

図 3. 安定株の chimera 分子の生産

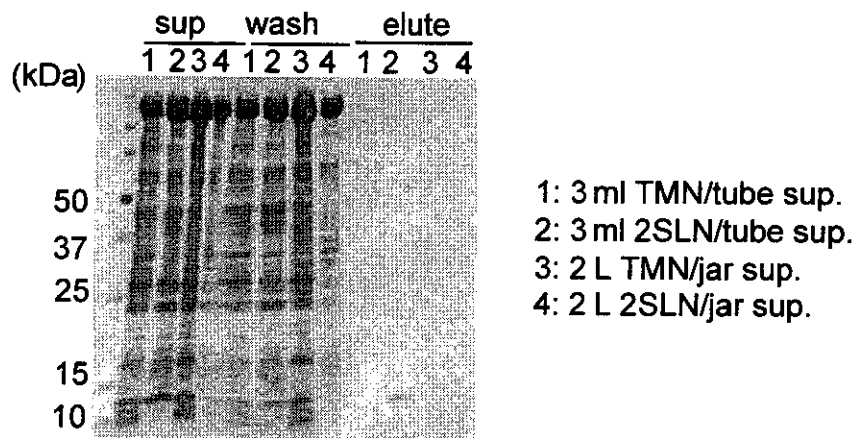


図 4. 培養上清からの chimera 分子の精製

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

CTのアジュバント活性部位の同定

分担研究者： 濱端 崇 国立国際医療センター研究所・室長

研究要旨： 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。IPTG 誘導により発現させると、封入体に高純度で蓄積されたため、Ni カラムにより変性条件下で精製した。しかし中性バッファーに置換すると、強い凝集・沈澱が認められた。この欠損変異 CT を可溶性画分で取り出すため種々の条件を検討した結果、巻き戻しの際のバッファーを最適化することにより、30・40% 程度が可溶性画分で回収できた。

A. 研究目的： コレラ毒素（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 分子のアジュバント活性を担う部位を同定し、ひいてはその部分のみの合成ペプチドがアジュバントとして実用可能かを検討する。

B. 方法： 無毒変異 CT（E112K、以下 mCT）遺伝子の A サブユニット（mCTA）を pET28 ベクターにサブクローニングした。さらに mCTA を、CT の構造解析を参考に 5 つの部分に分割し、それぞれを欠損する変異 mCT 分子を作製した。IPTG 誘導によって発現させ、封入体から変性条件の Ni カラム法により精製し、中性下での可溶化条件を最適化した。

（倫理面への配慮）

本研究内容は in vitro 実験であるので特段の問題はない。

C. 結果： 平成 13 年度報告書で示したように、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ので、6 M 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・沈澱した。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化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。

D. 考察： 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。CTA 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mCTA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。

E. 結論: CTのアジュバント活性部位を特定する目的で、mCTA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・沈殿した。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。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Hamabata, T., Liu, C., Takeda, Y.** Positive and negative regulation of water channel aquaporins in human small intestine by cholera toxin. *Microbial Pathogen.* 32: 273-277, 2002.
2. **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.
3. **Kweon, M.-N., Yamamoto, M., Watanabe, F.,**

Tamura, S., van Ginkel, F.W., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 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.

2. 学会発表

1. **Kawamura Y, Shirai Y, Kato R, Hamabata T, Yamamoto M, Furukawa K, Fujihashi K, McGhee JR, Dohi T.** GM1 ganglioside functions as a receptor for pathogen-associated molecular patterns (PAMP). 第32回日本免疫学会総会、2002年12月、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

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

分担研究者： 田村 慎一 大阪大学微生物病研究所 客員教授

研究要旨： 種々の A 型インフルエンザワクチンをアジュバントと共に経鼻免疫した pIgR (IgA の外分泌輸送に関与する多量体抗体受容体) 欠損マウスにおいて、分泌型 IgA 抗体の不在と関連して、ワクチン株とは異なるウイルス株の感染（流行）に対する交叉防御能が低下することが示され、交叉防御能が分泌型 IgA 抗体の誘導によって準備されることが明らかにされた。

A. 研究目的：

これまでワクチンを経鼻免疫したマウスにおいて、上気道に分泌される IgA 抗体が、ワクチン株と流行インフルエンザウイルス株が異なる場合にも交差感染防御をする重要な因子であることが示唆されている。その理由は、ワクチンに特異的な分泌型 IgA 抗体が、多量体に基ずくその交叉反応性によって、血中の単量体の IgG 抗体と比較して、高い交差感染防御能力を有しているからである。本研究では、種々の A 型や B 型インフルエンザワクチンをアジュバントと共に経鼻免疫した pIgR (IgA の外分泌輸送に関与する多量体抗体受容体) 欠損マウスにおいて、分泌型 IgA 抗体不在条件で、ワクチン株とは異なるウイルス株の感染（流行）に対する交叉防御能がどのようになるかを検討し、分泌型 IgA 抗体の防御上の役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法：

pIgR-KO マウス： マウス pIgR 遺伝子の exon 2 が欠損した pIgR-KO BALB/c マウスが実験に使用された。

ワクチン： 抗原性の異なる A 型の H1N1 亜型のウイルス、A/PR8、A/Yamagata、A/Beijing 由来の HA ワクチンを用いた。

免疫： マウスは、麻酔条件下で、CTB* [コレ

ラ毒素 (CT) の無毒の成分である B サブユニット (CTB) に微量の毒素を添加したもの] と混合した HA ワクチンを点鼻免疫され、4 週間後、ワクチンのみを点鼻追加免疫された。

感染： マウスに、麻酔条件下で、マウスに馴化した A/PR8 ウイルス (10^4 EID₅₀) を点鼻投与され、上気道に局限した感染を起こさせた。

鼻洗浄液及び血清材料： 麻酔条件下で、心採血後の血清を分離して IgA 及び IgG 抗体応答測定材料とした。また、鼻洗浄液を、IgA 及び IgG 抗体応答測定及びウイルス価測定材料とした。

抗体価とウイルス価： 抗体応答を ELISA 法により測定した。ウイルス価を、MDCK 細胞を用いたブラック法により測定し、免疫マウスの上気道における感染防御の指標とした。

(倫理面への配慮) マウスの飼育条件の快適さ、また、取り扱い時の苦痛の軽減等倫理面への配慮をした。

C. 研究結果：

pIgR-KO (pIgR^{-/-}) 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* 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+/+) 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-KO (pIgR-/-) 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-KO (pIgR-/-) 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。

D. 考察： 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。我々は、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、pIgR-KO マウスを用いて実験した。

E. 結論： 上気道の粘膜上に分泌される 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. Watanabe I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S.-E., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., Kiyono, H., Takeda, Y., McGhee, J. R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T., and Tamura, S.-I. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* 20: 3443-3455, 2002.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許習得	なし
2. 実用新案登録	なし
3. その他	なし

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

大腸菌を用いた mCT の大量産生系の確立

分担研究者： 駒瀬 勝啓 （社）北里研究所・生物製剤研究所 部門長

研究要旨： 粘膜ワクチンの有力なアジュバンドである変異 CT (mutantCT: mCT) を大腸菌で大量に調製する事は困難であった。昨年度は CT 遺伝子のシグナル配列を LT 遺伝子のそれと置き換えたキメラ CT 遺伝子を作成し、小スケールの培養条件ならば約 5・15mg/L の精製 mCT の回収が可能である事を示した。今年度は培養ジャーを用いてリッタースケールでの培養を行い、回収量と回収した mCT のアジュバンド活性、性状を検討した。その結果、量産系で得られた精製 mCT はインフルエンザ HA 抗原を用いた DTH 反応で native CT よりもやや弱いながらも明らかなアジュバンド活性を示し、粘膜ワクチンのアジュバンドとしての可能性が示された。

A 研究目的： 粘膜免疫を利用した経鼻、経口ワクチンは感染症制御のための次世代ワクチンとして期待されている。コレラ菌の産生するコレラトキシン (CT) や毒素原性大腸菌の産生する易熱性毒素 (LT) は粘膜上に効率よく分泌型 IgA (s-IgA) を誘導する有効なアジュバンドとして知られているが、ワクチンとして用いるには無毒化、あるいは弱毒化する必要が指摘されている。CT 遺伝子上に点変異を導入し、アジュバンド活性を保持したまま弱毒化、無毒化させたいいくつかの mCT が報告され、粘膜ワクチンのアジュバンドとして期待されている。しかし大腸菌での mCT の発現量は少なく、粘膜ワクチンを実用化する上で大きな障害となっている。本研究は、粘膜ワクチンの有力アジュバンドである mCT を、大腸菌を用いて大量に調製する方法を確立する事を目的としている。

B 研究方法： 1) リッタースケールでの培養；昨年度構築した *Trc* プロモーターの下流に、LT のシグナル配列を持つ mCT (CT112K; CTA サブユニットの 112 位アミノ酸のグルタミン酸をリジンに変換) 遺伝子をクローニングした *pTrcLT02*プラスミドを形質転換した大腸菌 DH10B を、Terrific Broth (TB) でサブカルチャーした後、1.5L の TB に植菌し、培養ジャー (BMS-03PI; バイオット) を用いて 24 時間培養し、その間の菌体数を経時的に計測した。菌体を回収後、破碎し菌体内の mCT を回収した。CT の精製は D-Galactose Immobilized Column (PIERCE) 用いて行った。

精製された mCT の性状は SDS-PAGE、Western Blotting、GMI 結合能で検討した。残存エンドトキシン量はトキシカラーシステム（生化学工業）を用いて計測した。CT 活性の測定には PF 試験を用いた。アジュバンド活性はインフルエンザ HA ワクチンを抗原とした DTH (delayed-type hypersensitivity) 法で測定し、native CT と比較した。

(倫理面への配慮)

北里研究所、組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けて行った。

C 研究結果： 1) リッタースケールでの培養；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 1.2×10^9 /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 GMI 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 $1.5 \cdot 2.6$ EU/ml であった (表 1)。

2) アジュバンド活性；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 (図 1)。

D 考察： 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、CTA 抗体を用いた Western blotting、GMI 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 $1 < 10^{-6}$ 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： 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ド活性を保持していた。この大腸菌による大量産生系は、経鼻ワクチンの実用化に有用であろう。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe , I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., Kiyono, H., Takeda, Y., McGhee J., Chiba, J., Sata T., Kurata,T., and Tamura, S-I. 2002,

Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine*. 20: 3443-3445, 2002.

2. 学会発表

なし

H 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

表 1. Properties of mCT(CT112K) derived from *E.coli*

Samples No.	Productivity (/L)	Toxicity (P.F) (4 mm)	Endotoxin (/ml)	GM1 binding
24	4.7 mg	> 10 ug	2.6EU	normal
25	4.9 mg	> 10 ug	1.5EU	normal
26	9.5 mg	> 10 ug	2.2EU	normal

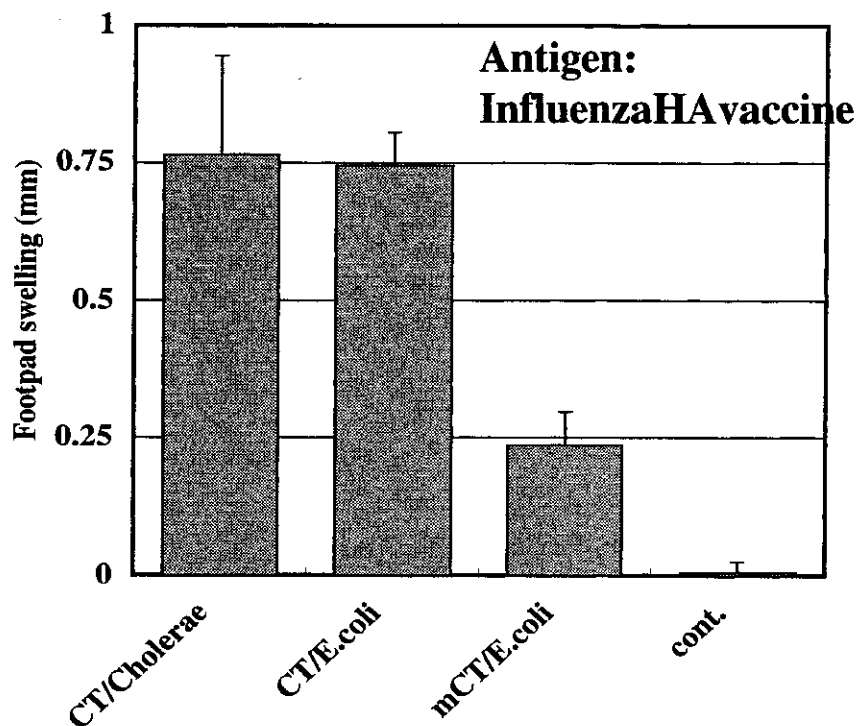


図 1. DTH reaction in mice. Group of BALB/c mice were immunized intranasally both CT derivatives and influenza HA vaccine. And six days later, the vaccine was injected into the footpad and the DTH reaction was measured by the footpad swelling.

研究成果の刊行に関する一覧

刊行物一覧

1. 発表論文

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 α 2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3⁺ CD4⁺CD45⁺ 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 **Tamura, 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 $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺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 α 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⁺CD45RB⁺ 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 $\alpha^{-/-}$ mice: A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4⁺ $\beta\beta$ 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⁺T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 170: 1754-1762, 2003.

20020600

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.27-P.29の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。