

A/Victoria/361/11 (IVR-165) (H3N2) に対して HI 試験を実施した。

野外株に対する血清 HI 抗体価は EMA の有効性判断基準を全く満たせなかったのに対し、ワクチン製造株に対する血清 HI 抗体価は抗体保有率を満たすことが明らかとなった。ワクチン接種前後における血清 HI 抗体価幾何平均値の上昇倍率は、野外株とワクチン製造株で大きく変わることはなかったが、ワクチン製造株を使用した場合には HI 抗体価の値が高くなる傾向にあった (表 1)。このため、ワクチン製造株に対しては、抗体保有率の条件となる HI 抗体価 1:40 以上を示す被験者の数が増加したためと考えられる。このことは、発育鶏卵でワクチンを製造するために開発されたワクチン製造株に対して反応する抗体は誘導されているが、実際に流行しているウイルス株には反応する抗体は誘導できていない可能性を示唆している。今年度は実施できなかったが、A (H1N1) や B 型ウイルスに対しても同様の評価を行う予定である。また、経鼻インフルエンザワクチン接種により上気道に誘導される分泌型 IgA 抗体は、ヒトにおいても交叉防御能を有している

ことが期待されているので、今後鼻腔洗浄液に関して野外株とワクチン製造株に対する中和試験等で評価する必要があると考える。

近年、A (H3N2) ウイルス株に関しては、発育鶏卵で継代すると卵に馴化したウイルスに変化し、流行するウイルスと抗原性が著しく異なってしまうという報告がある。したがって、実際に流行しているウイルスに限りなく抗原性が近いとされる細胞により分離・継代されたウイルス株を用いた場合には、さらに血清 HI 抗体価が低い値を示してしまう可能性がある。細胞培養系により分離・継代され、且つ細胞培養系で製造されたワクチンを用いることで、このような抗原性の乖離の問題を克服できる可能性がある。

また、経鼻ワクチン接種に関しては、噴霧したワクチンの鼻腔粘膜上への滞留効率を向上させる粘稠剤 CVP 添加による効果を検討した。有意差は付かないものの CVP 添加経鼻ワクチン接種により、血清 HI 抗体価が上昇する傾向が認められた。CVP の添加は経鼻ワクチンの確実性を増す効果が有ると考えられる。

表 1. A (H3N2) 株に対して誘導された血清 HI 抗体価の評価

ワクチン抗原	接種	HI試験に用いたウイルス									
		A/Victoria/361/11					A/Victoria/361/11 (IVR-165)				
		GMT (ratio)		% of 4-fold increase	% of >40		GMT (ratio)		% of 4-fold increase	% of >40	
Pre	Post	pre	post		Pre	Post	pre	post			
3価HAワクチン	皮下	21.2 (1.00)	39.3 (1.86)	13.5	35.1	64.9	77.1 (1.00)	145.7 (1.89)	16.2	89.2	97.3
3価全粒子ワクチン	経鼻 (+CVP)	17.5 (1.00)	33.0 (1.89)	21.3	36.2	55.3	50.7 (1.00)	105.9 (2.09)	21.3	74.5	87.2
3価全粒子ワクチン	経鼻 (-CVP)	14.3 (1.00)	21.9 (1.53)	10.6	25.5	42.6	52.2 (1.00)	87.4 (1.68)	17.0	72.3	93.6

EMA による有効性判断基準【抗体変化率】【抗体陽転率】【抗体保有率】に関して、条件を満たす値を太文字で表示した。

## E. 結論

本研究では健常人ボランティアを募り、現行の3価季節性インフルエンザHAワクチン皮下接種と3価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種により誘導されるA(H3N2)株に対する血清HI抗体価を評価した。野外株とワクチン製造株の間に抗原性の乖離の可能性が考えられたが、粘稠剤CVPを添加した不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種は、現行のワクチンと同等の血清HI抗体を誘導することが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Aina A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(9):1962-70.
- 2) Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Aina A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine.* 2013;63(2):194-200.

### 2. 学会発表

#### 国際学会

- 1) Hasegawa H, Aina A, Suzuki T, van Riet E, Tamura S, Ikeda K, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy naïve

human adults. *Keystone Symposia 2014, Jan 2014, CO, USA*

- 2) Suzuki T, Kawaguchi A, Aina A, Tamura S, Ito R, Tashiro M, Hasegawa H. Impact of the quaternary structure of human Secretory-IgA on neutralization potency to Influenza A virus in upper respiratory tract. *Keystone Symposia 2014, Jan 2014, CO, USA*

#### 国内学会

- 1) 長谷川秀樹、相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅：高病原性鳥インフルエンザウイルスA(H5N1)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の効果。第17回日本ワクチン学会学術集会（津）2013年12月
- 2) 鈴木忠樹、川口 晶、相内 章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにより鼻腔粘膜上に誘導される多量体IgA抗体のウイルス感染防御における役割。第17回日本ワクチン学会学術集会（津）2013年12月
- 3) 相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に年齢、性別あるいは副反応が与える影響。第17回日本ワクチン学会学術集会（津）2013年12月

## 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

## 不活化全粒子ワクチンの開発

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 所長

**研究要旨** インフルエンザウイルスの細胞培養系における生産性の向上を目的として、使用する細胞の選抜、培地及び培養条件の検討を行い、生産能力の向上を試みた。経鼻インフルエンザワクチンに関する有効性、安全性、剤型等の諸検討に使用することを目的として、2013-2014 シーズンに対応した厚生労働省指定ワクチン製造ウイルス株に、B 型ビクトリア系統のウイルス株を加えた 4 価ワクチン原液を作製した。但し、今回は細胞培養系を用いた条件が確立していないことから、既承認の製法である発育鶏卵による培養法を用いた。

### A. 研究目的

- (1) インフルエンザワクチンの有効性と安全性の向上、及び副反応の削減
- (2) 免疫無垢な抗原（H5N1、H7N9 等）に対しても有効性が高いインフルエンザワクチンの開発

用ウイルスの培養を行い、試作ワクチンを作製した。これを当会で日本脳炎ワクチン用ウイルスの培養用に用いている Vero 細胞で培養したウイルスによる試作ワクチンと比較し、ワクチンの免疫原性やウイルス増殖性の観点から比較し、有用な細胞を検討した。

### B. 研究方法

使用する細胞の選抜、培地及び培養条件の検討

#### (1) 細胞の選抜

当会でワクチン生産用として所有している MDCK 細胞のマスターセルバンクから限界希釈法によるクローニング株を取得した。これらの細胞クローンから、最近のインフルエンザワクチン株に関する感受性をもとに 1 次・2 次選抜を行った。さらに、増殖性をもとに 3 次選抜を行った。

また、選抜された細胞によりワクチン

#### (2) 培地及び培養条件の検討

当会で細胞培養ウイルスによるワクチン生産用として用いている培地のほか、複数の培地を用い、細胞の増殖性の観点から有用な培地を検討した。

### 経鼻投与用試作ワクチン製剤の作製

2013-2014 シーズンに対応した厚生労働省指定ワクチン製造ウイルス株 A/California/7/2009 (H1N1) pdm09、A/Texas (テキサス) /50/2012 (H3N2)、B/Massachusetts/02/2012 (山形系統) の 3 株

と、B/Brisbane/60/2008（ビクトリア系統）の4ウイルス株を培養し、単味不活化全粒子インフルエンザワクチン原液を作製した。なお、現在は細胞培養法によるウイルス培養条件が確立されていないことから、今回のウイルス培養には発育鶏卵を用いた。

また、これらに粘稠剤として CVP（カルボキシビニルポリマー）基剤を加え、人体への投与を想定した剤型とした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作製した。

得られたワクチン製剤について、有効性を裏付けるため、マウスを用いた経鼻投与による免疫応答確認試験を実施した。試験に用いた被験ワクチンは上記4原液を含む4価ワクチンとし、粘稠剤として CVP（カルボキシビニルポリマー）基剤を含む経鼻投与型製剤とした。投与は麻酔下で行い、3週間間隔で2回実施した。2回目の投与から2週間後に採血と鼻腔洗浄液の採取を行った。

#### 不活化処理条件の検討

迷入ウイルスによる汚染の恐れを低減させるため、従来以上にウイルスの死滅が期待できる不活化処理条件の探索を実施している。

#### （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

使用する細胞の選抜、培地及び培養条件の検討

#### （1）細胞の選抜

MDCK 細胞のマスターセルバンクからクローニング株を取得した。この細胞クローンから、最近のインフルエンザワクチン製造株に関する感受性をもとに1次・2次選抜を行った。さらに、増殖性をもとに3次選抜を行い、ワクチン生産用細胞候補株を取得した。これらの細胞株から、ワクチン生産に準じた培養条件での増殖性、および安全性をもとに候補細胞株の絞り込みを行っている。

#### （2）培地及び培養条件の検討

細胞培養用培地について、これまで使用していたワクチン生産用細胞及び新規ワクチン生産用細胞株を用い、最も増殖性の良い培地の選抜を行い、その成績をもとに更なる培地組成の改良検討を行っている。

#### 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について、品質管理試験を行なった。たん白質含量試験、HA含量試験、チメロサル含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、エンドトキシン試験、pH試験、不活化試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験のうち、事前に規格値を設定していた試験については規格値の範囲内の成績が得られた。また、参考値としていたものについても、非臨床試験を含む経鼻投与型ワクチン製剤の開発検討用材料として使用に支障は無いものと判断した。

有効性を裏付ける免疫応答試験については、現在分析中である。

### D. 考察

現在データの集積中であるが、ワクチン生産に用いる細胞及び培地については、従来用いていたものよりも高い生産性が得られる候補の

絞り込みを行っており、大幅な改善が見込まれている。また、4価ワクチン化・経鼻製剤化についても支障となる事象はなく、免疫応答についても3価ワクチンと同様の応答が認められている。

以上のことから、細胞培養によるインフルエンザワクチンの生産、及び経鼻投与型製剤化、及び3価から4価とすることに大きな問題点はないものと考えられる。

## E. 結 論

本研究において、新規のワクチン生産用細胞及び培地の選抜、及び発育鶏卵培養による全粒子インフルエンザワクチン製剤の試作を行った。現在までのところ、開発に関して問題となる点は認められていない。今後は、

- (1) パイロットスケールにおける細胞培養によるワクチン生産法の検討
- (2) 細胞培養法によるワクチンについて、有効性・安全性を確認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

## Inflammasome の活性化によるインフルエンザウイルス特異的 免疫応答の制御機構の解析

研究分担者 一戸 猛志 東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター 准教授

**研究要旨** 本研究では、インフルエンザウイルス感染細胞において、NLRP3 はミトコンドリア外膜上の mitofusin 2 (Mfn2) と相互作用し、inflammasome を活性化していることを明らかにした。肺での inflammasome の活性化は、インフルエンザウイルス特異的獲得免疫応答の誘導に必要であることから、これらの知見は、経鼻インフルエンザワクチンの効果的なアジュバントの開発に役立つ可能性がある。

### A. 研究目的

Inflammasome によるインフルエンザウイルス認識機構と獲得免疫応答の制御機構を理解することにより、inflammasome 経路を活性化するような新しい粘膜ワクチンアジュバントを開発に役立てることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. マウス

6 週齢メス C57BL/6J マウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した。

#### 2. 細胞とウイルス

マウス骨髄マクロファージは、マウス骨髄を 10% FBS, 2 mM L-グルタミン、ペニシリン・ストレプトマイシン (P/S)、30% L929 培養上清を含む DMEM で 5 日間培養することにより調製した。J774A.1 マクロファージと HEK293T 細胞は、10% FBS P/S DMEM で維持した。ヒト THP-1 細胞は、10% FBS P/S RPMI1640 で維持した。

脳心筋炎ウイルス (EMCV) は、L929 細胞で

増やした。インフルエンザウイルス A/PR8 は、10 日発育鶏卵に接種後、35°C で 2 日間培養して増やした。V 欠損麻疹ウイルスは、Vero-SLAM 細胞で増やした。

#### 3. $\rho 0$ J774A.1 マクロファージの樹立

J774A.1 細胞を 10% FBS, pyruvate (100  $\mu$ g/ml)、ethidium bromide (100 ng/ml)、uridine (50  $\mu$ g/ml) を含む DMEM で 2 週間培養した。ミトコンドリア DNA の脱落は、マウス 18S リボソーム、マウスシトクロム c オキシダーゼ I 特異的なプライマーを用いた定量的 PCR により確認した。

#### 4. shRNA ノックダウン

標的配列は、Invitrogen BLOCK-iT RNAi Designer で設計した。shRNA 発現レトロウイルスを作製するため、20  $\mu$ g の pRS-shMfn2 または pRS-shEGFP と、2  $\mu$ g の pCVSV-G を platinum-GP 細胞へトランスフェクトした。培地を 6 時間後に交換し、トランスフェクト 48 時間後の培養上清を shRNA 発現レトロウイル

スとした。shRNA 発現 J774A.1 を作製するために、shRNA 発現レトロウイルスを 8  $\mu$ g/ml の polybrene 存在下で感染させた。感染 5 時間後に、細胞を PBS で洗浄し、polybrene を含む 10% FBS DMEM で 24 時間培養した。その後、0.5  $\mu$ g/ml の puromycin を含む 10% FBS DMEM で 3 週間培養し、Mfn2 ノックダウン細胞株を樹立した。Mfn2 のノックダウンは、Mfn2 特異的な抗体を用いた W. B. により確認した。

#### 5. ELISA

ウイルス感染後、18-24 時間後に培養上清を回収し、不要物を取り除くために 1,800rpm で 10 分間遠心したあとの培養上清をサイトカイン測定用のサンプルに使用した。マウス IL-1 $\beta$ 、IL-6 の測定に必要な、抗体は eBioscience より購入した。

#### 6. W. B.

細胞は、細胞溶解バッファー [50 mM Tris (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM EDTA、10% glycerol、protease inhibitor (Sigma)] で溶解した。細胞溶解液は、20,630 $\times$ g で 5 分間遠心した。遠心後の上清を、SDS loading buffer [50 mM Tris (pH 6.8)、100 mM DTT、2% SDS、0.1% bromophenol blue、10% glycerol] と混ぜて、5 分間煮沸した。これらのサンプルを 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で泳動し、PVDF メンブレン (Hybond-P, Amersham Bioscience) に転写後、メンブレンを 5% スキムミルクで 1 時間ブロッキング後、5% スキムミルクで希釈した特異的な抗体で一晩インキュベーションした。2 次抗体を反応させたあと、メンブレンを 0.05% Tween-PBS で 3 回洗浄後、Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque) で 3 分間反応させ、シグナルは LAS-4000mini (GE Healthcare) で検出した。

#### 7. Flow Cytometric Analysis

ミトコンドリア活性酸素種 (ROS) は、MitoSOX (Molecular Probes/Invitrogen) による染色により検出した。ミトコンドリアの膜電位は、2  $\mu$ M JC-1 (Molecular Probes/Invitrogen) の染色により検出した。フローサイトメトリーによる解析には、FACSCalibur (BD Bioscience) と FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Inc.) を使用した。

#### 8. ミトコンドリア分画の抽出

細胞を 1ml の homogenization buffer [20 mM Hepes (pH 7.5)、70 mM sucrose、220 mM mannitol] で懸濁し、27G 針と 1ml シリンジを用いて、30 回ピペッティングした。これを 800 $\times$ g で 5 分遠心して核を取り除いたあと、10,000 $\times$ g で 10 分間遠心して、沈殿したものをミトコンドリア分画とした。

#### 9. NLRP3 inflammasome の再構築系

発現プラスミド pCA7-NLRP3、pCA7-ASC、pCA7-procaspase-1、pCA7-pro-IL-1 $\beta$  を 24 ウェルプレートにまいた HEK293T 細胞へトランスフェクトした。トランスフェクト 24 時間後に培養上清を回収し、不要物を取り除くために 1,800rpm で 10 分間遠心したあとの培養上清をサイトカイン測定用のサンプルに使用した。

(倫理面への配慮)

本研究の関わる動物実験計画書は、東京大学医科学研究所動物実験委員会より承認を得た。

### C. 研究結果

ウイルス感染による IL-1 $\beta$  の産生においても、ミトコンドリア産生活性酸素種 (ROS) が必要であるかどうかを確かめるため、ミトコン

ドリアのROSを特異的に阻害するMito-TEMPO存在下での、ウイルス感染によるIL-1 $\beta$ の産生を調べた。ATP やMSUの刺激に対するIL-1 $\beta$ の産生は、これまでの報告通り、ミトコンドリアROSの阻害剤で完全に抑制された。これとは対照的に、麻疹ウイルス、EMCV、インフルエンザウイルス感染によるIL-1 $\beta$ の産生は、Mito-TEMPO存在下では抑制されなかった。このことから、RNAウイルスによるNLRP3 inflammasomeの活性化は、ミトコンドリアROS以外のメカニズムが存在していることが示唆された。

ウイルス感染によるinflammasomeの活性化にミトコンドリアROSの影響が認められなかったため、ミトコンドリアDNAを脱落させたマクロファージにおけるinflammasomeの活性化について調べた。マウスマクロファージ細胞株であるJ774A.1細胞をethidium bromideを含む培地で2週間培養し、ミトコンドリアDNAが脱落していることをcytochrome c oxidase Iと18S ribosomal RNAのDNAコピー数の比を定量的PCR法で確認した。これを $\rho 0$  J774A.1細胞とし、この $\rho 0$  J774A.1細胞にインフルエンザウイルスやEMCVを感染させると、親株のJ774A.1細胞と比べて、IL-1 $\beta$ の産生が有意に低下していることが分かった。JC-1染色によりミトコンドリアの膜電位を解析すると、 $\rho 0$  J774A.1細胞では、ミトコンドリアの膜電位が低下していた。このことから、ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化には、正常なミトコンドリア膜電位が必要であることが示唆された。

ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化にミトコンドリア膜電位が必要であるかどうかを確かめるために、脱共役剤であるcarbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)を処理することにより細胞のミトコンドリア膜電位を消失させた。この細胞にインフ

ルエンザウイルス、EMCV、麻疹ウイルスを感染させ、ウイルス感染24時間後の培養上清中のIL-1 $\beta$ をELISAで測定した。膜電位を消失したミトコンドリアはATP合成も抑制されるため、コントロールには、ミトコンドリアF1F0-ATPaseの阻害剤であるoligomycin B、あるいはミトコンドリアcomplex I (COXI)の阻害剤であるrotenoneを使用した。CCCP処理した細胞で、ミトコンドリア膜電位の消失していることをJC-1染色により確認した。この結果、CCCP処理によりミトコンドリア膜電位を低下させた細胞では、インフルエンザウイルス、EMCV、麻疹ウイルス感染後のNLRP3 inflammasome (IL-1 $\beta$ の産生やcaspase-1の活性化)が低下していることが分かった。このことから、ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化には、ミトコンドリア膜電位が必要であることが明らかとなった。

ミトコンドリアの膜電位が消失すると、連結したミトコンドリアの断片化が起こることが知られている。このことは、ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化には、連結したミトコンドリアが必要であることを示唆している。このミトコンドリア同士の連結には、ミトコンドリア外膜タンパク質のmitofusin 1/2 (Mfn1, Mfn2)が必要である。インフルエンザウイルスまたはEMCV感染細胞のlysateをMfn2特異的な抗体で免疫沈降すると、NLRP3が特異的に共沈してくることが分かった。CCCP処理によりミトコンドリア膜電位を低下させて細胞では、このNLRP3-Mfn2の相互作用が低下していたことから、ウイルス感染によるNLRP3-Mfn2の相互作用は、ミトコンドリア膜電位(連結したミトコンドリア)依存的であることが示唆された。

ウイルス感染によるNLRP3 inflammasome活性化におけるMfn2の役割を明らかにするため

に、Mfn2ノックダウンJ774A. 1細胞にインフルエンザウイルスまたはEMCVを感染させると、Mfn2ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較して、ウイルス感染24時間後の培養上清中のIL-1 $\beta$ が有意に低下していることが明らかとなった。このことから、ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化には、ミトコンドリア膜電位依存的なNLRP3-Mfn2の結合が必要であることが示唆された (図1)。

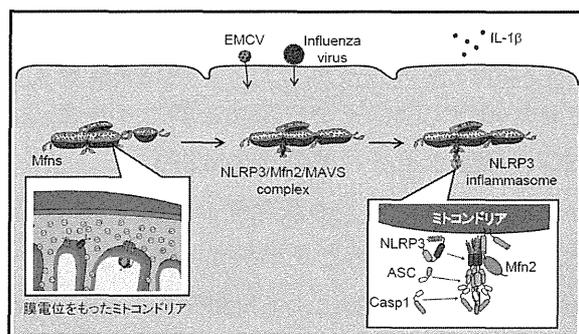


図1. ウイルス感染によるNLRP3 inflammasome 活性化のメカニズム

#### D. 考察

CCCPにより膜電位を消失させた細胞、ミトコンドリア同士の連結に必要なMfn2ノックダウン細胞では、ウイルス感染によるIL-1 $\beta$ の産生が有意に抑制された。このことからミトコンドリアの膜電位やMfn2は、ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化に必要であることが示唆された。インフルエンザウイルス感染による肺でのinflammasomeの活性化は、ウイルス特異的な獲得免疫応答の惹起に必要なものであるが、今回の研究成果は、ウイルス感染後の過剰な炎症反応を抑える治療薬の開発や、炎症を促進させることによりインフルエンザウイルスワクチンの効果を高めるようなアジュバントの開発につながる可能性がある。

#### E. 結論

ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化には、ミトコンドリアの膜電位(連結したミトコンドリア)と、ミトコンドリア外膜上でのNLRP3とMfn2の相互作用が必要であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamazaki T, Ichinohe T. Inflammasomes in antiviral immunity: clues for influenza vaccine development. Clin Exp Vaccine Res. 2014 Jan;3(1):5-11.
- 2) Ichinohe T, Yamazaki T, Koshiba T, Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 29;110(44): 17963-8.
- 3) 一戸猛志. インフルエンザウイルス認識機構と経鼻インフルエンザワクチン. 臨床とウイルス. 2013 Oct; 41(4): 212-21.

##### 2. 学会発表

- 1) 一戸猛志、山崎達也、小柴琢己、柳 雄介. ウイルス感染による mitofusin 2 依存的な NLRP3 inflammasome の活性化. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013 年 11 月
- 2) 山崎達也、上羽悟史、松島綱治、一戸猛志. 並体結合マウスを用いたインフルエンザウイルス特異的粘膜免疫応答の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013 年 11 月
- 3) 山崎達也、上羽悟史、松島綱治、一戸猛志. 並体結合マウスにおけるインフルエンザウイルス特異的粘膜免疫応答の解析. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 (三重) 2013 年 11 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## インフルエンザワクチンアジュバントの開発

研究分担者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科 教授

**研究要旨** 経鼻投与で分泌型 IgA の高産生を促進する免疫アジュバントを開発しインフルエンザワクチン HA 蛋白に最適な条件をマウス系で検討することを目指して系を作製した。

### A. 研究目的

現行のインフルエンザワクチンの問題点を克服した不活化全粒子経鼻ワクチンを開発し、供給を行う。そのために分泌型 IgA スイッチの効率的誘導と高い抗体産生に適した免疫アジュバントを開発することが本分担研究の使命である。特にトリインフルエンザ H5N1, H7N9 に対する抗体価を上げる自然免疫の戦略が必要になる。鶏卵でなく細胞培養系で作製した不活化全粒子インフルエンザワクチンと相性のよい免疫アジュバントを確立する。

### B. 研究方法

これまでの Alum, CpG などは基本的に DNA 型のアジュバントであった。本企画では抗体価、CD8 T 細胞の高誘導に最適のアジュバントの開発を目指す。初年度は RNA については *in vitro* 合成による試作品の抗体産生能をテストした。Pam2 は化学合成品を委託発注で作製した。他のコントロール DNA アジュバントは購入した。テストは OVA 抗原を用い、マウス (C57BL/6) で IgA、IgG 各サブセット、IgM、IgE を見た。TICAM-1, MyD88, IPS-1 の各 KO マウスを用い、抗体

産生が樹状細胞の如何なる経路に依存するかを検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト試料は使っていない。マウス実験は北海道大学の倫理指針(に順応)に従って行った。

### C. 研究結果

粘膜免疫の效果的誘導を図る目的で種々のアジュバントを用意し、マウス (C57BL/6) 鼻粘膜に抗原とともに投与している。アジュバントとしては Alum, polyI:C, Pam2 リポペプチド、CpG, をコントロールとし、Nanogel に包んだものと包まないものを抗原あり、無しの場合と比較投与している。抗原としては全粒子不活化ワクチンの前にインフルエンザ HA 抗原を採用する。現在、各種アジュバントをエンドトキシンフリーで揃えた。マウスに経鼻投与してベースのコントロールを採っている所である。今年の秋を目処にデータを完成させる予定である。

### D. 考察

本企画は全粒子インフルエンザワクチンの

実用化試験にアジュバントを提供する目的の研究である。

鼻粘膜へのアジュバント投与が自然免疫を活性化する経路は複数あるが、polyI:C, Ampligen を用いて抗体産生の効率化が達成されることが長谷川らによって報告されている。RNA を用いて TLR3 を活性化する方法は当研究室で確立しているが、マウス経鼻投与系で各種アジュバントの抗体産生の比較検討を行って RNA の種類と抗原との相性をまず確認する。Ampligen より優位な結果が得られれば、マウス以外の動物実験への試料を確定する。化学合成で GLP 標品を作製するため、現在大量合成の方策をたてている。

## E. 結論

各種アジュバントの IgA 産生誘導活性を確定し、RNA アジュバントの優位性を確認するため、マウス経鼻投与系で KO マウスを含めた試験系を作製した。アジュバントは大量化学合成の方策を検討中である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
- 2) Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *Biochem J*. 2014 Mar 1;458(2):195-201.
- 3) Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS One*. 2013 Dec 9;8(12):e83639.
- 4) Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, Seya T, Inagaki F. Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 3;110(49):19908-13.
- 5) Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seya T. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon  $\beta$ -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol*. 2014 Feb;57(2):100-10.
- 6) Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4740-7.
- 7) Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003533.
- 8) Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, Seya T, Arase H. Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion. *J Virol*. 2013 Oct;87(19):10900-3.
- 9) Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross

talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol*. 2013 Jul;87(14):8169-78.

- 10) Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T, Matsumoto M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat Commun*. 2013;4:1833.
- 11) Seya T, Azuma M, Matsumoto M. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 May;17(5):533-44.
- 12) Oshiumi H, Funami K, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Apr;61(2):127-38.
- 13) Toscano F, Estornes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Bonnin M, Ciancanelli MJ, Zhang SY, Funami K, Seya T, Matsumoto M, Pin JJ, Casanova JL, Renno T, Lebecque S. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):764-73.

## 2. 学会発表

省略

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する経鼻ワクチンによる抗体応答

研究分担者 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）

研究協力者 田村 慎一（国立感染症研究所 感染病理部）

鈴木 忠樹（国立感染症研究所 感染病理部）

泉地 恭輔（国立感染症研究所 感染病理部）

**研究要旨** 現行の注射により皮下に接種されるインフルエンザワクチンは、主に血中の IgG 抗体を誘導することで肺炎等の重症化を防ぐことが可能であるが、感染を防ぐことは出来ない。これに対して実用化に向け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 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 抗体を誘導し、感染自体を防ぐことが可能である。本研究では、健康成人ボランティアを募った臨床試験において、高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1) の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻ワクチン接種により誘導される抗体応答の評価を行った。

### A. 研究目的

現行インフルエンザワクチンは、注射により皮下に接種されるため、血中 IgG 抗体を誘導し、感染に伴う重症化を防ぐ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。また、この分泌型 IgA 抗体は、IgG 抗体と比較して変異ウイルスに対する交叉防御能が高いことが報告されている。これらの知見は主にマウスを主体とした動物実験により明らかにされたが、ヒトにおける経鼻インフルエンザワクチンが鼻腔粘膜上に誘導する抗体応答の評価は、採材が困難であること、

評価系が存在しないことから大きく遅れている。

我々は、ヒトの気道粘膜上に分泌される IgA 抗体を、生理的条件下にある抗体量と同等レベルに濃縮・調製することで、中和抗体応答を測定する系を確立した (Ainai *et al.*, J Med Virol. 84 (2):336-44, 2012)。さらに、現行季節性インフルエンザワクチンと比較して 3 倍量のヘマグルチニン (HA、インフルエンザワクチンの主要抗原) を含む A(H3N2) ウイルスの不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチン接種により誘導される抗体応答を評価した (Ainai *et al.*, Hum Vaccin Immunother. 9(9):1962-70, 2013)。この結果、既にワクチン接種や感染による暴露経験のあ

る A(H3N2) ウイルスに対しては、不活化全粒子ワクチンの経鼻接種のみで欧州医薬品庁(EMA)が定める有効性判断基準を満たす血清の血球凝集反応阻害抗体 (HI) を誘導し、かつ鼻腔粘液中にも中和活性を有する機能的な抗体を誘導することを明らかにした。

ヒトにおいても交叉防御能が高いと期待される分泌型 IgA 抗体を誘導する経鼻インフルエンザワクチンは、流行する株の予測が困難な新型インフルエンザに対するワクチンとして非常に有効であると期待されている。現在、散発的にヒトへの感染事例が報告されている高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)が、ヒトに馴化しヒトの間で流行する危険性が危惧されている。免疫学的に無垢な状態にある A(H5N1) ウイルスに対して、不活化全粒子ワクチンの経鼻接種が有効なワクチン接種法になりうるかは検証されていない。

そこで本研究では、健康成人ボランティアを募った臨床試験において、A(H5N1)不活化全粒子ワクチンの経鼻接種により誘導される抗体応答を評価することを目的とした。また、ワクチン接種の確実性を向上させる目的で、粘稠剤の添加の有無に関して比較を行った。

## B. 研究方法

### 1) ワクチン接種

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のもと健康成人ボランティアを募り、高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチン臨床試験を行った(研究代表者が実施)。接種(片鼻 250  $\mu$ l、計 500  $\mu$ l)あたり 45  $\mu$ g のヘマグルチニン (HA) を含有する不活化全粒子ワクチン IBCDC- RG2 (A/Indonesia/5/05 (H5N1)由来;阪大微生物病

研究会)を3週間間隔で2回経鼻接種した (Day0 と Day21 に接種)。本試験では、鼻腔内に噴霧したワクチンの粘膜上への滞留効果を増しワクチン接種の確実性を向上させる目的で、粘稠剤カルボキシビニルポリマー (CVP) 添加の有無により 2 群 (CVP 添加接種群は 31 名、CVP 非添加群は 32 名) を設けた。

### 2) 採材とサンプル調製

ワクチン接種開始より 3 週間毎に採血と鼻腔洗浄液の回収を行った (Day0、Day21 ならびに Day42)。鼻腔洗浄液は、市販の鼻うがい用器具を用い、生理食塩水にて洗浄することにより回収した。回収した鼻腔洗浄液から粗雑物の除去を行い、次いで遠心型濃縮チューブ (Vivaspin) を用い濃縮した。この方法により回収された鼻腔洗浄液は、総タンパク質量を 1 mg/ml に調製した場合に、生理的条件下にある鼻腔粘膜 IgA 抗体量 (約 2.21 mg/ml) の 1/10 量が含まれることが明らかになっている (Kurono *et al.*, Ann Otol Rhinol Laryngol 96(4):419-424, 1987; Aina *et al.*, J Med Virol. 84(2):336-44, 2012)。したがって、総タンパク質量を 1 mg/ml に調製した鼻腔洗浄液を用い以下の測定を行った。

### 3) 中和抗体価と HI 抗体価の測定

中和抗体価の測定は、マイクロ中和試験により行った。RDE 処理を行った血清 (1/10 希釈液) あるいは鼻腔洗浄液 (1/20 希釈相当液) の 2 倍段階希釈系列を準備し、100 TCID<sub>50</sub> (50%組織培養感染量の 100 倍量) のウイルス液と混合後、30 分間インキュベーションした。その後、この混合液を MDCK 細胞に添加し 4 日間培養を行い、顕微鏡下でインフルエンザウイルスによる細胞変性効果が確認できないサンプル最大希釈倍率を中和抗体価とした。ウイルスは、ワ

クチン製造株のもととなった A/Indonesia/5/05 (H5N1) 野外株を用いた。

### C. 研究結果

今回の臨床試験では、健康成人ボランティア 63 名を CVP 添加群 (31 名) と非添加群 (32 名) の二群に分け、A (H5N1) 不活化全粒子ワクチン経鼻接種による抗体応答を測定・比較した。

初回ワクチン接種直前 (Day0)、2 回目接種前 (Day21) そしてワクチン接種後 (Day42) に提供いただいた血清および鼻腔洗浄液に関して、A/Indonesia/5/05 (H5N1) 野外株に対する中和抗体価の測定を行った。中和抗体価を表 1 にまとめた。ワクチン接種による中和抗体価幾何平均値の上昇倍率は、血清に関しては、CVP 添加接種群で 2.3 倍、CVP 非添加接種群で 1.7 倍となり、鼻腔洗浄液に関しては CVP 添加接種群で 1.7 倍、CVP 非添加接種群で 1.4 倍となった。ワクチン接種後の中和抗体価がワクチン接種前と比較し 4 倍以上上昇した被験者の数は、血清中和抗体価に関して CVP 添加接種群 31 名中 5 名、CVP 非添加接種群 32 名中 3 名となっ

た。また鼻腔洗浄液中和抗体価に関して、同じく 4 倍以上の上昇が見られた被験者の数は、いずれの群においても 1 名となった。多くの被験者において中和抗体応答の上昇は認められなかった。

### D. 考察

本研究では、健康成人に対して高病原性鳥インフルエンザウイルス A (H5N1) の不活化全粒子ワクチンの経鼻接種を行い、血清および鼻腔洗浄液における中和抗体応答を評価した。インフルエンザウイルスのゲノム RNA は自然免疫担当細胞の Toll 様受容体に認識されることで、免疫応答を惹起することが可能であることが明らかとなっている。不活化全粒子ワクチンはこのゲノム RNA を内包するため、エーテル処理によりウイルスを破碎し調製される HA ワクチンに比べて免疫賦活化能が高いことが明らかになっている (Koyama *et al.*, *Sci Transl Med.* 2(25):25ra24, 2010)。季節性インフルエンザウイルス A (H3N2) の不活化全粒子ワクチン経鼻接種に関する臨床試験においては、

表 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

		中和抗体価の幾何平均値			4 倍以上の陽転を示した被験者数 (n/N)
		初回 接種前 (Day0)	2 回目 接種前 (Day21)	接種後 (Day42)	
血清	CVP 添加群	5	5	11.5	5/31
	CVP 非添加群	5	5	8.4	3/32
鼻腔洗浄液	CVP 添加群	10	10	16.7	1/31
	CVP 非添加群	10	10	13.7	1/32

血清および鼻腔洗浄液は、RDE 処理を行いサンプルとした。血清は 1/10 希釈から、鼻腔洗浄液は 1/20 希釈相当液から 2 倍の段階希釈を行い、インフルエンザウイルス感染による細胞変性効果が認められない最大希釈倍率を中和抗体価とした。血清中和抗体価 <10 は 5、鼻腔洗浄液中和抗体価 <20 は 10 とした。

粘膜アジュバントの添加を行わなかったにもかかわらず、血清 HI 抗体価は EMA が定める有効性判断基準の 3 項目（接種前後において HI 抗体価の幾何平均値の上昇倍率が 2.5 倍より大きいこと、接種により 4 倍以上の HI 抗体価の上昇を示した被験者の割合が集団において 40%以上であること、ワクチン接種後の HI 抗体価が 40 倍以上である被験者の割合が集団において 70%以上であること）を全て満たした (Ainai *et al.*, Hum Vaccin Immunother. 9(9):1962-70, 2013)。中和抗体価は HI 抗体価より通常高い値を示すことを考慮した場合、今回の臨床試験においては十分な抗体応答を誘導できなかったこととなる。

これまでのワクチン接種や感染による暴露経験のある A(H3N2) ウイルスに対しては、すでに獲得された免疫記憶を有するため、全粒子不活化ワクチンのみの経鼻接種で十分な抗体応答を誘導することが出来たと考えられる。逆に暴露経験のない A(H5N1) ウイルスに対しては免疫学的に無垢な状態に有る上に、A(H5N1) ウイルスの免疫原性の低さが影響し、十分な抗体応答を誘導できなかった可能性がある。免疫学的に無垢な状態にあるインフルエンザウイルスを対象とした経鼻インフルエンザワクチン接種により、十分な抗体応答を誘導するためには、追加ワクチン接種の検討あるいは粘膜アジュバントの添加を考える必要がある。現在、ヒトに対して認可されている粘膜アジュバントは存在しないため、ワクチンスケジュールを見直すことで十分な抗体応答が誘導できるのではないかと考える。

また、今回の試験では、噴霧したワクチンの鼻腔領域内へ滞留効果を向上させる目的で粘稠剤 CVP の添加・非添加の比較を行った。CVP は既に花粉症・アレルギー性鼻炎に対する点鼻薬に使用されている。今回の試験の結果では、

有意差は付かないものの CVP 添加群で血清および鼻腔洗浄液の中和抗体価が高くなる傾向が認められた。鼻腔領域内へのワクチンの滞留効果を向上させることで、ワクチン効果が高まることが考えられる。今後十分に評価を行い、CVP 添加がもたらす効果を明らかにする必要がある。

## E. 結 論

健康成人ボランティアに対して、高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1) に対する経鼻ワクチン接種を行い誘導される抗体応答を評価した。免疫学的に無垢な状態にある A(H5N1) ウイルスの不活化全粒子ワクチンのみの 2 回の経鼻接種では、十分な抗体応答を誘導することが出来なかった。しかしながら、ワクチン接種の確実性を高めると期待される CVP の添加により、抗体応答が促進する可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. Hum Vaccin Immunother. 2013 Sep;9(9):1962 -70.

### 2. 学会発表

#### 国際学会

- 1) Ainai A, van Riet E, Tamura S, Suzuki T, Kawaguchi A, Ito R, Ikeda K, Senchi K, Asanuma H, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Antibody responses in serum

and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy human adults. 7<sup>th</sup> Vaccine & ISV, Oct 2013, Barcelona, Spain

- 2) Suzuki T, Kawaguchi A, Ainai A, Tamura S, Ito R, Tashiro M, Hasegawa H. Impact of the quaternary structure of human secretory-IgA on viral neutralization activity in upper respiratory tract. 7<sup>th</sup> Vaccine & ISV, Oct 2013, Barcelona, Spain
- 3) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, van Riet E, Tamura S, Ikeda K, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy naïve human adults. Keystone Symposia 2014, Jan 2014, CO, USA
- 4) Suzuki T, Kawaguchi A, Ainai A, Tamura S, Ito R, Tashiro M, Hasegawa H. Impact of the quaternary structure of human Secretory-IgA on neutralization potency to Influenza A virus in upper respiratory tract. Keystone Symposia 2014, Jan 2014, CO, USA

#### 国内学会

- 1) 原田勇一、中村一哉、浜本いつき、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、奥野良信、山本典夫：マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013 年 11 月
- 2) 長谷川秀樹、相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅：高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)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の効果。第 17 回日本ワクチン学会学術集会（津）2013 年 12 月

- 3) 鈴木忠樹、川口 晶、相内 章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにより鼻腔粘膜上に誘導される多量体 IgA 抗体のウイルス感染防御における役割。第 17 回日本ワクチン学会学術集会（津）2013 年 12 月
- 4) 相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に年齢、性別あるいは副反応が与える影響。第 17 回日本ワクチン学会学術集会（津）2013 年 12 月
- 5) 原田勇一、中村一哉、浜本いつき、榎本匡志、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、山本典夫：マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析。第 17 回日本ワクチン学会学術集会（津）2013 年 12 月

#### 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

### 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
<u>Ainai A</u> , Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, <u>Hasegawa H</u>	Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults	Hum Vaccin Immunother	9	1962-1970	2013
Yamazaki T, <u>Ichinohe T</u>	Inflammasomes in antiviral immunity: clues for influenza vaccine development.	Clin Exp Vaccine Res	3	5-11	2014
<u>Ichinohe T</u> , Yamazaki T, Koshihara T, Yanagi Y	Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection.	Proc Natl Acad Sci USA	110	17963-8	2013
一戸猛志	インフルエンザウイルス認識機構と経鼻インフルエンザワクチン	臨床とウイルス	41	212-21	2013
Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, <u>Seya T</u>	IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection.	J Immunol	192	2770-2777	2014
Tatematsu M, <u>Seya T</u> , Matsumoto M	Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses.	Biochem J	458	195-201	2014