

塩分摂取がインフルエンザウイルス特異的な免疫応答に与える影響の解析

一戸 猛志

東京大学医科学研究所感染症国際研究センターウイルス学分野

概要 インフルエンザ感染症は我が国では毎年冬に流行が起こり、高齢者での肺炎、幼児での脳症が致死的となり問題である。最近の研究から、塩分の過剰な摂取は腸内細菌叢の破綻 (*dysbiosis*) を引き起こすことが示唆されている。一方、過剰な塩分摂取が抗ウイルス免疫応答に与える影響については明らかにされていない。我々はこれまでに、マウスに抗生物質を飲ませて腸内細菌叢を死滅させると、インフルエンザウイルス特異的な免疫応答が減弱することを見出している。さらにその後の研究により、腸内細菌叢由来代謝産物が、インフルエンザウイルス特異的な免疫応答の誘導に必要であることを明らかにした。そこで本研究ではマウスのインフルエンザウイルス感染モデルを用いて、過剰な塩分摂取がインフルエンザウイルス感染後や経鼻ワクチン接種後のウイルスまたはワクチン特異的な免疫応答に与える影響を解析することを目的とした。

C57BL/6J マウスに水または 2% NaCl 水を 2 週間飲ませた後、インフルエンザウイルス A/PR8 を感染させた。感染 10 日目の肺組織からリンパ球を回収し、CD8 抗体およびインフルエンザウイルス NP 特異的なテトラマーで染色することにより、肺組織中のインフルエンザウイルス特異的な CD8T 細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した (FACSVerse)。またマウスに水または 2% NaCl 水を 2 週間飲ませた後、致死量 (1,000 pfu) のインフルエンザウイルス A/PR8 を感染させ、感染後の生存率を観察した。

塩分摂取がインフルエンザウイルス感染後のウイルス特異的な獲得免疫の誘導に与える影響を解析するため、C57BL/6J マウスに水または 2% NaCl 水を 2 週間飲ませた後、インフルエンザウイルス A/PR8 を感染させた。感染 10 日目の肺組織中のインフルエンザウイルス特異的な CD8T 細胞の割合を解析したところ、コントロール群と比較して 2% NaCl 水を飲ませたグループで肺組織中のインフルエンザウイルス特異的な CD8T 細胞の割合が有意に変化することはなかった。次に塩分摂取がインフルエンザウイルス感染後の重症化に影響するのかを調べるため C57BL/6J マウスに水または 2% NaCl 水を 2 週間飲ませた後、致死量 (1,000 pfu) のインフルエンザウイルス A/PR8 を感染させ、感染後の生存率を観察した。しかしコントロール群と比較して 2% NaCl 水を飲ませたグループでインフルエンザウイルス感染後の生存率が有意に変化することはなかった。

今回 2% NaCl 水を 2 週間飲ませることにより肺組織中のウイルス特異的な CD8T 細胞の割合やインフルエンザウイルス感染後のマウスの生存率に有意な変化を認めることができなかった。この原因はいくつか考えられるが、ひとつは 2% NaCl 水を 2 週間飲ませただけでは、4 種類の抗生物質 (vancomycin, neomycin, metronidazole, ampicillin) を含んだ水を 4 週間与えたときのような腸内細菌叢の *dysbiosis* が起こっていないことも考えられる。また 2 週間の塩分摂取は腸内細菌叢だけでなく、さまざまな生理機能に影響を与えていると考えられ、腸内細菌叢の *dysbiosis* 以外のことが影響している可能性もある。今後は 2% NaCl 水を 2 週間飲ませたマウスの糞便を解析することにより、腸内細菌叢の *dysbiosis* が起こっているのかを確認する必要がある。またマウスの腸内細菌叢の *dysbiosis* を引き起こすのに必要な 2% NaCl 水の投与期間についても検討する必要がある。さらに今回は 1,000 pfu のインフルエンザウイルスを感染させた場合の生存率を観察したが、マウスに感染させるインフルエンザウイルスの量を検討してみる必要もある。

1. 研究の背景と目的

インフルエンザ感染症は我が国では毎年冬に流行が起り、高齢者での肺炎、幼児での脳症が致死的となり問題である。また新型インフルエンザウイルスの出現は社会的な混乱を招くこととなり、2009年に発生した新型インフルエンザウイルスのパンデミックがそれを示している。このようなインフルエンザ感染症の予防に有効なのはワクチン接種である。現在、我が国ではインフルエンザウイルスの感染防御抗原であるヘマグルチニン(HA)を主成分とした「HAワクチン」を皮下接種することにより、血液中のHA特異的なIgGを誘導している。しかしこの皮下接種では、インフルエンザウイルスの感染防御に中心的役割を果たすと考えられている上気道粘膜での分泌型IgA抗体が誘導されないため、ウイルスの感染そのものを阻止できない。またワクチン株と流行ウイルス株が一致する時は70%前後の防御効果を示すが、一致しない時は予防効果が減少する。これとは対照的に、インフルエンザウイルスに罹患したヒトは、その後数年間にわたって小さい変異のインフルエンザウイルスに再度感染しにくいことが疫学的に知られている(交叉防御効果)⁽¹⁾。この防御能は主にインフルエンザウイルスが自然感染した際に誘導される鼻粘膜上のウイルス特異的な分泌型IgA抗体によるものと考えられている⁽²⁾。そこで鼻粘膜上にウイルス特異的な分泌型IgA抗体を誘導するため、インフルエンザワクチンとアジュバントを鼻腔内に噴霧して、粘膜免疫を誘導するアジュバント経鼻インフルエンザワクチンの研究が続けられてきた。例えば、poly(I:C)は、ウイルスの複製過程で生じる二本鎖RNAを人工的に合成した核酸アナログであり、自然免疫受容体であるtoll-like receptor 3(TLR3)を活性化させるリガンドであるが⁽³⁾、このpoly(I:C)をアジュバントとしてHAワクチンとともに経鼻接種することにより、血中のHA特異的なIgGだけでなく鼻腔洗浄液中にHA特異的なIgAを誘導することができ、インフルエンザウイルスの感染そのものを阻止することが可能となる⁽⁴⁾。このように、効果的なワクチン開発のためには、インフルエンザウイルスが生体にもどのように認識されて(自然免疫応答)、そのことがどのようにウイルス特異的な獲得免疫応答の誘導に役立っているかを理解する必要がある。

インフルエンザウイルスは、少なくとも3つの自然免疫受容体によって認識されている(図1)。TLR7はエンドゾ

ーム内でインフルエンザウイルスのゲノムRNAを認識する^(5,6)。細胞質中のRIG-Iは、ウイルスのゲノムRNAを認識する^(7,8)。これとは対照的に、インフルエンザウイルスRNAはNLRP3を活性化しない⁽⁹⁾。Nod-like receptorsファミリーのNLRP3は、ATPや環境中刺激物だけでなく、さまざまな細菌やウイルスの感染などによって活性化する細胞内の自然免疫受容体である⁽¹⁰⁾。活性化したNLRP3はアダプタータンパク質のASCや未成熟型caspase-1とともに細胞内でNLRP3 inflammasomeと呼ばれる巨大なタンパク質複合体を形成し、これにより活性化したcaspase-1が細胞質中の未成熟型IL-1 β を切断することにより、成熟型IL-1 β が細胞外へ分泌される。インフルエンザウイルスによるNLRP3 inflammasomeの活性化には、インフルエンザウイルスM2タンパク質のプロトンチャネル活性が必要で、M2タンパク質はトランスゴルジ中のプロトン細胞質中へ流出させてNLRP3 inflammasomeを活性化させている⁽¹¹⁾。弱酸性のトランスゴルジ内のpHをM2タンパク質が中和することは、インフルエンザウイルスHAタンパク質の正しい立体構造を保つため(感染性のあるウイルス粒子を産生するため)に必要である。このことは宿主側が、効率的なウイルスの増殖に必要なウイルス側の戦略を逆手にとり、宿主のウイルス認識機構に利用している可能性を示唆している。他にも、ピコルナウイルス科の脳心筋炎ウイルス(EMCV)、ポリオウイルス、エンテロウイルス71型、ヒトライノウイルスの2Bタンパク質がNLRP3 inflammasomeを活性化させること⁽¹²⁾、RSウイルス(respiratory syncytial virus)のSHタンパク質がIL-1 β の産生を促進させることが報告されており⁽¹³⁾、このようなviroporin(ウイルスがコードするイオンチャネルタンパク質)は、RNAウイルスがNLRP3 inflammasomeを活性化させるメカニズムのひとつであると考えられる⁽¹⁴⁾。興味深いことに、インフルエンザウイルスのM2タンパク質やEMCVの2Bタンパク質のようなviroporinはミトコンドリアDNAを細胞質中へ放出し、細胞内DNAセンサー依存的なインターフェロン応答を誘導しているばかりでなく⁽¹⁵⁾、細胞内DNAセンサーであるAIM2が形成するinflammasome依存的なIL-1 β も誘導している⁽¹⁶⁾。このことは細胞内のDNAセンサーがDNAウイルスに対する防御免疫だけでなく、インフルエンザウイルスやEMCVなどのRNAウイルスの感染に対する自然免疫応答にも重要な役割を果たしていることを示唆している。

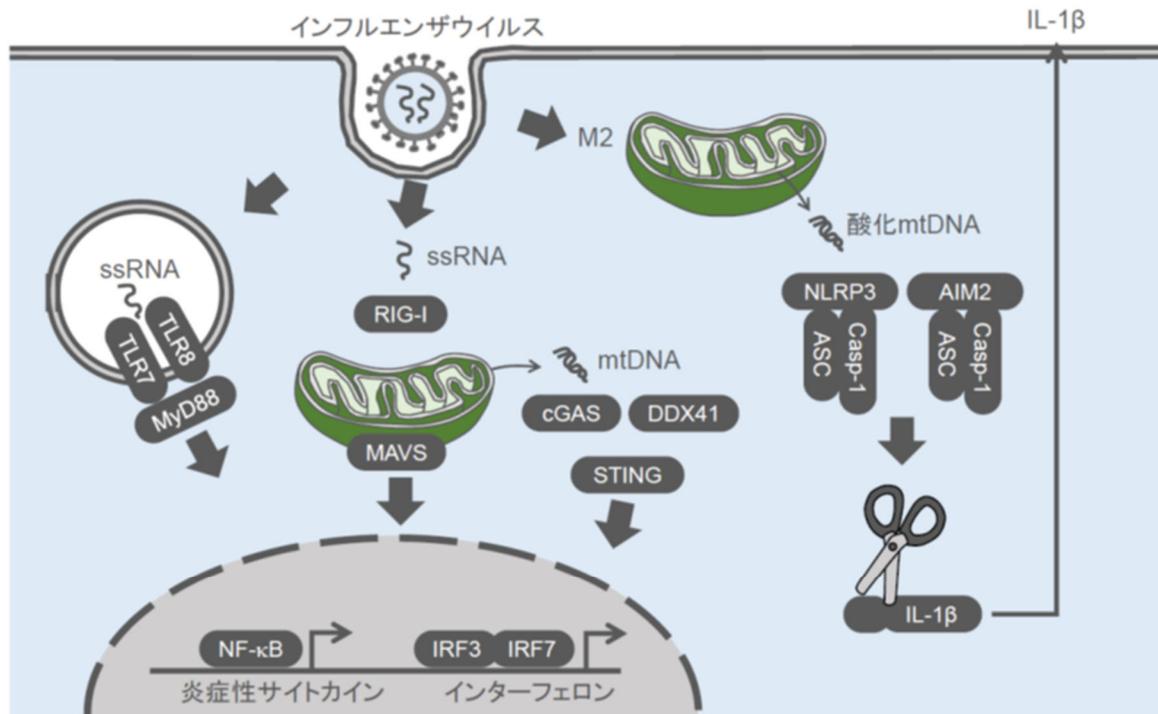


図1. 自然免疫系によるインフルエンザウイルスの認識機構. TLR7やRIG-IIはインフルエンザウイルスRNAを認識することによりインターフェロンや炎症性サイトカインを誘導する。またインフルエンザウイルスのM2タンパク質によりミトコンドリアDNAが細胞内へ放出されると、細胞内のDNAセンサー依存的な自然免疫応答だけでなく、NLRP3やAIM2 inflammasome依存的なIL-1βの分泌が起こる。

マウスにインフルエンザウイルスを感染させた場合、肺での inflammasomes の活性化と IL-1β の産生は、インフルエンザウイルス特異的な B 細胞, T 細胞応答の誘導に必要である⁽⁹⁾。インフルエンザウイルスに感染後、肺で inflammasome が活性化 (IL-1β が産生) されると、抗原を捕捉した樹状細胞 (DCs) が効率よく所属リンパ節 (mediastinal lymph node) へ遊走する (図 2)。このとき感染細胞周囲にいる DCs (bystander DCs) 上の IL-1 シグナルが、インフルエンザウイルス特異的な獲得免疫応答の誘導に必須である⁽¹⁷⁾。このように inflammasome の活性化による感染局所の炎症反応と IL-1 シグナルが、インフルエンザウイルス特異的な免疫応答の誘導必要であるが、インフルエンザウイルスには NLRP3 inflammasome の活性化を抑制する戦略がある。インフルエンザウイルスによる NLRP3 inflammasome の活性化には、ミトコンドリアの膜電位 (連結したミトコンドリア) が必要であるが⁽¹⁸⁾、インフルエンザウイルス PB1-F2 タンパク質は、ミトコンドリア外膜上の Tom40 チャネルにより膜間スペースへ輸送され、ミトコンドリアの膜電位を低下 (連結したミトコンドリアを断片化) させ

ることにより、NLRP3 inflammasome の活性化を抑制している⁽¹⁹⁾。またインフルエンザウイルスの NS1 タンパク質は NLRP3 と相互作用することにより、NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1β の産生を抑制していることも分かっている⁽²⁰⁾。

インフルエンザウイルス感染後の肺における NLRP3 inflammasome の活性化は、その後のウイルス特異的な獲得免疫応答の誘導に重要であるが、これまでに我々は腸内細菌叢がインフルエンザウイルス感染後の NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1β の産生や、その後のウイルス特異的な獲得免疫追等の誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした⁽²¹⁾。通常の水道水を飲んでいる C57BL/6 マウス (水マウス) の腸内細菌の 99% 以上はグラム陽性菌 (*Lactobacillus* spp.) である。一方、このマウスに 4 種類の抗生物質 (vancomycin, neomycin, metronidazole, ampicillin) を含んだ水を 4 週間与えると、培養可能な腸内細菌の数は 1/6 程度に低下し、またその半数以上がグラム陰性菌 (*Enterobacter* spp.) となる。この抗生物質を 4 週間飲ませたマウス (抗生物質マウス) に非致死量のインフルエンザウイルスを経鼻的に感染させて、

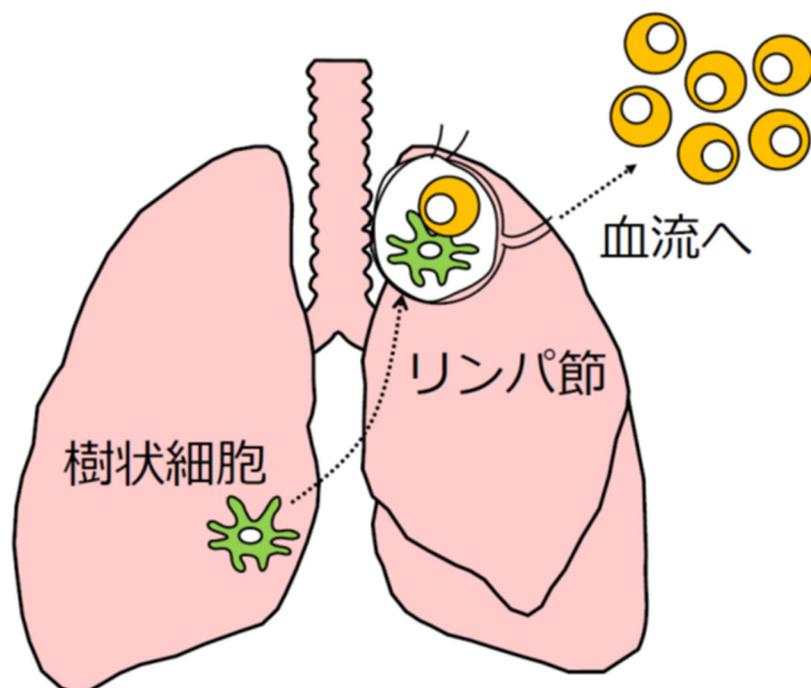


図2. インフルエンザウイルス特異的な獲得免疫の誘導機構. インフルエンザウイルスが肺に感染するとIL-1 β が分泌される。このIL-1 β は周囲の樹状細胞に作用し、ウイルス抗原を捕捉した樹状細胞は所属リンパ節へ遊走する。リンパ節では樹状細胞によりウイルス特異的なナイーブT細胞が活性化され、ウイルス特異的な獲得免疫の誘導が開始される。

感染 2 週間後のインフルエンザウイルスに対する免疫応答を解析すると、ウイルス特異的な血液中の IgG 抗体価、鼻腔洗浄液中の IgA 抗体価、脾臓のウイルス特異的 CD4T, CD8T 細胞応答、肺の CTL の数が低下した。これにより感染 9 日目の肺胞洗浄液中のウイルス量は、水マウスと比較して抗生物質マウスで有意に高くなる⁽¹⁴⁾。このように腸内細菌叢はインフルエンザウイルス感染後のウイルス特異的な獲得免疫応答の誘導に重要な役割を果たしている。

最近の研究から、塩分の過剰な摂取は腸内細菌叢の破綻 (dysbiosis) を引き起こすことが示唆されている⁽²²⁻²⁵⁾。一方、過剰な塩分摂取が抗ウイルス免疫応答に与える影響については明らかにされていない。上述した通り我々はこれまでに、マウスに抗生物質を飲ませて腸内細菌叢を死滅させると、インフルエンザウイルス特異的な免疫応答が減弱することを見出している⁽²¹⁾。さらにその後の研究により、腸内細菌叢由来代謝産物が、インフルエンザウイルス特異的な免疫応答の誘導に必要であることを明らかにした⁽²⁶⁾。そこで本研究ではマウスのインフルエンザウイル

ス感染モデルを用いて、過剰な塩分摂取がインフルエンザウイルス感染後や経鼻ワクチン接種後のウイルスまたはワクチン特異的な免疫応答に与える影響を解析することを目的とした。

2. 研究方法

C57BL/6J マウスに水または 2% NaCl 水を 2 週間飲ませた後、インフルエンザウイルス A/PR8 を感染させた。感染 10 日目の肺組織からリンパ球を回収し、CD8 抗体およびインフルエンザウイルス NP 特異的なテトラマーで染色することにより、肺組織中のインフルエンザウイルス特異的な CD8T 細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した (FACSVerse)。またマウスに水または 2% NaCl 水を 2 週間飲ませた後、致死量 (1,000 pfu) のインフルエンザウイルス A/PR8 を感染させ、感染後の生存率を観察した。

3. 研究結果

塩分摂取がインフルエンザウイルス感染後のウイルス特異的な獲得免疫の誘導に与える影響を解析するため、C57BL/6J マウスに水または 2% NaCl 水を 2 週間飲ませた後、インフルエンザウイルス A/PR8 を感染させた。感染 10

日目の肺組織中のインフルエンザウイルス特異的なCD8T細胞の割合を解析したところ、コントロール群と比較して2% NaCl水を飲ませたグループで肺組織中のインフルエンザウイルス特異的なCD8T細胞の割合が有意に変化することはなかった(図3)。

次に塩分摂取がインフルエンザウイルス感染後の重症化に影響するのかを調べるためC57BL/6Jマウスに水また

は2% NaCl水を2週間飲ませた後、致死量(1,000 pfu)のインフルエンザウイルスA/PR8を感染させ、感染後の生存率を観察した。しかしコントロール群と比較して2% NaCl水を飲ませたグループでインフルエンザウイルス感染後の生存率が有意に変化することはなかった(図4)。

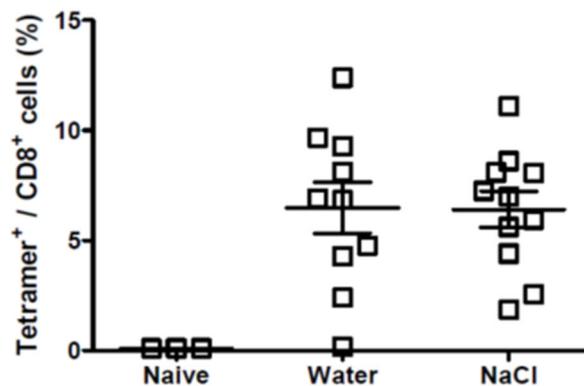


図3. インフルエンザウイルス特異的な肺組織中のCD8T細胞の割合. 水または2%食塩水を飲ませたマウスにインフルエンザウイルスを感染させ、感染10日目の肺組織中のウイルス特異的なCD8T細胞の割合を比較した。

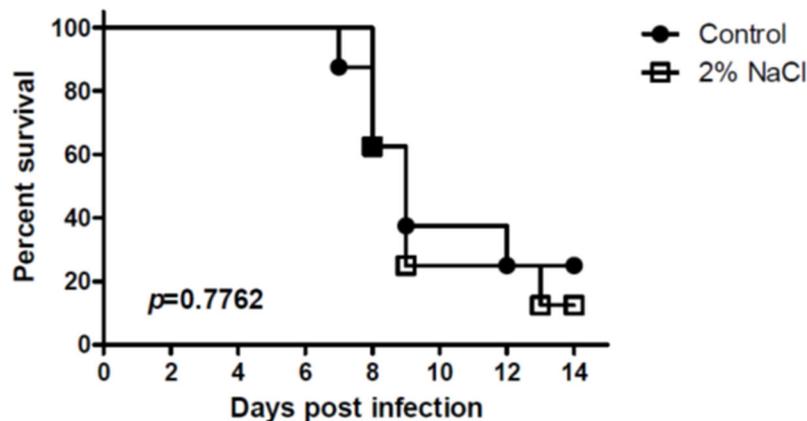


図4. インフルエンザウイルス感染後のマウスの生存率. 水または2%食塩水を飲ませたマウスに致死量のインフルエンザウイルスを感染させ、マウスの生存率を14日間観察した。

4. 考察と今後の課題

最近の研究から、塩分の過剰な摂取は腸内細菌叢の破綻(dysbiosis)を引き起こすことが示唆されている⁽²²⁻²⁵⁾。また我々のこれまでの研究から、抗生物質により腸内細菌叢の dysbiosis を引き起こすと、インフルエンザウイルス特異的な CD8T 細胞応答が減弱するだけでなく⁽²¹⁾、インフルエンザウイルス感染後の生存率が低下することが分かっている⁽²⁶⁾。しかし今回 2% NaCl 水を 2 週間飲ませることにより肺組織中のウイルス特異的な CD8T 細胞の割合やインフルエンザウイルス感染後のマウスの生存率に有意な変化を認めることができなかった。この原因はいくつか考えられるが、ひとつは 2% NaCl 水を 2 週間飲ませただけでは、4 種類の抗生物質 (vancomycin, neomycin, metronidazole, ampicillin) を含んだ水を 4 週間与えたときのような腸内細菌叢の dysbiosis が起こっていないことも考えられる。また 2 週間の塩分摂取は腸内細菌叢だけでなく、さまざまな生理機能に影響を与えていると考えられ、腸内細菌叢の dysbiosis 以外のことが影響している可能性もある。今後は 2% NaCl 水を 2 週間飲ませたマウスの糞便を解析することにより、腸内細菌叢の dysbiosis が起こっているのかを確認する必要がある。またマウスの腸内細菌叢の dysbiosis を引き起こすのに必要な 2% NaCl 水の投与期間についても検討する必要がある。さらに今回は 1,000 pfu のインフルエンザウイルスを感染させた場合の生存率を観察したが、マウスに感染させるインフルエンザウイルスの量を検討してみる必要もある。

5. 文献

1. Couch RB, Kasel JA. 1983. Immunity to influenza in man. *Annu Rev Microbiol* 37:529-549.
2. Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S. 2002. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol* 168:2930-2938.
3. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
4. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. 2005. Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol* 79:2910-2919.
5. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531.
6. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5598-5603.
7. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. 2005. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23:19-28.
8. Rehwinkel J, Reis e Sousa C. 2010. RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science* 327:284-286.
9. Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. 2009. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med* 206:79-87.
10. Kanneganti TD. 2010. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol* 10:688-698.
11. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. 2010. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 11:404-410.
12. Ito M, Yanagi Y, Ichinohe T. 2012. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog* 8:e1002857.
13. Triantafilou K, Kar S, van Kuppeveld FJ, Triantafilou M. 2013. Rhinovirus-induced calcium

flux triggers NLRP3 and NLRC5 activation in bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49:923-934.

14. Chen IY, Ichinohe T. 2015. Response of host inflammasomes to viral infection. *Trends Microbiol* 23:55-63.
15. Moriyama M, Koshihara T, Ichinohe T. 2019. Influenza A virus M2 protein triggers mitochondrial DNA-mediated antiviral immune responses. *Nat Commun* 10:4624.
16. Moriyama M, Nagai M, Maruzuru Y, Koshihara T, Kawaguchi Y, Ichinohe T. 2020. Influenza Virus-Induced Oxidized DNA Activates Inflammasomes. *iScience* 23:101270.
17. Pang IK, Ichinohe T, Iwasaki A. 2013. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8(+) T cell responses to influenza A virus. *Nat Immunol* 14:246-253.
18. Ichinohe T, Yamazaki T, Koshihara T, Yanagi Y. 2013. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:17963-17968.
19. Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata S, Mihara K, Koshihara T. 2014. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun* 5:4713.
20. Moriyama M, Chen IY, Kawaguchi A, Koshihara T, Nagata K, Takeyama H, Hasegawa H, Ichinohe T. 2016. The RNA- and TRIM25-Binding Domains of Influenza Virus NS1 Protein Are Essential for Suppression of NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1beta Secretion. *J Virol* 90:4105-4114.
21. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, Iwasaki A. 2011. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5354-5359.
22. Towhid ST. 2019. Effect of High-salt Consumption on Rodent Gut Microbiome: A Meta-Analysis. *Mymensingh Med J* 28:567-573.
23. Ferguson JF, Aden LA, Barbaro NR, Van Beusecum JP, Xiao L, Simmons AJ, Warden C, Pasic L, Himmel LE, Washington MK, Revetta FL, Zhao S, Kumaresan S, Scholz MB, Tang Z, Chen G, Reilly MP, Kirabo A. 2019. High dietary salt-induced dendritic cell activation underlies microbial dysbiosis-associated hypertension. *JCI Insight* 5.
24. Bielinska K, Radkowski M, Grochowska M, Perlejewski K, Huc T, Jaworska K, Motooka D, Nakamura S, Ufnal M. 2018. High salt intake increases plasma trimethylamine N-oxide (TMAO) concentration and produces gut dysbiosis in rats. *Nutrition* 54:33-39.
25. Hu J, Luo H, Wang J, Tang W, Lu J, Wu S, Xiong Z, Yang G, Chen Z, Lan T, Zhou H, Nie J, Jiang Y, Chen P. 2017. Enteric dysbiosis-linked gut barrier disruption triggers early renal injury induced by chronic high salt feeding in mice. *Exp Mol Med* 49:e370.
26. Moriyama M, Ichinohe T. 2019. High ambient temperature dampens adaptive immune responses to influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:3118-3125.

The Effects of Salt Intake in the Induction of Influenza Virus-Specific Adaptive Immune Responses

Takeshi Ichinohe

The University of Tokyo

Summary

Influenza A virus, a negative-stranded RNA virus that belongs to the *Orthomyxoviridae* family, is responsible for annual epidemics that cause severe morbidity or death in approximately 5 million people worldwide. The constant pandemic potential of novel influenza subtypes remains a serious threat to public health, as illustrated by the recent pandemics involving swine H1N1 and avian H7N9. Therefore, there is an urgent need to develop effective vaccines against influenza viruses. The innate immune system, the first line of defense against pathogens, relies on pattern recognition receptors (PRRs) to detect pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). For example, influenza genomic RNA is recognized by Toll-like receptor (TLR)-7, which is expressed in late endosomes, whereas the cytosolic sensor, retinoic acid inducible gene-I (RIG-I), detects 5'-triphosphates within the influenza viral genome in infected cells. Signaling via these receptors activates antigen-presenting cells (APCs). These cells produce type I interferons (IFNs) and proinflammatory cytokines, which help to establish an antiviral state, recruit additional immune cells, and direct the adaptive immune response. The type I IFNs not only limit viral replication but also act as a natural mucosal adjuvant for intranasally administered influenza vaccines. Many studies show that mucosal immunity induced by natural respiratory influenza infections is more cross-protective against subsequent infection by variant viruses than systemic immunity induced by parenteral immunization with inactivated vaccine. Therefore, to develop an effective vaccine, it is desirable to mimic the process of natural infection that bridges the innate and adaptive immune responses. For example, intranasally inoculated formalin-inactivated influenza virus vaccine induces protective immunity against both homologous and heterologous viruses; this is probably because the vaccine retains the viral genomic RNA that stimulates TLR7/8. By contrast, a split influenza vaccine does not induce antigen-specific immunity when the vaccine is introduced intranasally. Recent studies have demonstrated that microbiota critically regulates the virus-specific adaptive immune responses following influenza virus infection. In addition, several studies have indicated that high salt intake triggers enteric dysbiosis. Thus, we examined the effects of high salt intake on induction of the virus-specific adaptive immune responses following influenza virus infection. To this end, we fed mice 2% NaCl in drinking water continuously for 2 weeks before influenza virus infection. However, we did not see any significant differences in the virus-specific CD8T cell responses in the lung or survival rate of high salt-fed mice compared with control mice. Further studies are required to determine the effects of high salt intake on gut microbiota composition and the induction of mucosal immune responses against influenza virus infection.