

201225004A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

「インフルエンザワクチンの有効性と安全性の  
向上のための理論基盤構築」

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 健

(独) 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクトリーダー

平成 25 (2013) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

インフルエンザワクチンの有効性と安全性の向上のための理論基盤構築

石井 健 ----- 1 - 1 1

### II. 分担研究報告

課題 1. ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤

課題 2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築

課題 3. ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用

課題 4. ワクチンアジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索

課題 5. ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究

石井健、(青枝大貴) (課題 1 & 2) ----- 1 2 - 1 5

清野 宏 (課題 1 & 2) ----- 1 6 - 2 1

長谷川秀樹 (相内 章、鈴木 忠樹)(課題 2 & 3) ----- 2 2 - 2 7

迫田義博 (課題 2 & 3) ----- 2 8 - 3 0

中山哲夫、熊谷卓司、庵原俊昭 (課題 4 & 5) ----- 3 1 - 3 4

庵原俊昭、菅秀 (課題 4 & 5) ----- 3 5 - 4 3

石井健 (鉄谷耕平) (課題 4 & 5) ----- 4 4 - 4 6

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 4 7 - 5 6

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 別紙

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

「インフルエンザワクチンの有効性と安全性の向上のための理論基盤構築」

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 石井 健

研究要旨：

インフルエンザワクチンは、季節性のワクチンのみならず、近年の新型インフルエンザ（H1N1）の影響もあり、研究開発が最も盛んで接種対象者数も多い。その種類は多岐にわたっているものの、その微生物学的、細胞生物学的、免疫学的な観点から見た「作用機序」は、ワクチンの有効性や安全性の向上にとっては非常に重要であるにもかかわらず、未知の部分非常に大きい。

そこで本研究代表者、分担者らはワクチンの基礎研究、開発研究、臨床試験などに携わる中で上記の問題を共有し、議論を重ねた結果、インフルエンザワクチンにおいて臨床的にも重要と思われるが分子から個体レベルでの科学的根拠が特に乏しい研究項目として下記の5点を同定した。

- 1) ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤構築
  - 2) 注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築
  - 3) ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用
  - 4) ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索
  - 5) ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究
- よって本研究では、上記5課題を基礎、臨床研究、臨床医などによって形成された本研究班にて迅速かつ正確に解決を目指していく。また得られた知見や情報を、公開討論やワークショップなどを科学者、一般向けに開催して議論を深めるとともにインフルエンザワクチン開発に向けた最新情報をわかりやすく理解してもらうことを図る。平成24年度の成果として下記に詳細を報告する。

石井 健（研究代表者） 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト  
（兼）大阪大学免疫学フロンティア研究センター

庵原俊昭（研究分担者） 国立病院機構三重病院

清野 宏（研究分担者） 東京大学医科学研究所

迫田義博（研究分担者） 北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座

中山哲夫（研究分担者） 北里生命科学研究所

長谷川秀樹（研究分担者） 国立感染症研究所感染病理部

## A. 研究目的

本研究は、多岐にわたるインフルエンザワクチンの種類、投与方法、アジュバントによる免疫原性誘導のメカニズムの相違点や、副反応および副作用と呼ばれる現象の作用機序を解明することにより、より安全で有効性の高いインフルエンザワクチン開発に必須な生物学的、医学的理論基盤を構築することを目的とする。

本研究代表者、分担者らはワクチンの基礎研究、開発研究、臨床試験などに携わるものとしてディスカッションを重ねた結果、特に、インフルエンザワクチンにおいて臨床的にも重要と思われるが分子、細胞、組織、個体レベルでの科学的根拠が乏しい研究項目を5項目同定した（上記）。本研究計画立案について特記すべき点は、平成21年度に行われたアラムアジュバントを含有する全粒子H5N1プレパンドミックワクチンの小児での臨床試験（神谷齊国立病院機構三重病院名誉院長を研究代表者とする「沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1株）保存血清を使った臨床研究」での高頻度の発熱症例が見られた点を中心とした結果を基盤として臨床家と基礎研究者が一堂に介して、終日（平成21年11月3日）忌憚のない議論を重ねて浮かび上がってきた。これらの問題点はインフルエンザ感染対策として、ワクチン行政の上で最も緊急かつ重要な課題でもあり、基礎研究者と臨床研究者が本研究のような班を組んで行わ

なければ総括できない領域である。ただ単に「研究の為のワクチンを開発します」、ではなく「基礎研究結果や臨床治験結果による問題点を起点としてエビデンスを形成し、最終的にはワクチン行政や感染対策そして開発にその方向性の判断の理論基盤を賦与する」点が本研究課題の特色であり、独創的な点である。代表者の石井らはインフルエンザワクチンを含めた各種ワクチン、アジュバントの自然免疫受容体、シグナル伝達経路、細胞などを同定し、分子レベルで生体のワクチン作用機序を解明してきた。

分担者の庵原らは一貫して臨床医としての視点からインフルエンザワクチンの開発研究に従事し、季節性、H5N1高病原性、新型（H1N1）のワクチンの臨床試験を行ってきた。特に小児での全粒子ワクチン+アラムアジュバントの治験にて高頻度の発熱症例を経験し、この原因究明に取り組んでいる。

分担者の中山は、麻疹ウイルスの分子疫学、麻疹ワクチン弱毒の分子基盤の研究を一貫して行い、ワクチンの有効性、安全性に関する研究を臨床検体を用いて行っている。

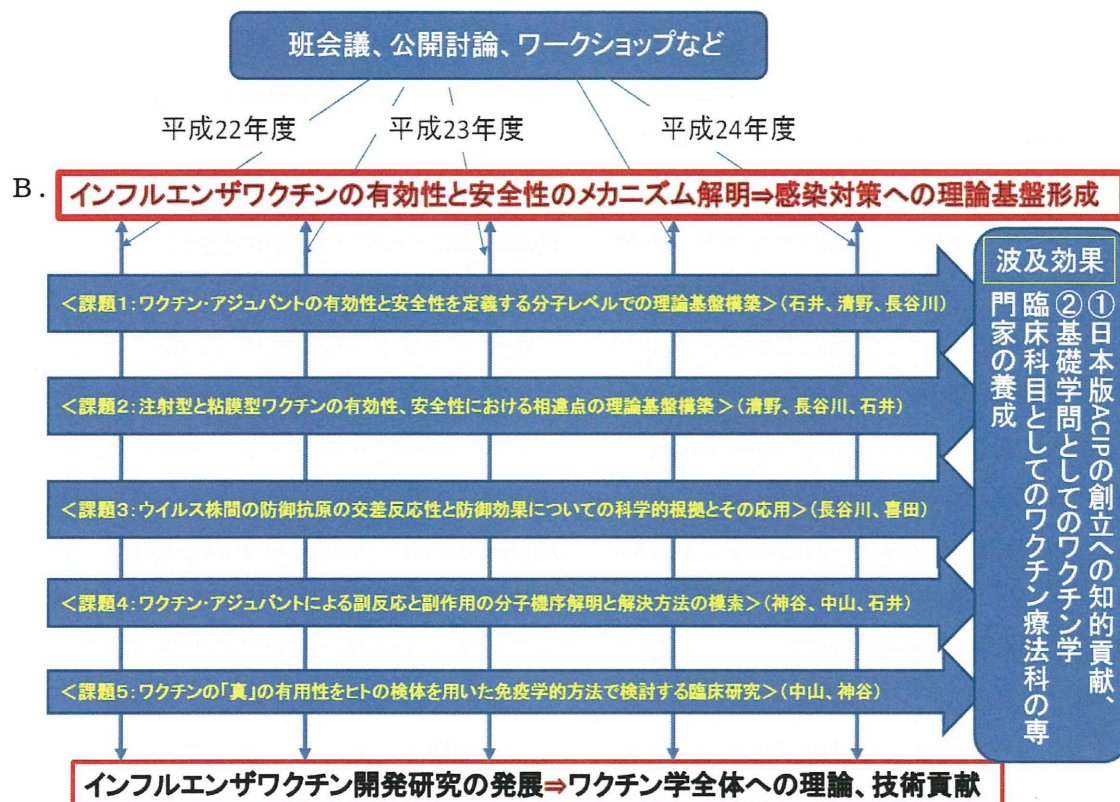
分担者の清野は粘膜免疫の基礎的研究成果をもとに、経口・経鼻ワクチン開発に向けた先導的研究を行っている。

分担者の長谷川らは粘膜投与型ワクチンの交叉防御効果を示す研究成果を発表し、現在

H5N1 および H1N1 ウイルスに対する経鼻ワクチンの臨床開発を進めている。

分担者の迫田らはインフルエンザ A ウイルスの全種類のライブラリーを整備するとともに、当該ライブラリーを用いてインフルエンザワクチン開発に向けてのウイルスバンク構築を進めている。

上記のように代表者、各分担者の研究の情報を共有しディスカッションを重ねることが、本研究の課題である「ワクチンの作用、副作用の作用機序解明とその分子メカニズムに基づいた有効性、安全性の理論基盤構築」という目標達成に必要不可欠と考える(下記の流れ図参照)。



## B. 研究方法

課題1：ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤構築

(石井、清野、長谷川)

インフルエンザワクチンはいくつもの種類があり、生ワクチン、全粒子ワクチン、スプリット HA ワクチンなどの剤型、皮下、筋肉、経鼻、舌下などの投与方法、アジュバントの有無に至るまで多岐にわたっている。これらの有効性、安全性がどのように自然免疫によって制御されているか解明する。そこで申請者はこれら異なるワクチン形態の免疫原性とアジュバント効果のメカニズムを解明するため、1) ワクチン構成成分においていったい何がアジュバントとして働いているか、2) 生体、特に経鼻的に免疫した際のワクチンを取り込む細胞はなにか、アジュバントの自然免疫シグナルを伝える細胞がなにかを同定し、また、3) どのようなエフェクター因子（液性因子、細胞間相互作用を含む）が関与しているか、免疫学的、分子生物学的手法を用いて解析する。さらには現在日本で唯一認可されている H1N1 ワクチンである HA スプリットワクチンの免疫原性が全粒子や生ワクチンに比較して減弱している予備データを得ていることから、これに加えるべきアジュバントを上記 1-3) のデータをもとに効率よく、効果および安全性を改善する方法を模索する。

課題2：注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築

(清野、長谷川、石井)

呼吸器粘膜系に関して清野らは、マウスモデルにおいてその中心的役割を果たすNALTの組織形成メカニズムから生物学的機能を明らかにし、経鼻ワクチンの理論的基盤を構築した。しかしヒトでは

同一の組織は存在せず扁桃腺に代表されるワルダイアーリングが類似の機能を持つとされる。マウスとヒトの鼻腔、口腔のワクチン免疫機能の相違点や上気道、下気道の感染免疫、ワクチン免疫機構の解明を分子生物学的手法、細胞免疫学的手法なども用い行う。これらの解析により、インフルエンザワクチンの投与方法やアジュバントの開発のみならず、ワクチンの副反応・副作用の軽減に向けた免疫的な理論基盤の構築を目指す。

課題3：ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用

(長谷川、迫田)

H5N1 のワクチンにおいて Clade の異なるワクチンの接種順序により交叉防御能が変わるかどうかといった問題に対し、マウスを用いた実験系で接種順序による交叉防御能の違いを皮下接種及び経鼻接種を比較する事により検討を行う。特に粘膜免疫を代表とする分泌型 IgA と全身系免疫を反映する血清 IgG 抗体レベルでそのサブクラスも考慮して検討を進める予定である。本課題での成果は上記の課題1と2にもフィードバックされ、より効果があり安全な次世代型インフルエンザワクチン開発への貴重な情報を提供する。

課題4：ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索

(庵原（神谷）、中山、石井)

H5N1のワクチンにおいて成人での製造承認許可を受けて小児から思春期（6ヶ月～20歳まで）での使用についても検討を開始した。小児例では中和抗体価の上昇は良かったが、初回接種後24時間以内から3日目までにかけて39～40℃の発熱する症例が半数以上に見られた。先の研究（厚

労科研 H5N1 ワクチン治験（正式名入れる）で見られた発熱者の血清を使用して、その原因を探るため血中の炎症性・発熱性サイトカイン等の検討をする予定である。具体的には H5N1 のパンデミックワクチン接種前後の血清において同意書を取り直し、保存されている徹研、北里のワクチン接種後の血清計 100 例前後の血清の EIA IgG subclass 抗体を検査する。また、血清中から採取できる新しい情報としてマイクロ RNA に注目してこれを網羅的に解析してワクチンの副反応、有効性に寄与するものがあるか検討する。

**課題 5：**ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究（中山、庵原（神谷）、（小林、熊谷）、石井）

種々の H5N1 ワクチンの形態（全粒子不活化、全粒子不活化+アルミアジュバント、スプリット、その他）を作製し各年齢層のヒト末梢リンパ球を培養しワクチン抗原で刺激し産生されるサイトカインを網羅的に解析する。Th1/Th2 応答、炎症性サイトカインを測定し免疫応答、発熱等の副反応と関連性が見いだせるかどうかを検討する。また、血清中から採取できる新しい情報としてマイクロ RNA に注目してこれを網羅的に解析してワクチンの副反応、有効性に寄与するものがあるか検討する。

### C. 研究結果

- ・研究代表者(石井 健)
- (1)各種インフルエンザワクチンの免疫学的機序を生体レベルで証明し、ヒトでの現象との関連性を示した (Koyama S et al *Science Translational Medicine* 2010)。
- (2)インフルエンザワクチンにて最も汎用されて

いるアラムアジュバントの作用機序の一端を解明した (Marichal T et al. *Nature Medicine* 2011, Kuroda E et al, *Immunity* 2011)。

(3)抗腫瘍効果を有する低分子化合物である DMXAA がインフルエンザワクチンのアジュバントとして働く事を明らかとした (Tang CK et al. *PLoS One* in press 2013)。

(4) 本研究内容の「議論を深め」、「啓蒙を図る」一環として、ワクチンフォーラム 2010 を開催し、本研究班主催のアジュバントワークショップにてアジュバント開発研究の新展開や審査行政への提言を行い、また、本研究班を中心に「次世代アジュバント研究会」を発足させ、アカデミアのアジュバント研究者、企業の開発担当者、PMDA の審査担当者を招き相互の意見交換を行った。またアジュバント研究のアウトリーチ活動も積極的に行い、研究室の一般公開、アジュバントに特化した専門書の発行、アジュバントに関する講演会などを行った。平成 23 年度のワクチン学会にて本研究内容を主としたシンポジウムも開催した。

(5) 今年度はこれまで非公開で行ってきた次世代アジュバント研究会を、一般に公開する形で開催した。その場で、今後インフルエンザワクチンのアジュバントとして期待される候補分子を報告した。

・研究分担者(神谷齊(故)、中山哲夫、熊谷卓司、石井健)

(1)ワクチン接種後の小児の発熱の疫学的解析を行う目的で先の研究 (BK-PIFA/KIB-PIA の健康小児を対象とした臨床試験:代表研究者 神谷齊)で見られた発熱者の血清を使用して、その原因を探るため血中の炎症性・発熱性サイトカイン、マイクロ RNA 等の検討をするための臨床研究を開

始し一部のデータを解析した。今年度は解析対象の大幅な拡大を行い、これまでの30検体に対して、追加で254検体においてmiRNAの発現を検討した。現在、バイオインフォマティクス的手法を用いて、バイオマーカーの同定を行っている。これまでの結果として、ワクチンによる獲得免疫の誘導は自然免疫により調節されており、H5N1パンデミックワクチンの小児臨床試験の結果高い発熱率を示したものの良好な免疫応答を誘導していた。今回の研究でH5N1パンデミックワクチン(アルミ添加全粒子不活化抗原:WIV+Alum)はIFN- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ を誘導していることが高い発熱率を示したものの良好な免疫応答を示したことに関連すると思われる。

(2)上記のH5N1全粒子ウイルスおよびアラムアジュバントによる小児のみ、かつ1回目免疫のみでの発熱に関し、マウスでの再現実験を行うため新たにマウス体温と行動を計時的に記録する装置を開発した(特許取得済)。また、現在はマウスのみならず、フェレットを用いてインフルエンザワクチンと発熱を検討している。

・研究分担者(庵原 俊昭)

(1)2009/10シーズンに妊婦にインフルエンザワクチンを接種することで効果的な免疫誘導が確認できた。また、妊婦と同じレベルの抗体価が児に移行することを確認した。また、特別な有害事象は認められなかった。以上の結果から、妊婦にインフルエンザワクチンを接種することで、6ヶ月未満時児のインフルエンザ予防が期待される。

(2)今年度は、Hibワクチンと肺炎球菌結合型ワクチン(PCV)同時接種翌日に発熱した8例を対象に発熱の誘因を検討した。8例中6例は好中球増多を伴う白血球数の増加があり、CRPは0.7~2.3

と少し上昇していた。

(3)2011/2012シーズンにおいて、2-フェノキシエタノールを防腐剤に入れたインフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーを発症した小児例が増加した。これら小児例を解析し結果、これまでのインフルエンザワクチンに対するIgE抗体を有している小児では、インフルエンザウイルス抗体が付着した好塩基球や肥満細胞が血中に存在しており、2-フェノキシエタノールによって好塩基球や肥満細胞が活性化されることで、アナフィラキシーを発症されたと推察された。

・研究分担者(清野 宏)

(1)ナノゲル型デリバリーシステムを用いて、インジウム標識<sup>111</sup>Inワクチンやアジュバントのマウス鼻腔上皮細胞等への挙動を検討したところ、マウス鼻腔上皮細胞上へのワクチンの保持時間の大幅延長という点で、CTと同様の効果が認められた。さらに、新たに開発した<sup>18</sup>F-PET、インジウム標識<sup>111</sup>In法を用いてワクチン、アジュバントの可視化解析に成功した。(Nochi T et al, *Nature Material* 2010, Tokuhara D et al *PNAS* 2010)

(2)本年度はインフルエンザウイルスとの混合感染が問題となっている肺炎球菌のワクチンを、ナノゲル化経鼻ワクチンの効果と安全性を示した(Kong et al., *Infect. Immun.* In press 2013)。

・研究分担者(長谷川 秀樹)

(1)高病原性鳥インフルエンザH5N1経鼻ワクチンの効果をカニクイザルを用いて調べた。

(2)経鼻投与インフルエンザワクチンにより、感染防御能力が1年以上持続する事、cladeの異なるワクチン株による交叉防御効果が有ること、さらに



clade の異なるワクチン株による追加免疫により広い交叉防御効果が有ることがカニクイザルで示された。

(3) 本年度はインフルエンザワクチン接種において、以前のウイルス感染歴、またはワクチン接種歴が与える影響を検討した結果、現行のワクチン接種では新しい抗原性を有するウイルスが流行した際に、効果が得られない可能性が示唆された。

・研究分担者(迫田 義博)

(1)H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原変異株が、鶏にワクチンを接種している国で出現している。我々は、グローバルサーベイランスを実施し、これらの抗原変異株を分離・同定した。これらの抗原変異株に対して、現在国内に備蓄されている H5 亜型鳥インフルエンザワクチンの発症防御効果が十分でないことを明らかにした。その理由として、抗原変異株と従来のワクチン株 (Vac-3 株) との間に大きな抗原性のずれがあることがわかった。今後の鳥インフルエンザのワクチン戦略としては、従来の Vac-3 ワクチンの抗原量を増やすか、もしくは抗原変異株をワクチン株として追加した 2 価ワクチンを準備する必要がある。

(2) 本年度は国内外で分離された、H5N1 ウイルスの遺伝子と抗原性の解析を行った。A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1) 株から不活化全粒子ワクチンを作製し、経鼻接種によりマウスを免疫後、これらの抗原変異株で感染実験を行った。その結果、今回用いた H5N1 抗原変異株に対しても不活化全粒子ワクチンは効果的な免疫応答を誘導する事が示された。

#### D. 考察

期待される成果：

1) 関連する世界的な先端研究を推進している免

疫学、ワクチン学、感染症学、小児科学専門家がマトリックス状に研究を展開するテーマを核として、他の厚労科研関連研究班や異分野の研究者とも積極的交流を図る。実際に現在バイオインフォマティクス分野と共同研究により、インフルエンザワクチンの安全性、有効性のバイオマーカー探索を行っている。その結果、次世代型インフルエンザワクチン開発研究者クラスターが形成され、安全性や有効性の確立した新たなワクチン研究のブレイクスルーと効率のよいワクチン開発が期待される。

2) 本研究で得られた知見や知識を、公開討論やワークショップなどを科学者、一般向けに開催して議論を深めるとともに啓蒙を図る。その結果として国民に対し、インフルエンザワクチンによる国の感染対策を「基礎と臨床のエビデンス」に基づいた理論基盤に基づいて提供することが可能になると期待される。

今後の課題：

<課題 1：ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤構築>

生体、特に経鼻的に免疫した際のワクチンを取り込む細胞はなにか、アジュバントの自然免疫シグナルを伝える細胞がなにかを同定し、また、どのようなエフェクター因子（液性因子、細胞間相互作用を含む）が関与しているか、免疫学的、分子生物学的手法を用いて解析する。

<課題 2：注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築>

マウスとヒトの鼻腔、口腔のワクチン免疫機能の相違点や上気道、下気道の感染免疫、ワクチン免疫機構の解明を分子生物学的手法、細胞免疫学的手法なども用い行う。具体的には インジウム標識<sup>111</sup>In と 18F 蛋白 PET を併用して、最初に

マウスを用いてワクチンとアジュバントの体内動態・脳内移行を試験するほか、上記試験系を駆使して、ヒトに近いサルを用いてワクチンとアジュバントの体内動態・脳内移行を試験する。

＜課題 3：ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用＞  
H5N1のワクチンにおいてCladeの異なるワクチンの接種順序により交叉防御能が変わるかどうかといった問題に対し、マウスを用いた実験系で接種順序による交叉防御能の違いを皮下接種及び経鼻接種を比較する事により検討を行う。

＜課題 4：ワクチンアジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索＞  
H5N1のワクチンの小児臨床試験で見られた発熱者の血清を使用して、その原因を探るため血中の炎症性・発熱性サイトカイン、miRNA等の解析を行い、発熱との関連性を明らかにする。

＜課題 5：ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究＞

種々のH5N1ワクチンの形態（全粒子不活化、全粒子不活化+アルミアジュバント、スプリット、その他）を作製し各年齢層のヒト末梢リンパ球を培養しワクチン抗原で刺激し産生されるサイトカインを網羅的に解析する。

## E. 結論

平成 22 年度の中途にて分担研究者であり、インフルエンザワクチンの臨床研究で世界的な権威でもあられる神谷齋先生が急逝された。その後神谷先生の遺志を引き継ぐべく、平成 23 年度はますます本研究班の発展にまい進したつもりである。平成 24 年度は最終年度という事もあり、より一層インフルエンザワクチンのあり方に関して研究、議論を行って来た。それらの結果として、研究班のチ

ームワークが実を結び、神谷先生の臨床研究から生まれた成果を Vaccine 誌に 1 本、論文を投稿することが出来たのがもっとも特筆すべき点である。また、Vaccine 誌に 2 本インフルエンザワクチンの総説も投稿する事が出来た。上記に示すような多くの成果が各分担研究者のグループより出され、最終年度として、研究に邁進出来たと考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表などの成果

- ・ 研究代表者(石井 健)

### 【国際学会：招待講演】

4月27日～29日 IMMUNOLOGY&IMMUNOGENETICS CONGRESS 2012 (トルコ アンタリア) “Extracellular nucleic acids in Immunity”

5月4日 GIGA DAY (The GIGA-Research Center ブリュッセル) “Nucleic acid sensing in immunity”

6月6日～8日 Asia-Pacific Congress of Medical Virology (オーストラリア アデレード) “Making immune sense of nucleic acids in inflammation and vaccination”

6月12日～14日 6th Annual World Vaccine Congress Asia 2012 (シンガポール)

“Innovative vaccine design: Important chemistry, manufacturing and controls (CMC) issues in adjuvant development”

7月9日～10日 GTC meeting for Influenza Research & Development (アメリカ サンフランシスコ) “Innate Immune Regulation of Influenza Vaccination by Endo and Exo-genous Adjuvants”

10月14日～16日 6th Vaccine & ISV Annual Glo

bal Congress (国際ワクチン学会) (中国 上海) “Making immune sense of nucleic acids in inflammation and vaccination”

2012年12月5日～7日 20th Anniversary Meeting  
DNA VACCINES 2012

「Intra-and Inter-Cellular Signaling Pathways for DNA Vaccines」

2013年3月25日～28日 Foundation Mérieux Conference (メリュー財団国際シンポジウム) ‘Therapeutic Vaccines: Reprogramming Immunity in Infectious Diseases, Allergy and Cancer’ (フランス アネシー) “Biomarkers and molecular mechanisms of vaccine adjuvant”

#### 【国内学会：招待講演】

6月28日～29日 7th RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2012 (パシフィコ横浜)

「Making immune sense of nucleic acids in inflammation and vaccination」

7月4日～5日 第28回日本DDS学会学術集会 (札幌コンベンションセンター)  
ワークショップ「ワクチンとDDS」

7月26日～27日 第16回日本がん免疫学会総会 (北海道大学 学術交流会館)  
ワークショップ「アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政まで」

7月30日～31日 第12回遺伝子・デリバリー研究会・夏季セミナー (かんぼの宿 北九州市)  
「免疫制御を目的とした核酸医薬の開発研究」

10月16日～19日 第34回内藤コンファレンス (札幌)  
「Immunobiology of nucleic acids and their metabolites」

11月17日～18日 第16回日本ワクチン学会学術集会 (パシフィコ横浜)  
「DDS機能をもったアジュバントの開発研究」

2013年1月29日 第1回免疫記憶—ワクチン国際研究会

「Biomarkers and mechanism of vaccine adjuvants」

2013年3月18日～20日 第86回日本細菌学会総会  
「アジュバント開発研究の最前線」

#### 【学会以外の講演会、セミナー等】

5月23日 ワクチンの市場・技術動向と開発・事業戦略 (東京・ゆうぼうと)

「ワクチンの非臨床～臨床試験の進め方と審査対応」

6月2日 第162回東三河小児科医会学術講演会 (ホテルアソシア豊橋)  
「ワクチンアジュバント開発研究の新展開」

7月23日～26日 第14回免疫サマースクール2012 (ラフォーレ那須)

座長「免疫病：研究から臨床へ、そして又研究へ」

8月31日 BD学術セミナー (マンダリンオリエンタル東京)

「細胞外核酸の免疫認識機構とその臨床応用」

11月19日 Wako ワークショップ 一次世代感染症ワクチンの開発をめざして—  
(ポスト日本ワクチン学会シンポジウム・サテライトシンポジウム)

「細胞外核酸の認識構造とそのワクチン、アジュバントへの応用」

2013年2月9日 第10回日本免疫治療学研究会学術集会 (東京ガーデンパレス)

「自然免疫シグナルを利用した新規アジュバント開発」 (小檜山 康司)

2013年2月12日 メディバイオ事業研究会 発会記念講演会

「ワクチン開発研究の新展開 自然免疫の次は？」

2013年2月27日 富山化学研究会

「ワクチン開発研究の新展開 自然免疫の次は？」

#### 【学術論文(英文・すべて査読付)】

1. Tang CK, Aoshi T, Jounai N, Ito J, Ohata K, Kobiyama K, Dessailly BH, Kuroda E, Akira S, Mizuguchi K, Coban C and Ishii KJ The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant *PLOS one* 2013 In press
  2. Kuroda E, Coban C, Ishii KJ Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings and future prospects. *Int. Rev. Immunol.* 2013 In press
  3. Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 110(8):2969-74.
  4. Jounai N, Kobiyama K, Takehita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 2 (168) 1-13.
  5. Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 4;9 (2) 1-8.
  6. Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, Ishii KJ, Yokoyama M. Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. *J Control Release.* 2013 Feb 10;165(3):183-90.
  7. Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell Host Microbe.* 2012 Nov 15;12(5):705-16.
  8. Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children. *Vaccine.* 2012 Oct 24.
  9. Tetsutani K, Ishii KJ. Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine.* 2012 Oct 19.
  10. Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, Sakurai F, Kawabata K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. Type-I IFN signaling is required for the induction of antigen-specific CD8(+) T cell responses by adenovirus vector vaccine in the gut-mucosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Aug 17;425(1):89-93.
  11. Desmet CJ, Ishii KJ. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jun 22;12(7):479-91.
  12. Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine.* 2012 Jun 6;30(26):3885-90.
  13. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Jul;130(1):184-94.e11.
- 【総説および書籍】
- 英文書籍
- 1 Book "Biological DNA Sensor: The Impact of Nucleic Acids on Diseases and Vaccinology" edited by Tang CK and Ishii KJ *Elsevier Inc.* In press 2013
- 日本語総説
1. 城内 直、石井 健. 「感染と免疫」 *Medicina* 2013,50(3):406-411
  2. 大西 元康、石井 健. 「ワクチン（アジュバント）デザインの展開」 *医薬ジャーナル* 2013,49(2):699-705

3. 石井 健.「トップランナーに聞く 核酸による自然免疫および獲得免疫の制御機構の研究と核酸アジュバントのワクチンへの応用研究」 最新医学 2013,68(2):107-111.
4. 鉄谷耕平、石井 健.「ワクチンアジュバントの現状と展望。」レギュラトリーサイエンス学会誌 2012, 2(2): 149-158.
5. 鉄谷耕平、石井 健.「アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政。」ファームテックジャパン 2012,28(4): 45-52.
6. 小檜山康司、石井 健.「自然免疫メカニズムを利用するワクチンアジュバント開発。」THE LUNG 2012 20(4):54-61.
7. 城内 直、石井 健.「細胞外核酸の生物学的意義と臨床応用。」実験医学増刊 2012 vol.30 No.20 p209(3367)-216(3374).
8. 黒田悦史.「粒子アジュバントのメカニズム。」実験医学増刊 2012 vol.30 No.20 p203(3361)-208(3366).
9. 石井 健.「感染・共生・生体防御研究から生まれる新たな疾患予防、治療法ターゲット。」実験医学増刊 2012 vol.30 No.20 p172(3330)-175(3333).
10. 石井 健.「宿主の生体バリア -腸管、肺、皮膚における新たな免疫細胞とその機能。」実験医学増刊 2012 vol.30 No.20 p134(3292)-137(3295).

課題 1. ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤

課題 2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性と安全性における相違点の理論基盤構築

### ワクチンによる発熱機構に関する研究

研究分担者 石井健 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究協力者 青枝大貴 同上 主任研究員

#### 研究要旨

アジュバント添加ワクチン接種による発熱は副反応として比較的高頻度に認められ、アジュバント添加ワクチンの安全性を考えるうえで重要であるが、発熱が獲得免疫誘導にどのような影響を与えるのかなどの基礎的な部分についても不明な点が多い。現行のワクチン製剤による発熱試験はウサギを用いて行われており、投与後わずか 3 時間の発熱状況のみが試験され、臨床上認められる 24 時間から 72 時間後の発熱については検査されておらず、アジュバント添加ワクチンの安全性を総合的に評価可能な動物実験システムの開発が望まれる。本研究では、アジュバントおよびアジュバント添加ワクチンの安全評価に寄与するべく、マウスを用いた非侵襲的かつ連続的な体温および行動モニタリングシステムを開発した。

#### A. 研究目的

アジュバントおよびアジュバント添加ワクチンの安全性評価研究の基盤として、マウスを用いて非侵襲的かつ連続的に体温および行動をモニタリングするシステムを開発する。

#### B. 研究方法

我々が開発したサーモグラフィーカメラと飼育環境(音、光、環境温度)をコントロール可能な独自のシステムを用い、通常の飼育状態で複数のマウスを同時に何ら拘束することなく連続的にサーモグラフィーカメラで測定した。測定された最高温度をマウス体温として、また最高温度が記録された座標の時間あたりの移動変化量を行動指標として

時間軸に対してプロットした。 1)モデル発熱物質として LPS を、実際のワクチンとしてインフルエンザ全粒子ワクチンを投与した。2)また温度変化および行動変化のデータを客観的に評価可能な解析法を開発する目的で周波数分析を行った。3)インフルエンザ全粒子ワクチンによる発熱については、マウス以外のカニクイザル、ウサギ、フェレットについてもサーモグラフィーカメラを用いない方法で検討し、動物種による違いについても考察した。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、医薬基盤研究所および大阪大学微生物病研究所動物実験委員会規定に基

づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

### C. 研究結果

1) マウス背部を除毛し、かつ光と環境温度をコントロールできる密閉型のインキュベーター内でマウスを飼育し、その上部からサーモグラフィカメラで撮影することで、数日間にわたって連続的にマウス体温をモニタリングする測定システムを構築することが出来た(特願 2011-102045)。LPS(1ug)投与前と投与後の体温変化の測定例を図1に示す。LPS投与後の発熱は、約5時間後に一過性にピークを示し、その後少なくとも一週間にわたって再び発熱することはなかった。また、LPSによる体温の最高温度は、夜間活動期の最高温度を超えることはなかった。

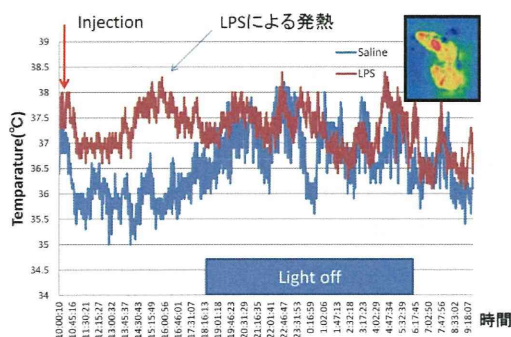


図 1. LPS 投与によるマウス体温変化

LPS 投与量を段階的に増加させて、体温及び行動変化を継続的に記録した。1ug および 10ug の LPS 投与では一過性の発熱および行動減少を認めるのみであるが、100ug 投与では長時間にわたる体温低下と行動減少を認めた。このことは重篤な敗血症で臨床的に認められる現象と非常に類似しており、サーモグラフィによる体温および行動測定モデルの有用性を示唆した(図 2)。

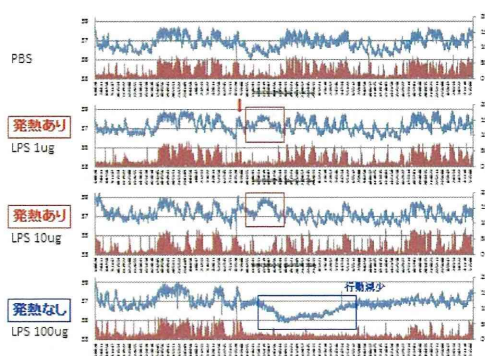


図 2. LPS 投与量によるマウス体温変化

2) 体温および行動変化をより客観的な指標を用いて解析することを目的に周波数分析を行った。周波数分析による解析では、一過性の発熱や行動変化を特徴的な周波数の消失として検出することが出来た(図 3)。

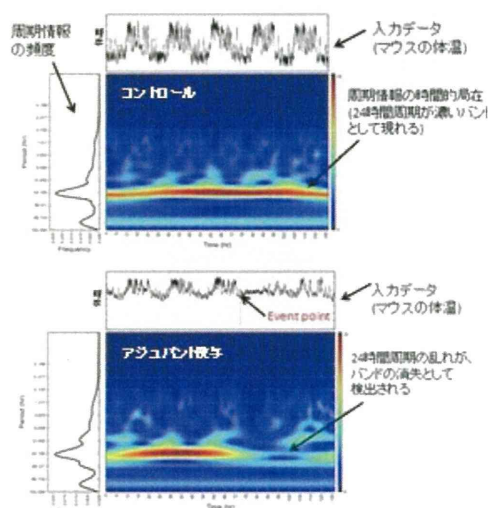


図 3. マウス体温時系列データの周波数解析

### D. 考察

本研究で開発・構築したマウス体温測定システムは、ハンドリングなどによる外的要因に影響されることなく、非侵襲的で経時的にマウス体温を測定することができ、ワクチン投与後の発熱反応測定に有用と考えられた。しかしながら、インフルエンザ全粒子ワクチン(H1N1 および H5N1)を

用いてマウスで同様の実験を行ったが数匹に一匹でわずかな発熱を認めるものも存在したが、確実に発熱を認める事例は観察されなかった。従ってヒト小児における H5 全粒子ワクチンの臨床試験で高頻度に見られた発熱については、少なくともマウスでは再現することは出来ないと考えられた。この結果をふまえ、マウス以外の動物種でインフルエンザ H5N1 全粒子ワクチン接種による発熱反応を検討したところ、カニクイザル、ウサギではマウス同様に明らかな発熱反応は認めなかったが、フェレットにおいては H5 全粒子ワクチン投与後に一過性の有意な発熱反応を認めた(参考図)。

	H5+Alum 1回目接種	H5+Alum 2回目接種
ヒト	あり	なし <small>(発熱程度に減少)</small>
カニクイザル	なし? <small>(明らかな発熱を認めず)</small>	—
ウサギ	なし	なし
フェレット	あり	なし <small>(発熱程度に減少)</small>
マウス	なし <small>(明らかな発熱を認めず)</small>	—

参考図. 動物種による発熱反応の違い

## E. 結論

我々の開発した体温測定システムは従来のウサギ発熱試験では測定出来なかった日単位での体温変化を非侵襲的に連続的に測定することができ、今後のワクチンの安全性評価や、発熱と獲得免疫反応の関連に対する基礎研究の進展に貢献すると考えられる。多くの生物種で共通の LPS に対する発熱反応については、マウスにおいても再現性よく評価出来るが、インフルエンザワクチンによる発熱については、マウスでは十分に評価出来ないことが示唆され、動物種による影響を考慮する必要があると考えられた。

## F. 研究発表

### 論文発表

- Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, Ishii KJ, Yokoyama M. J Control Release. 2012Dec3. Doi:pii:S0168-3659(12)00813-9. 10.1016/j.jconrel.2012.11.016.
- Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Cell Host Microbe. 2012;12(5):705-16. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.010.

### 学会発表

- PS[II]-42 Requirements of innate immune responses for CD8 T cell induction with infection and vaccination. Taiki AOSHI, Ken J ISHII. 第 34 回内藤コンファレンス(感染・炎症・免疫). 2012 年 10 月 16 日(火)~10 月 19 日(金) (札幌)

### 日本語総説

- 自然免疫と次世代ワクチン開発. 青枝大貴, 石井健. Drug Delivery System (0913-5006)27 巻 1 号 Page19-27 (2012.01)
- 自然免疫の関わる病態と治療への応用 自然免疫研究と次世代ワクチン. 青枝大貴, 石井健. 医学のあゆみ 243 巻 1 号 Page122-128



(2012.10)

書籍

3. 免疫学コア講義(第3版)(熊ノ郷淳, 阪口薫雄, 竹田潔, 吉田裕樹/編). ワクチン. 青枝大貴, 石井 健. 南山堂 2012年11月.
4. 免疫学 Update 分子病態の解明と治療への展開(審良静男, 熊ノ郷淳, 竹田潔/編). 第23章 ワクチン開発研究の展開. 青枝大貴, 石井 健. 南山堂 2012年12月

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許出願

実験用小動物のための体温測定装置および体温測定方法。青枝大貴、石井健、長谷田泰成  
特願 2011-102045.

課題 1. ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤

課題 2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性と安全性における相違点の理論基盤構築

研究分担者：清野 宏

東京大学医科学研究所 職名 所長・教授

#### 研究要旨

経鼻投与でのワクチン・アジュバンドの有効性、安全性を検証するために、蛍光標識、インジウム標識  $^{111}\text{In}$  法を用いて、経鼻ワクチンやアジュバンドのマウスでの副鼻腔上皮細胞、NALT、樹状細胞、中枢神経系への動態等を検討してきた。本年度はインフルエンザとの混合感染としても問題となる肺炎球菌に関して、その由来ワクチン候補抗原の PspA を用い、我々が開発したナノゲル化経鼻ワクチンの有効性と中枢神経系への動態を検討し、ナノゲル化経鼻ワクチンの効果と安全性を証明した。

#### A. 研究目的

経鼻ワクチン投与での防御免疫誘導効果と安全性を検証するために、経鼻ワクチンとして肺炎球菌の組換え PspA を使い、マウスでの経鼻ワクチンの効果と安全性を検討した。

#### B. 研究方法

経鼻ワクチンとして肺炎球菌の組換え PspA を用い、我々が開発したカチオン化ナノゲル経鼻投与方法 (Nochi et al., Nat. Mater. 9:572, 2010) を用いてワクチン効果並びに安全性を評価した。

#### (倫理面への配慮)

本研究の目的のために実施される動物実験計画は、東京大学医科学研究所、動物実験委員会への申請をもとに、倫理面を含む審査・承認を受けた。また、本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号 平成 18 年 6 月 1 日) に基づく研究施設の動物実験ガイドラインに則り、動物の保定法・麻酔

の方法・接種法・飼育観察法など、実験動物に対しての苦痛を可能な限り軽減できる方法で実施した。

#### C. 研究結果

#### ナノゲル型肺炎球菌の組換え PspA 経鼻ワクチン

カチオン化コレステロールプルランのナノ粒子 (cCHP) に PspA ワクチンを封入したナノゲル化経鼻ワクチンを開発した。

ナノゲルは蛋白分子をナノサイズのゲル内に取り込み安定化し、それを遊離することのできる人工シャペロン活性を持っており (Sasaki and Akiyoshi, Chem. Rec. 10: 366, 2010)、鼻腔上皮細胞に取り込まれた場合でも、容易に封入抗原が細胞内に遊離され、上皮細胞の下層の基底膜直下で、樹上細胞に取り込まれていることを FACS を用いて確認できた。そこで実際にマウスに経鼻免疫を実施した。1 週間隔で 3 回経鼻免疫し、免疫ごとに血清をとり、最終免疫 1 週間後に鼻洗浄液を集

め抗原特異的抗体価を測定した。cCHP-PspA ナノゲル投与群は、PspA 単独投与群に比して、抗原特異的な血清 IgG 抗体加えて、鼻粘膜での抗原特異的 IgA 抗体も高い値を示した。こうして免疫されたマウスは経鼻投与での肺炎球菌攻撃試験で完全な防御効果を示した。さらに、肺炎球菌ワクチンに関して同様にナノゲル化して、経鼻ワクチンとして有効であることを蛍光標識した肺炎球菌を用いた肺での菌増殖抑制効果により証明することができた。また  $^{111}\text{In}$ -PspA をナノゲル化して、マウスに経鼻投与することで、鼻腔上皮細胞（呼吸上皮細胞及び嗅覚上皮細胞）に長時間保持されるが、 $^{111}\text{In}$ -PspA の嗅球への移行は観察されなかった(Kong et al., *Infect. Immun.* in press, 2013)。以上 cCHP ナノゲルは経鼻ワクチンの DDS として極めて有用であることが判明した。

#### D. 考察

FITC または TRITC 蛍光標識、インジュウム  $^{111}\text{In}$  標識法により PspA をワクチン抗原とした経鼻ワクチンの効果と安全性について試験した。その結果、経鼻ワクチンの投与に関して鼻腔上皮細胞への長時間の滞留、吸着が免疫誘導において重要であることが判明した。従来から経鼻ワクチンの免疫誘導には NALT が重要であることがわかっていたが、本課題により副鼻腔粘膜上皮細胞からの抗原の取り込みの重要性が示唆された。このことは、NALT 並んで副鼻腔上皮細胞への抗原のデリバリーが経鼻ワクチンの有効性に重要であることを示している。

安全性の観点から、経鼻ワクチン DDS システムの開発において、鼻腔の呼吸上皮細胞への抗原送達・保持が重要であるが、一方で、同時に嗅覚上皮細胞を介して嗅球、大脳へのワクチンやアジ

ュバントの移行の可能性やその影響についても検討するシステムの確立が重要であると考えられた。

#### E. 結論

FITC または TRITC 蛍光標識、インジュウム  $^{111}\text{In}$  標識、を用いて経鼻ワクチンの効果と安全性を評価することができた。

#### F. 健康危機情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

○ Kim DY, Fukuyama S, Nagatake T, Takamura K, Kong IG, Yokota Y, Lee CH, Kiyono H. Implications of nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in the development of allergic responses in an allergic rhinitis mouse model. *Allergy* 67(4):502-9, 2012

Kunisawa J, Hashimoto E, Ishikawa I, Kiyono H. A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 7(2):e32094, 2012

○ Sato S, Kiyono H. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr. Opin. Virol.* 2(3):225-32, 2012

Yuki Y, Mejima M, Kurokawa S, Hiroiwa T, Kong IG, Kuroda M, Takahashi Y, Nochi T, Tokuhara D, Kohda T, Kozaki S, Kiyono H.

- RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine. *Vaccine* 13:30(28):4160-6, 2012
- Kunisawa J, Kiyono H. *Alcaligenes* is commensal bacteria habituating in the gut-associated lymphoid tissue for the regulation of intestinal IgA responses. *Front. Immunol.* 3:65, 2012
- Tanaka S, Saito Y, Kunisawa J, Kurashima Y, Wake T, Suzuki N, Shultz LD, Kiyono H, Ishikawa F. Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2ryKO mice. *J. Immunol.* 188(12):6145-55, 2012
- 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, Artis D. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 336(6086):1321-5, 2012
- Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, Tsuji NM, Kiyono H, Ma JS, Kusu T, Okumura R, Hara H, Yoshida H, Yamamoto M, Nomoto K, Takeda K. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* 8(5):e1002714, 2012
- Shibata T, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuchamy T, Izawa K, Li X, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Kunisawa J, Kiyono H, Akira S, Kitamura T, Kitaura J, Uematsu S, Miyake K. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. *Int. Immunol.* 24(10):613-23, 2012
- Kinoshita M, Kayama H, Kusu T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, Sakaguchi S, Takeda K. Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon. *J. Immunol.* 189(6):2869-78, 2012
- Kumagai T, Kiyono H. Summary for symposium I on the development of a more efficacious influenza vaccine held at the 15th Annual Meeting of the Japanese Society for Vaccinology, Tokyo, 2011. *Vaccine* 30(44):6338-9, 2012
- Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat. Commun.* 3:1034, 2012
- Nakajima-Adachi H, Koike E, Totsuka M,