

表 1 臨床使用されているアジュバント

アジュバント	主要な成分	使用されているワクチン	自然免疫受容体・シグナル分子	誘導される獲得免疫
alum	アルミニウム塩 (水酸化アルミニウムなど)	B型肝炎ワクチン, 破傷風, DT, DTP	NLRP3(?) lipid sorting and Syk ⁹⁾	抗体, Th2
AS04	alum+MPL(3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A)	子宮頸癌ワクチン (サーバリックス: GSK)	MPL→TLR4 alum→inflammasome(?)	抗体, Th2
MF59	squalene (oil-in-water emulsion)	H1N1 インフルエンザワクチン (Celtura: ノバルティスファーマ)	ASC ¹⁰⁾	抗体, Th2
AS03	squalene+DL- α -tocopherol (oil-in-water emulsion)	H1N1 インフルエンザワクチン (アレバニックス: GSK)	不明	抗体, Th2

表 2 研究使用されているアジュバント

アジュバント	主要な成分	自然免疫受容体・シグナル分子	誘導される獲得免疫
IFA	mineral or paraffin oil (water-in-oil emulsion)	NOD2 ¹⁸⁾	抗体, Th2
CFA	IFA+結核菌成分 (water-in-oil emulsion)	NLR, inflammasome, mincle, TLR?	抗体, Th1, Th17, CD8
poly I:C	synthetic dsRNA analogue	TLR3, MDA5	抗体, Th1, CD8
flagellin	flagellin	TLR5	抗体, Th1 or Th2
imiquimods	synthetic ssRNA analogue	TLR7, TLR8	抗体, Th1, CD8
CpG	synthetic CpG-ODNs	TLR9	抗体, Th1, CD8
QS-21	saponin	不明	抗体, Th1, Th2, CD8
TDM	trehalose dimycolate	mincle ¹⁹⁾	抗体, Th1, Th17
curdlan	β 1,3-glucan	dectin-1	抗体, Th1, Th17, CD8
hemozoin	β -hematin crystals	MyD88	抗体, Th1 or Th2

クアレンを主体とする oil-in-water エマルジョンが使用されている。これら以外にも多数のアジュバントが研究開発されているが(表 2)、まだ広く臨床に用いられるには至っていない。個々のアジュバントの詳細については、優れた総説^{4, 6)}を参照されたい。

2. アジュバントと獲得免疫誘導

これまで全く曝露されたことのない病原体に対して、ワクチンによって獲得免疫を誘導するには、ワクチン抗原となるタンパク質とともにアジュバントの添加が必須である。ワクチンにおける獲得免疫誘導を図 1 に示す。獲得免疫反応は、抗原を取り込み、また各種の自然

免疫受容体を介して活性化した主に樹状細胞(dendritic cell: DC)からなる抗原提示細胞が MHC 上に抗原由来のペプチドを提示し、それを T 細胞が TCR を介して認識することで開始される。T 細胞の活性化には MHC-peptide/TCR による signal-1 と B7/CD28 による signal-2 の両方が必要であり、signal-1 のみではアナジーまたはトレランスと呼ばれる免疫寛容が誘導されることが知られている。ワクチンでは、ワクチン抗原を DC に標的することによって signal-1 を、アジュバントによって DC を活性化することで signal-2 をそれぞれ T 細胞に送ることが重要である。また広い意味では signal-2 は活性化した DC 上の補助刺激分子群

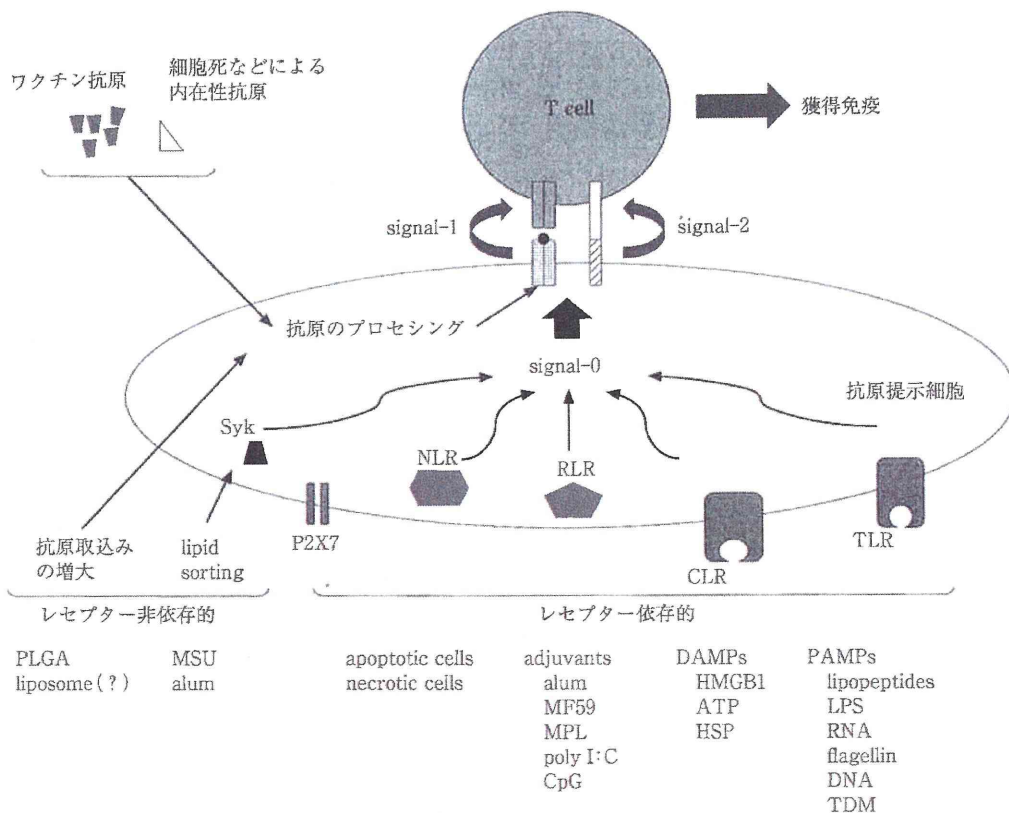


図1 アジュバントと獲得免疫誘導

(costimulatory molecules)だけでなく周囲の細胞あるいはDC自身によって産生されるサイトカイン(IFN- γ , IL-12, IL-4, IFN-Iなど)も含めて考えることができ, signal-2の強さや種類がその後のT細胞応答の方向付け(Th1, Th2, Th17, CTLなど)に少なくない影響を及ぼすことも知られている(表3)。このような意味でDCは獲得免疫誘導を起こすか起こさないか(self or non self), また起こすとしたらどのような免疫応答か(direction of immune responses)の2つを決定する要となっている。DCは微生物や組織損傷を認識する様々な自然免疫レセプター(TLR, CLR, RLR, NLRなど)を発現しており, それらが pathogen associated molecular patterns(PAMPs)や damage associated molecular patterns(DAMPs)⁷⁾として知られるモチーフを認識してDCの活性化を引

き起こす(図1)。また最近これら自然免疫レセプターを介さず, DCの細胞膜脂質を直接活性化する機構も報告された⁸⁾。この機構はlipid sorting⁹⁾と呼ばれ, alumやmonosodium urate(MSU)などの粒子状物質が細胞膜に接触してコレステロールを主体とする膜脂質の凝集を起こすことで, lipid raftに存在するITAMモチーフをもつシグナル分子の活性化に続きSykキナーゼを介した細胞内シグナルカスケードの活性化が起こる(図1)。このような複数の受容体依存的・非依存的なDC活性化刺激がsignal-0^{4,10,11)}として統合され, signal-1およびsignal-2の両方を増強し, T細胞活性化による獲得免疫応答に至る。そのような意味で, DCにsignal-0を誘導する物質はすべてワクチンアジュバントとして機能する可能性があり, 現在知られているアジュバント物質のほとんどはsignal-0を送

表 3 アジュバントと免疫応答

・自然免疫受容体依存的
TLR→Myd88/trif→IFN- α/β , IL-12→Th1 response
RLR→IPS-1→IFN- β →Th1 response
NLR→ASC→inflammasome activation→IL-1→inflammation, Th2 response(?)
CLR→CARD9→IL-23→Th17 response ²⁰⁾
・受容体非依存的 (alum, MSU, liposome, PLGA など)
depot effect
局所で炎症の持続
炎症性細胞の集積
抗原取り込みの増加
抗原の slow release
Syk activation→Th2(?)

表 4 樹状細胞サブセットと免疫応答

DC サブセット	CD8 α^+ DCs	CD8 α^- DCs	pDCs
表面マーカー	CD11c $^+$, CD11b $^-$, CD8 α^+	CD11c $^+$, CD11b $^+$, CD8 α^-	CD11c int , CD11b $^-$, B220 $^+$, Siglec-H $^+$, BST2 $^+$
サイトカイン	IL-12p70		IFN- α
T細胞応答	CD8>CD4	CD4>CD8	Th1 or Treg
特徴的な自然免疫レセプター	TLR3, Clec9A		TLR7, TLR9

る物質として理解されている。

3. 樹状細胞サブセットとワクチン

DCには少なくとも3種類のサブセットがマウスで知られ^{12,13)}(表4), CD8 α^+ DCはcross presentationによるCD8T細胞応答を, CD8 α^- DCはCD4T細胞応答をより誘導しやすいことが知られている¹⁴⁾。また形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell: pDC)は大量のIFN- α を産生しウイルス排除や獲得免疫誘導に重要な役割を果たしている。今後、詳細な検討が必要だが、ヒトでもほぼ同様のDCサブセットの存在が示されている¹⁵⁾。生体の示す免疫応答は非常に多様であるが、この多様性の一部は、生体に存在する複数の機能的に異なるDCサブセットとそれらが発現する自然免疫レセプターの組み合わせに由来すると考えられ(表3, 4), ワクチン免疫において、適切な免疫応答を誘導するためには、抗原とアジュバントをそれぞれのワクチンに適したDCサブセットと自

然免疫レセプターに標的させることが重要である。

4. アジュバントの必要性

ここでは不活化インフルエンザワクチンを例に、実際のワクチンでアジュバント、自然免疫反応、獲得免疫反応がお互いにどのような関係になっているのかをマウスでの実験結果を含めて概説する¹⁶⁾。不活化インフルエンザワクチンにはHAワクチン(スプリットワクチン)と全粒子ワクチンの2種類がある。季節性インフルエンザ(H1N1, H3N2)に対してはHAワクチンが用いられ、ヒトでの流行が危惧されているH5N1型インフルエンザに対しては全粒子ワクチンの準備が進められている。HAワクチンはインフルエンザウイルスをエーテルなどで処理してウイルス粒子を破碎した後、HAタンパク質を高度に精製したもので、ウイルス由来の核酸や脂質などの成分はほとんど含まれていない。それに対して全粒子ワクチンは、インフルエン

表5 マウスでの致死性インフルエンザに対する生存率

	B6 WT マウス	TLR7-KO マウス
HA ワクチン免疫群 (抗原のみ)	0%	0%
全粒子ワクチン免疫群 (抗原+アジュバント)	90%	0%

ザウイルスのウイルス粒子をそのままホルマリ
ンで固定したもので、HA 抗原だけでなくウイ
ルスゲノム由来の一本鎖 RNA も含んだウイ
ルス粒子をワクチンとして用いている。一本鎖
RNA は自然免疫受容体のうちの TLR7 を介して
認識されアジュバントとして働くため、全粒子
ワクチンはそれ自身でアジュバント添加ワクチ
ンとして機能し、HA ワクチンは抗原のみのワ
クチンとして機能する。

HA ワクチンと全粒子ワクチンをそれぞれマ
ウスに免疫した場合、全粒子ワクチンで免疫し
た群では、致死量のインフルエンザウイルスに
対して感染防御が成立するが、HA ワクチン群
では成立しない。また、TLR7 遺伝子欠損マ
ウスを用いて同様の実験を行うと、TLR7 遺伝子
欠損マウスでは、全粒子ワクチンを用いても感
染防御免疫を誘導しない(表5)。更に、マウス
をこれらのワクチンで免疫する際に、TLR7 依
存的に一本鎖 RNA を認識し大量の IFN- β を産
生する pDC をデプリーション抗体で1回目あ
るいは2回目の免疫時に取り除くと、1回目の
免疫時に pDC を除いたマウスでは、獲得免疫
が誘導されないのに対して、2回目の免疫時に
pDC を除いたマウスでは、獲得免疫が誘導され
た。このことは、ワクチンで獲得免疫応答を誘
導するには、初回免疫時の自然免疫反応は必須
だが、それ以降の自然免疫反応は必ずしも必要
ではないことを示唆している。

現行の HA ワクチンには、自然免疫を活性化
する成分はほとんど含まれていないにもかかわらず、公衆衛生の観点から一定程度の有効性が
確認されている。このことは、上に挙げたマウ
スでの実験結果と相反するようであるが、実験

動物モデルとしてのマウスは完全に‘ナイーブ’
で免疫以前に全くインフルエンザに曝露される
ことはなく、そのためアジュバントによる自然
免疫活性化が防御的な獲得免疫応答の誘導に必
須であるが、ヒトの場合は、ほとんどの人が顕
性・不顕性を問わず過去に何らかの形でインフ
ルエンザウイルスに曝露されており、既にイン
フルエンザウイルスに対するメモリー T 細胞・
B 細胞が準備されている。そのためアジュバン
トを含まない HA ワクチンであっても、ヒトで
は十分なブースト効果が発揮できる。

5. アジュバントと副反応

これまで見てきたように、アジュバントは
signal-0 を送ることでナイーブな免疫細胞にそ
の抗原が‘non-self’であることを教え、獲得免
疫応答を成立させる役割を果たすが、アジュバ
ントによる signal-0 は炎症反応を惹起し、それ
がワクチン投与による発熱・発赤などの副反応
の原因の一部ともなっている。先に述べたイン
フルエンザ全粒子ワクチンも、1970 年頃まで
日本でも臨床使用されていたが、効果が高い反
面、発熱などの副反応が高頻度に認められたこ
とで、現行の HA ワクチンに切り替えられた経
緯が存在する。今後の研究で自然免疫による炎
症誘導と獲得免疫誘導の詳細が明らかになれば、
副反応がほとんどなくかつ免疫効果の高いワ
クチンの実現が可能になると信じているが、現時
点ではワクチンの効果を犠牲にせず副反応をす
べて取り除くことは難しいといわざるを得ない。
インフルエンザワクチンの例でも見たように、
宿主にとって全く未知の抗原に対して獲得免疫
を誘導するには、アジュバントによる自然免疫
反応は必須であるが、既に存在している記憶免
疫を再活性化するにはアジュバントは必ずし
も必要ではない。ワクチンに対するアジュバン
トの添加は、ワクチン効果を高めると同時に常
に一定程度の自己免疫やアレルギーなどのリス
クを伴い、目的に合わせて適切な選択が必要で
ある。

6. 今後の展望

アジュバントは病原体感染における signal-0 を人工的に補い、ワクチンによって誘導される獲得免疫の性質を方向付ける役割を果たしている。近年の目覚ましい自然免疫学の進展は、signal-0 のワクチンにおける重要性を示している。多くの微生物感染においては、signal-0 として複数の PAMPs あるいは DAMPs が同時にそれぞれのシグナルを活性化し、ある組み合わせでは防御的な獲得免疫が促進され、また他の組み合わせではお互いのシグナルが抑制しあい感染防御に適切な免疫誘導が妨げられることも起こりうる。実際にウイルスはサイトカインなどを模倣した様々な免疫抑制分子で宿主の免疫

から免れていることが知られている。多くの自然免疫受容体が同定され個々の PAMPs/DAMPs によるシグナルとその獲得免疫に対する影響に対する理解は格段に進展したが、多様な自然免疫シグナル間のクロストークについては、不明な部分も多い。安全性と有効性をともに兼ね備えたワクチンの開発には、それぞれの標的疾患に対して最も適切な signal-0 を理解し、その誘導を実現できるアジュバントの開発が必須である。近年の免疫学・ワクチン学・アジュバント学の進展は、科学的な根拠に基づいたより安全で有効な次世代ワクチン開発の可能性を示しており、今後の更なる研究でその実現が期待される¹⁷⁻²⁰⁾。

■ 文 献

- 1) Didierlaurent AM, et al: AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* **183**: 6186-6197, 2009.
- 2) Schultze V, et al: Safety of MF 59(TM) adjuvant. *Vaccine* **26**: 3209-3222, 2008.
- 3) Roman F, et al: Immunogenicity and safety in adults of one dose of influenza A H1N1v 2009 vaccine formulated with and without AS03(A)-adjuvant: Preliminary report of an observer-blind, randomised trial. *Vaccine* **28**: 1740-1745, 2010.
- 4) Reed SG, et al: New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* **30**: 23-32, 2009.
- 5) Gupta RK, Siber GR: Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future—prospects. *Vaccine* **13**: 1263-1276, 1995.
- 6) Coffman RL, et al: Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**: 492-503, 2010.
- 7) Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**: 1-5, 2007.
- 8) Flach TL, et al: Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med* **17**: 479-487, 2011.
- 9) Shi Y, et al: Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunol Rev* **233**: 203-217, 2010.
- 10) Guy B: The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* **5**: 505-517, 2007.
- 11) Perrie Y, et al: Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm* **364**: 272-280, 2008.
- 12) Pulendran B, et al: Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* **20**: 61-67, 2008.
- 13) Coquerelle C, Moser M: DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* **234**: 317-334, 2010.
- 14) Dudziak D, et al: Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* **315**: 107-111, 2007.

- 15) Crozat K, et al: Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol Rev* 234: 177-198, 2010.
- 16) Koyama S, et al: Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med* 2: 25ra24, 2010.
- 17) Ellebedy AH, et al: Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) in the adjuvant effect of MF59. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2927-2932, 2011.
- 18) Moreira LO, et al: Modulation of adaptive immunity by different adjuvant-antigen combinations in mice lacking Nod2. *Vaccine* 26: 5808-5813, 2008.
- 19) Schoenen H, et al: Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol* 184: 2756-2760, 2010.
- 20) Iwakura Y, Ishigame H: The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116: 1218-1222, 2006.

アジュバントー開発研究の現状と課題

Adjuvant

特集

鉄谷 耕平 石井 健*

TETSUTANI Kohhei ISHII Ken J

VPDを制御するためのわが国の課題 Key words ワクチン アジュバント 薬物輸送系

ワクチンにとってのアジュバント

ラテン語 *Adjuvare* (to help) から *Adjuvant* と名付けられたように、アジュバントはワクチンの免疫原性を増強する物質を指す一般名詞で、表1にみるようにさまざまな物質がある。表2のように、弱毒化生ワクチンのようにアジュバントを含まないワクチンもあり、現在日本で用いられているワクチン商品24種のうちアジュバントを含むものは9種。そのうち古典的なアルミニウム塩がほとんどを占め、その他新規に MF59 などの乳化剤アジュバントがある。

ワクチンは、目標とする疾患の原因微生物の全体ないし一部をワクチン抗原として製造される。当該病原体に暴露されたとき速やかに排除して感

染を予防できるように、病原性を持たないように不活化ないし弱毒化した抗原をあらかじめ接種して、体内に抗原特異的な免疫を付与する医薬品である。弱毒化生ワクチンと不活化ワクチンとに大別され、後者はさらに不活化全粒子ワクチン、不活化スプリットワクチン、不活化サブユニットワクチン、遺伝子組み換えタンパクワクチン、DNA ワクチンなど、抗原によって区別される。

歴史的にみてワクチンは常に安全というわけでは必ずしもなく、夾雑物の混入や抗原の不十分な不活化などもあって、予防接種禍と呼ばれる医療事故が繰り返して発生した。そのため、より高い安全性を求めて、製造技術の向上とともに、全粒子ワクチンから遺伝子組み換えタンパクを用いたワクチンへと抗原の精製・単純化が進められてきた。

表1 アジュバントの分類

機能	分類	例
抗原輸送	アルミニウム塩	水酸化アルミニウムゲルなど
	乳化アジュバント	CFA, IFA, スクワレン, MF59 など
	微粒子アジュバント	リボソーム, PLGA などのバイオポリマー, ウィルス様粒子, ISCOM など
免疫増強	微生物由来物質	鞭毛成分, コレラトキシン・大腸菌易熱性毒素などの毒素, 細胞壁成分など
	サイトカイン	IL-2, IL-15, GM-CSF など
	Costimulatory molecule	CD134 など
	核酸	dsDNA, CpG-ODN など
	他	尿酸, 合成ヘモゾインなど

独立行政法人医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト
プロジェクト研究員 *プロジェクトリーダー

表2 日本医薬品集 2011 (文献16)に収録されているワクチン・トキソイド類における、アジュバント使用

日本標準商品分類	統一名	商品名例(メーカー)	アジュバント
631 ワクチン類	インフルエンザ HA ワクチン	各社20商品	なし
	乳濁 A 型インフルエンザ HA ワクチン	アレバニリックス(GSK)	スクワレン・トコフェロール(AS03)
	乳濁細胞培養 A 型インフルエンザ HA ワクチン	インフルエンザ HA ワクチン(ノバルティス)	スクワレン・スパン85・トウイン80(MF59)
	破傷風トキソイド結合インフルエンザ菌 b 型多糖	アクトヒブ(サノフィアス第一三共)	なし
	黄熱ワクチン	黄熱ワクチン(サノフィアス第一三共)	なし
	乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン	各社 3 商品	なし
	乾燥組織培養不活化 A 型肝炎ワクチン	エイムゲン(化血研)	なし
	組み換え沈降 D 型肝炎ワクチン	各社 4 商品	アルミニウム塩
	乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン	組織培養不活化狂犬病ワクチン(化血研)	なし
	コレラワクチン	各社 3 商品	
	乾燥弱毒生水痘ワクチン	乾燥弱毒生水痘ワクチン(阪大微研)	なし
	日本脳炎ワクチン	各社 8 商品	なし
	乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン	ジェービック(阪大微研)	なし
	肺炎球菌ワクチン	ニューモバックス NP (万有)	なし
	沈降 7 価肺炎球菌結合型ワクチン	プレバナー(ファイザー)	リン酸アルミニウム
	乾燥 BCG ワクチン	BCG ワクチン(日本 BCG)	なし
	組み換え沈降 2 価ヒトパピローマウイルス様粒子ワクチン	サーバリックス(GSK)	MPL, 水酸化アルミニウム(AS04)
	乾燥弱毒生風しんワクチン	各社 4 商品	なし
	経口生ポリオワクチン	ポリオワクチン(日本ポリオ)	なし
	乾燥弱毒生麻しんワクチン	各社 4 商品	なし
ウイルス病秋やみ混合ワクチン	ウイルス病秋やみ混合ワクチン(デンカ生研)		
632 毒素およびトキソイド類	成人用沈降ジフテリアトキソイド	ジフトキ(阪大微研)	リン酸アルミニウム
	沈降破傷風トキソイド	各社 5 商品	アルミニウム塩
636 混合生物学的製剤	沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド	各社 5 商品	アルミニウム塩
	沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン	各社 8 商品	アルミニウム塩
	乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチン	各社 2 商品	なし

しかし、古くは20世紀初頭に開発されたトキソイド、また1980年代の組み換えタンパクを抗原とするワクチンは、接種しても低い抗体価しか示せず、感染防御に十分な免疫を付与することができなかった。それを補うために抗原を沈降・濃縮したり、さまざまな物質を添加するなどが検討され、アジュバントが開発・改良されるきっかけになったとされる。たとえばアルミニウム塩は、ジフテリアトキソイドを沈降させるために添加したミョウバンが原型である。とはいえ、このようにアジュバントは当初経験則によって発見・使用されており、1989年 C. A. Janeway Jr. が“immunologists' dirty little secret”などと呼んだように、アジュバントがどのように効くか詳細に解明されないまま使用されてきた。

機能解析が進んだ現在では、精製されたワクチンが低い免疫原性を示すことについて、病原体由来のさまざまな因子が免疫増強の役割を果たしている、抗原の精製とともにこれらも除去されたためと考えられていて、粗精製だが強力だったワクチンを、“精製抗原+免疫増強アジュバント”として安全に、再構築するワクチンが盛んに設計されている。さらに、それらを効率よく免疫系に提示するワクチン輸送系アジュバントと併用するなど、今後のワクチンにおいてアジュバントはますます重要性を増すと思われる。

アジュバントの機能

薬物輸送(Drug Delivery System)は、とくに

癌治療薬剤において追究されている考え方で、目標臓器あるいは標的病原体に、薬物を効果的かつ集中的に送り込む技術をさし、具体的には、①薬剤を運搬媒体に安定的に封入し、②目標臓器に到達するまでの間生体内での代謝から保護し、③目標部位まで運搬し、④目標部位において薬剤を放出し、⑤薬剤活性を発揮させる技術からなる。

これは、抗癌剤の重大な副作用は癌組織以外の正常な組織にまで薬剤が作用するために起こるので、癌組織のみに薬剤を到達させることができ、より安全により強力な薬剤を用いることができるという仮説に基づいている。この考え方をワクチンアジュバントに敷衍すると、

①アジュバントと、抗原を組み合わせる製剤化の技術。

②抗原を生体内代謝から保護して長くそのままの形でとどめ、長時間の抗原提示を可能にする depot 効果。

③抗原提示細胞に働きかけ、抗原タンパクの取り込みの効率を上げる。

④抗原提示細胞に働きかけ、エフェクター免疫細胞への抗原提示の効率を上げる。

⑤抗原特異的記憶免疫細胞に働きかけ、これらをより長期間、より高いレベルで保持する。の段階に分けられよう。そのうち、抗原タンパクとともに生体内でふるまい、上記のうちの②あるいは②～③の機能を示すものを抗原輸送系 antigen delivery system と言う。一方、抗原タンパクとは必ずしも同一にふるまわず、たとえばサイトカインのように、免疫細胞を独自に活性化して③～⑤の機能を果たすものを免疫増強物質 immunopotentiator と言う。現存するワクチンアジュバントは以下各項で触れるように、抗原輸送あるいは免疫増強のいずれかを主に示すものが知られている(表1)。ただし以下各項でみるように、抗原輸送アジュバントとされているものでも免疫増強効果を持つことが近年明らかにされてきている。

アジュバントの使い方

アジュバントの機能解析が進むにつれ、ワクチンに適したアジュバント機能を選択する研究が盛んになってきている。特徴的なのは、どの免疫賦活アジュバントを用いるかによって、ワクチンが誘導する免疫応答の型^{21,22}が大きく影響を受けることで、微生物由来の自然免疫受容体リガンド Monophospholipid A (MPL) や CpG-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) などは Th1 型免疫応答を²¹、アルミニウム塩は Th2 型免疫応答を誘導すること²²が知られている。たとえば、Pollinex[®] Quattro Ragweed という花粉症ワクチンの開発ではこの点に着目して、MPL を花粉抗原とともに投与し、アレルギーを引き起こす病的な Th2 型ではなく、Th1 型免疫応答を生体内で誘導することによって花粉症を予防ないし治療するデザインをとっている。

このように、目的とする免疫応答の型によってアジュバントの選択が本来なのだろうが、実際にアジュバントを単数で用いる場合には、歴史的に最も長く利用され、また安全性が最も強固に担保されているとしてアルミニウム塩が主に選択される。表2にみるようにトキシノドのすべてと、遺伝子組み換えタンパクを抗原とするワクチンの多くに用いられており、きわめて高い安全性が求められる臨床応用を視野に入れるワクチンでは、アルミニウム塩がまず検討される候補といえよう。ただし、アルミニウム塩は Th2 型免疫応答を主に誘導するため、細胞障害性免疫応答が病原体排除に必要なウイルス性疾患の予防を目的とする場合、高い免疫原性を誘導するために最適なアジュバントとは必ずしも言えない。

そこで、アルミニウム塩を抗原輸送系として用い、免疫増強アジュバントを混合して用いることが行われる。混合アジュバントでは、アルミニウム塩や微粒子アジュバントを抗原輸送系として用い、そこに抗原とさまざまな免疫増強剤を吸着な

いし結合させて付加する。たとえばアルミニウム塩と MPL の混合アジュバントは、ヒトパピローマウイルスワクチンに添加されて臨床使用されている³⁾。

以下、各アジュバントの機能を概観する。

抗原輸送を担うアジュバント

1. アルミニウム塩

1926年 Glenny, Pope, Waddington, Wallace が、ジフテリアトキソイドを沈降させるためにアルミニウム塩を添加した結果、トキソイド接種量を10分の1に減らしても、沈降前と同程度以上の免疫原性が得られ、著明な免疫賦活効果を示した。アルミニウム塩は1934年ジフテリアトキソイドに添加されて、ヒトに初めて用いられたアジュバントワクチンとなった。

Glenny らは初出論文ですでに、「免疫原性が上昇したのは、沈殿物として接種されたために体内へ取り込まれるスピードが遅くなったためではないか」と、アルミニウム塩による Depot 効果を推測したが、Harrison が1935年に、アルミニウム添加ジフテリアトキソイド接種7週後のモルモットの接種局所部位を切り出して処理のち、別のモルモット個体に接種したところ、トキソイド特異的抗体を誘導したとして、アルミニウム塩とともに接種された抗原が接種局所に数週間以上とどまることを示し、depot 効果が確認された。

アルミニウム塩アジュバントとして水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムの2種が主に用いられる。水酸化アルミニウムは $\text{AlO}(\text{OH})$ の結晶構造を作り、大きさが nm 大の微粒子が合わさって $2\sim 20\mu\text{m}$ 大の結晶のゲル状となる。一方、リン酸アルミニウムは $\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$ の非晶質で定形をとらない。また、通称アラムはリン酸カリウムアルミニウム $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ である。

いずれも抗原タンパクを強く吸着することができるが、それは静電力、疎水結合と、すべてのアルミニウム塩が共通して表面に持つ水酸基をめぐ

ぐつての ligand exchange によるものとされ、なかでも静電力による結合がおそらく最も強い。水酸化アルミニウムの等電点は11.4であるが、等電点が7未満である抗原(4.8であるアルブミンなど)は水酸化アルミニウムに吸着されるが、等電点が7未満となる条件下でリン酸アルミニウムには吸着されないなど、抗原や他のアジュバントの条件設定には注意が必要である⁴⁾。

Depot 効果がアルミニウム塩のアジュバント機構と考えられていたが近年、免疫増強作用も持つことが明らかになってきた。たとえば接種局所に炎症を引き起こすことによる抗原提示細胞の誘導や、溶解している抗原を結晶化することで抗原提示細胞による取り込みを促進させること、さらには、自然免疫受容体の1つである NLRP3 と関連して炎症性サイトカイン分泌を促進する⁵⁾ ことなどが示されたほか、アルミニウム塩アジュバントは Th2 型免疫応答を誘導することが知られている。そのため、有効性についてはジフテリア・破傷風トキソイドの成人に対するブースター接種、インフルエンザ HA ワクチン、口蹄疫ワクチンにおいて疑問が呈された。

しかしアルミニウム塩の最大の特徴は、前述のとおり臨床使用に際して他のアジュバントよりも安全であることである。高 IgE 血症を引き起こす、アルミニウム塩を含むワクチンは共通して接種局所の硬結・疼痛・腫脹などを高頻度で引き起こすし、接種部位に肉芽腫形成がしばしば見られるなど、安全面の問題はないわけではないが⁶⁾、それらは必ずしも重症とはならず、現時点では、アルミニウム塩自体に発癌性・催奇形性・発熱性があるという証拠はないことから、「非常に豊富な経験から、ワクチンアジュバントとしてのこのクラスのアジュバントは安全だと結論付けられ⁶⁾」ている。

2. 乳化剤アジュバント

1916年、Le Moignic と Pinoy が「油脂ワクチン」として、ワセリンとラノリンを混ぜ合わせた植物

性油脂をサルモネラ (Paratyphique B) 死菌に加えて接種したところ、強い免疫原性が得られた。1937年 Freund が、ラノリン・パラフィン油および結核死菌を混合して接種したところ CFA 接種によって結核菌に対する細胞性免疫 (ツベルクリン反応) がより長い期間、被験動物において陽性のまま維持することを示し、完全フロイントアジュバント (Complete Freund's Adjuvant, CFA) とした。

乳化 (emulsify) という作業は、水と油という本来交じり合わないものを互いに分散させて乳濁液あるいは乳化剤 (emulsion) とする。これは、一方の液体中にもう一方の液体が $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$ 大の微粒子状に分散・浮遊した状態で、光を乱反射するため乳白色に見える。乳化剤の分類は、いずれがいずれに溶け込んでいるかによって大きく二分されるが、その決定因は乳化作業に用いられる界面活性剤である。両者を単に振り混ぜただけでは容易に分離するので、微粒子の安定化のために界面活性剤を乳化剤として添加するのだが、界面活性剤分子の親水基と疎水基とのバランス (hydrophile-to-lipophile balance, HLB) が高く親水性のほうが強いのを用いれば油脂が微粒子となる oil-in-water emulsion (O/W) に、HLB が低く疎水性の界面活性剤を用いれば水分が微粒子となる water-in-oil emulsion (W/O) となる。たとえば、ポリソルベートからなる Tween[®] は $9 \sim 16$ HLB と高く水溶性であるが、ソルビタンエステルからなる Span[®] は $2 \sim 9$ と低く脂溶性である。乳化アジュバントとして臨床応用されている MF59 は Tween と Span の両者を含んでいる。

当初、生体内で代謝されない油を用いることが必要だとされ、ドラケオールとアラセル A との組み合わせが用いられた。また 1961年 McKinney と Davenport が、植物油アジュバントが接種部位に 1 ヶ月以上とどまって抗原が接種部位から時間をかけて分散することが、接種後中長期的に高い抗体を誘導し続けると報告し、抗原輸送の機能を示唆した。

しかしアジュバントとしての有効性ととも、生体内において小分子への感受性・自己抗原に対する感受性などの好ましくない副反応が知られるようになった。結核死菌を含まない不完全フロイントアジュバント (incomplete Freund's adjuvant, IFA) を添加したインフルエンザワクチンが 1950 年台に世界中で使用されたが、製剤に混在したとされるペニシリン他に対するアレルギーが増加したほか、接種局所のアラセル A によると思われる膿瘍形成が多く観察された。IFA を用いた動物実験において、多発性関節炎・アミロイドーシス・ネフローゼ・さまざまな臓器における肉芽腫が報告された。安全性が危惧されて IFA は医薬品として承認されず、1990年代に Seppic 社が Montanide[®] として複数種開発するまで、乳化剤アジュバントに新たな展開は見られなかった。なお IFA 添加インフルエンザワクチンについては、35年の長期観察の結果、ワクチンに明白な発癌性がないことが確認されたが、それは 1993年である。

3. 微粒子アジュバント

微粒子アジュバントは径が nm 単位の微粒子で、より強力な Depot 効果を追求して設計された。すなわち、抗原をカプセル状の粒子のなかに包含させたうえで接種すれば、生体内で粒子が時間をかけて分解されるために抗原が長時間持続的に放出されるのではと考えられたのである。早くは 1979年 Preis らが ethylene vinyl acetate (EVA) とともに牛アルブミンを接種すると、6 ヶ月間抗体価が維持されたと報告した。

生体内で分解されるポリマーを用いた poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) は、抗原提示細胞をよく活性化する粒子径 10nm 以下の粒子と、より長期間抗原を放出できる $30 \sim 100 \text{nm}$ の粒子とを組み合わせたもので、分子量や lactide と glycolide の包含比率により、さまざまな組み合わせが試された。抗原を粒子内側に封入した PLGA と、表面に外側へ向けて抗原を吸着させた PLGA が、それぞれ強力なアジュバント効果を持つこと

が1990年代に知られていたが、ともに粒子径10nm以下の超微粒子であり、粒子の大きさが重要な因子であることが明らかになった。

リポソームも界面活性剤を用いて作成されるが、多層ないし単層構造、粒子径、膜脂質の親水性、抗原を内包するか粒子表面に外向きに結合させるか、膜脂質をポリエチレングリコール化するかなど、アジュバント機能の比較検討がなされた。リポソームは細胞障害性T細胞を誘導することが示されており、たとえば粒子径150nmの単層リポソームが、A型肝炎ワクチン、インフルエンザワクチンで臨床試験されたほか、最近では癌ワクチン、マラリアワクチンで試験されている。

微粒子の生体内での振る舞いについては、比較的大きい粒子(径500nm以上)のものはマクロファージによって取り込まれるが、VLPなどで20~200nm径のものは樹状細胞のエンドサイトーシスによって取り込まれる。興味深いことに、同じOVAペプチドで表面を覆った微粒子を20~120nmで異なるサイズで作成してマウスに皮内投与し、脾細胞の抗原との共培養でのサイトカイン産生をみることで免疫原性を比較したところ⁷⁾、粒子径が40~50nmではIFN γ 産生が、100~120nmではIL4産生がそれぞれ誘導され、粒子サイズによって誘導される免疫応答型をコントロールすることができるなど、抗原輸送に限定されない微粒子アジュバントの可能性が示されている。

免疫増強剤としてのアジュバント

1. 微生物由来物質

微生物の共感染や潜在感染が宿主の免疫応答に影響することは古くから知られていて、Ramonが1926年、ジフテリアトキソイド接種部位に膿瘍をたまたま形成した馬がより高い抗毒素を産生したことを報告した。ついで、結核他の慢性感染モデルモットにおいて免疫応答が増強することが観察されるなど、病原体の存在自体がアジュバント効

果を示すのかもしれないと考えられた。

ついで Freund が CFA を開発したが、含まれる死菌に大変強い免疫増強効果がみられた。同時期に見い出された *S.typhosa* のエンドトキシン由来の lipopolysaccharide (LPS) も強い免疫増強効果を示したが、ショックを引き起こすなど危険性についてもさまざまな報告がなされ、「抗原として用いるには安全だが、アジュバントとして用いるのには毒性があまりに強いと認識された」⁸⁾。CFA や LPS の有効性のみを保持するために、分離・分解・精製して、前者から incomplected Freund's adjuvant そして muramyl dipeptide (MDP) が、後者から monophosphoryl lipid A (MPL) が生まれ、それぞれ現在に至っている。

もう1つの大きな潮流は、1990年代に自然免疫学において Pattern Recognition Receptors (PRR) とそれらのリガンドの同定が行われたことで、これまで経験則でアジュバントの多くが PRR を介して自然免疫系を刺激することが次々に報告され、アジュバントが有効であるしくみが分子生物学の用語で説明できるように解明されてきた⁹⁾。それを受けて、ワクチン抗原と同様に、アジュバントも精製・単純化が行われ、有効性を残しながらより安全なものへと進んでいる。

MPL や RC529 (LPS を基礎構造とし、毒性を排除するように合成された化合物。TLR4のリガンド)、R839 (imiquimod, TLR7のリガンド)、R848 (resiquimod, TLR7/8のリガンド)、CpG-ODN (CpG-oligodeoxynucleotide, TLR9のリガンド)、FK565 (diaminopimelic acid, NOD1のリガンド) などの受容体が同定され、それぞれ免疫増強アジュバントとして機能することが明らかにされている。たとえば CpG-ODN は、抗原提示細胞である樹状細胞の活性化・分化を誘導して、生存を延長させるほか、単球・樹状細胞・マクロファージから、Th1型免疫応答に関連するサイトカインの分泌を促して、エフェクター細胞の活性方向に強く影響する。

サイトカイン同様これらのアジュバント候補

は、全身投与された場合の毒性の強さが欠点である。LPS は静脈内投与でショックを引き起こす。2004年 Lodes らによってフラジェリンはクローン病の自己抗原の1つであることが示された。また Visser らによってペプチドグリカンは神経疾患の病因との関連が示唆された。これは全身投与となったことでワクチン標的以外の臓器・細胞で不要な免疫応答を引き起こしたからだと考えられており、アジュバントを抗原と結合させて投与する手法で、標的臓器ないし細胞へより選択的に誘導することが試みられている。たとえば、マウスにおける HIV-1Gag タンパクを抗原とするワクチンの皮下接種において、TLR7とTLR8のリガンドである3M-012をGag タンパクとともに投与するよりも、両者を結合させたほうがより高い抗原特異的のCD4⁺、CD8⁺および活性化CD8⁺T細胞が誘導された¹⁰⁾。

しかし、リガンドの多くは細胞外にその受容体があるのに対し、抗原は細胞内に取り込まれてプロセッシングを受ける。そのため、細胞内のシグナル伝達系を直接刺激するアジュバントという概念が生まれ¹¹⁾、現在研究が進んでいる。

2. サイトカイン

アジュバントとして最も広く研究が進んでいるサイトカインはGM-CSFとIL-12で、GM-CSFは抗原提示細胞とくに樹状細胞の活性化とMHC分子および共刺激因子の誘導による抗原提示機能の活性化が、IL-12はエフェクター細胞、とくに細胞障害性T細胞の増殖と活性化、ならびにTh1型の抗体産生増強が期待される。

サイトカインは大部分がオートクリンないしパラクリンで分泌され、特異的受容体によって認識される。また生体内での半減期が大変短く、生理学的な濃度がナノないしピコモル単位と大変低濃度で活性を有する。癌治療(腎細胞癌に適用があるIFN γ)ないし抗ウイルス治療(肝炎ウイルスに適用があるIF α)に臨床適用が認められることからわかるように、全身投与は毒性が強いなどの

特徴から、ワクチンアジュバントとして用いる場合、体内での薬物輸送が慎重に設計される必要がある。

たとえば、既存のアルミニウム塩や乳化剤アジュバントとともに投与する、微粒子ポリマーに組み込む、あるいはDNAワクチンに抗原核酸とサイトカイン核酸をとともに組み込むなどのワクチン設計が試みられているほか、自然免疫受容体リガンドと同様に標的臓器・細胞への選択的な作用をめざしタンパク抗原と結合させてワクチンとすることも研究されている。

3. その他の免疫増強アジュバント

記憶免疫細胞を特異的に活性化するco-stimulatory分子として、TNF受容体スーパーファミリーに属するCD27-CD70、CD134(OX-40)、CD137(4-1BB)といった分子が知られている。ワクチンの最終的な標的が記憶免疫細胞であるため、これを標的とするアジュバントとしてco-stimulatory分子を用いることが検討されている。たとえばCD134について、ポックスウイルスに対する気道上皮におけるCD8記憶T細胞をより強く誘導する¹²⁾、HIV-1CanarypoxワクチンにおいてCD134-CD134Lシグナルによって液性免疫ではなく細胞性免疫が増強される¹³⁾などが報告され、新たなワクチンアジュバントとして期待されている。

さらに、いくつかの結晶が免疫増強機能と関連するが最近報告されている。たとえば核酸の代謝である尿酸結晶は¹⁴⁾、ヒト単球のIL-1 β 産生を強めるなど活性化を促すことが報告され、一連の尿酸結晶の免疫系における研究が開かれた。また、ヘム鉄から合成されたヘモゾイン結晶をOVAとともにマウスに皮下投与し、血清抗体価を比較したところ¹⁵⁾、CpGなど既知アジュバントと同程度以上の免疫増強効果を示すなど、Th1型の免疫へ誘導できるアジュバントとしての可能性が示された。

まとめ

以上、ワクチンに添加されるアジュバントの機能と、それによる分類を概説した。治療薬と異なり小児を含む健康な人を多数対象とするために、ワクチンには独特の安全性と有効性が求められており、ワクチン抗原の精製・単純化および安全で

有効なアジュバントの添加というワクチンデザインは今後さらに追及されると考えられる。これまで経験則で用いられていたアジュバントのいくつかは、自然免疫学の成果を応用することで作用機序の解明が進み、微生物由来のアジュバントとして確立されたように、今後も基礎免疫学との連携によりワクチンの改良が進むことが期待される。

文 献

- 1) Manicassamy S, Pulendran B : Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol* 21 : 185-193, 2009.
- 2) Marichal T, Ohata K, Bedoret D, et al : DNA released from dying host cells mediates aluminium adjuvant activity. *Nat. Med* : e-pub ahead, 2011.
- 3) グラクソ・スミスクライン株式会社, "サーバリックス®添付文書", http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ph/PDF/340278_631340QG1022_1_03.pdf
- 4) Vogel FR, Hem SL : "Vaccines : Expert Consult, 5th edition". Philadelphia, PA, USA. Elsevier Inc. 59-71, 2008.
- 5) Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, et al : Silica Crystals and Aluminum Salts Regulate the Production of Prostaglandin in Macrophages via NALP3 Inflammasome-Independent Mechanisms. *Immunity* 34 : 514-526, 2011.
- 6) Goldenthal KL, Cavagnaro JA, Alving CR, et al : Safety evaluation of vaccine adjuvants : national cooperative vaccine development meeting working group. *ADIS. Res. Hum. Retrov* 9 : S47-S51, 1993.
- 7) Mottram PL, Leong D, Crimeen-Irwin B, et al : Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size : formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Molecular Pharmaceutics* 4(1) : 73-84, 2007.
- 8) Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, et al : Adjuvants—a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11 : 293-306, 1993.
- 9) Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al : Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453 : 1122-1126, 2008.
- 10) Wille-Reece U, Wu CY, Flynn BJ, et al : Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8⁺ T cell response. *J. Immunol* 174 : 7676-7683, 2005.
- 11) Wales J, Foxwell B, Feldmann M : Targeting intracellular signaling : a novel approach to vaccination. *Expert Rev Vaccines* 6(6) : 971-980, 2007.
- 12) Salek-Ardakani S, Moutaftsi M, Sette A, et al : Targeting OX40 promotes lung resident memory CD8^T cell population s that protect against respiratory poxvirus infection. *J Virol* : e-pub ahead, 2011.
- 13) Willes-Reece U, Wu CY, Flynn BJ, et al : Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8⁺ T cell responses. *J. Immunol* 174 : 7676-7683, 2005.
- 14) Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al : Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440 : 237-241, 2006.
- 15) Cohan C, Igari Y, Yagi M, et al : Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe* 7 : 50-61, 2010.
- 16) "日本医薬品集2011", 日本医薬品集フォーラム編, 株式会社じほう, 2011.



ELSEVIER

SciVerse ScienceDirect

Current Opinion in
Virology

The mucosal immune system of the respiratory tract

Shintaro Sato and Hiroshi Kiyono

Most viruses use host mucosal surfaces as their initial portals of infection. The respiratory tract has the body's second-largest mucosal surface area after the digestive tract. An understanding of the unique nature of the mucosal immune system of respiratory organs is therefore extremely important for the development of new-generation vaccines and novel methods of preventing and treating respiratory infectious diseases, including viral infections.

Address

Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokane-dai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

Corresponding author: Kiyono, Hiroshi (kiyono@ims.u-tokyo.ac.jp)

Current Opinion in Virology 2012, 2:1–8

This review comes from a themed issue on
Viral pathogenesis
Edited by Diane Griffin and Veronika von Messling

1879-6257/\$ – see front matter
Published by Elsevier B.V.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.009>

Introduction

The respiratory, digestive, and reproductive tissues are located inside the body but are continuously exposed to the outside world. Thus they serve as gateways with a surveillance function for the acceptance of beneficial antigens from the outside environment and an immunological function for the rejection of non-beneficial antigens [1]. When the host takes in oxygen via the respiratory tract, essential nutrients via the digestive tract, or (in the case of females) spermatozoa via the reproductive tract, the organs in these tracts are at high risk of the invasion of pathogenic microorganisms. Mucosal epithelial cell layers cover the surfaces of these organs in the same way as skin covers the outside of the body, and they form physical and immunological barriers that prevent the invasion of harmful non-self materials. In addition, most of these mucosa-associated organs, apart from the lower respiratory tract (i.e. the lungs) possess 'resident flora,' which peacefully cohabit with the host and create a mutually beneficial environment. Therefore, the mucosa needs to distinguish not only beneficial and detrimental materials, but also resident and pathogenic bacteria. Beneficial materials or resident bacteria need to be actively taken up, whereas detrimental materials or

harmful bacteria need to be selectively excluded. This mechanism is controlled by the mucosal immune system (MIS) [1]. In this review, we focus on the unique nature of mucosal immunity in the respiratory tract and its contribution to the control of viral infection, with an emphasis on the influenza virus as an example of viruses that invade via the respiratory mucosa.

Anatomical uniqueness and physical barrier function of the airways

Mammalian respiratory systems are divided mainly into upper (from the nasal and oral cavities to the throat) and lower (trachea and lung) systems. The two airway compartments are environmentally separated by the glottis, and in healthy people the lower respiratory tract is essentially sterile. Therefore, once microbes colonize the lower tract and grow there, inflammatory responses that can lead to pneumonia are induced. In contrast, the upper respiratory tract is the entrance way for oxygen inhaled in the ambient air, and the mucosal surfaces in this part of the system are consistently exposed not only to resident or opportunistic microorganisms (e.g. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*) [2], and pathogenic microorganisms (e.g. *Corynebacterium diphtheriae* and influenza virus) [3,4], but also to foreign environmental substances such as various kinds of chemical materials (e.g. tobacco smoke) and allergen particulates (e.g. pollen and house dust).

The luminal side of the respiratory tract is physically protected by layers of epithelial cells that are adhered tightly to each other at tight junctions by occludin and various members of the claudin family, and at adherens junctions by E-cadherin [5,6]. The epithelial cells have well-developed cilia and produce mucus composed primarily of polysaccharides such as mucin (MUC) [7]. Of the different members of the MUC family, MUC1, 4, and 16 are membrane bound and MUC2, 5AC, 5B, and 19 are secreted-type mucins associated with the respiratory tract [8]. Expression of MUC5AC and 5B is increased in respiratory diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease via IL-13 and STAT6 signaling pathways [9]. At the bronchi, mucus and movement of cilia act cooperatively to prevent large foreign bodies (>5 μm) from drifting into the alveoli. Foreign bodies that do become trapped are carried toward the mouth by ciliary movement and expelled by coughing. This mechanism is called mucociliary clearance and is important in phylaxis [10]. However, in general, small foreign bodies, including most pathogens, can easily escape the physical barrier system and arrive at the pulmonary alveoli by

2 Viral pathogenesis

inhalation. A highly developed and orchestrated immunological defense system is therefore needed in the airways.

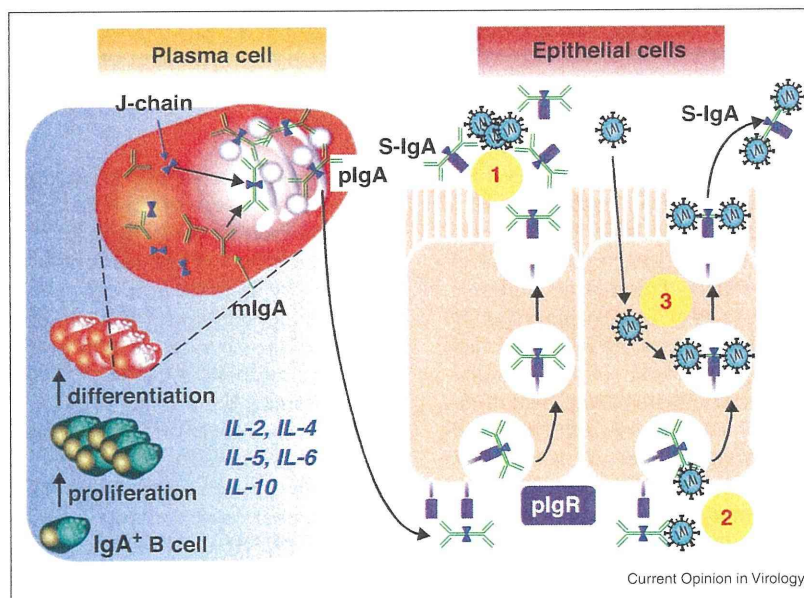
Induction and regulation of acquired immunity via the MIS

In general, the MIS consists of inductive and effector sites [11]. The inductive tissue consists of secondary mucosa-associated lymphoid tissue (MAL'T), represented by Peyer's patches (PPs) in the small intestine and nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in the rodents nasal cavity [11,12]. In the inductive tissue, mucosally introduced antigens are taken up from the luminal to the basolateral side of the epithelium by antigen-sampling cells. They are then processed and presented by antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells (DCs) to immunocompetent cells including naïve lymphocytes. The DCs migrate to the T-cell region of the MAL'T and then present the peptide form of the uptaken antigen to the naïve T cells. In the B-cell region, germinal center formation and antibody class switching occur [13]. A class switch to IgA predominantly occurs in the MAL'T by the action of the IgA-associated cytokine family of TGF β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, and IL-10 [14,15]. Post-switched IgA⁺ B cells egress from the MAL'T through efferent lymph vessels under the control of the sphingosine-1 phosphate system, a lipid mediator; they then enter

the body circulatory system [13,16]. Finally, these cells migrate to the mucosal layer of the effector tissue and form the necessary cellular network among Th1, Th2, Th17, Treg, and cytotoxic T cells, B cells, and DCs, together with epithelial cells, to provide the appropriate defensive responses.

The MIS thus consists of a unique lymphocyte migration system. For example, IgA⁺ B cells class-switched in the MAL'T usually express CCR10 on their surfaces [17], and these cells can migrate independently along antigen administration routes such as peroral and transnasal to various tissues, such as distant mucosal epithelia, in which the specific ligand molecule for CCR10, the chemokine CCL28, is produced. Thus mucosal immunization can induce similar immune responses at both local sites of antigen deposition and distal sites [18–20]. Nasal immunization can therefore effectively induce an antigen-specific mucosal immune response in the reproductive tissue in addition to the respiratory tract [21,22]. Recently, Cha *et al.* have demonstrated that intranasal immunization with adjuvant or virus itself accelerates CCL28 expression in both the uterus and the nasal cavity [23*]. This immunological interconnected circulation pathway of lymphocytes is often called the common mucosal immune system (CMIS); it is peculiar to the

Figure 1



Assembly of IgA in IgA plasma cells, and epithelial transcytosis of pIgA by plgR. IgA⁺ B cells, which arrive at the effector tissue, proliferate and differentiate into IgA plasma cells in response to the indicated cytokines. In the IgA plasma cells, mIgA and a J-chain are assembled to form pIgA just before its externalization. The J-chain is required for the interaction between pIgA and plgR, which are expressed on the basolateral surfaces of adjacent epithelial cells. The pIgA–plgR complexes move to the apical surfaces of the epithelial cells by transcytosis and are then released to the luminal side by digestion of part of plgR. There are at least three mechanisms of virus neutralization: (1) S-IgA recognizes the viral epitope and inhibits attachment to the epithelial cells; (2) pIgA can sense and then eliminate viruses that invade the lamina propria; or (3) Viruses that have invaded the cell can be recognized by pIgA–plgR complexes during their transcytosis.

MIS and is not found in other immune systems [24]. An understanding of the CMIS that bridges the respiratory and reproductive immune systems is very important for the development of mucosal vaccines against sexually transmitted infectious diseases, including papilloma virus and HIV.

When the IgA⁺ B cells arrive at the effector tissue, they are finally differentiated into IgA-producing plasma cells [14]. In the IgA plasma cells, monomeric forms of IgA are tied together by J-chains to form polymeric (pIgA) IgA (Figure 1) [1,25]. pIgA is transported to the luminal side of the epithelial cells by making a complex with poly Ig receptors (pIgR) expressed on the basal membrane side of the epithelial cells [26]. Part of the pIgR is digested on the luminal side, leading to the formation of secretory IgA (S-IgA), which is then released into the lumen (Figure 1) [26]. S-IgA binds to critical viral epitopes that have infected the mucous membrane and then neutralizes their biological activity; this leads to strong inhibition of viral growth both *in vitro* and *in vivo* [27]. For example, S-IgA and pIgA to hemagglutinin, which is a major component of the viral surface including the influenza virus, inhibit cellular attachment and internalization, and intracellular replication of virus, respectively. An *in vitro*

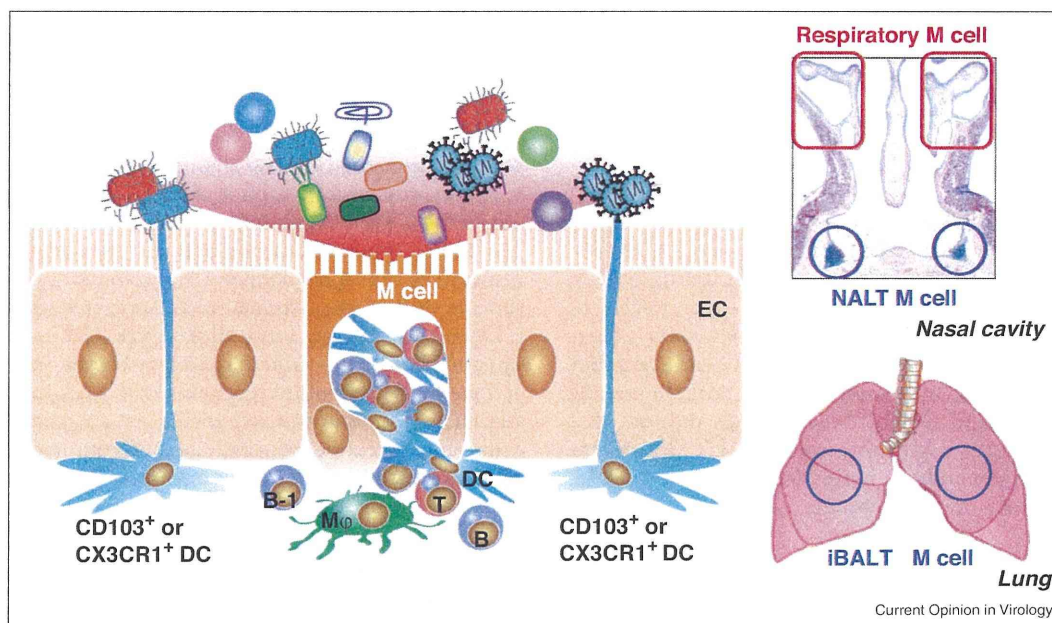
experiment has suggested that, in addition to the extracellular virus neutralization activity of secreted pIgA, pIgA can neutralize intracellular viruses, including influenza virus, during pIgR-mediated transport (Figure 1) [27].

The airway MIS: uniqueness of the secondary MALT and antigen-uptake system

Rodent NALT is located on both sides of the nasopharyngeal duct, dorsal to the cartilaginous soft palate. NALT is considered to be a counterpart of the human Waldeyer's ring, which includes the palatal tonsils and adenoids, and it has an important role in the induction and modulation of mucosal immunity in the upper respiratory tract [11,28].

Unlike the peripheral lymph nodes, MALT, including NALT, does not have afferent vessels [29]. Instead, antigens are usually taken in directly from the luminal side of the aerodigestive tract and are instantly captured by DCs waiting immediately beneath the epithelial layers. Although intestinal and lung alveolar DCs, which express CX3CR1 and CD103, respectively, on their surfaces, can directly recognize antigens by extending their dendrites through the tight junctions between the

Figure 2



Microfold cells (M cells) specialize in antigen uptake and their presence in the respiratory mucosal immune system. The cilia of M cells are shorter than those of conventional epithelium cells. On its basal side, the M cell develops a pocket-like structure that can hold immunocompetent cells. M cells, like macrophages, function in active antigen uptake. Because lysosome development in M cells is poor, in most cases the incorporated antigens are just passed through the M cells unmodified and then taken up by DCs. In addition to M cells, DCs that are located in the pulmonary alveoli and express CD103, or in the intestine and express CX3CR1, can directly take up luminal antigens by extending their dendrites. M cells can be found in three different locations in the respiratory tract namely the NALT FAE, the respiratory epithelium, and the iBALT FAE.

4 Viral pathogenesis

epithelial cells to reach the lumen [30,31], antigen is taken up mainly via specialized antigen-sampling cells called microfold cells (M cells) that use a transcytosis apparatus (Figure 2) [32,33]. M cells are found in the follicle-associated epithelium (FAE) covering the NALT and have short cilia that are less well developed than those of neighboring ciliated epithelial cells [34]. In addition, on their basolateral side, M cells have a pocket structure that holds DCs and/or lymphocytes, making this antigen-sampling system able to speedily and effectively deliver antigens to DCs without any antigen modifications [34]. M cells located in the NALT FAE can serve as invasion and sampling sites for not only respiratory pathogens (e.g. group A *Streptococcus* (GAS) [33]), but also intestinal pathogens (e.g. reovirus [35]).

Recently, we discovered cells in the murine nasal cavity epithelium that resembled M cells morphologically and functionally [36^{*}]. Because these cells have the hallmark characteristics of classical M cells but are anatomically located away from the NALT epithelium (e.g. in the turbinate epithelium of the nasal cavity), we named the cells 'respiratory M cells'. Unlike the NALT M cells the respiratory M cells have no pocket structure, but CD11c⁺ DCs, which are distributed throughout the nasal passages in the resting state, migrate to the area underneath the respiratory M cells to receive antigens after intranasal GAS infection [36^{*}].

The number of respiratory M cells per individual nasal cavity is 5–10 times the number of NALT M cells, the average number of which is 200–300 per mouse. This difference might just be a reflection of the large surface area of the nasal turbinates and the relatively small area of the NALT FAE.

Interestingly, the same numbers of respiratory M cells as in wild-type mice exist in Id2-deficient mice, which lack almost all secondary lymphoid tissues, including NALT [36^{*},37], when compared with wild-type mice. In addition, Id2-deficient and wild-type mice show equivalent levels of antigen-specific serum IgG and nasal IgA production in response to nasal infection with *Salmonella typhimurium* or GAS [36^{*}]. These findings indicate that the upper respiratory MIS consists of NALT-dependent and NALT-independent induction pathways for the generation of antigen-specific mucosal immune responses.

In addition to the presence of M cells in the upper respiratory tract, there have been a few reports of the existence of pulmonary M cells. Teitelbaum *et al.* have shown that *Mycobacterium tuberculosis* rapidly enters through M cells, which might be present on inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT; see later section) [38]. The respiratory epithelium therefore has at least three distinct pathogen-invasion and/or antigen-

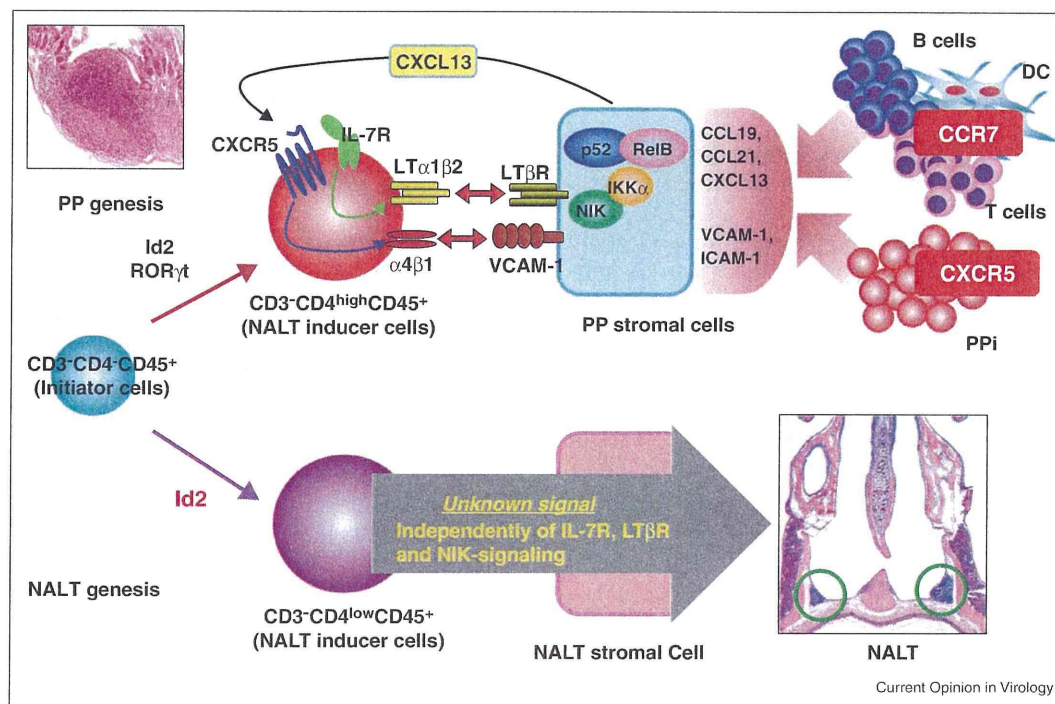
sampling sites: respiratory and NALT M cells in the upper respiratory tract, and pulmonary M cells in the lower respiratory tract. It may be possible that various respiratory pathogens have their own preferred entry sites: for example, the upper respiratory tract M cells for GAS and the pulmonary M cells for *M. tuberculosis*. In support of this speculation, one human study found that a human influenza virus receptor that possesses sialic acid linked to galactose by an α -2,6 linkage (SA α 2,6Gal) is dominantly expressed on nasal epithelial cells, whereas a receptor for avian influenza viruses, including H5N1, is found only on alveolar type-II cells in the lower respiratory tract [39]. It is an important future task to extensively characterize the use of the various influenza virus receptors among the different M cells located in the upper and lower respiratory tracts.

Unique characteristics of NALT organogenesis

The organogenesis mechanisms for peripheral lymph nodes and PPs, which are the representatives of MALT in the intestinal tract, are well studied [40]. Organogenesis of these tissues starts during the fetal period with the inflow of lymphoid tissue inducer (LTi) cells to the respective lymph node anlagen [41,42]. LTi cells, the development of which depends on two key transcription factors, Id2 and ROR γ t, have a common phenotype represented by CD3⁻CD4⁺CD45⁺. PP inducer (PPi) cells initially develop in the fetal liver with the expression of IL-7R, α 4 β 1 integrin, and CXCR5 [43,44]. Because the stromal cells around PP anlagen express CXCL13, which is a ligand for CXCR5, PPi cells specifically migrate to the anlagen site and then interact with the stromal cells [45,46]. The PPi cells are then stimulated by IL-7 produced by intestinal stromal and/or epithelial cells, leading to the expression of lymphotoxin (LT)- α 1 β 2, which is a ligand for LT β R expressed on the stromal cells [47–49]. The bidirectional interaction between PPi cells and anlagen cells is thus a key step for the initiation of PP tissue genesis. When the stromal cells are activated via the LT α 1 β 2–LT β R, an intracellular NIK–IKK α –p52/RelB signaling cascade is turned on to increase the production of lymphoid chemokine cocktails of CXCL13, CCL19, and CCL21 around the area of the PP anlagen and thus continuously recruit inducer cells and immunocompetent cells expressing CCR7—the receptor for CCL19 and CCL21—for the development of PPs [50].

NALT organogenesis has several developmental features distinct from those of PP tissue genesis (Figure 3) [11]. First, the NALT organogenesis program starts after birth, whereas PP tissue genesis is initiated and completed during the embryonic period. Second, in the case of PP genesis, the interaction of LT α 1 β 2 and LT β R is the most important step, but the NALT structure is found in both LT α -deficient and NIK-deficient mice, indicating that NALT is developed by a mechanism independent of

Figure 3



Distinct differences in organogenesis programs between PPs and NALT. Peyer's patch (PP) genesis is initiated at the embryonic stage by migration of a few CD3⁺CD4^{high}CD45⁺CXCR5⁺ PP inducer cells (PPI) to organizable stromal cells. This migration is controlled by the CXCR5-CXCL13 axis. CXCR5 signals induce a structural change in α4β1 integrin, enabling it to interact strongly with VCAM-1 on the stromal cells. The PPI are then activated by IL-7, leading to expression of the membrane type of lymphotoxin (LT)-α1β2. This LTα1β2 activates a non-canonical NF-κB pathway in the stromal cells via the LTβ-receptor (LTβR), NIK, and IKKα. The activation of NF-κB induces the expression of lymphoid chemokines such as CCL19, CCL21, and CXCL13 and of adhesion molecules such as VCAM-1 and ICAM-1. In response to the expression of these chemokines, immunocompetent cells, including T and B cells, and DCs, which express CCR7 (a receptor for CCL19 and CCL21), and additional PPI are accumulated at the site of PP formation. Therefore, all of the above-mentioned molecules are essential for PP organogenesis. In contrast to PP genesis, NALT genesis is initiated postnatally and is completely independent of IL-7R, LT, LTβR, and NIK-signaling. Whereas PPI require Id2 and RORγt transcription factors for their development from CD3⁺CD4⁻CD45⁺ initiator cells, differentiation of CD3⁺CD4^{low}CD45⁺ NALT inducer cells does not require RORγt.

LTα1β2-LTβR signaling. In addition, NALT genesis is found in RORγt-deficient [51], but not in Id2-deficient mice [37]. These observations suggest that the uniqueness of NALT organogenesis stems from the uniqueness of NALT inducer cells.

Inducible bronchus-associated lymphoid tissue for protective immunity

Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) was initially described as a family member of MALT located in the lower respiratory tract [52]. Well-developed BALT is found in a rabbit and feline lung as a region covered by the FAE including M cells similar to PP and NALT; however, BALT is not usually found in the lower respiratory tract of humans and mice [52-54]. In these species, the BALT structure is induced by inflammatory stimulation resulting from influenza virus infection or pneumonia. Therefore, this lymphoid structure belonging to the tertiary lymphoid tissues is often called inducible

BALT (iBALT) in humans and mice [55]. The functional and structural characteristics of iBALT resemble those of conventional BALT after influenza infection [55]. In addition, influenza-induced iBALT has the potential to prime influenza-specific T and B cells and to clear virus with the aid of CD8⁺ T cells, without support from other lymphoid tissues [55]. Although the mechanism of iBALT formation is poorly understood, these studies have also indicated that LT_i cells and LTα1β2-LTβR signaling are not required for iBALT formation, because both LTα-deficient and RORγt-deficient mice develop iBALT after influenza infection. It was recently reported that LPS-induced IL-17 produced by CD4⁺ T cells induces the production of CXCL13 and CCL19 in an LT_i cells-independent and lymphotoxin-independent manner, resulting in initiation of the first step for the recruitment of lymphocytes at the anlagen site of iBALT [56,57]. To develop novel influenza vaccines it might be useful to consider the critical role of iBALT in the

6 Viral pathogenesis

induction of protective immunity. An interesting strategy might be to develop a vaccine that supports the induction of iBALT generation simultaneously with the classical induction of influenza-specific S-IgA and cytotoxic T-lymphocytes.

Contribution of respiratory innate immune responses in the initial phase of infection

Mucosally induced S-IgA antibodies are a critical arm of acquired immunity for protecting the host from infection, but it takes several days to generate the necessary antigen-specific S-IgA at the sites of invasion and replication of an infectious agent. During that time, the innate immune response, which can respond promptly but functions in an antigen non-specific manner, confronts the pathogen by producing inflammatory cytokines and type I IFNs [58,59]. Because some inflammatory cytokines (e.g. IL-6, IL-12, and TNF α) are needed for the induction of antigen-specific T and B cells, the innate immune response is also extremely important for inducing acquired immunity [58].

In the case of influenza virus infection, the virus attaches to respiratory mucosal epithelial cells and then invades the cytoplasm by endocytosis [60]. Fusion of the endosomal membranes of the epithelial cell with the viral envelope is then observed. This fusion makes a gate pore linking endosome and cytoplasm; thus single-strand RNA (ssRNA) representing the genome of the influenza virus is released into the cytoplasmic region of the epithelial cell [60]. It has been well known that ssRNA viruses including influenza virus are recognized by two kinds of innate immune receptor. Toll-like receptor (TLR)7 (and also TLR8 in humans) is located on the endosome, and its ligand-binding site is turned toward the inside of the endosome [59]. TLR7/8 can sense ssRNA released into the endosome [61,62]. RIG-I recognizes genomic RNA released into the cytoplasmic region of infected cells [63,64]. TLR7/8 and RIG-I activated by ssRNA trigger intracellular signal transductions leading finally to prompt production of type I IFNs and inflammatory cytokines via activation of the transcription factors IRF3/7 and NF- κ B [59]. In addition to these above-described receptors that recognize ssRNA, it has recently been reported that NLRP3 inflammasome recognizes the M2 protein of influenza virus and activates caspase-1, leading to the production of IL-1 β , IL-18, and IL-33 [65].

Murine Nkp46 (Nkp44 in humans), which is a common natural killer (NK) cell-surface marker, can recognize hemagglutinin, which is a major component of the surfaces of viruses, including the influenza virus [66,67]. Therefore, when hemagglutinin is expressed on the surface of the infected host cell, NK cells recognize the infected cells immediately and are activated; the subsequent cytotoxic activity can control the growth of the virus. In the lung, the ratio of NK cells to all lymphocytes

(CD45-positive cells) is about 10%—markedly higher than in other organs [68]. In mice depleted in NK cells, the mortality rate from influenza infection of the lower respiratory tract is increased [69,70], indicating that the pulmonary NK cells play an important role in the phylaxis of influenza virus infection.

Concluding remarks

In recent years, anxiety over epidemics of emerging and re-emerging infectious diseases—especially respiratory tract infections such as seasonal and pandemic influenza, SARS, and tuberculosis—has increased worldwide, and effective methods of prevention and therapy need to be developed. In particular, the threat of pandemics of novel strains of highly pathogenic avian influenza has become a major social problem. Although there are some antiviral drugs that target NA and M2 proteins, for maximum prevention of infections with this virus we need to develop an effective vaccine with cross-reactivity. To achieve this, molecular- and cellular-level understanding of the mucosal immunity of the respiratory tract is very important, and continuous analysis will be needed in future.

Acknowledgements

Our work is supported by grants from: the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (Grant-in-Aid for challenging Exploratory Research [23659199 to S.S.], for Scientific Research S [23229004 to H.K.]); the Global Center of Excellence Program of the Center of Education and Research for Advanced Genome-based Medicine (to H.K.) and the Core Research for Evolutional Science and Technology Program of the Japan Science and Technology Agency (to H.K.).

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest

1. Mayer L, Walker WA: **Development and physiology of mucosal defense: an introduction**. In *Mucosal Immunology*, edn 3. Edited by Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, Mayer L. Elsevier; 2005:5-18.
2. Murphy TF, Bakaletz LO, Smeesters PR: **Microbial interactions in the respiratory tract**. *Pediatr Infect Dis J* 2009, **28**:S121-S126.
3. Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinserling VA, Yakovlev AA: **The pathology of diphtheria**. *J Infect Dis* 2000, **181**(Suppl. 1): S116-S120.
4. Broadbent AJ, Subbarao K: **Influenza virus vaccines: lessons from the 2009 H1N1 pandemic**. *Curr Opin Virol* 2011, **1**:254-262.
5. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A: **Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation**. *Oncogene* 2008, **27**:6930-6938.
6. Yonemura S: **Cadherin-actin interactions at adherens junctions**. *Curr Opin Cell Biol* 2011, **23**:515-522.
7. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA: **Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus**. *Annu Rev Physiol* 2008, **70**:459-486.
8. Evans CM, Koo JS: **Airway mucus: the good, the bad, the sticky**. *Pharmacol Ther* 2009, **121**:332-348.
9. Turner J, Jones CE: **Regulation of mucin expression in respiratory diseases**. *Biochem Soc Trans* 2009, **37**:877-881.