

に加え室温で2時間反応させた。5回の洗浄後、Streptavidin-Alkaline Phosphatase (BD Pharmingen, USA) を加え室温で1時間反応させた。7回の洗浄後、BCIP/NBT-plus substrate を加え室温で20分間反応させ、水道水を加え反応を停止させた。Eli-Puncher Kit (ZellNet Consulting Inc., USA) を用いてプレートより剥離後、顕微鏡下においてカウントした。

11. フローサイトメトリー

脾臓細胞を 1×10^6 個になるように 1.5mL のエッペンチューブに分注し、FCM buffer を $100 \mu\text{L}$ 加え、抗ラット CD16/CD32 (clone ; 2.4G) モノクローナル抗体 (BD Pharmingen, USA) で室温にて5分間処理した。さらに T-Select MHC Tetramer OVA-PE (MBL(株)医学生物学研究所、名古屋) で室温にて20分間処理した。さらに抗マウス CD8-FITC (MBL(株)医学生物学研究所、名古屋) で室温にて20分間処理した。FCM buffer で3回洗浄した後、7-ADD (MBL(株)医学生物学研究所、名古屋) で室温にて10分間処理し、細胞懸濁液を FACS caliber (日本 Becton-Dickinson、東京) にて解析した。

12. Class I 抗原提示試験

OVA エピトープペプチドで 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、 37°C 、5%CO₂ 環境下单相培養で *in vitro* にて継代、維持した。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 $50 \mu\text{g/ml}$ となるように AIM-V 培養液を加えて使用した。DC2.4 を AIM-V 培養液に懸濁し、96well plate に 1well あたり 4×10^4 cells/ $50 \mu\text{l}$ で播種し、5%CO₂、 37°C で培養した。15分後、漢方薬

を $50 \mu\text{L}$ 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 $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。(最終濃度：漢方薬または生薬エキス $200 \mu\text{g/ml}$ 、OVA $50 \mu\text{g/ml}$ 、LPF $20 \mu\text{g/ml}$)。5%CO₂、 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 4×10^4 cells/ $200 \mu\text{l/well}$ で播種した。5%CO₂、 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。

13. 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 100 unit/ml で3日間培養後、MODE-K の培地を Mitomycin C 50 $\mu\text{g/ml}$ 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 5×10^4 /well でまき、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、RPMI で3回洗浄、3A9 細胞を 5×10^4 /well で播種し、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。

14. 統計解析

統計的有意性は両側 Student' s t-test 及び Mann-Whitney' s 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. 十全大補湯のワクチンアジュバントとし

ての評価

OVA ワクチンの接種と十全大補湯の投与を併用する群の対象として OVA ワクチンの接種し水を投与する群を作製した。また、OVA ワクチンの非接種群も水投与群と十全大補湯投与群を作製した。以後、1.2-6 に準じた方法で OVA ワクチンの接種を行った群を、OVA(+)群と表記し、非接種群を、OVA(-)群と表記する。また、十全大補湯の投与を行った群を、JTT 群と表記し、水の投与を行った群を、Water 群と表記する。その結果、OVA(-)・Water 群において経日的に腫瘍体積の増大、すなわち腫瘍の増殖が観察された。この増殖は十全大補湯のみの投与 (OVA(-)・JTT 群) では抑制されなかった。OVA ワクチンの接種を行った結果 (OVA(+))・Water 群)、OVA 抗原に対する免疫が誘導されるため、OVA のエピトープペプチドが MHC class I 上に提示されている EG7 腫瘍は拒絶され、腫瘍増殖の抑制が確認された。さらに十全大補湯の投与を併用することにより (OVA(+))・JTT 群)、興味深いことに、腫瘍増殖の抑制が顕著に観察される結果となった。

2. 腫瘍生着までの期間

腫瘍体積が 10 mm³ 以上となった日を腫瘍が生着した日とみなし、腫瘍生着までの期間を検討し、OVA ワクチンによる免疫と十全大補湯の投与による併用効果を評価した結果、OVA ワクチンの接種をする (OVA(+))・Water 群) ことで遅延した腫瘍の生着までの期間が、十全大補湯を投与し併用する (OVA(+))・JTT 群) ことによりさらに延長した。さらに、観察期間の最終日である 37 日目においても、10 例中 2 例の腫瘍生着が確認されず、EG7 腫瘍が完全に拒絶されたものとみなした。

3. 生存期間

生存期間についても同様に検討を行った

結果、OVA ワクチンの接種を行っていない OVA(-)・Water 群は 13 日目より死亡が確認され始め、25 日目において全例の死亡が確認された。十全大補湯の投与のみでは生存期間は対象群と比較して延長せず、効果は確認されなかった。OVA ワクチンの接種を行うことで抗腫瘍免疫が誘導されたため、明らかな生存期間の延長が観察された。OVA ワクチンの接種に十全大補湯の投与を併用した OVA(+))・JTT 群)において、さらなる生存期間の延長が確認された。OVA ワクチンの接種群と比較しても有意な生存期間の延長が確認され、OVA ワクチンの接種を行うことによる免疫誘導を十全大補湯が増強することを示唆する結果が得られた。

4. OVA 抗原特異的な血清 IgG 産生に及ぼす増強効果

マウス血清中の OVA 抗原特異的 IgG1 および IgG2a を測定した。その結果、OVA ワクチンの接種を行わなかった群 (OVA(-))・Water 群)および OVA(-))・JTT 群) の血清中からは、抗体は検出されなかった (Not Detected : N. D.)。このことは、本実験の信頼性を裏付けるものである。次に、OVA ワクチンの接種を行うことにより、OVA 抗原特異的 IgG1 および IgG2a の産生が確認された。さらに、十全大補湯の投与を併用すると IgG2a で著明な抗体産生の増強作用が確認された。OVA ワクチンの接種により誘導された抗体量を基準として、十全大補湯の投与による併用効果を相対的に評価したところ、5.8 倍もの OVA 抗原特異的な抗体産生の増強が観察された。また、IgG1 に関しても、IgG2a ほどではないが、有意な抗体産生の増加が確認された。

5. IFN- γ 産生細胞数の増加効果

マウス脾臓細胞中の OVA 抗原反応性 IFN- γ 産生細胞数を ELISpot アッセイにより解析した。ELISpot アッセイでは、IFN- γ 産

生細胞とプレート上の捕捉抗体が密接しているため、産生されたサイトカインがプロテアーゼによる分解を受けるなどの影響がなく、抗原に反応し放出されたサイトカインを適格に捕捉することにより、サイトカインを産生する細胞数を測定することができる。OVA タンパクを作用させ、産生された IFN- γ を測定することにより、脾臓細胞中の OVA 抗原反応性 IFN- γ 産生細胞数を解析したところ、OVA ワクチンの接種により OVA 抗原に対する免疫の誘導が起こり、その結果、IFN- γ 産生細胞は増加した。さらに、十全大補湯を併用投与することにより脾臓細胞中の IFN- γ 産生細胞数は有意に増加し、免疫の増強効果が確認された (図 1)。

6. 抗原特異的 CTL の誘導効果

マウス脾臓細胞を OVA257-264 ペプチドと共に 5 日間の *in vitro* にて刺激を行い、蛍光染色を行い、FACS 解析を行った。その結果、OVA ワクチンの接種により OVA 抗原に対する免疫を誘導したマウスにおいて、抗原特異的 CTL が検出された。さらに十全大補湯の投与を併用すると、マウスの脾臓細胞中の抗原特異的 CTL の誘導が増強し、OVA ワクチンの接種単独群と比較して約 1.5 倍を示した。

7. 抗原提示能力を亢進する生薬の網羅的な探索

112 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 2 倍以上亢進させる生薬として、オウバク、オウレン、オンジ、カッコン、カンキョウ、キョウカツ、クマザサ、コウボク、シャクヤク、シャゼンシ、ショウマ、シンイ、セキシヤク、ゾクダン、チョレイ、トウキ、ドクカツ、トチュウ、ニクジュヨウ、ビヤクシ、ビヤクジュツ、ブクリョウ、ボウコン、ホコツ

シ、マオウ、マンケイシ、ヤクチの 27 種類が探索された。特に、オンジ、コウボク、シンイ、セキシヤク、ブクリョウの 5 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。また、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 2 倍以上抑制させる生薬として、ウコン、キキョウ、ケイヒ、サンショウ、ジコッピ、チクセツニンジン、チョウトウコウ、ビワヨウ、ビンロウジの 9 種類であった (図 2)。

一方で、対照群と比べて、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class II 提示能を 2 倍以上亢進させる生薬は見いだせず、サンシュユの 1.2 倍であった。MHC Class II 提示能を 2 倍以上抑制させる生薬として、クマザサが検索された。

D. 考察

E. 結論

十全大補湯単独の投与では、抗腫瘍効果が本実験モデルでは確認できなかったにも関わらず、OVA ワクチンの接種により OVA 抗原を MHC Class I に提示している EG7 に対する特異的な抗腫瘍免疫を誘導し、併用することにより、有意に腫瘍増殖を抑制し、腫瘍生着までの期間と生存期間の延長が観察できた。この結果より、十全大補湯がワクチン接種による特異的な免疫誘導を増強するという、がんワクチンのアジュバントになり得ることが明らかとなった。OVA というモデル抗原を用いた実験系ではあるが、十全大補湯ががんワクチンによる抗腫瘍効果を増強することが確認できた。抗腫瘍免疫において、その中心的な役割を担うエフェクター細胞は、がん抗原特異的な CTL であることから、この抗腫瘍効果の増強は、がん抗原特異的 CTL の誘導の増強に基づくものであることが明らかにされた。がん特異的 CTL の誘導に関わるサイトカインとして IFN- γ がよく知られている。そこで、

ELISpot アッセイにより、直接的に IFN- γ 産生細胞数に対する十全大補湯の効果を検討したところ、抗原反応性 IFN- γ 産生細胞を有意に増加させることが認められた。OVA ワクチンを接種した際に、十全大補湯の併用投与することにより、OVA 抗原特異的 CTL が増強されるか否かを確認するため、OVA/MHC テトラマーを用いて解析を行った。OVA 抗原特異的な CTL の誘導を解析した結果、OVA ワクチン接種と十全大補湯を併用投与したマウスにおいて、OVA ワクチンを接種し水を投与したマウスに比べ、OVA 抗原特異的な CTL の誘導が増強されることが明らかとなった。産生のバランスのみで十分に説明できるものではなく、他のサイトカイン、例えば IL-12 の産生量の変動を調べるなど、さらなる解析を要するものと考えられる。

また、これまでに、漢方方剤や生薬の免疫に対する影響は、*in vitro* および *in vivo* で数多く存在する。しかしながら、これらは抗原に対して非特異的な免疫応答に関する知見がほとんどであり、抗原特異的な免疫応答促進効果を示す生薬を明らかにしたのは、本研究が初めてである。

十全大補湯は、川芎、当帰、地黄、芍薬、蒼朮または白朮、人参、茯苓、甘草、黄耆および桂皮を加えて 10 種類の生薬により構成された補剤である。樹状細胞の抗原特異的な MHC Class I 提示能を 2 倍以上亢進させる生薬 27 種類の中に、十全大補湯構成 10 生薬のシャクヤク、トウキ、ビャクジュツ、ブクリョウの 4 種類 (1.7 倍のカンゾウを含めると 5 種類) も含まれていた結果となる。

昨年度までに、我々は、漢方薬の十全大補湯が、樹状細胞のがんモデルワクチン特異的な抗原提示を増強し、さらには、マウス担がんモデルにおけるワクチン効果を増強することを報告してきた。

この増強効果は、十全大補湯が樹状細胞

の抗原提示を亢進させる 4-5 種類もの生薬で構成されていた結果であると思われる。

今後は、これら生薬から増強効果を有する活性成分を同定し、生薬成分由来の新たなア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) 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) 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.

2. 学会発表

- 1) 加藤真一郎、小泉桂一、山田美幸、犬鷲明子、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
- 2) 保科瑛子、犬鷲明子、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

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

なし

3. その他

なし

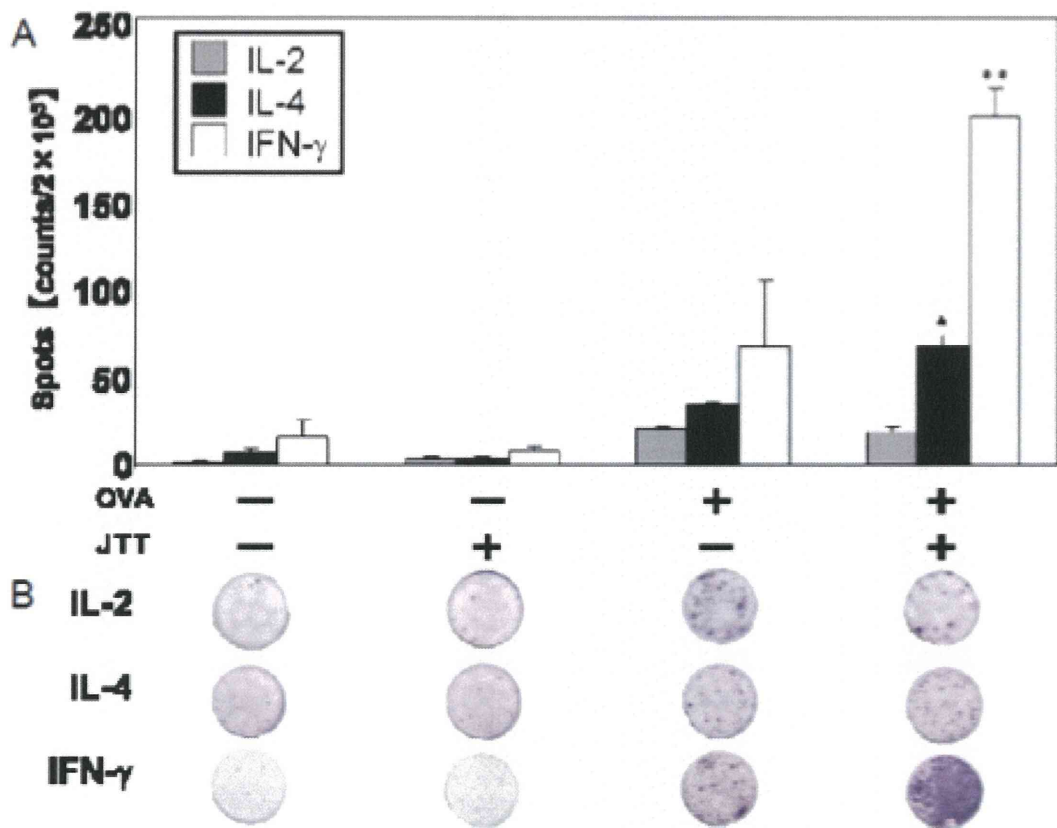


図1. 十全大補湯によるOVA特異的なIFN- γ 産生細胞の増加

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
T. Kogure	Immunomodulatory activities of Japanese traditional Medicines in rheumatoid arthritis	Edited by Debasis Bagchi, Hiroyoshi Moriyama and Siba P. Raychaudhuri	ARTHRITIS Pathophysiology, Prevention and Therapeutics	CRC Press Taylor & Francis Group	Boca Raton London NewYork	2011	219-230
T. Kogure	Recent clinical applications of Kampo Medicine in amenorrhea	Edited by Amr Chatterjee	AMENORRHEA	INTECH	Rijeka, Croatia	2011	127-138
T. Kogure	Chapter 4: Arthralgia-Neuralgia	Edited by Health and Labour Sciences Research grant Research on the standardization of traditional Japanese medicine promoting integrated medicine	Textbook of Traditional Japanese medicine Part1: Kampo	Nikkei Printing	Tokyo	2012	147-149
J. Kunisawa, and Kiyono	H. Populations and Cytokine Productions	Edited by Stefan H. E. Kaufman and Dieter Kambelitz	Methods in Microbiology	Academic Press	Boston	183-193	2010

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kogure T, Harada N, Tatsumi T, Fujinaga H	Persistent undifferentiated arthritis successfully treated with Japanese herbal medicine "Eppikajutsuto".	European Journal of Integrative Medicine	In Press	In Press	2013
Kogure T	Immunoregulation by Kampo medicines - Clinical application to RA -	Journal of Traditional medicine	30	31-33	2013
Kogure T, Harada N, Oku Y, Tatsumi T, Niizawa A	The Observation of humoral responses after influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis treated with Japanese Oriental (Kampo) Medicine: An observational study	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	2012	E-pub	2012
Kogure T.	Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis -recent topics on Japanese Oriental (Kampo) medicine-	Journal of Traditional Medicine	29	97-99	2012
Kogure T, Tatsumi T, Oku Y	Edematous Erythema at the Hands and Feet Probably Caused By the Traditional Herb "Radix Astragalii"	Integrated Medicine Insights	6	1-6	2011
Kogure T, Tatsumi T, Shigeta T, Fujinaga H, Sato T, Niizawa A	Effect of kampo medicine on pain and range of motion of osteoarthritis of the hip accompanied by acetabular dysplasia: case report and literature review.	Integrated Medicine Insights	6	13-17	2011
Kogure T, Tatsumi T, Sato H, Oku Y, Kishida, Ito T.	Traditional Herbal Medicines (Kampo) for Patients With Rheumatoid Arthritis Receiving Concomitant Methotrexate: A Preliminary Study.	Alternative Therapies in Health & Medicine	16	46-51	2010

Kogure T, Tatsumi T, Oku Y.	Four Cases of Dysthymic Disorder and General Malaise Successfully Treated with Traditional Herbal (Kampo) Medicines: Kamiuntanto.	Integrated Medicine Insights	5	1-6	2010
Taguchi A, Kawana K, Yokoyama T, Adachi K, Yamashita A, Tomio K, Kojima S, Oda K, Fujii T, Kozuma S	Adjuvant effect of Japanese herbal medicines on the mucosal type 1 immune response to human papillomavirus (HPV) E7 in mice immunized orally with <i>Lactobacillus</i> -based therapeutic HPV vaccine in a synergistic manner.	A Vaccine	30	5368-5372	2012
Kawana K, Adachi K, Kojima S, Kozuma S, Fujii T	Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach.	Open Virol J	6	264-269	2012
Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S	The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN.	Am J Reprod Immunol	69	134-141	2013
Nagasaka K, Seiki T, Yamashita A, Massimi P, Subbaiah VK, Thomas M, Kranjec C, Kawana K, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Kozuma S, Banks L	A novel interaction between hScrbp and PP1 γ downregulates ERK signaling and suppresses oncogene-induced cell transformation.	PLOS One	E-pub	E-pub	2013

<p>Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H</p>	<p>Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study.</p>	<p>Int J Clin Oncol</p>	<p>E-pub</p>	<p>E-pub</p>	<p>2013</p>
<p>Todokoro T, Furniss D, Oda K, Kawana K, Narushima M, Mihara M, Kikuchi K, Hara H, Yano T, Koshima I,</p>	<p>Effective treatment of pelvic lymphocele by lymphaticovenular anastomosis,</p>	<p>Gynecol Oncol</p>	<p>E-pub</p>	<p>E-pub</p>	<p>2013</p>
<p>Ikeda Y, Oda K, Nakagawa S, Murayama-Hosokawa S, Yamamoto S, Ishikawa S, Wang L, Takazawa Y, Maeda D, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y</p>	<p>Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays as a diagnostic tool in patients with synchronous endometrial and ovarian cancer.</p>	<p>Int J Gynecol Cancer</p>	<p>22</p>	<p>725-731</p>	<p>2012</p>
<p>Shirane A, Wada-Hiraike O, Tanikawa M, Seiki T, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Hirano M, Oishi H, Oda K, Kawana K, Nakagawa S, Osuga Y, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y</p>	<p>Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression.</p>	<p>Biochem Biophys Res Commun</p>	<p>424</p>	<p>604-610</p>	<p>2012</p>

<p>Arimoto T, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Tsukazaki T, Adachi K, Matsumoto Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y</p>	<p>Retreatment with nedaplatin in patients with recurrent gynecological cancer after the development of hypersensitivity reaction to carboplatin.</p>	<p>J Obstet Gynaecol Res</p>	<p>39</p>	<p>336-340</p>	<p>2013</p>
<p>Kashiyama T, Oda K, Kawana K, Arimoto T, Kanetaka Y, Takazawa Y, Maeda D, Nakagawa S, Yano T, Kozuma S</p>	<p>Low-grade endometrial stromal sarcoma developing in a postmenopausal woman under toremifene treatment for breast cancer.</p>	<p>J Obstet Gynaecol Res</p>	<p>39</p>	<p>424-429</p>	<p>2013</p>
<p>Shoji K, Oda K, Kashiyama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A, Kosoto, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Kawana K, Kuramoto H, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y</p>	<p>Genotype-Dependent Efficacy of a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR Inhibitor, RAD001, in Endometrial Carcinomas.</p>	<p>PLoS One</p>	<p>7</p>	<p>e37431</p>	<p>2012</p>
<p>Matsumoto K, Hirai Y, Furuta R, Takatsuka N, Oki A, Yasugi T, Maeda H, Mitsuhashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H.</p>	<p>Subsequent risks for cervical precancer and cancer in women with low-grade squamous intraepithelial lesions unconfirmed by colposcopy-directed biopsy: Results from a multicenter, prospective, cohort study</p>	<p>Int J Clin Oncol</p>	<p>17</p>	<p>233-239</p>	<p>2012</p>

Iwasawa Y, Kawana K, Fujii T, Schust DJ, Nagamatsu T, Kawana Y, Sayama S, Miura S, Matsumoto J, Adachi K, Hyodo H, Yamashita T, Kozuma S, Taketani Y.	A possible coagulation-independent mechanism for pregnancy loss involving β 2glycoprotein 1-dependent antiphospholipid antibodies and CD1d	Am J Reprod Immunol	67	54-55	2012
Yamamoto N, Mori R, Jacklin P, Osuga Y, Kawana K, Shibuya K, Taketani Y.	Introducing HPV vaccine and scaling up screening procedures to prevent deaths from cervical cancer in Japn: A cost-effectiveness analysis.	Br J Obstet and Gynecol	119	177-186	2012
Kojima S, Kawana K, Fujii T, Yokoyama T, Miura S, Tomio K, Tomio A, Yamashita A, Adachi K, Sato H, Nagamatsu T, Schust DJ, Kozuma S, Taketani Y.	Characterization of intraepithelial lymphocytes (IELs) residing in the cervical mucosa of patients with human papillomavirus (HPV)-infected intraepithelial neoplastic lesions.	Am J Reprod Immunol	66	435-443	2011
Inaba K, Arimoto T, Hoya M, Kawana K, Nakagawa S, Kozuma S, Taketani Y.	Interstitial pneumonitis induced by pegylated liposomal doxorubicin in a patient with recurrent ovarian cancer.	Med Oncol	29	1255-1257	2012
Arimoto T, Nakagawa S, Oda K, Kawana K, Yasugi T, Taketani Y.	Second-line chemotherapy with docetaxel and carboplatin in paclitaxel and platinum-pretreated ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer.	Med Oncol	29	1253-1254	2012

Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsuhashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H.	Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions?	J Med Virol	84	1128-1134	2012
Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Yasugi T, Ikeda Y, Takazawa Y, Kozuma S, Taketani Y.	Aromatase inhibitor anastrozole as a second-line hormonal treatment to a recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: a case report.	Med Oncol,	28	771-774	2011
Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y	CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV.	J Virol	84	11614-11623	2010
Okuma K, Yamashita H, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Nakagawa K	Advanced age is a significant determinant of poor prognosis in patients treated with surgery plus postoperative radiotherapy for endometrial cancer.	J Obstet Gynecol Res	36	757-763	2010
Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y	Oral immunization with <i>Lactobacillus casei</i> vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocyte against HPV16 E7.	Vaccine	28	2810-2817	2010

Yamashita H, Okuma K, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Yano T, Kobayashi S, Wakui R, Ohtomo K, Nakagawa K	Comparison Between Conventional Surgery Plus Postoperative Adjuvant Radiotherapy and Concurrent Chemoradiation for FIGO Stage II B Cervical Carcinoma: A Retrospective Study.	Am J Clin Oncol	33	583-586	2010
折笠秀樹	東洋医学研究における統計学の知識	日本東洋医学会雑誌	61(5)	683-689	2010
Higashi Y, Fujita M, Origasa H, Miyata T, Matsuo H, Naritomi H, Shigematsu H	Study design of SEASON Registry: Prospective surveillance of cardiovascular events in antiplatelet-treated arteriosclerosis obliterans patients in Japan (SEASON).	International Heart Journal	51(5)	337-342	2010
Origasa H, Goto S, Shimada K, Uchiyama S, Okada Y, Sugano K, Hiraishi H, Uemura N, Ikeda Y	A prospective cohort study of gastrointestinal complications and vascular disease in patients taking aspirin: rationale and design of the MAGIC study.	Cardiovascular Diseases and Therapy	25(6)	551-560	2011
折笠秀樹	臨床研究の計画・実施・報告・評価に関する現状および論点	薬理と治療	39(1)	51-65	2011
折笠秀樹	臨床試験における統計解析	Cognition and Dementia	10(3)	280-283	2011
折笠秀樹	臨床研究の企画～質の高い臨床研究を目指す～	Medicament News	No. 206 3	4-5	2011

Yan-bo Zhu, Heideki Origasa, Xiao-xia Luo, Yang-yang Wang, Jie Di, Lin Lin	Responsiveness of three subjective report of outcome measures for chronic heart failure. 、 Zhong xi yi jie he xue bao = Journal of Chinese integrative medicine	Journal of Chinese integrative medicine	10(12)	1375-1381	2012
許鳳浩、上馬場和夫、小川弘子、御影雅幸、折笠秀樹	漢方薬の代謝への作用の個人差：防風通聖散の二重盲検ランダム比較試験	東方医学	28(1)	37-59	2012
Kamouchi M, Kumagai N, Okada Y, Origasa H, Yamaguchi T, Kitazono T	A risk score for predicting recurrence in patients with ischemic stroke: The Fukuoka stroke risk score for Japanese.	Cerebrovascular Diseases	34	351-357	2012
Yamamoto H, Origasa H, Hori M	Effects of carvedilol on heart failure with preserved ejection fraction - The Japanese Diastolic Heart Failure Study (J-DHF).	European Journal of Heart Failure	15	110-118	2012
折笠秀樹	サンプルサイズの決め方	分子脳血管病	12(1)	93-96	2013
折笠秀樹	アダプティブデザインとデータモニタリング委員会	医学のあゆみ	244(13)	1243-1246	2013

<p>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</p>	<p>Nanogel-based PspA Intranasal Vaccine Prevents Invasive Disease and Nasal Colonization by Pneumococcus</p>	<p>Infection and Immunity</p>	<p>81</p>	<p>1625</p>	<p>2013</p>
<p>S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa, and H. Kiyono</p>	<p>Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells</p>	<p>Mucosal Immunol</p>	<p>in press</p>		<p>2013</p>
<p>Y. Kurashima, T. Amiya, T. Nochi, K. Fujisawa, T. Haraguchi, H. Iba, H. Tsutsui, S. Sato, S. Nakajima, H. Iijima, M. Kubo, J. Kunisawa, and H. Kiyono</p>	<p>Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors</p>	<p>Nat Commun</p>	<p>3</p>	<p>1034</p>	<p>2012</p>

<p>Sonnenberg, GF., Monticelli, LA., Alenghat, T., Fung, TC., Hutnick, NA., Kunisawa, J., Shibata, N., Grunberg, S., Sinha, R., Zahm, AM., Tardif, MR., Sathaliyawala, T., Kubota, M., Farber, DL., Collman, RG., Shaked, A., Fouser, LA., Weiner, DB., Tessier, PA., Friedman, JR., Kiyono, H., Bushman, FD., Chang, KM., and Artis, D.</p>	<p>Innate lymphoid cells promote an atomical containment of lymphoid -resident commensal bacteria.</p>	<p>Science</p>	<p>336</p>	<p>1321-1325</p>	<p>2012</p>
<p>Yamamoto. M., Pascual, DW., Kiyono, H.</p>	<p>M cell-targeted mucosal vaccine and strategies.</p>	<p>Curr. Top. Micorobiol. Immunol</p>	<p>354</p>	<p>39-52</p>	<p>2012</p>
<p>Fukuyama, Y., Tokuhara, D., Kataoka, K., Gilbert, RS., McGhee, JR., Yuki, Y., Kiyono, H., and Fujihashi, K.</p>	<p>Novel vaccine development strate gies for inducing mucosal immuni ty.</p>	<p>Expert Rev. Vaccines</p>	<p>11</p>	<p>367-379</p>	<p>2012</p>
<p>Goto Y, Kiyono H.</p>	<p>Epithelial barrier: an interface for the cross-communication bet ween gut flora and immune system</p>	<p>Immunol Rev.</p>	<p>245</p>	<p>147-163</p>	<p>2012</p>

Kunisawa, J., Kurashima, Y, Kiyono, H.	Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines.	Adv Drug Deliv Rev.	64	523-530	2012
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 HS-C engrafted NOD/SCID/IL2r γ KO mice	J Immunol	188		
Sato, S, Kiyono, H.	The Mucosal immune system of the respiratory tract.	Curr. Opin. Virol.	2	225-232	2012
Kumagai, T, Kiyono, H.	Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine.	Vaccine	30	6338-6339	2012
Kim DY, Sato A, Fukuyama S, Sagara H, Nagatake T, Kong IG, Goda K, Nochi T, Kunisawa J, Sato S, Yokota Y, Lee CH, Kiyono H	The airway antigen sampling system: Respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens	J. Immunol	186	4253-4262	2011
Okada K, Yamasoba T, Kiyono H.	Craniofacial mucosal immune system: importance of its unique organogenesis and function in the development of a mucosal vaccine	Adv. Otorhinolaryngol	72	31-36	2011

Goto Y, Kiyono H.	Epithelial cell microRNAs in gut immunity	Nat Immunol.	12	195-197	2011
Terahara K, Nochi T, Yoshida M, Takahashi Y, Goto Y, Hatai H, Kurokawa S, Jang H-M, Kweon M-N, Domino SE, Hiroi T, Yuki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi K, Kiyono H.	Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	404	822-828	2011
Yuki Y, Nochi T, Harada N, Katakai Y, Shibata H, Mejima M, Kohda T, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Ono F, Kozaki S, Terao K, Tsukada H, Kiyono H.	In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates	J Immunol	185	5436-43	2010
Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong IG, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H.	Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines	Nat Mater	9	572-8	2010