

- causes Chronic enterocolitis in myeloid cell-specific STAT3-deficient mice. *J.Clin.Invest.* 111:1297-1308.
40. Tamagawa, H., Takahashi, I., Furuse, M., Yoshitake-Kitano, Y., Tsukita, S., Itoh, T., Matsuda, H. and **Kiyono, H.** 2003. Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches: Preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. *Lab. Invest.* 83: 1045-1053.
41. Jan, M-H., Kweon, M-N., Hiroi, T. Yamamoto, M., Takahashi, I. And **Kiyono, H.** 2003. Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells. *Vaccine* 21: 1613-1619.
42. Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** 2003. Eosinophilic gastroenteritis: a problem of the mucosal immune system? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 79-85.
43. Park, E.J., Takahashi, I., Ikeda, J., Kawahara, K., Okamoto, T., Kweon, M-N, Fukuyama, S., Groh, V., Spies, T., Obata, Y., Miyazaki, J. and **Kiyono, H.** 2003. Clonal expansion of double-positive (DP) IELs by MICA expressed in mouse small intestinal epithelium. *J. Immunol.* 171:4131-4139.
- II. 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

Reciprocal Log₂ gp120-Specific IgG and IgAAb Titers

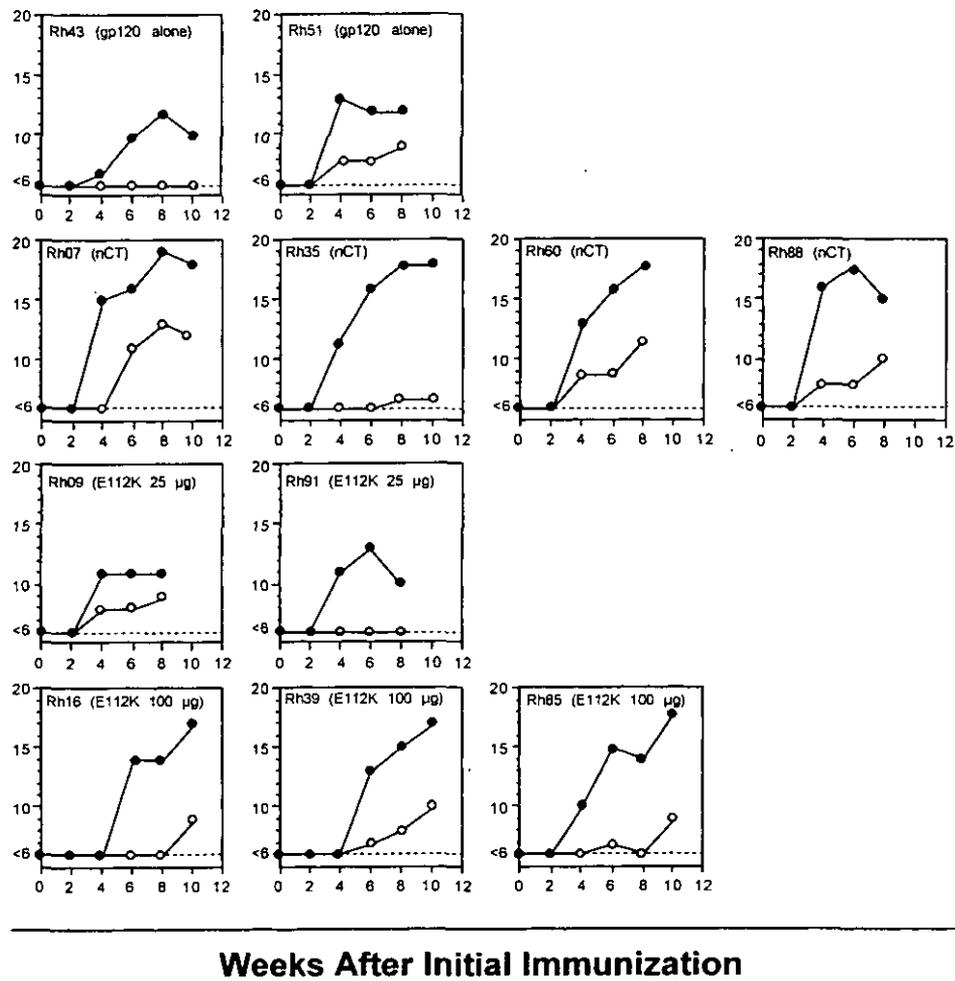


図1 mCT E112K の経鼻アジュバントとしての有効性の検討・サルにワクチン抗原と mCT E112K (100ug) を混合液として経鼻免疫すると抗原特異的抗体が誘導された。

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、精製物は mCT と同様の 1A5B 構造を有し、低毒性で、アジュバント活性を持っていた。

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、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 分子について検討した結果、粘膜アジュバントとしての活性を有しており、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。chimera 発現プラスミド

(pNCM02 chimera) を構築し (図 1)、このプラスミドが導入された *B. brevis* 形質転換株について chimera 蛋白質安定生産株の選抜を行った。安定化された chimera 蛋白質生産株を元に working cell を作製し、3L jar レベルでの chimera 蛋白質の生産、精製の検討を行った。

C. 研究結果 : 前年度の報告で得られた chimera 蛋白質安定生産株 *B. brevis* (pNCM02-chimera) の working cell を元に、以降の試験に用いた。2SLN 培地 2L を用いて 3L jar で回転数を変えて (1vvm, 32°C, 68 hr, ①320 rpm, ②270 rpm, ③240 rpm, ④200 rpm, ⑤160 rpm, ⑥120 rpm)、培養上清中の 1A5B 構造を持つ chimera 蛋白質の生産量を D-gal column assay 法 (1 ml immobilized D-galactose gel による回収量) により定量した。その結果、④200 rpm の培養条件時で chimera 蛋白質が大量に回収さ

れ菌の生育にも影響は認められなかった (図 2)。本条件下で得た培養液を元に精製を検討した。精製のスキームは図 3 に示した。その結果、培養液 2L 当たり 19mg の高い純度の chimera 蛋白質 (濃度 0.52 mg/mL、エンドトキシン濃度 25EU/mL) の製造に成功した (図 4)。

D. 考察: *B. brevis* の宿主-ベクター系を用いた chimera 分子 (mCTA/LTB) は、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便に他の夾雑蛋白質がなく精製できることが分かった。しかしながら、事業化を目指すためには生産量は比較的多いが、正しい構造体の存在比が低い

(D-gal column に結合する分子比率が圧倒的に低かった) ことが分かり、更なる培養条件の検討を行った。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ことが確認されていた為、3L jar で回転数を変えて immobilized D-galactose gel による 1A5B 構造の本分子の回収量を指標に検討したところ、回転数 200 rpm での条件で正しい構造体の生産量、回収量共に最も高い値であった。① 320rpm では生産量が少なく②280rpm、③ 240rpm、④200 rpm と生産量が増加した。また、⑤160 rpm、⑥120 rpm では菌の生育が悪かった。これらの事から、3L jar 培養での条件は④200 rpm と決定した。この培養条件よ

り得たサンプルを元に精製を検討したところ、培養液 2L 当たり 19mg の chimera 蛋白質 (濃度 0.52 mg/mL、エンドトキシン濃度 25EU/mL) の製造に成功した。本系での製造は再現性良く実施できた。今後の問題点としては、精製の最終工程でエンドトキシンを除去する為に UF100K 膜を使用しているが、回収率が約 50%に低下している。UF100K 膜をさらに検討することで、より高回収率のプロセスが完成できると考えている。

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 (培養、精製) を行う為に chimera 分子の安定生産菌株を用いて 3L jar 培養の検討を行った。その結果、最適な培養条件下 (1vvm, 32°C, 68 hr, 200 rpm) で培養液 2L 当たり 19mg の chimera 蛋白質 (濃度 0.52 mg/mL、エンドトキシン濃度 25EU/mL) を得る事に成功した。

(その他)

抗体作成用として LTB のみの分泌ベクターを設計し、3L ジャースケールから精製を行い、400mg の LTB タンパク質を代表研究者に送付した。

G. 研究発表: 特になし。

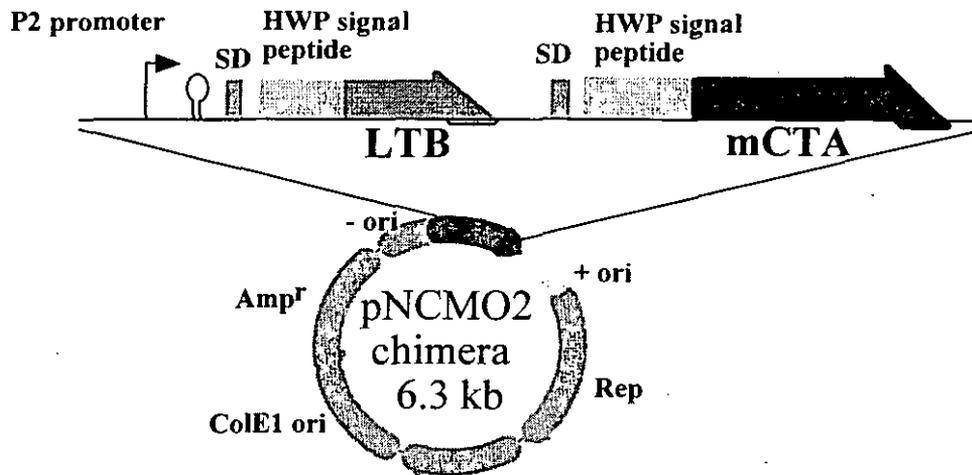


図1. pNCMO2-chimera プラスミドの構築

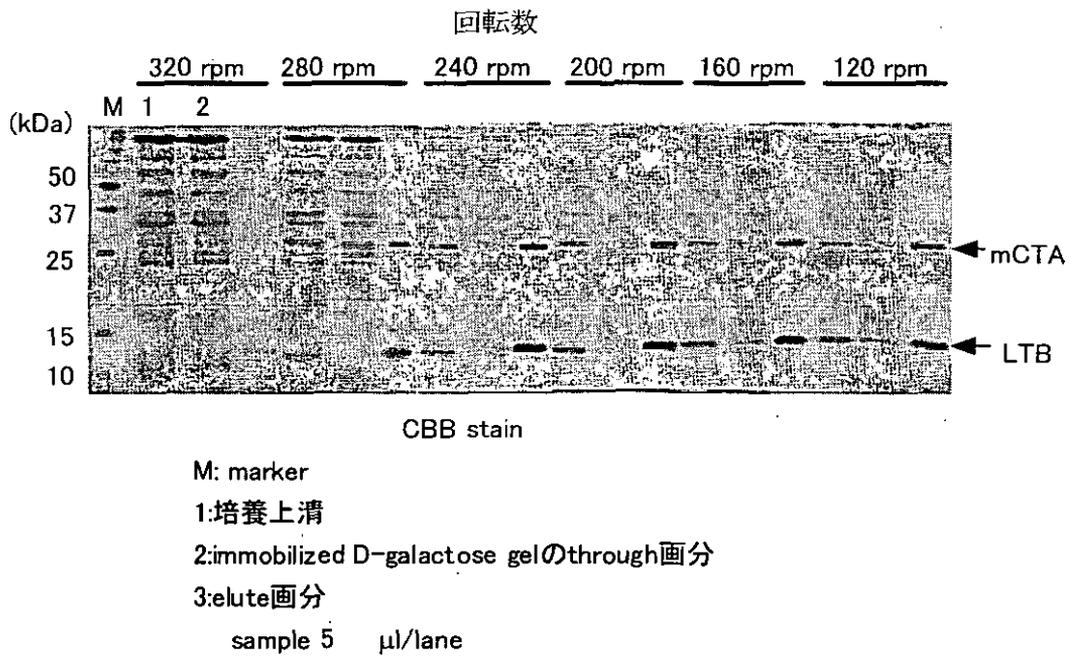


図2.回転数を変えた3L jar 培養における chimera 蛋白質の生産 (immobilized D-galactose gel による回収)

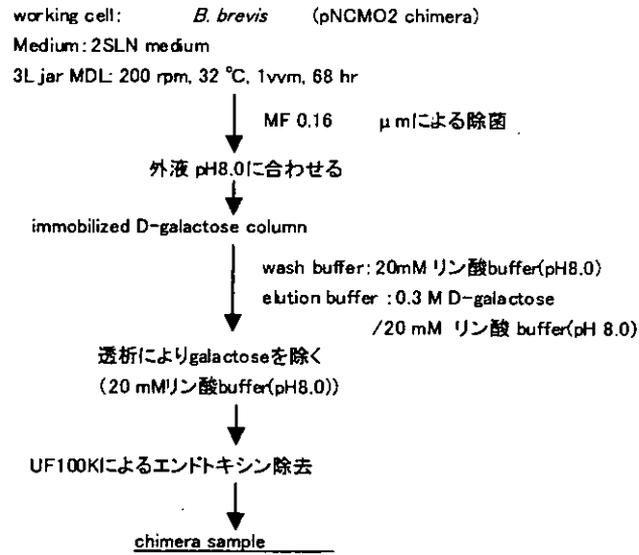


図 3. chimera 分子の精製スキーム

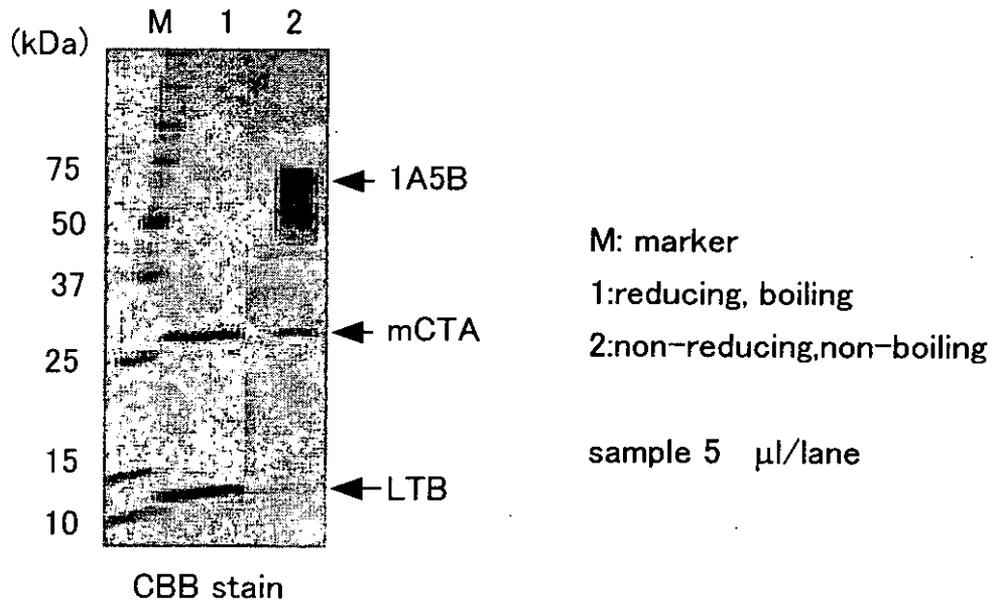


図 4. 精製 chimera 分子の SDS-PAGE

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、mCTA 遺伝子を基に 5 種類の欠損変異 mCTA 遺伝子を作製した。それらの発現タンパクは封入体に蓄積されたため、種々の条件を検討して可溶状態での精製を試みたが、結果的に動物実験に使用できる量を蓄積するのは不可能であった。また nCT と mCT の各サブユニットのアジュバント活性を OVA 抗原を用いマウス経鼻投与により比較したところ、nCT および nCTA が高いアジュバント活性を示し、mCT、mCTA、CTB のアジュバント活性は低かった。一方 TT を抗原とした同様の実験では nCTA は CTB と同程度のアジュバント活性しか示さなかった。今後は nCTA の経鼻ワクチンにおけるアジュバント活性に注目し、その抗原選択性や有効な投与条件などを明らかにする必要がある。

A. 研究目的： コレラ毒素 (CT) が強い粘膜アジュバント活性を有することはよく知られているが、そのメカニズムは不明である。CTB のみでは弱いアジュバント活性がホロ毒素の微量の混入により飛躍的に上昇することや、1 アミノ酸置換により毒性を減弱させた変異 CT でもアジュバント活性を有することから、本研究では CTA の構造的特徴がアジュバント活性を担うという仮説に基づき、CT 分子のアジュバント活性を担う部位の同定を試み、さらに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否かを検討し、安全かつ安価な粘膜アジュバント開発に向けた基礎的データをを得ることを目的とする。

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 CT の構造解析 (Zhang ら、J. Mol. Biol. 251:563-573 および Cong ら、Eur. J. Immunol. 26:2587-2594) を参考に mCTA を 5 領域に分割し、それぞれを欠損する変異 mCTA 分子を作製した (平成 13 年度報告)。IPTG 誘導によって発現させ、封入体から種々の精製方法により中性下、可溶状態での精製を検討した。

同じく pET28 ベクターに野生型 CT (nCT) および mCT のホロ毒素および各サブユニットの構造遺伝子を組み込み、発現、精製した。これを卵白アルブミン (OVA) とともにマウスに経鼻投与し、OVA に対する血清 IgG、鼻洗浄液 IgA および糞便 IgA を測定することにより各サブユニットの粘膜アジュ

バント活性を比較した。さらにトキシノイド化破傷風毒素 (TT) を抗原として nCT、nCTA、CTB をアジュバントとして経鼻投与し、血清、だ液および鼻洗浄液中の抗 TT 抗体を測定し、アジュバント活性を比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験は当研究所の動物取扱規程に準拠して行われ、倫理的に特段の問題はないと考える。

C. 結果： 5 種類の欠損 mCTA を不溶性画分から精製すべく種々の条件を検討し、L-Arginine (550 mM) を添加した特定のバッファーで巻き戻しを行えば全発現タンパク質の 30% 程度が可溶性画分で回収できた。しかしこのようにして蓄積したサンプルも、保存中や凍結・融解、あるいは濃縮によって再度凝集・沈殿し、結局動物実験に用いる量および濃度を実現することは不可能であると判断した。

nCT および mCT のホロ毒素およびサブユニットの OVA に対するアジュバント活性を経鼻投与で比較したところ、図 1 に示すように血清 IgG、鼻洗浄液 IgA とともに nCT と nCTA が高いアジュバント活性を示した。糞便 IgA はいずれも検出限界以下であった (データは示さない)。一方、TT を抗原とした実験では、nCT のみが高いアジュバント活性を示し、nCTA と CTB のアジュバント活性は低かった (図 2)。

D. 考察： 平成 14 年度報告書で示したように、

欠損変異 mCTA は天然に無い人工タンパク質であるため、構造的に非常に不安定と考えられる。極めて希薄な状態であればある程度可溶状態で存在できるが、それではその後のカラム操作が困難であり、また希薄過ぎて動物実験に用いることができない。また昨年報告した通り、封入体を形成させない条件の検討もすべて無駄であった。残念ながらこの方法は断念せざるを得ないと結論した。

CTA のアジュバント活性部位をスクリーニングする戦略として、前述のように CTA を構造的に5つの領域に分割した。その後の進め方には2通り考えられた。すなわち、1)各領域のみのポリペプチドを調整するか、2)各領域を欠損させるか、である。前者は欠損する部分があまにも大きいのでアジュバント活性が全く見えなくなる可能性が高いと考え、本研究の進め方として後者を選択した。今後、CTA の構造特徴がアジュバント活性を惹起するという結果が得られれば、改めて1)の方向性で進め方を考え直す必要がある。

一方、nCT および mCT のホロ毒素および各サブユニットのアジュバント活性は、OVA 抗原を用いた場合、nCT および nCTA のみが高い活性を示した。mCT、mCTA、CTB は OVA 単独群よりは血清 IgG は若干上昇していたが、鼻洗浄液 IgA は検出限界以下であった。この結果は、Campos ら (J. Oral. Sci. 45: 25-31, 2003) の報告と一致しており、ADP-ribosyltransferase 活性がアジュバント活性と強く相関していることを示唆する。CTA と黄色ブドウ球菌 protein A の抗体結合領域 (D) の融合タンパク CTA-DD もアジュバント効果を発揮することが知られており、Agren ら (J. Immunol. 162:2432-2440, 1999) はそれが CTA の持つ ADP-ribosyltransferase 活性と、D 領域の持つ Ig 結合能に依存することを報告している。したがって nCTA を免疫細胞に効率良く認識させることによりアジュバント活性が発揮されると考えられる。nCT では CTB と細胞表面糖脂質 GM1 の親和性がこれを担っており、また本実験では、OVA がキャリアタンパクとして nCTA の免疫細胞への供給を促進した可能性が考えられる。これにより TT を抗原とした時に nCTA のアジュバント活性が低かったことも説明可能である。

CT を経鼻投与すると、嗅覚細胞から嗅覚神経を通じて CT が中枢神経系 CNS へ供給され神経障害をまねく可能性が指摘されている (Fujihashi ら、Vaccine 20:2431-2438, 2002)。これは嗅覚細胞・嗅覚神経を含む神経系細胞表面に多く発現してい

る GM1 と CTB が強い親和性によって結合することにより引き起こされる。したがって、nCTA のみでアジュバント活性があるという本研究の結果は、経鼻投与のワクチンを考えた時に、CNS への影響を無視できるという重大な意味がある。今後は、nCTA のアジュバント活性発揮のメカニズムを、樹状細胞などの免疫細胞を標的に解明し、nCTA アジュバントの実用化の方向性を検討したい。

E. 結論: CT のアジュバント活性部位を特定する目的で作製した mCTA の一連の欠損変異タンパクは、あらゆる条件を検討したが結局中性可溶状態で動物実験に使用可能な濃度・量を得ることは不可能であった。

一方 OVA マウス経鼻投与の系では nCT と nCTA が高いアジュバント活性を示し、mCT、mCTA および CTB の活性は低-中等度であった。しかし nCTA のアジュバント活性は抗原を TT にすると認められなかった。今後 nCTA のアジュバント活性発揮の条件を詳細に検討し、経鼻ワクチンのアジュバントとしての実用化をめざしたい。

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) Sato T, Shimizu T, Watarai M, Kobayashi M, Kano S, Hamabata T, Takeda Y, Yamasaki S. Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2-converting phages. *Gene* 309: 35-48, 2003.
- 2) Shimizu T, Hamabata T, Yoshiki A, Hori T, Ito S, Takeda Y, Hayashi H. An association of 27- and 40-kDa molecules with glycolipids that bind A-B bacterial enterotoxins to cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1612: 186-194, 2003.
- 3) Sato T, Shimizu T, Watarai M, Kobayashi M, Kano S, Hamabata T, Takeda Y, Yamasaki S. Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages. *J. Bacteriol.* 185: 3966-3971, 2003.
- 4) Shimizu K, Asahara T, Nomoto K, Tanaka R,

Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. Development of a lethal Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infection mouse model using multiple mitomycin C treatment. *Microb. Pathogen.* 35: 1-9, 2003.

2. 学会発表

- 1) Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. A new mouse model for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on mitomycin C treatment in the late log phase. 第37回日米医学協力委員会 コレラ・細菌性腸管感染症部会 日米合同会議、2002年12月、宜野湾。
- 2) 朝原 崇、清水健介、野本康二、田中隆一郎、濱端 崇、小沢綾子、竹田美文：腸管出血性大腸菌（STEC）0157:H7 マウス腸管感染モデルにおけるピフィズス菌の感染防御効果。第76回日本細菌学会総会、2003年4月、熊本。

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

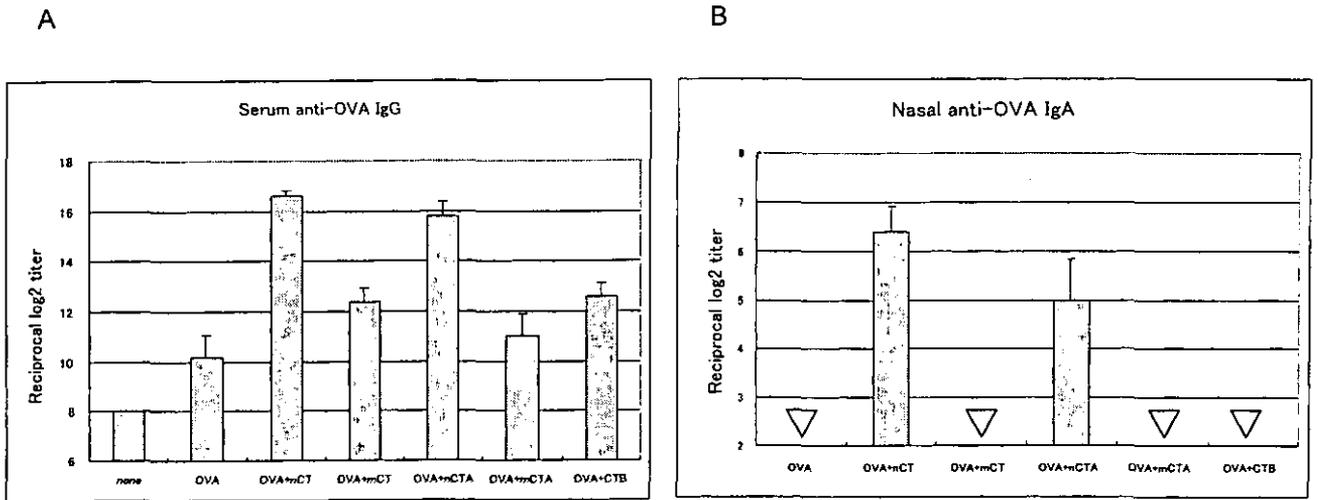


図1. OVA マウス経鼻投与における nCT および mCT ホロ毒素および各サブユニットのアジュバント効果
 C57BL/6 雌6週齢マウス(各群5匹)に OVA 100 μ g + 各 CT 分子 20 μ g (nCT のみ 2 μ g) を1週間ごと3回経鼻投与し、4週目に血清および鼻洗浄液を採取し、OVA 特異的血清 IgG (A) および鼻洗浄液 IgA (B) を測定した。▽ は検出限界以下。

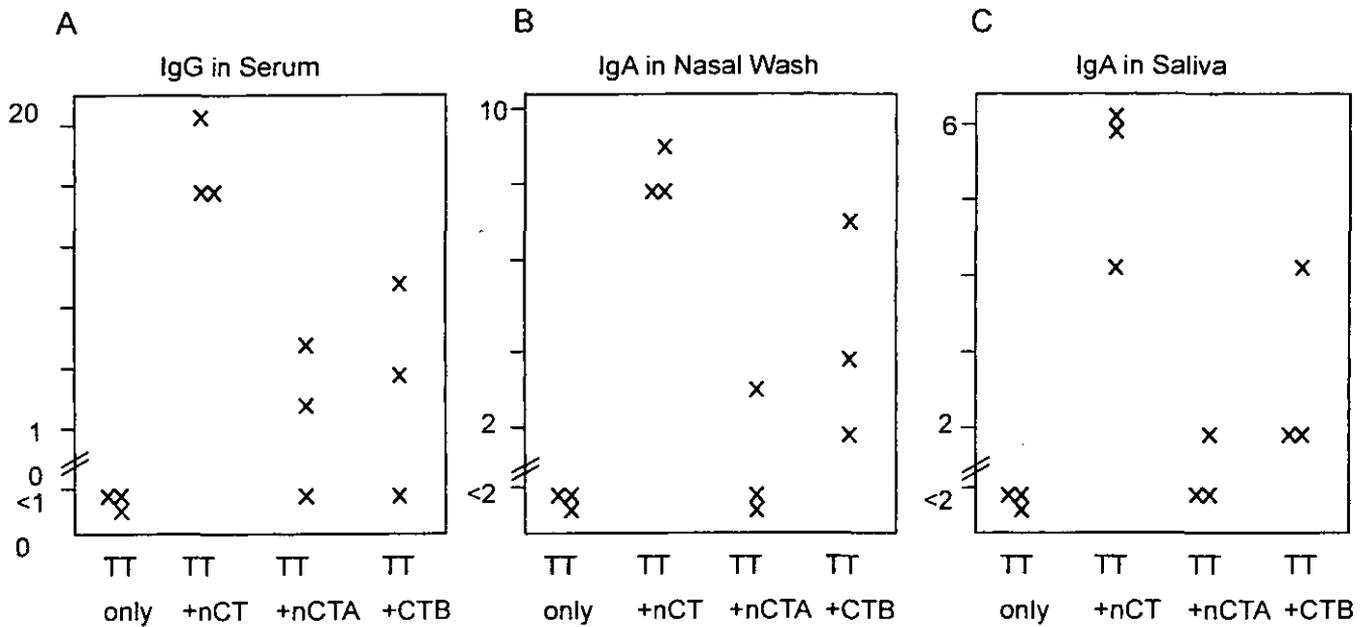


図2. TT マウス経鼻投与における nCT ホロ毒素およびサブユニットのアジュバント効果
 C57BL/6 雌6週齢マウス(各群3匹)に TT 5 μ g + nCT 0.5 μ g, +nCTA あるいは +nCTB 5 μ g を1週間ごと3回経鼻投与し、4週目に血清、鼻洗浄液およびだ液を採取し、TT 特異的血清 IgG (A)、鼻洗浄液 IgA (B) およびだ液 IgA (C) を測定した。縦軸は reciprocal log₂ titer。

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

気道の異なる部位における IgA および IgG 抗体の分布と濃度
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 致死量のウイルス感染に対する完全な感染阻止が成立するアジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンの最小有効量免疫条件で、気道の様々な部位（鼻腔、気管、気管支及び気管細支の粘膜及び肺胞）における特異 IgA および IgG 抗体の分布と濃度を検討した。その結果 IgA は上気道におけるインフルエンザの阻止に IgG はウイルス性肺炎の発症の阻止に主要な役割を果たしていることが示された。

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 抗体が変異ウイルスの流行に対する交差感染防御をする重要な因子であること、また、下気道の IgG 抗体がウイルス性肺炎の発症阻止に重要な因子であることが示唆されている。本研究では、ウイルス感染を完全阻止できるワクチンの最小有効量免疫条件で、マウスの気道の様々な部位（鼻腔、気管、気管支及び気管細支の粘膜及び肺胞）におけるウイルスのヘマグルチニン(HA)に対する IgA および IgG 抗体の分布と濃度を検討した。

B. 研究方法：鼻腔、咽頭、気管、気管支及び気管細支の粘膜、及び肺胞の表面積とその粘液および漿液の体積の測定；BALB/c マウスの鼻腔領域及び気管肺組織をホルマリン固定し、パラフィンに胞埋後、連続切片（4 μm）を作製した。その連続切片の組織像を染色し、100 μm 間隔で写真撮影（適当な倍率で）した。その写真上で、各部位の切片毎に粘膜あるいは肺胞上皮の周囲長を計測し、連続切片間の厚さを掛けて気道部位の全体分を積算し、それぞれの表面積を算定した。また、粘膜部位の粘液の体積はその液層の厚さを 0.01mm と仮定し、また、肺胞上の漿液の体積はその液層の厚さを 0.0001mm と仮定して各表面性を基に算定された。

ワクチン：マウスに馴化したウイルス、A/PR8(H1N1)由来の HA ワクチンを用いた。

免疫：1 群 5 匹のマウスに、麻酔条件下で、CTB*併用 HA ワクチン(各 0.1 μg)を左右鼻孔から 1 μl ずつ点鼻投与し、4 週間後ワクチンのみ(0.1 μg)を同様に点鼻追加免疫した。

感染：マウスに麻酔条件下で、A/PR8 ウイルス(104 EID50)を片方の鼻孔から 20 μl (致死量)点鼻投与した。

抗体およびウイルス価測定材料：血清；麻酔条件下のワクチン免疫マウスの心臓から全採血し、

その血清を材料とした。

気管肺洗浄液；全採血後、気管肺を分離し、気管経由で 0.1%BSA を含む 2ml の PBS を 3 回出し入れすることにより気管肺洗浄液を調整した。

気管洗浄液；分離した気管肺より気管を分離し、その内腔を 0.1%BSA を含む 0.2ml の PBS で 3 回洗浄することによって気管洗浄液を得た。

鼻洗浄液；全採血後のマウスの鼻腔を 0.1%BSA を含む 1ml の PBS で 3 回洗浄することによって鼻洗浄液を得た。

抗体応答；ELISA 法により測定した。

ウイルス価；MDCK 細胞を用いたブラック法により測定した。

(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：気道各部位の表面積と粘液及び漿液の体積

鼻腔、気管、気管支及び気管細支の粘膜の表面積がそれぞれ 299mm²、20mm²、及び 260mm²であり、また、それぞれの粘膜上の粘液の体積は、3.0mm³、0.2mm³及び 2.6mm³であった。また、肺胞の表面積はおよそ 220,000mm²で、それを覆う漿液の体積は 22mm³であった。

最小有効量のワクチンを経鼻免疫したマウスにおける感染防御

CTB*(0.1 μg)併用不活化ワクチン(0.1 μg)を初回経鼻投与し 4 週後にワクチン(0.1 μg)のみを追加免疫した BALB/c マウスにおいて上気道でも下気道でも完全な感染阻止が実現し、どちらか一方の免疫やワクチンのみでの 2 回免疫では完全な感染阻止は成立しなかった。また、この 2 回免疫群でのみ主に上気道に IgA 抗体が、下気道に IgG 抗体が誘導され、相関して完全な感染阻止が成立した。

CTB*併用ワクチン免疫マウスの気道の各部位の IgA および IgG 抗体の分布と濃度

感染阻止が成立しているマウスにおける鼻腔、気管肺、および気管洗浄液さらに血清の抗 IgA および IgG 抗体量 (ng/mouse) の実測値をもとに、気道の残りの部位の抗体量が推定された。これらを基に、IgA の 74% が上気道に、IgG の 91% が肺泡領域に分布していることが算定された。また、気道の各部位の IgA および IgG 抗体濃度 ($\mu\text{g/ml}$) が粘液及び漿液の体積 ($\text{mm}^3 = \mu\text{l}$) から変換された。粘液中の IgA 濃度が漿液や血清のそれに比して明らかに高く IgA が積極的に分泌されていること、逆に、IgG 濃度は肺胞上の漿液中では血清と同等に高く粘膜領域では濃度勾配によって浸みだしているために低いことが示唆された。

D. 考察：マウスの気道の各部位の表面積や体積はヒトのそれと相関しており、マウスの気道の各部位の IgA や IgG 抗体の分布や濃度もヒトのものと相関している可能性が示唆され、また、それらの役割の重要性も示唆された。

E. 結論：IgA 抗体は上気道におけるインフルエンザの阻止に、IgG 抗体はウイルス性肺炎の発症の阻止に主要な役割を果たしている。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito R, Ozaki Y, Yoshikawa T, Hasegawa H, Sato Y, Suzuki Y, Inoue R, Morishima t, Kondo N, Sata T, Kurata T and Tamura S-I. Roles of anti-hemagglutinin IgA and IgG antibodies in different sites of the respiratory tract of vaccinated mice in preventing lethal influenza pneumonia. *Vaccine* 21; 2362-2371, 2003

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

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 (mCT) を大腸菌で大量に調製する事は困難であった。LT 遺伝子のシグナル配列を持つ mCT (CT112K) 遺伝子を作製し、大腸菌で発現させたところ従来の約数百から千倍の mCT の回収が可能であった。昨年度はこのプラスミドを用いたジャー培養を行い、そのスケールでも mCT の量産が可能であり、DTH 法による検討では native CT よりもやや弱いながらもアジュバンド活性を保持していることを示した。本年度はジャー培養で得られた mCT を、破傷風トキソイドを抗原としてマウスに経鼻免疫を行い、粘膜ワクチンのアジュバンドとしての活性を再検討した。その結果、経鼻免疫においても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有用である事が示された。また一方、他の mCT (CT61F) の大量発現を同様のシステムを使って試みたが mCT61F の大量発現は成功せず、mCT の種類により発現量が大きく影響を受けることが確認された。

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。しかし蛋白質発現のために広く利用されている大腸菌での mCT の発現量はごく少量で、粘膜ワクチンの実用化はもちろん基礎研究を遂行する上でも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 を大腸菌で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) mCT112K のジャー培養；一昨年度構築した *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

(Fig. 1a) を形質転換した大腸菌 DH10B を、1.7L 培養ジャー (BMS-03PI；バイオット) を用いて培養し、遠心にて菌体を回収後、破碎し菌体内の mCT を回収した。CT の精製は D-Galactose Immobilized Column (PIERCE) を用いて行った (Fig. 1b)。

2) mCT の性状の解析 a) GM1 ELISA；GM1-ganglioside (Sigma) を 96 well プレートにコーティングし、サンプル、抗 CTA マウス IgG、アルカリホスファターゼ 標識抗マウス IgG ヤギ血清で反応後、基質液を反応させ吸光度を測定した。b) CT 活性；Y-1 細胞 assay ならびにウサギによる PF 法を用いて測定した。c) Western blotting；SDS-PAGE 後、Nylon membrane に蛋白を転写し、抗 CTA マウス IgG 抗体で反応後、アルカリホスファターゼ 標識抗マウス IgG ヤギ血清で反応させた後、アルカリホスファターゼ基質を反応させた。

3) アジュバンド活性；a) DTH 試験；精製した mCT112K、0.1ug をインフルエンザ HA 抗原 (A/Beijing)、0.1ug とともにマウスに経鼻投与し、一週間後、再度この抗原 5ug を後足蹠皮内に接種し、24 時間後の足の腫脹を計測した。b) 経鼻免疫；破傷風トキソイド (TT)、1LF (2.8ug) を mCT、5ug 又は CT、0.5ug とともに 2 週間間隔で

2回、マウスに経鼻接種し、4週間後に鼻腔洗浄液を回収して鼻腔洗浄液中の抗破傷風 IgA を ELISA 法で測定した。

- 4) mCT61F 大量産生系プラスミドの作製ならびに発現；CT112K 産生プラスミド、pTrcLT02 より特異的プライマーを用いた SOE-PCR 法で変異を導入し、LT シグナル配列を持つ mCT61F 産生プラスミドを構築し、pTrcLT10 とした。このプラスミドを大腸菌、DH10B に導入しコルベンをを用いた 200mL 培養での mCT61F の産生能を検討した。

(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) ジャー培養で得られた mCT (mCT112K) の性状；ジャー培養での精製 mCT の回収量は 5-10 mg/L であり、GMI 結合能、Western blotting 等の結果は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、Y-1 細胞を用いた mCT の CT 活性の測定では native CT の $1 < 10^{-6}$ であった。
- 2) アジュバンド活性；コレラ菌由来 CT を陽性対照とし、ジャー培養による精製 mCT のアジュバンド活性を DTH と経鼻免疫で確認した。DTH 法では前回と同様、陽性対照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。また TT を抗原とした経鼻接種では免疫後の鼻腔洗浄液中に抗破傷風 IgA が有意に誘導されていた (Fig. 2.)。一方、抗 CT 抗体も誘導されていた。
- 3) pTrcLT10 による mCT61F の発現；200mL 培養によって mCT112K と同様の条件で mCT61F の発現を試みたが大量発現は成功しなかった。

D. 考察：大腸菌での CT の大量調製は困難であったが CT 遺伝子の持つシグナル配列を 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報告してきた。一方、蛋白はその培養条件によって性状や活性が変異する事が知られている。そこでより大量培養系でアジュバンド活性を保持する mCT が回収出来るかを検討する必要がある。昨年、ならびに本年の結果からジャー培養においても、確立した mCT 発現系が発現量、アジュバンド活性の面で有用である事が確認された。これによってより大規模な発現系による mCT 回収の可能性が示された。又一方、本発現系を用いた mCT61F の大量発現は不首尾に終わった。CT 蛋白の変異の部位、あるいはその変異による蛋白の性状や構造の違いによって、発現が制限される可能性が示された。mCT61F は mCT112K と比較して蛋白質として不安定な傾向があり、こういった性状が発現量に影響したと考えられる。機能的な面だけでなく、構造面でも工業的な使用に耐えうる蛋白を構築する事は重要であり、mCT112K はその意味でも優れた粘膜アジュバンド候補であると考えられた。

E. 結論：pTrcLT02 プラスミドを保持した大腸菌は培養液量を増大させても活性を保持する mCT (CT112K) の量産が出来、より大規模な培養でも活性のある蛋白が回収出来る可能性が示された。また一方、この系でも大量に産生されない mCT (mCT61F) が確認され、活性面だけでなく構造面でも優れた mCT を探求する事は重要だと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表：特になし
2. 学会発表：特になし

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

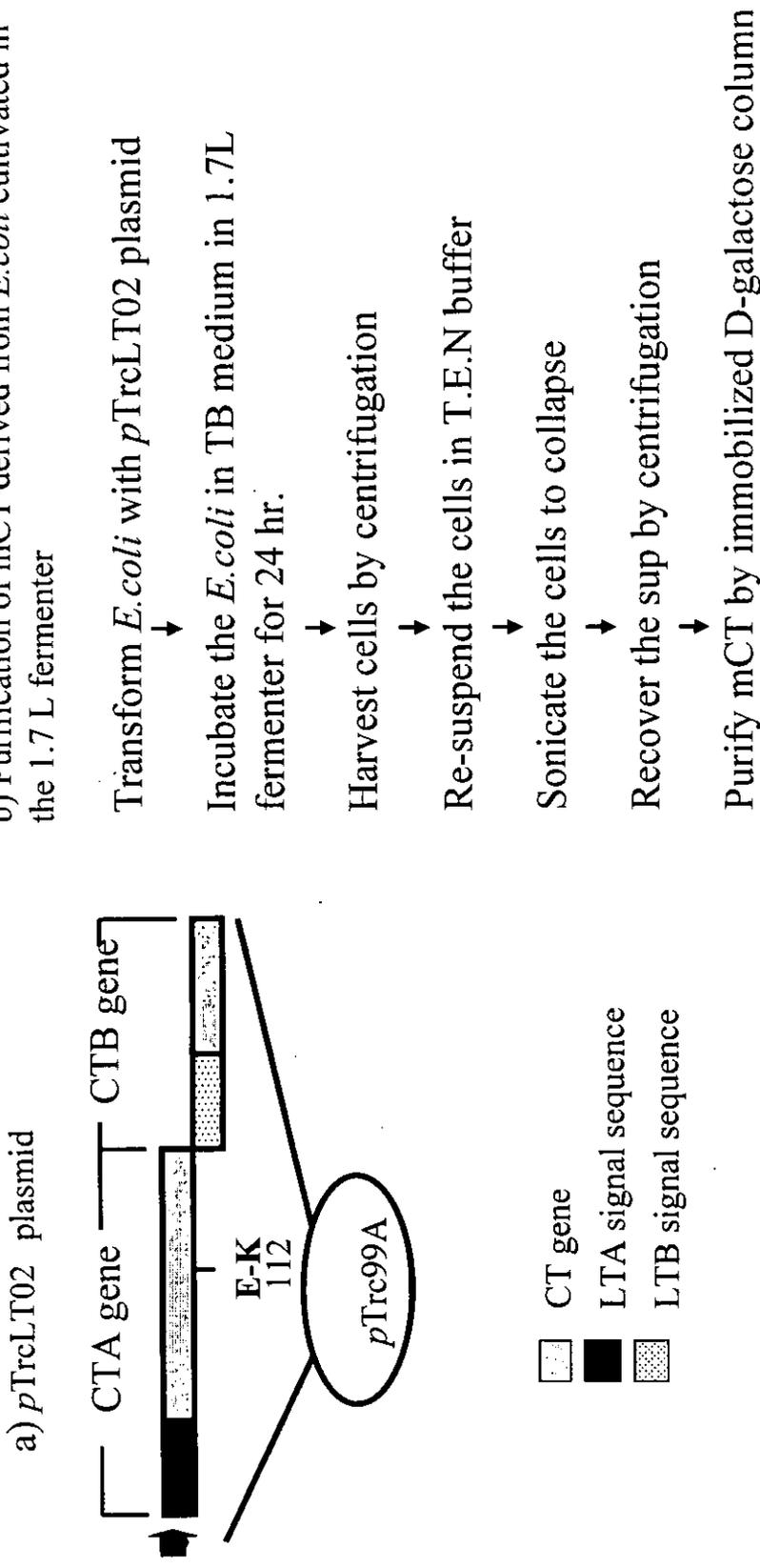


Fig.1. Preparation of mCT derived from *E. coli* having pTrcLT02 by 1.7L Bio-fermenter.

a) Structure of pTrcLT02 plasmid which produces mCT.

b) Procedure for purification of mCT derived from *E. coli* cultivated in the 1.7 L Bio-fermenter.

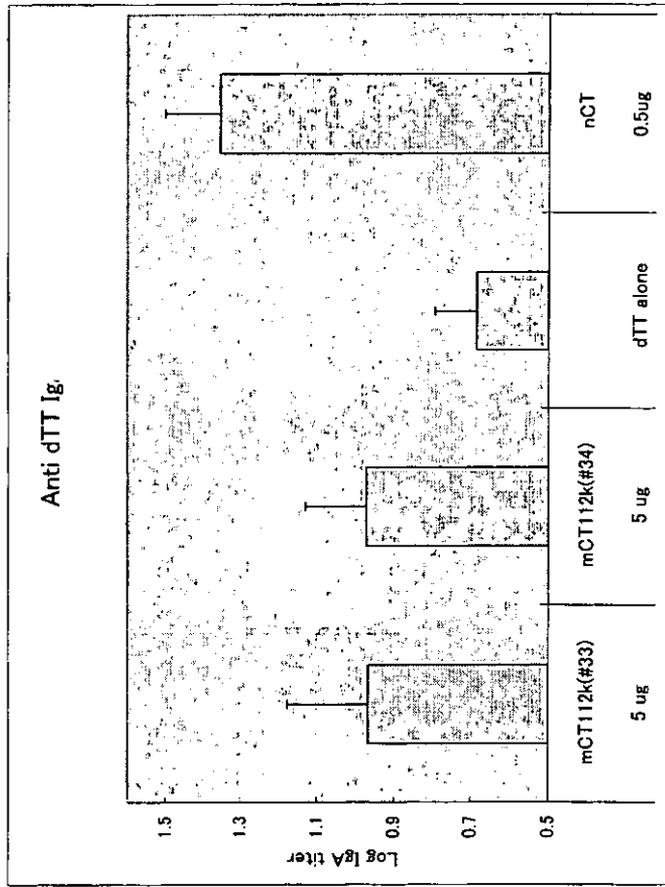


Fig.2. TT (Tetanus toxoid)- specific IgA responses in nasal wash of mice immunized with TT together with mCT or CT as adjuvant

研究成果の刊行に関する一覧

- ① 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: 82-826.
- ② Byun, Y., Ohmura, M., Fujihashi, 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.
3. 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.
- ④ 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.
- ⑤ 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.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
8. Hagiwara, Y., Iwasaki, T., Asanuma, H., Sato, Y., Sata, T., Aizawa, C., Kurata, T., and Tamura, S-I. 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. 2001. *Vaccine* 19: 1652-1660.
9. 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.
10. Kunisawa, J., Nakanishi, T., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Nagagawa, 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.
 11. 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. U.S.A.* **98**: 3310-3315.
 12. 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.
 13. Yura, M., Takahashi, I., Terawaki, S., Hiroi, T., Kweon, M-N, Yuki, Y. and Kiyono, H. 2001. Nasal administration of cholera toxin (CT) suppresses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Vaccine* **12**: 134-139.
 14. 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**: 2781-2790.
 15. Sakaue, G., Shimaoka, M., Fukuoka, T., Hiroi, T., Inoue, T., Sakaguchi, T., Sawa, Y., Morishita, T., Kiyono, H. and Mashimo, T. 2001. NF-kB "decoy" suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Neuroreport* **12**: 2079-2084.
 16. Simizu, M., Minakuchi, K., Tsuda, 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.
 17. Hiroi, T., Goto, H., Someya, K., Yanagita, M., Honda, M., Yamanaka, N. and Kiyono, H. 2001. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3F1 induces a long-term V3J1-peptide-specific neutralizing immunity in Th1 and Th2 deficient conditions. *J. Immunol.* **167**:5862-5867.
 18. Imaoka, H., Shimaoka, M., Matsuura, N., Nishimura, M., Ohta, N. and Kiyono, H. 2001. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophag activation, and TGF- β 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Aneth Analg.* **92**: 428-436
 19. Ohta, N., Shimaoka, M., Imanaka, H., Nishimura, M., Tanaka, N. and Kiyono, H. 2001. Steroid attenuates

- ventilator-induced lung injury. *Crit. Care Med.* 29: 1012-1016.
- ② 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. 2002. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor-knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. 2002. *J. Immunol.* 168: 2930-2938.
- ② Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W. van Ginkel, Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., McGhee, J.R., and Kiyono, H. 2002. 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.
- 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. 2002. NALT organogenesis is independent of the IL-7R, L α 1b2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3⁺CD4⁺CD45⁺ cells. *Immunity* 17:31-40.
23. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and Kiyono, H. 2002. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J.Immunol.* 170: 495-502.
- ② 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. 2002. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* 20: 3443-3455.
25. Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S., and Takeda, Y. 2001. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 infection in infant rabbits. *Infect. Immun.* 69: 1101-1108.
26. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., Kiyono, H., Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. 2002. 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.
27. Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S.,