

平成 11 年 3 月 31 日

厚生大臣 宮下 創平 殿

住 所 〒  
 フリカナ タムラ シンイチ 田村 慎一  
 研究者 氏 名 田村 慎一  
 生年月日 1941 年 11 月 19 日生

平成 10 年度厚生科学研究費補助金 ( 新興・再興感染症 研究事業) の事業実績報告書について

平成 10 年 10 月 30 日厚生省収健第 270 号をもって交付の決定 (又は変更承認) を受けた標記の事業を完了したので、関係書類を添えて報告する。

1. 国庫補助金精算所要額 : 金 20,000,000 円也
2. 研究課題名 (課題番号) : 粘膜免疫機構の基盤と応用 ( H10-新興-10 )
3. 研究実施期間 : 平成 10 年 4 月 1 日から平成 12 年 3 月 31 日まで ( 3 ) 年計画の ( 1 ) 年目
4. 研究者及び経理事務担当者

研究者	①所属施設 (部局)	国立感染症研究所 感染病理部	②所属施設所在地	〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
	③連絡先 TEL・FAX E-mail	03-5285-1111 (内2624) 03-5285-1189 stamura@nih.go.jp	④所属施設における職名	室長
	⑤最終卒業学校・卒業年次及び学位	東京教育大学大学院 昭和45年 理学博士	⑥専攻科目	動物学
経理事務担当者	(フリカナ) ⑦氏名	タムラ シンイチ 木村 真澄	⑧連絡先 所属施設・TEL FAX・E-mail	〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 国立感染症研究所感染病理部 TEL:03-5285-1111 (内2627) FAX:03-5286-1189

5. 分担した研究事業の概要

①研究者名	②分担した研究項目	③研究実施場所 (施設)	④研究実施期間	⑤配分を受けた研究費の額 (円)
別紙				

5. 研究組織

①研究者名	②分担する研究項目	③最終卒業学校・卒業年次・学位及び専攻科目	④所属施設及び現在の専門(研究実施場所)	⑤所属施設における職名	⑥研究費配分予定額(千円)
田村 慎一	経鼻インフルエンザワクチンの開発	東京教育大学大学院・昭和45年・理学博士・動物学	国立感染症研究所 感染病理部 感染免疫学	室長	主任研究者 一括計上
岩崎 琢也	感染や粘膜ワクチン投与に伴う粘膜免疫機構の組織学的解析	岩手医科大学医学部・昭和54年・医学博士・病理学	国立感染症研究所 感染病理部 感染病理学	室長	
阪口 雅弘	経鼻ワクチンに対するIgE抗体応答の測定	東京大学大学院 昭和59年・農学博士・免疫学	国立感染症研究所 免疫部 免疫学	主任研究官	
五十君 静信	乳酸菌を用いた経口ワクチンデリバリーシステムの開発	東京大学大学院 平成元年・農学博士・細菌学	国立感染症研究所 食品衛生微生物部 食品微生物学	主任研究官	
西沢 俊樹	経鼻蝕蝕ペプチドワクチンの開発	東京教育大学大学院・昭和48年 理学博士・植物学	国立感染症研究所 口腔科学部 免疫学	室長	
清野 宏	NALT細胞間イントラ・インターネットの解明	アラバマ大学大学院・昭和58年・理学博士・免疫病理学	大阪大学微生物病研究所 免疫学	教授	

## 6. 研究結果の概要

### 1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。

1) 感染後やワクチン投与後のNALTにおいて、感染ではIFN- $\gamma$ が優勢の免疫反応が起こり、ワクチン投与条件ではIL-4が優勢の免疫反応が起こっていた(田村、岩崎)。2) NALTには高頻度で細胞表面にIgM, IgG, IgA抗体を発現している前駆B細胞が存在しており、形質細胞はほとんど認められなかった(清野)。

### 2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

1) 経鼻インフルエンザワクチン(100  $\mu$ g)のアジュバントとしてヒトにおいて有効である、微量の大腸菌易熱性毒素(1%LT)を含むそのBサブユニット(LTB\*)(100  $\mu$ g)のアジュバント活性と毒性を、幾つかの変異CTのそれと、マウスにおいて比較検討した結果、変異CT112Kが、LTB\*の約1/2倍のアジュバント活性、約1/100の毒性を示し、本実験で用いられた変異CTのうちでヒトに適用出来る最も有効かつ安全なアジュバントになることが示された(田村)。2) 肺炎球菌の細胞膜抗原(PspA)を無毒化コレラトキシン(CT)と共に経鼻投与したマウスには、高いレベルで肺炎球菌特異的IgGとIgA抗体や抗体産生細胞が誘導された。これらのマウスに肺炎球菌をチャレンジ感染した結果、約8割のマウスに感染阻止が認められた(清野)。3) う蝕病原菌の初期付着因子に対する阻害抗体のみを誘導できる最小のペプチド抗原(13残基)をユニットとした様々なペプチドのうち、3量体を直列連結(タンデム型)し連結部のスペーサーにリジンを用いたものが最も阻害抗体誘導能が高かった(西沢)。4) 病原性大腸菌O157のVerotoxin 1(VT1)のエピトープを組み込んだ乳酸菌Lactococcus lactis IL1403は、それを経口投与されたマウスにおいて、VT1に特異的な血清及び腸洗浄液中のIgA及びIgG抗体応答を高めた(五十君)。

### 3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。

1) スギ花粉症の主要なアレルゲンであるCryj1のcDNAをpCAGGSプラスミドに組み込んだDNAワクチン(pCACJ1)は、予めマウスに筋肉注射しておくこと、アレルゲンであるCryj1蛋白質(とアラム)の感作によって誘導されるIgE抗体産生を抑制した(坂口)。

## 7. 研究により得られた成果の今後の活用・提供

1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。1) NALTとその周囲の鼻腔粘膜固有層は、それぞれ気道の粘膜免疫応答の誘導組織と実行組織として機能している(清野)。2) インフルエンザウイルスの感染とアジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンによって誘導される免疫応答において、両群に共通に見られるIL-6等のサイトカインがウイルス抗原に対するIgA抗体産生に関与しており、感染群に優勢のIFN- $\gamma$ はCTLsの産生に、ワクチン群に優勢のIL-4はIgG1やIgEの産生に関与している(田村、岩崎)

2. 新しい粘膜ワクチンの開発。1) CTの変異分子、CT112K(112番目のGluをLysに置換)(100  $\mu$ g)併用の経鼻インフルエンザワクチン(100  $\mu$ g)が、ヒトに適用出来る有効かつ安全な経鼻接種ワクチンになる(田村)。2) 無毒化コレラトキシン(CT)併用肺炎球菌の細胞膜抗原(PspA)は、肺炎球菌に対する有用な経鼻型ワクチンの候補になる(清野)。3) う蝕病原菌の初期付着因子(PAc)の生物活性阻害抗体のみを誘導できる最小単位のペプチド(13残基)の3量体を直列連結し連結部のスペーサーにリジンを用いたものが、経鼻う蝕ペプチドワクチンとして有力な候補になる(西沢)。4) 乳酸菌が経口ワクチンの有用な運び屋になる(五十君)。

3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。1) DNAワクチンを予め筋肉注射しておくことによって、アレルゲン特異的なTh1細胞が誘導され、アレルゲンに対するIgE抗体産生が抑制される(坂口)。

## 8. 研究の実施経過

### 1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。

- 1) インフルエンザウイルス感染やアジュバント併用経鼻ワクチンの投与に伴うNALT(マウスにおける気道の粘膜の中心組織である鼻咽頭関連リンパ組織)の様々なサイトカインmRNAの動態を検討した(田村)。
- 2) A型のインフルエンザウイルス株PR8(H1N1)と HK483(H5N1)の感染マウスにおいて、ウイルス感染細胞の局在について組織学的に検討した(岩崎)。
- 3) NALTの組織切片のコンフォーカル解析により、IgM, IgG, IgA前駆B細胞の存在とその頻度を解析した(清野)。

### 2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

- 1) アジュバント併用経鼻ワクチンの安全性を高めるために、CTの変異分子4種類、CT7K(CTのN末端から7番目のArgをLysに置換)、CT61F(CTの61番目をSerからPheに置換)、CT112K(112番目のGluをLysに置換)、CT118E(118番目のGlyをGluに置換)を作製して、そのアジュバント活性、毒性、アレルギー誘導能を検討した。本実験で用いられたマウスへのアジュバント併用インフルエンザワクチンの経鼻投与条件は、20kgのヒトにそれぞれ100 $\mu$ gのワクチンとアジュバントを投与する条件に対応していた(田村)。
- 2) 肺炎球菌の細胞膜抗原(PspA)を無毒化コレラトキシン(CT)と共に経鼻投与して、免疫応答と防御効果を検討した(清野)。
- 3) う蝕病原菌(*Streptococcus mutans*)の初期付着因子(菌体表層蛋白質抗原:PAc)に対する阻害抗体のみを誘導できる最小のペプチド抗原(13残基)をユニットとした様々なペプチドをデザインして抗体誘導能を検討した(西沢)。
- 4) 病原性大腸菌O157にVerotoxin 1(VT1)のエピトープを組み込んだ乳酸菌*Lactococcus lactis* IL1403を経口投与したマウスにおける粘膜免疫応答によって、経口ワクチンのベクターとしての乳酸菌の有用性を検討した(五十君)。

### 3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。

- 1) スギ花粉症の主要なアレルゲンであるCryj1のcDNAをpCAGGSプラスミドに組み込んで構築されたDNAワクチンを免疫したマウスにおいて、アレルゲン特異的なIgE抗体応答を検討した(坂口)。

9. 経費所要額精算調書

(1) 総事業費	20,000,000 円	(2) 寄付金その他の収入額	0 円	(3) 差引額 ((1)-(2))	20,000,000 円
(4) 補助金対象経費 実支出額	(5) 補助金の交付額	(6) 選定額 〔(4)と(5)を 比較して少ない方の額〕	(7) 補助金所要額 〔(3)と(6)を 比較して少ない方の額〕	(8) 差引過不足(Δ) 額 (5)-(7)	(9) (7)を超える (4)との差額 の出所
20,002,913 円	20,000,000 円	20,000,000 円	20,000,000 円	円 Δ2,913	銀行預金利息
(10) 補助対象経費実支出額内訳					
① 経費区分	金額	積 算 内 訳			
直接研究費	(円)				
調査研究費	20,002,913				
消耗品費	19,378,836	[別紙]			
雑役務費	21,577	振込手数料 [別紙2]			
謝金	146,000	資料整理及びデータ作成 1人 x 1,006円 x 145時間 = 146,000円			
賃金	456,500	実験補助 1人 x 8,300円 x 55日 = 456,500円			
小 計	20,002,913				

	計	利息	消耗品費	雑役務費	賃金	謝金
田村	5,001,114	1,114	5,001,114	9,450	456,500	146,000
岩崎	3,000,519	519	2,996,109	4,410	0	0
阪口	3,000,226	226	2,997,916	2,310	0	0
五十君	3,000,222	222	2,999,750	472	0	0
西澤	3,000,446	446	2,995,511	4,935	0	0
清野	3,000,386	386	3,000,386	0	0	0
計	20,002,913	2,913	19,378,836	21,577	456,500	146,000

平成 11 年 3 月 31 日

厚生大臣 宮下 創平 殿

住 所 〒  
 フリガナ タムラ シンイチ  
 研究者 氏 名 田村 慎一  
 (所属施設 国立感染症研究所)

平成 10 年度厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症 研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 粘膜免疫機構の基盤と応用 ( H10-新興-10 )

国庫補助金精算所要額 : 金 20,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
別紙			

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

(作成上の留意事項)

1. 「4. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記入した書籍又は雑誌は、その刊行物又は別刷り一部を添付すること。
2. その他
  - (1) 手書きの場合は、楷書体で記入すること。
  - (2) 氏名は、自署又は記名押印で記入すること。
  - (3) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。各項目の記入量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして差し支えない。

別添1

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

(作成上の留意事項)

総括研究報告書概要版は、別紙1「総括研究報告書概要版作成要領」に基づき作成すること。

別添2

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

(作成上の留意事項)

総括研究報告書は、別紙2「研究報告書レイアウト」を参考に作成すること。

別添3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

(作成上の留意事項)

分担研究報告書は、別紙2「研究報告書レイアウト」を参考に作成すること。

## 粘膜免疫機構の基盤と応用

主任研究者 田村 慎一 国立感染症研究所感染病理部

**研究要旨** 粘膜局所の免疫機構を分子・細胞・組織レベルで明らかにし、それを活用した有用な粘膜ワクチンを開発するために、次の三つのテーマについて研究を行った。1) ウイルスや細菌の感染、また、それらに対する粘膜ワクチンの投与によって誘導される気道の粘膜免疫応答の、粘膜組織、免疫担当細胞レベル、抗体やサイトカインレベルでの解析。2) アジュバント併用経鼻インフルエンザ・肺炎球菌及びう蝕(ペプチド)ワクチンの開発、及び経口ワクチンの有用なベクターの開発。3) 粘膜アレルギー反応の抑制機構の解析。

### 研究組織:

田村慎一: 国立感染症研究所感染病理部室長  
岩崎琢也: 国立感染症研究所感染病理部室長  
清野 宏: 大阪大学微生物病研究所教授  
西沢俊樹: 国立感染症研究所口腔科学部室長  
五十君 静信: 国立感染症研究所食品衛生微生物部  
坂口雅弘: 国立感染症研究所免疫部

以上6名(他研究協力者11名)

### A. 研究目的

広大な粘膜面を介して多くの細菌やウイルスは生体に感染し病気を引き起こす。生体はIgA抗体関与の粘膜免疫機構の働きによって病気から回復し、回復後再度の感染に対して生体をを防御する特異的な免疫能力を準備する。粘膜ワクチンは、発病させることなく生体に免疫能力を準備させるために予め投与される抗原であり、感染によって誘導されるのと同様に強い免疫能力を準備することがその理想条件になる。本研究は、ウイルスや細菌感染に伴う、また、粘膜ワクチンの投与に伴う粘膜免疫応答とその制御機構を、粘膜関連リンパ系の分子・細胞・組織のレベルで明らかにすると共に、それを基礎に予防効果の高い安全な粘膜ワクチンを開発することを目的としている。

### B. 研究方法

1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。

1) インフルエンザウイルス感染やアジュバント併用経鼻ワクチンの投与に伴うNALT(マウスにおける気道の粘膜の中心組織である鼻咽頭関連リン

パ組織)の様々なサイトカインmRNAの動態を検討した(田村)。

2) A型のインフルエンザウイルス株PR8(H1N1)とHK483(H5N1)の感染マウスにおいて、ウイルス感染細胞の局在について組織学的に検討した(岩崎)。

3) NALTの組織切片のコンフォーカル解析により、IgM, IgG, IgA前駆B細胞の存在とその頻度を解析した(清野)。

### 2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

1) アジュバント併用経鼻ワクチンの安全性を高めるために、CTの変異分子4種類、CT7K(CTのN末端から7番目のArgをLysに置換)、CT61F(CTの61番目をSerからPheに置換)、CT112K(112番目のGluをLysに置換)、CT118E(118番目のGlyをGluに置換)を作製して、そのアジュバント活性、毒性、アレルギー誘導能を検討した。本実験で用いられたマウスへのアジュバント併用インフルエンザワクチンの経鼻投与条件は、20kgのヒトにそれぞれ100  $\mu$ gのワクチンとアジュバントを投与する条件に対応していた(田村)。

2) 肺炎球菌の細胞膜抗原(PspA)を無毒化コレラトキシン(CT)と共に経鼻投与して、免疫応答と防御効果を検討した(清野)。

3) う蝕病原菌(*Streptococcus mutans*)の初期付着因子(菌体表層蛋白質抗原:PAc)に対する阻害抗体のみを誘導できる最小のペプチド抗原(13残基)をユニットとした様々なペプチドをデザインして抗体誘導能を検討した(西沢)。

4) 病原性大腸菌O157にVerotoxin 1(VT1)のエピトープを組み込んだ乳酸菌*Lactococcus lactis* IL1403を経口投与したマウスにおける粘膜免疫応答によって、経口ワクチンのベクターとしての乳酸菌の有用性を検討した(五十君)。



3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。1) スギ花粉症の主要なアレルゲンであるCryj1のcDNAをpCAGGSプラスミドに組み込んで構築されたDNAワクチンを免疫したマウスにおいて、アレルゲン特異的なIgE抗体応答を検討した(坂口)。

### C. 研究結果

1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。

1) 感染後やワクチン投与後のNALTにおける免疫応答にTh1型(IL-2とIFN- $\gamma$ )とTh2型(IL-4とIL-6)の両方のサイトカインが関与しているが、感染ではIFN- $\gamma$ が優勢の免疫反応が起こり、ワクチン投与条件ではIL-4が優勢の免疫反応が起こっていることを示していた(田村)。

2) H1N1亜型のウイルスは上皮細胞のみに感染するのに対し、H5N1のウイルスは上皮細胞のみならず上皮下の細胞にも感染が成立する事が明らかになった(岩崎)。

3) NALTには高頻度で細胞表面にIgM, IgG, IgA抗体を発現している前駆B細胞が存在しており、形質細胞はほとんど認められなかった(清野)。

2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

1) 実験で用いられた四種類の変異CTのうちで、既に報告されているCT112Kが、ヒトに適用出来る最も有効且つ安全な経鼻接種インフルエンザワクチンのアジュバントになることが示唆された(田村)。

2) 肺炎球菌の細胞膜抗原(PspA)を無毒化コレラトキシン(CT)と共に経鼻投与したマウスには、高いレベルで肺炎球菌特異的IgGとIgA抗体が、血清と鼻洗浄液・唾液に誘導された。また、肺炎球菌特異的IgGとIgA抗体産生細胞も脾臓、鼻腔粘膜固有層、唾液腺に誘導された。さらに、これらのマウスに肺炎球菌をチャレンジ感染した結果、約8割のマウスに感染阻止が認められた(清野)。

3) う蝕病原菌の初期付着因子に対する阻害抗体のみを誘導できる最小のペプチド抗原(13残基)をユニットとした様々なペプチドをデザインした。そのうち、3量体を直列連結(タンデム型)し連結部のスペーサーにリジンを用いたものが最も阻害抗体誘導能が高かった(西沢)。

4) 病原性大腸菌O157のVerotoxin 1(VT1)のエピトープを組み込んだ乳酸菌Lactococcus lactis IL1403は、それを経口投与されたマウスにおいて、VT1に特異的な血清及び腸洗浄液中のIgA

及びIgG抗体応答を高めた(五十君)。

3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。1) スギ花粉症の主要なアレルゲンであるCryj1のcDNAをpCAGGSプラスミドに組み込んだDNAワクチン(pCACJ1)は、予めマウスに筋肉注射しておくこと、アレルゲンであるCryj1蛋白質(とアラム)の感作によって誘導されるIgE抗体産生を抑制した。また、pCACJ1を筋肉注射したマウスの脾臓のT細胞は、in vitroでTh1型サイトカインIFN- $\gamma$ を産生した(坂口)。

### D. 考察

1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。

1) 感染と粘膜ワクチンによって誘導される免疫応答において、両群に共通に見られるIL-6等のサイトカインがインフルエンザウイルス抗原に対するIgA抗体産生に関与しており、感染群に優勢のIFN- $\gamma$ はCTLsの産生に、ワクチン群に優勢のIL-4はIgG1やIgEの産生に関与していることを示唆している(田村)。

2) HK483(H5N1)ウイルス株は1997年に香港で分離されたものであり、既に全身に存在するプロテアーゼによってHA分子の切断が起こりニトリにおいて全身感染を起こすことが報告されていた。本実験において、HK483(H5N1)がマウスにおいても上皮細胞のみならず上皮下の細胞にも感染を成立させる事が明らかになった。今後、PR8(H1N1)とHK483(H5N1)を感染したマウスの免疫応答の違いが検討されねばならない(岩崎)。

3) 組織レベルでNALTにはIgAを中心とした前駆B細胞が高頻度で存在しており形質細胞はほとんど認められないが、一方、NALTの周囲の鼻腔粘膜固有層にはIgAを産生する形質細胞が高頻度で存在する。従って、NALTとNALTの周囲の鼻腔粘膜固有層は、それぞれ気道の粘膜免疫応答の誘導組織と実行組織である(清野)。

2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

1) 我々既には、微量の大腸菌易熱性毒素(1% LT)を含むそのBサブユニット(LTB\*)(100  $\mu$ g)が、経鼻インフルエンザワクチン(100  $\mu$ g)のアジュバントとしてヒトにおいて有効であることを示唆してきた。本実験で用いられた条件下で、このLTB\*はマウスにおいてCT112Kの約2倍のアジュバント活性を示したが、毒性がnaiveCTの約1/250であり、CT112Kより約100倍高かった。従って、本実験で用いられた変異CTのうちで、CT112Kが、ヒトに適用出来る最も有効且つ安全な経鼻

接種インフルエンザワクチンのアジュバントになることが示唆された(田村)。

2) 無毒化コレラトキシン(CT)併用肺炎球菌の細胞膜抗原(PspA)は、肺炎球菌に対する有用な経鼻型ワクチンの候補になると考えられる(清野)。

3) 経鼻う蝕ペプチドワクチン用の抗原として、う蝕病原菌の初期付着因子(PAc)の生物活性阻害抗体のみを誘導できる最小単位のペプチド(13残基)の3量体を直列連結し連結部のスペーサーにリジンを用いたものが最も有力と考えられる(西沢)。

4) 病原性大腸菌O157のVerotoxin 1(VT1)のエピトープを組み込んだ乳酸菌Lactococcus lactis IL1403を経口投与されたマウスにおいて、誘導されたVT1に特異的な抗体が防御抗体として働くかどうかを検討されねばならない(五十君)。

3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。1) DNAワクチンを予め筋肉注射しておくことによって、アレルギー特異的なTh1細胞が誘導され、アレルギーに対するIgE抗体産生が抑制される(坂口)。

## E. 結論

1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。

1) 気道の粘膜組織であるNALTには、IgAを中心とした前駆B細胞が高頻度に存在し、一方、NALTの周囲の鼻腔粘膜固有層にはIgAを産生する形質細胞が高頻度に存在する。従って、NALTとその周囲の鼻腔粘膜固有層は、それぞれ気道の粘膜免疫応答の誘導組織と実行組織として機能している(清野)。2) インフルエンザウイルスの感染とアジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンによって誘導される免疫応答において、両群に共通に見られるIL-6等のサイトカインがインフルエンザウイルス抗原に対するIgA抗体産生に関与しており、感染群に優勢のIFN- $\gamma$ はCTLsの産生に、ワクチン群に優勢のIL-4はIgG1やIgEの産生に関与していることを示唆している(田村)

2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

1) CTの変異分子、CT112K(112番目のGluをLysに置換)(100  $\mu$ g)併用の経鼻インフルエンザワクチン(100  $\mu$ g)が、ヒトに適用出来る有効且つ安全な経鼻接種ワクチンになることが示唆された(田村)。2) 無毒化コレラトキシン(CT)併用肺炎球菌の細胞膜抗原(PspA)は、肺炎球菌に対する有用な経鼻型ワクチンの候補になることが示唆された(清野)。3) う蝕病原菌の初期付着因子(P

Ac)の生物活性阻害抗体のみを誘導できる最小単位のペプチド(13残基)の3量体を直列連結し連結部のスペーサーにリジンを用いたものが、経鼻う蝕ペプチドワクチンとして有力な候補になることが示された(西沢)。4) 乳酸菌が経口ワクチンの有用な運び屋になることが示された(五十君)。

3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。1) DNAワクチンを予め筋肉注射しておくことによって、アレルギーに対するIgE抗体産生を抑制することが出来る(坂口)。

感染や粘膜ワクチン投与に伴う気道の粘膜免疫機構の動態

主任研究者 田村 慎一 国立感染症研究所感染病理部  
研究協力者 松尾 和俊 国立感染症研究所感染病理部

**研究要旨** インフルエンザウイルス感染後やアジュバント併用経鼻ワクチン投与後のマウスのNALTにおける免疫応答には、Th1型(IL-2とIFN- $\gamma$ )とTh2型(IL-4とIL-6)の両方のサイトカインが関与しているが、感染ではIFN- $\gamma$ が優勢の免疫反応が起こり、ワクチン投与条件ではIL-4が優勢の免疫反応が起こっている。

**A. 研究目的**

インフルエンザウイルスに自然感染した生体には、気道局所のIgA抗体、血清中のIgG抗体、細胞溶解性T細胞(CTLs)が誘導され、その後の数年間は同じ亜型の変異ウイルスの流行には罹らない抵抗力が準備される。自然感染によって誘導されるこの変異ウイルスに対する交叉感染阻止能力は、主として交叉反応性のIgA抗体に依っている。この事実は、現行の不活化インフルエンザワクチンを用いた場合でも、粘膜のIgA産生を刺激することができれば、ワクチンの予防効果を高めることができることを示唆している。そこで我々は、現行のインフルエンザワクチンをコレラ毒素(CT)や大腸菌易熱性毒素(LT)等のアジュバントと共に経鼻接種することにより、上気道に分泌型IgA抗体を誘導することを試みてきた。その結果、変異ウイルスの流行にも対応出来る交叉感染防御の能力を準備できることを示すことができた。即ち、アジュバント併用粘膜ワクチンにより、ウイルスの自然感染によって誘導される気道のIgA抗体応答を模倣することができた。

ところで、マウスにおける気道の粘膜の中心組織が鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)であることが明らかになってきているが、感染や粘膜ワクチン投与に伴うNALTの動態についてその詳細は明かでない。そこで我々は、インフルエンザウイルス感染やアジュバント併用経鼻ワクチンの投与に伴うNALTの抗体産生細胞(AFC)応答を検討し、両者においてNALTのIgA-AFC応答が5日目から出現し7日目にピークに達しその後減少することを報告した。本研究ではさらに、インフルエンザウイルス感染やアジュバント併用経鼻ワクチンの投与に伴うNALTの様々なサイトカインmRNAの動態を検討した。

**B. 研究方法**

(1)感染及び免疫: BALB/cマウスにA/PR/8/34(P R8, H1N1)ウイルス液( $10^{4.5}$  EID<sub>50</sub>)を1  $\mu$ lずつ両鼻腔に滴下することによって感染した。また、0.2%のコレラ毒素を含むそのBサブユニット(CTB\*)(1  $\mu$ g)をアジュバントとして、インフルエンザワクチン(1  $\mu$ g)と共に経鼻免疫した。

(2)NALTの細胞の分画: NALTのCD3<sup>+</sup>(T cells), CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>細胞は、DYNALの磁力を用いた細胞分画装置によって分けられた。

(3)RNAの抽出と精製: NALTやその細胞からのRNAはTRIZOLを用いて抽出され、その精製はRNeasy(Quiagen)を用いて行われた。

(4)サイトカインのmRNAの同定と定量: 1  $\mu$ gの精製RNAからRT-PCRにより単鎖cDNAを合成し、それらを、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6及び $\beta$ -actinの3'-および5'-プライマーと共にPCRによって増幅した。それぞれのサイトカインのmRNA量は、得られた $\beta$ -actinのcDNA量をLightCyclerを用いて定量し、その一定量に対するそれぞれのサイトカインの相対的なcDNA量(アガールゲルの電気泳動上のエチジウムブロミド染色されたバンドの強度)によって決定した。

(5)抗体価測定: ELISA法によって行った。

**C. 研究結果**

(1)PR8ウイルスを感染したマウスとCTB\*併用ワクチンを経鼻投与したマウスのNALTにおける様々なサイトカインのmRNAの発現の時間経過を比較した。その結果、感染マウスでは、感染後5から7日にIL-2とIFN- $\gamma$ が、またIL-6も強く発現したが、IL-4の発現は弱かった。一方、ワクチン投与マウスでは、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6の発現は弱かったが、IL-4の発現は強かった。

(2)感染マウスとワクチン投与マウスのそれぞれ7

日後のNALTのCD3<sup>+</sup>(T cells), CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>細胞の色々なサイトカインのmRNAの発現を検討した。感染群では、IFN- $\gamma$  mRNAがCD8<sup>+</sup>細胞によって強くCD4<sup>+</sup>細胞によっても中等度に強く発現されたが、ワクチン群では、IL-4がCD4<sup>+</sup>細胞によって強く発現された。

(3) 感染マウスとワクチン投与マウスのそれぞれ4週間後の血清について、インフルエンザのHA分子に対するIgGサブクラスの応答を検討した。感染マウスではIgG2aがIgG1よりも多く、ワクチン投与マウスではIgG1がIgG2aよりも優勢であった。

#### D. 考察

(1) 及び(2)の結果は、感染後やワクチン投与後のNALTにおける免疫応答にTh1型(IL-2とIFN- $\gamma$ )とTh2型(IL-4とIL-6)の両方のサイトカインが関与しているが、感染ではIFN- $\gamma$ が優勢の免疫反応が起こり、ワクチン投与条件ではIL-4が優勢の免疫反応が起こっていることを示している。ところで、既に、IgG1の産生はTh2型のサイトカインによって仲介されており、IgG2aの産生はTh1型のサイトカインによって仲介されていることが知られている。このことは、感染マウスにおいてIgG2aが優勢であり、ワクチン投与マウスにおいてはIgG1が優勢であるという(3)の結果は、感染群においてTh1型のサイトカインが優勢に作用しており、また、ワクチン群においてTh2型のサイトカインが優性に働いていることを支持している。以上の結果は、感染と粘膜ワクチンによって誘導される免疫応答において、両群に共通に見られるIL-6等のサイトカインがインフルエンザウイルス抗原に対するIgA抗体産生に関与しており、感染群に優勢のIFN- $\gamma$ はCTLsの産生に、ワクチン群に優勢のIL-4はIgG1やIgEの産生に関与していることを示唆している。

#### E. 結論

感染後やワクチン投与後のNALTにおける免疫応答にTh1型(IL-2とIFN- $\gamma$ )とTh2型(IL-4とIL-6)の両方のサイトカインが関与しているが、感染ではIFN- $\gamma$ が優勢の免疫反応が起こり、ワクチン投与条件ではIL-4が優勢の免疫反応が起こっている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Tamura, S.-I., Iwasaki, T., Thompson, A. H., Asanuma, H., Chen, Ze., Suzuki, Y., Aizawa, C., & Kurata, T. Antibody-forming cells in the nasal associated lymphoid tissue during prim

ary influenza virus infection. J. Gen. Virol. 79, 291-299 (1998)

(2) Matsuo, K., Iwasaki, T., Asanuma, H., Yoshikawa, T., Chen, Ze., Tsujimoto, H., Kurata, T., & Tamura, S.-I. Cytokine mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissue during influenza virus infection and nasal vaccination. J. Gen. Virol. (submitted) (1999)

##### 1. 学会発表

(1) 松尾和俊、陳則、浅沼秀樹、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税: インフルエンザウイルス経鼻感染及び経鼻ワクチン接種時のマウスNALT領域でのサイトカインmRNAの比較。第46回日本ウイルス学会総会 1998. 10. 東京

## 粘膜免疫機構の基盤と応用

(代表研究者：田村慎一)

### 感染や粘膜ワクチン投与に伴う粘膜免疫組織の組織学的解析

分担研究者	岩崎琢也 国立感染症研究所感染病理部
研究協力者	倉田 毅、佐藤由子、旭 康子、熊坂利夫、浅沼秀樹 国立感染症研究所感染病理部 板村繁之、西村秀一 国立感染症研究所ウイルス第1部

**研究要旨** 経口あるいは経気道的あるいは接触により粘膜に感染するウイルスにおいては初期感染病巣の免疫応答が感染細胞あるいはウイルスの排除に重要な役割を果たしていると考えられる。本分担研究においては初感染病巣のウイルス感染の病態と、それに伴う宿主の免疫応答を組織学的に解明することを目的として、インフルエンザウイルスのマウス感染モデルにおいてウイルス感染細胞の局在について検討を行った。その結果、従来の H1N1 型の A 型インフルエンザウイルスは上皮細胞のみに感染するのに対し、1997 年に香港で分離された H5N1 型の A 型インフルエンザウイルスは上皮のみならず、上皮下の細胞にも感染が成立することが明らかになった。今後、この2種類の感染様式を示す A 型インフルエンザウイルスの感染モデルにおいて免疫応答を解析する。

#### A. 研究目的

経口あるいは経気道的あるいは接触により粘膜に侵入したウイルスは最初にウイルスが親和性を有する細胞に初感染巣を形成し、ウイルスの一次増殖が開始される。その後、ウイルスそれぞれの様式に従い、血行性、リンパ行性あるいは管腔性にウイルスが体内伝播し、二次増殖を引き起こす。宿主の免疫応答はこの侵入、一次増殖、体内伝播、二次増殖のすべての過程で引き起こされると想定される。本分担研究では初期感染巣・二次増殖におけるウイルス増殖と、それに伴う宿主の免疫応答を組織学的に解明することを目的とする。

初年度は経気道感染の代表的ウイルス感染症であり、かつワクチン投与による感染防止が行われているインフルエンザウイルスを取り上げ、マウス感染モデルにおいて感染細胞のと免疫グロブリン産生細胞の局在について検討した

#### B. 材料と方法

1. 動物: BALB/c ならびに ddY の 6-10 週令の SPF マウス(日本 SLC, 浜松市)を使用した。
2. ウイルス感染: インフルエンザウイルス A/ Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8)ならびに A/Hong Kong/483/97 (H5N1) (HK483)株を麻酔下でマウスに経鼻的に感染させた。PR8 株はフェレットで 148 回、その後、マウスで 596 回、さらに鶏卵で 72 回継代し、調整した。HK483 株は MDCK 細胞を用いた初代分離株であり、継代は数回以内である。接種量は 2  $\mu$ l と 20  $\mu$ l で、PR8 に関しては、それぞれに  $10^{4.1}$  EID<sub>50</sub> の同一量の感染性ウイルスが含まれるように調整した。感染後、マウスは毎日観察し、体重も測定した。

3. 組織標本作製:マウスは深麻酔下で脱血し、脳、上顎、脊椎、肺、心、胸腺、肝、脾、腎を採取し、直ちに緩衝ホルマリン溶液中で固定し、パラフィンに包埋した。厚さ 2.5  $\mu\text{m}$  の薄切標本作製し、hematoxylin-eosin 染色と免疫組織化学的検討を行った。

4. 免疫組織化学:A 型インフルエンザウイルスの組織内の局在を明らかにするため、PR8 の nucleoprotein を認識する一次抗体(ウサギ血清)を用い、ABC-ペルオキシダーゼ法により、DAB を基質とし、免疫組織化学的検討を行った。メチルグリーンもしくはヘマトキシリンによる核染色を加えた。

## C. 結果

### 1. PR8 (H1N1)マウス感染実験

10 LD<sub>50</sub> 量のウイルス懸濁液 2  $\mu\text{l}$  と 20  $\mu\text{l}$  を経鼻的に感染させ、ウイルスの体内の局在ならびに宿主の生存、組織病理学的変化、免疫系組織の経時的変化ならびに免疫グロブリン産生細胞の局在について検討した。

10 匹のマウスに 2  $\mu\text{l}$  経鼻的に感染させた場合、致死の転帰は認められず、一方、同じウイルス量を 20  $\mu\text{l}$  経鼻接種した場合は接種後 7-10 日で全頭死亡した。組織学的解析では鼻腔の粘膜上皮(円柱上皮ならびに嗅上皮)にはどちらの接種量でも炎症性変化が接種後 24 時間後には観察されたが、肺の変化は 20  $\mu\text{l}$  の接種量のマウスでのみ早期から観察された。A 型インフルエンザウイルスの nucleoprotein 抗原は接種後 6 時間目に上記の上皮の核内に散見されるようになり、24 時間目には細胞質さらには腔側面の細胞膜にも検出された。さらに、接種後 48-72 時間では陽性細胞も多数認められるようになった。

鼻粘膜に感染が局限する 2  $\mu\text{l}$  の感染マウスに接種後 72 時間目に PBS を 20  $\mu\text{l}$  経鼻的に投与したところ、75%がウイルス接種後 8-12 日(PBS 投与 5-7 日)の間に死亡した。死亡したマウスの肺を解析したところ、ウイルス抗原が検出され、死亡の原因はインフルエンザウイルスの肺内増殖であることが判明した。

なお、PR8 の感染マウスでは中枢神経系組織ならびに肝、脾、心、胸腺、腎に組織学的変化ならびにウイルス抗原は認められなかった。

### 2. HK483 マウス感染実験

2  $\mu\text{l}$  ならびに 20  $\mu\text{l}$  のウイルス懸濁液の経鼻感染実験を同様に行った。PR8 と異なり、2  $\mu\text{l}$  の感染マ

ウスも 100%の死亡率を示し、接種後 5-9 日以内に大多数が死亡した。20 $\mu\text{l}$  の感染マウスがより早期に死亡した。インフルエンザウイルス nucleoprotein 抗原は気道上皮細胞以外にも、中枢ならびに末梢神経系の神経細胞、肝細胞、心筋細胞、胸腺・脾組織の単核細胞、脂肪細胞にも検出された。

### 3. 免疫グロブリン産生細胞の分布・局在

非致死の感染量を接種したマウスでリンパ系組織の組織変化について検討した。観察した組織はヒトの扁桃に相応する nasal-associated lymphoid tissue (NALT)と脾、胸腺、リンパ節である。とくに NALT を中心に検討した。NALT では非感染マウスではリンパ濾胞の発達も未熟で、かろうじて T cell area と B cell area が区別できるが、感染後 1 週を経過すると濾胞がはっきりとし、3 週目には胚中心 germinal center を伴うリンパ濾胞が認められるようになった。現在、違ったウイルス株における免疫グロブリン産生細胞の局在について検討を行っている。

## D. 考察

以上の結果より、H1N1 株と H5N1 株の感染後のウイルスの局在が非常に異なり、感染様式に違いが存在することが判明した。この違いは hemagglutinin 蛋白の protease 切断部位のアミノ酸配列に依存することが avian influenza virus の研究よりすでに明らかにされており、H5 インフルエンザウイルスのマウスの感染実験での病理所見も従来のニワトリの感染実験結果とかなり類似している。

現在、ほとんどの流行株は H1N1 株と同様の protease 切断部位のアミノ酸配列を有し、今回の解析結果と同様に粘膜上皮にのみ感染が局限し、管腔内進展がウイルス感染の予後を決定する重大因子と考える。鼻粘膜にのみウイルス感染が局限している例でも感染後経鼻的に PBS を投与することにより、肺に感染が及び、死の転帰を来すことが今回の解析で判明した。日常的にも誤嚥が頻繁に生じる老人のインフルエンザウイルス感染が致死の転帰を来す一因となっていると考える。

一方、H5N1 株のような protease 切断部位のアミノ酸配列を有したインフルエンザウイルスでは初感染巣から直接上皮下にウイルスが侵入し、全身性にウイルス感染が拡大した。このような場合の宿主の免疫応答は PR8 株とは異なることが想像されるが、現時点ではその違いは不明である。今後、この 2 種類の A 型インフルエンザウイルスの感染マウスにおいてこの点について検討していきたい。

## E. 総括

従来の H1N1 型の A 型インフルエンザウイルスは上皮細胞のみに感染するのに対し、1997 年に香港で分離された H5N1 型の A 型インフルエンザウイルスは上皮のみならず、上皮下の細胞にも感染が成立することが明らかになった。今後、この 2 種類の感染様式を示す A 型インフルエンザウイルスの感染モデルにおいて免疫応答を解析する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Chen Z, Sahashi Y, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* 16: 1544-1549, 1998

Iwasaki T, Tamura S, Kumasaka T, Sato Y, Hasegawa H, Asanuma H, Aizawa S, Yanagihara R, Kurata T: Exacerbation of influenza virus pneumonia by intranasal administration of surfactant in a mouse model. *Arch Virol* (in press)

Chiba N, Iwasaki T, Mizutani T, Kariwa H, Kurata T, Takashima I: Pathogenicity of tick-borne encephalitis isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. *Vaccine* (in press)

Chen Z, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs. *Vaccine* 17: 653-659, 1999

### 2. 学会発表

岩崎琢也、佐藤由子、谷口貴代美、熊坂利夫、田村慎一、倉田毅: インフルエンザウイルス気道感染に及ぼすサーファクタントの影響。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

陳則、松尾和俊、浅沼秀樹、高橋秀宗、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税: インフルエンザウイルスの主要な蛋白質を発現するプラスミド DNA の感染防御能力の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

松尾和俊、陳則、浅沼秀樹、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税: インフルエンザウイルス経鼻感染および経鼻ワクチン接種時のマウス NALT 領域でのサイトカイン mRNA の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

## NALT 免疫機構：基礎的解明と経鼻ワクチン開発への応用性の検討

分担研究者：清野 宏 大阪大学微生物研究所 教授  
研究協力者：廣井隆親 大阪大学微生物研究所 助手  
山本正文 大阪大学微生物研究所 助手

呼吸器粘膜免疫機構の要となる鼻腔関連リンパ組織( NALT )の解析を行った。NALT には経鼻投与された抗原により抗体産生細胞になりうる IgA 前駆B細胞が高頻度で存在していることが分かった。肺炎球菌の PspA 抗原を粘膜アジュバントとして期待されている無毒化 CT と併用して経鼻免疫すると粘膜系と全身系両者の免疫機構に抗原特異的 IgA と IgG 抗体が誘導された。さらに、経鼻免疫によって誘導された抗原特異的免疫応答には肺炎球菌に対する感染阻止効果があった。

### 研究目的

感染症の新しい予防法として期待される、経鼻ワクチン開発に向けて呼吸器系を中心とした粘膜免疫機構の基礎的解析とその応用性についての検討が必要である。そこで、実験系マウスを使用して呼吸器における粘膜免疫誘導組織としての NALT の解析と肺炎球菌に対する経鼻ワクチンの可能性について検討した。

### 研究方法

1. 実験系マウスの前頭部からの組織切片を作成し、コンフォーカル解析法を駆使して NALT における IgM, IgG, IgA 前駆B細胞の存在とその頻度を解析した。
2. 肺炎球菌の細胞膜から精製分離した PspA 抗原 (100 $\mu$ g) と無毒化 CT (5 $\mu$ g) を経鼻ワクチンとして投与し、抗原特異的抗体の誘

導について ELISA 法と ELISPOT 法を併用して調べた。

### 研究結果

1. NALT には高頻度で細胞膜表面に IgM, IgG, IgA 抗体を発現している前駆B細胞が高頻度で存在しており、逆に形質細胞はほとんど認められなかった。
2. PspA 抗原と無毒化 CT を混合した経鼻ワクチンを投与したマウスには高レベルの肺炎球菌特異的 IgG と IgA 抗体が血清と鼻洗浄液/唾液に誘導されていた。さらに IgG, IgA 抗原特異的抗体産生細胞も脾臓、鼻腔粘膜固有層、唾液腺に惹起されていた。さらに、経鼻ワクチン投与後に肺炎球菌による感染実験を行い、約 80% の割合で実験動物群に感染阻止が成立していた。



## 考察

組織レベルで NALT に IgA を中心とした前駆 B 細胞が高頻度で存在することが確認された。その周囲の鼻腔粘膜固有層(NP)には反対に IgA を産生する形質細胞が高頻度で存在する事実と合わせると、NALT と NP が各々粘膜免疫の為の誘導、実効組織であることが強く示唆される。経鼻ワクチンとして PspA 抗原と無毒化 CT を併用投与すると効果的に粘膜系と全身系両方の免疫機構に肺炎球菌に対する感染阻止機能を有する免疫応答を誘導することが出来る。これは経鼻ワクチンの可能性に向けて貴重な情報である。さらに、PspA 抗原単独の経鼻免疫では効果的な免疫誘導が成立しないことから、無毒化 CT 併用による粘膜免疫賦活因子としての役割の重要性が示唆された。

## 結論

経鼻ワクチンの開発を考えたとき NALT が粘膜免疫誘導組織として重要である。肺炎球菌由来の PspA 抗原と新規粘膜アジュバントである無毒化 CT を混合した経鼻ワクチンにより、感染阻止効果のある抗原特異的免疫応答が誘導できることを実験系マウスモデルを使用して確認する事が出来た。

## 研究発表

### 1) 論文

1. Hiroi, T., Iwatani, K., Iijima, K., Kodama, S., Yanagita, M. and Kiyono, H. 1998. Nasal immune system : Distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur.J. Immunol.* **28** : 3346-3353.
2. Yamamoto, M., Briles, D.E., Yamamoto, S., Takeda, Y., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 1998. A nontoxic adjuvant for mucosal immunity to pneumococcal surface protein A. *J. Immunol.* **161** : 4115-4121.
3. Imaoka, K., Miller, C.J., Kubota, M., McChesney, M.B., Someya, K., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Honda, M., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 1998. Nasal immunization of non-human primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for anti-viral immunity. *J. Immunol.* **161** : 5952-5958
4. Itoh, M., Ishihara, K., Hiroi, T., Lee, B.O., Maeda, H., Iijima, H., Yanagita, M., Kiyono, H. and Hirano, T. 1998. Deletion of BST-1(CD157) gene impaired systemic TI-2 antigen-induced IgG3 and mucosal TD antigen-elicited IgA responses. *J. Immunol.* **161** : 3974-3983.
5. Nguyen, H.H., Boyaka, P.N., Moldoveanu, Z., Novak, M.J., Kiyono, H., McGhee, J.R. and

- Mestecky, J. 1998. Influenza virus-infected epithelial cells present viral antigen to antigen-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTL). *J. Virology* **72** : 4534-4536.
6. Yamamoto, M., Fujihashi, K., Kawabata, K., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 1998. Mucosal intranet : intestinal epithelial cells down regulate intraepithelial but not peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.* **160** : 2188-2196.
  7. Kweon, M-N., Fujihashi, K., VanCott, J.L., Higuchi, K., Yamamoto, M., McGhee, J.R., and Kiyono, H. 1998. The role of Th1 cells in tolerance : lack of mucosally-induced unresponsiveness in interferon- $\gamma$  knockout mice. *J. Immunol.* **160** : 1687-1696.
  8. Lu, X., Kiyono, H., Lu, D., Kawabata, S., Torten, J., Srinivasan, S., Dailey, P.J., McGhee, J.R., Lehner, T. and Miller, C.J. 1998. Targeted lymph node immunization with whole-inactivated SIV or envelope and core subunit antigen vaccines does not reliably protect rhesus macaques from vaginal challenge with SIV mac 251. *AIDS* **12** : 1-10.
  9. Kawabata, S., Miller, C.J., Lehner, T., Fujihashi, K., Kubota, M., McGhee, J.R. Hiroi, T., and Kiyono, H. 1998. Induction of polarized Th2 cytokine expression for p27-specific IgA B cell responses after immunization with antigen in rhesus macaques. *J. Infect. Dise.* **177** : 26-33.
  10. Kawabata, S., Boyaka, P.N., Coste, M., Fujihashi, K., Yamamoto, M., McGhee, J.R., and Kiyono, H. 1998. Unique characteristics of intraepithelial lymphocytes from villi tip and crypt portions of the small intestine. *Gastroenterology* **115** : 866-873.
  11. Iijima, H., Takahashi, I., Hiroi, T., Shimaoka, M., Kawano, S., Nagano, K., Hori, M., and Kiyono, H. 1998. Orally administered cholera toxin prevents murine intestinal T cells from staphylococcal enterotoxin B-induced anergy. *Gastroenterology* **115** : 1197-1204.
  12. Salvi, G.E., Brown, C.E., Fujihashi, K., Kiyono, H., Smith, F.W., Beck, J.D. and Offenbacher, S. 1998. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J. Periodontal Res.* **33** : 212-225.
  13. Shimaoka, M., Hosotsubo, K., Sugimoto, M., Sakaue, G., Taenaka, N., Yoshiya, I. and Kiyono, H. 1998. The influence of surgical stress on T cells : enhancement of early phase lymphocyte activation. *Aneth. Analg.* **87** : 1431-1435.
  14. Wikox, C.M., Harris, P.R., Redman, T.K., Kawabata, S., Hiroi, T., Kiyono, H., and Smith, P.D. 1998. High mucosal levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA are associated with cytomegalovirus esophagitis. *Gastroenterology* **114** : 77-82.
  15. Sugimoto, M., Shimaoka, M., Hosotsubo, K., Tanigami, H., Taenaka, N., Kiyono, H. and Yoshiya, I. 1998. Upregulation of fas ligand (Fas L) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after

- major surgery. Clin. Exp. Immunol. 112 : 120-125.
16. Shimaoka, M., Fujino, Y., Taenaka, N., Hiroi, T., **Kiyono, H.** and Yoshiya, I. 1998. High frequency oscillatory ventilation attenuates the activation of alveolar macrophages and neutrophils in lung injury. Crit. Care 2 :35-39.
  17. Harris, P.R., Ernst, P.B., Kawabata, K., **Kiyono, H.**, Graham, M.F. and Smith, P.D. 1998. Recombinant *Helicobacter pylori* urease activates primary mucosal macrophages. J. Infect. Dis. 178(5) : 1516-1520.
  18. Yuki, Y., Fujihashi, K., Yamamoto, M., McGhee, J.R. and **Kiyono, H.** 1998. Human milk proteins including secretory IgA fail to elicit tolerance after feeding. Intern. Immunol. 10 : 537-545.
  19. VanCott, J.L., Chatfield, S.N., Roberts, M., Hone, D.M., Hohmann, E., Pascual, D.W., Yamamoto, M., **Kiyono, H.** and McGhee, J.R. 1998. Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence gene. Nature Medicine 4 : 1247-1252.
  20. Kobayashi, T., Yamamoto, M., Hiroi, T., McGhee, J.R., Takeshita, Y., and **Kiyono, H.** 1998. Arginine enhances induction of T helper 1 and T helper 2 cytokine synthesis by Peyer's patch  $\alpha\beta$ T cell and antigen-specific mucosal immune response. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 : 2324-2340.
  1. Kurono, Y., Mogi, G., Kodama, S., Yamamoto, M., McGhee, J.R. and **Kiyono, H.** 1998. Mucosal immune responses in intranasally immunized mice with outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae*. In : *Mucosal Solutions. Advances in Mucosal Immunology*. Vol. 1., Husband, A. J. et. al. (eds.), pp311-315.
  2. Takahashi, I., and **Kiyono, H.** 1998.  $\gamma\delta$ T cells : Bodyguards and/or sleepers in the gut. Chemical Immunol. 71 : 77-87.
  3. James, S. P. and **Kiyono, H.** 1998. Gastrointestinal and mucosal T cells. In : *Mucosal Immunology*, Ogra, P.L. et al. (eds), Academic Press, San Diego. p381-396.

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

変異コレラ毒素の経鼻接種インフルエンザワクチンのアジュバントとしての有用性

主任研究者 田村 慎一 国立感染症研究所感染病理部  
研究協力者 萩原由加利 国立感染症研究所感染病理部

**研究要旨** アジュバント併用経鼻ワクチンのアジュバントであるコレラトキシン(CT)は、ヒトでの使用に際してはその毒性を減ずる必要がある。そこで既に毒性が低く有効なアジュバント活性を示すことが報告されているCT61F (CTの61番目をSerからPheに置換)やCT112K(112番目のGluをLysに置換)を含むいくつかの変異CTを作成し、それら変異CTの経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしてのヒトでの有効性と安全性について検討した。その結果、変異CT112Kが、ヒトに適用出来る最も有効且つ安全なアジュバントになることが示唆された。

**A. 研究目的**

我々はこれまで、マウスを用いた実験系において、現行のインフルエンザワクチンをコレラ毒素(CT)や大腸菌易熱性毒素(LT)等のアジュバントと共に経鼻接種することにより、上気道上に分泌型IgA抗体を誘導でき、それに伴い変異ウイルスの流行にも対応する交叉感染防御を準備できることを報告してきた。しかしながら、CTやLTは毒性が高く、ヒトに応用するためには、アジュバント活性を減ずることなく毒性のみを低下させる工夫が必要である。また、CTやLTには共存する抗原や毒素に対するIgE抗体(I型アレルギー)を誘導する作用があり、この副反応を除去する工夫も必要である。そこで本研究では、マウスを用いた実験系において、既に有効なアジュバント活性を示すことが報告されているCT61F (CTの61番目をSerからPheに置換)やCT112K(112番目のGluをLysに置換)を含むいくつかの変異CTを作成し、それら変異CTの経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしてのヒトでの有効性と安全性について検討した。

**B. 研究方法**

(1) 4種類の変異CT, CT7K(CTのN末端から7番目のArgをLysに置換)、CT61F, CT112K, CT118E(118番目のGlyをGluに置換)を構築した。  
(2) それぞれのCTの毒性の検定には、マウスY1副腎腫瘍細胞の培養系を用い、細胞の形態変化を指標とした。  
(3) 変異CTの経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしての能力は、BALB/cマウスにHAワクチン(0.1 $\mu$ g)を変異CT(0.1 $\mu$ g)と共に4週間隔で2回経鼻接種したマウスにおいて、2次接種後2週間目の抗体応答(ELISA法により血清IgGとIgE、及

び鼻洗浄液中のIgAを測定)によって検討した。

(4) その予防効果は、と致死量のウイルスのチャレンジ感染に対する防御能力(感染3日目のEID<sub>50</sub>により測定)によって検討した。

(5) CTのBサブユニットに対するIgE応答をPCA法により検討した。

**C. 研究成果**

(1) 毒性は、CT112Kが最も低く、naiveCTの約1/25000以下であった。

(2) 免疫マウスの鼻洗浄液中のIgA、血清中のIgG抗体はどちらも、CT112Kを用いた場合が最も高く、それぞれnaiveCTを用いた場合の約1/3の応答を示した。

(3) CT112KとCT118Eを用いた場合にチャレンジ感染に対するほぼ完全な防御が観察された。

(4) 血清中の全IgE抗体量もCTBに特異的な抗体量も共に、本実験において用いられた条件下では検出限界以下であった。

**D. 考察**

本実験で用いられたマウスへのアジュバント併用インフルエンザワクチンの経鼻投与条件は、20kgのヒトにそれぞれ100 $\mu$ gのワクチンとアジュバントを投与する条件に対応する。既に我々は、微量の大腸菌易熱性毒素(1%LT)を含むそのBサブユニット(LTB\*)(100 $\mu$ g)が、経鼻インフルエンザワクチン(100 $\mu$ g)のアジュバントとしてヒトにおいて有効であることを示唆してきた。本実験で用いられた条件下で、このLTB\*はマウスにおいてCT112Kの約2倍のアジュバント活性を示したが、毒性がnaiveCTの約1/250であり、CT112Kより約100倍高かった。従って、本実験で用いられた変異CTの