

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## 安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究

所 属 国立感染症研究所 安全性研究部  
研究者 後藤 紀久

### 分担研究者

- |                     |       |
|---------------------|-------|
| (1) 名古屋市立大学医学部      | 朽久保邦夫 |
| (2) 財団法人 化学及血清療法研究所 | 大隈 邦夫 |
| (3) 東レ株式会社          | 櫻井 信豪 |

### 要旨

rCTB を粘膜アジュバントとして用いて、今年度は *Helicobacter pylori* の感染防御を目的とした新しい粘膜ワクチン開発、肺炎球菌荚膜多糖体・インフルエンザワクチン開発に向けての研究、rCTB 添加ワクチンの安全性、アジュバント活性の作用機構、細胞性免疫への影響、更に MCP-1 のアジュバント活性を研究した。

### 1. 研究目的

ワクチンは種々の感染症の予防に多大の貢献をもたらしてきた。しかし、従来の注射法によるワクチン投与は血中の抗原特異的 IgG 抗体産生を得られても、感染の最初のバリアーとなる粘膜面での防御に関しては、局所分泌型 IgA 抗体の誘導が望めない故に、十分な効果が期待できない。そこで我々は宿主-ベクター系 (*B. brevis*-pNU212-A22) から得た組換えコレラ毒素 B サブユニット (rCTB) を粘膜アジュバントとして、現行ワクチン (破傷風、ジフテリア、B 型肝炎、百日咳) と同時投与することにより、粘膜 IgA そして血清中の IgG の両抗体産生応答を誘導させることに成功した。今年度は新しい粘膜ワクチンの開発に向けての試みとして、*Helicobacter pylori*、インフルエンザに対するワクチンの開発、そしてその他のアジュバント候補物質をも含め、それらの安全性やアジュバント物質の作用機構に関する研究等を進めた。

### 2. 研究方法

#### I. 組換えコレラ毒素 B サブユニット (rCTB) をアジュバントとして用いた研究

##### rCTB 標品

鶴高らにより開発された *Bacillus brevis* 外来タンパク分泌産生系にコレラ菌 569B 株の CTB 遺伝子を組換えた *B. brevis* HPD31 (pNU212-CTB) を 30℃ 5日間培養し、培養上清を D-ガラクトース-アガロースカラムにかけ、0.1-0.4M ガラクトースで溶出される GM1 ガングリオシド結合能を示すフラクションを集め、濃縮、透析後ゲル濾過でガラクトースを除去して rCTB 精製標品を作製した。

##### *H. pylori* 抗原の調整

*H. pylori* Sydney 株 1 を使用し、3%ウシ胎児血清添加 Brucella broth にて 72 時間微好気培養して遠心により集菌、生理食塩緩衝液に再浮遊後、菌体を超音波装置により破碎したものを抗原とした。

##### インフルエンザ HA ワクチンの調整

厚生労働省指定のインフルエンザウイルス株を 9-11 日齢孵卵尿膜腔内に接種し、34℃約 2 日間培養した。培養後増殖したインフルエンザウイルスを含む感染尿膜腔液から限外濾過・超遠心法等

で高濃度ウイルス浮遊液を採取した。このウイルス浮遊液を採取した。このウイルス浮遊液を蔗糖密度勾配遠心にかけて、ウイルスを高純度に精製した。この精製ウイルスをエーテル処理し分解後、攪拌・遠心等によりインフルエンザ HA 画分浮遊液とした。最後にホルマリンにより不活化し、インフルエンザ HA ワクチン抗原（単味原液）を調整した。なお、今回ワクチン抗原として調整したインフルエンザウイルス株は A/New Caledonia/20/99 (H1N1)と B/Johannesburg/5/99 の2株であった。

#### 組換え B 型肝炎 (HBs) 抗原の調整

遺伝子組換え HBs 産生酵母菌をブイヨン培地で培養し、培養菌体を集菌・洗浄後、機械的に破碎した。濾過及び等電点沈殿により夾雑蛋白の殆どを除去した後、その上清をゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び超遠心にかけて HBs 抗原を精製した。この精製 HBs 抗原をホルマリン処理、調整し、B 型肝炎ワクチン (HBs ワクチン) として用いた。

#### (1) *H. pylori* 超音波破碎物+rCTB の経口及び経鼻投与

実験動物として6週齢の雌 C57/BL6 マウスを使用した。経口投与ではマウス 1 匹あたり超音波破碎物 1 mg+rCTB 100  $\mu$ g、経鼻投与では超音波破碎物 50  $\mu$ g+rCTB 10  $\mu$ g により、それぞれ 0 日目、7 日目、14 日目、21 日目の計 4 回免疫した。最終免疫日から 21 日目に解剖を行い、血清、糞便および胃・小腸・大腸の各洗浄液を採取した。

#### (2) インフルエンザワクチンの経鼻投与

7 週齢の雌 BALB/c マウスを使用した。A/NC/20/99 ワクチン 1  $\mu$ g (HA として) +B/JB/5/99 ワクチン 1  $\mu$ g (HA として) +rCTB 10  $\mu$ g を、0 日目、14 日目、21 日目、28 日目の計 4 回免疫、最終免疫日から 7 日目に解剖を行い、血液、糞便、鼻腔・肺・小腸・大腸・膣の各洗浄液および唾液を採取した。

##### a. 抗体価の測定

*H. pylori* 抗原についてはホルマリン処理をした死菌を、インフルエンザワクチンについてはワクチン原液それぞれの希釈液を抗原として使用した。二次抗体として血清 IgG 抗体価の測定にはビオチン標識抗マウス IgG ヤギ抗体およびストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを、粘膜 IgA 抗体価の測定にはビオチン標識抗マウス IgA ヤギ抗体およびストレプトアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いて、間接 ELISA を行った。

##### b. HI 抗体価の測定

インフルエンザワクチンの経鼻投与により得られたマウス免疫血清を、所定の方法により前処理して非特異的インヒビターと赤血球自然凝集素を除去した。0.5%ニワトリ赤血球浮遊液の調整、標準品による 4HA 価の算出および HA 凝集素価の測定を行った後、前記前処理血清の HI 抗体価を測定した。

#### (3) 安全性評価

##### a. rCTB 添加ワクチンの頻回経鼻投与による脳神経系への影響

Hartley 系モルモット (雌、約 350g~400g) の左側鼻腔内に、rCTB 添加粘膜投与ワクチンのモデルとして、HBs ワクチン (アルミニウム無添加、化血研製) 30  $\mu$ g と rCTB15  $\mu$ g を 75  $\mu$ l の量に調整し、マイクロピペットで、0、14、21 そして 28 日目に投与した。右側鼻腔内には同量の生理食塩水を同間隔で投与した。最終投与1日後にペントバルビツール麻酔下で生体灌流固定後、脳、鼻腔そして主要内臓器等を採材し、10%ホルマリン緩衝液で固定、EDTA-PBS で脱灰処理後、包埋し、ヘマトキシリン・エオジン及びクリューパー・パレラ染色 (髄鞘の染色) を施し、病理組織学的に観察した。

b. 生物学的製剤基準・一般試験法の異常毒性否定試験に準じて、実験期間中における投与動物の異常の有無を観察した。

#### (4) rCTB のアジュバント活性の作用機構

##### a. IL-1 $\beta$ 及び IL-6 産生に対する rCTB の影響

BALB/c 系マウス（雌、7 週齢）腹腔マクロファージ (M $\phi$ ) を rCTB 存在下で LPS またはその他の刺激物（タキソール、ペプチドグリカン、CpG）で刺激し、24 時間後、上清に遊離した IL-1 $\beta$ 、IL-6 及びセリンプロテアーゼ阻害剤存在下で可溶化した場合の IL-1 $\beta$  について市販の ELISA キットを用いて調べた。また、同様に刺激した M $\phi$  について、トータル RNA を抽出し、RT-PCR 法により IL-1 $\beta$  の mRNA 発現について、 $\beta$ -アクチンを内部標準として半定量した。

##### b. BCG ワクチンを経鼻投与した場合の rCTB の影響

BCG ワクチン（日本 BCG 製造株式会社）を BALB/c 系マウス（雌、7 週齢）に経鼻投与した場合の rCTB の影響を、精製ツベルクリン (PPD) による足蹠反応と、脾臓細胞を PPD で抗原刺激した場合の IFN- $\gamma$  産生を調べた。また、Hartley 系モルモット（雌、約 300g）に同様に経鼻投与した実験では、PPD の皮内接種による発赤反応、脾臓細胞を抗原刺激した場合の細胞増殖反応を調べた。

## II. サイトカインの粘膜アジュバント作用の検討

### 液状ジフテリアトキソイド (DT) の調整

ジフテリア菌は Park-Williams No.8 株をブイヨン培地で 37 $^{\circ}$ C 約 2 日間培養し、培養濾過上清を限外濾過膜で濃縮し、硫酸アンモニウム沈殿法で塩析粗製後、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで高純度に精製した。更にアミノ酸存在化でホルマリンにより無毒化し、調整した。

### マウス IFN- $\beta$

組換え大腸菌にて発現させ、その後、シリカ/銅キレート/ブルー担体/ゲル濾過の精製法で調整した。

### ヒト MCP-1

ヒト線維芽細胞を培養し、合成核酸で刺激して上清中に MCP-1 を誘発させた。その後、シリカ/イオン交換/イオン交換/逆相 HPLC の精製法で調整した。

どちらのサイトカインも高純度に精製されたもので、品質管理項目としてエンドトキシンの定量、純度 (SDS-PAGE, HPLC) N 末端配列分析、アミノ酸組成分析等が実施されている。

#### a. サンプルの投与及び抗体価測定

BALB/c 系マウス（雌、7 週齢）に各濃度のサイトカイン (IFN- $\beta$ , MCP-1) と DT (5Lf) とを同時経鼻投与し、追加免疫を施し、初回免疫後 6 週目に採血し、ELISA 法により血清抗体価 (IgG) を測定した。

#### b. ジフテリア抗毒素価測定

宮村らによる Vero 細胞を用いた培養細胞法により測定した。Test toxin Lot M59、実測値：13CD<sub>50</sub>/25  $\mu$ l、Vero 細胞添加量：1.5 $\times$ 10<sup>4</sup> 細胞/well

#### c. NALT（鼻咽頭関連リンパ組織）細胞のサイトカイン mRNA 発現及び局所 IgA 抗体価測定

a と同様の方法で免疫したマウスより NALT、糞便及び鼻洗浄液を採取し、採取した NALT はトータル RNA 抽出液中でホモジナイズされた。その溶液から AGPC 法に従いトータル RNA を

抽出し、RT-PCR 法により mRNA 発現を調べた。また、糞便及び鼻洗浄液中の IgA 抗体価の測定にはビオチン標識抗マウス IgA ヤギ抗体及びストレプトアビジン-β-ガラクトシダーゼを用いた間接 ELISA 法で行った。

### 3. 研究成果

#### インフルエンザワクチン抗原の性状

ワクチン抗原としてのインフルエンザ HA ワクチンは、日本の生物学的製剤基準「インフルエンザ HA ワクチン」の原液の試験に適合した。また、マウス体重減少試験、不活化試験及び異常毒性否定試験等その他の安全性試験にも適合し、エンドトキシン含量も 0.28-0.53 EU/ml と極めて低く良好な成績であった。

インフルエンザ HA ワクチンの力価試験を、日本の生物学的製剤基準に準じ SRD 試験法で測定した結果、A/New Caledonia/20/99 (H1N1)の原液 (Batch A/NC-04/01) が 222 μg HA/ml (蛋白質含量 643.4 μg/ml) で、B/Johannesburg/5/99 の原液 (Batch B/JB-04/01) が 263 μg HA/ml (蛋白質含量 575.7 μg/ml) と何れも高力価を示し、十分な成績であった (Table 1)。

また、インフルエンザ HA ワクチン中の卵白アルブミン含量は 3.5 ng/ml と極めて低く、卵に由来する不純物を殆ど認めず、高純度・高品質であることが確認された (Table 2)。

#### I-(1) *H. pylori* 超音波破碎物+rCTB の経口および経鼻投与

経口投与、経鼻投与ともに、*H. pylori* 菌体に対する血清 IgG 抗体価が rCTB 存在下で有意に上昇した (Figs. 1A, 2A)。血清 IgA 抗体価も rCTB 存在下で両投与ともに有意に上昇したが、血清 IgG 抗体価より総じて低い傾向にあった (Figs. 1B, 2B)。粘膜 IgG 抗体価は、超音波破碎物の経口投与では胃と小腸の洗浄液で、経鼻投与では胃、小腸、大腸の各洗浄液と糞便のサンプル全てにおいて、rCTB 存在下で有意に上昇した。 (Figs. 3A, 4A)。粘膜 IgA 抗体価も経口投与では胃と小腸、経鼻投与では小腸、大腸、糞便において rCTB 存在下で有意に高くなった (Figs. 3B, 4B)。rCTB 存在下の経鼻投与で、胃の粘膜 IgA 抗体価は 4 匹中 1 匹のみわずかに上昇した (Fig. 4B)。

#### I-(2) インフルエンザワクチン+rCTB の経鼻投与

インフルエンザウイルス A/NC/20/99 と B/JB/5/99/の HA に対する血清中の特異的 IgG 抗体価と IgA 抗体価は、ともに rCTB 存在下で高くなる傾向にあった。IgG サブクラスでは、A/NC/20/99 の HA に対する IgG1 抗体価と IgG2b 抗体価が、rCTB 存在下で上昇傾向にあった。A/NC/20/99 の HA に特異的な粘膜 IgA 抗体価は、鼻腔、肺、小腸、膣の各洗浄液と糞便において、rCTB 存在下で免疫した場合に高くなる傾向にあり、B/JB/5/99 の HA に対しては、鼻腔、肺、大腸、膣の各洗浄液で rCTB 同時投与での免疫により上昇する傾向が見られた (Figs. 5, 6)。

血清中の HI 抗体価を測定したところ、rCTB 存在下で免疫したマウスから得られた血清が、A/NC/20/99 の HA による赤血球凝集を有意に阻止し、高い HI 抗体価を示した (Fig. 7)。

#### I-(3) 安全性評価

a. 頻回投与を施したにもかかわらず、HBs ワクチン+rCTB 群、HBs ワクチン単独投与群及び rCTB 単独投与群のいずれも、嗅球、視床、大脳、中脳、小脳、脳幹、橋、延髄、頸髄、髄膜 (軟膜、硬膜、くも膜) 及び主要臓器に病理組織学的所見は認められなかった。一方、無処置群以外のモルモットの投与局所の鼻粘膜上皮及び固有層には、以前の結果と同じく、多数の好酸球の浸潤が認められた。

b. 投与後の観察期間中、いずれの動物も体重減少を含む異常な変化は観察されなかった。

#### I-(4) rCTB のアジュバント活性の作用機構

a. IL-1β 及び IL-6 産生に対する rCTB の影響

M $\phi$  の LPS 刺激により細胞内 IL-1 $\beta$  が増加し、rCTB を加えると更に増強した。更に、同様な処理をした M $\phi$  について、LPS によって発現した IL-1 $\beta$  mRNA が rCTB により、更に増強することがわかった。ペプチドグリカン、タキソールによる IL-1 $\beta$  産生および CpG モチーフを含んだ DNA による IL-6 産生を rCTB は増強した (Figs. 8-10)。

#### b. BCG ワクチンを経鼻投与した場合の rCTB の影響

BCG を 10<sup>7</sup> 個投与した場合は、rCTB の有無にかかわらず細胞性免疫反応の増強が認められた。一方 10<sup>6</sup> 個 (Fig. 11) 及び 10<sup>5</sup> 個 (Fig. 12) 投与した場合は、rCTB の同時経鼻投与により明確な増強が認められた。

#### II-a, b) IFN- $\beta$ と MCP-1 のアジュバント作用

IFN- $\beta$  は高濃度使用で DT に対する血清 IgG 抗体産生を増強させるが、ジフテリア抗毒素価を上げることはできなかった。一方、MCP-1 は 0.1  $\mu$ g で血清 IgG 抗体産生を有意に増強し、且つジフテリア抗毒素価を 0.0592 IU/ml に上昇した。

#### II-c) NALT 細胞のサイトカイン mRNA 発現及び局所 IgA 抗体価

実験で用いたいずれの投与量での MCP-1 も  $\beta$ -actin のバンドを示した。しかし、特異的に増幅された遺伝子断片のバンドは検出できなかった。粘膜 IgA 抗体に関しては明確な抗体上昇が認められなかった。

### 4. 考察

rCTB を粘膜アジュバントとして *H. pylori* の超音波破砕物をマウスに経口的または経鼻的に投与すると、*H. pylori* 菌体に対する血清中の IgG、IgA 抗体のみならず、胃、小腸、大腸の粘膜 IgG、IgA 抗体も誘導されることが明らかになった。今後は、免疫マウスに経口的に *H. pylori* を投与して、感染阻止の有無や慢性胃炎の発生阻止の有無について検討する必要がある。感染の阻止や胃炎発生の阻止が観察された場合には、*H. pylori* の感染防御抗原を調べるとともにその抗原の大量発現系を開発して、ワクチンを作製したい。

インフルエンザワクチンに関しては、粘膜アジュバントの rCTB を加えなくても経鼻投与によりある程度の抗原特異的血清 IgG や IgA 抗体および粘膜 IgA 抗体が誘導されることが判明したが、rCTB を加えた方が抗体価は高くなる傾向にあった。特に、血清 IgG 抗体価および鼻腔と肺の粘膜 IgA 抗体価、さらには血清 HI 抗体価が高くなったことは、感染防御に意義があると思われる。

経鼻投与された CTB や CT が末梢神経細胞上のレセプターの GM1 ガングリオシドを介して脳に移行する可能性が言われている。ヨード 125 を標識したり、また、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼを結合したりして、各組織での CTB、CT 等の局在分布をマウスを用いて調べた仕事があるが、それらの実験結果から判断して、とりあえず通常の病理組織学的所見の観察が重要と考えた。今迄の我々の実験で、rCTB またはワクチン+rCTB 投与に対して、マウスより、より多様な病理組織学的反応を示すことのできるモルモットを用いて、頻回投与における、主に、脳での病理組織変化の有無を調べた。今回の方法で調べた限りでは、脳そして他の主要臓器に病変は認められなかった。また、頻回投与による臨床所見、体重減少も観察されなかった。HBs ワクチン+rCTB をモデルとしたこれらの実験で、経鼻粘膜投与での rCTB の安全性を更に確認できた。

rCTB の作用機構の研究で、用いた刺激物のレセプターは、Toll-like receptor (TLR) であり、それぞれ、LPS 及びタキソールは TLR4、ペプチドグリカンは TLR2、CpG は TLR9 である。これらレセプターと mRNA 発現にいたるまでのシグナル伝達経路で何らかの増強が起こっている可能性が考えられる。

BCG ワクチンは経鼻投与化が可能で、rCTB は細胞性免疫をも増強することがわかった。rCTB は、ワクチン抗原に依存して、液性、細胞性免疫にそれぞれ影響すると考えられる。可溶性タンパク抗原のジフテリアトキソイドを用いた場合の抗体産生増強効果と比較し、rCTB の免疫反応増強効果の

機構解析の一助としたい。

サイトカインの粘膜アジュバント作用について、今回の実験で、DT に対する抗毒素価を弱いけれど増強することができた。現在検討している徐放性デリバリーシステムの導入に成功したら、粘膜とのより長い接触が保たれ、もっと明確なアジュバント効果が得られるのではないかと考えている。

## 5. まとめ

- 1: *H. pylori* の超音波破碎物を抗原として経口的または経鼻的に免疫する時に、抗体価をあげるためには粘膜アジュバントを同時に投与する必要がある。
- 2: インフルエンザワクチンの経鼻投与では、粘膜アジュバント非存在下でも、ある程度の抗体価をあげることができるが、粘膜アジュバント存在下の方がより上昇する傾向を示す。
- 3: rCTB を粘膜アジュバントとして添加した HBs ワクチンを、頻回経鼻投与されたモルモットの脳及び主要臓器において、病理組織学的所見は認められなかった。
- 4: LPS による IL-1 $\beta$  mRNA 発現を rCTB はより増強した。また、ペプチドグリカン、タキソール及び CpG によるサイトカイン産生も増強した。
- 5: BCG ワクチンと rCTB との同時経鼻投与により、rCTB は細胞性免疫反応も増強した。
- 6: サイトカインである MCP-1 は、0.1  $\mu$ g 経鼻投与で、同時経鼻投与された DT に対する血清 IgG 産生とジフテリア抗毒素産生を増強した。

## 6. 研究発表

- 1) Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Kozuka, S., Taniguchi, T., Ohkuma, K., Tochikubo, K. & Goto, N. Cytokine responses to recombinant cholera toxin B subunit produced by *Bacillus brevis* as a mucosal adjuvant. *Microbiol. Immunol.* **45**, 111-117(2001).
- 2) Watanabe, K., Joh, T., Seno, K., Sasaki, M., Todoroki, I., Miyashita, M., Tochikubo, K. & Itoh, M. Development and clinical application of an immunoassay using intact *Helicobacter pylori* attached to a solid phase as an antigen. *Clin. Biochem.* **34**, 291-295(2001).
- 3) Taniguchi, T., Akeda, Y., Haba, A., Yasuda, Y., Yamamoto, K., Honda, T. & Tochikubo, K. Gene cluster for assembly of pilus colonization factor antigen III of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **69**, 5864-5873(2001).
- 4) Isaka, M., Yasuda, Y., Mizokami, M., Kozuka, S., Taniguchi, T., Matano, K., Maeyama, J., Mizuno, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. & Tochikubo, K. Mucosal immunization against hepatitis B virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis B surface antigen and recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* **19**, 1460-1466(2001).
- 5) Isaka, M., Yasuda, Y., Taniguchi, T., Kozuka, S., Matano, K., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. & Tochikubo, K. Comparison of systemic and mucosal responses of mice to aluminium-adsorbed diphtheria toxoid between intranasal administration and subcutaneous injection. *Nagoya Med. J.* **45**, 5-15(2001).

6) Maeyama,J., Isaka,M., Yasuda,Y., Matano,K., Taniguchi,T., Morokuma,K., Ohkuma,K., Tochikubo,K. & Goto,N. Co-stimulation of mouse macrophages with recombinant cholera toxin B subunit and lipopolysaccharide. (投稿中)

7. 知的所有権の取得状況  
なし



Table 1 : Characterization of the Influenza HA Vaccine

Item <sup>a</sup>	Influenza HA Vaccine	
	A/New Caledonia/20/99(H1N1) (Batch A/NC-04/01)	B/Johannesburg/5/99 (Batch B/JB-04/01)
Staining test <sup>a</sup>	pass	pass
Fractionation test <sup>a</sup> (Upper HA/Lower HA, $\geq 1$ )	pass(32.4)	pass(84.7)
Sterility <sup>a</sup>	pass	pass
Pyrogen test <sup>a</sup> ( $\leq 1.3^{\circ}\text{C}$ )	pass(0.47 $^{\circ}\text{C}$ )	pass(0.32 $^{\circ}\text{C}$ )
Mouse leucocytes-decreasing toxicity <sup>a</sup> ( $\geq 80\%$ )	pass(85.2%)	pass(95.3%)
Inactivation test	pass	pass
Mouse body weight-decreasing toxicity ( $\geq 0\text{g}$ )	pass(1.01g)	pass(1.28g)
Protein content	643.4 $\mu\text{g/mL}$	575.7 $\mu\text{g/mL}$
Test for freedom from abnormal toxicity	pass	pass
Potency(SRD method)	222 $\mu\text{gHA/mL}$	263 $\mu\text{gHA/mL}$
Endotoxin content	0.53 EU/mL	0.28 EU/mL

a, Minimum Requirement of Biological Products in Japan.

Table 2 : Ovalbumin content of Influenza HA Vaccine (by ELISA)

Influenza HA Vaccine	Ovalbumin Content
Final Product, Lot 208 (Batch A/NC-03/01, A/NC-04/01, A/PA-03/01, A/PA-04/01, B/JB-03/01&B/JB-04/01) <sup>a</sup>	3.5 ng/mL
Average(GMT) of Present Season Vaccines(2001-2002) (n=11)	2.8 ng/mL(0.2-5.5) <sup>b</sup>
Average(GMT) of Last Season Vaccines(2000-2001) (n=10)	21.6 ng/mL(18.4-24.9) <sup>b</sup>

a, Batches of bulk material which compose the vaccine product.

b, 95% Confidence Interval.

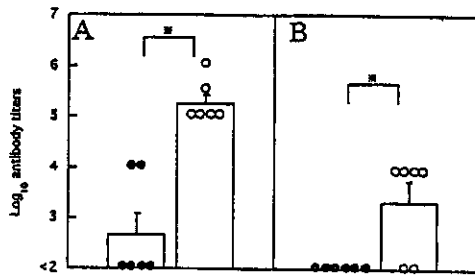


Fig. 1 Serum IgG (A) and IgA (B) antibody responses to the sonicate of *H. pylori* co-administered orally with (O) and (●) without rCTB  
\*  $p < 0.05$

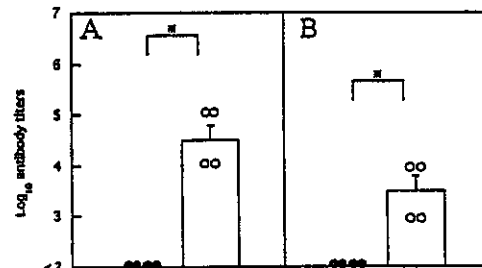


Fig. 2 Serum IgG (A) and IgA (B) antibody responses to the sonicate of *H. pylori* co-administered intranasally with (O) and (●) without rCTB  
\*  $p < 0.05$

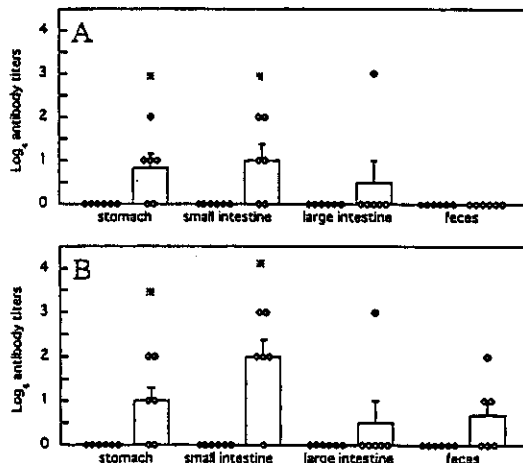


Fig. 3 Mucosal IgG (A) and IgA (B) antibody responses to the sonicate of *H. pylori* co-administered orally with (O) and (◆) without rCTB  
\*  $p < 0.05$

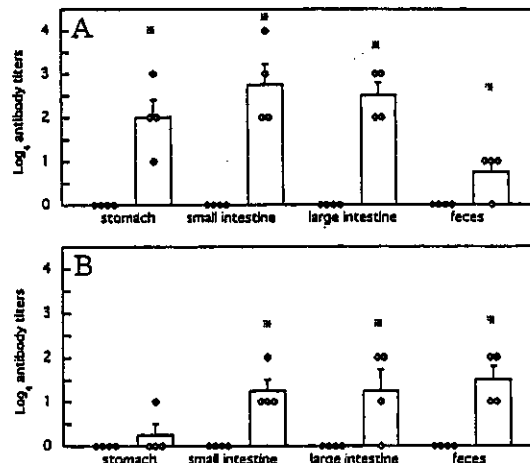


Fig. 4 Mucosal IgG (A) and IgA (B) antibody responses to the sonicate of *H. pylori* co-administered intranasally with (O) and (◆) without rCTB  
\*  $p < 0.05$

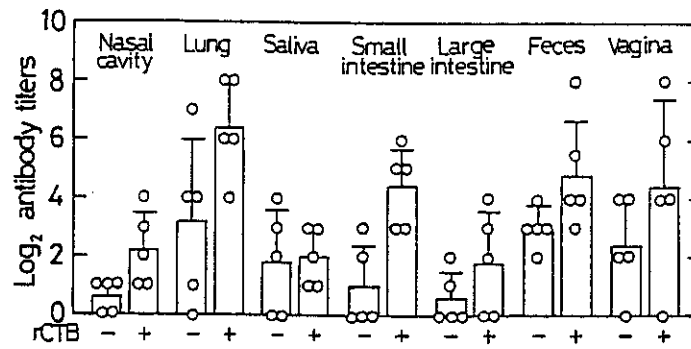


Fig. 5 Mucosal HA-specific IgA antibody responses in mice immunized intranasally with HA vaccine ± rCTB. HA vaccine was prepared from influenza virus A/New Caledonia/20/99

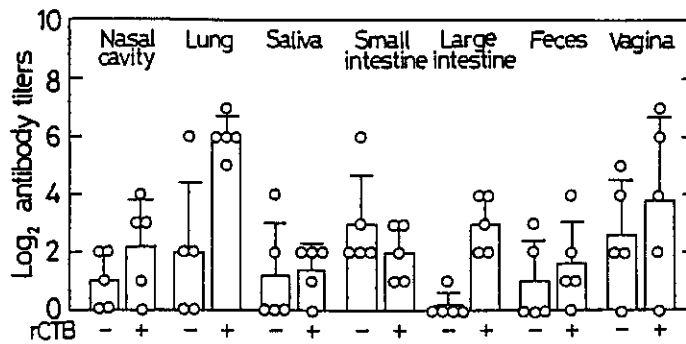


Fig. 6 Mucosal HA-specific IgA antibody responses in mice immunized intranasally with HA vaccine ± rCTB. HA vaccine was prepared from influenza virus B/Johannesburg/5/99

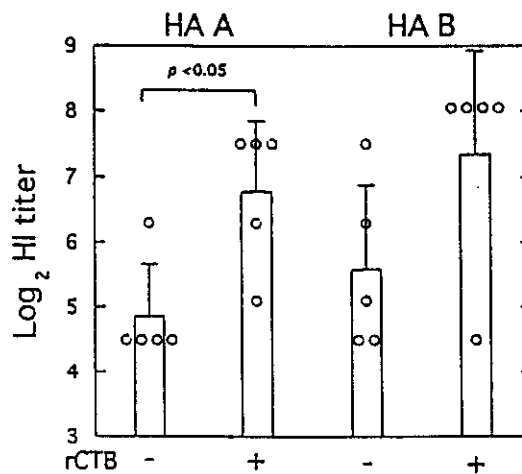


Fig. 7 Serum HI titers in mice immunized intranasally with HA vaccines ± rCTB. HA vaccines were prepared from influenza viruses A/New Caledonia/20/99 and B/Johannesburg/5/99

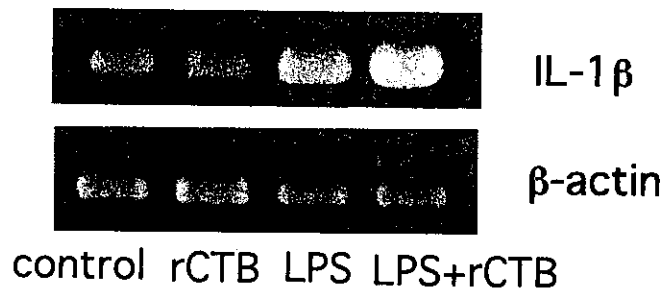


Fig. 8 Expression of IL-1 $\beta$  and  $\beta$ -actin mRNAs in non-stimulated M $\phi$  incubated *in vitro* with and without LPS and rCTB

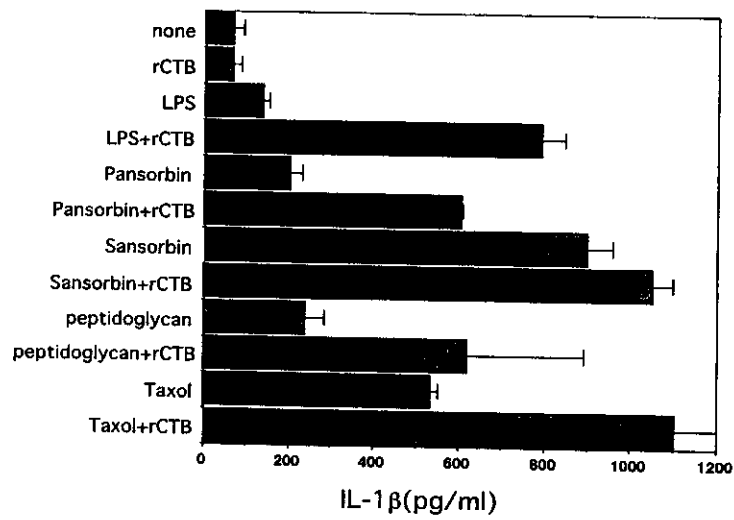


Fig. 9 Effect of rCTB on IL-1 $\beta$  production by M $\phi$  incubated with various stimulants

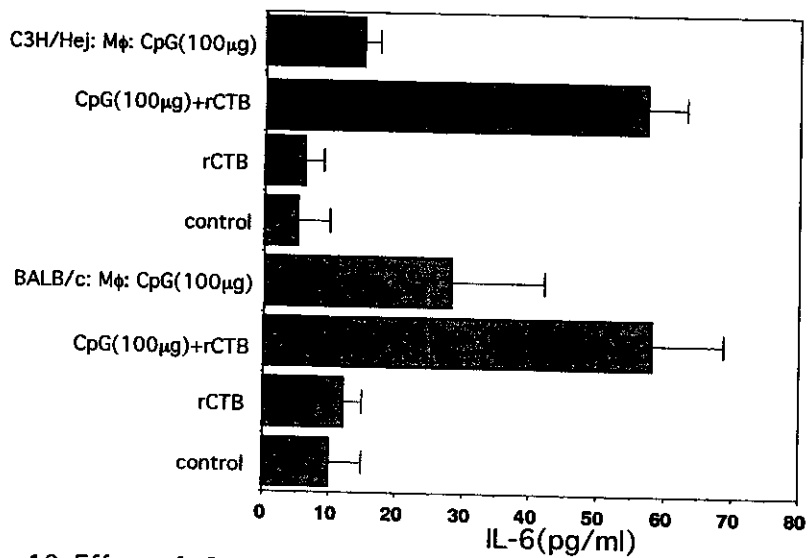


Fig. 10 Effect of rCTB on IL-6 production by M $\phi$  stimulated with CpG

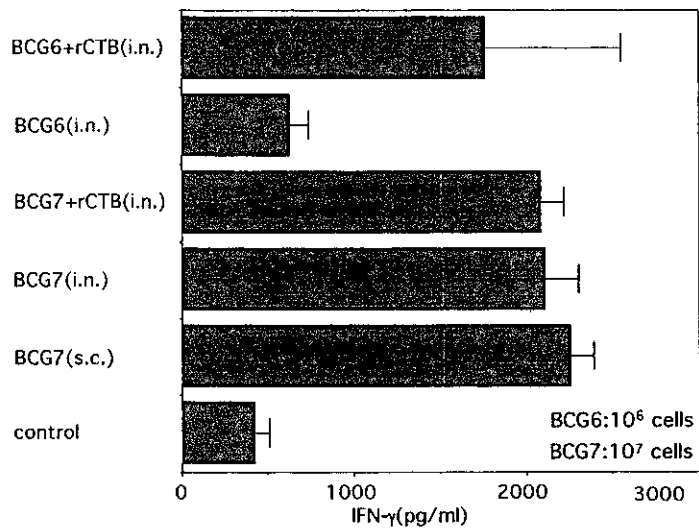


Fig. 11 Effect of rCTB on IFN- $\gamma$  production by mouse spleen cells stimulated with PPD after intranasal vaccination of BCG

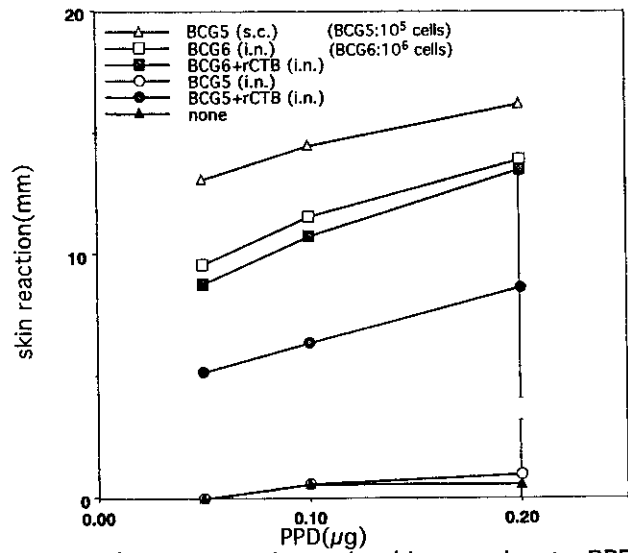


Fig.12 Effect of rCTB on guinea pig skin reaction to PPD after intranasal vaccination of BCG

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社