

課題 1. ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤

課題 2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性と安全性における相違点の理論基盤構築

### ワクチンによる発熱機構に関する研究

研究分担者 石井健 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究協力者 青枝大貴 同上 主任研究員

#### 研究要旨

アジュバント添加ワクチン接種による発熱は副反応として比較的高頻度に認められ、アジュバント添加ワクチンの安全性を考えるうえで重要であるが、発熱が獲得免疫誘導にどのような影響を与えるのかなどの基礎的な部分についても不明な点が多い。現行のワクチン製剤による発熱試験はウサギを用いて行われており、投与後わずか 3 時間の発熱状況のみが試験され、臨床上認められる 24 時間から 72 時間後の発熱については検査されておらず、アジュバント添加ワクチンの安全性を総合的に評価可能な動物実験システムの開発が望まれる。本研究では、アジュバントおよびアジュバント添加ワクチンの安全評価に寄与するべく、マウスを用いた非侵襲的かつ連続的な体温および行動モニタリングシステムを開発した。

#### A. 研究目的

アジュバントおよびアジュバント添加ワクチンの安全性評価研究の基盤として、マウスを用いて非侵襲的かつ連続的に体温および行動をモニタリングするシステムを開発する。

#### B. 研究方法

我々が開発したサーモグラフィーカメラと飼育環境(音、光、環境温度)をコントロール可能な独自のシステムを用い、通常の飼育状態で複数のマウスを同時に何ら拘束することなく連続的にサーモグラフィーカメラで測定した。測定された最高温度をマウス体温として、また最高温度が記録された座標の時間あたりの移動変化量を行動指標として時間軸に対してプロットした。 1)モデル発熱物

質として LPS を、実際のワクチンとしてインフルエンザ全粒子ワクチンを投与した。2)また温度変化および行動変化のデータを客観的に評価可能な解析法を開発する目的で周波数分析を行った。3)インフルエンザ全粒子ワクチンによる発熱については、マウス以外のカニクイザル、ウサギ、フェレットについてもサーモグラフィーカメラを用いない方法で検討し、動物種による違いについても考察した。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、医薬基盤研究所および大阪大学微生物病研究所動物実験委員会規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行っ

た。

### C. 研究結果

1) マウス背部を除毛し、かつ光と環境温度をコントロールできる密閉型のインキュベーター内でマウスを飼育し、その上部からサーモグラフィカメラで撮影することで、数日間にわたって連続的にマウス体温をモニタリングする測定システムを構築することが出来た(特願 2011-102045)。LPS(1ug)投与前と投与後の体温変化の測定例を図1に示す。LPS投与後の発熱は、約5時間後に一過性にピークを示し、その後少なくとも一週間にわたって再び発熱することはなかった。また、LPSによる体温の最高温度は、夜間活動期の最高温度を超えることはなかった。

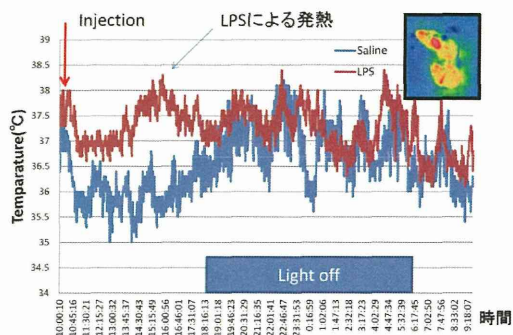


図1. LPS投与によるマウス体温変化

LPS投与量を段階的に増加させて、体温及び行動変化を継続的に記録した。1ugおよび10ugのLPS投与では一過性の発熱および行動減少を認めるのみであるが、100ug投与では長時間にわたる体温低下と行動減少を認めた。このことは重篤な敗血症で臨床的に認められる現象と非常に類似しており、サーモグラフィによる体温および行動測定モデルの有用性を示唆した(図2)。

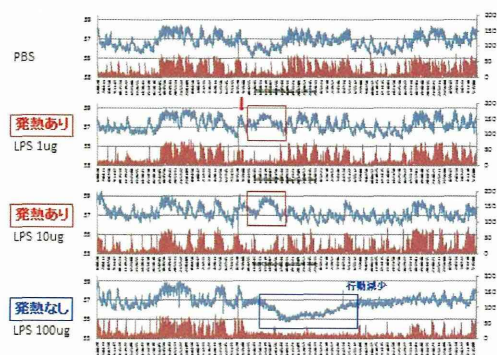


図2. LPS投与量によるマウス体温変化

2) 体温および行動変化をより客観的な指標を用いて解析することを目的に周波数分析を行った。周波数分析による解析では、一過性の発熱や行動変化を特徴的な周波数の消失として検出することが出来た(図3)。

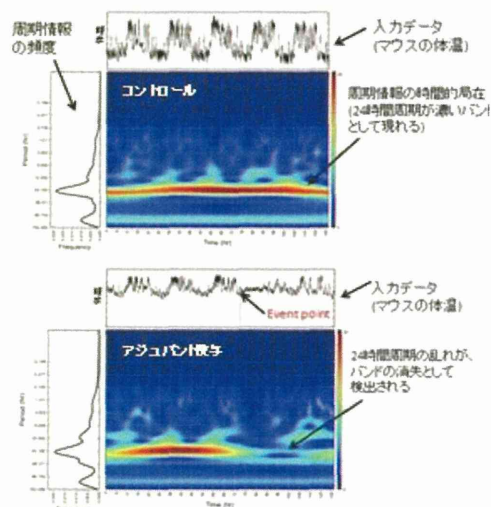


図3. マウス体温時系列データの周波数解析

### D. 考察

本研究で開発・構築したマウス体温測定システムは、ハンドリングなどによる外的要因に影響されることなく、非侵襲的で経時的にマウス体温を測定することができ、ワクチン投与後の発熱反応測定に有用と考えられた。しかしながら、インフルエンザ全粒子ワクチン(H1N1 および H5N1)を用いてマウスで同様の実験を行ったが数匹に一匹

でわずかな発熱を認めるものも存在したが、確実に発熱を認める事例は観察されなかった。従ってヒト小児における H5 全粒子ワクチンの臨床試験で高頻度に見られた発熱については、少なくともマウスでは再現することは出来ないと考えられた。この結果をふまえ、マウス以外の動物種でインフルエンザ H5N1 全粒子ワクチン接種による発熱反応を検討したところ、カニクイザル、ウサギではマウス同様に明らかな発熱反応は認めなかったが、フェレットにおいては H5 全粒子ワクチン投与後に一過性の有意な発熱反応を認めた(参考図)。

	H5-AIum 1回目接種	H5-AIum 2回目接種
ヒト	あり	なし <small>(発熱程度は減少)</small>
カニクイザル	なし? <small>(明らかに発熱は認めず)</small>	—
ウサギ	なし	なし
フェレット	あり	なし <small>(発熱程度は減少)</small>
マウス	なし <small>(明らかに発熱は認めず)</small>	—

参考図. 動物種による発熱反応の違い

## E. 結論

我々の開発した体温測定システムは従来のウサギ発熱試験では測定出来なかった日単位での体温変化を非侵襲的に連続的に測定することができ、今後のワクチンの安全性評価や、発熱と獲得免疫反応の関連に対する基礎研究の進展に貢献すると考えられる。多くの生物種で共通の LPS に対する発熱反応については、マウスにおいても再現性よく評価出来るが、インフルエンザワクチンによる発熱については、マウスでは十分に評価出来ないことが示唆され、動物種による影響を考慮する必要があると考えられた。

## F. 研究発表

論文発表

1. Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, Ishii KJ, Yokoyama M. J Control Release. 2012Dec3. Doi:pil:S0168-3659(12)00813-9. 10.1016/j.jconrel.2012.11.016.
2. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Cell Host Microbe. 2012;12(5):705-16. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.010.

学会発表

1. PS[II]-42 Requirements of innate immune responses for CD8 T cell induction with infection and vaccination. Taiki AOSHI, Ken J ISHII. 第 34 回内藤コンファレンス(感染・炎症・免疫). 2012 年 10 月 16 日(火)~10 月 19 日(金) (札幌)

日本語総説

1. 自然免疫と次世代ワクチン開発. 青枝大貴, 石井健. Drug Delivery System (0913-5006)27 巻 1 号 Page19-27 (2012. 01)
2. 自然免疫の関わる病態と治療への応用 自然免疫研究と次世代ワクチン. 青枝大貴, 石井健. 医学のあゆみ 243 巻 1 号 Page122-128 (2012. 10)

書籍

3. 免疫学コア講義(第 3 版)(熊ノ郷淳, 阪口薫)

雄，竹田潔，吉田裕樹／編）。ワクチン。青  
枝大貴，石井 健。南山堂 2012 年 11 月。

4. 免疫学 Update 分子病態の解明と治療への展  
開(審良静男，熊ノ郷淳，竹田潔／編)。第 23  
章ワクチン開発研究の展開。青枝大貴，石井  
健。南山堂 2012 年 12 月

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含 む。）

### 1. 特許出願

実験用小動物のための体温測定装置および体温測  
定方法。青枝大貴、石井健、長谷田泰成  
特願 2011-102045.

課題 1. ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤

課題 2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性と安全性における相違点の理論基盤構築

研究分担者：清野 宏

東京大学医科学研究所 職名 所長・教授

### 研究要旨

インフルエンザ経鼻ワクチンの有効性が実験的に確認されており、その開発が進められている。その開発の鍵を握っている経鼻投与でのワクチン・アジュバンドの有効性、安全性を検証するために、蛍光標識、インジウム標識  $^{111}\text{In}$  法を用いて、経鼻ワクチンやアジュバンドのマウスでの副鼻腔上皮細胞、NALT、樹状細胞、中枢神経系への動態等を検討した。経鼻ワクチンとしては、テタヌストキソイド (TT)、組換えボツリヌストキシン (BoHc) 及び肺炎球菌の組換え PspA を使い、アジュバント併用型としてコレラトキシン (CT) を用いた場合と我々が開発したナノゲル型デリバリーシステムを用いて比較検討した。その結果、CT 及びナノゲルともマウス鼻腔上皮細胞上へのワクチンの保持時間の大幅延長により効果的な抗原提示を起こすことで有効な防御免疫が誘導できることが示唆された。安全性に関しては、CT、ナノゲルとも、ワクチンを嗅球に移行させることはないが、CT 自身は嗅球への移行が起こることが判明した。また  $^{18}\text{F}$ -BoHc 標識体を用いる蛋白 PET を用いて、マウス及びサルの中枢神経系を含むワクチンとアジュバントとの動態を試験した。その結果、経鼻ワクチンとしてマウスとサルで有効な BoHc ワクチンは、マウスとサルの中枢神経系への動態も認められず、安全性の高いワクチンであることが証明でき、ワクチンの動態において PET/MRI の有効性を示すことができた。さらに、インフルエンザとの混合感染としても問題となる肺炎球菌に関して、そのワクチン候補抗原である PspA に関して同様な結果を得る事が出来た。

### A. 研究目的

インフルエンザ経鼻ワクチン開発へ向けての理論・技術的基盤を構築するのが大きな目的ある。経鼻ワクチン投与での防御免疫誘導効果と安全性を検証するために、経鼻ワクチンとしてテタヌストキソイド (TT)、組換えボツリヌストキシンワクチン (BoHc) 及び肺炎球菌の組換え PspA を使い、アジュバント併用型としてコレラトキシン (CT) を用いた場合と我々が開発したナノゲル型デリバリーシステムを用いて比較検討した。

### B. 研究方法

経鼻ワクチンを必要に応じて、FITC または TRITC 蛍光標識、インジウム  $^{111}\text{In}$  標識、 $^{18}\text{F}$  標識法による PET/MRI 解析により、経鼻投与後の鼻腔上皮細胞への吸着、取り込み、さらに樹状細胞への取り込みの追跡を行うと同時に、嗅覚神経、嗅球、脳への蓄積等をマウス及びサルを用いて検討した。また経鼻ワクチンとしてテタヌストキソイド (TT)、組換えボツリヌストキシン (BoHc) 及び肺炎球菌の組換え PspA を用いた場合のワクチン効果は、ワクチン特異的血清抗体、鼻腔洗浄液及び気管支洗浄液中のワクチン特異的

抗体を測定、ボツリヌストキシンワクチンに関しては毒素攻撃による防御免疫、中和抗体価を、肺炎球菌 PspA ワクチンについては、蛍光標識肺炎球菌を用いた攻撃試験で、防御免疫、中和抗体価を評価した。

#### (倫理面への配慮)

本研究の目的のために実施される動物実験計画は、東京大学医科学研究所、医薬基盤研霊長類センター、浜松ホトニクスPETセンターの動物実験委員会への申請をもとに、倫理面を含む審査・承認を受けた。また、本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第71号 平成18年6月1日)に基づく研究施設の動物実験ガイドラインに則り、動物の保定法・麻酔の方法・接種法・飼育観察法など、実験動物に対する苦痛を可能な限り軽減できる方法で実施した。

### C. 研究結果

1) テタヌストキソイド (TT) の経鼻投与  
TTをCTと経鼻投与することで、有効な防御免疫が誘導でき、CTのアジュバントとしての免疫担当細胞への関与(例: T細胞, 樹状細胞)等が知られていたが(Yamamoto et al., PNAS 94: 5267, 1997; Yamamoto, et al., J. Immunol. 162: 7015, 1999)、今回我々は <sup>111</sup>In-TT にCTを加えて投与することで、TTは嗅球には移行しないが、マウス鼻腔上皮細胞上へのTTの保持時間の大幅に延長することを確認した。CTのこの効果は、M細胞が存在し粘膜免疫誘導に中心的役割を果たしていると考えられるNALTへの持続保持には効果がなかった。またよく知られているように(van Ginkel et al., J. Immunol. 165: 4778, 2000)、本実験においてもCT自身は嗅球への移行を示した。

ちなみにCTを経鼻投与ではなく、腹腔内に投与した場合は嗅球への移行はなかった。嗅球への移行によりCTが嗅覚神経系にどんな作用を与えているかについては今後の課題である。

#### 2) ナノゲル型ボツリヌストキシンワクチン (BoHc) 及び肺炎球菌の組換え PspA 経鼻ワクチン

今回我々は、カチオン化コレステロールプールのナノ粒子(cCHP)に BoHc ワクチン、PspA ワクチンを封入したナノゲル化経鼻ワクチンを開発した。このワクチンの有効性を検討するために、BoHc ワクチンを FITC で蛍光標識し、TRITC で蛍光標識したナノゲルに封入した 2 重蛍光標識ワクチンを、マウスに経鼻投与して、経時的にマウス副鼻腔粘膜の組織切片をとり、FITC と TRITC の 2 つの蛍光を観察した。その結果、cCHP-BoHc はマウス副鼻腔粘膜上皮細胞に長時間にわたって観察され、CTアジュバントとTTワクチンの併用で観察された鼻腔上皮細胞へのワクチンの長時間の保持効果が観察された。また、すでに投与 1 時間あたりから上皮細胞に取り込まれていき、6 時間あたりからナノゲルから BoHc 分子が遊離していることが確認された。

ナノゲルは蛋白分子をナノゲル内に取り込み、安定化し、それを遊離することのできる人工シャペロン活性を持っている (Y. Sasaki, K. Akiyoshi The Chemical Record 10: 366, 2010)。組織学的観察により、さらにその上皮細胞の下層の基底膜直下で、BoHc は樹状細胞 (DC) に取り込まれている様子を可視化した。そこで、我々はこの部分の細胞を集めて、FACS で解析したところ、ナノゲル化することで CD11c<sup>+</sup>DC の約 40% が BoHc を取り込んでいることを確認した。ナノゲル化した BoHc ワクチンは NALT からの取り込みも観察されたが、むしろ副鼻腔粘膜上皮細胞層からの取り

込みが顕著であった。

次には実際にマウスに cCHP-BoHc の経鼻免疫を実施した。1 週間間隔で 3 回免疫し、免疫ごとに血清をとり、最終免疫 1 週間後に鼻洗浄液を集め抗原特異的抗体価を測定した。cCHP-BoHc ナノゲル投与群は、BoHc 単独投与群に比して、抗原特異的な血清 IgG 抗体を加えて、鼻粘膜での抗原特異的 IgA 抗体も高い値を示した。こうして免疫されたマウスは全身系及び経鼻でのボツリヌス A 型毒素攻撃にも完全な防御効果を示した。(Nochi et al., *Nat. Mater.* 9:572-578, 2010).

肺炎球菌ワクチンに関して同様にナノゲル化して、経鼻ワクチンとして有効であることを証明することもできた。マウスに経鼻免疫を 1 週間隔で 3 回経鼻免疫した場合、cCHP-PspA ナノゲル投与群は、PspA 単独投与群に比して、抗原特異的な血清 IgG 抗体に加えて、鼻粘膜での抗原特異的 IgA 抗体も高い値を示した。こうして免疫されたマウスは経鼻投与での肺炎球菌攻撃試験で cCHP-PspA ナノゲル投与群は完全な防御効果を示した。さらに、肺炎球菌ワクチンに関して同様にナノゲル化して、経鼻ワクチンとして有効であることを蛍光標識した肺炎球菌を用いた肺での菌増殖抑制効果によっても証明することができた。また  $^{111}\text{In}$ -PspA をナノゲル化して、マウスに経鼻投与することで、鼻腔上皮細胞（呼吸上皮細胞及び嗅覚上皮細胞）に長時間保持されるが確認され、 $^{111}\text{In}$ -PspA の嗅球への移行は観察されなかった (Kong et al., *Infect. Immun.* in press, 2013)。以上 cCHP ナノゲルは経鼻ワクチンの DDS として極めて有用であることが判明した。

### 3) サルを使った BoHc ワクチン $^{18}\text{F}$ -標識 PET での解析

BoHc ワクチンはナノゲル化しなくても、サル

に経鼻投与することで、ワクチン特異的血清 IgG 抗体、鼻洗浄液にワクチン特異的 IgA 抗体を誘導でき、毒素特異的中和抗体価及び毒素攻撃に対する防御免疫が出来ることが判明した (Yuki et al., *J. Immunol.*185:5436, 2010)。PET をもちいるイメージング技術を用いて、 $^{18}\text{F}$ -BoHc をアカゲザルに投与し、その中枢神経系への挙動を 6 時間連続 PET で解析した。動物用 PET はマウスやラットは全身をスキャンできる装置が開発されているが、サル等の大型動物では頭部を調べる装置しか現行では使用できない。サルの場合は MRI 画像上で直接中枢神経系への挙動を確認したが、嗅球及び脳への蓄積は認められなかった。

さらに 6 時間後、確認のため各臓器を摘出し、臓器ごとの  $^{18}\text{F}$  を計測したが、サルの場合も、鼻腔、食道、胃、腸、尿に  $^{18}\text{F}$  が計測され、尿で観測された  $^{18}\text{F}$  は低分子化合物であった。サルに経鼻投与された  $^{18}\text{F}$ -BoHc もマウスと同様に鼻腔では徐々に鼻腔上皮細胞に取り込まれるが、嗅球と中枢神経には貯留は認められず、その一部は食道、胃、腸に運ばれ、 $^{18}\text{F}$ -Lys まで分解され、腸で血中に取り込まれて急速に膀胱、尿へと排出されていると考えられた。(Yuki et al., *J. Immunol.*185:5436, 2010)。

### D. 考察

FITC または TRITC 蛍光標識、インジュウム  $^{111}\text{In}$  標識、 $^{18}\text{F}$  標識法による PET/MRI 解析を用いて、TT、BoHc、PspA をワクチン抗原とした経鼻ワクチンの効果と安全性について試験した。その結果、経鼻ワクチンの投与に関して鼻腔上皮細胞への長時間の滞留、吸着が抗原特異的免疫誘導において重要であることが強く示唆された。従来から経鼻ワクチンの免疫誘導には NALT が重要であることがわかっていたが、それに加えて、副鼻

腔粘膜上皮細胞からの抗原取り込みの関与も重要であることが示唆された。この点に関して、我々は、NALT と別にマウス鼻腔甲介上皮細胞層の絨毛上皮部分にM細胞様の抗原取り込み細胞を発見し、呼吸系M細胞と名づけたが (Kim et al., J. Immunol. 186:4253, 2011)、この細胞を通して効率的な抗原の取り込みが起こっている可能性も示唆される。このことは、NALT に並んで副鼻腔上皮細胞への抗原のデリバリーが経鼻ワクチンの有効性に重要であることを示している。

安全性の観点から、経鼻ワクチン用アジュバント及び DDS システムの開発において、鼻腔の呼吸上皮細胞への抗原の的確な送達と、その際に嗅覚上皮細胞から、嗅球、大脳へのワクチンやアジュバントの移行やその影響阻止を確認するシステムの確立が重要であると考えられた。この点に関して、今回は、我々は古典的な  $^{111}\text{In}$  や  $^{125}\text{I}$  の代わりに、 $^{18}\text{F}$ -PET を用いるイメージング技術を用いて解析する技術を開発した。PET を用いることで、経鼻ワクチンの挙動をマウス等の小動物のみならず、サル等の大動物においても効果的に脳内移行を含めて有益な情報がリアルタイムで得られ、かつ非侵襲的繰り返し同一動物を使用できる点で、動物試験にもちいる個体数を激減させることができると考えられ、経済的かつ動物愛護の観点からも極めて有用だと考えられる。

## E. 結論

FITC または TRITC 蛍光標識、インジュウム  $^{111}\text{In}$  標識、 $^{18}\text{F}$  標識による PET/MRI 解析を用いて経鼻ワクチンの効果と安全性を各種ワクチン抗原を使って評価することができた。

## F. 健康危機情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Malamut G, El Machhour R, Montcuquet N, Martin-Lannerée S, Dusanter-Fourt I, Verkarre V, Mention JJ, Rahmi G, Kiyono H, Butz EA, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Meresse B. IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. J. Clin. Invest. 120(6):2131-43, 2010

○ Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong IG, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. Nat. Mater. 9(7):572-8, 2010

Omoe K, Nunomura W, Kato H, Li ZJ, Igarashi O, Araake M, Sano K, Ono HK, Abe Y, Hu DL, Nakane A, Kiyono H, Takakuwa Y, Shinagawa K, Uchiyama T, Imanishi K. High affinity of interaction between superantigen and T cell receptor Vbeta molecules induces a high level and prolonged expansion of superantigen-reactive CD4+ T cells. J. Biol. Chem. 285(40):30427-35, 2010

Takahashi I, Fujihashi K, Kiyono H. Mucosal regulatory cells in the gastrointestinal tract and



periodontium. *Periodontol.* 2000 54(1):247-56  
2010

Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Arita S, Katayama K, Nomura T, Yoshikawa T, Kubota-Koketsu R, Ikuta K, Okamoto S, Mori Y, Kunisawa J, Kiyono H, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J. Virol.* 84(24):12703-12, 2010

○ Yuki Y, Nochi T, Harada N, Katakai Y, Shibata H, Mejima M, Kohda T, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Ono F, Kozaki S, Terao K, Tsukada H, Kiyono H. In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates. *J. Immunol.* 185(9):5436-43, 2010

Terahara K, Nochi T, Yoshida M, Takahashi Y, Goto Y, Hatai H, Kurokawa S, Jang MH, Kweon MN, Domino SE, Hiroi T, Yuki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi K, Kiyono H. Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404(3):822-8, 2011

Kunisawa J, Kiyono H. Peaceful mutualism in the gut: revealing key commensal bacteria for the creation and maintenance of immunological homeostasis. *Cell Host Microbe* 9(2):83-4, 2011

Goto Y, Kiyono H. Epithelial cell microRNAs in gut immunity. *Nat. Immunol.* 12(3):195-7, 2011

○ Kim DY, Sato A, Fukuyama S, Sagara H, Nagatake T, Kong IG, Goda K, Nochi T, Kunisawa J, Sato S, Yokota Y, Lee CH, Kiyono

H. The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J. Immunol.* 186(7):4253-62, 2011

Ogawa M, Yoshikawa Y, Kobayashi T, Mimuro H, Fukumatsu M, Kiga K, Piao Z, Ashida H, Yoshida M, Kakuta S, Koyama T, Goto Y, Nagatake T, Nagai S, Kiyono H, Kawalec M, Reichhart JM, Sasakawa C. A Tecpr1-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 9(5):376-89, 2011

Yamamoto M, Pascual DW, Kiyono H. M cell-targeted mucosal vaccine strategies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 354:39-52, 2012

Burggraf M, Nakajima-Adachi H, Hachimura S, Ilchmann A, Pemberton AD, Kiyono H, Vieths S, Toda M. Oral tolerance induction does not resolve gastrointestinal inflammation in a mouse model of food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* 55(10):1475-83, 2011

Kunisawa J, Kurashima Y, Kiyono H. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64(6):523-30, 2011

Stappenbeck T, Kiyono H. Host pathogens. Editorial overview. *Curr. Opin. Immunol.* 23(4):445-7, 2011

Kim SH, Jung DI, Yang IY, Kim J, Lee KY,

- Nochi T, Kiyono H, Jang YS. M cells expressing the complement C5a receptor are efficient targets for mucosal vaccine delivery. *Eur. J. Immunol.* 41(11):3219-29, 2011
- Goto Y, Kiyono H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol. Rev.* 245(1):147-63, 2012
- Kim DY, Fukuyama S, Nagatake T, Takamura K, Kong IG, Yokota Y, Lee CH, Kiyono H. Implications of nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in the development of allergic responses in an allergic rhinitis mouse model. *Allergy* 67(4):502-9, 2012
- Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, Koseki H, Ohara O, Saito T, Taniguchi S, Shultz LD, Ishikawa F. Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood* 119(12):2768-77, 2012
- Kunisawa J, Hashimoto E, Ishikawa I, Kiyono H. A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 7(2):e32094, 2012
- Fukuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, Gilbert RS, McGhee JR, Yuki Y, Kiyono H, Fujihashi K. Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert Rev. Vaccines* 11(3):367-79, 2012
- Sato S, Kiyono H. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr. Opin. Virol.* 2(3):225-32, 2012
- Yuki Y, Mejima M, Kurokawa S, Hiroiwa T, Kong IG, Kuroda M, Takahashi Y, Nochi T, Tokuhara D, Kohda T, Kozaki S, Kiyono H. RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine. *Vaccine* 30(28):4160-6, 2012
- Kunisawa J, Kiyono H. *Alcaligenes* is Commensal Bacteria Habituating in the Gut-Associated Lymphoid Tissue for the Regulation of Intestinal IgA Responses. *Front. Immunol.* 3:65, 2012
- Tanaka S, Saito Y, Kunisawa J, Kurashima Y, Wake T, Suzuki N, Shultz LD, Kiyono H, Ishikawa F. Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2ryKO mice. *J. Immunol.* 188(12):6145-55, 2012
- Kunisawa J, Kiyono H. Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the intestine. *Nutrients* 4(3):154-66, 2012
- Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, Shibata N,

- Grunberg S, Sinha R, Zahm AM, Tardif MR, Sathaliyawala T, Kubota M, Farber DL, Collman RG, Shaked A, Fouser LA, Weiner DB, Tessier PA, Friedman JR, Kiyono H, Bushman FD, Chang KM, Artis D. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 336(6086):1321-5, 2012
- Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, Tsuji NM, Kiyono H, Ma JS, Kusu T, Okumura R, Hara H, Yoshida H, Yamamoto M, Nomoto K, Takeda K. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* 8(5):e1002714, 2012
- Shibata T, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuchamy T, Izawa K, Li X, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Kunisawa J, Kiyono H, Akira S, Kitamura T, Kitaura J, Uematsu S, Miyake K. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. *Int. Immunol.* 24(10):613-23, 2012
- Kinoshita M, Kayama H, Kusu T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, Sakaguchi S, Takeda K. Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon. *J. Immunol.* 189(6):2869-78, 2012
- Kunisawa J, Kiyono H. Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Drug Discov. Today* 18(1-2):87-92, 2013
- Kumagai T, Kiyono H. Summary for symposium I on the development of a more efficacious influenza vaccine held at the 15th Annual Meeting of the Japanese Society for Vaccinology, Tokyo, 2011. *Vaccine* 30(44):6338-9, 2012
- Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat. Commun.* 3:1034, 2012
- Nakajima-Adachi H, Koike E, Totsuka M, Hiraide E, Wakatsuki Y, Kiyono H, Hachimura S. Two distinct epitopes on the ovalbumin 323-339 peptide differentiating CD4 T cells into the Th2 or Th1 phenotype. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(10):1979-81, 2012
- Sato S, Kaneto S, Shibata N, Takahashi Y, Okura H, Yuki Y, Kunisawa J, Kiyono H. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* in press, 2013
- Kusu T, Kayama H, Kinoshita M, Jeon SG, Ueda Y, Goto Y, Okumura R, Saiga H, Kurakawa T, Ikeda K, Maeda Y, Nishimura J, Arima Y, Atarashi K, Honda K, Murakami M, Kunisawa J, Kiyono H, Okumura M, Yamamoto

M, Takeda K. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine. *J. Immunol.* 190(2):774-83, 2013

○ Kong IG, Sato A, Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kurokawa S, Okada K, Sato S, Briles D, Kunisawa J, Inoue Y, Yamamoto M, Akiyoshi K, and Kiyono H. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Pneumococcus*. *Infect. Immun.* in press, 2013

## 2. 学会発表 国外

Kiyono H. Modern Mucosal Vaccine Adjuvants & Microbicides 2010, Invited Lecture, “MucoRice and MucoNanogel: New Horizon for the Development of Mucosal Vaccines”, Dublin, Ireland. April 2010

Kiyono H. The 10<sup>th</sup> International Advanced Course on Vaccinology in Asia Pacific Region, Invited Lecture, “Basic Principles of Immune Responses: Innate versus Adaptive Immunity”, Seoul, Korea. May 2010

Kiyono H. Pasteur-Areva Immunology Course Anti-Viral Immunity, Invited Lecture on “Mucosal Immunity in the Control of Infectious Diseases”, Shanghai, China. May 2010

Kiyono H. 7<sup>th</sup> World Congress on Vaccines Immunisation, and Immunotherapy, Invited Speaker, “MucoRice: New Horizon for the Development of Cold-chain Free Oral Vaccine”, Berlin, Germany. May 2010

Kiyono H. The 17<sup>th</sup> East Asia Joint and 9<sup>th</sup> Cross-Strait Symposium on Biomedical Research, Invited Lecture on “Cold-chain and Needle-free Vaccine MucoRice-CTB Induces Secretory IgA Mediated Cross Protection against *Vibrio cholera* and enterotoxigenic *Escherichia coli* caused Diarrheal Diseases”, Taipei, Taiwan. July 2010

Kiyono H. The 40<sup>th</sup> Annual Meeting DGF German Society for Immunology, Invited Lecture on “Intra-tissue Habitation of Intestinal Opportunistic Bacteria in Mammalian Gut-associated Lymphoid Tissues for the Creation of a Mucosal Antibody-mediated Symbiosis”, Leipzig, Germany. September 2010

Kiyono H. The 8<sup>th</sup> German-Japanese International Symposium, Regulation of Immune Response and Diseases, Invited Speaker, “Intra-Tissue Habitation of Commensal Bacteria in Peyer’s patches for Gut Immunity”, Cuxhagen, Germany. September 2010

Kiyono H. The 4<sup>th</sup> Vaccine and ISV Annual Global Congress, Invited Speaker, “Mucosal Nanogel-based Chaperon Vaccine for the

Induction of Protective Immunity”, Vienna, Austria. September 2010

Kiyono H. International Conference on Molecular Farming: Promises and Challenges, Invited Speaker, “Span and Spick in the Development of Mucosal Vaccine: MucoRice and Nanogel-based Vaccine for Induction of Protective Immunity”, Seoul, Korea. January 2011

Kiyono H. The 15<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology, Invited Speaker, “The Mucosal Gateway System for Antigen-sampling and Homeostatic Niche”, Paris, France. July 2011

Kiyono H. The 6<sup>th</sup> Annual International Symposium in Institute of Dermatological Science (IDS), Invited Speaker, “Mucosal Decisions of Mutualism and Elimination for Surface barrier system”, Seoul, Korea. February 2012

Kiyono H. Gordon Research Conferences: Glycolipid & Sphingolipid Biology, Invited Speaker, “Role of glycolipid/S1P in the regulation of mucosal immunity”, Lucca, Italy. April 2012

Kiyono H. Molecular Immunology & Immunogenetics Congress 2012, Invited Speaker, “MucoRice: Rice-based Oral Vaccine Development”, Antalya, Turkey. April 2012

Kiyono H. The 4<sup>th</sup> Microbial Pathogenesis & Immunity Symposium, Invited Speaker, “Mucosal Innate Immune System for Mutualism, Inflammation and Elimination”, Seoul, Korea. May 2012

Kiyono H. The 10<sup>th</sup> International Congress on Plant Molecular Biology, Invited Speaker, “MucoRice: Fusion of Mucosal immunology and plant biology led to the development of rice-based oral vaccine”, Jeju, Korea. October 2012

Kiyono H. The 35<sup>th</sup> General Meeting of Turkish Society of Microbiology, Invited Speaker, “Span and Spick in Intestinal Immunity: From Mucosal Homeostasis to Vaccine Development”, Izmir, Turkey. November 2012

Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kataoka N, Kong IG, Sato A, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H: Nanogel antigen delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. Baltimore, USA (2010)

Yuki Y, Nochi T, Harada N, Katakai Y, Shibata H, Mejima M, Kohda T, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Ono F, Kazaki S, Terao K, Tsukada H, Kiyono H: In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine. The 3<sup>rd</sup> World Congress of Vaccine. Beijing, China (2011).

Yuki Y, Nochi T, Harada N, Katakai Y, Mejima M, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Shibata H, Kohda T, Kozaki S, Tsukada H, Kiyono H: In vivo molecular imaging for a nasal botulism vaccine in mice and nonhuman primates. The American Association of Immunologists (AAI) San Francisco, USA (2011)

Kong IG, Yuki Y, Sato-Kimura A, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kurokawa S, Tokuhara D, Okada K, Sato S, Briles D, Akiyoshi K, Kiyono H: Nanogel based adjuvant-free Pneumococcal nasal vaccine induces protective immunity against Pneumococcus. International congress of Mucosal Immunology (ICMI) Paris, France (2011)

Yuki Y, Nochi T, Harada N, Katakai Y, Tsukada H, Kiyono H. In vivo molecular imaging for a nasal botulism vaccine in mice and nonhuman primates. Vaccine and ISV Annual Global Congress, Seattle, USA (2011)

Yuki Y, Kong IG, Sato A, Nochi T, Mejima M, Kurokawa S, Hiroiwa T, Fukuyama Y, Sawada S, Takahashi H, Akiyoshi K, Kiyono H: Adjuvant-free nanogel-based PspA nasal vaccine for the induction of protective immunity against Pneumococcus. The American Association of Immunologists (AAI) Boston, USA (2012)

国内

Kiyono H. The 6<sup>th</sup> Hokkaido Cancer Immunotherapy Conference, Invited Speaker, “New Strategy of Mucosal Immunity-based Vaccine”, Sapporo, Japan. June 2010

Kiyono H. The 44<sup>th</sup> US-Japan Medicine Program, Virus Diseases Panel, Symposium on Reduced Uptake of Oral Vaccines in the Tropics from the Perspective of Mucosal Immunology, Invited Lecture, “MucoRice and MucoNanogel: New Generation of Mucosal Vaccine”, Sapporo, Japan. June 2010

Kiyono H. The 7<sup>th</sup> International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways, Luncheon Lecture Chairperson, Hokkaido, Japan. July 2010

Kiyono H. The 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Immunology in the 21<sup>st</sup> Century: Defeating Infection, Autoimmunity, Allergy and Cancer, Invited Speaker, “Mucosal Immunology for New Generation of Needle/Syringe- and Cold Chain-free Vaccine”, Kobe, Japan. August 2010

Kiyono H. The 10<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity and United States-Japan Cooperative Medical Science Program 23<sup>rd</sup> Joint Meeting of the AIDS Panel and Immunology Panel, Invited Speaker, “Mucosal Chaperoning Nanogel Vaccine for the Induction of Protective Immunity”, Awaji, Japan. September 2010

Kiyono H. Vaccine Forum 2010 on the Development of New Vaccine from Japan, Invited Speaker, “Recent Progress on Mucosal Vaccine Delivery and Adjuvant”, Shinjuku, Japan. September 2010

Kiyono H. The 52<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology, Plenary Lecture on “The Mucosal Immune System: From Gut Symbiosis to Vaccine Development”, Tokyo, Japan. September 2010

Kiyono H. The 13<sup>th</sup> Human Science Foundation Research Workshop on Future Direction for Vaccine Development, Invited Lecture on “Surface Barrier System for the Development of Mucosal Vaccine”, Tokyo, Japan. November 2010

Kiyono H. The 28<sup>th</sup> General Conference of the Japanese Association of Medical Science, Co-Chairman, the Session of “Gastrointestinal Immunity: Symbiosis and Immunity”, Invited Speaker, “Mucosal Vaccine as the New Generation of Vaccine”, Tokyo, Japan. April 2011

Kiyono H. The 23<sup>rd</sup> Annual Spring Meeting of Japanese Association of Allergyology, Keynote Lecture on “Gut Microbiota and Mucosal Immunity: Elucidation of Cellular and Molecular Mechanisms of Symbiosis”, Chiba, Japan. May 2011

Kiyono H. International Union of

Microbiological Societies 2011, Invited Speaker, Unveiling the Symbiosis with Intestinal Microbiota Session, “The Beginning of Symbiosis”, Sapporo, Japan. September 2011

Kiyono H. Immunological Diseases and Clinical Immunology Week 2011, The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Clinical Immunology, Luncheon Educational Lecture, “Intestinal Symbiosis and Immunity by the Mucosal Immune System”, Tokyo, Japan. September 2011

Kiyono H. Immunological Diseases and Clinical Immunology Week 2011, The 14<sup>th</sup> International Rhinologic Society and 30<sup>th</sup> International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, Invited Speaker, “Mucosal Chaperoning Vaccines for Upper Respiratory Tract Infections”, Tokyo, Japan. September 2011

Kiyono H. The 38<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Plenary Speaker, “Intestinal Immune System for Microbiological Symbiosis and Vaccine Development”, Morioka, Japan. September 2011

Kiyono H. The 49<sup>th</sup> Small Intestine Research Meeting, Invited Speaker, “Governing of Gut Homeostasis and Immunity by the Mucosal Immune System”, Tokyo, Japan. November 2011

Kiyono H. The Joint Meeting of The XVII<sup>th</sup>

International Symposium on Gnotobiology and The XXXIV<sup>th</sup> Congress of the Society of Microbial Ecology and Disease, Invited Speaker, “Mucosal Decisions for Immunity to Co-habitation of Microflora”, Yokohama, Japan. November 2011

Kiyono H. 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, International Symposium on “HIV and Mucosal Immunity” Invited Speaker, “Spick-and-Span for the Development of MucoRice and Nanoantibody for the Control of Viral and Bacterial Infection”, Tokyo, Japan. December 2011

Kiyono H. The 30<sup>th</sup> Shinshu Immunology and Allergy Meeting, Plenary Lecture on “New Outlook of Mucosal Immunology: Gut Immunity and Homeostasis”, Nagano, Japan. December 2011

Kiyono H. The 4<sup>th</sup> International Symposium on Immunological Self, Session Chair and Invited Speaker, Session 3 “Lymphoid Organs and Mucosal Immunity”, Kyoto, Japan. January 2012

Kiyono H. The 4<sup>th</sup> Tokyo Host Defecation Research Meeting, Plenary Lecture on “Uniqueness of the Mucosal Immune System for the Development of Oral Vaccine”, Tokyo, Japan. February 2012

Kiyono H. The 85<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Bacteriology, Invited Speaker, “Mucosal Decisions of Mutualism and

Elimination at Epithelial Barrier”, Nagasaki, Japan. March 2012

Kiyono H. The 85<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Physiology, Invited Speaker, “The Mucosal Immune System for the Development of New Generation Vaccine”, Matsumoto, Japan. March 2012

Kiyono H. The Joint Symposium of the 7<sup>th</sup> International Symposium of the Institute Network, Invited Speaker, “Mucosal decisions for mutualism, inflammation and elimination”, Sendai, Japan. June 2012

清野宏. 第12回日本抗加齢医学会総会、招待講演者、基礎科学 5:腸内フローラ”粘膜免疫による腸内細菌共生制御機構”、横浜、2012年6月

Kiyono H. The 19<sup>th</sup> East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Invited Speaker, “Molecular Understanding for Physiology and Pathology”, “Mucosal integrated immunological seesaw between mutualization and elimination in the intestine.”, Seoul, Korea. August 2012

清野宏. 第5回日本口腔検査学会総会・学術集会、招待講演者、“粘膜免疫：口腔から始まる最大の免疫システム”、東京、2012年8月

Kiyono H. STS Forum 9<sup>th</sup> Annual Meeting, Session B, Invited Speaker, Mucosal Vaccine for the Control of Infectious Diseases, Kyoto, Japan. October 2012



Kiyono H. The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health, Invited Speaker, Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, “Spick-and-span in mucosal vaccine development”, Sapporo, Japan. October 2012

清野宏. あいちサイエンスフェスティバル 2012 市民向け講演会「先端科学技術と社会」, 招待講演者、“未知との遭遇：腸という最大の免疫システム”, 名古屋、2012年10月

Kiyono H. IEIIS 2012 Homeostatic Inflammation Symposium, Invited Speaker, “Mucosal integrated immunological seesaw between physiological and pathological inflammation”, Tokyo, Japan. October 2012

Kiyono H. The 16th Annual Meeting of The Japanese Society for Vaccinology, President, Yokohama, Japan. November 2012

清野宏. ポスト日本ワクチン学会シンポジウム・サテライトシンポジウム「次世代感染症ワクチンの開発をめざして」, 招待講演者、“粘膜ワクチン開発へ向けて最先端研究の動向”, 東京、2012年11月

清野宏. 第41回日本免疫学会学術集会, 招待講演者、トークレビュー：粘膜免疫最近の展開, 神戸、2012年12月

清野宏. 第14回神田川腎セミナー, 招待講演者、粘膜免疫による共生と排除の統合的制御, 東京、2013年1月

Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, T Kohda, Harada N, Kataoka N, Kong IG, Sato A, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H: Exploit of Novel Delivery System with Nanogel for Development of Adjuvant-Free Nasal Vaccine. International Conference of Immunology, Kobe. Japan (2010)

幸 義和、野地智法、秋吉一成、清野 宏：アジュバント不要ナノゲル型経鼻ワクチンの開発。日本ワクチン学会 東京 (2010)

幸 義和、清野 宏：経鼻ワクチンの安全性：マウスおよびサルに経鼻投与されたワクチンのリアルタイム分子イメージング。日本ワクチン学会 東京 (2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
1. 特許取得

Akiyoshi K, Kiyono H, Yuki Y, Nochi T. Mucosal vaccine using cationic nanogel Serial #13/126,357 PCT/JP2009/068647 (2011/04/27) 米国

Akiyoshi K, Kiyono H, Yuki Y, Nochi T. Mucosal vaccine using cationic nanogel Serial # 09823688.8 (2011/07/20) ヨーロッパ

幸 義和、野地 智法、秋吉一成、清野 宏：ナノゲルを用いる粘膜ワクチン (出願日 2008/10/31) 特開 2010-105968 日本

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

課題2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性と安全性における相違点の理論基盤構築

課題3. ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用

「経鼻インフルエンザワクチンの有効性と安全性の理論基盤構築に関する研究」

分担研究者：長谷川 秀樹(国立感染症研究所 感染病理部)

協力研究者：相内 章(国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター)

鈴木 忠樹(国立感染症研究所 感染病理部)

**研究要旨:**経鼻インフルエンザワクチンの有効性の科学的根拠を示す目的で高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 の不活化全粒子ワクチンを用いカニクイザルを用いその免疫応答、感染防御能、clade の異なる株に対する交叉防御能を調べた。経鼻ワクチンにより誘導された抗体が約1年以上持続し感染防御効果が有ること、clade の異なるワクチン株でブースター効果が有ることが示された。また、インフルエンザワクチン接種において、接種者のインフルエンザウイルス感染歴やワクチン接種歴が、誘導される免疫応答に影響を及ぼす可能性がある。そこで、感染歴あるいはワクチン接種歴を有するマウスに経鼻投与型ワクチン接種を施し、誘導される抗体応答を検討した。その結果、ウイルス感染のみで誘導される気道粘膜上 IgA 抗体はその後のウイルス感染阻止には不十分であり、感染歴に加えて全粒子不活化ワクチンの追加接種がウイルスの感染防御に効果的であることが明らかになった。経鼻ワクチン接種は皮下ワクチン接種と比較した場合、抗原性の異なるウイルス感染による基礎免疫を有する個体においても、攻撃ウイルスの増殖を抑える効果が高いことが明らかになった。

#### A. 研究目的

注射によるインフルエンザワクチンに比較し粘膜免疫を誘導する経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンは感染防御効果、交叉防御効果に優れている事が知られている。本研究においてはヒトに近い免疫系を持つカニクイザルを用い高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 に対する経鼻ワクチンによるインフルエンザウイルスの感染防御には感染の場である粘膜における免疫誘導の有効性を調べる事を目的とする。

経鼻インフルエンザワクチンにおいて、既存の基礎免疫が及ぼす影響は現在明らかになっ

ていない。そこで本研究では、経鼻あるいは注射によるワクチン接種により基礎免疫を構築したマウスに対して、改めてインフルエンザワクチンの接種を行い、誘導される抗体応答に対して基礎免疫が与える影響を検討した。

#### B. 研究方法

カニクイザルを用いた有効性の研究

##### 1) ワクチン株

ワクチンは不活化全粒子 A 型インフルエンザワクチン (H5N1 株) (PR8-IBCDC-RG2 株、NIBRG-14 : A/Indo/5/2005 (H5N1) 及び A/Vietnam/1194/04 の弱毒株) を抗原とし、50  $\mu$ g HA/mL を含むも、アジュバントとして

Ampligen を HA 抗原の 20 倍量(1mg/mL)添加するとともに、増粘剤として CVP 基剤を添加した。

## 2) 動物

3~4 歳、体重 2, 130~4, 180g のカニクイザル *cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)* を用いた。カニクイザルはいずれもつくば霊長類センターで繁殖され国立感染症研究の実験動物委員会の研究所における動物使用に関するガイドラインに従って飼育された動物を用いた。これらのサルを非免疫群とそれぞれの用量別免疫群に分けて 1 群 3 頭を用いて実験を行った。H5N1 ウイルスの感染実験は BSL3 実験室で行った。

## 3) ウイルス

A/Indonesia/6/2005 (H5N1) 及び A/Vietnam/1194/04 (H5N1) を使用した。それぞれ致死性の H5N1 インフルエンザ感染者から分離され 10 日齢の孵化鶏卵で増殖したものを使用した。

## 4) ウイルス価及び抗体価の測定

ウイルス価及び抗体価測定の為カニクイザルから血清を採取した。IgA 抗体及び IgG 抗体の抗体価は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて測定した。ウイルス価は MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法で測定した。

## 5) 粘膜アジュバント

経鼻投与の粘膜アジュバントとして合成二本鎖 PolyI:PolyC<sub>12</sub>U (Ampligen®) は Hemispherx Biopharma (Philadelphia, PA) より分与された。

## 6) ワクチン接種

カニクイザルはケタミン(0.1 ml/kg)により麻酔し 45 µg HA の不活化全粒子 A 型インフルエン

ザワクチン (H5N1 株) (PR8-IBCDC-RG2 株 : A/Indo/5/2005 (H5N1) の弱毒株) を 10 倍量及び 20 倍量のアジュバント及び CVP 基材と共に経鼻噴霧した。

## 7) 採血と血算

ワクチンの経鼻接種後 2 週間目の非感染時から攻撃感染後経時的に採血し抗体価を測定した。

## マウスを用いた研究

### 1) マウス

6~8 週齢、雌の BALB/c マウスを一群 5 匹を使用。動物への処置は国立感染症研究所の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

### 2) ウイルスおよびワクチン

A/Puerto Rico/8/34 (PR8 株、H1N1)、およびマウス馴化新型インフルエンザウイルス A/Narita/1/09 (Narita 株、(H1N1)pdm09) を用いた。また、全粒子不活化ワクチンとして、ホルマリンによる不活化処理を行った Narita 株を用いた。

### 3) ウイルス感染とワクチン接種

PR8 株、Narita 株、あるいは Narita 株全粒子不活化ワクチンの接種を行った。マウス 1 匹あたり、ウイルス感染は 1000 pfu、ワクチン接種は総タンパク量 1 µg を接種した。3 週間後に、Narita 株の全粒子不活化ワクチンの接種を同様の方法により行った。

### 4) 攻撃ウイルス感染と採材

Narita 株全粒子不活化ワクチン 2 週後に、一匹あたり 1000 pfu の Narita 株の感染を行った。感染は、ウイルス液を片鼻 2 µl ずつ (計 4 µl) 滴下する上気道感染モデルにて行った。感染 3