

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

トレハロース誘導体の粘膜アジュバント活性： 経鼻免疫を行ったマウスでの液性免疫増強効果の検討

川村花恵¹⁾, 吉野直人²⁾, 佐々木裕²⁾,
村上一行¹⁾, 川村英生¹⁾,
利部正裕¹⁾, 村木 靖²⁾, 杉山 徹¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 産婦人科学講座

²⁾ 岩手医科大学医学部, 微生物学講座: 感染症学・免疫学分野

(Received on December 7, 2015 & Accepted on December 28, 2015)

要旨

粘膜組織で感染防御に有効な免疫を誘導する粘膜ワクチンを開発するには, 免疫を増強するアジュバントが必要である. トレハロース-6,6'-ジミコレート (TDM) は強力な免疫賦活化作用を示すが, 動物への重篤な副反応がみられたため, ヒトへの応用は困難である. そこで, TDM と類似構造で, 毒性がより低いと考えられるオクタノン酸トレハロースエステル (C8) のアジュバント効果を検討した. 卵白アルブミン (OVA) と共にマウスに経鼻投与する

と, 粘膜分泌液と血漿中の OVA 特異的抗体価, 粘膜免疫および全身免疫関連組織における OVA 特異的抗体産生細胞数が増加した. 追加免疫により OVA 特異的抗体価の再上昇が観察され, 記憶免疫の成立も確認された. さらにデカン酸 (C10) およびドデカン酸トレハロースエステル (C12) にもアジュバント効果が認められた. 以上より, トレハロース誘導体は新規粘膜アジュバントとして期待される.

Key words : *adjuvant, mucosal immunity, trehalose derivative, immunological memory, vaccine*

I. 緒 言

感染症を予防する手段としてワクチン接種は非常に有効な手段である. ほとんどのワクチンは皮下もしくは筋肉内へ接種するが, この接種方法では多くの病原体の侵入門戸である粘膜組織に感染防御免疫を誘導できない. しかし, 粘膜からの抗原投与は粘膜組織に防御機構を構築することが可能である. 粘膜ワクチンは粘膜を介した免疫誘導によってより感染防御に適した免疫を惹起できることが期待されるため, 次世代ワクチン開発において着目されている^{1,2)}.

安全性の点から不活化抗原を用いた粘膜ワクチンの開発が目標とされているが, ワクチン抗原特異的な免疫を誘導するためにはアジュバントが必要となる³⁾.

アジュバントとは抗原に対する免疫応答を増強させる能力を持つ物質である^{4,5)}. アジュバントにはワクチン抗原の必要量や接種回数を減らし⁶⁾, 免疫力の弱い新生児や高齢者への効果を改善する役割がある^{7,8)}. これまで多くのアジュバント研究が前臨床モデルで研究されてきたが, ヒトに使用されるワクチンで有効性と安全性が確立しているものは少ない⁹⁾. 1926 年に開発されたアラム⁶⁾ は, 現在認可されているワクチンで最も汎用されている鉍物塩のア

ジュバントである^{10, 11)}。しかし、アラムは経粘膜接種を行ってもアジュバント効果を示さない¹²⁾。また、極めて強い粘膜アジュバント効果が確認されている物質としてコレラ毒素と大腸菌易熱性毒素があるが^{13, 14)}、経鼻接種によって顔面神経麻痺が誘発される相対危険度が19倍に高まることが報告されている¹⁵⁾。

近年の研究で、マクロファージや樹状細胞といった自然免疫を担う細胞の活性化とアジュバント効果の関連が注目されている。微生物に共通した分子構造 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を認識する受容体に、パターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) があり、マクロファージなどの細胞がPAMPsを認識するとサイトカインを産生し自然免疫を活性化させ獲得免疫を誘導する¹⁶⁾。トレハロースは象鼻虫が産生する trehala から分離され、細菌、真菌、植物および昆虫や線虫などの無脊椎動物が産生する二糖類化合物である¹⁷⁾。また、細菌の中にはトレハロース誘導体を生合成するものもある¹⁸⁾。その一つに、トレハロースに2つのミコール酸がエステル結合した構造を有しているトレハロース-6,6'-ジミコレート (Trehalose-6,6'-dimycolate; TDM) があり¹⁹⁾、結核菌のコードファクターとして古くから知られている²⁰⁾。TDMは活性化マクロファージに発現するPRRsの一種として同定された膜表面タンパクである Macrophage-inducible C-type lectin (Mincle)²¹⁾ に直接結合し²²⁾、マクロファージが炎症性サイトカインを産生することで強い免疫賦活化作用を有するが²³⁾、マウスに投与すると結核感染の特徴である肺胞肉芽腫を形成する^{24, 25)}。そのため、TDMをアジュバントとしてヒトに応用することは、その安全性から期待できない。トレハロース誘導体は、その炭素直鎖の長さが短いほど毒性が弱いことが知られている²⁶⁾。そこで本研究では、TDMに類似した構造で、炭素直鎖が

TDMより短く、Mincleへの結合能を有するトレハロース誘導体の粘膜アジュバント効果を検討することを目的とした。

II. 研究材料および方法

1. 研究倫理

動物実験は、動物実験委員会の承認後 (承認番号: 26-021)、本学動物実験規定を遵守して実施した。マウスは、飼育室の環境に馴化させるために、特定病原体除去下で7日間の飼育後に実験を開始した。人道的エンドポイントとして、被毛の汚れ、立毛、異常姿勢、うずくまり、姿勢などの外観が見られた場合と設定し、動物福祉に配慮した動物実験を行った。

2. アジュバントと抗原

TDMに類似した構造を持ち、Mincleへの結合能を有するトレハロース誘導体としてオクタノン酸トレハロースエステル (C8)、デカン酸トレハロースエステル (C10)、ドデカン酸トレハロースエステル (C12) (いずれも同仁化学研究所、熊本)^{27, 28)}、比較対象としてトレハロース二水和物 (C0) (和光純薬工業株式会社、大阪) をアジュバントとして用いた (図1)。LPS (lipopolysaccharide) にはアジュバント活性があるため²⁹⁾、アジュバント候補物質にLPSが含まれていないことを chromogenic limulus amoebocyte lysate endotoxin assay kit (GenScript, Piscataway, NJ, USA) で確認し、いずれも0.1エンドトキシンユニット/mg未満であった。抗原として卵白アルブミン (Ovalbumin; OVA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用した。各候補アジュバントとOVAは生理食塩液 (大塚製薬工場、徳島) で溶解し、マウス鼻腔内に投与した。

3. 経鼻免疫

実験動物には5週齢のメスのC57BL/6Njclマウス (日本クレア、東京) を用いた。経鼻免疫には各アジュバント候補物質とOVAを混合した溶液を用いた。ケタミン塩酸塩 (第一三

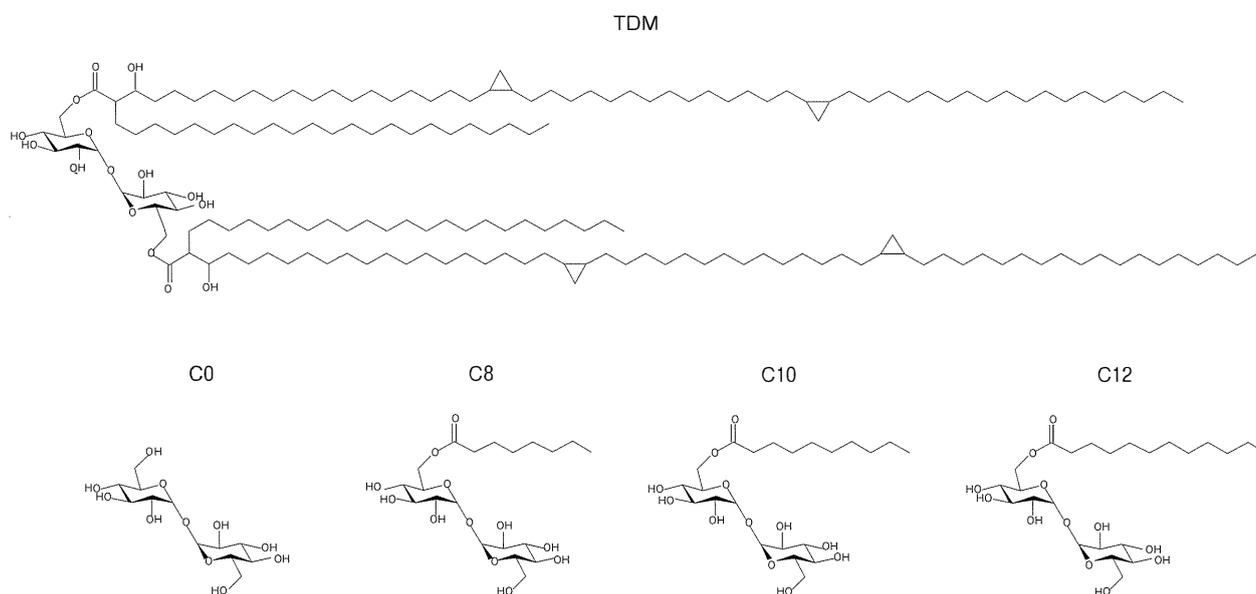


図1. TDM およびトレハロース誘導体の分子構造式
 トレハロース-6,6'-ジミコレート (TDM), トレハロース二水和物 (C0), オクタノン酸トレハロースエステル (C8), デカン酸トレハロースエステル (C10), ドデカン酸トレハロースエステル (C12) の分子構造式を示した。

共プロファーマ株式会社, 東京) をケタミン換算で 75mg/kg 腹腔内投与して浅麻酔を行った。1回の経鼻免疫で, 調製した溶液を片鼻に 2.5 μ l ずつ (計 5.0 μ l) 投与した。この際, 全ての実験において1回のOVAの投与量は 100 μ g/mouse に設定した。また, OVA 100 μ g/mouse とサーファクチン 500 μ g/mouse (482.5nmol/mouse) をマウスに経鼻投与した場合, 粘膜分泌液および血漿中のOVA特異的抗体価の上昇が認められていることから³⁰⁾, 各アジュバント候補物質の投与濃度は 500nmol/mouse に設定した。常法に従い窒息を回避するため, 左右の鼻腔への投与間隔を5分間とした。免疫によりアナフィラキシー反応が誘導される可能性を考慮し, 毎回免疫後にマウスを観察した。アナフィラキシー反応の所見は, 0, 症状なし; 1, 鼻や頭部の擦過; 2, 眼や口周囲の腫脹, 下痢, 立毛, 活動性の低下, 呼吸数の増加; 3, 喘鳴, 呼吸困難, 口周囲や尾のチアノーゼ; 4, 刺激後の活動性の消失, 振戦, 痙攣; 5,

死亡の項目で経鼻免疫後1時間の観察でスコア化した³¹⁾。免疫スケジュールは, 1週間間隔で合計3回経鼻免疫を行った^{32, 33)}。抗体価の長期推移の観察では3回の経鼻免疫後, 最終免疫から13週間後に1回追加免疫を行った。

4. Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA)

最終免疫から1週間後に, 粘膜分泌液 (糞便抽出液, 鼻腔洗浄液, 唾液, 腔洗浄液) と血漿を常法に従い採取した³⁴⁻³⁶⁾。また, 抗体価の長期推移の観察では糞便抽出液, 唾液, 血漿を最終免疫から1, 5, 9, 13, 15, 19週間後に採取し, 27週間後には糞便抽出液, 鼻腔洗浄液, 唾液, 血漿を採取した。各種の検体は使用するまで -80°C で保存した。粘膜分泌液中のOVA特異的IgA抗体価と, 血漿中のOVA特異的IgGおよびIgA抗体価, IgGサブクラス抗体価を, end-point ELISA^{32, 34)} で測定した。OVAを固相化した96穴プレートに2倍階段希釈検体を添加し, ペルオキシダー

ゼ (horseradish peroxidase; HRP) 標識ヤギ抗マウス IgA 抗体または HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体, HRP 標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体, HRP 標識ヤギ抗マウス IgG2b 抗体, HRP 標識ヤギ抗マウス IgG2c 抗体, HRP 標識ヤギ抗マウス IgG3 抗体 (いずれも Southernbiotech, Birmingham, AL, USA) で OVA 特異的抗体を検出した. 基質として TMB+ (3,3', 5,5', tetramethylbenzidine; DAKO, Carpinteria, CA, USA) を, 反応停止液として 0.5mol/l 硫酸 (和光純薬工業株式会社, 大阪) を添加した後, マイクロプレートリーダー (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) で 450nm の吸光度 (OD_{450}) を測定した. 検体非添加の吸光度を陰性対照とし, 抗体価は (検体の OD_{450}) - (陰性対照の OD_{450}) ≥ 0.1 となる最大希釈濃度とした.

5. Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) 法

最終免疫から 1 週間後に, 鼻腔粘膜固有層 (nasal lamina propria; n-LP), 鼻咽頭関連リンパ組織 (nasopharyngeal-associated lymphoid tissue; NALT), 小腸粘膜固有層 (small intestinal lamina propria; i-LP), 腸管膜リンパ節 (mesenteric lymph nodes; MLNs), 唾液腺 (submandibular glands; SMGs), 下顎リンパ節 (submandibular lymph nodes; SMLNs), 脾臓 (spleen; SP), 腋窩リンパ節 (axillary lymph nodes; ALNs) を採取しリンパ球を単離した³⁶⁾. また, 抗体価の長期推移の観察では最終免疫から 27 週間後に, n-LP, i-LP, SMGs, SP を採取しリンパ球を単離した.

それぞれの組織における OVA 特異的抗体産生細胞数を, ELISPOT 法^{32, 34)} を用いて測定した. OVA を固相化した 96 穴フィルタープレートに各組織から単離したリンパ球を加え, 5% CO₂, 37°C の条件下で 4 時間後に放出された OVA 特異的抗体をアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase; AP) 標識ヤギ抗マウ

ス IgA 抗体または AP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (いずれも Southernbiotech) を添加し検出した. NBT/BCIP (nitro-blue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) で発色させ, 実体顕微鏡でスポットを観察し OVA 特異的抗体産生細胞数を算出した.

6. リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (リアルタイム PCR) 法

TDM が Mincle に結合するとマクロファージから TNF- α や IL-6 といった炎症性サイトカインが産生されることが知られている^{37, 38)}. 本研究で用いたアジュバント候補物質でも同様にマクロファージからのサイトカイン産生が認められるかを検討した.

Mincle の発現が確認されているマウスマクロファージ細胞株である RAW264.7^{20, 39)} (DS ファーマバイオメディカル, 大阪) を, Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) に 10% 牛胎児血清, 20 単位/ml ペニシリン (Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京), 0.2mg/ml ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ株式会社) を添加した培養液を用いて, 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した⁴⁰⁾. RAW264.7 (1×10^6 個/well) と TDM (Sigma-Aldrich) または各種アジュバント候補物質を 24 穴プレートで共培養し, 24 時間後に細胞を回収した^{41, 42)}. 共培養する TDM および各種アジュバント候補物質の濃度は, 2nmol もしくは 20nmol とした⁴¹⁾. RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて回収した細胞から総 RNA を抽出し, 総 RNA 100ng 相当を ReverTra Ace[®] (TOYOBO, 大阪) と oligo (dT) プライマーを用いた逆転写反応に供し cDNA を合成した. サイトカイン遺伝子の発現は cDNA 1 μ l (総 RNA 10ng 相当) を template とし, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II

(タカラバイオ株式会社, 滋賀) と腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α), インターロイキン 6 (interleukin-6; IL-6) 特異的プライマー (いずれも日本遺伝子研究所, 宮城)⁴³⁾ を用いて, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) によるリアルタイム PCR 法で解析した. 内部標準遺伝子にはグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (glyoeraldehyde3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) (日本遺伝子研究所) を用いた^{43, 44)}. PCR は SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 添付の説明書に記載されている 3 step PCR に従って行った. TDM および各種アジュバント候補物質処理のサイトカイン遺伝子発現に対する影響は, コントロール細胞に対する比較定量法 ($\Delta\Delta$ CT 法) を用い, 相対的 mRNA 発現レベル (Fold Change) で表した.

7. 統計処理

図 2~図 5 の実験では 1 回につき 1 群 4 匹のマウスを用い, 再現性を確認するため計 2 回の実験を行った. 図 9 では, 同じ実験を 5 回繰り返した. 結果は全て GraphPad Prism バージョン 6.04 (GraphPad software, Inc. La Jolla, CA, USA) で解析し, 正規分布となるデータでは平均値 \pm 標準偏差 (SD), 非正規分布となるデータでは中央値と四分位範囲 (IQR) で表した. 2 群間の比較では正規分布となるデータは Student's t-test により解析し, 非正規分布となるデータでは Mann-Whitney U-test により解析した. $p < 0.05$ の値を有意とみなした.

III. 結 果

1. OVA 特異的抗体価の測定

トレハロース誘導体は, その炭素直鎖が短いほど毒性が弱いことが知られているため²⁶⁾, Mincle への結合が報告されているトレハロース誘導体の中で炭素直鎖が一番短い C8²⁸⁾ の粘膜アジュバント効果を検討したところ, 500nmol C8 投与群では OVA 単独群に比

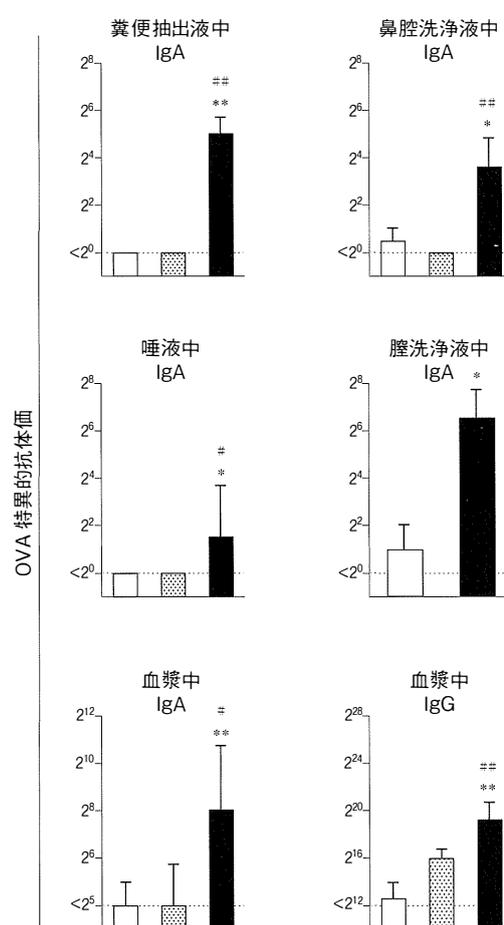


図 2. 粘膜分泌液および血漿中の OVA 特異的抗体価
OVA 単独群 (100 μ g/mouse); 白色, OVA + C8 (50nmol/mouse) 投与群; 点状, OVA + C8 (500nmol/mouse) 投与群; 黒色で示した. OVA 特異的抗体価は検出限界 (点線) 未満の検体が存在したため中央値と IQR で表し, OVA 単独群との有意差をアスタリスク (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$), 50nmol/mouse C8 投与群と 500nmol/mouse C8 投与群との間の有意差をスクエア (# $p < 0.05$, ## $p < 0.005$) で表した.

べ粘膜分泌液および血漿中の OVA 特異的 IgA 抗体価は有意な上昇を認めた. また, 全身免疫価は $2^{20.0}$ (範囲: 2^{19} - 2^{22}) であり, 有意に上昇していた. 一方, 投与量を 10 分の 1 に減らした 50nmol C8 投与群では OVA 単独群と比べ粘膜分泌液, 血漿ともに有意な抗体価の上昇は認めなかった (図 2).

2. OVA 特異的抗体産生細胞の測定

粘膜関連組織 (n-LP, NALT, i-LP, MLNs,

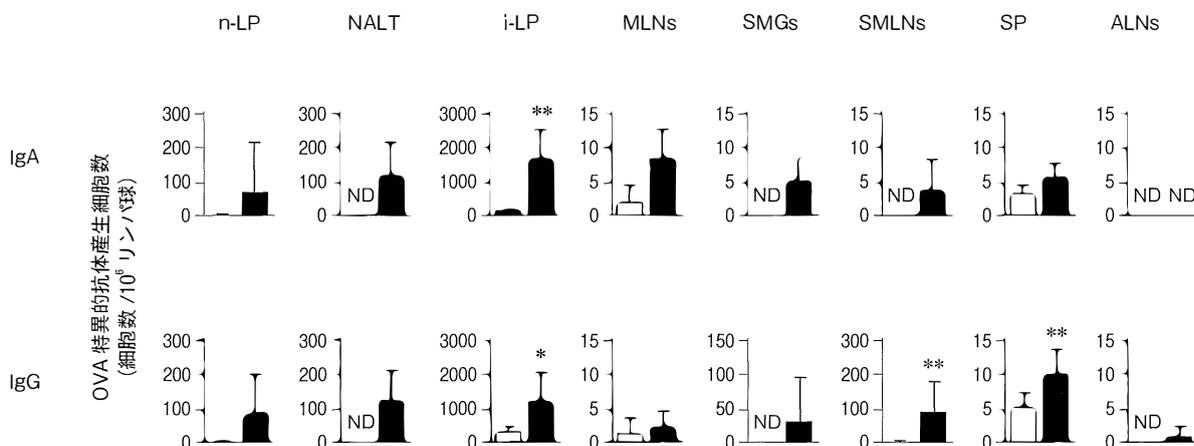


図3. OVA 特異的抗体産生細胞数

OVA 単独群 (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) ; 白色, OVA + C8 (500nmol/mouse) 投与群; 黒色で示した. 各 OVA 特異的抗体産生細胞数は平均値 \pm SD で表し, OVA 単独群との有意差をアスタリスク (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$) で表した. ND=not detected. n-LP; 鼻腔粘膜固有層, NALT; 鼻咽頭関連リンパ組織, i-LP; 小腸粘膜固有層, MLNs; 腸管膜リンパ節, SMGs; 唾液腺, SMLNs; 下顎リンパ節, SP; 脾臓, ALNs; 腋窩リンパ節.

SMGs, SMLNs) および脾臓 (SP) では, 500nmol C8 投与群で OVA 特異的 IgA または IgG 抗体産生細胞が誘導されていた. 特に, 経鼻免疫での誘導組織である NALT やその所属リンパ節である SMLNs⁴⁵⁾ で OVA 単独群では OVA 特異的 IgA 抗体産生細胞は検出されなかったが, 500nmol C8 投与群では OVA 特異的抗体産生細胞が確認された. また, 実行組織である i-LP における OVA 特異的 IgA および IgG 抗体産生細胞数と, 全身免疫に関与する脾臓における OVA 特異的 IgG 抗体産生細胞数は, OVA 単独群に比べ 500nmol C8 投与群で有意に高かった (図 3).

3. IgG サブクラス抗体の解析

C8 をアジュバントとして経鼻免疫した場合の IgG サブクラス抗体の解析において, 500nmol C8 投与群での血漿中 OVA 特異的 IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3 抗体価はいずれも OVA 単独群と比べて有意に高かった. また, サブクラスの中では IgG1 抗体の OVA 特異的抗体価が最も高かった. IgG1 抗体価は $2^{22.5}$ (範囲: 2^{19} - 2^{24}), IgG2c 抗体価は $2^{11.0}$ (範囲: < 28 -

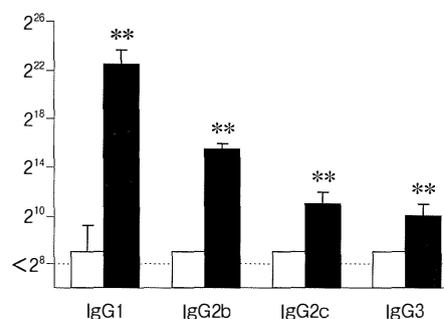


図4. 血漿中の OVA 特異的 IgG サブクラス抗体価の解析

OVA 単独群 (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) ; 白色, OVA + C8 (500nmol/mouse) 投与群; 黒色で示した. OVA 特異的抗体価は検出限界 (点線) 未満の検体が存在したため中央値と IQR で表し, OVA 単独群との有意差をアスタリスク (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$) で表した.

2^{13}) であり, IgG1/IgG2c 比は 6,820.6 であった (図 4).

4. OVA 特異的抗体価の長期推移

最終免疫から 13 週間後に追加免疫を行うまで, 追加免疫群と非追加免疫群の OVA 特異的抗体価に有意差はなかった. 糞便抽出液中の OVA 特異的 IgA 抗体価は最終免疫から 1 週間

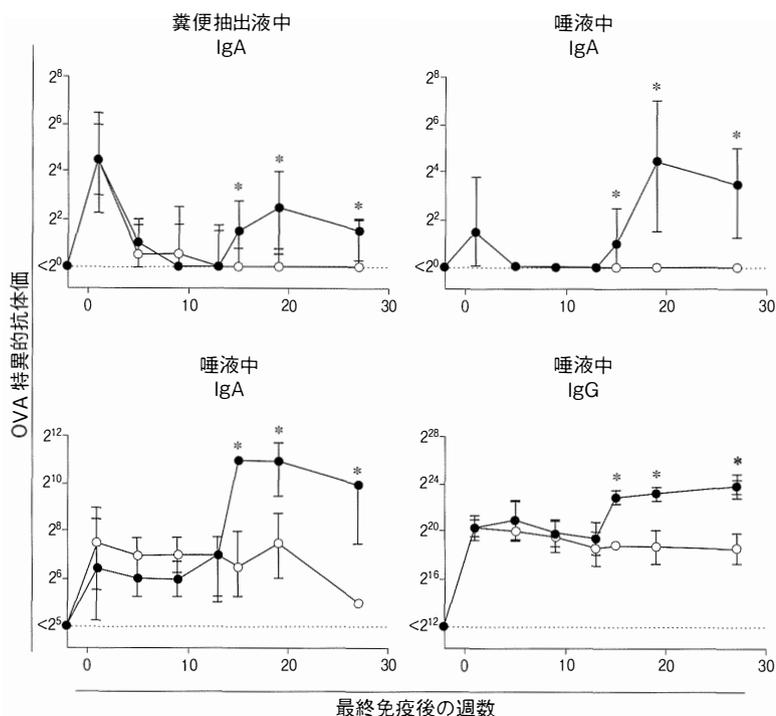


図 5. OVA 特異的抗体価の推移

非追加免疫群；白丸，追加免疫群；黒丸で示した。糞便抽出液，唾液，および血漿中の OVA 特異的 IgA 抗体価は検出限界（点線）未満の検体が存在したため中央値と IQR で表し，血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価は平均値 ± SD で表した。非追加免疫群との有意差をアスタリスク (* p<0.05, ** p<0.005) で表した。

後にピークとなり，以降は減少傾向を示した。非追加免疫群は抗体価が検出限界未満のまま推移したのに対し，追加免疫群では 15 週間後以降の抗体価が非追加免疫群と比較して有意な上昇を認めた。唾液中の OVA 特異的 IgA 抗体価は最終免疫から 1 週間後に上昇が認められたが，それ以降は追加免疫を行うまでは検出限界未満であった。追加免疫群では非追加免疫群に比べ 15 週間後より抗体価の有意な上昇を認めた。また，追加免疫群では追加免疫前後の 13 週間後と 15 週間後を比較すると抗体価は有意 (p < 0.05) に上昇しており，観察を終了した 27 週間後まで高値を維持した。血漿中の OVA 特異的 IgA および IgG 抗体価も同様の傾向を示した (図 5)。

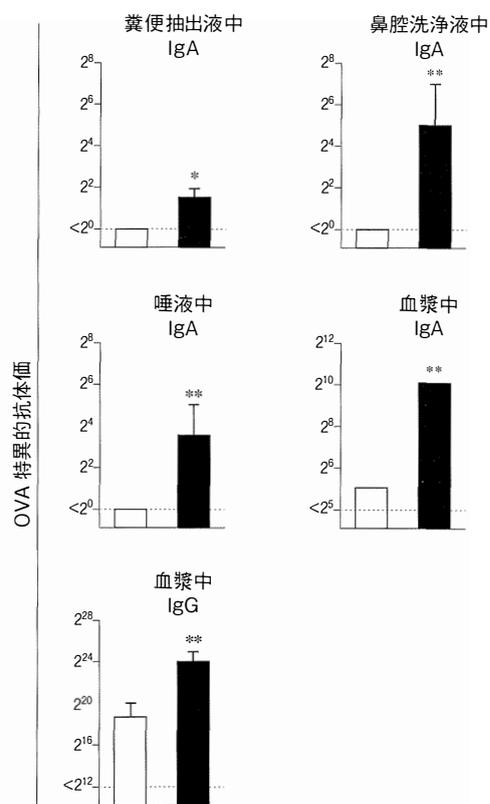


図 6. 最終免疫から 27 週間後の OVA 特異的抗体価

非追加免疫群；白色，追加免疫群；黒色で示した。粘膜分泌液および血漿中の OVA 特異的 IgA 抗体価は検出限界（点線）未満の検体が存在したため中央値と IQR で表し，血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価は平均値 ± SD で表した。非追加免疫群と追加免疫群の間の有意差をアスタリスク (* p<0.05, ** p<0.005) で表した。

最終免疫から 27 週間後の追加免疫群において，全ての粘膜分泌液中の OVA 特異的 IgA 抗体価と，血漿中の OVA 特異的 IgA および IgG 抗体価が非追加免疫群と比較して有意に高値を認めた (図 6)。また，最終免疫から 27 週間後に採取した全ての組織 (n-LP, i-LP, SMGs, SP) において追加免疫群で非追加免疫群よりも多くの OVA 特異的抗体産生細胞が存在した。特に，n-LP と i-LP では追加免疫群での OVA 特異的 IgA 抗体産生細胞が有意に多

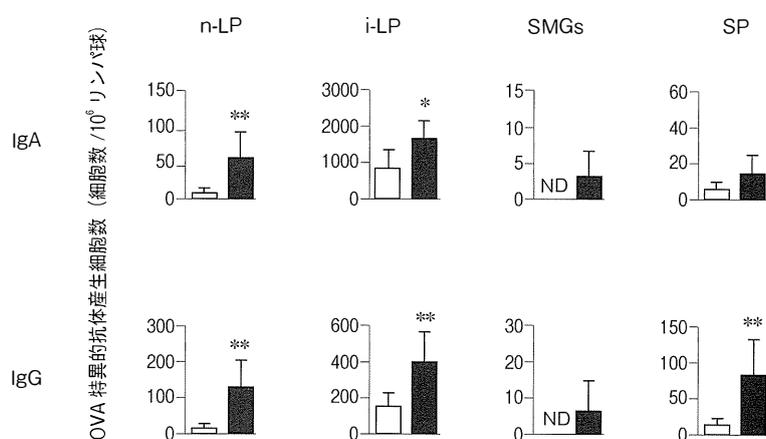


図7. 最終免疫から27週間後のOVA特異的抗体産生細胞数。非追加免疫群：白色，追加免疫群：黒色で示した。各OVA特異的抗体産生細胞数は平均値±SDで表し，非追加免疫群と追加免疫群との間の有意差をアスタリスク（* p<0.05, ** p<0.005）で表した。ND=not detected.

く，SMGsでは非追加免疫群でOVA特異的抗体産生細胞が検出されなかったのに対し，追加免疫群では存在していた。また，脾臓におけるOVA特異的IgG抗体産生細胞も有意に多く存在した（図7）。

5. トレハロース誘導体の比較

C0およびC8, C10, C12におけるアジュバント効果の比較を行ったところ，糞便抽出液ではC8投与群に比べてC10投与群では差を認めなかったが，C12投与群でOVA特異的IgA抗体価は有意に上昇していた。鼻腔洗浄液および唾液中のOVA特異的IgA抗体価は，C8, C10, C12の各群で差を認めなかった。また，血漿中のOVA特異的IgA抗体価にC8, C10, C12の各群で差は認められなかったが，OVA特異的IgG抗体価はC8投与群に比べC10投与群およびC12投与群では $2^{23.0}$ （範囲： 2^{22} - 2^{24} ）と有意に上昇した。一方，炭素直鎖を持たないC0投与群では粘膜分泌液および血漿中のOVA特異的抗体価の上昇は認められなかった（図8）。また，C0投与群の粘膜分泌液および血漿中のOVA特異的抗体価は，OVA単独群と比

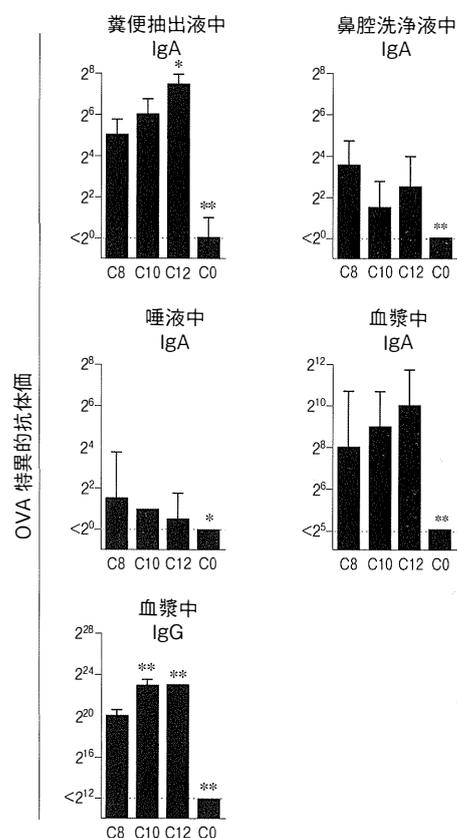


図8. C8, C10, C12, C0を経鼻免疫した場合のOVA特異的抗体価。OVA特異的抗体価は検出限界（点線）未満の検体が存在したため中央値とIQRで表し，C8投与群との有意差をアスタリスク（* p<0.05, ** p<0.005）で表した。

較しても差は認められなかった（図2，図8）。経鼻免疫後1時間の観察でアナフィラキシー反応の症状をスコア化した，全てのマウスでスコア0であった。

6. サイトカインmRNAの測定

2nmolのTDMの刺激によるTNF- α およびIL-6の遺伝子発現レベルは，非刺激群と比べてそれぞれ2.47倍，3.80倍であった。一方，2nmolのC8の刺激によるTNF- α とIL-6の発現は非刺激群と比べてそれぞれ，1.25倍，1.02倍であった。また，2nmolのC0, C10, C12についてもC8と同様，非刺激群とほぼ同等の低レベルの発現であった。さらに，20nmolの

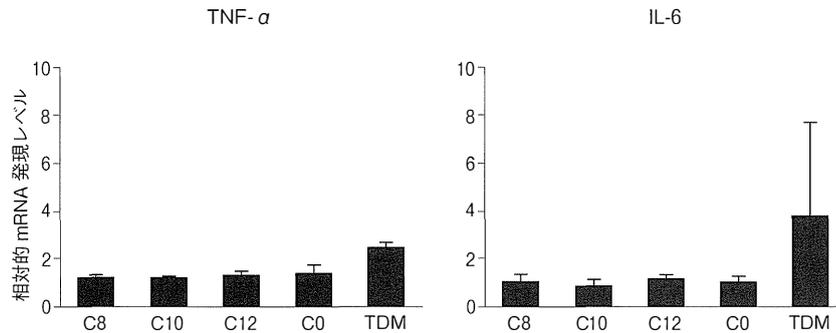


図9. RAW264.7からのサイトカインの産生
未刺激群を1.0とした場合の相対的 mRNA 発現レベル (fold change) は平均値 \pm SD (n=5) で表した。

C0, C8, C10, C12の刺激による mRNA レベルを定量したが, TNF- α , IL-6ともに発現レベルは非刺激群とほぼ同等であった (data not shown). アジュバント活性のない C0とアジュバント活性を認めた C8, C10, C12のサイトカイン発現レベルを比較したが, TNF- α , IL-6ともに差を認めなかった (図9).

IV. 考 察

トレハロース誘導体は粘膜分泌液および血漿中の OVA 特異的抗体価を上昇させたが, マウスの粘膜分泌液中の抗原特異的 IgA 抗体には血液中から移行した抗原特異的 IgA 抗体も含まれる^{46, 47)} ため, 抗体価の上昇を確認するだけでは粘膜アジュバント効果の有無を証明するには不十分である. また, 粘膜免疫は接種部位の粘膜組織のみならず遠隔の粘膜組織にも特異免疫を誘導出来ることが知られている⁴⁸⁾. そこで, 粘膜組織における OVA 特異的抗体産生細胞数を測定したところ, 鼻腔粘膜のみならず, 遠隔の腸管や唾液腺にも OVA 特異的抗体産生細胞数の増加が認められた. この結果から, トレハロース誘導体には粘膜アジュバント効果があること証明された. また, C0には粘膜アジュバント効果が認められなかったことから, トレハロース自体にはアジュバント効果はなく, トレハロースに炭素直鎖のある構造を持ったトレ

ハロース誘導体にアジュバント効果があることが判明した. さらに, 極めて強力な粘膜アジュバント効果が確認されているコレラ毒素と OVA を同系マウスに経鼻免疫をした同様の実験において, 血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価が $2^{24.3}$ (範囲: 2^{22} - 2^{29}) である³²⁾ ことと比較しても, トレハロース誘導体をアジュバントとした場合の血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価は高値であると言え, トレハロース誘導体には十分なアジュバント効果があると考えられた.

それぞれの病原体に対する防御免疫は, 細胞性免疫を増強するヘルパー T 細胞タイプ 1 (Th1) と液性免疫を増強する Th2 のバランスが重要となる⁴⁹⁾. また, アジュバントにより Th1 優位もしくは Th2 優位の特異免疫が誘導される. マウス (C57BL/6Njcl) では Th1 型免疫応答が優位な場合は IgG 抗体のサブクラスのうち IgG2c 抗体が, Th2 型免疫応答が優位な場合は IgG1 抗体が産生されやすく⁵⁰⁾, Th1 と Th2 のバランスは IgG1/IgG2c 比が指標となる. Th1 型優位とされる CpG をアジュバントとして用いた場合の IgG1/IgG2c 比の値が 2.5, Th2 型優位とされるコレラ毒素をアジュバントとして用いた場合の IgG1/IgG2c 比の値が 398.1 である報告⁵¹⁾ と比較し, C8 をアジュバントとして経鼻免疫した場合の IgG1/IgG2c 比は 6,820.6 と非常に高い値であり, C8 は Th2 型優位のア

ジュバントであることが示唆された。一般に、Th1細胞とTh2細胞から産生されるサイトカインはそれぞれ細胞性免疫と液性免疫を誘導する⁵²⁾。液性免疫では、産生された抗体が細胞外に存在する微生物（ウイルスを含む）や微生物の産生する毒素に結合することで生体防御に関与する⁵³⁾。また、Th2型サイトカインは粘膜におけるIgA抗体産生を増強する⁵⁴⁾。トレハロース誘導体のアジュバントの特性はTh2型応答が強い傾向にあることから、液性免疫により排除されやすい病原体や毒素に対するワクチンの粘膜アジュバントとして応用できると考えられた。しかしながら、IgG1抗体はTh2細胞により産生されるIL-4によって誘導されているが、IL-4はIgE抗体も誘導することが知られている^{55, 56)}。アラムもTh2型優位のアジュバントであるが、稀にIgE抗体の強い誘導が認められており⁵⁷⁾、I型アレルギーの誘導やアナフィラキシー反応の出現を考慮しなければならない⁵⁸⁾。本研究ではマウスにアナフィラキシー症状は観察されなかったが、今後の安全性研究において注意する必要がある。

一般に弱毒生ワクチンは長期間の特異免疫が記憶されるが、不活化ワクチンで生涯に渡る防御免疫を誘導することは困難であり⁵⁹⁾、記憶免疫を獲得することが出来るアジュバントが必要である。記憶B細胞が誘導されると追加免疫後に記憶B細胞から形質細胞へと迅速に分化し、特異的抗体価が短期間で上昇することが知られているが⁶⁰⁾、本研究の結果から、C8をアジュバントとして経鼻免疫した場合に記憶免疫が成立することが示唆された。さらに、経鼻免疫は全身と、呼吸器系や消化器系、生殖器系といった局所の両方の記憶免疫に影響することが知られている^{61, 62)}。トレハロース誘導体添加経鼻ワクチンは記憶免疫の獲得に大きな利点となると考えられ、呼吸器系のみならず消化器系や生殖器系における感染症に対する有効なワクチンとして開発できる可能性が示唆された。

結核菌の細胞壁に存在するTDMがマクロファージの細胞表面に発現するMincleに結合すると、マクロファージからTNF- α やIL-6などの炎症性サイトカインが産生され^{37, 38)}、結核感染の特徴である肺肉芽腫の形成を誘導する^{24, 25)}。本研究で用いたトレハロース誘導体はMincleに結合可能な構造であるが^{27, 28)}、これらの刺激によるRAW264.7からのTNF- α およびIL-6の発現は認められなかった。TDMの刺激によってRAW264.7からのTNF- α およびIL-6の発現レベルの上昇が認められたが、トレハロース誘導体では上昇しなかったことから、本研究で用いたトレハロース誘導体にはMincleへの結合能はあるが、Mincleからのシグナル伝達によるTNF- α およびIL-6の産生能はないと推察した。

アジュバントの作用機序は、トレハロース誘導体がMincleに結合し、免疫賦活化作用を持つTDMと同様のサイトカインを産生することで自然免疫および獲得免疫が活性化すると予想していた。しかし、トレハロース誘導体のサイトカイン遺伝子の発現レベルはアジュバント効果を持たないC0と差を認めなかった。このことから、トレハロース誘導体のアジュバント作用機序にMincleを介したマクロファージからの炎症性サイトカインの産生は関連性が低いと考えられた。

さらに、トレハロース誘導体のアジュバント作用が何に起因するのかを検討するため、これらの化合物の化学構造に着目した。アジュバント効果を認めなかったC0に対し、アジュバント効果を認めたC8、C10、C12は親水基であるトレハロースに疎水基である炭素直鎖が付いた両親媒性構造を持った物質である。両親媒性構造を持つ物質、すなわち界面活性剤にはアジュバント効果が報告されているものがある。*Bacillus*属の産生するポリミキシンBやコリスチン、サーファクチンには界面活性作用があり、経鼻投与によるアジュバント効果が報告されている^{30, 33)}。また、植物由来のサポニンもア

ジュバント効果が知られている界面活性剤である⁶³⁾。界面活性剤は一定の濃度を超えると溶液中のタンパク質などと結合し始めるため、もとのタンパク質の粒子は界面活性剤との複合体形成により増大する^{64, 65)}。また、抗原の直径がおよそ200nm以上になると鼻腔粘膜からの取り込み効率が上昇することが報告されている^{66, 67)}。OVA分子の直径は64nmであるが⁶⁸⁾、界面活性剤であるトレハロース誘導体の添加により抗原の直径が増大したことが予想された。また、複合体の直径は本研究では測定していないが、炭素直鎖の長いC12とOVAの複合体の直径はC8とOVAの複合体よりも大きいと考えられた。実際に、C8投与群に比べてC12投与群の糞便抽出液中のOVA特異的IgA抗体価および血漿中のOVA特異的IgG抗体価が有意に高かったことから、本研究で用いたトレハロース誘導体にアジュバント効果が認められた機序として、OVAとトレハロース誘導体の複合体が形成され、抗原の直径が増大したことにより鼻腔粘膜からの取り込み効率が上昇し、液性免疫がより強く誘導されたと考えられた。

トレハロース誘導体を産生する微生物には、TDMを産生する*Mycobacterium*属以外に*Rhodococcus*属⁶⁹⁻⁷¹⁾などの細菌があげられる。TDMはトレハロースに2つのミコール酸(炭素原子数が60~90個)がエステル結合した化合物であるのに対し、*Rhodococcus*属が産生するトレハロースジコリネミコレート(Trehalose-6,6'-dicorynomycolate; TDCM)はTDMと同様に炭素直鎖を持つが、その炭素原子数は30~54個である⁶⁹⁻⁷¹⁾。トレハロース

誘導体は炭素直鎖が短いほど肺の肉芽腫形成が弱くなることが知られており²⁶⁾、TDCMはTDMと比べて肉芽腫形成は弱いことが考えられる。また、*R. erythropolis*が産生するTDCMがマウスの線維芽細胞やヒトのケラチノサイトを用いた実験で皮膚への炎症性が弱いことが確認されており⁷²⁾、化粧品にも用いられている⁷³⁾。さらに、TDCMの炭素鎖を短くし、炭素原子数を21個にしたビザンチンは安全な免疫刺激剤として研究開発が行われており⁷⁴⁾、C10も食品に使用されている⁷⁵⁾。

ヒトへの応用が可能な粘膜ワクチンを開発するためには、有効で安全な粘膜アジュバントが必須である。トレハロース誘導体は強力な粘膜アジュバント効果を持つことが本研究で証明された。安全性にも期待ができることから、本研究で用いたトレハロース誘導体に効果的な新規粘膜アジュバントとしての臨床応用の可能性が見出された。

稿を終えるにあたり御指導、御協力を賜りました岩手医科大学微生物学講座感染症学・免疫学分野の八重樫寿美子女史、高橋尚子女史に深く感謝致します。動物実験にあたりましては御指導、御協力賜りました岩手医科大学歯薬総合研究所動物実験センターの技術員諸兄に深く感謝致します。

本研究の一部は学術研究助成基金助成金[科研費: 吉野直人(基盤研究C, 25460597)]の援助によって行われた。

利益相反: 著者には開示すべき利益相反はない。

References

- 1) Staats HF, Jackson RJ, Marinaro M, et al.: Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr Opin Immunol* **64**, 572-583, 1994.
- 2) Lamichhane A, Azegamia T and Kiyono H: The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine* **32**, 6711-6723, 2014.
- 3) Akira S: Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**, 2748-2755, 2011.
- 4) Nossal GJV: Vaccines. In "Fundamental Immunology 4th ed", ed by Paul WE, pp. 1387-1425, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia,

- 1998.
- 5) **Koyama S, Coban C, Aoshi T, et al.:** Innate immune control of nucleic acid-based vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines* **8**, 1099-1107, 2009.
 - 6) **Glenny AT, Pope CG, Waddington H, et al.:** The antigenic value of toxoid precipitated by postassium-alum. *J Path Bacteriol* **29**, 38-45, 1926.
 - 7) **Keith LS, Jones DE and Chou CH:** Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations. *Vaccine* **20**, S13-17, 2002.
 - 8) **Fukuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, et al.:** Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert Rev Vaccines* **11**, 367-379, 2012.
 - 9) **Ott G and Nest V:** Development of vaccine adjuvants: historical perspective. In "Vaccine adjuvants and delivery systems", ed by Singh M, pp. 1-31, WILEY-INTERSCIENCE, Canada, 2007.
 - 10) **HogenEsch H:** Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine* **31**, 34-39, 2002.
 - 11) **HogenEsch H:** Mechanism of immunopotential and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol* **3**, doi: 10.3389, 2013.
 - 12) **Alpar HO, Bowen JC and Brown MRW:** Effectiveness of liposomes as adjuvants of orally and nasally administered tetanus toxoid. *Int J Pharm* **88**, 335-344, 1992.
 - 13) **Elson CO and Ealding W:** Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J Immunol* **132**, 2736-2741, 1984.
 - 14) **Clements JD, Hartzog NM and Lyon FL:** Adjuvant activity of Escherichia coli heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* **6**, 269-277, 1988.
 - 15) **Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al.:** Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* **350**, 896-903, 2004.
 - 16) **Charles M, Sylvie B, Dana JP, et al.:** Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 12294-12299, 2014.
 - 17) **Teramoto N, Sachinvala ND and Shibata M:** Trehalose and trehalose-based polymers for environmentally benign, biocompatible and bioactive materials. *Molecules* **13**, 1773-1816, 2008.
 - 18) **Ruhal R, Kataria R and Choudhury B:** Trends in bacterial trehalose metabolism and significant nodes of metabolic pathway in the direction of trehalose accumulation. *Microb Biotechnol* **6**, 493-502, 2013.
 - 19) **Noll H, Bloch H, Asselineau J, et al.:** The chemical structure of the cord factor of Mycobacterium tuberculosis. *Biochim Biophys Acta* **20**, 299-309, 1956.
 - 20) **Bloch H:** Studies on the virulence of tubercle bacilli; the relationship of the physiological state of the organisms to their pathogenicity. *J Exp Med* **92**, 507-526, 1950.
 - 21) **Matsumoto M, Tanaka T, Kaisho T, et al.:** A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages. *J Immunol* **163**, 5039-5048, 1999.
 - 22) **Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, et al.:** Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* **206**, 2879-2888, 2014.
 - 23) **Schoenen H, Bodendorfer B, Hitchens K, et al.:** Mincle is essential for recognition and adjuvant activity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol* **184**, 2756-2760, 2010.
 - 24) **Bekierkunst A, Levij IS, Yarkoni E, et al.:** Granuloma formation induced in mice by chemically defined mycobacterial fractions. *J Bacteriol* **100**, 95-102, 1969.
 - 25) **Hunter RL, Olsen M, Jagannath C, et al.:** Trehalose 6,6'-dimycolate and lipid in the pathogenesis of caseating granulomas of tuberculosis in mice. *Am J Pathol* **168**, 1249-1261, 2006.
 - 26) **Fujita Y, Okamoto Y, Sunagawa M, et al.:** Molecular and supra-molecular structure related differences in toxicity and granulomatogenic activity of mycobacterial cord factor in mice. *Microb Pathog* **43**, 10-21, 2007.
 - 27) **Furukawa A, Kamishikiryo J, Mori A, et al.:** Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 17438-17443, 2013.
 - 28) **Hadar F, Sabin AFJ, Thomas JWR, et al.:** Mechanism for recognition of an unusual Mycobacterial glycolipid by the macrophage receptor Mincle. *J Biol Chem* **288**, 28457-28465, 2013.
 - 29) **Poltorak A, He X, Smirnova I, et al.:** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr

- mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**, 2085-2088, 1998.
- 30) 竹下亮輔, 吉野直人, 佐々木裕, 他; 経鼻免疫によるサーファクチンのアジュバント効果の検討. *岩手医誌* **66**, 23-35, 2014.
- 31) **Li MX, Schofield BH, Hung CK, et al.**: A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* **103**, 206-214, 1999.
- 32) **Yoshino N, Fujihashi K, Hagiwara Y, et al.**: Co-administration of cholera toxin and apple polyphenol extract as a novel and safe mucosal adjuvant strategy. *Vaccine* **27**, 4808-4817, 2009.
- 33) **Yoshino N, Endo M, Kanno H, et al.**: Polymyxins as novel and safe mucosal adjuvants to induce humoral immune responses in mice. *PLoS One* **8**, e61643, 2013.
- 34) **Wu HY and Russell MW**: Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* **61**, 314-322, 1993.
- 35) **Tamura S, Miyata K, Matsuo K, et al.**: Acceleration of influenza virus clearance by Th1 cells in the nasal site of mice immunized intranasally with adjuvant-combined recombinant nucleoprotein. *J Immunol* **156**, 3892-3900, 1996.
- 36) **Moldoveanu Z and Fujihashi K**: Collection and processing of external secretions and tissues of mouse origin. In: "Mucosal Immunology 3rd ed" ed by Mestecky J, et al., pp. 1841-1852, Academic Press, San Diego, 2005.
- 37) **Indrigo J, Hunter RL Jr and Actor JK**: Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology* **149**, 2049-2059, 2003.
- 38) **Perez RL, Roman J, Roser S, et al.**: Cytokine message and protein expression during lung granuloma formation and resolution induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6'-dimycolate. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 795-804, 2000.
- 39) **Ralph P and Nakoinz I**: Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J Immunol* **119**, 950-954, 1977.
- 40) **Yun CH, Jang EJ, Kwon SC, et al.**: A novel synthetic compound, YH-11118, inhibited LPS-induced inflammatory response by suppressing I κ B kinase/NF- κ B pathway in Raw264.7 cells. *J Microbiol Biotechnol* **25**, 1047-1055, 2015.
- 41) **Ozeki Y, Tsutsui H, Kawada N, et al.**: Macrophage scavenger receptor down-regulates mycobacterial cord factor-induced proinflammatory cytokine production by alveolar and hepatic macrophages. *Microb Pathog* **40**, 171-176, 2006.
- 42) **Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, et al.**: Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat Commun* **5**, 4982, 2014.
- 43) **Takahashi K, Funata N, Ikuta F, et al.**: Neuronal apoptosis and inflammatory responses in the entral nervous system of a rabbit treated with Shiga toxin-2. *J Neuroinflamm* **5**, doi: 10.1186/1742-2094-5-11, 2008.
- 44) **Liu J and Ma C**: Interferon regulatory factor 8 regulates RANTES gene transcription in cooperation with interferon regulatory factor-1, NF- κ B, and PU.1. *J Biol Chem* **281**, 19188-19195, 2006.
- 45) **Fujihashi K, Staats HF, Kozaki S, et al.**: Mucosal vaccine development for botulinum intoxication. *Expert Rev Vaccines* **6**, 35-45, 2007.
- 46) **Meckelein B, Externest D, Schmidt MA, et al.**: Contribution of serum immunoglobulin transudate to the antibody immune status of murine intestinal secretions: influence of different sampling procedures. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 831-834, 2003.
- 47) **Brandtzaeg P**: Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* **25**, 5467-5484, 2007.
- 48) **Holmgren J and Czerkinsky C**: Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* **11**, 45-53, 2005.
- 49) **Bretscher PA**: On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases. *Scnd J Immunol* **79**, 361-376, 2014.
- 50) **Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, et al.**: Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* **334**, 255-258, 1988.
- 51) **Bargieri DY, Rosa DS, Lasaro MAS, et al.**: Adjuvant requirement for successful immunization with recombinant derivatives of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 delivered via the intranasal route. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102**, 313-317, 2007.
- 52) **Street NE and Mosmann TR**: Functional

- diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* **5**, 171-177, 1991.
- 53) **Brady LJ**: Antibody-mediated immunomodulation: a strategy to improve host responses against microbial antigens. *Infect Immun* **73**, 671-678, 2005.
- 54) **Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson RJ, et al.**: Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med* **178**, 1309-1320, 1993.
- 55) **Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, et al.**: Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* **8**, 303-333, 1990.
- 56) **Snapper CM and Mond JJ**: Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today* **14**, 15-17, 1993.
- 57) **Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, et al.**: Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* **11**, 293-306, 1989.
- 58) **Kelso JM, Jones RT and Yunginger JW**: Anaphylaxis to measles, mumps, and rubella vaccine mediated by IgE to gelatin. *J Allergy Clin Immunol* **91**, 867-872, 1993.
- 59) **Amanna IJ, Carlson NE and Slifka MK**: Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med* **357**, 1903-1915, 2007.
- 60) **Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, et al.**: Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* **6**, 741-750, 2006.
- 61) **Zuercher AW**: Upper respiratory tract immunity. *Viral Immunol* **16**, 279-289, 2003.
- 62) **Neutra MR and Kozlowski PA**: Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* **6**, 148-158, 2006.
- 63) **Maharaj I, Froh KJ and Campbell JB**: Immune responses of mice to inactivated rabies vaccine administered orally: potentiation by *Quillaja saponin*. *Can J Microbiol* **32**, 414-420, 1986.
- 64) **Jones MN**: Protein-surfactant interactions. In "Surface activity of protein" ed by Magdassi S, pp. 237-284, Marcel Dekker, New York, 1996.
- 65) **Nielsen AD, Arleth L and Westh P**: Analysis of protein-surfactant interactions - a titration calorimetric and fluorescence spectroscopic investigation of interactions between *Humicola insolens* cutinase and an anionic surfactant. *Biochim Biophys Acta* **1752**, 124-132, 2005.
- 66) **Eyles JE, Bramwell VW, Williamson ED, et al.**: Microsphere translocation and immunopotential in systemic tissues following intranasal administration. *Vaccine* **19**, 4732-4742, 2001.
- 67) **Bachmann MF and Jennings GT**: Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* **10**, 787-796, 2010.
- 68) **Croguennec T, Renault A, Beaufils S, et al.**: Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *J Colloid Interface Sci* **315**, 627-636, 2007.
- 69) **Sutcliffe IC**: Cell envelope composition and organization in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**, 49-58, 1998.
- 70) **Lichtinger T, Reiss G and Benz R**: Biochemical identification and biophysical characterization of a channel-forming protein from *Rhodococcus erythropolis*. *J Bacteriol* **182**, 764-770, 2000.
- 71) **Hus F, Soehl K, Turk J, et al.**: Characterization of mycolic acids from the pathogen *Rhodococcus equi* by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *Anal Biochem* **409**, 112-122, 2011.
- 72) **Marques AM, Pinazo A, Farfan M, et al.**: The physicochemical properties and chemical composition of trehalose glycolipids from *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chem Phys Lipids* **158**, 1494-1496, 1990.
- 73) **Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, et al.**: Production and application of trehalose lipid biosurfactants. *Eur J Lipid Sci Technol* **112**, 617-627, 2010.
- 74) **Oda M, Yamamoto H, Shibutani M, et al.**: Vizantin inhibits endotoxin-mediated immune responses via the TLR 4/MD-2 complex. *J Immunol* **193**, 4507-4514, 2014.
- 75) **Raku T, Kitagawa M, Shimakawa H, et al.**: Enzymatic of trehalose esters having lipophilicity. *J Biotechnol* **100**, 203-208, 2003.

Trehalose derivatives as novel mucosal adjuvants to
enhance humoral immune responses in
intranasal immunized mice

Hanae KAWAMURA¹⁾, Naoto YOSHINO²⁾, Yutaka SASAKI²⁾,
Kazuyuki MURAKAMI¹⁾, Hideki KAWAMURA¹⁾, Masahiro KAGABU¹⁾,
Yasushi MURAKI²⁾ and Toru SUGIYAMA¹⁾

¹⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

²⁾ Division of Infectious Diseases and Immunology, Department of Microbiology,
School of Medicine, Iwate Medical University, Yahaba, Japan

(Received on December 7, 2015 & Accepted on December 28, 2015)

Abstract

Since most infectious agents are transmitted via mucosal surfaces, vaccines are generated to induce protective immunity in mucosal tissues. The protective immune responses at mucosal surfaces can also be enhanced by coadministration of effective mucosal adjuvants. Trehalose-6,6'-dimycolate (TDM) is an immunostimulatory component with a remarkable virulence demonstrated in animal experiments. To achieve a high level of safety and efficacy, we assessed the mucosal adjuvanticity of trehalose mono-octanoate (C8), a low toxic substance possessing a chemical structure similar to TDM. Intranasal immunization of mice with ovalbumin (OVA) in combination with C8 resulted

in increased levels of OVA-specific antibody (Ab) titer in mucosal secretions and plasma, as well as in the Ab-forming cells of mucosal and systemic tissues. Furthermore, boosted immunization with C8 induced re-elevation of OVA-specific Ab titers, suggesting the induction of immunological memory. In addition, it was clear that trehalose monodecanoate (C10) and trehalose monododecanoate (C12) also had mucosal adjuvanticity, whereas trehalose could not enhance the titers of OVA-specific Abs. These findings suggest that trehalose derivatives could be employed as novel mucosal adjuvants to induce humoral immune responses.
