

## 学位論文要旨

# 超音波の経皮ワクチン接種技術への応用に関する研究

遠城 聡子

### 緒論

ソノフォレシス (SP) は薬物の経皮送達を促進し、全身循環への薬物送達を増大させることを目的とした経皮薬物送達技術であり、主に水溶性高分子の経皮送達を高める投与方法として検討がなされてきた。一方で皮膚への超音波 (US) 適用がランゲルハンス細胞 (LC) を活性化し、皮膚免疫応答を惹起することが報告されている。このような知見から SP は注射針に頼らない低侵襲的な経皮ワクチン接種法として有用であると考えられる。しかしながら現在のところ、SP を用いたワクチン接種法は実用化に至っていない。その理由の一つとして US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激が、LC 活性化に伴う抗原捕捉とその後に引き続いて生じる抗体産生までの免疫機能について十分な検討がなされていないことが挙げられる。SP を用いたワクチン接種法の実用化に向けて、US 適用に伴う物理的刺激による皮膚免疫応答について基礎的情報を収集する必要があると考えられる。そこで著者は、皮膚免疫機能の活性化および抗体産生に対する US 適用の効果について検討を行った結果、以下の知見が得られた。

### 第1編 超音波適用に伴う物理的刺激による表皮ランゲルハンス細胞活性化の評価

3種類の周波数 (20 kHz、1 MHz および 3 MHz) の超音波を用い、種々US 適用条件をラット皮膚に適用した時の表皮 LC の活性化について評価した。その結果、LC 活性化は時間依存性を示し、US 適用 12 時間前後で誘発されることが明らかとなった。さらに照射時間、周波数および強度などの US 適用条件を変化させて検討を進めたところ、US 適用条件に依存した LC 活性化が認められた。低周波数 US である 20 kHz は 1 MHz や 3 MHz といった治療域 US に比べて LC 活性化により効果的であることが明らかとなった。これは US エネルギーによる機械的効果が皮膚に対して物理的な刺激となり、LC 活性化が増大したと考えられる。適用強度を変化させることで既に効果的な抗体産生を誘導することが報告されている microneedle に匹敵する LC 活性化マーカーである langerin の発現も認められたことから、低周波数 US は皮膚免疫機能の活性化に対する物理刺激として有用である可能性があることが示唆された。

### 第2編 超音波適用に伴う抗体産生量および表皮ランゲルハンス細胞の抗原捕捉能の評価

US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激が LC の抗原捕捉を活性化し、抗体産生を誘導するかどうかを明らかにするために、20 kHz、0.412 W/cm<sup>2</sup> US を 10 分間照射する条件で前処理したマウス皮膚にオボアルブミン (OVA) を皮内投与 (*i.d.*) した後の OVA 特異的 IgG<sub>1</sub> 抗体産生量および表皮 LC の抗原捕捉能をフローサイトメトリーにより評価した。US で前処理することで US 未適用群と比較して OVA 特異的 IgG<sub>1</sub> 抗体産生量は有意に増加した。この抗体産生の増加は活性化した LC による抗原捕捉が促進されたためと考えられた。そこで FITC-OVA を用いて抗原捕捉細胞の割合および抗原捕捉細胞あたりの捕捉抗原量を評価したところ、抗原を補足する LC および捕捉抗原量が増加することが明らかとなった。さらに、LC の抗原捕捉に関与する langerin との関係を示すために、langerin 発現レベルで細胞をゲーティン

グし、詳細に評価した。その結果 langerin 発現レベルが高い LC において抗原捕捉細胞数および捕捉抗原量の増加が認められたことから、US 適用に伴う皮膚の物理的的刺激が LC の抗原捕捉を促進し、最終的な抗体産生の誘導に寄与することが示唆された。

### 第3編 超音波適用に伴う表皮中サイトカインおよび転写因子の遺伝子発現量の評価

US 適用に伴う皮膚免疫機能の活性化がどのような生理学的機構を経ているかを考察することとした。前編までに抗体産生の誘導が明らかとなった 20 kHz、0.412 W/cm<sup>2</sup> US を 10 分間照射する処置条件でマウス皮膚を前処理し、OVA を *i.d.* 投与して、LC 活性化に関与することが報告されているインターロイキン 1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ ) および核内因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)の表皮中の遺伝子発現量の経時的变化を評価した。IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  および NF- $\kappa$ B の遺伝子発現量は適用後 6 時間で最大値を示した。さらに、US の前処理のみ行った条件においても IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  および NF- $\kappa$ B の遺伝子発現量は増加し、TNF- $\alpha$  および NF- $\kappa$ B は適用 6 時間後、IL-1 $\alpha$  は適用 9 時間後に最大値を示した。すべての因子において適用 12 時間後にはコントロールと同程度まで低下した。これらの変化は LC の活性化 (12 時間後) に先立つものであり、langerin 発現を伴う LC の活性化に、IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、および NF- $\kappa$ B が関与していると考えられた。

### 第4編 超音波によるオボアルブミンの皮内送達と抗原特異的抗体産生量の評価

LC 活性化を誘導できる最も有用な US 適用条件が抗原の皮内送達かつ効果的な抗体産生を誘導することが可能かどうかを明らかにするために、マウス皮膚表面に FITC-OVA を適用して SP を行う検討を実施した。前編と同様の 20 kHz、0.412 W/cm<sup>2</sup> US を 10 分間照射する処置条件とし、第2編での *i.d.* 投与量である 2  $\mu$ g と同じ量の OVA の送達を目標にして FITC-OVA の適用濃度を検討した。0.02%に調製した FITC-OVA を SP 適用することで、皮膚内 FITC-OVA 量は 1.94 $\pm$ 0.72  $\mu$ g (22.9 $\pm$ 0.4  $\mu$ g/g tissue) となり、目標とする抗原量を皮内に送達できることを示した。OVA の SP 適用を週に 1 回繰り返し、OVA 特異的 IgG 抗体産生を 8 週まで評価した結果、OVA の *i.d.* 投与と比較して SP 適用は 6 週目以降から有意に増加し、8 週まで増加していくことが示された。SP を使用して誘導される免疫の種類を調べるために、OVA 特異的 IgG<sub>1</sub> および IgG<sub>2a</sub> の測定も行った。その結果、皮内投与と比較した場合の US の効果は IgG<sub>2a</sub> においてより高く、実用されている注射針による免疫処置では誘導されにくい細胞性免疫の活性化も期待できるものと考えられた。

### 結論

以上のことから、US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激は表皮 LC 活性化および抗原捕捉を促進し、効果的な抗体産生量を誘導するアジュバント様作用を有することが示唆されたことから、SP は注射針に頼らない低侵襲的ワクチン接種法への応用が期待できると考えられる。

# Thesis abstract

## **Study on the application of ultrasound to transdermal vaccination techniques**

**Enjo Satoko**

### **Introduction**

Sonophoresis (SP) is a transdermal drug delivery technique that using ultrasound (US) aimed at enhancing drug delivery to the systemic circulation, especially for hydrophilic and large molecules. It is reported that pretreatment of skin with low-frequency US evokes an immune response to activate Langerhans cells (LC). These findings indicate that US-assisted cutaneous vaccination can be useful as a novel technique. However, basic information such as US application conditions, skin immune response, antibody production, and intradermal antigen delivery is necessary to be evaluated. The present study describes the potency of the US-assisted cutaneous vaccination in terms of the above of view.

### **Part 1···Activation of epidermal Langerhans cells by physical stimuli with ultrasound**

Three different US frequencies (20 kHz, 1 MHz, and 3 MHz) were used to evaluate epidermal LC activation. For all the frequencies tested, the expression of langerin as a marker for the activation of LC increased with time and peaked at 12 h post-US treatment. US application conditions including irradiation time, frequency, and intensity were changed, and LC activation was found to be dependent on these. US treatment at a low-frequency US (20 kHz) was more effective for LC activation than that at therapeutic frequencies like 1–3 MHz, suggesting the potential importance of mechanical effects like cavitation collapses produced by low-frequency US. Langerin expression is comparable to that obtained by the application of microneedle observed in the previous study. These findings suggest that low-frequency US treatment can be effective as physical stimuli to activate skin immune responses.

### **Part 2···Antibody production and epidermal Langerhans antigen capture by application of ultrasound**

It is important to evaluate whether activation of immune response after application of US induce antigen-specific antibody production. Ovalbumin (OVA)-specific immunoglobulin G<sub>1</sub>(IgG<sub>1</sub>) antibody production was measured after intradermal administration of OVA with or without 20 kHz US pretreatment at 0.412 W/cm<sup>2</sup> for 10 min in mice. US pretreatment significantly increased OVA-specific IgG<sub>1</sub> antibody production compared to that in the non-US treatment group. The increased antibody production is thought to be induced by the enhanced antigen-capture ability of LC. The amount of antigens captured into antigen-capturing cell was quantified by flow cytometry using fluorescein isothiocyanate (FITC)-OVA (FITC-OVA). The proportion of antigen-captured LC and the amount of antigen captured increased. In addition, cells were gated based on langerin expression to evaluate the relationship between langerin and antigen capture by LC. The number of antigen-capturing cells and quantity of captured antigen increased with higher langerin expression levels. These results indicate that application of low-frequency US to the skin induced antibody production, in which antigen capture by LC is seems to be involved.

### **Part 3···The gene expression level of epidermal cytokine and transcription factor by application of ultrasound**

I investigated the activation of skin immune response after the application of US through what sort of physiological mechanism. Time courses of the intradermal gene expression involved factors of LC activation such as interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) were evaluated by real time-RT PCR. Mouse skin was treated with intradermal administration of OVA after 20 kHz US at 0.412 W/cm<sup>2</sup> for 10 min. IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B of gene expression levels increased and peaked at 6 h. In addition, US pretreatment alone increased these factors and returned to control levels by 12 h post-US treatment. Involved factors of LC activation changes preceded occurred the activation of LC, suggesting that the involvement of IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B in the activation of LC is associated with langerin expression.

### **Part 4···Intradermal delivery of ovalbumin and antigen-specific antibody production by application of ultrasound**

US application condition to induced activated LC was evaluated to clear whether enables the function of both intradermal delivery of antigen and effective antibody production. To deliver the same amount of OVA as the intradermal dose of 2  $\mu$ g, detailed in Part 2, investigated administration concentration using FITC-OVA. The donor chamber was filled with 0.02% FITC-OVA, US application condition was 20 kHz US at 0.412 W/cm<sup>2</sup> for 10 min. The content after ultrasound application was  $1.94 \pm 0.72 \mu\text{g}$  ( $22.9 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$  tissue) indicating a similar amount of intradermal delivery. SP for OVA was repeated once per week, and OVA-specific IgG antibody production was evaluated for up to 8 weeks. Antibody production by SP treatment increased significantly from 6 weeks and continued to increase up to 8 weeks, compared to OVA intradermal administration. OVA-specific IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> were measured to investigate the type of immune system induced SP treatment. Regarding OVA-specific IgG<sub>2a</sub> production, US treatment was more effective than intradermal administration. The increase in OVA-specific IgG<sub>2a</sub> produced via helper T cell indicates that SP treatment expects cellular immunity activation.

### **Conclusions**

These findings suggest that physical stimuli of the skin associated with US treatment as adjuvant-like effects such as evoking epidermal LC activation and antigen capture induce effective antibody production. Therefore, SP has the potential for minimally invasive needle-free vaccination applications.

## 論文審査の結果の要旨

これまで薬物送達技術の一つであるソノフォレシス(SP)は、薬物の経皮送達を促進し、全身循環への薬物送達を増大させることを目的として多様な研究が行われており、治療目的で薬剤として皮膚に適用された水溶性高分子の経皮送達を高める投与方法として評価されてきた。一方で、超音波(US)による皮膚の前処理がランゲルハンス細胞(LC)を活性化し、皮膚免疫応答を惹起することも報告されている。これらの知見から、SPは注射針に頼らない侵襲性の低い抗原送達法として、新たな経皮ワクチン接種法となり得ると考えられた。しかしながら現在のところ、SPを用いたワクチン接種法は実用化に至っていない。その理由の一つとしては、US適用に伴う皮膚への物理的な刺激が、LC活性化とそれに伴う抗原捕捉、さらにはその後に引き続いて生じる抗体産生までの一連の過程において、どのように関わるかについて十分な検討がなされていないことが挙げられる。SPを用いたワクチン接種法の実用化に向けては、US適用に伴う物理的刺激による皮膚免疫応答について基礎的情報を収集する必要があり、またSPによる抗原送達量の増加と抗体産生量の関係など、系統的な研究が必要であると考えられた。そこで遠城聡子氏は、皮膚免疫機能の活性化および抗体産生に対するUS適用の効果について検討を行い、新しい経皮ワクチン実現の可能性を示唆する結果を得て、「超音波の経皮ワクチン接種技術への応用に関する研究」として論文にまとめている。以下にその内容を要約する。

第1編では、表皮LCの活性化に及ぼすUSの影響を、ラットを用いて評価している。すなわち、3種類の異なる周波数(20 kHz、1 MHz および 3 MHz)を用い、種々条件でラット皮膚にUSを適用したときの表皮LCの活性化について langerin 発現を指標として評価した。その結果、LC活性化は時間依存性を示し、US適用12時間前後に誘発されることが明らかとなった。さらに照射時間、周波数および強度などのUS適用条件を変化させて検討を進めたところ、US適用条件に依存してLC活性化に違いが認められた。低周波数USである20 kHzは、1 MHz および 3 MHz に比べて、LC活性化においてより効果的であることが明らかとなった。これは、20 kHzのUSにより生じるキャビテーション現象のような機械的効果が皮膚に対して物理的な刺激となり、LCの活性化を促したことを示唆している。適用強度を変化させることで既に効果的な抗体産生を誘導することが報告されているマイクロニードルに匹敵する langerin 発現も認められたことから、低周波数USは皮膚免疫機能の活性化を期待する物理刺激として有用である可能性が示唆された。

第2編では、皮膚へのUS適用に伴う物理的な刺激によって活性化されたLCにおいて、抗原捕捉が亢進し、抗体産生が効果的に誘導されるかについて明らかにするために、マウスを用いた評価を行った。すなわち、20 kHz US、0.412 W/cm<sup>2</sup>、10分間の条件で前処理したマウス皮膚にオボアルブミン(OVA)を皮内投与(2 µg)した後のOVA特異的IgG<sub>1</sub>抗体産生量および表皮LCの抗原捕捉能を評価した。USで前処理をすることでUS未適用群と比較して抗原特異的抗体産生量は有意に増加した。またこの抗体産生への効果は、週1回、3週までの繰り返し処置により増強された。この抗体産生の誘導に抗原捕捉能の亢進が関わると考え、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)-OVA (FITC-OVA)を用いて、抗原捕捉細胞の割合および抗原捕捉細胞あたりの捕捉抗原量を評価した。その結果、抗原を補足したLC率および細胞あたりの捕捉抗原量がそれぞれ約1.5倍および1.4倍に増加することが明らかとなった。さらに、LCの抗

原捕捉能と langerin 発現との関係を明らかにするために、langerin 発現レベルで細胞を分けて詳細に評価した結果、langerin 発現レベルが高い LC において抗原捕捉細胞数および捕捉抗原量が増加したのに対して、langerin 発現レベルが低い LC においては抗原捕捉細胞数および捕捉抗原量の増加が認められなかった。このことから、US 適用に伴う皮膚の物理的的刺激が、langerin 発現を伴う LC の活性化を促し、そのことにより抗原捕捉が促進され、最終的な抗体産生の効果的な誘導につながっていることが示唆された。

第3編では、US 適用に伴う皮膚免疫機能の活性化がどのような生理学的機構を経ているかを考察するため、マウスを用いた評価を行った。すなわち、前編までに抗体産生の誘導が明らかとなった 20 kHz、0.412 W/cm<sup>2</sup>、10 分間の処置条件でマウス皮膚を前処理し、さらに OVA を皮内投与して、LC 活性化に関与することが報告されているインターロイキン 1α(IL-1α)、腫瘍壊死因子(TNF-α) および核内因子 κB (NF-κB)の表皮中の遺伝子発現量の経時的变化を評価した。IL-1α、TNF-α、NF-κB のいずれも、処理後6時間で最大の発現が観察されたが、US を併用することで、その発現の最大値はいずれも約2倍に増加した。さらに、OVA の投与を行わず US 適用のみを行った場合でも、これらの発現は増加し、この場合も処理6時間後に高値を示し(ただし IL-1α のみ最大値は9時間後)、12時間後にはコントロールのレベルまで値は低下した。これらの変化は LC の活性化(12時間後)に先立つものであり、langerin 発現を伴う LC の活性化に、IL-1α、TNF-α、および NF-κB が関与していると考えられた。

第4編では、LC を活性化して抗体産生を誘導するのに最も有用な US 適用条件(20 kHz、0.412 W/cm<sup>2</sup>、10 分間の処置)において、SP としても効果が発現し、抗原が皮内に有効量送達され、かつ効果的な抗体産生が得られるかを明らかにするために、マウス皮膚表面に FITC-OVA を適用して SP を行う検討を実施した。第2編での皮内投与量である 2 μg と同じ量の OVA の送達を目標とし、分子量がほぼ等しい FITC ラベルデキストラン 40 を用いた予備検討を行い、FITC-OVA の適用濃度を 0.02% に定めた。確認の結果、US の適用によって得られる皮膚内 FITC-OVA 量は  $1.94 \pm 0.72 \mu\text{g}$  ( $22.9 \pm 0.4 \mu\text{g/g tissue}$ ) であり、適用条件は SP としても有効であり、また定量的な送達が可能であることが示された。週1回、7週まで OVA の SP 適用を繰り返し、OVA 特異的 IgG<sub>1</sub> 抗体産生を8週まで評価した結果、抗体産生は4週間後から確認され、8週まで増加していくことが示された。ヘルパーT1細胞が関わる細胞性免疫への効果も期待し、OVA 特異的 IgG<sub>2a</sub> の測定も行った。その結果、皮内投与と比較した場合の US の効果は IgG<sub>2a</sub> に対してより高く、US を利用したワクチン接種においては細胞性免疫の活性化も期待できるものと考えられた。

以上のことから、US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激は、表皮 LC 活性化および抗原捕捉を促進し、効果的な抗体産生量を誘導する作用を有することが示されたことから、US は侵襲性が低いワクチン接種技術として応用が期待できる。

本論文において、実験の計画・解析は適正になされ、またそれらに対して十分な考察が加えられている。各実験の実施において倫理的問題として指摘すべき事項はなく、研究は適正になされている。

これらのことより、本論文は、本学薬学研究科において博士(薬学)を与えるに十分なレベルを有すると判断する。