

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08246

研究課題名(和文)超音波の物理的刺激を利用した非侵襲的ワクチン接種法構築のための基礎検討

研究課題名(英文) Study on non-invasive cutaneous vaccination using ultrasound as physical stimulus

研究代表者

上田 秀雄 (Ueda, Hideo)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：50326998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラットおよびマウスの皮膚に、20 kHz、1および3 MHz超音波を異なる強度で適用したとき、皮膚免疫細胞であるランゲルハンス細胞を活性化し、その活性化の程度を強度および適用時間で制御できる可能性があることを示した。マウスにおけるオボアルブミンをモデル抗原に用いた繰り返し経皮免疫実験では、皮下および皮内投与単独条件に比べて、20 kHz、0.332 W/cm<sup>2</sup> 超音波の10 min照射を併用したときの血中IgG量は増加した。これらの結果は、超音波照射は皮内免疫応答を惹起し、経皮投与した抗原に対する特異的抗体産生を亢進させる可能性があることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚への超音波の適用は、主に皮内への薬物送達を促進するための技術としてこれまで考えられてきたが、超音波照射に伴う物理的刺激が皮膚の免疫機構の賦活化に関与する可能性が示されたことから、皮膚の生理学的機構に対する新たな学術的意義を見出すことに繋がると思われる。また、本研究では周波数や強度のような超音波照射条件の違い、すなわち物理的刺激の程度の違いによる皮膚免疫賦活化の違いを明らかにすることができ、抗原送達と免疫賦活化のバランスを考慮した新規の非侵襲的ワクチン接種技術の開発につながる事が予想される。

研究成果の概要(英文)：In rats and mice, applications of 20 kHz, 1 and 3 MHz ultrasounds (US) to skin activated Langerhans cells and the extent of activation depended on the intensity and the application period of US. It shows that it might potentially be able to control intradermal immune response by conditioning of US parameters. Furthermore, production of IgG induced by repeated subcutaneous or intracutaneous injections of ovalbumin was increased by the combination of 20 kHz US treatment at an intensity of 0.332 W/cm<sup>2</sup> for 10 min. Our results suggest that the application of US to skin induce intradermal immune response and enhance the production of specific antibody to a transdermally delivered antigen.

研究分野：薬剤学

キーワード：経皮ワクチン 超音波 物理刺激 ランゲルハンス細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚の表皮細胞層にはランゲルハンス細胞 (LCs) のような抗原提示細胞が存在し、免疫機構を担っている。一方、物理的な経皮薬物吸収促進法として研究されてきた microneedle (MN) や sonophoresis (SP) は、痛みを伴うことなく経皮的にワクチン接種することが可能であることが報告されている<sup>1, 2)</sup>。MN や SP による物理的刺激が皮膚免疫機構に対してアジュバント効果を持つことが示唆されているが<sup>2, 3)</sup>、そのような効果はほとんど試験されていない。超音波 (US) は、機械的振動、温熱作用、キャピテーション効果など様々な物理的効果を生体に対してもたらすことが知られ<sup>2)</sup>、これら US の物理的作用が LCs や真皮樹状細胞 (dDCs) に対する刺激となり、皮膚免疫機構を活性化するのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者の研究室で現在利用可能な 20 kHz ~ 3 MHz の周波数の US を用い、皮膚免疫機構賦活化に対する効果を検討することを目的とした。本研究では、経皮吸収促進技術として研究されてきた SP を様々な周波数、適用強度、適用パターンで皮膚に適用し、皮膚免疫賦活化に対する影響を試験し、非侵襲的なワクチン接種法としての利用が可能かどうかについて検討する。MN を用いた一部の検討はすでに行っているため、その効果と比較検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### 【方法】

#### (1) 実験動物

**ラット:** 8 週齢の雌性ヘアレスラット (120-170 g) にペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) で麻酔し、左腹側部皮膚に epilator<sup>®</sup> (kracie) を塗布して除毛した。

**マウス:** 7-8 週齢の雌性 BALB/c マウス (17-20 g) にイソフルラン (1 mg/mL) で吸入麻酔を施行し、腹部または背部皮膚に epilator<sup>®</sup> (kracie) を塗布して除毛した。

#### (2) 物理的刺激の適用

**ラット:** 除毛から 1 時間後に、物理刺激を適用した。US 適用部位となる左腹側部中央にプラスチックカップを取り付け、そこに 32 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を入れ、超音波ホーンを設置した。US の適用条件は、周波数を 20 kHz、1 および 3 MHz、適用時間を 1, 5, 10 分間とした。US 適用終了後 6, 12, 24 時間に皮膚を摘出した。Control には、別個体の左腹側部皮膚を除毛 1 時間後に US を適用せずに摘出したものを用いた。また、LCs 活性化マーカーの発現を誘導するポジティブコントロールとして、チタン製スタンプ式 MN (Micro Needle Derma Stamp, 500  $\mu$ m) を一定の範囲 (2  $\times$  2 cm<sup>2</sup>) に適用した<sup>3)</sup>。

**マウス:** 除毛から 1 時間後に、物理刺激を適用した。US 適用部位を腹部中央とし、ラットによる検討と同様に実験装置を設置した。US 適用条件は、周波数を 20 kHz、強度を 0.137-0.834 W/cm<sup>2</sup>、適用時間を 10 分間とした。また、比較対象として MN 適用、TransporeTMSurgical Tape を用いた 5 回のテープストリッピング (TS)、26G 注射針による皮下注射による物理刺激を施した。

#### (3) 免疫染色と画像解析

ラットおよびマウス摘出皮膚から、久保らの方法に従って表皮シートを調製し<sup>4)</sup>、LCs の活性化マーカーである langerin に対する特異的的一次抗体 (1:200)、および Alexa Fluor<sup>®</sup>568 で標識された二次抗体 (1:2000) を用いて免疫染色した。その後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 ( $\times$  400, 強度 2.0%, HV 568 v または HV650 v, Offset40%) (FV-1000, OLYMPUS) またはオールインワン蛍光顕微鏡 ( $\times$  40) (BZ-X800, Keyence) による画像撮影を行った。観察した X-Y 平面画像を用い、画像解析ソフトウェア Image-Pro Premier<sup>®</sup> で定量解析を行った。

#### (4) 定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応

麻酔下のヘアレスラットに 20 kHz US を入力電圧振幅 100-300 Vp-p (強度 0.1-0.88 W/cm<sup>2</sup>) で 10 分間適用し、適用後 1, 3, 6 時間に皮膚を摘出した。比較対象として MN 適用群および未処置の Control 群を設けた。摘出皮膚から表皮を剥離し、全 RNA を抽出した。500 ng の RNA 量相当の RNA 懸濁溶液から cDNA を合成し、StepOnePlus<sup>™</sup> リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems<sup>®</sup>) を利用して定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応により IL-1、TNF-、GM-CSF の mRNA 発現解析を行った。

#### (5) 繰り返し経皮免疫による抗体産生量の測定

モデル抗原として ovalbumin (OVA) (SIGMA-ALDRICH Co., Japan) を選択し、生理食塩水で 0.1 mg/mL に調製したものをワクチンとして用いた。繰り返し経皮免疫実験では、調製したワクチンを抗原量として 1 回あたり 2  $\mu$ g を 0, 7, 14, 21 日目に接種した。このとき、ワクチンは背部中央に皮内または皮下投与し、US 併用群ではワクチン接種直前に US を適用した。US 適用は、背部中央に実験装置を設置し、周波数を 20 kHz、強度を 0.332 W/cm<sup>2</sup>、適用時間を 10 分間で行った。初回ワクチン接種後 14 および 28 日に尾静脈から約 50  $\mu$ L を採血し、同一個体におけるベースラインとしてワクチン未接種時の抗体量を測定するために初回接種 3 日前にも採血した。マウス OVA-IgG<sub>1</sub> ELISA キット (Shibayagi Co., Gunma, Japan) を用いて血中 OVA-IgG<sub>1</sub> 活性を測定し、1 U/mL の抗 OVA-IgG<sub>1</sub> を 160 ng/mL の抗体と定義して抗体価を算出した。

本研究におけるすべての動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学動物実験管理委員会の承認を得て実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) US 適用後のラット表皮における langerin 発現の経時変化

Figure 1A は、20 kHz、1 および 3 MHz US を適用した表皮における langerin の免疫染色画像を示す。また、その画像解析により定量化した langerin の蛍光シグナル強度の経時変化を Fig. 1B に示す。すべての周波数において US 適用後 6 および 12 時間の蛍光強度は control に比べ増加し、20 kHz および 1 MHz 条件では 12 時間の蛍光強度は有意な増加だった。なお、データを示していないが 1 および 3 MHz 条件では、24 時間における蛍光強度は control レベルまで低下し、langerin の発現は検討した時間内では US 適用後 12 時間で最大になると考えられた。また、Fig. 1A に示す X-Z 断面画像より、control に比較して US 適用した表皮では角質層側に langerin の局在が観察され、US 適用による物理刺激によって樹状突起が皮膚表面側に向かって延伸していると考えられた。

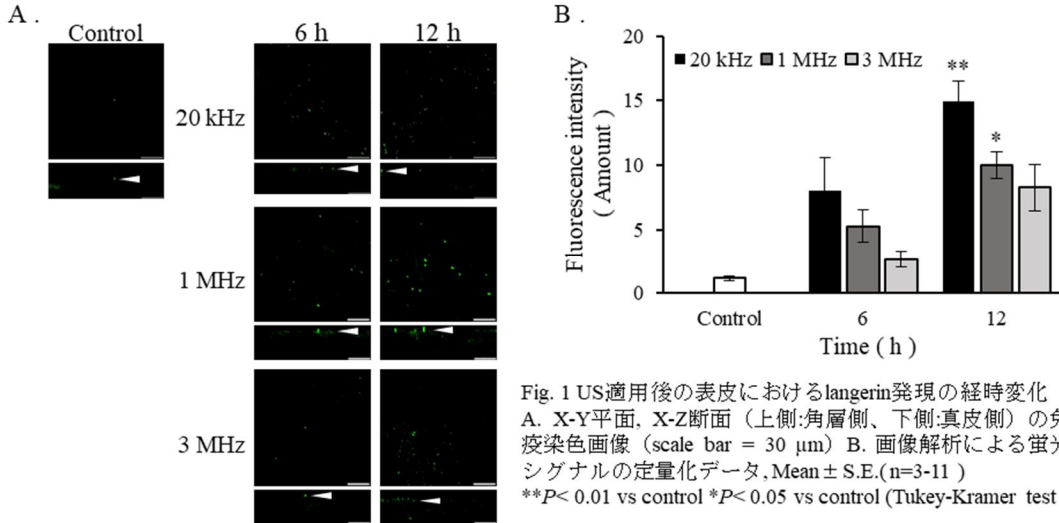


Fig. 1 US適用後の表皮におけるlangerin発現の経時変化  
A. X-Y平面, X-Z断面 (上側:角層側, 下側:真皮側) の免疫染色画像 (scale bar = 30  $\mu$ m) B. 画像解析による蛍光シグナルの定量化データ, Mean  $\pm$  S.E. (n=3-11)  
\*\* $P < 0.01$  vs control \* $P < 0.05$  vs control (Tukey-Kramer test)

##### (2) ラット表皮における Langerin 発現に対する US 適用時間の影響

US 適用後 12 時間に langerin の最大蛍光強度を示したので、その時間に皮膚を摘出して US 適用時間の影響を検討した。Fig. 2 は、20 kHz、1 および 3 MHz US を最大 20 分間適用した表皮における langerin 免疫染色画像 (データを示していない) の蛍光シグナルを定量化した結果を示す。試験したすべての周波数条件で、適用時間 10 分間まで蛍光強度は時間依存的に増大した。しかし、1 および 3 MHz US では適用時間 20 分間では 10 分間の蛍光強度とほぼ同等で、それ以上延長しても langerin 発現量は一定になると考えられた。20 kHz US を 20 分間適用した皮膚では損傷によりデータを取ることが出来なかったが (データを示していない)、検討した US 条件では LCs 活性化に対する US の効果は 10 分間適用で最大となると考えられた。

##### (3) ラット表皮における langerin 発現量と US エネルギーの関係

US 強度  $I$  ( $W/cm^2$ ) に時間を乗じてエネルギー量 ( $J/cm^2$ ) に変換できる。そこで、(1) および (2) の結果に含まれる 20 kHz、1 および 3 MHz US を適用したときの US 強度を US エネルギーに変換し、langerin 蛍光強度との関係をプロットした (Fig. 3)。US エネルギーが、100  $J/cm^2$  程度までの低い領域では各周波数での langerin 発現量の差は小さいが、約 200  $J/cm^2$  で比べると、3 MHz よりも 20 kHz の周波数で明らかに langerin 発現が高かった。治療域に比べ、低周波数域 US において、キャピテーション作用による強い物理作用が発生することが知られているので<sup>5)</sup>、US エネルギーが大きくなったときの langerin 発現強度に対して、低周波数域での強いキャピテーション作用が関係している可能性がある。

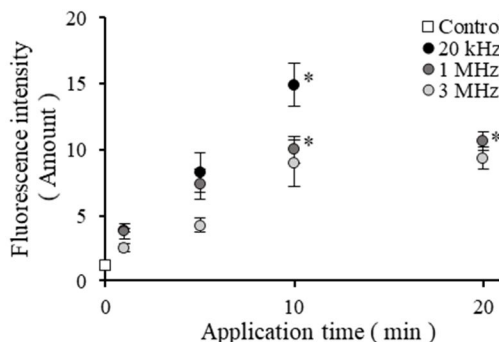


Fig. 2 US適用12時間後のlangerin発現に対する適用時間の影響, Mean  $\pm$  S.E. (n=3-11) \* $P < 0.01$  vs control (Tukey-Kramer test)

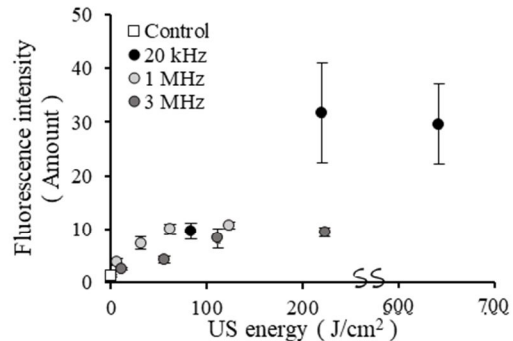


Fig. 3 USエネルギーとlangerin発現量の関係  
Mean  $\pm$  S.E. (n = 3-4), 1 MHz :  $I = 0.103 W/cm^2$ , 3 MHz :  $I = 0.186 W/cm^2$ , 20 kHz :  $I = 0.139 W/cm^2$ , 0.367  $W/cm^2$ , 1.07  $W/cm^2$

(4) ラット表皮における langerin 発現に対する 20 kHz US の適用強度の影響

ラットに周波数 20 kHz、適用強度を 0.206, 0.378 または 1.19 W/cm<sup>2</sup> の US を 10 分間適用した。その 12 時間後に皮膚を摘出して表皮 langerin の免疫染色を行った。その免疫染色画像をもとに langerin の蛍光シグナルを定量化し、US 強度との関係を Fig. 4 に示す。試験した US 強度の範囲のうち、0.378 W/cm<sup>2</sup> までは langerin 発現は US 強度依存的に増大したが、それ以上の US 強度では明らかな増大は観察されなかった。周波数 20 kHz では 0.4 W/cm<sup>2</sup> 程度の US 強度で皮膚免疫機能を活性化できる可能性があると考えられた。

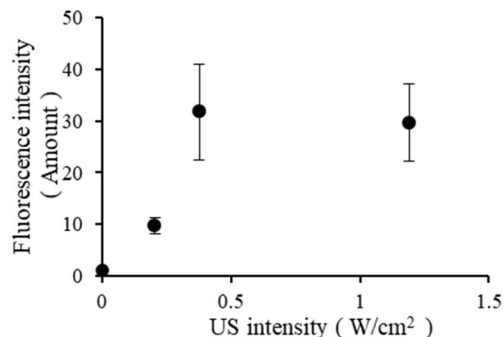


Fig. 4 20 kHz US を 10 分間適用したときの langerin 発現に対する適用強度の影響, Mean ± S.E. (n = 4)

(5) ラットにおける物理刺激によるサイトカイン遺伝子発現量の比較

Figure 5 は、20 kHz US および MN 適用後の表皮中 IL-1、TNF- および GM-CSF の経時的な遺伝子発現量の変化を control に対する相対比として表したものである。IL-1 では、200 および 300 Vp-p の US 適用 1 時間後にそれぞれ約 2.0 倍および約 2.2 倍であり、US 強度に依存して高くなる傾向が観察された (Fig. 5A)。一方で、MN では IL-1 発現の増大は観察されなかった。TNF- は、MN 適用 6 時間後に最も高く、約 8.3 倍だった (Fig. 5B)。200 Vp-p の US 適用 3 時間後で約 3.3 倍、300 Vp-p では 1 時間後で約 2.8 倍に増大したが、6 時間後には control に戻る傾向が観察された (Fig. 5B)。GM-CSF は、US 適用 1 時間後に約 1.7 倍 (100 Vp-p)、約 2.2 倍 (200 Vp-p)、約 1.1 倍 (300 Vp-p) まで増大したが、3 時間以降では低下した (Fig. 5C)。

MN 適用 12 時間後の langerin 発現は US 適用 12 時間後に比べ高いことが明らかにされていることから (Fig. 6B)、MN の物理的刺激 3 時間後では、今回のマーカーとして用いた 3 種のサイトカインは関与が低いと考えられる。一方、US 適用群では、1 時間後に IL-1 および TNF- レベルが US 強度依存的に増加していることが観察され (Figs. 5A および 5B)、サイトカイン発現は US による刺激の強さに依存すると考えられた。また、前述の検討で 300 Vp-p としたときに langerin 発現が最大となることを明らかにしているように US 強度依存的な langerin 発現とサイトカインレベルの増大が一致することから、両者が密接に関係していることが推測される。

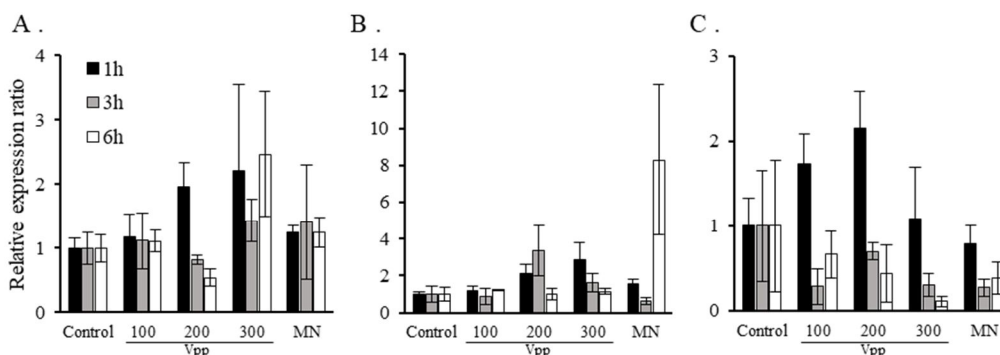


Fig. 5 20 kHz US および MN 適用したラットにおける表皮 IL-1α (A)、TNF-α (B)、GM-CSF (C) の半定量的遺伝子発現解析, Mean ± S.E. (n = 3-6)

(6) マウスにおける種々物理刺激による langerin 発現とラットにおける影響との比較

*In vivo* で物理刺激を適用したマウス皮膚で、従来の検討で用いたラットと同様な LC 活性化が得られるかを検討した。Fig. 6A は TS、MN、US (0.137 W/cm<sup>2</sup>)、SC の各処理適用 12 時間後の表皮における

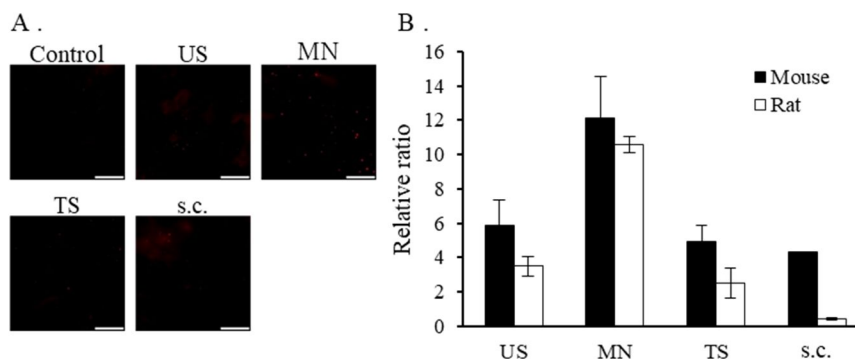


Fig. 6 異なる物理刺激を適用したときのマウス皮膚での langerin 免疫染色画像 (A) とラットにおける影響との比較 (B)、A. X-Y 平面、X-Z 断面 (上側:角層側、下側:真皮側) の免疫染色画像 (scale bar = 30 μm) B. 画像解析による蛍光シグナルの定量化データ, Mean ± S.E. (n = 1-4)



langerin の免疫染色画像である。また、それらを画像解析により定量化した蛍光シグナル強度の比較を control との相対比で表し、ラットにおける結果と合わせて Fig. 6B に示す。Langerin 発現は、いずれの種でも MN > US > TS > SC の順であり、各処理でラットとマウスとの間で有意差はなかった (Fig. 6B)。種々物理刺激に対するマウスおよびラット langerin の発現応答はほぼ同等であると考えられた (Fig. 6B)。従って、今後の免疫応答に関する詳細な検討を行うにあたり、マウスを用いた検討が可能であると考えられた。

#### (7) マウスに 20 kHz US 適用したときの langerin 発現に対する US 適用条件の影響

有意な皮膚損傷を起こさず、かつ langerin 発現が最大化するような条件を検討することを目的として、20 kHz US を用いて langerin 発現と適用強度との関係について検討した。Figure. 7A は US 適用強度を 0.238、0.412、0.834 W/cm<sup>2</sup> で 10 分間適用してから 12 時間後の langerin 発現を示す。langerin 発現量は US 強度依存的に増加した。検討した条件では 0.834 W/cm<sup>2</sup> で langerin 発現が最大となったが、データを示していないが表面観察像で明らかな損傷があり不適であると判断できるため、0.412 W/cm<sup>2</sup> を最適 US 強度として langerin 発現が最大化する時間について検討した。Figure 7B は、0.412 W/cm<sup>2</sup>、10 分間の US 適用後 0、6 および 12 時間後の langerin 蛍光シグナルを定量化した結果を示す。0、6 時間後では langerin 発現量に有意な差はないが、12 時間後においては有意に増加し、さらに長時間の検討が必要であるがラットと同様に langerin の発現は 12 時間が最大となる可能性が示された。

#### (8) OVA を繰り返し皮下または皮内投与したときの抗体産生に対する US 併用効果

高用量の単回ワクチン接種と小用量で繰り返しワクチン接種したときの抗体産生を予備的に検討した。データを示していないが、前者に比べて後者において著しく高い抗体価を得ることが確認できた。これは抗原による二次感作、すなわちブースト効果によると考えられた<sup>6)</sup>。そこで、ワクチンを繰り返し皮下 (s.c.) または皮内 (i.d.) 投与した群と、20 kHz、0.332 W/cm<sup>2</sup> の US を毎回適用した後にワクチン接種した群の抗体価を比較検討した。そのときの各群の抗体価および各個体のデータを Fig. 8 に示す。S.c. および i.c. 投与の両条件において、US を併用していない群に比べて併用した群で高い抗体価を示し、特に i.d. 投与後 28 日目において US 併用は有意に抗体価を上昇させた。また US 併用群で比較すると、ワクチンを i.d. 投与したときの抗体価は、s.c. 投与したときに比べて 14 日目および 28 日目とも高かったことから、US は皮内免疫応答を高めていることが推測された。

以上のことから、SP のような経皮薬物送達技術は、免疫担当細胞が多く存在する表皮および真皮領域に抗原を送達し、かつ皮膚免疫応答を高めることで非侵襲的なワクチン接種法になるものと考えられる。本研究では、超音波の皮内免疫機構に対して US がどのような作用を果たすのかは今後の課題であるが、そのメカニズムを明らかにすることにより経皮薬物送達技術を利用した効果的なワクチン接種法の開発につながるものと期待される。

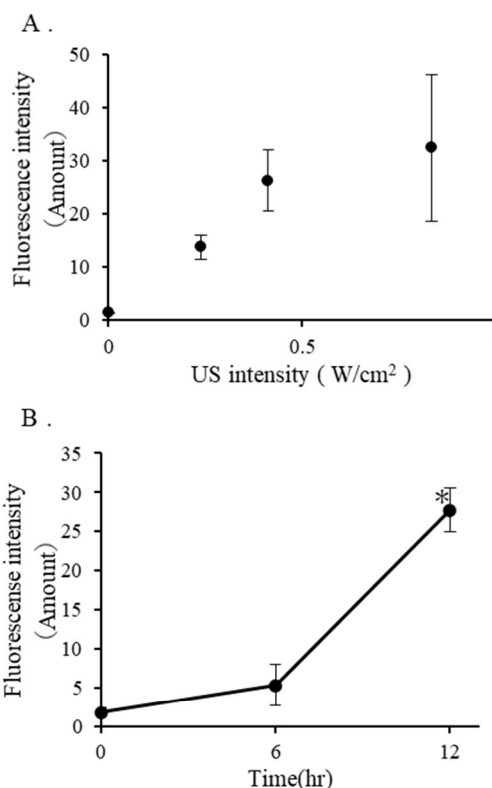


Fig. 7 20 kHz US適用後のlangerin発現に対するUS強度 (A) および適用時間 (B) の影響, Mean ± S.E. (n = 4)

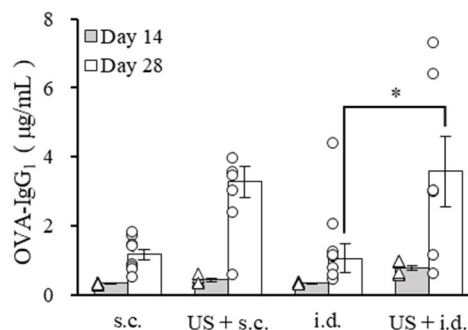


Fig. 8 繰り返し皮下または皮内ワクチン接種後のOVA-IgG<sub>1</sub>抗体産生に対するUSの併用効果 Mean ± S.E. (n=6-8) \*P < 0.05 vs control (Tukey-Kramer test)

- 1) A. Ikejiri *et al.*, *J. Biomaterials Biotechnology*, **3**, 325-334 (2012).
- 2) A. Tezel *et al.*, *Vaccine*, **23**, 3800-3807 (2005).
- 3) A. Takeuchi *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 1309-1318 (2016).
- 4) A. Kubo *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, **961**, 119-127 (2013).
- 5) S. Mitragotri *et al.*, *Pharm. Res.*, **13**, 411-420 (1996).
- 6) L. B. Nicholson, *Essays Biochem.*, **60**, 275-301 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠城聡子、木村聡一郎、森本雅憲、上田秀雄
2. 発表標題 超音波適用が表皮ランゲルハンス細胞の活性化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠城聡子、宮沢 睦、木村聡一郎、森本雅憲、上田秀雄
2. 発表標題 1 MHz超音波適用が表皮ランゲルハンス細胞の活性化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠城 聡子、平松 江梨、宮澤 睦、五十嵐 結月、間 祐太郎、木村 聡一郎、森本 雅憲、上田 秀雄
2. 発表標題 表皮 langerin 発現に対する超音波適用エネルギーの影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠城 聡子、平松 江梨、宮澤 睦、五十嵐 結月、間 祐太郎、木村 聡一郎、森本 雅憲、上田 秀雄
2. 発表標題 表皮 langerin 発現に対する超音波周波数と適用エネルギーの影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	木村 聡一郎  (Kimura Soichiro)  (30433650)	城西大学・薬学部・准教授    (32403)	