



Title	リポドAによるマウス致死活性の作用機構とその応用
Author(s)	朝井, 康行
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155302
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

リポドAによるマウス致死活性の作用機構とその応用

大阪大学大学院歯学研究科
歯学臨床系専攻（口腔外科学第二講座）
（指導教官：作田正義教授）

朝 井 康 行

大阪大学歯学部口腔外科学第二講座（主任：作田正義教授）

本論文の要旨は，第69回日本細菌学会総会（平成8年3月，福岡），第38回歯科基礎医学会学術大会（平成8年10月，横須賀），The 75th IADR General Meeting（1997年3月，Florida），第70回日本細菌学会総会（平成9年3月，宇都宮），第71回日本細菌学会総会（平成10年4月，松本），The 76th IADR General Meeting（1998年6月，Nice），The 5th Conference of the International Endotoxin Society（1998年9月，New Mexico），第4回日本エンドトキシン研究会（平成10年9月，東京），第35回日本細菌学会中部支部総会（平成10年10月，名古屋），第40回歯科基礎医学会学術大会（平成10年10月，名古屋）において発表した。

緒 言

細菌感染症は、抗生物質や全身管理によりコントロールされてはいるが、重症感染症患者では、敗血症性ショックから多臓器不全に陥り死に至ることが、現在でも多く認められる。敗血症は、エンドトキシン血症をしばしば伴い、発熱、心拍数の増加、凝固系亢進、循環動態の変化、ショック、多臓器不全などを引き起こす¹⁻³⁾。グラム陰性菌の細胞壁外膜に存在するリポ多糖体（LPS；エンドトキシン）は、これら敗血症を惹起する重要な因子であると考えられる。LPSの内毒素作用には、宿主細胞から産生されるサイトカイン、プロスタグランジン、活性酸素、一酸化窒素などのメディエーターが関与している⁴⁾。これらLPSにより作用をうける宿主細胞のなかで中心的役割を演じているマクロファージは、種々の炎症性サイトカインを含むメディエーターを産生し、エンドトキシン血症をとともなう致死活性の発現に深く関与していることが推測される⁴⁻⁸⁾。エンドトキシンショックや致死活性に対する治療法としては、血中エンドトキシンの中和や除去、内因性メディエーターの抑制などに関する研究が現在進められている⁹⁻¹⁴⁾。近年、LPSの構造、化学合成ならびに生物活性の一連の研究から、LPS活性の大半を担っているのはリピドA部分であることが明らかにされている^{15, 16)}。

歯周病原性細菌の一つとして注目される黒色色素産生性嫌気性グラム陰性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来のLPSは、大腸菌LPSと比較して、ウサギの発熱原性、マウス致死活性、シュワルツマン反応などの内毒素作用が非常に弱い¹⁷⁻¹⁹⁾。また、近年 *P. gingivalis* LPSのリピドA部分の構造が明らかにされ²⁰⁾、同リピドAは、低毒性でかつ種々の免疫生物学的作用を発揮することが示されている^{17, 21)}。しかしながら、細菌種によるLPS／リピドAの内毒素活性の違いや構造および宿主（細胞）に対する作用機構についての研究は諸についたばかりである²²⁾。本研究は、*P. gingivalis* および大腸菌由来のリピドAを用いて、ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに対する致死活性を指標として、同マウスのマクロファージからの炎症性サイトカインの産生誘導ならびにその作用機構の一端を明らかにし、また、これら作用機構にもとづいてエンドトキシンによる致死活性の抑制について検討した。

材料と方法

1. 実験動物

実験動物として、生後8週齢の雄性C57BL/6マウスを用い、日本チャールス・リバーKK（横浜）より購入した。

2. リピドA

P. gingivalis 381株リピドAおよび大腸菌型合成リピドA（化合物506）は、朝日大学歯学部口腔細菌学講座小川知彦博士より恵与された。

3. 供試イオノホアおよび抗体

カルシウムイオノホアA23187（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA）を純エタノール（和光純薬、大阪）を用いて 10^{-3} Mに調製し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS, pH7.5; 微研、大阪）により所定濃度に希釈した1mlをC57BL/6マウスの腹腔内に投与した。バリノマイシン（Sigma Chemical Co.）はDimethyl Sulfoxide（DMSO; 和光純薬）を用いて、グラミシジンA（Calbiochem-Novabiochem Co., La Jolla, CA, USA）はエタノールで各々 10^{-3} Mに調製した後、PBSにて所定濃度にしたものをマウス腹腔内に投与した。

ハムスター抗マウスinterleukin 1 beta (IL-1 β) 抗体（Genzyme Co., Cambridge, MA, USA）は、1mg/mlの濃度に調製した0.1mlをマウス尾静脈に投与した。

4. マウスマクロファージの調整

C57BL/6マウスにD-ガラクトサミン塩酸塩（和光純薬）を16mg/0.5mlに調製して腹腔内投与後30分、気管支洗浄法²³⁾により肺胞マクロファージを得た。すなわち、純エタノールで消毒したマウス腹部の皮膚を横隔膜に相当する部位より上部にて切開、剥離し気管を露出させた。気管に22ゲージ留置針（テルモ、東京）を挿入し、縫合糸（シラカワ、東京）にて針を結紮し固定後、PBSにて0.1%濃度に調製したethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt（EDTA・2Na; 和光純薬）の1mlを肺に注入した。胸部をマッサージした後、静かにシリンジにて吸引し肺胞マクロファージを得た。同様の操作を5回繰り返し集めた細胞浮遊液を4℃、 $100\times g$ で10分間遠心後、PBSで3回洗浄し、10%ウシ胎児血清（FBS; Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA）を添加したRPMI1640（日研生物医学研究所、京都）培養液（10%FBS-RPMI1640培養液）に細胞を浮遊し、以下の実験に供した。D-ガラクトサミン塩酸塩投与マウスの腹部中央部に22ゲージ針付シリンジ（テル

モ)で5mlのPBSを注入し、腹部をマッサージ後、腹腔内洗浄液を回収した。4℃、100×gで10分間遠心後、細胞をPBSで3回洗浄し、腹腔マクロファージを10%FBS-RPMI1640培養液に浮遊した。同マウスから脾臓および肝臓をそれぞれ摘出し、ナイロンセルストレーナー (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) 上でプラスチック棒を用いて磨り潰した。細分された組織をRPMI1640培養液に浮遊し、Histopaque1083® (Sigma Chemical Co.) 上に重層し、比重遠心法²⁴⁾により単核球画分を得た。RPMI1640培養液で洗浄後、10%FBS-RPMI1640培養液に細胞を浮遊した。プラスチックシャーレ中で37℃、2時間5%CO₂-95%湿空气中で培養後、培養液を吸引し非付着細胞を除去した。PBSで細胞を洗浄後、プラスチックシャーレに付着している細胞をラバーポリスマンにて剥離採集し、10%FBS-RPMI1640培養液で所定細胞数に調整した。これら付着細胞をマクロファージとして以下の実験に供した。なお、全細胞中98%以上が生細胞であることをトリパンプルー排除試験により確認した。

5. 産生サイトカインの測定

マクロファージからのサイトカイン産生は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて測定した。すなわち、10%FBS-RPMI1640培養液に5×10⁶個/mlとなるように調整したマクロファージに所定量のテスト標品を添加し、37℃、72時間5%CO₂-95%湿空气中で培養した。培養終了後、その上清中のTNF-α、IL-6、IL-1αおよびIL-1βをマウスELISAキット (Genzyme Co.) を用いて、マイクロプレートリーダー (モデル550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) で各々測定した。また、マクロファージからのサイトカイン産生に対するプロテインキナーゼの関与について検討した。すなわち、所定濃度に調製したプロテインキナーゼ阻害剤である1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7; 生化学工業, 東京), N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-8; 生化学工業), N-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide (HA1004; 生化学工業), N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7; 生化学工業) あるいはN-(6-aminohexyl)-1-naphthalenesulfonamide (W-5; 生化学工業) をマクロファージとともに37℃、4時間培養した。さらにリピドA (1μg/ウェル) を加えて72時間培養し、その上清中のサイトカイン量をマウスELISAキットを用いてマイクロプレートリーダーにより各々測定した。ELISAキットに含まれる対照サイトカインの検量線から、サイトカイン産生

量を各々算定した。測定は各培養ごとに3通り行い、平均値と標準誤差を求めた。

6. マウスサイトカインmRNAの発現誘導の検討

C57BL/6マウスより調整した肺胞マクロファージからIsogen（和光純薬）を用いて全RNAを抽出した。すなわち，細胞にIsogenを加えホモジナイズし，1/10量のクロロホルム（和光純薬）を添加後，15,000×g，15分間遠心した。分離されたRNAをイソプロパノール（和光純薬）を用いて沈殿し，純エタノールにて洗浄した。得られた全RNAを用いて，RNA PCR kit（宝酒造，大津）によりRT-PCR法²⁵⁾を実施した。すなわち，抽出・精製した全RNA（1μg）より，Oligo dT-Adaptor プライマーおよびAMV Reverse Transcriptase（宝酒造）を用いて，42℃，40分間逆転写反応を行い，complementary DNA（cDNA）を合成した。得られたcDNAを鋳型として2.5mM MgCl₂，2.5U TaKaRa Taq™（宝酒造）および検出するmRNAに特異的なセンスプライマー／アンチセンスプライマーを最終濃度0.2μMとなるように各々加え，95℃（20秒），58℃（2分），72℃（2分）を1サイクルとして合計30サイクルの設定でcDNAの増幅を行った。PCR産物は，エチジウムブロミド（ニッポンジーン，東京）を含む2%アガロースゲル（ニッポンジーン）にて電気泳動後，紫外線照射により可視化されたバンドをポラロイドフィルム（Polaroid Corporation, Cambridge, MA）を用いて撮影した。なお，供試した各々のプライマーの塩基配列，増幅されるcDNAの長さは，表1に示した。

表1 PCRプライマーの塩基配列

TNF-α	5'プライマー	5'-AGC CCA CGT CGT AGC AAA CCA CCA A-3'	445bp *
	3'プライマー	5'-ACA CCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T-3'	
IL-6	5'プライマー	5'-TTC CTC TCT GCA AGA GC T-3'	431bp
	3'プライマー	5'-TGT ATC TCT CTG AAG GAC T-3'	
IL-1α	5'プライマー	5'-TTA CAG TGA AAA CGA AGA-3'	416bp
	3'プライマー	5'-TGT TTG TCC ACA TCC TG-3'	
IL-1β	5'プライマー	5'-GCA ACT GTT CCT GAA CTC A-3'	320bp
	3'プライマー	5'-CTC GGA GCC TGT AGT GCA G-3'	
β-actin	5'プライマー	5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT-3'	568bp
	3'プライマー	5'-ATG AGG TAG TCT GTC AGG-3'	

* 増幅cDNAの分子量

7. 致死活性の検討

Galanosらの記載に従い、ガラクトサミン負荷マウスを用いた致死活性について検討した²⁶⁾。すなわち、PBSに溶解した16mg/0.5ml濃度のD-ガラクトサミン塩酸塩をC57BL/6マウスに腹腔内投与し、つづいて所定量の*P. gingivalis*リピドAあるいは化合物506を尾静脈より0.2ml注射し、24時間後の生死について観察した。リピドAの50%致死量は、Kärber法により算出した²⁷⁾。

8. マウス血中のエンドトキシンならびにサイトカイン濃度の測定

ガラクトサミン負荷マウスに化合物506 (0.1 μ g/0.2ml) を尾静脈に注射後、6時間まで経時的に採血し、血清分離を行ない-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。血清中のエンドトキシン量は、エンドトキシン測定試薬であるエンドスペシー[®] (生化学工業) を用いて測定した。すなわち、96穴平底培養用プレートの各ウェルに血清サンプルあるいはエンドスペシー標準試薬を各々50 μ lずつ容れ、ついでリムルス試薬を50 μ l添加し、37 $^{\circ}$ C、30分反応後合成基質から遊離するp-ニトロアニリンの発色をマイクロプレートリーダーにより測定した。また、血清中のサイトカイン量はマウスELISAキットを用いて測定し、各キットの対照サイトカインの検量線から血清中に含まれるサイトカイン産生量を算出した。測定は各試料ごとに3通り行い、平均値と標準誤差を求めた。

9. 統計処理

各実験における測定値の有意差は、各群ごとに平均値と標準誤差を算出し、Studentのt検定を用いて統計学的に比較した。また、相関性の検定には、Pearson's correlation coefficientを用いた。

結 果

1. リピドAによるガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに対する致死活性の検討

ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに対する*P. gingivalis*リピドAの致死活性は、化合物506のそれと比較検討した。その結果、表2に示すように*P. gingivalis*リピドAは、100 μ g (/匹) 投与量で供試した全マウスに対して致死活性を示したが、化合物506では0.1 μ g (/匹) 投与量で同様の活性がみられた。Kärber法による50%致死量を求めると*P. gingivalis*リピドAは12.6 μ gであり、化合物506は0.0079 μ gと算出され、*P. gingivalis*リピドAは非常に低い致死活性を示した。

表2 リピドAによるガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに対する致死活性

テスト標品	リピドA投与量 (μg/匹)						50%致死量* (μg)
	100	10	1	0.1	0.01	0.001	
<i>P. gingivalis</i> リピドA	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5		12.6
化合物 506				5/5	3/5	0/5	0.0079

ガラクトサミン塩酸塩 (16mg/匹) を腹腔内投与したC57BL/6マウスに所定量のリピドAを尾静脈より注射し、24時間後の致死活性 (死数/総数) を調べた。* 50%致死量はKärber法により算定した。実験は3回実施し、代表的な結果を示す。

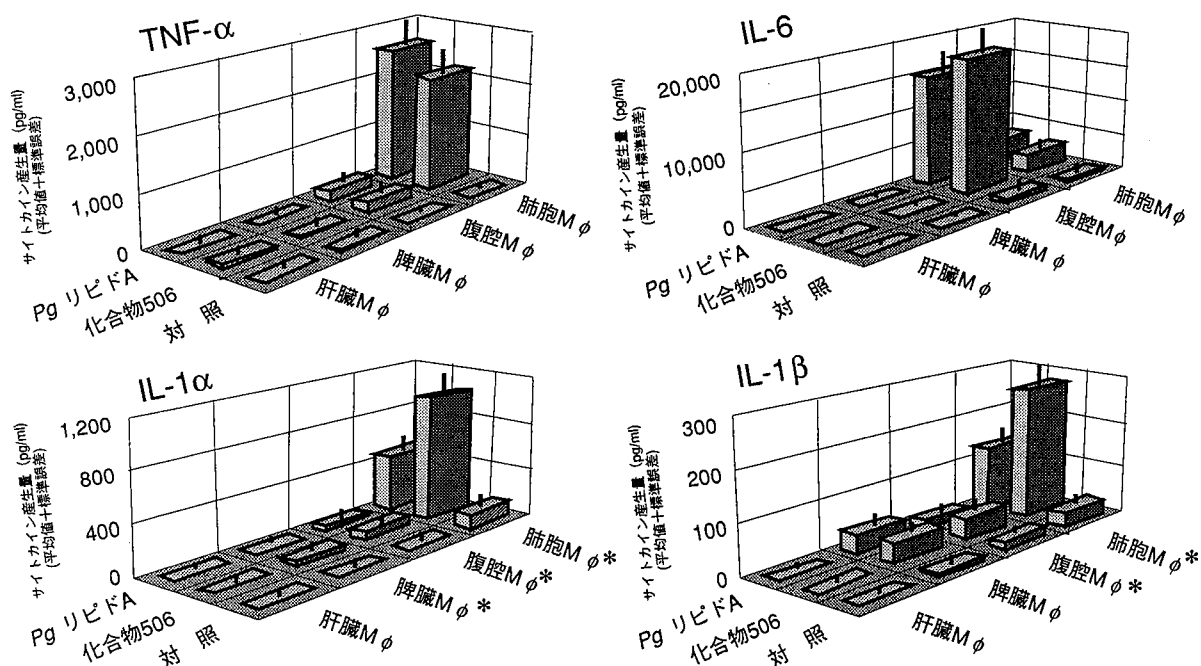


図1 リピドAによるガラクトサミン負荷C57BL/6マウス由来マクロファージ (Mφ) からの炎症性サイトカインの産生。C57BL/6マウスより調整したMφ (5×10⁵ 個/ウェル) は、リピドA (1μg/ウェル) とともに72時間培養し、その培養上清中のサイトカイン産生量をELISA法にて測定した。測定は各テスト標品ごとに3通り行い、平均値と標準誤差を求めた。また、Studentのt検定により、*Porphyromonas gingivalis* (Pg) リピドAと化合物506刺激によるサイトカイン量の間には1% (*) の危険率で有意の差が認められた。バーは標準誤差を示す。

2. リピドAによるC57BL/6マウスマクロファージからの炎症性サイトカイン産生の検討

*P. gingivalis*リピドAあるいは化合物506とともに培養したC57BL/6マウスの肺胞、腹腔、脾臓ならびに肝臓マクロファージからの炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-6、IL-1 α 、IL-1 β 産生について比較検討した（図1）。種々のマウスマクロファージのなかで、肺胞マクロファージからTNF- α 、IL-1 α およびIL-1 β 、腹腔マクロファージからIL-6の各々著明な産生誘導がみられた。他方、脾臓および肝臓マクロファージからのサイトカイン産生誘導は弱かった。また、化合物506刺激による肺胞、腹腔および脾臓マクロファージからのIL-1 α および肺胞や腹腔マクロファージからのIL-1 β 産生誘導は、*P. gingivalis*リピドAのそれらに比べて有意に高かった。

3. リピドAによるマウス肺胞マクロファージからの炎症性サイトカイン産生におよぼすプロテインキナーゼ阻害剤の作用

*P. gingivalis*リピドAおよび化合物506によるガラクトサミン負荷C57BL/6マウスの肺胞マクロファージからのサイトカイン産生における細胞内プロテインキナーゼの関与について検討した。すなわち、種々のプロテインキナーゼ阻害剤をガラクトサミン負荷C57BL/6マウス肺胞マクロファージと4時間前処理した後、*P. gingivalis*リピドAあるいは化合物506によるサイトカイン産生をELISA法により調べた。その結果、図2に示すように*P. gingivalis*リピドAならびに化合物506のいずれのリピドAの場合にも、TNF- α およびIL-6産生においてプロテインキナーゼC（PKC）阻害剤であるH-7、環状ヌクレオチド依存性プロテインキナーゼ（プロテインキナーゼA/プロテインキナーゼG; PKA/PKG）阻害剤であるH-8およびカルモデュリン阻害剤であるW-7により用量依存的に抑制された。IL-1 α 産生では、*P. gingivalis*リピドAおよび化合物506で刺激した場合に、H-7によりIL-1 α 産生の増強がみられたが、供試した他の阻害剤では変化はみられなかった。*P. gingivalis*リピドAによるIL-1 β 産生誘導は、化合物506のそれに比べてW-7により強く抑制された。カルモデュリンに対する阻害作用が弱いW-5で処理した場合には、W-7に比べてIL-1 β の産生抑制は弱かった。

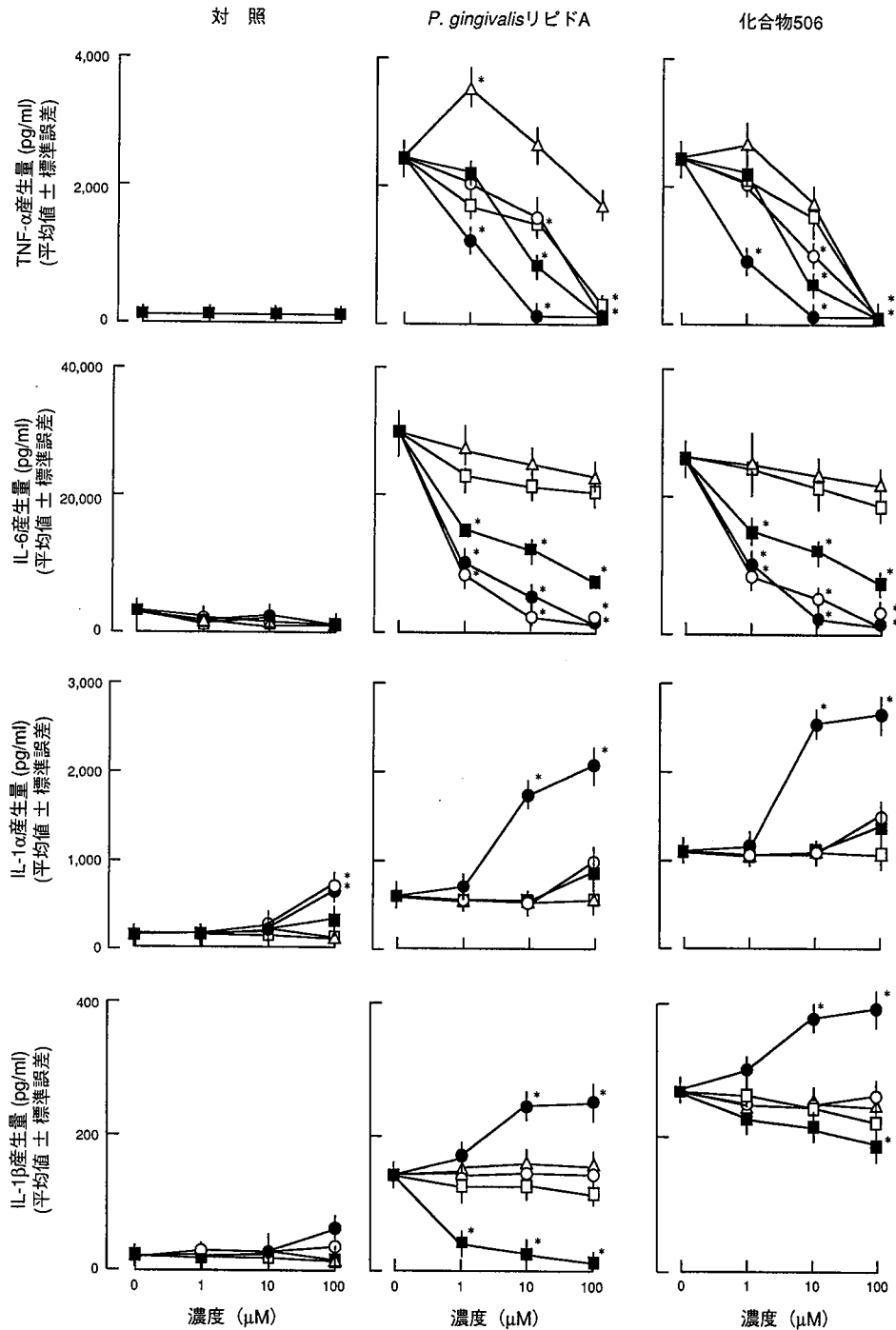


図2 リポドAによるガラクトサミン負荷C57BL/6マウス肺胞マクロファージからの炎症性サイトカイン産生誘導におよぼす種々のプロテインキナーゼ阻害剤の作用。C57BL/6マウス肺胞マクロファージ (5×10^5 個/ウェル) は、所定量のH-7 (●), H-8 (○), HA1004 (△), W-7 (■) あるいはW-5 (□) を添加した10%FBS-RPMI培養液中で37℃, 4時間培養した。つづいてリポドA (1 μ g/ウェル) とともに72時間培養し、その培養上清中のサイトカイン産生量をELISA法にて測定した。測定は各テスト標品ごとに3通り行い、平均値と標準誤差を求めた。また、Studentのt検定により、テスト培養と対照培養でのサイトカイン量の間には1% (*) の危険率で有意の差が認められた。バーは標準誤差を示す。

4. カルモデュリン阻害剤による肺胞マクロファージの炎症性サイトカインmRNA発現におよぼす作用

P. gingivalis リピドAあるいは化合物506によるC57BL/6マウス肺胞マクロファージのサイトカインmRNA発現誘導に対するカルモデュリン阻害剤の作用について、RT-PCR法を用いて検討した（図3）。その結果、*P. gingivalis* リピドAならびに化合物506刺激後4時間でTNF- α 、IL-6、IL-1 α およびIL-1 β mRNA発現の誘導がみられた。TNF- α 、IL-1 α およびIL-1 β mRNAについては、化合物506に比べて*P. gingivalis* リピドAで刺激すると、その発現は弱かった。IL-6 mRNAレベルは、両リピドAとも同程度の発現を示した。カルモデュリン阻害剤であるW-7で肺胞マクロファージを処理した場合、*P. gingivalis* リピドA刺激によるIL-1 β mRNAの発現は特異的に抑制され、図2で示した肺胞マクロファージからのサイトカイン産生抑制の結果と一致した所見が得られた。

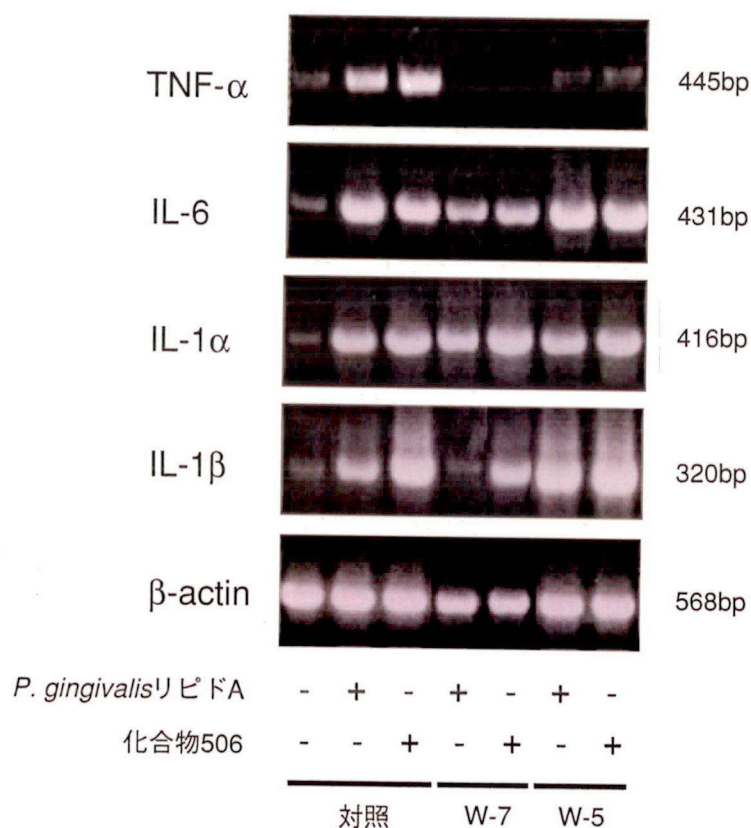


図3 リピドAによるC57BL/6マウス肺胞マクロファージからの炎症性サイトカインmRNA発現におよぼすカルモデュリン阻害剤の作用。C57BL/6マウス肺胞マクロファージ（ 5×10^5 個/ウェル）は、1 μ MのW-7あるいはW-5を添加した10%FBS-RPMI1640培養液中で37 $^{\circ}$ C、4時間培養した。つづいてリピドA（1 μ g/ウェル）とともに4時間培養し、全RNAを得た。サイトカインmRNAの発現量をRT-PCR法を用いて検出した。実験は3回実施し、代表的な結果を示す。

5. 化合物506投与マウスの血中エンドトキシンおよびサイトカイン濃度の経時的変化

化合物506 (0.1 μ g/匹) をガラクトサミン負荷C57BL/6マウスの尾静脈に投与した後、血中エンドトキシン濃度を測定した。その結果、図4に示すように化合物506投与後5分にはエンドトキシン濃度はピークに達したが、30分後にはほとんど検出されなかった。また、同マウス血中のサイトカイン濃度について検討した(図5)。その結果、マウス血中のTNF- α およびIL-6濃度は化合物506投与後60分にピークに達し、その後漸次減少した。血中IL-1 α 濃度は投与後120分より増加傾向を示し、また、IL-1 β 濃度は投与後360分に急激な上昇がみられた。

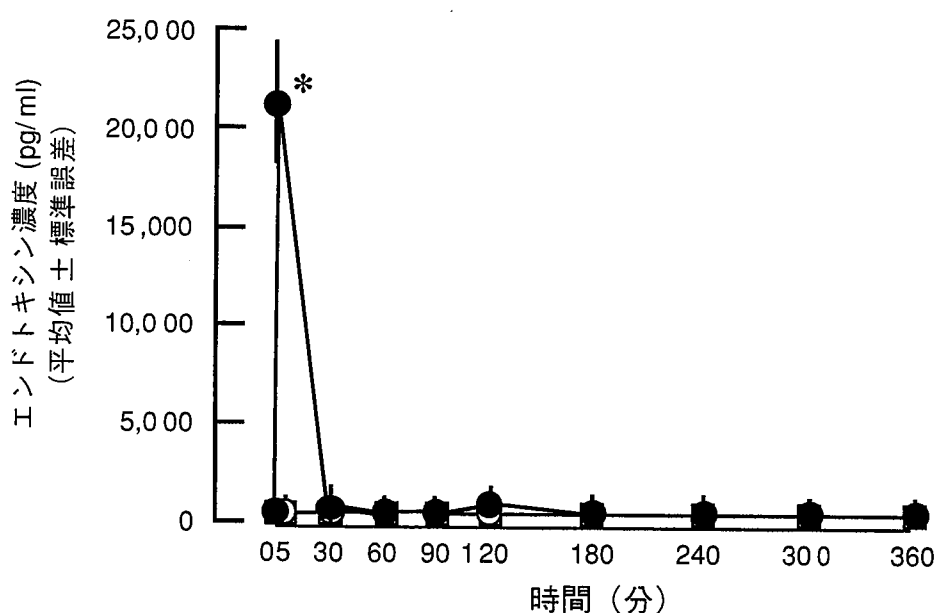


図4 化合物506刺激ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスの血中エンドトキシン濃度の経時的変化。C57BL/6マウスにガラクトサミン塩酸塩 (16mg/匹) を腹腔内投与した後、化合物506 (0.1 μ g/匹) を尾静脈に注射した。投与直後から経時的に血中エンドトキシン濃度をエンドトキシン試薬であるリムルステストにより測定した。●はガラクトサミン塩酸塩および化合物506の投与群、○はガラクトサミン塩酸塩投与群、□は非投与対照群のエンドキシン濃度を各々示している。また、Studentのt検定により、投与群と非投与群において1% (*) の危険率で有意の差が認められた。バーは標準誤差を示す。

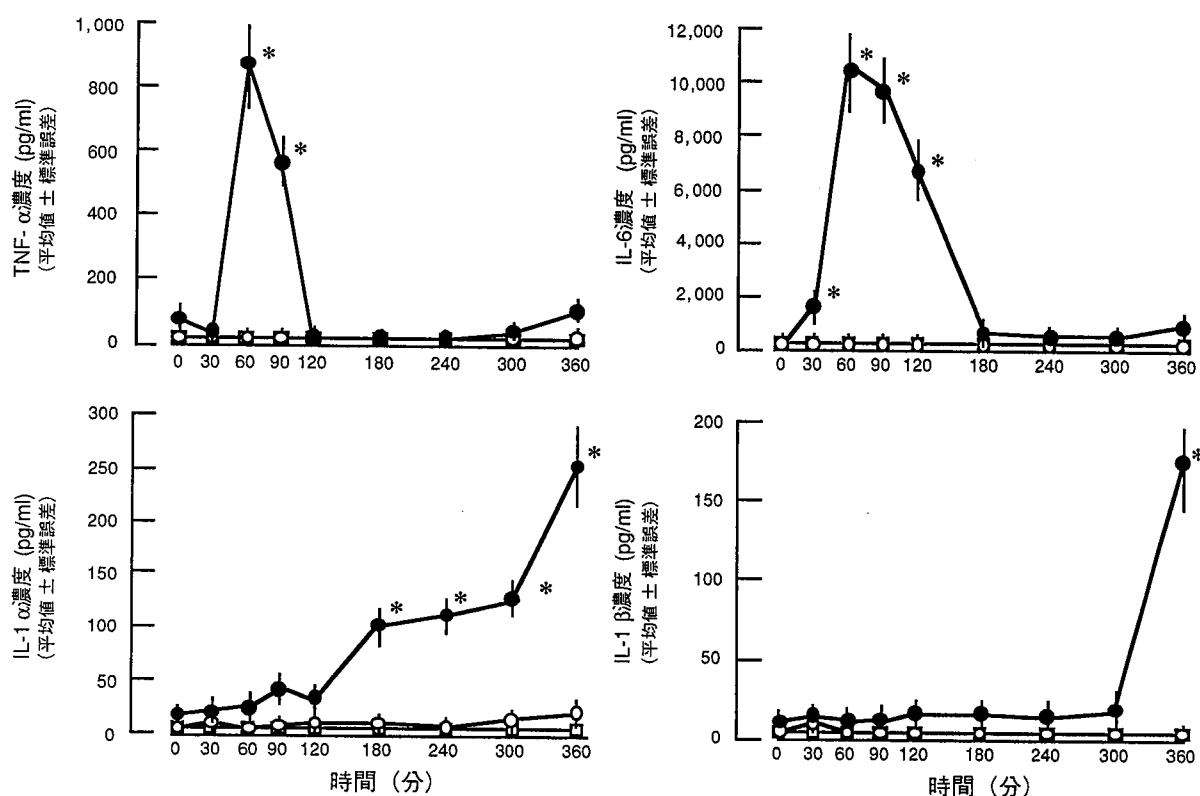


図5 ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに対する化合物506投与後の血中炎症性サイトカイン量の経時変化. C57BL/6マウスにガラクトサミン塩酸塩 (16mg/匹) を腹腔内投与した後, 化合物506 (0.1μg/匹) を尾静脈に注射した. 投与直後から経時的に採血して得た血清中のサイトカイン濃度をELISA法により測定した. ●はガラクトサミン塩酸塩および化合物506投与群, ○はガラクトサミン塩酸塩投与群, □は非投与対照群のサイトカイン量を示している. また, Studentのt検定により, 投与群と非投与群において1% (*) の危険率で有意の差が認められた. バーは標準誤差を示す.

6. イオノホアによるガラクトサミン負荷マウスの化合物506による致死活性に対する効果

化合物506 (0.1μg/匹) をガラクトサミン負荷C57BL/6マウスの尾静脈に投与後15分に, 所定量のカルシウムイオノホアA23187を腹腔内投与し, 24時間後のマウス致死活性を検討した. その結果, 表3に示すようにカルシウムイオノホアA23187の用量依存的に化合物506によるマウス致死活性を抑制した. また, イオノホアであるグラミシジンAやバリノマイシンについても同様に検討したが, これらのイオノホアでは明確な致死活性の抑制効果はみられなかった (表4). なお, 供試したイオノホア単独投与マウスでは特に影響はみられなかった.

表3 カルシウムイオノホアA23187による化合物506投与ガラクトサミン負荷C57BL/6マウス致死活性に対する効果

テスト標品	リピドA投与量 ($\mu\text{g}/\text{匹}$)	カルシウムイオノホアA23187の投与量/匹				
		10^{-4}M	10^{-5}M	10^{-6}M	10^{-7}M	0M
化合物506	0.1	0/5	0/5	3/5	5/5	5/5
対 照	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに化合物506 (0.1 $\mu\text{g}/\text{匹}$) を尾静脈より投与後15分に所定量のカルシウムイオノホアA23187を腹腔内に投与し、化合物506投与後24時間のマウス致死活性(死数/総数)を調べた。実験は3回実施し、代表的な結果を示す。

表4 イオノホアによる化合物506投与ガラクトサミン負荷C57BL/6マウス致死活性に対する効果

テスト標品	リピドA投与量 ($\mu\text{g}/\text{匹}$)	A23187	グラミシジンA	バリノマイシン	対照
		10^{-4}M	10^{-4}M	10^{-7}M	0M
化合物506	0.1	0/5	4/5	4/5	5/5
対 照	0	0/5	0/5	0/5	0/5

ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに化合物506 (0.1 $\mu\text{g}/\text{匹}$) を尾静脈より投与後15分に所定量のイオノホアを腹腔内に投与し、化合物506投与後24時間のマウス致死活性(死数/総数)を調べた。実験は3回実施し、代表的な結果を示す。

7. 化合物506によるガラクトサミン負荷マウスの血中サイトカインに対するイオノホアの作用

カルシウムイオノホアA23187, グラミシジンAあるいはバリノマイシンによる化合物506投与ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスの血中サイトカイン産生におよぼす影響について検討した。すなわち, TNF- α およびIL-6濃度は化合物506投与後60分, IL-1 α およびIL-1 β 濃度は投与後360分に各々マウスより採血して得た血清中のサイトカイン量をELISA法により測定した。血中のTNF- α およびIL-6濃度は, 供試したいずれのイオノホアによっても有意の抑制作用を示したが, IL-1 α では明確な抑制はみられなかった(図6)。他方, 血中のIL-1 β 濃度は, カルシウムイオノホアA23187により有意な抑制作用がみられたが, グラミシジンAやバリノマイシンではその効果は弱かった。

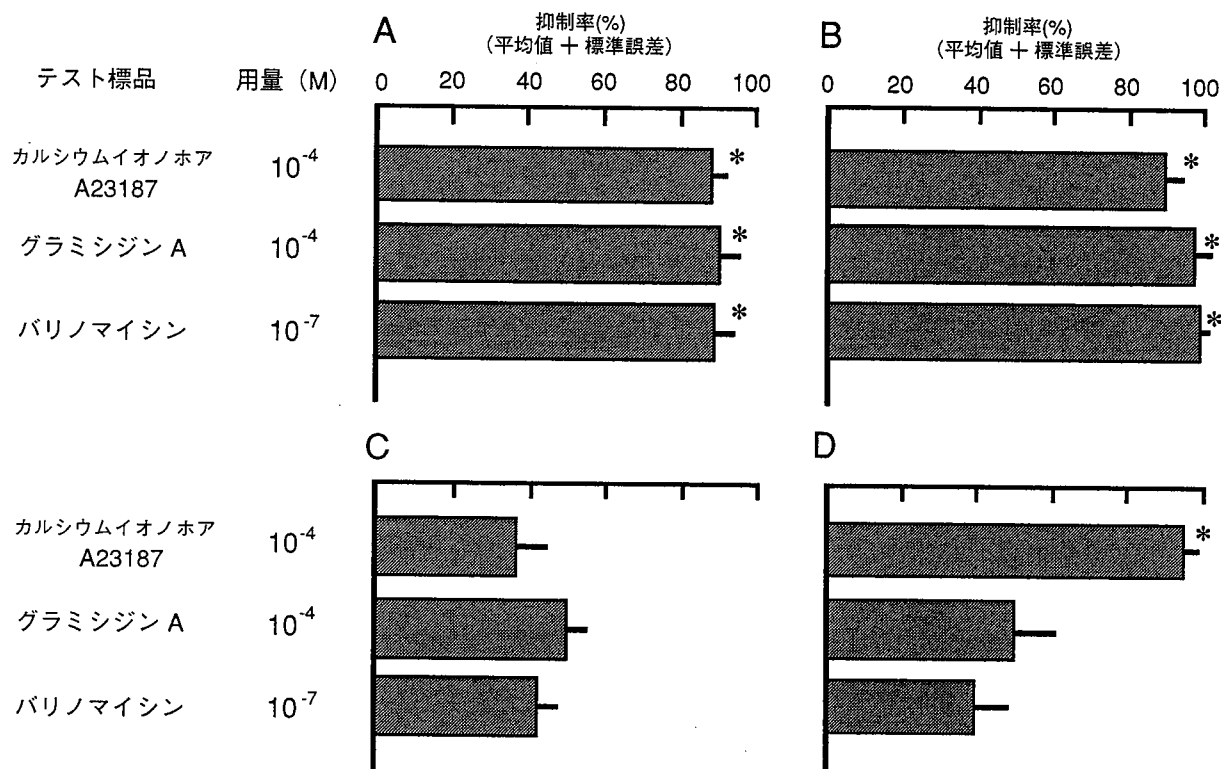


図6 イオノホアによる化合物506刺激ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスの血中サイトカインにおよぼす作用. ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに化合物506 (0.1 μ g/匹)を尾静脈より注射した. 投与15分後にイオノホアを腹腔内に投与し, TNF- α (A) およびIL-6 (B) の場合は化合物506投与後60分に, IL-1 α (C) およびIL-1 β (D) の場合は化合物506投与後360分に各々採血して得た血清中のサイトカイン量をELISA法により測定した. 結果は, イオノホア非投与マウスに対するイオノホア投与マウスのサイトカイン産生の抑制率 (%) で表した. Studentのt 検定により, イオノホア投与群と非投与群において1% (*) の危険率で有意の差が認められた. バーは標準誤差を示す.

8. ハムスター抗マウスIL-1 β 抗体による化合物506投与ガラクトサミン負荷C57BL/6マウス致死活性に対する効果

化合物506 (0.1 μ g/匹) を投与後15分に, ハムスター抗マウスIL-1 β 抗体 (100 μ g/匹) を尾静脈より投与し, 24時間後のマウス致死活性に対する効果を検討した. その結果, 表5に示すように化合物506によるマウス致死活性を抑制した.

表5 ハムスター抗マウスIL-1 β 抗体による化合物506投与ガラクトサミン負荷C57BL/6マウス致死活性に対する効果

テスト標品	投与量 ($\mu\text{g}/\text{匹}$)	化合物506 ($\mu\text{g}/\text{匹}$)	
		0.1	0
抗IL-1 β 抗体	100	0/6	0/6
対 照	0	6/6	0/6

ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに化合物506 (0.1 $\mu\text{g}/\text{匹}$) を尾静脈より投与後15分に、ハムスター抗マウスIL-1 β 抗体 (100 $\mu\text{g}/\text{匹}$) を同マウスの尾静脈より投与し、化合物506投与後24時間のマウス致死活性 (死数/総数) を調べた。実験は3回実施し、代表的な結果を示す。

考 察

P. gingivalis LPSは、大腸菌やサルモネラ属菌などの腸内細菌由来のいわゆる古典的LPSに比べて非常に低毒性である¹⁷⁻¹⁹⁾。また、*P. gingivalis* LPSの活性中心の本体であるリピドAも同様に低毒性であることが報告されている¹⁷⁾。本研究で供試した*P. gingivalis* リピドA²⁰⁾は、ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに対する致死活性が、大腸菌型合成リピドAである化合物506のその約1,600分の1と非常に弱い (表2)。エンドトキシンによるマウス致死活性は、宿主細胞から産生される内因性メディエーターによって惹起されることが報告されている⁴⁻⁸⁾。これらメディエーターとしては、マクロファージから産生される炎症性サイトカインが重要であると考えられる。Freudenbergら²⁸⁾は、エンドトキシンに耐性のC3H/HeJマウスにLPS感受性であるC3H/HeNマウスのマクロファージを移入すると、エンドトキシンに対し非常に感受性が高くなり、LPSによる致死活性を発揮することを示した。本研究では、低毒性である*P. gingivalis* リピドAおよび内毒素活性が強いことで知られている化合物506を用いて、C57BL/6マウス由来の種々のマクロファージからの炎症性サイトカインの産生誘導について検討した (図1)。これらマクロファージの中で、肺胞および腹腔由来のマクロファージから明確な炎症性サイトカインの産生誘導がみられた。なかでも化合物506による肺胞マクロファージからのIL-1 α およびIL-1 β 産生は、*P. gingivalis* リピドAのそれと比べ有意に高いものであった。Takaiら²⁹⁾は、ラットの種々の臓器から調整した単球/マクロファージをLPS刺激した場合、そのTNF- α mRNA発現は、肺胞マクロファージおよび末梢血単核球で強く、iNOSおよびIL-1 β mRNA発現は腹腔や肺胞マクロファージおよび末梢血単核球で強いことを示して

いる。しかしながら、クッパー細胞では、IL-6 mRNAの発現は全くみられなかったことを報告している。また、マクロファージ刺激因子をマウスの静脈内に投与すると、LPS刺激による脾臓マクロファージからのIL-6産生は、非投与対照マウスのそれと比べて5倍に上昇するが、肝臓、肺胞および腹腔マクロファージにおいては、増強効果はほとんどみられない³⁰⁾。本研究において肺胞マクロファージは明確なサイトカインの産生誘導を示したが、肺胞マクロファージは末梢血単球とは生化学的性状、機能および細胞表面の抗原分子が異なることが示されている³¹⁾。エンドトキシン耐性のC3H/HeJマウスから得られた肺胞マクロファージは、LPSに感受性であるC3HeB/FeJマウスのそれに匹敵するTNF- α 産生を誘導し³²⁾、肺胞マクロファージは他の臓器由来のマクロファージとは異なった機能を担っていることが示唆される。本研究に供試した*P. gingivalis*リピドAによるヒト末梢血単球／マクロファージからのIL-1 β およびIL-6産生誘導は図1に示したマウス肺胞マクロファージからのそれとよく一致している²¹⁾。

*P. gingivalis*リピドAあるいは化合物506で刺激したガラクトサミン負荷C57BL/6マウス由来の肺胞マクロファージの細胞内情報伝達系について、プロテインキナーゼ阻害剤を用いて検討した(図2)。本研究では、PKCに対して強い阻害作用を示すH-7³³⁾と弱い阻害作用を示すHA1004^{34, 35)}、環状ヌクレオチド依存性プロテインキナーゼ阻害剤であるH-8³⁵⁾およびカルモデュリンに対して強い阻害効果を示すW-7^{36, 37)}と弱い阻害作用を示すW-5³⁸⁾を各々用いて、内毒素活性の異なるリピドAにより刺激したガラクトサミン負荷C57BL/6マウスの肺胞マクロファージからの炎症性サイトカイン産生性について調べた。その結果、TNF- α 産生においては、内毒素活性の強弱にかかわらず両リピドAともにH-7では強く、HA1004では弱い抑制効果がみられた。また、H-8では濃度依存的に抑制効果がみられた。しかしながら、W-7およびW-5ではほぼ同程度の抑制を示し、特異的な抑制効果はみられなかった。これらの結果から、両リピドA刺激ともにTNF- α 産生には、PKCおよび環状ヌクレオチド依存性プロテインキナーゼの活性化が関与することが示唆された。IL-6産生では、*P. gingivalis*リピドAおよび化合物506刺激した肺胞マクロファージにおいて、PKC、環状ヌクレオチド依存性プロテインキナーゼおよびカルモデュリンが関与することが示された。Higashimotoら²³⁾は、マウス肺胞マクロファージをカルシトリオール存在下でLPS刺激するとTNF- α 産生が増強され、その産生はH-7やW-7

により抑制されることを示している。LPS刺激したヒト単球からのTNF- α ならびにIL-6産生は、H-7やH-8と同様の作用を示すことで知られるH-9により阻害されることから、これらサイトカイン産生はPKC特異的であることが報告されている^{39,40)}。これらの所見は、本研究における化合物506で刺激したマウス肺胞マクロファージにおける結果と一致している。また、IL-1 α 産生については、供試したいずれのプロテインキナーゼ阻害剤でも抑制効果はみられず、PKC阻害剤であるH-7処理により肺胞マクロファージからの同サイトカイン産生が増強するとの所見を得た。種々のサイトカイン産生において、細胞内情報伝達系が必ずしも同じではないことを示唆している。さらにIL-1 β 産生についてW-7およびW-5を用いて調べた結果から、*P. gingivalis*リピドA刺激した肺胞マクロファージにおいて特異的な抑制効果がみられたが、化合物506刺激した場合にはみられなかった(図2)。同様の所見は、肺胞マクロファージのIL-1 β mRNAレベルにおいてもみられた(図3)。したがって*P. gingivalis*リピドA刺激によるガラクトサミン負荷C57BL/6マウスの肺胞マクロファージからのIL-1 β の低産生性には、化合物506のそれとは異なり、その細胞内情報伝達においてカルモデュリンの活性化が特異的に関与していることが示唆された。カルモデュリンは細胞内の主たるカルシウム結合蛋白質であり、4分子のCa²⁺と結合することにより活性化し、多くの酵素活性を誘導する⁴¹⁾。OhmoriとHamilton⁴²⁾は、C57BL/6マウスの腹腔マクロファージをLPS刺激して誘導されるIL-1 α やIL-1 β mRNAの発現におよぼすカルモデュリン阻害剤の効果について、IL-1 α mRNA発現は抑制されないが、IL-1 β mRNAは抑制されることを報告している。また、Kovacs⁴³⁾らは、LPS刺激したC57BL/6マウス腹腔マクロファージからのIL-1産生は、H-7およびW-7により抑制されるが、TNF- α 産生はW-7では抑制されないことを示している。しかしながら、本研究で示した化合物506刺激による肺胞マクロファージからのIL-1 β 産生はW-7では抑制されなかった(図2)。これらの所見から、同系マウスでも、その局在するマクロファージや産生サイトカインの違いにより、細胞内情報伝達系が異なる可能性があることが考えられる。本研究で供試した*P. gingivalis*リピドAで刺激したヒト末梢血単核球細胞からのIL-1 β 産生誘導は、化合物506に比べ弱く、その低産生性にはカルモデュリンキナーゼ活性化の関与が報告されている²²⁾。

6時間後には致死活性を惹起する0.1 μ g (ノ匹) 濃度の化合物506を投与したガラクトサ

ミン負荷C57BL/6マウスの血中エンドトキシン濃度を経時的に調べた（図4）。リムルス試薬はエンドトキシン感受性因子であるC因子だけではなく、真菌、担子菌、藻類等の菌体成分として広く分布している(1-3)- β -D-グルカン感受性因子であるG因子にも反応性を示す^{44, 45)}。そのため本研究で投与したリピドAの血中濃度を正確に測定するために、C因子のみと反応性を示すエンドスピー法⁴⁶⁾を用いて測定した。その結果、化合物506投与直後にエンドトキシン濃度はピークを示したが、投与30分後には同マウス血中にエンドトキシンは検出されなかった（図4）。つぎに同一条件下でマウス血中の炎症性サイトカイン濃度について検討した。その結果、化合物506投与後60分にTNF- α およびIL-6濃度はピークに達し、その後漸次減少した。ついで120分後からはIL-1 α 濃度が上昇傾向を示し、致死直前（化合物506投与後6時間）にはIL-1 β の急激な上昇がみられた（図5）。Christopheら⁴⁷⁾は、ラットに致死量以下の*Escherichia coli* O55: B5 LPSを投与すると60分後に血中TNF- α 濃度が上昇し、その後減少することを報告している。Van Zeeら⁷⁾は、ヒビに致死量の大腸菌を静脈注射した際にTNF- α の上昇がみられ、ついでIL-1 β 、IL-6およびIL-8が増加した。しかしながら、致死量以下のLPSを投与した場合にはTNF- α 、IL-6およびIL-8の上昇はみられたが、IL-1 β は検出されなかったことを示している。また、致死量以下のIL-1 α を注射した場合、IL-6およびIL-8濃度は上昇するが、TNF- α やIL-1 β は検出されなかったことも併せて報告している。Toki⁴⁸⁾らは、LP-BM5マウス白血病ウイルスを感染させたC57BL/6マウスは、LPSによる致死活性が増強することを示しており、その際血中のTNF- α 濃度の有意な上昇はみられないが、IL-1 β 濃度は著明に上昇することを示している。また、ヒトに*E. coli* O113: H10: Kを静脈内投与した場合、エンドトキシン濃度は投与後30分に血中から検出されなくなるとともに、TNF- α の上昇がみられ90分後にピークを示した。ついで120分後にIL-6がピークに達したが、IL-1 β は検出されなかった⁴⁹⁾。これらの所見から、投与するエンドトキシン量にかかわらずTNF- α およびIL-6は、エンドトキシン投与初期にみられ、これらの所見は本研究の結果と一致している。

内毒素作用の異なるリピドAによる*in vitro*でのマクロファージからのサイトカイン産生性（図1）および*in vivo*における血中サイトカインの経時的変化の結果（図5）から総合的に鑑みて、リピドAによるマウス致死活性にはIL-1 β の増加が強く関与しているものと考えられる。また、*P. gingivalis*リピドAのIL-1 β の低産生性は、カルモデュリンの活性化が重要であることを示した（図2, 3）。そこで化合物506によるIL-1 β 産生を細胞

内カルモデュリンを活性化することにより抑制し、結果的に致死活性を阻止することができるのではないかと考えた。カルシウムイオノホアA23187は、細胞内へのCa²⁺を積極的に取り込み細胞質内のCa²⁺濃度を上昇させる。その結果、細胞内情報伝達系の一つであるCa²⁺結合蛋白であるカルモデュリンと複合体を形成し、Ca²⁺-カルモデュリン依存性キナーゼを活性化することから、カルモデュリンキナーゼ活性剤として用いられている^{50, 51)}。本研究では、ガラクトサミン負荷C57BL/6マウスに致死量(0.1μg/匹)の化合物506投与後15分に所定量のカルシウムイオノホアA23187を腹腔内投与することにより、用量依存的にマウス致死活性を抑制した(表3)。イオノホアは、一般的に細胞の脂質二重層膜に取り込まれることによりイオンの膜通過を容易にする物質である。分子機構としては、イオンをカゴ型に抱き込んで膜中を移動するキャリア型と数個の分子が膜にイオン通過路を形成することでイオン交換を行うチャンネル型に分類される。キャリア型に属するカルシウムイオノホアA23187⁵²⁾は、化合物506によるマウス致死活性を抑制した。しかしながら、同じキャリア型でナトリウムイオンに対する選択性の高いバリノマイシン^{52, 53)}やチャンネル型であるグラミシジンA⁵²⁾は、ガラクトサミン負荷マウスのリピドAによる致死活性に対して明確な抑制効果を示さなかった(表4)。また、これらイオノホアによる化合物506投与マウスの血中炎症性サイトカイン量に対する効果について調べた(図6)。その結果、いずれのイオノホアにおいても血中TNF-αおよびIL-6では強く、IL-1αでは弱い産生の低下がみられた。しかしながら、血中IL-1β濃度は、カルシウムイオノホアA23187を投与した場合にのみ著明な抑制効果を示した。また、IL-1β産生抑制とマウス致死活性の抑制効果との間に高い正の相関関係($r=0.99$)を示した。これらの所見は、血中IL-1βの上昇を抑えることが、致死活性の抑制につながることを示唆しており、化合物506によるガラクトサミン負荷マウスの致死活性をハムスター抗マウスIL-1β抗体を用いて抑制したことからも推測される(表5)。

従来、エンドトキシンの直接作用により惹起されると考えられていたエンドトキシンショックが、エンドトキシンに対する宿主側の反応の結果起こるとの認識がなされ、なかでもサイトカインが、そのショックにおいて中心的役割を演じていることが考えられる。その致死活性因子であるサイトカインを制御することが、エンドトキシンショックを含む敗血症の予防や治療に有効であることが示唆される。このような考え方によりマウス抗TNFモノクローナル抗体を前投与したヒビが、大腸菌によるショックから回避し

たとの知見から、抗TNF抗体療法が注目されている⁵⁴⁾。また、IL-1は抗原性が低いため同サイトカインに対する中和活性の強い抗体は開発されておらず、本研究においても化合物506に対するマウス致死活性を阻止するために、高濃度（100 μ g/匹）の抗体を必要とした。しかしながら、これら抗IL-1 β 抗体を用いてマウス致死活性を阻止できたことは、エンドトキシンによる敗血症性致死活性において、IL-1 β を低下させることが重要であると考えられる。また、カルモデュリンを含む細胞内情報伝達系を調節することは、今後エンドトキシンショックを含めた敗血症の予防や治療において、新しい基礎的情報を与えるものとして期待される。

結 論

*P. gingivalis*リピドAならびに大腸菌型リピドA刺激によるガラクトサミン負荷C57BL/6マウス由来マクロファージからの炎症性サイトカインの産生誘導やその作用機構の一端を検討し、また、大腸菌型リピドAによるマウス致死活性の抑制について調べた。その結果、1) *P. gingivalis*リピドAは、大腸菌型リピドAに比べ致死活性が非常に弱い。また、*P. gingivalis*リピドA刺激したマウス肺胞マクロファージからのIL-1 β 産生は弱く、この低産生性には、細胞内カルモデュリンの活性化が深く関与していることが示唆された。2) 大腸菌型リピドA投与後のガラクトサミン負荷マウス血中におけるIL-1 β 濃度の上昇と致死活性との間には高い正の相関関係 ($r=0.99$) がみられた。3) 大腸菌型リピドAを投与したガラクトサミン負荷マウスに、カルモデュリンキナーゼ活性剤であるカルシウムイオノホアA23187を投与すると、血中IL-1 β 濃度が低下し、致死活性も抑制された。4) 大腸菌型リピドAを投与したガラクトサミン負荷マウスにハムスター抗マウスIL-1 β 抗体を投与すると、その致死活性が抑えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、ご教示、ご鞭撻を賜りました本学口腔外科学第二講座作田正義教授に感謝致します。

また、本研究に際し、懇篤なる御指導と校閲の労をとられた朝日大学歯学部口腔細菌学講座小川知彦教授に深謝致します。さらに最後に、さまざまなご援助を頂いた本学口腔外科学第二講座の教室員の皆様にも厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Shenep, J.L. (1996) : Septic shock. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.*, **12**, 209-241.
- 2) Labeta, M.O., Durieux, J.J., Spagnoli, G., Fernandez, N., Wildenes, J. and Herrmann, R. (1993) : CD14 and tolerance to lipopolysaccharide, biochemical and functional analysis. *Immunology*, **80**, 415-423.
- 3) Wenzel, R.P., Pinsky, M.R., Ulevitch, R.J. and Young, L. (1996) : Current understanding of sepsis. *Clin. Infect. Dis.*, **22**, 407-413.
- 4) Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A.J. and Rietschel, E.T. (1995) : Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.*, **164**, 383-389.
- 5) Tracey, K.J., Beutler, B., Lowry, S.F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I.W., Hariri, R.J., Fahey III, T.J., Zentella, A., Albert, J.D., Shires, G.T. and Cerami, A. (1986) : Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, **234**, 470-474.
- 6) Zanetti, G., Heumann, D., Gérain, J., Kohler, J., Abbet, P., Barras, C., Lucas, R., Glauser, M.P. and Baumgartner, J.D. (1992) : Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. *J. Immunol.*, **148**, 1890-1897.
- 7) Van Zee, K.J., DeForge, L.E., Fischer, E., Marano, M.A., Kenney, J.S., Remick, D.G., Lowry, S.F. and Moldawer, L.L. (1991) : IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J. Immunol.*, **146**, 3478-3482.
- 8) Lee, W.J., Farmer, J.L., Hilty, M. and Kim, Y.B. (1998) : The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. *Infect. Immun.*, **66**, 1421-1426.
- 9) Read, R.C. (1998) : Experimental therapies for sepsis directed against tumour necrosis factor. *J. Antimicrob. Chemother.*, **41** (Suppl. A), 65-69.
- 10) Lynn, W.A. (1998) : Anti-endotoxin therapeutic options for the treatment of sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.*, **41** (Suppl. A), 71-80.
- 11) Finch, R.G. (1998) : Design of clinical trials in sepsis: problems and pitfalls. *J. Antimicrob. Chemother.*, **41** (Suppl. A), 95-102.
- 12) Nicoletti, F., Mancuso, G., Cusumano, V., Marco, R.D., Zacccone, P., Bendtzen, K. and Teti,

- G. (1997) : Prevention of endotoxin-induced lethality in neonatal mice by interleukin-13. *Eur. J. Immunol.*, 27, 1580-1583.
- 13) Guglielmotti, A., Aquilini, L., Rosignoli, M.T., Landolfi, C., Soldo, L., Coletta, I. and Pinza, M. (1997) : Benzylamine protection in a mouse model of endotoxemia. *Inflamm. Res.*, 46, 332-335.
- 14) Opal, S.M. and Yu Jr, R.L. (1998) : Antiendotoxin strategies for the prevention and treatment of septic shock. *Drugs*, 55, 497-508.
- 15) Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Ogawa, T., Takahashi, I., Ikeda, T., Otsuka, K., Shimauchi, H., Kasai, N., Mashimo, J., Nagao, S., Tanaka, A., Tanaka, S., Harada, K., Nagaki, K., Kitamura, H., Shiba, T., Kusumoto, S., Imoto, M. and Yoshimura, H. (1985) : Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an *Escherichia coli* re-mutant. *Infect. Immun.*, 49, 225-237.
- 16) Kanegasaki, S., Tanamoto, K., Yasuda, T., Homma, J.Y., Matsuura, M., Nakatsuka, M., Kumazawa, Y., Yamamoto, A., Shiba, T., Kusumoto, S., Imoto, M., Yoshimura, H. and Shimamoto, T. (1986) : Structure-activity relationship of lipid A: Comparison of biological activities of natural and synthetic lipid A's with different fatty acid compositions. *J. Biochem.*, 99, 1203-1210.
- 17) Ogawa, T. (1994) : Immunobiological properties of chemically defined lipid A from lipopolysaccharide of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *Eur. J. Biochem.*, 219, 737-742.
- 18) Nair, B.C., Mayberry, W.R., Dziak, R., Chen, P.B., Levine, M.J. and Hausmann, E. (1983) : Biological effects of a purified lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *J. Periodont. Res.*, 18, 40-49.
- 19) Fujiwara, T., Ogawa, T., Sobue, S. and Hamada, S. (1990) : Chemical, immunological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 319-326.
- 20) Ogawa, T. (1993) : Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *FEBS Lett.*, 332, 197-201.
- 21) Ogawa, T., Uchida, H. and Amino, K. (1994) : Immunobiological activities of chemically

defined lipid A from lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology*, 140, 1209-1216.

22) Ogawa, T. and Uchida, H. (1996) : Differential induction of IL-1 β and IL-6 production by the nontoxic lipid A from *Porphyromonas gingivalis* in comparison with synthetic *Escherichia coli* lipid A in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 14, 1-13.

23) Higashimoto, Y., Ohta, M., Iwamoto, Y., Fujimoto, H., Uetani, K., Suruda, T., Nakamura, Y., Nakai, S. and Funasako, M. (1995) : Stimulatory effect of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on mouse alveolar macrophage tumor necrosis factor- α production in vitro: involvement of protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase. *Respiration*, 62, 89-94.

24) Böyum, A. (1968) : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 97, 77-89.

25) Rappolee, D.A., Wang, A., Mark, D. and Werb, Z. (1989) : Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J. Cell. Biochem.*, 39, 1-11.

26) Galanos, C., Freudenberg, M.A. and Reutter, W. (1979) : Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5939-5943.

27) Kärber, G. (1931) : *Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer Reihenversuche*. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 162, 480-483.

28) Freudenberg, M.A. and Galanos, C. (1988) : Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect. Immun.*, 56, 1352-1357.

29) Takai, N., Kataoka, M., Higuchi, Y., Matsuura, K. and Yamamoto, S. (1997) : Primary structure of rat CD14 and characteristics of rat CD14, cytokine, and NO synthase mRNA expression in mononuclear phagocyte system cells in response to LPS. *J. Leukoc. Biol.*, 61, 736-744.

30) Asakura, E., Yamauchi, T., Umemura, A., Hanamura, T. and Tanabe, T. (1997) : Intravenously administered macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) specifically acts on the spleen, resulting in the increasing and activating spleen macrophages for cytokine production in mice. *Immunopharmacology*, 37, 7-14.

- 31) Du Bois, R.M. (1985) : The alveolar macrophage. *Thorax*, 40, 321-327.
- 32) Ryan, L.K. and Vermeulen, M.W. (1995) : Alveolar macrophages from C3H/HeJ mice show sensitivity to endotoxin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 12, 540-546.
- 33) Kawamoto, S. and Hidaka, H. (1984) : 1-(5-Isoquinoline-sulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 125, 258-264.
- 34) Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. and Sasaki, Y. (1984) : Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*, 23, 5036-5041.
- 35) Asano, T. and Hidaka, H. (1984) : Vasodilatory action of HA1004 [*N*-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide], a novel calcium antagonist with no effect on cardiac function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231, 141-145.
- 36) Hidaka, H., Yamaki, T., Naka, M., Tanaka, T., Hayashi, H. and Kobayashi, R. (1980) : Calcium-regulated modulator protein interacting agents inhibit smooth muscle calcium-stimulated protein kinase and ATPase. *Mol. Pharmacol.*, 17, 66-72.
- 37) Hidaka, H., Sasaki, Y., Tanaka, T., Endo, T., Ohno, S., Fujii, Y. and Nagata, T. (1981) : *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4354-4357.
- 38) Kanamori, M., Naka, M., Asano, M. and Hidaka, H. (1981) : Effects of *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide and other calmodulin antagonists (calmodulin interacting agents) on calcium-induced contraction of rabbit aortic strips. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 217, 494-499.
- 39) Weinstein, S.L., June, C.H. and DeFranco, A.L. (1993) : Lipopolysaccharide-induced protein tyrosine phosphorylation in human macrophages is mediated by CD14. *J. Immunol.*, 151, 3829-3838.
- 40) Beaty, C.D., Franklin, T.L., Uehara, Y. and Wilson, C.B. (1994) : Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur. J. Immunol.*, 24, 1278-1284.

- 41) Tanaka, T., Ito, M., Ohmura, T. and Hidaka, H. (1985) : Ca^{2+} -dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase is activated by poly (L-aspartic acid). *Biochemistry*, **24**, 5281-5284.
- 42) Ohmori, Y. and Hamilton, T.A. (1992) : Ca^{2+} and calmodulin selectively regulate lipopolysaccharide-inducible cytokine mRNA expression in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **148**, 538-545.
- 43) Kovacs, E.J., Radzioch, D., Young, H.A. and Varesio, L. (1988) : Differential inhibition of IL-1 and TNF- α mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages. *J. Immunol.*, **141**, 3101-3105.
- 44) Kakinuma, A., Asano, T., Torii, H. and Sugino, Y. (1981) : Gelation of *Limulus* amoebocyte lysate by an antitumor (1-3)- β -D-glucan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434-439.
- 45) Morita, T., Tanaka, S., Nakamura, T. and Iwanaga, S. (1981) : A new (1-3)- β -D-glucan mediated coagulation pathway found in *Limulus* amebocytes. *FEBS Lett.*, **129**, 318-324.
- 46) Obayashi, T., Tamura, H., Tanaka, S., Ohki, M., Takahashi, S., Arai, M., Masuda, M. and Kawai, T. (1985) : A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombined limulus coagulation enzymes and its clinical applications. *Clin. Chim. Acta.*, **149**, 55-65.
- 47) Christophe, S., Jacques, D. and Gérard, B. (1998) : Differential regulation of brain and plasma TNF α produced after endotoxin shock. *Neuro Report*, **9**, 309-313.
- 48) Toki, S., Hiromatsu, K., Aoki, Y., Makino, M. and Yoshikai, Y. (1997) : Protective effects of granulocyte colony-stimulating factor on endotoxin shock in mice with retrovirus-induced immunodeficiency syndrome. *Cytokine*, **9**, 781-786.
- 49) Deventer, J.H., Büller, H.R., ten Cate J.W., Aarden, L.A, Hack, C.E. and Sturk, A. (1990) : Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood*, **76**, 2520-2526.
- 50) Li, W.W., Alexandre, S., Cao, X. and Lee, A.S. (1993) : Transactivation of the grp78 promoter by Ca^{2+} depletion. *J. Biol. Chem.*, **268**, 12003-12009.
- 51) Sudo, Y. and Mariash, C.N. (1994) : Two-glucose-signaling pathways in S14 gene transcription in primary hepatocytes: a common role of protein phosphorylation. *Endocrinology*, **134**, 2532-2540.

- 52) Pressman, B.C. (1976) : Biological applications of ionophores. *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 501-530.
- 53) Makowski, P., Szewczyk, A., Jasinska, R. and Pikula, S. (1997) : An antagonist of ATP-regulated potassium channels, the guanidine derivative U-37883A, stimulates the synthesis of phosphatidylserine in rat liver endoplasmic reticulum membranes. *FEBS Lett.*, **409**, 292-296.
- 54) Tracey, K.J., Fong, Y., Hesse, D.G., Manogue, K.R., Lee, A.T., Kuo, G.C., Lowry, S.F. and Cerami, A. (1987) : Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*, **330**, 662-664.