

ヒト血清中の抗  $\beta$ -グルカン抗体に関する研究

池脇 香織 園田 徹\* 東 和弘\*\*

A study of anti- $\beta$ -glucan antibody in human serum

Kaori IKEWAKI , Tohru SONODA\* , Kazuhiro AZUMA\*\*

## Abstract

In this study, we found that anti- $\beta$ -glucan IgG antibodies were present in sera from the peripheral blood (PB) of normal adult donors and the umbilical cord blood (UCB) of neonates using a novel enzyme-linked immunoassay (EIA) developed in our laboratories. The titers of anti- $\beta$ -glucan IgG antibodies from the PB of normal adult donors were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than those from the UCB of neonates. These findings suggest that anti- $\beta$ -glucan IgG antibodies in sera from the UCB of neonates may be transferred from the mothers to the neonates via the placenta. The reactivity of serially diluted purified IgG antibody prepared from the serum of a normal adult donor (human purified IgG antibody) was also positive against  $\beta$ -glucan in a dose-dependent manner. On the other hand, a standard rabbit anti- $\beta$ -glucan IgG antibody completely blocked the reactivity of human purified IgG antibody to  $\beta$ -glucan in a dose-dependent manner. Taken together, these findings show that human sera contain specific anti- $\beta$ -glucan IgG antibodies and suggest that these anti- $\beta$ -glucan IgG antibodies may have unique actions in various immunological responses.

**Key words** : anti- $\beta$ -glucan antibody, enzyme-linked immunoassay, human serum.

**キーワード** : 抗  $\beta$ -グルカン抗体, エンザイムイムノアッセイ, ヒト血清

## はじめに

グルカンはブドウ糖のみが結合した多糖の一つで、結合様式によって  $\alpha$  および  $\beta$  の 2 種類に分けられる。その内、 $\beta$ -グルカンはアガリクスやシイタケなどのキノコ類、でんぷん、セルロース、酵母などの微生物培養液（微生物多糖）、紅藻などの海草類に多く含まれている<sup>1,2)</sup>。特に、カワラタケの含タンパク多糖 protein-bound polysaccharide K (PSK)、シイタケの多糖レンチナン、スエヒロタケの多糖シゾフィランは、その生理活性を利用して癌の免疫療

法剤として実用化されている。これらは抗癌剤のように直接癌細胞に作用するのではなく、生体の免疫増強 (Biological response modifier:BRM) によるものである<sup>3-5)</sup>。一方、 $\beta$ -グルカンは、健康食品をはじめ一般食品や化粧品分野でも注目が高まり、コレステロール上昇抑制作用、血糖値上昇抑制作用、免疫活性作用を有することが明らかになり、各産業界でさまざまな研究が進められている<sup>6-9)</sup>。

我々は天然の黒酵母菌 (*Aureobasidium pullulans*; *A. pullulans*) の特性を調べる過程で、この菌が多量の多糖

延岡学園高等学校 〒882-0001 宮崎県延岡市大峽町7820

\*九州保健福祉大学保健科学部作業療法学科 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町1714-1

\*\*東内科クリニック 〒887-0022 宮崎県日南市上平野町3-8-8

Department of Cooking, Nobeoka Gakuen High School 7820 Okaimachi, Nobeoka-shi, Miyazaki 882-0001, Japan

\*Department of Occupational Therapy, School of Health Science, Kyushu University of Health and Welfare

1714-1 Yoshino-machi, Nobeoka-city, Miyazaki 882-8508, Japan

\*\*Azuma Clinic of Internal Medicine, 3-8-8 Kamihirano-cho, Nichinan-shi, Miyazaki 887-0022, Japan

( $\beta$ -グルカン) を産生することを見出し、その分離に成功した<sup>10,11)</sup>。また、*A. pullulans*由来の $\beta$ -グルカンがヒト末梢血単核球のDNA合成能を増強させること、さらにサイトカインの一種であるインターロイキン-8 (IL-8) の産生を増強させることを明らかにしている<sup>12-14)</sup>。

近年、ヒト血清中に $\beta$ -グルカンに対する抗体(抗 $\beta$ -グルカン抗体)が存在することが明らかになり、この抗 $\beta$ -グルカン抗体が免疫応答に密接に関与していることが明らかになってきた<sup>15)</sup>。一般的に、ヒト血清中に存在する抗 $\beta$ -グルカン抗体は真菌属(主にカンジダ属菌)細胞壁主要構成多糖の一つである $\beta$ -グルカンに対する抗体と考えられている。さらに、癌患者、自己免疫疾患(膠原病)、川崎病、真菌症などでは血中のカンジダ属菌由来の抗 $\beta$ -グルカンに対する抗体価が各疾患によって変動がすることもわかってきた<sup>16,17)</sup>。すなわち、抗 $\beta$ -グルカン抗体は、広くヒト血清中に存在すると共に、免疫応答ならびに内因性感染防御において一定の役割を果たしていると考えられている。しかしながら、血清中の抗 $\beta$ -グルカン抗体が免疫応答にどのように関与しているのか、その詳細に関しては不明な点が多いのも現状である。これはヒトが食物(例えば、穀物やキノコ由来の $\beta$ -グルカン)や環境微生物(例えば、真菌属の $\beta$ -グルカン)に自然に感作された結果、生体内に誘導される免疫応答レベルが個人によって差があるからである。

本研究では、*A. pullulans*由来の $\beta$ -グルカンに対する抗体、特に抗 $\beta$ -グルカンIgG抗体がヒト血清中、特に健康成人血清および臍帯血血清中に存在するか否か、またその抗体価変動がどのようなパターンを示すのか、検討することを目的とする。

## 材料と方法

### 1. ヒト血清(市販品)

健康成人血清8検体(AD 1~AD 8)および臍帯血血清(正常分娩由来)8検体(CO 1~CO 8)を用いた。血清はコージンバイオ社(埼玉)から購入した。本研究で使用したヒト血清は、厚生労働省の製造販売承認を受けている会社から研究用に広く一般に市販・提供される個人情報を含まない血清を使用した。すなわち、本血清はヒト試料・情報に含まれないヒト由来の材料であると共に、本血清の購入においては、「ヒト組織由来研究用試薬提供についての同意書」を購入会社に提出し、倫理および安全性の配慮を行った。

### 2. $\beta$ -グルカン

黒酵母菌(*Aureobasidium pullulans*; *A. pullulans*)が産生する $\beta$ -グルカンを用いた。

### 3. ヒト血清のIgG精製

ヒト血清のIgG精製は、IgG purification kit-A(同仁化学研究所)(No.AP01)を用いた。ヒト精製IgG(NI0508)濃度は、リン酸緩衝液(PBS)で0.6mg/mLに調整した。

### 4. ウサギ抗 $\beta$ -グルカン抗体

ウサギ抗 $\beta$ -グルカン抗体(IK5856)は免疫生物研究所(IBL)(群馬)が作製し、プロテインAで精製したIgG抗体を用いた。IgG濃度は、PBSで1mg/mLに調整した。

### 5. Enzyme-linked immunoassay (EIA) 法

炭酸緩衝液(pH9.6)で調整した $\beta$ -グルカン(200 $\mu$ g/mL)50 $\mu$ Lを96-wellマイクロプレートに分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。0.05% Tween20を含むPBS(TPBS)(洗浄液)で3回wellを洗浄し、2%BSA(牛血清アルブミン)を含むTPBS(2%BSA-TPBS)を分注し、室温で1時間放置した(抗原結合マイクロプレート)。0.2%BSA-TPBSにて800倍に希釈したヒト血清50 $\mu$ Lを抗原結合マイクロプレートの各wellに分注し、室温にて1時間反応させた。陰性対照は0.2%BSA-TPBSを用いた。洗浄液にて3回wellを洗浄したのち、0.2%BSA-TPBSにて10,000倍に希釈したperoxidase標識抗ヒトIgG抗体(Binding Site社)(U.K.)を50 $\mu$ L加え、室温にて1時間反応させた。洗浄液にて6回wellを洗浄した後、発色液TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン)溶液(Bethyl Laboratories社)(U.S.A.)を50 $\mu$ L加え、室温にて15分間反応させ、停止液(0.5M塩酸)を50 $\mu$ L加えた。マイクロプレートリーダー(MPR-A4i II、東ソー社、東京)にて450nmにおける吸光度(O.D.)を測定した。結果は450nmにおけるO.D.の平均値 $\pm$ S.D.で表した。

### 6. ウサギ抗 $\beta$ -グルカン抗体の反応性

抗原結合マイクロプレートに各濃度のウサギ抗 $\beta$ -グルカン抗体(IgG)(IK5856)を50 $\mu$ L加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で3回wellを洗浄した後、0.2%BSA-TPBSで5,000倍に希釈したbiotin標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を50 $\mu$ L加え、室温にて1時間反応させた。洗浄液で3回wellを洗浄した後、0.2%BSA-TPBSにて5,000倍に希釈したperoxidase標識ストレプトアビジンを50 $\mu$ L加え、室温にて30分間反応させた。洗浄液でwellを6回洗浄した後、TMB溶液を50 $\mu$ L加え、室温にて15分間反応させ、停止液を50 $\mu$ L加えた。マイクロプレー

トリーダーにて450nmにおける吸光度 (O.D.) を測定した。

### 7. 抑制試験

抗原結合マイクロプレートにウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体 (IgG) (IK5856) (20  $\mu$ g/mL、10  $\mu$ g/mL、5  $\mu$ g/mL、2.5  $\mu$ g/mL、1.2  $\mu$ g/mL、0.6  $\mu$ g/mL) をそれぞれ50  $\mu$ L加え、4  $^{\circ}$ Cで一晩放置した。洗浄液で3回wellを洗浄した後、0.2%BSA-TPBSにて1.2  $\mu$ g/mLに希釈したヒト精製IgGを50  $\mu$ L加え、室温にて1時間反応させた。洗浄液で3回wellを洗浄した後、0.2%BSA-TPBSにて10,000倍に希釈したperoxidase標識抗ヒトIgG抗体を50  $\mu$ L加え、室温にて1時間反応させた。洗浄液で6回wellを洗浄した後、TMB溶液を50  $\mu$ L加え、室温にて15分間反応させ、停止液を50  $\mu$ L加えた。マイクロプレートリーダーにて450nmにおける吸光度 (O.D.) を測定し、ウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体 (IK5856) によるヒト精製IgG (NI0508) の  $\beta$ -グルカンに対する反応の抑制率 (%) を計算した。

### 8. 統計処理

統計処理は、Mann-Whitney U-test法を用い、5%以下 ( $P < 0.05$ ) を有意差ありとした。

## 結果

#### 1. ヒト血清中の抗 $\beta$ -グルカンIgG抗体

ヒト血清中 (健常成人血清と臍帯血清) の抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体をEIA法で検討した。図1に示すように、健常成人血清中および臍帯血清中には抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体が存在していることがわかった。おそらく臍帯血清中の抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体は、母体由来で胎盤通過性のIgG抗体であると推測される。また、健常成人血清中の抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体は、臍帯血清中の抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体と比較して抗体価は有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

#### 2. ヒト精製IgGの $\beta$ -グルカンに対する反応性

ヒト血清をpurification kit-AでIgGに精製し、 $\beta$ -グルカンに対する反応性をEIA法で検討した。図2に示すように、ヒト精製IgG (NI0508) は  $\beta$ -グルカンに濃度依存的に反応することがわかった。ヒト血清中には  $\beta$ -グルカンに対する抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体が存在していることが明らかになった。

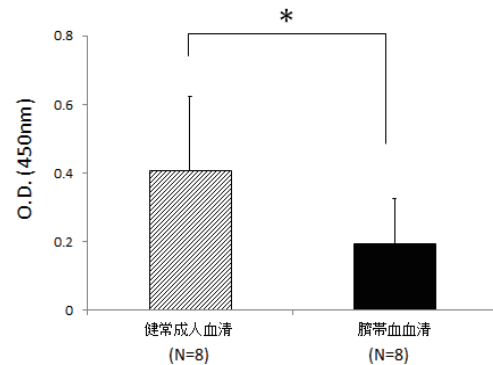


図1. ヒト血清中の抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体

ヒト血清中 (健常成人血清と臍帯血清) の抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体をEIA法で検討した。\*  $P < 0.05$  (健常成人血清 vs. 臍帯血清)。

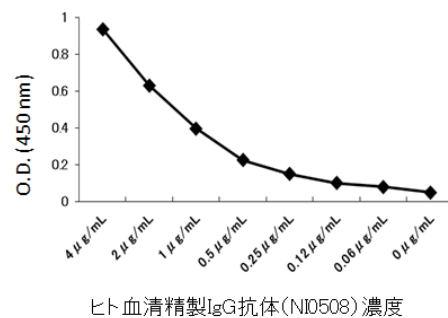


図2. ヒト精製IgG抗体 (NI0508) の  $\beta$ -グルカンに対する反応性

ヒト血清をpurification kit-AでIgGに精製し、 $\beta$ -グルカンに対する反応性をEIA法で検討した。

#### 3. ウサギ抗 $\beta$ -グルカン抗体の反応性

ウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体 (プロテインA精製IgG) (IK5856) の  $\beta$ -グルカンに対する反応性をEIA法で検討した。図3に示すように、IK5856抗体は  $\beta$ -グルカンに対して濃度依存的に反応し、さらに抗体濃度1 ng/mLに

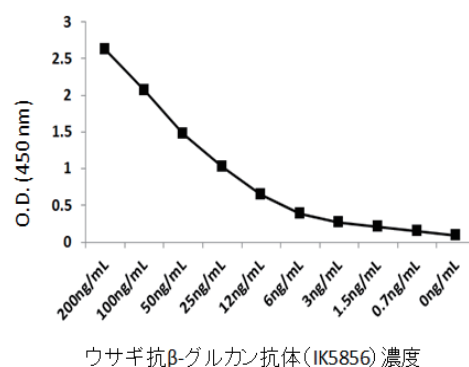


図3. ウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体 (IK5856) の反応性  
ウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体の  $\beta$ -グルカンに対する反応性をEIA法で検討した。

においてもその反応性が認められた。本抗体 (IK5856) は  $\beta$ -グルカンに対する標準/標品抗体として有益な抗体であることが判明した。

#### 4. ウサギ抗 $\beta$ -グルカン抗体による抑制試験

ウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体 (IK5856) による抑制試験を行った。図4に示すように、ウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体は濃度依存的にヒト精製IgG (NI0508) の  $\beta$ -グルカンに対する反応性を抑制した。特に、ウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体 (10~20  $\mu$ g/mL) は約90%の抑制率を示した。以上の結果から、ヒト精製IgGには  $\beta$ -グルカンに対する特異的抗体 (抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体) が存在していることが明確になった。

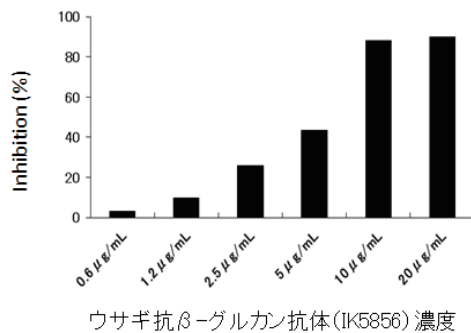


図4. ウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体による抑制試験

ウサギ抗  $\beta$ -グルカン抗体 (IK5856) によるヒト精製IgG (NI0508) の  $\beta$ -グルカンに対する抑制試験をEIA法で検討した。

### 考察

本研究から、健常成人血清中および臍帯血血清中には抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体が存在することが明らかになった。一般的に  $\beta$ -グルカンの抗原性は低いため、 $\beta$ -グルカンに対する免疫反応、すなわち抗体産生はおこりにくいと考えられてきた<sup>18)</sup>。しかしながら、本研究で使用した *A. pullulans* 由来の  $\beta$ -グルカンは抗体産生能の高い構造を有しているものと考えられる。しかしながら、抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体の抗体価には個人差があることが明らかになった。これは前述したように、生体内に誘導される  $\beta$ -グルカンに対する自然免疫および獲得免疫のレベルが個人によって差があると考えられるからである。また、臍帯血血清中の  $\beta$ -グルカンIgG抗体は、胎盤通過性で母体由来のIgG抗体であると考えられる。

本研究で示すように、ヒト血清中の抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体の検出とその動態把握は、個人人の免疫応答レベルを理解するうえできわめて有益な情報を提供するものと考えられる。一方、癌患者、自己免疫疾患 (膠原病)、川

崎病、真菌症では血中のカンジダ属菌由来の抗  $\beta$ -グルカン抗体価は各疾患によって変動すること、真菌症患者および膠原病患者では抗  $\beta$ -グルカン抗体価は有意に低下していることも明らかになっている<sup>16,17)</sup>。

ヒト血清中に抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体が存在する詳細な理由は不明であるが、食物 (例えば、穀物やキノコ) および環境微生物 (例えば、真菌属菌) に自然感作され、生体内に  $\beta$ -グルカンに対する自然免疫および獲得免疫が成立したものと推測できる。前述したように、これまで  $\beta$ -グルカンの抗原性は低く、抗体産生は誘導され難いと考えられてきた。確かに、医療用のシゾフィラン (sizofiran) とマイタケ由来のグリフォラン (grifolan) に対する抗体産生は誘導され難い研究報告はいくつかある<sup>19)</sup>。

しかしながら、マウスに酵母菌体を投与すると、抗  $\beta$ -グルカン抗体が産生されることから、抗体産生が誘導され難いのはsizofiranタイプの多糖であり、全ての  $\beta$ -グルカンが抗  $\beta$ -グルカン抗体の産生を誘導しにくいわけでは無いと考えられる。特に、真菌属菌の自然感作においては血清中に真菌細胞壁主要構成成分の一つである  $\beta$ -グルカンが遊離することから、各種サイトカインの産生と免疫系の活性化によって、抗  $\beta$ -グルカン抗体が誘導されるものと推測される。さらに、この抗  $\beta$ -グルカン抗体産生の誘導においては、 $\beta$ -グルカンレセプターであるDectin-1<sup>20)</sup> を介した細胞内シグナル伝達と各種機能的タンパク質のリン酸化反応が関与していると推測される。

一方、深在性真菌症は増加傾向にあるが、これは、超高齢化や高度先端医療の普及に伴う免疫不全患者の増加など、複合的な原因が関与していると考えられる。そこで重要なのは、真菌感染症の早期診断法の確立である。代表的な深在性真菌症としては、カンジダ属菌とアスペルギルス属菌であるが、いずれの細胞壁にも  $\beta$ -グルカンが共通して存在する。よって、血中に存在する極微量の  $\beta$ -グルカンを測定することは真菌感染症の早期診断として有益である。また、ヒト血清中の抗  $\beta$ -グルカン抗体は、真菌感染症の際、体内に侵入した真菌属菌に対しては感染防御因子として作用すると予想される<sup>17)</sup>。

抗  $\beta$ -グルカン抗体は、広くヒト血清中に存在すると共に、血清中の抗  $\beta$ -グルカン抗体の変動は、 $\beta$ -グルカンに対する生体免疫応答の指標として期待される。本研究において、ヒト血清中には抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体が存在することが明確になった。今後、抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体のサブタイプ (IgG 1、IgG 2、IgG 3、IgG 4) を決定すること、抗体量および抗体価の個人差を再検討するこ

とが求められる。血清検体を増やすと共に、各種疾病における抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体の測定など、より詳細な解析が必要であると考えられる。

抗  $\beta$ -グルカンIgG抗体の動態解析は、 $\beta$ -グルカンを含む食品に対する個々人の生体免疫機能を評価するうえでも大変重要な研究であると考えられる。今後、オーダーメイド医療の展開も視野に入れ、さらなる研究開発を行う予定である。

## 文献

1. 石橋健一, 大野尚仁:  $\beta$ -グルカンの構造と免疫賦活機構の解析. 食品と開発 44:4-7, 2009.
2. 宮本和明: 大麦  $\beta$ -グルカンの免疫機能について. 食品と開発 44:8-9, 2009.
3. Ebina, T., Fujimiya, Y.: Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. Biotherapy 11:259-265, 1998.
4. Ishurd, O., Zgheel, F., Kermagi, A., et al.: Antitumor activity of  $\beta$ -D-glucan from Libyan Dates. J. Med. Food 7:252-255, 2004.
5. 木村 隆: ハナビラタケ  $\beta$ -グルカンの健康保健効果について. 食品と開発 44:14-15, 2009.
6. 大野尚仁:  $\beta$  グルカンの生体防御系修飾作用. 日本細菌学雑誌 55:527-537, 2000.
7. 大槻 誠, 梅下和彦, 苔庵泰志, 他: ラット脂質代謝に及ぼす食用キノコの作用. 日本食品科学工学会誌 53:612-618, 2006.
8. 糟谷健二, 伊東千夏, 神前 健: パン酵母由来  $\beta$ -グルカンの機能性と応用. 食品と開発 44:10-12, 2009.
9. 加藤美智子, 池上幸江, 青江誠一郎: 高  $\beta$ -グルカン含有大麦の摂取が自然発症ApoE欠損マウスの脂肪組織の炎症と動脈硬化に及ぼす影響. 栄養学雑誌 71:196-203, 2013.
10. 池上裕倫, 永田信治: 黒酵母由来  $\beta$ -グルカン, その多機能性と未来. 食品工業 50:61-67, 2007.
11. Ikewaki, N., Fujii, N., Onaka, T., et al.: 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, 2007.
12. Ikewaki, N., Fujii, N., Onaka, T.: A polysaccharide produced by *Aureobasidium pullulans* FERM-P4257 up-regulates expression of CD11b antigen and induces interleukin-8 (IL-8) production. J. of Kyushu Univ. of Health and Welfare 3:5-9, 2002.
13. Ikewaki, N., Fujii, N., Onaka, T., et al.: Immunological responses of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from healthy donors cultured with  $\beta$ -1,3-1,6 glucan produced by *Aureobasidium pullulans*. J. of Kyushu Univ. of Health and Welfare 6:193-198, 2005.
14. Ikewaki, N., Tamauchi, H., Inoko, H.: Modulation of some cell surface antigens in the monocyte-like cell line U937 in response to  $\beta$ -1,3-1,6 glucan derived from *Aureobasidium pullulans*. J. of Kyushu Univ. of Health and Welfare 9:81-91, 2008.
15. Ishibashi, K., Morita, M., Motoi, M., et al.: Analysis of the titer and reactivity of antibody/ies against fungal cell wall  $\beta$ -glucans in human sera. Int. J. Med. Mushrooms. 15:115-126, 2013.
16. Ishibashi, K., Yoshida, M., Nakabayashi, I., et al.: Role of anti-beta-glucan antibody in host defense against fungi. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 44:99-109, 2005.
17. Ishibashi, K., Fukazawa, R., Miura, N.N., et al.: Diagnostic potential of antibody titres against *Candida* cell wall  $\beta$ -glucan in Kawasaki disease. Clin. Exp. Immunol. 177:161-167, 2014.
18. Harada, T., Nagi-Miura, N., Adachi, Y., et al.: Antibody to soluble 1,3/1,6-beta-D-glucan, SCG in sera of naive DBA/2 mice. Biol. Pharm. Bull. 26:1225-1228, 2003.
19. Adachi, Y., Suzuki, Y., Ohno, N., et al.: Adjuvant effect of grifolan on antibody production in mice. Biol. Pharm. Bull. 21:974-977, 1998.
20. Yamanaka, D., Tada, R., Adachi, Y., et al.: *Agaricus brasiliensis*-derived  $\beta$ -glucans exert immunoenhancing effects via a dectin-1-dependent pathway. Int. Immunopharmacol. 14:311-319, 2012.