真菌 β -1,3-グルカンの構造と生物活性

宿前利郎

東京薬科大学薬学部第一微生物学教室, 〒192-0392 八王子市堀の内 1432-1

Structure and Biological Activities of Fungal β -1,3-Glucans

Toshiro YADOMAE

Laboratory for Immunopharmacology of Microbial Products, School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1 Horinouchi,
Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

(Received December 16, 1999)

This paper summarizes the structure, biological activities, signaling, and metabolic degradation of fungal β -1,3-glucans. Fungal β -glucans exist both soluble and particulate forms. Conformation of the soluble β -glucan was classified into three groups: triple helix, single helix and random coil. Fungal β -1,3-glucans exhibit a variety of biological and immuno-pharmacological activities, and the significance of these activities is dependent on the structure, such as solubility in water, molecular weight, degree of branching, and conformation. Many of the activities, such as nitrogen oxide synthesis of macrophage and limulus factor G activation, were dependent on the conformation, but some of the others were independent, such as interferon- γ and colony stimulating factor syntheses. These activities are beneficial and pharmacologically useful, while some strongly related to allergic and inflammatory adverse reactions. It should be noted that the β -glucans, once administered into the body, remain mainly in the liver and spleen for a very long period of time. The activity, at least in part, is maintained during these periods. The biochemical mechanisms of the β -glucan, especially in soluble form, mediating biological activity was still not clearly demonstrated.

Key words— β -glucan; immunopharmacology; allergy; fungi; antitumor activity; conformation

はじめに

β -グルカンは真菌, 細菌, 植物など自然界に広く分布している。 β -グルカンは各々の生物において生物学的な機能を発揮するのは勿論のこと, 生物間のやり取りにおいても様々な役割を演じ (例えば, 生体防御系の刺激作用など), あるいは産業上も重要な素材であることから注目されている。これまでに構造解析された例も多く, おおのこの構造の細部を比較すると微妙に異なっている。しかし, これらは生物 (微生物) 由来であり, 用いた材料の個体差, 抽出方法の微妙な違い (これは抽出過程での部分分解も含む), 分析方法並びにそれらの精度を考慮したとき, 何が本当に意味のある差なのかについては一概に結論をだすことはできない。菌類 β -グルカンが医学薬学領域で注目されたのは 1960 年代まで遡ると思われる。現在医薬として利用されているレンチナン (lentinan, LNT), ソニフィラン (schizophyllan, sonifilan, SPG) の基礎研究はここより始まる。さらに“民間伝承薬”にまで遡るとすると“菌類生薬”として猪苓, 靈芝など多くの研究が展開されており, 研究の根本を探すのは現実的ではない。

当然, これらにまつわる総説, 解説, 書籍も先達により, 多数報告されている。¹⁻⁷⁾ 我々は, 1980 年ごろより β -グルカンの解析を開始した。本稿では当研究室で得られた成果を中心に β -グルカンの構造と生物活性について現在までの到達点を示したい。通称 β -グルカンは巷に広まった言葉であるが, ここでは非セルロース系の β -グルカン, 主に β -1,3-結合並びに β -1,6-結合を含む β -グルカンについて論じる。

 β -グルカンの基本構造と分布

我々が主に解析してきた β -グルカンは, マイタケ *Grifola frondosa*,⁸⁻²³⁾ 菌核菌 *Sclerotinia sclerotiorum*,²⁴⁻²⁷⁾ 雷丸 *Omphalia lapidescens*,^{28, 29)} オオチャワнтаケ, *Peziza vesiculosa*,^{30, 31)} ハナビラタケ *Sparaxis crispa*, アガリクスタケ *Agaricus blazei*, 並びにカンジダ *Candida* sp.³²⁾ より調製したものである。マイタケについては, 子実体, 菌蓋 (子実体の根元の部分), 菌糸体の発酵によって菌体外に放出された画分について検討した。前二者については熱水抽出, 冷アルカリ抽出, 熱アルカリ抽出を順次行い多糖画分を得て精製した。基本構造の類似した多糖が得られ, グリフォラン (grifolan, GRN, マイタ

ケ由来の抗腫瘍性 β -1,3-グルカン)と命名した。精製の簡便さから、現在では発酵法によって得られたものを主に用いている。菌核菌については、液体培養外液からSSG(菌核菌由来(液体培養濾液)の抗腫瘍性 β -1,3-グルカン)を、菌核のアルカリ抽出物からTSG(菌核菌由来(菌核)の抗腫瘍性 β -1,3-グルカン)を得た。菌核の熱水抽出物からはリンパ球幼若化物質も単離した³³⁻³⁵⁾が、これは本稿の趣旨と異なるので別の機会に紹介したい。雷丸並びにオオチャワンタケについてはアルカリ抽出から各々OL-2(雷丸由来の抗腫瘍性 β -1,3-グルカン)、PVG(オオチャワンタケ由来の抗腫瘍性 β -1,3-グルカン)を得た。ハナビラタケ並びにアガリクスタケについては子実体の熱水、冷アルカリ、並びに熱アルカリ抽出を行いSCG(ハナビラタケ由来の抗腫瘍性 β -1,3-グルカン)、AGG(アガリクスタケ由来の抗腫瘍性 β -1,6-グルカン)を得た。カンジダについては、菌体の次亜塩素酸酸化物をジメチルスルホキシドで抽出することにより、CSBG(カンジダ細胞壁 β -グルカンの可溶化物)を得た。

上述の β -グルカンの基本構造をFig. 1に示した。これらの構造は2つに大別できる。すなわち主鎖を β -1,3-とするものと β -1,6-とするものである。GRN, SSG, PVG, OL-2, SCGは主鎖を β -1,3-とする β -グルカンであり、側鎖はどれも β -グルコース1残基からなる。分岐度は菌ごとにかなり異なり、GRNでは主鎖3残基に1残基の割合(分岐度1/3)、SSGは1/2、OL-2は2/3、PVGは1/5であった。LNTでは2/5、SPGでは1/3と報告されているから、いずれの β -グルカンも主鎖の数個おきに分岐を有する基本構造をとっていると考えられる。一方、AGGは主鎖を β -1,6-とする β -グルカンであり少量の側鎖を有する。CSBGは両方の構造を併せ持つような基本構造であり、長い β -1,3-鎖に重合度10—50程度の β -1,6-鎖が結合し、さらにこの β -1,6-鎖が少量の分岐を持つ構造である。基本構造は上記のとおりであるが、微細構造、すなわち分岐度の不均一性や主鎖間の結合など、についてはほとんど解析を行っていない。GRN(菌蓋由来のGRN-NMF5N)については、酵素分解を行ったところ、約50%が分解抵抗性であったことから、分岐度に多少の偏りがあることを見出している¹⁵⁾。菌体(子実体)の成長過程でいかなる酵素群が多糖の生合成に関与しているかはまだ不明であり、微細構造を知るには分子生物学的方面からの解析が必要であろう。

茸の粗抽出物多糖組成を比較すると菌ごとに特徴があった。マイタケではGRNの他に β -1,6-結合を主結合様式とする β -グルカンが含まれていた。一方、ハナビラタケや菌核菌では抽出成分のほとんどが β -1,3-結合を主結合様式とする多糖であった。また、アガリクスでは β -1,3-を主結合様式とする多糖はほとんど検出できなかった。雷丸からもヘテロ多

Fig. 1. Architecture of Fungal β -Glucans

A) GRN, OL-2, SSG, PVG, SPG; B) AGG, C) CSBG. Ratio of branch is varied in each β -glucan.

糖が得られている。難波らは、マイタケのMDフラクション(D-フラクション)の基本構造が β -1,6-を主鎖としていると報告している^{36, 37)}。このように含有される多糖の種類は菌ごとにかなり差があることがわかった。しかし、我々が単離した β -グルカンは菌の有する様々な多糖のごく一部であり、これらが各々の菌を代表する β -グルカンであるか否かについて論じることは難しい。分画精製の評価系としてマウスでの抗腫瘍活性を指標としたので、ここで比活性が低い分画は詳細な解析を行っていない。これまでに詳細な解析を行わなかった多糖についても、評価系によっては活性を担う物質となる可能性もあろう。

β -グルカンはいずれも高分子量であり、ゲル濾過分析では100万前後の分子量を示すが、分布もかなり広い。これは抽出過程でアルカリ処理等を行い、部分的に鎖の切断が起きていることにも起因しているであろう。CSBGは一旦アルカリに溶解すると、中和後も水溶性である。カンジダ細胞壁は β -1,3-並びに β -1,6-グルカンから構成されており、細胞壁の物理的強度を与えるため、構成多糖は水不溶である。CSBGは可溶性 β -グルカンを得るために、次亜塩素酸酸化というかなり激しい処理を加え、部分的に細胞壁を切断して、可溶化しえたものである。このことから、本来は巨大で不溶性であったものを部分分解して、可溶化したといえる。SPGは製造過程で超音波処理を行うことで棒状三重螺旋体を導き、分子量をそろえて、医薬品として用いている。³⁸⁻⁴⁰⁾このような処置を行わない限り、分子量分布はかなり広いと考えるべきであろう。

グルカンの高次構造

β -1,3-グルカンの高次構造は、電子顕微鏡、X線、固体高分解能 NMR によって主に解析されており、カードラン (CRD, *Alcaligenes faecalis* 由来の β -1,3-グルカン)、LNT、SPG については三重螺旋構造が提示されている。⁴¹⁻⁴⁵⁾ 斎藤らは LNT 並びに CRD について、通常の溶液での高分解能 NMR を用い、相転移についても解析している。我々は、高次構造が生物活性にどのような影響を与えるかに着目し、溶液中での挙動を中心に NMR を用いて解析してきた。⁴⁶⁻⁴⁸⁾

高分子量の β -1,3-グルカンは、中性水溶液の NMR を測定すると、ほとんど検出できるシグナルを示さないという特徴を有している。これは β -1,3-グルカンが螺旋構造をとりうるという性質と一致した物性である。すなわち、高分子量の β -1,3-断片は水素結合を介した分子間相互作用が多く、そのため分子運動性が著しく制限されるので、NMR において観測可能な線幅のシグナルを与えないものと考えられる。一方、アルカリ濃度を上昇させると、分子間相互作用が減弱し、徐々にシグナルが観察されるようになり、約 0.3 N でシャープなシグナルとなる。0.3 N 以下では、特に 85 ppm 前後に現れる C-3 由来のシグナルの化学シフトは濃度依存的に変化し、特に低濃度では低磁場シフトが起き、このシグナルは運動性の上昇した一重螺旋構造によるものであると推定されている。

固体高分解能 NMR でも GRN の高次構造を解析したが、乾燥の仕方によって、一重螺旋構造を主にとる場合と三重螺旋構造を主にとるものの両方の状態が導けることがわかった。これらの結果、並びに後述する生化学的性質を総合的に判断して、高分子量の β -グルカンの高次構造並びにその相変化に関しては、Fig. 2 のように考えられるものと推定した。

β -1,3-グルカンの高次構造をいかに制御するかは生物活性を評価する上でも重要な問題である。水溶液中での高次構造を簡便に測定する必要がある。後述するように、カプトガニ体液凝固系は一重螺旋並びにランダムコイルに選択的に反応するので、これを用いることで微量で、高次構造の変化を見ることができた。この方法を用いることで、我々が解析してきた、分岐 β -1,3-グルカンではいずれも三重螺旋構造が安定であり、一旦一重螺旋にしても徐々に三重螺旋に移行することがわかった。一重から三重への変化は、GRN、SPG では低温下でも進行したが、CSBG は高圧蒸気滅菌によって初めて三重への変化が誘導された。また、水溶液を加圧下に 135 度以上に加熱すると、ランダムコイル状態になるが、冷却条件によって三重螺旋の含量に差が生じた。

以上のように、 β -1,3-グルカンの高次構造は条件によって著しく異なるので、生物活性を評価するためには、いかなる高次構造における活性であるのか

Fig. 2. Ultrastructure and Conformational Change of β -Glucans

を可能な限り、明確にすべきである。

種々の生物の β -グルカンに対する応答とその医学薬学への応用

カプトガニの体液凝固系はリムルス試験としてよく知られ、医薬品製造において無くてはならない存在である。リムルス試験は発熱性物質試験に代わって日本薬局方でエンドキシンの測定に使用されている。カプトガニはこの C 因子系のほかに、 β -1,3-グルカンと特異的に反応する G 因子 (カプトガニの β -1,3-グルカン特異的因子、リムルス G 因子) 系を含有していることが森田らにより見出された。⁴⁹⁾ これは更に田中らにより発展され、深在性真菌症の早期診断のための臨床試薬として利用されている。⁵⁰⁻⁵⁵⁾ 我々は構造活性相関の観点からこの反応系に興味を抱き 1989 年から解析をはじめた。⁵⁶⁻⁵⁸⁾ その過程で、G 因子のリムルス反応性は高次構造依存性があり、三重螺旋構造はほとんど反応しないことを SPG を用いて明らかにした。現在、患者血漿中の G 因子陽性物質の検出には血漿のアルカリ前処理が用いられているが、これは、三重螺旋構造を一重螺旋構造に変換するためにも合目的な処理である。

リムルス試薬を用いた臨床診断において常に論議されてきた点に、標準品の設定があげられる。C 因子系を活性化する細菌内毒素であれ、 β -グルカンであれ、いずれも高分子であり、有機化合物、ホルモンやサイトカインのように単一な成分としては存在しえない。細菌内毒素は O 抗原の長さの様々なものが混在しているのが天然型であり、真菌細胞壁を構成する β -グルカンもどのような分解、調製様式を経るかによって、分子量分布はかなり広い。G 因子系では更に、分岐度の異なる β -グルカンでは反応性は著しく異なることを明らかにした。臨床試薬として利用していくためには、これをふまえた上で基準値を設定する必要がある。従来標準品には、茯苓由来のパヒマンあるいは細菌の産生する β -グルカンである CRD が使用されている。しかし、深在性真菌症を診断するからには病原真菌から得るべきであるとの考えに立ち、我々は *Candida albicans* 細胞壁から次亜塩素酸酸化を行うことによって G 因子活性化能の高い β -グルカン (CSBG, カンジダ細胞壁 β -グルカンの可溶化物) を可溶化した (上述)。一方、

この β -グルカンは細胞壁を構成する成分であるので、本来は水には不溶であるはずである。この考えにたち、我々は完全合成培地を用いて *C. albicans* を培養し、菌体外多糖画分中からも G 因子活性化物質 (CAWS, カンジダ可溶性多糖画分) を見出した。⁵⁹⁾ これはマンナン- β -グルカン複合体構造をとり、菌が伸長する時に自己融解酵素により部分分解されて生じたものであろうと考えられる。事実、カンジダは β -1,3-グルカナーゼを有することが報告されている。

β -グルカンは天然に広く存在する。様々な製品に対する細菌内毒素汚染に対して、厳密な制御が行われていることと対比すると、 β -グルカンの制御については、ほとんど考慮されていないといっても過言ではない。発熱性を指標にすると、 β -グルカンはほとんどその活性を示さないが、ある種の呼吸器病の原因となる可能性のあることが報告されている (後述)。また、様々な免疫薬理活性も示す。これらのことから、 β -グルカンは生体に様々な影響を与えているので、本来は制御されるべきものであろう。リムルス試薬の特異性は厳密に解析されているので、本評価系は様々な局面での β -グルカン含量の評価に有用であろう。

β -グルカンの特異的反応系はカプトガニ以外でも様々な生物で認められている。蚕のフェノール酸化酵素系もそのひとつであり、ここから開発された SLP 試薬 (カイコ由来の β -1,3-グルカン、ペプチドグリカン検出試薬) は β -グルカンと反応することが知られている (ペプチドグリカンとの反応性も認められているので、厳密に β -グルカン特異的と言えるか否かは精査が必要である)。様々な β -グルカンをこの反応系に添加したところ、分岐の多寡によらず比較的一定の反応性を示し、リムルスの特異性とは異なる構造活性相関を示した。⁶⁰⁾ 魚や甲殻類にも β -グルカンに反応する生体防御系があることが知られている。この系は養殖における感染防御に応用されている。

植物は病原菌の進入に対して生体防御反応を起こすことが知られている。この誘導に β -グルカンが重要であることが 1980 年代後半の Albersheim 一派の研究に端を発し詳細に解析されている。感染局所において、植物の産生した β -グルカナーゼが菌体の細胞壁を部分的に分解し、遊離したオリゴ糖がエリシッターとして作用し、生体防御にかかわる様々な遺伝子を動因するという機序であるとされている。⁶¹⁻⁶⁵⁾ Albersheim らが始めに同定したオリゴ糖は β -1,3 分岐の β -1,6-グルコオリゴ糖であったが、その後の解析によって、 β -1,3- を主鎖とするオリゴ糖を認識するシステムも存在し、どちらの構造が重要であるかは、植物ごとに異なることが報告された。病害微生物に抵抗性の植物の作出のためにも、この分野について、更に詳細な解析が必要である

う。

免疫薬理作用の構造活性相関

β -グルカン並びに関連物質として、クレスチン、LNT, SPG が悪性腫瘍患者に利用されている。類似化合物で効果のより高いものを検索し、あるいは、作用機序を分子レベルで解析することで、より有効な治療法を開発しようとの試みは多くなされてきた。それらの化合物あるいは方法は“免疫応答修飾物質 (biological response modifier)”と呼ばれ、また最近サイトカインや遺伝子治療への著しい展開のなかで、“バイオセラピー”と呼ばれるようになってきた。様々な角度からの解析や開発が行われているが、根本には“腫瘍免疫の存在”があげられる。宿主に腫瘍に対する免疫系が存在しないとするならば、これらはすべて無駄な方向へ向かっていることになる。しかし、90 年代以降、メラノーマ患者からの melanoma associated antigen (MAGE) 遺伝子の発見、HIV (human immunodeficiency virus) や移植などによる高度に免疫不全に陥った患者での癌発生率の上昇、ウイルス感染と発ガンとの関連など、腫瘍免疫の存在を肯定する具体例があげられてきた。一方、癌細胞自身の免疫抑制作用についてもサイトカイン、シグナル伝達などの観点から明らかにされてきた。これらのことから、腫瘍免疫は存在するが、様々な条件によって、その機能が十分に発揮できない状況がつくられていると考えてよいであろう。本来存在する腫瘍免疫系をいかにしたら有効に働かせるかについて具体的方法を開発すべきである。これらに関しては癌ワクチン療法、遺伝子治療など各方面から総説も多く出版されている。ここでは、我々が得た結果を中心に以下に紹介する。

我々は β -グルカンを中心として、様々な生物活性について比較検討し、 β -グルカンの特性を余すところ無く見出すことを目的として解析してきた。狭義には β -グルカン特異的でないもの、薬理作用と呼ぶことがふさわしくないとされるものも含まれるが、全体像の把握のため、それらも取り上げてきた。Table 1 には得られた結果の要約を構造活性相関の立場から示したが、一見体系的では無い様々な活性が羅列された形になった。体系化は今後の問題であると考えている。また、穴のあいた部分 (未検討部分) が多々あるが、各々の物質の研究時期にズレがあるので、これはやむをえないことであった。

はじめに着目したのは、抗腫瘍活性についてである。抗腫瘍多糖として注目されてきたのでこれ抜きには考えられない。近交系での実験や転移抑制に関する成果も得ているが構造活性相関の立場からは検討できていないので一覽には示していない。最も興味深い成績は分岐度と活性の関連である。他の研究者によっても類似の結論は得られているが、高分岐の OL-2 (分岐度 2/3) は固形癌に対する作用は著しく弱かった。また、分岐の無い CRD でも活性は著

Table 1. Immunopharmacological and Immunotoxicological Activities of Soluble and Particulate β -Glucans

Source	LAM	CRD	SPG	SPG-OH	GRN	SSG	OL-2	CSBG	ZYM	ZYC
	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Schizophyllum commune</i>		<i>Grifola frondosa</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Ompharia lapidescence</i>	<i>Candida albicans</i> NaClO/DMSO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Branching ratio	DB=0/6	DB=0/6	DB=2/6	DB=2/6	DB=2/6	DB=3/6	DB=4/6	1,3- + 1,6-	1,3- + 1,6-	1,3- + 1,6-
Average mol. wt. (solvent)	5×10^4	DPn 450	4.5×10^5	1.5×10^5	$> 10^6$	$> 10^6$	2.5×10^5	$> 10^6$		
Conformation	r	s+t	t	s+t	s+t	s+t	s+t	(DMSO)	particle	particle
% of single helix (by limulus G test)			0	89	93	1	8	> 90		
%N (elemental analysis)								0.20%	2.28%	0.25%
«in vivo»										
Blood clearance			slow	fast				fast		
Antitumor activity (solid)	×	Δ	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	Δ	$\odot$	$\odot$	$\odot$
Antitumor activity (ascites)	×		×		$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$		
Colony stimulating factor production (ascites)		×	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$
Colony stimulating factor production (serum)			$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	×	
Enhance colony forming unit in bone marrow			$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$
Recovery from cyclophosphamide induced leukopenia			$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$		$\odot$		$\odot$
NO synthesis of PEC		×	×	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$
Enhance H_2O_2 synthesis of PEC			Δ	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$
IFN- γ synthesis (serum)	Δ	×	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	×	×
IFN- γ synthesis (spleen)	×	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$
Priming effect on LPS triggered TNF- α synthesis	×	×	Δ	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$
Synthesis of membrane TNF- α					$\odot$	$\odot$				
Extravascular release of Evans blue	Δ	$\odot$	×	Δ	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$
Lethal toxicity (+ Indomethacin)	×	×	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	$\odot$	Δ	Δ
Adjuvant activity (antibody response)					$\odot$	$\odot$	Δ	$\odot$	$\odot$	

Table 1. continued

Source	LAM	CRD	SPG	SPG-OH	GRN	SSG	OL-2	CSBG	ZYM	ZYC
	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Grifola frondosa</i>	<i>Sclerotium sclerotiorum</i>	<i>Ompharia lapidescence</i>	<i>Candida albicans</i> NaClO/DMSO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
«in vitro»										
Limulus G-test reactivity	○	⊙	×	○	○	○	○	⊙	⊙	⊙
Silkworm larvae reactivity	⊙	⊙	○	○	○	○	○			⊙
Plasma clotting (human)		fast	slow	fast	fast	slow				
Protein binding			×	○	○				⊙	△
Complement activation (APC) (human)		⊙	△	△	○	⊙	○	○	⊙	
Synthesis of IL-8, IL-12, TNF (human; cell line, PMN, PBMC)			△/○	⊙			○			
Glucose consumption	○				⊙				⊙	
Lysozomal enzyme	×				○				⊙	
Synthesis of membrane IL-1 α by macrophage	×		△	○	⊙	○	△		△	△
Synthesis of IL-6 by macrophage	△		△	⊙	⊙	△	○		○	○
Synthesis of TNF- α by macrophage	×	×	×	○ (+ IFN- γ)	○	×	×		⊙	○
Synthesis of chemotactic factor			×		○	×			○	○
Synthesis of NO by macrophage (+ IFN- γ)	×	△	×	○	○	×	×		△	△
H ₂ O ₂ synthesis of macrophage			×	×	×	×			○	⊙
Arachidonic acid release from macrophage (JA-4)		×	×		×	×			⊙	⊙
Antagonist to β -GR (H ₂ O ₂ synthesis <i>in vitro</i>)	⊙		⊙	○	○	○	○	○	(agonist)	(agonist)

LAM; laminaran, CRD; curdlan, SPG; sonifilan, SPG-OH; sodium hydroxide treated SPG, GRN; grifolan, DPn; degree of polymerization, DB; degree of branching, s; single helix, t; triple helix, r; random coil, PEC; peritoneal exudate cell, APC; alternative pathway, GR; glucan receptor, ×; negative, △; weak, ○; strong, ⊙; very strong, blank well; not determined.

Fig. 3. Effect of Several β -Glucans on Production of Anti-TNP IgG Isotype in AKR/N Mice

Groups of four mice were injected with TNP-OVA ($10\mu\text{g}$, i.p.) plus β -glucan (GRN, SSG, SPG or SPG-OH, $250\mu\text{g}$, i.p.) or saline (control) on days 0, 7, 14 and 21. Blood was drawn from the orbit of the mice on days 0, 10, 13, 17, 20 and 24. Anti-TNP IgG1 and IgG2a antibody levels in plasma were measured using ELISA. The data are plotted as mean values of groups of 4 mice $\pm$ S.D. Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

しく弱かった。どうも適度な分岐度が必要とされているらしい。しかし、OL-2は化学療法剤との併用で効果を発揮し、白血球減少症からの回復も促進した。⁶⁶⁻⁶⁹ 活性のベクトルが他の β -グルカンとは若干異なるが、活性が無いということではないらしい。この特徴については更にサイトカイン mRNA 発現のパターンにおいても異なっていることを明らかにした。CRDについても、カルボキシメチル基やヒドロキシエチル基を導入したり、酸化したりすると活性を発揮した。⁷⁰⁻⁷² この過程で、適度に置換基を導入するとゾル化した。それでも活性は示した。活性発現への螺旋構造の必要性が示唆されてきたが、ここで得られた結果は、この考えに合致しなかった。同様に、GRNについても側鎖をカルボキシル基に置換した GRN-PC (ポリカルボキシル化 GRN) を作成したところ、螺旋構造は有しなかった

Fig. 4. Effect of SSG on Induction of IL-12 and IFN- γ by Splenocytes

A) Mice were administered with TNP-OVA ($10\mu\text{g}$, i.p.) and SSG ($250\mu\text{g}$, i.p.) on days 0 and 7. Single cell suspensions of spleen cells were prepared on day 12 and total RNA was prepared from 5×10^6 cells/sample. IL-12 (p40) expression was detected by RT-PCR analysis. B) Adherent cells from mice administered TNP-OVA plus SSG and non-adherent cells administered TNP-OVA alone were incubated at 37°C for 3 d with or without TNP-OVA in the presence or absence of anti-IL-12 mAb. Culture supernatants were collected and used to determine IFN- γ production. Data represent means $\pm$ S.D. Significantly different from the value in the absence of anti-IL-12 mAb, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

が活性を発現した。²³ また、GRNの解析において、固体高分解能 NMR では明らかに一重螺旋と認められたにもかかわらず、強い抗腫瘍活性を示した。一方、SPGでは活性発現への至適濃度が高次構造を変えると著しく異なるとの報告がされている。^{73,74} 抗腫瘍活性に三重螺旋構造が重要であるとは半ば定説になっている。しかし、抗腫瘍活性に関し、分子レベルでの構造活性相関はなかなか明確にすることができない。

アジュバント活性とは、一定量の抗原に対する免疫応答を増強する作用のことを意味する。 β -グルカンはアジュバント活性を有すると報告されているが、抗体産生における Th1・Th2 バランスに対してどのような影響を与えるのかは十分に解析されていない。我々は抗原として TNP (トリニトロフェニル) 化卵白アルブミン (TNP-OVA) を用いて、種々の β -グルカンのアジュバント作用を比較検討した。⁷⁵ マウスに β -グルカンを抗原と共に投与し、経

時的に血漿中の抗 TNP 抗体を ELISA で測定したところ、血漿中の IgG 産生を最も強く誘導したのは GRN であり、次いで SSG, SPG-OH (アルカリ処理ソニフィラン) の順であった。この系で SPG はほとんど活性を示さなかった。さらに、アイソタイプ別に比較してみると、GRN や SPG-OH は IgG1 も IgG2a も上昇させたが、SSG は、IgG1 よりも IgG2a の産生を促進した (Fig. 3)。IgG1 はヘルパー T 細胞 (Th)2 由来の IL-4 や IL-5, IgG2a は Th1 由来の IFN- γ によってクラススイッチした抗体産生細胞からそれぞれ産生されることが知られていることから、SSG は Th1 優位な免疫応答系を増強する可能性が示唆された。この作用は SSG 投与マウスの脾細胞中に CD4⁺IFN- γ ⁺ の細胞ポピュレーションが増加したこと、IL-12mRNA 発現が SSG 投与で上昇したこと、並びに IL-12 中和抗体で IFN- γ 産生が消失したことからも示唆された (Fig. 4)。

評価系ごとに構造活性相関になぜこのような著しい違いが現れたのか。この答えを得るために、かえって逆説的にこの点の解明に集中することとなった。⁷⁶⁻⁸⁵⁾ 幸い医療用ソニフィラン (SPG) は完全棒状三重螺旋として分与していただくことができた。また、これをアルカリ処理 (SPG-OH) することで、一重螺旋へ変化させることができることはリムルス試験によって確認できたので、両者の活性を比較検討することにした。Table 1 に示したように様々な活性を比較検討したが、最も明確な差となって現れたのは、インターフェロン (IFN- γ) 共存下でのマクロファージからの酸化窒素 (NO) 産生の系であった。この活性は SPG-OH のみが示した。サイトカイン産生能から NO 産生の違いを評価してみると、

SPG-OH は特に IL-6 産生作用が強かった。リコンビナント IFN- γ +IL-6 をマクロファージに加えて培養すると NO 産生が誘導されるとの報告もあることから、SPG-OH による NO 産生の増強はサイトカイン産生の増強を介したものであることが示唆された。また、類似の NO 産生増強作用は β -グルカンに投与したマウスの腹腔浸出細胞でも認められた。これは、 β -グルカンは IFN- γ の誘導物質でもあることから、両方の作用があいまって効果発現に至ったのであろう。これらのことから、SPG-OH の免疫賦活作用は評価系によっては SPG よりも強力であることがわかった。他の β -グルカンについても同様の評価系を行ったところ、OL-2 並びにザイモザン (ZYM) は *in vitro* での NO 産生能が著しく低く、 β -グルカンごとに NO/IFN- γ 産生パターンには差のあることがわかった。

一方で、シクロホスファミド (CY) で白血球減少症モデルを作成し、造血促進効果を比較したところ、SPG と SPG-OH ではほぼ同様の造血促進効果を示し、NO 産生の高次構造依存性とは全く異なった。 β -グルカンによる造血促進作用には IL-6 産生増強が関連していると考えられるが、CY 処理マウスの骨髄並びに脾臓の培養上清中の IL-6 濃度は SPG 又は SPG-OH 投与群で上昇した。さらに、CY 処理マウスの骨髄並びに脾臓細胞の *in vitro* 培養系に SPG 又は SPG-OH を添加すると、IL-6 産生の上昇が認められた (Fig. 5)。これらの活性はいずれも SPG, SPG-OH でほぼ同等に認められたことから、先に示した経路とは別のものを利用しているのであろう。他の多くの β -グルカンもコロニー刺激因子 (CSF) を産生し造血促進作用を示したが、ZYM は

Fig. 5. Effect of SPG and SPG-OH on IL-6 Synthesis of Bone Marrow Cells (A) and Whole Blood (B) from Cyclophosphamide-Induced Leukopenic Mice

Bone marrow cells and heparinized whole blood were prepared on day 3 and day 7 from cyclophosphamide (200 mg/kg on day 0) treated ICR mice. Cells and blood were cultured with 100 μ g/ml of SPG or SPG-OH for 48 h, and concentration of IL-6 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Three mice/group.

投与局所での CSF 活性が強く、可溶性 β -グルカンとは異なっていた。

抗腫瘍性 β -グルカンの生物活性の特徴は、*in vivo* では強い効果を発揮するにもかかわらず、*in vitro* ではなかなか明確な活性評価系が認められないということであった。事実我々も、種々の評価系を検討したが、粒子状グルカンによる過酸化水素産生並びにサイトカイン産生に対するアンタゴニスト活性以外にはこれといった強い活性をなかなか見出せなかった。しかし、GRN は *in vitro* 培養系で直接 IL-1, IL-6 並びに腫瘍壊死因子 (TNF) 産生能を有することがわかった。^{86, 87)} 当初、GRN の溶解性の問題で不溶性のまま培養系に添加されたものがこのような作用を示したのではないかと心配したが、粒子状 β -グルカンと異なり、過酸化水素産生は全く認められなかったことから、この活性は GRN 固有のものであることがわかった。ただし、GRN を分子量によって細分画してみると、活性は高分子画分が強かったことから繰り返し構造が活性発現に関与していることが示唆された。また、SPG をこの培養系に添加すると、TNF 産生が抑制されたことから、SPG と GRN は受容体レベルでは同様のものを利用しているが分子量の違いでこの差が現れたのであろう。この系については細胞内情報伝達系の解析も行った(後述)。

ヒトの系については培養細胞として THP-1, U-937 並びに末梢血単核球を用いて検討したところ、IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF 産生の誘導作用が SPG-OH において強いことがわかった。⁸⁵⁾ さらに詳細に検討するため、全血、単核球並びに顆粒球画分の SPG 並びに SPG-OH に対する反応性を IL-8 を指標として比較したところ、全体的に SPG-OH の効果が高いが、SPG でも有意なサイトカイン産生能を示すことがわかった。⁸⁸⁾

以上構造活性相関について概略を示したが、高次構造依存性については、当初は抗腫瘍活性には三重螺旋構造が重要であるとの報告がされていたので、すべての免疫学的パラメータが同様の動きをするのかどうか大変興味があった。しかし、一重螺旋で強い活性が数多く見出され、ランダムコイルの SPG-PC (ポリカルボキシル化 SPG) でも示す活性があった。これらの事実から、免疫調節作用は三重螺旋の β -グルカンに限った活性では無いことが明確になった。また、体系的に生物活性を評価してみると、活性の強弱は一樣ではなく、すべての β -グルカンに共通した活性を選別することは極めて困難であることもわかった。

多糖類の一般的特徴のひとつは繰り返し構造があることである。この差が受容体の架橋頻度に違いを生じ、生物活性に反映されている可能性がある。また、補体系の活性化能、 β -グルカンに対する抗体産生が起きることを考え合わせると、補体受容体や Fc 受容体は β -グルカンの活性の一部に関連している可能性がある。分子量、分岐、高次構造のいずれもがこれらの直接・間接のメカニズムに影響を与えているのであろう。受容体解析が十分に行われていないので曖昧さは未だ拭いきれないが、今後解決しなければならない課題である。

β -グルカンによる Allogeneic CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) の誘導

腫瘍細胞に対して傷害活性を有する $CD8^+$ T 細胞を効率良く誘導することは腫瘍免疫において重要である。Allogenic CTL (AlloCTL) は養子免疫療法や、graft-versus-leukemia (GVL, 移植片対白血病) 反応の誘導において重要な細胞である。この細胞の誘導に β -グルカンがいかなる作用を示すか、マウスの脾細胞の混合培養 (mixed lymphocytes reaction, MLR) 系を用いて検討したところ、GRN あるいは SSG の

Fig. 6. Transwell Plate Assay to Induce CTL Activation

1.25×10^7 of CBA/J mice responder spleen cells (R) were cultured with or without 0.5×10^5 of DBA/2 mice stimulator spleen cells (S) in presence of $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ GRN (G) in lower (■) of 6 well transwell plate. The half of cell number and volume of lower well was mixed in the upper compartment (□). After 5 d culture, the cells were tested for cytotoxicity against ^{51}Cr -labeled P815 target cell (2×10^4). Effector to target ratio was 1 : 1.

Table 2. Antitumor Activity of SSG against Solid Form of Sarcoma 180 in ICR Mice

Dose×3 ($\mu\text{g}/\text{mouse}$)	Route	Days	Tumor weight (mean±S.D.)	Inhibition (%)	No. of mice (CR/total)	t-Test
100	i.p.	7, 9, 11	1.07±2.68	87.9	3/10	0.001
500	i.p.	7, 9, 11	0.08±0.06	99.1	3/10	0.001
100	p.o.	7, 9, 11	5.53±6.42	37.7	1/7	ns
500	p.o.	7, 9, 11	0.86±1.23	90.3	1/6	0.001
Control			8.87±5.26		0/10	

S-180 (5×10^6 cells/0.05 ml) were inoculated subcutaneously into the right groin of ICR mice. SSG was administered for thrice. Five weeks after the tumor inoculation, the mice were sacrificed and tumor was weighed. CR, complete regression.

発現のメカニズムの詳細は現在のところ解析できていないが、いずれのモデルも現代社会で解決を求められている疾患に関連したものばかりである。神経-内分泌-免疫系は相互に連動していることが明らかとなってきた。β-グルカンのこれらの作用がどの軸を介して発揮されているのか、今後も体系的に解析されるべきものである。

粒子状β-グルカン

β-グルカン研究を行うために構造既知の標準品は欠かすことができない。可溶性β-グルカンとしては医療用のLNTやSPGがこれにあたるが、粒子状β-グルカンとしてはザイモザン (Zymosan, ZYM) が汎用されてきた。一方で、炎症研究においてもZYMは起炎物質として用いられている。⁹²⁻⁹⁴⁾ ZYMの起炎物質としての性質があたかも粒子状β-グルカンによって誘導されているかのように受け取られている傾向がある。ザイモセル (Zymocel, Adjuvax, ZYC) はZYMからβ-グルカン部分を精製したものとして市販された。しかしこれは、著しく高価であり、化学分析を自由にできるほど利用することは困難であった。我々はZYMの活性中心について探るべく、いくつかのアプローチをとった。⁹⁵⁻¹⁰⁰⁾ 糖化学では過ヨウ素酸酸化はよく用いられるので、これを用いてZYMの側鎖の切断をねらった。しかし、これは予想通りには全く進行しなかった。そこで次に次亜塩素酸酸化後に過ヨウ素酸酸化を行ったところ、すべての側鎖を除去することができた。これは恐らく、細胞壁中のタンパク成分などが、物理障壁となり、過ヨウ素酸の側鎖への作用を妨げたためであろうと解釈している。このようにして得られた酸化ZYM (次亜塩素酸酸化ZYM, OX-ZYM) の活性をZYMと比較したところ、抗腫瘍活性や、補体活性化能は一致していたが、*in vitro*でのマクロファージからのTNF産生はこの処理で著しく低下した。また、ZYM免疫マウスの抗原特異的応答を脾臓細胞のサイトカイン産生で検討したところ、OX-ZYMでは反応性がほとんど消失した。これらのことから、ZYMで誘導されるすべての活性がβ-グルカン部分によって担われているわけではないことが強く示唆された。

ZYMは*in vitro*で強い活性を示す点、例えば、過酸化水素産生が可溶性のβ-グルカンと著しく異なる点である。β-グルカン受容体の存在を示唆した多くの報告では、可溶性β-グルカンが過酸化水素産生を阻害するという系を用いてきた。先に示したCSBGは様々な免疫賦活活性を示したが、この構造は溶解度の差はあるものの基本的にはOX-ZYMと同一である。すなわち基本構造はSPGやGRNとは著しく異なる。受容体が明確になっていないので明言できないが、基本構造が異なるのに阻害作用を示すのはどんな理由なのか、まだ解決できない問題点である。

β-グルカンの粘膜免疫賦活作用

茸産業を中心にβ-グルカンの経口投与での有用作用に期待が集まっている。厳密に考えるならば、茸にはβ-グルカン以外の様々な有効成分が含まれているので、評価するにあたっては、精製β-グルカンでの効果を評価する必要がある。当然の理屈のように見えるが、現実にはいくつもの壁があるのも事実である。その1つは、有用作用とは何を示すのか。2つ目は繰り返し構造を有するβ-グルカンのなかで、機能を発揮するβ-グルカンの構造を完全に特定しうるか。そして第3には、抽出効率が上げられる。これらの問題点は注射剤として用いる場合においても解決されていないものばかりである。さらに上述のごとく、β-グルカンの物性はかなり複雑であるので、低分子性化合物を扱う以上に問題は膨らむ。また、LNTやSPGは茸関連の医薬品であることも複雑さを加速する原因に加えられる。また、精製β-グルカンとしてでなくエキスを論ずる状態が多いが、この場合は更に複雑であり、“漢方方剤”の薬効解析において、常に付きまどってきたことと同質の問題がある。すなわち、吸収、化合物間の相互作用 (相乗作用と拮抗作用、抽出過程での複合体形成や化合物の修飾、など)、消化管内での修飾、薬効解析の評価系などである。

我々は86年に、子囊菌の1株、*Sclerotinia sclerotiorum* IFO9395株の培養外液から高分岐のβ-グルカン、SSGを単離し報告した。SSGの解析の過程で、これが経口投与でも抗腫瘍活性を発揮すること

Fig. 9. Tissue Distribution of i.p. Administered ³H-SSG (48 h) in Kupffer Cells and Splenic Macrophages Depleted Mice

Cl₂-MDP-liposome suspension (0.3 ml) was administered i.v. on day-1. ³H-SSG (250 μg/mouse) was administered i.p. on day 0. The mice were sacrificed 48 h later, each tissue was removed, and incorporated ³H-SSG was counted by liquid scintillation counter. Three mice/group. PE, peritoneal exudate fluid, PEC, peritoneal exudate cells.

を見出した (Table 2). そこで、90 年代中ごろにかけて SSG 経口投与の免疫系に与える影響を体系的に検討したところ、複数の同種同系固形癌に効果を有すること、転移抑制効果を示すこと、脾臓細胞のコンカナバリン A (ConA) 並びに lipopolysaccharide (LPS) に対する応答性が上昇すること、ナチュラルキラー (NK) 活性が上昇すること、腹腔並びに肺胞マクロファージ活性化作用 (酸性ホスファターゼ、貪食、殺菌、過酸化水素、IL-1) を示すこと、IgA 産生増強作用を示すことなどの作用を見出した。さらに、これらの作用にはパイエル板機能の上昇が関与していることを明らかにした。¹⁰¹⁻¹⁰⁴⁾ 一見、これらの作用は腹腔内並びに静脈内投与で認められた効果と類似しているが、至適投与量は腹腔内投与よりは一桁以上必要であり、経口と非経口での薬効発現のメカニズムにはかなり異なる部分があると思われる。この一連の研究によって、β-グルカンは経口投与によっても、有用作用を示しうることを明確に提示できた。β-グルカンの臓器分布については以下に示すが、経口投与した SSG は検出可能なレベルでは吸収されなかった。消化管粘膜をどのように刺激しているのかに関しては、さらに解析が必要である。

β-グルカンの体内蓄積

先に示したとおり、β-グルカンは *in vitro* の評価系でなかなか活性を見出せなかった。細菌内毒素が様々な活性を *in vitro* で現すこととは全く対照的なものである。細胞培養系に添加したとき、秒単位、分単位の急激な変化が無ければ β-グルカンに対する応答を分子レベルで調査することは非常に難し

い。そのような状況の中、β-グルカンの体内のどこに、どの程度存在するのか解析することが、活性発現、例えば抗腫瘍活性発現の機序を知る上で必要なことと考え調査することにした。これにいくつかのアプローチを採用した。第 1 に血中からの半減期測定を行った。^{105, 106)} これはリムルス G テストを用いてマウスの系で行った。その結果、ICR マウスに単独投与した場合 SPG では約 5 時間、SPG-OH では約 2 時間との結果を得た。また、CSBG ではかなり早く約 1 時間で血中から消失した。一方、SPG を 20 mg 大量投与したところ、1 ヶ月以上にわたって血中に持続的に β-グルカンの存在することがわかった。これは β-グルカン処理系が飽和したために起きた現象であろうと考えられる。

第 2 に臓器分布と蓄積性を検討した。¹⁰⁷⁻¹¹²⁾ これは放射ラベルした SSG を用いる系と、リムルス試験を用いる系の両方を用いた。いずれの方法でも、主な蓄積臓器は肝臓並びに脾臓であった。さらに、長期間での蓄積について検討したところ、投与後半年経過しても、大半が臓器に残存していることがわかった。β-グルカンの分解系は知られていないので、非酵素的に酸化的に分解されていると考えられるが、事実、肝臓から SSG を回収して分析したところ、酸性基の導入が確認され、分子量的にも減少していることがわかった。この持続的な分解に関与する細胞を特定するために、食細胞の阻害剤を使用した。まず、ガドリニウムクロライド (GdCl₃) を投与してクッパー細胞を阻害し、臓器分布と分解を調べたところ、分布臓器にはほとんど変化が無かったが、酸性化は抑制された。また、リムルス試験を行

うことで分岐の減少が抑制されたことがわかった。また、同様の実験をリボソーム封入 dichloromethylene diphosphonate (Cl_2MDP) 投与による食細胞の阻害系を用いて行ったところ、分布速度に遅延が認められたが、最終的な分布臓器の変化は認められなかった (Fig. 9)。以上のように、食細胞系が β -グルカンの活性発現のみならず、臓器分布にも関与しているはずであるが、阻害剤を用いても直接的な結果は認められなかった。そこでさらに、肝臓、脾臓を単細胞に分離し、どの画分に β -グルカンが存在するかを検討したところ、大半の β -グルカンは非細胞画分、すなわち、細胞間マトリックスに保持されていることがわかった。すなわち、臓器へは分布しても、そこで食細胞に処理されるにはかなりの時間がかかり、それに至るまでは細胞間マトリックスに保持されていることがわかった。食細胞の阻害が明確な差を与えなかった理由には非細胞画分への分布が関与しているのであろう。

第3に、このように長期間蓄積するとすると、活性はどの時期まで発現できるのか興味を持たれた。これを知るために、 β -グルカンを投与後、 β -グルカン分解酵素を投与し、活性の変動を見た。^{113, 114)} その結果、 β -グルカン投与後24時間に酵素を投与すると、活性は著しく低下することがわかった。すなわち、体内で β -グルカンが機能を発揮するためには、最低この程度の時間存在する必要があることが示唆された。また、秒単位、分単位の反応だけでは β -グルカンの作用機序は解釈しきれないことも示唆された。そこで第4に、 β -グルカンの作用の持続時間を活性の面から評価した。通常、至適投与時期としては、抗原となる癌細胞投与後、1週間程度経って、抗原提示がなされたところであるとされている。この実験では、あえてこの時期をはずし前投与を試みた。

さらに、 β -グルカンには至適濃度が存在するので、これを著しく超える量を投与し、活性の変動を調査した。その結果、Fig. 10に示したごとく、大量投与では、3ヶ月前に投与してもなお強い活性を保持していることがわかった。また、大量投与での活性減弱については、そのメカニズムの少なくとも一部にサイトカイン産生能の低下並びに細胞接着能の低下が関連することが示唆された。¹¹⁵⁾

以上のことから、 β -グルカンは体内では主に細胞間マトリックスに保持され、その局所を白血球が通過するとき、持続的にそれらの細胞を活性化し続けるという特徴を有することがわかった。 β -グルカンはどのような機序で細胞間マトリックスに存在するのかについては直接的結果は無いが、 β -グルカンのタンパク結合性を介してマトリックスに沈着したのであろう。関連した事実として、 β -グルカンをクエン酸血漿に添加し、カルシウムによる凝固を比較検討したところ、凝固時間が促進され、また凝固塊も拡大することを見出している。さらに、SPGが血清タンパクと結合能があることは、ゲル濾過でも確認した。¹¹⁶⁾ また、多くの β -グルカンは補体第二経路の活性化能があるので、糖の水酸基にはC3フラグメントが結合している可能性もある。これらの事実はいずれもマトリックスへの沈着を支持するものである。一方、 β -グルカンは細胞（腹腔マクロファージ、脾臓のマクロファージ、クッパー細胞など）にも取り込まれることを、代謝ラベル体並びに抗グルカン抗体を用いて *in vivo*, *in vitro* で明らかにした。¹¹⁷⁾ β -グルカンの *in vivo* での作用は持続的であることを前述したが、これは細胞間マトリックスにプールされた β -グルカンが徐々にマクロファージに取り込まれ、活性化することに基づくものであろう。

Fig. 10. Relationship between Dose and Administration Schedule on Antitumor Activity of SPG against Solid Form of Sarcoma 180 in Mice

Various doses of SPG (50, 250, 1000, 2000 µg/mouse/d $\times$ 3 times) was administered to ICR mice on day-90, 88, 86, day-60, 58, 56, day-30, 28, 26, and day 7, 9, 11. Sarcoma 180 was transplanted on day 0. Tumor in each mouse was weighed on day 35, and inhibition of the tumor growth was calculated to saline administered group. Ten mice/group.

Table 3. Effect of Various NSAIDs on Mortality of SSG-Administered Mice

	NSAID (mg/kg)	SSG (μ g/mouse)	Life span (days, mean $\pm$ S.D. ^{a)})	Number of mice (dead/total on day 14)	Mortality (%)
Indomethacin	5		12 $\pm$ 4.47	1/5	20
	5	250	2.8 $\pm$ 1.79 ^{c)}	5/5	100
Aspirin	600		14 $\pm$ 0	0/5	0
	600	250	8.6 $\pm$ 5.27 ^{b)}	3/5	60
Diclofenac	20		14 $\pm$ 0	0/5	0
	20	250	6.6 $\pm$ 4.62 ^{b)}	5/5	100
Sulindac	60		11.2 $\pm$ 3.90	2/5	40
	60	250	4 $\pm$ 1.87 ^{c)}	5/5	100

SSG was i.p. administered 3 times every other day on -day5, -day3, and -day1 before NSAIDs administered on day 0. All the NSAIDs was p.o. administered. Mortality was monitored from the day of NSAIDs administered. a) The significance was evaluated by Student's *t*-test against the corresponding NSAIDs administered group. b) $p < 0.05$. c) $p < 0.01$.

β -グルカンによるマクロファージの活性化における細胞内情報伝達機構

細胞内情報伝達経路には、受容体、細胞内ではプロテインキナーゼ、アダプタータンパク質、あるいは転写因子など様々な分子が存在し、互いに修飾されながら、活性化物質に固有の経路を形成することが徐々に明らかになってきている。しかし、その全貌が解明されるにはまだまだ多くの研究の積み重ねが必要である。さらに β -グルカン（特に可溶性）に関しては、適切な *in vitro* 評価系が探しにくいこと並びに受容体解析も不十分であることから、多重の困難を背負っていることになる。しかし、可能性のある部分から解析しなくては進展は望めないの、系を探しつつ情報伝達経路の検索も行うことにした。

GRN は *in vitro* でもマクロファージに作用してサイトカイン誘導を引き起こすことから、他のゲル形成性 β -グルカンと異なることがわかってきた。¹¹⁸⁾ さらに、GRN は酵母由来の粒子状 β -グルカン (ZYM, ZYC) とは異なり、マクロファージの活性化酸素産生を誘導しないという特徴を有している。マクロファージの強力な活性化物質として知られるリポ多糖 (LPS) は、微量でその活性を誘導し、自然環境に普遍的に存在することから、 β -グルカンのマクロファージの活性化作用が β -グルカン調製物への LPS の微量混入がもたらした結果ではないかという疑いがつきまとう。そこで、GRN を中心に用いて、マクロファージの活性化を LPS や ZYM などと比較してみた。マクロファージは活性化に伴い、TNF α , IL-1, IL-6 など様々な炎症性サイトカインを産生するので、これらの産生に関する細胞内情報伝達経路について比較することにした。まず、遺伝的に LPS に対する応答性が欠損している C3H/HeJ マウスの腹腔内マクロファージを用いたところ、LPS では誘導しないが、GRN はいずれのサイトカインも誘導したことから、両物質は異なる経路によってマ

クロファージを活性化することが明らかとなった。次に、タンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）の関与を解析するため、それらに対する阻害剤を用いて検討した。特にプロテインキナーゼ C (PKC) 及びカルモジュリン (CaM) 依存性キナーゼの関与を解析するため、それぞれ 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7) 及び N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide (W-7) 共存下で、マクロファージを GRN, LPS, あるいは ZYM で刺激し、TNF α 及び IL-1 α 産生を比較した。その結果、TNF α 産生に関してはいずれの活性化物質も PKC が重要であるが、CaM キナーゼは LPS による活性化にはあまり重要でなく、GRN や ZYM による活性化には重要な情報伝達物質であることが示された。一方、IL-1 α の産生誘導に関してはいずれの活性化物質でも PKC も CaM も必須であることが明らかとなった。¹¹⁹⁾ これらの結果も GRN と LPS は異なる経路でマクロファージを活性化することを支持するものである。

次に、情報伝達の鍵とも言うべき分子である mitogen-activated protein (MAP) キナーゼについて解析した。GRN あるいは ZYM でマクロファージを刺激すると、MAP キナーゼのファミリーのうち、extracellular signal-regulated kinase-1/2 (Erk1/2) については ZYM で強くリン酸化が誘導され、GRN ではわずかであった。一方、p38MAP キナーゼについては、LPS と同様に GRN, ZYM とともにリン酸化が認められた。TNF α や IL-1 などのサイトカイン受容体からの活性化シグナルに依存して、低分子量 G タンパク質を経由して MAP kinase kinase-3 (MKK3) などの MAP kinase kinase (MAPKK) ファミリーの活性化により p38MAP キナーゼは活性化を受け、転写因子である cAMP response element-binding protein (CREB) や ternary complex factor (TCF) のセリン残基のリン酸化を誘導することで

cAMP response element (CRE) や serum response element (SRE) の転写制御に関係することが知られている。¹²⁰⁾ これらの領域は IL-6 遺伝子上流に存在することが知られており、¹²¹⁾ GRN による IL-6 の誘導に関係している可能性も考えられる。サイトカインの誘導には他にも様々な転写調節因子が関連しており、これらの分子に対しても、 β -グルカンがどのような影響を及ぼすのか今後の検討課題である。

β -グルカンの免疫化学的性質

β -グルカンの作用を明確にし得なかった理由のひとつは受容体が明確にならなかったことにある。受容体研究は Czop ら並びに Ross らが精力的に行ってきた。¹²²⁻¹²⁶⁾ Ross らは補体受容体のひとつ CR3 が受容体であろうとの考えにたち、一連の研究を行っている。一方、Czop らは β -グルカン受容体を単離同定するために、抗イディオタイプ抗体を利用したアプローチをとった。すなわち、 β -グルカンと受容体は鍵と鍵穴の関係になるので、抗 β -グルカン抗体に対する抗体を利用すれば、受容体が見つかるであろうという考え方である。我々も同様の手法を用いてグリフォラン受容体を単離するため、抗グリフォラン抗体の作成を試みた。^{127, 128)} 常法に従い、部分分解して低分子グリフォランとした後、アルブミンに還元アミノ化反応で結合させ、免疫に用いた。単クローン抗体の作成を目指したが、マウスやラットでは、未だに成功に至っていない。一方ウサギでは高力価の抗血清が得られ、実用に供した。ビオチン標識した精製抗体を用いたサンドイッチ ELISA 系を用いて、GRN の反応性を比較したところ、ゲル化させることで反応性は著しく上昇することがわかった。これは分子間相互作用によって、固相に吸着できる抗原量が著しく上昇したために起きた現象であると思われる。また、この過程で、抗 GRN 抗体がカンジダや分裂酵母とも反応することがわかり、深在性真菌症の診断においても、役に立つ可能性がでた。カンジダ菌体との反応性に関しては、エピトープ解析の結果、 β -1,3-結合と β -1,6-結合の分岐点が反応部位となっていることが示唆された。カンジダは 3 分岐の β -1,6-グルカン断片を含有しており、抗 GRN 抗体はこれとも反応したものと考えられる。分裂酵母にも高分岐の β -1,6-グルカン断片が存在するが、やはりこの部分が抗体との反応性に関与しているのであろう。

マウスでは抗 GRN 抗体の作成が著しく困難であったこと、並びに多糖は一般的に抗原とはなりにくいことから、 β -グルカンに対する抗体産生はかなり条件を整えないとなしえないことかとの考えを持たざるを得なかった。しかし、前述したように、マウスに ZYM を投与すると、抗原特異的応答が惹起されたことから、CSBG の場合には抗体ができる可能性のあることが示唆された。そこで、カンジダ、ZYM、ZYC でマウスを免疫し、抗 CSBG 抗体産生

を比較したところ、マウスでも十分高い抗体価が得られることがわかった。¹²⁹⁾ すなわち、抗体産生が起き難いのは GRN タイプの多糖であり、すべての β -グルカンが抗体産生を起こしにくいわけでは無いことが強く示唆された。

β -グルカンの有害作用

β -グルカンは抗腫瘍性を有する免疫賦活剤として注目されているので、本物質の有害作用について論じた報告はあまり見当たらない。スウェーデンの Rylander らは、シックビル症候群の発症と β -グルカンが関連するのではないかと予測し、我々の開発した GRN 等を用いることで、気道にアレルギーが誘導され、またアレルギーが増悪化されることを見出した。¹³⁰⁻¹³⁴⁾ 環境中に存在するアレルゲンの中にはかなりの頻度で真菌が存在する。これらがアレルゲンとして作用する過程に細胞壁成分である β -グルカンが何らかの役割を果たしている可能性はあるだろう。

一方、我々は、 β -グルカンの抗腫瘍活性発現機序について解析している過程で、偶然、 β -グルカン投与マウスにインドメタシンを投与することによって致死がもたらされることを見出した。^{135, 136)} 致死毒性は、様々な β -グルカンのみならず、免疫賦活作用を示すほかの物質によっても誘導されること、また、インドメタシン以外にもアスピリンなどの非ステロイド性炎症薬によって誘導されたこと (Table 3) から、免疫賦活剤と非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) に共通して見られる現象であることがわかった。このとき免疫学的にどのような変化が誘導されているのか検討したところ、サイトカイン異常高値、低体温、低血糖、血小板、好中球増多、パーオキシダーゼ活性上昇などが認められることがわかった。NSAID はシクロオキシゲナーゼ活性を阻害するので、アラキドン酸カスケードにおいては血小板活性化因子 (PAF) 産生系、リポキシゲナーゼ系は結果として亢進した状況が作り出されることになる。これらはいずれも炎症の増悪因子でもある。アラキドン酸カスケード産物の量的バランスの微妙な違いがこの現象の根本にあると予測できる。発症メカニズムの解析は今後行う予定であるが、内毒素やスーパー抗原によって誘導される systemic inflammatory response syndrome (SIRS) 様の病態ではないかと推測している。また、NSAID は広く一般に利用される薬剤であるが、副作用の報告も多い。アスピリン喘息は喘息患者の致死発作とかなりの割合で関連していると言われている。しかし、どのような背景因子で症状が起きるのかについては必ずしも十分に解明されていない。一方我々は、 β -グルカンが肺胞マクロファージを活性化する作用のあることを報告しており、¹³⁷⁻¹³⁹⁾ また、この病態モデルでも肺への細胞浸潤が起きることも確認していることから、これがアスピリン喘息のモデルにもなりう

る可能性がある。我々がマウスで見出した現象が、NSAIDの副作用の予知と予防法の解析に役立てば幸いであると考えている。

まとめ

β -グルカンの構造と生物活性について、我々の得た結果を中心に概説した。 β -グルカンは多彩な生物活性を示すことがわかったが、“共通した活性”としては特定できないほど多様性に富んでいた。 β -グルカンの有効利用という観点からどの活性が指標となるかを決定すべきであろうが、“broad spectrum”であることが β -グルカンの特徴でもあるので、それは今後の研究の発展に期待したい。また、 β -グルカンは環境中に多量に存在しており、病気の原因の一部となっている可能性もありそうである。必要に応じて、これを制御するべきであろう。

β -グルカンは茸に多量に含まれている。茸並びに菌糸培養品はいわゆる健康食品として健康の維持と向上に貢献している。しかし、例えば癌などの特定の疾患を対象として、臨床上統計学的に有意な差をもって有効であるとする医薬品の領域に達するには、これまで以上の努力が必要であることは間違いないことであろう。今後は多施設共同研究といった大型プロジェクトで早期解決を期待したい。

β -グルカンは古くて新しい素材である。免疫調節を考えると、近年登場した、サイトカイン、遺伝子治療、癌ワクチンなどを用いることで、 β -グルカンの持つ多彩な効果が代替できるのだろうか。共存する必要もあるのではないだろうか。そのために、分子レベルでの解析が急がれる。

謝辞 ここに記載した成果は卒論生、大学院生、職員、学内外の共同研究者の人的協力と、本研究に興味を持ち経済的援助をしていただいた多くの団体・企業の両方に支えられて行ってきたものである。この場を借りて感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Stone B. A., Clarke A. E., “Chemistry and Biology of (1 $\rightarrow$ 3)- β -Glucans,” La Trobe University Press, Australia, 1992.
- 2) Hamuro J., Chihara G., “Immune Modulation Agents and Their Mechanisms” ed. by Fenichel R. L., Chirigos M. A., Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 409–435.
- 3) Maeda Y. Y., Chihara G., *Nature* (London), **229**, 634 (1971).
- 4) Williams D. L., Sherwood E. R., Browder I. W., McNamee R. B., Jones E. L., DiLuzio N. R., *Int. J. Immunopharmacol.*, **10**, 405–414 (1988).
- 5) Borchers A. T., Stern J. S., Hackman R. M., Keen C. L., Gershwin M. E., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **221**, 281–293 (1999).
- 6) Ross G. D., Vetvicka V., Yan J., Xia Y., Vetvickova J., *Immunopharmacology*, **42**, 61–74 (1999).
- 7) Wasser S. P., Weis A. L., *Crit. Rev. Immunol.*, **19**, 65–96 (1999).
- 8) Ohno N., Suzuki I., Oikawa S., Sato K., Miyazaki T., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1142–1151 (1984).
- 9) Suzuki I., Itani T., Ohno N., Oikawa S., Sato K., Miyazaki T., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **7**, 492–500 (1984).
- 10) Ohno N., Iino K., Suzuki I., Oikawa S., Sato K., Miyazaki T., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1181–1186 (1985).
- 11) Suzuki I., Itani T., Ohno N., Oikawa S., Sato K., Miyazaki T., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 217–226 (1985).
- 12) Iino K., Ohno N., Suzuki I., Miyazaki T., Yadomae T., Oikawa S., Sato K., *Carbohydr. Res.*, **141**, 111–119 (1985).
- 13) Ohno N., Iino K., Takeyama T., Suzuki I., Sato K., Oikawa S., Miyazaki T., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3395–3401 (1985).
- 14) Ohno N., Suzuki I., Sato K., Oikawa S., Miyazaki T., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4522–4527 (1985).
- 15) Iino K., Ohno N., Suzuki I., Sato K., Oikawa S., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4950–4956 (1985).
- 16) Ohno N., Adachi Y., Suzuki I., Sato K., Oikawa S., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1709–1715 (1986).
- 17) Ohno N., Iino K., Oikawa S., Sato K., Ohsawa M., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3328–3332 (1986).
- 18) Ohno N., Adachi Y., Suzuki I., Oikawa S., Sato K., Ohsawa M., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 861–864 (1986).
- 19) Suzuki I., Takeyama T., Ohno N., Oikawa S., Sato K., Suzuki Y., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 72–77 (1987).
- 20) Ohno N., Ohsawa M., Sato K., Oikawa S., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 2585–2588 (1987).
- 21) Takeyama T., Suzuki I., Ohno N., Oikawa S., Sato K., Ohsawa M., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 644–651 (1987).
- 22) Takeyama T., Suzuki I., Ohno N., Oikawa S., Sato K., Ohsawa M., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **11**, 381–385 (1988).
- 23) Adachi Y., Ohno N., Ohsawa M., Sato K., Oikawa S., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*,

- 37, 1838–1843 (1989).
- 24) Ohno N., Suzuki I., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1362–1365 (1986).
- 25) Ohno N., Yadomae T., *Carbohydr. Res.*, **159**, 293–302 (1987).
- 26) Ohno N., Kurachi K., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 478–486 (1987).
- 27) Shinohara H., Ohno N., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 819–823 (1988).
- 28) Saito K., Nishijima M., Ohno N., Yadomae T., Miyazaki T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 261–263 (1992).
- 29) Saito K., Nishijima M., Ohno N., Nagi N., Yadomae T., Miyazaki T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1227–1230 (1992).
- 30) Ohno N., Mimura H., Suzuki I., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2564–2568 (1985).
- 31) Mimura H., Ohno N., Suzuki I., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5096–5099 (1985).
- 32) Ohno N., Uchiyama M., Tsuzuki A., Tokunaka K., Miura N. N., Adachi Y., Aizawa M. W., Tamura H., Tanaka S., Yadomae T., *Carbohydr. Res.*, **316**, 161–172 (1999).
- 33) Ohno N., Shinohara H., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 5071–5078 (1986).
- 34) Ohno N., Shinohara H., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3353–3363 (1987).
- 35) Shinohara H., Ohno N., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2174–2178 (1989).
- 36) Nanba H., Kubo K., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **833**, 204–207 (1997).
- 37) Adachi K., Nanba H., Kuroda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 262–270 (1987).
- 38) Yanaki T., Norisuye T., Fujita H., *Macromolecules*, **13**, 1462–1466 (1980).
- 39) Itoh T., Teramoto A., Matsuo T., Suga H., *Macromolecules*, **19**, 1234–1240 (1986).
- 40) Norisuye T., Yanaki T., Fujita H., *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Edit.*, **18**, 547–558 (1980).
- 41) Bluhm T. L., Sarko A., *Can. J. Chem.*, **55**, 293–299 (1977).
- 42) Deslandes Y., Marchessault R. H., Sarko A., *Macromolecules*, **13**, 466–471 (1980).
- 43) Takahashi Y., Kobatake T., Suzuki H., *Rep/Progr. Polym. Phys. Jpn.*, **27**, 767–768 (1984).
- 44) Saito H., Miyata E., Sasaki T., *Macromolecules*, **11**, 1244–1251 (1978).
- 45) Saito H., Tabeta R., Yoshioka Y., Hara C., Kiho T., Ukai S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 4267–4272 (1987).
- 46) Ohno N., Adachi Y., Suzuki I., Oikawa S., Sato K., Suzuki Y., Ohsawa M., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2555–2560 (1986).
- 47) Ohno N., Adachi Y., Ohsawa M., Sato K., Oikawa S., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 2108–2113 (1987).
- 48) Ohno N., Shinohara H., Yadomae T., *Carbohydr. Res.*, **168**, 110–114 (1987).
- 49) Morita T., Tanaka S., Nakamura T., Iwanaga S., *FEBS Lett.*, **129**, 318–321 (1981).
- 50) Aketagawa J., Tanaka S., Tamura H., Shibata Y., Saito H., *J. Biochem.*, **113**, 683–686 (1993).
- 51) Tanaka S., Aketagawa J., Takahashi S., Shibata Y., Tsumuraya Y., Hashimoto Y., *Carbohydr. Res.*, **244**, 115–127 (1993).
- 52) Tanaka S., Aketagawa J., Takahashi S., Shibata Y., Tsumuraya Y., Hashimoto Y., *Carbohydr. Res.*, **218**, 167–174 (1991).
- 53) Saito H., Yoshioka Y., Uehara N., Aketagawa J., Tanaka S., Shibata Y., *Carbohydr. Res.*, **217**, 181–190 (1991).
- 54) Obayashi T., Yoshida M., Tamura H., Aketagawa J., Tanaka S., Kawai T., *J. Med. Veteri. Mycol.*, **30**, 275–280 (1992).
- 55) Obayashi T., Yoshida M., Mori T., Goto H., Yasuoka A., Iwasaki H., Teshima H., Kohno S., Horiuchi A., Ito A., Yamaguchi H., Shimada K., Kawai T., *Lancet*, **345**, 17–20 (1995).
- 56) Ohno N., Emori Y., Yadomae T., Saito K., Masuda A., Oikawa S., *Carbohydr. Res.*, **207**, 311–318 (1990).
- 57) Nagi N., Ohno N., Tanaka S., Aketagawa J., Shibata Y., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1532–1536 (1992).
- 58) Nagi N., Ohno N., Adachi Y., Aketagawa J., Tamura H., Shibata Y., Tanaka S., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 822–828 (1993).
- 59) Uchiyama M., Ohno N., Miura N. N., Adachi Y., Aizawa M. W., Tamura H., Tanaka S., Yadomae T., *FEMS Immunol. Med. Microb.*, **24**, 411–420 (1999).
- 60) Miura N. N., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **6**, 111–114 (1996).
- 61) Beffa R., Meins F., Jr., *Gene*, **179**, 97–103 (1996).
- 62) Johansson M. W., Soderhall K., *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **15**, 46–66 (1996).
- 63) Sharp J. K., Valent B., Albersheim P., *J. Biol. Chem.*, **259**, 11312–11320 (1984).
- 64) Sharp J. K., McNeil M., Albersheim P., *J. Biol. Chem.*, **259**, 11321–11336 (1984).
- 65) Darvill A. G., Albersheim P., McNeil M., Lau

- J. M., York W. S., Stevenson T. T., Thomas J., Doares S., Gollin D. J., Chelf P., *J. Cell. Sci. Suppl.*, **2**, 203–217 (1985).
- 66) Ohno N., Miura T., Saito K., Nishijima M., Miyazaki T., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2215–2218 (1992).
 - 67) Ohno N., Saito K., Nemoto J., Kaneko S., Adachi Y., Nishijima M., Miyazaki T., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 414–419 (1993).
 - 68) Nemoto J., Ohno N., Saito K., Adachi Y., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1046–1050 (1993).
 - 69) Nemoto J., Ohno N., Saito K., Adachi Y., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 948–954 (1994).
 - 70) Ohno N., Kurachi K., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1016–1025 (1988).
 - 71) Kurachi K., Ohno N., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2527–2531 (1990).
 - 72) Nono I., Ohno N., Masuda A., Oikawa S., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **14**, 9–19 (1991).
 - 73) Tabata K., Ito W., Kojima T., Kawabata S., Misaki A., *Carbohydr. Res.*, **89**, 121–135 (1981).
 - 74) Yanaki T., Itoh W., Tabata K., *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2415–2416 (1981).
 - 75) Adachi Y., Suzuki Y., Ohno N., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 974–977 (1998).
 - 76) Ohno N., Miura N. N., Chiba N., Adachi Y., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1242–1247 (1995).
 - 77) Ohno N., Hashimoto T., Adachi Y., Yadomae T., *Immunology Letters*, **52**, 1–7 (1996).
 - 78) Tateishi T., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1548–1553 (1997).
 - 79) Adachi Y., Takano E., Okazaki M., Ohno N., Yadomae T., *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **7**, 17–20 (1997).
 - 80) Hashimoto T., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 1006–1009 (1997).
 - 81) Tsuzuki A., Tateishi T., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 104–110 (1999).
 - 82) Hashimoto T., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *FEMS Immunol. Microbiol.*, **19**, 131–135 (1997).
 - 83) Hashimoto T., Ohno N., Yadomae T., *Drg. Develop. Res.*, **42**, 35–40 (1997).
 - 84) Suzuki T., Ohno N., Saito K., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**, 227–285 (1992).
 - 85) Hirata N., Tsuzuki A., Ohno N., Saita M., Adachi Y., Yadomae T., *Zent. bl. Bakteriolog.*, **288**, 403–413 (1998).
 - 86) Adachi Y., Okazaki M., Ohno N., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1554–1560 (1994).
 - 87) Okazaki M., Adachi Y., Ohno N., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1320–1327 (1995).
 - 88) Tsuzuki A., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *Drug. Develop. Res.*, **48**, 17–25 (1999).
 - 89) Adachi Y., Ishikawa M., Ohno N., Yadomae T., *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **9**, 14–17 (1999).
 - 90) Di Luzio N. R., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **73** PT-A, 412–421 (1976).
 - 91) Hetland G., Ohno N., Aaberg I. S., Lovik M., *FEMS Immunol. Med. Microb.*, **27**, 111–116 (2000).
 - 92) Pillemer L., Ecker E. E., *J. Biol. Chem.*, **137**, 139–142 (1941).
 - 93) DiCarlo F., Fiore J. V., *Science*, **127**, 756–757 (1958).
 - 94) Huber A. R., Weiss S. J., *J. Clin. Invest.*, **83**, 1122–1136 (1989).
 - 95) Miura N. N., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 2137–2141 (1996).
 - 96) Suzuki T., Ohno N., Chiba N., Miura N. N., Adachi Y., Yadomae T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 1243–1248 (1996).
 - 97) Ohno N., Miura T., Miura N. N., Chiba N., Uchiyama M., Adachi Y., Yadomae T., *Zent. bl. Bakteriolog.*, **289**, 63–77 (1998).
 - 98) Ohno N., Miura T., Miura N. N., Uchiyama M., Adachi Y., Yadomae T., *Pharmaceut. Pharmacol. Lett.*, **8**, 145–148 (1998).
 - 99) Miura T., Ohno N., Miura N. N., Adachi Y., Shimada S., Yadomae T., *FEMS Immunol. Med. Microb.*, **24**, 131–139 (1999).
 - 100) Ohno N., Miura T., Miura N. N., Adachi Y., Yadomae T., *Carbohydr. Poly.*, in press.
 - 101) Suzuki I., Hashimoto K., Ohno N., Tanaka H., Yadomae T., *Int. J. Immunopharm.*, **11**, 761–769 (1989).
 - 102) Hashimoto K., Suzuki I., Yadomae T., *Int. J. Immunopharmac.*, **13**, 437–442 (1991).
 - 103) Sakurai T., Hashimoto K., Suzuki I., Ohno N., Oikawa S., Masuda A., Yadomae T., *Int. J. Immunopharmac.*, **14**, 821–830 (1992).
 - 104) Suzuki I., Sakurai T., Hashimoto K., Oikawa S., Masuda A., Ohsawa M., Yadomae T., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1606–1608 (1991).
 - 105) Miura N. N., Ohno N., Adachi Y., Aketagawa J., Tamura H., Tanaka S., Yadomae T., *Biol.*

- Pharm. Bull.*, **18**, 185–189 (1995).
- 106) Miura N. N., Ohno N., Aketagawa J., Tamura H., Tanaka S., Yadomae T., *FEMS Immunol. Med. Microb.*, **13**, 51–57 (1996).
 - 107) Suda M., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**, 417–426 (1992).
 - 108) Suda M., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 131–135 (1994).
 - 109) Suda M., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 772–775 (1995).
 - 110) Suda M., Ohno N., Hashimoto T., Koizumi K., Adachi Y., Yadomae T., *FEMS Immunol. Med. Microb.*, **15**, 93–100 (1996).
 - 111) Miura N. N., Miura T., Ohno N., Adachi Y., Watanabe M., Tamura H., Tanaka S., Yadomae T., *FEMS Immunol. Med. Micro.*, **21**, 123–129 (1998).
 - 112) Miura T., Ohno N., Suda M., Miura N. N., Shimada S., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1797–1801 (1995).
 - 113) Nono I., Ohno N., Ohsawa M., Oikawa S., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **12**, 581–588 (1989).
 - 114) Nono I., Ohno N., Ohsawa M., Oikawa S., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **12**, 671–680 (1989).
 - 115) Miura T., Miura N. N., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 249–253 (2000).
 - 116) Ohno N., Suzuki T., Saito K., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 525–532 (1990).
 - 117) Adachi Y., Ohno N., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 278–283 (1998).
 - 118) Okazaki M., Chiba N., Adachi Y., Ohno N., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 18–23, (1996).
 - 119) Adachi Y., Okazaki M., Ohno N., Yadomae T., *Mediators of Inflammation*, **6**, 251–256 (1997).
 - 120) Ogura M., Kitamura M., *J. Immunol.*, **161**, 3569–3574 (1998).
 - 121) Nakajima K., Kusafuka T., Takeda T., Fujitani Y., Nakae K., Hirano T., *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3027–3041 (1993).
 - 122) Janusz M. J., Austen K. F., Czop J. K., *J. Immunol.*, **142**, 959–965 (1989).
 - 123) Czop J. K., Kay J., *J. Exp. Med.*, **173**, 1511–1520 (1991).
 - 124) Elstad M. R., Parker C. J., Cowley F. S., Wilcox L. A., McIntyre T. M., Prescott S. M., Zimmerman G. A., *J. Immunology*, **152**, 220–230 (1994).
 - 125) Xia Y., Vetvicka V., Yan J., Hanikyrova M., Mayadas T., Ross R. D., *J. Immunol.*, **162**, 2281–2290 (1999).
 - 126) Yan J., Vetvicka V., Xia Y., Coxon A., Carroll M. C., Mayadas T., Ross R. D., *J. Immunol.*, **163**, 3045–3052 (1999).
 - 127) Adachi Y., Ohno N., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1508–1512 (1994).
 - 128) Adachi Y., Miura N. N., Ohno N., Tamura H., Tanaka S., Yadomae T., *Carbohydr. Polymers*, **39**, 225–229 (1999).
 - 129) Uchiyama M., Ohno N., Miura N. N., Adachi Y., Tamura H., Tanaka S., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, in press.
 - 130) Young R. S., Jones A. M., Nicholls P. J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 11–17 (1998).
 - 131) Wan G. H., Li C. S., Guo S. P., Rylander R., Lin R. H., *Eur. J. Immunol.*, **29**, 2491–2497 (1999).
 - 132) Rylander R., Thorn J., Attefors R., *Eur. Respir. J.*, **13**, 1151–1157 (1999).
 - 133) Rylander R., Fogelmark B., McWilliam A., Currie A., *Clin. Exp. Immunol.*, **115**, 383–384 (1999).
 - 134) Rylander R., Holt P. G., *Mediators Inflamm.*, **7**, 105–110 (1998).
 - 135) Yoshioka S., Ohno N., Miura T., Adachi Y., Yadomae T., *FEMS Immunol. Med. Micro.*, **21**, 171–179 (1998).
 - 136) Ohno N., Miura N. N., Adachi Y., Yadomae T., “Cotton and Other Organic Dusts,” eds. by Wakelyn P. J., Jacobs R. R., Rylander R., National Cotton Council of America, 1998, pp. 240–244.
 - 137) Sakurai T., Ohno N., Yadomae T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 617–622 (1994).
 - 138) Sakurai T., Ohno N., Suzuki I., Yadomae T., *Immunopharmacology*, **30**, 157–166 (1995).
 - 139) Sakurai T., Ohno N., Yadomae T., *Leukocyt. Biol.*, **60**, 118–124 (1996).