

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成15年(2003年) 4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	1
II.	分担研究報告書	
1.	キメラ型アジュバントの免疫増強効果惹起メカニズムの解明 清野 宏	9
2.	<i>Bacillus brevis</i> によるchimera (mCT-A/LT-B)の生産 高木 広明	15
3.	CTのアジュバント活性部位の同定 濱端 崇	19
4.	インフルエンザの予防における上気道のIgA抗体の役割に関する研究 田村 慎一	21
5.	大腸菌を用いた mCT の大量産生系の確立 駒瀬 勝啓	23
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV.	研究成果の刊行物・別刷	31

# 研究総括報告書

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

主任研究報告書

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 東京大学医科学研究所免疫・感染研究部門炎症免疫学分野 教授

分担研究者： 高木 広明（株）プロテイン・エクスプレス 常務取締役）

濱端 崇（国立国際医療センター研究所 室長）

田村 慎一（大阪大学微生物病研究所 客員教授）

駒瀬 勝啓（（社）北里研究所・生物製剤研究所 部門長）

研究要旨： 粘膜免疫システムの基礎的解明が進んでいる最近、新興・再興感染症の予防に向けてそれを応用した『粘膜ワクチン』の開発が新世代ワクチンとして期待されている。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)や病原性大腸菌由来易熱性毒素(LT)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)や両者の特性を有しているキメラ型 mCT-A/LT-B の開発を試み成功している。さらに mCT や mCT-A/LT-B 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ている。実用化に向けて効率良い mCT や mCT-A/LT-B 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*, pTrCLT02）を駆使し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。

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)や最近開発に成功した、キメラ型 mCT-A/LT-B、そして新しい展開が期待される合成ペプチドアジュバントの開発を進め、実用化に向けた基礎研究を推進する。

B. 研究方法：新興・再興感染症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に注目し、それ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』の実現化に向けて粘膜免疫増強効果のある「粘膜アジュバント」

開発へ向けて先導的な基礎研究を進めている。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東京大学、大阪大学、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』の実用化に向けた基礎研究を推進している。これは、近年期待されている産学共同粘膜ワクチン開発チームの先駆けといえる。

我々が開発した粘膜アジュバント mCT の進化型アジュバントとして mCT-A サブユニットと大腸菌由来 LT-B サブユニットからなるキメラ型アジュバントの *B. brevis* 発現ベクターを使った大量培養系の確立を目指し、ヒゲタ・プロテインエクスプレスチームによりその目標達成に向けて研究が着実に進んでいる。東大チームはキメラ型 mCT-A/LT-B のアジュバント効果をマウスの実験系で検討し、破傷風やインフルエンザワクチン抗原との併用により感染防御効果のある免疫誘導能があること事を阪大、田村班との協力で確認している。さらに、東大チームは無毒化毒素型各サブユニットのアジュバント効果への関与を検討するために、各種キメラ分子 (LT-A/CT-B, CT-A/LT-B) を作成し比較検討した。阪大チームは粘膜アジュバント併用インフルエンザワクチンにより誘導される分泌型 IgA が交叉防御の責任抗体である事実を pIgR 欠損マウス実験系により証明した。国立国際医療センターチームは mCT 改良型と新型開発に向けて一連の欠損変異 mCT 遺伝子の作成と発現を進めている。北里研究所チームは mCT の大腸菌での大量発現系開発を進めてきたが、mCT 遺伝子のシグナル配列を LT 遺伝子に置換することで、小スケール培養において高濃度での回収が可能になった。さらに、粘膜アジュバント効果があることも確認されている。この様に、各チームが連携しながら、無毒化変異型 mCT と無毒化キメラ型 mCT-A/LT-B を中心として実用化に向けて、発現系から生物活性まで多面的な研究を展開している。

倫理面での配慮

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. 研究結果：

1. *Bacillus brevis* による無毒化キメラ型アジュバントの生産系確立（ヒゲタ・プロテインエクスプレスグループ）

*B. brevis* (pNCMO-chimera) の first transformants を tube (培地 3 ml) で培養して培養上清を SDS-PAGE で分析すると、chimera 分子が培養上清中に生産する株と生産しない株が得られた。そこで、chimera 分子を生産する株を継代を繰り返しながら選択していき、最終的に 3 代継代を繰り返しても安定に chimera 分子を分泌生産する株を選抜した。この安定株を元に working cell を作製し、以降のスケールアップ試験に用いた。TMN と 2SLN 培地を用いて tube (培地 3 ml)、3L jar (培地 2L ; 320 rpm, 1vvm, 32°C, *B. brevis* 培養における通常の培養条件) で培養したところ、SDS-PAGE において培養上清中に chimera 分子 (mCTA, LTB) は見られたが、immobilized D-galactose gel を用いた精製方法では、tube, 2SLN 培地で培養した培養上清からのみ chimera 分子が精製された。

2. キメラ型 (mCT-A/LT-B) アジュバントの免疫増強効果惹起メカニズムの解明（東京大学グループ）

まず、CT-A/LT-B や LT-A/CT-B キメラ毒素を作成し、各々のアジュバント活性の程度を比較・検討したところ、キメラ毒素を投与した群は CT, LT 投与群と同程度の強い抗原特異的血清 IgG, IgA 応答が誘導され、抗原特異的分泌型 IgA 抗体も唾液、鼻腔分泌液といった分泌液に誘導された。また、CT, LT は血清中に全く異なる IgG サブクラスパターン (例 Th2 型 vs Th1 型依存 IgG 応答) を誘導するが、2 種のキメラ毒素の IgG サブクラスパターンを CT, LT の場合と比較したところ、CT-A/LT-B 投与群では LT 投与群と同様に血清中抗原特異的 IgG2a サブクラスが上

昇していた。一方、LT-A/CT-B 投与群では CT 投与群と同様に抗原特異的 IgG1, IgG2b が上昇していた。

これまで CT 投与によって IgE 量が上昇することが報告され、LT 投与によっては CT 投与群と比較すると低い IgE 抗体反応が誘導されることが知られている。そこで更に 2 種のキメラ毒素間の違いを調べるために血清中総 IgE と抗原特異的 IgE 量についても調べた。両キメラ毒素によっても血清中 IgE 反応が誘導されるが、LTA/CTB のほうが CTA/LTB に比較して IgE 反応は高かった。

抗体産生増強効果を比較検討するために脾臓(全身性免疫組織)と上部呼吸器系粘膜組織における抗原特異的抗体産生細胞数の上昇を IgM, IgG, IgA 産生形質細胞数として調べた。キメラ投与群は CT, LT 投与群と同様に頸部リンパ節において高い抗原特異的 IgA 抗体産生細胞数、脾臓においても高い抗原特異的 IgG, IgA 抗体産生細胞数を示し、前述の粘膜組織、血清における抗原特異的抗体反応を裏付けている。

CT では IL-4 依存性 Th 2 型 CD4<sup>+</sup>T 細胞が、LT では IFN- $\gamma$  産生性 Th1 型、IL-4 非依存性 Th 2 型 CD4<sup>+</sup>T 細胞が誘導されることが報告されている。CD4<sup>+</sup>T 細胞から産生されるサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) 量を ELISA により測定したところ、CT-A/LT-B 投与群では IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-10 産生性 CD4<sup>+</sup>T 細胞が、LT-A/CT-B 投与群では IL-4 産生性 CD4<sup>+</sup>T 細胞が誘導されていた。

### 3. インフルエンザの予防における粘膜アジュバント誘導型上気道 IgA 抗体の役割 (大阪大学グループ)

分泌型 IgA の形成・産生に不可欠な pIgR の欠損マウス (pIgR<sup>-/-</sup>)BALB/c マウスに、H1N1 亜型の A/PR8、A/Yamagata、A/Beijing ワクチン、および B/Ibaraki ワクチンを CTB (微量 CT 混入型) と共に経鼻免疫した。4 週間後少容量の A/PR8 ウイルスをチャレンジ感染して、3 日後の鼻洗浄液及び血清の IgA 及び IgG 抗体応答及び鼻洗浄液のウイルス価を

検討した。その結果、野生型(pIgR<sup>+/+</sup>)マウスにおいて、A/PR8 ワクチンを免疫したマウスで完全な防御が、また、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスで部分的な防御が認められたのに、pIgR<sup>-/-</sup>マウスでは、A/PR8 ワクチン免疫マウスで防御が不完全になり、また、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスでは交叉防御能が低下した。平行して、ワクチン免疫マウスの鼻洗浄液中に A/PR8 の HA 分子と交叉反応する IgA 抗体の出現の抑制が認められた。以上の結果から、変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が、上気道の分泌型 IgA 抗体に依存していることが直接的に示された。

このことは、ワクチンを 2 回免疫方式で免疫した pIgR<sup>-/-</sup>マウスにおける A/PR8 ウイルスの上気道感染に対する抗体応答と感染防御においても確かめられた。

### 4. 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)

mCTA 遺伝子を構造的特徴から 5 つの部分に分けてそれぞれを欠損させた欠損変異 mCTA を、IPTG 存在下で培養し発現させたところ、すべて不溶性画分に発現したが、発現量及び純度は良好であった。そこで 6M 尿素で抽出し Ni カラム (His-Bind, Novagen 社) を用いて精製した。しかし動物実験に向け中性バッファーに置換 (巻き戻し) すると、大部分が凝集・沈殿した。可溶性画分での回収を得るため、まず発現時に封入体を形成しない条件を検討した。IPTG 濃度、培養時間、温度、大腸菌の濃度等を変化させても、封入体形成は防ぐことができなかった。親水性の高い GST をタグに持つ発現ベクター pGEX4T にリクローニングして同様の事を試みたが改善は見られなかった。*Brevibacillus chosinensis* の宿主・ベクター系も試したが、結局高発現株は得られなかった。

次に巻き戻し条件を検討した。一般的に用いられるグリセロールや界面活性剤の添加、高倍希釈法、変性剤や還元剤の段階的透析法、pH の変化 (pH 5-9) はすべて効果がなかった。FoldIt Screen kit

(Hampton Research 社) を用い 16 通りの巻き戻し条件を検討したところ、L-Arginine (550 mM) の存在がもっとも可溶性に影響することがわかった。最適化したバッファーでは全発現タンパク質の 30~40% 程度が可溶性画分で回収できた。今後、この方法をさらに改良して各種欠損変異型毒素を精製・分離していく。

#### 5. 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)

大腸菌を用いた mCT リッタースケールでの培養系の開発・改良をめざす実験を進めた。培養ジャーを用いて pTrcLT02 を保持する大腸菌を培養し、菌数の変化を経時的に計測した。菌数は 20 °C の培養条件で約 24 時間後にピークに達し、その時点の菌数密度は  $1.2 \times 10^9$ /ml であった。これは坂口コルベンを用いた培養系の約 3 倍であった。しかし mCT の回収率は、コルベンを用いたときの回収率 (約 15mg/L) を下回り 5~10 mg/L であった。精製した mCT の GM1 結合能、SDS-PAGE 泳動像、Western blotting の結果は大腸菌より回収し、活性が確認されている native CT とほぼ同様であった。また、PF 試験を用いた mCT の CT 活性は native CT の  $10^{-6}$  以下であった。その時のエンドトキシン濃度は 1.5 ~ 2.6 EU/ml であった。次にジャー培養より精製した mCT のアジュバンド活性を DTH 法で測定し、native CT と比較した。コレラ菌と、量産系キメラ CT 遺伝子を持つ大腸菌から回収した CT を陽性対照とした。量産系精製 mCT の活性は陽性対照らと比較するとやや弱いもののアジュバンド活性を保持していた。mCT の実用化に向けて大腸菌を使った大量培養系のシステム確立の可能性が示唆されてきた。

#### D. 考察:

##### 1. *Bacillus brevis* による無毒化キメラ型アジュバンドの生産系確立 (ヒゲタ・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 chimera 分子 (mCTA, LTB) の生産を行ったところ、培養上清

中に生産され、immobilized D-galactose gel を用いた精製法により、簡単で、他の夾雑蛋白質がなく精製された。しかし、スケールアップした大量培養 (jar 培養) での生産量が低かった為、chimera 生産菌株の安定化を行い、3 代継代を繰り返しても安定に chimera 分子を生産する安定株を選抜し、大量培養に適した working cell を作製した。この working cell を用いて 3L jar 培養を検討したところ、培養上清中に chimera 分子 (mCTA, LTB) は見られるものの、immobilized D-galactose gel を用いた精製方法では、tube, 2SLN 培地で培養した培養上清のみで chimera 分子が精製された。これは、immobilized D-galactose gel は 1A5B 構造を持つ chimera 分子のみを認識して精製する為、tube, 2SLN 培地でのみ 1A5B 構造を持つと考えられる。また、本分子の特性から他の夾雑タンパク質とアグリゲーションし易い現象が確認された。工業スケールに適したスケールアップを行う為、jar 培養における正しい 1A5B 構造を持つ chimera 分子を生産する培養条件を検討しなければならない。

##### 2. キメラ型 (mCT-A/LT-B) アジュバンドの免疫増強効果惹起メカニズムの解明 (東京大学グループ)

IgG サブクラスパターンおよび IgE 量の結果は LTA/CTB、CTA/LTB 2 種のキメラ分子が異なるメカニズムを介してアジュバンド活性を誘導していることを示唆している。つまり、CTA/LTB では LT 様の、LTA/CTB では CT 様の免疫応答を惹起していることを示唆している。そこで 2 種のキメラ毒素によって引き起こされる T 細胞 (Th) の型 (Th1 型、Th2 型) を明らかにしたところ、CTA/LTB 投与群では、粘膜免疫関連組織、脾臓に Th1 型と IL-4 非依存性 Th2 型反応を誘導する LT 様の CD4<sup>+</sup>T 細胞応答が検出された。一方、LTA/CTB 投与群では CT 様の IL-4 依存性 Th2 型反応を誘導する CD4<sup>+</sup>T 細胞が誘導されたことを示していた。つまり、B サブユニットの部分に Th1 型・Th2 型依存的アジュバンド効果の方向性を規定する

作用がある事が示唆された。

### 3. インフルエンザの予防における粘膜アジュバント誘導型上気道 IgA 抗体の役割 (大阪大学グループ)

気道粘膜の IgA 抗体が IgG 抗体よりも優れている点は、インフルエンザウイルスの侵入門戸である上気道に大量に分布し、変異ウイルスの感染に対する交叉防御の能力を準備することである。そこで、変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が上気道の分泌型 IgA 抗体の存在に依存していることをより直接的に立証するために、分泌型 IgA 形成に不可欠な pIgR が欠損している遺伝子改変マウスを用いて証明することが出来た。

### 4. 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)

コレラ毒素自体は全体的に親水性の構造であることが報告されているが、その中間部分を欠損させた欠損変異分子は、予想に反し極めて可溶化が困難であった。CT-A は球状の構造であると報告されているので、欠損により大きく構造が変化し、それが不溶化と巻き戻しの困難さの原因であると考えられる。L-Arginine は塩基性で極性を持つアミノ酸であり、分子間の相互作用を抑制することからタンパク質の巻き戻しの際によく用いられる。今回検討した要素の中では最も効果的だったが、それでも回収率は3〜4割であった。これは欠損変異 mCT-A が人工タンパク質であるため、構造の保持自体にかなりの無理があるからと考えられる。当面はこの手法で欠損変異 mCTA を蓄積し動物実験に着手するとともに、より効率のよい発現・精製法や、場合によってはスタート材料の見直しも視野に入れて研究を進めたい。

### 5. 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)

遺伝子操作に一般的に用いられる大腸菌での CT の大量調製は困難であった。昨年度は CT 遺伝子の持つシグナル配列を大腸菌の持つ LT 遺伝子の持つ

それと置き換える事によって、大腸菌における CT の発現量が大幅に改善されることを示した。本年度は 1.7L の培養ジャーを用いて大腸菌でのリッタースケールにおける mCT の回収を試みた。培養ジャーでは菌数密度は坂口コルベンを用いた時より上昇したが、逆に、mCT の産生量はやや減少する方向であった (5〜10 mg /L)。結果的には菌数の増加が mCT 産生量の増加につながらなかった。ジャー培養に適した培養条件の検討が必要と思われた。

この量産系を用いて回収、精製した CT、および mCT (CT112K) の性状を SDS-PAGE 電気泳動、CT-A 抗体を用いた Western blotting, GM1 結合能アッセイ等で検討したところ、CT と同様な性状を示し、ペンタマー構造を持つ B サブユニットと A サブユニットからなると構造を保持していると考えられた。また、CT 活性も mCT は native CT の  $1 \times 10^{-6}$  に弱毒されていた。DTH 法によって計測したアジュバンド活性は陽性対照の native CT よりも弱いものの保存されていた。これらにより培養ジャーによって得られた大腸菌による mCT がアジュバンドとして有効であること、ならびにより大型のジャーによるスケールアップの可能性が示唆された。

### E. 結論 :

#### 1. *Bacillus brevis* による無毒化キメラ型アジュバントの生産系確立 (ヒゲタ・プロテインエクспレスグループ)

*B. brevis* の宿主-ベクター系を用いて、chimera (mCTA, LTB) を分泌生産することに成功した。単離精製した chimera 分子は粘膜アジュバントとしての活性を十分に有していた。工業スケールに適したスケールアップを行う為に chimera 生産菌株の安定化を行い安定株を得た。この菌株を用いてスケールアップを行う為に、jar 培養条件の検討を進めている。

#### 2. キメラ型 (mCT-A/LT-B) アジュバントの免疫増強効果惹起メカニズムの解明 (東京大学グループ)



LTa/CTB と CTA/LTB の 2 種のキメラ型毒素を作成し、その免疫増強効果を検討したところ、両者とも LT, CT と同様にアジュバント活性が保たれ、エンテロトキシンの B サブユニットが CD4<sup>+</sup>Th 細胞の Th1 型・Th2 型誘導と関連 IgG サブクラス/IgA 抗体誘導に重要であることが示唆された。mCTA/LT においても LT 様の Th 細胞と IgA/IgG 抗体応答が示唆されている。

### 3. インフルエンザの予防における粘膜アジュバント誘導型上気道 IgA 抗体の役割 (大阪大学グループ)

上気道の粘膜上に分泌される分泌型 IgA 抗体が、変異ウイルス株の感染 (流行) に対する重要な交叉防御因子である。

### 4. 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部位を特定する目的で、mCT-A の一連の欠損変異遺伝子を作製した。それらはほぼ良好かつ高純度な発現を示したが、封入体を形成したため変性条件で精製し、巻き戻しのため中性バッファーに対し透析すると大部分が凝集・沈澱した。可溶性画分として精製するため種々の発現・精製の条件検討を行った。結局、巻き戻しのためのバッファー条件を最適化することで回収の効率が比較的改善された。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。

### 5. 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)

昨年度構築した pTrCLT02 プラスミドを持つ大腸菌は、リッタースケールのジャー培養においても mCT を量産した。また、この系から精製された mCT は高度に弱毒化されていたがアジュバント活性を保持していた。この大腸菌による大量産生系は、粘膜ワクチンの実用化に有用であろう。

### F. 健康危機情報: 当研究計画は医学的情報発信へ向

けた基礎的理論形成研究の為、現時点では該当しない。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表:

1. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W. van Ginkel., Miyachi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., J.R. McGhee. and Kiyono, H. A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab. *J Infect Dis* 186: 1261-1269, 2002.
2. Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S., Shikina, T., Yamamoto, M., Kurono, Y. and Kiyono, H. NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT  $\alpha$ 1 2/LT $\beta$ R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> cells. *Immunity* 17: 31-40, 2002.
3. Watanabe, I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., Kiyono, H., Takeda, Y., McGhee, J.R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T. and Tammura, S. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* 20: 3443-3455, 2002.
4. Suenobu, N., Kweon, M-N. and Kiyono, H. Nasal vaccination induces the ability to eliminate *Candida* colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of *Candida*-related atopic dermatitis. *Vaccine* 20: 2972-2980, 2002.
5. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and Kiyono, H. IL-15 induced CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>T cells in the development of small intestinal inflammation in T3b-IL-15 Tg mice. *J Immunol* 169: 460-468, 2002.
6. Ueta, M., Kweon, M-N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J., Koizumi, N., Kiyono, H. and Kinoshita, S. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol* 129: 464-470, 2002.

7. Kunisawa, J., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Hiroi, T., Nakagawa, S., **Kiyono, H.** and Mayumi, T. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 $\alpha$  antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen. *Eur J Immunol* 32: 2347-2355, 2002.
8. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and **Kiyono, H.** Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. *Clin Immunol* 102: 237-248, 2002.
9. Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., **Kiyono, H.**, Yamamoto, H. and Ishikawa, H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 168: 57-64, 2002.
10. Kweon, M-N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M-H., Suenobu, N. and **Kiyono, H.** Development of antigen-induced enterocolitis in SCID mice reconstituted with spleen-derived memory type CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>+</sup> T cells. *Gut* 50: 299-306, 2002.
11. Yanagita, M., Shimabukuro, Y., Nozaki, T., Yoshimura, N., Watanabe, J., Koide, H., Terakura, M., Saho, T., Takedachi, M., Jang, M-H., **Kiyono, H.** and Murakami, S. IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells. *Biochem Biophysical Res Commun* 297: 329-334, 2002.
12. Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., E. J. Park. and **Kiyono, H.** Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J Immunol* 169: 6187-6192, 2002.
13. Enose, Y., Ui, M., Miyake A., Suzuki, H., Uesaka, H., Kuwata, T., Kunisawa, J., **Kiyono, H.**, Takahashi, H., Miura T. and Hayami, M. Protection by intranasal immunization of a nef-deleted, nonpathogenic SHIV against intravaginal challenge with a heterologous pathogenic SHIV. *Virology* 298: 306-316, 2002.
14. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and **Kiyono, H.** HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 enapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J Immunol* 170: 495-502, 2002.
15. Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** CD40L in autoimmunity and mucosally induced tolerance. *J Clin Invest* 109: 171-173, 2002.
16. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., **Kiyono, H.**, Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66, 2002.
17. **Hamabata, T.**, Liu, C., and Takeda, Y. Positive and negative regulation of water channel aquaporins in human small intestine by cholera toxin. *Microbial Pathogen* 32: 273-277, 2002.
18. **Hamabata, T.**, Tanaka, T., Shima, T., Ozawa, A., Sato, T. and Takeda, Y. Genetic variation in the flanking regions of Shiga toxin 2 gene in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in Japan. *FEMS Microb Lett* 215: 229-236, 2002.
19. Asahi, Y., Yoshikawa, T., Watanabe, I., Iwasaki, T., Hasegawa, H., Sato, Y., Shimada, S., Nanno, M., Matsuoka Y., Ohwaki, M., Iwakura, Y., Suzuki, Y., Aizawa, C., Sata, T., Kurata, T., and **Tamura, S.-I.** Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor-knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol* 168: 2930-2938, 2002.
20. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and **Kiyono, H.** Development of colitis in STAT6-deficient TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice: A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4<sup>+</sup> $\beta$  $\beta$ T cells. *Am J Pathol* 162: 263-271, 2003.
21. Boyaka, P.N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R.J., McGhee, J.R., Yuki, Y. and **Kiyono, H.** Chimeras of labile toxin one and cholera

toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J Immunol* 170: 454-462, 2003.

22. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., **Tamura, S.**, Kurata, T., Takeda, Y., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4<sup>+</sup>T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 170: 1754-1762, 2003.
23. Kweon M.-N. and **Kiyono H.** Eosinophilic gastroenteritis: A problem of the mucosal immune system? *Current Allergy and Asthma Reports* 3: 79-85, 2003.

# 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

キメラ型アジュバントの免疫増強効果惹起メカニズムの解明

分担研究者： 清野 宏 東京大学医科学研究所 炎症免疫分野 教授

研究協力者： 星野 真理（旧姓 大村） 東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野

研究要旨： コレラ菌の産生するコレラ毒素 (CT) の A サブユニットと毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシン (LT) の B サブユニットのキメラ毒素 CT-A/LT-B と LT の A サブユニットと CT の B サブユニットのキメラ毒素 LT-A/CT-B を用いて、CD4<sup>+</sup> ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) の誘導への A サブユニットと B サブユニットの関与を調べたところ、CT-A/LT-B は LT 様の抗原特異的 IFN- $\gamma$  依存性 IL-4 非依存性 Th2 型 CD4<sup>+</sup> T 細胞を、LT-A/CT-B は CT 様の IL-4 依存性 Th2 型 CD4<sup>+</sup> T 細胞を誘導していた。本研究よりエンテロトキシンアジュバントの B サブユニットが Th 細胞反応を制御していることが示唆された。

A. 研究目的： コレラ菌の産生するコレラ毒素 (CT) や毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシン (LT) の分子構造は、毒素活性を担う A サブユニットと膜レセプターとの結合を担う B サブユニットから成る。この CT や LT、また、無毒変異型コレラ毒素 (mCT) は強い粘膜アジュバント活性を有することが知られている。無毒型粘膜アジュバント開発を目的として、この mCT の A サブユニットと LT の B サブユニットから成る無毒キメラ毒素 (mCT-A/LT-B) を作製し、破傷風トキソイドとインフルエンザウイルスの 2 種の抗原を用いて粘膜アジュバント活性を検討したところ、粘膜組織に顕著に抗原特異的 IgA 反応、血清中に高い抗原特異的 IgG、IgA 反応が誘導されていた。また、この免疫反応は防御効果を伴

っていた。このことは mCT-A/LT-B が細菌毒素およびインフルエンザウイルス感染に対し、防御的免疫反応を誘導できる効果的かつ安全な粘膜アジュバントであることを示している。そこで、CT の A サブユニットと LT の B サブユニットのキメラ毒素 CT-A/LT-B と LT の A サブユニットと CT の B サブユニットのキメラ毒素 LT-A/CT-B を設計し、この 2 つのキメラ分子を用いることにより mCT-A/LT-B の粘膜アジュバント機構の解明を行った。

B. 研究方法： CT、LT それぞれの A、B サブユニットを解離し、CT の A サブユニットと LT の B サブユニット、LT の A サブユニットと CT の B サブユニットを再融合させることによりキメラ毒素 CT-A/LT-B と LT-A/CT-B を構築し

た。これら新規のキメラ毒素と CT、LT といった強いアジュバント活性を有するエンテロトシキンの CD4<sup>+</sup>ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) の誘導への A サブユニットと B サブユニットの関与を比較検討した。

CT-A/LT-B, LT-A/CT-B 存在下に抗原 (卵白アルブミン:OVA) をマウスに週一回連続 3 週間経鼻投与後の血清中 (全身性免疫反応)、鼻腔洗浄液や唾液などの分泌液中 (粘膜性免疫反応) の抗原特異的抗体反応を ELISA を用いて、脾臓 (全身性免疫組織) と上部呼吸器系粘膜組織における抗原特異的抗体産生細胞数を ELISPOT 法により測定した。また、脾臓と頸部リンパ節からの CD4<sup>+</sup>T 細胞を用い、産生されるサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) 量を ELISA により測定し、そのサイトカインパターンを調べた。以上の結果を粘膜アジュバントとして LT もしくは CT を用いた場合と比較検討した。

C. 研究結果: まず、キメラ毒素のアジュバント活性の程度を調べたところ、キメラ毒素を投与した群は CT, LT 投与群と同程度の強い抗原特異的血清 IgG, IgA 反応が誘導され、抗原特異的分泌型 IgA 抗体も唾液、鼻腔分泌液といった分泌液に誘導された。また、CT, LT は血清中に全く異なる IgG サブクラスパターンを誘導するが、2 種のキメラ毒素の IgG サブクラスパターンを CT, LT の場合と比較したところ、CT-A/LT-B 投与群では LT 投与群と同様に血清中抗原特異的 IgG2a サブクラスが上昇していた。一方、LT-A/CT-B 投与群では CT 投与群と同様に抗原特異的 IgG1, IgG2b が上

昇していた。

これまで CT 投与によって IgE 量が上昇することが報告され、LT 投与によっては CT 投与群と比較すると低い IgE 抗体反応が誘導されることが知られている。そこで更に 2 種のキメラ毒素間の違いを調べるために血清中総 IgE と OVA 特異的 IgE 量についても調べた。両キメラ毒素によっても血清中 IgE 反応が誘導されるが、LT-A/CT-B のほうが CT-A/LT-B に比較して IgE 反応は高かった。

抗体産生増強効果を比較検討するために脾臓 (全身性免疫組織) と上部呼吸器系粘膜組織における抗原特異的抗体産生細胞数の上昇を IgM, IgG, IgA 産生形質細胞数として調べた。キメラ投与群は CT, LT 投与群と同様に頸部リンパ節において高い抗原特異的 IgA 抗体産生細胞数、脾臓においても高い抗原特異的 IgG, IgA 抗体産生細胞数を示し、前述の粘膜組織、血清における抗原特異的抗体反応を裏付けている。

CT では IL-4 依存性 Th 2 型 CD4<sup>+</sup>T 細胞が、LT では IFN- $\gamma$  産生性 Th1 型、IL-4 非依存性 Th 2 型 CD4<sup>+</sup>T 細胞が誘導されることが報告されている。CD4<sup>+</sup>T 細胞から産生されるサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) 量を ELISA により測定したところ、CT-A/LT-B 投与群では IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-10 産生性 CD4<sup>+</sup>T 細胞が、LT-A/CT-B 投与群では IL-4 産生性 CD4<sup>+</sup>T 細胞が誘導されていた。

D. 考察: IgG サブクラスパターンおよび IgE 量の結果は LT-A/CT-B, CT-A/LT-B 2 種のキメラ分子が異なるメカニズムを介してアジ

ユバント活性を誘導していることを示唆している。つまり、CT-A/LT-B では LT 様の、LT-A/CT-B では CT 様の免疫応答を惹起していることを示唆している。そこで2種のキメラ毒素によって引き起こされる T 細胞 (Th) の型 (Th1 型、Th2 型) を明らかにしたところ、CT-A/LT-B 投与群では、粘膜免疫関連組織、脾臓に Th1 型と IL-4 非依存性 Th2 型反応を誘導する LT 様の CD4<sup>+</sup>T 細胞応答が検出された。一方、LT-A/CT-B 投与群では CT 様の IL-4 依存性 Th2 型反応を誘導する CD4<sup>+</sup>T 細胞が誘導されたことを示していた。

E. 結論：本研究により LT-A/CT-B、CT-A/LT-B の2種のキメラ毒素では LT、CT と同様にアジュバント活性が保たれ、エンテロトキシンの B サブユニットが CD4<sup>+</sup>Th 細胞の Th1 型・Th2 型誘導に重要であることが示された。mCT-A/LT-B においても LT 様の Th 細胞反応が予想される。

F. 健康危険：情報当研究計画は医学的情報発信へ向けた基礎的理論形成研究の為、現時点では該当しない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W. van Ginkel., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., J.R. McGhee. and Kiyono, H. A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab. *J*

*Infect Dis* 186: 1261-1269, 2002.

2. Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S., Shikina, T., Yamamoto, M., Kurono, Y. and Kiyono, H. NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT  $\alpha$ 1 2/LT $\beta$ R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells. *Immunity* 17: 31-40, 2002.
3. Watanabe, I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., Kiyono, H., Takeda, Y., McGhee, J.R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T. and Tammura, S. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* 20: 3443-3455, 2002.
4. Suenobu, N., Kweon, M-N. and Kiyono, H. Nasal vaccination induces the ability to eliminate Candida colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of Candida-related atopic dermatitis. *Vaccine* 20: 2972-2980, 2002.
5. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and Kiyono, H. IL-15 induced CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>T cells in the development of small intestinal inflammation in T3b-IL-15 Tg mice. *J Immunol* 169: 460-468, 2002.
6. Ueta, M., Kweon, M-N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J., Koizumi, N., Kiyono, H. and Kinoshita, S. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol* 129: 464-470, 2002.
7. Kunisawa, J., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Hiroi, T., Nakagawa, S., Kiyono, H. and Mayumi,

- T. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 $\alpha$  antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen. *Eur J Immunol* 32: 2347-2355, 2002.
8. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and **Kiyono, H.** Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. *Clin Immunol* 102: 237-248, 2002.
  9. Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., **Kiyono, H.**, Yamamoto, H. and Ishikawa, H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 168: 57-64, 2002.
  10. Kweon, M-N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M-H., Suenobu, N. and **Kiyono, H.** Development of antigen-induced enterocolitis in SCID mice reconstituted with spleen-derived memory type CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>+</sup> T cells. *Gut* 50: 299-306, 2002.
  11. Yanagita, M., Shimabukuro, Y., Nozaki, T., Yoshimura, N., Watanabe, J., Koide, H., Terakura, M., Saho, T., Takedachi, M., Jang, M-H., **Kiyono, H.** and Murakami, S. IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells. *Biochem Biophysical Res Commun* 297: 329-334, 2002.
  12. Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., E. J. Park. and **Kiyono, H.** Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J Immunol* 169: 6187-6192, 2002.
  13. Enose, Y., Ui, M., Miyake A., Suzuki, H., Uesaka, H., Kuwata, T., Kunisawa, J., **Kiyono, H.**, Takahashi, H, Miura T. and Hayami, M. Protection by intranasal immunization of a nef-deleted, nonpathogenic SHIV against intravaginal challenge with a heterologous pathogenic SHIV. *Virology* 298: 306-316, 2002.
  14. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and **Kiyono, H.** HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J Immunol* 170: 495-502, 2002.
  15. Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** CD40L in autoimmunity and mucosally induced tolerance. *J Clin Invest* 109: 171-173, 2002.
  16. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., **Kiyono, H.**, Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66, 2002.
  17. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and **Kiyono, H.** Development of colitis in STAT6-deficient TCR $\alpha^{-/-}$  mice: A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4<sup>+</sup> $\beta\beta$ T cells. *Am J Pathol* 162: 263-271, 2003.
  18. Boyaka, P.N., **Ohmura, M.**, Fujihashi, K.,



Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R.J., McGhee, J.R., Yuki, Y. and **Kiyono, H.** Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J Immunol* 170: 454-462, 2003.

19. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., **Tamura, S.**, Kurata, T., Takeda, Y., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4<sup>+</sup>T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 170: 1754-1762, 2003.

20. Kweon M.-N. and **Kiyono H.** Eosinophilic gastroenteritis: A problem of the mucosal immune system? *Current Allergy and Asthma Reports* 3: 79-85, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
なし

## 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

### 分担研究報告書

#### *B. acillus brevis* による chimera (mCTA/LTB) の生産

分担研究者： 高木広明 株式会社プロテイン・エクスプレス 常務取締役

研究要旨： 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 chimera 分子（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 chimera 分子は、D-galactose column を用いた精製方法によって精製され、mCT と同様の 1A5B 構造を持ち、低毒性で、アジュバント活性を有していた。

A. 研究目的： *B. brevis* 宿主-ベクター系は蛋白質を分泌生産する能力に優れており、グラム陽性菌であるためエンドトキシンを産生しない等の利点がある。この *B. brevis* を用いた異種タンパク質分泌発現系を用いて毒性が低く粘膜アジュバント活性の強い分子を生産する目的で、変異型コレラトキシンと易熱性大腸菌のエンテロトキシンを組み合わせた chimera 分子 mCTA/LTB の分子設計を行い、分泌発現に成功した。その後、単離精製した chimera 分子は粘膜アジュバントとしての活性を十分に有しており、新規なワクチンアジュバントになる可能性が高いと判断された。そこで、本系の工業化を目標としたプロセスの開発を開始した。

B. 研究方法： *B. brevis* の宿主-ベクター系を用いて chimera (mCTA/LTB) を大量生産し、工業スケールに適したプロセスデザインの開発を行った。ベクターは *E. coli* と *B. brevis* のシャトルベクター pNCM02 を用い、mCTA と

LTB を共に分泌発現させる chimera 発現プラスミドを構築した（図1）。このプラスミドが導入された *B. brevis* 形質転換株を tube (培地 3 ml) で培養したところ、培養上清中に chimera 蛋白質を生産する株と生産しない株が見られた（図2）。工業的にスケールアップした大量培養を考えると、この生産性の不安定は大きな問題となる為、chimera 蛋白質生産株の安定化を行った。安定化された chimera 蛋白質生産株を元に working cell を作製し 3L jar レベルの chimera 蛋白質の生産を検討した。

C. 研究結果： *B. brevis* (pNCM0-chimera) の first transformants を tube (培地 3 ml) で培養して培養上清を SDS-PAGE で分析すると、chimera 分子が培養上清中に生産する株と生産しない株が得られた（図2）。そこで、chimera 分子を生産する株を継代を繰り返しながら選択していき、最終的に3代継代を繰り返しても安定に chimera 分子を分泌生産す

る株を選抜した (図 3)。この安定株を元に working cell を作製し、以降のスケールアップ試験に用いた。TMN と 2SLN 培地を用いて tube (培地 3 ml)、3L jar (培地 2L ; 320 rpm, lvvm, 32°C, *B. brevis* 培養における通常の培養条件) で培養したところ、SDS-PAGE において培養上清中に chimera 分子 (mCTA, LTB) は見られたが、 immobilized D-galactose gel を用いた精製方法では、tube, 2SLN 培地で培養した培養上清からのみ chimera 分子が精製された (図 4)。

D. 考察: *B. brevis* の宿主-ベクター系を用いて chimera 分子 (mCTA, LTB) の生産を行ったところ、培養上清中に生産され、 immobilized D-galactose gel を用いた精製法により、簡単で、他の夾雑蛋白質がなく精製された。しかし、スケールアップした大量培養 (jar 培養) での生産量が低かった為、chimera 生産菌株の安定化を行い、3代継代を繰り返しても安定に chimera 分子を生産する安定株を選抜し、大量培養に適した working cell を作製した。この working cell を用いて 3L jar 培養を検討したところ、培養上清中に chimera 分子 (mCTA, LTB) は見られるものの、 immobilized D-galactose gel を用いた精製方法では、tube, 2SLN 培地で培養した培養上清のみで chimera 分子が精製された。これは、 immobilized D-galactose gel は 1A5B 構造を持つ chimera 分子のみを認識して精製する為、tube, 2SLN 培地でのみ 1A5B 構造を持つと考えられる。また、本分子の特性から他の夾雑タンパク質とアグリゲーションし易い現象が確認された。工業スケールに適したスケールアップを行う為に、jar 培養における正しい 1A5B 構造を持つ chimera 分子を生産

する培養条件を検討しなければならない。

E. 結論: *B. brevis* の宿主-ベクター系を用いて、chimera (mCTA, LTB) を分泌生産することに成功した。単離精製した chimera 分子は粘膜アジュバントとしての活性を十分に有していた。工業スケールに適したスケールアップを行う為に chimera 生産菌株の安定化を行い安定株を得た。この菌株を用いてスケールアップを行う為に、jar 培養の検討を行ったが、現在の条件では正しい 1A5B 構造を持つ chimera 分子の大量生産には成功しなかった。今後、正しい 1A5B 構造を持つ chimera 分子を生産する jar の培養条件を検討する。

G. 研究発表:

1. 論文発表

1. Mi-Na Kweon, Masafumi Yamamoto, Fumiko Watanabe, **Shinichi Tamura**, Frederik W. van Ginkel, Akira Miyauchi, **Hiroaki Takagi**, Yoshifumi Takeda, **Takashi Hamabata**, Kohtaro Fujihashi, Jerry R. McGhee and **Hiroshi Kiyono**, A Nontoxic Chimeric Enterotoxin Adjuvant Induces Protective Immunity in Both Mucosal and Systemic Compartments with Reduced IgE Antibodies. *J Infect Dis* 186: 1261-1269, 2002.

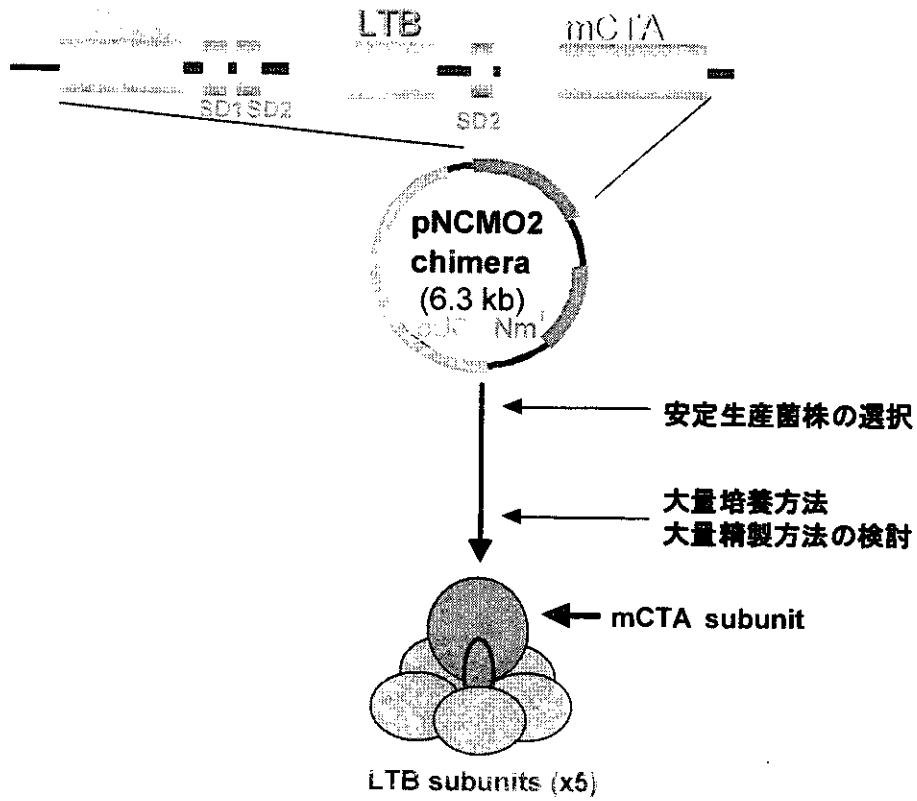


図 1. pNCMO2-chimera プラスミドの構築

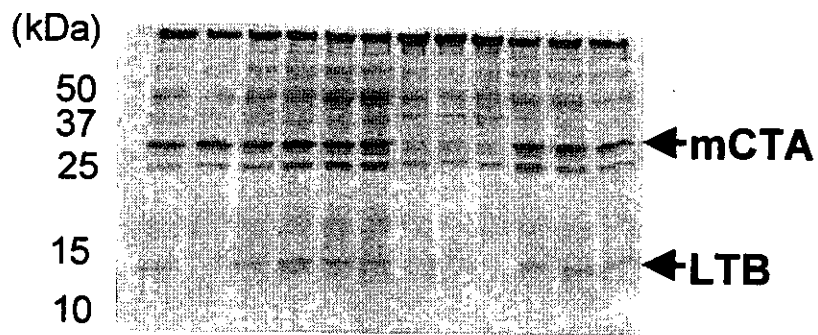


図 2. First transformants における chimera の生産