

原 著

ヒノキチオール¹⁾の唾液分泌型 IgA 抗体産生に与える影響

片岡 宏介¹⁾ 國友 栄治²⁾ 小淵健二郎³⁾
 上根 昌子¹⁾ 土居 貴士¹⁾ 三宅 達郎¹⁾

概要: ヒノキチオール (HNK) は、古くから細菌や真菌に対する抗菌作用を有し、生体に対してはストレス緩和作用という生理機能改善効果が知られ、現在、歯磨剤や整髪料、アロマ、食品に広く応用されている。だが、生体防御機構である免疫システムへの HNK が与える影響についてはほとんど知られていない。本研究では、HNK が粘膜免疫学的影響の一端を明らかにすることを目的に、マウス鼻腔から HNK を投与し、投与前・後の唾液中の分泌型 IgA 抗体 (SIgA Ab) 量の測定と、顎下唾液腺 (SMG) における免疫細胞学的解析を行った。

BALB/c マウス (8 週齢, メス) に、HNK 50 μg を毎週 1 回計 4 回経鼻投与し、各投与日の投与前および投与 0.5 時間後、1.5 時間後、3 時間後、6 時間後の唾液採取を行い、唾液 SIgA Ab の定量を行った。さらに最終投与日 (初回投与から 21 日目; Day 21) の HNK 投与前・後のマウス SMG における IgA Ab 産生細胞 (IgA AFCs) 数を計測し、さらに IgA AFCs の生存・増殖能の測定を行った。

HNK 各投与日における SIgA Ab 分泌量は、投与 1.5 時間後が最大であり、投与 6 時間後で投与前と同レベルになることが認められた。興味深いことに、投与回数と SIgA Ab 分泌量は正の相関傾向が認められた。Day 21 の HNK 投与前・後においては、SMG の IgA AFCs 数に有意な差は認められなかったが、IgA AFCs の生存・増殖能は HNK 投与 0.5 時間後と 1.5 時間後に有意な上昇が認められた。以上から、HNK の経鼻投与は、投与後 1.5 時間までの SMG IgA AFCs を活性化し、唾液 SIgA Ab の分泌を促進している可能性が示唆された。

索引用語: ヒノキチオール, 唾液, 分泌型 IgA 抗体 (唾液 SIgA), 経鼻投与

口腔衛生会誌 68 : 137-144, 2018

(受付: 平成 30 年 3 月 16 日 / 受理: 平成 30 年 5 月 1 日)

緒 言

消化管の起点である口腔は、摂食・嚥下に必須の器官である。また、外界との境界である口腔粘膜上には、400 から 700 種もの微生物が存在するといわれ、常に抗原やアレルゲンに曝されていることから、病原微生物の侵入に対して監視・排除を担う¹⁾ 一方、食物抗原やマイクロバイオーームとの共存を図る²⁾ という、ユニークな生体応答を司る臓器とも考えられている。つまり口腔粘膜は、全身免疫機構とは異なる「粘膜免疫機構」を作動させ、外界との恒常性を保ちつつ、第一線での監視・バリアの役を果たすことにより、われわれの体を外敵から守っている²⁾。私たちはこれまで、粘膜からの病原微生物の侵入 (初期感染) 阻止だけでなく、それらの侵入を許した場合でも進行 (重篤化) 防御を可能とする、粘膜

免疫を誘導・強化する経鼻・経口投与型ワクチンや、それに資するアジュバント (免疫賦活化剤) の研究開発を行っている³⁾。

口腔での免疫機構の中心は、唾液に含まれる分泌型 IgA 抗体 (SIgA Ab) と歯肉溝浸出液中の血清由来の IgG 抗体であることから⁴⁾、口腔は生体の粘膜系と全身系両方の免疫機構を兼ね備えた場であると考えられる。特にヒトの場合、SIgA Ab は、その 99% が粘膜組織や外分泌腺で産生・分泌されており^{5,6)}、唾液腺から分泌される唾液にも SIgA Ab が多く含まれている⁷⁾。そして、SIgA Ab の有する中和活性作用や凝集活性作用により、口腔内の微生物や異物を排除している。すなわち、SIgA Ab は、重要な感染防御因子の一つである。古くから、「う蝕」や「歯周病」などの感染予防を目的とし、さまざまな方法で抗原特異的な唾液 SIgA Ab

¹⁾ 大阪歯科大学歯学部口腔衛生学講座

²⁾ 小林製薬株式会社中央研究所

³⁾ 大阪歯科大学大学院歯学研究科

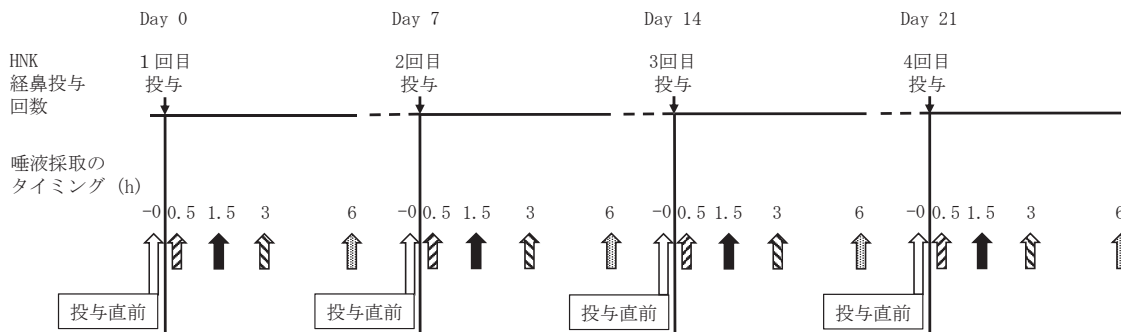


図1 HNK 経鼻投与と唾液採取スケジュール

6-8 週齢マウス（メス）に HNK 50 μg を週 1 回計 4 回経鼻投与した。

HNK の各投与日において投与直前（-0；□），投与 30 分後（0.5；▨），1.5 時間後（1.5；■），3 時間（3；▩）後，6 時間（6；■）後に唾液採取を行った。

を効果的に分泌させる方法が検討⁸⁻¹⁰されてきているが、実現に至ってはいない。われわれもまた、歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の表層タンパク FimA だけでなく卵白アルブミン^{11,12}、肺炎球菌表層タンパク PspA¹³⁻¹⁵ 抗原に対する抗原特異的 SIgA Ab を唾液中に誘導させることを目的に、抗原提示細胞である樹状細胞を活性化するサイトカイン Flt3 ligand を発現する DNA ベクターや、CpG オリゴ DNA (CpG ODN) を併用した新たな粘膜アジュバントの機能解析をマウスに経鼻投与する研究デザインを用いながら行っている。

ヒノキチオール (HNK) は、1900 年代初頭に日本人により精製抽出され、その後細菌や真菌に対する抗菌活性を有すること^{16,17}が知られるようになった天然由来の物質である。現代の日常生活では医療・食品・生活用品に応用され、歯磨剤や整髪料、アロマ剤などの医薬部外品として広く普及している。近年では、HNK はマウス肺ガン細胞のオートファジーを誘導し、肺ガン細胞の増殖を抑制する作用¹⁸や、適度な HNK 濃度の吸引がストレス負荷時に上昇した血中カテコールアミンやクロモグラニン A を減少させ、ストレス改善効果があるという生理学的作用¹⁹が報告されている。さらに、ヒトにおいて、HNK 吸引直後では唾液中の IgA Ab 分泌量が増加し、HNK の免疫増強作用を示唆する報告¹⁹がなされているが、HNK の吸引後の長期的な唾液 IgA Ab の産生・分泌への影響や、それらに関する免疫細胞学的な情報はほとんどみられない。そこで、本研究においてわれわれは、マウスに HNK を経鼻投与し、その投与前後における唾液 SIgA Ab 分泌量の時間的推移を検討するとともに、HNK の顎下唾液腺 (SMG) IgA Ab 産生細胞 (IgA AFCs) の免疫学的解析を行った。

実験材料ならびに方法

1. 実験動物

8 週齢の BALB/cCrSlc (SPF) 雌マウス (日本エスエルシー株式会社、浜松市) を購入し、5 匹ずつマイクロアイソレーターに入れ、大阪歯科大学楠葉学舎動物施設の SPF ルームにて滅菌水および滅菌食餌を与え飼育を行った。実験群として、HNK 投与直前 (-0)、HNK 投与 0.5 時間後 (0.5)、1.5 時間後 (1.5)、3 時間後 (3)、6 時間後 (6) の 5 グループを作成した。

なお、本研究は大阪歯科大学動物実験委員会の承認 (動物実験承認番号 17-08001 号) を得たうえで行われた。

2. ヒノキチオール (HNK)

HNK (β -ツヤプリシン; $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入し、ジメチルスルホキシド (DMSO; キシダ化学株式会社) により 100 mg/mL に溶解後、HNK 溶液として実験に供試された。

3. マウスへの HNK 経鼻投与方法と投与スケジュール

マウスには、塩酸メドトミジン (日本全薬工業株式会社、福島; 6 μg)、ミダゾラム (サンド株式会社、東京; 80 μg)、酒石酸プロルファノール (Meiji Seika ファルマ株式会社、東京; 100 μg) を PBS 溶液 200 μL に溶解した麻酔薬を腹腔内投与し、全身麻酔下にて HNK 50 μg (実験群名: HNK 溶液 100 mg/mL: 0.5 μL) を最終容量 6 μL (片鼻 3 μL ずつ) になるよう PBS 溶液にて調整したものを、毎週 1 回計 4 回経鼻投与した (図 1)。

4. 唾液採取と SMG からの単核球細胞の調整

唾液採取は、HNK の初回経鼻投与 (Day 0) を含め 7 日ごと (Day 7, Day 14, Day 21) に通常通り²⁰行った (図 1)。その概要は、副交感神経刺激薬ピロカルピン塩

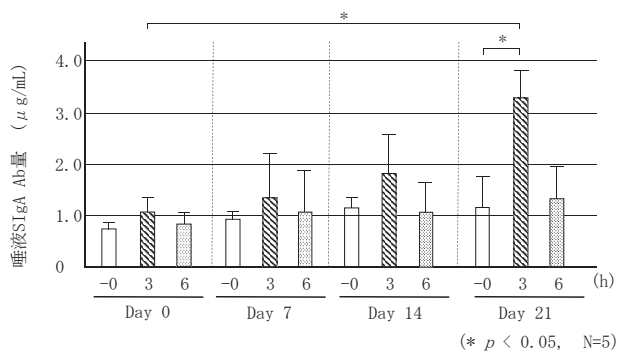


図2 HNK 経鼻投与前・後(6時間まで)の唾液IgA Ab分泌量

HNK 投与直前(-0; □)と投与3時間後(3; ▨), 6時間後(6; ▩)におけるマウス唾液を採取後, 唾液中IgA Ab量をELISA法により測定した。

酸塩(ナカライテスク株式会社, 京都) 100 μgをマウス腹腔内に投与し, 数分後の口腔内に滞留した唾液約100 μlを回収し, -20℃にて保管した。各々の投与日における唾液採取のタイミングは, HNK 投与直前(-0 h), HNK 投与0.5時間後(0.5 h), 1.5時間後(1.5 h), 3時間後(3 h), 6時間後(6 h)とした(図1)。

Day 21では, 唾液採取後のマウスにペントバルビタールを腹腔内に過量投与後安楽死させ, SMG摘出後, そのSMGから単核球細胞を通法²⁰⁾にて調整した。すなわち, 摘出したSMGを0.5 mg/mLコラゲナーゼ(タイプIV; シグマアルドリッチ ジャパン株式会社, 東京)にて消化, 細胞分離を行い, その後パーコール(GEヘルスケア・ジャパン株式会社, 東京)による濃度勾配法により単核球細胞を分取した。

5. 唾液SIgA Ab量およびSMGからのIgA AFCs数の計測

HNK 初回投与のDay 0, そしてDay 7, Day 14, Day 21において採取された唾液のSIgA Ab量は, Mouse IgA ELISA Quantitation Kit (BETHYL LABORATORY INC., Montgomery, TX, USA)を用い, プロトコールに従い行われた。そして, 大阪歯科大学中央歯学研究所内の吸光度測定機(SpectraMax M5; モレキュラーデバイス・ジャパン株式会社, 東京) 450 nmにて吸光度測定を行い, SoftMax Proバージョン6(モレキュラーデバイス・ジャパン株式会社, 東京)により唾液中のSIgA Ab量を計算した。

Day 21におけるそれぞれのタイミングのマウスSMGにおけるIgA AFCs数の計測は, 96穴PVDFプレートを用いたELISPOT法(Mouse IgA ELISpot Basic 3865-

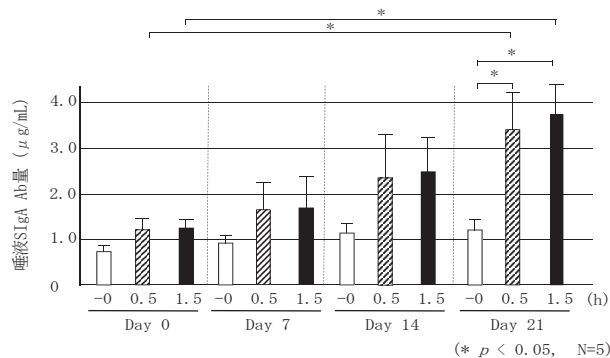


図3 HNK 経鼻投与前と直後(1.5時間まで)の唾液IgA Ab分泌量

HNK 投与直前(-0; □)と投与30分後(0.5; ▨), 1.5時間後(1.5; ▩)におけるマウス唾液を採取後, 唾液中IgA Ab量をELISA法により測定した。

2A; MABTECH Inc, Cincinnati, OH, USA)により, プロトコールに従い行われた。そして, 3-アミノ-9-エチルカルバゾール(和光純薬工業株式会社, 大阪)によりメンブレン上にドット染色されたIgA AFCs数は, 実体顕微鏡(Stemi 305; カールツァイスマイクروسコーピー株式会社, 東京)により計測した。

6. IgA AFCsの生存・増殖能測定

Day 21におけるそれぞれのタイミングのマウスSMGからの単核球細胞は, ピオチン標識されたラット抗マウスIgA抗体(407003; BioLegend, San Diego, CA, USA)とともにインキュベーションし, 洗浄した後, ストレプトアビジン標識ビーズにてIgA AFCsを標識し, Magnetic Cell Separation System (MojoSort; BioLegend, San Diego, CA, USA)を用いてポジティブセレクションを行った。そして, それぞれのタイミングのIgA AFCs 2×10^5 個を96穴マイクロプレート(BD Biosciences, Oxnard, CA)に播種し, 10 μlのCytoSelect TM MTT Cell Proliferation Assay Reagent (CELL BIOLABS Inc, San Diego, CA, USA)を添加後, 37℃, CO₂インキュベーターにて4時間静置した。その後, 100 μlのDetergent Solutionを添加し, 遮光のもと室温で2時間静置後, 540 nmにて吸光度測定(SpectraMax M5, SoftMax Proバージョン6; モレキュラーデバイス・ジャパン株式会社, 東京)し, IgA AFCsの生存・増殖能を測定した。

7. 統計処理

実験データは, 平均値±標準偏差で示し, 有意差検定はStudent's t検定を用いた。

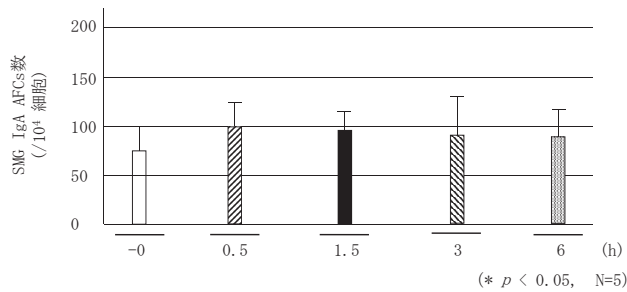


図4 HNK最終投与日 (Day 21) におけるHNK投与前・後のSMG IgA AFCs数の比較

HNK投与直前(-0;□)と投与30分後(0.5;▨), 1.5時間後(1.5;■), 3時間(3;▩), 6時間後(6;▧)のマウスSMGを摘出し, IgA AFCs数をELISPOT法により測定した。

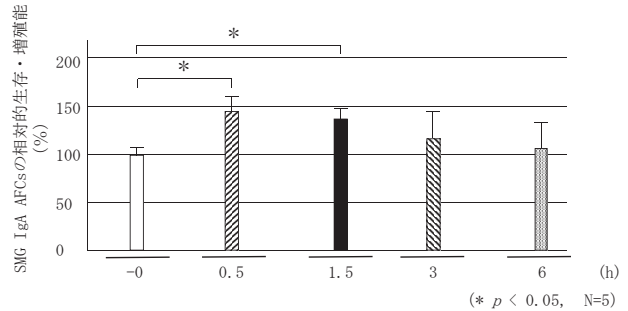


図5 HNK最終投与日 (Day 21) におけるHNK投与前・後のSMG IgA AFCsの生存・増殖能の比較

HNK投与直前(□)と投与30分後(▨), 1.5時間後(■), 3時間後(▩), 6時間後(▧)のマウスSMGを摘出し, IgA APCsをマグネットビーズ法により分取後, それぞれのタイミングにおける細胞の生存・増殖能をMTT法により測定した。投与前のSMG IgA AFCsの生存・増殖能を100(%)とした。

結 果

1. Day 0, 7, 14, 21 における HNK 投与前 (-0 h), 投与 3 時間後 (3 h), 6 時間後 (6 h) の唾液 SIgA Ab 量の推移 (SIgA 量誘導から収束までの時間的経過の検討)

当初われわれは, それぞれのHNK投与日におけるHNK投与後の唾液SIgA Ab量を計測するにあたり, 経鼻投与前, 投与3時間後, 6時間後, 12時間後, 24時間後のSIgA Ab量を観察した。しかしながら, HNKの投与6時間後および12時間後, 24時間後のSIgA Ab量は, 同日の投与前と同レベルであり, 有意な差は認められなかった(データは示していない)。

そこで, HNK投与前(-0 h), 投与3時間後(3 h), 6時間後(6 h)の結果を図2に示した。Day 0, 7, 14, 21において, 投与3時間後の唾液SIgA Ab量が最も高く, 先述したとおり投与6時間後ではHNK投与前と同レベルであった。そして, Day 21においては, 投与3時間後の唾液SIgA Ab量とHNK経鼻投与前の唾液SIgA Ab量には有意な差が認められた(図2)。

また興味深いことに, それぞれのタイミング(-0 h, 3 h, 6 h)における唾液SIgA Ab量は, 投与回数が増すごとに増加する傾向が認められ, Day 0におけるHNK投与3時間後の唾液SIgA Ab量とDay 21におけるHNK投与3時間後の唾液SIgA Ab量には有意な差が認められた(図2)。

2. HNK 投与後の唾液 SIgA Ab 量の短時間的推移 (SIgA 分泌量最大に達する時間的検討)

以上の結果(図2)から, 次にわれわれはHNK投与直

後, すなわち投与0.5時間後(0.5 h), 1.5時間後(1.5 h)における唾液SIgA Ab量の測定を行った。

それぞれのHNK投与日(Day 0, 7, 14, 21)において, 投与1.5時間後の唾液SIgA Ab量が最も高値を示し(図3), この値は図2で示した投与3時間後のSIgA Ab量よりも高いものであった。そして, Day 21における投与0.5時間後と1.5時間後の唾液SIgA Ab量は, HNK経鼻投与前と比較して有意な差が認められた(図3)。これらのことから, HNK投与後の唾液SIgA Ab分泌量の時間的推移は, 投与後から1.5時間でピークに達し, その後投与前の分泌量に戻る事が明らかとなった。

また図2の結果と同様に, それぞれのタイミング(-0 h, 3 h, 6 h)における唾液SIgA Ab量は, 投与回数が増すごとに増加する傾向が認められ, すなわち, Day 0の投与0.5時間後とDay 21の投与0.5時間後の唾液SIgA Ab量, そしてDay 0の投与1.5時間後とDay 21の投与1.5時間後の唾液SIgA Ab量においてそれぞれ有意差が認められた(図3)。

3. HNK 最終投与日 (D21) における SMG からの IgA AFCs 数の計測

次に, われわれはHNK最終投与日であるDay 21における投与前, 投与0.5時間(0.5 h), 1.5時間(1.5 h), 3時間(3 h), 6時間(6 h)後のマウスSMGからのIgA AFCs数の測定を行ったところ, すべてのタイミングのIgA AFCs数は, 投与前と比較したとき, 有意な差は認められなかった(図4)。

4. HNK 最終投与日 (D21) における SMG IgA AFCs の生存・増殖能の検討

次に, われわれはDay 21のそれぞれのタイミング

(-0 h, 0.5 h, 1.5 h, 3 h, 6 h) におけるマウスの SMG から調整された単核球細胞を磁気ビーズ法により IgA AFCs を分取し、その各タイミングにおける IgA AFCs の生存・増殖能の測定を行った。HNK 投与前の生存・増殖能を 100% とし、各タイミングにおける IgA AFCs の相対的生存・増殖能を図に示した (図 5)。

HNK 投与前の生存・増殖能と比較した時、投与 3 時間後、6 時間後では有意な差はなく、投与 0.5 時間後、1.5 時間後で生存・増殖能の有意な差があった。そして、投与 0.5 時間後が最も高い生存・増殖能を認めた。

考 察

HNK はこれまで、歯周病細菌²¹⁾ や寄生性細菌クラミジア菌²²⁾ など多くの細菌・真菌に対する抗菌作用や、近年ではシュドモナス菌¹⁶⁾ やカンジダ菌¹⁷⁾ のバイオフィルム形成の阻害効果など、さまざまな微生物に対する防御作用について報告されている。さらに HNK の生体に与える影響についてもこの数年、マウスの肺ガン細胞や大腸ガン細胞にオートファジーを誘導させること¹⁸⁾、また DNA メチル基転移酵素の発現を抑制することにより DNA 脱メチル化を誘導²³⁾ し、細胞の生育・発育をコントロールする可能性を示唆する報告がみられるようになってきた。しかしながら、HNK の生体防御機構に及ぼす影響、すなわち HNK の免疫生物学的解析を行った情報は限られている。論文検索を行ったところ、マイトーゲン (リボポリサッカライドやコンカナバリン A) で刺激したマウスマクロファージからの炎症性サイトカイン産生が抑制されること²⁴⁾ や、マウス脾臓 T リンパ球の細胞周期停止を誘導するといった²⁵⁾ *in vitro* 研究、生体を用いた *in vivo* 実験では、HNK の吸引直後の唾液に分泌される SIgA Ab 量は増加したことから、HNK の免疫増強作用を示唆する報告¹⁹⁾ があるが、非常に限られた情報しかみられない。本研究では、HNK の生体防御機構の免疫システムへの影響の一端を検討することを目的とし、HNK をマウスの鼻腔に投与したときの唾液 SIgA Ab 分泌量の時間的推移を観察するとともに、HNK 経鼻投与後の SMGIgA AFCs の免疫学的解析を行った。

まずマウスに投与する HNK の量を決定するための予備実験を行った。すなわち、1 匹のマウスに対して HNK 5 μ g, 50 μ g, 100 μ g を投与した。HNK 5 μ g を投与したマウスでは、唾液中への IgA 抗体分泌の時間的動向は、図 2 および図 3 の結果とほぼ相似した推移をたどることが認められたが、その IgA 抗体量は HNK 50 μ g を投与したマウス唾液よりも低い傾向であっ

た (データは示していない)。また、各時間における IgA AFCs 数についても HNK 5 μ g 投与のマウス SMG では、HNK 50 μ g 投与のマウスとはほぼ同結果 (図 4) であることが認められた (データは示していない)。また HNK 100 μ g を投与したマウスの唾液中に分泌される IgA 抗体量については、ほとんど変化はみられず、長期では減少するという結果を得た (データは示していない)。このことは HNK 量、もしくは HNK の溶媒であるジメチルスルホキシド量の過剰が抗体産生細胞に影響を及ぼしている可能性が考えられる。なぜなら、HNK 100 μ g を投与したマウス SMG の IgA AFCs 数が投与直後から激減すると同時に、細胞生存・増殖能についても HNK 50 μ g 投与のマウス SMG の IgA AFCs 数の 25% 以下であった (データは示していない)。以上の結果から、本研究では、マウスへの HNK 投与量を 50 μ g で行うこととした。

HNK 投与日の Day 0, 7, 14, 21 において、HNK 投与後 6 時間以降に唾液に分泌された SIgA Ab 量は、投与前の分泌量と差は認められなかった (データは示していない)。そして、HNK 投与後 6 時間まででは、それぞれの投与日の SIgA Ab 量については、HNK 投与 1.5 時間後で最大となり (図 2, 3)、投与 3 時間後では分泌量が減少し、投与 6 時間後には投与前の分泌量レベルになることが示された (図 2)。このことは、本研究で使用した HNK 量では、唾液 SIgA Ab 分泌に影響が及ぶのは、投与 0.5 時間から 3 時間までであること、また HNK 投与 1.5 時間後が SIgA Ab 分泌に最も強く影響を与えることが示されたと考えられる。大津¹⁹⁾ は、適度と感じる濃度の HNK 蒸気をヒトに吸引させ、吸引 1 分後の唾液 SIgA Ab 量を定量したところ、吸引前と比較して唾液中の SIgA Ab 量が増加していたことから、適量の HNK は免疫力増強効果を有することを示唆した。われわれのマウス実験の結果からは、HNK の経鼻投与後の 0.5 時間から 3 時間までは唾液中の SIgA Ab 分泌が増加することが示されたが、今後ヒトにおいても同様の結果が得られるかは非常に興味深い。

さらに、興味深いことに、HNK 投与 6 時間後までは、HNK の投与回数の増加に伴い、HNK 投与後の唾液 SIgA Ab 量も増加が認められ、HNK の投与回数と唾液 SIgA Ab 量には正の相関傾向があることが示された (図 2, 3)。このことは、HNK がワクチンなどで使用されるアジュバントとしての類似作用を有する可能性が考えられた。よって、われわれは HNK とニワトリ卵白アルブミン (OVA) 抗原をマウスに週 1 回合計 3 回経鼻連続投与を行い、最終投与から 7 日目の唾液中の OVA

抗原特異的 SIgA Ab 価の測定を行った。しかしながら、唾液中に OVA 抗原特異的 SIgA Ab 価は認められず²⁶⁾、HNK に抗原特異的免疫応答を誘導・賦活化する可能性は否定されることとなった²⁶⁾。また、HNK 投与 6 時間以後の唾液 SIgA Ab 量が投与前と同レベルになることから、HNK に本来のアジュバントとしての同様の作用は有しないと考えられた。しかしながら、HNK 投与後の早期の段階では、HNK の投与回数の増加に伴い、投与後の唾液中に含まれる SIgA Ab 量が増加する傾向にあったことから、HNK は粘膜免疫実効組織である SMG もしくは粘膜免疫誘導組織の鼻咽腔関連リンパ組織に存在する抗体産生細胞である形質細胞や記憶 B 細胞に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。われわれはこれまで、鼻咽腔関連リンパ組織 (NALT) にある樹状細胞を増殖および活性化させる新たな経鼻アジュバントの開発を行っているが、そのアジュバントを外來抗原とともにマウスに経鼻投与した場合、NALT に活性化された CD11c⁺ CD8⁺ 樹状細胞が CD4⁺ T 細胞の増殖活性を促し、刺激された CD4⁺ T 細胞からは Th2 型サイトカインが優位に産生され免疫応答が惹起されること、そして唾液中の抗原特異的 IgA 抗体価が上昇されることを報告してきた¹¹⁾。これらのことからヒノキチオールの経鼻投与が、唾液 SIgA Ab の産生における NALT 樹状細胞と CD4⁺ T 細胞との関連性、また CD4⁺ T 細胞が産生するサイトカインによりナイーブ B 細胞が形質細胞や記憶 B 細胞へと分化する過程などを明らかにしていきたい。

HNK 最終投与日 (D21) における SMG における IgA AFCs 数の計測を行ったが、投与後のすべてのタイミング (-0 h, 0.5 h, 1.5 h, 3 h, 6 h) における SMG の IgA AFCs 数は、投与前と比較して有意な差は認められなかった (図 4)。また、SMG の IgA AFCs の生存・増殖能は、投与前の IgA AFCs と比較したとき、投与後 0.5 時間後と 1.5 時間後で有意な増加が認められたが、投与後 3 時間以後では生存・増殖能は投与前と同レベルであり、差がないことが示された (図 5)。そして、投与後 0.5 時間後における IgA AFCs の生存・増殖活性が最も高く認められたが、このことは、1 時間のタイムラグはあるものの投与後 1.5 時間後の唾液 SIgA Ab 分泌が最大になることと関連性があるのかもしれない。また、SMG の IgA AFCs 数の変化に差がみられない (図 4) にもかかわらず、IgA AFCs の生存・増殖能の一時的な上昇が認められること (図 5) は、SMG 粘膜直下に存在する形質細胞の SIgA Ab 産生・分泌過程に、HNK の一時的な影響があるのかもしれない。

現在、高齢化は、わが国だけでなく地球規模的に急速に拡大・進行し、さまざまな社会問題を勃発させている。加齢に伴う免疫機能の低下という点においても、易感染性だけでなく、感染症の重篤化・重症化を招き易い²⁷⁾。また免疫機能の低い高齢者は、免疫機能の高い高齢者と比較して余命が短い²⁸⁾ という報告もあり、加齢による免疫機能の低下は感染症罹患に対する抵抗力低下を生じさせ、高齢者の寿命²⁹⁾ や QOL に大きな影響を及ぼすと考えられる。さらに、唾液中の SIgA Ab 分泌についても、高齢者は若齢者よりも低下していること³⁰⁾、また加齢とともに唾液分泌量や SIgA Ab 濃度が低くなる³¹⁾ ことが知られている。以上のことから、注射針を用いずに経口や経鼻投与型の「粘膜免疫機構」を利用した粘膜ワクチンや本研究で検討した HNK の経鼻投与というツールは、高齢社会に向かう人類の QOL 向上に、今後大いに貢献するものと考えられる。

本研究では、植物由来の安全性が高い HNK を経鼻投与することは、数時間ではあるものの、唾液中への SIgA Ab 分泌を促進する可能性が示された。HNK による唾液 SIgA Ab 分泌の促進は、体外からの病原微生物の侵入口である鼻・口腔における免疫防御機構の強化に繋がると考える。

最後に、本研究において、利益相反に関しての申告すべき事項はないことを宣言する。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会科学研究補助金基盤研究 (B) (課題番号 17H04424)、基盤研究 (C) (課題番号 17K12034) の一部と小林製薬 (株) の助成 (寄附金) を受け行われた。特に小林製薬 (株) には HNK が有する未知なる機能を解明するために、免疫学的アプローチを用いるという機会を与えていただいたことに甚大なる謝意を表す。また、本研究は大阪歯科大学歯学部口腔衛生学講座実験室ならびに大阪歯科大学中央歯学研究所の動物施設および組織培養実験施設において、同講座のスタッフ、大学院生と同研究所 堀 英明研究技術員、村上よし子主任の協力のもと行われたものであり、関係者の方々に厚くお礼申し上げる。本原著の作成にあたり、貴重かつ建設的なご意見を賜った東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発センター臨床ワクチン学分野 藤橋浩太郎教授に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Goto Y, Kurashima Y, Kiyono H: The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Rheumatol* 27: 388-396, 2015.
- 2) Kurashima Y, Goto Y, Kiyono H: Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. *Eur J Immunol* 43: 3108-3115, 2013.

- 3) Kataoka K, Fujihashi K: Dendritic cell-targeting DNA-based mucosal adjuvants for the development of mucosal vaccines. *Expert Rev of Vaccines* 8: 1183-1193, 2009.
- 4) Zhang T, Hashizume T, Kurita-Ochiai T et al.: Sublingual vaccination with outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and Flt3 ligand elicits protective immunity in the oral cavity. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 937-941, 2009.
- 5) Mestecky J, McGhee JR: Immunoglobulin A (IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* 40: 153-245, 1987.
- 6) Mestecky J, Moro I, Kerr MA et al.: Mucosal Immunoglobulins, Mestecky J, Bienenstock J, Lamm ME et al. (editors), *Mucosal Immunology*. Elsevier/ Academic Press, Amsterdam, 3rd ed., 2005, pp. 153-181.
- 7) 清野 宏 編: 臨床粘膜免疫学. シナジー社, 東京, 2010, 246-255 頁.
- 8) Michalek SM, Childers NK: Development and outlook for a caries vaccines. *Cri Rev Oral Bio Med* 1: 37-54, 1990.
- 9) Ogawa T, Shimauchi H, Hamada S: Mucosal and systemic immune response in BALB/c mice to *Bacteroides gingivalis* fimbriae administered orally. *Infect Immun* 57: 3466-3471, 1989.
- 10) Czerkinsky C, Russel MW, Lycke N et al.: Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect Immun* 57: 1072-1077, 1989.
- 11) Kataoka K, McGhee JR, Kobayashi R et al.: Nasal Flt3 ligand cDNA elicits CD11c⁺CD8⁺ Dendritic cells for enhanced mucosal immunity. *J Immunol* 172: 3612-3619, 2004.
- 12) Fukuiwa T, Sekine S, Kobayashi R et al.: A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG ODN as nasal adjuvant elicits NALT dendritic cells for prolonged mucosal immunity. *Vaccine* 26: 4849-4859, 2008.
- 13) Kataoka K, Fujihashi K, Oma K et al.: The nasal dendritic cell-targeting Flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumoniae. *Infect Immun* 79: 2819-2828, 2011.
- 14) Fukuyama Y, King JD, Kataoka K et al.: Secretory IgA antibodies play an important role in the immunity to *streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 185: 755-762, 2010.
- 15) Fukuyama Y, King JD, Kataoka K et al.: A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG oligodeoxynucleotide as nasal adjuvant elicits protective secretory-IgA immunity to *Streptococcus pneumoniae* in aged mice. *J Immunol* 186: 2454-2461, 2011.
- 16) Fotopoulou T, Ciric A, Kritsi E et al.: Antimicrobial/antibiofilm activity and cytotoxic studies of b-thujaplicin derivatives. *Arch Pharm Chem Life Sci* 349: 698-709, 2016
- 17) Kim DJ, Lee MW, Choi JS et al.: Inhibitory activity of hinokitiol against biofilm formation in fluconazole-resistant candida species. *PLoS ONE* 12: e0171244, 2017.
- 18) Wang WK, Lin ST, Chang WW et al.: Hinokitiol induces autophagy in murine breast and colorectal cancer cells. *Environ Toxicol* 31: 77-84, 2016.
- 19) 大津隆一: 合成ヒノキチオールの一過性吸引がヒト唾液中のクロモグラニン A および免疫グロブリン A (IgA) 分泌に与える影響. *自律神経* 42: 337-343, 2005.
- 20) Sekine S, Kataoka K, Fukuyama Y et al.: A novel adenovirus expressing Flt3 ligand enhances mucosal immunity by inducing mature nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue dendritic cell migration. *J Immunol* 180: 8126-8134, 2008.
- 21) Osawa K, Matsumoto T, Maruyama T et al.: Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their constituents against periodontopathic bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll* 31: 17-21, 1990.
- 22) Yamano H, Yamazaki T, Sato K et al.: In vitro inhibitory effects of hinokitiol on proliferation of *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2519-2521, 2005.
- 23) Seo JS, Choi YH, Moon JW et al.: Hinokitiol induces DNA demethylation via DNMT1 and UHRF1 inhibition in colon cancer cells. *BMC Cell Biol* 18: 14, 2017.
- 24) Byeon SE, Lee YG, Kim J-C et al.: Hinokitiol, a natural tropolone derivative, inhibits TNF- α production in LPS-activated macrophages via suppression of NF- κ B. *Planta Med* 74: 828-833, 2008.
- 25) Chung CL, Leung KW, Lu WJ et al.: Hinokitiol negatively regulates immune responses through cell cycle arrest in concanavalin A-activated lymphocytes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 2015.
- 26) 片岡宏介, 小淵健二郎, 田口洋一郎ほか: ヒノキチオール経鼻投与による抗原特異的 IgA 抗体産生への影響. *歯科医学* 81: 16-23, 2018.
- 27) 赤間高雄, 木村分律, 秋本崇之ほか: 高齢者の免疫機能に及ぼす影響. *体力科学* 52 Suppl: 65-72, 2003.
- 28) Robert-Thomson IC, Whittingham S, Youngchaiyud U et al.: Aging, immune response and mortality. *Lancet* 2: 368-370, 1974.
- 29) 河野一郎, 秋本崇之, 赤間高雄: 加齢と免疫機能. *トレーニング科学研究会編. 加齢とトレーニング*. 朝倉書店, 東京, 1999, 20-24 頁.
- 30) Miletic ID, Schiffman SS, Miletic VD et al.: Salivary IgA secretion rate in young and elderly persons. *Physiol Behav* 60: 243-248, 1996.
- 31) Evans P, Der G, Ford G et al.: Social class, sex and age differences in mucosal immunity in a large community sample. *Brain Behav Immun* 14: 41-48, 2000.

著者への連絡先: 片岡宏介 〒573-1211 大阪府枚方市楠葉花園町 8-1 大阪歯科大学歯学部口腔衛生学講座
 TEL: 072-864-3059 FAX: 072-864-3159
 E-mail: kataoka-k@cc.osaka-dent.ac.jp

Effect of Hinokitiol on Salivary Secretory-IgA Antibody Production System

Kosuke KATAOKA¹⁾, Eiji KUNITOMO²⁾, Kenjiro KOBUCHI³⁾, Masako UENE¹⁾,
Takashi DOI¹⁾ and Tatsuro MIYAKE¹⁾

¹⁾Department of Preventive and Community Dentistry, Faculty of Dentistry, Osaka Dental University

²⁾Central R&D Laboratory, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd.

³⁾Department of Periodontology, Graduate School of Dentistry, Faculty of Dentistry,
Osaka Dental University

Abstract: Hinokitiol (HNK) is a well-known antimicrobial and antifungal agent, and is widely used in various formulations including tooth pastes, mouth rinses, aromatics, cosmetics, and food. There is limited information on the immunobiological activity of HNK. In the present study, we investigated the effects of intranasally administered HNK on salivary secretory-IgA antibody (SIgA Ab) secretion in mice. BALB/c (8 weeks old) mice were given 50 μ g of HNK four times at weekly intervals (Days 0, 7, 14, and 21) via the nasal route. Saliva samples were collected prior to (-0 hour) and after (0.5, 1.5, 3, and 6 hours) the nasal administration of HNK on respective days, and the levels of salivary SIgA Ab were determined by ELISA. Furthermore, the numbers of SIgA Ab-producing cells (SIgA AFCs) in submandibular glands (SMG) were examined by ELISPOT, and proliferation responses of IgA⁺ B cells were measured by MTT assays based on the same schedule on Day 21.

On Days 0, 7, 14, and 21, the maximum level of SIgA Ab secretion in saliva occurred at 1.5 hours after the nasal administration of HNK. Interestingly, the number of doses of HNK and quantities of SIgA secretion showed a positive correlation. On Day 21, there were no significant differences between the number of SMG IgA AFCs prior to and after (0.5, 1.5, 3, and 6 hours) the nasal administration of HNK. However, significantly increased levels of IgA AFCs due to promotion of their proliferative activity were noted 0.5 and 1.5 hours after the nasal administration of HNK. Our results suggest that HNK has an impact on salivary SIgA Ab secretion immediately after nasal administration via elevating the proliferative activity of SMG IgA AFCs.

J Dent Hlth 68: 137-144, 2018

Key words: Hinokitiol, Saliva, Secretory-IgA Ab (SIgA), Nasal administration

Reprint requests to K. KATAOKA, Osaka Dental University, Faculty of Dentistry, Department of Preventive and Community Dentistry, 8-1, Kuzuha Hanazono-cho, Hirakata, Osaka, 573-1211, JAPAN
TEL: 072-864-3059/FAX: 072-864-3159/E-mail: kataoka-k@cc.osaka-dent.ac.jp