

内毒素性リポ多糖の生物活性：*in vivo*でのマウス皮膚反応 および*in vitro*でのマクロファージからの組織因子産生

石 川 義 人

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：工藤啓吾教授)

岩手医科大学医学部細菌学講座

(指導：吉田昌男教授)

Abstract : A single intradermal injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS) caused hemorrhagic necrosis in mouse skin (skin reaction). A tissue factor, membrane glycoprotein, is known to activate the extrinsic blood coagulation cascade. In this study, an attempt was made to compare the structural requirements of LPS to induce skin reaction *in vivo*, and to produce tissue factor by peritoneal macrophages *in vitro*. The skin reaction was induced by injection of a smooth type (S) - LPS, rough type (R : Ra-Re) - LPS, and lipid A derived from *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli* in a dose-dependent manner, but not by the polysaccharide portion of S-LPS. Re-LPS induced the strongest dermal inflammation (activation) in ddY mice. This was followed by Rc-LPS, lipid A (the activity of Rc-LPS was similar to lipid A), Ra-LPS and S-LPS in the order mentioned. In the C3H/HeN mice, Re-LPS and lipid A induced the skin reaction to almost the same levels as in the ddY mice. The activity of synthetic *E. coli* type lipid A (#506) which has a double acyl structure was similar to or slightly weaker than that by natural lipid A, whereas the activity of a synthetic counterpart of a lipid A precursor (#406) was considerably weak. In the C3H/HeJ mice, Re-LPS and lipid A did not induce any hemorrhagic response. The macrophage suspension of C3H/HeN mice was stimulated with Re-LPS at 37°C for 6 hours, and the sonic lysate of the cells was used to estimate the tissue factor activity by the clotting method using a fibrometer. The tissue factor was produced by Re-LPS in ddY and C3H/HeN mouse macrophages. The activity of #406 was the same as that of #506. C3H/HeJ macrophages did not respond to even a high dose of Re-LPS. These results indicate that the lipid A portion of LPS is very important to cause a reaction both *in vivo* and *in vitro*. As to the lipid A structure, the double acyl structure is not required for the production of tissue factor by macrophages, but is required for the induction of skin reaction.

Key words : LPS, skin reaction, tissue factor, synthetic lipid A, hemorrhagic necrosis

緒 言

細菌内毒素 (LPS : lipopolysaccharide) は

グラム陰性菌の最外層に存在し、その生物活性
中心はリピドAであり、多くの動物において、
きわめて多彩な生物活性を示すことが報告され

Biological activities of bacterial lipopolysaccharides : skin reaction in mice *in vivo* and
production of tissue factor by macrophages *in vitro*.

Yoshihito ISHIKAWA

(First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical
University, Morioka, 020 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 18 : 51-66, 1993

ている¹⁻³⁾。口腔領域においてLPSは歯周疾患の成因や悪性腫瘍患者の播種性血管内凝固(DIC: disseminated intravascular coagulation)と重要なかわり合いを有する。最近のリピドAの化学合成研究の発達により種々の生物活性と化学構造との相関性が徐々に解明されつつあるものの、未だ詳細については不明な点が多い。そこで著者は、種々ある生物活性の中で*in vivo*と*in vitro*の両系にそれぞれ一つずつのパラメーターを設定し、LPSの構造と生物活性の相関について検討を加えた⁴⁾。

*In vivo*としては皮膚反応(出血壊死)であるが、LPSによって惹起される皮膚反応としてはウサギを用いたシュワルツマン反応が古くから最もよく知られている⁵⁾。これに対し、マウスを用いた皮膚反応の報告^{6,7)}もあるが、LPSの構造との相関についてはまだ検討されたものはみられない。一方、*in vitro*の系としてはマウスの腹腔マクロファージがLPSで刺激された際に産生される組織因子(tissue factor, 組織トロンボプラスチン)の活性を用いた⁸⁾。組織因子は末梢血、単球、骨髄や脾臓のマクロファージおよび顆粒球などから産生される。これらの細胞をLPSで刺激すると組織因子の産生がさらに亢進する⁹⁻¹²⁾。組織因子はⅦ因子を介して外因性凝固系を活性化し、最終的にはフィブリノーゲンを水解してフィブリンを析出させる。

本研究ではLPSのもつ種々の活性のうち、上記のマウス皮膚反応(*in vivo*)とマクロファージからの組織因子産生の系(*in vitro*)についてLPSの構造と活性との関係を明らかにする目的で比較検討した。

材料および方法

マウス: ddY マウス(静岡農協)体重30~35 g, C3H/HeN マウスおよびC3H/HeJ(日本クレア)体重22~25 gの雄で8~12週齢のものを使用した。

LPSおよびこの関連物質: *Salmonella minnesota*のS型LPS(S-LPS)はList biological laboratories, Inc.より購入したものを、S.

minnesota R 60由来のRa型LPS(Ra-LPS)はC. Galanos博士より分与されたものを、S. *minnesota* R 595のRe型LPS(Re-LPS)はPCP(フェノールクロロホルム、石油エーテル混合液)法で抽出したものである¹³⁾。

Salmonella typhimurium LT 2のS-LPSはフェノール抽出したものを、リピドAはS-LPSを酢酸で水解したものを、またS-LPS由来の多糖画分(PS画分)はS-LPSを酢酸で水解し、その可溶性画分をゲル濾過したものである。

Escherichia coli O 111: B 4のS-LPS, *E. coli* J 5由来のRc型LPS(Rc-LPS)およびリピドAは, Ribi Immunochemical Research, Inc.より購入したものである。

合成リピドAはFig. 1に示す通りグルコサミンジサッカライドを基本構造とし、406は脂肪酸が2, 3, 2', 3'位に結合しており(ジサッカライド前駆体Ia), 506はさらに脂肪酸が2モル結合した構造になっており、大腸菌のリピドAと同一構造を有する。さらにそれぞれ1位と4'位のリン酸基の結合の有無によって403, 404, 405, 406あるいは503, 504, 505, 506に分類される。406と506は第一化学社製を、503~505は芝 哲夫博士より分与されたものを使用した。

アルカリ処理糖脂質(NaOCH₃-ReGl): S. *minnesota* R 595(Re-LPS)よりPCP法で抽出したRe変異株のLPSに相当する糖脂質(ReGl)を0.25 NのNaOCH₃で37℃, 10時間処理し、アシル結合脂肪酸を除去した¹⁴⁾もので、城西大学薬学部久恒和仁博士より分与された。

スフィンゴ糖脂質(glycosphingolipid): 典型的なLPSとは構造が異なり、リポ多糖の主要成分を保有しない*Sphingomonas paucimobilis*から分離したもの¹⁵⁾で、北里研究所の川原一芳博士より分与された。

血小板活性化因子(PAF: platelet activating factor): Avanti polar-lipids, Inc.より市販されているもの(使用まで-80℃に保管)を使用した。

1. 皮膚反応

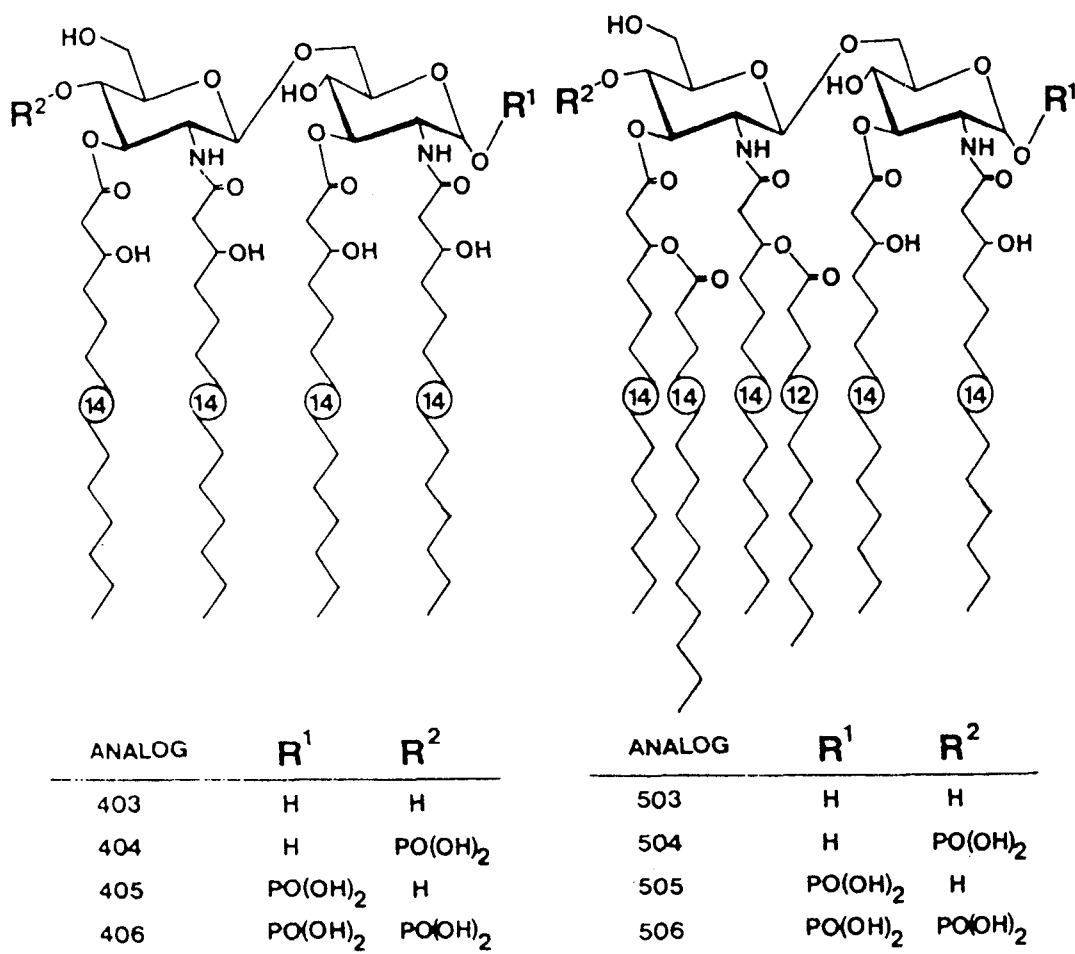


Fig. 1 Structure of synthetic lipid A.

Compound 406 is an analogue representing a chemical counterpart of biosynthetic precursor 1a of lipid A. The structure contains a 1, 6-linked D-glucosamine disaccharide which carries two phosphoryl groups at C1 and C4' positions, and is acylated at positions C3, C3', C2 and C2' by (R) -3-β hydroxytetradecanoyl residues. Compounds 403, 404 and 405 contain the same fatty acids as 406, but 403 is a nonphosphorylated compound, and 404 and 405 are monophosphorylated at C4' or C1 position, respectively. Compounds 503, 504, 505 and 506 in which the hydroxyl groups of (R) -3-hydroxytetradecanoic acid at C2' and C3' of 406 are acylated by dodecanoic acid, and tetradecanoic acid, respectively. Compound 506 carries two phosphoryl groups, 503 contains no phosphoryl, and 504 and 505 have one phosphoryl at C4' or C1 position, respectively. Compound 506 is a chemical counterpart of natural *E.coli* type lipid A.

マウスの腹部右側に検体溶液 (30 ~ 80 μl) を, また左側にコントロールとして同量の検体を含まない溶媒を各々皮内に注射した。注射 48 時間後血管の透過性の亢進をより客観的に観察

するためにエバンスブルー溶液 100 μl (Merck 社製: 20 mg/ml の濃度になるよう生理食塩水に溶解) を尾静脈に注射し, さらに 30 分後マウスを屠殺して, 局所の皮膚の状態を内外側より観

察して判定した。

皮膚反応の分類と判定

肉眼的に点状出血と斑状出血を判別するのに 1 mm が適切であると判断し、皮膚反応の強さを以下の 4 つに分類した。

++: 直径が 1 mm を越える出血壊死巣があるもの。

+: 直径が 1 mm 以下の出血壊死巣があるもの。

±: 肉眼的に出血壊死巣を認めず、血管外へのエバンスブルーの漏出による青色斑の直径が 2 mm を越えるもの。

-: 肉眼的に出血壊死を認めず、エバンスブルーによる青色斑の直径が 2 mm 以下のもの。

+ 以上のものを陽性と判定し、半数のマウスに出血壊死を起こす量 (ED_{50}) を Probit 法にて算出した。

2. 組織因子活性

プラズマ: ddY マウスを使用し、3.13% クエン酸を含むシリンジに 26 G の注射針を装着後、心臓穿刺により採血した。その後遠心 (4°C , 10 分, 3000 rpm 2 回) してプラズマを分離し、1~2 ml ずつ Cryo Tubes (Nunc 社製) に分注して -80°C に保存した。

吸着プラズマ (凝固因子を除去したもの): マクロファージを得る際に使用するもので、上記のプラズマを 56°C , 30 分加熱により非動化し、あらかじめ 250°C , 2 時間加熱でエンドトキシンフリーとした $\text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (リン酸カルシウム) を 20 mg/ml の割合に加え室温で 20 分間攪拌した。この遠心上清に再びリン酸カルシウムを加えて同様の操作を行い、凝固因子を除去した。

マクロファージの分離: 2.0 ml のチオグリコレート培地 (栄研化学社製) をマウス腹腔内に注射し、5 日後に腹腔細胞を集め、10% の吸着プラズマを含む組織培養液 RPMI 1640 (日水製薬社製) に $1 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整し組織培養用フラスコ (Angled neck N SI 25 $\text{cm}^2/50$ ml, Nunc 社製) に 5~7 ml 入れ、 CO_2 インキュ

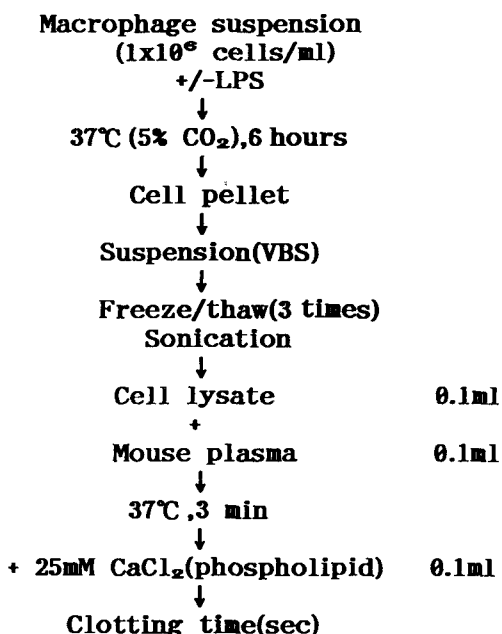


Fig.2 Tissue factor assay.

VBS: veronal buffered saline

ベーターで 1 時間作用させ、Disposable cell scraper (25 cm handle, Costar 社製) で付着細胞を集めた。

組織因子活性の測定 (Fig.2): C3H/HeN マウスの腹腔マクロファージを $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し 1/10 volume の LPS を加えて 5% CO_2 インキュベーターで 37°C , 6 時間培養した。遠心後に得た細胞に VBS (veronal buffered saline) を加え凍結融解を 3 回繰返し、10 秒間音波処理して検体とした (lysate)。なお実験によっては培養後遠心せずにそのまま同様に処理した (whole sample) ものを使用した。0.1 ml のマウスプラズマに検体 0.1 ml を加え、 37°C , 3 分加温し、25 mM CaCl_2 (リン脂質含む) を 0.1 ml 加えて fibrometer (Becton, Dickinson and Co. 製) で凝固時間を測定した。あらかじめ種々の濃度の標準の組織因子 (シンプラスチン®: 小野薬品工業社製) をマウスプラズマに加えて凝固時間を測定し回帰直線を作製した (1 mg の組織因子の活性を 1×10^6 単位とし

Table 1 Kinetics of skin reactions induced by LPS and lipid A.

Stimulant	Time (h) after injection	Mice with the following dermal responses (%)			
		+	+	±	-
LPS (S-from) <i>S. typhimurium</i> LT2	12	—	—	80	20
	24	60	40	—	—
	48	60	—	40	—
	72	—	—	40	60
Lipid A from <i>S. typhimurium</i> LT2	12	—	—	100	—
	24	—	60	40	—
	48	80	—	20	—
	72	60	40	—	—
	120	20	—	80	—

Ten micrograms of *S. typhimurium* LT2 LPS or lipid A were injected i.d. Local reaction was evaluated at various time intervals after i. d. injection. Five mice were used in each group.

Dermal responses were evaluated according to the following criteria :

++ ; a lesion (with hemorrhagic necrosis) with diameter of more than 1mm

++ ; a lesion (with hemorrhagic necrosis) with diameter of 1mm or less

± ; a blue spot (due to leakage of Evans blue into an extravascular space)
with diameter of more than 2mm and without hemorrhagic necrosis

- ; a blue spot with diameter of 2mm or less and without hemorrhagic necrosis.

て)。上記細胞の組織因子活性を標準の組織因子単位 (tissue factor units) に換算して表現した¹²⁾。

結 果

1. 皮膚反応

1) 経時的变化 (Table 1)

S. typhimurium の S-LPS およびリピド A を ddY マウスの皮内に投与し、経時的に局所の変化を観察した。注射後 12 時間で、すでに血管の透過性の亢進による浮腫 (±) が認められた。出血壊死を惹起するマウスの固体数は S-LPS では 24 時間と 48 時間に、リピド A では 48 時間と 72 時間に各々ピークが認められ、それ以後は固体数が減少した。そこで以下の実験は、すべて検体を投与後 48 時間での皮膚所見について検討した。

ddY マウスに天然リピド A を 20 μ g 皮内注射し、48 時間後における皮膚の肉眼的所見を観察すると明らかな局所の出血と壊死がみられた (Fig. 3A : 外側面観, B : 内側面観)。組織学的には対照群 (Fig. 3C) に比較して、実験群 (Fig. 3D) の皮膚では表皮が軽度の錯角化を示

し、真皮から皮下組織および筋層にかけて顕著な出血をともない好中球を混えたリンパ球の慢性浸潤がみられ肥厚していた。また、皮下組織には軽度の壊死性変化が認められた。

2) 種々の LPS 標品による皮膚反応 (Table 2, 6)

ddY マウスを用い種々の LPS, 天然リピド A および PS 画分の皮膚反応を比較した。R 型 LPS (Ra, Rc, Re) の活性が最も強く、いずれも数 μ g の量でマウスに出血壊死を惹起した。ED₅₀ で比較すると、Re-LPS で約 1 μ g, Rc-LPS で約 2 μ g, Ra-LPS で約 3 μ g であった。ついで天然リピド A の活性も比較的強く、ED₅₀ は 1.9 から 2.5 μ g であった。S-LPS の ED₅₀ は 4.7 から 5.3 で、活性は Re-LPS や天然リピド A に比べると反応にばらつきがみられ、用量依存性が良くなかった。また *S. typhimurium* LT 2 (S-LPS) の PS 画分 (Fig. 4) では全く出血壊死は惹起されなかった。

3) 合成リピド A による皮膚反応 (Table 3, 6)

i) 406 と 506 の比較

合成リピド A 化合物 506 は、天然のリピド A

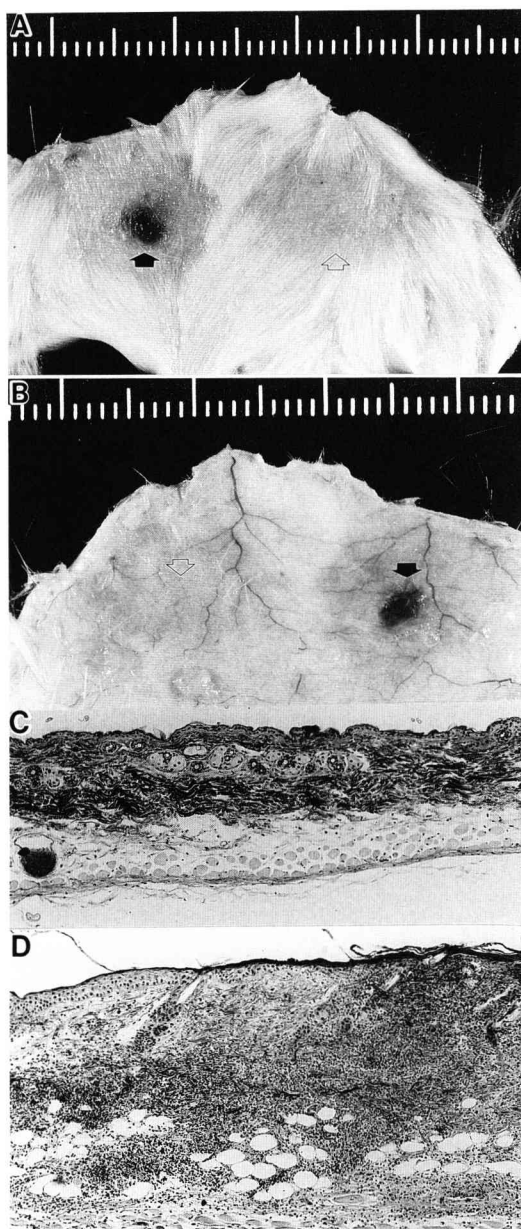


Fig. 3 A: External view of hemorrhagic skin lesion of mice 48 hours after i.d. injection of 20 μ g of *S.typhimurium* LT2 lipid A (closed arrow) or 20 μ g of 0.025% triethylamine in saline at the control site (open arrow).
 B: Internal view of "A".
 C: Histological structure of control skin.
 D: Histopathological structure of skin lesion of mice 48 hours after i.d. injection of lipid A. (See legend in "A".)
 (H.E. stain, $\times 100$.)

または R-LPS と同等かそれ以下の活性 ($ED_{50} < 1.3 \sim 5.0 \mu\text{g}$) を有していた。一方, 406 は $ED_{50} < 10 \sim 20 \mu\text{g}$ で, 10 μg の用量ではほとんど出血壊死を惹起しなかった。

ii) 503 ~ 506 の検討

503 では 10 μg の用量でも全く出血壊死を確認することができなかった。504, 505, 506 では 5 μg の用量でも出血壊死 (≡ または +) が確認され, 用量依存性も認められた。

4) アルカリ処理糖脂質 ($\text{NaOCH}_3\text{-ReGI}$) による皮膚反応 (Table 4, 6)

この標品による皮膚反応の活性は Re-LPS に比較してかなり弱かった。

5) スフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipid) による皮膚反応 (Table 4, 6)

最高 40 μg まで検討したが, 出血壊死を惹起することはできなかった。

6) LPS 低感受性マウスにおける皮膚反応 (Table 5, 6)

C3H/HeN マウスは, ddY マウスとほぼ同様な反応を示したが, LPS 低感受性であることが知られている C3H/HeJ マウスでは, S-LPS, Re-LPS, 天然リピド A とともに 10 μg の用量でも出血壊死を惹起せず, さらに S-LPS のみは最高 40 μg まで検討したが出血壊死を惹起することはできなかった。

7) 血小板活性化因子 (PAF) による皮膚反応 (Table 7)

i) 経時的変化

LPS 標品と同様 48 時間後に最も著明な皮膚反応が観察された個体数が多かったので, 48 時間後の皮膚所見を検討した。

ii) 皮膚反応

ddY マウスでは 10 μg の用量で出血壊死を確認し, 用量依存性も認められた。またエンドトキシン低感受性マウスである C3H/HeJ でも 10 μg で出血壊死を惹起し得た。なお ddY (10 μg), C3H/HeJ (20, 40 μg) では, いずれのマウスにおいても死亡例が確認された。

2. 組織因子活性

1) 経時的変化 (Fig. 5)

Table 2 Skin reactions of ddY mice induced by LPS and lipid A.

Stimulant	Dose (μ g/mouse)	Mice with the following dermal responses (%)				No. of mice tested
		+	+	±	-	
LPS (S-form)						
<i>S. minnesota</i>	40	100	—	—	—	3
	20	100	—	—	—	5
	10	100	—	—	—	5
	5	40	—	60	—	5
	2.5	20	—	80	—	5
	1.3	—	20	60	20	5
<i>S. typhimurium</i> LT2	40	67	17	17	—	6
	20	50	—	33	17	6
	10	60	—	40	—	10
	5	20	20	60	—	5
	2.5	20	20	60	—	5
	1.3	—	20	80	—	5
<i>E. coli</i> OIII : B4	40	80	—	20	—	5
	20	50	17	17	17	6
	10	60	40	—	—	5
	5	50	17	34	—	6
	2.5	20	20	60	—	5
	1.3	20	20	20	40	5
LPS (R-form)						
<i>S. minnesota</i> R60 (Ra)	10	83	—	17	—	6
	5	60	—	40	—	5
	2.5	—	40	40	20	5
	1.3	—	40	20	40	5
<i>E. coli</i> J5 (Rc)	10	100	—	—	—	6
	5	80	—	20	—	5
	2.5	40	—	60	—	5
	1.3	40	—	40	20	5
<i>S. minnesota</i> R595 (Re)	10	100	—	—	—	5
	5	100	—	—	—	5
	2.5	100	—	—	—	5
	1.3	20	60	20	—	5
Lipid A						
from <i>S. typhimurium</i> LT2	20	100	—	—	—	5
	10	90	5	—	5	21
	5	43	43	—	14	14
	2.5	10	50	30	10	10
	1.3	7	28	21	43	14
from <i>E. coli</i> J5	10	40	40	20	—	10
	5	20	70	10	—	10
	2.5	20	20	60	—	5
	1.3	—	40	60	—	5
Polysaccharide						
from <i>S. typhimurium</i> LT2	80	—	—	—	100	5
	40	—	—	—	100	5
Saline		—	—	—	100	159
0.025% triethylamine in saline		—	—	—	100	94

LPS or related compounds were injected i.d. Local reaction was evaluated 48 hours after i.d. injection. Refer to Table 1 for criteria of dermal responses.

Table 6 Doses of LPS and lipid A required to induce hemorrhagic necrosis.

Strain	Stimulant		ED ₅₀ (μ g)(+, +)
ddY mice	LPS (S-form)	<i>S. minnesota</i>	5.1
		<i>S. typhimurium</i> LT2	5.3
		<i>E. coli</i> 0III B4	4.7
	LPS (R-form)	<i>S. minnesota</i> R60 (Ra)	3.1
		<i>E. coli</i> J5 (Rc)	2.1
		<i>S. minnesota</i> R595 (Re)	<1.3
	Natural lipid A from	<i>S. typhimurium</i> LT2	1.9
		<i>E. coli</i> 0III B4	2.5
	Synthetic lipid A	503	> 10.0
		504	2.5~ 5.0
		505	2.5~ 5.0
		506 (<i>E. coli</i> type)	<1.3~ 5.0
		406 (precursor Ia)	> 10.0~20.0
	NaOCH ₃ -ReGl		> 20.0
	Glycosphingolipid		> 40.0
	Polysaccharide from	<i>S. typhimurium</i> LT2	> 80.0
C3H/HeN	LPS (S-form)	<i>S. minnesota</i>	5.1
	LPS (R-form)	<i>S. minnesota</i> R595 (Re)	1.3
	Lipid A from	<i>S. typhimurium</i> LT2	2.5
C3H/HeJ	LPS (S-form)	<i>S. minnesota</i>	> 40.0
	LPS (R-form)	<i>S. minnesota</i> R595 (Re)	> 10.0
	Lipid A from	<i>S. typhimurium</i> LT2	> 10.0

ED₅₀s of samples to induce hemorrhagic lesion (+ and +) were estimated by Probit analysis from the results shown in Tables 2, 3, 4 and 5.

C3H/HeN マウスのマクロファージに Re-LPS を加えて刺激し、経時的に組織因子活性を調べた。LPS 添加後 6~8 時間にピークが認められ、10 μ g/ml, 1 μ g/ml の LPS では刺激 6 時間後には、それぞれ対照の 5.2 倍, 4.2 倍に活性の上昇がみられた。8 時間後でも同様に 3.2 倍, 3.1 倍の上昇がみられ、以後時間の経過と共に活性が低下した。そこで以下の実験は 6 時間刺激の検体について検討した。

2) 各種マウスにおける組織因子産生の用量依存性および LPS 応答性 (Fig. 6)

ddY, C3H/HeN, C3H/HeJ のマクロファージに種々の濃度の Re-LPS を添加して 6 時間刺激し、組織因子産生の量依存性と LPS 応答性を観察した。ddY が最も LPS 応答性がよく、対照の 1065 units に対して 0.1 μ g/ml の LPS では 5593 units (5.3 倍) に増加し、1 μ g では 8932 units (8.4 倍) に増加した。C3H/HeN では対照の 802 units から 0.1, 1, 10 μ g/ml の LPS ではそれぞれ 2147 (2.7 倍), 2515 (3.1 倍) および 5607 (7.0 倍) に増加した。一方、C3H/HeJ マウス由来のマクロファージでは 10 μ g/

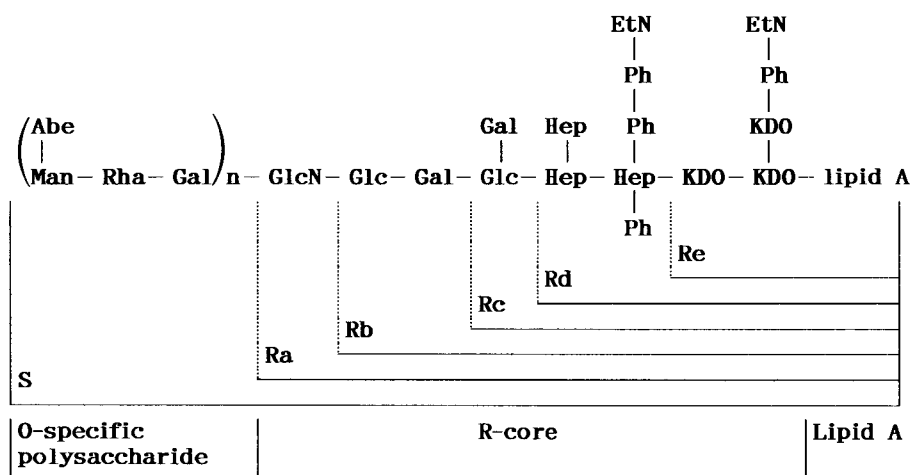


Fig.4 Chemical structure of endotoxin from *Salmonella*.

Abe : Abequose, Man : Mannose, Rha : Rhamnose, Gal : Galactose,
 GlcN : Glucosamine, Glc : Glucose, Hep : Heptose, Ph : Phosphoric acid,
 EtN : Ethanalamine, KDO : 2-keto-3-deoxy-octonate

Table 3 Skin reactions of ddY mice induced by synthetic lipid A.

Stimulant	Dose (μ g/mouse)	Mice with the following dermal responses (%)				No. of mice tested
		+	+	±	-	
406 (precursor Ia)	40	100	—	—	—	5
	20	80	20	—	—	5
	10	—	20	—	80	10
	5	—	9	—	91	11
	2.5	—	9	—	91	11
	1.3	—	—	—	100	11
503	10	—	—	40	60	5
	5	—	—	—	100	5
	2.5	—	—	60	40	5
	1.3	—	—	—	100	4
504	10	100	—	—	—	5
	5	80	—	—	20	5
	2.5	—	—	20	80	5
	1.3	—	—	—	100	5
505	10	100	—	—	—	5
	5	40	20	—	40	5
	2.5	—	40	60	—	5
	1.3	—	—	40	60	5
506 (<i>E. coli</i> type)	10	67	—	27	6	15
	5	64	—	22	14	14
	2.5	20	10	50	20	10
	1.3	10	30	10	50	10

Synthetic lipid A was injected i.d. Local reaction was evaluated 48 hours after i.d. injection. Refer to Table 1 for criteria of dermal responses.

Table 4 Skin reactions of ddY mice induced by glycosphingolipid and NaOCH₃-ReGl.

Stimulant	Dose ($\mu\text{g}/\text{mouse}$)	Mice with the following dermal responses (%)				No. of mice tested
		+	+	±	-	
Glycosphingolipid	40	—	—	55	44	9
	20	—	—	44	55	9
	10	—	—	67	33	6
	5	—	—	—	100	5
	2.5	—	—	60	40	5
	1.3	—	—	20	80	5
NaOCH ₃ -ReGl	20	—	40	20	40	5
	10	20	—	60	20	5
	5	20	—	80	—	5
	2.5	—	—	40	60	5

Glycosphingolipid was isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. NaOCH₃-ReGl was deacylated LPS from Re-form LPS. Glycosphingolipid or NaOCH₃-ReGl was injected i.d. Local reaction was evaluated 48 hours after i.d. injection. Refer to Table 1 for criteria of dermal responses.

ml の LPS 刺激でも組織因子産生はみられなかった。

3) 合成リピド A 刺激による組織因子産生 (Fig. 7)

406 または 506 で C3H/HeN のマクロファージを刺激すると、その添加量に依存して組織因子の産生がみられた。0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の刺激では対照の 3~4 倍に、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では約 5 倍に組織因子活性が増加した。406 は 506 と同程度の活性を示した。

4) 血小板活性化因子 (PAF) 刺激による組織因子産生 (Fig. 8)

i) 経時的変化

C3H/HeN のマクロファージに 1.0 μM (1 $\mu\text{M} \approx 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) の PAF を加えて培養し、経時的に組織因子活性を測定した。PAF 非添加の対照群では 0, 1, 3, 6 時間後にそれぞれ 21, 34, 221, 496 単位と組織因子活性が増加した。一方、PAF 添加群では 1, 3, 6 時間刺激後に 35, 205, 1208 単位とさらに活性が高まった。そこで以下の実験は 6 時間刺激後の検体を検討した。

ii) 用量反応

0.1 μM および 1.0 μM の PAF 刺激によって用量依存性が認められたが、10 μM の量では組織因子の産生が認められなかった。

考 察

1. 皮膚反応

著者らは最近マウスに LPS やリピド A を皮内に一回注射し、48 時間後には局所に出血壊死が惹起されることをみいだした¹⁶⁾。本研究では、この生物活性を内毒素学的に検討した。この皮膚反応 (出血壊死) における微小循環の変化は LPS 特有の病像ではなく、基本的には一般の急性炎症と同様の所見を呈する¹⁷⁾。すなわち、LPS 投与後、顆粒球が細小静脈や毛細管の内皮細胞に沿って移動あるいは管壁に粘着し、血小板凝集または顆粒球とフィブリン線維による血栓形成が起こる。また内皮細胞の腫脹による血管の透過性の亢進が起こり浮腫を形成する。さらに内皮細胞が脱落して基底膜のコラーゲンが露出し、それに血小板などが付着して血栓を形成する。ddY マウスにおける種々 LPS 標品の皮膚反応を観察すると、S-LPS, R-LPS, 天然リピド A のいずれにおいても発現することがわかる (Table 2)。またこの反応はサルモネラの S-LPS 由来の多糖画分では 80 μg の高濃度においても出血壊死が起こらないことから、これらの反応を惹起するためには LPS 分子中のリピド A 構造 (Fig. 4) が必須であることが示唆された。

Table 5 Skin reactions induced by S-form LPS, Re-form LPS and lipid A in mice with low responses to LPS.

Stimulant	Dose (μ g/mouse)	Mice with the following dermal responses (%)				No. of mice tested
		+	+	±	-	
C3H/HeJ	40	—	—	100	—	5
S-form LPS	20	—	—	80	20	5
(<i>S. minnesota</i>)	10	—	—	40	60	5
	5	—	—	20	80	5
	2.5	—	—	20	80	5
	1.3	—	—	20	80	5
Re-form LPS	10	—	—	100	—	5
(<i>S. minnesota</i> R595)	5	—	—	100	—	5
	2.5	—	—	80	20	5
	1.3	—	—	40	60	5
Lipid A	10	—	—	67	33	9
(<i>S. typhimurium</i> LT2)	5	—	—	100	—	5
	2.5	—	—	—	100	5
	1.3	—	—	—	100	5
C3H/HeN						
S-form LPS	10	80	20	—	—	5
(<i>S. minnesota</i>)	5	20	20	60	—	5
	2.5	—	—	80	20	5
	1.3	—	—	80	20	5
Re-form LPS	10	100	—	—	—	5
(<i>S. minnesota</i> R595)	5	100	—	—	—	5
	2.5	80	20	—	—	5
	1.3	40	—	60	—	5
Lipid A	10	60	10	20	10	10
(<i>S. typhimurium</i> LT2)	5	40	20	40	—	5
	2.5	—	80	20	—	5
	1.3	—	60	40	—	5

LPS or related compounds were injected i. d. Local reaction was evaluated 48 hours after i. d. injection. Refer to Table 1 for criteria of dermal responses.

Table 7 Skin reactions of ddY and C3H/HeJ mice induced by PAF.

Strain	Dose (μ g/mouse)	Mice with the following dermal responses (%)					No. of mice tested
		*	+	+	±	-	
ddY	10	7	40	13	40	—	15
	5	—	—	—	67	33	9
	2.5	—	—	—	22	78	9
	1.3	—	—	—	11	89	9
C3H/HeJ	40	100	—	—	—	—	1
	20	100	—	—	—	—	3
	10	—	—	66	33	—	3

* : dead

PAF : platelet activating factor

PAF was injected i.d. Local reaction was evaluated 48 hours after i. d. injection. Refer to Table 1 for criteria of dermal responses.

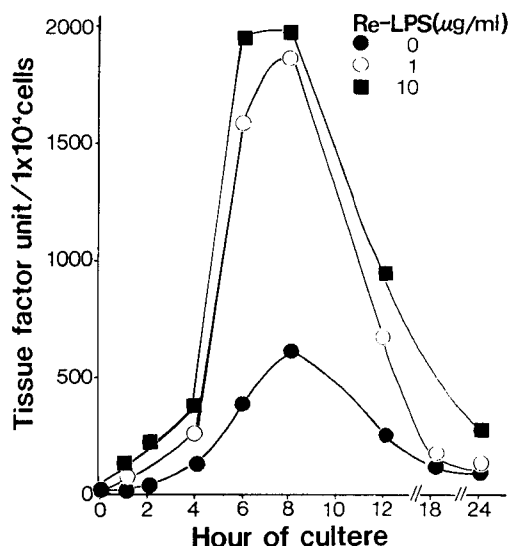


Fig. 5 Time course of tissue factor production by macrophage after stimulation with LPS.

Re-LPS was added to macrophage suspension of C3H/HeN mice. Tissue factor production was evaluated at various hours of culture.

さらに皮膚反応の活性の強さを半数のマウスに出血壊死(+以上)を起こす ED_{50} の値より検討したところ, Re-LPS > Rc-LPS, 天然リピド A > Ra-LPS > S-LPS の順であった (Table 6)。多糖部分の長さの増加につれて皮膚反応の活性が减弱しており, 全 LPS 分子中に占めるリピド A の割合によって活性が強く影響されることが示唆された。また, この多糖部分自身が活性を减弱させている可能性も考えられる。その他 R コア部分 (Fig. 4), KDO (2-ケト-3-デオキシーオクトン酸) 部分の影響も考えられ, Re-LPS の活性がリピド A よりも強いことより, 特に KDO 部分の関与が強く示唆された。これと同様な反応, すなわち R-LPS の活性が S-LPS より強い例として直接赤血球凝集¹⁸⁾, 補体の活性化¹⁹⁾, マウス腹膜のマクロファージによる leukotriene C4 の遊離²⁰⁾, ラット単球の腫瘍壊死因子 (TNF: tumor necrosis factor) 産生²¹⁾などの報告がみられる。

さらに合成リピド A^{22, 23)}を用いた検討ではジサッカリド前駆体 Ia に相当する 406 が大腸菌

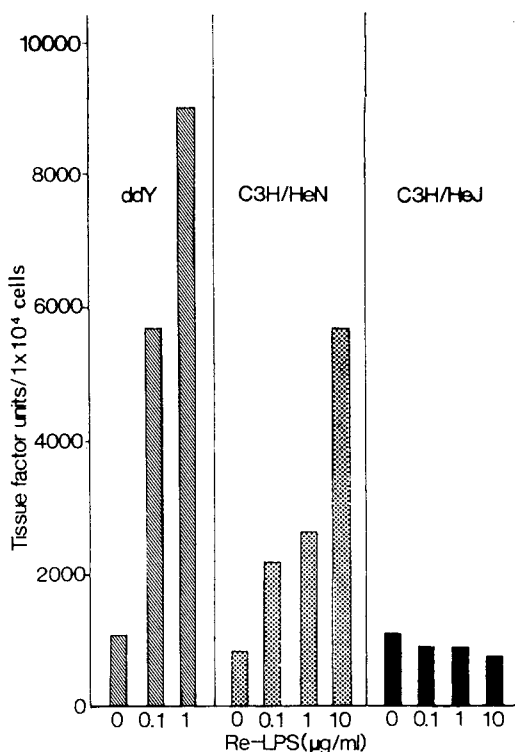


Fig. 6 LPS-induced tissue factor production in macrophage.

Re-LPS was added to macrophage suspension of ddY, C3H/HeN and C3H/HeJ mice, and cultured for 6 hours.

の完成リピド A に相当する 506 に比較してかなり活性が减弱していた²⁴⁾。406 と 506 の構造の差異は, 406 がリピド A 生合成の中間産物であり, アシルオキシアシル基をジサッカライド骨格に保有していないことである (Fig. 1)。406 と 506 の結果からウサギの皮膚反応であるシュワルツマン反応と同様に, リピド A の脂肪酸のダブルアシル構造がこのマウス皮膚反応に強く関与していることがわかった。このように LPS による出血壊死反応は動物の種差を越えて構造要求性の強い反応であることがあきらかになった²⁵⁻²⁸⁾。さらに天然の LPS と生物活性の構造要求性を詳細に検討すると, Re 変異株より NaOCH₃ 処理によってアシル結合脂肪酸を除去した標品 (NaOCH₃-ReGI) による皮膚反応 (Table 4, 6) では ED_{50} が > 20 であり, この出

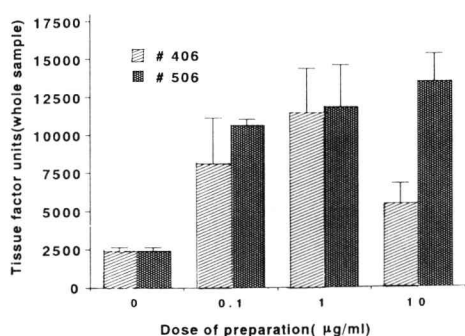


Fig. 7 Tissue factor production by synthetic lipid A analogues.

Synthetic lipid A analogue (406 or 506) was added to macrophage suspension of C3H/HeN mice, and cultured for 6 hours.

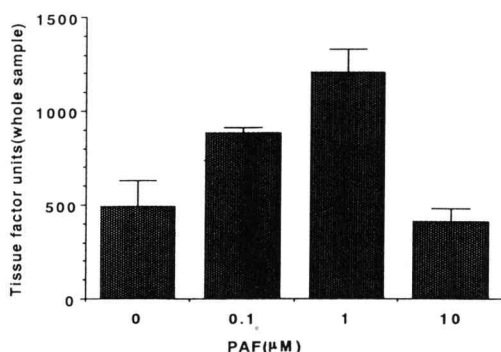


Fig. 8 PAF-induced tissue factor production.

Platelet activating factor was added to macrophage suspension of C3H/HeN mice, and cultured for 6 hours.

血壊死反応にアシル結合脂肪酸が必須であることが示唆された。また特殊なバクテリアである *Sphingomonas paucimobilis* から分離されたスフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipid) は典型的な LPS と構造が異なり、3-ハイドロキシ脂肪酸 (Fig. 1) や KDO などのリポ多糖の主要成分を保有していない。このスフィンゴ糖脂質では出血壊死を惹起することはできず、この皮膚反応の発現には3-ハイドロキシ脂肪酸が必須であることもわかった (Table 4)。さらに合成リポド A の 503 ~ 506 の検討によりリン酸基を全く保有しない 503 の皮膚反応は最も弱く、リン酸基を一個以上保有する 504, 505, 506 の

反応は 503 に比べ著しく強かった。このことよりこの出血壊死反応を惹起するには、リン酸基が少なくとも一個以上必要であることが示唆された (Table 3, 6)。

LPS 低感受性マウスである C3H/HeJ におけるこの出血壊死反応は著明に低下している (Table 5, 6)。一方、LPS によって惹起される局所の血管の透過性の亢進 (±) は 406 でもかなりの低濃度で起き C3H/HeJ でも起こることより、出血壊死とは異なった機序で起こる反応であることが示唆された。このようなことから C3H/HeJ でも起こる反応として補体の活性化や好中球の遊走などが知られているが、この血管の透過性亢進 (±) による浮腫性変化は、このような反応と関連した反応であると考えられる。また出血壊死反応はマクロファージや血管内皮細胞のような標的細胞²⁹⁾の活性化と関連した反応であるのかもしれない。

エンドトキシンの活性発現に関与する因子としてヒスタミン、セロトニン、キニン、さらには interleukin-1 (IL-1) や TNF などのサイトカインが知られているが、最近注目を集めている chemical mediator として血小板活性化因子 (PAF) が知られている。PAF は種々の生理活性を有し、エンドトキシンショックのメディエーターとしての働きの他に炎症、血液凝固とも関連しているものと考えられている。高濃度の PAF による皮膚反応によって ddY, C3H/HeJ はともに出血壊死を惹起した (Table 7)。このことにより LPS による皮膚反応に PAF が何らかの関与をしていることが示唆された。

2. 組織因子

In vivo で LPS をマウスやニホンザルに投与すると骨髓に顆粒球を中心とした細胞毒性反応が惹起され、これと相関して骨髓および脾臓のマクロファージ、顆粒球が刺激され、細胞膜由来の組織因子活性が亢進する^{9-12, 30)}。同様に *in vitro* においてもマクロファージに LPS を加えて培養すると組織因子, prothrombinase, X 因子 activator などが産生される。

マウス腹腔マクロファージを LPS で刺激し

た場合に組織因子が産生され、また Re-LPS 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の刺激でも組織因子産生が惹起された (Fig. 5)。皮膚反応では R 型 LPS、天然リピド A の活性が S 型 LPS の活性より著しく強かったが、同様にマウスマクロファージからの組織因子産生についても R 型 LPS が S 型 LPS に比べて、より活性の高いことはすでに平田ら⁸⁾により報告されている。合成リピド A の検討では 406, 506 を用いたが、その添加量に依存して組織因子産生が認められ、皮膚反応とは異なり 406 でも 506 と同程度の活性を示した (Fig. 7)。したがって LPS 刺激による組織因子産生においてはダブルアシル構造は必ずしも強く関与していないことが示唆された。これは *in vitro* における反応がマクロファージだけについての反応であるのに対して、*in vivo* の反応は生体反応であり、より総合的に構造要求性を反映していること、また種差や assay 系の差も関連していることが考えられた。このように構造要求性にも種々の段階と程度があることを考慮しなければならない。

LPS 低感受性マウスである C3H/HeJ における LPS 刺激によるマクロファージからの組織因子産生は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LPS 刺激でも組織因子産生がみられなかった (Fig. 6)。この反応が他の多くの LPS による生物活性と同様に lps 遺伝子の制御を受けていることが示唆された。

PAF による検討では PAF 非添加群に比較して PAF 添加群のほうの活性が増強されていた (Fig. 8)。また PAF 拮抗剤の前処理により LPS または PAF 刺激により誘導された組織因子の産生が抑制された³¹⁾。従って LPS 刺激による組織因子の産生には PAF が関与しているこ

とが考えられる。

以上、LPS のもつ活性のうち *in vivo* における皮膚反応と *in vitro* における組織因子の産生をとりあげて種々比較検討した。LPS の刺激によりマクロファージが TNF, IL-1 等種々のサイトカインを産生し、これらのサイトカインが組織因子の産生を惹起することが知られている。皮膚反応において見られた血液凝固系の活性化にもとづくフィブリン形成に、単球、マクロファージが産生する組織因子が関与していることが想像され、皮膚反応（出血壊死）の発現にサイトカインが関与していることも考えられた。

結 語

細菌内毒素における生物活性の中心であるリピド A の構造と活性の相関について *in vivo* の反応であるマウス皮膚反応（出血壊死）と *in vitro* の反応であるマウス組織因子産生の 2 つをパラメーターとして検討し、以下の結果を得た (Table 8)。

1. マウス皮膚反応（出血壊死）

1) R-LPS の活性が最も強く、ついで天然リピド A, S-LPS の順であった。

2) *S. typhimurium* LT 2 (S-LPS) の PS 画分では全く出血壊死は惹起することができなかった。

3) 合成リピド A の 506 の活性は R-LPS, 天然リピド A と同等か、それ以下の活性を示したが、406 はかなり活性が弱かった。

4) 出血壊死を惹起するにはリン酸基が少なくとも一個以上必要であった。

5) 出血壊死を惹起するにはアシル結合脂肪

Table 8 Comparison of structural requirements of LPS to induce skin reactions and to produce tissue factor.

	S-type & R-type (ddY & C3H/HeN)	406 & 506 (ddY)	Mouse strain ddY, C3H/HeN, C3H/HeJ
Skin reaction	S-type < R-type	406 < 506	ddY > C3H/HeN > C3H/HeJ No reaction in C3H/HeJ
Production of tissue factor	S-type \leq R-type*	406 \approx 506	ddY > C3H/HeN > C3H/HeJ No reaction in C3H/HeJ

* : According to No.8 of the references cited.

酸, 3-ハイドロキシ脂肪酸の関与が示唆された。

6) C3H/HeN マウスは ddY マウスと同等の反応を示したが, C3H/HeJ マウスでは出血壊死反応を惹起することはできなかった。

7) 血小板活性化因子 (PAF) による皮膚反応では ddY, C3H/HeJ とともに出血壊死を惹起し C3H/HeJ マウスは, かなり強い細胞毒性を示した。

2. マウス組織因子産生

1) LPS 応答性は ddY マウス, C3H/HeN マウス, の順によく, C3H/HeJ マウスでは組織因子の産生が見られなかった。

2) 合成リピド A の 406 と 506 は同程度の活性を示した。

3) 0.1 μ M, 1.0 μ M の PAF 刺激では用量依存性が認められたが, 10 μ M では組織因子産生が認められなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました岩手医科大学医学部細菌学講座吉田昌男教授, 同歯学部口腔外科学第一講座工藤啓吾教授, 同歯学部口腔微生物学講座金子克教授, 同歯学部口腔生化学講座太田 稔教授, に深甚なる感謝の意を表します。また終始御指導, 御鞭撻を賜りました同医学部細菌学講座平田陸正講師, 自治医科大学医学部微生物学講座切替照雄助手に心より感謝の意を表します。さらに病理学的御指導を頂きました岩手医科大学歯学部口腔病理学講座佐藤方信教授, 武田泰典講師に深謝いたします。貴重な試料を御提供いただきました芝 哲夫博士, マックスプランク研究所 C.Galanos 博士, 城西大学薬学部久恒和仁博士, 北里研究所川原一芳博士に厚く御礼申し上げます。また岩手医科大学医学部細菌学講座, 同歯学部口腔外科学第一講座の医局員各位に心より謝意を表します。

本論文の要旨は第 61 回日本細菌学会総会 (1988 年 4 月 7 日岡山), 第 64 回日本細菌学会総会 (1991 年 3 月 27 日大阪) ならびに第 2 回

国際エンドトキシン学会議 (1992 年 8 月 19 日ウィーン) において発表した。

参 考 文 献

- 1) 吉田昌男: 内毒素の活性, 本間 遜監修; 内毒素—その構造と活性—, 第 2 版, 医歯薬出版, 東京, 141-144 ページ, 1983.
- 2) Rietschel, E.T., Schade, U., Jensen, M., Wolle-nweber, H.-W., Lüderitz, O. and Greisman, S.G.: Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicemia. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 31: 8-21, 1982.
- 3) 本間 遜, 松浦基博, 熊沢義雄: 内毒素の活性中心 (リピド A) の研究—化学構造と生物活性相関の観点から—, 日細菌誌, 44: 585-608, 1989.
- 4) Ishikawa, Y., Hirata, M., Kirikae, T. and Yoshida, M.: LPS and lipid A-induced local skin reaction *in vivo* and tissue factor generation *in vitro*. 2nd. conference of the international endotoxin society abstract 121, 1992.
- 5) Schwartzman, G.: A new phenomenon of local skin reactivity to *B.typhosus* culture filtrate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 25: 560-561, 1928.
- 6) Homma, J.Y.: The Schwartzman phenomenon in the mouse. *Japan. J. Exp. Med.* 22: 17-22, 1952.
- 7) Yoshida, M., Hirata, M., Nemoto, N. and Wako, H.: Skin reaction produced by endotoxins and lactobacillus in mouse. *Japan. J. Exp. Med.* 44: 241-248, 1974.
- 8) 平田陸正, 下村有子, 稲田捷也, 吉田昌男: エンドトキシンによるマウス腹腔マクロファージからの組織因子の新生誘導: 顆粒球由来の塩基性蛋白の影響, 第 36 回毒素シンポジウム予稿集, 174-179, 1989.
- 9) 平田陸正, 角田伸子, 稲田捷也, 毛利英満, 工藤一顕, 吉田昌男: 内毒素投与による骨髓内細胞毒性と骨髓細胞の凝固亢進作用, 血液と脈管, 11: 609-612, 1980.
- 10) 平田陸正, 角田伸子, 稲田捷也, 吉田昌男: 内毒素血症と血液凝固・線溶系—マウス系統と内毒素に対する感受性—, 血液と脈管, 15: 340-348, 1984.
- 11) 平田陸正, 角田伸子, 稲田捷也, 吉田昌男: 内毒素性 DIC と骨髓細胞の組織トロンボプラスチン活性, 血液と脈管, 16: 480-489, 1985.
- 12) Hirata, M., Yoshida, M., Tsunoda, N. and Inada, K.: Endotoxemia and blood coagulation: Procoagulant activity of mouse bone marrow cells, In: Bacterial endotoxin, chemical biological and clinical aspects, ed. Homma, J.Y., Kanegasaki, S., Lüderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O. pp 351-362, Verlag Chemie, Weinheim, 1984.
- 13) Galanos, C., Lüderitz, O. and Westphal, O.: A new method for the extraction of R lipopolysac-

- charides. *Eur. J. Biochem.* 9: 245-249, 1969.
- 14) 切替照雄, 切替富美子, 菊地 充, 石川義人, 稲田捷也, 吉田昌男, 配島由二, 近藤誠一, 久恒和仁: Re 変異糖脂質の生物活性に及ぼすアシル結合脂肪酸の関与, 第 62 回日本細菌学会総会抄録集, 136, 1989.
 - 15) Kawahara, K., Seydel, U., Matsuura, M., Danbara, H., Rietschel, E.T. and Zähringer, U.: Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. *FEBS LETTERS* 292: 107-110, 1991.
 - 16) Ishikawa, Y., Kirikae, T., Hirata, M., Yoshida, M., Haishima, Y., Kondo, S. and Hisatsune, K.: Local skin response in mice induced by a single intradermal injection of bacterial lipopolysaccharide and lipid A. *Infect. Immun.* 59: 1954-1960, 1991.
 - 17) 吉田昌男: エンドトキシンの話, 金原出版, 東京, 56-57 ページ, 1981.
 - 18) Kirikae, T., Inada, K., Hirata, M., Yoshida, M., Galanos, C. and Lüderitz, O.: Hemagglutination induced by lipopolysaccharides and lipid A. *Microbiol. Immunol.* 30: 269-274, 1986.
 - 19) Morrison, D.C. and Kline, L.F.: Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J. Immunol.* 118: 362-368, 1977.
 - 20) Lüderitz, T., Brandenburg, K., Seydel, U., Roth, A., Galanos, C. and Rietschel, E.T.: Structural and physicochemical requirements of endotoxins for the activation of arachidonic acid metabolism in mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 179: 11-16, 1989.
 - 21) Schlayer, H.-J., Karck, U., Ganter, U., Hermann, R. and Decker, K.: Enhancement of neutrophil adherence to isolated rat liver sinusoidal endothelial cells by supernatants of lipopolysaccharide-activated monocytes. *J. Hepatol.* 5: 311-321, 1987.
 - 22) Imoto, M., Yoshimura, H., Kusumoto, S. and Shiba, T.: Total synthesis of lipid A, active principle of bacterial endotoxin. *Proc. Japan Acad.* 60: 285-288, 1984.
 - 23) Imoto, M., Yoshimura, H., Yamamoto, M., Shimamoto, T., Kusumoto, S. and Shiba, T.: Chemical synthesis of phosphorylated tetraacyl disaccharide corresponding to a biosynthetic precursor of lipid A. *Tetrahedron Lett.* 25: 2667-2670, 1984.
 - 24) Yoshida, M., Hirata, M., Inada, K., Tsunoda, N., Kirikae, T., Onodera, T., Ishikawa, Y., Shiba, T., Kusumoto, S., Galanos, C., Lüderitz, O., Kondo, S. and Hisatsune, K.: Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A analogs. *Microbiol. Immunol.* 33: 797-810, 1989.
 - 25) Galanos, C., Lehmann, V., Lüderitz, O., Rietschel, E.T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M.A., Hansen-Hagge, T., Lüderitz, T., McKenzie, G., Schade, U., Strittmatter, W., Tanamoto, K., Zähringer, U., Imoto, M., Yoshimura, H., Yamamoto, M., Shimamoto, T., Kusumoto, S. and Shiba, T.: Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. *Eur. J. Biochem.* 140: 221-227, 1984.
 - 26) Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E.T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M.A., Schade, U., Imoto, M., Yoshimura, H., Kusumoto, S. and Shiba, T.: Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.* 148: 1-5, 1985.
 - 27) Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Ogawa, T., Harada, K., Mori, Y., Kawasaki, A., Tanaka, A., Nagao, S., Tanaka, S., Shiba, T., Kusumoto, S., Imoto, M., Yoshimura, H., Yamamoto, M. and Shimamoto, T.: Immunobiologically active lipid A analogs synthesized according to a revised structural model of natural lipid A. *Infect. Immun.* 45: 293-296, 1984.
 - 28) Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Ogawa, T., Takahashi, I., Ikeda, T., Otsuka, K., Shimouchi, 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.: 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, 1985.
 - 29) Morrison, D.C.: The case for specific lipopolysaccharide receptors expressed on mammalian cells. *Microb. Pathog.* 7: 389-398, 1989.
 - 30) 平田陸正, 中村 伸, 後藤俊二, 川崎 一, 田村弘志, 田中重則, 吉田昌男: ニホンザルにおける内毒素応答性: 発熱性, 白血球動態, 組織因子新生および TNF 産生の解析, 第 35 回毒素シンポジウム予稿集, 125-129, 1988.
 - 31) 平田陸正, 下村有子, 吉田昌男: LPS 刺激によるマクロファージからの組織因子産生の機序について, 第 37 回毒素シンポジウム予稿集, 130-133, 1990.