

# 日生研おより

第68巻 第3号(通巻624号) 2022年(令和4年)7月

## 挨拶・巻頭言

MV (Mind Vaccine)・考  
……………野村吉利(2)

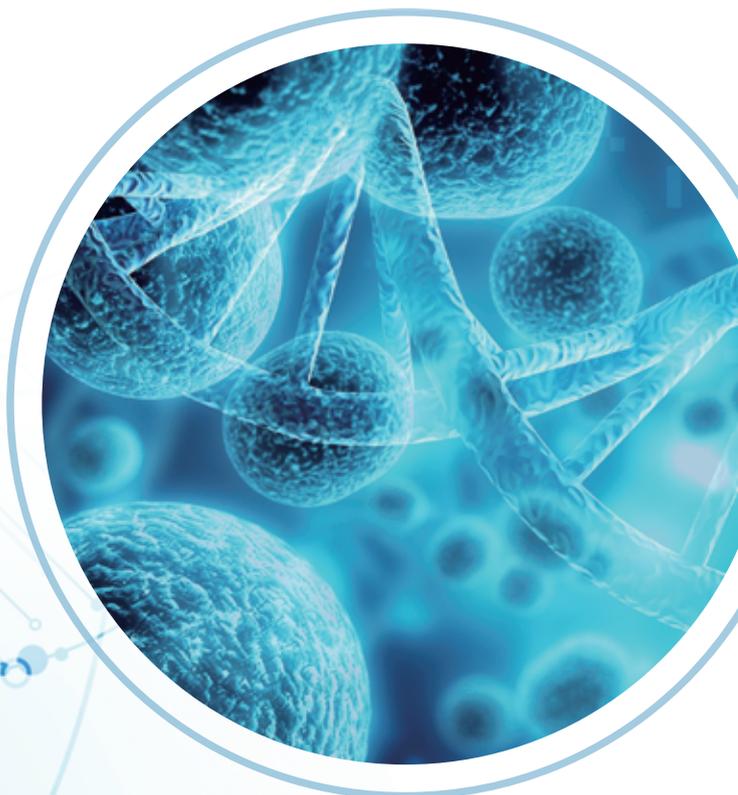
## レビュー

マクロファージ病理学  
第3回:マクロファージと肝毒性(その2)  
……………山手丈至(3)

抗原のキトサン粒子化による粘膜ワクチン  
への応用……………高井亮輔(11)

## おしらせ

2022年度定時評議員会開催……………(18)



## MV (Mind Vaccine) ・考

野村 吉利

約7～8万年前と目される共通祖先の発生以来、累積人口一千百五十億、現時点で七十八億という巨大な地球社会を築き上げた人類は今や自らの存続にとって致命的な環境破壊という障壁に直面することとなった。

その解決策として2015年に国連総会で採択された17の世界的目標、169の達成基準、232の指標から成るSDGs（持続可能な開発目標）の旗印の下、ようやく世界規模での対応が始まり直近では2021年末に開催されたグラスゴーでのCOP26において条約加盟各国の温室効果ガス排出量ゼロ目標達成計画（30～50年の幅）の発表に辿り着いた。

これらのSDGs課題が数十年後に解決されると仮定した場合、その段階で人類滅亡の危機脱出の見通しが立つのであろうか？ SDGsに掲げられた目標は主に“物”や“政治”又は“制度”といった可視的なものであり不可視的な「心の問題」の解決の遅延が予想されるからである。人間の脳活動の深奥にある“心”には宿命的に善と悪が共存する。その最たる戦争を含めて全ての犯罪の根源たる悪の要素を抑制又は排除する為に人類は死闘を重ねて来た。その結果、近時での大規模戦争回避という成果は挙げ得たものの地域紛争やテロリズムほか一般犯罪は世界人口増加という基盤があるにせよ減少を見せていない。

その悪をより効率的且つ予防的に抑制乃至制御することが出来れば人類存続の道に光明が見出せるのではなかろうか。まさにMV (Mind Vaccine) の創出が希求される場所である。その手法としては人類がこれまでに同じ目標に向かって用いて来たような教育、政治、宗教ではなく、より具体的且つ実践的な新しいツールが必要となろう。

まず心に潜む“悪”の心因要素を解明することが前提となる。例えば「過ち先入観」、「過信」、「利己」、「反道徳」、「孤独」などが「基本的な悪心因要素」、次にこれらから派生する「人種差別」、「誘拐」、「性差別」、「詐欺」など個別的なものから「武力主張」や「侵略」など集団的なものが「派生的な悪心因要素」として挙げられる。次にこれら各要素に対応したMVを創ることになるが、二つの方向性が考えられる。一つは各心因要素の発現に関わる特定な脳の生理活性素因物質の発見とその抑制物質発現型ワクチンで従来のワクチンと同じ「物質型」、他の一つは個々の悪心因要素を感情路線ではなく道義的理性路線で排除する「心因型」である。前者の物質型ワクチンは急速な発展をみせている分子生物学、遺伝子操作、AIなどの先端技術を駆使すれば実現も可能と予測されるが、結果的には脳組織に直接的に作用する医薬品となる可能性が強く、人間の尊厳無視への危惧が予想されて実用化の公算は小さい。従って究極的には後者の心因型ワクチン・MVの開発に希望を託することとなろう。一例として「利己ワクチン」を挙げれば、その内容は「他人を1. 喜ばせたか？ ～2. 励ましたか？ ～今日一日、言葉と行動で」といった倫理的理性路線上に創られた簡潔なcatch word抗原が記載されたもので、その使用形態としては幼児期～小学低学年で使う教科書型と一般使用可能なSNSアプリ型となり、使用方法としては「一日一回抗原唱読」を基準とし、抗原の反復刺激による心的抗体産生即ち利己心発現を予防する精神構造の醸成を図るものである。

この心因型MVの特性は遅効性であること、そしてその効果が他の複数のワクチンと重複性を持つことで、例えば「利己ワクチン」の効果は「孤独ワクチン」の効果と重なり、「利他精神」や「協調精神」が共に醸成、定着されること、さらにはその重複使用によってより強固なブースター効果も期待されることである。また上述した基礎的な悪心因要素対応のワクチンは派生型の悪心因要素にも有効となるので殆どの派生型ワクチンが開発不要となり経済性が高まり全地球的普及を容易にすることである。但しこのMVは既存の一部教育や宗教が過去に犯したmind control的な使用を排除することが絶対条件となりその対応策樹立も必須要件となるが遠くない未来での開発を夢見る余地も皆無ではないと考えられる。〔註〕本稿はロシアのウクライナ侵攻直前の2022.1.18受領、編集部

(名誉顧問)

## マクロファージ病理学 第3回：マクロファージと肝毒性（その2）

山手丈至（大阪府立大学名誉教授）

### はじめに

肝臓は、体内に取り込まれた様々な化学物質を代謝・解毒する最も重要な器官である。それ故に、化学物質の毒作用により肝障害が生じるリスクが常にある。毒作用に基づいた肝障害の発生機序については広く研究されている。一方、肝障害は、肝在住のマクロファージ（クッパー細胞やグリソン鞘間質樹状細胞など）や傷害部位に出現する炎症細胞により多様に修飾される。このような生体反応に基づいた肝毒性の発現機序に関する研究は少ない。「マクロファージ病理学」の「第3回：マクロファージと肝毒性（その1）」（第68巻第2号）では、肝恒常性維持と、化学物質による肝障害に係わるマクロファージ機能について、M1/M2分極化の観点から紹介した。今回は、（その2）として、肝在住のマクロファージを介した肝毒性と、肝硬変症や胆管周囲線維症などの慢性病変に出現するマクロファージ

の特性について解析した研究成果を紹介する。

### 1. 肝毒性病変の発現に係わる肝マクロファージの役割

化学物質誘発肝障害モデルとして広く利用されているチオアセトアミド（TAA）は、薬物代謝酵素により生成される中間代謝物が肝毒性を惹起する [1]。ラットに TAA を投与すると、投与後 1 日で肝小葉中心性の凝固壊死を誘起し、1 日目と 2 日目では炎症細胞が浸潤し、3 日目と 5 日目には炎症細胞が減じつつ修復性線維化が生じ、7 日目までには肝細胞が再生し元の組織に復する [2, 3]。炎症細胞の多くは CD68 発現 M1 型（炎症誘導）と CD163 発現 M2 型（抗炎症作用）のマクロファージである。クロドロネート前処置により肝マクロファージを枯渇させると、TAA 誘発肝細胞傷害は遷延し、異栄養性石灰沈着が生じる [4]。すなわち、組織傷害を助長し貪食活性の高い M1 型と、抗炎症作用と修復性線維

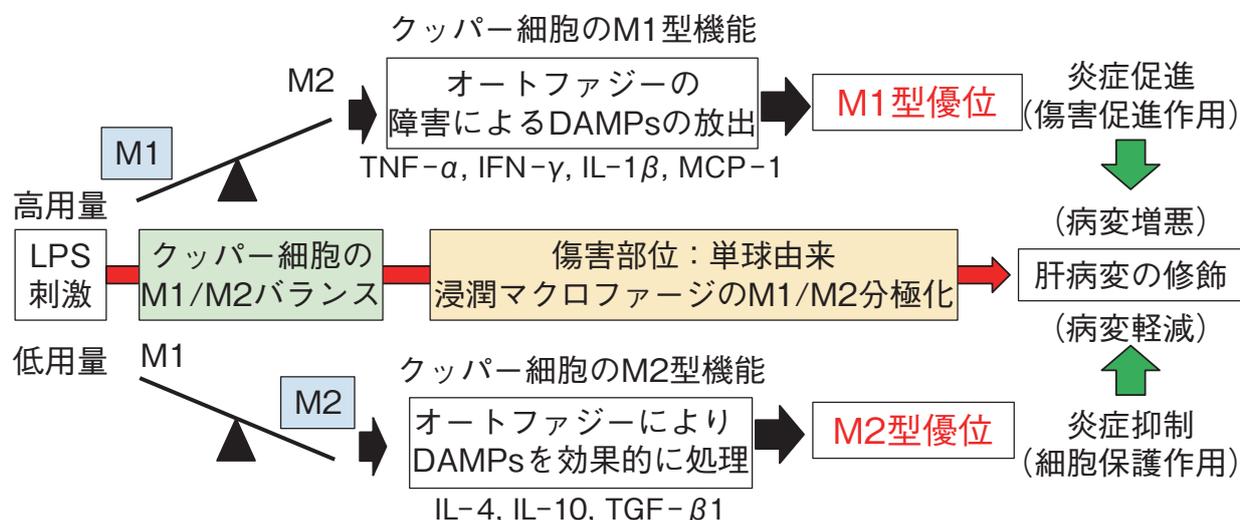


図1 LPSの刺激によるクッパー細胞の二面性に基づいた肝病変への影響（本文参照）

化に係わる M2 型の機能が欠失することで、TAA 誘発肝障害が増悪する。M1/M2 型マクロファージが適切な時期に出現し、機能が分極化し効果的に作用することが肝細胞傷害後の組織修復において重要である [4]。そこで、肝毒性発現に係わる肝マクロファージの影響についてラットを用いてさらに解析した。

#### 1-1. デキサメサゾンの TAA 誘発肝毒性への影響

デキサメサゾンは抗炎症薬として広く利用されている。デキサメサゾンの臨床適用量を正常なラットに投与すると、類洞に沿って存在する CD163 発現クッパー細胞が 7 割程度減少した。組織学的な異常はみられなかったが、肝逸脱酵素の AST と ALT の値が増加した。なお、投与中止 4 日後にはクッパー細胞は 8 割程度回復し、かつ AST と ALT の値も対照群レベルに戻った。デキサメサゾンはクッパー細胞を減少させること、またクッパー細胞が肝逸脱酵素のクリアランスに係わることで改めて示された [5, 6]。

そこで、デキサメサゾンを前処置し、その後 TAA を投与する実験を行った [5]。その結果、TAA 単独投与群では投与後 1～3 日に肝細胞傷害部位に CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型が多数出現したが、デキサメサゾン処置後に TAA を投与した群では、M1 型は投与後 1～7 日まで常に 7 割程度、M2 型は投与後 1～3 日に 5 割程度減少した。なお、M2 型は投与後 5 日と 7 日では正常レベルまで回復した。興味ある所見として、TAA 投与による肝細胞傷害後の修復性線維化は投与後 3～5 日に生じ始めるが、その程度はデキサメサゾン前処置群においてかなり軽減していた。デキサメサゾン処置により炎症を助長する M1 型の誘導が抑制され組織傷害が減じた結果、線維化の程度も軽減したと考えられた。また、デキサメサゾン処置によりクッパー細胞が減少していたことから、M1 型の誘導抑制にはクッパー細胞の機能低下も係わると考えられた。さらに、

デキサメサゾン処置で M2 型も減少していたが、M1 型よりもより早く回復していたことから、M2 型による修復性の線維化が良好に機能したとも考えられた。クロドロネート処置では、ほとんどの肝マクロファージが長期に亘り枯渇するために、M1/M2 型の機能が欠失し、その結果 TAA 誘発肝障害が増悪した [4] が、デキサメサゾンの臨床適用量では、肝マクロファージ機能がほどよく抑制され、その結果線維化（組織修復）が改善したと考えられた [5]。

#### 1-2. 低用量リポポリサッカライド (LPS) の TAA 誘発肝毒性への影響

グラム陰性菌の細胞壁構成成分である LPS は、大腸菌症等の際に肝臓へ多量に流入することで肝障害を惹起する。正常なラットに低用量 LPS を投与した際の肝マクロファージへの影響と、LPS 前処置による TAA 誘発ラット肝障害への効果を検討した。なお、予備実験により、AST や ALT などの肝逸脱酵素値に影響が生じることなく、かつ肝細胞傷害が惹起されない用量を LPS 低用量として設定した。要するに、肝臓には病理学的な変化が認められない用量である [7, 10]。

##### 1-2-1. 低用量 LPS の肝マクロファージへの影響

低用量 LPS を正常なラットに投与すると、CD163 発現クッパー細胞が活性化して腫大する（写真 1）。腫大したクッパー細胞には、M2 型に発現する CD204 の増加があり、かつ抗炎症作用のある M2 型因子の IL-10 や TGF- $\beta$  1 が増加していた。なお、MCP-1、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  などの炎症性因子の増加があったが、CD68 発現 M1 型の浸潤マクロファージの反応は極軽度であった。クッパー細胞は、微小環境条件に依存し M1 型あるいは M2 型の特性を現すと考えられる [7, 9, 10] が、低用量 LPS の刺激では M2 型の機能がより優位になることが示唆された（図 1）。興味ある所見として、低用量 LPS 投与により肝細胞における LC3B 抗体陽性の

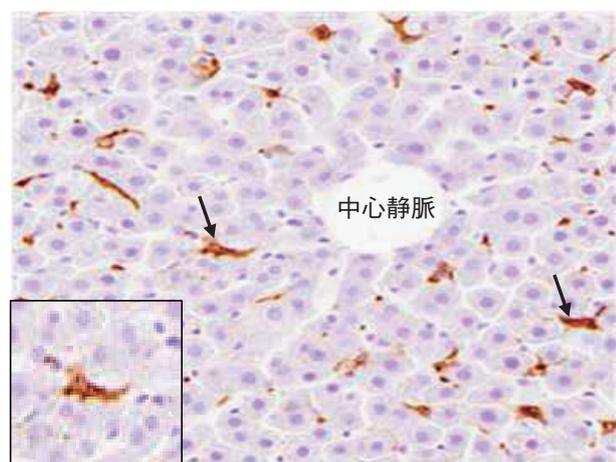


写真1 低用量 LPS により活性化した CD163 免疫陽性クッパー細胞 (矢印)  
挿入図：クッパー細胞の拡大像

オートファゴゾームが増数していた (写真 2)。また、クロドロネート前処置によるクッパー細胞枯渇下での低用量 LPS 投与では、オートファゴゾームの誘導が抑制された。すなわち、低用量 LPS により刺激されたクッパー細胞は、肝細胞のオートファジーの誘導にも係わることが示された。

以上より、低用量 LPS の正常ラットへの投与は、クッパー細胞を活性化することで M2 型の機能が誘導され、かつ肝細胞のオートファジーを亢進することが分かった (図 1)。

### 1-2-2. 低用量 LPS 前処理の TAA 誘発肝毒性への影響

TAA 投与前 24、12、6 及び 2 時間のポイントで低用量 LPS を投与しておく、TAA 単独投与群 (LPS 前処置なし) に比べ、LPS 前処置群で TAA 誘発肝障害が軽減した。特に、24 と 12 時間前に低用量 LPS を投与した群では顕著であり、時間依存性に TAA 誘発肝障害が軽減することが分かった。そこで、低用量 LPS の 24 時間前処置の TAA 誘発肝毒性への影響をより詳細に解析した [8]。その結果、肝細胞傷害と炎症反応が最も顕著となる TAA 投与後 1 日と 2 日において、低用量 LPS 前処置群でその病変が 8 割程度も軽減され、同時に TAA 単独投与群で増加した AST と ALT の値も低用量 LPS の前

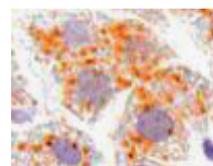


写真2 低用量 LPS により誘導された肝細胞内の LC3B 免疫陽性のオートファゴゾーム

処置で低下していた。さらに、TAA 単独群に比較し、低用量 LPS 前処置群では、CD68 発現 M1 型は投与後 2 日に減少し、かつ M1 型が産生する炎症誘導・組織傷害に係わる MCP-1 と IL-1 $\beta$ 、そして M2 型誘導に係わる IL-4 が低下していた。IL-4 の低下に関連し、実際に低用量 LPS 前処置群では、投与後 2 日に CD163 発現 M2 型も減少していた。また、低用量 LPS 前処置群では、傷害部位周囲の肝細胞に LC3B 抗体陽性のオートファゴゾームの増数があった。一般的には、TAA により傷害された肝細胞内では、核内から細胞質に移動する HMGB-1 (high mobility group box-1) などの DAMPs (damage-associated molecular patterns) が、細胞外に放出されることで炎症が増強される [1, 11]。この起炎因子となる DAMPs が、オートファジーにより効果的に処理されれば炎症が抑制される。低用量 LPS で刺激されたクッパー細胞は M2 型の抗炎症作用を現し、かつ肝細胞内で増数したオートファゴゾームは TAA 投与の傷害で生じた DAMPs を効果的に処理することで、TAA 誘発肝毒性の病変が軽減したと考えられた (図 1)。

### 1-3. ガラクトサミン (D-GalN) 誘発肝障害の発現機序

D-GalN は、コンドロサミンとも呼ばれ、糖タンパク質や粘液多糖の主成分で、ガラクトースがアミノ化されたアミノ糖である。D-GalN 誘発肝障害は、TAA やアセトアミノフェン誘発の肝小葉中心性の肝細胞傷害病変 [2, 3, 11] とは異なり、肝小葉全体に散在する多巣性の病変を形成する。D-GalN をラットに投与すると、投与後 1 日と 2 日に、AST

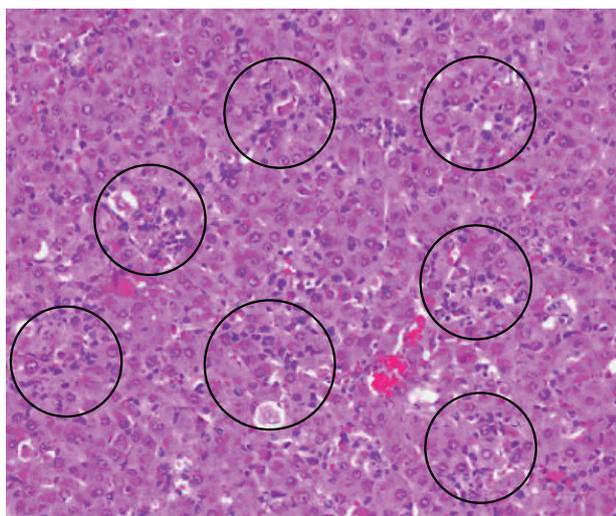


写真3 ガラクトサミン (D-GalN) 誘発の肝小葉内巣状病変 (HE 染色)

と ALT の値が増加し、肝小葉内に多巣性病変が形成された (写真3) [12]。その病巣は、数個の肝細胞の変性・アポトーシス・凝固壊死から成り、同時に炎症反応を伴っていた。加えて、病巣には膠原線維を産生する筋線維芽細胞が増生し修復性線維化も並行して生じていた。投与後3日と5日ではこれら病変は急激に消失し肝細胞が再生した。「変性-壊死-炎症-再生-修復」が同時に生じるこのような巣状病変の組織像は、ヒトの急性ウイルス性肝炎のそれに類似するとされる [12]。

D-GalN 誘発肝巣状病変において、投与後2日に CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型が増加し、二重免疫染色により CD68 と CD163 を共発現するマクロファージが実に約 80% もあった。また、投与後1日と2日において、M1 型 (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-6) と M2 型 (IL-4、IL-10、TGF- $\beta$ 1) の因子が共に増加していた [12]。D-GalN 誘発肝障害では、刺激されたクッパー細胞から TNF- $\alpha$  などの細胞傷害因子が産生され、肝細胞にアポトーシスや凝固壊死を引き起こすことで、肝小葉内に多巣性の病変が形成されると考えられている [13]。低用量 LPS に刺激されて誘導された M2 型機能を現すクッパー細胞とは異なり、D-GalN 誘発肝障害でのクッパー細胞は M1 型の機能が優位に作動して

いると考えられた。実際、今回の D-GalN 誘発肝障害においては、元来 CD163 を発現するクッパー細胞は投与後1日で腫大・増数し活性化していた。すなわち、D-GalN により刺激されたクッパー細胞が M1 型機能を現すことで、その後に M1 型と M2 型の双方の機能を現す浸潤マクロファージが肝小葉内の巣状病変に即座に誘導され「変性-壊死-炎症-再生-修復」が同時に生じたものと考えられた。なお、D-GalN 誘発肝障害では、投与後1日と2日の傷害肝細胞において、異常な形態の LC3B 抗体陽性のオートファゴゾームが観察された。これは細胞内で処理出来なかった DAMPs が細胞外に放出され、その後の M1 型と M2 型の浸潤マクロファージを誘導する起炎因子として働いている可能性を示す。

以上より、D-GalN 誘発肝障害では、クッパー細胞は M1 型の機能が優位となり、異常なオートファジーを誘導することで、肝小葉内に特徴的な多巣性病変を形成すると考えられた。

#### 1-4. 肝障害に係わるクッパー細胞と LPS の影響

腸管微生物が産生する LPS などの PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) は、門脈を介し、TLRs を発現するクッパー細胞や類洞内皮を、肝障害が惹起されない程度に常に刺激していると考えられる [14]。これが異常となると自然免疫が起動し、特に、マクロファージ系細胞であるクッパー細胞は、炎症誘導に係わる M1 型のサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$ 、IL-6)、あるいは M2 型の抗炎症性サイトカイン (IL-10 や TGF- $\beta$ 1 など) を産生する [9, 10]。化学物質誘発の肝毒性病変は、そのようなクッパー細胞の機能状態に依存し多様に修飾されると考えられる (図1)。

上述したように、低用量 LPS 前処理により TAA 誘発肝障害が軽減された。その現象は、M2 型の抗炎症作用が優位に機能したためと考えられる。また、LPS そのものがオートファジーを誘導することが報告されている [15] が、低用量 LPS 前処理により

刺激されたクッパー細胞を介してもオートファジーがさらに亢進されることが分かった。オートファジーは、細胞内の DAMPs などの不要物を処理し、細胞の恒常性維持に係わっている。すなわち、低用量 LPS は、肝細胞保護作用を示すことで肝障害を軽減すると考えられた (図 1) [8]。

そこで、高用量の LPS 投与により生じる肝臓の病態を解析した。高用量 LPS は、AST と ALT の値が異常に増加し、かつ肝細胞に凝固壊死を惹起する用量とした。その結果、やはりクッパー細胞は腫大し活性化するが、肝組織には CD68 発現 M1 型の出現とその関連因子である TNF- $\alpha$  や IL-1  $\beta$  が増加していた。さらに、傷害されつつある肝細胞では、HMGB-1 の核内から細胞質への移行が顕著にみられ、かつ LC3B 抗体陽性の空胞状の異常な形態を示すオートファゴソームが散見された。これらの所見から判断すると、高用量 LPS 投与により活性化したクッパー細胞は M1 型機能を現すことで、TNF- $\alpha$  などの因子を産生し肝細胞に壊死を惹起させるとともに、肝細胞に異常なオートファジーが誘導され HMGB-1 などの DAMPs を処理することができず細胞外に放出し、その結果、DAMPs が起炎因子となり、M1 型の浸潤マクロファージが誘導され肝障害がさらに助長されると考えられた。すなわち、高用量 LPS は傷害促進作用を現す (図 1)。上述したように、D-GalN 誘発肝障害においてもクッパー細胞は M1 型として機能しており、かつ異常なオートファジーがその病変形成に係わっていることが示された。D-GalN/LPS 併用投与では、D-GalN 単独投与よりも肝小葉内の肝細胞により広範な壊死と炎症反応が生じることが報告されている。それは、LPS で刺激されたクッパー細胞が TNF- $\alpha$  などの細胞傷害因子を過剰に産生するためと考察されている [13]。この D-GalN/LPS 併用投与は、ヒトの薬剤性やウイルス性の急性肝不全 (劇症型肝炎など) の病態モデルとして用いられている [13]。

以上のように、肝在住マクロファージであるクッパー細胞は、微小環境、特に門脈から流入する LPS の血中濃度に依存し M1 型 (傷害促進作用)、あるいは M2 型 (細胞保護作用) の二面性の機能を現す可能性がある [9, 10]。肝毒性病変の形成において、その炎症反応に対し前者では促進的に、後者では抑制的に作用すると思われる (図 1)。ヒトの薬剤性肝障害では、LPS により刺激された肝マクロファージによる炎症誘導が、その病理発生に重要であると考えられている [16]。また、D-GalN 誘発肝障害では、LPS により刺激されたクッパー細胞が、その病変形成の助長因子になる [13]。毒性試験を実施する際に、クッパー細胞に影響を与える LPS を産生する腸内細菌叢の状態を勘案し評価する必要があるかもしれない。肝臓に常在するクッパー細胞においても、傷害組織に出現する血中単球由来の浸潤マクロファージのように M1 型と M2 型の機能バランスがあることが分かった (図 1)。LPS などの PAMPs は、自然免疫系を介し、肝疾患のみならず、神経変性疾患や癌など様々な病態形成に係わると考えられていることから、「腸内細菌叢-クッパー細胞-肝病変」の関連は今後さらなる研究が必要となる [14]。

## 2. 化学物質誘発の肝臓の慢性病変 (肝硬変症と胆管周囲線維症) におけるマクロファージの特性

炎症促進と高い貪食活性を有する M1 型と、抗炎症作用と線維化を誘導する M2 型が効果的に出現し連携することで、傷害された組織が良好に修復する。一方、難治性の皮膚強皮症モデルであるブレオマイシン誘発の皮膚硬化症では、M1 型と M2 型の出現が分極化することなく持続するために、これらマクロファージの相互連携が破綻する結果、不完全治癒であるケロイド様の瘢痕が惹起される [17, 18]。そこで、難治性の線維化とされる肝硬変症と胆管周囲線維症のラットモデルを作製し、出現するマクロファージの特性を解析した。

## 2-1. TAA の長期反復投与により作出した肝硬変症におけるマクロファージの特性

TAA を週 2 回 25-32 週間に亘り反復投与することで肝硬変症の病態を作出することができる。このモデルでは、15 週以降に、中心静脈とグリソン鞘の間、中心静脈と中心静脈の間、グリソン鞘とグリソン鞘の間を繋ぐように線状に膠原線維が増生することで、いわゆる線維性架橋（線維化）が形成される。その架橋に囲まれた肝細胞の集団が偽小葉となる。その後、膠原線維がさらに増生することで線維性架橋の幅が太くなり線維化が進み、かつ肝細胞の傷害と再生が繰り返し生じることで偽小葉がより明瞭となる [19]。TAA 誘発肝硬変症では、肉眼的に大小の結節病変が形成されることから、ヒトの小結節性肝硬変症に類似するとされる。

### 2-1-1. 線維性架橋の形成に係わるマクロファージの特性

線維性架橋には  $\alpha$ -平滑筋アクチンを発現する筋線維芽細胞が出現する (写真 4)。筋線維芽細胞は、 $TGF-\beta 1$  を産生するマクロファージにより誘導される [18]。線維性架橋部位には、15 週ごろより CD68 発現 M1 型 (写真 5) と CD163 発現 M2 型 (写真 6) のマクロファージが数多く出現し始め、その後も持続的に増加していた。その架橋部位をマイクロダイゼクション法で抽出し、発現因子を解析したところ、M1 型因子である  $IFN-\gamma$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$  と、M2 型因子である  $TGF-\beta 1$ 、 $IL-4$ 、 $IL-10$  が増加していた。特に、線維化に係わる  $TGF-\beta 1$  の発現は、肝硬変症の進行に伴い増加した。プレオマイシン誘発の皮膚硬化症モデル [17, 18] と同様に、M1 型による組織傷害と同時に出現する M2 型による線維化が慢性的に持続することで、線維性架橋が形成され、進展することが分かった。すなわち、線維性架橋部位においても、M1 型と M2 型の効果的な機能連携が破綻しており、その結果難治性の線維化である肝硬変症の病態が進展することが分かった [19]。

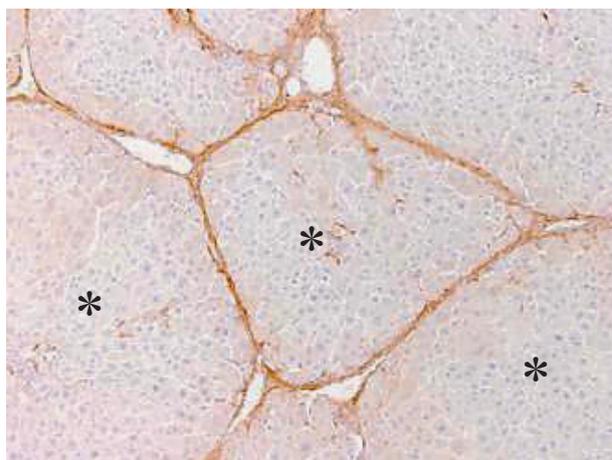


写真 4 肝硬変症の線維性架橋における  $\alpha$ -平滑筋アクチン免疫陽性筋線維芽細胞と偽小葉 (\*) の形成

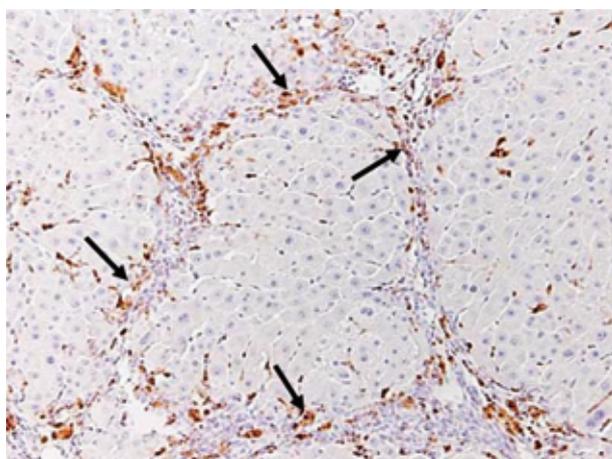


写真 5 肝硬変症の線維性架橋 (矢印) における CD68 免疫陽性 M1 型マクロファージ

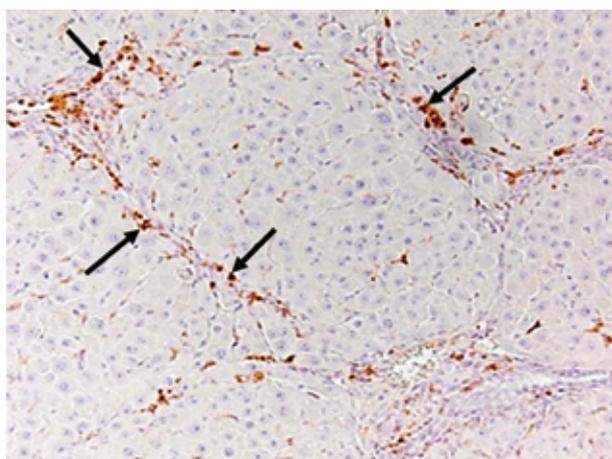


写真 6 肝硬変症の線維性架橋 (矢印) における CD163 免疫陽性 M2 型マクロファージ

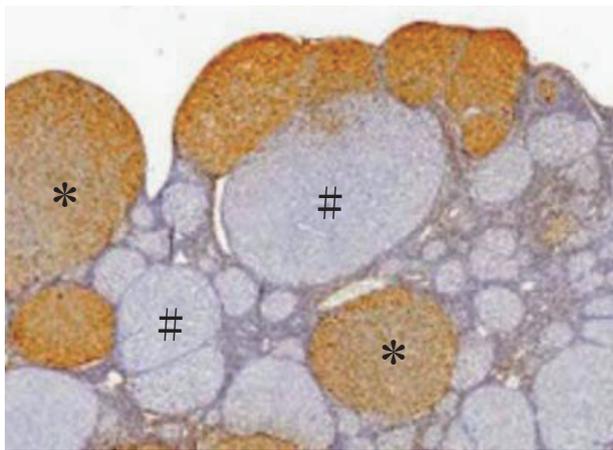


写真7 肝硬変症の GST-P 免疫陽性 (\*) と陰性 (#) の偽小葉

### 2-1-2. 胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST-P) を発現する偽小葉 (前腫瘍性病変) の形成に係わるマクロファージの特性

肝細胞癌は肝硬変症を背景に生じることが知られている。TAA の反復投与で作製したラットの肝硬変症において、GST-P を発現する偽小葉と発現しない偽小葉があることが分かった [20] (写真7)。GST-P を発現する肝細胞は前腫瘍性病変と考えられている。そこで、GST-P 陽性と陰性の偽小葉におけるマクロファージの特性を解析した。GST-P 陽性偽小葉では、CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型の出現が、GST-P 陰性偽小葉に比べてどちらも有意に増加していた。興味ある所見として、MHC クラス II 発現マクロファージの出現は、GST-P 陰性偽小葉に比較すると GST-P 陽性偽小葉で有意に減少していた。

腫瘍組織に出現する腫瘍随伴マクロファージ (TAM) には、活性酸素種などの細胞傷害因子を産生することで殺腫瘍効果を示す M1 型と、栄養供給に係わる血管新生や免疫を抑制することで腫瘍形成を促進する M2 型がある [21]。M2 型 TAM の出現は腫瘍の悪性度と関連する。CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型が GST-P 陽性偽小葉において混在していたが、これは GST-P 陽性偽小葉は前腫瘍

性病変であることから、抗腫瘍性機能のある M1 型と腫瘍促進作用のある M2 型が鎬を削っている像と考えられた。また、M1 型の機能を有するとされる MHC クラス II 発現マクロファージの出現が GST-P 陽性偽小葉で有意に減じていたが、これは GST-P 陽性偽小葉は、やはり腫瘍の特性を備えつつある前腫瘍性病変として捉えることができる [20]。GST-P 陽性の偽小葉に出現する TAM の特性解析は、肝硬変症を背景として生じる肝細胞癌の病理発生機序の解明に繋がることが期待できる。

### 3. $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT) 誘発の胆管周囲線維症に係わるマクロファージの特性

ANIT は、胆管上皮を傷害することで胆汁うっ滞型の肝毒性を現す。ANIT を週 2 回 19 週間に亘ってラットに反復投与した。投与開始後 7 週ごろから、総ビリルビン値が増加し始め、グリソン鞘の小葉間胆管上皮が傷害され、その周囲に水腫・炎症を伴い線維化が形成され始めた。線維化は投与後 13 週ごろからより顕著となり、その後は小胆管 (偽胆管) の増生を伴い進展した [22] (写真8)。傷害されたグリソン鞘において、CD68 発現 M1 型は投与後 7 週ごろから出現し、観察期間を通じ増加し続けた。CD163 発現 M2 型は線維化が顕著となる投与後 13 週ごろから増加した。また、CD163 発現 M2 型の出現に伴い線維原性因子である TGF- $\beta$ 1 が増加した。すなわち、肝硬変症での線維性架橋 (上述) にみられるように、炎症と組織傷害を誘導する M1 型と線維化を導く M2 型が相互に複雑に関連することで、小葉間胆管周囲に進行性の線維化が生じることが分かった。

興味ある所見として、MHC クラス II 発現細胞が、投与初期から観察期間を通じ常に高頻度で出現していた (写真9)。MHC クラス II 発現細胞は、ANIT の単回投与によるグリソン鞘の小葉間胆管上皮の急性傷害とその後の線維化においても、CD68 発現 M1

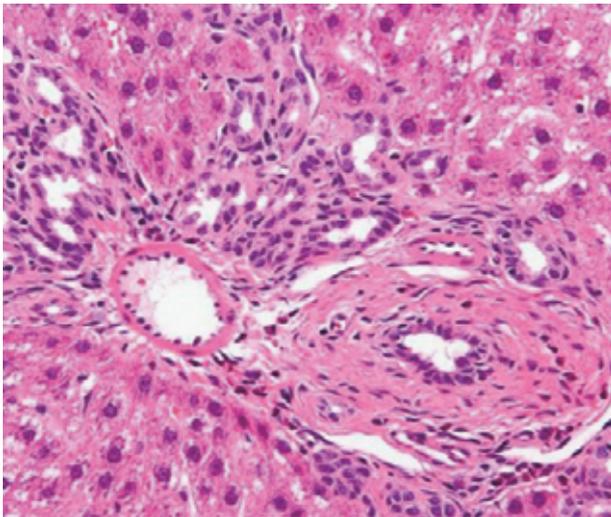


写真8  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT) 投与によるグリソン鞘における炎症細胞反応と小胆管の増生を伴った胆管周囲線維症 (HE 染色)

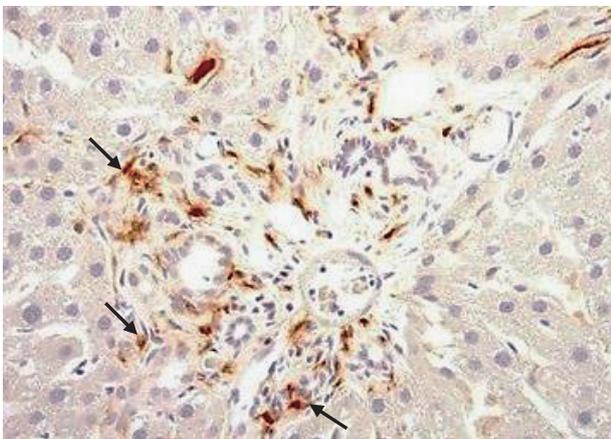


写真9 ANIT 投与によるグリソン鞘の胆管周囲線維症における MHC クラス II 発現間質樹状細胞 (矢印)

型や CD163 発現 M2 型よりもより早く出現していた [23]。グリソン鞘には、元来 MHC クラス II を発現する間質樹状細胞が存在する。この細胞は、クッパー細胞と同様に肝固有のマクロファージである。クッパー細胞は肝小葉内で自然免疫として機能することで肝細胞傷害を誘導する (図 1) [14]。ANIT による小葉間胆管上皮の傷害では、グリソン鞘に在在する MHC クラス II 発現間質樹状細胞が即座に応答することで機能し、グリソン鞘に病変が形成されと考えられた。さらに、グリソン鞘間質樹状細胞には抗原提示能があることから、獲得免疫が起動する可能性がある。ヒトの原発性胆汁性胆管炎は、アレルギー介在性の自己免疫性肝疾患とされる

[24]。ANIT 誘発胆管上皮傷害後のグリソン鞘の線維化に特徴的に出現する MHC クラス II 発現間質樹状細胞の機能特性の解明は、胆汁性胆管炎の発症機序を追究する上で有用であると考えられた。

#### おわりに

肝固有マクロファージ (クッパー細胞やグリソン鞘間質樹状細胞) は、肝臓の毒性病変の形成において自然免疫や獲得免疫として重要な役割を演じている。腸内細菌叢から産生される LPS は門脈から流入することで、その血中濃度に依存し M1 型、あるいは M2 型の二面性の機能を現す可能性がある。前者では、肝毒性病変を増悪 (傷害促進作用) させ、後者では軽減 (細胞保護作用) することが示された (図 1)。また、グリソン鞘に存在する MHC クラス II 発現間質樹状細胞は、胆管上皮細胞の傷害に対し即座に、かつ長期に亘り影響を与え、自然免疫や獲得免疫として機能することで、グリソン鞘に生じる原発性胆汁性胆管炎のような複雑な病変形成に係わる可能性が示された。また、肝硬変症においては、線維性架橋は M1 型と M2 型の機能的な連携が破綻することにより進行すること、そして GST-P 陽性の前腫瘍性病変では TAM が作動していることが分かった。「マクロファージ病理学：第 3 回 (その 1) と (その 2)」において紹介したように、肝臓の病変は、肝固有のマクロファージの状態と、浸潤する M1/M2 型マクロファージの分極化の特性を踏まえ評価する必要がある。「肝腎なことは忘れないように……」と子供のころよく言われたものである。「マクロファージ病理学：第 4 回」の最終稿ではマクロファージと腎線維化」について紹介する。

#### 参考文献

1. Kuramochi M., et al. 2016. *Exp Toxicol Pathol*,

- 68 : 471–477.
2. Mori Y., *et al.* 2009. *Toxicol Pathol*, 37 : 463–473.
  3. Wijesundera K. K., *et al.* 2014. *Histol Histopathol*, 29 : 497–511.
  4. Golbar Md., *et al.* 2016. *Toxicol Pathol*, 44 : 246–258.
  5. Hada N., *et al.* 2020. *J Toxicol Pathol*, 33 : 237–246.
  6. Pervin M., *et al.* 2016. *J Toxicol Pathol*, 29 : 139–44.
  7. Pervin M., *et al.* 2018. *Toxicol Pathol*, 46 : 540–552.
  8. Pervin M., *et al.* 2022. *Toxicol Pathol*, 50 : 1–13.
  9. Seki E., *et al.* 2001. *J Immunol*, 166 : 2651–2657.
  10. Wynn T. A., *et al.* 2013. *Nature*, 496 : 445–455.
  11. Tsuji Y., *et al.* 2020. *Int J Mol Sci*, 21 : 8998.
  12. Rahman N., *et al.* 2018. *Toxicol Pathol*, 46 : 764–776.
  13. Ansari M. A., *et al.* 2021. *World J Gastroenterol*, 27 : 592–608.
  14. Potrykus M., *et al.* 2021. *Nutrients*, 13 : 3839.
  15. Ueno T., *et al.* 2017. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14 : 170–184.
  16. Du H., *et al.* 2021. *Histol Histopathol*, 36 : 653–662.
  17. Juniantito V., *et al.* 2013. *Vet Pathol*, 50 : 76–85.
  18. Juniantito V., *et al.* 2013. *Exp Toxicol Pathol*, 65 : 567–577.
  19. Wijesundera K. K., *et al.* 2014. *Exp Mol Pathol*, 96 : 382–392.
  20. Wijesundera K. K., *et al.* 2015. *Exp Toxicol Pathol*, 67 : 467–475.
  21. Bondoc A., *et al.* 2017. *Cancer Microenviron*, 10 : 9–24.
  22. Golbar Md., *et al.* 2013. *Exp Toxicol Pathol*, 65 : 825–835.
  23. Golbar Md, *et al.* 2011. *Toxicol Pathol*, 39 : 795–808.
  24. Gerussi A., *et al.* 2020. *Front Med (Lausanne)*, 7 : 117.

(評議員)

## レビュー

# 抗原のキトサン粒子化による粘膜ワクチンへの応用

高井亮輔

## はじめに

従来、ワクチンはその生物学的性状から生ワクチンと不活化ワクチンに分類されてきた。生ワクチンとしては異種細胞や発育鶏卵に継代馴化して弱毒化した微生物を利用したものや人工的に遺伝子を欠損あるいは組換えたものなどがあり、不活化ワクチンとしては微生物を薬剤などによる処理で不活化し病原体全体を用いるものや抗原となるタンパク質を精製もしくは合成した病原体の一部を用いるもの、またあるいはウイルス様粒子を形成させたものなどが

存在する。これらに加えて近年では mRNA ワクチン、DNA ワクチン、ウイルスベクターワクチンなど世界中の製薬会社で研究・開発が進められていたものが、最近では新型コロナウイルスワクチンをはじめとして急速に実用化されている。

近年の新興・再興感染症の出現に呼応した急激なワクチンの剤型の変化の理由としてドラッグデリバリーシステムが挙げられ、最適化へ向けた研究が進んでいる。今後、人体用医薬品だけではなく、経済性が求められる動物用医薬品においても、デリバリーシステムを考慮してワクチン剤型が変化し、簡

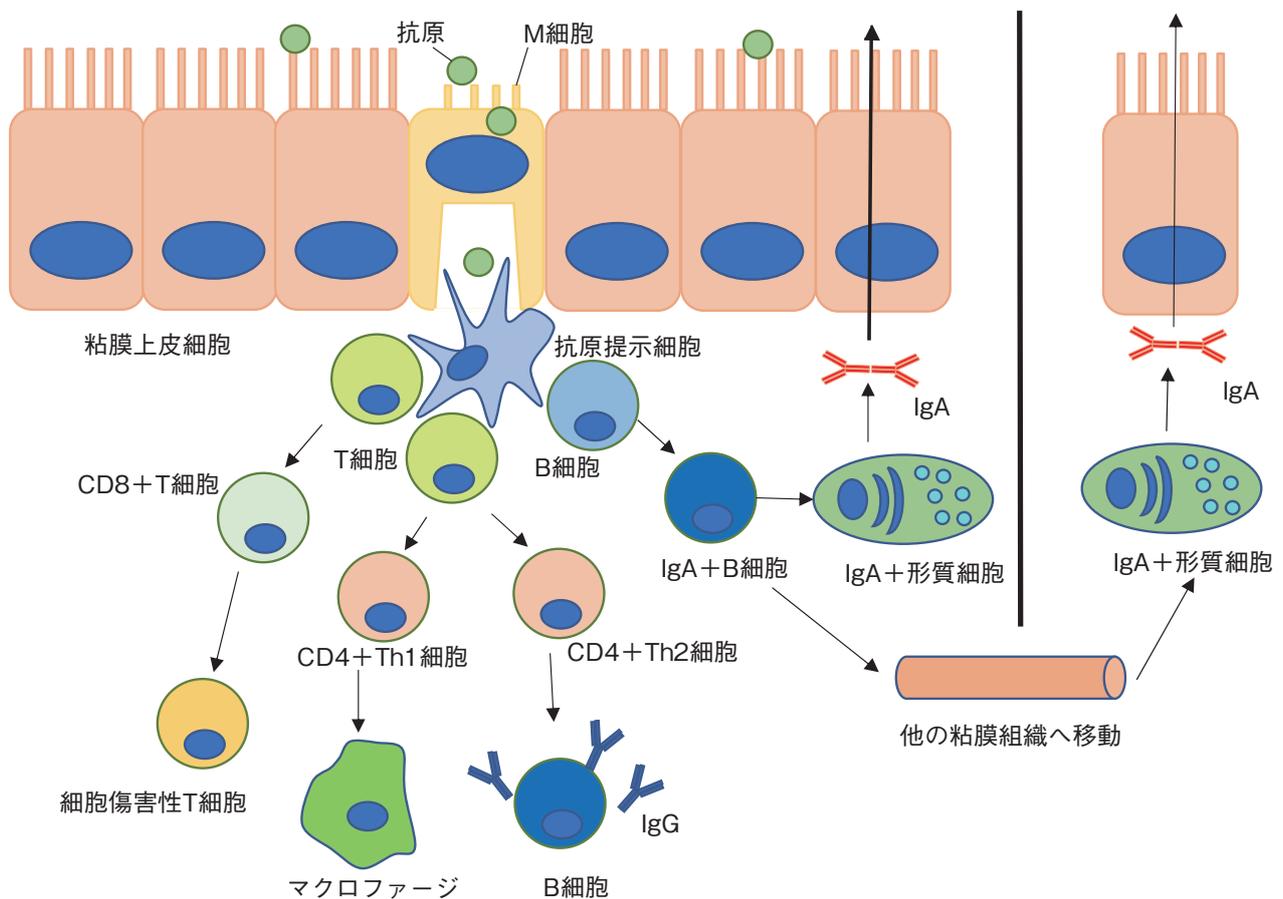


図1 粘膜免疫（引用文献 [11] より改変）

抗原提示細胞は、M細胞により伝達された抗原を貪食し、各種免疫細胞へ抗原提示を行う。抗原提示を受けた各種免疫細胞は細胞傷害性T細胞への分化、マクロファージの活性化及びナイーブB細胞のIgA分泌型B細胞への分化・成熟などが起こる。また一部B細胞は血流に乗り、抗原提示を受けた組織とは異なる粘膜組織でIgAを分泌する。

便な操作でより長期間持続する優れた防御免疫を宿主に賦与できることは獣医公衆衛生上望ましいことである。そこで、本稿では動物用医薬品分野でも研究が進んでいる粘膜ワクチンに関する知見、特にキトサン粒子を用いた事例を紹介したい。

### 粘膜免疫応答

生物は病原微生物の感染から身を守るため、免疫系を発達させてきた。多くの病原微生物は、呼吸器や消化器などの粘膜表面から体内へ侵入し、感染を成立させる。粘膜免疫はそのような微生物の侵入を防ぐ第一の砦として非常に重要な免疫機構である。その粘膜免疫の中心的役割を担っている組織は、リンパ球が集積している粘膜関連リンパ組織（Mucosal-associated lymphoid tissues : MALT）である [3]。消

化器及び呼吸器の粘膜面に存在する MALT は、腸管関連リンパ組織（Gut-associated lymphoid tissues : GALT）、鼻咽頭関連リンパ組織（Nasopharynx-associated lymphoid tissues : NALT）及び気管支関連リンパ組織（Bronchus-associated lymphoid tissues : BALT）と呼ばれ [3]、大部分の粘膜上皮細胞の粘膜側面は丈が高い微絨毛で覆われているが、唯一 MALT には微絨毛の丈が低い M 細胞（Microfold cell）が散在する [15]。

M 細胞は微絨毛の丈だけではなく機能的にも他の粘膜上皮細胞とは大きく異なり、微絨毛が短い故に他の粘膜細胞に比べて微生物が侵入しやすい。M 細胞に取り着いた病原微生物はトランスサイトシスにより積極的に細胞内に取り込まれ、粘膜上皮直下に存在する樹状細胞などの抗原提示細胞へと運搬される。運搬された病原微生物はそのまま抗

原提示細胞に貪食され、プロセッシングを受けて B 細胞や T 細胞といった免疫細胞へと抗原提示される。このように、M 細胞は粘膜表面上の病原微生物などを受け入れ、効率よく抗原提示細胞側へ受け渡す役割を持っている。

抗原提示を受けた CD4+T 細胞はマクロファージを活性化させ、CD8+T 細胞は細胞傷害性 T 細胞として働き、細胞性免疫が誘導される。また、CD4+T 細胞は、ナイーブ B 細胞を、抗原特異的 IgG を産生する形質細胞へ分化・成熟（クラススイッチ）させることで液性免疫を誘導する。このほか、抗原提示を受けたナイーブ B 細胞は抗原特異的 IgA を産生する形質細胞へも分化・成熟する（図 1）[11]。産生された IgA は粘膜上皮の管腔側に分泌され、病原微生物や毒素と結合し中和活性などにより、微生物などが MALT を超えて体内へ侵入することを防ぎ、無毒化した状態で体外への排出を促す [3]。さらに、たとえば局所のある粘膜組織で抗原感作を受けた B 細胞や T 細胞は、他の粘膜組織へ移動し、新たな場所で免疫応答を起こすことができる。この場合、抗原感作を受けた組織を誘導組織と呼び、免疫細胞が移動し、IgA が分泌されるなどの免疫応答が起こる組織を実効組織という。このような免疫細胞の移動は共通粘膜免疫機構（Common Mucosal Immune System : CMIS）といい、粘膜免疫の特徴の 1 つである [16]。

### 粘膜ワクチン

現在使用されているワクチンは、冒頭で述べたとおり、従来型の弱毒生ワクチンや不活化ワクチンのほか、抗原となるタンパク質遺伝子をコードした mRNA ワクチンなどが新たなワクチンとして登場した。これらのワクチンが皮下あるいは筋肉注射により接種されると主に IgG が誘導され、全身的な免疫応答、たとえば血中の中和抗体価が上昇し、病

気の重症化が阻止される。一方、粘膜ワクチンは IgG だけではなく IgA を微生物感染の門戸である粘膜に局所的に誘導・分泌させることで、微生物の生体への侵入、すなわち感染を防ぐ。粘膜ワクチンの抗原刺激として重要なことの 1 つは、M 細胞へ抗原を効率よく取り込ませることであり、その方法に關しての研究が進んでいる。

粘膜ワクチンの投与経路としては、経口投与あるいは経鼻投与が考えられるが、それぞれに長所と短所がある。経口投与の場合、大型のリンパ組織である GALT が消化器粘膜に存在するため、必然的に抗原が M 細胞に取り込まれやすくなる。しかし、胃を通過する必要があるため、pH 及び消化酵素などの影響を受け、抗原が分解され易い。一方、経鼻投与の場合、NALT では pH 及び消化酵素などの影響を受けず抗原が分解され難いため、投与量は経口に比べ少量で済む。しかし、気道には異物を線毛運動等で体外へ排出する粘膜クリアランス機構が存在するため、効率の良い抗原の取り込みが行われにくい [11]。このため、抗原の保護及び効率の良い M 細胞への抗原の取り込みを目的とした研究が盛んに行われ、その 1 つに粘膜ワクチンのキャリアーとしてのポリマー粒子がある。ここからは粘膜ワクチンのキャリアーとして有力な分子の 1 つであるキトサンに焦点を当てて紹介する。

### キトサン粒子によるドラッグデリバリーの機序

キトサンはカニやエビの殻の主成分として知られ、キチンの脱アセチル化によって合成される。D-グルコサミンと N-アセチル-D-グルコサミンが  $\beta$ -(1-4) グリコシド結合により結合した直鎖状の多糖類ポリマーである [11]。キトサンはアミノ基を持つカチオン性アミノ多糖であり、強い正電荷を有する。一方で、粘膜上皮はシアル酸を含むため、負の電荷を持っている。この静電的な相互作用により、

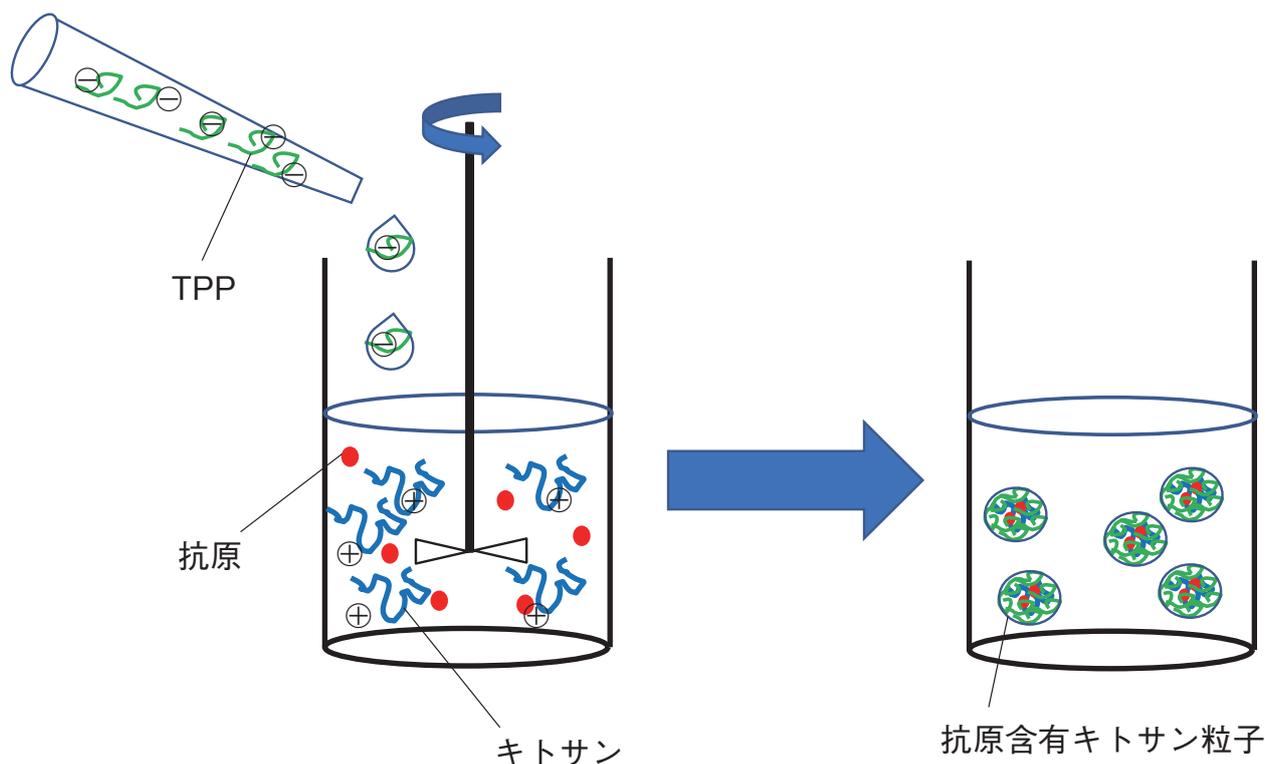


図2 キトサン粒子の調製方法（物理的方法）

抗原含有キトサン粒子の物理的調製方法の一例。抗原を含んだキトサン水溶液に TPP を攪拌しながら添加することで、イオン結合で自発的に抗原を含んだキトサン粒子が形成される。

キトサン粒子は粘膜上皮に結合しやすくなっている。その結果、抗原と共に調製されたキトサン粒子は、長く粘膜表面に存在することになり、最終的に M 細胞へ抗原が取り込まれやすくなる [5]。さらに、キトサンは細胞間のタイトジャンクションに関連するタンパク質である Zonula occludens-1 (ZO-1) の細胞内局在を変化させることが報告されている。その結果、細胞間の F-アクチンの分布が変化し、粘膜上皮細胞間のタイトジャンクションが開き、抗原は細胞間隙を通過し、粘膜上皮直下の免疫細胞へ伝達することができるといわれている [5]。この他に、キトサンは生分解性、生体適合性及び非毒性であるといった理由で、粘膜ワクチンキャリアーとして有力であると考えられている [7]。以上の様に、粘膜ワクチンのキャリアーとしての最適な物理化学特性を持つものの、中性付近において水に溶けづらいため [11]、抗原との混合を可能にするを目的として、様々なキトサン誘導体が存在し、キャリアーとして用いられている [13]。

キトサンをキャリアーとして抗原輸送粒子を調製する方法には、物理的方法と化学的方法の2種類がある。物理的方法とは、カチオン性であるキトサンとトリポリフォスフェート (TPP) といったアニオン性分子との間で生じるイオン性架橋を利用した粒子調製法である。抗原を含有させる場合は、抗原をキトサン水溶液あるいは TPP に抗原を加えた後、キトサン水溶液に TPP を攪拌しながら添加することで、自発的に抗原がイオン結合したキトサン粒子が形成される (図2) [10, 14]。

化学的方法とは、キトサンと抗原のアミノ基をそれぞれ 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸 N-スクシンイミジル (SPDP) といった二官能性架橋剤で官能基化し、両分子間でジスルフィド結合を可能にすることで抗原が共有結合したキトサン粒子を調製する方法である (図3) [12]。化学的方法は架橋剤によるタンパク質の化学的修飾や、高温での反応が必要であるという理由と未反応の架橋剤の除去が難しいという2つの理由で、抗原含有キトサン粒

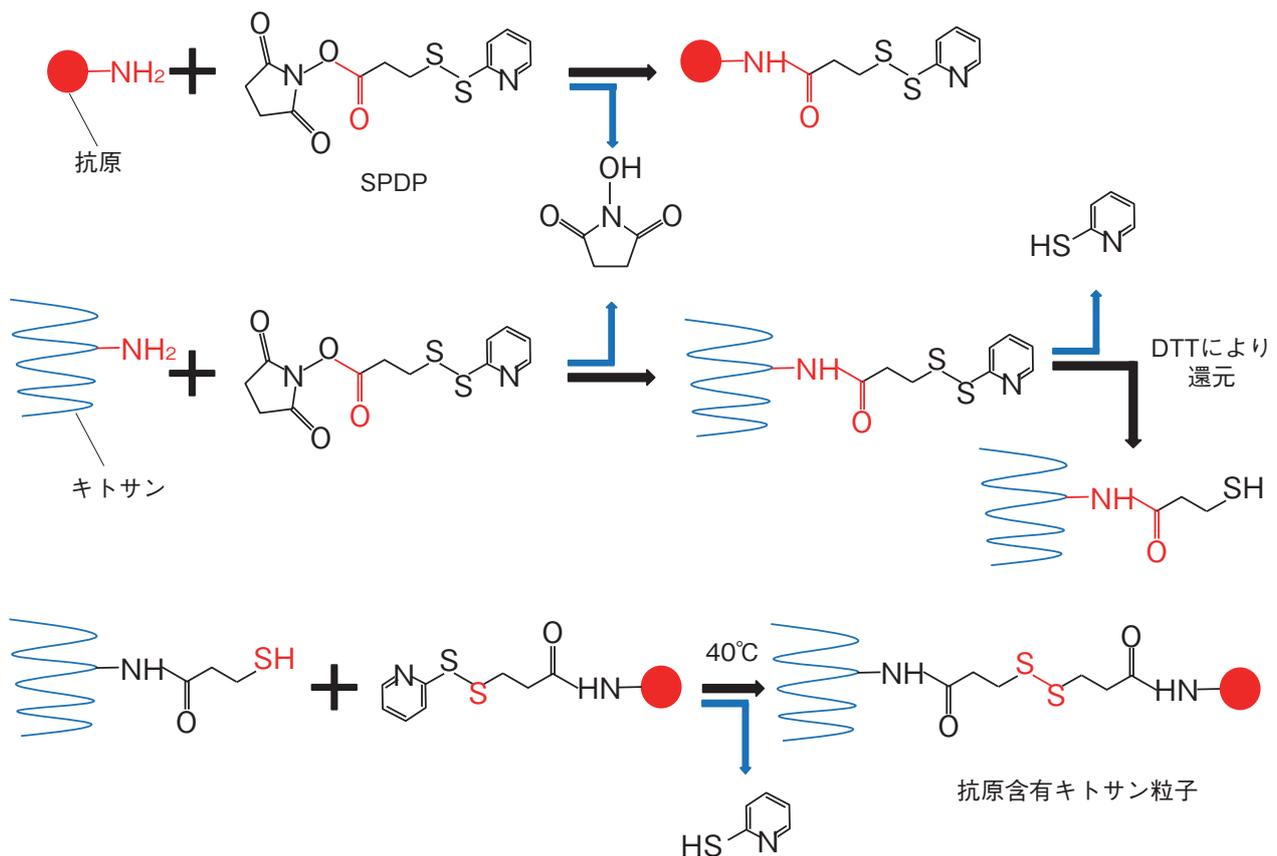


図3 キトサン粒子の調製方法（化学的方法）（引用文献 [12] より改変）

抗原含有キトサン粒子の化学的調製方法の一例。SPDPにより抗原とキトサンのアミノ基にピリジルジスルフィド基が導入される。DTTなどの還元剤により、キトサンに導入されたピリジルジスルフィド基はSH基に還元され、ピリジルジスルフィド基を導入された抗原と40℃で反応させると抗原とキトサンがジスルフィド結合で共有結合された抗原含有キトサン粒子が形成される。

子の調製には物理的方法が好まれている [11]。

### 動物用医薬品への応用

以下にキトサン粒子を動物用ワクチンに応用した報告例をいくつか紹介する。

#### ①鶏の *Salmonella* Enteritidis 感染症

*S. Enteritidis* は鶏の消化管内に存在するが、鶏に対しては症状を示さず、ヒトに感染すると症状を示す鶏卵関連食品の食中毒原因菌である [6]。米国では年間で約 40,000 人が感染し、その内約 400 人が死亡している [4]。*S. Enteritidis* の外膜タンパク質 (OMP) とフラジエリントタンパク質 (F) を抽出し、キトサン粒子化したワクチン候補 (OMPs-F-CS NPs) を鶏に 3 週間隔で 3 回飲水投与を行った後、*S. Enteritidis* で攻撃した。OMPs-F-CS NPs 飲水投

与群は非免疫群と比較して、攻撃後の *S. Enteritidis* の排出量が有意に減少していた。また、OMPs-F-CS NPs を非免疫の鶏の末梢血単核球 (PBMC) に添加した後、自然免疫応答において重要なシグナル伝達系の受容体である TLRs 及び各種サイトカインの mRNA 発現量を測定した。その結果、OMPs-F-CS NPs 非添加 PBMC 及びキトサン粒子化していないタンパク質 (OMPs-F) を添加した PBMC と比較して、TLR-1、TLR-2、TLR-3、TLR-4、TLR-5、TLR-7、TLR-15、TLR-21、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 及び IL-10 といった TLRs やサイトカインの mRNA 発現量が増加したことから、OMPs-F-CS NPs によってキトサンは抗原デリバリーシステムとして有効であることが示唆された [10]。

#### ②鶏の伝染性気管支炎

伝染性気管支炎は Infectious Bronchitis Virus

(IBV) の感染により発生し、鶏の性別及び日齢に関係なく、世界中で病気の発生が確認されている。呼吸器症状を主徴とするが、その他にも腎炎及び産卵率の低下などの様々な病態を示す [1]。発育鶏卵の尿膜腔内で増殖させた IBV を  $\beta$ -プロピオラクトンで不活化した後、キトサンと結合させたものをワクチン候補 (IBV-CS) とした。IBV-CS を 14 日齢の鶏に経鼻投与した後、31 日齢時に IBV で攻撃した。攻撃後の涙中の IgA 量及び気管での IFN- $\gamma$  の mRNA 発現量は、非免疫群に比べて免疫群で有意に増加していた。また、攻撃後 5 日目の IBV の RNA コピー数は、気管では非免疫群と比べて免疫群で有意に減少し、腎臓では検出できなかった。IBV 攻撃後の気管及び腎臓における病理組織学的評価では、免疫群では約 70% の個体で、IBV 感染による異常は認められなかった [8]。

### ③豚インフルエンザ

豚インフルエンザは Swine Influenza Virus type A (SIV) に感染することで発生し、養豚産業に甚大な経済的損失を与える感染症の 1 つである [2]。豚は日齢を問わず SIV に感染し、急性呼吸器症状を主徴とする。SIV をバイナリエチレンイミンで不活化し、キトサンと結合させたものをワクチン候補 (CS NPs-KAg) とした。また、TLR-3 のリガンドである poly (I:C) をキトサンと結合したものを自然免疫アジュバント (CS NPs-poly (I:C)) とした。CS NPs-KAg と CS NPs-poly (I:C) を混合し、3 週間隔で 2 回経鼻投与を行った後、2 週間後に SIV で攻撃した。攻撃後 6 日目のサイトカインの mRNA 発現量を測定した結果、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-6、IL-10 及び IL-13 の発現量が、市販多価ワクチンで免疫した群と比べて有意に増加した。さらに、攻撃後の鼻腔スワブ中のウイルス力価や、肺の病理組織学的評価は市販多価ワクチンに匹敵した [9]。

以上 3 つの研究成果を紹介したが、いずれも非免疫群と比較して、攻撃後の菌やウイルスの排出が抑

えられ、一定の効果を示していた。すなわち、抗原タンパク質及び不活化ウイルス抗原のキトサン粒子化によって、ワクチン効果が得られることが示された。

### 終わりに

今回紹介したキトサン粒子化を用いた抗原の調製において、その成否を左右する重要な技術は、粘膜免疫を誘導できる最適な粒子を調製することである。用いる抗原によって、キトサンや TPP の量等を調整する必要があり、実用化されるまでに多くの検討を要する。

粘膜免疫が誘導されると、細胞性免疫が誘導されるだけでなく、液性免疫によって微生物侵入時の妨げになる IgA が粘膜面に分泌され、血中には IgG が分泌される。粘膜ワクチンとして動物に免疫が可能となれば、その高い有効性だけでなく、免疫方法も簡易になる可能性がある。動物用医薬品として実用化されると、小動物臨床領域では投与時の非侵襲性の点から飼い主に好まれ、畜産領域においても生産効率が改善するツールとなり得るだろう。

### 参考文献

1. Bande, F. *et al.*, 2016. Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. *Adv. Virol.* **2016**: 4621659.
2. Borkenhagen, L. K. *et al.*, 2019. Animal influenza virus infections in humans: A commentary. *Int. J. Infect. Dis.* **88**: 113-119.
3. Czerkinsky, C. *et al.*, 1999. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunol. Rev.* **170**: 197-222.
4. Fabrega, A. *et al.*, 2013. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the host:

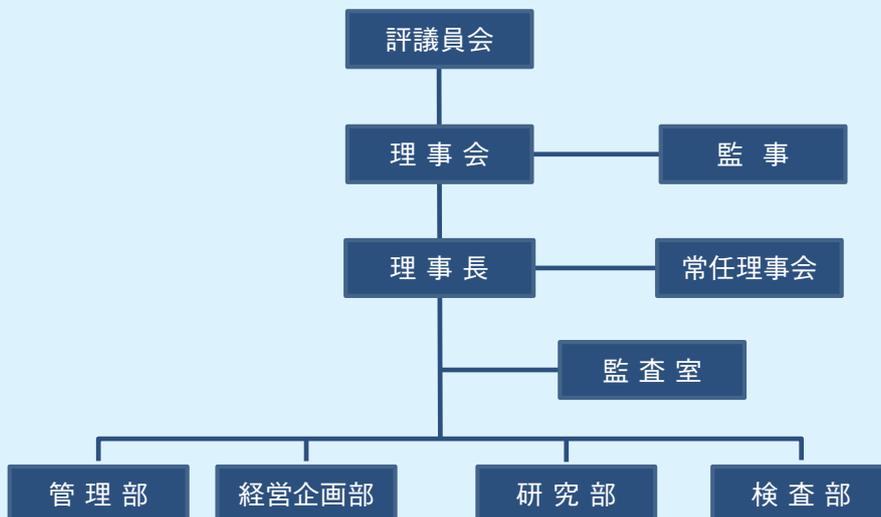
- Virulence and Regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* **26** : 308–341.
5. Illum, L. *et al.*, 2001. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **51** : 81–96.
  6. Khan, M, I. *et al.*, 2003. Reducing colonization of *Salmonella* Enteritidis in chicken by targeting outer membrane proteins. *J. Appl. Microbiol.* **95** : 142–145.
  7. Li, P. *et al.*, 2015. Polysaccharides : Candidates of promising vaccine adjuvants. *Drug Discov. Ther.* **9** : 88–93.
  8. Lopes, P. D. *et al.*, 2018. Inactivated infectious bronchitis virus vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles induces mucosal immune responses and effective protection against challenge. *Vaccine* **36** : 2630–2636.
  9. Renu, S. *et al.*, 2020a. Poly (I : C) augments inactivated influenza virus–chitosan nanovaccine induced cell mediated immune response in pigs vaccinated intranasally. *Vet. Microbiol.* **242** : 108611.
  10. Renu, S. *et al.*, 2020b. Chitosan–adjuvanted *Salmonella* subunit nanoparticle vaccine for poultry delivered through drinking water and feed. *Carbohydr. Polym.* **243** : 116434.
  11. Singh, B. *et al.*, 2018. Chitosan–based particulate systems for the delivery of mucosal vaccines against infectious diseases. *Int. J. Biol. Macromol.* **110** : 54–64.
  12. Slutter, B. *et al.*, 2010. Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen. *J. Control. Release* **143** : 207–214.
  13. Verheul, R.J. *et al.*, 2008. Synthesis, characterization and in vitro biological properties of *O*–methyl free *N,N,N*–trimethylated chitosan. *Biomaterials* **29** : 3642–3649.
  14. Vila, A. *et al.*, 2004. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57** : 123–131.
  15. Wang, M. *et al.*, 2014. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10** : 3544–3551.
  16. Wu, H. *et al.*, 1997. Nasal Lymphoid Tissue, Intranasal Immunization, and Compartmentalization of the Common Mucosal Immune System. *Immunol. Res.* **16** : 187–201.

(研究員)

## 2022 年度定時評議員会開催

当研究所の2022年度定時評議員会が、去る2022年6月21日に開催され、2021年度の事業報告及び決算報告が承認されると共に、任期満了に伴い、次期の評議員、理事及び監事が選任されました。現在の組織、評議員、理事及び監事は下記のとおりです。

### 1. 組織



### 2. 評議員

佐々木 伸雄      やまて じょうじ      こが さとし      あんざい とおる      はが たけし  
 さ さ き の お お      や ま て      こ が      さ と し      あ ん ざ い      と お る      は が      た け し  
 佐 々 木   伸 雄      山 手   丈 至      古 我   知 史      安 齊   了      芳 賀   猛

### 3. 理事・監事

氏 名	役 職	担 当
長井 伸也	理事長	経営統括
笹川 千尋	所長	研究及び検査
杉浦 勝明	非常勤理事	
土屋 耕太郎	常務理事	経営企画
林 志鋒	常務理事	管理
小坂 善三	監事	
長澤 洋二	監事	



—— テーマは「生命の連鎖」——  
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)  
 (通巻624号) 令和4年6月25日印刷 令和4年7月1日発行(第68巻第3号)  
 発行所 一般財団法人日本生物科学研究所  
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1  
 TEL: 0428(33)1520(経営企画部) FAX: 0428(31)6166  
 URL: <http://nibs.lin.gr.jp/>  
 発行人 土屋耕太郎

編集室 委員/高橋真理(委員長)、古澤貴章、河島奈悠  
 事務/経営企画部  
 印刷所 株式会社 精興社  
 (無断転載を禁ず)