부한 단백질 부분에서 나타난다는 것이 보고되었다.^{51,52)} 같은 자낭균류에 속하는 *Cordyceps ophioglossoides* 배양액에서 분리한 단백다당체인 SN-C는, 숙주 증개성 면역반응에 영향을 미치는 β -(1 \rightarrow 3)-glucan인 CO-1과 암세포에 직접적인 세포 독성을 나타내는 protein bound galactosaminoglycan인 CO-N으로 구성되어 항암작용을 발휘한다는 연구 결과가 발표되었다.^{53,54)}

Collyban은 B 임파구 mitogen으로서의 가능성과 자궁경부의 HeLa 세포에 대해 직접적인 작용을 나타내는 점 등으로 미루어 볼 때 대부분의 한국산 담자균류에서 분리한 항암성 다당류 또는 단백다당류와는 상이한 결과를 나타내었다. 특히 Collyban에서 풍부한 단백 부분을 분리하여 단백질이 단순한 협잡물인지 아니면 당단백질로서 밀버섯의 항암성분에 중요한 특성을 부여하는 유효 물질인지를 보다 더 진전된 실험을 통해 밝힐 필요가 있다고 사료되었다.

항암력을 구별할 수 있는 모든 system에서 활성을 나타내는 물질은 없지만 특히 항암력의 강약은 실험에 사용된 동물의 종이나 암의 종류 및 이식 방법과 약물의 투여 시기, 경로 등에 의해 크게 영향을 받기도 하므로 궁극적으로 암의 예방과 치료에 면역요법제로서의 적용 가능성을 위하여선 보다 활성이 강한 물질의 순수한 분리와 구조 구명이 수행되어야 한다고 본다.

결 론

한국산 담자균류 4종에 대하여 마우스 S180 세포에 대한 종양 억제율을 예비 실험에서 검사한 결과, 71%로 가장 양호한 억제율을 나타낸 밀버섯 *Collybia confluens*를 시료 균주로 선택하였으며, 그 균사는 배양액에서 진탕 배양함으로써 대량 생산의 가능성을 확인하였다. 이 버섯의 균사체를 열수로 추출하여 단백다당체인 Fr. A를 분리하였으며, 이 성분을 DEAE-cellulose 이온교환 수지를 이용하여 중성 다당체 분획인

Fr. B와 산성 다당체 분획인 Fr. C로 각각 분리하였다.

각 분획에 대하여 S180-ICR 마우스에서 종양 억제율을 검사하였던 바, 고히암은 물론 복수암에도 약 200%로 우수하게 수명 연장 효과를 나타낸 단백다당체인 Fr. C를 주요 항암성분으로 선택하였다. 이것을 특히 Collyban이라 명명하고 syngeneic ascitic tumor mice에 대한 항암작용을 검사한 결과, MM46 마우스 유암 세포의 경우에는 50 mg/kg/day의 용량에서 약 150%의 수명 연장 효과를 나타내었다. 인체 자궁경부암인 HeLa 세포를 BALB/c strain인 nude mice에 피하로 이종이식시켜 Collyban 100 mg/kg/day의 용량을 복강내로 투여하였을 때 71%의 유의적인 종양 억제 효과가 관찰되었다.

Collyban의 특성을 화학적으로 분석한 결과, 다당체 31%, 단백질 27% 및 hexosamine 3%로 구성된 고분자 물질로서 다당체는 glucose, mannose 및 galactose로된 heteropolysaccharide이다. 단백질 부분은 glycine, alanine 및 proline을 포함한 16종의 아미노산으로 구성되어 있다. Collyban의 분자량을 측정하기 위해 Sephadex G-200 gel 여과법을 사용한 결과, 분자량 약 50만의 Fr. C-I과 약 3만 및 8천의 Fr. C-II로 각각 분리되었다.

Acknowledgments—This research was supported in part by a grant of Research Center for New Drug Development, Seoul National University and we gratefully acknowledge the support. <1993년 8월 10일 접수 : 1993년 9월 24일 수리>

참 고 문 헌

1. Nakahara, W., Tokuzen, R., Fukuoka, F. and Wistler, R.L.: *Nature* 216, 374(1967).
2. Sun, Y., Hersh, E.M., Talpaz, M., Lee, S.L., B.S., W.W., Loo, T.L. and Mavlight, G.M.: *Cancer* 52, 70(1983).
3. Kosuge, T., Yokata, M., Sugiyama, K., Yamamoto, T., Ni, M.Y. and Yan, S.C.: *Yakugaku Zasshi* 105, 791(1985).
4. Halpern, B.N., Biozzi, G., Stiffel, C. and Mouton, D.: *Nature*(London) 212, 853(1966).

5. Aoki, T. and Kvedar, J.P.: *J. Natl. Cancer Inst.* 56, 687(1976).
6. Ogura, T., Hara, H., Yokota, S., Hose, S., Kawase, I., Kishimoto, S. and Yamamura, Y.: *Cancer Res.* 45, 6371(1985).
7. Diller, I.C., Mankowski, Z.T. and Fisher, M.E.: *Cancer Res.* 23, 201(1963).
8. Tsukagoshi, S. and Ohashi, F.: *Gann* 65, 557 (1974).
9. Suzuki, I., Itani, T., Ohno, N., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. and Yadomae, T.: *J. Pharm. Dyn.* 7, 492(1984).
10. Fisher, B., Saffer, E.A. and Fisher, E.K.: *Cancer* 27, 771(1971).
11. Kirkwood, J.M. and Ernstoff, M.S.: *J. Clin. Oncol.* 2, 336(1984).
12. Rosenberg, S.A. and Lotze, M.T.: *Annu. Rev. Immunol.* 4, 681(1986).
13. West, W.H., Tauer, K.W., Yannelli, J.R., Marshall, G.D., Orr, D.W., Thurman, G.B. and Oldham, R.K.: *N. Engl. J. Med.* 316, 898 (1987).
14. Schwarzenberg, L., Simmler, M.C. and Pico, J.L.: *Cancer Immunol. Immunother.* 1, 69 (1976).
15. Amery, W.K.: *Int. J. Immunopharmacol.* 3, 339(1981).
16. Lotze, M.T., Chang, A.E., Scipp, C.A., Simpson, C., Tetto, J.T. and Rosenberg, S.A.: *JAMA* 256, 3117(1986).
17. Thompson, J.A., Lee, D.J., Lindgren, C.G., Benz, L.A., Collins, C., Daniel, L. and Fefer, A.: *J. Clin. Oncol.* 6, 669(1988).
18. Nuruse, S., Takeda, S., Ito, H., Fujii, K., Terada, Y., Shimura, K., Sugiura, M. and Miyazaki, T.: *Mic. Med. J.* 23, 207(1974).
19. Mizuno, T.: *Jpn. J. Cancer Chemother.* 21, 473 (1983).
20. Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimuro, K., Saito, G. and Sakai, S.: *Gann* 60, 137(1969).
21. Suzuki, M., Arika, T., Amemiya, T. and Fujiwara, M.: *Jap. J. Exp. Med.* 52, 59(1982).
22. Tabata, K., Ito, W., Kojima, T., Kawabata, S. and Misaki, A.: *Carbohydr. Res.* 89, 121(1981).
23. Kojima, T., Tabata, K., Itoh, W. and Yamaki, T.: *Agric. Biol. Chem.* 50, 231(1986).
24. Ikekawa, T., Ikeda, Y., Yoshioka, Y., Nakanishi, K., Yokoyama, E. and Yamazaki, E.: *J. Pharm. Dyn.* 5, 576(1982).
25. Mizuno, T., Kato, N., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, K. and Shimizu, M.: *Nippon Noeikagaku Kaishi* 58, 871(1984).
26. Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 2641(1985).
27. Miyazaki, T., Oikawa, N., Yadomae, T., Yamada, H., Yamada, Y., Hsu, H.Y. and Ito, H.C.: *Carbohydr. Res.* 69, 165(1979).
28. Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. and Yadomae, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 38, 988(1990).
29. Kim, B.K., Park, E.K. and Shim, M.J.: *Arch. Pharm. Res.* 2, 145(1979).
30. Min, H.K., Choi, E.C. and Kim, B.K.: *Kor. J. Mycol.* 8, 13(1980).
31. Lee, C.O., Choi, E.C. and Kim, B.K.: *Arch. Pharm. Res.* 4, 117(1981).
32. Kang, C.Y., Shim, M.J., Choi, E.C., Lee, Y.N. and Kim, B.K.: *Kor. Biochem. J.* 14, 101(1981).
33. Kim, S.H., Woo, M.S. and Kim, B.K.: *Kor. J. Mycol.* 10, 155(1982).
34. Kim, J.S., Choi, E.C., Kim, H.R., Lee, C.K., Lee, C.O., Chung, K.S., Shim, M.J. and Kim, B.K.: *Kor. J. Mycol.* 11, 151(1983).
35. Chung, K.S. and Kim, B.K.: *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* 10, 1(1985).
36. Gregory, F.J., Healy, E.M., Agerborg, H.P.K. Jr. and Warren, G.H.: *Mycologia* 58, 80(1966).
37. Yang, Q.Y. and Jong, S.C.: *Proceeding of the twelfth international congress on the science and cultivation of edible fungi*, Ed. Grabbe, G. and Hilber, O., Braunschweig Press, Braunschweig (1989).
38. Lee, J.Y.: *Colored Korean Mushrooms*. I, 81. Academic Press(1988).
39. Janik, P., Briand, P. and Hartmann, N.R.: *Cancer Res.* 35, 3698(1975).
40. Herbert, D., Phipps, P.J. and Strange, R.E.: *Methods in Microbiology* 58, 265(1971). Academic Press Inc., N.Y.
41. Cooper, T.G.: *The tools of biochemistry*. 53

- (1977). Willey-Interscience.
42. Dische, Z.: *Methods in carbohydrate chemistry*. I, 507(1962). ed. Roy, L.W. and Wolfrom, M.L. Academic Press.
 43. Michalski, C.J. and Beneke, E.S.: *Mycologia* 61, 1041(1969).
 44. Kawai, C.J. and Beneke, E.S.: *Mycologia* 61, 1041(1969).
 45. Yamasaki, Y. and Suzuki, Y.: *Agric. Biol. Chem.* 42, 971(1978).
 46. Hong, J.S., Choi, Y.H. and Yun, S.E.: *Kor. J. Mycol.* 14, 121 (1986).
 47. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, T.: *Cancer Res.* 30, 2776 (1970).
 48. Abe, S., Yamazaki, M. and Mizuno, D.: *Gann* 69, 223(1978).
 49. Zakany, J., Chihara, G. and Fachel, J.: *Int. J. Cancer* 25, 371(1980).
 50. Ohno, N., Iino, K., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. and Yadomae, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 33, 1181(1985).
 51. Ohno, N., Arai, Y., Suzuki, I. and Yadomae, T.: *J. Pharmacobio-Dyn.* 9, 593(1986).
 52. Shinohara, H., Ohno, N. and Yadomae, Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 38, 2219(1990).
 53. Ohmori, T., Tamura, K., Wakaiki, A., Kawanishi, G., Tsuru, S., Yadomae, T. and Nomoto K.: *Chem. Pharm. Bull.* 36, 4512(1988).
 54. Ohmori, C., Tamura, K., Fukui, K., Kawanishi G., Mitsuyama, M., Nomoto, K. and Miyazaki T.: *Chem. Pharm. Bull.* 37, 1019(1989).