

博 士 論 文

黒酵母 β - グルカンの抗アレルギー性皮膚炎
塗布剤としての基礎的研究

平成 27 年 6 月

高知大学大学院総合人間自然科学研究科
黒潮圏総合科学専攻
北村 亜希子

目次

第1章 序論	1
第2章 黒酵母 β -グルカンの <i>in vitro</i> での抗酸化能	5
第3章 黒酵母 β -グルカンの線維芽細胞の増殖に対する効果	11
第4章 黒酵母 β -グルカンを用いた炎症モデルマウスでの評価	15
第5章 黒酵母 β -グルカンの好酸球に対する脱顆粒促進効果	21
第6章 総括	33
第7章 要旨	35
謝辞	36
引用文献	37

参考論文などのリスト

学位論文を構成する参考論文

査読あり

1. 北村(難波)亜希子, 渡部嘉哉, 中島洋, 溝渕俊二 (2015) 黒酵母 β -グルカンの抗アレルギー性皮膚炎塗布剤としての基礎的研究. *Health Sciences*, 31巻(2): 117-125.

国際会議等での発表のリスト

1. 北村亜希子, 渡部嘉哉, 中島洋, 大島正人, 溝渕俊二: 黒酵母 β -1,3-1,6 グルカンの抗アレルギー塗布剤としての検討. 第 62 回日本アレルギー学会秋期学術大会 (口頭), 2012.11.29 (大阪)
2. Akiko Kitamura, Yoshiya Watanabe, Shunji Mizobuchi: Effect of topical application of β -1,3-1,6-glucan on allergic dermatitis. 3rd World Academy of Nursing Science (ポスター), 2013.10.16-18 (Seoul, Korea)

第1章 序論

諸言

単糖であるグルコースのみがグリコシド結合してできた多糖をグルカンと呼ぶ。グルコースには、 α 型と β 型が存在し、水にグルコースが解けているときは両方の型を行き来している。 α 型グルコースが糖構造の平面より下方向に置換基がグリコシド結合したものを α -グルカンと呼び、デンプンやグリコーゲンがこれに相当する。 β 型グルコースが糖構造の平面より上方向に置換基がグリコシド結合したものを β -グルカンと呼び、食物繊維として知られるセルロースも β -グルカンである。グルコースは6個の炭素をもち、きのこや黒酵母由来の β -グルカンは主鎖が1番目と3番目の炭素、側鎖が1番目と6番目の炭素で結合していることから β -1,3-1,6-グルカンと呼ばれる(図1-1)。

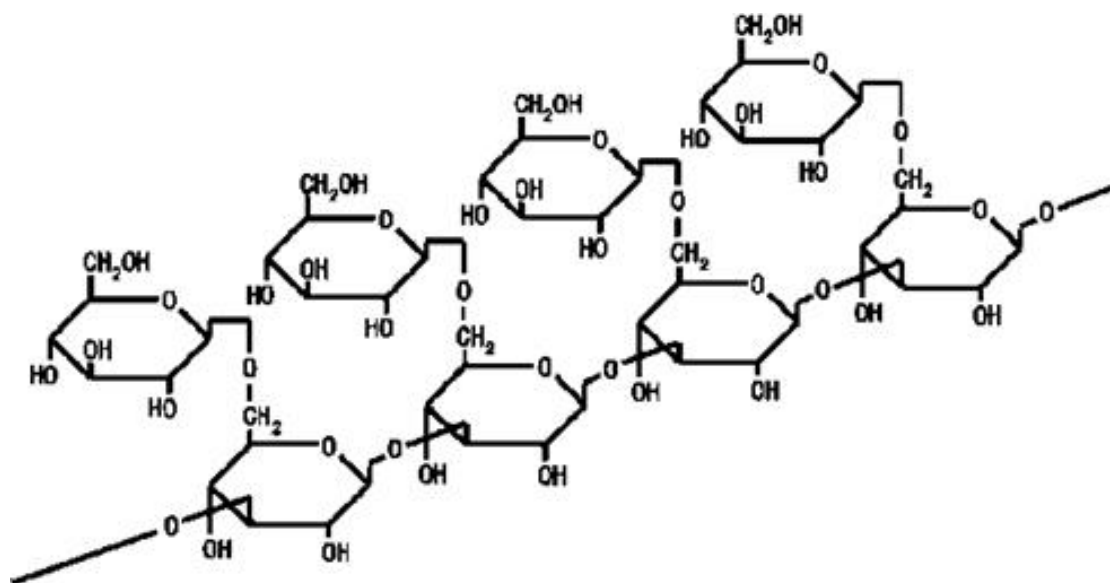


図1-1 β -1,3-1,6-グルカン

近年、植物や真菌に含まれる多糖類には、様々な生物活性を示すものが多く、植物を摂取することにより、免疫機能の調節が可能であることが報告された。その一つに β -グルカンが挙げられる。

β -グルカンの研究は、1941年アメリカの化学者 Louis Pillemer 博士(1908-1957)らが酵母の細胞壁からザイモザン(Zyмосan)と名付けられた免疫活性化物質を発見したことから始まる。このザイモザンは粗精製であったため、酵母に由来するタンパク質や糖質などの不純物が混じり、免疫系を活性化する本体が何であるかは不明であった。しかし、1960

年代に Nicholas DiLuzio 博士 (1926-1986) らによってザイモサンの有効成分が β -1,3-1,6-グルカンであることが示され, 1984 年米マサチューセッツ工科大学(MIT)と Alpha Beta Technology 社(ABT)の産学共同研究で酵母 β -グルカンの微粒子精製に成功した (Duvic et al., 1987)。

真菌である *Aureobasidium* 属は酵母細胞に似た楕円形の細胞形態をもち, コロニーを形成する際, メラニン色素の生成によって黒く着色することから黒酵母と呼ばれる。この黒酵母である *Aureobasidium pullulans* は, 生活環で酵母型と菌糸型の 2 つの形態を取り (図 1-2), 酵母型が水溶性 β -1,3-1,6-グルカンを産生し, 産生されたグルカンは菌体外へ放出される。今回使用する黒酵母 β -グルカン (BG) は, *Aureobasidium pullulans* を培養した後 *Aureobasidium pullulans* を滅菌した培養液であり, β -1,3-1,6-グルカンが豊富に含まれている。また, この BG は厚生労働省から 1996 年に既存添加物として認可されており, 2003 年度調査された既存添加物の安全性の見直しに関する調査研究においては, 90 日間以上の反復投与試験および変異原性試験で問題ないことが報告された (厚生労働省薬事・食品衛生審議会添加物部会, 2004)。食品としての安全性が改めて証明され, 経口摂取する上での安全性は担保され現在多くの食品に使用されている。

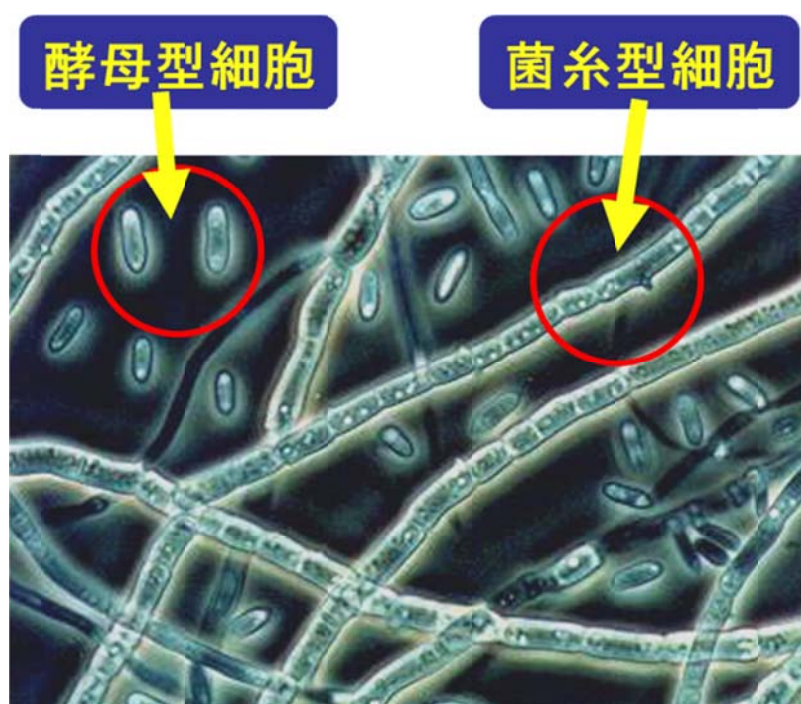


図 1-2 *Aureobasidium pullulans*

グルカンの研究が進歩してきた背景には, β -グルカンの受容体が発見されたこと, 受容体を介した細胞内情報伝達系の解析が進んだことにある。また, β -1,3-1,6-グルカンが自然免

疫系を活性させる条件として、可溶化状態で3重らせん構造を形成する必要があり、そのためには5万 Da 以上の分子量が必要であることがわかっている（鈴木, 2005）。

β -グルカンの受容体は、補体第三成分受容体（Complement receptor type-3: CR3, CD11b/CD18）（Elstad et al., 1994）、Dectin-1（Willment et al., 2001; Brown et al., 2002; Taylor et al., 2002; Viriyakosol et al., 2005）、Toll 様受容体（Toll-like receptor: TLR）（Gantner et al., 2003; Viriyakosol et al., 2005; Ikewaki et al., 2007）などが報告されている。CR3 は Mac-1 と呼ばれ、好中球、好酸球、NK 細胞、Dendritic cell（DC）、単球やマクロファージ、T 細胞や B 細胞など多様な細胞に発現している。CR3 は種々の細胞外マトリックスタンパク質や接着分子などを認識することで細胞と細胞外マトリックスに作用する。

また、 β -グルカンの受容体タンパク質としては白血球細胞表面に存在する Dectin-1 が同定されている。Dectin-1 は樹状細胞様株化細胞とマクロファージとの subtractive cDNA sequence 解析から樹状細胞特異的に多く発現する遺伝子として 2000 年 Ariizumi らによってクローニングされた（Ariizumi et al., 2000）。Dectin-1 は C 末端側が細胞外にある 2 型の膜タンパク質で C 型レクチンに分類される。C 型レクチンの特徴である Carbohydrate recognition domain (CRD) と呼ばれる糖鎖を認識する領域を Dectin-1 は細胞外に 1 つもち、細胞内には Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) と呼ばれる活性化シグナル伝達モチーフがある。Dectin-1 は樹状細胞、マクロファージや、好中球といったミエロイド系細胞に発現している（Taylor et al., 2002; Brown et al., 2002; Viriyakosol et al., 2005）。しかし、 β -グルカン多糖類の Dectin-1 への結合様式や結合最小単位免疫活性化機構などはほとんど明らかにされていない。その理由の 1 つとして、 β -グルカンは構造が 5~50 万 Da の分子量がある不均一な多糖類であるため、天然多糖を用いた研究をもとに活性発現に重要な構造を特定することが難しいことが挙げられる。

TLR は動物の細胞表面にある受容体タンパク質で、種々の病原体を関知して自然免疫を作動させる機能がある。Toll 遺伝子は 1980 年代にショウジョウバエで正常な発生（背腹軸の決定）に必要な遺伝子として発見されたが、1996 年には分子 Toll が抗菌ペプチド産生を誘導し真菌感染を防御することが発見された（Lemaitre et al., 1996）。1997 年には、哺乳動物にも Toll 遺伝子と相同性の高い遺伝子が見つかり、Toll-like receptor と命名され、植物や昆虫、ほ乳類などの多細胞生物に共通の微生物認識機構が存在することが報告された（Medzhitov et al., 1997）。TLR は、病原体に常に存在し、しかも病原体に特異的なパターンを認識する。例えば、細菌表面のリポ多糖、リポタンパク質、鞭毛のフラジェリン、ウイルスの 2 本鎖 RNA、細菌やウイルスの DNA に含まれる非メチル化 CpG アイランドなどを認識する。このように TLR は特定の分子を認識するのではなく、一群の分子を認識する

パターン認識受容体である。β-グルカンの受容体としては、TLR-2、TLR-6やTLR-4などが報告されている (Gantner et al., 2003; Viriyakosol et al., 2005; Ikeda et al., 2005; Ikewaki et al., 2007)。TLR-2は、マクロファージ、好中球、肥満細胞に、TLR-6は、マクロファージ、肥満細胞、Bリンパ球に、TLR-4は、マクロファージ、好中球、肥満細胞、Bリンパ球、腸上皮に発現している。

また、β-1,3-1,6-グルカンは、小腸で腸管免疫を刺激する免疫調整物質として、小腸のリンパ組織に集まっているリンパ球、マクロファージなどの白血球の細胞膜上に存在する受容体に認識される。そしてβ-グルカンを摂取することで抗アレルギー効果 (Tsukada et al., 2003; Abo et al., 1991)、免疫賦活効果 (Tsukada et al., 2003; Abo et al., 1991)、抗腫瘍効果 (Chan et al., 2009; Ross et al., 1999)、血糖値改善効果がある (Kim et al., 2005; Kiho et al., 1995; Tapola et al., 2005) ことが報告されている。

経口摂取による効果は、以上のようにたくさん報告があるが、β-グルカンを塗布することによる報告は少ない。最近、創傷治癒に重要な細胞の一つである正常線維芽細胞膜にβ-グルカンの受容体があり、β-グルカンが結合することによって細胞内にシグナル伝達されることが報告されている (Kougias et al., 2001)。

一方、従来好酸球はアレルギー疾患時に患部に集積し、内部顆粒中の塩基性タンパク質や活性酸素分子種によって、アレルギー性炎症を増悪する細胞として捉えられてきた (Gleich et al., 1979; Motojima et al., 1989)。しかし、近年になって好酸球の細胞内に存在する特殊顆粒中の塩基性タンパク質に存在する物質が、組織の修復に寄与するなど、組織修復細胞として捉えられ始めている (Munitz et al., 2004; Nissim et al., 2010)。

β-グルカンが塗布剤としては、コラーゲンや乳酸-グリコール酸共重合体 (Poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)と併用することで創傷治癒を促進するとの報告 (Delatte et al., 2001; Kim et al., 2012) や、不溶性グルカンの塗布剤としての検討報告 (Kenyon et al., 1985; Wolk et al., 1985; Leibovich et al., 1980) が認められるが、水溶性グルカン単独での皮膚組織の修復の研究報告はない。

そこで、今回は、β-グルカンが様々な細胞に直接作用する可能性がある塗布による効果を、創傷治癒に対するβ-グルカンの効果で検証した。特に本研究では好酸球を組織修復細胞としての観点から解析を進め、アレルギー炎症部位周辺で積極的に好酸球の活性化を促すことで、アレルギー性炎症の治癒を促す方法を開発することを目的とした。

第2章 黒酵母β-グルカンの *in vitro* での抗酸化能

酸化ストレスは、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) によって引き起こされるストレスの一種である (Finkel・Holbrook, 2000)。スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素、ヒドロキシラジカル (HO^{\cdot}) は酸素由来の活性種であり、狭義の ROS である。

ヒトはつねに ROS によるストレスにさらされている。酸化ストレスでは DNA などさまざまな細胞内の分子が ROS により修飾・障害される。従って過剰な酸化ストレスの蓄積は、癌や生活習慣病、老化などさまざまな疾患の原因と考えられている。細胞は過剰な酸化ストレスを感知して消去し、細胞内の酸化還元バランスを適正に維持する分子機構を備えている。

炎症の場合においては、細胞内の ROS 産生が増加することで細胞内が酸化状態に傾き、酸化ストレスの状態となる。炎症細胞である好中球、マクロファージなどの白血球の NADPH オキシダーゼは酸素を一電子還元してスーパーオキシドを生ずる。この分子種は不均化されて過酸化水素になり、これがさらにヒドロキシラジカルや次亜塩素酸 ($HClO$) に変換されうる (図 2-1)。これらの活性酸素種は、取り込まれた細菌や真菌を含む食胞内に放出されるだけでなく、細胞外に放出され組織障害的に働き、正常組織の炎症を引き起こすことが言われている (Devasagayam et al., 2004; Dröge, 2002)。従って、炎症の場で過剰に産生された ROS を消去することは、炎症による組織障害を抑制する効果があると思われる。

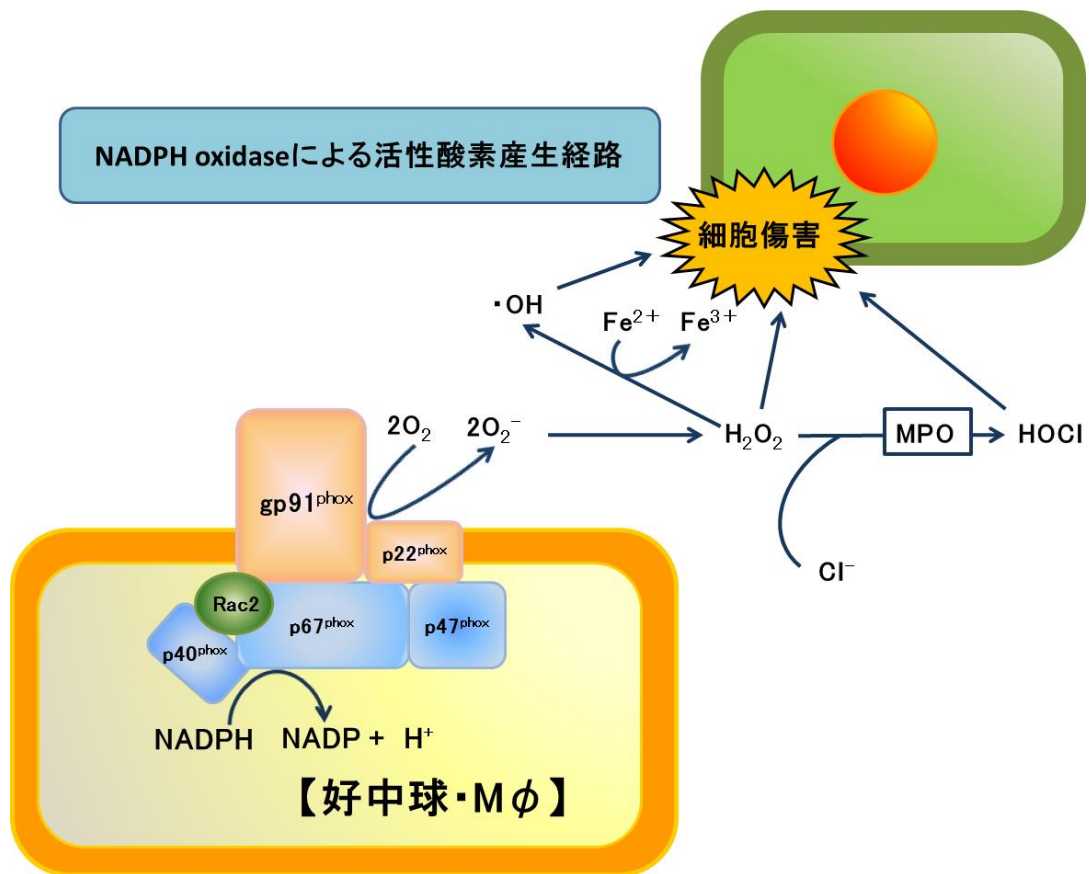
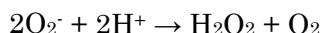


図 2-1 好中球・マクロファージの細胞膜における NADPH oxidase による活性酸素産生経路

体内にはこれらの ROS を分解消去する酵素が存在し、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide dismutase: SOD) , カタラーゼ, ペルオキシダーゼなどが挙げられる (Thannickal・Fanburg, 2000) 。SOD は, スーパーオキシドを過酸化水素と酸素に分解し, スーパーオキシドに由来する酸化ストレスを減少させる抗酸化酵素である (McCord・Fridovich, 1969)。すなわち, SOD は以下のスーパーオキシドの不均化反応を触媒する酵素である。



SOD には細胞内での局在が異なる 3 種類のアイソザムが存在する。①細胞質には銅・亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (Cu, Zn-SOD) (Richardson et al., 1975) , ②ミトコンドリアにはマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) (Borgstahl et al., 1992) , ③細胞外には細胞外スーパーオキシドジスムターゼ (extracellular-SOD) (Marklund et al., 1982) が存在している。また SOD によって生成した過酸化水素は, 細胞質に高濃度に存在するカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼにより速やかに分解されて水となるので, 正常状態では組織傷害因子とはなりにくい。

そこで, β -グルカンに炎症の場で好中球やマクロファージから産生される活性酸素を無害化する抗酸化効果を検証した。

抗酸化効果は, 強力な抗酸化作用をもつ SOD と同様なスーパーオキシド消去活性の有無について検討した。すなわち, キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で産生されたスーパーオキシドに対する SOD 様活性を SOD Assay Kit-WST を用いて測定した。 β G の終濃度は 0.03% (v/v) で解析を行った。

NADPH オキシダーゼは, 膜結合酵素複合体であり, 細胞膜や食胞膜上で見られ, 複数のサブユニットから構成される (図 2-1)。従って, 実験には細胞が必要である。一方, キサンチン-キサンチンオキシダーゼは, 図の如くキサンチンオキシダーゼが反応を触媒し, キサンチンがキサンチンオキシダーゼの作用により尿酸に転換される過程で, スーパーオキシドと過酸化水素が産生される。従って, キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系は無細胞系活性酸素産生系である (図 2-2)。

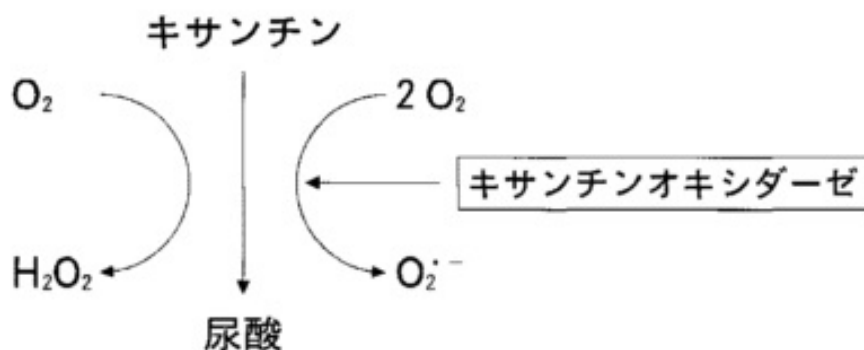


図 2-2 キサンチンオキシダーゼによるスーパーオキシドの産生過程。

方法

本研究では、株式会社同仁科学研究所の SOD Assay Kit WST を用いて SOD 様活性を測定した（受田，2000）。キサンチン及びキサンチンオキシダーゼ（XOD）により発生したスーパーオキシドラジカルは発色試薬 WST-1 と反応し，高水溶性ホルマザンである WST-1 ホルマザンを生成し，黄色に発色する。そこで，その極大吸収波長である 450nm にて吸光度を測定することにより，SOD 様活性値を求めた。

この SOD Assay Kit-WST の特徴は，

① 高水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩 WST-1 を使用しているため，NBT 法のようなホルマザンの溶解操作は不必要である。

② WST-1 は xanthine oxidase(XO)と直接反応しないため，100% SOD 阻害率を測定することができる。

③ 96 穴マイクロプレート対応なので，一度に多検体の測定が可能である。などが挙げられる。

SOD Assay Kit WST（株式会社同仁化学研究所）には以下の試薬が含まれる。

- WST solution (WST-1, Xanthine)
- Enzyme solution (XOD)
- Buffer solution
- Dilution buffer

WST solution 1mL と buffer solution 19mL を混合し，WST working solution とした。また，enzyme solution 15 μ L を dilution buffer 2.5mL で希釈し，enzyme working solution を調整した。

試料溶液 20 μ L と WST working solution 200 μ L を 96 穴マイクロプレートに添加し、プレートミキサーで 1 分間攪拌した。次に、enzyme working solution 20 μ L を添加し、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダーで 450nm における吸光度を測定した。試験時には試料溶液を添加するもの (Sample・S)、試料溶液を添加しないもの (Control・C)、enzyme working solution を添加しないもの (Sample-Blank・S-BL)、試料溶液、enzyme working solution 共に添加しないもの (Control-Blank・C-BL) についても吸光度を測定した。尚、試料は蒸留水 (20%DMSO) で溶解し、試験に用いた。SOD 様活性値は式に従い、control を 0% として算出した。試験は 3 回行い、その平均を 1 データとして表した。

$$\text{SOD 様活性 (\%)} = \left[\frac{(C - C\text{-BL}) - (S - S\text{-BL})}{(C - C\text{-BL})} \right] \times 100$$

β -グルカンの添加量は反応系の最大添加量である 10% (v/v) とし、 β G の混和は細胞増殖試験と同様の方法で行った。

結果

純水の SOD 様活性値は検出限界以下であったのに対して、 β G 群の SOD 様活性値は 18.8 \pm 4.48% (n=3) であり、SOD 様活性が認められた。

考察

β G には、SOD 様活性による抗酸化作用が認められた。炎症の場においては、好中球、マクロファージなどの白血球の NADPH オキシダーゼ由来の活性酸素分子種は、取り込まれた細菌や真菌を含む食胞内に放出されるだけでなく、細胞外に放出され組織障害的に働き、正常組織の炎症を引き起こすことが言われている (Devasagayam et al., 2004 ; Dröge, 2002)。従って、炎症の場で、過剰に産生された活性酸素を β -グルカンが消去することは、炎症による組織障害を抑制する効果があると思われる。

生体でのスーパーオキシドの主な産生場所は、細胞ではミトコンドリアと細胞膜の NADPH オキシダーゼであり、その他キサンチンオキシダーゼが挙げられる。これらによってスーパーオキシドが産生されるが、その後の消去系は 3 者とも同じであることから、今回の β G のキサンチン・キサンチンオキシダーゼ由来のスーパーオキシド消去能は、*in vivo* における炎症の場において、3 つの消去系に同様に作用しているものと思われる。スーパーオキシドが過酸化水素まで分解されれば、過酸化水素を不均化して酸素と水に変える反応を触媒する酵素であるカタラーゼは、細胞質に高濃度に存在しており、過酸化水

素をただちに分解除去する。

第3章 黒酵母β-グルカンの線維芽細胞の増殖に対する効果

創傷治癒の機序

創傷治癒過程は障害を受けた組織（多くは皮膚・皮下組織）が再度バリアーとして再構築される一連の修復過程を指す。炎症期，増殖期，成熟期に分類される。

1. 第1期・炎症期（受傷後数時間から3~4日）

はじめの数時間以内に出血・凝固期がまず起こる。創部周辺の毛細血管が拡張し，血球成分が毛細血管から動員される。細胞成分ははじめに好中球が動員され，蛋白質分解酵素を放出し，さらに活性酸素を産生して壊死組織の融解，殺菌作用を発揮する。好中球は急速にアポトーシスに陥り，ついでにリンパ球，単球が創内に誘導され，単球はマクロファージに分化し盛んに貪食を行う。肉眼的には，炎症の4徴候である発熱，疼痛，腫脹，発赤などの炎症症状が認められる（館・小和田，2011）。

2. 第2期・増殖期（受傷後3~14日間）

炎症期後半の単球，マクロファージはしだいにアポトーシスに陥り，増殖期には肉芽形成が行われる。この時期ではマクロファージの放出する物質により線維芽細胞が呼び出され修復の主たる成分，コラーゲンが産生される。このときに膨大なエネルギーと酸素を必要とする。それを供給する補給路として毛細血管の新生も活発に行われる。毛細血管は血管内皮細胞がフィブリンを分解しながら侵入増殖する。

3. 第3期・成熟期（受傷後2週間~6ヶ月）

組織欠損は組織の修復過程で新たにつくられた毛細血管に富む組織である肉芽組織で埋められ，表皮で覆われる。その後は耐久性のある組織に徐々に改造されていく。すなわち，毛細血管はしだいに減少して膠原線維成分が増し，最終的にかたい白色調の膠原線維のみからなる瘢痕組織に置き換えられていく。

以上のように，創傷治癒において線維芽細胞は重要な役割を担っている。β-グルカンを創部に塗布することは，線維芽細胞と直接接触することも考えられることから，線維芽細胞にβ-グルカンを混和することでの線維芽細胞に対する増殖効果を検討した。

材料

1) 黒酵母β-グルカン (BG) :

Aureobasidium pullulans を培養した後に *Aureobasidium pullulans* を滅菌した培養液であり，水溶性β-1,3-1,6-グルカンが4mg/mlと豊富に含まれている。BGを株式会社ソフィ

(高知, 日本) より購入した。このグルカンは, 厚生労働省 (日本政府により) より食品添加物として認可されている。

この BG を生食に溶解した 10v/v%水溶液 (10%BG) と 50v/v%水溶液 (50%BG) を作成し動物実験に供した。

2) 細胞 :

ヒト正常線維芽細胞 (CCD-1056SK: Skin, fibroblast, normal control, human, 26years, Femal) は, 健康なアジア系成人女性 26 歳より採取した細胞を大日本住友製薬 (大阪, 日本) より購入した。

3) 細胞培養 :

CCD-1056SK は, 10% fetal bovine serum, 1.0mM ピルビン酸および 0.1 mM non-essential amino acids (NEAA(1%)) (WAKO), 100µg/ml ペニシリンおよび 100IU/ml ストレプトマイシン添加イーグル最小必須培地 (Eagle's minimal essential medium (E-MEM)) 中で 37°C, 5%CO₂ 条件下で培養を行った。

方法

CCD-1056SK 細胞の BG による増殖効果を試験した。CCD-1056SK 細胞は, 10% fetal bovine serum, 1.0mM ピルビン酸, 0.1 mM non-essential amino acids, 100µg/ml ペニシリンおよび 100IU/ml ストレプトマイシン添加イーグル最小必須培地 (Eagle's minimal essential medium (E-MEM)) 中で 37°C, 5%CO₂ 条件下で培養を行った。CCD-1056SK 細胞を BG で 1×10^6 cell/ml に懸濁し, 96 穴プレートで, 1 穴あたり容量 100µl で培養を行った。なお, BG の浸透圧は 9 容の BG に対して 1 容の 8.5%(w/v) NaCl を添加し等張に調整した。浸透圧調整後を濃度 100%と定義した。BG は, 終濃度 0.003% (v/v) で添加した。細胞播種後, 24 時間の前培養を行い, 附着していない細胞を除去した後, この時点を開始とし 5 日間培養した。各細胞の増殖程度を, Cell Counting Kit を用い, A₄₅₀₋₆₀₀ の吸光度変化を測定した。

Cell Counting Kit-8 は細胞増殖または化学物質の感受性試験において, 細胞数を測定するキットである。高感度水溶性ホルマザンを生成する新規テトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質として WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され, 水溶性のホルマザンを生成する。細胞数と生成するホルマザンの量は直線的な比例関係にあるためホルマザンの 450 nm の吸光度を直接測定することにより, 生細胞数を計測できる (図 3-1)。

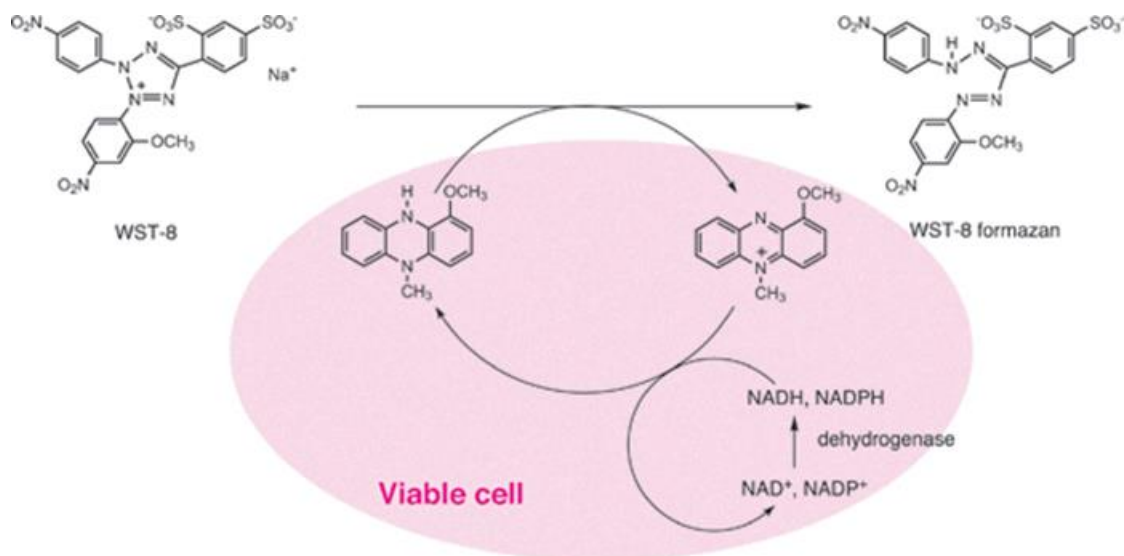


図 3-1 Cell Counting Kit-8 測定原理, DOJINDO

Cell Counting Kit の具体的な測定法を以下に示す。

- ① 細胞をマイクロプレートに植え込み，細胞が総面積の 10%になるまで，炭酸ガスインキュベーターで前培養を行った。
- ② グルカンと混和して，最大 5 日間の共培養を行った。
- ② 培養が終了し次第，試薬溶液 10 μ l を各ウェルに加えてよく混和する。
- ③ 混合後，炭酸ガスインキュベーターで呈色反応を行う。
- ④ 反応後，そのままプレートリーダーで測定する。なお測定波長は 450 nm，参照波長は 600 nm を使用する。

結果

3 日目以降，生食と比較して 8G 群で CCD-1056SK 細胞の増殖促進効果が認められた。培養開始 5 日後，対照群である生理食塩液における増殖を 100%とした場合，8G 群は，125.5 \pm 6.9% (n=3) であり，8G によるヒトの正常線維芽細胞の有意な増殖促進効果が得られた (p=0.002 vs 対照群)。

考察

ヒト正常線維芽細胞 CCD-1056SK 細胞培養液に 8G を混和することによって，8G 群で

有意な細胞増殖促進効果が認められた。Chin ら (Chin et al., 2005) による *in vivo* 実験によると、線維芽細胞は、創傷治癒の際、第 2 期・増殖期において、炎症期に創傷部へ集まった血小板やマクロファージなどから分泌される血小板由来成長因子により動員される。その結果、受傷後 3~5 日までに、活性化した線維芽細胞が創部に集積、進入し、創部において最も有意な細胞となる。そして、血小板、活性化したマクロファージや線維芽細胞から分泌された Transforming growth factor β (TGF- β) が、線維芽細胞を増殖させ、線維芽細胞のコラーゲンを中心とする細胞外基質の合成を促し肉芽組織が形成される。その後、コラーゲン分子は凝集し、原線維となり、瘢痕組織が形成され、創の修復が進む (Chin et al., 2005; Eichler et al., 2006)。従って創傷治癒を促進するには線維芽細胞の増殖は、重要な因子である。

線維芽細胞には、Toll 様受容体等のパターン認識受容体が発現しているとの報告がある (Tabeta et al., 2000; Wang et al., 2000)。そして、Kougias ら (Kougias et al., 2001) は、免疫細胞ではない線維芽細胞の膜上に β -1,3-1,6-グルカンに対して 2 つの特異的な結合部位があり、この受容体を介して β -1,3-1,6-グルカンの刺激が細胞内に伝達されることを報告している。

今回の試験管内での実験では、線維芽細胞と BG のみの環境であることから、線維芽細胞表面の受容体への β -グルカンの直接的な作用、すなわち線維芽細胞の受容体にこの β -グルカンが結合することによって、線維芽細胞の増殖が促進されたと考えられる。

第4章 黒酵母β-グルカンを用いた炎症モデルマウスでの評価

TNCB 誘導皮膚炎モデルマウス：

皮膚は、外界の化学物質等の様々な異物から生体を防御する免疫臓器であるが、分子量1000以下の化学物質（ハプテン）は皮膚内に侵入することができる。皮膚内に侵入したハプテンは、表皮蛋白との結合により免疫原性を獲得することで、アレルギー性接触皮膚炎等の皮膚毒性を誘発する（Karlberg et al., 2008）。今回は、ハプテンとして 2, 4, 6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)を使用し、TNCB の反復塗布を行うことで、アレルギー性接触皮膚炎 (ACD, Allergic Contact Dermatitis) モデルを作成した。ACD は、Coombs 分類の IV 型アレルギー反応に分類される免疫反応である。

ACD は搔痒を伴う発疹が原因物質の接触した部位に出現し、マウスでは搔爬行動が出現し（Yamaura et al., 2012; Yamaura et al., 2013）、搔爬創が発生する。痒みは搔破を誘導し、搔破は表皮ケラチノサイトから炎症性サイトカインの遊離を惹起し、その結果、皮膚に炎症が誘起され、皮疹の増悪をきたし、搔痒のさらなる増強をきたすことになる（高森, 2009）。発疹は、紅斑、滲出性丘疹、小水疱、湿潤、結痂そして落屑などの経過をたどる湿疹が認められる。

TNCB 塗布により皮膚の Th1 優位な環境から Th2 優位な環境に誘導している。すなわち局所のサイトカインが INF- γ 、IL-2 優位から IL-18, IL-4, IL-6, IL-10 優位へと変化している（Kitagaki H. et al., 1997, Harada D. et al. 2005）。Th2 細胞が優位な場合、アレルギー反応が惹起される。Th2 細胞が産生するサイトカインである IL-4 は、B 細胞における免疫グロブリン (Ig) E へのクラススイッチを誘導 (IgE 抗体産生を促進) し、血清 IgE が上昇する（Kitagaki H. et al., 1995, Harada D. et al. 2005, Seike M. et al., 2009）。

また TNCB 塗布後の組織像においては、表皮や真皮に膨大な数の好酸球、肥満細胞、好中球そしてリンパ球などの炎症細胞の浸潤が認められる。特に真皮では、浮腫と好酸球の浸潤が観察される（Harada D. et al. 2005, Seike M. et al., 2009）。耳介は、TNCB で惹起を繰り返し行うことで、浮腫が発生し耳介厚が増して行く。

材料

Hos:HR 系ヘアレスマウス：

Hos:HR 系ヘアレスマウスは、1968年に Temple University Skin and Cancer Hospital が Sandra Biological Supply から毛の生えてこないマウスを入手し、それを CBA マウスと

交配することによって Skh:HR が作成された。この系統は様々な毛色を呈している。CBA マウスとは、Bagg のアルビノマウスと DBA マウス（1900 年代に C. C. Little によって毛色の遺伝の研究のために育成された最も古い近交系の 1 つ）の交配から Strong によって 1920 年代に育成されたマウスである。

1987 年に（株）星野試験動物飼育所はクローズドコロニーで維持されていた Skh:HR のうちアルビノマウスのみを選抜し、さらに SPF 化して Hos:HR-1 として生産・供給している。近交系マウスである。

最初は普通のマウスと同様に毛が生えるが、毛根萎縮により生後 17～23 日で頭部から毛が抜け始める。4 週齢になると完全に毛が抜け、以後は生えることはない。

毛を剃る手間が省ける上に毛を剃って皮膚に傷を付けることがないことから、皮膚研究に適した動物である。免疫機能は正常であり、通常の飼育が可能である。

実験に用いた Hos:HR 系ヘアレスマウス雌は、日本 SLC 株式会社（浜松、日本）より購入し、実験開始時 6 週齢のものをを用いた。

方法

Hos:HR 系ヘアレスマウスの腹部および背部に 7%TNCB アセトン溶液 30 μ l を塗布し、感作した。感作から 1 週間後、2 日毎に頸背部に 1%TNCB アセトン溶液 30 μ l を塗布することにより惹起を行い、皮膚炎を発症させた。惹起は実験終了まで継続して行った。

皮膚炎モデルマウスに対し、1%TNCB アセトン溶液塗布による惹起と同時に β G 溶液あるいは生食 30 μ l を毎日、耳介及び背部に塗布を開始した。これらのサンプル塗布は、1%TNCB アセトン溶液塗布による惹起後 2 時間以上をおいて行った。

実験群は、

- ① 未感作群 (n=5)
- ② 対照群 (生理的食塩水塗布群 : n=5)
- ③ 10% β G 塗布群 (n=5)
- ④ 50% β G 塗布群 (n=5)

の 4 群とした。

効果の評価は、試験標品の塗布開始 2 週間後に病態のスコア化と病巣である耳介の厚みで行った。病巣のスコアリングは、①発赤・出血、②痂皮形成・乾燥、③浮腫、④擦傷・組織欠損をそれぞれ 0: 無症状、1: 軽度、2: 中等度、3: 重度の 4 段階評価とした (表 4-1)。

表 4-1 皮膚スコアの評価方法

	無症状(0点)	軽症(1点)	中等度(2点)	重症(3点)
1 紅斑	認められない	血管に沿った線の発赤	血管線から広がった発赤	面積の半分以上を占める発赤
2 浮腫・肥厚	認められない	初期の肥厚	広範囲に広がった肥厚	面積の半分以上を占める肥厚
3 出血・掻破痕	認められない	一箇所出血・掻破痕	2箇所出血・掻破痕	面積の1/3以上を占める出血・掻破痕
4 乾燥	認められない	初期の乾燥	広範囲に広がった乾燥	面積の半分以上を占める乾燥

耳介の厚みは、定圧ノギスで測定した。定圧ノギスは、アズワン株式会社（大阪，日本）で購入した。

統計解析方法

実験結果の値は、平均値±SD で表し、統計解析は、Student's t-test（対応なし）でおこなった。

倫理的配慮

今回行った動物実験は、高知大学医学部および岡山県立大学動物実験委員会に実験計画書を提出し、動物の苦痛軽減・排除の方法及び保定・拘束時間等について承認を得たのち開始した。

飼育は、HEPA フィルターを介した空気を供給された SPF 条件下で室温 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ の環境で、自由給水、自由摂餌で行った。

研究開始後は動物愛護法施行令、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準等の動物実験に関する法令に加え、高知大学医学部および岡山県立大学動物実験管理規則、高知大学医学部および岡山県立大学動物実験委員会規則、高知大学医学部大学動物実験自己点検・自己評価委員会規則等動物実験に係わる規則を遵守し、遂行した。

結果

試験標品塗布 2 週間後の後頸部と耳介の観察における病巣のスコアリングは、未感作群 0 点、対照群 5.0 ± 1.00 点、10%βG 群 4.0 ± 1.00 点、50%グルカン 2.2 ± 0.45 点であった（図 4-2）。各群の皮膚スコアの平均値のマウスの病巣の写真を図 4-1 に示した。

耳介の厚みの平均は、未感作群 0.216 ± 0.023 mm であったのに対し、対照群 0.415 ± 0.056 mm、10%βG 群 0.318 ± 0.042 mm (vs 対照群; $p=0.0002$)、50%βG 群が 0.217 ± 0.026 mm (vs 対照群; $p=0.0000$) であった（図 4-2）。病巣のスコアリングに加えて、客観的な指標である左右耳介の厚みにおいても β-グルカン塗布群に有意な改善が認められた。そして、そ

の効果は濃度依存的であり、これらの実験結果は、3 回行った独立した実験系で再現性が得られた。

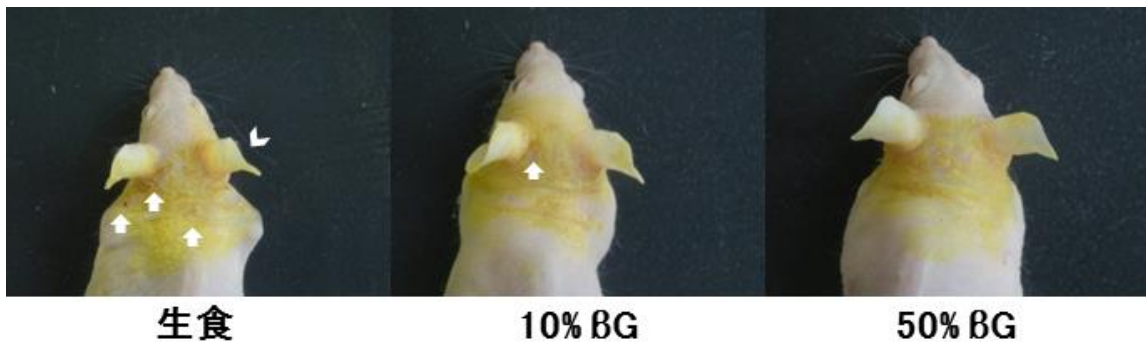


図 4-1 各群の皮膚スコアの平均値のマウスの病巣像

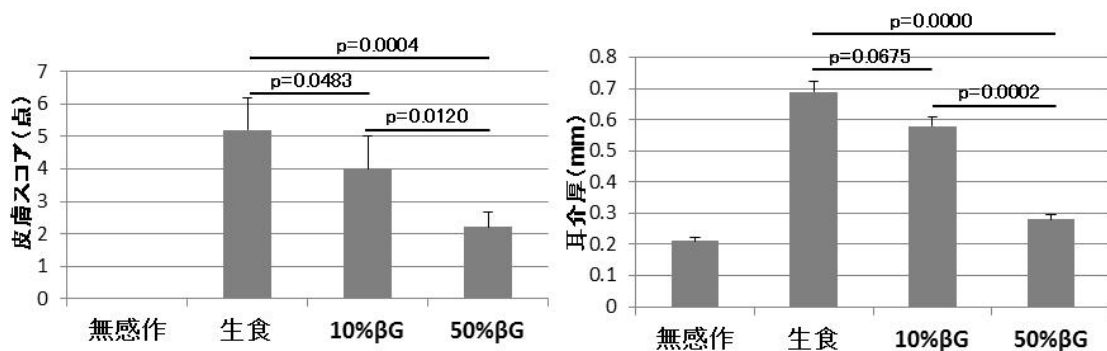


図 4-2 各群の皮膚スコアと耳介厚の平均値

考察

これらの試験管で示された BG の効果が効果的に発揮されるモデルとして、皮膚炎モデルに対する効果を検証した。その結果、皮膚炎モデルマウスにおいて、BG 塗布により症状が軽減された。

以上の様に、BG の炎症部位への塗布による傷の治癒促進効果は、β-グルカンの生体での異なる効果の相乗効果によるものと思われる。一つは、正常線維芽細胞への増殖促進効果、二つ目は、患部での SOD 活性による抗炎症効果、3 つ目に次章で述べる好酸球の活性化に

伴う脱顆粒に由来する成分による治癒促進効果が挙げられる。

創閉鎖においては IL-6 が重要であり、IL-6 は癒痕形成を促進すると報告されている (Gallucci et al., 2000; Dasu et al., 2004; Ghazizadeh et al., 2007)。また、創傷治癒の早期には、創部辺縁のケラチノサイトに発現している Toll 様受容体-4 (TLR-4) が重要な役目を果たしているとの報告もある (Chen et al., 2013)。Chen らは、TLR-4 に遺伝子異常を伴いリガンドが結合できないマウス (C3H/HeJ) を用いて検討すると、IL-6 の産生が有意に低下し、創閉鎖に要する時間も有意に延長したと述べている。したがって創傷治癒に TLR-4 は重要であり、その TLR-4 は β -グルカンの受容体の一つである (Ikewaki et al., 2007)。創部に BG を塗布することによりケラチノサイトに発現している TLR-4 に β -グルカンが結合し、IL-6 が誘導され癒痕形成が促進される可能性がある。

また、 β -グルカンを血管内に投与することで、マクロファージが活性化され、その結果創傷治癒においてコラーゲンの生合成が促進され、消化管吻合力を強めたり (Compton et al., 1996)、開腹創の治癒力を高めたりする (Portera et al., 1997) との報告がある。溝渕らのグループは、第 64 回日本消化器外科学会 (大阪, 2009)、第 47 回日本癌治療学会 (横浜, 2009) において、 β -グルカンをマウスに経口投与することで腹腔内誘導マクロファージの細胞障害活性を亢進させたと報告している。Browder らは、局所に塗布することでもマクロファージを活性化し同様の結果が見られたと報告している (Browder et al., 1988)。溝渕らのグループでも第 46 回日本癌治療学会 (名古屋, 2008) において腹腔内誘導マクロファージを β -グルカンで直接刺激することによって、NO 産生の亢進が得られたと報告している。これらは、 β -グルカンがマクロファージを刺激し、マクロファージの機能を亢進させた結果である。

マクロファージの膜表面には、CR3, Dectin-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6 などの β -グルカンの受容体 (Elstad et al., 1994; Willment et al., 2001; Brown et al., 2002; Taylor et al., 2002; Viriyakosol et al., 2005; Gantner et al., 2003; Viriyakosol et al., 2005; Ikewaki et al., 2007) が存在する (矢田, 2007) (図 4-3)。 β -グルカンを塗布することで創部のマクロファージの受容体に β -グルカンが結合し、マクロファージを活性化する可能性があると思われる。

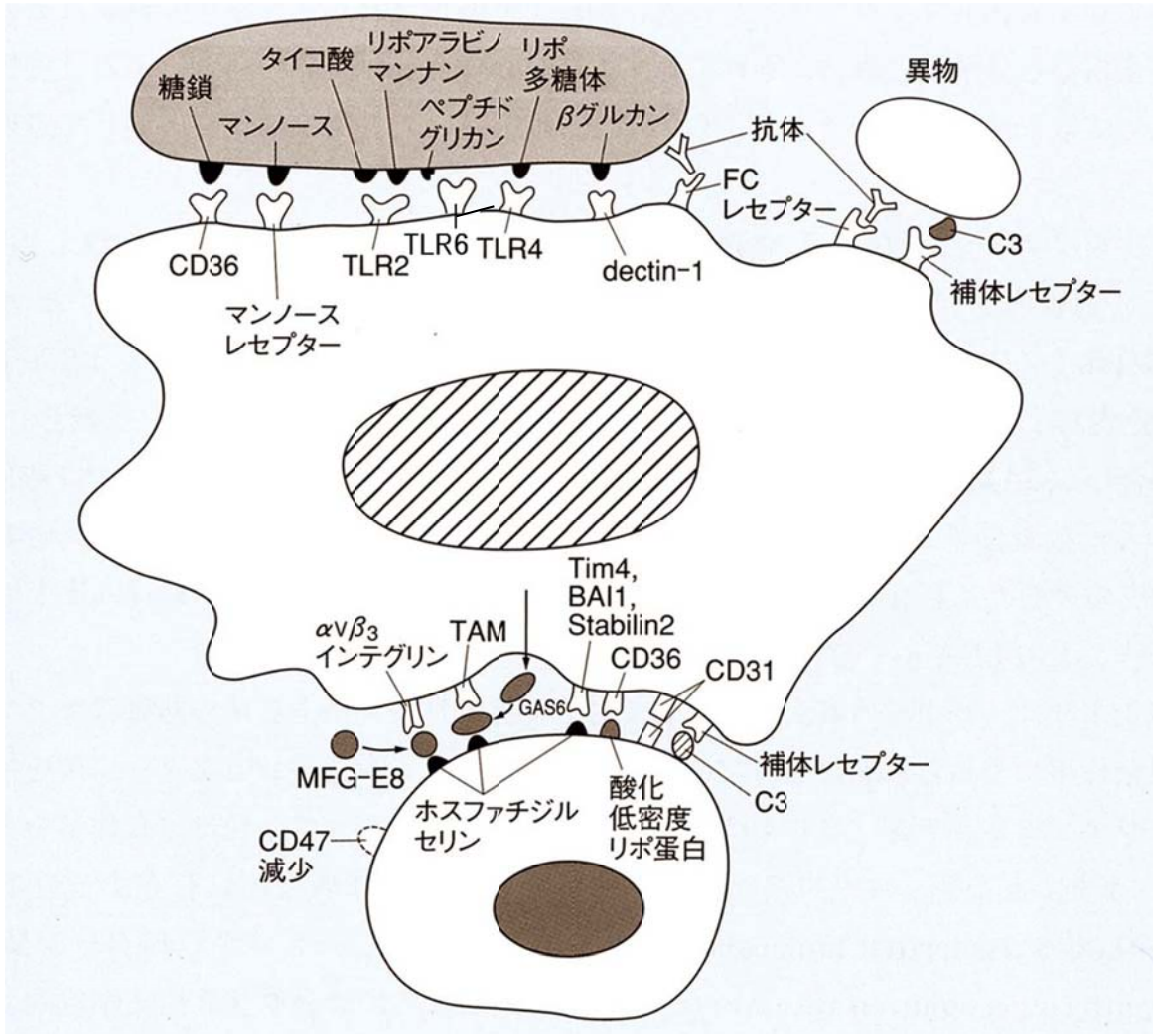


図 4-3 マクロファージ表面の細菌・真菌・死細胞などを捕える、あるいは認識するレセプター (矢田, 2007 一部改変)

第5章 黒酵母 β -グルカンの好酸球に対する脱顆粒促進効果

好酸球は、1879年 Paul Ehrlich 博士により命名された白血球の一種であり、顆粒球の1つである。正常な末梢血で見られるのは成熟型で、普通染色標本で見ると、エオジン親和性の橙黄色に染まる均質・粗大な好酸性顆粒が細胞質に充満している（図 5-1）。ヒト好酸球の核は通常2分葉で細かいクロマチン糸でつながれ細胞周縁に偏在し、直径13~17 μ m程度の大きさがある。健康な人の血液1 μ Lには好酸球が100~500程度の数存在をしており、血液中の白血球の1~3%未満と少ない。



図 5-1 成熟好酸球 (Zucker-Franklin et al. 1988)

骨髓造血幹細胞から骨髓系共通前駆細胞、骨髓球系前駆細胞（顆粒球/単球前駆細胞）を経て、好酸球系前駆細胞に分かれ、骨髓芽球、前骨髓球、好酸性骨髓球、好酸性後骨髓球、そして杆状核球と分化して末梢血に移行し、成熟型の分葉核球である好酸球となる。好酸球は、Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF)、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン-5 (IL-5) の刺激によって分化増殖し、血中、粘膜組織へ分布していく。GM-CSF、IL-3、IL-5 の受容体は、 α 鎖と β 鎖のヘテロ2量体からなり、 β 鎖は GM-CSFR、IL-3R、IL-5R 共通のシグナル伝達分子である (Takatsu et al., 1994; 長井・高津, 2009)。また、これらのサイトカインのなかで、IL-5 が最も好酸球の分化に選択的に作用し (Sanderson, 1992), *in vitro* で好酸球性前駆細胞から成熟好酸球への分化・成熟を誘導する (Clutterbuck et al., 1987; Yamaguchi et al., 1988)。IL-5 の受容体であ

る IL-5R alpha は、好酸球特異的な前駆細胞においてすでに発現しているといわれている (Iwasaki et al., 2005)。さらに、IL-5 は好酸球のアポトーシスを抑制してその生存を延長する働きがある (Yamaguchi et al., 1988; Yamaguchi et al., 1991) (図 5-2)。

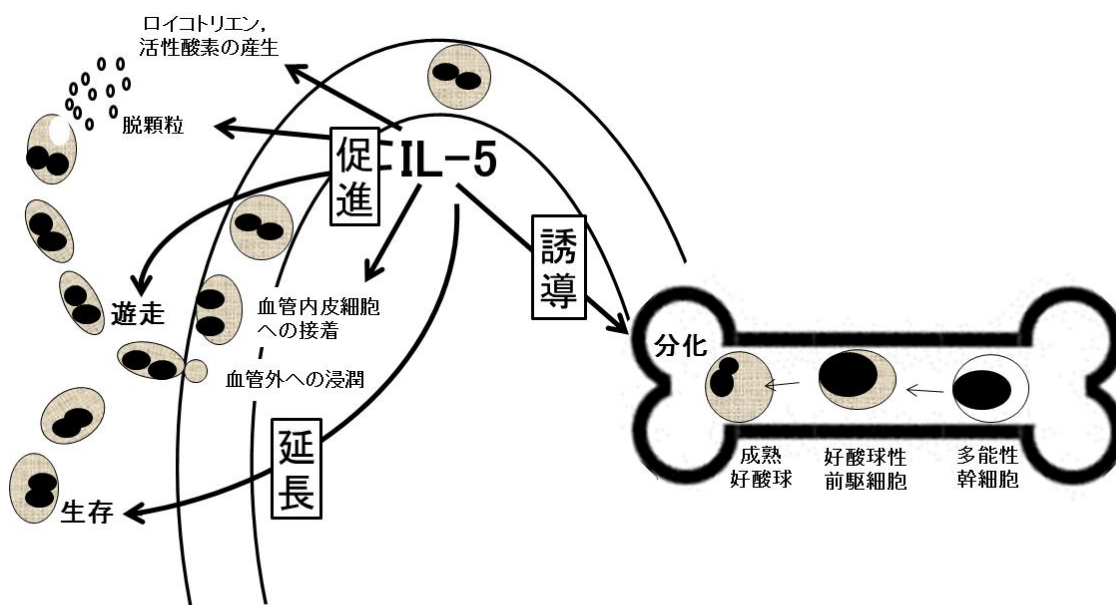


図 5-2 好酸球およびその前駆細胞に対する IL-5 の作用。矢印の途中に書かれた枠内の文字は、その矢印の先に示した事象に対して IL-5 が与える影響を示している。(日塔武彰, 2003 一部改変)

血中の好酸球はその表面に発現している L-セレクチン (CD62L) を介して血管内皮細胞に接着した後、ついで発現する PSGL-1 (CD162) と血管内皮細胞の P-セレクチン (CD62P) が接着して局所の血管壁を転がる (rolling)。好酸球表面の VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ integrin, CD49d/CD29) が VCAM-1 (CD106) (Ig スーパーファミリー) に結合して血管壁に接着する。その後、好酸球表面に VLA-4 に置き換わり LFA-1 ($\alpha L\beta 2$ integrin, CD11a/CD18), Mac-1 ($\alpha M\beta 2$ integrin, CD11b/CD18), LPAM-1 ($\alpha 4\beta 7$ integrin) が発現し、LFA-1 と Mac-1 は血管内皮細胞の ICAM-1 (CD54) に、LPAM-1 は MAdCAM-1 に結合し、血管壁へ接着し、血管内皮を横断移行する。さらに好酸球表面のケモカイン受容体 CCR3 を介して eotaxin-1, RANTES, MCP-4 などの濃度勾配により病変局所への遊走を生じる。組織に移行後は、CD44 が発現し、ヒアルロン酸に結合することによって組織でフォーミングしている (Watanabe et al., 2001)。

好酸球は IL-5 や GM-CSF などによって活性化され, 好酸球顆粒のコアに存在する major basic protein (MBP), マトリックスに存在する eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil peroxidase (EPO), eosinophil-derived neurotoxin (EDN)などの蛋白質(図 5-3)を放出する。これらは寄生虫障害作用を持つとともに, 組織障害活性を持ち好酸球による病態を形成する。

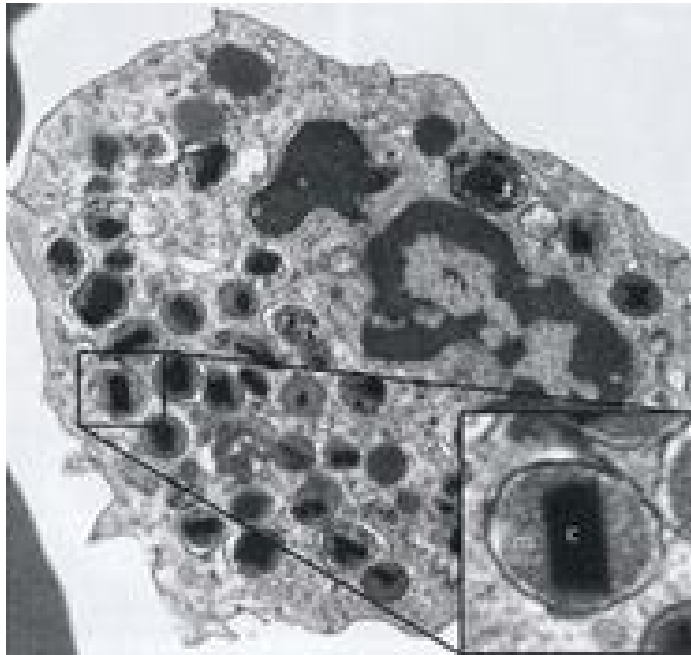


図 5-3 好酸球の電子顕微鏡写真 拡大像は, 好酸球顆粒を示している。中心部の晶質体 (Crystalloid:c)に MBP が含まれ, その周囲のマトリックス(m)に EDN, ECP, EPO が含まれる。(Bankers-Fulbright J. L., O'Grady S. M., in Eosinophils, 27, 2012)

また, 好酸球からの leukotrieneC4 (LTC4), LTB4, platelet activating factor (PAF)などの脂質メディエーター放出は気道収縮や血管透過性亢進を促し病態を修飾する (Jörg et al., 1982)。

従来好酸球はアレルギー疾患時に患部に集積し,内部顆粒中の塩基性タンパク質や活性酸素種によって,アレルギー性炎症を増悪する細胞として捉えられてきた (Corrigan & Kay, 1992; Gleich et al., 1979; Motojima et al., 1989)。しかし, 2000年に喘息患者に対する好酸球を標的とした抗 IL-5 抗体投与試験が無効であったとの報告 (Leckie et al., 2000) から好酸球の役割の再評価が行われてきた。そして近年になって好酸球の細胞内に存在する特殊顆粒中の塩基性タンパク質が組織の修復に寄与するなど,組織修復細胞として捉えられ始めている (Munitz et al.,2004 ; Nissim et al.,2010)。さらに, 線維芽細胞のコラーゲンやフィブロネクチンの産生を促進するなど組織修復に関与するサイトカイン, トランスフォ

ーミング成長因子 TGF- β (transforming growth factor- β) が主に好酸球から産生されるとの報告もある (Flood-Page et al., 2003; Munitz et al., 2004; Tanaka et al., 2004)。TGF- β は、正常の線維芽細胞の形質転換を促進する因子の一つとして発見されたことからこの名称が与えられた。その後の研究では、TGF- β は上皮細胞、内皮細胞、血球細胞、リンパ球など多くの細胞に対してむしろ増殖を抑制する因子であることが明らかとなった。また TGF- β は、前述した細胞外基質産生促進の他、免疫系の制御、血管新生に対する影響などの多彩な作用をもつことが明らかとなった (Miyazono et al., 1994)。

TGF- β は分子量約 25kDa のタンパク質で 2 本のペプチドの二量体構造をとる (Miyazono et al., 1994)。TGF- β には 5 つのアイソフォームが存在するが、哺乳類で見られるものは TGF- β 1, β 2, β 3 の 3 つである。

そこで本研究では好酸球を組織修復細胞としての観点から解析を進め、アレルギー炎症部位周辺で積極的に好酸球の活性化を促すことで、アレルギー性炎症の治癒を促す方法を開発することを目的とした。

好酸球は正常時には末梢血白血球中にわずか 1~3% しか存在せず、その純度や収量に限界があり、加えて成熟好酸球は *in vitro* で寿命が短い。以上のことから、機能性の解析にはむずかしい細胞である。

そこで本研究では、ヒト由来好酸球性白血病細胞株 EoL-1 細胞と IL-5 トランスジェニックマウスの好酸球を用いて BG の好酸球の脱顆粒に対する影響を検証した。ヒト由来好酸球性白血病細胞株 EoL 細胞には 3 つの subclone があり (EoL-1, EoL-2, EoL-3), それぞれ性格を異にする (Saito et al., 1985)。すなわち、EoL-1 細胞は通常の培養条件下でも 2~3% の細胞は Luxol-fast-blue 染色に陽性に染まる好酸性顆粒を含有する細胞に自然に分化し、後で述べるように種々の刺激によりさらに好酸性顆粒陽性の細胞に分化誘導させることが可能である。EoL-3 は通常の培養条件下で好酸性顆粒陽性細胞が存在せず、また EoL-2 と EoL-3 細胞は、EoL-1 細胞に認められる好酸性顆粒の誘導も起こさない (森田, 1993)。そこで今回は、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO) で好酸球様細胞に誘導可能な EoL-1 細胞を用いた。

材料

1. EoL-1 細胞

EoL-1 細胞株は、フランス人 33 歳、男性のヒト好酸球性白血病細胞から Saito ら (Saito et al., 1985) によって樹立された好酸性細胞株で腫瘍細胞である。通常の培養条件下では骨髓芽球 (myeloblast) 様の形態を示し、好酸球の特徴である内部特殊顆粒を有する細胞の

割合がきわめて低い。

EoL-1 細胞はジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO), 弱アルカリ刺激, 種々の既知のサイトカインや Human Interleukin-3 (hIL-3) 培養上清の添加により好酸性顆粒陽性細胞の誘導が可能である (Saito et al., 1985; 森田, 1993)。本研究では, EoL-1 細胞を DMSO で刺激し, 内部顆粒の成熟を促し, 成熟後の細胞を実験に用いた。

EoL-1 細胞株の DMSO 刺激による成熟培養は, Saito らの方法 (Saito et al., 1985) を一部改編して行った。10%ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地中に 5×10^5 /ml の growth phase の細胞を浮遊させ, ここに終濃度 0.1% (V/V) の DMSO を添加して, 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養を行った。細胞の成熟は, 後述の細胞内 EPO 活性値を指標として用いた。成熟がほぼプラトーに達した DMSO 添加 10 日後の細胞を実験に供した (図 5-4)。

EoL-1 細胞に対する DMSO 刺激に伴う細胞内部顆粒の成熟を, 細胞内総 EPO 活性で示した。DMSO 添加に伴い経時的に, 細胞内 EPO 活性が上昇することは, EoL-1 細胞が成熟し, 細胞部顆粒が充実してきた事を示す。EoL-1 細胞を DMSO 存在下で培養すると, 内部顆粒が成熟する半面, 細胞生存率が著しく低下するため, 実験に必要な細胞数が十分に確保できる 10 日後を DMSO 刺激のエンドポイントとした。

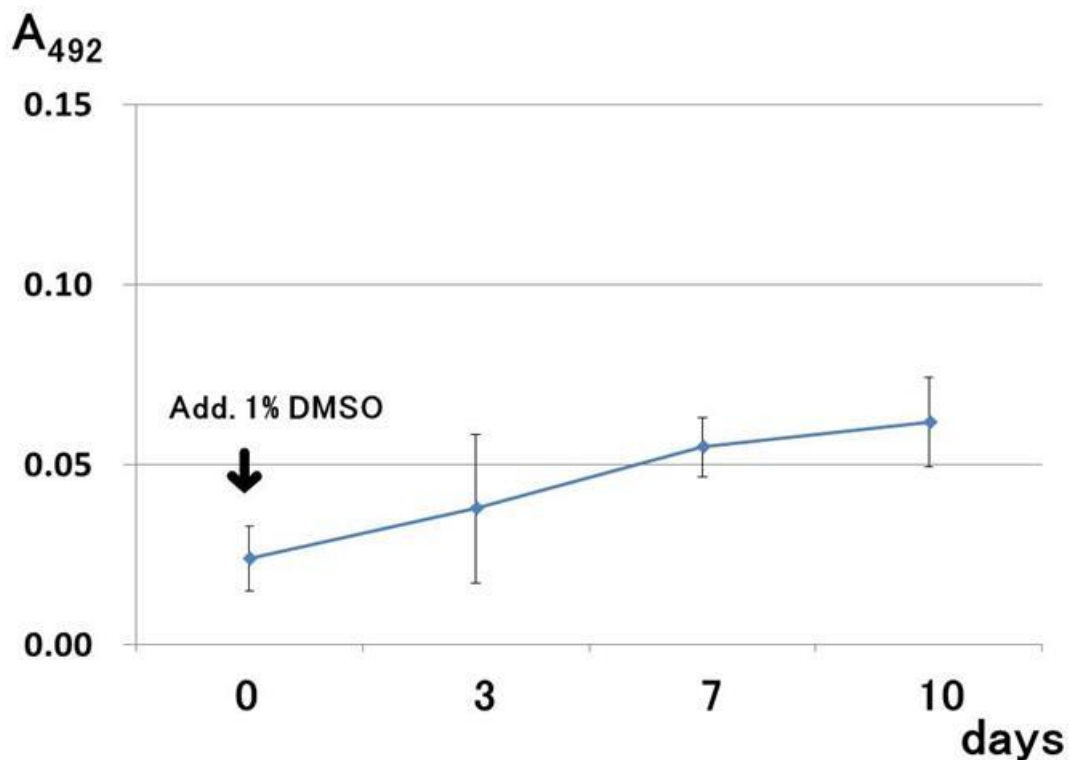


図 5-4 EoL-1 細胞に対する DMSO 刺激に伴う細胞内部顆粒の成熟 (細胞内総 EPO 活性)

2. IL-5 トランスジェニックマウスの好酸球

好酸球は、好酸球増多状態にある IL-5 トランスジェニックマウス (IL-5 TG マウス) (C3H/HeN-TgN (IL-5) Imeg) の脾臓から分離した。IL-5 TG マウスは、メタルチオネインプロモーター下流に IL-5 遺伝子をトランスジェニックすることで作成した (Tominaga et al., 1991)。DNA 委員会で承認を得て、自家繁殖させた 16 週齢のマウスを使用した。

IL-5 TG マウスをエーテル麻酔下で放血処理を行った後、脾臓を摘出し氷冷 Ca⁺⁺ free Krebs Ringer phosphate buffer [KRP: 122 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 17 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)] 中でホモジナイズした。未破壊の組織を除去し、前処理された脾臓細胞懸濁液からの好酸球分離を Gärtner (Gärtner, 1980) の方法を改変して行った。すなわち Percoll (70%, 75%, 80%) を用いた不連続密度勾配遠心分離法にて好酸球を分離した。遠心後 75%層に集積する好酸球を回収し、KRP で 2 度の洗浄を行った。回収した細胞集団を分離用緩衝液に再懸濁し、T 細胞と結合する抗 Thy1.2 抗体結合磁気ビーズと B 細胞と結合する抗 B220 抗体結合磁気ビーズを添加し、4°C, 15 分間反応させた後、永久磁石を用いたネガティブセレクションで T 及び B リンパ球を除去し、残った細胞集団を好酸球集団として実験に供した。

方法

BG の好酸球に対する効果は、脱顆粒を指標とし、脱顆粒量の指標には刺激後細胞外に放出された、Eosinophil peroxidase (EPO) の活性を用いた。

実験 1.と同様の方法で調整した BG をハンクス平衡塩類で終濃度 0.05%BG (各 n=3), 0.1%BG (各 n=3), 1%BG (各 n=3) に希釈したものを反応液とした。その反応液中に好酸球を終濃度 1×10^6 cells/200 μ l で再懸濁した。10 μ M カルシウムイオノフォア (A₂₃₁₈₇) で刺激を行い、10 分間, 30 分間, 60 分間, 120 分間それぞれの時間, 37°C, 5%CO₂ 条件下で静置した。BG 無添加群を対象群とした。

EPO 活性の測定は Kroegel ら (Kroegel et al., 1989) の方法を改変して行った。好酸球を所定の時間インキュベートした後、400 x g, 4°C, 5 分間遠心し、上澄 100 μ l を回収し、ここに 300 μ l の OPD 溶液(1 mM H₂O₂, 1 mM o-phenylenediamine, 0.1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)を添加した。反応液を、室温で 30 分間反応させた後、25 μ l の 4M H₂SO₄ を添加し、反応を停止させ、ここから 200 μ l を 96 穴プレートに分取し、マイクロプレートリーダーを用いて波長 492 nm における吸光度を測定した。

実験 1. DMSO 刺激後 10 日目の EoL-1 cells を

- ①未刺激
 - ②A₂₃₁₈₇（カルシウムイオノファ）で刺激した群
 - ③②に 0.1%グルカンを添加した群
 - ④②に 0.05%グルカンを添加した群
- の計 4 群で検討した。

実験 2. IL-5 TG マウスの脾臓由来の好酸球を

- ①未刺激
 - ②A₂₃₁₈₇（カルシウムイオノファ）で刺激した群
 - ③②に 1.0%グルカンを添加した群
 - ④②に 0.1%グルカンを添加した群
 - ⑤②に 0.05%グルカンを添加した群
- の計 5 群で検討した。

統計解析方法

実験結果の値は、平均値±SD で表し、統計解析は、Student's t-test（対応なし）でおこなった。

結果

1. EoL-1 細胞

EoL-1 細胞を A₂₃₁₈₇ で刺激すると時間とともに A₄₉₂ が上昇していることから、脱顆粒に伴い EPO が上昇していることを示している。最も効果が顕著であった培養 120 分後で数値の比較を行うと、未刺激の EoL-1 細胞単独では A₄₉₂ が 0.010±0.013（±S.D.）で、この数値が spontaneous な脱顆粒量を示す。EoL-1 細胞に A₂₃₁₈₇ 刺激を行うと、0.064±0.026 と A₄₉₂ が著明に上昇し、脱顆粒が引き起こされたことが示唆された。この反応系に BG を添加すると、0.1%添加では 0.027±0.009、0.05%添加では 0.031±0.006 と、好酸球系細胞株からの脱顆粒が阻害された（図 5-5）。すなわち、BG は A₂₃₁₈₇ で刺激される EoL-1 細胞の脱顆粒に伴う EPO 放出を抑制した。

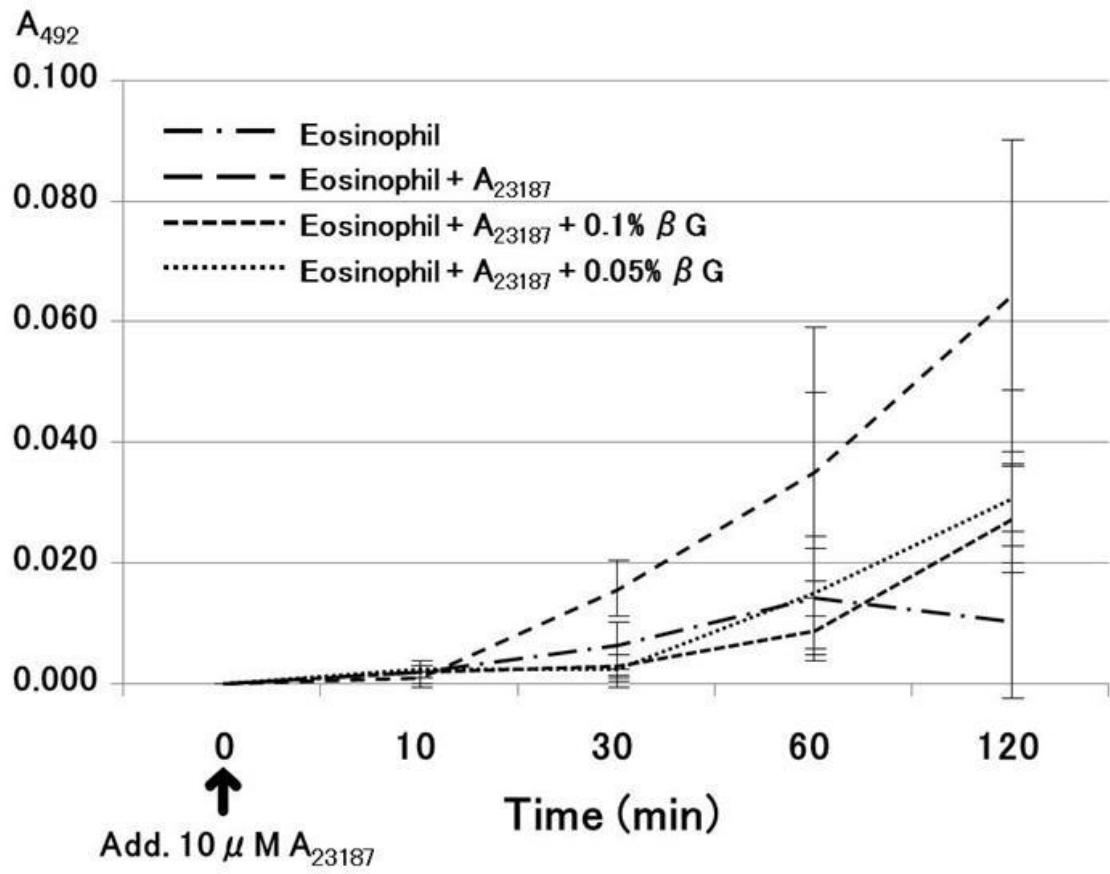


図 5-5 好酸球系細胞株 EoL-1 細胞を A_{23187} で刺激した際の脱顆粒に対する黒酵母 β -グルカンの効果

2. IL-5 トランスジェニックマウスの好酸球

好酸球に A₂₃₁₈₇ 刺激を行うと時間の経過とともに吸光度 492nm は上昇した。すなわち脱顆粒による EPO 活性の上昇が認められた。好酸球に 1.0%グルカンを追加して A₂₃₁₈₇ 刺激を行った群の吸光度 492nm が最も高く推移し、A₂₃₁₈₇ 刺激を行わなかった群が最も低く推移した。好酸球に A₂₃₁₈₇ 刺激を行った 10 分後の波長 492nm における吸光度は、0.123±0.008 と刺激前に比較すると有意に上昇し、脱顆粒が引き起こされた。この反応系に βG を添加した 1%βG 群では 0.157±0.006 とさらに高値を示しており (p=0.0045 vs A₂₃₁₈₇ 刺激のみ)、βG を添加することで脱顆粒が促進された (図 5-6)。A₂₃₁₈₇ 刺激 30 分後の値は、A₂₃₁₈₇ 刺激のみでは 0.129±0.005 であるのに対し、βG を添加した 0.1%βG 群では、0.149±0.007、1%βG 群では 0.170±0.011 と A₂₃₁₈₇ 刺激のみと比較して有意に高値を示し (p=0.0148, p=0.0046 vs A₂₃₁₈₇ 刺激のみ)、1%βG 群は 0.1%βG 群に対しても有意差を認め (p=0.0496)、βG 添加による好酸球の脱顆粒の促進には、濃度依存性が認められた (図 5-7)。

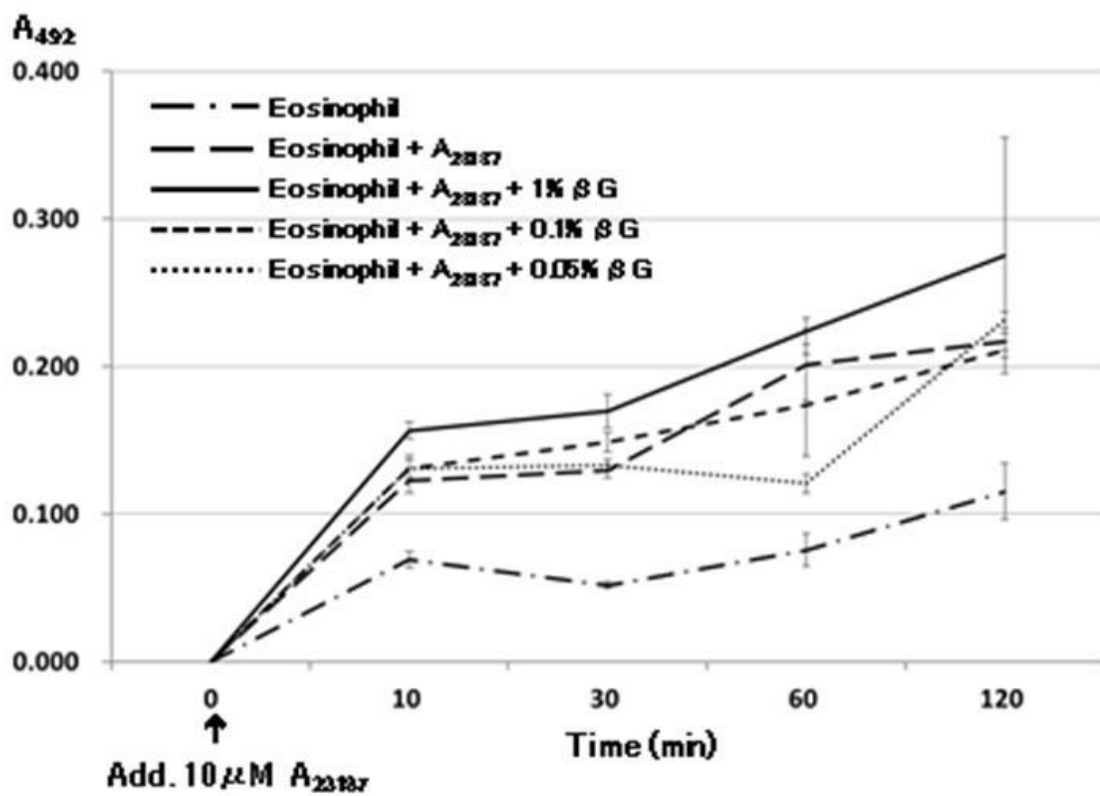


図 5-6 IL-5 トランスジェニックマウスの好酸球に A₂₃₁₈₇ 刺激を行った後の吸光度 492nm の推移

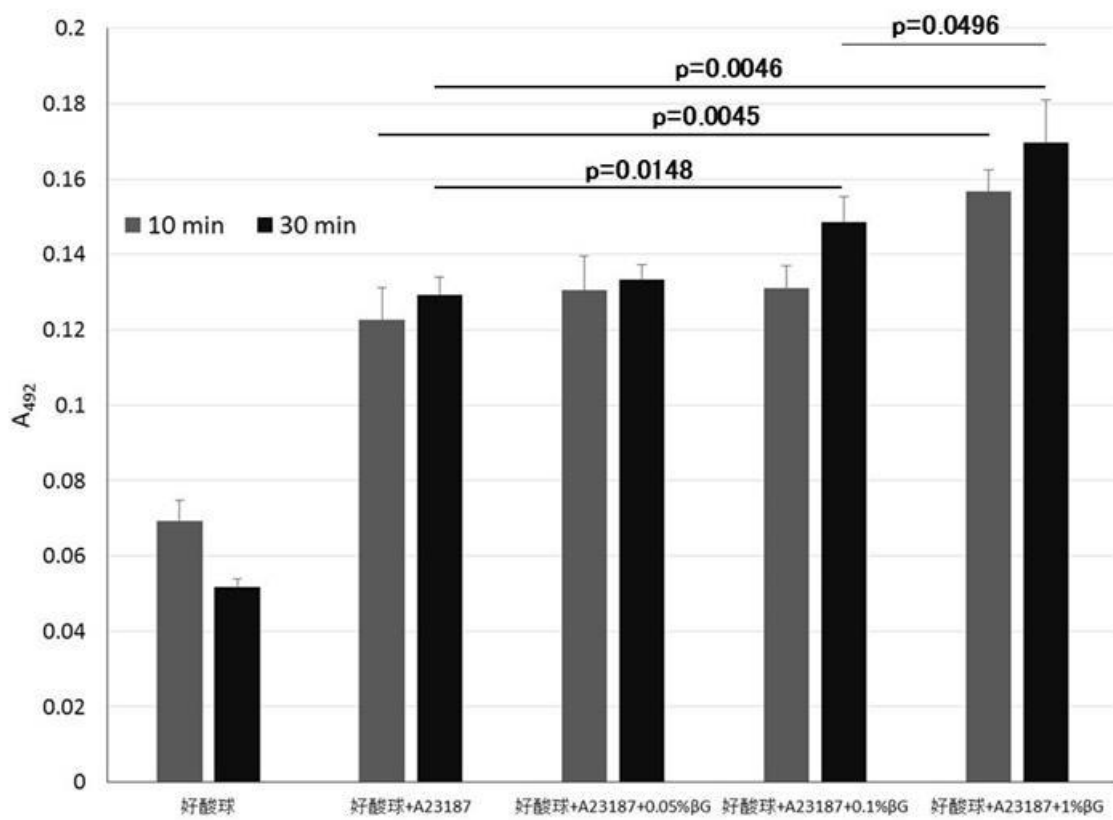


図 5-7 IL-5 トランスジェニックマウスの好酸球を A₂₃₁₈₇ 刺激した 10 分後と 30 分後の吸光度 492nm の値

考察

βG の EoL-1 細胞と IL-5 トランスジェニックマウスから得られた好酸球に対する作用は、相反する結果が得られた。すなわち、EoL-1 細胞に対しては、βG は脱顆粒を抑制し、IL-5 トランスジェニックマウスから得られた好酸球に対しては脱顆粒を促進した。

EoL-1 細胞は、ヒト由来好酸球性白血病細胞株すなわち腫瘍細胞であり正常な好酸球ではない。また、生体内には存在しない DMSO で誘導した細胞である。また、細胞内の顆粒は未成熟で、十分な数の成熟好酸球が得られなかった。一方、IL-5 トランスジェニックマウスから得られた好酸球は正常な好酸球であり、十分量の好酸球が得られた。塗布試験で βG を用いることで良好な結果が得られた試験は、マウスを対象としていることから、今回の βG の好酸球に対する脱顆粒への影響に関しては、正常なマウスの好酸球である IL-5 トランスジェニックマウスから得られた好酸球の実験結果を採用することとした。

その結果、βG には好酸球の脱顆粒に対する促進効果が認められた。このことから、β-グルカンには、好酸球の脱顆粒を促進させる効果があることがわかった。1%βG でこのような結果が得られたことから、10%βG を使用したマウス塗布の実験においては、同様の効果が炎症部位で引き起こされていたことが考えられる。

また、炎症部位周辺などでは、感染した細菌が行う嫌氣的呼吸による乳酸の増加や、破壊された細胞から酸性物質の放出を原因として、pH が低下するとされている。β-グルカンによって刺激された脱顆粒による好酸球顆粒内の塩基性物質によって、低下した pH を正常 pH に戻している可能性も示唆された。

第6章 総括

本報は、水溶性 β -1,3-1,6-グルカンのアレルギー性炎症に対する塗布剤としての効果を検討した。特に、好酸球を組織修復細胞としての観点から解析を進めた初めての報告である。

使用した黒酵母 β -グルカン (BG) は、*Aureobasidium pullulans* を培養した後に *Aureobasidium pullulans* を滅菌した培養液であり、 β -1,3-1,6-グルカンが豊富に含まれている。BG は既存添加物に認可されており、BG を経口摂取することで、免疫賦活効果、抗腫瘍効果等があることが報告されている (Tsukada et al., 2003; Chan et al., 2009)。

本研究では、好酸球を組織修復細胞としての観点から解析を進め、アレルギー性炎症部位周辺で BG が積極的に好酸球の活性化を促すことで、アレルギー性炎症の治癒を促進する方法を探索した。

まずは、BG には、キサンチンオキシダーゼによって産生されるスーパーオキシドの消去能が認められた。炎症の場においては、好中球、マクロファージなどの白血球の NADPH オキシダーゼ由来の活性酸素分子種は、取り込まれた細菌や真菌を含む食胞内に放出されるだけでなく、細胞外に放出され組織障害的に働き、正常組織の炎症を引き起こすことが報告されている (Devasagayam et al., 2004; Dröge, 2002)。従って、炎症の場で過剰に産生された活性酸素を β -グルカンが消去することは、炎症による組織障害を抑制する効果があると思われる。

続いて、ヒト正常線維芽細胞 CCD-1056SK に BG を混和することによって、BG 群で有意な細胞増殖促進効果が認められた。線維芽細胞は、*in vivo* においては、創傷治癒の際、第 2 期・増殖期 (肉芽形成期) において、炎症期に創傷部へ集まった血小板やマクロファージなどから分泌される血小板由来成長因子により動員される (Tapola et al., 2005)。その結果、受傷後 3~5 日までに、活性化した線維芽細胞が創部に集積、進入し、創部において最も有意な細胞となる。そして、血小板、活性化したマクロファージや線維芽細胞から分泌された Transforming growth factor β (TGF- β) が、線維芽細胞を増殖させ、線維芽細胞のコラーゲンを中心とする細胞外基質の合成を促し肉芽組織が形成される。その後、コラーゲン分子は凝集し、原線維となり、瘢痕組織が形成され、創の修復が進む (Chin et al., 2005; Eichler et al., 2006)。従って創傷治癒を促進するには線維芽細胞の増殖は、重要な因子である。

線維芽細胞には、Toll 様受容体等のパターン認識受容体が発現しているとの報告がある (Tabeta et al., 2000; Wang et al., 2000)。そして、Kougias ら (Kougias et al., 2001) は、免疫細胞ではない線維芽細胞の膜上に β -グルカンに対して 2 つの特異的な結合部位があり、

この受容体を介して β -グルカンの刺激が細胞内に伝達されることを報告している。

今回の試験管内での実験では、線維芽細胞と β -グルカンのみの環境であることから、線維芽細胞表面の受容体への β -グルカンの直接的な作用であることが考えられる。したがって、線維芽細胞の受容体にこの β -グルカンが結合することによって、線維芽細胞の増殖が促進されたことが考えられる。

これらの試験管で示された BG の効果を生体で検証するために、皮膚炎モデルマウスで検証した。その結果、皮膚炎モデルマウスにおいて、BG により症状が軽減された。

他方、BG には、好酸球の脱顆粒に対する促進効果が認められた。1%BG でこのような結果が得られたことから、10%BG を使用したマウス塗布の実験においては、病巣局所で試験管内以上の BG が存在することが予想されるため、好酸球の脱顆粒が炎症部位で引き起こされていたことが示唆される。

以上の様に、BG の炎症部位への塗布による傷の治癒促進効果は、 β -グルカンの生体での異なる効果の相乗効果によるものと思われる。1つ目は、患部での SOD 活性による抗炎症効果、2つ目は、正常線維芽細胞への増殖促進効果、3つ目に好酸球の活性化に伴う脱顆粒に由来する成分による治癒促進効果が挙げられる。

特に好酸球については、近年、炎症増悪細胞から組織再生に寄与する細胞へと考え方が変わってきている。すなわち、好酸球特殊顆粒中の塩基性タンパク質が直接線維芽細胞の増殖に寄与するとの報告がある (Munitz et al., 2004; Smith et al., 2000)。さらに、好酸球から線維芽細胞のコラーゲン産生を促進する TGF- β が産生されるとの報告もある (Munitz et al., 2004)。また、 β -グルカンによって刺激された脱顆粒による好酸球顆粒内の塩基性物質によって、炎症部位周辺の低下した pH を正常 pH に戻している可能性が示唆される。本研究の特徴は、病巣部位に浸潤している好酸球を β -グルカン塗布によって積極的に活性化し、組織再生に利用する点である。

本研究により BG による好酸球の活性化が明らかとなり、また、脱顆粒促進作用から好酸球が組織修復促進に働いている可能性が示唆された。今後は、この研究を発展させることで、BG はアレルギー性皮膚炎に対する新規の塗布剤として応用できる可能性が期待される。

第7章 要旨

目的：本研究では、好酸球を組織修復細胞としての観点から解析を進め、アレルギー性炎症部位周辺で黒酵母β-グルカン(BG)が積極的に好酸球の活性化を促すことで、アレルギー性炎症の治癒を促進する方法を探索した。

方法：試験管内の系でBGのsuperoxide dismutase (SOD)活性と、線維芽細胞の増殖に与える影響を検討した。さらに、TNCB炎症モデルマウスでその効果を検討した。対照群は生食とし、BGを連日塗布した。評価には皮膚スコアと耳介厚を用いた。また、マウスの好酸球に対する効果は脱顆粒を指標として検討した。

結果：SOD活性と線維芽細胞の増殖促進効果が確認された。マウスでは、皮膚スコアと耳介厚で濃度依存的に有意な症状の軽減効果が認められた。好酸球は、BG刺激によって脱顆粒が誘導された。

結論：BG塗布による炎症モデルマウスにおける症状緩和効果は、BGの抗酸化力による炎症の軽減と、BGによる線維芽細胞の増殖促進効果によって傷の治癒が促進されたと思われる。また、BGによる好酸球の活性化が創傷治癒促進に働いている可能性が示唆された。今後は、この研究を発展させることで、BGはアレルギー性皮膚炎に対する新規の塗布剤として応用できる可能性が期待される。

謝辞

本論文の遂行にあたり、熱心なご助言を賜るとともに丁寧にご指導して下さいました高知大学大学院総合人間自然科学研究科黒潮圏総合科学専攻教授、溝渕俊二先生に深甚なる謝意を表します。

共同研究者であり、実験の実施及び分析にあたり細部にわたるご指導とご助力頂いた高知大学医学部特任助教の渡部嘉哉先生に心から感謝の意を表します。

副指導としてお世話になりました高知大学大学院黒潮圏総合科学専攻長、飯國芳明先生、高知大学大学院黒潮圏総合科学専攻教授、富永明先生、高知大学大学院黒潮圏総合科学専攻教授で前専攻長、奥田一雄先生に深謝致します。

本論文の遂行にあたり、共同研究者であり貴重な黒酵母 β -グルカンを御恵与下さいました株式会社ミューズ、中島洋氏に感謝の意を表します。

実験の実施にあたり、ご協力頂きました高知大学医学部総合研究センター生命・機能物質部門動物実験施設の皆様、岡山県立大学理事長、辻英明学長と岡山県立大学保健福祉学長、高橋吉孝先生、岡山県立大学動物実験委員会の皆様と岡山県立大学動物実験施設管理の皆様に心からお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご支援、ご協力下さいました独立行政法人日本学術振興会（科学研究費補助金挑戦的萌芽研究 課題番号 23660037）および中小企業庁（平成 21 年度ものづくり中小企業製品開発等支援補助金 T 217390008）に感謝致します。

2015 年 6 月 北村 亜希子

引用文献

- Abo H., Matsumura T., Kodama T., Ohta H., Fukui K., Kato K., Kagawa H. (1991) Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase). *J. Bacteriol.*, **173**: 989-996.
- Ariizumi K., Shen G.L., Shikano S., Xu S., Ritter R. 3rd, Kumamoto T., Edelbaum D., Morita A., Bergstresser P.R., Takashima A. (2000) Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J. Biol. Chem.*, **275**: 20157-20167.
- Bankers-Fulbright J. L., O'Grady S. M. (2012) Mechanisms of eosinophil degranulation: pH regulation and release of major basic protein (MBP). In *Eosinophils*, Walsh G. M. editor, Nova Biomedical, New York, 25-45
- Borgstahl G.E., Parge H.E., Hickey M.J., Beyer W.F. Jr, Hallewell R.A., Tainer J.A. (1992) The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell*, **71**: 107-118.
- Browder W., Williams D., Lucore P., Pretus H., Jones E., McNamee R. (1988) Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery*, **104**: 224-230.
- Brown G.D., Taylor P.R., Reid D.M., Willment J.A., Williams D.L., Martinez-Pomares L., Wong S.Y., Gordon S. (2002) Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.*, **196**: 407-412.
- Chan G.C., Chan W.K., Sze D.M. (2009) The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.*, **2**:25.
- Chen L., Guo S., Ranzer M.J., DiPietro L.A. (2013) Toll-like receptor 4 has an essential role in early skin wound healing. *J. Invest. Dermatol.*, **133**: 258-267.
- Chin G.C., Diegelmann R.F., Schultz G.S. ,et al. (2005) Cellular and molecular regulation of wound healing, Falabella A.F., editors, *Wound Healing*, Boca Raton, Taylor & Francis Group, 17-37.
- Clutterbuck E., Shields J.G., Gordon J., Smith S.H., Boyd A., Callard R.E., Campbell H.D., Young I.G., Sanderson C.J. (1987) Recombinant human interleukin 5 is an eosinophil differentiation factor but has no activity in standard human B cell growth factor assays. *Eur. J. Immunol.*, **17**: 1743-1750.

- Compton R., Williams D., Browder W. (1996) The beneficial effect of enhanced macrophage function on the healing of bowel anastomoses. *Am. Surg.*, **62**: 14-18.
- Corrigan C.J., Kay A.B. (1992) T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol. Today*, **13**: 501-507.
- Dasu M.R., Hawkins H.K., Barrow R.E., Xue H., Herndon D.N. (2004) Gene expression profiles from hypertrophic scar fibroblasts before and after IL-6 stimulation. *J. Pathol.*, **202**: 476-485.
- Delatte S.J., Evans J., Hebra A., Adamson W., Othersen H.B., Tagge EP. (2001) Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children. *J. Pediatr. Sur.*, **36**: 113-118.
- Devasagayam T.P., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D. (2004) Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India.*, **52**, 794-804.
- Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, **82**, 47-95.
- Duvic M., Reisman M., Finley V., Rapini R., DiLuzio N.R., Mansell P.W. (1987) Glucan-induced keratoderma in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Dermatol.*, **123**: 751-756.
- Eichler M.J., Carlson M.A. (2006) Modeling dermal granulation tissue with the linear fibroblast-populated collagen matrix: a comparison with the round matrix model. *J. Dermatol. Sci.*, **41**: 97-108.
- Elstad M.R., Parker C.J., Cowley F.S., Wilcox L.A., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A. (1994) CD11b/CD18 integrin and a beta-glucan receptor act in concert to induce the synthesis of platelet-activating factor by monocytes. *J. Immunol.*, **152**: 220-230.
- Finkel T., Holbrook N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**: 239-247.
- Flood-Page P., Menzies-Gow A., Phipps S., Ying S., Wangoo A., Ludwig M.S., Barnes N., Robinson D., Kay A.B. (2003) Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J. Clin. Invest.*, **112**: 1029-36.
- Gallucci R.M., Simeonova P.P., Matheson J.M., Kommineni C., Guriel J.L., Sugawara T., Luster M.I. (2000) Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and

- immunosuppressed mice. *FASEB J.*, **14**: 2525-2531.
- Gärtner I. (1980) Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll). *Immunology*, **40**: 133-136.
- Ghazizadeh M., Tosa M., Shimizu H., Hyakusoku H., Kawanami O. (2007) Functional implications of the IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, **127**: 98-105.
- Gleich G.J., Frigas E., Loegering D.A. (1979) Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J. Immunol.*, **123**: 2925-2927.
- Harada D., Takada C., Tsukumo Y., Takaba K., Manabe H. (2005) Analyses of a mouse model of the dermatitis caused by 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)-repeated application. *J. Dermatol. Sci.*, **37**: 159-167.
- Ikeda Y., Adachi Y., Ishibashi K., Miura N., Ohno N. (2005) Activation of toll-like receptor-mediated NF-kappa beta by zymosan-derived water-soluble fraction: possible contribution of endotoxin-like substances. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **27**: 285-298.
- Ikewaki N., Fujii N., Onaka T., Ikewaki S., Inoko H. (2007) Immunological actions of Sophy beta-glucan (beta-1,3-1,6 glucan), currently available commercially as a health food supplement. *Microbiol. Immunol.*, **51**: 861-873.
- Iwasaki H., Mizuno S., Mayfield R., Shigematsu H., Arinobu Y., Seed B., Gurish M.F., Takatsu K., Akashi K. (2005) Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J. Exp. Med.*, **201**: 1891-1897.
- Jörg A., Henderson W.R., Murphy R.C., Klebanoff S.J. (1982) Leukotriene generation by eosinophils. *J. Exp. Med.*, **155**: 390-402.
- Karlberg A.T., Bergström M.A., Börje A., Luthman K., Nilsson J.L. (2008) Allergic contact dermatitis-formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**: 53-69.
- Kenyon A.J., Douglas D.M., Hamilton S.G. (1985) Defective macrophage function in wound repair of P/J mice, *Lab. Anim. Sci.*, **35**: 150-152.
- Kiho T., Morimoto H., Sakushima M., Usui S., Ukai S. (1995) Polysaccharides in fungi. XXXV. Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**: 1627-1629.
- Kim H.L., Lee J.H., Lee M.H., Kwon B.J., Park J.C. (2012) Evaluation of electrospun (1,3)-(1,6)- β -D-glucans/biodegradable polymer as artificial skin for full-thickness

- wound healing. *Tissue Eng. Part A*, **18**: 2315-2322.
- Kim Y.W., Kim K.H., Choi H.J. (2005) Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol. Lett.*, **27**: 483-487.
- Kitagaki H., Fujisawa S., Watanabe K., Hayakawa K., Shiohara T. (1995) Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. *J. Invest. Dermatol.*, **105**: 749-55.
- Kitagaki H., Ono N., Hayakawa K., Kitazawa T., Watanabe K., Shiohara T. (1997) Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J. Immunol.*, **159**: 2484-2491.
- Kougias P., Wei D., Rice P.J., Ensley H.E., Kalbfleisch J., Williams D.L., Browder I.W. (2001) Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (1->3)-beta-D-glucans. *Infect. Immun.*, **69**: 3933-3938.
- Kroegel C., Yukawa T., Dent G. (1989) Stimulation of degranulation from human eosinophils by platelet-activating factor. *J. Immunol.*, **142**: 3518-3526.
- Leckie M.J., ten Brinke A., Khan J., Diamant Z., O'Connor B.J., Walls C.M., Mathur A.K., Cowley H.C., Chung K.F., Djukanovic R., Hansel T.T., Holgate S.T., Sterk P.J., Barnes P.J. (2000) Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, **356**: 2144-2148.
- Leibovich S.J., Danon D. (1980) Promotion of wound repair in mice by application of glucan. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **27**: 1-11.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**: 973-983.
- Marklund S.L., Holme E., Hellner L. (1982) Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acta.*, **126**: 41-51.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049-6055.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**: 394-397.

- Miyazono K., Ten Dijke P., Ichijo H., Heldin C.H. (1994) Receptors for transforming growth factor-beta. *Adv. Immunol.*, **55**: 181-220.
- Motojima S., Frigas E., Loegering D.A.(1989) Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **139**: 801-805.
- Munitz A., Levi-Schaffer F. (2004) Eosinophils 'new' roles for 'old' cells. *Allergy*, **59**: 268-275.
- Nissim Ben Efraim A.H., Eliashar R., Levi-Schaffer F. (2010) Hypoxia modulates human eosinophil function. *Clin. Mol. Allergy*, **8**: 10.
- Portera C.A., Love E.J., Memore L., Zhang L., Müller A., Browder W., Williams D.L. (1997) Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. *Am. Surg.*, **63**: 125-131.
- Richardson J.S., Thomas K.A., Rubin B.H., Richardson D.C. (1975) Crystal structure of bovine Cu,Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 1349-1353.
- Ross G.D., Vetvicka V., Yan J. (1999) Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer. *Immunopharmacology*, **42**: 61-74.
- Saito H., Bourinbaiar A., Ginsburg M., Minato K., Ceresi E., Yamada K., Machover D., Bréard J., Mathé G. (1985) Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood*, **66**: 1233-1240.
- Sanderson C.J. (1992) Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*, **79**: 3101-3109.
- Seike M., Furuya K., Omura M., Hamada-Watanabe K., Matsushita A., Ohtsu H. (2009) Histamine H(4) receptor antagonist ameliorates chronic allergic contact dermatitis induced by repeated challenge. *Allergy*, **65**: 319-326.
- Smith S.J., Levi-Schaffer F. (2000) Mast cell-eosinophil-fibroblast crosstalk in allergic inflammation. *Chem. Immunol.*, **78**: 81-92.
- Tabeta K., Yamazaki K., Akashi S. (2000) Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. *Infect. Immun.*, **68**: 3731-3735.
- Takatsu K., Takaki S., Hitoshi Y. (1994) Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. *Adv. Immunol.*, **57**: 145-190.
- Tanaka H., Komai M., Nagao K., Ishizaki M., Kajiwara D., Takatsu K., Delespesse G., Nagai H. (2004) Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **31**: 62-68.

- Tapola N., Karvonen H., Niskanen L., Mikola M., Sarkkinen E. (2005) Glycemic responses of oat bran products in type 2 diabetic patients. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **15**: 255-261.
- Taylor P.R., Brown G.D., Reid D.M., Willment J.A., Martinez-Pomares L., Gordon S., Wong S.Y. (2002) The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.*, **169**: 3876-3882.
- Thannickal V.J., Fanburg B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **279**: L1005-1028.
- Tominaga A., Takaki S., Koyama N., Katoh S., Matsumoto R., Migita M., Hitoshi Y., Hosoya Y., Yamauchi S., Kanai Y., Miyazaki J., Usuku G., Yamamura K. (1991) Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor gene (interleukin 5) develop eosinophilia and autoantibody production. *J. Exp. Med.*, **173**: 429-437.
- Tsukada C., Yokoyama H., Miyaji C., Ishimoto Y., Kawamura H., Abo T. (2003) Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of beta-glucan. *Cell Immunol.*, **221**: 1-5.
- Viriyakosol S., Fierer J., Brown G.D., Kirkland T.N. (2005) Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect. Immun.*, **73**: 1553-1560.
- Wang P.L., Azuma Y., Shinohara M. (2000) Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**: 1161-1167.
- Watanabe Y., Hashizume M., Kataoka S., Hamaguchi E., Morimoto N., Tsuru S., Katoh S., Miyake K., Matsushima K., Tominaga M., Kurashige T., Fujimoto S., Kincade P.W., Tominaga A. (2001) Differentiation stages of eosinophils characterized by hyaluronic acid binding via CD44 and responsiveness to stimuli. *DNA Cell Biol.*, **20**: 189-202.
- Willment J.A., Gordon S., Brown G.D. (2001) Characterization of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.*, **276**: 43818-43823.
- Wolk M., Danon D. (1985) Promotion of wound healing by yeast glucan evaluated on single animals. *Med. Biol.*, **63**: 73-80.
- Yamaguchi Y., Hayashi Y., Sugama Y., Miura Y., Kasahara T., Kitamura S., Torisu M., Mita S., Tominaga A., Takatsu K. (1988) Highly purified murine interleukin 5 (IL-5)

- stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J. Exp. Med.*, **167**: 1737-1742.
- Yamaguchi Y., Suda T., Ohta S., Tominaga K., Miura Y., Kasahara T. (1991) Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood*, **78**: 2542-2547.
- Yamaguchi Y., Suda T., Suda J., Eguchi M., Miura Y., Harada N., Tominaga A., Takatsu K. (1988) Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J. Exp. Med.*, **167**: 43-56.
- Yamaura K., Doi R., Suwa E., Ueno K. (2012) Repeated application of glucocorticoids exacerbate pruritus via inhibition of prostaglandin D2 production of mast cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *J. Toxicol. Sci.*, **37**: 1127-1134.
- Yamaura K., Tomono A., Suwa E., Ueno K. (2013) Topical royal jelly alleviates symptoms of pruritus in a murine model of allergic contact dermatitis. *Pharmacogn. Mag.*, **9**: 9-13.
- Zucker-Franklin D. (1988) Eosinophils. In atlas of Blood Cells, second edition, Zucker-Franklin D., Greaves M.F., Grossi C.E., Marmont A.M. editors, E.E ed-ermes, Milano, Lea & Febiger Philadelphia, 262.
- 受田浩之 (2000) 酵素スーパーオキシド(SOD)の活性測定法. *Dojin News*, **96**: 1-7 .
- 鈴木利雄 (2005) 酵母 *Aureobasidium pullulans* の産生とその展開. *フードスタイル* **21**, **9**: 61-64.
- 高森 建二 (2009) アトピー性皮膚炎におけるかゆみのメカニズム. *医学のあゆみ*, **228**: 25-30.
- 館正弘, 古和田雪 (2011) 創傷治癒の機序と難治性創傷. *医学のあゆみ*, **237**: 5-8.
- 長井良憲, 高津聖志 (2009) IL-5 と好酸球で誘導されるアレルギー性炎症. *実験医学増刊「アレルギー疾患の免疫機構」*, **27**: 107-113.
- 日塔武彰 (2003) 好酸球のリボヌクレアーゼと生体防御. *山形医学*, **21**: 47-61.
- 森田昌雄 (1993) 綜説: ヒト好酸球培養株を用いた研究の動向. *日本臨牀*, **51**: 712-717.
- 矢田純一 (2007) 12 章 食細胞-好中球とマクロファージ. 改訂 10 版 医系免疫学. 矢田純一著, 中外医学社, 東京, 360.