

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860115

研究課題名(和文)皮膚・リンパ節内の免疫細胞挙動の解析による経皮ワクチン免疫誘導機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of transcutaneous immune responses in skin and draining lymph nodes

## 研究代表者

廣部 祥子(Hirobe, Sachiko)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70644582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、従来の注射投与型ワクチンと比較して高い有効性を発揮しうる経皮ワクチンの免疫誘導機構の解明を目指した。独自に開発した2種類の経皮ワクチンデバイス(ハイドロゲルパッチと皮膚内溶解型マイクロニードル)を用いた経皮ワクチンと注射投与(皮下および皮内)における免疫応答を比較検討した。その結果、皮膚を標的とした経皮ワクチンでは、皮膚組織内での遺伝子発現変化、所属リンパ節内での細胞ポピュレーション変化やT・B細胞の活性化など、注射投与ワクチンとは異なる反応が生じていることが判明し、これらの反応の違いが経皮ワクチンの優れた抗体産生誘導能に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to clear the mechanism of immune responses by transcutaneous vaccination, whose efficacy is stronger than that of conventional injectable vaccination. We compared immune responses by transcutaneous vaccination using two type of transcutaneous vaccine devices (hydrogel patch and microneedle patch) to that by injectable vaccination (subcutaneously and intradermally). The differences between transcutaneous vaccination and injectable vaccination were recognized in mRNA expression in skin, population of dendritic cells in draining lymph nodes, and activation of T or B cells. Those results indicated that these differences contributed to high antibody production by transcutaneous vaccination.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：経皮ワクチン 皮膚免疫 マイクロニードル

## 1. 研究開始当初の背景

感染症は世界において未だに死亡原因の第一位であり、その唯一根本的な予防手段であるワクチンの研究開発が注目されている。しかしながら、現状のワクチンは主に注射投与製剤であり、投与に医療技術者を必要とし、痛みを伴うことが人々をワクチン接種から遠ざけている。また、注射針を介した二次感染やワクチンの輸送・保管に必要な低温温度管理が開発途上国へのワクチン普及を停滞させている。これらの注射型ワクチンが抱える課題を一举に克服する新規ワクチンシステムとして、経皮ワクチンの開発が待望されている。しかしながら、経皮ワクチンにおける免疫応答誘導機序に関する情報は乏しく、より安全性・有効性に優れた経皮ワクチン製剤の開発に向けては、ワクチン投与部位である皮膚組織ならびに所属リンパ節での免疫機構を詳細に解明・理解する必要がある。

我々は、ハイドロゲルパッチ (HG) ならびに皮膚内溶解型マイクロニードル (MicroHyal; MH) といった 2 種類の経皮ワクチンデリバリーデバイスを考案・開発しており、これらデバイスによる抗原送達部位が異なることを見出している。ハイドロゲルパッチは粘着性パッチを基盤とした製剤であり、貼付により角質層を水和させることで抗原の角質層透過を促進することから、主に角質層直下の生きた表皮へと抗原を送達する。また、MH は生体適合性に優れたヒアルロン酸を主体とする 300~800  $\mu\text{m}$  の非常に微小な針を用いて物質透過のバリアとなる角質層を突破し、その針自身が皮膚内の水分で溶解することで装填された抗原を角質層下の生きた表皮・真皮へと送達するデバイスである。

我々独自の経皮ワクチンデリバリーデバイスを用いて皮膚免疫機構を解明・理解することで、より安全性・有効性に優れた経皮ワクチンの開発を目指す。

## 2. 研究の目的

皮膚は LC と dDC のように、皮膚表面からの深度により異なる抗原提示細胞が分布する特殊な組織である。皮膚免疫機構の解明は優れた経皮ワクチンの開発に向けた重要な研究領域である。我々が独自に開発してきたハイドロゲルパッチは抗原を浸透させることで主に生きた表皮へと抗原を送達し、一方で MH は微小針によって真皮へも抗原を容易に送達することができる。これら 2 種類の経皮ワクチンデバイスを使い分けることでワクチン抗原の皮膚への投与深度と誘導される免疫応答特性との関係を体系的に解析できる。また、経皮ワクチンシステムにおける物理的アジュバントによる免疫賦活化が議論されているが、そこに焦点をおいた研究例はほとんどない。MH 貼付に伴う皮膚免疫機構への影響に関する成果は、マイクロニードル型経皮ワクチン製剤の実用化に向けた貴重な情報である。本課題では、有効性・安全性

評価ガイドラインの作成への貢献や、感染症ワクチンだけでなく癌ワクチンや皮膚疾患治療への経皮デリバリーデバイスの応用に向けた皮膚免疫機構の基礎情報の収集を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

BALB/c マウス、BALB/c ノードマウス、C57BL/6 マウスは Japan SLC, Inc. より購入した。OT-I マウス、OT-II マウス、BDCA2-DTR マウスは Jackson Laboratory より購入した。Lang-DTR/EGFP マウス、CD11c-DTR/EGFP マウスは Dr. Bernard Malissen より供与を受けた。

本研究における動物の飼育および実験は大阪大学動物実験規程に準じて行った。

### (2) MH の作製

コスメディ製薬株式会社に作製依頼した MN を本論文では cMN と表記する。針長 300  $\mu\text{m}$  のマイクロニードルを使用した。

富士フィルム株式会社に作製依頼した MN を本論文では fMN と表記する。本研究では針長 430  $\mu\text{m}$  の fMN を使用した。

### (3) HG の作製および OVA 装填 HG の調製

HG の作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。HG (1 cm  $\times$  1 cm) の皮膚貼付面に 50  $\mu\text{L}$  の OVA 溶液を滴下し、室温乾燥することで OVA 装填 HG を調製した。

### (4) CD4 陽性細胞あるいは CD8 陽性細胞を枯渇させたマウスの作製

C57BL/6 マウスに purified anti-mouse CD4 あるいは purified anti-mouse CD8 を腹腔内投与することにより、CD4 陽性細胞枯渇マウスおよび CD8 陽性細胞枯渇マウスを作製した。対照群には IgG from rat serum を腹腔内投与した。各抗体の投与スケジュールは、初回免疫前に 3 日連続投与し、以降は 4 日間隔で投与した。CD4 陽性細胞あるいは CD8 陽性細胞の枯渇は、初回免疫時に回収した血液細胞の FCM 解析により確認した。

### (5) OVA 免疫とサンプルの回収

マウスの除毛背部皮膚に OVA 装填 cMN は 6 時間、OVA 装填 fMN は 5 分間、OVA 装填 HG は 24 時間、それぞれ貼付することにより経皮免疫した。また皮下注射 (SC) 群および皮内注射 (ID) 群はマウス背部皮下あるいは皮内に OVA 溶液を注射免疫した。

眼窩静脈叢から採血した血液を 5,000 rpm で 15 分間遠心分離して血清を得た。また、免疫部位に対する所属リンパ節 (dLN) として上腕リンパ節、腋窩リンパ節、鼠径リンパ節を、非所属リンパ節として腸間膜リンパ節 (MLN) をそれぞれ回収し、常法に従ってリンパ節細胞懸濁液を調製した。

### (6) OVA 特異的抗体価の測定

OVA 固相化溶液を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  で 96 well enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate に添加し、4°C で一晩インキュベーションした。OVA 固相化プレートに 8% スキムミルク in PBS を 200  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加し、37°C、2 時間インキュベーションしてブロッキング処理を施した。0.8% スキムミルク in 0.05% Tween-20/Tris-buffered saline (TBST) で希釈した試料溶液を添加し、室温、2 時間インキュベーションした。プレートを TBST で 5 回洗浄した後、0.8% スキムミルク in TBST で 1/5000 希釈した HRP-conjugated goat anti-mouse IgG を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。プレートを TBST で 7 回洗浄した後、TMB ultra sensitive substrate を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加し、室温にて発色反応を進行させた。2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加することにより反応を停止し、吸光波長 450 nm、副波長 655 nm にて吸光度を測定した。抗体価は免疫前の血清よりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal  $\log_2$  titer として表した。

(7) CD4/CD8 陽性 T 細胞の単離およびマウスへの移入

CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞は、マウス脾細胞およびリンパ節細胞から mouse CD8 $\alpha^+$  T Cell Isolation Kit あるいは mouse CD4 $^+$  T Cell Isolation Kit を用いた磁気細胞分離装置 (autoMACS; Miltenyi Biotec) により単離した。

単離細胞のマウスへの移入は  $5 \times 10^6$  cells/500  $\mu\text{L}$  を尾静脈内投与した。

(8) FCM 解析

細胞を Staining buffer (0.1% fetal bovine serum (FBS)/0.05%  $\text{NaN}_3$  in PBS) を用いて  $1 \times 10^7$  cells/mL に懸濁し、Rat anti-mouse CD16/CD32 blocks-Fc binding を添加して氷上で 30 分間インキュベーションした。各種抗体および LIVE/DEAD $^{\text{®}}$  Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit を添加してさらに氷上で 30 分間インキュベーションした。細胞を洗浄後、Gallios $^{\text{™}}$  Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) を用いて蛍光強度を測定し、FlowJo を用いて死細胞およびセルデブリスを除外した生細胞分画を対象に解析した。

(9) 一次免疫応答における OVA 特異的 T 細胞の分裂増殖の評価

(7) に従って OT-I マウス由来 CD8 陽性 T 細胞あるいは OT-II マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を単離した。細胞懸濁液  $2 \times 10^7$  cells/mL PBS (37°C) に 20  $\mu\text{M}$  eFluor 670 in PBS (37°C) を終濃度 10  $\mu\text{M}$  となるように添加し、室温で 10 分間インキュベーションすることによって蛍光標識した。これらの細胞をそれぞれ C57BL/6 マウスに移入し、翌日に OVA を fMN または HG を用いた経皮免疫、あるいは

SC 免疫した。OVA 免疫から 3、4、5 日後にこれらのマウスから dLN 細胞、MLN 細胞、および脾細胞を調製し、eFluor 670 蛍光強度の減弱を指標に各移入細胞の分裂増殖を評価した。FCM 解析は(8)に従って行った。

(10) 一次免疫応答における OVA 特異的 T 細胞の活性化および分化の評価

(7) に従って OT-II マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を単離し、C57BL/6 マウスに移入した。翌日に OVA を fMN または HG を用いた経皮免疫、ID 免疫、あるいは SC 免疫した。OVA 免疫から 1 週間後にこれらのマウスから dLN 細胞を調製し、(8) に従って FCM 解析を行った。

(11) 二次免疫応答におけるリンパ球の活性化および分化の評価

BALB/c マウスに OVA を 2 週間隔で 6 回、cMN または HG を用いた経皮免疫、あるいは SC 免疫した。最終免疫から 2 週間後にこれらのマウスから dLN 細胞を調製し、(8) に従って FCM 解析を行った。

(12) MH 貼付後皮膚の遺伝子発現マイクロアレイ解析

C57BL/6 マウスの背部皮膚に cMH を 5 秒間貼付し、1、6、あるいは 24 時間後に皮膚を回収した。皮膚から抽出した mRNA について、マイクロアレイ解析を委託した。

#### 4. 研究成果

(1) 経皮ワクチンの抗体産生誘導における T 細胞機能の寄与

cMN または HG を用いて BALB/c マウスに OVA を 2 週間隔で 6 回経皮免疫すると、どちらもわずか 1 回の免疫によって抗体価が上昇する個体が認められ、cMN 群では 3 回免疫後に、HG 群では 4 回免疫後にそれぞれの抗体価がプラトーに達した (Fig. 1)。一方、SC 群では 2 回免疫後にはじめて抗体価の上昇が検出され、プラトーに到達するには 5 回の免疫を必要とした。また、SC 群では抗体価の分散 (個体差) が cMN 群および HG 群と比較して大きかった。これらの結果は、経皮ワクチンが従来の SC ワクチンよりも速やかに且つ安定に抗体産生を誘導できる投与形態であることを示している。

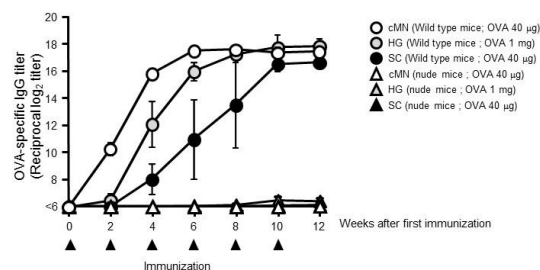


Fig. 1 BALB/c and nude mice were vaccinated with OVA six times at 2-week intervals and sera collected from these mice were assayed to determine the OVA-specific IgG titer by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of results from 3-5 mice. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance followed by Tukey-Kramer method for multiple comparisons. \*,  $p < 0.05$  versus SC, \*\*,  $p < 0.01$  versus SC, ††,  $p < 0.01$  versus HG.

BALB/cヌードマウスへのOVA免疫においては、cMN群、HG群、SC群のいずれにも明らかな抗体価の上昇は認められなかった (Fig. 1)。したがって、cMNまたはHGを用いた経皮ワクチンによる抗体産生誘導には、SC群と同様にT細胞機能が関与していることが明らかとなった。そこでCD4陽性細胞枯渇マウスおよびCD8陽性細胞枯渇マウスにOVAを2週間隔で3回免疫したところ、cMN群、HG群、SC群のいずれにおいてもCD8陽性細胞枯渇マウスではコントロールマウスと同程度の抗体価上昇が認められたのに対して、CD4陽性細胞枯渇マウスでは明らかに抗体産生誘導効果が失われていた (Fig. 2)。本結果は、cMNまたはHGを用いた経皮ワクチンにおいても、従来のSCワクチンと同じくCD4陽性T細胞のヘルパー機能がB細胞の形質細胞への分化や抗体産生誘導に大きく寄与していることを示している。

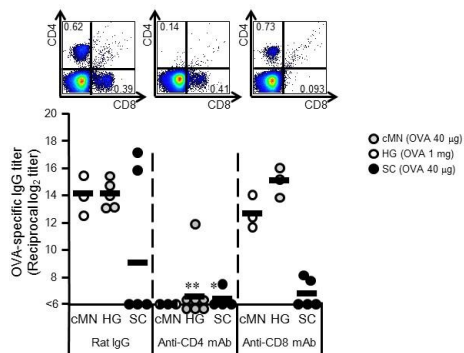


Fig. 2 C57BL/6 mice were injected with either 200  $\mu$ g rat IgG antibody or 100  $\mu$ g anti CD4 monoclonal antibody (mAb) or 200  $\mu$ g anti CD8 mAb on day -1, -2, -3 and subsequently every four days. Flow cytometric analysis of CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells was determined on day 0. These mice were vaccinated with OVA on day 0, 14, and 28, and then sera collected on day 42 were assayed to determine the OVA-specific IgG titer by ELISA. Each symbol represents individual mouse, and the horizontal bars represent the mean values. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance followed by Tukey-Kramer method for multiple comparisons. \*\*:  $p < 0.01$  versus rat IgG group.

## (2) 経皮ワクチンに伴う抗原特異的T細胞の増殖 (一次免疫応答)

fMNまたはHGを用いたOVAの経皮ワクチンあるいはOVAのSCワクチンに伴うOVA特異的CD4陽性T細胞 (移入OT-II細胞)の増殖を解析したところ、dLNにおけるfMN群およびHG群の分裂頻度はSC群と比較して高く、この傾向はOVA免疫から3、4、5日後のいずれの時点においても同様であった (Fig. 3)。またMLNおよび脾臓におけるOT-II細胞については、いずれの群も個体差が大きかったため精度には欠けるもののSC群と比較するとfMN群でより分裂頻度が高い傾向が見て取れた。したがって、経皮ワクチンにより皮膚に送達された抗原は皮下に投与された抗原よりもCD4陽性T細胞に効率よく提示 (MHC class II介在性)される可能性が示唆された。

一方、OVA特異的CD8陽性T細胞 (移入OT-I細胞)のdLNにおける分裂頻度については、SC群ではOVA免疫から3、4、5日後でほぼ一定値 (32~36%)を示したのに対して、fMN群

およびHG群では経時的に分裂頻度が増大した (Fig. 4)。また、fMN群ではSC群と比較してOT-I細胞のより活発な増殖が認められたが、HG群ではSC群よりも低い分裂頻度しか認められなかった。MLNおよび脾臓においても同様に、fMN群ではHG群およびSC群よりもOT-I細胞の分裂増殖が活発であった。

これらの結果は、fMNを用いた経皮ワクチンがSCワクチンと比較してMHC class I分子を介したCD8陽性T細胞への抗原提示 (クロスプレゼンテーション)を引き起こしやすい可能性を示すとともに、経皮ワクチンといえども用いるデバイス (抗原の皮膚内送達深度)が異なれば抗原特異的CD8陽性T細胞への抗原提示効率に差異が生じることを明らかとした。

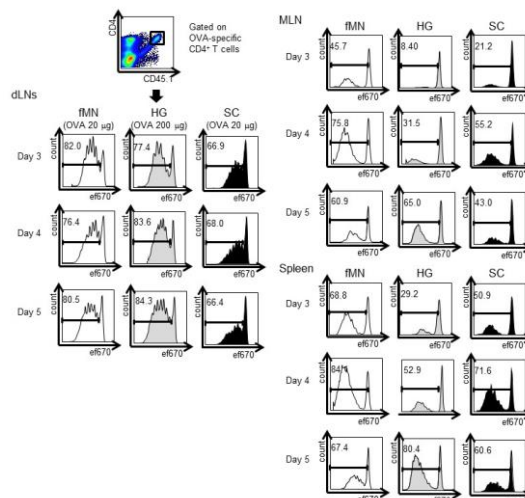


Fig. 3 C57BL/6 mice (CD45.2, CD90.2) were intravenously transferred with e670-labeled OT-II cells (CD45.1, CD90.2). One day later, mice were immunized with OVA on day 0. On day 3, 4, or 5 after immunization, cellular division of OT-II cells or OT-I cells in draining lymph nodes (dLNs), mesenteric lymph node (MLN) or spleen was analyzed by flow cytometry. Data is expressed as a representative histogram of each group (1-3 mice).

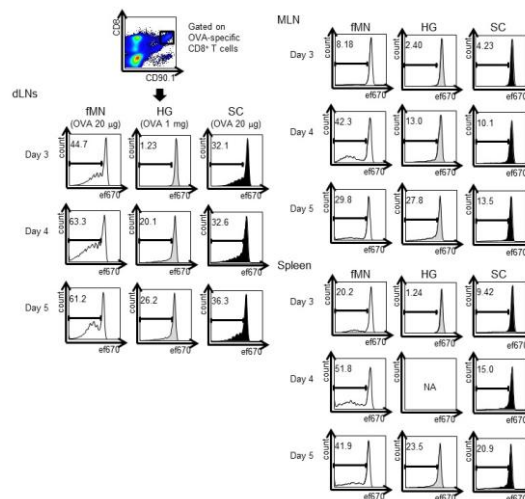


Fig. 4 C57BL/6 mice (CD45.2, CD90.2) were intravenously transferred with e670-labeled OT-I cells (CD45.2, CD90.1). One day later, mice were immunized with OVA on day 0. On day 3, 4, or 5 after immunization, cellular division of OT-II cells or OT-I cells in draining lymph nodes (dLNs), mesenteric lymph node (MLN) or spleen was analyzed by flow cytometry. Data is expressed as a representative histogram of each group (1-3 mice).

## (3) 経皮ワクチンに伴う抗原特異的CD4陽性T細胞の活性化および分化 (一次免疫応答)

OVA を種々の経路で免疫したマウスにおける OVA 特異的 CD4 陽性 T 細胞 (移入 OT-II 細胞) の活性化および分化を表面マーカー発現解析から比較検討した。fMN 群および HG 群の OT-II 細胞では、CD44 (T 細胞活性化マーカー) 高発現分画 (CD44<sup>high</sup>) の割合が ID 群および SC 群の OT-II 細胞よりも高値を示した (Fig. 5)。すなわち、経皮ワクチンは注射ワクチンよりも抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞を効率よく活性化できることが示唆された。

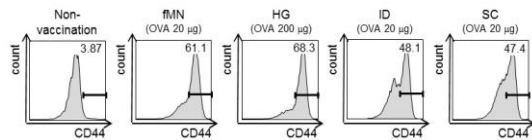


Fig. 5 OT-II cells ( $5 \times 10^6$ ) were intravenously injected into recipient C57BL/6 mice. One day later, mice were immunized with OVA. One week after immunization, phenotypes of OT-II ( $CD4^+ CD45^+$ ) cells in DLNs were analyzed by flow cytometry. The intensity of CD44 on OT-II cells was analyzed. Data is expressed a representative histogram of each group (2-3 mice).

#### (4) 経皮ワクチンに伴う CD4 陽性 T 細胞および B 細胞の分化 (二次免疫応答)

Fig. 1 で示したとおり OVA を 6 回免疫することによって OVA 特異的抗体価がプラトーに達した BALB/c マウスを用いて、二次免疫応答における経皮ワクチンにより活性化された内在性 CD4 陽性 T 細胞 ( $CD44^+ CD90.2^+ CD4^+$ ) の分化について検討した (Fig. 6)。免疫していないマウスと比較して、cMN 群、HG 群、SC 群のいずれにおいても dLN 細胞中の CD4 陽性 T 細胞ポピュレーションに大きな変動を認めなかった。また、3 つの免疫群すべてにおいて Tem 細胞サブポピュレーションが増加しており、なかでも HG 群における Tem

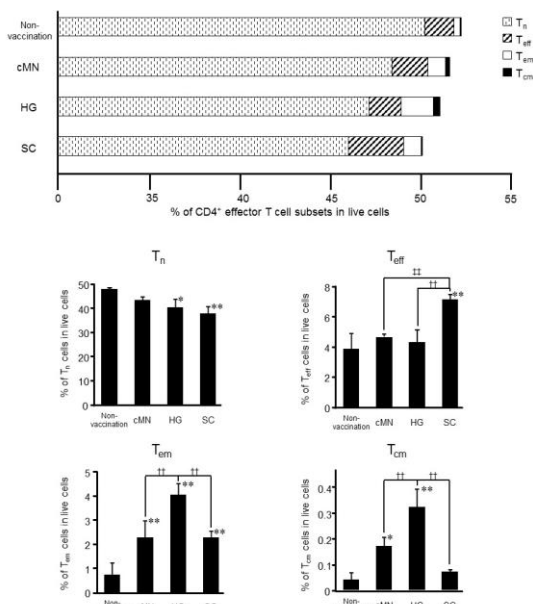


Fig. 6 BALB/c mice were immunized with OVA six times at 2 weeks intervals. Two week after immunization, phenotypes of  $CD4^+$  cells in dLNs were analyzed by flow cytometry. The percentage of  $CD4^+$  T cells subsets ( $T_n$  cells,  $T_{eff}$  cells,  $T_{em}$  cells or  $T_{cm}$  cells) in live cells was determined. (B) Data are expressed as mean  $\pm$  SD of results from 3 mice. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance followed by Tukey-Kramer method for multiple comparisons. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  versus non-vaccination group, ††,  $p < 0.01$  versus HG, \*,  $p < 0.05$ , †††,  $p < 0.01$  versus cMN.

細胞の増加は顕著であった。さらに cMN 群と HG 群においては  $T_{cm}$  サブポピュレーションにも拡大が認められ、その分化効率は HG 群でより高値を示した。SC 群では cMN 群および HG 群と比較して  $T_{eff}$  細胞サブポピュレーションが他の群と比較して高い割合を示した。

これらの解析結果から、cMN や HG を用いた経皮ワクチンは SC ワクチンと比較して二次免疫応答における CD4 陽性 T 細胞のメモリー分化効率に優れることが示され、特に HG による皮膚表層から抗原を浸透させる手法がメモリー T 細胞の誘導には有効である可能性が示唆された。

次にこれらのマウスの dLN 細胞中の B 細胞について、表面マーカーの発現を指標として、ナイーブ B 細胞 ( $CD45R^+ IgD^+$ )、形質細胞 ( $CD45R^- CD138^+$ )、胚中心 B 細胞 ( $CD45R^+ IgD^- IgG1^+ GL7^+ CD95^+$ )、メモリー B 細胞 ( $CD45R^+ IgD^- IgG1^+ GL7^- CD38^+$ ) の 4 つのサブセットへの分化頻度を評価した (Fig. 7)。免疫していないマウスと比較して、cMN 群、HG 群、SC 群のいずれにおいても dLN 細胞中の B 細胞ポピュレーションは拡大されていた。抗体の産生・分泌を行う形質細胞への分化頻度は、HG 群および SC 群では免疫していない群と比較して変化が認められなかったが、cMN 群では明らかに高い傾向にあった。また、高親和性抗体を産生する形質細胞の誘導・成熟を促進する胚中心 B 細胞については、免疫していない群と比較してすべての免疫

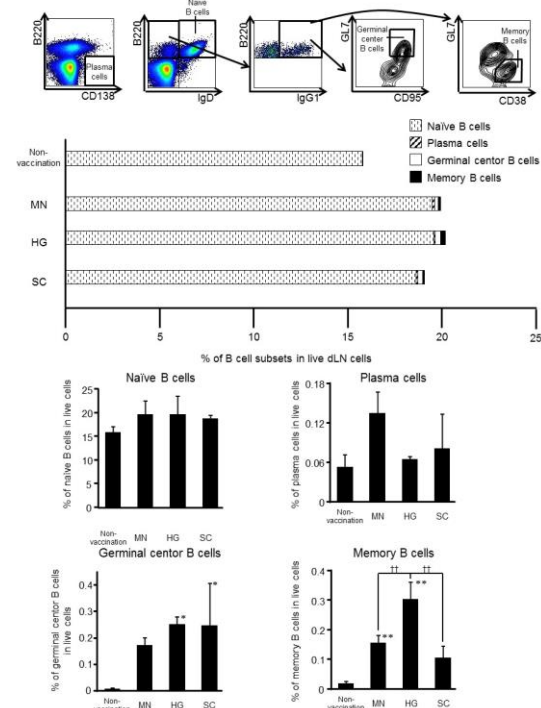


Fig. 7 Representative dot plots are shown to illustrate the gating strategy for the discrimination of naive B cells ( $CD45R^+ IgD^+$ ) cells, plasma ( $CD45R^- CD138^+$ ) cells, germinal center B ( $CD45R^+ IgD^- GL7^+ CD95^+$ ) cells or memory B ( $CD45R^+ IgD^- GL7^- CD38^+$ ) cells. BALB/c mice were immunized with OVA six times at 2 weeks intervals. Two week after immunization, phenotypes of B cells in dLNs were analyzed by flow cytometry. The percentage of B cells subsets (naive B cells, plasma cells, germinal center B cells or memory B cells) in live cells was determined. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of results from 3 mice. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance followed by Tukey-Kramer method for multiple comparisons. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  versus non-vaccination group, ††,  $p < 0.01$  versus HG.

群において増加しており、それら免疫群間での差は認められなかった。さらに、ワクチンの有効性を持続させるうえで重要なメモリーB細胞については、いずれの免疫群においても誘導・拡大されており、なかでもHG群において分化頻度の顕著な増加が認められた。

これらのB細胞サブポピュレーション解析の結果から、従来のSCワクチンと比較するとcMNを用いた経皮ワクチンは形質細胞への分化誘導効率が高く、HGを用いた経皮ワクチンはメモリーB細胞の誘導・維持に優れることが示された。また、経皮ワクチンおよびSCワクチンのいずれにおいてもCD4陽性T細胞の機能が胚中心B細胞の分化に促進的に働くことが明らかとなり、形質細胞の成熟に必須である胚中心の形成および維持には抗原特異的なCD4陽性T細胞の効率的な感作・活性化が重要であることが示唆された。

#### (5) MHの貼付による皮膚内遺伝子発現変化

MHの貼付により、皮膚組織内において様々なサイトカインやケモカインの遺伝子発現変化が認められた。また、近年免疫応答への影響が示唆されている自己核酸認識受容体についても発現上昇がみとめられた (Fig. 8)。このように、MHの貼付に伴うマイクロニードルの皮膚組織への穿刺刺激が遺伝子発現に影響を及ぼし、効果的な免疫応答の誘導につながっている可能性が示された。

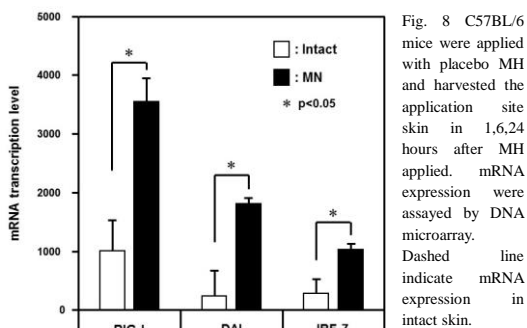


Fig. 8 C57BL/6 mice were applied with placebo MH and harvested the application site skin in 1,6,24 hours after MH applied. mRNA expression were assayed by DNA microarray. Dashed line indicate mRNA expression in intact skin.

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕 (計 12 件)

- ① 伊藤 沙耶美、廣部 祥子、小野 彰彦、中川 晋作、岡田 直貴  
日本薬学会 第 136 年会 (2016 年 3 月 26-29 日、神奈川県横浜市)
- ② 江口 涼介、廣部 祥子、吉田 淳哉、小山田 孝嘉、中川 晋作、岡田 直貴  
日本薬学会 第 136 年会 (2016 年 3 月 26-29 日、神奈川県横浜市)

- ③ 廣部 祥子、竹内 ほんか、江口 涼介、須佐井 亮、岡田 直貴、中川 晋作  
第 19 回日本ワクチン学会学術集会 (2015 年 11 月 14-15 日、愛知県犬山市)
- ④ 竹内 ほんか、須佐井 亮、廣部 祥子、岡田 直貴、中川 晋作  
第 31 回日本 DDS 学会学術集会 (2015 年 7 月 2-3 日、東京都新宿区)
- ⑤ 廣部 祥子、須佐井 亮、竹内 ほんか、岡田 直貴、中川 晋作  
日本薬学会 第 30 年会 (2015 年 5 月 21-23 日、長崎県長崎市)
- ⑥ 竹内 ほんか、須佐井 亮、廣部 祥子、岡田 直貴、中川 晋作  
日本薬学会 第 135 年会 (2015 年 3 月 25-28 日、兵庫県神戸市)
- ⑦ 廣部 祥子、須佐井 亮、岡田 直貴、中川 晋作  
日本薬学会 第 135 年会 (2015 年 3 月 25-28 日、兵庫県神戸市)
- ⑧ 竹内 ほんか、須佐井 亮、廣部 祥子、岡田 直貴、中川 晋作  
第 18 回日本ワクチン学会学術集会 (2014 年 12 月 6-7 日、福岡県福岡市)
- ⑨ 廣部 祥子、須佐井 亮、岡田 直貴、中川 晋作  
第 18 回日本ワクチン学会学術集会 (2014 年 12 月 6-7 日、福岡県福岡市)
- ⑩ Ryo Susai, Sachiko Hirobe, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa  
第 43 回日本免疫学会学術集会 (2014 年 12 月 10-12 日、京都府京都市)
- ⑪ 須佐井 亮、大塚 梨沙、廣部 祥子、権 英淑、神山 文男、岡田 直貴、中川 晋作  
第 30 回日本 DDS 学会学術集会 (2014 年 7 月 30-31 日、東京都港区)
- ⑫ 竹内 ほんか、須佐井 亮、廣部 祥子、岡田 直貴、中川 晋作  
日本薬学会 第 29 年会 (2014 年 5 月 20-22 日、埼玉県さいたま市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

廣部 祥子 (HIROBE, Sachiko)  
大阪大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：70644582