

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 血液・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 大学院医学研究科 枋久保邦夫
- (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

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用いて、消化器感染症と呼吸器感染症の防御を目的とした新しい粘膜ワクチンの開発に向けての研究を行った。rCTB のアジュバント活性の作用機構や IFN- β の粘膜アジュバント活性に関しても研究を進めた。

1. 研究目的

多くの感染症は微生物が粘膜表面に付着し、定着あるいは侵入することによって始まるため、それらを阻止することが非常に重要である。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。新しい粘膜ワクチンの開発に向けての試みとして、腸管出血性大腸菌、インフルエンザ、肺炎球菌に対するワクチン等の開発、そして、それらの抗体産生能や粘膜アジュバントの作用機構に関しての研究を進めた。また、IFN- β にキトサンを加えることにより、投与剤形を変えたサイトカインの粘膜アジュバント活性についても検討した。更に、次年度報告予定で、現在進行中のサルの実験に用いるワクチン抗原の作製及びそれらの品質管理試験も行った。

2. 研究方法

I. rCTB をアジュバントとして用いた研究

1) rCTB 標品

鷓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。

2) 志賀毒素 1 の B サブユニット組換え体 (rStx1B) 抗原の調整

腸管出血性大腸菌 (EHEC) が産生する rStx1B を比較的多量に産生するプレビス菌-ベクター系を開発し、その培養上清から rStx1B を精製して抗原とした。また、EHEC の死菌菌体も抗原と

して使用した。すなわち、本菌を Luria-Bertani (LB) ブイヨンにて 37℃一昼夜培養後遠心して集菌、PBS により数回の遠心洗浄、0.37%ホルマリンにて室温で2時間続いて氷水中で5日間処理、PBS により数回の遠心洗浄、最終的に PBS に浮遊して死菌菌体液とした。ホルマリン処理菌体が増殖しないことを、LB ブイヨンでの培養により確認した。

3) 肺炎球菌莢膜多糖体と rCTB の架橋調整

23 種類の多糖体型を含む市販の肺炎球菌ワクチン (PW、萬有) を用いた。

rCTB に adipic dihydrazide (AH) と 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDC)を加えて 4℃時間反応後、P6DG カラムで脱塩して、スパーサー導入 rCTB を得た。肺炎球菌莢膜多糖体の活性化には 1-cyano-4-dimethylaminopyridium tetrafluoroborate (CDAP) を使用した。活性化多糖体とスパーサー導入 rCTB を混合し、4℃一晩作用させて両者を架橋した。HPLC によるゲル濾過で架橋されたと判断し、目的の画分に架橋産物のあることを SDS-PAGE とウエスタンブロット法により確認した。

4) 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、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。

5) 免疫スケジュールとサンプルの採取

全て7週齢の雌BALB/cマウスを使用した。(1) rStx1Bの経鼻投与-rStx1B 10 μ g \pm rCTB 10 μ g を計4回経鼻投与した。(2) EHEC の経口及び経鼻投与-経口投与では、約 3 \times 10⁹ 個死菌 \pm rCTB 50 μ g を 0.2 M NaHCO₃-PBS に混ぜて全量を 500 μ l とし、経鼻投与では、3 \times 10⁶ 個死菌 \pm rCTB 10 μ g を PBS に混ぜて全量を 30 μ l にして、それぞれ計4回免疫した。(3)PW の経鼻投与-PW 11.5 μ g \pm rCTB 10 μ g を計4回経鼻投与した。(4)インフルエンザワクチンの経鼻投与-A/NC/20/99 ワクチン 0.2 μ g(HA として)+B/JB/5/99 ワクチン 0.2 μ g(HA として) \pm rCTB 10 μ g を計4回経鼻免疫した。(1)、(3)、(4)については最終免疫日から7日目に、実験(2)については最終免疫日から14日目にマウスを解剖し、血液、糞便、鼻腔・肺・小腸・大腸・膣の各洗浄液及び唾液を採取した。

6) ELISA 抗体価の測定

rStx1B 抗原については、Gb3-cholesterol-phosphatidylcholine 混合液を ELISA プレートにコートした後、rStx1B を結合させたものを、*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- β -ガラクトシダーゼを用いて、間接 ELISA を行った。

7) 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価の算出及び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。

8) rCTBのアジュバント活性の作用機構

a. マウス腹腔マクロファージに対するrCTBの影響

BALB/c系マウス(雌、7週齢)腹腔マクロファージ(M ϕ)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- β 、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 β について市販のELISAキットを用いて調べた。また、rCTBで刺激したM ϕ について、トータルRNAを抽出し、RT-PCR法によりIL-1 β 、MyD88、TLR2及びTLR4のmRNA発現について、 β -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- γ 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. サル実験用のワクチン抗原作製及びそれらの品質の検討

1) ジフテリアトキソイド(DT)及び破傷風トキソイド(TT)

(1) 高純度DT及びTTの調整法

ジフテリア菌 Park-Williams No. 8 株を37°C約2日間培養した。培養遠心濾過上清を限外濾過膜で濃縮し、ジフテリア毒素は塩析法で粗精製後、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。この精製ジフテリア毒素をアミノ酸存在下でホルマリンにより無毒化し、調整した。また、破傷風菌 Harvard A-47 株を37°C約7日間培養し、培養濾過上清を限外濾過膜で濃縮し、破傷風毒素は塩析法で粗精製後、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。この精製破傷風毒素をアミノ酸存在下でホルマリンにより無毒化した。

(2) 化学試験及び動物試験

DT及びTTの純度は、蛋白窒素1mg当りのLf価として示した。蛋白窒素はケルダール法で、Lf価は試験管内沈降反応法で測定した。エンドトキシンの定量は、エンドスピー(生化学工業、日本)で測定した。標準品として *E.coli* 0111:B4 (Westphal) を用いた。発熱試験は、日本の生物学的製剤基準・一般試験法の発熱試験法に準じて実施した。また、DT及びTTの力価試験を行い、その有効性を評価した。

2) 組換えB型肝炎ウイルス表面抗原(組換えHBs抗原)

(1) 高純度HBs抗原の調整法

遺伝子組換えHBs産生酵母菌をブイヨンに培地で培養した。培養菌体を集菌・洗浄後、機械的に破碎させた。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組換えHBs抗原を調整した。この精製HBs抗原をホルマリン処理した。

(2) 化学試験

組換え HBs 抗原の純度は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析によった。常法に従い、試料 20 μ L を東ソー製 TSKgel G3000SW(7.5mmID \times 60cm)カラムにかけ、検出波長 280nm で分析した。

3) ワクチン抗原の純度試験 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [SDS-PAGE])

(1) ジフテリア及び破傷風トキソイド

常法に従い、1%SDS 下で熱処理した試料を岩城硝子製 8-16%グラジェント・ポリアクリルアミドスラブゲル (TF-01-045) に 1 列当り 10 μ L 乗せ、20mA を約 1.5 時間通電した。分子量の指標としてアマシャム・ファルマシア製 HMW マーカーキット (17-0445-01) を置いた。泳動終了後、常法に従いゲルの銀染色を行った。

(2) 組換え HBs 抗原

常法に従い、1%SDS 及び 1%2-メルカプトエタノール存在下で熱変性させた試料をトキソイドの場合と同じゲル (TF-01-045) に 1 列当り 10 μ L 乗せ、30mA を約 1 時間通電した。分子量の指標としてはアマシャム・ファルマシア製 LMW マーカーキット (17-0446-01) を用い、泳動終了後コマジープリリアントブルー-R-250 でゲルを染色した。

III. サイトカインの粘膜アジュバント作用の検討

1) ワクチン抗原としての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。純度は 2,989 Lf/mg PN である。

2) マウス IFN- β

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。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。

3) サンプルの投与及び抗体価測定

DT (5Lf/マウス) をワクチン抗原として、各濃度のマウス IFN- β (0、1,000、30,000 IU/マウス) を含有する水溶液及びキトサン (和光純薬) の 1%溶液を調整し、BALB/c 系マウス (雌、7 週齢) 1 群 5 匹に 30 μ l ずつ同時経鼻投与し、その後、追加免疫を 14、21、28 日目に行い、初回免疫後 5 週目に採血し、ELISA 法により血清抗体価 (IgG、IgA) を測定した。更に、下記の方法でジフテリア抗毒素価を測定した。

4) ジフテリア抗毒素価測定

マウス血清中のジフテリア抗毒素価は、宮村らによる Vero 細胞を用いた培養細胞法により、各群 5 匹よりなるマウスプール血清の値を測定した。標準ジフテリア抗毒素 Lot.10、End point : 0.0038 IU/ml、実測値 : 17CD₅₀/25 μ l、Vero 細胞添加量 : 1.5 \times 10⁴細胞/well で実施した。

3. 研究成果

I-(1) rStx1B の精製

EHEC 堺株由来の Stx1B 遺伝子を pNU212 に組み込み *Bacillus brevis* HPD 31-OK 株に導入、T2M ブイヨンにて 30℃一昼夜振盪しながら前培養した。その一部を大量の改良 5YC ブイヨンに接種し、30℃、3~4 日間振盪培養後、培養液を遠心して上清画分を得た。その上清を PBS で平衡化した globotriose ゲルアフィニティカラムにかけて、PBS で洗浄した。続いて、1 M NaCl で非特異的吸着物を除去した後、4 M MgCl₂ を添加した。デンカ生研製 VTEC RPLA による凝集反応と SDS-PAGE により Stx1B の溶出部位を調べたところ、素通り画分後半と 4 M MgCl₂ 添加後に溶出されてくることがわかった。夾雑物の少ない両溶出画分を集めて濃縮し透析後、ゲル濾過にかけて Stx1B を精製した。SPD-PAGE により約 8 kDa の位置に単一のバンドとして検出されること、市販の抗 Stx1 抗体と反応すること、プロテインシーケンサーにかけて調べた N 末端アミノ酸配列が報告されている Stx1B のそれと一致すること、Stx1 の結合部位である Gb3 に結合することなどから、精製された蛋白質が Stx1B であることが確認された。

I-(2) rStx1B + rCTB の経鼻投与

抗 rStx1B 血清 IgG 抗体は rCTB の有無に関わらず上昇し、ELISA 抗体価は両者ともに希釈倍数 1:10,000 前後で同程度であった。この抗体価は、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、B 型肝炎ワクチンの抗体価に比べてかなり低かった。rStx1B 特異的血清 IgA 抗体及び各粘膜部位での IgA 抗体はほとんど検出されなかった。

I-(3) 肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン (PW) + rCTB の経鼻投与

rCTB の有無に関わらず、血清中の抗 PW IgM 抗体価は初回免疫で最高値に達し、2 回目以後の免疫でブースター効果は観察されなかった。また、抗 IgG 及び抗 IgA 抗体価は抗 IgM 抗体価に比べてかなり低い値を示したに過ぎなかった。抗 PW 粘膜 IgA 抗体は調べた全ての粘膜部位で検出されなかった。

I-(4) 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。

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。A 型、B 型ともに HA 量を 1/5 (0.2 μg) に減量して経鼻投与したところ、A 型及び B 型の HA に対する血清中の特異的 IgG 抗体価は、投与量 1 μg の場合と異なり、rCTB の有無に関係なく同程度に高い値を示した。抗 HA 血清 IgA 抗体価は相対的に IgG 抗体価よりも低い値を示し、A 型では rCTB の存在に関係なく同程度の抗体価、B 型では rCTB 存在下の方が高い抗体価を示した。各粘膜における抗 HA 粘膜 IgA 抗体価については、現在測定中である。血清の HI 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、B/JB/5/99 の HA による赤血球凝集を有意に阻止し、高い HI 価を示した。

I-(5) rCTB のアジュバント活性の作用機構

a. マウス腹腔マクロファージに対する rCTB の影響

M ϕ の LPS 刺激により細胞内 IL-1 β 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 ϕ について、LPS によって発現した IL-1 β 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 β 産生及び CpG モチーフを含んだ DNA による IL-6 産生を rCTB は増強した。M ϕ において、MyD88、TLR2 の mRNA 発現は、未刺激ではほとんど認められなかったが、rCTB 刺激により、3 時間後からは MyD88、1 時間後から 6 時間後までは TLR2 の mRNA について、発現が増強することがわかった。一方、TLR4 については、rCTB 刺激の有無に関わらず一定の発現があり、その影響が認められなかった。

b. BCG ワクチンを経鼻投与した場合の rCTB の影響

BCG を 10⁷CFU (マウス、モルモット) 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 10⁶CFU (マウス) 及び 10⁵CFU (モルモット) を投与した場合は、rCTB の同時経鼻投与により明確な増強が認められた。BCG10⁵CFU (モルモット) を rCTB と共に投与し、その後 2、3、4 週目に、更に、rCTB のみを 3 回投与した場合は、BCG と rCTB の一回同時経鼻投与に比べて細胞性免疫反応の増強が認められ、値のばらつきも減少した。

II. 試作ワクチン抗原の性状

1) DT 及び TT

純度は、どれも約 3,000Lf/mgPN と極めて高く、どちらも日本の生物学的製剤基準の試験項目の全てに適合した。エンドトキシン含量は、DT が 8.0 pg/mL で、TT も 1.8 pg/mL と極めて低く、どちらも家兎発熱試験にも適合した。

両トキシドをワクチン濃度に配合して SDS-PAGE を行った結果、ジフテリア毒素は単一バンドに、破傷風抗毒素も 2 本のバンドに分れ、何れのワクチン抗原も不純物を殆ど認めず、高純度であることが確認された。

また、それぞれの力価試験を行ったところ、ジフテリア (91.3 IU/mL) 及び破傷風 (333.8 IU/mL) の何れにおいても基準値以上の十分な成績であった。

2) 組換え HBs 抗原

組換え HBs 抗原を還元下で SDS-PAGE と HPLC にかけて純度分析を行った結果、どちらも単一バンドと単一のピークを認め、極めて高純度であることが確認された。

III. キトサンを添加した IFN- β のアジュバント作用

IFN- β の濃度に依存して DT に対する血清 IgG 及び IgA 抗体価が上昇した。また、DT に対する抗毒素価では、キトサン添加群で、ヒトにおいて防御効果があるといわれる 0.1 IU/ml 以上 (1.38 ~ 2.76) の十分な値を示し、IFN- β と 1%キトサンを併用することにより、それぞれの単独投与よりも有意に高い抗毒素価を得られることがわかった。また、IFN- β の用量を増やすに伴い、キトサン添加群においては抗毒素価の上昇が認められた。

4. 考察

rStx1B+rCTB の経鼻免疫に関しては、今後、rStx1B の投与量、投与回数、投与方法 (経口投与) 等詳細に検討する必要がある。今回、粘膜 IgA 抗体が全く検出されなかった理由の一つとして、Gb3 をコートしたサンドイッチ法 ELISA を行った為に、試料を集める際に使われた粘膜洗浄中の Tween 20 が、Gb3 をプレートから解離した可能性を否定することができない。rStx1B を直接 ELISA プレートにコートして再検討する必要がある。

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 抗体価及び鼻腔と肺の粘膜 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。HI 価は rCTB 存在下で有意あるいはかなり高い値が得られた。感染防御を確実にするためには、rCTB の同時投与が必要と考える。

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。そのシグナル伝達の重要なコンポーネントである MyD88 の発現増強がサイトカイン産生増強に関与している可能性がある。

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。また、rCTB 単独で頻回追加投与が有効であることがわかり、免疫条件がほぼ確立した。

今回、サルの実験用に作製した DT 及び TT 並びに組換え HBs 抗原は、日本の生物学的製剤基準及びその他の試験項目に全て適合し、高純度・高品質であるといえる。

サイトカインの粘膜アジュバントの研究において、IFN- β 単独では、経鼻投与による抗毒素価上昇は得られなかったが、キトサンを併用することで、それぞれ単独で用いた場合の相加的な値よりはるかに高い抗毒素価の上昇が認められた。このことは、キトサンにもアジュバント作用があることが知られているので、両者のアジュバント作用メカニズムの間に何らかの相乗的作用があったと考えられる。あるいは、キトサン添加により鼻粘膜滞留性が増し、サイトカインの作用が持続することにより、IFN- β が初めて十分なアジュバント作用を発揮することが出来たという可能性がある。今後、それぞれの用量を含めた剤形のさらなる検討と共にアジュバント作用機構の解明が必要と考えられる。

5. まとめ

- 1: 腸管出血性大腸菌及び肺炎球菌の感染を予防するための粘膜ワクチンは、投与量、投与形態、投与回数、投与経路等に関して、一層の検討を要する。
- 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: シグナル伝達の重要なコンポーネントである MyD88 の発現増強がサイトカイン産生増強に関与しているらしい。
- 4: 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。また、rCTB 単独追加投与はさらに増強を強めた。
- 5: サルの実験用に製造したワクチン抗原は、生物学的製剤基準及びその他の試験項目に全て適合し、高純度・高品質の製剤である。
- 6: IFN- β は 1%キトサン溶液と共に経鼻投与することにより、高いジフテリア抗毒素の産生を誘導できることがわかった。

6. 研究発表

- 1) Maeyama,J., Isaka,M., Yasuda,Y., Matano,K., Taniguchi,T., Morokuma,K., Ohkuma,K., Tochikubo,K. & Goto,N. Effects of recombinant cholera toxin B subunit on IL-1 β production by macrophages in vitro. *Microbiol. Immunol.*, 46, (9) 593-599(2002).
- 2) Isaka,M., Yasuda,Y., Taniguchi,T., Kozuka,S., Matano,K., Maeyama,J., Morokuma,K., Ohkuma,K., Goto,N. & Tochikubo,K. Mucosal and systemic antibody responses against an acellular pertussis vaccine in mice after intranasal co-administration with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine*, 21, 1165-1173(2003)
- 3) Yasuda,Y., Isaka,M., Taniguchi,T., Zhao,Y., Matano,K., Matsui,H., Morokuma,K., Maeyama,J., Ohkuma,K., Goto,N. and Tochikubo,K. Frequent nasal administrations of recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) - containing tetanus and diphtheria toxoid vaccines induced antigen-specific serum and mucosal immune responses in the presence of anti-rCTB antibodies. *Vaccine* (*in press*)

7. 知的所有権の取得状況

なし