약학회지 제 54 권 제 3 호 187~191 (2010)
Yakhak Hoeji Vol. 54, No. 3

藥學會誌

차가버섯 열수 추출물이 비장세포 증식능과 Cytokine 생성능에 미치는 영향

김보라 · 고숙경 · 표명윤#
숙명여자대학교 약학대학
(Received February 8, 2010; Revised May 10, 2010; Accepted May 10, 2010)

Effects of Hot Water Extract of Chaga Mushroom on the Proliferation and Cytokines Production of Mouse Splenocytes *In Vitro*

Pora Kim, Suk-Kyung Ko and Myoung-Yun Pyo#
College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) has been identified to have various biological activities. This study was performed to investigate the potential of chaga mushroom as a immunomodulating functional food. When mouse splenocytes were exposed to various concentration of hot water extracts of chaga mushroom (IOE) with mitogens (Con A, LPS), splenocytes proliferation was significantly increased. Also, IFN-γ and IL-4 levels were significantly enhanced. Therefore, our results suggest that chaga mushroom may have the potential of being an immunomodulating functional food.

Keywords □ Chaga mushroom, Con A, LPS, IFN-γ, IL-4

생체의 면역계는 각종 이물질 및 병원체의 침입에 대항하는 숙주의 장기, 면역관련세포, 각종 인자 등으로 구성되어 있는 매우 복잡한 계통이며, 면역계 내에서 또는 생체내의 다른 계통과 서로 복잡하게 상호작용을 하고 있다. 이러한 생체의 정상적인 면역기능이 환경오염물질, 의약품의 부작용, 질병 및 노화 등과 같은 매우 다양한 위해요인으로 인하여 억제되거나 또는 바람직하지 않은 변화가 일어날 수 있다. 최근에는 지금까지 인류가 섭취해 온 천연물질로부터 변화된 면역기능을 조정하여 정상으로 회복시키거나 이러한 변화를 최대한 경감시키고 생체방어능력을 증강시키는 물질을 발굴하려는 연구가 매우 활발히 이루어지고 있다.[1)]

차가버섯(*Inootus obliquus*)은 소나무 비늘버섯과 시루뻔버섯속에 속하는 다년생의 담자균 버섯으로, 자연 상태에서 시베리아, 핀란드, 노르웨이, 우크라이나, 홋카이도 등의 북위 45~50도 내의 춥고 습한 북반구의 광대한 지역에 분포하는 극내 한성버섯이다. 국내에서 자생한다는 보고는 아직 없으며, 백색 부후균의 일종으로 자연 상태에서 성장하면 검은색의 균핵덩어리가 되어 자작나무 등의 줄기에 기생하는 것으로 알려져 있다.

현재까지 연구된 바로는 차가버섯은 항종양 활성을 지녀 세포독성을 나타내고 세포성장을 억제[2,3)]한다고 보고되어 있다. 항암작용[4-6)]뿐만 아니라 차가버섯의 추출물은 항산화 작용,[7,8)] 항고지혈증, 항당뇨,[5)] 항진균,[9)] 항바이러스[10)] 효과 또한 있다고 보고된 바 있다. 또한 차가버섯은 항염증, 진통작용[11)]을 지닌다고 알려져 있다. 이와 같이 차가버섯의 다양한 생리활성이 알려지면서 기능성 식품 소재로서 차가버섯에 대한 관심이 높아지고 있다.

본 연구에서는 차가버섯의 면역기능조절 관련 기능식품소재로서의 가능성을 탐색하는 연구의 일환으로, 일차적으로 차가버섯 열수 추출물이 mitogen으로 유도되는 마우스 비장세포의 증식능과 cytokine(IFN-γ, IL-4) 생성능에 미치는 영향을 *in vitro*에서 측정하였다.

실험방법

실험물질 및 추출

서울시 목동에 위치한 상락수에서 구입한 차가버섯을 분쇄하여 분말로 한 다음 건조분말 50 g에 3차 증류수 1 *l*를 가하여 수욕상에서 83°C를 유지하면서 8시간 동안 진탕 추출하고 여과지로 감압여과하여 1차 추출액을 얻고 남은 잔사에 같은 부피의 3

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9573 (팩스) 02-710-9573
(E-mail) mypyo@sookmyung.ac.kr

차 증류수 1 *l*를 가하여 수욕상에서 83°C를 유지하며 4시간 동안 진탕하면서 추출한 후, 여과하여 2차 추출액을 얻었다. 1, 2차 추출액을 합하여 동결건조한 후 -20°C에서 보관하였으며, 실험을 시작하기 직전에 배지액으로 농도별로 희석하여 차가버섯 추출액(IOE)을 만들어 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

본 실험에서 사용한 시약은 RPMI medium 1640 powder, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco Co.에서, 그리고 concanavalin A(Con A), lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma Co.에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium(MTT)는 Amresco에서 구입하였으며, Mouse IFN-γ set, Mouse IL-4 set은 BD Biosciences에서 구입하였다. 기타 시약은 약용 및 특급으로 구입하여 사용하였다. 실험 기기로는 CO_2 incubator(Sanyo), ELISA microplate reader(ELX 800, BIO-TEK instruments) 등을 이용하였다.

실험동물

6~7주령인 Balb/c 암컷 마우스를 (주)샘타코에서 분양받아 고형사료와 물을 자유롭게 공급하면서 실험 동물실에서 1주간 적응시킨 후, 체중 18±1 g의 마우스를 실험에 사용하였다. 실험동물실의 온도는 21~24°C, 습도는 40~60°C, 명암교대는 12시간을 유지하였다.

비장세포액 조제

마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 빙냉의 RPMI-1640 배지액에 넣고 frosted microscope slides로 갈아 비장세포액을 만들어 원심분리(1000 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 상등액을 제거한 후 세포침전물에 RBC lysis buffer를 가하여 원심분리(1000 rpm, 10 min, 4°C)하여 적혈구를 용혈시킨 후 상등액을 제거하였다. 같은 방법으로 배지로 2회 세척하고 침전된 비장세포에 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지액을 가하여 trypan blue exclusion method[12]로 4×10^6 cells/m*l*의 비장세포액이 되도록 조정하였다.

비장세포 증식능 측정

비장세포 증식능에 대한 Con A와 LPS의 최적농도와 배양시간을 예비실험 한 결과 Con A 5 μg/m*l*와 LPS 50 μg/m*l* 그리고 72 시간 배양으로 결정하여 실험하였다. 비장세포액(4×10^6 cells/m*l*)을 96 well plate에 well당 100 μ*l*씩 가하고 각 well에서 차가버섯 추출물의 최종농도가 10, 20, 50, 100 μg/m*l*가 되도록 10% FBS-RPMI 배지액에 녹여 가하였다. 여기에 mitogen(Con A; 5 μg/m*l*, LPS; 50 μg/m*l*) 또는 10% FBS-RPMI 배지액를 가한 후 72시간 동안 배양(37°C, 5% CO_2)하였다. MTT assay[13]는 생존세포의 효소작용에 의해 MTT 시약이 환원되어 생성되는 formazan의 양을 측정함으로써 세포독성 연구와 비장세포 증식능 측정에 자주 사용되며, 측정된 결과도 ^{3}H-thymidine uptake assay의 결과와 유사한 것으로 보고되어[13] 있으므로 본 연구에서는 이 방법을 이용하여 실험하였다. 즉, 배양 후 각 well에 MTT용액(3 mg/m*l*)을 50 μ*l*씩 가하고 4시간 동안 배양한 후에 원심분리(2000 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액을 제거하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO) 원액을 well당 50 μ*l*씩 가하고 10분 이내에 ELISA microplate reader로 흡광도(570 nm)를 측정하였다.

Cytokine(IFN-γ, IL-4) 생성능 측정

정상 마우스를 ether로 치사시킨 후, 비장을 무균적으로 적출하여 위와 같은 방법으로 비장세포액을 조제한 후, 24 well flat bottomed plate에 세포액 500 μ*l*(4×10^6 cells/m*l*)을 가하였다. 1시간 배양(37°C, 5% CO_2)하여 안정시킨 후, 각 well에서 차가버섯 추출물의 최종농도가 10, 20, 50, 100 μg/m*l*가 되도록 가하고, 다시 1시간 후 Con A(5 μg/m*l*)를 가하여 48시간 동안 배양하여 얻은 배양액을 -70°C에 보관하면서 사용하였다. BD Biosciences에서 제공한 sandwich ELISA법에 준하여 배양액 중의 cytokine 생성량을 측정하였다. 즉, anti-mouse IFN-γ monoclonal antibody 또는 anti-mouse IL-4 monoclonal antibody를 96 well flat bottomed plate(Dynex Immulon 4HBX)에 도포한 후 acetate plate sealer로 밀봉하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 washing buffer로 5회 또는 3회 세척하고 각 well에 200 μ*l*의 10% FBS-PBS를 가하고 1시간 동안 실온에서 방치하였다. 3회 세척 후 비장세포를 배양하여 얻은 배양액을 각 well에 100 μ*l*씩 duplicate로 가하고, 검량선을 작성하기 위해서는 recombinant mouse IFN-γ를 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 pg/m*l*, recombinant mouse IL-4를 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 0 pg/m*l* 농도로 희석하여 100 μ*l*씩 duplicate로 가한 후, plate를 acetate plate sealer로 봉하여 실온에서 2시간 방치하였다. IFN-γ 5회, IL-4는 3회 반복 세척한 후 biotinylated anti-mouse IFN-γ polyclonal antibody 또는 biotinylated anti-mouse IL-4 polyclonal antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 동량 섞은 용액을 well당 100 μ*l*씩 가하였다. 실온에서 1시간 방치한 뒤 plate를 IFN-γ는 10회, IL-4는 7회 세척하였다. 3,3',5,5'tetramethylbenzidine(TMB)과 hydrogen peroxidase를 사용 직전에 동량 섞어서 각 well당 100 μ*l*씩 가한 뒤 실온, 암소에 30분간 방치 후 50 μ*l*의 2 N-H_2SO_4를 가해 반응을 정지시킨 다음 30분 이내에 450 nm에서 ELISA microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 자동적으로 배양액 중의 cytokines(IFN-γ, IL-4) 함량을 산출하였다.

통계분석

각 실험군의 측정값의 평균과 표준편차를 구하고, 대조군과의

차이를 Student t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

실험결과 및 고찰

비장세포 증식능에 미치는 영향

차가버섯 열수 추출물(IOE)이 비장세포 증식, Con A로 유도되는 T 세포 반응 및 LPS로 유도되는 B 세포 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *in vitro*에서 비장세포에 IOE만을 가하여 배양하거나, mitogen(Con A, LPS)과 IOE를 동시에 처리하여 배양한 후 비장세포의 증식정도를 MTT assay로 측정하여 그 결과를 Fig. 1~3에 나타내었다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 정상 마우스의 비장세포에 이미 mitogen으로 잘 알려져 실험에 많이 사용하는 Con A 또는 LPS를 첨가하여 배양한 군의 흡광도 값이 mitogen을 첨가하지 않고 비장세포만을 배양한 군의 흡광도 보다 높아 mitogen에 의해 비장세포 증식이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 비장세포에 IOE을 농도별로 가하여 72시간 배양 후 측정된 흡광도값이 비장세포만을 배양한 대조군의 흡광도값에 비하여 모든 군에서 유의성 있게 증가되었으며 특히 100 μg/m*l* 농도에서는 현저히 증가되었다. 이러한 결과로 면역 조절 활성이 있는 것으로 알려진 여러 천연물질과 유사하게 차가버섯 열수 추출물이 시험관에서 비장세포에 분열 촉진인자(mitogen)으로 작용하여 비장세포 증식능을 증가시키는 것을 알 수 있었다.

차가버섯 열수 추출물이 Con A로 유도되는 T 세포 반응에 미치는 영향을 알아 보기 위해 정상마우스의 비장세포에 IOE를 농도별로 첨가하고 T 세포 분열 촉진인자인 Con A을 처리하여 72시간 배양 후 측정된 실험군의 흡광도가 비장세포에 IOE를 가하지 않고 Con A만을 처리하여 배양한 대조군의 흡광도와 비교해 보면(Fig. 2), IOE를 처리한 모든 농도에서 10~20% 정도 유의성 있게 증가되었다. T 세포는 지연형 과민반응, 세균이나 바이러스 감염에 대한 저항, 장기이식 거부반응 및 종양에 대한 면역반응 등의 세포성 면역반응에 관여할 뿐만 아니라 B 세포나 다른 세포에 의해 진행되는 면역반응을 조절하는 기능을 가지고 있고, Con A는 시험관내에서 비장세포중의 T 세포를 활성화 시키는데 사용되는 분열촉진인자이다.[15] 그러므로, 차가버섯 열수 추출물의 첨가로 Con A로 유도되는 비장세포 증식이 증가된 본 실험의 결과는 차가버섯 열수 추출물이 세포성 면역반응을 증강

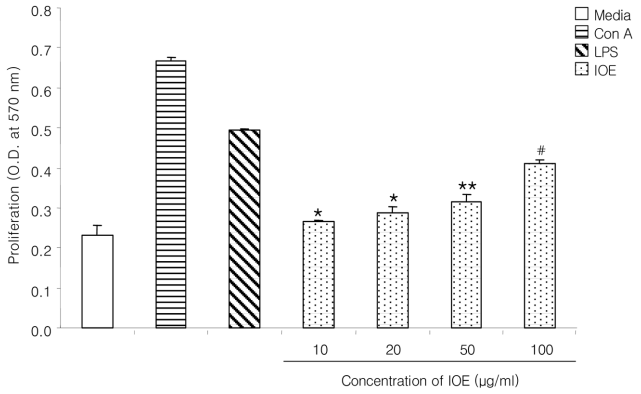

Fig. 1 – The effects of IOE on the proliferation of mouse splenocytes *in vitro*. Mouse splenocytes were stimulated without mitogens in the presence of various concentration of *Inonotus obliquus* hot water extracts (IOE) for 72hrs. Control group (Media) was cultured without mitogens and IOE. The splenocytes proliferation was assessed by MTT assay. Results are the means±S.D. of 3 different experiments and all experiments were done in triplicate. Significant difference from control (*p<0.05, **p<0.01, #p<0.001).

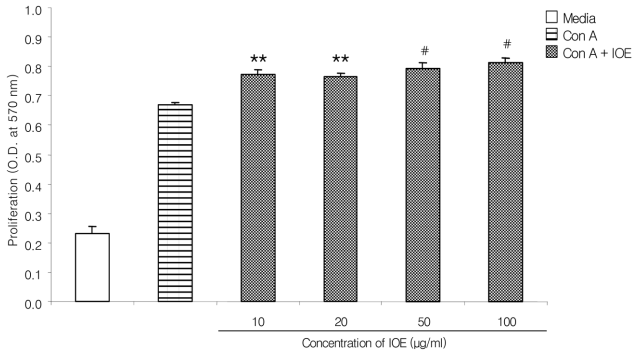

Fig. 2 – The effects of IOE on the splenocytes proliferation induced by Con A *in vitro*. Mouse splenocytes were stimulated with Con A (5 μg/m*l*) in the presence of various concentration of *Inonotus obliquus* hot water extracts (IOE) for 72 hrs. Control group was cultured with Con A alone. Other legends and methods are the same those as described in Fig. 1. Significant difference from control (**p<0.01, #p<0.001).

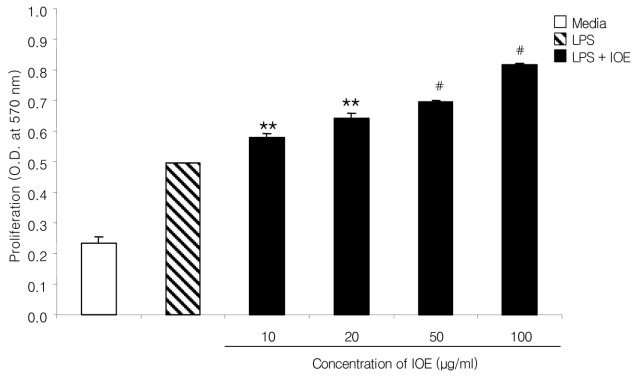

Fig. 3 – The effects of IOE on the splenocytes proliferation induced by LPS *in vitro*. Mouse splenocytes were stimulated with LPS (50 μg/m*l*) in the presence of various concentration of *Inonotus obliquus* hot water extracts (IOE) for 72 hrs. Control group was cultured with LPS alone. Other legends and methods are the same those as described in Fig. 1. Significant difference from control (**p<0.01, #p<0.001).

시키는 작용을 나타낼 수 있는 가능성을 시사해 주고 있다.

또한, 정상마우스의 비장세포에 B 세포 분열촉진인자인 LPS를 가하고 IOE를 농도별로 처리하여 72시간 배양 후 측정된 실험군의 흡광도가 비장세포에 IOE를 가하지 않고 LPS만을 첨가하여 배양한 대조군의 흡광도와 비교해 보면(Fig. 3), IOE 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 20, 50, 100 μg/m*l* 농도에서 각각 30%, 40%, 64% 정도 유의성 있게 증가되었다. B 세포는 항원의 자극과 T 세포 등의 도움으로 항체를 분비하는 형질세포로 변화하는 체액성 면역반응에 관여하는 세포이며, LPS는 시험관내에서 비장세포 중의 B 세포를 활성화 시키는 데 사용되는 분열촉진인자이다.[16] 그러므로, 차가버섯 열수 추출물의 첨가로 LPS로 유도되는 비장세포 증식이 증가된 본 실험의 결과는 차가버섯 열수 추출물이 체액성 면역반응을 증강시키는 작용을 나타낼 수 있는 가능성을 시사해 주고 있다.

Kim 등[17] 차가버섯을 배양하여 얻은 수용성 endo-polysaccharide가 비장세포 증식과 B 세포 증식을 증가시켰으나, T 세포 증식과 T 세포에 의해 유도되는 cytokine 생성에는 영향이 없는 것으로 보고하였는데, 이는 차가버섯 열수 추출물에 대한 본 실험결과와 차이가 있어 이에 대한 체계적인 연구가 필요하다고 생각된다.

비장세포의 cytokine 생성능에 미치는 영향

차가버섯 열수 추출물이 Con A로 유도되는 비장세포의 cytokine 생성능에 미치는 영향을 알아보기 위해 정상마우스의 비장세포에 Con A와 차가버섯 열수 추출물을 농도별로 가하여 48시간 배양 후 배양액 중의 IFN-γ와 IL-4의 생성량을 측정하여 그 결과를 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다.

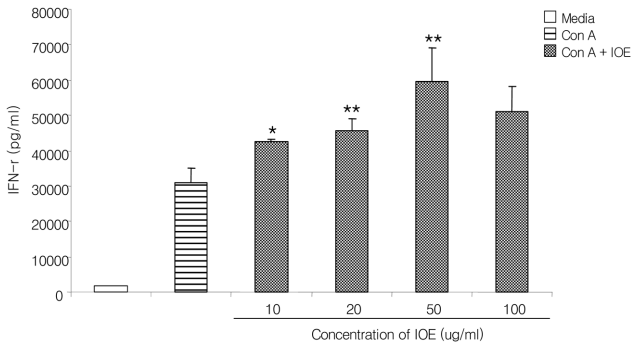

Fig. 4 – The effect of IOE on the IFN-γ production from splenocytes stimulated with T cell mitogen *in vitro*. Mouse splenocytes were cultured with *Inonotus obliquus* hot water extracts (IOE) in the presence of Con A (5 μg/m*l*) for 48 hrs. Control group was cultured with Con A alone. Cytokine level in culture supernatant was determined by ELISA assay. The results are expressed as the means±S.D. of 3 separate experiments (duplicated for experiment). Significant difference from control (*p<0.05, **p<0.01).

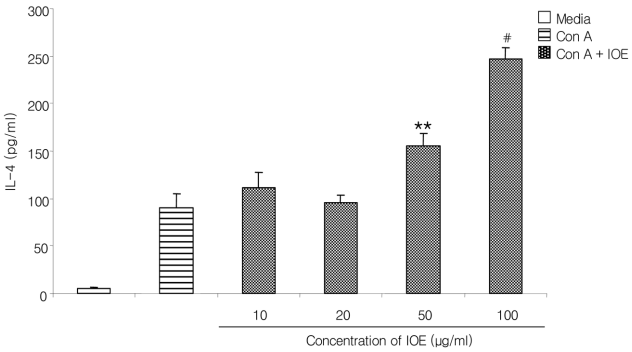

Fig. 5 – The effect of IOE on the IL-4 production from splenocytes stimulated with T cell mitogen *in vitro*. Other legends and methods are the same those as described in Fig. 4. Significant difference from control (**p<0.01, #p<0.001).

Fig. 4에서 보는 바와 같이 T 세포만을 활성화시키는 Con A를 가한 비장세포에 IOE를 첨가하여 배양 후 배양액 중의 IFN-γ 생성량을 측정한 결과, IOE를 첨가하지 않고 Con A만을 가한 대조군에 비하여 증가되는 경향을 보였으며, 100 μg/m*l* 농도를 제외한 모든 군에서 대조군에 비하여 뚜렷이 유의성있게 증가하였다. 또한, IL-4의 생성량(Fig. 5)도 Con A만을 가한 대조군에 비교해 보면 차가버섯 열수 추출물의 농도가 50과 100 μg/m*l*일 때 유의적으로 현저히 증가하였다.

T 세포의 아집단인 보조 T 세포(helper T 세포, Th cell)는 다른 임파구의 활성화를 촉진하며 각종 세포활성물질을 생성하는데, 생성하는 세포활성물질의 종류의 차이에 따라 type 1 T 세포(Th1)와 Type 2 T 세포(Th2)의 아집단으로 분류된다. IFN-γ는 Th1 세포가 생성하는 대표적인 특징 cytokine이며, IL-4는 Th2 세포에서 분비되는 대표적인 cytokine으로 이들은 T 세포 아집단을 구분할 때도 주로 사용된다.[16,18] 따라서 시험관내에서 차가버섯 열수 추출물의 직접 노출에 의해 Con A로 유도되는 비장세포의 cytokine이 IOE의 농도에 따라 차이는 있으나 대조군보다 모두 증가되어 차가버섯 열수 추출물이 Th1 반응과 Th2 반응유도 가능성을 시사해 주고 있어 이에 대한 체계적인 연구가 본 연구실에서 진행되고 있다.

결 론

차가버섯 열수 추출물이 *in vitro*에서 비장세포 증식을 증가시키고, T 세포 mitogen인 Con A와 B 세포 mitogen인 LPS로 유도되는 비장세포 증식도 항진시켰다. 또한 차가버섯 열수 추출물은 cytokine(IFN-γ, IL-4)의 생성을 유의적으로 증가시켜 세포성 및 체액성 면역반응을 증강시킬 수 있는 가능성을 시사해 주어 차가버섯의 면역조절 기능식품 소재로서의 개발 가능성에 대한 계속적인 연구가 본 연구실에서 진행되고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2009학년도 교내연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1) Pyo, M. Y., Hyun, S. M. and Yang, K. S. : Effects of *Phellinus lineus* Extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. *Kor. J. Appl. Pharmacol.* **9**, 194 (2001).
2) Hu, H. H., Zhang, Z. Y., Lei, Z. F., Yang, Y. N. and Sugiura, N. : Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*. *J. Biosci. Bioeng.* **107**, 42 (2009).
3) Nomura, M., Takahashi, T., Uesugi, A., Tanaka, R. and Kobayashi, S. : Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis. *Anticancer Res.* **28**, 2691 (2008).
4) Youn, M. J., Kim, J. K., Park, S. Y., Kim, Y., Kim, S. J., Lee, J. S., Chai, K. Y., Kim, H. J., Cui, M. X., So, H. S., Kim, K. Y. and Park, R. : Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) induces G0/G1 arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *World J. Gastroenterol.* **14**, 511 (2008).
5) Kim, M. A., Jeong, Y. S., Chun, G. T. and Cha, Y. S. : Antihyperlipidemic and glycemic control effects of mycelia of *Inonotus obliquus* including protein-bound polysaccharides extract in C57BL/6J mice. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 667 (2009).
6) Ham, S. S., Kim, S. H., Moon, S. Y., Chung, M. J., Cui, C. B., Han, E. K., Chung, C. K. and Choe, M. : Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **672**, 55 (2009).
7) Cui, Y., Kim, D. S. and Park, K. C. : Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *J. Ethnopharmacol.* **96**, 79 (2005).
8) Park, Y. K., Lee, H. B., Jeon, E. J., Jung, H. S., and Kang, M. H. : Chaga mushroom extract inhibits oxidative DNA damage in human lymphocytes as assessed by comet assay. *Biofactors* **21**, 109 (2004).
9) Kahlos, K. and Tikka, V. H. : Antifungal activity of cysteine, its effect on C-21 oxygenated lanosterol derivatives and other lipids in *Inonofus obliquus*, *in vitro*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 385 (1994).
10) Ichimura, T., Otake, T., Mori, H. and Maruyama, S. : HIV-1 protease inhibition and anti-HIV effect of natural and synthetic water-soluble lignin-like substances. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 2202 (1999).
11) Park, Y. M., Won, J. H., Kim, Y. H., Choi, J. W., Park, H. J. and Lee, K. T. : *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *J. Ethnopharmacol.* **101**, 120 (2005).
12) Mischell, B. and Shiigi, S. : Preparation of mouse cell suspension. In *Selected methods in cellular immunology*, pp. 1-27. W. H. Freman and company, San Fransisco (1980).
13) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
14) Ciapetti, G., Cenni, E., Pratelli, L. and Pizzoferrato, A. : *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* **14**, 359 (1993).
15) Mischell, B. and Shiigi, S. : *Selected methods in cellular immunology*, W. H. Freman and company, San Fransisco, p. 156 (1980).
16) Swain, S. L., Bradley, L. M., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A. D., Duncan, D. D., Hedrick, S. M., Dutton, R. W. and Huston, G. : Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol. Rev.* **123**, 115 (1991).
17) Kim, Y. O., Han, S. B., Lee, H. W., Ahn, H. J., Yoon, Y. D., Jung, J. K., Kim, H. M. and Shin, C. S. : Immuno-stimulating effect of the endo-polysccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sciences* **77**, 2438 (2005).
18) Abbas, A. K. and Lichtman, A. H. : *Basic immunology: functions and disorders of the immune system* 2nd ed., Sanders, Philadelphia, p. 95 (2006).