

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 食品添加物部
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。サルモネラのリポド A の種特異的反応には、従来エンドトキシンの活性には寄与していないとされてきた糖鎖部分が重要な役割を果たしていることを見出した。一方、エンドトキシンの種特異的反応には寄与しないとされてきた CD14 も C 末側の要求性という点で種差が存在することを発見した。昨年度の成果と合わせ、CD14、TLR4、MD-2 といった分子全てがエンドトキシンの糖鎖部分も含めた構造認識に関わり、これを識別する機構が生体に存在することが示唆された。また、*Sphingomonas* 属細菌の菌体成分であるスフィンゴ糖脂質 (GSL) はそれ自体は不活性であるが、エンドトキシントラランスおよびリポアラビノマンナンに対するクロストラランスが誘導する事、さらに受容体としては TLR4 の同じ部位で認識されているが、細胞内でのシグナル伝達が異なることを見いだした。このように、生体の細菌成分の認識には種々の蛋白による微細な機構が関与しており、この詳細な機構を解明することは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。

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ており、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 由来のものを Sigma (St. Louis, MO) より購入した。また、*E. coli* R3F653 由来、*Salmonella abortus equi* 由来、*Salmonella minnesota* Re595 由来の LPS は当研究室で調製したものをを用いた。大腸菌由来の 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て再精製した。サルモネラ由来のリピド A は *Salmonella abortus equi* 由来または *Salmonella minnesota* Re595 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。*E. coli* 型 (506)、*Salmonella* 型 (516) の化学合成活性型のリピド A は第一化学薬品よりご供与いただいた。LBP は酵母の発現系 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で発現させ、His Bind Resin (Novagen, Madison, WI) を用いて精製した。ビオチン化した LPS は再精製した *E. coli* R3F653 由来の LPS を PFP-biotin (Pierce, Rockford, IL) によりビオチン化して作成した。photoreactive LPS (SBED-LPS) は再精製した *E. coli* R3F653 由来の LPS を sulfo-SBED (Pierce, Rockford, IL) と反応させて作成した。*Sphingomonas* 属細菌より単離した GSL-4A および GSL-4B は川原一芳博士 (北里研究所) より分与された。

フェノール画分 (PEX) の調製：*Escherichia coli* (*E. coli*) O111:B4 由来の LPS を、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、そのフェノール画分を 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 PEX 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。CD14 の変異体プラスミドは PCR により作成した。得られたプラスミドの塩基配列は dye terminator cycle sequencing 法により確認した。

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 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 μ g とコントロールプラスミド pRL-TK

(Promega, Madison, WI) 0.05 μg をトランスフェクトした。THP-1 細胞 (2×10^6) 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 μl を用い、各発現プラスミド、および、pELAM-1 1 μg と pRL-TK 0.1 μg をトランスフェクトした。RAW264 細胞 (3.5×10^5) は 6 穴プレートに播き、18 時間後に FuGene 3 μl を用い、各発現プラスミド、および、pELAM-1 0.5 μg と pRL-TK 0.5 μg をトランスフェクトした。それぞれの細胞は、24 時間後、Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を用い、ルシフェラーゼ活性を測定した。

マウス：雌性 10 週令 BALB/c マウスを使用した。

マクロファージ：マクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞およびチオグリコレートで誘導した PEC を BALB/c マウスから採取し実験に用いた。

試料による刺激：各 10 μg の GSL-4A および GSL-4B をエタノール/ドデカン (98 : 2) に溶解し、96 穴プレートに分注した。一晚静置し溶媒を揮発させることにより試料をプレートに固相化した。細胞浮遊液 (PEC: $5 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ 、RAW: $4 \times 10^5/100 \mu\text{l}$) を固相化プレートの各穴に分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターで 2 時間培養した。*Salmonella abortus equi* 由来の LPS および *Mycobacterium tuberculosis* Aoyama B 株由来の LAM も用いた。被験試料の上清を回収し、TNF- α の測定を行うまで -20 $^{\circ}\text{C}$ に保存した。

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 LD₅₀ を算出し、試料の希釈倍率から培養上清中の TNF- α の濃度を算出した。

トレランスの誘導：PEC を GSL (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) または LPS (20 ng/well) と共に 24 時間培養した後、LPS (20 ng/well) または LAM (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) で再刺激し、上清を回収して TNF- α 量を測定した。

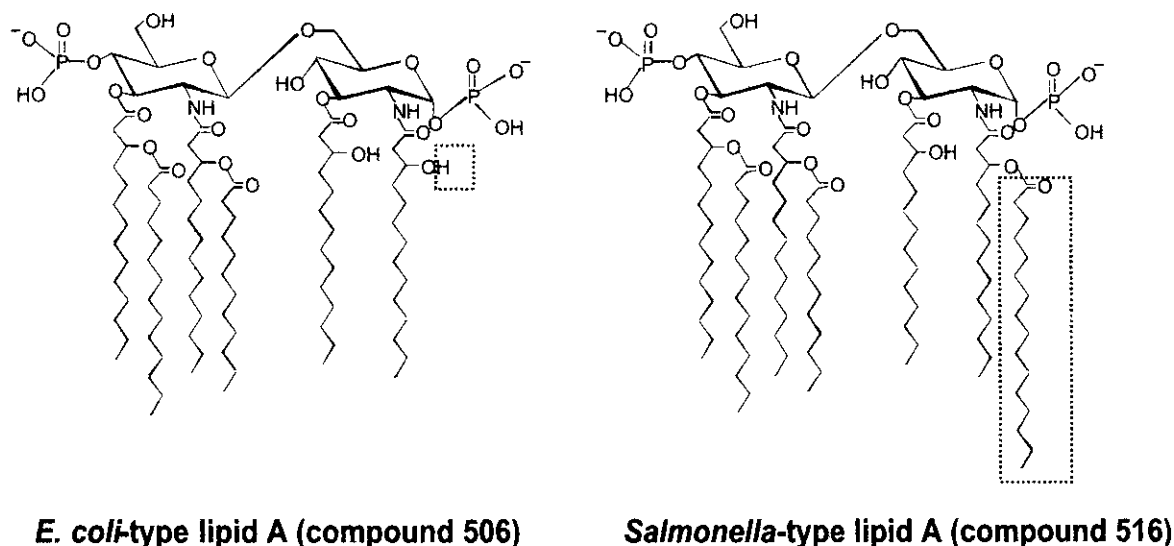


Fig. 1. Chemical structures of lipid A molecules.

3. 研究成果

サルモネラ LPS の活性発現における多糖部分の重要性：サルモネラの LPS が活性を有することは古くから知られている。LPS とリポド A では多糖があるかないかだけの違いだが、LPS の活性中心は多糖ではなくリポド A 部分にあるというのが定説となっている。本研究ではサルモネラリポド A がヒト細胞で活性を示さなかったことから、サルモネラ LPS の多糖部分の重要性について検討した。THP-1 細胞およびヒトの CD14/TLR4/MD-2 を発現させた 293 細胞では、大腸菌の LPS から多糖部分を除いたリポド A でも LPS と同等の活性を示すにも関わらず (Fig. 2B, Fig. 3B)、サルモネラ LPS から多糖部分を除いたリポド A は活性が 1000 倍以上低下した (Fig. 2A, Fig. 3A)。一方、RAW264 細胞およびマウスの CD14/TLR4/MD-2 を発現させた 293 細胞では、大腸菌の LPS、リポド A、およびサルモネラ LPS

がほぼ同等の活性を示し、サルモネラリポド A の活性はこれらに比べ 10 倍程度弱いものの依然として強い活性を示した (Fig. 2B, D, Fig. 3B, D)。また、2 分子の糖がリポド A に結合したサルモネラの Re 変異株由来の LPS は THP-1 細胞、および、ヒトまたはマウスの CD14/TLR4/MD-2 を発現させた 293 細胞のいずれにおいても強い活性を示したが、そのリポド A はほとんど活性を示さなかった (Fig. 4)。大腸菌型およびサルモネラ型の化学合成リポド A (506、516) でも天然由来のリポド A と同様の結果が得られた。以上より、サルモネラの LPS では、ヒトの TLR4 を介する NF- κ B の活性化に糖鎖部分が不可欠であることを明らかにした。

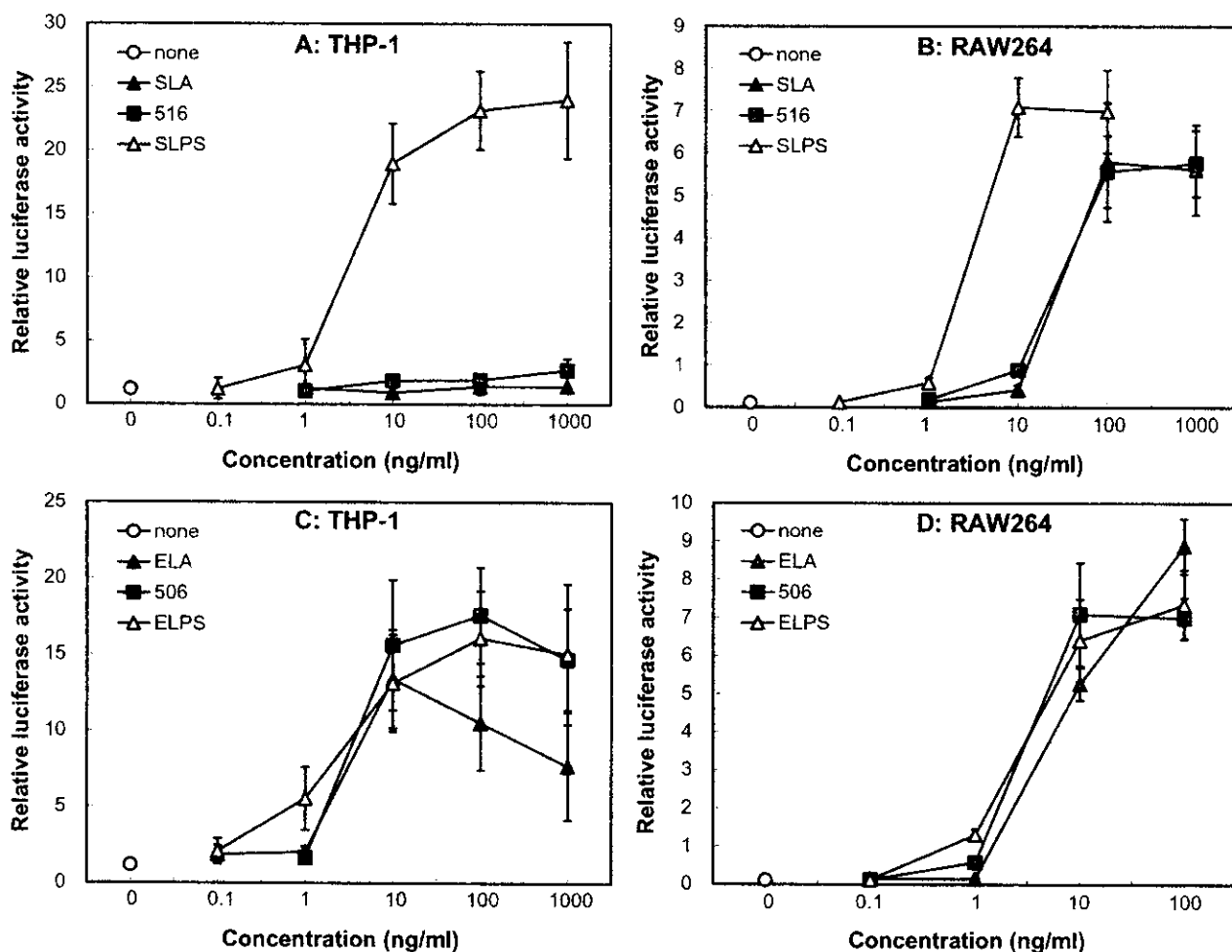


Fig. 2. Loss of the polysaccharide structure greatly reduces the activity of *Salmonella* lipid A in human macrophage cells.

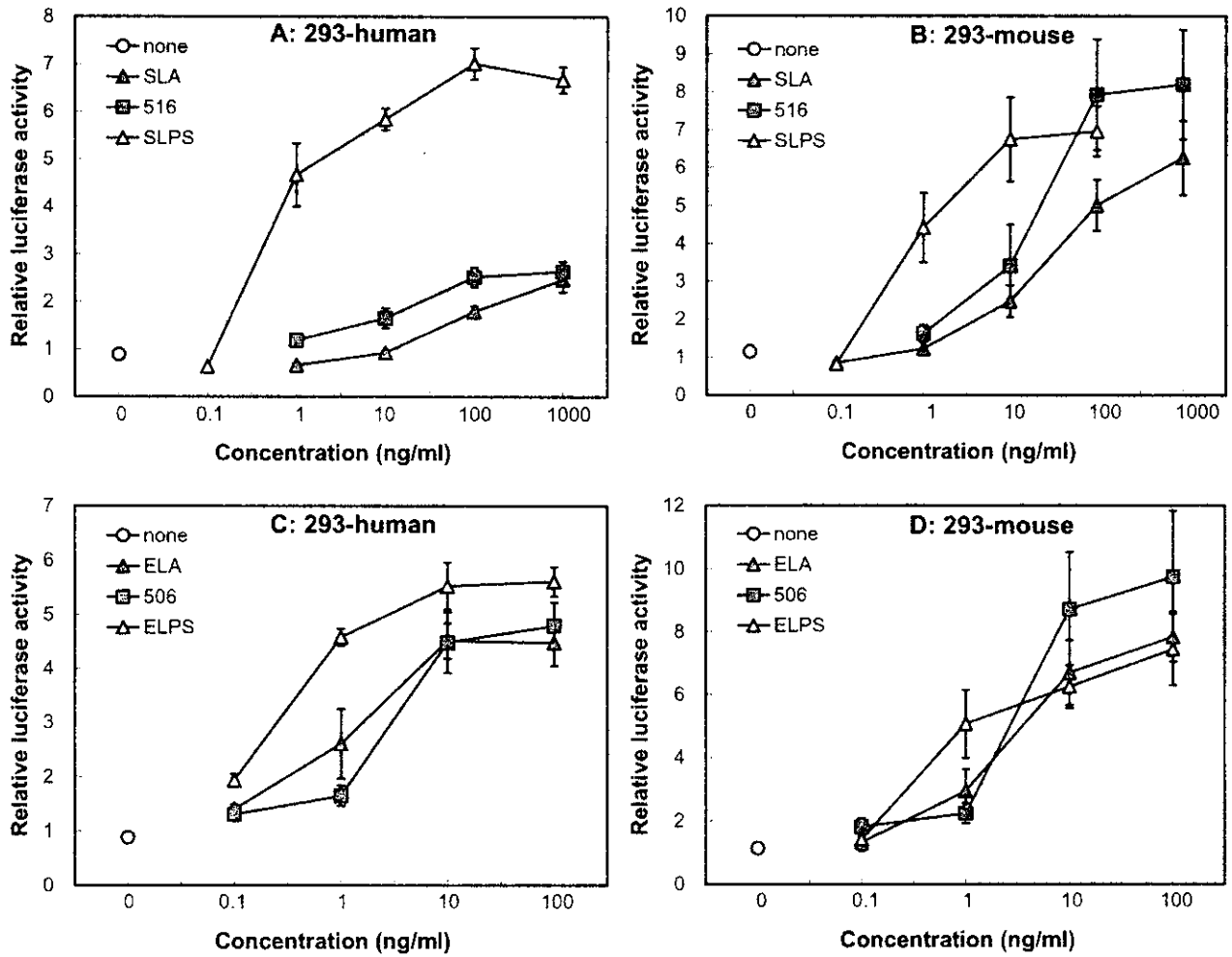


Fig. 3. Loss of the polysaccharide structure greatly reduces the activity of *Salmonella* lipid A in 293 cells expressing human CD14/TLR4/MD-2.

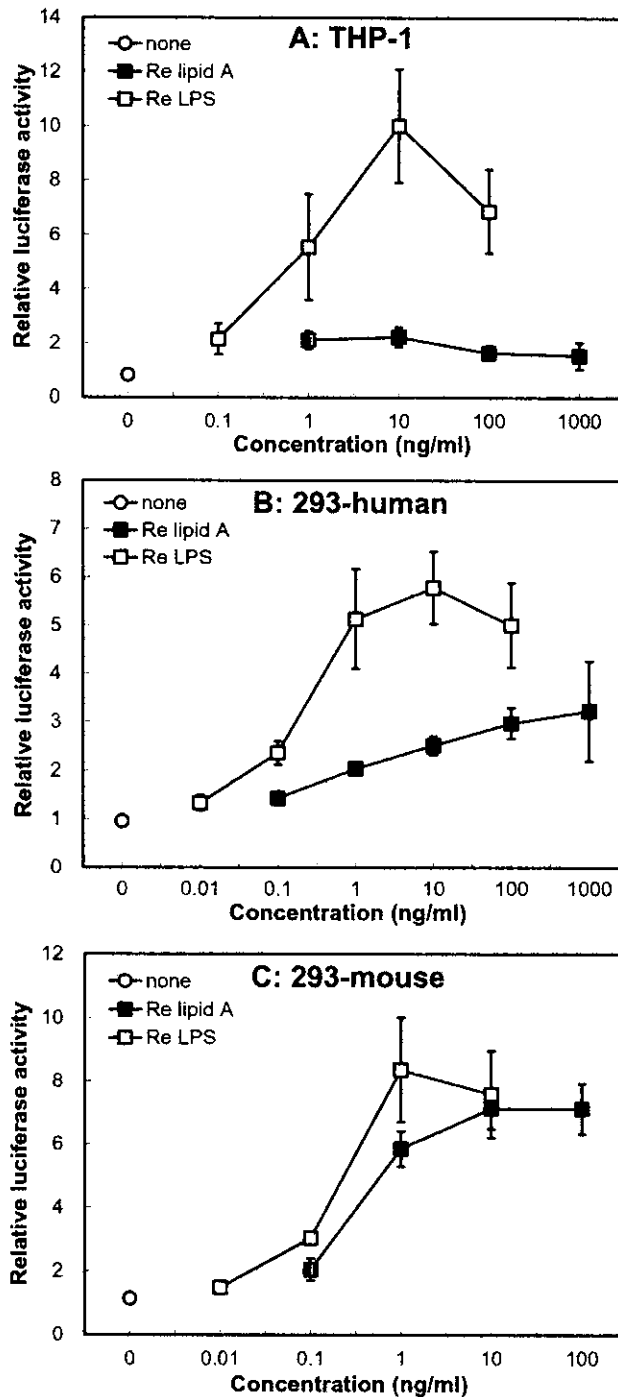


Fig. 4. Presence of only a disaccharide is sufficient to increase the activity of *Salmonella* lipid A in differentiated THP-1 cells and 293 cells expressing human CD14/TLR4/MD-2.

LPS のシグナル伝達における CD14 の動物種差：サルモネラリポド A の動物種特異的反応には MD-2 が関与していたが、LPS のシグナル伝達における CD14 の動物種差については検討されていない。CD14 は種々の菌体成分を認識し、そのシグナルを TLR4 や TLR2 といった分子に伝達する重要な役割を果たしている。しかし、CD14 が異なる菌体成分を識別し、そのシグナルを TLR4 または TLR2 に分別する機構は明らかにされていない。そこで、TLR4 と TLR2 を介する NF- κ B の活性化に必要なマウス CD14 分子の機能的部位を探索した。マウス由来の TLR4/MD-2 または TLR2 を発現させた 293 細胞にさらに

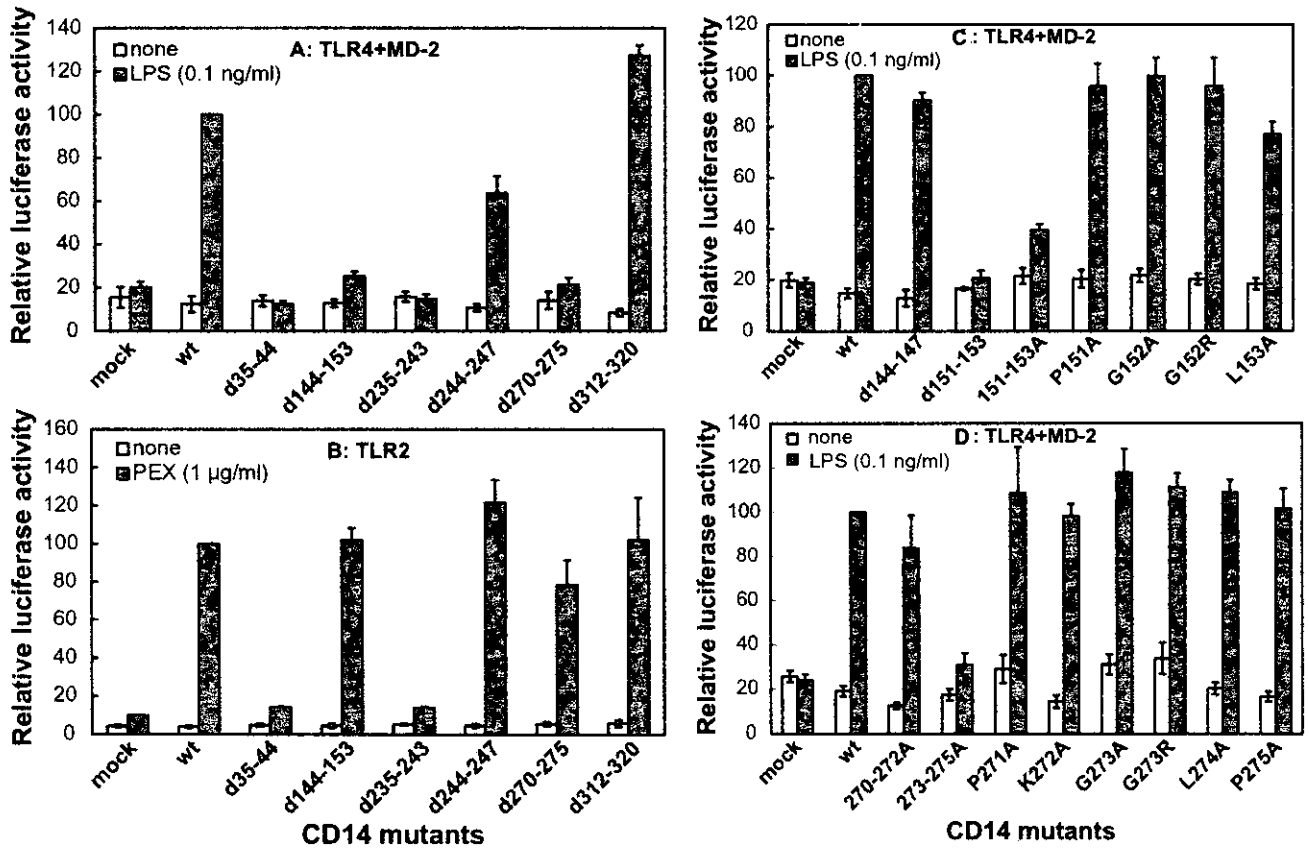


Fig. 5. Effect of CD14 mutants on TLR4/MD-2- and TLR2-mediated activation of NF- κ B in 293 cells.

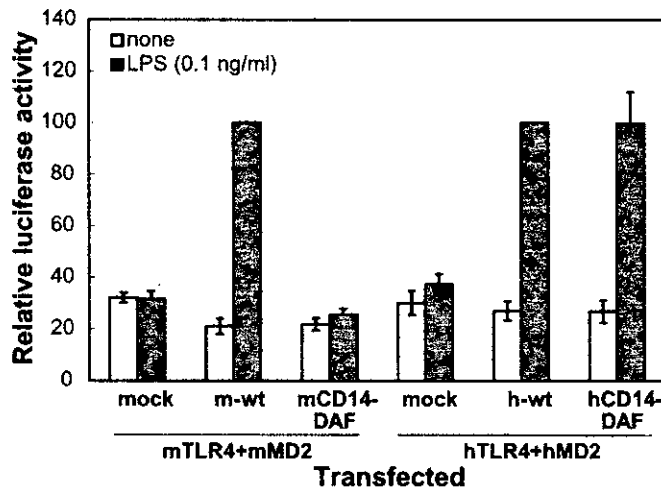


Fig. 6. Species-difference in CD14 molecules.

マウス由来の野生型 CD14 を発現させると、LPS または LPS のフェノール画分 (PEX) 刺激による NF- κ B 依存性のレポーター活性が増強される。野生型の代わりに 35-44、144-153、235-243、270-275 のアミノ酸をそれぞれ欠失した CD14 欠失変異体 (d35-44、d144-153、d235-243、d270-275) を発現させると TLR4/MD-2 を発現させた 293 細胞での増強作用を示さなくなった。TLR2 を発現させた 293 細胞でも d35-44 と d235-243 は増強作用を示さなかったが、d144-153 と d270-275 は野生型と同等な活性を示した (Fig. 5)。TLR4/MD-2 を介する活性化における CD14 の 144-153 または 270-275 のアミノ酸の役割を

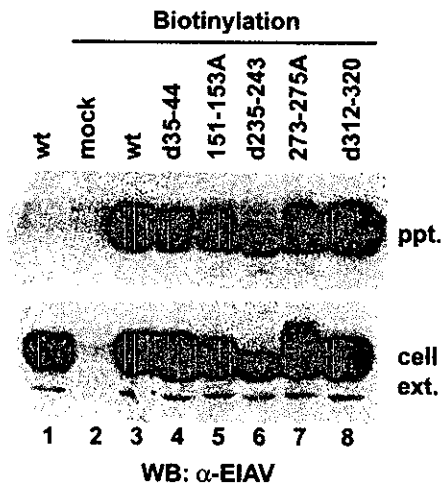


Fig. 7. Cell-surface expression of CD14 mutants.

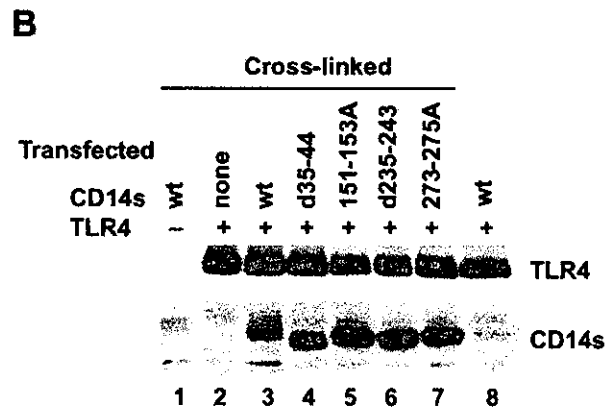
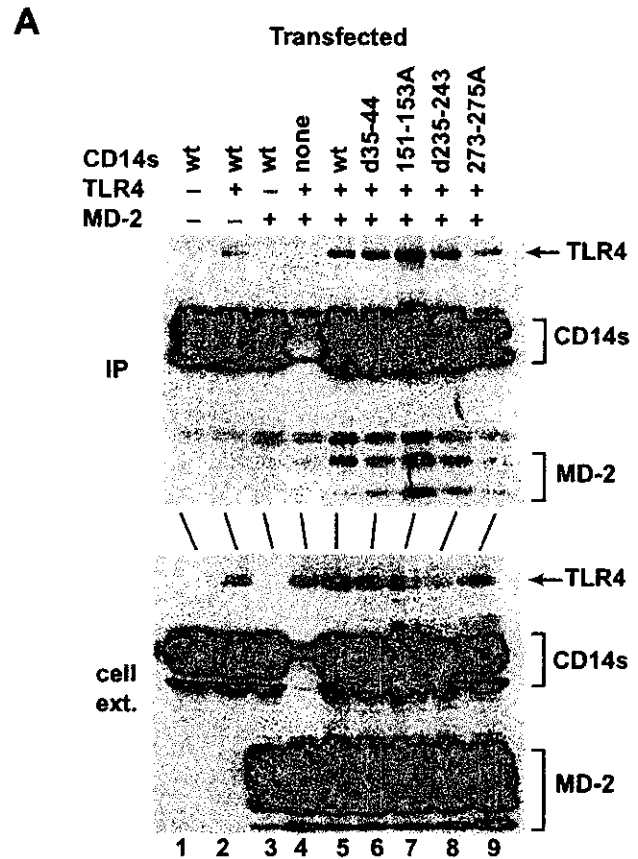


Fig. 8. Association of CD14 mutants with TLR4.

さらに詳細に検討すると、d144-147は野生型と同等な活性を示すが、d151-153では活性が全く見られなかった。151から153のアミノ酸を全てアラニンに置換した変異体(151-153A)でもほとんど活性を示さなかったが、151から153のアミノ酸をそれぞれアラニンに置換した点変異体では野生型と同等な効果が見られた。一方、270から272までをアラニンに置換した変異体は野生型と同等な活性を示したが、273から275をアラニンに置換した変異体(273-275A)には活性が見られなかった。しかし273から275までのアミノ酸をそれぞれアラニンに置換した点変異体は野生型と同等な活性を示した(Fig. 6)。ヒト由来のCD14は151以降のアミノ酸を欠失しても野生型と同等なTLR4/MD-2を介する活性を有するにもかかわらず、マウス由来のCD14は151以降のアミノ酸を欠失すると活性が消失した(Fig. 7)。d35-44、151-153A、d235-243および273-275Aの細胞膜上への発現能(Fig. 8)およびTLR4との結合能(Fig. 9)は野生型と同等であった。これらの変異体のTLR4/MD-2へのシグナル伝達能はphotoreactiveなLPSのCD14変異体、TLR4、MD-2への結合能と平行した(Fig. 10)。以上より、ヒトとマウスのCD14ではLPSのシグナル伝達においてC末側の要求性という点で異なっていること、さらに、TLR4/MD-2またはTLR2を介するNF- κ Bの活性化にはマウスCD14の異なる領域が必要であり、35-44、151-153、235-243および273-275のアミノ酸がLPSとの結合およびTLR4/MD-2へのLPSの受け渡しに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

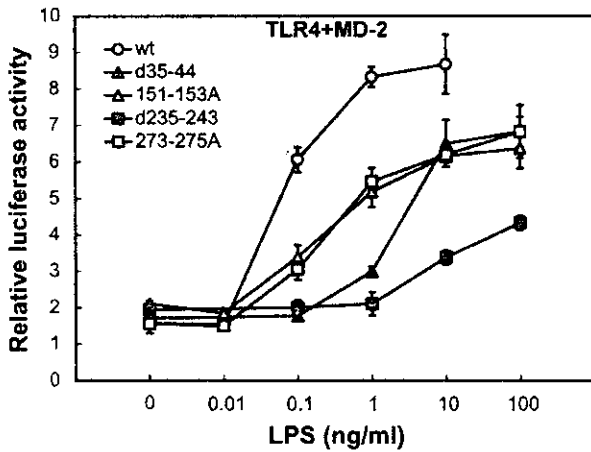
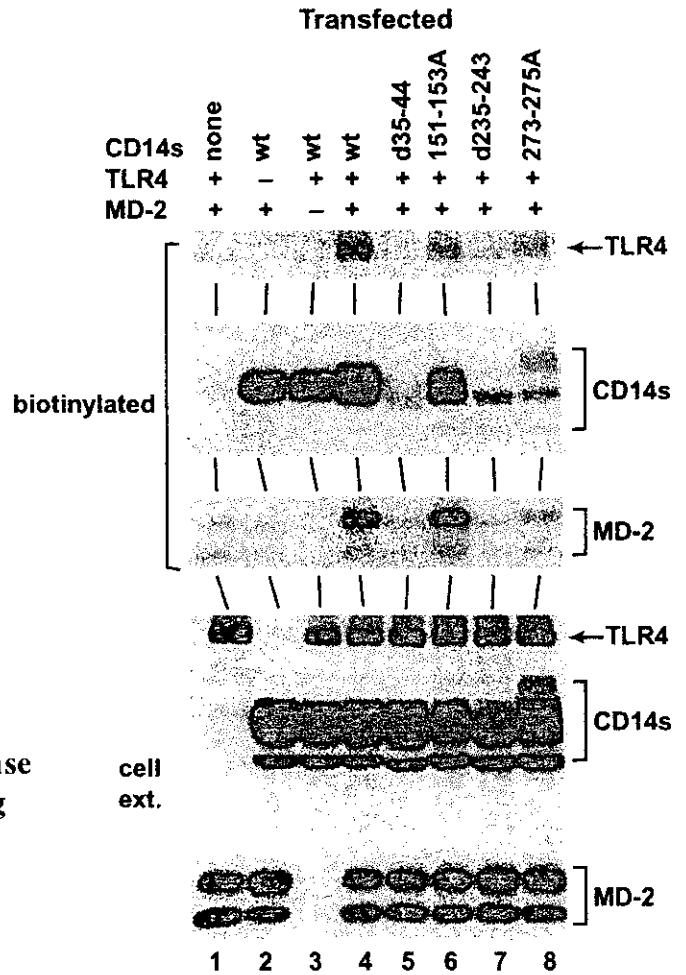


Fig. 9 Comparison between LPS-response and LPS-binding in 293 cells expressing CD14 mutants and TLR4/MD-2.



GSL-4B によるマクロファージへの作用とトレランスの誘導: RAW264.7 細胞を LPS で刺激すると、TNF- α などのサイトカイン産生が誘導された。TNF- α の転写は NF- κ B の活性化により、刺激 10 分後には細胞質の I κ B が完全に分解されていた。GSL-4A は TNF- α 誘発活性をもつが、LPS と比べ活性が低いので I κ B の分解も弱かった。誘発活性を持たない GSL-4B で刺激した場合には、一過性の I κ B の分解を認めた。RAW264.7 細胞を GSL-4B 存在下で 2 時間 LPS 刺激し、培養上清中の TNF- α 量を測定したところ、LPS 単独で刺激した場合より TNF- α 産生が低かった (data not shown)。LPS の TLR4/MD2 への結合を GSL-4B が競合的に阻害していることが分かった。

マクロファージを GSL-4B で前処理することによりエンドトキシントレランスが誘導されるかについて検討した。GSL-4B の前処理により、LPS 刺激で誘導される TNF- α 産生が低下し、部分的なエンドトキシントレランスが誘導された。マクロファージを GSL-4B で前処理することによりクロストレランス誘導されるかについて検討した。GSL-4B で前処理すると、TLR2 のリガンドである LAM 刺激により誘導される TNF- α 産生が阻害された。

4. 考察

LPS の生理活性が LPS のリピド A 部分に起因することは広く受け入れられている。しかし、当研究室ではサルモネラ LPS から調製したリピド A や 516 がヒトマクロファージ細胞においてほとんど活性を示さないことを見出した。天然由来のサルモネラリピド A を用いたいくつかの実験で、サルモネラリピド A が NF- κ B を活性化するという報告がある。しかし、天然由来のサルモネラリピド A 中には大腸菌型のリピド A が多く含まれているものがあることを当研究室では見出している。大腸菌型のリピド A はヒトマクロファージ細胞でも活性を有するので、これらの報告で見られた活性はサルモネラリピド A 中の大腸菌型のリピド A に起因する可能性が考えられる。本研究で用いたサルモネラリピド A は脂肪酸分析により、大腸菌型リピド A をほとんど含んでいないことを確認しており、さらにサルモネラ型の合成リピド A もヒトマクロファージ細胞では活性を持たなかった。これらのことは、天然

由来のリピド A では見出せなかった LPS の活性発現における多糖部分の重要性を指摘するものであり、化学合成エンドトキシンの使用が必要不可欠であることを意味する。

今回、我々は3つのタイプの CD14 欠失変異体を作成した。1つはヒトの CD14 で、LPS の認識とそのシグナル伝達に重要な役割を果たしていると言われている領域（アミノ酸 35-44）を欠失したものの、2つ目は動物種間でアミノ酸配列が保存されている領域（144-153、235-243、270-275）を欠失したものの、そして3つ目は動物種間でアミノ酸配列が異なる領域（244-247、312-320）を欠失したものである。動物種間でアミノ酸配列が異なる領域を欠失した変異体は TLR2 および TLR4 を介するシグナル伝達どちらにおいても野生型と同等の反応を示した。一方、動物種間でアミノ酸配列が保存されている領域を欠失した変異体はいずれも TLR2 または TLR4 を介するシグナル伝達どちらかに必要な領域であった。これは、動物種間でアミノ酸配列が保存されている領域は CD14 の機能に重要な役割を果たしていることを意味している。LPS の認識とそのシグナル伝達に重要な役割を果たしていると言われている領域を欠失した変異体は TLR4 を介するシグナル伝達に必要な領域であっただけではなく、TLR2 を介するシグナル伝達にも必要であった。今回、我々が使用した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をすでに見出している。この物質がどのようなものかは明らかではないが、CD14 がエンドトキシンの構造的な違いを識別し、CD14 の異なるアミノ酸領域を利用して異なった TLR 分子にシグナルを分別する機構が存在することを示唆するもので興味深い。

ヒトの CD14 では、152 番目以降のアミノ酸は LPS のシグナル伝達には必要ないと報告されている。しかし今回の我々の結果はマウスの CD14 では 273-275 のアミノ酸が必要であることを示した。このことはヒトとマウスの CD14 では C 末側の要求性という点で種差が存在することを意味している。サルモネラのリピド A が動物種間で異なる反応、つまり、種特異的の反応を示すことは既に我々が報告したが、この種特異性には CD14 分子ではなく MD-2 が関与していることを見出している。一方、lipid IVa も種特異的の反応を示すことが報告されているが、こちらは TLR4 が関与することが報告されている。これらのことから、CD14、TLR4、MD-2 といった分子全てがエンドトキシンの糖鎖部分も含めた構造認識に関わり、これを識別するものと考えられる。

また本研究では GSL-4B は LPS のアンタゴニストとして働くとともにトレランスを誘導することが示唆された。現在まで、サイトカイン誘導能をもたない化合物が LPS のアンタゴニストとして働くことが数多く報告されているが、エンドトキシントレランスやクロストレランスを誘導する化合物は報告されていない。これらのトレランスは、SOCS-1 などのシグナル抑制分子の誘導によるものであることが最近明らかになりつつある。GSL-4B 刺激によるシグナル伝達機構を解析することにより、トレランス誘導の機序が解明されると考えられる。

5. まとめ

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。本研究ではエンドトキシンの動物種特異的の反応の分子機構を解析した。すなわち、サルモネラ由来のリピド A はマウス細胞では活性を有するにもかかわらずヒト細胞では不活性である。一方、サルモネラ由来の LPS はヒトでもマウスでも活性を有する。この種特異的の反応には、従来エンドトキシンの活性には寄与していないとされてきた糖鎖部分が重要な役割を果たしていることを見出した。一方、エンドトキシンの種特異的の反応には寄与しないとされてきた CD14 も C 末側の要求性という点で種差が存在することを発見した。これらのことと我々が既に報告したことから、CD14、TLR4、MD-2 といった分子全てがエンドトキシンの糖鎖部分も含めた構造認識に関わり、これを識別する機構が生体に存在することが示唆される。また、*Sphingomonas* 属細菌の菌体成分であるスフィンゴ糖脂質 (GSL) はそれ自体は不活性であるが、エンドトキシントレランスおよびリポアラビノマンナンに対するクロストレランスが誘導する事、さらに受容体としては TLR4 の同じ部位で認識されているが、細胞内でのシグナル伝達が異なることを見いだした。このように、生体の細菌成分の認識にはこれらの蛋白による微細な機構が関与しており、この詳細な機構を知ることは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

誌上発表

Takaekida, K., Kikuchi Y., Yamazaki T., Horiuchi M., Kakeya T., Shinagawa M., Takatori K., Tanimura A., Tanamoto K., Sawada J. Quantitative analysis of Prion protein by immunoblotting. J. Health Sci. 48(3),

288-291, 2002

- Kikuchi Y., Kakeya T., Yamazaki T., Takekida K., Nakamura N., Matsuda H., Takatori K., Tanimura A., Tanamoto K., Sawada J. G1-dependent prionprotein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol. Pharm. Bull.* 25(6), 728-733, 2002
- 武木田薫、菊池裕、山崎壯、掛谷知志、高鳥浩介、棚元憲一、澤田純一、谷村顕雄 ELISA による食品試料中のプリオン蛋白質検出に関する検討 *食品衛生学雑誌* 43(3), 173-177, 2002
- Muroi, M., Ohnishi, T., and Tanamoto, K.: MD-2 is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A. *Infect. Immun.*, 70, 3546-3550 (2002)
- Muroi, M., and Tanamoto, K.: Polysaccharide portion plays an indispensable role in *Salmonella* lipopolysaccharide-induced activation of NF- κ B through human Toll-like receptor 4. *Infect. Immun.*, 70, 6043-6047 (2002)
- Muroi, M., Ohnishi, T., and Tanamoto, K.: Regions of mouse CD14 molecule required for Toll-like receptor 2- and 4-mediated activations of NF- κ B. *J. Biol. Chem.*, 277, 42372-42379 (2002)
- 佐々木次雄、棚元憲一、遺伝子解析による微生物の迅速同定法 *医薬品研究*, 33(12) 763-769 (2002)
- 室井正志、棚元憲一：サルモネラリピド A の動物種特異的応答の分子機構：MD-2 の関与、エンドトキシン研究 5、pp60-66、医学図書出版 (2002)
- 大西貴弘、室井正志、棚元憲一：エンドトキシンの情報伝達における MD-2 分子上のグリコシル化の役割、エンドトキシン研究 5、pp50-55、医学図書出版 (2002)
- 棚元憲一 局方微生物試験法の現状、国際調和と将来展望 -第 1 4 改正日本薬局方を中心として- *Bokin Bobai* 31(1) 19-25, 2003
- Sakai A., Kikuchi Y., Muroi M., Masui T., Furuhashi C., Uchida E., Takatori K. & Tanamoto K.. Overexpression of NP95 mRNA by tumor promoters in the promotion phase of a two-stage BALB/3T3 cell transformation assay. *Biol. Pharm. Bull.* 26(3), 347-351, 2003.
- Ohnishi, T. Muroi M., & Tanamoto K. N-linked glycosylation critical to the Toll-like receptor 4 function require the presence of MD-2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (2003) in press
- Mita, M., N. Imura, Y. Kumazawa and S. Himeno. Suppressed proliferative response of spleen T cells from metallothionein null mice. *Microbiol. Immunol.* 46: 101-107, 2002.
- Kawaguchi, K., R. Hasunuma, S. Kikuchi, R. Ryll, K. Morikawa and Y. Kumazawa. Time- and dose-dependent effect of fosfomycin on suppression of infection-induced endotoxin shock in mice. *Biol Pharm Bull.* 25:1658-1661, 2002.
- Hasunuma, R., H. Maruyama, H. Takimoto, R. Ryll. S. Tanaka and Y. Kumazawa. Does High Mobility Group 1 Protein function as a late mediator for LPS- or TNF-induced shock in galactosamine-sensitized mice? *J. Endotoxin Res.* 8(5): 391-398, 2002.
- Andoh, A., A. Masuda, Y. Kumazawa and T. Kasajima. Serum antibody response and nasal lymphoid tissue (NALT) structure in the absence of IL-4 and IFN- γ . *Cytokine* 20 (3): 107-112, 2002.
- S.Kitada, R.Maekura, N.Toyosima, N.Fujiwara, I.Yano, T.Ogura, M.Ito and K.Kobayasi ; Serodiagnosis of pulmonary disease due to mycobacterium avium complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptid lipid antigens; *Clin. Infect. Dis.* 35, 1328-1335, 2002
- 藤田由希子、矢野郁也；肺結核－抗抗酸菌抗体(感染症関連の新しい検査)；*総合臨床*2003,52(1):135-142
- Axonal transport of puromycin-sensitive aminopeptidase in rat sciatic nerves, M. Yamamoto, T. Chikuma, R. Yajima, H. Hirano, Y. Yamamoto, K. Nishi, I. Ohkubo, and T. Kato, *Neurosci. Res.* 42, 133-140, 2002.
- Production of interleukin-6 and its implication in rats after subcutaneous injection of carbon tetrachloride, H. Hojo, T. Kasakura, R. Zuinen, M. Aoki, M. Yamaguchi, T. Chikuma, and M. Sato, *J. Health Sci.* 48, 134-139, 2002.
- Fluorimetric assay for measuring Dns-His-Lys-Arg-His-Lys cleaving enzyme using high-performance liquid chromatography, T. Chikuma, Y. Shimabukuro, T. Iguchi, A. Tanaka, K. Taguchi, T. Kato, M. Yamaguchi, and H. Hojo, *Anal. Chim. Acta*, 457, 157-164, 2002.
- Effect of monensin on the levels of tachykinins and their processing enzyme activity in rat dorsal root ganglia, T. Chikuma, Y. Inomata, K. Tsuchida, H. Hojo, and T. Kato, *Neurosci. Lett.* 326, 89-92, 2002.
- Degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by acetylacetic chloromethyl ketone in U937 cells, M. Yamaguchi, Y. Tsuchiya, T. Chikuma, and H. Hojo, *Biochem. Pharmacol.* 63, 1857-1862,

2002.

7. 知的所有権の取得状況
該当なし。