

(横浜) 2012年11月

- 8) Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜) 2012年11月
- 9) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜) 2012年11月
- 10) 浅沼秀樹、相内 章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代眞人: 野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討。第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜) 2012年11月
- 11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内 章、藤本 陽、千葉 丈: インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜) 2012年11月

2. 実用新案登録

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)

長谷川秀樹、谷本武史

混合免疫賦活剤を含む新規ワクチン

出願番号 特願 2008-094360

出願日 平成 20 年 3 月 31 日

登録日 平成 25 年 2 月 8 日

経鼻インフルエンザワクチン等粘膜ワクチンの有効性に関する研究

研究分担者 奥野 良信（財）阪大微生物病研究会 観音寺研究所長

研究要旨：2012-2013 シーズン用季節性インフルエンザウイルスから免疫応答評価用のワクチン原液を作製した。作製したワクチン原液については、その品質管理試験及び安定性試験を行った結果、抗体価調査用として使用できることを確認し、国立感染症研究所に提供した。また、ワクチン原液からヒトへの投与を想定した経鼻投与用試作ワクチン製剤を作製し、非臨床試験（毒性・生殖発生試験、及び安全性薬理試験）を開始した。

A. 研究目的

- (1) 鼻粘膜における経鼻インフルエンザワクチンの有効性を判定する基準を作るための材料の提供
- (2) 有効な経鼻インフルエンザワクチンの開発に寄与する

インフルエンザワクチン原液に粘稠剤を加え、人体への投与を想定した剤型で非臨床試験用の経鼻投与用季節性インフルエンザワクチン製剤を調製した。

B. 研究方法

経鼻接種による免疫応答評価用インフルエンザワクチン原液の作製

2012/2013 冬シーズンの季節性インフルエンザワクチン株ウイルスである

- ・ A/California/7/2009 (H1N1) pdm09
- ・ A/Victoria/361/2011 (H3N2)
- ・ B/Wisconsin/01/2010 (山形系統)

の 3 株を用い、ホルマリンにより不活化した単味全粒子ワクチン原液を作製した。これを用いて、免疫応答評価用の 2 種類の 3 混ワクチン原液を調製した。

経鼻投与用試作ワクチン製剤の作製

上記の試験にて作製した単味不活化全粒子

経鼻投与用試作ワクチン製剤の GLP 試験

上記非臨床試験用ワクチン製剤を被験薬とし、毒性（単回投与、間歇投与）試験、生殖発生試験（受胎能および着床までの初期胚発生、出生前および出生後の発生並びに母体の機能、胚・胎児発生に関する試験）、及び安全性薬理試験（中枢神経系に及ぼす影響、心血管系および呼吸系に及ぼす影響）を開始した。本試験は、GLP 適合施設に実施を委託した。

（倫理面への配慮）

「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）に基づいた試験を行った。

C. 研究結果

経鼻接種による免疫応答評価用インフルエンザワクチン原液の作製

調製した2種のワクチン原液について、HA含量試験を行なった。2種類のワクチン原液のHA含量は、どちらも設定値±15%の範囲内であり、無菌試験も適合した。これらのワクチン100mLを国立感染症研究所へ発送した。

経鼻投与用試作ワクチン製剤の作製

作製した経鼻投与式季節性インフルエンザワクチンの品質管理試験を行なった。HA含量試験、チメロサル含量試験、浸透圧試験、性状確認試験、エンドトキシン試験、pH試験、粘度測定試験については事前に設定していた規格値の範囲内の成績が得られた。また、常温における光安定性については48時間安定であり、無菌試験にも合格したため、非臨床試験に使用できるものと判断した。

経鼻投与用試作ワクチン製剤のGLP試験

GLP適合施設下で各試験における投与が終了し、分析及び成績の取り纏めを行っている。被験物質の1回あたりの投与量は、成人の体重(50kg)あたりの予定臨床投与量の数十倍に相当するが、現在までのところ、被験薬に起因する有害な影響は報告されていない。

D. 考察

昨年までに報告した試験から、抗原を全粒子ワクチンとし、粘稠剤を添加した製剤とすれば、鼻腔粘膜のIgA抗体、血清のIgG抗体の両方を感染防御レベルまで誘導させることが可能であることが明らかとなっている。こ

れをもとに、今回は季節性インフルエンザに対するワクチン原液を作製し、抗体価調査用として提供するとともに、非臨床試験用として人体への投与を想定した剤型の試作ワクチン製剤を作製した。ワクチン原液、試作ワクチン製剤とも規格値に合格したため、それぞれの目的に使用可能であると判断し、これらを用いた試験を進めている。

E. 結論

本研究において作製した、全粒子インフルエンザワクチン原液、及び経鼻投与用季節性インフルエンザワクチン製剤は事前に設定した規格値に適合した成績であり、抗体価調査、非臨床試験に使用できるものであった。今後は、

- (1) 抗体価調査において有用な成績を得る
 - (2) 非臨床試験において安全であることを確認する
 - (3) 非臨床試験に用いた試作ワクチン製剤を用いた動物実験により、用法・用量・有効性の根拠となる成績を集積する
- 等の検討を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

経鼻インフルエンザワクチン接種で誘導される 抗体産生細胞の評価に関する研究

研究分担者： 田代 真人（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター長）

協力研究者： Elly van Riet（国立感染症研究所 感染病理部、インフルエンザウイルス研究センター）

相内 章（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター）

研究要旨：インフルエンザウイルスの感染を阻止できる分泌型 IgA 抗体を気道粘膜上に誘導する経鼻インフルエンザワクチンは、現行の注射型ワクチンに比べて効果が高いと考えられている。有効性の高いワクチンには、長期にわたって抗体を産生し続ける抗体産生形質細胞と、ウイルスの侵入の際に直ちに抗体応答を誘導できる記憶 B 細胞の誘導が重要であると考えられている。経鼻インフルエンザワクチン接種を受けたヒトにおいて、鼻腔粘膜上の抗体応答を含め、これら免疫細胞の動態は現在のところ明らかになっていない。本研究では、全粒子不活化インフルエンザワクチンの経鼻接種を受けた健康人ボランティアにおいて、ワクチン接種により獲得される抗体産生形質細胞と記憶 B 細胞を評価することを目的とした。

A. 研究目的

現行の注射型インフルエンザワクチンは、血中のみに IgG 抗体を誘導し、感染に伴う発症および重症化を防ぐことに有効であることが知られている。現在、実用化に向けて研究が進められている経鼻インフルエンザワクチンは、血中の IgG 抗体に加えて感染の場となる上気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することで、感染自体を阻止することができる。この分泌型 IgA 抗体応答に関しては、マウスを用いた実験において明らかにされているが、ヒトにおいてその詳細はまだ明らかになっていない。

インフルエンザウイルス感染の阻止、発症あるいは重症化を低減するためには、ワクチンによりウイルス特異的抗体を効率よく誘導でき

ることが重要となる。抗体誘導を目的とするワクチンには、長期にわたり存在し特異的抗体を持続的に産生する形質細胞と、ウイルスの侵入の際に直ちに抗体産生を誘導可能な記憶 B 細胞を誘導できることが求められる。マウスを用いた経鼻インフルエンザワクチンに関する研究では、ウイルス特異的な抗体産生形質細胞に関する継時的な解析、これら形質細胞や記憶 B 細胞が所属する組織等の解析が行われてきた。しかしながら、ヒトにおけるこれらの解析は遅れており、未だに不明な点が多い。

経鼻インフルエンザワクチンの実用化を考えた時に、最終的に得られる抗体応答の評価が最も重要ではあるが、免疫担当細胞の評価は本ワクチン接種法の有効性を科学的に補完する

ために必要であると考えられる。そこで本研究では、不活化全粒子インフルエンザワクチンの経鼻接種を受けた被験者において、抗原特異的な抗体を産生する形質細胞と記憶 B 細胞の解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) ワクチン接種と末梢血リンパ球の回収

本研究班の代表研究者が行う経鼻インフルエンザワクチン臨床研究において、被験者である健康人ボランティア 50 名のうち、10 名（男性 8 名、女性 2 名）にワクチン接種後の末梢血の提供をお願いした。本臨床研究では、接種（片鼻 250 μ l、計 500 μ l）あたり 45 μ g のヘマグルチニン（HA）を含有する全粒子不活化ワクチン X-187（A/Victoria/210/09(H3N2)由来；阪大微生物病研究会）が 3 週間間隔で 2 回、経鼻接種されている。初回ワクチン接種前（Day0）、初回ワクチン接種 10 日後（Day10）、2 回目ワクチン接種前（Day21）、2 回目ワクチン接種 10 日後（Day31）および 2 回目ワクチン接種 3 週間後（Day42）に、末梢血を提供して頂き、血球分離溶液 Lymphoprep™を用いて末梢血リンパ球を回収した。なお、本臨床研究は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得ている。

2) 抗体産生形質細胞の定量

ワクチン X-187 特異的な抗体を産生する形質細胞の測定は、ELISPOT 法により測定した。抗体産生形質細胞の解析には、Day10 と Day31 に提供頂いた末梢血（4 名）を用いた。抗ヒト Ig 抗体あるいは接種に用いたワクチン X-187 をコーティングしたマルチスクリーンプレート（Millipore, MSIP S4510）に、調製した末梢血リンパ球をウェルあたり 2×10^5 細胞を播き込み、約 6 時間インキュベートした。その後、

細胞を洗い流したプレートに関してビオチン化抗ヒト IgA 抗体あるいは抗ヒト IgG 抗体の反応、続いてアルカリフォスファターゼ標識アビジンの反応を行い、BCIP/NBT 基質を用いて各アイソタイプの抗体産生細胞の検出を行った。スポットの数を数えることで、播き込み細胞数あたりの抗体産生細胞の割合を算出した。

3) 記憶 B 細胞の定量

記憶 B 細胞の解析には、Day0、Day21 そして Day42 に提供頂いた末梢血（10 名）を用いた。被験者から回収した末梢血リンパ球を試験管内で刺激し、この刺激に応じて抗体を産生する細胞を記憶 B 細胞とした。被験者から採取した末梢血リンパ球を 24 ウェルプレートに 5×10^5 細胞で播き込み、CpG-ODN 2006（終濃度 3 μ g/ml）、ヒト rBAFF（終濃度 20 ng/ml）と人 rIL-15（終濃度 5 ng/ml）を添加し、5 日間培養することで試験管内刺激を行った。上述の ELISPOT 法による抗体産生細胞の測定系において、この試験管内刺激を行った細胞を用いることで抗体を産生する細胞を記憶 B 細胞としてカウントし、評価を行った。

4) 中和抗体価と HI 抗体価の測定

血清および鼻腔洗浄液の中和抗体価と HI 抗体価の測定は、マイクロ中和試験あるいは通常の赤血球凝集反応阻止試験により行われた。マイクロ中和試験では、RDE 処理を行い段階希釈した血清あるいは鼻腔洗浄液と 100 TCID₅₀（50%組織培養感染量の 100 倍量）のウイルス液とを混合した抗原抗体反応液を MDCK 細胞に添加し、4 日間の培養後に細胞変性効果が確認できないサンプル最大希釈倍率の逆数を中和抗体価とした。赤血球凝集反応阻止試験では、RDE 処理を行い段階希釈した血清あるいは鼻腔洗浄液と 8HA 価のウイルス液と等量混合し

た抗原抗体反応液に 0.5%七面鳥血球を添加し、45 分後に赤血球凝集反応阻害がみられたサンプル最大希釈倍率の逆数を HI 抗体価とした。

上記抗体価に関しては、本研究班の代表研究者から対象となった 10 名分の結果を頂き、抗体産生形質細胞と記憶 B 細胞との関連を調べた。

C. 研究結果

今回の臨床研究(本研究班の代表研究者が実施)では、健常人ボランティア 50 名に対し、季節性インフルエンザウイルス全粒子不活化ワクチン X-187 (A/Victoria/210/09 由来) を 45 µg HA/dose の接種量で、3 週間間隔 2 回の経鼻接種を行った。

対象となる 10 名の被験者のうち 4 名に関して、ワクチン接種に伴う抗体産生形質細胞の解析を行った。ワクチン X-187 特異的抗体を産生する形質細胞は、IgG 抗体産生細胞は Day10 と Day31 において大きな差が見られなかったのに対し、IgA 抗体産生細胞は Day31 において若干上昇する傾向にあった(図 1)。次に、対象となる 10 名の被験者に関して、記憶 B 細胞の検討を行った。ワクチン接種前においては、ワクチン X-187 特異的 IgG 抗体を産生可能な記憶 B 細胞は少ないながらも 60%の被験者で測定可能であったのに対し、ワクチン特異的 IgA 抗体を産生可能な記憶 B 細胞は 1 名を除き検出できなかった。しかしながら、これらの IgG あるいは IgA 抗体を産生可能な記憶 B 細胞は、ワクチン接種に伴いその数が増加することが明らかとなった(図 2)。

上述のワクチン特異的抗体産生可能な記憶 B 細胞比率と中和抗体価(あるいは HI 抗体)との関係性を調べたところ、末梢血中の記憶 B 細胞数と血清あるいは鼻腔洗浄液中の中和抗体価(あるいは HI 抗体価)の間には相関関係

があることが示された。また、末梢血中に存在する IgA 抗体産生記憶 B 細胞数は、鼻腔洗浄液中の IgA 抗体応答と相関し、血清中の IgG 抗体応答とは相関しないことが明らかになった。

D. 考察

本研究では、全粒子不活化インフルエンザワクチンの経鼻接種を受けた被験者において、ワクチン接種により獲得される抗体産生形質細胞と記憶 B 細胞の評価を行った。末梢血中に誘導されるワクチン特異的 IgG 抗体産生形質細胞はワクチン接種に伴い目立った増加は認められなかったが、その存在比率は既に報告がある現行のワクチンによって誘導されるものと比較して大きな差は認められなかった。これに対し IgA 抗体産生形質細胞は、ワクチン接種に伴い増加することが示唆された。また末梢血中に誘導される IgG あるいは IgA を産生しうる記憶 B 細胞はワクチン接種によって増加することが明らかとなった。さらには、末梢血中に誘導される IgA 抗体産生記憶 B 細胞数は、鼻腔洗浄液中の IgA 抗体応答と相関することが明らかとなり、これを反映し中和抗体価(あるいは HI 抗体価)が増強された。経鼻インフルエンザワクチン接種により IgA 抗体を産生する形質細胞と記憶 B 細胞が誘導されることで、上気道での IgA 抗体の分泌が促進され、鼻腔粘膜上でのウイルスの中和が達成される関係性を裏付ける重要な知見であると考えられる。

本研究において、全粒子不活化ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチンは、ヒトにおいても有意にウイルス特異的抗体産生細胞を誘導可能であり、ウイルスに対する中和抗体および HI 抗体はこれら抗体産生細胞の誘導と相関していることが明らかとなった。

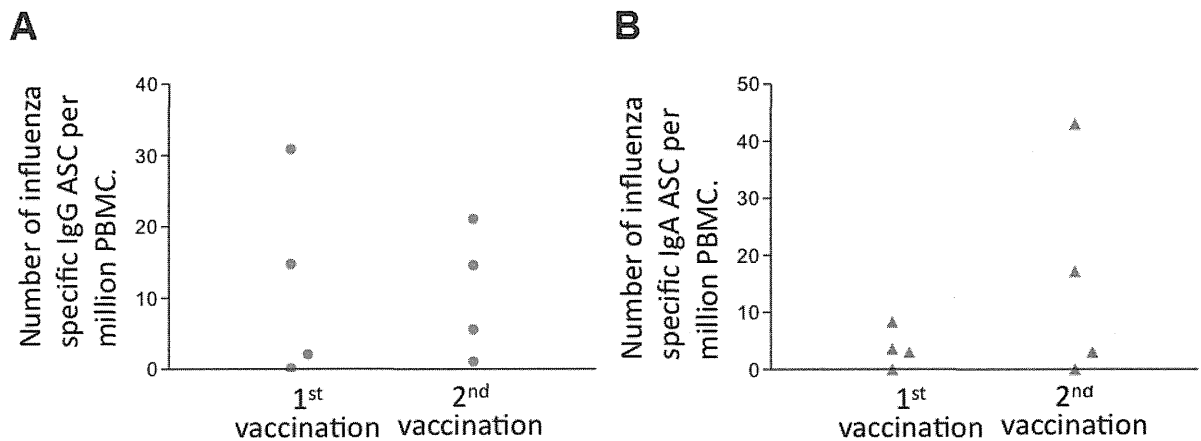


図 1. 末梢血中のワクチン X-187 特異的な抗体産生形質細胞の推移

末梢血中に存在するワクチン X-187 特異的な IgG 抗体産生形質細胞 (A) と IgA 抗体産生形質細胞 (B) の数を ELISPOT 法により評価した。4 名の被験者に関して、初回ワクチン接種 10 日後 (Day10) と 2 回目ワクチン接種 10 日後 (Day31) において、末梢血の提供を依頼しサンプルとした。

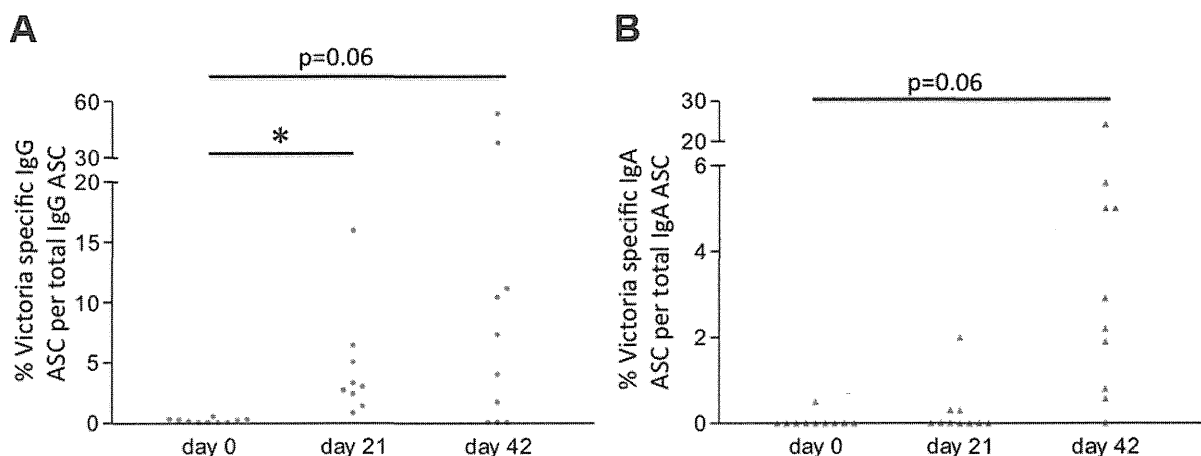


図 2. 末梢血中のワクチン X-187 特異的な抗体を産生可能な記憶 B 細胞の推移

末梢血中に存在するワクチン X-187 特異的な抗体を産生可能な記憶 B 細胞を ELISPOT 法により評価した。IgG 抗体産生記憶 B 細胞 (A)、IgA 抗体産生記憶 B 細胞 (B)。10 名の被験者に関して、初回ワクチン接種前 (Day0)、2 回目ワクチン接種前 (Day21) および 2 回目ワクチン接種 3 週間後 (Day42) において、末梢血の提供をお願いした。末梢血リンパ球は、CpG-ODN2006、ヒト rBAFF およびヒト rIL-15 の存在化で試験管内刺激を行い、サンプルとして用いた。

E. 結論

ヒトにおいて経鼻インフルエンザワクチンの実用化を考えた場合、ワクチンにより誘導される HI 抗体価あるいは中和抗体価の評価に加えて、体内で起きている免疫応答を正しく評価することはワクチンの有効性を示す上で重要である。鼻腔洗浄液を用いた抗体応答の評価は

サンプル調製に労力を有するため、鼻腔粘膜上の IgA 抗体および中和抗体と相関する末梢血中のワクチン特異的 IgA 抗体産生細胞の比率も合わせて評価することで、ヒトにおける経鼻インフルエンザワクチンの有効性を明らかにできると期待する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Transmission studies resume for avian flu.

Fouchier RA, García-Sastre A, Kawaoka Y, Barclay WS, Bouvier NM, Brown IH, Capua I, Chen H, Compans RW, Couch RB, Cox NJ, Doherty PC, Donis RO, Feldmann H, Guan Y, Katz JM, Kiselev OI, Klenk HD, Kobinger G, Liu J, Liu X, Lowen A, Mettenleiter TC, Osterhaus AD, Palese P, Peiris JS, Perez DR, Richt JA, Schultz-Cherry S, Steel J, Subbarao K, Swayne DE, Takimoto T, Tashiro M, Taubenberger JK, Thomas PG, Tripp RA, Tumpey TM, Webby RJ, Webster RG.
Science. 2013 Feb 1;339(6119):520-1.

Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay.

Takayama I, Nakauchi M, Fujisaki S, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T.
J Virol Methods. 2012 Dec 20;188(1-2):73-75.

A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs.

Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Sato H, Tashiro M, Imai M, Odagiri T.
Biochem Biophys Res Commun. 2012 Nov 3.
doi:pii: S0006-291X(12)02087-6.
10.1016/j.bbrc.2012.10.095. [Epub ahead of print]

Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-11.

Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T.
Virus Res. 2012 Sep 19. doi:pii: S0168-1702(12)00322-X.
10.1016/j.virusres.2012.09.004. [Epub ahead of print]

WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011.

Klimov AI, Garten R, Russell C, Barr IG, Besselaar TG, Daniels R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Smith D, Tashiro M, Xu X, Webby R, Wang D, Ye Z, Yuelong S, Zhang W, Cox N; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012.
Vaccine. 2012 Oct 5;30(45):6461-71. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.089.

Molecular analysis of genome of the pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus associated with fatal infections in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi prefectures in Japan during the first pandemic wave.

Obuchi M, Toda S, Tsukagoshi H, Oogane T, Abiko C, Funatogawa K, Mizuta K, Shirabe K, Kozawa K, Noda M, Kimura H, Tashiro M.
Jpn J Infect Dis. 2012 Jul;65(4):363-7.

Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010.

Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System.
PLoS One. 2012;7(5):e37568.

Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs.

Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T.
Clin Vaccine Immunol. 2012 Jun;19(6):897-908.

Antiviral effects of Psidium guajava Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition.

Sriwilajaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y.
Antiviral Res. 2012 May;94(2):139-46. doi: /10.1016/j.antiviral.2012.02.013.

Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010.

Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H.
J Med Microbiol. 2012 Jun;61(Pt 6):820-9.

2. 学会発表

パンデミック(H1N1)2009 の教訓と新型インフルエンザ事前準備・緊急対応体制の再構築
田代眞人
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

新しい薬剤耐性変異を持つ B 型インフルエンザウイルスの性状
藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、谷脇妙、徐紅、岸田典子、横山勝、佐藤裕徳、江島美穂、金南希、佐藤彩、土井輝子、伊東玲子、菅原裕美、田代眞人、小田切孝人
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

3 シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス
高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、金南希、佐藤彩、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、田代眞人、小田切孝人、全国地方衛生研究所
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

2011/12 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 24 年度のワクチン株
岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、金南希、佐藤彩、江島美穂、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代眞人、小田切孝人、全国地方衛生研究所
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

免疫抑制患者において薬剤投与後長期間排泄された A (H3N2) インフルエンザウイルスの解析
川上千春、高下恵美、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人、田代眞人
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断法の開発
影山努、高山郁代、中内美名、田代眞人、大場邦弘

第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響
山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、田代眞人、長谷川秀樹、田代眞人
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析
川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代眞人、長谷川秀樹
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果
池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代眞人、浅沼秀樹、長谷川秀樹
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

蛍光標識プライマーを用いた Direct RT-LAMP 法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築
高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代眞人、影山努
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

インフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞の評価
原田勇一、高橋仁、中村一哉、浜本いつき、Roth Bernhard, Trusheim Heidi、許斐奈美、浅沼秀樹、板村繁之、田代眞人、山本典生
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

インフルエンザ HA ワクチンにおけるワクチン製造株のアミノ酸変異による抗原蛋白経時安定性への影響
嶋崎典子、白倉雅之、信澤枝里、矢野茂生、板村繁之、田代眞人
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

無血清培地に馴化させた MDCK 細胞のインフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞としての検討
浜本いつき、原田勇一、中村一哉、高橋仁、許斐奈美、浅沼秀樹、田代眞人、山本典生

第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

インフルエンザワクチンシードウイルスに求められる遺伝的安定性の検討
高橋仁、原田勇一、中村一哉、浜本いつき、Bernhard Roth、Heidi Trusheim、板村繁之、田代真人、山本典生
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

孵化鶏卵分離、馴化に伴うインフルエンザワクチン株の抗原性変異と問題点
小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、田代真人
第 16 回日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析
鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹
第 16 回日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響
相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹
第 16 回日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination

Elly van Riet、Akira Ainai、Ryo Ito、Kyosuke Senchi、Tadaki Suzuki、Shin-ichi Tamura、Masato Tashiro、Hideki Hasegawa
第 16 回日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human

Hideki Hasegawa、Akira Ainai、Tadaki Suzuki、Shin-ichi Tamura、Masato Tashiro、Takeshi Kurata
第 16 回日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

H5N1 インフルエンザワクチン種株候補の抗原収量の検討

有田知子、白倉雅之、信澤枝里、田代真人
第 16 回日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討
浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人
第 16 回日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

なし

2. 実用新案登録

なし

脂質代謝系を介した自然免疫賦活により ワクチンの有効性を高める研究

研究分担者 新井 洋由 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究要旨：粘膜ワクチンの有効性に重要な自然免疫応答の制御機構は未解明な点が多い。本研究では脂質代謝系を介した自然免疫応答制御を解明することにより、粘膜ワクチンの有効性を高める創薬基盤を確立する。本年度は、哺乳動物培養細胞を用いて抗ウイルス応答に関与する細胞内シグナル伝達に対する Type 8 PLA₂ の関与を調べた。その結果、本酵素の発現抑制により RIG-I like receptor 経路の活性化の増強がみられ、一方本酵素の強制発現は同経路の活性化を抑制した。これらの結果から Type 8 PLA₂ は RIG-I like receptor 経路を負に制御する因子であることが明らかとなった。

A. 研究目的

粘膜ワクチンの有効性に重要な自然免疫応答の制御機構は未解明な点が多い。我々はこれまでに Type 8 PLA₂ という脂質代謝酵素を精製・クローニングし、機能解析を行ってきた。最近、Type 8 PLA₂ の欠損細胞ではウイルス感染時の I 型インターフェロン産生が増大することを見出し、本酵素が I 型インターフェロン応答の抑制因子であることが分かった。本研究では脂質代謝系を介した自然免疫応答制御を解明することにより、粘膜ワクチンの有効性を高める創薬基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

抗ウイルス応答に関与する細胞内シグナルにおける Type 8 PLA₂ の関与を調べるために、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞に Type 8 PLA₂ に対する siRNA、または Type 8 PLA₂ 強制発現ベクターをトランスフェクションし、RIG-I

恒常活性化体 (aa 1-229) による I 型インターフェロン応答を ISRE-Luc のレポーターアッセイにより調べた。また RIG-I 恒常活性化体による転写因子 IRF3 の活性化（二量体化）を Native-PAGE 後に抗 IRF3 抗体でウェスタンブロットティングすることにより検出した。

C. 研究結果

HEK293 細胞において、Type 8 PLA₂ を siRNA により発現抑制したところ、RIG-I 恒常活性化体の発現により誘導される I 型インターフェロン応答が有意に増強された。一方、Type 8 PLA₂ を強制発現させると、RIG-I 恒常活性化体による I 型インターフェロン応答は顕著に抑制された。同様の結果は、RIG-I like 経路を構成する分子である IPS-1/MAVS、IKKε、IRF3 の過剰発現による I 型インターフェロン応答においても得られた。また Type 8 PLA₂ の強制発現は、RIG-I 恒常活性化体による IRF3 の二量体化を抑制することもわかつ

た。Type8 PLA₂はN末端がミリスチル化されており、細胞質と膜の両方に存在する。Type8 PLA₂によるI型インターフェロン応答シグナルの抑制における酵素活性やミリスチル化の必要性を調べたところ、IRF3の過剰発現によるI型インターフェロン応答は酵素活性を欠失したType8 PLA₂ (S234C) やミリスチル化されないType8 PLA₂ (G2A) では抑制できなかった。

D. 考察

哺乳動物培養細胞を用いた解析から、Type8 PLA₂はRIG-I like receptor経路を負に制御する因子であることが明らかとなった。Type2 PLA₂の過剰発現はRIG-I恒常活性化体によるIRF3の二量体化を抑制したことから、RIG-Iの下流かつIRF3の上流においてType8 PLA₂が作用していることが示唆された。RIG-I like receptor経路はミトコンドリア外膜に存在するIPS-1/MAVSを介するシグナル経路である。Type8 PLA₂の作用には膜との相互作用に重要なミリスチル化が必要であったことから、ミトコンドリア膜上でRIG-I like receptor経路を制御していることが考えられる。またType8 PLA₂の作用において酵素活性の必要性も見出すことができた。本酵素の作用機構を詳細に解析するとともに、阻害剤の開発・応用も進めていきたい。

E. 結論

今回の哺乳動物培養細胞を用いた解析から、Type8 PLA₂はRIG-I like receptor経路を負に制御する因子であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

LPIAT1 regulates arachidonic acid content

in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. Lee HC, Inoue T, Sasaki J, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, Tanaka F, Udagawa O, Kono N, Itoh T, Ogiso H, Taguchi R, Arita M, Sasaki T, Arai H. *Mol. Biol. Cell.* (2012) 23:4689-700.

Depletion of *mboa-7*, an enzyme that incorporates polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol (PI), impairs PI 3-phosphate signaling in *Caenorhabditis elegans*. Lee HC, Kubo T, Kono N, Kage-Nakadai E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Inoue T, Arai H. *Genes. Cells.* (2012) 17:748-57.

Impaired retrograde membrane traffic through endosomes in a mutant CHO cell defective in phosphatidylserine synthesis. Lee S, Uchida Y, Emoto K, Umeda M, Kuge O, Taguchi T, Arai H. *Genes. Cells.* (2012) 17:728-36.

Subcellular localization of sphingomyelin revealed by two toxin-based probes in mammalian cells. Yachi R, Uchida Y, Balakrishna BH, Anderluh G, Kobayashi T, Taguchi T, Arai H. *Genes Cells* (2012) 17:720-7.

2. 学会発表

Nozomu Kono, Hiroyuki Ariyama, Rikuto Tanaka, Shinji Matsuda, Takao Inoue, Hiroyuki Arai (Dept of Health Chem, Grad Sch of Pharm Sci, Univ of Tokyo, 2 Dept of Metabolome, Grad. Sch. of Med., Univ. of Tokyo) 「Increased saturation of membrane phospholipids activates

unfolded protein response」 LIPID MAPS Annual Meeting (2012, 5/7-8, San Diego)

大場陽介 1、井上貴雄 1、櫻木健司 1、原直子 1、中臺枝里子 2、井上飛鳥 3、石原直忠 4、青木淳賢 3、三谷昌平 2、新井洋由 1 (1 東大院・薬、2 東女医大・医、3 東北大院・薬、4 久留米大・分子生命研) 「細胞内リゾホスファチジン酸によるミトコンドリアの形態制御」第 54 回日本脂質生化学会 (2012, 6/7-8, 福岡)

久保卓也 1、松田真治 1、河野望 1、中臺枝里子 2、三谷昌平 2、新井洋由 1 (1 東大・院薬・衛生化学、2 東女医大・医・第二生理) 「ホスファチジルイノシトールの特徴的な脂肪酸組成の生物学的意義」第 54 回日本脂質生化学会 (2012, 6/7-8, 福岡)

Kojiro Mukai 1, Nozomu Konou 1, Hiroyuki Arai 1 (1 東大院・薬・衛生化学) 「Analysis of type II PAF acetylhydrolase, an oxidized phospholipids-selective phospholipase」組織的若手海外派遣ヨーロッパシンポジウム (2012, 6/6-14, Kembridge, Oxford, Bonn)

Hiroyuki Arai (University of Tokyo) 「A new approach to study the functions of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in biological membranes」FASEB: Phospholipid Metabolism: Disease, Signal Transduction, and Membrane Dynamics (2012, 7/15-20, Vermont)

新井洋由 (東大院・薬・衛生化学) 「生体膜リン脂質脂肪酸鎖の飽和化/不飽和化に対する細胞応答」The 6th Diabetes Leading-edge Conference (2012, 8/11-12, 千葉)

北井祐人、田中陸人、有山博之、河野望、新井洋由 (東大院・薬・衛生化学) 「小胞体ストレス応答分子 IRE1 α を介した膜脂肪酸組成の恒常性維持機構」第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム (2012, 9/15-16, 福岡)

有山博之、河野望、新井洋由 (東大院・薬) 「飽和脂肪酸による小胞体ストレス応答活性化の意義」フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012, 10/25-26, 名古屋)

嶋中雄太 1, 河野望 1, 武富芳隆 2, 向井康治朗 1, 村上誠 2, 新井洋由 1 (1 東大院・薬・衛生化学, 2 東京都医学総合研究所) 「酸化リン脂質分解酵素 PAF-AH2 のマスト細胞の脱顆粒シグナルにおける役割」フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012, 10/25-26, 名古屋)

久保卓也 1, 松田真治 1, 井上貴雄 1, 中臺枝里子 2, 三谷昌平 2, 新井洋由 1 (1 東大・院薬・衛生化学、2 東女医大・医・第二生理) 「A new approach to study the functions of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in biological membranes」フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012, 10/25-26, 名古屋)

河野望 1, 田中陸人 1, 井上貴雄 1, 平田祐介 1, 中臺枝里子 2, 三谷昌平 2, 新井洋由 1 (1 東大・院薬・衛生化学, 2 東京女子医大・医・第二生理) 「小胞体ストレス応答分子 IRE-1 を介した飽和脂肪酸代謝制御」第 35 回日本分子生物学会年会 (2012, 12/11-14, 福岡)

北井祐人、田中陸人、有山博之、河野望、新

井洋由 (東大院・薬・衛生化学) 「小胞体ストレス応答分子 IRE1 α を介した膜脂肪酸組成の恒常性維持機構」 第 85 回日本生化学会大会 (2012, 12/14-16, 福岡)

山守なつみ 1、平田祐介 1、河野 望 1、田中陸人 1、井上貴雄 1、中臺枝里子 2、三谷昌平 2、新井洋由 1 (1 東大院・薬、2 東京女子医大・医) 「高度不飽和脂肪酸欠乏により活性化される MAP キナーゼ経路の熱ストレス応答における役割」 第 85 回日本生化学会大会 (2012, 12/14-16, 福岡)

久保卓也 1、李賢哲 1、河野 望 1、中臺枝里子 2、三谷昌平 2、新井洋由 1 (1 東大・院薬・衛生化学、2 東女医大・医・第二生理) 「ホスファチジルイノシトール脂肪酸転移酵素 MBOA-7 の欠損による PI3P シグナリングの異常」 第 85 回日本生化学会大会 (2012, 12/14-16, 福岡)

田中沙紀子、河野 望、新井洋由 (東大院・薬) 「Establishment and characterization of PUFA-depleted mammalian cell lines」 第 85 回日本生化学会大会 (2012, 12/14-16, 福岡)

新井洋由 (東大・院薬・衛生化学) 「膜リン脂質からみた新しい生体膜像」 第 85 回日本生化学会大会 (2012, 12/14-16, 福岡)

河野 望 1、嶋中雄太 1、武富芳隆 2、村上 誠 2、新井洋由 1 (1 東大・院薬・衛生化学、2

都医学研・脂質代謝プロジェクト) 「酸化リン脂質選択的ホスホリパーゼ PAF-AH2 のマスト細胞活性化シグナルにおける機能」 第 85 回日本生化学会大会 (2012, 12/14-16, 福岡)

Hiroyuki Ariyama, Nozomu Kono, Hiroyuki Arai (Dept. of Health Chem., Grad. Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo) 「Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response」 The 5th Global COE Retreat in Oiso (2012, 1/19-20, 神奈川)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T	Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam.	Mod Pathol	Nov 23 [Epub ahead of print]	doi: 10.1038/modpathol.2012.193.	2012
Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T	Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development.	Blood	120(24)	4733-43	2012
van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H	Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design.	Vaccine	30(40)	5893-900	2012
Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T	Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function.	ACS Chem Biol	7(3)	552-62	2012

<p>Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H</p>	<p>Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine.</p>	<p>J Med Virol</p>	<p>84(2)</p>	<p>336-44</p>	<p>2012</p>
<p>Fouchier RA, García-Sastre A, Kawaoka Y, Barclay WS, Bouvier NM, Brown IH, Capua I, Chen H, Compans RW, Couch RB, Cox NJ, Doherty PC, Donis RO, Feldmann H, Guan Y, Katz JM, Kiselev OI, Klenk HD, Kobinger G, Liu J, Liu X, Lowen A, Mettenleiter TC, Osterhaus AD, Palese P, Peiris JS, Perez DR, Richt JA, Schultz-Cherry S, Steel J, Subbarao K, Swayne DE, Takimoto T, Tashiro M, Taubenberger JK, Thomas PG, Tripp RA, Tumpey TM, Webby RJ, Webster RG</p>	<p>Transmission studies resume for avian flu.</p>	<p>Science</p>	<p>339(6119)</p>	<p>520-1</p>	<p>2013</p>
<p>Takayama I, Nakauchi M, Fujisaki S, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T</p>	<p>Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay.</p>	<p>J Virol Methods</p>	<p>188(1-2)</p>	<p>73-75</p>	<p>2012</p>

Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Sato H, Tashiro M, Imai M, Odagiri T	A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs.	Biochem Biophys Res Commun	Nov 3 [Epub ahead of print]	doi:pii: S0006-291X (12)02087-6. 10.1016/j.bbrc. 2012.10.095.	2012
Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T	Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-11.	Virus Res	Sep 19 [Epub ahead of print]	doi:pii: S0168-1702 (12)00322-X. 10.1016/j. virusres.2012. 09.004.	2012
Klimov AI, Garten R, Russell C, Barr IG, Besselaar TG, Daniels R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Smith D, Tashiro M, Xu X, Webby R, Wang D, Ye Z, Yuelong S, Zhang W, Cox N; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012	WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011.	Vaccine	30(45)	6461-71	2012
Obuchi M, Toda S, Tsukagoshi H, Oogane T, Abiko C, Funatogawa K, Mizuta K, Shirabe K, Kozawa K, Noda M, Kimura H, Tashiro M.	Molecular analysis of genome of the pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus associated with fatal infections in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi prefectures in Japan during the first pandemic wave.	Jpn J Infect Dis	65(4)	363-7	2012

Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System	Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010.	PLoS One	7(5)	e37568	2012
Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T	Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs.	Clin Vaccine Immunol	19(6)	897-908	2012
Sriwilaijaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y	Antiviral effects of Psidium guajava Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition.	Antiviral Res	94(2)	139-46	2012
Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H	Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010.	J Med Microbiol	61(Pt 6)	820-9	2012

Lee HC, Inoue T, Sasaki J, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, Tanaka F, Udagawa O, Kono N, Itoh T, Ogiso H, Taguchi R, Arita M, Sasaki T, Arai H	LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice.	Mol Biol Cell	23	4689-700	2012
Lee HC, Kubo T, Kono N, Kage-Nakadai E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Inoue T, Arai H	Depletion of <i>mboa-7</i> , an enzyme that incorporates polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol (PI), impairs PI 3-phosphate signaling in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	Genes Cells	17	748-57	2012
Lee S, Uchida Y, Emoto K, Umeda M, Kuge O, Taguchi T, Arai H	Impaired retrograde membrane traffic through endosomes in a mutant CHO cell defective in phosphatidylserine synthesis.	Genes Cells	17	728-36	2012
Yachi R, Uchida Y, Balakrishna BH, Anderluh G, Kobayashi T, Taguchi T, Arai H	Subcellular localization of sphingomyelin revealed by two toxin-based probes in mammalian cells.	Genes Cells	17	720-7	2012