リポソームを応用した経口ワクチンの開発

—経口投与可能なリポソームによる免疫応答—

韓 梅^{*1)}, 渡来 仁^{*2)}, 保田立二^{*1)}, 児玉 洋^{*2)}

Application of liposomes for development of oral vaccines: Stability of liposomes in vitro, and the serum and intestinal humoral immune responses of mice to orally administered antigen in liposomes

To evaluate the usefulness of liposomes as oral vaccines, the stability of liposomes, and the serum and intestinal IgA antibody responses to antigen associated with liposomes after oral administration were examined.

In the liposomes tested, liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS), and cholesterol (Chol) (1:1:2, molar ratio), distearoylphosphatidylcholine (DSPC) and Chol (7:2, molar ratio), and DSPC, DPPS, and Chol (7:3:2 or 1:1:2, molar ratio) were stable in acidic solution (pH 2.0), bile, and pancreatin solution. After the oral immunization of antigen (ganglioside GM1)-containing liposomes composed of DPPC, DPPS, and Chol (1:1:2, molar ratio) to mice, the serum and intestinal IgA antibody responses against ganglioside GM1 were found. Furthermore, when monophosphoryl lipid A was incorporated into liposomes containing ganglioside GM1, further augmentation of serum IgA responses to ganglioside GM1 was observed.

On the other hand, the oral administration with liposomes composed of DPPC, Chol, and ganglioside GM1 (unstable liposomes), ganglioside GM1 mixed with liposomes composed of DPPC, DPPS and Chol, and ganglioside GM1 alone was unable to induce any detectable anti-ganglioside GM1 IgA antibody responses.

These results suggest that liposomes which showed the stability to acidic solution, bile, and pancreatin solution would serve effectively as an oral delivery vehicle for inducing mucosal immune responses.

Mei Han^{*1)}, Shinobu Watarai^{*2)},
Tatsuji Yasuda^{*1)}, Hiroshi Kodama^{*2)}

key words : liposomes, mucosal immunity,
oral administration, oral vaccine, stability

腸管は、生体が直接外界と接し、無数の病原微生物や外来抗原と直接接触する最前線である。そのため消化管粘膜は、絶えず暴露されているウイルス、細菌などの微生物、食餌性抗原、異物の侵入を阻止するために common mucosal immune system を形成し、粘膜局所において生体防御を営んでいる。その中核をなすのが、パイエル氏板などの腸管リンパ装置 (gut-associated lymphoid tissue, GALT) である。パイエル氏板は小腸にあって、一層の特殊に分化した上皮細胞層によって被覆されたリンパ小節の集合体である。パイエル氏板を被覆している上皮細胞層には、腸内抗原を積極的に取り込むM細胞があり^{1,2)}、取り込んだ抗原情報をパイエル氏板に伝達している^{3,4)}。その結果、口腔を介して侵入してきたある種の抗原物質に対し分泌型IgAが粘膜面に誘導され(粘膜免疫)、抗原物質が排除される^{1,3)}。ほとんどの感染症が粘膜を介して引き起こされることから、ワクチンを含めた効果的な予防法の手段として、分泌型IgAを中心とした粘膜免疫が重要となっている。しかしながら、抗原を経口投与することにより、腸管を含めた粘膜面に抗原特異的な分泌型IgAを誘導することは難しいのが現状である。

脂質2重層からなるリポソームは、薬剤、生体由来の物質、あるいは細菌やウイルスの抗原の

^{*1)} Department of Cell Chemistry, Institute of Cellular and Molecular Biology, Okayama University Medical School 岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設細胞工學部門

^{*2)} Laboratory of Veterinary Immunology, Department of Veterinary Science, College of Agriculture, Osaka Prefecture University 大阪府立大学農学部獣医学科獣医免疫学講座
Offprint requests to : Shinobu Watarai, Ph.D., Laboratory of Veterinary Immunology, Department of Veterinary Science, College of Agriculture, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Sakai-shi, Osaka 593

キャリアとしてよく使われている⁵⁾。特に、リポソーム内に封入された物質は、標的となる部位に到達するまで、酵素などの作用による分解から免れることができるだけでなく、それ自身にもアジュバント効果があることから、近年、経口ワクチンのキャリアならびにアジュバントとして注目されている⁶⁾。しかしながら、経口投与されたリポソームが、胃や腸管を通過する間に、分解もしくは封入抗原を放出することなくパイエル氏板に到達し、抗原提示できるかどうかについての報告はほとんどない⁷⁾。今回筆者らは、経口ワクチンとしてのリポソームの可能性を明らかにするために、経口投与可能なリポソームの脂質組成を検討するとともに、経口投与可能なリポソームにハプテン抗原であるガングリオシド GM1 を組み込み、経口投与することにより腸管粘膜の免疫系を賦活化できるかどうかを検討した。

材料と方法

(1) 脂質と試薬

ジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、コレステロール (Chol) ならびにモノホスホリリピド A (MPL) はシグマケミカル社から、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) は日本精化^(株)から、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) は日本油脂^(株)から、カルボキシフルオレセイン (CF) はコダック社から購入した。ガングリオシド GM1 ならびにパンクレアチンは和光純薬^(株)から購入した。ウシ胆汁は、と畜場から得た。

(2) マウス

BALB/c マウスは、日本チャールズ・リバー社から購入した。

(3) リポソームの作製

DPPC と Chol のモル比 7:2 (total 14.4 μmol)、DPPC、DPPS、Chol のモル比 7:3:2 (total 14.4 μmol) あるいは 1:1:2 (total 16.0 μmol)、DSPC と Chol のモル比 7:2 (total 14.4 μmol)、DSPC、DPPS、Chol のモル比 7:3:2 (total 14.4 μmol) あるいは 1:1:2 (total 16.0 μmol) からなる脂質をナシ型フラスコに取り、エ

バポレーターにより有機溶媒を除去し、脂質フィルムを作製した。その後、マーカースとして 75 mM の CF を加え、ボルテックスを行い多重層リポソーム (MLV) を作製した。これらのリポソームは安定性試験に用いた。

一方、DPPC (0.5 μmol)、DPPS (0.5 μmol)、Chol (1.0 μmol)、ガングリオシド GM1 (0.05 μmol) からなる脂質、DPPC (1.58 μmol)、Chol (0.45 μmol)、ガングリオシド GM1 (0.05 μmol) からなる脂質、DPPC (0.5 μmol)、DPPS (0.5 μmol)、Chol (1.0 μmol)、MPL (2 μg あるいは 4 μg)、ガングリオシド GM1 (0.05 μmol) からなる脂質をそれぞれナシ型フラスコに取り、上記と同様にエバポレーターにより脂質フィルムを作製した。CF の代わりに生理食塩水を封入させ、経口免疫用リポソームとした。

(4) リポソームの安定性試験

CF 入りリポソームを、Tris-HCl buffer (pH 2.0 あるいは 7.4)、10%胆汁溶液あるいは 2.8% パンクレアチン溶液と 37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、胆汁溶液あるいはパンクレアチン溶液と反応させたりポソームは、CENTRICUT mini (クラボー社) を用いて限外濾過を、Tris-HCl buffer と反応させたりポソームは遠心 (95,000 g, 4°C, 30 分) を行った。限外濾過の場合は濾過液の、遠心の場合は上清ならびに沈澱の CF 量を定量 (励起波長 490 nm、蛍光波長 520 nm で CF の濃度を測定) し、リポソームの安定性を検討した。

(5) 経口免疫

〔実験①〕 BALB/c マウスを四つのグループに分け (1 グループ 5 匹)、経口免疫を行った。

Group A: DPPC (0.5 μmol)、DPPS (0.5 μmol)、Chol (1.0 μmol)、ガングリオシド GM1 (0.05 μmol) からなるリポソームを経口投与した。

Group B: DPPC (1.58 μmol)、Chol (0.45 μmol)、ガングリオシド GM1 (0.05 μmol) からなるリポソームを経口投与した。

Group C: DPPC (0.5 μmol)、DPPS (0.5 μmol)、Chol (1.0 μmol) からなるリポソームにガ

表 1 Stability of liposomes *in vitro*

Lipid composition (molar ratio)	Leakage of CF(%)			
	pH 7.4	pH 2.0	10% bile	2.8% pancreatin
DPPC : Chol(7 : 2)	20.8±6.5	49.7±10.6	74.9±49.4	7.2±2.2
DPPC : DPPS : Chol(7 : 3 : 2)	11.7±5.1	17.5±11.4	99.9±23.3	2.7±0.1
DPPC : DPPS : Chol(1 : 1 : 2)	1.8±0.8	16.3±4.8	7.6±0.9	1.9±0.6
DSPC : Chol(7 : 2)	2.9±2.5	7.5±4.9	10.8±1.3	4.4±1.4
DSPC : DPPS : Chol(7 : 3 : 2)	0.7±0.2	15.0±11.6	3.8±0.8	11.4±2.6
DSPC : DPPS : Chol(1 : 1 : 2)	1.0±0.1	22.0±5.5	5.0±0.5	4.1±1.2

ングリオシド GM1 を混ぜて経口投与した。

Group D : ガングリオシド GM1 のみ経口投与した。

2 週間後, すべての group から採血を行った。

Group A のマウスにおいては, 採血後 1 週間目(初回免疫から 3 週間目)に同じ組成のリポソームを経口投与し, 1 週間後(初回免疫から 4 週間目)採血を行った。さらに, 2 週間後(初回免疫から 6 週間目)に採血を行うとともに, 腸液を採取した。

〔実験②〕 DPPC(0.5 μ mol), DPPS(0.5 μ mol), Chol(1.0 μ mol), MPL(2 μ g あるいは 4 μ g), ガングリオシド GM1(0.05 μ mol) からなるリポソームを BALB/c マウスに経口免疫した。2 週間後, 採血を行った。

実験①, ② においては採取された血清ならびに腸液について, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA 法)によりガングリオシド GM1 に対する IgA, IgG および IgM 型抗体の産生を調べた。

(6) ELISA 法⁹⁾

1 μ g のガングリオシド GM1 を含むエタノール溶液 10 μ l を 96 well プレート(Sumitomo MS-7896F, 住友ベークライト社)に加え, 乾燥させた。各 well に 100 μ l の 1% ウシ血清アルブミン(BSA)-PBS 溶液を加え, 37°C で 2 時間保温したのち, 0.1% Tween 20-PBS 溶液で 5 回洗浄し, 1% BSA-PBS 溶液で希釈した血清を 50 μ l 加え, 4°C で一夜反応させた。0.1% Tween 20-PBS 溶液で 5 回洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgA(PBS で 2,000 倍希釈), 抗マウス IgG(PBS で 1,000 倍希釈) あるいは抗マウス IgM(PBS で 2,000 倍希釈)を加え, 37°C 2 時間で保温した。そ

の後, 0.1% Tween 20-PBS 溶液で 5 回洗浄し, 50 μ l の基質溶液(*o*-phenylenediamine dihydrochloride, Sumitomo ELISA Color Reagent Kit, 住友ベークライト社)を加え, 室温で 15 分間反応させ, マイクロプレート光度計で 492 nm の吸光度を測定した。

結 果

(1) リポソームの安定性

経口投与後, 分解されることなく腸管まで到達できる安定なリポソームの脂質組成を明らかにするために, 種々の脂質組成からなるリポソームに CF を封入させ, pH 2.0, パンクレアチンならびに胆汁存在下で, どの程度封入された CF が放出されるかを調べた。

表 1 に示すように, DPPC と Chol のモル比 7 : 2 からなるリポソームは, pH 2.0 ならびに 10% ウシ胆汁溶液中では不安定であった。DPPC, DPPS, Chol のモル比 7 : 3 : 2 からなるリポソームは 10% ウシ胆汁溶液中でのみ不安定であった。しかしながら, DPPC, DPPS, Chol のモル比 1 : 1 : 2 からなるリポソーム, DSPC と Chol のモル比 7 : 2 からなるリポソーム, DSPC, DPPS, Chol のモル比 7 : 3 : 2 あるいは 1 : 1 : 2 からなるリポソームは, pH 2.0, 10% ウシ胆汁溶液ならびに 2.8% パンクレアチン溶液中でも安定であった。

(2) 経口投与による免疫応答

安定なリポソームが, 経口免疫のためのキャリアとして有用か否かについて明らかにするために, 安定なリポソーム(DPPC : DPPS : Chol = モル比 1 : 1 : 2)にモデル抗原としてガングリオシド GM1 を組み込み経口投与し, 血清中の免疫応

図 1 Serum antibody responses in mice administered orally with ganglioside GM1-containing liposomes

Four groups of 5 BALB/c mice were orally immunized as follows: [group A] liposomes composed of DPPC (0.5 μ mol), DPPS (0.5 μ mol), Chol (1.0 μ mol), and ganglioside GM1 (0.05 μ mol), [group B] liposomes composed of DPPC (1.58 μ mol), Chol (0.45 μ mol), and ganglioside GM1 (0.05 μ mol), [group C] ganglioside GM1 (0.05 μ mol) mixed with liposomes composed of DPPC (0.5 μ mol), DPPS (0.5 μ mol) and Chol (1.0 μ mol), [group D] ganglioside GM1 alone (0.05 μ mol).

Sera were collected at 14 days after immunization and used for antibody assay. Antibody activity was detected against ganglioside GM1 by ELISA with absorbance at 492 nm using a 1/10 dilution of serum.

The values are expressed as the mean $\pm$ SD.

図 2 Serum antibody responses to ganglioside GM1 following oral immunization

Five BALB/c mice (group A) were orally immunized at 0 and 3 weeks, with liposomes composed of DPPC (0.5 μ mol), DPPS (0.5 μ mol), Chol (1.0 μ mol), and ganglioside GM1 (0.05 μ mol).

Sera were collected at 0, 2, 4, and 6 weeks after primary immunization and assayed for ganglioside GM1 antibodies by ELISA using a 1/10 dilution of serum.

The values are expressed as the mean $\pm$ SD.

答を調べた。

図 1 に示すように、安定なりポソームにガングリオシド GM1 を組み込んで経口投与した場合 (group A)、ガングリオシド GM1 に対する抗体は IgA 型のみ誘導され、IgM あるいは IgG の抗体は誘導されなかった。一方、不安定なりポソーム (DPPC : Chol = モル比 7 : 2) にガングリオシド GM1 を組み込んで経口投与した場合 (group B) や安定なりポソーム (DPPC : DPPS : Chol = モル比 1 : 1 : 2) にガングリオシド GM1 を組み込まずに混合して経口投与した場合 (group C)、あるいはガングリオシド GM1 のみを経口投与した場合 (group D)、いずれにおいてもガングリオシド GM1 に対する抗体の誘導は認められなかった。Group A におけるガングリオシド GM1 に対する IgA 抗体の誘導は、他の group にくらべて有意に高かった ($p < 0.01$)。

さらに、ガングリオシド GM1 に対する IgA 型抗体が誘導された group A のマウスを用い追加

免疫を行い、その後の血清中における免疫応答ならびに腸管における抗体産生について調べた。その結果、初回免疫後4週目ならびに6週目のガングリオシド GM1 に対する血清中の IgA 型抗体の応答に顕著な増強は認められず、免疫後2週間目の抗体活性とあまり変化がなかった(図2)。また、IgM ならびに IgG 型の抗体は誘導されなかった(図2)。腸管においては、血清中と同様にガングリオシド GM1 に対する IgA 型抗体のみ誘導され、IgM 型、IgG 型の抗体は誘導されなかった(図3)。腸管におけるガングリオシド GM1 に対する IgA 型抗体活性は、血清中の抗体活性にくらべ高かった(図3)。

(3) MPL による免疫応答増強作用

経口投与リポソームに、抗原とともにアジュバントである MPL を組み込み経口投与した場合、抗原の免疫原性が高まるかどうかについて調べた。

図4に示すように、MPL をマウスあたり $2\mu\text{g}$ 安定なりポソーム(DPPC:DPPS:Chol=モル比1:1:2)にガングリオシド GM1 とともに組み込んで経口投与すると、ガングリオシド GM1 に対する血清中の IgA 抗体の応答は、MPL を組み込んでいない安定なりポソームにくらべ約2倍に増強された。しかしながら、MPL をマウスあたり $4\mu\text{g}$ と増やしても、そのアジュバント効果は増強されなかった。一方、IgM 型、IgG 型抗体は、いずれの場合においても誘導されなかった。

考 察

粘膜免疫は、粘膜局所からの種々の微生物や抗原物質の侵入に対する防御機構として重要な役割を担っている⁹⁾。特に、分泌型 IgA は粘膜免疫の中心的役割を果たしている。しかしながら、抗原物質を経口的に投与しても、消化作用により抗原物質が腸管局所に到達するまでに分解されるため、腸管粘膜に抗原特異的な分泌型 IgA を誘導することは困難である。

マイクロカプセルとしての機能を持つリポソームは、経口投与によりリポソーム内に封入した抗原物質を、胃液や胆汁、胆汁酸などから守り、抗

図3 Intestinal antibody responses in mice administered orally with ganglioside GM1-containing liposomes

Five BALB/c mice (group A) were orally immunized at 0 and 3 weeks, with liposomes composed of DPPC ($0.5\mu\text{mol}$), DPPS ($0.5\mu\text{mol}$), Chol ($1.0\mu\text{mol}$), and ganglioside GM1 ($0.05\mu\text{mol}$).

Small intestinal wash samples were collected at 6 weeks after primary immunization and used for antibody assay. Antibody activity was detected against ganglioside GM1 by ELISA with absorbance at 492 nm using a 1/60 dilution of intestinal fluid.

The values are expressed as the mean $\pm$ SD.

原性を失うことなく腸管局所へ到達させることができる可能性を持っている。そのため、近年リポソームは、腸管局所への有効な抗原提示法として注目されている^{7,10)}。今回筆者らは、リポソームを経口ワクチンとして応用するために、経口投与可能なりポソームの脂質組成を検討し、経口投与により腸管免疫を賦活化できるかどうかを調べた。

本研究において、DSPC を含むリポソームすなわち DSPC と Chol のモル比 7:2 からなるリポソーム、DSPC, DPPS, Chol のモル比 7:3:2 あるいは 1:1:2 からなるリポソームは、pH 2.0、10%胆汁溶液ならびに 2.8%パンクレアチン溶液のいずれの条件下でも高い安定性を示した。一方、

図4 Effect of monophosphoryl lipid A (MPL) dose on serum anti-GM1 antibody responses in mice after oral administration of ganglioside GM1-containing liposomes

Three groups of 5 BALB/c mice were orally immunized with liposomes composed of DPPC (0.5 μmol), DPPS (0.5 μmol), Chol (1.0 μmol), MPL (0, 2, or 4 μg), and ganglioside GM1 (0.05 μmol) in a volume of 0.15 ml per mouse.

Sera were collected at 14 days after immunization and used for antibody assay. Antibody activity was detected against ganglioside GM1 by ELISA with absorbance at 492 nm using a 1/10 dilution of serum.

The values are expressed as the mean ± SD.

DPPC を含むリポソームすなわち DPPC と Chol のモル比が 7:2 からなるリポソームは、pH 2.0 と 10%胆汁溶液中で不安定であった(表 1)。このことは、DSPC と DPPC の相転移温度(Tc)の違い(DSPC: 58.0°C, DPPC: 41.5°C)によるもの

と思われる。一般的に、高い Tc を持つリン脂質 (PC) からなるリポソームの膜流動性は低い。そのため、DSPC を含むリポソームは DPPC を含むリポソームよりも膜が固く、膜の透過性が低くなる。このことにより、DSPC を含むリポソームは、pH 2.0、10%胆汁ならびに 2.8%パンクレアチン溶液中でも高い安定性を示すものと考えられる。事実、Tc の高い DSPC を含むリポソームは、酸性溶液ならびに胆汁溶液中でも安定であるという報告がある¹¹⁾。さらに、10%胆汁溶液中における DPPC, DPPS, Chol からなるリポソームの安定性が、Chol の含量の増加により高まった(表 1)。これは、Chol 含量の増加により、リポソーム膜の Tc が変化したことによるものと思われる。リポソーム膜の Chol 含量が増加すると、リポソーム膜の流動性が減少するため¹²⁾、リポソーム膜が硬くなりリポソーム膜が安定化する。また、Chol を含むリポソームは胆汁のリパーゼに対し抵抗性を示すことが知られている¹³⁾。今回調べたリポソームすべてが、2.8%パンクレアチンの条件下で高い安定性を示したのは、このことによるものと思われる。

本研究の結果から、pH 2.0、10%胆汁ならびに 2.8%のパンクレアチン存在下で安定なリポソーム、すなわち DPPC, DPPS, Chol のモル比が 1:1:2 からなるリポソーム、DSPC と Chol のモル比 7:2 からなるリポソーム、DSPC, DPPS, Chol のモル比 7:3:2 あるいは 1:1:2 からなるリポソームは、経口投与可能であり、経口免疫誘導のためのキャリアとして有用であると考えられた。

静脈内に投与されたリポソームの多くは、肝臓の Kupffer 細胞や脾臓のマクロファージのような細網内皮系の細胞により捕食される¹⁴⁾。GALT であるパイエル氏板を被覆している M 細胞は、マクロファージと同様に捕食活性を持っている。したがって、胃や腸管で分解されない安定なリポソームは経口投与したのち、M 細胞により捕食されるものと思われる。今回の実験において、安定なリポソーム (DPPC: DPPS: Chol = モル比 1:1:2) にガングリオシド GM1 を組み込んで経口投与した場合、ガングリオシド GM1 に対する IgA 型抗体が誘導されたが (group A)、不安定な

リポソーム(DPPC:Chol=モル比7:2)にガングリオシド GM1 を組み込んで経口投与した場合 (group B) や安定なりポソーム(DPPC:DPPS:Chol=モル比1:1:2)にガングリオシド GM1 を組み込まずに混合して経口投与した場合 (group C),あるいはガングリオシド GM1 のみを経口投与した場合 (group D) においては,ガングリオシド GM1 に対する IgA 型抗体の誘導は認められなかった(図1)。これらの結果は,安定なりポソームは,胃や腸管を通過する間に消化されることなく封入抗原をパイエル氏板に提示し,リポソーム内に封入された抗原に対する分泌型 IgA 型抗体を誘導することができることを示している。事実,腸管において抗原特異的な IgA 型抗体が産生され, IgM 型, IgG 型抗体は産生されなかった(図3)。また,リポソームを経口投与した場合,それ自身アジュバント活性を示すということが報告されている¹⁵⁾。

今回,ハプテン抗原であるガングリオシド GM1¹⁶⁾を経口投与した場合,そのみでは IgA 抗体を誘導することができなかったが,安定なりポソームに組み込んで投与すると,ガングリオシド GM1 に対する IgA 型抗体が誘導された(図1)。このことは,安定なりポソームは,それ自身アジュバント活性を持っているということを示唆している。さらに今回,追加免疫により IgA 抗体の免疫応答が増強されなかった(図2)。これは,免疫原に用いた抗原がハプテン抗原であることによるものと思われる。

MPL は,ヒトのワクチンにおいてアジュバントとして用いられているだけでなく,リポソームに組み込んでもアジュバント活性を示すことが知られている^{6,17,18)}。このことから筆者らは,リポソーム型ワクチンの免疫賦活剤として MPL を用いた。本研究において, MPL を含むリポソームは,経口投与により MPL を含まないリポソームにくらべ,より高いガングリオシド GM1 に対する IgA 型抗体の産生を促した(図4)。このことは,経口投与された MPL が,腸管粘膜上に IgA 抗体の応答を増強する効果的なアジュバントとして作用すること,さらにリポソーム自身のアジュバ

ント作用が, MPL を組み込むことによりさらに増強されることを示している。

また,経口的に抗原を投与した場合,その抗原に対する抗体は, IgA 型のみ産生されることが報告されている^{1,2)}。今回,ガングリオシド GM1 を組み込んだ安定なりポソームを経口投与した場合,ガングリオシド GM1 に対する抗体は,血清中ならびに腸管において IgA 型の抗体のみ誘導され, IgM 型あるいは IgG 型の抗体は誘導されなかった(図1~4)。これは,この事実によるものと思われる。

最後に, pH 2.0, 10%胆汁ならびに 2.8%パンクレアチン存在下で安定なりポソームは,経口ワクチンに応用可能と考えられる。また,ハプテン抗原であるガングリオシド GM1 を安定なりポソームに組み込み経口投与した場合,ガングリオシド GM1 に対し高い IgA 型抗体が誘導されたことから,安定なりポソームは,抗原性が弱い抗原の経口ワクチンを開発するうえでも有用であると考えられる。

本研究にご協力いただいた小林和子技官に感謝致します。

文 献

- 1) Mestecky J, Abraham R, Ogra PL: Common mucosal immune system and strategies for the development of vaccines effective at the mucosal surface. Handbook of Mucosal Immunology. (eds. Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J), Academic Press, San Diego, 1994, p 357-372.
- 2) Michalek SM, Childers NK, Katz J, Dertzbaugh M, Zhang S et al.: Liposome and conjugate vaccines for antigen delivery and induction of mucosal immune responses. Adv. Exp. Med. Biol. 327: 191-198, 1992.
- 3) McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M et al.: The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. Vaccine 10: 75-88, 1992.
- 4) Michalek SM, Childers NK, Katz J, Denys FR, Berry AK et al.: Liposome as oral adjuvants. Curr. Topics Microbiol. Immun. 146: 51-57, 1989.
- 5) Gregoriadis G: Immunological adjuvants: a role for liposomes. Immunol. Today 11: 89-97, 1990.
- 6) Alving CR: Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. J. Immunol. Methods 140: 1-13, 1991.

- 7) Aramaki Y, Tomizawa H, Hara T, Yachi K, Kikuchi H et al. : Stability of liposomes *in vitro* and their uptake by rat Peyer's patches following oral administration. *Pharm. Res.* 10 : 1228-1231, 1993.
- 8) Higashi H, Ikuta K, Ueda S, Kato S, Hirabayashi Y et al. : Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing glycosphingolipids from a Marek's disease lymphoma-derived chicken cell line, MSB1, as tumor-associated heterophile Hanganutziu-Deicher antigens. *J. Biochem.* 95 : 785-794, 1984.
- 9) Mestecky J : The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretins. *J. Clin. Immunol.* 7 : 265-276, 1987.
- 10) Tomizawa H, Aramaki Y, Fujii Y, Hara T, Suzuki N et al. : Uptake of phosphatidylserine liposomes by rat Peyer's patches following intraluminal administration. *Pharm. Res.* 10 : 549-552, 1993.
- 11) Bakouche O, Gerlier D : Enhancement of immunogenicity of tumour virus antigen by liposomes : the effect of lipid composition. *Immunology* 58 : 507-513, 1986.
- 12) Vemuri S, Rhodes CT : Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery system : a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 70 : 95-111, 1995.
- 13) Rowland RN, Woodley JF : The stability of liposomes *in vitro* to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 620 : 400-409, 1980.
- 14) Oku N, Namba Y, Okada S : Tumor accumulation of novel RES-avoiding liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1126 : 225-260, 1992.
- 15) Childers NK, Michalek SM, Pritchard DG, McGhee JR : Mucosal and systemic responses to an oral liposome-*Streptococcus mutans* carbohydrate vaccine in humans. *Reg. Immunol.* 3 : 289-296, 1990/1991.
- 16) Makita A, Taniguchi N : 1985. Glycosphingolipids. *New Comprehensive Biochemistry* vol. 10. (ed. Wiegant H), Elsevier, Amsterdam, 1985, p 1-99.
- 17) Vosika GT, Barr C, Gilbertson D : Phase-I study of intravenous modified lipid A. *Cancer Immunol. Immunother.* 18 : 107-112, 1984.
- 18) Alving CR, Richards RL : Liposomes containing lipid A : a potent nontoxic adjuvant for a human malaria sporozoite vaccine. *Immunol. Lett.* 25 : 275-280, 1990.