

平成13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3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

### 第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

## 第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

## 医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための 正当な評価と新試験法の開発に関する研究

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) 和光純薬工業株式会社大阪研究所 高岡 文
- (2) 生化学工業株式会社・機能化学品事業部 田中重則
- (3) 日本 BCG 研究所 矢野郁也
- (4) 日本電子照射サービス株式会社つくばセンター 山瀬 豊
- (5) 北里大学理学部・生体防御学 熊沢義雄
- (6) 昭和薬科大学衛生化学 知久馬敏幸

### 要旨

汚染菌及び菌体成分の正当な評価法と新試験法の開発を目的として、種々の菌体成分の活性発現機構の解析を分子レベルで行った。動物種特異性を示すサルモネラのリピドAのヒトマクロファージ活性化は、TLR4とMD-2、とりわけMD-2がこの種特異的反応の主因であることを明らかにした。また、多くの天然のLPSにTLR4と共にTLR2介する活性化が確認されたが、大部分は蛋白を含まず、リポ蛋白やpeptidoglycanとは異なる作用機作によってTLR2を介して細胞を活性化する因子を持っていることを見いだした。293細胞に種々の膜蛋白を発現させることによってこれらの細菌成分を区別できることがわかり、種々の細菌成分の正当な評価法・試験法に道が開かれた。

### 1. 研究目的

医薬品および医療用具の開発の際は、これらの安全性を確保するため菌や菌体成分による汚染を正しく評価する必要がある。代表的な菌体成分であるエンドトキシンの検出にはウサギによる発熱性試験、カプトガニの血液凝固反応を利用したリムルス試験が行われている。しかし、近年、エンドトキシン以外の菌体成分も、エンドトキシンとは異なる機構で生体を活性化し、毒性を示すことが明らかとなってきた。さらに、我々はエンドトキシンの種類によってはヒトとマウスで全く活性が異なるという動物種特異性を見出し、現在の試験法ではヒトに対し毒性を示す菌体成分を見落とし、また、ヒトにおける真の毒性を反映していないという大きな問題がある。現に、我々は、リムルス試験における結果とヒトにおける毒性が一致しないエンドトキシンの存在を見出している。

医薬品等における汚染菌および菌体成分のうちエンドトキシンによって引き起こされる疾患は、米国だけでも年間、数十万人が死亡するといった临床上重要な問題である。生体のエンドトキシン認識機構の解明は、最近のToll-like receptor (TLR)の発見により飛躍的に進展しつつある。多くの菌体成分による細胞の活性化（毒性の発現）にはこのTLRが関与しており、それにCD14、MD-2、lipopolysaccharide binding protein (LBP)といった分子群が複雑に絡んでヒトにける微生物認識機構が形成されていると考えられている。また、多様な菌体成分がTLRを介してその活性（毒性）を発現することが明らかになりつつあることから、現在、世界的に活発な研究が展開されている。しかし、どのような構造体がどの分子を利用するのかといったことや、ましてや、エンドトキシンの動物種特異性に関する分子機構はほとんど明らかにされていない。

本研究では、多様な菌体成分の活性発現に関与するとされているTLR、CD14、MD-2、LBPといった分子を複合的に組み合わせた各種形質導入細胞を構築し、種々な菌体成分の活性発現に必要な分子群を特定する。加えて、エンドトキシンの動物種特異性を支配する分子、さらには、活性化の調節機構を分子レベルで明らかにする。これらの解析をもとに、本研究は、現行のリムルス試験で見落とされている菌体および菌体成分をも検出し、かつ、ヒトにおける毒性を反映した正しい検出法、試験法を開発することを目的としている。この検出法の開発により、現在の試験法では見落としていた菌体成分の検出や、ヒトでは毒性を示すにもかかわらず検出できていなかった菌体成分を正しく評価する

ことが可能となり、さらに、この検出法は、各種、診断等に発展できるものである。また、多様な菌体成分のヒトにおける認識機構を明らかにすることは菌体成分により引き起こされる難治性のエンドトキシン疾患をはじめとする各種疾患の予防、対策につながる。

## 2. 研究方法

**試薬：**lipopolysaccharide (LPS)は、*Escherichia coli* (*E. coli*) O111:B4 からフェノール/水法により抽出したもの (O111b)、これをさらにゲル濾過により精製したもの (O111a)、また、*E. coli* J5 由来のもの、*E. coli* F583 由来の 4 種類を Sigma (St. Louis, MO)より購入した。また、*E. coli* R3F653 由来、*Salmonella abortus equi* 由来、*Salmonella minnesota* 由来の LPS は当研究室で調製したものをを用いた。peptidoglycan は *Staphylococcus aureus* 由来のものを和光純薬 (大阪) または Toxin Technology (Sarasota, FL)より購入した。*E. coli* の murein リポ蛋白由来の合成 lipopeptide (tripalmitoyl-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala: Pam<sub>3</sub>CSSNA) は Bachem (Bubendorf, Germany)より購入した。サルモネラ由来のリピド A は *Salmonella abortus equi* 由来の LPS から調製した。大腸菌由来のリピド A は *E. coli* F-583 由来のものを Sigma (St. Louis, MO)より購入した。糖脂質として *M. tuberculosis* (Mtb-)および *Rhodococcus* (Rho-) sp. 4306 株由来の Trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)および trehalose 6-monomycolate (TMM)を用いた。

**LPS の再精製およびフェノール画分 (PhExt) の調製：**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 2 度フェノール抽出し、その水層を精製水中で透析後、3M の酢酸ナトリウム (pH 4) を最終濃度 0.3 M になるように加え、3 倍量の氷冷したエタノールを加えて遠心後の沈殿物を乾燥させ、再精製 LPS として用いた。フェノール抽出の際のフェノール画分は 0.2%トリエチルアミンおよび 0.5%デオキシコール酸を含む水溶液で 2 度抽出し、そのフェノール層を精製水中で透析し乾燥させたものを PhExt として用いた。

**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。

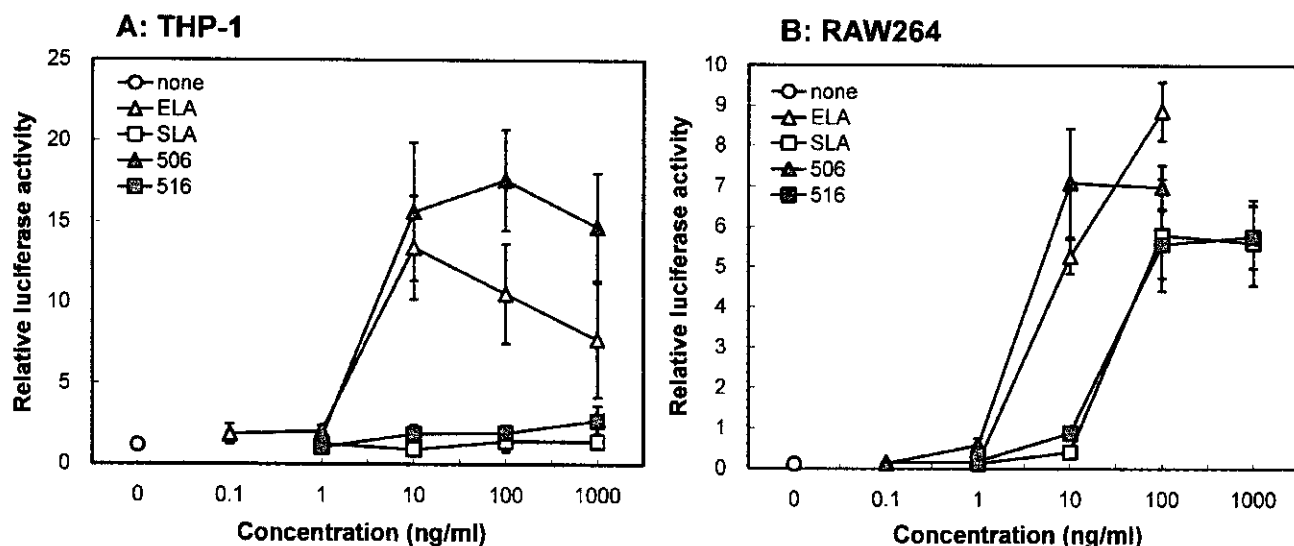
**発現プラスミド：**ヒト (h) およびマウス (m) CD14 の cDNA を含むプラスミドは山本俊輔博士 (大分医科大学)よりご供与いただいた。hTLR2 (THP-1)、mTLR2 (L929)、mTLR4 (RAW264)、hMD-2 (THP-1) のシグナルペプチド領域を除くコード領域の cDNA はそれぞれ括弧内に示す株化細胞から調製した total RNA から既存のデータベースの塩基配列をもとに RT-PCR 法により作成した。hTLR4 のシグナルペプチド領域を除くコード領域の cDNA はヒト脾臓 total RNA (サワディー・テクノロジー)より上記と同様に RT-PCR 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。

**動物：**C57BL/10ScSn (B10Sn)マウスおよび TLR4 欠損 C57BL/10ScCr (B10Cr)マウスを SPF 環境下で飼育し実験に用いた。

**NF- $\kappa$ 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 pGL3-Basic (Promega, Madison, WI)に組み込んだレポータープラスミド pELAM-L、0.2  $\mu$ g とコントロールプラスミド pRL-TK (Promega, Madison, WI) 0.05  $\mu$ g をトランスフェクトした。THP-1 細胞 ( $2 \times 10^6$ ) は 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 3  $\mu$ l を用い、各発現プラスミド、および、pELAM-1 1  $\mu$ g と pRL-TK 0.1  $\mu$ g をトランスフェクトした。RAW264 細胞 ( $3-5 \times 10^5$ ) は 6 穴プレートに播き、18 時間後に FuGene 3  $\mu$ l を用い、各発現プラスミド、および、pELAM-1 0.5  $\mu$ g と pRL-TK 0.5  $\mu$ g をトランスフェクトした。それぞれの細胞は、24 時間後、Dual-Luciferase™

Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を用い、ルシフェラーゼ活性を測定した。

**LPS 試料中の蛋白および polysaccharide の検出:** LPS 試料を常法に従い SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、第一化学薬品(東京)の 2D-銀染色試薬・II「第一」を用いて polysaccharide の染色を行なった。別に、LPS 試料を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、PVDF 膜に転写した後、



**Fig. 1 Lipid A-induced activation of NF- $\kappa$ B in human (THP-1) and mouse (RAW264) macrophage cell line**

BIO-RAD 社 (Hercules, CA) の Colloidal Gold Total Protein Stain 試薬および Gold Enhancement kit を用いて蛋白を染色した。

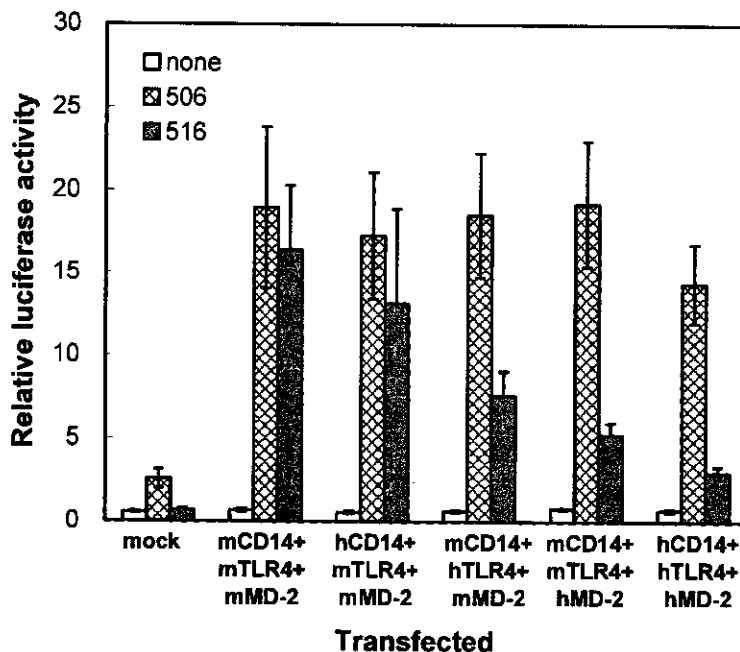
**TNF 測定:** TNF の測定はアクチノマイシン存在下で L929 細胞を用いたバイオアッセイで行った。細胞傷害活性を示す標準試料の濃度から LD<sub>50</sub> を算出し、試料の希釈倍率から培養上清中の TNF- $\alpha$  の濃度を算出した。

### 3. 研究成果

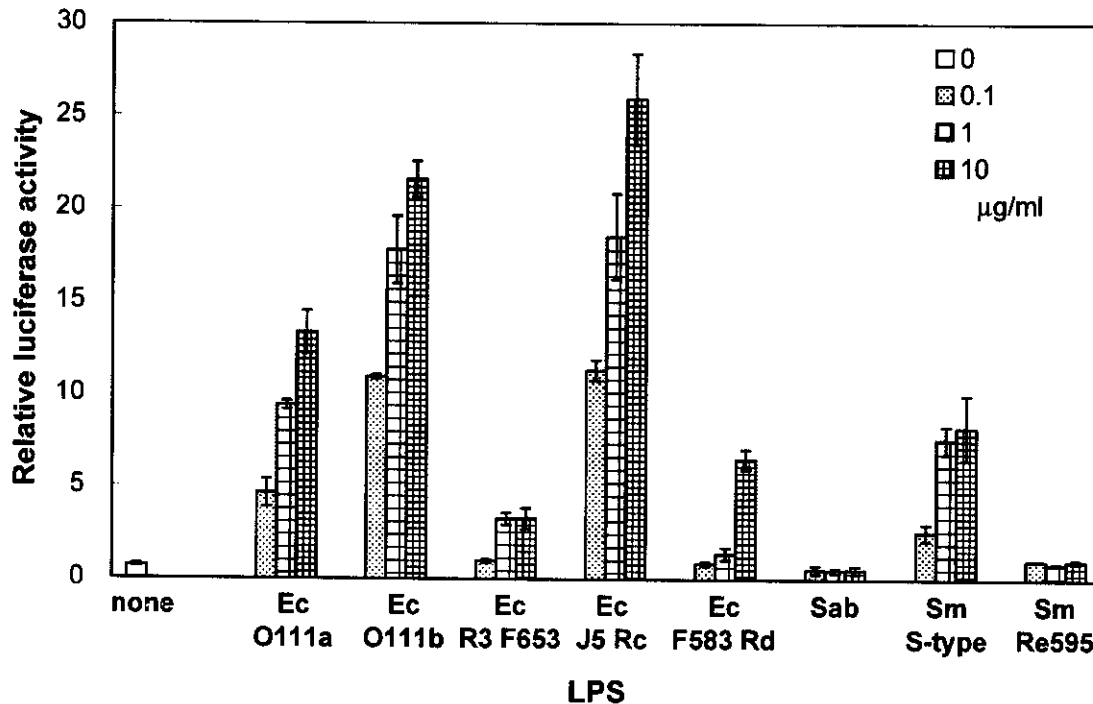
**サルモネラリピド A の動物種特異的作用の分子機構:** 我々は大腸菌由来のリピド A がヒトマクロファージ細胞とマウスマクロファージ細胞のどちらでも同等の活性を示すのに対し、サルモネラ由来のリピド A がマウスマクロファージ細胞では強い活性を示すのにもかかわらずヒトマクロファージ細胞ではほとんど活性を示さないという動物種特異的の反応を示すことを、TNF- $\alpha$  産生、I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解誘導などを指標に見出している。そこで、まず、本研究では、NF- $\kappa$ B 依存性のレポータ活性のレベルでも種特異的の反応を観察できるかどうか定量的に検討した (Fig. 1)。分化させたヒト由来のマクロファージ細胞株 THP-1 では、大腸菌のリピド A が 10 ng/ml という低濃度から強い活性を示すのに対し、サルモネラのリピド A は 1  $\mu$ g/ml という高濃度を用いてもほとんど活性を示さなかった。化学合成リピド A を用いると、大腸菌型の合成リピド A、506 は、天然の大腸菌リピド A と同等な活性を示すのに対し、サルモネラ型の合成リピド A、516 は、天然のものと同様、ほとんど活性を示さなかった (Fig. 1A)。一方、マウスのマクロファージ細胞株 RAW264 では、サルモネラのリピド A が大腸菌のリピド A に比べ、10 倍程度弱いものの、依然、強い活性を示した。合成リピド A も天然のものと同様、大腸菌型、サルモネラ型ともに強い活性を示した。このように、レポーター活性のレベルでもサルモネラリピド A はマウスでは強い活性を示すが、ヒトではほとんど活性を示さないという動物種特異的の反応を示すことが判明した。

現在、LPS の機能的受容体は CD14/TLR4/MD-2 複合体であるとされている。そこで、サルモネラリピド A の動物種特異的の反応がこれらの複合蛋白のうち、どの蛋白に起因するものなのかを合成リピド A を用いて検討した (Fig. 2)。分化させたヒトマクロファージ細胞 THP-1 にコントロールベクターのみをトランスフェクトすると、上述したように、大腸菌型リピド A (506) 刺激によりルシフェラーゼレポーター活性が上昇するが、サルモネラ型リピド A (516) では 30 ng/ml の高濃度でも全く活性の上昇は見られない。そこで、THP-1 細胞にマウス由来の CD14/TLR4/MD-2 を発現させると 506 に対する応答性が著しく増強されるのに加えて、516 に対しても明らかに応答するようになった。このことは CD14/TLR4/MD-2 がサルモネラリピド A の動物種特異的の反応に関与していることを示している。そ

ここで、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

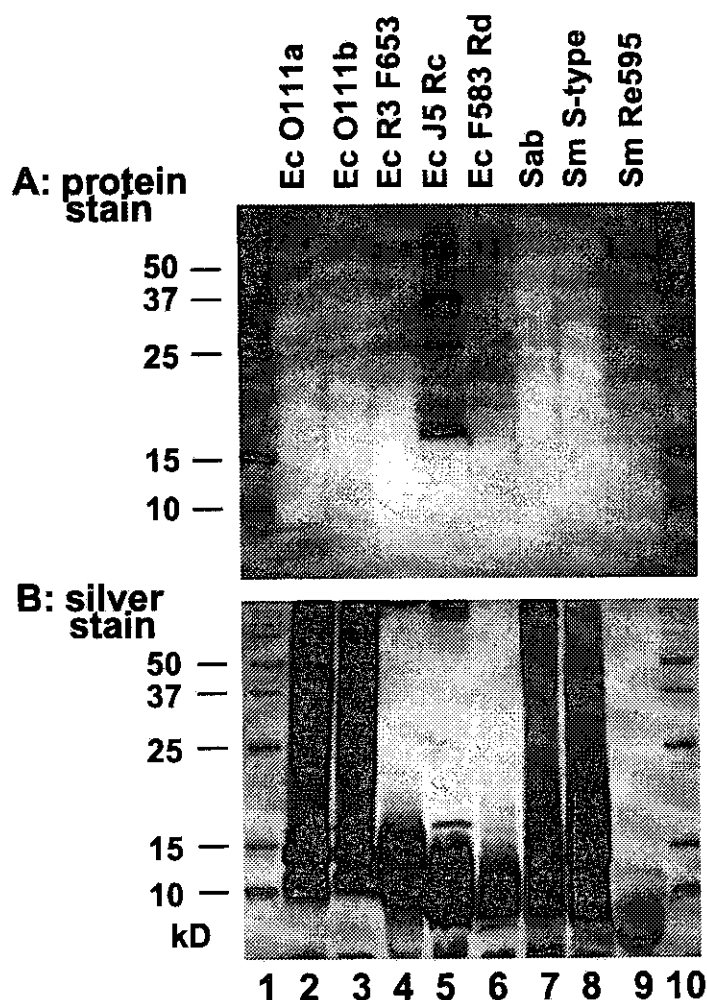


**Fig. 2 Replacement of mMD-2 with hMD-2 severely impaired responsiveness to *Salmonella* lipid A in THP-1 cells (h: human; m: mouse)**



**Fig. 3 Activation of NF- $\kappa$ B in response to various LPS preparations in 293 cells expressing human CD14 and TLR2 (Ec: *E. coli*; Sab: *Salmonella abortus*; Sm: *Salmonella minnesota*)**

ヒト由来のものに置換した場合の応答性を検討した。CD14をヒト由来のものに置換しても506および516の応答性に変化は見られず、TLR4をヒト由来のものに置換すると、506に対する応答性には変化が見られなかったが、516に対する応答性は50%程度に減弱した。一方、MD-2をヒト由来のものに



**Fig. 4 Protein (A) and polysaccharide (B) staining of various LPS preparations (Ec: *E. coli*; Sab: *Salmonella abortus*; Sm: *Salmonella minnesota*)**

置換すると、506 に対する応答性には変化が見られなかったが、516 に対する応答性は 30%程度に減少し、ヒト由来の CD14/TLR4/MD-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. 2)。

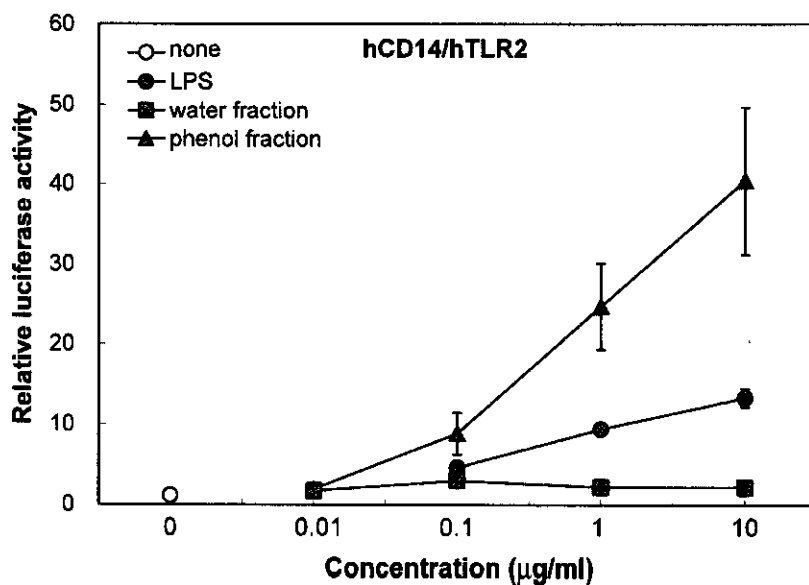
以上の結果より、サルモネラリポド A の動物種特異的の反応には、TLR4 も関与するものの、MD-2 が主因であることが明らかとなった。

#### LPS 試料中に含まれる TLR2 活性化物質

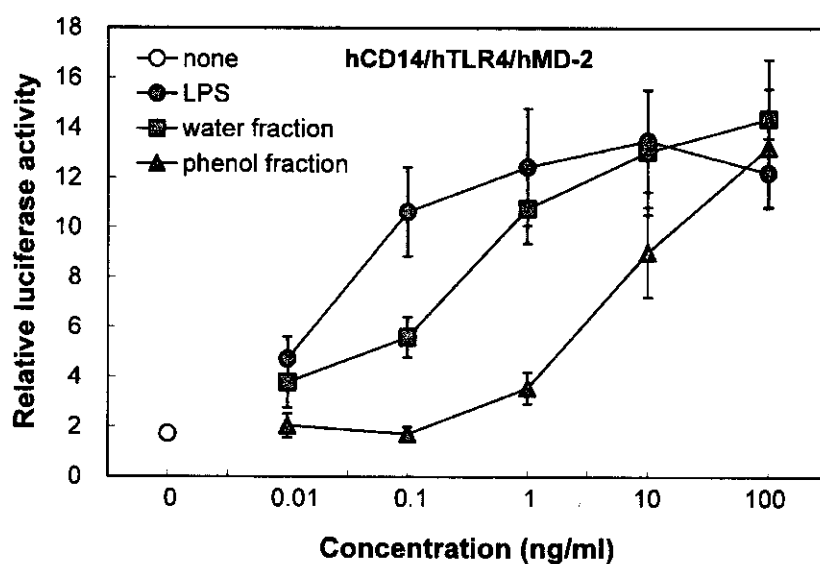
LPS はその化学構造が複雑であるため細菌から調製したものをを用いる。現在、エンドトキシン試験法で用いられている LPS 標準品も細菌から調製したものである。しかし、細菌から調製するため LPS 試料中には LPS 以外のものも含まれている可能性がある。通常の LPS の精製法では LPS と強固に結合しているために除くことができない物質が存在し、これが LPS の受容体である TLR4 とは異なり TLR2 を介して NF- $\kappa$ B を活性化することが報告されており、その物質は細菌由来のリポ蛋白ではないかとされている。そこで我々はまず、数種の LPS 試料の TLR2 刺激活性をヒト由来の CD14 と TLR2 を発現させた 293 細胞で検討した (Fig. 3)。大腸菌由来の LPS 5 種類とサルモネラ由来の LPS 3 種類について検討したところ、*Salmonella abortus equi* 由来および *Salmonella minnesota* 由来の LPS を除いた全ての LPS が NF- $\kappa$ B 依存性のレポーター活性を上昇させた。

そこで、これらの試料中の蛋白混入の程度を知るため、これらの試料を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、総蛋白を金染色により検出した (Fig. 4)。全ての LPS 試料中に polysaccharide は検出されるものの (Fig. 4B)、蛋白を検出したのは *E. coli* J5 の LPS のみであった (Fig. 4A)。

次に、金染色で蛋白の混入を認めなかった LPS の TLR2 刺激活性がどのような物質によるものなのかを検討するため、*E. coli* O111 の LPS をデオキシコール酸存在下でフェノール抽出を行い、水層とフェノール層に分画した。両画分の TLR2 刺激活性を知るため、ヒト由来の CD14 と TLR2 を発現さ



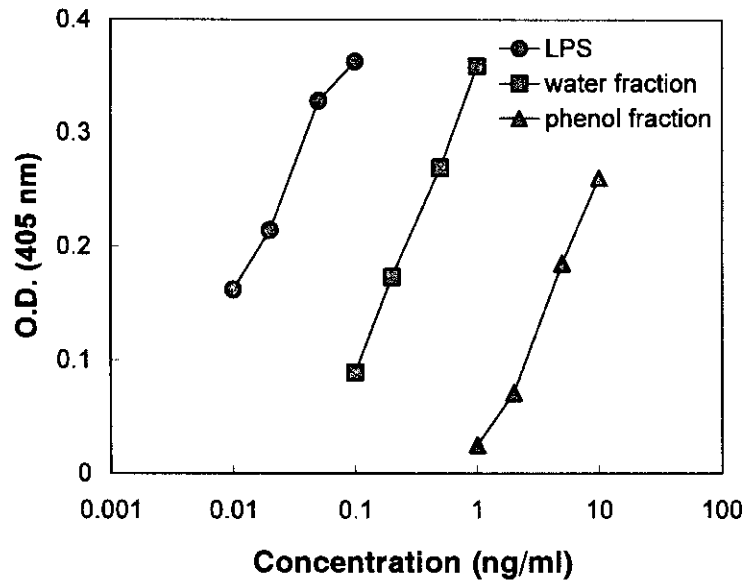
**Fig. 5** Activation of NF- $\kappa$ B in response to LPS and its fractionated compounds in 293 cells expressing human CD14 and TLR2 (LPS was fractionated into water and phenol fractions by phenol-water extraction)



**Fig. 6** Activation of NF- $\kappa$ B in response to LPS and its fractionated compounds in 293 cells expressing human CD14, TLR4 and MD-2 (LPS was fractionated into water and phenol fractions by phenol-water extraction)

せた 293 細胞で NF- $\kappa$ B 依存性のレポーター活性を検討すると、フェノール画分にもとの LPS を上回る活性を認め、逆に、水面分には全く活性を認めなかった (Fig. 5)。通常、フェノール分画では水層





**Fig. 7** *Limulus* amoebocyte gelation activity of LPS and its fractionated compounds (*Limulus* activity was measured with Endospecy)

に LPS が移行することが知られているので、水面分の LPS 活性を知るためヒト由来の CD14、TLR4、MD-2 を発現させた 293 細胞で NF- $\kappa$ B 依存性のレポーター活性を検討すると、水面分はもとの LPS より 10 倍程度活性は劣るものの、強い TLR4 刺激活性を示した (Fig. 6)。驚くことに、フェノール画分にもまた、水面分より 10 倍程度弱いながら TLR4 刺激活性を認めた (Fig. 6)。このフェノール画分の TLR4 刺激活性がエンドトキシンによるものかどうかを知るため、エンドトキシンに特異的なリムルス試薬 (エンドスペシー) を用い、リムルス活性を測定したところ、もとの LPS、水面分、フェノール画分とも、TLR4 刺激活性と平行したリムルス活性を認めた (Fig. 7)。

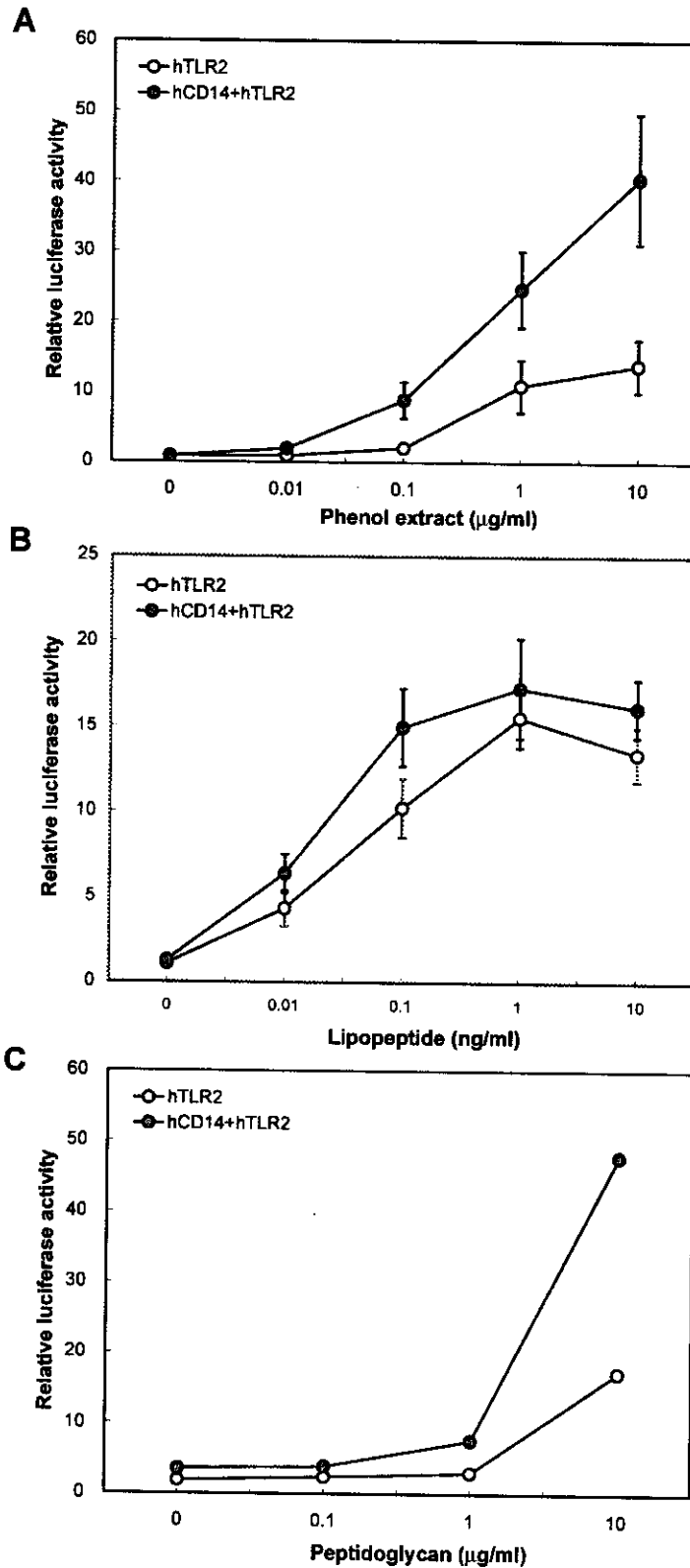
次に、フェノール画分の TLR2 刺激活性を代表的な TLR2 リガンドである peptidoglycan および lipopeptide と比較した (Fig. 8)。いずれの物質もバクテリアのみ、あるいはヒト由来の CD14 のみを発現させた 293 細胞では NF- $\kappa$ B 依存性のレポーター活性を上昇させなかったが (データは示していない)、ヒト由来の CD14 と TLR2 を発現させた 293 細胞ではいずれも強い活性を示した。しかし、CD14 を除き、TLR2 のみを発現させた細胞ではフェノール画分の活性が半分以下に低下する (Fig. 8A) のに対し、lipopeptide の活性はほとんど変化しなかった (Fig. 8B)。一方、peptidoglycan の活性はフェノール画分と同様、CD14 の非発現下で半分以下に低下した (Fig. 8C)。このことはフェノール画分の TLR2 刺激活性は CD14 に依存的であるが lipopeptide の TLR2 刺激活性は CD14 に依存しないという点で異なる作用機作であることを示している。

上述のように、フェノール画分は TLR4 刺激活性を有し、LPS 様の物質が含まれていることが考えられる。LPS の特徴的な作用様式として、血清中に含まれる lipopolysaccharide binding protein (LBP) の要求性、すなわち、LBP もしくは血清の非存在下では LPS の活性が大きく減弱するというものである。そこで、フェノール画分の活性が血清または LBP に依存するかどうかを検討した (Fig. 9)。ヒト由来の CD14 と TLR2 を発現させた 293 細胞でフェノール画分の活性は血清非存在下では血清の存在下に比べ 10 分の 1 に減少し、血清の非存在下でも LBP を共に加えることにより大きく活性が増強された (Fig. 9A)。一方、peptidoglycan と lipopeptide は血清非存在下でも存在下と同等の活性を示した (Fig. 9B)。このことからフェノール画分は peptidoglycan と異なる LPS 様の作用様式を示すことが明らかとなった。

以上より、細菌由来の LPS 試料中には、peptidoglycan やリボ蛋白とは異なるエンドトキシン様の物質が含まれている可能性があることを明らかにした。

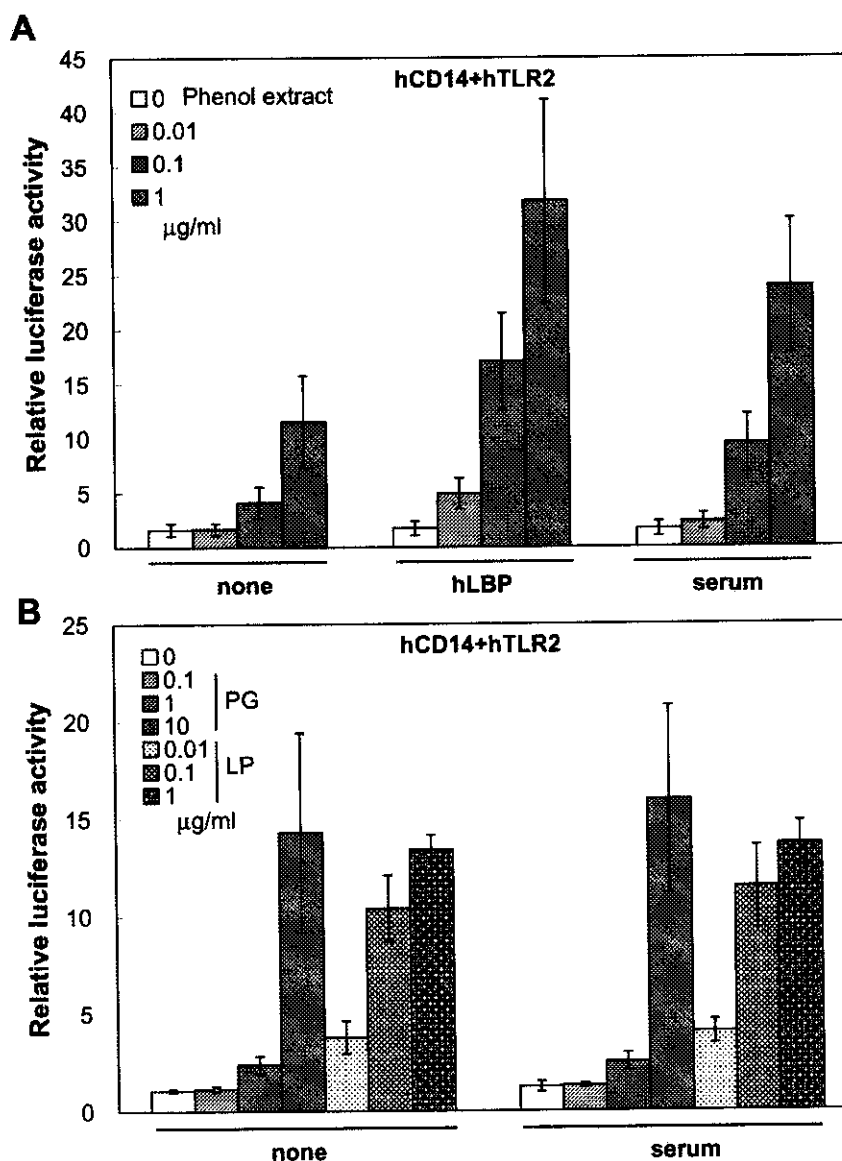
#### 各種ミコール酸含有糖脂質によるマウス腹腔細胞の TNF- $\alpha$ 産生

TLR4 を欠損している B10Cr マウスとその原種である B10Sn マウスの腹腔細胞を用いて *M. tuberculosis* 株由来 TDM 刺激による TNF- $\alpha$  の産生を検討した。TDM は用量依存的に TNF- $\alpha$  の産生を誘導した。また、B10Sn マウスと B10Cr マウスの腹腔細胞による TNF- $\alpha$  の産生量を比較すると、TLR4



**Fig. 8 Activation of NF- $\kappa$ B in response to TLR2 ligands in 293 cells expressing human TLR2 or human CD14 and TLR2**

を欠損した B10Cr 腹腔細胞の方が B10Sn のものより非常に高い産生能を示した。今回使用した Mtb-TDM のミコール酸の炭素数は約 80 であるが、Rho-TDM のものの炭素数は約 40 である。Mtb-TDM と Rho-TDM のマウス腹腔細胞による TNF- $\alpha$ 誘導能を比較すると、Mtb-TDM の方が高い活性を示した。TDM よりミコール酸が 1 分子少ない TMM 作用と比較した。Mtb-TMM および Rho-TMM 刺激を受け



**Fig. 9** Activation of NF- $\kappa$ B in response to TLR2 ligands in 293 cells expressing human CD14 and TLR2 in the absence or presence of human LBP or serum (hLBP: human lipopolysaccharide binding protein; PG: peptidoglycan; LP: lipopeptide)

たマウス腹腔細胞による TNF- $\alpha$ 産生のレベルは、いずれも TDM のものより低かった。

#### 4. 考察

代表的な大腸菌型およびサルモネラ型のリポド A 分子の化学構造は既に明らかになっている。両者の違いは還元型グルコサミン構造の 2 位に結合している 3-hydroxy tetradecanoic acid の水酸基に hexadecanoyl acid が結合しているかどうかだけである。つまり、大腸菌型リポド A (化合物 506) は 6 個の脂肪酸側鎖を有し、サルモネラ型リポド A (化合物 516) は 7 個の脂肪酸側鎖を有している。この脂肪酸側鎖 1 つだけの差だけで、両者のヒト細胞における活性は大きく異なるが、マウスにおいては両者に活性の差はあまりない。ヒトとマウスで異なる反応、すなわち種特異性は大腸菌リポド A の前駆体であるリポド IVa (別名 406) や *Rhodobacter sphaeroides* のリポド A でも見られる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ポド 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。また、リピド IVa は天然には存在しないが、サルモネラのリピド A は天然に存在するものに由来しているという点でサルモネラのリピド A の動物種特異的反応は意味深い。

動物種特異性は 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。

LPS のシグナルは CD14 が LPS を認識し、そのシグナルを TLR4/MD-2 に伝えることで伝達されるとされている。我々や他の研究者の結果では CD14 はサルモネラリピド A やリピド IVa、*Rhodobacter sphaeroides* のリピド A の動物種特異的反応に関与していないことが明らかになっている。このことは、CD14 における結合以降の過程でこれらのリピド A の識別が行なわれていることを意味している。本研究ではサルモネラリピド A の動物種特異的反応に MD-2 が関与することを示したが、このことは MD-2 がリピド A 分子の識別に携わっていることを示唆するものであり、LPS のシグナル伝達がどのような機構で起きるのかを知る上でサルモネラリピド A の認識機構を知ることは意味深いと言える。

現在、エンドトキシン試験で用いられる LPS 標準品には細菌から調製した LPS が用いられている。LPS によるマクロファージ活性化には CD14/TLR4/MD-2 複合体が関与するとされているが、天然由来の LPS 試料の中には TLR2 を介して細胞を活性化するものがあることが報告されている。本研究でも LPS 試料 8 種のうち 6 種が TLR2 刺激活性を有することを見出した。他の研究者の報告によると、この TLR2 刺激活性は LPS に強固に結合しているリポ蛋白であるとされている。しかし本研究では TLR2 刺激活性を有する LPS 試料 6 種のうち、明らかに蛋白の混入を認めたのは 1 種のみであった。また、lipopeptide の TLR2 刺激活性が CD14 に依存しなかったのに対し、LPS 試料から得たフェノール画分の TLR2 刺激活性は CD14 に依存していた。従って、本研究で用いた LPS 試料中にはリポ蛋白とは異なる TLR2 刺激物質が含まれているといえる。

TLR2 刺激活性を有する細菌成分として peptidoglycan がある。本研究でも peptidoglycan はフェノール画分と同様、CD14 依存的に TLR2 刺激活性を示した。しかしフェノール画分の活性は血清または LBP により増強されるのに対し、peptidoglycan の作用は血清により影響を受けなかった。これらのこと、及び、フェノール画分が TLR4 刺激活性およびリムルス活性を有することから、フェノール画分にはエンドトキシン様の TLR2 刺激物質が含まれていることが明らかとなった。この物質は 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、LPS 試料の一部には TLR2 を介して生体を活性化する物質が存在するものがあることは明らかなので、エンドトキシンの活性を正確に評価するためには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。

## 5. まとめ

汚染菌及び汚染菌体成分の正当な評価法と新試験法の開発を目的として、種々の菌体成分の活性発現関与する分子群の特定を行った。特に菌体成分の中でもとりわけ活性が強力なエンドトキシンについて、その動物種特異性を支配する分子を解明することによって、活性化の調節機構について分子レベルの解析を行った。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。我々は代表的な細菌であるサルモネラのリピド A がヒトには不活性で、マウスには強力な活性を示すという動物種特異性を示すことを見いだしているが、その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、活性が現れることを見出した。特にこの際のマウスの 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 50%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することから、MD-2 がこの種特異的反応の主因であることを明らかにした。一方、天然の LPS、特に市販のエンドトキシン標品には汚染リポ蛋白を含むものがあり、TLR2 を介する活性化が確認された。しかしながら LPS 中にも TLR2 リガンドであるリポ蛋白や peptidoglycan とは異なる作用機作によって TLR2 を介して細胞を活性化する因子が存在していることを見出した。このことは LPS 分画中には TLR4 以外に TLR2 を活性化する物質が含

まれていることを意味している。本研究ではさらに今、再興感染症として問題となっている結核菌の病原性菌体成分であるミコール酸含有糖脂質が、同じく TLR2 を介してマクロファージを活性化することを見いだした。以上のように種々の菌体成分が CD14、TLR2、TLR4、MD-2 といった膜蛋白の組み合わせにより細胞の活性化を引き起こすが、本研究の結果は 293 細胞に発現させることにより、これらの細菌成分を区別できうる可能性を示している。これらの蛋白による細菌成分の認識機構を知ることがさまざまな細菌成分の正当な評価法の確立に大いに寄与するものと思われる。

## 6. 研究発表

Tanamoto, K., Kato H., Haishima, Y., & Azumi, S. Biological property of lipid A isolated from *Flavobacterium meningosepticum*. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunol.* **8**, 522-527(2001).

Tanamoto, K., Iida, T., Haishima, Y. & Azumi, S. Endotoxic property of lipid A from *Comamonas testosteroni*. *Microbiology* **147**, 1087-1094(2001).

Ohnishi, T., Muroi, M. & 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- $\kappa$ B by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **167**, 3354-3359(2001).

Muroi, M., Ohnishi, T. & Tanamoto, K. MD-2 is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A. *Infect. Immun. in press*

Yamagami, H., Matsumoto, T., Fujiwara, N., Arakawa, T., Kaneda, K., Yano, I. & Kobayashi, K. Trehalose 6,6'-Dimycolate (Cord Factor) of *Mycobacterium tuberculosis* Induces Foreign-Body-and Hypersensitivity-Type Granulomas in Mice. *Infect. Immun.* **69**, 810-815(2001).

Ueda, S., Fujiwara, N., Naka, T., Sakaguchi, I., Ozeki, Y., Yano, I., Kasama, T. & Kobayashi, K. Structure-activity relationship of mycoloyl glycolipids derived from *Rhodococcus* sp. 4306. *Microbiol Pathogenesis* **30**, 91-99(2001).

Ryll, R. R., Watanabe, K., Fujiwara, N., Takimoto, H., Hasunuma, R., Kumazawa, Y., Okada, M., & Yano, I. Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD 1d1 on murine macrophages. *Microbes Infect* **3**, 611-619(2001).

Sakai, J., Matsuzawa, S., Usui, M. & Yano, I. New diagnostic approach for ocuber tuberculosis by ELISA using cord factor as antigen. *Br. J. Ophthalmol.* **85**, 130-133 (2001).

Sakaguchi, I., Tsujimura, M., Ikeda, N., Minamoto, M., Kato, Y., Watabe, K., Yano, I., & Kaneda, K. Granulomatous tissue formation of shikon and shikonin by air pouch method. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 650-655(2001).

Iwata, M., Hotta, H., Higuchi, K., Nishiuchi, Y., Fujiwara, Y., Arakawa, T., Yano, I., & Kobayashi, K. Induction of thymic apoptosis by shiga toxin from *Escherichia coli* O157:H7 *in vivo* and *in vitro*. *Osaka City Med. J.* **47**, 11-22(2001).

Maekura, R., Okuda, Y., Nakagawa, M., Hiraga, T., Yokota, S., Ito, M., Yano, I., Kohno, H., Wada, M., Abe, C., Toyoda, T., Kishimoto, T. & Ogura, T. Clinical Evaluation of Anti-tuberculous Glycolipids (Anti-TBGL) Immuno globulin-G Antibody Assay for Rapid Serodiagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3603-3608(2001).

Ryll, R. R., Kumazawa, Y. & Yano, I. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids-a review. *Microbiol. Immunol.* **45**, 801-811(2001).

Hasunuma, R., Morita, H., Tanaka, S., Freudenberg, M. A., Galanos C. & Kumazawa, Y. Differential clearance and induction of host responses by various administered or released lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* **7**, 421-429(2001).

Mita, M., Imura, N., Kumazawa, Y. & Himeno, S. Suppressed proliferative response of spleen T cells from metallothionein null mice. *Microbiol. Immunol.* **46**, 101-107(2002).

## 7. 知的所有権の取得状況

該当なし。

---

平成13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3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10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