약학회지 제 52 권 제 6 호 494~499 (2008)
Yakhak Hoeji Vol. 52, No. 6

18β-Glycyrrhetinic Acid의 면역보조제효능에 의한 항 전신성캔디다증 효과

한 용 문#
동덕여자대학교 약학대학 면역 · 미생물학교실
(Received November 1, 2008; Revised November 27, 2008)

18β-Glycyrrhetinic Acid Induces Protective Anti-*Candida albicans* Antibody by Its Immunoadjuvant Activity

Yongmoon Han#
Department of ImmunoMicrobiology, College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract — The role of antibody in the fungal infections is controversial. However, our previous reports showed a certain epitope in *Candida albicans* cell wall (CACW) induces protective antibody. A major problem is that the epitope isolation requires tremendous time with high cost. This aspect led us to investigate a simple way inducing protective antibodies against *C. albicans*. In the present study, we determined if 18β-glycyrrhetinic acid (18β-GA) from Glabrae Radix (a family of *Leguminosae*) has immunoadjuvant activity. Data displayed that the 18β-GA suppressed proliferations of both T- and B-lymphocytes at high concentrations, whereas below 20 μM concentration the compound supported the proliferations. These observations indicate that 18β-GA has immunoregulatory activity. Based on this observation, an immunoadjuvant effect was examined at the low concentration. Results from animal experiments showed that CACW combined with or without 18β-GA produced the anti-*C. albicans* antiserum in mice. Nevertheless, the CACW combined with 18β-GA formula only protected mice against disseminated candidiasis ($P<0.05$). These data implicate that 18β-GA has immunoadjuvant activity, which may provoke the CACW antigen to induce protective antibody. Currently, we are investigating possible mechanism of how the 18β-GA provokes such protective immunity against the disseminated disease.

Keywords □ immunoregulation, *Candida albicans* cell wall, 18β-GA, protective antibody, immunoadjuvant, disseminated candidiasis

병원성 진균인 *Candida albicans*로 기인된 전신성 캔디다감염증(disseminated candidiasis)의 치료에 있어 체액성 면역(humoral immunity)에 의한 항체요법에 대해서는 찬반양론이 있었으나,[1-3] 1990년 중반부터 진균감염 시 항체역할에 대한 찬성이론이 구체화 된 바 있다.[1,4] 그러나 이와 같은 결론이 모든 항진균 항체가 효과가 있는 것을 의미하지는 않으며, 기존의 진균감염 시 항체요법이 효능이 없다는 학술적 견해(dogma)도 타당성이 있는 것으로 사료된다. 그 이유는 모든 항캔디다 항체가 효과가 있는 것은 아니며 오직 특정항원으로 유도된 좋은 항체('good antibody')만이 효과가 있는 것으로 구명되고 있기 때문이다.[1,2] 하지만 좋은 항체를 유도를 위해 필요한 항원의 분리는 매우 까다롭고 시간과 막대한 비용이 요구되므로 진균백신 개발 시, 좋은 항체만을 유도 할 수 있는 면역보조제의 발견은 매우 획기적일 것으로 간주된다.

본 연구실의 면역보조제개발에 관한 연구과정에서 특정 한약재의 성분이 면역조절효과가 있음을 관찰한 바 있는데, 예를 들면 인삼배당체 성분인 Ginsenoside Rg1의 면역증진에 의한 항균효과[5]와 황기의 β-sitosterol 배당체인 daucosterol의 면역기능 강화에 의한 감염성치료,[6] 인동에 함유된 chlorogenic acid[7]의 면역조절력에 의한 감염성관절염치료 등이 대표적인 경우이다. 이 결과를 고찰해보면, isoprenoid 성분(예: terpenoid, steroid)의 함량조절에 따라 T-lymphocyte의 면역반응에 영향을 주는 것으로 검색되어서 terpene 계열의 배당체 성분들이 이러한 면역조절효능이 있음을 유추해 볼 수가 있다. 이런 점을 근거로 하여 다양한 종류의 배당체에 대한 면역유도성을 검색하였는데, 그 중에서 감초의 지표성분으로 알려진 glycyrrhizin의 비당부

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

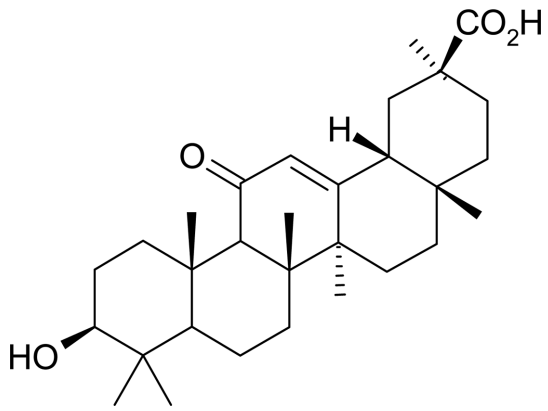

Fig. 1 – Chemical structure of 18β-glycyrrhetinic acid (18β-GA). This diagram displays glycyrrhizin and 18β-GA. Glycyrrhizin, a triterpene glycoside, consists of 18β-GA and two molecules of glucuronic acids (GlcA) that are attached at the C-3 position.

(aglycone)인 18β-glycyrrhetinic acid는 고농도에서 CD4+T-lymphocyte의 증식을 억제하여 *Candida albicans*기인성 감염성 관절염을 치료하는 효과가 있으며,[8] 본 연구실의 또 다른 기초 연구결과에 의하면 저농도에서는 반대로 T-lymphocyte의 증식을 보조하는 것으로 평가되었다. 이는 18β-glycyrrhetinic acid (18β-GA)가 함량조절에 따라 T-lymphocyte의 면역반응에 영향을 주는 면역조절효능의 가능성이 있음을 의미한다. Glycyrrhizin과 18β-GA의 화학구조적 관계는, penetacyclic tritepene 배당체인 glycyrrhizin은 β-amyrin 계열에 속하며 18β-GA와 2분자의 glucuronic acid로 구성되어 있다(Fig. 1). 18β-GA의 대표적인 약리활성효과로서는 항염증효과[9]와 항궤양효과,[10] cortisol의 불활성화촉매작용에 관여하는 11-β-hydroxysteroid dehydrogenase 효소를 억제하고,[11,12]세포사멸 억제효과[13] 등을 들 수 있다. 그러나 면역조절효과에 의한 감염성치료에 관한 보고는 없다.

면역계에서 CD4+T-lymphocyte는 면역반응유도에 중추적 역할을 담당하며 면역반응유도에는 신호전달이 필요하며 적절한 신호의 발생에 따라 유효세포(effector cells)가 된다. 또한, CD4+T-lymphocyte는 MHC(major histocompatability) molecules에 의해 제공되는 항원의 자극에 의한 반복된 증식과정을 통해서 Th1과 Th2 effector 세포로 분화(differentiation) 된다.[5,6] 이렇게 분화된 CD4+T-lymphocyte는 여러 종류의 cytokine을 분비하고 이렇게 분비된 cytokine은 주변의 면역세포에 영향을 주어서 파급적으로 이 면역세포로 하여금 신호물질인 또 다른 종류의 cytokine을 분비토록 한다. 그래서 cytokine의 종류에 따라 유효기능(effective functions)을 예측해 볼 수 있는 소위 cytokine profile의 개념이 설정되었고,[14] 면역력 발현의 초기단계로서 염증반응유도에 관여하는 기능에 따라 CD4+T helper cell은 Th1 type CD4+T-cell과 Th2 type CD4+T-cell로 구분하는데 이와 같은 분화를 위해서는 T-cells의 초기 활성이 매우 중요하다.[15] 그러므로 항원에 대한 숙주의 면역반응을 통해 체액성 면역(humoral Immunity) 또는 세포매개성 면역(cell-mediated immunity) 관여 여부를 유추할 수 있다.[16,17]

한편 타 연구자의 연구보고를 고찰해보면 saponin 계열의 성분인 *Quillajia saponaria*에서 분리된 Quil A를 항원과 병용하여 항체를 유도하였을 때 병용하지 않았을 때보다 항체생성의 증가가 있는 것으로 보고된 바 있다.[18] 이 성분은 항원으로 외독소와 병용하면 Th1 면역반응과 세포독성 T-림프구(cytotoxic T-lymphocyte; CTL) 생산을 유도하여 숙주세포 내 침투성 병원균(intracellular pathogens)에 대한 백신뿐만 아니라 암백신(cancer vaccine) 제조에 유효하다는 것이 보고된 바 있다.[19,20] 그러나 이 성분은 독성으로 인한 부작용으로 백신개발에 상업적으로 사용하기에는 제한이 있다.

본 연구에서는 상기와 같은 연구배경을 바탕으로 하여 한약재에서 일반적으로 널리 사용되는 감초에서 분리되는 18β-GA의 면역조절효과를 검색한 다음에 항체생성증진효과의 유무와 *C. albicans* 진균백신에 병용 시 보호효과가 있는 항체의 유도생성 가능성을 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

모든 실험에 사용된 생쥐는 대략 6~7 주령의 BALB/c 암컷생쥐(Orient Inc.-Charles River Lab, Seoul)를 사용하였고, 구입된 생쥐는 실험실 환경에서 1주일간 적응시킨 후 실험하였으며, 멸균된 fiter-top cage에서 멸균된 사료 및 물을 자유롭게 먹게 하였다. 동물실의 환경은 온도 20±2°C, 습도 50±10%로 유지하였고, 조명은 12시간 간격으로 밤과 낮을 조절하였다. 동물관리는 동덕여자대학교 동물관리규정에 따라 취급하였다.

균주와 배양조건

C. albicans 균주는 기연구에서 특성이 규명된 CA-1 strain[7,8,21,22]을 사용하였고, 실험직전에 37°C에서 GYEP(glucose-yeast extract-peptone) 액체배지에서 24시간 간격으로 3회 배양한 후 효모형태(blastoconidial form)의 세포를 원심분리법으로 수집하여 멸균된 인산완충용액(DPBS; pH 7.4; 4°C)으로 3회 이상 세척하여 사용하였다. 생쥐를 감염시키기 위한 세포 수 측정(cell counting)은 hemocytometer(Gibco, USA)를 사용하여 측정하였다.

18β-glycyrrhetinic acid (18β-GA)

18β-GA는 Sigma에서 구입하였으며, 실험에 사용하기 전에 endotoxin 오염여부를 상업용 endotoxin kit(Sigma)을 사용하여

endotoxin 혼재유무를 확인 한 다음에 본 실험에 사용하였다.

***C. albians* cell wall extract(CACW)의 추출분리**

*C. albians*의 세포벽분리는 본 연구실에서 보고된 방법을 사용하였다.[1,8,21] 이 방법을 간략히 기술하면, GYEP(glucose-yeast extract-peptone) 액체배지에 배양한 *C. albicans* 균을 원심분리 방법으로 수집하여 DPBS(4°C)로 세척한 다음에 disodium EDTA (0.1 M; pH 7.5)와 trisodium EDTA(0.1 M; pH 9.0)로 연속 처리하고 0.3 M β-mercaptoethanol로 30분 동안 실온에서 처리한 후 상등액을 수집하였다. 수집된 상등액을 투석막(membrane cut-off=12,000 Da)에 넣고 멸균된 탈이온수에 대하여 3일 동안 투석하였다. 투석이 완료된 후 투석막 내부물질을 동결건조(Eyela FD-1000, Tokyo, Japan)하여 분말화 시켰다. 분말화된 세포벽은 desiccator안에 저장보관하고 사용하였다.

18β-GA의 T-lymhocyte 및 B-lymphocyte 증식에 대한 효과

증식효과를 검색하기 위해서 본 연구실에서 사용하는 방법[7,8]을 적용하였다. 6주령의 Balb/c 암컷생쥐에서 splenocytes를 무균조작으로 채취하여RBC lysis buffer로 적혈구를 제거한 후, RPMI 1640(Sigma) culture medium에 넣고 37°C CO_2 배양기에서 24시간 배양 후 실험에 사용하였다. 이 splenocytes(5×10^6 cells/well)에 concanavalin A(Con A: 5 μg/m*l*; C2010; Sigma)를 투여하고 다양한 농도의 18b-GA를 첨가한 후, 동일한 배양조건에서 72시간 배양한 다음에 CCK-8(cell count kit-8; Dojindo Lab; Japan)를 투여하고 3시간 더 배양한 후에 T-lymphocytes의 증식억제효과를 검색하였다. B-lymphocyte증식효과 검색에서는 상기 방법과 동일한 방법을 사용하되, Con A 대신에 LPS(lipopolysaccharide; 10 μg/m*l*)를 처리한 다음에 18β-GA을 다양한 농도로 처리하여 효과를 측정하였다. Con A는 T-lymphocytes 증식효과를 검색을 위한 T-cell mitogen이며, LPS는 B-lymphocytes에 대한 관여도를 측정하기 위한 B-cell mitogen이다.[18]

Anti-*C. albicans* 항체생성 증진 효과검색

백신제형을 제조하기 위해서, 18β-GA(1 mg/m*l*)과 항원성분으로 CACW(1 mg/m*l*)를 섞은 혼합액 1 m*l*에 oil로만 조성된 IFA (incomplete Freund's adjuvant1; 1 m*l*)를 첨가하여 유화제 형태로 백신제형을 제조하였다. 18b-GA의 보조제 효과를 검색하기 위해서 18β-GA와 CACW만을 혼합한 제형을 생쥐에 투여하여 효과여부를 검색하였다. Balb/c 생쥐에 면역접종을 한 후, 21일 후에 재접종을 복강 내로 투여하였다. 투여량은 18β-GA가 100 mg/mouse이 되도록 하여 사용하였다. 2차 면역접종 7일 후에 면역된 생쥐의 꼬리동맥에서 피를 수집하여 혈청만을 분리하였다. 수집한 혈청에 대한 anti-CACW(*C. albicans*) 항체의 생성여부는 ELISA 방법으로 검색하였다. ELISA 방법은 본 연구실에서 사용되는 방법을 사용 하였으며,[6,24] 간략히 기술하면 다음과 같다. 96-well flat bottomed plate에 항원으로 CACW를 2 mg/well로 coating한 후, 1% BSA 용액으로 blocking하고 4°C에서 overnight 했다. 그리고 수집된 혈청을 1 : 100으로 희석하여 coating된 well에 첨가하고 일정시간 37°C 5%-CO_2 배양기에서 배양한 후에 희석용액(DPBS)으로 세척하고 poly Ig's 항체(secondary antibody)를 첨가하여 일정기간 상기처럼 동일한 배양조건에서 배양하였다. 재차 DPBS로 세척한 다음에 OPD 용액을 첨가하여 30분 동안 처리한 후, 황산을 투여하여 반응을 정지 시킨 다음 microplate reader(Bio-Lab, USA)를 사용하여 발색정도를 측정하여 항체생성 여부를 평가하였다.

18β-GA의 면역보조제적 효과검색

상기 기술한 방법처럼 18β-GA(1 mg/m*l*)과 CACW(1 mg/m*l*)를 섞은 혼합액 1 m*l*에 IFA(1 m*l*)를 첨가하여 유화제 형태로 제조된 백신제형을 BALB/c 생쥐에 면역접종 한 후, 21일 후에 재접종을 복강 내로 투여하였다. 접종량은 18β-GA이 100 mg/mouse 되도록 조절하여 사용하였다. 2차 면역접종 7일 후에 이 생쥐들에게 *C. albicans*(5×10^5 yeast cell/mouse) 꼬리정맥을 통해서 전신감염을 유발시킨 후 면역접종을 받지 못하고 감염만 된 생쥐 그룹(음성대조군)의 생존률을 관찰하였다. 평가는 생존곡선으로 도표화하여 평가 비교하였다.

통계 처리 – 실험결과는 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 계산하였다. 각 군 간의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하였고 값이 5% 미만일 때에 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 그리고 생존율의 유의성은 Kaplan-Meier 방법(New Statics for Windows; SPSS, Chicago, USA)을 사용하여 판정하였다.

실험결과 및 고찰

T-lymphocyte와 B-lymphocyte 증식에 대한 효과

Balb/c 생쥐로부터 splenocyte를 분리하여 Con A를 넣고 다양한 농도의 18β-GA(0, 20, 40, 80, 160 mM)로 처리하였을 때, Con A로 증식(proliferation)된 T-cells은 저농도에서는 증식이 거의 없는 반면, 고농도에서는 증식이 농도 의존적으로 현저히 감소하였다(Fig. 2). 또한, splenocytes에 B-cell mitogen인 LPS를 넣고 18β-GA(20 mM)로 처리했을 때에도 T-cell의 경우와 유사하게 저농도에서는 B-cell의 증식이 거의 없었고 그 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 증식이 감소되었으며, 대조군과의 차이는 통계학적으로 유의성이 있었다($P<0.05$)(Fig. 3). 그러므로 18β-GA의 T-lymphocyte와 B-lymphocyte의 증식효과를 위해서는 저농도의 사용량이 중요한 것으로 평가되었다. 반대로 18β-GA 고농도에서의 T-lymphocyte 증식억제효과는 항관절염효과

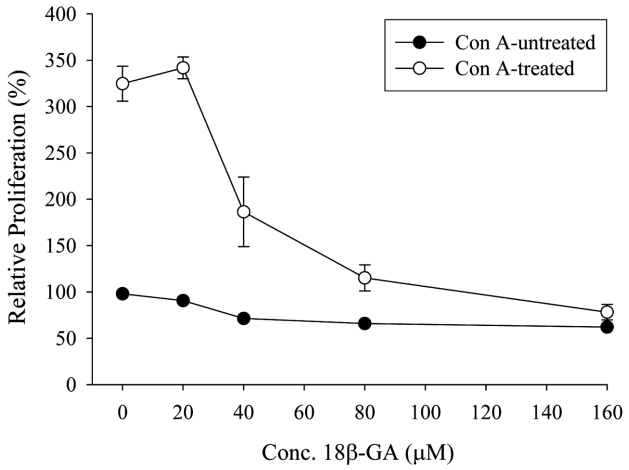

Fig. 2 – Effect of 18β-GA on the proliferation of T-lymphocytes. At the high dose, the 18β-GA suppressed proliferation of T-lymphocyte activated by Con A (concanavaline A) in dose-dependent fashion, whereas at the lower dose below 20 μM the compound enhanced T-cell prolifearation. Error bar: SE.

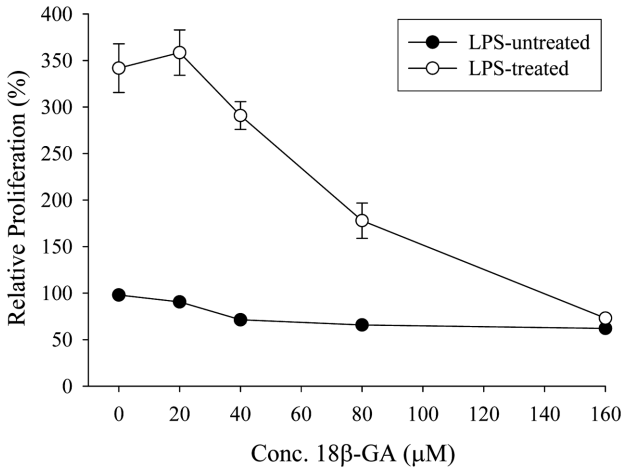

Fig. 3 – Effect of 18β-GA on the proliferation of B-lymphocytes. As the case of T-cell prloiferation, The 18β-GA suppressed proliferation of B-lymphocyte activated by LPS (lipopoly-saccharide). However, he proliferatve effect was reversed at lower doses. Error bar: SE.

가 있는 것으로 이미 연구조사 된 바 있는데[8] 이 결과를 볼 때 18β-GA는 농도에 따라서 면역조절효과가 있음을 알 수 있다.

Anti-*C. albicans* antibody 생성 증진효과

CACW 항원과 18β-GA 병용(CACW/18β-GA)하여 항체생성을 측정했을 때, CACW 단독으로 사용한 경우와 거의 유사한 정도의 항체가 생성되었으며 18β-GA 만을 투여 받은 대조군생쥐그룹에서 수집된 혈청에서는 anti-CACW antibody가 검색되지 않았다(Fig. 4). 그러므로 이 결과에서, 18β-GA 첨가에 관계없이

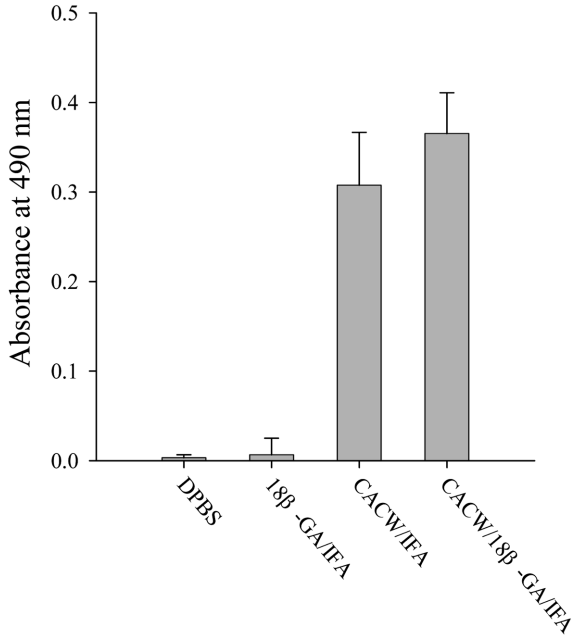

Fig. 4 – The 18β-GA to CACW enhances induction of anti-*C. albicans* antiserum in mice. The CACW/18β-GA formula into mice resulted in more induction of anti-*C. albicans* antiserum than did CACW without 18β-GA. Mice groups that were given DPBS, which was used for a negative control, or animals that received 18β-GA resulted in no production of the antiserum, displaying values of the ELISA experimental backgrounds. This observation indicate that the 18β-GA appears to function as an immunoadjuvant. CACW and IFA stand for *C. albicans* cell wall and incomplete Freund's adjuvant, respectively. Error bar: SE.

CACW 항원의 항체생성정도는 거의 동등한 정도인 것을 알 수 있으나, 각 경우의 항체가 캔디다전신감염증에 보호효과가 있는지의 여부는 알 수가 없다. 이 평과를 위해서 전신성 캔디다증(disseminated candidiasis) 동물모델을 사용하여 18β-GA/CACW 백신제형의 효과를 검색하였다.

18β-GA/CACW 백신제형의 효능평가

생쥐(BAL/c strain)를 네 그룹으로 분류하여 희석액(DPBS: 음성대조군), 18b-GA, CACW, 또는 CACW에 18β-GA을 첨가하고 각각 IFA에 혼합한 제형으로 각 그룹 생쥐에 면역접종을 한 후 *C. albicans* 생균으로 감염시킨 다음에 생쥐들의 생존시간을 측정하여 생존율(survival rates) 로 환산하였다. 실험결과, 각 경우의 생존율을 비교하면, 네 그룹 중에서 CACW/18β-GA로 면역된 생쥐그룹의 생존시간이 가장 높았고 30일간의 관측기간 동안에 50% 이상의 보호효과가 있었다(Fig. 5). 이 결과를 음성대조군의 생존율과 비교할 때 현저한 차이가 있어서 통계적으로도 유위성이 있는 것으로 평가되었다($P<0.05$)(Fig. 5). 한편, CACW 단독으로 면역된 생쥐의 생존율은 음성대조군에 비해서 약간 높

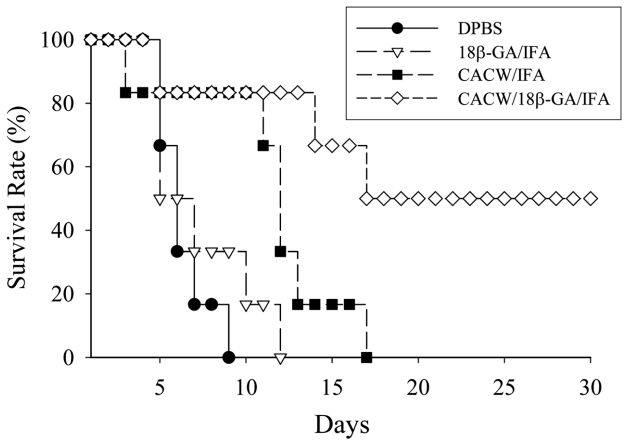

Fig. 5 – The CACW/18β-GA vaccine formula enhanced resistance of mice against disseminated candidiasis. CACW/18β-GA-immunized mice survived longer than control mice groups that received DPBS, which was used as a negative control ($P<0.05$). In a similar way, the 18β-GA itself had no protective effect against the disseminated disease. The CACW alone induced in mice ant-*C. albicans* antibody like the CACW/18β-GA formula as shown in Fig. 5), but the CACW-immunized mice were not protected against the candidiasis. This indicates that the 18β-GA might help the CACW antigen to produce the protective antibody in mice, presumably via immunoadjuvant effect on the CD4+ T-lymphocytes.

지만, 이 생쥐들 모두가 관측기간 17일째에 모두 죽어서 궁극적으로는 보호효과가 거의 없음을 알 수 있었다(Fig. 5). 이 실험결과를 고찰하면, Fig. 4에서 보듯이 CACW 단독제형도 CACW/18β-GA제형처럼 거의 유사한 양의 항 *C. albicans* 항체를 생성하였지만 이 항체는 보호효과가 없으므로 18β-GA는 CACW 항원으로부터 보호효과가 있는 항체를 유도할 수 있는 면역보조제 효과가 있는 것으로 사료된다. 본 연구를 본 연구실의 타 연구결과와 비견해 볼 때, 전신 캔디다증 유발 시 Th2 면역반응이 우세한데[26] 이 면역성을 Th1으로 전환하면 숙주에게는 유리하여 치료효과가 있는 것을 규명한바가 있다.[5,6] 이 경우에서는 항체보다는 T-cell의 활성화로 수반되는 보호효과로 검색된 바 있다. 반면에, 항체생성에 관여하는 반응은 체액면역반응은 Th2 면역성에 영향을 받으므로 18β-GA의 보호효과는 항체생성에 의한 것으로 고려된다. 그러나 이 점에 관한 좀 더 구체적인 연구의 필요성이 있다.

결 론

본 연구에서는 감초성분의 일종인 18β-glycyrrhetinic acid (18β-GA)에 대한 면역조절효과에 의한 감염성 질환에 대하여 연구를 하였다. 먼저 T-lymphocyte와 B-lymphocyte 증식에 대한 평가에서, Con A로 처리된 생쥐의 splenocyte에 다양한 농도의 18β-GA로 처리하였을 때, Con A로 증식된 T-cells은 저농도에서 증식효과가 있지만 고농도에서는 증식이 억제되었다. LPS로 처리된 경우에는 거의 비슷한 결과가 산출되었다. 이 실험결과를 토대로 하여 18β-GA의 면역보조제효과를 조사하기 위해서 증식억제 영향을 주지 않는 20 mM 이하의 농도를 선택하였다. 18β-GA를 비당부로 함유하고 있는 glycyrrhizin 배당체에서는 이러한 효과가 없는 것으로 검색되어서 화학적 구조가 유사하더라도 당의 결합이 매우 중요한 것으로 추정되어지며 18β-GA의 면역조절효과에서는 사용 농도가 중요한 것으로 평가되었다.

면역보조제적 효과검색결과를 분석해보면, 18β-GA는 항체(anti-*C. albicans* antibody)생성 증진효과가 있었다. CACW의 항원성에 대한 특성은 기연구에서 이미 규명된 바 있고,[1-3] CACW 그 자체로는 보호효과가 없기 때문에 liposome 백신제형[1]이나 conjugate vaccine[25] 등으로 제형화 하였을 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 위와 같은 제형화 과정은 매우 까다롭고, 반감기(half life)가 매우 짧기 때문에 필요 시 마다 제조해야하는 번거로움과 장기보존에 문제가 있다.

결론적으로, 18β-GA이 첨가 없이 CACW 단독으로 면역된 생쥐에서 생성된 항체역가와 거의 동일한 수준의 항체가 생성되었더라도 보호효과가 없었다. 이 결과로 부터, 18β-GA는 면역보조제로서 보호효과가 있는 항체생성 유도효과가 있는 것으로 판정된다. 그러므로 기존의 진균백신 개발 시 항원분리를 위해서 복잡하고 까다로운 공정과 고가의 비용 대신에 손쉽게 18β-GA를 항원에 첨가하여 보호효과가 있는 항체생성을 유도 할 수 있으므로, 본 연구의 결과는 진균백신 개발에 획기적인 도움을 제공할 것으로 평가된다. 현재는 계속적인 연구를 통해서 어떻게 18β-GA가 보호효과가 있는 항체를 유도하는가의 작용기전을 조사 중에 있다.

문 헌

1) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
2) Han, Y., Riesselman, M. H. and Cutler, J. E. : Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. *Infect. Immun.* **68**, 1649 (2000).
3) Han, Y., Kozel, T. R., Zhang, M. X., MacGill, R. S., Carroll, M. C. and Cutler, J. E. : Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J. Immunol.* **167**, 1550 (2001).
4) Banerjee, U., Mohapatra, L. N. and Kumar, R. : Role of antibody in defence against murine candidosis. *Indian J. Med. Res.* **79**, 760 (1984).

5) Lee, J. H. and Han, Y. : Ginsenoside Rg1 helps mice resist to disseminated candidiasis by Th1 type differentiation of CD4+ T cell. *Int. Immunopharm.* **6**, 1424 (2006).
6) Lee, J. H., Lee, J. Y., Park, J. H., Jung, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, Y. S. and Han, Y. : Immunoregulatory activity by daucosterol, a beta-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice. *Vaccine*. **25**, 3834 (2007).
7) Lee, J. H., Park, J. H., Kim, Y. S. and Han, Y. : Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol*. **8**, 1681 (2008).
8) Han, Y. : Effect of 18β-glycyrrhetinic acid on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Yakhak Hoeji*. **51**, 325 (2007).
9) Inoue, H. and Mori, T. : Modulation by glycyrrhetinic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. *B. J. Pharmacol*. **96**, 204 (1989).
10) Yano, S. and Harada, M. : Antiulcer activities of glycyrrhetinic acid derivatives in experimental gastric lesion models. *Chem Pharm Bull*. **37**, 2500 (1989).
11) Teelucksingh, S., Mackie, A. D., Burt, D., McIntyre, M. A., Brett, L. and Edwards, C. R. : Potentiation of hydrocortisone activity in skin by glycyrrhetinic acid. *Lancet*. 1060 (1990).
12) Marandici, A. and Monder, C. : Inhibition by glycyrrhetinic acid of rat tissue 11-hydroxysteroid dehydrogenase *in vivo*. *Steroids*. **58**, 153 (1993).
13) Gumpricht, E., Dahl, R., Devereaux, M. W. and Sokol, R. J. : Licorice compounds glycyrrhizin and 18beta-glycyrrhetinic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem*. **280**, 10556 (2005).
14) MacLeod, M. K., McKee, A., Crawford, F., White, J., Kappler. J. and Marrack, P. : CD4 memory T cells divide poorly in response to antigen because of their cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **23**, 14521 (2008).
15) Chen, G. H., McNamara, D. A., Hernandez, Y., Huffnagle, G. B., Toews, G. B. and Olszewski, M. A. : Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to Cryptococcus neoformans in a mouse model. *Infect. Immun.* **76**, 2379 (2008).
16) Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. and Harrington, L. E. : IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol*. **25**, 821 (2007).
17) Corthay, A. : A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scand. J. Immunol*. **64**, 93 (2006).
18) Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M. and Marciani, D. : Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex. *J. Immunol.* **146**, 431 (1991).
19) Ghochikyan, A., Mkrtichyan, M., Loukinov, D., Mamikonyan, G., Pack, S. D., Movsesyan, N., Ichim, T. E., Cribbs, D. H., Lobanenkov, V. V. and Agadjanyan, M. G. : Elicitation of T cell responses to histologically unrelated tumors by immunization with the novel cancer-testis antigen, brother of the regulator of imprinted sites. *J. Immunol*. **178**, 566 (2007).
20) White, K., Rades, T., Kearns, P., Toth, I. and Hook, S. : Immunogenicity of liposomes containing lipid core peptides and the adjuvant Quil A. *Pharm Res.* **23**, 1473 (2006).
21) Han, Y., Morrison, R. P. and Cutler, J. E. : A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect. Immun.* **66**, 5771 (1998).
22) Han, Y., Kanbe, T. K., Cherniak, R. and Cutler, J. E. : Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect. Immun.* **65**, 4100 (1997).
23) Coutinho, A., Forni, L., Melchers, F. and Watanabe, T. : Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol*. **7**, 325 (1977).
24) Han, Y., van Rooijen, N. and Cutler, J. E. : Binding of *Candida albicans* yeast cells to mouse politeal lymph node is mediated by macrophages. *Infect. Immun*. **61**, 3244 (1993).
25) Han, Y., Ulrich, M. A. and Cutler, J. E. : *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J. Infect. Dis.* **179**, 1477 (1999).
26) Han, Y., Jin B. S., Ko, S. K. and Lee, J. H. : Immunoactivity of ginsenosides Re and Rg1 that enhances resistance of mice against disseminated candidiasis. *Nat. Prod. Sci*. **10**, 134 (2004).