

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

目次

総論の部

緒論	1
----	---

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	4
-------------------	---

第1章 20 kHz、1 MHz および 3 MHz の超音波適用に伴う

表皮 langerin 発現量の評価	6
--------------------	---

第1節 超音波適用に伴う経時的表皮 langerin 発現	6
-------------------------------	---

第2節 超音波適用に伴う表皮 langerin 発現に対する照射時間の影響	9
---------------------------------------	---

第3節 超音波適用に伴う表皮 langerin 発現に対する周波数の影響	10
--------------------------------------	----

第2章 20kHz の超音波および他の物理的刺激適用に伴う

表皮 langerin 発現量の評価	12
--------------------	----

第1節 超音波適用に伴う表皮 langerin 発現に対する適用強度の影響	12
---------------------------------------	----

第2節 超音波と他の物理的刺激適用に伴う表皮 langerin 発現の比較	14
---------------------------------------	----

第3章 本編の考察および小括	15
----------------	----

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	17
----------------------	----

第1章 超音波と他の物理的刺激適用に伴う表皮 langerin 発現における

ラットとマウス間の種差の確認	19
----------------	----

第2章 抗原単独投与および超音波併用による抗原特異的抗体産生量の比較

第1節 単回免疫処置に対する超音波併用の効果	22
------------------------	----

第2節 複数回免疫処置における超音波併用の効果	24
-------------------------	----

第3章 超音波適用に伴う表皮ランゲルハンス細胞による抗原捕捉の評価

第1節 超音波適用に伴う表皮ランゲルハンス細胞における

抗原捕捉の定性的評価	26
------------	----

第2節 超音波適用に伴う表皮ランゲルハンス細胞における

抗原捕捉能の定量的評価	28
-------------	----

第4章 本編の考察および小括

30

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32

第1章 抗原単独皮内投与および超音波併用による

表皮中サイトカインおよび転写因子発現量の経時的变化・・・・・・・・ 34

第2章 超音波単独適用による

表皮中サイトカインおよび転写因子発現量の経時的变化・・・・・・・・ 36

第3章 本編の考察および小括・・・・・・・・・・・・・・・・ 38

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・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

第1章 オボアルブミンの皮内送達量の評価・・・・・・・・ 40

第2章 IgG 抗体産生量の経時的推移・・・・・・・・ 42

第3章 IgG₁ および IgG_{2a} 抗体産生量の経時的推移・・・・・・・・ 44

第4章 皮内投与による抗体産生量からの

超音波照射による皮内オボアルブミン送達量の見積もり・・・・・・・・ 46

第5章 本編の考察および小括・・・・・・・・・・・・・・・・ 48

結論	49
謝辞	52
実験の部	53
引用文献	65

総論の部

緒言

Covid-19、インフルエンザ、HIV のようなウイルス感染症は、グローバルヘルスに脅威をもたらしている^{1,2)}。近年では Covid-19 が世界中で蔓延し、健康被害および感染対策による社会行動の制限から経済的な損失をもたらした³⁾。このように生命を脅かす保健や医療の問題だけでなく、経済活動の低下や感染者の人権問題などの深刻な社会問題も引き起こす可能性がある⁴⁾。19 世紀以降、公衆衛生の整備やワクチンの開発によってウイルス感染症に対する予防や治療方法は飛躍的に進歩してきた⁵⁾。ワクチン接種は感染症に対する根本的な予防の手段であり、個人の発症および重症化を防止するだけでなく感染症の蔓延を予防する役割を担う⁶⁾。

現在実用されているワクチンの大部分が皮下注射 (s.c.) や筋肉内注射といった注射による投与方法であり、痛みや恐怖を伴う侵襲的なものである。加えて医療資源が不十分な国や地域においては針の使いまわしといった二次感染の危険性があることも欠点である⁷⁾。このような背景から医療ごみの削減も可能な needle-free ワクチンの開発が求められており、さまざまなワクチン接種法の研究が行われてきた^{8,9)}。

マイクロニードル (MN)、ジェットインジェクション、ソノフォレシス (SP) といった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 Transdermal Drug Delivery System (TDDS) の技術は、needle-free ワクチン投与の技術としての適用が検討されている^{10,11)}。海外で承認されたジェットインジェクターを用いたインフルエンザワクチン接種は従来の筋肉内注射とほぼ同等の抗体産生を誘導することが報告されている¹²⁾。また、近年では溶解型の MN を用いた経皮ワクチン接

種法が盛んに研究されており、インフルエンザ抗原を充填した自己溶解型 MN は *s.c.* 投与の半分の抗原量で効果的な免疫応答を誘導すること¹³⁾、さらに MN の先端に抗原を保持する従来の 2 層性の MN と表皮層への抗原送達を目的とし MN の中間層に抗原を保持する 3 層性の MN を調製し、抗原送達部位の違いによる抗体産生能について評価された研究において、3 層性の MN は *s.c.* 投与や抗原が真皮に送達されるような従来の 2 層性の MN と比べ高い抗体産生が誘導されたことが報告されている¹⁴⁾。このように TDDS において確立してきた物理的送達法を利用したワクチン接種法は、現在実用されている *s.c.* 投与または筋肉内注射と同等もしくはそれ以上の抗体産生を誘導することから、侵襲性の低いワクチン接種法として有用であると考えられる。

SP は超音波 (US) を利用した物理学的吸収促進法として知られ、皮膚を介した薬物の吸収促進を目的に広く検討されている^{15, 16)}。Mitragotri らによる 20 kHz、225 mW/cm² の低周波数 US を用いた研究によって、insulin (~6 kDa) および interferon γ (~25 kDa) といった高分子生理活性物質の皮膚透過を促進することが報告された¹⁷⁾。当研究室の以前の検討では、41 kHz、120 mW/cm² の低周波数 US が少なくとも 40 kDa までの親水性高分子の皮膚透過を一時的に促進することを明らかにした¹⁸⁾。したがって低周波数 US は皮膚への物質送達を促進し、分子サイズの大きなワクチン抗原の皮膚への経皮送達を可能にすると考えられる。

一方、Tezel らは、20 kHz US での皮膚の前処理が、皮膚での免疫応答を開始する上で必要不可欠な抗原提示細胞である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を報告している¹⁹⁾。また、久保らは、角層除去のためのテープストリッピング (TS) に伴う皮膚刺激が LC を活性化し、活性化された LC の樹状突起が角層直下のタイトジャンクション (TJ) バリアを越えて延伸し、TJ バリア外の抗原

補足に関与することを報告している²⁰⁾。さらに、効率的な抗体産生を誘導させることが知られている MN は、適用に伴う皮膚への物理刺激のみで C57BL/6 マウスの LC が活性化することも報告されている²¹⁾。

これらのことから経皮送達の促進に利用される皮膚への物理的な刺激の適用が、皮膚免疫機能を惹起し、経皮ワクチン接種における効果増強に応用できる可能性がある。加えて、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おける皮膚への物理的な刺激の寄与についてはほとんど明らかになっておらず、その機能解明は US によるワクチンデリバリーシステムの開発に有用性が高い。

そこで本研究では US の技術を経皮ワクチン接種法に利用できるかどうかを明らかにすることを目的として、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した。第 1 編では、3 種類の異なる US 周波数を用い、種々 US 適用条件で皮膚に適用した時の表皮 LC の活性化について、その指標として用いられる langerin²²⁾の発現に基づいて評価した。第 2 編では、US 適用に伴う物理的な刺激が 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、モデル抗原にオボアルブミン (OVA) を選択し、OVA の皮内注射 (*i.d.*) 投与に US を併用した際の抗体産生量および表皮 LC の抗原捕捉能への影響について評価した。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に、LC の活性化に関与することが報告されているサイトカインおよび転写因子の遺伝子発現レベルでの発現変化を評価した。第 4 編では、第 3 編までの結果に基づいて LC 活性化を誘導できる最も有用な US 適用条件を用い、US によって OVA を皮内送達させた際の皮内抗原送達量と抗体産生の関係について考察を試みた。以下得られた結果について論述する。なお、本研究における利益相反は存在しない。

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

皮膚の角層を物理的に取り除く TS や数 100 μm の微小な針を皮膚に穿刺させ角層バリアを破壊する MN の物理的な刺激により、表皮 LC が活性化することが報告されている^{20, 21)}。LC は、細胞表面抗原である主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) class II や CD80 および CD86 といった共刺激分子、さらに樹状突起先端に langerin を発現させることが報告されており、活性化した LC は効率的な T 細胞への抗原提示を誘導する²²⁻²⁴⁾。US は周波数が 20 kHz を超える音波、もしくは弾性振動と定義され²⁵⁾、5~100 kHz の power US (低周波数)、0.7~3 MHz の治療 US (中周波数)、2~100 MHz の診断 US (高周波数) に分類される。US が生体にもたらす効果は周波数によって異なり、温熱効果と機械的効果に大別する²⁶⁾。低周波数 US ではキャビテーションの発生および圧壊が生じ、皮膚表面で非対称のキャビテーションが圧壊すると強いエネルギーをもつマイクロジェットが発生するなど機械的効果が生じやすい。一方で 1 MHz 以上の治療域および高周波数 US では、US のエネルギーが吸収されることで生じる局所の温度上昇、すなわち温熱効果が期待できる²⁷⁻²⁹⁾。これらは皮膚に対して物理的な刺激になりうると考えられる。US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激は、TS や MN と同様に LC の活性化を誘導する可能性が考えられる。しかしながら、US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激による LC の活性化についての研究成果は現在のところ報告されていない。

そこで本編では、US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激が表皮 LC の活性化に影響を及ぼすかについて明らかにすることを目的として、3 種類の異なる US 周波数を用

いて照射時間、周波数および適用強度を変化させて皮膚表面に適用した時の LC 活性化について、その指標として用いられる langerin の発現に基づいて評価した。ヘアレスラットを用いて皮膚表面に US を適用し、免疫組織学的手法を用いて langerin の発現変化を観察し、皮膚への US の適用条件と LC 活性化との関係性について考察した。

第1章 20 kHz、1 MHz および 3 MHz の超音波適用に伴う 表皮 langerin 発現の評価

第1節 超音波適用に伴う経時的表皮 langerin 発現

US が生体にもたらす効果は周波数によって異なり、20~100 kHz の低周波数 US では機械的効果が生じやすく、1 MHz 以上の治療域および高周波数 US では温熱効果が期待できる^{27, 28)}。これらは皮膚に対して物理的な刺激になりうると考えられるため、本章では3種類の異なる US 周波数 (20 kHz、1 MHz および 3 MHz) を用いて LC の活性化に及ぼす影響について評価した。

既に LC 活性化が報告されている TS や MN による皮膚への物理刺激によって、皮膚樹状細胞は刺激適用後に速やかに活性化が認められ、24 時間後にはリンパ節へ遊走することが報告されている²⁰⁾。そこで US 適用後の経時的 LC 活性化を明らかにするため、US 適用後の経時的な langerin の発現を評価することとした。

Figure 1 は、20 kHz、1 MHz および 3 MHz US をそれぞれヘアレスラットの皮膚表面に 10 分間適用した後の表皮における langerin の免疫染色画像の X-Y 平面画像 (上側) と X-Z 断面画像 (下側) を示す。適用強度は 20 kHz、1 MHz および 3 MHz はそれぞれ 0.412、0.103 および 0.186 W/cm² とし、1 MHz および 3 MHz は設定できる最大強度であった。さらに X-Y 平面画像の langerin 蛍光シグナルの定量結果を Fig. 2 に示す。すべての周波数で US 適用後の langerin 発現は経過時間に依存していることが確認された。Langerin 発現は US 適用後の経過時間と共に増加し、適用 12 時間後でピークを示し、24 時間後には全ての周波数で control と同程度まで減少した。X-Z 断面画像より、langerin は角層側に局在していることが観察された。

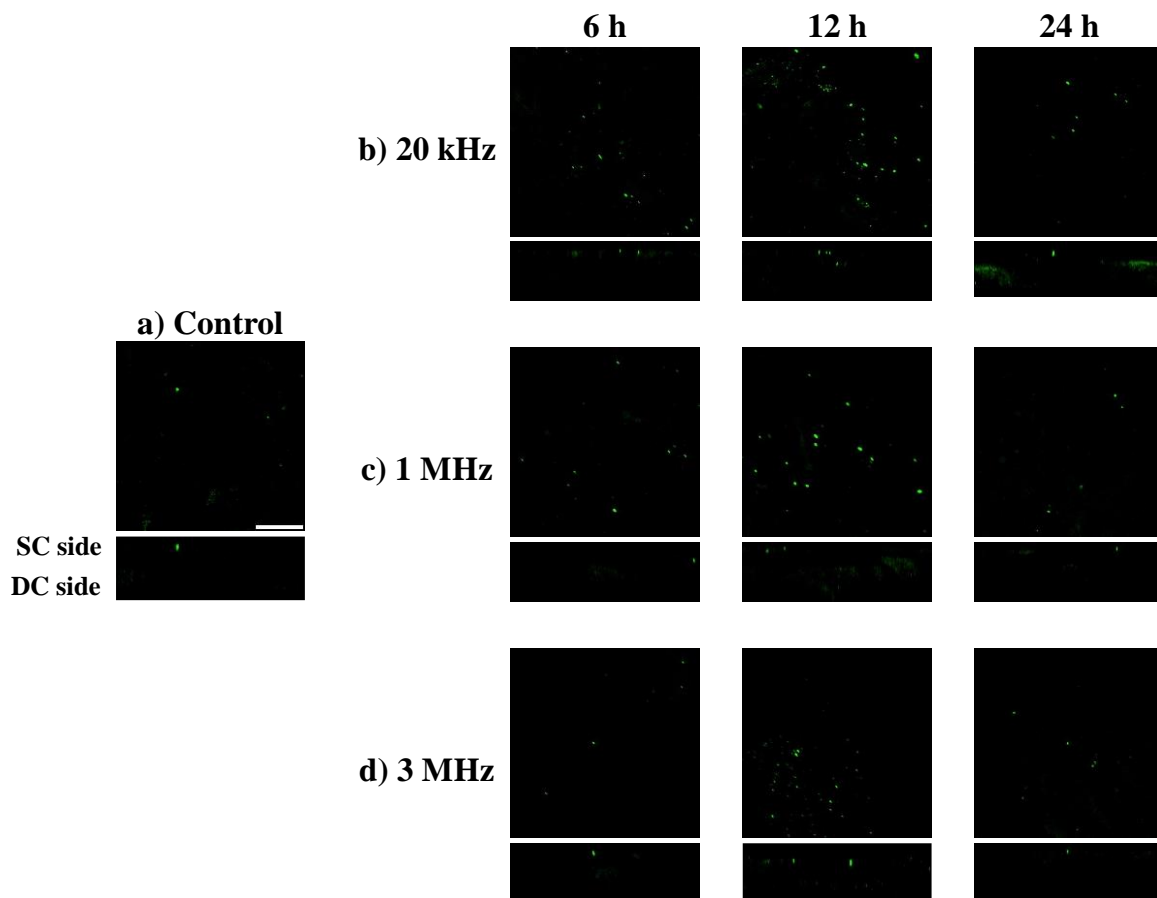


Figure 1 Confocal laser-scanning photomicrographs of the lateral and longitudinal directions of the epidermal sheets of hairless rats.

The epidermal sheet was stained with goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor® 568 preabsorbed antibody that reacts with the langerin/CD207 polyclonal antibody. Langerin (green) was used as an index for the activation of LCs in the epidermal sheet. Lateral (X-Y) and longitudinal (X-Z) directions were imaged at a magnification of $400\times$. Bars, 30 μm . The upper and lower sides of the longitudinal direction images indicate the stratum corneum (SC) and the dermal (DC) side.

a) Control (no treatment); b–d) 6, 12, and 24 h post-ultrasound (US) treatment at 20 kHz (b), 1 MHz (c), and 3 MHz (d).

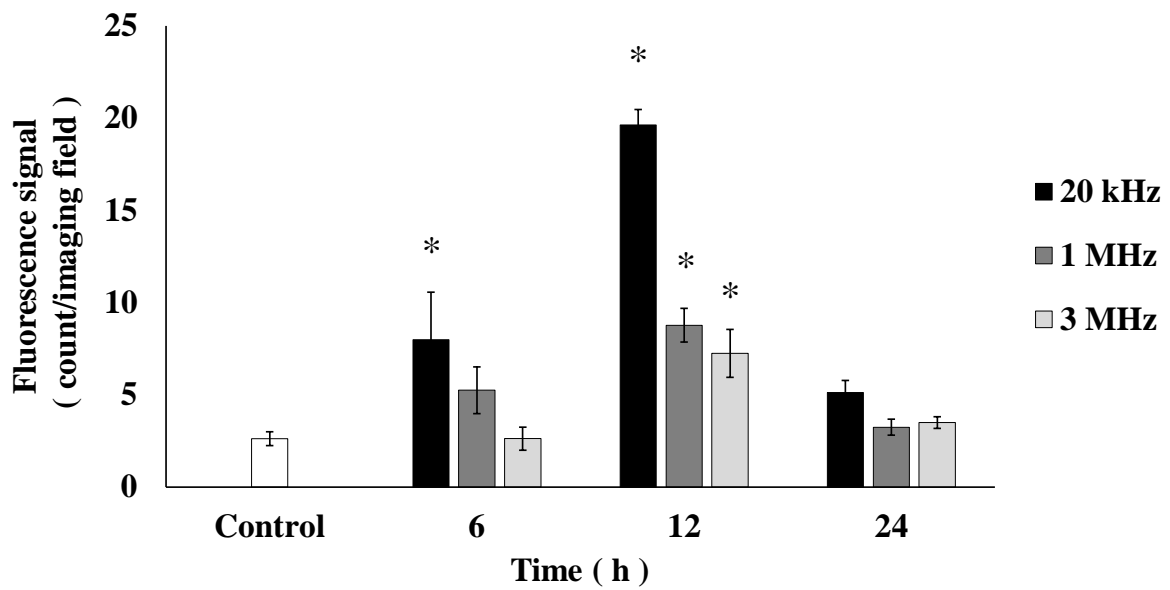


Figure 2 Time-dependency of the langerin signal in epidermal sheets of hairless rats.

The fluorescence signal was quantified by image analysis of Fig. 1. Each data column represents the mean \pm standard error (S.E., n = 3–9). Statistical significance was evaluated using ANOVA with Dunnett’s test. * p < 0.05 compared with the control.

第2節 超音波適用に伴う

表皮 langerin 発現に対する照射時間の影響

本節では、US 処理後の皮膚摘出時間を 12 時間とし、US 照射時間の影響を試験した。US 適用強度は、20 kHz、1 MHz および 3 MHz はそれぞれ 0.412、0.103 および 0.186 W/cm² とした。Figure 3 は、1~20 分の範囲の照射時間において、US 適用 12 時間後での表皮 langerin 蛍光シグナルの定量結果を示している。Langerin 蛍光シグナルは、20 分までの照射時間とともに増加した。さらに 10 分以上の US 照射時間で、20 kHz US 適用後に得られた langerin 蛍光シグナルは、1 MHz および 3 MHz US 適用後と比較して高かった。すべての US 周波数において照射時間 10 分以上で langerin 蛍光シグナルは横ばいになる傾向を示した。

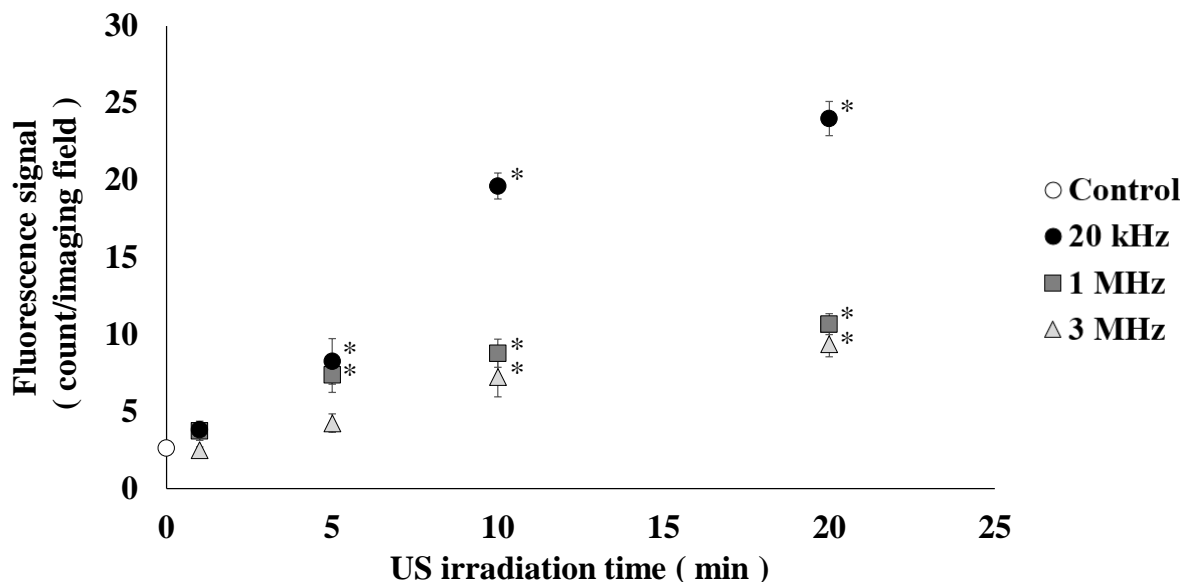


Figure 3 Effect of US irradiation time on the expression of langerin in the epidermal sheets of hairless rats.

The fluorescence signal was quantified by analyzing the images obtained at 12 h post-US treatment for 1, 5, 10, and 20 min of irradiation. Each data point represents the mean \pm S.E. (n = 3–9). Statistical significance was evaluated using ANOVA with Dunnett's test. * p < 0.05 compared with the control. (○, control; ●, 20 kHz; ■, 1 MHz; △, 3 MHz)

第3節 超音波適用に伴う表皮 langerin 発現に対する周波数の影響

前節同様に、US 適用 12 時間後に皮膚を摘出し US 周波数の効果を評価した。3 種類の US 周波数について、同一の強度に設定することは技術的に困難であるため、US 適用強度は、20 kHz、1 MHz および 3 MHz はそれぞれ 0.139、0.103 および 0.186 W/cm² とし、20 kHz について同程度のレベルの強度まで低下させた条件で比較することとした。

Figure 4 には、周波数の異なる同程度の強度に設定した US を 10 分間皮膚に適用した 12 時間後の表皮 langerin 蛍光シグナルを定量化した結果を示し、周波数で比較した。皮膚への US 適用によって誘導される langerin 発現は 3 種類の周波数間で有意な差は認められなかったが、20 kHz > 1 MHz > 3 MHz の順で高かった。このことより 1 MHz および 3 MHz の治療域の US より周波数が低い 20 kHz の低周波数 US は、LC の活性化を誘導するのに、より効果的であることが明らかとなった。そこで、以降の検討では 20 kHz US を用いて行うこととした。

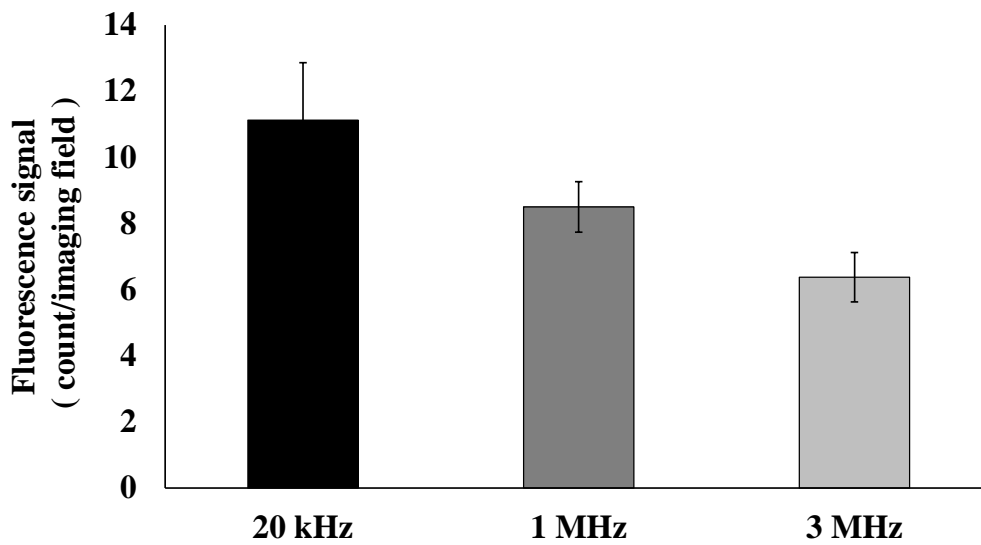


Figure 4 Expression of langerin in the epidermal sheets of hairless rats after treatment with US of different frequencies.

The fluorescence signal was quantified by analyzing the images obtained at 12 h post-US treatment for 10 min. The applied intensities were 0.139 W/cm² for 20 kHz, 0.103 W/cm² for 1 MHz, and 0.186 W/cm² for 3 MHz. Each data column represents the mean ± S.E. (n = 3–9).

第2章 20 kHz の超音波および他の物理的刺激適用に伴う 表皮 langerin 発現の評価

第1節 超音波適用に伴う表皮 langerin 発現に対する 適用強度の影響

機械的効果として考えられるキャビテーションは US エネルギーの増大に伴い発生量も増大し、治療域および高周波数 US ではほとんど発生が認められないことが報告されている¹⁵⁾。そこで本節では langerin の発現に高い効果を示した 20 kHz US を用いて、US 適用強度の影響を検討した。US の照射時間は 10 分に固定し、US 適用 12 時間後の表皮 langerin 発現を観察した。Figure 5 は、0.139、0.412 および 1.19 W/cm² の 20 kHz US を皮膚に適用した時のそれぞれの langerin 蛍光シグナルを示している。0.412 W/cm² と 1.19 W/cm² では有意な差は認められなかったが、適用強度の増加に伴い langerin の発現が増加することが確認された。

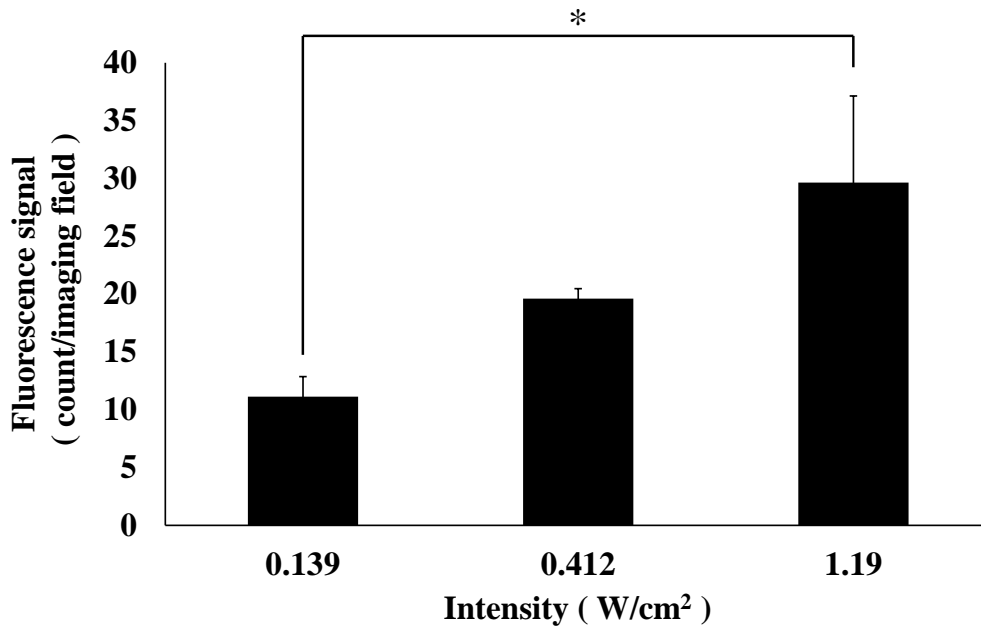


Figure 5 Effect of US intensity on expression of langerin in the epidermal sheets of hairless rats treated with 20 kHz US.

The fluorescence signal was quantified by analyzing the images obtained at 12 h post-US treatment for 10 min. The applied intensities were 0.139, 0.412, and 1.19 W/cm². Each data column represents the mean \pm S.E. (n = 3–9). Statistical significance was evaluated using ANOVA with Dunnett's test. * p < 0.05 compared with 0.139 W/cm².

第2節 超音波と他の物理的刺激適用に伴う

表皮 langerin 発現の比較

TS は皮膚に対して物理刺激となり、皮膚免疫機能が活性化する²⁰⁾。また MN 適用は直接抗原を皮内に送達させることが可能であり、さらに MN 適用そのものが皮膚免疫機能を活性化することが既に報告されている^{14,30)}。本節では、表皮 langerin 発現において、それら物理刺激と US の効果を比較することとした。

Figure 6 に各物理的処置 12 時間後における表皮 langerin 発現の変化を示す。20 kHz、1.19 W/cm² US を 10 分間皮膚に適用および MN 適用により表皮 langerin 発現が有意に増加した。TS は control と比較して表皮 langerin 発現は増加するものの、有意な差は認められなかった。なお、現在実用されているワクチン投与方法である *s.c.* 投与では、生理食塩水 0.1 mL ずつの 3 箇所投与において、langerin の発現は誘導されなかった。

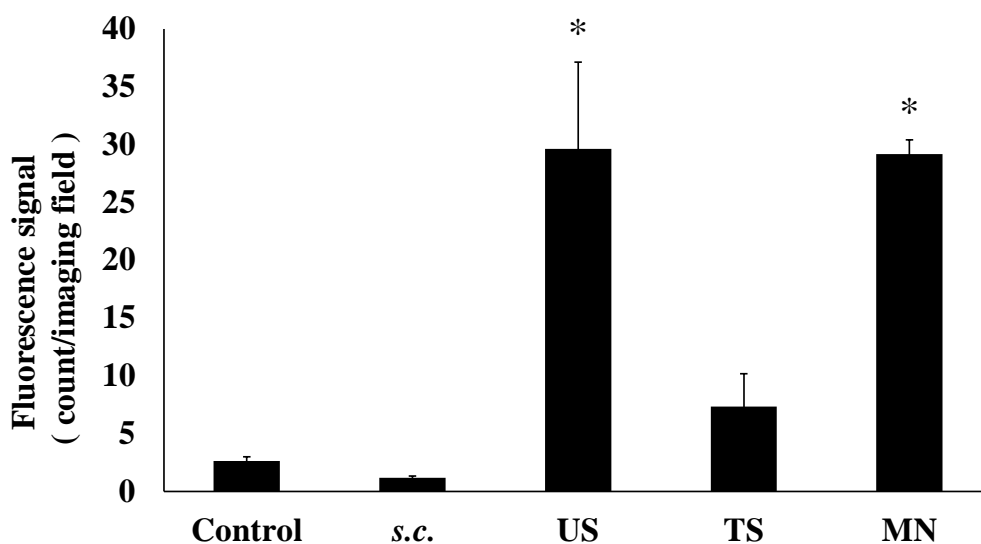


Figure 6 Expression of langerin in the epidermal sheets of hairless rats after treatment with 20 kHz US, tape stripping (TS), microneedle (MN), and subcutaneous injection (*s.c.*).

The fluorescence signal was quantified by analyzing the images obtained at 12 h post-1.19 W/cm² 20 kHz US treatment for 10 min, TS, MN, and *s.c.*. Each data column represents the mean \pm S.E. ($n = 3-9$). Statistical significance was evaluated using ANOVA with Dunnett's test. * $p < 0.05$ compared with the control.

第3章 本編の考察および小括

本編では、3種類の異なる周波数（20 kHz、1 MHz および 3 MHz）を用い、種々US適用条件を皮膚に供した時の表皮 LC の活性化について評価した。TS による物理刺激後 12 時間以内に LC の活性化が誘導され、48 時間後には活性化した LC の大部分が表皮から遊離すると報告されている²⁰⁾。そこでヘアレスラットの背部に US を適用し、LC の活性化の時間依存性を観察した。本編の結果から LC の活性化が 12 時間前後で誘発されることが明らかとなった (Figs. 1 および 2)。このような LC の活性化の時間依存性は、過去に検討された 500 μm MN の皮膚への適用後に得られたものと同様であった²¹⁾ため、以降の実験では US 適用 12 時間後に固定し、種々US適用条件で評価することとした。

Figures 3~5 に示すように、LC の活性化は、照射時間、周波数および強度などの US 適用条件に依存することが明らかとなった。Figure 4 に示す langerin 蛍光シグナルは、同様の強度範囲において 20 kHz > 1 MHz > 3 MHz の順で高くなり、LC の活性化は US 周波数に依存し、低周波数の方がより効果的であることが明らかとなった。また、langerin 発現の増加は、すべての周波数で 20 分までの US の照射時間に依存したが、20 分で明らかに高い langerin 発現が観察された。これらの結果は、低周波数 US が LC の活性化を介して皮膚免疫反応を効果的に活性化させる可能性を示唆している。低周波数 US は、1 MHz や 3 MHz といった治療域 US と比較してキャビテーション現象によって皮膚に強い機械的効果を与えることが知られている⁷⁾。実際、41 kHz の低周波数 US により皮膚表面の媒体溶液中に発生する非対称キャビテーション崩壊は、経皮薬物輸送を促進する機械的効果として皮膚へのマイクロジェットを引き起こす可能性が確認されている。このような機械的効果は、158 および 450 kHz の US を使用し

た場合には誘発されなかったと報告されている³¹⁾。このように 100 kHz より周波数の低い US により強く表れるとされる機械的効果は、TS や MN 処理と同様な皮膚の免疫機構を活性化する物理的刺激として重要であると考えられる。Langerin 蛍光シグナルに対する 20 kHz US の効果は、1.19 W/cm² までの適用強度に依存した (Fig. 5)。20 kHz、1.19 W/cm² US で得られた langerin 蛍光シグナルは、MN の適用による物理刺激によるものと同等であった。MN は皮膚免疫機能を活性化し、実用されている *s.c.* 投与および筋肉内注射と比較して高い抗体産生が誘導されることが報告されている。そのため、同等の LC 活性化が認められた 20 kHz US は十分に皮膚免疫機能を活性化し、効果的な抗体産生を誘導できる可能性があると考えられた。一方で、現在実用されているワクチン投与方法である *s.c.* 投与は針を穿刺するという物理的な刺激になりうる方法ではあるが、樹状細胞の存在しない皮下組織への注射であるため、LC 活性化にほとんど影響が無いものと考えられる (Fig. 6)。

以上より、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

前編において 20 kHz US を皮膚に適用にすることで表皮 langerin の発現の増加が認められたことから、低周波数 US は表皮 LC の活性化を効果的に惹起できるものと考えられた。活性化した LC は、同時に周りの細胞から誘導される炎症性サイトカインおよび微生物由来のシグナルを認識し、速やかにかつ一過性に貪食能や樹状突起の延伸および皮膚内における運動性を亢進させることが報告されており、抗原の取り込みが活発となる³²⁾。抗原を捕捉した LC は、MHC と共に細胞表面に抗原ペプチドを提示し、リンパ節への遊走が増進される。遊走された LC はナイーブ T 細胞に抗原提示を行い、抗原提示を受けたナイーブ T 細胞は種々のサイトカインにより細胞性免疫や体液性免疫を誘導し、一連の免疫応答が誘導されることが考えられる^{24, 33-36)}。

伊藤らにより、10 µg の OVA を充填した溶解性 MN の適用は 20 µg OVA 溶液の *s.c.* または *i.d.* 投与によって誘導される抗体量と比較して高い抗体産生を誘導し、所属リンパ節内において抗原捕捉をした LC および真皮樹状細胞が有意に増加することが報告されている³⁷⁾。また Cao らは、皮膚表面にフラクショナルマイクロラジオ波 (RF) を適用するだけで、抗原の捕捉および成熟が促進され、さらに適用範囲に抗原を *i.d.* 投与することで、化学アジュバントであるスクアレンベースの水中油型ナノエマルジョンである Addavax や水酸化アルミニウムゲルである ALUM と比較して有意に高い抗体産生を誘導することを報告している³⁸⁾。これらの報告より、TDDS 技術の利用に伴う皮膚への刺激がアジュバント作用となり免疫機能が活性化されることが考えられる。US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激による表皮 LC の活性化は、

上述の他の TDDS 技術と同様に LC の抗原捕捉を活発にし、抗体産生を誘導する可能性が考えられる。

そこで本編では、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ことを目的とした。モデル抗原として OVA を選択し US を適用した皮膚に対して高用量の抗原を用いた単回の免疫処置および低用量の抗原を用いて複数回免疫処置したときの抗体産生量への影響について評価した。抗体産生量に変化が認められたときの表皮 LC の抗原捕捉能については fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した OVA (FITC-OVA) を用いて評価した。これらの評価に先立ち、LC の抗原捕捉による活性化から抗体産生までの免疫機能の一連の流れをマウスを用いて評価するため、第 1 編で明らかとなった LC の活性化がマウスでも同様に認められるかを確認した。

第1章 超音波と他の物理的刺激適用に伴う

表皮 langerin 発現における

ラットとマウス間の種差の確認

皮膚免疫担当細胞への影響やその後に引き続いて生じる抗体産生までの免疫機能の一連の流れを評価するにあたり、実験動物をラットから OVA による抗体産生能の高いマウスに変更した。そのためラットで評価してきた前編の現象がマウスでも同様に観察できるかを確認した。そこで本章では、マウスの皮膚に対して第1編と同様に US を適用し、免疫組織学的手法を用いて LC の活性化について評価し、ラットで得られた結果と比較することとした。前編で高い LC 活性化が確認された 20 kHz US に焦点を当て LC 活性化に対する US 適用強度、適用後の経過時間について検討した。

はじめに、20 kHz US を用いてマウスの表皮 langerin 発現に対する US 適用強度の影響を検討した。US の照射時間は 10 分間に固定し、US 適用 12 時間後の表皮 langerin 発現を観察した。Figure 7 は、0.139、0.412 および 1.19 W/cm² の 20 kHz US をラットおよびマウス皮膚に適用した時の langerin 蛍光シグナルの相対比を示している。マウスではラットに比べて langerin シグナルは高く、US 適用強度の増加に伴い langerin の発現が増大することが確認された。しかし、0.139、0.412 および 1.19 W/cm² の 20 kHz US をマウス皮膚に適用した時の皮膚表面を観察したところ、20 kHz、1.19 W/cm² US 適用直後、皮膚の浮腫が確認され、ホーン直下に明らかな皮膚の損傷が認められた。US 適用 12 時間後には浮腫は消失していたが、損傷が残存していた (Fig. 8)。検討した条件では、1.19 W/cm² で表皮 langerin 蛍光シグナルが最も高いことが明らかとなったが、皮膚表面に明らかな損傷があり不適であると判断できるため、以降の実験では 0.412 W/cm² を最適強度と考えて検討を進めることとした。

Figure 9 は最適強度とした 20 kHz、0.412 W/cm² US をマウス皮膚に 10 分間適用後 0、6、12 および 24 時間後の表皮 langerin の経時的発現変化を示す。ラットと同様に表皮 langerin 発現は US 適用後の経過時間と共に増加し、適用 12 時間後でピークを示し、24 時間後には control と同程度まで減少した。以上のことから、US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激に対するラットで得られた langerin 発現応答は、マウスでも同様に得られ、マウスにおいてより高い応答が得られるものと考えられた。

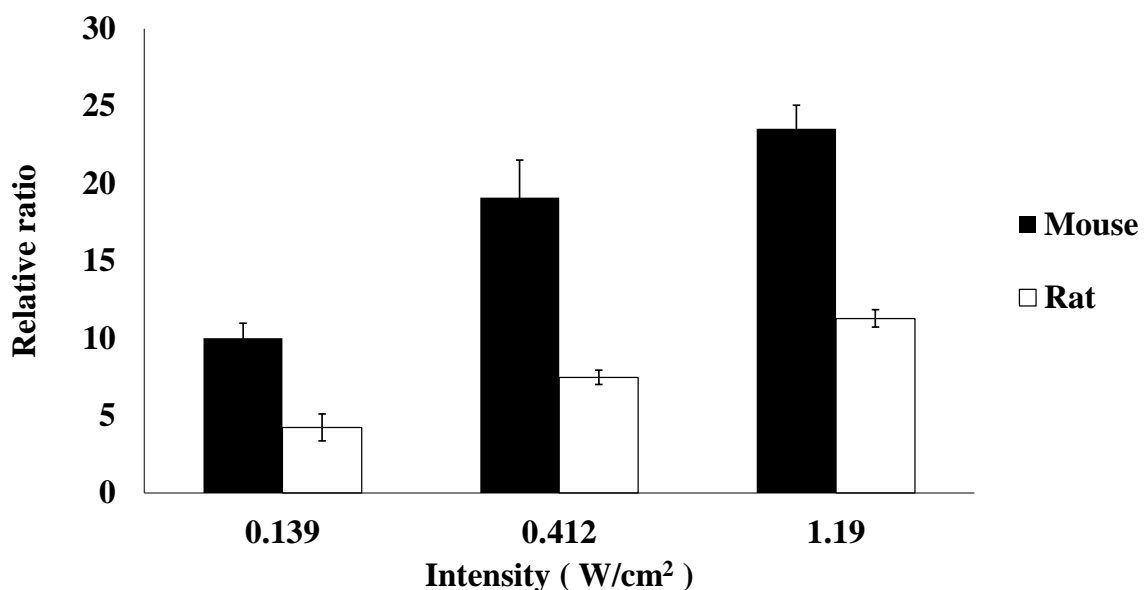


Figure 7 Effect of US intensity on expression of langerin in the epidermal sheets of hairless rats and BALB/c mice treated with 20 kHz US.

The fluorescence signal was quantified by analyzing the images obtained at 12 h post-20 kHz US treatment for 10 min. The applied intensities were 0.139, 0.412, and 1.19 W/cm². The black and white bars denote mouse and rat, respectively. Each data column represents the mean \pm S.E. (n = 3–9).

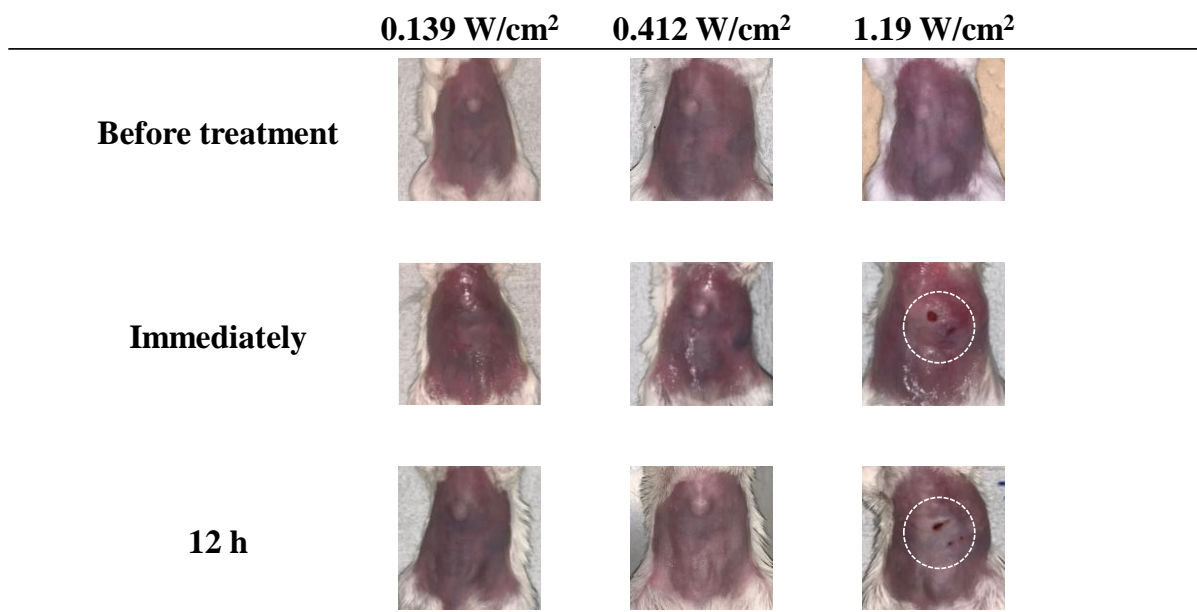


Figure 8 Photographs of mouse skin after the application of 20 kHz US. Photographs of mouse skin after the application of 20 kHz US for 10 min. Images of the skin surface were before treatment, immediately after US treatment, and 12 h post-US treatment. The applied intensities were 0.139, 0.412, and 1.19 W/cm².

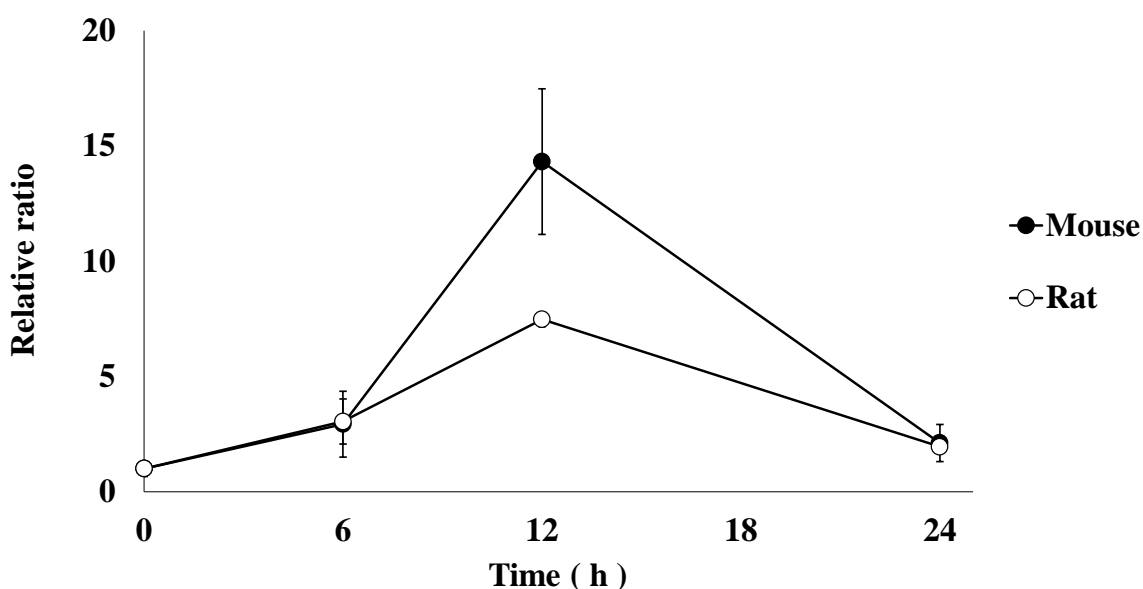


Figure 9 Time-dependency of the langerin signal in epidermal sheets of BALB/c mice and hairless rats treated with US.

The fluorescence signal was quantified by analyzing the images obtained at 12 h after treating the skin with 20 kHz US at 0.412 W/cm² for 10 min. Each data point represents the mean \pm S.E. (n = 3–9). (●, Mouse; ○, Rat)

第2章 抗原単独投与および超音波併用による 抗原特異的抗体産生量の比較

第1節 単回免疫処置に対する超音波併用の効果

本章では、US 適用によって誘導された表皮 LC の活性化が抗原特異的な抗体産生を誘導するかどうか検討した。最適強度と設定した 20 kHz、0.412 W/cm² US をマウスの背部に適用後、報告されているマウスへの OVA 感作条件³⁹⁾を基に、抗原量が 50 µg となるように調製した OVA 生理食塩液を *s.c.* 投与した。比較対象群は US を適用せずに OVA 生理食塩液を *s.c.* 投与したものをを用いた。免疫処置初日を 0 週目として、2 および 4 週間目に採血し、OVA 特異的 IgG₁ 抗体量を評価した。OVA 生理食塩液の単独 *s.c.* 投与および US 併用群ともに 2 週目と比較して 4 週目で産生される抗体量は増加したが、US 併用群の方が OVA 生理食塩液の単独 *s.c.* 投与に比べ抗体産生量は、2 および 4 週目ともに低下し、抗体産生の促進は認められなかった (Fig. 10)。

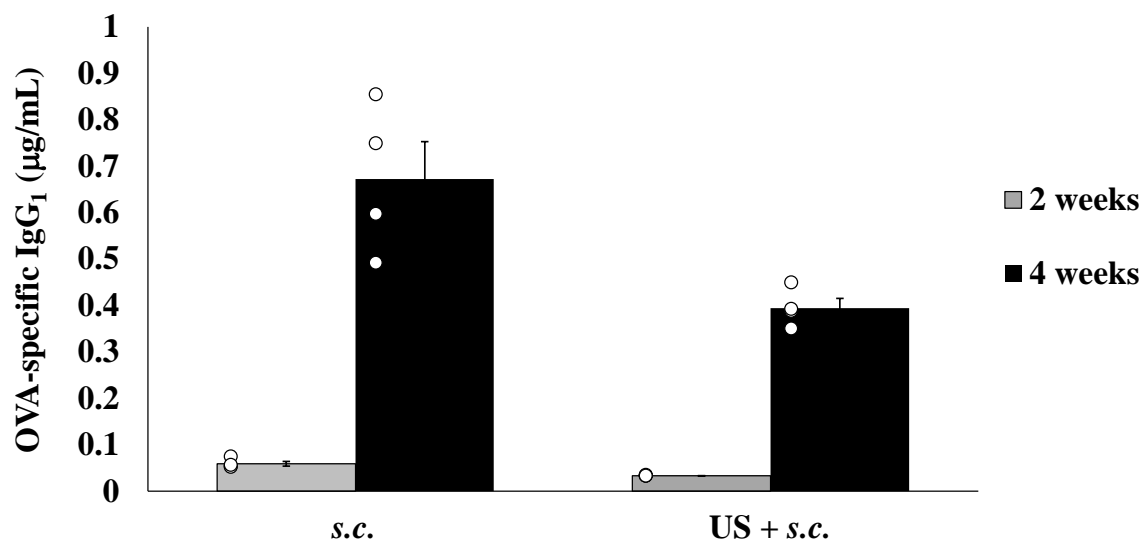


Figure 10 Ovalbumin (OVA)-specific immunoglobulin G1 (IgG₁) antibody concentrations in the serum of BALB/c mice at single immunization either pretreated with or without 20 kHz US.

The US + *s.c.* group was the administration of *s.c.* of OVA to the mouse skin after 0.412 W/cm² 20 kHz US pre-treatment for 10 min. The *s.c.* group was only the administration of *s.c.* of OVA. OVA-specific IgG₁ concentrations at 2 and 4 weeks post-first immunization were measured using an ELISA kit.

The gray and black bars denote mean \pm S.E. OVA-specific IgG₁ antibody concentrations 2 and 4 weeks after immunization. Each data point (○) represents respective OVA-specific IgG₁ antibody concentrations in 4 mice.

第2節 複数回免疫処置における超音波併用の効果

前節の高用量の抗原を用いた単回の免疫処置では US の前処理による抗体産生の誘導が認められなかった。モデル動物への免疫処置は、低用量の抗原を用いて複数回処置する検討も多く行われている⁴⁰⁾。そこで本節では、低用量の抗原を用いて複数回の免疫処置をした時の US 併用の効果を評価することとした。さらに、皮膚の免疫機構では生きた表皮および真皮の免疫担当細胞の役割が重要であるため、皮内領域に抗原が存在することが望ましく、皮内に抗原を送達するワクチン接種は効果的であると報告されている⁴⁰⁾。MN や SP といった TDDS 技術は皮膚を介して薬物を送達させるため、抗原の皮内への送達をも可能にすると考えられることから、US で前処理した皮膚に抗原を *s.c.* 投与および *i.d.* 投与し、抗原の送達部位の違いと抗体産生の関係について考察することとした。

前節と同様に最適強度と設定した 20 kHz、0.412 W/cm² US を 10 分間マウスの背部に適用後、抗原量が 2 μg となるように調製した OVA 生理食塩液を *s.c.* 投与または *i.d.* 投与した。比較対象群は US を適用せずに OVA 生理食塩液を *s.c.* 投与または *i.d.* 投与したものを用いた。免疫処置初日を 0 週目として、1 週間おきに 3 週間まで繰り返して適用し、2 および 4 週間目に採血し、OVA 特異的 IgG₁ 抗体量を評価した。

Figure 11 は、20 kHz US で前処理した皮膚に OVA の *s.c.* 投与または *i.d.* 投与した後の OVA 特異的 IgG₁ 抗体量を示したものである。*s.c.* 投与および *i.d.* 投与ともに、US 未適用群と比較し、US で前処理した群では、OVA 特異的 IgG₁ 抗体量が増加した。US で前処理した場合、2 週間後の OVA 特異的 IgG₁ 抗体量は *s.c.* 投与で 1.3 倍、*i.d.* 投与 2.3 倍増加した。さらに、4 週間後の OVA 特異的 IgG₁ 抗体量は、*s.c.* 投与で 2.8 倍、*i.d.* 投与で 3.4 倍に増加した。また、US で前処理した *i.d.* 投与は 2 および 4 週間

後ともに *s.c.* 投与より高く、US の適用が免疫応答を誘導することが示唆された。

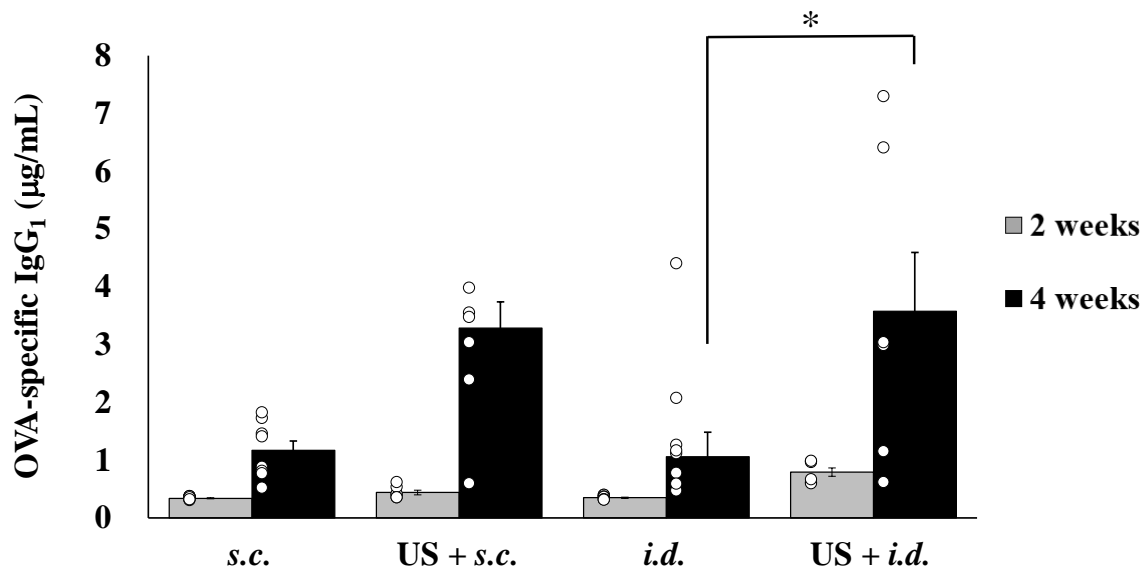


Figure 11 OVA-specific IgG₁ antibody concentrations in the serum of BALB/c mice at multiple immunizations either pretreated with or without 20 kHz US.

The US + *s.c.* group was the administration of *s.c.* of OVA to the mouse skin after 0.412 W/cm² 20 kHz US pre-treatment for 10 min. The *s.c.* group was only the administration of *s.c.* of OVA. The US + *i.d.* group was the administration of *i.d.* of OVA to the mouse skin after 0.412 W/cm² 20 kHz US pre-treatment for 10 min. The *i.d.* group was only the administration of *i.d.* of OVA. OVA-specific IgG₁ concentrations at 2 and 4 weeks post-first immunization were measured using an ELISA kit.

The gray and black bars denote mean ± S.E. OVA-specific IgG₁ antibody concentrations 2 and 4 weeks after immunization. Each data point (○) represents respective OVA-specific IgG₁ antibody concentrations in 6-8 mice. Statistical significance was evaluated using ANOVA with Tukey-Kramer test. * p < 0.05 compared with *i.d.*

第3章 超音波適用に伴う表皮ランゲルハンス細胞による 抗原捕捉の評価

第1節 超音波適用に伴う表皮ランゲルハンス細胞における 抗原捕捉の定性的評価

前章で 20 kHz US で前処理した皮膚に低用量の抗原を繰り返し投与することで、抗体産生の誘導が明らかとなった。効果的な抗体産生を誘導した背景には、免疫担当細胞の抗原捕捉能が高まったことが考えられる。しかし第1編で明らかとなった LC 活性化の増大がその後の抗原捕捉に寄与しているかは明確でなく、US 適用による LC 活性化と抗原捕捉との関係を明らかにする必要があると考えられる。そこで本章では US 適用後のマウス皮膚に FITC-OVA を *i.d.* 投与した際の LC の抗原捕捉量について評価し、LC 活性化マーカーである *langerin* と *i.d.* 投与した抗原を捕捉した細胞量および抗原捕捉量の関係について考察することとした。

20 kHz、 0.412 W/cm^2 US をマウス皮膚に 10 分間適用後、FITC-OVA 生理食塩液を *i.d.* 投与した。マウスの皮膚を FITC-OVA 生理食塩液を *i.d.* 投与直後と投与 12 時間後に皮膚を摘出し、LC による抗原取り込みを共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。Figure 12 は抗原投与直後および 12 時間後における LC の抗原捕捉について解析した画像を示す。青の蛍光は *langerin* を、緑色の蛍光は FITC-OVA を示している。

投与直後では、X-Y 平面、Z-Y 断面画像より細胞表面に発現する *langerin* の内側の細胞内に FITC-OVA の蛍光を観察した細胞はほとんど確認できなかった。一方、抗原投与 12 時間後では細胞表面に発現する *langerin* の内側の細胞内に FITC-OVA の蛍

光が観察された。この結果より、フローサイトメトリーで検出される FITC-OVA の蛍光が LC の抗原捕捉によるものであると明らかにした。

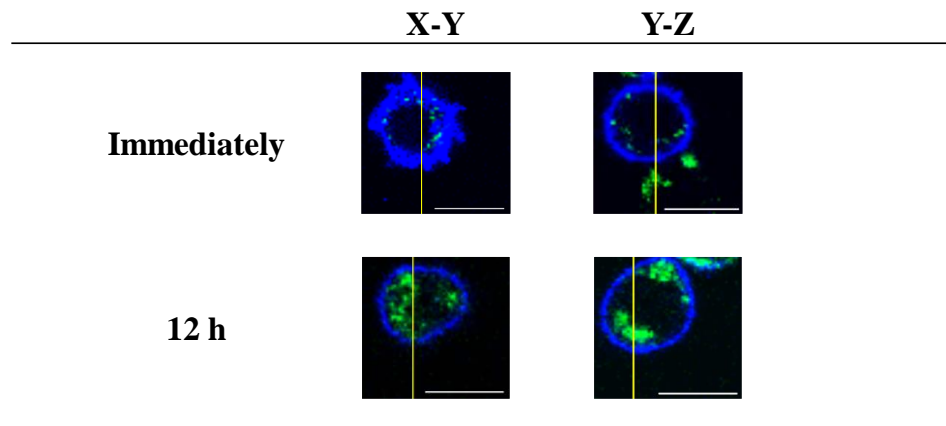


Figure 12 Immunostaining images of LCs captured with FITC-OVA.

Images were Immediately and 12 h post- the administration of *i.d.* of FITC-OVA after 0.412 W/cm^2 20 kHz US pre-treatment for 10 min.

The epidermal cell suspension samples were obtained immediately and 12 h after administration of *i.d.* of FITC-OVA. Epidermal LC was stained with anti-mouse CD207 APC. The Blue signal is langerin(CD207). The Green signal is FITC-OVA. Lateral (X-Y) and longitudinal (Y-Z) directions were imaged at a magnification of $600\times$. Bars, 10 μm . The yellow bar of X-Y images indicated the position of the cross-section.

第2節 超音波適用に伴う表皮ランゲルハンス細胞における 抗原捕捉能の定量的評価

前節において FITC-OVA が LC に捕捉された観察像が確認できた。そこで、20 kHz US を皮膚に前処理することで抗原捕捉能に影響を及ぼすかを明らかにするために、マウス表皮細胞懸濁液を用いて、FITC-OVA を補足した細胞数の割合と細胞 1 つあたりの捕捉した抗原量を測定することとした。

Figure 13 は FITC-OVA の *i.d.* 及び US 併用 12 時間後の表皮 LC における抗原捕捉細胞数の割合および抗原捕捉量を示している。LC 表面抗原のフローサイトメトリー解析により求めた抗原を捕捉した LC の占有率は、US 適用によって FITC-OVA の *i.d.* と比較し約 1.7 倍、抗原捕捉量は約 1.4 倍となった。

さらに、抗原捕捉に関与する langerin 発現と関係を明らかにするために、FITC-OVA を捕捉した細胞をさらに langerin 発現の高い LC ($\text{langerin}^{\text{high}}$ LC) ならびに低い ($\text{langerin}^{\text{low}}$ LC) でゲートし、それぞれの抗原捕捉した LC の割合および抗原捕捉量の変化を示し、US 適用の影響を評価した。Figure 14 は FITC-OVA の *i.d.* 及び US 併用 12 時間後の $\text{langerin}^{\text{high}}$ LC および $\text{langerin}^{\text{low}}$ LC の抗原捕捉細胞割合および抗原捕捉量の変化を示したグラフである。 $\text{langerin}^{\text{high}}$ LC において占有率および抗原捕捉量が高い値を示す傾向が認められた。また、US 適用の有無で比較した時、 $\text{langerin}^{\text{low}}$ LC では占有率および抗原捕捉量ともに変化が認められなかったが、 $\text{langerin}^{\text{high}}$ LC では占有率は約 1.8 倍、抗原捕捉量は約 1.4 倍増加した。そのため US 適用により $\text{langerin}^{\text{high}}$ LC の抗原捕捉が活性化され、細胞あたりの捕捉抗原量が増加することが示唆された。

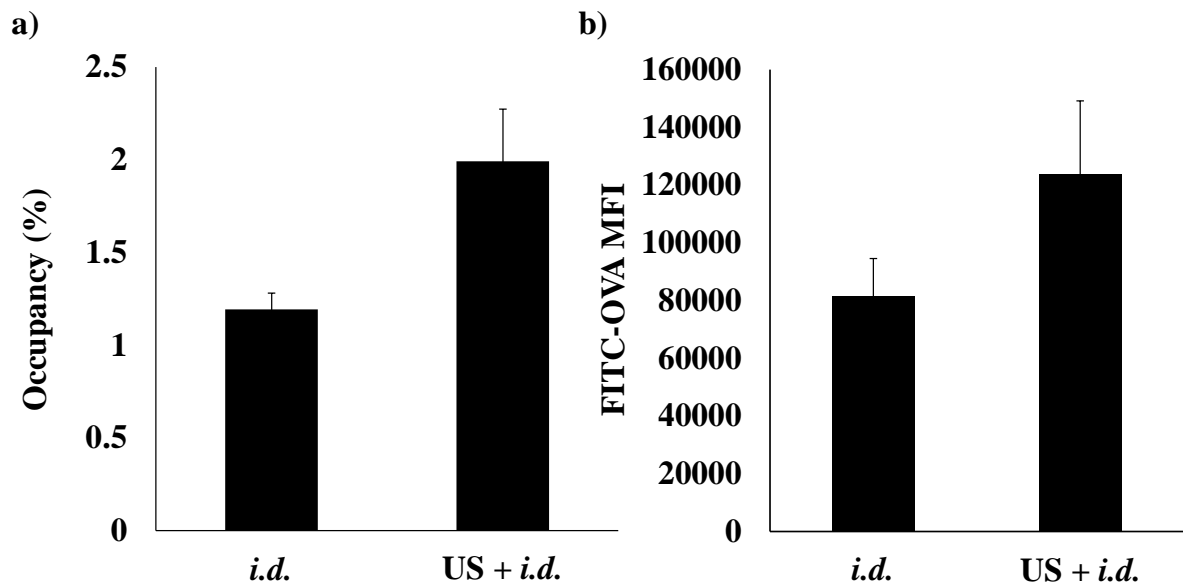


Figure 13 OVA-capture in LC in the mouse epidermal cells, either pretreated with or without 20 kHz US.

a) the proportion of OVA-capture in LC of the total LC, b) the amount of OVA-capture in LC Occupancy and FITC-OVA

The mean fluorescence intensity (MFI) was quantified by flow cytometry analysis obtained at 12 h after treating the skin with or without 20 kHz US at 0.412 W/cm² for 10 min. Each data column represents the mean \pm S.E. (n = 4–5).

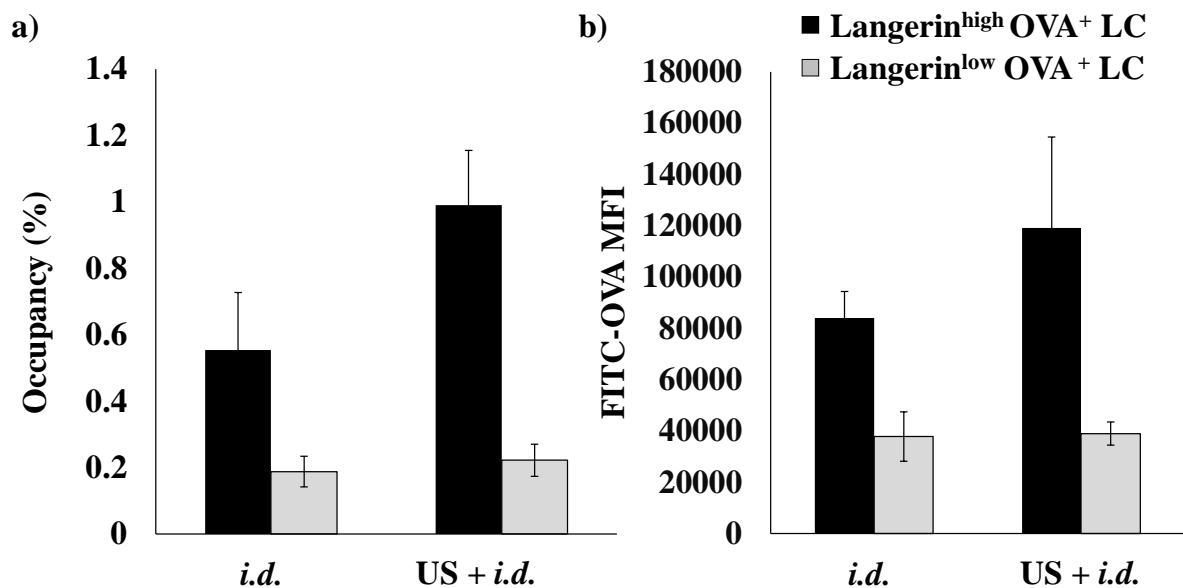


Figure 14 OVA-capture in langerin high and low expression level LC in the mouse epidermal cells, either pretreated with or without 20 kHz US.

a) the proportion of OVA capture in LC of the total LC, b) the amount of OVA-capture

The mean fluorescence intensity (MFI) was quantified by flow cytometry analysis obtained at 12 h after treating the skin with or without 20 kHz US at 0.412 W/cm² for 10 min. The black and gray bars denote Langerin^{high} OVA⁺ LC and Langerin^{low} OVA⁺ LC, respectively. Each data column represents the mean \pm S.E. (n = 4–5).

第4章 本編の考察および小括

本編では、マウスに OVA を *s.c.* 投与または *i.d.* 投与し、20 kHz US で前処理した場合としない場合の OVA 特異的 IgG₁ 抗体産生に対する US 適用の影響、さらに抗原捕捉に対する影響を検討した。

除毛した皮膚に 20 kHz、0.412 W/cm² US を 10 分間前処理したマウスと行わないマウスで、OVA を *s.c.* 投与または *i.d.* 投与した後の OVA 特異的 IgG₁ 抗体産生量を測定した。この抗体産生および抗原捕捉の評価では、ヘアレスラットの代わりに BALB/c マウスを用いたため、20 kHz、0.412 W/cm² US を 10 分間適用した後、langerin 発現量を観察し、LC の活性化を前もって確認した (Fig. 7)。US 適用後の langerin シグナルの増加の時間依存性はヘアレスラットで観察されたものと同様であり (Fig. 9)、US 適用による免疫反応の誘導において、LC の活性化を伴うという点で BALB/c マウスとヘアレスラットの皮膚で同様であることが示された。マウス皮膚に 20 kHz US で前処理後、処理範囲内に OVA を *s.c.* 投与または *i.d.* 投与し、処理しなかったマウスの抗体産生量と比較検討した。Figure 10 に示すように、20 kHz US で前処理したマウス皮膚に 50 μg の OVA を *s.c.* 投与で免疫処置した場合、20 kHz US で前処理しなかったマウスと比較して OVA 特異的 IgG₁ 抗体量の増加は認められなかった。そこで、1 回に適用する抗原量を 50 から 2 μg に減らし、複数回の免疫処置をした時の US 併用の効果の評価することとした。20 kHz US で前処理したマウスにおいて、2 μg の OVA を *s.c.* および *i.d.* 投与で免疫処置した場合、*s.c.* および *i.d.* 投与ともに 20 kHz US で前処理しなかったマウスと比較して抗体産生量が増加したことが明らかとなった (Fig. 11)。また 20 kHz US で前処理したマウスにおいて、*s.c.* および *i.d.* 投与の抗体産生を比べると、皮内投与で抗体価が高いことから、超音波は皮内での免疫応答を高めているこ

とが推測される。この結果は、20 kHz の US による前処理が皮膚免疫機能を惹起して抗体産生の誘導をもたらすことが示唆された。plastic-MN を適用した部位付近に抗原を *s.c.* 投与または *i.d.* 投与すると、抗体産生が誘導され、皮膚への物理的な刺激が最終的な抗体産生の誘導に寄与する可能性が報告されており³⁷⁾、20 kHz US の適用も同様の効果が得られたと考えられる。

さらにこの抗体産生の増加には langerin の重要な役割である抗原捕捉が影響すると考え、US の適用および未適用によって抗原捕捉能にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とし、FITC-OVA を *i.d.* 投与し実験を行った。また、LC による抗原捕捉を定量的に評価した結果、US 適用により占有率を指標とした抗原捕捉細胞数は約 1.5 倍、抗原捕捉量は約 1.4 倍を増加した (Fig. 13)。さらに、langerin^{high} LC では、langerin^{low} LC と比較して抗原捕捉細胞数および抗原捕捉量が高い傾向を示し、US 適用による抗原捕捉細胞および抗原捕捉量の増加は langerin^{high} LC で認められることが明らかとなった (Fig. 14)。抗原を充填しない自己溶解型 MN を適用した時に、所属リンパ節に LC および真皮樹状細胞が有意に遊走されたことも報告されており、物理的な刺激が抗原の取り込みに関係なく LC の活性化およびリンパ節への遊走といった皮膚免疫機能の活性化を誘導する可能性が考えられる³⁰⁾。本編では、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することが明らかとなり、この報告と同様に、US 処理でも LC のリンパ節への遊走にも影響を与え、効果的な抗原提示につながると考えられた。

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

前編より、最適強度と設定した 20 kHz、0.412 W/cm² US を用いて 10 分間マウスの背部に適用後、モデル抗原である OVA を *i.d.* 投与することで US 未適用と比較して抗原特異的抗体産生量の増加が明らかとなった。さらに抗原の捕捉には langerin 発現の高い LC が関与し、US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激が抗原捕捉を活性化し、効果的な抗体産生を誘導することが示唆された。本編では、US 刺激により皮膚免疫活性化に作用する生体因子について検討することにした。

皮膚は、通常角層と顆粒層第 2 層に存在する TJ の 2 段階の物理的バリアによって異物の侵入を防いでいる。この物理的バリアが破綻し、抗原が皮内に侵入すると皮膚の約 90% を占めるケラチノサイトは、IL-1 および TNF- α といった種々サイトカインを産生し、自然免疫を誘導する。LC はこれらサイトカインの影響を受けて、抗原貪食能が亢進され、抗原を捕捉することが報告されている⁴¹⁻⁴⁴。皮膚に US などの物理的刺激を与えると転写因子である NF- κ B が核内に移行し、サイトカインである IL-1 α および TNF- α などの転写が促進されることが報告されている⁴⁵。さらにヒト LC において NF- κ B は、LC の成熟を促進し、MHC class II や共刺激分子の発現を促すことが報告されている^{44,46}。つまり物理的な刺激による転写因子の発現とケラチノサイトからのサイトカイン放出といった皮膚の微小環境の変化が LC の活性化に関与していると考えられる。本研究で用いた 20 kHz US 適用に伴う皮膚免疫機能の活性化にどのような生理学的機構が働いているのかまだ明らかではないが、報告されている物理刺激と同様な変化が生じていると推察できる。第 1 編および第 2 編で行った物理的刺激適

用後の表皮 langerin 発現変化の評価において物理的刺激適用後 12 時間後にピークを示すことが明らかとなり、物理的な刺激を適用してから表皮 langerin 発現までにタイムラグが生じているが、上述の皮膚の微小環境の変化はこの時間内に生じていると考えられる。したがって、langerin 発現ピークが適用 12 時間後であることを考慮し、サイトカインの発現についても同様の時間範囲で評価する必要があると考えられる。

そこで本章では、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のかを考察するために、20 kHz US で前処理した皮膚に OVA の *i.d.* 投与をした後に LC 活性化に関与することが報告されている IL-1 α 、TNF- α および NF- κ B の表皮中の遺伝子レベルでの発現の時間的推移を測定し、langerin 発現との関係性について考察することとした。

第 1 章 抗原単独皮内投与および超音波併用による 表皮中サイトカインおよび転写因子発現量の 経時的変化

抗体産生量および抗原捕捉の影響を評価した時と同じ条件でマウス皮膚を前処理し OVA を *i.d.* 投与した後の表皮中サイトカインおよび転写因子発現について評価した。

Figures 15a、15b、および 15c は、OVA 単独 *i.d.* 投与および US 併用後 0（直後）、1、3、6、9 および 12 時間後のそれぞれ表皮中 IL-1 α 、TNF- α および NF- κ B の遺伝子発現量を示したものである。データは、生理食塩液の *i.d.* 投与に対する相対比として経時的に表した。12 時間後までの測定において、US 併用および未適用の両者ともに 6 時間後に発現量が最大値を示した。その相対比は OVA 単独 *i.d.* 投与では IL-1 α 、TNF- α および NF- κ B に対してそれぞれ 3.0 倍、2.5 倍および 3.6 倍だったのに対し、US 併用では 5.6 倍、4.8 倍および 8.8 倍であり US を併用することでサイトカインおよび転写因子の遺伝子発現量が増加することが明らかとなった。

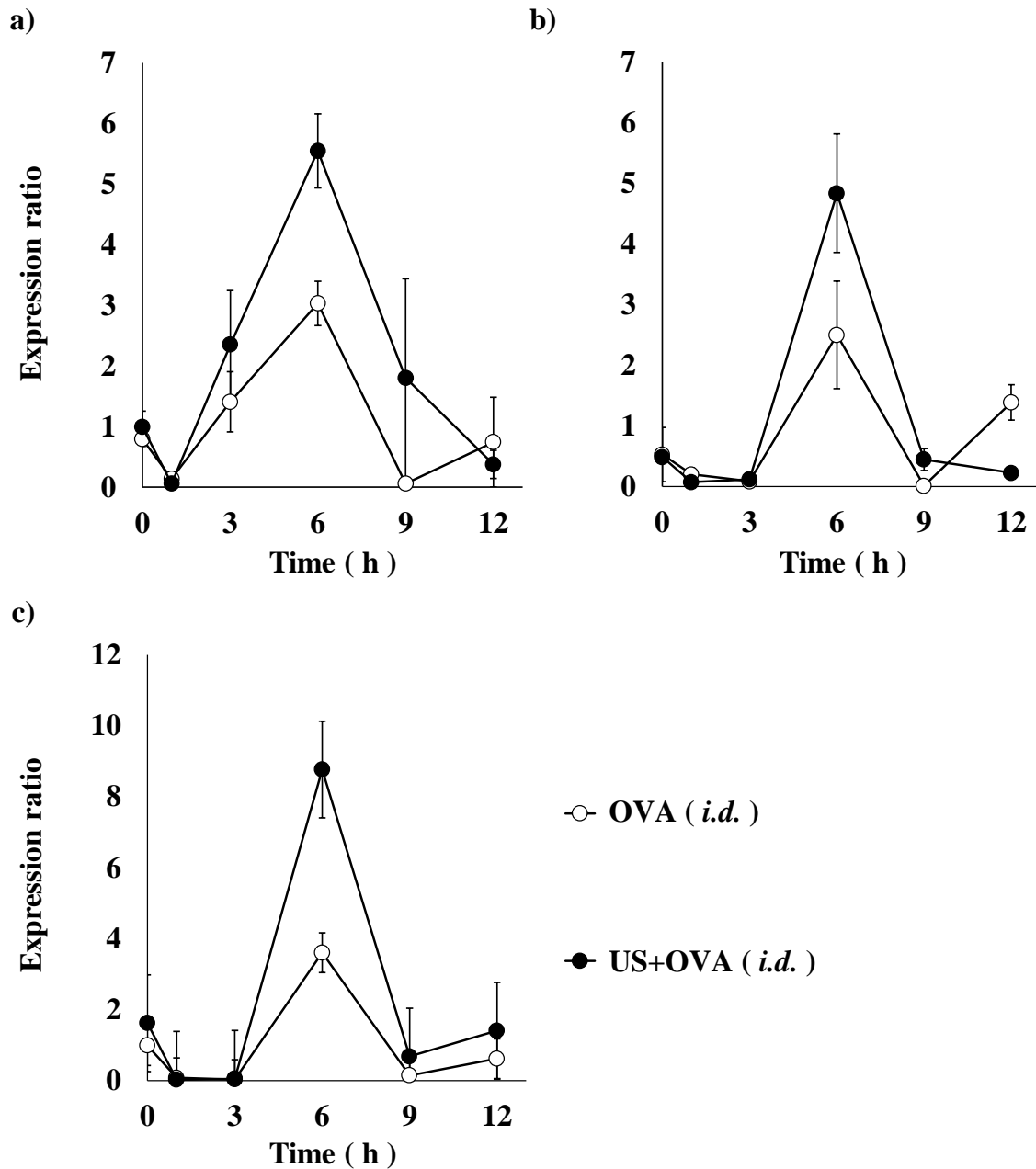


Figure 15 Time course of gene expression levels of IL-1 α , TNF- α , and NF- κ B in mice epidermal of OVA *i.d.* either pretreated with or without 20 kHz US.

a) IL-1 α , b) TNF- α , c) NF- κ B

The US + OVA group was the administration of *i.d.* of OVA to the mouse skin after 0.412 W/cm² 20 kHz US pre-treatment for 10 min. The OVA group was only the administration of *i.d.* of OVA. The control group was the administration of *i.d.* of Saline. Total RNA was extracted followed by reverse transcription and real-time PCR analysis of IL-1 α , TNF- α and NF- κ B gene expression using 18S as endogenous control. Each data point represents the mean \pm S.E. (n = 2–6). (○, OVA *i.d.*; ●, US+OVA *i.d.*)

第2章 超音波単独適用による表皮中サイトカインおよび転写因子発現量の経時的変化

前章で US 併用によりサイトカインおよび転写因子の発現が増加したことから、US のみ適用した時の表皮中サイトカインおよび転写因子発現について評価した。Figure 16 は、US 適用 0 (直後)、1、3、6、9 および 12 時間後の表皮中 IL-1 α 、TNF- α および NF- κ B の遺伝子発現量を control に対する相対比とし経時的に表したものである。US 適用 12 時間後までの時間経過において、IL-1 α では適用 6 時間後から増加が認められ、9 時間後に発現量は最大値を示した。TNF- α は US 適用後 6 時間後に最大値を示した。NF- κ B では適用 3 時間後から増加が認められ、6 時間後に最大値を示した。最大値の相対比はそれぞれ 2.2 倍、3.8 倍および 4.1 倍だった。評価したすべての因子で US 適用 12 時間後には発現は control と同程度まで低下した。

1 MHz、300 mW/cm² US では、皮膚表面に連続照射適用することで適用 1 時間および 2 時間後に IL-1 α 、TNF- α および TGF- β の遺伝子発現レベルが未適用群と比較して増加することが報告されているが、この報告では US は適用後 2 時間の時間推移までしか評価されていない。一方、物理刺激の一種であるイオントフォレシスでは、適用 6 時間後まで IL-1 α 、TNF- α の遺伝子発現レベルが増加することが報告されている⁴⁵⁾。

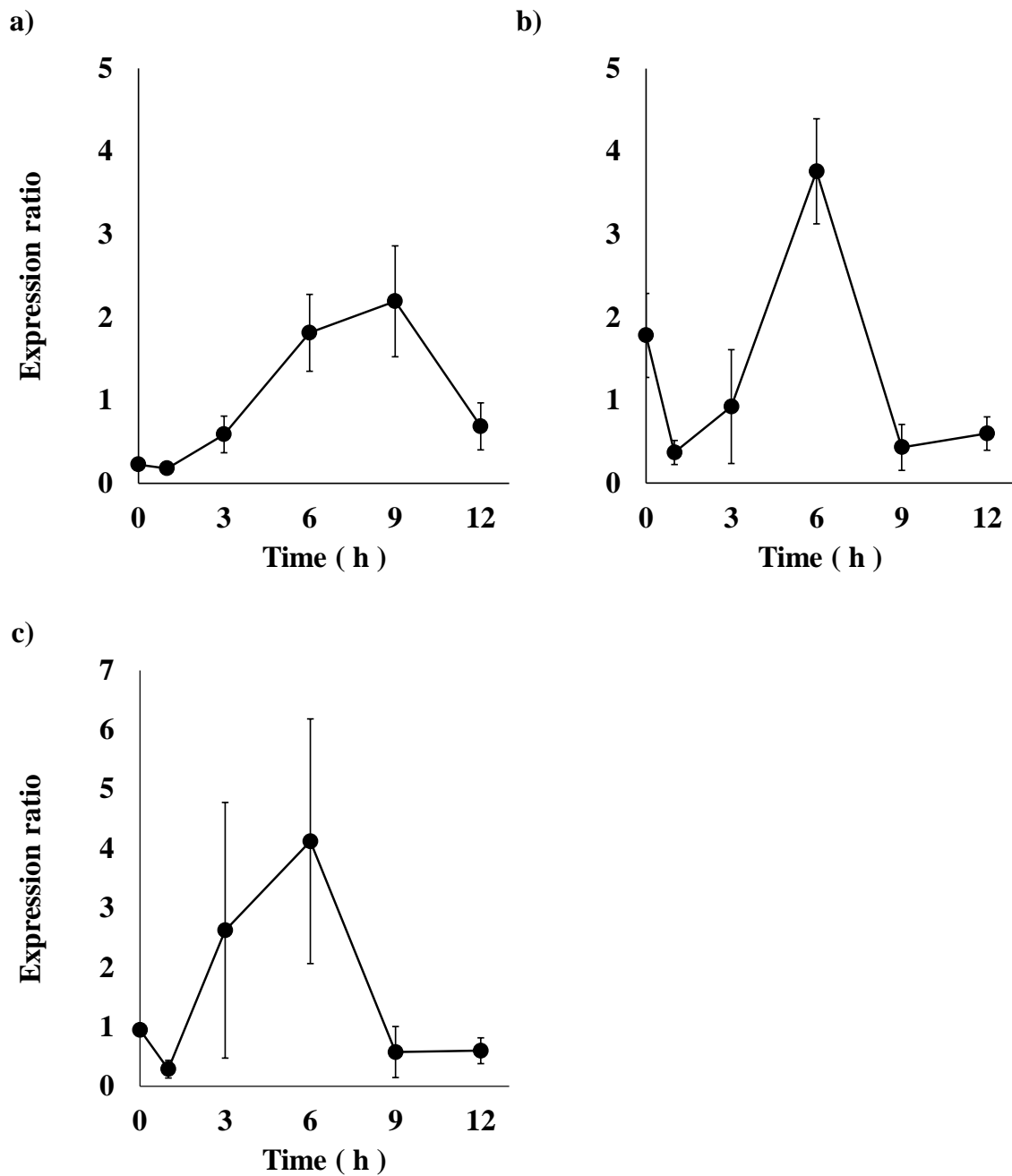


Figure 16 Time course of gene expression levels of IL-1 α , TNF- α , and NF- κ B in mice epidermal treated with 20 kHz US.

a) IL-1 α , b) TNF- α , c) NF- κ B

0.412 W/cm² 20 kHz US pre-treatment for 10 min to the mouse skin. The control group was non-treatment.

Total RNA was extracted followed by reverse transcription and real-time PCR analysis of IL-1 α , TNF- α and NF- κ B gene expression using 18S as endogenous control. Each data point represents the mean \pm S.E. (n = 2–7).

第3章 本編の考察および小括

第2編で誘導が確認された抗体産生に対応して、OVA 単独 *i.d.* 投与と比較して US 併用では表皮中転写因子およびサイトカインの発現量がそれに先立つ形で増加したことから、US 併用によってこれら転写因子およびサイトカインの発現を誘導することが明らかとなった (Fig. 15)。抗原を投与していないにも関わらず MN や RF の皮膚への適用によって LC が活性化されることが報告されているが、これらは物理的刺激によって皮膚細胞から炎症性サイトカインや Alarmin と呼ばれる炎症因子が放出されることによって誘導されると考えられている^{37, 38)}。IL-1 α は正常時からケラチノサイトに貯蔵されており、細胞の損傷などによって放出されることが報告されており、TNF- α は IL-1 α とは異なり正常時の貯蔵は少ないが、刺激を受けることで産生が促されることが知られている⁴⁷⁾。今回用いている低周波数 US の機械的効果は強く、皮膚に対して強い物理的な刺激を与えると考えられるが、免疫機能を活性化させることが明らかとなった US 適用条件下においては、抗原を投与しない US 単独での適用でも表皮中 IL-1 α 、TNF- α および NF- κ B の遺伝子発現量の増加が認められたことから (Fig. 16)、US 適用に伴う物理的な刺激がケラチノサイトに対して一時的な損傷を与え、MN や RF と同様に皮膚の微小環境に刺激因子が放出されることで、LC の活性化を誘導していると考えられる。この考察は、表皮中 IL-1 α 、TNF- α および NF- κ B の遺伝子発現が最大化する時間が US のみの適用で langerin の発現が最大化する 12 時間より前の 6 または 9 時間であったことから合理的である (Fig. 16)。

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

ここまでの検討で、US 適用に伴う皮膚への物理的な刺激が LC 活性化に関与するサイトカインおよび転写因子の発現を誘導し、表皮 LC の抗原捕捉を促し効果的な抗体産生を誘導できる可能性があることが明らかとなった。ここまでの検討に用いてきた低周波数 US (20 kHz) は薬物の皮膚透過を促進させることが数多く報告されており、約 40~70 kDa の薬物およびワクチン抗原に対する皮膚の透過性を高めるのに有効であると報告されている¹⁷⁾。このことから、物質送達を促進させることを目的として多くの検討がなされている低周波 US はワクチン抗原の送達と効果的な抗体産生の誘導を期待できると考えられた⁴⁸⁾。

そこで本編では、第3編までの OVA の *i.d.* 投与での結果に基づいて、LC の活性化を誘導できる最も有用な US 適用条件として 20 kHz、0.412 W/cm² US10 分間を選択し、US によって OVA を皮内に送達させた際の皮内抗原送達量と抗体産生の関係について考察を試みた。

20 kHz、0.412 W/cm² US を 10 分間適用することで送達できる抗原量を第2編で評価した条件と同様に OVA の皮内送達量が 2 µg となるように OVA 生理食塩液の濃度設定を行い、検討を進めた。比較対象群としてヒトで臨床使用が認可されている化学アジュバントである水酸化アルミニウムゲル (ALUM) を用いて、同様のスケジュールで OVA を *i.d.* 投与し、効果的な抗体産生の誘導ができるかどうか比較することとした。

第1章 オボアルブミンの皮内送達量の評価

第2編より 0.1 mg/mL OVA 生理食塩液 20 μ L を *i.d.* 投与した時に US を併用することで、効果的な抗体産生を誘導することが明らかとなった (Fig. 11)。一方で、US の物理的な刺激による抗体産生の誘導は、単回の高用量適用の場合に得られにくいという結果が得られている (Fig. 10)。そのため、US を用いて同程度の抗原を皮内に送達させることを目標に OVA 生理食塩液の適用濃度の検討を進めた。本研究で用いている OVA は分子量が約 45 kDa であるため、OVA と分子量が近く、比較的安価で入手しやすい平均分子量約 40 kDa の FD-40 を用いて予備的検討を行うこととした。

当研究室の以前の検討で、0.5%FD-40 溶液を適用し、41 kHz、120 mW/cm² US を 30 分間照射することで、ホーン直下に FD-40 の強い着色が観察され、FD-40 が容易に皮膚を透過していることが明らかとなっている¹⁸⁾。そこで、同濃度の FD-40 を用いて免疫機能活性化が認められた 20 kHz、0.412 W/cm² US を 10 分間適用し、皮膚中 FD-40 量の測定を試みた。

0.5%FD-40 生理食塩液を皮膚に適用して US を 10 分間照射した直後に皮膚中 FD-40 量を測定したところ、 $48.6 \pm 9.6 \mu\text{g}$ ($584 \pm 101 \mu\text{g/g tissue} \times 0.0815 \pm 0.0027 \text{ g tissue}$, $n = 6$) となり、目標とする $2 \mu\text{g}$ の 25 倍程度であることが明らかとなった。そこで、適用する濃度を約 25 倍に希釈した 0.02%FD-40 生理食塩液を調製し、同様の実験を行ったところ $2.61 \pm 1.57 \mu\text{g}$ ($23.7 \pm 12.1 \mu\text{g/g tissue} \times 0.0935 \pm 0.0076 \text{ g tissue}$, $n = 7$) となり、目標とした $2 \mu\text{g}$ に近い値を得た。目標となる $2 \mu\text{g}$ に近い値が FD-40 において得られたことから、0.02%FITC-OVA 生理食塩液を用いて OVA の皮内送達量の確認を行った。US 適用直後に皮膚中 FITC-OVA 量を測定したところ $1.94 \pm 0.72 \mu\text{g}$ ($22.9 \pm 0.4 \mu\text{g/g tissue} \times 0.0849 \pm 0.0049 \text{ g tissue}$, $n = 3$) となったことから、以後の実験で

は、OVA 生理食塩液の適用濃度を 0.02%とすることとした。

第 2 章 IgG 抗体産生量の経時的推移

本章では、これまでの結果から LC 活性化の誘導において最も有用な US 適用条件を用いて、US 処理により OVA をマウス皮膚内に導入した後の血清中の OVA 特異的 IgG 抗体量を測定し、抗体産生の誘導が可能かどうかを検討した。US 適用条件は第 3 編までの結果に基づいて 20 kHz、0.412 W/cm² US を用いて適用時間を 10 分間に設定した。また、比較対象群として OVA 生理食塩液を *i.d.* 投与およびヒトでの使用が認可されている化学アジュバントである ALUM を OVA 生理食塩液と 1:1 の割合で混合して *i.d.* 投与して免疫処置実験を行った。第 2 編の繰り返し適用と同様に週 1 回の条件を選択し、免疫処置初日を 0 週目として、7 週目まで US 処理による OVA の皮膚内導入を繰り返し、2、4、6 および 8 週間目に採血し、OVA 特異的 IgG 抗体量を評価した。

Figure 17 は 20 kHz、0.412 W/cm² を用いて OVA 生理食塩液を皮内送達させた群、OVA 生理食塩液を *i.d.* 投与した群および OVA 生理食塩液に ALUM を添加し *i.d.* 投与した群における血清中の OVA 特異的 IgG 抗体量の経時的推移を示す。OVA 生理食塩液をマウス背部に *i.d.* 投与すると、OVA 特異的 IgG 抗体量は徐々に増加し、免疫処置後 6 週目以降から 8 週目はほぼ横ばいとなった。ALUM を *i.d.* 投与した群では、OVA 特異的 IgG 抗体量は徐々に増加し、免疫処置後 8 週目まで増加傾向が観察されたが、ALUM 未使用と差は確認されなかった。一方、20 kHz、0.412 W/cm² を用いて OVA 生理食塩液を投与した後の OVA 特異的 IgG 抗体量は、OVA 生理食塩液を *i.d.* 投与および ALUM を *i.d.* 投与した群よりも免疫処置後 6 週目以降から有意に高い値を示した。

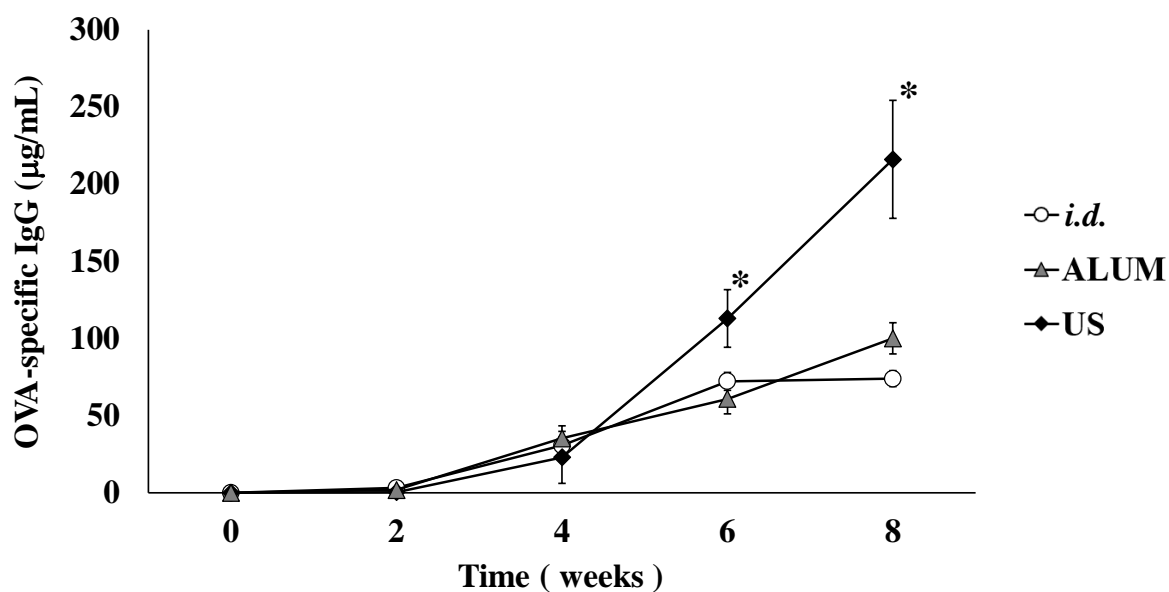


Figure 17 OVA-specific IgG antibody levels in the serum induced by various immunization in BALB/c mice.

The *i.d.* group was only the administration of *i.d.* of OVA. The ALUM group was the administration of *i.d.* of mixture OVA and ALUM. The US group administered OVA by treatment of mouse skin at 0.412 W/cm² 20 kHz US for 10 min.

Each treatment was weekly until 8 weeks. OVA-specific IgG concentrations at 2, 4, 6, and 8 weeks post-first immunization were measured using an ELISA kit.

Each data point represents the mean \pm S.E. (n = 4–6). Statistical significance was evaluated using ANOVA with Tukey-Kramer test. * p < 0.01 compared with *i.d.* and ALUM. (○, *i.d.*; ▲, ALUM; ◆, US)

第3章 IgG₁ および IgG_{2a} 抗体産生量の経時的推移

免疫応答は一般的にウイルスや細菌感染時に誘導される細胞性免疫と引き続く B 細胞の活性化による抗体の産生を誘導する体液性免疫の 2 つに大別される。細胞性免疫において、抗原提示を受けたエフェクター T 細胞は IL-12 によってヘルパー T (Th) 1 細胞に分化する。Th1 細胞は IFN- γ を産生し、周囲のマクロファージの活性化や B 細胞からの IgG_{2a} 抗体の産生を促す。一方で、体液性免疫では IL-4 によってエフェクター T 細胞は Th2 型に分化し、自身も IL-4 を産生および放出し、IgG₁ 抗体の産生を促す。一般的に、細胞性免疫は体液性免疫と比較して強力な効果をもつことが知られ、実用されている注射針を用いた投与方法では誘導されにくいことが報告されている。

そこで本章では、20 kHz、0.412 W/cm² US を用いた免疫処置により誘導される免疫応答性についてさらに詳細に検討するために、第 1 章と同様に OVA 生理食塩液の *i.d.* 投与群および ALUM を *i.d.* 投与に併用する群を比較群として、それぞれ IgG₁ および IgG_{2a} を測定し、Th 細胞応答タイプを見積り、細胞性免疫応答および体液性免疫応答のどちらを優位に誘導しているのか推察することとした。

Figure 18 は 0.412 W/cm² 20 kHz US で皮膚を 10 分間前処理をした後、OVA 生理食塩液を皮内送達させた群、OVA 生理食塩液を *i.d.* 投与した群および OVA 生理食塩液に ALUM を添加し *i.d.* 投与した群のそれぞれの血清中の OVA 特異的 IgG₁ および IgG_{2a} 抗体量の経時的推移を示す。すべての免疫処置において、OVA 特異的 IgG₁ 抗体量は IgG_{2a} 抗体量と比較して高い値を示した。OVA 生理食塩液を *i.d.* 投与した群において、OVA 特異的 IgG₁ 抗体量は増加したが、OVA 特異的 IgG_{2a} 抗体量は変化しなかった。また、ALUM を *i.d.* 投与した群においても OVA 生理食塩液を *i.d.* 投与した群と同様な傾向を示し、ALUM の効果は確認できなかった。一方で、20 kHz、0.412 W/cm²

を用いて OVA 生理食塩液を皮内送達させた群では OVA 特異的 IgG₁ 抗体量のみならず、免疫処置後 8 週目において有意に高い OVA 特異的 IgG_{2a} 抗体量を示した。これらことから、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方が誘導されていることが考えられる。

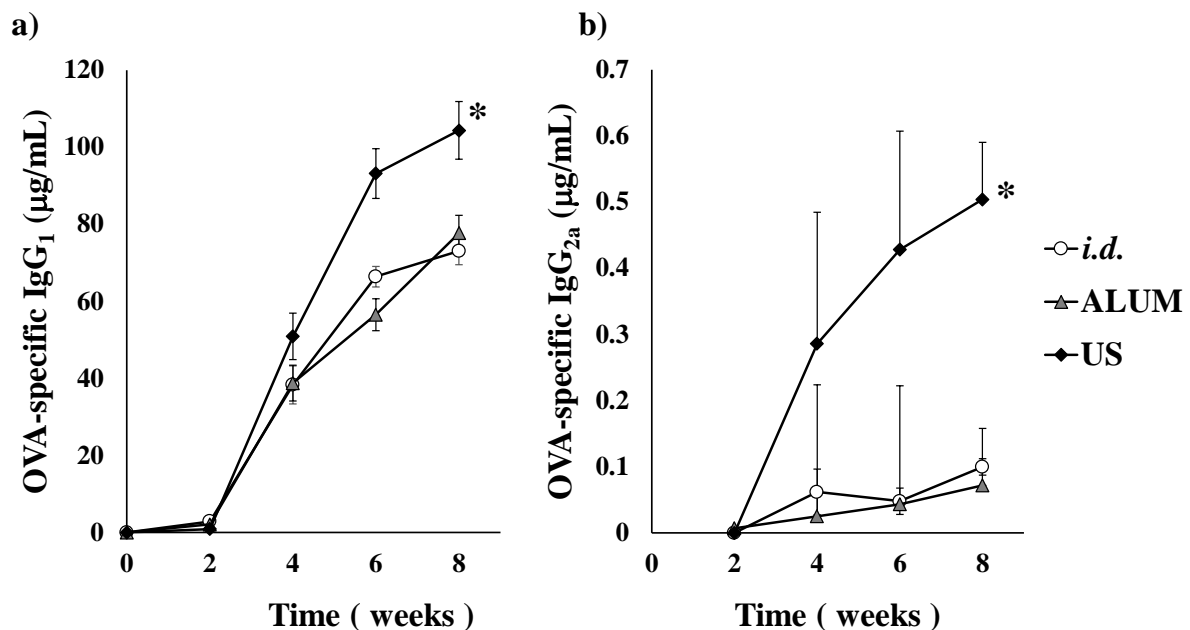


Figure 18 OVA-specific IgG₁ and IgG_{2a} antibody levels in the serum induced by various immunization in BALB/c mice.

a) OVA-specific IgG₁, b) OVA-specific IgG_{2a}

The *i.d.* group was only the administration of *i.d.* of OVA. The ALUM group was the administration of *i.d.* of mixture OVA and ALUM. The US group administered OVA by treatment of mouse skin at 0.412 W/cm² 20 kHz US for 10 min.

Each treatment was weekly until 8 weeks. OVA-specific IgG₁ and IgG_{2a} concentrations at 2, 4, 6, and 8 weeks post-first immunization were measured using an ELISA kit.

IgG₁ and IgG_{2a} at each data point represent the mean ± S.E. (n = 5–6) and mean + S.E. (n = 1–6), respectively. Statistical significance was evaluated using ANOVA with Tukey-Kramer test. * p < 0.01 compared with *i.d.* and ALUM. (○, *i.d.*; ▲, ALUM; ◆, US)

第4章 皮内投与による抗体産生量からの超音波照射による 皮内オボアルブミン送達量の見積もり

前章までで US を用いて同程度の抗原量を皮内に送達させた群は、同量の OVA を含有する生理食塩液を *i.d.* 投与したときよりも高い抗体量を示した。*i.d.* 投与では、OVA の仕込み量がすべて皮内に送達されるため、異なる OVA 量を含有する生理食塩液の *i.d.* 投与による抗体産生量と比較することにより US で抗原を送達した時がどの程度の抗原送達量に相当するかを見積もることができると考えた。

1 回に投与される抗原量が同程度の 2 μg に加え、5 および 10 μg となるように OVA 生理食塩液の濃度を調製し、第 3 章と同じスケジュールで繰り返し免疫処置し、8 週間後の OVA 特異的 IgG 抗体産生量に基づいて評価した。20 kHz、0.412 W/cm² を用いて OVA 生理食塩液を皮内送達させた場合、OVA 特異的 IgG 抗体産生量は約 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、これは 5 μg の OVA を皮内投与で免疫接種した時の抗体産生量に近い値を示した (Fig. 19)。

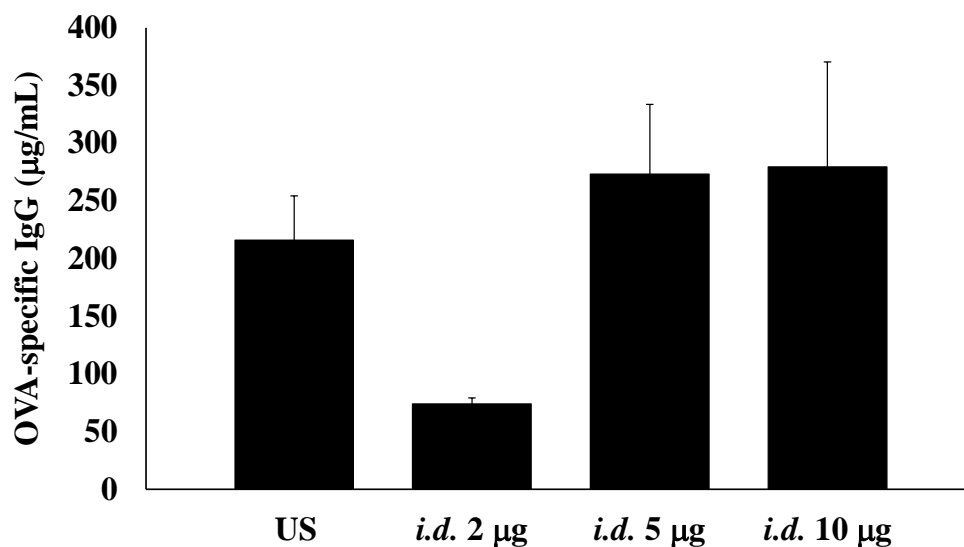


Figure 19 OVA-specific IgG antibody levels in the serum induced by various OVA dose immunization in BALB/c mice.

The *i.d.* group was only the administration of *i.d.* of OVA.

OVA physiological saline solutions with different concentrations were prepared so that the dose of OVA was 2, 5, and 10 µg, and 20 µL each was administered. The US group administered OVA by treatment of mouse skin at 0.412 W/cm² 20 kHz US for 10 min.

Each treatment was weekly until 8 weeks. OVA-specific IgG concentrations at 8 weeks post-first immunization were measured using an ELISA kit.

Each data column represents the mean ± S.E. (n = 5–6). Statistical significance was evaluated using ANOVA with Tukey-Kramer test. * p < 0.01 compared with *i.d.* and ALUM.

第5章 本編の考察および小括

本章では、US によって OVA を皮内に送達させた際の皮内抗原送達が免疫処置方法として有用であるかどうかを評価し、それにより誘導される免疫応答性について検討を行った。その結果、US を用いて OVA 生理食塩液を皮内送達させた群は同量の OVA を含有する生理食塩液の *i.d.* 投与したときよりも 6 週目以降で有意に高い抗体量を示したことから (Fig. 17)、US によって OVA を皮内送達させることが実用されている *s.c.* 投与よりも有用であることが明らかとなった。免疫応答性は Fig. 18 に示すように、OVA 生理食塩液の皮下注射と ALUM では Th1 優位の免疫応答である細胞性免疫応答により誘導させる IgG_{2a} 抗体量に変化は認められなかった。一方で、US は IgG_{2a} 抗体量を増加させた。過去の報告によると ALUM は細胞性免疫の誘導は乏しく、Th2 優位のアジュバントと分類される⁴⁹⁾。そのため US は、細胞性免疫応答である Th1 優位の免疫応答の誘導も期待できることが示唆された。さらに免疫処置の抗原量を変化させた検討において、20 kHz、0.412 W/cm² US を用いて OVA 生理食塩液を皮内送達させた場合、5 µg の OVA を *i.d.* 投与した時の抗体産生量に近い抗体産生を認めたため (Fig. 19)、免疫機能の活性化を誘導する US 適用条件は、OVA の皮内に送達を可能とし、*i.d.* 投与と比較して効果的な抗体産生を誘導できることが明らかとなった。

以上の結果より、US を用いて抗原を皮内に送達させる免疫処置は、実用されている注射針を用いた投与方法と比較して細胞性免疫応答の誘導が可能であると考えられ、より強力な抗体産生を誘導できる可能性が明らかとなった。

結論

これまで 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研究が行われており、水溶性高分子の経皮送達を高める投与方法が検討されてきた。一方で US での皮膚の前処理が 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⁹⁾。このような知見から SP は注射針に頼らない侵襲性の低い経皮ワクチン接種法として有用であると考えられた。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⁵⁰⁾。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た。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。

(1) まず初めに 3 種類の異なる周波数 (20 kHz、1 MHz および 3 MHz) 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 および 3 MHz 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效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 MN 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。

(2) 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、US で前処理したマウス皮膚に OVA を *i.d.* 投与した時の抗体産生量および表皮 LC の抗原捕捉能への影響を評価した。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。この抗体産生の誘導には抗原捕捉が促進されたと考え、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 および捕捉抗原量の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 との関係を明らかにするために、langerin 発現レベルでさらに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したことを示唆している。

(3) 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抗体産生の誘導まで明らかとなった処置条件をマウスに施し、LC 活性化に関与することが報告されているサイトカインおよび転写因子の表皮中の遺伝子発現量の経時的変化を評価した。US を併用することで、サイトカインおよび転写因子の遺伝子発現量が US 適用後 6 時間で増加した。さらに、US 適用のみでもこれらの発現は増加し、langerin 発現に関与するものと考えられた。

(4) 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、US によって OVA を皮内送達させた際の皮内抗原送達量と抗体産生の関係について考察を試みた。その結果、同程度の OVA を含有する生理食塩液を *i.d.* 投与したときよりも有意に高い抗体産生を誘導し、実用されている注射針による免疫処置よりも有用であることを明らかにした。また、このときに誘導される免疫応答性について検討した結果、実用されている注射針による免疫処置では誘導がされにくい Th1 優位の免疫応答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 は侵襲性の低いワクチン接種法への応用が期待できると考えられる。

謝辞

本研究に際し、研究テーマの決定から結論に至るまで、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 病院薬剤学講座教授 上田秀雄先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 生化学講座教授 畑中朋美先生、佐賀大学 リージョナル・イノベーションセンター 化粧品科学講座 特任教授 徳留嘉寛先生、城西大学薬学部 化粧品動態制御学講座准教授 藤堂浩明先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、研究遂行に対する御指導並びに御激励を賜りました城西大学 名誉教授 森本雍憲先生、城西大学薬学部 病院薬剤学講座准教授 木村聡一郎先生、城西大学薬学部 病院薬剤学講座助教 間祐太郎先生に深謝の意を表します。

本論文作成に際し、御校閲並びに御教示を賜りました城西大学薬学部 薬剤学講座教授 関俊暢先生、城西大学薬学部 製剤学講座教授 夏目秀視先生、城西大学薬学部 薬局管理学講座教授 大嶋繁先生に深謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、御協力並びに御支援いただきました城西大学薬学部 病院薬剤学講座 渡邊一理 博士、城西大学薬学部 病院薬剤学研究室の皆様、なにより共に研究活動に励んだ経皮免疫チームのメンバーに感謝いたします。

本研究において尊い命を捧げていただきました全ての動物たちに深く感謝し、哀悼の意を表します。

最後に、いつも支えてくれた家族、友人に心から感謝いたします。

実験の部

第 1 編 実験方法

(1) 試薬および実験材料

Alexa Fluor[®] 568 goat anti-rabbit IgG H&L は Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA) から購入した。Langerin/CD207 polyclonal antibody はフナコシ株式会社 (東京、日本) から購入した。VECTASHIELD[®] は Vector Laboratories, Inc. (CA, USA) から購入した。その他の試薬は、すべて特級品を使用した。

(2) 実験動物

WBN/ILA-Ht ヘアレスラット (120-170 g) は石川実験動物 (埼玉、日本) より購入、もしくは城西大学生命科学センター (埼玉、日本) より得た。全ての動物実験は城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認 (平成 29 年度: H29036, 2018 年度: 18034) を得て行った。

(3) US 装置

発振器 (WF1943) および電力増幅器 (HSA4012) は NF 回路設計ブロック株式会社 (神奈川、日本) より、20 kHz の US トランスデューサーは第一高周波工業株式会社 (東京、日本) より購入した。1 および 3 MHz の実験では、それぞれの周波数で動作するトランスデューサーとマッチングボックス (本多電子株式会社、日本) を接続した。デジタルオシロスコープ (DL1640) は横河電機株式会社 (東京、日本) より購入した。Figure 20 に示すように全ての機器を接続して実験に使用した。

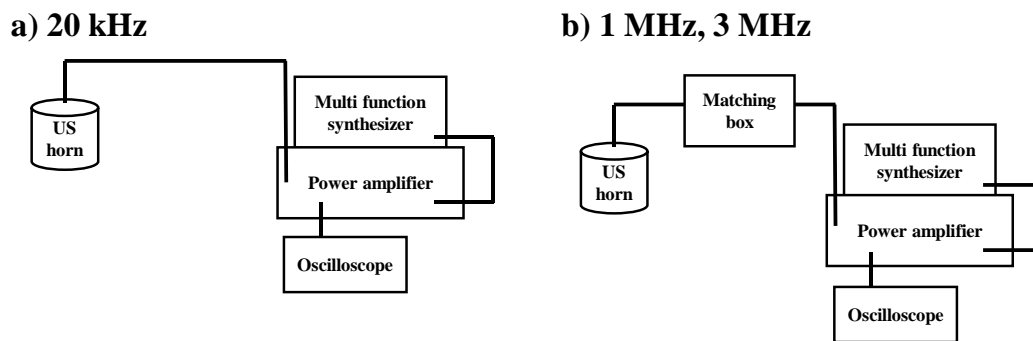


Fig. 20 Schematic diagram of US experimental apparatus.

a) 20 kHz, b) 1 MHz, 3 MHz

(4) カロリメトリー法を用いた US 適用強度の測定

US エネルギーの熱変換を利用したカロリメトリー法⁵¹⁾により精製水中で US 強度を測定した。断熱したビーカーに水 50 g を適用し、US トランスデューサーを一定の位置に設置した。US ホーンに入力した種々の電圧振幅で US 照射を 10 分間行い、これを 3 回繰り返した。このときの水温上昇を測定 (UNCORDER U-228、pantos) し、US 強度 I (W/cm^2) の次式から算出した。

$$I = \frac{M_{\text{water}} \cdot C_{\text{p,water}} \cdot \Delta T}{A \cdot \Delta t}$$

I は US 強度 (W/cm^2)、 M_{water} US を照射した水の量 (g)、 $C_{\text{p,water}}$ は水の比熱[4.18 $\text{J}/(\text{g} \cdot ^\circ\text{C})$]、 A は US トランスデューサーの面積、そして $\Delta T/\Delta t$ は水の温度変化を示している。

(5) 皮膚への物理的処置

WBN/ILA-Ht ヘアレスラット (8 週齢) に、ペントバルビタール生理食塩液を 40 mg/kg の用量で腹腔内投与した。ヘアレスラットの背部を電気シェーバー (BS2865;

Braun) 及び除毛クリーム (epilat; クラシエホールディング株式会社、東京、日本) で除毛した。

US 適用部位は半透膜を除いた Cell Culture Insert (Becton Dickinson Labware Europe) を取り付け、そこに 32°C のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を適用した。US 周波数は 20 kHz、1 MHz および 3 MHz とした。US 適用時間は 1、5、10 および 20 分とし、適用終了後、Cell Culture Insert 内の PBS を除去して 6、12 および 24 時間後に皮膚を摘出した。

比較対象条件として、MN、TS および *s.c.* 適用を行った。MN 適用は 500 μm の Micro Needle Derma Stamp を 10 秒間押し当て、Micro Needle Derma Stamp の向きを変え再び同じ箇所にも 10 秒間押し付けることを行った。TS 適用については、adhesive テープ (セロテープ®、ニチバン株式会社、東京、日本) で、5 回ストリッピング処理を行った。*s.c.* 適用は、処置部位に 0.1 mL ずつ生理食塩水を計 3 箇所に *s.c.* 投与した。Control 条件では、別個体を用いて除毛のみを行い、物理的処置は行わないものとした。

(6) 表皮シートの免疫染色法

久保らの方法に準じて以下の手順で免疫染色を行った⁵²⁾。任意の皮膚摘出時間にマウスから皮膚サンプルを切除した。摘出した皮膚組織片の表皮側を下にして 95% エタノールを用いて 30 分間、氷上で固定した後、真皮側の表面を PBS で軽くすすぎ、表皮面が完全に乾くまで数秒放置した。その皮膚組織片を 3.8% チオシアン酸アンモニウム溶液 (Sigma Aldrich) で 60 分間、37°C の水浴上でインキュベートし、表皮と真皮を分離した。表皮シートを 1% Triton® X-100 溶液で 30 分間、室温でインキュベートし浸透処理した。その後、ブロッキング溶液として 10% スキムミルク溶液で 60 分間、室温でインキュベートした。次に、スキムミルク溶液で希釈した一次抗体

(Langerin/CD207 Polyclonal Antibody (1 : 200)) で一晩、4°C でインキュベートした。翌日、表皮シートを 5 mL の 0.0005% Tween 20-Tris 緩衝生理食塩水 (T-TBS) で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、スキムミルク溶液で希釈した二次抗体 (Alexa Fluor[®] 568 goat anti-rabbit IgG H&L (1 : 2000)) で 2 時間、室温でインキュベートした。表皮シートを 5 mL の 0.0005% Tween 20-Tris 緩衝生理食塩水 (T-TBS) で 10 分間ずつ 6 回洗浄した。サンプルは VECTASHIELD[®]1-2 滴を滴下し、カバーガラスを被せて標本とした。

(7) 表皮シートの画像解析

観察は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV-1000 (OLYMPUS[®], Tokyo, Japan) (×400, 強度 2.0%, HV 650 v, Offset 40%) で行った。Image Pro[®] ソフトウェア (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) を使用して、得られた蛍光画像を定量化した。本解析では、一定以上の強度および面積を示す蛍光シグナルを検出対象とし、その個数を計数し蛍光シグナル強度とした。

(8) 統計解析

データはすべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。統計解析には ANOVA を用い、Dunnett 検定を行い、危険率 (p) が両側 0.05 未満の場合を有意な差とみなした。

第 2 編 実験方法

(1) 試薬および実験材料

第 1 編 (1) と同様のものに加え、Ovalbumin (OVA) は、Sigma-Aldrich Co., Lcc. (St. Louis, USA) から購入した。OVA-IgG₁ ELISA キットは富士フイルムワコーシバヤギ (群馬、日本) から購入した。OVA, Fluorescein Conjugate (FITC-OVA) は Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA) から購入した。その他の試薬は、すべて特級品を使用した。

(2) 実験動物

BALB/c マウス (8 週齢) は三共ラボサービス (東京、日本) より購入した。全ての動物実験は城西大学動物実験規定に従い。全学動物実験管理委員会の承認 (2019 年度: 19017, 2020 年度: 20020, 2021 年度: 21022, 2022 年度: 22020) を得て行った。

(3) 皮膚への物理的処置

第 1 編 (5) と同様の方法を用いた。

(4) 表皮シートの免疫染色法

第 1 編 (6) と同様の方法を用いた。

(5) 表皮シートの画像解析

第 1 編 (7) と同様の方法を用いた。さらに本編では、マウスおよびラットの US 適用によって得られた画像解析により定量化した蛍光シグナル強度の比較をそれぞれの control との相対比で示す。

(6) 免疫処置法

US 処理群では、20 kHz、0.412 W/cm² US をマウス皮膚に 10 分間適用した。高用量の単回免疫処置の場合、US 適用直後（0 週目）に 1.0 mg/mL OVA 生理食塩液を 50 μ L *s.c.* 投与した。低用量の複数回免疫処置の場合、US 適用直後（0 週目）、1、2 および 3 週間目に同部位に 0.1 mg/mL OVA 生理食液を 20 μ L *s.c.* 投与および *i.d.* 投与した。US 未適用群ではそれぞれ US 処理を除き同様の抗原投与を行った。

(7) 血清の採取

免疫処置してから経時的に（2 および 4 週日目）マウス尾静脈からヘマトクリット管を用いて採血を行った。氷上で 30 分静置させた後、室温 3000 rpm で 15 分間遠心分離して血清を分離・分取した。分取した血清は -80°C で保存し、抗体価の測定に用いた。採血と OVA 投与が同日に行われた場合は、前者を先に実施した。

(8) OVA 特異的 OVA IgG₁ 抗体の測定

ELISA 法にて血清中の OVA 特異的 IgG₁ 抗体を測定した。シバヤギのプロトコルに従って操作し、着色反応後マイクロプレートリーダー（Molecular Devices LLC., Japan）を使用して、620 nm の基準波長に対する 450 nm でのサンプル吸光度を測定し、抗体価を算出した。製造元のプロトコルでは 1 U/mL の抗 OVA-IgG₁ は 160 ng/mL の抗体と定義される。

(9) 表皮細胞分散液の調製

摘出した皮膚を、速やかに Epidermal dissociation kit（Miltenyi Biotec K.K., Bergisch Gladbach, Germany）を用いて酵素処理により表皮細胞分散液を調製した。用いた kit

に示された方法に従い4°C以下で 16 時間酵素処置した後、ピンセットを用いて表皮組織と真皮組織に分離した。kit に含まれる細胞分散用酵素を用い、表皮組織から表皮細胞を単離した。分散液を繰り返しピッペティング操作し、37°C、20 分間インキュベートした後、70 μm のメッシュで濾過して表皮細胞懸濁液とした。

(10) 細胞分散液の免疫染色法

作成した細胞懸濁液を抗体染色した。細胞表面抗原の解析に用いた蛍光色素標識モノクローナル抗体を以下に示す；anti-mouse CD11c APC、anti-mouse CD207 PE、anti-mouse CD207 APC (Miltenyi Biotec)。CD11c は 1×10^6 個の細胞に対して 1:50 に、langerin (CD207) は 1:10 になるように希釈し、十分に混和して 4°C、10 分間インキュベートして染色した。

(11) 細胞分散液の画像解析

(10) で得られた細胞懸濁液の観察および画像撮影は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (×600、強度 2.0%、HV 710 v、Offset 0%) (FV-3000、OLYMPUS) により行った。X-Y 平面、Z-Y 断面画像を用い、LC による抗原捕捉を観察した。

(12) LC 表面抗原のフローサイトメトリー解析

LC の langerin 発現および FITC-OVA 捕捉細胞の測定には CytoFLEX (BECKMAN COULTER) を用いた。各サンプル 1×10^6 cells になるまで測定を行った。CD11c 陽性をゲーティングし、表皮における LC を選別した。解析ソフトには CytExpert を用いた。

抗原捕捉能の評価を行うために抗原捕捉細胞数の割合を占有率として以下の式で

求め、細胞 1 つ当たりが捕捉する抗原量は CD11c (+) FITC-OVA (+) 細胞の FITC-OVA の平均蛍光強度 (MFI) として評価した。

占有率 (%) = CD11c (+) FITC-OVA (+) 細胞数 / CD11c (+) 細胞数

(13) 統計解析

データはすべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。2 群間の解析には、Student's t-test を用い、多群間の解析には、ANOVA を用い、Dunnett 検定あるいは Tukey 検定を行い、危険率 (p) が両側 0.05 未満の場合を有意な差とみなした。

第3編 実験方法

(1) 試薬および実験材料

RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit は QIAGEN から購入した。SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase Enzyme、TaqPath qPCR Master Mix、CG、Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)、プライマーとプローブのミクスチャーである TaqMan Gene Expression Assays は、18s (TaqMan[®] Gene Expression Assays;Hs99999901_s1)、IL-1 α (TaqMan[®] Gene Expression Assays; Mm00439620_m1 Il1a)、TNF- α (TaqMan[®] Gene Expression Assays; Mm00443258_m1 Tnf)、NF- κ B (TaqMan[®] Gene Expression Assays; Mm00476361_m1 Nfkb1) を使用し、Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA) から購入した。OVA は、Sigma-Aldrich Co., Lcc. (St. Louis, USA) から購入した。

(2) 実験動物

第2編 (2) と同様のものを用いた。

(3) 皮膚への物理的処置

第1編 (5) と同様の方法を用いた。

(4) RNA 抽出および cDNA 合成

処理 0 (直後)、1、3、6、9 および 12 時間後に皮膚を摘出し 3.8%チオシアン酸アンモニウム-PBS 中 37°Cで 40 分間インキュベートし、表皮を剥離した後、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit を用いて、全 RNA を抽出した。BioSpec-nano (島津ライフサイエンス) を用いて、RNA 懸濁溶液 5 μ L より RNA 濃度を定量した。500 ng の RNA 量相当の

RNA 懸濁溶液を、SuperScript™ IV VILO™ Master Mix を用いて、逆転写反応を行い cDNA の合成を行った。

(5) リアルタイム PCR 解析

18s を内標準遺伝子として選択し、StepOnePlus™リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems®) を用いて、IL-1 α 、TNF- α および NF- κ B の mRNA 発現を分析した。合成した cDNA サンプルを用いてリアルタイム RT-PCR を行った。プライマーには、18s (TaqMan® Gene Expression Assays;Hs99999901_s1)、IL-1 α (TaqMan® Gene Expression Assays; Mm00439620_m1 Il1a)、TNF- α (TaqMan® Gene Expression Assays; Mm00443258_m1 Tnf)、NF- κ B (TaqMan® Gene Expression Assays; Mm00476361_m1 Nfkb1) を使用した。サンプルを 50°Cで 2 分間インキュベートし、次いで 95°Cで 20 秒増幅した後、95°Cで 1 秒、60°Cで 20 秒のサイクルを 60 サイクル行った。

(6) $\Delta\Delta$ Ct 解析

PCR 終了後、StepOne™Software v 2.1 を用いてデータを抽出した。データは、標的遺伝子と内標準遺伝子の Ct 値として分析した。 Δ Ct 値は、内標準遺伝子の Ct 値から標的遺伝子の Ct 値を引くことにより決定した。 $\Delta\Delta$ Ct 値はそれぞれの群の Δ Ct 値から比較対象群の平均 Δ Ct 値を引くことによって決定した。その後、 $2^{-\Delta\Delta$ Ct}に代入して、相対値として決定した。

第 4 編 実験方法

(1) 試薬および実験材料

FD-40 は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。FITC-OVA は、Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA) から購入した。Mouse Anti-OVA IgG Antibody Assay Kit, Mouse Anti-OVA IgG₁ Antibody ELISA Kit, Mouse Anti-OVA IgG_{2a} Antibody ELISA Kit は Chondrex, Inc. (WA, USA) から購入した。水酸化アルミニウムゲルは富士フイルム和光純薬から購入した。

(2) 実験動物

第 2 編 (2) と同様のものを用いた。

(3) FD-40 および FITC-OVA の皮内送達量の評価

US 適用方法は、第 1 編 (5) と同様の方法を用いた。

マウスの背部皮膚に 0.02% FITC-OVA 生理食塩液 2.5 mL を適用し、その後皮膚を摘出しホモジナイズして皮膚中 FITC-OVA 量の測定を行った。US 照射後および直ちにチャンバー内の溶液を取り去り、表面に残存する FD-40 または FITC-OVA を取り除くために精製水で 3 回洗浄した。表面の水分を丁寧に拭き取った後、皮膚を摘出し、重さを測定した。得られた皮膚サンプルは、はさみを用いて細かく切断してから 2 mL の生理食塩水を加えてホモジナイザーを用いて氷冷下でホモジナイズした。マイクロチューブに得られた皮膚ホモジネートを入れ、7000×g で 10 分間遠心分離して上清を採取し、測定した。

(4) 免疫処置法

第2編(6)と同様に除毛後、US適用部位は半透膜を除いた Cell Culture Insert (Becton Dickinson Labware Europe) を取り付け、そこに 0.02%OVA 生理食塩液を 2.5 mL 適用した。US適用条件は、20 kHz、0.412 W/cm²とした。US適用時間は10分とし、適用終了後、Cell Culture Insert 内の OVA 生理食塩液を除去した。比較対象群として、OVA の *i.d.* 投与および ALUM 併用群の検討もおこなった。OVA の *i.d.* 投与は1回の皮内投与量が 2,5 および 10 µg となるように OVA 生理食塩液を 0.1、0.25 および 0.5 mg/mL に調製し、マウス背部に 20 µL *i.d.* 投与した。ALUM と 0.2 mg/mL OVA 生理食塩液と ALUM を 1:1 で混合して 20 µL *i.d.* 投与した。

(5) 血清の採取

第2編(7)と同様の方法を用いた。

(6) OVA 特異的 IgG、IgG₁、IgG_{2a} の測定

ELISA 法にて血清中の OVA 特異的 IgG、IgG₁、IgG_{2a} を測定した。Chondrex のプロトコルに従って操作し、着色反応後マイクロプレートリーダー (Molecular Devices LLC., Japan) を使用して、630 nm の基準波長に対する 450 nm でのサンプル吸光度を測定し、抗体価を算出した。

(7) 統計解析

データはすべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。解析には、ANOVA を用い、Tukey 検定を行い、危険率 (*p*) が両側 0.05 未満の場合を有意な差とみなした。

引用文献

1. Institute of Medicine. *Informing the Future: Critical Issues in Health*. 2nd ed. Washington DC: National Academies Press. 2003;166 p.
2. Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, Dahal S, Kumar H, Kv D. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J*. 2020;96(1142):753-758.
3. Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, Kerwan A, Al-Jabir A, Iosifidis C, Agha M, Agha R. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int J Surg*. 2020;78:185-193.
4. 辻村（伊藤）貴子. 新型コロナウイルス感染症と法の関わり-日本における行動制限措置と偏見差別をめぐって. *IATSS Review* (国際交通安全学会誌). 2021;46(1):22-31.
5. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(34):12283-12287.
6. Greenwood B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1645):20130433.
7. Simonsen L, Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Kane M. Unsafe injections in the developing world and transmission of bloodborne pathogens: a review. *Bull World Health Organ*. 1999;77(10):789-800.
8. Giudice EL, Campbell JD. Needle-free vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(1):68-89.
9. Mitragotri S. Immunization without needles. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):905-916.
10. Kim YC, Prausnitz MR. Enabling skin vaccination using new delivery technologies. *Drug Deliv Transl Res*. 2011;1(1):7-12.
11. Wang FY, Chen Y, Huang YY, Cheng CM. Transdermal drug delivery systems for fighting common viral infectious diseases. *Drug Deliv Transl Res*. 2021;11(4):1498-1508.

12. Shapiro JR, Hodgins B, Hendin HE, Patel A, Menassa K, Menassa C, Menassa M, Pereira JA, Ward BJ. Needle-free delivery of influenza vaccine using the Med-Jet[®] H4 is efficient and elicits the same humoral and cellular responses as standard IM injection: A randomized trial. *Vaccine*. 2019;37(10):1332-1339.
13. Hirobe S, Azukizawa H, Hanafusa T, Matsuo K, Quan YS, Kamiyama F, Katayama I, Okada N, Nakagawa S. Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch. *Biomaterials*. 2015;57:50-58.
14. Ikejiri A, Ito Y, Naito S, Takada K. Two-and three-layered dissolving microneedles for transcutaneous delivery of model vaccine antigen in rats. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2012;3: 325-334.
15. Mitragotri S, Kost J. Low-frequency sonophoresis: a review. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(5):589-601.
16. Polat BE, Blankschtein D, Langer R. Low-frequency sonophoresis: application to the transdermal delivery of macromolecules and hydrophilic drugs. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(12):1415-1432.
17. Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. *Science*. 1995;269(5225):850-853.
18. Morimoto Y, Mutoh M, Ueda H, Fang L, Hirayama K, Atobe M, Kobayashi D. Elucidation of the transport pathway in hairless rat skin enhanced by low-frequency sonophoresis based on the solute-water transport relationship and confocal microscopy. *J Control Release*. 2005;103(3):587-597.
19. Tezel A, Paliwal S, Shen Z, Mitragotri S. Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. *Vaccine*. 2005;23(29):3800-3807.
20. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*. 2009;206(13):2937-2946.
21. Takeuchi A, Nomoto Y, Watanabe M, Kimura S, Morimoto Y, Ueda H. Application of Microneedles to Skin Induces Activation of Epidermal Langerhans Cells and Dermal Dendritic Cells in Mice. *Biol Pharm Bull*. 2016;39(8):1309-1318.

22. Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev.* 2010;234(1):120-141.
23. Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, Seo N, Furukawa F, Takigawa M. Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. *J Invest Dermatol.* 1997;109(2):175-182.
24. Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):935-947.
25. 超音波便覧編集委員会. 超音波便覧. 丸善. 1999; 733 p.
26. Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther.* 2001;81(7):1351-1358.
27. 大森豊明. 生体物理刺激と生体反応. フジ・テクノシステム. 2004; 869 p.
28. Vranić E. Sonophoresis-mechanisms and application. *Bosn J Basic Med Sci.* 2004;4(2):25-32.
29. Park D, Park H, Seo J, Lee S. Sonophoresis in transdermal drug deliverys. *Ultrasonics.* 2014;54(1):56-65.
30. Hirobe S, Susai R, Takeuchi H, Eguchi R, Ito S, Quan YS, Kamiyama F, Okada N. Characteristics of immune induction by transcutaneous vaccination using dissolving microneedle patches in mice. *Int J Pharm.* 2021;601:120563.
31. Ueda H, Mutoh M, Seki T, Kobayashi D, Morimoto Y. Acoustic cavitation as an enhancing mechanism of low-frequency sonophoresis for transdermal drug delivery. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(5):916-920.
32. DeFranco AL, Locksley RM, Robertson M. Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. New Science Press. 2007; 387 p.
33. Igyártó BZ, Kaplan DH. Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(1):115-119.
34. Clayton K, Vallejo AF, Davies J, Sirvent S, Polak ME. Langerhans Cells-Programmed by the Epidermis. *Front Immunol.* 2017;8:1676.
35. Kaplan DH. In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends Immunol.* 2010;31(12):446-451.

36. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):77-84.
37. Ito S, Hirobe S, Yamashita R, Sugiyama A, Takeuchi H, Eguchi R, Yoshida J, Oyamada T, Tachibana M, Okada N. Analysis of immune response induction mechanisms implicating the dose-sparing effect of transcutaneous immunization using a self-dissolving microneedle patch. *Vaccine.* 2022;40(6):862-872.
38. Cao Y, Zhu X, Hossen MN, Kakar P, Zhao Y, Chen X. Augmentation of vaccine-induced humoral and cellular immunity by a physical radiofrequency adjuvant. *Nat Commun.* 2018;9(1):3695.
39. Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clin Exp Immunol.* 1999;118(1):9-15.
40. Yasuda T, Ura T, Taniguchi M, Yoshida H. Intradermal Delivery of Antigens Enhances Specific IgG and Diminishes IgE Production: Potential Use for Vaccination and Allergy Immunotherapy. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167952.
41. Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest.* 1992;90(2):482-487.
42. Berthier-Vergnes O, Bermond F, Flacher V, Massacrier C, Schmitt D, Péguet-Navarro J. TNF-alpha enhances phenotypic and functional maturation of human epidermal Langerhans cells and induces IL-12 p40 and IP-10/CXCL-10 production. *FEBS Lett.* 2005;579(17):3660-3668.
43. Zhang C, Merana GR, Harris-Tryon T, Scharschmidt TC. Skin immunity: dissecting the complex biology of our body's outer barrier. *Mucosal Immunol.* 2022;15(4):551-561.
44. Chopra A, Gupta A. Skin as an immune organ and the site of biomimetic, non-invasive vaccination. *Med Nov Technol Devices.* 2022;16:100196.
45. Choi EH, Kim MJ, Yeh BI, Ahn SK, Lee SH. Iontophoresis and sonophoresis stimulate epidermal cytokine expression at energies that do not provoke a barrier abnormality: lamellar body secretion and cytokine expression are linked to altered epidermal calcium levels. *J Invest Dermatol.* 2003;121(5):1138-1144.

46. Peiser M, Koeck J, Kirschning CJ, Wittig B, Wanner R. Human Langerhans cells selectively activated via Toll-like receptor 2 agonists acquire migratory and CD4+T cell stimulatory capacity. *J Leukoc Biol.* 2008;83(5):1118-1127.
47. 島田眞路. 表皮の免疫担当細胞について. *Jpn J Clin Immun.* 1994;17(6) :664-666.
48. Gao Y, Du L, Li Q, Li Q, Zhu L, Yang M, Wang X, Zhao B, Ma S. How physical techniques improve the transdermal permeation of therapeutics: A review. *Medicine (Baltimore).* 2022;101(26):e29314.
49. Schirmbeck R, Melber K, Mertens T, Reimann J. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *J Virol.* 1994;68(3):1418-1425.
50. Hettinga J, Carlisle R. Vaccination into the Dermal Compartment: Techniques, Challenges, and Prospects. *Vaccines (Basel).* 2020;8(3):534.
51. Mitragotri S, Farrell J, Tang H, Terahara T, Kost J, Langer R. Determination of threshold energy dose for ultrasound-induced transdermal drug transport. *J Control Release.* 2000;63(1-2):41-52.
52. Kubo A, Nagao K, Amagai M. 3D visualization of epidermal Langerhans cells. *Methods Mol Biol.* 2013;961:119-127.