

和漢生薬由来の腸管パイエル板免疫機能調節多糖の活性発現糖鎖と作用の解析

清原寛章,^{a,b,c} 松崎敏明,^a 松本 司,^{a,b,c} 永井隆之,^{a,b,c} 山田陽城^{*,a,b,c}**Elucidation of Structures and Functions through Peyer's Patches of Responsible Carbohydrate Chains in Intestinal Immune System Modulating Polysaccharides from Japanese Medicinal Herbs**Hiroaki KIYOHARA,^{a,b,c} Toshiaki MATSUZAKI,^a Tsukasa MATSUMOTO,^{a,b,c}
Takayuki NAGAI,^{a,b,c} and Haruki YAMADA^{*,a,b,c}^aGraduate School of Infectious Control, ^bKitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan and ^cOriental Medicine Research Center, The Kitasato Institute, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8642, Japan

(Received December 12, 2007)

Carbohydrate chains in glycoconjugates play important roles in various life phenomena, and there are numerous types of recognition system for carbohydrate chains due to carbohydrate-lectin interactions/carbohydrate-carbohydrate interactions in all higher life forms. It has been proposed that macromolecular polysaccharides isolated from plants, marine organisms, or fungi cross-interact with known and unknown recognition systems in mammals to express their pharmacological activities. Therefore the elucidation of carbohydrate structures related to the activities and functions of these polysaccharide molecules will lead us to utilize the related information in the development of novel carbohydrate-based drugs and functional foods for human health care. Peyer's patches present in the upper intestinal tract play important roles as inductive sites for both protective IgA production and immune tolerance induction in mucosal and systemic immune systems. Dysfunction of the immunocompetent cells of Peyer's patches is thought to induce allergic/autoimmune diseases and down-regulation of the protective system against infectious agents on mucosal sites. We have isolated several Peyer's patch cell-modulating polysaccharides from medicinal herbs used in traditional Japanese herbal remedies, and they have been assumed to comprise the responsible carbohydrate chains with oligosaccharide sizes for expression of modulating activity. Accumulation of knowledge on the structures and functions of these responsible carbohydrate chains in polysaccharide molecules is believed to be important for the development of methodology for logically factitious regulation of functions of immunocompetent cells in Peyer's patches. This review deals with recent results of our study on the structural clarification of responsible carbohydrate chains in modulating polysaccharides against functions of immunocompetent cells in Peyer's patches.

Key words—herbal medicine; polysaccharide; arabinogalactan; glucomannan; mucosal immune system; Peyer's patch

1. はじめに

ヒトなどの生体内に存在する糖タンパク質や糖脂質上の複合糖質糖鎖は第3の生命鎖として種々の細胞間のコミュニケーションや病原微生物の感染などの多くの生命現象に重要な役割を果たすことが明らかとなってきている。¹⁾ これらの複合糖質糖鎖の認

識には極めて多数の糖鎖認識タンパクや糖鎖-糖鎖間での認識機構が関与していることが報告されている。一方、医薬品や食品として用いられてきている植物、キノコや甲殻類、海産生物なども構造の多様な複合糖質糖鎖や単純糖鎖をその一次代謝産物として含んでいるが、これまでに、これらの天然素材から *in vitro* や *in vivo* で種々の薬理作用を有する多彩な構造の高分子性の糖鎖化合物(多糖)が見出されている。^{2,3)} さらに、その作用メカニズムの解析から、これらの一部の活性多糖では、本来ほ乳類の生体内の複合糖質糖鎖を認識する Toll-like receptor, CD14, Galectin-3 や Dectin-1, asialoglycoprotein

^a北里大学大学院感染制御科学府, ^b北里大学・北里生命科学研究所 (〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1) ^c北里研究所・東洋医学総合研究所 (〒108-8642 東京都港区白金 5-9-1)

*e-mail: yamada@lisci.kitasato-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムSD2で発表したものを中心に記述したものである。

受容体などの糖認識タンパクや lactosylceramide などの糖脂質からなる糖鎖受容体と糖鎖構造依存的に相互作用することが明らかとされてきており、外来性の糖鎖化合物が未知なものも含め、これらの糖鎖認識機構を介してその薬効を発現することが示唆されている (Fig. 1).³⁾ これらのことから、外来性の素材から得られる生理活性な糖鎖化合物の有する糖鎖構造情報を解明し、その作用発現メカニズムの詳細を解析することが、未知の生体制御機構の解明とともに、外来性糖鎖化合物自体やその活性発現のための糖鎖構造を元にした新たな合成糖鎖医薬品並びに新規機能性食品の開発につながると期待される (Fig. 2).

粘膜免疫機構は「分泌型 IgA 産生」と「免疫寛容」の誘導の正負の 2 面的作用を有し、その理論的な人為的制御が感染予防や食物アレルギー改善などをもたらす。上部腸管に存在するパイエル板は高度に機能化されたリンパ濾胞組織で、抗原特異的な分泌型 IgA 産生及び免疫寛容発現のための重要な出発点である誘導組織の 1 つとなっている。さらに当該器官のリンパ球は常時ホーミング現象により他の局所粘膜免疫系及び全身免疫系付属組織にリクルートされ、免疫情報を伝搬させる機能を有する。^{4,5)} こ

れらのことから、パイエル板の免疫担当細胞の機能の人為的な制御は広く局所粘膜や全身における感染防御能の強化並びに免疫寛容誘導による異常免疫応答の制御につながるということが証明されてきている。⁶⁾ また、パイエル板の免疫機能は加齢に伴い、全身免疫系に先駆けて低下してしまうことも明らかとなっている。⁷⁾ しかしながら、パイエル板の抗体産生誘導と免疫寛容の相反する 2 面的な作用を差別化して理論的に制御し得る方法論に関する研究分野は未知領域となっている。

漢方処方で補剤に分類される十全大補湯 (じゅうぜんたいほうとう) や補中益気湯 (ほちゅうえつきとう) は、体力低下時や虚弱体質者の慢性消耗性疾患、化膿性疾患及びアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患に臨床応用されており、全身免疫系や造血系に対する薬理作用が基礎研究により証明されている。^{8,9)} 筆者らはこれまでにこれらの漢方処方のパイエル板を含めた腸管免疫系や上気道粘膜免疫機構に対する作用についての検討を行い、両方剤がパイエル板の免疫担当細胞のサイトカイン産生などの機能を調節すること、補中益気湯が上気道粘膜免疫系の有する鼻腔での抗原特異的 IgA 産生や全身免疫系での抗原特異的 IgG 誘導作用を増強するが、十

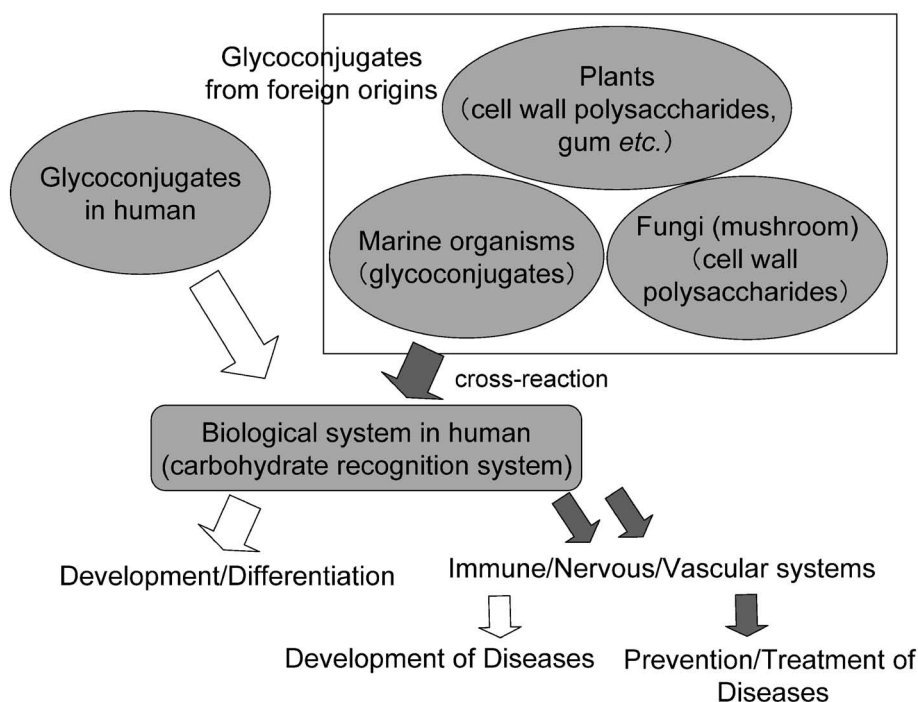


Fig. 1. Glyco-chains from Plants, Marine Organisms, Fungi as the Signal Molecules for Modulation of Biological Systems of Human through Cross Interaction with Endogenous Carbohydrate Recognition System

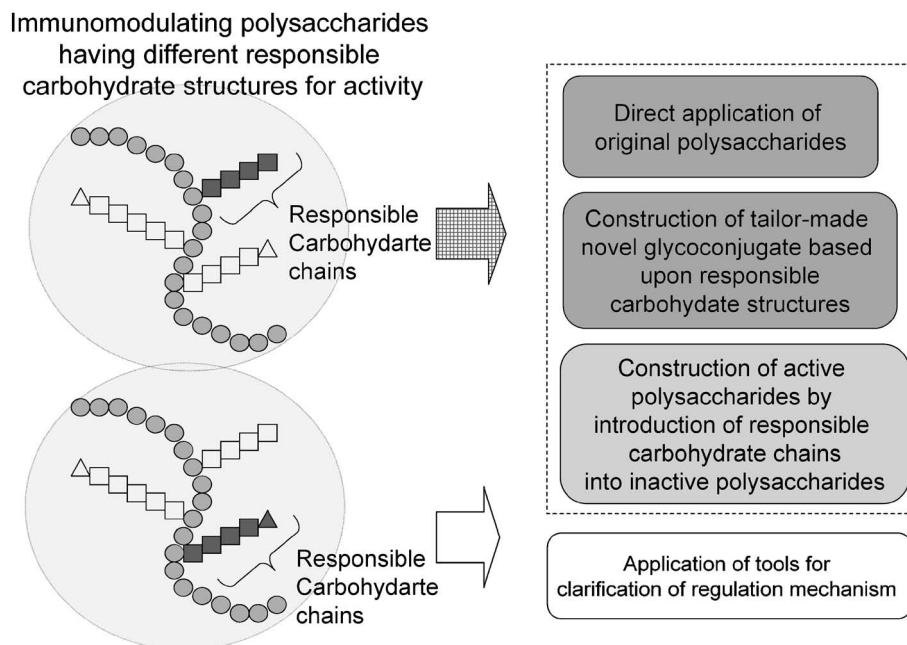


Fig. 2. Proposed Application of Information on Glyco-chains of Macromolecular Polysaccharides from Plant Origin for Development of Novel Carbohydrate-based Drugs and Functional Foods

全大補湯には本作用は認められないことを明らかとした。^{8,10)} さらに両方剤の作用成分の検討から、作用成分の1つが高分子糖鎖化合物であることを明らかとした。^{8,10)} この検討結果から、漢方方剤の構成生薬などの種々の和漢薬由来の多糖成分の中にはパイエル板の免疫担当細胞の機能を調節し得る糖鎖構造を有するものが存在する可能性が期待された。そこで、パイエル板免疫担当細胞のサイトカイン産生機能に対し影響を与える和漢薬由来多糖成分を、これらのサイトカインによる骨髄細胞の増殖促進作用を指標とした評価系¹¹⁾を用いてスクリーニングし、パイエル板免疫担当細胞に対し強いサイトカイン産生調節活性（以下パイエル板免疫機能調節活性とする）を有する数種の和漢薬由来多糖を選別した。これまでに、高分子物質である多糖の薬理活性発現には、その高次構造が関与する場合と分子中のオリゴ糖サイズの糖鎖構造が関与する場合があることが想定されている。³⁾ 和漢薬から得られたパイエル板免疫機能調節活性を示す多糖は、その活性発現に特定のオリゴ糖鎖構造が関与する可能性が示唆された。^{2,3)} そこで、筆者らは、これらのパイエル板免疫機能調節多糖の活性発現糖鎖構造について解析するとともに、そのパイエル板の免疫担当細胞のサイトカイン産生に対する影響について検討を加えたので

概説する。なお、本総説で記述したマウスパイエル板を用いた評価に係わる試験は、当該法律並びに文部科学省及び総理府からの通達に従って規定された北里大学が定める実験動物取り扱い安全衛生管理規定に準じて行われたものである。

2. 蒼朮及びナイモウオウギ地上部からの活性 β -D-(1→3,6)-Galactan 含有多糖及びペクチン様多糖の活性発現糖鎖の解析

十全大補湯の構成生薬である蒼朮（そうじゅつ）（キク科ホソバオケラ、*Attractylodes lancea* DC. の根茎）からは3種の、また黄耆（おうぎ）の基源植物であるナイモウオウギ（マメ科、*Astragalus mongholicus* Bunge.）の地上部からは計17種のパイエル板免疫機能調節多糖が得られた。蒼朮の活性多糖のうち1種は arabinogalactan で、もう1種は pectic arabinogalactan に分類される多糖であった。さらに、もう1種は 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO)や 2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosaric acid (DHA) など植物多糖では稀少糖となる構成糖を含んでおり、植物細胞壁構成多糖ユニットの rhamnogalacturonan II (RG-II) (Fig. 3) と類似の構造を有する多糖であることが明らかとなった。^{12,13)} また、蒼朮の pectic arabinogalactan 様構造を有する多糖の活性発現部位の検討から、本多糖

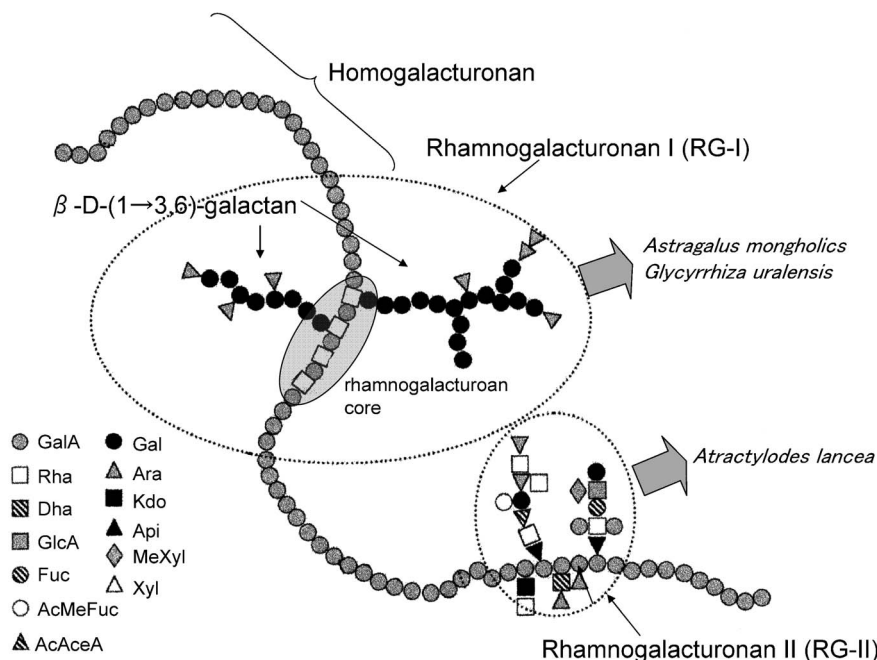


Fig. 3. Proposed Active Sites in Peyer's-patch-function-modulating Pectic Polysaccharides Isolated from *Atractylodes lancea* and *Astragalus mongholicus*

も RG-II 様構造ユニットを活性発現部位として示されることが示された (Fig. 3).¹³⁾ 一方, ナイモウオウギ地上部由来の活性多糖では, 2 種の arabinogalactan, 4 種の pectic arabinogalactan, 2 種の pectin が含まれ, 加えて他の 9 種は arabinogalactan を主体構造として有するがさらに glucose (Glc) などが組み込まれた複雑な構造の heteroglycan に分類される多糖であることが示唆された. ナイモウオウギ由来の pectic arabinogalactan や pectin は蒼朮由来の pectic arabinogalactan と同様に rhamnogalacturon I (RG-I) と RG-II 及び homogalacturonan をその構造ユニットとして含んでいたが (Fig. 3), 活性発現部位は RG-II ユニットでなく RG-I ユニットであることが判明し, 同じ pectic polysaccharide の基本構造を有する多糖でもパイエル板免疫担当細胞と相互作用する糖鎖構造部分が異なることが示唆された (Fig. 3). これらの多糖のうち, arabinogalactan 及び RG-I はその分子内に β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan と総称される糖鎖構造を有していた. 蒼朮及びナイモウオウギの β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan を主要構造とする arabinogalactan についてその活性発現糖鎖構造の解析を行った結果, 主鎖となる β -D-(1 \rightarrow 3)-galactan 鎖や側鎖となる β -D-(1 \rightarrow 6)-ガラクトオリゴ糖鎖を各々特異的な糖鎖分解酵素で

ある *exo*- β -D-(1 \rightarrow 3)-galactanase (1,3-GNase) 若しくは *endo*- β -D-(1 \rightarrow 6)-galactanase (1,6-GNase) による酵素消化により分解しても活性は消失すること (Fig. 4) や活性を持たない β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan 構造の多糖がいずれも重合度が 1-2 の短い鎖長の β -D-(1 \rightarrow 6)-ガラクトオリゴ糖側鎖しか有さないことから, 重合度が 3 以上の長鎖の β -D-(1 \rightarrow 6)-ガラクトオリゴ糖鎖が主鎖となる β -D-(1 \rightarrow 3)-galactan 鎖に結合して, 集積構造 (糖鎖クラスター) を取ることで活性を発現することを示唆した (Fig. 5).^{14,15)} これに対し, ナイモウオウギ由来の RG-I 構造の活性多糖は, 主鎖としては α -(1 \rightarrow 2) 結合 Rha と α -(1 \rightarrow 4) 結合 GalA が繰り返し結合した酸性のコア構造 (rhamnogalacturonan core) を持ち, 本コアに Rha の 4 位を介して β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan 構造の側鎖が結合した構造を有していた (Figs. 3 and 5). この活性発現部位の β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan 鎖ではコアとなる β -D-(1 \rightarrow 3)-galactan 鎖に結合する側鎖のガラクトオリゴ糖鎖はいずれも重合度 2 以下の β -D-(1 \rightarrow 6)-ガラクトオリゴ糖鎖で, 前記の arabinogalactan を主要構造とする多糖では活性を示さない構造を持っていた. しかしながら, この rhamnogalacturonan core に結合した β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan 構造を 1,3-GNase による酵素消化を用いて

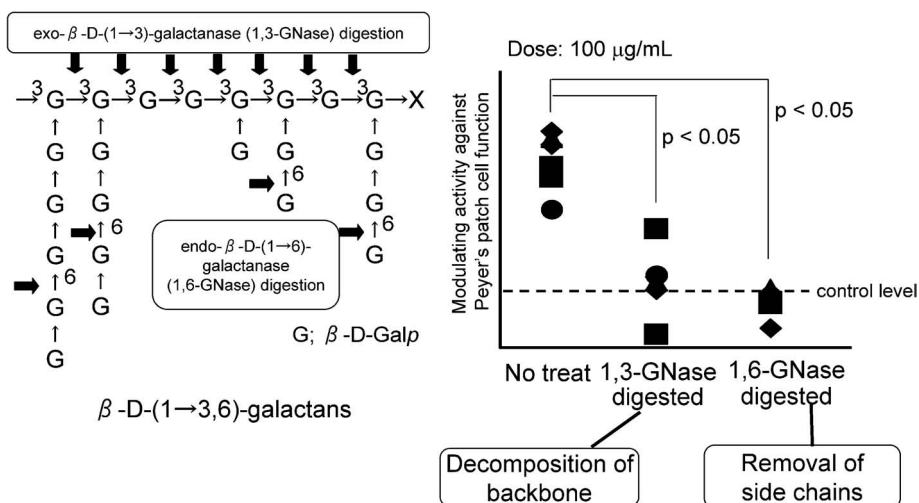


Fig. 4. Contributions of β -D-(1 \rightarrow 3)- and β -D-(1 \rightarrow 6)-Galactosyl Chains in β -D-(1 \rightarrow 3,6)-Galactans from *Atractylodes lancea* and *Astragalus mongholicus* for Expression of Modulating Activity against Function of Immunocompetent Cells of Peyer's Patch

Each β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan from *Atractylodes lancea* and *Astragalus mongholicus* was digested with either *exo*- β -D-(1 \rightarrow 3)-galactanase (1,3-GNase) or *endo*- β -D-(1 \rightarrow 6)-galactanase (1,6-GNase) to decompose either β -D-(1 \rightarrow 3)-galactan backbone or β -D-(1 \rightarrow 6)-galactosyl side chains (left panel of the figure), and then the intact polysaccharides and digestion mixtures of them were measured the modulating activity against functions of cytokine production of Peyer's patch immunocompetent cells (right panel of the figure). The modulating activity against Peyer's patch function was measured by the method of Hong *et al.*¹¹⁾ Peyer's patch cells from C3H/HeJ mice were cultured with intact or enzymatically digested polysaccharide for 6 days, and then bone marrow cells from C3H/HeJ mice were further cultured in the conditioned medium, which had been obtained from Peyer's patch cell-culture in order to estimate the amounts of cytokines having the stimulating activity against proliferation of bone marrow cells in the Peyer's patch cell-culture. Each symbol in right panel of the figure indicates the respective active polysaccharides.

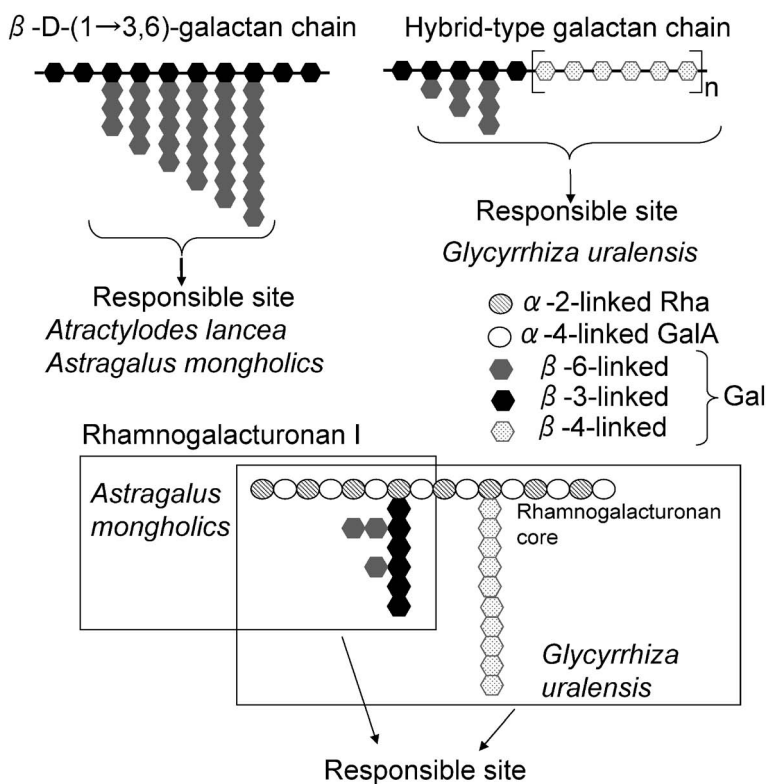


Fig. 5. Candidates of Responsible Carbohydrate Structures Found in the Modulating Arabinogalactan and Pectic Polysaccharides from *Atractylodes lancea*, *Astragalus mongholicus* and *Glycyrrhiza uralensis* against Functions of Immunocompetent Cells in Peyer's Patches

切断した場合、パイエル板免疫機能調節活性は消失し、RG-I 構造の活性は、短い β -D-(1 \rightarrow 6)-ガラクトオリゴ糖鎖を側鎖に持つ β -D-(1 \rightarrow 3)-galactan 鎖が rhamnogalacturonan core にさらに結合した構造が活性発現に関与する可能性が示唆され、arabinogalactan タイプの多糖とは異なる活性発現糖鎖を有することが推定された (Fig. 5).

3. 炙甘草由来の混成型 Galactan 構造の活性発現に対する関与の解析

炙甘草 (しゃかんぞう) (マメ科カンゾウ, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch et DC. の根) から 9 種のパイエル板免疫機能調節多糖が見いだされた。これらの活性多糖は蒼朮やナイモウオウギ由来の活性多糖と類似の基本構造を有する arabinogalactan や pectic arabinogalactan であったが、分子内の β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan 構造の 1,3-GNase 消化による分解のみでは一部の活性は低下するものの、有意な活性は残存していた (Fig. 6)。 β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan 構造を除去した多糖分子には著明な量の β -D-(1 \rightarrow 4)-galactan 構造が含まれていたため、この構造を *endo*- β -D-(1 \rightarrow 4)-galactanase を用いた酵素消化により分解させたところ残存する活性は完全に消失した (Fig. 6)。以上のことから、炙甘草由来の活性多糖

の場合、蒼朮やナイモウオウギ由来の活性多糖とは異なり、 β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactan 構造と β -D-(1 \rightarrow 4)-galactan 構造の両方からなる混成型の糖鎖構造が活性発現部位となっていることが示唆された (Figs. 5 and 6).

4. 知母由来のパイエル板免疫機能調節 Glucomannan の活性発現部位の解析

蒼朮、ナイモウオウギ及び炙甘草のパイエル板免疫機能調節多糖の活性発現糖鎖の解析から、これらの多糖はいずれも共通して galactan 構造を活性発現糖鎖部分とすることが明らかとなった。パイエル板の免疫担当細胞と相互作用する天然の外来性糖鎖化合物としては本糖鎖構造以外に全く別の糖鎖構造が存在するかについて知見を整理していく必要があると考えられる。知母 (ちも) (ユリ科ハナスゲ, *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. の根茎) からは 16 種のパイエル板免疫機能調節活性を有する多糖が分離されたが、そのうちの 4 種は β -D-(1 \rightarrow 4) 結合 mannose (Man) と β -D-(1 \rightarrow 4) 結合 Glc を主要構成糖とし、いわゆる glucomannan に分類される多糖で、前述の蒼朮、ナイモウオウギ地上部や炙甘草から見いだされた活性多糖とは全く異なるタイプの多糖であることが判明した。Mannan や

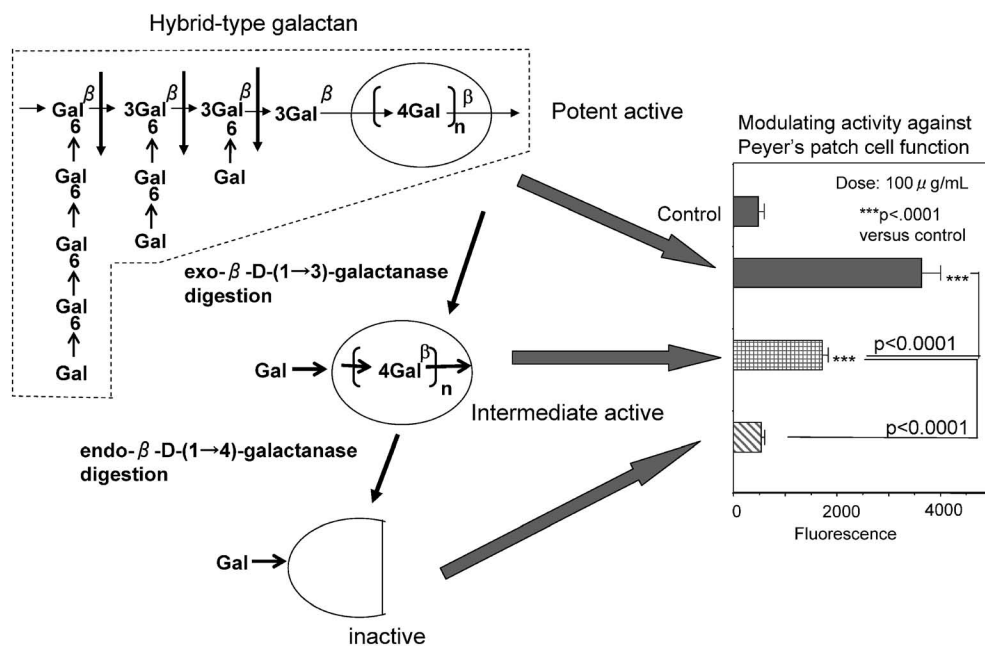


Fig. 6. Contributions of β -D-(1 \rightarrow 3)- and β -D-(1 \rightarrow 4)-Galactosyl Chains in Hybrid-type Galactan from *Glycyrrhiza uralensis* for Expression of Modulating Activity against Function of Immunocompetent Cells of Peyer's Patch

Hybrid-type galactan from *Glycyrrhiza uralensis* was digested sequentially with *exo*- β -D-(1 \rightarrow 3)-galactanase and *endo*- β -D-(1 \rightarrow 4)-galactanase (left panel of the figure), and then the each digestion mixtures was measured the activity (right panel of the figure). The modulating activity was measured by the same method as in Fig. 4.

glucomannan タイプの多糖ではコンニャクなどに由来するものが食品の増粘剤などの用途で広く用いられてきている。これらの植物性食品由来の一部の glucomannan, mannan や galactomannan など β -D-(1 \rightarrow 4) 結合 Man を主要構造とする多糖についてパイエル板免疫機能調節作用を調べたところ、いずれも活性を示さなかった。このことから知母由来の活性 glucomannan はコンニャク由来の同タイプ多糖とは異なる微細糖鎖構造を有することが推定された。知母由来の glucomannan の活性は β -D-(1 \rightarrow 4)-mannosyl 糖鎖構造を分解する *endo*- β -D-(1 \rightarrow 4)-mannanase を用いた酵素消化により著しく低下した。このため、消化物中の遊離したオリゴ糖鎖をコンニャク由来の不活性な glucomannan から同じ酵素消化により遊離したオリゴ糖鎖と比較した。その結果、知母由来のパイエル板免疫機能調節 glucomannan ではコンニャク glucomannan には含まれていない重合度が 4-11 の長鎖オリゴ糖鎖シークエンスを部分構造として有することが明らかとなり、この構造が活性発現に関与することを推定している。

5. 和漢薬由来のパイエル板免疫機能調節多糖の *Exo vivo* でのパイエル板免疫機能調節作用

パイエル板中の B 及び T リンパ球や抗原提示細胞は、インターロイキン類 (IL-2, 4, 5, 6, 10, 12),

TGF- β 並びに IFN- γ などのサイトカイン類による複合的な paracrine 効果を介して表面 IgA 抗原陽性細胞や制御性 T リンパ球の誘導に関与し、抗原特異的な分泌型 IgA 産生や免疫寛容を制御している。⁴⁻⁶⁾ そこで、ナイモウオウギ、炙甘草及び知母の多糖画分を若年 C3H/HeJ マウス及び加齢 BALB/c マウスに経口投与後、パイエル板細胞を concanavalin A の刺激下で培養し、培養上清中の重要な各種サイトカインの産生量の変化を測定することにより、各々の活性多糖のパイエル板免疫機能に対する作用について検討を行った。その結果、これらの多糖画分の経口投与によりパイエル板免疫担当細胞からのサイトカイン産生パターンに変化が認められるとともに、その変化は各多糖画分で異なっていた (Fig. 7)。このことから、各多糖画分に含まれる異なる活性発現糖鎖構造を有する多糖がパイエル板に取り込まれた後、免疫担当細胞とその糖鎖構造を介して相互作用し、糖鎖構造依存的にパイエル板での免疫ネットワークに変化をもたらすことが強く示唆された。

6. 総括

国内外において感染症の予防のためにパイエル板への取り込みを指向した食物ワクチンの開発が進められている。しかしながら、宿主の状態により、その抗体誘導能は低い場合があるため安全な経口アジ

Mice	Polysaccharide fraction (100 mg/kg/day)	Cytokine production (Con-A-stimulated)					
		IL-2	IL-5	IL-6	IL-10	IFN- γ	TGF- β
C3H/HeJ (7 weeks old, female) 1 week, <i>p.o.</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	→	→	↓	↓	↓	→
	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	↑	→	↓	→	↓	→
	<i>Astragalus mongholicus</i>	→	↑	↓	→	↓	→
BALB/c (6 months old, female) 2 weeks, <i>p.o.</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	→	↓	↓	↑	→	↓
	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	→	↓	↑	↗	↑	↓
	<i>Astragalus mongholicus</i>	→	↓	↓	→	→	→

Fig. 7. Summary of Changes on Cytokine Production Pattern of Peyer's Patch Cells of Mice by Oral Administrations of Polysaccharide Fractions from *Astragalus mongholicus*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Anemarena asphodeloides*

C3H/HeJ mice (7 weeks old, female) and BALB/c mice (6 months old, female) were administered polysaccharide fractions from *Astragalus mongholicus*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Anemarena asphodeloides* for 1 (for C3H/HeJ mice) and 2 weeks (for BALB/c mice), and Peyer's patch cells isolated from the above mice were cultured in the presence of concanavalin A for 3 days. The produced cytokines in the resulting culture media were measured by ELISA. → or ←; Not change, ↑ or ↓; Significantly change, ↗ or ↘; Slightly change.

ユバントの開発が切望されているが実用化された例はいまだにない。¹⁶⁾ 一方、腸管免疫系を介した免疫寛容誘導のための人為的な制御に関する方法論についての系統的な検討は発展途上であり、粘膜免疫機構に関する基盤研究での知見に基づいた調節物質に関する種々の方向からの検討が必要と考えられる。筆者らの検討から天然植物資源に由来する外来性の糖鎖化合物の中には糖鎖構造依存的にパイエル板の免疫担当細胞と相互作用し機能調節作用を示すものが存在することが強く示唆された。これまでで見出された構造タイプの多糖の活性発現糖鎖を解明するとともに、新たな活性発現糖鎖の探索を植物などの天然資源から行い、パイエル板の免疫機能の人為的な制御のための候補となる糖鎖構造に関する知見を整理していく必要がある。さらに、これらの糖鎖の持つ調節メカニズムをパイエル板中のターゲットとなる免疫担当細胞及びその受容体の特定や糖鎖構造依存的なターゲット細胞への作用、それに引き続く他の免疫担当細胞に対する paracrine effect などの by standar 効果の解析を通してパイエル板における糖鎖構造依存的な作用の全体像を明らかとすることを目指したい。これらの研究を通じた外来性の糖鎖の有する最終的なアウトプットとしての粘膜免疫機構に対する正負の作用の解明が、人為的な粘膜免疫機構の制御の方法論の構築のための基盤情報の提示につながると期待される。

REFERENCES

- 1) Taniguchi N., Kawasaki T., Furukawa K., Kimata K., Suzuki A., "Functions of Glyco-Chains: As the Third Chain Molecule next to Nucleic Acid and Protein", *Protein, Nucleic acid, Enzyme*, **48 Suppl.**, 885-1227 (2003).
- 2) Yamada H., Kiyohara H., "Immunomodulatory Agents from Plants," ed. by Wagner H., Birkhäuser Publishing Ltd., Basel, 1999, pp. 161-202.
- 3) Yamada H., Kiyohara H., "Comprehensive Glycoscience," Vol. 4, Chap. 4.34, eds. by Kamerling J. P., Boons G.-J., Lee Y. C., Suzuki A., Taniguchi N., Voragen A. G. J., Elsevier, Oxford, 2007, pp. 663-694.
- 4) Fagarasan S., Kiyono H., *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 63-72 (2004).
- 5) Kunisawa J., Goda M., Kiyono H., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 319-326 (2007).
- 6) Tsuji N., *Bio Clin.*, **20**, 506-512 (2005).
- 7) Koga T., McGhee J. R., Kato H., Kato R., Kiyono H., Fujihashi K., *J. Immunol.*, **165**, 5352-5359 (2000).
- 8) Kiyohara H., Yamada H., "Juzen-taiho-to (Shi-Quan-Da-Bu-Tang). Scientific Evaluation and Clinica Application," Chapter 7, eds. by Yamada H., Saiki I., CRC Press, Boca Raton, 2005, pp. 115-139.
- 9) Kiyohara H., Nagai T., Matsumoto T., Yabe T., Yamada H., "Medical and Pharmaceutical Sciences of Kampo Medicine," Chapter 2-2, eds. by Yamada H., Hanawa T., Kim S. J., Nanzando, Tokyo, 2007, pp. 92-120.
- 10) Kiyohara H., Nagai T., Munakata K., Nonaka K., Kim S. J., Yamada H., *eCAM*, **3**, 459-467 (2006).
- 11) Hong T., Matsumoto T., Kiyohara H., Yamada H., *Phytomedicine*, **5**, 353-360 (1998).
- 12) Yu K. W., Kiyohara H., Matsumoto T., Yang H. C., Yamada H., *Planta Med.*, **64**, 714-719 (1998).
- 13) Yu K. W., Kiyohara H., Matsumoto T., Yang H. C., Yamada H., *Carbohydr. Polym.*, **46**, 125-134 (2001).
- 14) Yu K. W., Kiyohara H., Matsumoto T., Yang H. C., Yamada H., *Carbohydr. Polym.*, **46**, 147-156 (2001).
- 15) Taguchi I., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H., *Carbohydr. Res.*, **339**, 763-770 (2004).
- 16) Yuki Y., *Antibiot. Chemother.*, **19**, 1779-1784 (2003).