

## 잣버섯 균사체로부터 분리한 단백다당체의 암종에따른 선별적 항암작용

진미림\*\* · 정규선\* · 김병각

숙명여자대학교 약학연구소\* 서울대학교 약학대학

(Received June 25, 1998)

### Differential Antitumor Activities of the Proteoglycans from the Mycelium of *Lentinus Lepideus*

Mirim Jin\*\* Kyu Sun Jung\* and Byong Kak Kim

Research Institute of Pharmaceutical Sciences\*, Sookmyung Women's University Seoul, 140-742,  
Seoul College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract**—Many antitumor and immune modulating components have been isolated from fungal extracts. In this study, the authors isolated the proteoglycans from cultured mycelia of *Lentinus lepidus*, including especially the acidic polysaccharide fraction, named lepidan. It was obtained by extraction with hot water followed by purification using DEAE cellulose anion exchange. To elucidate antitumor effects against different type of tumor, the proteoglycans were tested on sarcoma 180, C3H MCA clone 16 and P388 leukemia *in vivo*. Lepidan showed 58.3% of tumor inhibition against solid form of sarcoma 180 and 58.6% against MCA clone 16, but lepidan did not affect life span of mice against P388 leukemia. Also when Lepidan was applied to MIT assay, it did not show any direct cytotoxicity against various tumor cells *in vitro*.

**Keywords** □ *Lentinus lepidus*, proteoglycan, lepidan, antitumor activity.

미생물에서 유래하는 생체반응 조절물질중에서도 특히 진균류에 속하는 담자균류에서 분리한 단백다당체 또는 다당체가 생체 면역 기능을 증강시키거나 억제된 면역 기능을 정상으로 회복시켜 줌으로써 항암효과를 발휘한다는 것은 그간의 연구 결과에 의해 밝혀지고 있다.<sup>1)</sup> 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 1960년 Roland 등이 *Calvatia gigantea*로부터 calvacin을 분리함으로써 시작되어, Chihara<sup>2)</sup> 등이 표고버섯인 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 분리한 다당체로서 마우스 육종 180 세포에 강력한 종양 억제 효과가 있는 lentinan을 보고하였으며, Fujii 등은 표고버섯 배양 균사체로부터 단백질이 결합된 다당체 KS-2를 분리한 후 인터페론 유발 작용이 있음을 발표하였다.<sup>3)</sup> Zakany는

여러가지 allogenic 및 syngenic tumor system에서의 KS-2의 항암효과를 발표하였고<sup>4)</sup> Judith 등은 이들의 항암작용이 숙주의 면역 활성 증가에 의한 것임을 발표하였다.<sup>5)</sup> 일본에서 항암제로 시판되고 있는 단백다당체인 PS-K는 구름버섯인 *Coriolus versicolor*의 배양 균사로부터 분리한 분자량 약 10만의  $\beta$ -1, 4;  $\beta$ -1, 3;  $\beta$ -1, 6 glucan 및 18~38%의 단백질을 함유하고 있는 성분으로서 PS-K가 화학요법제 및 방사선요법과의 병용 효과시 우수한 생체 조절 작용을 나타낸다고 보고하였으며<sup>6)</sup> Yoshikumi 등은 PS-K가 종양으로 인해 저하된 숙주의 면역 활성을 회복시켜 다른 항암요법제의 효과를 증강시킨다는 연구 결과를 발표하였다.<sup>7)</sup> 한편 Ito 등 및 Ohno 등은 육종 180의 Shionogi carcinoma, Fibrosarcoma 등 다양한 종양에 대하여도 항암효과를 나타냄을 주장하였다.<sup>8-9)</sup> Nomoto 등 및 Ebina 등은 담압 상태에서 감소된 숙주의 면역 활성을 증강시키는 작

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-710-9728 (팩스) 02-715-9498

용 기전을 밝혔다.<sup>10-11)</sup>

한편 한국의 담자균류에 대한 연구는 Kim 등이 영지버섯, 구름버섯, 표고버섯 및 느타리버섯의 자실체로부터 마우스의 육종180에 대해 강력한 항암작용을 나타내는 다당류와 단백질로 구성된 고분자 추출물을 보고한<sup>12-13)</sup> 이후로 메꽃버섯, 노랑다발버섯, 덕다리버섯, 애기줄가버섯, 뽕나무버섯 및 노랑치마아재비버섯 등의 자실체 또는 배양 균사체로부터 마우스 육종180에 대해 항암 작용을 가진 단백다당체를 분리하여 보고하였다.<sup>14-17)</sup> 암극복을 위하여 현재 사용되고 있는 방법은 외과적 수술, 방사능 요법, 항암성 화학요법제 및 항생물질 투여법이다. 그러나 화학요법제는 암환자와 그의 정상 세포에 대한 독성, 암세포의 내성획득, 인체내에서의 신속한 분해와 배설등의 결점을 지니고 있을 뿐 아니라 숙주의 방어력에 중요한 역할을 담당하는 임파구 및 골수 세포등을 파괴한다는 결점이 잘 알려져 있다. 그러므로 정상 세포에는 독성을 나타내지 않고 면역체계를 활성화 시키므로서 암을 치료하려는 노력이 다각도에서 이루어 지고 있으며 이를 약제로서 개발하는것은 암치료 분야에 있어서 중요한 연구 목표가 되고 있다. 담자균류에서 분리한 단백다당체 성분이 숙주에 대하여 독작용을 나타내지 않으면서 종양 억제 작용을 나타냄이 보고되고 있고,<sup>18)</sup> 최근에는 그러한 항암력이 자연면역과 특이적면역에서의 증강 효과 생체내의 사이토카인의 조절등의 다양한 효과에 의한다는 것이 발표되고 있다.<sup>19-21)</sup> 잣버섯은 고목 생나무에 단생 또는 속생하는 목재 갈색 부후균이며 전세계에 분포한다. 본 연구실에서는 잣버섯 배양 균사체로부터 B 세포의 증식을 촉진하는 단백다당체를 분리하였으며 면역작용을 조절하는 중요한 전사조절인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화함으로써 그 작용을 나타낸다는 것을 보고하였다.<sup>22)</sup> 본 연구에서는 잣버섯 균사체로부터 독성이 없으면서 우수한 종양 억제 능력을 발휘하는 면역 조절 물질의 암에 따른 항암작용을 규명하려하였다.

**실험방법**

**균사체의 배양 방법**

한국임업 시험장으로 부터 제공된 신선한 잣버섯(*Lenzitis lepidouse*) 균사체를 실험에 사용하였다. CCM slant는 glucose 20 g, peptone 4 g, yeast extract 4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, agar 20 g에 증류수를 1 L를 가해 121°C, 1.1 kg/cm<sup>2</sup>에

서 15분간 고압증기멸균하여 사용하였으며, 액내 배양용 배지는 glucose 20 g, peptone 4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g 을 증류수 1 L를 가해 pH 를 5.6~5.8로 맞춘 후, 121°C, 1.1 kg/cm<sup>2</sup>에서 15분간 고압증기 멸균하여 사용하였다.

1차 예비배양은 용합체의 균사를 CCM slant에 각각 이식하여, 28±1°C에서 7일간 배양한 후, 그 균사를 무균적으로 200 ml의 액내배지에서 균질화 하고 28±1°C에서 45×g로 10 일간 진탕배양하였고, 2차 예비배양은 1차 예비배양에서 얻은 균사를 균질화한 후, 각각 1 L 배지에 접종하고 1 차 예비배양과 동일 조건으로 배양 균사가 성숙할 때까지 10일간 진탕배양하였으며, 본 배양은 2차 예비배양에서 얻은 균사를 균질화하여 1 L 배지에서 20%(v/v) 로 접종하여 위의 조건으로 10 일간 진탕배양하여 균사배양액을 얻었다.

**단백다당체의 추출, 분리 및 정제**

본 배양 후 각 배양액을 감압 여과하여 배양 균사를 얻고 증류수로 세척하고 증류수와 함께 균질화한 후, 80~90°C의 mantle에서 6시간 동안 3회 열수 추출 하였다. 감압여과하고 그 추출액을 감압 농축한 다음 95% cold ethanol을 3배 용량 가하여 4°C에서 24 시간 방치하여 침전을 완결시켰다. 침전물을 증류수에 용해시켜 cellulose dialysis tube(Sigma Chemical Co., U. S. A.)에 넣어 4°C에서 7 일간 투석한 후 원심 분리하여 상정액을 감압농축하고 동결 건조하여 수용성의 갈색 건조 분말(Fr. CR)을 얻었다. 한편 불용성 추출 잔사는 20~30°C에서 10시간 동안 5% NaOH 용액에서 3회 알카리 추출하여 감압 여과한 다음 여액을 1 N CH<sub>3</sub>COOH 용액으로 중화시키고 감압농축한 후 상기와 동일한 방법을 실시하여 불용성의 짙은 갈색 건조 분말(이후 Fr. CA이라 칭함)을 얻었다. 상기에서 분리한 Fr. CR을 탈이온수(deionized distilled water, DDW)에 용해시킨 후 원심분리하여 얻은 상정액을 DEAE-cellulose resin(Cl-form, Sigma Chemical Co., U. S. A.)으로 충전 시킨 coulumn(3.2 cmo×60 cm, Bio-Rad Co., U. S. A.)에 적용하여 다당체와 단백질을 확인하고 anthrone 양성 반응 분획 들을 모아 감압 농축 후 투석하고 동결 건조시켜 미백색의 건조 분말(Fr. IN 이라 칭함)을 얻었다. DEAE-cellulose 이온 교환 수지에 흡착된 성분은 2 M NaCl 용액으로 용출시킨 후 anthrone 양성 반응 분획들을 모아 감압 농

죽 후 투석하고 동결 건조 시켜 갈색 건조 분말(이후 Fr. IA : lepidan 이라 칭함)을 얻었다.

**단백다당체의 항암실험**

**실험 동물** - 4~5 주령의 ICR 생쥐(♂, 20~25 g)와 C<sub>3</sub>H (♂, 20~25 g)는 서울대학교 실험 동물 사육장에서 공급받아 사용하였으며 CDF<sub>1</sub> 생쥐는 생명공학연구소로부터 제공받은 DBA<sub>2</sub> 생쥐와 Balb/c(♀, 서울대학교 사육장) 생쥐를 교배하여 얻었다. 사육장은 인공 조명에 의하여 조명시간을 오전 7시 부터 오후 7시 까지로 하였으며 실내온도는 18~23°C로 유지하였다. 사료는 고행사료(삼양사)를 사용하였고 그 조성은 조 단백질 21%, 조 지방 3.5%, 조 셀룰로오즈 5.0%, 무기질 8.0% 등 이었다. 급수는 수도물을 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다.

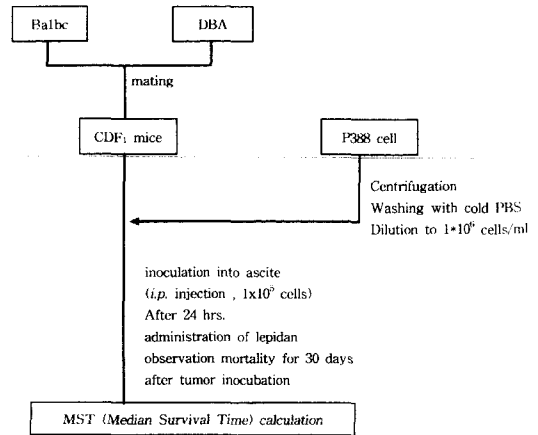
**암 세포 이식 및 시료투여** - 생쥐 Sarcoma 180 세포(이후 S 180 세포라 칭함)는 본 연구실에서 ICR 생쥐의 복강내에서 7일 간격으로 계대배양 한것을 복수와 함께 취하여 빙냉 phosphate buffered saline(pH 7.2, 이후 PBS라 칭함) 용액으로 세척한 후 약 5×10<sup>6</sup> cells/ml이 되도록 부유 시켜 0.1 ml씩(5×10<sup>5</sup> cells/생쥐)을 건강한 정상 ICR 생쥐의 왼쪽 서혜부에 피하 이식하여 고행암을 유발시켰다.

생쥐 MCA Clone 16 세포(이후 MCA 세포라 칭함)는 ATCC(American Type Cell culture Collection)로 부터 구입하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양 한것을 PBS용액으로 3회 세척한 후 약 5×10<sup>6</sup> cells/ml 이 되도록 부유 시켜 0.1 ml씩(5×10<sup>5</sup> cells/생쥐)을 건강한 정상 C3H 생쥐의 오른쪽 복부 피하에 이식하여 고행암을 유발시켰다.

생쥐 P388 leukemia 세포는 동아제약 연구소로부터 제공받아 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한것을 PBS 용액으로 3회 세척한 후 약 2×10<sup>6</sup> cells/ml이 되도록 부유 시켜 0.1 ml씩(1×10<sup>5</sup> cells/생쥐)을 건강한 CDF<sub>1</sub> 생쥐의 복강에 이식하여 복수암을 유발시켰다(Scheme 1).

암 세포를 이식한 다음 날부터 생리 식염수에 용해시킨 시료를 일정량(20 mg/kg/day, 또는 50 mg/kg/day)씩 매일 1회 10일간 복강내에 0.1 ml씩 투여하였다. 대조군에는 생리식염수를, 양성대조군에는 Kres-tin 20 mg/kg/day을 0.1 ml씩 투여하였으며 모든 투여시료는 100°C에서 30분간 끓여서 사용하였다.

**결과 판정** - 고행암의 경우에 50% 종양 저지량 결정



**Scheme 1**— Procedure for antitumor test *in vivo* effects on P388 leukemia.

은 각 시료에 대하여 2가지 이상의 투여량으로 실시한 고행암 실험 결과로부터 횡축은 dose, 종축은 종양저지율로 하여 얻은 직선식에서 암대조군의 50% 종양 저지율을 나타내는 투여량을 50% 종양 저지량(inhibition dose of 50%, ID<sub>50</sub>)으로 결정하였다. 종양 저지 백분율 결정은 암세포를 이식한지 30일째 되는 날 실험동물을 처사 시키고 유발된 고행암을 적출한 후 그 중량을 측정하여 평균 종양 중량을 얻고 다음 식에 따라 종양저지 백분율(percent of inhibition ratio, I. R.%)을 계산하였다.

$$I.R. (%) = \frac{Cw - Tw}{Cw}$$

Cw : 대조군의 평균 종양 중량

Tw : 시료 투여군의 평균 종양 중량

종양 부피 측정은 시료 투여후 시간에 따른 고행암의 성장 저지 정도를 알아보기 위해 암 이식 후 10, 20, 25, 30 및 35일째에 종양의 크기를 측정하여 다음식에 따라 종양 부피를 계산하였다.

$$Tumor\ volumn\ (cm^3) = \frac{ab^2}{2}$$

a : 종양의 장반경(cm)

b : 종양의 단반경(cm)

복수암의 경우는 암 세포 이식 후 대조군과 시료투여군의 생존여부를 관찰하여 평균 생존일(mean survival time, MST)과 평균 생존 백분율(T/C, %)을 다음 식에 따라 계산하였다.

$$TC (\%) = \frac{TMST}{CMST} \times 100$$

CMST : 대조군의 평균 생존일

TMST : 시료 투여군의 평균 생존일

**암 세포에 대한 직접적 작용**

단백 다당체가 암세포에 대한 직접 독성을 나타내는가를 알아보기 위하여 Mosmann 등의<sup>23)</sup> 방법을 개량한 Charnichael 등의<sup>24)</sup> 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 마우스 Lewis lung carcinoma(이후 LLC라 칭함) 세포는 동아제약 연구소로부터 제공받았다. S 180, LLC, P388, MCA 암세포 1×10<sup>5</sup> cells/ml를 96-well microplate(Falcon Labware Co., U. S. A.)에 well당 100 μl씩 분주한 후 lepidan을 50, 200 및 500 μl의 농도로 가하여 최종 부피가 200 μl가 되도록 하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양한 다음 MTT 시약(5 mg/ml in PBS, Sigma Chemical Co., U. S. A.)을 20 μl씩 가하여 4시간 동안 배양한 후 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 0.3 N HCl을 포함한 isopropanol 150 μl를 각각 well에 가하여 상온에서 10분간 방치한 후 Plate vortexer에서 30분동안 교반시킨 후 automatic ELISA reader (Flow Laboratories Co., U. S. A.)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

잣버섯 균사체로부터 면역 조절 작용 및 항암력을 지닌

**Table I**— Effects of antitumor components on sarcoma 180 solid tumor

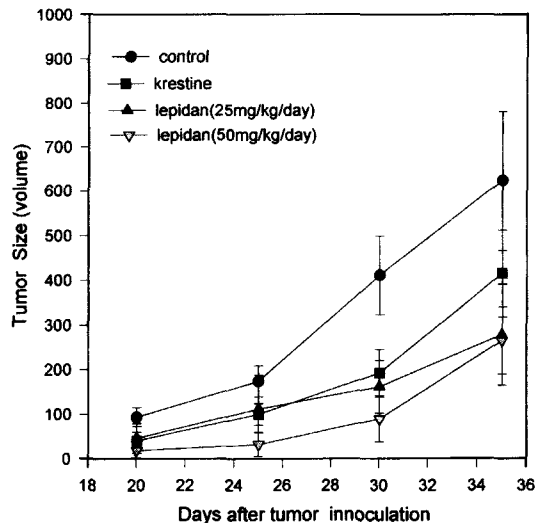
Fraction	Dose (mg/kg/day)	Tumor weight (g. Mean ± S.E.)	Inhibition ratio (%)	Complete regression (no. of mice)
Control		5.80±1.35		
Krestin	20	2.77±1.67	35.0	0/10
CR	20	2.85±0.97	50.0	0/10
	50	4.50±1.95	22.4	0/10
CN	20	1.64±0.42	71.0	2/10
	50	3.00±1.09	48.0	0/10
IN	20	2.48±1.17	57.2	0/10
IA	20	2.42±1.71	58.3	0/10
	50	3.19±2.28	45.0	0/10

Duncan's test on all the data showed p<0.05

유효성분을 얻기위해 배양, 추출 및 정제 과정을 통하여 산성 단백다당체 성분인 lepidan을 분리하였으며 마우스 sarcoma 180 고형암에 대하여 항암 실험을 실시한 결과 양호한 항암 효과를 나타내었다. 정제한 각 분획들을 마우스 sarcoma 180고형암에 대해 항암실험을 시행한 결과 Fr. IA 20 mg/kg/day의 투여군이 가장 우수한 종양 억제율 58.3. %를 나타내었고 양성 대조군인 Krestine의 투여군 보다 높은 억제율을 나타내었다. 중성다당체의 항암력도 비슷한 정도를 나타내었으나 수득률이 낮았으므로 산성 다당체 분획을 lepidan이라 명명하고 이후 모든 실험의 시료로 사용하였다(Table I). C 3H MCA clone을 이용하여 항암실험을 실시하였을 때 lepidan은 50 mg/kg/day의 용량에서 58.6% 이상의 항암력을 나타내었으며(Table II) 시간 경과에 따른 고형암의 성장억제 정도를 알아보기 위하여 암 이식 후 10, 20, 25, 30 및 35일에 lepidan투여군의 고형암의 크기를 측정된 결과 암 이식 후 2 주까지는 비교적 비슷하게 성장하였으나 이후부터는 특히 성장이 둔화됨을 알 수 있었다(Fig. 1). 그러나 마우스 P388 백혈암에 대한 lep-

**Table II**— Effects of lepidan on MCA clone 16 solid tumor

Fraction	Dose (mg/kg/day)	Tumor weight (mg. Mean ± S.E.)	Inhibition ratio (%)
Control		787±166	
Krestine	25	397±150	49.5
Lepidan	25	370±144	52.9
	50	326±139	58.6



**Fig. 1**— Effects of lepidan on MCA clone 16 Tumor.

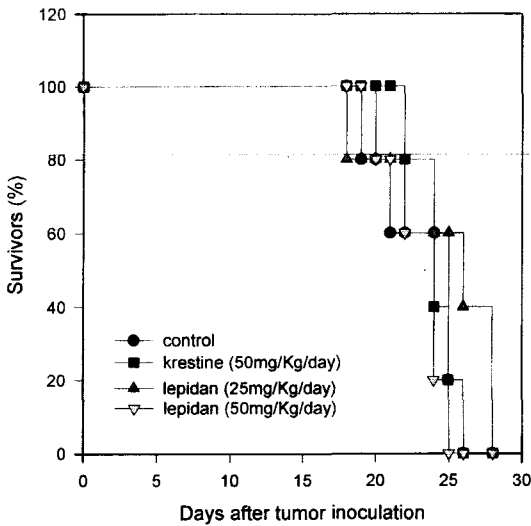


Fig. 2—Effects of lepidan on the life span against the ascitic form of P388 leukemia in CDF<sub>1</sub> mice.

idan의 수명 연장 효과를 관찰하였을때 유의성있는 수명 연장 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 담자군류에서 분리한 다당체가 sarcoma 180등의 allogeneic tumor system에 대하여서는 높은 항암력을 나타낸다는 연구 결과는 이미 많이 보고되어 있다. 한편 암 세포와 숙주간의 조직 적합성 항원(major histocompatibility complex, MHC) 차이로 인하여 allograft rejection이 일어날 가능성을 배제하기 위하여 숙주와 동일한 MHC를 가진 syngenic tumor system을 사용함으로써 항암작용 스펙트럼의 다양화를 시도하였다. 마우스 sarcoma 180 고형암에 양호한 항암효과를 나타낸 lepidan은 C3H MCA clone 16 고형암에 대해서도 암의 성장을 억제하는 효과를 나타내었으나 P388 마우스 백혈암에 대하여서는 수명연장 효과를 나타내지 못했다. 항암물질 선별 실험에서 널리 사용되고 있는 마우스 백혈병 암종인 P388, L1210 및 EL 4 등의 복수형 종양에 대하여 확실하게 항암 효과를 나타내는 담자군류의 다당체는 지금까지 거의 보고되어 있지 않은데, 이는 *in vivo* 실험에서 비교적 느리게 성장하는 육종등에 비하여 빠른 속도로 성장하는 백혈병 암종의 특성으로 인해 숙주의 억제된 면역 활성을 증가하는 것만으로는 유의적으로 암을 억제하지 못하는 것으로 생각되었다. 암의 발생 원인으로 알려져 있는 화학적 발암물질, 바이러스 및 방사선 등은 대부분 숙주의 면역 기능을 억제하며, 암 자체도 면역체계가 인지하지 못할정도의 항원성만을 발현하거나 항원성을 변

Table III—Direct effect of lepidan on viability of tumor cells in *in vitro*

Tumor	Dose (μg/ml)	Average viability of tumor cells (% Mean ± S.E.)
Sarcoma 180	50	98.1 ± 8.5
	200	101.9 ± 9.1
	500	99.0 ± 5.8
	1000	95.3 ± 2.5
P338	50	93.9 ± 6.5
	200	98.4 ± 1.4
	500	94.6 ± 7.8
	1000	95.4 ± 10.2
MCA clone 16	50	100.2 ± 7.3
	200	98.4 ± 9.3
	500	93.9 ± 7.8
	1000	95.4 ± 1.2
LLC	50	143.4 ± 16.4
	200	112.2 ± 12.3
	500	124.4 ± 10.9
	1000	108.6 ± 10.2

형하는등의 기전을 통해 숙주의 면역 감시망을 피하여 성장하게된다. 따라서 암치료 및 예방을 위한 면역학적 방법은 암 세포의 항원성 및 숙주의 면역 기능을 증강시키는 방향으로 조절하거나 발암성 물질 및 암세포 의한 면역 억제 작용을 극소화 함으로써 달성할수 있을 것으로 사료되었다. 암 세포에 직접 작용을 나타내거나 숙주의 면역 세포에 영향을 주어 암에 대한 개체의 방어능력을 증가시키는 등 여러 가지 작용 기전으로 생체 반응을 향진시켜 항암 효과를 나타내는 생체 반응 조절 물질의 관점에서 lepidan의 항암 기전을 규명하기 위하여, 먼저 암 세포에 대한 직접적인 영향을 MTT assay를 통하여 알아보았다. *In vitro* 실험에서 sarcoma 180, MCA clone 16, LLC, P388등의 암세포의 생존율에 영향을 주지 않는것으로 보아 lepidan은 암 세포에 직접적인 세포 독성을 나타내지 않았다(Table III). 담자군류에서 분리한 항암성 다당체들은 대부분 암세포에 대한 직접적인 작용보다는 담암으로 인해 억제된 숙주의 면역활성을 정상으로 회복시키거나 증강시키는 면역 조절 기전으로 항암 작용을 나타낼 것으로 기대된다.

결 론

1. 생쥐 sarcoma 180 고형암에 대해 중성다당체인 Fr. IA가 20 mg/kg/day의 투여시에 가장 우수한 종양 억제율 58.3%를 나타내었다.

2. 수득률이 가장 우수한 산성 다당체 분획을 lepidan이라 명명하고 C3H MCA clone을 이용하여 항암 실험을 실시하였을 때 50 mg/kg/day의 용량에서 58.6 % 이상의 항암력을 나타내었다.

3. 시간 경과에 따른 고형암의 성장억제 정도는 lepidan투여군 고형암의 크기를 측정 한 결과 암 이식 후 2 주까지는 비교적 비슷하게 성장하였으나 이후부터는 특히 성장이 둔화됨을 알 수 있었다.

4. P388 백혈암에 대한 lepidan의 수명 연장 효과를 관찰하였을 때 유의성있는 수명 연장 효과가 관찰되지 않았다.

5. 암세포에 대한 직접독성을 MTT로 측정 한 결과 lepidan은 암세포를 직접 죽이는 효과가 없었다.

### 감사의글

본 연구비용의 일부는 서울대학교 부속 약학연구소로부터 제공받았기에 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Mizuno, T., Ohsawa, K., Hagiwara, N and Kuboyama, R. : Studies on the host-mediated antitumor polysaccharide part VI, fractionation, chemical structure, chemical modification and antitumor activity of homo and heteroglucans isolated from Mitake, the fruiting body of *Grifola frondosa.*, *Bull. Fac. Arg. Shizuoka Univ.* **35**, 49 (1982).
- 2) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachyman). *Nature*. **225**, 943 (1970).
- 3) Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. and Ishida, N. : Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics*, **31**, 1079 (1978).
- 4) Zakanky, J., Chihara, G. and Fachel, J : Effect of lentinan on tumor growth in murine allogeneic and syngeneic host. *Int. J. Cancer*. **25**, 371-376 (1980).
- 5) Judith, G. G., Paul, W. K. and Steven, B. M. : Interleukin-1 mediated induction of  $\kappa$ -light chain synthesis and surface immunoglobuline expression on pre B cells. *J. Immunol.* **132**, 223 (1984).
- 6) Tsukagoshi, S., and Ohashi : Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann* **65**, 557 (1974).
- 7) Yoshikumi, C., Matsunaga, K., Fujii, T., Yoyota, N., Arakawa, Y., Kobayashi, Y., Nomoto, K. and Takeya, K. : Antitumor effect of local irradiation and its augmentation by PS-K. *Jpn. J. Cancer Chemother.* **2**, 1063 (1975).
- 8) Ito, H., Fujii, K., Terada, Y., Shimura, K., Sugiyura, M. and Miyazaki, T. : Studies on antitumor activity of basidiomycete polysaccharides II, antitumor effects of polysaccharides prepared from cultured basidiomycetes. *Mie. Med. J.* **23**, 207 (1973).
- 9) Ohno, R., Imai, K., Yokomaku, S. and Yamada, K. Antitumor effect of protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, against 3 methyl-cholanthren-induced fibrosarcoma in C57BL/6 mice. *Gann*. **66**, 679 (1975)
- 10) Nomoto, K., Yoshikumi, C., Matsunaga, K., Fujii, T. and Takeya, K. Restoration of antibody forming capacities by PS-K in tumor bearing mice *Gann*, **66**, 365 (1975).
- 11) Ebina, T., Kohya, M. and Ishikawa, K. : Antitumor effect of PS-K role of regional lymph-node and enhancement of concomitant and sinecomitant immunity in the mouse. *Gann*. **80**, 158 (1989).
- 12) Kim, B. K., Park, E. K. and Shim M. J. : Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor*, *Pleutus ostreatus* and *Lentinus edoes*, *Arch Pharm. Res.* **2**, 145 (1979).
- 13) Hyun, J. W., Choi, E. C. and Kim, B. K. : Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVII), antitumor components of the basidiocarp of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **18**, 58 (1990).
- 14) Kim, H. R., Shim, M. J., Kim, J. W., Kim, H. W., Lee, C.O., Choi, E.Cc. and Kim, B. K. : Antitumor components extracted from the cultured mycelia of *Lyophyllum decastes*. *Kor. J. Phar-*

- macogn.*, **15**, 61 (1984).
- 15) 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. : Studies on constituents of the higher fungi of Korea. antitumor components of *Armillariella mella*. *Kor. J. Mycolo.* **11**, 151 (1983).
  - 16) Kim, S. H., Woo, M. S. and Kim, B. K. : Antitumor components extracted from the carpophores and cultured mycelia of *Laccaria lacca*. *Kor. J. Mycol.* **10**, 155 (1982).
  - 17) Lee, C. O., Choi, E. C. and Kim, B. K. : Immunological studies on the antitumor components of *Lyophyllum decastes*. *J. Kor. Cancer Res. Assoc.* **19**, 57 (1987).
  - 18) Hamuro, J., and Chihara, G. : Lentinan, T-cell oriented immuno potentiator: its experimental and clinical application and possible mechanism of immune modulation. In immune modulation agents and their mechanisms, pp 409-437 *Marcel Dekker*, New York (1984).
  - 19) Foon, K. A. : Biological response modifiers, the new immunotherapy. *Cancer Res.* **49**, 1621 (1989).
  - 20) Abe, S., Takahashi, K., Yamazaki, M. : Local induction of a tumor necrosis factor (TNF) like cytotoxic factor in murine tissues with tumorous and nontumorous inflammation after systematic administration of antitumor polysaccharides *J. Pharmaco-Dyn.* **472** (1988).
  - 21) Jin M., Kim S., and Kim B. K. : Induction of B cell proliferation and NF- $\kappa$ B activation by a water soluble glycan from *Lentinus lepideus*. *Int. J. Immunopharmac.* **18**, 8/9 439 (1996).
  - 22) Sakagami, Y., Mizogushi, Y., Shin, T., Seki, S., Kobayashi, K., morisawa, S. and Yamamoto, S. : Effect of an antitumor polysaccharide schizophyllan on interferon- $\gamma$  and interleukin-2 by peritoneal blood mononuclear cells, *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* **155**, 650 (1988).
  - 23) Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Method.* **65**, 55 (1983).
  - 24) Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936 (1987).