

## 受賞講演 4

## サルモネラ制御における乳酸菌を用いた組換えワクチンの開発

梶川揚申

ノースカロライナ州立大学

一部の乳酸菌は発酵食品中に見出されるほか、腸内細菌叢を構成する共生微生物としても知られている。そのため、少なくとも健康なヒト（およびその他の動物）が経口的に摂取する限りにおいては安全であると考えられている。近年、乳酸菌を抗原運搬体とする経口粘膜ワクチンの開発が試みられるようになった。演者らの研究グループは *Lactobacillus casei* IGM393株を用い、主に *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) を標的とする経口粘膜ワクチンについて研究を進めてきた。

鞭毛抗原フラジェリン (FliC) はSEに対する感染防御抗原のひとつである。FliCをコードする遺伝子をタンパク質菌体表層提示用プラスミドベクターへ挿入し、菌体表層にFliCを固定化した組換え *L. casei* を作製した。この組換え乳酸菌をC3H/HeJマウスへ経口投与し、免疫後にSEを経口感染させたところ、感染防御効果が認められた。免疫したマウスからFliC特異的な抗体はほとんど検出されなかったが、FliCで再刺激した脾臓細胞などから比較的高濃度のIFN- $\gamma$ が検出された。これらの結果から、FliC発現乳酸菌による感染防御免疫は、抗体に依存せず、細胞性免疫が関与したものであることが示唆された。

SEの病原因子であるSipCをFliCと融合させることにより、感染防御効果の向上を試みた。Overlap PCRによりSipCとFliCをコードする遺伝子断片を繋ぎ、既述の方法によりSipC-FliC融合タンパク質を菌体表層に発現する組換え *L. casei* を作製した。この組換え乳酸菌はCaco-2細胞からのIL-8産生を誘導したことから、菌体表層のFliC融合タンパク質がTLR5により認識されることが示唆された。この組換え乳酸菌をマウス腹腔内へ投与したところ、FliC、SipCの両方に対する特異的免疫応答が確認された。経口免疫後のSE感染実験による評価では、FliCのみを発現する乳酸菌で免疫した場合と同程の効果に留まった。

これまでの研究により、経口投与において乳酸菌と抗原の組合せだけでは十分な免疫を誘導できない場合がよくあることが分かっている。そのため、アジュバント効果を持つ分子を乳酸菌に発現させる方法が検討されている。演者らは、成熟型マウスIL-1 $\beta$ を分泌する *L. casei* を作製し、SE死菌体と共投与することで、そのアジュバント効果を評価した。IL-1 $\beta$ 分泌 *L. casei* を共投与したマウスからは、対照群の個体よりも高いSE特異的抗体の産生がみられた。この結果から、IL-1 $\beta$ を分泌する乳酸菌が経口アジュバントとしての効果を持つことが確認された。

以上の研究を通して、乳酸菌を抗原運搬体とする経口ワクチンが、SEの制御に応用できる可能性が示された。

## Development of Recombinant Vaccines in Lactobacilli for Elimination of *Salmonella*

Akinobu Kajikawa

North Carolina State University

Many *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains are generally regarded as safe for consumption because they are utilized for food fermentation or inhabit at intestinal mucosa as commensals. Recently, vaccine delivery systems using lactic acid bacteria (LAB) have been under development. Our research group has been investigating the development of oral mucosal vaccines against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) using *Lactobacillus casei* IGM393 as an antigen delivery vehicle.

SE produces a flagellar antigen, flagellin (FliC), which is known as a protective antigen against SE infection. In our study, a recombinant *L. casei* expressing FliC on the cell surface was constructed by introducing a plasmid vector including a gene fragment encoding FliC fused to a signal peptide and to an anchor motif. C3H/HeJ mice were immunized with the recombinant *L. casei* via the intragastric route and subsequently challenged with SE. Lower numbers of SE were detected from spleens of the mice immunized with FliC-producing *L. casei* in comparison with those of mice in the control groups. Albeit FliC-specific antibodies were barely detected, a relatively high amount of IFN- $\gamma$  was released from spleen cells restimulated with FliC *ex vivo*. These results suggested that this protective immunity against SE was antibody-independent and likely attributed to cellular immunity.

Improvement of the protective efficacy was attempted by fusion of FliC with an additional SE antigen, SipC. Gene fragments encoding SipC and FliC were connected by overlap PCR and introduced into *L. casei* using the same technique. The recombinant lactobacilli expressing the FliC-fusion antigen on cell surfaces induced IL-8 release from Caco-2 cells. The result suggested that the fusion antigen retained an activity for eliciting innate immune responses via Toll-like receptor 5. Intraperitoneal immunization of mice with the recombinant *L. casei* evoked specific immune responses to both FliC and SipC. In oral immunization, however, the protective efficacy of the strain was no better than that of *L. casei* expressing FliC alone.

It has been recognized that lactobacilli producing antigens occasionally lack sufficient immunogenicity for induction of robust immune responses. Thus, a suitable adjuvant has been sought to complement the immunogenicity of lactobacilli. Our group constructed a recombinant *L. casei* secreting a mature form of mouse IL-1 $\beta$  as a mucosal adjuvant. Mice immunized intragastrically with this strain along with inactivated SE elicited production of specific antibodies against SE more efficiently. This result suggested that the IL-1 $\beta$ -producing *L. casei* possessed an adjuvant effect in oral immunization.

In conclusion, lactobacilli as antigen/adjuvant-delivery vehicles are promising for oral vaccination to eliminate SE.