

國立臺灣大學醫學院藥學研究所



碩士論文

School of Pharmacy

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

疫苗佐劑對於血液細胞分化影響之研究

Effects of vaccine adjuvant on hematopoiesis

鄭凱文

Kai-Wen Cheng

指導教授：楊雅雯教授

Advisor: Ya-Wun Yang, Ph.D.

中華民國105年1月

January, 2016



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

疫苗佐劑對於血液細胞分化影響之研究
Effects of vaccine adjuvant on hematopoiesis

本論文係鄭凱文君（學號 R01423032）在國立臺灣大學藥學研究所完成之碩士學位論文，於民國 105 年 1 月 18 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

口試委員：

楊雅雯 楊雅雯 博士
(指導教授)

伍安怡 伍安怡 博士

李建國 李建國 博士

繆希椿 繆希椿 博士

致謝



這本論文能夠完成首先要感謝楊雅雯教授在我碩士三年半生涯中的教導與指點，引領我進入研究的殿堂，提供我一間完善的實驗室與設備能夠讓我自由發揮研究方向，非常感謝楊雅雯教授一路以來的辛苦付出。還要感謝免疫所的三位教授：伍安怡教授、李建國教授以及繆希椿教授能夠在百忙之中撥冗參與我的口試，提供我非常多寶貴的意見。也要感謝藥學所教授們以及藥學系系辦公室的各位同仁對我的關心與鼓勵，都是支持我完成碩士班研究的動力之一。

感謝在我初進實驗室指導我實驗技術的張志峰學長以及羅文蕙學姊，還有一共流式細胞儀核心的王靜嫻與黃志成博士教導我流式細胞儀的操作、幫助我分選細胞，還有在諸多次機器阻塞時幫我解決危機，以及容許我在奇怪的時間做實驗。感謝一共顯微影像核心的徐華蔓技師教導我顯微鏡的操作。感謝二共楊凱婷技師幫助我操作流式細胞儀分選細胞。感謝實驗動物中心繁殖組的劉育如以及其他多位獸醫師幫助我繁殖基因轉殖實驗動物。感謝劉振偉學長在我的實驗上提供了很多的想法，以及協助我實驗的進行。感謝我父母這麼多年來的支持，讓我花了這麼久的時間完成碩士班研究，感謝他們的辛苦付出。

感謝楊雅雯教授爭取到的國科會計畫經費，讓我能夠做這麼多的實驗，以及在我手下犧牲的數百隻實驗小鼠，沒有他們的犧牲我無法進行研究。還要感謝的人太多了，諸多不及備載，謝謝各位，我終於寫完論文了。

鄭凱文 2016/02/04

目錄



中文摘要	i
Abstract.....	iii
第一章 文獻回顧	1
1.1 疫苗佐劑(vaccine adjuvant)之概要	1
1.2 含有 Pluronic L121 block co-polymer 之疫苗佐劑介紹	1
1.3 血液幹細胞及前驅細胞(hematopoietic stem/progenitor cells, HSPCs)的分化	2
1.4 發炎反應影響血液幹細胞及前驅細胞的分化	3
1.5 B 細胞的發育及分化	3
1.6 胸腺中 T 細胞的發育及分化	4
1.7 毒殺 T 細胞(CTL)與 MHC-I cross presentation	4
第二章 研究目的與實驗設計	9
第三章 材料與方法	12
3.1 藥品試劑 (依照字母排序).....	12
3.2 培養基與緩衝液配方	13
3.3 用於流式細胞儀分析之螢光抗體與純化 CD8 ⁺ 細胞所用的抗體	13
3.4 用於免疫螢光染色所使用之抗體	15
3.5 小鼠品系	15
3.6 疫苗佐劑與注射方式	15
3.7 流式細胞儀與小鼠組織細胞的處理方式	16
3.8 腫瘤的植入與測量	17
3.9 體內專一性殺手型 T 細胞(Cytotoxicity T Lymphocytes, CTL)的細胞毒殺能力試驗	17
3.10 分析 L121-adj.對於骨髓內髓細胞(myeloid cells)以及脾臟與淋巴結中顆粒性白血球、樹突細胞分化的影響	18
3.11 在 OVA 上標記 FITC 的方法	18



3.12 分析 L121-adj.對於淋巴結中顆粒性白血球與樹突細胞吞噬抗原能力的影響	19
3.13 分析 L121-adj.對於局部皮下注射部位中顆粒性白血球與樹突細胞抗原呈現的影響	19
3.14 測試局部皮下注射部位中顆粒性白血球與樹突細胞的交叉呈現能力 ...	19
3.15 體內去除顆粒性白血球後測量專一性細胞毒殺 T 細胞活性	20
3.16 分析 L121-adj.對骨髓、脾臟中 B 細胞與胸腺 T 細胞分化的影響	21
3.17 骨髓腔內注射前驅 B 細胞後分析 L121-adj.對於前驅 B 細胞的分化的影響	22
3.18 分析 L121-adj.對骨髓中血液幹細胞分化的影響	22
3.19 分析 L121-adj.對於 CLP 細胞分化能力的影響	22
3.20 以 ELISA 測量注射 L121-adj.後小鼠血液中 G-CSF 濃度	23
3.21 以小鼠血清體外培養 LSK、CMP、GMP 細胞與分析其分化	24
3.22 皮下注射部位切片組織免疫螢光染色以及細胞型態之顯微鏡觀察	24
4.1 注射含 L121-adj.與抗原 OVA 之疫苗能夠抑制 B16F10-OVA 黑色素細胞瘤之生長，與延長小鼠存活時間	26
4.2 注射含 L121-adj.與抗原 OVA 之疫苗能夠於一周之內產生抗原專一性之 T 細胞毒殺免疫反應(CTL)	26
4.3 注射 L121-adj.促使顆粒性白血球與單核細胞離開骨髓	28
4.4 注射 L121-adj.促使脾臟中顆粒性白血球增加，並且表現出 F4/80 表面抗原	29
4.5 注射 L121-adj.增加顆粒性白血球與樹突細胞的輸送抗原至淋巴結中	30
4.6 注射 L121-adj.吸引顆粒性白血球與樹突細胞浸潤局部注射位置，並且使樹突細胞獲得抗原呈現的能力	31
4.7 以 1A8 單株抗體能夠有效減少體內顆粒性白血球的數量，在施打疫苗前	

去除體內顆粒性白血球能夠增加毒殺性 T 細胞的活性.....	33
4.8 注射 L121-adj.影響骨髓內 B 細胞的分化，減少骨髓內前驅 B 細胞的數量	35
4.9 注射 L121-adj.促進脾臟中 B 細胞的分化，使 marginal zone B 細胞的數量 增加，並且產生 germinal center B 細胞與 plasma B 細胞。.....	37
4.10 注射 L121-adj.促使骨髓中前驅 B 細胞轉移到脾臟中分化成 transitional B 細胞.....	39
4.11 注射 L121-adj.影響胸腺 T 細胞的分化，並且使胸腺 T 細胞減少.....	39
4.12 注射 L121.adj.促進胸腺中 T 細胞之成熟，加速正向選擇(positive selection)	41
4.13 注射 L121-adj.影響骨髓中血液幹細胞的分化，改變血液幹細胞的恆定性	43
4.14 注射 L121-adj.使骨髓中 CLP 細胞之 Sca-1 表現短暫提高.....	45
4.15 注射 L121-adj.抑制 CLP 細胞的分化，減少 B 細胞的產生.....	46
4.16 注射 L121-adj.使血液中 G-CSF 濃度大量提昇.....	46
4.17 L121-adj.透過血液中的細胞激素影響骨髓中血液幹細胞產生大量顆粒性 白血球.....	47
第五章 討論.....	49
第六章 結論.....	55
參考文獻.....	57



圖表目錄



示意圖 一、簡化之血液幹細胞分化階層模型圖(hierarchy model)	6
示意圖 二、簡化之 B 細胞分化理論模型圖	7
示意圖 三、簡化之 T 細胞分化理論模型圖	8
圖 一、注射 L121-adj. 以及 OVA 抗原能有效抑制 B16F10-OVA 黑色素細胞腫瘤的 增生以及增加動物存活率	68
圖 二、注射 L121-adj. 以及 OVA 抗原能有效在六天之內產生抗原專一性之細胞毒 殺反應	70
圖 三、注射 L121-adj. 影響骨髓中顆粒性白血球與單核細胞的發育	72
圖 四、注射 L121-adj. 使脾臟中顆粒性白血球增加，並且使顆粒性白血球表現出 F4/80 表面抗原	77
圖 五、注射 L121-adj. 使淋巴結中顆粒性白血球表現出 F4/80 表面抗原	79
圖 六、注射 L121-adj. 增加樹突細胞以及顆粒細胞輸送抗原至淋巴結中	81
圖 七、注射 L121-adj. 使該局部注射位置吸引更多的樹突細胞以及顆粒性白血球 浸潤，並且使樹突細胞表現出 MHC-I-SIINFEKL 抗原呈現機制	83
圖 八、注射 L121-adj. 使該局部注射位置發炎腫脹，並且吸引樹突細胞以及顆粒 性白血球至組織中	86
圖 九、注射 L121-adj. 使樹突細胞獲得抗原呈現的能力	89
圖 十、 <i>In vivo</i> 去除顆粒性白血球後，再注射 L121-adj. 使專一性毒殺性 T 細胞毒 殺能力增加	91
圖 十一、注射 L121-adj. 影響骨髓中 B 細胞的發育，並且減少骨髓中 B 細胞之數 量	94
圖 十二、注射 L121-adj. 影響脾臟中 B 細胞的分化，增加 germinal center B 細胞 以及 plasma B 細胞	99



圖 十三、 注射 L121-adj.使骨髓中前驅 B 細胞轉移到脾臟中，成為 transitional B 細胞	104
圖 十四、 注射 L121-adj.影響胸線中 T 細胞的發育，並且減少 T 細胞的數量.	106
圖 十五、 注射 L121-adj.影響胸線中 T 細胞的發育，加速 T 細胞的成熟.....	111
圖 十六、 注射 L121-adj.影響骨髓中血液幹細胞以及免疫細胞的分化	114
圖 十七、 注射 L121-adj.使骨髓中 CLP 細胞表現高量 Sca-1 表面抗原	119
圖 十八、注射 L121-adj.抑制 CLP 細胞分化，減少 B 細胞產生	121
圖 十九、注射 L121-adj.在血液中產生立即性的 G-CSF 濃度提升	124
圖 二十、注射 L121-adj.後小鼠血液中可使血液細胞分化成顆粒性白血球以及巨噬細胞	126
附錄圖 一、注射 L121-adj.後使脾臟中 CD8 ⁺ T 細胞產生 IFN- γ 以及 granzyme B	129
附錄圖 二、C57BL/6 小鼠骨髓中的 CD11b ⁺ Gr-1 ^{int} Ly6C ^{int} 細胞的外觀型態以及經過體外培養成熟後可發育成顆粒性白血球	130
附錄圖 三、注射 L121-adj.後，C57BL/6 小鼠骨髓中 CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ 細胞以及 CD11b ⁺ Gr-1 ^{int} Ly6C ⁻ 細胞數量隨時間的變化.....	131
附錄圖 四、注射 L121-adj.後脾臟中 Ly6G ⁺ CD11b ⁺ 顆粒性白血球不會抑制 CD8 ⁺ T 細胞的活化增生	133

中文摘要




L121-adjuvant (L121-adj.) 為一含有 Pluronic L121 block copolymer、Tween 80 與 squalane 等成分之疫苗佐劑。本論文研究目的為探討此 L121-adj. 所引發之免疫反應，包含毒殺 T 細胞 (cytotoxicity T lymphocyte, CTL) 反應、對抗腫瘤增生，與其所造成之發炎反應對於顆粒性白血球、B 細胞、T 細胞、血液幹細胞、前驅細胞 [hematopoietic stem/progenitor cell (HSPC)] 等免疫細胞分化的影響。

在第一部分的研究中，我們證實皮下注射 L121-adj. 與抗原能夠有效產生抗原專一性 CTL 反應，與可以做為治療性疫苗，抑制 B16F10 黑色素細胞腫瘤的增生。為了瞭解 L121-adj. 產生 CTL 的機制，我們以流式細胞儀分析了不同組織中的抗原呈現細胞，發現注射 L121-adj. 會導致局部注射皮下位置產生發炎反應，吸引顆粒性白血球與樹突細胞至注射部位，並且促進顆粒性白血球與樹突細胞吞噬攜帶抗原至淋巴結中，同時導致骨髓中的顆粒性白血球釋放減少，增加脾臟中的顆粒性白血球。除此之外，我們發現注射位置中的樹突細胞能夠透過 MHC-I 呈現抗原，使 $CD8^+$ T 細胞活化。為了瞭解顆粒性白血球是否能夠活化 $CD8^+$ T 細胞，我們以抗體去除體內顆粒性白血球後，然而卻不會降低 L121-adj. 所產生的 CTL 反應。以上實驗結果證明注射部位中的抗原呈現細胞是活化 CTL 之重要機制。

第二部分的研究裡，為了分析 L121-adj. 對於 T 細胞與 B 細胞發育分化的影響，我們以流式細胞儀分析骨髓與脾臟中的 B 細胞，與胸腺中的 T 細胞的 CD marker 表現型。我們發現注射 L121-adj. 之後的發炎反應會驅使骨髓中的前驅 B 細胞減少，並轉移至脾臟中分化為 transitional B 細胞，以產生更多的 marginal zone B 細胞以及 follicular B 細胞，進一步使脾臟中產生 germinal center B 細胞與 plasma B 細胞。L121-adj. 亦加速胸腺中 T 細胞之發育成熟，使更高比例的前驅 T 細胞通過 positive selection，成熟為 $CD4^+$ T 細胞。

第三部分的研究中，為了分析 L121-adj. 對於 HSPCs 分化的影響，我們以流式

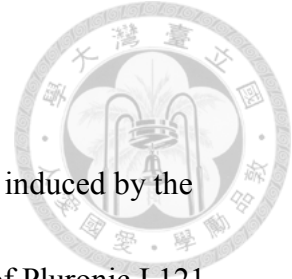


細胞儀分析骨髓中的 HSPCs，我們發現注射 L121-adj.後會改變血液系統的恆定狀態(homeostasis)，造成血液幹細胞分化為更多顆粒性白血球與巨噬細胞，並且減少 common lymphoid progenitors (CLPs)之分化。表示 L121-adj.所造成之發炎反應能夠調控血液幹細胞的分化。

綜合以上結果，證明注射 L121-adj.會造成多層次的影響，包含增加樹突細胞的抗原呈現能力，並且活化毒殺 T 細胞，抑制腫瘤增生。與促進 T 細胞、B 細胞的分化成熟。另一方面，透過血液調控骨髓中血液幹細胞分化，以產生更多的顆粒性白血球，補償顆粒性白血球的消耗。

關鍵詞：疫苗佐劑；毒殺 T 細胞；免疫細胞分化


Abstract



The objective of this study was to examine the immunological effect induced by the L121-adjuvant (L121-adj.), an emulsion vaccine adjuvant consisting of Pluronic L121, Tween 80, and squalane, including the cytotoxicity T lymphocyte (CTL) response and the differentiation of B cells, T cells, and the hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs).

Vaccination of B16F10 melanoma-bearing mice with L121-adj. containing ovalbumin (OVA) induced an antigen-specific CTL response, resulted in an inhibition of tumor growth with an increased the survival rate. Flow cytometric analysis illustrated both dendritic cells and granulocytes were recruited to the injection sites after vaccination, and antigens were transported to draining lymph nodes by the antigen presenting cells (APCs). Accelerated production of granulocytes was observed in the bone marrow, in response to inflammation induced by vaccination, followed by moving into the spleen. Dendritic cells were able to effectively cross-present antigen *in vivo* via MHC-I molecule and activate the CD8⁺ T cells. Depletion of granulocytes prior to immunization resulted in an enhanced CTL response.

Injection of L121-adj. promoted the translocation of B cell precursors from bone marrow to the spleen, resulted in the differentiation of transitional B cells into marginal zone B cells and follicular B cells, followed by the formation of germinal center and



plasma B cells. Positive selection of developing T cells in the thymus was accelerated by the treatment of L121-adj., resulted in a significant production of mature CD4⁺ T cells. Modification of hematopoietic homeostasis was also noticed after vaccination of animals with L121-adj. Flow cytometric analysis showed marked increase of Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) hematopoietic stem cells (HSCs) and consequently the granulocyte-macrophage progenitors (GMPs), presumably at an expense of the common myeloid progenitors (CMPs). Generation of F4/80⁺ and Ly6G⁺ cells from LSK, CMPs, and GMPs was profoundly increased due to the presence of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the serum of immunized mice.

Taken together, injection of mice with L121-adj. exhibited several immunological effects, including the recruitment of dendric cells for the activation of CTL, promoting the differentiation and maturation of progenitors of B and T progenitors into functional lymphocytes. L121-adj. also triggers the differentiation and proliferation of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs), giving rise to the generation of granulocytes in the bone marrow of immunized animals.

Key words : CTL ; Development of immune cells ; Hematopoiesis ; Vaccine adjuvant

第一章 文獻回顧




1.1 疫苗佐劑(vaccine adjuvant)之概要

疫苗最早源自 Edward Jenner 於 1796 年成功接種牛痘來預防天花，致使天花於 1970 年絕跡。疫苗可將疾病抗原事先使生物體產生後天性免疫(adaptive immunity)，以作為預防疾病之手段。疫苗之抗原可來自：減毒(attenuated)活病原體、去活化(inactivated)病原體、細菌毒素，與純化蛋白質抗原。然而並非所有抗原都能夠成功活化免疫反應產生後天性免疫反應，因此發展出疫苗佐劑來輔助免疫系統產生免疫力。疫苗佐劑本身不具抗原性，用於增強疫苗的效用，使免疫系統產生對施打之抗原產生更好的免疫力。目前所開發出之疫苗佐劑的種類有相當多種，包括：礦物鹽類、微生物製劑、乳劑、saponin、細胞激素(cytokines)、聚合物、微粒子(microparticles)與脂質體(liposomes)等(1)，然而疫苗佐劑的機制卻未完全了解，目前被認為之機制包含：一、產生 depot effect，使抗原能夠停留在注射部位不易清除，達到緩釋效果。二、產生 cytokines 與 chemokines 吸引免疫細胞至局部注射部位。三、促進抗原呈現細胞(antigen presenting cells, APCs)之抗原呈現能力等機制(2)。疫苗佐劑由於機制不明而發展不易，與安全性問題發展緩慢，許多疾病仍然無法有效研發出疫苗，發展出除了產生抗體之外，能夠產生有效細胞免疫(cell-mediated immunity)與安全的疫苗佐劑為迫切需要(3)。

1.2 含有 Pluronic L121 block co-polymer 之疫苗佐劑介紹


為了研究疫苗佐劑之機制，我們以一種含有 Pluronic L121, Tween 80, 與 squalane 成分，經過微流化(microfluidize)製成之 o/w 乳劑之疫苗佐劑，L121-adjuvant (L121-adj.)(4)，作為研究材料。此疫苗佐劑在過去曾被證實可以引起抗體免疫(humoral response)，同時也可以產生細胞免疫，與抗原專一性毒殺 T 細胞反應



(cytotoxic T lymphocyte, CTL)(5)。此疫苗佐劑劑型最早可追溯到 Syntex adjuvant formulation (SAF)，以取代常用的 complete Freund's adjuvant (CFA)疫苗佐劑，當時發現此種疫苗佐劑能夠有效產生抗體免疫與細胞免疫(6)，引發 Th1-type 免疫反應與產生 IgG2a 抗體(7)，隨後證實此疫苗佐劑與純化蛋白質抗原能夠有效引發 CTL 反應(8)，之後於人體臨床實驗亦被證實能夠治療 B-cell lymphoma (9)。關於此疫苗佐劑之成分，Squalane 由於具有生物可分解性，適合作為乳劑型疫苗佐劑之油相，以取代 CFA 中的礦物油(10)，並且以 Tween 80 作為介面活性劑幫助乳化，此外加入具有介面活性之共聚合物 Pluronic L121 被發現能夠進一步增加疫苗佐劑的功效(11, 12)。由於 L121-adj.具有良好的佐劑效果，因此我們想深入探討瞭解其效果機制，作為開發安全有效疫苗佐劑之踏腳石。

1.3 血液幹細胞及前驅細胞(hematopoietic stem/progenitor cells, HSPCs)的分化

關於疫苗佐劑之機制，除了目前前面所述幾種公認可能機制之外，我們認為疫苗佐劑所引發之發炎反應，會改變血液細胞的分化，作為先天性免疫的一種，以調控後天性免疫反應，因此在本論文中，我們將分析觀察 L121-adj.對於 HSPCs 分化之影響。體內之免疫細胞乃分化自骨髓中的 HSPCs，本論文採用目前較為接受之分化階層理論(hierarchy model) (13-15)。如示意圖(一)所示，簡述如下，最上游之血液幹細胞為多功能性(multipotent)幹細胞，一般稱為 LSK 細胞 (Lineage⁻CD117⁺ Sca-1⁺) (16, 17)，具有良好自我新生 self-renewal 能力與分化為下游前驅細胞，可依據分化及 self-renewal 特性分成 long-term HSC (LT-HSC)，short-term HSC(ST-HSC)，以及 multipotent progenitor (MPP) (13)，可往下分化為單功能(oligopotent)前驅細胞，包含 common lymphoid progenitor (CLP)細胞(18, 19)，與 common myeloid progenitors (CMP)細胞(20-22)。CLP 細胞可分化為 T 細胞、B 細胞與 NK 細胞等淋巴球(lymphocyte)，而不會產生顆粒性白血球、巨噬細胞、單核細胞、紅血球等髓細胞(myeloid cell)(18)，反之 CMP 細胞則可分化為




granulocyte-macrophage progenitor (GMP)細胞，與 megakaryocyte/erythroid progenitor (MEP)細胞而不會分化為淋巴球(20-22)。GMP 細胞可進一步分化為顆粒性白血球、單核細胞、巨噬細胞，而 MEP 細胞則分化為紅血球與血小板(20)。另外，樹突細胞則來自骨髓中表現有 CD135 的前驅細胞(23, 24)，包括 CMP 細胞、CLP 細胞，與 common dendritic progenitor (CDP)細胞(22, 25, 26)。

1.4 發炎反應影響血液幹細胞及前驅細胞的分化

一般狀況下，血液幹細胞會維持穩定的分化與 self-renewal，以維持血液系統的穩定。然而，感染所導致之發炎反應會影響血液幹細胞與前驅細胞的分化，以補償免疫細胞的消耗(27)。舉例來說，細菌(*Ehrlichia muris*)感染會透過 IFN- γ 使骨髓中的 CMP 與 GMP 細胞消耗以產生更多成熟顆粒性白血球，以維持衡平(28)；注射 lipopolysaccharide (LPS)會增加 LSK 細胞的 self-renewal 與分化速度(29)；疫苗佐劑 alum 亦會使顆粒性白血球消耗，而使骨髓快速產生大量顆粒性白血球(30)；血液幹細胞甚至能夠轉移至發炎部位分化為顆粒性白血球(31, 32)；血液幹細胞亦與成熟的免疫細胞一樣表現出 toll like receptor (TLR)，以調控分化(33)；顯示血液幹細胞亦可直接或是間接的參與調控免疫反應(34)。因此在本論文中，我們將分析觀察血液細胞的分化在注射疫苗佐劑後所受到的影響。

1.5 B 細胞的發育及分化

如示意圖(二)所示，B 細胞來由骨髓中的 CLP 細胞的分化而來，骨髓中的前驅 B 細胞為 B220⁺IgM⁻(35)，利用 CD43，BP-1 與 CD24 可將前驅 B 細胞分為四群細胞，其中 pre-pro B 細胞(Fr. A)，為最上游之前驅 B 細胞(35, 36)，可分化為 pro B 細胞，包括 early pro B 細胞(Fr. B)與 late pro B 細胞(Fr. C)，後續再分化為 pre B 細胞(Fr. D)，接著分化為 immature B 細胞(Fr. E)與 mature B 細胞(Fr. F) (35-38)。骨髓中的 immature B 細胞會離開骨髓轉移至脾臟中繼續分化為 transitional B 細胞，



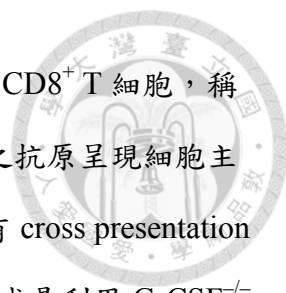
transitional B 細胞可至少再分為兩群，分別為 T1 以及 T2 B 細胞 (39-41)，一部分的 transitional B 細胞可分化成 marginal zone (MZ) B 細胞，或是分化成 follicular (FO) B 細胞(42, 43)。MZ B 細胞位於脾臟 marginal zone 中，受到血液中抗原刺激時可以快速且大量的產生 IgM(44, 45)，並且表現出 costimulatory molecules 如 CD80 與 CD86 等，可做為抗原呈現細胞活化 CD4⁺ T 細胞(46, 47)，因此被認為是第一線參與早期免疫反應之細胞(48)，對抗血液中病原體的感染(49, 50)，亦可分化為 germinal center (GC) B 細胞，產生 somatic hypermutation 成為 memory B 細胞(51)。FO B 細胞位於脾臟 follicles 中，為脾臟中主要的 B 細胞，且會在骨髓、淋巴器官中循環(42, 52)，可由 follicular helper T 細胞活化，而產生抗體(53)。

1.6 胸腺中 T 細胞的發育及分化

T 細胞之發育成熟如示意圖(三)，簡述如下：T 細胞於胸腺中發育成熟，骨髓中的前驅細胞經由血液循環移動到胸腺中，此細胞由於還沒表現出 CD4 或是 CD8，稱為 double negative (DN)細胞，依分化順序可區分為四群，首先為 DN1 細胞，依序分化成 DN2 細胞，DN3 細胞，與 DN4 細胞，之後才分化成同時具有表現 CD4 及 CD8，稱為 double positive 細胞(DP)，此時細胞會分化成熟為只有表現 CD4 或是 CD8 之一的 single positive (SP)細胞，分別為 CD4⁺ SP 細胞或是 CD8⁺ SP 細胞，之後進入血液循環移動至周邊淋巴器官(54-56)。CD4⁺ T 細胞受到抗原刺激可再化成熟為 helper T 細胞或是 regulatory T 細胞，而 CD8⁺ T 細胞則分化成熟為毒殺 T 細胞(CTL) (55)。

1.7 毒殺 T 細胞(CTL)與 MHC-I cross presentation

毒殺 T 細胞可釋放出 perforin、granzyme B 來毒殺目標細胞(57)，或是透過表現 Fas ligand 來引發目標細胞凋亡(58)，Cytotoxicity T 細胞的目標細胞可為受病毒感染細胞，或是癌細胞，因此被發展作為免疫療法來治療癌症(59)。毒殺 T 細胞



需要抗原呈現細胞將細胞外的抗原吞噬後，經由 MHC-I 呈現給 CD8⁺ T 細胞，稱為 cross presentation (60)。目前已知具有 cross presentation 能力之抗原呈現細胞主要為樹突細胞(61)。嗜中性顆粒性白血球(neutrophil)亦被發現具有 cross presentation 的能力(62)，然而在其他研究中利用抗體去除體內顆粒性白血球或是利用 G-CSF^{-/-} neutropenic 小鼠測試顆粒性白血球對於 CD8⁺ T 細胞活性的影響卻未見降低(63)，顯示顆粒性白血球活化 CD8⁺ T 細胞的能力仍有待研究與討論。

目前對於疫苗佐劑對於血液細胞分化的影響並未完全明瞭，因此本論文以 L121-adj. 作為研究材料，探討其對血液細胞分化的影響，以了解血液細胞分化與疫苗佐劑所引發的免疫反應之間的關聯性，以提供一個疫苗佐劑機制研究的新觀點。我們的研究呈現了 L121-adj. 能夠造成多方面的影響，包括增加樹突細胞的抗原呈現能力，以活化毒殺 T 細胞，以及促進 T 細胞、B 細胞的分化成熟。另一方面，透過血液調控骨髓中血液幹細胞分化，以產生更多的顆粒性白血球，補償顆粒性白血球的消耗。

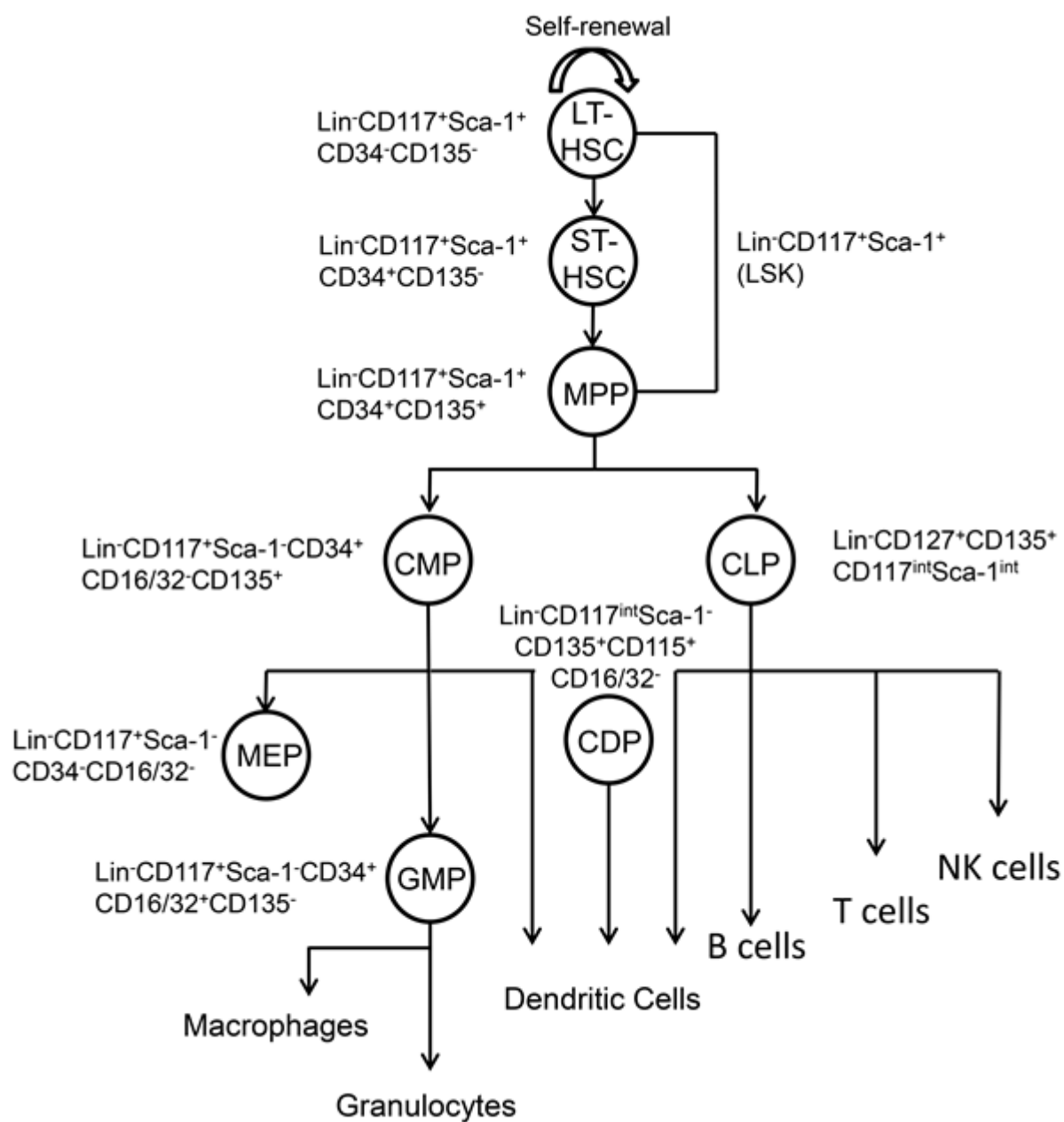


示意圖 一、簡化之血液幹細胞分化階層模型圖(hierarchy model)

本圖主要參考自 Weissman IL 等人於 2011 年之著作(13)，並且加入 CDP 細胞的發現(25)。CMP、GMP 以及 CDP 之 CD marker 表現進一步參考自其他文獻(22)，以之作為本論文之分析方式。

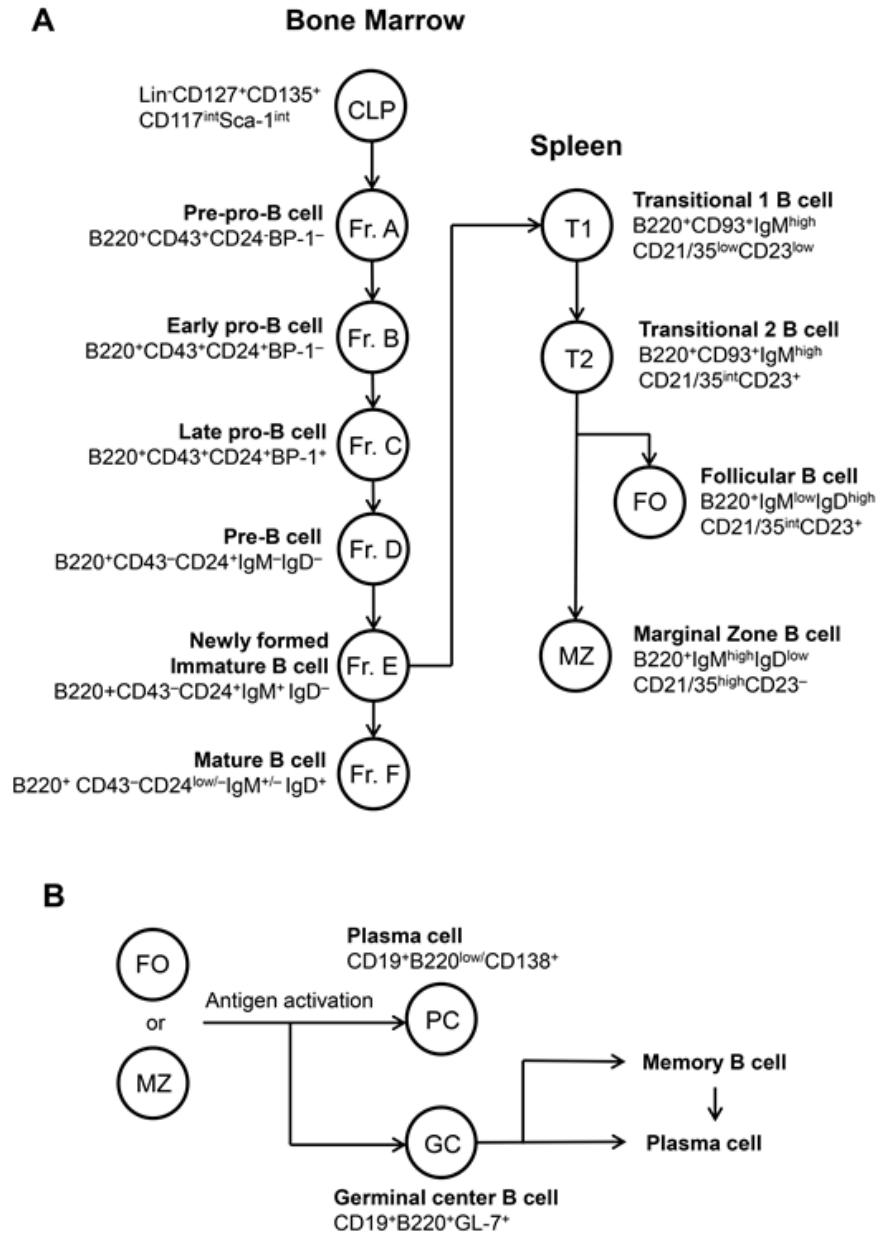


示意圖 二、簡化之 B 細胞分化理論模型圖

圖(A)為 antigen-independent 之 B 細胞分化理論模型圖，骨髓中 B 細胞的分化主要參考自 Hardy 等人之研究(64)，以及其他回顧文獻(65)。脾臟中 B 細胞的分化則參考自數篇文獻(43, 66)。圖(B)為 antigen-dependent 之 B 細胞分化理論模型圖，plasma B 細胞以及 GC B 細胞之 CD marker 表現過去研究文獻(51, 67, 68)。

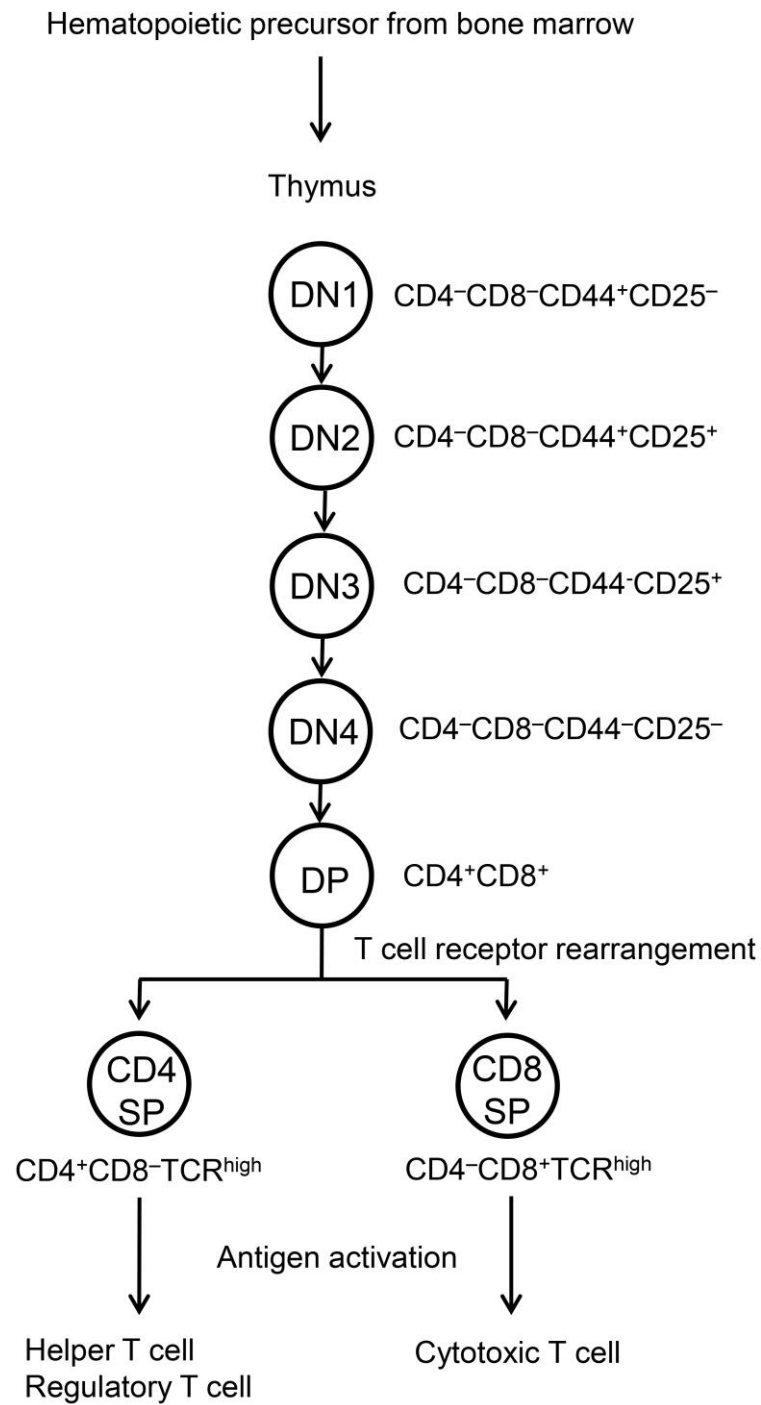


示意圖 三、簡化之 T 細胞分化理論模型圖

本圖為胸腺中 T 細胞分化成熟之理論模型圖，主要參考自過去數篇回顧文獻，經簡化後呈現(54-56)。

第二章 研究目的與實驗設計



由於疫苗佐劑之機制未完全明瞭仍有待更深入探討，導致疫苗無法有效產生 CTL 與 Th1 response 是目前開發疫苗佐劑所遇到的難題之一(3)。含有 Pluronic L121, Tween 80, 與 squalane 之 L121-adjuvant 能夠有效產生 Th1 response (7)，在過去曾被證實可以引起抗體免疫(humoral response)，同時也可以產生細胞免疫，與抗原專一性毒殺 T 細胞反應(cytotoxic T lymphocyte, CTL) (5)。由於近年來發現發炎反應會調影響血液細胞的分化(30, 69)，與血液幹細胞透過改變分化行為以調控、參與免疫反應(27, 34)，然而關於疫苗佐劑對於血液細胞分化的影響目前並沒有太多研究，因此我們欲探討 L121-adj.對於血液細胞的分化之影響。

L121-adj.為乳劑型疫苗佐劑，與抗原混和後以皮下注射至 C57BL/6 實驗小鼠，我們以常被使用於免疫研究之 ovalbumin (OVA)作為模式抗原以研究抗原專一性之免疫反應。為了證實 L121-adj.能夠有效產生 CTL 以及抑制腫瘤的增生，我們在注射 L121-adj.與 OVA 之後，以標記有螢光 CFSE 並且帶有 OVA 部分胜肽片段 SIINFEKL 之 CD45.1 小鼠之脾臟細胞做為毒殺 T 細胞之目標細胞，於不同時間點分析體內 CTL 的反應。

我們選用適合接種於皮下以利於觀察腫瘤增生，以及帶有 OVA 抗原之 B16F10-OVA 黑色素細胞瘤作為腫瘤模式的研究，並且使用 L121-adj.作為治療性疫苗，於腫瘤成功生長出來後再注射 L121-adj.與抗原 OVA，並且觀察腫瘤是否能夠因為 L121-adj.所引發之免疫反應而減緩增生，以證實 L121-adj.是有效之疫苗佐劑。

由於皮下部位有豐富的淋巴組織與免疫細胞，再加上疫苗佐劑在局部注射部位能夠引起發炎反應，我們將以流式細胞儀分析皮下組織中的抗原呈現細胞，以及其他免疫器官包括脾臟、骨髓中的抗原呈現細胞受到疫苗佐劑刺激的影響。

為了瞭解疫苗佐劑之注射是否會改變抗原於體內分布的改變，我們以螢光物

質 FITC 與抗原 OVA 進行反應將兩者連結在一起，之後使用流式細胞儀追蹤分析抗原於體內的分布。

為了瞭解皮下注射部位中的免疫細胞是否能夠活化 CD8⁺ T 細胞以產生 CTL 反應，我們將皮下部位中的免疫細胞以流式細胞儀分選出來，並且與來自 OT-I 小鼠具有 OVA 專一性之 CD8⁺ T 細胞混和後，再以尾靜脈注射至未經處理的 CD45.1 小鼠，於三天後分析體內 CD8⁺ T 細胞是否有活化，以證明 L121-adj.皮下注射部位中的抗原呈現細胞能夠活化 CD8⁺ T 細胞以產生 CTL。

由於顆粒性白血球曾被指出具有抗原呈現的能力，我們為了測試 L121-adj.是否能夠使顆粒性白血球產生抗原呈現能力以活化 CTL，於注射 L121-adj.之前先以 anti-Ly6G 專一性抗體去除體內顆粒性白血球，再測量之後的 CTL 反應，以瞭解顆粒性白血球在產生 CTL 機制中的功能。

為了探討 L121-adj.對於 B 細胞分化的影響，我們借鏡過去研究所發現 B 細胞分化的成果，於注射 L121-adj.後不同時間點，以流式細胞儀分析骨髓與脾臟中 B 細胞分化的改變。同樣的，我們也利用流式細胞儀分析胸腺中 T 細胞分化的改變。

為了證明 L121-adj.能夠使骨髓中前驅 B 細胞轉移到脾臟中，導致骨髓中前驅 B 細胞的減少，我們將 CD45.1 小鼠骨髓中的前驅 B 細胞以流式細胞分選儀分選出來後，經由骨髓腔注射，將前驅 B 細胞移植至 C57BL/6 小鼠骨髓中，並且於注射 L121-adj.後分析脾臟中是否有來自骨髓的前驅 B 細胞。

為了分析骨髓中血液幹細胞受到 L121-adj.刺激所產生的改變，我們同樣引用過去研究所使用之分析方式，以流式細胞儀分析骨髓中的血液幹細胞分化的改變。

為了證明 L121-adj.是透過何種方式使血液幹細胞產生大量顆粒性白血球，我們將注射過 L121-adj.之小鼠血清於體外培養經由流式細胞分選儀所分選出的 LSK、CMP、GMP 細胞，之後再以流式細胞儀分析其分化情形。

為了瞭解 CLP 細胞的分化受到 L121-adj.的影響，我們將 C57BL/6 小鼠骨髓中的 CLP 細胞經由流式細胞分選儀分選出來後，以尾靜脈注射至 CD45.1 小鼠體內，

並且於不同時間點觀察血液中由 CLP 細胞分化而來的 B 細胞以及 T 細胞的變化。



第三章 材料與方法



3.1 藥品試劑 (依照字母排序)

7-amino-actinomycin D (7-AAD) viability staining solution 購自 eBioscience (00-6993-50); albumin from bovine serum (BSA) 購自 Sigma-Aldrich (A7906); albumin from chicken egg white (Ovalbumin, 簡稱 OVA) 購自 Sigma-Aldrich (A5503); boric acid 購自 BioRad (161-0751); Biomag® magnetic microbeads conjugated goat anti-rat IgG 購自 Qiagen (310107); Brilliant Violet 650™ conjugated streptavidin 購自 Biolegend (405231); calf serum 購自 Gibco (16440-034); carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) 購自 Molecular Probes (C1157); collagenase type IV 購自 Worthington (4188); DNase I 購自 Roche (10104159001); DMEM/HIGH Medium 購自 Hyclone (SH30003.02); dimethyl sulfoxide (DMSO) 購自 Sigma-Aldrich (D5879); eosin Y Solution (Alcoholic) 購自 ScyTek (EYA500); ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA-Na₂) 購自 Amresco (P0024519); fixable viability dye eFluor® 506 購自 eBioscience (65-0866-14); fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) 購自 Sigma-Aldrich (F-7250); fetal bovine serum (FBS) 購自 Gibco (10437); 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) 購自 Research Organics (6003H-4); hematoxylin, Mayer's (Lillie's Modification) 購自 ScyTek (HMM500); isoflurane 購自 Baxter; 2-mercaptoethanol 購自 Fluka (63690); MEM non-essential amino acids (NEAA) 購自 Gibco (11140-050); NeA-Blue tetramethylbenzidine substrate 購自 Clinical Science Products (01016-1-500); ovalbumin (257-264), chicken (胺基酸序列: SIINFEKL) 購自 PolyPeptide (SC1302); Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) 購自 Hyclone (SH30013.04); polyoxyethelene (20) sorbitan monolaurat 購自 Wako (167-11515); Polybead® microspheres 15.00µm 購自 Polyscience (18328); penicillin-streptomycin solution 購自

Biological Industries (1425127); RPMI 1640 medium 購自 Gibco (31800-022); sodium bicarbonate 購自 Wako (191-01305); sodium pyruvate 購自 Gibco (11360); sodium tetraborate 購自 J.T.Baker (3574); Tissue-Tek® O.C.T. Compound 購自 SAKURA FINETEK (4583); Wright-Giemsa Stain, Modified 購自 Sigma-Aldrich (WG16)。

3.2 培養基與緩衝液配方

RPMI 1640 培養基含有 2 g/l sodium bicarbonate, 25 mM HEPES, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 units/ml penicillin 與 100 μ g/ml streptomycin, 再以 HCl 與 NaOH 調整至 pH=7.2 (70); DMEM 培養基含有 3.7 g/l sodium bicarbonate, 再以 HCl 與 NaOH 調整至 pH=7.2; red blood cell (RBC) lysis buffer 含有 8.34 g/l NH_4Cl , 37.22 mg/l EDTA, 1 g/l NaHCO_3 ; Borate buffer 含有 6.18 g/l boric acid, 9.54 g/l sodium tetraborate, 4.38 g/l sodium chloride, 再以 HCl 與 NaOH 調整至 pH=9.0。

3.3 用於流式細胞儀分析之螢光抗體與純化 CD8^+ 細胞所用的抗體

以下抗體購自 Biologend: APC-anti-CD115 (AFS98), APC-anti-Ly6G (1A8), APC-anti-CD138 (281-2), APC-anti-CD24 (M1/69), APC-Cy7-anti-CD16/32 (93), APC-Cy7-anti-CD11b (M1/70), APC-Cy7-anti-IgD (11-26c.2a), Brilliant Violet 605TM-anti-B220 (RA3-6B2), Brilliant Violet 711TM-anti-CD45.1 (A20), biotin-anti-CD34 (HM34), FITC-anti-Sca-1 (D7), FITC-anti-CD8 (53-6.7), PE-anti-Ly6C (HK1.4), PE-anti-F4/80 (BM8), PE-anti-Gr-1 (RB6-8C5), PE-anti-CD3 (145-2C11), PE-anti-CD19 (6D5), PE-anti-B220 (RA3-6B2), PE-anti-CD11b (M1/70), PE-anti-NK1.1 (PK136), PE-anti-erythroid cells (Ter119), PE-anti-CD11c (N418), PE-anti-CD21/35 (7E9), PE/DazzleTM 594-anti-CD45.2 (104), PerCP-Cy5.5-anti-CD11b (M1/70), PE-Cy7-anti-IgM (RMM-1), PE-Cy7-anti-CD25 (PC61), PE-Cy7-anti-CD127 (A7R34), PE-Cy7-anti-IFN- γ (XMG1.2), purified



rat-anti-MHC-II (M5/114.15.2)。

以下抗體購自 eBioscience：APC-anti-MHC-I-SIINFEKL (eBio25-D1.16)，APC-eFluor® 780-anti-CD11b (M1/70)，APC-eFluor® 780-anti-CD8 (53-6.7)，biotin-anti-CD5 (53-7.3)，eFluor® 450-anti-Ly6C (HK1.4)，eFluor® 450-anti-TCRV α 2 (B20.1)，eFluor® 450-anti-TCR β chain (H57-597)，eFluor® 450-anti-CD117 (2B8)，eFluor® 450-anti-GL7 (GL-7)，FITC-anti-Gr-1 (RB6-8C5)，FITC-anti-CD11b (M1/70)，FITC-anti-CD19 (eBio1D3)，PE-anti-granzyme B (16G6)PE-anti-CD44 (IM7)，PerCP-eFluor® 710-anti-IgD (11-26c)，PerCP-eFluor® 710-anti-CD4 (GK1.5)，PerCP-eFluor® 710-anti-CD135 (A2F10)，PE-Cy7-anti-CD11b (M1/70)，PE-Cy7-anti-CD11c (N418)，PE-Cy7-anti-B220 (RA3-6B2)。

以下抗體購自 UCSF antibody core：rat anti-CD11b (M1/70)，rat anti-F4/80 (BM8)，rat anti-CD4 (GK1.5)，rat anti-Gr-1 (RB6-8C5)，rat anti-erythroid cell (Ter119)，rat anti-B220 (RA3-6B2)，rat anti-CD19 (6D5)，rat anti-CD16/32 (93)。

以下抗體購自 Biolegend 用於作為 isotype control：APC-Mouse IgG1, κ (MOPC-21)，APC-Rat IgG 2a, κ (RTK2758)，APC-Rat IgG2b, κ (RTK4530)，APC-Cy7-Rat IgG 2a, κ (RTK2758)，APC-Cy7-Rat IgG2b, κ (RTK4530)，FITC-Rat IgG2b, κ (RTK4530)，PE-Rat IgG 2a, κ (RTK2758)，PE-Rat IgG1, κ (RTK2071)，PerCP-Cy5.5-Rat IgG2b, κ (RTK4530)。或是購自 eBioscience 作為 isotype control：APC-Armenian Hamster IgG (eBio299Arm)，FITC-Armenian Hamster IgG (eBio299Arm)，FITC-Rat IgG 2a, κ (eBM2a)，PE-Armenian Hamster IgG (eBio299Arm)，PE-Cy7-Armenian Hamster IgG (eBio299Arm)，PE-Cy7-Rat IgG 2a, κ (eBR2a)，PerCP-Cy5.5-Rat IgG 2a, κ (eBR2a)。

Anti-Gr-1(RB6-8C5)抗體會同時辨認 Ly6G 及 Ly6C(71)，一般會用於在流式細胞儀分析中區分類粒性白血球(72)，但是專一性較差，單核細胞以及部分樹突細胞也會表現出較低量 Gr-1(73)，故在部分實驗中會以 anti-Ly6G (1A8)作為專一性較高之抗體來區分脾臟與淋巴結中的類粒性白血球(74)。



3.4 用於免疫螢光染色所使用之抗體

Anti-chicken egg albumin antibody produced in rabbit whole antiserum 購自 Sigma-Aldrich (C6534); anti-rat IgG (whole molecule)-FITC antibody produced in goat affinity isolated antibody, buffered aqueous solution 購自 Sigma-Aldrich (F6258); anti-rabbit IgG (whole molecule)-TRITC antibody produced in goat IgG fraction of antiserum, buffered aqueous solution 購自 Sigma-Aldrich (F5268), DyLight™ 405 AffiniPure goat anti-armenian hamster IgG (H+L) 購自 Jackson ImmunoResearch Inc. (127-475-099); purified anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) antibody 購自 Biolegend (RB6-8C5, 108401), purified anti-mouse CD11c antibody 購自 Biolegend (N418, 117301)。


3.5 小鼠品系

雄性 C57BL/6 (CD45.2⁺) 小鼠、雄性或雌性 B6.SJL-*Ptprc^aPepc^b*/BoyJ 小鼠(簡稱 CD45.1⁺)、與雄性或雌性 C57BL/6-Tg (TcraTcrb)1100Mjb/J 小鼠(簡稱 OT-I)皆由台灣大學醫學院實驗動物中心提供。本實驗中所使用的小鼠年齡皆為 6-12 週。實驗中動物之使用均已經國立臺灣大學醫學院實驗動物照護及使用委員會審查核准。

3.6 疫苗佐劑與注射方式

L121-adjuvant(簡稱 L121-adj.)是一種劑型為水包油 (oil-in-water) 乳劑的疫苗佐劑，製作方式如前所述 (5, 8)。成分包含 3.75 % Pluronic L121、0.6% Tween 80 與 15% squalane 於 PBS 內混合。L121-adj.在使用前先以 PBS 稀釋三倍。將 90 μ l 稀釋後之 L121-adj.與 10 μ l OVA 溶液(10 μ g/ μ l, 溶於 PBS 中)混和後，以 31 gauge 針頭打入小鼠體側(hind flanks)皮下，左右兩邊各打入 50 μ l，總共 100 μ l (4)。

3.7 流式細胞儀與小鼠組織細胞的處理方式



注射疫苗佐劑後的小鼠於指定天數使用約 0.4 % (v/v) 吸入性 isoflurane 麻醉後，以頸椎脫臼方式犧牲。從脛骨與股骨 (tibias and femurs) 中以 26G 針頭與不含血清之 RPMI 1640 培養液沖出骨髓細胞(75)。脾臟(spleen)、腹股溝淋巴結 (inguinal lymph nodes)、與胸腺(thymus)細胞則使用玻璃玻片之磨砂部分磨碎(76, 77)，並經 200 目(74 μ m)尼龍篩網過濾成細胞懸浮液。皮下注射部位的皮膚，先以剪刀切成小塊，再浸泡於 37 °C 含有 6 mg/ml collagenase type IV, 0.1 mg/ml DNase I 與 10 % FBS 的 RPMI 1640 培養液內 1 小時進行分解反應。分解完成後，使用含 2 mM EDTA- Na_2 的 PBS 清洗細胞，並以 200 目(74 μ m)尼龍篩網過濾成細胞懸浮液。血液之採取使用採血針自小鼠頷下靜脈(submandibular vein)取得(78)，每次採取約 100 μ l 之血量，並加入 14.3 USP units sodium heparin 避免血液凝固。使用 RBC lysis buffer 溶解紅血球。將細胞均勻分散在 cold FACS staining buffer，為 PBS 含有 1% calf serum 與 2 mM EDTA- Na_2 (79)，細胞濃度約為 10^7 /ml，與 10 μ g/ml 之 purified anti-CD16/32 抗體作為 FcR blocking 後(部分實驗未加入)，再加入根據經驗適量之 fluorochrome-conjugated antibodies 於 4°C 培養 30 分鐘。將細胞清洗後，加入 fluorochrome-conjugated streptavidin 培養 30 分鐘，並加入 7-aminoactinomycin D 或 fixable viability dye eFluor® 506 區分死細胞與活細胞。然後加入 1.35×10^5 顆直徑 15 μ m 的 polystyrene microspheres 作為計算絕對細胞數的 internal control 加至各組細胞內。細胞的分析是使用配備有 405, 488, 561, 640 nm 雷射的 LSRFortessa (BD Bioscience)，或是配備有 488 nm、640 nm 雷射的 FACSVerse 流式細胞儀分析 (BD Bioscience)。細胞的分選是使用國立台灣大學醫學院第一共同研究室流式細胞分析與分選中心提供的 FACS Aria II 或 FACS Aria III (BD Bioscience) 細胞分選服務。流式細胞儀的數據是使用 FlowJo (Treestar) 第十版軟體進行分析。



3.8 腫瘤的植入與測量

B16F10-OVA 為表現 OVA 的黑色素細胞瘤(80)，此細胞株是培養在含 10% FBS 之 DMEM 內。首先將 2×10^6 個 B16F10-OVA 細胞均勻分佈至 100 μ l PBS 內，再以皮下注射方式注射至 C57BL/6 小鼠背部，每兩天以游標尺記錄一次腫瘤大小與小鼠的存活率。腫瘤大小的計算方式如下(81)：(volume = larger diameter \times smaller diameter² \times 0.4)。腫瘤植入兩週後，當腫瘤的成長已進入指數期（腫瘤體積每兩天增加兩倍），將 100 μ L 含 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 或 PBS 注射至小鼠皮下。兩組實驗組各使用五隻小鼠。此實驗中小鼠身上的腫瘤體積超過 4,000 mm³ 時則視為實驗終點(5)。

3.9 體內專一性殺手型 T 細胞(Cytotoxicity T Lymphocytes, CTL)的細胞毒殺能力試驗

將 100 μ l 含 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 於第 0 天與第 7 天注射至 C57BL/6 皮下，之後每 2 天測量一次細胞毒殺率直到第 14 天。細胞毒殺率的決定方式是參考自過去文獻建立的方法(82)。將公 CD45.1 小鼠脾臟細胞分成兩份，一部分經 5 μ M CFSE 標記，再於含 10% FBS 之 RPMI 1640 培養基加入 2 μ M SIINFEKL 培養 1 小時 (CFSE^{high})，另一部分則標記 0.5 μ M CFSE 未加入 SIINFEKL 處理 (CFSE^{low})，之後用 PBS 清洗細胞，將 CFSE^{high} 細胞與 CFSE^{low} 細胞以 1:1 比例(共 5×10^6 個細胞)混合於 100 μ l PBS 中，以尾靜脈注射方式注射至已打過疫苗佐劑的 C57BL/6 小鼠體內，20 小時後將小鼠犧牲，並收集脾臟細胞，以 PE/Dazzle™ 594-anti-CD45.2 與 Brilliant Violet 711™-anti- CD45.1 染色後，使用 LSRFortessa 流式細胞儀分析，然後將 CD45.1⁺，CD45.2⁻細胞群落圈選出來並計算出 CFSE^{high} 細胞與 CFSE^{low} 細胞的數目，細胞毒殺率的計算公式如下(83)：specific cytotoxicity=[1- (number of CFSE^{high}/number of CFSE^{low})] \times 100%

3.10 分析 L121-adj.對於骨髓內髓細胞(myeloid cells)以及脾臟與淋巴結中顆粒性白血球、樹突細胞分化的影響

將 100 μ l 含 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 於第 0 天與第 7 天注射至 C57BL/6 小鼠皮下。分析骨髓的部分，分別於第 2, 4, 6, 8, 10 天將小鼠犧牲取出骨髓細胞，以未經處理之小鼠做為第 0 天控制組。將骨髓細胞均勻分散至 staining buffer 內，以 FITC-anti-Gr-1, PE-anti-Ly6C, PE-Cy7-anti-B220, APC-anti-CD115, APC-eFluor® 780-anti-CD11b 染色，最後加入 7-AAD 區分死細胞，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀進行分析。另外，分析脾臟與淋巴結的部分，於第 2、3 天將小鼠犧牲，取出脾臟與腹股溝淋巴結細胞。將細胞均勻分散至 staining buffer 內，以 PE-anti-F4/80, PE-Cy7-anti-CD11c, APC-anti-Ly6G, APC-eFluor® 780-anti-CD11b 染色，再加入 7-AAD 區分死細胞，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀進行分析。

3.11 在 OVA 上標記 FITC 的方法

為了追蹤注射 L121-adj.後對於體內 OVA 抗原吞噬的影響，我們利用 FITC 螢光標記 OVA 以利於流式細胞儀分析。將 FITC 標記 OVA 的方法參考修改自其他文獻(84)。將 OVA 溶解在 pH 9 的 borate buffer 內，製成濃度 10 mg/mL 的溶液。FITC 溶於 DMSO 內成 10 mg/mL 的溶液。100 μ l 的 FITC 溶液緩慢加入 1 ml 的 OVA 溶液內於 4°C 持續攪拌 10 小時，過程保持避光。使用可過濾分子量 10,000 蛋白質之 Amicon® centrifugal filter (Millipore) 移除過量的 FITC 數次，直到未接在 OVA 上的 FITC 全部被過濾乾淨，即濾液經 492 nm 測量無螢光吸光值。之後將 OVA-FITC 溶液調整至濃度 10 mg/ml，並且於黑暗與 4°C 環境中儲存。經 280 nm 以及 492 nm 測量吸光值，依據參考文獻之公式(84)，所計算出之 fluorescence/protein 比例為 1.46。

3.12 分析 L121-adj.對於淋巴結中顆粒性白血球與樹突細胞吞噬抗原能力的影響

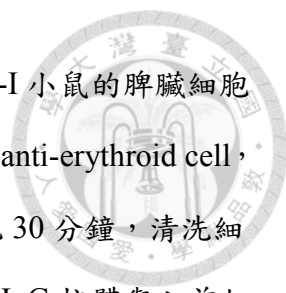
將 100 μ l 含 200 μ g FITC-conjugated OVA 之 L121-adjuvant 或 PBS 注射入 C57BL/6 小鼠皮下，在過了 48 與 72 小時後，將小鼠犧牲並取出腹股溝淋巴結細胞，再將細胞均勻分散於 staining buffer 並且使用 PE-anti-F4/80，PE-Cy7-anti-CD11c，APC-anti-Ly6G，APC-eFluor® 780-anti-CD11b，Brilliant Violet 605™-anti-B220 染色，再加入 7-AAD 區分死細胞，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀進行分析。

3.13 分析 L121-adj.對於局部皮下注射部位中顆粒性白血球與樹突細胞抗原呈現的影響

將 100 μ l 含 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 或 PBS 注射入 C57BL/6 小鼠皮下，注射部位先以電動除毛刀去除毛髮，於經過 24, 48, 72 小時之後，將小鼠犧牲取出注射部位。將細胞均勻分散至 staining buffer，並以 FITC-anti-Gr-1，PE-Cy7-anti-CD11c，APC-anti-MHC-I-SIINFEKL complex 染色，再加入 7-AAD 區分死細胞，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀進行分析。

3.14 測試局部皮下注射部位中顆粒性白血球與樹突細胞的交叉呈現能力

將 100 μ l 含 100 μ g OVA 之 L121-adj.或 PBS 注射入 C57BL/6 小鼠經過以電動除毛刀除毛後之皮下，經過 48 小時之後，取出注射部位細胞。將細胞均勻分散至 staining buffer，並以 PE/Dazzle™ 594- anti-CD45.2，PE-anti-CD11c，APC-anti-Ly6G 染色，加入 7-AAD 區分死細胞，再使用 FACSAriaII 流式細胞儀進行分析與分選，分選出 CD11c⁺Ly6G⁻樹突細胞與 CD11c⁻Ly6G⁺顆粒性白血球。注射 L121-adj.小鼠之皮下注射部位可收得 $4.2 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$ 個 Ly6G⁺顆粒性白血球，以及 $2.9 \times 10^5 \pm 0.2 \times 10^5$ 個 CD11c⁺樹突細胞；注射 PBS 小鼠之皮下注射部位可收得 $1.6 \times 10^4 \pm 0.4 \times 10^4$ 個 Ly6G⁺顆粒性白血球，以及 $1.2 \times 10^5 \pm 0.1 \times 10^5$ 個 CD11c⁺樹突細



胞。另外，OVA-specific CD8⁺ T cells 是由 OT-I 小鼠而來。將 OT-I 小鼠的脾臟細胞加入 rat anti- CD11b, rat anti-F4/80, rat anti-CD4, rat anti-Gr-1, rat anti-erythroid cell, rat anti-MHC-II, rat anti-B220, rat anti-CD19 等抗體於 4 °C 標記 30 分鐘，清洗細胞，再加入 Biomag® magnetic microbeads conjugated goat anti-rat IgG 抗體與之前加入的 rat 抗體於 4 °C 結合 30 分鐘，之後使用磁座吸附非 CD8⁺ T 細胞之其他細胞，以 negatively selection 方式將 CD8⁺ T 細胞分離出來。將純化後之 CD8⁺ T 細胞使用 5 μM CFSE 於 37°C 標記 10 分鐘(85)。之後將從注射 L121-adj. 或 PBS 小鼠的注射部位分選出來的樹突細胞或顆粒性白血球，與 5×10⁶ 個經 CFSE 標記 OT-I CD8⁺ T 細胞於 PBS 內混合，以尾靜脈注射方式注射至 CD45.1 小鼠體內，經過 3 天後將 CD45.1 小鼠犧牲以分析 OT-I CD8⁺ T 細胞增生的情形。將脾臟細胞均勻分散於 staining buffer 內，並使用 PE/Dazzle™ 594-anti-CD45.2, Brilliant Violet 711™- anti-CD45.1, APC-eFluor® 780-anti-CD8, eFluor® 450-anti-TCRVα2 染色，再加入 7-AAD 區分死細胞，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀進行分析。Division index 由 Flowjo 軟體分析計算。

3.15 體內去除顆粒性白血球後測量專一性細胞毒殺 T 細胞活性

為了測試顆粒性白血球對於 L121-adj. 產生毒殺 T 細胞活性的影響，此實驗中使用 anti-mouse Ly6G (1A8) 單株抗體來去除體內顆粒性白血球(73)。將 500 μg 之 1A8 抗體(調整至 500 μg/500 μl 溶於 PBS 中)從腹腔注射入 C57BL/6 小鼠體內，24 小時後，於第 0 天與第 7 天皮下注射 100 μl 含 100 μg OVA 之 L121-adjuvant 或 PBS 於小鼠皮下。為了分析體內顆粒性白血球是否已經完全去除，於第 1 天(注射 1A8 抗體 48 小時之後)從小鼠頷下靜脈採血，以 APC-anti-Ly6G, PE-anti-Ly6C, FITC-anti-CD11b 染色，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀分析血液中的顆粒性白血球。為了測量細胞毒殺 T 細胞活性，將標記 SIINFEKL 的 CFSE^{high} 與未標記 SIINFEKL 的 CFSE^{low} 之 CD45.1 脾臟細胞經尾靜脈注射至注射過佐劑之小鼠體

內，20 小時後將小鼠犧牲取出脾臟以分析專一性細胞毒殺反應。另外，將脾臟細胞用 PE-anti-Gr-1，PerCP-Cy5.5-anti- CD11b，eFluor® 450-anti-Ly6C 染色，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀分析脾臟中的顆粒性白血球。



3.16 分析 L121-adj.對骨髓、脾臟中 B 細胞與胸腺 T 細胞分化的影響

將 100 μ l 含 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 於第 0 天與第 7 天注射至 C57BL/6 小鼠皮下，分別於第 2, 4, 6, 8, 10 天犧牲小鼠取出骨髓、脾臟與胸腺，以未經處理之小鼠做為第 0 天控制組。

關於骨髓的分析，將骨髓細胞均勻分散至 staining buffer 內，以 FITC-anti-CD43，Dump (包含 PE-anti-CD3，PE-anti-CD8，PE-anti-Gr-1，PE-anti-F4/80)，PE-Cy7-anti-IgM，APC-anti-CD93，APC-Cy7-anti-IgD，Pacific Blue-anti-CD24，Brilliant Violet 605™-anti-B220，biotin-anti-BP-1 等抗體染色，再加入 Brilliant Violet 650™-streptavidin，與 7-AAD 以區分死細胞，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀分析。

關於脾臟的分析，將脾臟細胞均勻分散至 staining buffer 內，以 PE-anti-CD21/35，PE-Cy7-anti-IgM，APC-anti-CD138，APC-Cy7-anti-IgD，eFluor® 450-anti-GL7，Brilliant Violet 605™-anti-B220 等抗體染色，再加入 7-AAD 區分死細胞，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀進行分析。

關於胸腺的分析，將胸腺細胞均勻分散至 staining buffer 內，以 FITC-anti-CD8，PE-anti-CD44，PerCP-eFluor® 710-anti-CD4，PE-Cy7-anti-CD25，APC-anti-CD24，eFluor® 450-anti-TCR β chain，biotin-anti-CD5 等抗體染色，再加入 Brilliant Violet 650™-streptavidin，與 fixable viability dye eFluor® 506 以區分死細胞，再以 2 % paraformaldehyde 固定細胞，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀分析。

3.17 骨髓腔內注射前驅 B 細胞後分析 L121-adj.對於前驅 B 細胞的分化的影響


取 CD45.1 小鼠之骨髓細胞，以 Brilliant Violet 605TM-anti-B220，PE-Cy7-anti-IgM，PerCP-eFluor® 710-anti-IgD 等抗體染色，再以 FACS Aria III 流式細胞分選儀分選出骨髓中 B220⁻IgM⁻IgD⁻ 之 B 細胞前驅細胞(35)，以 PBS 清洗過後，以 31G 針頭將 CD45.1 小鼠之 B 細胞前驅細胞注射至 CD45.2 小鼠之脛骨骨髓腔內，而 CD45.2 小鼠則於骨髓腔注射前以 240 mg/kg 之 tribromoethanol 以腹腔注射麻醉。在骨髓腔注射後，再以 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj 或是 PBS 皮下注射，兩天後犧牲 CD45.2 小鼠取出脾臟細胞，將脾臟細胞均勻分散至 staining buffer 內，以 FITC-anti-CD19，PE-anti-CD21/35，PE-Cy7-anti-IgM，Brilliant Violet 605TM-anti-B220，PE/DazzleTM 594-anti-CD45.2 與 Brilliant Violet 711TM -anti-CD45.1 染色後，再以 LSRFortessa 流式細胞儀進行分析。

3.18 分析 L121-adj.對骨髓中血液幹細胞分化的影響

將 100 μ l 含 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 於第 0 天與第 7 天注射至 C57BL/6 小鼠皮下，分別於第 2, 4, 6, 8, 10 天犧牲小鼠取出骨髓細胞，以未經處理之小鼠做為第 0 天控制組。將骨髓細胞均勻分散至 staining buffer 內，以 FITC-anti-Sca-1，PE-anti-lineage (lin) 包括以下抗體：(PE-anti-CD3，PE-anti-CD19，PE-anti-B220，PE-anti-CD11b，PE-anti-Gr-1，PE-anti-NK1.1，PE-anti-CD11c，以及 PE-anti-Ter119)。PerCP-eFluor® 710-anti-CD135，PE-Cy7-anti-CD127，APC-Cy7-anti-CD16/32，eFluor® 450-anti-CD117 等抗體染色等抗體染色，再加入 fixable viability dye eFluor® 506 以區分死細胞，再以 2% paraformaldehyde 固定細胞，並使用 LSRFortessa 流式細胞儀分析。

3.19 分析 L121-adj.對於 CLP 細胞分化能力的影響

為了測量 CLP 細胞受到 L121-adj.刺激後分化的改變，將 C57BL/6 小鼠的骨髓



細胞取出，以 FITC-anti-CD90.2，PE-anti-CD3，PE-anti-CD19，PE-anti-B220，PE-anti-CD11b，PE-anti-Gr-1，PE-anti-NK1.1，PE-anti-CD11c，PE-anti-Ter119，PerCP-Cy5.5-anti-Sca-1，APC-anti-CD127，APC-Cy7-anti-CD117 染色後，以 FACS Aria II 流式細胞分選儀分析，並分選出 $\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{CD117}^{\text{int}} \text{Sca-1}^{\text{int}} \text{CD90.2}^-$ 之 CLP 細胞(18)，以尾靜脈注射至 CD45.1 小鼠，CD45.1 小鼠預先經過 ^{137}Cs 放射儀器 (IBL 637, CIS bio international) 以 600 rad γ -放射線照射，再於皮下注射 100 μl 含有 100 μg OVA 之 L121-adj. 或是 PBS。之後於第二週開始每週由頷下靜脈採血以流式細胞儀分析。紅血球以 RBC lysis buffer 去除後，以 FITC-anti-CD45.1，PE-anti-B220，PE-Cy7-anti-CD3，PerCP-Cy5.5-anti-CD11b，APC-anti-CD45.2，APC-Cy7-anti-CD8 染色，再以流式細胞儀 FACSVerse 分析。

3.20 以 ELISA 測量注射 L121-adj.後小鼠血液中 G-CSF 濃度

為了分析血液中 G-CSF 受到 L121-adj.之影響，將 100 μl 含 100 μg OVA 之 L121-adjuvant 於第 0 天與第 7 天注射至 C57BL/6 小鼠皮下，分別於第 2, 4, 6, 8, 10 天犧牲小鼠，以心臟採血，並且以未經處理之小鼠做為第 0 天控制組，血液於 37 $^{\circ}\text{C}$ 待凝血完成後，以 2,000 g 離心一小時以去除血塊，取出血清後保存於 -80 $^{\circ}\text{C}$ (86)。血清中的 G-CSF 濃度以 G-CSF ELISA kit (Peprotech, 900-K103) 測量，為 sandwich ELISA。方法依照廠商建議，簡述如下：將 capture antibody (polyclonal rabbit anti-mouse G-CSF) 以 PBS 稀釋至 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，加入 ELISA 專用 96 孔盤(Nunc)，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 吸附隔夜，以 wash buffer 清洗過後，加入 blocking buffer 於室溫放置一小時後再洗去，加入經過 assay diluent 倍數稀釋的 G-CSF standard 與小鼠血清樣本，經室溫吸附兩小時後以 wash buffer 洗去，再加入以 assay diluent 稀釋至 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 detection antibody (biotinylated polyclonal rabbit anti-mouse G-CSF) 於室溫吸附兩小時後以 wash buffer 洗去，再加入 avidin conjugated horseradish peroxidase (HRP)，於室溫吸附 30 分鐘後以 wash buffer 洗去，最後加入 tetramethylbenzidine substrate

室溫反應 10 分鐘後加入 1M H₃PO₄ 終止反應，以 450 nm 讀取吸收值，並依 standards 計算血清中之 G-CSF 濃度。ELISA wash buffer 為 0.05% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate 溶於 PBS 中。ELISA blocking buffer 為 1% BSA 溶於 PBS 中。ELISA assay diluent 為 0.1% BSA 與 0.05% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate 溶於 PBS 中。


3.21 以小鼠血清體外培養 LSK、CMP、GMP 細胞與分析其分化

為了證明 L121-adj. 可透過血液調控影響血液幹細胞分化的影響，將 LSK(Lin⁻CD127⁻CD117⁺Sca-1⁺)、CMP(Lin⁻CD127⁻CD117⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32⁻)、GMP (Lin⁻CD127⁻CD117⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32⁺) 細胞自 C57BL/6 小鼠以 FACS AriaII 或是 FACS AriaIII 流式細胞分選儀分選出(20)，以含有 10% 注射過 L121-adj. 後第 2、4、6、8、10 天小鼠之血清與未經處理的小鼠血清的 RPMI 1640 培養基(另外加入 MEM NEAA 與 1 mM sodium pyruvate)培養 4 天後，以 staining buffer 清洗，將細胞均勻分散至 staining buffer 內，加入 APC-anti- Ly6G，PE-anti-F4/80，APC-Cy7-anti-CD11b，最後加入 7-AAD 去除死細胞，再以 LSRFortessa 流式細胞儀分析。

3.22 皮下注射部位切片組織免疫螢光染色以及細胞型態之顯微鏡觀察

為了觀察皮下注射部位中樹突細胞以及顆粒性白血球的細胞型態，將 100 μL L121-adj. 注射至 C57BL/6 小鼠皮下後第 2 天，取出皮下注射部位，以 PE-anti-CD11c 以及 APC-anti-Ly6G 抗體染色後，再加入 7-AAD 以區別死細胞，再以 FACS AriaII 流式細胞分選儀分選出 Ly6G⁺CD11c⁻ 以及 Ly6G⁻CD11c⁺ 細胞後，以 cytospin 4 離心機(Thermo Scientific)將細胞貼附於玻片上，並且以 Wright-Giemsa 染色，封片後以顯微鏡(Zeiss AxioImager. A1)觀察。

為了觀察皮下注射部位中樹突細胞以及顆粒性白血球的位置，將 100 μl



L121-adj.注射至 C57BL/6 小鼠皮下後第 2 天，取出皮下注射部位，以 OCT compound 包覆，冷凍保存，之後以冷凍切片機(LEICA, CM1900)切成厚度 10 μm 之薄片，貼附於玻片上後以 4 % paraformaldehyde 固定三十分鐘，再以 10% goat serum 作為 blocking reagent 一小時，以 PBS 洗去之後加入一抗[包含 1:20 之 anti-chicken egg albumin antibody，1:100 之 armenian hamster anti-mouse CD11c 與 1:100 之 rat anti mouse Gr-1)於 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存一夜，洗去之後再加入二抗(包含 1:100 之 Dylight 405 goat anti-armenian hamster IgG，1:20 之 TRITC goat anti-rabbit IgG 與 1:20 之 FITC goat anti-rat IgG)於室溫染色一小時後洗去，封片後以顯微鏡(Zeiss AxioImager. A1)觀察。

第四章 結果




4.1 注射含 L121-adj.與抗原 OVA 之疫苗能夠抑制 B16F10-OVA 黑色素細胞瘤之生長，與延長小鼠存活時間

為了研究 L121-adj.對於腫瘤細胞生長的影響，我們於 C57BL/6 小鼠背部皮下注射表現有 OVA 抗原之 B16F10 黑色素細胞瘤，於 20 天後腫瘤生長期到達指數期(約每兩天體積增長兩倍)，於腹側之皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 抗原之 L121-adj.或是 PBS 作為控制組，一組各 5 隻小鼠。圖一(A)為小鼠腫瘤體積在 6 天之內的變化。於第 0 天剛注射疫苗時，兩組之間的腫瘤大小並沒有差異，於第 2 天之後開始產生差異。注射 PBS 之控制組小鼠未能產生對抗腫瘤之免疫能力，故腫瘤以指數型生長；而注射 L121-adj.之小鼠可以顯著性的延緩腫瘤細胞的生長，證明與過去文獻所指出的有相同的抑制腫瘤細胞生長功效(5)。圖一(B)為小鼠存活率之變化，注射含有 L121-adj.之組別在 6 天之內並無任何小鼠死亡；而注射 PBS 之組別在第 4 天出現小鼠死亡的情形，進一步在第 6 天因為小鼠腫瘤體積過大(超過 4,000 mm^3 實驗終點基準值)，視為實驗終結點(5)。證明 L121-adj.可以讓小鼠產生對抗腫瘤之免疫反應。

4.2 注射含 L121-adj.與抗原 OVA 之疫苗能夠於一周之內產生抗原專一性之 T 細胞毒殺免疫反應(CTL)

如圖一(A)所示，注射 L121-adj.與抗原 OVA 可在短時間內產生抑制腫瘤細胞生長的效果，為了進一步證實此疫苗佐劑能夠產生抗原專一性之 T 細胞毒殺免疫反應，我們利用過去文獻所建立的測量方式(82)，使用帶有 SIINFEKL 且標定以 CFSE^{high} 與不帶有抗原且標定以 CFSE^{low} 之 CD45.1 脾臟細胞測量專一性細胞毒殺反應。於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 抗原之 L121-adj.，分別於第 2、4、6、8、10、12、14 天犧牲小鼠分析脾臟中 T 細胞毒



殺的能力，以未經處理之小鼠作為第 0 天控制組。結果表示於圖二(A)中，以曲線直方圖(histogram)呈現，其中 CFSE^{high} 之細胞為帶有 SIINFEKL 之細胞，可被抗原專一性毒殺 T 細胞所辨認而殺死，數目減少越多代表毒殺能力越強，而標定 CFSE^{low} 之細胞則未經 SIINFEKL 處理，不會被毒殺 T 細胞所殺，作為相對數量基準，以計算 T 細胞毒殺能力。其中以第 6 天及第 12 天 CFSE^{high} 細胞數目減少的最多，顯示有較好的細胞毒殺反應。

圖二(B)為四次獨立試驗計算統計之後的結果，含有 L121-adj.在注射後的第 0 天與第 2 天無法測得任何 T 細胞毒殺反應，於第 4 天可測得 T 細胞毒殺比例至 10% 之微量反應(p=0.08)，於第 6 天達到 75%之尖峰值。然而在經過第 7 天注射第二針之疫苗佐劑，第 8 天與第 10 天所測得之 T 細胞毒殺反應下降至 24%與 31%，可能為過度活化，導致細胞活性下降之暫時現象。然而在第 12 天所測得之 T 細胞毒殺反應再度上升至 75%之尖峰值，於第 14 天所測得之 T 細胞毒殺反應再度下降至 36%。以上結果與腫瘤生長實驗中的結果相符，顯示含有 L121-adj.之疫苗可在短時間內產生抗原專一性毒殺 T 細胞之免疫反應，並且抑制腫瘤細胞的生長。另一方面，由以上結果我們發現，只要給予一劑 L121-adj.與 OVA，就能於第 6 天產生高量的抗原專一性毒殺 T 細胞反應，且毒殺性 T 細胞反應高峰期皆在注射疫苗後之第 5 至第 6 天。

此外，為了進一步證明 CD8⁺ T 細胞受到 L121-adj.的刺激而活化，我們取出注射 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.或是 PBS 後第 10 天 C57BL/6 小鼠之脾臟，加入 SIINFEKL 於體外再活化，以及加入 brefeldin A 抑制細胞激素的分泌，之後以流式細胞儀偵測分析 CD8⁺ T 細胞之 IFN- γ ，IL-2，granzyme B 以及 TCR- β ，以證明 CD8⁺ T 細胞之活化，結果呈現於附錄圖一中。



4.3 注射 L121-adj.促使顆粒性白血球與單核細胞離開骨髓

為了分析 L121-adj.對骨髓中細胞分化的影響。我們於第 0 天與第 7 天注射 L121-adj.與 OVA 於 C57BL/6 小鼠皮下，然後在第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠，以未經處理之小鼠作為第 0 天控制組，以流式細胞儀分析。圖三(A)為流式細胞儀分析骨髓中髓細胞之 pre-gating 分析方法。首先以 FSC-A 及 SSC-A 選出主要細胞群，再以 FSC-A 及 FSC-H 選出單顆細胞(single cells)，選出 7-AAD⁻之活細胞以去除死細胞，再選出 B220⁻CD11b⁺髓細胞(myeloid cells)後，以 Gr-1 及 CD115 為軸，分為三群細胞，分別為 CD115⁻Gr-1^{high}，CD115^{low}Gr-1^{int}，CD115⁻Gr-1⁻，其中 CD11b⁺Gr-1^{high}CD115⁻為 Ly6C^{int}顆粒性白血球(granulocytes)。另外，Gr-1^{int}圈選出後，以 Ly6C 及 CD115 為軸，可再分為三群細胞，分別為 CD11b⁺Gr-1^{int}Ly6C^{high}CD115^{low}，CD11b⁺Gr-1^{int}Ly6C^{int}CD115⁻，CD11b⁺Gr-1^{int}Ly6C⁻CD115⁻等三群細胞，其中 CD11b⁺Gr-1^{int}Ly6C^{high}CD115^{low}為單核細胞(monocytes) (87)。

圖三(B)為以 Gr-1 及 CD115 分析骨髓中 7-AAD⁻B220⁻CD11b⁺髓細胞。注射 L121-adj.後第 2 天 CD115⁻Gr-1^{high}顆粒性白血球大量減少，在第 4 及第 6 天回復正常值，經過第 7 天第二次注射 L121-adj.後，於第 8 天顆粒性白血球再度大量減少，於第 10 天再度回升。

圖三(C)為以 Ly6C 及 CD115 分析骨髓中 7-AAD⁻B220⁻CD11b⁺Gr-1^{int}細胞。注射 L121-adj.後，Ly6C^{high}CD115^{low}單核細胞與顆粒性白血球有類似的變化，於第 2 天及第 8 天暫時性減少。

圖三(D)為加入 microbeads 作為 internal control，計算細胞絕對數量，經統計分析呈現骨髓中 CD11b⁺CD115⁻Gr-1^{high}顆粒性白血球在注射 L121-adj.後，隨時間的細胞數量變化。顯示在第 2 天及第 8 天顆粒性白血球暫時性減少後，於第 4、6、10 天會產生代償性的增加。

圖三(E)為 CD11b⁺Gr-1^{int}Ly6C^{high}CD115^{low-neg}單核細胞細胞數目隨時間的變化，與顆粒性白血球相似，於第 2、8 天注射 L121-adj.後暫時減少。

圖三(F)為 $CD11b^+Gr-1^{int}Ly6C^{int}$ 細胞數目隨時間的變化，與顆粒性白血球與單核細胞受到 L121-adj. 刺激於第 2、8 天減少不同， $CD11b^+Gr-1^{int}Ly6C^{int}$ 細胞反而在注射 L121-adj. 後短期內於第 2、8 天增加，於 4、6 天減少，恰好與顆粒性白血球與單核細胞之變化相反。此外，於附錄圖二中，我們將 $CD11b^+Gr-1^{int}Ly6C^{int}$ 細胞自骨髓中以流式細胞分選儀分選出來後以 Wright-Giemsa 染色後以顯微鏡觀察細胞型態外觀，發現 $CD11b^+Gr-1^{int}Ly6C^{int}$ 細胞為 meta-myelocyte 為顆粒性白血球的前驅細胞(88)。此外，以含有 10 ng/ml GM-CSF 以及 10% FBS 之 RPMI 培養基培養 $CD11b^+Gr-1^{int}Ly6C^{int}$ 細胞後四天，再次以 Wright-Giemsa 染色觀察細胞型態外觀，證實可以分化為顆粒性白血球。顆粒性白血球於注射 L121-adj. 後第二天的減少，與 meta-myelocyte 的增加相關，顯示 meta-myelocyte 之增加為代償性反應，導致注射 L121-adj. 後第 4、6 天顆粒性白血球的增加。

$CD11b^+CD115^-Gr-1^-$ 以及 $CD11b^+Gr-1^{int}Ly6C^-CD115^-$ 兩群細胞的數目則沒有受到 L121-adj. 刺激的影響而有明顯改變，故呈現於附錄圖三中。

4.4 注射 L121-adj. 促使脾臟中顆粒性白血球增加，並且表現出 F4/80 表面抗原

為了證明骨髓中的顆粒性白血球受到 L121-adj. 刺激後，會離開骨髓移動到脾臟中，除了分析骨髓中的顆粒性白血球之外，我們亦分析脾臟中的顆粒性白血球。圖四(A)為以 Ly6G 及 CD11c 分析注射 L121-adj. 後第 2 天及第 3 天脾臟中顆粒性白血球($Ly6G^+$)與樹突細胞($CD11c^+$)，注射 L121-adj. 使脾臟中顆粒性白血球大量增加，與注射 PBS 及 OVA 之控制組相比，第 2 天的顆粒性白血球由 1.79% 上升至 5.11%，第 3 天則略降至 3.87%，脾臟中顆粒性白血球的增加與骨髓中顆粒性白血球的減少相符，證明注射 L121-adj. 會使顆粒性白血球快速的由骨髓轉移至脾臟中。L121-adj. 除了使脾臟中的顆粒性白血球增加之外，亦改變顆粒性白血球分化的改變。

圖四(B)為以 CD11b 及 F4/80 分析脾臟中 $Ly6G^+CD11c^-$ 顆粒性白血球之代表

圖，顆粒性白血球皆為 CD11b⁺，注射 PBS 與 OVA 之控制組顆粒性白血球表現少量 F4/80 表面抗原，然而在注射 L121-adj.與 OVA 之後的第 2 天及第三天，顆粒性白血球開始提升表現 F4/80 表面抗原。

圖五(A)為以 Ly6G 及 CD11c 分析離疫苗注射部位最近的腹股溝淋巴結 (draining lymph node) 中的顆粒性白血球與樹突細胞，顆粒性白血球在淋巴結中相當稀少，即使注射 L121-adj.後第 2 天及第 3 天也未見增加。

圖五(B)中為以 CD11b 及 F4/80 分析淋巴結中顆粒性白血球的分化改變，與脾臟中的顆粒性白血球有相同的變化，注射 PBS 與 OVA 之控制組當中的顆粒性白血球不表現 F4/80 表面抗原，然而在注射 L121-adj.後第 2 天及第 3 天，顆粒性白血球表現出 F4/80 表面抗原。證明 L121 疫苗佐劑除了影響顆粒性白血球使之轉移到脾臟及局部注射位置之外，並使之分化改變。

4.5 注射 L121-adj.增加顆粒性白血球與樹突細胞的輸送抗原至淋巴結中

為了瞭解 L121-adj.對於抗原於體內分布的影響，將標定有 FITC 螢光之 OVA 抗原，與 L121-adj.或是 PBS 混和，皮下注射至 C57BL/6 小鼠，並且於第 2 天與第 3 天分析腹股溝淋巴結中的樹突細胞與顆粒性白血球是否有吞噬帶有 FITC 螢光的 OVA。圖六(A)為淋巴結中顆粒性白血球注射含有 FITC 標定之 OVA 後第 2 天與第 3 天，分析帶有 FITC 螢光之顆粒性白血球的比例，以未經處理不帶螢光之小鼠細胞作為 FITC 螢光判斷基準。注射 L121-adj.後的顆粒性白血球帶有較高比例的 FITC 螢光，證明 L121-adj.會增加顆粒性白血球吞噬抗原的能力。而注射 PBS 的組別，則幾乎沒有顆粒性白血球帶有 FITC 螢光。

圖六(B)為淋巴結中樹突細胞帶有 FITC 螢光的比例，以未經處理不帶螢光之小鼠細胞作為 FITC 螢光判斷基準。注射 L121-adj.會增加樹突細胞帶有 FITC 螢光的比例，證明 L121-adj.會增加樹突細胞吞噬抗原的能力。顆粒性白血球與樹突細胞相比，注射 L121-adj.後顆粒性白血球有較高的抗原吞噬能力，於第 2 天達到

11.9%的比例帶有螢光，卻在第3天下降至3.59%，而樹突細胞在第2天有4.73%帶有螢光的比例，到第3天仍然維持4.75%，並未如顆粒性白血球細胞減少。顯示顆粒性白血球是較好的吞噬細胞，主要功能在於清除外來抗原，而樹突細胞雖然吞噬能力不如顆粒性白血球，卻能攜帶抗原較長時間，以利抗原呈現，與過去文獻相符(89)。

4.6 注射 L121-adj.吸引顆粒性白血球與樹突細胞浸潤局部注射位置，並且使樹突細胞獲得抗原呈現的能力

由於 L121-adj.與 OVA 注射於皮下位置，故只有注射位置中的抗原呈現細胞能夠吞噬抗原且進行抗原呈現。為了證明免疫細胞能夠受到注射 L121-adj.的影響而移動到注射部位，我們取出皮下注射位置之細胞以流式細胞儀分析。圖七(A)為分析注射 L121-adj.第1、2、3天後，分析注射部位皮膚中顆粒性白血球(Gr-1^+)與樹突細胞(CD11c^+)之代表圖。注射 L121-adj.後，顆粒性白血球與樹突細胞大量增加。注射 PBS 與 OVA 則不會造成局部組織免疫細胞的浸潤，證明注射 L121-adj.所導致之發炎反應使顆粒性白血球離開骨髓，轉移至局部注射之皮下位置。

除此之外，如圖七(B)所示，以 MHC-I-SIINFEKL 抗體分析局部注射位置中的顆粒性白血球(Gr-1^+)與樹突細胞(CD11c^+)，該抗體能夠專一性的辨認抗原呈現細胞經由 MHC-I 所呈現的 SIINFEKL 胜肽片段(90)，SIINFEKL 為 OVA 中的八個胺基酸片段且能夠由毒殺性 T 細胞所辨認而活化(91)。注射 PBS 與 OVA 之皮膚中的顆粒性白血球與樹突細胞不會表現出 MHC-I-SIINFEKL，以虛線表示，並且與同一時間點的注射 L121-adj.做比較。注射 L121-adj.之顆粒性白血球與樹突細胞的 MHC-I-SIINFEKL 以實線做表示。注射 L121-adj.第1天後，樹突細胞未表現出 MHC-I-SIINFEKL，而第2天與第3天後開始表現高量的 MHC-I-SIINFEKL。然而，顆粒性白血球只有在注射 L121-adj.後第2天表現出少量的 MHC-I-SIINFEKL，顯示樹突細胞是較好的抗原呈現細胞。

圖七(C)為計算皮下注射部位中 CD11c⁺以及 Gr-1⁺細胞數目受到 L121-adj. 刺激的變化，證明注射 L121-adj. 能夠吸引大量之 CD11c⁺以及 Gr-1⁺細胞至局部注射部位。此外，為了瞭解局部注射部位中 CD11c⁺以及 Gr-1⁺細胞型態的變化，我們以流式細胞分選儀分選出 CD11c⁺以及 Gr-1⁺細胞後，以 cytopsin 離心至玻片上，以 Wright-Giemsa 染色，再以顯微鏡觀察，結果呈現於圖七(D)，我們發現注射 L121-adj. 除了增加注射部位中 CD11c⁺以及 Gr-1⁺細胞數量之外，也會導致細胞中產生大量的囊泡，我們推測可能與增加細胞的吞噬抗原有關。

為了證明注射 L121-adj. 能夠吸引 CD11c⁺以及 Gr-1⁺細胞至局部注射部位，我們於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj. 或是 PBS，兩天後取下注射部位以冷凍切片機切成厚度 10 μ m 之薄片，分別以 hematoxylin 與 eosin(H&E)染色，或是以螢光抗體染色以觀察注射部位中的 CD11c⁺以及 Gr-1⁺細胞。如圖八(A)所呈現，我們發現注射 L121-adj. 會導致局部注射部位的腫脹，導致皮膚的增厚情形，此外免疫螢光染色的結果呈現於圖八(B)，我們發現不管注射 L121-adj. 或是 PBS 都可以看到 OVA 分散於皮下組織之中，然而只有注射 L121-adj. 能夠誘使 CD11c⁺以及 Gr-1⁺細胞聚集至局部注射部位。

為了進一步證實顆粒性白血球與樹突細胞的抗原呈現能力，將注射含有 OVA 之 L121-adj. 與 PBS 控制組之局部注射位置中的顆粒性白血球細胞(Ly6G⁺ CD11b⁺) 與樹突細胞(CD11c⁺) 利用流式細胞分選儀分選出後，與純化後且標記有 CFSE 的 OT-I CD8⁺ T 細胞一併經由靜脈打入 CD45.1 小鼠，於 3 天後取出脾臟分析 OT-I CD8⁺ T 細胞的 CFSE 稀釋情形，CFSE 的螢光稀釋次數及為 T 細胞複製分裂次數，每分裂一次，CFSE 螢光亮度會減半，故以此方法分析 T 細胞活化與複製的程度 (85)。

如圖九(A)所示，為以 CD45.1⁻CD45.2⁺ CD8⁺ TCRV β 5⁺ 7-AAD⁻ 圈選出所打入之 OT-I CD8⁺ T 細胞，分析其 CFSE 螢光稀釋程度。結果顯示來自注射 L121-adj. 注射位置之樹突細胞有最好的抗原呈現能力，其 CFSE 稀釋的程度也最明顯，共經

過五次的分裂，證明 L121-adj. 主要透過樹突細胞作為抗原呈現細胞活化毒殺性 T 細胞。注射 PBS 與 OVA 注射位置之樹突細胞相較之下 CFSE 稀釋程度不明顯。另一方面，來自注射過 L121-adj. 之局部注射位置的顆粒性白血球可引發些微的 T 細胞活化，CFSE 稀釋程度亦不明顯。而注射 PBS 與 OVA 後的顆粒性白血球則沒有任何 T 細胞活化的能力。

將 CFSE 螢光稀釋情形以 Flowjo 軟體分析以計算 division index 以量化 OT-I CD8⁺ T 細胞的活化程度，呈現於圖九(B)中，我們發現注射 L121-adj. 後能夠引發樹突細胞有最好的活化效果，而注射 L121-adj. 後之顆粒性白血球與注射 PBS 後之樹突細胞之間並沒有統計顯著差異，但是都較注射 PBS 之顆粒性白血球還好。這些結果顯示 L121-adj. 能夠略為提升顆粒性白血球的抗原呈現能力，但仍然不是主要機制，L121-adj. 主要是透過樹突細胞作為抗原呈現機制。

4.7 以 1A8 單株抗體能夠有效減少體內顆粒性白血球的數量，在施打疫苗前去除體內顆粒性白血球能夠增加毒殺性 T 細胞的活性

為了瞭解顆粒性白血球在引發毒殺性 T 細胞機制中所扮演的角色，利用 anti-mouse Ly6G (1A8) 單株抗體來去除體內顆粒性白血球後，再測試毒殺性 T 細胞活性的變化。分別於第 0 天與第 7 天於小鼠皮下注射含有 OVA 之 L121-adj. 或是 PBS 控制組，且在其前 1 天事先腹腔注射打入 anti-mouse Ly6G(1A8) 單株抗體。最後於第 11 天測量體內毒殺 T 細胞活性，測量方法為以經過 CFSE 標定以及處理 SIINFEKL 後的 CD45.1 細胞作為目標細胞，於體內測量 CTL 活性。

圖十(A)為於第 11 天測量毒殺 T 細胞活性的同時，以 CD11b 及 Gr-1 分析脾臟中顆粒性白血球的數量。注射 PBS 與 OVA 的組別脾臟中有 4.27% 的 CD11b⁺Gr-1⁺ 顆粒性白血球，經過 1A8 注射後 5 天，顆粒性白血球仍然較少，脾臟中有 2.02% 的 CD11b⁺Gr-1⁺ 顆粒性白血球。注射 L121-adj. 與 OVA 的組別脾臟中的 CD11b⁺Gr-1⁺ 顆粒性白血球增加至 13.7%，經過 1A8 注射後，顆粒性白血球減少至 7.22%。證明

1A8 抗體能夠有效減少體內顆粒性白血球的數量，效果維持至少 5 天。

圖十(B)為注射 L121-adj.或是 PBS 與 OVA 後的第一天，以 CD11b 及 Ly6G 分析血液中 CD11b⁺ Ly6G⁺顆粒性白血球的數量。注射 PBS 與 OVA 後血液中的顆粒性白血球為 5.46%，經過 1A8 注射後第 2 天，血液中的顆粒性白血球降至 0%，證明 1A8 能夠有效暫時去除體內顆粒性白血球。注射 L121-adj.與 OVA 後血液中的顆粒性白血球上升至 26.5%，以 1A8 去除顆粒性白血球 2 天後，血液中的顆粒性白血球仍有 18.9%，雖然未能完全去除，仍然可以有效減少體內顆粒性白血球的數量。

圖十(C)為以標記有 CFSE 之 CD45.1 脾臟細胞做為目標細胞測試毒殺 T 細胞活性的結果，取三次重複試驗中一次做為代表。注射 PBS 與 OVA 並未產生細胞毒殺反應使 CFSE^{high} 細胞減少，以 1A8 去除顆粒性白血球亦未造成影響。而注射 L121-adj.與 OVA 則有效產生細胞毒殺反應而減少 CFSE^{high} 細胞，再以 1A8 去除顆粒性白血球則更進一步減少 CFSE^{high} 細胞，加強了細胞毒殺反應。

圖十(D)為經統計後之細胞毒殺率，注射 PBS 與 OVA 無法產生有效毒殺 T 細胞反應，而注射 L121-adj.與 OVA 則能產生 57%之細胞毒殺反應，再以 1A8 去除顆粒性白血球則使細胞毒殺反應提升至 82%。以上結果顯示 L121-adj.主要不是透過顆粒性白血球來活化 CD8⁺ T 細胞產生專一性毒殺細胞反應。

為了瞭解顆粒性白血球是否會抑制 CD8⁺ T 細胞的活化，我們將 CD45.1 小鼠於皮下注射 100 μg OVA 以及 100 μL L121-adj.或是 PBS，兩天後取出脾臟，以流式細胞分選儀分選出 CD11b⁺Ly6G⁺顆粒性白血球，此外，CD8⁺ T 細胞分離自 C57BL/6 小鼠脾臟，並且經過 negatively selection 純化，並且標記有 CFSE 螢光，之後以 CD3 及 CD28 抗體活化，並且與不同比例之顆粒性白血球共同培養 72 小時後，以流式細胞儀分析其 CFSE 因活化增生而稀釋的情形。結果呈現於附錄圖四中，我們發現顆粒性白血球並不會直接抑制 CD8⁺ T 細胞的活化。

4.8 注射 L121-adj. 影響骨髓內 B 細胞的分化，減少骨髓內前驅 B 細胞的數量

過去研究文獻曾經發現，注射疫苗佐劑如 incomplete Freund's adjuvant (IFA) 所引起的發炎反應會影響骨髓中 B 細胞的分化，減少骨髓中的 B 細胞(92)，使之離開骨髓轉移至周邊組織(93, 94)。為了瞭解 L121-adj. 是否會產生類似的發炎效果影響 B 細胞的分化，與更詳盡的分析 L121-adj. 對於不同的前驅 B 細胞是否會有不同的影響，我們將前驅 B 細胞區分為：pre-pro B (Fraction A, Dump⁻B220⁺CD43⁺CD24⁻BP-1⁻), pro B (Fraction B/C, Dump⁻B220⁺CD43⁺CD24⁺BP-1^{+/-}), pre B (fraction D, Dump⁻B220⁺CD43⁻IgM⁻IgD⁻), immature B (fraction E, Dump⁻B220⁺CD43⁻IgM⁺IgD⁻), 與 mature B (Fraction E, Dump⁻B220⁺CD43⁻IgM^{+/-}IgD⁺) 等五群細胞(65, 95)。

圖十一(A)為以流式細胞儀分析骨髓內前驅 B 細胞之分析方法，以未經處理之控制組作為代表。先以 FSC-A 及 SSC-A 圈選出主要細胞群，再以 FSC-A 及 FSC-H 圈選出單顆細胞，以 7-AAD 及 dump 去除其他非 B 細胞，圈選出 7-AAD⁻dump⁻細胞，再以 B220 及 CD43 為軸分析。骨髓中的 B 細胞利用 CD43 可分為 B220⁺CD43⁺ 與 B220⁺CD43⁻，其中 B220⁺CD43⁺ 為較上游之前驅 B 細胞，以 CD24 及 BP-1 分析，可區分 pre-pro B 細胞(CD24⁻BP-1⁻) 與 pro B 細胞(CD24⁺BP-1^{+/-})。另一方面 B220⁺CD43⁻ 為較下游相對成熟之 B 細胞，以 IgM 及 IgD 可區分 pre B 細胞(IgM⁻IgD⁻)、immature B 細胞(IgM⁺IgD⁻)、mature B 細胞(IgM^{+/-}IgD⁺)。

圖十一(B)為接受 L121-adj. 皮下注射之小鼠在不同天的時間後，分析 B220⁺CD43⁺ 中 pre-pro B 細胞與 pro B 細胞的相對變化。Pro B 細胞在注射 L121-adj. 後相對逐漸減少，直到第 8 天回復後，再次於第 10 天後減少。

圖十一(C)為接受 L121-adj. 皮下注射之小鼠在不同天的時間後，分析 B220⁺CD43⁻ 中 pre B 細胞、immature B 細胞、mature B 細胞的相對變化，mature B 細胞在注射 L121-adj. 後第 4 天減少後回升，再次於第 10 天減少。為了精確計算各群細胞之精確絕對數量，我們加入 beads 做為 internal control。

接受 L121-adjuvant 皮下注射之小鼠在不同天的時間後 B 淋巴球前驅細胞之絕

對數量變化如圖十一(D)所示，並以未經處理之控制組(第 0 天)之細胞數量作為基準 100%，計算不同天數時各別細胞相對第 0 天之改變百分比。

圖十一(D-a)為 pre-pro B 細胞在注射 L121-adj.後，在第 2 天細胞數量降低至 68%，第 4 天沒有改變維持在 66%，然而在第 6 天時開始復原，細胞數量提升至 83%，然而在第 7 天接受第二劑 L121-adj.後，pre-pro B 細胞在第 8 天又再度下降至 65%，可見 pre-pro B 細胞會在受到 L121-adj.的刺激下，減少細胞的數量，並且在約莫一周後開始回復。

圖十一(D-b)為 pro B 細胞在接受 L121-adj.刺激之後，細胞數量在 2、4、6 天分別下降至 52%、36%、與 31%，然而卻在第 7 天接受第二劑之 L121-adj.之刺激後，於第 8、10 天 pro B 細胞數量提升至 65%、67%，由於 pro B 細胞由 pre-pro B 細胞分化而來，第 8 天 pro B 細胞的增加可能是由於 pre-pro B 細胞分化增加所致，與第 8 天 pre-pro B 細胞的減少結果相符。

圖十一(D-c)為 pre B 細胞在施打 L121-adj.後第 2 天減少至 30%，然而在第 4 天回升至 54%，又在第 6 天與第 8 天下降至 29%與 14%，於第 10 天則維持在 20%。

圖十一(D-d)為 immature B 細胞的變化，類似於 pre B 細胞，於第 2 天下降至 49%，在第 4 天回升至 62%，接下來則於第 6、8、10 天持續下降至 38%、23%、17%。由於 pre B 細胞與 immature B 細胞為 pro B 細胞分化而來，第 4 天回升的現象可能為 pro B 細胞分化增加所導致。

圖十一(D-e)為 mature B 細胞在受到 L121-adj.刺激後，在第 2 天及第 4 天逐步下降至 36%與 9%，然而卻在第 6 天及第 8 天快速的回升至 71%及 67%。由於 mature B 細胞為由 pre B 細胞與 immature B 細胞分化而來，第 6 天與第 8 天的回升現象可能與這兩群細胞分化增加所致，與其在第 4 天至第 10 天持續性的減少現象相符，亦有可能為周邊成熟之 B 細胞回到骨髓所致，而在接受第 7 天 L121-adj.再度刺激後，mature B 細胞再度於第 10 天減少至 5%。

圖十一(E-a)為將接受 L121-adj.刺激後，五群 B 淋巴球前驅細胞數量加總而

成，即所有 B 細胞在骨髓裡的總數隨時間的變化，我們發現 L121-adj. 會導致骨髓中的 B 細胞數量快速的下降，維持 4 天後才停止下降，於第 6 天回升，然而在第 7 天給予第二劑的 L121-adj. 會再度使 B 細胞減少，於第 10 天再度達到與第 4 天相同的低點，也都是在注射 L121-adj. 之後的 3 到 4 天。為了測試 alum 是否也會達到相同的結果，我們一樣於第零天與第七天，以皮下注射 100 μ L 之 alum 後，分析骨髓中 B 細胞的變化。

如圖十一(E-b)所示，我們發現 alum 一樣會導致 B 細胞數目的減少，且隨時間的變化趨勢與注射 L121-adj. 之組別相仿，顯示不同疫苗佐劑之間效果的共通性，注射疫苗佐劑所導致之發炎反應皆會影響骨髓中 B 細胞的分化。

4.9 注射 L121-adj. 促進脾臟中 B 細胞的分化，使 marginal zone B 細胞的數量增加，並且產生 germinal center B 細胞與 plasma B 細胞。

骨髓是 B 淋巴球發育的器官，未成熟的 B 細胞會轉移到脾臟中，成為 transitional B 細胞再行分化成 marginal zone B 細胞或是 follicular B 細胞(66)。因此我們進一步分析脾臟中 B 淋巴球分化的情形，將脾臟中 B220⁺ B 細胞區分成三大群 B 細胞，分別為 transitional B 細胞(B220⁺IgM^{high}CD21/35^{low})，follicular B 細胞(B220⁺IgM⁺CD21/35⁺)，marginal zone B 細胞(B220⁺IgM^{high}CD21/35^{high})等三群細胞(43, 96)，與 germinal center B 細胞(B220⁺GL7⁺)(97)，還有 plasma B 細胞(B220^{+/-}CD138⁺)(98)。

圖十二(B)為以 CD21/35 與 IgM 分析脾臟中 B220⁺ 中三群 B 細胞受到 L121-adj. 影響後隨時間變化的代表圖，圖中所示為相對比率之變化。其中最顯著的變化就是 transitional B 細胞於第 2 天短暫增加後減少，與 marginal zone B 細胞比例的增加。

圖十二(C)為以 CD138 分析脾臟中 plasma B 細胞隨時間變化的代表圖，我們發現在經過第 7 天第二次注射 L121-adj. 後，第 8 天開始出現 plasma B 細胞，於第

10 天達到高點。顯示 L121-adj. 在 10 天之內可以使脾臟 B 細胞分化成 plasma B 細胞。

圖十二(D)為以 GL7 與 B220 分析脾臟中 germinal center B 細胞在施打 L121-adj. 後隨時間的比例變化，我們發現 germinal center B 細胞與 plasma B 細胞類似，都在第 8 天開始增加，第 10 天達到高點。為求細胞準確數量，我們一樣加入 beads 精算脾臟中各群 B 細胞數量的變化。

如圖十二(E-a)所示，transitional B 細胞在第 2 天增加至 138%，其後開始隨時間於第 4、6、8 下降至 74%、58%、67%，直到第 10 天停止下降回升至 90%。Follicular B 細胞數目的變化呈現於圖十二(E-b)中，follicular B 細胞在注射 L121-adj. 後分別於第 2 及 8 天提升至 115% 以及 126%，之後即略為下降，我們推測可能為 follicular B 細胞可於不同免疫器官之間循環，導致脾臟中 follicular B 細胞數量相對穩定。此外，圖十二(E-c)為 marginal zone B 細胞在注射 L121-adj. 後，在第 8 天達到顯著性的增加至 177%。Transitional B 細胞於第 2 天的增加與骨髓中 B 淋巴球前驅細胞的減少相符，顯示 L121-adj. 可促進骨髓中前驅 B 細胞轉移至脾臟中成為 transitional B 細胞，而 transitional B 細胞後續的減少與 marginal zone B 細胞以及 follicular B 細胞的增加相符，顯示 L121-adj. 可促進 transitional B 細胞分化成 marginal zone B 細胞以及 follicular B 細胞。

B 細胞受到抗原呈現細胞的刺激後可分化成 germinal center B 細胞與 plasma B 細胞開始產生抗體(99)。圖十二(E-d)即為 germinal center B 細胞受到 L121-adj. 刺激後隨時間的數量變化，我們發現在第 2 天至第 6 天之間沒有顯著變化，直到第 8 天開始有些微的增加至 121%，且於第 10 天達到顯著性的增加至 252%。

圖十二(E-e)為 plasma B 細胞受到 L121-adj. 刺激後隨時間的變化，與 germinal center B 細胞類似，於第 8 天增加至 255%，且於第 10 天顯著性的提高至 560%，顯示 L121-adj. 可以刺激脾臟中之 B 細胞活化成 germinal center B 細胞，再進一步分化成能夠產生抗體的 plasma B 細胞。



4.10 注射 L121-adj.促使骨髓中前驅 B 細胞轉移到脾臟中分化成 transitional B 細胞

為了證明骨髓中前驅 B 細胞會受到 L121-adj.的影響轉移到脾臟之內，我們將 CD45.1 小鼠骨髓中的前驅 B 細胞($B220^+IgM^-IgD^-$)利用流式細胞分選儀 FACS Aria III 分選出來(35, 65)，注射至 CD45.2 小鼠骨髓腔內，並且於皮下注射 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.或是 PBS，並且於 2 天後分析脾臟中所打入之 CD45.1 細胞。圖十三(A)為經過圈選出 $CD45.2^-CD45.1^+$ 細胞群後，以 B220 及 CD19 分析，不管注射 PBS 或是 L121-adj.後，前驅 B 細胞所分化成的細胞大部分為 $B220^+CD19^+$ B 細胞，小部分為 $B220^+CD19^{low}$ B 細胞，顯示注射 L121-adj.不會改變前驅 B 細胞之分化方向，前驅 B 細胞只會分化成 B 細胞。圖十三(B)為經過圈選出 $CD45.2^-CD45.1^+$ 細胞群後，以 IgM 及 CD21/35 分析，注射 L121-adj.使 transitional B 細胞($B220^+IgM^{high} CD21/35^{low}$)增加，證明 L121-adj.會使骨髓中的前驅 B 細胞轉移到脾臟中，因此導致骨髓中前驅 B 細胞減少，與脾臟中 transitional B 細胞增加。

4.11 注射 L121-adj.影響胸腺 T 細胞的分化，並且使胸腺 T 細胞減少

T 細胞的發展與成熟受到精密的調控，首先，骨髓中的 T 細胞前驅細胞(early T cell progenitor)會經由血液循環移動到胸腺中，成為 DN1 細胞($CD4^+CD8^-CD44^+CD25^-$)，再分化成 DN2 細胞($CD4^-CD8^-CD44^+CD25^+$)，DN3 細胞($CD4^-CD8^-CD44^-CD25^+$)，DN4 細胞($CD4^+CD8^-CD44^-CD25^-$)，之後才成為 DP 細胞($CD4^+CD8^+$)，再分化為成熟的 CD4 SP 細胞($CD4^+CD8^-$)或是 CD8 SP 細胞 ($CD4^-CD8^+$)進入血液循環移動至周邊淋巴器官(55)。為了分析 L121-adj.所引發之發炎反應對於胸腺中 T 細胞分化的影響，我們以 CD4、CD8、CD25、CD44 分析注射 L121-adj.後不同時間點胸腺中的 T 細胞分化的情形。

圖十四(A)為以流式細胞儀分析胸腺 T 細胞方法的示意圖，以未經處理之控制

組作為代表。首先以 FSC-A 及 FSC-H 圈選出單顆細胞，再圈選出 viability dye negative 之活細胞，再以 CD4 及 CD8 分為五群細胞，分別為：CD4 SP，CD8 SP，DP^{dull}(CD4⁺CD8⁺)，DP^{bright}(CD4^{bright}CD8^{bright})與 DN(CD4⁻CD8⁻)。其中 DN 細胞可再以 CD25 及 CD44 區分，分別為：DN1 細胞，再分化成 DN2，DN3，DN4 等四群細胞(100)。

圖十四(B)為注射 L121-adj.後，以 CD4 及 CD8 分析經過不同時間後胸腺中 T 細胞分化的變化情形。經過第一劑 L121-adj.注射後 2 天，DP^{dull} 細胞的比例開始降低，而 DP^{bright} 細胞的比例則開始上升，顯示 L121-adj.驅使 DP^{dull} 細胞分化為 DP^{bright} 細胞。至第 4 天時，DP^{bright} 細胞的比例開始下降，CD4 SP 細胞比例則持續逐漸上升，顯示 DP^{bright} 細胞持續分化成熟為 CD4 SP 細胞。於注射 L121-adj.第 6 天後，胸腺中各群 T 細胞比例回歸至未注射之前相同的比例，顯示 L121-adj.影響胸腺 T 細胞分化的效果可維持 6 天。然而，於第 7 天注射第二劑 L121-adj.後，DP^{dull} 細胞比例再度下降，CD4 SP 細胞比例則再次上升，顯示第 2 劑的 L121-adj.使更多的 DP^{dull} 細胞分化為 CD4 SP 細胞。DN 細胞在第 2 至第 6 天沒有明顯比例變化，至第 8 與第 10 天開始上升。CD8 SP 細胞亦未見比例變化，顯示 L121-adj.主要影響 DP 細胞分化為 CD4 SP 細胞，對於 CD8 SP 細胞分化較無影響。

圖十四(C)為為注射 L121-adj.後，以 CD44 及 CD25 分析經過不同時間後胸腺中 DN 細胞分化的變化情形。DN1 細胞比例於注射 L121-adj.後第 2 天大量上升，顯示更多的 T 細胞前驅細胞自骨髓轉移到胸腺中，DN1 細胞比例在第 4 與第 6 天則逐漸下降，伴隨 DN2 細胞比例逐上升，顯示 DN1 細胞逐漸分化為 DN2 細胞。在第 7 天注射 L121-adj.第二劑之後，DN1 細胞比例於第 8 天再度上升，與第一劑產生相同的效果。

圖十四(D)為加入 beads 精算注射 L121-adj.後胸腺 T 細胞的數量，與各別細胞群的數量。注射後第 2 天胸腺細胞開始些微減少，持續至第 4 天顯著性的減少，然而第 6 天後停止減少，顯示 L121-adj.減少胸腺 T 細胞的效果維持 6 天。在第 7

天注射第二劑 L121-adj.後，於第 8 天未見明顯減少，卻於第 10 天再次顯著性減少，顯示注射 L121-adj.後 3~4 天會發生減少胸腺細胞的現象。

圖十四(E-a)為 DN1 細胞隨時間的變化，注射 L121-adj.後第 2 天 DN1 細胞數量上升至 146%，接著再分化成下游細胞，於第 4 天與第 6 天下降至 45%與 52%，然而在第 7 天注射第二劑 L121-adj.後，再度上升至 107%，於第 10 天下降至 26%，顯示注射 L121-adj.會驅使骨髓中的 T 細胞前驅細胞轉移到胸腺中成為 DN1 細胞。


圖十四(E-b)、(E-c)、(E-d)分別為 DN2、DN3、DN4 注射 L121-adj.後隨時間的變化，皆於注射 L121-adj.後減少數量，直到第 6 天停止減少，可能為 L121-adj.導致胸腺消耗 DN 細胞分化為下游成熟細胞所致，然而 DN 細胞卻在注射第二劑 L121-adj.後於第 8 天突然上升，可能為注射第二劑 L121-adj.使大量前驅細胞自骨髓轉移至胸腺中補償先前細胞減少之代償機制。

圖十四(E-e)為注射 L121-adj.後 DP^{dull} 細胞隨時間的變化，注射後第 2 天與第 4 天分別減少至 67%與 35%，於第 6 天回升至 45%，於第 8 天與第 10 天再度下降至 27%與 11%，顯示 L121-adj.會促使 DP^{dull} 細胞消耗分化成下游成熟細胞，而第 6 天細胞數量的回升可能為消耗 DN 細胞而分化補充 DP^{dull} 細胞所致，第 7 天之第二劑 L121-adj.驅使 DP^{dull} 細胞於第 8 天再度分化消耗減少，與之相應的為 DP^{bright} 細胞於第 8 天的回升，顯示 L121-adj.驅使 DP^{dull} 細胞快速分化為 DP^{bright} 細胞。

圖十四(E-g)與(E-h)為 CD4 SP 細胞與 CD8 SP 細胞於注射 L121-adj.後隨時間的變化，兩者皆於注射 L121-adj.後離開胸腺導致數量減少，然而 CD4 SP 細胞卻於注射第二劑 L121-adj.後突然上升，可能為其他胸腺未成熟細胞(DN、DP 細胞)加速分化產生出更多 CD4 SP 細胞所致。然而 CD8 SP 細胞減少後卻無補充，顯示 L121-adj.驅使胸腺 DP 細胞選擇分化為 CD4 SP 細胞，而非 CD8 SP 細胞。

4.12 注射 L121.adj.促進胸腺中 T 細胞之成熟，加速正向選擇(positive selection)

正向選擇是 T 細胞成熟的重要步驟之一，T 細胞透過正向選擇篩選出表現正



確 T 細胞受器(T cell receptor)而有功能之 T 細胞(101, 102)。胸腺中 T 細胞可用 CD5 及 TCR β chain 來分析 T 細胞進行正向選擇的過程(103)。利用流式細胞儀分析，可將胸腺中 T 細胞分為五群：CD5⁻TCR β ⁻，CD5^{low}TCR β ^{low}，CD5^{int}TCR β ^{low}，CD5^{high}TCR β ^{int}，CD5^{high}TCR β ^{high}。

圖十五(A)為以未經處理之控制組小鼠為代表，以 CD4 及 CD8 來分析此五群細胞。CD5⁻TCR β ⁻ (stage 0)主要為 CD4⁻CD8⁻ DN 細胞，為 T 細胞之前驅細胞；CD5^{low}TCR β ^{low}(stage 1)主要為 CD4^{dull}CD8^{dull} (DP^{dull})細胞，尚未進行正向選擇；CD5^{int}TCR β ^{low}(stage 2)為 DP^{dull} 細胞開始分化成 CD4^{bright}CD8^{bright} (DP^{bright})細胞，正在準備進行正向選擇；CD5^{high}TCR β ^{int} (stage 3)為 DP 細胞與 CD4⁺CD8^{low} 細胞，正在進行正向選擇；CD5^{high}TCR β ^{high} (stage 4)為結束正向選擇的 T 細胞，分化成熟為 CD8⁺CD4⁻與 CD8⁻CD4⁺細胞(104)。

圖十五(B)為皮下注射 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.後，經過不同天對於胸腺中正向選擇的影響。注射第一劑 L121-adj.後，stage 1 與 stage 2 的比例皆於第 2 天下降，而 stage 3 與 stage 4 的比例繼而提升，顯示注射 L121-adj.增加胸腺中 stage 1 與 stage 2 細胞分化成 stage 3 與 stage 4，促進胸腺 T 細胞的正向選擇。於第 4 天時，stage 3 的比例下降，stage 4 的比例則進一步提升，顯示更多的 T 細胞結束正向選擇，分化成熟為 CD8⁺CD4⁻與 CD8⁻CD4⁺細胞。胸腺中各個 stage 的細胞於第 6 天回復至與第 0 天未注射 L121-adj.之前相同的正常狀態，顯示 L121-adj.促進 T 細胞成熟的效果可維持 6 天。然而，在第 7 天給予第二劑的 L121-adj.後，於第 8 天時 stage 1 與 stage 2 又再次下降，而 stage 3 與 stage 4 則再次上升，與第一劑產生相同的反應，甚至促使更多的 T 細胞發育成熟。於第 4 天時，stage 3 下降且 stage 4 提升。圖十五(C)為統計 stage 4 T 細胞之比例，於注射 L121-adj.後第 2 天與第 4 天提升，至第 6 天則回復未注射 L121-adj.之前的正常比例，然而在注射第二次 L121-adj.後，產生更高比例的 stage 4 T 細胞，顯示更多的 T 細胞結束正向選擇，分化成熟為 CD8⁺CD4⁻與 CD8⁻CD4⁺細胞。證明 L121-adj.能刺激更多胸腺 T



細胞進入正向選擇階段，以產生出更多的成熟 T 細胞。

4.13 注射 L121-adj. 影響骨髓中血液幹細胞的分化，改變血液幹細胞的恆定性

過去已有相當多的文獻研究發現發炎反應會影響骨髓中血液幹細胞分化的改變(27, 69, 105)，且血液幹細胞可以直接或是間接的調控免疫反應(34)。為了分析 L121-adj. 對於骨髓中血液幹細胞與免疫前驅細胞分化的影響，於第 0 天與第 7 天注射 L121-adj. 與 OVA，在第 2、4、6、8、10 天犧牲 C57BL/6 小鼠，未經處理之小鼠作為第 0 天控制組，以流式細胞儀分析。

圖十六(A)為以流式細胞儀分析骨髓中血液幹細胞的示意圖，以未經處理的控制組作為代表。首先以 FSC-A 及 FSC-H 圈選出單顆細胞後，再以 viability dye 圈選出活細胞(省略未呈現)，接著選出 lineage⁻圈選出骨髓中之未成熟細胞，先以 CD127 及 CD135 為軸，圈選出 CD127⁺CD135⁺ CLP 細胞(19)，再以 CD117 及 Sca-1 為軸分析其表現，未經處理之小鼠的 CLP 細胞為 CD117^{low}Sca-1^{low} (18)。另外，圈選出 lineage⁻CD127⁻細胞群後，使用 CD117 及 Sca-1 為軸分析，其中 CD117⁺Sca-1⁺細胞為 LSK 細胞群，為最上游的血液幹細胞群(16, 17)。另外 CD117⁺Sca-1⁻細胞群圈選出後以 CD16/32 與 CD135 分析，可再分為三群；CD16/32⁻CD135⁻為 MEP 細胞，CD16/32⁻CD135⁺為 CMP 細胞，CD16/32⁺CD135⁻為 GMP 細胞(21, 22)。此外，CD117^{int}Sca-1⁻CD16/32⁻CD135⁺為 CDP 細胞(21, 22)。

圖十六(B)為經圈選出 Lineage⁻細胞群後，以 CD127 與 CD135 為軸分析骨髓中 CLP 細胞比例的變化，注射 L121-adj. 後第 2、4 天，CLP 細胞比例減少，直到第 6 天開始回升至第 8 天，再度於第 10 天降低，顯示注射 L121-adj. 會影響骨髓中免疫前驅細胞恆定改變，驅使 CLP 細胞消耗或是離開骨髓，並且代償性使幹細胞分化成 CLP 細胞補充其流失。

圖十六(C)為經圈選出 Lineage⁻CD127⁻細胞群後，以 CD117 與 Sca-1 為軸分析骨髓中 LSK 細胞比例的變化，注射 L121-adj. 後第 2 天，LSK 細胞比例大量上升，

接著於第 4、6 天逐漸減少，再次於第 7 天注射 L121-adj. 第二劑再次使 LSK 細胞比例於第 8 天大量上升然後逐漸減少，顯示 L121-adj. 可能會使 LSK 細胞 self-renew 能力快速增加，增生更多 LSK 細胞，然後促進其分化減少或是離開骨髓而減少。過去曾有研究指出 interferony 會導致骨髓中 LSK 細胞的增生(106)，我們推測可能是注射 L121-adj. 發炎而導致體內細胞激素的提升，進而調控 LSK 細胞的分化。

圖十六(D)為經圈選出 Lineage⁻CD127⁻CD117⁺Sca-1⁻細胞群後，以 CD16/32 與 CD135 為軸分析骨髓中 CMP、GMP、MEP 細胞比例的變化，CMP 細胞為由 LSK 細胞分化而來，能夠繼續分化為 GMP 細胞與 MEP 細胞(20)。注射 L121-adj. 後第 2 天，CMP 細胞比例大量減少，伴隨 GMP 細胞比例的增加，MEP 細胞比例未見變化，顯示注射 L121-adj. 會驅使 CMP 細胞分化為 GMP 細胞。接下來於注射後第 4、6 天 CMP 細胞比例開始回升，然而再次於第 7 天注射第二劑 L121-adj. 後，CMP 細胞再次大量分化為 GMP 細胞，產生與第 2 天相同的結果。MEP 細胞比例在第 8 天後相對減少，顯示 GMP 細胞的分化趨向產生 GMP，而減少了 MEP 細胞的產生。

圖十六(E)為經圈選出 Lineage⁻CD127⁻CD117^{int}Sca-1⁻細胞群後，以 CD16/32 與 CD135 為軸分析骨髓中 CDP 細胞比例的變化。CDP 細胞比例於注射 L121-adj. 後第 2 天後快速下降，接著於第 4、6 天回升，於第 7 天注射第二劑 L121-adj. 後，於第 8 天細胞比例再次減少，顯示注射 L121-adj. 可能會驅使 CDP 細胞消耗分化而降低比例。

圖十六(F-a)為骨髓中 LSK 細胞數量隨時間的變化，注射 L121-adj. 後會快速的增加 LSK 細胞數量，分別於注射後第 2、8 天上升至 311% 及 519%，然後驅使 LSK 細胞分化消耗而減少，LSK 細胞於第 4、6 天的減少至 127%，伴隨 CLP[圖十六(F-b)] 及 CMP[圖十六(F-c)] 細胞數量的增加，證明 L121-adj. 會增加 LSK 細胞的增生，然後分化為下游 CLP 及 CMP 細胞。CLP 細胞在注射 L121-adj. 後於第 2、4 天減少至 66%、42% [圖十六(F-b)]，伴隨骨髓中 pre-pro B 細胞的增加[圖十二(D-a)] 與胸腺中 DN1 細胞[圖十四(D-a)] 的增加相符，我們推測可能為 L121-adj. 會驅使 CLP 細胞快

速分化成 B 細胞與 T 細胞而減少數量。

CMP 細胞在注射 L121-adj.後快速減少，分別於注射後第 2、8 天減少至 36%、43%，顯示 L121-adj.會驅使 CMP 細胞分化而消耗減少[圖十六(F-c)]。GMP 細胞於第 4、6 天下降至 81%、51%、56%[圖十六(F-d)]，伴隨顆粒性白血球細胞數目在第 4、6 天大量上升[圖三(D)]，顯示 L121-adj.可能會促使 GMP 分化產生大量的顆粒性白血球。

而 GMP 細胞數量在接受第二劑 L121-adj.後於第 8 天大量提昇至 152%[圖十六(F-d)]，伴隨 CMP 細胞數量的減少[圖十六(F-c)]，顯示注射 L121-adj.可能會驅使 CMP 細胞分化為 GMP 細胞。CDP 細胞亦於注射 L121-adj.後快速減少，於第 2、8 天減少至 39%、31%[圖十六(F-e)]，顯示 L121-adj.可能會驅使 CDP 細胞快速分化而消耗減少。以上結果證明，L121-adj.所引發之發炎反應會影響骨髓中免疫前驅細胞、幹細胞分化的改變，加速前驅細胞的分化以產生更多成熟免疫細胞，以補償免疫細胞的消耗，以之間接調控免疫反應。

4.14 注射 L121-adj.使骨髓中 CLP 細胞之 Sca-1 表現短暫提高

Sca-1 為幹細胞所表現之表面抗原，全名為 stem cell antigen-1，由 LSK 細胞所表現(17)，當 LSK 細胞分化為 CLP 細胞時，其 Sca-1 的表現開始下降(18)，表示其失去 self-renew 之幹細胞特性(107)。

圖十七(A)為以 Lineage⁻CD127⁺CD135⁺ CLP 細胞後(19)，以 Sca-1 為軸分析 CLP 細胞之 Sca-1 表現量，經過注射 L121-adj.後第 2 天 CLP 細胞之 Sca-1 表現大量提昇，於第 4、6 天逐漸降回，然而在第 7 天注射第二劑 L121-adj.後，CLP 細胞的 Sca-1 表現再次大量提昇，第 10 天開始降回，但是表現量仍較第 0 天之未經處理控制組高。

圖十七(B)為將 CLP 細胞之 Sca-1 螢光表現量以 geometric mean 呈現，以平均值及 SEM 呈現，證明注射 L121-adj.後會使 CLP 細胞暫時增加 Sca-1 的表現量。由

於 Sca-1 與幹細胞 self-renew 能力有關(107)，我們推測 Sca-1 的表現提高可能使 CLP 細胞減少向下游分化(symmetric differentiation)的能力，而增強 CLP 細胞 self-renew 的能力，導致注射 L121-adj 後骨髓中 B 細胞的產生減少。發炎反應所產生之 interferon α 亦會調控 sca-1 之表現(108)，因此也可能是注射 L121-adj. 導致體內細胞激素的改變而調控 CLP 細胞之 sca-1 表現所造成。

4.15 注射 L121-adj. 抑制 CLP 細胞的分化，減少 B 細胞的產生

為了證實注射 L121-adj. 後會抑制 CLP 細胞的分化，我們將 CLP (Lineage⁻ CD127⁺CD117^{int}Sca-1^{int}) 細胞自 CD45.2 小鼠骨髓中以流式細胞儀分選出來後(18)，以尾靜脈注射移植至 CD45.1 小鼠，接著每週自 CD45.1 小鼠頷下靜脈採血，以流式細胞儀分析。圖十八(A)為移植 CD45.2⁺ CLP 細胞後，以 CD45.1 及 CD45.2 分析周邊血液細胞，以計算 CLP 細胞之增殖率(engraftment rate)。此外，圈選出 CD45.1⁻ CD45.2⁺ 細胞後以 B220 及 CD3 分析，證實 CLP 所分化出的細胞主要為 B 細胞與少量的 T 細胞，呈現於圖十八(B)。圖十八(C)為統計 CD45.2 CLP 細胞所分化出的 B 細胞及 T 細胞所佔血液細胞的比例，以平均值及 SEM 呈現。由於 CLP 細胞不是幹細胞，不具有良好 self-renew 能力，故於移植後兩週產生最高量的淋巴球，於接下來每週逐漸下降，而注射 L121-adj. 後則顯著抑制了 CLP 細胞的分化，使之所分化出的淋巴球大量減少。

4.16 注射 L121-adj. 使血液中 G-CSF 濃度大量提昇

G-CSF 可驅使骨髓產生更多的顆粒性白血球(109)，與使成熟的顆粒性白血球自骨髓離開，移動至血液循環與周邊組織(110)。以上兩種現象均在注射 L121-adj. 後發生，因此為了證實 L121-adj. 會增加血液中的 G-CSF 濃度，而增加骨髓所產生的顆粒性白血球，於第 0、7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj. 後，以心臟採血，分離注射 L121-adj. 後第 0、2、4、6、8、10 天之血

清，並且以 ELISA 分析血液中 G-CSF 的濃度。

圖十九即為血液中 G-CSF 濃度隨時間的變化，未注射 L121-adj.前，血液中 G-CSF 濃度為 277 pg/ml，然而注射 L121-adj.後第 2 天血液中 G-CSF 濃度提昇至 7035 pg/ml，隨後分別於第 4、6 天降低，然而在第 7 天注射第 2 劑 L121-adj.後，血液中的 G-CSF 濃度竄升至 41155 pg/ml。證明注射 L121-adj.能夠大量短暫提昇血液中 G-CSF 濃度，且再次注射 L121-adj.能夠使 G-CSF 濃度提昇更高。

4.17 L121-adj.透過血液中的細胞激素影響骨髓中血液幹細胞產生大量顆粒性白血球

注射 L121-adj.後會增加骨髓中[圖三(D)]與脾臟中[圖四(A)]的顆粒性白血球，與提昇血液中 G-CSF 濃度[圖(十九)]，為了證明 L121-adj.會透過血液中的細胞激素如 G-CSF 驅使幹細胞分化更多的顆粒性白血球，我們將 LSK(Lin⁻CD127⁻CD117⁺Sca-1⁺)、CMP(Lin⁻CD127⁻CD117⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32⁻)、GMP (Lin⁻CD127⁻CD117⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32⁺)細胞自 C57BL/6 小鼠以流式細胞分選儀分選出(20)，以含有 10%注射過 L121-adj.後第 2、4、6、8、10 天小鼠之血清的 RPMI 1640 培養基培養 4 天後，再以流式細胞儀分析。

圖二十(A)為以 Ly6G 及 F4/80 分析血液幹細胞所分化之細胞，以注射 L121-adj.後第 4、6、8、10 天的血清與未經處理的小鼠的血清皆無法使幹細胞成功於體外環境分化存活，因此無細胞由流式細胞儀所偵測，故不呈現，只有以注射 L121-adj.後第 2 天及第 8 天的血清培養才能分化出細胞。第 2 天的血清不足以使 LSK 細胞分化產生出大量的 Ly6G⁺顆粒性白血球與 F4/80⁺巨噬細胞，卻足夠使 CMP 細胞分化成 F4/80⁺巨噬細胞，與 GMP 細胞分化產生 Ly6G⁺顆粒性白血球；第 8 天的血清足夠使 LSK、CMP、GMP 細胞分化產生出 Ly6G⁺顆粒性白血球與 F4/80⁺巨噬細胞，顯示第 8 天的血液中含有較高量的細胞激素，此外，第 8 天的血清能夠使 CMP 細胞分化出較多量的 Ly6G⁺顆粒性白血球，可能為第 8 天的血清含有較高量 G-CSF

的緣故[圖(十九)]。

圖二十(B)為以倒立顯微鏡拍攝 $\text{Lin}^- \text{CD117}^+$ 細胞分化的情形，以第 0 天與第 6 天的血清所培養之 $\text{Lin}^- \text{CD117}^+$ 細胞無法產生分化而凋亡，但是以第 2 天與第 8 天的血清能夠使 $\text{Lin}^- \text{CD117}^+$ 分化產生細胞，又以第 8 天的血清能夠使 $\text{Lin}^- \text{CD117}^+$ 細胞產生較好的分化，原因可能為第 8 天的血清含有較高量之 G-CSF[圖(十九)]。以上結果證實注射 L121-adj. 後引發的發炎反應會促使血液中細胞激素的提升，影響骨髓中幹細胞的分化，產生高量之顆粒性白血球細胞。

第五章 討論



首先，為了證明 L121-adj. 是有效的疫苗佐劑，在皮下移植 B16F10 黑色素細胞瘤後 2 周且腫瘤大小約達 300 mm^3 時，L121-adj. 可以作為 therapeutic vaccine，於 2 天之內抑制腫瘤的增生與維持存活率，而只有注射抗原而未注射 L121-adj. 的腫瘤體積則持續以倍數增長(圖一)。另一方面，如圖二所示，L121-adj. 可在 6 天之內使動物產生抗原專一性的 CTL 反應，證明 L121-adj. 可引發毒殺 T 細胞反應與抑制腫瘤的增長。不過在此實驗模式中使用之抗原為雞卵白蛋白(ovalbumin)，是常用於研究使用的抗原，但是此抗原並非小鼠內生性的蛋白質，相對較容易被小鼠免疫系統所辨認。此外，B16F10 melanoma 細胞成長相當快速，與臨床所見成長緩慢不易發現的腫瘤不同，可能較容易引發免疫反應排斥腫瘤(111)。有趣的是，在一般未移植腫瘤只有注射 L121-adj. 的小鼠，需要 6 天才能產生大量 CTL 反應(圖二)，但是在有腫瘤的實驗下，可以在 2 天之內看到抑制腫瘤增長的反應(圖一)，顯示 L121-adj 亦有可能透過其他方式來抑制腫瘤生長，免疫系統當中除了 CTL 之外，NK 細胞亦能夠殺死癌細胞，我們推測 NK 細胞可能在 L121-adj. 抑制腫瘤效果中作為重要機制之一。

系統性的發炎反應會導致血液幹細胞發生 emergency granulopoiesis，為血液幹細胞快速大量的分化產生顆粒性白血球的現象(112)。骨髓中的顆粒性白血球與單核細胞，在注射 L121-adj. 後立即減少[圖三(D-第 2 天)]，且於再次注射第二劑 L121-adj. 後，再次發生減少的現象[圖三(D-第 8 天)]，隨後在脾臟中[圖四(A)]，與注射部位皮膚中[圖七(A)]，發現顆粒性白血球大量提升，顯示注射 L121-adj. 會產生類似於在細菌感染的情況下，使骨髓中所存藏的顆粒性白血球釋放至周邊系統中(113)，作為 effector cell 清除病原體。此外，過去研究發現，注射 alum 疫苗佐劑會使脾臟中 $\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^+\text{F4/80}^{+/-}$ 細胞增加，並且促進 B 細胞的活化以產生抗體，在我們的研究之中，我們發現注射 L121-adj. 同樣會使脾臟與淋巴結中聚集大量的


CD11b⁺Gr-1⁺F4/80^{+/-}細胞[圖(六與五)]，與後續產生更多的 plasma B 細胞以及 germinal center B 細胞相符[圖(十三)]，我們推測注射 L121-adj.也會造成類似 alum 之效果，透過影響 CD11b⁺Gr-1⁺細胞的分化，來調控 adaptive immunity。

骨髓中顆粒性白血球與單核細胞會在受到 L121-adj.刺激後減少，並且快速回升[圖三(第 4 天與第 10 天)]。此外注射 L121-adj.後會快速消耗 CMP 細胞分化為 GMP 細胞(圖十六(D, 第 2 天與第 8 天))，與使血液中 G-CSF 濃度大量增加[圖十九(第 2 天與第 8 天)]，注射 L121-adj.後之小鼠血清可以促進血液幹細胞分化為顆粒性白血球與巨噬細胞[圖(二十)]，以上結果皆顯示血液幹細胞作為補償消耗的顆粒性白血球與單核細胞而提高分化產量以維持血液系統恆定。

L121-adj.除了影響血液幹細胞分化產生顆粒性白血球之外，CLP 細胞雖然不會分化為顆粒性白血球，亦也會被影響。注射 L121-adj.會導致 CLP 細胞短暫提升 Sca-1 的表現[圖(十七)]，與降低 CLP 的分化能力[圖(十八)]。Sca-1 一般表現於幹細胞上，如 LSK 細胞，隨著 LSK 細胞分化為 CLP 細胞，Sca-1 的表現會隨之降低，然而 Sca-1 的表現是否與 CLP 細胞的分化有影響仍然無法證明，在本論文中我們發現 L121-adj.主要對於血液幹細胞分化的影響是會導致其分化偏向產生 myeloid lineage，降低 lymphoid lineage，而此現象與細菌感染導致之發炎反應類似(27)。

除了 L121-adj.會引起 emergency granulopoiesis 之外，注射無機鹽類 alum 疫苗佐劑也會引發類似的效果(30)，顯示此反應可能為疫苗佐劑之共通性反應。注射 L121-adj.會增加淋巴結中的顆粒性白血球與樹突細胞吞噬抗原的能力，促進抗原輸送至淋巴結中[圖(六)]，此效果亦在其他種類疫苗佐劑發現，注射 complete Freund's adjuvant (CFA)，alum，與 MF59 疫苗佐劑也會增加顆粒性白血球攜帶抗原至淋巴結中(114, 115)，注射 AS03 疫苗佐劑則會促進樹突細胞攜帶抗原至淋巴結中(116)，顯示促進免疫細胞由局部注射位置吞噬攜帶抗原至淋巴系統中是疫苗佐劑之共通性反應。我們推測此種反應為疫苗佐劑促進抗原呈現引發後天性免疫的重要機制。

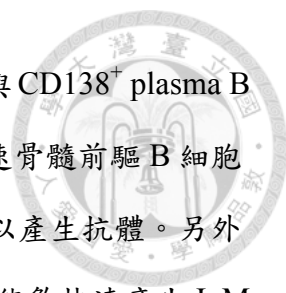
顆粒性白血球在疫苗佐劑中的機制仍然未知，顆粒性白血球能夠交叉呈現抗



原以活化 CD8⁺ T 細胞(62)，疫苗佐劑會刺激顆粒性白血球的生成，作為 effector cell 前往局部注射位置(圖七)，吞噬抗原攜帶至淋巴結中[圖六(A)]，顯示顆粒性白血球可能可以作為抗原呈現細胞調控 adaptive immunity。然而以單株 anti-Ly6G 抗體去除小鼠體內之顆粒性白血球後再注射 L121-adj.，會導致毒殺 T 細胞反應增加[圖十(D)]，顯示顆粒性白血球細胞並非主要抗原呈現細胞。類似的結果亦於其他研究文獻指出過：一樣以 anti-Ly6G 抗體去除小鼠體內顆粒性白血球後比較疫苗佐劑的效果，發現不影響 MF59 疫苗佐劑產生抗體的效果(115)，不影響 CFA 疫苗佐劑之 CD8⁺ T 細胞反應，與提升 CD4⁺ T 與 B 細胞的反應(63, 117)，因此顆粒性白血球可能會參與調控疫苗佐劑所產生的免疫反應，但是機制未明，由於顆粒性白血球有較好的吞噬能力，且能夠快速清除抗原(118)，過去研究亦發現，去除顆粒性白血球會導致皮膚傷口復原變差(119)，因此我們推測去除顆粒性白血球導致局部注射位置中的抗原較難以被清除，反而加強了樹突細胞的抗原呈現能力，加強 T 細胞的活化。

相對於顆粒性白血球，樹突細胞一直被認為是主要的抗原呈現細胞(120)，注射 L121-adj.後會吸引樹突細胞移動至局部注射部位皮膚[圖七(A)]，於第 2 天後透過 MHC-I 呈現抗原[圖七(B)]。此外，也會增加樹突細胞吞噬抗原攜帶至淋巴結中[圖六(B)]，並且能夠交叉呈現抗原活化 CD8⁺ T 細胞[圖(九)]，證明 L121-adj.可以透過樹突細胞作為抗原呈現機制來產生毒殺 T 細胞活性。

過去的研究指出，注射 incomplete Freund's adjuvant (IFA)所引發的發炎反應，會透過增加 TNF α ，降低 CXCL12，驅使骨髓中的前驅 B 細胞離開骨髓，轉移至脾臟中，使骨髓產生更多的顆粒性白血球(92, 94)。注射 L121-adj.亦驅使骨髓中的前驅 B 細胞離開骨髓，導致骨髓中 B 細胞大量減少，且注射 alum 疫苗佐劑也會造成類似的結果[圖十一(E-b)]，顯示此現象亦為疫苗佐劑之共通反應。此外，L121-adj.促進更多骨髓前驅 B 細胞轉移至脾臟中分化[圖(十三)]，導致脾臟中 transitional B 細胞短暫增加[圖十二(E-a)]，接著分化為 MZ B 細胞以及 FO B 細胞[圖十二(E-b 與



c)], 進一步於注射第二劑 L121-adj. 後開始產生 $GL-7^+ GC$ B 細胞與 $CD138^+$ plasma B 細胞等 adaptive immunity 反應，我們推測疫苗佐劑透過短暫加速骨髓前驅 B 細胞的分化，於淋巴器官中產生更多 B 細胞，使之接觸抗原並活化以產生抗體。另外一方面，由於 MZ B 細胞為第一線參與初期免疫反應之 B 細胞，能夠快速產生 IgM 以中和病原體，並且具有抗原呈現的能力，因此我們推測 L121-adj. 影響 MZ B 細胞分化的增加可使免疫系統能夠更快速的活化以產生 adaptive immunity，為疫苗佐劑產生免疫反應的機制之一。

L121-adj. 也會影響胸腺中 T 細胞的分化，增加胸腺中 $CD5^{high} TCR\beta^{high}$ 細胞的比例，顯示 L121-adj. 會使更多的 T 細胞前驅細胞通過 positive selection 成熟[圖(十四)]，與降低胸腺中 DP 細胞的比例，增加 $CD4^+$ T 細胞的比例[圖十五(B)]，顯示注射 L121-adj. 會促進胸腺 DP 細胞分化為成熟 $CD4^+$ T 細胞，釋放至周邊淋巴組織。然而，L121-adj. 所引發之發炎反應也導致胸腺細胞整體的減少[圖十五(D 與 E)]，過去曾發現，細菌感染導致之發炎反應，皮質類固醇、飢餓等壓力都會造成胸腺的萎縮(121)，注射 LPS 也會導致與 L121-adj. 類似的反應：減少 DP 細胞的比例，增加 $CD4^+$ 與 $CD8^+$ 細胞的比例(122)，與其他感染發炎都會造成類似結果(123)。DN1 細胞在注射 L121-adj. 後短暫增加[圖十五(E-a, 第 2 天與第 8 天)]，顯示 L121-adj. 會促進骨髓中的前驅細胞轉移至胸腺中補充，而 DP 細胞則持續消耗[圖十五(E-e 與 f)]，以分化為 $CD4^+$ T 細胞[圖十五(E-g)]，以補充 $CD4^+$ T 細胞。注射 L121-adj. 後胸腺中的 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T 細胞都會離開胸腺而減少細胞數量，顯示 L121-adj. 促進成熟 T 細胞移動至淋巴器官，以促進免疫反應，而作為代償，胸腺消耗前驅 T 細胞來產生更多 $CD4^+$ T 細胞。


我們透過觀察前驅 T 細胞與前驅 B 細胞在注射 L121-adj. 後隨時間點不同變化，發現 L121-adj. 對於 B 細胞或是 T 細胞都有產生類似的促進分化的效果，促進前驅 B 細胞離開骨髓轉移至淋巴器官，產生更多具有免疫功能的成熟 B 細胞，包括 MZ B 細胞，GC B 細胞與能夠產生抗體的 plasma B 細胞，同樣的，也會增加胸

腺中前驅 T 細胞的分化，促進 positive selection，以產生更多成熟的 CD4⁺ T 細胞，可能是疫苗佐劑促進免疫反應的機制之一。

L121-adj. 當中的介面活性物質會導致細胞凋亡與壞死(124)，因此也會導致局部注射之細胞凋亡、死亡，引起發炎反應，吸引免疫細胞。另外，過去有研究發現，注射凋亡細胞亦能夠作為疫苗佐劑來引發免疫反應包括毒殺 T 細胞反應(125)，而樹突細胞能夠吞噬凋亡細胞，並將抗原呈現給 CD8⁺ T 細胞而產生毒殺活性(126)，壞死細胞亦能夠釋放出多種內生性的 TLR ligand 使樹突細胞成熟(127)，透過活化 innate immunity，如樹突細胞，來進一步活化 B 細胞或是 T 細胞(128)。因此我們推論 L121-adj. 透過引發注射部位細胞凋亡與壞死，產生 "danger signal" 來刺激免疫系統。本論文則提出另外一種假設機制，疫苗佐劑除了在局部產生發炎，透過樹突細胞來活化 T 細胞與 B 細胞之外，也會造成血液幹細胞、前驅細胞分化的改變，加速前驅 T 細胞與 B 細胞的分化，產生更多成熟之 T、B 細胞，進一步匯聚至淋巴器官中(即造成淋巴結、脾臟腫大的原因)，以提高樹突細胞成功找到能夠辨認抗原之 T 細胞或是 B 細胞，以利產生專一性免疫反應。另外，亦增加血液幹細胞的分化，產生更多顆粒性白血球，補償顆粒性白血球的消耗，清除壞死組織(118)，以協助組織恢復。除此之外，不只有 L121-adj. 有此種現象反應，其他疫苗佐劑如 alum 或是 CFA/IFA 亦有類似反應，我們推論此現象並非偶然，而是免疫系統為了調控免疫反應或是活化更好的專一性進階免疫反應而產生的內生性免疫反應。

感染發炎會影響血液細胞分化的改變，以對應免疫系統的需求產生需要的免疫細胞(27)，同樣的，疫苗佐劑在我們的研究當中也證實造成類似的反應，因此我們認為疫苗佐劑引發發炎反應，造成類似於病原體感染的效果，進一步調控血液細胞的分化，以促進後天性免疫反應的產生，是疫苗佐劑的重要機制之一。

本論文大部分實驗使用多色流式細胞儀分析注射疫苗佐劑後不同時間點中，不同免疫器官中各種免疫細胞表面抗原的變化，以細胞數量變化之趨勢以推測細



胞分化的改變，無法直接證明細胞分化的改變，未來可以利用更多 adoptive transfer 實驗模型來證明細胞分化的改變，以獲得更多的證據。此外，由於本論文所觀察的現象是一併注射疫苗佐劑以及抗原做為完整疫苗以分析血液細胞分化的改變，並無法區分是疫苗佐劑自身導致的發炎反應導致細胞分化的改變，或是由於受到抗原刺激而產生的抗原專一性免疫反應，未來若是欲更清楚的界定疫苗佐劑產生之內生性免疫反應或是後天性免疫反應，需要更多的 side by side 比較。由於疫苗佐劑主要透過 cytokines 以及 chemokines 來調控血液細胞的分化，未來需要更多的實驗來分析血液中細胞激素的改變，以及利用基因剔除實驗動物來觀察個別細胞激素的影響。最後，本論文並未探討疫苗佐劑引發發炎反應的機制，未來需要設計更多實驗以瞭解更多疫苗佐劑之機制。

第六章 結論



1. 小鼠植入 B16F10 腫瘤細胞後，注射 L121-adj. 能夠有效抑制腫瘤生長，並且提高存活率。此外，L121-adj. 能夠在 6 天之內引發抗原專一性 CTL 反應。並且注射第二劑之 L121-adj. 能夠再次產生高強度的 CTL 反應。
2. 小鼠在注射 L121-adj. 後其骨髓中的顆粒性白血球與單核細胞數量會暫時減少，並且使顆粒性白血球轉移到脾臟及注射皮下位置，之後再由血液幹細胞分化補償增加骨髓中顆粒性白血球的數量。
3. 注射 L121-adj. 會吸引顆粒性白血球與樹突細胞至注射皮下部位，造成更多抗原傳輸進入淋巴結中，並且使樹突細胞透過 MHC-I 呈現出 OVA 之 SIINFEKL 胜肽片段，並且能夠交叉呈現抗原給 CD8⁺ T 細胞，活化 CD8⁺ T 細胞。證明 L121-adj. 可以透過樹突細胞作為抗原呈現細胞來產生毒殺 T 細胞反應。
4. 以單株抗體去除體內顆粒性白血球之後，再施打 L121-adj. 會增加 CTL 效果，顯示 L121-adj. 主要不是透過顆粒性白血球作為抗原呈現細胞來產生抗原專一性毒殺 T 細胞反應。
5. 注射 L121-adj. 加速骨髓中前驅 B 細胞轉移至脾臟中分化為 transitional B 細胞，以產生更多的成熟 marginal zone B 細胞以及 follicular B 細胞，並且使脾臟 B 細胞活化為 germinal center B 細胞與產生能夠製造抗體的 plasma B 細胞。
6. 注射 L121-adj. 會加速胸腺中 T 細胞的分化成熟，使更多前驅 T 細胞完成正向選擇，以成熟分化為 CD4⁺ T 細胞，並且使 T 細胞自胸腺中離開，導致胸腺中的 T 細胞減少。
7. 注射 L121-adj. 會改變骨髓中幹細胞的分化，使 LSK 細胞短暫增加後分化而減少，進一步驅使 CMP 細胞分化為 GMP 細胞以產生更多顆粒性白血球。另外 CLP 細胞的 Sca-1 表現受到 L121-adj. 刺激而暫時增加，並且降低 CLP 細胞的分化能力。
8. 注射 L121-adj. 會使血液中 G-CSF 的濃度短暫而快速的提升，以注射過 L121-adj.

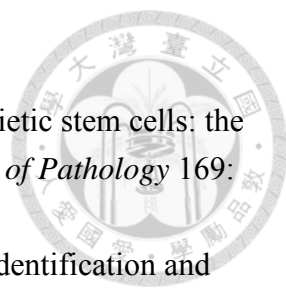
之小鼠的血清培養 LSK、CMP、GMP 細胞均會促進此三種細胞產生 F4/80⁺細胞與 Ly6G⁺細胞。

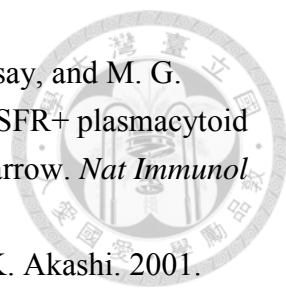
9. 整體而言，L121-adj. 會導致骨髓血液幹細胞的分化趨向 myeloid lineage，而減少 lymphoid lineage 的分化，使大量顆粒性白血球在短時間之內產生，以補償顆粒性白血球的消耗。同時加速骨髓與脾臟中的前驅 B 細胞以及胸腺中前驅 T 細胞的分化成熟，產生更多成熟的 B 細胞與 T 細胞，並且因為血液幹細胞減少分化為前驅 T 細胞以及前驅 B 細胞，導致骨髓中前驅 B 細胞以及胸腺中前驅 T 細胞減少。

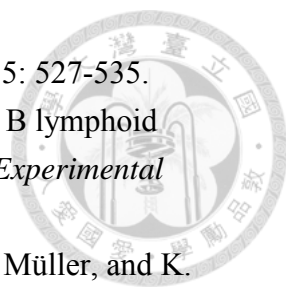
參考文獻

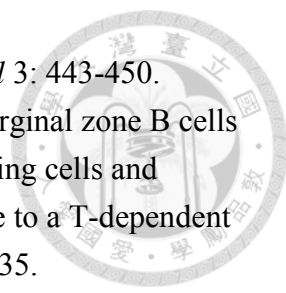



1. Guy, B. 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Micro* 5: 505-517.
2. Awate, S., L. A. Babiuk, and G. Mutwiri. 2013. Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology* 4: 114.
3. Petrovsky, N., and J. C. Aguilar. 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 82: 488-496.
4. Shen, S.-S., and Y.-W. Yang. 2015. Dynamics of antigen delivery and the functional roles of L121-adjuvant. *Vaccine* 33: 4341-4348.
5. Hariharan, K., and N. Hanna. 1998. Development and application of PROVAX™ adjuvant formulation for subunit cancer vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 187-197.
6. Byars, N. E., and A. C. Allison. 1987. Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity. *Vaccine* 5: 223-228.
7. Kenney, J. S., B. W. Hughes, M. P. Masada, and A. C. Allison. 1989. Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. *Journal of Immunological Methods* 121: 157-166.
8. Raychaudhuri, S., M. Tonks, F. Carbone, T. Ryskamp, W. J. Morrow, and N. Hanna. 1992. Induction of antigen-specific class I-restricted cytotoxic T cells by soluble proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 8308-8312.
9. Hsu, F. J., C. B. Caspar, D. Czerwinski, L. W. Kwak, T. M. Liles, A. Syrengelas, B. Taidi-Laskowski, and R. Levy. 1997. Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma — long-term results of a clinical trial. *Blood* 89: 3129-3135.
10. Allison, A. C. 1999. Squalene and squalane emulsions as adjuvants. *Methods* 19: 87-93.
11. Allison, A. C., and N. E. Byars. 1986. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. *Journal of Immunological Methods* 95: 157-168.
12. Hunter, R., F. Strickland, and F. Kézdy. 1981. The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. I. The role of hydrophile-lipophile balance. *The Journal of Immunology* 127: 1244-1250.
13. Seita, J., and I. L. Weissman. 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and*

- 
- medicine* 2: 640-653.
14. Bryder, D., D. J. Rossi, and I. L. Weissman. 2006. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *The American Journal of Pathology* 169: 338-346.
 15. Weissman, I. L., and J. A. Shizuru. 2008. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112: 3543-3553.
 16. Ikuta, K., and I. L. Weissman. 1992. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 1502-1506.
 17. Spangrude, G., S. Heimfeld, and I. Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241: 58-62.
 18. Kondo, M., I. L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661-672.
 19. Blaho, V. A., S. Galvani, E. Engelbrecht, C. Liu, S. L. Swendeman, M. Kono, R. L. Proia, L. Steinman, M. H. Han, and T. Hla. 2015. HDL-bound sphingosine-1-phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation. *Nature* 523: 342-346.
 20. Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I. L. Weissman. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-197.
 21. Cohen, S. B., N. L. Smith, C. McDougal, M. Pepper, S. Shah, G. S. Yap, H. Acha-Orbea, A. Jiang, B. E. Clausen, B. D. Rudd, and E. Y. Denkers. 2014. β -catenin signaling drives differentiation and proinflammatory function of IRF8-dependent dendritic cells. *The Journal of Immunology*.
 22. Satpathy, A. T., W. KC, J. C. Albring, B. T. Edelson, N. M. Kretzer, D. Bhattacharya, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2012. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *The Journal of Experimental Medicine* 209: 1135-1152.
 23. D'Amico, A., and L. Wu. 2003. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 293-303.
 24. Karsunky, H., M. Merad, A. Cozzio, I. L. Weissman, and M. G. Manz. 2003. Flt3 Ligand regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 305-313.

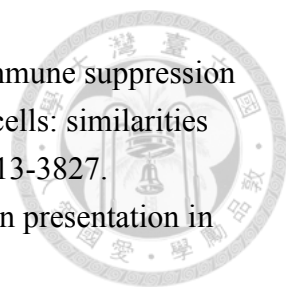
- 
25. Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay, and M. G. Manz. 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8: 1207-1216.
26. Manz, M. G., D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman, and K. Akashi. 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97: 3333-3341.
27. Takizawa, H., S. Boettcher, and M. G. Manz. 2012. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood* 119: 2991-3002.
28. MacNamara, K. C., K. Oduro, O. Martin, D. D. Jones, M. McLaughlin, K. Choi, D. L. Borjesson, and G. M. Winslow. 2011. Infection-Induced Myelopoiesis during Intracellular Bacterial Infection Is Critically Dependent upon IFN- γ Signaling. *The Journal of Immunology* 186: 1032-1043.
29. Takizawa, H., R. R. Regoes, C. S. Boddupalli, S. Bonhoeffer, and M. G. Manz. 2011. Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 208: 273-284.
30. Cain, D. W., P. B. Snowden, G. D. Sempowski, and G. Kelsoe. 2011. Inflammation triggers emergency granulopoiesis through a density-dependent feedback mechanism. *PLoS ONE* 6: e19957.
31. Massberg, S., P. Schaerli, I. Knezevic-Maramica, M. Köllnberger, N. Tubo, E. A. Moseman, I. V. Huff, T. Junt, A. J. Wagers, I. B. Mazo, and U. H. von Andrian. 2007. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* 131: 994-1008.
32. Kim, M.-H., J. L. Granick, C. Kwok, N. J. Walker, D. L. Borjesson, F.-R. E. Curry, L. S. Miller, and S. I. Simon. 2011. Neutrophil survival and c-kit⁺-progenitor proliferation in Staphylococcus aureus-infected skin wounds promote resolution. *Blood* 117: 3343-3352.
33. Nagai, Y., K. P. Garrett, S. Ohta, U. Bahrn, T. Kouro, S. Akira, K. Takatsu, and P. W. Kincade. 2006. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 24: 801-812.
34. Granick, J. L., S. I. Simon, and D. L. Borjesson. 2012. Hematopoietic stem and progenitor cells as effectors in innate immunity. *Bone Marrow Research* 2012: 8.
35. Hardy, R. R., C. E. Carmack, S. A. Shinton, J. D. Kemp, and K. Hayakawa. 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* 173: 1213-1225.
36. Li, Y.-S., R. Wasserman, K. Hayakawa, and R. R. Hardy. 1996. Identification of

- 
- the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 5: 527-535.
37. Allman, D., J. Li, and R. R. Hardy. 1999. Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *The Journal of Experimental Medicine* 189: 735-740.
 38. Loffert, D., S. Schaal, A. Ehlich, R. R. Hardy, Y.-R. Zou, W. Müller, and K. Rajewsky. 1994. Early B-cell development in the mouse: insights from mutations introduced by gene targeting. *Immunological Reviews* 137: 135-153.
 39. Osmond, D. G. 1993. The turnover of B-cell populations. *Immunology Today* 14: 34-37.
 40. Chung, J. B., M. Silverman, and J. G. Monroe. 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in Immunology* 24: 342-348.
 41. Osmond, D. G. 1986. Population dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunological Reviews* 93: 103-124.
 42. Pillai, S., and A. Cariappa. 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 9: 767-777.
 43. Allman, D., and S. Pillai. 2008. Peripheral B cell subsets. *Current Opinion in Immunology* 20: 149-157.
 44. Martin, F., A. M. Oliver, and J. F. Kearney. 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14: 617-629.
 45. Oliver, A. M., F. Martin, G. L. Gartland, R. H. Carter, and J. F. Kearney. 1997. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *European Journal of Immunology* 27: 2366-2374.
 46. Oliver, A. M., F. Martin, and J. F. Kearney. 1999. IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *The Journal of Immunology* 162: 7198-7207.
 47. Attanavanich, K., and J. F. Kearney. 2004. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *The Journal of Immunology* 172: 803-811.
 48. Martin, F., and J. F. Kearney. 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2: 323-335.
 49. Belperron, A. A., C. M. Dailey, C. J. Booth, and L. K. Bockenstedt. 2007. Marginal zone B-cell depletion impairs murine host defense against *Borrelia burgdorferi* infection. *Infection and Immunity* 75: 3354-3360.
 50. Tanigaki, K., H. Han, N. Yamamoto, K. Tashiro, M. Ikegawa, K. Kuroda, A. Suzuki, T. Nakano, and T. Honjo. 2002. Notch-RBP-J signaling is involved in

- 
- cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol* 3: 443-450.
51. Song, H., and J. Cerny. 2003. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 1923-1935.
52. Cariappa, A., C. Chase, H. Liu, P. Russell, and S. Pillai. 2007. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Blood* 109: 2339-2345.
53. Vinuesa, C. G., S. G. Tangye, B. Moser, and C. R. Mackay. 2005. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 5: 853-865.
54. Zuniga-Pflucker, J. C. 2004. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol* 4: 67-72.
55. Germain, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2: 309-322.
56. Koch, U., and F. Radtke. 2011. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27: 539-562.
57. Peters, P. J., J. Borst, V. Oorschot, M. Fukuda, O. Krähenbühl, J. Tschopp, J. W. Slot, and H. J. Geuze. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *The Journal of Experimental Medicine* 173: 1099-1109.
58. Lowin, B., M. Hahne, C. Mattmann, and J. Tschopp. 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370: 650-652.
59. Maher, J., and E. T. Davies. 2004. Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer* 91: 817-821.
60. Carbone, F. R., and M. J. Bevan. 1990. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 171: 377-387.
61. Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G.-I. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman, and R. A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17: 211-220.
62. Beauvillain, C., Y. Delneste, M. Scotet, A. Peres, H. Gascan, P. Guermonprez, V. Barnaba, and P. Jeannin. 2007. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* 110: 2965-2973.
63. Yang, C.-W., B. S. I. Strong, M. J. Miller, and E. R. Unanue. 2010. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to

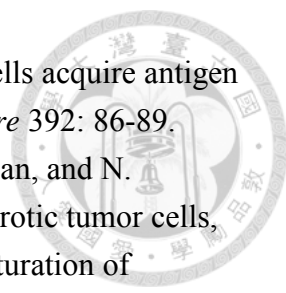
- 
- protein antigens in adjuvants. *The Journal of Immunology* 185: 2927-2934.
64. and, R. R. H., and K. Hayakawa. 2001. B cell development pathways. *Annual Review of Immunology* 19: 595-621.
 65. Nagasawa, T. 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 6: 107-116.
 66. Shapiro-Shelef, M., and K. Calame. 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 5: 230-242.
 67. Castillo-Méndez, S. I., C. A. Zago, L. R. Sardinha, A. P. Freitas do Rosário, J. M. Álvarez, and M. R. D'Império Lima. 2007. Characterization of the spleen B-cell compartment at the early and late blood-stage *Plasmodium chabaudi* Malaria. *Scandinavian Journal of Immunology* 66: 309-319.
 68. Ingold, K., A. Zumsteg, A. Tardivel, B. Huard, Q.-G. Steiner, T. G. Cachero, F. Qiang, L. Gorelik, S. L. Kalled, H. Acha-Orbea, P. D. Rennert, J. Tschopp, and P. Schneider. 2005. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *The Journal of Experimental Medicine* 201: 1375-1383.
 69. Baldridge, M. T., K. Y. King, and M. A. Goodell. 2011. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends in Immunology* 32: 57-65.
 70. Whang, M. I., N. Guerra, and D. H. Raulet. 2009. Costimulation of dendritic epidermal $\gamma\delta$ T cells by a new NKG2D ligand expressed specifically in the skin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182: 4557-4564.
 71. Hickey, M. J. 2012. Has Ly6G finally found a job? *Blood* 120: 1352-1353.
 72. Fleming, T. J., M. L. Fleming, and T. R. Malek. 1993. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *The Journal of Immunology* 151: 2399-2408.
 73. Daley, J. M., A. A. Thomay, M. D. Connolly, J. S. Reichner, and J. E. Albina. 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology* 83: 64-70.
 74. Rose, S., A. Misharin, and H. Perlman. 2012. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 81: 343-350.
 75. Boxio, R., C. Bossenmeyer-Pourié, N. Steinckwich, C. Dournon, and O. Nübe. 2004. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 604-611.
 76. Lee, C.-k., K. Kim, L. A. Welniak, W. J. Murphy, K. Muegge, and S. K. Durum. 2001. Thymic emigrants isolated by a new method possess unique phenotypic and functional properties. *Blood* 97: 1360-1369.
 77. Webster, N. L., C. Zufferey, J. A. Pane, and B. S. Coulson. 2013. Alteration of

- the thymic T cell repertoire by rotavirus infection is associated with delayed type 1 diabetes development in non-obese diabetic mice. *PLoS ONE* 8: e59182.
78. Golde, W. T., P. Gollobin, and L. L. Rodriguez. 2005. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* 34: 39-43.
 79. Lugaajju, A., S. Reddy, C. Ronnberg, M. Wahlgren, F. Kironde, and K. Persson. 2015. Novel flow cytometry technique for detection of Plasmodium falciparum specific B-cells in humans: increased levels of specific B-cells in ongoing infection. *Malaria Journal* 14: 370.
 80. Song, X.-T., M. E. Turnis, X. Zhou, W. Zhu, B.-X. Hong, L. Rollins, B. Rabinovich, S.-Y. Chen, C. M. Rooney, and S. Gottschalk. 2011. A Th1-inducing adenoviral vaccine for boosting adoptively transferred T cells. *Molecular Therapy* 19: 211-217.
 81. Stehn, J. R., N. K. Haass, T. Bonello, M. Desouza, G. Kottyan, H. Treutlein, J. Zeng, P. R. B. B. Nascimento, V. B. Sequeira, T. L. Butler, M. Allanson, T. Fath, T. A. Hill, A. McCluskey, G. Schevzov, S. J. Palmer, E. C. Hardeman, D. Winlaw, V. E. Reeve, I. Dixon, W. Weninger, T. P. Cripe, and P. W. Gunning. 2013. A novel class of anticancer compounds targets the actin cytoskeleton in tumor cells. *Cancer Research* 73: 5169-5182.
 82. Aichele, P., K. Brduscha-Riem, S. Oehen, B. Odermatt, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner, and H. Pircher. 1997. Peptide antigen treatment of naive and virus-immune mice: antigen-specific tolerance versus immunopathology. *Immunity* 6: 519-529.
 83. Durward, M. A., J. Harms, D. M. Magnani, L. Eskra, and G. A. Splitter. 2010. Discordant Brucella melitensis antigens yield cognate CD8(+) T cells in vivo. *Infection and Immunity* 78: 168-176.
 84. Holmes, K. L., L. M. Lantz, and W. Russ. 2001. Conjugation of fluorochromes to monoclonal antibodies. In *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc.
 85. Lyons, A. B., and C. R. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 171: 131-137.
 86. Thavasu, P. W., S. Longhurst, S. P. Joel, M. L. Slevin, and F. R. Balkwill. 1992. Measuring cytokine levels in blood: importance of anticoagulants, processing, and storage conditions. *Journal of Immunological Methods* 153: 115-124.
 87. Lin, S. L., A. P. Castaño, B. T. Nowlin, M. L. Lupper, and J. S. Duffield. 2009. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *The Journal of Immunology* 183: 6733-6743.

- 
88. Pillay, J., T. Tak, V. M. Kamp, and L. Koenderman. 2013. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70: 3813-3827.
89. Savina, A., and S. Amigorena. 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews* 219: 143-156.
90. Porgador, A., J. W. Yewdell, Y. Deng, J. R. Bennink, and R. N. Germain. 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide–MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 6: 715-726.
91. Lipford, G. B., M. Hoffman, H. Wagner, and K. Heeg. 1993. Primary in vivo responses to ovalbumin. Probing the predictive value of the Kb binding motif. *The Journal of Immunology* 150: 1212-1222.
92. Ueda, Y., M. Kondo, and G. Kelsoe. 2005. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* 201: 1771-1780.
93. Nagaoka, H., G. Gonzalez-Aseguinolaza, M. Tsuji, and M. C. Nussenzweig. 2000. Immunization and infection change the number of recombination activating gene (Rag)-expressing B cells in the periphery by altering immature lymphocyte production. *The Journal of Experimental Medicine* 191: 2113-2120.
94. Ueda, Y., K. Yang, S. J. Foster, M. Kondo, and G. Kelsoe. 2004. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *The Journal of Experimental Medicine* 199: 47-58.
95. Tung, J. W., M. D. Mrazek, Y. Yang, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg. 2006. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 6293-6298.
96. Zekavat, G., S. Y. Rostami, A. Badkerhanian, R. F. Parsons, B. Koeberlein, M. Yu, C. D. Ward, T.-S. Migone, L. Yu, G. S. Eisenbarth, M. P. Cancro, A. Najji, and H. Noorchashm. 2008. In vivo BLYS/BAFF neutralization ameliorates islet-directed autoimmunity in nonobese diabetic mice. *The Journal of Immunology* 181: 8133-8144.
97. Laszlo, G., K. S. Hathcock, H. B. Dickler, and R. J. Hodes. 1993. Characterization of a novel cell-surface molecule expressed on subpopulations of activated T and B cells. *The Journal of Immunology* 150: 5252-5262.
98. Sanderson, R. D., P. Lalor, and M. Bernfield. 1989. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regulation* 1: 27-35.
99. Nutt, S. L., P. D. Hodgkin, D. M. Tarlinton, and L. M. Corcoran. 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 15: 160-171.
100. Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda, and A. Zlotnik. 1993. A developmental

- pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *The Journal of Immunology* 150: 4244-4252.
101. Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 14: 377-391.
 102. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annual Review of Immunology* 21: 139-176.
 103. Azzam, H. S., A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E. W. Shores, and P. E. Love. 1998. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *The Journal of Experimental Medicine* 188: 2301-2311.
 104. Aliahmad, P., and J. Kaye. 2008. Development of all CD4 T lineages requires nuclear factor TOX. *The Journal of Experimental Medicine* 205: 245-256.
 105. Schuettpelz, L. G., and D. C. Link. 2013. Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation. *Frontiers in Immunology* 4: 204.
 106. Zhao, X., G. Ren, L. Liang, P. Z. Ai, B. Zheng, J. A. Tischfield, Y. Shi, and C. Shao. 2010. Brief report: interferon- γ induces expansion of Lin⁻Sca-1⁺C-Kit⁺ cells. *STEM CELLS* 28: 122-126.
 107. Holmes, C., and W. L. Stanford. 2007. Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *STEM CELLS* 25: 1339-1347.
 108. Trumpp, A., M. Essers, and A. Wilson. 2010. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 10: 201-209.
 109. Eyles, J. L., M. J. Hickey, M. U. Norman, B. A. Croker, A. W. Roberts, S. F. Drake, W. G. James, D. Metcalf, I. K. Campbell, and I. P. Wicks. 2008. A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis. *Blood* 112: 5193-5201.
 110. Semerad, C. L., F. Liu, A. D. Gregory, K. Stumpf, and D. C. Link. 2002. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 17: 413-423.
 111. Ostrand-Rosenberg, S. 2004. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. *Current Opinion in Immunology* 16: 143-150.
 112. Manz, M. G., and S. Boettcher. 2014. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol* 14: 302-314.
 113. Delano, M. J., K. M. Kelly-Scumpia, T. C. Thayer, R. D. Winfield, P. O. Scumpia, A. G. Cuenca, P. B. Harrington, K. A. O'Malley, E. Warner, S. Gabrilovich, C. E. Mathews, D. Laface, P. G. Heyworth, R. Ramphal, R. M. Strieter, L. L. Moldawer, and P. A. Efron. 2011. Neutrophil mobilization from

- the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. *The Journal of Immunology* 187: 911-918.
114. Maletto, B. A., A. S. Ropolo, D. O. Alignani, M. V. Liscovsky, R. P. Ranocchia, V. G. Moron, and M. C. Pistoiresi-Palencia. 2006. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* 108: 3094-3102.
 115. Calabro, S., M. Tortoli, B. C. Baudner, A. Pacitto, M. Cortese, D. T. O'Hagan, E. De Gregorio, A. Seubert, and A. Wack. 2011. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29: 1812-1823.
 116. Morel, S., A. Didierlaurent, P. Bourguignon, S. Delhaye, B. Baras, V. Jacob, C. Planty, A. Elouahabi, P. Harvengt, H. Carlsen, A. Kielland, P. Chomez, N. Garçon, and M. Van Mechelen. 2011. Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* 29: 2461-2473.
 117. Yang, C.-W., and E. R. Unanue. 2013. Neutrophils control the magnitude and spread of the immune response in a thromboxane A(2)-mediated process. *The Journal of Experimental Medicine* 210: 375-387.
 118. Bratton, D. L., and P. M. Henson. 2011. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends in Immunology* 32: 350-357.
 119. Ebaid, H. 2014. Neutrophil depletion in the early inflammatory phase delayed cutaneous wound healing in older rats: improvements due to the use of un-denatured camel whey protein. *Diagnostic Pathology* 9: 46.
 120. Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12: 557-569.
 121. Gruver, A. L., and G. D. Sempowski. 2008. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *Journal of Leukocyte Biology* 84: 915-923.
 122. Billard, M. J., A. L. Gruver, and G. D. Sempowski. 2011. Acute Endotoxin-Induced Thymic Atrophy Is Characterized By Intrathymic Inflammatory and Wound Healing Responses. *PLoS ONE* 6: e17940.
 123. de Meis, J., D. Aurélio Farias-de-Oliveira, P. H. Nunes Panzenhagen, N. Maran, D. M. S. Villa-Verde, A. Morrot, and W. Savino. 2012. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. *Journal of Parasitology Research* 2012: 9.
 124. Yang, Y.-W., C.-A. Wu, and W. J. W. Morrow. 2004. Cell death induced by vaccine adjuvants containing surfactants. *Vaccine* 22: 1524-1536.
 125. Shi, Y., W. Zheng, and K. L. Rock. 2000. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 14590-14595.

- 
126. Albert, M. L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-89.
127. Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, and N. Bhardwaj. 2000. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 191: 423-434.
128. Coffman, R. L., A. Sher, and R. A. Seder. 2010. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity* 33: 492-503.

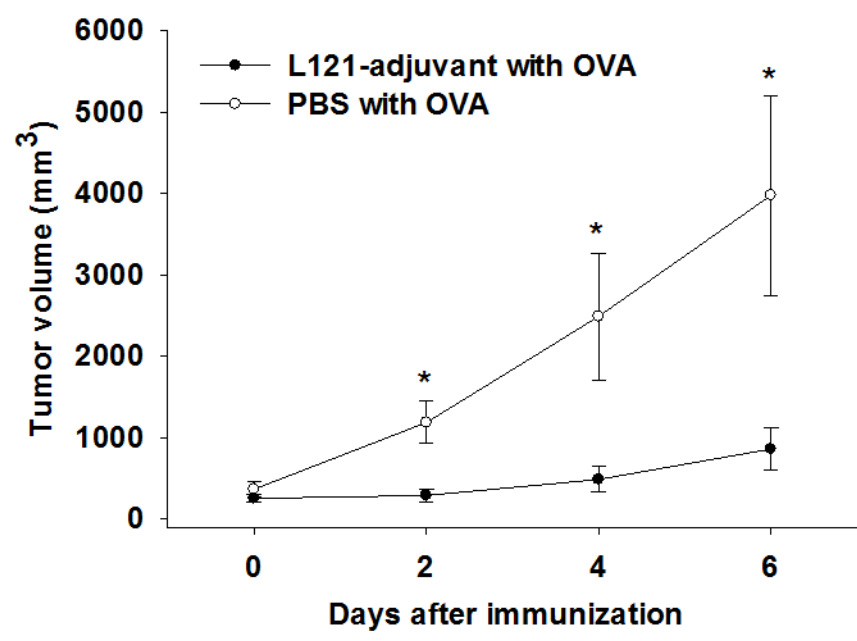


圖一、注射 L121-adj. 以及 OVA 抗原能有效抑制 B16F10-OVA 黑色素細胞腫瘤的增生以及增加動物存活率

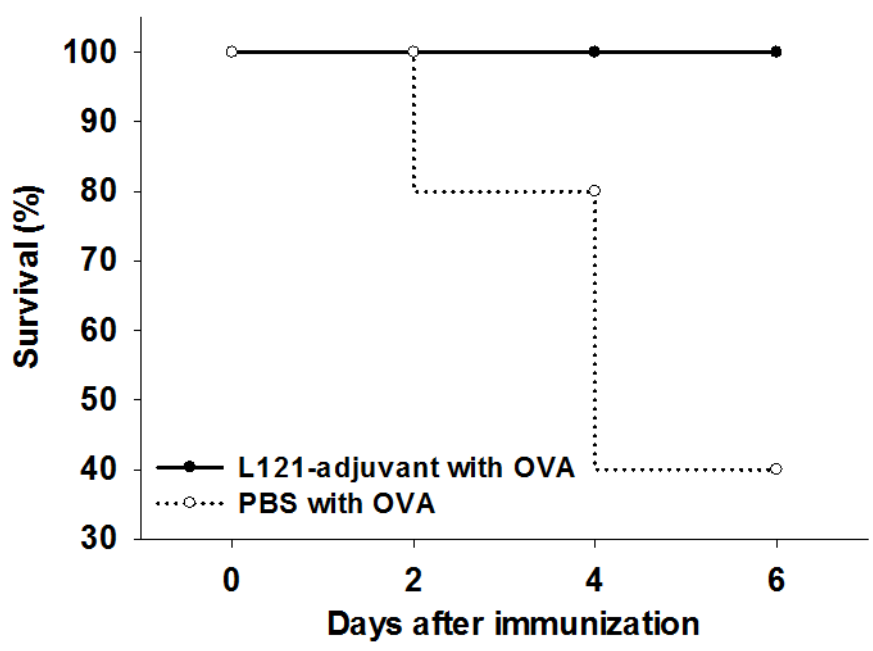
於 C57BL/6 小鼠皮下植入 2×10^6 個 B16F10-OVA 黑色素瘤細胞，兩周後於小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj. 疫苗佐劑或是 PBS。每兩天以游標尺測量腫瘤長寬。腫瘤體積為長 \times 長 \times 寬 \times 0.4。腫瘤體積大於 4,000 mm^3 時視為實驗終點，犧牲動物。(A)圖為經計算統計腫瘤體積後，以平均值以及標準誤差 (standard error mean) 表示，並且以 unpaired t-test 計算注射 L121-adjuvant 以及 PBS 各組之間的 p 值。* $p < 0.05$ 。(B)圖為小鼠之存活率。本實驗各組皆使用五隻 C57BL/6 小鼠。



A



B



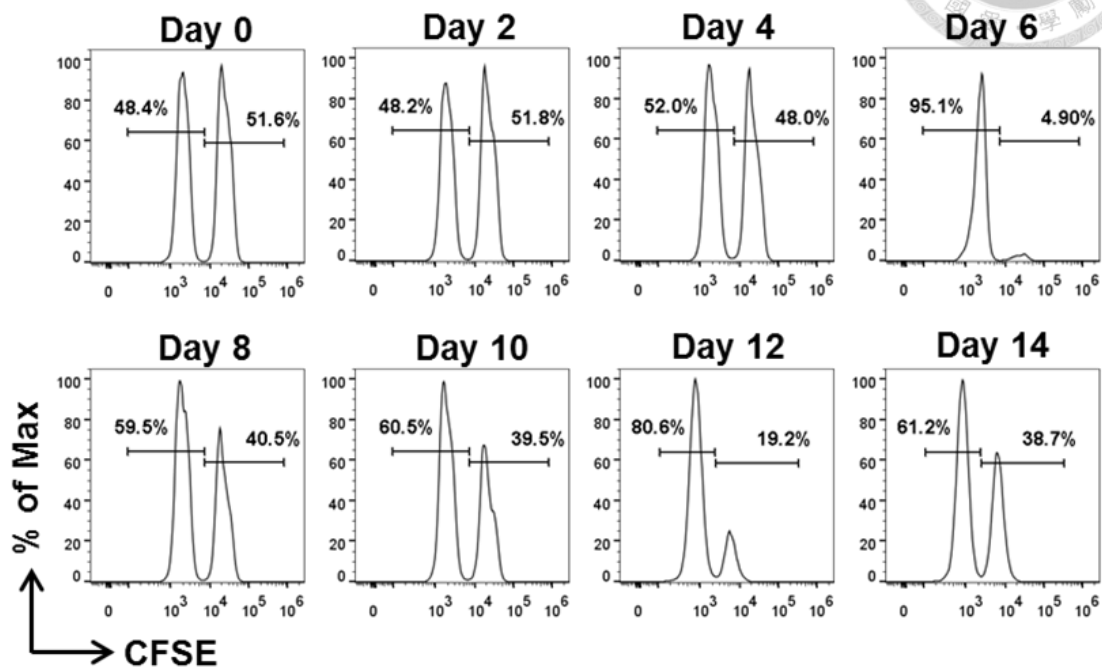


圖二、注射 L121-adj. 以及 OVA 抗原能有效在六天之內產生抗原專一性之細胞毒殺反應

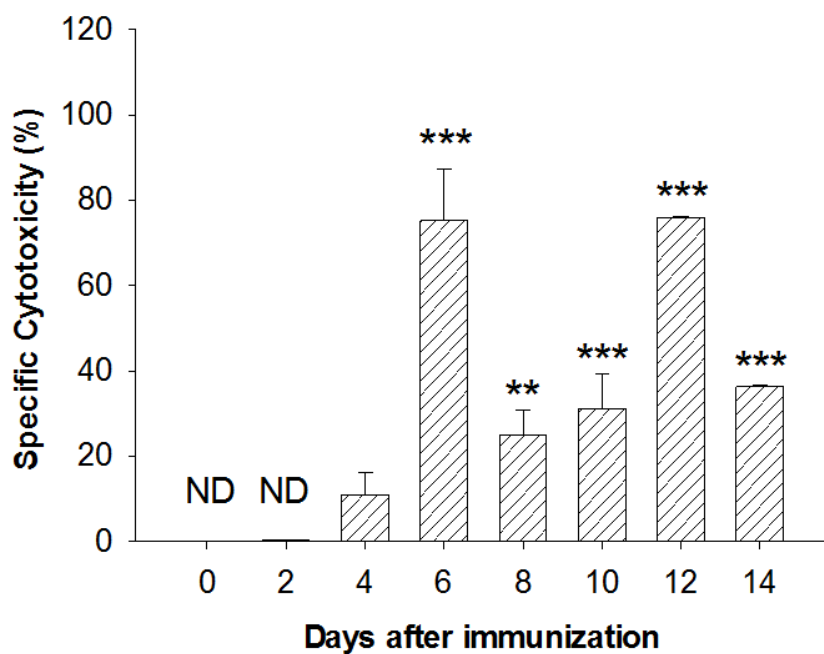
於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj. 疫苗佐劑。於注射後第 2、4、6、8、10、12、14 天測試其體內專一性細胞毒殺能力。測試方法為靜打入 5×10^6 個分別標記有 CFSE^{high} 以及 CFSE^{low} 之 CD45.1 小鼠脾臟細胞。其中 CFSE^{high} 細胞以 2 μ g/mL SIINFEKL 胜肽處理一小時，而 CFSE^{low} 細胞則未加入 SIINFEKL 胜肽。然後將相同數目之兩群細胞混合後打入 C57BL/6 小鼠靜脈。於 20 小時後犧牲 C57BL/6 小鼠，接著以流式細胞儀分析脾臟內 CD45.1⁺/CD45.2 族群中 CFSE^{high} 以及 CFSE^{low} 細胞數目的比例。細胞毒殺以 $1 - (\text{CFSE}^{\text{high}}/\text{CFSE}^{\text{low}}) \times 100\%$ 計算，並扣除第 0 天控制組之背景值。(A) 圖為四次獨立重複試驗中之代表圖。(B) 圖為統計四次獨立重複試驗之抗原專一性細胞毒殺的能力，以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示。以 One Way ANOVA 統計分析。 $**p < 0.01$ ； $*** p < 0.001$ ，為與第 0 天控制組比較之結果。n.d. 表示未測得。



A



B





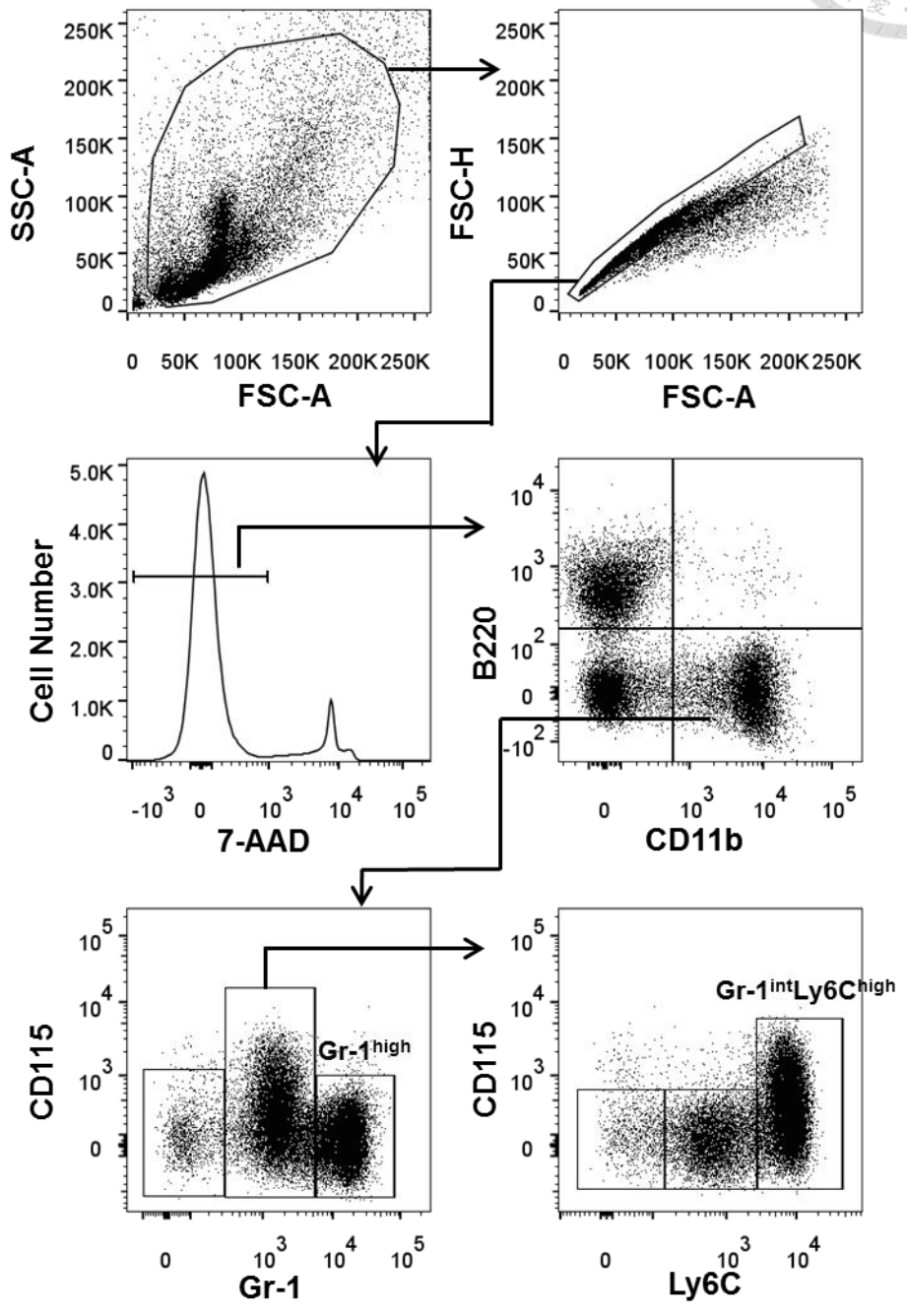
圖三、注射 L121-adj. 影響骨髓中顆粒性白血球與單核細胞的發育

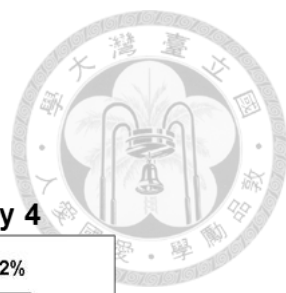
於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj. 疫苗佐劑。於注射後第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠，取脛骨以及股骨中之骨髓，接著以流式細胞儀分析。(A)圖為分析骨髓中顆粒性白血球與單核細胞的 pre-gating 示意圖，取 untreated 控制組作為代表。(B)圖為以 Gr-1 以及 CD115 分析不同時間點骨髓中顆粒性白血球的變化。(C)圖為以 Ly6C 及 CD115 分析不同時間點骨髓中單核細胞的變化。(D)圖為顆粒性白血球隨時間點不同，數量的變化。(E)圖單核細胞隨時間點不同，數量的變化。結果為三次獨立實驗取其一為代表圖，細胞數目以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示(n=3)。並且以 One Way ANOVA 統計分析。* p < 0.05；** p < 0.01；*** p < 0.001。



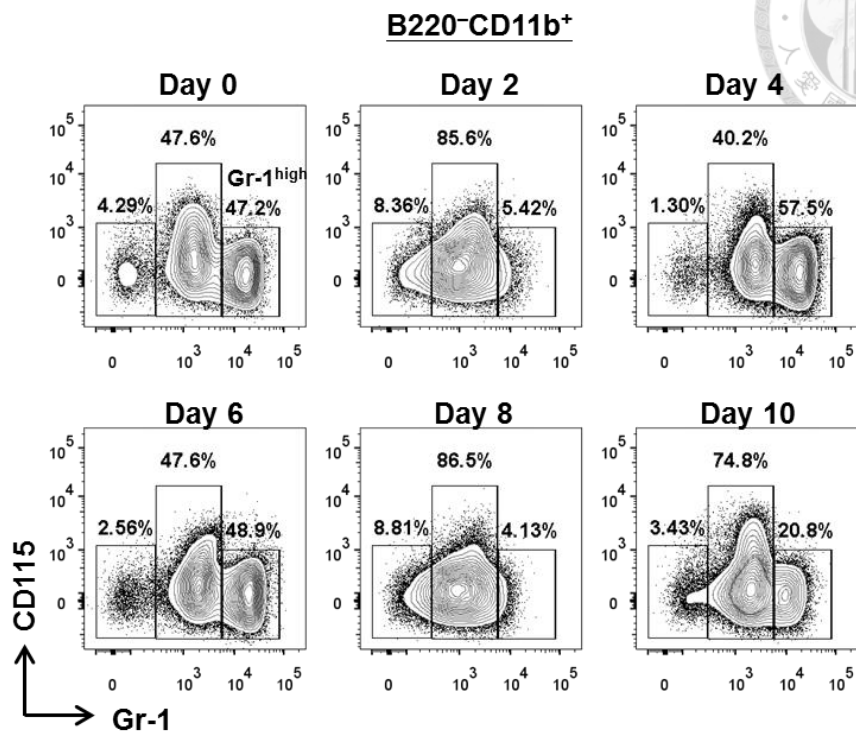
A

Bone Marrow

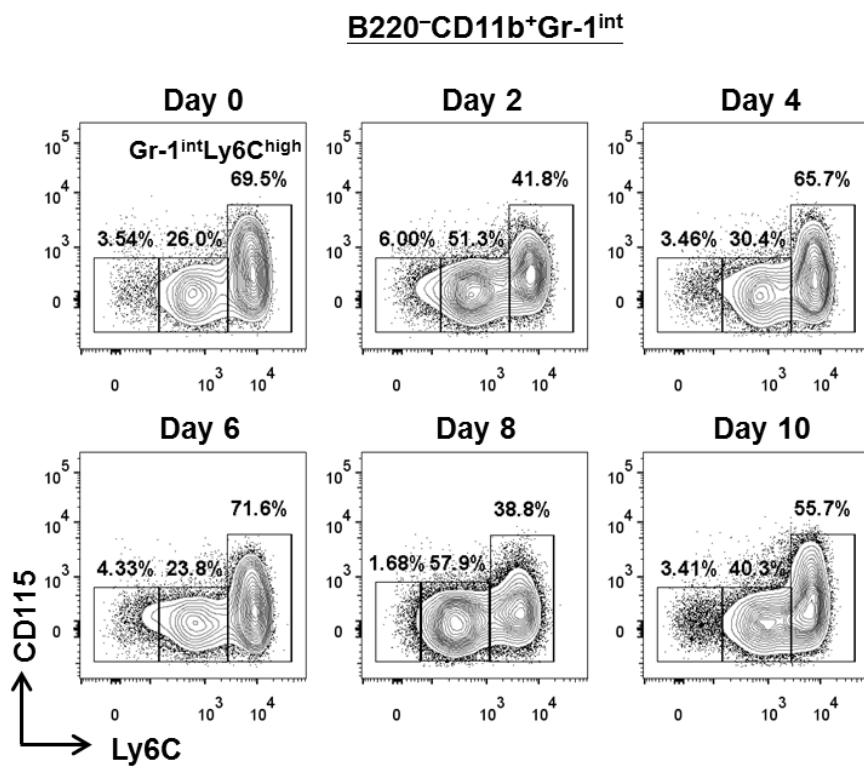




B Bone Marrow

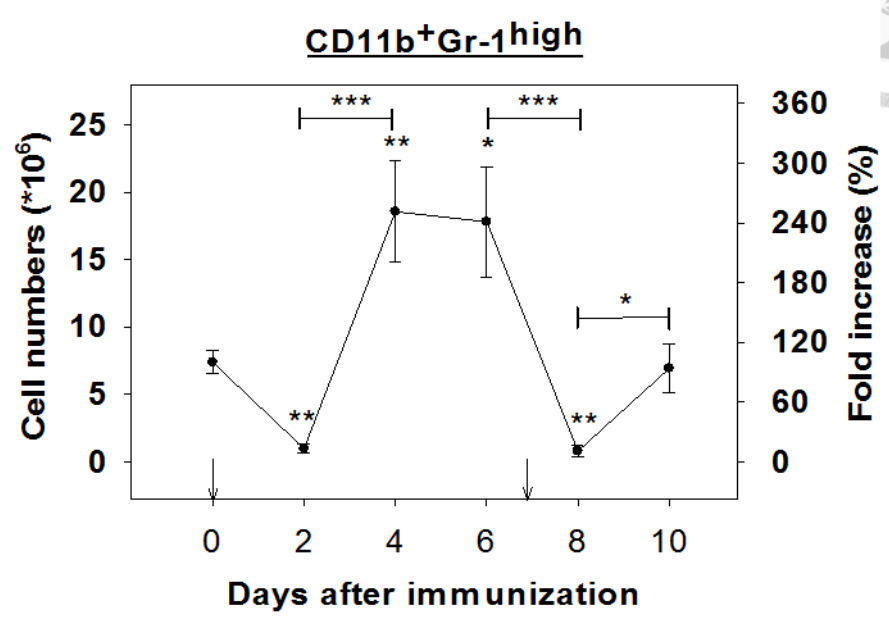


C Bone Marrow

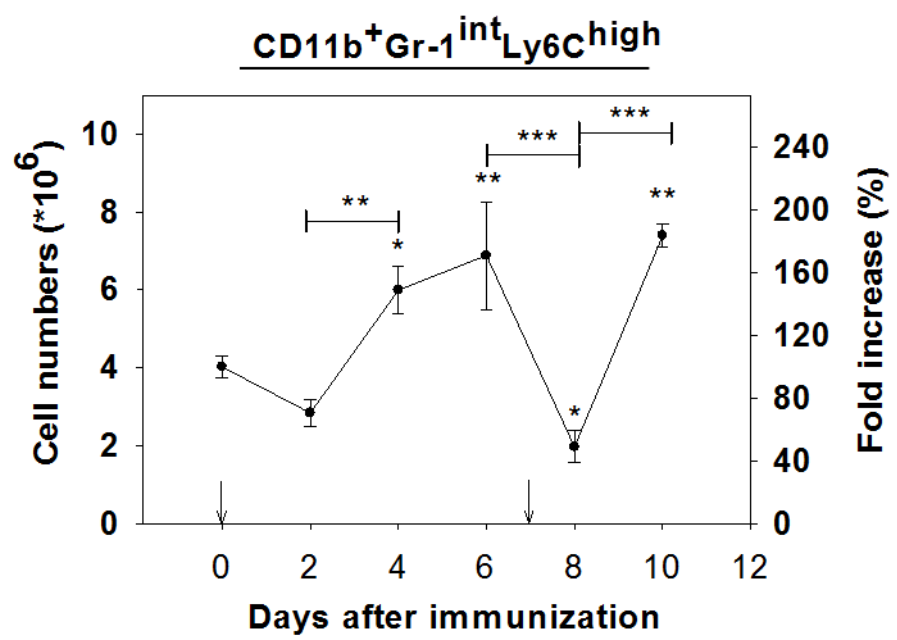




D Bone Marrow



E Bone Marrow





F

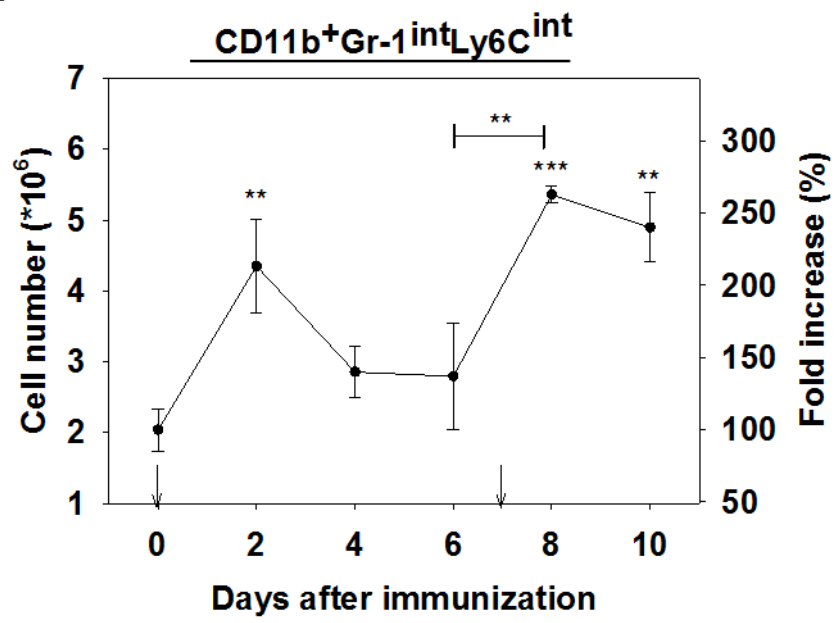


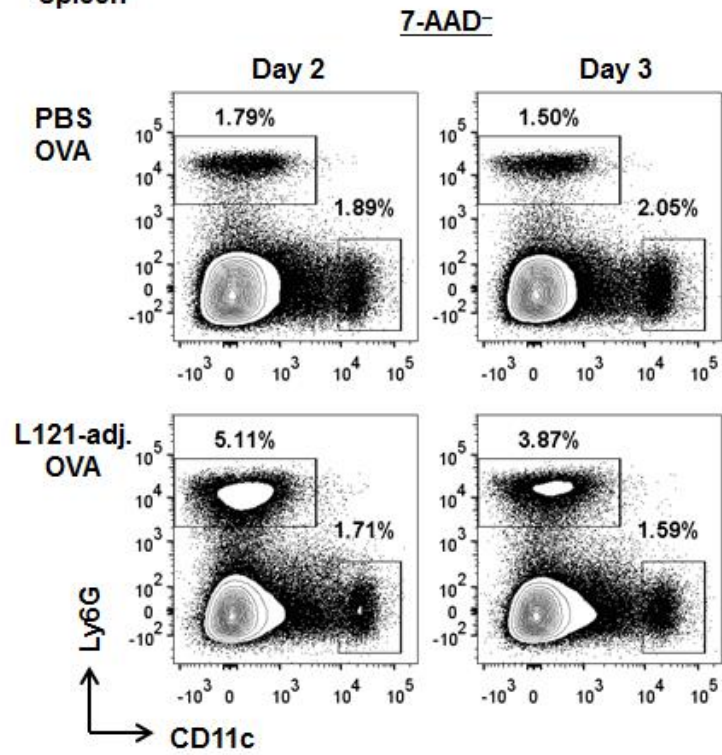


圖 四、 注射 L121-adj.使脾臟中顆粒性白血球增加，並且使顆粒性白血球表現出 F4/80 表面抗原

C57BL/6 小鼠於皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.或是 PBS。於注射後 48 及 72 小時後，犧牲小鼠，取出脾臟細胞以流式細胞儀分析。(A)圖為以 Ly6G 以及 CD11c 分析脾臟中樹突細胞以及顆粒性白血球。(B)圖為以 CD11c 以及 Ly6G gating 出脾臟中顆粒性白血球之後，再以 CD11b 以及 F4/80 分析顆粒性白血球的 F4/80 表現之變化。自三次獨立試驗其中取一代表性呈現。



A Spleen



B Spleen

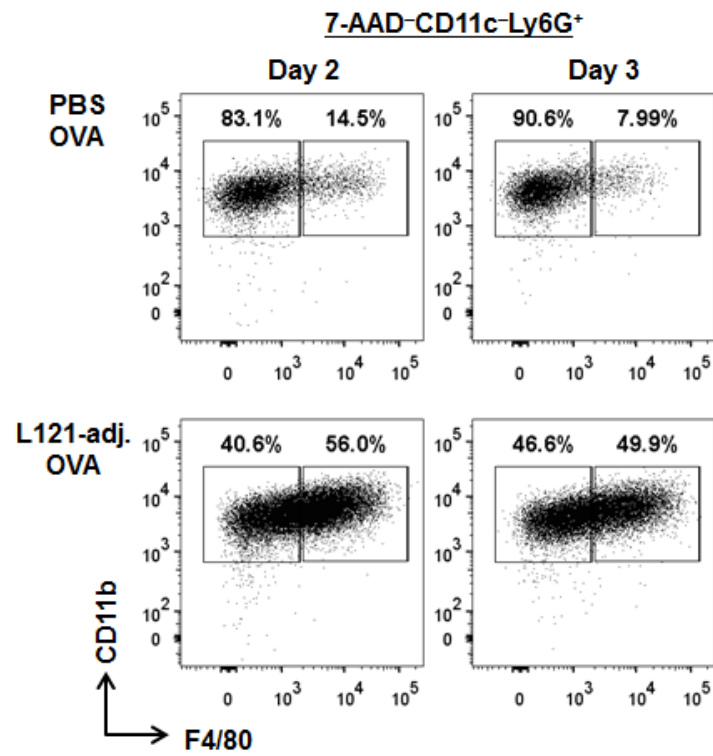


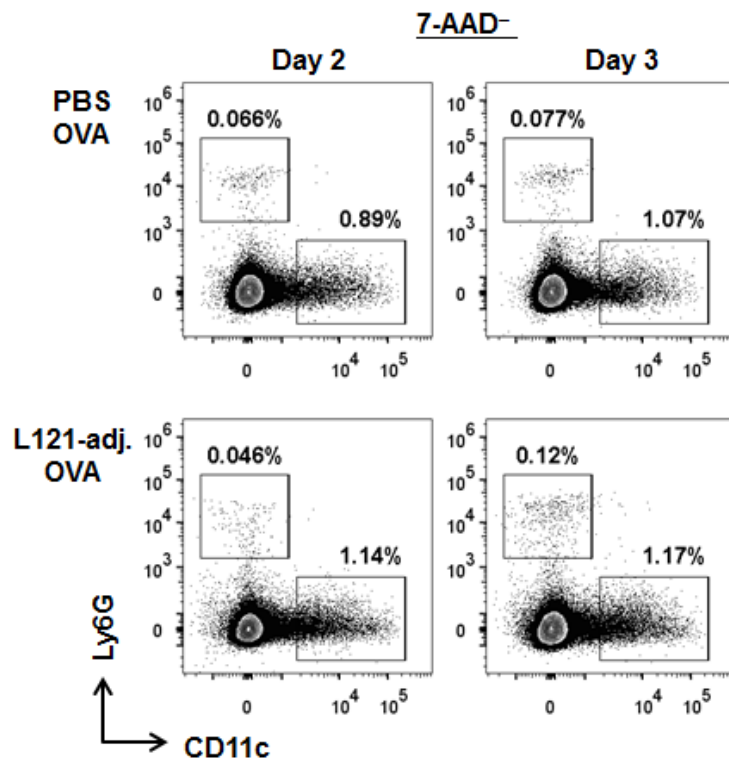


圖 五、注射 L121-adj.使淋巴結中顆粒性白血球表現出 F4/80 表面抗原

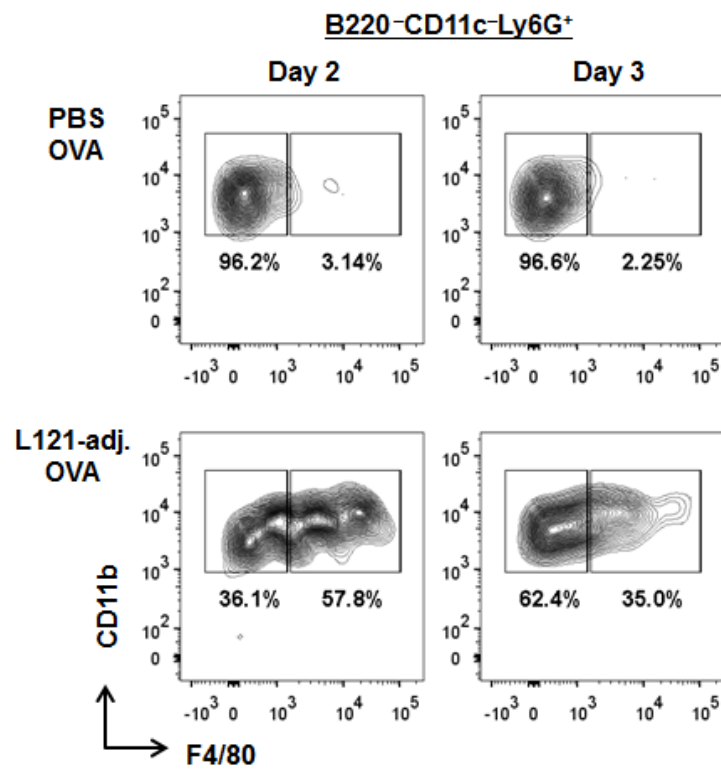
C57BL/6 小鼠於皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.或是 PBS。於注射後 48 及 72 小時後，犧牲小鼠，取出腹股溝之淋巴結細胞以流式細胞儀分析。(A)圖為以 Ly6G 以及 CD11c 分析淋巴結中樹突細胞以及顆粒性白血球。(B)圖為以 CD11c 以及 Ly6G gating 出淋巴結中顆粒性白血球之後，再以及 F4/80 分析顆粒性白血球的 F4/80 表現之變化。所呈現為三次獨立試驗中其中之一作為代表。



A Draining LN



B Draining LN

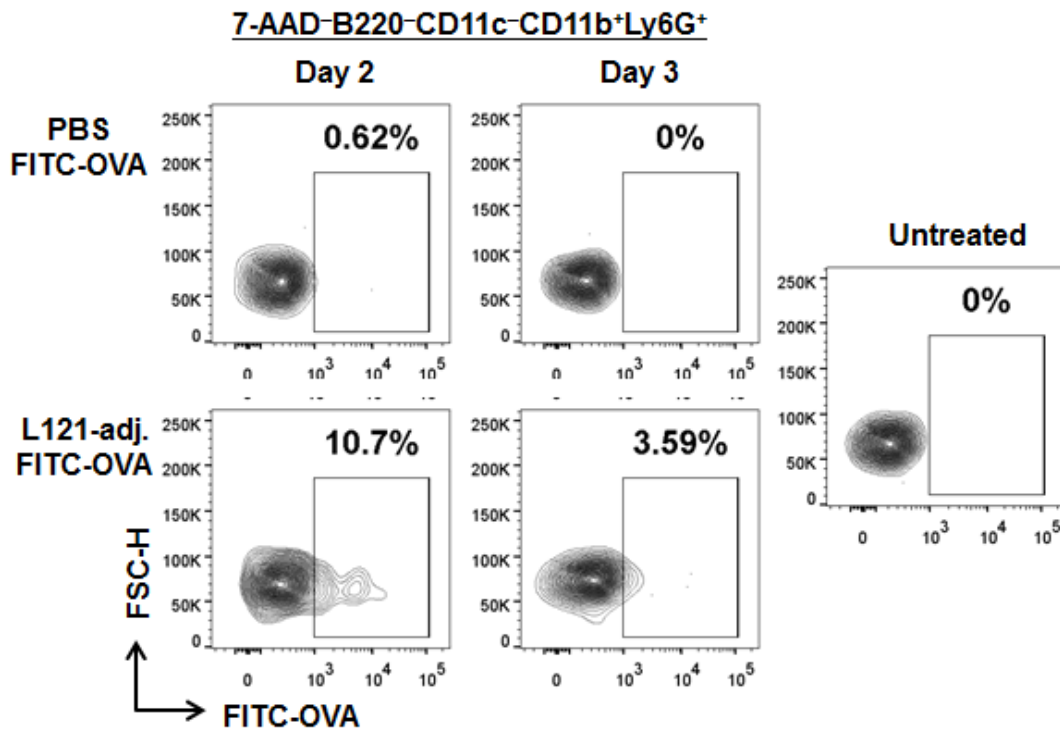




圖六、注射 L121-adj. 增加樹突細胞以及顆粒細胞輸送抗原至淋巴結中

C57BL/6 小鼠於皮下注射 100 μL 含有 200 μg 標定有 FITC 螢光 OVA 之 L121-adj. 或是 PBS。於注射後 48 及 72 小時後，犧牲小鼠，取出腹股溝之淋巴結細胞以流式細胞儀分析。(A)圖為先以 7-AAD⁻Ly6G⁺以及 CD11c⁻作為 pre-gating，分析顆粒性白血球中吞噬抗原 OVA 而帶有 FITC 螢光的情形。(B)圖為先以 7-AAD⁻Ly6G⁻以及 CD11c⁺作為 pre-gating，分析樹突細胞中吞噬抗原 OVA 而帶有 FITC 螢光的情形。所呈現為三次獨立試驗中其中之一作為代表。並且以未注射任何螢光抗原之控制組作為判斷是否帶有螢光之標準。

A Draining LN



B Draining LN

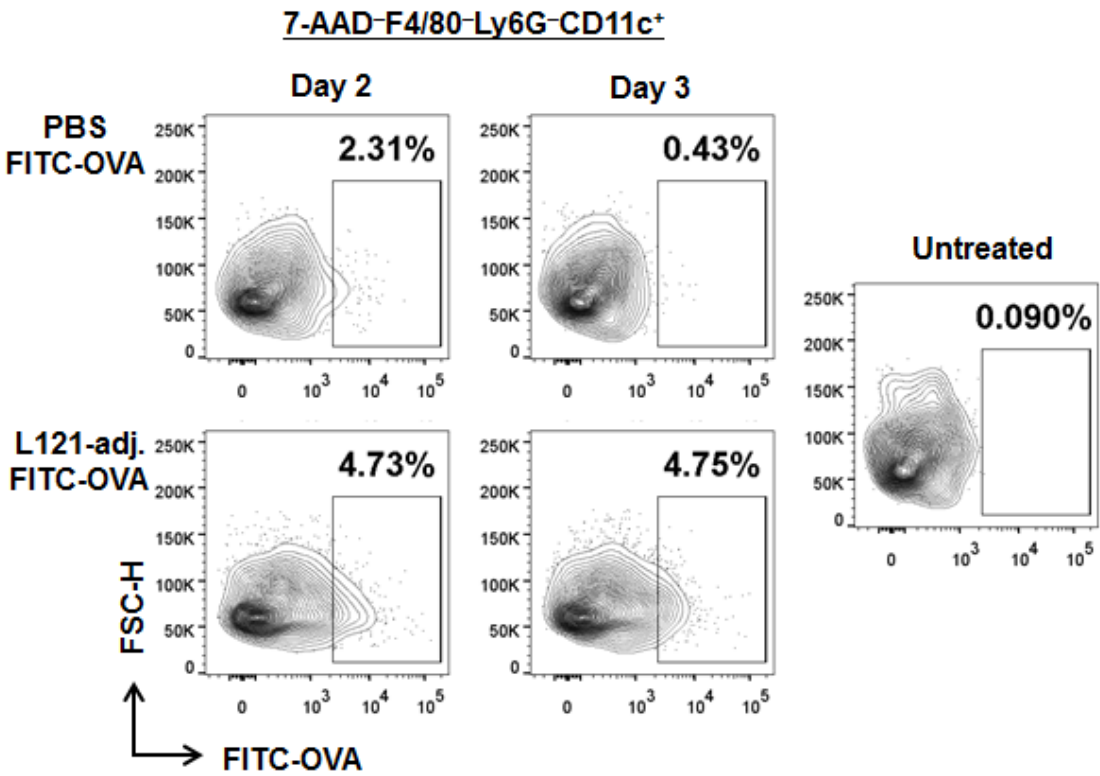
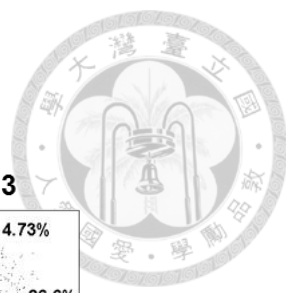


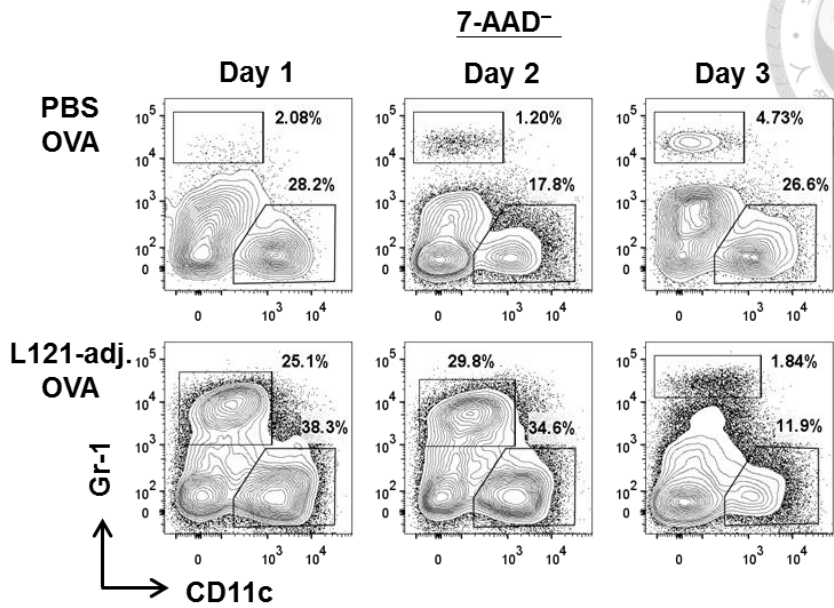


圖 七、注射 L121-adj.使該局部注射位置吸引更多的樹突細胞以及顆粒性白血球浸潤，並且使樹突細胞表現出 MHC-I-SIINFEKL 抗原呈現機制

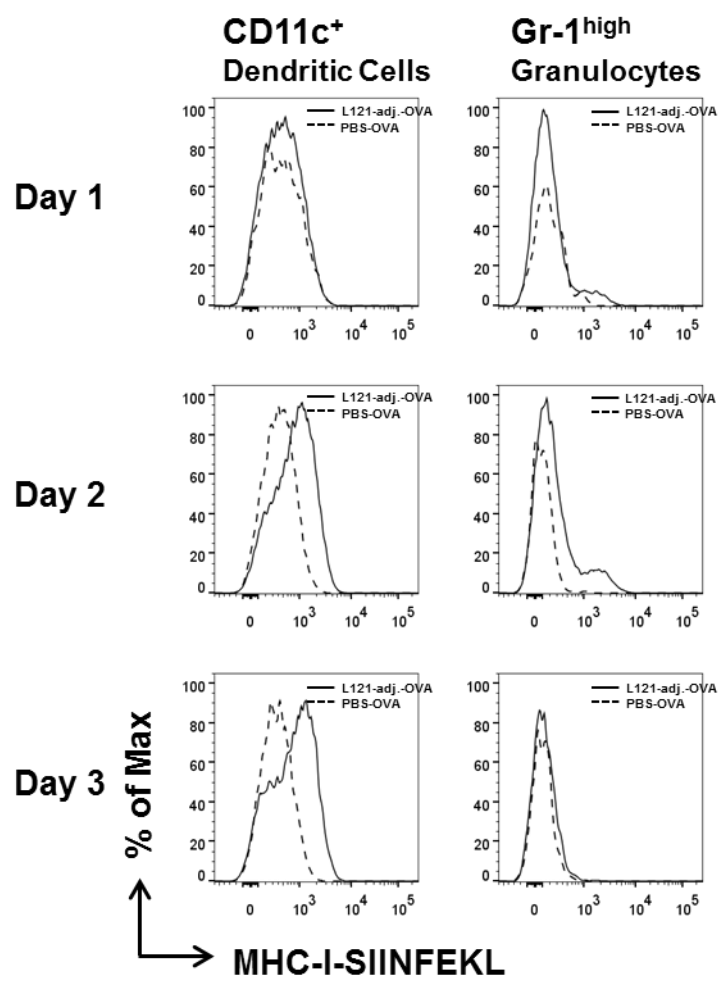
C57BL/6 小鼠於以除毛之皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.或是 PBS。於注射後 24, 48 及 72 小時後，犧牲小鼠，取出注射位置之皮下組織細胞以流式細胞儀分析。(A)圖為先以 7-AAD⁻作為 pre-gating，去除死細胞後，以 Gr-1 及 CD11c 分析注射位置之皮下組織中的顆粒性白血球以及樹突細胞。(B)圖為分析注射位置之皮下組織中，樹突細胞以及顆粒性白血球表現出 MHC-I-SIINFEKL 表現的情形，以判斷抗原呈現的能力。圖中實線為注射 L121-adjuvant 以及 OVA 的組別，而虛線為在相同時間點，注射 PBS 以及 OVA 的組別。兩組並列以作為比較。(C)圖為局部注射部位中 CD11c⁺樹突細胞以及 Gr-1^{high}顆粒性白血球之數量。(D)圖為以流式細胞分選儀將局部注射部位中的 CD11c⁺樹突細胞以及 Gr-1^{high}顆粒性白血球分選出後，以 Wright-Giemsa 染色呈現細胞外觀。結果為三次重複實驗取其一為代表圖，細胞數目以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示(n=3)。並且以 One Way ANOVA 統計分析。** p <0.01。

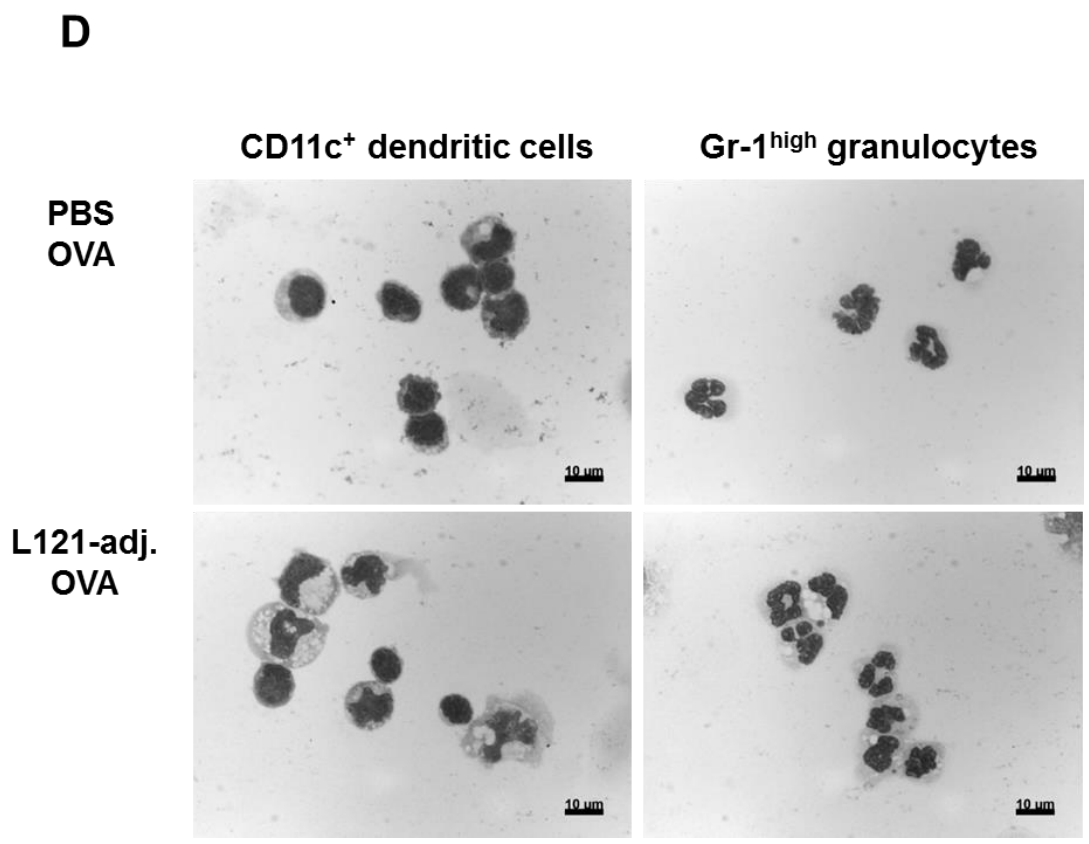
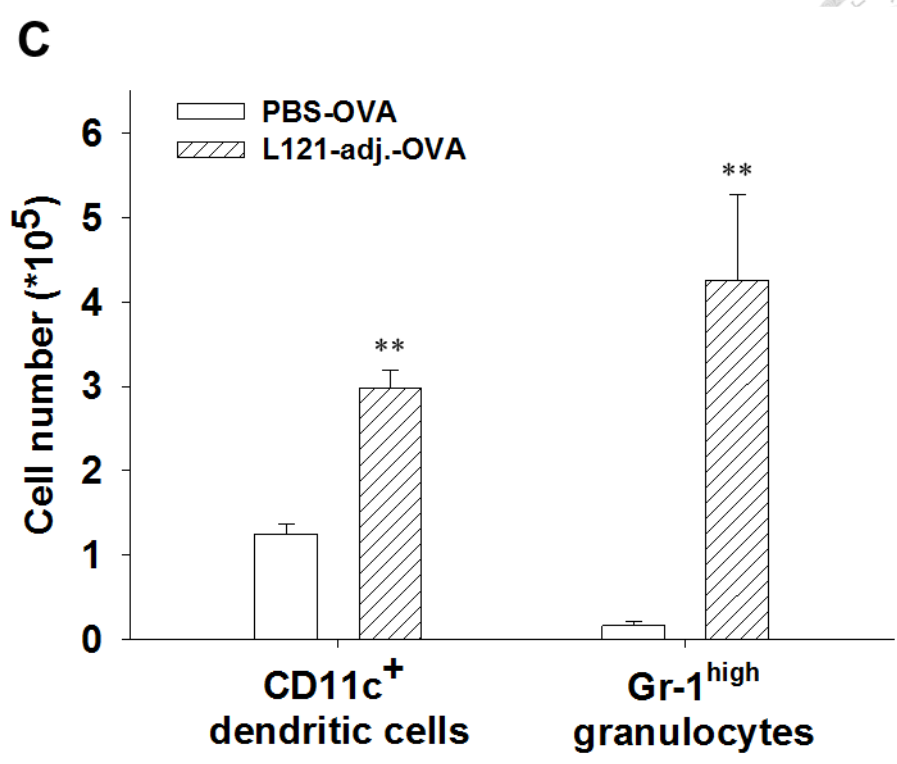


A Injection site



B Injection site







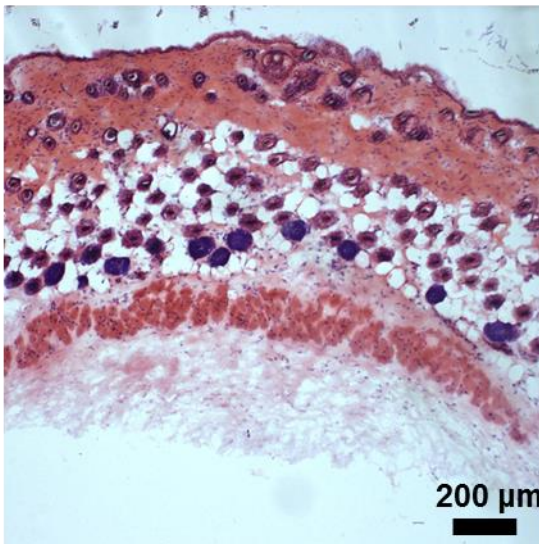
圖八、注射 L121-adj.使該局部注射位置發炎腫脹，並且吸引樹突細胞以及顆粒性白血球至組織中

C57BL/6 小鼠於以除毛之皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.或是 PBS。於注射後兩天後，犧牲小鼠，取出注射位置之皮下組織，以 OCT compound 包覆，以冷凍切片機切成厚度 10 μ m 之薄片。(A)圖為將切片以 haematoxylin and eosin 染色，並且以顯微鏡觀察，圖中 scale bar 為 200 μ m。(B)圖為將切片以 rabbit anti-chicken ovalbumin, armenian hamster anti-mouse CD11c 以及 rat anti-mouse Gr-1 為一抗，再以 TRITC anti-rabbit IgG, Dylight 405 anti-armenian hamster IgG 以及 FITC anti-rat IgG 做為二抗染色，並且以螢光顯微鏡觀察，圖中 scale bar 為 50 μ m。OVA 螢光以紅色呈現，CD11c 螢光以藍色呈現，Gr-1 螢光以綠色呈現。

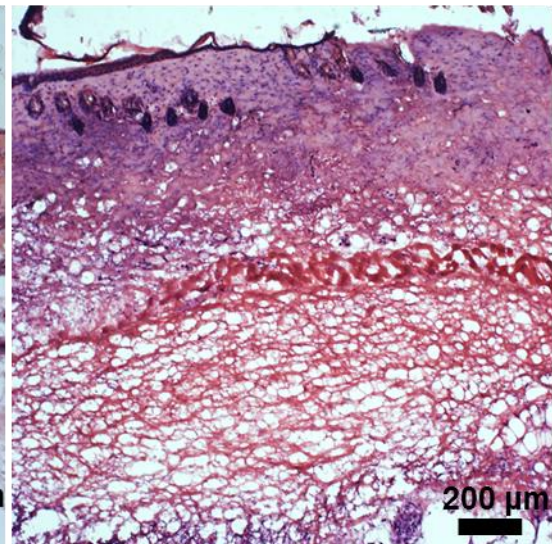


A

**PBS-OVA
day 2**



**L121-adj.-OVA
day 2**

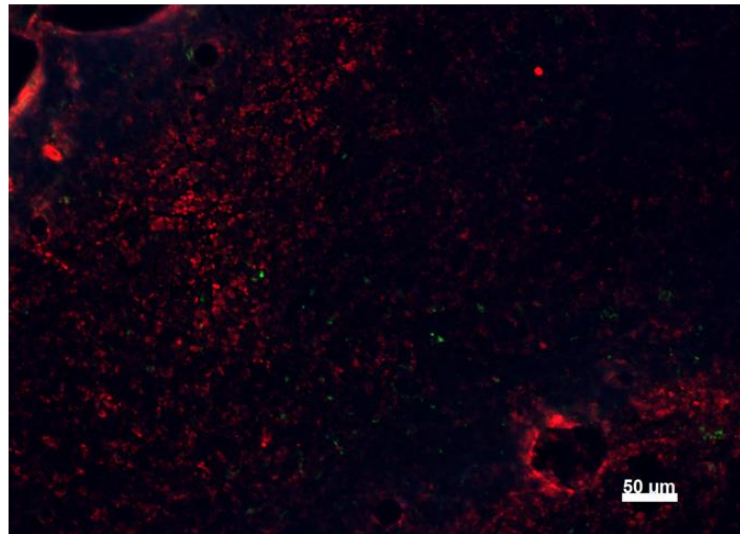




B

OVA / CD11c / Gr-1

**PBS-OVA
day 2**



OVA / CD11c / Gr-1

**L121-adj.-OVA
day 2**

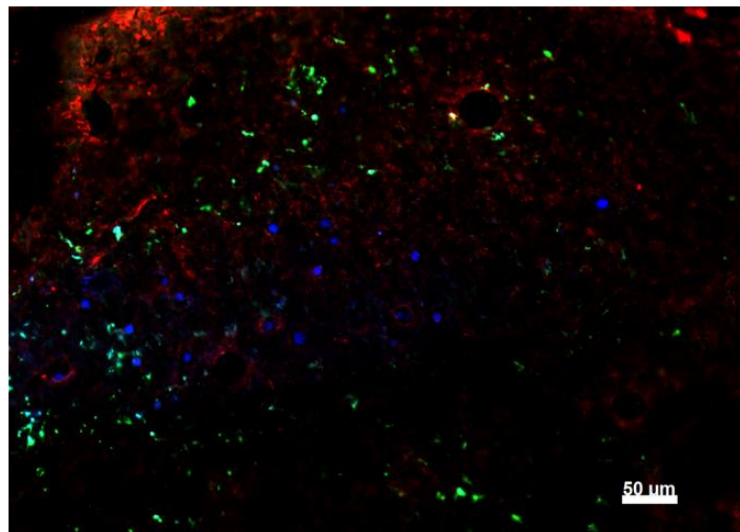




圖 九、 注射 L121-adj.使樹突細胞獲得抗原呈現的能力

C57BL/6 小鼠於已除毛之皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 或是 PBS。於注射 48 小時後，犧牲小鼠，取出注射位置之皮下組織細胞以流式細胞分選儀，分選出 Gr-1^{high} 顆粒性白血球，以及 CD11c⁺ 樹突細胞，分別與純化後的 OT-I CD8⁺ T 細胞混合後以尾靜脈注射至 CD45.1 小鼠。72 小時後犧牲 CD45.1 小鼠，取出脾臟細胞，以流式細胞儀分析 OT-I CD8⁺ T 細胞之增生。(A)圖為以 CFSE 為軸，分析 CD8⁺ T 細胞活化後增生而導致 CFSE 染劑稀釋的情形，所呈現為三次獨立試驗中其中之一作為代表。(B)圖為經計算 division index 之後，以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示(n=3)，並且以 One Way ANOVA 統計分析。* p <0.05；*** p <0.001。

A

Spleen

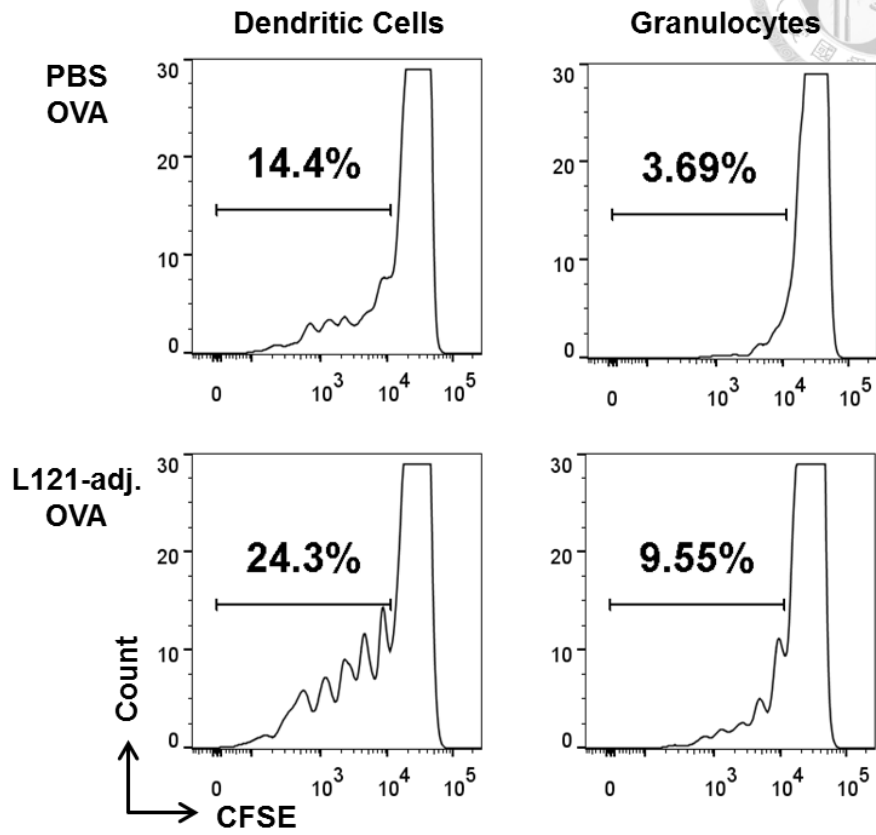
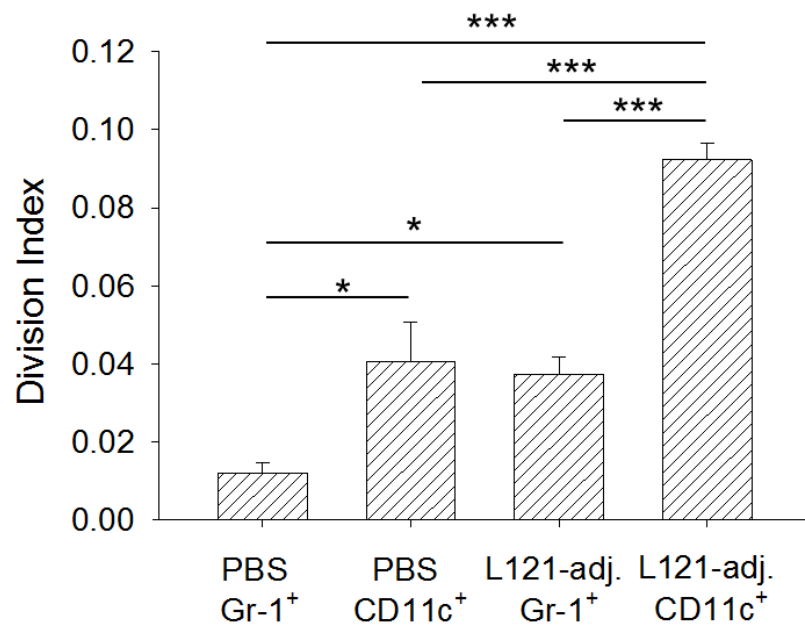
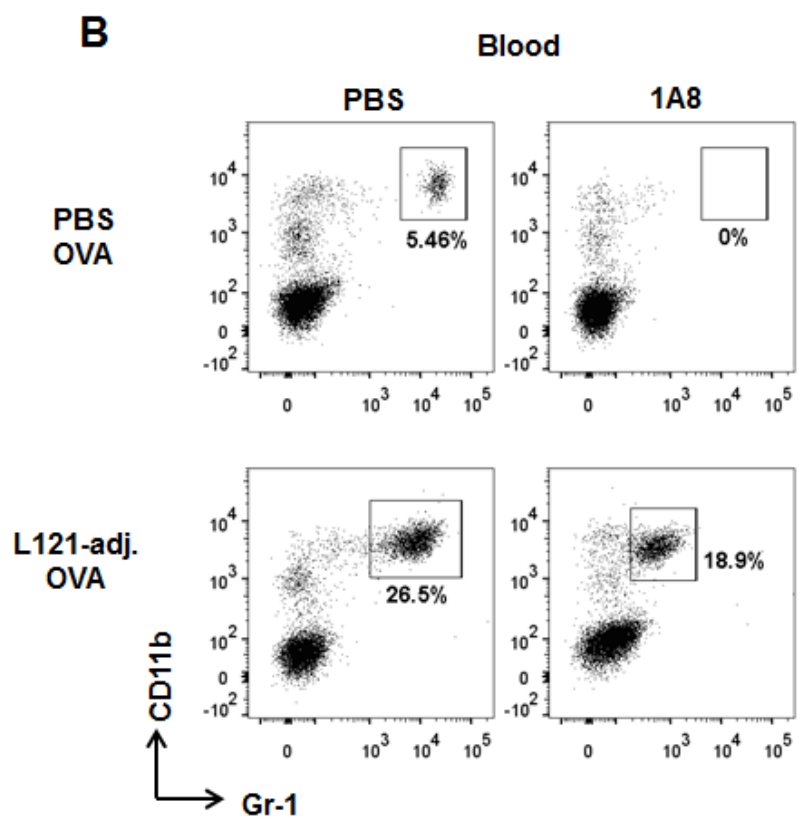
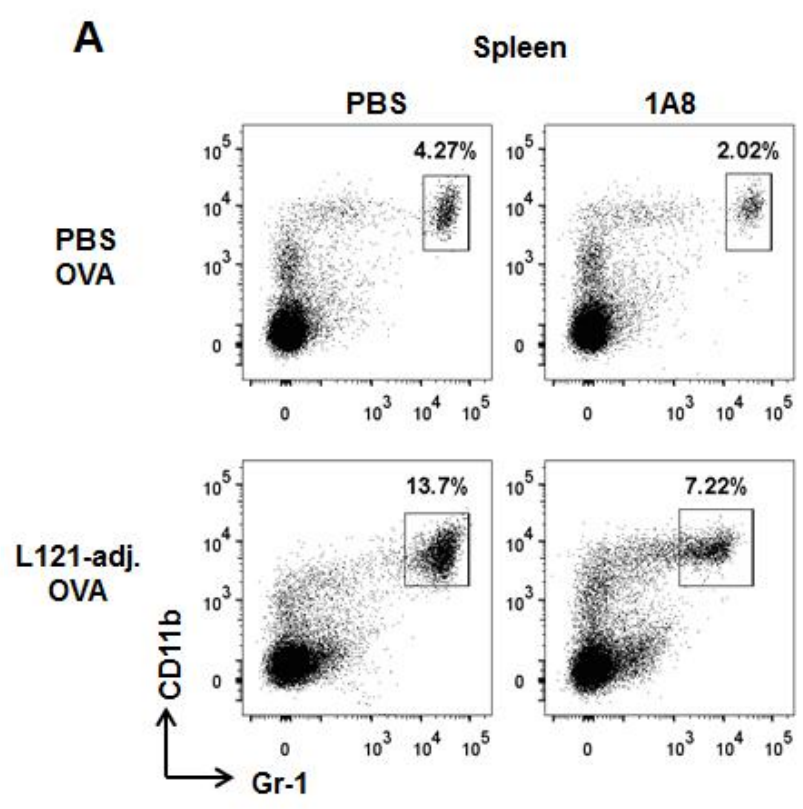
CD45.1⁻CD45.2⁺CD8⁺TCRVβ5⁺7-AAD⁻**B**

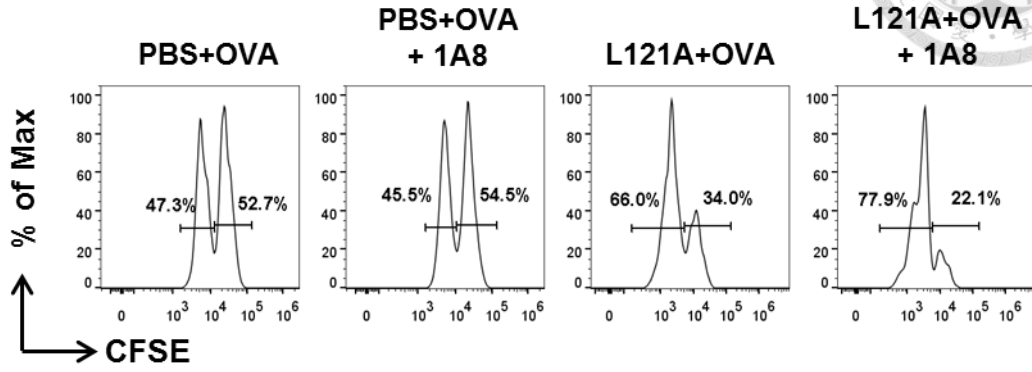


圖 十、*In vivo* 去除顆粒性白血球後，再注射 L121-adj.使專一性毒殺性 T 細胞毒殺能力增加

C57BL/6 小鼠於注射 L121-adjuvant 以及 OVA 之前一天，於腹腔注射 500 μg 之 anti-mouse Ly6G (1A8) 單株抗體以去除小鼠體內顆粒性白血球。於第零、七天各注射一劑 1A8 抗體，於第一、八天各注射一劑 L121-adjuvant 以及 100 μg OVA，於第十二天測量體內專一性毒殺 T 細胞能力。(A)圖為第十一天，也就是注射 1A8 抗體五天後，以 CD11b 及 Gr-1 分析脾臟中顆粒性白血球細胞。(B)圖為第二天，也就是注射 1A8 抗體二天後，頰窩採血以分析血液中顆粒性白血球細胞。(C)圖為三次獨立重複試驗中之代表圖。(D)圖為統計三次獨立重複試驗之抗原專一性細胞毒殺的能力，以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示(n=3)。以 One Way ANOVA 統計分析。 $**p < 0.01$ ； $***p < 0.001$ 。n.d. 表示未測得。



C



D

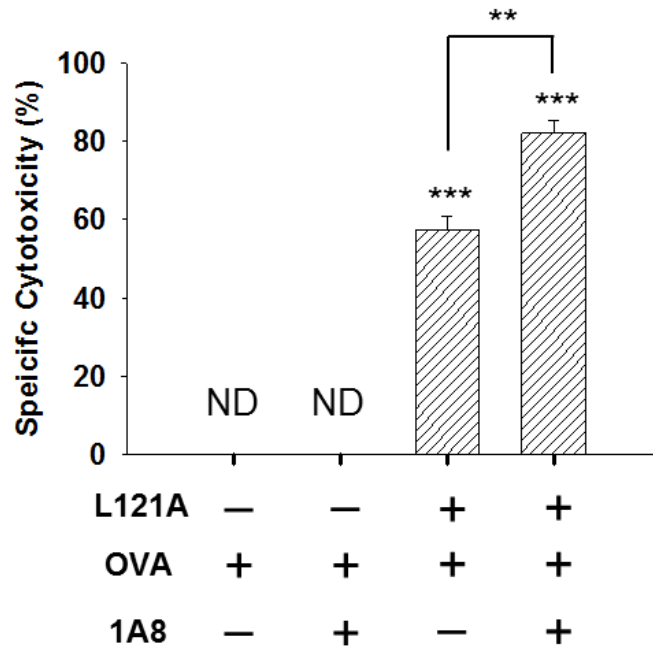
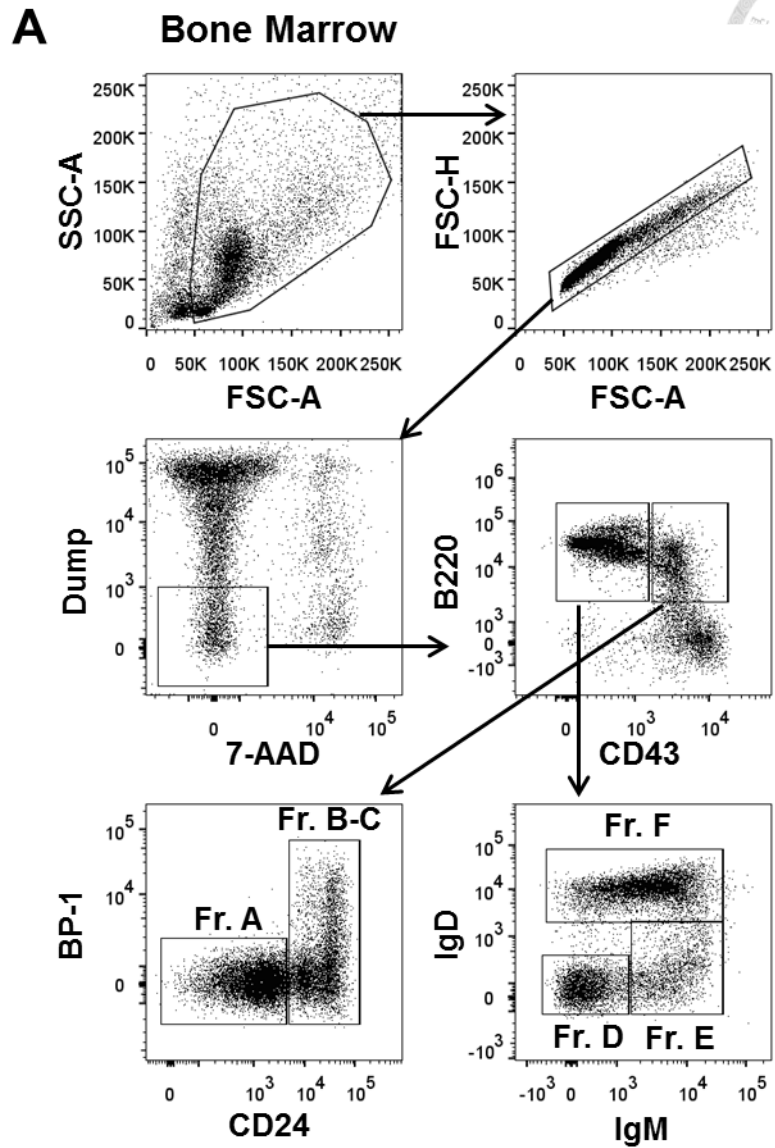
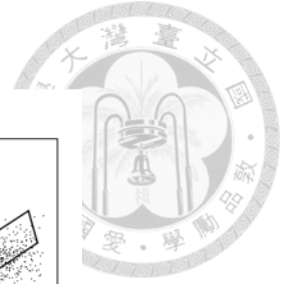


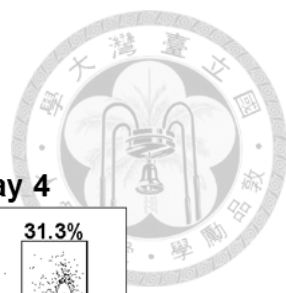


圖 十一、 注射 L121-adj. 影響骨髓中 B 細胞的發育，並且減少骨髓中 B 細胞之數量

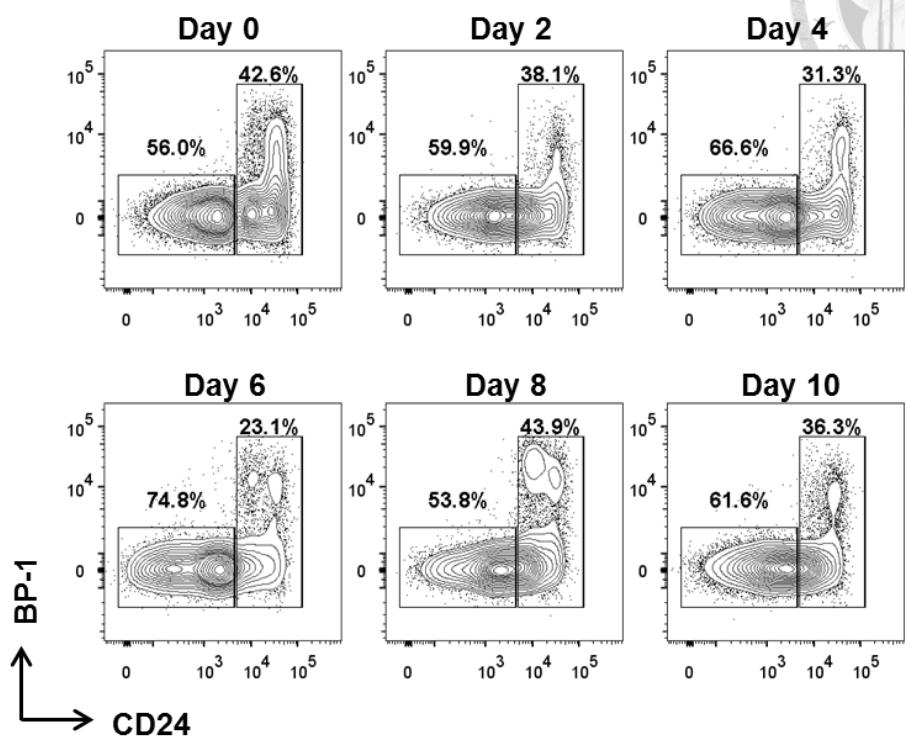
於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.。於注射後第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠，取脛骨以及股骨中之骨髓，以流式細胞儀分析。(A)圖為分析骨髓中 B 細胞之 pre-gating 示意圖。以及不同 fraction 之定義。取未經任何處理之控制組別作為代表。(B)圖為經 L121-adj. 注射後，不同時間點 B 細胞中 fraction A 至 fraction C 之變化。(C)圖為經 L121-adj. 注射後，不同時間點 B 細胞中 fraction D 至 fraction F 之變化。(D-a)圖為骨髓中 pre-pro B 細胞數目(fraction A)在不同時間點的變化。(D-b)圖為骨髓中 pro B 細胞數目(fraction B-C)在不同時間點的變化。(D-c)圖為骨髓中 pre B 細胞數目(fraction D) 在不同時間點的變化。(D-d)圖為骨髓中 immature B 細胞數目(fraction E)在不同時間點的變化。(D-e)圖為骨髓 mature B 細胞數目(fraction F)在不同時間點的變化。(E-a)圖為骨髓中所有 B 細胞數目(fraction A-F)的總和注射 L121-adjuvant 在不同時間點的變化。(E-b)圖為骨髓中所有 B 細胞數目(fraction A-F)的總和注射 Alum 在不同時間點的變化。結果為三次獨立實驗取其一作為代表，細胞數目以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示(n=3)。以 One Way ANOVA 統計分析。* p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 。



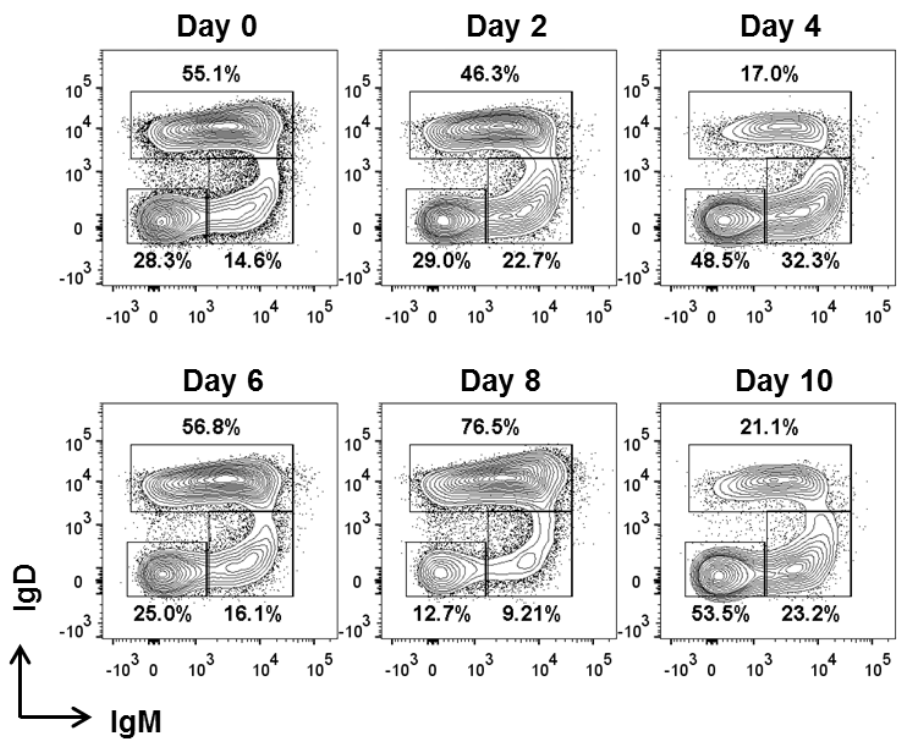
Fraction	Name	Phenotype
A	Pre-pro B cell	Dump ⁻ B220 ⁺ CD43 ⁺ CD24 ⁻ BP-1 ⁻
B-C	Pro B cell	Dump ⁻ B220 ⁺ CD43 ⁺ CD24 ⁺ BP-1 ^{+/-}
D	Pre B cell	Dump ⁻ B220 ⁺ CD43 ⁻ IgM ⁻ IgD ⁻
E	Immature B cell	Dump ⁻ B220 ⁺ CD43 ⁻ IgM ⁺ IgD ⁻
F	Mature B cell	Dump ⁻ B220 ⁺ CD43 ⁻ IgM ^{+/-} IgD ⁺

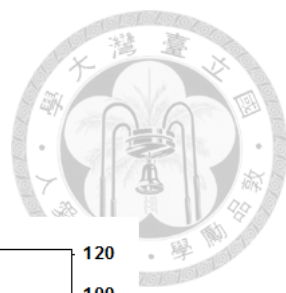


B BM Dump⁻B220⁺CD43⁺



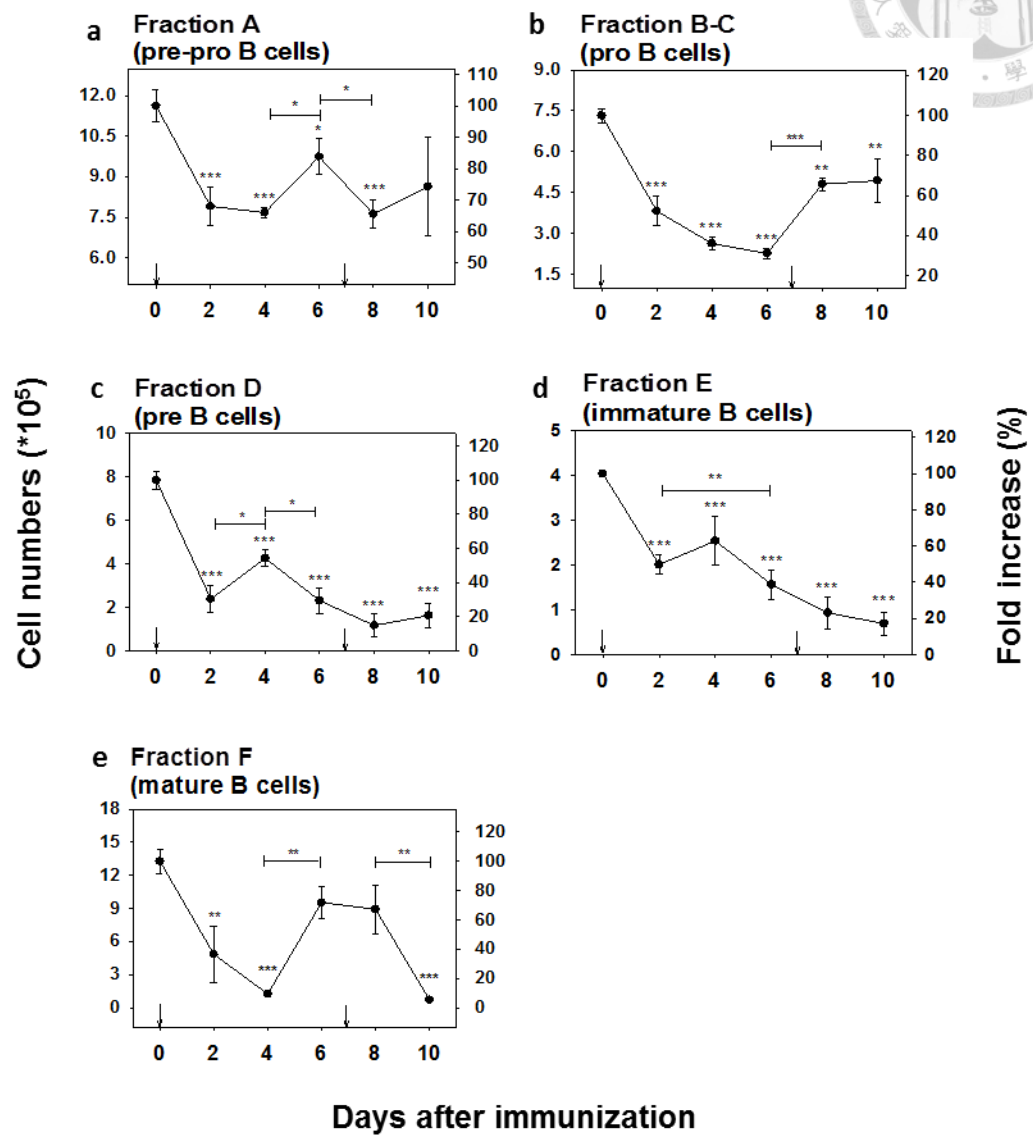
C BM Dump⁻B220⁺CD43⁻





D

BM





E BM

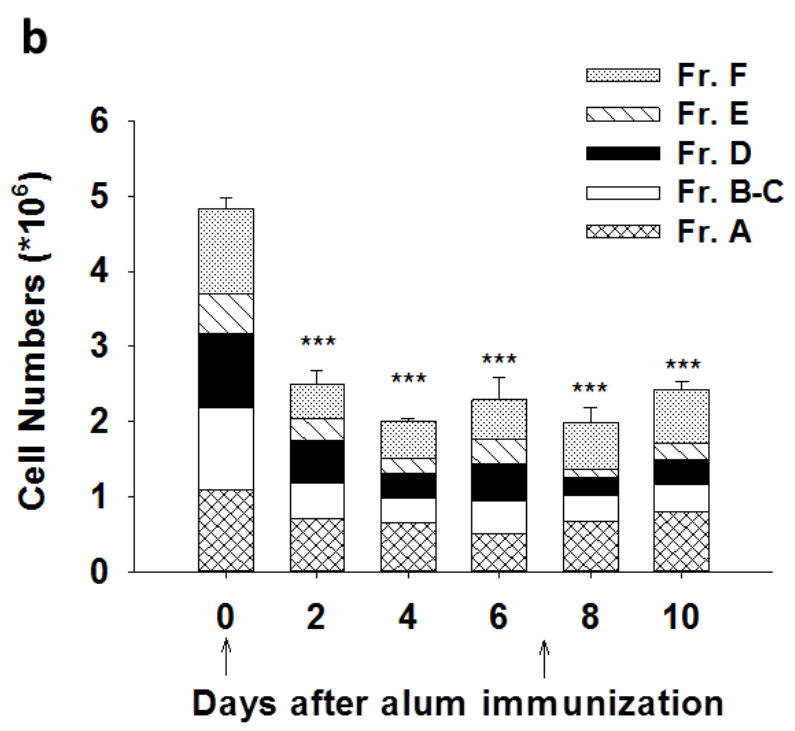
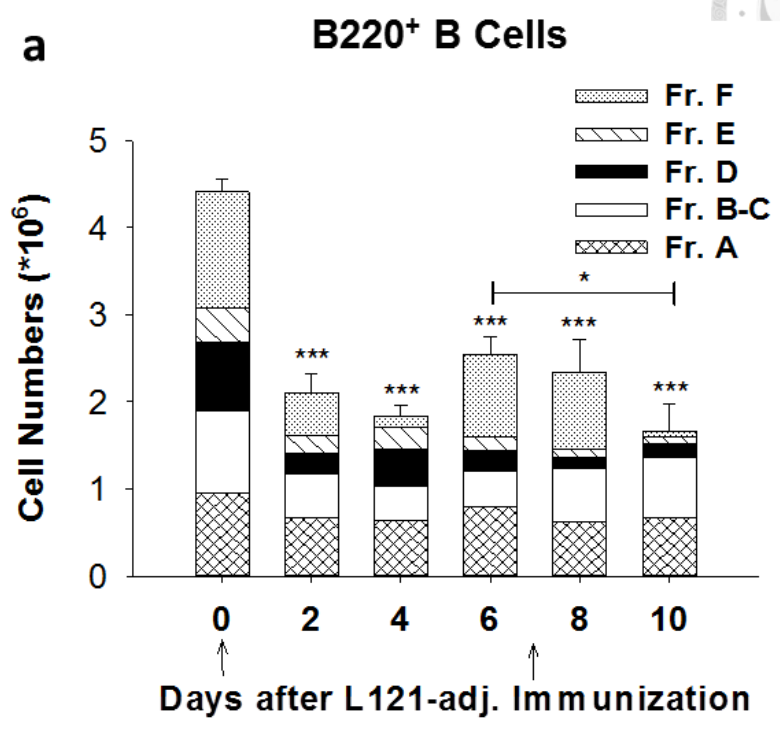


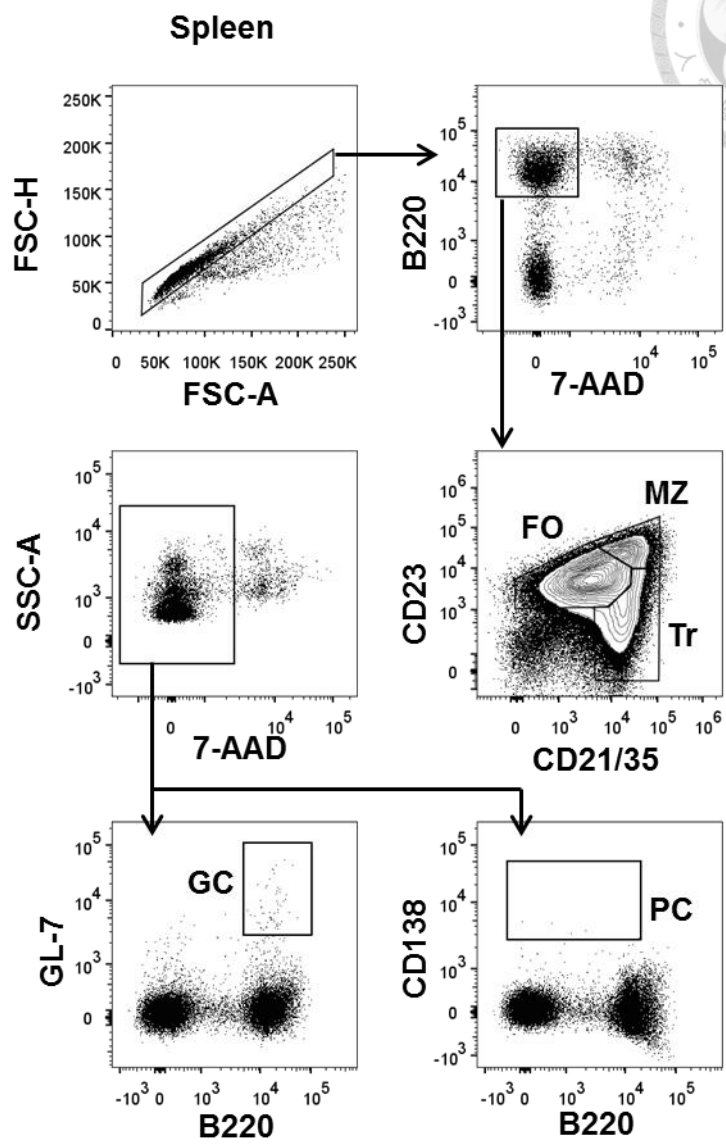


圖 十二、注射 L121-adj. 影響脾臟中 B 細胞的分化，增加 germinal center B 細胞以及 plasma B 細胞

於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.。於注射後第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠，取脾臟以流式細胞儀分析。(A) 圖為以 IgM 及 CD21/35 為軸，分析所有 B220⁺ 之 B 細胞，並且以不同時間作圖。(B) 圖為以 CD138 分析脾臟中的 plasma B 細胞，並且以不同時間作圖。(C) 圖為分析不同時間點，germinal center B 細胞隨時間的變化。(D-a) 圖為 transnational B 細胞數目隨時間的變化。(D-b) 圖為 marginal zone B 細胞數目隨時間的變化。(D-c) 圖為 germinal center B 細胞數目隨時間的變化。(D-d) 圖為 plasma B 細胞數目隨時間的變化。結果為四次獨立實驗取其一作為代表，細胞數目以平均值以及標準誤差 (standard error mean) 表示 (n=6-7)。以 One Way ANOVA 統計分析。* p < 0.05；** p < 0.01；*** p < 0.001。



A

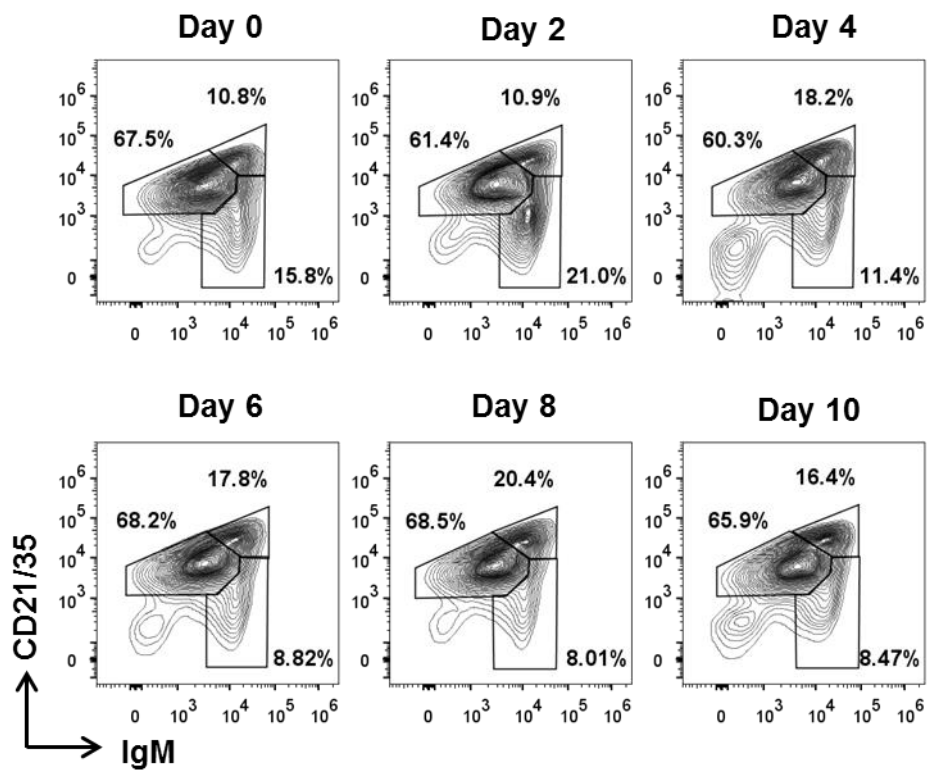


Population	Phenotype
Marginal Zone (MZ) B Cells	B220 ⁺ IgM ^{high} CD21/35 ^{high}
Follicular (FO) B Cells	B220 ⁺ IgM ⁺ CD21/35 ⁺
Transitional (Tr) B Cells	B220 ⁺ IgM ^{high} CD21/35 ^{low}
Germinal Center (GC) B Cells	B220 ⁺ GL7 ⁺
Plasma B Cells (PC)	B220 ^{+/-} CD138 ⁺



B Spleen

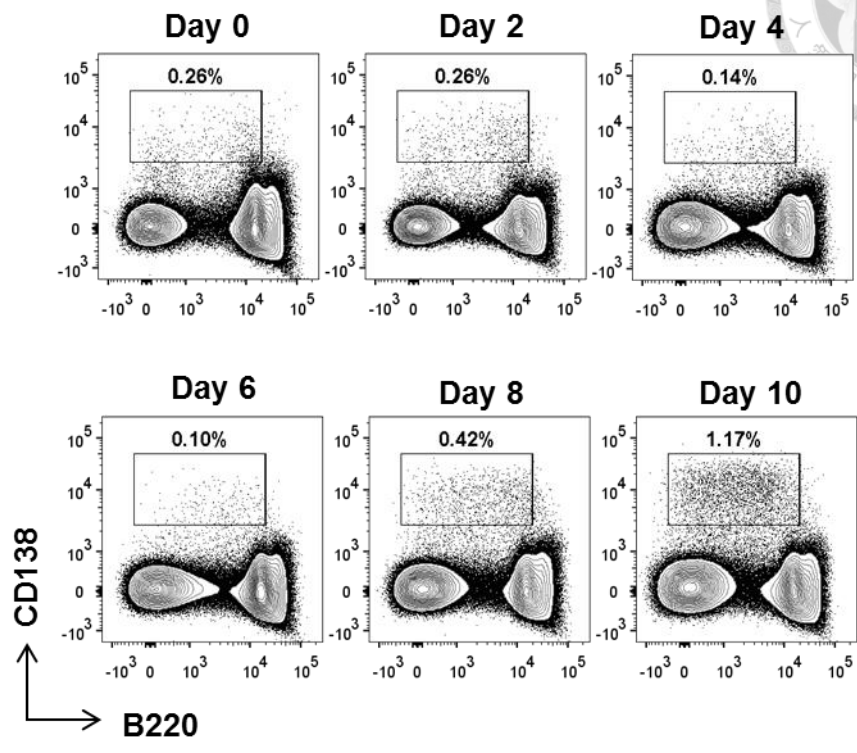
7-AAD-B220⁺





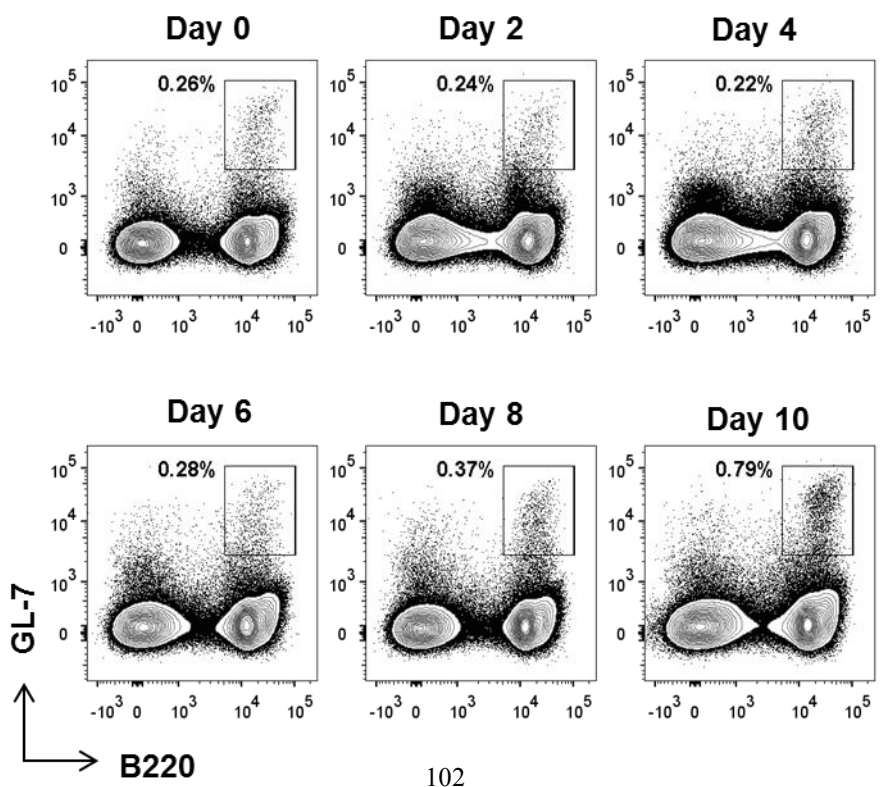
C Spleen

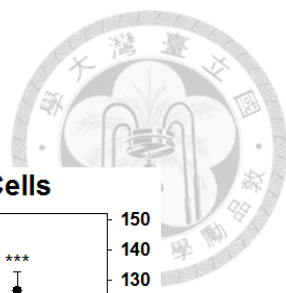
7-AAD⁻



D Spleen

7-AAD⁻





E Spleen

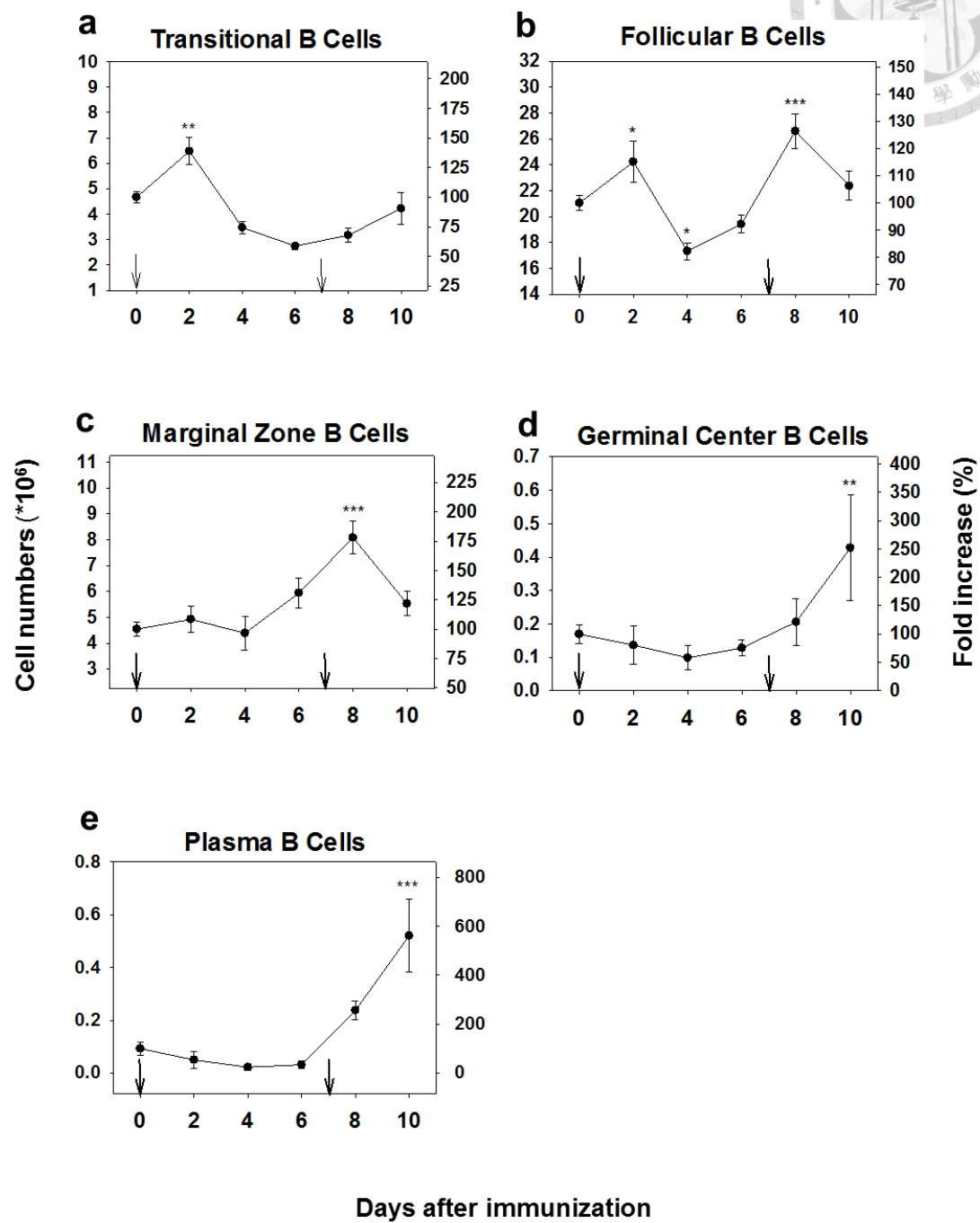




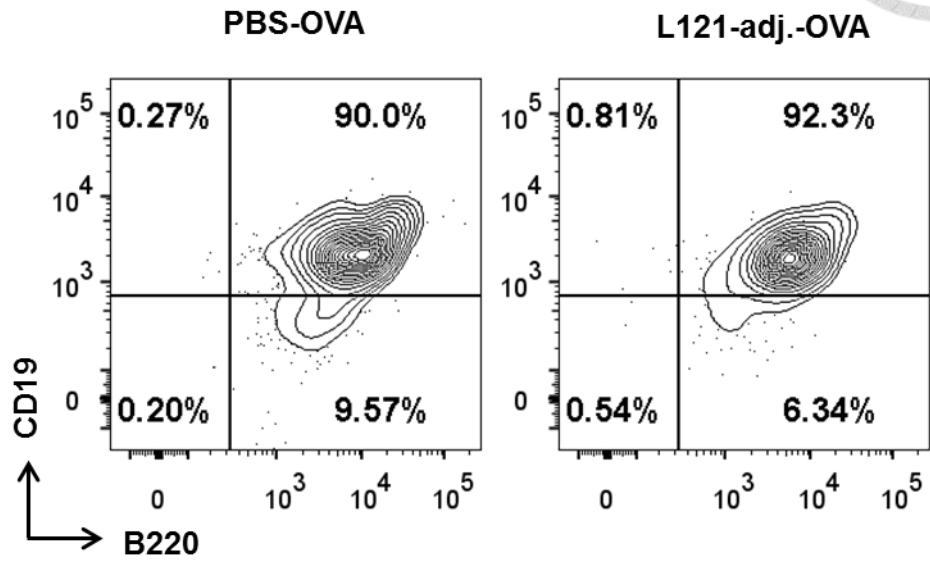
圖 十三、注射 L121-adj.使骨髓中前驅 B 細胞轉移到脾臟中，成為 transitional B 細胞

以 FACS Aria III 流式細胞分選儀分選出 CD45.1 小鼠之前驅 B 細胞 (B220⁺IgM⁻IgD⁻)，注射至 CD45.2 小鼠脛骨骨髓腔，並且皮下注射 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.或是 PBS。兩天後犧牲 CD45.2 小鼠，取出脾臟以流式細胞儀分析。圖(A)為圈選出 CD45.2⁻CD45.1⁺後，以 B220 及 CD19 分析。圖(B)為圈選出 CD45.2⁻CD45.1⁺後，以 CD21/35 及 IgM 分析。所呈現為三次獨立試驗中其中之一作為代表。



A Spleen

donor cells
CD45.2⁻CD45.1⁺



B Spleen

donor cells
CD45.2⁻CD45.1⁺

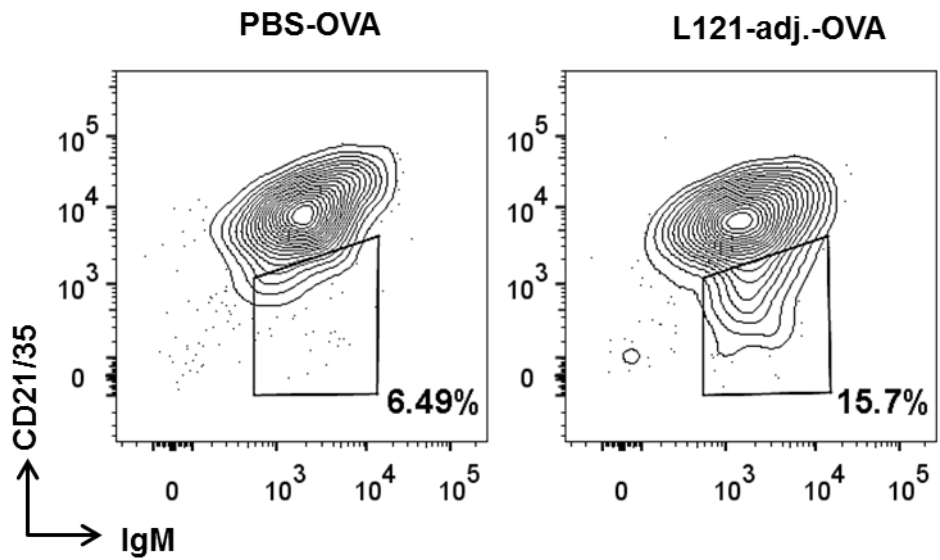
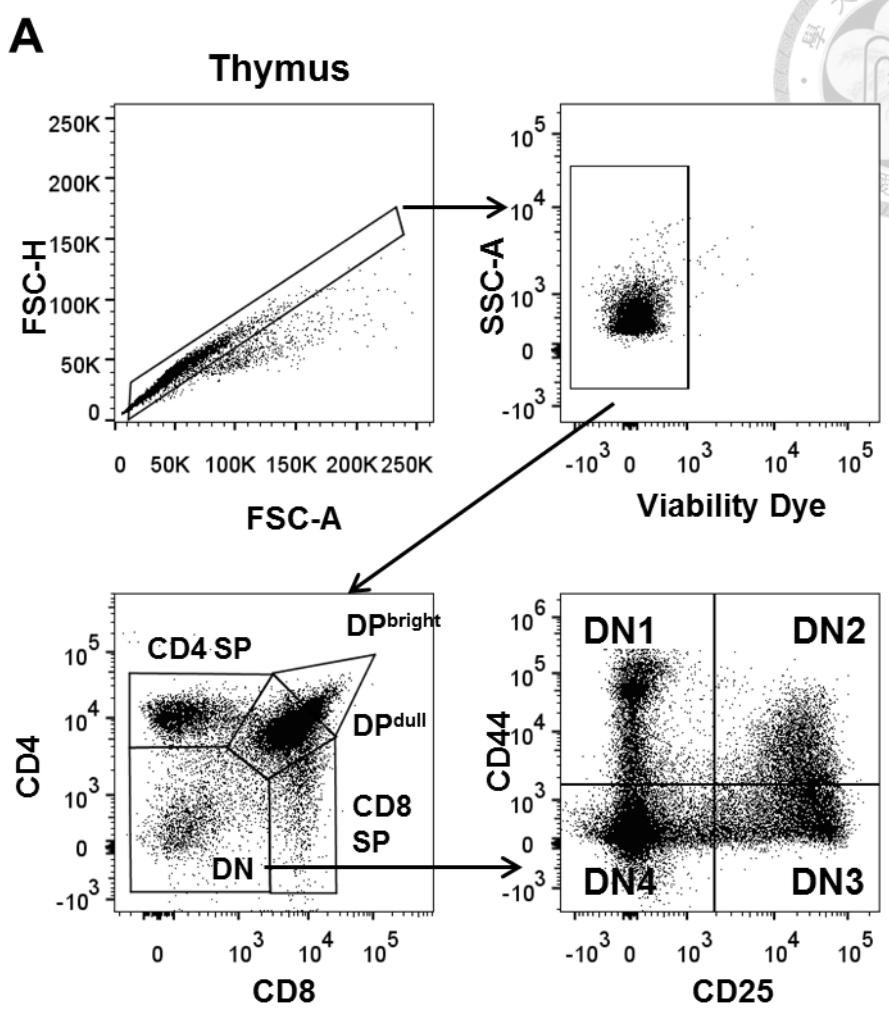


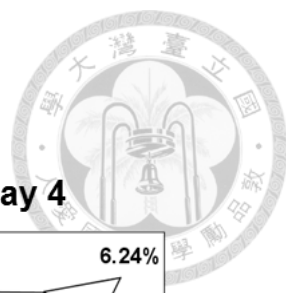


圖 十四、 注射 L121-adj. 影響胸腺中 T 細胞的發育，並且減少 T 細胞的數量

於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.。於注射後第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠取胸腺，再以流式細胞儀分析。(A)圖為分析胸腺中 T 細胞之 pre-gating 示意圖，以 CD4 及 CD8 為軸可區分成五群細胞，其中 CD4⁻CD8⁻(DN)可再由 CD25 及 CD44 區分成四群細胞。以未經處理之控制組作為代表圖。(B)圖為以 CD4 及 CD8 分析不同時間點時 胸腺 T 細胞的變化。(C)圖以 CD25 及 CD44 分析 CD4⁻CD8⁻細胞群不同時間點的變化。(D-a)圖至 (D-d)圖分別為 DN1 至 DN4 T 細胞數量在不同時間點的變化。(E-e)圖為 DP^{dull} T 細胞數量在不同時間點的變化。(E-f)圖為 DP^{bright} T 細胞數量在不同時間點的變化。(E-g)圖為胸腺中 CD4⁺ SP 細胞數量在不同時間點的變化。(E-h)圖為胸腺中 CD8⁺ SP T 細胞數量在不同時間點的變化。(E)圖為胸腺中所有 T 細胞數量在不同時間點的變化。細胞數目以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示(n=4)。以 One Way ANOVA 統計分析。* p < 0.05；** p < 0.01；*** p < 0.001。

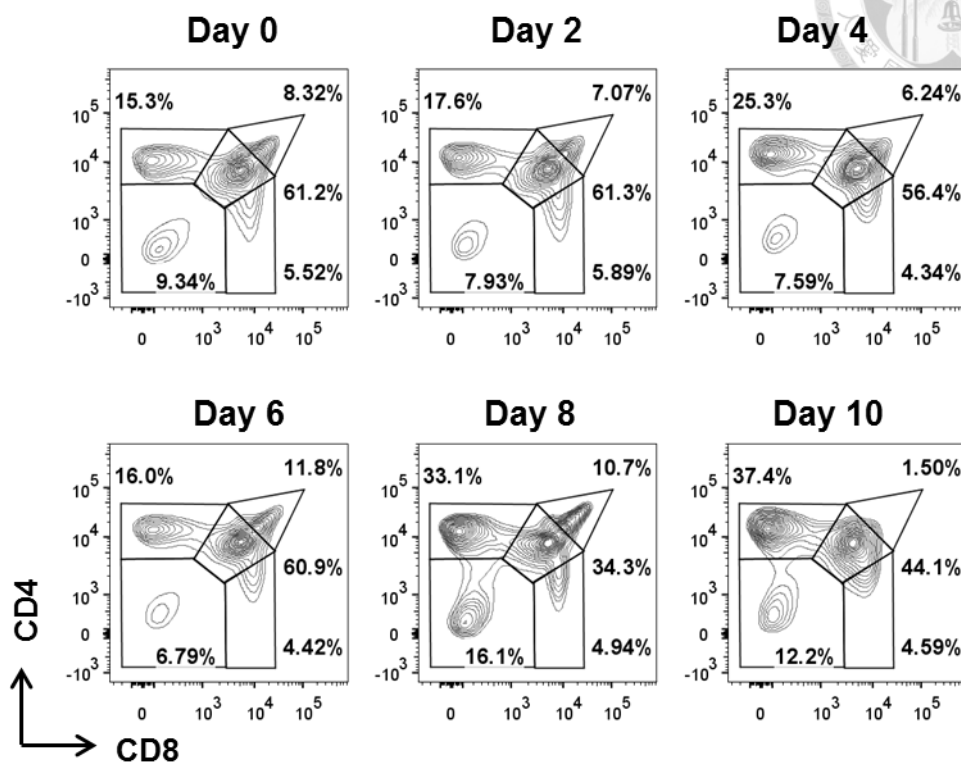


Population	Phenotype
CD8 SP	CD8 ⁺ CD4 ⁻
CD4 SP	CD8 ⁻ CD4 ⁺
DP ^{bright}	CD8 ^{bright} CD4 ^{bright}
DP ^{dull}	CD8 ⁺ CD4 ⁺
DN4	CD8 ⁻ CD4 ⁻ CD25 ⁻ CD44 ⁻
DN3	CD8 ⁻ CD4 ⁻ CD25 ⁺ CD44 ⁻
DN2	CD8 ⁻ CD4 ⁻ CD25 ⁺ CD44 ⁺
DN1	CD8 ⁻ CD4 ⁻ CD25 ⁻ CD44 ⁺



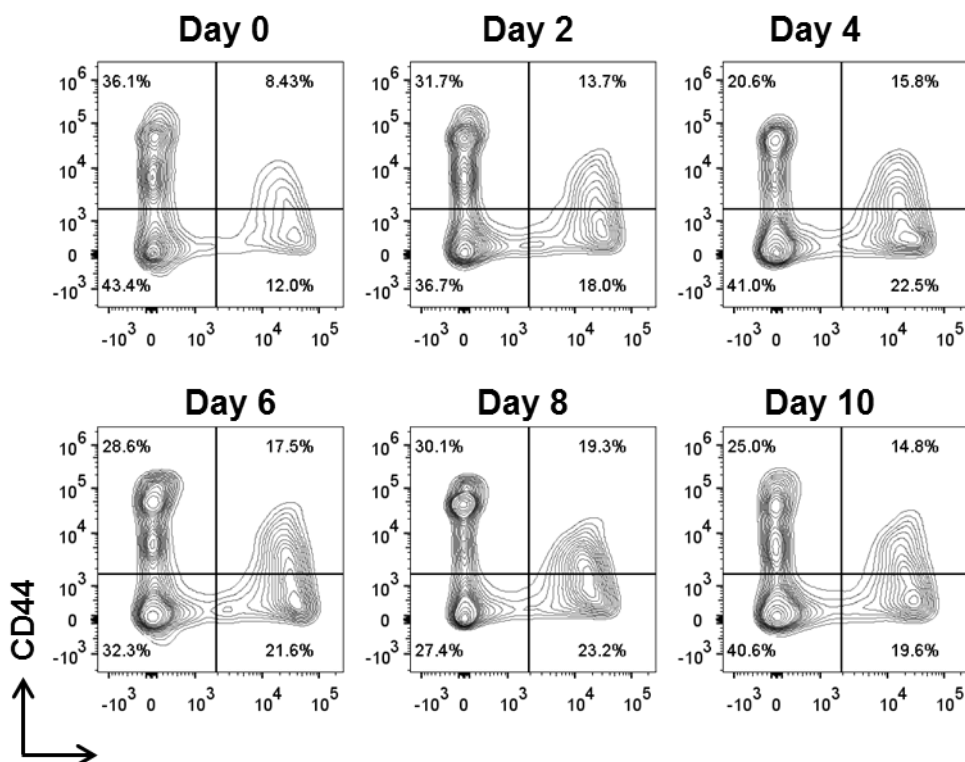
B Thymus

Viability dye⁻



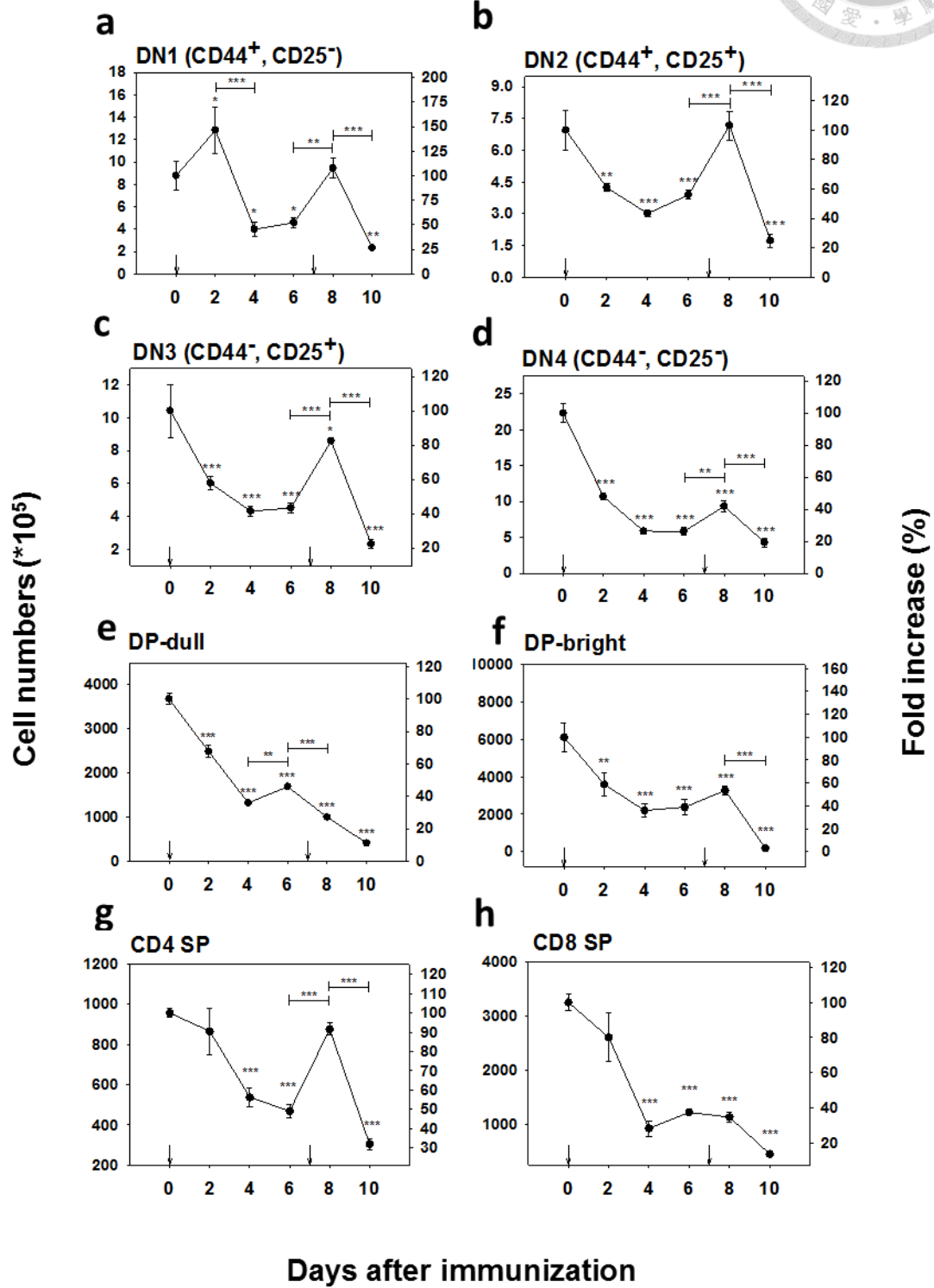
C Thymus

Viability dye⁻CD4⁻CD8⁻





D Thymus





E

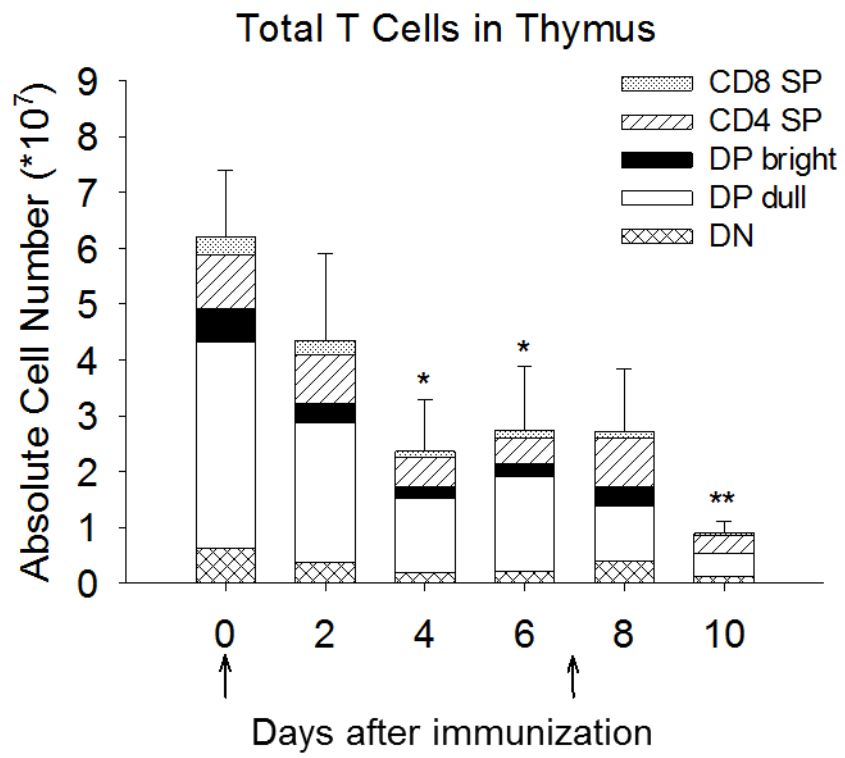


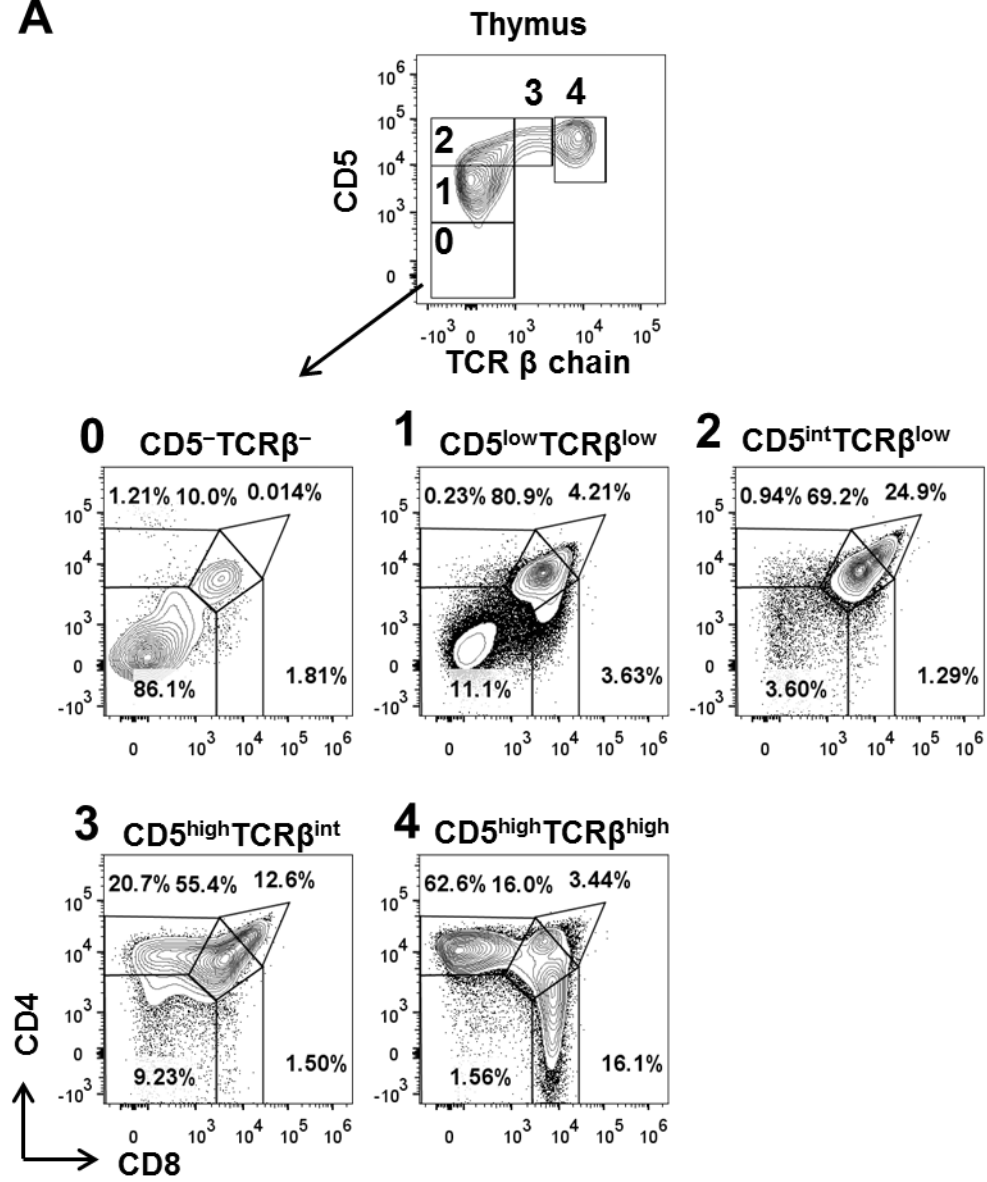


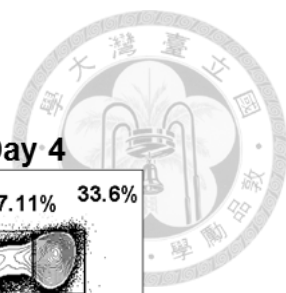
圖 十五、 注射 L121-adj. 影響胸腺中 T 細胞的發育，加速 T 細胞的成熟

於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.。於注射後第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠取胸腺，再以流式細胞儀分析。圖(A)為以 CD5 及 TCR β chain 分析胸腺細胞，可分為五群細胞，分別為 CD5⁻TCR β ⁻，CD5^{int}TCR β ⁻，CD5^{high}TCR β ⁻，CD5^{high}TCR β ^{int}，CD5^{high}TCR β ^{high}。五群細胞再各別以 CD4 及 CD8 分析。CD4 及 CD8 可再將細胞區分為五群細胞，如圖中附表。圖(B)為以 CD5 及 TCR β chain 分析注射 L121-adj.後不同天數胸腺 T 細胞分化的變化。圖(C)為統計 stage 4 T 細胞於胸腺中佔的比例，以平均值以及標準誤差 (standard error mean)表示(n=3)。以 One Way ANOVA 統計分析。* p<0.05；** p<0.01；*** p<0.001。



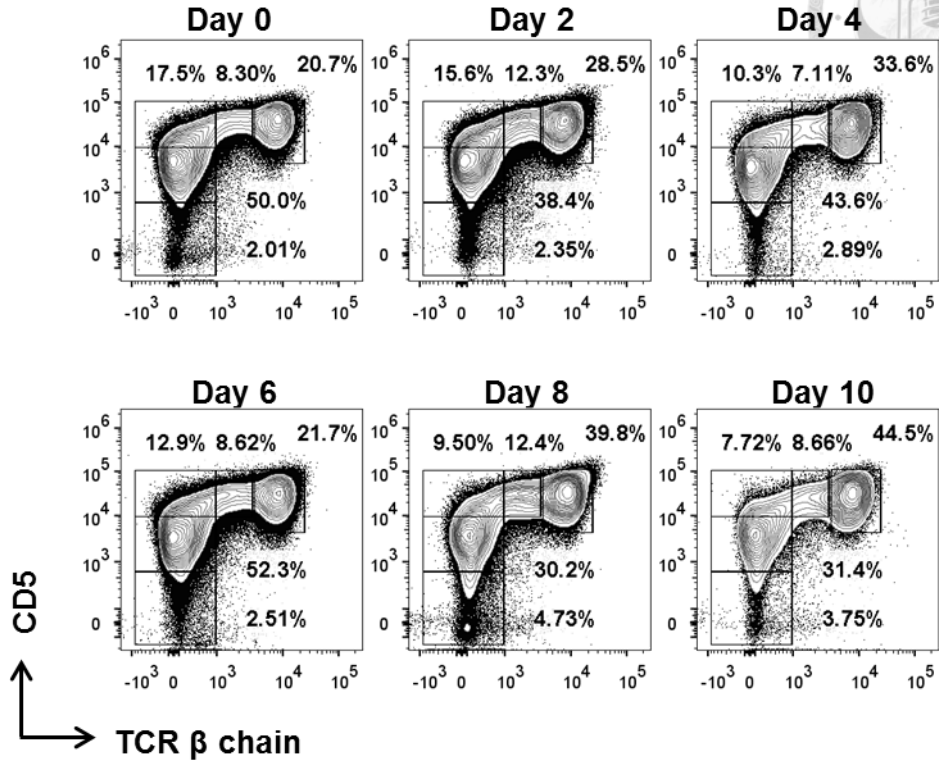
A





B

Viability dye⁻



C

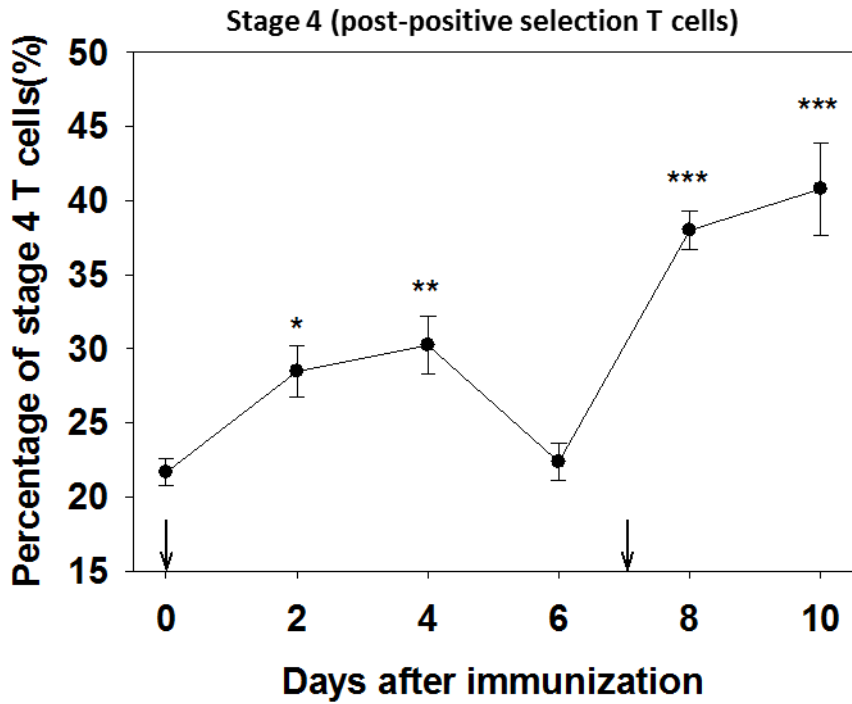
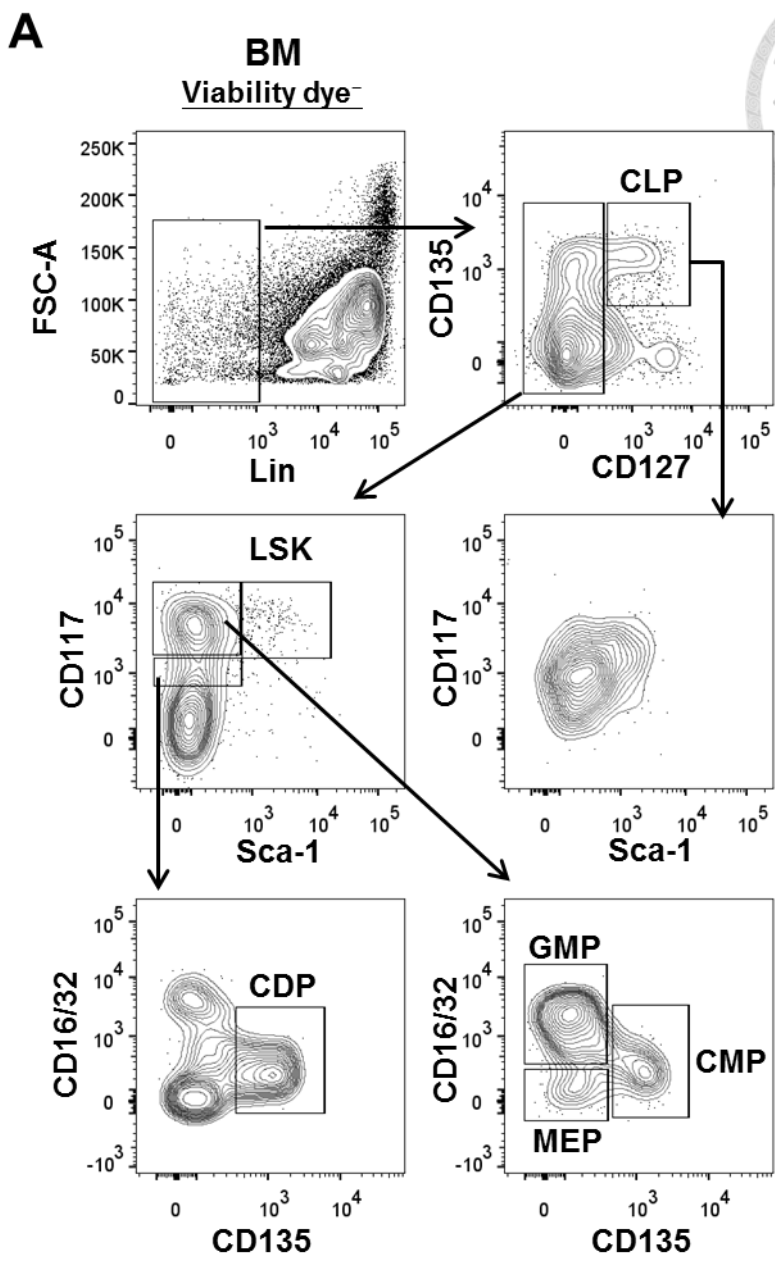


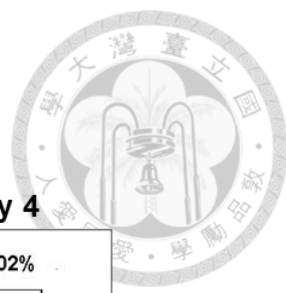


圖 十六、 注射 L121-adj. 影響骨髓中血液幹細胞以及免疫細胞的分化

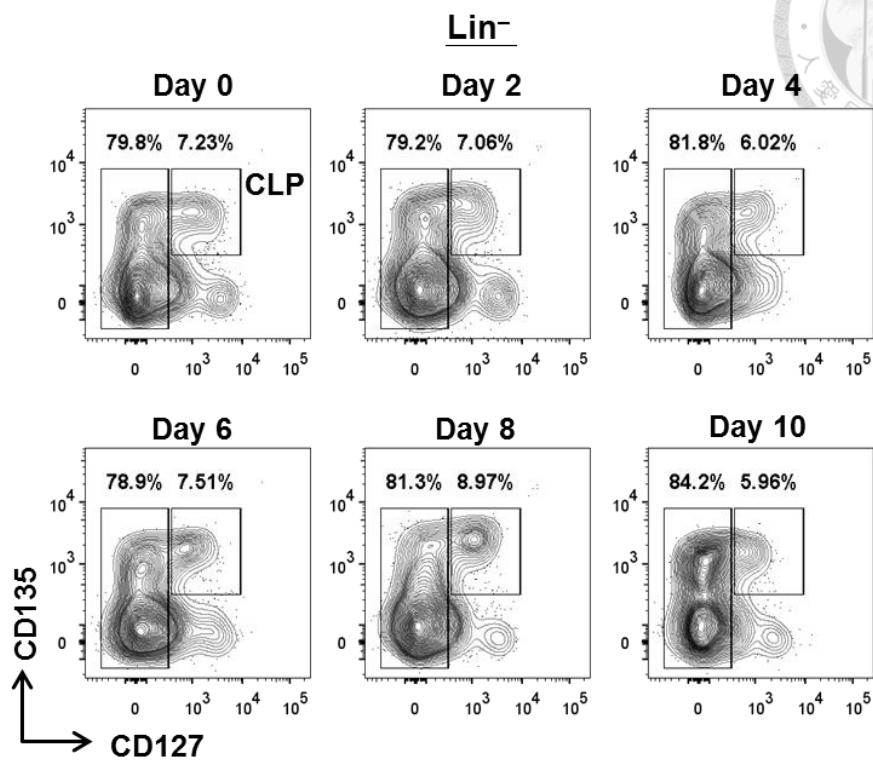
於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 疫苗佐劑。於注射後第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠，取脛骨以及股骨中之骨髓，以流式細胞儀分析。(A)圖為分析骨髓中血液幹細胞及免疫前驅細胞的 pre-gating 示意圖，取 untreated 控制組作為代表。(B)圖為以 CD135 以及 CD127 分析不同時間點骨髓中 CLP 細胞的變化。(C)圖為以 CD117 及 Sca-1 分析不同時間點骨髓中 LSK 細胞的變化。(D)圖為以 CD135 及 CD16/32 分析不同時間點骨髓中 CMP、GMP、MEP 細胞的變化。(E)圖以 CD135 及 CD16/32 分析不同時間點骨髓中 CDP 細胞的變化。(F-a)圖為 LSK 細胞隨時間點不同，數量的變化。(F-b)圖為 CLP 細胞隨時間點不同，數量的變化。(F-c)圖為 CMP 細胞隨時間點不同，數量的變化。(F-d)圖為 GMP 細胞隨時間點不同，數量的變化。(F-e)圖為 CDP 細胞隨時間點不同，數量的變化。結果為三次獨立試驗取一作為代表，細胞數目以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示(n=3)。以 One Way ANOVA 統計分析。* p <0.05；** p <0.01；*** p <0.001。



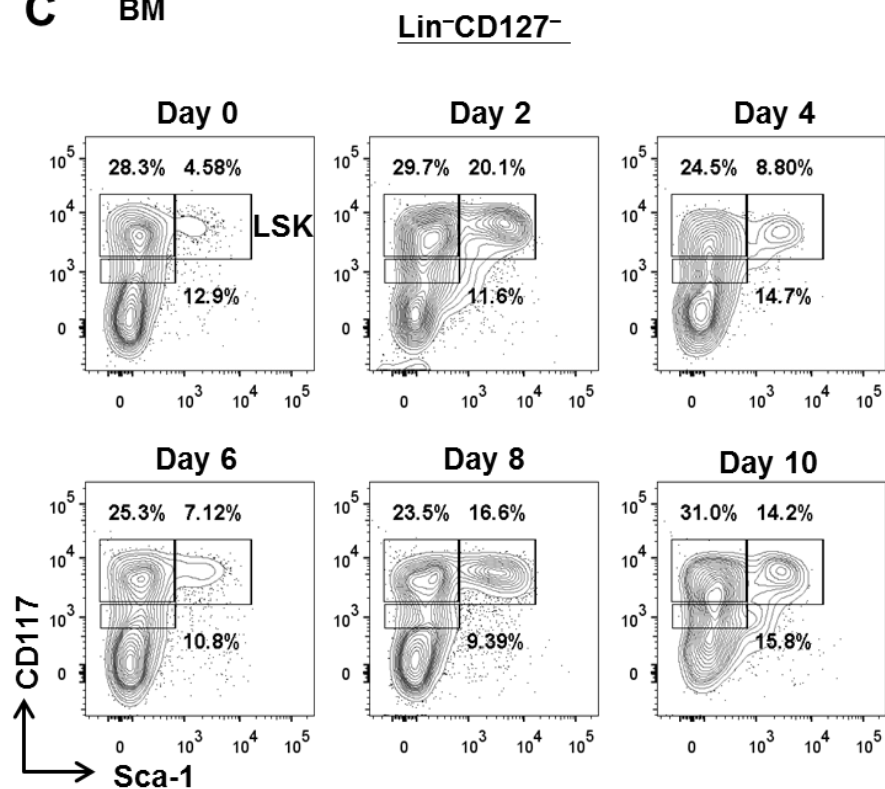
Population	Phenotype
LSK	Lin-CD117 ⁺ Sca-1 ⁺
Common Lymphoid Progenitor (CLP)	Lin-CD135 ⁺ CD127 ⁺ CD117 ^{int} Sca-1 ^{int}
Common Myeloid Progenitor (CMP)	Lin-CD127 ⁻ CD117 ⁺ Sca-1 ⁻ CD135 ⁺ CD16/32 ⁻
Granulocyte Macrophage Progenitor(GMP)	Lin-CD127 ⁻ CD117 ⁺ Sca-1 ⁻ CD135 ⁻ CD16/32 ⁺
Common Dendritic Cell Progenitor (CDP)	Lin-CD127 ⁻ CD117 ^{int} Sca-1 ⁻ CD135 ⁺ CD16/32 ⁻



B BM

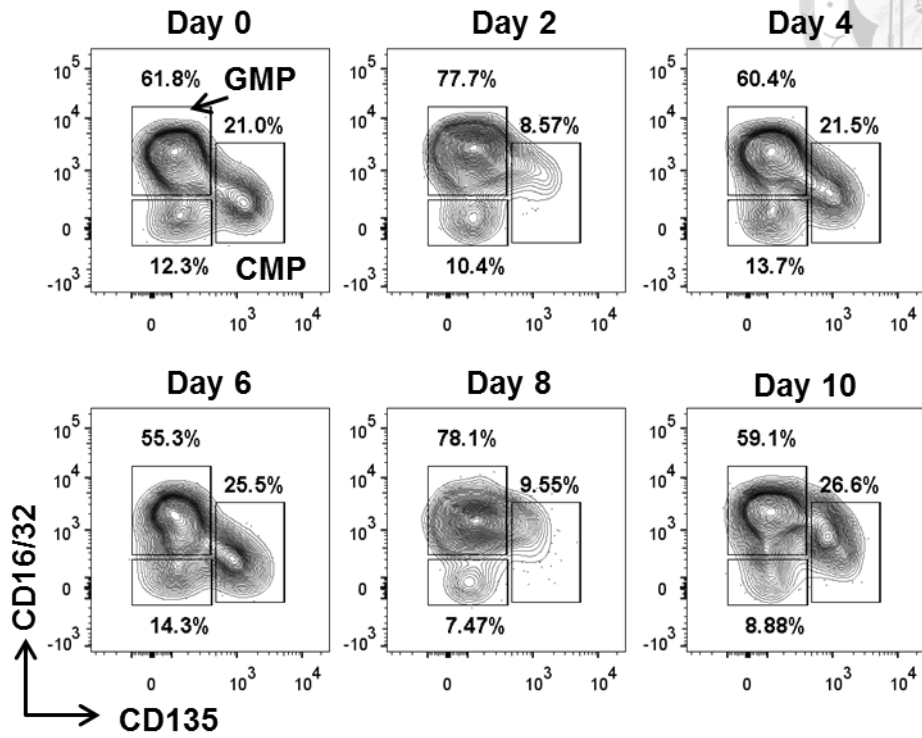


C BM



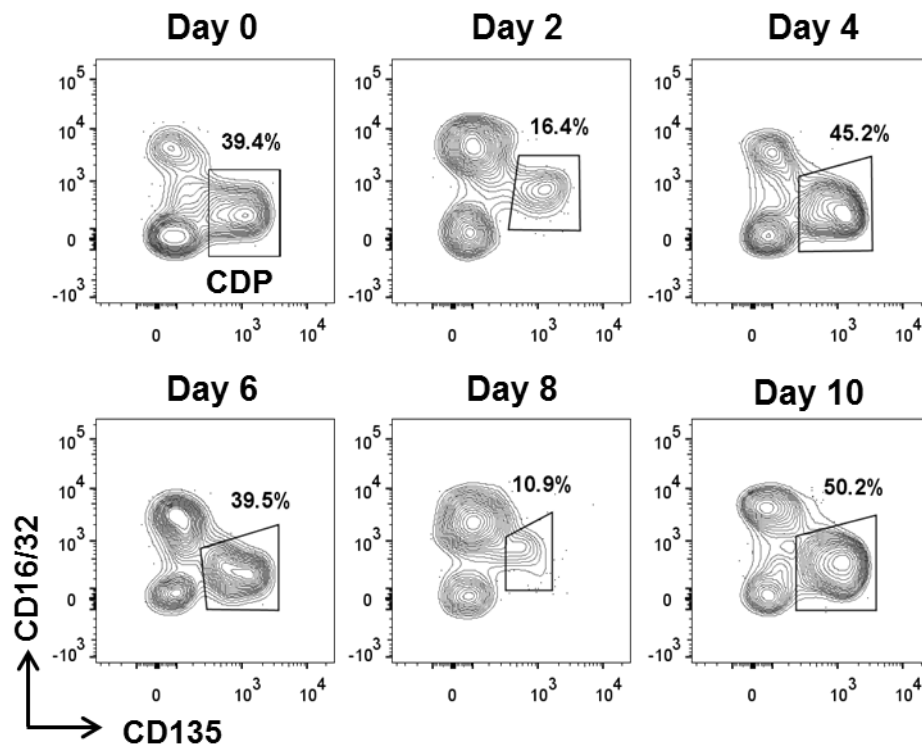
D BM

Lin⁻CD127⁻CD117⁺Sca-1⁻



E BM

Lineage⁻CD127⁻CD117^{int}Sca-1⁻





F BM

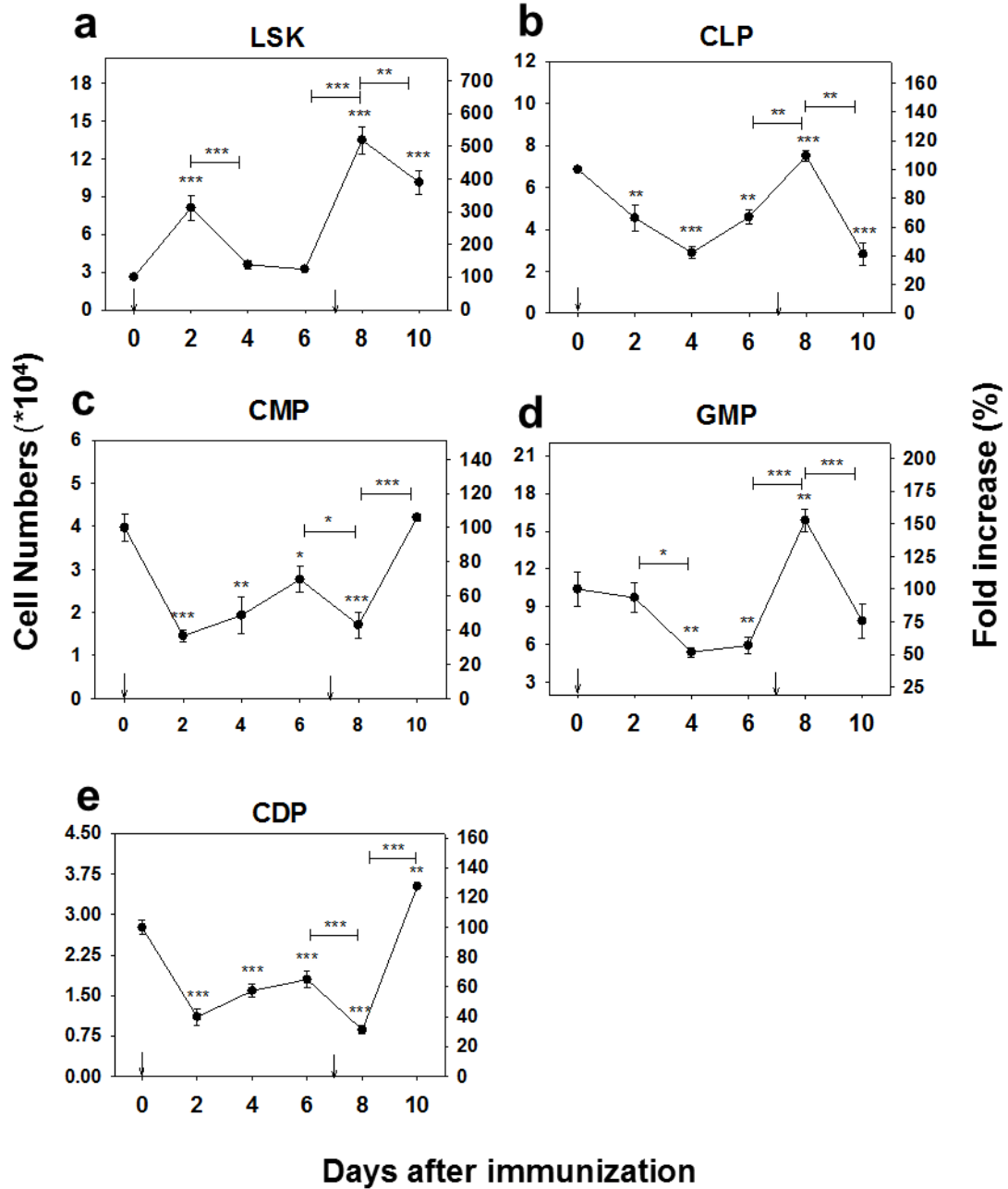




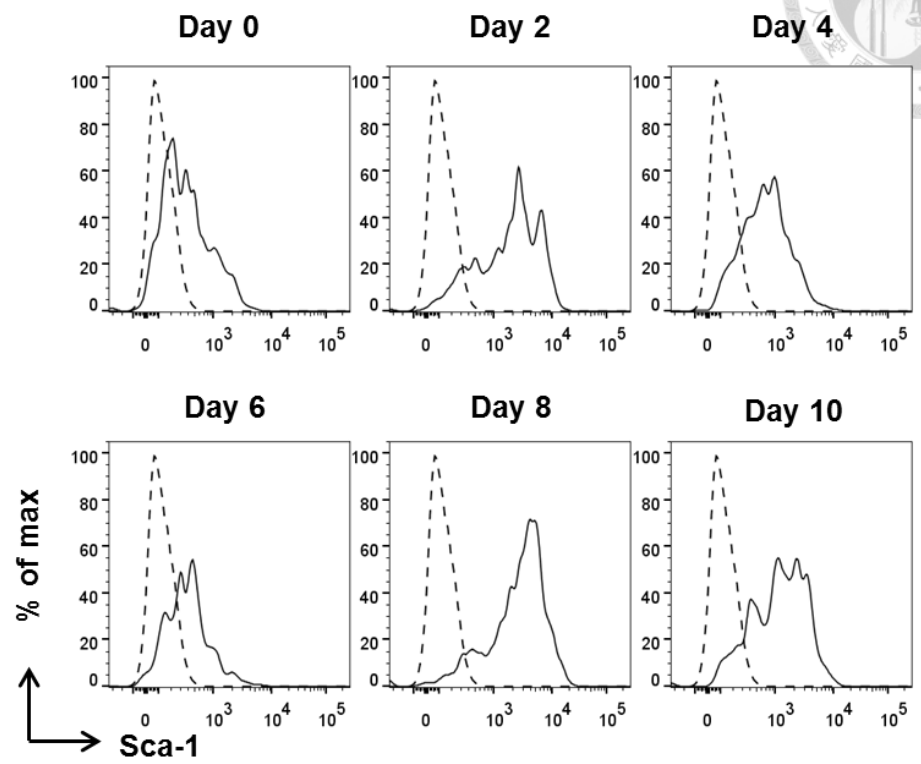
圖 十七、 注射 L121-adj.使骨髓中 CLP 細胞表現高量 Sca-1 表面抗原

於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.。於注射後第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠，以未經處理之小鼠作為第 0 天控制組，取脛骨以及股骨中之骨髓，以流式細胞儀分析。(A)圖為經過圈選出 Lineage⁻CD135⁺CD127⁺細胞群後以 Sca-1 為軸，分析螢光表現，isotype control 以虛線表示。(B)圖 Sca-1 之螢光表現強度以 geometric mean 量化再經統計後以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示(n=3)。以 One Way ANOVA 統計分析。* p <0.05；** p <0.01；*** p <0.001。



A BM

Lineage⁻CD135⁺CD127⁺



B

Sca-1 expression on CLPs

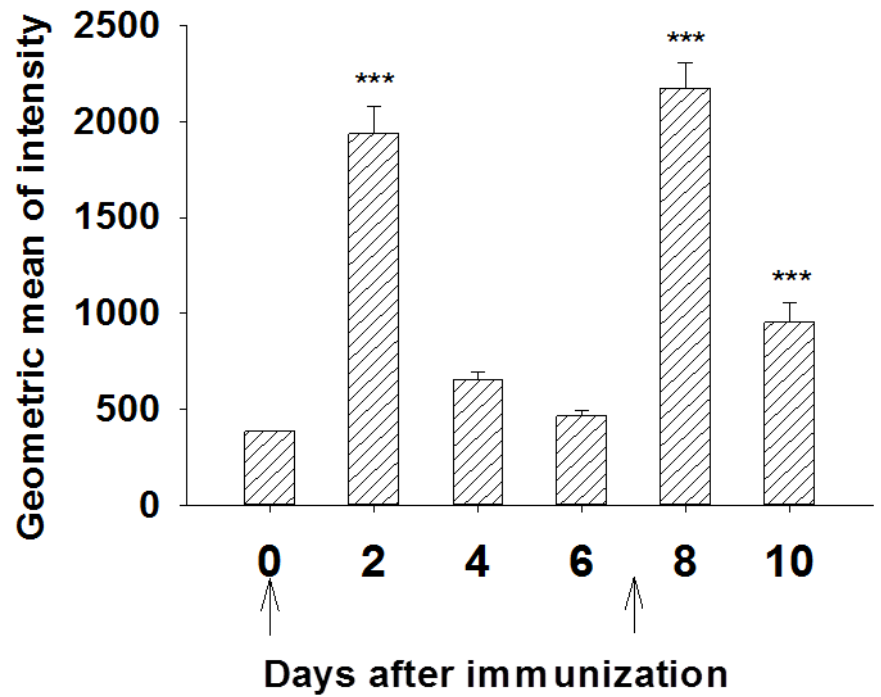




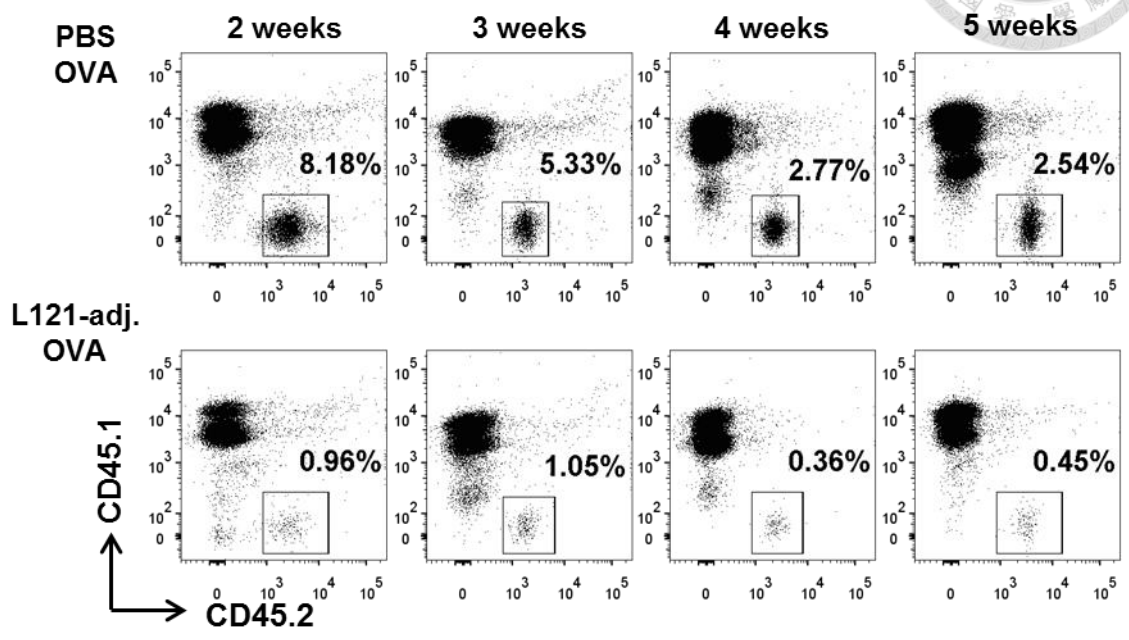
圖 十八、注射 L121-adj. 抑制 CLP 細胞分化，減少 B 細胞產生

利用流式細胞分選儀 FACS Aria II 自 CD45.2 小鼠骨髓中分選出 Lineage⁻Sca-1^{int}CD117^{int}CD127⁺CD90.2⁻CLP 細胞，以尾靜脈注射至 CD45.1 小鼠，再皮下注射 100 μ l 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj. 或是 PBS。之後於第二週開始每週由頷下靜脈採血以流式細胞儀分析。(A)圖為以 CD45.2 及 CD45.1 分析血液中 donor/recipient 細胞的比例。(B)圖為統計血液中來自植入之 CD45.2⁺ CLP 細胞所分化出的細胞比例，以平均值以及標準誤差(standard error mean)表示。結果為三次獨立試驗取一作為代表，並且以 t-test 統計每個時間點注射 L121-adj. 的組別與注射 PBS 組別之間的 p 值。* p < 0.05；** p < 0.01；*** p < 0.001。

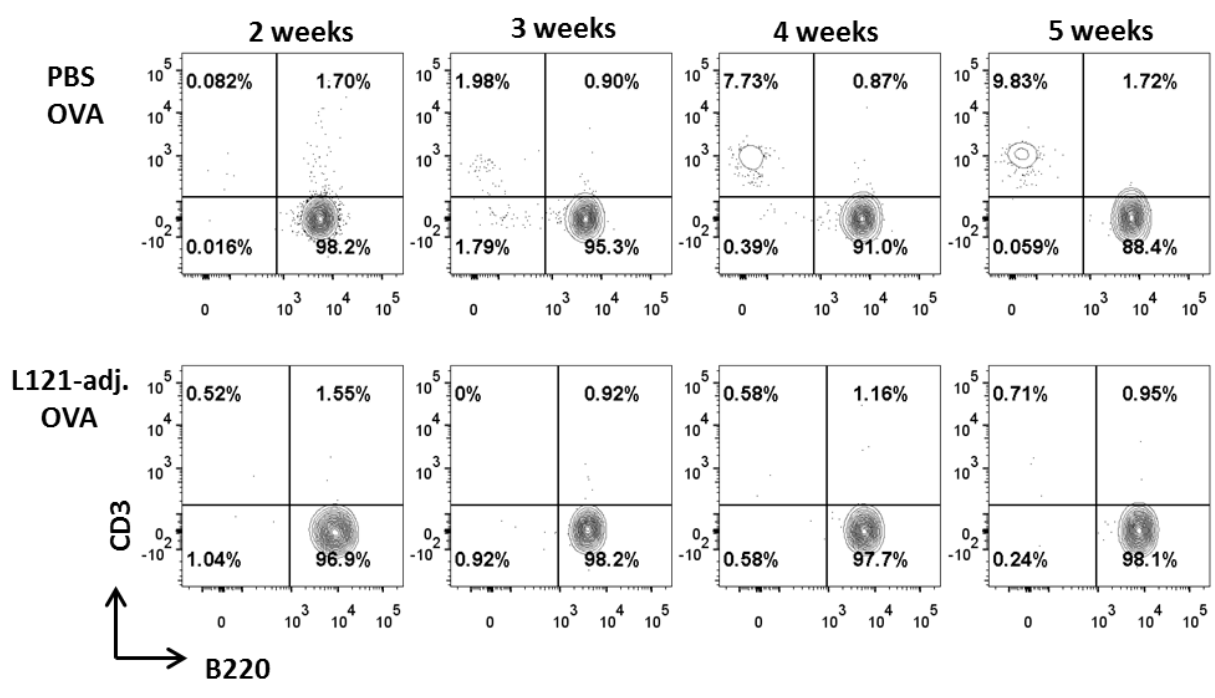


A

Peripheral blood



B



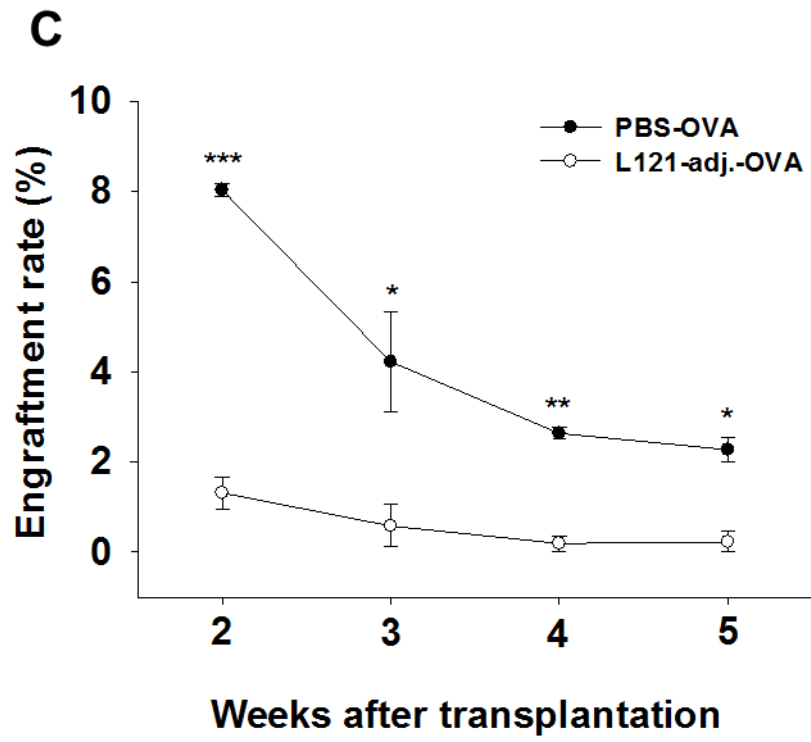




圖 十九、注射 L121-adj.在血液中產生立即性的 G-CSF 濃度提升

於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.。於注射後第 0、2、4、6、8、10 天犧牲小鼠，經心臟採血以 ELISA 分析。實驗結果來自四次獨立試驗，所得數值經統計後以平均值以及標準誤差 (standard error mean)表示(n=4)。以 One Way ANOVA 統計分析。* p <0.05；*** p <0.001。

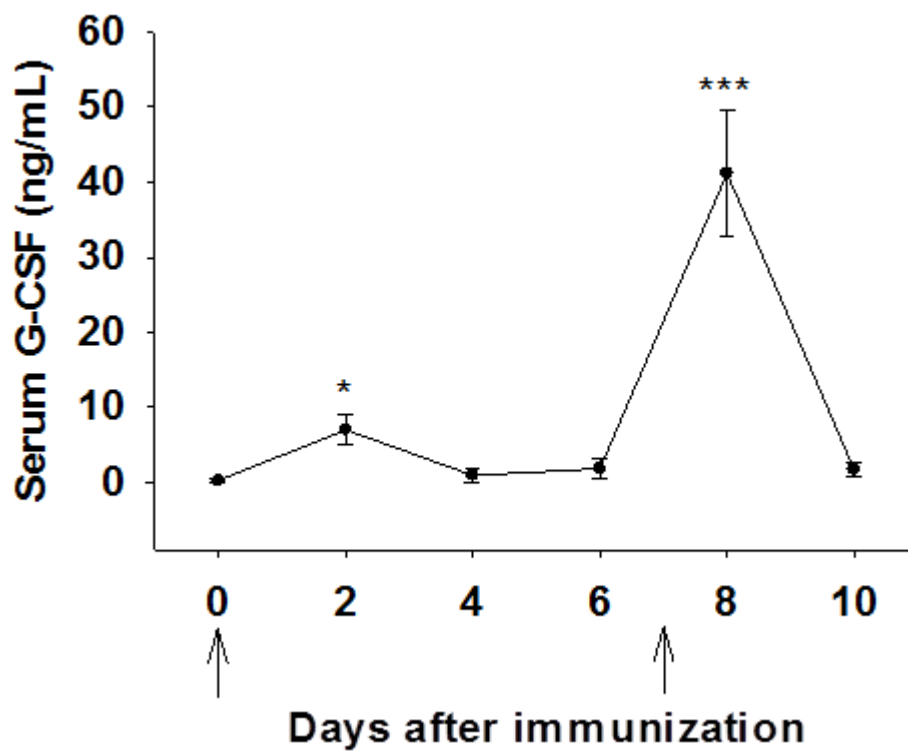




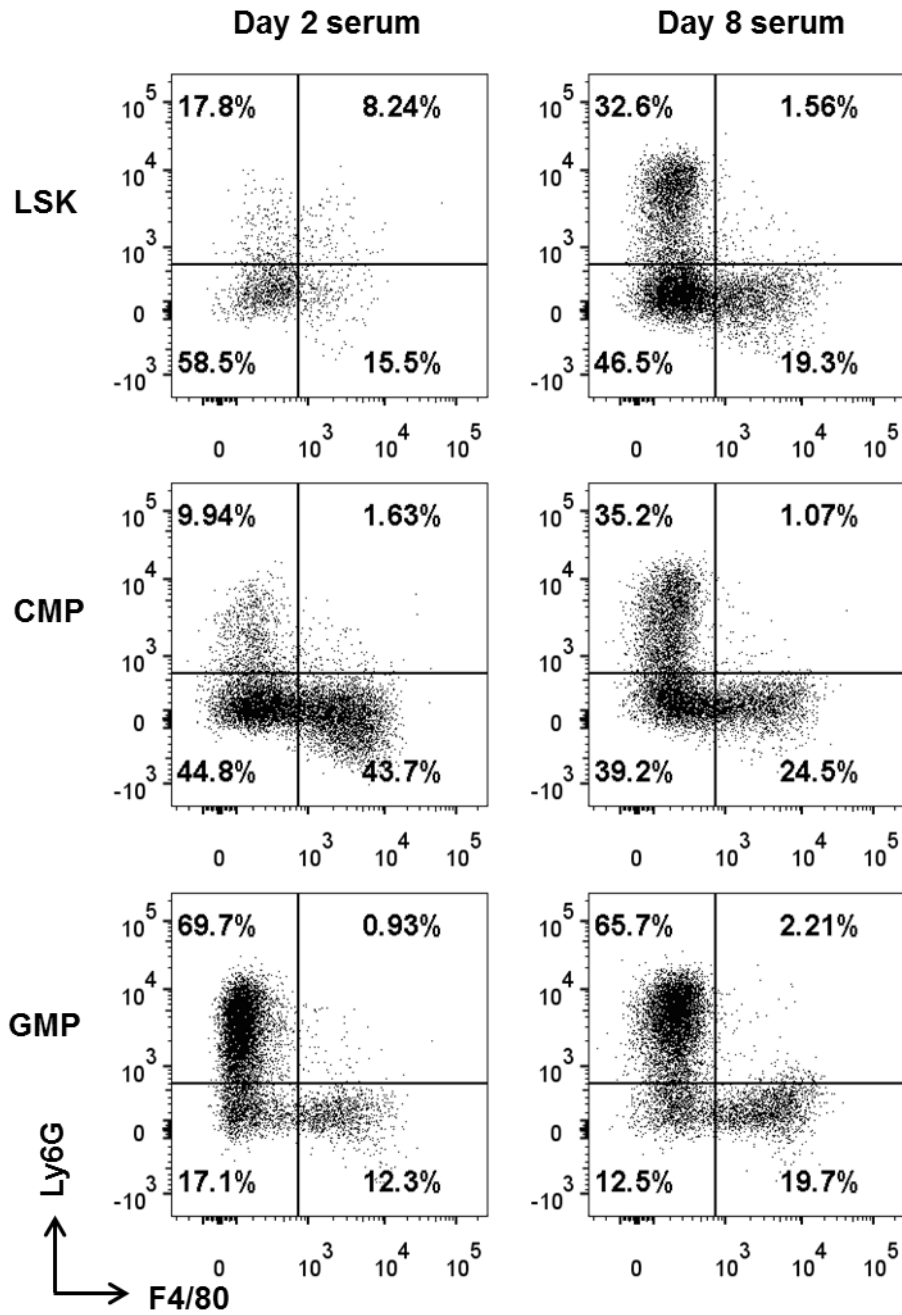
圖 二十、注射 L121-adj.後小鼠血液中可使血液細胞分化成顆粒性白血球以及巨噬細胞

於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 疫苗佐劑。於注射後第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠，採血，離心後取得之血漿以 10 %濃度與 LSK、CMP、GMP 細胞培養四天後再以流式細胞儀分析。其中第 0、4、6、10 天之血清無法使幹細胞產生分化，故不顯示於圖中。(A) 圖為取三次獨立試驗中一次作為代表圖，以 F4/80 及 Ly6G 分析分化出之顆粒性白血球以及巨噬細胞。(B)圖為以倒立顯微鏡，拍攝以第 0、2、6、8 天之血清培養 Lin⁻CD117⁺細胞為代表，顯示細胞分化的情形。結果為三次獨立實驗結果取一作為代表。



A

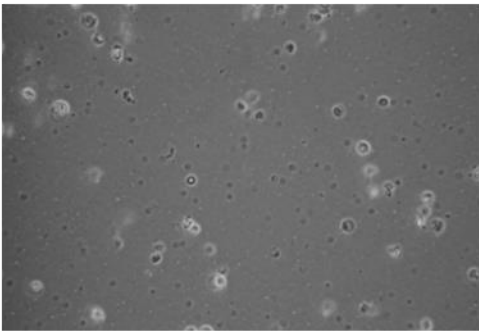
7-AAD⁻CD11b⁺



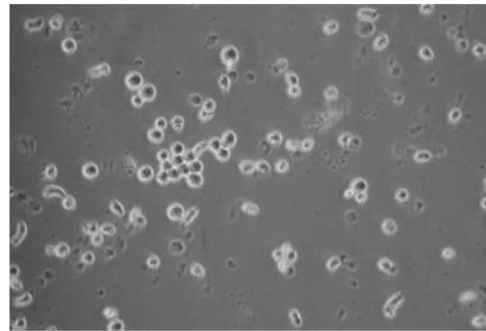


B

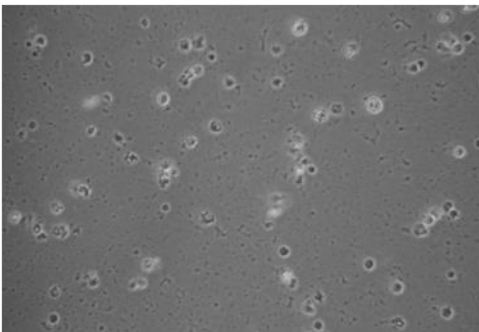
Day 0



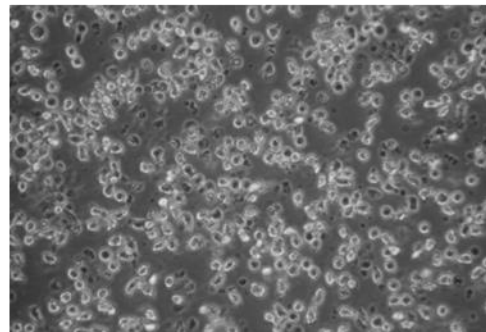
Day 2

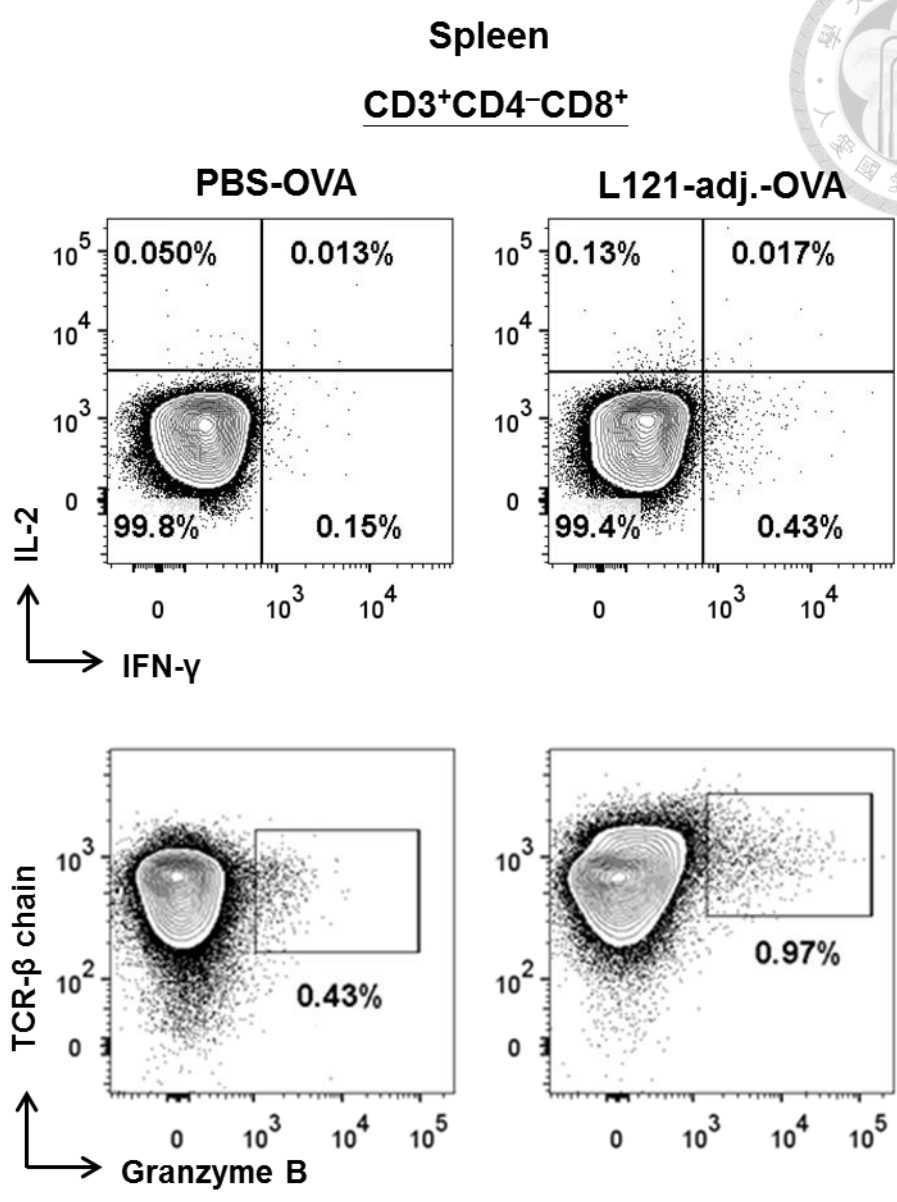


Day 6



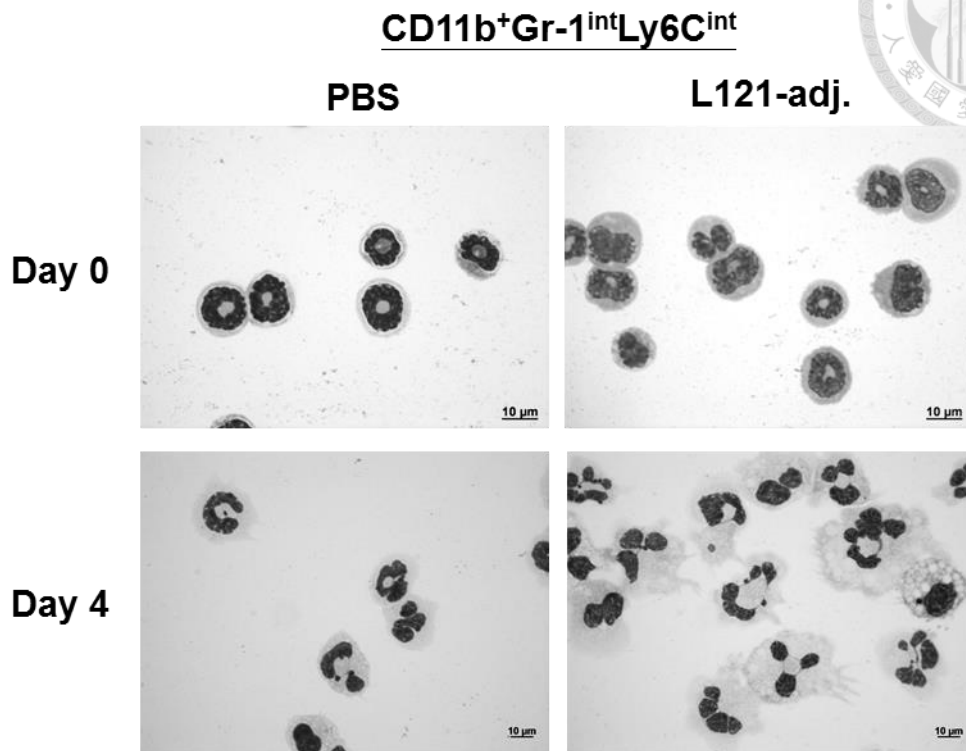
Day 8





附錄圖 一、注射 L121-adj.後使脾臟中 CD8⁺ T 細胞產生 IFN-γ 以及 granzyme B

於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μL 含有 100 μg OVA 之 L121-adjuvant 疫苗佐劑或是 PBS。於第 10 天犧牲小鼠取出脾臟，加入 brefeldin A 以及 10 μg/ml SIINFEKL 於 37°C 培養 20 小時後，以 4 % paraformaldehyde 固定細胞，再以 0.1% saponin 於細胞膜打洞，之後加入抗體偵測細胞內之 IFN-γ 以及 granzyme B 分泌，以流式細胞儀分析。結果為三次獨立試驗取其一作為代表。



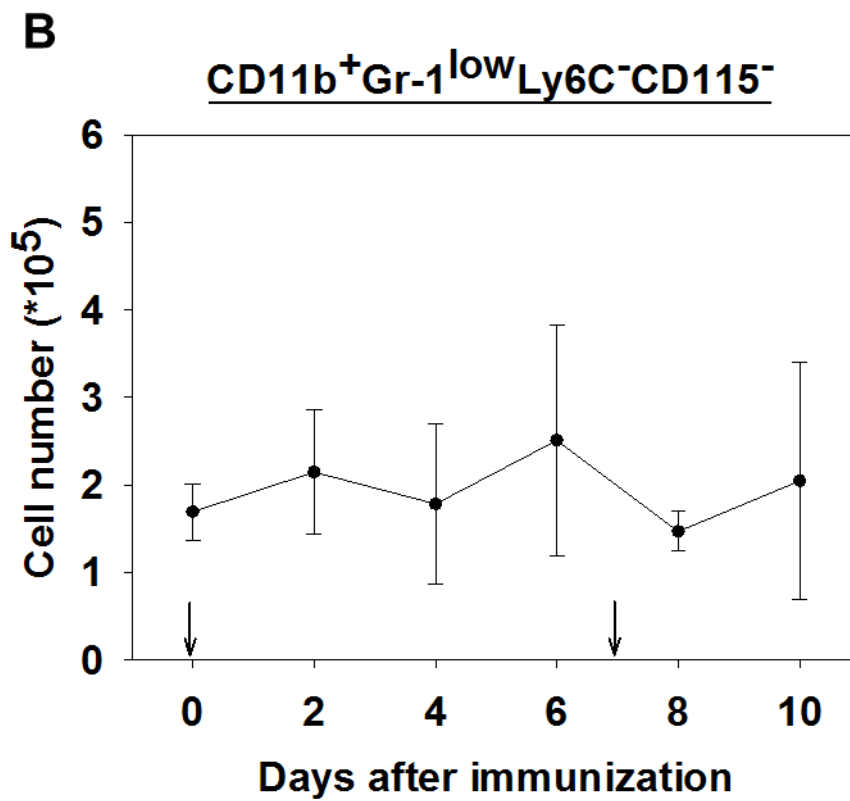
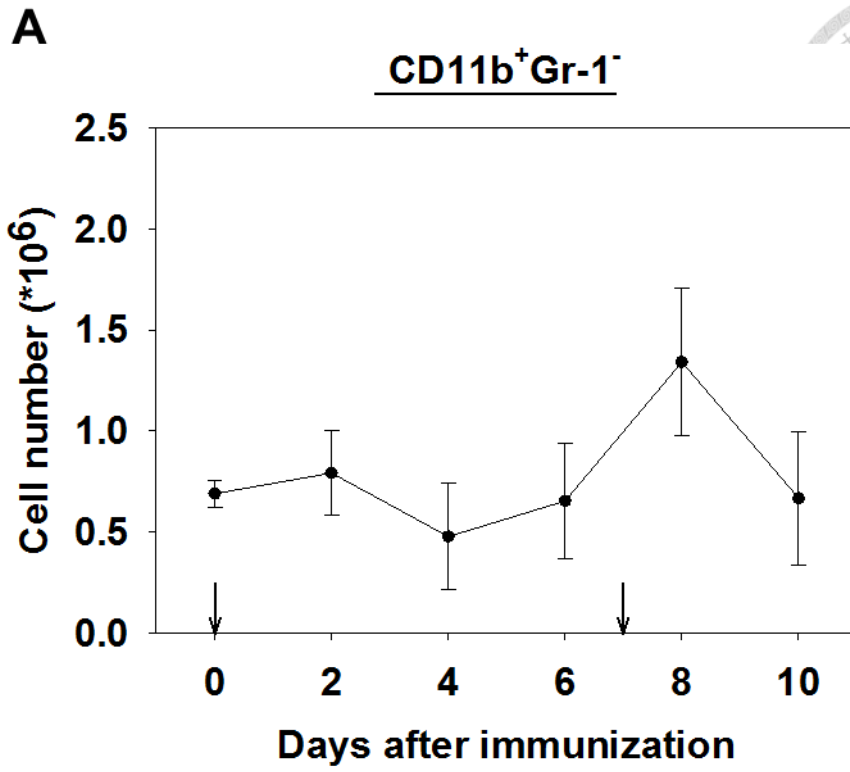
附錄圖 二、C57BL/6 小鼠骨髓中的 CD11b⁺Gr-1^{int}Ly6C^{int} 細胞的外觀型態以及經過體外培養成熟後可發育成顆粒性白血球

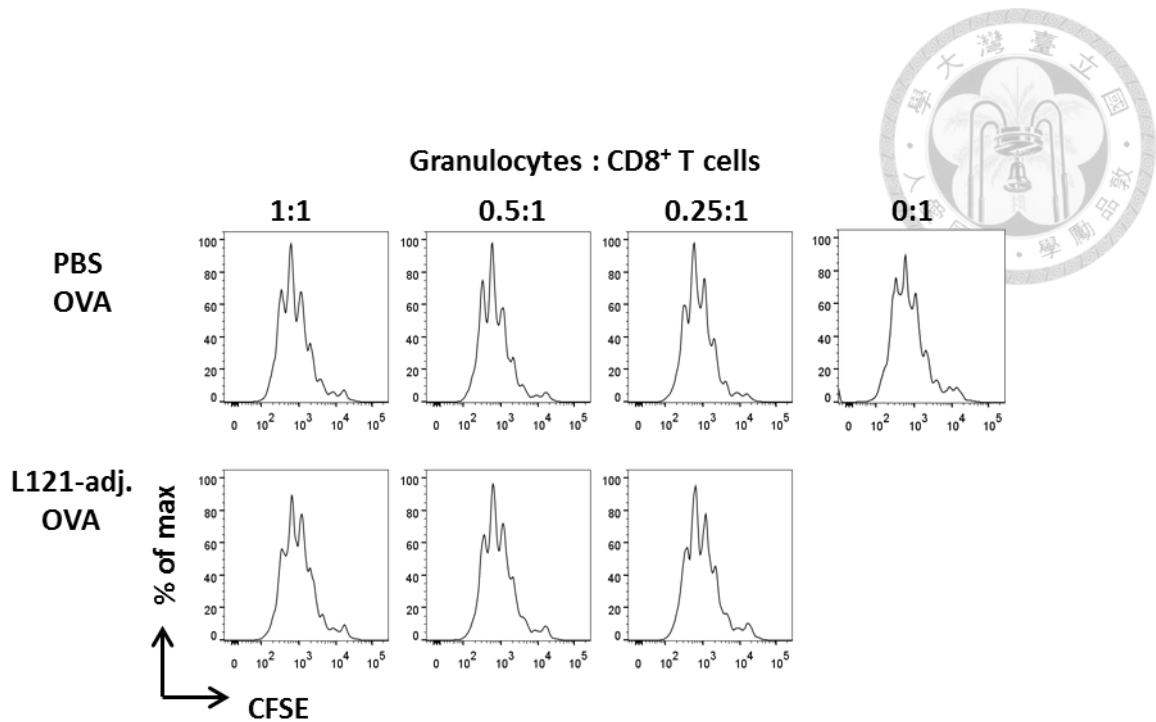
於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adjuvant 疫苗佐劑或是 PBS。於第 10 天犧牲小鼠取出骨髓，以 FACS Aria III 流式細胞分選儀分選出 CD11b⁺Gr-1^{int}Ly6C^{int} 細胞後，經過 cytopsin 離心至玻片上，或是另外以含有 10 ng/ml GM-CSF 以及 10% FBS 之 RPMI-1640 中培養四天後，再以 cytopsin 離心至玻片上，以 Wright-Giemsa 染色後，以顯微鏡觀察。圖中的 scale bar 為 10 μ m。



附錄圖 三、注射 L121-adj.後，C57BL/6 小鼠骨髓中 CD11b⁺Gr-1⁻細胞以及 CD11b⁺Gr-1^{int}Ly6C⁻細胞數量隨時間的變化

於第 0 天與第 7 天於 C57BL/6 小鼠皮下注射 100 μ L 含有 100 μ g OVA 之 L121-adj.疫苗佐劑。於注射後第 2、4、6、8、10 天犧牲小鼠，取脛骨以及股骨中之骨髓，接著以流式細胞儀分析。(A)圖為 CD11b⁺Gr-1⁻細胞隨時間的變化。(B)圖為 CD11b⁺Gr-1^{int}Ly6C⁻細胞數目隨時間的變化。細胞數目以平均值以及標準誤差 (standard error mean)表示(n=3)。並且以 One Way ANOVA 統計分析，細胞數量的改變皆沒有統計上的顯著差異。





附錄圖 四、注射 L121-adj.後脾臟中 Ly6G⁺CD11b⁺顆粒性白血球不會抑制 CD8⁺ T 細胞的活化增生

CD45.1 小鼠於皮下注射 100 μg OVA 以及 100 μL L121-adj.或是 PBS，兩天後取出脾臟，以流式細胞分選儀分選出 CD11b⁺Ly6G⁺顆粒性白血球，CD8⁺ T 細胞分離自 C57BL/6 小鼠脾臟，並且經過 negatively selection 純化，並且標記有 CFSE 螢光，之後以 CD3 及 CD28 抗體活化，並且與不同比例之顆粒性白血球共同培養 72 小時後，以流式細胞儀分析其 CFSE 因活化增生而稀釋的情形。實驗結果來自五個獨立孔盤，取一做為代表。