

## エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への 応用に関する研究

所属 国立感染症研究所 細胞化学部  
研究者 西島 正弘

### 研究要旨

- (1) サルモネラ菌のリピドA修飾は、感染細菌にとって宿主Toll-like receptor 4による認識から逃れやすくなる点で細菌にとって有利に働く。この修飾の一つであるリピドA脱アシル化はリピドAのアミノアラビノース修飾により抑制されている。
- (2) スフィンゴ糖脂質 GSL は TLR4/MD2 を介してマクロファージを活性化したが、リムルス活性をもたなかった。フラボノイドは、LPS 刺激を受けたマクロファージ細胞膜でのラフト集積を抑制し、シグナル伝達の下流も抑制した。フラボノイドの前投与により、エンドトキシンショックが抑制された。
- (3) アポトーシス細胞の貪食に伴って産生される IL-6 は樹状細胞を未熟な状態にとどめるのに部分的に関わることにより、自己抗原に対する応答を未然に防いでいると考えられた。

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 川崎清史  
(2) 生化学工業株式会社 明田川純  
(3) 北里大学理学部 熊沢義雄  
(4) 東邦大学理学部 小林芳郎

### A. 研究目的

注射用医薬品、生物学的製剤、及び医療用具中の発熱物質による汚染は医療安全性上重要な問題である。従来、汚染の検出にはウサギを利用した発熱試験及びその代替法としてのカプトガニ血液凝固系のエンドトキシン応答性を応用したリムルステストが利用されてきた。発熱試験は簡便性に欠け、一方リムルステストは簡便かつ高感度であるが、エンドトキシンに対する特異性、非エンドトキシン発熱物質の存在、天然資源であるカプトガニを利用することから環境保護上の問題点が長らく指摘されてきた。従って、これらの問題点を解決する新しい試験法の開発は重要な課題である。

近年、エンドトキシンによる発熱応答の原因となるリポ多糖の免疫担当細胞による認識機構は、受容体を構成する因子 (Toll-like receptor 4 (TLR4) と MD-2) の発見に伴い急速に解明されつつある。宿主免疫細胞によるエンドトキシン認識はエンドトキシンによる発熱応答の分子基盤である。従って、この系をエンドトキシン検出に応用できればヒトの応答性に近いエンドトキシン試験法が開発されることが期待できる。

本研究では従来のリムルステスト法の問題点を補完する、新しいエンドトキシン検出法を作出するため免疫担当細胞 (マクロファージ等) によるエンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明とそのエンドトキシン検出法への応用に関する研究を行う。本研究により、ヒトのエンドトキシン応答性に非常に近い測定法が確立されることが期待できる。また、培養細胞を利用した測定法を目指しており、この方法はウサギ発熱試験より簡便かつ迅速であることが期待できる。これらの研究目標を達成するため、国立感染症研究所 (1) 及び生化学工業 (2) の研究グループは「エンドトキシン受容体を利用したエンドトキシン検出法に関する研究」を行う。北里大学理学部のグループは「リポ多糖シグナルの情報伝達機構」、東邦大学理学部の研究グループは「アポトーシス細胞の取り込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義」に関する研究を行う。

### B. 研究方法

B-1) TLR4-MD2 複合体活性化における感染細菌リピドA修飾の意義

B-1-1) 修飾型リピドAの精製

サルモネラ菌のリピドA修飾酵素 (パルミトイル化酵素 PagP と脱アシル化酵素 PagL) を過剰発現している大腸菌株を培養し、定法に従いリピドAを精製する。精製されたリピドAは様々な構造の混合物なので、薄層クロマトグラフィーにより分離

し、パルミトイル化を受けたリポド A、脱アシル化を受けたリポド A、両方による修飾を受けたリポド A、及び修飾を受けていないリポド A を精製する(図 1)。修飾の確認は質量分析計で精製リポド A の質量を測定することにより行った。

#### B-1-2) 修飾型リポド A の活性測定

ヒト TLR4 とヒト MD-2 を強制発現している Ba/F3 細胞株及び HEK293 細胞株を精製したリポド A で刺激し、転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を測定する(レポーターアッセイ)。

#### B-2) サルモネラ菌におけるリポド A 脱アシル化制御

サルモネラ菌野生株及び変異株よりリポド A を精製し、質量分析計 (MALDI-TOF MS) 及び薄層クロマトグラフィーによる分離により分析を行う。

#### B-3) リムルス活性と関連した細菌糖脂質の認識とシグナル伝達

**糖脂質:** 単糖型リポド A 類縁体の GLA-60 およびリポド A の構成脂肪酸タイプの acyloxyacyl 基を導入した MDP は、岐阜大学・木曾真教授より分与された。*Sphingomonas* 属由来スフィンゴ糖脂質 GSL-1 および GSL-4A は、関東学院大学・川原一芳教授より分与された。

**フラボノイド:** フラボン、ルテオリン、アピゲニン、アピゲトリン、ディオスメチン、ディオスミン、ケンフェロール、ケルセチン、ルチン、モリン、ミリセチン、フラバノン、エリジクチオール、ナリンゲニン、ナリンジン、ヘスペレチン、ヘスペリジンを用いた。

**マクロファージ:** C57BL/10ScSn マウスおよび TLR4 欠損 C57BL/10ScN マウスの骨髄由来マクロファージおよび腹腔滲出マクロファージを用いた。骨髄由来マクロファージは、骨髄細胞を M-CSF 存在下で 10 日間培養して得た。腹腔滲出マクロファージは、4% チオグリコレート培地で誘導した。

**サイトカイン測定:** 各糖脂質で刺激した骨髄由来マクロファージの培養上清中の TNF- $\alpha$  は、L929 細胞を用いたバイオアッセイで測定した。IL-6 は ELISA 法で測定した。

**ウエスタンブロット:** 各糖脂質で刺激した骨髄由来マクロファージおよびマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用い、乗法に従って I- $\kappa$ B、Akt、p38、リン酸化 Akt およびリン酸化 p38 に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

**ラフト集積:** 細胞膜に存在する GM3 を FITC 標識コレラトキシンで結合させ、共焦点レーザー顕微鏡で

観察した。

**LPS 誘導 TNF- $\alpha$  産生:** LPS を静脈注射し、2 時間後の血清中 TNF- $\alpha$  を測定した。

**エンドトキシンショックの誘導:** ガラクトサミン負荷マウスに LPS を注射する系および *Salmonella typhimurium* 大量感染の系を用いた。

#### B-4) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

IL-6KO マウスは東京大学医科学研究所岩倉教授より供与された。これを SPF 条件で繁殖させて用いた。他のマウスは三協ラボより購入した。マウス未熟樹状細胞は、マウス (C57BL/6、雄 6 週令) 骨髄細胞を GM-CSF 存在下 7 日培養して得た。すなわち 3 日目に培地を半分交換し、5 日目に非付着性細胞を集め、まきなおして、得た。この方法で得られた細胞の 60-80% は細胞表面マーカーと形態から見て未熟樹状細胞であった。アポトーシス細胞は IL-2 依存性細胞 CTLL-2 を IL-2 非存在下 28 時間培養して得た。食食度の測定は、アポトーシス細胞を PKH26 で染色して、共焦点顕微鏡を用いて行った。細胞表面マーカーは蛍光標識抗体を用いて、フローサイトメーターによって解析した。mRNA レベルは半定量的 RT-PCR によって測定した。上清中のサイトカインレベルは ELISA で測定した。樹状細胞の抗原提示能は、MLR によって測定した。

### C. 研究結果

#### C-1) TLR4-MD2 複合体活性化における感染細菌リポド A 修飾の意義

TLR4-MD-2 複合体はリポド A の微細構造を認識し細胞内に活性化シグナルを伝達する。腸内細菌である大腸菌とサルモネラ菌はリポド A の基本構造は同一である。一方、サルモネラ菌は低マグネシウムなどの宿主環境を模倣した培養条件下でリポド A の修飾酵素(脱アシル化酵素 PagL、パルミトイル化酵素 PagP、水酸化酵素 Lpx0 など)の遺伝子発現が活性化される。これらリポド A 修飾の意義を検討する目的で、脱アシル化、パルミトイル化、脱アシル化とパルミトイル化を受けた修飾型リポド A と非修飾型リポド A (図 1) を分離精製し、TLR4-MD-2 複合体による相対的検出感度を解析した。その結果、すべての修飾型リポド A は非修飾型と比べて TLR4-MD-2 複合体による検出感度が 30 から 100 倍程度低下する、すなわち TLR4-MD-2 複合体に認識されにくくなることがわかった。

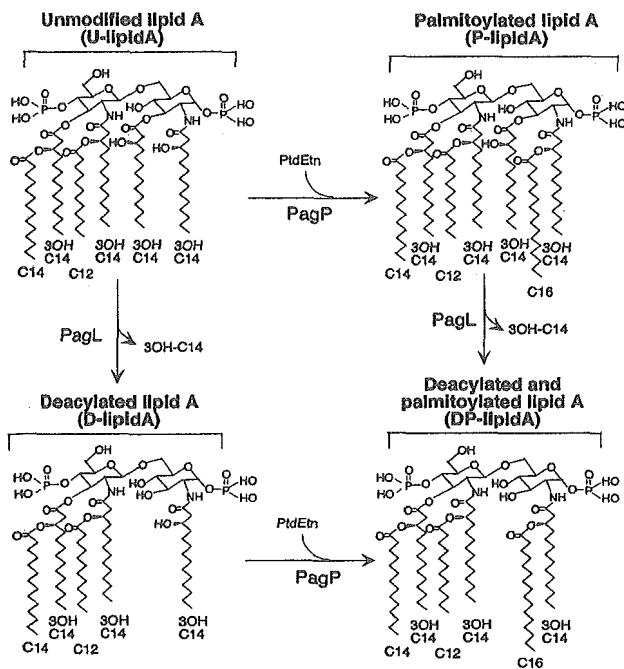


図1 非修飾型及び修飾型リポド A の構造

## C-2) サルモネラ菌におけるリポド A 脱アシル化制御

サルモネラ菌などのグラム陰性病原細菌は生育環境に応答してリポ多糖を含む表面構成成分の再構成を行う。リポ多糖はグラム陰性細菌外膜表層の主要構成成分である。リポ多糖のリポド A 部位はエンドトキシン本体であり、その構造変化、特に脂肪酸鎖の変化は感染宿主のエンドトキシン受容体 TLR4 からの細胞内刺激伝達に大きな影響を与えることが上述のように明らかとなっている。感染応答によりサルモネラ菌ではリポド A 部位の脂肪酸の付加・脱離にかかわる酵素発現が誘導される。本研究ではサルモネラ菌リポド A 脱アシル化に着目し、その制御機構について解析を行った。

サルモネラ菌のリポド A 脱アシル化酵素 PagL は感染環境を模倣する低マグネシウム培地培養下で発現誘導される。しかしながら、リポド A の脱アシル化はこの培養条件下では認められない。一方、別のリポド A 修飾であるアミノアラビノース付加が起らない変異株では、低マグネシウム培地培養下でリポド A の脱アシル化が認められた。このことから、リポド A 修飾は相互に関連しあっており、アミノアラビノース付加が脱アシル化を抑制することがわかった。また、サルモネラ菌の超音波破碎処理や界面活性剤オクチルグルコシド処理 (図 2) によっても脱アシル化が見られることから、アミノアラビノースを含有する無傷の細胞膜が脱アシル化を抑制していると考えられた。この制御がサルモネラ菌の病原性とどのように関わっているのか不明であるが、新しい細菌脂質修飾制御機構であると考えられる。

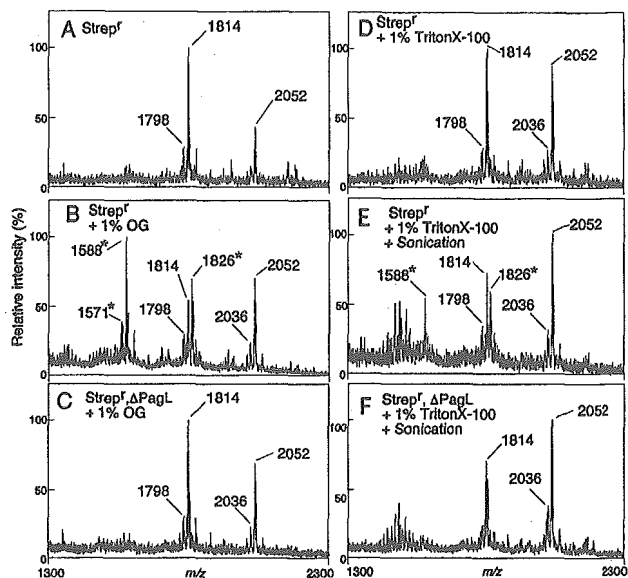


図2 質量分析計によるリポド A の分析

\*印をつけたピークが脱アシル型リポド A に相当するピーク。

## C-3) リムルス活性と関連した細菌糖脂質の認識とシグナル伝達

### C-3-1) TLR4 を介して認識されるエンドトキシン以外のリガンドについての検討

グラム陰性菌の外膜に存在するリポ多糖 (LPS) は Toll-like receptor (TLR) 4/MD2 複合体を介して、グラム陽性菌由来の糖脂質やリポペプチドは TLR2 と TLR1 または TLR6 複合体を介して認識され、マクロファージを活性化し、サイトカイン産生を誘導する。細菌由来糖脂質がどのようにして TLR によりパターン認識されているかについては未だ明らかにされていない。リムルス反応による LPS の認識には、リポド A の構成脂肪酸とリン酸基が重要である。ペプチドグリカンやムラミルジペプチド (MDP) は、TLR ではなく NOD により認識されることが報告されている。そこで、化学合成した単糖型リポド A 類縁体、リポド A の構成脂肪酸である acyloxyacyl 基を導入した MDP を用い、これら糖脂質が TLR2 か TLR4 により認識されるのか、あるいは NOD を介して認識されるかについて検討した。

グラム陰性菌の *Sphingomonas* 属の細胞壁にはリポ多糖ではなく、スフィンゴ糖脂質 (GSL) が存在する。GSL-1 はセラミドにグルクロン酸が結合した化合物であり、それに糖が付加した GSL-4A [ $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -GlcN-(1 $\rightarrow$ 4)-GSL-1] が存在する。GSL がどのような受容体を介してマクロファージを活性化するについても検討した。

単糖型リポド A 類縁体の GLA-60 が TLR4 によって認識されるのを確認した。MDP にリポド A の構成脂

脂肪酸タイプの acyloxyacyl 基を導入しても TLR4 により認識されなかった。スフィンゴ糖脂質の GSL-1 (セラミドにグルクロン酸が結合した化合物) や GSL-4A は TLR4 を介してマクロファージに作用し、TNF- $\alpha$  や IL-6 などのサイトカイン産生を誘導した。しかし、その活性はリポ多糖と比べ約 1/1000 の活性であり、リムルス活性を示さなかった。GSL で前処理してもエンドトキシントレランスは誘導されなかった。また、GSL-4A 刺激を受けたマクロファージ細胞株において、TLR4 を介する 3 種類のシグナル伝達経路 (IkB の分解、Akt と p38 のリン酸化) についてウエスタンブロットで検討したところ、いずれの経路でも刺激が伝達されていた。

#### C-3-2) LPS 刺激を制御する分子についての検討

植物性フラボノイドは、LPS で誘導されるマクロファージ活性化作用を抑制することが報告されている。種々のフラボノイドを用いて、LPS 刺激で誘導される TLR4/MD2 を介したマクロファージ活性化のシグナル伝達について検討した。さらに、フラボノイドの前投与によりが 2 種類のエンドトキシントックモデルを制御できるかについても検討した。

17 種類のフラボノイドについて、LPS 誘発マクロファージ活性化作用について検討した。配糖体よりアグリコン骨格の化合物の方が *in vitro* の活性は強かった。この中で、抑制作用が強かったルテオリン (LUT)、クエルセチン (QUE) を用いてシグナル伝達の抑制作用について検討したところ、弱いながら LPS で誘導される上述の IkB の分解、Akt と p38 のリン酸化の抑制が認められた。LPS 刺激すると TLR4 を含めたラフトが集積することを認めていたので、細胞膜に存在する GM3 に FITC 標識コレラトキシンを結合させ、ラフトの集積に及ぼす LUT と QUE の作用について検討したところ、両者はラフトの集積を抑制した。フラボノイドのナリンジン、ヘスペリジンを腹腔内に前投与すると、LPS で誘導される TNF- $\alpha$  産生、LPS 誘導ガラクトサミン負荷マウスでのショック、および *Salmonella typhimurium aroA* 変異株の大量感染により誘導されるエンドトキシントックが抑制された。

#### C-4) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状

##### 細胞の応答とその生理的意義

細胞死はアポトーシスとネクローシスに大別される。前者は発生、免疫、老化などさまざまな生物現象にかかわり、プログラム細胞死とほぼ同義語であるのに対し、後者はやけどなどの病理的な原因でおこる。アポトーシス細胞は近隣のマクロファージなどの食

細胞によって貪食除去され、このとき炎症を伴わないのに対し、ネクローシス細胞は細胞の内容物を放出し、炎症をひき起こす。ところが数年前に我々は、アポトーシス細胞の取込みに伴ってマクロファージが炎症性サイトカインの一つ、IL-8 またはそのマウスホモログ MIP-2、を産生することを発見した。その後、この現象は、常在性マクロファージを含むさまざまなマクロファージとさまざまなアポトーシス細胞の組み合わせで、多少の差はあれ、観察された。そこで我々は、生体がマクロファージのこのような応答を防ぐための仕組みをもっていると考えに至った。そして実際に (1) ヒトマクロファージがヒト血清存在下にアポトーシス細胞を取込むと抗炎症性サイトカインが産生されること、(2) きわめて初期のアポトーシス細胞は取込まれてもほとんど応答をひき起こさないこと、を発見した。

さて未熟樹状細胞はマクロファージとならんでアポトーシス細胞の貪食除去に関わる主要な食細胞である。未熟樹状細胞がアポトーシス自己細胞を取込んでも自己抗原に対する免疫応答は起こらない。そこで本研究では、マウス骨髄細胞から GM-CSF 存在下培養して得た未熟樹状細胞を用いて、アポトーシス細胞の貪食がもたらす樹状細胞の分化に対する影響を調べた。

未熟樹状細胞はアポトーシス CTLL-2 細胞をアポトーシスの段階が進むほど効率よく貪食した。また未熟樹状細胞を LPS によって処理すると、MHC class II、CD80、CD86、CD40 の発現が増加し、成熟化した。さらにあらかじめアポトーシス細胞を貪食させると LPS による成熟化が抑制された。これらの知見はすでに報告されていることと一致する。

アポトーシス細胞と共培養した未熟樹状細胞は IL-6 と、程度は少ないものの IL-12p40 を mRNA レベルでもタンパクレベルでも産生した。これらはアポトーシス CTLL-2 細胞だけでなく放射線照射によってアポトーシスを起こさせた胸腺細胞と共培養しても産生されたが、ネクローシス細胞や生細胞と共培養しても産生されなかった。IL-6 を外から添加すると樹状細胞の分化が抑制され、アポトーシス細胞を貪食させたあと抗 IL-6 抗体を添加すると樹状細胞の分化抑制が一部解除された。これらの知見は今回初めて得られたものである。

さらに IL-6KO マウスにアポトーシス胸腺細胞を腹腔投与したあとの抗 ssDNA 抗体 (IgM) 産生を調べたところ野生型マウスに比べ上昇する傾向が見られた。一方、抗 ssDNA 抗体 (IgG) 産生はむしろ野生型マウスのほうが高い傾向があった。

## D. 考察

### D-1) TLR4-MD2 複合体活性化における感染細菌リビ

## ドA修飾の意義

サルモネラ菌のリピドA修飾酵素によるリピドA修飾が宿主TLR4による細菌認識を低下させる効果があることを明らかにした。サルモネラ菌が宿主に感染している環境下でこれらの酵素の発現誘導がされることから、感染サルモネラ菌が宿主の免疫応答から逃れるためにリピドA修飾が行われていることが考えられる。

### D-2) サルモネラ菌におけるリピドA脱アシル化制御

リピドA修飾は相互に関連しあっており、アミノアラビノース付加が脱アシル化を抑制すると考えられる。サルモネラ菌の超音波破碎処理や界面活性剤オクチルグルコシド処理(図2)によっても脱アシル化が見られることから、アミノアラビノースを含有する無傷の細胞膜が脱アシル化を抑制していると考えられた。この制御がサルモネラ菌の病原性と深く関わっていると推定される。

### D-3) リムルス活性と関連した細菌糖脂質の認識とシグナル伝達

#### D-3-1) TLR4を介して認識される新規リガンドの検討

単糖型リピドA類縁体のGLA-60もTLR4/MD2を介してマクロファージ活性化作用を発現すること、acyloxyacyl基を導入したMDPがTLR4により認識されなかったことから、TLR4/MD2は単糖型でもよいが、アシル基とリン酸基などマイナスチャージの両方が認識に必要であることが示唆された。GSLがTLR4/MD2を介してマクロファージを活性化したことは、グルクロン酸のマイナスチャージがTLR4/MD2による認識に有効であることを示唆している。GSLはリムルス活性を示さなかったことから、その認識はTLR4/MD2によるものと異なることが示唆された。これらの結果から、リムルス試験のみでは、発熱原性を発現する物質を見逃す可能性があるため、TLR4/MD2を介したシグナルの検討も重要であることが示唆された。

#### D-3-2) LPS刺激を制御する分子についての検討

フラボノイドは、LPSによるマクロファージ活性化を抑制することが報告されているが、本研究により、フラボノイドはLPS刺激によるTLR4を含めたラフトの集積を抑制することにより、シグナル伝達の上流から抑制することが明らかとなった。LPS刺激を受けたマクロファージの活性化作用がフラボノイドにより抑制されるという現象は、*in vitro*だけでなく*in vivo*でも確認することが出来た。今後、

フラボノイドを経口投与した時の体内への吸収・移行などを明らかにする必要があるが、慢性疾患に対するフラボノイドの抑制作用が期待できる。

### D-4) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

今回の結果から、アポトーシス細胞を貪食した未熟樹状細胞がIL-6を産生し、それが樹状細胞への分化をオートクリン的に抑制していることが示唆された。これは、自己アポトーシス細胞を未熟樹状細胞が取込んでも免疫応答を起こさないようにする上で重要な機構の一つであろうと推察される。実際、IL-6KOマウスにアポトーシス胸腺細胞を腹腔投与して自己抗体(抗ssDNA抗体(IgMクラス))が産生されるか調べたところ、野生型マウスよりも上昇する傾向があった。しかし抗ssDNA抗体(IgGクラス)はむしろ野生型マウスのほうが高い傾向が見られた。後者はIL-6がクラススイッチに関わるためであろうと考えられる。

## E. 結論

### E-1) TLR4-MD2複合体活性化における感染細菌リピドA修飾の意義

サルモネラ菌のリピドA修飾酵素によるリピドA修飾は、感染細菌にとって、宿主TLR4による認識から逃れやすくなる効果がある

### E-2) サルモネラ菌におけるリピドA脱アシル化制御

アミノアラビノースを含有する無傷の細胞膜がPagLによる脱アシル化を抑制している

### E-3) リムルス活性と関連した細菌糖脂質の認識とシグナル伝達

#### E-3-1) TLR4/MD2を介して認識されるエンドトキシン以外のリガンドについての検討

TLR4/MD2はacyloxyacyl基を1分子導入したMDPを認識できなかったが、スフィンゴ糖脂質GSLはTLR4/MD2を介してマクロファージを活性化したが、リムルス活性をもたなかった。

#### E-3-2) LPS刺激を制御する分子についての検討

フラボノイドは、LPS刺激を受けたマクロファージ細胞膜でのラフト集積を抑制し、シグナル伝達の下流も抑制した。フラボノイドの前投与により、エンドトキシンショックが抑制された。

### E-4) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

アポトーシス細胞の食食に伴って産生される IL-6 は樹状細胞を未熟な状態にとどめるのに部分的に関わることにより、自己抗原に対する応答を未然に防いでいると考えられた。

#### F. 研究発表

1. K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem* (2004) vol. 279, 20044-20048
2. K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Deacylation and palmitoylation of lipid A by Salmonellae outer membrane enzymes modulate host signaling through Toll-like receptor 4. *J. Endotoxin Res.* (2004) vol.10 439-444
3. K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J. Bacteriol.* in press
4. K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Purification and characterization of deacylated and/or palmitoylated lipid A species unique to *Salmonella typhimurium*. *J. Endotoxin Res.* in press
5. Kano, H., T. Doi, Y. Fujita, H. Takimoto, I. Yano and Y. Kumazawa. 2005. Serotype-specific modulation of human monocyte functions by glycopeptidolipid (GPL) isolated from *Mycobacterium avium* complex. *Biol. Pharm. Bull.* 28(2): 335-339.
6. Nagayama, Y., O. Saitoh, S.M. McLachlan, B. Rapoport, H. Kano and Y. Kumazawa. 2004. TSH receptor-adenovirus-induced Graves' hyperthyroidism is attenuated in both interferon- and interleukin-4 knockout mice; implications for the Th1/Th2 paradigm. *Clin. Exp. Immunol.* 138: 417-422.
7. Morita, H., R. Hasunuma, K. Kawaguchi, Y. Adachi, S. Tanaka and Y. Kumazawa. 2004. Limitation of polymyxin B on suppression of endotoxin shock induced by *Salmonella* infection in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (11): 1840-1843.
8. Kudo, K., H. Sano, H. Takahashi, K. Kuronuma, S. Yokota, N. Fujii, K. Shimada, I. Yano, Y. Kumazawa, D. R. Voelker, S. Abe and Y. Kuroki. 2004. Pulmonary collectins enhance phagocytosis of *Mycobacterium avium* through increased activity of mannose receptor. *J. Immunol.* 172: 7592-7602.
9. Kaneko, M., T. Mizunuma, H. Takimoto and Y. Kumazawa. 2004. Development of TCR $\alpha\beta$  CD8 $\alpha$  intestinal intraepithelial lymphocytes is promoted by IL-15- producing epithelial cells constitutively stimulated by Gram-negative bacteria via TLR. *Biol. Pharm. Bull.* 27(6): 883-889.
10. Kawaguchi, K., S. Kikuchi, R. Hasunuma, H. Maruyama, T. Yoshikawa and Y. Kumazawa. 2004. A *Citrus* flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 27(5): 679-683.
11. Takimoto, H., D. Wakita, K. Kawaguchi and Y. Kumazawa. 2004. Potentiation of cytotoxic activity in naïve and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (3): 404-406.
12. Kawaguchi, K., S. Kikuchi, R. Hasunuma, H. Maruyama, R. Ryll and Y. Kumazawa. 2004. Suppression of infection-induced endotoxin shock in mice by a *Citrus* flavanone naringin. *Planta Med.* 70: 17-22.
13. Takahashi, M. and Kobayashi, Y.: Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells. *Cell. Immunol.* 226, 105-115 (2003)
14. Ohtani, M., Kobayashi, Y. and Watanabe, N.: Gene expression in the elicitation phase of guinea pig DTH and CHS reactions. *Cytokine* 25, 246-253 (2004)
15. Takahashi M., Kurosaka K., and Kobayashi Y.: Immature dendritic cells reduce proinflammatory cytokine production by a coculture of macrophages and apoptotic cells in a cell-cell contact-dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* 75, 865-873 (2004)
16. Iyoda T. and Kobayashi Y.: Involvement of MIP-2 and CXCR2 in neutrophil infiltration following injection of late apoptotic cells into the peritoneal cavity. *Apoptosis* 9, 485-493 (2004)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし