

원형질체 융합 및 핵전이에 의한 새로운 담자균류의 개발에 관한 연구(II). 융합균사체의 항암성분이 생쥐의 면역세포에 미치는 영향

김병각,* 문 철, 김채균, 윤종명, 심미자,¹ 김하원,¹ 최응칠

서울대학교 약학대학 미생물약품화학교실, ¹서울시립대학교

Studies on Development of New Basidiomycetes by Protoplast Fusion and Nuclear Transfer II. The Effects of the Components of the Protoplast Fusants on Mouse Immune Cells

Byong Kak Kim,* Chul Moon, Chae Kyun Kim, Jong Myung Yoon, Mi Ja Shim,¹
Ha Won Kim¹ and Eung Chil Choi

Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea; and ¹Seoul City University, Seoul 130-743, Korea

Abstract - The antitumor components of the protoplast fusants of *Lentinula edodes* and *Ganoderma lucidum* were examined for immunological activity to elucidate the mechanism of their antitumor activity. They did not show any direct cytotoxicity against tumor cells. But being examined for immunopotential activity, they increased the number of colonies in the bone marrow stem cells to 3.0 times. They also increased the activities of the acid phosphatase in activated macrophages to 2.1 times and the secretion of nitric oxide in RAW 264.7 to 2.2 times, respectively. They activated the components of the alternative complement pathway. In humoral immunity, they increased the activities of the alkaline phosphatase in differentiated B cells to 1.6 times and the number of plaque forming cells to 1.8 times, respectively. In cellular immunity, they restored the depressed response of delayed type hypersensitivity in tumor bearing mice to normal level.

Key words - *Lentinula edodes*; *Ganoderma lucidum* protoplast fusant P22; activated macrophage; alternative complement pathway; plaque forming cell; delayed type hypersensitivity.

미생물로부터 유래되는 생체반응 조절물질 중에서도 특히 담자균류에서 분리된 단백 다당체 또는 다당체가 생체의 면역기능을 증가시키거나 억제된 면역기능을 정상으로 회복시켜 줌으로써 효과를 발

휘한다는 것이 그간의 연구결과에 의해 밝혀지고 있다.^{1,2)} 특히 숙주의 면역학적 방어기전을 유지하는 세포독성능 대식세포, B 임파구, 세포독성능 T 임파구 및 NK 세포 등의 체액성 및 세포성 면역에 대한 영향과 보체계에 대한 영향으로 담자균류에 저하된 면역활성을 증가시켜 항암효과를 나타내는 넓은 의

*교신저자 : Fax 02-872-1795

미로서의 생체반응조절제라는 관점에서 담자균류의 항암성 다당체의 면역조절기전에 대한 새로운 검토가 이루어지고 있다.³⁻⁷⁾ 한편, 최근에 본 연구실에서 보다 약리활성이 큰 담자균류를 개발하기 위하여 영지와 표고의 원형질체 융합에 성공⁸⁾하여 우수한 항암력을 가진 융합체 P22를 선발하였고, 이 융합균사체로부터 추출한 성분의 암세포에 대한 직접적인 작용 및 대식세포, B와 T 임파구에 대한 영향을 검토하여 항암작용의 기전을 면역학적 측면에서 규명하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. DMC-1과 *Ganoderma lucidum* (Curt ex FR.) Karsten DMC-1의 영양요구성 돌연변이주인 *Lentinula edodes* 4 (PABA): LE4와 *Ganoderma lucidum* 1 (hypoxanthine): GL1의 원형질체 융합체 P22를 배양한 후, 그 균사체를 열수 추출하여 얻은 분획을 DEAE-cellulose 이온교환수지를 이용하여 분리정제한 단백다당체 분획(이하 Fr. IV로 약칭)을 본실험에 사용하였다.

암세포에 대한 직접적 작용 - Carmichael 등⁹⁾의 방법에 준하여 MTT assay를 실시하였다. Sarcoma 180, P388 및 RAW264.7 암세포를 1×10^5 cells/ml로 조정하여 다음, 96 well microplate (Falcon Co., U.S.A.)에 well 당 100 μ l씩 분주하였다. Fr. IV는 50, 200 및 500 μ g/ml의 농도로 조정하여 well 당 최종 부피가 200 μ l가 되도록 가하였다. 대조군으로는 Fr. IV 대신 RPMI-1640 배지(Gibco Co., U.S.A.)를 100 μ l씩 가하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양한 다음, MTT 시약(5 mg/ml in phosphate buffered saline(PBS), Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 20 μ l씩 가하여 4시간 동안 배양하였다. 400 \times g에서 원심분리하여 상정액은 버리고 100% dimethylsulfoxide(DMSO) 150 μ l를 가한 다음 40 \times g에서 30분간 교반한 후, ELISA Reader(Flow Lab., U.K.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 cell growth를 관찰하였다.

마우스의 조혈모 세포에 대한 작용 - 서울대학교 실험동물 사육장에서 분양받은 Balb/c 마우스(♂, 20~22 g, H-2^d)를 경주탈구법에 의하여 치사한 후

대퇴골을 무균적으로 절단하고 HBSS 용액(Sigma Chem. Co., U.S.A.)이 들어있는 26 gauge 주사기로 대퇴골의 골수세포를 뽑아 내었다. 300 \times g에서 5분씩 HBSS 용액으로 2회 원심분리 세척한 후 40% FCS 첨가 2 \times EMEM 배지(Gibco Co., U.S.A.)에 골수세포를 3×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켰다. 1% agar 용액에 골수세포 50 μ l, 40% FCS 첨가 2 \times EMEM 950 μ l, Fr. IV 50, 100, 200 및 500 μ g/ml의 농도로 가하여 잘 혼합한 후 최종 agar 농도가 0.5% 되도록 하였다. 총 반응액 2 ml를 잘 혼합하여 6 well plate에 고르게 가하여 상온에서 굳힌 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 7일간 배양시킨 후 40배율 하에서 위상차현미경(Olympus optical Co., Japan)으로 생성된 세포 집락(colony) 수를 측정하였다. 이 때 세포가 30 개 이상 모인 것을 1 집락으로 간주하였다.

마우스의 대식세포 활성화에 미치는 영향 - 대식세포 활성화 여부를 알아보기 위해 활성화된 대식세포로부터 분비되는 acid phosphatase의 활성을 Suzuki 등¹⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다. 4~5 주령의 ICR 마우스(♂, 20~25 g)를 정상군, Fr. IV를 투여한 정상 시료 투여군, sarcoma 180을 마우스의 왼쪽 서혜부에 이식한 암 대조군 및 Fr. IV를 투여한 암 시료 투여군으로 나누었으며 실험군마다 5마리씩 사용하였다. 시료 투여는 sarcoma 180 세포 현탁액(1×10^7 cells/ml) 0.1 ml를 마우스의 왼쪽 서혜부에 이식하고 24시간 후부터 대조군과 시료 투여군으로 나누어 생리식염수와 Fr. IV 20 mg/kg/day를 매일 1회 5일간 투여하였다. 복강세포 중의 대식세포 제조는 항암성분 최종 투여일로부터 5일 후 마우스를 치사시키고, PBS로 복강 세포를 취하고 300 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 세포를 1×10^6 cells/ml이 되도록 10% FBS 첨가 RPMI-1640 배지(Gibco Co., U.S.A.)에 부유시키고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하여 plate에 부착된 대식세포만을 취했다. Acid phosphatase의 활성 측정은 위에서 얻은 대식세포에 0.1% Triton X-100(Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 100 μ l를 가한 다음 0.02 M p-nitrophenyl phosphate/0.1 M citrate buffer(pH 5.0)를 0.5 ml 가해 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1 시간 반응시킨 후 300 \times g에서 5 분간 원심분리 후 얻은 상정

액에 4°C 상에서 0.2 M borate buffer(pH 9.8) 1 ml를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대식세포의 활성은 다음과 같은 식에 따라 계산하였다.

Acid phosphatase activity (p-nitrophenol $\mu\text{mol}/10^6$ macrophages/60 mins.) = 1.15 \times O.D. at 405 nm

Nitric oxide 생성에 미치는 영향 - 활성화된 대식세포만이 분비하는 것으로 알려진 nitric oxide의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 Choi 등의 방법¹¹⁾에 따라 마우스의 단핵구 기원의 RAW264.7 cell line을 이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 측정하였다. 세포배양용 flask에 배양한 RAW 264.7 세포를 1% trypsin(Gibco Co., U.S.A.)으로 처리하여 떼어낸 후 serum free DMEM(Gibco Co., U.S.A.)으로 300 \times g에서 5 분간 3회 원심분리 세척 후 2 \times 10⁵ cell/ml로 조정하여 24 well multiplate에 분주하였다. PBS 20 μ l에 최종농도가 IFN- γ 10 U/ml(Sigma Chem. Co., U.S.A.), IFN- 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml(Gibco Co, U.S.A.), Fr. IV 50, 100, 200, 500 μ g/ml 및 IFN- 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml이 되도록 혼합 첨가하여 4 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, 10%가 되도록 FBS를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48 시간 동안 배양하였다. 400 \times g에서 30 분간 원심분리하여 상정액 100 μ l만을 취하여 ELISA titer tek plate에 옮긴 후 100 μ l Griess reagent(Sigma Chem. Co., U.S.A.)를 넣고 10분간 실온에 방치한 후 ELISA Reader(Flow Lab., U.K.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrite의 검량선으로부터 nitric oxide의 대사체인 nitrite의 농도를 계산하였다.

보체 대체 경로의 활성화에 대한 작용 - 보체 대체 경로(alternative complement pathway)에 대한 작용을 알아보기 위해 Adachi 등의 방법¹²⁾에 따라 실시하였다. 보체원인 신선한 사람 혈청 0.4 ml에 Fr. IV 및 zymosan A(Sigma Chem. Co., U.S.A.)를 각각 1.0, 2.5 및 5.0 mg/ml씩 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후, GVB (gelatin 1 g, NaCl 8.65 g, sodium barbiturate (Veronal, Sigma Chem. Co., U.S.A.) 2.06 g/탈이온수 1 L, pH 7.4)-EGTA Mg²⁺ 용액(EGTA,

Sigma Cnem. Co., U.S.A.) 0.3 ml와 토끼적혈구 (RRBC, Sigma Chem. Co., U.S.A.)를 0.2 ml (5 \times 10⁷ cells/ml) 가하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양하고 GVB-EDTA(Sigma Chem. Co., U.S.A.) 용액 2 ml를 가하여 반응을 종결시킨 후, 300 \times g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상정액의 흡광도를 414 nm에서 측정하였다.

마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 영향 - Ohno 등의 방법¹³⁾에 따라 분화된 B 임파구의 표면에 발현되는 alkaline phosphatase를 측정하였다. ICR 마우스(♂, 20~25 g)를 경추탈구법으로 처사시키고 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망위에서 분쇄한 후 얻은 세포 부유액을 LSM용액 (lymphocyteseparation medium, Gibco Co., U.S.A.)에 천천히 2:1의 비율로 적가하여 400 \times g에서 20분간 원심분리하였다. 단핵세포층만 조심스럽게 취하여 300 \times g에서 5분씩 3회 원심분리하여 세척한 후, 1 \times 10⁶ cells/ml로 하여 well당 1 ml 씩 분주하고 Fr. IV 50, 200, 500 및 LPS 50 μ g/ml의 농도로 가하여 최종부피가 2 ml가 되도록 하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48 시간 배양한 다음 400 \times g에서 10분간 원심분리하여 상정액은 버리고, 남은 침전물에 p-nitrophenyl phosphate in 50 mM sodium carbonate buffer 1 ml를 가한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1 시간 반응시켰다. 빙냉의 0.3 N NaOH 용액 500 μ l를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, B 임파구의 alkaline phosphatase 활성은 다음 식에 따라 계산하였다. Alkaline phosphatase activity (p-nitrophenol $\mu\text{mol}/10^6$ lymphocytes /60 mins.) = 1.15 \times O.D. at 405 nm

마우스의 용혈반 형성세포(plaque forming cell)에 미치는 영향 - B 임파구의 분화 능력을 검색하기 위해, 면양 적혈구(sheep red blood cell, SRBC)에 대한 항체 IgM 생성능을 Cunningham의 방법¹⁴⁾을 개량하여 측정하였다. 항암성분 투여 및 마우스(ICR, ♂, 20~25 g)의 면역화는 4 실험군으로 분류하고 각 군마다 5마리씩 사용하였다. 2군은 대조군으로, 나머지 2군은 항암성분 투여군으로 준비하고 대조군과 투여군의 각 1군에 sarcoma 180 세포 현탁액(1 \times 10⁷ cells/ml) 0.1 ml를 마우스의 서혜부에 이식하였다. 이식 24시간 후

부터 대조군에는 생리식염수를, 항암성분 투여군에는 Fr. IV 20 mg/kg/day를 1일 1회 5일간 복강 내로 주사하였다. 투여 완료 7일 후 SRBC(1×10^7 cells/0.1 ml, sheep red blood cells, Korea media, Korea)를 복강 내에 주사하여 면역화시켰다. 면역화시킨-마우스를 5일 후에 경추탈구법으로 치사시켜 비장을 적출하여 상기 방법대로 비장세포를 분리하여 HBSS 2.5 ml에 부유시키고, 비장세포 수를 측정하고, 10배, 100배 희석하였다. 현탁된 SRBC를 HBSS 용액으로 3회 세척하고(400×g, 5분), 20% (v/v)가 되도록 HBSS 용액에 부유하였다. Agar underlay는 1.4% agar를 HBSS 용액에 녹여 culture plate에 깔았다. Agar overlay는 0.7% agar와 0.5 mg/ml DEAE-dextran(Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 HBSS에 완전히 녹인 후, 47 °C로 유지하였다. 5 ml round-bottom tube에, 800 μ l의 agar 용액과 150 μ l의 SRBC 및 250 μ l의 비장세포 부유액을 즉시 혼합하여 이 혼합액을 culture plate에 가하고 smearing 하여 굳힌 후, 10배 희석한 Guinea pig complement(Gibco Co., U.S.A.)를 0.1 ml 가하고, 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. 배양 후 형성된 용혈반형성세포 수를 측정하였다.

마우스의 T 임파구 활성화에 대한 작용-Lagrange의 방법¹⁵⁾에 준하여 SRBC에 대한 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity, DTH)을 측정하였다. 실험동물로 4~5 주령의 ICR 마우스(♂, 20~25 g)를 사용하였다. 4군의 실험군으로 나누어 각각 5마리의 마우스를 사용하였다. 2군은 sarcoma 180 세포 현탁액(1×10^7 cells/ml) 0.1 ml를 마우스의 왼쪽 서혜부에 이식하고 다른 2군은 정상으로 하여, 그들 각각을 다시 대조군과 시료 투여군으로 나누어 생리식염수와 Fr. IV 20 mg/kg/day를 매일 1회 5일간 투여하였다. 시료 투여 마지막 날, SRBC 5×10^5 개를 마우스의 꼬리 정맥에 주사하여 감작시킨 다음, 5일 후 5×10^5 개의 SRBC를 마우스의 오른쪽 발바닥에 피하주사하였다. 이 때 왼쪽 발바닥에는 생리식염수를 주사하여 비교치로 삼았다. 24, 48, 72시간 후의 발두께(발바닥과 발등간의 두께)를 outside micrometer(Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 오른쪽 발두께에서 왼쪽 발두께를 뺀 수치를 발바닥 부종 두께

변화로 표시하고 DTH 반응의 척도로 삼았다.

결과 및 고찰

암세포에 대한 직접적인 효과-Sarcoma 180, P388 및 RAW264.7 암세포에 항암성분 Fr. IV 50, 200 및 500 μ g/ml를 가해 배양한 후 MTT assay를 실시하여 평균 암세포 생존율을 측정한 결과, 위의 농도범위에서는 상기의 암세포에 대해 직접적인 cytotoxic 효과를 나타내지 않았다(Table I).

마우스의 조혈모 세포에 대한 작용-조혈모 세포의 증식 및 분화에 미치는 Fr. IV의 영향을 관찰하기 위하여 생성된 집락수로 측정된 결과, Fr. IV

Table I. Effects of Fr. IV on average viability of tumor cells in tissue culture

Tumor	Dose (μ g/ml)	Average viability of tumor cells (%) [*] (Mean±S.D.)
Sarcoma 180	50	90.96± 6.41
	200	84.93± 7.91
	500	77.24± 6.32
P 388	50	92.60±10.64
	200	87.79± 2.10
	500	78.77± 5.11
RAW 264.7	50	89.76± 1.74
	200	88.58±10.37
	500	84.75± 6.27

$$* \text{Average viability}(\%) = \frac{\text{O.D. of treated group}}{\text{O.D. of control group}} \times 100$$

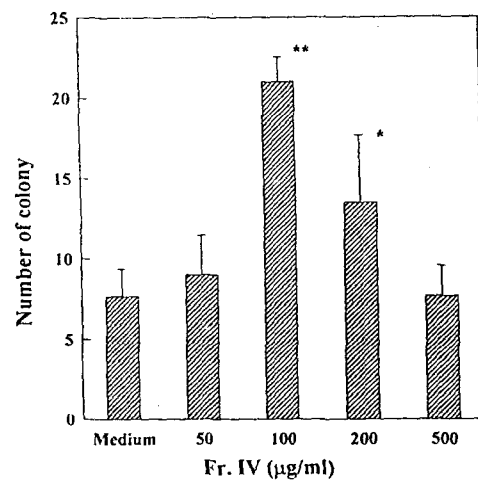


Fig. 1. Effects of Fr. IV on colony formation of the murine bone marrow cells. * p<0.05, ** p<0.01.

100 µg/ml 농도에서는 대조군에 비하여 약 3.0배, 200 µg/ml에서도 약 1.5배 집락수가 증가하였지만 다른 농도에서는 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig.1). 이것으로 Fr. IV 100 µg/ml에서는 이미 조절모 세포 단계에서 골수 세포의 증식 및 분화에 관여함을 알 수 있었다.

마우스의 대식세포 활성화에 미치는 영향-활성화된 대식세포로부터 분비되는 물질인 acid phosphatase의 양을 측정하여 대식세포의 활성화에 대한 Fr. IV의 영향을 검토한 결과, 정상군에 비해 암

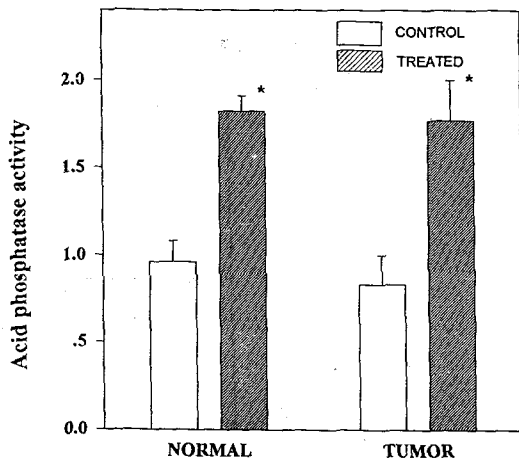


Fig. 2. Effects of Fr.IV on the release of acid phosphatase of peritoneal macrophages. p-nitrophenol µmol/10⁶ lymphocytes/60 mins = 1.15×O.D. at 405 nm.

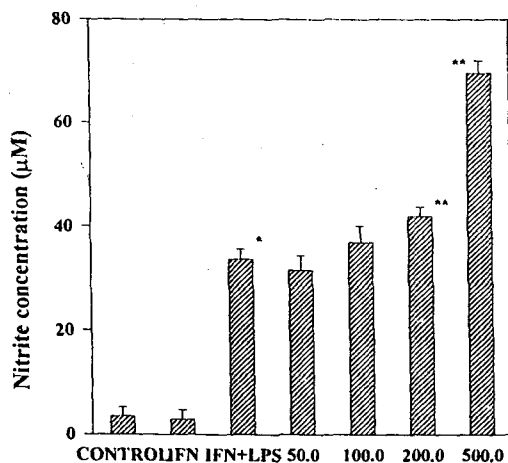


Fig. 3. Effects of Fr.IV on nitrite production in RAW 264.7. Control vs.*, p<0.01; * vs.**, p<0.01.

대조군에서는 14% 감소하였으나, Fr. IV 투여군에서는 약 2.1배 증가하였다(Fig.2).

Nitric oxide 생성에 미치는 영향-마우스의 단핵구 기원의 RAW264.7 cell line을 이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 그 대사체인 nitrite의 농도로 추정하였을 때, IFN-γ 10 U/ml만을 처리했을 때에는 대조군과 차이를 보이지 않았으며, IFN-γ 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml을 함께 처리한 경우에는 이보다 11배, Fr. IV 500 µg/ml 및 IFN-γ 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml을 처리한 경우에는 IFN-γ 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml을 함께 처리한 경우보다 약 2.2배 증가하였다 (Fig.3).

보체 대체 경로의 활성화에 미치는 영향-보체 대체 경로의 활성화에 대한 Fr. IV의 영향을 검토한 결과, 1.0 mg/ml 농도에서는 대조군과 유사하였으나, 2.5 및 5.0 mg/ml 농도에서는 각각 18%와 40%씩 보체를 활성화시켰다(Fig.4).

마우스 B 림파구 활성화에 미치는 영향-B 림파구가 분화시 세포 표면에 발현되는 alkaline phosphatase 활성을 측정한 결과, Fr. IV 500 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 1.6배 증가하였으며 양성 대조군인 LPS 50 µg/ml에서는 2.0배 증가하였다(Fig.5). 형질세포(plasma cell) 수를 측정한 결과, Fr. IV 투여군의 SRBC에 대한 용혈반 형성세포 수는 대조군에 비해 정상 시료 투여군에서 1.4배, 암 시료 투여군에서 1.8배로 현저히 증가하였다(Fig.6).

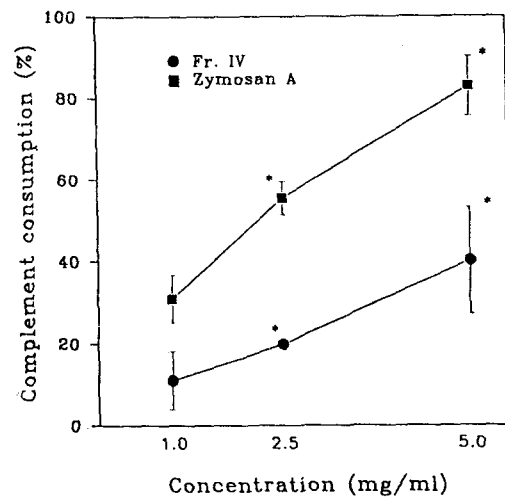


Fig. 4. Effects of Fr.IV on the alternative complement pathway. * p<0.01.

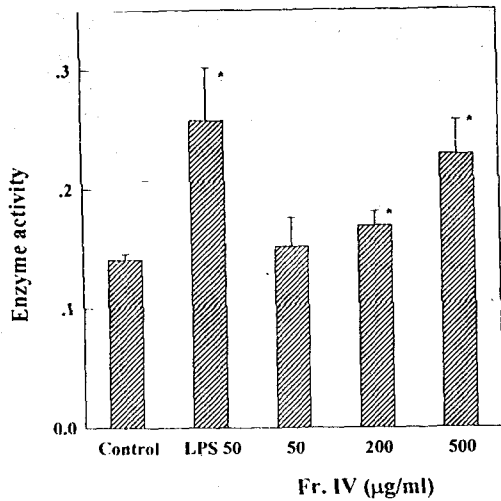


Fig. 5. Effects of Fr.IV on the alkaline phosphatase in the murine spleen cells. p-nitrophenol µmol/1×10⁶ lymphocytes/60 min = 1.15×O.D. at 405 nm. * p<0.01.

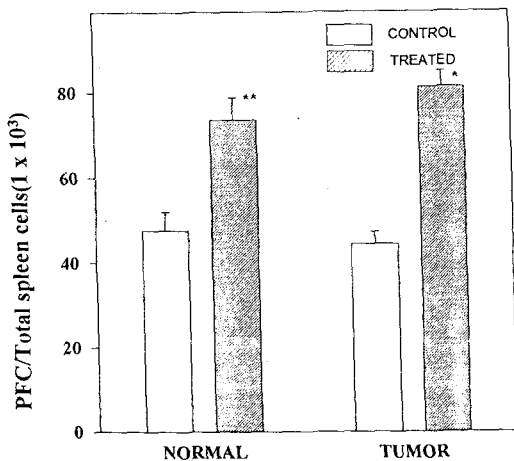


Fig. 6. Effects of Fr.IV on IgM hemolytic plaque forming cells. * vs.**, p<0.05.

마우스의 T lymphocyte 활성화에 대한 효과 - SRBC에 대한 지연형 과민 반응을 측정된 결과, 정상 시료 투여군의 경우 약 113% 증가하였고, 암 대조군에서 정상군에 비해 감소된 반응이 암 시료 투여군의 경우 130%까지 증가하였다(Fig.7).

결론

Fr. IV는 직접적인 세포독성을 나타내지 않았으

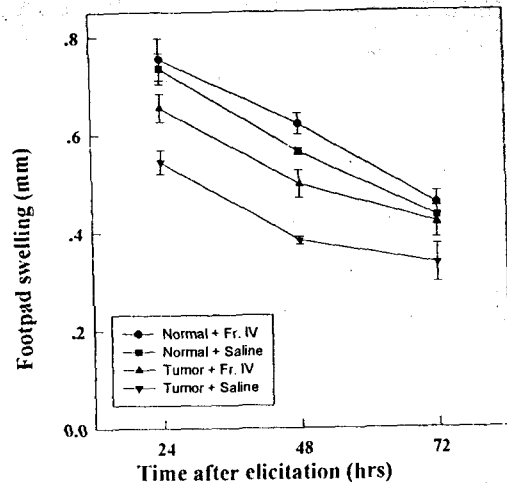


Fig. 7. Effects of Fr.IV on the delayed type hypersensitivity response.

며, 조혈모 세포의 분화에 미치는 영향을 실험한 결과, 100 µg/ml의 농도에서 골수세포의 집락수를 3.0배 증가시켰다. 대식세포의 acid phosphatase 활성이 Fr. IV 투여군의 경우 암 대조군에 비해 2.1배, nitrite의 분비는 2.2배 증가시켰으며, 보체 대체 경로에 관여하는 보체 성분들을 활성화시켰다. 용혈반 형성세포 수의 증가 및 alkaline phosphatase의 활성화로 보아 B 임파구의 분화단계에도 관여함을 알 수 있었다. 면양 적혈구에 대한 지연형 과민 반응에 있어서 암 이식군에서 저하된 반응이 Fr. IV 투여군에서 증가하였다. 이상으로 미루어 융합균 사체에서 추출한 성분의 항암 작용은 종양세포에 직접적 세포독성을 나타낸다고보다는 다양한 면역 기전으로 생체 반응을 항진시켜 자기방어 기능을 활성화시킴으로써 나타남을 알 수 있었다.

사사

이 연구에 소요된 경비의 일부는 한국학술진흥재단 및 서울대학교 신의약품개발연구센터(KOSEF-RCNDD)의 연구비로 충당되었으며 이에 감사하는 바입니다.

인용문헌

1. Mizuno, T. (1983) Structure and antitumor ac-

- activities of β -D-glucan of *Ganoderma ap-planatum*. *Jpn. J. Cancer Chemother.* 21: 473-479.
2. Nuruse, S., Takeda, S., Ito, H., Fujii, K., Tera-da, Y., Shimura, K., Sugiura, M. and Miyazaki, T. (1974) Antitumor effects of polysaccharides prepared from cultured basidiomycetes. *Mie Med. J.* 23: 207-231.
 3. Hyun, J. W., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1990) Studies on constituents of higher fungi of Korea(LXVII), Antitumor components of basidiocarps of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* 18:58-69.
 4. Lee, J. O., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1987) Immunological studies on the antitumor components of *Lyophyllum descates*. *J.Kor.Cancer Res.Assoc.* 19: 57-62.
 5. Sakagami, Y., Mizoguchi, Y., Shin, T., Seki, S., Kobayashi, K., Morisawa, S. and Yamamoto, S. (1988) Effect of an antitumor polysaccharide schizophyllan on interferon- γ and interleukin-2 by peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* 155: 650-655.
 6. Shim, M. J. (1980) Stimulating effects of *Coriolus versicolor* constituents on immune response. *Kor. J. Mycol.* 8: 115-116.
 7. Shin H. W., Kim, H. W., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1985) Studies on inorganic composition and immunopotentiating activity of *Ganoderma lucidum* in Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* 15: 181-190.
 8. Bok, J. W. (1994) Studies on protoplast fusion between *Lentinula edodes* and *Ganoderma lucidum*. Ph. D. thesis, Graduate School, Seoul National University.
 9. Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942.
 10. Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osawa, M. and Yadomae, T. (1989) Antitumor and immunomodulating activities of a β -glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 410-413.
 11. Choi, S. H., Jun, C. D., Lee, B. S., Lee, B. S., Park, S. D., Oh, J. S. and Chung, H. T. (1993) Effect of various extrinsic and intrinsic factors on the nitric oxide production of murine macrophages. *Korean J. BRM.* 3: 15-22.
 12. Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. and Yadomae, T. (1990) Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 988-992.
 13. Ohno, N., Arai, Y., Suzuki, I. and Yadomae, T. (1986) Induction of alkaline phosphatase activity in murine spleen cells treated with various mitogens. *J. Pharmacobio-Dyn.* 9: 593-599.
 14. Cunningham, A. (1973) Plaque assay for antibody producing cells. *Prog. Allergy.* 17: 5-8.
 15. Lagrange, P. H., Mackaness, G. B. and Miller, T. E. (1974) Potentiation of T cell mediated immunity by selective suppression of antibody formation with CY. *J. Exp. Med.* 139: 1529-1539.

(1996년 8월 28일 접수)