

201208007B

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22-24年度 総合研究報告書

主任研究者 小泉 桂一

平成25年(2013年)5月

目 次

I. (総合) 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. (総合) 分担研究報告

1. 樹状細胞の抗原提示を亢進させる生薬由来化合物の網羅的な探索 4

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 13

國澤 純

3. 漢方薬ならびにその有効成分によるマラリア感染免疫修飾機序の解明
. 28

平山 謙二

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷 40

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

本事業では、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、粘膜免疫の活性化効果を有する、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、本研究事業では、実際にワクチンアジュバント開発に用いられる In vitro 樹状細胞の抗原提示試験を用いることで、上記(1)および(2)の条件を具備した漢方薬である十全大補湯、および補中益気湯が探索された。この十全大補湯構成生薬の主要成分である 1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) に上記効果があることが確認された。さらに、この十全大補湯は脳マラリアのマウスモデルの神経症状を改善させ、脳マラリアでの死亡を減少させる効果のあることが明らかとなった。一方で、補中益気湯は、IgA 抗体の産生を増強すること、その増強効果は IgA 高産生サブセットの誘導ではなく、抗原特異的 IgA 抗体産生細胞を総量的に増加させることが作用機序であることが明らかとなった。また、生薬成分由来の新たな経口可能なワクチンアジュバントを開発する目的で、合計 96 種類生薬由来化合物を用いて、抗原提示能力を亢進させる生薬由来化合物を網羅的に探索した。その結果、PGG を含めて、合計 9 種類が探索された。

今後は、これら本研究事業の結果を基に、上記の生薬およびこれら生薬で構成される漢方薬をアジュバントとして応用する臨床研究へと発展させ、さらに、上記化合物をリード化合物とした新規ワクチンアジュバントを開発する予定である。

分担研究者

國澤 純 東京大学医科学研究所
(H24.12 まで) (独) 医薬基盤研究所 (H25.1 から)

平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所免疫
遺伝学分野

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。

これまでに、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

A. 研究目的

(平成 22 年度当初目的の変更はない。)

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、および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

ることを見出した。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・平山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. ワクチンアジュバント開発を目的とした樹状細胞の抗原提示を亢進させる生薬由来化合物の探索
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
3. 漢方薬ならびにその有効成分によるマラリア感染免疫修飾機序の解明
平山 謙二

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を亢進させる生薬由来化合物の網羅的な探索
小泉の分担報告書参照のこと
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
國澤の分担報告書参照のこと
3. 漢方薬ならびにその有効成分によるマラリア感染免疫修飾機序の解明
平山の分担報告書参照のこと

(倫理面への配慮)

動物実験は富山大学、東京大学医科学研究所および長崎大学熱帯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、樹状細胞の抗原提示能力を亢進する漢方薬として、十全大補湯、および補中益気湯が探索された。そこで、次に、十全大補湯の樹状細胞の抗原提示能力の亢進作用を有する成分の同定を行った。十全大補湯構成生薬の主要成分に関して、樹状細胞の抗原提示能力の亢進作用を解析した結果、1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) に強い活性があることが確認された。ワクチン投与では、局所の炎症反応や全身性のアナフィラキシーなどが副作用として起こることがあり、PGG はこれら副作用の原因の一端を担う肥満細胞の脱顆粒反応を抑制しつつ、抗原提示を増加させるユニークな特性を有することが明らかになった。さらに、生薬成分由来の新規経口可能なワクチンアジュバントを開発する目的で、合計 96 種類生薬由来化合物を用いて、樹状細胞の抗原提示能力を亢進させる生薬由来化合物を網羅的に探索した。昨年度に探索された PGG を含めて、合計 9 種類が探索された。

また、國澤の研究結果から、補中益気湯による IgA 産生増強効果は、IgA 誘導

の場合であるパイエル板における樹状細胞の抗原取り込みを促進することで IgA 抗体産生細胞の質 (IgA 高産生 CD11b 陽性細胞の誘導) ではなく、抗原特異的 IgA 抗体産生細胞の総量を増加させていることが作用機序の一旦であることが明らかとなった。

さらに、平山が、脳マラリアのマウスモデルを用い、補中益気湯と十全大補湯の病態への影響を調べた結果、このモデルにおいて、いずれの漢方薬も神経症状を改善させ、特に十全大補湯では、脳マラリアでの死亡を減少させる効果のあることが明らかとなった。

D. 考察

E. 結論

考察および結論の詳細は、各分担研究報告書を参照されたい。

漢方薬・生薬は基礎および臨床研究においても、自然免疫を活性化させることが明らかとなっている。従って、生薬由来化合物を免疫活性化剤、またはワクチンのアジュバントのシーズとして利用することは理にかなっていると思われる。

本研究事業では、当初目的通り、実際にワクチンアジュバント開発に用いられる *In vitro* 樹状細胞の抗原提示試験を用いることで、(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として、十全大補湯および補中益気湯を探索することに成功した。 *In vitro* の同じ試験で選抜された 2 種類の漢方薬であるにもかかわらず、 *In vivo* のマウスモデルの実験では、アジュバントとしてのスペックが顕著に異なったことは興味深い。

実際に、経口投与された十全大補湯の脳マラリアマウスモデルにおける神経症状改善および死亡率の減少効果は、全身免疫系の活性化が誘導された結果であると思われる。一方で、補中益気湯は、粘膜免疫を活性化し、経口ワクチンに対する

アジュバント効果を有することも明らかとなった。

さらに、本研究事業では、アジュバント候補化合物を漢方薬の構成生薬から合計 9 種類が探索することに成功した。

今後は、これら本研究事業の結果を基に、上記の生薬およびこれら生薬で構成される漢方薬をアジュバントとして応用する臨床研究へと発展させ、さらに、上記化合物をリード化合物とした新規ワクチンアジュバントを開発する予定である。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

各分担研究者の項を参照のこと

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

各分担研究者の項を参照のこと

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ワクチンアジュバント開発を目的とした 樹状細胞の抗原提示を亢進させる生薬由来化合物の探索

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。

本事業の初年度、平成 22 年度に、樹状細胞の抗原提示能力を亢進する漢方薬の探索を行った。使用した漢方薬は、これまでに、臨床知見において、免疫活性化作用が報告されている 15 種類を選抜した。その結果、対照群に比較して 2 倍以上抗原提示能力を亢進させた漢方薬としては、特に、十全大補湯、および補中益気湯に顕著な抗原提示能力の亢進が明らかとなった。次に、平成 23 年度においては、十全大補湯に焦点を絞って、この樹状細胞の抗原提示能力の亢進作用を有する成分の同定を行った。十全大補湯の 10 種類の構成生薬の主要成分を試験物質として、樹状細胞の抗原提示能力の亢進作用を確認したところ、1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) に強い活性があることが確認された。興味深いことに、この PGG により肥満細胞の脱顆粒抑制が確認された。ワクチン投与では、局所の炎症反応や全身性のアナフィラキシーなどが副作用として起こることがあり、PGG はこれら副作用の原因の一端を担う肥満細胞の脱顆粒反応を抑制しつつ、抗原提示を増加させるユニークな特性を有することが明らかになった。最終年度の平成 24 年においては、生薬成分由来の新たな経口可能なワクチンアジュバントを開発する目的で、合計 96 種類生薬由来化合物を用いて、樹状細胞の 2 種類の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC class I および II) に対する抗原提示能力を亢進させる生薬由来化合物を網羅的に探索した。その結果、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class I 提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、昨年度に探索された PGG を含めて、Coptisine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Epihesperidin (陳皮成分)、Gomisin A (五味子成分)、Palmatine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Perillaldehyde (蘇葉)、Rosmarinic Acid (蘇葉成分)、Sennoside A (大黃成分)、Sennoside B (大黃成分) の 9 種類が探索された。さらに、MHC Class II 提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、Wogonin (黄芩成分) が探索された。

今後は、これら結果を基に、上記化合物をリード化合物とした新規ワクチンアジュバントを開発を進める予定である。

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。一方で、漢方薬は自然免疫を賦活する作用をもつことが数多く報告されている。代表的な補剤である十全大補湯は、臨床的にはがんなどの全身性消耗疾患の全身倦怠の改善や、化学療法、放射線療法に伴う骨髄抑制の改善に効果を示している。基礎的研究からは、肝臓における natural killer T (NKT) 細胞誘導作用、マクロファージ貪食能の促進及び各種免疫細胞のサイトカイン産生の誘導、抗体産生能の促進、脾細胞のマイトジェン活性の誘導が報告されている。しかしながら、漢方薬の獲得免疫系に対する作用に関して、特に、漢方薬による抗原特異的免疫な誘導機序の解明や、ワクチンアジュバントとしての応用に関する研究は皆無であった。

そこで、本研究事業は、樹状細胞の抗原提示能力の亢進作用を指標として、ワクチンアジュバント効果を有する漢方薬およびその主成分を網羅的に探索することで、新規ワクチンアジュバントを開発することを目的とした。

B. 研究方法

1. 漢方薬

黄耆建中湯、十全大補湯、小柴胡湯、人参湯、補中益気湯、六君子湯、桂枝茯苓丸、八味地黄丸、桂枝湯、小建中湯、真武湯、半夏瀉心湯、白虎加人参湯、柴朴湯、竹茹温胆湯を最終濃度が 200 μ g/ml になるように用いた。

2. 生薬成分由来化合物

富山大学和漢医薬学総合研究所が構築した和漢薬標準ライブラリーを使用した(表1)。

3. 十全大補湯構成生薬由来化合物

Astragaloside IV、Catalpol、(E)-Cinnamic acid、Cinnam aldehyde、beta-Eudesmol、Ginsenoside Rb1、Ginsenoside Rg1、Glycyrrhizic acid、(Z)-Ligustilide、Paeoniflorin、1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl-b-D-glucose (PGG)

3. Class I 抗原提示試験

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、およびマウス樹状細胞の培養細胞株である DC2. 4 細胞を使用した。DC2. 4 に漢方薬および生薬由来化合物を添加後、ワクチンモデル抗原である OVA を取り込ませ、洗浄した後、CD8-OVA1. 3 細胞を播種し、上清を回収し、IL-2 を ELISA により定量した。

4. Class II 抗原提示試験

マウス小腸上皮細胞由来 MODE-K 細胞を IFN- γ で 3 日間培養後、MODE-K の培地を Mitomycin C 入りの培地に交換し、45 分間培養した。トリプシンで細胞をはがし、96 穴プレートに播種して 2 時間培養後に、培地を除去し、lipofectin と 35 分間前培養

した HEL (鶏卵由来リゾチーム蛋白) 入りの DMEM に交換した。5 時間培養後に、3A9 細胞を播種し、24 時間後、プレートを遠心し、上清を回収した。ELISA で上清中の IL-2 を測定し、抗原提示を評価した。詳細は、Class I 抗原提示試験に準拠した。

5. 肥満細胞の脱顆粒反応抑制試験

ラット肥満細胞株 RBH-2H3 細胞を 48 well plate に播種し、PGG を加えた後、DNP-IgE 溶液を添加した。6 時間後 DNP-BSA 溶液を加え、30 分間反応させた後、氷上で 10 分間冷却し反応を停止させ、1000g で 5 分間遠心し、上清を回収した。総酵素量の測定には、細胞を DNP-BSA で反応させる時点で、0.1% tween in PBS を加えインキュベートし、回収した細胞上清を用いた。また、この培養上清中の β -hexosaminidase を定法に従って測定した。

6. 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

本事業の初年度、平成 22 年度に、樹状細胞の抗原提示能力を亢進する漢方薬の探索を行った。使用した漢方薬は、これまでに、臨床知見において、免疫活性化作用が報告されている 15 種類を選抜した。その結果、対照群に比較して 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、人參湯、六君子湯、八味地黄丸、白虎加人參湯、真武湯の 9 種類が選択された。特に十全大

補湯、および補中益気湯に顕著な抗原提示能力の亢進が明らかとなった。漢方薬の獲得免疫系に対する作用に関して、特に、漢方薬による抗原特異的免疫な誘導機序の解明や、ワクチンアジュバントとしての応用に関する研究は皆無であった。しかし、最近、当研究室において、十全大補湯が抗原特異的な免疫を誘導することを明らかにしている。

従って、平成 23 年度において、十全大補湯に焦点を絞って、この樹状細胞の抗原提示能力の亢進作用を有する成分の同定を行った。なお、補中益気湯に関しての検討は、分担研究者の國澤の報告を参照されたい。十全大補湯の 10 種類の構成生薬の主要成分を試験物質として、樹状細胞の抗原提示能力の亢進作用を確認したところ、1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) に強い活性があることが確認された (図 1)。

興味深いことに、PGG により肥満細胞の脱顆粒抑制が確認された (図 2)。ワクチン投与では、局所の炎症反応や全身性のアナフィラキシーなどが副作用として起こることがあり、PGG はこれら副作用の原因の一端を担う肥満細胞の脱顆粒反応を抑制しつつ、抗原提示を増加させるユニークな特性を有することが明らかになった。これらの結果から、PGG は I 型アレルギーの惹起に影響を及ぼさない新規ワクチンアジュバントの成分になり得る可能性が示唆された。抗原提示の促進機序としては、PGG は、樹状細胞の成熟を抑制することで抗原取り込みの促進を図っている可能性が考えられた。このように PGG の探索結果から、漢方薬の構成生薬の成分は、ワクチンアジュバントの有望なシーズになることが明らかとなった。

そこで、最終年度の平成 24 年度において、生薬成分由来の新規経口可能なワクチンアジュバントを開発する目的で、合計 96

種類生薬由来化合物を用いて、樹状細胞の抗原提示能力を亢進させる生薬由来化合物を網羅的に探索した。96種類におよぶ多数の生薬の探索結果から、対照群と比べて、樹状細胞の抗原特異的なMHC Class I提示能を1.5倍以上亢進させる生薬由来化合物として、昨年度に探索されたPGGを含めて、Coptisine Chloride（黄柏, 黄連成分）、Epihesperidin（陳皮成分）、Gomisin A（五味子成分）、Palmatine Chloride（黄柏, 黄連成分）、Perillaldehyde（蘇葉）、Rosmarinic Acid（蘇葉成分）、Sennoside A（大黄成分）、Sennoside B（大黄成分）の9種類が探索された。特に、Coptisine Chloride（黄柏, 黄連成分）、Gomisin A（五味子成分）、Palmatine Chloride（黄柏, 黄連成分）、Sennoside B（大黄成分）4種類は、樹状細胞のMHC Class Iの抗原提示能を極めて亢進させることが明らかとなった（図3）。

D. 考察

E. 結論

抗原特異的な免疫応答の誘導は、(1)樹状細胞等が抗原を取り込んだ後に細胞表面上のMHC分子に抗原を提示する。(2)この提示された抗原に特異的に応答するT細胞が質・量共に促進・増加することにより起こる。従って、ワクチン療法の効果は、接種したワクチン抗原を如何に効率良くT細胞に提示させるかに依存している。

本研究事業では初めに、十全大補湯の構成生薬の種々成分存在下で、樹状細胞株DC2.4細胞にモデル抗原であるOVAを取り込ませた後、OVA拘束性T細胞クローンCD8-OVA1.3細胞を共培養し、最終的に本クローンから産生されるIL-2の産生亢進率を指標に、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持つ成分を探索す

る試みを行った。この樹状細胞株およびT細胞クローンを用いた上記実験系を用いて、すでに数多くのアジュバントが開発されてきており、我々は本試験系に漢方薬を用いた研究に初めて導入した。その結果、十全大補湯が抗原提示能を促進すること、および十全大補湯構成生薬由来の成分で、PGGは樹状細胞の抗原提示能を顕著に増加させ、その効果は濃度依存的であった。本試験系を用いることで、十全大補湯の抗原提示能の促進効果の一端を担う成分を探索できたことは、今後のワクチンアジュバント効果有する生薬由来成分の探索の進展においては重要な一歩である。

そこで、本研究事業では、生薬成分由来の新たな経口可能なワクチンアジュバントを開発する目的で、合計96種類生薬由来化合物を用いて、樹状細胞の2種類の主要組織適合遺伝子複合体(MHC class IおよびII)に対する抗原提示能力を亢進させる生薬由来化合物を網羅的に探索した。その結果、樹状細胞の抗原特異的なMHC Class I提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、昨年度までに探索されたPGGを含めて、Coptisine Chloride（黄柏, 黄連成分）、Epihesperidin（陳皮成分）、Gomisin A（五味子成分）、Palmatine Chloride（黄柏, 黄連成分）、Perillaldehyde（蘇葉）、Rosmarinic Acid（蘇葉成分）、Sennoside A（大黄成分）、Sennoside B（大黄成分）の9種類が探索された。さらに、MHC Class II提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、Wogonin（黄芩成分）が探索された。ワクチン投与では、局所の炎症反応や全身性のアナフィラキシーなどが副作用として起こることがある。興味深いことに、PGGはこれら副作用の原因の一端を担う肥満細胞の脱顆粒反応を抑制しつつ、抗原提示を増加させるユニークな特性を有することが明らかになった。

今後は、これら結果を基に、上記化合物

をリード化合物とした新規ワクチンアジュバントを開発する予定である。

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) 小泉桂一、犬嶋明子、大江未来広、柴原直利、済木育夫 トピックス：漢方薬のワクチンアジュバント効果、最新医学、2013、869-873
- 2) Orawin Prangsaengtong, Jun Yeon Park, Akiko Inujima, Yoshiko Igarashi, Naotoshi Shibahara and Keiichi Koizumi: Enhancement of lymphangiogenesis *in vitro* via the regulations of HIF-1 α expression and nuclear translocation by deoxyshikonin, Evid Based Complement Alternat Med. 2013, in press.
- 3) Sanphanya K, Wattanapitayakul SK, Prangsaengtong O, Jo M, Koizumi K, Shibahara N, Priprem A, Fokin VV, Vajragupta O.: Synthesis and evaluation of 1-(substituted)-3-prop-2-ynylureas as antiangiogenic agents. Bioorg Med Chem Lett. 2012 ;22(8):3001-5.
- 4) 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

- 1) 保科瑛子、犬嶋明子、大江未来広、山田美幸、竹野伸洋、条美智子、櫻井宏明、柴原直利、済木育夫、小泉桂一 抗原提示試験による経口ワクチン亜糖苷糖路候補の探索と機序解明、第28回和漢医薬学会学術大会、富山、2011
- 2) 山田美幸、犬嶋明子、竹野伸洋、篠原看奈、櫻井宏明、済木育夫、小泉桂一 Penta-galloyl-glucose の樹状細胞の抗原提示に与える影響、第28回和漢医薬学会学術大会、富山、2011
- 3) 小泉桂一、國澤純、犬嶋明子、大江未来広、保科瑛子、条美智子、櫻井宏明、柴原直利、清野宏、済木育夫 漢方薬の経口ワクチンに対するアジュバントとしての有用性、第28回和漢医薬学会学術大会、富山、2011
- 4) 加藤真一郎、小泉桂一、山田美幸、犬嶋明子、竹野伸洋、中西剛、櫻井宏明、中川晋作、済木育夫 薬成分 pentagalloylglucose の貪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

発明の名称 低酸素応答因子の増強剤および増強方法

出願番号 特許出願2011-14141

出願日 2011年6月27日

出願人 国立大学法人富山大学

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 富山大学和漢医薬学総合研究所
標準和漢薬ライブラリー

化合物（生薬含有成分）

No.	品名（英）	No.	品名（英）
1	Aconitine	51	Ginsenoside-Rd
2	Albiflorin	52	Ginsenoside-Re
3	Alisol A	53	Ginsenoside-Rg1
4	Alisol B	54	Glabridin
5	Alkannin	55	Glycyrrhizic Acid
6	Amygdalin	56	Gomisin A
7	Arbutin	57	Gomisin N
8	Astragaloside IV	58	Hesperidin
9	Atractylenolide III	59	Hirsutine
10	Atractylodin	60	Honokiol
11	Atropine Sulfate	61	Hypaconitine
12	Aucubin	62	Icariin
13	Baicalein	63	Isofraxidine
14	Baicalin	64	Isorhynchophylline
15	Barbaloin	65	(Z)- Ligustilide (0.1mg/ml Methanol Solution)
16	Benzoylmesaconine Hydrochloride	66	Limonin
17	Berberine Chloride	67	Liquiritin
18	Bergenin	68	Loganin
19	Bisdemethoxycurcumin	69	Luteolin
20	Bufalin	70	Magnolol
21	Bufotalin	71	Mesaconitine
22	Capillarisin	72	Naringin
23	(E)- Capsaicin	73	Nodakenin
24	Catalpol	74	Osthole
25	(E)- Chlorogenic Acid	75	Oxymatrine
26	(E)- Cinnamic Acid	76	Paeoniflorin
27	Cinobufagin	77	Paeonol
28	Cinobufotalin	78	Palmatine Chloride
29	Coptisine Chloride	79	Perillaldehyde
30	Corydaline	80	Praeruptorin A
31	Costunolide	81	Puerarin
32	Curcumin	82	Rhynchophylline
33	Dehydrocorydaline Nitrate	83	Rosmarinic Acid
34	Dehydrocostuslactone	84	Saikosaponin a
35	demethoxycurcumine	85	Saikosaponin b2
36	Dihydrocapsaicin	86	Saikosaponin c
37	Dimethylesculetin	87	Saikosaponin d
38	Eleutheroside B	88	Schizandrin
39	(-)-Epigallocatechin Gallate	89	Senoside A
40	Epihesperidin	90	Senoside B
41	Ergosterol	91	Shikonin
42	beta-Eudesmol	92	[6]-Shogaol
43	Evodiamine	93	Sinomenine
44	(E)- Ferulic Acid	94	Swertiamarin
45	Geniposide	95	Timosaponin A-III
46	Geniposidic Acid	96	Wogonin
47	Gentiopicroside		
48	[6]-Gingerol		
49	Ginsenoside-Rb1		
50	Ginsenoside-Rc		

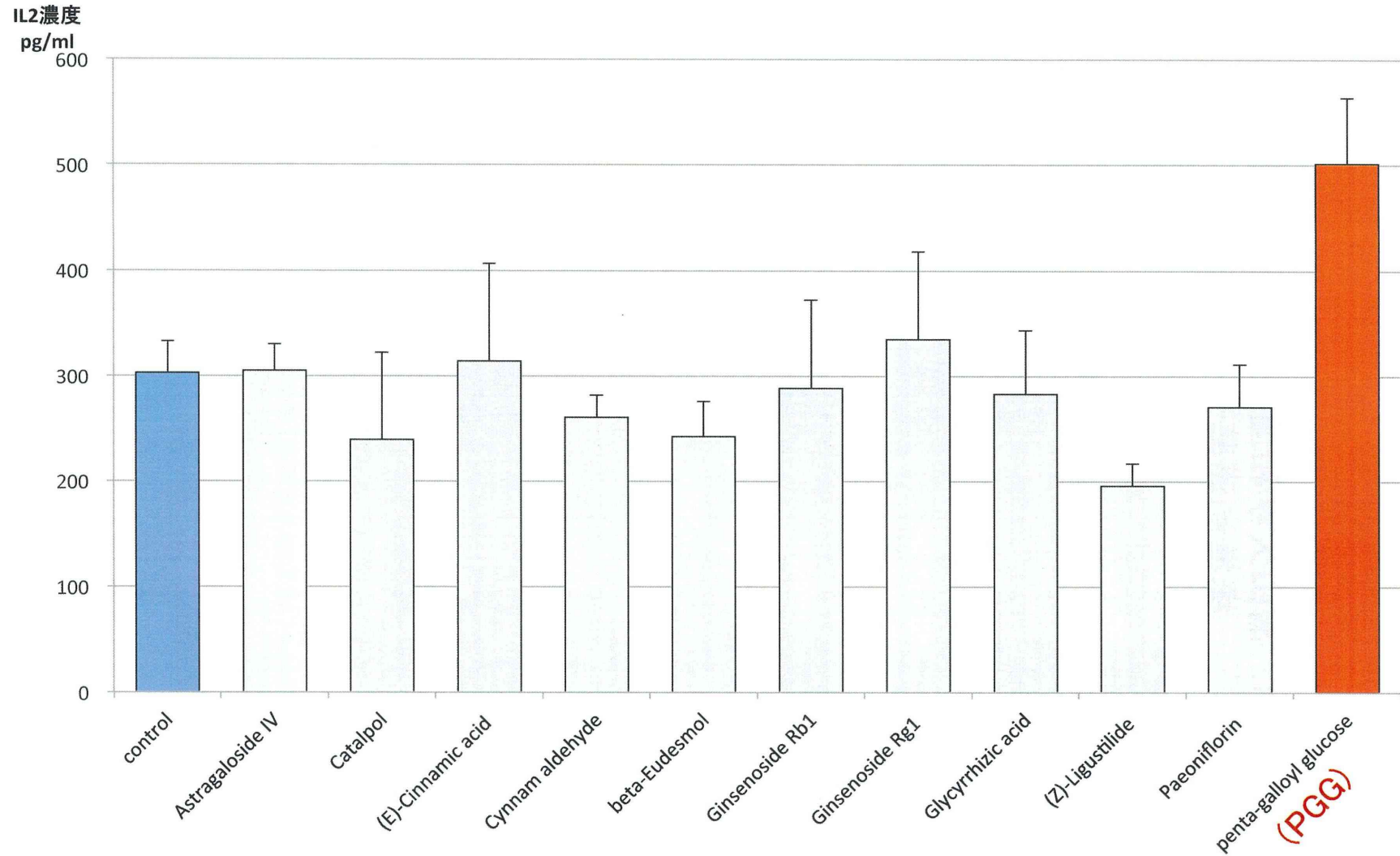


図1. 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose(PGG)による
樹状細胞の抗原提示能力の亢進作用

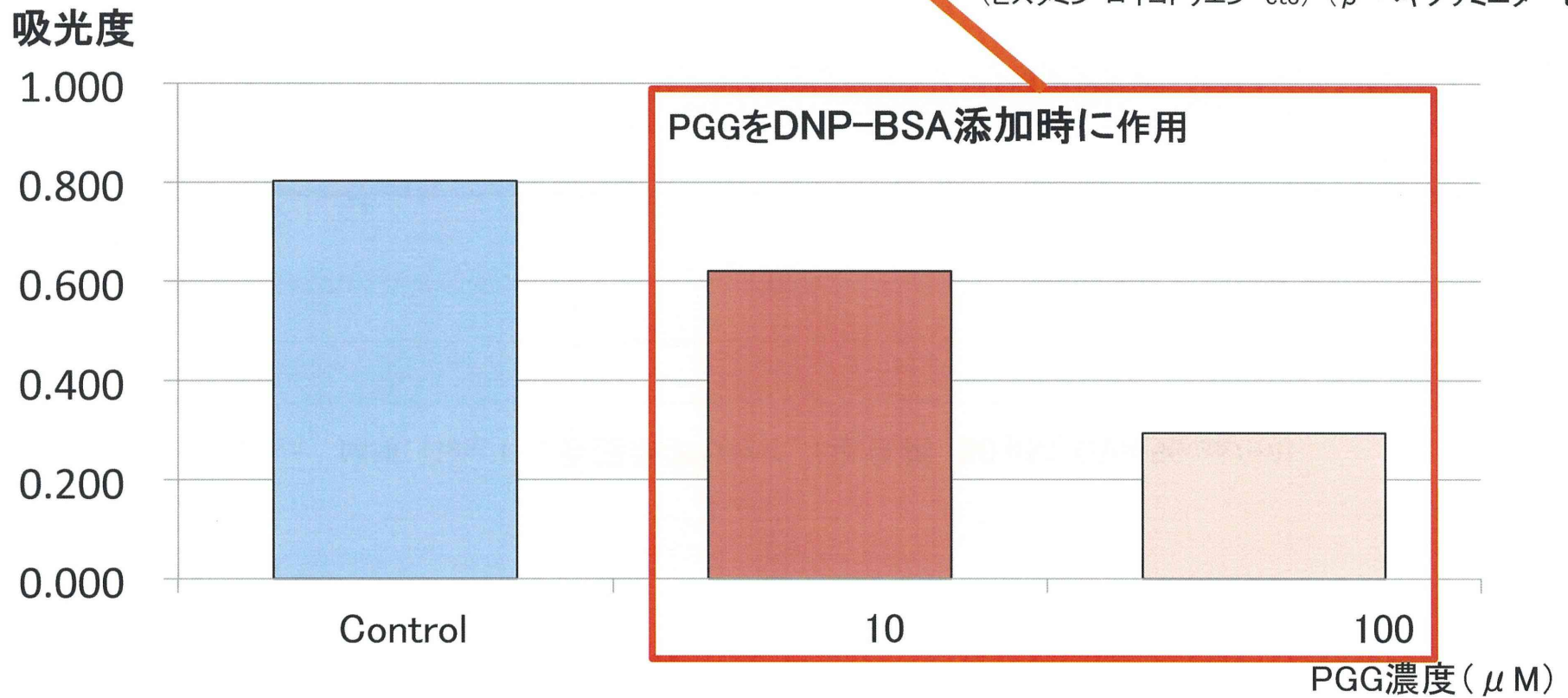
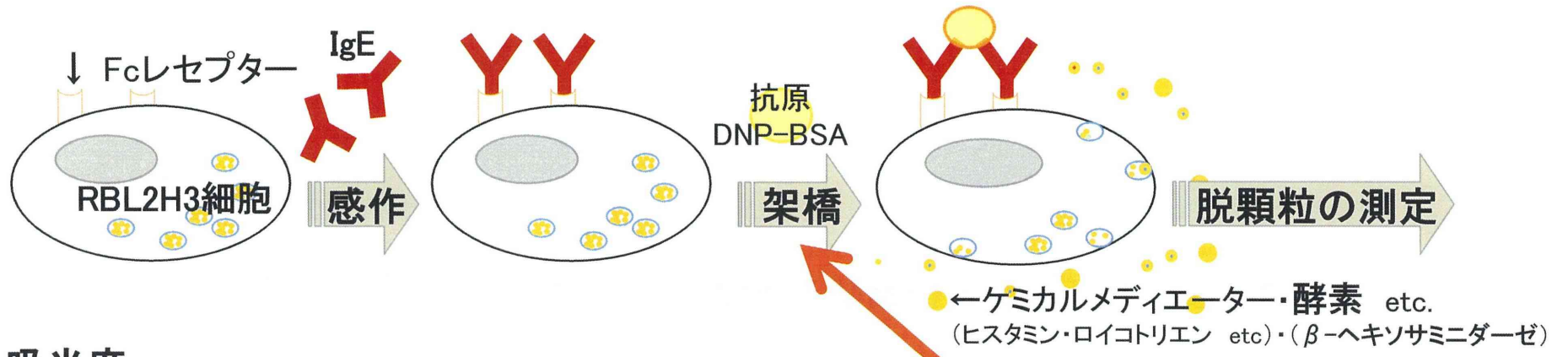


図2. 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose(PGG)による肥満細胞の脱顆粒反応抑作用

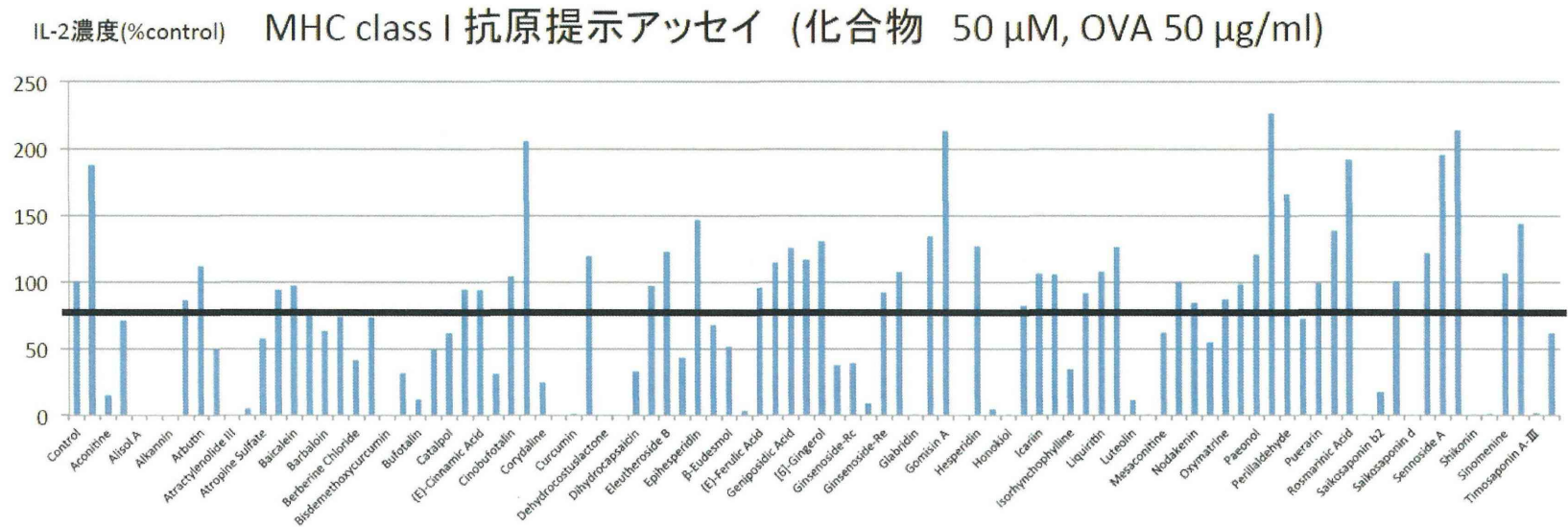


図3. 各種生薬由来化合物の樹状細胞の抗原提示に与える影響

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（H24.12 まで）
（独）医薬基盤研究所（H25.1 から）

研究要旨

古くより多くの漢方薬は免疫系に作用することが知られており、その作用メカニズムについても、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機序は徐々に明らかとなってきた。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。本事業においては、研究分担者の國澤がこれまで得てきた腸管免疫に関する知的・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研究を推進した。本事業の3年間の研究から、①消化器機能の改善に用いられる補中益気湯がIgA抗体の産生を増強すること、②経口ワクチンによるIgA抗体の産生増強においては補中益気湯の同時投与が必要であること、③経口ワクチンによるIgA誘導組織であるパイエル板依存的IgA高産生細胞を同定した、④補中益気湯によるIgA増強効果はIgA高産生サブセットの誘導ではなく、抗原特異的IgA抗体産生細胞を総量的に増加させることが作用機序であることが示された。

A. 研究目的

古くから免疫調整作用があることが知られている漢方薬であるが、その作用メカニズムの多くは不明である。特に漢方薬の多くが内服処方なのにも関わらず、直接的な影響を受けると予想される腸管免疫に対する作用はほとんど未解明であると言っても過言ではない。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。本事業においてはこれらの研究から得た知的・技術基盤をもとに、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作用メカニズムを明らかにする為の研究を遂行している。特に

免疫調節機能があることが報告されている漢方薬のうち、補中益気湯が経口ワクチン投与時における腸管での抗原特異的IgA抗体の産生を増強することを見だし、その作用点、ならびに宿主免疫系の応答に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. 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週間後に糞便を回収し、ELISA法によりOVA特異的IgA抗体産生を定量した。

2. 上記2の実験でIgA産生増強における補中益気湯の作用機序を解明する目的で、免疫スケジュールの異なるタイミングで補中益気湯を投与する群を用意した。
3. 胎生14日目に抗IL-7 α 受容体抗体を500 μ g投与することでパイエル板欠損マウスを作製した。パイエル板欠損マウス、ならびにコントロール抗体を投与したマウスの腸管から単核球を回収し、フローサイトメトリー法にて解析を行った。
4. 正常マウスの腸管から回収した単核球をIgA抗体とCD11b抗体で標識した後、Cell sorterによりCD11b陽性IgA陽性細胞とCD11b陰性IgA陽性細胞を分取した。それらの細胞からRNAを回収し、両サブセットにおける遺伝子発現の違いをMicroarray法で解析した。
5. 上記4の方法により単離したCD11b陽性IgA陽性細胞とCD11b陰性IgA陽性細胞をそれぞれ 1×10^4 cells/wellに調整し3日間培養した後、培養液中に産生されたIgA量をELISA法で測定した。
6. 補中益気湯の投与は週5回の頻度とし、1回当たりマウスに40 mg経口投与した。1ヶ月間投与したマウスの腸管から単核球を回収し、フローサイトメトリー法によりIgA産生細胞におけるCD11b発現細胞の割合を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京大学医科学研究所と医薬基盤研究所のガイドラインに則り行った。

C. 研究結果

経口ワクチンによる抗原特異的IgA抗体産生を解析する目的で、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抗体の産生増強が観察された(図1)。一方で十全大補湯や黄耆建中湯を投与した群においてはOVA特異的IgA抗体の増

加は認められなかった(図1)。

そこで次に補中益気湯の作用を検討する目的で以下の2グループを用意した。

グループ1. 経口免疫を行っている期間のみ、補中益気湯を投与

グループ2. 経口免疫を行っている期間は補中益気湯を投与せず、経口免疫後より投与開始

グループ1においては、上記の結果と同様、補中益気湯を投与した群で糞便中の抗原特異的IgAの産生増強が認められた。一方、グループ2において、経口ワクチン接種後から補中益気湯の投与を開始した群においては、同期間、補中益気湯を投与してもIgAの産生増強効果は認められなかった(図2)。図2の結果から、補中益気湯はIgA抗体の誘導時に作用することでIgA抗体の産生を増強させていることが示唆された。そこで腸管でのIgA抗体の産生において代表的な誘導組織であるパイエル板に着目し、パイエル板依存的なIgA抗体応答に関する基礎的な検討を行った。胎生14日目にIL-7受容体中和抗体を投与したマウスから生まれた仔マウスはパイエル板のみが欠損している。このパイエル板欠損マウスの腸管でのIgA抗体産生細胞を様々なマーカー分子の発現を指標に解析を行ったところ、通常のマウスの腸管ではIgA陽性細胞はCD11bの発現の有無により二つのサブセットに分類されること、そのうちCD11b陽性細胞がパイエル板欠損マウスで減少することが判明した(図3)。形態や細胞表面マーカーはCD11bの発現に関わらず同一でどちらも抗体産生形質細胞としての表現型を示したことから、マイクロアレイ解析により遺伝子レベルでの機能的差異の検討を行った。その結果、CD11b陽性IgA産生細胞はCD11b陰性細胞に比べ、細胞周期や増殖に関わる分子を強く発現していることが判明した(図4)。さらにCD11b陽性IgA産生細胞とCD11b陰性細胞をそれぞれ単離、精製した後、*in vitro*での抗体産生能を比較したところ、CD11b陽性細胞は陰性細胞に比べIgA産生能力が高いことが判明した(図5)。すなわちパイエル板依存的に誘導されるCD11b陽性IgA産生細胞は、細胞増殖活性

と IgA 抗体の産生能力が高いことが判明した。

これらの結果から、補中益気湯は IgA 高産生サブセットである CD11b 陽性細胞を誘導し、その結果、IgA 産生が増強した可能性が考えられた。しかしながら補中益気湯を一ヶ月投与したマウスにおける CD11b 陽性 IgA 産生細胞と CD11b 陰性細胞を比較したところ、コントロール群と比較して同程度であった (図 6)。

上記の知見をもとに、補中益気湯を経口ワクチンの接種時に投与することで抗原特異的 IgA 抗体の産生が増強しているマウスの腸管組織から単核球を回収し、OVA 特異的 IgA 抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて測定したところ、補中益気湯を投与した群において腸管の OVA 特異的抗体産生細胞数の増加が認められた (図 7)。

D. 考察

腸管での IgA 抗体の産生を指標にした検討から、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。

補中益気湯による経口ワクチンに対する IgA 産生増強強化は、ワクチン接種時に投与することで発揮されること、一方でワクチン接種後の投与では効果が得られないことから、補中益気湯による腸管 IgA 産生の増強の作用点として、IgA 産生応答の中で特に誘導相において作用していることを強く示唆する結果であると考えられる。

腸管組織において IgA 産生の主要誘導組織として機能しているのがパイエル板である。パイエル板を覆う上皮細胞層には M 細胞と呼ばれる抗原取り込みに特化した細胞が存在し、経口的に投与された抗原をパイエル板内に輸送する。M 細胞の直下においては樹状細胞が存在し、M 細胞を介して取り込んだ抗原を補足し、T 細胞、ならびに B 細胞を介した抗原特異的免疫応答を惹起する。これらの性質から経口ワクチンの重要

なデリバリー標的組織であると考えられている。

今回の検討からパイエル板依存的に誘導され、IgA を高産生する CD11b 陽性 IgA 産生細胞を同定することが出来た。上記の知見を考えると補中益気湯はパイエル板依存的に誘導される CD11b 陽性 IgA 抗体産生細胞の誘導促進を行うことで腸管組織での IgA 抗体の産生量が増加した可能性が考えられたが、今回の結果から補中益気湯の増強効果は CD11b 陽性サブセットの増加ではないことが示された。一方で補中益気湯は抗原特異的 IgA 産生細胞の数は増やしているものの、IgA 産生細胞の総量には影響を与えていない、すなわち IgA 産生細胞の数を非特異的に増加させているのではなく抗原特異的な細胞の割合が増加しているという結果を得ている。上述のようにパイエル板における IgA 産生の鍵となる細胞が抗原提示細胞である樹状細胞である。本事業の研究代表者である小泉がこれまで行ってきた検討から、樹状細胞による抗原取り込みを増強する生薬成分が存在することが判明したことを考慮すると、補中益気湯による IgA 産生増強効果は、IgA 誘導の場であるパイエル板における樹状細胞の抗原取り込みの促進が作用機序の一つの可能性として考えられる。また同様にパイエル板における最初の取り込み細胞となる M 細胞の抗原取り込みも同様に促進されているのかもしれない。

今回の結果より、補中益気湯による IgA 産生増強効果は、IgA 誘導の場であるパイエル板における樹状細胞の抗原取り込みを促進することで IgA 抗体産生細胞の質 (IgA 高産生 CD11b 陽性細胞の誘導) ではなく、抗原特異的 IgA 抗体産生細胞の総量を増加させていることが作用機序の一つの可能性として考えられる。今後は補中益気湯に含まれる免疫活性物質の同定、さらには生体内での体内動態、宿主免疫系の標的細胞の同定を行うことで、さらに漢方アジュバントの開発に向けた研究へと発展すると期待される。漢方の分野において「中」とは腹部を指し「補中」は「腹部を補う」という意味であるが、本事業での研究をさらに発

展させることで、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補中益気湯の有効性を実証し、漢方アジュバントとして開発していくことが重要であると考える。

E. 結論

F. 健康危険情報 なし

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 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) D. Y., Kim, A. Sato, S. Fukuyama, H. Sagara, T. Nagatake, I. G. Kong, K. Goda, T. Nochi, J. Kunisawa, S. Sato, Y. Yokota, C. H. Lee, and H. Kiyono, The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J Immunol* 186: 4253-62, 2011

6) J. Kunisawa, Y. Kurashima, and H. Kiyono, Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 64: 523-30, 2012

7) J. Kunisawa and H. Kiyono, Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the intestine. *Nutrients* 4: 154-166, 2012

8) J. Kunisawa and H. Kiyono, Commensal bacteria habituated in the gut-associated lymphoid tissues regulates the intestinal IgA responses. *Front in Immunol* 3 (65): 1-5, 2012

9) S. Takagi, Y. Saito, A. Hijikata, S. Tanaka, T. Watanabe, T. Hasegawa, S. Mochizuki, J. Kunisawa, H. Kiyono, H. Koseki, O. Ohara, T. Saito, S. Taniguchi, L. D. Shultz, F. Ishikawa, Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood* 119: 2768-77, 2012

10) J. Kunisawa, E. Hashimoto, I. Ishikawa, and H. Kiyono, A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo, *PLoS One* 7: e32094, 2012

- 11) S. Tanaka, Y. Saito, J. Kunisawa, Y. Kurashima, T. Wake, N. Suzuki, L. D. Shultz, H. Kiyono, and F. Ishikawa, Development of mature and functional human myeloid subsets in HSC engrafted NOD/SCID/IL2 γ KO mice, *J Immunol* 188:6145–55, 2012
- 12) G. F. Sonnenberg, L. A. Monticelli, T. Alenghat, T. C. Fung, N. A. Hutnick, J. Kunisawa, N. Shibata, S. Grunberg, R. Sinha, A. M. Zahm, M. R. Tardif, T. Sathaliyawala, M. Kubota, D. L. Farber, R. G. Collman, A. Shaked, L. A. Fouser, D. B. Weiner, P. A. Tessier, J. R. Friedman, H. Kiyono, F. D. Bushman, K. Chang, and D. Artis, Innate lymphoid cells orchestrate anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria and prevent systemic immune activation, *Science* 336(6086):1321–5, 2012
- 13) T. Shibata, N. Takemura, Y. Motoi, Y. Goto, T. Karuppuchamy, K. Izawa, X. Li, S. Akashi-Takamura, N. Tanimura, J. Kunisawa, H. Kiyono, S. Akira, T. Kitamura, J. Kitaura, S. Uematsu, K. Miyake, PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells, *Int Immunol* 24:613–23, 2012
- 14) M. Kinoshita, H. Kayama, T. Kusu, T. Yamaguchi, J. Kunisawa, H. Kiyono, S. Sakaguchi, and K. Takeda, Dietary folic acid promotes survival of Foxp3⁺ regulatory T cells in the colon, *J Immunol* 189: 2689–78, 2012
- 15) Y. Kurashima, T. Amiya, T. Nochi, K. Fujisawa, T. Haraguchi, H. Iba, H. Tsutsui, S. Sato, S. Nakajima, H. Iijima, M. Kubo, J. Kunisawa* (*corresponding author), and H. Kiyono, Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors, *Nat Commun* 3: 1034, 2012
- 16) T. Kusu, H. Kayama, M. Kinoshita, S. G. Jeon, Y. Ueda, Y. Goto, R. Okumura, H. Saiga, T. Kurakawa, K. Ikeda, Y. Maeda, J. I. Nishimura, Y. Arima, K. Atarashi, K. Honda, M. Murakami, J. Kunisawa, H. Kiyono, M. Okumura, M. Yamamoto, and K. Takeda, Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine, *J Immunol* 190:774–83, 2013
- 17) S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa, and H. Kiyono, Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells, *Mucosal Immunol* (2013, in press)
- 18) I. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono, Nanogel-based PspA Intranasal Vaccine Prevents Invasive Disease and Nasal Colonization by Pneumococcus, *Infection and Immunity* 81(5):1625–34, 2013
- 19) Y. Fukuyama, D. Tokuhara, S. Sekine, K. Aso, K. Kataoka, J. Davydova, M. Yamamoto, R. S. Gilbert, Y. Tokuhara, K. Fujihashi, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, J. R. McGhee, K. Fujihashi, Potential roles of CCR5⁺ CCR6⁺ dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses, *PLoS One* 8(4):e60453, 2013
- 20) J. Kunisawa, M. Gohda, E. Hashimoto, I. Ishikawa, M. Higuchi, Y. Suzuki, Y. Goto, C. Panea, I. I. Ivanov, R. Sumiya,

- L. Aayam, T. Wake, S. Tajiri, Y. Kurashima, S. Shikata, S. Akira, K. Takeda, and H. Kiyono, Microbe-dependent CD11b⁺ IgA⁺ plasma cells in early-phase robust intestinal IgA responses in mice, *Nat Commun* 4: 1772, 2013
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 和氣太一、國澤 純、清野 宏 粘膜表層における生体防御システムとしての粘膜免疫機能 表面 49: 13-22, 2011
- 26) 國澤 純 IgA 産生における腸内免疫ネットワーク 実験医学増刊 免疫記憶の制御と疾患治療 29: 100-105, 2011
- 27) 國澤 純 マクロ共焦点顕微鏡を用いた粘膜組織における細胞動態 Drug Delivery System 26: 419-421, 2011
- 28) 國澤 純 粘膜ワクチンの現状と未来 ドラッグデリバリーシステムの新展開 II 149-154, 2012
- 29) 國澤 純、柴田納央子、清野 宏 腸管関連リンパ組織内における共生細菌との免疫学相互作用 医学のあゆみ 241: 181-185, 2012
- 30) 國澤 純、清野 宏 実用化ステージとなった粘膜ワクチンの今後に向けた新展開 実験医学増刊号「感染・共生・防御の研究最前線」30: 3348-3353, 2012
- 31) 柴田納央子、國澤純、清野宏 自然リンパ球はリンパ組織内共生細菌の解剖学的な隔離を促進する 細胞工学 31: 1256-1257, 2012
- 32) 田尻 創、清野 宏、國澤 純 腸管免疫疾患における脂質メディエーター 遺伝子医学 MOOK (印刷中)
2. 学会発表
- 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)
- 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)
- 6) Jun Kunisawa et al, New trend for