

〔原 著〕

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*  
感染マクロファージに認められる  
アポトーシス発現機序に関する研究

室 三之

北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座

(主任：小鷺 悠典教授)

Studies about apoptosis  
expression mechanism recognaized  
in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*  
infection macrophages

Miyuki MURO

Department of Periodontology  
School of Dentistry Health Science University of Hokkaido

(Chief: Prof. Yusuke KOWASHI)

**Abstract**

Evidence for apoptosis in J774.1 cells by the periodontopathic bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* has been reported, suggesting that the ability of *A. actinomycetemcomitans* to promote apoptosis may be important in the initiation and development of periodontitis. This study examined the role of macrophage CD14 in the induction of apoptosis induced by *A. actinomycetemcomitans* infection using the parent J774.1 cells and the CD14 defective mutant LR-9 cells. It was found that LR-9 cells showed a weak cytotoxic effect after being infected with *A. actinomycetemcomitans* Y4. The LR-9 cells infected with *A. actinomycetemcomitans* Y4 showed no increase in the population of apoptotic nuclei, compared with the non-infected cells. A smaller number of *A. actinomycetemcomitans* Y4 inside LR-9 cells than inside J774.1 cells was detected by confocal scanning microscopy. Further, CD14 is a receptor for lipopolysaccharide (LPS) and it has been suggested that intracellular information was transmitted in relation to the LPS binding. It was examined whether stimulation of J774.1 cells with LPS prior to infection affects the subsequent apoptosis. Apoptotic cell death of LPS-stimulated J774.1 cells was found to be significantly lower than that in the controls. Significantly smaller numbers of live *A. actinomycetemcomitans* were recovered from the

受付：平成11年3月11日

LPS-stimulated macrophages than from controls at 8 and 10h after the infection. These findings suggest that the CD14 may contribute to the phagocytosis of *A. actinomycetemcomitans* by J774.1 cells, and at least in part, regulate apoptotic cell death of macrophages infected with *A. actinomycetemcomitans*, and that the inhibitory effect of LPS on apoptosis results from an enhanced bactericidal activity.

**Key words :** *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Macrophages, Apoptosis, CD14, Lipopolysaccharide.

## I. 緒 言

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*は、これまで限局型若年性歯周炎 (Localized juvenile periodontitis: LJP) の主な関連菌とされてきたが<sup>1-6)</sup>、近年、急速進行性歯周炎の進行にも深く関与していることが報告された<sup>7)</sup>。また、難治性歯周炎の病態が進行した部位からも検出されるという報告から、*A. actinomycetemcomitans*は若年性歯周炎のみならず、様々な病型の歯周炎に深く関わっているという考え方が一般的になってきた<sup>8)</sup>。歯周ポケット内から分離される *A. actinomycetemcomitans*は血清型a, b, cの3つに分類されており、ヒトの口腔内からは、血清型aと血清型bが多く分離されると報告されている<sup>9)</sup>。最近では、血清型dおよびeの存在も報告されている<sup>10)</sup>。特に血清型bはLJP患者から最も高頻度に分離されるため、この血清型bの菌株がLJPにおける病原菌として重要視されている<sup>11)</sup>。*A. actinomycetemcomitans*の病原性因子として、ロイコトキシン、リポ多糖、膜小胞などが報告されているが<sup>12-15)</sup>、なかでもロイコトキシンはヒトの多形核白血球と単球に対し毒性を示すため、LJPの発症メカニズムを考える上で、重要であると報告されている<sup>16)</sup>。また、リポ多糖はリンパ球やマクロファージといった免疫担当細胞を活性化し、様々な作用を発現することが知られている<sup>17,18)</sup>。このような多彩な病原因子は、本菌の歯周ポケット内での定着と増殖、

宿主組織への侵入、それに続く組織破壊過程において極めて重要な役割を果たしていると考えられる。

これまで細胞死は、傷害性因子による偶発的な死の過程をとるネクロシスによるものとされてきたが、1972年にKerrら<sup>19)</sup>は、細胞の膨潤や細胞膜、ミトコンドリアなどの変化を主体とするネクロシスとは異なる細胞死を見出し、その細胞死をアポトーシスと定義した。近年、アポトーシスは免疫系における自己認識細胞の排除、神経系の発達過程における細胞の排除および細胞分化・増殖に深く関与していることが明らかにされてきた<sup>20)</sup>。また、HIVウィルスに感染したTリンパ球の細胞死、*Shigella*や*Bordetella*に感染したマクロファージにおける細胞死が、アポトーシスによる細胞死であると報告されている<sup>21,22)</sup>。

一方、リポ多糖はグラム陰性細菌の細胞膜に存在し、生体内に侵入することにより多彩な生物学的作用を引き起こす。リポ多糖が生体に対して多彩な生物学的作用を起こす際に中心的役割を果たしているのはマクロファージである。マクロファージは歯肉および歯根膜の主たる構成要素である結合組織中に存在している。マクロファージは異物を貪食し、Tリンパ球にその抗原を提示したり、プロスタグランジンE<sub>2</sub>や炎症性サイトカインの放出により骨破壊を助長する。マクロファージは微量のリポ多糖により活性化され、種々の生理活性物質を産生・放出し、

これらがメディエーターとなって多彩な活性が発現される。リボ多糖によるマクロファージの活性化の第1ステップはリボ多糖のマクロファージへの結合であるが、最近、この結合反応にはマクロファージ細胞膜表面タンパク質であるCD14分子が関与していることが明らかにされた<sup>23)</sup>。

われわれは、これまで*in vitro*の培養系で*A. actinomycetemcomitans* Y4株がマクロファージ細胞株であるJ774.1細胞のアポトーシスを誘導することを報告した<sup>24)</sup>。また、*A. actinomycetemcomitans* Y4株によるアポトーシス誘導において、マクロファージが*A. actinomycetemcomitans* Y4株を貪食することが重要であることを示した。本研究では、*A. actinomycetemcomitans* Y4株が細胞内に貪食される際に関与する因子として、リボ多糖のレセプターの一つと考えられているCD14分子に着目し、アポトーシス発現にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

## II. 材料および方法

### 1. 供試細胞株および供試細菌株

供試細胞株として、マウスマクロファージ細胞株J774.1細胞（国立感染症研究所 口腔科学部供与）とそのCD14欠損株であるLR-9細胞<sup>25,26)</sup>（同研究所 細胞科学部供与）を用いた。細胞はRPMI1640培地（Gibco Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A.）に非働化牛胎仔血清（FCS；Gibco）を10%添加し、ペニシリンGカリウム（100U/ml, 明治製菓, 東京）および硫酸ストレプトマイシン（100μg/ml, Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.）を含む培地（以下、10%FCS-RPMI1640培地）を使用し37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。

供試細菌株として、国立感染症研究所口腔科学部保存株である*A. actinomycetemcomitans* の血清型a（ATCC29523株）、b（Y4株）、c

（NCTC9710株）、d（IDH781株）およびe（OMZ534株）の5菌株を用いた。これらはTodd-Hewitt Broth（Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.）に酵母エキス（Difco）を1%加えた培地に接種し、37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で2日間培養した。また、培養後の*A. actinomycetemcomitans* Y4株全菌体からWestphalら<sup>27)</sup>の方法に従いリボ多糖を抽出・精製し実験に使用した。

### 2. 細胞の感染操作

10%FCS-RPMI1640培地で $2 \times 10^5$ 個/mlに調製した細胞を、96穴マイクロプレート（Corning Glass Works, Corning, NY, U.S.A.）に $2 \times 10^4$ 個/穴となるように播種し、あらかじめ18時間培養した。培養終了と同時に24時間前に培養しておいた*A. actinomycetemcomitans* Y4株を遠心分離して集めた後に抗生物質を含まないRPMI1640培地に懸濁し、吸光度550nmで菌数を調製した。細胞数と細菌数の比が、1:50, 1:500, 1:5000となるように細胞に添加し、 $1,000 \times g$ で10分間遠心操作を行った。37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で1時間培養した後、ペニシリンGカリウム、硫酸ストレプトマイシンおよび硫酸ゲンタマイシン（200μg/ml, Sigma）を含むRPMI1640培地で3回洗浄した。その後、上記の培地に5%FCSを添加した培地でさらに以下の培養を行った<sup>21,28)</sup>。

### 3. 致死活性率（MTTアッセイ）

感染操作後、細胞を37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で48時間培養した。培養終了4時間前に3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide（MTT試薬；2.5mg/ml；Sigma）を各穴に20μl添加した。培養終了時に0.04N HCl添加イソプロパノール100μlを加え十分混和して発色させた後、分光光度計（Multiskan Biochromatic microplate

reader; Labsystems, Helsinki, Finland) を用いて570nm (対照波長620nm) にて吸光度を測定した<sup>29)</sup>。致死活性率は以下の計算式により算定した。

致死活性率 (%) =  $100 \times (1 - \text{感染細胞における吸光度} / \text{非感染細胞における吸光度})$

#### 4. アポトーシス細胞の検出法

##### 1) フローサイトメーターによる検出

感染操作後、細胞を48時間培養した。その後、細胞を1 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) に3.4 mM クエン酸, 0.1% TritonX-100, 100  $\mu$ M EDTA $\cdot$ 2Na, 50  $\mu$ g/ml ヨウ化プロピディウム (propidium iodide; Gibco) を添加したPI試薬に懸濁し、氷上に1時間静置した。試料をメッシュに通した後にFACScan<sup>®</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Francisco, CA, U.S.A.) を用いてDNA量を測定した<sup>30)</sup>。

##### 2) Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nicked end labeling (TUNEL) 法

TUNEL法での検出は *In Situ* Cell Death Detection Kit (FITC, Boehringer Mannheim, Germany) を用いて行った<sup>31)</sup>。感染操作後、細胞を48時間培養した。その後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS, pH7.2) で洗浄し、4% パラフォルムアルデヒドで固定し、さらに0.1% TritonX-100添加した0.1% クエン酸ナトリウム溶液に懸濁し、氷上に2分間静置した。再度PBSで洗浄した後、TUNEL反応液で処理し37°C, 1時間暗所に静置した。試料をメッシュに通した後にFACScan<sup>®</sup> を用いて解析した。

##### 3) DNA断片化検出法

感染操作してから細胞を24時間培養後、あらかじめ4°Cに冷やしておいたLysis buffer (5 mM EDTA $\cdot$ 2Na, TritonX-100を1%含む10

mM トリス塩酸緩衝液; pH7.4) に懸濁した。氷上に20分間静置後、10,000  $\times g$  で20分間遠心操作を行った。遠心操作後、上清を採取しリボヌクレアーゼ (500  $\mu$ g/ml; Boehringer Mannheim) を10  $\mu$ l添加し37°Cで1時間反応させた。さらにプロティナーゼK (10mg/ml; 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を10  $\mu$ l添加し50°Cで1時間反応させた後、DNAをフェノール/クロロフォルム (1:1) で抽出した。抽出したDNAはエタノール沈殿後、TE buffer (1 mM EDTA $\cdot$ 2Naを含む10mM トリス塩酸緩衝液; pH8.0) に溶解し、2% アガロースゲル上に添加した。Mupid-2 (コスモ・バイオ株式会社, 東京, 日本) を用いて100Vの定電圧にて電気泳動を行った後、エチジウムプロマイド (1  $\mu$ g/ml; 和光純薬工業株式会社) で染色した<sup>32)</sup>。DNAマーカーとしては、Supper Ladder-low 100 bp ladder (Gen Sura Laboratories, Inc., Del Mar, CA, U.S.A.) を用いた。

#### 5. 感染J774.1細胞の致死活性の発現に及ぼす抗CD14抗体の影響

J774.1細胞に対して感染操作を行う際に、抗CD14ウサギIgG抗体 (6  $\mu$ g/ml; 大分医科大学医学部第二病理学講座 山本俊輔博士供与) を添加した。感染操作後48時間培養し、MTTアッセイにて致死活性率を算定した。抗CD14抗体添加による効果は、以下のように決めた致死活性抑制率で評価した。

致死活性抑制率 (%) =  $(1 - \text{抗体を添加した細胞の致死活性率} / \text{抗体を添加しなかった細胞の致死活性率}) \times 100$

#### 6. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

あらかじめFITC (fluorescein isothiocyanate; Sigma) を0.05M炭酸ナトリウム一重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.1) で50  $\mu$ g/mlになるように調製した。A. *actinomycetem-*

*comitans* Y4株 ( $10^9$ 個/ml) をFITC溶液に懸濁後、4°Cで1時間静置し、FITC標識 *A. actinomycetemcomitans* Y4株を調製した。8穴チャンバースライド (Nunc, Naperville, Ill., U.S.A.) に細胞を  $2 \times 10^4$  個/穴となるように播種し、37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で18時間培養した。その後、細胞にFITC標識 *A. actinomycetemcomitans* Y4株を前述の感染操作に従って細胞に感染させ、感染細胞を37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で6時間培養した。培養後、PBSで洗浄し、過ヨウ素酸ーリジンーパラフォルムアルデヒド試薬 (PLP; 10mM NaI<sub>4</sub>, 75mMリジン, 37.5mMリン酸緩衝液, 2%パラフォルムアルデヒド; pH6.2) 中で37°Cで1時間固定した。固定後, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyaninen perchlorate (DiI; 5  $\mu$ g/ml; 和光純薬工業株式会社) 試薬を添加して40°Cにて2時間処理した<sup>33)</sup>。その後、PBSで2回洗浄後、チャンバースライドの上部枠を除去し細菌感染細胞を *p*-phenylenediamineを含むグリセリン-PBSにて封入後、Leica TCS 4D共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った<sup>34)</sup>。細胞への菌体の取り込みは、100個の細胞に取り込まれた菌数を算定することにより評価した。細胞への菌体の取り込みの差はStudent's *t*検定により有意差検定を行った。

#### 7. J774.1細胞のアポトーシス発現に及ぼすリポ多糖前処理の影響

J774.1細胞を6穴マイクロプレート (Corning) に  $5 \times 10^6$  個/穴になるように播種し、37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。6時間後に位相差顕微鏡下にて細胞がプレート底に付着したのを確認し、培養上清を取り除いた。その後、リポ多糖の最終濃度が1, 5および10 $\mu$ g/mlとなるように抗生物質、血清を含まないRPMI1640培地で調製し、これを用いて18時間培養した後、前述の2.の細胞の感染操作を行った。

#### 8. 感染マクロファージ内に生存する *A. actinomycetemcomitans* Y4株の菌数測定

Todd-Hewitt Brothに0.5%の酵母エキスおよび1.5%の寒天粉末 (和光純薬工業株式会社) を加えた培地を高圧滅菌した後、50~60°Cにまで冷却し、ヒツジの脱繊維血液 (日本バイオテスト研究所, 東京, 日本) を5%になるように無菌的に滅菌シャーレ (岩城硝子株式会社, 千葉, 日本) に注ぎ血液寒天培地を作製した。感染操作後、細胞を培養し、操作直後から2時間おきに培養上清を取り除いた細胞に0.1% TritonX-100を添加することにより細胞溶解させた。その後、溶解液をPBSで $10^5$ 倍希釈してから血液寒天培地に100 $\mu$ l接種した。血液寒天培地は37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で48時間培養した後、コロニー数 (CFU) を測定し細菌数を算定した。

### III. 結 果

#### 1. *A. actinomycetemcomitans*感染による致死活性率の変化

異なる血清型の *A. actinomycetemcomitans* 5菌株をJ774.1細胞に感染させ、48時間培養後に致死活性率を調べた。その結果、血清型a (ATCC29523株), b(Y4株), c(NCTC9710株) およびd (IDH781株), e (OMZ534株) の5菌株のいずれを感染させた場合も感染させなかったJ774.1細胞 (対照群) と比較して致死活性の発現が認められた。また、感染させた菌数の増加にともない致死活性率は上昇した (図1)。血清型の違いにより致死活性率に差がほとんど認められなかったため、以降の解析には血清型bのY4株のみを用いた。

J774.1細胞およびLR-9細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させたところ、細胞:細菌比が1:50の場合はJ774.1細胞でおよそ20%の致死活性の発現が認められたが、LR-9細胞では致死活性の発現はほとんど認められなかった。また、1:5000の比率で感染

させると、致死活性率がJ774.1細胞では71.7%, LR-9細胞では34.4%と両者の間に有意な差が認められた (図2)。

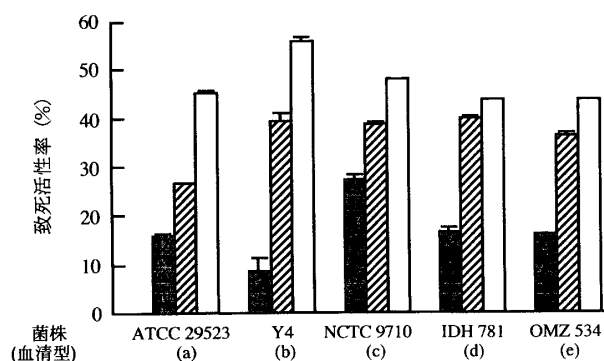


図1 異なる血清型の *A. actinomycetemcomitans* を感染させたJ774.1細胞における致死活性率

*A. actinomycetemcomitans* の血清型a, b, c, d, eの各菌株を細胞:細菌の比率が1:50, 1:500および1:5000となるようにJ774.1細胞に感染させて48時間培養した。致死活性の測定はMTTアッセイで行い、致死活性率として表した。  
致死活性率 (%) =  $100 \times (1 - \text{感染細胞における吸光度} / \text{非感染細胞における吸光度})$

■ 1:50  
▨ 1:500  
□ 1:5000

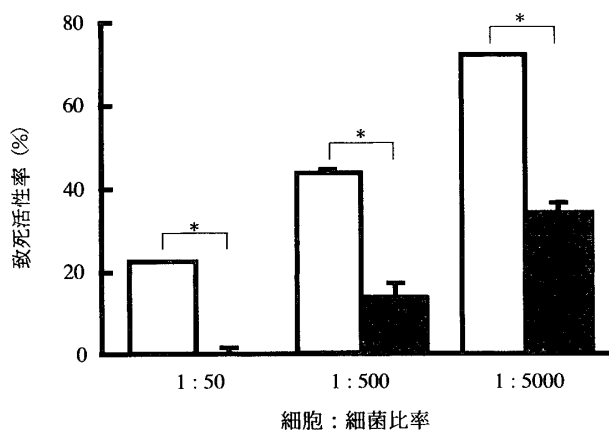


図2 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージの致死活性率

*A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞:細菌の比率が1:50, 1:500および1:5000となるようJ774.1細胞とLR-9細胞の各々に感染させて48時間培養した。致死活性の測定はMTTアッセイで行い、致死活性率は図1と同様に計算した。

□ J774.1細胞  
■ LR-9細胞

\*:  $p < 0.05$  を有意差ありと判定している。

## 2. アポトーシス細胞

J774.1細胞およびLR-9細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞1に対し5000となるように感染させた後、48時間培養してからPI染色しフローサイトメーターで解析した。細菌を感染させなかったJ774.1細胞およびLR-9細胞のハイポディプロイドDNAを有する核の量はほとんど同じであった。一方, *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させた後のJ774.1細胞は、ハイポディプロイドDNAを有する核の量がおおよそ3倍増加したが、LR-9細胞では細菌を感染させなかった場合と比較してもほとんど変化は認められなかった (図3)。

J774.1細胞およびLR-9細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞1に対し5000となるように感染させた後、48時間培養

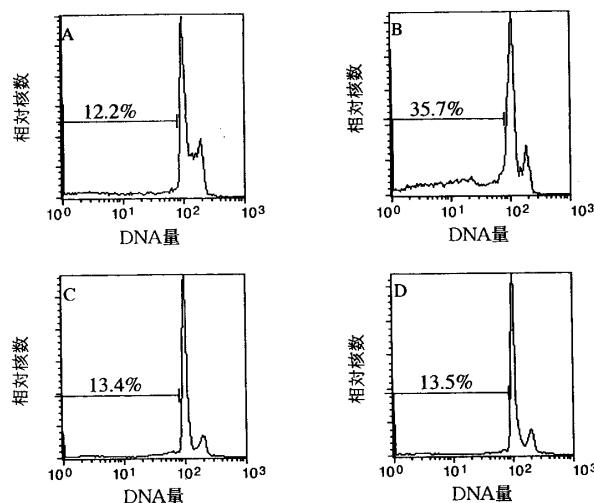


図3 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージのフローサイトメーターによる解析

*A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞:細菌の比率が1:5000となるようにJ774.1細胞とLR-9細胞の各々に感染させて48時間培養した。

PI染色した後にアポトーシス細胞をフローサイトメーターで検出した。

A: *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させなかったJ774.1細胞

B: *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させたJ774.1細胞

C: *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させなかったLR-9細胞

D: *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させたLR-9細胞

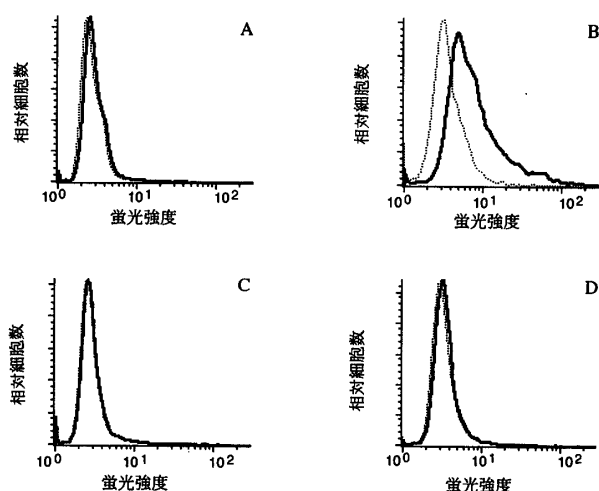


図4 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージのTUNEL法による解析

*A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞：細菌の比率が1：5000となるようにJ774.1細胞とLR-9細胞の各々に感染させて48時間培養した。アポトーシス細胞はIn Situ Cell Death Detection Kitを用いてFITCで標識後、フローサイトメーターで解析した。

A；*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させなかったJ774.1細胞

B；*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させたJ774.1細胞

C；*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させなかったLR-9細胞

D；*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させたLR-9細胞

---；TUNEL反応液を添加しなかった時

—；TUNEL反応液を添加した時

してからFITC結合dUTPによって標識したフローサイトメーターで解析した。細菌を感染させなかったJ774.1細胞およびLR-9細胞の蛍光度は、細胞自身が持つ自己蛍光とほとんど差が認められなかった。*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染後のJ774.1細胞では、出現ピークが強い蛍光を示し、右方に移動したが、LR-9細胞では細菌を感染させなかったLR-9細胞と比較しても蛍光度の違いは認められなかった（図4）。

感染操作後、24時間培養した細胞からDNAを抽出して、2%アガロースゲルで泳動した。その結果、*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させたJ774.1細胞では明瞭なDNA断片化像が観察されたが、LR-9細胞では1：50、1：



図5 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージにみられたDNA断片化像

*A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞：細菌比が1：50（2，6），1：500（3，7）および1：5000（4，8）となるように調製し、J774.1細胞（1～4）とLR-9細胞（5～8）の各々に感染させた。培養24時間後、DNAを抽出して2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

M；DNAマーカー（Supper Ladder-low）

1，5；感染させなかった細胞

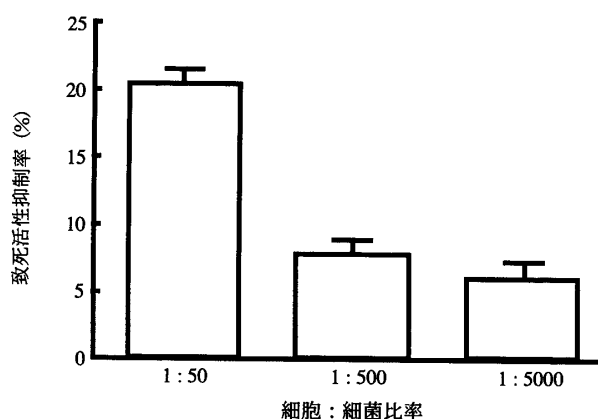


図6 抗CD14抗体の*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染J774.1細胞の致死活性の発現に及ぼす影響

*A. actinomycetemcomitans* Y4株をJ774.1細胞に感染させる際に抗CD14抗体を添加し48時間培養を行った。致死活性はMTTアッセイで測定した。

致死活性抑制率(%) = (1 - 抗体を添加した細胞の致死活性率 / 抗体を添加しなかった細胞の致死活性率) × 100

500，1：5000のいずれの比率で感染させてもDNA断片化像は観察されなかった（図5）。

### 3. 抗CD14抗体による致死活性率の抑制

J774.1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させる際に、抗CD14抗体を添加したところ、致死活性率が20.5%抑制された。また、感染菌数を増加すると、抑制率は低下したものの、1:500, 1:5000の比率で感染させた場合においても10%未満の抑制効果が認められた(図6)。

### 4. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

共焦点レーザー顕微鏡下では、FITCで標識した*A. actinomycetemcomitans* Y4株は点状の黄色として、細胞はDiI試薬にて後染色を行ったために赤色の細胞像として観察された(図7)。J774.1細胞とLR-9細胞を任意にそれぞれ100個を選択し、細胞内に取り込まれた菌数を測定した。その結果、J774.1細胞では1細胞あたり平

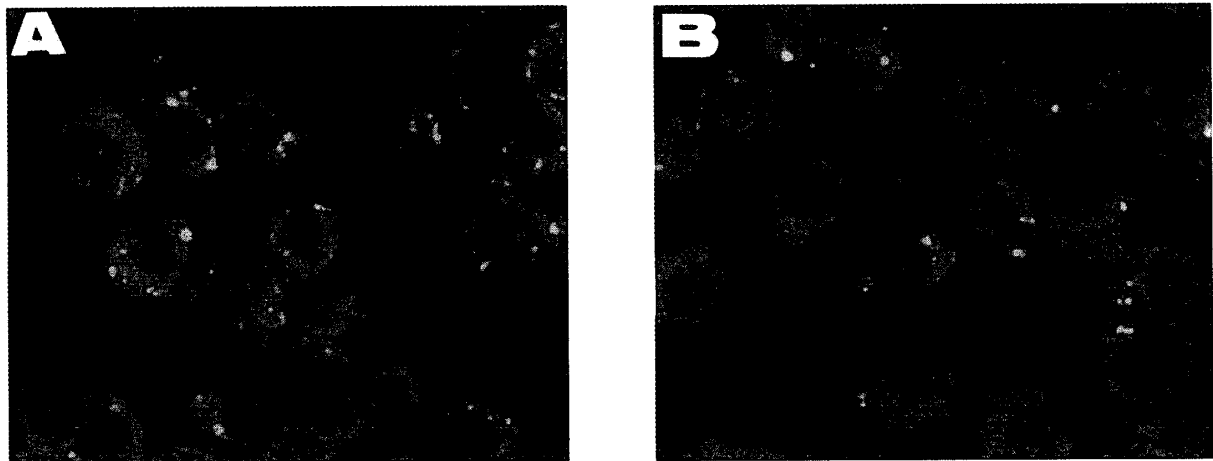


図7 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージの共焦点レーザー顕微鏡での観察像

*A. actinomycetemcomitans* Y4株をFITC標識し、この標識菌体を細胞：細菌の比率が1:5000となるようにJ774.1細胞(A)とLR-9細胞(B)の各々に感染させた。その後6時間培養してマクロファージ細胞をDiI試薬で染色し、LeicaTCS4Dの共焦点レーザー顕微鏡で観察した(×400)。

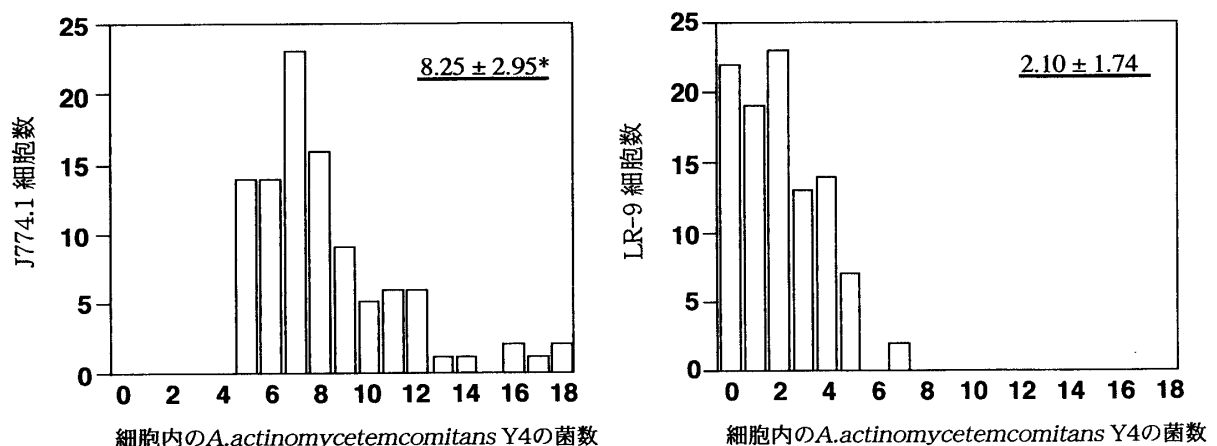


図8 マクロファージに貪食された*A. actinomycetemcomitans* Y4株の菌数の比較

*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染J774.1細胞およびLR-9細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。それぞれの細胞100個を任意に選び出し、細胞内の*A. actinomycetemcomitans* Y4株の菌数を測定した。

J774.1細胞;  $8.25 \pm 2.95^*$  (平均±標準誤差)

LR-9細胞;  $2.10 \pm 1.74$  (平均±標準誤差)

\*; LR-9細胞内に取り込まれた菌数と比較して、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定している。



均8.3個の細菌が認められたが、LR-9細胞では平均2.1個の細菌しか認められなかった (Student's *t*検定) (図8)。

### 5. リポ多糖で前処理したJ774.1細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させた時の影響について

リポ多糖で前処理した細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞1に対して50, 500, 5000となるように感染させて致死活性率の変化を調べた。リポ多糖で前処理した細胞では、リポ多糖量の増加に伴って致死活性率が抑制された (Student's *t*検定)。特に10 $\mu$ g/mlのリポ多糖で前処理した細胞に細胞：細菌比が1：50となるように *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させると、ほとんど致死

活性の発現が認められなかった (図9)。

リポ多糖での前処理の有無に関わらず、*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させなかった細胞では、ハイポディプロイドDNAを有する核の割合は7.8%にとどまった。一方、リポ多糖で前処理した細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞1に対して5000となるように感染させると15.0%のハイポディプロイドDNAを有する核の割合が認められ、前処理しなかった細胞と比較して、およそ50%減少した (図10)。

細胞内に取り込まれた菌数を比較したところ、感染直後ではリポ多糖の前処理細胞内に取り込まれた菌数はほとんど同じであった。培養時間の経過とともに前処理しなかった細胞では細胞内の菌数は増加したが、前処理した細胞で

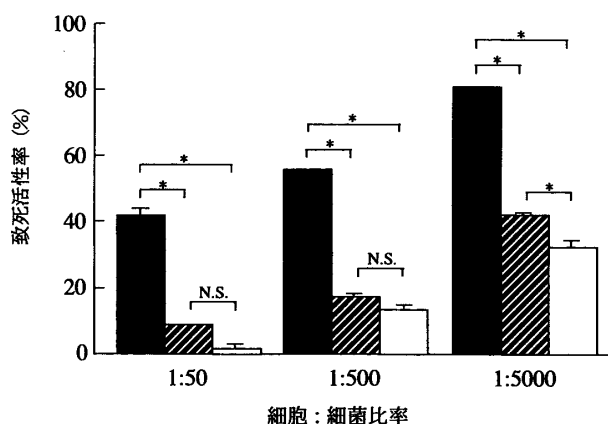


図9 リポ多糖で前処理したJ774.1細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させた際の致死活性発現

*A. actinomycetemcomitans* Y4株から抽出したリポ多糖で18時間培養したJ774.1細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞：細菌の比率が1：50, 1：500および1：5000となるように、感染させて48時間培養した。致死活性の測定はMTTアッセイで行い、致死活性率は図1と同様に計算した。

- *A. actinomycetemcomitans* Y4株由来のリポ多糖 (0  $\mu$ g/ml)
- ▨ *A. actinomycetemcomitans* Y4株由来のリポ多糖 (1  $\mu$ g/ml)
- *A. actinomycetemcomitans* Y4株由来のリポ多糖 (10  $\mu$ g/ml)

N.S.; Not Significant (有意差なし)

\*;  $p > 0.05$ を有意差ありと判定している。

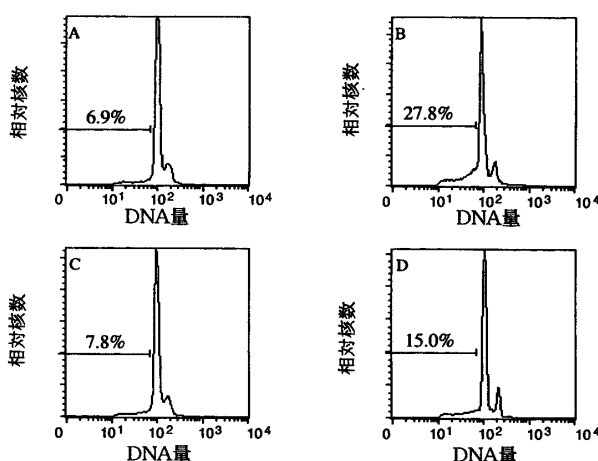


図10 リポ多糖で前処理した後に感染させたJ774.1細胞のフローサイトメーターによる解析

*A. actinomycetemcomitans* Y4株から抽出したリポ多糖 (10  $\mu$ g/ml) で18時間培養したJ774.1細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞：細菌の比率が1：5000となるように感染させて48時間培養した。PI染色した後にアポトーシス細胞をフローサイトメーターで検出した。

- A; *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させなかった細胞
- B; *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させた細胞
- C; リポ多糖で前処理した細胞
- D; リポ多糖で前処理した細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させた

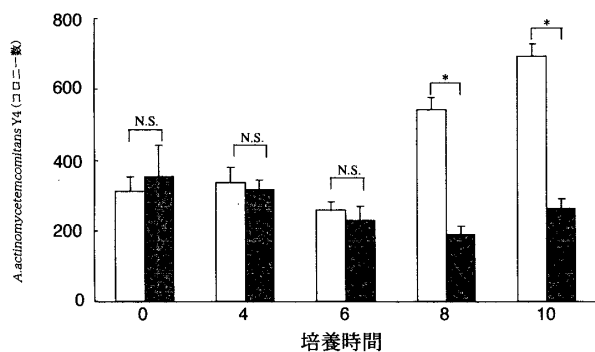


図11 リポ多糖で前処理後に感染させたJ774.1細胞から回収された*A. actinomycetemcomitans* Y4株の菌数

*A. actinomycetemcomitans* Y4株から抽出したりポ多糖 (10 $\mu$ g/ml) で18時間培養したJ774.1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞:細菌の比率が1:5000となるように感染させた。培養時間ごとに感染細胞を溶解し、血液寒天培地に播種し、48時間培養し、培地上に生育したコロニー数を測定した。

□ リポ多糖で前処理しなかった細胞

■ リポ多糖で前処理した細胞

N.S.; Not Significant (有意差なし)

\*;  $p < 0.05$ を有意差ありと判定している。

は細胞内の菌数に変化は認められなかった。特に感染操作後、8から10時間の培養で、リポ多糖で前処理した細胞と前処理しなかった細胞の間で、細胞内の菌数に明らかな違いが認められた (Student's *t*検定) (図11)。

#### IV. 考 察

CD14分子は、分子量55kDaのGPIアンカー型糖タンパク質で、マクロファージでは常に強く発現されている。この糖タンパク質をコードするcDNAはすでにクローニングされ、その塩基配列からCD14分子はロイシンに富む24個のアミノ酸から成る繰り返し配列を13個含むことが明らかにされている<sup>35,36)</sup>。近年、ヒトCD14分子を高発現するトランスジェニックマウスが作製され、このマウスはリポ多糖に対して高い感受性を示すことが報告された<sup>37)</sup>。このような研究結果が蓄積され、CD14分子がリポ多糖のレセプターとしてシグナル伝達に関与していると考えられるようになった。

Hara-Kugeら<sup>25,26)</sup>は、マウスマクロファージJ774.1細胞の変異株で、リポ多糖に対する反応性を欠如したLR-9細胞を作製し、この細胞ではリポ多糖の細胞内へのシグナル伝達を引き起こされないことを明らかにした。また、Wrightら<sup>38)</sup>は、(1)マクロファージの分化抗原の一つであるCD14に対する抗体がリポ多糖-リポ多糖結合タンパク質 (以下、LBP) 複合体のマクロファージへの結合を阻止すること、(2)PI-アンカータンパク質であるCD14をPI特異的ホスホリパーゼCを用いて、細胞膜表面から除去するとリポ多糖-LBP複合体の結合が消失すること、(3)抗CD14抗体がリポ多糖-LBP複合体によるマクロファージからの腫瘍壊死因子産生を阻害することを明らかにした。これらの結果から、リポ多糖がまず血清中に存在するLBPと結合してLBPに構造変化を起こし、そのリポ多糖-LBP複合体がCD14分子に結合することを示した。そこで本研究では、リポ多糖のレセプターとしてのCD14分子に着目し、J774.1細胞およびCD14分子欠損株であるLR-9細胞を用いて*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現機構を比較検討した。

まず、J774.1細胞およびLR-9細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させ、MTTアッセイを指標とした致死活性率で感染細胞の細胞死を確認した。*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させることにより、J774.1細胞ではLR-9細胞に比べて有意に高い致死活性の発現が認められた (図2)。さらに、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染後のJ774.1細胞では、ハイポディプロイドDNAを有する核の割合が増加していた (図3)。TUNEL法およびアガロースゲル電気泳動で解析したところ、感染J774.1細胞では断片化DNAの割合が増加していた (図4, 5)。一方、*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させたLR-9細胞では、感染させていないLR-9細胞と比較

してハイポディプロイドDNAを有する核の割合に変化は認められなかった。TUNEL法およびアガロースゲル電気泳動においても断片化DNAは検出されなかった(図3, 4, 5)。さらに, J774.1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させる際に抗CD14抗体を添加したところ, 致死活性率が有意に低下した(図6)。以上の結果から, *A. actinomycetemcomitans*感染させたJ774.1細胞にみられたアポトーシス発現にCD14分子が関与している可能性が強く示唆された。

Katoら<sup>24)</sup>はマクロファージの貪食を抑制する薬剤であるサイトカラシンDを添加することにより, *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染J774.1細胞のアポトーシスが有意に抑制されることを見出し, 感染J774.1細胞のアポトーシス発現には細胞がY4株を貪食することが必須であると報告した。今回, 共焦点レーザー顕微鏡の観察結果から, J774.1細胞とLR-9細胞内に貪食された*A. actinomycetemcomitans* Y4株の菌数に明らかな違いが認められた(図7)。100個の細胞中に, 取り込まれた*A. actinomycetemcomitans* Y4株の菌数を数えたところ, J774.1細胞では1細胞あたり平均8.3個の*A. actinomycetemcomitans* Y4株が取り込まれているのに対し, LR-9細胞で取り込まれていた*A. actinomycetemcomitans* Y4株は平均2.1個であった(図8)。これは, 細胞内に貪食された*A. actinomycetemcomitans* Y4株の菌数とアポトーシス発現の相関関係を明確に示すものであり, *A. actinomycetemcomitans* Y4株が細胞内に貪食される際には細胞膜上のCD14分子が深く関与していることを示唆するものであった。

次に, *A. actinomycetemcomitans* Y4株から抽出したリポ多糖でJ774.1細胞を前処理し, その後*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させて致死活性の発現およびハイポディプロイドDNAを有する核の割合を検討した。リポ多糖で

前処理した細胞は前処理していない細胞と比較して有意に低い致死活性率を示し(図9), ハイポディプロイドDNAを有する核の割合も減少していた(図10)。これらの結果から, リポ多糖で前処理することにより, *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染J774.1細胞でのアポトーシス発現が抑制されることが明らかとなった。そこで, リポ多糖で前処理することにより, J774.1細胞に取り込まれた*A. actinomycetemcomitans* Y4株の生菌数に変化が見られるか否かについて検討した。リポ多糖で前処理した細胞から, 感染直後に回収された菌数は, 前処理しなかった細胞とほとんど同じであった。しかし, 感染させてから10時間後では, リポ多糖で前処理しなかった細胞では, 回収された菌数は感染直後に比べて有意に増加した。しかし, リポ多糖で前処理した細胞から回収された菌数は, 感染直後と培養10時間後との間で大きな違いは認められなかった(図11)。

マクロファージは直径15~20 $\mu$ mの単核細胞で, 細胞質に富み偽足を出して運動を行い異物を貪食する。貪食に伴い活性酸素やリゾチームなどのライソゾーム酵素を多量に産生し, 異物を破壊消化したのち細胞外へ放出する。マクロファージの活性化物質として, インターフェロン- $\gamma$ をはじめとして多くのものが存在しているが, リポ多糖は微量でマクロファージを活性化することが広く知られている。今回の実験でも*A. actinomycetemcomitans* Y4株から抽出したリポ多糖で前処理したJ774.1細胞は*A. actinomycetemcomitans* Y4株の増殖を阻害していた。それにともない, *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染後のアポトーシス発現が著しく抑制されていた。対して, リポ多糖で前処理しなかったJ774.1細胞では, アポトーシス発現と*A. actinomycetemcomitans* Y4株の細胞内増殖に関して正の相関が認められた。このことからJ774.1細胞に取り込まれた*A.*

*actinomycetemcomitans* Y4株が、その後細胞内で増殖することでアポトーシスが誘導されている可能性が強く示唆された。

本研究の結果、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染J774.1細胞のアポトーシス発現には、CD14分子が深く関与し、*A. actinomycetemcomitans* Y4株は、細胞壁を構成する成分の一つであるリポ多糖と血清中に含まれるLBPと結合し、細胞膜上のCD14分子との結合を介してJ774.1細胞に取り込まれることが明らかとなった。さらに、リポ多糖で前処理したJ774.1細胞を用いた実験結果から、取り込まれた*A. actinomycetemcomitans* Y4株はJ774.1細胞内で増殖し、マクロファージであるJ774.1細胞のアポトーシスの誘導に深く関わっていることが強く示唆された。

## V. 結 論

*A. actinomycetemcomitans* を感染させたマクロファージ細胞株のアポトーシス発現機構について検討し、以下の結果が得られた。

1. *in vitro* の培養系でマウスマクロファージ細胞株 J774.1 細胞に *A. actinomycetemcomitans* の血清型 a (ATCC29523 株), b (Y4 株), c (NCTC9710 株) および d (IDH781 株), e (OMZ534 株) の 5 菌株を感染させたところ、血清型の違いにかかわらず、同程度の致死活性の発現が認められた。
2. J774.1 細胞およびその CD14 分子欠損変異株である LR-9 細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4 株を感染させて致死活性率を比較したところ、J774.1 細胞では 71.7%, LR-9 細胞では 34.4% と両細胞の間に有意な差が認められた。
3. *A. actinomycetemcomitans* Y4 株感染マクロファージのアポトーシス発現を様々な方法で解析したところ、*A. actinomycetemcomitans* Y4 株を感染させた J774.1 細胞では

アポトーシス発現が認められたが、CD14 分子欠損株である LR-9 細胞ではアポトーシス発現が認められなかった。

4. J774.1 細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4 株を感染させる際に抗 CD14 抗体を添加させたところ、感染処理後の J774.1 細胞でのアポトーシス発現が抑制された。
5. *A. actinomycetemcomitans* Y4 株感染マクロファージを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、マクロファージ内に取り込まれていた *A. actinomycetemcomitans* Y4 株は、J774.1 細胞では 1 細胞あたり平均 8.3 個、LR-9 細胞では 2.1 個と両細胞の間に菌数に違いが認められた。
6. リポ多糖で前処理した J774.1 細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4 株を感染させたところ、前処理しなかった J774.1 細胞に比べ、低い致死活性率を示した。
7. リポ多糖で前処理した J774.1 細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4 株を感染させてフローサイトメーターで解析したところ、前処理しなかった J774.1 細胞に比べてアポトーシス細胞の出現が有意に減少していることが明らかとなった。
8. リポ多糖で前処理した J774.1 細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4 株を感染させた後、J774.1 細胞内に取り込まれた *A. actinomycetemcomitans* Y4 株の生菌数を測定したところ、感染直後の J774.1 細胞ではリポ多糖の処理の有無にかかわらず、両者の間に有意な差は認められなかった。しかし、感染 10 時間後の J774.1 細胞内の生菌数は、リポ多糖で前処理した細胞と前処理しなかった細胞との間に有意な差が認められ、リポ多糖で前処理した J774.1 細胞内の生菌数は感染直後と比べて 2.6 倍に増加していた。一方、リポ多糖で前処理した J774.1 細胞では生菌数の増加は認められなかった。

以上, *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染処理によるマクロファージ内への取り込みとその後に引き起こされるアポトーシスにマクロファージ細胞膜上のCD14分子が深く関わっていることが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御教示, 御校閲を頂きました小鷲悠典教授に心から感謝の意を表します。また, 研究に際し, 御指導, 御校閲を頂きました国立感染症研究所 (旧国立予防衛生研究所) 口腔科学部花田信弘部長に心から感謝の意を表します。さらに, 実験に際し常に御助言, 御指導を頂きました口腔科学部歯周病室室長西原達次博士に心から御礼を申し上げます。本研究に用いたLR-9細胞は国立感染症研究所細胞化学部西島正弘部長の御好意によるものであり, また, 共焦点レーザー顕微鏡の観察像は, 九州大学歯学部口腔解剖学第二講座大崎康吉博士の甚大なる協力によるものであり, 心から感謝の意を表します。また, 細胞内の生菌数の測定方法のご助言を頂きました口腔衛生学講座廣瀬公治助教授に心から感謝の意を表します。また, 国立感染症研究所口腔科学部の諸先生方, ならびに歯科保存学第一講座教室員各位に御礼を申し上げます。

## 文 献

1. Slots, J.: The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.*, **84**: 1-10, 1976.
2. Liljenberg, B. and Lindhe, J.: Juvenile periodontitis. Some microbiological, histopathological and clinical characteristics. *J. Clin. Periodontol.*, **7**: 48-61, 1980.
3. Slots, J. and Rosling, B. G.: Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J. Clin. Periodontol.*, **10**: 465-486, 1983.
4. Mandell, R. L.: A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. *Infect. Immun.*, **45**: 778-780, 1984.
5. Christersson, L. A., Slots, J., Rosling, B. G. and Genco, R. J.: Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, **12**: 465-476, 1985.
6. Asikainen, S.: Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Spirochetes* in relation to age in localized juvenile periodontitis. *J. Periodontol.*, **57**: 537-541, 1986.
7. Vincent, J. W., Suzuki, J. B., Falkler, Wa, Jr., and Cornett, W. C.: Reaction of human sera from juvenile periodontitis, rapidly progressive periodontitis, and adult periodontitis patients with selected periodontopathogens. *J. Periodontol.*, **59**: 464-469, 1985.
8. Bragd, L., Dahlén, G., Wikström, M. and Slots, J.: The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, **14**: 95-99, 1987.
9. Zambon, J. J., Slots, J. and Genco, R. J.: Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect. Immun.*, **41**: 19-27, 1983.
10. Gmür, R., Manabb, H., van Steenberg, T. M. J., Baehni, P., Mombelli, A., van Winkelhoff, A. J. and Guggenheim, B.: Seroclassification of hitherto nontypable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol. Immunol.*, **8**: 116-120, 1993.
11. Zambon, J. J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, **12**: 1-20, 1985.
12. Listgarten, M. A., Lai, C. -H. and Evian, C. L.: Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. *J. Clin. Periodontol.*, **8**: 155-164, 1981.
13. Ebersole, J. L., Taubman, M. A., Smith, D. J., Genco, R. J. and Frey, D. E.: Human immune responses to oral microorganisms. 1. Association of localized juvenile periodontitis (LJP) with

- serum antibody responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Clin. Exp. Immunol.*, **47** : 43-52, 1982.
14. Smith, D. J., Ebersole, J. L., Taubman, M. A. and Gadalla, L.: Salivary IgA antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a young adult population. *J. Periodontol. Res.*, **20** : 8-11, 1985.
  15. Christersson, L. A., Wikesjö, U. M. E., Albin, B., Zambon, J. J. and Genco, R. J.: Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. 2. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. *J. Periodontol.*, **58** : 540-545, 1987.
  16. Hammond, B. F. and Stevens, R. H.: *Capnocytophaga* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* : occurrence and pathogenic potential in juvenile periodontitis. Genco, R. J. and Mergenhausen, S. E., Host-Parasite Interactions in Periodontal Diseases, *American Society for Microbiology, Washington, D. C.*, 1982, 46-61.
  17. 西原達次 : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の免疫生物学的活性に関する研究—リボ多糖体, 全菌体抽出物, および菌体外産物の化学組成と免疫生物学的活性について—*日歯周誌*, **28** : 56-78, 1986.
  18. Barker, K. A. and Holt, S. C. : The *in vitro* effect of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4 lipopolysaccharide on murine peritoneal macrophages. *Can. J. Microbiol.*, **29** : 1552-1563, 1983.
  19. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26** : 239-257, 1972.
  20. Raff, M. C.: Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, **356** : 397-400, 1992.
  21. Zychlinsky, A., Prevost, M. C. and Sansonetti, P. J.: *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, **358** : 167-169, 1992.
  22. Khelef, N., Zychlinsky, A. and Guiso, N.: *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.*, **61** : 4064-4071, 1993.
  23. Raetz, C. R., Ulevitch, R. J., Wright, S. D, Sibley, C. H., Ding, A. and Nathan, C. F.: Gram - negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.*, **5** : 2652-2660, 1991.
  24. Kato, S., Muro, M., Akifusa, S., Hanada, N., Semba, I., Fujii, T., Kowashi, Y. and Nishihara, T.: Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect. Immun.*, **63** : 3914-3919, 1995.
  25. Hara-Kuge, S., Amano, F., Nishijima, M. and Akamatsu.: Isolation of a lipopolysaccharide (LPS) -resistant mutant, with defective LPS binding, of cultured macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.*, **265** : 6606-6610, 1990.
  26. Nishijima, M., Hara-Kuge, S., Takasuka, N., Akagawa, K., Setouchi, M., Matsuura, K., Yamamoto, S. and Akamatsu, Y.: Identification of a biochemical lesion, and characteristic response to lipopolysaccharide (LPS) of a cultured macrophage-like cell mutant with defective LPS-binding. *J. Biochem.*, **116** : 1082-1087, 1994.
  27. Westphal, O. and Jann, K.: Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol - water and further applications of the procedure. Whistler, R. L., *Methods in Carbohydrate Chemistry* vol. 5, *Academic Press, New York and London*, 1965, 83-91.
  28. Clerc, P. L., Ryter, A., Mounier, J. and Sansonetti, P. J.: Plasmid-mediated early killing of eucaryotic cells by *Shigella flexneri* as studied by infection of J774 macrophages. *Infect. Immun.*, **55** : 521-527, 1987.
  29. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65** : 55-63, 1983.
  30. Pcrandones, C. E., Illera, V. A., Peckham, D., Stunz, L. L. and Ashman, R. F.: Regulation of apoptosis *in vitro* in mature murine spleen T cells. *J. Immunol.*, **151** : 3521-3529, 1993.
  31. Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A.: Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119** : 493-502, 1992.
  32. Moore, K. J. and Matlashewski, G.: Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J. Immunol.*, **152** :

- 2930-2937, 1994.
33. Carette, M. J. M. and Ferguson, M. W. J.: The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion *in vitro* : an analysis by DiI labeling and confocal microscopy. *Development*, **114** : 379-388, 1992.
34. Ohsaki, Y., Nagata, K. and Kurisu, K.: Localization of types 1 and 3 collagen and fibronectin in the developing mouse palatal shelves. *Acta Anat.*, **153** : 161-167, 1995.
35. Ferrero, E., Goyert, S. M.: Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14 *Nucleic Acids Res.*, **16**, 4173, 1988.
36. Setoguchi, M., Nasu, N., Yoshida, S., Higuchi, Y., Akizuki, S., Yamamoto, S.: Mouse and human CD14 (myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein) primary structure deduced from cDNA clones. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1008** : 213-222, 1989.
37. Ferrero, E., Jiao, D., Tsuberi, B. Z., Tesio, L., Rong, G. W., Haziot, A. and Goyert, S. M.: Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90** : 2380-2384, 1993.
38. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. and Mathison, J. C.: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, **249** : 1431-1433, 1990.