

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	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	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

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

研究要旨 rCTB 添加インフルエンザ、肺炎球菌多糖体、腸管出血性大腸菌各ワクチンに関して抗体産生能を中心に検討した。rCTB の作用機構の研究により、細胞性免疫も増強することが明確となった。安全性に関しては高次動物であるサルを用いて評価し、安全性が確認できた。また、サイトカインの有用性も検討した。

分担研究者

- (1) 名古屋市立大学大学院医学研究科 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

A. 研究目的

我々は宿主-ベクター系 *Bacillus brevis* HPD31 (pNU212-CTB) 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 (破傷風トキソイド:TT、ジフテリアトキソイド:DT、B 型肝炎ワクチン:HBs、百日咳ワクチン:P) 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。更に、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、インフルエンザそして肺炎球菌に対する粘膜ワクチン等の開発、そして、それらの抗体産生能、感染防御効果、高次の動物であるサルを用いての安全性の検討や粘膜アジュバントの作用機構に関する研究を進めた。また、サイトカインの粘膜アジュバントとしての有用性等についても検討した。

B. 研究方法

I. rCTB を用いた粘膜ワクチンの抗体産生

1) インフルエンザ HA ワクチン (化学及血清療法研究所製造)

インフルエンザ A 型 HA ワクチン[A/ニューカレドニア (NC) /20/99(H1N1)由来、A 型 HA]1.0 μ g と rCTB10 μ g を BALB/c マウス (7

週齢、雌) に、0、14、21、28 日目の計 4 回経鼻免疫した。最終免疫後 9 日目に赤血球凝集阻止 (HI) 抗体価および中和 (NT) 抗体価測定用に血液を採取、14 日目にマウス馴化ウイルスを経鼻して 14 日間、体重の増減と生死を観察した。

マウス馴化ウイルスは、ワクチン株に遺伝学的に近い A/Aichi/88/02(H1N1) 株をマウスに経鼻投与→肺をすりつぶして均一化→遠心上清を次のマウスに経鼻接種、これを 5 代繰り返して得た。

デンカ生研製インフルエンザ HI 試薬により HI 抗体価を、常法にしたがって NT 抗体価をそれぞれ七面鳥赤血球を使って測定した。

2) 肺炎球菌多糖体ワクチン (萬有)

a) adipic dihydrazide と 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide によりスパーサーを導入した rCTB と、1-cyano-4-dimethylamino-pyridium tetrafluoroborate により活性化した肺炎球菌 3 型多糖体 (PS) を混合して架橋し、ゲル濾過により精製して PS-rCTB 結合ワクチンを得た。

PS-rCTB 結合ワクチン 0.5 または 5 μ g を、rCTB10 μ g 存在下と非存在下で、BALB/c マウス (7 週齢、雌) に 0、14、21、28 日目の計 4 回経鼻免疫した。35 日目に血清と肺洗浄液を採取し、ELISA 抗体価を測定した。

b) コートソーム (空のリポソーム、日本油脂製) に PS 液、rCTB 液または PS+rCTB 液をそれぞれ混ぜて攪拌して、PS 0.5 μ g/rCTB10 μ g/30

μl リポソーム (PS/rCTB/lipo) または PS 0.5 $\mu\text{g}/30\mu\text{l}$ リポソーム (PS/lipo) \pm rCTB10 $\mu\text{g}/30\mu\text{l}$ リポソーム (rCTB/lipo) を作製した。免疫方法は a) に準じた。

3) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) ワクチン (試作) について

a) BALB/c マウスにホルマリン不活化菌体ワクチン $3\times 10^6\text{CFU}\pm\text{rCTB}10\mu\text{g}$ を経鼻接種、 $3\times 10^9\text{CFU}\pm\text{rCTB}50\mu\text{g}$ を経口接種した。免疫は 2) に準じて行われ、42 日目にサンプルを採取した。

b) *Bacillus brevis* (pNU212-Stx1B or Stx2B) 系により rStx1B と rStx2B を作製し、rStx1B は Gb3 結合能を利用したグロボトリオースゲルにより、rStx2B はイオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過を繰り返すことにより精製した。rStx1B または rStx2B $10\mu\text{g}\pm\text{rCTB}10\mu\text{g}$ を上記免疫スケジュールにしたがって経鼻接種し、35 日目サンプル採取した。

4) ELISA 抗体価の測定について

2) では肺炎球菌多糖体を、3) の a) ではホルマリン処理 EHEC 死菌を、b) では rStx1B と rStx2B をそれぞれ抗原とした。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。

5) 血清および粘膜 IgA の精製

DT で免疫したマウスの血清および肺洗浄液を透析、IgA 用 KAPTIV-AE ゲルに吸着、酢酸で溶出、もとの液量にしてタンパク定量を行った後、抗毒素価を測定した。

II. rCTB のアジュバント活性の作用機構

1) BCG ワクチンを経鼻投与した場合の rCTB の影響

BCG 10^6CFU を投与用量 $100\mu\text{l}$ で単独または rCTB と共に Hartley 系モルモット (雌、約 300g) に経鼻投与し、その後 2、3、4、週目に

rCTB 単独で追加投与し、6 週目の精製ツベルクリン (PPD : 0.05、0.1、0.2 μg) に対する遅延型アレルギー反応 (DTH) を皮膚反応により調べた。また、同様の方法で、PPD 単独、rCTB 単独および PPD+rCTB についても調べた。

2) rCTB の *in vitro* での免疫細胞に対する作用

BALB/c マウス (7 週齢、雌) より鼻咽頭粘膜関連リンパ組織 (NALT) および粘膜組織由来のリンパ球を採取し、細胞数 5×10^5 個に対して、LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、rCTB (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下または非存在下で培養した。24 時間培養後に上清中の IL-1 β と TNF- α を定量した。

III. カニクイザルを用いての研究

前年度に報告した方法により、化学及血清療法研究所が製造した DT(50Lf)、TT(50Lf)、HBs(50 μg) をカニクイザル (5 歳齢、雄 3 頭、雌 3 頭) に rCTB 存在下または非存在下で、0、2、3、4、5、6 週目計 6 回にわたり経鼻投与した。各週に血清、唾液、糞尿を採取し、8 週目に解剖し、血清及び各粘膜よりのサンプルを採取し、抗体価及び抗毒素価そして、免疫したサルの扁桃細胞をワクチン抗原で刺激した時のサイトカイン産生の様相を調べた。更に、8 週目の剖検時に、以下の臓器を採材し、病理組織学的所見を観察した。検索対象臓器は：大脳、小脳、脳幹、脊髄、視神経、鼻腔を含む上顎、扁桃、咽喉頭、三叉神経節、下顎・腋下・鼠径・腸間膜・骨盤腔各リンパ節、胸腺、心、肺、肝、脾、腎、副腎、唾液腺、甲状腺、膵、胃、小腸、大腸、精巣(卵巣)等である。

IV. サイトカインの粘膜アジュバント作用の検討

1) 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。

2) 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。

3) マウスへの免疫方法とスケジュール

ジフテリアトキソイド (DT : 5Lf/マウス) とマウス IFN- β (0, 1,000, 30,000 IU/マウス) または MCP-1 (0, 0.01, 0.1 μ g/マウス) を水溶液およびキトサン溶液 (キトサン 0.05-1%) として調整し、BALB/c マウス (雌、4 週齢) に同時経鼻投与した。初回免疫後、2、3、4 週目に同様の条件で追加免疫を行った。5 週目に採血し、6 週目に脾臓細胞を採取した。

4) マウス血清中・糞便中ジフテリア抗体価および血清抗毒素価の測定

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。条件として、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 で実施された。抗体価は ELISA 法にて測定した。

5) サイトカインの定量

6 週目に脾臓細胞を採取し、細胞数 10⁷ 個に対して DT10 μ g を添加して培養した。培養 1 および 5 日後のそれぞれの上清に産生された種々のサイトカインを ELISA キットを用いて定量した。

6) 抗原特異的脾臓細胞増殖反応

採取したマウス脾臓細胞 (2 \times 10⁵/well) を DT10 μ g/ml 存在下で 5 日間培養し、最終 18 時間での [³H]チミジンの取り込み量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は実験動物 (マウス、モルモット、サル等を使用) を用いて行う部分が含まれる。国立感染症研究所 (感染研) 動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、審査許可を受けた後、感染研動物実験に関する実験指針に従い実験を実施した。経鼻粘膜ワクチンの開発に関する研究は、現在、世界中で進行中であり、研究方法は実験動物の鼻腔粘膜にワクチンと粘膜免疫誘導アジュバントを投与して行う以外にはない。動物に苦痛を与えないために、投与は軽麻酔下で行う。また、投与検体は刺激もなく、連続投与しても苦痛を与えないものとする。また、

感染(発症)防御能をみる試験法は生物学的製剤基準の当該製剤力価試験法に基づいて行った。それに関する動物試験以外の試験法は世界中で未だなく、他の方法では評価も得られないのが現状である。副反応を知るために病理組織学的所見を観察するが、現在では鼻粘膜の人工構築組織モデルはなく、代替法は残念ながらない。培養細胞に対する試験は既に終了させた。すべての動物実験は麻酔下で行い、採材時には適当な方法で安楽殺に導き、動物福祉の上で充分配慮して、苦痛を与えないようにして実験を遂行している。特にサルを用いての実験は感染研動物実験委員会にサル類使用実験計画書の提出・審査、更に、ヒヤリングを受け、サルを使用する正当性および動物福祉の観点から厳しい審査を受けた。

C. 研究結果

I. rCTB を用いた粘膜ワクチンの抗体産生

1) インフルエンザ HA ワクチン

非免疫マウスは 6 日目までに全て死亡し、4 日目まで生き残ったマウスの平均体重は 27%減少していた。A 型 HA のみで免疫されたマウスは 4 日目までに 3 匹死亡し、生き残った 5 匹の体重の回復に大きなバラツキが見られた。それに対して、A 型 HA+rCTB で免疫されたマウスは 8 匹全てが生き残り、平均体重の減少は 10%前後に過ぎなかった。最終免疫後 9 日目の HI 抗体価と NT 抗体価は rCTB 存在下で有意に高い値を示した。以上の結果より、インフルエンザ発症防御の観点から、A 型 HA の経鼻接種では粘膜アジュバントである rCTB の同時投与が必須であることが明らかになった。

2) 肺炎球菌ワクチン

PS-rCTB \pm rCTB ワクチン:PS の量に関係なく、PS 特異的血清 IgG 抗体価は 1024~2048 倍、IgA 抗体価は 256~512 倍、IgM 抗体価は 4096~8192 倍までに上昇した。しかし、rCTB を同時接種してもその効果はほとんど見られなかった。それに対して、気管支肺胞洗浄液中の PS 特異的粘膜 IgA 抗体価は、PS 量 0.5 と 5 μ g の両者において rCTB 添加時に有意に上昇した。

PS/rCTB/lipo または PS/lipo \pm rCTB/lipo :

予備実験を行った結果、両者ともに抗PS血清IgG抗体を誘導した。

3) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) ワクチン

不活化全菌体ワクチン:経鼻、経口投与とともにrCTBの有無に関わらず、血清抗菌体IgG、IgAの産生が誘導され、rCTB存在下で高い抗体価が得られた。特に経鼻投与では経口投与に比べて1/1000の菌量で十分に高い抗体価が得られたことから、「全菌体ワクチンの経鼻投与法」の有効性が示唆された。粘膜IgA抗体の誘導はrCTB存在下での経鼻投与マウスの一部の肺で観察されたが、腸管では見られなかった。

rStx1B または rStx2B±rCTB ワクチン:血清抗rStx1B IgG、IgAの産生が見られた。すなわち、血中に入った毒素を中和して溶血性尿毒症症候群や脳症の予防に働く可能性が示唆された。しかし、抗体価は比較的低く、rCTBによる増強効果は見られなかった。粘膜IgA抗体もほとんど検出されなかった。

rStx1Bの粘膜アジュバント活性:DT 5Lf±rStx1B10μgを経鼻投与した結果、rStx1B存在下でのみ高い抗DT IgG抗体価、KPA抗体価の誘導が見られ、rStx1Bにアジュバント活性のあることがわかった。

4) IgAのジフテリア抗毒素価

13.0、1.63、3.26 CCM IU/mlという抗毒素価を示した抗血清から精製したIgAの抗毒素価は、それぞれ0.102、0.005、0.026 CCM IU/mlであり、肺洗浄液から精製した粘膜IgAの抗毒素価は0.102、0.026、0.026 CCM IU/mlであった。以上の結果は、IgAも発症防御に重要な役割をえんじている可能性があることを示唆している。

II. rCTBのアジュバント活性の作用機構

1) rCTBをアジュバントとして用いた場合のモルモットにおけるBCG経鼻投与の条件を確立した。すなわち、投与液量を変え、前年度と同様にrCTB+BCG初回免疫後、rCTB単独で頻回投与することにより、皮下接種と同程度のPPDによるDTHが得られ、rCTB単独で細胞性免疫を増強することが分かった。また、rCTB単独、PPD

単独またはrCTB+PPDで経鼻投与し、その後にrCTB単独で頻回投与を行った場合、PPDおよびrCTBによるDTHは認められなかった。DTHを示すためには、BCG投与が必要であることがわかった。また、大量のrCTBを皮下投与した場合においても、rCTBはDTHを起こさなかった。

2) rCTBの*in vitro*での免疫細胞に対する作用について、これまでの研究ではマクロファージを用いて検討してきたが、経鼻免疫ということを考え、今年度はNALTおよび鼻粘膜の単核球を用いた。これらの細胞を*in vitro*でLPS刺激した時、rCTB同時投与によってIL-1βとTNF-αの産生が増強した。

III. カニクイザルを用いての研究

TTでは血清抗毒素価において、HBsでは血清、唾液中の凝集価において、rCTB存在下で高い値が得られた。一方、DTにおいては、供給された全てのサルが高いジフテリア抗毒素価をもち、このため、DTに対する抗毒素価の様相について明確な結果が得られなかったが、鼻腔、肺、膺洗浄液に関しては、rCTB存在下で高い抗毒素価が得られた。DT・TT・HBsで免疫したサルの扁桃細胞をワクチン抗原で刺激した時のサイトカイン産生を調べたところ、rCTB添加群ではIFNγの産生は認められず、非添加群で産生が認められた。また、高い抗体価を示した個体では細胞増殖も顕著であった。

安全面では、rCTB添加群3頭のうち1頭の投与部位の鼻腔内嗅上皮(多列線毛上皮)に好酸球浸潤が認められた。しかし血清IgE抗体の上昇は見られなかった。頻回投与にもかかわらず、他の特記すべき所見はいずれの臓器においても認められなかった。

IV. サイトカインの粘膜アジュバント作用の検討

1) キトサンを投与剤形に加えた場合、ヒトにおいて発症防御効果があるといわれる0.1 IU/ml以上の十分なDTに対する抗毒素価を示し、IFN-βにより有意に高い抗毒素価が得られることがわかった。また、IFN-βの用量に依存して抗毒素価の上昇が認められた。

サイトカインアジュバントとして MCP-1 を用いた場合、IFN- β と同様に、キトサンの添加により投与剤形を変えることにより、有意に高いアジュバント効果が認められた。MCP-1 0.01 μ g/マウスと 0.1 μ g/マウス両投与量を比較したところ、血清抗体産生 (IgA, IgG) および DT 抗毒素価ともに 0.01 μ g/マウスの群が高値を示し、低用量にてアジュバント効果が現われることが分かった。

IFN- β 30,000IU を投与された群のみ糞便中の IgA 抗体産生が認められた。

2) 脾臓細胞を *in vitro* で抗原刺激し、培養上清中のサイトカインを定量した結果、IFN- β に 1%キトサンを添加した群に IL-5 の有意な産生増強が認められた。

3) 抗原特異的脾臓細胞増殖反応を検討した結果、高い DT 抗毒素価を示したところの、IFN- β に 1%キトサンを添加して経鼻投与した群では *in vitro* での DT 刺激による脾臓細胞増殖が顕著であった。

D. 考察

rCTB の共存下でのインフルエンザワクチンの経鼻接種は、HI 抗体価と NT 抗体価を確実に上昇させ、遺伝学的に近い関係にあるウイルスの感染に対して発症防御効果のあることが示され、皮下接種から経鼻接種に切り換えることが可能だと考えられる。

肺炎球菌多糖体ワクチンについては、rCTB と化学結合させれば経鼻接種である程度血清抗体価が上昇し、さらに rCTB を共存させると気管支肺洗浄液中の IgA 抗体価も上昇するという成績が得られた。しかし、さらにより高い抗体価を得る条件の検討と感染実験をする必要がある。また、リボソームを利用した方法についてもさらに検討をする必要がある。

EHEC ワクチンについては、現段階では rCTB の有効性を示す実験データは得られていない。精力的に条件検討をする必要がある。また、Stx1B、Stx2B そのものの抗原性が低いことがわかったので、抗原性を高める処理方法についても検討する必要がある。

rCTB は、Toll-like receptor (TLR)のシグナル伝達系に作用することが示唆された。TLR 系の関与する自然免疫系は液性免疫と細胞性免疫との両方に作用するため、rCTB は両免疫系に関与できると考えられる。

サルを用いての実験で、rCTB 添加群では扁桃細胞よりの IFN γ の産生が認められなかったが、これは抗体産生のために Th2 側に傾いていたからであろう。

rCTB 添加群中 1 頭のサルの投与部位に好酸球の浸潤が認められたが、血清 IgE の上昇は認められていないので、特にアレルギー性反応誘導の心配はないであろう。

IFN- β に低濃度のキトサン溶液を加えた投与剤形は、キトサンの作用として報告されている粘膜附着性、水溶性巨大分子の透過促進およびタンパク分子の鼻粘膜吸収促進等の作用により、鼻腔内での滞留性および粘膜の吸収性が増し、それらが DT に対する高い抗毒素価産生に関与したと思われる。もちろん、キトサンにもアジュバント作用があり、IFN- β との相乗効果もあると考えられる。

E. 結論

1) rCTB を粘膜アジュバントとして、インフルエンザワクチンの接種を「皮下」から「経鼻」に切り換えることが可能である。

2) サルは純系化されていないので、個体間の違いが大きく、抗体産生に個体差が見られたが、安全性は明確に確認できた。

3) rCTB は体液性免疫だけでなく細胞性免疫をも増強することが作用機作の研究でより一層明らかになった。しかし、rCTB 単独頻回投与では DTH を起こさない。

4) サイトカインである IFN- β および MCP-1 は、キトサンを加えた投与剤形にすることで、DT に対する強い抗毒素価産生増強を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yasuda, Y., Tochikubo, K., Tsuji, T. & Morita, A. Development of a new protein transduction system by fusing N-terminal peptide of partial cholera toxin B subunit. Nagoya Medical Journal,

46(1-2), 17-26, 2003.

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(11-21), 1165-1173, 2003.

3) Yasuda, Y., Isaka, M., Taniguchi, T., Zhao, Y., Matano, K., Matsui, H., Morokuma, K., Maeyama, J., Ohkuma, K., Goto, N. & 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*, 21(21-22), 2954-2963, 2003.

4) 趙 艶秋、組換えコレラ毒素 B サブユニットを粘膜アジュバントとしたインフルエンザ赤血球凝集素 (hemagglutinin, HA) ワクチンのマウスへの経鼻免疫 (学位論文: 指導 朽久保邦夫). 名古屋市立大学医学会雑誌 54(4), 135-153, 2003.

5) Isaka, M., Komiya, T., Takahashi, M., Yasuda, Y., Taniguchi, T., Zhao, Y., Matano, K., Matsui, H., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. & Tochikubo, K. Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine. *Vaccine (in press)*

6) Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Tochikubo, K., Yamamoto, S. & Goto, N. Effects of recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) on cellular immune

responses : Enhancement of delayed-type hypersensitivity following intranasal co-administration of *Mycobacterium bovis*-BCG with rCTB. *Microbiol. Immunol. (in press)*

2. 学会発表

1) 前山順一、山本三郎、井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久. BCG との同時経鼻投与でみた組換えコレラ毒素 B サブユニットの細胞性免疫増強効果. 第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、4/1-3, 2003.

2) 趙 艶秋、井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、松井秀之、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、後藤紀久、朽久保邦夫. 組換え CTB を粘膜アジュバントとするインフルエンザワクチンの経鼻接種. 第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、4/1-3, 2003.

3) 井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、小宮貴子、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、近田俊文、高橋元秀、後藤紀久、朽久保邦夫. 組換え CTB を粘膜アジュバントとした DTP 混合経鼻投与の有効性評価. 第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、4/1-3, 2003.

4) 蔵田優子、櫻井信豪、前山順一、後藤紀久. マウス経鼻投与における IFN- β のアジュバント作用の増強について. 第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会・学術集会、7/23-24, 2003.

5) 前山順一、山本三郎、井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久. 細胞性免疫増強効果からみた鼻粘膜アジュバントとしての組換えコレラ毒素 B サブユニット. 第 7 回日本ワクチン学会学術集会 (名古屋)、10/18-19, 2003.

6) 山本三郎、山本十糸子、前山順一、後藤紀久、McMurray, D.N. BCG 経鼻免疫モルモットの抗結核作用と CpG DNA の免疫増強効果. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡)、12/8-

10, 2003.

7) 前山順一、井坂雅徳、安田陽子、枋久保邦夫、山本三郎、後藤紀久. *B. brevis* で産生させた組換えコレラ毒素 B サブユニットの粘膜アジュバント効果. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡)、12/8-10, 2003.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30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