

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開発に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 19 年（2007 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開発に関する研究	
	清野 宏	1
II.	分担研究報告書	
	1. 粘膜アジュバント開発へ向けての基礎研究	
	清野 宏	11
	2. 新規無毒化コレラ毒素アジュバントによる粘膜免疫応答の誘導に関する研究	
	萩原 由加利	17
	3. <i>B. brevis</i> 発現系を使ったキメラ型アジュバント作成	
	高木 広明	21
	4. ペプチド型アジュバントの開発	
	濱端 崇、竹田 美文	23
	5. TLR をターゲットとした新規粘膜アジュバント開発	
	竹田 潔	27
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV.	研究成果の刊行物・別刷	35

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

粘膜ワクチン開発の基礎となるアジュバント開発に関する研究

主任研究者：清野 宏（東京大学医科学研究所）
分担研究者：萩原 由加利（社団法人北里研究所・生物製剤研究所）
：高木 広明（株式会社 プロテイン・エクスプレス）
：竹田 美文（株式会社 シネ・サイエンス研究所）
：濱端 崇（国立国際医療センター研究所）
：竹田 潔（九州大学生体防御医学研究所）

A. 研究要旨：本研究計画の最終年度として、当研究班で開発を進めてきた無毒化変異型(mCT)とキメラ型(mCTA/LTB)について、マウスでの検討結果を基盤としてヒトへの応用化を目指した霊長類での粘膜アジュバント効果（例、経鼻・経口投与）と安全性の検討を開始する為に霊長類における粘膜免疫機構の解析を開始した。さらに、実用化に向けてキメラ型の工業的製造法の確立も進めた。mCT や mCTA/LTB の経口アジュバントとしての有効性を付与するために二重変異型（ダブルミュータント）を作製し、その有効性を示唆する結果を得ることが出来、経鼻だけではなく経口投与による免疫増強効果誘導への可能性を提示出来た。キメラ型によるアジュバント効果の詳細について検討を進め、mCTA と B サブユニット部位におけるアジュバント効果についてその両者の関与が示唆された。次世代粘膜アジュバント開発に向けて自然免疫の観点から TLR を介した NF- κ B 依存性早期・遅期誘導型遺伝子発現系の存在が明らかとなり、それを標的とした免疫調節型アジュバント開発への基礎を提供することが出来た。最終年度に当たり、mCT や mCTA/LTB の実用化に向けた研究成果を挙げ、次のステップに進める基盤が形成された。さらに、それを進化させた次世代粘膜アジュバントの開発とその有効性についても、進展を図る事が出来た。

B. 研究目的

新興・再興感染症を引き起こす鳥インフルエンザに代表されるインフルエンザ、HIV、サルモネラ菌、赤痢菌などは全て、呼吸、消化、性行為など宿主が日常行う生理的行為を介して粘膜面から侵入する。一方、呼吸器、消化器、生殖器粘膜には柔軟性と重層性を有してダイナミックに生体防御に関わる粘膜免疫機構が存在し、第一線のバリアとして働き、感染防御の中核的役割を果たしている。さらに、粘膜免疫系は体内の免疫機構である全身性免疫の誘導・制御にも関わっており、粘膜を介した抗原

特異的免疫誘導は感染性微生物に対して二段構えの防御を誘導できる。その為に、次世代ワクチンとして「経口・経鼻ワクチン」開発が期待されている。そこで、本研究ではその要とも言える粘膜アジュバントと粘膜抗原デリバリー法開発に結びつく開発基礎研究を推進してきた。

その目的達成に向けて 1)清野らはキメラ型 mCTA/LTB のヒトへの応用を目指し霊長類での検討を開始する為の準備と次世代ワクチン抗原粘膜面送達法の開発への基礎研究を進めた。2)萩原らは無毒化変異型(mCT) の経口免疫への応用性を検討する為、二重変異型（ダブルミュータント：dmCT）

を作製しその効果を検討した。3)高木らはキメラ型の実用化に向けて工業的製造法確立を目指したシステムの立ち上げを進めた。4)濱端・竹田らはキメラ型アジュバントの免疫賦活効果についてのメカニズム解明を解析した。5)竹田(潔)らは次世代のアジュバント開発に向けて自然免疫の観点からTLRを介したシグナル伝達系を標的とした免疫調節効果について検討を進めた。

B. 研究方法

1) 本研究計画で第二世代として開発されたキメラ型(mCT-A/LT-B)アジュバントの経口・経鼻アジュバントとしてのヒトへの応用性・安全性を検討するためには霊長類での検討が必要である。その目的達成に向けては霊長類における腸管免疫・上気道免疫機構の基礎的解明が不可欠である。そこで、医薬基盤研究所霊長類医科学センターの協力を得てパイエル板やNALTについての同定や分離法の確立を始めた。

粘膜ワクチン開発に向けては、効果的にワクチン抗原を選択的に粘膜面に送達する方法の開発も必要であり、粘膜上皮細胞指向性のあるアデノウイルスが感染機構として有するアデノウイルス2ファイバータンパクに注目し、米国研究グループとの共同で、より安全なリコンビナント分子を使った粘膜デリバリー効果について検討を開始した。

2) 本研究では既に有効で安全なmCTとして報告してきたmCT E112K (Aサブユニットの112番目のアミノ酸をグルタミン酸からリジンに置換)に、中枢神経系への移行を軽減するためにAサブユニットのCOOH末端KDEL配列(リジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン:小胞体残留シグナル)に2つめの変異を導入し、中枢神経系への蓄積を有意に低減した2種のダブルミュータントdmCT E112K/KDEVとdmCT E112K/KDGLの作成に成功し、前年までにその安全性と経鼻投与でのアジュバント活性について報告してきた。本年

度はその経口アジュバント効果について検討した。

- 3) キメラ型 mCT-A/LT-B の実用化に向けた工業的製造法の確立と、基礎研究や動物実験のための試料の調製を進めた。本年度は、キメラ分子の保存、流通時の品質保証、および投与時の品質管理を目的に、製造フローに凍結乾燥工程を加えた試料調整を検討した。
- 4) 毒素由来無毒化改変型各種アジュバント候補群の免疫増強効果の詳細を検討する為に野生型ホロCT (nCT)、112番目のグルタミン酸をリジンに変異させ無毒化した変異ホロCT (mCT)、mCTのAサブユニット(mCTA)と毒素原性大腸菌の易熱性毒素(LT)のBサブユニット(LTB)を組換えたキメラ型およびCTのBサブユニット(CTB)をアジュバントとし、卵白アルブミンとともにマウスに1週間間隔で3回経鼻投与し、最終投与から2週間目に血液、便、鼻洗浄液を採取し、抗原特異的免疫誘導効果を比較検討した。
- 5) 自然免疫系の活性制御機構を解析し新規アジュバント標的としての可能性を検討した。TLR刺激によるNF- κ B依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。まず、MyD88欠損マクロファージをTLR4リガンドで刺激し、TRIF依存性のシグナルが入る状況で早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子発現を解析した。さらに、早期誘導型遺伝子としてMIP2遺伝子、遅期誘導型遺伝子としてLcn2遺伝子を代表とし、各遺伝子プロモーターへの転写制御因子群のリクルートをクロマチン免疫沈降法で解析した。また、各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストンH3のメチル化を指標に解析した。

(倫理面の配慮) 本実験計画では、主に実験動物ならびに分離した細胞、細胞株を使用して研究を推進した。実験動物使用にあたっては、独立行政法人国立大学実験動物施設協議会指針、国立国際医療センター

研究所動物取扱規定、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類センター動物実験指針、各々研究施設の指針に基づき、動物実験施設の管理下で実験を行った。ヒトからの検体組織・細胞の使用の必要がある時は、臨床試験倫理規定に基づき、倫理委員会との連絡を密にその計画を慎重に進めた。

C. 研究結果

- 1) カニクイサルの小腸を開き胃側から大腸にむけて粘膜面を精査していくと、回腸部に向けてパイエル板の頻度が高いことが明らかになった。さらに、実態顕微鏡下でパイエル板を同定し、分離することに成功し、現在各種細胞の分離法確立を進めている。さらに電顕法を駆使してパイエル板ドーム上皮細胞層における抗原取り込み細胞である M 細胞の同定にも成功している。さらにアデノイドの同定と分離についても、その手法を確立し、現在有効な細胞分離法の開発を進めている。
次に次世代抗原粘膜送達法開発に向けて、アデノウイルス 2 ファイバタンパク (Ad2F)C 末側をイースト発現系 (*Pichia pastoris*) に発現させた。さらに、*in vivo* と *in vitro* を使ったその抗原送達能を検討する目的で Ad2F に蛍光色素遺伝子 (Red2 gene) を会合させたキメラ分子 Ad2-Red2 を構築し、その発現をタンパクレベルで確認した。さらに、呼吸器上皮細胞特異的に同キメラタンパクが結合することを確認した。つまり、上皮細胞株 (HeLa, 293A) には効率よく結合するが、線維芽系細胞株には全く結合しない。
- 2) dmCT の経口アジュバント活性を調べる目的で、OVA 1 mg を dmCT E112K/KDEV、dmCT E112K/KDGL あるいはコントロールとして CT 20 µg と共に、1 週間間隔で 4 回経口投与した。その結果、dmCT E112K/KDGL 群において有意な OVA-特異的血漿 IgM、IgG および糞便抽出液 IgA の誘導が認められた。しかしながら、これらの応答は CT 併用群との比較では優位に低かった。OVA-特異的抗体産生細胞誘導の解析においては、脾臓では dmCT E112K/KDGL 群で OVA-特異的 IgM および IgA 産生細胞が高頻度で検出され、腸管膜リンパ節、パイエル板、腸管粘膜固有層では dmCT E112K/KDGL 群で CT 群に匹敵する頻度で OVA-特異的 IgA 抗体産生細胞が検出された。
- 3) キメラ発現プラスミド (pNCMO2 chimera) を保有する *B. choshinensis* 形質転換株から蛋白質安定生産株の選抜を行ない、ワーキングセルを作成した。ワーキングセルを用いて、3L jar レベルでのキメラ分子を生産精製した。2SLN 培地 2 L を用い、通気量と回転数は 1vvm, 200 rpm の条件で 32°C, 68 時間培養した。培養液を、pH 8.0 に調整し、精密ろ過による除菌を行った。固定化 D-galactose column を用い、キメラ分子の精製を行った。
- 4) OVA 抗原に対する各改変型毒素分子のアジュバント活性をマウス経鼻投与で比較したところ、血清 IgG、血清 IgA、鼻洗浄液 IgA および糞便 IgA いずれにおいても nCT が高いアジュバント活性を示し、また mCT および CTB はほぼ同程度の低い活性を示した。一方 mCTA/LTB は、血清 IgA ではアジュバント効果が見られなかったものの、血清 IgG、鼻洗浄液 IgA および糞便 IgA では nCT に匹敵するアジュバント活性を示した。実際、血清 IgG のデータの統計学的検定を行って見たところ、mCT 群 および CTB 群と nCT 群 および mCTA/LTB 群の差は有意であり ($P < 0.01$)、また、nCT 群と mCTA/LTB 群の間には有意差は見られなかった ($P > 0.05$)。
- 5) MyD88 欠損マクロファージを TLR4 刺激すると TRIF 依存性の一見無意味なシグナルが活性化される。そこで、MyD88

欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、早期誘導型と遅期誘導型の各遺伝子の mRNA の発現誘導をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、遅期誘導型の遺伝子は MyD88 欠損マクロファージでは全く誘導されないが、早期誘導型の遺伝子はかなり減弱しているもののかすかに誘導された。このかすかな早期誘導型遺伝子の発現は、MyD88/TRIF 二重欠損マクロファージでは全く認められなかった。このように、早期誘導型遺伝子は、極めて発現誘導されやすく、一見無意味なシグナルが入ることによって、かすかに誘導されることが明らかになった。

D. 考察

第二世代粘膜アジュバントとして開発されたキメラ型(mCT-A/LT-B)について、その応用性を検討するために霊長類での腸管免疫機構ならびに呼吸器粘膜免疫機構の基礎的基盤形成を医薬基盤研究所霊長類医学センターの協力を得て開始することが出来た。特に同キメラ型については経口アジュバントとしての有効性・安全性についても検討する為、腸管免疫機構の詳細な解明が必要である。そこで、小腸でのパイエル板の同定と分離法を確立することが出来た。さらに、パイエル板ドーム上皮細胞層に抗原取り込み細胞である M 細胞の存在を確認し、現在その細胞の分離・精製法の確立を目指している。つまり、M 細胞に特異的膜タンパクを同定し、標的分子として応用し、そこに我々が開発してきたキメラ型(mCT-A/LT-B)アジュバントを連結させた新規粘膜免疫誘導システムとしての応用性を視野に入れて研究を推進している。さらに、アデノウイルスの気道上皮細胞指向性を使ってアデノウイルス 2 ファイバータンパク(Ad2F)粘膜抗原デリバリー法の開発を目指した研究も開始し、現在 Ad2F にワクチン抗原を発現させたキメラタンパクによる免疫誘導効果についても検討し、その有効性

を示唆する知見を得ている。

さらにキメラ型については実用化に向けて大量生産と質的均一性を考慮した工業的製造法に向けて研究が進んだ。3 L ジャーファーメンター規模での *B. choshinensis* 宿主-ベクター系を用いたキメラ分子(mCTA/LTB)の生産・精製を行い、安定して標品を得ることができるようになった。加えて、凍結乾燥を行っても高次構造を保持したキメラ標品が得られたことにより、実用レベルでの製造フローが構築できると考えている。

経口アジュバントの可能性については、既に有効で安全に使用できる 2 種の dmCT E112K/KDEV と E112K/KDGL について研究が進んだ。これら 2 種のアジュバントは、CT が細胞内に取り込まれる際の逆行性輸送に関与する、CT-A サブユニットの COOH-末端 KDEL 配列にアミノ酸置換を導入することにより、近年その危険性が危惧されていた CT の中枢神経系への蓄積を回避することに成功したアジュバントである。一方でこのアジュバントは、非常に高いアジュバント活性を保持しており、経鼻投与では CT に匹敵するアジュバント活性を示した。そこで、本研究では dmCT の経口アジュバント活性を検討した結果、その方向性を示唆する貴重な結果を得ることが出来た。

キメラ型アジュバントマウス経鼻投与による結果で特筆すべきは、mCTA/LTB キメラ型の高いアジュバント活性である。血清 IgG に関しては、この結果は協同研究者の Kweon ら (J Infect Dis 186 : 1261-1269, 2002) の報告を完全に再現している。この論文中には mCT (E112K) のデータがないので、mCT と mCTA/LTB のアジュバント活性の比較は本結果が初めてである。

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類される。遅期誘導型の遺伝子プロモーターはクロマチン構造が閉じていて、TLR 刺激により構造変換を受け、転写制御因子がアクセスする。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造は常に開いている。このこと

が、早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子群に分けられるメカニズムであることが考えられる。このように、自然免疫系の活性制御機構を解析し、その制御技術基盤を確立し、有効なアジュバントの創出に寄与したい。

E. 結論

本研究計画を通して、第二世代粘膜アジュバントとして開発されたキメラ型(mCT-A/LT-B)について、そのヒトへの応用性を検討するために霊長類での腸管免疫機構ならびに呼吸器粘膜免疫機構の基礎的基盤形成を医薬基盤研究所霊長類医科学センターの協力を得て開始することが出来た。その成果をふまえてキメラ型(mCT-A/LT-B)ならびに改良型であるダブル変異型についても霊長類での検討に向けた準備が進められている。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 (論文発表)

Tamagawa H, Hiroi T, Mizushima T, Ito T, Matsuda H, and **Kiyono H**. Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin-10-deficient colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007. (in press)

Kunisawa J, Takahashi I, and **Kiyono H**. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol. Rev.* 2007. (in press)

Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Ogahara I, and **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood* 2007. (in press)

Kim N, Knisawa J, Kweon MN, Eog Ji G, and **Kiyono H**. Oral feeding of *Bifidobacterium*

bifidum (BGN4) prevents CD4⁺ CD45RB (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin.Immunol.* 2007. (in press)

Maddaloni M, Staats HF, Mierzejewska D, Hoyt T, Robonson A, Callis G, Kozaki S, **Kiyono H**, McGhee JR, Fujihashi K, and Pascual DW. Mucosal vaccine targeting improves onset of mucosal and systemic immunity to botulinum neurotoxin A. *J. Immunol.* 177 : 5524-5432. 2006.

Nochi T, and **Kiyono H**. Innate immunity in the mucosal immune system. *Curr Pharm Des.* 12 : 4203-4213. 2006.

Duverger A, Jackson RJ, van Ginkel FW, Fischer R, Tafaro A, Leppla SH, Fujihashi K, **Kiyono H**, McGhee JR, and Boyaka PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. *J. Immunol.* 176 : 1776-1783. 2006.

Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, **Takeda Y**, **Kiyono H**, McGhee JR, and Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J Immunol.* 177 : 3045-3054. 2006.

Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Tang BG, Seoh JY, Lipp M, **Kiyono H**, Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* 176 : 803-810. 2006.

Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Takamura K, Park EJ, Kaisho T, Tanaka N, Kurono Y, and **Kiyono H**. Uniqueness of lymphoid chemokine requirement for the initiation and

- maturation of NALT organogenesis. *J. Immunol.* 177 : 4276-4280. 2006. (Cutting Edge)
- Safa A, Bhuyian NA, Nusrin S, Ansaruzzaman A, Alam M, **Hamabata T**, **Takeda Y**, Sack DA, and Nair GB. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. *J. Med. Microbiol.* 55 : 1563-1569. 2006.
- Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, Yamamoto M, Akira S, Himeno K, Matsumoto M, and **Takeda K**. TLR-dependent induction of IFN- β mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177 : 7059-7066. 2006.
- Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, **Takeda K**, and Watanabe M. Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 2007. (in press)
- Yamamoto M, Okamoto T, **Takeda K**, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, Yamaoka S, Kawai T, Matsuura Y, Takeuchi O, and Akira S. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7 : 962-970. 2006.
- Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, Kato H, Sougawa N, Matsui H, Kuwata H, Hemmi H, Goban C, Kawai T, Ishii KJ, Takeuchi O, Miyasaka M, **Takeda K**, and Akira S. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c⁺ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7 : 868 – 874. 2006.
- Yoshimatsu T, Kawaguchi D, Oishi K, **Takeda K**, Akira S, Masuyama N, and Gotoh Y. Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33 : 2553-2563. 2006.
- Miyatsuka T, Kaneko H, Shirai T, Matsuoka TA, Yamamoto K, Kato K, Nakamura Y, Akira S, **Takeda K**, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Sandgren EP, Kawaguchi Y, Wright CV, and Fujitani Y. Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20 : 1435-1440. 2006.
- Takegagara N, Takamatsu H, Toyofuku T, Tsujimura T, Okuno T, Yukawa K, Mizui M, Yamamoto M, Prasad DV, Suzuki K, Ishii M, Terai K, Moriyama M, Nakatsuji Y, Sakoda S, Sato S, Akira S, **Takeda K**, Inui M, Takai T, Ikawa M, Okabe M, Kumanogoh A, and Kikutani H. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8 : 615-622. 2006.
- Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Akamine M, Fujita J, Kawamura I, Mitsuyama M, Adachi Y, Ohno N, **Takeda K**, Akira S, Miyazato A, Kaku M, and Kawakami K. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen. *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47 : 148-154. 2006.
- Yu Q, Tang C, Xun S, Yajima T, **Takeda K**, and Yoshikai Y. MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8 $\alpha\alpha$ and TCR $\gamma\delta$ intestinal intraepithelial T lymphocytes. *J. Immunol.* 176 : 6180-6185. 2006.
- Inoue H, Ogawa W, Asakawa A, Okamoto Y, Nishizawa A, Matsumoto M, Teshigawara K, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Notohara

K, Katayose K, Okamura H, Kahn CR, Noda T, **Takeda K**, Akira S, Inui A, and Kasuga M. Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3 : 267-75. 2006.

Kinoshita D, Hirota F, Kaisho T, Kasai M, Izumi K, Bando Y, Mouri Y, Matsushima A, Niki S, Han H, Oshikawa K, Kuroda N, Maegawa M, Irahara M, **Takeda K**, Akira S, and Matsumoto M. Essential role of I κ B kinase α in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176 : 3995-4002. 2006.

Santos LL, Milenkovski GP, Hall PH, Leech M, Sharma L, **Takeda K**, Akira S, Kitching AR, and Morand EF. IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 84 : 166-173. 2006.

Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, **Takeda K**, Fukai F, Mizuguchi J, and Yoshimoto T. IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through suppressor of cytokine signaling 3. *J. Immunol.* 176 : 2773-2780. 2006.

吉田理人、五十嵐脩、寺原和孝、清野宏。 絨毛 M 細胞の形態と機能。 *臨床免疫*。 45: 236-242. 2006.

廣井隆親、塚越百合子、清野宏。 粘膜系好酸球様樹状細胞による免疫寛容制御 感染と免疫 221-230 2007.

(学会発表)

Kurashima Y, Kunisawa J, Gohda M, Higuchi M, Shimizu M, and **Kiyono H**. Different roles of sphingosine 1-phosphate in the regulation of mobility of mast cells and eosinophils in peritoneal and intestinal compartments. *Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists.*

Massachusetts, USA. May 12th. 2006.

Kiyono H. M cell targeted mucosal vaccine. *Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists.* Massachusetts, USA. May 13th. 2006.

Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Shimizu M, and **Kiyono H**. Sphingosine-1-phosphate-mediated regulatory T cell trafficking in the large intestinal epithelium. *Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists.* Massachusetts, USA. May 13th. 2006.

Takayama N, Igarashi O, Kweon MN, and **Kiyono H**. Peyer's patch NKT and CD4+CD25+ T cell mediated mucosal regulatory network for the control of intestinal allergy. *Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists.* Massachusetts, USA. May 13th. 2006.

Gohda M, Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Shimizu M, and **Kiyono H**. Regulation of peritoneal B cell mobility to intestine and subsequent production of the intestinal IgA by sphingosine -1- phosphate. *Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists.* Massachusetts, USA. May 14th. 2006.

Terahara K, Igarashi O, Gotoh Y, Nochi T, Yuki Y, Hiroi T, **Kiyono H**. Induction of villous M-cells by intestinal environmental factors. *Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists.* Massachusetts, USA. May 14th. 2006.

Yuki Y, Takagi H, Nochi T, Yang L, Hiroi T, Takaiwa F, and **Kiyono H**. Development of a rice-based oral vaccine. *Immunology 2006, The*

Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14th. 2006.

Terahara K, Igarashi O, Yoshida Y, Nochi T, Goto G, Taguchi F, Beauchemin N, and **Kiyono H**. Novel CEACAM 1 splice variants expressed by murine small intestinal epithelium. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. Jun 17th. 2006

國澤純、倉島洋介、樋口森生、合田昌史、清野宏. Sphingosine 1-phosphate receptor differently regulates naïve and activated intraepithelial T lymphocytes. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

高山尚子、五十嵐脩、権美那、清野宏. Role of NKT cells for the formation of a mucosal regulatory network in the control of intestinal allergy. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

樋口森生、國澤純、倉島洋介、合田昌史、清野宏. Cytokine regulation of epithelial cell-mediated innate and acquired phases of antigen presentation. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

野地智法、幸義和、依田昌樹、魚住明央、寺原和孝、金銅瑩、福山聡、五十嵐脩、清野宏. Immunological and biochemical characterization of M-cell by newly established monoclonal antibody. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006

魚住明央、野地智法、依田昌樹、幸義和、五十嵐脩、柴田宏昭、清野宏. Identification and characterization of non-human primate M-cells. 第36回日本免疫学会総会・学術総

会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

Yoshino N, Kanekiyo M, Okamura T, **Hagiwara Y**, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Yamamoto N, Sato S, and Honda M. Replication-deficient vaccinia virus DIs recombinant as an effective and safe mucosal vaccine for immunodeficiency virus. XVI International AIDS Conference. Toronto, Canada. Aug.18th. 2006.

吉野直人、萩原由加利、菅野祐幸、堤玲子、野田公俊、佐藤成大. リンゴポリフェノール併用によるコレラ毒素アジュバントの毒性軽減と抗原特異的抗体産生 第10回日本ワクチン学会. 大阪市, 大阪府. 10月21日. 2006.

Hagiwara Y, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. Double mutant of nontoxic cholera toxin dmCT E112K/KDGL provides potent oral adjuvant activity. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

佐藤壽男、島龍一郎、小沢綾子、竹田美文、濱端 崇. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 の Stx2 無毒化経口生ワクチンの開発. 第88回日本細菌学会関東支部総会. 浜松市, 静岡県. 10月. 2006.

清水 健、佐藤壽男、川上怜美、太田敏子、濱端 崇. 志賀様毒素の病原性と受容体親和性との関連. 第79回日本細菌学会総会. 金沢市, 石川県. 3月. 2006.

清水 健、川上怜美、佐藤壽男、濱端 崇、太田敏子、野田公俊. 志賀様毒素の分泌機構の解析. 第53回毒素シンポジウム. 北杜市, 山梨県. 7月. 2006.

Shimizu T, Kawakami Sato T, Sasaki T, Higashide M, **Hamabata T**, Ohta T, and Noda M. Analysis of the secretion of *Shiga*-like toxin

in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 第40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. 岐阜市, 岐阜県. 11月. 2006.

Takeda K. Regulation of innate immune responses. Awaji Forum. Sept.3-6. Hyogo, Japan. 2006.

Takeda K. Innate immune responses against mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program, 41st Tuberculosis and leprosy research conference. July19-21. Kagoshima, Japan. 2006.

Takeda K. Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting. June 1. San Francisco, USA. 2006.

Takeda K. Nuclear I κ B protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium). 第36回日本免疫学会学術集会. 12.11-13.大阪市, 大阪府. 2006.

香山尚子、竹田潔. Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第36回日本免疫学会学術集会. 12.11-13.大阪市, 大阪府. 2006.

財賀大行、竹田潔. Lipocalin 2 mediates anti-mycobacterial immune responses. 第36回日本免疫学会学術集会. 12.11-13.大阪市, 大阪府. 2006.

古賀律子、竹田潔. IFN- β -dependent innate immune response against *Trypanosoma cruzi*. 第36回日本免疫学会学術集会. 12.11-13.大阪市, 大阪府. 2006.

竹田潔. 自然免疫系によるトリパノソーマ原虫の感染制御機構. 第59回日本寄生虫学会. 10.28. 福岡. 2006.

竹田潔. 自然免疫系の活性制御機構. 第2回食品免疫学会. 10.23. 東京. 2006.

竹田潔. 自然免疫系の活性制御機構. 第43回補体シンポジウム. 8.19. 福岡. 2006.

竹田潔. 粘膜免疫の今後の展望. 第43回日本消化器免疫学会総会. 8.3-4. 青森. 2006.

竹田潔. 自然免疫系による炎症制御. 日本動脈硬化学会. 7.13-14. 東京. 2006.

竹田潔. I型IFNによる細胞内寄生性原虫の感染防御機構. 第71回インターフェロンサイトカイン学会. 7.7-8. 兵庫. 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

分担研究報告書

粘膜アジュバント開発へ向けての基礎研究

分担研究者 : 清野 宏 (東京大学医科学研究所・感染免疫部門 炎症免疫学分野)

研究要旨: 本研究計画で開発してきた無毒化変異型(mCT)とキメラ型(mCT-A/LT-B)粘膜アジュバントの有効性をマウスモデルで確認すると共に、ヒトへの応用性を検討する目的で霊長類での検討を進めてきた。前者に関しては、各粘膜アジュバントの経鼻免疫での安全性ならびに有効性が確認された。後者に関してはヒトに近い霊長類であるサルで有用性を検討する上で必要なサル粘膜免疫機構の基礎的解明を医薬基盤研究所霊長類医科学センターの協力のもと行い、腸管パイエル板や鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)の同定法や一部の粘膜免疫担当細胞の分離法を確立した。さらに、新規粘膜抗原デリバリー法としてアデノウイルス2ファイバー (Ad2F) タンパクの応用性について海外研究グループとの共同研究として検討し、その可能性を明らかにした。

A. 研究目的

新興・再興感染症を引き起こす鳥インフルエンザに代表されるインフルエンザ、HIV、サルモネラ菌、赤痢菌などは全て、呼吸、消化、性行為など宿主が日常行う生理的行為を介して粘膜面から侵入する。一方、呼吸器、消化器、生殖器粘膜には柔軟性と重層性を有してダイナミックに生体防御に関わる粘膜免疫機構が存在し、第一線のバリアとして働き、感染防御の中核的役割を果たしている。さらに、粘膜免疫系は体内の免疫機構である全身性免疫の誘導・制御にも関わっており、粘膜を介した抗原特異的免疫誘導は感染性微生物に対して二段構えの防御を誘導できる。その為に、次世代ワクチンとして「経口・経鼻ワクチン」開発が期待されている。そこで、本研究ではその要とも言える粘膜アジュバントと粘膜抗原デリバリー法開発に結びつく開発基礎研究を推進してきた。

B. 研究方法

- 1) 本研究計画で第二世代として開発されたキメラ型(mCT-A/LT-B)アジュバントの経口・経鼻アジュバントとしてのヒトへの応用性・安全性を検討するためには霊長類における腸管免疫・上気道免疫機構の基礎的解明が不可欠である。そこで、医薬基盤研究所霊長類医科学センターの協力を得てパイエル板や NALT についての同定や分離法の確立を始めた。
- 2) 粘膜ワクチン開発に向けては、効果的にワクチン抗原を選択的に粘膜面に送達する方法の開発も必要であり、粘膜上皮細胞指向性のあるアデノウイルスが感染機構として有するアデノウイルス2ファイバータンパクに注目し、米国研究グループとの共同で、より安全なりコンビナント分子を使った粘膜デリバリー効果について検討を開始した。

(倫理面の配慮) 本実験計画では、主に実験用動物ならびに分離した細胞、細胞株を使用して研究を推進する。実験動物使用にあたっては、独立行政法人国立大学実験動物施設協議会指針に基づき、動物実験施設の管理下で実験を行う。ヒトからの検体組織・細胞の使用の必要がある時は、臨床試験倫理規定に基づき、倫理委員会との連絡を密にその計画を慎重に進める。

C. 研究成果

- 1) カニクイサルの小腸を開き胃側から大腸にむけて粘膜面を精査していくと、回腸部に向けてパイエル板の頻度が高いことが明らかになった。さらに、実態顕微鏡下でパイエル板を同定し、分離することに成功し、現在各種細胞の分離法確立を進めている。さらに電顕法を駆使してパイエル板ドーム上皮細胞層における抗原取り込み細胞である M 細胞の同定にも成功している。さらにアデノイドの同定と分離についても、その手法を確立し、現在有効な細胞分離法の開発を進めている。
- 2) アデノウイルス 2 ファイバータンパク (Ad2F)C 末側をイースト発現系 (*Pichia pastosis*) に発現させた。さらに、*in vivo* と *in vitro* を使ったその抗原送達能を検討する目的で Ad2F に蛍光色素遺伝子 (Red2 gene) を会合させたキメラ分子 Ad2-Red2 を構築し、その発現をタンパクレベルで確認した。さらに、呼吸器上皮細胞特異的に同キメラタンパクが結合することを確認した。つまり、上皮細胞株 (HeLa, 293A) には効率よく結合するが、線維芽系細胞株には全く結

合しない。

D. 考察

第二世代粘膜アジュバントとして開発されたキメラ型 (mCT-A/LT-B) について、その応用性を検討するために霊長類での腸管免疫機構ならびに呼吸器粘膜免疫機構の基礎的基盤形成を医薬基盤研究所霊長類医科学センターの協力を得て開始することが出来た。特に同キメラ型については経口アジュバントとしての有効性・安全性についても検討する為、腸管免疫機構の詳細な解明が必要である。そこで、小腸でのパイエル板の同定と分離法を確立することを試み、それに成功した。さらに、パイエル板ドーム上皮細胞層に抗原取り込み細胞である M 細胞の存在を確認し、現在その細胞の分離・精製法の確立を目指している。つまり、M 細胞に特異的に発現する膜タンパク質を同定し、標的分子として応用し、そこに我々が開発してきたキメラ型 (mCT-A/LT-B) アジュバントを連結させた新規粘膜免疫誘導システムとしての応用性を視野に入れて研究を推進している。さらに、アデノウイルスの気道上皮細胞指向性を使ってアデノウイルス 2 ファイバータンパク (Ad2F) 粘膜抗原デリバリー法の開発を目指した研究も開始した。現在 Ad2F にワクチン抗原を発現させたキメラタンパクによる免疫誘導効果についても検討し、その有効性を示唆する知見を得ている。

E. 結論

本研究計画を通して、第二世代粘膜アジュバントとして開発されたキメラ型 (mCT-A/LT-B) について、そのヒトへの応用

性を検討するために霊長類での腸管免疫機構ならびに呼吸器粘膜免疫機構の基礎的基盤形成を医薬基盤研究所霊長類医科学センターの協力を得て開始することが出来た。その成果をふまえてキメラ型(mCT-A/LT-B)ならびに改良型であるダブル変異型についても霊長類での検討に向けた準備が進められている。また、新世代粘膜抗原デリバリー法開発の目的でアデノウイルス2ファイバータンパク(Ad2F)の有用性を強く示唆する基礎データを得ることが出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

Tamagawa H, Hiroi T, Mizushima T, Ito T, Matsuda H, and **Kiyono H**. Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin-10-deficient colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007. (in press)

Kunisawa J, Takahashi I, and **Kiyono H**. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol. Rev.* 2007. (in press)

Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Ogahara I, and **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood* 2007. (in press)

Kim N, Kunisawa J, Kweon MN, Eog Ji G, and **Kiyono H**. Oral feeding of Bifidobacterium

bifidum (BGN4) prevents CD4⁺ CD45RB (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin.Immunol.* 2007. (in press)

Maddaloni M, Staats HF, Mierzejewska D, Hoyt T, Robonson A, Callis G, Kozaki S, **Kiyono H**, McGhee JR, Fujihashi K, and Pascual DW. *J. Immunol.* 177 : 5524-5432. 2007.

Nochi T, and **Kiyono H**. Innate immunity in the mucosal immune system. *Curr Pharm Des.* 12 : 4203-4213. 2006.

Duverger A, Jackson RJ, van Ginkel FW, Fischer R, Tafaro A, Leppla SH, Fujihashi K, **Kiyono H**, McGhee JR, and Boyaka PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. *J. Immunol.* 176 : 1776-1783. 2006.

Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, **Takeda Y**, **Kiyono H**, McGhee JR, and Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J. Immunol.* 177 : 3045-3054. 2006.

Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Tang BG, Seoh JY, Lipp M, **Kiyono H**, Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina

propria to mesenteric lymph nodes. J. Immunol. 176 : 803-810. 2006.

Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Takamura K, Park EJ, Kaisho T, Tanaka N, Kurono Y, and **Kiyono H**. Uniqueness of lymphoid chemokine requirement for the initiation and maturation of NALT organogenesis. J. Immunol. 177 : 4276-4280. 2006. (Cutting Edge)

吉田理人、五十嵐脩、寺原和孝、清野宏. 絨毛 M 細胞の形態と機能. 臨床免疫. 45:236-242. 2006.

廣井隆親、塚越百合子、清野宏 粘膜系好酸球様樹状細胞による免疫寛容制御 感染と免疫 221-230 2007.

(学会発表)

Kiyono H. 粘膜ワクチン開発へ向けて：新しい展開. The 79th Annual meeting of Japanese Society for Bacteriology. Kanazawa. Japan. March 2006.

Kiyono H. 粘膜免疫を応用した感染症ワクチン開発ストラテジー. The 80th Annual Meeting of the Japanese Association for Infectious Diseases. Tokyo. April 2006.

Kurashima Y, Kunisawa J, Gohda M, Higuchi M, Shimizu M, and **Kiyono H**. Different roles of sphingosine 1-phosphate in the regulation of mobility of mast cells and eosinophils in peritoneal and intestinal compartments. Immunology 2006, The Annual Meeting of The

American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 12th. 2006.

Kiyono H. M cell targeted mucosal vaccine. Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13th. 2006.

Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Shimizu M, and **Kiyono H**. Sphingosine -1-phosphate-mediated regulatory T cell trafficking in the large intestinal epithelium. Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13th. 2006.

Takayama N, Igarashi O, Kweon MN, and **Kiyono H**. Peyer's patch NKT and CD4+CD25+ T cell mediated mucosal regulatory network for the control of intestinal allergy. Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13th. 2006.

Gohda M, Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Shimizu M, and **Kiyono H**. Regulation of peritoneal B cell mobility to intestine and subsequent production of the intestinal IgA by phingosine -1- phosphate Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14th. 2006.

Terahara K, Igarashi O, Gotoh Y, Nochi T, Yuki Y, Hiroi T, **Kiyono H**. Induction of villous M-cells by intestinal environmental

factors. Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14th. 2006.

Yuki Y, Takagi H, Nochi T, Yang L, Hiroi T, Takaiwa F, and **Kiyono H**. Development of a rice-based oral vaccine. Immunology 2006, The Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14th. 2006.

Terahara K, Igarashi O, Yoshida Y, Nochi T, Goto G, Taguchi F, Beauchemin N, and **Kiyono H**. Novel CEACAM 1 splice variants expressed by murine small intestinal epithelium. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. Jun 17th. 2006.

Kiyono H. Mucosal decision for immunity, tolerance and infection. 2nd the Biomolecule Secretion Research Symposium. Seoul. Korea. October 2006.

Kiyono H. 粘膜免疫：免疫とアレルギーの接点. The 43th Annual meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical immunology. Chiba. Nov. 2006.

Kiyono H. Mucosal antigen uptake network : A key for the development of mucosal vaccine. US-Japan Cooperative Medical science Program, 19th Joint Meeting of the AIDS Panels. Kagoshima. Dec. 2006.

國澤純、倉島洋介、樋口森生、合田昌史、清野宏. Sphingosine 1-phosphate receptor differently regulates naïve and activated intraepithelial T lymphocytes. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

高山尚子、五十嵐脩、権美那、清野宏. Role of NKT cells for the formation of a mucosal regulatory network in the control of intestinal allergy. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

樋口森生、國澤純、倉島洋介、合田昌史、清野宏. Cytokine regulation of epithelial cell-mediated innate and acquired phases of antigen presentation. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

野地智法、幸義和、依田昌樹、魚住明央、寺原和孝、金銅瑩、福山聡、五十嵐脩、清野宏. Immunological and biochemical characterization of M-cell by newly established monoclonal antibody. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

魚住明央、野地智法、依田昌樹、幸義和、五十嵐脩、柴田宏昭、清野宏. Identification and characterization of non-human primate M-cells. 第36回日本免疫学会総会・学術総会. 大阪市, 大阪府. 12月13日. 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 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

新規無毒化コレラ毒素アジュバンドによる粘膜免疫応答の誘導に関する研究

分担研究者 萩原 由加利 社団法人北里研究所・生物製剤研究所

研究要旨：ダブルミュータント無毒変異型コレラ毒素 (dmCT) E112K/KDEV および dmCT E112K/KDGL は低毒性で高い経鼻アジュバンド活性を持つ。これら dmCT の経口アジュバンド活性を検討した。その結果、卵白アルブミン (OVA) 1 mg を dmCT E112K/KDGL 20 μ g と混合して一週間間隔で4回経口免疫することにより、陽性コントロールとしての CT よりは低いものの、有意な血漿中で抗原特異的 IgM および IgG 応答、そして糞便抽出液中で抗原特異的 IgA 応答を誘導することができた。さらに、抗原特異的抗体産生細胞の解析において、腸管膜リンパ節、パイエル板、腸管粘膜固有層において抗原特異的 IgA 産生細胞が高頻度で検出された。従って、dmCT E112K/KDGL は有効な経口アジュバンドになる可能性が示唆された。

A. 研究目的

有効で安全な粘膜アジュバンドの開発は、粘膜ワクチン開発に必要不可欠である。天然型コレラ毒素 (native CT : nCT) や大腸菌易熱性毒素 (native LT) が、強力な粘膜アジュバンドであることは周知されている。しかし、その強力な生物活性故にヒトへの臨床応用は困難である。特に、近年マウスとサルを用いた実験において CT が嗅神経等の中枢神経系に取り込まれ神経障害を認める所見が得られ、懸念されている。そこで、本研究では既に有効で安全な mCT として報告してきた mCT E112K (A サブユニットの 112 番目のアミノ酸をグルタミン酸からリジンに置換) に、中枢神経系への移行を軽減するために A サブユニットの COOH 末端 KDEL 配列 (リジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン：小胞体残留シグナル) に2つめの変異を導入し、中枢神経系への蓄積を有意に低減した2種のダブルミュータント (二重変異型) CT (dmCT E112K/KDEV と dmCT E112K/KDGL) の作成に成功し、前年までにその安全性と経鼻投与でのアジュバンド活性について報告してきた。

経粘膜的に免疫を行った場合、投与経路の違いにより粘膜組織からの分泌型 IgA (S-IgA) の発現パターンに違いがあることが報告されている (Holmgren J, et al. Nature Med. 2005. 11:S45-53)。経鼻免疫の場合、気道、唾液の他腔分泌液中で高濃度の S-IgA が検出されるのに対し、経口免疫では腸管分泌液と乳汁中に高濃度で S-IgA が検出され

る。このような違いから、目的に応じた正しい投与経路の選択が必要である。

有効な経鼻アジュバンドは多数報告されているが、経口アジュバンドに関しては現在までにほとんど報告がなく大きな課題となっている。そこで本年度は、dmCT の経口アジュバンド活性について検討を行った。

B. 研究方法

C57BL/6 マウス (6 週齢、雌性) に、前処置として空腹時に 7.5% Sodium bicarbonate isotonic 液を経口投与した。30 分後、抗原として卵白アルブミン (OVA) 1mg を nCT、dmCT E112K/KDEV または dmCT E112K/KDGL 10~50 μ g と混合して、1 週間間隔で 3~5 回経口投与した。最終免疫から 1 週間後、血漿および糞便抽出液を採取し、ELISA 法により OVA-特異的抗体応答を測定した。さらに、脾臓、パイエル板、腸管膜リンパ節、腸管粘膜固有層から細胞を分離し、ELISPOT 法により OVA-特異的抗体産生細胞誘導を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は当研究所の動物取り扱い規定に準拠して飼育し、取り扱いにおいては苦痛を軽減するよう配慮した。

C. 研究結果

dmCT の経口アジュバンド活性を調べる目的で、OVA 1 mg を dmCT E112K/KDEV、dmCT