

平成15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

# 目 次

## 第3分野

### 課題番号

20030917A KH31028	非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価	吉岡澄江 …… 1
918A KH31029	ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発	能美健彦 …… 10
919A KH31030	バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発	川崎ナナ …… 18
920A KH31031	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	棚元憲一 …… 27
921A KH31032	動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究	大野泰雄 …… 33
922A KH31033	医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発	藤本純一郎 …… 43
923A KH31034	創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立	井上 達 …… 48
924A KH31035	新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究	合田幸広 …… 58
925A KH31036	医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究	頭金正博 …… 67
926A KH31037	多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発	山崎利雄 …… 74
927A KH31038	食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立	山本茂貴 …… 83
928A KH32081	DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究	阿曾幸男 …… 90

## 第4分野

929A KH41039	ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立	小熊恵二 …… 97
930A KH41040	小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究	奥山虎之 …… 101
931A KH42074	熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究	名和行文 …… 105
932A KH42075	新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究	山崎俊夫 …… 115

## 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 食品添加物部  
研究者 棚元憲一

**研究要旨** MD-2はエンドトキシン認識に加えTLR4の機能発現にも必須であることを明らかにした。また、ヒトのCD14、TLR2、TLR4、MD-2といった分子を連結したキメラプラスミドを細胞に導入することでヒトでの活性を正しく反映した菌体成分検出系を構築し得ることを示した。

### 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
- (2) 和光純薬工業(株)大阪研究所 高岡文
- (3) 生化学工業(株)・機能化学品事業部 田中重則
- (4) 日本BCG製造(株)中央研究所 矢野郁也
- (5) 日本電子照射サービス(株) 山瀬 豊
- (6) 北里大学理学部・生体防御学 熊沢義雄
- (7) 昭和薬科大学衛生化学 知久馬敏幸

### A. 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ている。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臨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お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。

本研究は、ヒトにおける菌体成分の認識機構を解析し、ヒトにおける毒性を反映した正当な菌体成分検出法、試験法を開発することを目的とした。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。

### B. 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、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酢酸ナトリウム(pH4)を最終濃度0.3M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。細胞膜非透過性のビオチン化試薬sulfo-NHS-LC-LC-biotinはPierce (Rockford, IL)より、PNGase FはNew England BioLabs (Beverly, MA)より購入した。

**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 (RAW 264)、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 シーケ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、このクローンシーケンスの 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、RAW 264 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。各種変異体プラスミドおよびキメラプラスミドは PCR により作成した。

**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。24 時間後、Dual-Luciferase<sup>TM</sup> Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を用い、ルシフェラーゼ活性を測定した。

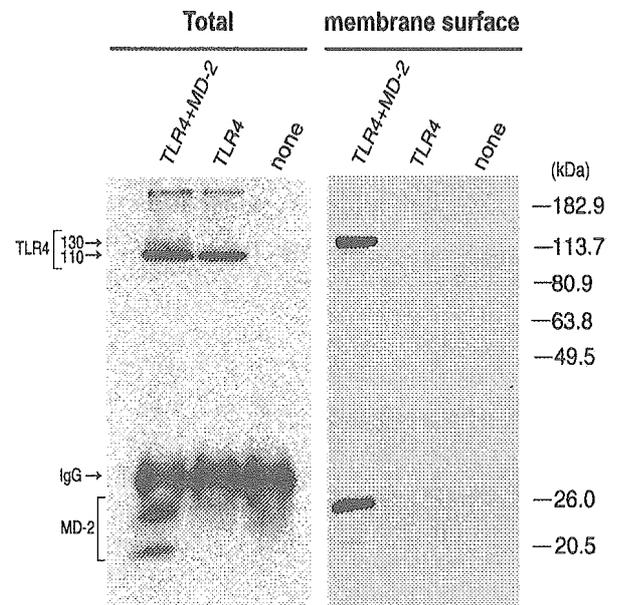
**Western Blotting :** 各種細胞抽出液を SDS-polyacrylamide gel 電気泳動により分離し、セミドライトランスファーユニットを用いて PVDF membrane (Millipore Corp., Bedford, MA) に転写した後、5% nonfat dry milk を含む TBST (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.2% Tween 20, pH 7.5) でブロックした。引き続き、1 次抗体で 30 分間処理し、TBST で洗浄後、2 次抗体で 30 分間処理した。TBST で洗浄後、ECL 試薬 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) を用いて検出した。

(倫理面への配慮)

国立医薬品食品衛生研究所の「研究倫理審査委員会」、「動物倫理委員会」および「バイオセーフティ委員会」の定める規則に則り研究を遂行した。

### C. 研究結果

**TLR4 の機能発現に及ぼす MD-2 の役割 :** 我々は既にマクロファージにおけるエンドトキシンの認識には CD14、TLR4、MD-2 といった分子が不可欠であることを見出し



**Fig. 1.** MD-2 存在下では細胞膜上に発現する電気泳動上の移動度の遅い TLR4 が出現する。293 細胞に TLR4 あるいは TLR4 と MD-2 を発現させ、細胞膜表面の蛋白を細胞膜非透過性のビオチン化試薬でビオチン化し、細胞抽出液 (Total) あるいはビオチン化された蛋白中 (membrane surface) の TLR4 と MD-2 を検出した。

ている。CD14 はエンドトキシンの認識に寄与し、TLR4 はエンドトキシンのシグナルを細胞内に伝達する役割を果たし、MD-2 はエンドトキシンの微細構造の識別に関与することを報告した。そこで本研究では MD-2 の役割についてさらに詳細に検討した。

TLR4 と MD-2 を 293 細胞に発現させると TLR4 は SDS-PAGE 上で移動度の異なる 2 本のバンドとして検出されるが、TLR4 だけを発現させると 1 本のバンドしか検出できなかった (Fig. 1、左)。TLR4 は細胞膜表面に発現して機能を発揮するので、細胞膜表面の TLR4 を細胞膜非透過性のビオチン化試薬を用いて検出すると、TLR4 だけを発現させた場合はほとんど膜表面に TLR4 が検出されないが、TLR4 と MD-2 を一緒に発現させると膜表面に TLR4 が検出され、この移動度は上述の移動度の遅いバンドに相当した (Fig. 1、右)。このことは、TLR4 が MD-2 の存在により電気泳動上の移動度に影響を与える種の修飾を受け、その修飾を受けた TLR4 が細胞膜表面に移行するというを意味する。

上記の TLR4 の修飾が何に起因するのかを知るため、TLR4 と MD-2 を発現させた 293 細胞の細胞抽出液を脱リン酸化酵素 (CIP) で処理したが TLR4 の移動度に変化は見られず (Fig. 2、左)、脱グリコシル化酵素 (PNGaseF) で処理すると元の TLR4 よりさらに移動度の速い 1 本のバンドに収束した (Fig. 2、右)。このことは MD-2 存在下における TLR4 の移動度の変化はグリコシル化によるものであることを示唆する。

TLR4 にはグリコシル化され得るアスパラギン残基が

数箇所存在する。そこで、これらのアスパラギン残基を置換し、MD-2 存在下での移動度の変化が起きるかどうかが検討した。526、575 番目のアスパラギンをグルタミンに置換すると MD-2 存在下にもかかわらず TLR4 の移動度の変化は見られなくなったが、497 番目を置換しても移動度の変化は観察された (Fig. 3)。このことは、上記の PNGaseF の結果と合わせ、MD-2 存在下により TLR4 の 526 と 575 番目のアスパラギンのそれぞれ、または、両者がグリコシル化され、移動度の変化を来すことを意味する。

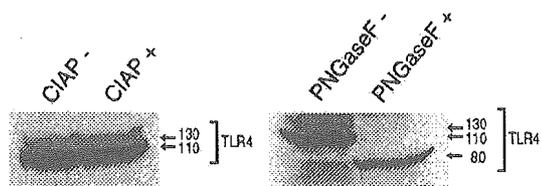


Fig. 2. 移動度の遅い TLR4 は脱グリコシル化により消失する。293 細胞に TLR4 と MD-2 を発現させ、細胞抽出液を脱リン酸化酵素 (CIAP) または脱グリコシル化酵素 (PNGaseF) で処理し、TLR4 と MD-2 を Western blotting により検出した。

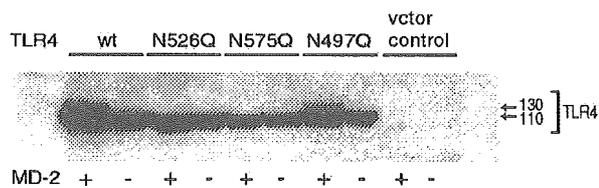


Fig. 3. 526 と 575 番目のアスパラギンが TLR4 の移動度の違いに寄与する。293 細胞に各種 TLR4 変異体と MD-2 を発現させ、TLR4 を Western blotting により検出した。

526 と 575 番目のアスパラギンのグリコシル化が TLR4 の細胞膜表面への移行に関係するのかどうかを知るため、細胞膜表面の蛋白をビオチン化して TLR4 を検出すると、N526Q、N575Q の両変異体とも細胞膜表面には移行せず、

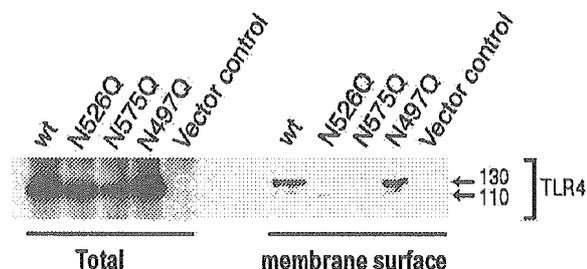


Fig. 4. 526 と 575 番目のアスパラギンが TLR4 の細胞膜表面への発現に寄与する。293 細胞に各種 TLR4 変異体と MD-2 を発現させ、細胞膜表面の蛋白を細胞膜非透過性のビオチン化試薬でビオチン化し、細胞抽出液 (Total) あるいはビオチン化された蛋白中 (membrane surface) の、TLR4 と MD-2 を Western blotting により検出した。

移動度の遅いバンドが検出された N497Q 変異体は膜表面に移行した (Fig. 4)。このことは 526 と 575 番目のアスパラギンがグリコシル化されることにより TLR4 が細胞膜表面に移行できるようになることを示している。

MD-2 が共存することで TLR4 の 526 と 575 番目のアスパラギンがグリコシル化され細胞膜表面に移行することは上述したが、これらのグリコシル化には MD-2 が TLR4 と結合することが必要なのかどうかを知るため、TLR4 と His タグを付加した MD-2 を発現させ、ニッケルカラムで MD-2 を沈殿させたときに MD-2 に各種 TLR4 変異体が結合して共沈するかどうかを検討すると、N526Q、N575Q および N497Q のいずれの変異体も MD-2 と結合することが明らかとなった (Fig. 5)。このことは 526 と 575 番目のアスパラギンのグリコシル化には MD-2 の存在が必須であるが、TLR4 と MD-2 の結合だけでは十分でないことを示している。

以上より、MD-2 は TLR4 が細胞膜表面に移行して機能

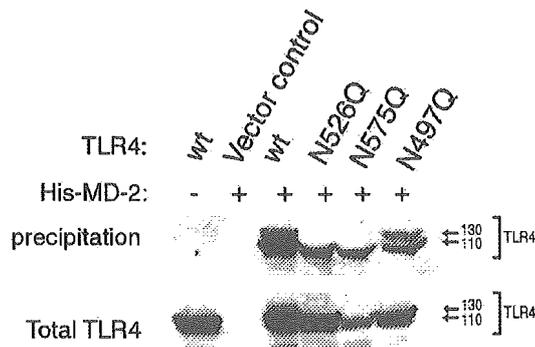


Fig. 5. 526 と 575 番目のアスパラギンを置換した TLR4 は MD-2 と結合する能力を保持している。293 細胞に各種 TLR4 変異体と His タグ MD-2 を発現させ、細胞抽出液 (Total) または Ni カラムの吸着物 (precipitation) 中の TLR4 を Western blotting により検出した。

を発揮するために必須であることを見出した。

ヒトにおける活性を反映した菌体成分検出系の作成: これまでの研究でヒト細胞では CD14、TLR2、TLR4、MD-2 といった分子を巧妙に使い分けることにより異なる菌体成分を識別していることを示してきた。このことから、これらの分子を組み合わせて菌体成分に非感受性の細胞に発現させることができればヒトにおける菌体成分の活性を正しく検出できるはずである。しかし、複数の蛋白を同時に発現する安定発現株を樹立することは困難が予想されるため、複数の分子を結合し、1つの分子として発現させる方法を試みた。

293 細胞はさまざまな菌体成分に非感受性であることが知られている。そこで 293 細胞に MD-2 と TLR4 を結合させた蛋白 (hMD-2/TLR4) を発現させると LPS に応

答するものの、CD14、TLR4、MD-2をそれぞれ個々に発現させた場合に比べ応答性が低かった (Fig. 6)。これはMD-2とTLR4を直接連結させたため両者の立体的配位がうまくいかないのではと考え、両者間に柔軟性を持たせるためのスペーサーを導入したキメラプラスミド (hMD-2/TLR4G) を作成しLPSの応答性を検討すると、CD14、TLR4、MD-2をそれぞれ個々に発現させた場合に比べやや応答性に劣るものの、hMD-2/TLR4Gでは十分な応答性が見られることが明らかになった (Fig. 7)。

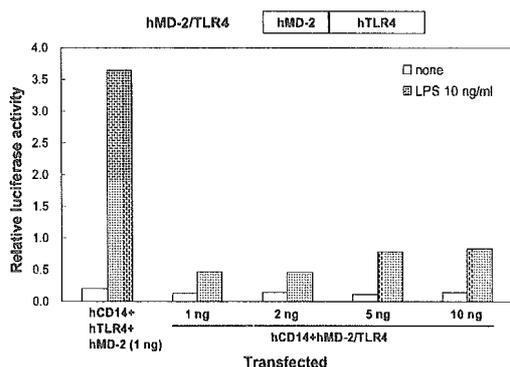


Fig. 6. キメラ蛋白のエンドトキシン応答性。293 細胞に CD14、TLR4、MD-2 それぞれ、もしくは MD-2 と TLR4 を連結した蛋白 (hMD-2/TLR4) を発現させ、NF- $\kappa$ B 依存性のレポーター活性を測定した。

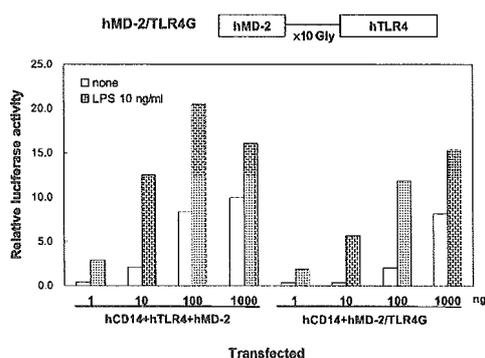


Fig. 7. キメラ蛋白のエンドトキシン応答性。293 細胞に CD14、TLR4、MD-2 それぞれ、もしくは これらを連結した蛋白 (hMD-2/TLR4G) を発現させ、NF- $\kappa$ B 依存性のレポーター活性を測定した。

次に CD14 と TLR4 を連結したキメラ蛋白について検討した。このキメラ蛋白 (hCD14/TLR4) も MD-2 とともに発現させると CD14、TLR4、MD-2 をそれぞれ個々に

発現させた場合に比べやや応答性に劣るものの LPS に応答した (Fig. 8)。そこで、CD14、TLR4、MD-2 の 3 つ

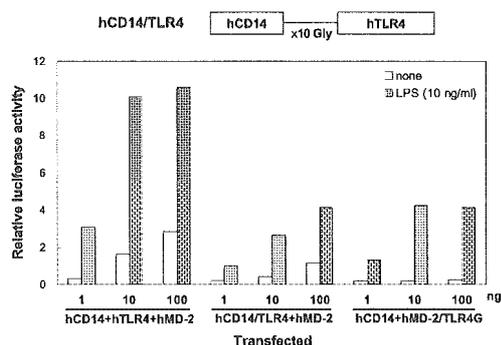


Fig. 8. キメラ蛋白のエンドトキシン応答性。293 細胞に CD14、TLR4、MD-2 それぞれ、CD14 と TLR4 (hCD14/TLR4) もしくは MD-2 と TLR4 (hMD-2/TLR4) を連結した蛋白を発現させ、NF- $\kappa$ B 依存性のレポーター活性を測定した。

の蛋白を連結したキメラ蛋白 (CMT) について検討した。CD14 と MD-2 の間のスペーサーをグリシン 10 個から 30 個までの長さのものについて検討したが、LPS によるレポーター活性の上昇は見られなかった (Fig. 9)。

#### D. 考察

代表的な菌体成分の一つである LPS の認識には CD14、TLR4、MD-2 といった 3 つの蛋白が必要である。このうちの MD-2 についてはある種の lipid A の構造識別に関与していることを我々は報告してきた。今回我々は MD-2 を TLR4 とともに発現させると電気泳動上で移動度の遅い TLR4 が出現することを見出し、この移動度の遅い TLR4 は脱グリコシル化酵素処理、または、TLR4 の 526

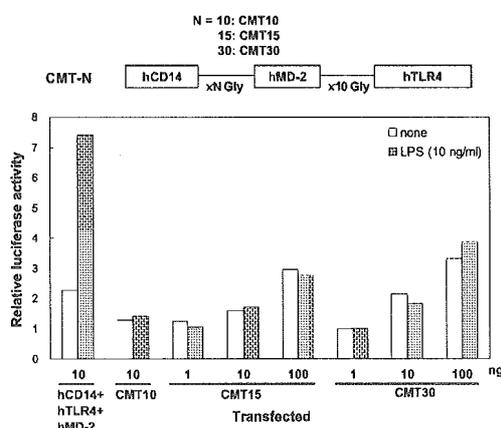


Fig. 9. キメラ蛋白のエンドトキシン応答性。293 細胞に CD14、TLR4、MD-2 それぞれ、もしくは これらを連結した蛋白 (CMT) を発現させ、NF- $\kappa$ B 依存性のレポーター活性を測定した。

と 575 番目のアスパラギンをグルタミンに置換してやることにより消失すること、さらに、この移動度の遅い TLR4 が主に細胞膜表面に発現することを見出した。これらのことは、TLR4 が細胞膜表面に移行するためには 526 と 575 番目のアスパラギンがグリコシル化される必要があり、このグリコシル化には MD-2 の存在が必須であることを意味している。我々はまた、TLR4 の 526 と 575 番目のアスパラギンをグルタミンに置換した変異体が TLR4 と結合する能力を保持していることも見出しており、このことは、TLR4 の 526 と 575 番目のグリコシル化は MD-2 が TLR4 に結合することだけでは不十分であることを示す。結合以外に何が必要なのかについては今後の問題であるが、MD-2 は lipid A の認識以外にも TLR4 が細胞膜表面に移行し機能するためにも必須なものであることを見出した。

我々は、ヒト細胞で CD14、TLR2、TLR4、MD-2 といった分子を巧妙に使い分けることにより異なる菌体成分を識別していることを示してきた。このことは、これらの分子を使い分けることで個々の菌体成分に固有の検出系を構築できる可能性を示している。その手始めとして、本研究では、代表的な菌体成分であるエンドトキシンを検出系の作成を試みた。エンドトキシンの認識には CD14、TLR4、MD-2 といった 3 種の蛋白が必要であり、菌体成分の中でも最も複雑な認識機構と言える。菌体成分に非感受性の細胞にこれら 3 つの分子を安定的に発現させることができればエンドトキシンの検出が可能となるが、3 種の蛋白の遺伝子を別々に細胞の染色体上に取り込ませたのではいずれかの遺伝子が脱落する確立が増し、安定発現細胞株の品質維持が困難と考えられる。そこで本研究では CD14、TLR4、MD-2 の 3 つの蛋白を連結したキメラ蛋白をコードする遺伝子を作成した。MD-2 と TLR4、または CD14 と TLR4 を連結したキメラ蛋白はやや感度が劣るもののエンドトキシンに応答することが判明した。このことはキメラ蛋白の遺伝子を用いた菌体成分検出系の構築に可能性を与えるものである。しかし、3 つの蛋白を連結したキメラ蛋白は今のところエンドトキシンの応答を示すコンストラクトは得られていない。これは、各蛋白間のスペーサー間隔が短く本来の立体配座が取れないのか、それとも、本来、これらの蛋白は別個に存在しなければならないのかは不明である。この問題は各蛋白間のスペーサー間隔を十分に長くしたコンストラクト、もしくは、各蛋白間に内因性の蛋白切断酵素の認識配列を組み込んだコンストラクトを作成することにより解決するものと思われる。

## E. 結論

本研究では菌体成分の認識機構を解析し、ある種の菌体成分の感受性には動物種差が存在し、ヒト細胞では CD14、TLR2、TLR4、MD-2 といった分子を巧妙に使い

分けることにより異なる菌体成分を識別していることを示した。また、これらの分子を組み合わせて菌体成分非感受性の細胞に発現させることにより、それぞれの菌体成分のヒトにおける毒性を反映した検出ができる可能性を示した。この検出法の開発により、現行の試験法では見落とされ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、対策につながるものと思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ohnishi T., Muroi M., and Tanamoto K.: MD-2 is necessary for the Toll-Like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 405-410 (2003).
- Muroi M., Ohnishi T., and Tanamoto K.: Lipopolysaccharide-mimetic activities of Toll-like-receptor 2-stimulatory substance(s) contained in enterobacterial lipopolysaccharide preparations. *Infect. Immun.*, **71**, 3221-3226 (2003).
- Sakai, A., Kikuchi, Y., Muroi, M., Masui, T., Furihata, 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**, 347-351 (2003).
- 室井正志、大西貴弘、棚元憲一：Toll-like receptor を介する NF- $\kappa$ B の活性化に必須なマウス CD14 分子の機能的部位、エンドトキシン研究 6、pp136-143、医学図書出版 (2003).
- 大西貴弘、室井正志、棚元憲一：Toll-like receptor 4 の膜発現に重要な N-グリコシル化における MD-2 の役割、エンドトキシン研究 6、pp31-35、医学図書出版 (2003).
- Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H., Ikeda, H.: Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Therapeut.*, **100**, 171-194 (2003).
- Maekura R., Kohno H., Hirofumi A., Okura Y., Ito M., Ogura T., and Yano I. Prospective Clinical Evaluation of the Serologic Tuberculous Glycolipid Tset in Combination with the Nucleic Acid Amplification Test. *J. Clin. Microbiol.*, **41**(3):1322-1325, 2003
- Kawashima T., Norose Y., Watanabe Y., Enomoto Y., Narazaki H., Watari E., Tanaka S., Takahashi H., Yano I.,

Brenner M.B., and Sugita M. Major CD8 T Cell Response to Live *Bacillus Calmette-Guerin* is Mediated by CD1 Molecules. *J. Immunol.*, 170:5345-5348,2003.

Minamino M., Sakaguchi I., Naka T., Ikeda N., Kato Y., Tomiyasu I., Yano I., and Kobayashi K. Bacterial Ceramides and Sphingophospholipids Induce Apoptosis of Human Leukaemic Cells. *Microbiology*,149: 2071-2081, 2003.

Naka T., Fujiwara N., Yano I., Maeda S., Doe M., Minamino M., Ikeda N., Kato Y., Watabe K., Kumazawa Y., Tomiyasu I., and Kobayashi K. Structural Analysis of Sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum* the Type Species of Genus *Sphingobacterium*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1635:83-92, 2003.

Takimoto H., Wakita D., Kawaguchi K., Kumazawa Y. Potentiation of Cytotoxic Activity in Naïve and Tumor-Bearing Mice by Oral Administration of Hot-Water Extracts from *Agaricus brazei* Fruiting Bodies. *Biol Pharm Bull.* 2004 Mar;27(3):404-6.

Kawaguchi K., Kikuchi S., Hasunuma R., Maruyama H., Ryll R., Kumazawa Y. Suppression of infection-induced endotoxin shock in mice by a citrus flavanone naringin. *Planta Med.* 2004 Jan;70(1):17-22.

Naka T., Fujiwara N., Yano I., Maeda S., Doe M., Minamino M., Ikeda N., Kato Y., Watabe K., Kumazawa Y., Tomiyasu K. Structural analysis of sphingophospholipids derived from *sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *sphingobacterium*. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Dec 30;1635(2-3):83-92.

Morikawa K., Nonaka M., Narahara M., Torii I., Kawaguchi K., Yoshikawa T., Kumazawa y., Morikawa S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.* 2003 Dec 26;74(6):709-21.

## 2. 学会発表

杉山圭一、室井正志、棚元憲一：LPSによるマクロファージ活性化に与える内分泌かく乱物質の影響、第76回日本細菌学会総会、熊本、日本細菌学雑誌、58、285 (2003).

志水美文、室井正志、棚元憲一：内毒素によるマクロファージからの一酸化窒素産生に与える内分泌かく乱化学物質の作用機序、第76回日本細菌学会総会、熊本、日本細菌学雑誌、58、286 (2003).

室井正志、大西貴弘、棚元憲一：Toll-like receptor を介するシグナル伝達に必須なマウス CD14 分子の機能的部位の解析、第76回日本細菌学会総会、熊本、日本細菌学雑誌、58、292 (2003).

大西貴弘、室井正志、棚元憲一：Toll-like receptor 4 の膜発現における MD-2 の役割、第76回日本細菌学会

総会、熊本、日本細菌学雑誌、58、293 (2003).

Muroi, M., Ohnishi, T., and Tanamoto, K.: Signal sorting by CD14 to Toll-like receptors. 第76回日本生化学会、横浜、(2003).

志水美文、室井正志、棚元憲一：内毒素によるマクロファージの一酸化窒素産生に対するアラクロールとカルバリルの抑制作用機序、第9回日本エンドトキシン研究会、盛岡、(2003).

畑尾史彦、室井正志、比企直樹、三村芳和、上西紀夫、棚元憲一：エンドトキシン活性に及ぼす Toll-like receptor 刺激薬による cross tolerance 効果、第9回日本エンドトキシン研究会、盛岡、(2003).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし。

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし。

---

平成15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16年9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