

厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

粘膜ワクチン開発の基礎となるアジュバントに関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 14 年（2002 年）3 月

目 次

I.	研究総括報告書	
	粘膜ワクチン開発の基礎となるアジュバントに関する研究	
	清野 宏	1
II.	分担研究報告書	
1.	無毒化新規 mCT-A/LT-B キメラ型アジュバントの粘膜免疫 増強効果の検討	
	清野 宏	11
2.	CT のアジュバント活性部位の同定	
	濱端 崇	22
3.	<i>Bacillus brevis</i> による chimera(mCT-A/LT-B)の生産	
	高木 広明	25
4.	変異コレラ毒素併用経鼻インフルエンザワクチンによって 誘導される防御免疫応答	
	田村 慎一	29
5.	大腸菌を用いた mCT の大量産生系の確立	
	駒瀬 勝啓	32
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV.	研究成果の刊行物・別刷	44

厚生科学研究費（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

粘膜ワクチン開発の基礎となるアジュバントに関する研究

主任研究者：清野 宏 大阪大学微生物病研究所・教授

研究要旨

新興・再興感染症の予防に向けて新世代ワクチンとして期待される「粘膜ワクチン」開発が期待されている。この目的達成に向けて粘膜アジュバント、もしくは粘膜免疫調節因子と呼ばれる粘膜免疫誘導機能を増強させる分子・物質の開発が必要である。当研究班ではコレラ菌の産生するコレラトキシン(CT)の粘膜アジュバント効果に注目し、遺伝子工学の手法を応用して毒性がなく、且つ免疫増強作用が維持されている無毒化変異型 CT(mCT)の開発を試み成功している。本研究計画では mCT の自然免疫・獲得免疫での粘膜免疫における免疫増強作用メカニズムについて分子・細胞レベルでの解明を進め、無毒化アジュバント活性ペプチドの合成を試みる。さらに実用化に向けて効率良い mCT 産生システムの開発も異なる発現ベクター（例：*Bacillus brevis*, HPD31-M3, *E. coli*, pTrc99A）を駆使して、その実用化へ向けて研究を推進している。この研究計画を基盤に「安全で効果のある粘膜アジュバント」を開発し、ヒトへの応用に向けた基礎を確立する目的で研究が展開されている。

分担研究者：	高木 広明	プロテインエクスプレス株式会社
	濱端 崇	国立国際医療センター
	田村 慎一	国立感染症研究所
	駒瀬 勝啓	財団法人 北里研究所

A. 研究目的

新興・再興感染症の予防に向けて新世代ワクチンとして「粘膜ワクチン」が期待されている。その成功の鍵を握っている新規の粘膜アジュバント開発に向けての基礎研究を行う。我々が開発してきた無毒化変異型 CT(mCT)を中心として、その改良型、キメラ型、合成ペプチドの開発を進め、実用化に向けた基礎研究を推進する。

B. 研究方法

『感染と免疫』の原点に立ち返ると殆どすべての病原微生物は体外と体内環境の接点となっている鼻腔・口腔にはじまり呼吸器、消化器、泌尿生殖器を被っている広大な粘膜面を介して侵入して体内を攪乱する。そこで、当研究班は生体の第一線の防御バリアーとして機能している粘膜免疫機構を有効に応用した次世代ワクチンとして期待されている『粘膜ワクチン』の開発に向けて粘膜免疫システムの解明を中心に、先導的な研究を進めている。本研究計画

では粘膜免疫と感染症研究の領域で先導的立場にある大阪大学、国立感染症研究所、国立国際医療センター研究所、北里研究所、ヒゲタ研究所（プロテインエクスプレス）からなる産学共同研究開発体制を構築して『粘膜ワクチン』の実用化を推進している。これは、新世紀における産学共同粘膜ワクチン開発チームの先駆けといえる。

粘膜アジュバントとして期待されている mCT は大腸菌発現ベクター(pUC119)を使って産生してきたが、その回収率は低い。そこで、ヒゲタ・プロテインエクスプレスチームは *B.brevis* 発現ベクター (HPD31-M3)のシステムを応用した大量培養系の確立に向けて研究を進めている。阪大・感染研チームは *B.brevis* 発現システム由来の mCT (例：E112K) や mCT-A と LT-B キメラ型粘膜アジュバントの免疫増強効果とそのメカニズムについて研究を展開している。国立国際医療センター（医療セ研）グループは、CT のアジュバント活性を担う部位の特定を試み、その合成ペプチドの利用について検討している。一方、北里研究所（北里）研究グループは発現用プロモーターの選択と CT 遺伝子のシグナル配列を改良することで大腸菌内の mCT 産生性向上をはかっている。

倫理面への配慮

各々の研究チームが各研究機関の定めている実験動物使用指針や DNA 安全委員会の基準に準じた実験を進めている。

C. 研究成果

1. *B. acillus brevis* によるキメラ(mCT/LTB)の生産(プロテインエクスプレスグループ)

B. brevis の宿主-ベクター系を用いて、キメラ型 (mCT 改良型：mCTA/LTB)を分泌生産することに成

功した。この分泌産生されたキメラ型アジュバントは、immunobilized D-galactose column を用いた精製方法によって mCT と同様の A₁B₅ 構造を持ち、毒性が低く、アジュバント活性を有すキメラ型が調製された。このキメラ型は夾雑蛋白質がほとんどなく、エンドトキシン濃度が低かった。今後、生産性の向上（菌株の安定化、培養条件の検討）および精製効率の向上を検討する。

2. 無毒化新規 mCT-A/LT-B キメラ型アジュバントの粘膜免疫増強効果の検討（大阪大学グループ）

キメラ型 mCTA/LTB の毒素活性の測定を、*in vitro* と *in vivo* の両方の系を用いて解析したところ、毒素原性は認められなかった。例えば、結紮した腸への mCTA/LTB の影響を検索したところ、100 ng の自然型 CT(nCT)は顕著な分泌液の産生を誘導したが、その 1000 倍量の mCTA/LTB を使っても分泌液を誘導しなかった。

次にキメラ型アジュバント活性を測定するために、mCTA/LTB をタンパク抗原の破傷風ワクチン (TT) とともにマウスに経鼻免疫した。その結果、血清中に顕著な TT 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体応答が誘導された。さらに、唾液および鼻腔洗浄液中にも、顕著な TT 特異的分泌型 IgA 抗体価が検出された。次にこれらの免疫したマウスに致死量 (130LD₅₀) の破傷風毒素を投与した。その結果、TT と nCT による免疫と同様に、TT と mCTA/LTB によって誘導された抗体は破傷風毒素に対して完全な防御効果を示した。

興味あることに、血清中の全 IgE 量、TT 特異的 IgE 抗体価ともに、mCTA/LTB をアジュバントとして用いた群は nCT をアジュバントとして用いた群に比べて、顕著に減少していた。

3. 変異コレラ毒素併用経鼻インフルエンザワクチンによって誘導される防御免疫応答 (国立感染症研究所グループ)

経鼻ワクチンとして最小有効濃度(0.1 μ g)のインフルエンザワクチンと無毒化変異型 CT(mCT)である CT112K を共に初回投与し、4 週間後に PR8HA ワクチン(0.1 μ g)のみを追加した。この経鼻ワクチン投与スケジュールにより BALB/c マウスに誘導される獲得免疫応答のうち、抗体応答、特に、上気道の IgA 抗体応答が、また、下気道では IgG 抗体応答がウイルス感染阻止に最も重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、粘膜の IgA 抗体は変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にもこの CT112K 併用経鼻インフルエンザワクチンが有効であることが示唆された。

4. 大腸菌を用いた mCT の大量産生系の確立 (北里研究所グループ)

LT のシグナル配列を持つ CT 遺伝子 (pTrcLT01)、mCT (pTrcLT02) 遺伝子を作成し、大腸菌で発現させたところ、CT、mCT の発現量が飛躍的に増大した。この CT、mCT 発現系は粘膜アジュバンドとしての mCT の大量調整に有用である。

5. CT のアジュバント活性部位の同定 (国立国際医療センター研究所グループ)

CT のアジュバント活性部位を決定する目的で、mCT の一連の欠損変異遺伝子を作製した。それらはほぼ良好な発現を示し、定法で精製可能であった。今後動物実験によりそれらのアジュバント効果の比較検討を行う予定である。

D. 考察

1. *B. brevis* によるキメラ型アジュバント

(mCT/LTB)の生産(プロテインエクスプレスグループ)

B. brevis の宿主-ベクター系を用いたキメラ型アジュバント (mCTA/LTB) は、培養上清中に生産された。その生産量は、試験管(培地 3 ml) での生産量が一番高く (約 0.1 mg/ml)、500 ml 三角フラスコ(培地 50 ml)、3L ジャー (培地 2L) と続いた。スケールアップを行うためには菌株の安定化、培養条件の検討により生産性の向上を計る必要がある。精製されたキメラ型は夾雑蛋白質もほとんどなく、エンドトキシン濃度も低く、mCT と同様の A₁B₅ 構造を取っており、毒性が低く、アジュバント活性を有していた (大阪大の結果 下記参照)。しかし、蛋白質の濃縮やエンドトキシンの除去工程を目的として膜処理 (UF3000、UF10000) を行うと、キメラ型の回収率が低いという問題点が残っている。今後、これらの点を改良して回収率の良い精製方法の開発が必要である。

2. 無毒化新規 mCT-A/LT-B キメラ型アジュバントの粘膜免疫増強効果の検討 (大阪大学グループ)

本研究ではヒトへの応用を念頭においた安全有効な粘膜アジュバントの開発を試みている。これまでわれわれは、CT の持つ強いアジュバント効果を維持しつつ、毒性のみを取り除くために、CT-A サブユニットの ADP-ribosyltransferase 活性中心のアミノ酸を置換することにより無毒化した 2 つの CT 変異毒素(mutant CT: mCT) S61F、E112K を作製した。その結果、mCT をタンパク抗原とともに経鼻投与することにより、鼻腔、消化管、唾液および膺分泌液中に抗原特異的 IgA 産生が認められ、mCT の有効性が示された。

CT と同様の A₁B₅ 構造を有する毒素原性大腸菌の易熱性毒素 (LT)は CT に比較して IL-4 に依存せ

ず、IgE 抗体応答がほとんど見られないことがわれわれのこれまでの報告によって示されている。また、CT はそのアジュバント作用誘導に際して、CT-B サブユニットが細胞表面の GM1 ガングリオシドに結合するが、LT はその B サブユニットや GM1 以外のガングリオシド (GM2、アシアロ GM1) にも結合することが示されている。これらの結果より、LT の低 IgE 抗体応答は LT-B を介するシグナル伝達経路に依存しているものと考えられる。そこで、低 IgE 抗体応答を示すアジュバント開発のために LT-B を mCT (E112K) の A サブユニットと結合させたキメラ型 (mCTA/LTB) を作製した。その結果、mCTA/LTB はアジュバント効果を維持しているにも関わらず、毒性は認められず、IgE 抗体応答は非常に低いものであった。したがって、mCTA/LTB はヒトへの応用の可能性を持つ安全有効な粘膜アジュバントであることが示唆された。

3. 変異コレラ毒素併用経鼻インフルエンザワクチンによって誘導される防御免疫応答 (国立感染症研究所グループ)

変異型無毒化 CT(mCT:CT112K)併用経鼻ワクチンの 2 回免疫方式によって、インフルエンザウイルス抗原に対する抗体応答、DTH 応答、CTL 応答などの獲得免疫応答が誘導されることが示された。これらの応答の中で、抗体応答が、初回免疫よりも 2 回免疫によって強化される防御機構として、しかも、感染直後から作用し感染 1 日目後には完了する防御機構として最も重要な役割を果たしていることが考えられた。さらに、上気道でのウイルス感染防御において IgA 抗体応答が、また、下気道において IgG 抗体応答が重要な役割を果たしていることが示された。さらに、ウイルスの侵入門戸である気道粘膜において分泌型 IgA 抗体の変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイル

ス株が異なる場合にもこの CT112K 併用経鼻ワクチンの有効性が確認された。

4. 大腸菌を用いた mCT の大量産生系の確立 (北里研究所グループ)

大腸菌は、遺伝子工学による産物を発現させるための最も一般的な宿主として認知されている。困難とされている大腸菌での mCT の大量調整を可能にする事は、粘膜ワクチンを実用化するための重要なステップである。

大腸菌での CT 発現量はコレラ菌の約 1/100 以下になることが経験的に知られている。このことは菌体内の CT の動態に関係があると考えられている。コレラ菌では CT を培養液中に放出するのに対し、大腸菌ではほとんどの CT 分子が菌体内に Inclusion body の形で蓄積される。CT を発現する大腸菌の増殖抑制や、CT の発現量の低下はその結果と推測される。一方、CT と活性、構造が類似している毒素原生大腸菌の産生する LT は大腸菌で比較的大量に調整できるとの報告がある。LT は大腸菌内で容易にペリプラズムへ移行する。菌体内で発現した蛋白を菌体外、あるいはペリプラズムへ誘導する機構の一つにシグナル配列がある。CT、LT の移行はシグナル配列によっている。CT 遺伝子と LT 遺伝子を比較すると活性を担う本体の相同性は高いが、シグナル配列部位の相同性は低い。CT 遺伝子の持つシグナル配列が大腸菌内では機能しない可能性が考えられた。そこで、LT のシグナル配列を CT 遺伝子に導入したキメラ CT 遺伝子を作成し、大腸菌での発現を検定した。LT のシグナル配列を持った pTrcLT01、02 の CT の発現量は大きく増加し、10 mg/L 前後の mCT が回収され、今回のキメラ CT プラスミドの有用性が示された。

5. CT のアジュバント活性部位の同定 (国立国際医療センター研究所グループ)

今回、作製・精製した各種変異型 mCT を大量精製し、卵白アルブミン (OVA) 抗原とともにマウスへ投与し、抗 OVA 抗体価を測定することによりアジュバント効果の変化を調べる予定である。アジュバント活性部位が複数存在する、あるいは欠損部位の境界にまたがっている等の可能性もあるので、必要であればさらに細かく欠損変異を作製し、動物実験を繰り返し、慎重に同定を行う予定である。

E. 結論

1. *B. brevis* によるキメラ型アジュバント (mCT/LTB) の生産 (プロテインエクスプレスグループ)

アジュバントの新領域である粘膜アジュバントの開発は内外で注目を受けている。そこで、低毒性で粘膜アジュバント活性の強いキメラ型 (mCT 改良型: mCTA/LTB) の設計を行い、*B. brevis* 宿主ベクター系を用いた発現、生産、精製方法の検討を行った。*B. brevis* を用いて効率的に分泌生産されたキメラ型アジュバントは、D-galactose column を用いた精製方法によって精製され、mCT と同様の A₁B₅ 構造を持ち、低毒性でアジュバント活性を有していた。

2. 無毒化新規 mCT-A/LT-B キメラ型アジュバントの粘膜免疫増強効果の検討 (大阪大学グループ)

B. brevis 発現システムを用いて作製された新規キメラ型粘膜アジュバント mCTA/LTB に毒性は認められなかった。キメラ型併用破傷風ワクチンを経鼻投与したマウスは破傷風毒素接種に対して、完全な防御を示した。また、野生型 CT を粘膜アジュバントとして用いた場合に見られる強い IgE 抗体応答が、mCTA/LTB の場合にはほとんど見られなかった。

以上の結果より、*B. brevis* システムを用いて作製されたキメラ型 mCTA/LTB はヒトへの応用が可能な安全有効な粘膜アジュバントであると考えられる。

3. 変異コレラ毒素併用経鼻インフルエンザワクチンによって誘導される防御免疫応答 (国立感染症研究所グループ)

安全性の高い無毒化変異コレラ毒素 (mCT) E112K (A サブユニットの N 末から 112 番目のグルタミン酸をリシンに置換したもの) を併用したインフルエンザワクチンの経鼻投与によって、インフルエンザの防御に有効な IgA 抗体応答を上気道に優先的に誘導でき、効率的にインフルエンザを予防できることが明らかになった。

4. 大腸菌を用いた mCT の大量産生系の確立 (北里研究所グループ)

点突然変異の導入により弱毒させた変異 CT (mCT) は有効な粘膜アジュバントと評価されているが大腸菌での量産は困難であった。mCT のシグナル配列を大腸菌易熱性毒素 (LT) のそれと置換したキメラ mCT 遺伝子を作成し、大腸菌での発現量を検討したところ、従来の数百倍の mCT の発現が確認された。また、精製した mCT は従来のもと同様な性状を示した。今回確立した大腸菌での mCT 量産系は、粘膜免疫ワクチン実現化ために重要であろう。

5. CT のアジュバント活性部位の同定 (国立国際医療センターグループ)

CT のアジュバント活性発現メカニズムの解明ならびにより効果的な粘膜アジュバントの開発に向け、CT のアジュバント活性を担う部位を同定するため、mCT 遺伝子を含む発現ベクターを用いて一連の欠損変異 mCT 遺伝子を作製した。これらを IPTG 誘導により発現させ、Ni カラムにより精製可能であること

を確認した。

E. 研究発表

1. 発表論文

1. Yashiro K, Lowenthal JW, O'Neil TE, Ebisu S, Takagi H, Moore RJ. 2001. High-level production of recombinant chicken interferon-gamma by *Brevibacillus choshinensis*. Protein. Expr. Purif. 23(1):113-20
2. Kim, J-K., Takahashi, I., Okuda, Y., Itakura, M., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 2001. T cell receptor dynamism of mucosal and systemic CD4⁺ T cells in the course of an immune response to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J. Infect. Dis. 184 : 43-51.
3. Kim, J-K., Takahashi, I. Kai, Y. and Kiyono, H. 2001. Influence of enterotoxin on mucosal intranet : selective inhibition of extrathymic T cell development in intestinal intraepithelial lymphocytes by oral exposure to heat-labile toxin. Eur. J. Immunol. 31: 2960-2969.
4. Byun Y., Ohmura, M., Fuhihashi, K., Yamamoto, S., McGhee, J.R., Udaka, S., Kiyono, H., Takeda, Y., Kohsaka, T. and Yuki, Y. 2001. Nasal immunization with *E. coli* verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizin antibodies. Vaccine 19 : 2061-2070.
5. Saito, M., Otake, S., Ohmura, M., Hirasawa, M., Takeda, K., Mega, J., Takahashi, I., Kiyono, H., McGhee, J.R., Takeda, Y. and Yamamoto, M. 2001. Protective immunity to *Streptococcus mutans* induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin adjuvant. J. Infect. Dis. 183 : 823-826.
6. Fujihashi, K., Dohi, T., Rennert, P.D., Yamamoto, M., Koga, T., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2001. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(6) : 3310-3315.
7. Yuki, Y., Byun, Y., Fujita, M., Jaurigue, M., Izutani, W., Suzuki, T., Udaka, S., Fujihashi, K., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 2001. Production of a recombinant hybrid molecule of cholera toxin-B-subunit and protelipid-protein-peptide for the treatment of experimental encephalomyelitis. Biotech. Bioeng. 74:62-69.
8. Kunisawa, J., Nakarishi T., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Nakagawa, S., Kiyono, H., and Mayumi, T. 2001. Novel antigen delivery system using Fusogenic liposome for the induction of mucosal and systemic immune responses. J. Immunol. 167(3) : 1406-1412.
9. Hodge, L. M., Marinaro, M., Jones, H. P., McGhee, J.R., Kiyono, H. and Simecka, J.W. 2001. IgA responses and IgE associated inflammation along the respiratory tract after mucosal but not systemic immunization.

- Infect. Immun. **69** : 2328-2338.
10. Jones, H.P., Hodge, L.M., Fujihashi, K., Kiyono, H., McGhee, J.R. and Simecka, J.W. 2001. The pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation. *J. Immunol.* **167**: 4518-4526.
 11. Yura, M., Takahashi, I., Serada, M., Koshino, T., Nakagami, K., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2001. Role of MOG-stimulated Th1 type "light-up" (GFP⁺) CD4⁺ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmunity* **17**:17-25.
 12. Yura, M., Takahashi, I., Terawaki, S., Hiroi, T., Kweon, M., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2001. Nasal administration of cholera toxin (CT) suppresses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Vaccine.* **12** : 134-139.
 13. Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y.I., Brownring, J.L. and McGhee, J.R. 2001. Elimination of colonic patches with lymphotoxin β receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. *J. Immunol.* **167**(5) :2781-2790.
 14. Simizu, M., Minakuchi, K., Tuda, A., Hiroi, T., Tanaka, N., Koga, J. and Kiyono, H. 2001. A role of stem cell factor and *c-kit* signaling for the organogenesis of intestine : regulation of fetal intestinal epithelial cell adhesion to fibronectin. *Exp. Cell Res.* **266** : 311-322.
 15. Imaoka, H., Shimaoka, M., Matsuura, N., Nishimura, M., Ohta, N. and Kiyono, H. 2001. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF- β 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth Analg.* **92**: 428-436.
 16. Ohta, N., Shimaoka, M., Imanaka, H., Nishimura, M., Taenaka, N. and Kiyono, H. 2001. Steroid attenuates ventilator-induced lung injury. *Crit. Care Med.* **29** : 1012-1016.
 17. Sakaue, G., Shimaoka, M., Fukuoka, T., Hiroi, T., Inoue, T., Sakaguchi, T., Sawa, Y., Morishita, T., Kiyono, H. and Mashimo, T. 2001. NF- κ B "decoy" suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Neuroreport* **12**: 2079-2084.
 18. Hiroi, T., Goto, H., Someya, K., Yanagita, M., Honda, M., Yamanaka, N. and Kiyono, H. 2001. HIV mucosal vaccine : nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long-term V3J1-peptide-specific neutralizing immunity in Th1 and Th2 deficient conditions. *J. Immunol.* **167** : 5862-5867.
 19. Ohmura, M., Yamamoto, M., Kiyono, H., Fujihashi, K., Takeda, Y. and McGhee, J.R.

2001. Highly purified mutant E112K of cholera toxin elicits protective lung mucosal immunity to diphtheria toxin. *Vaccine* 20: 756-762.
20. Hagiwara, Y., Tsuji, T., Iwasaki, T., Kadowaki, S., Asanuma, H., Chen Z., Komase, K., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T., and Tamura, S. 2001. Effectiveness and safety of mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine*; 19 :2071-2079.
21. Nakayama, T., Komase, K., Uzuka, R., Hoshi, A., and Okafuji, T. 2001. Leucine at position 278 of the AIK-C measles virus vaccine strain fusion protein is responsible for reduced syncytium formation. *J. Gen. Virol*, 82; 2143-2150.
22. Hagiwara, Y., Iwasaki, T., Asanuma, H., Sato, Y., Sata, T., Aizawa, C., Kurata, T. and Tamura, S. 2001. Effects of intranasal administration of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. *Vaccine* 19:1652-1660.
2. 学会発表
1. Yoshino, N., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Lu, F.X., Miller, C.J., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2001. Nasal immunization with gp120 and mutant cholera toxin elicits antigen-specific mucosal IgA responses in non-human primates. 11th ICI. Tue 87.
2. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and Kiyono, H. 2001. Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. 11th ICI. Tue 79.
3. Kweon, M-N., Jang, M-H., Suenobu, N., Ueta, M., Yamamoto, M. and Kiyono, H. 2001. Bone marrow derived eosinophils play a central role for induction of IgE-independent allergic diarrhea. 11th ICI. Tue 83.
4. Jang, M-H., Kweon, M-N., Yamamoto, M. and Kiyono, H. 2001. Effects of mucosal adjuvant CT on dendritic cells: induction of MHC class I-restricted CD8⁺ T cells. 11th ICI. Wed 32.
5. Yamamoto, M., Rennert, P., Kweon, M-N., McGhee, J.R., Otake, S. and Kiyono, H. Blockade of both TNF/LT α and LT α / β , but not TNF/LT α / β , pathways result in the inhibition of mucosal and systemic IgA responses. 11th ICI. Fri 96.
6. Kinoshita, N., Hiroi, T., Fukuyama, S. and Kiyono, H. 2001. Regulation of mucosal homeostasis in intestinal epithelium by IL-15 dependent perforin producing TCR negative intraepithelial lymphocytes. *Proc. Jpn. Soc.*

- Immunol. 31: 281.
7. Park, E. J., Takahashi, I., Fukuyama, S., and **Kiyono, H.** 2001. Expression of NKG2D ligand molecules on murine intestinal epithelial cells. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 281.
 8. Hiroi, T., Iwatani, K., Tanaka, T., Akira, S. and **Kiyono, H.** 2001. Enhancement of IgA-producing B-1 cells in mucosa-associated tissues of NF-IL-6 deficient mice. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 283.
 9. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Yoshino, N., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Tamura, S., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. 2001. Delayed aging in the NALT mucosal immune system. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 285.
 10. Suenobu, N., Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** 2001. Development of novel mucosal immuno-therapy for the control of *Candida albicans*-associated atopic dermatitis. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 287.
 11. Yoshino, N., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Fabien, L.U., Ding, L.U., Christopher, M.J., **Kiyono, H.** and J.R. McGhee. 2001. Nasal immunization of primates with gp120 and nontoxic cholera toxin adjuvant induces mucosal IgA but not IgE responses. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 288.
 12. Jang, M-H., Kweon, M-N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Kunisawa, J. and **Kiyono, H.** 2001. Intestinal villous M-cell islands: a new antigen entry site in the mucosal epithelium. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 289.
 13. Okuda, Y., Takahashi, I., Iijima, H., Kim, J-K., Kai, Y., Ohta, N., Tamagawa, H., Iwatani, K., Hiroi, T., Takeda, K., Akira, S. and **Kiyono, H.** 2001. Development of colitis in TCR $\alpha^{-/-}$ x STAT6 $^{-/-}$ double knock out mice : a potential role of STAT6 independent IL-4 signaling pathway for the generation of pathogenic Th2 type CD4 $^{+}$ T cells. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 289.
 14. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Mashimo, T., Miyazaki, J. and **Kiyono, H.** 2001. IL-15 dependent activation -induced cell death-resistant Th-1 type CD8 $\alpha\beta^{+}$ NK1.1 T cells for the development of small intestinal inflammation. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 290.
 15. Kweon, M-N., Jang, M-H., Suenobu, N, Yamamoto, M. and **Kiyono, H.** 2001. Do bone marrow derived eosinophils play a central roll for the induction of IgE-independent allergic diarrhea? Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 293.
 16. Dohi, T., Fujihashi, K., Etani, Y., Yoshino, N., Shirai, Y., Kawamura, Y., **Kiyono, H.** and McGhee, J.R. 2001. IL-4-deficient CD4 $^{+}$ CD45Rb hi T cells mediate gastritis.

17. 渡辺泉、田村慎一他 8 名；アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンが誘導する免疫応答と防御効果。第 5 回日本ワクチン学会、熊本、2001
 18. 服部信章、長井正昭、佐藤隆昭、大石光男、駒瀬勝啓、相澤主税 経皮吸収ワクチン用アジュバンドとしてのホルマリン不活化コレラトキシンの有効性の検討 第 5 回日本ワクチン学会、熊本、2001
 19. Y, Shirai Y, Hamabata T, Furukawa K, Dohi T. Effect of mutant cholera toxin on bone marrow-derived dendritic cells. 第 31 回日本免疫学会総会、大阪、2001
14. 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

無毒化新規 mCT-A/LT-B キメラ型アジュバントの粘膜免疫増強効果の検討

主任研究者 清野 宏 大阪大学・微生物病研究所・教授
協同研究者 権 美那 大阪大学・微生物病研究所・助手
山本 正文 大阪大学・微生物病研究所・非常勤講師

研究要旨 *B. choshinensis* 発現システムを用いて作製された新規キメラ型粘膜アジュバント mCTA/LTB に毒性は認められなかった。マウスに破傷風ワクチンに (TT) mCTA/LTB を混合して経鼻免疫することにより、粘膜領域において顕著な TT 特異的 IgA 抗体が誘導された。さらに血清中にも高レベルの TT 特異的 IgG 抗体を誘導し、致死量の破傷風毒素接種に対して、完全な防御を示した。また、野生型 CT を粘膜アジュバントとして用いた場合に見られる強い IgE 抗体応答が、mCTA/LTB の場合にはほとんど見られなかった。以上の結果より、*B. choshinensis* システムを用いて作製された mCTA/LTB はヒトへの応用が可能な安全有効な粘膜アジュバントであると考えられる。

A. 研究目的

コレラ毒素(CT)は非常に効果的な粘膜アジュバントとして知られている。しかしながら、ADP-ribosyltransferase 活性により下痢原性を有するため、ヒトへの応用は不可能である。われわれは CT-A サブユニットの ADP-ribosyltransferase 活性中心のアミノ酸を置換することにより無毒化した 2 つの無毒化変異型毒素 (mutant CT: mCT) S61F、E112K を開発し、そのアジュバント活性の有無を解析してきた。その結果、mCT をタンパク抗原とともに経鼻投与することにより、Th2 型応答を誘導し、その結果、鼻腔、消化管、唾液および膣分泌液中に抗原特異的 IgA 産生が認められ、mCT の有効性が示された。さらに有効な粘膜アジュバントを開発する為に CT と同様の A₁B₅ 構造を有し、Th1 型応答も誘導できる毒素原性大腸菌の易熱性毒素 (LT) の B サブユニットを mCT (E112K) の A サブユニットと結合させたキメラ分子 (mCTA/LTB) を作製

し、ヒトへの応用を念頭においた安全有効な粘膜アジュバントの開発を試みた。また、その生産においては LPS の混入を阻止でき、且つタンパクの大量発現が可能な *B. choshinensis* システムを用いた。

B. 研究方法

1. 毒素活性の測定

CHO assay は CHO 細胞を各アジュバントとともに 24 時間培養後、20%以上の細胞が紡錘形を示した時の濃度を酵素・毒性原性とした。cAMP 産生量は CHO 細胞を各アジュバント(1ng/ml)と 24 時間培養後、ELISA 法にて測定した。各アジュバントの腸管毒性は ileal loop test によって測定した。すなわち、2cm 幅で形成された腸管ループに各アジュバントを注入し、18 時間後に分泌された液量を測定して 40 μ l 以上を産生する濃度を陽性とした。

2. 免疫

6 週齢の C57BL/6 マウスを用い、10 μ g の破傷風類毒素ワクチン(tetanus toxoid: TT)をタンパク抗原とし、mCTA/LTB (10.0 μ g)あるいは自然型 CT(nCT) (0.5 μ g)を経鼻免疫した。免疫は週 1 回、計 3 回行った。最終免疫の一週間後に血清、鼻腔洗浄液、唾液を採集して ELISA 法を用い抗体量を測定した。また、免疫後のマウスの脾臓、鼻腔組織、唾液腺よりリンパ球を分離し、抗原特異的抗体産生細胞の数を ELISPOT 法を用いて測定した。さらに破傷風毒素に対する防御免疫応答を検討した。

C. 研究結果

1. 毒素活性の測定

CHO 細胞を用いて mCTA/LTB の cAMP 産生を測定した。その結果、nCT では 1.0ng/ml で cAMP 産生が認められるのに対し、mCTA/LTB では 1.0 μ g/ml の濃度でも cAMP 産生は検出されなかった (表 1)。また、結紮した腸への mCTA/LTB の影響を検索したところ、100 ng の nCT は顕著な分泌液の産生を誘導したが、その 1000 倍量の mCTA/LTB を使っても分泌液を誘導しなかった (表 1)。つまり mCTA/LTB には下痢誘導性がない事を強く示唆している。

2. 粘膜アジュバントとしての mCTA/LTB の経鼻投与における抗体応答誘導能

mCTA/LTB のアジュバント活性を測定するために、mCTA/LTB をタンパク抗原の TT とともにマウスに経鼻免疫した。その結果、血清中に顕著な TT 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体応答が誘導された。また、そのレベルは nCT をアジュバント

として用いた場合に匹敵するものであった (図 1)。

3. 粘膜アジュバント mCTA/LTB の経鼻投与による粘膜面での TT 特異的分泌型 IgA 抗体の誘導
TT を mCTA/LTB とともに経鼻免疫したマウスの唾液および鼻腔洗浄液中の分泌型 IgA 抗体応答を測定したところ、顕著な TT 特異的 IgA 抗体価が検出された。さらに、唾液腺および鼻腔組織内に多数の TT 特異的 IgA 産生細胞が認められた (図 2)。

4. 粘膜アジュバント mCTA/LTB の経鼻投与による IgE 抗体応答の誘導

粘膜アジュバントとしての mCTA/LTB の IgE 誘導能を解析した。その結果、血清中の全 IgE 量、TT 特異的 IgE 抗体価ともに、mCTA/LTB をアジュバントとして用いた群は nCT をアジュバントとして用いた群に比べて、顕著に減少していた (図 3)。

5. TT と mCTA/LTB の経鼻投与により誘導された破傷風毒素に対する防御免疫応答

TT と mCTA/LTB の経鼻免疫によって誘導された抗原特異的抗体応答の中和抗体能を測定するために、免疫したマウスに致死量 (130LD₅₀) の破傷風毒素を投与した。その結果、TT と nCT による免疫と同様に、TT と mCTA/LTB によって誘導された抗体は破傷風毒素に対して完全な防御効果を示した (図 4)。

D. 考察

本研究ではヒトへの応用を念頭においた安全有効な粘膜アジュバントの開発を試みている。これまでわれわれは、CT の持つ強いアジュバント効

果を維持しつつ、毒性のみを取り除くために、CT-A サブユニットの ADP-ribosyltransferase 活性中心のアミノ酸を置換することにより無毒化した2つのCT変異毒素(mutant CT: mCT) S61F、E112K を作製した。その結果、mCT をタンパク抗原とともに経鼻投与することにより、鼻腔、消化管、唾液および膺分泌液中に抗原特異的 IgA 産生が認められ、mCT の有効性が示された。

CT と同様の A₁B₅ 構造を有する毒素原性大腸菌の易熱性毒素 (LT) は CT に比較して IL-4 に依存せず、IgE 抗体応答がほとんど見られないことがわれわれのこれまでの報告によって示されている。また、CT はそのアジュバント作用誘導に際して、CT-B サブユニットが細胞表面の GM1 ガングリオシドに結合するが、LT はその B サブユニットや GM1 以外のガングリオシド (GM2、アシアロ GM1) にも結合することが示されている。これらの結果より、LT の低 IgE 抗体応答は LT-B を介するシグナル伝達経路に依存しているものと考えられる。そこで、低 IgE 抗体応答を示すアジュバント開発のために LT-B を mCT (E112K) の A サブユニットと結合させたキメラ分子 (mCTA/LTB) を作製した。その結果、mCTA/LTB はアジュバント効果を維持しているにも関わらず、毒性は認められず、IgE 抗体応答は非常に低いものであった。したがって、mCTA/LTB はヒトへの応用の可能性を持つ安全有効な粘膜アジュバントであることが示唆された。

E. 結論

本研究で mCTA/LTB 産生に用いた *B. choshinensis* host-vector システムは従来の *E. coli* を用いたシステムに比較して、2つの大きな長所が認められる。第一に、*B. choshinensis* は組

み換え型タンパクの大量産生が可能である。第二に、*B. choshinensis* はグラム陽性の非病原性細菌であるため、LPS や他の病原性因子の混入を除外出来る。以上のことより、*B. choshinensis* host-vector システムは mCTA/LTB のようなヒトへの応用を念頭においた組み換え型タンパクの産生に適したシステムだと考えられている。

F. 研究発表

1. 論文発表

(発表)

1. Kim, J-K., Takahashi, I., Okuda, Y., Itakura, M., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 2001. T cell receptor dynamism of mucosal and systemic CD4⁺ T cells in the course of an immune response to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Infect. Dis.* **184**: 43-51.
2. Kim, J-K., Takahashi, I. Kai, Y. and Kiyono, H. 2001. Influence of enterotoxin on mucosal intranet : selective inhibition of extrathymic T cell development in intestinal intraepithelial lymphocytes by oral exposure to heat-labile toxin. *Eur. J. Immunol.* **31**: 2960-2969.
3. Byun Y., Ohmura, M., Fuhihashi, K., Yamamoto, S., McGhee, J.R., Udaka, S., Kiyono, H., Takeda, Y., Kohsaka, T. and Yuki, Y. 2001. Nasal immunization with *E. coli* verotoxin 1 (VT1)-B subunit

- and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. *Vaccine* 19 : 2061-2070.
4. Saito, M., Otake, S., Ohmura, M., Hirasawa, M., Takeda, K., Mega, J., Takahashi, I., Kiyono, H., McGhee, J.R., Takeda, Y. and Yamamoto, M. 2001. Protective immunity to *Streptococcus mutans* induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin adjuvant. *J. Infect. Dis.* 183 : 823-826.
 5. Fujihashi, K., Dohi, T., Rennert, P.D., Yamamoto, M., Koga, T., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2001. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (6) : 3310-3315.
 6. Yuki, Y., Byun, Y., Fujita, M., Jaurigue, M., Izutani, W., Suzuki, T., Udaka, S., Fujihashi, K., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 2001. Production of a recombinant hybrid molecule of cholera toxin-B-subunit and protelipid-protein-peptide for the treatment of experimental encephalomyelitis. *Biotech. Bioeng.* 74:62-69.
 7. Kunisawa, J., Nakanishi T., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Nakagawa, S., Kiyono, H., and Mayumi, T. 2001. Novel antigen delivery system using Fusogenic liposome for the induction of mucosal and systemic immune responses. *J. Immunol.* 167(3) : 1406-1412.
 8. Hodge, L. M., Marinaro, M., Jones, H. P., McGhee, J.R., Kiyono, H. and Simecka, J.W. 2001. IgA responses and IgE associated inflammation along the respiratory tract after mucosal but not systemic immunization. *Infect. Immun.* 69 : 2328-2338.
 9. Jones, H.P., Hodge, L.M., Fujihashi, K., Kiyono, H., McGhee, J.R. and Simecka, J.W. 2001. The pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation. *J. Immunol.* 167: 4518-4526.
 10. Yura, M., Takahashi, I., Serada, M., Koshino, T., Nakagami, K., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2001. Role of MOG-stimulated Th1 type "light-up" (GFP⁺) CD4⁺ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmunity* 17:17-25.
 11. Yura, M., Takahashi, I., Terawaki, S., Hiroi, T., Kweon, M., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2001. Nasal administration of cholera toxin (CT) suppresses clinical

- signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Vaccine*. 12 : 134-139.
12. Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y.I., Browning, J.L. and McGhee, J.R. 2001. Elimination of colonic patches with lymphotoxin β receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. *J. Immunol.* 167(5) :2781-2790.
 13. Simizu, M., Minakuchi, K., Tuda, A., Hiroi, T., Tanaka, N., Koga, J. and Kiyono, H. 2001. A role of stem cell factor and *c-kit* signaling for the organogenesis of intestine : regulation of fetal intestinal epithelial cell adhesion to fibronectin. *Exp. Cell Res.* 266 : 311-322.
 14. Imaoka, H., Shimaoka, M., Matsuura, N., Nishimura, M., Ohta, N. and Kiyono, H. 2001. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF- β 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth Analg.* 92 : 428-436.
 15. Ohta, N., Shimaoka, M., Imanaka, H., Nishimura, M., Taenaka, N. and Kiyono, H. 2001. Steroid attenuates ventilator-induced lung injury. *Crit. Care Med.* 29 : 1012-1016.
 16. Sakaue, G., Shimaoka, M., Fukuoka, T., Hiroi, T., Inoue, T., Sakaguchi, T., Sawa, Y., Morishita, T., Kiyono, H. and Mashimo, T. 2001. NF- κ B "decoy" suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Neuroreport* 12: 2079-2084.
 17. Hiroi, T., Goto, H., Someya, K., Yanagita, M., Honda, M., Yamanaka, N. and Kiyono, H. 2001. HIV mucosal vaccine : nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long-term V3J1-peptide-specific neutralizing immunity in Th1 and Th2 deficient conditions. *J. Immunol.* 167 : 5862-5867.
 18. Ohmura, M., Yamamoto, M., Kiyono, H., Fujihashi, K., Takeda, Y. and McGhee, J.R. 2001. Highly purified mutant E112K of cholera toxin elicits protective lung mucosal immunity to diphtheria toxin. *Vaccine* 20: 756-762.
- (総説)
1. Yamamoto, M., McGhee, J.R., Hagiwara, Y., Otake, S. and Kiyono, H. 2001. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 53 : 211-217.
 2. Iijima, H., Takahashi, I. and Kiyono, H. 2001. Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 11 : 117-133.

3. Kweon, M-N., Takahashi, I. and Kiyono, H. 2001. New insights into mechanism of inflammation and allergic diseases in mucosal tissues. *Digestion*, 63 (Sup1) : 1-11.
 4. Kiyono, H., Kweon, M-N., Hiroi, T. and Takahashi, I. 2001. The mucosal immune system : from specialized immune defence to inflammation and allergy. *Acta. Odontol. Scand.* 59 : 145-153.
 5. Schenck, K. and Kiyono, H. 2001. Innate and acquired immunity, cytokines, and genetic factors in relation to the mucosal immune system. *Acta. Odontol. Scand.* 59 : 121-123.
 6. Fujihashi, K., Kato, H., van Ginkel, F.W., Koga, T., Boyaka, P.N., Jackson, R.J., Kato, R., Hagiwara, Y., Etani, Y., Goma, I., Fujihashi, K., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2001. A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance. *Acta. Odontol. Scand.* 59 : 301-308.
 7. Schenck, K., Kiyono, H., Helgeland, K., Steinsvoll, S. and Taylor, B. 2001. Proceedings of the conference "New Frontiers in Oral Immunological Diseases" Lillehammer, Norway, 2001. Part 3. Immunological tolerance; the good, the bad, and the ugly. *Acta. Odontol. Scand.* 59 : 297-300.
 8. Kiyono, H. 2001. Mucosal immune system: close encounter in the uncharted world of immunology. *Ophthalmologica.* 215: Suppl 1: 22-32.
2. 学会発表
 1. Yoshino, N., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Lu, F.X., Miller, C.J., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2001. Nasal immunization with gp120 and mutant cholera toxin elicits antigen-specific mucosal IgA responses in non-human primates. 11th ICI. Tue 87.
 2. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and Kiyono, H. 2001. Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. 11th ICI. Tue 79.
 3. Kweon, M-N., Jang, M-H., Suenobu, N., Ueta, M., Yamamoto, M. and Kiyono, H. 2001. Bone marrow derived eosinophils play a central roll for induction of IgE -independent allergic diarrhea. 11th ICI. Tue 83.
 4. Jang, M-H., Kweon, M-N., Yamamoto, M. and Kiyono, H. 2001. Effects of mucosal adjuvant CT on dendritic cells: induction of MHC class I-restricted CD8⁺ T cells. 11th ICI. Wed 32.

5. Yamamoto, M., Rennert, P., Kweon, M-N., McGhee, J.R., Otake, S. and Kiyono, H. Blockade of both TNF/LT α and LT α / β , but not TNF/LT α / β , pathways result in the inhibition of mucosal and systemic IgA responses. 11th ICI. Fri 96.
6. Kinoshita, N., Hiroi, T., Fukuyama, S. and Kiyono, H. 2001. Regulation of mucosal homeostasis in intestinal epithelium by IL-15 dependent perforin producing TCR negative intraepithelial lymphocytes. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 281.
7. Park, E. J., Takahashi, I., Fukuyama, S., and Kiyono, H. 2001. Expression of NKG2D ligand molecules on murine intestinal epithelial cells. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 281.
8. Hiroi, T., Iwatani, K., Tanaka, T., Akira, S. and Kiyono, H. 2001. Enhancement of IgA-producing B-1 cells in mucosa-associated tissues of NF-IL-6 deficient mice. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 283.
9. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Yoshino, N., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Tamura, S., Kiyono, H. and Fujihashi, K. 2001. Delayed aging in the NALT mucosal immune system. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 285.
10. Suenobu, N., Kweon, M-N. and Kiyono, H. 2001. Development of novel mucosal immuno-therapy for the control of *Candida albicans*-associated atopic dermatitis. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 287.
11. Yoshino, N., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Fabien, L.U., Ding, L.U., Christopher, M.J., Kiyono, H. and J.R. McGhee. 2001. Nasal immunization of primates with gp120 and nontoxic cholera toxin adjuvant induces mucosal IgA but not IgE responses. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 288.
12. Jang, M-H., Kweon, M-N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Kunisawa, J. and Kiyono, H. 2001. Intestinal villous M-cell islands: a new antigen entry site in the mucosal epithelium. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 289.
13. Okuda, Y., Takahashi, I., Iijima, H., Kim, J-K., Kai, Y., Ohta, N., Tamagawa, H., Iwatani, K., Hiroi, T., Takeda, K., Akira, S. and Kiyono, H. 2001. Development of colitis in TCR α ^{-/-} x STAT6^{-/-} double knock out mice : a potential role of STAT6 independent IL-4 signaling pathway for the generation of pathogenic Th2 type CD4⁺ T cells. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 289.
14. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N.,

- Kinoshita, N., Jang, M-H., Mashimo, T., Miyazaki, J. and Kiyono, H. 2001. IL-15 dependent activation -induced cell death-resistant Th-1 type CD8 $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1 T cells for the development of small intestinal inflammation. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 290.
15. Kweon, M-N., Jang, M-H., Suenobu, N, Yamamoto, M. and Kiyono, H. 2001. Do bone marrow derived eosinophils play a central roll for the induction of IgE-independent allergic diarrhea? Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 293.
16. Dohi, T., Fujihashi, K., Etani, Y., Yoshino, N., Shirai, Y., Kawamura, Y., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2001. IL-4-deficient CD4⁺CD45Rb^{hi} T cells mediate gastritis. Proc. Jpn. Soc. Immunol. 31: 293.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案 なし
3. その他 なし