

# 免疫応答におけるマスト細胞活性化機構に関する研究： Toll-like receptorによるマスト細胞活性化について

*Activating mechanism of mast cell in immuno-responses:  
mast cell activation due to Toll-like receptor*

池田輝雄<sup>1</sup>, 舟場正幸<sup>2</sup>, 村上 賢<sup>3</sup>

<sup>1</sup>麻布大学獣医学部病態生化学研究室, <sup>2</sup>栄養学研究室, <sup>3</sup>分子生物学研究室

Teruo Ikeda<sup>1</sup>, Masayuki Funaba<sup>2</sup>, Masaru Murakami<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pathbiochemistry and Immunology, <sup>2</sup>Nutrition, <sup>3</sup>Molecular Biology

**Abstract.** The role of mast cells in infections is invariably thought of as a detrimental one. However, recent studies have shown that mast cells play a key role in host defense against various enterobacterial infections. In this study, using mast cell-deficient and mast cell-sufficient mice we have investigated the protective role of mast cells in the infections. Our findings indicate that i. the mast cells are activated by adhesion protein, ii. Killing bacteria is dependent on the activated mast cells, and iii. activated mast cells secrete IL-3 and the IL-3 promotes mast cell proliferation by autocrine. Taken together, these findings suggest a beneficial role of mast cells in infections in mice.

## 1. 目的

マスト細胞が関連した尿路感染における炎症反応のメカニズムについては、その研究が始められたばかりでよく理解されていないのが現状である。しかし、その幾つかの機構は炎症反応の最初に起こる泌尿器系の上皮細胞のサイトカイン反応であるとされている一方で、そのほかの炎症細胞が細菌感染に対する生体反応に活発に反応しているのではないかと考えられている。明らかに炎症細胞は膀胱の粘膜下織内の上皮の下に迅速に見られ、その細胞はマスト細胞である。マスト細胞は免疫細胞の中で最も長寿の細胞であり、感染性病原体に対して早期に炎症および免疫反応をする能力を備えている。また、マスト細胞は炎症細胞を誘発する多くのメディエーターを多量に産生・放出する能力を持つこともよく知ら

れており、そのマスト細胞の活性化はいろいろな炎症や病態の悪化に寄与することもある。しかしながら、最近このマスト細胞は、色々な腸内細菌感染症、たとえば type1 線毛保有大腸菌が引き起こす感染症に対する宿主感染防御において重要な役割を果たすことが報告されている。マスト細胞は、グラム陰性桿菌感染部位における好中球の初期誘導において重要であり、それによってマウスの腹腔感染や肺感染での細菌の排除をすることができる。その機構には、マスト細胞の好中球遊走を誘導するケトカインの放出、すなわち  $TNF\alpha$  とロイコトリエン (LT) が含まれている。そこで本研究ではマスト細胞細菌クリアランスを中心にそのメカニズムを検討した。

## 2. 方法

### マウス

日本チャールズリバーからBALB/cマウス、メス6-8週令を購入し使用した。マスト細胞欠損マウスであるWBB6F1-W/W<sup>v</sup>マウスと対照マウスWBB6F1-+/+は6-8週令、メスを静岡実験動物から購入し使用した。マウスは5匹ずつバリアフリーの環境の下にゲージで実験動物委員会規定のもとに飼育された。

### 試薬

牛胎児血清はHyclone (Logan, UT) を使用した。Triton X-100, 牛血清アルブミン, トルイジンブルーはSigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。マッコンキー寒天培地は日水製薬株式会社 (東京) を使用した。

### 細菌株

*E. coli* ORN103 (pSH2) は、K12大腸菌にtype1線毛の機能全長発現遺伝子をコードするプラスミドpSH2を遺伝子導入されたリコンビナント菌株である。一方、*E. coli* ORN103 (pUT2002) はORN103 (pSH2) の部分欠損変異体で、線毛先端のFimH遺伝子がコードするアドヒジョンタンパク質を発現しない。*E. coli* J96 は、type1線毛保有大腸菌で尿路感染症から分離された臨床分離株である。*E. coli* J96 Pile は、*E. coli* J96 のFimH欠損変異株である。

### マウスマスト細胞

マウスマスト細胞株であるCFTL-12はNIHのJaclyn H. Peirce博士から分与された。CFTL-12細胞は、マウス粘膜型マスト細胞と同じ性質を有することが知られている。CFTL-12はその発育と増殖にIL-3を必要とする。CFTL-12細胞は、10%非働化牛胎児血清、ペニシリン (100 U/ml), ストレプトマイシン (100 µg/ml) そしてIL-3 (0.01 µg/ml) を含むRPMI1640培地で培養された。CFTL-12細胞は培養4-6日目に継代され、使用した。

### マウス膀胱内での細菌によるヒスタミンの放出

マウス膀胱内における細菌によるヒスタミン放出

を調べるために、マウスは安楽死され膀胱を露出した。膀胱内に貯留する尿を除去後 $2.5 \times 10^7$  CFU/mlの*E. coli* J96の浮遊液100 µlを膀胱内に接種した。対照マウスには同量のPBSを接種した。室温で1時間、細菌を膀胱に充分接触させた。1時間後、注射器を用いて膀胱内接種液を回収し、遠心後上清中に含まれるヒスタミンをO-phthalaldehyde fluorometric法を用いて測定した。

### 増殖測定法

大腸菌に対するマスト細胞の増殖反応の検出にはMTT法 (3-[2,5-dimethylthiazol-2-y]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) を用いた。すなわち、 $0.1 \times 10^5$  個/mlのCFTL-12細胞と $1 \times 10^5$ /mlの大腸菌を含む浮遊液100 µlを96穴マイクロプレートに入れ、37°C 48時間培養する。そこにMTT10 µlを加え37°C 4時間培養して活性化細胞の代謝によるformazan結晶を形成させる。そのformazan結晶は0.01 N塩酸を含む10% SDS溶液で37°C一昼夜溶解させ、各々のウエルの吸光度を540 nmで測定した。

細菌が誘導するマスト細胞から産生されるIL-3がマスト細胞の増殖を刺激するかどうかを検討するため、 $0.1 \times 10^4$ のCFTL-12細胞が $0.12 \times 10^5$ の大腸菌とともに96穴マイクロプレートで100 µlのIL-3を含まない培養液中で培養された。抗マウスIL-3抗体 (R&D Systemm Minneapolis, MN) が各々のウエルに加えられ、細胞は37°C 48時間培養された。培養後、細胞増殖はCellTiter 96 Aqueous Kit (Promega, Madison, WI) を用いて測定された。

### 感染モデル

感染モデルは、以前記載した方法に準じてBALB/c, WBB6F1-W/W<sup>v</sup>およびWBB6F1-+/+マウスで作製された。すなわち、体重20-25 gのマウスに5%ブドウ糖液を4日間与えた。5日目にマウスを安楽死させ、26 Gのカニユーレにより尿を除いた後PBS100 µl中に $2.5 \times 10^5$ 個の*E. coli*を含んだ細菌浮遊液が膀胱に接種された。その後反応時間毎に膀胱は回収され、その一部はホモジナイズされた。膀胱組織に侵入した細菌数の測定はマッコンキー寒天培地を用いた段階希釈法により測定された。細菌感染後

の mast 細胞数の測定のために、膀胱はカルノア固定され、パラフィン包埋後、5  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切された。組織は、好中球に対してはヘマトキシリン-エオジン染色、mast 細胞に対してはトルイジンブルー染色された。mast 細胞数の測定は、高倍率 (X40) により測定され、膀胱組織 1  $\text{mm}^2$  中の mast 細胞数として計算された。

### RT-PCR によるマウス IL-3 遺伝子の測定

mast 細胞からの Total RNA の分離には RNeasy mini kit (Qiagen, Japan) が用いられた。Total RNA は DNase 処理後、SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いて cDNA を作製した。PCR は the Expand High-Fidelity PCR System (Roche, Indianapolis, IN) を使用した。PCR は、94  $^{\circ}\text{C}$  30 秒、58  $^{\circ}\text{C}$  30 秒、72  $^{\circ}\text{C}$  45 秒の 35 サイクルで行われた。用いたマウス IL-3 に対するプライマーはセンスプライマー 5'-caccgtttaaccagaacgtga-3'、アンチセンスプライマー 5'-atccagatctcgaatgaagacc-3' を使用した (予想される増幅産物は 442 bp)。PCR 産物は 2% アガロースで電気泳動され、エチジウムブロマイドで可視化され測定された。

### 3. 結果と考察

#### 膀胱における細菌排除のための mast 細胞の分布

多くの研究で mast 細胞がグラム陰性細菌感染で病理生理学的に重要な役割を演じていることはよく理解されてきている。それらの研究では、例えば  $\text{TNF}\alpha$  やロイコトリエンなどの免疫媒介分子を放出することによって食細胞を誘導し、マウスの腹腔や肺における細菌の排除を強力に推し進めていることが示されている。我々は、mast 細胞がマウス膀胱での細菌排除を強力に推進するかどうかを検討した。膀胱における mast 細胞は粘膜下織に見られ、そこは戦略的に膀胱の粘膜下織に侵入しようとする尿路病原体と遭遇する場所に位置している。これを調べるために、我々は尿路感染モデルを改変した方法を用いた。Type1 線毛保有尿路病原性大腸菌 J96 の  $2 \times 10^5$  個を膀胱内に直接接種し BALB/c マウスの膀胱感染症を惹起した。この感染症は 10 日間で終息する (データ未掲載)。感染症のピークの間 (感染後 3 日目)、多数の炎症細胞が尿中に細菌数で  $1 \times 10^8/\text{ml}$

と同じように尿中に検出される。その後数日は炎症細胞は徐々に減少してゆき、生菌が検出されるようになった (データ未掲載)。膀胱内 mast 細胞の関連を調べるために、我々はよくその性質が判明している mast 細胞欠損マウス (WBB6F1-W/W<sup>v</sup>, 一般的には W/W<sup>v</sup> と呼ばれる) とその対照であるワイルドタイプ (WBB6F1-+/+, +/+ と表現される) を使用した。mast 細胞欠損マウスは遺伝的に C57BL/6 マウスの 5 番目の染色体上の W 領域に両側の突然変異を生じており、このマウスは市販されている。mast 細胞が欠損していると同時に、W/W<sup>v</sup> マウスは貧血、不妊そして被毛の色素欠損を示す。W/W<sup>v</sup> と +/+ との結果を比較することによって、mast 細胞がある特別な生物学的な状況での役割を果たしているかどうか証明することが容易であるかもしれない。もし、両者間での著しい相違があることが分かれば、mast 細胞の重要性は、mast 細胞の再構築 W/W<sup>v</sup> マウスでのその役割の回復を見ることによって確認することができる。この再構築の系を用いて我々は以前肺でのグラム陰性菌感染と同様に腹腔感染での mast 細胞の重要性を報告した。我々の実験では、細菌の静脈内接種後 3 及び 7 日での W/W<sup>v</sup> と +/+ マウスにおける細菌クリアランスの割合を比較した。その結果、mast 細胞が細菌のクリアランスに重要であることをしめすような結果、すなわち W/W<sup>v</sup> マウスの尿中の細菌数は、+/+ マウスの尿中の細菌数に比べて著しく高値を示した (図 1)。

しかしながら、付加実験例えば mast 細胞再構築 W/W<sup>v</sup> マウスにおける細菌クリアランスで、膀胱内における細菌クリアランスに対する mast 細胞の役割を決定的に証明する必要があるかもしれない。接種 3 日目での W/W<sup>v</sup> マウス膀胱内における生菌数が  $3.20 \pm 17 \times 10^4 \text{ CFU}$  であったのに対して、+/+ マウスでは  $0.43 \pm 0.1 \times 10^4 \text{ CFU}$  であった。以前の我々の報告と同様、細菌クリアランスの割合は、野生型マウスに比べ W/W<sup>v</sup> マウスでは著しく低い値を示した ( $P < 0.05$ )。接種 7 日目では全体的に生菌数は少ないものの、依然として両者間には著しい相違が見られた。以上のことから、mast 細胞は膀胱感染においても細菌のクリアランスに寄与していることが示された。

次に、我々は +/+ マウスと比較して W/W<sup>v</sup> マウス

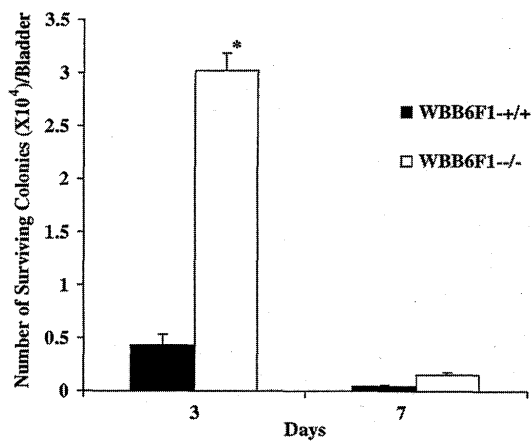


Fig. 1. Bacterial clearance in the urinary bladder of mast cell-deficient (WBB6F1-W/W<sup>y</sup>) and mast cell-sufficient wild type (WBB6F1-+/+) mice. The bladder infection in the mice was induced by intravesicular instillation with  $2.5 \times 10^5$  type 1 fimbriated uropathogenic *E. coli* J96. The mice were sacrificed on days 3 or 7 post-bacterial instillation and the bladders were removed and homogenized. The viable bacteria associated with bladder tissue were quantified by plating tenfold serial dilutions in duplicate on MacConkey Agar plates and the number of bacterial colonies was counted after 24 h. The data presented show mean S.E.M. from three to five mice per group. (\*P < 0.05 significance of difference from WBB6F1-+/+ mice on day 3)

では細菌のクリアランスが少ないがその原因を調べるために両者のマウスの膀胱組織の病理学的検査を実施した。我々は、 $2.5 \times 10^5$  *E. coli* J96 を静脈内接種した後、6時間目に+/+およびW/W<sup>y</sup>マウスより膀胱を採取し、病理組織標本を作製したのちヘマトキシリン-エオジン染色し病理組織学的に比較した。それらの標本で、病理組織学的に+/+マウスの膀胱と比較して(図2A)W/W<sup>y</sup>マウスの膀胱(図2B)で好中球の浸潤が明らかに少ないことが観察された。好中球の浸潤を両方のマウスで定量的に解析した。浸潤程度を3段階の1-3に分類し、1：軽度の浸潤、2：中等度の浸潤、3：重度の浸潤とした。+/+マウスでは8匹中6匹(75%)で明らかな好中球の浸潤(スコア3)が見られ、25%が中等度の浸潤であったのに対して、W/W<sup>y</sup>マウスではすべて(100%)が軽度の好中球の浸潤を示していた。このことからW/W<sup>y</sup>マウスでの細菌クリアランスの減弱は制限された好中球の浸潤によることが明らかとなった。マスト細胞から放出される化学媒介物質(例えばTNF $\alpha$ やロイコトリエンB<sub>4</sub>など)は感染部位における好中球の誘導に重要な役割を持つことから、W/W<sup>y</sup>

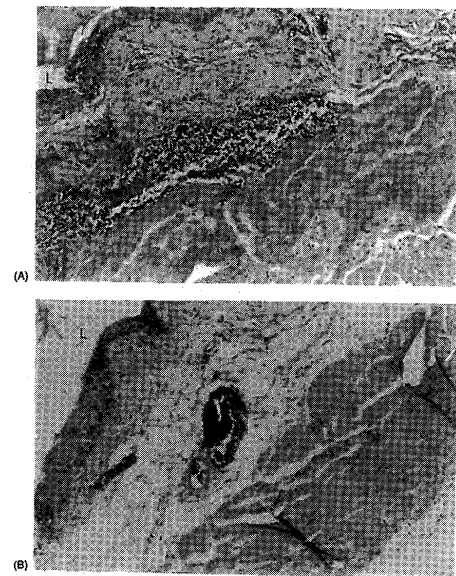


Fig. 2. Hematoxylin and Eosin staining of bladder cross-section obtained from bacteria infected mast cell-sufficient wild-type (WBB6F1-+/+)(A) and mast cell-deficient (WBB6F1-W/W<sup>y</sup>)(B) mice. The bladder tissues from type 1 fimbriated *E. coli* J96 ( $2.5 \times 10^5$ ) challenged WBB6F1-+/+ and WBB6F1-W/W<sup>y</sup> were obtained at 6 h time point, and fixed in formalin. Sections (5  $\mu$ m thickness) of paraffin-embedded bladder tissue were stained with hematoxylin and eosin. Note the remarkable subepithelial infiltrate of leukocytes in the +/+ mice, which is absent in the W/W<sup>y</sup> mice. The histology shown in Fig. 3 is representative of each group that had five to eight mice. Similar pathology was observed in individual animals in each group.

マウスでのマスト細胞の欠損は直接細菌のクリアランスと関係する。

#### type 1 線毛保有大腸菌感染の間膀胱ではマスト細胞の増殖が起こっている

+/+マウスの膀胱組織の病理組織学的検査でのそのほかの特徴的な所見として、PBSを接種した対照のマウスと比較して感染の後期で膀胱組織内により多くのマスト細胞が観察されることであった。この我々の観察は膀胱内の細菌感染の間マスト細胞が増えているという過去の報告と一致している。この所見は、細菌感染により膀胱内でのマスト細胞の増殖が誘導されることを示唆するものであった。この可能性を調べるため、我々は膀胱内に*E. coli*を直接接種し、1週間後とのマスト細胞数を決定した。マウスを0, 7, 14日目に安楽死させ、膀胱をカルノア固定の後、常法に従いパラフィン切片作製の後トルイジンブルー染色により1mm<sup>2</sup>当たりのマスト細胞数

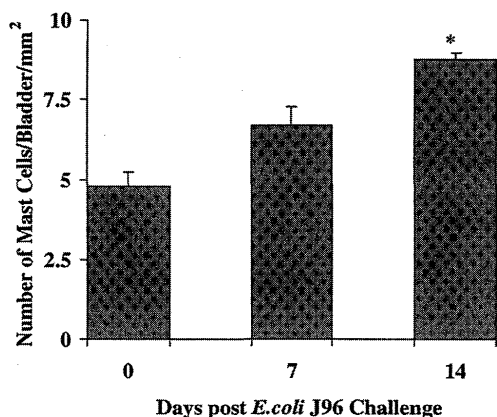


Fig. 3. Urinary bladder mast cell proliferation induced by type 1 fimbriated *E. coli*. A  $2.5 \times 10^5$  *E. coli* J96 were injected into the bladder of anesthetized female BALB/c mice. The mice were sacrificed on days 0, 7, 14 post-bacterial instillation and their bladders were removed and fixed in Carnoy's fixation. Paraffin section ( $5 \mu\text{m}$ ) of each of the bladder were stained with toluidine blue and examined for the number of mast cells per  $\text{mm}^2$  tissue section under 40X magnification. The data has been presented as mean S.E.M. of three to five animals per group. (\* $P < 0.05$  significance of difference from day 0).

を測定した。2週間に亘り、恒常的なマスト細胞数の増加が観察された(図3)。14日以降では細菌が全てクリアランスされるため期間は14日間とした。

この結果は、type 1 線毛保有大腸菌はマスト細胞の増殖を刺激する能力を有することを示唆している。

マスト細胞の増殖は type 1 線毛保有大腸菌によって in vitro で誘導される

どのようにして type1 線毛保有大腸菌感染マウス膀胱でのマスト細胞の増加が起こるのかを説明するために、我々は type1 線毛保有大腸菌がマスト細胞を刺激し、増殖させることができるのではないかと推測した。これは、type1 線毛保有大腸菌がリンパ球の増殖を促進することを示した過去の報告から推測されたものである。この推測を確認するために、我々はマスト細胞の細胞株である CFTL-12 と線毛保有および無線毛大腸菌をそれぞれ一緒に培養した。type1 線毛保有大腸菌と一緒に培養したマスト細胞は、無線毛大腸菌と比較して明らかな増殖が見られ、とくに培養2日目で顕著であった(図4)。これらの結果は、type1 線毛保有大腸菌が持続的にマスト細胞の増殖を誘導していることを示唆している。

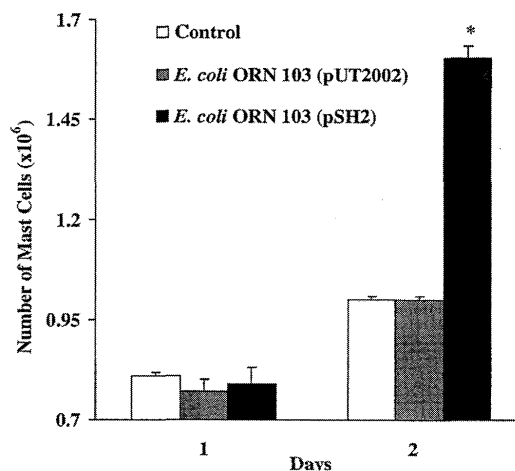


Fig. 4. Mast cell proliferation induced by type1 fimbriated *E. coli* in vitro. CFTL-12 mast cells were cultured in 96-well culture plates at a cell density of  $0.1 \times 10^5$  cells/ml in 100 ml media with type1 fimbriated *E. coli* ORN103 (pSH2), isogenic mutant *E. coli* ORN103 (pUT2002) or vehicle for 48 h at  $37^\circ\text{C}$ . The cell proliferation induced by bacteria was determined by using an MTT assay. The data has been presented as mean S.E.M. from three independent experiments performed. (\* $P < 0.05$  significance of difference from isogenic mutant *E. coli* ORN103 (pUT2002) day 2.)

#### 細菌に誘導されたマスト細胞増殖における IL-3 の役割

次に我々はどうのようにしてマスト細胞の増殖が細菌によって誘導されるのかを調べた。マスト細胞の増殖のためには、Stem cell factor (SCF) あるいは IL-3 が必要なことはよく知られている。強力なアゴニストに暴露されたマスト細胞は、IL-3 を分泌しオートクラインの経路を誘導して自身の増殖をする。細菌によりこの経路が誘導されるかを調べるために、マスト細胞と type1 線毛保有大腸菌および無線毛大腸菌を培養して、マスト細胞での IL-3 mRNA の誘導を調べた。その結果、図5に見られるように type1 線毛保有大腸菌と培養したマスト細胞だけに IL-3 mRNA の誘導が確認された。これらの結果は、type1 線毛はマスト細胞での転写レベルでの IL-3 を誘導することを示している。

細菌によって誘導されるマスト細胞の IL-3 がマスト細胞増殖に関与しているかを確認するために、抗 IL-3 抗体存在下でマスト細胞と type1 線毛保有大腸菌を培養したときにマスト細胞の増殖を検討した。マスト細胞の増殖測定は MTT 測定法を用いた。図6に見られるように、抗 IL-3 抗体は濃度依存的にマスト細胞の増殖を阻害した。それらの結果は、明らかに

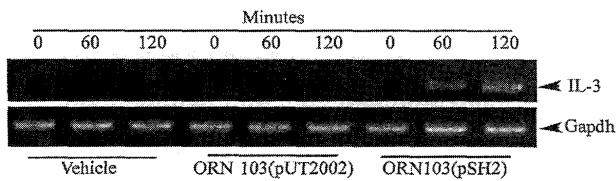


Fig. 5. Induction of IL-3 mRNA in mast cell after exposure to FimH-positive type1 fimbriated *E. coli* and FimH-negative *E. coli*. Mast cells were incubated with FimH-positive *E. coli* ORN103 (pSH2) or FimH-negative *E. coli* ORN103 (pUT2002) bacteria for the times indicated. The bacteria were then washed off and the cells were harvested. Total RNA was extracted from the cells using a RNaseasy RNA isolation kit. Specific transcripts for IL-3 and GAPDH were determined by reverse transcription and the amplification of the cDNA. Resulting cDNA was run on a 2% agarose gel and the DNA fragment co-migrating with the molecular weight marker was identified.

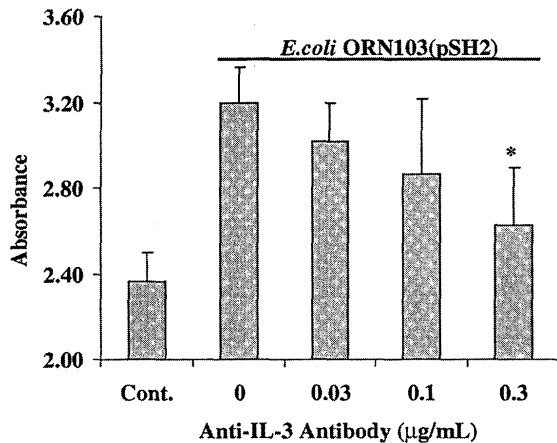


Fig. 6. Inhibition of *E. coli* induced mast cell proliferation by anti-IL-3 antibody. CFTL-12 cells were cultured in 96-well tissue culture plates at a cell density of  $0.1 \times 10^5$  cells/ml with type1 fimbriated *E. coli* ORN103 (pSH2) in 1 ml media (without IL-3) for 48 h at 37 °C. Anti-IL-3 antibody was added to the wells at the dose indicated. The cell proliferation induced by bacteria was determined using MTT assay. An increase or decrease in the absorbance of cells with respect to PBS treated control is indicative of change in the cell number. The data has been presented as mean S.E.M. from three independent experiments performed. (\* $P < 0.05$  significance of difference from 0 mg/ml anti-IL-3 antibody control).

マスト細胞の増殖は、type1線毛により誘導されたIL-3により誘導されることをしめしたおり、したがって膀胱でのマスト細胞の増殖はこのIL-3によって誘導されたことが示唆された。

一般的に我々は、マスト細胞はアレルギーや喘息におけるIgEを介したの主要な役割を果たすだけの細胞として捕らえられている。しかしながら、我々

の研究を含めた最近の研究からグラム陰性菌による感染症に対する宿主感染防御におけるマスト細胞の重要な役割が明らかとなってきた。膀胱においても最近の侵入部位である粘膜直下にマスト細胞は分布しているが、膀胱でのグラム陰性菌感染に対するマスト細胞の役割は知られていない。本研究で我々は、よく条件設定されたin vivoおよびin vitroの感染モデルを用いて細菌性膀胱炎におけるマスト細胞の役割を調べた。

我々の結果では、マスト細胞が尿路系感染症の病因に重要な役割を果たしていることは明白である。細菌性膀胱炎のマウスモデルを用いて我々は膀胱の一般的な細菌のひとつである大腸菌のType1線毛は膀胱におけるマスト細胞からのヒスタミンの放出を誘導することを示した。さらにマスト細胞欠損マウスは明らかに対照の野生型のマウスよりも細菌のクリアランスが低かった。マスト細胞がもつTNF $\alpha$ およびロイコトレンなどは色々な細菌感染モデルにおいて食細胞の遊走を媒介することが示されていることから、我々は同様のことが膀胱でも起こっており、マスト細胞欠損マウスが野生型マウスより細菌クリアランスが低い理由として好中球の誘導能が劣ることがその理由であることを示した。我々の結果はまた、尿路系病原細菌感染による膀胱内でのマスト細胞の増殖を実験的に証明した。膀胱内のマスト細胞の増加は、細菌によって刺激されたマスト細胞のアウトクラインおよび増殖の因子として知られているIL-3の放出によることである。マスト細胞はグラム陰性菌を貪食し殺菌することから、感染部位でのその数の増加は細菌のクリアランスと関係していることが示唆される。以前、MaruerらはSCFを投与したマウスでマスト細胞の増殖とそれによる急性の腹腔細菌感染によるマウスモデルでの感染防御を報告している。それらの観察では、SCFおよびIL-3単独または併用で、標的器官でのマスト細胞数の増加をしめしており、この方法により感染防御が有効であることを示している。この戦略は自然免疫能を促進するために免疫不全患者などに有効であるかもしれない。

#### 4. 要約

細菌感染におけるマスト細胞の役割はほとんど注

目されていない。しかしながら、近年の多くの研究からマスト細胞が多様な腸内細菌による感染症に対する感染防御の重要な細胞であることが示されてきた。本研究ではマスト細胞欠損マウス (WBBF1-W/W<sup>y</sup>) を用いて、細菌感染におけるマスト細胞感染防御能を検討した。その結果、(1) マスト細胞はアドヒジョンタンパク質により活性化される。(2) 細菌は活性化されたマスト細胞によって殺菌されること、(3) 活性化されたマスト細胞はIL-3産生し、それがオートクラインによってマスト細胞数の増殖をもたらすことがわかった。これらのことから、細菌感染において、マスト細胞は重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Thankavel K., Madison B., Ikeda T., Malaviya R., Shah AH., Arumugam PM., Abraham SN. *J. Clin. Invest* 100, 1123-1136, 1997.
- 2) Malaviya R., Ikeda T., Ross EA., Jackschik BA., Abraham SN. *Am. J. Ther.* 2, 787-792, 1995.
- 3) Malaviya R., Ikeda T., Ross EA., Abraham SN. *Nature* 381, 77-80, 1996.
- 4) Malaviya R., Ross EA., MacGregor JJ., Ikeda T., Little JR., Jakshik BA., Abraham SN. *J. Immunol.* 152, 1907-1914, 1994.