

粘膜免疫のユニーク性の解明と粘膜ワクチンへの展開

國澤 純,* 合田昌史, 清野 宏

Uniqueness of the Mucosal Immune System for the Development of Prospective Mucosal Vaccine

Jun KUNISAWA,* Masashi GOHDA, and Hiroshi KIYONO

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

(Received August 10, 2006)

The mucosal immune system acts as the first line of defense against microbial infection through a dynamic immune network based on innate and acquired mucosal immunity. To prevent infectious diseases, it is pivotal to develop effective mucosal vaccines that can induce both mucosal and systemic immune responses, especially secretory IgA (S-IgA) and plasma IgG, against pathogens. Recent advances in medical and biomolecular engineering technology and progress in cellular and molecular immunology and infectious diseases have made it possible to develop versatile mucosal vaccine systems. In particular, mucosal vaccines have become more attractive due to recent development and adaptation of new types of drug delivery systems not only for the protection of antigens from the harsh conditions of the mucosal environment but also for effective antigen delivery to mucosa-associated lymphoid tissues such as Peyer's patches and nasopharynx-associated lymphoid tissue, the initiation site for the induction of the antigen-specific immune response. In this review, we shed light on the dynamics of the mucosal immune system and recent advances toward the development of prospective mucosal antigen delivery systems for vaccines.

Key words—mucosal vaccine; drug delivery system; Peyer's patch; nasopharynx-associated lymphoid tissue; fusogenic liposome

1. はじめに

われわれは体の外表面を覆っている皮膚のみならず、体の内側を覆っている粘膜組織を介し、外界と接している。表面積で計算してみると、絨毛構造を持つ粘膜組織は皮膚の約200倍もの面積を持ち、その値はテニスコートの1.5面分に相当すると言われている。すなわち消化管や呼吸器、泌尿器といった粘膜組織は体の内側にありながら、“内なる外”として外界と接し、常時外来異物に曝されている最大の組織となる。さらに病原体の感染経路という観点でみると、傷口を介して感染する破傷風菌や蚊などを媒体とするマラリアなどを除き、インフルエンザやHIVなど多くの病原体が粘膜面を介して感

染する。言い換えると粘膜面は単なる消化、呼吸、排泄をつかさどる組織ではなく、多くの病原体の主要感染経路でもある。

最近の研究から、呼吸器や消化器、泌尿・生殖器といった粘膜面に存在する免疫システムである粘膜免疫システムが生体防御において重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。¹⁾ これまでの免疫学の分野においては、主に体の内側に存在する脾臓や胸腺を中心とした全身系免疫システムが中心となり研究が進んできた。しかしながら粘膜を介し感染してくる病原体に対する防御機構という視点でみると、これら体の内側に存在する全身免疫システムは粘膜を介し病原体が感染した後の防御システムである。一方で、粘膜免疫システムは感染の初発部位に存在する免疫システムであり、感染時、若しくは感染初期における生体防御において重要な役割を担っていると考えられる。

この粘膜免疫システムを応用し、感染の初発部位

東京大学医科学研究所炎症免疫学分野(〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

*e-mail: kunisawa@ims.u-tokyo.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS33で発表したものを中心に記述したものである。

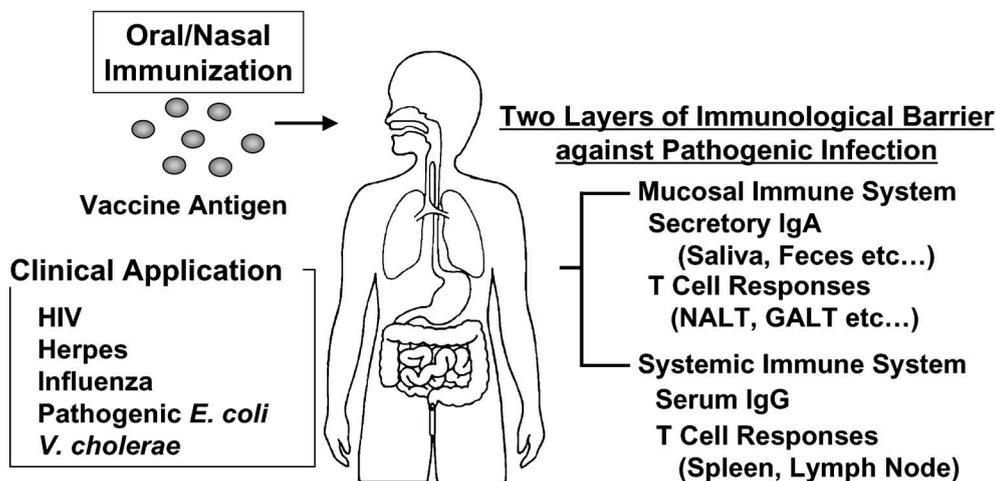


Fig. 1. Application of Mucosal Vaccine for the Prevention of Infectious Diseases

である粘膜面において感染防御システムを誘導しようとするのが粘膜ワクチンである (Fig. 1). 既存のワクチンのほとんどは注射による接種である. この場合, 全身系免疫システムには抗原特異的な免疫応答を誘導することができるが, 初発感染防御を担う粘膜免疫システムに免疫応答を誘導することができない. すなわち, 従来の注射によるワクチン接種では, 感染した後の病気の重篤化を防ぐことはできるが, 病原体の侵入そのものを防御することは困難である. これに対して, 抗原を吸わせる, 飲ませるといった粘膜ワクチンは注射によるワクチン接種と同様, 全身系免疫システムに免疫応答を誘導できると同時に, 粘膜免疫にも免疫応答を誘導することができる (Fig. 1). すなわち初発感染防御を担う粘膜免疫と病原体が生体内に入った際の防御機構である全身系免疫との二段構えの防御システムが構築できることから, 粘膜ワクチンは粘膜を介し感染・発症するような病原体に対し絶大な効果が期待できるワクチンとして期待されている. 本稿においては粘膜免疫のユニーク性とそのユニーク性を基盤とした粘膜ワクチンの開発について概説したい.

2. 自然免疫と獲得免疫を併せ持つユニークな粘膜免疫担当細胞

粘膜免疫システムが持つユニークな性質の1つとして, 全身系免疫システムには観察されない細胞の存在が挙げられる. その代表的なものが上皮細胞間リンパ球 (Intraepithelial lymphocyte; IEL) である.²⁾ IELはその名が示すように, 上皮細胞の間に存在する細胞である. そのほとんどはT細胞であ

るが, 全身系免疫システムで観察されるT細胞と異なる点として, T細胞受容体 (TCR) の発現パターンの違いがある (Fig. 2). 全身系免疫システムで観察されるT細胞のほぼすべては $\alpha\beta$ 型TCR ($\alpha\beta$ TCR)を発現するのに対し, IELでは $\alpha\beta$ TCR若しくは $\gamma\delta$ 型TCR ($\gamma\delta$ TCR)を発現している細胞が混在している. $\alpha\beta$ TCRを発現するIELは, 全身系免疫システムで観察されるT細胞と同様, 病原体由来タンパク質が細胞内で分解されてできたペプチド断片とMHC分子の複合体を認識する (Fig. 2 (A)).³⁾ この認識は抗原特異的なものであり, いわゆる獲得免疫の起点となる反応である. 一方で, IELに特異的に発現している $\gamma\delta$ TCRは上皮細胞に発現している非古典的MHC分子を認識する (Fig. 2 (B)). 非古典的MHC分子は構造的にMHC分子に類似しているが, 特徴的な性質として挙げられることとして, ほとんどの非古典的MHC分子は抗原由来のペプチドを提示せず, そのもの自身がリガンドとして機能することであり, $\gamma\delta$ TCRはそのうちのいくつかを認識する.⁴⁾ これら $\gamma\delta$ TCRに認識される非古典的MHC分子の多くは, 病原体が感



國澤 純

東京大学医科学研究所助手, 1974年山口県生まれ. 大阪大学薬学部卒業, 大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了 (2001年・真弓忠範教授). 2000年より2004年まで日本学術振興会特別研究員 (DCならびにPD). その間 (2001—2003年), University of California, BerkeleyにてVisiting Postdoctoral Fellow (Nilabh Shastri教授). 2004年より現職 (清野 宏教授).

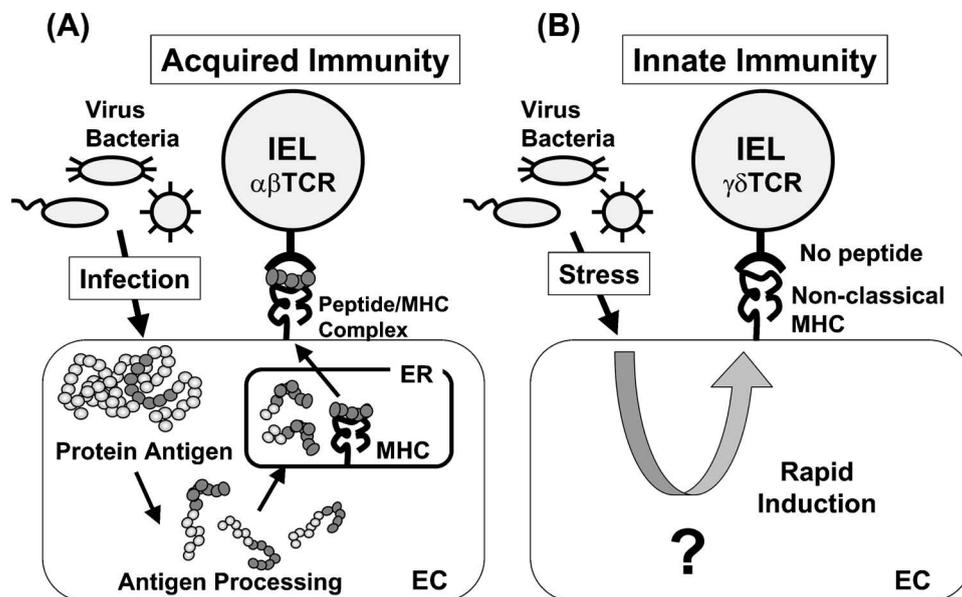


Fig. 2. IEL Mediates Innate and Acquired Immunity through Two Different T Cell Receptors

(A): $\alpha\beta$ TCR IEL recognizes antigenic peptides presented by conventional MHC molecules. The recognition is a trigger of antigen-specific acquired immunity. (B): Non-classical MHC molecules do not present antigenic peptides but act as ligands for $\gamma\delta$ TCR IELs. Because the expression of non-classical MHC molecules is rapidly induced by microbial infection and is not specific for the pathogens, it plays an important role in the innate mucosal immunity.

染したというストレスにより誘導されるものである。すなわちその分子は病原体に特異的ではなく、またその発現自身も非常に素早い反応であることから、自然免疫の範疇に含まれる免疫応答として現在考えられている。つまり生体防御の最前線である上皮細胞層に存在する IEL は、自然免疫と獲得免疫の両方で働くことのできる細胞集団として位置付けられる。

一方、B 細胞レベルにおいても粘膜面には自然免疫をつかさどる細胞と獲得免疫で働く細胞が存在する (Fig. 3)。通常われわれが観察している B 細胞は B2 B 細胞と呼ばれる細胞である。B2 B 細胞はその抗体産生に T 細胞の助けを必要とし、そこから産生される抗体のほとんどは病原体に特異的なタンパク質抗原を認識し、獲得免疫において重要な役割を果たしている (Fig. 3(A))。一方、粘膜免疫システムには B1 B 細胞と呼ばれるユニークな B 細胞も存在する (Fig. 3(B))。B1 B 細胞は CD5 や CD11b を発現しているという表現型の特異性を有する。⁹⁾ さらに抗体産生に T 細胞の助けを必要としないことや、産生される抗体のほとんどが、脂質や多糖類など病原体が共通で発現している分子を認識するという機能的な特徴も有している (Fig. 3(B))。すなわち B1 B 細胞由来抗体は病原体が共

通に発現している分子を認識することで、獲得免疫が機能する前に病原体の侵入を防いでいる訳である。このように粘膜免疫システムにおいては T 細胞、B 細胞のレベルにおいて、自然免疫と獲得免疫の両免疫システムを発達させることで、外界と接している生体の最前線を何重にも防御するシステムを構築している訳である。

3. 腸管免疫誘導組織としてのパイエル板

抗原を飲ませる・吸わせるといった経粘膜的な免疫により、粘膜免疫システムと全身系免疫システムに病原体に対する免疫応答を誘導しようとするのが粘膜ワクチンである。ワクチンの主目的である獲得免疫の誘導においては、免疫誘導組織と呼ばれる粘膜系リンパ組織が重要である。腸管免疫システムにおいて主要な免疫誘導組織として機能しているのはパイエル板と呼ばれるリンパ組織である。マウスにおいてパイエル板は米粒の半分位の隆起状組織として観察され、小腸に 10 個前後点在する。全身系免疫システムで観察されるリンパ組織とは異なり、パイエル板には外来抗原の取り込み口となる輸入リンパ管が存在しない。その代わりに、パイエル板内の上皮細胞層には絨毛構造ではなくドーム状の構造を取っている follicle-associated epithelium (FAE) と呼ばれる部位が存在し、そこでは M 細胞と呼ばれ

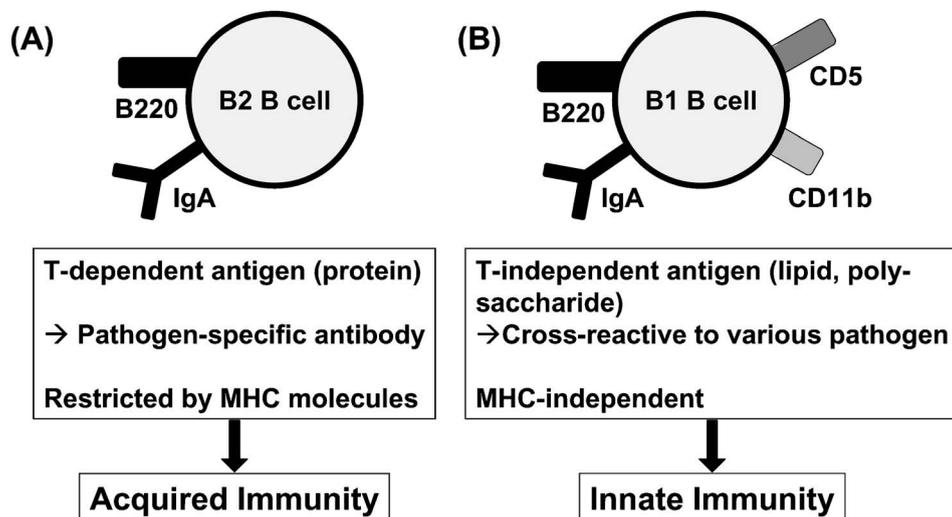


Fig. 3. B Cell-mediated Innate and Acquired Mucosal Immunity

(A): Mucosal B2 B cells produce IgA against pathogen-specific protein antigen. The IgA production from B2 B cells requires T cell help and is restricted by MHC molecules. So, they play a crucial role in the acquired mucosal immunity. (B): Mucosal B1 B cells produce IgA against T-independent antigen such as lipids and polysaccharides. Because these molecules are widely expressed on various pathogens, B1 B cell-derived IgA exhibits the cross-reactivity against various kinds of pathogens for the efficient innate-type mucosal immunity.

る特殊に分化した細胞が観察される。この M 細胞は、通常の吸収上皮細胞に比べ微絨毛も含めて背丈が低いという形態的特徴に加え、抗原取り込み能力の高い細胞として知られており、輸入リンパ管の代わりに腸管内に存在する抗原をパイエル板へ選択的に取り込む働きを担っていると考えられている。⁶⁾ さらにその下層には樹状細胞を始めとする抗原提示細胞や T 細胞、B 細胞が集積している。⁷⁾ これらの特徴から、パイエル板においては M 細胞を介して取り込まれた抗原が、樹状細胞に送達され、樹状細胞を介した抗原提示により T 細胞や B 細胞が活性化されると考えられている (Fig. 4)。^{1,8)} この際、抗原刺激を受けた B 細胞は IL-4 や TGF- β の作用を受け、IgA 発現細胞へとクラススイッチする。最近、パイエル板などの腸管関連リンパ組織に存在する樹状細胞から産生されるレチノイン酸が、腸管固有層へリンパ球が遊走する際に必要とされる $\alpha 4\beta 7$ インテグリンとケモカイン受容体 CCR9 を発現誘導することが報告された。⁹⁾ すなわち腸管関連リンパ組織で抗原感作を受けた T 細胞や B 細胞はレチノイン酸の作用を受け $\alpha 4\beta 7$ インテグリンや CCR9 を発現させることで、腸管指向性を獲得する。その結果、パイエル板で活性化された B 細胞や T 細胞は腸管膜リンパ節を経て血流に乗り、その後、吸収上皮細胞の下層に位置する腸管固有層へ遊走する

(Fig. 4).

腸管固有層に到達した B 細胞は IL-5 や IL-6 の作用を受け、IgA 分泌プラズマ細胞へと分化する (Fig. 4)。粘膜面において産生された IgA は J 鎖により結合した多量体を形成しており、上皮細胞に発現した poly immunoglobulin (Ig) 受容体を介したトランスサイトーシスにより分泌型 IgA として腸管内へ分泌される。このような一連の経路から、パイエル板は腸管を介した抗原特異的免疫応答の誘導において、免疫誘導組織として機能していると考えられている。

またパイエル板は発生学的にも研究の進んでいる組織である。パイエル板は胎生期に構築されることが知られており、そこでは IL-7 やリンホトキシンといったサイトカインや VCAM-1 などの接着分子が関与している。^{8,10)} これらの知見を基にパイエル板を欠損したマウスを人工的に作製することが可能となった。^{8,10)} すなわち、パイエル板の構築がなされる時期に、パイエル板の組織形成に関与する経路の一部を遮断することでパイエル板形成を阻害することが可能となる。興味深いことにパイエル板の組織形成時期は他のリンパ組織とは異なるため、阻害時期を限定することでパイエル板のみが欠損したマウスを作製することが可能となる。^{8,10)} われわれは妊娠マウスの胎生 14 日目に抗 IL-7 受容体抗体を投

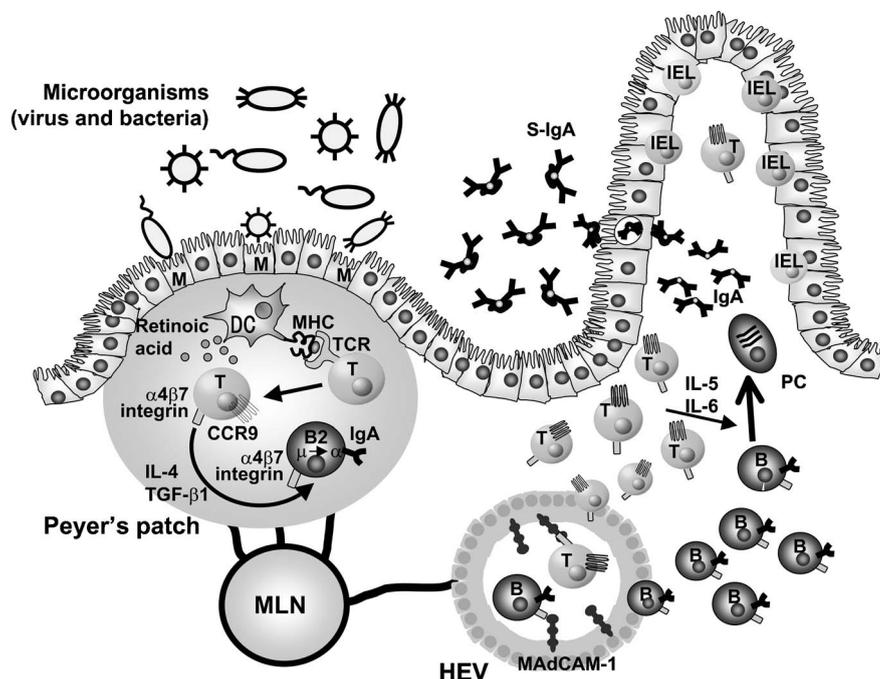


Fig. 4. Mucosal Immune Network for the Production of Secretory IgA (S-IgA)

Pathogens in the intestinal lumen are transported into Peyer's patch through M cells, where dendritic cells (DC) take them for the antigen presentation to T cells. Simultaneously, preferential production of IL-4 and TGF-β induces IgA-committed B cells. Peyer's patch DC also produce retinoic acid to render the antigen-primed T and B cells to gut-tropic cells by the induction of α4β7 integrin and CCR9. The antigen-primed T and B cells migrate into intestinal lamina propria via the interaction of α4β7 integrin/MAdCAM-1 in high endothelial venule (HEV) and that of CCR9/CCL25 in the lamina propria, where IgA-committed B cells further differentiate to IgA-producing plasma cells (PC) under the influence of IL-5 and IL-6. Epithelial cells transport IgA into intestinal lumen as S-IgA.

与することで、パイエル板を欠損させたマウスを作製し、経口ワクチンにおけるパイエル板の重要性を検討した。¹¹⁾ ワクチンデリバリーシステムとして頻用されているポリ乳酸マイクロスフェアに抗原を封入し、パイエル板欠損マウスに経口免疫を行うと、通常のマウスで観察される粘膜面と全身面の両免疫応答が効果的に誘導されないことが判明した。¹¹⁾ これらの結果から現在、粘膜ワクチン開発において粒子状抗原デリバリーシステムを考慮した際パイエル板、特に M 細胞への抗原送達が重要であると考えられている。

4. 鼻咽頭関連免疫担当組織

インフルエンザなど多くのウイルスや細菌が呼吸器を介して感染するという事を考えてみると、腸管と同様、呼吸器も免疫バリアーとして重要である。ヒトの場合、アデノイドや口蓋扁桃が免疫担当組織として機能することが知られている。^{8,10)} またマウスなど齧歯類の場合、鼻腔に接する形で一對のリンパ組織として存在している鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) が最も研究の進んでいる呼吸器関連リンパ組織である。^{8,10)} NALT は小腸におけるパイエ

ル板と同様、輸入リンパ管を持たない代わりに M 細胞を持ち、鼻腔を介した T 細胞や B 細胞の免疫誘導組織として機能していることが知られている。¹²⁾ 興味深いことに、パイエル板と NALT は構造的・機能的には非常に類似しているが、その発生過程は全く異なる。^{8,13)} 例えば、前述のように妊娠マウスを IL-7 受容体に対する抗体で処理すると、パイエル板を欠損したマウスが生まれてくる。これらパイエル板欠損マウスの NALT を観察してみると、ほぼ野生型のマウスと同様の NALT を形成している。^{8,13)} すなわち NALT はパイエル板と機能的・構造的には類似しており、それぞれ呼吸器と消化管における粘膜免疫誘導組織として機能しているが、発生過程は制御プログラムにおいて異なっており、その特異性の解明とそれら結果を基にした新規経鼻ワクチンへの展開について進展が待たれているところである。

5. 粘膜ワクチンへの展開

これまでのワクチンの多くは、生ワクチンや不活化ワクチンなどの病原体そのものを使用するものであった。しかしながら遺伝子工学やタンパク質産生

技術が飛躍的に向上した現在においては、安全性に問題のある従来型のワクチンに代わり、病原体の抗原部分をコードした遺伝子を用いる DNA ワクチンや病原体の一部を組み換えタンパク質として用いるサブユニットワクチンが安全性の高いワクチンとして開発が進められている。しかしながら腸管や呼吸器は、元来、外来異物を分解・排除するための機能が発達しているため、DNA ワクチンやサブユニットワクチンを単独で投与しても、効果的に抗原特異的免疫応答が得られないのが実情である。これらの問題点を解決する方法の1つとして、Drug Delivery System (DDS) 技術の応用が進められている。^{10,14} DDS 技術は古くより、薬物を目的の部位へ必要量送達するための技術として研究が発展してきた。その1つとして経鼻・経口投与後の薬物のバイオアベイラビリティを上昇させるための技術開発が進められている。抗原を薬物にみだてることで、これらの技術はすぐに粘膜ワクチンへ応用できるものである。すなわち、これまで蓄積された薬物の経鼻・経口投与のための DDS 技術をそのまま粘膜ワクチンに応用することで、単に抗原の分解を抑制するだけではなく、積極的な抗原送達も可能となってきた。例えばわれわれは粘膜付着性高分子であるカルボキシビニルポリマーをワクチンキャリアーに付加することで、抗原の腸管内停滞時間が延長し、ワクチン効果が増強することを確認している。¹⁵ さらには粘膜免疫誘導組織であるパイエル板や NALT に存在する M 細胞への効果的な抗原送達のためにレクチンなどを利用する方法も提唱されている。¹⁶ UEA-1 は糖鎖である α -L- フコースを認識するレクチンであるが、マウスの腸管においては、パイエル板 M 細胞の管腔側に選択的に結合することが知られている。¹⁷ そのため UEA-1 でコートした粒子を用いることで、M 細胞への効率のよい抗原送達が可能となり、優れた粘膜ワクチン効果が得られることが報告されている。¹⁷ また同様のアプローチとして、Yersinia 菌由来の *invasin* や Reovirus の $\sigma 1$ protein などのように病原体が M 細胞に侵入する際に働くリガンドを用いる方法も考案されている。¹⁸⁻²⁰

われわれはセンダイウイルスとリポソームのハイブリット型粒子である膜融合リポソームの粘膜ワクチンへの応用について研究を進めてきた。^{10,14,21} 膜

融合リポソームはセンダイウイルスがリポソームにも融合するという性質を応用して開発された DDS 技術である。^{21,22} 粒子表面のセンダイウイルス由来膜タンパク質を利用した細胞膜との融合により、細胞に傷害を与えることなく、*in vitro* 並びに *in vivo* において遺伝子やタンパク質、さらには粒子状抗原までもリポソームに内封でき、それら内封物を効率よく導入できることが報告されている。²³⁻²⁶ また、筆者らはこれまでに膜融合リポソームを用いることで、内封した抗原が標的細胞の細胞質中に導入され、MHC class I 分子を介して抗原提示されること、さらに抗原封入膜融合リポソームを注射により免疫すると全身系免疫組織に抗原特異的抗体産生のみならず細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte: CTL) を誘導できることを示した。つまり、膜融合リポソームが全身系免疫を標的としたワクチンキャリアーとして液性・細胞性両免疫応答を誘導できる高い機能を有していることを報告している。^{25,27,28} 一方、膜融合リポソームの作製に用いているセンダイウイルスは本来気道粘膜上皮細胞に感染するウイルスであることから、生体内においてセンダイウイルスと同様の挙動を示すと思われる膜融合リポソームも粘膜面に投与すると効果的に M 細胞を含む粘膜上皮細胞に融合し、その内封物を粘膜免疫担当組織に送達できると期待された。

事実、われわれの研究結果から、膜融合リポソームは鼻腔リンパ組織である NALT の M 細胞に抗原を送達するとともに、その下層に存在すると思われる抗原提示細胞へ非常に効率よく抗原送達していることが確認された。²⁹ これら NALT への高い抗原送達能を反映し、HIV の膜タンパク質である gp160 を封入した膜融合リポソームを経鼻免疫したマウスの血清中には gp160 特異的 IgG が、粘膜面においては分泌型 IgA が非常に多く産生されていた (Fig. 5)。³⁰ 特筆すべきことは、投与部位である鼻腔洗浄液中のみならず、遠隔の粘膜組織である膣や腸管分泌液中においても gp160 特異的 IgA の産生が観察されたことである (Fig. 5)。特に HIV の主要な感染経路となっている生殖器において、抗体産生が誘導できるという結果は、感染予防の観点からして、膜融合リポソームの粘膜ワクチンとしての有用性を強く示唆するものである。またこれら膜融合リポソームを用い経鼻免疫したマウスから得られ

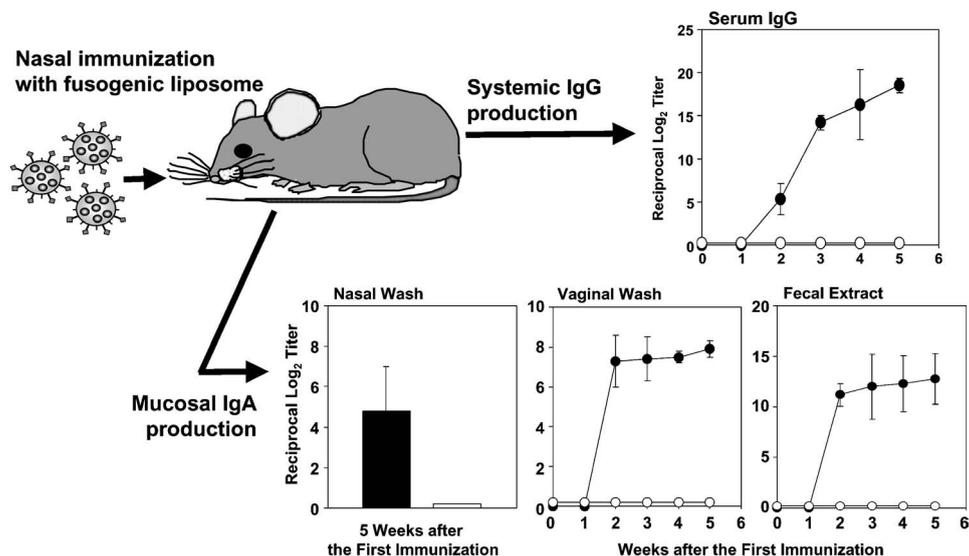


Fig. 5 A Novel Hybrid Delivery Vehicle, Fusogenic Liposome, for the Efficient Induction of NALT-mediated Mucosal and Systemic Immune Responses

Nasally administered fusogenic liposome efficiently deliver the encapsulated antigen into the antigen presenting cells in NALT. Thus, high levels of HIV gp160-specific antibody responses were induced in both systemic (serum) and mucosal (nasal wash, vaginal wash, and fecal extract) compartments of mice nasally immunized with gp160-fusogenic liposome (closed bar and circles). As a control, mice were nasally administered with fusogenic liposome containing PBS (open bar and circles).

た血清並びに膣洗浄液は、実際のエイズ患者から単離した HIV に対し感染を防止できる中和活性を示した。³⁰⁾ さらに抗体産生のみならず CTL も誘導できることが確認されたことから、膜融合リポソームは中和活性を有する抗体産生を粘膜面と全身面で誘導でき、かつキラー T 細胞も誘導可能な優れた粘膜ワクチン送達システムであることが判明した。

6. 総括

われわれは飲む・食べる・吸うワクチンである粘膜ワクチンを次世代ワクチンのスタンダードとすべくその目標達成に向けて基盤形成研究を進めている。感染症に対する効果を考えると初発感染部位である粘膜面に抗原特異的免疫応答を誘導できる粘膜ワクチンは、これまでの注射のワクチンに比べ二段構えの防御免疫誘導などより有効な効果を発揮すると思われる。米国においてインフルエンザに対する新世代ワクチンとして吸入ワクチンが導入された事実をみても、その考えの将来性がみえてくる。われわれの現在進めつつある粘膜免疫のユニーク性を解明する基礎研究と薬学領域にて培われた DDS 技術がうまく融合すれば、粘膜免疫のユニーク性と DDS 技術を基盤とした粘膜ワクチンが、感染症の撲滅に大きく貢献するものと期待される。

謝辞 本総説中で紹介した研究において、ご協力とご指導下さいました大阪大学大学院薬学研究科・真弓忠範先生（現在、神戸学院大学）、中川晋作先生、堤 康央先生（現、医薬基盤研究所）、日本医科大学の高橋秀美先生、武田薬品工業・小川泰亮先生（現在、ガレニサーチ株式会社）、秋山洋子先生、永原直樹先生に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Kunisawa J., Kiyono H., *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 1308–1321 (2005).
- 2) Kunisawa J., Takahashi I., Kiyono H., *Immunol. Rev.*, (2007), (in press).
- 3) Shastri N., Cardinaud S., Schwab S. R., Serwold T., Kunisawa J., *Immunol. Rev.*, **207**, 31–41 (2005).
- 4) Das G., Janeway Jr. C. A., *Trends Immunol.*, **24**, 88–93 (2003).
- 5) Martin F., Kearney J. F., *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 195–201 (2001).
- 6) Neutra M. R., Pringault E., Kraehenbuhl J. P., *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 275–300 (1996).
- 7) Iwasaki A., Kelsall B. L., *J. Exp. Med.*, **191**, 1381–1394 (2000).
- 8) Kiyono H., Fukuyama S., *Nat. Rev. Im-*

- munol.*, **4**, 699–710 (2004).
- 9) Iwata M., Hirakiyama A., Eshima Y., Kagechika H., Kato C., Song S. Y. *Immunity*, **21**, 527–538 (2004).
 - 10) Kunisawa J., Fukuyama S., Kiyono H., *Curr. Mol. Med.*, **5**, 557–572 (2005).
 - 11) Kunisawa J., Takahashi I., Okudaira A., Hiroi T., Katayama K., Ariyama T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kiyono H., Mayumi T., *Eur. J. Immunol.*, **32**, 2347–2355 (2002).
 - 12) Hiroi T., Iwatani K., Iijima H., Kodama S., Yanagita M., Kiyono H., *Eur. J. Immunol.*, **28**, 3346–3353 (1998).
 - 13) Fukuyama S., Hiroi T., Yokota Y., Rennert P. D., Yanagita M., Kinoshita N., Terawaki S., Shikina T., Yamamoto M., Kurono Y., Kiyono H., *Immunity*, **17**, 31–40 (2002).
 - 14) Kunisawa J., McGhee J., Kiyono H., “Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A,” ed. by Kaetzel C., Kluwer Academic/Plenum Publishers, (2007), (in press).
 - 15) Kunisawa J., Okudaira A., Tsutsumi Y., Takahashi I., Nakanishi T., Kiyono H., Mayumi T., *Vaccine*, **19**, 589–594 (2000).
 - 16) Jepson M. A., Clark M. A., Hirst B. H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 511–525 (2004).
 - 17) Clark M. A., Jepson M. A., Hirst B. H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **50**, 81–106 (2001).
 - 18) Hussain N., Florence A. T., *Pharm. Res.*, **15**, 153–156 (1998).
 - 19) Wu Y., Wang X., Csencsits K. L., Haddad A., Walters N., Pascual D. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 9318–9323 (2001).
 - 20) Wang X., Hone D. M., Haddad A., Shata M. T., Pascual D. W., *J. Immunol.*, **171**, 4717–4725 (2003).
 - 21) Kunisawa J., Nakagawa S., Mayumi T., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 177–186 (2001).
 - 22) Nakanishi M., Mizuguchi H., Ashihara K., Senda T., Eguchi A., Watabe A., Nakanishi T., Kondo M., Nakagawa T., Masago A., Okabe J., Ueda S., Mayumi T., Hayakawa T., *Mol. Membr. Biol.*, **16**, 123–127 (1999).
 - 23) Mizuguchi H., Nakanishi M., Nakanishi T., Nakagawa T., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **73**, 472–476 (1996).
 - 24) Mizuguchi H., Nakagawa T., Toyosawa S., Nakanishi M., Imazu S., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Ijuhin N., Mayumi T., *Cancer Res.*, **58**, 5725–5730 (1998).
 - 25) Yoshikawa T., Imazu S., Gao J. Q., Hayashi K., Tsuda Y., Shimokawa M., Sugita T., Niwa T., Oda A., Akashi M., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 500–505 (2004).
 - 26) Kunisawa J., Masuda T., Katayama K., Yoshikawa T., Tsutsumi Y., Akashi M., Mayumi T., Nakagawa S., *J. Control Release*, **105**, 344–353 (2005).
 - 27) Hayashi A., Nakanishi T., Kunisawa J., Kondoh M., Imazu S., Tsutsumi Y., Tanaka K., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 824–828 (1999).
 - 28) Nakanishi T., Hayashi A., Kunisawa J., Tsutsumi Y., Tanaka K., Yashiro-Ohtani Y., Nakanishi M., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T., *Eur. J. Immunol.*, **30**, 1740–1747 (2000).
 - 29) Kunisawa J., Nakanishi T., Takahashi I., Okudaira A., Tsutsumi Y., Katayama K., Nakagawa S., Kiyono H., Mayumi T., *J. Immunol.*, **167**, 1406–1412 (2001).
 - 30) Sakaue G., Hiroi T., Nakagawa Y., Someya K., Iwatani K., Sawa Y., Takahashi H., Honda M., Kunisawa J., Kiyono H., *J. Immunol.*, **170**, 495–502 (2003).