

201008023A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

粘膜免疫機能を増強する漢方薬の探索と  
その有効成分の同定

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小泉 桂一

平成23年(2011年)5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

粘膜免疫機能を増強する漢方薬の探索とその有効成分の同定 . . . . . 1

小泉 桂一

### II. 分担研究報告

1. 樹状細胞の抗原提示能力を亢進する漢方薬の探索およびその機序解析 . . . . . 6

小泉 桂一

2. 漢方薬ならびにその有効成分による粘膜免疫強化機序の解明 . . . . . 16

國澤 純

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 22

IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 24

## 粘膜免疫機能を増強する漢方薬の探索とその有効成分の同定

研究代表者 小泉 桂一 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授

### 研究要旨

本研究では、種々漢方薬および生薬成分をスクリーニング源として供し、(1) 単独の服用で、粘膜免疫を活性化する、および、(2) 経口ワクチンとの服用で、アジュバント効果を有する 漢方薬を網羅的に探索し、その有効成分の同定と作用機序の解明を行うことを目的としている。そこで、本年度は、既に臨床での有効性と安全性が確認されている漢方薬を経口アジュバントとして開発・応用するための基礎的な検討を行った。In vitro 抗原提示試験の結果から、十全大補湯、黄耆建中湯、および補中益気湯は樹状細胞の抗原提示能力を大きく亢進させることが明らかとなった。さらに、消化器機能の改善に用いられる補中益気湯を単独で服用するだけで、マウスの腸管免疫が活性化されるだけでなく、経口ワクチンとの併用でワクチン抗原特異的な IgA の産生が顕著に亢進することが明らかとなった。また、抗原特異的アジュバント活性を有する成分、pentagalloylglucose および類縁体も同定し、本内容は英文雑誌に受理された (Biol. Pharm. Bull., 33: 1878-1885, 2010.)。生薬成分では、黄耆エキスに樹状細胞に対する非常に強い抗原提示能力亢進作用が確認できた。従って、今後は、黄耆エキスを水溶性成分・脂溶性成分、さらには複数の分画を分取し、抗原提示試験に供することにより、黄耆建中湯による抗原提示能力亢進作用を有する活性本体の同定を行い、pentagalloylglucose と同様に同定された有効成分は、感染症に対する新規医薬品開発に対するシーズとしての可能性を追求していく予定である。

### 分担研究者

國澤 純 東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 講師

疫応答に基づく粘膜防御強化のみならず、ワクチン接種による粘膜系獲得免疫応答の増強も可能である。従って、今後の感染症予防対策の切り札として期待されているが、その殆どが実用化に至っていない理由の一つとして、安全かつ有効なアジュバントの開発が進んでいないことが挙げられる。

### A. 研究目的

人類は、新興・再興も含めて、再び感染症の脅威に直面している。この脅威を取りのぞくためにも、効果的な治療・予防法開発が強く求められている。粘膜組織は多くの病原体の主要初発感染部位であり、粘膜組織を標的とした経口ワクチンは、自然免

これまで、漢方薬が自然免疫を活性化することは多数報告があり、実際にインフルエンザ等の感染防御効果が報告されている。つい最近、研究代表者の小泉は、漢方薬である十全大補湯が、ワクチン抗原特異

的な獲得免疫誘導をも促進することを見出した（投稿準備中）。このように、投与ルートが経口である事を考えると、漢方薬は粘膜アジュバントとしての応用が期待されるが、粘膜免疫系に対する影響の詳細は解明されていない。そこで、本研究では、種々漢方薬および生薬成分をスクリーニング源として供し、かつ、漢方薬と免疫学に精通した小泉および研究分担者の國澤が連携して免疫学的な手法を駆使することで、(1) 単独の服用で、粘膜免疫を活性化する、および、(2) 経口ワクチンとの服用で、アジュバント効果を有する漢方薬を網羅的に探索し、その有効成分の同定と作用機序の解明を行うことを目的とする。その結果、すでに医療現場で使用されており、かつ安価である漢方薬を優れた粘膜アジュバント剤として利用可能となれば、感染症に対策に速やかに貢献することができ、医療経済的にも有利であると考えられる。さらに、本研究より同定された有効成分は、感染症に対する新規医薬品開発に対するシーズとなり、新たなイノベーションも創出すると思われる。このように本研究は学術的にも厚生労働行政的にも大きく貢献するものであると確信する。

以下に本年度の具体的な研究項目を列挙する。

1. 樹状細胞の抗原提示能力を亢進する漢方薬の探索およびその機序解析  
小泉 桂一
2. 漢方薬ならびにその有効成分による粘膜免疫強化機序の解明  
國澤 純

なお、本総括研究報告書は研究組織全体の総括的な研究概要の報告とするため、分担研究の詳細は各分担研究報告書に記載する。

## B. 研究方法

### 1. 樹状細胞の抗原提示能力を亢進する漢方薬とその成分探索およびその機序解析

まず初めに、臨床で汎用されており、かつ自然免疫活性化作用が報告されている17種類の漢方薬の中から、樹状細胞を用いた *in vitro* 抗原提示試験により、ワクチンアジュバント効果を有する可能性が高い漢方薬とその成分を網羅的に探索した。次に、これら漢方薬による樹状細胞の抗原提示能力亢進機序を免疫学的な観点からローサイトメトリー法にて解析した。さらに、その有効生薬を同定した。

### 2. 漢方薬ならびにその有効成分による粘膜免疫強化機序の解明

小泉の研究結果より、樹状細胞の抗原提示能力を亢進することが明らかとなった漢方薬、十全大補湯、補中益気湯、および黄耆建中湯を週5回の頻度でマウスに経口投与し(40 mg/head/time)、経日的に糞便、血清を回収し、その中に含まれる抗体価をELISA法で測定した。

2. 経口投与した抗原に対する特異的な免疫応答を検討する目的で、上記、漢方薬を5日間前投与したマウスにモデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン(OVA)を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に経口投与した。投与は1週間に1回の頻度で行い、免疫期間中も週5回の頻度で漢方薬を投与した。最終免疫の1週間後に糞便、ならびに単核球を回収し、それぞれELISA法とELISPOT法によりOVA特異的抗体反応を測定した。また同マウスの抗体産生形質細胞をIgAとCD138をマーカーに用いたフローサイトメトリー法にて測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は富山大学および東京大学医学研究所のガイドラインに則り行った。

### C. 研究結果

小泉の研究結果から、In vitro 抗原提示試験の結果から、十全大補湯、黄耆建中湯、および補中益気湯は樹状細胞の抗原提示能力を大きく亢進させることが明らかとなった。この亢進機序としては、黄耆建中湯は樹状細胞の MHC、共刺激分子、および細胞接着分子の発現が増強された結果、T 細胞への抗原提示能力が亢進したことが明らかとなった。現在、十全大補湯、補中益気湯についても解析中である。さらに、抗原特異的アジュバント活性を有する成分の同定、およびその作用機序を網羅的に解析した。その結果、pentagalloylglucose および類縁体には、強い抗原提示活性があり、その機序としては、樹状細胞の抗原貪食能力の亢進作用にあることが明らかとなった。次に、In vitro 抗原提示試験で選択された漢方薬、十全大補湯、黄耆建中湯、および補中益気湯が、(1) 単独の服用で、粘膜免疫を活性化し、および、(2) 経口ワクチンとの服用で、アジュバント効果を有するの否かを、國澤が動物実験で検討した。その結果、補中益気湯が腸管免疫を活性化すること、経口ワクチン投与期間中に補中益気湯を投与すると抗原特異的 IgA 抗体の産生が増強することを見いだした。

### D. 考察

### E. 結論

ワクチン療法の効果増強は、抗原提示細胞の抗原提示の高率化に依存している。そこで、in vitro 抗原提示試験により、抗原特異的な免疫応答を誘導できるアジュバント活性を有する漢方薬のスクリーニングを行った。その結果、十全大補湯、補中益気湯、および黄耆建中湯には、強い抗原提示活性が確認できた。特に、消化器機能の改善に用いられる補中益気湯が腸管免疫を活

性化すること、経口ワクチン投与期間中に補中益気湯を投与すると抗原特異的 IgA 抗体産生の増強作用があったことは興味深い。今後、経口ワクチンとの併用療法構築のためのトランスレーショナルリサーチを展開することが大切だと思われる。さらに、抗原特異的アジュバント活性を有する成分、pentagalloylglucose および類縁体も同定し、本内容は英文雑誌に受理された (Biol. Pharm. Bull., 33: 1878-1885, 2010.)。また、生薬成分では、黄耆エキスに樹状細胞に対する非常に強い抗原提示能力亢進作用が確認できた。今後は、黄耆エキスを水溶性成分・脂溶性成分、さらには複数の分画を分収し、抗原提示試験に供することにより、黄耆建中湯による抗原提示能力亢進作用を有する活性本体の同定を行い、pentagalloylglucose と同様に同定された有効成分は、感染症に対する新規医薬品開発に対するシーズとしての可能性を追求していく予定である。

### F. 健康危険情報

特記事項無し

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kato S, Koizumi K\*(corresponding author), Yamada M, Inujima A, Takeno N, Nakanishi T, Sakurai H, Nakagawa S, Saiki I. A phagocytotic inducer from herbal constituent, pentagalloylglucose enhances lipoplex-mediated gene transfection in dendritic cells. Biol Pharm Bull. 2010;33(11):1878-85.
- 2) T. Obata, Y. Goto, J. Kunisawa, S. Sato, M. Sakamoto, H. Setoyama, T. Matsuki, K. Nonaka, N. Shibata, M.



- Gohda, Y. Kagiya, T. Nochi, Y. Yuki, Y. Fukuyama, A. Mukai, S. Shinzaki, K. Fujihashi, C. Sasakawa, H. Iijima, M. Goto, Y. Umesaki, Y. Benno, and H. Kiyono, Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:7419-24, 2010
- 3) H. Kayamuro, Y. Yoshioka, Y. Abe, S. Arita, K. Katayama, T. Nomura, T. Yoshikawa, R. Kubota-Koketsu, K. Ikuta, S. Okamoto, Y. Mori, J. Kunisawa, H. Kiyono, N. Itoh, K. Nagano, H. Kamada, Y. Tsutsumi, S.I. Tsunoda, Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J Virol* 84: 12703-12, 2010
- 4) J. Kunisawa, and H. Kiyono, Analysis of intestinal T cell populations and cytokine productions. *Methods in Microbiology* (Edited by Stefan H.E. Kaufmann and Dieter Kabelitz). Academic Press, Oxford, pp. 183-193, 2010
- 5) J. Kunisawa\* (corresponding author) and H. Kiyono, Peaceful mutualism in the gut: Revealing key commensal bacteria for the creation and maintenance of immunological homeostasis. *Cell Host Microbe* 9: 83-84, 2011
- 6) J. Kunisawa\* (corresponding author), Y. Kurashima, and H. Kiyono, Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* (2011, in press)
- 7) 國澤 純 粘膜免疫の新展開－生体最前線における腸内環境との調和と排除－  
無菌生物 40, 25-28, 2010
- 8) 國澤 純 腸管の生体防御や恒常性維持における脂質メディエーター：スフィンゴシン1リン酸の役割 *化学と生物* 48: 827-830, 2010
- 9) 倉島洋介、網谷岳朗、國澤 純、清野 宏 食物アレルギーの予防および治療的戦略の確立に向けた粘膜免疫研究の展開 *アレルギー免疫* 18: 66-77, 2011
- 10) 國澤 純、後藤義幸、小幡高士、清野 宏 腸内細菌のバイエル板組織内共生 *細胞工学* 30: 409-412, 2011
2. 学会発表
- 1) 加藤真一郎、小泉桂一、山田美幸、犬寫明子、竹野伸洋、中西剛、櫻井宏明、中川晋作、済木育夫 芍薬成分 pentagalloylglucose の食食亢進作用に基づく樹状細胞への遺伝子導入剤としての応用、第 27 回和漢医薬学会学術大会、京都、2010 1) 國澤 純 粘膜組織における免疫学的普遍性と特殊性 第 10 回鎌倉カンファレンス (特別講演、2010 年 4 月、横浜)
- 2) Jun Kunisawa and Hiroshi Kiyono, MyD88 mediates intestinal IgA production in the maintenance of appropriate composition of commensal bacteria, The 2nd International Conference on Modern Mucosal Vaccine, Adjuvants & Microbicides (2010 年 4 月、Dublin, Ireland)
- 3) Jun Kunisawa and Hiroshi Kiyono, Vitamin B6-Mediated Sphingosine 1-Phosphate Metabolism in the Immunological Homeostasis in the Gut, ISSFAL2010 (2010 年 5 月、Maastricht, Netherland)
- 4) 國澤 純 次世代ワクチンとしての粘

- 膜免疫と DDS 第 26 回日本 DDS 学会(招待講演、2010 年 6 月、大阪) なし
- 5) Jun Kunisawa et al, MyD88-mediated high-IgA-secreting plasma cells for the effective mucosal immunity, 14th International Congress of Immunology (2010 年 8 月、Kobe, Japan) 3. その他  
なし
- 6) Jun Kunisawa et al, New trend for oral vaccine development: Control of vitamin B9-mediated regulatory T cell function to enhance the vaccine antigen-specific IgA antibody responses, 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress (2010 年 10 月、Vienna, Austria)
- 7) Jun Kunisawa, Regulation of IgA antibody responses by immunological crosstalk with intestinal environmental factors, 第 5 回千葉大学 G-COE シンポジウム (招待講演、2010 年 12 月、東京)
- 8) Jun Kunisawa, Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the regulation of innate and acquired phases of intestinal IgA responses, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010) (招待講演、2010 年 12 月、神戸)
- 9) Jun Kunisawa, The uniqueness of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine, BIT Life Sciences' 3rd World Congress of Vaccine (招待講演、2011 年 3 月、北京、中国)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録

## 樹状細胞の抗原提示能力を亢進する漢方薬の探索 およびその機序解析

研究分担者 小泉 桂一 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授

### 研究要旨

人類は、新興・再興も含めて、再び感染症の脅威に直面している。この脅威を取りのぞくためにも、効果的な治療・予防法開発が強く求められている。粘膜組織を標的とした経口ワクチンは、自然免疫応答に基づく粘膜防御強化のみならず、ワクチン接種による粘膜系獲得免疫応答の増強も可能である。従って、今後の感染症予防対策の切り札として期待されているが、その殆どが実用化に至っていない理由の一つとして、安全かつ有効なアジュバントの開発が進んでいないことが挙げられる。本研究では、既に臨床での有効性と安全性が確認されている漢方薬を経口アジュバントとして開発・応用するための基礎的な検討を行った。In vitro 抗原提示試験の結果から、十全大補湯、黄耆建中湯、および補中益気湯は樹状細胞の抗原提示能力を大きく亢進させることが明らかとなった。この亢進機序としては、黄耆建中湯は樹状細胞のMHC、共刺激分子、および細胞接着分子の発現が増強された結果、T細胞への抗原提示能力が亢進したことが明らかとなった。また、黄耆建中湯の6種の構成生薬を単独で樹状細胞に作用させた場合、黄耆の抗原提示能亢進作用が最も大きいことが確認できた。今後の課題として、黄耆エキスを水溶性成分・脂溶性成分、さらには複数の分画を分取し、抗原提示試験に供することにより、黄耆建中湯による抗原提示能力亢進作用を有する活性本体の同定を行っていく予定である。現在、十全大補湯、補中益気湯に関しても今年度に行った黄耆建中湯と同様の研究を行っている。

### A. 研究目的

経口および全身性のワクチンに共通して、その効果を効率的に発揮するには、そのワクチン抗原がプロフェッショナルな抗原提示細胞（antigen presenting cell: APC）である樹状細胞やマクロファージなどに取り込まれ、主要組織適合遺伝子複合体（Major Histocompatibility Complex: MHC）と複合体を形成して細胞表面にて提示され、複合体がT細胞レセプター（TCR）により認識

されるプロセスの効率的な亢進が重要となる。特に成熟した樹状細胞は抗原提示能力がマクロファージやB細胞に比較して高く、T細胞刺激活性は最も強い。従って、ワクチンアジュバントの具備すべき条件としては、樹状細胞の抗原提示能力を亢進させる作用を有することがキーポイントとなる。そこで、本研究では、まず初めにin vitro 抗原提示試験により、既に臨床効果として免疫力亢進の報告がある17種類の漢方薬



の中から、樹状細胞の抗原提示能力を亢進可能な漢方薬の探索を行った。さらに、探索された漢方薬の構成生薬に関しても同様な試験を行った。本研究に用いた *in vitro* 抗原提示試験は、マウス樹状細胞培養株である DC2.4 細胞に作用させたワクチンモデル抗原として用いたニワトリ卵白アルブミン (Ovalbumin, OVA) が取り込まれ、細胞内の抗原プロセッシングにより生じたエピトープペプチド OVA257-264 を MHC Class I 分子との複合体として細胞表面上に提示し、OVA エピトープペプチドである OVA257-264 と MHC Class I (H-2Kb) 複合体を特異的に認識して IL-2 を分泌する T-hybridoma である CD8OVA1.3 細胞が複合体を特異的に認識し、IL-2 を産生して自身のクローナルな増殖、活性化を行うという細胞性免疫のメカニズムを利用した系であり、実際に本 *in vitro* 抗原提示試験により多くのアジュバントの探索が行われている汎用試験系である。次に、*in vitro* 抗原提示試験により、樹状細胞の抗原提示能力を顕著に亢進する漢方薬が見出された 3 種類の漢方薬、十全大補湯、黄耆建中湯、および補中益気湯の抗原提示亢進機序を明らかとした。本報告書では、この機序の詳細が明らかとなった耆建中湯に関して記す。なお、十全大補湯、および補中益気湯の樹状細胞に対する抗原提示亢進機序に関しては、現在解析中である。耆建中湯は臨床において虚弱体質、体力低下の改善を目的に広く用いられるほか、アトピー性皮膚炎、化膿瘡の治癒遅延、褥瘡の改善など免疫力の低下・異常により引き起こされる病気に対し繁用され、多くの症例報告がなされている。さらに、免疫力を高めることで知られる黄耆を主薬とし、第 1 章においても抗原提示能力亢進に対し黄耆の寄与が最も大きいことが確認されたことから、以降、黄耆建中湯による樹状細胞に対する抗原提示能力亢進機序を解析した。まず初めに、免疫学的に解析する目的

で、ワクチンのモデル抗原として OVA を用いて刺激を行った DC2.4 細胞の (1) 抗原取り込み能力、および (2) 細胞上に発現する MHC Class I・II、および共刺激分子である B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、ICAM-1 の発現に関して、フローサイトメトリーにより解析を行った。次に、(3) 黄耆建中湯の誘導する細胞数減少と抗原提示能力亢進との関連を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 培養液

RPMI1640 (GIBCO) 培養液、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO USA) にペニシリン (penicillin, 0.1mg/ml、明治製菓 東京)、ストレプトマイシン (streptomycin, 0.1mg/ml、明治製菓 東京) を添加し、ミリポアフィルター (0.22  $\mu$ m/径、Millipore, USA) にて濾過滅菌後用いた。培養細胞の継代、維持には FCS (終濃度 10%)、2-Mercaptoethanol (2-ME, GIBCO, USA) を加えて完全培地とした。なお、本研究に用いた FCS はすべて 56°C、30 分間の非働化处理を行った。ダルベッコ PBS (-) ニュスイは日水製薬株式会社 (東京) より購入した。

### 2. 試薬

Lipofectin Reagent<sup>®</sup>、Ovalbumin FITC-Conjugate、AIM-V (無血清培地) は *invitrogen* (USA) から購入した。Mouse IL-2 ELISA Ready Set Go! は *eBioscience* (USA) より購入した。OVA は *Sigma-Aldrich* (USA) から購入した。

### 3. 漢方薬

黄耆建中湯 (TJ-98) (Lot. 2080098010)、十全大補湯 (TJ-48) (Lot. 2080048010)、小柴胡湯 (TJ-9)

(Lot. 2080009010) 、人參湯 (TJ-32)  
(Lot. 2080032010) 、補中益氣湯 (TJ-41 )  
(Lot. 2080041020) 、六君子湯 (TJ-43)  
(Lot. 2080043030) 、桂枝茯苓丸 (TJ-25)  
(Lot. 2080025010) 、八味地黄丸 (TJ-7)  
(Lot. 2070007020) 、桂枝湯 (TJ-45)  
(Lot. 2080045010) 、小建中湯 (TJ-99)  
(Lot. 2080099010) 、真武湯 (TJ-30)  
(Lot. 2080030010) 、半夏瀉心湯 (TJ-14)  
(Lot. 2080014010) 、白虎加人參湯 (TJ-34)  
(Lot. 2080034010) 、柴朴湯 (TJ-96)  
(Lot. 2080096010) 、竹茹温胆湯 (TJ-91)  
(Lot. 2080091010) 、黄耆建中湯を構成する  
生薬の刻み (黄耆: Lot. D09851、桂皮:  
Lot. D23431、芍薬: Lot. D03641、大棗:  
Lot. D12861、甘草: Lot. C25821、生姜:  
Lot. D12861) 、は株式会社ツムラ (東京)  
から供与された。生薬の刻みは各々100gを  
500mlの水で50分間煎じ、煎液をガーゼで  
濾し、冷後、液体窒素で凍結させ、凍結乾  
燥器にて凍結乾燥エキスを調製した。黄耆  
建中湯、生薬凍結乾燥エキスは、最終濃度  
が200  $\mu$ g/mlになるように用いた。

#### 4. 細胞株

OVA エピトープペプチドである  
OVA257-264とMHC Class I (H-2Kb) 複合体  
を特異的に認識して IL-2 を分泌する  
T-hybridoma である CD8-OVA1,3 細胞は、大  
阪大学大学院薬学研究科 中川晋作先生・  
中西剛先生 (現岐阜薬科大学) から恵与さ  
れ、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下单相培養で *in vitro*  
にて継代、維持した。本細胞の培養には  
DMEM 完全培地を用いた。マウス樹状細胞の  
培養細胞株である DC2.4 細胞は C57BL/6 骨  
髄由来の細胞である。本細胞は、37°C、5%  
CO<sub>2</sub> 環境下单相培養で *in vitro* にて継代、  
維持した。本細胞の培養には RPMI 完全培地  
を用いた。

#### 5. OVA/LPF 溶液の調製

OVAを5mg/mlとなるようにHBSS (-)に  
溶解した後、Lipofectin Reagent® (以下  
LPF) と1:2で混合し、35分間室温にてイ  
ンキュベートし、OVAの最終濃度が50  $\mu$   
g/mlとなるようにAIM-V培養液を加えて使  
用した。

#### 6. *in vitro* 抗原提示試験

DC2.4をAIM-V培養液に懸濁し、96well  
plateに1wellあたり4×10<sup>4</sup>cells/50  $\mu$ l  
で播種し、5%CO<sub>2</sub>、37°Cで培養した。15分  
後、漢方薬を50  $\mu$ lずつ添加し、1時間半  
後、上記に準じた方法で調製したOVA-LPF  
溶液を100  $\mu$ lずつ添加した。(最終濃度:  
漢方薬または生薬エキス200  $\mu$ g/ml、OVA50  
 $\mu$ g/ml、LPF20  $\mu$ g/ml)。5%CO<sub>2</sub>、37°Cで  
24時間培養し、抗原であるOVAを取り込ませ  
たPBS (-)で1回洗浄を行い、0.05%  
グルタルアルデヒド (室温、5分) 処理に  
より細胞を固定化し、PBSで2回洗浄した  
あと、CD8-OVA1.3細胞を4×10<sup>4</sup>cells/200  
 $\mu$ l/wellで播種した。5%CO<sub>2</sub>、37°Cで24  
時間培養後、上清を回収し、IL-2をELISA  
により定量した。

#### 7. ELISA

Mouse IL-2 ELISA Ready Set Go!  
(eBioscience USA)を用いた。プロトコル  
は添付のものに基づいて実施した。

#### 8. 抗原取り込み試験

本実験にはOVAタンパクをFITCでラベル  
化したものを用いた (以下OVA-FITCと表  
記する)。DC2.4細胞をAIM-V培養液に懸  
濁し、12well plateに2×10<sup>5</sup>cells/600  $\mu$ l  
で播種し、5%CO<sub>2</sub>、37°Cで培養した。15分  
後、黄耆建中湯を600  $\mu$ lずつ加え、1時間  
半後、上記に準じた方法で調製を行った  
OVA/LPF溶液を1200  $\mu$ lずつ添加した。  
(最終濃度:黄耆建中湯200  $\mu$ g/ml、OVA50  
 $\mu$ g/ml、LPF20  $\mu$ g/ml)。5%CO<sub>2</sub>、37°Cにて

14 時間培養し、抗原である OVA-FITC を取り込ませた。2 回 FCM-Buffer (2 % FCS/0.05%NaN<sub>3</sub>/PBS) で洗浄を行い、トリプシン EDTA にて細胞を剥離した。5ml のチューブに分注し、ベクトン・ディキンソン FACS Calibur にて解析を行った。FACS Calibur は本研究室のものを使用した。

#### 9. 細胞表面分子解析試験

DC2.4 を AIM-V 培養液に懸濁し、12well plate に 2×10<sup>5</sup>cells/600 μl で播種し、5% CO<sub>2</sub>、37°C で培養した。15 分後、黄耆建中湯を 600 μl ずつ加え、1 時間半後、上記に準じた方法で調製を行った OVA/LPF 溶液を添加した (最終濃度: 黄耆建中湯 200 μg/ml、OVA50 μg/ml、LPF20 μg/ml)。5%CO<sub>2</sub>、37°C で 24 時間培養した。2 回 FCM-Buffer (2%FCS/0.05%NaN<sub>3</sub>/PBS) で洗浄を行い、トリプシン EDTA にて細胞を剥離した。1.5ml のコレクションチューブに 1×10<sup>6</sup>cells/ml になるように分注し、Purified Rat Anti-mouseCD16/CD32 (Mouse BD Fc Block) (Clone 2.4-G2) を 0.5 μl 加えて氷上で 10 分間処理し、Fc レセプターのプロッキングを行った。FCM-Buffer を加えて 1 回洗浄した後、FCM-Buffer を 100 μl 加え、以下に示す各種抗マウス抗体 2 μl を加え、氷上にて 30 分間処理した。FCM-Buffer を加えて 2 回洗浄した後、PI (Propidium Iodide) (5 μg/ml) を 2 μl 添加することにより死細胞を染色した。細胞懸濁液をベクトン・ディキンソン FACS Calibur にて解析を行った。

#### FACS 抗体

FITC-Conjugated Anti-mouse MHC Class I (Clone28-14-8) 、 PE-Conjugated Anti-mouse MHC Class I (Clone28-14-8) 、 FITC-Conjugated Anti-mouse MHC Class II (CloneM5/114.15.2) 、 PE-Conjugated Anti-mouse MHC Class II

(CloneM5/114.15.2) 、 FITC-Conjugated Anti-mouse CD80 (B7-1) (Clone16-10A1) 、 PE-Conjugated Anti-mouse CD80 (B7-1) (Clone16-10A1) 、 FITC-Conjugated Anti-mouse CD86 (B7-2) (CloneGL1) 、 FITC-Conjugated Anti-Mouse CD54 (ICAM-1) (CloneYN1/1.7.4.) 、 PE-Conjugated Anti-Mouse CD54 (ICAM-1) (CloneYN1/1.7.4.) は eBioscience (USA) 、 Purified Rat Anti-mouseCD16/CD32 (Mouse BD Fc Block) (Clone 2.4-G2) は BD Bioscience (USA) より購入した。

#### 9. 統計解析

統計的有意性は両側 Student' s t-test により解析し、p<0.05 を有意であると判断した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は富山大学のガイドラインに則り行った。

#### C. 研究結果

##### 1. in vitro 抗原提示試験による樹状細胞の抗原提示能力を亢進する漢方薬の探索

抗原提示試験を OVA 抗原提示している DC2.4 細胞と共培養した CD8-OVA1.3 細胞からの IL-2 の産生量を指標に、ELISA 法により解析した (図 1)。その結果、Control に比較して 2 倍以上抗原提示能力を亢進させた漢方薬としては十全大補湯、黄耆建中湯、補中益気湯、小柴胡湯、人参湯、六君子湯、八味地黄丸、白虎加人参湯、真武湯の 9 種類が選択された。特に十全大補湯、黄耆建中湯、および補中益気湯を添加した際、Control に比較して顕著な抗原提示能力の亢進が確認された。

##### 2. 黄耆建中湯構成生薬および小建中湯の樹状細胞の抗原提示能力に対する影響



上記3種類の漢方薬、十全大補湯、黄耆建中湯、および補中益気湯の抗原提示亢進機序を明らかとした。黄耆建中湯を構成する6つの生薬、黄耆、桂皮、芍薬、生姜、大棗、甘草、および黄耆建中湯構成生薬から黄耆を抜いた処方である小建中湯に関して抗原提示試験を行った。その結果、6つの生薬のうち黄耆は黄耆建中湯の抗原提示能力亢進作用と同等以上の効果を示し、Controlと比較し、4.0倍の抗原提示能力を亢進する結果となった。さらに、黄耆建中湯が大きく抗原提示能を亢進させたのに対し、黄耆を除いた小建中湯の効果はほとんど確認できなかった(図2)。

### 3. 黄耆建中湯による樹状細胞の抗原提示能力の亢進機序に関する解析

#### (1) 黄耆建中湯による樹状細胞の抗原取り込み能力への影響

黄耆建中湯による樹状細胞の抗原提示能力の亢進機序に関して、免疫学的な解析を行った。2.2-6の方法に準じて、モデル抗原としてのOVA-FITCを取り込ませたDC2.4細胞をFACS Caliburによって解析し、黄耆建中湯がDC2.4細胞の抗原取り込み能力に与える効果を評価した。OVA-FITC単独でDC2.4細胞を刺激した場合、OVA-FITCの取り込み量は非常に低かったが、OVA-FITCとLipofectin®で刺激したところ、取り込み量が増加した。しかしながら、黄耆建中湯はこの取り込みを亢進することは確認できなかった(図3)。

#### (2) 黄耆建中湯による樹状細胞の細胞表面抗原の発現変化

抗原刺激を行った際の主刺激分子であるDC2.4細胞のMHC Class IとMHC Class II、および共刺激分子であるCD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、ICAM-1の発現をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、主刺激分子に関しては、OVA抗原のみを取り

込ませたDC2.4細胞であるControl群と比較して、黄耆建中湯共存下において抗原を取り込ませたOKT群のMHC Class I発現は、著しく亢進することが明らかとなった。さらに、この発現分布は、高発現している細胞(多数)と低発現している細胞(少数)に2極化していることが観察された。また、MHC Class IIに関しては、2極化は観察できなかったものの、その発現の亢進が確認できた(図4)。さらに、共刺激分子に関しては、CD80、ICAM-1の発現は亢進しており、一方で、CD86の発現が減少していることが確認できた(図5)。これらの結果から、黄耆建中湯は、TCRへの主刺激としてシグナル伝達を行うMHC分子と、副刺激としてT細胞上の分子とシグナル伝達を行うCD80、ICAM-1の発現を亢進させることによって樹状細胞の抗原提示能力を増強させていることが示唆された。

## D. 考察

## E. 結論

樹状細胞の表面分子の発現を指標に、黄耆建中湯による樹状細胞の抗原提示能力亢進の免疫学的な機序解析を、抗原提示の際の主刺激であるMHC分子、および副刺激である共刺激分子を指標に解析を行った。結果として、DC2.4細胞上のMHC Class I、およびMHC Class II発現ともに、黄耆建中湯により大幅に増加していた。本研究で用いたCD80VA1.3細胞は、MHC Class I拘束性の細胞であるが、黄耆建中湯によりMHC Class IIも発現が亢進していた結果を考察すると、外来性抗原の提示プロセスであるMHC Class IIを介して行われるCD4陽性T細胞への抗原提示はさらに活性化されている可能性が高く、その後続くTh2細胞によるB細胞の活性化、形質細胞からの抗原特異的抗体産生を大幅に増加させることが考えられる。この結果から、黄耆建中湯は、経口



ワクチンと併用して抗原特異的な IgA の産生を誘導できるアジュバントとしての応用可能であることが示唆された。抗原特異的 T 細胞を誘導する際、抗原提示細胞上の Co-stimulatory molecule や Cell-adhesion molecule の十分な発現やそれらを介した T 細胞との接触が重要である。今回の実験で発現の増強がみられた CD80 (B7-1) は T 細胞上の CD28 と結合する。ナイーブ T 細胞は、1 つの抗原提示細胞が対応する特異抗原と、B7 分子の両方を発現するときに限って応答し、B7 分子は T 細胞からの IL-2 の産生に対して 2 つの働きを行うと考えられている。1 つは IL-2 mRNA を安定化する作用である。サイトカインの mRNA は自身を不安定化させる塩基配列を持つことにより半減期が短いという特徴がある。しかし不安定な mRNA を安定化することで、IL-2 の生合成は 20 倍から 30 倍に増加することが明らかとなっている。2 つ目は CD28 を介するシグナルは、NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) や、AP-1 (Activator Protein-1) などの転写因子を活性化して、IL-2 mRNA の転写活性を約 3 倍上昇させることが知られている。NF- $\kappa$ B はその活性化により細胞質から核内へと移行して遺伝子の転写を誘導し、AP-1 は核内において NFAT (Nuclear Factor Activated T cell) の細胞内構成成分である NFATc の活性型と複合体を形成して遺伝子の転写を誘導するという、サイトカインや T 細胞の活性化に深く関与する働きをしている。このため CD28 を介した共刺激シグナルが存在しなければ、IL-2 はほとんど産生されず、T 細胞は増殖を始めることができない。このことから、黄耆建中湯により CD28 のリガンドである CD80 の発現増強がみられたことは、黄耆建中湯がワクチンアジュバントとして有用であることに対するエビデンスの 1 つとして、重要といえる。なお、CD86 (B7-2) も CD80 と同様に CD28 のリガンドとして働くこと

が知られている。CD86 は本実験では細胞上の発現量が低下していたが、MHC Class I、II や CD80 の発現の亢進により、抗原提示能力にはそれほど大きな影響を与えなかったとみられる。さらに、発現増強がみられた ICAM-1 は、T 細胞に発現する LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) と結合し、T 細胞と抗原提示細胞の最初の結合を作り出す。黄耆建中湯により ICAM-1 の発現を増強させ、細胞同士の接着を促進させることは、黄耆建中湯を生体に投与した際に、抗原提示細胞がリンパ節の皮質部分を移動し、抗原特異ペプチドを探すナイーブ T 細胞との接触を行い、T 細胞が抗原提示細胞上の MHC 分子と抗原ペプチドの複合体に出会うというプロセスを効率よく行うために大きな役割を果たすことができると考えられる。本実験において行った、樹状細胞による CD8 陽性 T 細胞への抗原提示を模した実験系において、黄耆建中湯は抗原提示能力を大幅に亢進させることが明らかとなった。これまでに、我々は十全大補湯が本試験系で抗原提示を亢進させること、および十全大補湯の服用とがんモデルワクチンの皮下接種で、顕著な抗腫瘍効果が誘導できることを動物実験で確認している。十全大補湯と較べて、黄耆建中湯は樹状細胞の抗原提示能力を同等以上に亢進させることから、今後、がんワクチンとの併用実験を行っていく必要がある。さらに、抗原提示亢進作用は小建中湯ではほとんど確認できなかったこと、および黄耆建中湯を構成する 6 つの生薬エキスのなかでは、黄耆が抗原提示亢進作用を有することから、本研究で確認された黄耆建中湯の顕著な抗原提示能力亢進作用は、大きく黄耆に依存することが明らかとなった。実際に、黄耆に含まれる astragaloside などの多糖類成分はインターフェロン誘起作用やリンパ球の活性化作用を、また、生姜の shogaol や gingerdione などの免疫活性化

作用を持つ成分を含む など、黄耆建中湯は  
その他にも免疫力を増強させ、また免疫反  
応を調整する成分を持つことが報告されて  
いる。今後の課題として、黄耆エキスを水  
溶性成分・脂溶性成分、さらには複数の分  
面を分収し、抗原提示試験に供することに  
より、黄耆建中湯による抗原提示能力亢進  
作用を有する活性本体の同定を行っていく  
予定である。現在、十全大補湯、補中益気  
湯に関しても今年度に行った黄耆建中湯と  
同様な研究を行っている。

なし  
3. その他  
なし

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kato S, Koizumi K, Yamada M, Inujima  
A, Takeno N, Nakanishi T, Sakurai H,  
Nakagawa S, Saiki I. A phagocytotic  
inducer from herbal constituent,  
pentagalloylglucose enhances  
lipoplex-mediated gene transfection  
in dendritic cells. Biol Pharm Bull.  
2010;33(11):1878-85.

##### 2. 学会発表

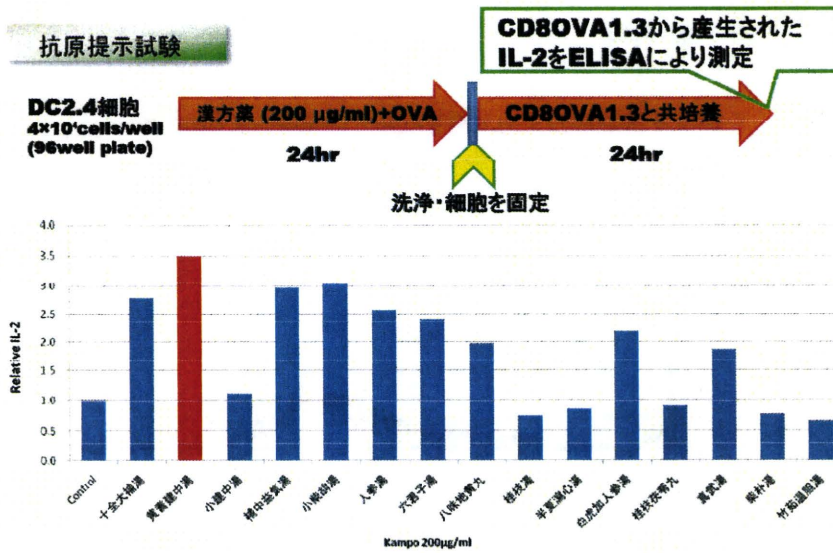
加藤真一郎、小泉桂一、山田美幸、犬寫明  
子、竹野伸洋、中西剛、櫻井宏明、中川晋  
作、済木育夫  
芍薬成分 pentagalloylglucose の食食亢進  
作用に基づく樹状細胞への遺伝子導入剤と  
しての応用、第 27 回和漢医薬学会学術大会、  
京都、2010

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

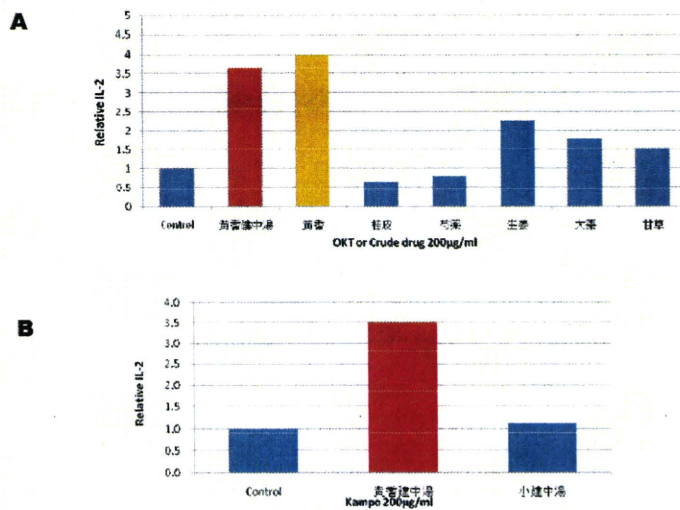
##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録



**Fig1** DC2.4細胞により抗原提示されたOVAを認識したCD8OVA1.3細胞から産生されたIL-2 (Controlに対する比) 黄耆建中湯はControlに比較して大きく抗原提示能を増強させた。



**Fig.2A**,黄耆建中湯または構成生薬(200 $\mu$ g/ml)を用いた抗原提示試験結果(Controlに対する比) 黄耆がControlに比較して抗原提示能力を大きく増強させた。**6B**, Control,黄耆建中湯、小建中湯による抗原提示試験結果(Controlに対する比)。小建中湯では抗原提示能力亢進作用が小さかったことから、黄耆が黄耆建中湯の抗原提示能力亢進作用に対する寄与が大きいことが確認できた。

プロトコル

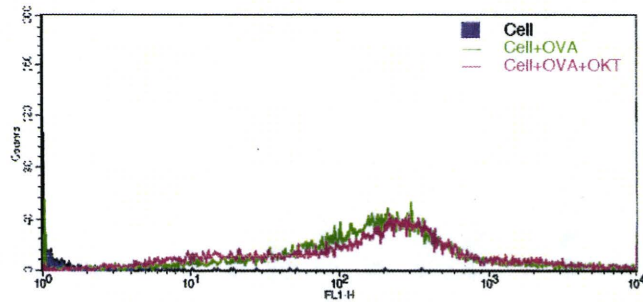


Fig.3 黄耆建中湯を用いた抗原取り込み実験 DC2.4細胞とOVA-FITC、黄耆建中湯を14時間共培養してFACS解析し、DC2.4細胞のOVA-FITCによる蛍光強度を測定した。DC2.4細胞をOVA-FITCのみと共培養したControlに対して、DC2.4細胞をOVA-FITC、黄耆建中湯と共培養したところ、抗原取り込みはほぼ変わらなかった。

プロトコル



FACS 解析

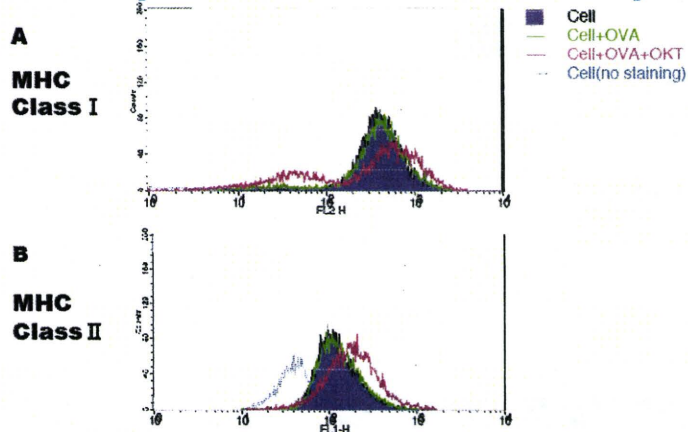
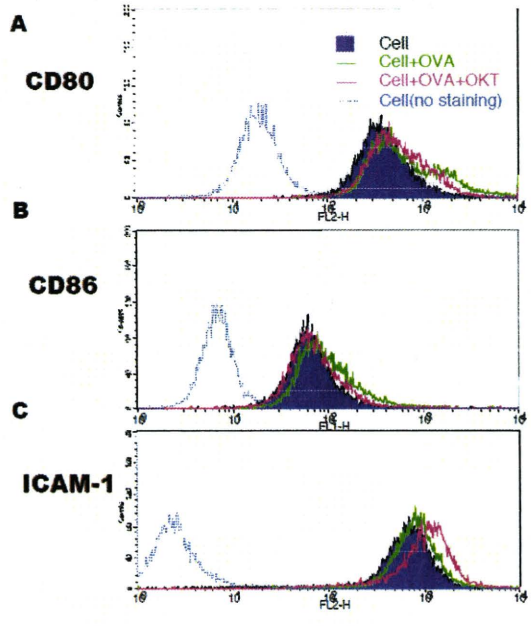


Fig.4 黄耆建中湯を用いたMHC分子発現解析実験 DC2,4細胞をOVA、黄耆建中湯と24時間共培養し、FACS解析を行った。MHC Class I (A)では黄耆建中湯の添加により、分子を高発現している細胞と低発現している細胞に分かれた。MHC Class II (B)では黄耆建中湯の添加により、分子を高発現している細胞が増加した。





**Fig.5** 黄耆建中湯を用いた共刺激分子発現解析実験 DC2,4細胞をOVA、黄耆建中湯と24時間共培養し、FACS解析を行った。CD80 (A)では黄耆建中湯の添加により、分子を高発現している細胞が増加した。CD86(B)では黄耆建中湯の添加により、分子を高発現している細胞が減少した。ICAM-1(C)では黄耆建中湯の添加により、分子を高発現している細胞が増加した。

## 漢方薬ならびにその有効成分による粘膜免疫強化機序の解明

研究分担者 國澤 純 東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 講師

### 研究要旨

古くより漢方薬の多くは免疫系に作用することが知られており、ここ最近の精力的な研究から、脾臓などの全身系の免疫に対する作用メカニズムは徐々に明らかになりつつある。一方で、内服することの多い漢方薬の影響を最も受けると考えられる腸管の免疫システムへの影響についてはほとんど未解明である。本事業の初年度にあたる22年度は、研究分担者の國澤がこれまで進めてきた腸管免疫に関する先導的研究から構築してきた知的・技術基盤をもとに、漢方薬の腸管免疫に対する作用を明らかにする為の基礎実験を推進した。その結果、消化器機能の改善に用いられる補中益気湯が腸管免疫を活性化すること、経口ワクチン投与期間中に補中益気湯を投与すると抗原特異的 IgA 抗体の産生が増強することを見いだした。

### A. 研究目的

古くより漢方薬の多くは免疫系に作用することが知られている。最近の研究から、脾臓などの全身系の免疫に対する作用メカニズムは徐々に明らかになりあるが、一方で漢方薬の多くが内服処方なのにも関わらず、最も影響を受けると予想される腸管免疫に対する作用とその作用機序についてはほとんど未解明である。研究分担者の國澤はこれまでに冬虫夏草をリード化合物とする FTY720 を用いた研究から、生体防御に関わる IgA の産生や T 細胞の遊走制御を始めとする腸管免疫制御機構に関する研究を進めてきた。本研究ではこれらの研究成果を中心に、漢方薬の有する腸管免疫に対する制御機能、ならびに経口ワクチンに用いるアジュバントとしての作用を中心に、その免疫学的メカニズムを明らかにする為の基礎実験を行った。本事業の初年度である 22

年度においては、これまでの脾臓などの全身系免疫システムの活性化を指標にした研究から、免疫調節機能があることが報告されている十全大補湯や補中益気湯、黄耆建中湯を経口投与した際の腸管免疫の機能を解析した。

### B. 研究方法

1. 研究代表者の小泉の研究結果より、樹状細胞の抗原提示能力を亢進することが明らかとなった漢方薬、十全大補湯、補中益気湯、および黄耆建中湯を週 5 回の頻度でマウスに経口投与し (40 mg/head/time)、経日的に糞便、血清を回収し、その中に含まれる抗体価を ELISA 法で測定した。
2. 経口投与した抗原に対する特異的な免疫応答を検討する目的で、上記、漢方薬を 5 日間前投与したマウスにモデル抗原であ

るニワトリ卵白アルブミン (OVA) を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に経口投与した。投与は1週間に1回の頻度で行い、免疫期間中も週5回の頻度で漢方薬を投与した。最終免疫の1週間後に糞便、ならびに単核球を回収し、それぞれ ELISA 法と ELISPOT 法により OVA 特異的抗体反応を測定した。また同マウスの抗体産生形質細胞を IgA と CD138 をマーカーに用いたフローサイトメトリー法にて測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京大学医科学研究所のガイドラインに則り行った。

### C. 研究結果

1. 十全大補湯や補中益気湯、黄耆建中湯を週5回の頻度でマウスに経口投与し、経口的に糞便を回収し、その中に含まれる IgA 量を ELISA 法で測定したところ、補中益気湯を投与した群で、非投与群の 1.5 倍 (2 週間投与)、約 2 倍 (4 週間投与) の IgA 産生の増強が観察された。また黄耆建中湯においても 2 週間投与において約 2 倍の IgA 産生増強が観察されたが、4 週間投与では変化が認められなかった。一方で十全大補湯投与群においては有意な差は認められなかった (図 1)。

2. 経口投与した抗原に対する特異的な免疫応答を検討する目的で、各漢方薬を5日間投与したマウスにモデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン (OVA) と粘膜アジュバントであるコレラトキシンを共に経口投与した。投与は1週間に1回の頻度で行い、免疫期間中も週5回の頻度で漢方薬を投与した。最終免疫の1週間後に糞便を回収し、OVA 特異的 IgA を ELISA 法にて測定したところ、補中益気湯投与群で糞便中の OVA 特異的 IgA の約 4 倍の産生増強が観察された (図 2)。さらに同マウスにおいては血清中

の OVA 特異的 IgG 産生も 2 倍に増強していた。一方で、糞便中 IgA の産生には影響を与えない十全大補湯投与群において血清中の OVA 特異的 IgG 産生の約 2 倍の増強が認められた。同じく最終免疫の1週間後に腸管組織と脾臓から単核球を回収し、OVA 特異的抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて測定したところ、左記の結果と相関し、補中益気湯投与群において腸管ならびに脾臓において OVA 特異的抗体産生細胞数の増加傾向が認められたが、例数が少ないため現時点では有意な差ではなかった。またフローサイトメトリーにて CD138 陽性 IgA 産生形質細胞を測定したところ、IgA 産生形質細胞の全体数には変化が認められなかった。

### D. 考察

### E. 結論

本検討から補中益気湯に腸管免疫の活性化を担う機能があることが判明した。一方で脾臓等の免疫機能を指標としたこれまでの検討から免疫調整機能があることが示されていた十全大補湯や黄耆建中湯は、腸管免疫に対してはそれほど影響を与えることはなかった。漢方において「中」とは腹部を指し「補中」は「腹部を補う」という意味で補中益気湯食欲不振や胃弱に用いられているが、免疫学的観点からも腹部 (消化管) の免疫機能を増強させることは興味深い知見であると考えられる。今後は十全大補湯や黄耆建中湯に代わり補中益気湯に特異的に含まれる漢方成分に焦点を当て、その有効成分の解析を進めつつ、腸管免疫を活性化作用機序を解明することが重要であると考えられる。腸管免疫の活性化を行うことが判明した補中益気湯を投与したマウスにおいては、自然に産生されている腸管 IgA 量の産生増強が認められた。自然型 IgA は各種病原体に対する抵抗性を強めることが知られていることから、日常的な補中益気湯



の投与により粘膜免疫を介した生体防御機能が強まることが期待される。さらに自然型 IgA だけではなく、経口ワクチン投与時に補中益気湯を同時服用することで抗原特異的な免疫応答も 4 倍に増強した。このことは今後ワクチン投与時に投与する漢方アジュバントとして補中益気湯が有効であることを強く示唆する結果であると考え、今後は実際の病原体に対する生体防御反応や腸管以外での免疫応答等、経口ワクチン効果についてより詳細に検討していく予定である。またその作用機序として IgA 産生細胞数の増加を予想したが、予想に反し数の増加はそれほど認められなかった。一方で ELISPOT 法による解析時に各スポットの大きさが大きくなっていることが確認された。このことは補中益気湯は IgA 産生細胞を増加させるのではなく、各細胞からの IgA 産生量を増加させることで腸管組織における IgA 量を増加させていると考えられる。今後は *ex vivo* の解析系も交え、その作用機序を明らかにすることが重要であると考え

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) T. Obata, Y. Goto, J. Kunisawa, S. Sato, M. Sakamoto, H. Setoyama, T. Matsuki, K. Nonaka, N. Shibata, M. Gohda, Y. Kagiya, T. Nochi, Y. Yuki, Y. Fukuyama, A. Mukai, S. Shinzaki, K. Fujihashi, C. Sasakawa, H. Iijima, M. Goto, Y. Umesaki, Y. Benno, and H. Kiyono, Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:7419-24, 2010
- 2) H. Kayamuro, Y. Yoshioka, Y. Abe, S. Arita, K. Katayama, T. Nomura, T. Yoshikawa, R. Kubota-Koketsu, K. Ikuta, S. Okamoto, Y. Mori, J. Kunisawa, H. Kiyono, N. Itoh, K. Nagano, H. Kamada, Y. Tsutsumi, S. I. Tsunoda, Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J Virol* 84: 12703-12, 2010
- 3) J. Kunisawa, and H. Kiyono, Analysis of intestinal T cell populations and cytokine productions. *Methods in Microbiology* (Edited by Stefan H.E. Kaufmann and Dieter Kabelitz). Academic Press, Oxford, pp. 183-193, 2010
- 4) J. Kunisawa\* (corresponding author) and H. Kiyono, Peaceful mutualism in the gut: Revealing key commensal bacteria for the creation and maintenance of immunological homeostasis. *Cell Host Microbe* 9: 83-84, 2011
- 5) J. Kunisawa\* (corresponding author), Y. Kurashima, and H. Kiyono, Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* (2011, in press)
- 6) 國澤 純 粘膜免疫の新展開－生体最前線における腸内環境との調和と排除－無菌生物 40, 25-28, 2010
- 7) 國澤 純 腸管の生体防御や恒常性維持における脂質メディエーター：スフィンゴシン 1 リン酸の役割 化学と生物 48: 827-830, 2010
- 8) 倉島洋介、網谷岳朗、國澤 純、清野 宏