

영지와 표고의 융합체의 면역활성 증강작용

문 철² · 현진원³ · 김하원^{1*} · 심미자¹ · 김병각²

¹*서울시립대학교 생명과학과, ²서울대학교 약학대학 종합약학연구소, ³서울대학교 의과대학 약리학교실

Immunostimulating Activity by Protoplast Fusants between *Ganoderma lucidum* and *Lentinus edodes*

Chul MOON², Jin Won HYUN³, Ha Won KIM^{1*}, Mi Ja SHIM¹, and Byong Kak KIM²

Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, ¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, ²Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

(Received May 29, 2000; accepted June 18, 2000)

Abstract – On the inter-order protoplast fusants of *Lentinus edodes* and *Ganoderma lucidum* was the antitumor activity test performed and the fusant P22 was selected. The hot water extract of the cultured mycelia of P22 were purified by DEAE-cellulose chromatography and the resulting purified fraction was designated as P22A. It was found to be a proteoglycan whose molecular weight was 47 kDa. When examined for immunopotentiating activity, P22A increased the number of colony forming unit in the bone marrow stem cells to 3-folds. It also potentiated the secretion of nitric oxide in activated macrophages to 2-folds. In humoral immune response, it increased the activities of the alkaline phosphatase in differentiated B cells to 1.6-folds and the number of plaque forming cells to 1.8-folds. In cellular immune response, it restored the depressed response of delayed type hypersensitivity in tumor bearing mice to normal level. These results suggest that P22A have potential to restore the decreased immune activity of the tumor bearing mice to normal level.

Keywords □ Protoplast fusant, macrophage activation, plaque forming cell, delayed type hypersensitivity

고등균류에 속하는 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 1960년 Roland 등이 *Calvatia gigantea*로부터 calvacin을 분리함으로써 시작되어, Chihara 등 (1970)이 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 분리한 고분자 β -(1 \rightarrow 3)-glucan인 lentinan이 마우스 sarcoma 180세포에 강력한 종양 억제작용이 있음을 보고하였으며, Komatsu 등 (1969)은 *Schizophyllum commune*으로부터 β -(1 \rightarrow 6); β -(1 \rightarrow 3)-glucan인 schizophyllan을 분리하였고, Tsugagoshi 등 (1974)은 *Coriolus versicolor*의 배양균사로부터 β -(1 \rightarrow 3); β -(1 \rightarrow 4); β -(1 \rightarrow 6)-glucan인 항암성 단백질다당체인 PS-K(Krestin)을 분리하였다. Fujii 등 (1978)은 *Lentinus edodes*의 배양 균사체로부터 단백질이 결합된 다당체 KS-2를 분리한 후 인 터페론 유발작용이 있음을 발표하였다.

이들 담자균류의 항암작용은 숙주의 면역활성 증가에 의한 것임이 Hamuro 등 (1978), Masuko 등 (1982) 및 Judith 등 (1984)에 의해 보고되었으며, 만성 간염 및 human immunodeficiency virus(HIV)에 대한 영향이 Kitamura

등 (1986) 및 Tochikura 등 (1988)에 의해 각각 연구되었다. 담자균류에서 분리한 다당체 및 단백질 다당체를 다양한 추출법과 정제과정을 통하여 보다 우수한 항암효과를 나타내는 성분을 얻고자 하는 연구가 Mizuno 등 (1983)에 의해 수행되었으며 다당체인 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan을 periodate로 산화시키거나 borohydride로 환원시키므로써 항암효과가 현저히 증강됨을 Sone 등 (1985)이 발표한 이후 다당체의 화학 구조와 분자량이 항암활성과 연관성이 있음을 Adachi 등 (1990)이 보고하였다.

한국산 담자균류의 항암 성분에 관한 연구는 Kim 등 (1979)이 구름버섯, 표고 및 느타리버섯의 자실체로부터 마우스의 sarcoma 180에 대해 강력한 항암작용을 나타내는 다당류와 단백질로 구성된 고분자 물질을 보고한 이래 메꽃버섯 (Min 등, 1980), 노랑다발 버섯 (Lee 등, 1981), 덕다리 버섯 (Kang 등, 1982), 애기졸각 버섯 (Kim 등, 1982), 뽕나무 버섯 (Kim 등, 1983), 노랑치마아재비 버섯 (Chung 등, 1985), 줌우단 버섯 (Kwak 등, 1992) 및 버들송이 (Kim 등, 1997) 등의 자실체 또는 배양 균사체로부터 마우스 sarcoma 180에 대해 항암 작용을 나타내는

*To whom correspondence should be addressed.

단백 다당체를 분리하여 보고하였다. 이와같이 담자균류가 숙주의 면역반응에 관여하는 대식세포, 항체, 세포 독성능 T 림프구 및 NK 세포 등의 작용을 증강시켜 담암으로 인해 현저히 저하된 면역반응을 활성화함으로써 항암효과를 나타내는 생체반응 조절물질이라는 관점에서 담자균류의 항암성 다당체의 면역조절기전에 대한 새로운 검토가 이루어지고 있다 (Ebina 등, 1989; Mizoguchi 등, 1987).

한편 이러한 고등균류의 자실체인 버섯은 자연상태에서 균사접합에 의해 재배되어 왔으나 환경의 악화, 병충해의 발생 등으로 안정재배가 어려워 생산력이 급격하게 떨어지게 되었고, 이에따라 새로운 품종 및 육종방법의 개발이 대두되게 되었다. 이러한 방법의 일환으로서 원형질체 융합기법에 의한 유전자 전이로 잡종이나 형질전환된 신품종의 육성이 가능하게 되었고 (Peberdy, 1979), 영지속 균주의 원형질체 융합 (Kim 등, 1989), 영지와 구름버섯의 원형질체 융합 (Park 등, 1991), 구름버섯과 표고의 원형질체 융합 (Kim 등, 1993) 및 영지와 표고의 원형질체 융합 (Bok, 1994) 등이 보고되었다. 이에 저자 등은 항암작용, 간염치료 작용, 후천성 면역결핍성 바이러스 복제 억제작용, 인터페론 유발작용 등을 지닌 표고와 고혈압, 간염 및 신경쇠약 치료작용, 항암작용, 항알러지 작용 등 다양한 약리작용을 지닌 영지의 원형질체 융합체의 배양 균사체를 열수추출하여 우수한 항암력을 지닌 융합체 P22를 선발하였고 그 항암작용의 기전을 면역학적 측면에서 연구하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료

Lentinus edodes (Berk.) Sing. DMC-1의 영양요구성 돌연변이주인 *Lentinus edodes* 4 (PABA⁻)와 *Ganoderma lucidum* (curt ex FR.) Karsten DMC-1의 영양요구성 돌연변이주인 *Ganoderma lucidum* 1 (hypoxanthine⁻)의 원형질체 융합체로부터 얻은 P22 융합체에서 본 저자는 액내 배양하여 균사체를 열수추출하고 DEAE-cellulose anion exchange chromatography를 이용하여 분리 정제한 P22A를 실험시료로 사용하였다. P22A는 단백질 9.7%와 다당체 69.1%로 구성된 proteoglycan이며, 분자량은 67 kDa으로 분석되었다.

고형암 및 복수암에 대한 항암작용 검색

고형암 항암 실험은 다음과 같이 실시하였다. ICR마우스의 서혜부에 sarcoma 180 세포 2×10^5 cells씩 이식하여 고형암을 유발시켰다. 암세포를 이식하고 24시간 후부터 생리식염수에 녹인 양성 대조군 krestin과 P22A를 각각 20 mg/kg/day의 용량으로, 대조군에는 생리 식염수를 0.1 ml씩 매일 1회 10일간 연속하여 복강내에 주사하였다. 암

세포 이식 후 30일째 되는 날 실험동물을 처사시키고 유발된 고형암을 적출하여 그 중량을 측정하고 다음 식에 의거하여 종양저지 백분율 (percent inhibition ration, I.R., %)을 계산하였다. $I.R. (\%) = 100 \times (C_w - T_w) / C_w$, 단, C_w = 대조군의 평균 종양 중량, T_w = 시료투여군의 평균 종양 중량이다.

복수암에 대한 항암검색 실험은 다음과 같이 실시하였다. ICR 마우스의 복강에 sarcoma 180 세포 2×10^5 cells씩 이식하여 복수암을 유발시켰다. 암세포를 이식하고 24시간 후부터 생리식염수에 녹인 양성 대조군 krestin과 P22A를 각각 20 mg/kg/day의 용량으로, 대조군에는 생리 식염수를 0.1 ml씩 매일 1회 10일간 연속하여 복강내에 주사하였다. 결과 판정은 암세포 이식 후 대조군과 시료 투여군의 생존 여부를 관찰하여 평균생존일 (mean survival day)을 계산한 다음 평균 생존 백분율 (mean survival rate, %)로 항암효과를 계산하였다. $I.R. (\%) = 100 \times (\text{mean survival day of treated mice}) / (\text{mean survival day of control mice})$

마우스의 조혈모 세포에 대한 작용

Balb/c 마우스를 경추탈구법에 의해 처사한 후 대퇴골을 무균적으로 절단하고 HBSS 용액이 들어있는 26 gauge 주사기로 대퇴골의 골수세포를 뽑아 내었다. $300 \times g$ 에서 5분씩 HBSS 용액으로 2회 원심분리 세척한 후 40% FCS 첨가 $2 \times$ EMEM 배지에 골수 세포를 3×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켰다. 1% agar 용액에 골수세포 50 μ l, 40% FCS 첨가 $2 \times$ EMEM 950 μ l, P22A시료는 50, 100, 200 및 500 μ g/ml의 농도로 가하여 잘 혼합한 후 6 well plate에 고르게 가하여 상온에서 굳힌 다음, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 7일간 배양시킨 후 40 배율 하에서 위상차 현미경 (Olympus optical Co., Japan)으로 생성된 세포 집락(colony)수를 측정하였다. 이때 세포가 30개 이상 모인 것을 1 집락으로 간주하였다.

마우스의 대식세포 활성화에 미치는 영향

활성화된 대식세포만이 분비하는 것으로 알려진 nitric oxide의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 Choi 등 (1994)의 방법에 따라 마우스의 단핵구 기원의 RAW 264.7 cell line을 이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 측정하였다. 세포 배양용 flask에 배양한 RAW 264.7 cell line을 1% trypsin (Gibco Co., USA)으로 처리하여 떼어낸 후 serum free DMEM으로 $300 \times g$ 에서 5분간 3회 원심분리 세척 후 2×10^5 cells/ml로 조정하여 24 well multiplate에 분주하였다. PBS 20 μ l에 최종농도가 IFN- γ 10 U/ml, IFN- γ 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml, P22A 50, 100, 200, 500 μ g/ml 및 IFN- γ 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml이 되도록 혼합 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시

간 동안 배양한 후 10%가 되도록 FBS를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 400×g에서 30 분간 원심분리하여 상등액 100 μl만을 취하여 ELISA titer plate에 옮긴 후 100 μl Griess reagent를 넣고 10 분간 실온에 방치한 후 ELISA Reader (Flow Lab., UK)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrate의 검량선으로부터 nitric oxide의 대사체인 nitrite의 농도를 계산하였다.

마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

분화된 B 임파구의 표면에 발현되는 alkaline phosphatase를 Ohno 등(1986)의 방법에 따라 실시하였다. ICR 마우스를 경추탈구법으로 치사시키고 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망위에서 분쇄한 후 얻은 세포 부유액을 LSM 용액에 천천히 2:1의 비율로 적가하여 400×g에서 20분간 원심분리 하였다. 단핵세포 층만을 조심스럽게 취하여 300×g에서 5분씩 3회 원심분리하여 세척한 후 1×10⁶ cells/ml로 하여 well당 1 ml씩 분주하고 P22A 50, 200, 500 및 LPS 50 μg/ml의 농도로 가하여 최종부피가 2 ml가 되도록 하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양한 다음 400×g에서 10분간 원심분리하여 상등액은 버리고 남은 침전물에 p-nitrophenyl phosphate in 50 mM sodium carbonate buffer 1 ml를 가한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 반응시켰다. 빙냉의 0.3 N NaOH용액 500 μl를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 B 임파구의 alkaline phosphatase 활성은 다음 식에 따라 계산하였다. Alkaline phosphatase activity (p-nitrophenol μmol/10⁶ lymphocytes/hr)=1.15×OD at 405 nm

또한 B 임파구의 분화 능력 척도로서 면역 적혈구 (sheep red blood cell, SRBC)에 대한 항체 IgM 생성능을 Cunningham (1973)의 방법을 개량하여 측정하였다. P22A 투여 및 마우스의 면역화는 4 실험군으로 분류하고 각 군마다 5 마리씩 사용하였다. 2 군은 대조군으로 나머지 2 군은 P22A 투여군으로 분류하고 대조군과 투여군의 각 1군에 sarcoma 180 세포 현탁액 1×10⁶ cells/mouse를 마우스의 서혜부에 이식하였다. 이식 24시간 후부터 대조군에는 생리 식염수를, P22A 투여군에는 20 mg/kg/day를 1일 1회 5일간 복강내로 주사하였다. 투여 완료 7 일 후 SRBC 1×10⁶ cells/mouse를 복강내에 주사하여 면역화시켰다. 면역화시킨 마우스를 5 일 후에 경추 탈구법으로 치사시켜 비장을 적출하여 상기 방법대로 비장세포를 분리하여 비장세포 수를 측정하였다. 5 ml round bottomed tube에 800 μl의 agar 용액과 150 μl의 SRBC 및 250 μl의 비장 세포 부유액을 즉시 혼합하여 이 혼합액을 1.4% agar culture plate에 가하고 smearing하여 균한 후 comple-

ment를 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2 시간 배양하였다. 배양 후 형성된 용혈반 형성세포 수를 측정하였다.

마우스의 T 임파구 활성화에 미치는 영향

Lagrange (1974)의 방법에 준하여 SRBC에 대한 지연형 과민반응 (delayed type hypersensitivity, DTH)을 측정하였다. 실험군을 4 군으로 나누어 2군은 sarcoma 180 세포 1×10⁶ cells/mouse를 마우스의 왼쪽 서혜부에 이식하고 다른 2군은 정상으로 하여 그들 각각을 다시 대조군과 시료 투여군으로 나누어 생리 식염수와 P22A 20 mg/kg/day를 매일 1회 5일간 투여하였다. 시료투여 마지막 날 SRBC 5×10⁵개를 마우스 꼬리 정맥에 주사하여 감작시킨 다음 5일 후 SRBC 5×10⁵개를 마우스의 오른쪽 발바닥에 피하주사하였다. 이때 왼쪽 발바닥에는 생리 식염수를 주사하여 비교치로 삼았다. 24, 48, 72시간 후의 발두께를 outside micrometer (Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 오른쪽 발두께에서 왼쪽 발두께를 뺀 수치를 발바닥 부종 두께변화로 표시하고 DTH 반응의 척도로 삼았다.

실험결과

고형암 및 복수암에 대한 항암작용

원형질 융합체 P22의 배양군사체로부터 분리 정제한 P22A에 대해 Sarcoma 180 고형암에 대해 항암 실험을 한 결과 20 mg/kg/day 용량에서 양성 대조군인 krestin인 52%인 반면에 P22A인 경우는 63%로서 krestin보다 종양 억제율이 높게 나타났다. 복수암의 경우 sarcoma 180 복수암에 대한 평균 생존율이 20 mg/kg/day의 P22A 투여군에서 129%, 50 mg/kg/day에서는 150%로 나타나 현저한 수명 연장효과를 보였다 (Table I).

마우스의 조혈모 세포에 대한 효과

조혈모 세포의 증식 및 분화에 미치는 P22A의 영향을 관찰하기 위하여 생성된 집락수로 측정된 결과 P22A 100 μg/ml 농도에서는 대조군에 비하여 약 3배, 200 μg/ml 농도에서는 1.5배 집락수가 증가하였지만 저농도와 고농도에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1). 이것으로 P22A 100 μg/ml 농도에서는 이미 조혈모 세포 단계에서 골수세포의 증식 및 분화에 관여함을 알 수 있었다.

마우스의 대식세포 활성화에 미치는 효과

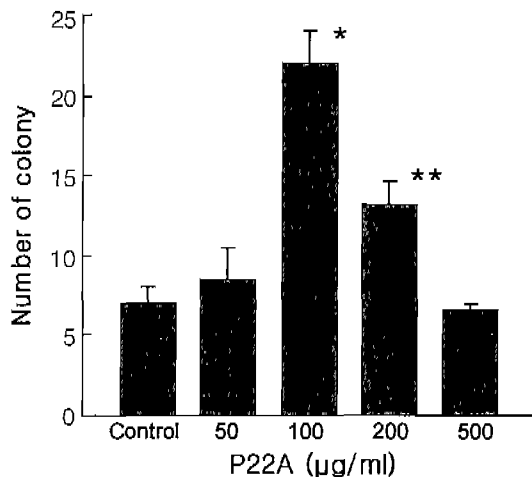
마우스의 단핵구 기원의 RAW 264.7 cell line을 이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 그 대사체인 nitrate의 농도를 추정하였을 때 IFN-γ 10 U/ml만을 처리하였을 때는 대조군과 차이를 보이지 않았으며 IFN-γ 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml를 함께 처리한 경우에는 이보다 11배, P22A

Table I. Effects of P22A on sarcoma 180 solid tumor and ascitic tumor

Fraction	Dose(mg/kg/day)	Tum weight (g) or Mean survival time (day)	IR (%) ^{a)} or T/C (%) ^{b)}	Complete regression
[Solid tumor]				
Control	Saline	12.5 ± 2.8 (g)	-	0/8
Krestin	20	6.1 ± 2.9 (g)*	52 ^{a)}	0/8
P22A ^{c)}	20	4.6 ± 2.3 (g)*	63 ^{a)}	1/8
[Ascite]				
Control	Saline	30.6 ± 10.4 (day)	100 ^{b)}	
P22A	20	39.6 ± 15.2 (day)	129 ^{b)}	
	40	45.8 ± 11.6 (day)*	150 ^{b)}	

* p < 0.05

a) Inhibition ratio

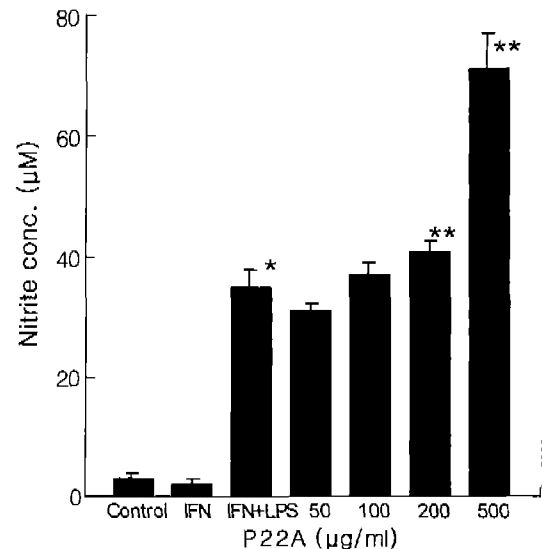
b) T/C (%) = $\frac{\text{Mean survival time of treated group}}{\text{Mean survival time of control group}} \times 100$ c) P22A is a purified proteoglycan (MW 47 kDa) from one of the protoplast fusants between *Lentinus edodes* and *Ganoderma lucidum*.**Fig. 1.** Effects of P22A on colony formation of the murine bone marrow cells. *p < 0.01, ** p < 0.05

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. 2).

마우스의 B 림파구 활성화에 미치는 효과

B 림파구가 분화시 세포 표면에 발현되는 alkaline phosphatase 활성을 측정한 결과 양성 대조군인 LPS 50 µg/ml에서는 2 배 증가하였으며, P22A 500 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 1.6배 증가하였다(Fig. 3). 또한 B 림파구가 분화시 생성되는 형질세포 수는 대조군에 비해 정상 시료 투여군에서 1.4 배 암 시료투여군에서 1.8 배로 현저히 증가하여 B 림파구의 항체 생성능을 증가시켰다(Fig. 4). 따라서 P22A는 *in vivo*에서 체액성면역반응을 촉진시켰다.

마우스의 T 림파구 활성화에 미치는 효과

**Fig. 2.** Effects of P22A on nitrite production in activated macrophage cell line, RAW 264.7. *p < 0.05, ** p < 0.01

T 림파구의 활성 정도를 측정하고자 SRBC에 대한 지연성 과민반응을 24, 48, 72 시간 별로 측정한 결과 정상 시료 투여군의 경우 정상 대조군에 비해 약 13% 증가하였다. 암 대조군에서는 정상군에 비해 약 20% 정도 감소된 지연성 과민 반응이 암 시료투여군의 경우에는 정상군의 수준까지는 회복시키지 못하였지만 암대조군에 비해서는 30%까지 증가하였다(Fig. 5). 이로서 암에 의해 억제된 T 림파구의 면역 반응이 P22A 투여에 의해 증강시킴을 확인하였다.

고 찰

원형질 융합체 P22의 배양균사체로부터 분리 정제한 P22A에 대해 Sarcoma 180 고형암에 대해 항암 실험을

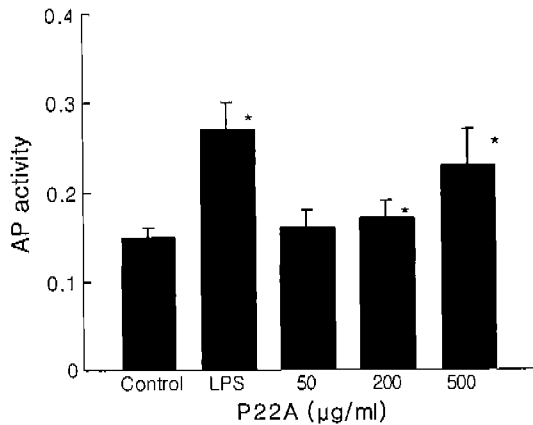


Fig. 3. Effects of P22A on the alkaline phosphatase in the murine spleen cells. *p < 0.01

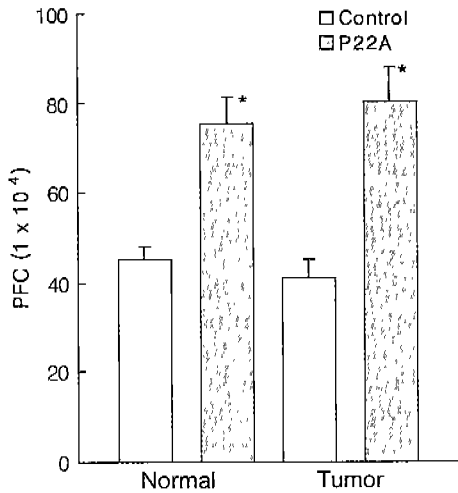


Fig. 4. Effects of P22A on IgM hemolytic plaque forming cells in the murine spleen cells. *p < 0.05

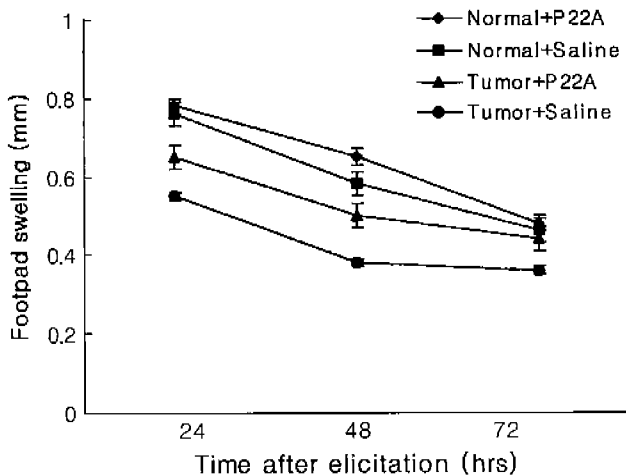


Fig. 5. Effects of P22A on delayed type hypersensitivity response.

한 결과 20 mg/kg/day 용량에서 양성 대조군인 krestin 보다 종양 억제율이 높게 나타났다. 복수암의 경우 sarcoma 180 복수암에 대한 평균 생존율이 20 mg/kg/day의 P22A 투여군에서 129%, 50 mg/kg/day에서는 150%로 나타나 현저한 수명 연장효과를 보였다.

본 연구에서는 숙주의 면역세포에 영향을 주어 암에 대한 개체의 방어 능력을 증강시켜 항암효과를 나타내는 생체반응 물질의 관점에서 P22A성분을 면역학적 측면에서 항암작용의 기전을 구명하고자 하였다. 조혈모 세포에 대한 P22A성분의 영향을 살펴본 결과 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서는 집락 수가 증가한 것으로 보아 골수세포의 증식 및 분화에 관여하는 것으로 사료되거나 어떤 면역세포의 조혈모 세포에 대해 작용하는지는 알 수 없었다. 500 µg/ml의 P22A 농도에서는 오히려 골수세포의 집락수가 감소하는 것으로 보아 고농도에서는 억제효과를 나타내는 것으로 사료된다.

대식세포는 외부로부터 들어오는 이물질을 직접 탐식하여 분해하고 제거하는 기능을 가짐으로써 자연 면역반응에 매우 중요한 기능을 수행할 뿐만 아니라 외부로부터 흡수한 항원을 적절히 변형시켜 세포 표면으로 발현하여 T 임파구로 하여금 그 항원을 인식하게 하고 그 항원에 대한 면역반응을 유도하여 궁극적으로 항체를 만들도록 한다. 대식세포는 활성화된 정도에 따라 항균 및 세포독성 작용에 차이가 있을 뿐만 아니라 숙주의 방어기능의 진전과 더불어 기생체의 생존 능력이 진보하므로 대식세포가 완전히 활성화되지 않으면 비록 탐식을 했더라도 세포내 사멸작용은 할 수 없어 탐식작용이 오히려 기생체에 이로운 역할을 할 수 있음이 보고되었다(Vanasbeck 등, 1985). P22A가 대식세포에 미치는 영향을 살펴본 결과 마우스의 단핵구 기원의 RAW 264.7 cell line을 이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 그 대사체인 nitrite의 농도로 추정하였을 때 P22A는 nitric oxide의 분비를 촉진할 수 있음을 보여주었다. 활성화된 대식세포만이 생성한다고 알려진 nitric oxide는 산소 중간물질 등에 내성을 보이는 기생체나 종양 세포에도 유효하다고 알려졌으며(Jan 등, 1992), 대식세포가 nitric oxide를 생성하는데에는 반드시 helper T세포로부터 유래되는 gamma interferon(IFN-γ)에 의하여 priming되고 그람 음성균에서 분리된 lipopolysaccharide(LPS)에 의하여 triggering되어야 한다고 보고되었다(Hibbs 등, 1972).

B 임파구의 분화척도가 되는 alkaline phosphatase 활성화 및 용혈반 형성세포의 증가로 보아 P22A는 분화단계에 작용하는 것으로 보인다. Yadomae 등(1979)은 주발버섯 *Peziza vesiculosa* 자실체 성분인 vesiculogen이 강력한 B cell mitogen으로 작용할 뿐만 아니라 항원 비특이적으로 용혈반 형성세포 수를 증가시켜 B 임파구의 polyclonal B cell activator로서의 가능성을 제시하였다.

Helper T 세포의 측정법인 지연형 과민반응에 대한 실험 결과 암대조군에 의해 억제된 반응이 P22A 투여군의 경우 회복됨에 따라 helper T 임파구의 면역능을 증강시킴을 확인하였다. Helper T세포의 면역능을 증강시켜 B 세포의 항체 생산유도나 cytotoxic T lymphocyte(CTL)의 성숙 및 증식 효과까지도 기대할 수 있다.

상기의 실험결과로부터 P22A는 담암으로 인하여 저하된 숙주의 면역기능을 정상으로 회복시키거나 증강시켜 생체 반응 조절물질로서 항암작용을 나타내는 것으로 사료되며 담자균류에서 분리한 성분이 숙주에 거의 독작용을 나타내지 않으면서 생체 면역기능을 증강시켜 주므로써 항암효과(Kim 등, 1983; Mizoguchi 등, 1987)를 나타낼 뿐 아니라 식용으로 할 수 있어서 그 실용적 가치가 점점 높아지고 있는 추세에 비추어 볼 때 원형질체 융합기법에 의한 보다 우수한 융합체의 개발 및 그 생리 활성의 검색은 새로운 생체반응 조절 물질의 탐색을 위한 가능성을 제시해 줄 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 약학대학 부속 종합약학연구소의 연구비로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. and Yadomae, T. (1990). Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked (1→3)-β-D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 988-992.
- Bok, J. W., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1994). Studies on protoplast fusion between *Lentinus edodes* and *Ganoderma lucidum*. *Arch. Pharm. Res.* **17**(6), 492-496.
- Chihara, G., Hamura, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970). Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk) Sing (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**, 2776-2781.
- Choi, S. H., Jun, C. D., Lee, B. S., Park, S. D., Oh, J. S. and Chung, H. T. (1994). Effect of various extrinsic and intrinsic factors on the nitric oxide production of murine macrophages. *Korean J. BRM.* **3**, 15-22.
- Chung, K. S. and Kim, B. K. (1985). Studies on antitumor constituents of *Pluteus cervinus*. *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.*, **10**, 1-18.
- Cunningham, A. (1973) Plaque assay for antibody producing cells. *Prog. Allergy*, **17**, 5-8.
- Ebina, T., Kohya, M. and Ishikawa, K. (1989). Antitumor effect of PS-K role of reginal lymph-node and enhancement of concomitant and sinecomitant immunity in the mouse. *Gann* **80**, 158-166.
- Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. and Ishida, N. (1978). Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from cultured mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics* **31**, 1079-1090.
- Hamuro, J., Hadding, U. and Suermann, D. B. (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.
- Hibbs, J. B., Lambert, L. H. and Remington, J. S. (1972). Possible role of macrophage mediated nonspecific cytotoxicity in tumor resistance. *Nature*, **235**, 48-50.
- Jan, A. M., Marielle, E. B., Peter, H. N., Pieter, S. H. and Ralph, V. F. (1992). IFN-γ induced L-arginine dependent toxoplasmastic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-α. *J. Immunol.* **148**, 568-571.
- Judith, G. G., Paul, W. K. and Steven, B. M. (1984). Interleukin-1 mediated induction of κ-light chain synthesis and surface immunoglobulin expression on pre B cells. *J. Immunol.* **132**, 223-228.
- Kang, C. Y., Shim, M. J., Choi, E. C., Lee, Y. N. and Kim, B. K. (1981). Mycelial culture and antineoplastic component of *Ganoderma lucidum*. *Kor. Biochem. J.* **14**, 101-112.
- Kim, B. K., Hyun, J. W., Yoon J. M. and Choi, E. C. (1997). Immunological studies on the antitumor components of the Basidiocarps of *Agrocybe cylindracea*. *Arch. Pharm. Res.* **20**(2), 128-137.
- Kim, B. K., Park, E. K. and Shim, M. J. (1979). Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145-151.
- Kim, C.K., Choi, E.C. and Kim, B.K. (1997). Protoplast fusion between *Lentinus edodes* and *Coriolus versicolor*. *Arch. Pharm. Res.* **20**(5), 448-453.
- 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. (1983). Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XXXVII), antitumor components of *Armillariella mella*. *Kor. J. Mycol.* **11**, 151-157.
- Kim, B. K. and Park, S. H. (1989). Studies on protoplast and nuclear fusion of *Ganoderma* species. *Proc. Int. Sym. on New Drug Development from Natural Projects. May 2*, 172-207.
- Kim, S. H., Woo, M. S. and Kim, B. K. (1982). Antitumor components extracted from the carpophores and cultured mycelia of *Laccaria laccata*. *Kor. J. Mycol.* **10**, 155-163.
- Kitamura, M. (1986). Effect of *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on immunological liver cell injury and antibody production. *Jpn. J. Gastroenterol.* **83**, 1905-1912.
- Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakai, S. (1969). Host mediated antitumor action of Schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* **60**, 137-144.
- Kwag, S. D., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1992). Antitumor components of the cultured mycelia of *Paxillus astrotomentous*. *Kor. J. Mycol.* **20**, 240-251.
- Lagrange, P. H., Mackaness, G. B. and Miller, T. E. (1974).

- Potential of T cell mediated immunity by selective suppression of antibody formation with CY. *J. Exp. Med.* **139**, 1529-1539.
- Lee, C. O., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1981). Studies on the antitumor components of Korean basidiomycetes (IV), antitumor components of *Naematoloma fasciculare* (Fr.) Karst. *Arch. Pharm. Res.* **4**, 117-122.
- Masuko, Y., Nakajima, H., Tsubouchi, T., Yamazaki, M., Mizuno, D. and Abe, S. (1982). Changes of antitumor immunity of hosts with murine mammary tumors regressed by lentinan, potentiation of antitumor delayed hypersensitivity reaction. *Gann* **73**, 790-797.
- Min, H. K., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1980). Studies on the constituents of the higher fungi of Korea, components of *Microporus affinis*. *Kor. J. Mycol.* **8**, 13-19.
- Mizoguchi, Y., Kato, H., Kobayashi, K., Yamamoto, S. and Morisawa, S. (1987). Effects of extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on polyclonal antibody response induced by pokeweed mitogen. *Gastroenterologia Japonica*, **22**, 627-632.
- Mizuno, T. (1983). Structure and antitumor activities of β -D-glucan of *Ganoderma applanatum*. *Jpn. J. Cancer Chemother.* **21**, 473-479.
- 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.
- Park, S. H., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1991). Studies on intergeneric protoplast and nuclear fusion between *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*. *Arch. Pharm. Res.* **14**, 282-283.
- Peberdy, J. F. (1979). Fungal protoplast isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 21-39.
- Roland, J. F., Chmoilewicz, Z. F., Weiner, B. A. and Gross, A. M. (1960). Calvacin: a new antitumor agent. *Science* **132**, 1987.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. (1985). Structure 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.
- Tochikura, T.-S., Nakashima, H., Ohashi, Y. and Yamamoto, Y. (1988). Inhibition of replication of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Med. Microbiol. Immunol.* **177**, 235-244.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. (1974). Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann* **65**, 557-560.
- Vanasbeck, B. S. and Hoidal, J., Vercellotti, G. M. Schwartz, B. A. Moldow, C. F. and Jacob, H. S. (1985). Production against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocyte: role of red cell glutathione. *Science* **227**, 756-759.
- Yadomae, T., Suzuki, I., Yonekubo, H., Nunomura, K. and Miyazaki, T. (1979). Examination of the mitogenic activity of materials from fungi on murine lymphocytes *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* **23**, 815-819.