ワクチンと感染防御

田村慎一

(国立予防衛生研究所)

はじめに

ウイルスによる感染は、感染部位の広がりや感染の持続時間によって、各々局所感染と全身感染、さらに急性感染と持続感染にわけられる(表1)。これら感染様式の違いは防御機構の違いを生み出すことになる。従って、ワクチンによってウイルス感染による発病を予防しようとする時、防御に有効な免疫応答を誘導する必要がある。

インフルエンザウイルスの場合、感染部位は気道に限局され、最初のウイルス増殖がそのまま発病につながるため、1～3日の潜伏期間で発病する。この急性の発病を阻止するには増殖ウイルスによって惹起される免疫応答では間に合わず、感染そのものを抑制しなければならない。

インフルエンザウイルスは、8個のマイナスストランドのRNA、核蛋白(NP)、それを取り囲むウイルス膜、それに埋め込まれた表面抗原であるヘマグルチニン(HA)やノイラミニダーゼ(NA)から構成されている。そして、HA分子が気道の上皮細胞上のシアル酸受容体と結合することによって感染過程が開始される。従って、感染そのものを阻止するには、HA分子に対する抗体をワクチン接種によって予め作っておくことが有効である¹⁻³。

一方、インフルエンザウイルスは、A、B、Cの3種類の型に大別され、そのうちA型は世界的な大流行

を、またB型は局地的な流行を起こしている。その原因は、HAやNAが変異することによっている。これら抗原は毎年少しずつ変化し、既存の抗体による感染防御を受け難くしている。特にA型ウイルスは10～30年毎に大きく変化するため、1933年以後、H1N1、H2N2、H3N2等の亜型ウイルスの大流行が記録されている。従って、インフルエンザの発病をワクチンによって予防しようとする時の要件として、感染そのものを阻止できる免疫の誘導が必要とされる。しかも、ワクチンに用いたウイルスと流行ウイルスの抗原型が異なる場合でも交差感染阻止できる抗体の誘導が必要である。

ところで、自然感染から回復した生体にはその後数年間、ウイルスの小さい変異の流行に対して抵抗できる強い防御能が準備される。罹患後に獲得されるこの免疫能力は、気道粘膜上に分泌されるIgA抗体、血中のIgG抗体、感染細胞傷害性T細胞等によっていると考えられている⁴⁻⁸。特に、変異ウイルスに対する交差感染阻止において、HA分子に対する局所のIgA抗体の役割が大きいと考えられる。このIgA抗体は次のような特徴を持っている。(i)多量体であるため単量体の抗体よりも多くの抗原結合部位を持つことになり、交差反応性が高い(図1)。(ii)HA分子と結合しウイルスの細胞への付着を阻止する。(iii)ウイルス侵入部位に多く分泌される。(iv)気道の蛋白質分解酵素の作用を受け難い安定な構造をしている、等⁹⁻¹²。

一方、現行のインフルエンザ不活化ワクチンは、ウイルスをエーテル処理後の蛋白質成分から成り立っている。これを、主として血中の抗体産生を高めることを目指して皮下に接種している。そのため気道の免疫系が刺激されず、IgAが分泌されない。従って、現行のワクチンによる予防効果は、流行ウイルス株とワクチン株の抗原型が一致しない時減少する。このような

Vaccine and protection against infection
Shin-ichi Tamura

Department of Pathology, National Institute of Health,
1-23-1 Toyama, Shinzaku-ku, Tokyo 162, Japan.
〒162 東京都新宿区戸山1-23-1

本論文は第40回日本ウイルス学会総会シンポジウム“ウイルス感染と生体応答”における講演内容を纏めたものである。

表 1 ウイルス感染様式

感染様式	病 名 (病因ウイルス)	特 徴
急性局所感染	インフルエンザ カゼ (ライノ, RS) 小児胃腸炎 (ロタ) 等	ウイルス増殖が感染局所に限定。 1 ~ 3 日の潜伏期間で発病。 (1 ~ 2 週間で回復)
急性全身感染	ポリオ 麻疹 痘瘡, 等	ウイルス血症を起こす 1 ~ 3 週間の潜伏期間 (1 ヶ月前後で回復)
持続感染	性器ヘルペス 成人 T 細胞白血病 エイズ, 等	ウイルス遺伝子が長期間潜伏。 再発する。

表 2 Augmentation of antiviral antibody responses to influenza HA vaccine by CTB and protection against infection

Nasal inoculation		Antiviral antibodies ^a		Lung titre ^b (10 ⁿ)	Incidence of infection ^c (%)
Vaccine (μ g)	CTB (1 μ g)	Serum HI (2 ⁿ)	Nasal IgA (units)		
—	—	<2 ⁴	<0.5	10 ^{5.4±0.5}	5/5(100)
—	+	<2 ⁴	<0.5	10 ^{5.3±0.4}	5/5(100)
1.5	—	<2 ⁴	<0.5	10 ^{4.5±0.5}	5/5(100)
0.015	+	<2 ⁴	<0.5	10 ^{4.5±0.4}	5/5(100)
0.15	+	2 ^{8.8±1.1}	3.5±0.8	10 ^{<1}	0/5(0)
1.5	+	2 ^{7.4±1.1}	3.5±1.0	10 ^{<1}	0/5(0)

^a Values represent means±s.d. of serum titres and nasal IgA concentrations from all mice in each group of five mice. Serum and nasal wash specimens were collected three days after infection from mice which were infected with PR-8 virus four weeks after nasal inoculation of both the vaccine and CTB ^b Values represent means±s.d. of lung homogenate endpoint titres from all the mice in each group. Mouse lung titre was determined three days after infection ^c Values represent the number of infected mice, in which the virus was present in the lung homogenate (1:10), per five tested mice.

表 3 Effects of reduced doses of vaccine and CTB on secondary antiviral antibody responses and on protection against infection

Nasal inoculation			Antiviral antibodies		Lung virus titres (10 ⁿ)
Primary		Secondary vaccine (μg)	Serum HI (2 ⁿ)	Nasal IgA (Units)	
Vaccine (0.03μg)	CTB (0.05μg)				
—	—	—	<2 ⁴	<0.5	10 ^{5.5±0.3}
—	—	PR-8 (1.5)	<2 ⁴	<0.5	10 ^{5.6±0.6}
PR-8	+	—	2 ^{5.8±2.7}	2.4±0.6	10 ^{3.8±1.0}
PR-8	+	PR-8 (0.015)	2 ^{8.4±3.3}	37.2±11.9	10 ^{<1}
PR-8	+	PR-8 (0.15)	2 ^{11.4±1.1}	33.3±9.5	10 ^{<1}
PR-8	+	PR-8 (1.5)	2 ^{12.4±1.1}	38.4±18.0	10 ^{<1}

図1 Schematic representation of the secretory IgA and the serum IgG molecules. The secretory IgA is dimer that contains two monomeric IgA subunits as well as two extra polypeptide chains, secretory component and J chain.

図2 Roles of cholera toxin in pathogenesis of cholera, immunomodulation and other biological responses.

現行ワクチンの問題点を改善するために、これまでワクチンを経鼻接種する試みがなされてきている^{13,14}。しかし、ワクチンのみを経鼻接種しても簡単に高いレベルのIgA抗体を誘導できない。そこで我々は、コレラトキシンのBサブユニット (CTB) をアジュバントとして、これをワクチンと共に経鼻接種することを試みた¹⁵⁻¹⁸。

コレラトキシン (CT) は、ヒブリオコレラ菌が産生する下痢症の原因毒素で、A、Bの2つのサブユニットから構成されている(図2)。その中のBサブユニットが細胞膜のGM1ガングリオシドと結合し、次に、Aサブユニットが細胞内に入ってアデニルシクラーゼを活性化することによって下痢症を含む様々な生物活性が生み出される¹⁹⁻²⁴。これら生物活性の1つとして、CTが、一緒に経口投与された他の抗原に対してアジュバント作用を発揮することが報告されている²⁵。そこで我々はまず、CTが、腸管においてばかりでなく気道においてもその粘膜の免疫系を刺激し、共存する抗原に対するIgA産生を増強することを検討し、これを確かめた¹⁵。さらに、CTの1/10以下の活性ではあるが、CTBにもそのようなアジュバント活性があることを知り、CTBをワクチンの経鼻接種のアジュバントとして用いた。ところで我々が用いたCTBは市販のものであり、0.1%以下のCTを混入している。この微量のCTがCTBのアジュバント活性に関与している可能性について、現在検討中である。

本報告では、CTB併用経鼻接種インフルエンザワクチンを用いたマウスでの実験結果を、次の順序で述べる。(1)抗体応答、感染阻止及びその持続。(2)皮下接種との比較。(3)3価ワクチンの予防効果。(4)自然感染との比較。(5)HA分子に対する気道のIgA抗体の性状とその役割。(6)HA分子以外の成分に対する免疫応答とその役割。(7)まとめ。

I. ワクチンに対する抗体応答とチャレンジウイルスに対する感染阻止及びその持続

(1) 1回接種方式の場合¹⁶; Balb/c (6w, 雌)の鼻腔内に、マウス馴化ウイルスPR8(H1N1)由来のワクチンをCTBと共に、10 μ lの容量で滴下して、4週間後の抗体応答及び感染阻止能力を検討した。抗体応答は、鼻の洗浄液中のIgA抗体及び血清中の血球凝集阻止(HI)抗体により、また、感染阻止能力は、致死量のウイルスを経鼻投与後3日目の肺乳剤のウイルス価によって検討した。その結果、少なくとも0.1 μ g以上のワクチンを1 μ gのCTBと共に免疫したマウスにおい

図 3 Weeks after Vaccination

表 4 各種ワクチンを CTB とともに経鼻接種されたマウスにおける A/貴州 (H3N2) ウイルス感染に対する感染防御*

経 鼻 接 種		ウイルス 感染 (A/貴州)	感染 3 日後のウイルス価 ($EID_{50}; 10^n$)	
ワクチン (0.15 μ g)	CTB (1 μ g)		上気道感染 (P) (鼻洗浄液)	下気道感染 (P) (肺乳剤)
—	—	+	4.0 $\pm$ 0.4 (—)	6.2 $\pm$ 0.3 (—)
PR8 (H1N1)	+	+	2.3 $\pm$ 0.2 (<0.01)	5.9 $\pm$ 0.2 (NS)
A/貴州 (H3N2)	+	+	1.0 $\pm$ 0.3 (<0.001)	0.6 $\pm$ 0.2 (<0.001)
A/福岡 (H3N2)	+	+	0.8 $\pm$ 0.3 (<0.001)	4.1 $\pm$ 0.9 (<0.01)
A/四川 (H3N2)	+	+	0.7 $\pm$ 0.3 (<0.001)	4.6 $\pm$ 0.3 (<0.001)
B/茨城	+	+	3.8 $\pm$ 0.2 (NS)	6.0 $\pm$ 0.5 (NS)

* ワクチン接種 4 週目のマウスに、A/貴州ウイルス ($2.5 \times 10^4 EID_{50}$) を 2μ l (上気道感染)、あるいは 20μ l (下気道感染) の容量で感染した。表中の数値は、一群 6 匹のマウス鼻洗浄液、あるいは 10%肺乳剤のウイルスのウイルス価の平均値 ($\pm$ SD) を示している。

表 5 各種ワクチンを CTB とともに皮下接種されたマウスにおける A/貴州 (H3N2) ウイルス感染に対する感染防御

皮 下 接 種		ウイルス 感染 (A/貴州)	感染 3 日後のウイルス価 ($EID_{50}; 10^n$)	
ワクチン (0.15 μ g)	CTB (1 μ g)		上気道感染 (P) (鼻洗浄液)	下気道感染 (P) (肺乳剤)
—	—	+	4.0 $\pm$ 0.4 (+)	6.2 $\pm$ 0.5 (—)
PR8 (H1N1)	+	+	3.3 $\pm$ 0.2 (NS)	5.7 $\pm$ 0.3 (NS)
A/貴州 (H3N2)	+	+	1.9 $\pm$ 0.2 (<0.001)	<0.5 (<0.001)
A/福岡 (H3N2)	+	+	4.0 $\pm$ 0.3 (NS)	4.0 $\pm$ 1.4 (<0.05)
A/四川 (H3N3)	+	+	4.2 $\pm$ 0.3 (NS)	4.6 $\pm$ 0.5 (<0.005)
B/茨城	+	+	3.9 $\pm$ 0.2 (NS)	6.4 $\pm$ 0.2 (NS)

図 4

図 5 感染後の日数

て、IgA 抗体、HI 抗体の明らかな上昇が検出され、それに伴って、完全な感染阻止が認められた。ワクチンのみの接種群では、抗体応答も感染阻止も検出されなかった(表 2)。

また、1 回免疫後、局所の IgA 抗体、血清中の HI 抗体共に少なくとも 16 週間以上持続した(図 3)。さらに、このような抗体応答の持続条件で、致死量のウイルス

感染に対する完全な感染阻止も持続した。

(2) 2 回接種方式の場合¹⁷；ワクチンの接種効果を高めるには、1 回接種よりも 2 回接種の方が効率が良い。そこで、ワクチンと CTB を 1 次接種 4 週後に、ワクチンのみを 2 次接種して、その 2 週後の抗体応答と感染阻止能力を検討した。その結果、1 次接種ワクチン量を 0.03 μ g、CTB 量を 0.05 μ g まで下げ、2 次接種量を

表 6 各種ワクチンを CTB とともに経鼻あるいは皮下接種されたマウスにおける A/貴州(H3N2) HA 分子に対する交差抗体産生

接 種			抗 A/貴州-HA 反応性抗体 (ng/マウス;ELISA)			
ワクチン (0.15μg)	CTB (1μg)	接種 ルート	鼻 洗 淨 液		肺 洗 淨 液	
			IgA	IgG	IgA	IgG
—	—	—	1 ± 1	< 1	10 ± 2	4 ± 1
PR8 (H1N1)	+	経鼻	3 ± 1	1 ± 1	11 ± 5	6 ± 3
A/貴州 (H3N2)	+	経鼻	12 ± 3	23 ± 14	36 ± 15	804 ± 53
A/福岡 (H3N2)	+	経鼻	6 ± 2	2 ± 1	31 ± 13	186 ± 130
A/四川 (H3N2)	+	経鼻	7 ± 3	4 ± 1	25 ± 10	193 ± 125
B/茨城	+	経鼻	1 ± 1	1 ± 1	13 ± 2	5 ± 4
—	—	—	2 ± 1	< 1	10 ± 6	8 ± 5
PR8 (H1N1)	+	皮下	1 ± 1	1 ± 1	14 ± 4	25 ± 9
A/貴州 (H3N2)	+	皮下	1 ± 1	49 ± 17	11 ± 3	873 ± 200
A/福岡 (H3N2)	+	皮下	2 ± 1	3 ± 2	9 ± 2	362 ± 133
A/四川 (H3N2)	+	皮下	1 ± 1	1 ± 1	9 ± 4	252 ± 184
B/茨城	+	皮下	1 ± 1	2 ± 2	11 ± 5	11 ± 4

表 7 ワクチンの経鼻接種と皮下接種の予防効果の比較

ワクチン 接種経路	感染部位		ワクチンと感染ウイルスの関係			
			同じ抗原型	同じ亜型	異なる亜型	異なる型
経鼻	上気道	感染防御	≡	≡	+	—
		交差抗体	IgA ≡ IgG	IgA	IgA	—
	下気道	感染防御	≡	+	—	—
		交差抗体	IgA < IgG	IgA < IgG	—	—
皮下	上気道	感染防御	≡	—	—	—
		交差抗体	IgG	—	—	—
	下気道	感染防御	≡	+	—	—
		交差抗体	IgG	IgG	—	—

0.015μg にした時でも、高いレベルの局所及び血清の抗体応答が検出され、並行して PR 8 ウイルス感染に対する完全な阻止も成立した(表 3)。また、2 次接種後少なくとも 12 週以上の間高いレベルの抗体応答が持続した。

II. CTB 併用ワクチンの経鼻接種と皮下接種の予防効果の比較¹⁸⁾

ワクチンの経鼻接種が皮下接種に比して明らかに優れていることを示すために、両者の詳細な比較を行った。即ち、マウスに型や亜型の異なる様々なワクチンを CTB と共に経鼻あるいは皮下接種し、4 週間後の抗体応答と、H3N2 亜型のマウス馴化ウイルス A/貴州-X を感染した時の防御効果を検討した。抗体応答は、感染ウイルスの HA 分子に対する鼻及び肺洗浄中の IgA 及び IgG 抗体を ELISA により測定した。また、感染部位の違いによるワクチン接種効果の違いを明らかに

するために、上気道及び下気道感染を行った。上気道感染は鼻腔に 2 μl, また下気道感染は 20μl ウイルス液を経鼻投与することによって行った。そして、感染 3 日後の鼻洗浄液及び肺乳剤中のウイルス価を感染阻止の指標とした(図 4)。

(1) ウイルスの感染部位と増殖動態；図 5 は、ウイルスを非免疫マウスの上気道及び下気道に感染した場合の、鼻洗浄液及び 10% 肺乳剤のウイルス価の経時変化を示している。ウイルス液を左右鼻孔に 1 μl ずつ滴下することによってマウスの鼻腔に局限した上気道感染を誘導すると、まず鼻でウイルス増殖が始まり、後に肺でウイルス増殖が起こるようになる(図 5 A)。一方、大量のウイルス液を鼻孔から吸引させることによって下気道で優先的に感染を起こさせると、はじめから肺で高いレベルのウイルス増殖が起こり、感染 7 日前後で 9 割以上のマウスが肺炎によって死亡する(図 5 B)。これら感染条件の違いによる症状の違いは、ヒ

表8 ワクチンを1回鼻腔内接種したマウスにおける交差感染防御

接 種		A/貴州 感染	ウイルス価 (EID ₅₀ ; 10 ⁿ)			
ワクチン (2 μ g)	CTB (2 μ g)		上気道感染 (鼻洗浄液)	p	下気道感染 (10%肺乳剤)	p
—	—	+	2.7 $\pm$ 0.2	—	5.9 $\pm$ 0.3	—
PR/8	+	+	1.5 $\pm$ 0.3	<0.002	5.7 $\pm$ 0.2	NS
A/貴州(H3N2)	+	+	<0.5	<0.001	<0.5	<0.001
A/福岡(H3N2)	+	+	<0.5	<0.001	3.8 $\pm$ 0.6	<0.005
A/四川(H3N2)	+	+	<0.5	<0.001	4.0 $\pm$ 0.8	<0.02
B/茨城	+	+	2.2 $\pm$ 0.7	NS	5.9 $\pm$ 0.2	NS

表9 ワクチンを2回鼻腔内接種したマウスにおける交差感染防御とその持続

一次接種		二次接種	二次接種後の A/貴州 感染 までの期間	ウ イ ル ス 価			
ワクチン (0.1 μ g)	CTB (0.2 μ g)	ワクチン (1 μ g)		上気道感染 (鼻洗浄液)	p	下気道感染 (10%肺乳剤)	p
—	—	—		3.1 $\pm$ 0.4	—	5.7 $\pm$ 0.2	—
A/貴州(H3N2)	+	—		<0.5	<0.001	0.6 $\pm$ 0.3	<0.001
A/福岡(H3N2)	+	—		2.5 $\pm$ 0.7	NS	4.7 $\pm$ 0.5	<0.05
A/四川(H3N2)	+	—		1.8 $\pm$ 1.0	NS	4.4 $\pm$ 0.6	<0.05
A/貴州(H3N2)	+	A/四川	2週	<0.5	<0.001	<0.5	<0.001
A/福岡(H3N2)	+	A/四川	2週	<0.5	<0.001	2.2 $\pm$ 0.3	<0.001
A/四川(H3N2)	+	A/四川	2週	<0.5	<0.001	<0.5	<0.001
—	—	A/四川	2週	3.0 $\pm$ 0.3	NS	5.4 $\pm$ 0.6	NS
—	—	—		3.0 $\pm$ 0.3	—	5.5 $\pm$ 0.3	—
A/貴州(H3N2)	+	—		0.8 $\pm$ 0.5	<0.001	0.6 $\pm$ 0.3	<0.001
A/貴州(H3N2)	+	A/四川	12週	0.8 $\pm$ 0.1	<0.001	<0.5	<0.001
A/福岡(H3N2)	+	A/四川	12週	0.8 $\pm$ 0.1	<0.001	0.5 $\pm$ 0.2	<0.001
A/四川(H3N2)	+	A/四川	12週	0.8 $\pm$ 0.1	<0.001	0.7 $\pm$ 0.5	<0.001
—	—	A/四川	12週	3.0 $\pm$ 0.1	NS	4.6 $\pm$ 0.6	NS

表10 三価ワクチンを2回鼻腔内接種したマウスにおける交差感染防御

一次接種		二次接種	感染 ウイルス	ウイルス価 (EID ₅₀ ; 10 ⁿ)			
三価ワクチン (0.1 μ g $\times$ 3)	CTB (0.2 μ g)	ワクチン (1 μ g $\times$ 3)		上気道感染 (鼻洗浄液)	p	下気道感染 (10%肺乳剤)	p
—	—	—	PR/8	4.4 $\pm$ 0.4	—	6.6 $\pm$ 0.3	—
Y+S+N	+	—	PR/8	3.2 $\pm$ 0.5	<0.05	ND	
—	—	B+F+A	PR/8	3.5 $\pm$ 0.5	NS	ND	
Y+S+N	+	B+F+A	PR/8	1.7 $\pm$ 0.7	<0.001	4.9 $\pm$ 0.8	<0.05
—	—	—	A/貴州	3.8 $\pm$ 0.5	—	5.5 $\pm$ 0.4	—
Y+S+N	+	—	A/貴州	2.3 $\pm$ 0.6	<0.05	ND	
—	—	B+F+A	A/貴州	3.3 $\pm$ 0.3	NS	ND	
Y+S+N	+	B+F+A	A/貴州	0.6 $\pm$ 0.2	<0.001	0.9 $\pm$ 0.2	<0.001
—	—	—	B/茨城	3.3 $\pm$ 0.3	—	5.4 $\pm$ 0.2	—
Y+S+N	+	—	B/茨城	2.0 $\pm$ 0.4	<0.001	ND	
—	—	B+F+A	B/茨城	2.8 $\pm$ 0.2	NS	ND	
Y+S+N	+	B+F+A	B/茨城	1.0 $\pm$ 0.6	<0.002	2.9 $\pm$ 1.0	<0.02

Y+S+N; A/山形(H1N1), A/四川(H3N2), B/長崎
B/愛知

B+F+A; A/バンコク(H1N1), A/福岡(H3N2),

図6 PR8 (H1N1) のHA分子免疫マウスの気道洗浄液から精製されたIgA (A) およびIgG (B) の分子サイズ。セファクリル・カラムを使用。

トのインフルエンザの際の諸症状、即ち鼻炎、咽頭炎、気管支炎から、ウイルス性肺炎までのモデルに対応すると考えられる。

(2) ワクチンの経鼻及び皮下接種の上、下気道感染に及ぼす影響；表4及び表5は、PR8(H1N1)、A/貴州-X(H3N2)、A/福岡(H3N2)、A/四川(H3N2)、B/茨城ウイルス由来のワクチンをCTBと共に経鼻あるいは皮下接種した時の結果を示している。経鼻接種した時(表4)、上気道感染の場合には、感染ウイルス(A/貴州、H3N2)と同じ亜型の異なるウイルス(A/福岡、A/四川)由来のワクチンを接種したマウスにおいてはほぼ完全な交差感染阻止が検出された。下気道感染の場合には、感染ウイルス由来のワクチンを接種したマウスでのみ完全な感染阻止が、また、同じ亜型の異なるウイルス(A/福岡、A/四川)由来のワクチンを接種したマウスにおいて、部分的な交差感染阻止がみられた。一方、皮下接種した時(表5)、上気道感染の場合に、感染ウイルス由来のワクチンを接種した群でのみ完全な感染阻止がみられ、他のウイルス由来のワクチン接種群では全く交差感染阻止が検出されなかった。また、下気道感染に対する感染阻止は経鼻接種した時と同様であった。

(3) ワクチンの経鼻及び皮下接種の交差抗体産生に及ぼす影響；上記ワクチンの経鼻あるいは皮下接種条件では、鼻及び肺洗浄液中に、表6に示すような感染ウイルスのHA分子と反応する抗体が検出される。即ち、経鼻接種条件では、同じ亜型のウイルス由来のワ

図7 受動免疫された抗PR8-HA IgA抗体の気道残存量と受動免疫後のPR8感染阻止能

図8 感染細胞による抗原提示

表11 CTB 併用ワクチンと生ウイルスの経鼻投与による感染阻止能力の比較

鼻腔限局投与 ($1\mu\ell \times 2$)	ウイルス感染 (A/山形)	感染3日後のウイルス価 ($EID_{50}; 10^n$)			
		上気道感染 (鼻洗浄液)	p	下気道感染 (肺洗浄液)	p
非免疫	+	4.3 ± 0.2	(—)	6.0 ± 0.4	(—)
ワクチン	+	4.5 ± 0.4	(NS)	6.1 ± 0.3	(NS)
ワクチン+CTB	+	<0.5	(<0.001)	3.0 ± 0.5	(<0.001)
ウイルス ($4LD_{50}$)	+	<0.5	(<0.001)	<0.5	(<0.001)

表12 Characterization of HA-specific IgA and IgG antibodies in nasal-wash, wash and serum specimens from PR-8 HA-immunized mice

		Nasal-wash	Bronchoalveolar-wash	Serum
Immunoglobulin content (ng/mouse)				
Measured value	IgA	663 ± 174	$11,037 \pm 1,810$	$200,700 \pm 80,875$
	IgG	853 ± 175	$87,267 \pm 38,910$	$1,837,815 \pm 311,640$
Calculated value	IgA	603	9,857	
	IgG	302	76,446	
HA-specific antibody content (ng/mouse)				
Measured value	IgA	568 ± 64	$7,730 \pm 4,162$	$15,668 \pm 2,902$
	IgG	508 ± 205	$52,971 \pm 26,846$	$1,147,420 \pm 458,357$
Calculated value	IgA	517	6,903	
	IgG	180	46,403	
(HA-specific antibody)/(Immunoglobulin)				
	IgA	0.856	0.700	0.078
	IgG	0.593	0.607	0.624

表13 Cross-reactivity of HA-specific IgA and IgG antibodies in nasal-wash specimens from mice immunized with different influenza A virus HA

HA molecules used for immunization	Antibody	HA-specific Antibodies ; ng/mouse ^a		
		PR8	A/Yamagata	A/Fukuoka
PR8	IgA	571 ± 59 (520) ^b [100] ^c	164 ± 64 (148) [28.5]	29 ± 8 (26) [5.1]
	IgG	462 ± 214 (164) [100]	82 ± 38 (29) [17.6]	11 ± 8 (4) [2.4]
A/Yamagata	IgA	108 ± 15 (98) [31.9]	339 ± 31 (308) [100]	24 ± 13 (22) [8.0]
	IgG	72 ± 44 (25) [16.1]	449 ± 49 (159) [100]	13 ± 8 (5) [3.0]
A/Fukuoka	IgA	35 ± 6 (32) [9.2]	22 ± 3 (20) [5.8]	386 ± 69 (351) [100]
	IgG	16 ± 5 (6) [4.3]	6 ± 3 (2) [1.7]	374 ± 133 (132) [100]

^a Values represent means±SD of the amounts of anti-HA IgA or IgG antibodies in the nasal-wash specimens from five mice immunized by the two-dose regimen using PR8, A/Yamagata or A/Fukuoka HA (Table 1). The amounts of the antibodies which bind to different HA molecules were assayed by ELISA.

^b The values in parentheses represent the true amounts of HA-reactive antibodies, calculated by subtracting each blood contamination from each measured value (Table 2). ^c Percentage of the amount of cross-reactive antibodies to the amount of antibodies directed against HA used for immunization is given in brackets.

表14 Protection provided by local PR8 HA-specific IgA antibodies, transferred intranasally into naive mice before infection with PR8 virus

Antibodies ^a transferred	Amt of anti-HA antibodies (ng/mouse)	Lung virus ^b titer (10 ⁿ)	P ^c
Diluent	—	6.3±0.4	—
Myeloma IgA	—	6.7±0.7	N.S.
PR8 HA-specific IgA	600	1.6±0.8	<0.001
	150	3.3±1.5	<0.01
	37.5	4.7±1.6	N.S.

^a Mice were administered intranasally with 25μl of graded dilutions of local IgA raised against PR8 HA three hours before infection with a lethal dose of PR8. Control groups of mice were given either diluent (PBS containing 0.1% BSA) or mouse myeloma IgA (600 ng/mouse).

^b Values represent means±SD of lung homogenate titers (EID₅₀) from all mice in each group of five mice. ^c N.S., not significant

クチンを接種したマウスの鼻及び肺洗浄液中に感染ウイルスのHA分子と交差反応するIgA抗体とIgG抗体が検出された。一方、皮下接種条件では、鼻及び肺洗浄液中にIgA抗体は全く誘導されず、交差反応性を示すIgG抗体のみが検出された。

これらの結果は、表7のようにまとめることができる。即ち、ワクチンを経鼻接種したマウスにおいて、上気道感染時にみられた強い交差感染阻止が、主とし

て上気道上に存在している交差反応性の高いIgA抗体によっている。また、下気道感染時にみられた弱い交差感染阻止は、主として肺に量的に多く存在する交差反応性の低いIgG抗体によっている。従って、IgA産生を誘導する経鼻接種の方が、IgG産生のみ誘導する皮下接種に比較して、上気道感染に対する交差感染阻止能力が高い。このことが、ワクチンと流行ウイルス株の抗原性が異なる場合でも、経鼻接種の方が皮下接種

よりも防御能力が高い根拠になると考えられる。

III. CTB 併用 3 価ワクチンを鼻腔限局接種した時の予防効果²⁶

上記の結果は、マウスに比較的大容量 (10 μ l) のワクチンを接種した時のものである。しかし、ヒトで経鼻接種ワクチンを実現しようとする時、ワクチンの小容量を滴下や噴霧によって行うことになる。そこで以下の実験では、ワクチンを 1 μ l ずつ左右鼻孔に滴下、即ち、鼻腔内に限局接種する条件で予防効果を検討した。また、様々な亜型や型のウイルスの流行に備えるために 3 価ワクチンを接種した時の予防効果も検討した。

(1) **1 価のワクチンを 1 回接種方式で鼻腔限局接種した場合の交差感染防御**；様々な CTB 併用ワクチンを接種 4 週後に、A/貴州ウイルスを上気道感染した時、H3N2の亜型のどの変異ウイルス由来のワクチンを接種したマウスにおいても完全な交差感染阻止が成立した (表 8)。また下気道感染した時は、部分的な交差感染阻止が成立した。従って、ワクチンを鼻に限局接種した場合にも、大容量接種した場合とほぼ同様の予防効果がみられた。

(2) **1 価のワクチンを 2 回接種した場合の予防効果**；H3N2亜型のあるウイルス由来のワクチンを CTB と共に 1 次接種し、4 週後に別の変異ウイルスワクチンを 2 次接種したマウスにおいて、3 番目のウイルスのチャレンジに対する交差感染阻止能力を検討した (表 9)。その結果、上気道でも下気道でも、1 回接種方式の時よりも効果的に交差感染防御が成立した。しかも、この交差感染阻止能力は、ワクチンを 2 次接種後少なくとも 12 週間以上持続した。

(3) **3 価ワクチンを 2 回接種した場合の予防効果**；H1N1, H3N2, B 型のウイルス由来のワクチンを混合した 3 価ワクチンを CTB と共に 1 次接種 4 週後に別の 3 価ワクチンを 2 次接種したマウスにおいて、交差感染防御を検討した (表 10)。その結果、2 次接種後 2 週間目にチャレンジされた各々 PR8 (H1N1), A/貴州-X (H3N2), B/茨城ウイルスに対して、上気道でも下気道でも交差感染阻止が成立した。従って、3 価ワクチンを鼻に 2 回限局接種することにより、型や亜型の異なるウイルスの感染に対して幅広い交差感染防御を準備できることが明らかになった。

IV. CTB 併用ワクチンと生ウイルス投与の予防効果の比較

これまで自然感染から回復した生体には、強い交差感染阻止能力が長期間準備されることが報告されている。このような強い免疫状態をワクチン接種によって誘導することが、ワクチン開発の一つの目標となる。そこで CTB 併用ワクチンとウイルス感染による免疫状態及び感染阻止能力を、ワクチン及びウイルス液を左右鼻孔に 1 μ l ずつ投与したマウスにおいて検討した。

(1) **抗体応答及びチャレンジウイルスに対する感染阻止能力**；マウスに馴化した A/山形 (H1N1, 化血研より分与していただいたもの) ウイルス由来のワクチンを CTB と共に経鼻、あるいは生ウイルスを経鼻投与 4 週目に、致死量の同じウイルスをチャレンジ (20 μ l) した時の感染防御能力を比較した (表 11)。その結果、CTB 併用ワクチンによって上気道では完全な感染阻止が、下気道では部分的な感染阻止が成立した。一方生ウイルス (4LD₅₀) 接種によっては、下気道感染に対しても完全な感染阻止が成立した。また、両者の A/山形 HA 分子に対する抗体応答を比較した結果、CTB 併用ワクチン接種群よりも生ウイルス投与群の鼻及び肺洗浄液中の、特に IgG 抗体産生が高かった。このことは、ウイルス接種群の下気道での感染阻止能力が、ワクチン接種群に比較して高いことと相関している。この結果は、気道の免疫系が生きた増殖能の高いウイルスによって CTB 併用不活性ワクチンよりもよく刺激されることを示唆している。ところで、CTB 併用ワクチンの 1 回接種による感染阻止の能力は、2 回接種によって高められ、下気道感染に対する阻止効果が改善された。

(2) **交差感染阻止能力の比較**；様々のマウスに馴化したウイルス由来のワクチンを CTB と共に経鼻接種あるいは各々の生ウイルスを投与した場合の A/山形ウイルスチャレンジに対する交差感染阻止能力を検討した。その結果、ワクチン接種群、生ウイルス投与群共に、B 型ウイルス感染に対しては全く交差防御を示さなかった。一方、両群共に A 型内のウイルス間で部分的な交差感染阻止能力を示した。

以上の結果は、CTB 併用経鼻接種ワクチンが、多少劣るが、インフルエンザ罹患後の生体に類似の強い免疫応答を誘導していることを示している。

V. HA 分子に対する気道の IgA 抗体の性状とその役割^{27,28}

これまで述べてきた実験結果は、ウイルスの HA 分子に対する上気道の IgA 抗体の存在が、交差感染阻止と良く相関していることを示している。しかし、これらは、気道の IgA 抗体がウイルスの侵入局所で直接感

表15 各種 HA 分子免疫マウス由来の気道の精製 IgA 抗体による PR8 (H1N1) 感染に対する感染阻止*

受動免疫した IgA 抗体の由来	抗 HA-IgA (単位/マウス)	交差抗体量 (%) ; PR/8 抗 HA-IgA	肺内ウイルス価 (10 ^a)	p
—	—	—	5.6±0.6	—
PR/8 HA 免疫マウス (H1N1)	100	100	1.4±0.7	<0.001
A/山形 HA 免疫マウス (H1N1)	100	24	3.5±0.8	<0.02
A/福岡 HA 免疫マウス (H3N2)	100	9	5.9±0.5	NS

* それぞれの HA 免疫マウス由来の IgA 抗体 (生理的濃度:100単位) を経鼻投与 (受動免疫) しておいたマウスに, 3 時間後致死量の PR8 を感染させ, 感染 3 日後の肺乳剤のウイルス価を測定した。

図9 In vitro secondary CTL (C3Hマウス)

染阻止を媒介していることを示すものではない。そこで次に, 精製された HA 分子を CTB と共に経鼻免疫したマウスにおいて, その鼻, 肺及び血清中の抗 HAIgA 及び IgG 抗体の性状を検討した。さらに, 気道の IgA を精製し, その性状と感染阻止能力を検討した。

(1) 鼻, 肺洗浄液及び血清中の抗 HA1aA 及び IgG 抗体の性状: PR8(H1N1), A/山形(H1N1), A/福岡(H3N2)ウイルスの HA 分子を CTB と共に 2 回接種方式で免疫したマウスの鼻, 肺の洗浄液及び血清中の抗体は,

次のような性質を有していた。i) 鼻洗浄液中には抗 HAIgA 抗体が多く分布し, 肺洗浄液中には IgG 抗体が多かった。ii) 鼻や肺洗浄液中の抗 HAIgA 抗体の全 IgA 抗体量に対する割合 (比活性) は, 血中のそれに比較して高く, 一方, 局所の抗 HAIgG の全 IgG 抗体に対する割合は血中のものと変わらなかった (表12)。このことは, 抗 HAIgA 抗体は気道局所で活発に合成分泌されているが, IgG 抗体はその多くが血中から気道に移行したものであることを示唆している。iii) PR8, A/山形, A/福岡の各々のウイルスの HA 分子免疫したマウスの鼻洗浄液中には, 免疫に用いた HA 分子と反応する高いレベルの抗体のみでなく, 同じ亜型の他の HA 分子と交差反応する中程度の, また他の亜型の HA 分子と交差反応する低いレベルの抗体が含まれていた (表13)。その交差反応性は, IgA が IgG よりも数倍高かった。iv) 鼻, 肺洗浄液より IgA 及び IgG 抗体をアフィニティー・カラムを用いて精製した。それをセファクリル・カラムを用いて分画した結果, 精製された IgA 抗体の大部分が多量体であり, また IgG 抗体は単量体であった (図6)。

(2) 受動免疫された IgA 抗体による感染阻止: 気道の抗 HAIgA 抗体の感染阻止能力を, PR8, A/山形, あるいは A/福岡 HA 免疫マウスの精製 IgA 抗体を用いた受動免疫法によって検討した。i) 免疫マウスの鼻洗浄液に検出される量の抗 PR8HAIgA 抗体 (100ユニット) を正常マウスの気道に予め投与 (受動免疫) しておき, その 3 時間後に致死量の PR8 を経鼻感染した (表14)。その結果, 感染 3 日後の肺内ウイルス価が検出限界以下になり, 完全な感染阻止が示された。この IgA 抗体の感染阻止能力は受動免疫に用いる抗体量

に依存していた。ii) A/山形 HA 免疫マウス由来の抗 HAIgA 抗体も、その中に含まれる PR8HA と交差反応する抗体量と相関して、受動免疫した際に、PR8感染に対する部分的な感染阻止を示した。一方、A/福岡 HA 免疫マウス由来の IgA 抗体は、PR8HA に対する交差反応抗体が少なく、受動免疫時に、PR8感染に対する阻止能力を示さなかった (表15)。

(3) **受動免疫された IgA 抗体の感染阻止能力の持続**；生理的濃度の抗 PR8HA IgA 抗体を正常マウスの気道に投与後、経口的に致死量の PR8を経鼻感染して、抗体の感染阻止能力の持続を検討した。その結果、IgA の気道残存量の減少と相関して感染阻止能力の減少がみられた。この場合、少なくとも気道に30ng の IgA 抗体が検出される受動免疫後72時間迄感染阻止能力が維持した (図7)。

以上の結果は、HA 分子に対する気道の IgA 抗体が、HA 分子由来のウイルスに対する感染阻止においてばかりでなく、同じ亜型の変異ウイルスに対する交差感染阻止においても決定的な役割を果たしていることを示している。

VI. HA 分子以外の成分に対する免疫応答とその役割

ワクチンの中の HA 分子以外の成分の感染防御における役割を明らかにすることは、不要な夾雑物を含まないワクチンの開発を考える際に重要である。既に、感染細胞内で合成されたウイルスのコアの成分が、細胞表面に MHC 抗原と共に表現されると、感染細胞を破壊するキラーT細胞を誘導することが報告されている (図8)^{6,29,30}。そこで次に、CTB 併用ワクチンを経鼻接種することによって誘導される免疫応答の中に、感染の拡大を防止するのに役割を果たすキラーT細胞の応答が含まれているかどうかを検討した。

(1) **キラーT細胞の産生を促進するメモリーT細胞の誘導**；生のウイルス感染マウスと異なり、CTB 併用ワクチンを接種して1週間目の Balb/c マウスには、PR8 感染標的細胞 (P815) を破壊するキラーT細胞が誘導されていなかった。しかし、ワクチン接種マウスの脾細胞を、PR8感染脾細胞と共に5日間培養した時、高いレベルのキラーT活性の誘導が検出された (図9)。このキラー細胞は、感染による二次刺激に対してのみ出現することから、CTB 併用ワクチン接種によって誘導されたメモリー細胞によるものと考えられる。また、このメモリー細胞の活性は、PR8を感染した異なる MHC を表現する標的細胞では検出されず、MHC に拘束されていた。更に、このキラー産生促進活性を誘導するメ

モリー細胞は、CTB 併用ワクチン接種後3日目位から出現しはじめ、5日目位に最大値に達して、その後そのレベルを維持した。

このメモリー活性は、PR8 (H1N1)、A/山形 (H1N1)、亜型の異なる A/貴州-X (H3N2) のいずれの A 型ウイルス由来のワクチンを CTB と共に接種したマウスにおいても検出されるが、B/茨城ウイルス由来のワクチンを接種したものでは検出されなかった。従ってこの活性は、インフルエンザウイルスの型に特異的な、ワクチン成分中の恐らく NP 等のコアの成分に対して誘導されていることが示唆された。

(2) **ワクチン中の NP 分子の感染防御における役割**；PB8ウイルスより精製された NP 分子を CTB と共に経鼻接種した Balb/c マウスに、4 週後 PR8ウイルスを上気道感染し、その後の鼻のウイルス価の変動を検討した。その結果、CTB 併用 NP 接種群が、NP 単独群に比較して、感染3日目以後の鼻ウイルス価の速やかな低下を示した。従って、ワクチン中の NP が、感染からの回復促進に役割を果たしている成分の1つであることが示唆された。このことは、CTB 併用 NP 接種群に致死量の PR8ウイルスを感染した時、感染3日後の肺内ウイルス価に有意の減少が認められないが、感染3週間後の生残数が有意に高められた、という結果によっても支持された。

このような同じ型のウイルス内で交差反応性を示すキラーT細胞の存在も、IgA や IgG のような抗体による感染阻止機能が不十分な条件では、ワクチンの有効性を恒常的に確保するために必須であるようにみえる。

VII. まとめ

これまで述べた結果を要約すると次のようになる。

(1) 現行のインフルエンザワクチンを適当なアジュバントと共に鼻腔内に限局接種することにより、A 型ウイルスの同じ亜型内や、B 型内の変異ウイルスに対する交差感染阻止能力を高めることができる。

(2) この交差感染阻止能力は、主として上気道で産生分泌される、HA 分子に対する IgA 抗体と、下気道に侵出している血清由来の IgG 抗体によっている。この IgA 抗体は多量体で、IgG 抗体よりも交差反応性が高く、気道上での交差感染阻止を直接媒介している。

(3) 感染阻止抗体が有効でない条件では、ワクチンに含まれるコアの成分に対して誘導されたメモリーT細胞が、ウイルス侵入時にキラーT細胞の産生を促進することによって感染細胞の拡大を抑制し、回復の促進に貢献しているようにみえる。

(4) この経鼻ワクチンをヒトに適用しようとする時、その有効性や安全性を高める要件として次のことを挙げることができる。

- 1) ワクチンを鼻腔内に噴霧や滴下によって接種する。
- 2) 1 カ月間隔で2回、1回目はアジュバントと共に、2回目はワクチンのみ接種する。
- 3) H1N1, H3N2, B型のウイルス由来のワクチンを混合接種する。
- 4) ワクチン株としては最近流行したウイルス株を用いる。(最近の変異ウイルスのHA分子上には、過去から現在迄の変異が蓄積して表現されており、新しい流行株はその前の流行株に近似していると考えられる。)
- 5) 今後、ウイルス成分の各々の感染防御上の役割を明らかにし、重要な成分のみから構成されたカクテルワクチンの作製を目指す。
- 6) アジュバントの作用機序、副反応等について詳細に検討し、その有効性の基礎を明らかにする。これをもとに、さらに優れた経鼻接種アジュバントの開発を目指す。

おわりに

CTBのワクチンに対する免疫応答増強効果について簡単に述べると次のようになる。1) CTBは、ワクチンと同時に、しかも同じ粘膜上に投与された時に一過性に免疫応答を増強する¹⁶。このことはCTBが気道の粘膜の免疫系に作用して、ワクチンに対する感作初期の反応、特に抗原認識段階やT、B細胞の初期分化に促進的に作用していることを示唆している。2) アジュバントとして用いた低濃度のCTBを頻回投与して、気道上に予め抗CTB抗体を誘導しておいた条件でも、CTBのワクチンに対するアジュバント活性は抑制されることがなかった³¹。従って、CTBはワクチンと共に頻回経鼻接種され得る。我々は今後さらに、ワクチンのアジュバントとしてのCTBの有用性を検討し、この流れの研究に有用な知見を加えたいと考えている。

[本研究は、倉田 毅 (国立予防衛生研究所・感染病理部長)、鯨ヶ井靖雄、倉田秀樹、船戸洋乃、吉沢啓子、山中亜弥、下原美由紀 (予研実習生)、菊田 宜、伊藤勇次、浅沼秀樹 (予研研究生)、平林義弘、スエンビオン・ギズラーソン (HS財団・協力研究員)、中川雅郎 (予研・獣疫部)、相沢主税 (北里研究所・技術部長)、長峯 隆 (北研・インフルエンザ部門長)、鈴木雄次郎 (北研・インフルエンザ部門) その他、北研の方々。

大谷 明 (予研・元所長) 等との協同研究によってなされた]

References

- 1) Murphy, B. R., and Webster, R. G. (1990). Orthomyxoviruses. In Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe, R. M. Chanock, M. S. Hirsch, J. L. Melnick, eds. Raven Press, New York. p.1091.
- 2) Wilson, I. R., and Cox, J. C. (1990). Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 737-771.
- 3) Mayer, H. M., Jr., Hopps, H. E., Parleman, P. D. and Ennis, F. A. (1978). Review of existing vaccines for influenza. *Am. J. Clin. Pathol.* **70**, 146-152.
- 4) Schulman, J. L., and Kilbourne, E. D. (1965). Induction of Partial specific heterotypic immunity in mice by a single Infection with influenza A virus. *J. Bacteriol.* **89**, 170-174.
- 5) Hoskins, T. W., Davies, J. R., Smith, A. J., Allchin, A., Miller, C. L., and Pollock, T. M. (1974). Influenza at Christ's Hospital. *Lancet* **1**, 105-108.
- 6) Webster, R. G., and Askonas, B. A. (1980). Cross-protection and cross-reactive cytotoxic T cells induced by influenza virus vaccines in mice. *Eur. J. Immunol.* **10**, 396-401.
- 7) Yetter, R. A., Lehrer, S., Ramphal, R., and Small, P. A. Jr. (1980). Outcome of influenza infection: effect of site of initial infection and heterotypic immunity. *Infect Immun.* **29**, 654-662.
- 8) Couch, R. B., and Kasal, J. A. (1983). Immunity to influenza in man. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 529-549.
- 9) Liew, F. Y., Russell, S. M., Appleyard, G., Brand, C. M., and Beale, J. (1984). Cross-protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA antibody rather than serum antibody or cytotoxic T cell activity. *Eur. J. Immunol.* **14**, 350-356.
- 10) Waldman, R. H., Wigley, F. M., and Small,

- P. A., Jr. (1970). Specificity of respiratory secretion antibody against influenza virus. *J. Immunol.* **105**, 1477-1483.
- 11) Taylor, H. P. and Dimmock, N. J. (1985). Mechanisms of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J. Exp. Med.* **161**, 198-209.
- 12) Underdown, B. J. and Schiff, J. M. (1986). Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* **4**, 389-417.
- 13) Waldman, R. H. and Ganguly, R. (1974). Immunity to infections on secretory surfaces. *J. Infect. Dis.* **130**, 419-425.
- 14) Wright, P. F., Murphy, B. R., Kervina, M., Lawrence, M. E., Phelan, M. A., and Karzon, D. T. (1983). Secretory immunological response after intranasal inactivated influenza A virus vaccination: evidence for immunoglobulin A memory. *Infect. Immun.* **40**, 1092-1095.
- 15) Tamura, S.-I., Samegai, Y., Kurata, H., Nagamine, T., Aizawa, C., and Kurata, T. (1988). Protection against influenza virus infection by vaccine inoculated intranasally with cholera toxin B subunit. *Vaccine* **6**, 409-413.
- 16) Tamura, S.-I., Samegai, Y., Kurata, H., Kikuta, K., Nagamine, T., Aizawa, C., and Kurata, T. (1989). Enhancement of protective antibody responses by cholera toxin B subunit inoculated intranasally with influenza vaccine. *Vaccine* **7**, 257-262.
- 17) Tamura, S.-I., Kurata, H., Funato, H., Nagamine, T., Aizawa, C. and Kurata, T. (1989). Protection against influenza virus infection by a two-dose regimen of nasal vaccination using vaccines combined with cholera toxin B subunit. *Vaccine* **7**, 314-320.
- 18) Tamura, S.-I., Asanuma, H., Ito, Y., Hirabayashi, Y., Suzuki, Y., Nagamine, T., Aizawa, C., Kurata, T., and Oya, A. (1992). Superior cross-protective effect of nasal vaccination to subcutaneous inoculation with influenza HA vaccine. *Eur. J. Immunol.* **22**, 477-481.
- 19) van Heyningen, S. (1974). Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM. *Science* **183**, 656-657.
- 20) Holmgren, J. (1981). Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature* **292**, 413-417.
- 21) Moss, J., Burns, D. L., Hsia, J. A., Hewlett, E. L., Guerrant, R. L. and Vaughan, M. (1984). Cyclic nucleotides: mediators of bacterial toxin action in disease. *Ann. Int. Med.* **101**, 653-666.
- 22) Lycke, N., Lindholm, L. and Holmgren, J. (1983). IgA isotype restriction in the mucosal but not in the extramucosal immune response after oral immunizations with cholera toxin or cholera B subunit. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **72**, 119-127.
- 23) Holmgren, J. and Svennerholm, A. M. (1983). Cholera and the immune response. *Prog. Allergy*, **33**, 106-119.
- 24) Elson, C. O. and Ealding, W. (1984). Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J. Immunol.* **133**, 2892-2897.
- 25) Tamura, S., Samegai, Y., Kurata, H. and Kurata, T. (1988). Effects of cholera toxin on delayed type hypersensitivity to sheep red blood cells inoculated intranasally into mice. *Microbiol. Immunol.* **32**, 1145-1161.
- 26) Tamura, S.-I., Ito, Y., Asanuma, H., Hirabayashi, Y., Suzuki, Y., Nagamine, T., Aizawa, C. and Kurata, T. (1992). Cross-protection against influenza virus infection afforded by trivalent inactivated vaccines inoculated intranasally with cholera toxin B subunit. *J. Immunol.* **149**, 981-988.
- 27) Tamura, S.-I., Funato, H., Hirabayashi, Y., Kikuta, K., Suzuki, Y., Nagamine, T., Aizawa, C., Nakagawa, M. and Kurata, T. (1990). Functional role of respiratory tract haemagglutinin-specific IgA antibodies in protection against influenza. *Vaccine* **8**, 479-485.

- 28) Tamura, S.-I., Funato, H., Hirabayashi, Y., Suzuki, Y., Nagamine, T., Aizawa, C. and Kurat, T. (1991). Cross-protection against influenza A virus infection by passively transferred respiratory tract IgA antibodies to different hemagglutinin molecules. *Eur. J. Immunol.* **21**, 1337-1344.
- 29) Ada, G. L., and Jones, P. D. (1986). The immune response to influenza infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **128**, 1-54.
- 30) Wraith, D. C. (1987). The recognition of influenza A virus infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol. Today* **8**, 239-246.
- 31) Tamura, S., Funato, H., H., Nagamine, T., Aizawa, C. and Kurata, T. (1989). Effectiveness of cholera toxin B subunit as an adjuvant for nasal influenza vaccination despite pre-existing immunity to CTB. *Vaccine* **7**, 503-505.