

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

課題番号				
71253 20000997A	臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究	大野 泰雄	……	1
72001 20001001A	日本におけるヒト肝細胞の保存・管理に関する基準の検討	小林 英司	……	10
72002 20001002A	日本人の肝及び腎の薬物排泄能の個人差と遺伝子多型	遠藤 仁	……	14
72003 20001004A	ヒト組織新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究 －産学共同のネットワーク作りをめざして－	松浦 成昭	……	21
72004 20000998A	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物の有効性、安全性評価法の確立	永森 静志	……	25
72005 20001003A	ヒト薬物代謝酵素遺伝子多型簡易迅速定量法の臨床応用の新展開 －医薬品の適性使用と医療経済の効率化を目的として－	水柿 道直	……	29
72006 20001005A	臓器移植患者におけるP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量的解析を基盤とした免疫抑制剤の適正使用法確立に関する研究	乾 賢一	……	39
72007 20001000A	エンドトキシン作用の種特異性の機構解明と、医薬品の有効性・安全性評価への応用に関する研究	棚元 憲一	……	45
72008 20000999A	肝移植により摘出された患者肝細胞の保存方法の確立と病的細胞の分子生物学的解析	香坂 隆夫	……	55

エンドトキシン作用の種特異性の機構解明と、医薬品の有効性・安全性評価への応用に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究者 棚元憲一

分担研究者

(1) 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室井正志

要旨

サルモネラリピドAがマウス細胞で強力な活性を示すが、ヒト細胞では不活性であるのは、MD-2が主因であることをつきとめた。また、大腸菌由来のLPSやリピドAの中には、TLR2を介して細胞を活性化する因子が含まれていることを見出した。

1. 研究目的

エンドトキシンは、グラム陰性菌感染症に伴う敗血症により米国内だけでも年間に数十万人の死者を生ずる微生物由来の強力な毒素である。多彩な作用を有するエンドトキシンは、一旦生体内に導入されると無秩序な炎症性メディエータの産生を誘導することにより生体の恒常性の破綻を招き、その結果ショックやDICといった致命的な疾患を引き起こす原因物質である。この毒素は存在するグラム陰性菌全てに存在するために生体が常に汚染の危険にさらされていることから、医薬品の管理面においても重要な物質である反面、強力な免疫賦活作用、抗腫瘍活性等の生体に有益な作用を有することから医薬品への応用も期待されるといった両面性を持つ物質である。近年、この難治のエンドトキシン疾患に対する種々の治療法が研究されているが、これらの研究の基盤としてエンドトキシンの作用機構の解明、及びエンドトキシン自体の安全性、有効性を確認する信頼性のある方法の確立が不可欠である。現在、この毒素はウサギの発熱性試験、及び原始生物カプトガニの血球成分の凝固反応によって測定・管理されているが、近年の申請者等の研究からエンドトキシンの中には動物種差により作用を全く異にする化合物の存在が明らかになり始め、ヒト疾患をターゲットとした本質的なエンドトキシン作用の理解や、信頼のある有効性・安全性の評価のためにはヒトに対する本当の作用を研究することが必要となっている。

本研究はエンドトキシンの種特異性を系統的に明らかにすると共に、申請者が開発してきた種特異性を示す種々の構造体を利用して、異なる動物種のマクロファージ活性化機構の解明を行うことにより、種特異性を支配している機構を蛋白分子レベルで解明し、临床上重要な問題であるエンドトキシン疾患に対する本質的な治療法への発展を目指すと共に、医薬品の有効性、安全性の正当な評価法の確立を図ろうとするものである。

2. 研究方法

リピドAの調製：LPSは *Salmonella abortus equi*、*Escherichia coli* (*E. coli*) 03K2a2b:H2 の各菌種からフェノール/水法により抽出、精製した。リピドAはLPSを1%酢酸100°C、90分の水解後、沈殿物として得た。*E. coli* LPSはさらに、0.2%トリエチルアミンおよび0.5%デオキシコール酸存在下でフェノール抽出し、その水層を再精製LPSとして用いた。また、*E. coli* K12 D31m4、*E. coli* F-583 さらに *Salmonella minnesota* LPS由来の市販のリピドAを用いた。

化学合成リピドA：化学合成活性型のリピドAとして *E. coli* 型 (506)、*Salmonella* 型 (516) を用いた。化学構造は Fig. 1 に示した。大腸菌、サルモネラのリピドAはいずれもジグルコサミン構造と1、4'位にリン酸基を持つという基本骨格を持ち、それに脂肪酸がそれぞれ6個、7個結合した構造を持っている。すなわち唯一の構造の違いは還元末端側のグルコサミンの2位の3-ヒドロキシミリリスチン酸の水酸基にパルミチン酸が結合しているかないかの1点である。本研究で用いた天然由来のサルモネラリピドAは分析の結果、いずれも大部分が7個の脂肪酸を持つ構造体であることを確認している。

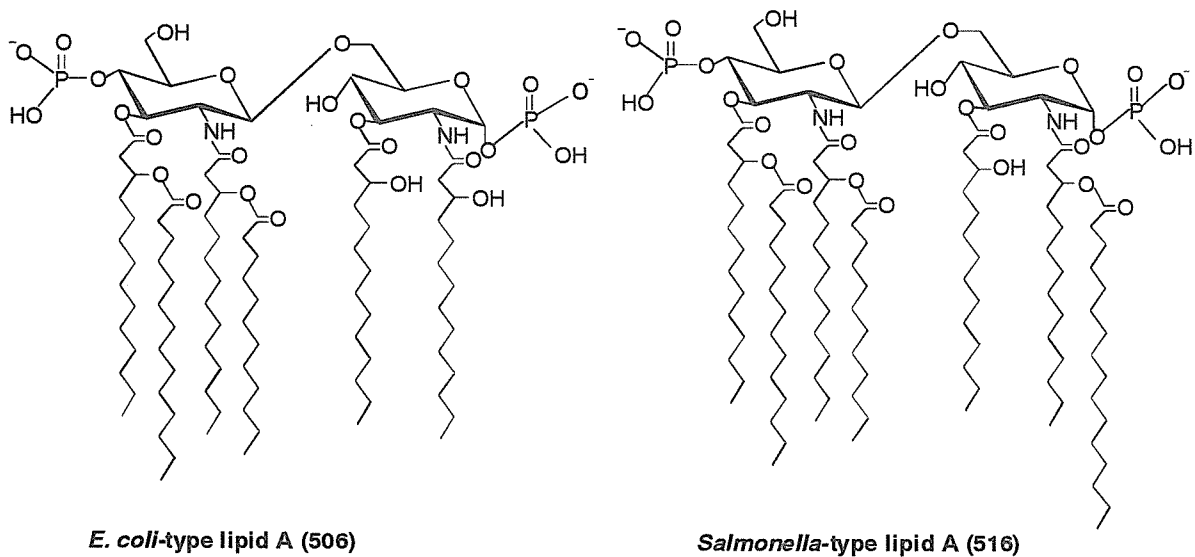


Fig. 1 Chemical structures of *E. coli*-type hexaacylated (506) and *Salmonella*-type (516) heptaacylated lipid A molecules synthesized chemically

発現プラスミド：ヒト (h) およびマウス (m) CD14 の cDNA を含むプラスミドは山本俊輔博士 (大分医科大学) よりご供与いただいた。hTLR2 (THP-1)、mTLR2 (L929)、mTLR4 (RAW264)、hMD-2 (THP-1) のシグナルペプチド領域を除くコード領域の cDNA はそれぞれ括弧内に示す株化細胞から調製した total RNA から既存のデータベースの塩基配列をもとに RT-PCR 法により作成した。hTLR4 のシグナルペプチド領域を除くコード領域の cDNA はヒト脾臓 total RNA (サワディー・テクノロジー) より上記と同様に RT-PCR 法にて作成した。得られた cDNA の塩基配列は dye terminator cycle sequencing 法により確認した。mMD-2 の cDNA シークエンスは未発表であったため、マウス EST データベース検索により hMD-2 類縁クローン (Accession No. AA109204) を得た。しかし、このクローンは 3'側が欠損していたため、このクローンシークエンスの 100 から 126 番目の塩基配列を上流プライマーに、オリゴ dT を下流プライマーとして、RAW264 細胞から調製した total RNA を鋳型にして RT-PCR によりシグナルペプチド領域を除くコード領域の mMD-2 cDNA を得た。TLR、MD-2 および CD14 の cDNA はそれぞれ N 末端に EIAV-tag を付加し、preprotrypsin のシグナルペプチド配列の下流に挿入し、これを哺乳動物用発現ベクターに組み込んだ。

NF- κ B Reporter Assay : 293 細胞 ($3-5 \times 10^5$) を 6 穴プレートに播き、18 時間後、リン酸カルシウム法により各発現プラスミド、および、ELAM-1 のプロモーター領域 (-730+52) を組み込んだレポータープラスミド pGL3-Basic (Promega, Madison, WI) 0.2 μ g とコントロールプラスミド pRL-TK (Promega, Madison, WI) 0.05 μ g をトランスフェクトした。24 時間後、Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を使い、ルシフェラーゼ活性を測定した。

THP-1 細胞 (2×10^6) を 6 穴プレートに播き、100 ng/ml の PMA および 100 nM のビタミン D3 を加え、3 日後に FuGene (Roche, Indianapolis, IN) 3 μ l を使い、各発現プラスミド、および、ELAM-1 のプロモーター領域 (-730+52) を組み込んだレポータープラスミド pGL3-Basic (Promega, Madison, WI) 1 μ g とコントロールプラスミド pRL-TK (Promega, Madison, WI) 0.1 μ g をトランスフェクトした。24 時間後、Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を使い、ルシフェラーゼ活性を測定した。

細胞抽出液および核抽出液の調製：細胞 (2×10^6 /well) に、蛋白分解酵素阻害薬 (0.1 μ g/ml, CompleteTM、

EDTA-free、Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) を加えた lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40、1 mM DTT)を加え、細胞をスクレイパーでかき取った後、氷上で 10 分間、時々攪拌しながらインキュベートし、遠心 (1000 g、5 分、4°C) して上清を取り、これを細胞抽出液とした。このとき得られた沈殿物を上記の lysis buffer で 2 回洗い、沈殿物に extraction buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 420mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 25% glycerol) を 30 μ l 加え、氷上で時々攪拌しながら 10 分間、インキュベートした。これを、遠心 (10,000 g、5 分、4°C) して上清を取り、この上清に dilution buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% glycerol) を 20 μ l 加え、これを核抽出液とした。

I κ B- α の分解および NF- κ B p65 の測定: I κ B- α および NF- κ B p65 蛋白の測定は Western blotting 法により行なった。I κ B- α の測定の際は I κ B- α の再合成を抑えるため、細胞をあらかじめ 20 μ g/ml の cycloheximide で 30 分間処理した後、エンドトキシンで 30 分間刺激した後、細胞抽出液を調製した。NF- κ B p65 の測定の際は、細胞をエンドトキシンで 60 分間刺激した後、核抽出液を調製した。得られた細胞抽出液または核抽出液を SDS-PAGE に流し、セミドライ方式により PVDF メンブランに転写した。得られたメンブランを 5% non-fat milk を含む TBST (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で 30 分ブロッキング後、1 次抗体を加え 30 分インキュベートし、TBST で洗浄後、5% non-fat milk を含む TBST で希釈した 2 次抗体溶液を加え、30 分インキュベートした。TBST で洗浄後、ECL-system (Amersham Pharmacia Biotech、Uppsala、Sweden) により検出を行った。

3. 研究成果

リピド A のマクロファージ活性化における Toll-like receptor 2 の役割: エンドトキシン非感受性の 293 細胞にルシフェラーズレポータープラスミドを導入し、天然由来の大腸菌リピド A およびサルモネラリピド A で刺激してもレポーター活性の上昇は見られなかった (データは示していない)。これに、マウス (m) 由来の CD14 と Toll-like receptor (TLR) 2 を発現させると、1 社の大腸菌リピド A がレポーター活性を上昇させたが、他社の大腸菌リピド A およびサルモネラのリピド A は 10 μ g/ml まで活性を示さなかった (Fig. 2A)。これらのリピド A が生物学的活性を有しているかどうか確認するため、マウスマクロファージ細胞株 J774-1 をこれらのリピド A で刺激すると、0.1-10 ng/ml といった低濃度で I κ B- α の分解を誘導した (Fig. 2B)。

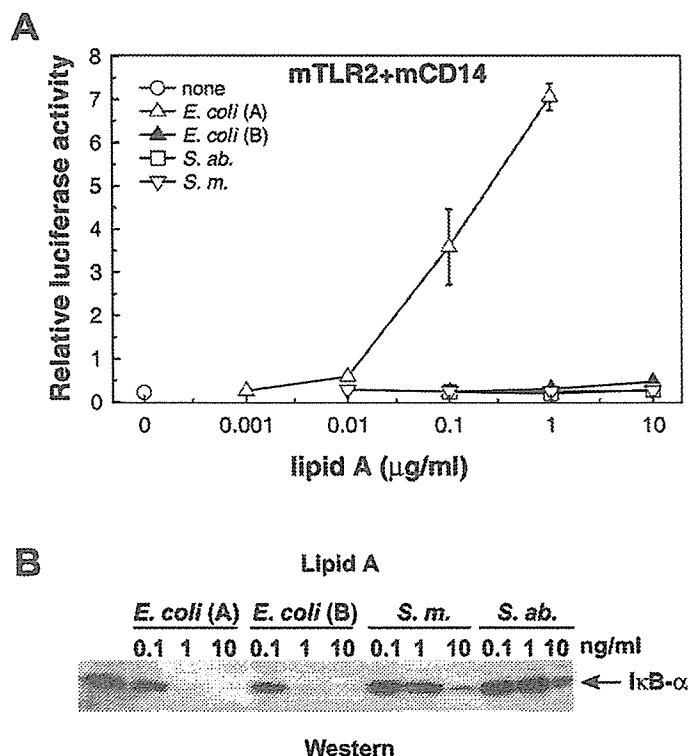


Fig. 2 Effects of lipid A preparations of bacterial origins on 293 cells transfected with TLR2 and CD14 (A) or on J774-1 cells (B)

天然由来のリピド A には夾雑物の混入が考えられるため、化学合成リピド A を使用してマウスおよびヒト (h) の TLR2/CD14 を発現させた 293 細胞での活性を検討した。これらの細胞では大腸菌由来の lipopolysaccharide (LPS) 刺激により、ルシフェラーゼレポーター活性の上昇が見られたが、大腸菌型合成リピド A (506)、および、サルモネラ型合成リピド A (516) では活性の上昇は見られなかった (Fig. 3)。TLR2/CD14 を安定発現させた 293 細胞でも合成リピド A の効果を検討したが、レポーター活性と同様、NF- κ B の核内移行を誘導しなかった (Fig. 4)。

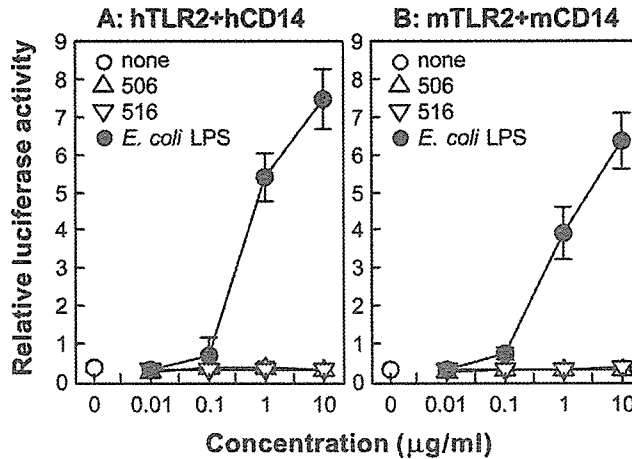


Fig. 3 Synthetic lipid A compounds do not activate NF- κ B in 293 cells transfected with TLR2 and CD14

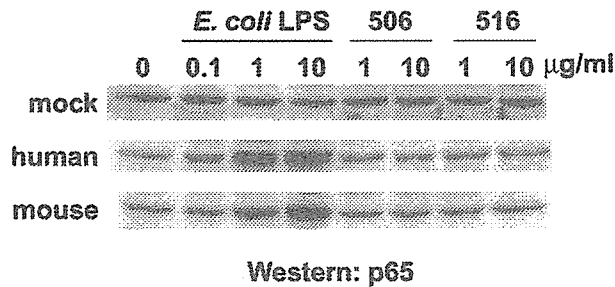
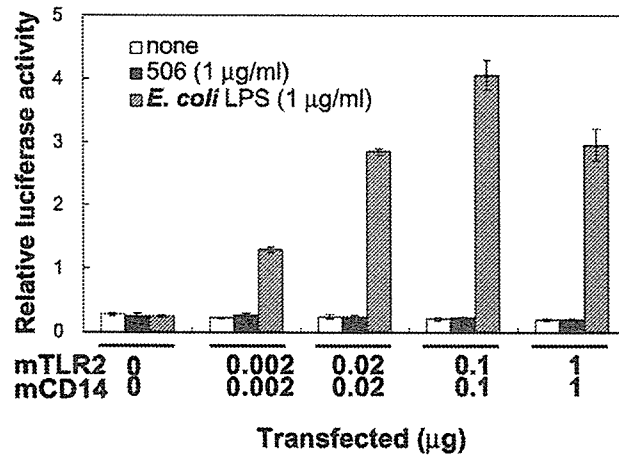


Fig. 4 Synthetic lipid A compounds do not activate NF- κ B in 293 cells stably expressing TLR2 and CD14

上記の実験では TLR2/CD14 の発現量の問題でリピド A の活性が見られない可能性があるため、TLR2/CD14 の発現量を変化させて 506 の効果を検討した。mTLR2/mCD14 のトランスフェクトするプラスミドの量を 0-1 μ g に変化させるとプラスミドの導入量に依存して LPS によるレポーター活性の上昇が見られたが、506 によるレポーター活性の上昇は見られなかった (Fig. 5A)。この時の mCD14 と mTLR2 の発現量を Western blotting で調べると、プラスミドの導入量に依存してこれらの蛋白の発現量が増えていた (Fig. 5B)。

以上の結果から、TLR2 はリピド A による細胞活性化には寄与していないことが明らかであるが、TLR2/CD14 がリピド A をアンタゴニストとして認識している可能性がある。そこで、mCD14/mTLR2 を発現させた 293 細胞を 506 または 516 で前処理した後、大腸菌由来の LPS で刺激すると、これらリピド A の存在・非存在に関わらず LPS により同等なレポーター活性の上昇が見られた (Fig. 6)。

A



B

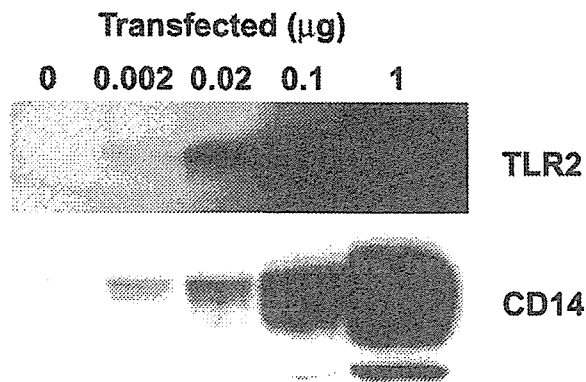


Fig. 5 *E. coli*-type lipid A, 506, does not activate NF- κ B in 293 cells regardless of the expressing levels of TLR2 and CD14

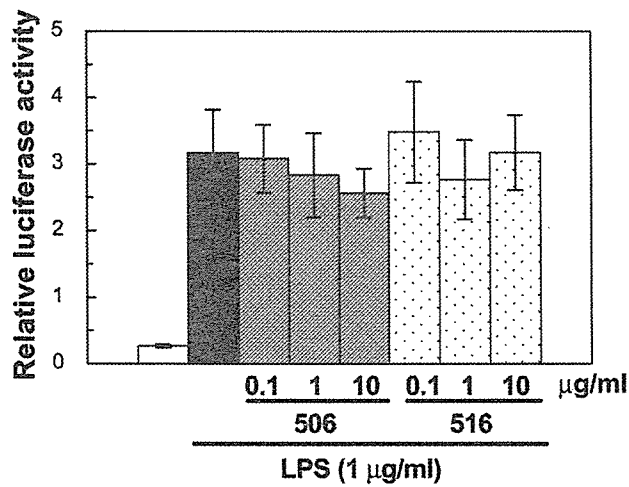


Fig. 6 Effects of 506 and 516 on LPS-induced activation of NF- κ B in 293 cells transfected with TLR2 and CD14

サルモネラリピド A の動物種特異的作用の分子機構：上記の結果で、リピド A による細胞活性化は TLR2 を介さないことが明らかとなったので、次に TLR4/MD-2 を介する活性化を検討した。293 細胞にヒト (Fig. 7A) またはマウス (Fig. 7B) 由来の TLR4/MD-2 を発現させ、506、516、大腸菌 LPS またはサルモネラ LPS で刺激すると、いずれも 10-100 ng/ml といった低濃度でレポーター活性を上昇させた。しかし、大腸菌型リピド A である 506 の効果はヒトおよびマウスの TLR4/MD-2 を発現させた細胞で同等に見られるのに対し、サルモネラ型のリピド A の効果はヒトの蛋白を発現させた細胞ではかなり弱かった (Fig. 7)。

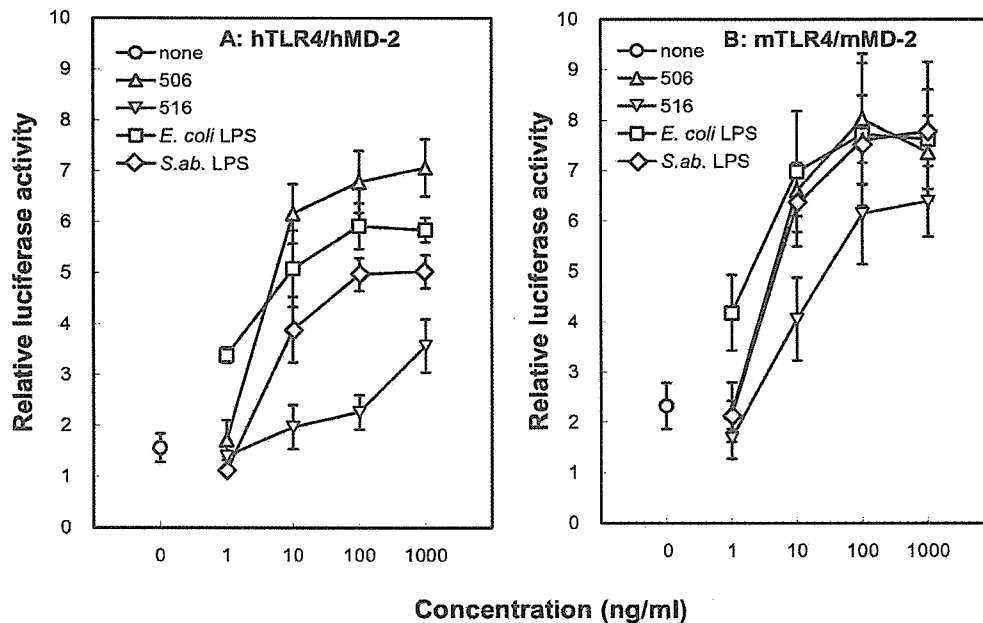


Fig. 7 Activation of NF- κ B by synthetic lipid A compounds and LPS in 293 cells transfected with human TLR4/MD-2 (A) or mouse TLR4/MD-2 (B)

上記の結果はサルモネラリピド A の動物種特異的反應が TLR4/MD-2 に起因する可能性を示している。そこでこれを詳細に検討するため、ヒトマクロファージ細胞 THP-1 にマウス由来の CD14/TLR4/MD-2 を発現させリピド A の効果を検討した。コントロールベクターのみをトランスフェクトした THP-1 細胞は大腸菌リピド A 刺激によりルシフェラーズレポーター活性が上昇するが、サルモネラのリピド A では 100 ng/ml の高濃度でも全く活性の上昇は見られなかった (Fig. 8)。THP-1 細胞にマウス由来の CD14/TLR4/MD-2 を発現させると大腸菌リピド A に対する応答性が著しく増強されるのに加えて、サルモネラリピド A に対しても明らかに応答するようになった。一方、THP-1 にヒト由来の CD14/TLR4/MD-2 を発現させると大腸菌リピド A に対する応答性はマウスの場合と同様に増強されるが、サルモネラリピド A に対しては若干の活性はあるがほとんど応答しなかった (Fig. 8)。この結果は、サルモネラリピド A の動物種特異的反應に CD14/TLR4/MD-2 が関与していることを示している。

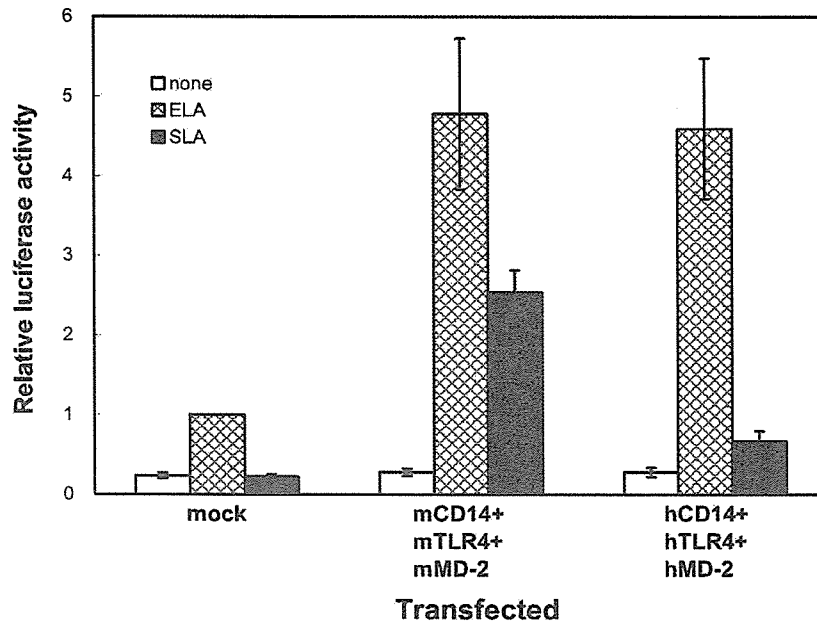


Fig. 8 Effects of *E. coli* lipid A (ELA) and *Salmonella* lipid A (SLA) preparations on NF- κ B activity in THP-1 cells transfected without or with mouse (m) CD14/TLR4/MD-2 or human (h) CD14/TLR4/MD-2

次に、CD14/TLR4/MD-2のうち、どの蛋白が関与しているのかを特定するため、この3者を1つずつ発現させリポドAに対する応答性を検討した (Fig. 9)。mCD14またはmMD-2を発現させても大腸菌およびサルモネラリポドAどちらの反応性にも影響がなく、mTLR4を発現させると大腸菌リポドAの効果は増強されたが、サルモネラリポドAには応答しなかった (Fig. 9)。

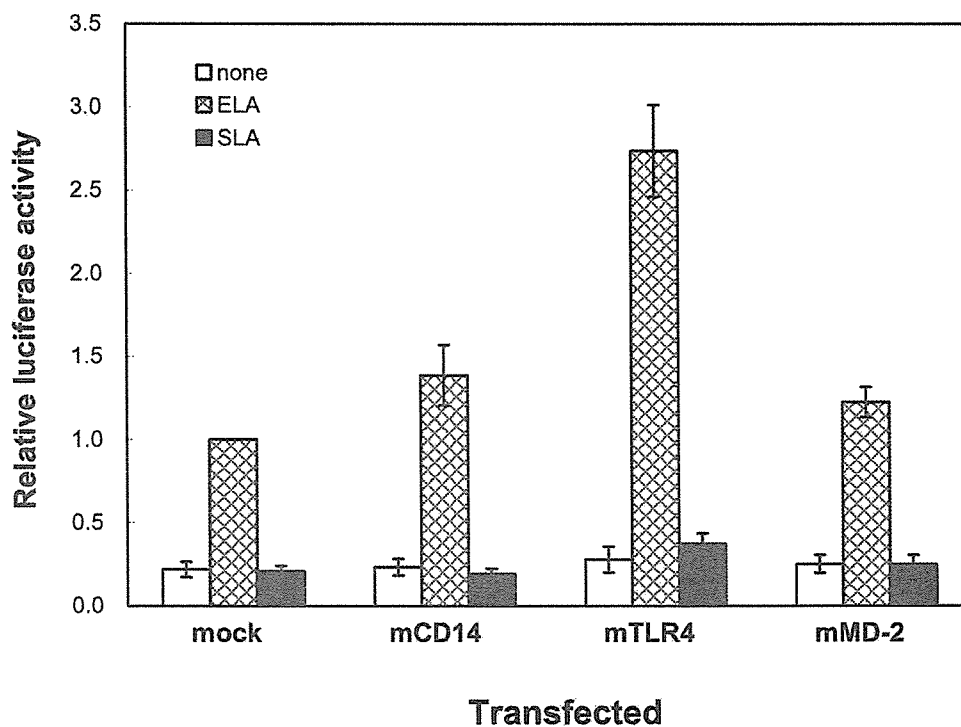


Fig. 9 Effects of *E. coli* lipid A (ELA) and *Salmonella* lipid A (SLA) preparations on NF- κ B activity in THP-1 cells transfected without or with CD14, TLR4, or MD-2 of mouse origin

次に、上記の3者を2つずつ組み合わせて発現させリピドAに対する応答性を検討した (Fig. 10)。mCD14/mMD-2を発現させても、リピドAに対する応答性には変化が見られなかった。mCD14/mTLR4を発現させると大腸菌リピドAに対する応答性は著しく増強され、サルモネラリピドAに対しても若干ではあるが応答するようになった。これに比較し、mTLR4/mMD-2を発現させると大腸菌リピドAに加えてサルモネラリピドAに対しても明らかな応答を示した (Fig. 10)。

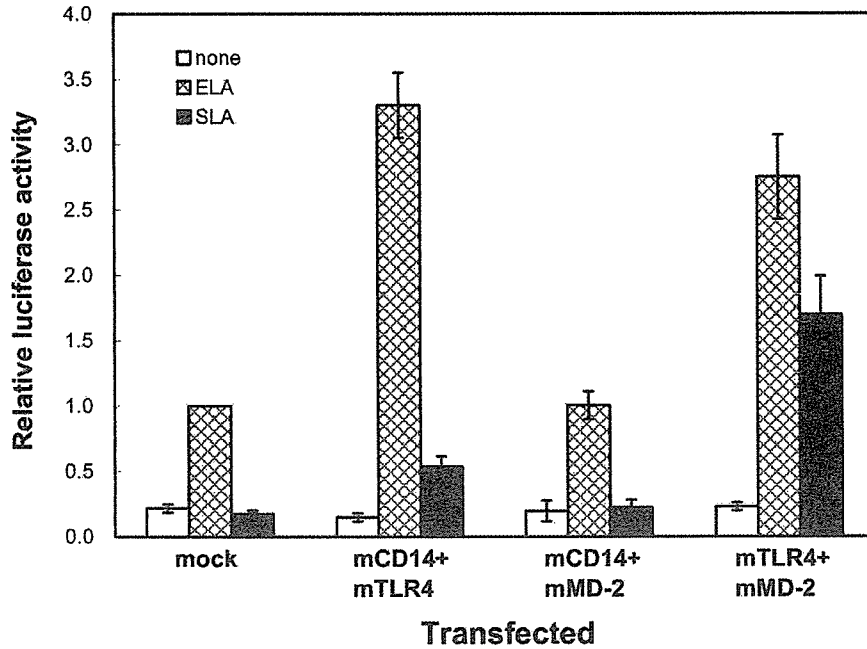


Fig. 10 Effects of *E. coli* lipid A (ELA) and *Salmonella* lipid A (SLA) preparations on NF- κ B activity in THP-1 cells transfected without or with either two of CD14, TLR4, or MD-2 of mouse (m) origin

上記では、ヒトのマクロファージ細胞にマウス蛋白を補完して、リピドAに対する応答性を見たが、今度はマウス由来のCD14、TLR4、MD-2を、それぞれ、ヒト由来のものに置換した場合の応答性を検討した (Fig. 11)。THP-1細胞にmCD14/mTLR4/mMD-2を発現させると上で示したように大腸菌およびサルモネラのどちらのリピドAに対しても強い応答性が見られる。このうちCD14をヒト由来のものに置換するとサルモネラリピドAに対する応答性は逆に強くなった。TLR4をヒト由来のものに置換すると、大腸菌リピドAに対する応答性には変化が見られなかったが、サルモネラリピドAに対する応答性は60%程度に減弱した。一方、MD-2をヒト由来のものに置換すると、大腸菌リピドAに対する応答性はむしろ増強されるのに対し、サルモネラリピドAに対する応答性は大きく減少し、hCD14/hTLR4/hMD-2を発現させた細胞での応答性とほぼ同程度になった (Fig. 11)。

以上の結果より、サルモネラリピドAの動物種特異的の反応には、TLR4も関与するものの、MD-2が主因であることが明らかとなった。

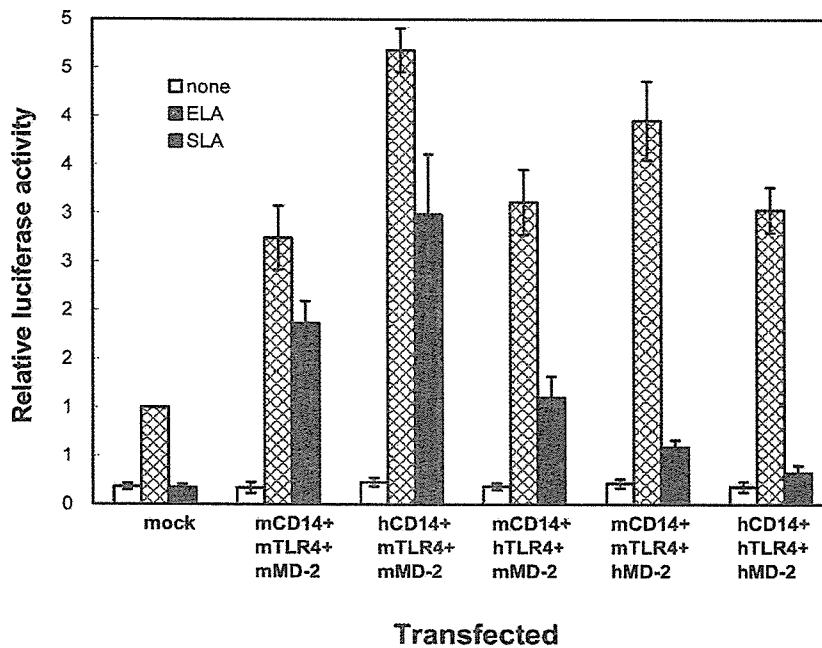


Fig. 11 Effects of *E. coli* lipid A (ELA) and *Salmonella* lipid A (SLA) preparations on NF- κ B activity in THP-1 cells transfected without or with combinations of CD14, TLR4, or MD-2 of mouse (m) and human (h) origins

4. 考察

生体におけるエンドトキシンを認識する分子としては以前より CD14 であるとされてきた。しかし、CD14 は膜貫通型蛋白ではないためエンドトキシンのシグナルを細胞内へと伝達する機能的蛋白の存在が示唆されていた。最近になり、TLR2 と TLR4/MD-2 複合体がエンドトキシンの情報伝達分子であることが報告された。しかし、本研究で化学合成リポド A を用いて TLR2 を介する細胞活性化を検討したところ、これらの合成リポド A は全く活性を示さなかった。活性は示さないが TLR2/CD14 分子がこれらのリポド A をアンタゴニストとして認識する可能性が考えられるが、本研究では TLR2/CD14 を発現させた細胞で、LPS による活性化は 506 および 516 により抑制されなかった (Fig. 6) ことから、TLR2/CD14 は大腸菌およびサルモネラリポド A 分子をアゴニストとしてもアンタゴニストとしても認識しないと言える。

天然由来の LPS およびリポド A を用いて TLR2 を介する細胞の活性化が起きることが報告されている。本研究では天然由来のリポド A では、1 社のリポド A を除き、TLR2 を介する活性を示さなかった。最近、天然の LPS を界面活性剤存在下でフェノールで抽出すると、TLR4/MD-2 を介する活性化は保持されるものの、TLR2 を介する活性化は消失することが報告され、天然の LPS には、エンドトキシン以外の TLR2 を活性化する成分が混入している可能性が考えられている。従って、本研究で活性の見られた 1 社のリポド A もこの物質が混入しているものと思われる。実際に、今回用いた LPS は、TLR2 を介する活性化が見られたが、この LPS をデオキシコール酸存在下でフェノール抽出を行なうと CD14/TLR4/MD-2 を介する活性は保持していたが CD14/TLR2 を介する活性は消失した (データは示していない)。この混入物は TLR2 を介する活性を有したエンドトキシンの 1 種なのか、それとも、エンドトキシンとは全く異なる細菌膜成分なのかは明らかではない。しかし、エンドトキシン以外の菌体成分が TLR2 を介して生体を活性化することが最近明らかにされてきたので、現在、エンドトキシン試験などの標準品として用いられているエンドトキシンにもこのような物質の混入が疑われ、この混入物質の同定と、エンドトキシンの新たな精製法の確立が急務であると思われる。

ヒトとマウスで異なる反応、すなわち種特異性は LPS と類似の反応を惹起する taxol でも報告されている。taxol はマウスマクロファージを活性化するが、ヒトマクロファージは活性化しないと言われている。最近、この taxol の種特異性が分子レベルで検討され、種特異性は MD-2 に起因することが報告された。また、マウス MD-2 分子の 22 番目のグルタミンをチロシンに置換すると LPS には応答するが taxol には応答しなくなり、22 番目のグルタミンが taxol の反応性に寄与していることも明らか

となっている。本研究ではサルモネラリピド A の種特異性に MD-2 が大きく寄与していたが、MD-2 の 22 番目のグルタミンをチロシンに置換してもサルモネラリピド A に応答する（データは示していない）ことから、サルモネラリピド A と taxol の種特異性の機構は異なると言える。

大腸菌リピド A の前駆体であるリピド IVa（別名 406）や *Rhodobacter sphaeroides* のリピド A もまた動物種に依存した反応を示すことが知られている。これらの種特異性は、THP-1 細胞に異なる動物種由来の TLR4 を発現させるといった本研究と同様の手法により解析され、TLR4 がこれらの種特異性を支配する因子であることが見出されているが、MD-2 の関与については検討されていない。本研究におけるサルモネラリピド A の種特異性は、TLR4 の寄与はあるものの、MD-2 が主因であった。これらのことは、CD14、TLR4、MD-2 といった分子が LPS 受容体複合体を形成してはいるものの、各種エンドトキシンと LPS 受容体複合体との相互作用様式は微妙に異なることを意味している。

本研究の結果はエンドトキシンの活性を測定する上で大きな警鐘を与える。すなわち、安直な動物実験、あるいはリムルス試験でエンドトキシンの活性を評価することの危険性を示していると言えよう。エンドトキシンをヒトの疾患の原因物質として捉える時、例えばそれが動物に対して無毒性であっても、あくまでもヒトの系でのエンドトキシン作用を調べることが不可欠であると思われる。従って、本研究で解明できた種特異性の分子機構を応用し、ヒトにおける作用を反映できる評価系を作成することは急務であると思われる。

5. 結論

エンドトキシン作用の種特異性の問題は、エンドトキシン疾患の治療法の開発、活性の生体利用、汚染エンドトキシンによる医薬品等評価において非常に重要な問題である。本研究では代表的な細菌であるサルモネラのリピド A がマウスではアゴニストとして働くのにも関わらず、ヒトでは逆にアンタゴニストとして働くという動物種特異的の分子機構を解析した。すなわち、サルモネラ由来リピド A はヒトマクロファージにマウス由来の TLR4 と MD-2 を発現させることにより、アゴニストとして働くようになることを見出した。この際のマウスの TLR4 をヒト由来のものに置換してもサルモネラリピド A の反応が 60%程度残るものの、MD-2 をヒト由来のものに置換すると、この反応性は大きく減弱し、MD-2 が、この種特異的の反応の主因であることを明らかにした。また、この種特異的の反応機構を解析する過程で、大腸菌の LPS やリピド A 中には TLR2 を介して細胞を活性化する因子が混入していることを見出した。本研究の結果は動物実験やリムルス試験によるエンドトキシン活性の安直な理解に警鐘を与え、さらにはエンドトキシン試験などに用いられる標準品の精製法についても考慮する必要性を指摘するものである。また、本研究の動物種特異的の反応の分子機構を利用して、ヒトでの活性を反映するようなエンドトキシン評価法の確立に役立つものと思われる。

6. 研究発表

Tanamoto, K., H. Kato, Y. Haishima & S. Azumi. Biological property of lipid A isolated from *Flavobacterium meningosepticum*. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology* 2001, 印刷中

Tanamoto, K., T. Iida, Y. Haishima & S. Azumi. Endotoxic property of lipid A from *Comamonas testosteroni*. *Microbiology* 2001, 印刷中

Tanamoto K & Azumi S. *Salmonella*-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of LPS action on human line cells. *J. Immunol.* 2000, 164, 3149-3156

Muroi, M., Ohnishi, T., Azumi, S., and Tanamoto, K.: Toll-like receptor 2/CD14 complex does not recognize *E. coli*- and *Salmonella* lipid A molecules. Submitted for publication

Ohnishi, T., Muroi, M., and Tanamoto, K.: N-linked glycosylation at Asn-26 and Asn-114 of human MD-2 are required for Toll-like receptor-mediated activation of NF- κ B by lipopolysaccharide. Submitted for publication

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社