

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。

#### E. 結論

変異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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Komase, K., Tamura, S.-I., Matsuo, K., Watanabe, K., Hattori, N., Okada, A., Suzuki, Y., Kurata, T., and Aizawa, C. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 16, 248-254 (1998)

(2) Hagiwara, Y., Komase, K., Chen, Z., Matsuo, K., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T., and Tamura, S.-I. Mutants of cholera toxin as an effective and safe adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* (in press)(1999)

##### 1. 学会発表

(1) 萩原由加利、駒瀬勝啓、相沢主税、吉河智城、倉田毅、田村慎一：変異コレラ毒素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有効性。第46回日本ウイルス学会総会。1998. 10. 東京

(2) 萩原由加利、駒瀬勝啓、吉河智城、相沢主税、倉田毅、田村慎一：変異コレラ毒素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安全性。第2回日本ワクチン学会。1998. 11. 大阪

経鼻う蝕ペプチドワクチンの開発に関する研究

分担研究者

西沢俊樹

国立感染症研究所 口腔科学部 室長

研究要旨： う蝕は口腔という特殊環境下で、歯という硬組織に発症する多因性の細菌感染症である。そのため、通常のワクチン開発とは趣を異にし、その対象は唾液中の sIgA を主体とした粘膜免疫となる。事実、病原菌の付着因子に対する sIgA 抗体が同菌の歯面への定着を抑制することが実証されており、ワクチン開発の可能性が示唆されている。しかしながら、付着因子の免疫による心内膜炎の危険性が指摘され、これがヒトへのう蝕ワクチンの応用を足踏みさせている。本研究事業の最終目的は病原菌の定着を抑制する抗体のみを誘導できるペプチドを抗原とした手軽で安全な経鼻う蝕ワクチンの開発であり、すでにう蝕病原菌 *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単位の抗原として、13 残基ペプチド（TYEAALKQYEADL）を特定している。

本年度は、このペプチドをユニットとした様々なペプチドをデザインして化学合成し、ペプチド抗原の抗体誘導能の増強方法を検討した。その結果、アジュバント非存在下において、MAPs ( Multiple Antigenic Peptides ) よりもタンデム連結型において抗体誘導能が著しく増強されること、また、連結部にスペーサーとしてリジン1 残基または2 残基を用いることによりさらに増強効果が高まること、ペプチドユニットの C 末側に3 残基アミノ酸 KQY をつなげることによっても誘導能の増強が認められること、等々が明らかとなった。

A. 研究目的

う蝕は世界に蔓延している細菌感染症であり、その予防は国を問わず口腔保健領域における最優先課題の一つである。しかしながら、う蝕は口腔という特殊環境下における多因性疾患であり、そのため、その制圧には幾つかの予防方法の並用が必須となる。我々の最終目標は、典型的な小児う蝕である表面う蝕や隣接面う蝕、そして高齢者に多い根面う蝕を、物理学的、生物化学的及び免疫学的予防方法の並用により抑制しようとするものであり、現在、フッ化物塗布剤、代用糖、ワクチン等の開発研究を平行して行っている。

本研究課題はワクチン開発の一部であり、う蝕病原菌 (*Streptococcus mutans*) の菌体や菌体表層蛋白質抗原 (Pac) の免疫で、単一菌感染動物

における実験う蝕が抑制できることは、我々を含め国内外の幾つかの研究グループですでに実証されている。しかしながら、菌体や表層蛋白質抗原の免疫によりヒトの心筋に結合する抗体の誘導される危険性が事実として指摘されており、これがヒトへのう蝕ワクチンの応用を足踏みさせてきた。

う蝕が致死性の疾患でなく、総義歯という究極の代替手段も現実に存在する以上、う蝕ワクチンには他のいかなるワクチンにもまして安全性求される。また、口腔という特殊環境下での疾患ゆえ、ワクチンの効果は唾液中の分泌型 IgA ( sIgA ) が主体となる粘膜免疫に依存することになる。これら口腔の特殊性に鑑み、我々はここ数年来、う蝕予防に最適なワクチンとして、副作用の削除が容易で sIgA の誘導が可能な経鼻う蝕ペプチドワクチンの開発研究を続けている。

短鎖ペプチドをワクチン用抗原として用いることの利点は、成分が均一で安定、目的抗体のみの誘導が可能、高分子抗原では誘導できないようなマイナーな抗原決定基を認識する抗体の誘導も可能、抗原デザインの自在性などたくさんあるが、一方では、弱点として、1. 免疫原性が弱い、2. 阻害抗体の誘導が難しい、3. 阻害効果の減弱、4. ヒトによる免疫原性の強弱、5. 細胞性免疫誘導能が弱い、が存在する。我々は、これまでのワクチン開発研究において、その幾つかを解決している。また、幸いなことに、口腔という特殊事情ゆえキラーT細胞など細胞免疫はう蝕予防には期待できない事実から、弱点5は回避できる。残るは免疫原性増強方法の完成と弱点4、すなわちMHC遺伝子によるペプチドの免疫原性の拘束をいかに回避するかである。

本研究事業の目的は、う蝕ワクチン用として開発したう蝕病原細菌の歯面定着関与因子(PAC)の生物活性阻害抗体を誘導できる最少単位のペプチド(ユニットペプチド:TYEAALKQYEADL)を基本とし、そのアミノ酸配列や連結方法に意図的に手を加えることにより、抗原性のより強いワクチン用ペプチド抗原を構築することであり、また、完成したペプチド抗原を種々のルートや条件下に免疫し、sIgA抗体産生に最も効率の良い免疫方法を確立することである。

## B. 研究方法

B10.D2マウスにおいて、ユニットペプチド(PAC(365-377)ペプチド)はそのB細胞エピトープ内にT細胞エピトープを重複するユニークな抗原ペプチドであり、その単独免疫でPACに対する交叉反応性阻害抗体を効率良く誘導できる最小単位のペプチド抗原である。しかしながら、他のペプチド同様、アジュバントなしでは極めてその免疫原性が低い。ワクチンの実現には、アジュバント非存在下においても強い免疫原性を発現させる工夫が必要である。

### (a) ペプチド抗原のデザイン

PAC(365-377)ペプチドをユニットとし、その数や連結様式の異なる幾種かのペプチドをデザインしFmoc法で合成した。ユニットペプチドの並列連結にはリジンの側鎖アミノ基を利用したMAP(Multiple Antigenic Peptide)システムを用い

た。直列連結(タンデム型)では2量体や3量体、またその連結部位におけるスペーサーアミノ酸の種類や数を変化させた。

### (b) 免疫方法および抗体誘導能の検討

それぞれのペプチド(200ug/マウス)をB10.D2マウスにフロイント完全アジュバント(CFA)、同不完全アジュバント(IFA)あるいはアジュバント非存在下(PBS)で腹腔免疫し、等量の免疫原で追加免疫後、抗血清中の抗体価を「免疫原(総抗体価)」、「PAC(361-379)ペプチド(ユニットに対する抗体価)」、「rPAC(交叉反応抗体価)」をそれぞれコート抗原としたELISA法により測定した。

## C. 研究結果および考察

ユニットペプチド単独に比べMAPsが強い免疫原性を持つことは既にCFA存在下で報告しているが、今回、我々はIFA存在下においてもCFA存在下とほぼ同等の強い免疫増強効果を観察した。加えて、少なくともユニットペプチドに関しては、CFA、IFAいずれのアジュバント存在下においても、タンデム連結型ダイマーおよびトリマーが、MAPsと同等かもしくはそれ以上の抗体誘導能増強効果を持つことを明かにした。

一方、アジュバント非存在下では、ユニット単独はもちろん、MAPs免疫においても抗体がほとんど産生されないのに対し、タンデム連結型に強い抗体誘導能が観察された。そして、タンデム連結型においては、ダイマーよりトリマーに、直結よりスペーサー挿入に、またその際のスペーサーアミノ酸としてグリシンよりアラニン、アラニンよりリジンに、それぞれより強い免疫原性増強効果がみとめられた。ちなみにグリシン残基は $\alpha$ -ヘリックス構造をとり難くさせるといわれており、トリマーに比べダイマーにおいてその影響がより強く出たとも考えられる。また、スペーサーアミノ酸の数は3個より1~2個に強い免疫原性が認められた。いずれにしても、エピトープの数では勝るMAPsに比べてもタンデムの方がより効果的であるという事実はペプチドのタンデム連結様式がアジュバント非存在下におけるペプチドの半減期や抗原提示過程になんらかの影響を与える可能性を強く示唆する。

また、徐放効果の強いアジュバントであるIFA存在下ではユニット単独でも十分抗体誘導が可能であることから、リポゾーム等人体に安全でsIgA誘導能の強い徐放性アジュバントの開発も必要であろう。

さらに、ユニットペプチドのカルボキシ末端にKQYと3個のアミノ酸を連結すること、あるいは、ユニットペプチドのT細胞エピトープとは異なるT

細胞エピトープを連結することによっても免疫原性の増強が可能であることが明らかとなった。

これらの知見は今後のペプチドワクチン開発研究の基礎データとして有用と思われる。

なお、MAPs、タンデムいずれにおいても rPac に対する非交叉反応性抗体（免疫原に対する血清抗体価 - rPac に対する血清抗体価）が同時に誘導されており、ペプチドの連結により新たに非交叉反応性エピトープの生じる可能性が示唆された。

#### D. 結論

経鼻う蝕ペプチドワクチン用の抗原として、う蝕病原細菌の歯面定着関与因 (Pac) の生物活性阻害抗体を誘導できる最少単位のペプチド（ユニットペプチド：TYEAALKQYEADL）をリジンをスペーサーアミノ酸として3連結したユニットペプチドのリジンスペーサーの3量体が最も有力と考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

The immunogenicity of various peptides antigens inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. K. Kato, H. Takeuchi, Y. Oishi, H. Senpuku, N. Shimura, N. Hanada and T. Nisizawa, Oral Microbiology and Immunology, 1999 (in press).

##### 2. 学会発表

Synthetic Peptides Inducing Cross-reacting Antibodies to Streptococcal PAc without Adjuvant. H. Kato, H. Takeuchi, Y. Oishi, H. Senpuku, N. Hanada, N. Shimura and T. Nisizawa, 78, Abstracts of Papers, 423,2540, 77th General Session of the IADR

## 分担研究報告書

### 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

分担研究者 五十君 静信 国立感染症研究所 食品衛生微生物部 主任研究官

#### 研究要旨

粘膜ワクチンとして用いる安全性の高い抗原デリバリーシステムの開発を目標とし、乳酸菌に防御抗原のエピトープを組み込むベクターの開発を行い、経口的に使用可能と思われる無毒化毒素遺伝子の検討を行い、これらを組み込んだ組換え乳酸菌ワクチンの作出を試みた。出血性大腸菌 O157 のワクチンとして作出した Verotoxin 1(VT1)のエピトープを組み込んだ乳酸菌 *Lc.lactis* は、マウスへの経口投与により、VT1 に特異的な IgG および IgA 抗体の上昇を示した。

#### A. 研究目的

粘膜ワクチンとして用いる安全性の高い抗原デリバリーシステムの開発を試みる。すなわち、乳酸菌を抗原運搬体とする組換え乳酸菌粘膜ワクチンを作成するのに必要な3要素、エピトープとして用いる安全性の高い抗原遺伝子、乳酸菌を形質転換可能なベクター、および宿主としての乳酸菌の検討を行い、組換え乳酸菌ワクチンの作出を試みる。

#### B. 研究方法

*Streptococcus bovis* 由来の  $\alpha$ -アミラーゼが、各種乳酸菌で発現、分泌するため、この遺伝子のプロモーター、分泌シグナル配列を利用し、乳酸菌発現ベクターの開発を行った。分泌シグナル配列の挿入の長さを調節することにより、挿入した遺伝子の発現産物が、菌体から分泌される分泌型ベクターと、菌体表面に残る非分泌型ベクターの2種類のベクターを用い、毒素活性部位の遺伝子を取り除いた無毒化ベロ毒素遺伝子 (VT1 および VT2) を組込んだ。無毒化したエピトープ遺伝子とプラスミドベクターとの組み合わせを変え、乳酸菌での発現を調べ、大腸菌発現株との比較により、マウスに対するワクチンとしての効果を検討した。

#### C. 研究結果

分泌型ベクターに組み込んだ VT1 の B サブユニットを用いた無毒化遺伝子は、乳酸菌 *Lactococcus lactis* IL1403 株に発現し、充分な量のエピトープを産生した。一方、大腸菌 JM109 株では、VT1 及び VT2 の毒素活性部分の遺伝子

を含まず、かつ立体的には元の毒素に近い無毒化遺伝子を発現させることに成功した。これらの株の産生する毒素類似タンパク質は、Vero 細胞に対する毒性、マウスに対する毒性は認められず、病原大腸菌 O157 の経口ワクチンとして用いるエピトープとして有望であることが示された。これらの株を、C57BL/6 マウスに胃内投与し、ワクチンとしての効果を調べたところ、VT1 に特異的な抗体価の上昇が認められた。血液中のタイターは、大腸菌と乳酸菌でそれぞれ4頭の平均が IgG16 倍と 40 倍、IgA が、16 倍と 27 倍であった。特に顕著であったのは、十二指腸から抽出した抗体のタイターで、大腸菌と乳酸菌でそれぞれ平均 IgG40 倍と 65 倍、IgA125 倍と 145 倍を示した。

#### D. 考察

分泌型ベクターに組み込んだ VT1 の B サブユニット遺伝子は、乳酸菌 *Lc.lactis* に発現した。この菌を用いたマウスに対する経口免疫では、大腸菌に組み込んだ A2B 型の無毒化 VT1 発現株と同等以上に VT1 に特異的な IgG および IgA 抗体価を示した。今のところ、マウス実験により得られた特異的抗体が、防御抗体として働くかどうかの検討が終わっていないため、ワクチンとしての有効性については、次の感染防御実験が必要と思われる。いずれにせよ、乳酸菌に組み込んだエピトープが、経口投与により、マウスに対し、特異的抗体価を上げることを実証したことは重要で、乳酸菌が粘膜免疫の抗原運搬体として十分に機能することが示された。

## E. 結論

実験に用いた、乳酸菌、発現用ベクタープラスミド、挿入遺伝子の組み合わせは、マウスの動物実験において、乳酸菌を運び屋とする抗原デリバリーシステムとして機能することが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Izumikawa K, Hirakata Y, Yamaguchi T, Takemura H, Maesaki S, Tomono K, Igimi S, Kaku M, Yamada Y, Kohno S and Kamihira S. 1998. Escherichia coli O157 interactions with human intestinal Caco-2 cells and the influence of fosfomycin. J. Antimicrobial Chemotherapy. 42:341-347.

五十君 静信. 1998. 乳酸菌を抗原運搬体とする経口ワクチンの開発. 日本乳酸菌学会誌. 8:101-105.

### 2. 学会発表

Shizunobu Igimi. Lactic acid bacteria as antigens delivery vehicles for mucosal immunization. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry symposium Lactic Acid Bacteria: New Frontier Studies. 1999.4. Fukuoka.

五十君 静信、高橋 元秀、熊谷 進。腸管出血性大腸菌ワクチンのエピトープとして用いる VT1 無毒化遺伝子の評価。日本細菌学会総会。平成 10 年 4 月。松本。

五十君 静信、高橋 元秀、熊谷 進。腸管出血性大腸菌 VERO 毒素無毒化遺伝子の乳酸菌 *Lactococcus lactis* での発現とその評価。日本細菌学会総会。平成 11 年 3 月。東京。

## スギ花粉症の予防および治療を目的としたDNAワクチン開発の基礎的研究

分担研究者 阪口雅弘 国立感染症研究所免疫部主任研究官

研究要旨：スギ花粉症の予防および治療への利用を目的として、スギ花粉アレルゲン遺伝子のDNAワクチンを構築した。DNAワクチンをあらかじめ筋肉注射したマウスでは、アレルゲン特異的Th1細胞が誘導でき、アレルゲンに対するIgEの産生が抑制できた。以上の結果から、スギ花粉症の予防におけるDNAワクチンの有効性が示唆された。

### A. 研究目的

スギ花粉症は、鼻腔から吸入されたスギ花粉が鼻粘膜に沈着して起こるアレルギー疾患であり、根治的かつ簡便な免疫治療法が求められている。今回、スギ花粉症の予防および治療への利用を目的としたDNAワクチンの構築を行い、その有効性をマウスの実験系を用いて検討した。

### B. 研究方法

DNAワクチン：スギ花粉主要アレルゲンの一つであるCry j 1のcDNAをpCAGGSプラスミドに組み込み、pCACJ1（DNAワクチン）を構築した。

免疫応答誘導試験：マウスに筋肉注射あるいはGene gunを用いてpCACJ1を接種した。マウス血中のアレルゲン特異的IgGをELISA法により測定した。

サイトカイン産生試験：pCACJ1を接種したマウスの脾臓T細胞をin vitroにおいてアレルゲンで刺激した。培養上清中のIL-4、IFN- $\gamma$ の量をELISA法を用いて測定した。

IgE産生予防試験：あらかじめpCACJ1接種したマウスを、スギ花粉アレルゲンとアラムで感作した。マウス血中のアレルゲン特異的IgEを蛍光ELISA法により測定した。

### C. 研究結果

DNAワクチン（pCACJ1）をマウスに筋肉注射した場合に、あるいはpCACJ1を金コロイドに吸着させた後、Gene gunを用いてマウスの皮膚組織に投与した場合に、Cryj 1に特異的な抗体の産生が認められた（図1）。

pCACJ1を筋肉注射したマウス由来の脾臓T細胞は、*in vitro*の条件下でTh1型サイトカインIFN- $\gamma$ を産生した。Gene gunを用いてpCACJ1を投与したマウス由来の脾臓T細胞は、Th2型サイトカインIL-4を産生した（表1）。

さらに、予防的にDNAワクチンを接種することでスギ花粉アレルゲン特異的IgEの産生が抑制できるかどうかを調べた。pCACJ1をマウスに筋肉注射した後、スギ花粉アレルゲンタンパクとアラムで感作したところ、アレルゲンに対するIgE抗体産生の抑制が認められた（図2）。一方、Gene gunによりpCACJ1を投与したマウスでは、アレルゲン特異的IgE抗体産生の抑制は認められなかった。

### D. 考察

Gene gunによるDNAワクチンの接種は、Th2型の免疫応答を誘導するため、スギ花粉

アレルゲンに対するIgEの産生を抑制しなかった。一方、あらかじめ筋肉注射によりDNAワクチンを接種した場合には、アレルゲン特異的Th1細胞が誘導されたため、アレルゲンに対するIgE抗体の産生が抑制できたと考えられる。

#### E. 結論

あらかじめDNAワクチンを筋肉注射することで、アレルゲン特異的Th1細胞が誘導でき、アレルゲンに対するIgEの産生を抑制できることが明らかになった。この結果はスギ花粉症の予防におけるDNAワクチンの有効性を示すものである。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 野原修 今井透 遠藤朝彦 永倉仁史 小野幹夫 小沢仁 森山寛 齊藤三郎 阪口雅弘 谷口美文 : スギ・ヒノキ花粉の共通抗原性におけるCry j 2の関与。耳鼻免疫アレルギー 16, 26-32, 1998.

2) Hirahara, K., Saito, S., Serizawa N., Sakaguchi, M., Taniguchi Y., Kaminogawa S. and Shiraishi, A.: Oral administration of a dominant T cell determinant peptide inhibited allergen-specific T cell and IgE responses in intrasally-primed mice with Cry j 2 of Japanese cedar pollen. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 102, 961-967, 1998.

3) Sakaguchi, M. and Inouye, S.: Two patterns of systemic immediate-type reactions to Japanese encephalitis vaccines. Vaccine 16, 68-69, 1998.

4) Sakaguchi, M., Nakayama T. and Inouye, S.: Cases of systemic immediate-type urticaria associated with diphtheria-tetanus-pertussis vaccines. Vaccine 16, 1138-1140, 1998.

5) Shirai, T., Hattori, S., Sakaguchi, M., Inouye, S., Kimura, A., Ebihara, T., Irie, S., Nagai Y. and Hori, H. : The complete cDNA coding sequence for the bovine pro  $\alpha$  2(I) chain of type I procollagen. Matrix Biology 17, 85-88, 1998.

6) Nagai Y. and Hori, H. : The complete cDNA coding sequence for the bovine pro  $\alpha$  2(I) chain of type I procollagen. Matrix Biology 17, 85-88, 1998.

7) Kobayashi, C., Hashimoto, M., Nigi, H., Fujimoto, K., Inouye, S., and Sakaguchi, M.: Parasite infection and Japanese cedar pollinosis in monkeys. Veterinary Immunology and Immunopathology 67, 93-100, 1999.

8) Sakaguchi, M., Hori, H., Ebihara, T., Irie, S., Yanagida, M., and Inouye, S.: Response of IgE in bovine gelatin-sensitive children to gelatins from various animal. Immunology, 96, 286-290, 1999.

9) Nakai, S., Nitta, H., Ono, M., Abe, K. and Sakaguchi, M.: Measurement of biological contaminants and particulate matter inside a Japanese dwelling. Indoor Air, 9, 41-46, 1999

10) Sakaguchi, M., Kaneda, H., and Inouye, S.: A case of anaphylaxis to gelatin included in erythropoietin products. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 103, 349-350, 1999.

11) Kobayashi, C., Nigi, H., Saito, S., Ide, T., Taniguchi, Y., Inouye, S., Sakaguchi, M.: IgE reactivity and cross-reactivity of Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) to Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) and cypress (*Chamaecyparis obtusa*) pollen allergens. Clinical Experimental Allergy, in press.



12)Sakauguchi, M., Kobayashi, C., Inouye, S., Saito, S., Hirahara, K., Shiraishi, A., Konka, A, Yamada, T., Nigi, H.: The incidence of Japanese cedar pollinosis and sensitization to the pollen allergens among Japanese monkeys in a troop. *Immuology*, in press.

13)Miyazawa, H., Saitoh, S., Kumagaya, T., Yamanaka, T., Yasuda, S., Yokota-Tsunetsugu, Y., Inouye, S. and Sakaguchi, M.: IgG antibody to gelatin in children with systemic immediate and non-immediate reactions to measles, mumps and rubella vaccines. *Vaccine*, in press.

図1 pCACJ1免疫マウスにおけるスギ花粉アレルギー特異的IgGの産生

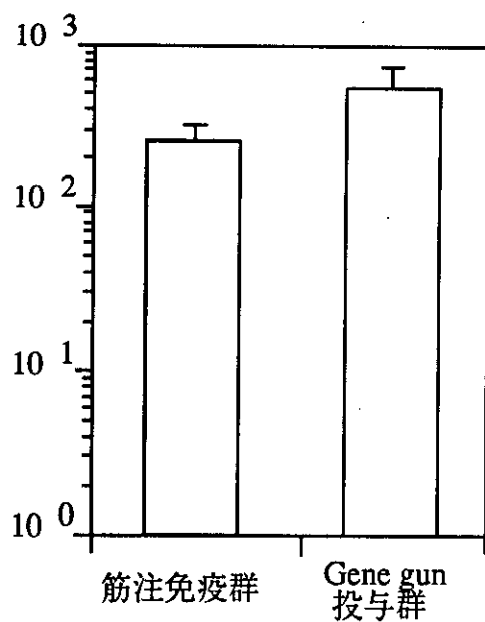
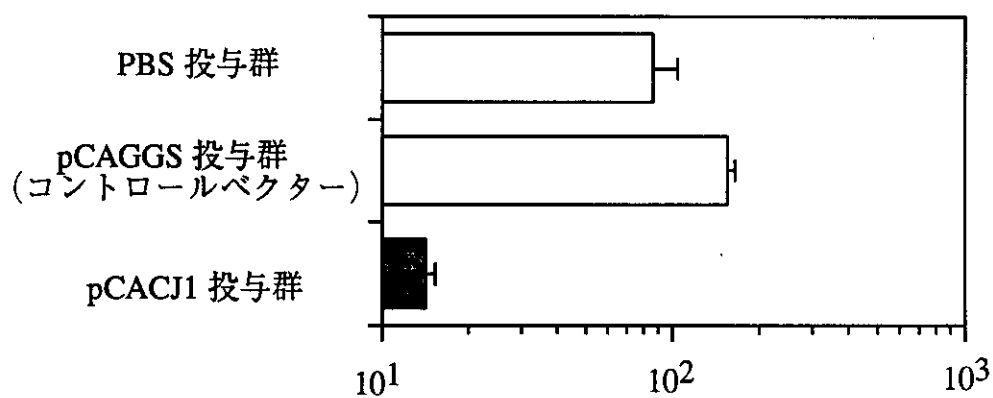


表1. pCACJ1免疫マウスにおけるサイトカイン応答

免疫方法	サイトカイン	
	IFN- $\gamma$ (U/ml)	IL-4 (pg/ml)
筋肉免疫	185	< 4.0
Gene gun免疫	134	27

図2 pCACJ1免疫マウスにおけるスギ花粉特異的IgE産生の抑制



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 田村慎一

1. Komase, K., Tamura, S.-I., Matsuo, K., Watanabe, K., Hattori, N., Odaka, A., Suzuki, Y., Kurata, T., & Aizawa, C. Mutants of Escherichia coli heat-labile enterotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 1998, 16:248-254
2. Tamura, S.-I., Iwasaki, T., Thompson, A. H., Asanuma, H., Chen, Z., Suzuki, Y., Aizawa, C. & Kurata, T. Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *J. Gen. Virol.* 1998, 79:291-299
3. Chen, Z., Sahashi, Y., Matsuo, K., Asanuma, H., Takahashi, H., Iwasaki, T., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T. & Tamura, S.-I. Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* 1998, 16:1544-1549
4. Asanuma, H., Aizawa, C., Kurata, T. & Tamura, S.-I. IgA antibody-forming cell responses in the nasal-associated lymphoid tissue of mice vaccinated by intranasal, intravenous and/or subcutaneous administration. *Vaccine* 1998, 16: 1257-1262
5. Chen, Z., Matsuo, K., Asanuma, H., Takahashi, H., Iwasaki, T., Suzuki, Y., Chikara, A., Kurata, T. & Tamura, S.-I. Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs *Vaccine* 1999, 17:653-659
6. Hagiwara, Y., Komase, K., Chen, Z., Matsuo, K., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T. and Tamura, S.-I. Mutants of cholera toxin as an effective and safe adjuvant for nasal influenza vaccine *Vaccine* (in press) 1999
7. 田村慎一:経鼻インフルエンザウイルス蛋白質(あるいはプラスミドDNA)ワクチンの開発に伴う問題点. *Drug Delivery System* 1999,14:13-19

### 岩崎琢也

1. Iwasaki, T., Tamura, S.-I., 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* 1999, 144:1-11

### 清野 宏

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 immuno-deficiency 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., Yangita, 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 unresponsive- ness in interferon- 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. Dis.* **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 intra- epithelial lymphocytes from villi tip and cript 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 staphylo- cocal 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-mRNA are associated with cytomegalovirus esphagitis. *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 T cell and antigen-specific mucosal immune response. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 : 2324-2340.
  21. 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.
  22. Takahashi, I., and **Kiyono, H.** 1998. T cells : Bodyguards and/or sleepers in the gut. *Chemical Immunol.* 71 : 77-87.
  23. 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.

#### 西沢俊樹

1. Kato, K., Takeuchi, Y., Oishi, H., Senpuku, N., Shimura, N., Hanada, N. & Nishizawa, T. The immunogenicity of various peptide antigens inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Immunol.* (In press) 1999
- 2.

#### 五十君静信

1. Izumikawa, K., Hirakata, Y., Yamaguchi, T., Takemura, H., Maesaki, S., Tomoto, K., Igimi, S., Kaku, M., Yamada, Y., Kohno, S. & Kamihira, S. Escherichia coli O157 interactions with human intestinal Caco-2 cells and the influence of fosfomycin. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 1998, 42:341-347
2. 五十君静信. 乳酸菌を抗原運搬体とする経口ワクチンの開発. 日本乳酸菌学会誌. 1

坂口雅弘

1. Sakaguchi M, Inouye S.: Two patterns of systemic immediate-type reactions to Japanese encephalitis vaccines. *Vaccine* 1998, 16, 68-69.
2. Sakaguchi M, Nakayamam T, Inouye S.: Cases of systemic immediate-type urticaria associated with diphtheria-tetanus-pertussis vaccines. *Vaccine* 1998,16, 1138-1140.
3. Shirai T, Hattori S, Sakaguchi M, et al. : The complete cDNA coding sequence for the bovine pro 2(I) chain of type I procollagen. *Matrix Bio* 1998, 117, 85-88.
4. Hirahara, K., Saito, S., Sakaguchi M., et al.: Oral administration of a dominant T cell determinat peptide inhibited allergen-specific T cell and IgE responses in intrasally-primed mice with Cry j 2 of Japanese cedar pollen. *J Allergy Clin Immunol*, in press.
5. Nakai S, Nitta H, Sakaguchi M, et al.: Measurement of biological contaminants and particulate matter inside a Japanese dwelling. *Indoor Air*, in press.
6. Sakaguchi M, Kaneda H, Inouye S.: A case of anaphylaxis to gelatin included in erythropoitin products. *J Allergy Clin Immunol*, in press.
7. Miyazawa H, Saitoh S, Sakaguchi M.: IgG antibody to gelatin in children with systemic immediate and non-immediate reactions to measles, mumps and rubella vaccines. *Vaccine*, in press.
8. Kobayashia C, Hashimoto M, Sakaguchi M., et al. : Parasite infection and Japanese cedar pollinosis in monkeys. *Vet Immunol Immunopathol*, in press.
9. Sakaguchi M, Hori H, Ebihara T, et al.: Response of IgE in bovine gelatin-sensitive children to gelatins from various animal. *Immunology*, in press.
10. Kobayashi C, Nigi H, Sakaguchi M, et al: IgE-reactivity and cross-reactivity of Japanese monkeys to Japanese cedar and cypress pollen allergens. *Clin Exp Allergy*, in press.