

## 큰눈물버섯 (*Psathyrella velutina*) 으로부터 분리한 단백다당체 PVP 의 항암 · 면역활성

정경수\*# · 이지선

충남대학교 약학대학 미생물면역학교실

(Received October 11, 2001; Revised November 21, 2001)

### Antitumor Immunomodulatory Activity of PVP, a Protein-polysaccharide Fraction Prepared from a Wild Mushroom *Psathyrella velutina*

Kyeong-Soo Chung\*# and Ji-Seon Lee

Laboratory of Microbiology and Immunology, College of Pharmacy,  
Chung-Nam National University, Taejon 305-764

**Abstract** — A protein-polysaccharide fraction of a Korean wild mushroom *Psathyrella velutina*, PVP, was prepared and its antitumor immunomodulatory activity was investigated. When PVP was administered once daily for seven days from day 1 to day 7 into male ICR mice implanted with  $1 \times 10^5$  cells of sarcoma 180 tumor cells into the peritoneum on day 4, it inhibited the growth of sarcoma 180 cells by 92.8 %. In XTT assay, PVP also exerted *in vitro* anti-proliferation activity on U-937, a human monoblastoid cell line, as well as sarcoma 180 cells. PVP showed marked stimulatory activity on the immune system in that it induced the accumulation of PEC (the stimulation index, SI=4.90 at 100 mg/kg), stimulated the BALB/c mouse splenic lymphocytes to form lymphoblasts (SI=5.75 at 100  $\mu$ g/ml), and upregulated the expression of CD25 molecules. All these results strongly support that PVP exerts its antitumor activity through stimulation of the immune system as well as anti-proliferative activity on the tumor cells.

**Keywords** □ *Psathyrella velutina*, PVP, protein-polysaccharide, antitumor, sarcoma 180, immunostimulation.

운지(*Coriolus versicolor*), 상항(*Phellinus linteus*), 표고(*Lentinus edodes*) 등 일부 담자균류(basidiomycetes)의 단백다당체 및 다당체들은 숙주의 면역기능을 활성화시켜 항암효과를 나타내며 뚜렷한 부작용이 없어서 암의 치료에 보조적으로 사용되고 있다.<sup>1-5</sup> 그러나 방대한 야생 담자균류 자원 중 항암효과가 검색된 것은 일부에 지나지 않기 때문에 이들로부터 새롭고 강력한 항암성 단백다당체를 탐색하는 노력은 체계적이고 지속적으로 추진되어야 한다. 이에 저자들은 한국산 야생 담자균류를 대상으로 지속적인 연구를 수행하여 오고 있으며<sup>6-9</sup> 본보에서는 큰눈물버섯(*Psathyrella*

*velutina*) 으로부터 새로운 단백다당체 PVP를 분리하고 그 항암면역 활성을 검토하였다. 그동안 큰눈물버섯의 생리활성 성분에 관한 연구는 주로 lectin 단백질에 관하여 제한적으로 이루어져 왔으며,<sup>10-12</sup> 단백다당체의 활성에 관한 연구는 찾아볼 수 없었다. 따라서 본 논문은 큰눈물버섯 단백다당체의 항암면역활성에 관한 최초의 보문이다.

#### 실험방법

**시료 및 단백다당체 분리** - 연구에 사용한 큰눈물버섯은 2001년 7월에 대전광역시 소재 계족산 일원으로부터 채집하였으며 동결건조시킨 자실체 일부를 증거 표본으로 본 실험실에 보존 중이다. 채집된 시료는 당

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-821-5927 (팩스) 042-823-6566

일에 신선한 상태로 열탕추출하여 이미 보고한 바<sup>8,9)</sup>에 따라 단백당체 분획을 제조하여 동결건조된 암갈색 수용성 분말을 얻었고, 이를 "PVP"(Psathrella velutina protein-polysaccharide)라 칭하였다.

**실험동물** - SPF(specific pathogen-free) BALB/c 마우스(female)는 대한바이오텍사의 것을 그리고 ICR 마우스(male)는 Charles River사의 것을 각각 입수하여 공조시설이 갖추어진 실험실에서 사육하며 실험에 사용되되 사료(삼육실험동물연구소)와 물은 제한 없이 공급하였다.

**Sarcoma 180 세포에 대한 항암 실험** - 실험동물로는 ICR 마우스를 사용하였으며, 시료는 제 1일부터 제 7일까지 매일 1회 100 mg/kg 용량으로 복강 주사하였고, 제 4일에는 sarcoma 180 암세포( $4 \times 10^5$  cells/mouse)를 복강내 이식하였다. 제 8일에 실험동물을 희생시켜 체중을 측정된 후 이미 보고한 바와 같이<sup>7-9)</sup> 복강내용물을 회수, PE-conjugated anti-mouse CD45 mAb(Sigma)로 복강유입세포(peritoneal exudate cells)를 분별염색하고 FACSCalibur 유세포분석기(Beckton-Dickinson, USA)로 PEC와 sarcoma 180 cell을 분별 계수하였다. 한편 복강내용물을 회수한 직후 비장을 적출하여 시료 투여로 인한 비장 중량의 변화를 관찰하였다.

**XTT를 이용한 암세포 저해 작용 실험** - 암세포주로는 본실험실에서 ICR 마우스 복강에 일주일 간격으로 계대 배양 중인 마우스 sarcoma 180 세포(ATCC TIB-66)와 충북대학교 약학대학 이종길 교수로부터 분양받은 U-937 세포(ATCC CRL-1593.2, 사람 monoblastoid 세포주)를 사용되되 penicillin-streptomycin solution(Sigma, USA) 10 ml 및 fetal bovine serum(Hyclone, Utah, USA) 10%를 첨가한 RPMI 1640(Sigma) 배지에 2회 이상 계대 배양한 후 실험에 사용하였다. 실험 직전에 이들 세포를 phenol red가 첨가되지 않은 RPMI 1640 배지(GibcoBRL, USA)로 1회 세척한 후 같은 배지에  $4 \times 10^4$  cells/ml로 현탁시켜 96 well culture plate(flat bottomed, Falcon 3072, Becton Dickinson)에 50  $\mu$ l씩 가하고 농도별로 희석한 PVP 시료를 동량 가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 대기 하에서 48 시간 배양하고 Scudiero 등<sup>13-15)</sup>의 방법에 따라 sodium 3-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate(XTT, Sigma)를 이용한 비색법으로 암세포 저

해 효과를 실험하였다. 이 때 사용한 XTT 시약은 phenol red가 들어있지 않은 RPMI 1640 배지에 XTT를 1 mg/ml로 용해시킨 XTT 용액 5 ml과 phosphate buffered saline(PBS)에 1.25 mM로 용해시킨 N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate(PMS, Sigma) 용액 0.1 ml을 사용직전에 혼합하여 제조하였다. XTT 시약을 실험 구 당 50  $\mu$ l 씩 가한 후 다시 배양하며 발색도를 육안으로 확인한 후 sarcoma 180 세포의 경우 XTT 시약을 가한 지 2시간 만에, U-937 세포의 경우에는 16시간 만에 ELISA reader(THERMO-max microplate reader, Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm에서의 흡광도를 측정하고 650 nm에서의 흡광도를 상쇄하여 흡광도치로 취하였다.

**마우스 비장세포에 대한 in vitro 면역활성 실험<sup>6-8)</sup>** - 이미 보고한 바와 같이 BALB/c 마우스 비장 백혈구 ( $2 \times 10^6$  cells/ml)를 제조하여 농도별로 PVP를 가하고, 24~48 시간 배양한 후 유세포분석기로 세포 생존율, 세포직경 (FSC) 및 lymphoblast 백분율을 분석하였고, T cell 활성화 효과를 확인하기 위한 실험에서는 CD25 분자(Interleukin-2 receptor  $\alpha$  chain, p55)를 FITC-conjugated rat anti-mouse CD25 monoclonal antibody(BD Biosciences, USA)로 형광염색한 후 분석하여 비장세포에 대한 면역활성을 확인하였다.

**당함량 및 단백질함량 분석** - 총당 함량은 anthrone 시약을 사용하여,<sup>16)</sup> 총단백 함량은 Coomassie brilliant blue G250 시약을 사용하여<sup>17)</sup> 비색법으로 분석하였다.

**통계처리** - 모든 실험 data는 Student's t-test를 시행하여 유의성을 검토하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

## 실험결과 및 고찰

**큰눈물버섯 단백질당체 PVP의 물리화학적 성상** - 신선한 큰눈물버섯 자실체 1,000 g으로부터 1,071 mg의 PVP(동결건조된 암갈색 무정형 분말)를 획득하였으며, 이는 증류수나 식염수, RPMI 1640 배지 등에 잘 용해되었다. 한편, anthrone 시약 및 Coomassie brilliant blue G250을 이용하여 PVP의 당 함량 및 단백질 함량을 분석한 결과 41.2%의 당과 13.9%의 단백질을 함유하는 것으로 확인되었다. 이처럼 당과 단

**Table I** – Antitumor activity of PVP<sup>a)</sup> against sarcoma 180 tumor cells in ICR mice<sup>b)</sup>

Group	Dose (mg/kg)	n	Body weight (g)	Spleen weight (mg)	sarcoma 180 cells <sup>c)</sup>		PEC <sup>d)</sup>	
					Count	% inhibition <sup>e)</sup>	Count	SI <sup>f)</sup>
control	-	6	37.1 ± 1.4	202 ± 14	7,412 ± 552 <sup>g)</sup>	-	1,875 ± 67	-
PVP	100	6	38.0 ± 1.0	467 ± 37***	532 ± 202***	92.8	8,638 ± 1,952***	4.61

<sup>a)</sup>PVP is a protein-polysaccharide prepared from the carpophores of *Psathyrella velutina*.  
<sup>b)</sup>Male ICR mice were ip injected once daily for seven consecutive days (day 1 through 7) and sarcoma 180 cells ( $4 \times 10^5$  cells/mouse) were intraperitoneally implanted on day 4.  
<sup>c)</sup>The sarcoma 180 cells were counted using a flow cytometer as previously described<sup>7-9)</sup>.  
<sup>d)</sup>Just prior to flow cytometrical analysis, PECs were labeled with PE-conjugated anti-mouse CD45 mAb and counted using a flow cytometer as previously described<sup>7-9)</sup>.  
<sup>e)</sup>% inhibition =  $(C_N - T_N) / C_N \times 100$ , where  $C_N$  and  $T_N$ , respectively, stands for the number of sarcoma 180 cells of the control group and the treated group.  
<sup>f)</sup>SI (stimulatory index) =  $T_N / C_N$ , where  $C_N$  and  $T_N$ , respectively, stands for the number of the PEC of the control group and the treated group.  
<sup>g)</sup>each data stands for mean ± S.E.  
 \*significant at  $p < 0.05$ , \*\*\*significant at  $p < 0.001$

백질의 합이 55.1%에 불과한 원인에 대하여는 여러 가지 추정이 가능하나 그 중 가능성이 가장 큰 것은 PVP의 구성 당 중 상당 부분이 anthrone 시약에 의해 발색되지 않는 당일 것이라는 것이다. 즉, 일반적으로 6탄당류와 glycogen, starch, dextrin, glucan, cellulose 등의 다당류와 이들의 인산유도체들은 황산 존재하에서 가열할 때 furfural 유도체를 형성하여 anthrone 시약과 반응하여 선택적인 정량성을 나타내지만 triose, tetrose, hexosamine 등의 amino sugar 나 glycerol, mannitol, ribitol 등의 sugar alcohol은 furfural을 형성할 수 없으므로 anthrone과 반응하지 않는다.<sup>16)</sup> 또한 pentose도 2~3분 이내에 연두노랑색을 나타내다가 금방 감소되어 10 분간 가열한 이후에는 거의 남지 않으므로 정량할 수 없다.<sup>16)</sup> 이러한 점들을 감안한다면 PVP에는 anthrone 법으로 정량하지 못하는 단당류 및 다당류 또는 담자균류 자체특이성 다당류가 상당량 함유되어 있을 가능성이 있다. 이와 같이 단백다당체의 당 함량 및 단백질 함량의 합이 100%에 현저히 미달되는 경우는 다른 버섯<sup>7,8)</sup>에서도 흔히 찾아볼 수 있기 때문에 PVP의 분석 결과는 정상적인 것으로 사료된다.

**실험동물의 체중 및 비장 중량에 미치는 영향** – PVP 시료투여로 인한 체중변화를 관찰한 결과 대조군에 비하여 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 이는 PVP가 실험 동물에 현저한 충격을 주지 않음을 의미한다. 한편 비장 중량은 유의성 있게 증가하였는데 이는 단백다당체에 존재하는 단백질들이 체내에 직접 유입됨으로써 발생한 당연한 결과로 풀이될 수도 있다.

그러나 PVP 투여로 인해 비장 중량이 대조군의 2.31 배로 증가된 것은 예외적인 증가로 판단되며, 이러한 현상은 PVP가 조혈기구를 자극하여 백혈구 생성을 현저히 증가시킴을 암시하기도 한다. 이러한 추정을 뒷받침하는 자료로 다음 항에 기술한 PEC의 현저한 증가를 들 수 있다.

**항암 효과** – ICR 마우스 복강에 이식한 sarcoma 180 세포에 대한 항암효과를 확인하기 위하여 시료 투여를 마친 후 복강 내용물을 회수하여 이미 보고한 방법<sup>7-9)</sup>에 따라 유세포 분석기로 분석한 결과, PVP는 sarcoma 180 복수암세포의 증식을 92.8% 억제함이 확인되었다(Table I). 뿐만 아니라 PVP는 면역세포들의 복강유입을 현저히 촉진하여 대조군에 비해 PEC가 4.61 배 증가되었다. 이처럼 담자균류의 단백다당체가 PEC를 증가시킴과 동시에 항암효과를 나타내는 현상은 이미 본 연구자들에 의하여 수차례 보고된 바 있다.<sup>7-9)</sup> 즉, 긴꼬리말볼버섯(*Lycoperdon pedicellatum*) 단백다당체 PPLP는 PEC를 2.45배로 증가시키고, sarcoma 180 세포의 성장을 97.6% 억제하였으며, 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*) 단백다당체 PJ-4(100 mg/kg/day)는 PEC를 2.38배로 증가시키고, sarcoma 180 세포의 성장을 85.1% 억제한 바 있다. 한편 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 생장점으로부터 분리한 항암성 단백다당체 GLB-A도 PEC를 1.64배로 증가시킨 바 있다. 따라서 PVP도 다른 항암성 단백다당체와 마찬가지로 PEC의 증가 및 활성화를 통하여 항암효과를 나타낸 것으로 판단된다.

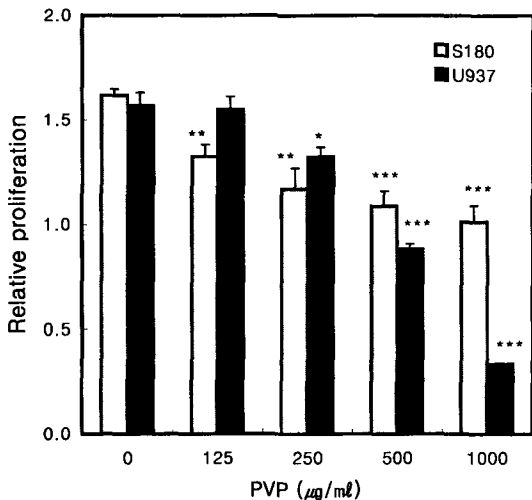
**PVP의 in vitro 암세포 저해 효과** – 본 연구에서는

XTT를 이용하여 세포증식 억제효과를 실험하였다. 이 방법은 방사성 동위원소를 사용하지 않고 세포의 증식 및 생존율을 정확히 측정할 수 있는 방법으로서, 방사성 동위원소법과 대등한 감도를 지니면서도 발색시약을 가한 후 별도의 처리과정이 요구되지 않아 실험 과정이 매우 간략하다는 장점이 있다. 뿐만 아니라 육안으로도 발색정도를 관찰할 수 있으며 XTT 시약을 가한 후 24시간까지 배양을 계속하며 횟수에 제한 없이 발색도를 측정할 수 있다는 큰 장점을 지니고 있다. 이러한 점에서 용해, 추출 등 복잡한 과정이 요구되는 MTT 법이나 방사성 동위원소법에 비해 윗등한 실험 방법으로 인정받고 있다.<sup>15)</sup>

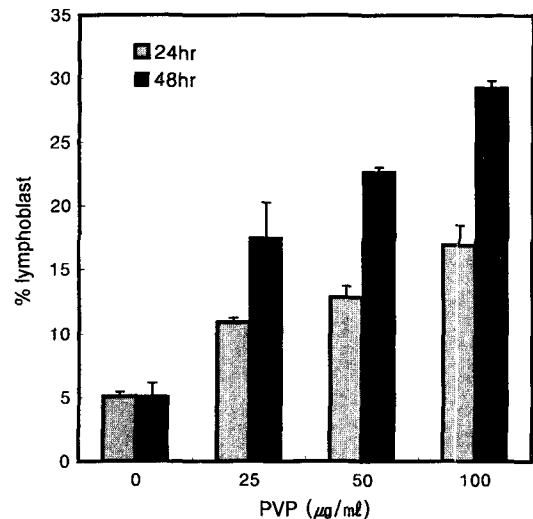
실험 결과 PVP는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 사람 monoblastoid 세포주인 U-937 세포와 마우스 육종암 세포인 sarcoma 180 세포에 대해 농도의존적 저해효과를 나타내었다. 즉 시료를 가하고 48 시간 배양 후 분석하였을 때 U-937 및 sarcoma 180 에서 대조군의 흡광도가 각각 1.57 및 1.62 입에 반해 PVP 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 각각 0.33 및 1.01로서 세포증식이 79.0% 및 37.7% 억제되었다. 그러나, sarcoma 180 세포에 대하여 유세포분석법으로 세포생존율을 분

석한 결과 PVP 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  까지 세포생존율이 전혀 감소되지 않았기 때문에(자료제시 생략), 단백질다당체의 암세포에 대한 직접 저해작용에 대한 확실한 결론을 얻기 위해서는 PI exclusion법을 이용한 유세포분석 및 XTT를 이용한 발색법을 병용하는 것이 합리적이라고 사료된다.

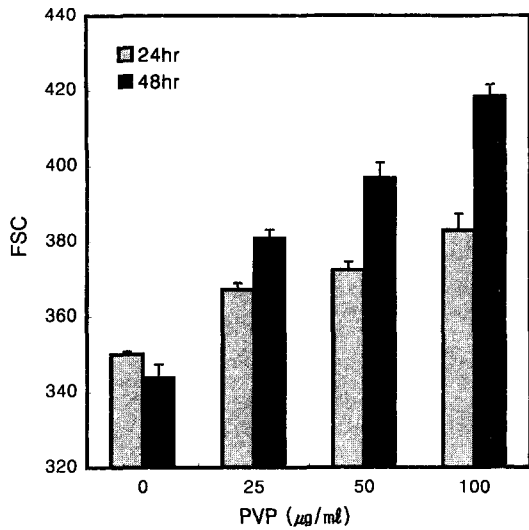
한편, PVP가 암세포주에 대하여 직접 저해 작용을 나타낸다는 본 연구 결과는 그 동안의 일반적 견해 즉 담자균류의 단백질다당체가 암세포에 대하여 직접적인 저해작용을 나타내지 아니하고, 숙주의 면역계를 활성화시켜 항암효과를 발휘한다는 것과 상반된 것이다. 그러나 본 연구자들은 이미 본 연구 결과와 유사한 연구 결과들을 눈꽃동충하초 단백질다당체 PJ-4<sup>9)</sup> 및 긴꼬리말뚝 단백질다당체 PPLP<sup>8)</sup>에서도 얻은 바 있어서 담자균류의 단백질다당체가 암세포에 저해작용을 나타내지 아니하고, 숙주의 면역계를 통하여서만 항암작용을 나타낸다는 확실적인 추정은 피해야할 것으로 보인다. 따라서 큰눈물버섯의 단백질다당체 PVP의 sarcoma 180에 대한 *in vivo* 항암효과는 PVP의 면역활성 뿐 아니라 암세포에 대한 직접적인 저해작용도 기여한 것으로 보



**Fig. 1** - The cytotoxic activity of PVP on U-937 cells and sarcoma 180 cells using XTT assay. The  $4 \times 10^4$  cells were incubated in phenol red-free RPMI 1640 medium alone or in the presence of PVP for 48 hours and then the absorbance was measured 2 to 16 hours after the addition of XTT reagent. Error bar: mean  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Fig. 2** - *In vitro* Lymphoblastogenic effect of PVP on the splenic lymphocytes of a BALB/c mouse. The cells were incubated in RPMI 1640 medium with or without PVP for 24-48 hours and then the FSC values were measured using a FACSCalibur flow cytometer as described in the text. Error bar: mean  $\pm$  S.D. All the values of PVP-treated group were significantly different from that of the control at  $p < 0.001$ .

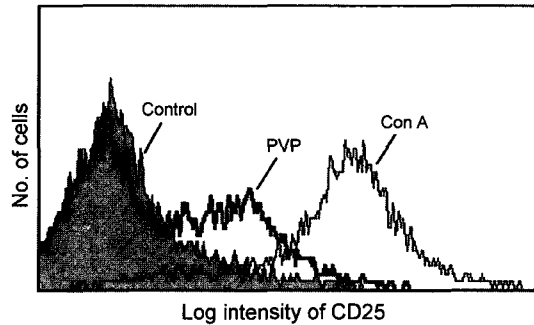


**Fig. 3** - *In vitro* Lymphoblastogenic effect of PVP on the splenic lymphocytes of a BALB/c mouse. The cells were incubated in RPMI 1640 medium with or without PVP for 24-48 hours and then the FSC values were measured using a FACSCalibur flow cytometer. The cells with higher FSC values were taken as lymphoblasts as described elsewhere.<sup>7)</sup> Error bar: mean  $\pm$  S.D. All the values of PVP-treated group were significantly different from that of the control at  $p < 0.001$ .

여진다.

**Lymphoblast 생성자극효과** - BALB/c 마우스 비장 임파구에 PVP를 0~100 µg/ml의 농도로 가하고 24~48시간 배양한 후 분석하였을 때, Fig. 2에 나타난 바와 같이 비장임파구 전체의 FSC값(세포 직경에 비례하는 변수)이 343.9에서 418.5로 21.7% 농도의 존적으로 증가되었다. 한편 임파구의 활성화 초기단계로 볼 수 있는 lymphoblast의 비율을 분석한 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 대조군의 경우 5.1% 였으나, PVP 처리군에서는 29.3%까지 농도의존적으로 5.74배나 현저히 증가하였다. 이는 PVP가 숙주의 면역계를 활성화시킴으로써 항암효과를 발휘한다는 증거로 받아들일 수 있다.

**T cell 활성화 효과**<sup>7)</sup> - 전항에서 확인한 FSC값 증가 및 lymphoblast 비율 증가가 구체적으로 어떤 면역세포를 활성화시킴으로써 나타난 결과인지를 확인하기 위하여 세포매개성면역(cell-mediated immunity)의 근간이 되는 T cell의 활성화 정도를 유세포분석법을 이용하여 분석하였다. 즉, T cell 활성화 지표분자(activation



**Fig. 4** - A representative overlay histogram showing the stimulatory activity of PVP on the expression of CD25 molecule of BALB/c splenic lymphocytes. The cells were incubated for 48 hours in medium alone shaded histogram or in the presence of PVP (100 µg/ml, bold line) or concanavalin A (1.25 µg/ml, solid line). Just prior to analysis the cells were labeled with FITC-conjugated anti-mouse CD25 monoclonal antibody.

maker molecule)의 대표적인 CD25(Interleukin-2 receptor  $\alpha$  chain, p55)의 발현정도를 분석한 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 PVP는 CD25 발현을 현저히 증가시킴으로써 T cell 활성화 효과가 입증되었다.

**결 론**

큰눈물버섯(*Psathyrella velutina*) 자실체로부터 단백질 다당체 PVP를 분리하여 항암효과 및 면역활성을 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PVP(100 mg/kg/day)는 ICR 마우스의 복강에 이식한 sarcoma 180 복수암의 증식을 92.8%( $p < 0.001$ ) 억제하였고, 복강유입세포(PEC)를 현저히 증가시켰으며, *in vitro* 실험에서 U-937 암세포 및 sarcoma 180 암세포의 증식을 농도의존적으로 억제하였다.
2. PVP는 1차 배양 BALB/c 마우스 비장 백혈구에 대하여 강력한 lymphoblast 생성 자극 효과를 나타내었고, T cell을 활성화시켜 CD25(IL-2 receptor  $\alpha$ -chain)의 발현을 유의적으로 증가시켰다.
3. 이러한 결과들은 PVP를 새로운 항암면역요법제로 개발하기 위한 연구의 필요성을 제기하고 있다.

**문 헌**

1) Moon, C.-K., Lee, S.-H., Mock, M.-S., and Kim, D.-

- O. : Antitumor Activity of the Polysaccharide-Fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its Effects on the Immune Function. *Yakhak Hoeji* **31**, 126 (1987).
- 2) Jo, S.-K., Kim, S.-H., and Yoon, T.-K. : Effects of Copolang on Murine Immune Function and Antitumor Activity. *J. Kor. Cancer Assoc.* **19**, 95 (1987).
  - 3) Chung, K. S. , Kim, S. S., Kim, H. S., Han, M. W. and Kim, B. K. : Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelial culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji* **38**, 158 (1994).
  - 4) Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y., Han, M. W., and Kim, B. K.: Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. *Arch. Pharm. Res.* **16**, 336 (1993).
  - 5) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fraction of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**, 2776 (1970).
  - 6) Chung, K. S., Kim, S. B. and Chung, S. H. : Immunoactivities of the protein-polysaccharides of the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji* **41**, 105 (1997).
  - 7) Oh, J. Y. and Chung, K. S. : Flow cytometrical analysis of the antitumor and immunomodulatory activities of GLB-A and GLB-B, the protein-polysaccharide fractions of the growing tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji* **42**, 487 (1998).
  - 8) Chung, K. S. and Kim, J. H. : Antitumor and immunomodulatory activity of *Lycoperdon pedicellatum*. *Yakhak Hoeji* **44**, 463 (2000).
  - 9) Lee, J. S., Lee, I. S., Chung, K. S., Kim, Y. H., Han, Y. H. and Lee, M. H. : Flow cytometrical investigation on antitumor activity of mycelial culture of insect-born fungus *Paecilomyces japonica* DGUM 32001. *Yakhak Hoeji*, **45**, 64 (2001).
  - 10) Kochibe, N. and Matta, K. L. : Purification and properties of an N-acetylglucosamine-specific lectin from *Psathyrella velutina* mushroom. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 173 (1989).
  - 11) Endo, T., Ohbayashi, H., Kanazawa, K., Kochibe, N. and Kobata, A. : Carbohydrate binding specificity of immobilized *Psathyrella velutina* lectin. *J. Biol. Chemistry* **267**, 707 (1992).
  - 12) Ueda, H., Saitoh, T., Kojima, K. and Ogawa, H. : Multi-specificity of a *Psathyrella velutina* mushroom lectin: heparin/pectin binding occurs at a site different from the N-acetylglucosamine/N-acetylneuraminic acid-specific site. *J. Biochem.* **126**, 530 (1999).
  - 13) Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. : Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827 (1988).
  - 14) Weislow, O. S., Kiser, R., Fine, D. L., Bader, J., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. : New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 577 (1989).
  - 15) Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M. and Glasebrook, A. L. : An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* **142**, 257 (1991).
  - 16) Norris, J. R. and Ribbons, D. W. : Methods in microbiology Vol. 5B, Academic Press, New York, 209-339 (1971).
  - 17) Read, S. M. and Northcote, D. H. : Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**, 53 (1981).