약학회지 제37권 제3호 254~261(1993)
Yakhak Hoeji Vol. 37, No. 3

해양동물 눈알고둥 렉틴의 림프구 분열효과 및 면역화학적 특성

소명숙 · 전경희* · 정시련#
영남대학교 약학대학, *이과대학

(Received April 26, 1993)

Lymphocytes Mitogenic and Immunochemical Properties of the Lectins from Marine Animal *Lunella coronata coreensis*

Myung Suk So, Kyung Hee Jeune* and See Ryun Chung#
*College of Pharmacy and *College of Science, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea*

Abstract—Developing new substance for immunosuppressor or immunomodulator from natural products is extremely important in the present biomedicine. In this paper, we focused our efforts on the mitogenicity and immunochemical properties of the two lectins (LCC-I, LCC-II) obtained from marine animal *Lunella coronata coreensis*. Immunochemical techniques were employed to elucidate the structural and/or functional similarities between the LCC lectins. Molecular weight of the LCC lectins, LCC-I and LCC-II were estimated to be around 60 KD and 66-70 KD, respectively.

LCC lectins were mitogens for murine splenic lymphocytes, and the optimum mitogenic doses were 31.25 μg/m*l* and 3.91 μg/m*l*, respectively. LCC-II lectin was a good mitogen toward human peripheral lymphocytes at a concentration about 31.25 μg/m*l*.

Keywords Lectins. *Lunella coronata coreensis*, immunodiffusion, immunoelectrophoresis, molecular size, mitogenic activity.

현대의 여러가지 질병에 대응하는 하나의 방편으로 림프구를 자극분열 시키는 면역조정제를 천연물 자원으로부터 개발하려는 노력은 대단히 중요한 과제라고 할 수 있는바 이 목적으로 렉틴의 연구가 주목된다.

렉틴은 분자량, subunit, 당 특이성 등 생물물리화학적 및 면역학적 성질이 다양하며 여러가지 생리활성을 가진 것으로, 흥미있는 생리활성 몇가지를 살펴보면, 림프구 자극분열 효과,[1-3] 항종양 효과,[4-8] 그리고 인슈린 유사 효과[9-11] 등이 있다.

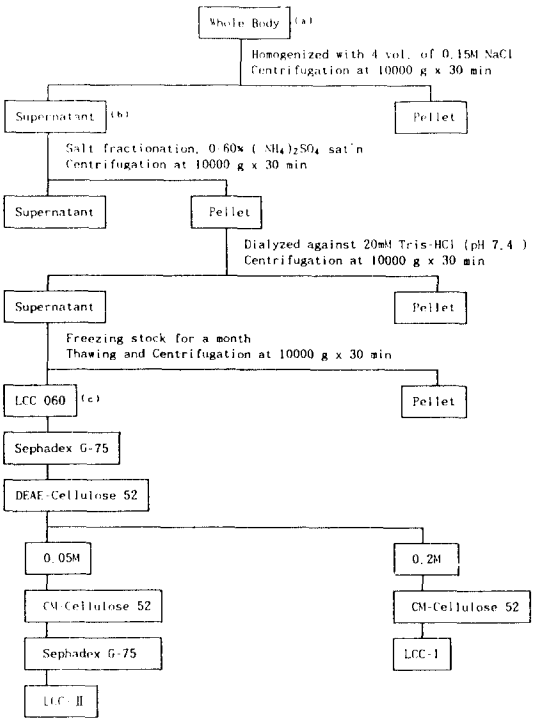
렉틴을 면역계에 응용한 첫 시도는 P. Ehrlich가 1890년대에 abrin과 ricin을 이용한 것으로,[2] 렉틴을 이용한 항원 항체를 연구함으로써 비로소 면역학의 기초를 수립 할 수 있었다. 그후 1960년 Nowell에 의해 PHA렉틴이 림프구 세포의 분열과 증식을 자극 촉진시킨다는 첫 보고가 있는 이래 많은 연구가들이 렉틴의 mitogenic activity에 관한 연구를 시도하여 왔다.[12] 그 결과 다수의 렉틴들이 림프구를 자극분열 증식시키는 효과가 있음이 확인되었으며,[1-3] 이들 렉틴은 T cell자극분열 렉틴이 대부분이나, B cell을 자극분열하는 렉틴도 가끔 보고되었다.[1] 이의 기전에 대해서는 정확히 밝혀지지 않았지만 T cell의 경우 렉틴이 macrophage를 자극하면 이때 유리되는 interleukin-I (IL-I)의 영향으로 helper T cell이 활성화되고 이에 따라 유리되는 interleukin-2가 cytotoxic T cell을 자극하여 증식되며, B cell의 경우는 mitogen이 직접 작용하여 증식되거나 혹은 helper T cell에 의해 유리되는 γ-interferon, B cell growth factor (BCGF-1,2)와 B cell differentiation factor(BCDF)

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

등의 영향으로 증식되어지는 것으로 이해되고 있다.[2,3] 따라서 이런 관점에서 렉틴의 면역기능 조정제로서의 역할이 크게 기대된다.

국내에서 렉틴에 관한 연구는 1976년 부터 본 연구진이 17년 여 동안 각종 천연물(식물, 동물, 해양동물 그리고 고등균류)로 부터 이 독특한 생리활성 성분의 검색, 분리, 정제 및 생물 물리 화학적 특성을 구명한 바 있다.[13-18]

이 연구는 전보[18]에 계속하여 해양 천연물 중 패류(貝類)인 눈알고둥(*Lunella coronata coreensis* RECLUZ)으로부터 렉틴성분, LCC-I을 전보[18]의 방법으로, 그리고 또다른 방법으로 LCC-II를 분리 정제하여 이를 대상으로 면역화학적인 연구와 림프구 세포 분열효과를 비교 구명했다. 따라서 본 연구에서 시도한 눈알고둥 렉틴성분의 mitogenicity는 신물질 창출이란 점에서 큰 의미를 갖고 있고, 앞으로 더 나아가 T-cell과 B-cell을 분리하여 mitogenic activity를 조사 연구하는 등의 더욱 심도 있는 계속적인 연구가 필요하다고 믿는다.



Scheme 1—The purification procedure of the LCC lectins.
(a), *Lunella coronata coreensis*(LCC), a marine shellfish, meat; (b), crude LCC extract; (c), crude LCC lectins.

실험방법

실험재료

소라과(Turbinidae)에 속하는 눈알고둥(*Lunella coronata coreensis* RECLUZ)을 제주도 서귀포 해안에서 채취하여 실험재료로 사용하였다.

렉틴의 분리 정제

살아 있거나 −70℃로 급속냉동 된 눈알고둥으로부터 렉틴의 분리 정제는 Scheme 1과 같이 하였고, 그 각각은 이미 보고된 방법[18]과 이를 개선한 다양한 ion exchanger, gel filtration 등으로 분리 정제 하였다.

LCC-I의 정제는 전보[18]와 같이하였고 새로이 LCC-II는 전보[18]에서와 같이 crude lectins을 Sephadex G-75, DEAE-Cellulose 52를 계속 통과시켜 얻은 0.05 M 분획을 다시 CM-Cellulose 52와 Sephadex G-75로 정제하였다.

CM-Cellulose(CM 52) column chromatography—DEAE-Cellulose 52 column chromatography에서 lectin 활성을 나타낸 시료중 0.05 M fraction을 10 mM phosphate buffer(pH 6.8)에 투석시키고, 같은 buffer로 미리 평형시켜둔 CM-Cellusose 52 column(1.8×20 cm)에 주입시켜 분리 정제 후 전[18]과 동일한 방법으로 확인 농축하였다.

Sephadex G-75 column chromatography—전항에서 lectin 활성을 나타낸 0.1M fraction을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 투석시키고 0.5M NaCl을 함유한 같은 buffer로 평형시켜둔 Sephadex G-75 column (1.5×100 cm)에 주입시켜 분리정제 후 전항과 동일한 방법으로 확인 농축 하였다.

렉틴의 활성시험 및 순도 검정

앞에서 정제되는 과정마다 그 활성은 Chung 등의 방법[13]으로, 그리고 순도는 Davis 방법[19]의 PAGE로 확인하였다.

분자량 측정

정제된 렉틴은 Laemmli와 King[20] 방법의 SDS-PAGE 및 Andrews[21]와 Locascio[22] 등의 gel filtration에 의해 분자량을 측정하였다.

면역화학적 시험

Immunization 및 antisera의 형성 및 분리는 Scheme 1의 DE 52 column 0.2M, 0.05M 렉틴 시료를 생리 식염수 투석, Millipore membrane (0.45 μm) 통과, adjuvant mixing 등의 과정을 거친 다음, Howard와 Shannon[23]의 방법에 따라 체중 2~2.5 Kg 정도의 건강한 집토끼에 면역시킨뒤, Chung 등[13]의 방법으로 분리했다. Immunoassay로서 immunodiffusion과 immunoelectrophoresis는 Ouchterlony와 Nilsson[24]의 방법에 따라 수행하였다.

림프구 세포 분열 효과

Mitogenic activity는 Peacock and Tomar[25]의 방법을 응용하여 수행하였다. 렉틴 시료는 생리식염수에 충분히 투석시킨 후, Millipore membrane(0.22 μm)을 통과시켜 불순물을 제거 했고, murine splenic 림프구는 Wysocki와 Sato,[26] Mishell[27]의 방법으로 분리 세척한 다음 2×10^6 cells/ml로 조제하였으며, human 림프구는 Callard,[28] Ly and Mishell[29] 등의 방법으로 분리 세척하여 0.4% Trypan blue로 viability test를 한 후, 1.2×10^6 cells/ml로 조제하고, medium은 25 mM HEPES, 100 μg/ml streptomycin과 100 IU/ml penicillin을 함유한 RPMI 1640(pH 8.0)으로 하였다.

림프구 배양은 flat bottomed microtiter plate (Nunc. Co.)에서 triplicate로 실시하였다. 즉 lectin 용액 100 μl을 넣고 동량의 medium으로 2배수 희석시킨다음, 동량의 림프구 및 20% fetal bovine serum을 각 well에 넣었다. 이를 CO_2-incubator (5% CO_2/95% Air)에서 37℃로 48시간 배양시킨 후, 1 μCi의 thymidine-methyl-^{3}H를 각 well에 넣고 18시간 더 배양시켜 림프구를 회수하여 DNA와 incorporation된 radioisotope의 양을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

렉틴의 분리, 정제－전보[18]의 방법에 따라 LCC-I을, 그리고 전보[18]에 언급한 DEAE Cellulse 52 column의

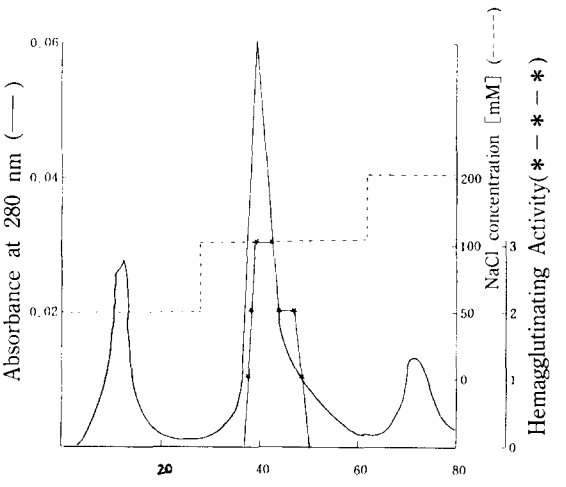


Fig. 1－Elution profiles of 0.05M fraction from DE 52 anion exchange column on CM 52 cation exchange column. column; 1.8×20 cm : flow rate; 15 ml/hr.

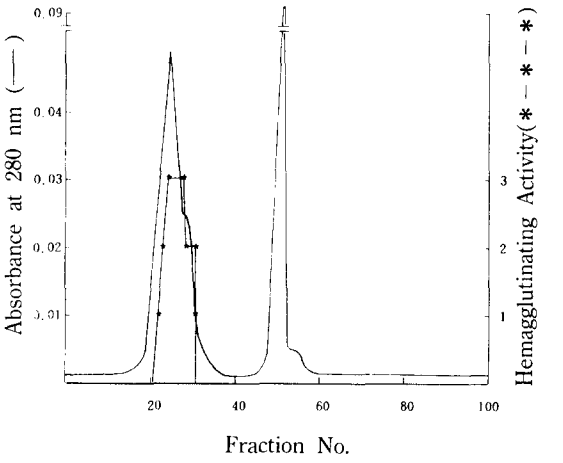


Fig. 2－Elution profiles of 0.1M fraction from CM 52 cation exchange column on SephadekG-75 column. column; 1.5×100 cm : flow rate; 6 ml/hr.

0.05 M 분획을 CM-Cellulose 52와 Sephadex G-75를 반복 통과시켜 정제한 결과는 Fig 1, Fig. 2와 같았고 이를 LCC-II라 하였다.

렉틴의 정제도, 회수율 및 순도검정－본 연구실에서 이미 발표한 방법[18]을 수정한 Scheme에 따라 LCC-I, LCC-II 렉틴을 분리 정제하여 그 활성과 순도를

Table I—Purification of LCC-II lectin from the whole body of shellfish[a]

Purification step	Total Protein [mg]	Total units[b] [$\times 10^{-3}$]	Specific activity[c] [units/mg]	Purification [fold]	Recovery [%]
Crude LCC Extract	30162.2	1280.0	42.4	1.0	100.0
LCC 060	3209.0	809.0	252.1	6.0	63.0
Sephadex G-75	3113.3	798.3	256.3	6.0	62.3
DEAE-Cellulose 52 (0.05M)	104.2	346.1	3321.5	78.3	27.0
CM-Cellulose 52 (0.1M)	1.6	54.1	32011.8	755.0	4.2
Sephadex G-75	1.0	42.7	42321.5	988.1	3.3

[a]LCC 500g. [b]a unit of hemaggluting activity is defined as the reciprocal of the dilution endpoint. [c]Sepecific activity corresponds to the value of the unit divided by the amount of protein used in the assay.

확인한 바 LCC-I은 이미 발표한 것과 일치하는 결과이었다.

Crude extract를 기준으로 LCC-II 렉틴의 정제도와 회수율을 비교검토한 바, Table I과 같은 결과로 나타났다. 이는 crude extract에 비해 998.1배 정제되었고 3.3% 회수되었다. 또한 정제 단계에서 얻은 LCC-II 렉틴의 각 분획을 PAGE한 결과는 Fig. 3과 같았다.

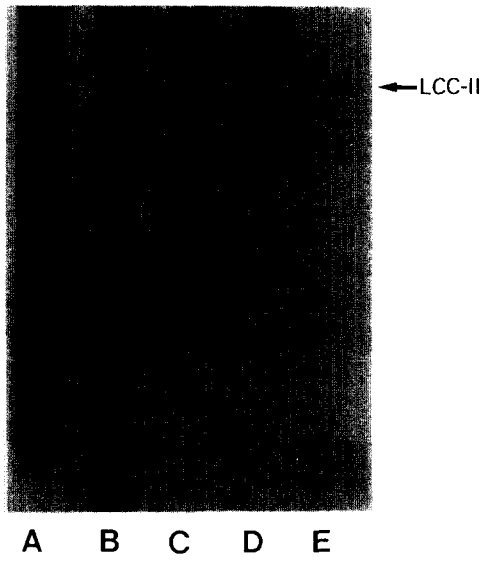


Fig. 3—Polyacrylamide disc gel electrophoresis patterns of LCC-II lectin. Electrophoresis was carried out in 7.5% polyacrylamide disc gel at pH 8.3.
Lane A : LCC 060, B : Sephadex G-75, C : DE 52 0.05M, D : CM 52 0.1M, E : Sephadex G-75 Proteins were stained with 0.1% Coomassie brilliant bule R-250.

SDS-PAGE에 의한 분자량 측정—LCC-I lectin은 이미 발표한 것[18]과 일치하였고 LCC-II 렉틴의 분자량을 측정한 SDS-PAGE는 Fig. 4와 같이 70,000 정도임을 추정 할 수 있었다.

Gel filtration에 의한 분자량 측정—LCC 렉틴의 분자량을 측정하기 위하여 Sephadex G-75 column을 이용하여 gel filtration한 결과를 standard protein으로 얻은 calibration plot으로부터 분자량을 측정 하였을때 LCC-I lectin은 60,000, LCC-II lectin은 66,000 정도인 것으로 추정되었다.

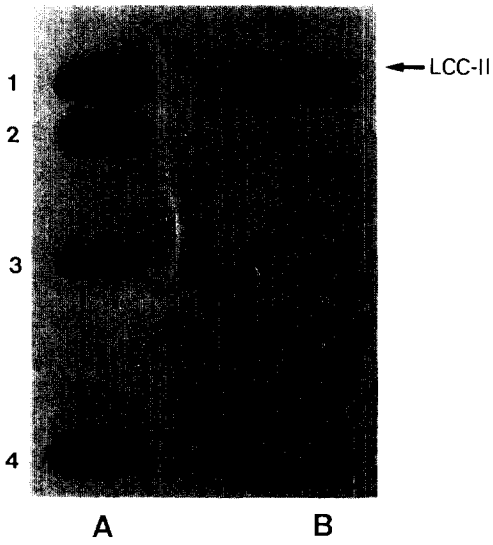


Fig. 4—SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of the LCC-II lectin.
Lane A, Low M. W. Kit; Lane B, LCC-II lectin 1. Bovine serum albumin (68 K); 2. Ovalbumin (45K); 3. Chymotrypsinogen A (25K); 4. Cytochrome C (12.4K).

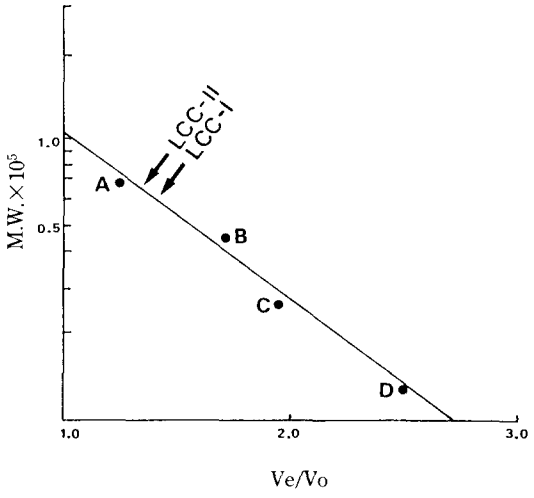


Fig. 5—Determination of the molecular weight of LCC-I and II by gel filtration on Sephadex G-75. Vo, void volume; Ve, elution volume. A, Bovine serum albumin (68K); B, ovalbumin (45 K); C, Chymotrypsinogen A(25K); D, Cytochrome C(12.4 K).

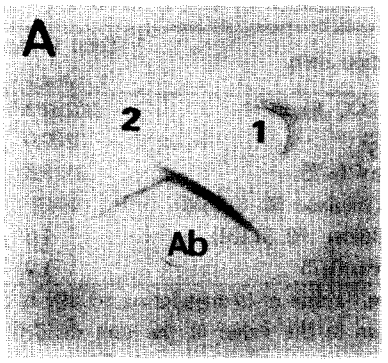


Fig. 6—Double immunodiffusion of LCC lectins in agarose.
Ab, LCC DE 52 0.2M antisera+LCC DE 52 0.05 M antisera(1 : 1); 1, LCC-I; 2, LCC-II. Diffusion was carried out at room temperature for 24h and precipitin bands were stained with 0.5% Coomassie brilliant blue R-250.

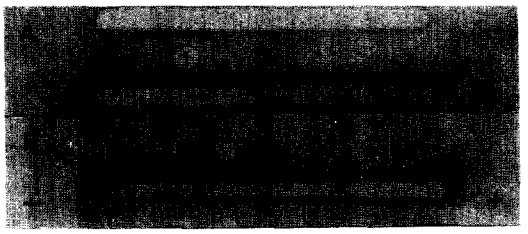


Fig. 7—Immunoelectrophoresis of LCC lectins.
A, LCC DE 52 0.2M antisera; B, LCC DE 52 0.05M antisera; 1, LCC-I; 2, LCC-II. Electrophoresis was carried out at 10V/cm for 90 min and diffusion was performed for 15h.

면역화학적 특성—LCC 렉틴(500 μg/ml)을 각각 집토끼의 lymph node에 근육 주사하여 얻은 antisera를 이용하여 LCC-I과 II의 구조 내지 기능상의 상관성을 알아보기 위해 면역확산을 시행한 결과는 Fig. 6과 같았다. 1번 well에는 LCC-I 렉틴 용액을, 2번 well에는 LCC-II 렉틴 용액을 넣고 Ab well에는 DE 52 0.05M과 0.2M 렉틴으로 유도시켜 얻은 antisera를 동량 혼합하여 넣고 diffusion 시켰다. 이때 LCC-I과 LCC-II에 의해 형성된 침전 band가 하나의 돌출부만을 형성하는 것으로 보아 LCC-I과 LCC-II 렉틴은 부분적으로 유사한 것으로 판명되었다. 또한, 이들의 순도를 알아보고자 immunoelectrophoresis를 실시하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 이 결과 2종 lectins의 mobility는 서로 비슷하였으나 각각 하나의 침전 band만을 형성하는 것으로 보아 순수하게 정제되었음을 확인 할 수 있었다.

림프구 세포 분열 효과—렉틴의 몇가지 생리활성중 가장 흥미 있는 림프구 자극분열효과를 알아보기 위해 LCC-I, II 렉틴을 이미 잘 알려진 다른 렉틴 즉 Con A, PHA와 함께 비교 연구하였다.

Murine splenic 림프구에 대한 LCC-I, II 렉틴의 mitogenic activity는 Fig. 8과 같았다. LCC-I 렉틴은 31.25 μg/ml의 농도에서, LCC-II 렉틴은 3.91 μg/ml의 농도에서 최대의 mitogenic activity가 나타났다. 이는 비교 시료로 사용한 대표적인 mitogenic 렉틴인 Con A와 PHA의 최대의 mitogenic activity가 나타난 농도인 31.25 μg/ml과 비교해 보면 LCC-I은 같은 정도의 농도에서, LCC-II는 훨씬 낮은 농도에서 최대 mitogenic activity가 확인 되었으며, 증식 정도는 LCC렉틴이 다소 낮았다. 사람의 림프구에 대한 LCC-I, II lectin의 mitogenic activity는 Fig. 9와 같았는바, 비교시료로 사용한 Con A가 7.81～125 μg/ml 농도에서, PHA가

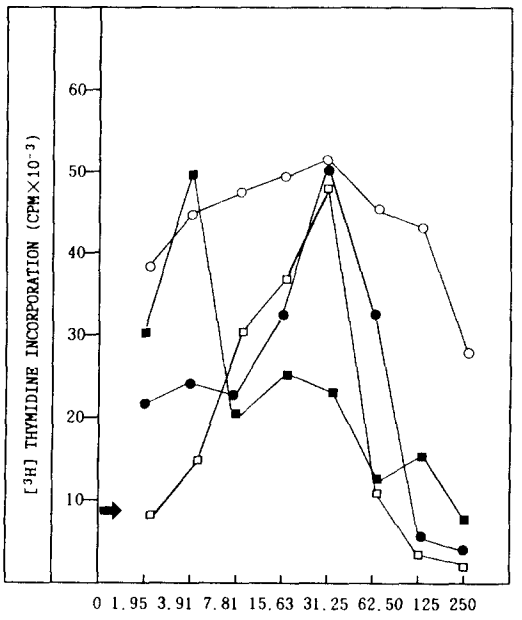


Fig. 8—Effect of lectins on mitogenic responses to murine splenic lymphocytes.
LCC-I, (●—●—); LCC-II, (■—■—■); Con A, (○—○—○); PHA, (□—□—□); control, (➡)

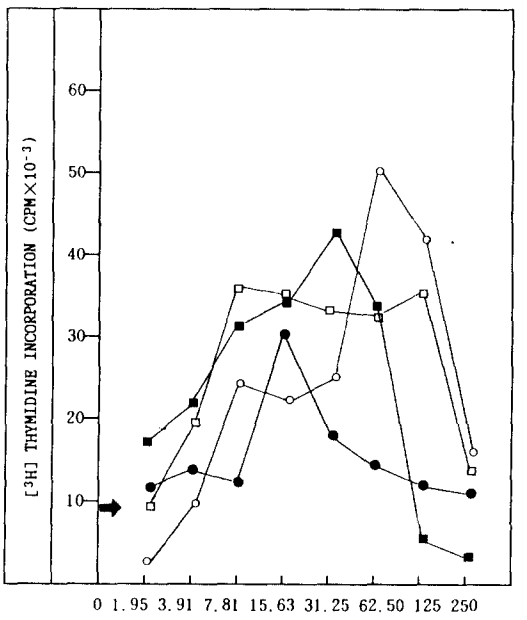


Fig. 9—Effect of lectins on mitogenic responses to human peripheral lymphocytes.
LCC-I, (●—●—); LCC-II, (■—■—■); Con A, (○—○—○); PHA, (□—□—□); control, (➡)

62.5 μg/ml에서 최대 활성을 나타내는데 비하여 LCC-I은 15.63 μg/ml, LCC-II 렉틴은 31.25 μg/ml에서 최대 mitogenic activity가 확인되었으며, 증식정도는 LCC-I은 PHA와 비슷한 정도로, LCC-II는 Con A와 비슷한 정도의 mitogen임이 밝혀졌다. 그러나 LCC-I은 증식정도가 미약한 점에서 그 효과가 재고 되어야 하겠다.

동물렉틴 중 mitogenic activity를 갖는것으로는 *Limulus polyphemus*에서 분리 된 limulin III가 10~30 μg/ml에서 림프구를 자극 분열시킬 수 있었으며, lobster, *Homarus americanus*의 hemolymph에서 분리된 LAg1, LAg2는 LAg1만이 드물게 볼 수 있는 B cell mitogen임이 밝혀졌다.[30]

또한 mitogenic activity를 나타내는 데는 valence와 site가 중요한 인자이며, 그예로 lima bean에는 mitogenic 렉틴과 non-mitogenic lectin이 공존하는바 2가의 valence를 갖는 tetramer 형태의 LBL_4는 non mitogenic이나, 4가의 valence를 갖고 있는 octamer인 LBL_8은 사람과 소의 림프구에 강력한 mitogenic activity를 나타내는 것을 들 수 있다.[31]

Fig. 8, Fig. 9에 나타난 결과를 Con A, PHA 렉틴과 비교 종합해 보면, murine splenic lymphocyte에서는 LCC-I, LCC-II렉틴 모두 강력한 효과를 나타냈고, human peripheral lymphocyte에 대해서는 LCC-II가 LCC-I보다 훨씬 강력한 효과를 나타냈으며, 비교 시료로 사용한 PHA나 Con A와 같은 정도에서 최대 효과를 나타내어 이들 LCC-I과 LCC-II 렉틴의 면역기능 조정제로서의 개발 가능성이 높음을 알 수 있다. 눈알고둥의 생체 조직내에, murine splenic 림프구와 human peripheral 림프구 모두에 대해 강력한 mitogen인 LCC-II가 존재하는 사실은 흥미가 있으며 앞으로 더 나아가 T-cell과 B-cell을 분리하여 mitogenic activity를 조사, 연구하고 다른 여러가지 물리화학적

성상과 면역기능 발현효과와 기전 등 더 많은 연구가 추진되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

눈알고둥(*Lunella coronata coreensis*)으로부터 렉틴을 분리 정제하고 이에 대한 몇가지 특성을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 눈알고둥 조직으로부터 2종의 렉틴, LCC-I, LCC-II를 분리 정제하였으며 LCC-II는 crude extract에 비해 998.1배 정제되었고 3.3% 회수되었다.

2. PAGE 상에서 LCC-I, LCC-II 렉틴은 각각 1개의 band가 나타났기 때문에 순수하게 정제된 것임을 알 수 있었다.

3. SDS-PAGE와 Gel filtration에 의한 분자량 측정에서 LCC-I은 그 분자량이 약 60,000, LCC-II는 약 66,000~70,000 정도로 나타났다.

4. 림프구 세포분열 효과는 murine splenic 림프구에 대해서 LCC-I은 31.25 μg/m*l*, LCC-II는 3.91 μg/m*l*의 농도에서 최대효과를 나타내는 mitogen이었다.

5. Human peripheral 림프구에 대한 세포분열 효과는 LCC-I이 15.63 μg/m*l*, LCC-II가 31.25 μg/m*l*에서 최대효과를 나타내는 mitogen으로 밝혀졌다.

문 헌

1) Campbell, P. Hartman, A. L. and Abel, C. A. Stimulation of B cell but not T cell or thymocytes, by a sialic acid-specific lectin. *Immunology* **45**, 155-162 (1982).

2) Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J. Properties, function and application in biology and medicine. *in* The Lectin: Academic Press, New York, pp. 1-600 (1986).

3) Robb, R. J. Interleukin 2: The molecule and its function. *Immunol. Today* **5**, 203-209 (1984).

4) Blakey, D. C., Wawrzynezak, E. J., Wallace, P. M. and Trope, P. E. Antibody toxin conjugates: A perspective. *in* Monoclonal Antibody Therapy. Progress in Allergy. Waldmann, H. (eds), Basel Publications, **45**, 50-90 (1988).

5) Vitetta, E. S., Krolick, K. A., Miyama-Inaha, M., Cushley, W. and Uhr, J. W. Immunotoxin: A new approch to cancer therapy. *Science* **219**, 644-649 (1983).

6) Olsnes, S., Refsnes, K. and Pihl, A. Mechanism of action of the toxic lectin abrin and ricin. *Nature* **249**, 627-631 (1974).

7) Yamazaki, M., Ikenami, M., Komano, H., Tsunawaki, S. Kamiya, H., Natori, S. and Mizuno, D. Polymorphonuclear leukocyte-mediated cytolysis induced by animal lectin. *Gann.* **74**, 576-583. (1983).

8) Nakajima, H., Kamano, H., Esumi-Kurisu, M, Abe, S., Yamazaki, M., Natori, S. and Mizuno, D. Induction of macrophage-mediated tumor lysis by an animal lectin, *Sacophaga peregrina agglutinin. Gan* **73**, 627-632 (1982).

9) Cuatrecasas, P. Interaction of Concanavalin A and wheat germ agglutinin with the insulin receptor of fat cells and liver. *J. Biol Chem.* **248**, 3528-3531 (1973).

10) Czech, M. P., Lawrence, J. C. and Lynn, W. S. Activation of hexose transport by Concanavalin A in isolated brown fat cells. *J. Biol Chem.* **249**, 7499-7505 (1974).

11) Shechter, Y. and Sela, B. A. Insulin-Like effects for wax bean agglutinin in rat adipocytes. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **98**, 367-373 (1981).

12) Nowell, P. C. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in culture of normal human leukocytes. *Cancer Res.* **20**, 462-468 (1960).

13) Chung, S. R., Kim, J. H. and Jeune-Chung, K. H. Studies on lectins from marine shells(II): Isolation, purification and characterization of lectin from shellfish, *Neptunea intersculpta. Korean Biochem J.* **18**, 429-435 (1985).

14) Chung, S. R. Kim, J. H., Suh, Y. A. and Jeune-Chung, K. H. Studies on lectins from marine shells (III): Screening of lectin-like agglutinins from marine shells. *Arch Pharm Res.* **9**, 201-203 (1986).

15) Chung, S. R., Kim, J. H. and Jeune-Chung, K. H. Studies on lectin from marine shells (V): Isolation and purification of lectin from *Tepes Philippinarum. Yakhak Hoeji* **31**, 52-59 (1987).

16) Chung, S. R., Son, K. S., So, M. S. and Jeune-

Chung, K. H. Lectin from marine shells (VII): Partial purification and characterization of new lectin from a top shell, *Chlorostoma argyrostoma lischkei Korean Biochem J.* **20**, 247-252 (1987).

17) Jeune, K. H., Suk, Y. A., So, M. S. and Chung, S. R. Lymphocytes Mitogenic and Immunochemical Properties of the Lectins from *Neptunea intersculpta. Korean Biochem J.* **24**, 240-245 (1991).

18) So, M. S., Suh, Y. H. Jeune, K. H. and Chung, S. R. Purification and Characterization of A New Lectins from Marine Animal *Lunella coronata coreensis. Yakhak Hoeji.* **36**, 241-249 (1992).

19) Davis, B. J. Disc elctrophoresis II. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427 (1964).

20) Laemmli, G. U. K. and King, J. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4, *J. Mol. Biol.* **62**, 465-477 (1971).

21) Andrews, P. Estimation of the molecular weight of protein by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* **91**, 222-233. (1964).

22) Locascio, G., Tigier, H. A. and Battle, A. M. Del C. Estimation of molecular weight of proteins by agarose gel filtration. *J. Chromatog.* **40**, 453-457 (1969).

23) Howard, J. and Shannon, L. M. A rapid quantitative and highly specific assay for carbohydrate-binding proteins. *Anal. Biochem.* **79**, 234-239 (1977).

24) Ouchterlony, O. and Nilsson, L. A. Immunodiffusion and immuno-electrophoresis. *in Handbook of Experimental Immunology*. Weil, D. M. (eds), Blackwell Scientific Publications 19-1-19-39. (1973).

25) Peacock, J. E. and Tomar, R. H. Manual of Laboratory Immunology. Peacock and Tomar (eds), Lea and Febiger Publication, Philadelphia, 1-228 (1980).

26) Wysocki, L. J. and Sato, V. L. "panning" for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* **75**, 2844-2848 (1978).

27) Mishell, B. B., Shiigi, S. M., Henry, C., Chan, E. L., North, J., Gallily, R., Slomich, M., MIller, K., Marbrook, J., Parks, D. and Good, A. H. Preparation of mouse cell suspensions in selected methods. *in* Cellular Immunology., Mishell and Shiigi (eds), Freeman Co., San Francisco, 3-27 (1980).

28) Callard, R. E., Shields, J. C. and Smith, S. H. Assay for human B cell growth and differentiation factors. *in* Lymphokines and Interferons, Clemens, Morris and Gearing (eds), IRL Press, Oxford, 345-354 (1987).

29) Ly, I. A. and mishell, R. J. Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G-10, *J. Immunol. Methods* **5**, 239-247 (1974).

30) Suh, Y. A., Purification and Biophysicochemical Characterization of New Lectin from Marine Shells *Neptunea intersculpta. in* Ph. D Thesis, Yeungnam University, 1-70 (1987).

31) Pandolfino, E. R., Namen, A. E., Munske, G. R. and Magnuson, J. A.: A comparison of the cell-binding characteristics of the mitogenic and nonmitogenic lectins from lima beans, *J. Biol. Chem.* **258**, 9203-9207 (1983).